

基于指纹图谱结合一测多评法评价不同产地牻牛儿苗质量

孙仁爽¹, 隋艳艳², 闫红³, 张立秋¹, 顾地周⁴, 陈新连^{5*}

1. 通化师范学院医药学院, 吉林 通化 134002
2. 吉林省通化振国药业有限公司, 吉林 通化 134002
3. 吉林玉仁制药股份有限公司, 吉林 通化 134002
4. 通化师范学院生命科学学院, 吉林 通化 134002
5. 中山大学药学院, 广州 广东 510006

摘要: 目的 建立牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* 的指纹图谱, 并同时建立其中 4 个酚酸类成分含量的一测多评分析 (quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS) 方法, 以期对牻牛儿苗药材进行整体质量控制。方法 以没食子酸为参照峰确定共有峰, 建立牻牛儿苗的高效液相色谱指纹图谱; 以没食子酸为内标, 确定柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸的相对校正因子并计算含量, 实现一测多评。同时采用外标法测定 4 个成分的含量, 比较计算值和实测值的差异。结果 建立了牻牛儿苗的 HPLC 指纹图谱, 10 批样品相似度均在 0.891 以上; 以没食子酸为内标建立的柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸的相对校正因子分别为 0.751、0.214 和 0.444, 重现性良好, 10 批牻牛儿苗样品 QAMS 法计算值与实测值无显著差异。结论 所建立的指纹图谱结合 QAMS 简便可行, 可为牻牛儿苗药材整体质量控制提供参考和依据。

关键词: 牻牛儿苗; 指纹图谱; 一测多评法; 相对校正因子; 没食子酸; 柯里拉京; 老鹳草素; 鞣花酸

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)21-7186-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.21.027

Application of fingerprint combined with quantitative analysis of multi-components with a single-marker in quality evaluation of *Erodium stephanianum*

SUN Ren-shuang¹, SUI Yan-yan², YAN Hong³, ZHANG Li-qi¹, GU Di-zhou⁴, CHEN Xin-lian⁵

1. Medical College, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China
2. Jilin Tonghua Zhengguo Pharmaceutical Co., Ltd, Tonghua 134002, China
3. Jilin Yuren Pharmaceutical Co., Ltd, Tonghua 134002, China
4. College of Life Sciences, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China
5. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To establish the fingerprint of *Erodium stephanianum* Willd. and a single standard for determination of multiple components method was used to determine the content of four main components simultaneously, in order to control the overall quality of *E. stephanianum*. **Methods** Using gallic acid as the reference peak, the common peaks were determined to establish HPLC fingerprint of *E. stephanianum*. Gallic acid was selected as internal reference and the relative correction factors (RCF) of four components were calculated and the contents were calculated by QAMS. Meanwhile, the contents of four components in *E. stephanianum* were determined by external standard method. The accuracy and feasibility of QAMS was evaluated by comparing the results between the measured values by external standard method and calculated values by QAMS. **Results** The HPLC fingerprint of *E. stephanianum* was established and the similarity of fingerprints of 10 batches of test samples were above 0.891. The RCF of corilagin, geraniin and ellagic acid were 0.751, 0.214 and 0.444 and showed good reproducibility. The contents of four components showed no significant difference in the 10 batches of *E. stephanianum* determined by external standard method and

收稿日期: 2023-05-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81973431); 通化师范学院应用研究项目—中药质量评价研究 (01054)

作者简介: 孙仁爽, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础和质量控制研究。

*通信作者: 陈新连, 女, 博士, 研究方向为中药资源及分子生药学。E-mail: 804590217@qq.com

QAMS. Conclusion The established fingerprint combined with QAMS method are simple and feasible, which can provide some reference and basis for the overall quality control of *E. stephanianum*.

Key words: *Erodium stephanianum* Willd.; fingerprint; QAMS; relative correction factor; gallic acid; corilagin; geraniin; ellagic acid

牻牛儿苗是牻牛儿苗科牻牛儿苗属牻牛儿苗 *Erodium stephanianum* Willd.植物的干燥地上部分^[1],用于风湿痹痛、麻木拘挛、筋骨酸痛、泄泻痢疾。牻牛儿苗的主要化学成分为鞣质和黄酮类,包括老鹳草素、柯里拉京、鞣花酸、没食子酸、山奈酚和槲皮素苷等^[2]。近年来,随着人们对牻牛儿苗及鞣质药理活性研究的深入,越来越多的鞣质新活性被发掘出来,鞣质的药理活性已不止于收敛固涩,而广泛应用于抗菌、抗病毒、抗氧化、抗肝病、止血及抗肿瘤等领域^[3]。没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸是牻牛儿苗主要鞣质类成分^[4-5],是牻牛儿苗抗病毒、抗肿瘤等作用的药效物质基础,因此本实验选择没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸作为指标成分进行测定。《中国药典》2020 年版对牻牛儿苗药材定量指标仅有水溶性浸出物“不得少于 18.0%”。目前使用常规方法以多成分含量测定来评价牻牛儿苗药材质量的研究已有报道^[6],但 these 方法所需对照品量大,长期以来面临着对照品难求、价格昂贵、货源紧缺等问题,难以推广至牻牛儿苗药材质量控制的实际应用中。一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS)采用单一对照品同时测定多个成分的含量,是实现中药多成分质控的一种经济、简便的分析方法^[7]。而中药指纹图谱是中药整体质量控制的核心技术之一,可以反映不同样品质量的均一性^[8]。为解决对照品的缺乏导致的多组分同时定量的矛盾,本实验采用高效液相色谱方法,建立了指纹图谱结合 QAMS 法的牻牛儿苗质量评价方法,在较全面表征牻牛儿苗化学成分整体轮廓、评价牻牛儿苗药材整体质量的基础上,同时对主要成分进行含量测定,为牻牛儿苗多指标质量控制推广提供参考^[9-11]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

戴安 U3000 高效液相色谱仪(含 P680 泵、ASI-100 自动进样器、PDA100 紫外二级管阵列检测器和变色龙工作站)、Agilent1260 高效液相色谱仪(含四元梯度泵、自动进样器、柱温箱和 DAD 检测器)、Waters E2695 高效液相色谱仪(含 alliance 2695

型泵、alliance 2695 型自动进样器、2489 型紫外检测器和 empower3 型工作站)、岛津 20A 高效液相色谱仪(含 LC-20AD 泵、SPD-20A 紫外检测器、LCsolution 色谱工作站、SIL20A 自动进样器、CTO-10A 柱温箱)、大连依利特 1100 梯度高效液相色谱仪(含恒流泵 D1100、紫外-可见检测器 1100、色谱柱恒温箱、Elitapex 色谱数据工作站)和上海伍丰 LC-100 高效液相色谱仪(P100 高压恒流泵、UV100 紫外检测器、恒温柱箱和 WS100 工作站);KQ3200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);CPA225D 型十万分之一电子天平(赛多利斯公司)。

1.2 试剂

色谱甲醇和色谱乙腈(迈瑞达科技公司);甲醇和磷酸为分析纯(天津市大茂化学试剂厂);娃哈哈纯净水。对照品没食子酸(110831-201906,质量分数以 91.5%计)、柯里拉京(111623-200302,质量分数 ≥ 98%)、鞣花酸(111959-201903,质量分数以 98.8%计)均购自中国食品药品检定研究院;老鹳草素(100503,质量分数 ≥ 98%)购自上海融禾医药科技有限公司。10 批牻牛儿苗药材(表 1)经通化师范学院医药学院于俊林教授鉴定为牻牛儿苗 *E. stephanianum* Willd.的干燥地上部分。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和

表 1 10 批牻牛儿苗药材产地信息

Table 1 Origin information of 10 batches of *E. stephanianum*

编号	产地
S1	吉林松原市
S2	辽宁阜新市彰武县
S3	辽宁锦州黑山县
S4	吉林白城
S5	辽宁东陵
S6	北京延庆县
S7	内蒙古科尔沁左翼后旗
S8	大连瓦房店
S9	黑龙江大庆
S10	河北沽源县

鞣花酸对照品适量, 加入甲醇制成含没食子酸 232.34 $\mu\text{g/mL}$ 、柯里拉京 120.52 $\mu\text{g/mL}$ 、老鹳草素 50.30 $\mu\text{g/mL}$ 、鞣花酸 150.26 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品储备液。

2.2 供试品溶液的制备

取牻牛儿苗药材粉末 1 g, 置具塞锥形瓶中, 加入 70% 丙酮溶液 18 mL, 精密称定, 超声 (频率 100 kHz) 提取 60 min, 浓缩, 用甲醇定容至 100 mL 量瓶中, 得供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: 安捷伦 XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.3% 磷酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) - 甲醇 (C), 梯度洗脱: 0~5 min, 95% A; 0%~3% B, 5%~2% C; 5~10 min, 95%~91% A; 3%~8% B, 2%~1% C; 10~35 min, 91%~89% A; 8%~10% B, 1% C; 35~45 min, 89%~86% A; 10%~14% B, 1%~0 C; 45~65 min, 86%~85% A; 14%~15% B, 0% C; 65~80 min, 85%~70% A; 15%~16% B, 0~14% C; 80~90 min, 70%~57% A; 16%~17% B, 14%~26% C; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 10 μL ; 检测波长 278 nm。

2.4 指纹图谱的建立

2.4.1 精密度试验 取同一供试品溶液, 连续进样 6 次, 以没食子酸为参比峰, 各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.65%~2.74% 和相对峰面积 RSD 为 1.78%~2.69%。

2.4.2 重复性试验 精密称取同一批药材粉末 6 份, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液进行测定, 以没食子酸为参比峰, 各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.87%~2.50% 和相对峰面积 RSD 为 0.32%~2.43%。

2.4.3 稳定性试验 取同一供试品溶液, 在室温下放置, 分别于 0、4、8、12、24 h 测定, 以没食子酸为参比峰, 各共有峰的相对保留时间 RSD 为 0.57%~3.28% 和相对峰面积 RSD 为 0.76%~4.26%。

2.4.4 指纹图谱建立及相似度评价 将上述 10 批样品的 AIA 数据文件导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统研究版》软件进行相似度评价^[12], 设定 S1 为参照, 多点校正、匹配, 得到的 10 批牻牛儿苗 HPLC 叠加图谱见图 1。生成的牻牛儿苗对照指纹图谱见图 2, 可作为牻牛儿苗鉴别的特征图谱。牻牛儿苗样品共有峰峰面积见表 2,

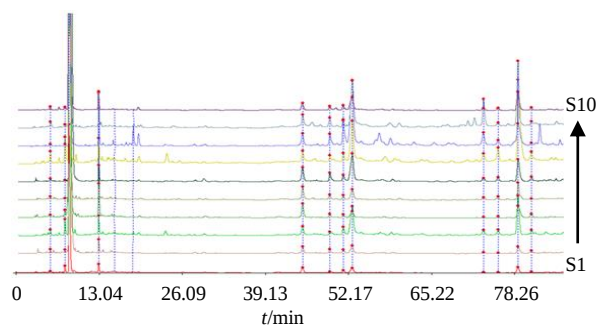
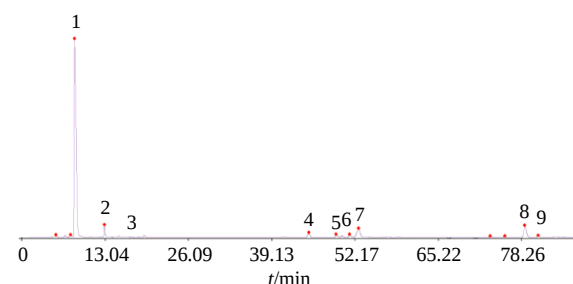


图 1 10 批牻牛儿苗 HPLC 叠加图谱

Fig. 1 HPLC overlay graph of 10 batches of *E. stephanianum*



1-没食子酸 6-柯里拉京 7-老鹳草素 8-鞣花酸
1-gallic acid 6-corilagin 7-geraniin 8-ellagic acid

图 2 牻牛儿苗药材 HPLC 共有峰对照图谱

Fig. 2 HPLC characteristic peaks of extract from *E. stephanianum*

10 批牻牛儿苗药材有 9 个共有峰, 通过对照品确认 1 号峰为没食子酸、6 号峰为柯里拉京、7 号峰为老鹳草素、8 号峰为鞣花酸。共有峰的保留时间差异较小, 保留时间 RSD 小于 0.33%; 峰面积差异较大, RSD 为 33.88%~158.15%。可能与牻牛儿苗属于广分布品种, 不同的生长环境影响植物的次生代谢; 所采集的样品生长年限不同; 果、茎叶和花等不同药用部位比例差异较大, 药材的不同部位有效成分含量有着显著的差异有关。10 批样品与对照图谱比较, 相似度评价结果分别为 0.992、0.985、0.986、0.987、0.994、0.991、0.891、0.909、0.973、0.997, 可为牻牛儿苗药材的品质评价提供科学依据。

2.5 多成分含量测定

2.5.1 对照品溶液的制备 按照“2.1”项制备混合对照品溶液。

2.5.2 供试品溶液的制备 按照“2.2”项制备供试品溶液。

2.5.3 色谱条件 色谱条件同“2.3”项。混合对照品溶液和供试品溶液色谱图见图 3。

表 2 10 批样品共有峰峰面积
Table 2 Common peak areas of 10 batches of samples

样品	共有峰峰面积								
	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9
S1	1 145.482	66.795	12.620	94.303	35.324	105.114	22.123	106.975	19.788
S2	6 001.195	99.800	20.207	118.243	59.201	158.628	37.988	103.078	37.259
S3	2 706.251	151.383	40.295	187.749	125.334	639.596	106.580	671.537	65.649
S4	4 468.306	491.408	48.892	216.393	55.085	153.854	28.558	196.474	59.165
S5	3 808.418	120.951	44.267	200.942	68.937	252.144	28.212	59.876	327.121
S6	9 200.458	121.240	22.166	239.503	102.508	586.990	79.423	378.042	72.318
S7	2 368.095	185.018	75.179	264.814	173.655	951.662	168.878	1347.733	159.614
S8	2 421.391	227.108	12.881	253.908	356.486	1 339.197	159.737	506.668	338.657
S9	4 357.195	241.298	55.651	287.974	138.198	1 228.676	111.593	490.034	1 246.074
S10	3 250.522	124.616	13.689	121.977	73.963	296.706	49.342	286.919	37.857
平均峰面积	3 972.731	182.962	34.585	198.581	118.869	571.257	79.243	414.734	236.350
RSD/%	57.50	66.43	62.27	33.88	78.95	80.65	69.55	92.82	158.15

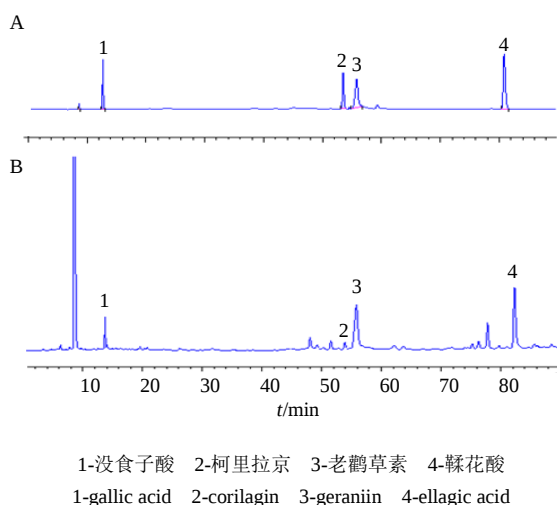


图 3 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 溶液的 HPLC 图
Fig. 3 High performance liquid chromatogram of mixed reference substances (A) and samples (B)

2.5.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取混合对照品溶液,按上述色谱条件测定,以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),得到各成分的回归方程及线性范围。结果表明 4 个酚酸类成分在线性范围内线性良好,结果见表 3。

2.5.5 精密度试验 取混合对照品溶液,重复进样 6 次,计算各成分峰面积的相对标准偏差,结果没食子酸的 RSD 为 1.2%,柯里拉京的 RSD 为 1.9%,老鹳草素的 RSD 为 1.0%,鞣花酸的 RSD 为 1.4%,表明仪器的精密度良好。

表 3 4 个酚酸类成分的标准曲线

Table 3 Standard curves of four phenolic acids

化合物	回归方程	相关系数	线性范围/ μg
没食子酸	$Y=31.593 X+5.926 2$	0.999 4	0.23~4.64
柯里拉京	$Y=42.357 X+11.182$	0.999 3	0.24~4.80
老鹳草素	$Y=68.664 X+0.633 4$	0.999 6	0.50~10.00
鞣花酸	$Y=101.85 X-4.029 6$	0.999 5	0.15~3.00

2.5.6 稳定性试验 取样品溶液分别于 0、4、8、12、24 h 测定,样品中没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸不同时间峰面积的 RSD 分别为 1.3%、1.7%、1.4%、1.9%。表明牻牛儿苗样品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.7 重复性试验 取牻牛儿苗药材,粉碎,取 6 份分别精密称定,制备样品溶液,测定,计算各样品溶液中没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸的含量。结果没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸分别为 2.05、1.24、0.42 和 1.45 mg/g, RSD 分别为 2.7%、2.3%、2.5%和 2.8%,表明方法的重复性较好。

2.5.8 加样回收率试验 取牻牛儿苗粉末约 1 g,精密称定 6 份,按药材中的量和对照品量 1:1 左右加入相应的对照品溶液^[13],制备样品溶液,计算平均回收率,没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸的平均回收率分别为 101.3%、99.5%、103.1%、99.8%, RSD 分别为 2.3%、1.9%、2.5%、1.7%,表明方法的准确性较高。

2.6 一测多评方法建立

2.6.1 相对校正因子(f)计算 在一定的线性范围, 成分的量(质量或浓度)与检测器响应成正比。在多指标($s, a, b, \dots, i, \dots$)质量评价时, 以药材中某一典型有效成分作内参物(s), 建立内参物与其它待测成分($a, b, \dots, i, \dots$)间的 $f(f_{sa}, f_{sb}, f_{sc}, \dots)$, 按下式计算:

$$f_{si} = f_s / f_i = A_s \times C_i / C_s \times A_i$$

A_s 为内参物对照品 s 峰面积, C_s 为内参物对照品 s 浓度, A_i 为某待测成分对照品 i 峰面积; C_i 为某待测成分对照品 i 浓度^[15]

取混合对照品溶液进样, 记录各成分的峰面积, 以没食子酸为内参物, 计算其他组分与内参物的 f 。结果表明, 以没食子酸为内参物, 其他成分的 f 的 RSD 均小于 3%, 结果见表 4。柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸对没食子酸的 f 分别为 0.751、0.214 和 0.444。

2.6.2 f 的耐用性考察

(1) 不同仪器考察: 精密吸取混合对照品溶液 5 μ L,

表 4 牻牛儿苗中 4 个酚酸成分相对校正因子

Table 4 Relative correction factors of four phenolic acids

进样体积/ μ L	f 柯里拉京/没食子酸	f 老鹳草素/没食子酸	f 鞣花酸/没食子酸
1	0.748	0.216	0.451
2	0.758	0.218	0.461
5	0.777	0.202	0.421
10	0.741	0.212	0.444
15	0.737	0.217	0.447
20	0.744	0.219	0.442
平均值	0.751	0.214	0.444
RSD/%	1.96	2.97	2.98

进样分析。计算柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸对没食子酸的相对校正因子。分别考察了戴安 U3000、Agilent1260、Waters E2695、岛津 20A、依利特 1100 梯度和伍丰 LC-100 等 6 台高效液相色谱仪, 结果见表 5, 不同相对校正因子的 RSD 均在 3% 以下。

表 5 6 台仪器得到的相对校正因子

Table 5 Relative correction factors determined by six apparatus

高效液相色谱仪	相对校正因子		
	f 柯里拉京/没食子酸	f 老鹳草素/没食子酸	f 鞣花酸/没食子酸
戴安 U3000	0.737	0.191	0.449
Agilent1260	0.777	0.202	0.421
Waters E2695	0.754	0.192	0.446
岛津 20A	0.746	0.194	0.452
依利特 1100 梯度	0.739	0.185	0.451
伍丰 LC-100	0.748	0.189	0.447
平均值	0.750	0.192	0.444
RSD/%	1.94	2.97	2.62

(2) 不同实验室考察: 考察了 QAMS 法在不同实验室的结果, 不同实验室测得相对校正因子见表 6。相对校正因子的 RSD 在 2.74% 以下, 说明不同实验室测定结果差异较小。

2.6.3 柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸色谱峰的定位 单独用没食子酸做对照品进行含量测定, 柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸的色谱峰准确定位非常关键。以柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸对没食子酸的保留时间差和相对保留值作为考察指标, 并验证了二者在不同品牌仪器中的重复性。不同仪器目标成分间保留时间差结果见表 7, 不同仪器保留时间差的 RSD 值在 0.89%~2.25%。不同仪器目标成分的相对保留

表 6 不同实验室得到的校正因子

Table 6 Relative correction factors determined by different kinds of labs

进样体积/ μ L	f 柯里拉京/没食子酸		f 老鹳草素/没食子酸		f 鞣花酸/没食子酸	
	实验室 1	实验室 2	实验室 1	实验室 2	实验室 1	实验室 2
1	0.726	0.731	0.195	0.192	0.452	0.456
2	0.737	0.743	0.192	0.193	0.448	0.443
5	0.777	0.768	0.202	0.206	0.421	0.454
10	0.752	0.743	0.193	0.196	0.448	0.449
15	0.741	0.746	0.191	0.192	0.446	0.446
20	0.747	0.735	0.194	0.194	0.455	0.458
平均值	0.747	0.744	0.195	0.196	0.445	0.451
RSD/%	2.32	1.73	2.02	2.74	2.74	1.32

表 7 不同仪器目标成分间保留时间差

Table 7 Retention time difference (Δt_R) determined by different kinds of instruments

仪器	保留时间差/min		
	Δt_R 柯里拉京/没食子酸	Δt_R 老鹳草素/没食子酸	Δt_R 鞣花酸/没食子酸
戴安 U3000	37.664	38.982	65.073
Agilent1260	37.845	39.144	65.046
Waters E2695	38.284	39.664	65.549
岛津 20A	37.323	38.486	63.889
依利特 1100 梯度	37.249	38.395	63.795
伍丰 LC-100	37.444	38.631	64.277
平均值	37.635	38.884	64.605
RSD/%	1.03	1.23	1.11

值结果见表 8, RSD 值在 1.23%~2.14%, 柯里拉京、老鹳草素、鞣花酸和没食子酸的 DAD 紫外光谱图见图 4, 4 个成分在 220 nm 和 270 nm 左右均有 2 个吸收峰, 其中 220 nm 左右为最大吸收波长, 但是 2 个峰的形状和峰高的比值不同, 可用于 4 个成分的指认。因此, 采用柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸对没食子酸的保留时间差或相对保留值结合二极管阵列检测器的紫外光谱图, 可准确指认牻牛儿苗中的目标色谱峰。

2.6.4 QAMS 法与外标法结果比较 为验证 QAMS 法的准确性, 本实验采用外标法进行比较。收集 10 批不同产地牻牛儿苗, 分别采用 QAMS 法和外标

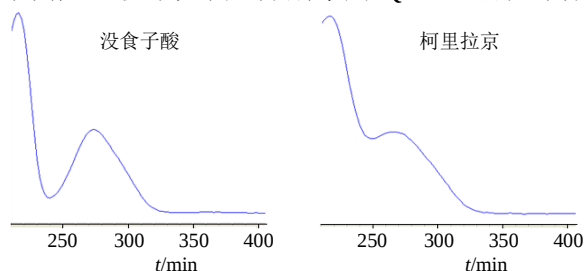


图 4 4 个成分的 DAD 紫外光谱图
Fig. 4 Diode array detection (DAD) spectra of four components

用 Pearson 相关系数进行比较, 结果柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸计算值与实测值的简单相关系数均为 1, 说明两法得到的含量的相似性极高; 两种方法得到的柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸含量的相对误差为 0.11%、0.29%和 0.23%, 说明 QAMS 法可准确测定牻牛儿苗中没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸的含量。

3 讨论

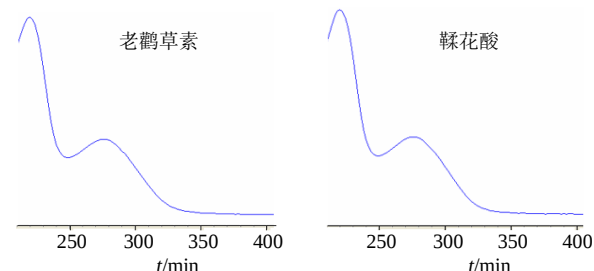
本实验选用 70%丙酮为溶剂对牻牛儿苗中的总鞣质进行提取, 通过干酪素法对总鞣质含量进行测

表 8 不同仪器目标成分的相对保留值

Table 8 Relative retention value determined by different kinds of apparatus

仪器	相对保留值		
	t_R 柯里拉京/没食子酸	t_R 老鹳草素/没食子酸	t_R 鞣花酸/没食子酸
戴安 U3000	3.994	4.096	6.145
Agilent1260	3.959	4.061	6.109
Waters E2695	3.956	4.062	6.061
岛津 20A	3.983	4.076	6.107
依利特 1100 梯度	3.987	4.079	6.115
伍丰 LC-100	3.996	4.090	6.142
平均值	3.979	4.077	6.113
RSD/%	0.44	0.35	0.50

法测定其没食子酸、柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸的含量, 2 种方法所得的各批次药材的含量和相对误差情况见表 9。10 批牻牛儿苗药材中柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸的含量分别为 0.258%~1.378%、0.284%~1.589%和 0.299%~1.852%。不同产地和采收期 4 个成分的含量均呈现一定的动态变化, 但规律不一致。其中柯里拉京在黑龙江大庆的产地含量最低, 大连瓦房店的产地含量最高。老鹳草素在吉林松原市产地含量最低, 吉林白城产地含量最高。鞣花酸在河北沽原县的产地含量最低, 辽宁锦州黑山县的产地含量最高^[15]。两法所得到的含量值之间



定, 确定牻牛儿苗总鞣质的最佳提取工艺^[16]。鞣质的经典含量测定方法有很多种, 最常用的有皮粉法、高锰酸钾法、干酪素法、络合滴定法、比色法和分光光度法。皮粉法适用的范围非常广, 但是耗用样品多, 测定时间长, 而且没有选择性, 其测定结果往往偏高。同皮粉法一样, 高锰酸钾法选择性小, 易受样品中还原性物质干扰, 误差较大。干酪素法测定鞣质含量的优点在于干酪素能有选择性地结合有生理活性的鞣质, 因此测出来的是有疗效的鞣质, 而无疗效的鞣质, 如鞣酐则不被测定。

表 9 QAMS 法和外标法测定 4 种成分的含量与相对误差

Table 9 Contents and relative error of four components by external standard method and QAMS

编号	没食子酸	柯里拉京/%			老鹳草素/%			鞣花酸/%		
	外标法	QAMS	外标法	RSD	QAMS	外标法	RSD	QAMS	外标法	RSD
S1	1.123	0.676	0.676	0.00	0.284	0.284	0.00	0.542	0.541	0.18
S2	3.208	1.253	1.253	0.00	0.684	0.686	-0.29	1.160	1.159	0.09
S3	1.089	0.906	0.907	-0.11	0.930	0.932	-0.21	1.852	1.851	0.05
S4	1.272	0.806	0.806	0.00	1.589	1.593	-0.25	1.629	1.628	0.06
S5	2.695	1.101	1.102	-0.09	0.708	0.709	-0.14	1.700	1.699	0.06
S6	3.692	1.263	1.263	0.00	0.462	0.463	-0.22	1.554	1.553	0.06
S7	1.706	0.856	0.856	0.00	1.061	1.064	-0.28	1.419	1.418	0.07
S8	2.154	1.378	1.378	0.00	1.088	1.091	-0.27	1.668	1.667	0.06
S9	0.180	0.258	0.258	0.00	0.820	0.821	-0.12	0.443	0.442	0.23
S10	0.543	0.740	0.740	0.00	1.097	1.099	-0.18	0.299	0.299	0.00

本实验通过高效液相色谱仪的二极管阵列检测器得到的三维图谱比较发现,以 278 nm 检测波长能够较好地检测出牻牛儿苗药用植物的主要有效成分,故选择 278 nm 作为测定波长。

本实验采用 HPLC 法建立了牻牛儿苗的指纹图谱,采用 QAMS 的质量控制方法,一次分析中可同时测定 4 个成分的含量。10 批牻牛儿苗药材共标定了 9 个共有峰,所有样品的相似度均高于 0.891,所建立的指纹图谱可用于牻牛儿苗药材的整体质量评价。本实验通过对照品确认了 4 个共有峰,并同时建立了 QAMS 的含量测定方法。以没食子酸为内标,柯里拉京、老鹳草素和鞣花酸在 278 nm 下的校正因子分别为 0.751、0.214 和 0.444。以 QAMS 法和外标法计算得到的含量结果之间无明显差异,表明所建立的 QAMS 方法准确,可用于牻牛儿苗药材的多成分含量测定。QAMS 法结合指纹图谱技术,既发挥 QAMS 法简便、易行、经济的优点,又体现指纹图谱整体、全面的优势。指纹图谱与含量测定采用同一方法,简化了分析过程,降低分析成本。所建立的方法同时达到定性、定量 2 个目的,可作为牻牛儿苗药材的质量评价方法。

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: 126.
- [2] 吴秋月, 齐洁, 李默影, 等. 牻牛儿苗的化学成分研究 [J]. 中医药学报, 2012, 40(1): 76-78.
- [3] 王瑞斌, 薛成虎. 国内鞣质生理活性研究进展 [J]. 榆林学院学报, 2010, 20(2): 47-49.
- [4] 陈玉武, 李克明, 李药兰, 等. 牻牛儿苗化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1148-1150.
- [5] 雷海民, 毕藏, 李强, 等. 牻牛儿苗化学成分研究 [J]. 西北药学杂志, 2008, 23(1): 18-19.
- [6] 赵晓雨, 尹海波. RP-HPLC 同时测定牻牛儿苗中 4 种酚酸类活性成分含量 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22): 3137-3140.
- [7] 李小阳, 翟小林, 王丹, 等. 基于一测多评法的当归药材质量控制研究 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6354-6360.
- [8] 王琪, 李晓琦, 黄萌萌, 等. 基于指纹图谱及多成分含量的化学模式识别法评价不同产地栀子药材的质量 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2690-2699.
- [9] 唐清, 匡艳辉, 李雯珊, 等. 基于指纹图谱和一测多评(QAMS)法的丹红化瘀口服液质量评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1663-1670.
- [10] 冯军, 柴玲, 陈明生, 等. 指纹图谱结合一测多评法评价拟草果质量的研究 [J]. 中草药, 2021, 52(3): 852-856.
- [11] 杜俊潮, 浦香兰, 范恺磊, 等. 基于 UPLC 指纹图谱及一测多评法的天麻标准汤剂质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4909-4917.
- [12] 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.
- [13] 王翠翠, 毕启瑞, 张建青, 等. 一测多评法定量分析半夏及其混伪品中的 4 种核苷类成分 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6180-6186.
- [14] 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.
- [15] 尹海波, 赵晓雨, 涂秀文, 等. 不同采收时期牻牛儿苗中 4 种酚酸类活性成分的动态分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 121-124.
- [16] 许鑫, 涂秀文, 姜海燕, 等. 牻牛儿苗总黄酮提取工艺优化及含量测定研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8): 1953-1955.

[责任编辑 时圣明]