

一测多评法测定藏茴香中异绿原酸A、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸C

周 凡^{1,2}, 李淑萍¹, 贺 飞¹, 吴 涛¹, 阿吉艾克拜尔·艾萨^{1*}, 买吾兰江·买提努尔^{1,2*}

1. 中国科学院新疆理化技术研究所, 新疆特有药用资源利用省部共建国家重点实验室培育基地, 中国科学院干旱区植物资源化学重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 中国科学院大学, 北京 100049

摘要: 目的 建立一测多评法(QAMS)测定藏茴香中6种咖啡酰奎宁酸类成分含量,并验证该方法在藏茴香质量评价中应用的可行性与适用性。方法 取藏茴香粉末(过三号筛)0.5 g,精密加入70%甲醇20 mL,超声处理(250 W、频率53 kHz)30 min,制备供试品溶液;采用Phenomenex GeminiR C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相,梯度洗脱,检测波长为330 nm,体积流量1.0 mL·min⁻¹,柱温30 °C,进行专属性、供试品提取条件、检测波长选择、色谱条件、线性关系、精密度、重复性、稳定性、加样回收率方法学考察,建立异绿原酸A、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸C成分含量检测的HPLC法;以异绿原酸A为内参成分,分别计算新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸C 5种成分的相对校正因子,分别采用3种不同色谱仪和3种色谱柱进行相对校正因子、相对保留时间耐用性考察,对藏茴香样品同时采用外标法与QAMS测定6种成分的质量分数,比较2种测定方法结果的差异。结果 建立的6种成分的HPLC检测方法的专属性、供试品提取条件、检测波长选择、色谱条件、线性关系、精密度、重复性、稳定性、加样回收率均符合要求;新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸C的相对校正因子平均值分别是1.362、1.257、1.335、1.470、1.134,3种不同色谱仪和3种色谱柱对相对校正因子、相对保留时间均无明显影响;QAMS与外标法2种方法测定3批藏茴香样品中6种成分得到的结果之间无显著差异。结论 建立的QAMS简便、准确、可靠,可用于藏茴香中6种咖啡酰奎宁酸类成分——异绿原酸A、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸C的定量分析。

关键词: 藏茴香; 一测多评法; 相对校正因子; 咖啡酰奎宁酸; 异绿原酸A; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 异绿原酸B; 异绿原酸C

中图分类号: R291.4; 927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)04-0703-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.04.002

Determination of isochlorogenic acid A, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, and isochlorogenic acid C in *Carum carvi* fruits by QAMS

ZHOU Fan^{1,2}, LI Shuping¹, HE Fei¹, WU Tao¹, Haji Akber Aisa¹, Maitinuer Maiwulanjiang^{1,2}

1. State Key Laboratory Basis of Xinjiang Indigenous Medicinal Plants Resource Utilization, CAS Key Laboratory of Chemistry of Plant Resources in Arid Regions, Xinjiang Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Objective To establish a method for the content determination of six caffeoylquinic acids components in *Carum carvi* L. through quantitative analysis of multi-components with single marker (QAMS). To verify the feasibility and applicability of the method in its quality control. **Methods** Take 0.5 g of *C. carvi* powder (through the third sieve), accurately add 20 mL of 70%

收稿日期: 2022-12-15

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2022D01E94); 新疆维吾尔自治区天山英才培养计划资助项目(2022TSYCCX0023)

第一作者: 周 凡(1984—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要从事中药民族药研究。E-mail: zhoufan0220@sina.com

*共同通信作者: 买吾兰江·买提努尔(1984—), 男, 博士生导师, 研究员, 主要从事维吾尔医药研究。E-mail: mavlanjan@ms.xjb.ac.cn
阿吉艾克拜尔·艾萨(1965—), 男, 博士生导师, 研究员, 主要从事民族药天然产物研究。E-mail: haji@ms.xjb.ac.cn

methanol, and conduct ultrasonic treatment (250 W, frequency 53 kHz) for 30 min to prepare the test solution. Phenomenex Gemini[®] C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution was used as mobile phase, gradient elution, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, column temperature was 30 °C, and detection wavelength was 330 nm. Conduct methodological studies on specificity, test article extraction conditions, detection wavelength selection, chromatographic conditions, linear relationship, precision, repeatability, stability, and sample addition recovery. With isochlorogenic acid A as the internal reference component, relative correction factors of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C was established. Three different chromatographs and three chromatographic columns were used to investigate the relative correction factor and relative retention time durability. The external standard method and QAMS were used to simultaneously determine the mass fractions of six components in *C. carvi* samples, and the differences between the two determination results were compared. **Results** The specificity, extraction conditions, detection wavelength selection, chromatographic conditions, linear relationship, precision, repeatability, stability, and sample recovery of the established HPLC detection methods for the six components meet the requirements. The relative positive factors of isochlorogenic acid A and neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C were 1.362, 1.257, 1.335, 1.470, and 1.134, respectively. Three different chromatographs and three chromatographic columns had no significant impact on the relative correction factor and relative retention time. There was no significant difference between the calculated values of six components in three batches of samples by the QAMS and the measured values of the external standard method. **Conclusion** The method established in the study is simple and stable, and can be used for the synchronous quality control of six components (isochlorogenic acid A, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid B and isochlorogenic acid C) in *C. carvi*.

Key words: *Carum carvi* L.; quantitative analysis of multi-components with single marker (QAMS); relative correction factor; caffeoylquinic acids; isochlorogenic acid A; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid C

藏茴香为伞形科(Umbelliferae)葛缕子属 *Carum* 植物藏茴香 *Carum carvi* L. 的果实。藏茴香是汉语名称,又名葛缕子、贡蒿子, *Kerwiyea* 是维吾尔医习用名称^[1]。藏茴香植物为多年生草本,原产于中东和欧洲,亚洲、北美洲和北非洲均有分布^[2],我国东北、华北、西北、四川、青海和西藏等地均有广泛分布^[3]。藏茴香资源量丰富,其根、果入药,其药性温,味微辛,有芳香健胃、驱风理气之功效,是维吾尔医临床用于治疗白癜风的重要药材之一,临床疗效显著^[4-5]。藏茴香的挥发油类成分早已引起学者关注,其主要成分香芹酮具有抗紫癜和抗氧化的药理作用^[6-8]。研究证明含有较多咖啡酸衍生物的药用植物往往具有强抗氧化活性,其含量与自由基阳离子清除活性和自由基清除活性呈正相关^[9]。课题组前期采用超高效液相-轨道阱高分辨质谱组合质谱(UHPLC-Q-orbitrap HRMS/MS)从藏茴香中鉴定出大量咖啡酸衍生物类成分,提示除了挥发油之外,咖啡酸衍生物有可能是藏茴香中另一类活性成分群。

中药的活性化学成分众多,其疗效往往是多种活性成分的协同作用。现有的中药质量控制标准大多采用外标法,仅以1~2个代表成分的含量测定来控制其质量,不足以全面科学地反映其内在质

量,存在一定的缺陷或者不足。外标法是最常用的化学成分含量分析方法之一,由于某些对照品购买成本较高、且具有化学多样性和检测的不稳定性等因素,使其具有局限性^[10]。为了解决这一问题,王智民等^[11]首次系统地提出了一测多评法(QAMS)。《中国药典》2015年版已报道此法适用于中药材的含量测定,其优点是实现每种分析成分含量独立测定的同时可以节约实验成本,缩短检测时间。目前有关藏茴香的QAMS研究比较缺乏,本研究采用此技术,以异绿原酸A为内参成分,建立藏茴香中6种咖啡酰基奎宁酸成分的QAMS,为藏茴香物质基础研究 with 质量评价提供了一种操作简便、快速高效的含量测定方法。

1 材料

1.1 主要仪器

G1311C型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司);DIONEX型高效液相色谱仪(美国戴安公司);Phenomenex Gemini[®] C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱;Thermo Scientific Synchronis C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱;InertSustain[®] C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱;UV-1800型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);SK7210HB型超声波清洗

器(上海科导超声仪器有限公司);Sartorius BT 25S 型十万分之一电子天平、Sartorius CPA124s 型万分之一电子天平(德国赛多利斯公司);YP5102型电子天平(上海光正医疗仪器有限公司);TGL-20B型高速离心机、R-210型旋转蒸发仪、B-491型恒温水浴锅(瑞士步琦公司);DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司);FW-100型高速万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

1.2 药材及主要试剂

对照品:绿原酸(批号 15060713)购自上海士峰生物科技有限公司;异绿原酸A(批号 16031611)、异绿原酸C(批号 16031613)购自北京恒元启天化工技术研究院;异绿原酸B(批号 0304/2018)、新绿原酸(批号 0401/2017)、隐绿原酸(批号 1404/2018)购自上海纯优生物科技有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$ 。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,纯化水(杭州娃哈哈集团有限公司),其余试剂均为分析纯。

藏茴香(批号分别是 20180715、20201224 和 20220808)购自青海优润堂商贸有限责任公司,经中国科学院新疆理化技术研究所鲁春芳副研究员鉴定为伞形科(Umbelliferae)葛缕子属 *Carum* L. 植物藏茴香 *C. carvi* L. 的干燥成熟果实。藏茴香的植物标本存放于中国科学院新疆生态与地理研究所标本馆,乌鲁木齐。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Phenomenex Gemini[®] C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱,以乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~9 min, 9%→11% A; 9~14 min, 11%→15% A; 14~16 min, 15%→17% A; 16~35 min, 17% A; 35~36 min, 17%→19% A; 36~60 min, 19%→22% A),检测波长为 330 nm,体积流量 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 10 μL。

2.2 供试品溶液的制备

取藏茴香粉末(过三号筛)0.5 g,精密称定,置

具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 20 mL,密塞,称定质量,超声处理(250 W、频率 53 kHz)30 min,取出,放冷,再称定质量,用相应溶剂补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液的制备

分别取绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 对照品适量,精密称定,分别加甲醇制成绿原酸(127.2 μg·mL⁻¹)、新绿原酸(30.8 μg·mL⁻¹)、隐绿原酸(33.8 μg·mL⁻¹)、异绿原酸 A(314.2 μg·mL⁻¹)、异绿原酸 B(67.2 μg·mL⁻¹)和异绿原酸 C(177.7 μg·mL⁻¹)对照品贮备液,分别精密吸取上述对照品贮备液各 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度制成混合对照品工作液(绿原酸 12.72 μg·mL⁻¹、新绿原酸 3.08 μg·mL⁻¹、隐绿原酸 3.38 μg·mL⁻¹、异绿原酸 A 31.42 μg·mL⁻¹、异绿原酸 B 6.72 μg·mL⁻¹、异绿原酸 C 17.77 μg·mL⁻¹)。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 取混合对照品工作液和供试品溶液,按照“2.1”项色谱条件进样,色谱图见图 1。

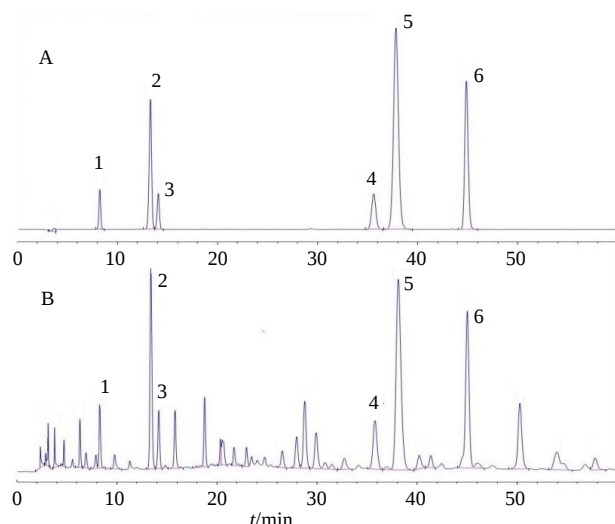
2.4.2 供试品提取条件考察 (1)提取溶剂考察:取藏茴香粉末(过三号筛)4 份,每份 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入 100%、70%、50%、30% 甲醇各 20 mL,密塞,称定质量,超声处理(250 W、频率 53 kHz)30 min,取出,放冷,再称定质量,用相应溶剂补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,按“2.1”项下色谱条件分别测定绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 的峰面积,计算质量分数。结果表明,采用 100%、70%、50% 甲醇提取 6 种成分的质量分数差异不大,其中 70% 甲醇提取的成分质量分数略高,而采用 30% 甲醇无法提取出 6 种成分,故采用 70% 甲醇提取。见表 1。

(2)提取溶剂用量考察:取藏茴香粉末(过三号筛)5 份,每份 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别精密加入 70% 甲醇 10、15、20、30、40 mL,密塞,称

表 1 供试品提取溶剂考察结果

Table 1 Investigation result of extraction solvent for test samples

编号	取样量/ g	提取溶剂	溶剂体积/ mL	超声时间/ min	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
					绿原酸	新绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 A	异绿原酸 B	异绿原酸 C
1	0.502 2	100% 甲醇	20	30	0.50	0.10	0.16	0.82	0.27	0.62
2	0.499 9	70% 甲醇	20	30	0.51	0.11	0.16	0.82	0.29	0.63
3	0.501 0	50% 甲醇	20	30	0.51	0.11	0.15	0.81	0.28	0.63
4	0.501 7	30% 甲醇	20	30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00



1-新绿原酸; 2-绿原酸; 3-隐绿原酸; 4-异绿原酸 B; 5-异绿原酸 A; 6-异绿原酸 C

1-neochlorogenic acid; 2-chlorogenic acid; 3-cryptochlorogenic acid; 4-isochlorogenic acid B; 5-isochlorogenic acid A; 6-isochlorogenic acid C

图1 混合对照品(A)和藏茴香供试品(B)的HPLC色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *C. carvi* fruits for test (B)

定质量,超声处理(250 W、频率 53 kHz)30 min,取出,放冷,再称定质量,用相应溶剂补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,按“2.1”项下色谱条件分别测定绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 的峰面积,计算质量分数。结果表明,随着溶剂体积增大,所测得 6 种成分的含量变化并不大,其中采用 20 mL 70% 甲醇提取的成分质量分数略高于其他;但随着溶剂体积逐渐增

大,HPLC 检测时相应成分的峰面积响应值逐渐减小,当溶剂体积过大时,供试品溶液浓度过低,某些成分的峰面积响应值太小,影响检测,同时,基于节省溶剂的考虑,采用 20 mL 70% 甲醇来提取。见表 2。

(3)超声时间考察:取藏茴香粉末(过三号筛)0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 20 mL,密塞,称定质量,分别超声处理(250 W、频率 53 kHz)20、30、40 min,取出,放冷,再称定质量,用相应溶剂补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,按“2.1”项下色谱条件分别测定绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 的峰面积,计算质量分数。结果表明,随着超声时间延长,所测得 6 种成分的质量分数变化并不大,基于降低能耗与经济成本的考虑,采用超声 20 min 提取。见表 3。

2.4.3 检测波长选择 采用二极管阵列检测器,选取 200~400 nm 的波长,分别对质量浓度为 $12.72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的绿原酸、质量浓度为 $3.08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的新绿原酸、质量浓度为 $3.38 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的隐绿原酸、质量浓度为 $31.42 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的异绿原酸 A、质量浓度为 $6.72 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的异绿原酸 B 和质量浓度为 $17.77 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的异绿原酸 C 进行扫描,其最大吸收波长为 330 nm,考虑到检测灵敏度等问题,选取 330 nm 为检测波长。

2.4.4 流动相考察 筛选了多种色谱流动相体系:(1)乙腈-0.1% 磷酸水体系;(2)乙腈-0.1% 甲酸

表 2 供试品提取溶剂用量考察结果

Table 2 Investigation result of extraction solvent dosage for test samples

编号	取样量/g	提取溶剂	溶剂体积/ mL	超声时间/ min	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					
					绿原酸	新绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 A	异绿原酸 B	异绿原酸 C
1	0.501 3	70% 甲醇	10	30	0.49	0.10	0.15	0.81	0.27	0.62
2	0.500 2	70% 甲醇	15	30	0.50	0.10	0.16	0.81	0.27	0.62
3	0.499 7	70% 甲醇	20	30	0.51	0.11	0.16	0.82	0.29	0.63
4	0.502 6	70% 甲醇	30	30	0.50	0.11	0.15	0.82	0.27	0.62
5	0.504 4	70% 甲醇	40	30	0.51	0.11	0.16	0.82	0.28	0.63

表 3 供试品超声提取时间考察结果

Table 3 Investigation result of ultrasonic extraction time for test samples

编号	取样量/g	提取溶剂	溶剂体积/ mL	超声时间/ min	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)					
					绿原酸	新绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 A	异绿原酸 B	异绿原酸 C
1	0.500 2	70% 甲醇	20	20	0.51	0.10	0.16	0.81	0.27	0.61
2	0.499 9	70% 甲醇	20	30	0.51	0.11	0.16	0.83	0.28	0.63
3	0.501 0	70% 甲醇	20	40	0.51	0.10	0.16	0.83	0.28	0.63

水体系;(3)乙腈-0.3%甲酸水体系。经比较得出,采用乙腈-0.1%甲酸水为流动相,梯度洗脱,得出的藏茴香中绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C的峰形及分离度等都较其他方法优,出峰时间亦较理想,所以采用乙腈-0.1%甲酸水为色谱流动相进行梯度洗脱。

2.4.5 线性关系考察 精密吸取混合对照品工作液,按“2.1”项下色谱条件,分别依次进样1、3、5、7、10、15、20、25、30 μL ,测定峰面积,以峰面积为纵坐标,对照品进样量为横坐标,绘制标准曲线。绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C的线性回归方程、相关系数和线性范围见表4。

表4 6种成分的线性关系考察结果

Table 4 Linear relationship of six components

待测成分	回归方程	r	线性范围/ μg
新绿原酸	$Y=3\ 048.2\ X-0.758\ 3$	0.999 9	0.009 3~0.092 7
绿原酸	$Y=3\ 204.2\ X+6.214\ 0$	0.999 9	0.012 7~0.254 4
隐绿原酸	$Y=3\ 110.8\ X-0.950\ 4$	0.999 8	0.010 1~0.101 4
异绿原酸B	$Y=2\ 967.1\ X-8.687\ 2$	0.999 4	0.020 2~0.201 6
异绿原酸A	$Y=4\ 078.5\ X+9.886\ 3$	0.999 9	0.031 4~0.942 7
异绿原酸C	$Y=3\ 653.9\ X-2.683\ 0$	0.999 9	0.017 8~0.533 2

2.4.6 精密度考察 精密吸取混合对照品工作液,按“2.1”项下色谱条件,每次进样10 μL ,连续测定6次,分别记录绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C的峰面积,计算相对标准偏差(RSD)分别是0.94%、1.02%、0.96%、1.01%、1.15%、0.96%,表明仪器的精密度良好。

2.4.7 重复性考察 取同批藏茴香供试品粉末6份,每份0.5 g,精密称定,按照“2.2”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件分别测定绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C的峰面积,计算其平均质量分数分别是0.51、0.11、0.16、0.81、0.28、0.62 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD分别是0.73%、0.90%、1.99%、0.51%、2.12%、0.62%,表明本方法重复性良好。

2.4.8 稳定性考察 取藏茴香供试品粉末0.5 g,精密称定,按照“2.2”项下方法制备,分别于0、3、6、9、12、15、18、21、24 h进样1次,进样10 μL ,按“2.1”项下色谱条件分别测定绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C的峰面积,计算其RSD分别是0.95%、1.48%、1.62%、0.25%、1.48%、0.17%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.4.9 加样回收率考察 取已知待测物质量分数的藏茴香(批号20201224,绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C的质量分数分别是0.513 9、0.107 2、0.162 0、0.813 1、0.278 4、0.620 2 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)粉末(过三号筛)9份^[12],每份0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,分别按照样品中待测成分的量与对照品1:0.8、1:1、1:1.2的量加入对照品,每种浓度各制备3份,按照“2.2”项下方法制备,按“2.1”项下色谱条件测定,记录待测成分的峰面积,计算回收率。结果表明,绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C回收率范围分别为97.20%~105.93%、100.12%~107.89%、98.99%~106.52%、98.80%~104.92%、98.40%~106.84%、96.73%~104.55%;RSD分别为2.96%、2.61%、2.49%、1.88%、1.89%、2.90%。

2.5 相对校正因子的确定

取“2.3”项下混合对照品工作液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以异绿原酸A为内参成分,计算相对校正因子。6种成分相对校正因子测定结果见表5。

$$f_{s/i}=f_s/f_i=(A_s/C_s)/(A_i/C_i)$$

A_s 为内参成分对照品峰面积, C_s 为内参成分对照品浓度, A_i 为待测成分对照品峰面积, C_i 为待测成分对照品浓度^[13]

2.6 仪器、色谱柱耐用性考察

取“2.3”项下混合对照品工作液,分别采用安捷伦G1311C型高效液相色谱仪、岛津LC-20AT型高效液相色谱仪、戴安DIONEX型高效液相色谱仪,分别采用Phenomenex Gemini[®] C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱、Thermo Scientific Synchronis C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱和InertSustain[®] C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱进行测定,考察不同仪器及色谱柱对相对校正因子的影响,计算平均值和RSD,结果见表6。结果表明仪器及色谱柱对相对校正因子均无明显影响。

2.7 待测色谱峰定位

取“2.3”项下混合对照品工作液,分别采用3种不同色谱仪和3种色谱柱测定,计算各待测成分对异绿原酸A的相对保留时间($r=t_{Ri}/t_{Rs}$),结果见表7。结果表明利用相对保留时间进行色谱峰的定位是可行的。

2.8 QAMS与外标法测定结果比较

取藏茴香3批各0.5 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,分别用外标法和QAMS测定各成分质量分数^[14],结果见表8。外标法实测值与QAMS计算值比较,差异无统计学意义,表明

表5 5种待测成分的相对校正因子

Table 5 Relative correction factors of five components tested

进样体积	$f_{\text{异绿原酸 A/新绿原酸}}$	$f_{\text{异绿原酸 A/绿原酸}}$	$f_{\text{异绿原酸 A/隐绿原酸}}$	$f_{\text{异绿原酸 A/异绿原酸 B}}$	$f_{\text{异绿原酸 A/异绿原酸 C}}$
3 μL	1.372	1.257	1.350	1.501	1.144
5 μL	1.374	1.259	1.345	1.496	1.150
7 μL	1.380	1.261	1.350	1.486	1.153
10 μL	1.378	1.265	1.343	1.495	1.142
15 μL	1.350	1.251	1.326	1.512	1.118
20 μL	1.347	1.256	1.332	1.427	1.120
25 μL	1.349	1.252	1.323	1.422	1.123
30 μL	1.343	1.252	1.311	1.424	1.120
平均值	1.362	1.257	1.335	1.470	1.134
RSD/%	1.17	0.38	1.06	2.64	1.29

表6 不同仪器和色谱柱测定5种待测成分的相对校正因子

Table 6 Determination of relative correction factors of five components by different instruments and chromatographic columns

HPLC 色谱仪	色谱柱	$f_{\text{异绿原酸 A/新绿原酸}}$	$f_{\text{异绿原酸 A/绿原酸}}$	$f_{\text{异绿原酸 A/隐绿原酸}}$	$f_{\text{异绿原酸 A/异绿原酸 B}}$	$f_{\text{异绿原酸 A/异绿原酸 C}}$
安捷伦 G1311C	Phenomenex	1.378	1.265	1.343	1.495	1.142
	Thermo	1.272	1.205	1.253	1.434	1.115
	InertSustain	1.400	1.284	1.355	1.579	1.196
岛津 LC-20AT	Phenomenex	1.388	1.231	1.283	1.458	1.128
	Thermo	1.328	1.197	1.379	1.503	1.125
	InertSustain	1.431	1.242	1.350	1.494	1.157
戴安 DIONEX	Phenomenex	1.296	1.265	1.261	1.522	1.142
	Thermo	1.392	1.193	1.385	1.502	1.147
	InertSustain	1.322	1.270	1.398	1.505	1.156
	平均值	1.361	1.235	1.326	1.498	1.144
	RSD/%	4.08	2.79	3.97	2.87	2.17

表7 不同仪器和色谱柱测定5种待测成分的相对保留时间

Table 7 Determination of relative retention time of five components by different instruments and chromatographic columns

HPLC 色谱仪	色谱柱	$r_{\text{新绿原酸/异绿原酸 A}}$	$r_{\text{绿原酸/异绿原酸 A}}$	$r_{\text{隐绿原酸/异绿原酸 A}}$	$r_{\text{异绿原酸 B/异绿原酸 A}}$	$r_{\text{异绿原酸 C/异绿原酸 A}}$
安捷伦 G1311C	Phenomenex	0.439	0.571	0.590	0.980	1.056
	Thermo	0.456	0.600	0.623	0.968	1.069
	InertSustain	0.466	0.582	0.599	0.991	1.023
岛津 LC-20AT	Phenomenex	0.439	0.552	0.581	0.983	1.071
	Thermo	0.451	0.577	0.603	0.967	1.074
	InertSustain	0.444	0.562	0.594	0.941	1.058
戴安 DIONEX	Phenomenex	0.450	0.574	0.645	0.981	1.089
	Thermo	0.402	0.567	0.591	0.984	1.076
	InertSustain	0.467	0.555	0.584	0.993	1.049
	平均值	0.443	0.573	0.603	0.974	1.064
	RSD/%	4.25	2.49	3.45	1.63	1.87

建立的方法具有较好的准确度与可信度。

3 讨论

QAMS 作为适宜于中药特点的多指标质量控

制评价新模式和新方法,已经越来越多地应用于中药的科研和生产实际中,成为中药质量评价的重要定量评价手段。目前 QAMS 在中药材及其饮片质

表8 外标法和QAMS测定藏茴香中6种待测成分质量分数比较

Table 8 Comparison of EMS and QAMS in determination of six components in *C. carvi* fruits

批号	异绿原酸A/ (mg·g ⁻¹)	新绿原酸/(mg·g ⁻¹)		绿原酸/(mg·g ⁻¹)		隐绿原酸/(mg·g ⁻¹)		异绿原酸B/(mg·g ⁻¹)		异绿原酸C/(mg·g ⁻¹)	
		外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS
20180715	0.81	0.11	0.11	0.51	0.53	0.16	0.17	0.28	0.27	0.62	0.61
20201224	0.74	0.10	0.10	0.47	0.46	0.15	0.15	0.26	0.25	0.57	0.57
20220808	0.78	0.11	0.10	0.49	0.48	0.14	0.14	0.25	0.25	0.60	0.61

量评价、多品种中药基原鉴定、炮制工艺及炮制品质量评价,原料药提取物、中间体及制剂的质量评价等多个方面应用广泛,显示出方便、快捷、成本低廉、准确度高等优势和良好的应用前景^[15-17]。

绿原酸是由咖啡酸与奎尼酸反应生成的酯,其分子中含有酯键、不饱和双键与多元酚等多个不稳定部分,通常以几种异构体共存的形式存在于植物中,平常提取到的绿原酸类物质主要包括咖啡酰奎宁酸、二咖啡酰奎宁酸和阿魏酰奎宁酸等^[18]。藏茴香中比较典型的咖啡酸衍生物是咖啡酰奎宁酸(绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸)和二咖啡酰奎宁酸(异绿原酸A、异绿原酸B和异绿原酸C)。由于这些成分是同分异构体,化学结构类似,因此同时测定多个成分的含量比单独测定某1、2个成分更能代表此类化学成分群的全貌。采用传统外标法测定多成分含量时往往需要购买每个对照品,经济成本较高,而QAMS可以快速高效地实现多成分含量测定,大大节约了经济成本与时间成本。

咖啡酸衍生物具有高抗氧化活性,许多研究表明氧化应激在白癜风的发生、发展中起重要作用。白癜风患者皮损或血清中活性氧、H₂O₂、丙二醛和超氧化物歧化酶水平显著升高,脂质过氧化反应增强。过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和还原型谷胱甘肽(GSH)表达水平降低,表明白癜风患者存在氧化-抗氧化失衡^[19-20]。

已有研究报道二咖啡酰基奎宁酸在介导黑色素形成方面的正向作用。例如1,5-二咖啡酰基奎宁酸可通过B16细胞中的MAPK和cAMP/PKA信号通路刺激黑色素生成^[21]。异绿原酸A即3,5-二咖啡酰奎宁酸通过β-连环蛋白(β-catenin)信号通路介导黑色素合成的加速,其作用具有时间和剂量相关性^[22]。这些活性成分对白癜风疾病具有潜在的治疗意义。

相对于其他待测成分,异绿原酸A在藏茴香中的含量较高,化学性质较稳定,廉价易得,故选其作为内参成分。本研究建立QAMS,以异绿原酸A为

内参成分,同时测定藏茴香中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B和异绿原酸C成分的含量,通过方法学考察、色谱峰定位以及与外标法测定值进行比较,对其可行性进行了探讨分析,结果表明,QAMS计算值与外标法测定值无明显差异,具有较高的重现性与稳定性,该方法操作简便,提高了分析测试效率,降低了生产经济成本与时间成本,实现藏茴香多指标成分控制的目的,可为藏茴香药材的质量评价提供参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 新疆维吾尔自治区卫生厅. 维吾尔药材标准(上册) [M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生, 1993: 398.
Department of Health of Xinjiang Uygur Autonomous Region. *Standard for Uighur Medicinal Materials (Volume I)* [M]. Urumqi: Xinjiang Science and Technology Health, 1993: 398
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第七十四卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 275-277.
Editorial Committee of Flora of China. *Chinese Academy of Sciences Flora of China (Volume 74)* [M]. Beijing: Science Press, 1985: 275-277.
- [3] 杨丽娟, 何婷, 火明才, 等. «回回药方»中“茴香”的本草考证 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(7): 3213-3216.
Yang L J, He T, Huo M C, et al. Herbal textual research of fennel in *Huihui Yaofang* [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(7): 3213-3216.
- [4] 买买提衣明·吾不力卡生木. 藏茴香制剂治疗白癜风 [J]. 中国民族医药杂志, 2006, 12(4): 92.
Wubulikashengmu M. Treatment of vitiligo with Tibetan fennel preparation [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2006, 12 (4): 92.
- [5] Xiong C, Elken A, Abduvaidi C, et al. Clinical observation of Uyghur medicine Atiri Pull Tablet in the treatment of stable vitiligo [J]. World Lat Med Inf, 2020, 20: 215-222.
- [6] Es-Safi I, Mechchate H, Amaghnoije A, et al. An insight into the anxiolytic and antidepressant-like proprieties of

- Carum carvi* L. and their association with its antioxidant activity [J]. *Life* (Basel), 2021, 11(3): 207.
- [7] Abuduaini A, Lu X Y, Zang D, et al. Effects of a traditional caraway formulation on experimental models of vitiligo and mechanisms of melanogenesis [J]. *Evid Based Compl Alternat Med*, 2021, 2021: 6675657.
- [8] Trifan A, Aprotosoaie A C, Cioancă O, et al. Antioxidant activity of essential oil from *Carum carvi* L. cultivated in north-eastern Romania [J]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2016, 120(3): 732-736.
- [9] Tajner-Czopek A, Gertchen M, Rytel E, et al. Study of antioxidant activity of some medicinal plants having high content of caffeic acid derivatives [J]. *Antioxidants* (Basel), 2020, 9(5): 412.
- [10] 李琪, 王博, 李晨阳, 等. 黑骨藤LC-MS定性分析及4种绿原酸一测多评分析方法 [J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2021, 44(5): 666-673.
- Li Q, Wang B, Li C Y, et al. Chemical profiling and quantitative analysis of multi-components by single marker of four chlorogenic acids in *Periploca forrestii* Schltr [J]. *J Sichuan Norm Univ Nat Sci*, 2021, 44(5): 666-673.
- [11] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. "一测多评"法中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- 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*, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [12] 中国药典 [S]. 四部. 2020.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020.
- [13] 麻景梅, 麻朝朝, 高乐, 等. 一测多评法用于茵栀黄传统汤剂12种成分含量测定的适用性研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2021, 28(6): 75-82.
- Ma J M, Ma Z Z, Gao L, et al. Study on applicability of QAMS for content determination of 12 components in Yinzhihuang traditional decoction [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2021, 28(6): 75-82.
- [14] 徐玉平, 蒋向辉, 王翔. 一测多评法测定金银花中咖啡酰奎尼酸类化学成分的含量 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(1): 118-121.
- Xu Y P, Jiang X H, Wang X. Determination of caffeoyl quinic acids in *Lonicera japonica* Thunb. by one-test and multiple-evaluation method [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2018, 46(1): 118-121.
- [15] 朱晶晶, 王智民, 高慧敏, 等. 一测多评法在中药质量评价中的应用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16): 220-228.
- Zhu J J, Wang Z M, Gao H M, et al. Advances on quality evaluation of Chinese materia medica by QAMS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2016, 22(16): 220-228.
- [16] 罗家敏, 高雯, 李萍. 指纹图谱结合一测多评法的栀子质量控制方法研究 [J]. 中草药, 2022, 53(11): 3480-3486.
- Luo J M, Gao W, Li P. Study on quality control method of *Gardenia jasminoides* by fingerprint combined with single standard for determination of multiple components [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(11): 3480-3486.
- [17] 袁汉文, 吕梦颖, 罗江溢, 等. 基于特征图谱和一测多评法的黄柏质量控制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5491-5496.
- Yuan H W, Lv M Y, Luo J Y, et al. Quality control of *Phellodendri Chinensis Cortex* based on HPLC characteristic fingerprint and single standard to determine multi-components method [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(17): 5491-5496.
- [18] 包伊凡, 沈新春, 汪芳. 咖啡酸及其主要衍生物的研究进展及开发前景 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(10): 1825-1833, 1733.
- Bao Y F, Shen X C, Wang F. The research progress and development prospects of biosynthesis, structure activity relationship and biological activity of caffeic acid and its main types of derivatives [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2018, 30(10): 1825-1833, 1733.
- [19] He Y M, Li S L, Zhang W G, et al. Dysregulated autophagy increased melanocyte sensitivity to H₂O₂-induced oxidative stress in vitiligo [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42394.
- [20] Li S L, Dai W, Wang S J, et al. Clinical significance of serum oxidative stress markers to assess disease activity and severity in patients with non-segmental vitiligo [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 739413.
- [21] Mamat N, Lu X Y, Kabas M, et al. Potential anti-vitiligo properties of cynarine extracted from *Vernonia anthelmintica* (L.) Willd [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(5): 2665-2675.
- [22] Mamat N, Dou J, Lu X Y, et al. Isochlorogenic acid A promotes melanin synthesis in B16 cell through the β -catenin signal pathway [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2017, 49(9): 800-807.

[责任编辑 兰新新]