

一测多评法同时测定不同产地墨旱莲中 9 种成分及其质量评价研究

刘颖新, 冯传平, 刘利利, 孔兴欣, 田青青(湖南中医药高等专科学校药学院, 湖南 株洲 412012)

摘要: 目的 建立一测多评法同时测定墨旱莲中 9 种成分, 并对不同产地墨旱莲质量进行综合评价。方法 采用 HPLC, 使用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL, 柱温维持在 25 °C, 检测波长 210, 349 nm。以蟛蜞菊内酯为内参物, 计算其他 8 个成分的相对校正因子, 并计算含量, 同时采用外标法测定墨旱莲中 9 种成分的含量, 比较一测多评法计算值与外标法实测值的差异。采用灰色关联度法构建墨旱莲质量的灰色关联质量评价模型。结果 以蟛蜞菊内酯为内参物测得的其他成分相对校正因子系统适应性良好, 一测多评法得到的结果与实测值之间无显著性差异。不同产地墨旱莲相对关联度范围为 0.440~0.747, 说明各产地墨旱莲的质量存在差异。结论 建立的一测多评法适合于墨旱莲多成分含量测定, 基于灰色关联度模型可以更客观地评价不同产地墨旱莲的质量。

关键词: 墨旱莲; 产地; 一测多评法; 灰色关联分析; 质量评价

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)18-2339-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.18.007

引用本文: 刘颖新, 冯传平, 刘利利, 等. 一测多评法同时测定不同产地墨旱莲中 9 种成分及其质量评价研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(18): 2339-2346.

Study on Simultaneous Determination of 9 Components in Eclipta Herba from Different Growing Areas by QAMS Method and It's Quality Evaluation

LIU Yingxin, FENG Chuanping, LIU Lili, KONG Xingxin, TIAN Qingqing(College of Pharmacy, Hunan Traditional Chinese Medical College, Zhuzhou 412012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a quantitative analysis of multi-components by single-marker(QAMS) method for the simultaneous content determination of 9 components in Ecliptae Herba, and to comprehensively evaluate the quality of Ecliptae Herba from different growing areas. **METHODS** An Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used in the HPLC assay. Acetonitrile-0.2% phosphoric acid aqueous solution with gradient elution was employed as the mobile phase. The flow rate was 1 mL·min⁻¹, the injection volume was 20 μL, the column temperature was maintained at 25 °C and the detection wavelength was 210, 349 nm. Wedelolactone was used as the internal reference substance to calculate the relative correction factors of the other eight constituents and calculate their contents accordingly. Moreover, the external standard method was used to quantify the 9 components in Ecliptae Herba. Comparison of the difference between the QAMS and external standard method was made. The grey correlation quality evaluation model of Ecliptae Herba was established by grey correlation analysis. **RESULTS** The relative correction factors of other components measured with wedelolactone as internal reference had good system adaptability, and there was no significant difference between the results obtained by QAMS and the measured values. The relative correlation degree of Ecliptae Herba from different growing areas ranged from 0.440 to 0.747, indicating that there were differences in the quality of Ecliptae Herba from different growing areas. **CONCLUSION** The established QAMS method is suitable for the content determination of multi index components of Ecliptae Herba. Based on the grey correlation model, the quality of Ecliptae Herba from different growing areas can be evaluated more objectively.

KEYWORDS: Ecliptae Herba; growing areas; quantitative analysis of multi-components by single-marker; grey correlation analysis; quality evaluation

墨旱莲为菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分, 收载于中国药典 2020 年版一部, 具有滋补肝肾、凉血止血之功效^[1]。中国药典 2020 年版中以蟛蜞菊内酯作为指标对墨旱莲的品质进行控制, 但中药所表现出来的生理功效往往是多

种成分共同作用的结果, 中药成分的复杂性也决定了在质量控制过程中不能仅以一两个指标性成分含量的高低表征中药的整体质量。近年来, 采用多指标成分分析对中药材质量进行控制已成为共识, 但在定性过程中对照品的价格、种类、质

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2019JJ70007); 湖南省中医药科研计划项目(2020029); 湖南省教育厅科学研究项目(20C1441)

作者简介: 刘颖新, 男, 硕士, 副教授 E-mail: liuyx412@163.com

量等也是中药多指标评价需要面对的问题。本研究根据文献^[2-3]尝试建立一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS)同时测定墨旱莲中 9 种成分,并与外标法(external standard method, ESM)实测值进行比较,希望提升墨旱莲质量控制水平的同时降低检测成本。灰色关联度分析作为一种多因素统计分析的方法,目前在中药质量评价中应用较为广泛,本研究在对墨旱莲多指标成分定量基础上,采用灰色关联分析对不同产地的墨旱莲质量进行综合评价,以期对墨旱莲质量整体提升提供实验依据。

1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪,配 SPD-M20A 检测器(日本岛津公司);Agilent 1260 型高效液相色谱仪配 1260 VWD 检测器、Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)均购自 Agilent 科技公司;Phenomenex Luna C₁₈(2) 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(天津博纳艾杰尔科技有限公司);Xbridge C₁₈(2) 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(美国 Waters 公司);AE240 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。KQ3200DE 型数控超声提取仪(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q 型超纯水系统(Millipore 公司)。

20 批墨旱莲饮片购自全国多家饮片生产企业,经湖南中医药高等专科学校药学院冯传平教授鉴定为菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分,厂家及批号见表 1。对照品木犀草苷(批号:PS011538)、芹菜素-7-*O*-β-葡萄糖苷(批号:PS011186)、槲皮素(批号:PS010462)、蟛蜞菊内酯(批号:PS000724)、旱莲苷 A(批号:PS000410)均购自成都普思生物科技股份有限公司,纯度均>98.0%;蒙花苷(批号:GZDD-0162)、木犀草素(批号:GZDD-0040)、芹菜素(批号:GZDD-003)、齐墩果酸(批号:GZDD-0043)均购自贵州迪大科技有限公司,纯度均≥98%;乙腈为色谱纯(美国 TEDIA 公司);水为超纯水;其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent 1260 型高效液相色谱仪;色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.2%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~15 min, 22%→25%A; 15~23 min, 25%→28%A; 23~33 min, 28%→30%A;

33~40 min, 30%→35%A; 40~42 min, 35%→50%A; 42~52 min, 50%→55%A; 52~55 min, 55%→90%A; 55~70 min, 90%→95%A);于 349 nm 下检测木犀草苷、芹菜素-7-*O*-β-葡萄糖苷、蒙花苷、木犀草素、槲皮素、蟛蜞菊内酯和芹菜素,210 nm 下检测旱莲苷 A 和齐墩果酸;流速 1 mL·min⁻¹;柱温 25 ℃;进样量 20 μL。

表 1 墨旱莲饮片信息

Tab. 1 Sample information of *Ecliptae Herba* prepared slices

编号	生产厂家	批号	产地
S1	湖南衡岳中药饮片有限公司	20052105	湖南
S2	安国市广济堂药业有限责任公司	20051504	河南
S3	安国市广济堂药业有限责任公司	20072601	河南
S4	湖南君昊中药饮片科贸有限公司	200501	湖南
S5	湖南松龄堂中药饮片有限公司	200301	湖北
S6	湖南三湘中药饮片有限公司	2020042901	湖南
S7	湖南衡岳中药饮片有限公司	20083106	湖南
S8	普宁市泽群中药饮片有限公司	200301	河南
S9	安徽惠丰国药有限公司	201101	安徽
S10	广东联丰中药饮片有限公司	190801	广东
S11	西安中药饮片厂有限公司	201201	陕西
S12	河北康派中药材有限公司	200603	河北
S13	四川新荷花中药饮片有限公司	1912110	四川
S14	吉林山林百草商贸有限公司	201218	吉林
S15	四川藏曦堂生物科技有限公司	210208	四川
S16	安国市瑞琪中药材有限公司	20210101	河北
S17	亳州市京皖中药饮片厂	201001	安徽
S18	南京海源中药饮片有限公司	200501	江苏
S19	亳州众益堂中药材销售有限公司	20210204	江苏
S20	亳州亳草中药材销售有限公司	20210111	河南

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取木犀草苷、芹菜素-7-*O*-β-葡萄糖苷、蒙花苷、木犀草素、槲皮素、蟛蜞菊内酯、芹菜素、旱莲苷 A 和齐墩果酸的对照品适量,加甲醇配制成质量浓度分别为 1.642, 1.443, 0.680, 0.501, 0.913, 2.362, 0.582, 1.710, 1.924 mg·mL⁻¹ 的单一对照品溶液;精密吸取上述单一对照品溶液各 1 mL,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,配制成含木犀草苷 164.2 μg·mL⁻¹、芹菜素-7-*O*-β-葡萄糖苷 144.3 μg·mL⁻¹、蒙花苷 68.0 μg·mL⁻¹、木犀草素 50.1 μg·mL⁻¹、槲皮素 91.3 μg·mL⁻¹、蟛蜞菊内酯 236.2 μg·mL⁻¹、芹菜素 58.2 μg·mL⁻¹、旱莲苷 A 171.0 μg·mL⁻¹、齐墩果酸 192.4 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液 I。精密吸取混合对照品溶液 I 适量,依次用甲醇稀释 2, 5, 10, 25, 50 倍,分别作为混合对照品溶液 II, III, IV, V, VI。

2.2.2 供试品溶液 取墨旱莲粉末适量, 过 60 目筛(筛孔内径 0.3 mm), 精密称取 2.0 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入无水乙醇 25 mL, 称量, 经超声法提取(150 W, 40 kHz)1 h, 放冷, 用无水乙醇补足减失的量, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 精密吸取“2.2”项下供试品溶液、对照品溶液适量, 按“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 1。结果显示, 各目标成分分离度 >1.5 , 理论板数均 $\geq 4\,000$ 。表明方法专属性良好。

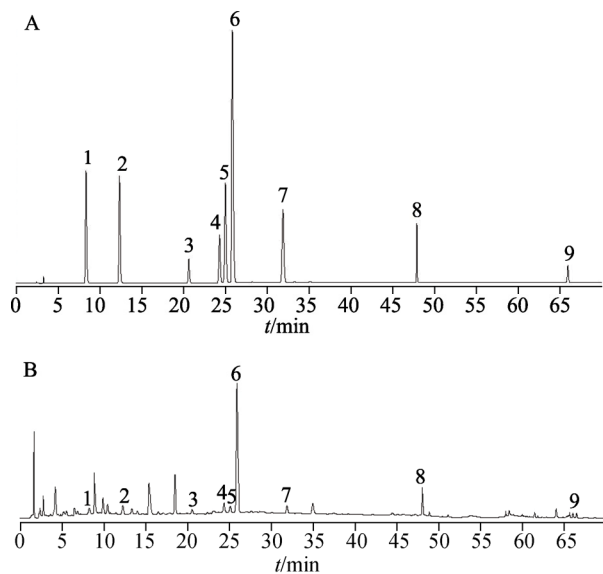


图 1 各成分高效液相色谱图
A-混合对照品; B-墨旱莲供试品; 1-木犀草苷; 2-芹菜素-7-*O*- β -葡萄糖苷; 3-蒙花苷; 4-木犀草素; 5-槲皮素; 6-蟛蜞菊内酯; 7-芹菜素; 8-早莲苷 A; 9-齐墩果酸。

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents
A-mixed reference substances; B-sample of Ecliptae Herba; 1-luteoloside; 2-apigenin-7-*O*- β -glucoside; 3-buddleioside; 4-luteolin; 5-quercetin; 6-weddelolactone; 7-apigenin; 8-ecliptasaponin A; 9-oleanolic acid.

2.3.2 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下 I~VI 混合对照品溶液各 10 μL , 按“2.1”项色谱条件下

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various components

成分	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	r	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
木犀草苷	$Y=3.328\times 10^4 X-1.213\times 10^4$	3.284~164.2	0.999 8	0.178	0.464
芹菜素-7- <i>O</i> - β -葡萄糖苷	$Y=3.928\times 10^4 X+8.142\times 10^3$	2.886~144.3	1.000 0	0.135	0.377
蒙花苷	$Y=1.768\times 10^4 X+2.248\times 10^4$	1.360~68.00	0.999 3	0.262	0.819
木犀草素	$Y=5.549\times 10^4 X-4.412\times 10^3$	1.002~50.10	0.999 7	0.131	0.393
槲皮素	$Y=6.658\times 10^4 X-7.785\times 10^3$	1.826~91.30	1.000 0	0.170	0.596
蟛蜞菊内酯	$Y=6.663\times 10^4 X-3.353\times 10^4$	4.724~236.2	0.999 8	0.115	0.332
芹菜素	$Y=5.736\times 10^4 X-3.502\times 10^3$	1.164~58.20	0.999 9	0.097	0.283
早莲苷 A	$Y=4.815\times 10^3 X-2.394\times 10^3$	3.420~171.0	0.999 5	0.128	0.459
齐墩果酸	$Y=4.367\times 10^3 X+1.857\times 10^2$	3.848~192.4	0.999 4	0.065	0.202

进样测定, 以对照品的浓度为横坐标(X), 色谱峰面积为纵坐标(Y), 进行线性回归, 结果显示, 各成分在各自浓度范围内线性关系良好。结果见表 2。

2.3.3 仪器精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液 I, 按“2.1”项下色谱条件进样测定 6 次, 测得木犀草苷、芹菜素-7-*O*- β -葡萄糖苷、蒙花苷、木犀草素、槲皮素、蟛蜞菊内酯、芹菜素、早莲苷 A 和齐墩果酸峰面积的 RSD 分别为 1.2%, 0.97%, 0.89%, 0.76%, 0.93%, 0.95%, 1.1%, 0.92%, 0.85%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取同一批墨旱莲样品(批号: 20052105)6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, ESM 测得木犀草苷、芹菜素-7-*O*- β -葡萄糖苷、蒙花苷、木犀草素、槲皮素、蟛蜞菊内酯、芹菜素、早莲苷 A 和齐墩果酸的平均含量分别为 0.916, 1.510, 1.027, 0.231, 0.190, 2.414, 0.029, 1.582, 0.199 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; RSD 分别为 1.1%, 1.5%, 1.2%, 0.4%, 0.96%, 0.92%, 0.89%, 1.3%, 1.2%。结果表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液(批号: 20052105), 室温下于 0, 2, 4, 8, 12, 16 h, 按“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得木犀草苷、芹菜素-7-*O*- β -葡萄糖苷、蒙花苷、木犀草素、槲皮素、蟛蜞菊内酯、芹菜素、早莲苷 A 和齐墩果酸峰面积的 RSD 分别为 1.3%, 0.94%, 0.86%, 0.97%, 1.1%, 0.88%, 1.2%, 0.82%, 1.1%, 表明供试品溶液在 16 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取同一批次已知含量的墨旱莲粉末(批号: 20052105)适量, 共取 9 份, 每份约 1.5 g, 分成 3 组, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入另行配制的混合对照品溶液(蟛蜞菊内酯 1.811 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、木犀草苷 0.687 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、芹菜素-7-*O*- β -葡萄糖苷 1.133 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、蒙花苷

0.770 mg·mL⁻¹、木犀草素 0.173 mg·mL⁻¹、槲皮素 0.143 mg·mL⁻¹、芹菜素 0.022 mg·mL⁻¹、早莲苣 A 1.187 mg·mL⁻¹和齐墩果酸 0.299 mg·mL⁻¹)1.5, 2.0, 2.5 mL, 各 3 份。按“2.2.2”项下方法制备供试溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 计算各成分加样回收率。结果蟛蜞菊内酯、木犀草素、芹菜素-7-O-β-葡萄糖苷、蒙花苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、早莲苣 A 和齐墩果酸的加样回收率分别为 101.2%, 99.5%, 100.3%, 97.7%, 98.2%, 100.9%, 98.8%, 101.7%, 99.1%; RSD 分别为 1.1%, 0.98%, 0.96%, 1.3%, 1.2%, 0.93%, 0.89%, 1.2%, 0.85%。

2.4 计算相对校正因子

精密吸取“2.3.2”项下线性溶液适量, 按“2.1”项色谱条件下进样测定, 以蟛蜞菊内酯为内参物, 根据公式: $f_{si}=f_s/f_i=(m_i \times A_s)/(m_s \times A_i)$, 式中 f_i 为待测物 i 的绝对校正因子, f_s 为内参物 s 的绝对校正因子, m_i 和 m_s 分别为待测物质 i 和内参物 s 的质量 (μg), A_i 和 A_s 分别为待测物质 i 和内参物 s 的色谱峰面积, 计算其他 8 种成分的相对校正因子, 结

果见表 3。

2.4.1 不同仪器和色谱柱的考察 取“2.2.1”项下混合对照品溶液 I, 分别考察不同型号色谱仪 (SHIMADZU LC-20AT、Agilent 1260 高效液相色谱仪) 和不同型号色谱柱 [Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Phenomenex Luna C₁₈(2) 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Xbridge C₁₈(2) 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)] 对相对校正因子的影响, 结果表明不同高效液相色谱仪及色谱柱对相对校正因子无显著影响, 见表 4。

2.4.2 不同流速的考察 取“2.2.1”项下混合对照品溶液 I, 采用岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱, 考察不同流速对相对校正因子的影响, 结果表明不同流速对相对校正因子无显著影响, 结果见表 5。

2.4.3 不同柱温的考察 取“2.2.1”项下混合对照品溶液 I, 采用岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱, 考察不同柱温对相对校正因子的影响, 结果表明不同柱温对相对校正因子无显著影响, 结果见表 6。

表 3 蟛蜞菊内酯对各成分的相对校正因子

Tab. 3 Relative correction factors of wedelolactone to various constituents

混合对照品溶液	相对校正因子							
	木犀草素	芹菜素-7-O-β-葡萄糖苷	蒙花苷	木犀草素	槲皮素	芹菜素	早莲苣 A	齐墩果酸
VI	1.853 8	1.326 7	2.344 7	1.147 7	1.479 5	0.956 9	8.578 7	6.949 6
V	1.864 4	1.328 9	2.387 6	1.142 9	1.464 0	0.950 2	8.510 6	6.957 2
IV	1.845 8	1.312 4	2.372 1	1.128 4	1.465 6	0.962 9	8.521 2	6.948 6
III	1.869 7	1.315 1	2.369 9	1.153 6	1.471 7	0.957 7	8.517 7	6.901 9
II	1.875 1	1.320 8	2.368 5	1.129 6	1.477 4	0.958 1	8.568 3	6.905 8
I	1.854 2	1.311 9	2.360 3	1.150 6	1.461 2	0.969 4	8.560 9	6.900 7
平均值	1.865 0	1.319 3	2.367 2	1.142 1	1.469 9	0.959 2	8.542 9	6.927 3
RSD/%	0.60	0.56	0.60	0.94	0.51	0.64	0.35	0.39

表 4 不同仪器、色谱柱对相对校正因子的影响

Tab. 4 Effects of different instruments and columns on relative correction factors

仪器	色谱柱	相对校正因子							
		木犀草素	芹菜素-7-O-β-葡萄糖苷	蒙花苷	木犀草素	槲皮素	芹菜素	早莲苣 A	齐墩果酸
Agilent 1260	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C ₁₈	1.846 5	1.312 1	2.365 2	1.136 9	1.463 3	0.958 9	8.521 0	6.930 0
	Phenomenex Luna C ₁₈ (2)	1.858 1	1.335 4	2.331 7	1.150 6	1.450 2	0.971 0	8.580 9	6.961 2
	Xbridge C ₁₈ (2)	1.832 0	1.319 9	2.370 1	1.127 7	1.475 6	0.942 4	8.514 7	6.906 4
SHIMADZU LC-20AT	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C ₁₈	1.853 3	1.327 3	2.372 3	1.131 4	1.467 0	0.957 3	8.515 6	6.909 9
	Phenomenex Luna C ₁₈ (2)	1.848 9	1.330 1	2.368 8	1.145 0	1.469 8	0.968 1	8.568 1	6.977 0
	Xbridge C ₁₈ (2)	1.866 7	1.312 5	2.335 9	1.120 3	1.462 4	0.952 1	8.573 2	6.958 3
平均值	—	1.850 9	1.322 9	2.357 3	1.135 3	1.464 7	0.958 3	8.545 6	6.940 5
RSD/%	—	0.63	0.73	0.78	0.99	0.59	1.10	0.37	0.42

表 5 不同流速对相对校正因子的影响

Tab. 5 Effects of different flow rates on relative correction factors

流速/ mL·min ⁻¹	相对校正因子							
	木犀草苷	芹菜素-7-O-β-葡萄糖苷	蒙花苷	木犀草素	槲皮素	芹菜素	旱莲苷 A	齐墩果酸
0.9	1.870 5	1.302 2	2.373 7	1.138 0	1.458 3	0.968 1	8.571 3	6.949 6
1.0	1.821 1	1.330 9	2.349 4	1.152 3	1.475 0	0.954 6	8.520 9	6.965 4
1.1	1.837 6	1.328 4	2.350 1	1.147 8	1.471 1	0.950 4	8.513 7	6.902 0
平均值	1.843 1	1.320 5	2.357 7	1.146 0	1.468 1	0.957 7	8.535 3	6.939 0
RSD/%	1.40	1.20	0.59	0.64	0.60	0.97	0.37	0.48

表 6 不同柱温对相对校正因子的影响

Tab. 6 Effects of different column temperatures on relative correction factors

柱温/℃	相对校正因子							
	木犀草苷	芹菜素-7-O-β-葡萄糖苷	蒙花苷	木犀草素	槲皮素	芹菜素	旱莲苷 A	齐墩果酸
20	1.8676	1.3378	2.3702	1.1483	1.4755	0.9686	8.5144	6.9008
25	1.8350	1.3122	2.3414	1.1247	1.4627	0.9613	8.5770	6.9298
30	1.8564	1.3291	2.3679	1.1399	1.4601	0.9534	8.5203	6.9571
平均值	1.8530	1.3264	2.3598	1.1376	1.4661	0.9611	8.5372	6.9292
RSD/%	0.89	0.98	0.68	1.10	0.56	0.79	0.40	0.41

2.5 待测成分色谱峰的定位

以蟛蜞菊内酯色谱峰为参照,分别计算待测成分木犀草苷、芹菜素-7-O-β-葡萄糖苷、蒙花苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、旱莲苷 A 和齐墩果酸的相对保留时间,公式为 $r_{is}=t_{Ri}/t_{Rs}$, 式中 r_{is} 为待测物 i 与内参物 s 的保留时间的比值(即相对保留时间), t_{Ri} 和 t_{Rs} 分别为待测物 i 和内参物 s 的保留时间。通过考察各待测成分相对保留时间在不同高效液相色谱仪和色谱柱中的重现性,结果表明各待测成分相对保留时间波动较小,差异无统计学意义,结果见表 7。

2.6 样品含量测定

取表 1 中 20 批墨旱莲饮片,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项色谱条件下进

样测定,分别采用 ESM 和 QAMS 计算含量,结果显示 2 种方法差异无统计学意义,根据公式相对平均偏差(RAD)=($\bar{d}/\bar{x}$)×100%($\bar{d}$ 为平均偏差, $\bar{x}$ 为平均值),得各成分 RAD<2.0%。结果见表 8。

3 灰色关联分析法对不同产地墨旱莲样品质量的综合评价

依据各产地墨旱莲 9 种成分 ESM 实测值,采用灰色关联分析法构建墨旱莲质量的灰色关联评价模型。计算各样品相对于最优参考序列和最差参考序列的关联系数,以及相对于最优参考序列关联度和相对关联度,参照夏慧敏等^[4]文献报道的方法进行计算,结果显示,不同产地墨旱莲品质排名前 5 位依次为 S20>S9>S2>S16>S11。结果见表 9。

表 7 各成分相对保留时间

Tab. 7 Relative retention time of various constituents

仪器	色谱柱	相对保留时间							
		木犀草苷	芹菜素-7-O-β-葡萄糖苷	蒙花苷	木犀草素	槲皮素	芹菜素	旱莲苷 A	齐墩果酸
Agilent 1260	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C ₁₈	0.324 5	0.478 9	0.807 7	0.940 9	0.968 0	1.235 6	1.852 9	2.548 8
	Phenomenex Luna C ₁₈ (2)	0.321 0	0.485 1	0.812 1	0.947 0	0.961 1	1.245 7	1.869 7	2.562 1
	Xbridge C ₁₈ (2)	0.319 3	0.470 6	0.817 4	0.932 8	0.974 2	1.231 0	1.850 1	2.540 7
SHIMADZU LC-20AT	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C ₁₈	0.326 6	0.476 4	0.805 0	0.930 2	0.956 0	1.237 6	1.846 6	2.535 9
	Phenomenex Luna C ₁₈ (2)	0.324 9	0.480 9	0.818 9	0.946 0	0.962 3	1.240 1	1.861 0	2.544 0
	Xbridge C ₁₈ (2)	0.326 7	0.471 8	0.820 6	0.929 9	0.950 5	1.233 9	1.840 4	2.531 1
平均值	—	0.323 8	0.477 3	0.813 6	0.937 8	0.962 0	1.237 3	1.853 5	2.543 8
RSD/%	—	0.94	1.20	0.78	0.84	0.87	0.42	0.57	0.43

表 8 各成分含量测定结果($n=3$)Tab. 8 Results of content determination of various constituents($n=3$) $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

样品	蟛蜞菊内酯 ESM	木犀草苷			芹菜素-7- <i>O</i> - β -葡萄糖苷			蒙花苷			木犀草素		
		ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%
S1	2.414	0.916	0.898	0.99	1.510	1.529	0.63	1.027	1.016	0.54	0.231	0.235	0.89
S2	4.700	1.290	1.281	0.35	1.942	1.973	0.79	0.847	0.864	0.99	0.417	0.414	0.36
S3	2.533	1.686	1.647	1.17	1.771	1.761	0.28	0.553	0.550	0.27	0.312	0.309	0.48
S4	3.589	1.905	1.883	0.58	1.297	1.288	0.35	1.247	1.232	0.61	0.262	0.261	0.19
S5	1.197	0.923	0.927	0.22	0.800	0.814	0.87	0.549	0.538	1.01	0.157	0.153	1.29
S6	2.218	0.547	0.532	1.39	0.677	0.662	1.12	0.552	0.547	0.45	0.238	0.233	1.06
S7	3.810	1.617	1.630	0.40	1.744	1.749	0.14	0.723	0.718	0.35	0.293	0.296	0.51
S8	2.699	1.077	1.084	0.32	1.576	1.561	0.48	1.775	1.759	0.45	0.230	0.227	0.66
S9	4.277	1.609	1.615	0.19	2.108	2.120	0.28	2.442	2.451	0.18	0.408	0.411	0.37
S10	1.860	1.004	0.997	0.35	0.800	0.793	0.44	0.573	0.564	0.79	0.243	0.244	0.21
S11	2.942	1.493	1.486	0.23	0.789	0.795	0.38	2.050	2.041	0.22	0.446	0.440	0.68
S12	4.840	1.369	1.348	0.77	1.839	1.828	0.30	0.680	0.682	0.15	0.287	0.289	0.35
S13	1.935	1.010	1.025	0.74	1.109	1.084	1.14	0.673	0.679	0.44	0.196	0.201	1.26
S14	3.450	1.425	1.414	0.39	1.138	1.144	0.26	1.394	1.390	0.14	0.373	0.371	0.27
S15	2.281	0.944	0.949	0.26	1.624	1.648	0.73	0.749	0.751	0.13	0.232	0.229	0.65
S16	5.135	3.494	3.507	0.19	1.031	1.039	0.39	1.156	1.130	1.14	0.329	0.328	0.15
S17	3.245	1.319	1.333	0.53	1.249	1.251	0.08	0.762	0.757	0.33	0.263	0.266	0.57
S18	3.369	1.257	1.271	0.55	1.280	1.274	0.23	0.520	0.536	1.02	0.283	0.278	0.89
S19	3.424	1.278	1.294	0.62	1.613	1.633	0.62	0.738	0.731	0.48	0.266	0.264	0.38
S20	4.720	1.726	1.714	0.35	1.468	1.475	0.24	2.076	2.064	0.29	0.424	0.420	0.47

样品	槲皮素			芹菜素			早莲苷 A			齐墩果酸		
	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%	ESM	QAMS	RAD/%
S1	0.190	0.191	0.26	0.029	0.028	1.75	1.582	1.577	0.16	0.399	0.402	0.37
S2	0.238	0.235	0.63	0.030	0.029	1.69	2.881	2.868	0.23	0.741	0.749	0.54
S3	0.162	0.159	0.93	0.016	0.016	0	1.466	1.449	0.58	0.738	0.757	1.30
S4	0.249	0.252	0.60	0.028	0.029	1.75	2.270	2.254	0.35	0.250	0.243	1.40
S5	0.104	0.110	1.50	0.012	0.012	0	2.352	2.317	0.75	0.285	0.284	0.18
S6	0.176	0.175	0.28	0.016	0.016	0	2.682	2.671	0.21	0.790	0.810	1.30
S7	0.245	0.244	0.20	0.026	0.027	1.88	2.385	2.354	0.65	0.349	0.355	0.85
S8	0.165	0.168	0.90	0.018	0.018	0	2.962	2.955	0.12	0.409	0.415	0.73
S9	0.276	0.274	0.36	0.034	0.035	1.44	1.662	1.623	1.19	0.238	0.236	0.42
S10	0.131	0.128	1.20	0.013	0.013	0	2.328	2.310	0.39	0.334	0.340	0.89
S11	0.243	0.240	0.62	0.056	0.057	0.88	1.771	1.766	0.14	0.217	0.211	1.40
S12	0.228	0.226	0.44	0.015	0.015	0	2.246	2.223	0.51	0.341	0.338	0.44
S13	0.131	0.134	1.10	0.013	0.013	0	1.163	1.141	0.95	0.290	0.285	0.87
S14	0.231	0.232	0.22	0.045	0.044	1.12	1.131	1.137	0.26	0.346	0.339	1.00
S15	0.181	0.184	0.82	0.017	0.017	0	4.121	4.134	0.16	0.390	0.391	0.13
S16	0.300	0.297	0.50	0.038	0.037	1.33	1.801	1.810	0.25	0.116	0.120	1.70
S17	0.219	0.216	0.69	0.022	0.022	0	2.566	2.573	0.14	0.391	0.387	0.51
S18	0.193	0.191	0.52	0.019	0.019	0	2.644	2.668	0.45	0.551	0.549	0.18
S19	0.176	0.180	1.10	0.017	0.017	0	2.364	2.350	0.30	0.445	0.438	0.79
S20	0.298	0.300	0.33	0.042	0.043	1.18	2.063	2.044	0.46	0.660	0.671	0.83

表9 各样品相对于最优参考序列的关联系数、关联度、相对关联度及排序

Tab. 9 Correlation coefficient, correlation degree, relative correlation degree and ranking of each sample relative to the optimal reference sequence

样品	关联系数									关联度	相对关联度	排序
	蟛蜞菊内酯	木犀草苷	芹菜素-7-O- β -葡萄糖苷	蒙花苷	木犀草素	槲皮素	芹菜素	早莲苷 A	齐墩果酸			
S1	0.420	0.364	0.545	0.404	0.402	0.471	0.443	0.371	0.463	0.816	0.567	16
S2	0.819	0.401	0.811	0.376	0.833	0.612	0.453	0.547	0.873	1.181	0.713	3
S3	0.431	0.449	0.679	0.337	0.519	0.415	0.350	0.360	0.867	0.931	0.597	12
S4	0.560	0.481	0.469	0.446	0.440	0.657	0.434	0.447	0.384	0.897	0.621	8
S5	0.333	0.364	0.354	0.337	0.333	0.333	0.328	0.458	0.400	0.683	0.440	20
S6	0.403	0.333	0.333	0.337	0.410	0.441	0.350	0.509	1.000	0.870	0.546	17
S7	0.598	0.440	0.663	0.359	0.486	0.641	0.418	0.463	0.433	0.934	0.632	6
S8	0.447	0.379	0.573	0.591	0.401	0.421	0.361	0.563	0.469	0.885	0.604	10
S9	0.696	0.439	1.000	1.000	0.792	0.803	0.494	0.378	0.379	1.252	0.722	2
S10	0.376	0.372	0.354	0.340	0.416	0.367	0.333	0.455	0.425	0.722	0.487	18
S11	0.473	0.424	0.352	0.710	1.000	0.632	1.000	0.389	0.370	1.136	0.674	5
S12	0.870	0.410	0.726	0.353	0.476	0.577	0.344	0.444	0.429	0.932	0.615	9
S13	0.381	0.372	0.417	0.352	0.366	0.367	0.333	0.336	0.403	0.697	0.467	19
S14	0.539	0.416	0.425	0.478	0.665	0.587	0.662	0.333	0.432	0.948	0.628	7
S15	0.408	0.366	0.596	0.362	0.403	0.451	0.355	1.000	0.457	0.932	0.600	11
S16	1.000	1.000	0.399	0.428	0.553	1.000	0.544	0.392	0.333	1.144	0.679	4
S17	0.510	0.404	0.454	0.364	0.441	0.547	0.387	0.490	0.458	0.844	0.590	13
S18	0.527	0.397	0.464	0.333	0.470	0.478	0.368	0.503	0.585	0.858	0.586	14
S19	0.535	0.399	0.591	0.361	0.445	0.441	0.355	0.460	0.494	0.847	0.585	15
S20	0.825	0.455	0.528	0.724	0.869	0.979	0.606	0.421	0.722	1.270	0.747	1

4 讨论

4.1 指标成分和内参物的选择

现代药理研究表明,墨旱莲具有免疫调节、保肝、抗炎、抗氧化等药理作用。其中木犀草苷、木犀草素、槲皮素、芹菜素、早莲苷 A 和齐墩果酸均具有抗肿瘤活性^[5-10]。蒙花苷有抗衰老和舒张血管作用^[11]。芹菜素-7-O- β -葡萄糖苷具有抗炎活性^[12]。蟛蜞菊内酯具有保肝、抗免疫抑制等活性^[13]。因此,本研究选择了以上 9 种成分进行同时测定。

选择蟛蜞菊内酯作为本次实验的内参,主要依据以下几方面考虑。首先,蟛蜞菊内酯在 9 种成分中含量最高,易于识别,且性质稳定、价格相对便宜。其次,蟛蜞菊内酯保留时间处于色谱图中位,有利于其他成分色谱峰的相对保留时间计算。

4.2 色谱条件优选

在流动相的选择上,比较了甲醇、乙腈与水 and 不同比例磷酸溶液之间的组合,结果发现适量的磷酸可改善实验过程中色谱峰的峰形。使用甲醇作为流动相时,各成分保留时间较长。因此,选择乙腈-磷酸溶液作为洗脱剂。同时对不同浓度

的磷酸溶液(0.05%, 0.1%, 0.2%)进行了考察,结果显示使用 0.05%和 0.1%的磷酸溶液时,个别色谱峰峰形不对称,故选择乙腈-0.2%磷酸溶液作为流动相。

通过紫外扫描显示,齐墩果酸、早莲苷 A 最大吸收波长为 210 nm。木犀草苷、芹菜素-7-O- β -葡萄糖苷、蒙花苷、木犀草素、槲皮素、蟛蜞菊内酯和芹菜素的最大吸收波长均在 349 nm 左右(分别为 349, 350, 334, 349, 349, 351, 340 nm),故选取 349 nm 作为 7 种成分的测定波长。

4.3 供试品溶液制备方法选择

本实验考察了不同提取方式(超声法、回流法)、不同提取时间(1, 1.5, 2.0 h)和不同提取溶剂(甲醇、无水乙醇、90%甲醇、70%甲醇、80%乙醇、60%乙醇)对结果的影响,结果显示超声法和回流法对提取结果影响不大。甲醇和无水乙醇可以整体提高目标成分的溶出度,但区别不大。3 种提取时间对结果影响差异不显著。故选择毒性较低的无水乙醇超声提取 1 h 作为供试品溶液制备方法。

4.4 小结

中药质量多指标综合评价的科学性和准确性是中药现代化的重要环节。目前, QAMS 在中药材、饮片及复方制剂中的相关应用研究较多^[14-17]。该方法在缺少对照品的情况下可以实现多指标含量分析。本实验结果表明, QAMS 计算的含量结果与 ESM 测定结果差异不显著, 可以在缺少对照品的情况下, 通过相对校正因子计算含量。灰色关联分析能够排除主观干扰, 根据各个指标与评价主体的关联程度, 得出各个主体的总体优劣评价排序, 提高了中药质量多指标综合评价的科学性。但本实验也存在不足之处, 例如, 选取的 9 种指标性成分虽然均是墨旱莲中经现代药理研究证实的活性成分, 但仍有诸如刺囊酸、金合欢素、山柰酚等墨旱莲中的其他活性成分未同时测定。此外, 在中药品质评价过程中, 除了考察有效成分含量, 还需与药效作用相结合, 从多个角度对中药品质作出合理、准确的评判, 以上不足之处在以后的研究中需要进一步完善。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 391.
- [2] WANG Z M, GAO H M, FU X T, et al. Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(23): 1925-1928.
- [3] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.
- [4] XIA H M, ZHANG H W, BAI Y X, et al. Evaluation of the quality of different batches of *Terminalia chebula* Retz. based on HPLC fingerprint technology and grey relational analysis[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(12): 1448-1453.
- [5] WANG T T, WANG S K, HUANG G L, et al. Inhibition of luteoloside on proliferation of human esophageal carcinoma cell line Eca109 and its mechanism[J]. China Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44(12): 1604.
- [6] YI J L, HOU K M, CHEN R. Effects of luteolin on proliferation and apoptosis of human ovarian cancer cell line SKOV3[J]. Tradit Chin Drug Res Pharmacol(中药新药与临床药理), 2020, 31(2): 125-133.
- [7] PANG L R, CHEN J, LU J E, et al. Effect of quercetin on proliferation, migration and invasion in colon cancer SW480 cells with HSP-27 knockdown and its mechanism[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2021, 44(6): 1468-1474.
- [8] CHEN X Y, FU C L. Effect of apigenin on rat osteosarcoma apoptosis and Bax, Bcl-2, caspase-3, caspase-9, and cyt-C proteins[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(15): 139-142.
- [9] DU G Q, ZHANG Y L, HU X H. Study on the effects of oleanolic acid on the proliferation, invasion and metastasis of human ovarian cancer SKOV3 cells and its mechanism[J]. J China Pharm(中国药房), 2020, 31(10): 1190-1197.
- [10] LI S Y, DING Y H, HUANG H L. Effect of ecliptasaponin A on the apoptosis of HepG-2 cells[J]. J Guangdong Pharm Univ(广东药科大学学报), 2018, 34(1): 50-54.
- [11] YANG Y, CHEN B, LIANG K L, et al. Relaxation effect of buddleioside combined with luteolin on isolated vessels *in vivo* and its mechanism[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(7): 1370-1375.
- [12] WANG J J. Biological anti-inflammatory effects in active components of *Flos Chrysanthemi Indici*[J]. Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药), 2011, 28(3): 251-253.
- [13] 许静, 陈杰, 孙萍萍, 等. 蟛蜞菊内酯抗大鼠肝缺血再灌注损伤作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(9): 2058-2059.
- [14] XU X M, WU X Y, YI H, et al. Determination of 6 components in Tibetan medicine *Berberis Cortex* with quantitative analysis of multi-components by single marker[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2020, 29(24): 2852-2858.
- [15] GUO H B, DONG F Y, LI W S, et al. Determination of six flavonoids in extract of *Diospyros kaki* Thunb. leaves by QAMS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(7): 831-835.
- [16] GUO L Q, LI X, LIU Q, et al. Simultaneous quantitative analysis of six active ingredients in *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma* from different habitats by QAMS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(24): 3051-3055.
- [17] OUYANG Y T, TAN Z B, CHEN L M. Simultaneous determination of three phenolic acids in *Artemisia Japonica* by QAMS[J]. Pharm Today(今日药学), 2021, 31(1): 23-26, 31.

收稿日期: 2021-10-26

(本文责编: 蔡珊珊)