

基于HPLC多组分定量联合化学计量学及灰色关联度分析的地肤子质量控制研究

乔乐天¹, 刘 源¹, 贾 号¹, 孙 彬^{2*}

1. 商丘市第一人民医院 药学部, 河南 商丘 476100

2. 聊城大学 生物制药研究院, 山东 聊城 252059

摘要: 目的 建立定量检测地肤子中9种成分含量的高效液相色谱(HPLC)法, 并联合化学计量学及灰色关联度分析对其质量控制进行研究。方法 采用HPLC法同时检测地肤子中芦丁、金丝桃苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素、齐墩果酸、胡萝卜苷、地肤子皂苷Ic、 β -谷甾醇含量, 并通过聚类分析、主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析及灰色关联度分析比较不同产地地肤子质量差异。结果 芦丁、金丝桃苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素、齐墩果酸、胡萝卜苷、地肤子皂苷Ic和 β -谷甾醇分别在各自范围内线性关系良好($r > 0.999\ 2$); 精密度、稳定性及重复性良好; 平均加样回收率在96.93%~100.12%。聚类分析结果显示17批样品聚为3类; 主成分分析结果显示主成分1、2是影响样品质量评价的主要因子; 正交偏最小二乘法-判别分析结果显示地肤子皂苷Ic、芦丁和齐墩果酸变量重要性投影(VIP)值均 >1 , 是影响产品质量差异的标志性成分; 灰色关联度分析结果显示17批样品的相对关联度在0.334 0~0.622 5, 不同产地地肤子质量存在一定差异。结论 所建立的HPLC多组分定量联合化学计量学及灰色关联度分析方法操作便捷、结果准确, 可为地肤子质量控制和品质评价提供依据。

关键词: 地肤子; 化学计量学; 灰色关联度分析法; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 芦丁; 金丝桃苷; 异鼠李素-3-O-葡萄糖苷; 槲皮素; 异鼠李素; 齐墩果酸; 胡萝卜苷; 地肤子皂苷Ic; β -谷甾醇

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)04-0812-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.04.015

Comprehensive quality evaluation of *Kochia scoparia* based on HPLC multicomponent quantitative combined with chemometric analysis and GRA

QIAO Letian¹, LIU Yuan¹, JIA Hao¹, SUN Bin²

1. Department of Pharmacy, The First People's Hospital of Shangqiu, Shangqiu 476100, China

2. Institute of Biopharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of nine components in *Kochia scoparia*, and to study the quality by combining chemometrics and grey relational analysis (GRA). **Method** HPLC method was used to simultaneously determine the contents of rutin, hyperoside, isorhamnetin-3-O-beta-D-glucoside, quercetin, isorhamnetin, oleanolic acid, eleutheroside A, kochioside Ic and β -sitosterol in *K. scoparia*. The quality differences of *K. scoparia* from different producing areas were compared by cluster analysis, principal component analysis, orthogonal partial least-squares method-discriminant analysis and grey correlation analysis. **Results** The linear relationship of rutin, hyperoside, isorhamnetin-3-O-beta-D-glucoside, quercetin, isorhamnetin, oleanolic acid, eleutheroside A, kochioside Ic and β -sitosterol was good in their respective ranges ($r > 0.999\ 2$). The method had good precision, stability, and repeatability ($RSD < 2.0\%$). The average recovery ($n = 9$) was between 96.93% and 100.12% ($RSD < 2.0\%$). Cluster analysis showed that 17 batches of *K. scoparia* were clustered into three categories. Principal component analysis showed that principal component 1 and 2 was the main factor affecting the quality evaluation of the samples. Orthogonal partial least squares-discriminant analysis showed that VIP values of kochioside Ic, rutin and oleanolic acid were all greater than 1, which were the symbolic components affecting the quality difference of products. GRA

收稿日期: 2023-01-18

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81703357); 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20210992)

第一作者: 乔乐天(1985—), 男, 本科, 主管药师, 研究方向为药物质量控制。E-mail: az3306630@163.com

*通信作者: 孙 彬(1984—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为生物制药。E-mail: uyvy86@163.com

showed that the relative correlation degree of 17 batches of *K. scoparia* was between 0.334 0 and 0.622 5. There were some differences in the quality of *K. scoparia* from different producing areas. **Conclusion** The established HPLC multi-component quantitative method combined with chemometrics and grey relational analysis is convenient and accurate, which can provide a basis for quality control and quality evaluation of *K. scoparia*.

Key words: *Kochia scoparia*; chemometric analysis; grey correlation analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; rutoside; hyperoside; isorhamnetin-3-*O*- β -*D*-glucoside; quercetin; isorhamnetin; oleanolic acid; eleutheroside A; kochioside Ic; β -sitosterol

地肤子为藜科植物地肤 *Kochia scoparia* (L.) Schrad. 的干燥成熟果实, 具有清热利湿、祛风止痒的作用, 临床用于小便涩痛、阴痒带下、风疹、湿疹、皮肤瘙痒等症的治疗。地肤子在我国分布和应用^[1]均较为广泛, 研究表明地肤子中富含皂苷类、黄酮类和挥发油等化合物^[2-3], 其中齐墩果酸是地肤子抑菌活性的物质基础^[4], 皂苷单体成分的抗真菌活性程度不一^[5]。地肤子收载于《中国药典》2020年版一部^[6], 对地肤子皂苷 Ic 含量进行了测定。文献也局限于少数成分研究分析^[7-9]。中药因其多成分、多靶点的作用优势, 在防治疾病方面具有独特疗效, 仅靠少数成分为指标去评价其整体质量存在一定的片面性, 因此, 建立科学快捷的质量评价方式, 对评价地肤子的整体质量具有重要的现实意义。本研究采用 HPLC 法同时测定不同产地地肤子中芦丁、金丝桃苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素、齐墩果酸、胡萝卜苷、地肤子皂苷 Ic 和 β -谷甾醇 9 种成分的含量, 并通过化学计量学^[10-11]和灰色关联度分析法 (GRA)^[12-13]对 8 省 17 批样品中 9 种成分的含量进行差异性研究, 旨在为地肤子的整体质量控制及药材品质评价奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

Waters e2695 型 HPLC 仪 (美国 Waters 公司); CPA225D 型分析天平 (德国 Sartorius 公司); KQ-250DE 型超声波清洗器 (昆山市超声波仪器有限公司)。

1.2 主要试剂

对照品芦丁、金丝桃苷、槲皮素、异鼠李素、齐墩果酸、地肤子皂苷 Ic 和 β -谷甾醇 (中国食品药品检定研究院, 批号分别为 100080-202012、111521-201809、100081-201610、110860-202012、110709-202109、111723-201806、110851-201909, 质量分数分别为 92.2%、94.9%、99.8%、99.1%、95.8%、92.0%、92.7%); 异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷和胡萝卜苷 (成都普瑞法科技开发有限公司, 批号分别为 PRF8081421、PRF8021422, 质量分数分别为 99.4%、

99.3%); 17 批地肤子样品信息见表 1, 经商丘市第一人民医院药学部刘源副主任药师鉴定, 为藜科植物地肤 *K. scoparia* (L.) Schrad. 的干燥成熟果实; 乙腈和磷酸 (色谱级, Fisher 公司); 甲醇 (分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); 水为娃哈哈纯净水。

表 1 样品采集地信息

Table 1 Information of sample collection place

编号	采集地	采收时间	编号	采集地	采收时间
S1	浙江松阳县	2021-10	S10	安徽凤台县	2021-10
S2	浙江浦江县	2021-09	S11	安徽金寨县	2021-10
S3	江西婺源县	2021-10	S12	湖北南漳县	2021-10
S4	江西泰和县	2021-10	S13	湖北保康县	2021-09
S5	陕西凤县	2021-09	S14	河南宁陵县	2021-10
S6	陕西汉阴县	2021-08	S15	河南罗山县	2021-10
S7	山东巨野县	2021-09	S16	湖南隆回县	2021-09
S8	山东东阿县	2021-08	S17	湖南新邵县	2021-10
S9	山东平邑县	2021-08			

2 方法及结果

2.1 HPLC 多组分定量检测方法学研究

2.1.1 色谱条件 采用 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 柱温 25 $^{\circ}$ C; 乙腈-0.2% 磷酸为流动相, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 梯度洗脱 (0~12 min, 19% 乙腈; 12~20 min, 19%→55% 乙腈; 20~29 min, 55%→75% 乙腈; 29~40 min, 75%→85% 乙腈; 40~49 min, 85%→90% 乙腈; 49~60 min, 90%→12% 乙腈); 进样量 10 μ L; 检测波长分别为 283 nm (0~29 min 检测芦丁、金丝桃苷、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素和异鼠李素)^[14-16]、205 nm (29~60 min 检测齐墩果酸、胡萝卜苷、地肤子皂苷 Ic 和 β -谷甾醇)^[17-20]。

2.1.2 对照品溶液制备 精确称取各对照品适量, 用 75% 甲醇制成每毫升含芦丁 0.532 mg、金丝桃苷 0.190 mg、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷 0.042 mg、槲皮素 0.076 mg、异鼠李素 0.058 mg、齐墩果酸 0.310 mg、胡萝卜苷 0.172 mg、地肤子皂苷 Ic 8.570 mg、 β -谷甾醇 0.256 mg 的混合对照品贮备液。再用 75% 甲

醇精确稀释20倍配制成对照品溶液：芦丁($26.60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、金丝桃苷($9.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷($2.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、槲皮素($3.80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、异鼠李素($2.90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、齐墩果酸($15.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、胡萝卜苷($8.60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、地肤子皂苷Ic($428.50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和 β -谷甾醇($12.80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)，即得。

2.1.3 供试品溶液制备 精确称取地肤子粉末约0.5 g，置25 mL量瓶中，用75%甲醇超声提取30 min，放至室温后用75%甲醇定至标线，摇匀，0.45 μm 滤膜滤过，续滤液即为供试品溶液。

2.1.4 专属性试验 精确量取对照品溶液和供试品溶液各10 μL ，进样并记录色谱图。结果显示供试品溶液中9种成分与对照品的保留时间一致，且在该条件下，与相邻色谱峰分离度均 ≥ 1.5 ；理论塔板数按齐墩果酸计不低于6 500(图1)。

2.1.5 线性考察 精确量取“2.1.2”项混合对照品贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、2.5 mL，采用75%甲醇为溶剂定容至20 mL制得6个不同质量浓度的对照品工作溶液，依法测定，记录芦丁等9种成分色谱峰面积，以峰面积积分值为纵坐标，质量分数为横坐标进行标准曲线的绘制，见表2。结果表明，对照品溶液中9种成分在各自范围内线性关系良好。

2.1.6 精密度、稳定性及重复性试验 取地肤子(S17)供试品溶液1份，在“2.1.1”项色谱条件下连续6次进样，记录色谱图，得芦丁等9种成分峰面积的RSD值依次为0.67%、1.16%、1.31%、1.26%、1.24%、0.99%、1.08%、0.39%、1.02%，表明仪器精密度良好。取1份地肤子(S17)供试品溶液，于制备后0、2、4、6、10、16、24 h进样，记录色谱图，得芦丁等9种成分峰面积的RSD值依次为1.09%、1.50%、1.88%、1.43%、1.37%、1.25%、1.58%、0.70%、1.49%，

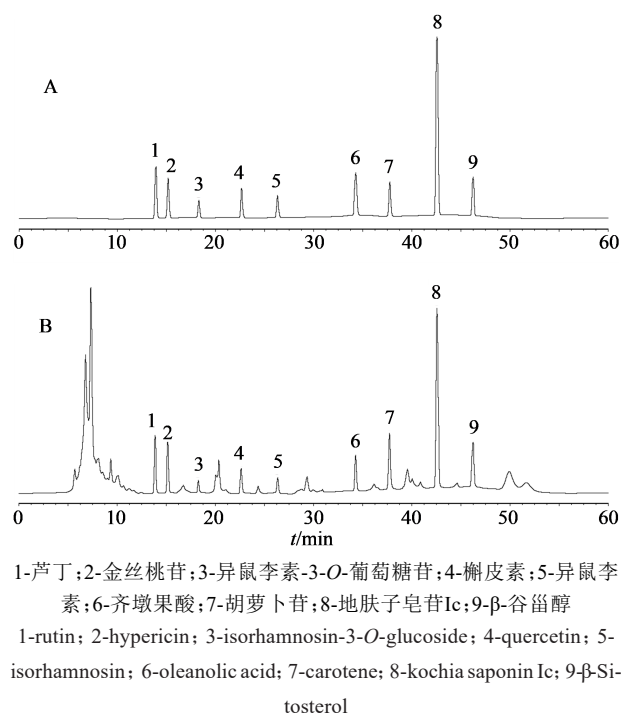


图1 混合对照品(A)、地肤子供试品溶液(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), and *K. scoparia* (B)

表明地肤子供试品溶液24 h内稳定。按“2.1.3”项方法平行制备6份地肤子(S1)供试品溶液，依法进样，记录色谱峰峰面积，用外标法计算芦丁等9种成分的含量，得各成分含量的RSD值依次为1.46%、1.69%、1.94%、1.79%、1.82%、1.43%、1.65%、0.68%、1.36%，表明方法重复性良好。

2.1.7 加样回收率试验 取已知各成分含量的地肤子粉末(S17)9份，每份精确称取0.25 g，均分成3组，分别加入混合对照品溶液(每毫升含芦丁0.389 mg、金丝桃苷0.154 mg、异鼠李素-3-*O*-葡萄糖苷0.018 mg、槲皮素0.047 mg、异鼠李素0.029 mg、齐

表2 线性方程、相关系数及线性范围

Table 2 Linear relationship, correlation coefficient and linearity

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
芦丁	$Y=4.9851 \times 10^6 X + 1\ 093.6$	0.999 4	2.66~66.50
金丝桃苷	$Y=3.7029 \times 10^6 X - 351.2$	0.999 7	0.95~23.75
异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	$Y=1.5917 \times 10^6 X + 232.8$	0.999 6	0.21~5.25
槲皮素	$Y=3.1541 \times 10^6 X - 758.9$	0.999 9	0.38~9.50
异鼠李素	$Y=2.5034 \times 10^6 X + 523.1$	0.999 6	0.29~7.25
齐墩果酸	$Y=5.3274 \times 10^6 X - 1\ 126.7$	0.999 8	1.55~38.75
胡萝卜苷	$Y=2.2867 \times 10^6 X - 655.3$	0.999 5	0.86~21.50
地肤子皂苷Ic	$Y=2.7516 \times 10^6 X - 396.6$	0.999 2	42.85~1\ 071.25
β -谷甾醇	$Y=4.6359 \times 10^6 X + 1\ 018.8$	0.999 9	1.28~32.00

墩果酸0.238 mg、胡萝卜苷0.131 mg、地肤子皂苷Ic 6.397 mg、 β -谷甾醇0.206 mg) 0.8、1.0、1.2 mL, 按照“2.1.3”项方法处理后, 精确量取10 μ L进样测定, 计算各成分回收率。结果9种成分的平均加样回收率分别为99.07%、98.10%、96.93%、98.31%、97.53%、98.65%、96.95%、100.12%、98.659%, RSD分别为1.24%、1.03%、1.45%、1.04%、1.36%、1.16%、

0.90%、0.83%、1.14%。

2.2 含量测定

取地肤子17批(S1~S17)样品, 按照“2.1.3”项方法制备供试品溶液, 依法进样分析, 运用外标法计算芦丁、金丝桃苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素、齐墩果酸、胡萝卜苷、地肤子皂苷Ic、 β -谷甾醇的质量分数, 结果见表3。

表3 含量测定结果($n=3$)
Table 3 Results of content determination ($n=3$)

编号	芦丁/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	金丝桃苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	异鼠李素-3-O-葡 萄糖苷/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	槲皮素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	异鼠李素/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	齐墩果酸/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	胡萝卜苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	地肤子皂苷Ic/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	β -谷甾醇/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
S1	2.072	0.547	0.000	0.154	0.096	0.673	0.845	21.123	0.764
S2	1.515	0.614	0.067	0.158	0.099	0.662	0.720	22.096	0.794
S3	1.427	0.564	0.063	0.149	0.090	0.727	0.862	20.463	0.736
S4	1.370	0.524	0.066	0.143	0.093	0.555	0.755	20.039	0.708
S5	1.224	0.958	0.112	0.240	0.154	0.793	0.436	32.320	1.112
S6	1.151	0.812	0.116	0.225	0.138	1.104	0.629	32.950	1.215
S7	1.063	0.929	0.125	0.246	0.151	0.913	0.472	33.599	1.176
S8	1.006	0.862	0.107	0.235	0.147	0.605	0.825	31.626	1.054
S9	0.949	0.837	0.103	0.219	0.141	1.000	0.553	32.111	1.084
S10	1.967	0.652	0.088	0.165	0.125	1.085	0.586	23.661	0.884
S11	1.741	0.633	0.100	0.192	0.122	1.212	0.512	27.490	1.025
S12	1.783	0.716	0.084	0.174	0.109	1.071	0.703	26.260	0.941
S13	1.858	0.667	0.091	0.178	0.116	1.158	0.665	25.364	0.912
S14	1.657	0.689	0.095	0.187	0.106	1.183	0.535	28.094	0.995
S15	1.614	0.785	0.080	0.170	0.102	1.051	0.779	26.899	0.968
S16	1.487	0.499	0.075	0.163	0.119	0.852	0.575	24.342	0.844
S17	1.562	0.601	0.076	0.182	0.113	0.942	0.521	25.704	0.819

2.3 化学计量学质量评价模式的建立

2.3.1 聚类分析(CA) 将17批地肤子中9种成分质量分数数据导入SPSS 26.0软件, 以Euclidean距离为测度, 采用平均联接法运行系统聚类程序, 得图2。结果显示聚类明显, 当类间距离为10时, 聚为3类, 一类为S5、S9、S8、S6和S7, 一类为S3、S4、S1和S2, 另一类为S10、S16、S11、S14、S13、S17、S12和S15。

2.3.2 主成分分析(PCA) 将地肤子中9种成分质量分数数据导入SPSS 26.0软件进行降维分析, 以特征值大于1为标准筛选出2个主成分, 2个主成分的累积方差贡献率达到85.772%(表4), 其中主成分1方差贡献率为69.042%, 综合了芦丁、金丝桃苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素、胡萝卜苷、地肤子皂苷Ic、 β -谷甾醇的信息, 主成分2的方差贡献率为16.730%, 解释了齐墩果酸的信息(表5)。

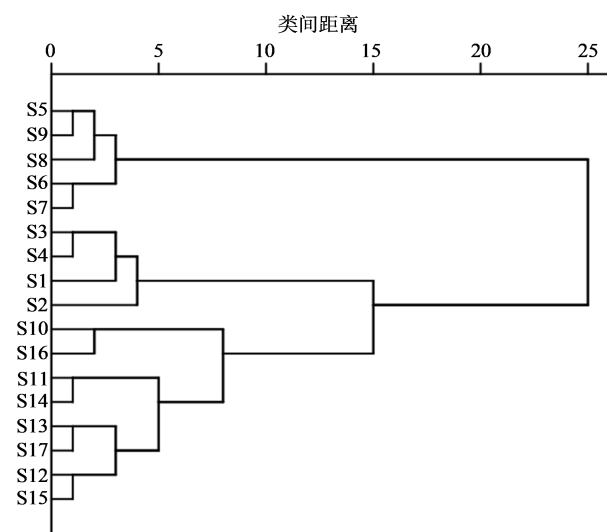


图2 12批样品CA图

Fig. 2 Dendrogram for CA for 12 batches of samples

表4 地肤子中主成分方差分析

Table 4 Principal component analysis of variance in *K. scoparia*

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	6.214	69.042	69.042
2	1.506	16.730	85.772
3	0.561	6.229	92.001
4	0.370	4.110	96.112
5	0.147	1.637	97.748
6	0.127	1.416	99.164
7	0.039	0.432	99.597
8	0.028	0.313	99.910
9	0.008	0.090	100.000

表5 地肤子中9种成分的矩阵载荷

Table 5 Composition matrix of nine ingredients in *K. scoparia*

成分	载荷	
	1	2
芦丁	-0.669	0.613
金丝桃苷	0.898	-0.171
异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	0.889	0.124
槲皮素	0.965	-0.154
异鼠李素	0.927	-0.099
齐墩果酸	0.333	0.892
胡萝卜苷	-0.630	-0.496
地肤子皂苷Ic	0.980	-0.011
β -谷甾醇	0.955	0.101

同时应用多元变量统计软件SIMCA 14.1建立PCA模型(图3),共提取出2个主成分 R^2_x 为0.858,大于0.5,所建立的模型稳定性较高,进一步说明2个主成分可以代表地肤子的整体质量情况。从图3可以看出,S1~S4、S5~S9以及S10~S17分别呈现一定关联性,与CA结果基本一致。

2.3.3 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)为进一步确定引起地肤子质量差异的主要成分,在PCA的基础上进行了OPLS-DA。将地肤子中9种成分质量分数数据导入SIMCA 14.1软件,运行OPLS-DA程序,得图4,结果累积解释能力参数(R^2_x 、 R^2_y)分别为0.968和0.791,预测能力参数 Q^2 为0.698,均大于0.6,所建立的模型稳定可靠、预测能力强。

对建立的OPLS-DA模型进行200次置换检验,结果显示最右侧的 R^2 和 Q^2 值均高于左侧,表明所构建的OPLS-DA模型预测能力好(图5)。结合变量

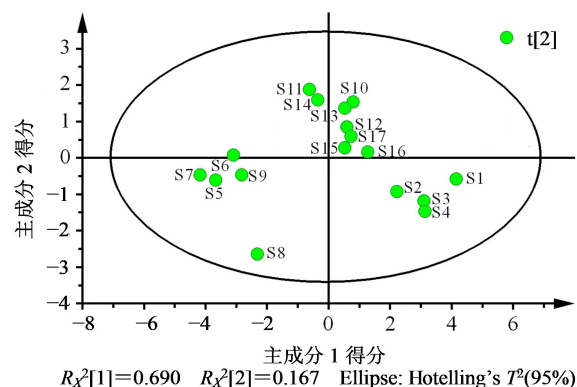


图3 地肤子PCA得分

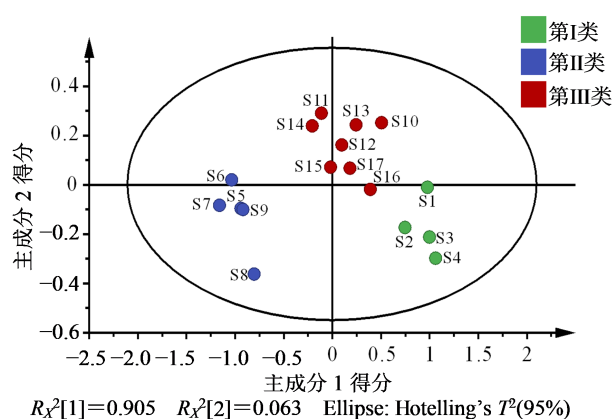
Fig. 3 PCA scores of *K. scoparia*

图4 地肤子OPLS-DA模型得分

Fig. 4 OPLS-DA scores of *K. scoparia*

\$M2.DA(1) Intercepts: $R^2 = (0.0, 0.065)$, $Q^2 = (0.0, -0.380)$

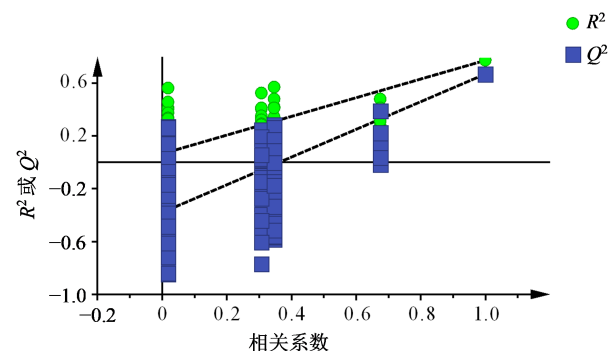


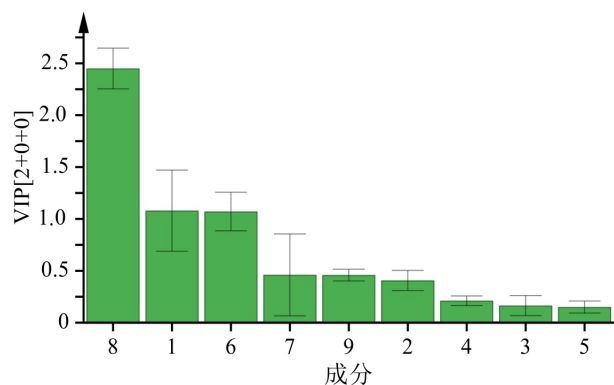
图5 OPLS-DA置换检测结果

Fig. 5 Permutation plot of OPLS-DA

重要性投影(VIP)法筛选影响地肤子化学成分差异的标志性成分(图6),以VIP>1为标准筛选到3个成分,即成分8(地肤子皂苷Ic, VIP=2.450)>成分1(芦丁, VIP=1.070)>成分6(齐墩果酸, VIP=1.071),是影响地肤子产品质量的主要成分。

2.4 灰色关联度分析质量评价模式的建立

2.4.1 原始数据矩阵规格化 灰色关联度分析即通过度量变量的发展趋势的相同或相异程度,来衡



1-芦丁;2-金丝桃苷;3-异鼠李素-3-O-葡萄糖苷;4-槲皮素;5-异鼠李素;6-齐墩果酸;7-胡萝卜苷;8-地肤子皂苷Ic;9-β-谷甾醇
1-rutoside; 2-hyperoside; 3-isorhamnetin-3-O-beta-D-glucoside;
4-quercetin; 5-isorhamnetin; 6-oleanolic acid; 7-eleutheroside A;
8-kochioside Ic; 9-β-sitosterol

图6 地肤子样品的VIP图

Fig. 6 VIP values of *K. scoparia*

表6 地肤子中9种成分质量分数数据规格化处理结果

Table 6 Normalization results of content data of nine components of *K. scoparia*

编号	芦丁	金丝桃苷	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	槲皮素	异鼠李素	齐墩果酸	胡萝卜苷	地肤子皂苷Ic	β-谷甾醇
S1	1.384 3	0.782 1	0.000 0	0.823 1	0.807 4	0.734 1	1.309 1	0.790 7	0.810 2
S2	1.012 2	0.877 9	0.786 4	0.844 5	0.832 6	0.722 1	1.115 4	0.827 1	0.842 0
S3	0.953 4	0.806 4	0.739 4	0.796 4	0.756 9	0.793 0	1.335 4	0.766 0	0.780 5
S4	0.915 3	0.749 2	0.774 6	0.764 3	0.782 2	0.605 4	1.169 6	0.750 1	0.750 8
S5	0.817 7	1.369 7	1.314 6	1.282 7	1.295 2	0.865 0	0.675 4	1.209 8	1.179 2
S6	0.769 0	1.161 0	1.361 5	1.202 6	1.160 6	1.204 2	0.974 4	1.233 4	1.288 4
S7	0.710 2	1.328 3	1.467 1	1.314 8	1.270 0	0.995 9	0.731 2	1.257 7	1.247 1
S8	0.672 1	1.232 5	1.255 9	1.256 0	1.236 3	0.659 9	1.278 1	1.183 9	1.117 7
S9	0.634 0	1.196 7	1.208 9	1.170 5	1.185 9	1.090 8	0.856 7	1.202 0	1.149 5
S10	1.314 1	0.932 2	1.032 9	0.881 9	1.051 3	1.183 5	0.907 8	0.885 7	0.937 4
S11	1.163 1	0.905 1	1.173 7	1.026 2	1.026 1	1.322 0	0.793 2	1.029 0	1.087 0
S12	1.191 2	1.023 7	0.985 9	0.930 0	0.916 7	1.168 2	1.089 1	0.983 0	0.997 9
S13	1.241 3	0.953 7	1.068 1	0.951 4	0.975 6	1.263 1	1.030 2	0.949 5	0.967 1
S14	1.107 0	0.985 1	1.115 0	0.999 5	0.891 5	1.290 4	0.828 8	1.051 7	1.055 1
S15	1.078 3	1.122 4	0.939 0	0.908 6	0.857 9	1.146 4	1.206 8	1.006 9	1.026 5
S16	0.993 5	0.713 5	0.880 3	0.871 2	1.000 8	0.929 3	0.890 8	0.911 2	0.895 0
S17	1.043 6	0.859 3	0.892 0	0.972 7	0.950 4	1.027 5	0.807 1	0.962 2	0.868 5

对关联度计算公式得17批地肤子样品的相对关联度,相对关联度位于0~1,数值越大,样品综合质量最优,反之越差。以相对关联度大小为测度,对地肤子样品进行质量优劣排序(表9)。结果17批地肤子样品相对关联度0.334 0~0.622 5,样品S6、S7、S5、S8和S9分别位于排名前5位,S1、S2、S3和S4位于排名后4位,其余批次位于排名的中间位置。

3 讨论

中药材所含化学成分多而杂,且影响产品质量

量相关性。参考文献报道^[21]采用均值变换法对17批地肤子中芦丁、金丝桃苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素、齐墩果酸、胡萝卜苷、地肤子皂苷Ic、β-谷甾醇的质量分数数据进行规格化处理,结果见表6。

2.4.2 参考序列关联系数计算 以17批地肤子中各评价指标规格化处理后的最大值为最优参考序列,最小值为最差参考序列,参考序列关联系数计算公式^[21]分别计算各评价单元与最优参考序列的关联系数(表7)以及与最差参考序列的关联系数(表8)。

2.4.3 相对关联度计算 灰色关联度分析时,关联度为每批次地肤子样品中9种成分关联系数的平均值,由表7、8可得被评价对象与最优参考序列关联度以及与最差参考序列关联度,参考文献报道^[21]相

的因素较多,我国幅员辽阔,产地、环境、采摘期、炮制方式、储存条件等均可能影响产品质量,而只有多指标分析手段能够较为全面地反映中药材整体质量。本研究收集8个省中17批地肤子药材,测定其所含芦丁、金丝桃苷、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素、齐墩果酸、胡萝卜苷、地肤子皂苷Ic、β-谷甾醇的含量,并对17批样品进行了CA、PCA、OPLS-DA及灰色关联度分析,发掘出影响地肤子药材质量的主要成分为地肤子皂苷Ic、芦丁和齐墩果酸,发现不

表7 各评价单元与最优参考序列的关联系数

Table 7 Correlation coefficient between each evaluation unit and optimal reference sequence

编号	芦丁	金丝桃苷	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	槲皮素	异鼠李素	齐墩果酸	胡萝卜苷	地肤子皂苷Ic	β -谷甾醇
S1	1.000 0	0.358 3	0.333 3	0.358 9	0.355 6	0.378 7	0.926 2	0.352 1	0.359 8
S2	0.502 0	0.400 2	0.518 7	0.369 2	0.367 8	0.373 9	0.600 0	0.370 8	0.375 8
S3	0.465 4	0.368 1	0.502 0	0.346 8	0.333 3	0.403 8	1.000 0	0.340 4	0.346 1
S4	0.444 4	0.345 9	0.514 4	0.333 3	0.344 1	0.333 3	0.665 6	0.333 3	0.333 3
S5	0.398 4	1.000 0	0.827 9	0.895 6	1.000 0	0.439 5	0.333 3	0.841 2	0.711 1
S6	0.378 8	0.611 2	0.874 2	0.710 4	0.666 6	0.752 6	0.477 6	0.912 6	1.000 0
S7	0.357 5	0.888 0	1.000 0	1.000 0	0.914 4	0.523 5	0.353 2	1.000 0	0.866 8
S8	0.345 0	0.705 1	0.776 4	0.824 0	0.820 5	0.351 1	0.852 1	0.774 7	0.611 6
S9	0.333 3	0.654 8	0.739 7	0.656 1	0.711 2	0.607 8	0.408 1	0.820 0	0.659 3
S10	0.842 4	0.428 6	0.628 2	0.388 7	0.524 6	0.721 2	0.435 6	0.405 6	0.433 7
S11	0.629 1	0.413 9	0.714 3	0.488 2	0.500 0	1.000 0	0.378 4	0.526 0	0.571 7
S12	0.660 2	0.486 7	0.603 9	0.417 0	0.415 6	0.699 7	0.572 6	0.480 2	0.480 6
S13	0.724 0	0.440 9	0.647 7	0.431 0	0.457 2	0.858 8	0.519 5	0.451 6	0.455 5
S14	0.575 0	0.460 4	0.675 7	0.466 1	0.400 0	0.919 0	0.394 5	0.552 0	0.535 4
S15	0.550 8	0.570 2	0.581 4	0.403 9	0.381 0	0.671 1	0.719 6	0.503 0	0.506 5
S16	0.489 8	0.333 3	0.555 6	0.382 9	0.477 6	0.477 1	0.426 0	0.422 8	0.405 9
S17	0.524 1	0.391 3	0.560 5	0.445 9	0.438 4	0.548 9	0.384 5	0.462 0	0.390 3

表8 各评价单元与最差参考序列的关联系数

Table 8 Correlation coefficient between each evaluation unit and worst reference sequence

编号	芦丁	金丝桃苷	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	槲皮素	异鼠李素	齐墩果酸	胡萝卜苷	地肤子皂苷Ic	β -谷甾醇
S1	0.333 3	0.827 1	1.000 0	0.824 0	0.842 0	0.735 7	0.342 4	0.862 1	0.819 0
S2	0.498 0	0.666 2	0.482 6	0.774 4	0.780 5	0.754 3	0.428 6	0.767 2	0.746 7
S3	0.540 1	0.779 3	0.498 0	0.895 6	1.000 0	0.656 3	0.333 3	0.941 0	0.900 5
S4	0.571 5	0.901 9	0.486 4	1.000 0	0.914 1	1.000 0	0.400 4	1.000 0	1.000 0
S5	0.671 3	0.333 3	0.358 2	0.346 8	0.333 3	0.579 9	1.000 0	0.355 7	0.385 5
S6	0.735 4	0.423 0	0.350 1	0.385 7	0.400 0	0.374 4	0.524 6	0.344 3	0.333 3
S7	0.831 2	0.348 0	0.333 3	0.333 3	0.344 1	0.478 5	0.855 4	0.333 3	0.351 3
S8	0.907 8	0.387 3	0.368 7	0.358 9	0.359 6	0.868 0	0.353 8	0.369 1	0.422 8
S9	1.000 0	0.404 4	0.377 6	0.403 9	0.385 5	0.424 7	0.645 4	0.359 6	0.402 7
S10	0.355 5	0.600 0	0.415 3	0.700 6	0.477 6	0.382 6	0.586 8	0.651 8	0.590 3
S11	0.414 9	0.631 3	0.384 6	0.512 4	0.500 0	0.333 3	0.736 9	0.476 4	0.444 3
S12	0.402 4	0.514 0	0.426 6	0.624 2	0.627 5	0.389 0	0.443 7	0.521 5	0.521 0
S13	0.381 9	0.577 3	0.407 2	0.595 3	0.551 7	0.352 7	0.481 9	0.560 0	0.554 1
S14	0.442 3	0.547 1	0.396 8	0.539 2	0.666 6	0.343 4	0.682 7	0.457 0	0.469 0
S15	0.457 8	0.445 2	0.438 6	0.656 1	0.727 1	0.398 4	0.383 1	0.497 1	0.493 7
S16	0.510 7	1.000 0	0.454 5	0.720 3	0.524 6	0.525 2	0.605 1	0.611 7	0.650 8
S17	0.478 1	0.692 3	0.451 3	0.569 1	0.581 8	0.459 1	0.714 7	0.544 8	0.695 5

同产地的地肤子质量差异较大,提示在其质量控制上需重视产地因素。

本实验比较了超声法和加热回流法对地肤子中芦丁等9种成分提取率的影响。结果发现超声法提取率高、易操作。同时筛选了提取溶剂:甲醇、

75% 甲醇、50% 乙醇、80% 乙醇及提取时间:20、30、50、60 min,结果发现 75% 甲醇超声提取 30 min 为最佳。流动相的筛选在 HPLC 法中非常重要,本实验考察了乙腈-磷酸、甲醇-磷酸、乙腈-甲酸、甲醇-甲酸等体系,结果发现乙腈-0.2% 磷酸为流动相进行梯

表9 17批地肤子相对关联度及排序

Table 9 Ranking results of relative correlation degree of 17 batches of *K. scoparia*

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	0.491 4	0.731 7	0.401 8	14
S2	0.430 9	0.655 4	0.396 7	15
S3	0.456 2	0.727 1	0.385 5	16
S4	0.405 3	0.808 3	0.334 0	17
S5	0.716 3	0.484 9	0.596 3	3
S6	0.709 3	0.430 1	0.622 5	1
S7	0.767 0	0.467 6	0.621 3	2
S8	0.673 4	0.488 4	0.579 6	4
S9	0.621 1	0.489 3	0.559 3	5
S10	0.534 3	0.528 9	0.502 5	11
S11	0.580 2	0.492 7	0.540 8	6
S12	0.535 2	0.496 7	0.518 7	10
S13	0.554 0	0.495 8	0.527 7	7
S14	0.553 1	0.504 9	0.522 8	8
S15	0.543 1	0.499 7	0.520 8	9
S16	0.441 2	0.622 5	0.414 8	13
S17	0.460 7	0.576 3	0.444 3	12

度洗脱时, 芦丁等9种成分峰型对称、分离效果好, 基线平稳, 运行时间短。

本研究采用HPLC法对不同批次的地肤子中9种指标成分进行了含量测定, 采用多指标定量结合化学模式及灰色关联度分析方法对不同批次的地肤子质量进行了综合评价, 直观评价了其品质的一致性, 为地肤子的质量控制提供了数据支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 翟艳会, 吉红玉, 朱向东, 等. 地肤子的临床应用及其用量探究 [J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38(9): 960-963.
Zhai Y H, Ji H Y, Zhu X D, et al. Study on the clinical application and dosage of belvedere fruit [J]. J Chang Univ Chin Med, 2022, 38(9): 960-963.
- [2] 卢向红, 徐向东, 付红伟, 等. 地肤子化学成分的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(5): 338-342.
Lu X H, Xu X D, Fu H W, et al. Study on chemical constituents of *Kochia scoparia* [J]. Chin Pharm J, 2012, 47(5): 338-342.
- [3] 王红娟, 武洋, 王嘉玮, 等. 地肤子药理作用研究现状 [J]. 甘肃科技纵横, 2021, 50(8): 98-100, 111.
Wang H J, Wu Y, Wang J W, et al. Research on pharmacological effects of *Kochia scoparia* [J]. Sci Tech Inf Gansu, 2021, 50(8): 98-100, 111.
- [4] 闫梦茹, 张文博, 罗国平, 等. 地肤子抑菌活性成分筛选 [J]. 化学与生物工程, 2019, 36(2): 28-31.
Yan M R, Zhang W B, Luo G P, et al. Screening of antibacterial active constituents from *Fructus Kochiae* [J]. Chem Bioeng, 2019, 36(2): 28-31.
- [5] 徐云辉, 黄浩, 郭兆霞, 等. 地肤子抗真菌化学成分研究 [J]. 中成药, 2012, 34(9): 1726-1729.
Xu Y H, Huang H, Guo Z X, et al. Chemical constituents of antifungal extract from *Kochiae Fructus* [J]. Chin Tradit Pat Med, 2012, 34(9): 1726-1729.
- [6] 中国药典 [S]. 一部, 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [7] 吴小燕, 方丽红, 吕伟旗, 等. 地肤子中地肤子皂苷Ic含量变异规律与优良种质筛选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 183-188.
Wu X Y, Fang L H, Lyu W Q, et al. Variation pattern analysis of momordin ic content and high-quality germplasm screening in *Kochiae Fructus* from various origins [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(6): 183-188.
- [8] 肖作奇, 欧阳波, 潘涛, 等. 地肤子高效液相色谱指纹图谱及聚类分析研究 [J]. 中医药导报, 2017, 23(13): 37-39, 43.
Xiao Z Q, Ouyang B, Pan T, et al. Study on HPLC fingerprint of *Kochiae Fructus* and their cluster analysis [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 23(13): 37-39, 43.
- [9] 肖作奇, 文晓柯, 欧阳波, 等. HPLC法测定地肤子中芦丁和槲皮素的含量 [J]. 中国医药导报, 2016, 13(21): 146-148, 152.
Xiao Z Q, Wen X K, Ouyang B, et al. Simultaneous determination of rutin and quercetin in *Kochiae Fructus* by HPLC [J]. China Med Her, 2016, 13(21): 146-148, 152.
- [10] 于洋, 李军, 李宝国. 化学计量学在中药质量控制研究中的应用 [J]. 中成药, 2018, 40(5): 1139-1142.
Yu Y, Li J, Li B G. Application of chemometrics in quality control of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Pat Med, 2018, 40(5): 1139-1142.
- [11] 王宝林, 丘海芯, 甘金月, 等. 基于指纹图谱结合化学模式识别及多成分定量的千斤拔质量评价研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(12): 2464-2472.
Wang B L, Qiu H X, Gan J Y, et al. Determination of multi-components of *Moghania Radix* based on fingerprints and chemical pattern recognition [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(12): 2464-2472.
- [12] 李力, 潘倩雯, 刘宏. 灰色关联度分析法在中药谱效学

- 研究中的应用[J]. 中国药房, 2018, 29(11): 1581-1584.
- Li L, Pan Q W, Liu H. Application of grey correlation analysis in the study of spectrum efficiency of traditional Chinese medicine [J]. China Pharm, 2018, 29(11): 1581-1584.
- [13] 石依姗, 万青, 汪秋兰, 等. 基于熵权 TOPSIS 法和灰色关联度分析的藤茶药材等级研究 [J]. 中草药, 2022, 53(17): 5504-5512.
- Shi Y S, Wan Q, Wang Q L, et al. Research on grades of vine tea based on entropy TOPSIS method and grey correlation analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(17): 5504-5512.
- [14] 肖瑾, 肖珊, 许忠, 等. HPLC 法同时检测 16 种五加属植物中 10 种黄酮类成分的含量 [J]. 中药材, 2020, 43(9): 2181-2188.
- Xiao J, Xiao S, Xu Z, et al. Simultaneous determination of ten flavonoids contents in sixteen species of *Acanthopanax* plants by HPLC [J]. J Chin Med Mater, 2020, 43(9): 2181-2188.
- [15] 吴锦玉, 吴建国, 吴锦忠, 等. HPLC 法同时测定不同产地厚朴叶中 7 个成分的含量 [J]. 海峡药学, 2018, 30(10): 74-76.
- Wu J Y, Wu J G, Wu J Z, et al. Simultaneous determination of seven components in *Magnoliae Officinalis* leaves from different habitats by HPLC [J]. Strait Pharm J, 2018, 30(10): 74-76.
- [16] 崔小敏, 晋玥妮, 任慧, 等. 正心降脂片多指标成分的含量测定及聚类热图分析 [J]. 中国药房, 2021, 32(22): 2743-2747.
- Cui X M, Jin Y T, Ren H, et al. Content determination of multiple indexes in Zhengxin Jiangzhi Tablets and cluster heatmap analysis [J]. China Pharm, 2021, 32(22): 2743-2747.
- [17] 王建, 侯金良, 李正国. HPLC 法同时测定徐长卿及老君须提取物中咖啡酸、橙皮苷、白薇苷 A 和胡萝卜苷含量 [J]. 中国药师, 2022, 25(10): 1829-1833.
- Wang J, Hou J L, Li Z G. Simultaneous determination of caffeic acid, hesperidin, cynatratoside A and daucosterol in the extracts of *Cynanchum paniculatum* and *Cynanchum inamoenum* by HPLC [J]. China Pharm, 2022, 25(10): 1829-1833.
- [18] 李茹娜, 秦雯, 李晓瑾, 等. HPLC 测定不同产地大苞荆芥中的齐墩果酸和熊果酸 [J]. 华西药理学杂志, 2023, 38(1): 84-86.
- Li R N, Qin W, Li X J, et al. Determination of oleanolic acid and ursolic acid in *Nepeta bracteata* from different areas by HPLC [J]. West China J Pharm Sci, 2023, 38(1): 84-86.
- [19] 罗国平, 孟会宁, 陈程, 等. HPLC 法测定地肤子凝胶中地肤子皂苷 Ic 的质量分数 [J]. 化工科技, 2015, 23(6): 67-70.
- Luo G P, Meng H N, Chen C, et al. Content determination of Momordin Ic in *Fructus Kochiae* gel by HPLC [J]. Sci & Technol Chem Ind, 2015, 23(6): 67-70.
- [20] 尹君, 胡鹏辉, 舒畅. 高效液相色谱法同时检测油脂类药物辅料中胆甾醇、豆甾醇和 β -谷甾醇的含量 [J]. 中南药学, 2022, 20(3): 609-612.
- Yin J, Hu P H, Shu C. Simultaneous determination of cholesterol, stigmasterol and β -sitosterol in oil pharmaceutical excipients by HPLC [J]. Central South Pharm, 2022, 20(3): 609-612.
- [21] 范耀耀, 罗宇琴, 李国卫, 等. 基于灰色关联度分析与 TOPSIS 模型的不同产地射干标准汤剂质量评价 [J]. 中药材, 2022, 45(3): 659-663.
- Fan Y Y, Luo Y Q, Li G W, et al. Quality evaluation of *Belamcanda chinensis* standard decoction from different producing areas based on grey relational analysis and TOPSIS model [J]. J Chin Med Mater, 2022, 45(3): 659-663.

[责任编辑 兰新新]