

# 团羽铁线蕨 HPLC-DAD 指纹图谱的建立与多种特征成分含量测定

王宇<sup>1</sup>, 林肯<sup>2</sup>, 肖丹<sup>3</sup>, 高源<sup>3\*</sup>

(1. 贵州省农业科学院 植物保护研究所, 贵州 贵阳 550006; 2. 贵州省印江县新寨镇卫生院, 贵州 铜仁 555200; 3. 贵州省食品检验检测院, 贵州 贵阳 550004)

**摘要:**通过建立团羽铁线蕨指纹图谱和多种共有成分含量测定方法,以在不同产地团羽铁线蕨质量控制中应用。采用 SHISEIDO CAPCELL PAK C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),检测波长 280 nm,检测温度 35 ℃,甲醇-0.05% 磷酸水溶液梯度洗脱方法建立铁线蕨指纹图谱与特征成分含量测定的 HPLC-DAD 分析方法,对多批次药材以相似度软件与化学计量学分析相结合的方式质量评价。结果表明:本方法提取铁线蕨有 13 个共有峰,指认出共有峰 2 个,分别为槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸和山奈酚-3-O-芸香糖苷,相似度为 0.558~0.901。结合聚类分析和主成分分析,使用化学计量学正交偏最小二乘判别分析法对 13 个共有峰进行评价,样本中槲皮素-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷酸和山奈酚-3-O-芸香糖苷含量范围分别为 0.11~4.35 mg/g、0.15~10.35 mg/g,结果显示不同产地团羽铁线蕨数据差异大。建立的指纹图谱及多种特征成分含量测定的 HPLC-DAD 分析方法,能更全面而准确地体现团羽铁线蕨药化学成分整体轮廓与各类特征成分含量贡献,为提升不同产地团羽铁线蕨药材的质量控制方法奠定了基础。

**关键词:**团羽铁线蕨; HPLC-DAD 指纹图谱; 含量测定; 方法学考察

中图分类号: R917 文献标识码: A

文章编号: 1008-0457(2022)05-0008-07

国际 DOI 编号: 10.15958/j.cnki.sdnyswxb.2022.05.002

团羽铁线蕨,又名猪鬃草,为铁线蕨科 Adiantaceae 铁线蕨属 *Adiantum* 植物 *Adiantum capillus-junonis* Rupr. 的全草,为少数民族地区常用药材,具有清热利尿、润肺止咳、补肾通络的功效<sup>[1]</sup>,其广布于全国多地,常见于贵州、云南、四川等地区<sup>[2]</sup>。常生长于海拔 300~2500 m 的湿润石灰岩壁石缝中、阴湿墙壁基部石缝中或荫蔽湿润的白垩土上。由于团羽铁线蕨药材现有质量标准较低,药材来源质量控制不佳,《贵州中药材、民族药材质量标准》(2003 版)中未收录能反映药材质量的化学成分整体轮廓的指纹图谱<sup>[3]</sup>,且含量测定方法提取过程繁琐,不能全面反映铁线蕨药材的质量。因此,利用中药指纹图谱具整体性的特点,实现对中药内在化学成分的综合评价和整体质量的全面控制<sup>[4]</sup>。本研究利用指纹图谱技术与化学计量学分析,首次建立 19 个不同产地团羽铁线蕨药材指纹图谱与特征成分含量测定,并进行方法学研究,为提高药材质量标准奠定基础。本实验指认的槲皮素-3-O-β-D-

吡喃葡萄糖苷酸和山奈酚-3-O-芸香糖苷属于黄酮类物质,黄酮类化合物在临床上有抗氧化、抗突变等作用,可用于高血压的辅助治疗,有防止脑溢血、循环器官疾病的功效<sup>[5-8]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

试验主要用到的仪器有电子天平(型号 XS205DU; AL204)、超声仪(昆山市超声仪器有限公司)、电热恒温水浴锅(AISITI)、回流提取器(上海南阳仪器有限公司)、waters e2695 高效液相色谱仪(waters)、DAD 二极管阵列检测器(waters)、Agilent ZORBAX SB-Aq C18 色谱柱(安捷伦科技有限公司)、Waters XSelect<sup>®</sup> T3 色谱柱(沃特世科技有限公司)、SHISEIDO CAPCELL PAK C18 色谱柱。

### 1.2 试剂

实验主要用到的试剂有甲醇、乙腈(GR, 淮安科仪化玻有限公司);甲酸、乙酸、磷酸(AR, 天津市

收稿日期: 2022-05-31; 修回日期: 2022-06-12

基金项目: 贵州省农业科学院青年科技创新工程项目(黔农科院青年基金[2022]32); 贵州省科技厅科技支撑计划项目(黔科合支撑[2017]2841); 贵阳市现代药业计划项目(筑科合同 2018-11-3)

\* 通讯作者: 高源(1985—), 男, 硕士, 主任药师, 主要从事食品药品风险评估及研发工作, E-mail: youaremygy@163.com.

富宇精细化工有限公司)。槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸(成都普思生物科技股份有限公司,批号: MUST-19052825,纯度:99.72%);山奈酚-3-O-芸香糖苷(成都普思生物科技股份有限公司,批号: MUST-19041507,纯度:98.16%)。

### 1.3 药材

实验所用药材来自不同省份的多个地区,部分为自行采集,部分为购买,详见表1所示。

表1 团羽铁线蕨的来源

Tab.1 Sources of *Adiantum capillus-junonis* Rupr.

序号	获得方式	时间	产地
S1	购于广州	2020年6月	广东省梅州市蕉岭县
S2	购于浙江	2020年6月	浙江省台州市富山乡
S3	购于安徽	2020年6月	安徽省豪州市涡阳县
S4	购于广州	2020年6月	广东省梅州市丰顺县
S5	购于广州	2020年6月	广东省梅州市兴宁县
S6	购于贵州	2020年6月	广西省南宁市马山县
S7	自行采集	2020年5月	贵州省毕节市纳雍县
S8	自行采集	2020年6月	贵州省黔南州罗甸县
S9	自行采集	2020年6月	贵州省黔西南州望谟县
S10	自行采集	2020年7月	贵州省兴义市顶效镇
S11	购于湖北	2020年8月	湖北省黄冈市蕲春县
S12	购于山东	2020年8月	山东省菏泽市鄄城县
S13	自行采集	2020年8月	四川省凉山州宁南县
S14	自行采集	2020年8月	四川省雅安市石棉县
S15	自行采集	2020年7月	云南省楚雄州大姚县
S16	自行采集	2020年7月	云南省楚雄州武定县
S17	自行采集	2020年7月	云南省大理州鹤庆县
S18	自行采集	2020年7月	云南省昆明市禄劝县
S19	自行采集	2020年7月	云南省丽江市丽江古城

### 1.4 方法

#### 1.4.1 色谱条件

色谱条件参照文献记载[9]。

#### 1.4.2 样品及对照品制备方法

供试品制备:称取药材样本1g置于锥形瓶,

精确加入80%甲醇25 mL<sup>[10]</sup>,70℃条件下回流60 min,趁热过滤,于80℃水浴挥发至6~7 mL,定容至10 mL,过0.45  $\mu$ m的微孔滤膜,待用。

标准溶液的制备:分别称取槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸、山奈酚-3-O-芸香糖苷标准品25 mg于小烧杯内,溶解转移至25 mL容量瓶中,分别使用80%甲醇定容至刻度,配置成浓度约为0.1 mg/mL的混合溶液。

## 2 结果与分析

### 2.1 指纹图谱研究

#### 2.1.1 仪器精密度、稳定性、重复性考查及团羽铁线蕨 HPLC 方法完整性考查

取S15药材供试品溶液进样测定,以10号峰为参照峰计算得精密度相对保留时间RSD值为0.02%~0.05%、稳定性相对保留时间RSD值为0.05%~0.20%、重复性相对保留时间RSD值为0.05%~0.12%(均小于3%),精密度相对峰面积RSD值为0.11%~2.95%、稳定性相对峰面积RSD值为0.14%~2.85%、重复性相对峰面积RSD值为0.10%~2.98%(均小于3%);采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版)进行相似度评价分析,设置时间窗宽度为0.1,可得相似度均达到0.99以上,精密度RSD值为0.23%、其余为0;显示该方法仪器精密度、方法48小时稳定性、重复性良好。取S15药材制备6份供试品溶液,将100%甲醇洗脱时间调整到100 min,其余洗脱梯度不变,进样量为20  $\mu$ L,未见有峰洗脱出来,说明本HPLC方法完整。

#### 2.1.2 建立图谱及特征峰指认

以S19药材图谱为参照图谱,通过中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2004 A版),采用平均数图谱生成法和多点矫正的方式,整合19批样本的

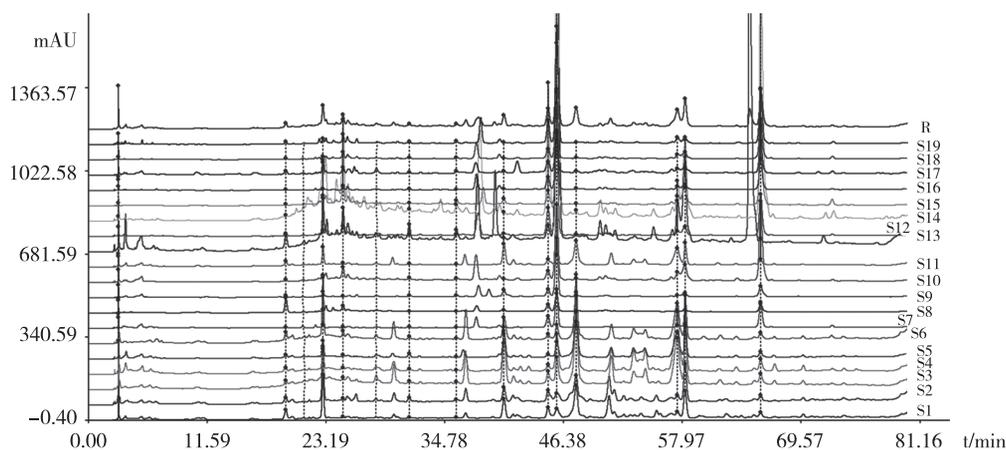


图1 19批团羽铁线蕨 HPLC 叠加图谱(S1-S19)与对照图谱(R)

Fig.1 HPLC overlay atlas (S1-S19) and control atlas (R) of 19 batches of *Adiantum capillus-junonis* Rupr.

指纹图谱数据,生成 19 批团羽铁线蕨 HPLC 叠加图谱与指纹对照图谱(图 1、图 2),可见团羽铁线蕨 80% 甲醇提取液有 13 个相同的共有峰,通过与对照品(图 3)比对,指认出共有峰 2 个,分别为槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸和山奈酚-3-O-芸香糖苷,其余 11 个共有峰未被指认出。通过叠加图谱和指纹对照图谱,可知 19 批次样本的 DAD 指纹图谱相似度范围为 0.558 ~ 0.901,平均值为 0.756, RSD 值为 16.91%。以 10 号峰为参照峰,计算出 19 批次样本的相对保留时间 RSD 值为 0.11% ~ 0.99%,相对峰面积 RSD 值较大。

### 2.1.3 聚类分析

以 10 号峰为参照,以 19 批药材中 13 个共有峰的相对峰面积为变量,标准化组成  $19 \times 13$  阶原始数据矩阵,通过 SPSS 26 软件进行聚类分析。利用组间连接法,以欧式距离作为样品的测度<sup>[11]</sup>,结果见图 4,19 批药材可聚为 3 类,其中 S1、S2 为一类,S3-S6、S11 聚为一类,其余批次药材聚为一类。

### 2.1.4 主成分分析

主成分分析(PCA)方法是一种能够从原始数据中提取出其共有特征的方法,通过构建主成分因子可以体现样本间相似性和原始数据对主成分因子

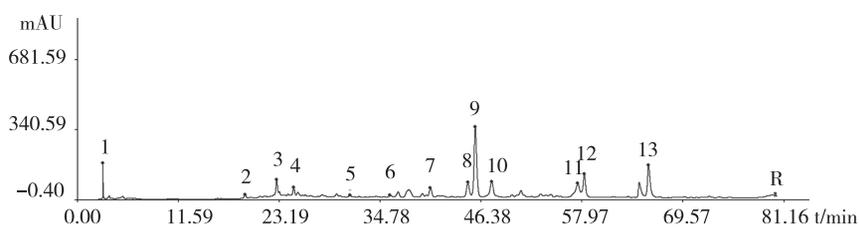


图 2 指纹对照图谱

Fig. 2 Fingerprint control

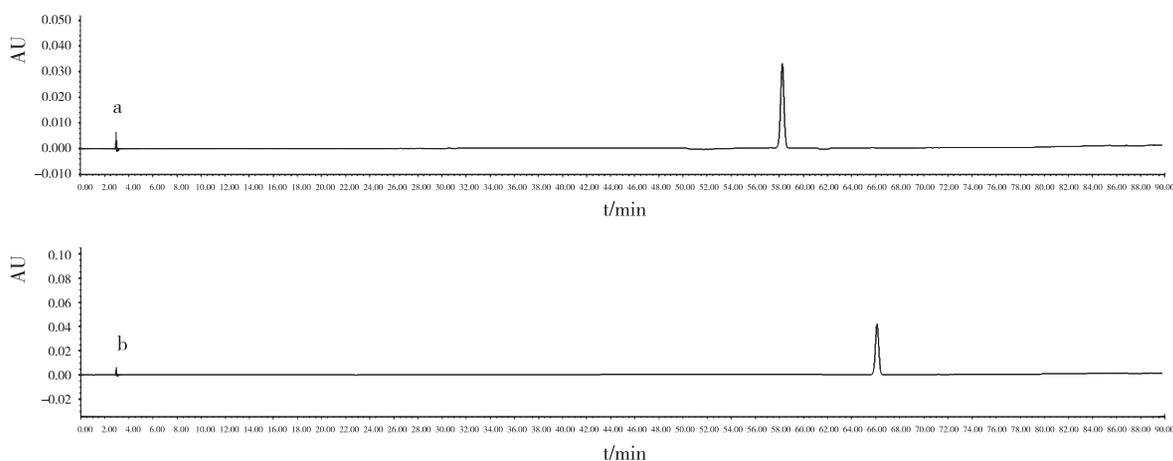


图 3 槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸(a)和山奈酚-3-O-芸香糖苷(b)的对照色谱图

Fig. 3 contrast chromatogram of Quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucuronide (a) and Kaempferol-3-O-coumarosine (b)

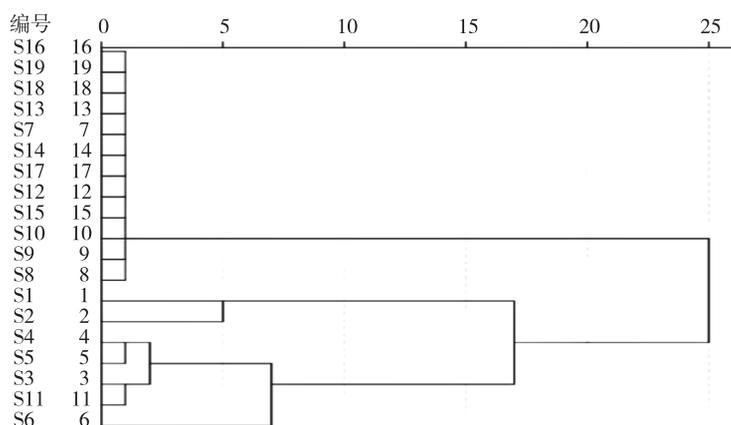


图 4 19 批团羽铁线蕨聚类分析图

Fig. 4 Cluster analysis of 19 batches of *Adiantum capillus-junonis* Rupr.

的贡献<sup>[11-12]</sup>。以10号峰为参照,以19批药材样品中13个共有峰的相对峰面积为变量进行PCA分析,选择3个主成分,累积方差贡献率为85.6%,说明模型预测良好。由PCA得分图(图5)显示,19批药材样品可分为3类,S1、S2聚为一类,S3-S5、S11、S6聚为一类,其余产地聚为一类。

**2.1.5 正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)分析**

不同产地的团羽铁线蕨药材样品集中在不同区域,19批药材样品可分为3组(图6),S1、S2聚为一组,S3-S5、S11、S6聚为一组,其余产地聚为一组,与PCA分析、聚类分析结果一致。OPLS-DA模型(图7)中的拟合参数 $R^2X=0.851, R^2Y=0.966,$

模型预测参数( $Q^2$ )=0.903,均大于0.5,表明所建模型稳定且预测能力较强。以模型变量投影(VIP)值为指标对引起组间差异的成分进行分析,筛选贡献较大的8个变量(以VIP值>1为标准),从大到小依次为11号(VIP=1.20455)>8号(VIP=1.12766)>1号(VIP=1.11016)>3号(VIP=1.06954)>10号(VIP=1.05879)>7号(VIP=1.04475)>12号(VIP=1.03037)>6号(VIP=1.02963),提示引起19批药材样品质量差异的为上述8个成分<sup>[13]</sup>。

**2.2 特征成分含量测定**

**2.2.1 含量测定方法**

在指纹图谱研究的基础上,由于有部分产地特

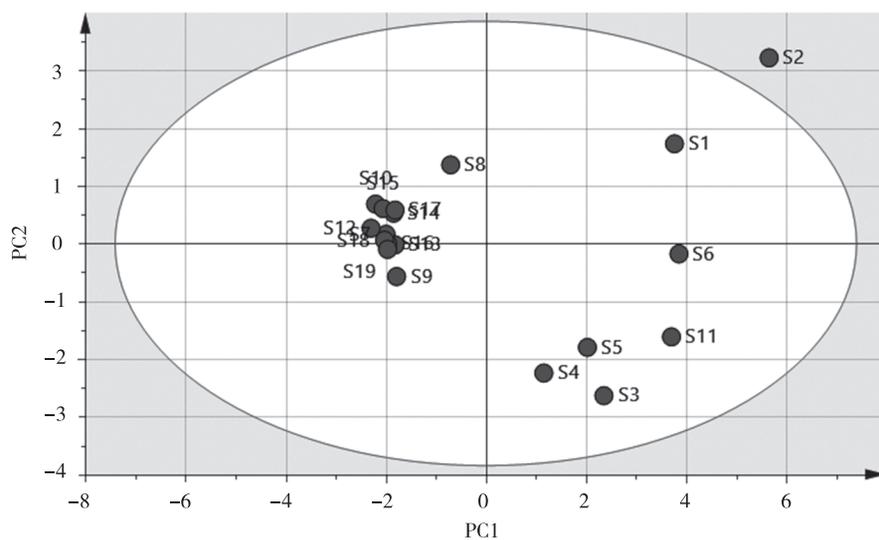


图5 19批团羽铁线蕨PCA得分图

Fig. 5 PCA score chart of 19 batches of *Adiantum capillus-junonis* Rupr.

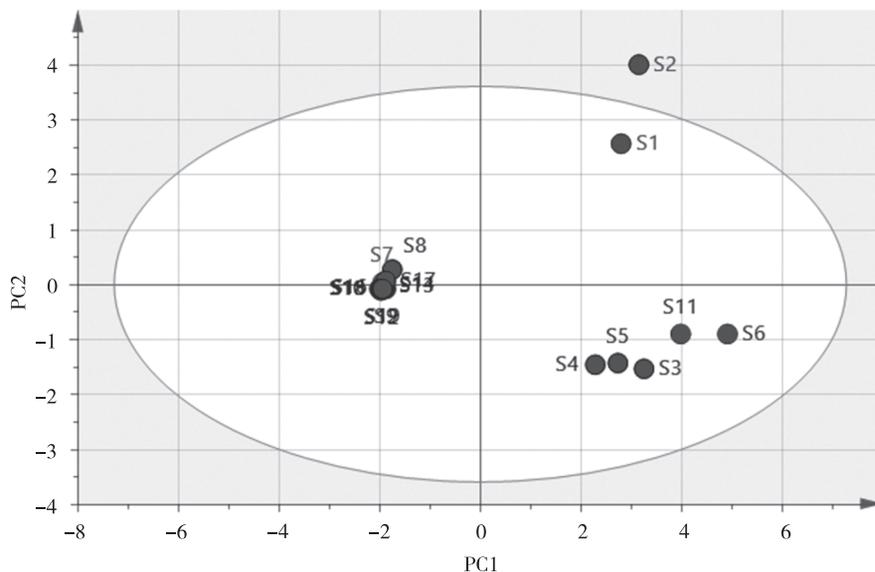


图6 19批团羽铁线蕨OPLS-DA得分图

Fig. 6 OPLS-DA score chart of 19 batches of *Adiantum capillus-junonis* Rupr.

征成分分离度不足以满足含量测定的要求,且指纹图谱方法测试时间太长,不符合试验经济学,故调整洗脱梯度为甲醇(A)-0.05 磷酸水溶液(B)(0~30 min,30%~48% A)。

### 2.2.2 专属性考查

取空白溶液及供试品溶液进样测试,如图 8 所示,空白溶液不干扰特征成分槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸、山奈酚-3-O-芸香糖苷槲 2 个成分,说明方法专属性良好。

### 2.2.3 线性考查

进样分析并记录 2 个成分的不同浓度峰面积。以 X 轴为对照品浓度,Y 轴为峰面积进行线性回归计算。结果可得,槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸在 0.01100~0.2200 mg/mL 范围内呈良好线性关系,回归方程为  $y = 724\ 515x - 38\ 962$ , $R^2$  为 0.997;山奈酚-3-O-芸香糖苷槲在 0.01017~0.2034 mg/mL 范围内呈良好线性关系,回归方程为  $y = 806\ 074x - 22\ 310$ , $R^2$  为 0.998,表明对照品在相应浓度范围内线性关系良好。

### 2.2.4 精密度、重复性、稳定性考查

取 S15 产地药材进样测定,分别记录 2 个成分的峰面积,并计算其 RSD 值,特征成分槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸、山奈酚-3-O-芸香糖苷槲的精密度 RSD 值分别为 1.81%、0.90%,稳定性 RSD 值为 1.39%、1.38%,重复性 RSD 值为 2.39%、2.24%。结果表明,仪器精密度良好,48 h 内方法稳定性,重复性良好。

### 2.2.5 回收率考查

取 S15 产地药材 9 份,每份 0.5 g,分为三组,每一组的 3 份以 80%、100%、120% 比例分别加入槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸、山奈酚-3-O-芸香糖苷槲 2 种对照品,进样测试并记录。结果显示,槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸、山奈酚-3-O-芸香糖苷槲平均回收率分别为 102.5%、95.1%,RSD 值分别为 1.60%、2.65%。符合《中国药典》(2020 版)四部中附录(9101)分析方法验证指导原则<sup>[14]</sup>,可用于铁线蕨 2 种特征成分含量测定。

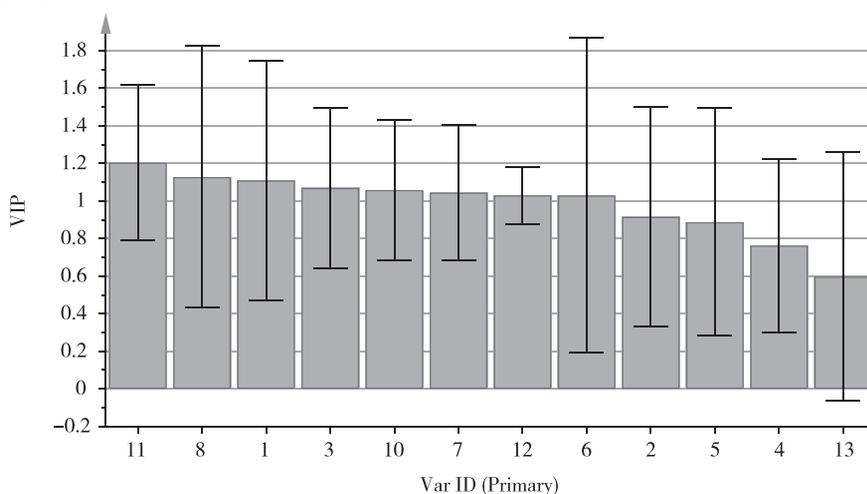
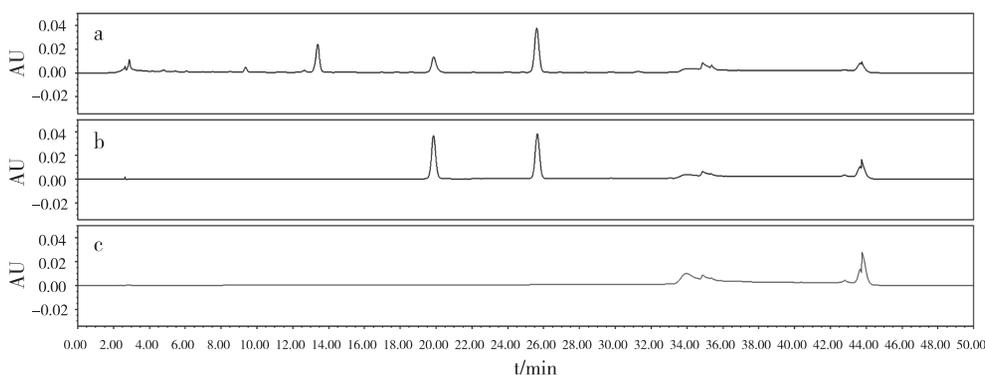


图 7 19 批团羽铁线蕨 OPLS-DA 模型中共有峰的 VIP 值

Fig. 7 VIP value of common peaks in OPLS-DA model of 19 batches of *Adiantum capillus-junonis* Rupr.



注:a 为供试品图谱;b 为对照品图谱;c 为空白图谱。

图 8 团羽铁线蕨专属性实验

Fig. 8 Specificity experiment of *Adiantum capillus-junonis* Rupr.

### 2.2.6 含量测定结果

分别精密称定 19 批次药材 1 g, 进样测试并记录峰面积, 通过标准曲线进行定量, 记录槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸和山奈酚-3-O-芸香糖苷的含量, 结果见表 2, 槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸含量范围为 0.11 ~ 4.35 mg/g, 山奈酚-3-O-芸香糖苷量范围为 0.15 ~ 10.35 mg/g。

表 2 样品含量测定结果

Tab. 2 Determination of sample content

编号	槲皮素-3-O- $\beta$ -D-	山奈酚-3-O-
	吡喃葡萄糖苷酸/(mg·g <sup>-1</sup> )	芸香糖苷/(mg·g <sup>-1</sup> )
S1	0.85	0.19
S2	0.93	0.15
S3	0.15	0.36
S4	0.13	0.41
S5	0.17	0.40
S6	0.11	0.21
S7	0.35	1.56
S8	0.19	0.44
S9	0.29	0.62
S10	1.75	4.74
S11	0.21	0.31
S12	4.35	10.35
S13	0.84	2.23
S14	2.97	6.38
S15	1.93	4.42
S16	0.53	1.63
S17	0.67	1.85
S18	0.81	2.37
S19	1.42	3.86
平均值	0.98	2.24

## 3 结论与讨论

本文章主要研究了团羽铁线蕨化学指纹图谱及特征成分含量测定。通过方法学考察, 调整确定流动相梯度, 得到了 19 批次不同产地团羽铁线蕨的 HPLC-DAD 指纹图谱, 并定量检测槲皮素-3-O- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷酸和山奈酚-3-O-芸香糖苷两个物质的含量, 本研究首次建立了团羽铁线蕨指纹图谱与含量测定方法, 实验具有较大创新意义。

团羽铁线蕨在西南地区产地较多, 药材丰富, 从结果中可以看出, 西南地区云贵川三省产地团羽铁线蕨药材 HPLC-DAD 指纹图谱相似度较好, 但其余各省相似度较差, 说明团羽铁线蕨生长环境对其化学成分含量影响较大, 西南地区特有的气候、土壤环境使得团羽铁线蕨化学成分与其他省份差异较大, 文献研究也指出了西南地区的生物气候环境非常适合于铁线蕨的生长繁殖<sup>[2]</sup>。19 个团羽铁线蕨产地数据显示, 共有峰相对保留时间 RSD 值较小, 说明 19 批药材团羽铁线蕨化学成分基本一致, 但共有峰相对面积 RSD 值较大, 其 RSD 值最高达 131.61%, 说明 19 批团羽铁线蕨成分含量差异较大, 推测原因为: (1) 团羽铁线蕨样品本身化学成分的差异较大; (2) 与样品不同采摘期有关, 本实验样品由药材供应商提供, 无法对采摘期进行控制, 今后的试验将会进一步针对研究不同采摘期团羽铁线蕨化学成分差异进行报道。

(责任编辑: 段丽丽)

## 参 考 文 献:

- [1] 高源, 方灿, 彭源, 等. 苗药猪鬃草研究进展综述[J]. 海峡药学, 2020, 32(1): 42-45.
- [2] 陈云辉, 沈阳, 陈倩, 等. 九种铁线蕨属植物对中国主要城市的气候适应性研究[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2015, 44(6): 638-644.
- [3] 贵州省市场监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003.
- [4] 刘东方, 赵丽娜, 李银峰, 等. 中药指纹图谱技术的研究进展及应用[J]. 中草药, 2016, 47(22): 4086-4094.
- [5] 李珊, 姚默, 刘向辉, 等. 铁线蕨属药学研究概况[J]. 宁夏农林科技, 2012, 53(7): 71-73.
- [6] Pan C, Chen Y G, Ma X Y, et al. Phytochemical constituents and pharmacological activities of plants from the genus Adiantum: a review[J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2011, 10(5): 681-692.
- [7] Rastogi S, Pandey M M, Rawat A K S. Ethnopharmacological uses, phytochemistry and pharmacology of genus Adiantum: a comprehensive review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 215(4): 101-119.
- [8] 钮松召, 崔颖, 卢菲, 等. 蒙药山川柳的 HPLC 指纹图谱建立、相似度评价和聚类分析[J]. 中国药房, 2019, 30(8): 1091-1094.
- [9] 肖丹, 范东生, 刘星, 等. 不同产地铁线蕨药材指纹图谱的建立、分析及差异成分的含量测定[J]. 中国药房, 2021, 32(17): 2085-2090.
- [10] 孙文娟, 龙毅. 不同浓度乙醇溶液对黑骨藤提取物的影响[J]. 山地农业生物学报, 2022, 41(2): 88-92.

- [11] 杨浩. 基于 SPSS 的聚类分析在行业统计数据中的应用[D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [12] 梁军, 刘彩凤, 刘冬涵, 等. 藏药白脉软膏多成分定量、指纹图谱结合多元统计分析的质量控制研究[J]. 中草药, 2020, 51(2): 356-363.
- [13] 徐锋, 杨澜, 成婷婷, 等. 地瓜藤的 UPLC 指纹图谱建立及聚类分析、主成分分析[J]. 中国药房, 2019, 30(24): 3388-3392.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

### Establishment of Fingerprint of HPLC-DAD *Adiantum capillus-junonis* Rupr. and Quantitative Analysis of Multi-Characteristic Components

Wang Yu<sup>1</sup>, Lin Ken<sup>2</sup>, Xiao Dan<sup>3</sup>, Gao Yuan<sup>3\*</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang, Guizhou 550006, China; 2. Xinzhai Town Health Center, Yinjiang County, Tongren 555200; 3. Guizhou institute of food inspection, Guiyang, Guizhou 550004, China)

**Abstract:** The method of fingerprinting and content determination of multi-characteristic components of *Adiantum capillus-junonis* Rupr. was established and applied to the quality control of *A. capillus-junonis* Rupr. in different origin. Method: The chromatographic condition was set up on the SHISEIDO CAPCELL PAK C18 chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) by gradient elution of methanol - 0.05% phosphoric acid, the monitoring wavelength was 280 nm, detection temperature was 35 °C. The technique was used to establish a HPLC-DAD analysis method for the analysis of fingerprint and multi-characteristic components of *A. capillus-junonis* Rupr. And similarity software and chemometrics analysis was used to quality evaluation of multi-batch medicinal materials. There were 13 common peaks in this method, and 2 were identified as quercetin-3-O-β-D-glucuronide and kaempferol 3-O-rutinoside respectively, similarity ranged from 0.558 to 0.901, combined with cluster analysis and principal component analysis, 13 common peaks were evaluated by orthogonal partial least squares discriminant analysis, and the contents of quercetin-3-O-β-D-glucuronide and kaempferol 3-O-rutinoside were determined in the range of 0.11 ~ 4.35 mg/g and 0.15 ~ 10.35 mg/g, respectively. It can be seen from the results that there is a great difference in the *A. capillus-junonis* Rupr. medicinal materials from different habitats. The HPLC-DAD analysis method for fingerprinting and content determination of multi-characteristic components of *A. capillus-junonis* Rupr. can more comprehensively and accurately reflect the contribution of the overall chemical composition of *A. capillus-junonis* Rupr. and the content of various characteristic components. It lays a foundation for improving the quality control method of *A. capillus-junonis* Rupr.

**Keywords:** *Adiantum capillus-junonis* Rupr.; HPLC-DAD fingerprint; content determination; methodological examination