

基于 HPLC 指纹图谱与一测多评法对甜叶菊的质量评价

厉 晓^{1,3}, 张少航², 龚 婕^{1,3}, 浦子牛^{1,3}, 熊文惠^{1,3}, 文 静^{1,3}, 黄佳仪^{1,3}, 崔培梧^{1,3*}

1. 湖南中医药大学药学院 菌物药研究室, 湖南 长沙 410208

2. 河北省平山县农业农村局, 河北 石家庄 050400

3. 国家中医药管理局中药药性与药效三级科研实验室, 湖南 长沙 410208

摘要:目的 建立甜叶菊高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 指纹图谱和分析其 9 种成分含量的一测多评 (quantitative analysis of multicomponents by single-marker, QAMS) 方法, 实现对甜叶菊质量的系统评价。方法 采用 HPLC 法建立甜叶菊指纹图谱, 运用相似度评价、聚类分析 (cluster analysis, CA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA) 等化学模式识别对指纹图谱进行分析; 以新绿原酸和莱菔迪苷 A (rebaudioside A) 为内参物, 通过建立其与绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D (rebaudioside D)、莱菔迪苷 M (rebaudioside M)、莱菔迪苷 C (rebaudioside C)、莱菔迪苷 G (rebaudioside G) 等 9 种成分的相对校正因子和相对保留时间, 建立相应的 QAMS 分析方法, 并与外标法 (external standard method, ESM) 测定结果进行比较。**结果** 15 批甜叶菊 HPLC 指纹图谱中有 12 个共有峰, 指认了其中 9 个特征色谱峰对应的化学成分, 分别为新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 A、莱菔迪苷 C、莱菔迪苷 G。15 批甜叶菊相似度为 0.900~1.000, CA、PCA 和 OPLS-DA 分析表明, 甜叶菊供试品可分为 2 类, 差异性成分为峰 4、峰 12 (莱菔迪苷 G)、峰 9 (莱菔迪苷 M)、峰 6 (异绿原酸 A)、峰 7 (异绿原酸 C) 和峰 10 (莱菔迪苷 A); 建立了分析所指认的 9 种成分含量的 QAMS 方法, 分析结果与 ESM 法测定的相应成分含量无显著差异。**结论** 所建立的 HPLC 指纹图谱和 QAMS 法操作简便、高效、经济、可靠, 可为甜叶菊及其衍生产品的质量评价提供参考和依据。

关键词: 指纹图谱; 一测多评法; 甜叶菊; 质量评价; 绿原酸; 异绿原酸 A; 异绿原酸 C; 莱菔迪苷 D; 莱菔迪苷 M; 莱菔迪苷 C; 莱菔迪苷 G

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2025)22-8357-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.22.025

Quality evaluation of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves based on HPLC fingerprint and quantitative analysis of multicomponents by single-marker method

LI Xiao^{1,3}, ZHANG Shaohang², GONG Jie^{1,3}, PU Ziniu^{1,3}, XIONG Wenghui^{1,3}, WEN Jing^{1,3}, HUANG Jiayi^{1,3}, CUI Peiwu^{1,3}

1. Mycomedicine Research Lab, School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Agriculture and Rural Bureau of Pingshan Country, Shijiazhuang 050400, China

3. Tertiary Research Lab of TCM Property & Efficacy, National Administration of TCM, Changsha 410208, China

Abstract: Objective A method combining high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint with quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) was established to analyze the contents of nine components in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves (SrL) and realize the systematic evaluation of the quality of SrL samples. **Methods** The HPLC fingerprint of SrL samples was explored through HPLC analysis and comprehensively evaluated through a series of analytical methods including similarity evaluation, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). Neochlorogenic acid and Rebaudioside A were selected as internal reference standards for the exploration of the QAMS method, which

收稿日期: 2025-05-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973211/C0033375); 长沙市自然科学基金资助项目 (kq2402180); 湖南中医药大学“十四五”重点学科-生物工程学科 (校行发规字 [2023] 2 号)

作者简介: 厉 晓, 硕士研究生, 研究方向为中药活性物质挖掘及生物合成。E-mail: xiaode0322@163.com

*通信作者: 崔培梧, 副教授, 硕士生导师, 从事中药/菌物药药效物质挖掘、质量控制研究。E-mail: cuipeiwu@126.com

was then applied to determine the content of 9 components in SrL samples including chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, Rebaudioside D, Rebaudioside M, Rebaudioside C, Rebaudioside D and so on. **Results** There were 12 common peaks in the HPLC fingerprints of 15 batches of SrL samples and 9 peaks of them were confirmed, which were neochlorogenic acid, chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, rebaudioside D, rebaudioside M, rebaudioside A, rebaudioside C and rebaudioside G, respectively. The similarity of 15 batches of SrL samples was 0.900—1.000. According to the further calculation of the fingerprints through CA, PCA and OPLS-DA, the tested SrL samples can be categorized into two groups. The differential components among the test SrL samples were identified as peak 4, peak 12 (rebaudioside G), peak 9 (rebaudioside M), peak 6 (isochlorogenic acid A), peak 7 (isochlorogenic acid C) and peak 10 (rebaudioside A), respectively. The QAMS method for quantitative analysis of the 9 confirmed components in SrL samples was established, and there was no significant difference between the analytical results from QAMS and ESM. **Conclusion** The established HPLC fingerprint and QAMS method were found to be simple, efficient, economical and reliable, which can provide a reference and basis for the quality evaluation of SrL samples and the derived products.

Key words: fingerprint analysis; quantitative analysis of multi-components by single-marker; *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves; quality evaluation; chlorogenic acid; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid C; rebaudioside M; rebaudioside C; rebaudioside G

甜叶菊 *Stevia rebaudiana* Bertoni 为菊科 (Asteraceae) 甜叶菊属多年生草本植物, 为药食两用植物资源, 其干燥叶片是天然甜味剂甜菊糖苷的主要来源^[1], 主要活性成分甜菊醇类物质, 具有低热量、高甜度的特性^[2], 且可发挥降血糖、降血压、抗肿瘤、抗氧化、抗炎及调血脂等活性^[3]。此外, 甜菊糖苷在药物递送载体领域也具有良好的应用前景, 如王彦阁等^[4]发现以甜菊糖苷为载体制备的二氢杨梅素纳米胶束具有粒径小、载药量高、缓释特征明显等特点, 可显著促进二氢杨梅素在体内的吸收。随着大健康产业的快速发展, 甜叶菊在我国食品和医药领域的应用备受关注^[5-6], 这也为甜叶菊的质控方法提出了更高的要求。目前甜叶菊的质量评价多聚焦于单一或少数成分 (如甜菊苷、莱菔迪苷 A) 的含量分析, 这难以实现对甜叶菊及其衍生产品品质的综合评价, 而结合中药多成分、多靶点特征开发的指纹图谱分析技术和一测多评法可快速实现对药用植物资源及其衍生产品复杂成分的系统评价, 已被广泛应用于该领域相关产品质量控制的研究过程^[7-8], 为甜叶菊的质量评价相关研究提供了重要参考。基于上述分析, 采用指纹图谱分析技术和一测多评 (quantitative analysis of multicomponents by single-marker, QAMS) 建立适用于甜叶菊及其衍生产品质量系统评价的分析方法对于甜叶菊资源的可持续开发具有重要意义, 故本研究拟在基于变波长策略的高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 基础上建立甜叶菊 HPLC 指纹图谱, 并探索可同时测定甜叶菊中新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷

A、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 含量的 QAMS 方法, 以期提升甜叶菊质量标准的提升和甜叶菊相关产品的质量控制提供参考和依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技公司), Wayeal 3100 型高效液相色谱仪 (安徽皖仪科技股份有限公司), Waters-Symmetry-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, Agilent Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent 5TC C₁₈ (2) (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱、EX224ZH 型电子分析天平 ($d=0.01$ mg, 美国 OHAUS 公司), JS-40 型超声波清洗仪 (常州鸿泽实验科技有限公司)。

1.2 试剂与药品

乙腈为色谱纯, 水为纯净水, 其余试剂均为分析纯。对照品新绿原酸 (批号 CRN0301, 质量分数≥98%)、异绿原酸 A (批号 CRN0032, 质量分数≥98%)、异绿原酸 C (批号 CRN0057, 质量分数≥98%)、莱菔迪苷 G (批号 CRN0165, 质量分数>96%) 购自湖北萃园生物科技股份有限公司, 绿原酸 (批号 RP90505, 质量分数≥99%) 购自成都麦德生物科技有限公司, 莱菔迪苷 D (批号 AFBL1402, 质量分数 98%)、莱菔迪苷 M (批号 AFCD1709, 质量分数 98%)、莱菔迪苷 A (批号 AZDB0151, 质量分数 98%) 购自成都埃法生物科技有限公司, 莱菔迪苷 C (批号 C10830335, 质量分数>96%) 购自上海生化科技股份有限公司。15 批甜叶菊供试品来源信息见表 1, 经湖南中医药大学药学院王智副教授鉴定为菊科植物甜叶菊 *S. rebaudiana* Bertoni 的干燥叶片。

表 1 甜叶菊供试品基本信息

Table 1 Sample information of tested *Stevia rebaudiana* leaves

编号	批号	产地
T1	230401	江苏
T2	22052103-1	山东
T3	23050806	江苏
T4	22052103-2	山东
T5	2302001	安徽
T6	2304051	江苏
T7	2301045	江苏
T8	22052103-3	山东
T9	22123102	安徽
T10	22052103-4	山东
T11	22052103-5	山东
T12	2206002	安徽
T13	22052103-6	山东
T14	20230703-1	河北
T15	230501	河北

2 方法与结果

2.1 外标法 (ESM) 有效成分的测定

2.1.1 色谱条件 Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) - 0.1%磷酸溶液 (B), 梯度洗脱: 0~8 min, 0.5% A; 8~10 min, 0.5%~6% A; 10~32 min, 6%~10% A; 32~34 min, 10%~14% A; 34~45 min, 14% A; 45~48 min, 14%~18% A; 48~66 min, 18%~

21% A; 66~78 min, 21%~24% A; 78~85 min, 24%~30% A; 85~100 min, 30% A; 100~107 min, 30%~45% A; 107~115 min, 45%~0.5% A; 检测波长为变波长程序 (0~20 min, 203 nm; 20~40 min, 325 nm; 40~59 min, 254 nm; 59~67 min, 210 nm; 67~72 min, 325 nm; 75~115 min, 203 nm), 柱温 25 °C; 进样量 20 μL; 体积流量 1.0 mL/min。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取各对照品适量, 加 50%甲醇溶解制成含新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 A、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 质量浓度分别为 2.090、1.493、2.985、3.284、25.187、28.358、25.933、48.507、25.373 μg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 取甜叶菊供试品粉末 (过筛) 约 0.5 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入体积分数 90%甲醇 10 mL, 称定质量, 65 °C加热回流提取 30 min, 放冷, 再称定质量, 用体积分数 90%甲醇补足减失质量, 滤过, 经 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

2.1.4 线性关系考察 取“2.2”项混合对照品溶液, 分别按“2.1”项下色谱条件进样 10、20、40、60、80、100 μL^[9-10], 记录峰面积。以化学成分的进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 得到甜叶菊中 9 种成分的回归方程及线性范围 (表 2)。

表 2 9 种成分的线性回归方程及线性范围

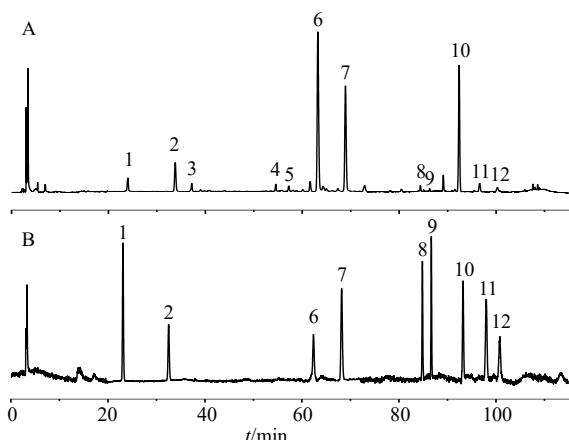
Table 2 Linear regression equation and linear range of 9 components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性回归范围/μg
新绿原酸	$Y=3057.4 X+13.07$	1.000 0	0.034~0.343
绿原酸	$Y=2568.7 X+17.077$	0.999 4	0.021~0.209
异绿原酸A	$Y=1475.5 X+57.237$	0.999 4	0.030~0.299
异绿原酸C	$Y=3139.7 X+6.07$	0.999 9	0.033~0.328
莱菔迪苷D	$Y=308.84 X+7.030$	0.999 7	0.252~2.519
莱菔迪苷M	$Y=287.89 X+3.599$	0.999 4	0.284~2.836
莱菔迪苷A	$Y=363.77 X+28.45$	0.999 8	0.259~2.593
莱菔迪苷C	$Y=219.65 X-1.483$	0.999 7	0.485~4.851
莱菔迪苷G	$Y=265.81 X-14.375$	0.999 4	0.254~2.537

2.1.5 专属性试验 分别精密吸取含新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 A、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 的混合对照品溶液、甜叶菊供试品溶液 (T1) 按“2.1.1”项下确定的色谱条件测定。结果表明各成

分保留时间基本一致, 特征峰紫外吸收光谱高度吻合、各色谱峰分离度均大于 1.5, 表明方法专属性良好, 见图 1。

2.1.6 精密度试验 精密吸取“2.1.3”项下的供试品溶液, 按“2.1.1”项的色谱条件连续进样 6 次,



1-新绿原酸; 2-绿原酸; 6-异绿原酸 A; 7-异绿原酸 C; 8-莱菔迪苷 D; 9-莱菔迪苷 M; 10-莱菔迪苷 A; 11-莱菔迪苷 C; 12-莱菔迪苷 G; 图 2 同。

1-neochlorogenic acid; 2-chlorogenic acid; 6-isochlorogenic acid A; 7-isochlorogenic acid C; 8-lebaudioside D; 9-lebaudioside M; 10-lebaudioside A; 11-lebaudioside C; 12-lespidin G; same as Fig.2.

图 1 甜叶菊样品 (A) 和混合对照品 (B) 的高效液相色谱图

Fig. 1 High performance liquid chromatography spectra of SrL sample (A) and mixed reference substances (B)

每次 20 μL , 记录相对保留时间和峰面积并计算其 RSD, 新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 A、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 色谱峰的相对保留时间 RSD 分别为 0.98%、0.96%、0.40%、0.40%、0.14%、0.14%、0.20%、0.41%、0.37%, 相对峰面积 RSD 分别为 2.49%、1.81%、2.70%、1.75%、2.20%、2.36%、2.45%、2.60%、2.96%, 表明仪器的精密度良好。

2.1.7 重复性试验 精密称取同一批号甜叶菊样品 (T1), 按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1.1”项色谱条件分别注入 20 μL 进样分析, 记录色谱图, 计算新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 A、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 的相对保留时间 RSD 值分别为 1.14%、1.16%、0.68%、0.70%、0.28%、0.23%、0.43%、0.66%、0.57%, 相对峰面积 RSD 分别为 1.14%、1.81%、2.37%、1.46%、1.87%、2.22%、2.24%、1.73%、2.80%, 表明方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (T1) 20 μL , 按“2.1.1”项色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 记录各个测定时间点的相对峰面积, 计算 RSD 值, 新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 A、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 的相对保留时

间 RSD 值分别为 2.18%、2.22%、1.15%、1.16%、0.23%、0.20%、0.22%、0.29%、0.47%, 相对峰面积 RSD 分别为 1.93%、2.66%、3.19%、2.14%、2.59%、2.57%、2.77%、2.84%、2.02%, 表明供试品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

2.1.9 加样回收率试验 按“2.1.3”项下方法将称样量减半平行制备 6 份供试品溶液, 即首先按减半称样量精密称取适量样品, 再分别加入与供试品溶液中相应成分含量为 1:1 的对照品溶液 10 mL, 按“2.1.3”项提取制备供试品溶液, 再按“2.1.1”项下确定的色谱条件进样测定, 记录各指标成分相对峰面积, 计算新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 A、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 的平均加样回收率分别为 103.06%、104.26%、98.82%、102.69%、97.08%、100.21%、102.49%、99.14%、97.41%, RSD 分别为 1.39%、0.51%、2.80%、1.85%、3.0%、2.94%、1.64%、2.67%、2.02%。

2.2 QAMS 法测定有效成分

2.2.1 相对校正因子 (f) 测定 根据“2.1.1”项色谱条件, 取混合对照品溶液分别进样 20、30、40、50、60、80、100 μL ^[11], 记录各成分的峰面积, 以莱菔迪苷 A 为内参物, 计算待测成分与内参物的 f ^[12]。

$$f = A_i \times C_s / (A_s \times C_i) \quad (1)$$

A_i 为待测成分峰面积, C_i 为待测成分浓度, A_s 为内参物峰面积, C_s 为内参物浓度

结果表明, 新绿原酸作为内参物时绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的 f 分别为 0.877 0、0.729 0、1.008 7; 莱菔迪苷 A 作为内参物时莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 的 f 分别为 0.800 9、0.791 4、0.526 9、0.579 9, RSD 均小于 3%。

2.2.2 不同色谱柱对 f 的影响 取混合对照品溶液, 进样量为 50 μL , 分别考察柱 1: Waters-Symmetry- C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、柱 2: Agilent Eclipse Plus C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、柱 3: Agilent 5TC C_{18} (2) 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 共 3 根色谱柱对甜叶菊中 9 种成分 f 的影响。结果表明, 新绿原酸作为内参物时绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的 f 分别为 0.886 8、0.723 8、1.004 9; 莱菔迪苷 A 作为内参物时莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 的 f 分别为 0.839 1、0.791 6、0.540 6、0.562 6。

RSD 均小于 3%，表明色谱柱更换对各成分的 f 无显著性影响。

2.2.3 不同柱温对 f 的影响 采用 Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱，分别在不同柱温（20、25、30 ℃）条件下测定甜叶菊中 9 种成分的 f 值。结果表明，新绿原酸作为内参物时绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的 f 分别为 0.881 2、0.531 7、1.004 9；莱菔迪昔 A 作为内参物时莱菔迪昔 D、莱菔迪昔 M、莱菔迪昔 C 和莱菔迪昔 G 的 f 分别为 0.8175、0.785 9、0.550 6、0.531 1。RSD 均小于 3%，表明柱温对各成分的 f 值无显著性影响。

2.2.4 不同流动相体积流量对 f 值的影响 采用 Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱，考察不同体积流量（0.8、1.0、1.2 mL/min）对甜叶菊中 9 种成分 f 值的影响。新绿原酸作为内参物时绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的 f 分别为 0.886 3、0.738 6、1.024 0；莱菔迪昔 A 作为内参物时莱菔迪昔 D、莱菔迪昔 M、莱菔迪昔 C 和莱菔迪昔 G 的 f 分别为 0.831 3、0.799 8、0.554 7、0.582 6。RSD 均小于 3%，表明不同体积流量对各成分 f 值无显著性影响。

2.2.5 不同仪器对 f 值的影响 采用 Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱，考察不同仪器（Agilent 1200、Waycal 3100）对甜叶菊中 9 种成分 f 值的影响。新绿原酸和莱菔迪昔 A 作为内参物时，考察 Agilent 1200 和 Waycal 3100 两台仪器对绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪昔 D、莱菔迪昔 M、莱菔迪昔 C 和莱菔迪昔 G 的 f 值的影响，计算所得 7 种成分的 f 值分别为 0.891 1、0.718 4、1.029 2、0.809 8、0.793 9、0.548 3、0.5918，同一成分在两台仪器上对应的 f 因子 RSD 均小于 3%，表明不同仪器对各成分 f 值无显著性影响。

2.2.6 色谱峰定位参数 色谱峰的准确定位是保

证 QAMS 法应用的前提，色谱峰的定位方法有保留时间差（ Δt ）法和相对保留时间（ t_R ）法，按文献计算^[13-14]。本实验以新绿原酸和莱菔迪昔 A 为内参物，取混合对照品溶液进样 50 μ L，考察不同色谱柱[Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱，Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱，Agilent 5TC C₁₈（2）色谱柱]、不同柱温、不同体积流量时新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 相对于新绿原酸的 Δt 和 t_R ，以及莱菔迪昔 D、莱菔迪昔 M、莱菔迪昔 A、莱菔迪昔 C、莱菔迪昔 G 相对于莱菔迪昔 A 的 Δt 和 t_R 。

考察结果表明，待测成分和内参物之间的 Δt 和 t_R 值波动较小，其 RSD 均小于 0.1%（表 3、4），因此保留时间差值法和相对保留时间法都可用于色谱峰定位。

2.3 QAMS 法与 EMS 法测定结果比较

采用本实验建立的变波长-梯度洗脱 HPLC 法对 15 批甜叶菊样品进行分析，首先采用 ESM 法分别计算出桑黄样品中新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪昔 D、莱菔迪昔 M、莱菔迪昔 A、莱菔迪昔 C 和莱菔迪昔 G 共 9 种成分的含量；然后分别以新绿原酸和莱菔迪昔 A 为 QAMS 法的内参物，依据实验测得的各成分对应的平均相对校正因子 f ，参照公式（2）计算其余 7 种成分的含量^[11,15]。将 ESM 法实测值与 QAMS 法计算值进行配对 t 检验^[16]。

$$f=(A_i \times W_s)/(A_s \times W_i) \quad (2)$$

W_i 为待测成分含量， A_i 为待测成分峰面积， W_s 为内参物含量， A_s 为内参物峰面积。

结果显示， P 值均 >0.05 ，表明 2 种方法测定结果之间无显著差异，提示建立的 QAMS 法有较好的准确性和可行性，见表 5。

表 3 甜叶菊中 9 种成分的 t_R

Table 3 t_R of nine components in *Stevia rebaudiana*

影响因素	型号	t_R						
		绿原酸	异绿原酸A	异绿原酸C	莱菔迪昔D	莱菔迪昔M	莱菔迪昔C	莱菔迪昔G
色谱柱	Waters-Symmetry-C ₁₈	9.769	39.272	45.081	8.572	6.763	5.071	8.071
	Agilent 5TC C ₁₈	9.740	40.207	45.607	8.029	6.067	4.335	7.027
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	9.961	39.696	44.987	8.133	5.933	4.339	6.979
柱温	25 ℃	9.687	38.911	44.466	8.344	6.412	4.509	7.123
	35 ℃	8.741	36.923	41.603	10.281	7.763	4.986	7.509
	30 ℃	9.414	39.315	45.155	8.535	6.747	5.056	7.771
体积流量	0.8 mL·min ⁻¹	9.618	39.246	44.979	8.141	6.279	4.545	7.218
	1.0 mL·min ⁻¹	9.635	39.169	44.815	8.303	6.294	4.439	7.211
	1.2 mL·min ⁻¹	9.659	39.443	45.283	8.154	6.328	4.608	7.470
平均值		9.580	39.131	44.664	8.499	6.510	4.654	7.375
RSD/%		0.036	0.023	0.027	0.082	0.083	0.065	0.049

表 4 甜叶菊中 9 种成分的 Δt
Table 4 Δt of nine components in *Stevia rebaudiana*

因素	型号	Δt						
		绿原酸	异绿原酸A	异绿原酸C	莱菔迪苷D	莱菔迪苷M	莱菔迪苷C	莱菔迪苷G
色谱柱	Waters-Symmetry-C ₁₈	1.411	2.653	2.897	0.909	0.928	1.054	1.086
	Agilent 5TC C ₁₈	1.423	2.746	2.981	0.913	0.934	1.047	1.076
	Agilent Eclipse Plus C ₁₈	1.427	2.703	2.930	0.911	0.935	1.047	1.076
柱温	25 °C	1.410	2.647	2.882	0.910	0.931	1.049	1.077
	35 °C	1.399	2.685	2.899	0.889	0.916	1.054	1.081
	30 °C	1.419	2.748	3.008	0.909	0.928	1.054	1.083
体积流量	0.8 mL·min ⁻¹	1.407	2.660	2.903	0.912	0.932	1.049	1.078
	1.0 mL·min ⁻¹	1.410	2.667	2.907	0.910	0.932	1.048	1.078
	1.2 mL·min ⁻¹	1.409	2.672	2.919	0.912	0.932	1.050	1.080
平均值		9.580	1.413	2.687	2.925	0.908	0.930	1.050
RSD/%		0.036	0.006	0.014	0.014	0.008	0.006	0.003

表 5 ESM 和 QAMS 测定 15 批甜叶菊样品中 9 个成分含量的结果
Table 5 Determination of nine components in 15 batches of SrL samples by ESM and QAMS

编号	新绿原酸/%	绿原酸/%		异绿原酸 A/%		异绿原酸 C/%		莱菔迪苷 A/%		莱菔迪苷 D/%		莱菔迪苷 M/%		莱菔迪苷 C/%		莱菔迪苷 G/%	
	ESM	EMS	QAMS	EMS	QAMS	EMS	QAMS	ESM	EMS	QAMS	EMS	QAMS	EMS	QAMS	EMS	QAMS	
T1	0.295 6	1.856 6	1.811 6	3.200 9	3.186 7	0.849 9	0.798 5	10.037 9	0.556 0	0.535 3	0.339 8	0.326 9	1.502 9	1.472 1	1.561 2	1.511 0	
T2	0.231 8	0.752 2	0.764 7	4.068 7	4.220 6	1.154 2	1.129 9	11.945 6	0.530 1	0.510 4	0.263 5	0.253 5	2.061 7	2.020 0	1.915 6	1.853 9	
T3	0.181 1	0.703 5	0.715 2	3.650 3	3.786 5	0.987 4	0.966 6	10.813 1	0.524 8	0.505 4	0.243 8	0.234 5	1.666 6	1.632 5	2.010 7	1.946 0	
T4	0.196 2	0.542 6	0.551 7	4.073 1	4.225 1	1.925 5	1.884 9	13.947 5	0.663 9	0.639 3	0.339 8	0.348 1	2.265 2	2.21 89	2.069 1	2.002 6	
T5	0.254 2	1.536 6	1.562 2	4.201 0	4.357 7	0.690 3	0.675 8	11.571 0	0.538 7	0.518 7	0.342 9	0.329 9	1.901 9	1.863 1	2.575 6	2.492 7	
T6	0.262 1	1.276 8	1.298 1	3.709 3	3.847 7	0.994 1	0.973 1	10.965 4	0.505 8	0.487 0	0.330 5	0.317 9	1.685 9	1.651 4	2.068 6	2.002 0	
T7	0.229 1	0.101 0	0.102 6	3.616 9	3.751 8	0.96 8	0.947 6	10.703 6	0.556 0	0.535 3	0.302 2	0.290 7	1.732 8	1.697 3	2.054 7	1.988 6	
T8	0.227 8	1.176 9	1.196 5	3.636 0	3.771 7	1.384 1	1.354 9	11.838 4	0.676 4	0.651 3	0.333 5	0.320 8	1.911 9	1.872 8	1.804 2	1.746 2	
T9	0.303 3	1.947 7	1.980 2	4.012 1	4.161 8	0.862 7	0.844 5	11.308 2	0.537 0	0.517 1	0.376 6	0.362 2	1.702 4	1.667 6	2.382 2	2.305 6	
T10	0.219 4	0.768 7	0.781 6	4.053 4	4.204 7	1.124 5	1.100 8	12.173 2	0.578 2	0.556 8	0.281 5	0.270 8	2.056 5	2.014 5	2.204 2	2.133 3	
T11	0.217 6	0.677 5	0.688 8	4.208 5	4.365 6	1.567 7	1.534 7	13.373 8	0.583 0	0.561 4	0.277 5	0.266 9	2.033 0	1.991 4	1.420 8	1.375 1	
T12	0.254 0	1.209 6	1.229 8	4.424 6	4.589 7	1.004 3	0.983 1	12.621 6	0.518 7	0.499 4	0.292 8	0.281 6	1.940 8	1.901 1	2.324 2	2.267 0	
T13	0.211 1	0.675 6	0.686 9	4.155 2	4.310 3	1.593 7	1.560 1	13.386 0	0.601 7	0.579 4	0.266 9	0.256 7	2.151 0	2.107 0	1.872 2	1.811 9	
T14	0.297 6	1.509 3	1.534 5	5.256 0	5.452 2	1.133 2	1.109 3	15.028 4	0.644 1	0.620 3	0.340 0	0.327 0	2.351 4	2.303 3	2.896 3	2.803 1	
T15	0.244 1	1.123 3	1.142 0	4.443 5	4.609 3	1.413 8	1.383 9	13.768 9	0.567 8	0.546 8	0.292 9	0.281 8	2.149 5	2.105 6	2.039 5	1.973 9	

2.4 指纹图谱的建立及相似度评价

2.4.1 色谱条件 同“2.1.1”项。

2.4.2 混合对照品溶液的制备 同“2.1.2”项。

2.4.3 供试品溶液的制备 分别取 15 个不同批次的甜叶菊样品，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液。

2.4.4 精密度试验 精密吸取“2.1.3”项下的供试品溶液，按“2.1.1”项色谱条件连续进样 6 次，每次 20 μL ，以莱菔迪苷 A 为参照峰，计算得到各共有峰相对保留时间 RSD 分别为 0.98%、0.96%、0.40%、0.40%、0.14%、0.14%、0.20%、0.41%、0.37%，相对峰面积 RSD 分别为 2.49%、1.81%、2.70%、1.75%、2.20%、2.36%、2.45%、2.60%、2.96%，表明仪器

的精密度良好。

2.4.5 重复性试验 精密称取同一批号甜叶菊样品 (T1)，按“2.1.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，分别注入 20 μL 进样分析，记录色谱图，以莱菔迪苷 A 为参照峰，记录各色谱峰与莱菔迪苷 A 峰相对保留时间与相对峰面积，计算 RSD 值，新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 A、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 峰的相对保留时间 RSD 分别 1.14%、1.16%、0.68%、0.70%、0.28%、0.23%、0.43%、0.66%、0.57%，相对峰面积 RSD 分别为 1.14%、1.81%、2.37%、1.46%、1.87%、2.22%、2.24%、1.73%、2.80%，表明方法重复性良好。

2.4.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 (T1) 20 μ L, 按“2.1.1”项色谱条件分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析, 记录各个测定时间点的相对保留时间和相对峰面积, 计算 RSD 值, 新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、莱菔迪苷 D、莱菔迪苷 M、莱菔迪苷 A、莱菔迪苷 C 和莱菔迪苷 G 相对保留时间 RSD 值分别为 2.18%、2.22%、1.15%、1.16%、0.23%、0.20%、0.22%、0.29%、0.47%, 相对峰面积 RSD 分别为 1.93%、2.66%、3.19%、2.14%、2.59%、2.57%、2.77%、2.84%、2.02%, 表明供试品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

2.4.7 相似度评价 按“2.1.1”项色谱条件分析, 分别记录药材样品和对照品的色谱图, 将 15 个批次的 HPLC 图导入至《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》, 得到其相似度数据, 进行分析。

以 T4 样品为参照图谱, 经多点校正和 Mark 峰匹配后生成对照指纹图谱 (R), 对照指纹图谱和 15 个批次的 HPLC 指纹图谱见图 2 (T1~T15)。共标定 12 个共有峰, 通过与混合对照品溶液的色谱图比对, 指出 9 种共有峰, 分别为新绿原酸 (1 号峰)、绿原酸 (2 号峰)、异绿原酸 A (6 号峰)、异绿原酸 C (7 号峰)、莱菔迪苷 D (8 号峰)、莱菔迪苷 M (9 号峰)、莱菔迪苷 A (10 号峰)、莱菔迪苷 C (11 号峰) 和莱菔迪苷 G (12 号峰)。以生成的对照指纹图谱为标准, 计算 15 个批次甜叶菊供试品的相似度。结果显示, 15 个批次的甜叶菊供试品与甜叶菊对照指纹图谱的相似度范围为 0.906~1.000, 甜叶菊供试品与对照指纹图谱相似度均达 0.9 以上, 表明不同批次的甜叶菊具有良好的相似性。采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)”软件计算 15 批次甜叶菊样品的相似度, 将数据导入 Origin 2021 软件, 结果见图 3, 红色表示正相关, 蓝色

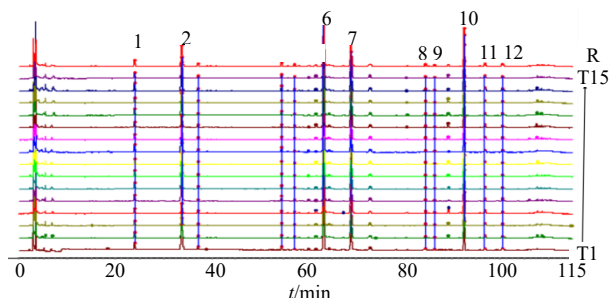


图 2 15 批样品的指纹图谱

Fig. 2 Fingerprints of 15 batches of samples

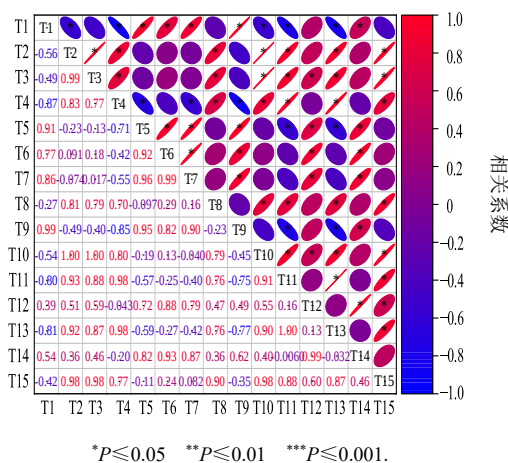


图 3 15 批样品的相关系数图

Fig. 3 Correlation coefficient diagram of 15 batches of samples

表示负相关, 颜色越深, 相关性越大, 圈的朝向代表正负相关性, 圈越大越圆表示相关系数绝对值越小, 数值越大代表相关性越接近, P 代表样品相关性显著程度。

2.5 聚类分析

将 15 批次甜叶菊样品 HPLC 图谱中 12 个共有峰的峰面积作为变量导入 Origin 2021 软件进行聚类分析, 行标签为 12 个共有峰编号, 列标签为样本编号, 对行数据进行标准化使得相同峰面积具有可比性, 采用平均聚类方法、曼哈顿距离类型, 见图 4。由蓝至黄至红的颜色及颜色深浅变化则表示甜叶菊 12 个特征共有峰的峰面积差异程度。聚类分析将 15 批样品分为 2 大类, T12 单独为一大类, 其余样品则被分为另一大类。由此可知, 不同甜叶菊样品的特征成分含量可能存在显著差异, 这可能与基原品种、产地生态环境、加工工艺等因素有关, 当前基于特征图谱结合化学计量学和多策略定量分析的方法^[17-18]已较多地为中药的质量评价提供快速、准确的分析策略。

2.6 主成分分析 (principal component analysis, PCA)

PCA 是通过降维的思想在损失很少信息的前提下将多个互相关联的变量转化成少数几个互不相关的综合指标的统计学方法, 可以用较少的变量去解释原始多变量中的大多数变异^[19]。以 15 批甜叶菊样品指纹图谱中 12 个共有峰的峰面积作为原始数据导入 SIMCA14.1 软件进行 PCA, 分析结果 (图 5) 显示, 模型的拟合参数 R^2_X 为 0.987, 模型预测参数 Q^2 为 0.910, 均大于 0.5, 说明该模型预测能

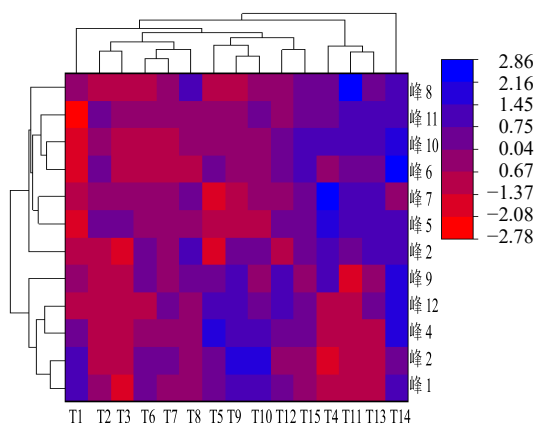


图 4 15 批次样品聚类分析热图

Fig. 4 Heatmap of cluster analysis of 15 batches of samples

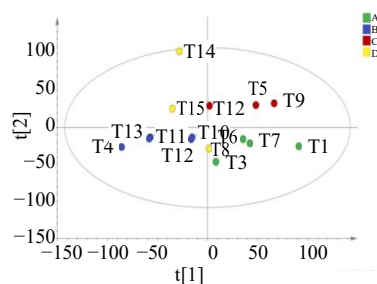


图 5 15 批供试品的主成分分析图

Fig. 5 Principal component analysis of 15 batches of tested SrL samples

力较好, 确认该分析结果可接受。PCA 分析将不同产地的甜叶菊分为 2 大类, 其中 T14 单独为一类, T1~T13、T15 分布相对集中, 提示 15 批次甜叶菊在化学成分含量上存在较大的差异, 与上述聚类分析结果基本一致。

2.7 正交偏最小二乘判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)

PCA 为一种无监督的模型验证方法, 并不能够对所有样本加以区分以使得每个样本对模型都有相同的贡献。所以, 当样本组间差异大而组内差异较小时, PCA 分析难以区分和发现组内差异。因此有必要采用一种有监督模式的 OPLS-DA 分析^[20]。

为了从成分上区分上述 CA 和 PCA 结果中的 2 类甜叶菊供试品, 将 15 批甜叶菊样品 HPLC 图谱的 12 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件建立有监督模式的 OPLS-DA 模型进行判别分析。分析结果显示, 模型的自变量 (R^2_X) 和因变量 (R^2_Y) 拟合参数分别为 0.567、0.829、模型预测参数 (Q^2) 为 0.714, 均大于 0.5, 说明该模型预测能力较好^[21], 确认该分析结果可接受, 见图 6-A。OPLS-DA 模型

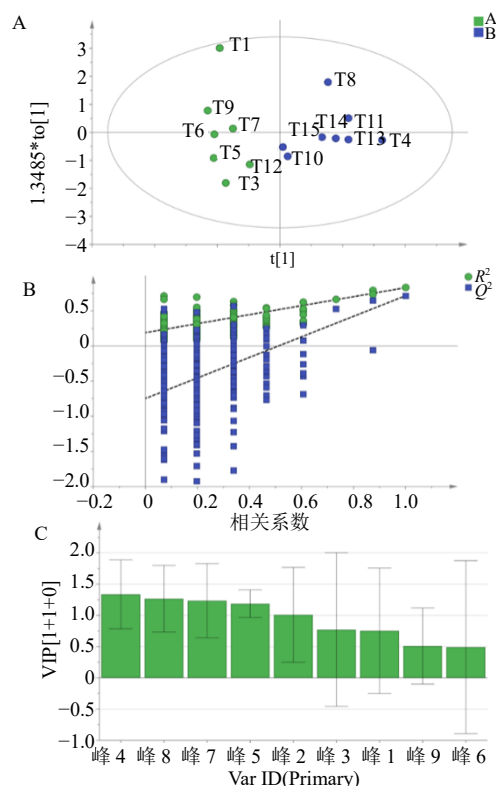


图 6 OPLS-DA 得分图 (A)、置信检验图 (B)、结合变量重要性投影值图 (C)

Fig. 6 OPLS-DA score map (A), confidence test map (B), combined variable importance projection value map (C)

的 200 次置换检测结果显示, 所有排列在左边的 R^2 和 Q^2 值都低于右边的原始点, 并且 Q^2 点的蓝色回归线与 Y 轴相交于负轴 (图 6-B), 模型未出现过拟合的情况, 所建立的模型可以基于 12 种成分判别 15 批次甜叶菊样品的质量差异。结合变量重要性投影值 (variable importance in projection, VIP) (图 6-C) 可知 $VIP > 1$ 的色谱峰 (数值由高到低) 分别为峰 4、峰 8 (莱菔迪苷 D)、峰 7 (异绿原酸 C)、峰 5、峰 2 (绿原酸), 这些成分对不同产地甜叶菊的质量差异具有更大贡献。

3 讨论

本研究通过单因素实验对不同提取溶剂 (体积分数 25%、50%、70%、80%、90%、100% 甲醇、90% 乙醇和纯水)、不同料液比 (体积比 0.5 : 10、1 : 10、0.25 : 10)、不同提取方式时间 (加热回流、超声)、不同流动相水相组成 (0.1% 甲酸、0.1% 磷酸和水) 进行考察, 以峰面积的个数、峰面积的大小最终选定以体积分数 90% 甲醇作为提取溶剂、料液比 0.5 : 10、60 °C 加热回流 30 min 作为样品的提取方法。由于该色谱洗脱方法

流动相水相比比例较大,因此,此研究选择了耐水性更好的 Waters-Symmetry-C₁₈ 色谱柱。而在流动相中有机的选择中,乙腈的强度因子高于甲醇,在此研究中洗脱速率明显较甲醇更好;在水相的选择中,发现流动相水相为 0.1%甲酸水时或者纯水时,谱图基线浮动大,峰形较差,因此选择乙腈-0.1%磷酸水为流动相。甜叶菊中甜菊糖苷类化合物的紫外最大吸收波长迥然不同,设置单一波长只能满足单一物质达到最大吸收波长,也未达到甜叶菊中绿原酸类成分的最大吸收波长,且考虑色谱图整体基线受末端吸收的影响,因此设计了变波长程序。根据 QAMS 法的指导原则,内标物应选择药材中的有效成分或指标成分,且应与待测成分为同类成分或母核相同,光谱特性基本一致^[22]。因此分别以新绿原酸和莱菔迪昔 A 作为内标,在各自最大吸收波长下,对绿原酸类和甜菊糖苷类成分进行含量测定,既降低了实验中对照品、仪器的投入成本,同时保证了检测的灵敏度和准确性。

综上所述,本研究建立了准确可靠的可鉴别和分析甜叶菊的 HPLC 方法;并从所建立的特征图谱上指认了 12 个共有峰,采用 SPSS、SIMCA、Origin 软件对 15 批不同甜叶菊供试品进行相似度分析、PCA、OPLS-DA 分析。建立了以内参物新绿原酸与待测成分绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的 *f*;以莱菔迪昔 A 为内标与待测成分莱菔迪昔 D、莱菔迪昔 M、莱菔迪昔 C、莱菔迪昔 G 的 *f*,通过对 15 批市售不同甜叶菊样品中 5 个甜菊苷类成分与 4 个绿原酸类成分含量的测定,以传统 ESM 法测定结果验证 QAMS 测定结果的准确性,为甜叶菊及其衍生产品的全面质量评价提供了参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Gatea F, Sârbu I, Vamanu E. *In vitro* modulatory effect of stevioside, as a partial sugar replacer in sweeteners, on human child microbiota [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(3): 590.
- [2] Ali K, Khan M I, Akram M, *et al.* Addition of black cumin in *Stevia* apple jam and to check effect on its nutrition profile on storage [J]. *Pak J Med Health Sci*, 2022, 16(12): 467-470.
- [3] 鲍玉龙, 柳春燕, 邵太丽, 等. 甜叶菊化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. *中草药*, 2024, 55(3): 1014-1025.
- [4] 王彦阁, 陈晨, 丁林, 等. 以甜菊糖苷为载体的二氢杨梅素纳米胶束的制备、表征及口服生物利用度评价 [J]. *中草药*, 2024, 55(23): 8011-8022.
- [5] 吕博, 韩印森, 许庆轩. 电喷雾串联质谱法鉴定甜叶菊干叶中甜菊糖苷的结构 [J]. *中国糖料*, 2022, 44(2): 44-50.
- [6] 谢虹, 陈云, 梁建生. 甜叶菊花和叶中酚类成分分析及含量测定 [J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(9): 151-157.
- [7] 李灿琳, 刘海洋, 李思, 等. 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 [J]. *中草药*, 2024, 55(2): 614-621.
- [8] 孟俊华, 刘媛, 占慧慧, 等. 基于特征图谱结合化学计量学和一测多评法的薤白质量评价 [J]. *中草药*, 2023, 54(21): 7176-7185.
- [9] 万鸣, 黄超, 杨玉莹, 等. 不同产地茯苓中 7 种三萜类成分含量的测定及聚类分析 [J]. *中国药房*, 2020, 31(17): 2101-2106.
- [10] 徐文武, 谢涛, 吕东峰, 等. 一测多评法同时测定红参中 11 种人参皂苷的含量 [J]. *中草药*, 2021, 52(7): 2099-2105.
- [11] 罗祖良, 仇峰, 韦日伟, 等. 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.
- [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] 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.
- [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] 宝鲁尔, 陈红梅, 吴杰斯, 等. 一测多评法同时测定蒙药扎冲十三味丸中 4 种成分的含量 [J]. *中国药理学杂志*, 2022, 57(1): 69-75.
- [16] 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.
- [17] 纪国力, 周伟, 巴然然, 等. 双标多测法测定丹参配方颗粒中 6 个酚酸类成分 [J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(8): 1326-1333.
- [18] 彭思源, 邓元辉, 丁婵, 等. 基于 HPLC 指纹图谱与一测多评法结合的桑黄品质评价研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2024, 59(6): 531-540.
- [19] 熊婧, 李慧勇, 李广生, 等. 化学计量学在中药色谱分析中的应用探讨 [J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(10): 1681-1689.
- [20] Shen T, Yu H, Wang Y Z. Assessing geographical origin of *Gentiana rigescens* using untargeted chromatographic fingerprint, data fusion and chemometrics [J]. *Molecules*, 2019, 24(14): 2562.
- [21] 邵淑贤, 王淑燕, 王丽, 等. 基于 ATD-GC-MS 技术的不同品种白牡丹茶香气成分分析 [J]. *食品工业科技*, 2022, 43(1): 261-268.
- [22] 罗庆云, 印敏. 甜菊糖苷类化合物的质谱行为分析及定量策略初探 [J]. *中国糖料*, 2022, 44(2): 28-36.

[责任编辑 时圣明]