

结合化学识别模式的霞日森登质量标志物研究

杨洋¹, 李珍^{1*}, 乔向东², 包塔娜¹, 乔轲¹, 徐萌杰^{3*} (1. 鄂尔多斯市检验检测中心, 鄂尔多斯 017010; 2. 鄂尔多斯市中心医院, 鄂尔多斯 017000; 3. 鄂尔多斯市疾病预防控制中心, 鄂尔多斯 017004)

摘要 目的: 建立基于蒙药材霞日森登质量标志物(Q-Marker)的质量控制方法, 结合化学识别模式分析不同产地霞日森登的质量差异。方法: 采用高效液相色谱法(HPLC)同时测定杨梅素、二氢杨梅素、没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素及花旗松素7种Q-Marker含量, 建立一测多评法(QAMS), 并与外标法(ESM)及标准曲线法所得结果比较结果差异; 通过霞日森登HPLC指纹图谱及运用聚类分析、主成分分析等化学识别模式对11批霞日森登药材质量进行评价。结果: 建立了QAMS, 内参物二氢杨梅素与没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素和花旗松素的相对校正因子分别为1.569、1.435、1.426、1.467、0.794(杨梅素为0.489, 因偏离大去除), 且11批霞日森登样品3种方法测定结果无显著差异; 获得指纹图谱及共有模式, 经过聚类分析和主成分分析得出不同产地的11批霞日森登可聚为4类。结论: 通过建立的指纹图谱和QAMS能精准测定霞日森登中Q-Marker的含量, 可用于霞日森登的质量评价, 为评估霞日森登的质量提供了更为科学与全面的基础依据。

关键词: 霞日森登; 质量标志物; 化学识别模式; 聚类分析; 主成分分析; 相对校正因子

中图分类号: R932 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)04-0404-10

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.04.006

Evaluation of Quality Markers of *Xanthocerassorbifolia* Combined With Chemical Pattern Recognition

Yang Yang¹, Li Zhen^{1*}, Qiao Xiangdong², Bao Tana¹, Qiao Ke¹, Xu Mengjie^{3*} (1. Ordos Center for Inspecting & Testing, Ordos 017010, China; 2. Ordos Central Hospital, Ordos 017000, China; 3. Ordos Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ordos 017004, China)

Abstract Objective: To establish a quantitative analysis method of *Xanthocerassorbifolia* based on quality marker (Q-Marker), and to analyze the quality differences of *X.sorbifolia* from different origins by combining with chemical pattern recognition. **Methods:** An HPLC method was developed for the determination of seven quality markers, including myricetin, dihydromyricetin, galliccatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin and flagellin. The results of the three methods were compared: quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS), external standard method (ESM) and standard curve method. The HPLC fingerprint of *X.sorbifolia* was obtained, and the quality of 11 batches of *X.sorbifolia* was evaluated by chemical pattern

基金项目: 内蒙古自然科学基金(编号 2021MS02021); 鄂尔多斯市应用技术与开发科技计划项目《基于抗风湿作用的蒙药材霞日森登拆分组分筛选研究》(编号 2019-501)

作者简介: 杨洋 Tel: (0477) 8580563; E-mail: yangyangsea@126.com

通信作者: 李珍 Tel: (0477) 8580563; E-mail: 308965957@qq.com

徐萌杰 Tel: 18247761910; E-mail: 315092667@qq.com

recognition such as cluster analysis and principal component analysis (PCA). **Results:** The relative correction factors (RCF) of six components were calculated and the contents were calculated by QAMS. The RCF of galliccatechin, catechin, epicatechin, epigallocatechin and dihydromyricetin were 1.569, 1.435, 1.426, 1.467 and 0.794 (myricetin was 0.489, removed due to large deviation), respectively. The contents of six components showed no significant difference among the three methods in 11 batches of *X.sorbifolia* samples. The HPLC fingerprints and common patterns were obtained, and the cluster analysis and principal component analysis showed that 11 batches of *X.sorbifolia* from different origins could be clustered into four groups. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint and QAMS can accurately determine the content of Q-Markers in *X.sorbifolia*. It provides a more scientific and comprehensive basis for the quality control of *X.sorbifolia*, which can be used to evaluate the quality of *X.sorbifolia*.

Keywords: *X.sorbifolia*; Q-Marker; chemical pattern recognition; cluster analysis; PCA; RCF

蒙药材霞日森登为无患子科植物霞日森登 (*Xanthocerasorbifolia* Bunge) 的干燥茎干或枝条, 是蒙、藏医常用的药材。其味甘、涩、微苦、动、凉、燥, 具有协日乌素、消肿、清热及止痛之功效^[1]。霞日森登中含有大量的黄酮类物质, 以单方或者复方的形式被广泛应用于风湿性关节炎、皮肤风湿病、痢疾和夜遗尿等疾病的治疗^[2-5]。

中蒙药材多数为植物药, 受不同生长环境影响, 各自所含的有效成分有较大不同。中蒙医药讲究药材的道地性, 天然药物的质量差异与生态环境因素密不可分。现阶段多数中药材主要为人工栽培, 而研究发现, 人工种植无法保障植物所需地理环境、气候条件、土质矿物质及土层微生物菌群等生长条件, 影响植被生长, 导致人工种植的中药材从源头上药效就难以保障^[6]。因受品种、产地和加工采收等固有因素以及炮制和配伍应用等习惯用法方面的影响, 中蒙药质量控制成为制约中蒙医药产业现代化发展的关键因素^[7]。中药质量标志物 (Quality Marker, Q-Marker) 是可以对药材或制剂进行质量控制的一种或多种化学成分, 是能够反映其安全性和有效性的标志性成分^[8], 为中蒙药材的质量控制提供了新的思路。模式识别是化学计量学的重要组成部分, 也是筛选中药质量标志物的关键方法, 常用的化学模式识别技术有主成分分析和聚类分析^[9]。

本研究以霞日森登为研究对象, 通过高效液相指纹图谱对霞日森登主要化学成分进行宏观整体表征, 采用化学模式识别技术对指纹图谱中提取的共有峰进行整合分析, 得到影响不同产地质量的特征化学成分并进行含量测定, 从而建立霞日森登

Q-Marker, 以期为霞日森登的质量标准研究和资源开发利用提供参考。

1 仪器与试药

岛津LC-2030C 3D Plus高效液相色谱仪 (日本), 梅特勒型电子天平AL201-IC[梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司], 舒美KQ5200DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), 双列六孔电热恒温水浴锅 (天津市泰斯仪器有限公司)。

本研究所用的对照品分别为没食子儿茶素对照品 (批号M27FB114096, 纯度 $\geq 98\%$)、表没食子儿茶素对照品 (批号K22N9R75650, 纯度 $\geq 98\%$)、杨梅素对照品 (批号YM0311YA13, 纯度 $\geq 98\%$) 和二氢杨梅素对照品 (批号Y26D10K106736, 纯度 $\geq 98\%$), 均来源于上海源叶生物科技有限公司; 表儿茶素对照品 (批号110878-201703, 含量以99.7%计)、儿茶素对照品 (批号110877-202005, 含量以95.1%计)、花旗松素对照品 (批号110816-201102, 含量以98.9%计), 均来源于中国食品药品检定研究院。乙腈 (赛默飞世尔科技中国有限公司)、磷酸 (天津市风船化学试剂科技有限公司) 为色谱纯, 水为UPR-I-40L/UPHW-II-90T组合型超纯水机 (四川优普超纯科技有限公司) 制备的超纯水, 其余所用试剂均为分析纯。

霞日森登来源、收集时间或批号见表1。编号依次为S1~S11。上述样品由内蒙古民族大学蒙医药学院拉喜那木吉拉教授和鄂尔多斯市检验检测中心药品检验室主任中药师丁华共同鉴定, 均为正确的品种。

表 1 11 批霞日森登药材样品来源信息

样品编号	来源	批号	购买厂家或采集时间
S1	内蒙古阿拉善（购买）	A21041701	内蒙古阿如蒙药有限责任公司
S2	内蒙古阿拉善（购买）	A21041702	内蒙古阿如蒙药有限责任公司
S3	河北安国市（购买）	C21062103	安国润德药业有限公司
S4	河北安国市（购买）	C20112813	安国润德药业有限公司
S5	内蒙古鄂尔多斯市（自采）	E18032501	2018.03.25
S6	内蒙古鄂尔多斯市（自采）	E21082201	2021.08.22
S7	内蒙古鄂尔多斯市（自采）	E20031601	2020.03.16
S8	内蒙古通辽市（自采）	T21070802	2021.07.08
S9	内蒙古通辽市（自采）	T21070803	2021.07.08
S10	内蒙古通辽市（自采）	T21090902	2021.09.09
S11	内蒙古通辽市（自采）	T21090903	2021.09.09

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱型号为Agilent 5 TC-C₁₈，规格为250 mm × 4.6 mm，P/N为518925-902。流动相：乙腈（A）-0.1%磷酸溶液（B）；梯度洗脱：0~15 min，5%A~12%A；15~25 min，12%A~18%A；25~40 min，18%A~35%A；40~45 min，35%A；45~52 min，5%A；流速：1.0 mL·min⁻¹；柱温：30℃，检测波长：210 nm，进样量：10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备

分别精密称取没食子儿茶素、表没食子儿茶素、杨梅素、二氢杨梅素、表儿茶素、儿茶素、花旗松素对照品适量，加甲醇制成浓度依次为72.4、68.8、107.2、89.6、69.6、106.8、99.6 mg·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取霞日森登药材粉末（过40目筛）约0.5 g，精密称定质量。精密加入100 mL 75%乙醇溶液和1 mL稀盐酸，称定质量，加热回流30 min，冷却至室温后再次称定质量。用75%乙醇溶液补足减失的重量，摇匀，过滤，取续滤液，过0.45 μm微孔滤膜，即得。

2.3 方法学考察

二氢杨梅素价格适中较好获得，在高效液相色谱图中，峰形良好，峰面积较大表示其含量较高。在共有峰相对保留时间和相对峰面积的计算过程中，其保留时间适中，故将其作为参考峰。

2.3.1 精密度试验

取霞日森登样品（批号E20031601）1份，约0.5 g，精密称取，按“2.2.2”项下制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，连续进样6次，记录色谱峰，以二氢杨梅素为参照峰，计算每个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、杨梅素以及花旗松素成分相对保留时间的RSD依次为0.18%、0.06%、0.05%、0.05%、0.06%和0.09%，相对峰面积的RSD依次为0.54%、0.28%、0.46%、0.24%、0.57%和0.31%，且其他共有峰相对峰面积的RSD值均小于3%，说明仪器的精密度良好。

2.3.2 稳定性试验

精密吸取供试品溶液（批号E20031601）2 μL，分别于0、2、4、8、12、24 h进样，测定峰面积，以二氢杨梅素为参照峰，计算每个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD，数据结果显示，没

食子儿茶素在8 h时峰相对保留时间和相对峰面积RSD均大于3%，其余成分在24 h内相对保留时间和相对峰面积RSD均小于3%，综合考虑可认为供试品溶液在8 h内稳定。

2.3.3 重复性试验

取霞日森登样品（批号E20031601）6份，各约0.5 g，精密称取，按“2.2.2”项制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，连续进样6次，记录色谱峰，以二氢杨梅素为参照峰，计算每个共有峰的相对保留时间和相对峰面积的RSD。结果没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、杨梅素以及花旗松素成分相对保留时间的RSD依次为0.13%、0.07%、0.00%、0.05%、0.10%和0.11%，相对峰面积的RSD依次为0.92%、0.81%、1.90%、1.18%、1.38%和0.41%，且其他共有峰相对保留时间和相对峰面积的RSD值均小于3%，说明方法的重复性良好。

2.3.4 指纹图谱及相似度评价

分别取11批霞日森登样品，按“2.2.2”项制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，记录色谱图，采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2004年版A）进行共有峰识别，以色谱峰信息相对丰富的S3号样品的指纹图谱为参照图谱，时间窗设为0.1，采用中位数法，多点校正后进行全峰的匹配，共确立了14个共有峰。综合混合对照保留时间和紫外-可见3D光谱的比对结果，指认了7个成分。其中，峰1为没食子儿茶素，峰2为表没食子儿茶素，峰3为儿茶素，峰5为表儿茶素，峰6为二氢杨梅素，峰12为花旗松素，峰14为杨梅素。结果显示，11批样品指纹图谱与对照图谱（R）相似度分别为0.999、0.999、1.000、0.997、0.943、0.874、0.952、0.924、0.970、0.933、0.933。相似

度数值介于0.874~1.000之间，表明这11批药材中的黄酮类成分相似度较高，但不同产地样品存在一定的差异，除S4由于采样时间与其他样品间隔太长及储存不当等原因，可能导致某些成分分解进而产生其他成分，使得相似度数据略低，其他内蒙古阿拉善和河北安国的药材相似度较高，范围均在0.997~1.000之间，与内蒙古鄂尔多斯以及通辽的样品差异性较大，通辽市的药品指纹图谱的相似度在0.924~0.970之间，跨度较大，说明同一产地的样品质量相似，但所含成分仍然存在一定差异。

通过《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》（2004年版A）软件分析形成的11批次霞日森登样品指纹图谱如图1所示，分析形成的对照指纹图谱如图2所示。混合对照品的HPLC图谱如图3所示。

2.4 化学识别模式研究

2.4.1 聚类分析

以7个指认共有峰含量测定结果中的“百分比含量”为变量，以夹角余弦为距离，采用SPSS 16.0统计软件对来自不同产地的11批霞日森登样品进行系统聚类分析，结果如图4所示。由图4可知，若以距离5为判别条件时，11批霞日森登药材可大致分为4类，其中编号S5~S7的样品聚为Ⅰ类，编号S8、S10、S11的样品聚为Ⅱ类，编号S9的样品聚为Ⅲ类，编号S1~S4的样品聚为Ⅳ类。该结果基本呈现出产地以及采收时间的规律性：编号S5~S7的霞日森登药材来自内蒙古鄂尔多斯，S6采收时间较S5、S7晚；S8~S11的霞日森登药材来自内蒙古通辽，S10、S11采收时间较晚；S1~S2和S3~S4的霞日森登样品相似度较高，分别来自于内蒙古阿拉善和河北安国，表明不同产地的霞日森登药材具有一定差异性的同时也具有一定的相似性，这与相似度评价的结果基本一致。

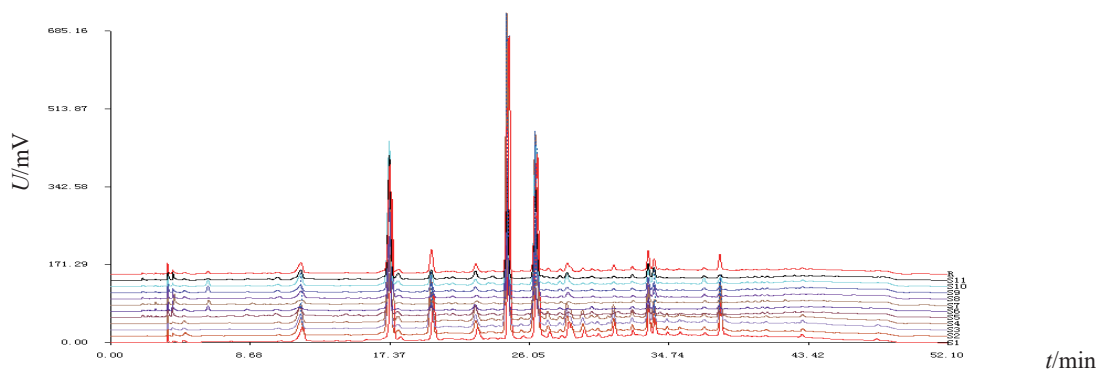
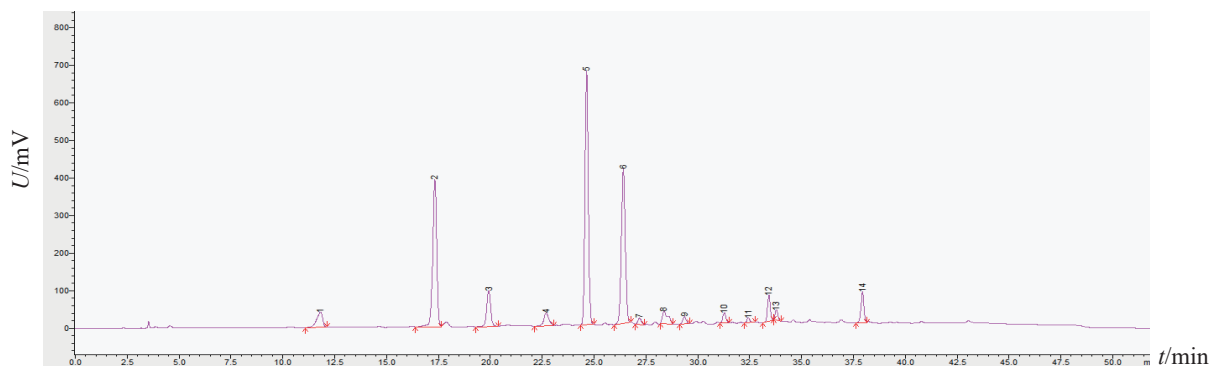
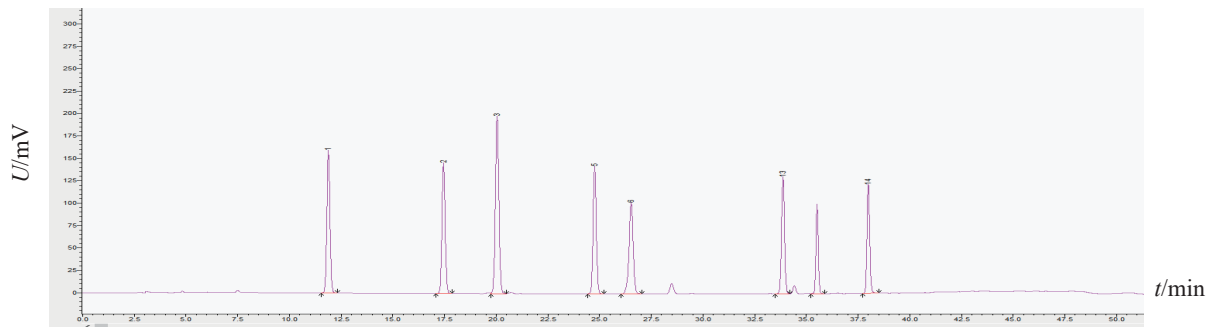


图1 11批霞日森登样品指纹图谱



1. 没食子儿茶素; 2. 表没食子儿茶素; 3. 儿茶素; 5. 表儿茶素; 6. 二氢杨梅素; 12. 花旗松素; 14. 杨梅素。

图 2 对照指纹图谱



1. 没食子儿茶素; 2. 表没食子儿茶素; 3. 儿茶素; 5. 表儿茶素; 6. 二氢杨梅素; 12. 花旗松素; 14. 杨梅素。

图 3 混合对照品 HPLC 图

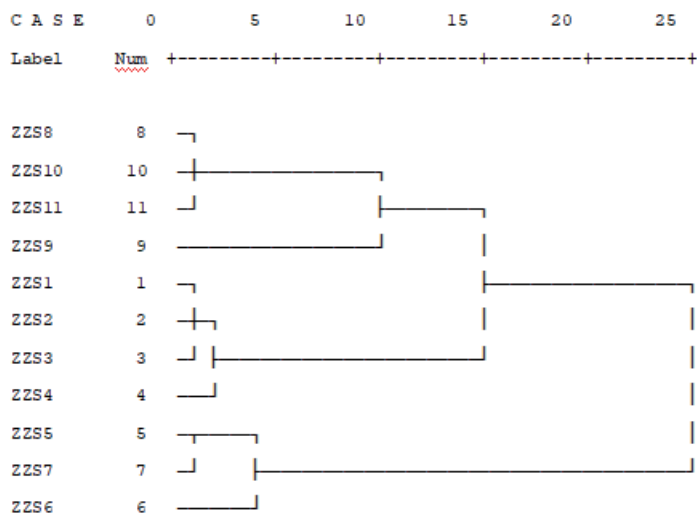


图 4 11 批霞日森登药材的聚类分析图

2.4.2 主成分分析

将11批霞日森登样品7个指认共有峰含量测定结果中的“峰面积”导入SPSS 16.0统计软件中，数据标准化后进行主成分分析，依据分析之后得到的各主成分对应的特征值排序，排在前3位的即认为是主成分，它们的累积贡献率高达99.24%，包括了大部分信息。其中前3个主成分特征值分别为

6.476、0.347、0.124，方差贡献率分别为92.51%、4.96%、1.78%。分别以其第1~3主成分建立坐标系，如图5所示，图中的点与样品相对应。由图5可知，霞日森登药材大致可分为4类：其中编号S5~S7的样品聚为Ⅰ类，编号S8~S11的样品聚为Ⅱ类，编号S3~S4的样品聚为Ⅲ类，编号S1~S2的样品聚为Ⅳ类。该分类情况与霞日森登的产地分布

吻合度较高：编号S5~S7的霞日森登药材来自内蒙古鄂尔多斯，S8~S11的霞日森登药材来自内蒙古通辽，S1~S2和S3~S4的霞日森登样品分别来自内蒙古阿拉善和河北安国。该结果与聚类分析存在微弱的差异，是由于采用不同的化学计量模式进行数据处理造成的。

2.5 QAMS定量分析

2.5.1 液相色谱条件以及制备

方法与“2.1”“2.2.1”“2.2.2”项下方法相同。

2.5.2 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品适量，配制成如下的系列浓度混合液，2.5、5、10、20、30、40、80 mg·L⁻¹，吸取混合溶液10 μL，进样2次，记录色谱图，以进样质量为横坐标（X），峰面积平均积分值为纵坐标（Y），得混合对照品的回归方程。结果表明：霞日森登中的没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、二氢杨梅素、花旗松素以及杨梅素的进样量分别在一定浓度范围呈现良好的线性关系，见表2。

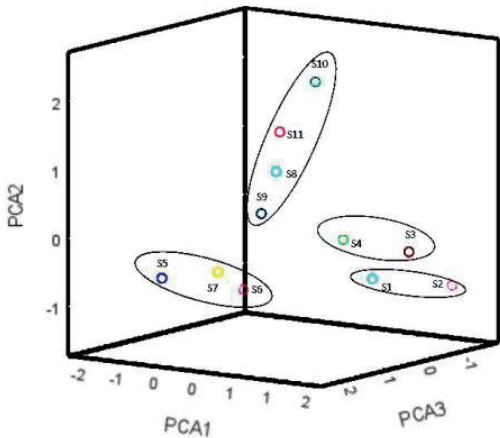


图5 主成分 3D 得分图

表 2 药材中 7 种成分的线性考察

成分	回归方程	R ²	线性范围/ng
没食子儿茶素	Y=0.0009X-28.67	0.9999	181~5792
表没食子儿茶素	Y=0.0009X-16.71	0.9999	172~5504
儿茶素	Y=0.001X-82.172	0.9997	267~8544
表儿茶素	Y=0.001X-44.227	0.9998	174~5568
二氢杨梅素	Y=0.0013X-43.641	0.9999	224~7168
花旗松素	Y=0.0015X-31.81	0.9999	249~7968
杨梅素	Y=0.0016X+51.574	0.9993	268~8576

2.5.3 精密度试验

精密吸取“2.5.2”项下20 mg·L⁻¹混合对照溶液10 μL，进样6次，记录色谱图，结果没食子酸儿茶素、儿茶素、表儿茶素、二氢杨梅素、花旗松素以及杨梅素峰面积的RSD值均小于1.0%，说明仪器的精密度良好。

2.5.4 稳定性试验

取同一批（批号E20031601）霞日森登样品1

份，室温下，分别于0、2、4、8、12、24 h进样，测定峰面积。结果显示，没食子儿茶素在24 h内的峰面积RSD值小于6%，在8 h内的峰面积的RSD值变化在4%以内；其余各成分在24 h内的峰面积RSD值均小于2%。将7种黄酮类成分作为整体考虑，认为供试品溶液在8 h内稳定性良好。

2.5.5 重复性试验

取同一批霞日森登样品（批号E20031601）6

份, 每份约0.5 g, 精密称取, 按供试品溶液方法制备, 按色谱条件测定, 结果没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、二氢杨梅素、花旗松素以及杨梅素峰面积的RSD值依次为0.64%、1.27%、0.87%、1.16%、1.46%、0.88%、1.24% ($n=6$), 说明方法的重复性良好。

2.5.6 加样回收试验

取已知含量的霞日森登(批号E20031601)粉末, 共称取9份, 每份约0.5 g, 精密称取, 置锥形瓶中, 低、中、高浓度各3份, 按对照品为供试品相应成分含量的75%、100%和125%, 分别加入各对照品, 用75%乙醇溶液定容至100 mL, 按“2.2.2”项制备供试品溶液, 按“2.1”项下方法进行测定, 依据测定的峰面积, 计算回收率。结果显示, 没食子儿茶素、表没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、二氢杨梅素、花旗松素

以及杨梅素的平均加样回收率分别为100.23%、99.11%、100.93%、98.44%、100.64%、101.11%、102.77%, RSD值分别为0.66%、1.47%、0.91%、1.16%、1.11%、0.59%、1.39% ($n=9$), 表明此测定方法准确度良好。

2.5.7 相对校正因子(f)的测定

吸取同一混合对照品溶液, 分别进样1、2、4、6、8 μL , 按“2.1”项下色谱条件平行进样6次, 记录7种成分色谱峰的面积。以二氢杨梅素为内参物, 按公式 $f_{s/j}=f_s f_j=(C_s \times A_j)/(A_s \times C_j)$ (式中 $f_{s/j}$ 为内参物s对待测成分j的校正因子, A_s 为内参物对照品s峰面积, C_s 为内参物对照品s的浓度, A_j 为某待测成分对照品j峰面积, C_j 为某待测成分对照品j的浓度)分别计算不同的进样体积下其他6种化学成分的 f 及RSD, 得到校正因子的平均值作为相对校正因子 f (表3)。

表3 各成分的相对校正因子

进样体积/ μL	f					
	二氢杨梅素/没食子儿茶素	二氢杨梅素/儿茶素	二氢杨梅素/表儿茶素	二氢杨梅素/表没食子儿茶素	二氢杨梅素/花旗松素	二氢杨梅素/杨梅素
1	1.513	1.401	1.379	1.391	0.772	0.481
2	1.541	1.414	1.404	1.427	0.779	0.485
4	1.580	1.443	1.435	1.477	0.794	0.489
6	1.600	1.456	1.451	1.520	0.806	0.494
8	1.610	1.462	1.460	1.522	0.818	0.495
平均值	1.569	1.435	1.426	1.467	0.794	0.489
RSD/%	2.61	1.85	2.35	3.94	2.38	1.23

a) 不同色谱柱对 f 的影响: 本试验考察了不同色谱柱对各成分 f 的影响, 结果显示, 色谱柱型号为Agilent 5 TC- C_{18} , 规格为250 mm $\times$ 4.6 mm; Tnater C_{18} , 规格为250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm ; Shim-pack GIST, 规格为250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μm 测得的 f 非常接近, RSD在4%以内偏差较小, 显示不同色谱柱对各组分 f 的影响不显著。

b) 不同温度对 f 的影响: 本试验考察了3种柱温(依次为25、30、35 $^{\circ}\text{C}$)下各 f 的变化, 结果显示, 各 f 的RSD都小于2%, 表明温度的变化对各组分的 f 无显著的影响。

2.4.8 QAMS、ESM及标准曲线法的测定结果分析

依次称取11批次霞日森登样品, 按“2.2”项制备样品溶液, 按“2.1”项下条件进行测定, 采用外标法(External Standard Method, ESM)、一测多评法(Quantitative Analysis of Multi-components by Single, QAMS)[按照公式 $C_j=(C_s \times A_j)/(A_s \times f_{s/j})$ 进行计算, 式中 $f_{s/j}$ 为内参物s对待测成分j的校正因子, A_s 为内参物对照品s峰面积, C_s 为内参物对照品s的浓度, A_j 为某待测成分对照品j峰面积, C_j 为某待测成分对照品j的浓度]及标准曲线法分别对霞日森登中的7种成分含量进行测定, 除杨梅素外, 其余6种成分的3种方法测定结果基本一致, 如表4所示。

表 4 11 批次雷日森登药材中 6 种成分的含量测定结果

样品批号	没食子儿茶素				儿茶素				表儿茶素			
	标准曲线法	QAMS/ (mg · g ⁻¹)	ESM/ (mg · g ⁻¹)	RSD/%	标准曲线法	QAMS/ (mg · g ⁻¹)	ESM/ (mg · g ⁻¹)	RSD/%	标准曲线法	QAMS/ (mg · g ⁻¹)	ESM/ (mg · g ⁻¹)	RSD/%
S1	1.17	1.17	1.17	0.00	2.99	2.98	2.97	0.34	14.17	14.18	14.17	0.04
S2	1.10	1.09	1.10	0.53	2.85	2.81	2.84	0.73	13.99	13.97	13.97	0.08
S3	0.98	0.98	0.98	0.00	2.37	2.34	2.36	0.65	13.97	14.11	13.95	0.62
S4	1.43	1.42	1.43	0.40	2.61	2.62	2.61	0.22	15.66	15.62	15.66	0.15
S5	0.43	0.43	0.44	1.33	0.58	0.59	0.58	0.99	4.43	4.45	4.43	0.26
S6	0.19	0.18	0.18	3.15	0.36	0.37	0.36	1.59	3.60	3.65	3.61	0.73
S7	0.21	0.22	0.22	2.66	0.31	0.32	0.31	1.84	3.12	3.14	3.12	0.37
S8	0.51	0.50	0.50	1.15	0.42	0.43	0.42	1.36	3.54	3.52	3.54	0.33
S9	0.38	0.37	0.37	1.55	0.54	0.55	0.53	1.85	4.55	4.54	4.56	0.22
S10	0.78	0.77	0.77	0.75	0.77	0.79	0.77	1.49	5.82	5.82	5.85	0.30
S11	0.47	0.47	0.47	0.00	0.56	0.58	0.56	2.04	5.04	5.05	5.04	0.11

样品批号	表没食子儿茶素				花旗松素				杨梅素			
	标准曲线法	QAMS/ (mg · g ⁻¹)	ESM/ (mg · g ⁻¹)	RSD/%	标准曲线法	QAMS/ (mg · g ⁻¹)	ESM/ (mg · g ⁻¹)	RSD/%	标准曲线法	QAMS/ (mg · g ⁻¹)	ESM/ (mg · g ⁻¹)	RSD/%
S1	8.10	8.09	8.11	0.12	1.23	1.20	1.23	1.42	3.19	4.41	3.18	19.68
S2	7.64	7.63	7.65	0.13	1.31	1.28	1.31	1.33	3.45	4.83	3.48	20.11
S3	7.11	7.04	7.10	0.53	1.45	1.42	1.45	1.20	2.85	3.95	2.85	19.74
S4	10.08	10.09	10.07	0.10	1.26	1.24	1.27	1.22	3.49	4.83	3.48	19.74
S5	3.61	3.66	3.61	0.80	0.34	0.33	0.34	1.71	0.00	0.00	0.00	/
S6	1.98	1.99	1.98	0.29	0.28	0.27	0.28	2.09	0.36	0.43	0.31	16.44
S7	2.43	2.46	2.41	1.03	0.23	0.22	0.22	2.59	0.00	0.00	0.00	/
S8	4.95	5.03	4.94	0.99	0.79	0.78	0.80	1.27	0.24	0.31	0.23	16.76
S9	4.31	4.30	4.32	0.23	0.54	0.53	0.54	1.08	0.18	0.24	0.18	17.32
S10	7.94	7.90	7.95	0.33	1.11	1.08	1.11	1.57	0.51	0.73	0.53	20.62
S11	6.92	6.95	6.93	0.22	0.86	0.84	0.86	1.35	0.26	0.35	0.25	19.21

由表4可知,采用QAMS和ESM测定的霞日森登中没食子儿茶素含量的RSD为0.00%~3.15%,儿茶素含量的RSD为0.22%~2.04%,表儿茶素含量的RSD为0.04%~0.73%,表没食子儿茶素含量的RSD为0.10%~1.03%,花旗松素含量的RSD为1.08%~2.59%,均在3%以内。而杨梅素含量的RSD为16.44%~20.62%,数据之间相差甚远。以二氢杨梅素为内参物,实现对霞日森登药材中没食子儿茶素、儿茶素、表儿茶素、表没食子儿茶素以及花旗松素成分的一测多评;而有效成分杨梅素因不同方法测定结果相差大不可用QAMS计算。对3种方法进行比对发现,含量结果测定的RSD在4%以内,说明方法之间结果基本一致。

3 讨论

中药Q-Marker可作为反映中药安全性和有效性的标示性物质对中药质量进行控制。本研究首次将中药Q-Marker的概念应用于蒙药材霞日森登,以期建立霞日森登全程质量控制及质量溯源体系。霞日森登为蒙医专属药材,在内蒙古分布广泛,除野生之外还集约化种植用于蒙药材生产加工,通辽和鄂尔多斯均有霞日森登种植园。霞日森登中主要的化学成分包括黄酮类等,在药理活性方面具有抗炎等作用。药材的道地性(地域、地理因素)、个体、品系、年龄、采样部位、采样时期和样品贮存时间等差异因素对黄酮类成分合成积累产生影响。本试验所选研究成分为没食子儿茶素、表没食子儿茶素、杨梅素、二氢杨梅素、表儿茶素、儿茶素和花旗松素,均属于黄酮类化合物。

中蒙药材、饮片及提取物的含量测定是中蒙药质量的重要指标,但是中蒙药材中含有的化学成分众多,任何单一成分都难以准确表达其整体质量,所以含量可以采用指标性成分或药效成分的个别代表进行标识。QAMS可根据中药有效成分内在的函数关系和比例关系,通过测定一个成分含量后实现多个成分的同步测定^[10-12]。多指标综合质量控制模式相比单一的外标法测定更加全面和快速,能满足快速检测的需求,是中蒙药质量评价的发展趋势^[13-15]。

为了准确评价和控制药材有效性,应重点针对Q-Marker进行研究分析^[16-17]。依据Q-Marker的研究策略^[6],通过文献对霞日森登的Q-Marker进行前期分析,综合考虑霞日森登的主要有效成分及化

学可测性,初步筛选出芦丁、槲皮素、没食子儿茶素、表没食子儿茶素、杨梅素、二氢杨梅素、表儿茶素、儿茶素、花旗松素9种作为指标成分,但通过含量测定,所有批次霞日森登样品中均未能检测出芦丁,而槲皮素的检测波长为360 nm,无法与其他化学物质在同一检测波长下测定,因此,暂时不将芦丁和槲皮素列为Q-Marker的考察范围。将其余7种指标成分作为Q-Marker建立QAMS含量测定方法,并通过霞日森登指纹图谱运用聚类分析和主成分分析对不同产地霞日森登进行综合分析,建立以Q-Marker为导向的霞日森登药材的质量评价体系。

选择二氢杨梅素作为内参物,该成分不仅普遍存在于各地的霞日森登药材中,而且化学性质稳定、易于获得,各成分 f 的RSD均小于4%,较为稳定。另外,分别考察了不同柱温、不同体积流量和不同色谱柱对 f 的影响,结果显示RSD均小于4%,说明选择二氢杨梅素作为内参物建立的QAMS方法可行。本研究拟采用QAMS同时测定没食子儿茶素、表没食子儿茶素、杨梅素、二氢杨梅素、表儿茶素、儿茶素、花旗松素7种成分的含量,但从测定结果中发现不同批次霞日森登样品中杨梅素含量测定结果的RSD值较大,测定结果存在较大误差。分析其可能影响含量准确性的因素为不同类型化合物的化学性质与紫外吸收特征具有较大差别,且系统适应性试验中杨梅素线性范围较宽。因此,杨梅素的含量测定不适用于以二氢杨梅素作为内参物的QAMS,本研究最终建立了同时测定霞日森登药材中没食子儿茶素、表没食子儿茶素、二氢杨梅素、表儿茶素、儿茶素和花旗松素6种指标成分的QAMS方法,11批次的QAMS结果与ESM实测值无显著差异且方法精密度、重复性和稳定性良好,研究结果表明没食子儿茶素、表没食子儿茶素、杨梅素、二氢杨梅素、表儿茶素、儿茶素和花旗松素在不同产地的霞日森登中均稳定存在且含量相对较高,具有明确的化学结构和生物活性,是霞日森登可能的药效物质基础,反映出质量标志物的有效性、特有性和可测性,证明了QAMS应用在霞日森登的质量评价中的可行性。

为了更好地分析所测样品中各成分含量的规律和不同产地间药材的差异,本试验采用HPLC法建立了不同产地霞日森登的指纹图谱,相似度均在

0.874以上,表明这11批霞日森登药材的质量相对稳定;采用 SPSS 16.0软件进行聚类分析和主成分分析,结果显示不同产地的霞日森登可聚为4类,内蒙古自治区阿拉善产的霞日森登成分含量与河北产地类似,而与其他内蒙产地存在差异,提示霞日森登成分既与生长环境又与采收时间相关。

综上所述,本研究建立了11批次不同产地霞日森登药材6种 Q-Marker 的 HPLC QAMS 含量测定方法,有助于建立更全面的质量控制体系,提高霞日森登药材的质量水平,为后期深入研究其作用机制提供参考。

参考文献:

- [1] 蒙古学百科全书编辑委员会医学编辑委员会. 蒙古学百科全书·医学卷(蒙古文)[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 2002: 606.
- [2] 杨倩, 王晓琴, 丁艳霞. 文冠木化学成分的研究[J]. 中成药, 2020, 42(8): 2062-2066.
- [3] 其日格, 韩晓静, 布和巴特尔, 等. 蒙、藏药研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报, 2021, 36(1): 89-92.
- [4] 苏日塔拉图, 于佳琦, 王曦华, 等. HPLC-DAD法同时测定蒙药森登-4汤散中7种抗风湿活性成分的含量[J]. 中国药房, 2019, 30(2): 221-225.
- [5] 路撞, 王侠, 李佳鸿, 等. UPLC-QTOF-MS法同时测定春季文冠果叶中11种黄酮类化合物的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2021, 38(2): 147-154.
- [6] 薛蓉, 张倩, 陈鹏, 等. 中药饮片质量标志物(Q-Marker)研究策略[J]. 中草药, 2022, 53(5): 1285-1293.
- [7] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [8] 侯小涛, 郝二伟, 秦健峰, 等. 肉桂的化学成分、药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药, 2018, 49(1): 20-34.
- [9] 久欣, 张慧文, 刘宏, 等. 化学计量学方法在中药质量标志物中的应用[J]. 中成药, 2021, 43(12): 3416-3421.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 李珍, 杨洋, 徐萌杰, 等. 指纹图谱结合一测多评法评价文冠木药材的质量[J]. 中国药房, 2022, 33(18): 2245-2249.
- [13] 郭龙, 薛紫鲸, 刘爱朋, 等. 基于一测多评法的丹参酮提取物质量控制[J]. 中国现代中药, 2019, 21(3): 357-364.
- [14] Li SP, Zhao J, Yang B. Strategies for Quality Control of Chinese Medicines [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 55(4): 802-809.
- [15] Jiang Y, David B, Tu PF, et al. Recent Analytical Approaches in Quality Control of Traditional Chinese Medicines: A review [J]. Anal Chim Acta, 2010, 657(1): 9-18.
- [16] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [17] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径[J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.

(收稿日期 2022年5月31日 编辑 李亚微)