

蒙药材蓝盆花指纹图谱及一测多评含量测定方法研究

娜仁图雅¹, 籍学伟¹, 韩塔娜¹, 高磊^{1*}, 郑健^{2*} (1. 内蒙古自治区药品检验研究院, 内蒙古自治区中蒙药标准研究重点实验室, 呼和浩特 010000; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立蒙药材蓝盆花的HPLC指纹图谱及一测多评法同时测定绿原酸、木犀草苷、异绿原酸A及异绿原酸C 4个成分的含量, 评价药材质量。方法: 采用Kromasil 100-5-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.2%磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长分别为326 nm(含量测定)和350 nm(指纹图谱), 柱温30 ℃。以17批样品建立指纹图谱共有模式。以异绿原酸A为内参物, 建立绿原酸、木犀草苷、异绿原酸C与内参物的相对校正因子, 计算含量, 并与外标法计算结果进行比较。结果: 建立了蓝盆花药材的HPLC指纹图谱, 标示了10个共有峰, 并指认其中的7个色谱峰, 分别为绿原酸、木犀草苷、异绿原酸A、大波斯菊苷、异绿原酸C、木犀草素、芹菜素。相对校正因子重现性良好, 以异绿原酸A为内参物采用校正因子计算的含量值与实测值之间无显著差异。结论: 采用指纹图谱与多指标检测模式可为评价蒙药材蓝盆花的质量提供有效方法。

关键词: 蓝盆花; 指纹图谱; 一测多评法; 绿原酸; 木犀草苷; 异绿原酸A; 异绿原酸C; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)02-0184-11

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.02.007

Combinational Quality Control Method of Mongolian Medicinal Materials Flos Scabiosae Based on Fingerprint and QAMS

Naren Tuya¹, Ji Xuewei¹, Han Tana¹, Gao Lei^{1*}, Zheng Jian^{2*} (1. Inner Mongolian Institute for Drug Control, Huhehaote 010000, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish a quality control method of Flos Scabiosae by HPLC fingerprint and simultaneous determination of chlorogenic acid, galuteolin, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C by the quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for evaluation of medicinal materials quality. **Methods:** Kromasil 100-5-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was employed with a mobile phase of a acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution with gradient elution. Detection wavelength was set at 350 nm (fingerprint) and 326 nm(QAMS), the column temperature was 30 ℃, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the injection volume was 20 μL. The common mode of fingerprint was established using the determination of seventeen batches of Scabiosa Flos. Using isochlorogenic acid A as an internal reference, the relative correction factors among chlorogenic acid, galuteolin, isochlorogenic acid C and the internal reference were established, and the contents were calculated and compared to those obtained with external standard method. **Results:** HPLC

作者简介: 娜仁图雅, 本科; 研究方向: 民族药学、分子生物学、中药学; Tel: (0471) 4505169; E-mail: nrty2012@126.com

通信作者: 高磊, 硕士; Tel: (0471) 4505696; E-mail: nrty2012@126.com

郑健, 博士, 研究员; Tel: (010) 67095739; E-mail: jzj825@163.com

fingerprint was established for the medicinal materials of *Scabiosa Flos*, 10 common peaks were labeled, and 7 chromatographic peaks were identified, which were chlorogenic acid, galuteolin, isochlorogenic acid A, apigenin-7-O-glucoside, isochlorogenic acid C, luteolin and apigenin, respectively. The established relative correction factors (RCF) had good reproducibility. No significant difference was found between the quantitative results of external standard method and QAMS. **Conclusion:** The application of HPLC fingerprint and QAMS method model can provide an effective method to evaluate the quality of *Scabiosa Flos*.

Keyword: *Flos Scabiosae*; fingerprint; quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); chlorogenic acid; galuteolin; Isochlorogenic acid A; Isochlorogenic acid C; HPLC

蒙药蓝盆花作为“绿绒蒿”的代用品, 又称蒙古山萝(花), 蒙药名“陶森-套日麻”, 也叫“乌赫日茵-树鲁苏”, 来源于川续断科植物窄叶蓝盆花 *Scabiosa comosa* Fisch. ex Roem. et Schult. 和华北蓝盆花 *Scabiosa tschillensis* Grun. 的干燥花序^[1-4]。夏季花将开放时采摘, 阴干。《中国植物志》^[5]及《内蒙古植物志》^[6]记载, 华北蓝盆花主要分布于内蒙古呼伦贝尔、锡林郭勒、乌兰察布以及大青山地区。窄叶蓝盆花主要分布于内蒙古呼伦贝尔、赤峰、锡林郭勒、乌兰察布以及巴彦淖尔。蓝盆花属植物所含化学成分较多, 主要有黄酮类、三萜类、环烯醚萜类、香豆素类、酚类、有机酸和挥发油等化合物。具有清热、清“协日”的功效, 蒙医临床用于肝热、肺热、咽喉热等病^[7-12]。

蓝盆花现收载于《内蒙古蒙药材标准》(1986版)^[13]及《卫生部药品标准》蒙药分册^[14]中, 其中仅收载【性状】【鉴别】项(理化鉴别), 缺少【鉴别】(薄层鉴别)、【含量测定】等项。蓝盆花的含量测定文献已有较多报道^[15-19], 大部分是单一成分含量测定。特征图谱及指纹图谱方面研究^[20-23]较少。本研究采用HPLC法, 建立了蓝盆花的指纹图谱分析方法, 并同时以一测多评法测定4个成分(绿原酸、木犀草苷、异绿原酸A、异绿原酸C)的含量, 为蓝盆花药材的质量控制提供科学依据。

1 仪器、试药及样品

1.1 仪器

岛津LC-20AT型高效液相色谱仪、戴安U3000高效液相色谱仪(均带SPD-M20A型二极管阵列检测器), ME5型电子天平(赛多利斯, 百万分之一), XP-205电子天平(梅特勒, 十万分之一), JD200-2型电子天平(梅特勒, 百分之

一), AS 5150A超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂试药

绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110753-201415, 标示含量96.2%)、木犀草苷对照品(上海同田生物技术股份有限公司, 批号 18083022, 标示含量98.0%)、异绿原酸A(上海源叶生物技术有限公司, 批号 P25J9L66496, 标示含量HPLC \geq 98%)、异绿原酸C(上海源叶生物技术有限公司, 批号 Y24N8Y49009, 标示含量HPLC \geq 98%)。甲醇和乙腈为色谱纯(Sigma-Aldrich公司); 水为纯化水。

1.3 样品来源

共收集17批次蓝盆花样品, 来源见表1, 由内蒙古自治区药品检验研究院韩塔娜及乌云索德专家鉴定为川续断科植物窄叶蓝盆花 *Scabiosa comosa* Fisch. ex Roem. et Schult. 和华北蓝盆花 *Scabiosa tschillensis* Grun. 的干燥花序。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用Kromasil100-5-C₁₈色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 以乙腈为流动相A, 以0.2%磷酸溶液为流动相B, 梯度洗脱(0~5 min, 5%A \rightarrow 15%A; 5~25 min, 15%A \rightarrow 18%A; 25~35 min, 18%A \rightarrow 20%A; 35~55 min, 20%A \rightarrow 80%A), 流速1.0 mL \cdot min⁻¹, 指纹图谱检测波长350 nm, 含量测定检测波长326 nm; 柱温30 $^{\circ}$ C, 进样量20 μ L。

2.2 混合对照品溶液制备

取绿原酸、木犀草苷、异绿原酸A、异绿原酸C的对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每1 mL含绿原酸140 μ g、木犀草苷 22 μ g、异绿原酸A 120 μ g、异绿原酸C 22 μ g的混合溶液, 即得。

表1 蓝盆花样品来源

序号	基原	采集地点	采集时间
S1	华北蓝盆花 <i>Scabiosa tschillensis</i> Grun.	内蒙古乌兰察布市红召高山草原	2018-07-27
S2		内蒙古海拉尔区奋斗镇友联村现代农业产业基地	2018-07-30
S3		内蒙古兴安盟扎赉特旗国营牧场	2018-07-30
S4		内蒙古兴安盟科右中旗西哲里木老鹰山	2018-08-01
S5		河北省围场县姜家店三道沟	2018-08-02
S6		内蒙古乌兰浩特市阿尔山白狼风景区	2018-08-06
S7		内蒙古呼伦贝尔莫力达瓦旗塔温敖宝镇	2018-08-01
S8		内蒙古乌兰察布市丰镇红山牧场	2018-08-02
S9		内蒙古锡林郭勒盟东乌宝格达山	2019-07-31
S10		内蒙古兴安盟科右前旗五岔沟镇	2019-07-29
S11	内蒙古通辽市扎鲁特旗罕山国家级自然保护区	2019-08-01	
S12	窄叶蓝盆花 <i>Scabiosa comosa</i> Fisch. ex Roem. et Schult.	内蒙古海拉尔区奋斗镇友联村现代农业产业基地	2018-08-15
S13		内蒙古通辽市扎鲁特旗罕山国家级自然保护区	2019-08-01
S14		内蒙古海拉尔市鄂温克旗锡尼河苏木基地	2019-08-05
S15	商品药材	内蒙古怡生堂药业有限公司	2018-07-26
S16		内蒙古宝芝林药业有限公司	2017-11-20
S17		亳州市圣牛海牛药饮片有限公司	2017-09-24

2.3 供试品溶液制备

取样品粉末(过3号筛)约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称量,浸泡1 h,超声处理(功率500 W,频率40 kHz)40 min,放冷,再称量,用甲醇补足减失的量,摇匀,取上清液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.4 指纹图谱

2.4.1 共有模式的建立及部分共有峰的指认

分别精密吸取17批样品(S1~S17)的供试品溶液20 μL进样测定,将样品的图谱以最小峰面

积为不少于总峰面积的0.5%积分,转换成AIA格式,导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012.1版本)进行匹配,确定10个共有峰。采用对照品保留时间确认,其中7个色谱峰分别为绿原酸(1号峰)、木犀草苷(3号峰)、异绿原酸A(6号峰)、大波斯菊苷(7号峰,为重叠峰)、异绿原酸C(8号峰)、木犀草素(9号峰)、芹菜素(10号峰)。蓝盆花样品的叠加图见图1、共有模式图谱见图2。17批样品相似度0.919~1.000,表明各样品质量均一,相似性较好。

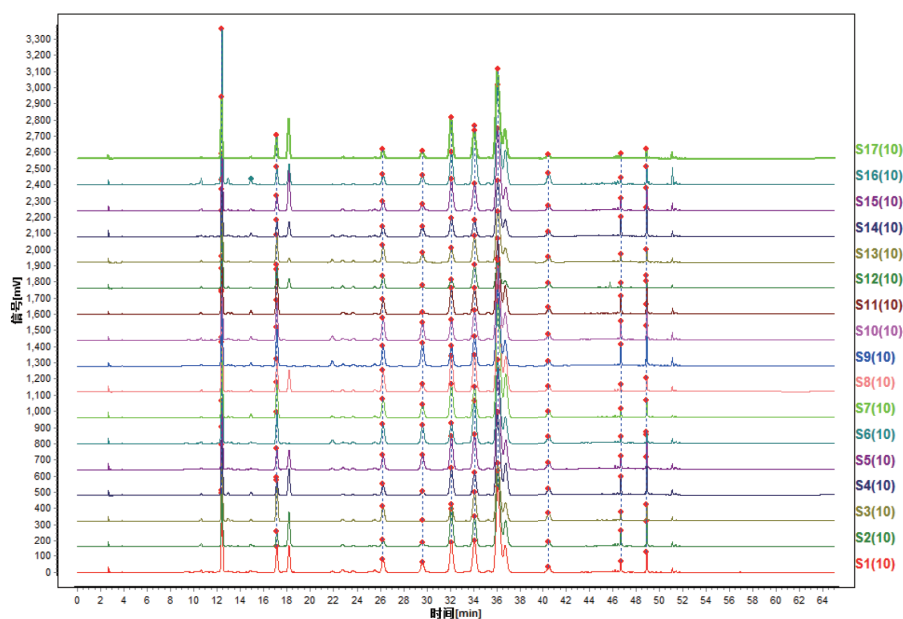
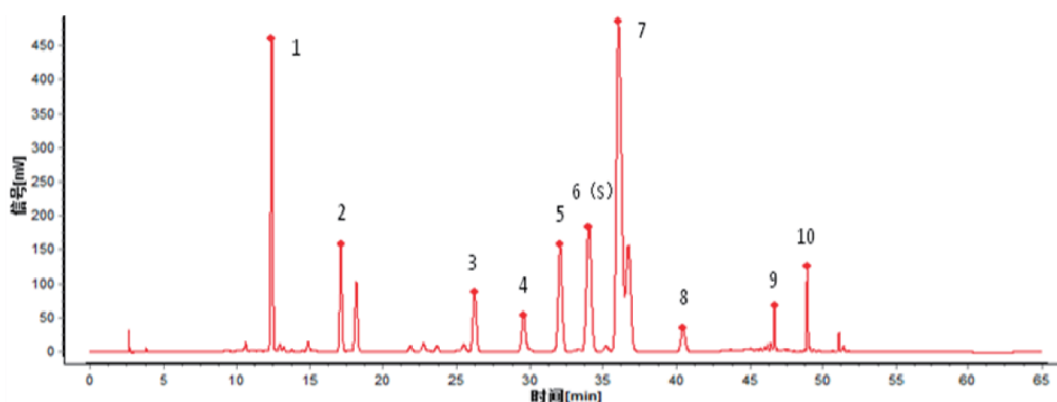


图 1 17 批蓝盆花药材 HPLC 叠加图谱



1. 绿原酸; 3. 木犀草苷; 6 (S). 异绿原酸A; 8. 异绿原酸C; 9. 木犀草素; 10. 芹菜素。

图 2 蓝盆花 HPLC 对照指纹图谱

2.4.2 重复性试验

取同一批蓝盆花样品 (S1) 粉末6份, 精密称定, 按“2.3”节下方法分别制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液20 μ L, 分别进样测定, 记录色谱图。以异绿原酸A 峰为参照峰, 计算共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积的RSD<2%; 采用Chempattern 化学计量学软件进行评价, 相似度为0.99。结果表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 (S1) 20 μ L, 分别于0、2、6、10、15、20、24 h, 按上述色谱

条件进样测定, 记录色谱图。以异绿原酸A 峰为参照峰, 计算共有指纹峰的相对保留时间及相对峰面积的RSD<1%, 相对峰面积在20 h内的RSD<2%; 采用Chempattern 化学计量学软件进行评价, 相似度为0.97。结果表明供试品溶液在20 h内稳定性良好。

2.4.4 耐用性试验

分别对ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 和Kromasil 100-5-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 2根色谱柱进行考察, 采用Chempattern 化学计量学软件进行评价, 相似度为0.99。本文选择

Kromasil 100-5-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱进行试验。

分别在3台高效液相色谱仪 (Shimadzu LC-2010A两元高压泵; Shimadzu LC-2010A四元低压泵; Thermo U3000四元低压泵) 上进行测定, 结果不同仪器的色谱图主要色谱峰的出现顺序、相对保留时间、峰高相对比例等基本保持稳定, 相似度为0.94, 表明本方法适用于不同的液相色谱仪。本文选择Shimadzu LC-2010A两元高压泵高效液相色谱仪进行试验。

2.5 一测多评含量测定方法

2.5.1 线性关系考察

精密吸取“2.2”节下混合对照品溶液 2、5、10、15、20、25 μL 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积 Y 对进样量 X (μg) 进行回归分析。绿原酸: $Y = 2.3 \times 10^3 X + 76176$ ($r=0.997$); 木犀草苷: $Y = 2.3 \times 10^3 X + 5510$ ($r=0.999$); 异绿原酸A: $Y = 3.8 \times 10^3 X + 10852$ ($r=0.999$); 异绿原酸C: $Y = 3.3 \times 10^3 X + 4933$ ($r=0.999$)。结果表明绿原酸、木犀草苷、异绿原酸A、异绿原酸C进样量分别在0.57~7.16 μg、90.1~1126.0 ng、1.50~7.52 μg、84.0~1050.6 ng范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.5.2 精密度试验

精密吸取“2.2”节下对照品混合溶液, 按“2.1”节下色谱条件, 连续进样6次, 记录峰面积。绿原酸、木犀草苷、异绿原酸A和异绿原酸C的峰面积平均值分别为8303880、1028781、8358940、1508379, RSD分别为1.48%、1.49%、

1.38%和1.45% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

2.5.3 重复性考察

取同一样品 (S1) 6份, 按“2.3”节下方法制备供试品溶液, 按“2.1”节下色谱方法测定, 记录峰面积, 计算含量。测定结果显示, 绿原酸平均含量为0.819%, RSD为1.29%; 木犀草苷平均含量为0.123%, RSD为1.69%; 绿原酸A平均含量为0.617%, RSD为1.48%; 绿原酸C平均含量为0.096%, RSD为1.29%, 表明方法重复性好。

2.5.4 溶液稳定性试验

取同一份样品溶液 (S1), 按“2.3”节下方法制备供试品溶液, 放置0、2、6、10、15、20、24 h后进样测定, 结果绿原酸、木犀草苷、异绿原酸A和异绿原酸C在15 h内的峰面积平均值分别为8993550、1047730、8603692、1250547, RSD ($n=6$) 分别为0.94%、1.39%、0.63%、1.25%, 表明供试品溶液中绿原酸、木犀草苷、异绿原酸A和异绿原酸C在15 h内稳定。

2.5.5 加样回收试验

取已知含量的样品 (S1) 粉末6份, 每份各约0.25 g, 精密称定, 分别置具塞锥形瓶中, 分别精密加入一定量的混合对照品溶液, 按照“2.3”节下方法制备样品溶液, 进样分析, 对绿原酸、木犀草苷、异绿原酸A和异绿原酸C 4个成分分别以外标法和一测多标法计算回收率, 结果以外标法计算平均回收率在98%~101%之间 (见表2); 以一测多评法计算回收率在98%~101%之间 (见表3), 表明该方法加样回收试验结果良好。

表2 外标法计算加样回收率试验结果 ($n=6$)

成分	称样量 / g	样品中的量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收 / %	RSD / %
绿原酸	0.2583	2.110	1.439	3.590	102.3	101.5	0.70
	0.2544	2.085	1.439	3.529	100.3		
	0.2545	2.086	1.439	3.553	101.9		
	0.2554	2.093	1.439	3.558	101.7		
	0.2568	2.105	1.439	3.572	101.9		
	0.2675	2.192	1.439	3.648	101.1		

续表 2

成分	称样量 / g	样品中的量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收 / %	RSD/ %
木犀草苷	0.2583	0.319	0.2298	0.552	101.3	101.1	0.88
	0.2544	0.314	0.2298	0.547	101.4		
	0.2545	0.314	0.2298	0.548	101.7		
	0.2554	0.315	0.2298	0.548	101.3		
	0.2568	0.317	0.2298	0.550	101.6		
	0.2675	0.330	0.2298	0.558	99.3		
异绿原酸 A	0.2583	1.594	1.183	2.744	97.1	97.8	0.73
	0.2544	1.570	1.183	2.726	97.7		
	0.2545	1.571	1.183	2.742	98.9		
	0.2554	1.577	1.183	2.743	98.6		
	0.2568	1.585	1.183	2.739	97.5		
	0.2675	1.651	1.183	2.804	97.4		
异绿原酸 C	0.2583	0.248	0.2237	0.466	97.7	99.8	1.39
	0.2544	0.244	0.2237	0.465	98.6		
	0.2545	0.244	0.2237	0.468	99.9		
	0.2554	0.245	0.2237	0.471	100.9		
	0.2568	0.246	0.2237	0.471	100.4		
	0.2675	0.256	0.2237	0.483	101.3		

表 3 以一测多评法计算加样回收率试验结果 (n=6)

成分	称样量 / g	样品中的量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收 / %	RSD/ %
绿原酸	0.2583	2.089	1.439	3.52	99.4	98.7	0.74
	0.2544	2.058	1.439	3.46	97.4		
	0.2545	2.058	1.439	3.484	99.1		
	0.2554	2.066	1.439	3.489	98.9		
	0.2568	2.077	1.439	3.502	99.0		
	0.2675	2.164	1.439	3.577	98.2		

续表 3

成分	称样量 / g	样品中的量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收 / %	RSD/ %
木犀草苷	0.2583	0.315	0.2298	0.547	101.0	101.3	1.26
	0.2544	0.31	0.2298	0.543	101.4		
	0.2545	0.31	0.2298	0.543	101.4		
	0.2554	0.311	0.2298	0.544	101.4		
	0.2568	0.313	0.2298	0.546	101.4		
	0.2675	0.326	0.2298	0.554	99.2		
异绿原酸 A	0.2583	1.591	1.183	2.744	97.5	98.4	0.73
	0.2544	1.567	1.183	2.726	98.0		
	0.2545	1.567	1.183	2.742	99.3		
	0.2554	1.573	1.183	2.743	98.9		
	0.2568	1.581	1.183	2.739	97.9		
	0.2675	1.647	1.183	2.804	97.8		
异绿原酸 C	0.2583	0.248	0.2237	0.468	98.3	101.0	1.50
	0.2544	0.244	0.2237	0.466	99.2		
	0.2545	0.244	0.2237	0.469	100.6		
	0.2554	0.245	0.2237	0.472	101.5		
	0.2568	0.246	0.2237	0.473	101.5		
	0.2675	0.256	0.2237	0.485	102.4		

2.5.6 相对校正因子的计算

精密吸取“2.2”节下对照品混合溶液2、5、10、15、20、25 μL 注入高效液相色谱仪，按“2.1”节下色谱条件进行测定，以异绿原酸A为内

参物，分别计算绿原酸、木犀草苷、异绿原酸C与内参物异绿原酸A的相对校正因子(f)，结果显示RSD均小于5%（见表4）。

表 4 相对校正因子的计算

进样体积 / μL	f (绿原酸 / 异绿原酸 A)	f (木犀草苷 / 异绿原酸 A)	f (异绿原酸 C / 异绿原酸 A)
2	1.170	1.581	1.056
5	1.178	1.583	1.057
10	1.195	1.587	1.054
15	1.214	1.583	1.052
20	1.220	1.532	1.048
25	1.228	1.533	1.046
平均值	1.201	1.566	1.052
RSD/%	1.96	1.69	0.41

2.5.7 校正因子的影响因素考察

采用Kromasil 100-5-C₁₈色谱柱,分别考察了岛津低压四元LC-20A型、岛津两元高压LC-20A型和戴安U3000 3种不同的高效液相色谱系统对异绿原酸A相对校正因子的影响,结果RSD分别为1.56%、3.52%、1.42% (n=3),表明各成分相对校正因子重复性良好。

采用岛津低压四元LC-20高效液相色谱系统,分别考察了Kromasil 100-5-C₁₈及ZORBAX SB-C₁₈ 2种色谱柱对异绿原酸A相对校正因子的影响,结果相对偏差分别为0.75%、3.02%、1.04% (n=2),表明各成分相对校正因子重现性良好。

采用岛津低压四元LC-20高效液相色谱系统和Kromasil 100-5-C₁₈色谱柱分别对不同流速(0.8、1.0、1.2 mL·min⁻¹)对异绿原酸A相对校正因子的影响进行考察,结果RSD分别为0.38%、0.34%、0.27%,表明各成分相对校正因子重复性良好。

2.5.8 一测多评法色谱峰的定位

采用不同仪器和色谱柱,分别以相对保留时间法、保留时间差法和相对容量因子法3种方法进行计算,结果见表5~7,显示异绿原酸A、木犀草苷和异绿原酸C在3种方法下RSD均小于5%,而绿原酸在3种方法下RSD均大于5%,不能准确定位,最终选择相对保留时间法定位异绿原酸A、木犀草苷和异绿原酸C,绿原酸用对照品辅助定位。

2.5.9 外标法与一测多评法测定结果的比较及含量限度确定

分别采用外标法和一测多评法计算含量,并将两种方法计算的结果进行比较,试验结果见表8, HPLC色谱图见图3,显示外标法实测值与一测多评计算的含量值无显著差异,相对偏差<2.5%。表明本方法可用于蓝盆花主要化学成分的质量评价研究。

表5 相对保留时间法待测成分色谱峰的定位

仪器	色谱柱	与内参物的相对保留值计算		
		绿原酸	木犀草苷	异绿原酸 C
岛津两元高压 LC-20 A 型	Kromasil	0.365	0.769	1.189
岛津低压四元 LC-20 A 型	Kromasil	0.369	0.761	1.188
	ZORBAX	0.301	0.741	1.197
戴安低压四元 U3000	Kromasil	0.338	0.767	1.167
RSD/%		9.11	1.65	1.06

表6 保留时间差法待测成分色谱峰的定位

仪器	色谱柱	与内参物的保留时间差计算		
		绿原酸	木犀草苷	异绿原酸 C
岛津两元高压 LC-20 A 型	Kromasil	21.707	7.904	6.454
岛津低压四元 LC-20 A 型	Kromasil	20.500	7.760	6.101
	ZORBAX	22.305	8.257	6.276
戴安低压四元 U3000	Kromasil	23.957	8.439	6.053
RSD/%		6.50	3.86	2.93

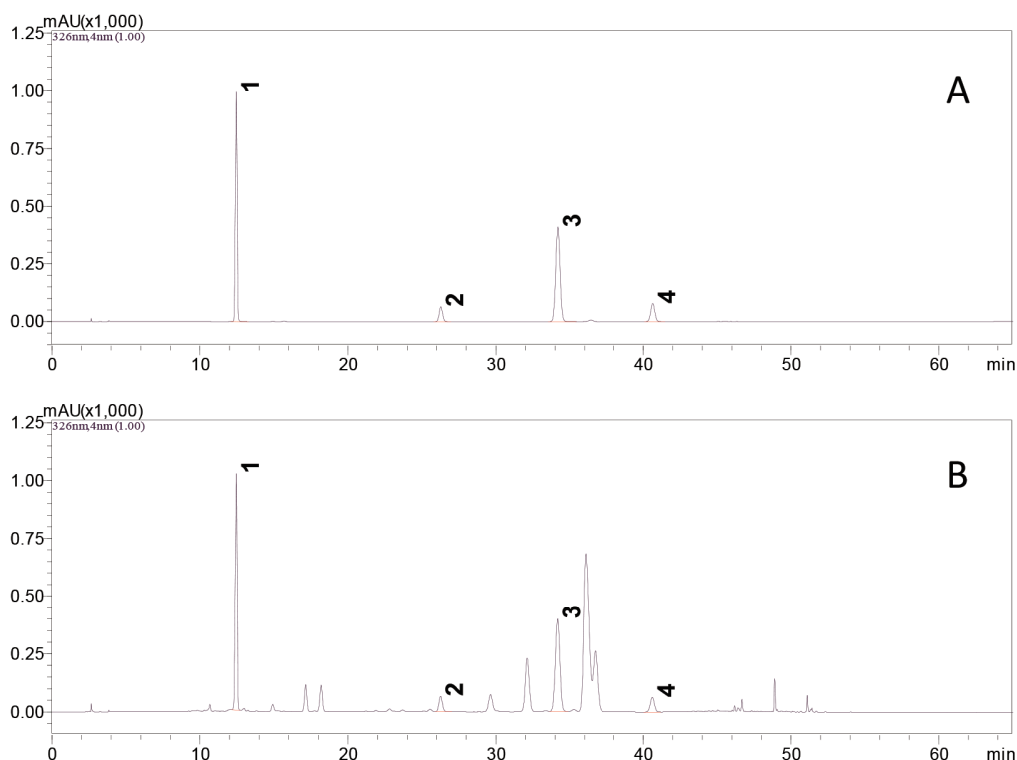
表 7 相对容量因子法待测成分色谱峰的定位

仪器	色谱柱	相对容量因子法计算		
		绿原酸	木犀草苷	异绿原酸 C
岛津两元高压 LC-20 A 型	Kromasil	0.072	0.674	1.25
岛津低压四元 LC-20 A 型	Kromasil	0.0764	0.663	1.27
	ZORBAX	0.0823	0.658	1.27
戴安低压四元 U3000	Kromasil	0.0672	0.654	1.26
RSD/%		8.63	1.30	0.75

表 8 外标法与一测多评法测定结果的比较

序号	绿原酸			木犀草苷 /%			异绿原酸 A/%	异绿原酸 C/%		
	含量 /%		偏差 / %	含量 /%		偏差 / %	外标	含量 /%		偏差 / %
	外标	QAMS		外标	QAMS			外标	QAMS	
S1	0.87	0.864	0.3	0.131	0.129	0.7	0.658	0.102	0.100	0.9
S2	0.598	0.590	0.6	0.070	0.069	0.7	0.626	0.083	0.085	1.1
S3	0.602	0.594	0.6	0.091	0.089	1.1	0.543	0.091	0.095	2.1
S4	0.811	0.800	0.6	0.146	0.143	1	0.592	0.142	0.149	2.4
S5	0.737	0.728	0.6	0.216	0.212	0.9	0.465	0.117	0.121	1.6
S6	0.736	0.726	0.6	0.141	0.139	0.7	0.725	0.113	0.117	1.7
S7	1.11	1.09	0.9	0.191	0.188	0.7	0.876	0.114	0.120	2.5
S8	0.816	0.806	0.6	0.190	0.186	1	0.635	0.098	0.102	2
S9	1.06	1.05	0.4	0.214	0.211	0.7	0.745	0.082	0.085	1.7
S10	0.830	0.820	0.6	0.122	0.12	0.8	0.482	0.088	0.091	1.6
S11	0.779	0.769	0.6	0.172	0.168	1.1	0.544	0.085	0.088	1.7
S12	0.589	0.582	0.5	0.098	0.096	1	0.338	0.08	0.083	1.8
S13	0.817	0.808	0.5	0.131	0.129	0.7	0.626	0.119	0.122	1.2
S14	0.845	0.832	0.7	0.114	0.11	1.7	0.609	0.104	0.105	0.4
S15	0.812	0.802	0.6	0.209	0.204	1.2	0.634	0.083	0.085	1.1
S16	0.776	0.767	0.5	0.223	0.22	0.6	0.628	0.108	0.112	1.8
S17	0.654	0.645	0.6	0.155	0.152	0.9	0.569	0.12	0.125	2

注：偏差为相对平均偏差。



A.对照品混合溶液；B.供试品溶液；1.绿原酸；2.木犀草苷；3.异绿原酸A；4.异绿原酸C。

图3 蓝盆花 HPLC 含量测定色谱图

3 讨论

3.1 检测波长的选择

按“2.1”节下色谱条件进行检测，对检测波长190~800 nm进行色谱分析，结果在326 nm处含量测定4个成分中含量较少的木犀草苷和异绿原酸C有最大吸收值，且色谱峰分离情况较好，因此选用326 nm作为含量测定波长；在350 nm处，指纹图谱各共有峰的吸收值相对均匀且色谱峰分离情况较好，故350 nm作为指纹图谱的检测波长。

3.2 供试品提取溶剂及提取方法的选择

提取溶剂的选择：分别选择60%甲醇、70%甲醇、80%甲醇、纯甲醇及乙醇进行考察，随着溶剂中水的比例增大，45~55 min区域的3个峰的吸收值略微增高，但随着水的比例增加，样品漂浮于溶剂表面、摇匀后易挂在容器壁上，不易操作。用纯甲醇提取时杂峰较少，基线较好。故综合考虑选纯甲醇为提取溶剂。

提取方法的选择：比较了超声提取和回流提取两种方法，结果提取效率基本一致，考虑易于操作，选择超声提取方法。

3.3 柱温对测定的影响

考察不同柱温：25、30、35和40℃，结果30℃柱温比其他柱温分离效果相对较好，且考虑到易于实际控制，确定30℃柱温为测定柱温。

3.4 一测多评法待测色谱峰的定位

采用不同仪器和色谱柱，分别以相对保留时间法、保留时间差法和相对容量因子法3种方法进行计算，结果异绿原酸A、木犀草苷和异绿原酸C在3种方法下均能准确定位，而绿原酸在3种方法下均不能准确定位，最终选择相对保留时间法定位异绿原酸A、木犀草苷和异绿原酸C，绿原酸用对照品辅助定位。

4 结语

本研究首次建立了蓝盆花药材的一测多评含量测定方法，并且在同一色谱条件下同时进行指纹图谱分析。以异绿原酸A为内参物，测定17批药材中绿原酸、木犀草苷、异绿原酸A和异绿原酸C的含量，方法简便、快速、准确，为蓝盆花药材的定性鉴别与定量测定提供了有效的手段。

参考文献：

- [1] 罗布桑. 蒙药志[M]. 呼和浩特：内蒙古人民出版社，1980：417-421.
- [2] 白清云. 中国医学百科全书[M]. 呼和浩特：内蒙古科学技术出版社，1986：402-403.
- [3] 蒙古学百科全书编辑委员会. 蒙古学百科全书·医学卷[M]. 呼和浩特：内蒙古人民出版社，2002：938.
- [4] 国家中医药管理局. 中华本草·蒙药卷[M]. 上海：上海科学技术出版社，2004：385-386.
- [5] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京：科学出版社，1989，73：78-81
- [6] 内蒙古植物志编辑委员会. 内蒙古植物志·第五卷[M]. 呼和浩特：内蒙古人民出版社，1980：361-363.
- [7] 王国英，赵子龙，薛培凤，等. 华北蓝盆花化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (5)：807-813.
- [8] 黎田儿，欧阳辉，杨林军，等. 蓝盆花属植物化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21 (18)：226-230.
- [9] 白玉霞，齐日麦图，乌优，等. 蒙古山萝卜花研究进展[J]. 中国民族医药杂，2004，4 (2)：38-39.
- [10] 王乃利，白玉霞，樊峥嵘，等. 蒙古山萝卜活性成分的研究[J]. 中草药，1989，309 (6)：247-249.
- [11] 冀敏，李淑娟，马超美. 窄叶蓝盆花花序化学成分及其抗氧化和抑制 α -葡萄糖苷酶活性的研究[J]. 内蒙古大学学报，自然科学版，2014，45 (4)：1-6.
- [12] 王国英，薛培凤. 蒙药蓝盆花及其同属植物的研究进展[J]. 内蒙古医学院学报，2019，31 (5)：487-490.
- [13] 内蒙古自治区卫生厅. 内蒙古蒙药材标准[M]. 呼和浩特：内蒙古科学技术出版社，1986：221-222.
- [14] 国家药典委员会. 卫生部药品标准蒙药分册 [S]. 1998：52.
- [15] 王国英. HPLC 法测定蒙药蓝盆花中木犀草素和芹菜素的含量[J]. 中国药房，2012，23 (15)：1407-1408.
- [16] 武桂芝. 蒙古山萝卜 (窄叶蓝盆花) 与两种变异品种形态及绿原酸含量[J]. 中国民族医药杂志，2016，2 (2)：38-39.
- [17] 白玉霞，巴根那，武晓兰. 蒙古山萝卜花与茎总黄酮含量的比较[J]. 中国民族医药杂志，1998，4 (增刊)：69-70.
- [18] 李甫泉，于蕾，周雪梅，等. HPLC法测定民族药材蒙古山萝卜中金丝桃苷的含量[J]. 民族医药杂志，2016，11：55-56.
- [19] 中华人民共和国药典：一部 [S]. 2015：308.
- [20] 白玉霞，通拉嘎. 蒙药蓝盆花 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国现代应用药学，2013，30 (6)：610-613
- [21] 马飞祥，赵子龙，薛培凤，等. 蒙药蓝盆花 HPLC 特征图谱及 7 种成分的含量测定[J]. 中药材，2018，41 (3)：644-649.
- [22] 吴珊珊，林燕. 一测多评法测定蒙药材刺柏叶中 4 种黄酮的含量[J]. 中国药事杂志，2016，30 (3)：297-303.
- [23] 王明娟，李娅萍，杨亚莉，等. 提高高效液相色谱法定性准确性的方法探讨[J]. 药物分析杂志，2006，26 (1)：206-210.

(收稿日期 2019年7月30日 编辑 郑丽娥)