

HPLC 多指标成分定量联合化学计量学评价不同产地茜草

姜云¹, 乔春风¹, 刘华¹, 乔亚红¹, 李俊涛²

1. 郑州颐和医院 药学部, 河南 郑州 450047

2. 河南省医药科学研究所 药物研究所, 河南 郑州 450052

摘要: **目的** 建立茜草多指标成分定量联合化学计量学评价不同产地茜草的质量。**方法** 采用高效液相色谱法测定 8 省区 18 批茜草中新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇和异落叶松脂素, 并采用主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析、灰色关联度分析对测定结果进行评价。**结果** 相同产区的茜草, 质量较接近; 共找到 4 个差异性标志成分, 其影响显著性排序为大叶茜草素>茜草素>1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌>羟基茜草素; 陕西、河南和安徽所产的茜草整体质量较好。**结论** 方法便捷、准确, 易于推广, 可以更全面、更系统地评价茜草的质量。

关键词: 茜草; 大叶茜草素; 茜草素; 1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌; 羟基茜草素; 高效液相色谱; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 灰色关联度分析

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)01-0094-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.01.012

Evaluation of *Rubiae Radix* from different regions by HPLC multi index components combined with chemometrics

JIANG Yun¹, QIAO Chunfeng¹, LIU Hua¹, QIAO Yahong¹, LI Juntao²

1. Department of Pharmacy, Zhengzhou Yihe Hospital, Zhengzhou 450047, China

2. Institute of Pharmacology, Henan Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To establish a method for quality evaluation of *Rubiae Radix* by HPLC combined with chemometrics. **Methods** The contents of neohesperidin, kaempferol, alizarin, xanthopurpurin, purpurin, 1,3,6-trihydroxy-2-methylantraquinone, mollugin, dehydro- α -lapachone, β -sitosterol, and isolariciresinol in 18 batches of *Rubiae Radix* collected from 8 provinces were determined by HPLC method, and the results were analyzed by principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), and grey relational analysis (GRA) method. **Results** *Rubiae Radix* from the same production area had similar quality. A total of four differential marker components were found, and their significance was ranked as follows: mollugin > alizarin > 1,3,6-trihydroxy-2-methylantraquinone > purpurin. The overall quality of *Rubiae Radix* in Shaanxi, Henan, and Anhui Province was good. **Conclusion** The method is convenient, accurate, and easy to promote, which can comprehensively and systematically evaluate the quality of *Rubiae Radix*.

Key words: *Rubiae Radix*; mollugin; alizarin; 1,3,6-trihydroxy-2-methylantraquinone; purpurin; HPLC; PCA; OPLS-DA; GRA

茜草是茜草科植物茜草 *Rubia cordifolia* L. 的干燥全草, 可凉血、祛瘀、止血、通经, 临床上主要用于吐血、衄血、崩漏、外伤出血、瘀阻经闭、关节痹痛、跌扑肿痛^[1]。蒽醌及其苷类化合物、萘醌类、萘氢醌、黄酮类、环己肽类、多糖类和微量元素等是茜草中主要药效成分^[2-4]。现代研究表明, 茜

草具有抗肿瘤、升高白细胞、免疫调节、护肝、抗炎、抗风湿、抗氧化、止血等作用^[5-7], 并且现代研究还证明, 蒽醌类成分茜草素在体外对沙门菌、大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和变形杆菌等都具有明显的抑制作用^[4], 还用于治疗婴幼儿病毒性腹泻^[5, 8]。茜草收载于《中国药典》2020 年版

收稿日期: 2023-10-30

基金项目: 河南省医学科技攻关计划省部共建指导性计划重点项目 (SBGJ202002105)

作者简介: 姜云 (1991—), 女, 河南郑州人, 主管中药师, 本科, 研究方向为中药药物质量评价、临床药学。E-mail: ogrsmy@163.com

一部，标准中规定大叶茜草素不得少于 0.40%，羟基茜草素不得少于 0.10%。对于茜草质量研究文献仅限指纹图谱^[9-12]和 1~2 个成分的定量^[13-15]。中药是复杂的个体，所含成分多而杂，少数指标成分不能诠释其内在整体质量。主成分分析（PCA）和正交偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）是化学计量学常用的技术手段，通过对含量数据分析挖掘，查找共性和不同，对样品分组分类，发现决定产品质量的标志性成分，预测精度高^[16-19]。灰色关联度分析（GRA）可客观地对各组数据相似程度进行因素间相互关联分析，是解决多目标之间复杂关系问题的有力工具^[20-22]。PCA、OPLS-DA 和 GRA 均不存在主观因素，客观地对大量数据进行分析，非常适用于所含成分繁多的中药。本研究收集陕西、河南、安徽、河北、山东、青海、四川和西藏 8 省区共 18 个批茜草药材，采用 HPLC 法同时测定新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇、异落叶松脂素 10 种成分，通过化学计量学结合 GRA 法进行综合质量评价，希望为茜草质量总体评价和新标准的提升、制定提供数据。

1 材料

1.1 试药

新橙皮苷（批号 111857-202305，质量分数 99.6%）、山柰酚（批号 110861-202214，质量分数 97.4%）、羟基茜草素（批号 111898-202004，质量分数 98.8%）、大叶茜草素（批号 110884-202107，质量分数 99.5%）、 β -谷甾醇（批号 110851-201909，质量分数 92.7%）对照品均购自中国食品药品检定研究院；茜草素（批号 CFS202301，质量分数 98.2%）、异茜草素（批号 CFS202201，质量分数 98.5%）、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌（批号 CFS202201，质量分数 98.9%）、去氢- α -拉杷醌（批号 CFS202201，质量分数 98.0%）、异落叶松脂素（批号 CFS202201，质量分数 98.5%）对照品均购自武汉天植生物技术有限公司；乙腈（色谱纯，VSA 公司），磷酸（色谱纯，Fisher 公司），水为纯净水，甲醇（分析纯，天津市大茂化学试剂厂）；茜草经河南省医药科学研究院李俊涛研究员鉴定为正品，产地信息见表 1。

1.2 仪器

LC-20A HPLC 仪（日本岛津）；CP225D 型电子分析天平（北京赛多利斯），SB-5200 DTD 超声波发生器（宁波新芝生物科技股份有限公司）。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples					
编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	河北文安县	220401	S10	四川宁南县	220304
S2	河北广宗县	224005	S11	西藏左贡县	220308
S3	河北隆尧县	220402	S12	西藏江达县	220903
S4	山东东明县	221003	S13	河南嵩县	220305
S5	山东莒县	220901	S14	河南浚县	221004
S6	青海囊谦县	221011	S15	陕西富平县	220902
S7	青海治多县	220306	S16	陕西澄城县	220303
S8	四川泸定县	220401	S17	安徽南陵县	221005
S9	四川红原县	220302	S18	安徽霍山县	220901

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精准称取新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇、异落叶松脂素 10 个对照品适量，用 60% 甲醇溶解并制成质量浓度分别为 0.028、0.492、0.610、0.064、1.370、1.878、4.730、0.092、0.128、0.236 mg/mL 的混合贮备液，再将混合贮备液用同一溶剂稀释 20 倍，即得混合对照品溶液（含新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇和异落叶松脂素 1.40、24.60、30.50、3.20、68.50、93.90、236.50、4.60、6.40、11.80 μ g/mL）。

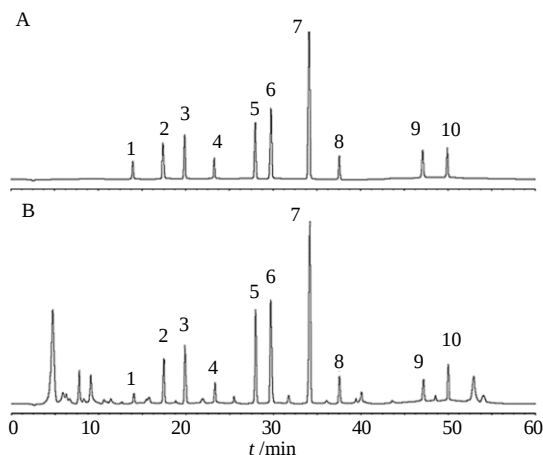
2.2 供试品溶液的制备

将茜草样品干燥、粉碎（过二号筛），取粉末约 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 60% 甲醇 25 mL，称定质量，加热回流 45 min，放冷，再称定质量，用提取溶剂补足质量，摇匀，0.45 μ m 滤膜滤过，即得。

2.3 色谱条件

Alltima C₁₈ 色谱柱（250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μ m）；流动相 0.2% 磷酸（A）- 乙腈（B），梯度洗脱（0~12 min，20.0% B；12~19 min，20.0% $\rightarrow$ 28.0% B；19~40 min，28.0% $\rightarrow$ 45.0% B；40~53 min，45.0% $\rightarrow$ 80.0% B；53~60 min，80.0% $\rightarrow$ 20.0% B）；检测波长：254 nm（0~40 min，新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌）、210 nm（40~60 min， β -谷甾醇、异落叶松脂素）；体积流量 1.0

mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL。在上述色谱条件下, 供试品溶液中 10 种成分色谱峰的保留时间与对照品一致, 且峰形对称, 与相邻色谱峰分离良好 (分离度均≥1.5), 色谱图见图 1。



1-新橙皮苷 2-山柰酚 3-茜草素 4-异茜草素 5-羟基茜草素
6-1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌 7-大叶茜草素 8-去氢-α-拉杷醌
9-β-谷甾醇 10-异落叶松脂素
1-neohesperidin 2-kaempferol 3-alizarin 4-xanthopurpurin 5-purpurin
6-1,3,6-trihydroxy-2-methylanthraquinone 7-mollugin 8-dehydro-α-lapachone 9-β-sitosterol 10-isolariciresinol

图 1 对照品 (A) 和茜草供试品 (B) 的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms reference substances (A) and *Rubiae Radix* samples (B)

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸混合贮备溶液, 分别用 60% 甲醇按照 4、10、20、40、100、200 倍稀释成从高到低的 6 个质量浓度, 进样测定, 用得到的色谱峰峰面积作线性回归处理。逐步稀释各对照品溶液, 进样测定, 计算主峰峰高与基线噪音的比值 (S/N)。以 S/N 为 3 时的质量浓度计为检测限浓度; S/N 为 10 时的质量浓度计为定量限浓度。结果见表 2。可见 10 个成分在各自范围内线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 取混合对照品溶液连续进样 6 次, 记录新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢-α-拉杷醌、β-谷甾醇、异落叶松脂素色谱峰峰面积, 计算得 10 个成分峰面积的 RSD 值分别为 1.45%、1.06%、0.98%、1.23%、0.56%、0.50%、0.39%、1.32%、1.18%、1.22%。

2.4.3 稳定性试验 称取 1 份茜草 (S1) 样品, 制成供试品溶液, 分别在 0、2、5、9、14、20、24 h 进样, 计算得新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢-α-拉杷醌、β-谷甾醇、异落叶松脂素峰面积的 RSD 值分别为 1.95%、1.66%、1.08%、1.74%、0.78%、0.92%、0.67%、1.62%、1.88%、1.76%, 结果表明茜草供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

表 2 线性关系考察

Table 2 Linear relationship investigation

成分	回归方程	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	r	检测限/(μg·mL ⁻¹)	定量限/(μg·mL ⁻¹)
新橙皮苷	$Y=2.2941 \times 10^6 X + 1389.7$	0.14~7.00	0.9991	0.033	0.108
山柰酚	$Y=5.7781 \times 10^6 X + 217.8$	2.46~123.00	0.9993	0.099	0.329
茜草素	$Y=7.1140 \times 10^6 X - 1214.5$	3.05~152.50	0.9995	0.112	0.376
异茜草素	$Y=2.7450 \times 10^6 X + 785.6$	0.32~16.00	0.9997	0.035	0.116
羟基茜草素	$Y=4.5778 \times 10^6 X + 1411.7$	6.85~342.50	0.9994	0.062	0.207
1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌	$Y=5.0580 \times 10^6 X - 1052.6$	9.39~469.50	0.9997	0.095	0.315
大叶茜草素	$Y=6.3047 \times 10^6 X + 2547.9$	23.65~1182.50	0.9994	0.081	0.269
去氢-α-拉杷醌	$Y=3.3963 \times 10^6 X - 790.5$	0.46~23.00	0.9991	0.043	0.143
β-谷甾醇	$Y=5.1924 \times 10^6 X + 1539.3$	0.64~32.00	0.9992	0.054	0.179
异落叶松脂素	$Y=6.7064 \times 10^6 X - 2072.7$	1.18~59.00	0.9994	0.061	0.202

2.4.4 重复性试验 称取茜草 (S1) 6 份, 制备供试品溶液, 进样, 结果新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢-α-拉杷醌、β-谷甾醇、异落叶松

脂素的平均质量分数分别为 0.032、0.549、0.836、0.073、1.922、2.537、6.561、0.098、0.136、0.253 mg/g, RSD 值分别为 1.98%、1.86%、1.35%、1.60%、1.02%、0.89%、0.63%、1.57%、1.79%、1.81%。

2.4.5 回收率试验 取茜草(S1)细粉(过二号筛)9份,每份0.5g,精密称定,分别加入混合对照品溶液(含新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇、异落叶松脂素0.017、0.271、0.426、0.039、0.965、1.263、3.251、0.048、0.069、0.124 mg/mL)0.8、1.0、1.2 mL,制备供试品溶液,进样测定峰面积,计算得10种成分的平均回收率分别为96.97%、97.68%、98.05%、97.54%、

100.10%、99.09%、100.18%、97.15%、97.38%、98.05%,RSD值分别为0.93%、1.43%、1.34%、1.06%、0.76%、1.38%、0.69%、1.51%、1.13%、1.91%。

2.5 样品测定

精密吸取18批茜草样品,制备供试品溶液,进样测定,记录峰面积,采用外标法计算新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇、异落叶松脂素的质量分数,结果见表3。

表3 茜草中新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇、异落叶松脂素的测定结果(n=3)

成分	质量分数/(mg g ⁻¹)																	
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18
新橙皮苷	0.033	0.042	0.034	0.038	0.039	—	—	0.037	—	0.032	—	—	0.027	0.026	0.024	0.022	0.021	0.020
山柰酚	0.564	0.656	0.473	0.535	0.625	0.315	0.303	0.251	0.294	0.326	0.305	0.262	0.863	0.840	0.802	0.910	0.940	0.768
茜草素	0.860	0.991	0.959	0.978	1.057	0.778	0.708	0.551	0.664	0.605	0.615	0.507	0.942	0.724	1.008	0.833	0.552	1.013
异茜草素	0.074	0.070	0.053	0.058	0.066	0.062	—	—	—	—	—	—	0.083	0.088	0.092	0.104	0.096	0.079
羟基茜草素	1.922	2.085	2.999	2.290	2.132	1.596	1.520	1.584	1.804	1.963	1.750	1.676	2.465	3.065	2.598	2.970	2.758	2.877
1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌	2.609	2.816	3.084	2.997	2.904	2.688	3.171	3.264	2.345	2.531	2.433	2.255	3.629	3.542	3.870	3.746	3.359	3.454
大叶茜草素	6.744	6.208	7.058	6.890	6.655	6.387	7.371	7.213	5.369	5.797	5.542	5.258	8.119	8.480	8.645	8.815	8.298	8.375
去氢- α -拉杷醌	0.099	0.115	0.104	0.110	0.119	—	—	—	0.082	0.087	—	—	0.157	0.146	0.152	0.163	0.140	0.134
β -谷甾醇	0.136	0.146	0.150	0.154	0.159	0.178	0.164	0.142	0.204	0.188	0.193	0.198	0.116	0.122	0.112	0.105	0.128	0.132
异落叶松脂素	0.259	0.275	0.361	0.343	0.308	0.242	0.327	0.294	0.165	0.208	0.201	0.182	0.447	0.464	0.431	0.482	0.414	0.370

“—”表示未检出。

“—” indicate undetected.

2.6 主成分分析(PCA)

应用SIMCA 14.1软件对18批茜草样品中新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇、异落叶松脂素质量分数数据建立PCA模型,得图2。提取出2个主成分,其中模型系数 $R^2_X=0.820$,18批茜草样品分为3组,S1~S5为1组,S6~S12为2组,S13~S18为3组,聚为相同组的样品来自1个产区,说明相同产区的茜草,质量较接近,且所有散点均在95%置信区间内,表明检测数据未出现异常。

2.7 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)

运行OPLS-DA程序,结果见图3,模型参数 $R^2_X=0.990$ 、 $R^2_Y=0.935$ 、 $Q^2=0.753$,均大于0.5,表明建立的模型稳定可靠、预测能力强^[16]。再以变

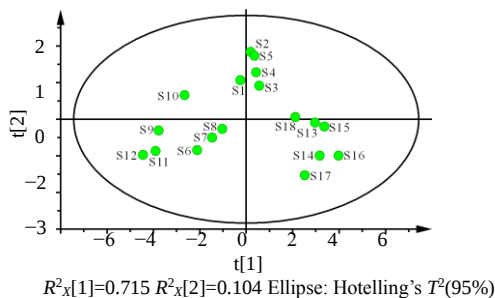


图2 PCA得分图

Fig. 2 PCA score chart

量重要性投影(VIP)值>1为显著影响^[18],共找到4个差异性标志成分,影响显著性为大叶茜草素>茜草素>1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌>羟基茜草素,VIP值分别为1.810 3、1.366 7、1.240 5、1.226 4,结果见图4。

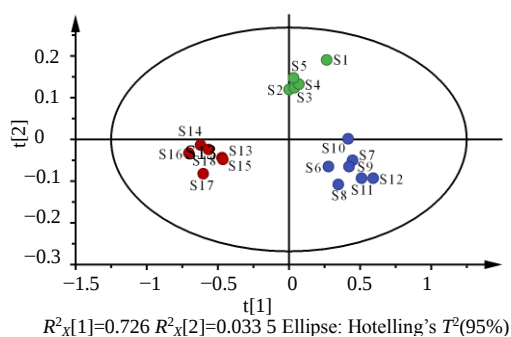


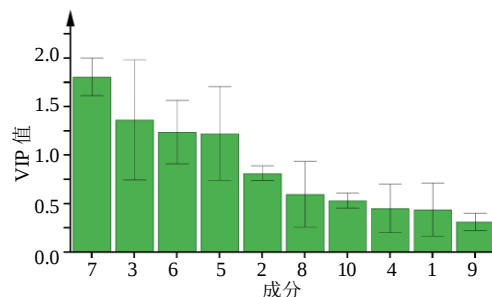
图 3 茜草的 OPLS-DA 模型得分图

Fig. 3 Score chart of OPLS-DA model for *Rubiae Radix*

2.8 灰色关联度分析 (GRA)

采用均值变换法对 18 批茜草中 10 个成分新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇、异落叶松脂素的质量分数数据进行规格化处理 (表 4)。以处理后每个成分的最大值为最优参考序列, 最小值为最差参考序列, 分别计算各评价单元与最优参考序列的关联系数、与最差参考序列的关联系数 (表 5、6) [20], 最后计算相对关联度 [20]。以相对关联度为测度, 对茜草样品进行质

量优劣排序 (表 7)。结果 18 批茜草的相对关联度在 0.327 6~0.592 7, S16、S15、S14、S13、S18、S17 分别位于排名前 6 位, S3、S5、S2、S4、S1 位于排名中间位置, S12、S9、S11、S6、S8、S10、S7 位于排名后 7 位。结果表明陕西、河南和安徽所产的茜草整体质量较好, 其次为河北和山东产地。



1-新橙皮苷 2-山柰酚 3-茜草素 4-异茜草素 5-羟基茜草素
6-1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌 7-大叶茜草素 8-去氢- α -拉杷醌
9- β -谷甾醇 10-异落叶松脂素
1-neohesperidin 2-kaempferol 3-alizarin 4-xanthopurpurin 5-purpurin
6-1,3,6-trihydroxy-2-methylanthraquinone 7-mollugin
8-dehydro- α -lapachone 9- β -sitosterol 10-isolaricresinol

图 4 茜草的 VIP 图

Fig. 4 VIP images of *Rubiae Radix*

表 4 数据规格化处理结果

Table 4 Results of data contents

编号	新橙皮苷	山柰酚	茜草素	异茜草素	羟基茜草素	1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌	大叶茜草素	去氢- α -拉杷醌	β -谷甾醇	异落叶松脂素
S1	1.506 8	1.012 0	1.079 2	1.439 7	0.863 7	0.847 7	0.969 4	1.108 6	0.917 7	0.807 6
S2	1.917 8	1.177 1	1.243 6	1.361 9	0.937 0	0.915 0	0.892 4	1.287 8	0.985 2	0.857 5
S3	1.552 5	0.848 7	1.203 4	1.031 1	1.347 7	1.229 5	1.158 3	1.164 6	1.012 1	1.125 7
S4	1.735 2	0.960 0	1.227 3	1.128 4	1.029 1	0.973 8	0.990 4	1.231 8	1.039 1	1.069 5
S5	1.780 8	1.121 5	1.326 4	1.284 0	0.958 1	0.943 6	0.956 6	1.332 6	1.072 9	0.960 4
S6	0.000 0	0.565 2	0.976 3	1.206 2	0.717 2	0.873 4	0.774 3	0.000 0	1.201 1	0.754 6
S7	0.000 0	0.543 7	0.888 4	0.000 0	0.683 2	1.030 3	1.059 5	0.000 0	0.701 8	1.019 6
S8	1.689 5	0.450 4	0.691 1	0.000 0	0.711 8	1.060 6	0.749 3	0.000 0	0.958 2	0.916 7
S9	0.000 0	0.527 5	0.833 2	0.000 0	0.810 7	0.762 0	0.771 8	0.918 3	1.376 5	0.514 5
S10	1.461 2	0.585 0	0.759 2	0.000 0	0.882 2	0.822 4	0.833 3	0.974 2	1.268 6	0.648 6
S11	0.000 0	0.547 3	0.771 7	0.000 0	0.786 4	0.790 6	0.796 6	0.000 0	1.302 3	0.626 8
S12	0.000 0	0.470 1	0.636 2	0.000 0	0.753 2	0.732 7	0.755 8	0.000 0	1.336 0	0.567 5
S13	1.232 9	1.548 5	1.182 1	1.614 8	1.107 8	1.179 2	1.167 0	1.758 1	0.782 7	1.393 8
S14	1.187 2	1.507 3	0.908 5	1.712 1	1.377 4	1.150 9	1.218 9	1.634 9	0.823 2	1.446 8
S15	1.095 9	1.439 1	1.264 9	1.789 9	1.167 5	1.257 5	1.242 7	1.702 1	0.755 7	1.343 9
S16	1.004 6	1.632 9	1.045 3	2.023 3	1.334 7	1.217 2	1.267 1	1.825 3	0.708 5	1.503 0
S17	0.958 9	1.686 7	0.692 7	1.867 7	1.239 4	1.091 4	1.192 8	1.567 7	0.863 7	1.290 9
S18	0.913 2	1.378 1	1.271 2	1.537 0	1.292 9	1.122 3	1.203 8	1.500 6	0.890 7	1.153 7

表 5 各指标与最优参考序列的关联系数

Table 5 Correlation coefficient between each index and the optimal reference sequence										
编号	新橙皮苷	山柰酚	茜草素	异茜草素	羟基茜草素	1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌	大叶茜草素	去氢- α -拉杷醌	β -谷甾醇	异落叶松脂素
S1	0.550 0	0.478 1	0.582 6	0.459 5	0.403 2	0.390 4	0.465 1	0.387 5	0.423 7	0.415 5
S2	1.000 0	0.548 1	0.806 5	0.428 6	0.440 8	0.433 8	0.408 6	0.457 6	0.463 0	0.433 6
S3	0.579 0	0.424 5	0.737 2	0.333 3	0.921 2	0.903 6	0.704 1	0.407 0	0.480 7	0.567 1
S4	0.733 4	0.459 6	0.776 9	0.356 6	0.499 1	0.480 5	0.483 4	0.433 1	0.500 0	0.532 7
S5	0.785 7	0.522 4	1.000 0	0.401 6	0.452 9	0.455 3	0.454 7	0.479 3	0.526 3	0.476 7
S6	0.000 0	0.355 3	0.496 4	0.377 8	0.344 6	0.405 9	0.344 4	0.000 0	0.657 9	0.397 7
S7	0.000 0	0.351 0	0.440 7	0.000 0	0.333 3	0.535 9	0.555 0	0.000 0	0.333 3	0.505 5
S8	0.687 5	0.333 3	0.352 0	0.000 0	0.342 7	0.571 3	0.333 3	0.000 0	0.446 4	0.457 4
S9	0.000 0	0.347 8	0.411 7	0.000 0	0.379 8	0.346 2	0.343 3	0.333 3	1.000 0	0.333 3
S10	0.523 8	0.359 4	0.378 3	0.000 0	0.412 1	0.376 2	0.373 8	0.347 6	0.757 7	0.366 5
S11	0.000 0	0.351 7	0.383 5	0.000 0	0.370 0	0.359 8	0.354 9	0.000 0	0.819 7	0.360 6
S12	0.000 0	0.336 9	0.333 3	0.000 0	0.357 4	0.333 3	0.336 1	0.000 0	0.892 8	0.345 7
S13	0.423 1	0.817 3	0.705 1	0.548 4	0.562 8	0.770 2	0.721 2	0.870 9	0.362 3	0.819 0
S14	0.407 4	0.775 1	0.452 3	0.614 5	1.000 0	0.711 1	0.843 0	0.704 3	0.378 8	0.897 9
S15	0.379 3	0.714 0	0.848 7	0.680 1	0.623 2	1.000 0	0.913 9	0.786 4	0.352 1	0.756 5
S16	0.354 9	0.919 9	0.551 1	1.000 0	0.890 5	0.866 9	1.000 0	1.000 0	0.335 6	1.000 0
S17	0.343 8	1.000 0	0.352 6	0.761 2	0.715 5	0.612 4	0.777 0	0.637 7	0.396 8	0.699 7
S18	0.333 3	0.667 0	0.862 1	0.505 0	0.804 2	0.660 0	0.803 5	0.582 8	0.409 8	0.585 9

表 6 各指标与最差参考序列的关联系数

Table 6 Correlation coefficient between each index and the worst reference sequence										
编号	新橙皮苷	山柰酚	茜草素	异茜草素	羟基茜草素	1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌	大叶茜草素	去氢- α -拉杷醌	β -谷甾醇	异落叶松脂素
S1	0.759 3	0.524 0	0.437 9	0.833 3	0.657 9	0.695 3	0.540 5	0.905 9	0.609 8	0.627 7
S2	0.650 8	0.459 6	0.362 3	0.860 6	0.577 6	0.590 1	0.644 0	0.832 1	0.543 5	0.590 3
S3	0.745 4	0.608 1	0.378 3	1.000 0	0.343 1	0.345 6	0.387 6	0.881 4	0.520 9	0.447 1
S4	0.694 9	0.548 1	0.368 6	0.954 5	0.500 9	0.521 2	0.517 8	0.853 8	0.500 0	0.471 1
S5	0.683 3	0.479 5	0.333 3	0.889 8	0.558 0	0.554 4	0.555 3	0.815 5	0.476 2	0.525 7
S6	0.000 0	0.843 4	0.503 6	0.921 0	0.910 8	0.651 0	0.911 9	0.000 0	0.403 2	0.673 0
S7	0.000 0	0.868 9	0.577 8	0.000 0	1.000 0	0.468 6	0.454 9	0.000 0	1.000 0	0.494 6
S8	0.706 9	1.000 0	0.862 8	0.000 0	0.923 9	0.444 5	1.000 0	0.000 0	0.568 2	0.551 3
S9	0.000 0	0.889 1	0.636 6	0.000 0	0.731 4	0.899 6	0.920 0	1.000 0	0.333 3	1.000 0
S10	0.773 6	0.821 2	0.737 2	0.000 0	0.635 6	0.745 2	0.755 0	0.970 4	0.373 1	0.786 6
S11	0.000 0	0.864 5	0.718 1	0.000 0	0.770 8	0.819 2	0.845 5	0.000 0	0.359 7	0.814 9
S12	0.000 0	0.969 1	1.000 0	0.000 0	0.832 2	1.000 0	0.975 5	0.000 0	0.347 2	0.903 2
S13	0.854 1	0.360 2	0.387 3	0.777 8	0.449 8	0.370 2	0.382 6	0.685 6	0.806 6	0.359 8
S14	0.872 3	0.369 0	0.559 0	0.750 0	0.333 3	0.385 5	0.355 4	0.718 7	0.735 4	0.346 5
S15	0.911 1	0.384 7	0.354 4	0.729 1	0.417 5	0.333 3	0.344 1	0.700 2	0.862 2	0.373 4
S16	0.953 5	0.343 3	0.457 6	0.673 1	0.347 6	0.351 3	0.333 3	0.668 7	0.980 5	0.333 3
S17	0.976 2	0.333 3	0.859 3	0.709 4	0.384 3	0.422 5	0.368 6	0.738 2	0.675 7	0.389 0
S18	1.000 0	0.399 9	0.352 1	0.801 5	0.362 8	0.402 5	0.362 9	0.758 7	0.641 0	0.436 1

表 7 各样品相对关联度及质量优劣排序

Table 7 Relative correlation degree and quality ranking of the samples

编号	与最优参考 序列关联度	与最差参考序 列关联度	相对关 联度	排序	编号	与最优参考 序列关联度	与最差参考序 列关联度	相对关 联度	排序
S1	0.455 6	0.659 2	0.408 7	11	S10	0.432 8	0.733 1	0.371 2	13
S2	0.542 1	0.611 1	0.470 1	9	S11	0.428 6	0.741 8	0.366 2	16
S3	0.605 8	0.565 8	0.517 1	7	S12	0.419 4	0.861 0	0.327 6	18
S4	0.525 5	0.593 1	0.469 8	10	S13	0.660 0	0.543 4	0.548 4	4
S5	0.555 5	0.587 1	0.486 2	8	S14	0.678 4	0.5425	0.555 7	3
S6	0.422 5	0.727 2	0.367 5	15	S15	0.705 4	0.541 0	0.565 9	2
S7	0.436 4	0.695 0	0.385 7	12	S16	0.791 9	0.544 2	0.592 7	1
S8	0.440 5	0.757 2	0.367 8	14	S17	0.629 7	0.585 7	0.518 1	6
S9	0.436 9	0.801 3	0.352 9	17	S18	0.621 4	0.551 8	0.529 7	5

3 讨论

3.1 目标成分的选择

茜草中主要药效成分为蒽醌及其苷类化合物、萘醌类、萘氢醌、黄酮类、环己肽类、多糖类等，现代研究表明萘醌类和蒽醌及其苷类化合物类为茜草中最主要的活性成分，与其抗氧化、抗炎、抗肿瘤功能密切相关用^[5]，以茜草素、羟基茜草素、1-羟基甲基蒽醌、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、异茜草素、山柰酚、新橙皮苷的含量较高；甾醇类是一类天然化合物，以 β -谷甾醇含量较高。故本实验以上述 10 种成分作为目标成分，采用 HPLC 法同时测定。

3.2 流动相和供试品溶液的处理方式确定

考察了洗脱能力较强的有机相乙腈，水相选择 0.1%磷酸、0.2%磷酸、0.5%磷酸、0.1%甲酸、水。综合色谱峰对称情况、基线平稳情况、成分间的分离度、出峰时间等，最终确定流动相为乙腈 - 0.2%磷酸溶液。由于本实验中待测成分涵盖了黄酮类、萘类、蒽醌类、甾醇类化合物，各类物质极性不同，在供试品的预处理时，以新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇和异落叶松脂素的综合提取率、杂质峰为指标，通过对提取溶剂（45%甲醇、60%甲醇、75%甲醇）进行对比，发现以 60%甲醇提取色谱峰数目多，且峰的纯度高。通过对提取方式（超声、加热回流）和时间（30、45、60 min）进行了考察，最终确定以 60%甲醇加热回流提取 45 min 为茜草供试品溶液的最佳提取方式。

3.3 测定结果和化学计量学分析结果评价

本实验对不同产地的 18 批茜草中新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇和异落叶松脂素进行了检测，结果显示部分产地茜草中未检出新橙皮苷、异茜草素和去氢- α -拉杷醌，大叶茜草素和羟基茜草素质量分数分别在 5.258~8.815 mg/g 和 1.520~3.065 mg/g，符合《中国药典》2020 年版一部的要求。采用化学计量学中最常用的 PCA 和 OPLS-DA 对全国 8 个省产地的 18 批茜草中新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇和异落叶松脂素共 10 个成分的质量分数数据进行分析，结果显示大叶茜草素、茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌和羟基茜草素是影响茜草质量的主要物质，提示对茜草的研究应着重关注上述 4 个成分，而且这 4 个成分的质量分数结果显示 S13~S18 明显高于其他批次。同时 GRA 结果显示，陕西、河南和安徽产地的茜草整体质量较好，与文献报道^[6,9,12]相符，为茜草的道地性研究指明了方向。

本研究检测的 10 个成分新橙皮苷、山柰酚、茜草素、异茜草素、羟基茜草素、1,3,6-三羟基-2-甲基蒽醌、大叶茜草素、去氢- α -拉杷醌、 β -谷甾醇和异落叶松脂素涵盖了黄酮类、蒽醌类、甾体类和木脂素类，方法便捷、准确，易于推广，可以更全面、更系统地评价茜草的质量，为茜草药材的综合评价、产地道地性评价提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 245-246.
- [2] 陈毅, 王海丽, 薛露, 等. 茜草的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2771-2779.
- [3] 李海峰, 肖凌云, 张菊, 等. 茜草化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中药材, 2016, 39(6): 1433-1436.
- [4] 于瑞, 高明洁, 崔彬彬, 等. HPLC 法测定中药茜草中茜草素, 羟基茜草素和大叶茜草素的含量 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2017, 51(3): 195-199.
- [5] 李慧, 包永睿, 王帅, 等. 中药茜草抗氧化, 抗炎, 抗肿瘤不同药用部位精准研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(3): 401-407.
- [6] 李慧, 包永睿, 王帅, 等. 基于灰色关联分析的茜草醇提物抗氧化, 抗肝癌谱效关系研究 [J]. 中南药学, 2019, 17(6): 815-819.
- [7] 袁悦, 董双双, 冯文佩, 等. 茜草的化学成分及其生理活性研究进展 [J]. 江西饲料, 2016, 18(4): 14-18.
- [8] 张茂婷. 茜草藤的化学成分和质量研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2017.
- [9] 李慧, 包永睿, 王帅, 等. 基于多元统计分析的茜草药材指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1385-1388.
- [10] 王闽予, 何民友, 李国卫, 等. 不同产地茜草药材 UPLC 指纹图谱研究及化学计量学分析 [J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(5): 609-614.
- [11] 李慧, 包永睿, 王帅, 等. 基于灰色关联分析的茜草醇提物抗氧化, 抗肝癌谱效关系研究 [J]. 中南药学, 2019, 17(6): 815-819.
- [12] 乔玄, 赵丽, 张磊, 等. 陕西不同产地茜草 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 现代中医药, 2015, 35(1): 57-60.
- [13] 李鹏, 胡正海. 陕西省9个地市产茜草药材中大叶茜草素含量比较研究 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(5): 458-460.
- [14] 谢华, 周艳, 赵丽娜, 等. 煎煮对茜草, 茜草炭饮片化学成分和止血作用的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(24): 2094-2096.
- [15] 郭凯华, 练从龙, 杨灏, 等. 不同生长年限茜草的近红外定性及定量分析 [J/OL]. 分子植物育种. <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1068.S.20230531.1718.030.html>
- [16] 张蕊, 徐延昭, 张静, 等. 参乌益肾片中8种成分的HPLC法测定及其化学计量学综合评价 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(5): 976-982.
- [17] 刘凯丽, 刘艳, 王世晖, 等. 一测多评法结合指纹图谱和化学模式识别分析在西黄丸质量评价中的应用 [J]. 中国药房, 2022, 33(18): 2219-2223.
- [18] 王闽予, 邓淙友, 陈康梅, 等. 6种芸香科药材的特征图谱及含量对比研究 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(5): 61-71.
- [19] 张智慧, 王悦, 张学兰, 等. 基于HPLC指纹图谱与多元统计分析的生地黄与熟地黄差异评价 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(6): 1383-1386.
- [20] 庞文娟, 张生杰, 田志梅. 灰色关联分析结合聚类分析评价不同产地板蓝根饮片质量 [J]. 中医药导报, 2023, 29(5): 53-57.
- [21] 张娜, 翁伟锋, 魏坤盛, 等. 基于灰色关联度与TOPSIS融合模型对不同产地广西郁金的质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(3): 137-145.
- [22] 黄广伟, 陈淮臣, 刘渝, 等. 基于灰色关联度和偏最小二乘回归分析的芩苏胶囊抑菌谱效关系研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(6): 1060-1069.

[责任编辑 解学星]