

一测多评法同时测定一枝黄花中 9 个有效成分含量

杨群¹, 肖文涛^{1*}, 刘德鸿^{2*}

(1. 九江市检验检测认证中心, 九江 332000; 2. 江西省药品检验检测研究院 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029)

摘要 目的: 建立一测多评法同时测定一枝黄花中酚酸类及黄酮类共 9 个成分(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-O-二咖啡酰奎宁酸)的含量。方法: 采用超高效液相色谱法, 采用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.3 mL · min⁻¹, 检测波长 327 nm, 柱温 30 °C, 进样量 1 μL。酚酸类成分以绿原酸为内标, 黄酮类成分以芦丁为内标, 采用多点校正法, 分别建立新绿原酸、隐绿原酸、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸和异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷的相对校正因子, 并计算其含量。测定结果与外标法结果进行比较, 验证其准确性。结果: 9 个成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.9995$); 平均加样回收率分别为 98.2%~101.7%, RSD 分别为 1.0%~1.7%。9 批样品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸和 4,5-O-二咖啡酰奎宁酸的含量范围分别为 0.008%~0.014%、0.055%~0.097%、0.010%~0.019%、0.191%~0.412%、0.018%~0.035%、0.116%~0.250%、0.028%~0.048%、0.111%~0.235%、0.113%~0.182%。一测多评法测定结果与外标法结果一致(相对平均偏差 < 2.8%)。结论: 该方法简便、准确, 重复性好, 可用于一枝黄花药材的质量控制。
关键词: 一枝黄花; 酚酸; 黄酮; 绿原酸; 咖啡酰奎宁酸; 芦丁; 异槲皮苷; 山柰酚-3-O-芸香糖苷; 含量测定; 超高效液相色谱; 一测多评

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)07-1186-09
doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0386

Simultaneous determination of nine effective components in *Solidaginis Herba* by QAMS

YANG Qun¹, XIAO Wen-tao^{1*}, LIU De-hong^{2*}

(1. Jiujiang Inspection, Testing and Certification Center, Jiujiang 332000, China; 2. Jiangxi Institute for Drug Control, National Medical Products Administration Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine, Jiangxi Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China)

Abstract Objective: To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) method for the simultaneous determination of nine effective components including phenolic acids and flavonoids (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutoside, isoquercitrin, kaempferol-3-O-rutinoside, 3,4-O-dicaffeoylquinic acid, 3,5-O-dicaffeoylquinic acid, 4,5-O-dicaffeoylquinic acid), in

* 通信作者 肖文涛 Tel:13979249277; E-mail:361321615@qq.com
刘德鸿 Tel:(0791)88158716; E-mail:479193106@qq.com
第一作者 Tel:13879238787; E-mail:127913662@qq.com

Solidaginis Herba. **Methods:** Ultra - high performance liquid chromatography was developed on an ACQUITY UPLC® HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column with acetonitrile (A) - 0.1% phosphoric acid solution (B) as mobile phase in gradient elution. The flow rate was 0.3 mL · min⁻¹, the detection wavelength was 327 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 1 μL. Chlorogenic acid and rutoside were chosen as the internal standards for phenolic acids and flavonoids respectively to establish the determine correction factors of neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 3,4 - O - dicaffeoylquinic acid, 3,5 - O - dicaffeoylquinic acid, 4,5 - O - dicaffeoylquinic acid isoquercitrin and kaemperol - 3 - O - rutoside, respectively, by multi - point correction method and their contents were calculated. The results were compared with the results of external standard method to verify their accuracy. **Results:** Nine components showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.9995$), whose average recoveries were 98.2% - 101.7% with the RSDs of 1.0% - 1.7%. The contents of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutoside, isoquercitrin, kaemperol - 3 - O - rutoside, 3,4 - O - dicaffeoylquinic acid, 3,5 - O - dicaffeoylquinic acid and 4,5 - O - dicaffeoylquinic acid, in nine batches of samples were 0.008% - 0.014%, 0.055% - 0.097%, 0.010% - 0.019%, 0.191% - 0.412%, 0.018% - 0.035%, 0.116% - 0.50%, 0.028% - 0.048%, 0.111% - 0.235% and 0.113% - 0.182%. The results obtained by QAMS were consistent with those of external standard method (relative average deviations less than 2.8%). **Conclusion:** The simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Solidaginis Herba.

Keywords: Solidaginis Herba; phenolic acids; flavonoids; chlorogenic acid; caffeoylquinic acids; rutoside; isoquercitrin; kaemperol - 3 - O - rutoside; content determination; UPLC; QAMS

一枝黄花为菊科植物一枝黄花 *Solidago decurrens* Lour. 的干燥全草。收载于 2020 年版《中华人民共和国药典》一部,其性凉,味辛、苦,具有清热解毒、疏散风热之功效。用于喉痹、乳蛾、咽喉肿痛、疮疖肿毒、风热感冒^[1]。多产于我国南方,浙江、福建、江西、四川、贵州、湖南、湖北、广西、贵州、云南等地广为分布。因地域不同,一枝黄花别名很多,如江浙通名金锁钥,福建名百根草,江西又有一支枪、一支箭等名称^[2]。作为民间常用的清热解毒传统中药,一枝黄花组方众多,常用的中成药有复方一枝黄花喷雾剂、鼻宁喷雾剂、姜黄消瘰搽剂、妇平胶囊、穿黄消炎片、肾炎片、感冒炎咳灵片(糖浆)、复方桑菊感冒片、感冒解毒(片)颗粒、清热感冒颗粒、复方野菊感冒颗粒、罗浮山百草油等。现代研究表明,一枝黄花具有抗菌、消炎、利尿、祛痰平喘、抗病毒、抗氧化等多种药理作用。其主要化学成分有黄酮类、苯丙酸类、皂苷类等^[3-6]。大量研究表明以芦丁为代表的黄酮类成分和以绿原酸为代表的酚酸类成分是其药效成分^[7-13]。目前 2020 年版《中华人民共和国药典》一部仅以芦丁单个成分作为含量测定指标,对中药材质量评价具有一定的局限性。已有文献报道的

多成分含量测定研究也仅以 2、3 个代表性成分作为指标^[14-16],且均为外标法(external standard method, ESM),ESM 测定对对照品的需求较大,部分对照品不易得到,检测成本较高,且相对耗时,限制了一枝黄花多指标质量控制的建立和应用推广。

一测多评(quantitative analysis of multi - components by single marker, QAMS)的方法是基于中药同类有效成分间可能存在内在关系和规律性,利用有效成分内在的函数关系和比例关系,通过单一成分来获得多个成分的同步定量结果的中药质量评价方法^[17]。自 2006 年首次提出以来,在中药多指标质量评价方面,得到广泛应用和认可^[18-21],2020 年版《中华人民共和国药典》一部已有丹参、黄连、淫羊藿、银杏叶提取物、银杏叶系列制剂、咳特灵片(胶囊)、宫血宁胶囊、镇脑宁胶囊等 17 个中药材、饮片、中药提取物及制剂采用 QAMS 法控制其质量。目前未见一枝黄花药材的相关研究报道。因此,本研究参考 QAMS 法,酚酸类成分以绿原酸为内标,黄酮类成分以芦丁为内标,同时测定一枝黄花中 9 个成分的含量,以期为进一步完善一枝黄花药材及其制剂的质量评价方法提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1290 Infinity 超高效液相色谱仪 (Agilent 公司, 含 OpenLab CDS 色谱工作站、四元泵、自动进样器和 DAD 检测器); Mettler Toledo ML204 电子天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司, 万分之一); Sartorius BT 25S 电子天平 (赛多利斯科学仪器北京有限公司, 十万分之一); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q Direct 16 纯水系统 (Millipore 公司)。

1.2 试剂、试药与材料

对照品新绿原酸 (批号 240008-202005, 纯度 $\geq 98\%$), 上海鸿永生物科技有限公司; 隐绿原酸 (批号 AF9080321, 纯度 $\geq 98\%$), 成都埃法生物科技有限公司; 3,4-O-二咖啡酰奎宁酸 (批号 3089, 纯度 $\geq 98\%$), 上海诗丹德科技有限公司; 3,5-O-二咖啡酰奎宁酸 (批号 111782-202208, 纯度 95.9%), 4,5-O-二咖啡酰奎宁酸 (批号 111894-202205, 纯度 94.9%), 山柰酚-3-O-芸香糖苷 (批号 112007-202103, 纯度 94.0%), 异槲皮苷 (批号 111809-201804, 纯度 97.2%), 芦丁 (批号 100080-202012, 纯度 91.6%), 绿原酸 (批号 110753-202119, 纯度 96.3%), 中国食品药品检定研究院。

乙腈 (Sigma-Aldrich 公司)、磷酸 (上海麦克林生化科技股份有限公司) 均为色谱纯, 水为 Milli-Q 制备的超纯水, 其余试剂均为分析纯。

9 批一枝黄花药材来源广西、云南、贵州、江西等地, 经江西省药品检验检测研究院陈伟康主任中药师鉴定为菊科植物一枝黄花 *Solidago decurrens* Lour. 的干燥全草。样品编号为 S1~S9。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 精密称取对照品新绿原酸 13.60 mg、绿原酸 15.58 mg、隐绿原酸 31.05 mg、芦丁 65.68 mg、异槲皮苷 16.16 mg、山柰酚-3-O-芸香糖苷 61.29 mg、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸 14.14 mg、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸 61.32 mg、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸对照品 33.28 mg, 分别置 5、5、10、20、5、25、5、20、10 mL 量瓶中, 加 75% 甲醇水使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得质量浓度分别为 2.665 6、3.000 7、3.042 9、3.008 1、3.141 5、2.304 5、2.771 4、2.940 3 和 3.158 3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的单一成分溶液,

即得。

2.1.2 混合对照品溶液 精密吸取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸的对照品储备液适量, 置 25 mL 量瓶中, 加 75% 甲醇水稀释至刻度, 摇匀, 即得上述成分质量浓度分别为 13.328 0、60.014 0、20.326 6、300.810 0、31.415 0、230.450 0、36.915 0、176.418 0 和 157.915 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

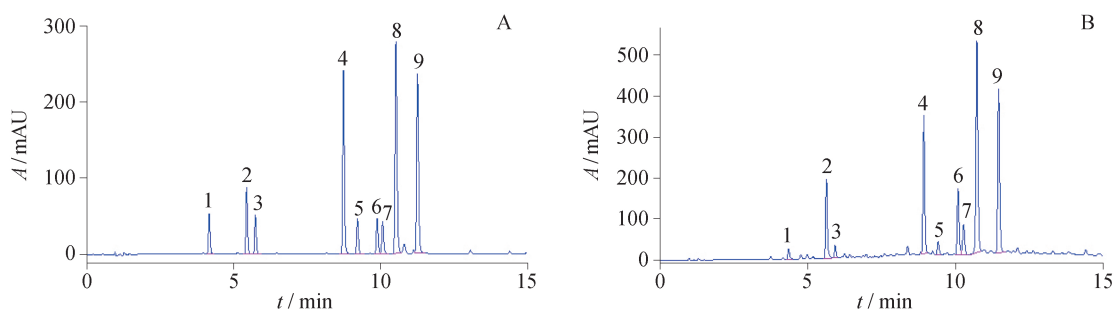
2.1.3 供试品溶液 取一枝黄花粉末 (过 3 号筛) 约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 75% 甲醇水 10 mL, 称量, 超声 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 处理 1 h, 放冷, 用 75% 甲醇水补足减失的量, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件

采用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A)-0.1% 磷酸溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~7 min, 5%A \rightarrow 20%A; 7~15 min, 20%A \rightarrow 30%A), 流速 0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长 327 nm, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 1 μL 。在上述条件下, 一枝黄花中 9 个化学成分峰与相邻峰的分度均 > 1.5 , 结果见图 1。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.1.1”项下新绿原酸对照品储备液 0.025、0.062、0.100、0.125、0.188、0.250、0.125 mL, 绿原酸对照品储备液 0.100、0.250、0.400、0.500、0.750、1.000、0.500 mL, 隐绿原酸对照品储备液 0.033、0.083、0.133、0.167、0.250、0.333、0.167 mL, 芦丁对照品储备液 0.500、1.250、2.000、2.500、3.750、5.000、2.500 mL, 异槲皮苷对照品储备液 0.050、0.125、0.200、0.250、0.375、0.500、0.250 mL, 山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品储备液 0.500、1.250、2.000、2.500、3.750、5.000、2.500 mL, 3,4-O-二咖啡酰奎宁酸对照品储备液 0.067、0.167、0.267、0.333、0.500、0.667、0.333 mL, 3,5-O-二咖啡酰奎宁酸对照品储备液 0.300、0.750、1.200、1.500、2.250、3.000、1.500 mL, 4,5-O-二咖啡酰奎宁酸对照品储备液 0.250、0.625、1.000、1.250、1.875、2.500、1.250 mL, 一一一对应分别置 25、25、25、25、25、25、10 mL 量瓶中, 加 75% 甲醇水稀释至刻度, 摇匀, 即得 7 个浓度点的混合对照品溶液; 分别按“2.2”项下色谱条件进样分析, 以各对照品的质量



1. 新绿原酸 (neochlorogenic acid) 2. 绿原酸 (chlorogenic acid) 3. 隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid) 4. 芦丁 (rutoside) 5. 异槲皮苷 (isoquercitrin) 6. 山柰酚-3-O-芸香糖苷 (kaempferol-3-O-rutinoside) 7. 3,4-O-二咖啡酰奎宁酸 (3,4-O-dicaffeoylquinic acid) 8. 3,5-O-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-O-dicaffeoylquinic acid) 9. 4,5-O-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-O-dicaffeoylquinic acid)

A. 混合对照品溶液 (mixed reference solution) B. 供试品溶液 (sample solution)

图 1 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms

浓度 ($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 相应峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线并进行回归计算, 得 9 个成分的

线性回归方程, 结果见表 1, 可知 9 个成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various components

成分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
新绿原酸 (neochlorogenic acid)	$Y = 7.9131X - 1.2373$	1.000	2.666 ~ 33.320
绿原酸 (chlorogenic acid)	$Y = 9.1372X - 11.8668$	0.9999	12.003 ~ 150.035
隐绿原酸 (cryptochlorogenic acid)	$Y = 6.6684X - 2.0581$	1.000	4.017 ~ 50.816
芦丁 (rutoside)	$Y = 3.6147X + 27.9451$	0.9998	60.162 ~ 752.025
异槲皮苷 (isoquercitrin)	$Y = 4.4577X + 2.2821$	0.9999	6.283 ~ 78.538
山柰酚-3-O-芸香糖苷 (kaempferol-3-O-rutinoside)	$Y = 2.9989X + 23.6141$	0.9996	46.090 ~ 576.125
3,4-O-二咖啡酰奎宁酸 (3,4-O-dicaffeoylquinic acid)	$Y = 8.4821X - 5.6306$	0.9999	7.427 ~ 92.288
3,5-O-二咖啡酰奎宁酸 (3,5-O-dicaffeoylquinic acid)	$Y = 12.0466X - 56.7072$	0.9999	35.284 ~ 441.045
4,5-O-二咖啡酰奎宁酸 (4,5-O-dicaffeoylquinic acid)	$Y = 11.3836X - 48.6126$	0.9999	31.583 ~ 394.788

2.4 精密度试验

精密吸取“2.1.2”项下混合对照品溶液 1 μL , 按“2.2”项下色谱条件连续进样测定 6 次, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸峰面积的 RSD ($n=6$) 为 0.10%~0.42%, 表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批一枝黄花药材 (S9 号样品) 粉末 (过 3 号筛) 6 份, 每份约 1 g, 精密称定, 分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行测定, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、3,4-O-二咖啡酰

奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸的平均含量 ($n=6$) 分别为 0.014%、0.089%、0.018%、0.368%、0.031%、0.230%、0.045%、0.210% 和 0.169%, RSD ($n=6$) 为 0.09%~0.56%, 结果表明该方法重复性良好。

2.6 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液 (S9 号样品) 1 μL , 于溶液制备后 0、1、2、4、8、12、24 h 分别按“2.2”项下色谱条件进样测定, 测得新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸峰面积的 RSD ($n=6$) 为 0.20%~0.82%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 加样回收率试验

精密称取已测知含量的 S9 号一枝黄花药材的粉末(过 3 号筛)6 份,每份约 0.5 g,精密称定,分别精密加入含新绿原酸 $0.0068 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、绿原酸 $0.0456 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、隐绿原酸 $0.0090 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、芦丁 $0.1890 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、异槲皮苷 $0.0170 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、

山柰酚-3-O-芸香糖苷 $0.1218 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸 $0.0237 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸 $0.1066 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸 $0.0868 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液 10 mL,按“2.1.3”项下方法制备供试溶液,并按“2.2”项下色谱条件进样测定,计算回收率,结果见表 2。

表 2 各成分加样回收率试验结果

Tab. 2 Recoveries of various components

成分 (component)	含有量 (original)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
新绿原酸(neochlorogenic acid)	0.070 2	0.068 0	0.137 1	98.4	100.5	1.5
	0.070 3	0.068 0	0.139 8	102.2		
	0.070 8	0.068 0	0.140 1	101.9		
	0.070 4	0.068 0	0.137 8	99.1		
	0.070 9	0.068 0	0.139 5	100.9		
	0.070 2	0.068 0	0.138 6	100.6		
绿原酸(chlorogenic acid)	0.447 8	0.456 0	0.901 2	99.4	100.5	1.4
	0.448 0	0.456 0	0.910 5	101.4		
	0.451 6	0.456 0	0.899 5	98.2		
	0.448 6	0.456 0	0.909 9	101.2		
	0.452 0	0.456 0	0.911 1	100.7		
	0.447 6	0.456 0	0.912 0	101.8		
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	0.091 5	0.090 0	0.181 8	100.3	98.1	1.4
	0.091 5	0.090 0	0.179 8	98.1		
	0.092 2	0.090 0	0.181 5	99.2		
	0.091 6	0.090 0	0.178 9	97.0		
	0.092 3	0.090 0	0.179 9	97.3		
	0.091 4	0.090 0	0.178 6	96.9		
芦丁(rutoside)	1.846 2	1.890 0	3.686 8	97.4	98.4	1.4
	1.846 9	1.890 0	3.689 1	97.5		
	1.861 6	1.890 0	3.693 8	96.9		
	1.849 5	1.890 0	3.713 4	98.6		
	1.863 5	1.890 0	3.755 3	100.1		
	1.845 4	1.890 0	3.737 5	100.1		
异槲皮苷(isoquercitrin)	0.154 1	0.170 0	0.325 6	100.9	101.7	1.7
	0.154 1	0.170 0	0.330 1	103.5		
	0.155 4	0.170 0	0.328 9	102.1		
	0.154 4	0.170 0	0.326 7	101.4		
	0.155 5	0.170 0	0.323 6	98.9		
	0.154 0	0.170 0	0.329 6	103.3		
山柰酚-3-O-芸香糖苷(kaempferol-3-O-rutinoside)	1.153 8	1.218 0	2.389 9	101.5	99.1	1.5
	1.154 3	1.218 0	2.343 6	97.6		
	1.163 5	1.218 0	2.351 1	97.5		
	1.155 9	1.218 0	2.369 5	99.6		
	1.164 6	1.218 0	2.375 6	99.4		
	1.153 4	1.218 0	2.359 1	99.0		
3,4-O-二咖啡酰奎宁酸(3,4-O-dicaffeoylquinic acid)	0.223 9	0.237 0	0.461 6	100.3	100.0	1.5
	0.224 0	0.237 0	0.458 6	99.0		
	0.225 8	0.237 0	0.461 1	99.3		

表 2(续)

成分 (component)	含有量 (original)/mg	加入量 (added)/mg	测得量 (detected)/mg	回收率 (recovery)/%	平均回收率 (average recovery)/%	RSD/ %
3,5-O-二咖啡酰奎宁酸(3,5-O-dicaffeoylquinic acid)	0.224 3	0.237 0	0.465 9	101.9	101.2	1.1
	0.226 0	0.237 0	0.466 8	101.6		
	0.223 8	0.237 0	0.456 2	98.1		
	1.055 2	1.066 0	2.132 8	101.1		
	1.055 6	1.066 0	2.150 2	102.7		
	1.064 0	1.066 0	2.149 5	101.8		
	1.057 1	1.066 0	2.136 8	101.3		
4,5-O-二咖啡酰奎宁酸(4,5-O-dicaffeoylquinic acid)	1.065 1	1.066 0	2.126 9	99.6	100.1	1.1
	1.054 8	1.066 0	2.125 8	100.5		
	0.845 0	0.868 0	1.715 6	100.3		
	0.845 3	0.868 0	1.707 5	99.3		
	0.852 1	0.868 0	1.736 2	101.9		
	0.846 5	0.868 0	1.718 0	100.4		
	0.852 9	0.868 0	1.708 9	98.6		
0.844 7	0.868 0	1.711 1	99.8			

2.8 相对校正因子计算

本研究采用多点校正法计算相对校正因子,即取“2.3”项下 9 个成分 7 个浓度点的进样浓度和对应峰面积,酚酸类成分以绿原酸为内标,黄酮类成分以芦丁为内标,按公式 $F_i = (A_s \times C_i) / (C_s \times A_i)$ 计算另外 7 个待测成分的相对校正因子。

其中, F_i 为待测成分的相对校正因子, C_s 、 C_i 分别为内标物和待测成分的浓度, A_s 、 A_i 分别为内标物和待测成分的峰面积。结果,新绿原酸、隐绿原酸、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸的平均相对校正因子($n=7$)分别为 1.142 1、1.362 5、0.820 1、1.193 7、1.070 2、0.764 2、0.809 5, RSD 均 < 1.0%。

2.9 不同仪器、色谱柱对相对校正因子的影响

取“2.1.2”项下混合对照品溶液,考察 3 个型号色谱仪(Agilent 1290 Infinity、Agilent 1290 Infinity II、Waters ACQUITY UPLC™)和 3 根色谱柱[ACQUITY UPLC® HSS T3(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)、ACQUITY UPLC® BEH C₁₈(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)、InfinityLab Poroshell 120 Aq-C₁₈(100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm)]对新绿原酸、隐绿原酸、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸以及 4,5-O-二咖啡酰奎宁酸相对校正因子的影响,结果见表 3。由表 3 可

知,新绿原酸、异槲皮苷等 7 个成分相对校正因子的 RSD($n=9$)均 < 1.0%,表明不同色谱仪和不同色谱柱对新绿原酸、异槲皮苷等 7 个成分相对校正因子的影响较小。

2.10 色谱峰的定位

本实验考察了各成分相对保留时间值($r_{i/s} = t_{Ri}/t_{Rs}$)在不同仪器、色谱柱下的情况,结果见表 4。由此可知,各成分相对保留时间的 RSD 均 < 3.5%,故本试验采用相对保留时间进行色谱峰定位。

2.11 样品含量测定

取不同批号的 9 批一枝黄花药材粉末(过 3 号筛)各 2 份,分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2”项下色谱条件进样测定,采用 ESM 和 QAMS 法计算含量, QAMS 法计算公式为 $C_i = (F_i \times [(C_s \times A_i) / A_s])$,其中 C_i 、 C_s 分别为待测成分及内标物的浓度, F_i 为待测成分的相对校正因子, A_i 、 A_s 分别为待测成分及内标物的峰面积,结果见表 5。由此可知,ESM 和 QAMS 法所得结果相近,相对平均偏差(relative average deviation, RD) < 2.8%,表明 QAMS 法可用于一枝黄花的含量测定。

3 讨论

3.1 内标物质的选择

QAMS 法提出者王智民课题组认为 QAMS 可应用于中药复杂体系中同类成分之间的评价,但在不同结构母核的化学成分类别之间,应用 QAMS 法

表 3 不同仪器、色谱柱对相对校正因子的影响

Tab. 3 Effects of different instruments and columns on relative correction factors

成分 (component)	相对校正因子(relative correction factor)									平均值 (average value)	RSD/ %
	Agilent 1290 Infinity			Agilent 1290 Infinity II			waters ACQUITY UPLC™				
	HSS T3	BEH C ₁₈	Aq - C ₁₈	HSS T3	BEH C ₁₈	Aq - C ₁₈	HSS T3	BEH C ₁₈	Aq - C ₁₈		
新绿原酸(neochlorogenic acid)	1.142 1	1.135 1	1.139 9	1.146 6	1.151 2	1.136 9	1.145 6	1.142 5	1.140 1	1.142 2	0.44
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	1.362 5	1.351 0	1.346 6	1.376 3	1.352 8	1.355 9	1.355 9	1.356 4	1.358 2	1.357 3	0.62
异槲皮苷(isoquercitrin)	0.820 1	0.825 6	0.819 5	0.816 3	0.826 9	0.832 5	0.821 2	0.826 5	0.816 8	0.822 8	0.65
山柰酚-3-O-芸香糖苷(kaempferol-3-O-rutinoside)	1.193 7	1.186 6	1.192 5	1.201 4	1.198 6	1.199 9	1.186 9	1.195 6	1.189 9	1.193 9	0.46
3,4-O-二咖啡酰奎宁酸(3,4-O-dicaffeoylquinic acid)	1.070 2	1.074 0	1.076 0	1.071 2	1.073 6	1.075 2	1.069 5	1.076 2	1.075 7	1.073 5	0.24
3,5-O-二咖啡酰奎宁酸(3,5-O-dicaffeoylquinic acid)	0.764 2	0.748 7	0.749 2	0.762 9	0.750 9	0.762 1	0.759 9	0.759 8	0.766 1	0.758 2	0.89
4,5-O-二咖啡酰奎宁酸(4,5-O-dicaffeoylquinic acid)	0.809 5	0.807 6	0.810 7	0.816 0	0.813 2	0.821 2	0.810 1	0.806 9	0.809 9	0.811 7	0.56

表 4 各成分相对保留时间

Tab. 4 Relative retention time of various constituents

成分 (component)	相对保留时间(relative retention time)									平均值 (average value)	RSD/ %
	Agilent 1290 Infinity			Agilent 1290 Infinity II			waters ACQUITY UPLC™				
	HSS T3	BEH C ₁₈	Aq - C ₁₈	HSS T3	BEH C ₁₈	Aq - C ₁₈	HSS T3	BEH C ₁₈	Aq - C ₁₈		
新绿原酸(neochlorogenic acid)	0.769 7	0.743 8	0.736 4	0.759 4	0.746 1	0.735 9	0.726 7	0.738 9	0.740 5	0.744 2	1.8
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	1.054 3	1.079 9	1.072 7	1.055 0	1.062 6	1.071 1	1.065 6	1.059 6	1.068 2	1.065 4	0.80
异槲皮苷(isoquercitrin)	1.053 8	1.050 4	1.042 9	1.052 0	1.046 3	1.052 6	1.061 1	1.056 5	1.046 8	1.051 4	0.53
山柰酚-3-O-芸香糖苷(kaempferol-3-O-rutinoside)	1.129 3	1.132 5	1.122 3	1.126 5	1.135 2	1.127 4	1.123 7	1.115 6	1.129 9	1.126 9	0.52
3,4-O-二咖啡酰奎宁酸(3,4-O-dicaffeoylquinic acid)	1.827 5	1.994 7	1.939 4	1.830 3	1.973 6	1.889 3	1.853 6	1.978 5	1.879 8	1.907 4	3.4
3,5-O-二咖啡酰奎宁酸(3,5-O-dicaffeoylquinic acid)	1.908 7	2.047 8	2.011 9	1.911 3	1.960 9	1.992 5	1.959 8	2.017 7	2.000 7	1.979 0	2.4
4,5-O-二咖啡酰奎宁酸(4,5-O-dicaffeoylquinic acid)	2.043 1	2.234 8	2.178 4	2.053 3	2.121 3	2.121 2	2.212 2	2.069 2	2.080 9	2.123 8	3.3

仍需探讨^[22]。经结构分析,一枝黄花中的6个酚酸类成分具有相同的结构母核,3个黄酮类成分也具有相同的结构母核。同时对9个成分进行光谱扫描,6个酚酸类成分光谱图基本一致,3个黄酮类成分光谱图也基本一致。基于此,选择性质较稳定,对照品易得,含量较大的绿原酸和芦丁分别作为酚酸类和黄酮类的内标物,保证结果的准确性,试验结果也证实以2个物质作为内标物的测定结果和ESM的结果非常接近。

3.2 检测波长的选择

将混合对照品溶液于200~400 nm波长范围内进行光谱扫描,结果6个酚酸类成分在327 nm附近有最大吸收,黄酮类成分在354 nm附近有最大吸收,样品中新绿原酸和隐绿原酸含量较低,在354 nm附近响应低,黄酮类成分在327 nm处响应相对较

好,因此选择酚酸类成分的最大吸收波长327 nm作为检测波长。

3.3 供试品溶液制备方法的选择

考察了不同提取方式(加热回流提取和超声提取),不同提取溶剂(30%甲醇水、70%甲醇水、甲醇、乙醇),不同提取时间(0.5、1、1.5 h),不同料液比(1:5、1:10、1:20)。结果加热回流提取时温度较高,酚酸类化合物受热不稳定,2类化合物的70%甲醇水提取效率明显高于甲醇和乙醇,超声0.5 h的含量偏低,超声1 h和1.5 h的含量基本一致,1:10和1:20的料液比结果无明显区别,但料液比为1:20时,供试品溶液中含量低的待测成分峰面积较小,故最终选择采用料液比1:10,70%甲醇水超声处理1 h作为供试品溶液的制备方法。

表 5 S1 ~ S9 号一枝黄花中 9 个成分含量测定结果 ($n=2$)
 Tab. 5 Determination results of 9 components in *Solidaginis Herba* S1 - S9

成分 (component)	方法 (method)	含量(content)/%								
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
新绿原酸(neochlorogenic acid)	ESM	0.008	0.013	0.011	0.010	0.008	0.010	0.010	0.014	0.014
	QAMS	0.008	0.013	0.011	0.010	0.008	0.010	0.010	0.014	0.014
	RD/%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
绿原酸(chlorogenic acid)	ESM	0.056	0.061	0.072	0.068	0.055	0.069	0.068	0.097	0.089
隐绿原酸(cryptochlorogenic acid)	ESM	0.011	0.017	0.014	0.012	0.010	0.013	0.013	0.019	0.018
	QAMS	0.011	0.017	0.014	0.012	0.010	0.013	0.013	0.018	0.018
	RD/%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.7	0.00
芦丁(rutoside)	ESM	0.236	0.191	0.328	0.319	0.262	0.320	0.329	0.412	0.368
异槲皮苷(isoquercitrin)	0.031	ESM	0.020	0.018	0.029	0.028	0.023	0.028	0.029	0.035
	0.031	QAMS	0.020	0.018	0.029	0.028	0.023	0.028	0.029	0.035
	0.00	RD/%	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
山柰酚-3-O-芸香糖苷(kaemperol-3-O-rutinoside)	0.139	ESM	0.116	0.198	0.196	0.156	0.197	0.203	0.250	0.230
	0.231	QAMS	0.140	0.117	0.198	0.197	0.156	0.198	0.204	0.251
	0.22	RD/%	0.36	0.43	0.00	0.25	0.00	0.25	0.25	0.20
3,4-O-二咖啡酰奎宁酸(3,4-O-dicaffeoylquinic acid)	0.045	ESM	0.028	0.032	0.035	0.035	0.028	0.035	0.036	0.048
	0.044	QAMS	0.028	0.032	0.035	0.035	0.027	0.035	0.036	0.048
	1.1	RD/%	0.00	0.00	0.00	0.00	1.8	0.00	0.00	0.00
3,5-O-二咖啡酰奎宁酸(3,5-O-dicaffeoylquinic acid)	0.162	ESM	0.111	0.194	0.202	0.160	0.193	0.203	0.235	0.211
	0.211	QAMS	0.162	0.111	0.195	0.203	0.160	0.193	0.204	0.235
	0.00	RD/%	0.00	0.00	0.26	0.25	0.00	0.00	0.25	0.00
4,5-O-二咖啡酰奎宁酸(4,5-O-dicaffeoylquinic acid)	0.1145	ESM	0.116	0.154	0.141	0.113	0.146	0.145	0.182	0.169
	0.169	QAMS	0.115	0.117	0.155	0.141	0.113	0.146	0.145	0.183
	0.00	RD/%	0.00	0.43	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27

3.4 流动相考察

考察了 4 个流动相系统(乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.1% 醋酸溶液、甲醇-水), 结果以乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相时, 能够获得较好的色谱峰峰形及分离效果, 同时分析时间也最短。

综上, 本研究采用 QAMS 法同时测定一枝黄花中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、3,4-O-二咖啡酰奎宁酸、3,5-O-二咖啡酰奎宁酸、4,5-O-二咖啡酰奎宁酸 6 个酚酸类和芦丁、异槲皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷 3 个黄酮类成分的含量, 方法操作简便高效, 结果准确可靠, 减少了试剂试药的消耗, 节约了研究检测成本, 可为进一步完善和提高一枝黄花药材的质量标准提供参考依据。

参考文献

[1] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 3
 ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 3

[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志. 第 74 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 75

Editorial Committee of Flora of China. Flora of China. Vol 74 [M]. Beijing: Science Press, 1985: 75

[3] 姜银杰, 罗霜, 张彦哲, 等. 一枝黄花提取物下调 cyclinA1/CDK2 通路抑制肝癌细胞增殖、迁移与侵袭[J]. 中国新药与临床杂志, 2023, 42(4): 233

JIANG YJ, LUO S, ZHANG YZ, et al. *Solidago decurrens* extracts inhibit proliferation, invasion and migration of liver cancer cells by suppressing cyclinA1/CDK2 pathway [J]. *Chin J New Drugs Clin Remed*, 2023, 42(4): 233

[4] 李晓岚, 裘名宜, 刘素鹏. 一枝黄花的化学成分、药理活性及临床应用[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 93

LI XL, QIU MY, LIU SP. Chemical composition, pharmacological activity and clinical application of *Solidaginis Herba* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2008, 19(1): 93

[5] 肖薇依, 刘美红, 刘再枝, 等. 一枝黄花属植物化学成分和药理活性研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(9): 1607

XIAO WY, LIU MH, LIU ZZ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Solidago* species

- [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2022, 34(9): 1607
- [6] 沈校, 邹嵘嵘. 一枝黄花属植物的化学成分和生物活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(23): 4303
SHEN X, ZHOU ZR. Review on research progress of chemical constituents and bioactivities of *Solidago*[J]. *China J Chin Mater Med*, 2016, 41(23): 4303
- [7] 韩亚如, 马国力, 韩亚龙, 等. 二咖啡酰奎宁酸类天然产物植物来源、药动学及生物活性的研究进展[J]. *中草药*, 2023, 54(4): 1285
HAN YR, MA GL, HAN YL, *et al.* Research progress on plant origins, pharmacokinetics, and biological activities of natural dicaffeoylquinic acids[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(4): 1285
- [8] 朱文卿, 任汉书, 徐美霞, 等. 咖啡酰奎宁酸类化合物的生物学活性及提高其生物利用度技术研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(3): 321
ZHU WQ, REN HS, XU MX, *et al.* Advances in research on biological activity and bioavailability of caffeoylquinic acids[J]. *Food Sci*, 2021, 42(3): 321
- [9] 李胜男, 曹坦, 刘雅萍. 药用植物中咖啡酰奎宁酸类化合物的研究进展[J]. *中国民族民间医药*, 2023, 32(7): 45
LI SN, CAO T, LIU YP. Research progress of caffeoylquinic acid compounds in medicinal plants[J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2023, 32(7): 45
- [10] 杨诗宇, 宋基正, 杨山景, 等. 芦丁药理作用与新剂型的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(10): 1360
YANG SY, SONG JZ, YANG SJ, *et al.* Research progress on pharmacological action and new dosage forms of rutin[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39(10): 1360
- [11] 张文通, 李俊, 吴玉婷, 等. 山柰酚-3-O-芸香糖苷对血管平滑肌细胞增殖、迁移及TGFBR1信号通路活化的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(5): 832
ZHANG WT, LI J, WU YT, *et al.* Effects of kaempferol-3-O-utinoside on proliferation, migration and TGFBR1 signaling pathway activation in vascular smooth muscle cells[J]. *Chin J Pathophysiol*, 2018, 34(5): 832
- [12] 刘芳. 中药桑叶中主要成分的含量测定的研究进展[J]. *天津药学*, 2018, 30(2): 53
LIU F. Research progress on development of determination method of mulberry leaf[J]. *Tianjin Pharm*, 2018, 30(2): 53
- [13] 陈燕, 詹羽姣, 李晨阳, 等. 异槲皮苷的生物活性研究进展[J]. *中国现代中药*, 2018, 20(12): 1579
CHEN Y, ZHAN YJ, LI CY, *et al.* Research progress in biological activity of isoquercitrin[J]. *Mod Chin Med*, 2018, 20(12): 1579
- [14] 高良美, 茅向军, 林瑞超, 等. HPLC同时测定一枝黄花中芦丁和绿原酸的含量[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(16): 2422
GAO LM, MAO XJ, LIN RC, *et al.* Simultaneous determination of rutin and chlorogenic acid in *Solidaginis Herba* by HPLC[J]. *China J Chin Mater Med*, 2012, 37(16): 2422
- [15] 冯华, 聂明华, 王祥培, 等. HPLC法同时测定一枝黄花药材中绿原酸、芦丁和山柰素的含量[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2014, 16(4): 904
FENG H, NIE MH, WANG XP, *et al.* HPLC determination of chlorogenic acid, rutin and kaempferide in *Solidago decurrens* Lour. [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med - World Sci Technol*, 2014, 16(4): 904
- [16] 吴玲芬, 李敏, 陈芝华. 7省16个产地一枝黄花中芦丁、绿原酸、槲皮素含量测定与相关性分析[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2023, 33(6): 547
WU LF, LI M, CHEN ZH. Determination and correlation analysis of rutin, chlorogenic acid and quercetin in *Solidaginis Herba* from 16 producing areas in 7 provinces[J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med*, 2023, 33(6): 547
- [17] 闫艳, 杜晨晖. 一测多评法在中药质量控制中的应用及研究进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(6): 2378
YAN Y, DU CH. Recent advances in quantitative analysis of multi-components by single marker on quality control of traditional Chinese medicine [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med - World Sci Technol*, 2022, 24(6): 2378
- [18] 季加威, 李铮, 尉捷, 等. 标准物质替代测定法在中药质量评价中的应用与发展[J]. *北京城市学院学报*, 2023(1): 44
JI JW, LI Z, YU J, *et al.* Application and development of substitution analysis of reference materials in the quality evaluation of traditional Chinese medicines[J]. *J Beijing City Univ*, 2023(1): 44
- [19] 张敏, 王芳, 刘惠娟, 等. 一测多评法在中药质量控制中的应用[J]. *中国民族民间医药*, 2021, 30(14): 51
ZHANG M, WANG F, LIU HJ, *et al.* Application of quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) in quality control of traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2021, 30(14): 51
- [20] 石莉尧, 房蕴歌, 陈两绵, 等. 以蟾酥制剂为例, 探讨一测多评法在中成药质量评价和控制中的应用研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(12): 2931
SHI LY, FANG YG, CHEN LM, *et al.* Application of QAMS for quality evaluation and control of Chinese patent medicines; taking *Bufois Venenum*-contained preparations as examples[J]. *China J Chin Mater Med*, 2021, 46(12): 2931
- [21] 胡瑞雪, 梁元昊, 徐文丽, 等. 一测多评法在中药中的应用及研究进展[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(11): 1968
HU RX, LIANG YH, XU WL, *et al.* Application and research progress of QAMS in traditional Chinese medicine [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(11): 1968
- [22] 朱晶晶, 王智民, 高慧敏, 等. 一测多评法在中药质量评价中的应用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(16): 220
ZHU JJ, WANG ZM, GAO HM, *et al.* Advances on quality evaluation of Chinese materia medica by QAMS[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2016, 22(16): 220

(本文于2024年7月5日修改回)