

基于一测多评法多指标定量及化学模式识别法的灵香草质量评价

侯迎迎¹, 焦响乐¹, 李刚刚², 王晓波³

1. 安阳职业技术学院 中医药学院, 河南 安阳 455000

2. 郑州大学第五附属医院 药学部, 河南 郑州 450000

3. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046

摘要: 目的 建立灵香草 *Lysimachia foenum-graecum* 一测多评法 (quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS) 多指标成分定量控制方法, 采用多元统计分析模型评价不同产地灵香草质量差异。方法 以 Prep Scalar C₁₈ 柱为色谱柱, 乙腈-0.2%磷酸为流动相 (梯度洗脱), 以槲皮素和熊果酸为内参物, 采用 QAMS 法同时测定灵香草中绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β -谷甾醇含量, 同时用外标法验证 QAMS 法的准确性。依据《中国药典》检测浸出物、总灰分和酸不溶性灰分。进一步应用主成分分析 (principal component analysis, PCA)、因子分析 (factor analysis, FA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 法对 15 批不同产地的灵香草进行区分比较, 寻找差异因子。结果 建立的相对校正因子可用于定量分析, 且耐用性良好; QAMS 法与外标法结果无显著差异, 但各批次间差异较大。PCA 结果显示 15 批灵香草聚为 3 类, FA 结果显示广东和广西产地的灵香草质量较优, OPLS-DA 结果显示 foenumoside B、山柰酚、零陵香皂苷 C、绿原酸、槲皮素和豆甾醇是影响灵香草产品质量的差异化标志物。结论 基于多指标成分定量、多元统计分析评价灵香草质量的方法, 为灵香草质量标准统一和提升提供基础资料。

关键词: 灵香草; 一测多评法; 多指标定量; 多元统计分析; 质量差异评价; 绿原酸; 杨梅素; 槲皮素; 山柰酚; foenumoside B; 零陵香皂苷 C; 齐墩果酸; 熊果酸; 豆甾醇; β -谷甾醇

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)21-7483-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.21.026

Quality evaluation of *Lysimachia foenum-graecum* based on QAMS, multi-index quantification and chemical pattern recognition method

HOU Yingying¹, JIAO Xiangyue¹, LI Ganggang², WANG Xiaobo³

1. School of Traditional Chinese Medicine, Anyang Vocational and Technical College, Anyang 455000, China

2. Department of Pharmacy, The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

3. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To establish a quantitative control method for multi-index components of *Lysimachia foenum-graecum* by QAMS, and to evaluate the quality difference of *Lysimachia foenum-graecum* from different producing areas by multivariate statistical analysis model. **Method** A Prep Scalar C₁₈ column was used as the chromatographic column, and acetonitrile-0.2% phosphoric acid was used as the mobile phase (gradient elution). The contents of chlorogenic acid, myricetin, quercetin, kaempferol, foenumoside B, lysimachigenoside C, oleanolic acid, ursolic acid, stigmasterol and β -sitosterol in *Lysimachia foenum-graecum* were simultaneously determined by QAMS method with quercetin and ursolic acid as internal reference. The accuracy of QAMS method was verified by external standard method. Meanwhile, extract, total ash and acid insoluble ash were detected according to *Chinese Pharmacopoeia*. The PCA, FA and OPLS-DA were used to distinguish and compare 15 batches of *Lysimachia foenum-graecum* from different producing areas, and explore the difference factors for quality evaluation of *Lysimachia foenum-graecum*. **Results** The established relative correction factor can be used for quantitative analysis and has good durability. The results of QAMS method were close to those of external standard method, but the difference between batches was large. The PCA results showed that 15 batches of *Lysimachia foenum-*

收稿日期: 2024-05-26

基金项目: 河南省高等学校重点科研指导计划项目 (20B550007)

作者简介: 侯迎迎 (1987—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为主要从事中药药物分析教研。E-mail: ns8532@163.com

graecum were clustered into three categories. The FA results showed that the quality of *Lysimachia foenum-graecum* from Guangdong and Guangxi was better. The results of OPLS-DA showed that foenumoside B, kaempferol, lysimachigenoside C, chlorogenic acid, quercetin and stigmasterol were differential markers affecting the quality of *Lysimachia foenum-graecum*. **Conclusion** The method of evaluating the quality of *Lysimachia foenum-graecum* based on HPLC, multivariate statistical analysis provides basic data for the screening of *Lysimachia foenum-graecum* and the unification and improvement of quality standards.

Keywords: *Lysimachiae Foenum-graeci Herba*; QAMS; multi-index quantification; multivariate statistical analysis; quality difference evaluation; chlorogenic acid; myricetin; quercetin; kaempferol; foenumoside B; lysimachigenoside C; oleanolic acid; ursolic acid; stigmasterol; β -sitosterol

灵香草为报春花科植物灵香草 *Lysimachia foenum-graecum* Hance 的干燥全草。主要分布在广西、广东、云南等地^[1], 可用于治疗伤风、头疼、齿疼、咽喉肿痛、胸闷腹胀等, 具散风寒、辟秽功效、遗精、驱蛔虫等功效^[2-3], 有很大的研究价值。现代医学研究证明, 灵香草具有抗肿瘤、抗氧化、抗菌消炎等功效^[4-5]。灵香草主要含黄酮类, 多酚类、皂苷类、甾体类、香豆素类、挥发油等多种成分^[6-9]。一测多评 (quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS) 法自 2006 年提出后, 因操作简便, 检测用时短, 含量测定结果准确, 成本低, 越来越多地用于对照品制备难度大或对照品不稳定的多指标质量评价模式^[10-11]。多元统计分析包括主成分分析 (principal component analysis, PCA)^[12]、因子分析 (factor analysis, FA)^[13]、正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)^[14]等分析方法, 预测精度高, 越来越多地用于评价中药质量。灵香草采用地方标准^[15-16], 标准均未涉及定量分析。现以槲皮素和熊果酸为内参物, 利用 QAMS 法对 6 省 15 个批次的灵香草样品中绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β -谷甾醇含量进行测定, 参照《中国药典》检测了浸出物、总灰分和酸不溶性灰分含量, 应用 PCA、FA 和 OPLS-DA 方法分析研究不同产地灵香草

的质量差异, 为其道地性研究和质量控制提供借鉴。

1 材料

1.1 试药

对照品槲皮素 (批号 100081-201610, 质量分数 99.8%)、绿原酸 (批号 110753-202119, 质量分数 96.3%)、齐墩果酸 (批号 110709-202109, 质量分数 95.8%)、 β -谷甾醇 (批号 110851-201909, 质量分数 96.7%) 购于中国食品药品检定研究院; 杨梅素 (批号 CFS202301, 质量分数 98.0%)、山柰酚 (批号 CFS202302, 质量分数 99.3%)、熊果酸 (批号 CFS202202, 质量分数 98.8%)、豆甾醇 (批号 CFS202201, 质量分数 98.5%) 购于武汉天植生物技术有限公司; foenumoside B (批号 HY-N11924-23152, 质量分数 98.2%)、零陵香皂苷 C (批号 HY-N11923-65915, 质量分数 98.9%) 购于上海皓元生物医药科技有限公司; 乙腈和磷酸 (HPLC 试剂, Merck 公司), 其余试剂为 AR 级; 药材采集地信息见表 1, 经河南中医药大学王晓波教授鉴定为灵香草 *L. foenum-graecum* Hance 的干燥全草。

1.2 仪器

EL2401 型分析天平 (瑞士梅特勒公司); Agilent 1100 型、Waters e2695 型 HPLC 仪 (Agilent 和 Waters 公司); 规格均为 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 的 Prep Scalar C₁₈ 柱、Kromasil C₁₈ 柱和 Alltima

表 1 灵香草药材信息

Table 1 Information of *L. foenum-graecum* samples

编号	采集地	采集时间	编号	采集地	采集时间
S1	云南富宁	2023-09	S9	四川普格	2023-09
S2	云南砚山	2023-10	S10	四川盐源	2023-08
S3	云南麻栗坡	2023-10	S11	广西容县	2023-10
S4	贵州荔波	2023-08	S12	广西南明	2023-08
S5	贵州独山	2023-07	S13	广西德保	2023-06
S6	贵州余庆	2023-06	S14	广东始兴	2023-08
S7	湖南中方	2023-09	S15	广东仁化	2023-09
S8	湖南嘉禾	2022-10			

C₁₈ 柱; SK2510HP 型数控超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

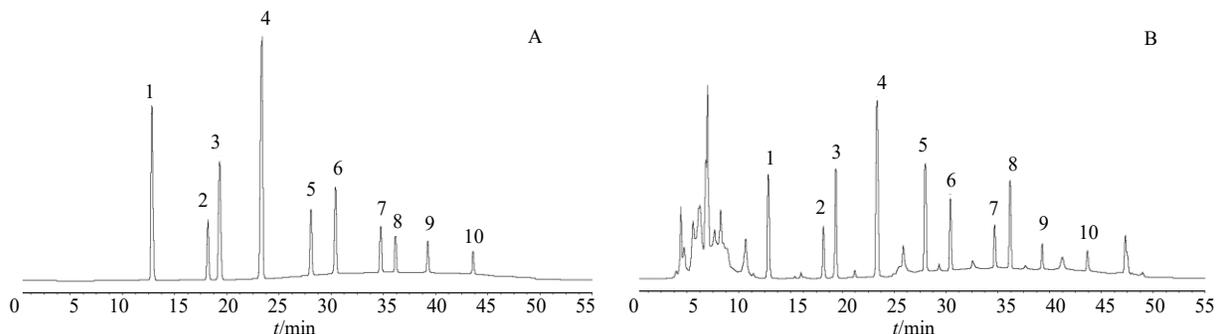
2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 对照品溶液制备 精密称取对照品绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β-谷甾醇适量, 50% 甲醇溶解并制成含各对照品 0.274、0.126、0.218、0.39、0.154、0.196、0.072、0.06、0.042 和 0.028 mg/mL 的混合贮备液。精密吸取贮备液, 用 50% 甲醇定量稀释 20 倍, 摇匀, 即得。

2.1.2 供试品溶液制备 取灵香草粉末约 0.5 g, 精密称定, 置三角瓶中, 精密加 50% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声提取 40 min, 冷却, 补足质量, 摇匀, 即得。HPLC 检测用溶液均采用 0.22 μm 有机滤膜滤过。

2.1.3 HPLC 检测条件 采用 Prep Scalar C₁₈ 色谱柱; 检测波长 327 nm (0~16 min 检测绿原酸)^[17]; 360 nm (16~25 min 检测杨梅素、槲皮素和山柰酚)^[18]; 210 nm (25~55 min 检测 foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β-谷甾醇)^[19]; 乙腈 (A) -0.2% 磷酸水溶液 (B) 为流动相梯度洗脱; (0~16 min, 42.0% A; 16~25 min, 42.0%~68.0% A; 25~47 min, 68.0%~75.0% A; 47~55 min, 75.0%~42.0% A); 进样体积 10 μL, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 运行时间 55 min。在以上条件下进行试验并分析绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β-谷甾醇与相邻峰的分度, 结果分离度达到要求 (大于 1.5), 理论板数按各成分计均大于 5 500 (图 1)。



1-绿原酸; 2-杨梅素; 3-槲皮素; 4-山柰酚; 5-foenumoside B; 6-零陵香皂苷 C; 7-齐墩果酸; 8-熊果酸; 9-豆甾醇; 10-β-谷甾醇。
1-chlorogenic acid; 2-myricetin; 3-quercetin; 4-kaempferol; 5-foenumoside B; 6-lysimachigenoside C; 7-oleanolic acid; 8-ursolic acid; 9-stigmasterol; 10-β-sitosterol.

图 1 对照品 (A) 和供试品溶液 (B) 高效液相色谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and test solution (B)

2.1.4 线性关系考察 通过提取溶剂将“2.1.1”项中混合对照品贮备液准确稀释 4、10、20、40、100 和 200 倍, 摇匀后分别进样 10 μL, 进行峰面积 (Y) 与质量浓度 (X) 的线性拟合。结果绿原

酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β-谷甾醇在各自范围内与峰面积呈良好的线性关系, 结果见表 2。

表 2 10 种成分的线性关系

Table 2 Linear relationship of ten components determined by HPLC

成分	回归方程	线性范围/(μg·mL ⁻¹)	R ²
绿原酸	$Y=8.369\ 9\times 10^5 X-923.1$	1.37~68.50	0.999 1
杨梅素	$Y=5.129\ 6\times 10^5 X+159.7$	0.63~31.50	0.999 3
槲皮素	$Y=6.846\ 3\times 10^5 X-1\ 045.6$	1.09~54.50	0.999 5
山柰酚	$Y=1.101\ 1\times 10^6 X+1\ 631.5$	1.95~97.50	0.999 7
foenumoside B	$Y=5.742\ 4\times 10^5 X-428.4$	0.77~38.50	0.999 4
零陵香皂苷 C	$Y=6.512\ 9\times 10^5 X-2\ 211.7$	0.98~49.00	0.999 2
齐墩果酸	$Y=4.837\ 8\times 10^5 X+907.9$	0.36~18.00	0.999 5
熊果酸	$Y=4.045\ 3\times 10^5 X-259.6$	0.30~15.00	0.999 1
豆甾醇	$Y=3.583\ 6\times 10^5 X-1\ 031.2$	0.21~10.50	0.999 1
β-谷甾醇	$Y=2.724\ 2\times 10^5 X+173.9$	0.14~7.00	0.999 4

2.1.5 精密度试验 在“2.1.3”项色谱条件下，取同一供试品（S1）溶液，连续进样 6 次，结果各成分峰面积的 RSD 值均 < 2.0%，提示仪器精密度良好，检测方法可靠。

2.1.6 稳定性试验 在“2.1.3”项色谱条件下，取同一供试品（S1）溶液分别分别于供试品溶液放置 2、4、8、10、16、24 h 时进样，结果各成分峰面积的 RSD 值均 < 2.0%，提示供试品溶液 24 h 内性质稳定，检测方法可靠。

2.1.7 重复性试验 取灵香草（S1）6 份，每份约 0.5 g，分别按“2.1.2”项制成供试品溶液，进样，计算各成分质量分数，结果各成分质量分数的 RSD 值均 < 2.0%，表明样品制备方法重复性良好，用于测定 10 个待测成分含量数据可靠。

2.1.8 加样回收率试验 取 9 份已测定绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β-谷甾醇含量的灵香草粉末（S1），每份 0.25 g，精密称定，分别按低、中、高 3 个水平加入混合对照品溶液（绿原酸 0.197 mg/mL、杨梅素 0.058 mg/mL、槲皮素 0.146 mg/mL、山柰酚 0.275 mg/mL、foenumoside

B 0.077 mg/mL、零陵香皂苷 C 0.103 mg/mL、齐墩果酸 0.038 mg/mL、熊果酸 0.032 mg/mL、豆甾醇 0.021 mg/mL、β-谷甾醇 0.012 mg/mL）0.8、1.0、1.2 mL，剩余操作同“2.1.2”项，进样，计算绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β-谷甾醇的平均加样回收率分别为 100.02%、97.66%、98.07%、100.15%、99.03%、98.75%、97.91%、99.25%、96.78%和 96.98%，RSD 分别为 0.70%、1.51%、1.40%、0.89%、1.54%、1.18%、1.37%、0.95%、1.46%和 1.38%。

2.2 相对校正因子 (f) 计算

取“2.1.4”项 10 个成分混合对照品溶液各 10 μL，进样，以槲皮素为内参物，按照公式计算绿原酸、杨梅素和山柰酚的 f 值；以熊果酸为内参物，计算 Foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、豆甾醇和 β-谷甾醇的 f 值，取各成分平均值作为各成分定量的 f 值^[20]。结果见表 3。

$$f = \rho_s \times A_i / \rho_i \times A_s$$

ρ 和 A 依次代表相质量浓度和峰面积，i 和 s 代表内参物和其他待测成分。

表 3 多点校正法的 f 值

Table 3 f-Values of multipoint correction method

混合对照品溶液	f							
	绿原酸	杨梅素	山柰酚	foenumoside B	零陵香皂苷 C	齐墩果酸	豆甾醇	β-谷甾醇
1	0.791 6	1.289 4	0.622 7	0.711 3	0.631 9	0.827 4	1.163 8	1.480 7
2	0.805 0	1.316 9	0.629 0	0.716 9	0.626 5	0.844 3	1.164 7	1.502 0
3	0.816 9	1.323 9	0.636 3	0.694 8	0.620 2	0.837 7	1.129 7	1.475 6
4	0.801 9	1.324 5	0.622 8	0.716 2	0.628 3	0.838 6	1.171 0	1.485 6
5	0.834 6	1.345 8	0.609 5	0.693 4	0.616 9	0.810 7	1.136 7	1.448 5
6	0.816 1	1.332 7	0.623 0	0.705 4	0.621 7	0.837 8	1.130 5	1.487 0
平均值	0.811 0	1.322 2	0.623 9	0.706 3	0.624 3	0.832 7	1.149 4	1.479 9
RSD/%	1.84	1.43	1.41	1.46	0.90	1.45	1.65	1.20

2.3 f 耐用性考察及色谱峰定位

选用 Waters e2695 型、Agilent 1100 型 HPLC 仪和色谱柱（Prep Scalar C₁₈ 柱、Kromasil C₁₈ 柱和 Alltima C₁₈ 柱），取“2.1.1”项下混合对照品溶液，进样检测，记录各成分的保留时间，计算各成分的 f 值及相对保留时间 (t_R) 值，结果见表 4、5，提示不同仪器和色谱柱对各成分的 f 值和 t_R 值均无显著影响 (RSD 均 < 2.0%)。

2.4 试样检测

取不同编号 (S1~S15) 样品按“2.1.2”项制备供

试品溶液（每批制备 3 份），各进样 10 μL，运用外标法 (ESM) 计算样品中绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β-谷甾醇的含量，再利用 QAMS 法，以槲皮素为内参物，测定并计算绿原酸、杨梅素和山柰酚的含量；以熊果酸为内参物，计算 foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、豆甾醇和 β-谷甾醇的含量，再运用 SPSS26.0 统计软件中独立样本 T 检验方法对各组分 2 种方法所得数据进行分析，结果显示 2 种方法所得含量未见明显差异。结果见表 6。

表 4 仪器和色谱柱对 *f* 影响
Table 4 Effects of instruments and columns on *f* values

仪器	色谱柱	<i>f</i> 值							
		绿原酸	杨梅素	山柰酚	foenumoside B	零陵香皂苷 C	齐墩果酸	豆甾醇	β-谷甾醇
Waters e2695	Prep Scalar C ₁₈	0.810 3	1.321 3	0.622 9	0.705 1	0.623 4	0.831 9	1.147 5	1.477 3
	Kromasil C ₁₈	0.819 9	1.336 9	0.629 1	0.709 4	0.624 6	0.836 7	1.159 2	1.481 9
	Alltima C ₁₈	0.833 1	1.340 2	0.635 8	0.715 8	0.631 1	0.843 7	1.170 1	1.501 5
Agilent 1100	Prep Scalar C ₁₈	0.798 7	1.290 6	0.608 4	0.695 1	0.617 3	0.811 4	1.130 5	1.453 1
	Kromasil C ₁₈	0.802 5	1.302 8	0.613 7	0.708 6	0.620 8	0.827 1	1.146 3	1.496 2
	Alltima C ₁₈	0.831 2	1.331 5	0.630 5	0.714 2	0.629 7	0.840 2	1.167 3	1.500 3
	平均值	0.81 60	1.320 6	0.623 4	0.708 0	0.624 5	0.831 8	1.153 5	1.485 1
	RSD/%	1.78	1.51	1.69	1.05	0.84	1.4	1.29	1.25

表 5 仪器和色谱柱对 *t* 的影响
Table 5 Effects of instruments and columns on *t* values

仪器	色谱柱	<i>t_R</i>							
		绿原酸	杨梅素	山柰酚	foenumoside B	零陵香皂苷 C	齐墩果酸	豆甾醇	β-谷甾醇
Waters e2695	Prep Scalar C ₁₈	0.663 1	0.940 7	1.210 2	0.776 7	0.841 5	0.961 1	1.086 5	1.206 1
	Kromasil C ₁₈	0.670 8	0.946 2	1.223 9	0.785 3	0.846 9	0.976 8	1.091 6	1.215 2
	Alltima C ₁₈	0.679 2	0.957 1	1.236 5	0.799 1	0.857 0	0.985 7	1.105 7	1.227 9
Agilent 1100	Prep Scalar C ₁₈	0.653 9	0.931 5	1.201 7	0.762 4	0.825 6	0.942 5	1.072 2	1.198 4
	Kromasil C ₁₈	0.658 7	0.935 7	1.203 9	0.765 8	0.837 4	0.950 1	1.079 5	1.203 7
	Alltima C ₁₈	0.673 4	0.952 3	1.233 1	0.793 2	0.851 8	0.976 1	1.097 5	1.224 6
	平均值	0.666 5	0.943 9	1.218 2	0.780 4	0.843 4	0.965 4	1.088 8	1.212 7
	RSD/%	1.44	1.04	1.23	1.89	1.32	1.75	1.11	0.98

表 6 15 批灵香草含量测定结果 (*n*=3)
Table 6 Determination results of 15 batches of *L. foenum-graecum* (*n*=3)

编号	绿原酸(mg·g ⁻¹)		杨梅素(mg·g ⁻¹)		槲皮素(mg·g ⁻¹)		山柰酚(mg·g ⁻¹)		foenumoside B(mg·g ⁻¹)		零陵香皂苷 C(mg·g ⁻¹)		齐墩果酸(mg·g ⁻¹)		熊果酸(mg·g ⁻¹)		豆甾醇(mg·g ⁻¹)		β-谷甾醇(mg·g ⁻¹)	
	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
S1	0.782	0.761	0.236	0.230	0.594	1.092	1.062	0.307	0.299	0.421	0.409	0.148	0.144	0.117	0.086	0.088	0.054	0.053		
S2	0.849	0.825	0.223	0.217	0.641	1.198	1.176	0.385	0.376	0.447	0.435	0.151	0.154	0.135	0.116	0.113	0.063	0.062		
S3	0.798	0.779	0.153	0.149	0.725	1.146	1.114	0.332	0.324	0.462	0.451	0.149	0.146	0.150	0.126	0.123	0.041	0.040		
S4	0.931	0.907	0.184	0.179	0.682	1.001	1.028	0.351	0.341	0.557	0.542	0.168	0.164	0.130	0.103	0.101	0.049	0.050		
S5	0.896	0.872	0.179	0.174	0.722	1.021	0.997	0.326	0.317	0.529	0.516	0.170	0.174	0.147	0.103	0.106	0.048	0.047		
S6	0.997	0.971	0.155	0.159	0.684	0.949	0.927	0.292	0.300	0.573	0.557	0.158	0.154	0.120	0.094	0.092	0.044	0.043		
S7	0.553	0.568	0.177	0.172	0.562	1.056	1.027	0.267	0.260	0.356	0.347	0.182	0.177	0.106	0.087	0.085	0.052	0.051		
S8	0.795	0.777	0.153	0.151	0.576	0.901	0.927	0.298	0.290	0.337	0.329	0.204	0.199	0.103	0.076	0.078	0.032	0.031		
S9	0.729	0.714	0.124	0.121	0.534	0.862	0.843	0.280	0.273	0.253	0.260	0.222	0.216	0.097	0.056	0.055	0.029	0.028		
S10	0.683	0.664	0.141	0.138	0.513	0.897	0.876	0.269	0.262	0.295	0.287	0.204	0.209	0.101	0.049	0.050	0.024	0.025		
S11	0.994	0.976	0.265	0.259	0.826	1.392	1.361	0.255	0.248	0.713	0.707	0.120	0.123	0.186	0.083	0.081	0.083	0.081		
S12	1.052	1.029	0.278	0.285	0.881	1.334	1.301	0.214	0.220	0.682	0.680	0.122	0.119	0.179	0.071	0.069	0.077	0.075		
S13	1.198	1.176	0.332	0.323	0.853	1.452	1.415	0.208	0.203	0.779	0.762	0.114	0.111	0.192	0.087	0.085	0.083	0.085		
S14	1.118	1.092	0.305	0.298	0.765	1.352	1.384	0.198	0.193	0.641	0.654	0.133	0.136	0.165	0.067	0.066	0.090	0.088		
S15	1.037	1.060	0.251	0.245	0.846	1.368	1.330	0.177	0.182	0.598	0.584	0.144	0.140	0.158	0.077	0.075	0.074	0.072		

2.5 浸出物、总灰分和酸不溶性灰分检测

浸出物、总灰分和酸不溶性灰分分别参照《中国药典》2020 年版四部通则 2201、2302 进行测定^[21]。结果见表 7。

表 7 灵香草中浸出物、总灰分和酸不溶性灰分检测结果 (n=2)

Table 7 Determination results of extraction, total ash and acid insoluble ash in *L. foenum-graecum* (n=2)

编号	浸出物/%	总灰分/%	酸不溶性灰分/%
S1	17.09	6.35	0.52
S2	16.24	6.42	0.61
S3	15.79	6.91	0.58
S4	17.95	6.53	0.64
S5	18.60	6.84	0.55
S6	16.92	6.38	0.59
S7	12.35	7.52	0.81
S8	14.96	8.38	0.92
S9	13.25	7.05	1.33
S10	11.92	6.93	1.28
S11	19.50	5.11	0.31
S12	20.19	5.96	0.42
S13	21.34	5.03	0.37
S14	19.91	6.01	0.45
S15	21.08	5.78	0.39

2.6 多元统计分析

2.6.1 PCA 运用 SPSS 26.0 统计软件对 15 批灵香草中 10 个成分 QAMS 含量、浸出物、总灰分和酸不溶性灰分检测结果进行处理，以欧式距离作为测量度，进行系统聚类分析（图 2）。结果以 10 为测度时，15 批样品大致分为 3 类，其中 S11~S15 为 I 类，S1~S6 为 II 类，S7~S10 为 III 类。以 1 为特征值的阈值，同时满足累积方差贡献率大于 85%^[22]，提取出 2 个主成分分析结果见表 8、9，表 7 显示主成分 1 的特征值为 9.758，对方差的贡献率为 75.062%，其中绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、β-谷甾醇、浸出物、总灰分和酸不溶性灰分对其贡献较大；主成分 2 的特征值为 1.807，对方差的贡献率为 13.897%，体现了 foenumoside B 和豆甾醇的信息。为验证 15 批样品聚类分组的准确性，应用 SIMCA 14.1 软件对 15×13 矩阵数据进行 PCA 分析，结果 15 批灵香草分组情况与聚类分析一致，同时所有检测数据无异常（所有数据点均在 95%置信区间内）（图 3）。

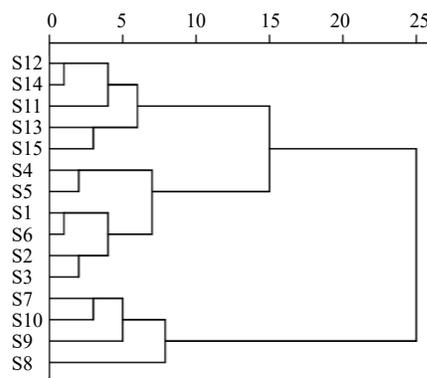


图 2 聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis diagram

表 8 主成分特征值和方差贡献率

Table 8 Principal component eigenvalue and variance contribution rate

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	9.758	75.062	75.062
2	1.807	13.897	88.959
3	0.476	3.659	92.618
4	0.330	2.538	95.156
5	0.221	1.703	96.859
6	0.148	1.141	98.000
7	0.081	0.621	98.621
8	0.066	0.511	99.132
9	0.058	0.444	99.576
10	0.033	0.250	99.826
11	0.015	0.116	99.942
12	0.004	0.032	99.974
13	0.003	0.026	100.000

表 9 初始因子载荷矩阵及成分得分系数

Table 9 Initial factor load matrix and component score coefficient

成分	因子载荷		成分得分系数	
	主成分 1	主成分 2	主成分 1	主成分 2
绿原酸	0.898	-0.076	0.092	-0.042
杨梅素	0.923	-0.172	0.095	-0.095
槲皮素	0.945	0.058	0.097	0.032
山柰酚	0.943	-0.067	0.097	-0.037
foenumoside B	-0.538	0.778	-0.055	0.431
零陵香皂苷 C	0.964	0.055	0.099	0.030
齐墩果酸	-0.937	-0.206	-0.096	-0.114
熊果酸	0.953	0.063	0.098	0.035
豆甾醇	0.095	0.976	0.010	0.540
β-谷甾醇	0.944	-0.083	0.097	-0.046
浸出物	0.937	0.076	0.096	0.042
总灰分	-0.864	0.077	-0.089	0.043
酸不溶性灰分	-0.887	-0.369	-0.091	-0.204

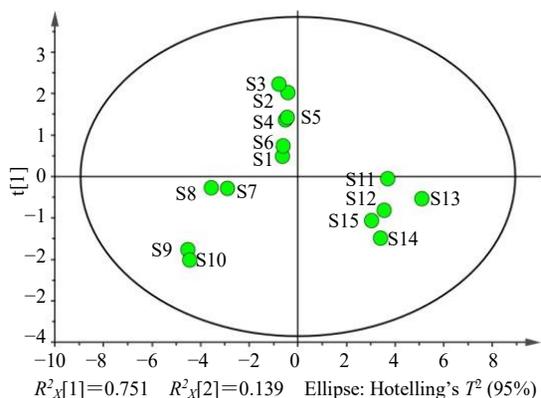


图 3 15 批灵香草的 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score chart for 15 batches of *L. foenum-graecum*

2.6.2 因子分析 对表 6 和表 7 中 15 批灵香草中 13 个指标测定数据进行标准化处理, 按公式计算得标准化数据矩阵。

$$Y_{ij} = (X_{ij} - \bar{X}_j) / SD_j$$

X_{ij} 为第 i 批样品第 j 个成分的含量, \bar{X}_j 为 15 批灵香草第 j 个成分的平均含量, SD_j 为 15 批灵香草第 j 个成分含量的标准差, Y_{ij} 为第 i 批样品第 j 个成分含量标准化后结果

再按公式 $F_{i1} = Y_{i1} \times 0.092 + Y_{i2} \times 0.095 + Y_{i3} \times 0.097 + Y_{i4} \times 0.097 - Y_{i5} \times 0.055 + Y_{i6} \times 0.099 - Y_{i7} \times 0.096 + Y_{i8} \times 0.098 + Y_{i9} \times 0.010 + Y_{i10} \times 0.097 + Y_{i11} \times 0.096 - Y_{i12} \times 0.089 - Y_{i13} \times 0.091$; $F_{i2} = Y_{i1} \times (-0.042) - Y_{i2} \times 0.092 + Y_{i3} \times 0.032 - Y_{i4} \times 0.037 + Y_{i5} \times 0.431 + Y_{i6} \times 0.030 - Y_{i7} \times 0.114 + Y_{i8} \times 0.035 + Y_{i9} \times 0.540 - Y_{i10} \times 0.046 + Y_{i11} \times 0.042 + Y_{i12} \times 0.043 - Y_{i13} \times 0.204$ 分别计算 15 批灵香草第一、二主成分得分。按公式 $W_t = C_t / C_z$ (其中 W_t 为第 t 个主成分相对权重, C_t 为第 t 个主成分方差贡献率, C_z 为累积方差贡献率) 计算主成分相对权重, 结果主成分 1 和 2 相对权重分别为 0.844 和 0.156。再按公式: $F_i = F_{i1} \times 0.844 + F_{i2} \times 0.156$ 计算灵香草各批次主成分综合得分^[13] (表 10), 并按照主成分综合得分高低对样品进行排序, 因子分析 (factor analysis, FA) 中综合得分越高, 产品质量相对越优。结果显示 S13 的综合得分最高, 其质量最优。

2.6.3 OPLS-DA 分析 为查找导致差异的主要化学标记物, 在 PCA 基础上运用 SIMCA 14.1 软件运行 OPLS-DA 分析程序, 结果模型参数均大于 0.5^[23] ($R^2_X = 0.939$, $R^2_Y = 0.904$, $Q^2 = 0.812$), 提示建立的模型稳定可靠、预测能力好 (图 4)。分析变量重要投影性 (VIP) 值 (图 5), 以大于 1 为显著影响, 结果 $VIP > 1$ 的成分分别为 foenumoside B (VIP =

表 10 15 灵香草主成分得分及排序

Table 10 Principal component scores and ranking of 15 batches of *L. foenum-graecum*

编号	F_{i1}	F_{i2}	F_i	排序
S1	-0.200	0.370	-0.111	11
S2	-0.132	1.492	0.121	6
S3	-0.244	1.635	0.049	8
S4	-0.157	1.008	0.025	9
S5	-0.134	1.056	0.052	7
S6	-0.191	0.554	-0.075	10
S7	-0.930	-0.205	-0.817	12
S8	-1.138	-0.191	-0.990	13
S9	-1.449	-1.279	-1.422	14
S10	-1.421	-1.466	-1.428	15
S11	1.189	-0.032	0.999	2
S12	1.139	-0.584	0.870	3
S13	1.640	-0.383	1.324	1
S14	1.093	-1.076	0.755	4
S15	0.976	-0.766	0.704	5

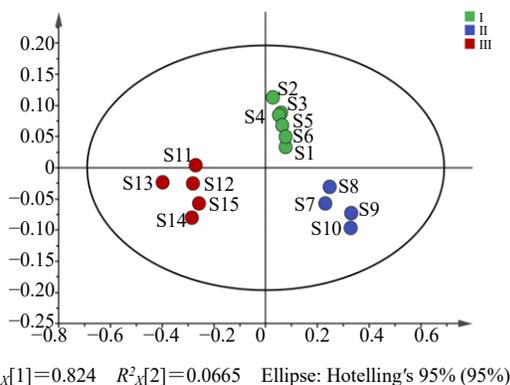


图 4 15 批灵香草样品 OPLS-DA 模型得分图

Fig. 4 Score chart of OPLS-DA model for 15 batches of *L. foenum-graecum*

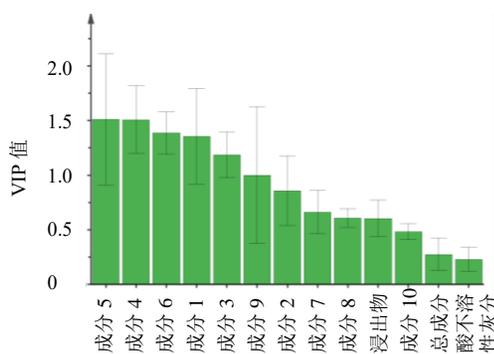


图 5 15 批灵香草样品 VIP 图

Fig. 5 VIP images of 15 batches of *L. foenum-graecum*

1.510 5)、山柰酚 (VIP=1.509 5)、零陵香皂苷 C (VIP=1.386 4)、绿原酸 (VIP=1.355 2)、槲皮素 (VIP=1.187 0) 和豆甾醇 (VIP=1.000 2), 表明上述 6 个组分导致差异的主要化学标记物。

3 讨论

在前期预试验中分别考察了简单易行的超声提取时不同体积分数(30%、50%和70%)甲醇和时间(30、40、60 min)对灵香草绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β -谷甾醇提取率的影响,结果50%甲醇超声提取40 min为灵香草供试品制备的最佳方法:供试品色谱图中基线平稳,指标成分响应值最大。试验还考察了不同流动相系统:乙腈为有机相,不同体积分数(0.05%、0.1%、0.2%)的磷酸溶液为水相。结果显示乙腈-0.2%磷酸溶液运行时,所得色谱图中基线平稳、色谱峰数量较多且色谱峰丰度饱满。

本实验以槲皮素和熊果酸为内参物,首先建立了相对校正因子测定,进而考察了相对校正因子耐用性和色谱峰定位,结果相对校正因子耐用性良好,QAMS法可用于绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β -谷甾醇的色谱峰定位。采用QAMS法对6省15批灵香草绿原酸、杨梅素、槲皮素、山柰酚、foenumoside B、零陵香皂苷 C、齐墩果酸、熊果酸、豆甾醇和 β -谷甾醇进行定量测定,同时利用外标法进行准确性验证,结果2种方法无明显差异,但不同产地的灵香草产品质量差异较大。为查找导致灵香草质量差异的主要化学成分,分别采用SPSS26.0和SIMCA 14.1软件对检测的数据进行分析,2种软件均显示15批不同产地灵香草分为3组。因子分析结果显示广西和广东产地的灵香草整体质量较好。OPLS-DA分析结果表明导致质量差异的主要化学成分为foenumoside B、山柰酚、零陵香皂苷 C、绿原酸、槲皮素和豆甾醇。

本实验采用QAMS法结合化学计量学对15批灵香草进行了批间质量差异评价,建立的方法操作简单、经济,为灵香草批次间质量评价提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 欧阳旭. 灵香草的种植现状、存在问题及发展对策探析[J]. 广西农学报, 2020, 35(6): 41-43.
- [2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴-第三册[M]. 北京: 科学出版社, 1974: 56.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典-下册[M]. 缩印本. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 78.

- [4] 高林晓, 宋秀华, 冯雅静. 民族药灵香草研究新进展[J]. 云南化工, 2021, 48(4): 9-12.
- [5] 代禄梅. 灵香草中三萜皂苷及其抗肿瘤活性研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2017.
- [6] 高林晓, 田琴, 郭蒙, 等. 响应面法优化提取灵香草中绿原酸工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(6): 106-109.
- [7] 蒋向辉, 杨永平, 谭荣. 高效液相色谱法灵香草中槲皮素含量[J]. 凯里学院学报, 2020, 38(3): 37-40.
- [8] 闫旭宇, 李梦汝, 李玲. 灵香草总黄酮的提取及对羟自由基的清除效率[J]. 热带作物学报, 2017, 38(8): 1464-1467.
- [9] 孙科, 李德慧, 孙铭铭, 等. 灵香草中多酚提取工艺优化研究[J]. 右江民族医学院学报, 2016, 38(3): 245-249.
- [10] 黄远, 董福越, 李楚源, 等. 一测多评法测定板蓝根中6种化学成分的含量[J]. 中草药, 2021, 52(3): 845-851.
- [11] 冯亚茹, 周荣荣, 耿佳乐, 等. 一测多评法同时测定大黄药材中8个结合型蒽醌含量的系统研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(2): 1884-1894.
- [12] 何佳, 黄文康, 马相锋, 等. 基于主成分分析与PLS-DA分析研究浙麦冬道地性与等级评价标准[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(4): 285-292.
- [13] 梁军, 刘彩凤, 刘冬涵, 等. 藏药白脉软膏多成分定量、指纹图谱结合多元统计分析的质量控制研究[J]. 中草药, 2020, 51(2): 356-363.
- [14] 李海燕, 王慧然, 那丽莎, 等. 基于主成分分析、正交偏最小二乘判别分析及加权逼近理想解排序-灰色关联度融合模型评价不同产地珠子参质量[J]. 中草药, 2024, 55(9): 3116-3126.
- [15] 安徽省中药材标准[S]. 2022: 80-81.
- [16] 重庆市中药材质量标准 DB50/YC043-2022[S]. 2022 年版: 71.
- [17] 王琳, 李宜泽, 房明建, 等. HPLC法测定蒲公英根、叶和花中绿原酸及没食子酸含量研究[J]. 粮食与食品工业, 2023, 30(1): 64-68.
- [18] 盘涌, 罗彩神, 覃日宏, 等. HPLC法测定糯米藤中槲皮素和山柰酚的含量[J]. 广州化工, 2022, 50(6): 83-85.
- [19] 陈贵, 夏稷子, 徐作刚. 山芝麻中 β -谷甾醇的定性和定量分析[J]. 中国民族民间医药, 2020, 29(11): 40-42.
- [20] 沈洁, 王琴, 熊维建, 等. HPLC-一测多评法测定参芪延肾颗粒中淫羊藿药材中的6个黄酮类成分的含量[J]. 中国药房, 2019, 30(17): 2327-2331.
- [21] 中国药典[S]. 四部. 2020: 232, 234.
- [22] 王玉勤, 范国荣. 基于指纹图谱结合多模式化学计量学方法评价补骨脂药材质量[J]. 中草药, 2021, 53(4): 1143-1150.
- [23] 肖会敏, 杨旭, 黄新文, 等. 基于HPLC指纹图谱及多成分含量的化学模式识别法评价小血藤质量[J]. 西北药学, 2022, 37(5): 1-7.

[责任编辑 时圣明]