一测多评法同时测定鱼腥草不同部位中 6 种活性成分的量

何 兵[1]，刘 艳[1]，李春红[1]，杨世艳[2*]，张 燕[3]

1. 泸州医学院 药物研究中心，四川 泸州 646000
2. 泸州医学院附属中医医院，四川 泸州 646000
3. 泸州医学院附属医院，四川 泸州 646000

摘 要：目的 建立鱼腥草不同部位中新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷及槲皮苷的一测多评测定方法。**方法** 以 Kromasil C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm），乙腈-0.1%磷酸溶液梯度洗脱，分段变波长测定。以绿原酸为参照物建立与其余成分的相对校正因子，并计算其量，实现一测多评。同时采用外标法测定该 6 个成分的量，并比较二者的差异，以验证一测多评法的准确性和可行性。**结果** 鱼腥草中 6 个成分的计算值与实测值间无显著差异，鱼腥草不同部位 6 个成分量有所不同，绿原酸类和黄酮类主要分布在叶中。**结论** 鱼腥草的药效成分主要集中在叶中，本实验建立的一测多评法可行准确，可以用来对鱼腥草进行质量控制。

关键词：一测多评；相对校正因子；鱼腥草；绿原酸；芦丁；金丝桃苷；槲皮苷；异槲皮苷

中图分类号：R286.2 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2013)15 - 2160 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.15.024

Simultaneous determination of six active constituent in different parts of *Houttuyniae Herba* by quantitative analysis of multi-components by single marker

HE Bing[1], LIU Yan[1], LI Chun-hong[1], YANG Shi-yan[2], ZHANG Yan[3]

1. Research Center for Drug, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China
2. Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China
3. Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of the contents of six main active constituents (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, rutin, hyperin, isoquercitrin, and quercitrin) in *Houttuyniae Herba* by quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS). **Methods** The chromatographic separation was achieved on a Kromasil C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid aqueous with gradient elution and changeable wavelength detection. Chlorogenic acid was used as the reference, the calibration factor of other five constituents to that of chlorogenic acid was calculated respectively to get each relative calibration factor. And the contents of the active constituents were calculated by the relative calibration factor to realize QAMS. At the same time, the external standard method was used to detect the contents of the six constituents, comparing the two methods to validate the accuracy and feasibility of the new method. **Results** No significant differences were found in the quantitative results of the six active constituents in *Houttuyniae Herba* determined by measured value and calculated value. The amounts of the six active constituents in the different parts of *Houttuyniae Herba* were found to be varied, chlorogenic acids and flavonoids mainly distributed in the leaves. **Conclusion** The active constituents of *Houttuyniae Herba* mainly distribute in the leaves. The QAMS is feasible and accurate to evaluate the contents of the six active constituents in *Houttuyniae Herba*.

Key words: quantitative analysis of multi-components by single marker; relative correction factor; *Houttuyniae Herba*; chlorogenic acid; rutin; hyperin; quercitrin; isoquercitrin

鱼腥草为三白草科多年生草本植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草或干燥地上部分[1]。鱼腥草性味辛、微寒，具有清热解毒、消毒排脓、利尿通淋之功效，有较强的抗菌抗病毒作

收稿日期：2013-01-10

基金项目：泸州市 2010 年重点科技项目（泸市财企 [2010] 41 号）；泸州医学院 2010 年青年基金（泸医院 [2010] 108 号）

作者简介：何 兵，副研究员，主要从事中药活性成分及质量分析研究。Tel: 13982770721 E-mail: lyhb2008@126.com

***通信作者** 杨世艳 Tel: 18982785351 E-mail: lyysy2010@126.com

网络出版时间：2013-07-05 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130705.1535.007.html

用。鱼腥草的有效成分为黄酮类、有机酸类、挥发油等[2]。其中黄酮类主要有芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷及槲皮苷等。有机酸类主要有新绿原酸、绿原酸等。现代药理研究显示绿原酸类具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、抗白血病、降血脂、降血糖等生物活性[3]，而芦丁、金丝桃苷及槲皮苷等黄酮类具有抗病毒、抗氧化、抗炎、抗肿瘤及保护肝脏和心血管等活性[4-6]。《中国药典》未收载鱼腥草定量方法，文献对鱼腥草质量控制多为测定单一成分或同时测定其他较微量的成分[7-10]，且需要独立对照品。为考察药效成分在鱼腥草不同部位的分布，本实验采用一测多评法以常见的绿原酸对照品为参照，建立与其余成分的相对校正因子，同时测定了泸州纳溪鱼腥草不同部位中所含的 6 个主要活性成分（新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷及槲皮苷）的量，为鱼腥草药材质量控制和评价提供更好的技术手段，也为鱼腥草作为原料药的选择及其质量标准提高研究提供科学依据。

1 仪器与试药

Dionex 高效液相色谱仪（包括 P680A 四元梯度泵，PDA—100 二极管阵列检测器，TCC—100 柱温箱和 Chromeleon 色谱工作站）。Agilent 1100 高效液相色谱仪（包括 G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1315B 二极管阵列检测器、G1316A 柱温箱和 Agilent ChemStation 工作站）。色谱柱：AkzoNobel Kromasil C_{18}、Lubex Kromasil C_{18}、Phenomenex Luna C_{18}（2）（均为 250 mm×4.6 mm，5 μm）。瑞士 Precisa 电子天平（XR 205SM—DR）。CQX25—06 超声波清洗器（上海必能信超声有限公司，功率 250 W，频率 25 kHz）。

新绿原酸（批号 070915）、绿原酸（批号 080620）、芦丁（批号 090618）、金丝桃苷（批号 090802）、槲皮苷（批号 091205）及异槲皮苷（批号 091226）对照品均由成都曼思特有限公司提供。所有对照品经 HPLC 峰面积归一化法检测纯度均在 98%以上。

鱼腥草采自四川省泸州市纳溪寿登寺，栽培品，经作者鉴定，为三白草科植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的新鲜全草，分取全草、叶、花、茎及根，50 ℃烘干备用。乙腈为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 分析方法验证

2.1.1 色谱条件 AkzoNobel Kromasil C_{18} 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液，梯度洗脱：0～10 min，6%～8%乙腈；10～35 min，8%～27%乙腈；35～37 min，27%乙腈；37～38 min，27%～6%乙腈；38～40 min，6%乙腈；体积流量 1.0 mL/min；分段变波长测定：0～25 min 为 326 nm，25～40 min 为 254 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷及槲皮苷对照品适量，以 90%甲醇溶解并定容，制成质量浓度分别为新绿原酸 1.913 mg/mL、绿原酸 0.952 mg/mL、芦丁 0.575 mg/mL、金丝桃苷 1.288 mg/mL、异槲皮苷 0.677 mg/mL 及槲皮苷 1.725 mg/mL 的对照品储备液，分别精密吸取 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL，置 25 mL 量瓶中，以 90%甲醇稀释至刻度，制得系列混合对照品溶液，避光保存。

2.1.3 供试品溶液的制备 取本品粉末（过 4 号筛）适量（全草、叶、花取约 0.5 g，根、茎取约 2.0 g），精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 90%甲醇 25 mL，称定质量，超声处理 30 min，取出，放冷，再称定质量，用 90%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，即得。

2.1.4 系统适应性试验 取混合对照品溶液、供试品溶液进样分析，结果见图 1。新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷及槲皮苷与其相邻色谱峰的分离度均大于 1.5，拖尾因子在 0.94～1.01，理论塔板数以各色谱峰计均在 10 000 以上。

2.1.5 线性范围 分别精密吸取系列浓度的混合对照品溶液 10 μL，注入液相色谱仪，记录色谱图。以峰面积为纵坐标（Y），对照品质量（X）为横坐标，绘制标准曲线。同系列对照品制备方法逐级稀释，分别以信噪比 3 和 10 考察检测限和定量限，结果见表 1。

2.1.6 精密度试验 取同一混合对照品溶液，连续进样 6 次，记录各组分色谱峰峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷及槲皮苷峰面积 RSD 分别为 0.25%、0.30%、0.41%、0.33%、0.39%、0.36%，表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验 取同一供试品溶液，分别于制备后 0、4、8、12、24、48 h 注入液相色谱仪，记录各组分色谱峰峰面积。结果新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷及槲皮苷峰面积 RSD 分别为 1.19%、1.08%、1.41%、1.12%、1.47%、1.12%，表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

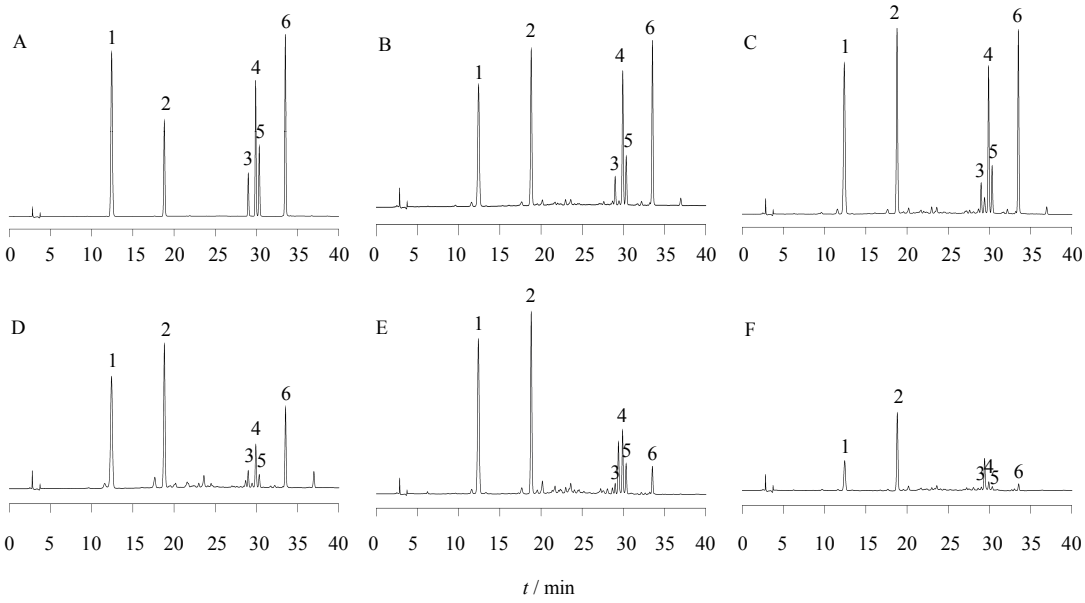

图 1 混合对照品 (A)、鱼腥草全草 (B)、叶 (C)、花 (D)、茎 (E)、根 (F) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), *Houttuyniae Herba* (B), and leaves (C), flowers (D), stems (E), and roots (F) of *Houttuyniae Herba*

表 1 6 个成分的线性关系

Table 1 Linear equations of six constituents

成分	线性方程	*r*	线性范围 / μg	检测限 / ng	定量限 / ng
新绿原酸	Y=52.675 2 X−0.398 5	0.999 9	0.077～3.825	0.23	0.76
绿原酸	Y=52.567 1 X−0.284 6	0.999 7	0.038～1.900	0.26	0.86
芦丁	Y=31.459 6 X−0.305 4	0.999 8	0.023～1.150	0.37	1.25
金丝桃苷	Y=44.975 4 X−0.356 8	0.999 9	0.052～2.575	0.27	0.91
异槲皮苷	Y=45.584 3 X−0.435 7	0.999 8	0.027～1.354	0.31	1.04
槲皮苷	Y=45.367 8 X−0.397 3	0.999 9	0.069～3.450	0.26	0.88

2.1.8 重复性试验 取鱼腥草全草样品，按照“2.1.3”项下方法制备 6 份供试品溶液，进样分析，计算新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷及槲皮苷平均质量分数分别为 4.226、4.190、1.028、3.742、1.351、4.616 mg/g，RSD 分别为 0.66%、0.75%、0.98%、0.87%、1.03%、0.81%，表明本法重复性良好。

2.1.9 加样回收率试验 精密称取鱼腥草全草样品 9 份，每份 0.25 g，分成 3 组，每组 3 份，分别精密添加含新绿原酸 0.418 mg/mL、绿原酸 0.410 mg/mL、芦丁 0.102 mg/mL、金丝桃苷 0.375 mg/mL、异槲皮苷 0.136 mg/mL、槲皮苷 0.463 mg/mL 的混合对照品溶液 2、2.5、3 mL，照“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，进样测定，并分别计算其平均回收率。新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷及槲皮苷平均回收率分别为 99.39%、99.43%、98.48%、99.16%、98.86%、99.27%，RSD 分别为 0.93%、0.89%、1.25%、1.01%、1.19%、1.06%。结果表明，本法具有良好的回收率。

2.1.10 耐用性试验 分别考察流动相各梯度点比例变化±3%、水相 pH 值变化±0.2、柱温变化±5 ℃、各变波长点检测波长变化±5 nm、流速变化±20%以及采用 3 根不同色谱柱 AkzoNobel Kromasil C_{18}、Lubex Kromasil C_{18}、Phenomenex Luna C_{18}（2）（均为 250 mm×4.6 mm，5 μm）进行测定时，仪器色谱行为的变化。检测同一批鱼腥草中 6 个成分的

量及 RSD，并考察其分离度、拖尾因子、理论塔板数。结果各条件下所测质量分数的 RSD＜2.39%，分离效果理想。因此，鱼腥草中的 6 个活性成分测定条件较宽，具有较好的耐用性。

2.2 一测多评法

2.2.1 相对校正因子的计算[11] 在标准曲线 Y＝a×X＋b 中，X＝ (Y－b) / a＝Y/a－b/a，由于 b 值通常为误差引起，在 a/b 值大于 100 时，b/a 值可以忽略不计，此时可以 X＝Y/a 直接计算其量。故校正因子可以二者的斜率 a 之比直接计算，校正因子计算公式为：$f_{k/s}$＝a_k/a_s，即可以参照物快速推算其余待测化学成分的量，计算公式为 C_k'＝A_k' / (a_s×$f_{k/s}$)。式中 a_s 为参照物斜率；a_k 为其他对照组分斜率；C_k' 为待测组分浓度；A_k'为待测组分峰面积。以 326 nm 下绿原酸为参照（1.000），254 nm 下的芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷的校正因子分别为 0.598、0.856、0.867、0.863；326 nm 下的新绿原酸的校正因子为 1.002。

2.2.2 校正因子重现性考察 试验考察了不同实验室的 2 套色谱系统（Dionex P680 和 Agilent 1100）及不同的色谱柱（Kromasil C_{18}、Luna C_{18}、Platisil，均为 250 mm×4.6 mm，5 μm）对校正因子的影响，结果其 RSD 均＜2.17%。表明相对校正因子在不同实验室、不同色谱系统和不同色谱柱下具有良好的重现性。

2.2.3 待测组分色谱峰的定位 王龙星等[12]通过色谱热力学分析发现，在相同的色谱条件下，即使采用不同的液相色谱仪器或不同的色谱柱，组分的保留时间存在简单的线性关系。其采用已有的 5 个对照品做内标，并计算其线性方程，但在一测多评试验中，这点并不适合，失去了一测多评的意义。参考其原理，假设 5 个点均落在线性方程上，那么采用 2 个点其结果与采用 5 个点基本一致，而在一测多评试验中，用 2 个点已足够。采用绿原酸和最后一个容易辨认的色谱峰（槲皮苷）两点校正，推导其校正方程，利用该校正方程可以快速推测各成分理论出峰时间，快速定位色谱峰。试验采用该方法，建立各待测成分保留时间校正方程，计算其理论出峰时间，并考察不同实验室、不同色谱系统（Dionex、Agilent）、不同色谱柱（Lubex Kromasil、Phenomenex Luna 与 AkzoNobel Kromasil）之间的差异，结果除新绿原酸稍大外（新绿原酸各条件下相对保留时间均为 0.64），其余保留时间 RSD 均在 1.0%以内。通过该法预测出峰时间后，若该色谱峰临近还有其他色谱峰，再根据紫外吸收光谱、整体峰形或峰面积百分比，即能够在一定程度上准确定位色谱峰。

2.2.4 一测多评法与常规法（外标法）结果的比较研究 分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液，进样测定，记录新绿原酸、绿原酸、芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷及槲皮苷的峰面积，分别采用外标法和一测多评法计算其量，结果见表 2。

为确认一测多评法的准确性，将 2 种方法计算结果经相关系数分析，结果 2 种方法之间的相关系数均大于 0.999 9，说明 2 种方法得到的量相似性极高。同时经 t 检验，P 值远大于 0.05，说明 2 种方法计算结果并无显著性差异。可见一测多评法在鱼腥草的多指标成分质量评价中应用是可行的。

3 讨论

实验分别采用 25%、50%、75%、90%甲醇及纯甲醇同法超声提取，结果 25%、50%甲醇提取，黄酮类量较低。甲醇提取，黄酮类虽然质量分数较高，但新绿原酸出现溶剂效应，峰形欠佳，其量偏低。而 90%甲醇提取，各成分量均达最高，色谱峰

表 2 不同方法对鱼腥草中 6 个成分的测定结果 (n = 3, RSD＜2%)

Table 2 Determination of six constituents in *Houttuyniae Herba* by different methods (n = 3, RSD < 2%)

部位	质量分数 / (mg·g^{-1})											
	新绿原酸		绿原酸		芦丁		金丝桃苷		异槲皮苷		槲皮苷	
	外标法	一测多评	外标法	一测多评	外标法	一测多评	外标法	一测多评	外标法	一测多评	外标法	一测多评
全草	4.226	4.220	4.190	4.189	1.028	1.031	3.742	3.737	1.351	1.353	4.616	4.611
叶	6.912	6.903	6.922	6.921	1.459	1.464	5.183	5.176	1.682	1.684	6.539	6.532
花	5.331	5.324	4.886	4.886	0.693	0.696	1.368	1.366	0.391	0.392	2.498	2.495
茎	1.627	1.625	1.496	1.496	0.110	0.110	0.506	0.505	0.244	0.244	0.213	0.213
根	0.300	0.300	0.630	0.629	0.043	0.043	0.069	0.069	0.034	0.034	0.052	0.052

峰形也较佳，故以 90%甲醇提取。

一测多评法中校正因子的计算，文献普遍采用多点校正[13-18]，再求平均值的方法，但这种方法的弊端就是如果有一两个点有较大偏差（特别是第一个和最后一个点），其会拖累整个平均值，从而导致计算值出现较大误差。而采用标准曲线斜率之比计算校正因子，即使有几个点有较大偏差，其对整个标准曲线斜率影响不大，相对多点校正更科学合理。另外斜率校正无需逐个浓度计算校正因子求其平均值，直接以标准曲线斜率计算，相对更快捷。

一测多评中色谱峰的定位，文献均采用相对保留时间定位的方法[13-17]，但在实验中发现，随着各色谱峰保留时间远离参照峰绿原酸，其相对保留时间 RSD 逐渐增大，甚至超过 5%。在这种情况下，利用相对保留时间很难准确定位。可见该法仅用于相同填料或色谱行为极为相似的色谱柱，且还需保证保留时间漂移不大的情况。实验采用两点校正法，以参照峰绿原酸和最后一个容易辨认的色谱峰槲皮苷的保留时间推导校正方程，采用该法可快速准确定位色谱峰，经校正后，推测出峰时间和实测保留时间无明显差异，其 RSD 除新绿原酸稍大外，其余均低于 1.0%，得到明显改善。对于新绿原酸，由于其出峰时间短，反而不适合该法。未校正前，其相对保留时间均为 0.64，故新绿原酸可单独采用相对保留时间校正。

本实验首次采用一测多评法建立了 HPLC 同时测定鲜鱼腥草 6 个活性成分的方法，该方法简便、快速、灵敏，可用于鱼腥草的质量控制。不同部位鱼腥草各成分的量不同，叶中各成分的量均最高，其次是全草和花，茎次之，根中各成分的量均最低。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 刘玉峰, 杨秀伟, 武 滨. 鱼腥草化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(22): 2378-2381.

[3] 吴卫华, 康 桢, 欧阳冬生, 等. 绿原酸的药理学研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(4): 691-694.

[4] 臧志和, 曹丽萍, 钟 铃. 芦丁药理作用及制剂的研究进展 [J]. 医药导报, 2007, 26(7): 758-760.

[5] 黄 凯, 杨新波, 黄正明. 金丝桃苷药理作用研究进展 [J]. 医药导报, 2009, 28(8): 1046-1048.

[6] 朱学鑫, 蒋福升, 丁志山. 槲皮苷生物活性的研究进展 [J]. 蛇志, 2012, 24(1): 47-50.

[7] 黄琴伟, 张文婷, 赵维良. HPLC 法测定鱼腥草不同生长季节、不同药用部位中黄酮类成分 [J]. 中草药, 2007, 37(8): 1253-1255.

[8] 彭全材, 杨占南, 胡继伟, 等. 高效液相色谱法同时测定鱼腥草中 7 黄酮的含量 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版, 2008, 32(6): 645-661.

[9] 孟 江, 周毅生, 赵中振, 等. HPLC 法同时测定鲜鱼腥草不同部位 8 个活性成分的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(6): 516-518.

[10] 张 颖, 吴希文, 李淑芬. RP-HPLC 法测定鱼腥草生药中 4 种黄酮类化合物的含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(3): 398-400.

[11] 何 兵, 刘 艳, 杨世艳, 等. HPLC 一测多评法同时测定双青咽喉片中 10 种成分 [J]. 中草药, 2013, 44(8): 974-981.

[12] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫淼. 一种提高色谱指纹谱保留时间重现性的新方法 [J]. 分析化学, 2003, 31(10): 1232-1236.

[13] 宋永贵, 张武岗, 刘岩庭, 等. 一测多评法同时测定预知子中 4 种三萜皂苷 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1418-1421.

[14] 林永强, 徐丽华, 王淑华. 一测多评法同步测定银黄片中 6 种咖啡酰奎宁酸 [J]. 中草药, 2012, 43(4): 706-710.

[15] 尹 萌, 孟月兰, 闻琍毓. 关黄柏中生物碱类成分的“一测多评” [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1093-1096.

[16] 罗祖良, 仇 峰, 韦日伟. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.

[17] 林 青, 匡艳辉, 黄 琳, 等. 一测多评法测定穿心莲及其制剂中内酯类成分 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2406-2411.

[18] 蓝天凤, 王 晓, 王岱杰, 等. 一测多评法测定丹参药材中 4 种丹参酮类成分的含量 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2420-2423.