钩苞大丁草的HPLC指纹图谱建立及含量测定Δ

孙丽莎[1,2*]，蒋　礼[1]，李　丽[1,2]，田　琳[3]，汪　洋[1]，潘　洁[4]，李月婷[4]，李勇军[1,2,4#]（1.贵州医科大学中药功效成分发掘与利用全国重点实验室/贵州省药物制剂重点实验室，贵阳　550004；2.贵州医科大学药学院，贵阳　550004；3.贵州健兴药业有限公司，贵阳　550018；4.贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心/贵州省民族药与中药开发应用工程技术研究中心，贵阳　550004）

中图分类号　R917；R284.1　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2025）09-1052-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2025.09.06

摘　要　目的　建立钩苞大丁草的指纹图谱及其11种成分的含量测定方法。**方法**　采用高效液相色谱（HPLC）法，根据《中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012版）》建立13批（编号S1～S13）钩苞大丁草的指纹图谱并进行相似度评价，同时进行共有峰指认；采用SPSS 25.0软件和SIMCA 14.1软件进行分层聚类分析（HCA）、主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘法-判别分析（OPLS-DA）；采用HPLC法测定样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3,8-二羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、咖啡酸、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸A、芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸C、花椒毒素11种成分的含量。**结果**　13批钩苞大丁草的HPLC指纹图谱相似度为0.801～0.994；从中共标定了38个共有峰，并指认了其中13个共有峰。HCA、PCA结果均显示，S1～S5、S7聚为一类，S6聚为一类，S8聚为一类，S9、S11聚为一类，S10、S12～S13聚为一类；OPLS-DA结果显示，峰7（绿原酸）、峰21（异绿原酸A）、峰26（花椒毒素）、峰19（异绿原酸B）、峰33、峰13、峰23（异绿原酸C）、峰2（新绿原酸）、峰17（木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷）的变量重要性投影值均大于1。上述11种成分在各自检测质量浓度范围内线性关系均良好（r均大于0.999）；精密度、重复性、稳定性试验的RSD均不大于2%（n均为6）；平均加样回收率为92.54%～105.55%，RSD为0.83%～1.93%（n=6）；平均含量分别为0.744、5.014、0.646、0.431、0.069、0.582、0.979、2.754、0.157、1.284、2.943 mg/g。**结论**　本研究建立的HPLC指纹图谱和含量测定方法简单、准确、稳定，可为钩苞大丁草药材的质量控制提供依据。花椒毒素、绿原酸、异绿原酸A、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸C、新绿原酸可作为钩苞大丁草药材的质量标志物。

关键词　钩苞大丁草；高效液相色谱法；指纹图谱；含量测定；化学模式识别

Establishment of HPLC fingerprint and content determination of *Gerbera delavayi*

SUN Lisha[1,2], JIANG Li[1], LI Li[1,2], TIAN Lin[3], WANG Yang[1], PAN Jie[4], LI Yueting[4], LI Yongjun[1,2,4] [1. State Key Laboratory of Discovery and Utilization of Functional Components in Traditional Chinese Medicine/Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. School of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. Guizhou Jianxing Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550018, China; 4. Guizhou Medical University Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education)/Guizhou Provincial Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Guiyang 550004, China]

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish the fingerprint of *Gerbera delavayi* and the methods for the content determination of 11 components in *G. delavayi*. **METHODS** High-performance liquid chromatography (HPLC) was adopted to establish the fingerprints of 13 batches of *G. delavayi* (No. S1-S13), and the similarities were evaluated according to *Similarity Evaluation System of Chromatographic Fingerprint of TCM* (*2012 edition*), while the common peaks were identified. Hierarchical clustering analysis (HCA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least square-discriminant analysis (OPLS-DA) were carried out by using SPSS 25.0 software and SIMCA 14.1 software. The contents of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 3, 8-dihydroxy-4-methoxy-2-oxo-2*H*-1-benzopyran-5-carboxylic acid, caffeic acid, 3-hydroxy-4-methoxy-2-oxo-2*H*-1-benzopyran- 5-carboxylic acid, luteolin-7-*O*-*β*-D-glucoside, isochlorogenic acid A, apigenin-7-*O*-*β*-D-glucoside, isochlorogenic acid C and xanthotoxin were determined by HPLC. **RESULTS** The similarities in HPLC fingerprint of 13 batches of *G. delavayi* were 0.801-0.994; a total of 38 common peaks were identified and 13 common peaks were identified. The results of HCA showed that S1-S5 and S7 were

Δ**基金项目**　国家自然科学基金项目（No.U1812403）；贵州省科技计划项目（No.黔科合基础-〔2024〕青年247）；贵州医科大学高层次人才科研启动基金项目（No.校博合J字〔2023〕025号）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：中药药效物质与质量控制技术。E-mail：2160823995@qq.com

＃**通信作者**　教授，博士生导师，博士。研究方向：中药、民族药的药效物质基础。E-mail：liyongjun026@126.com

clustered into one group, S6 into one category, S8 into one category, S9 and S11 into one category, S10, S12 and S13 into one category, and the results of PCA were consistent with them. The results of OPLS-DA showed that variable importance values for the projection of peak 7 (chlorogenic acid), peak 21 (isochlorogenic acid A), peak 26 (xanthotoxin), peak 19 (isochlorogenic acid B), peak 33, peak 13, peak 23 (isochlorogenic acid C), peak 2 (new chlorogenic acid), peak 17 (luteolin-7-*O*-β-D-glucoside) were greater than 1. The above 11 components had good linearity in their respective detection concentration ranges (r was greater than 0.999). RSDs of precision, repeatability, and stability tests were not more than 2% (n=6). The average recovery rates were 92.54%-105.55%, and the RSDs were 0.83%-1.93% (n=6). The average contents of 11 components were 0.744, 5.014, 0.646, 0.431, 0.069, 0.582, 0.979, 2.754, 0.157, 1.284 and 2.943 mg/g, respectively. **CONCLUSIONS** The constructed HPLC fingerprint and content determination methods are simple, accurate and stable, which can provide reference for quality control of *G. delavayi*. Xanthotoxin, chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, luteolin-7-*O*-β-D-glucoside, isochlorogenic acid C and new chlorogenic acid can be used as markers for *G. delavayi*.

KEYWORDS *Gerbera delavayi*; high-performance liquid chromatography method; fingerprint; content determination; chemical pattern recognition

钩苞大丁草 *Gerbera delavayi* Franch.是菊科大丁草属多年生草本植物，主要分布在我国云南、四川南部及越南北部，全草入药。其味辛、微苦，性平，具有清热解毒、利湿消肿和化瘀止血等作用，可用于治疗肺热咳嗽、湿热下痢、热淋等症[1]。《哀牢本草》记载，钩苞大丁草具有活血祛瘀、接骨续筋的作用，可用于治疗四肢骨折及瘀血肿痛[2]。该药的质量标准在《云南省中药材标准（2005年版·第6册·彝族药Ⅲ）》中有所收载，但仅有水分、总灰分和酸不溶性灰分检查项[3]。目前，有关钩苞大丁草的研究主要包括化学成分的提取分离[4-6]、薄层鉴别[7]、基因测序分析[8]、纤维特性分析[9]、花粉萌发与贮藏特性分析[10]等，而关于其质量控制的相关研究较少。

高效液相色谱（HPLC）指纹图谱作为一种控制传统药材、天然药物质量的有效方法，可以实现多成分的快速检测[11]；同时，指纹图谱可用于评估中药质量的一致性，其结合化学模式识别分析方法还可有效评价中药的整体质量[12]。基于此，本研究拟采用HPLC法建立13批钩苞大丁草的指纹图谱并进行相似度评价，结合分层聚类分析（hierarchical clustering analysis，HCA）、主成分分析（principal component analysis，PCA）、正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least square-discriminant analysis，OPLS-DA）等化学模式识别方法对不同批次药材的质量差异进行分析，并对该药材中含量较高且活性较强的新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3，8-二羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精（后文简写为“3，8-Dhmcc”）、咖啡酸、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、木犀草素-7-*O*-β-D-葡萄糖苷、异绿原酸A、芹菜素-7-*O*-β-D-葡萄糖苷、异绿原酸C、花椒毒素的含量进行测定，旨在为钩苞大丁草药材的质量评价奠定基础，为其质量标准的完善及进一步开发利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括UltiMate 3000型HPLC仪、Multifuge X3R型高速冷冻离心机（美国Thermo Fisher Scientific公司），KQ-5200E型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司），EL204型电子天平[梅特勒-托利多国际贸易（上海）有限公司]，WP-UP-Ⅳ-10型超纯水机（四川沃特尔科技发展有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C、芹菜素-7-*O*-β-D-葡萄糖苷对照品（批号分别为wkq22080406、wkq23022707、wkq22072103、wkq21011104、wkq23010903、wkq23041713、wkq23011-207、wkq23061211，纯度均不低于98%）均购自四川省维克奇生物科技有限公司；木犀草素-7-*O*-β-D-葡萄糖苷、花椒毒素、异野漆树苷、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、3，8-Dhmcc对照品（批号分别为20220523、20220618、20220911、20220924、20220715）均为本课题组自行分离纯化而得，纯度均不低于98%；乙腈、磷酸为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

13批钩苞大丁草药材均采收自云南省，经贵州医科大学药学院刘春花副教授鉴定，均为菊科植物钩苞大丁草 *G.delavayi* Franch.的干燥全草，具体信息见表1。

表1 钩苞大丁草药材信息

编号	采集时间	产地	编号	采集时间	产地
S1	210729	永仁县	S8	230417	永仁县
S2	210729	丽江市	S9	230417	西畴县
S3	210729	保山市	S10	230417	祥云县
S4	210711	文山市	S11	230830	文山市
S5	210711	楚雄市	S12	230830	永胜县
S6	210720	永胜县	S13	230830	安宁市
S7	210711	大理市			

2 方法与结果

2.1 HPLC指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件

采用ACE Excel 5 C_{18}-PFP（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱，以乙腈（A）-0.2%磷酸溶液（B）为流动相进

行梯度洗脱(0～6 min,5%A→10%A;6～20 min,10%A→17%A;20～45 min,17%A;45～55 min,17%A→25%A;55～70 min,25%A→35%A;70～80 min,35%A→60%A;80～90 min,60%A→70%A;90～105 min,70%A→85%A);柱温为35 ℃;检测波长为330 nm;流速为1.0 mL/min;进样量为5 μL。

2.1.2　对照品溶液的制备

分别精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3,8-Dhmcc、咖啡酸、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异野漆树苷、花椒毒素对照品适量,置于不同容量瓶中,以70%甲醇溶解并稀释,制成质量浓度分别为0.502、1.004、0.496、1.151、0.503、0.491、1.000、1.017、0.986、0.988、0.962、0.580、0.972 mg/mL的对照品储备液。分别精密吸取上述13种对照品储备液适量,置于同一10 mL容量瓶中,加入70%甲醇稀释并定容,摇匀,制得上述成分质量浓度分别为9.79、57.80、9.97、21.68、3.47、20.23、68.97、13.61、50.35、29.34、9.62、5.80、86.91 μg/mL的混合对照品溶液。

2.1.3　供试品溶液的制备

取钩苞大丁草药材样品,粉碎。取粉末(过三号筛,下同)1 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,精密称定,加入70%甲醇25 mL,称质量;超声(功率200 W,频率40 kHz)提取60 min,放冷,再次称质量;用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液适量,以12 000 r/min离心10 min,取上清液,即得。

2.1.4　精密度试验

取钩苞大丁草药材粉末(S1)1 g,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。以21号峰(分离度较好,保留时间稳定且适中)为参照,计算得各共有峰相对保留时间的RSD为0.01%～0.69%(*n*=6)、相对峰面积的RSD为0.26%～2.89%(*n*=6),表明该方法精密度良好。

2.1.5　重复性试验

取钩苞大丁草药材粉末(S1)1 g,共6份,分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以21号峰为参照,计算得各共有峰相对保留时间的RSD为0.02%～0.42%(*n*=6)、相对峰面积的RSD为0.78%～2.94%(*n*=6),表明该方法重复性良好。

2.1.6　稳定性试验

取钩苞大丁草药材粉末(S1)1 g,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以21号峰为参照,计算得各共有峰相对保留时间的RSD为0.01%～0.69%(*n*=6)、相对峰面积的RSD为0.57%～2.76%(*n*=6),表明该供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性好。

2.1.7　指纹图谱的建立与相似度评价

取13批钩苞大丁草药材粉末各1 g,分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将所得图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》,以样品S1的色谱图为参照图谱,设置时间窗宽度为0.1 min,经多点校正后进行Mark峰匹配,生成13批钩苞大丁草药材的叠加指纹图谱,并采用中位数法生成对照指纹图谱R,详见图1。结果显示,13批样品共标定了38个共有峰。经与混合对照品溶液图谱(图2)比对,指认了其中13个共有峰,分别为新绿原酸(峰2)、绿原酸(峰7)、隐绿原酸(峰8)、3,8-Dhmcc(峰9)、咖啡酸(峰10)、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精(峰12)、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷(峰17)、异绿原酸B(峰19)、异野漆树苷(峰20)、异绿原酸A(峰21)、芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷(峰22)、异绿原酸C(峰23)、花椒毒素(峰26)。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》对13批样品进行相似度评价,得S1～S13的相似度分别为0.834、0.801、0.942、0.852、0.934、0.985、0.956、0.855、0.994、0.988、0.967、0.957、0.966,说明13批钩苞大丁草药材的相似度良好,整体化学成分基本一致。

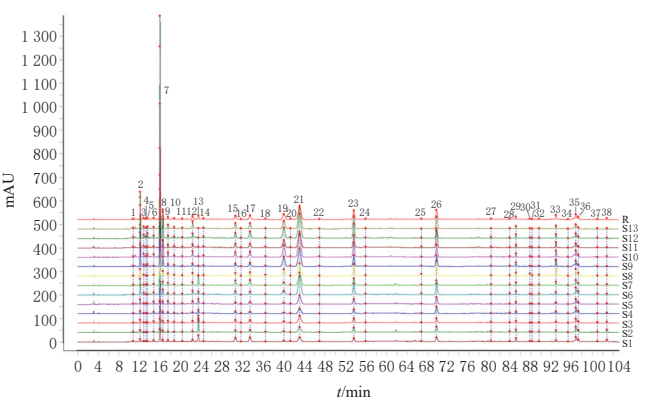


图1　13批钩苞大丁草药材的HPLC叠加指纹图谱及其对照指纹图谱R

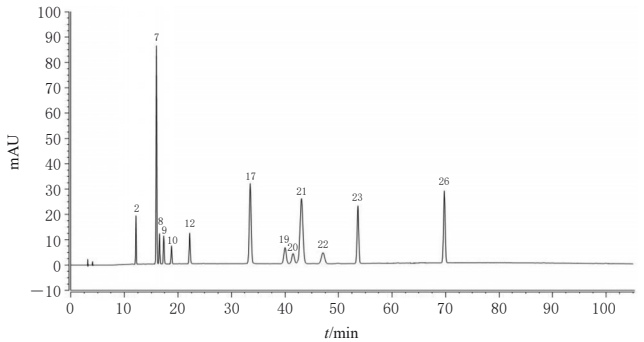
2.2　化学模式识别分析

2.2.1　HCA

将13批钩苞大丁草药材中38个共有峰的峰面积导入SPSS 25.0软件,采用组间连接法进行HCA。结果(图3)显示,当平方欧氏距离为10时,13批钩苞大丁草药材可被分为5类:S1～S5、S7聚为一类,S6聚为一类,S8聚为一类,S9、S11聚为一类,S10、S12～S13聚为一类。这表明不同批次的药材质量具有一定差异。

2.2.2　PCA

将13批钩苞大丁草药材中38个共有峰的峰面积导入SIMCA 14.1软件,建立PCA模型。结果(图4)显示,13批钩苞大丁草药材可被分为5类,与HCA结果一致。



2：新绿原酸；7：绿原酸；8：隐绿原酸；9：3，8-Dhmcc；10：咖啡酸；12：3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精；17：木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷；19：异绿原酸B；20：异野漆树苷；21：异绿原酸A；22：芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷；23：异绿原酸C；26：花椒毒素。

图2　混合对照品溶液的HPLC图

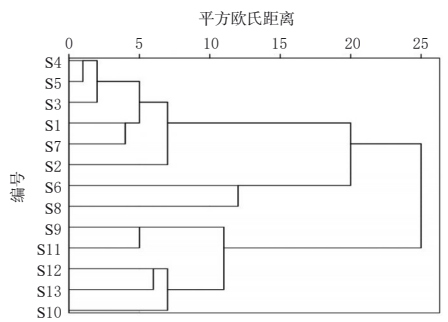


图3　钩苞大丁草药材的HCA树状图

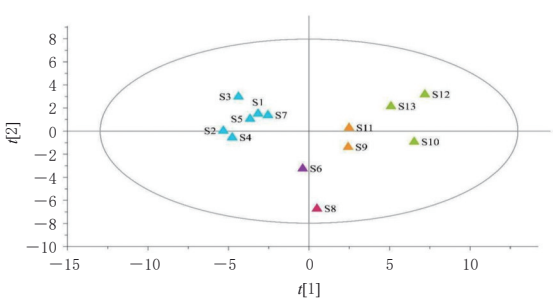


图4　钩苞大丁草药材的PCA得分图

2.2.3　OPLS-DA

在PCA基础上进一步进行OPLS-DA，采用SIMCA 14.1软件绘制OPLS-DA的变量重要性投影（variable importance for the projection，VIP）得分图（图5）。以VIP值＞1为阈值[13]，筛选出了9个差异化合物，对应的共有峰依次为峰7（绿原酸）、峰21（异绿原酸A）、峰26（花椒毒素）、峰19（异绿原酸B）、峰33、峰13、峰23（异绿原酸C）、峰2（新绿原酸）、峰17（木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷）。由此推测，上述9个共有峰所代表的化学成分可能是导致13批钩苞大丁草药材之间质量差异的主要标志物。

2.3　含量测定

2.3.1　色谱条件

采用ACE Excel 5 C_{18}-PFP（4.6 mm×250 mm，5 μm）色谱柱，以乙腈（A）-0.1%磷酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0～6 min，5%A→10%A；6～25 min，10%A→17%A；25～28 min，17%A；28～50 min，17%A→25%A；50～55 min，25%A→35%A；55～65 min，35%A→60%A；65～66 min，60%A→95%A）；柱温为35 ℃；检测波长为330 nm；流速为1 mL/min；进样量为5 μL。

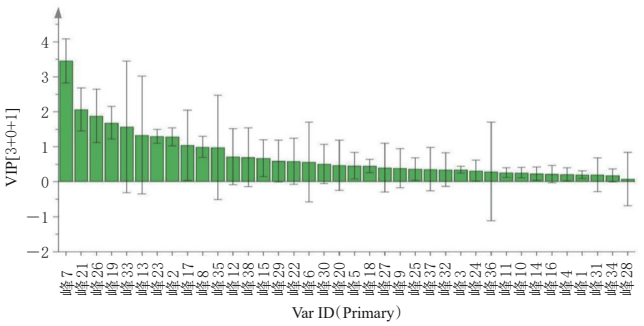


图5　钩苞大丁草药材OPLS-DA的VIP得分图

2.3.2　对照品溶液的制备

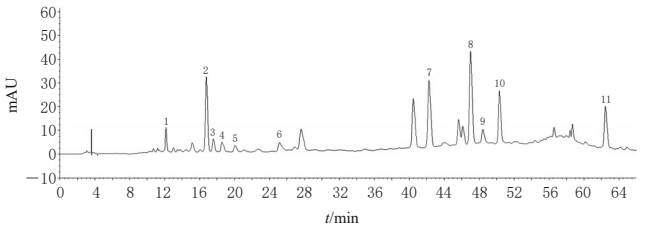
分别精密称取绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸C、3，8-Dhmcc对照品适量，以50%乙醇定容至5 mL容量瓶中，制成质量浓度分别为1.952、1.209、2.052、2.050、0.990 mg/mL的单一成分对照品储备液；分别精密称取新绿原酸、咖啡酸、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷和花椒毒素对照品适量，以50%乙醇定容至10 mL容量瓶中，制成质量浓度分别为0.502、0.503、0.496、1.039、0.561、2.058 mg/mL的单一成分对照品储备液。分别精密吸取上述11种单一成分对照品储备液适量，置于同一10 mL容量瓶中，加50%乙醇定容，得绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸C、3，8-Dhmcc、新绿原酸、咖啡酸、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷和花椒毒素质量浓度分别为0.173、0.033、0.164、0.092、0.077、0.034、0.011、0.078、0.210、0.033、0.290 mg/mL的混合对照品溶液。

2.3.3　供试品溶液的制备

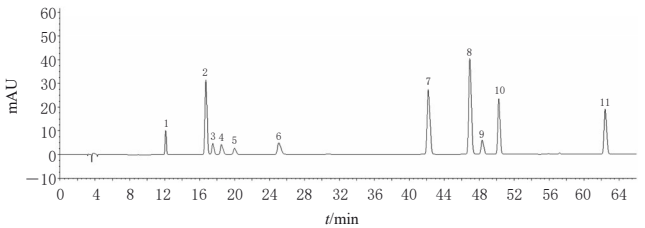
取钩苞大丁草药材粉末1 g，置于50 mL具塞锥形瓶中，精密称定，加入50%乙醇25 mL，称定质量；加热回流30 min，放冷，用50%乙醇补足减失的质量，摇匀，过滤。取续滤液适量，以12 000 r/min离心10 min，取上清液作为供试品溶液A；再精密吸取上述续滤液2.5 mL至10 mL容量瓶中，以50%乙醇稀释至刻度，摇匀，以12 000 r/min离心10 min，取上清液作为供试品溶液B。

2.3.4　专属性考察

分别吸取“2.3.2”和“2.3.3”项下混合对照品溶液、供试品溶液A 5 μL，按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果显示，供试品溶液A与混合对照品溶液图谱相同保留时间处有相应的色谱峰，各待测成分与相邻色谱峰间的分离度均大于1.5，且空白溶液（50%乙醇）不干扰测定，说明该方法专属性良好（图6，空白溶液色谱图略）。



A. 供试品溶液A



B. 混合对照品溶液

1：新绿原酸；2：绿原酸；3：隐绿原酸；4：3，8-Dhmcc；5：咖啡酸；6：3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精；7：木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷；8：异绿原酸A；9：芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷；10：异绿原酸C；11：花椒毒素。

图6　钩苞大丁草药材含量测定专属性考察的HPLC图

2.3.5　线性关系考察

分别取“2.3.2”项下混合对照品溶液2.0、1.2、0.6、0.4、0.2、0.1 mL至2 mL容量瓶中，加50%乙醇定容，制成系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液各适量，按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以各成分的质量浓度为横坐标（*X*）、峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归，结果见表2。由表2可知，11个成分在各自进样质量浓度范围内的线性关系均良好（*r*均大于0.999）。

表2　钩苞大丁草中11个成分的线性关系考察结果

成分	回归方程	*r*	线性范围/(μg/mL)
新绿原酸	*Y*=0.267 3*X*+0.016 2	0.999 9	1.72～34.37
绿原酸	*Y*=0.263 2*X*+0.050 1	0.999 9	8.64～172.77
隐绿原酸	*Y*=0.205 9*X*+0.021 7	0.999 9	1.63～32.65
3，8-Dhmcc	*Y*=0.095 5*X*−0.010 1	0.999 9	3.86～77.20
咖啡酸	*Y*=0.439 0*X*−0.001 9	0.999 9	0.53～10.56
3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精	*Y*=0.148 8*X*−0.081 0	0.999 9	3.90～78.10
木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷	*Y*=0.246 5*X*+0.084 2	0.999 9	10.52～210.36
异绿原酸A	*Y*=0.438 5*X*+0.172 6	0.999 9	8.21～164.17
芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷	*Y*=0.311 3*X*+0.015 6	0.999 9	1.67～33.35
异绿原酸C	*Y*=0.404 5*X*+0.062 3	0.999 9	4.61～92.26
花椒毒素	*Y*=0.109 8*X*+0.069 5	0.999 9	14.51～290.18

2.3.6　精密度试验

取钩苞大丁草药材粉末（S1）1 g，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液A、B，分别按“2.3.1”项下色谱条件重复进样测定6次，记录峰面积。结果显示，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3，8-Dhmcc、咖啡酸、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸A、芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸C、花椒毒素11个成分峰面积的RSD分别为0.19%、0.07%、0.21%、0.17%、0.19%、0.39%、0.24%、0.05%、1.47%、0.33%、0.12%（*n*=6），表明该方法精密度良好。

2.3.7　重复性试验

取钩苞大丁草药材粉末（S1）1 g，共6份，分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液A、B，按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法计算样品含量。结果显示，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3，8-Dhmcc、咖啡酸、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸A、芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸C、花椒毒素11个成分平均含量的RSD分别为1.17%、1.47%、1.00%、1.58%、1.12%、1.57%、1.83%、1.35%、1.39%、1.23%、1.45%（*n*=6），表明该方法重复性良好。

2.3.8　稳定性试验

取钩苞大丁草药材粉末（S1）1 g，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液A、B，分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果显示，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3，8-Dhmcc、咖啡酸、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸A、芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸C、花椒毒素11个成分峰面积的RSD分别为0.38%、0.33%、0.33%、0.47%、1.96%、1.97%、0.48%、0.29%、0.39%、0.20%、0.34%（*n*=6），表明上述供试品溶液A、B在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.3.9　加样回收率试验

取已知含量的钩苞大丁草药材粉末（S1）0.5 g，精密称定，共6份，分别置于50 mL具塞锥形瓶中，分别加入新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3，8-Dhmcc、咖啡酸、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸A、异绿原酸C、芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、花椒毒素对照品0.085、0.439、0.085、0.188、0.028、0.176、0.551、0.410、0.090、0.236、0.700 mg，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液A、B，分别按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，采用外标法计算样品含量并计算加样回收率。结果显示，上述11个成分的平均加样回收率分别为98.66%、100.78%、101.41%、97.96%、96.65%、95.56%、92.54%、100.90%、105.55%、96.06%、100.97%，RSD分别为0.89%、0.83%、1.93%、1.23%、1.73%、1.68%、1.01%、1.10%、0.97%、1.63%、0.90%（*n*=6），表明该方法准确度良好。

2.3.10　样品含量测定

取13批钩苞大丁草药材粉末各1 g，精密称定，分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液A、B，再分别按“2.3.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，采用外标法计算样品中各成分含量。各样品平行测定2次，取平均值。结果见表3。

表3　钩苞大丁草药材样品中11种成分的含量测定结果（mg/g，n=2）

编号	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	3,8-Dhmcc	咖啡酸	3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精	木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷	异绿原酸A	芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷	异绿原酸C	花椒毒素
S1	0.171	0.852	0.175	0.358	0.052	0.380	1.086	0.793	0.174	0.487	1.378
S2	0.172	1.053	0.180	0.102	0.040	0.136	0.662	1.153	0.125	0.689	1.783
S3	0.214	1.668	0.220	0.385	0.056	0.374	0.704	1.460	0.114	0.664	1.242
S4	0.159	0.924	0.154	0.212	0.035	0.229	0.490	1.119	0.083	0.585	2.147
S5	0.260	1.667	0.205	0.537	0.044	0.491	0.573	1.849	0.105	0.675	2.126
S6	0.491	4.915	0.436	0.343	0.057	0.696	0.737	3.834	0.129	1.557	3.485
S7	0.419	3.279	0.393	0.500	0.077	0.620	1.440	2.785	0.160	1.102	1.489
S8	0.405	1.913	0.432	0.401	0.063	0.473	0.855	2.697	0.170	1.666	4.897
S9	1.121	6.363	0.844	0.330	0.057	0.536	0.916	3.637	0.218	1.612	3.492
S10	1.460	9.471	1.213	0.691	0.062	0.902	1.143	4.061	0.205	1.881	3.539
S11	0.807	4.157	0.698	0.571	0.092	0.620	0.932	3.228	0.170	1.691	5.383
S12	2.109	15.910	1.738	0.446	0.132	0.810	1.611	4.918	0.247	2.170	3.304
S13	1.886	13.010	1.715	0.731	0.128	1.297	1.579	4.272	0.142	1.916	3.997
均值	0.744	5.014	0.646	0.431	0.069	0.582	0.979	2.754	0.157	1.284	2.943

3　讨论

3.1　色谱条件的优化及供试品溶液制备方法的选择

本研究通过对供试品溶液进行全波长扫描，选择了330 nm作为最佳检测波长。此外，本研究对不同流动相（甲醇-水、乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.2%磷酸溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液）进行了考察，发现在含量测定过程中以乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相时，各色谱峰的峰形较为尖锐、对称，杂质干扰较少，且出峰时间稳定；在指纹图谱分析过程中以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相时，各色谱峰的分离度均较好。

本研究以色谱峰数量、峰形、分离度及杂质多少为指标，分别对样品的不同提取方式、提取溶剂、提取时间进行了考察，最终确定以70%甲醇超声提取60 min和50%乙醇加热回流提取30 min分别作为建立指纹图谱和测定含量用供试品溶液的处理方法。

3.2　含量测定指标成分的确定

本研究前期通过查阅文献发现，花椒毒素是一种呋喃香豆素类天然产物，具有抗菌、抗肿瘤和抗炎作用[14]。酚酸类化合物如绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸和咖啡酸等，均具有抗氧化、抗病毒和抗菌等药理活性[15—17]。黄酮类化合物芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷具有抗菌和抗炎的作用；而木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷除了对心肌细胞具有保护作用以外，还具有抗氧化损伤的能力，其可经*β*-葡萄糖苷酶水解成木犀草素，从而抑制环氧合酶2蛋白在小鼠单核巨噬细胞白血病细胞中的表达[18—21]。异绿原酸A和异绿原酸C可通过清除自由基的方式起到抗氧化的作用[22]。上述成分的药理活性与钩苞大丁草的药效作用相关。此外，由OPLS-DA结果可知，绿原酸、异绿原酸A、花椒毒素、异绿原酸C、新绿原酸和木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷可能是导致13批钩苞大丁草之间存在质量差异的主要标志物，再结合本课题组前期研究结果——3,8-Dhmcc、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精可能是钩苞大丁草在体内发挥作用的药效物质，故本研究选择这些成分作为含量测定的指标。由OPLS-DA结果还可知，异绿原酸B也可能是导致13批钩苞大丁草药材之间质量差异的主要标志物，但本课题组在前期研究中尝试过多种方法，都无法使异绿原酸B达到含量测定的分离度和回收率要求，所以在本研究中没有选择异绿原酸B作为含量检测指标。

3.3　指纹图谱和化学模式识别结果分析

本研究通过HPLC法建立了13批钩苞大丁草药材的指纹图谱，共确定了38个共有峰，指认了其中13个共有峰；相似度评价结果显示，13批样品与对照指纹图谱R的相似度为0.801～0.994，其中部分批次样品的相似度低于0.900，这可能是因为13批钩苞大丁草药材产地不同，受气候、地理位置及采收时间等自然因素及人为因素的共同影响，导致不同批次药材之间存在一定的质量差异。通过HCA、PCA结果可知，S1～S5、S7聚为一类，S6聚为一类，S8聚为一类，S9、S11聚为一类，S10、S12～S13聚为一类。该结果提示：2021年采收于不同产地的药材质量差异较小，除S6以外的药材样品相似性较高；2023年采收于不同产地的药材质量不完全一致，这可能是因为产地的气候（降雨量和光照等）不同所导致的，例如样品S8的产地云南省永仁县，与其他产地相比，其日照时间较长，年均日照时间居云南省第一[23]。经OPLS-DA可知，峰7（绿原酸）、峰21（异绿原酸A）、峰26（花椒毒素）、峰19（异绿原酸B）、峰33、峰13、峰23（异绿原酸C）、峰2（新绿原酸）、峰17（木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷）9个共有峰所代表的化学成分可能是导致13批不同产地和不同年份钩苞大丁草药材之间质量差异的主要标志物，并且其中花椒毒素、绿原酸、异绿原酸A、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸C、新绿原酸的含量较高。因此，可考虑将这6个含量较高且有较好药理活性的成分作为钩苞大丁草药材的质量标志物。

3.4 含量测定结果分析

由于新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A这4个成分在不同批次钩苞大丁草药材中的含量差异过大，线性关系考察时混合对照品溶液的配制存在困难，因此本研究选择对供试品溶液A进行稀释制得供试品溶液B的方式，实现对上述4个成分的含量测定。结果显示，新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3，8-Dhmcc、咖啡酸、3-羟基-4-甲氧基-5-羧基-香豆精、木犀草素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸A、芹菜素-7-*O*-*β*-D-葡萄糖苷、异绿原酸C、花椒毒素的含量范围分别为0.159～2.109、0.852～15.910、0.154～1.738、0.102～0.731、0.035～0.132、0.136～1.297、0.490～1.611、0.793～4.918、0.083～0.247、0.487～2.170、1.242～5.383 mg/g，平均含量分别为0.744、5.014、0.646、0.431、0.069、0.582、0.979、2.754、0.157、1.284、2.943 mg/g。13批钩苞大丁草药材中有效成分含量存在差异可能与存放时间相关，如2023年采收药材中的有效成分含量相较2021年采收药材更高。其具体原因可能为2021年采收的药材存放时间更长，导致药材中绿原酸等有机酸类和花椒毒素等香豆素类成分损失。因此，笔者建议在存放钩苞大丁草药材时应注意其存放时间和储存条件，以保证药材的质量稳定。

综上所述，本研究建立的HPLC指纹图谱和含量测定方法简单、准确、稳定，能够为钩苞大丁草药材的质量控制提供依据，还可为进一步开发应用钩苞大丁草资源提供参考。

参考文献

[1] 钱金栿，夏从龙. 大理苍山植物药物志[M]. 昆明：云南科技出版社，2016：356.

[2] 王正坤，周明康. 哀牢本草[M]. 太原：山西科学技术出版社，1991：22.

[3] 云南省食品药品监督管理局. 云南省中药材标准：2005年版：第6册：彝族药Ⅲ[M]. 昆明：云南科技出版社，2010.

[4] LIU S Z，FENG J Q，WU J，et al. A new monoterpene-coumarin and a new monoterpene-chromone from *Gerbera delavayi*[J]. Helv Chim Acta，2010，93(10)：2026-2029.

[5] HE Z L，XU Y J，JIANG L，et al. Four new glycosides isolated from *Gerbera delavayi* Franch.[J]. Nat Prod Res，2024：1-6.

[6] YANG Y X，WANG Q，HUANG H Y，et al. New 5-methyl-4-hydroxycoumarin polyketide derivatives from *Gerbera delavayi* with anti-inflammatory activity[J]. Fitoterapia，2023，169：105568.

[7] 徐冰钰. 钩苞大丁草薄层鉴别研究[J]. 云南中医中药杂志，2014，35(2)：60-61.

[8] 陈菁，郑伟，王谈笑，等. 钩苞大丁草高通量转录组测序及差异表达分析[J]. 西北植物学报，2017，37(3)：470-477.

[9] 俞琰，王西朝，张瑞云，等. 云南野生火草纤维及其绒网的结构与性能[J]. 纺织学报，2022，43(4)：10-14，19.

[10] 刘春雪，李叶芳，关文灵. 大丁草属2种植物花粉萌发与贮藏特性研究[J]. 江苏农业科学，2019，47(11)：173-176.

[11] 赵紫薇，赵程成，徐鑫梅，等. 藏药圆柏HPLC指纹图谱的建立及不同品种模式识别研究[J]. 中草药，2023，54(2)：663-669.

[12] 范鑫玉，吉田，笔雪艳，等. 中药指纹图谱分类及评价概述[J]. 黑龙江医药，2023，36(6)：1254-1258.

[13] 干志强，熊双凤，钟镥，等. 藏药鸭嘴花的指纹图谱建立、化学模式识别及含量测定[J]. 中国药房，2022，33(14)：1712-1717.

[14] 李佳丽. 花椒毒素衍生物的设计、合成及舒张血管活性研究[D]. 延吉：延边大学，2019.

[15] 李倩，张洁，雷凤梅，等. 核桃花中绿原酸、新绿原酸和隐绿原酸的提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报，2024，15(11)：284-293.

[16] 林登蕃，郑志豪，周映君，等. 植物基食品中多酚的生物转化及生物活性研究进展[J]. 食品科学，2024，45(14)：319-327.

[17] 庾丽峰，丘琴，甄丹丹，等.HPLC同时测定龙利叶抗炎活性部位中的原儿茶酸和咖啡酸[J].华西药学杂志，2020，35(6)：640-643.

[18] 王娇，徐家怡，左雅敏，等.HPLC法同时测定五味霍香片中6种成分[J].中成药，2018，40(10)：2198-2201.

[19] CHEN Z X，YING X X，MENG S，et al. LC determination of luteolin-7-O-β-D-glucoside and apigenin-7-O-β-D-glucoside in rat plasma after administration of *Humulus scandens* extract and its application to pharmacokinetic studies[J]. Nat Prod Res，2012，26(6)：530-539.

[20] 庆伟霞，王悠悠，王艳艳，等. 高速逆流色谱法分离忍冬叶中木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷和忍冬苷[J]. 中国医药工业杂志，2015，46(2)：145-148.

[21] 赵磊，夏鹏飞，张艳，等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法测定金沙绢毛菊中木犀草素和木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖苷的含量[J]. 中国医院药学杂志，2011，31(6)：511-513.

[22] 赖立勇，夏天爽，徐圣焱，等. 中药青蒿抗氧化活性的谱效关系研究[J]. 药学实践与服务，2024，42(5)：203-210，216.

[23] 王永. 云南省永仁县国家水土保持示范县创建思考[J]. 中国水土保持，2025(1)：86-88.

（收稿日期：2024-12-16　修回日期：2025-04-10）

（编辑：胡晓霖）