

## 一测多评法测定大花龙胆中环烯醚萜类和黄酮类成分的含量

李灿琳<sup>1</sup>, 刘海洋<sup>1</sup>, 李 思<sup>2</sup>, 李廷菊<sup>2</sup>, 黄 茜<sup>2</sup>, 古 锐<sup>1\*</sup>

1. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

**摘要:** 目的 拟用一测多评法同时测定大花龙胆 *Gentiana szechenyii* 中的环烯醚萜类成分和黄酮类成分的含量, 并验证该方法在大花龙胆质量评价应用中的可行性和适用性。方法 采用 HPLC, 以大花龙胆药材中 2 个典型成分大花龙胆苷 A、异荛草苷为内参物, 测定其与马钱苷酸、獐牙菜苷、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷、异金雀花素-2"-*O*-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素的相对校正因子, 并用该相对校正因子计算其他几种成分的含量, 实现一测多评; 采用外标法测定药材中这 8 种成分的含量, 并比较两者差异, 以验证一测多评法的准确性和可行性; 同时对不同产地药材质量进行评价。结果 以大花龙胆苷 A 为内参物, 马钱苷酸、獐牙菜苷、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷的相对校正因子分别为 1.901、0.994、0.974、1.398; 以异荛草苷为内参物, 异金雀花素-2"-*O*-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素的相对校正因子分别为 1.511、0.969。各相对校正因子重复性良好。一测多评法与外标法对 24 批大花龙胆中 8 个成分含量的测定结果无显著差异。结论 所建立的一测多评法结果准确、可靠、重复性好, 可为大花龙胆多指标质量评价提供参考。

**关键词:** 大花龙胆; 一测多评法; 相对校正因子; 大花龙胆苷 A; 异荛草苷; 马钱苷酸; 獐牙菜苷; 乌奴龙胆苷 D; 平龙胆酯苷; 异金雀花素-2"-*O*-吡喃葡萄糖苷; 异金雀花素

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)02-0614-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.02.027

## Determination of iridoids and flavonoids in *Gentiana szechenyii* by quantitative analysis of multi-components with single marker

LI Canlin<sup>1</sup>, LIU Haiyang<sup>1</sup>, LI Si<sup>2</sup>, LI Tingju<sup>2</sup>, HUANG Xi<sup>2</sup>, GU Rui<sup>1</sup>

1. College of Ethnomedicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To determine the content of iridoids and flavonoids in *Gentiana szechenyii* simultaneously by quantitative analysis of multicomponents by single marker (QAMS), and verify the feasibility and applicability of the method in the application of its quality evaluation. **Methods** Using HPLC with two typical elements szechenyin A and isoorientin as the internal reference, the relative correction factors (RCFs) of the loganic acid, sweroside, gentiournoside D, depressine, isoscoparin-2"- $\beta$ -*D*-glucopyranoside and isoscoparin were determined. Then, the above relative correction factors were used to calculate the content of several other components, so as to achieve QAMS. The external standard method (ESM) was used to determine the contents of these eight components in the medicinal materials. And the differences of measured results of the two methods were compared to verify the accuracy and feasibility of QAMS. The quality of herbs from different origins was also evaluated. **Results** The RCFs of the loganic acid, sweroside, gentiournoside D and depressine were 1.901, 0.994, 0.974 and 1.398, respectively, with szechenyin A as the internal reference. The RCFs of isoscoparin-2"- $\beta$ -*D*-glucopyranoside and isoscoparin were 1.511 and 0.969, respectively, using isoorientin as the internal reference. The results showed that the RCFs repeatability was good. There were no significant differences in the determination results of the contents of 24 batches of *G. szechenyii* obtained by QAMS and ESM. **Conclusion** The results of the QAMS established in this study are accurate, reliable and reproducible, and can provide reference for the quality evaluation of multiple indicators of *G. grandiflora*.

**Key words:** *Gentiana szechenyii* Kanitz; quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); relative correction factor; szechenyin A; isoorientin; loganic acid; sweroside; gentiournoside D; depressine; isoscoparin-2"- $\beta$ -*D*-glucopyranoside; isoscoparin

收稿日期: 2023-10-02

基金项目: 国家科技部重大研发计划课题: 民族药资源再生与生态保护适宜技术及产业化模式研究 (2019YFC1712305)

作者简介: 李灿琳 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为民族药可持续开发与利用。Tel: 15933820502 E-mail: 2576038425@qq.com

\*通信作者: 古 锐, 教授, 研究方向为民族药可持续开发与利用。Tel: 15108237310 E-mail: 664893924@qq.com

大花龙胆 *Gentiana szechenyii* Kanitz 收载于《四川省藏药材标准》“白花龙胆（榜间嘎保）”项下，入药部位为除去基生叶的带花地上部分。大花龙胆味苦，性凉，具有解毒、利咽的功效，是白花龙胆的主流药材<sup>[1-3]</sup>，临床上治疗哮喘、急慢性咽喉炎、急慢性支气管炎等疾病效果明显。由于市场需求量大，资源紧缺，目前已被列入一级濒危藏药。指纹图谱研究表明，大花龙胆主要成分包括以大花龙胆苷 A、平龙胆酯苷、马钱苷酸、獐芽菜苷、乌奴龙胆苷 D 等为主的环烯醚萜类和以异荛草苷、异金雀花素-2''-O-吡喃葡萄糖苷（或称为异金雀花素苷）、异金雀花素为代表的黄酮类成分。目前，在四川省藏药材标准（2020 年版）中，建立了大花龙胆苷 A 的含量测定方法，缺陷在于不能很好地控制药材中多种成分的质量；受需要对照品的数量和种类较多，成本高且部分对照品未有出售的影响，外标法存在一定局限性，并不适宜于民族地区药检系统检测需要<sup>[4-5]</sup>。为更好地控制藏药大花龙胆的质量，本研究提出采用“一测多评法”<sup>[6-11]</sup>，此法已广泛应用于藏药的质量控制。通过一测多评技术实现同时测定大花龙胆中的多个指标性成分，为提升大花龙胆药材的质量控制标准提供理论依据。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent1260A 型高效液相色谱仪（美国安捷伦科技公司）；岛津 LC2030 高效液相色谱仪（日本岛津公司）；SB-5200DT 超声清洗仪器（宁波新芝生物科技股份有限公司）；UPT-11-10T 优普系列超纯水器（四川优普超纯科技有限公司）；CAP2250 赛多利斯电子分析天平（白山市玖久仪器仪表有限公司）。

### 1.2 试药

甲醇为色谱纯，水为超纯水，其余试剂均为分析纯。对照品马钱苷酸（批号 PS000658，质量分数 $\geq 98\%$ ）、獐牙菜苷（批号 PS011123，质量分数 $\geq 98\%$ ）、异金雀花素（批号 PS010491，质量分数 $\geq 98\%$ ）、乌奴龙胆苷 D（批号 PS010489，质量分数 $\geq 98\%$ ）、平龙胆酯苷（批号 PS010487，质量分数 $\geq 98\%$ ）购自成都普思生物科技股份有限公司。异荛草苷、异金雀花素-2''-O-吡喃葡萄糖苷、大花龙胆苷 A 为成都中医药大学民族医药学院自制，经峰面积归一化法计算质量分数为 98% 以上。24 批大花龙胆药材自采或购买于西藏、青海、四川等地，经成都中医药大学民族医药学院古锐教授鉴定为大花龙胆 *G. szechenyii* Kanitz 的干燥花枝，见表 1。

表 1 24 批样品来源信息

Table 1 Source information of 24 batches of samples

| 编号   | 采集时间     | 来源或产地                |
|------|----------|----------------------|
| DH1  | 20190925 | 青海省泽库县杂贡村            |
| DH2  | 20200902 | 四川省甘孜州石渠藏医院（收集）      |
| DH3  | 20190925 | 青海省泽库县科日则乡寄宿学校下      |
| DH4  | 20200915 | 四川省甘孜州理塘县德达乡小毛亚坝村    |
| DH5  | 20200712 | 西藏自治区拉萨市藏药材公司（收集）    |
| DH6  | 20200902 | 青海八一药材市场-三智商铺（收集）    |
| DH7  | 20200730 | 青海省果洛藏医院（收集）         |
| DH8  | 20200730 | 青海省八一药材市场-504 商铺（收集） |
| DH9  | 20200902 | 西藏山南藏医院（收集）          |
| DH10 | 20200903 | 青海省泽库藏医院（收集）         |
| DH11 | 20200713 | 青海省藏医院（收集）           |
| DH12 | 20190621 | 四川省阿坝州藏医院（收集）        |
| DH13 | 20190925 | 四川省阿坝州若尔盖日尔郎山 2 号大桥  |
| DH14 | 20190925 | 青海省泽库县龙洼俄当           |
| DH15 | 20200805 | 青海省玉树藏医院（收集）         |
| DH16 | 20201120 | 西藏贝珠雅药业有限公司（收集）      |
| DH17 | 20200708 | 四川省甘孜州藏医院（收集）        |
| DH18 | 20190920 | 西藏那曲藏药厂（收集）          |
| DH19 | 20201003 | 西藏山南索达乡（收集）          |
| DH20 | 20200923 | 西藏山南索达乡（收集）          |
| DH21 | 20200723 | 西藏拉萨（收集）             |
| DH22 | 20201114 | 西藏亚郎藏药材销售公司（收集）      |
| DH23 | 20190925 | 青海省藏医院（收集）           |
| DH24 | 20200902 | 青海省称多藏医院（收集）         |

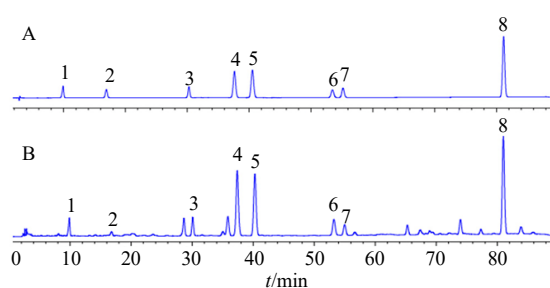
## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱：Inertsil ODS-3 色谱柱（250 mm $\times$ 4.6 mm，5  $\mu$ m）；流动相为 0.2% 磷酸水溶液（A 相），甲醇（B 相），梯度洗脱：0~5 min，20%~27% B；5~12 min，27% B；12~55 min，27%~45% B；55~62 min，45%~48% B；62~82 min，48%~56% B；82~85 min，56% B；85~90 min，56%~20% B；体积流量 1.0 mL/min；进样量 10  $\mu$ L；检测波长 254 nm；柱温 35  $^{\circ}$ C，色谱图见图 1。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取对照品马钱苷酸 17.09 mg、獐牙菜苷 17.92 mg、异荛草苷 17.20 mg、异金雀花素-2''-O-吡喃葡萄糖苷 20.24 mg、异金雀花素 16.78 mg、乌奴龙胆苷 D 17.82 mg、平龙胆酯苷 19.15 mg、大花龙胆苷 A 67.27 mg 分别置于 10 mL 量瓶中，加甲醇至相应刻度，摇匀。分别精密移取上述 8 个对照品溶液适量，置于 50 mL 量瓶中，加甲醇制成质量浓度分别为 153.90、71.68、51.60、253.00、178.13、89.10、143.63、605.43 mg/L 的混合对照品溶液。于 4  $^{\circ}$ C 冰箱避光保存，备用。



1-马钱苷酸, 2-獐牙菜苷, 3-异荛草苷, 4-异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷, 5-异金雀花素, 6-乌奴龙胆苷 D, 7-平龙胆酯苷, 8-大花龙胆苷 A。

1-loganic acid, 2-sweroside, 3-isoorientin, 4-isoscoparin-2"-β-D-glucopyranoside, 5-isoscoparin, 6-gentiourmosides D, 7-depressine, 8-szechenylin A。

图 1 混合对照品溶液 (A) 和大花龙胆样品 (B) HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatographs of mixed reference substances (A) and sample of *G. szechenyii* (B)

滤过, 取续滤液, 即得。

## 2.3 供试品溶液的制备

取样品粉末 (过 3 号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W、频率 40 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

## 2.4 方法学考察

**2.4.1 线性范围考察** 精密吸取上述混合对照品溶液, 加甲醇稀释制成系列浓度的混合对照品溶液, 按“2.1”项色谱条件下测定其峰面积, 以峰面积 ( $Y$ ) 为纵坐标, 各待测对照品浓度 ( $X$ ) 为横坐标绘制标准曲线, 得到回归方程和线性相关系数 ( $R^2$ ), 结果  $R^2$  均大于 0.999, 表明进样浓度与峰面积有良好的线性关系, 见表 2。

表 2 大花龙胆中 8 种成分的线性回归方程

Table 2 Linear regression equations of eight components in *G. szechenyii*

| 成分                | 回归方程                     | $R^2$   | 线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) |
|-------------------|--------------------------|---------|-------------------------------------------|
| 马钱苷酸              | $Y=6.581\ 3\ X+2.711\ 2$ | 0.999 6 | 9.23~153.90                               |
| 獐牙菜苷              | $Y=12.53\ X+3.081\ 1$    | 0.999 7 | 4.30~71.68                                |
| 异荛草苷              | $Y=21.177\ X+0.634\ 2$   | 0.999 7 | 3.10~51.60                                |
| 异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷 | $Y=13.925\ X+4.086\ 3$   | 0.999 7 | 15.18~253.00                              |
| 异金雀花素             | $Y=21.694\ X+3.666$      | 0.999 7 | 10.69~178.13                              |
| 乌奴龙胆苷 D           | $Y=12.954\ X+0.570\ 7$   | 0.999 7 | 5.35~89.10                                |
| 平龙胆酯苷             | $Y=8.923\ 3\ X+1.732\ 9$ | 0.999 7 | 8.62~143.63                               |
| 大花龙胆苷 A           | $Y=12.436\ X+12.6$       | 0.999 6 | 36.33~605.43                              |

**2.4.2 精密度试验** 精密吸取混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次进行分析, 每次进样 10  $\mu\text{L}$ , 记录大花龙胆苷 A、马钱苷酸、獐牙菜苷、异荛草苷、异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷的峰面积, 计算峰面积的 RSD 值, 结果显示上述各成分的峰面积 RSD 分别为 0.87%、0.76%、0.47%、0.89%、0.90%、0.88%、0.69%、0.82%, 说明仪器精密度良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取大花龙胆药材 (DH6), 按“2.3”项下制备供试品溶液, 置于室温下, 分别于配制后的 0、2、4、8、12、24、48 h 进样, 记录峰面积, 结果大花龙胆苷 A、马钱苷酸、獐牙菜苷、异荛草苷、异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷的峰面积 RSD 别为 0.87%、0.52%、1.35%、0.97%、0.80%、

0.77%、1.10%、0.74%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

**2.4.4 重复性试验** 取大花龙胆药材 (DH6), 按照“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 依照“2.1”项下条件进样, 测定马钱苷酸、獐牙菜苷、异荛草苷、异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷、大花龙胆苷 A 的平均含量分别为 2.668、0.782、1.227、9.560、6.719、1.395、1.852、13.962 mg/g, RSD 值分别为 1.20%、1.02%、0.65%、0.75%、0.49%、0.38%、0.91%、0.64%, 表明该方法重复性良好。

**2.4.5 加样回收率试验** 精密称取 0.25 g 已知含量的大花龙胆药材粉末 (DH6) 6 份, 加入一定量混合对照品溶液适量 (相当于药材中各被测成分含量的 100%), 按“2.3”项下方法制备供试品溶

液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 计算大花龙胆苷 A、马钱苷酸、獐牙菜苷、异荛草苷、异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷的平均回收率分别为 99.65%、96.51%、100.87%、96.65%、99.82%、99.84%、103.33%、100.91%; RSD 分别为 1.66%、2.36%、1.90%、1.34%、1.77%、1.63%、2.24%、2.45%。

## 2.5 相对校正因子 ( $f_{s/i}$ ) 的计算

采用多点矫正法, 取混合对照品溶液, 按

“2.1”项下色谱条件进样 2、4、6、8、10、15  $\mu\text{L}$ , 以大花龙胆苷 A 和异荛草苷为内参物, 分别计算大花龙胆苷 A 对马钱苷酸、獐牙菜苷、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷的相对校正因子 ( $f$ ) 和异荛草苷对异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素的  $f$ , 见表 3、4。

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

$A_s$  为内参物  $s$  峰面积,  $C_s$  为内参物  $s$  浓度,  $A_i$  为待测成分  $i$  峰面积;  $C_i$  为待测成分  $i$  浓度。

表 3 大花龙胆中环烯醚萜类的相对校正因子

Table 3 RCF of iridoids in *G. szechenyii*

| 进样体积/ $\mu\text{L}$ | $f$ 大花龙胆苷 A/马钱苷酸 | $f$ 大花龙胆苷 A/獐牙菜苷 | $f$ 大花龙胆苷 A/乌奴龙胆苷 D | $f$ 大花龙胆苷 A/平龙胆酯苷 |
|---------------------|------------------|------------------|---------------------|-------------------|
| 2                   | 1.914            | 0.990            | 0.980               | 1.378             |
| 4                   | 1.894            | 0.989            | 0.970               | 1.390             |
| 6                   | 1.894            | 0.987            | 0.969               | 1.399             |
| 8                   | 1.888            | 0.994            | 0.970               | 1.398             |
| 10                  | 1.886            | 0.987            | 0.969               | 1.391             |
| 15                  | 1.929            | 1.015            | 0.989               | 1.430             |
| 平均值                 | 1.901            | 0.994            | 0.974               | 1.398             |
| RSD/%               | 0.88             | 1.09             | 0.84                | 1.26              |

表 4 大花龙胆中黄酮类的  $f_{s/i}$

Table 4 RCF of flavonoids in *G. szechenyii*

| 进样体积/ $\mu\text{L}$ | $f$ 异荛草苷/异金雀花素苷 | $f$ 异荛草苷/异金雀花素 |
|---------------------|-----------------|----------------|
| 2                   | 1.490           | 0.956          |
| 4                   | 1.524           | 0.974          |
| 6                   | 1.524           | 0.976          |
| 8                   | 1.505           | 0.966          |
| 10                  | 1.510           | 0.972          |
| 15                  | 1.512           | 0.970          |
| 平均值                 | 1.511           | 0.969          |
| RSD/%               | 0.83            | 0.74           |

## 2.6 $f_{s/i}$ 的耐用性考察

**2.6.1** 不同高效液相色谱仪和色谱柱对  $f_{s/i}$  的影响 试验考察了仪器安捷伦 1260、岛津 LC2030 2 种不同的高效液相色谱系统和 Inertsil ODS-3 (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、SWELL-C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Comatex-C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )、Sepax GP-C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 4 种不同的色谱柱, 对大花龙胆中 6 种有效成分马钱苷酸、獐牙菜苷、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷、异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素的  $f_{s/i}$  的影响, 结果各成分的 RSD 值  $< 5.0\%$ , 表明  $f_{s/i}$  在不同的色谱柱和仪器下具有较好的适用性, 见表 5。

**2.6.2** 柱温对  $f_{s/i}$  的影响 其他色谱条件不变, 在不同柱温 (30、35、40  $^{\circ}\text{C}$ ) 下测定马钱苷酸、獐牙菜苷、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷、异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素的  $f_{s/i}$ , RSD 分别为 0.57%、

1.47%、0.30%、2.93%、0.99%、0.27%, 说明不同柱温对  $f_{s/i}$  的影响无显著性差异。

**2.6.3** 不同体积流量对  $f_{s/i}$  的影响 其他色谱条件不变, 在不同体积流量 (0.8、1.0、1.2 mL/min) 测定马钱苷酸、獐牙菜苷、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷、异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素的  $f_{s/i}$ , RSD 值为 0.34%、1.53%、0.91%、3.38%、0.18%、0.58%, 说明不同体积流量下  $f_{s/i}$  具有良好适用性。

## 2.7 一测多评法 (quantitative analysis of multicomponents by single marker, QAMS) 中待测成分色谱峰定位

本研究采用相对保留时间 ( $t_{R/s}$ ) 进行待测成分色谱峰的定位, 分别计算马钱苷酸、獐牙菜苷、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷对参照物大花龙胆苷 A 的相对保留时间 ( $t_R$ ) 以及异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素对参照物异荛草苷的  $t_R$ , 对各成分进行色谱峰定位。结果如表 6 所示, 各成分  $t_R$  的 RSD 均小于 5%, 表明可利用  $t_R$  对各成分进行定位。

## 2.8 QAMS 与外标法 (external standard method, ESM) 的比较

分别精密吸取 24 批供试品溶液各 10  $\mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪, 测定。采用 ESM 和 QAMS 计算药材中大花龙胆苷 A、马钱苷酸、獐牙菜苷、异荛草苷、异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷的含量, 结果见表 7。结

表 5 不同仪器和色谱柱对大花龙胆中各成分的  $f_{s/i}$  影响

| Table 5 Effects of different columns and different instruments on RCF of ingredients in <i>G. szechenyii</i> |                          |                           |                           |                              |                            |                          |                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 仪器                                                                                                           | 色谱柱                      | $f_{\text{大花龙胆苷 A/马钱苷酸}}$ | $f_{\text{大花龙胆苷 A/獐芽菜苷}}$ | $f_{\text{大花龙胆苷 A/乌奴龙胆苷 D}}$ | $f_{\text{大花龙胆苷 A/平龙胆酯苷}}$ | $f_{\text{异荛草苷/异金雀花素苷}}$ | $f_{\text{异荛草苷/异金雀花素}}$ |
| 安捷伦 1260A                                                                                                    | Inertsil ODS-3           | 1.887                     | 0.988                     | 0.986                        | 1.408                      | 1.515                    | 0.976                   |
|                                                                                                              | SWELL-C <sub>18</sub>    | 1.869                     | 0.988                     | 0.972                        | 1.460                      | 1.505                    | 0.967                   |
|                                                                                                              | Comatex-C <sub>18</sub>  | 1.876                     | 0.989                     | 0.975                        | 1.424                      | 1.500                    | 0.973                   |
|                                                                                                              | Sepax GP-C <sub>18</sub> | 1.870                     | 0.966                     | 1.002                        | 1.481                      | 1.516                    | 0.965                   |
| 岛津 LC2030                                                                                                    | Inertsil ODS-3           | 1.835                     | 1.019                     | 0.980                        | 1.375                      | 1.489                    | 0.953                   |
|                                                                                                              | SWELL-C <sub>18</sub>    | 1.849                     | 1.008                     | 0.954                        | 1.400                      | 1.508                    | 0.966                   |
|                                                                                                              | Comatex-C <sub>18</sub>  | 1.847                     | 1.015                     | 0.976                        | 1.410                      | 1.483                    | 0.957                   |
|                                                                                                              | Sepax GP-C <sub>18</sub> | 1.895                     | 1.048                     | 1.030                        | 1.373                      | 1.536                    | 0.871                   |
| 平均值                                                                                                          |                          | 1.870                     | 1.000                     | 0.985                        | 1.422                      | 1.509                    | 0.954                   |
| RSD/%                                                                                                        |                          | 0.96                      | 2.63                      | 2.50                         | 2.59                       | 1.08                     | 3.87                    |

表 6 不同仪器和色谱柱测得的相对保留值

| Table 6 Relative retention time of different columns and different instruments |                          |                           |                           |                              |                            |                          |                         |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 仪器                                                                             | 色谱柱                      | $t_{\text{大花龙胆苷 A/马钱苷酸}}$ | $t_{\text{大花龙胆苷 A/獐芽菜苷}}$ | $t_{\text{大花龙胆苷 A/乌奴龙胆苷 D}}$ | $t_{\text{大花龙胆苷 A/平龙胆酯苷}}$ | $t_{\text{异荛草苷/异金雀花素苷}}$ | $t_{\text{异荛草苷/异金雀花素}}$ |
| 安捷伦 1260A                                                                      | Inertsil ODS-3           | 0.123                     | 0.211                     | 0.663                        | 0.683                      | 1.244                    | 1.340                   |
|                                                                                | SWELL-C <sub>18</sub>    | 0.123                     | 0.201                     | 0.661                        | 0.670                      | 1.256                    | 1.323                   |
|                                                                                | Comatex-C <sub>18</sub>  | 0.123                     | 0.217                     | 0.657                        | 0.681                      | 1.299                    | 1.371                   |
|                                                                                | Sepax GP-C <sub>18</sub> | 0.124                     | 0.206                     | 0.658                        | 0.677                      | 1.265                    | 1.335                   |
| 岛津 LC20A                                                                       | Inertsil ODS-3           | 0.124                     | 0.210                     | 0.659                        | 0.681                      | 1.242                    | 1.337                   |
|                                                                                | SWELL-C <sub>18</sub>    | 0.116                     | 0.185                     | 0.630                        | 0.652                      | 1.301                    | 1.382                   |
|                                                                                | Comatex-C <sub>18</sub>  | 0.115                     | 0.198                     | 0.630                        | 0.665                      | 1.350                    | 1.440                   |
|                                                                                | Sepax GP-C <sub>18</sub> | 0.120                     | 0.210                     | 0.633                        | 0.664                      | 1.304                    | 1.386                   |
| 平均值                                                                            |                          | 0.121                     | 0.205                     | 0.649                        | 0.672                      | 1.285                    | 1.362                   |
| RSD/%                                                                          |                          | 2.97                      | 4.86                      | 2.29                         | 1.59                       | 2.88                     | 2.81                    |

果表明, 2 种方法测得的含量无显著性差异, 表明建立的 QAMS 在环烯醚萜成分与黄酮类成分检测中的适宜性良好, 可为大花龙胆的多指标质量控制标准提供理论参考。

2.9 结果与分析

将 24 批不同产地药材高相液相色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版) 中, 以 DH6 药材色谱图为参照色谱, 构建指纹图谱并进行相似度分析 (图 2)。结果发现 24 批大花龙胆共有 12 个共有峰, 保留时间分别为 9.934、16.927、28.806、30.25、37.618、40.509、53.446、55.202、65.426、74.451、77.451、81.102 min。24 批大花龙胆药材与 DH6 的相似度在 0.956~1.000, 这表明不同产地的大花龙胆药材具有较高的一致性 24 批药材叠加图谱见图 2。以 8 个有效成分含量作为评价指标, 运用 GraphPad Prism 进行热图分析, 见图 3。

由图 3 可知, 大花龙胆中有效成分含量差异显著, 大花龙胆苷 A 含量显著高于其他成分, 而獐芽

菜苷显著低于其他成分。结合含量测定结果发现, DH13 (四川省阿坝州若尔盖日尔郎山 2 号大桥) 样品中各成分 (马钱苷酸、乌奴龙胆苷 D 除外) 的质量分数均显著低于其他产地, 分别为 1.725、0.125、0.920、1.434、2.710、1.891、0.495、5.943 mg/g。马钱苷酸、獐芽菜苷、异金雀花素、大花龙胆苷 A 含量最高的批次均为 DH4 (质量分数分别为 7.911、1.779、8.586、31.593 mg/g); 异荛草苷含量最高的批次为 DH14 (2.28 mg/g), 与最低的 DH13 (0.920 mg/g) 相差 2.48 倍; 异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷含量最高的批次为 DH24, 与最低的 DH13 (1.437 mg/g), 相差 7.76 倍; 乌奴龙胆苷 D 含量最高的批次为 DH19 (4.765 mg/g), 与最低的 DH6 (1.337 mg/g) 相差 3.56 倍; 平龙胆酯苷含量最高的批次为 DH3, 与最低的 DH13 (0.502 mg/g) 相差 10.96 倍。综上所述, 不同产地样品中成分含量差异十分显著, 四川省甘孜州理塘县德达乡小毛亚坝村采集的药材质量较好, 四川省阿坝州若尔盖日尔郎山 2 号大桥

表 7 QAMS 与 ESM 测得 24 批大花龙胆中 5 种环烯醚萜类和 3 种黄酮类的含量

Table 7 Content of five iridoids and three flavones in 24 batches of *G. szechenyi* by QAMS and ESM

| 产地   | 方法   | 质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> ) |       |       |        |       |         |       |         |
|------|------|----------------------------|-------|-------|--------|-------|---------|-------|---------|
|      |      | 马钱苷酸                       | 獐牙菜苷  | 异荛草苷  | 异金雀花素苷 | 异金雀花素 | 乌奴龙胆苷 D | 平龙胆酯苷 | 大花龙胆苷 A |
| DH1  | ESM  | 1.848                      | 0.814 | 1.492 | 9.160  | 5.881 | 1.980   | 1.071 | 17.236  |
|      | QASM | 1.875                      | 0.825 | —     | 9.106  | 5.840 | 2.005   | 1.081 | —       |
| DH2  | ESM  | 3.477                      | 0.912 | 1.825 | 7.856  | 5.544 | 2.537   | 3.965 | 19.425  |
|      | QASM | 3.509                      | 0.924 | —     | 7.813  | 5.507 | 2.569   | 3.977 | —       |
| DH3  | ESM  | 2.847                      | 1.338 | 1.341 | 10.249 | 5.860 | 4.085   | 5.487 | 25.927  |
|      | QASM | 2.879                      | 1.350 | —     | 10.186 | 5.819 | 4.138   | 5.503 | —       |
| DH4  | ESM  | 7.855                      | 1.767 | 1.366 | 7.418  | 8.651 | 4.597   | 5.087 | 31.593  |
|      | QASM | 7.911                      | 1.779 | —     | 7.377  | 8.586 | 4.659   | 5.104 | —       |
| DH5  | ESM  | 3.222                      | 0.806 | 1.975 | 8.053  | 5.862 | 2.919   | 3.476 | 17.708  |
|      | QASM | 3.253                      | 0.817 | —     | 8.009  | 5.823 | 2.956   | 3.486 | —       |
| DH6  | ESM  | 2.561                      | 0.754 | 1.180 | 9.177  | 6.452 | 1.321   | 1.774 | 13.380  |
|      | QASM | 2.587                      | 0.764 | —     | 9.121  | 6.405 | 1.337   | 1.783 | —       |
| DH7  | ESM  | 1.601                      | 0.882 | 2.081 | 7.951  | 5.495 | 1.920   | 2.358 | 12.129  |
|      | QASM | 1.624                      | 0.892 | —     | 7.908  | 5.459 | 1.942   | 2.365 | —       |
| DH8  | ESM  | 3.525                      | 0.753 | 1.452 | 6.563  | 6.593 | 3.528   | 4.444 | 20.257  |
|      | QASM | 3.558                      | 0.764 | —     | 6.528  | 6.546 | 3.572   | 4.456 | —       |
| DH9  | ESM  | 2.907                      | 0.721 | 1.829 | 10.020 | 6.828 | 2.521   | 2.700 | 15.989  |
|      | QASM | 2.936                      | 0.732 | —     | 9.962  | 6.781 | 2.551   | 2.709 | —       |
| DH10 | ESM  | 2.644                      | 0.827 | 2.106 | 8.852  | 6.265 | 3.481   | 3.758 | 20.010  |
|      | QASM | 2.674                      | 0.838 | —     | 8.804  | 6.223 | 3.525   | 3.770 | —       |
| DH11 | ESM  | 3.155                      | 0.677 | 1.991 | 9.443  | 6.616 | 2.664   | 3.353 | 18.170  |
|      | QASM | 3.185                      | 0.689 | —     | 9.389  | 6.570 | 2.698   | 3.364 | —       |
| DH12 | ESM  | 4.259                      | 0.921 | 1.533 | 8.436  | 6.582 | 3.623   | 4.275 | 22.983  |
|      | QASM | 4.296                      | 0.932 | —     | 8.388  | 6.535 | 3.670   | 4.289 | —       |
| DH13 | ESM  | 1.725                      | 0.125 | 0.920 | 1.434  | 2.710 | 1.891   | 0.495 | 5.943   |
|      | QASM | 1.741                      | 0.137 | —     | 1.437  | 2.694 | 1.905   | 0.502 | —       |
| DH14 | ESM  | 1.953                      | 0.703 | 2.280 | 9.739  | 7.632 | 4.432   | 3.355 | 17.300  |
|      | QASM | 1.980                      | 0.714 | —     | 9.684  | 7.579 | 4.486   | 3.365 | —       |
| DH15 | ESM  | 2.562                      | 1.072 | 2.217 | 9.555  | 7.068 | 2.660   | 4.086 | 21.671  |
|      | QASM | 2.592                      | 1.084 | —     | 9.501  | 7.019 | 2.694   | 4.099 | —       |
| DH16 | ESM  | 3.360                      | 0.614 | 1.549 | 9.808  | 6.696 | 2.551   | 1.666 | 14.679  |
|      | QASM | 3.390                      | 0.625 | —     | 9.750  | 6.648 | 2.581   | 1.675 | —       |
| DH17 | ESM  | 2.103                      | 0.743 | 2.170 | 9.454  | 6.745 | 2.371   | 2.614 | 16.355  |
|      | QASM | 2.130                      | 0.754 | —     | 9.402  | 6.699 | 2.400   | 2.624 | —       |
| DH18 | ESM  | 2.953                      | 0.734 | 1.717 | 10.965 | 6.907 | 3.058   | 2.514 | 18.563  |
|      | QASM | 2.984                      | 0.745 | —     | 10.900 | 6.859 | 3.097   | 2.525 | —       |
| DH19 | ESM  | 4.043                      | 0.548 | 1.194 | 8.010  | 6.490 | 4.706   | 4.153 | 21.400  |
|      | QASM | 4.079                      | 0.560 | —     | 7.963  | 6.443 | 4.765   | 4.166 | —       |
| DH20 | ESM  | 3.788                      | 0.838 | 1.705 | 8.331  | 5.718 | 2.914   | 3.908 | 19.520  |
|      | QASM | 3.821                      | 0.849 | —     | 8.285  | 5.679 | 2.951   | 3.919 | —       |
| DH21 | ESM  | 2.921                      | 0.778 | 2.223 | 8.635  | 6.598 | 3.008   | 3.380 | 17.020  |
|      | QASM | 2.951                      | 0.789 | —     | 8.588  | 6.553 | 3.045   | 3.390 | —       |
| DH22 | ESM  | 4.205                      | 1.000 | 1.924 | 8.668  | 6.167 | 3.852   | 4.412 | 20.618  |
|      | QASM | 4.240                      | 1.011 | —     | 8.620  | 6.125 | 3.900   | 4.425 | —       |
| DH23 | ESM  | 2.560                      | 0.740 | 1.790 | 8.366  | 5.878 | 2.599   | 2.989 | 17.709  |
|      | QASM | 2.589                      | 0.752 | —     | 8.320  | 5.838 | 2.632   | 2.999 | —       |
| DH24 | ESM  | 3.935                      | 0.606 | 1.527 | 11.217 | 6.981 | 3.306   | 2.921 | 17.232  |
|      | QASM | 3.968                      | 0.617 | —     | 11.148 | 6.931 | 3.346   | 2.932 | —       |

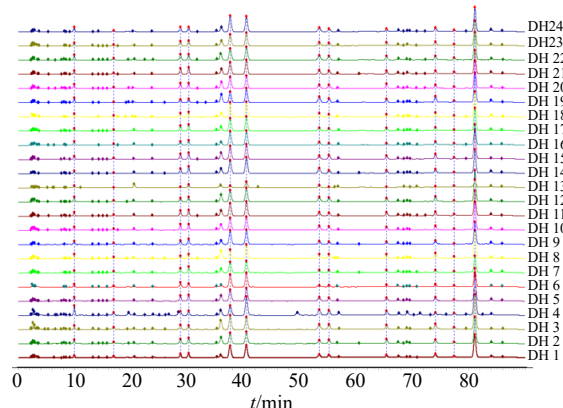


图 2 24 批大花龙胆药材 HPLC 图

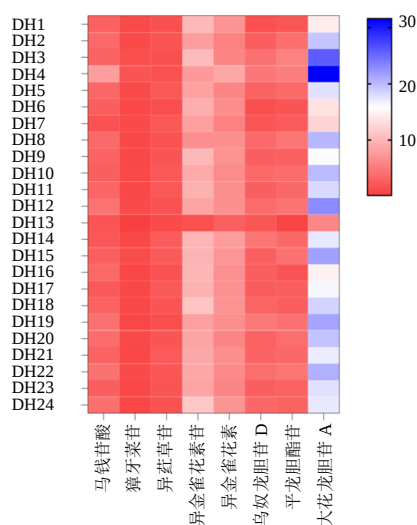
Fig. 2 HPLC chromatograms of 24 batches of *G. szechenyii*

图 3 不同产地成分差异热图

Fig. 3 Heat map of ingredients of different producing areas  
采集的药材质量较差。

将 24 批大花龙胆药材的马钱苷酸、獐牙菜苷、异红草苷、异金雀花素苷、异金雀花素、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷、大花龙胆苷 A 的含量原始数据导入 SIMCA.14.1 统计分析软件中, 进行主成分分析 (principal component analysis, PCA), 结果见图 4。PCA 结果表明, 不同批次大花龙胆分布较为分散, 整体离散度较大, 这可能与其产地不同有关, 不同土壤及气候对药材中有效成分含量影响较大。尤其是, 四川省甘孜州理塘县德达乡小毛亚坝村、四川省阿坝州若尔盖日尔郎山 2 号大桥采集的药材与其余批次差异较明显。

### 3 讨论

大花龙胆作为白花龙胆的主流药材, 主要成分为大花龙胆苷 A、马钱苷酸、獐牙菜苷、异红草苷、

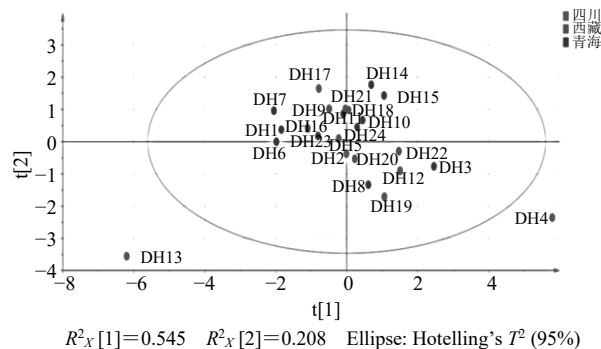


图 4 不同产地 PCA 得分图

Fig. 4 Score plot of PCA of different producing areas

异金雀花素-2"-O-吡喃葡萄糖苷、异金雀花素、乌奴龙胆苷 D、平龙胆酯苷<sup>[14]</sup>。其中, 大花龙胆苷 A 和异红草苷是大花龙胆中环烯醚萜类和黄酮类成分的主要活性成分, 含量高且稳定性好, 因此选择大花龙胆苷 A 和异红草苷为内标物, 建立 QAMS 法, 弥补了对照品不足的缺点, 实现藏药材多成分质量控制, 也体现了一测多评法低成本的优势。

参考相关文献报道<sup>[14-18]</sup>, 本研究采用 2 个不同的高效液相色谱仪和 4 种不同的色谱柱对相对校正因子进行考察, 同时, 对柱温和体积流量也进行了相对校正因子的耐用性考察, 结果 RSD 值都小于 5.0%, 说明 QAMS 法的系统耐用性良好。

本研究共收集得到不同产地的药材 24 批, 根据 QAMS 法和 ESM 法进行含量测定与分析, 结果表明 2 种方法的结果基本一致, 无显著差异。验证了 QAMS 法的可行性与准确性。对 24 批药材进行指纹图谱相似度评价、热图分析、PCA, 发现不同产地药材具有较高的一致性, 但质量差异显著。其中, 四川省甘孜州理塘县德达乡小毛亚坝村地区药材质量最优。本试验建立的一测多评法适用于大花龙胆中 8 种有效成分的含量测定, 相对校正因子稳定; 该法不仅节约检测成本、缩短检测时间, 而且简化了大花龙胆的定量检测方法, 具有很强的实用性, 可为大花龙胆后续的质量评价提供参考。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 四川省药品监督管理局. 四川省藏药材标准 [S]. 成都: 四川科学技术出版社, 2020: 48.
- [2] 钟世红, 古锐, 马羚, 等. 藏药白花龙胆品种考证与使用现状调查 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(13): 2450-2455.

- [3] 马羚. 藏药“榜间嘎保”品种整理及主流品种的品质研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
- [4] 张彩虹. 藏药白花龙胆主流品种的亲缘关系、遗传多样性及药效学研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [5] 付林. 藏药榜间资源学与大花龙胆质量标准研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 南措, 古锐, 付林, 等. 一测多评法测定藏族药“蓝花龙胆”中环烯醚萜类和黄酮类成分的含量 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(18): 4423-4428.
- [9] 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.
- [10] 刘艳芬, 段芳, 张翹, 等. 基于 HPLC-QAMS 及化学计量学的利胆石颗粒质量评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(19): 6044-6053.
- [11] 张龙, 李珊珊, 白雪, 等. 基于一测多评法的淫羊藿质量评价方法研究及验证 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2843-2851.
- [12] 秦昆明, 杨冰, 胡静, 等. 一测多评法在中药多组分质量控制中的应用现状与思考 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 725-731.
- [13] 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.
- [14] 冯洁, 郭晔红, 姜侃, 等. 一测多评法测定不同寄主肉苁蓉中 4 种苯乙醇苷类含量 [J]. 世界中医药, 2022, 17(13): 1879-1882.
- [15] 周洪旭, 张毅, 杨新勇, 等. 一测多评法测定川射干中 8 个异黄酮类成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(6): 1072-1080.
- [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.
- [17] 王海燕, 刘斌. 一测多评法测定不同产地漏芦中 5 种有效成分的含量 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(10): 1342-1346.
- [18] 萨出拉, 王秀枝, 杨立国, 等. 一测多评法同时测定沙芪浓缩丸中 5 种黄酮 [J]. 中成药, 2023, 45(2): 381-386.

[责任编辑 时圣明]