

- 1534-1536.
- [12] 朱美霖, 朱新忠, 冯宁川. 重金属在甘草中的健康风险评估及限量浓度测定[J]. 中成药, 2016, 38(8): 1771-1776.
- [13] 鲁文慧, 杨辛欣, 刘会, 等. 不同蒸制时间对红参中人参皂苷及农药残留的影响[J]. 人参研究, 2016, 28(4): 2-5.
- [14] 刘丽娜, 金红宇, 孙磊, 等. 中药材及部分制剂中黄曲霉毒素残留筛查报告及初步风险评估[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(17): 1541-1546.
- [15] 左甜甜, 李耀磊, 陈沛, 等. 西洋参、山楂、枸杞子中重金属及有害元素残留量测定及初步风险评估[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(11): 2016-2021.
- [16] Gonzálezrodríguez R M, Canchogrande B, Torradoagrasar A, et al. Evolution of tebuconazole residues through the wine making process of mencia grapes [J]. Food Chemistry, 2009, 117(3): 529-537.
- [17] 王彝白纳, 金红宇, 张磊. 11省成年消费者中药食用情况调查分析[J]. 云南中医学院学报, 2017, 40(2): 71-75, 93.
- [18] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 402-404.

9省市19个产地野马追中2种活性成分测定及相关性分析

陈月桃, 吕伟旗, 潘晨曦, 邹慧龙^{*}
(丽水市人民医院药学部, 浙江丽水 323000)

摘要: 目的 测定9省市19个产地野马追 *Eupatorium lindleyanum* DC. 中金丝桃苷、醇溶性浸出物并分析其相关性。
方法 用热浸法测定野马追中醇溶性浸出物含有量。野马追甲醇提取物的分析采用 Waters Xbridge C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.2%醋酸水; 体积流量1.0 mL/min; 检测波长255 nm; 柱温26℃。并考察其与生长性状、生境因子间的相关性, 用SPSS23.0软件进行方差分析与聚类分析。
结果 金丝桃苷在0.010 9~0.065 4 mg/mL范围内线性关系良好, $R^2=0.999\ 6$, 平均加样回收率99.49%~101.61%, RSD1.67%~2.21%。醇溶性浸出物、金丝桃苷含有量与株高、茎粗、叶长、叶宽、叶长宽比、经度间呈正相关, 与纬度呈负相关; 19个产地野马追分为3个类群, 其中类群I以江苏、浙江种质为主, 该类群植株较高, 茎秆粗壮, 叶片大而多狭长, 醇溶性浸出物与金丝桃苷含有量较高。
结论 该方法操作简便、重复性好、准确度高, 可用于野马追药材质量评价。

关键词: 野马追; 醇溶性浸出物; 金丝桃苷; 相关性; 聚类分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)02-0373-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.026

Determination of two active ingredient contents of *Eupatorium lindleyanum* in nineteen growing areas of nine provinces and municipalities

CHEN Yue-tao, LÜ Wei-qi, PAN Chen-xi, ZOU Hui-long^{*}
(Department of Pharmacy, Lishui People's Hospital, Lishui 323000, China)

KEY WORDS: *Eupatorium lindleyanum* DC.; ethanol-soluble extract; hyperoside; correlation; cluster analysis

野马追系菊科多年生草本植物轮叶泽兰 *Eupatorium lindleyanum* DC. 的地上部分, 秋季花初开时采割, 晒干入药。其性平、味苦, 归肺经, 有清肺止咳、化痰平喘、降血压的功效, 临床主要用于治

疗慢性支气管炎、痰多、咳嗽、气喘、高血压等^[1-2]。现代药物化学与药理学研究表明, 野马追中含有萜类^[3]、黄酮类^[4]、甾体类^[5]、内酯类^[6]、有机酸^[7]等化合物, 具有抗炎、抗病毒、抑菌、

收稿日期: 2018-08-25

作者简介: 陈月桃(1987—), 女, 主管药师。研究方向为中药质量控制。Tel: (0578) 2292776, E-mail: cathy9393@163.com

*通信作者: 邹慧龙(1987—), 男, 副主任药师。研究方向为中药质量评价与资源利用。Tel: (0578) 2292776, E-mail: aurora1027@126.com

保护肺损伤等多种药理学活性^[8-10]。

野马追在我国分布较广，除新疆外，其余各地均有分布，因南北跨度大，药材质量参差不齐，影响其资源利用与市场健康发展^[11]。药材的产量和质量不仅受其自身遗传特性的影响，而且也与多种环境因素密切相关，在药材栽培实践中了解生境因子与药材质量和产量的相关性对提高药材品质具有重要意义。醇溶性浸出物与金丝桃苷含有量是2015年版《中国药典》规定的野马追主要质量评价指标。本研究收集9省市19个产地野马追种质资源，对其醇溶性浸出物与金丝桃苷含有量进行考察，并分析其与生长性状、产地生境因子间的相关性，以期为野马追药材质量评价与种质资源可持续利用提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂 Milli-Q Academic 超纯水仪（美国Millipore公司）；DGG-9070电热恒温鼓风干燥器（上海森信试验仪器有限公司）；600-2998型高效液相色谱仪（美国Waters公司）；FA2004G型电子分析天平（上海花潮实业有限公司）；FQ-1024型超声波清洗机（杭州法兰特超声波科技有限公司）；HH-21-6型恒温水浴锅（常州诺基仪器有限公司）；DF-300手提式粉碎机（苏州奇乐电子科技有限公司）；SHB-III A循环水式真空泵（北京林茂仪器有限公司）。金丝桃苷对照品（YZ-111521）购于北京索莱宝科技有限公司；色谱级甲醇、乙腈购于北京京科瑞达科技有限公司；分析用甲醇、乙醇、醋酸、磷酸等试剂购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 材料 2017年9月至10月，收集辽宁、湖北、重庆、吉林、湖南、浙江、江苏、山东、贵州9省市19个产地野马追资源，经丽水市人民医院药学部邹慧龙副主任药师鉴定为正品，信息见表1。

2 方法与结果

2.1 生长性状考察 取新鲜野马追植株，用卷尺测量株高，每株随机取3片叶片，用直尺测量叶片中脉长（叶长），叶宽，计算叶长宽比，用游标卡尺测量茎中部粗（茎粗），每个产地随机取20株。

2.2 醇溶性浸出物含有量测定 将新鲜野马追药材洗净，取地上部分，切段，50℃下烘干至恒定质量，粉碎过60目筛。取药材粉末2.0g，加20mL 60%乙醇，称定质量，80℃水浴回流1h，冷却至室温，乙醇补足减失质量，精密吸取10mL

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	产地	经度/°	纬度/°	海拔/m	生境
S1	辽宁义县	121.61	41.48	377	山谷
S2	辽宁本溪	124.96	41.38	422	水湿地
S3	湖北房县	110.77	32.40	895	山坡
S4	湖北神农架	110.68	31.74	887	公路旁
S5	重庆綦江	106.52	29.03	235	林下湿地
S6	吉林通化	125.94	41.71	481	山坡
S7	吉林船营	126.53	43.82	183	山谷湿地
S8	湖南蓝山	111.99	25.10	934	公路旁
S9	湖南岳阳	113.43	29.21	109	山谷
S10	浙江庆元	119.19	27.73	1241	林下湿地
S11	浙江临安	118.87	30.14	726	山谷
S12	浙江磐安	120.52	28.98	866	山谷
S13	浙江缙云	120.29	28.46	790	公路旁
S14	江苏句容	119.25	32.10	135	林下湿地
S15	江苏金坛	119.32	31.80	68	林下湿地
S16	山东泰安	117.25	36.04	585	阔叶林下
S17	山东招远	120.49	37.46	450	水湿地
S18	贵州台江	108.26	26.59	1077	山谷
S19	贵州独山	107.69	25.72	797	林下

提取液置于质量为a的蒸发皿中，105℃下烘干至恒定质量，取出置于干燥器中冷却至室温，称定质量为b，计算醇溶性浸出物含有量。

2.3 金丝桃苷含有量测定

2.3.1 色谱条件 Waters Xbridge C₁₈色谱柱（4.6 mm×250 mm, 5 μm）；流动相乙腈-0.2%醋酸水；体积流量1.0 mL/min；检测波长255 nm；柱温26℃；进样量10 μL。

2.3.2 线性关系考察 精密吸取质量浓度为0.109 mg/mL的金丝桃苷标准溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL置于10 mL量瓶中，甲醇定容。取适量，过0.45 μm微孔滤膜，在“2.3.1”色谱条件下测定，以峰面积为纵坐标(Y)，标准溶液质量浓度为横坐标(X)，得回归方程为Y=13 819X-17.2, R²=0.999 6，表明金丝桃苷在0.010 9~0.065 4 mg/mL的范围内线性关系良好。

2.3.3 样品含有量测定 精密称取样品粉末1.0 g，加20 mL甲醇溶液，室温条件下超声（功率250 W，频率33 kHz）提取40 min，抽滤，定容至25 mL量瓶，取适量，过0.45 μm微孔滤膜，在“2.3.1”色谱条件下测定，试验平行3次，色谱图见图1。

2.3.4 稳定性试验 随机取S14样品，按“2.3.3”项下方法制备样品溶液，阴凉密闭放置

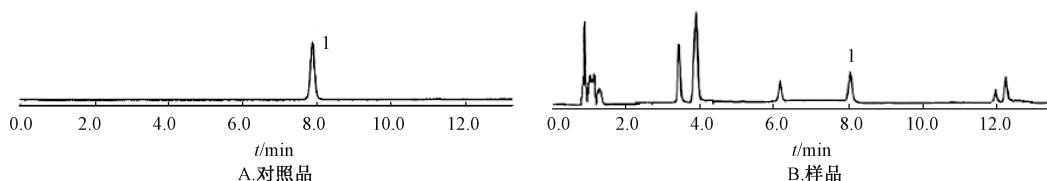


图1 金丝桃苷HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of hyperoside

0、2、4、8、12、16、24 h 后，在“2.3.1”项条件下进样，测得S14样品含有量 RSD 1.07%，表明供试品溶液在24 h 内稳定性良好。

2.3.5 精密度试验 取同一对照品溶液，在“2.3.1”项色谱条件下连续进样6次，测得金丝桃苷平均峰面积 RSD 0.93%，表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验 随机取S7样品6份，按

“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，测定样品中金丝桃苷含有量，得S7样品平均含有量 RSD 2.30%，表明该方法重复性良好。

2.3.7 加样回收率试验 随机取已知金丝桃苷含有量的S10样品，按照低、中、高3个质量浓度加入适量金丝桃苷对照品，按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液，测定样品中金丝桃苷含有量，计算加样回收率，见表2。

表2 各成分加样回收率试验结果 (n=6)

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents (n=6)

组别	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
低质量浓度	0.400 2	0.360 7	0.400 5	0.763 2	100.50	101.61	2.21
	0.400 1	0.360 6	0.400 2	0.762 1	100.32		
	0.400 2	0.360 7	0.400 1	0.758 3	99.38		
	0.400 5	0.361 0	0.400 0	0.778 0	104.26		
	0.399 8	0.360 3	0.400 2	0.779 2	104.66		
	0.400 0	0.360 5	0.400 3	0.763 1	100.57		
中质量浓度	0.500 1	0.450 7	0.500 2	0.958 4	101.49	99.49	1.67
	0.500 0	0.450 7	0.500 1	0.947 3	99.31		
	0.500 4	0.451 0	0.500 1	0.942 1	98.20		
	0.500 6	0.451 2	0.500 0	0.947 3	99.22		
	0.500 2	0.450 8	0.500 4	0.938 0	97.36		
	0.500 3	0.450 9	0.500 3	0.957 9	101.34		
高质量浓度	0.600 1	0.540 9	0.600 3	1.167 3	104.35	101.16	2.11
	0.600 3	0.541 1	0.600 7	1.132 4	98.44		
	0.600 3	0.541 1	0.600 2	1.148 5	101.21		
	0.600 3	0.541 1	0.600 4	1.137 3	99.31		
	0.600 2	0.541 0	0.600 0	1.147 9	101.16		
	0.600 5	0.541 2	0.600 1	1.156 3	102.49		

2.4 数据处理与分析 用SPSS23.0与EXCEL2010软件处理数据，采用单因素ANOVA分析，聚类分析采用组间联接法，区间测量采用欧式距离。

2.5 结果与分析

2.5.1 生长性状、有效成分含有量测定 19个产地野马追生长性状、醇溶性浸出物、金丝桃苷含有量存在显著性($P<0.05$)或极显著性($P<0.01$)差异。生长性状方面，江苏种质野马追表现优良，其中句容样品植株最高，平均株高1.32 m，金坛样品茎粗、叶长、叶宽指标最高，分别为0.61、10.02、

2.41 cm；供试野马追醇溶性浸出物平均含有量为13.34%，金丝桃苷平均含有量为0.696 9 mg/g，其中江苏金坛醇溶性浸出物、浙江缙云金丝桃苷含有量最高，分别为17.94%、0.931 2 mg/g，湖北房县样品醇溶性浸出物、辽宁本溪金丝桃苷含有量最低，仅为9.12%、0.463 9 mg/g。样品均符合2015年版《中国药典》规定的标准^[1]，见表3。

2.5.2 相关性分析 野马追醇溶性浸出物、金丝桃苷含有量与生长性状、产地生境因子间存在相关性，见表4。可知，醇溶性浸出物含有量与株高、茎粗、叶长、叶宽、叶长宽比、经度呈正相关，其

表3 不同产地样品生长性状与活性成分含有量比较

Tab. 3 Comparison of growth traits and active ingredient contents of samples in different growing areas

产地	株高/m	茎粗/cm	叶长/cm	叶宽/cm	叶长宽比	醇溶性浸出物/%	金丝桃苷/(mg·g⁻¹)
辽宁义县	0.87	0.39	7.04	1.78	3.96	9.43	0.473 1
辽宁本溪	0.90	0.42	7.21	1.64	4.40	10.92	0.463 9
湖北房县	1.02	0.44	7.85	1.89	4.15	9.12	0.465 3
湖北神农架	0.97	0.49	8.03	1.74	4.61	12.43	0.563 1
重庆綦江	1.06	0.46	7.74	1.93	4.01	12.43	0.731 2
吉林通化	0.84	0.34	6.98	2.01	3.47	11.94	0.663 2
吉林船营	0.91	0.35	7.03	1.83	3.84	11.73	0.648 1
湖南蓝山	0.84	0.39	7.05	1.89	3.73	13.20	0.684 2
湖南岳阳	0.89	0.41	7.31	1.94	3.77	14.32	0.650 4
浙江庆元	1.09	0.49	9.31	2.21	4.21	16.09	0.901 3
浙江临安	1.12	0.50	8.83	2.13	4.15	15.89	0.874 3
浙江磐安	1.14	0.47	9.67	2.09	4.63	16.49	0.908 3
浙江缙云	0.98	0.48	9.43	2.27	4.15	15.93	0.931 2
江苏句容	1.32	0.56	9.89	2.34	4.23	16.45	0.787 2
江苏金坛	1.28	0.61	10.02	2.41	4.16	17.94	0.823 1
山东泰安	0.91	0.53	7.46	1.65	4.52	13.40	0.653 3
山东招远	0.87	0.46	7.09	1.82	3.90	12.28	0.703 4
贵州台江	0.82	0.38	7.41	1.98	3.74	11.09	0.662 1
贵州独山	0.87	0.41	7.03	2.10	3.35	12.43	0.653 8
平均值	0.98	0.45	8.02	1.98	4.05	13.34	0.696 9
F值	5.47*	12.31**	6.30*	4.98*	4.53*	9.04**	15.39**

注: *P<0.05 表示组间差异显著; **P<0.01 表示组间差异极显著

表4 活性成分含有量与生长性状、生境因子相关性分析

Tab. 4 Correlation analysis between active ingredient contents and growth traits, habitat factors

因素	株高/m	茎粗/cm	叶长/cm	叶宽/cm	叶长宽比	醇溶性浸出物/%	金丝桃苷/(mg·g⁻¹)	经度/°	纬度/°	海拔/m
株高/m	1.000 0									
茎粗/cm	0.807 6	1.000 0								
叶长/cm	0.895 6	0.780 8	1.000 0							
叶宽/cm	0.688 5	0.476 9	0.782 3	1.000 0						
叶长宽比	0.495 0	0.619 2	0.536 9	-0.103 6	1.000 0					
醇溶性浸出物/%	0.712 9	0.696 2	0.829 7	0.758 6	0.301 9	1.000 0				
金丝桃苷/(mg·g⁻¹)	0.549 5	0.474 3	0.735 9	0.758 4	0.141 0	0.879 8	1.000 0			
经度/°	0.089 0	-0.037 5	0.131 6	0.023 2	0.159 0	0.163 0	0.122 8	1.000 0		
纬度/°	-0.228 8	-0.278 1	-0.374 9	-0.478 7	0.037 6	-0.434 4	-0.484 7	0.729 8	1.000 0	
海拔/m	-0.217 4	-0.131 6	0.048 5	-0.011 4	0.104 1	-0.070 7	0.144 9	-0.324 0	-0.497 9	1.000 0

中与叶长呈最大正相关, 相关系数为0.829 7; 与纬度呈负相关, 相关系数为0.434 4; 与海拔相关性较低, 相关系数仅为0.070 7; 金丝桃苷含有量与株高、茎粗、叶长、叶宽、叶长宽比、经度、海拔呈正相关, 其中与叶宽呈最大正相关, 相关系数为0.758 4; 与纬度呈负相关, 相关系数为0.484 7。表明, 高海拔、高经度、低纬度地区栽培野马追有利于提高药材中醇溶性浸出物与金丝桃苷含有量积累。

2.5.3 聚类分析 根据欧式距离 $D^2 = 13.08$ 可将供试19个产地野马追划分为3个类群, 见图2。

第Ⅰ类群共6个产地, 分别为浙江庆元、浙江临安、浙江磐安、浙江缙云、江苏句容、江苏金坛。该类群以江浙野马追为主, 植株较高, 茎秆粗壮, 叶片大而多狭长, 醇溶性浸出物含有量与金丝桃苷含有量较高; 第Ⅱ类群共8个产地, 分别为吉林通化、贵州台江、贵州独山、湖南蓝山、湖南岳阳、吉林船营、山东招远、重庆綦江。该类群以吉林、贵州与湖南产地为主, 植株较矮, 茎秆细, 叶片较小而多宽钝, 醇溶性浸出物与金丝桃苷含有量较低; 第Ⅲ类群共5个产地, 分别为湖北神农架、山东泰安、辽宁义县、辽宁本溪、湖北房县。该类群

以湖北与辽宁产地为主，植株中等高度，茎秆中等粗度或较细，叶片较小而多狭长，醇溶性浸出物与金丝桃苷含有量较低。

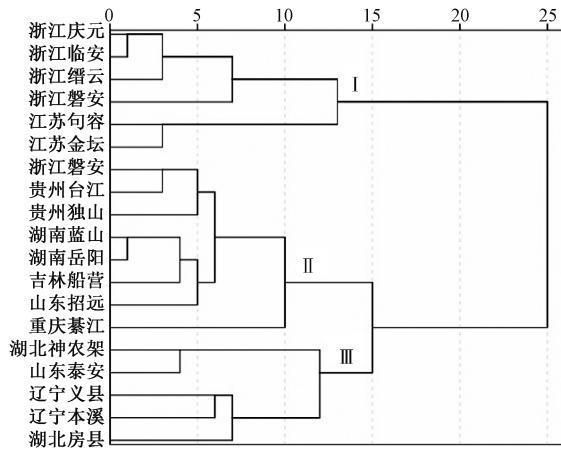


图 2 19 批样品聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram of nineteen batches of samples

3 讨论

在 2015 年版《中国药典》与已有报道基础上^[1,12-13]，本研究考察了不同流动相（甲醇-水、乙腈-0.2% 磷酸水、乙腈-0.2% 醋酸水），提取方式（加热回流提取、索式提取、超声提取）与提取时间（30、40、50、60 min）对野马追中金丝桃苷含有量测定的影响，结果表明以甲醇为提取溶剂，在 25 °C 下超声提取 40 min，即可提取完全。在“2.3.1”项色谱条件下金丝桃苷出峰时间为 7.963 min，定量限为 2.58 μg/mL，检测限为 1.12 μg/mL。

药用植物在长期与环境因素，包括生物性因素与非生物性因素的适应过程中，其生长发育受自身遗传与环境因素的双重影响^[14-15]。非生物性因素包括经度、纬度、海拔、光照、水分等。本研究在收集野马追药材种质资源的基础上，考察了其主要质量评价指标醇溶性浸出物、金丝桃苷含有量与生长性状、生境因子之间的相关性，表明我国主分布区野马追药材质量较好，多样性丰富，为野马追良种选育提供了较好的备选种质；相关性结果表明在高经度、高海拔、低纬度地区种植野马追有利于其金丝桃苷含有量积累，野马追良种选育可优先在江苏、浙江种质中选择。

中药材生长发育过程中，各环境因子间往往具有关联性^[16]，本研究下一步将在野马追优良种质

资源筛选的基础上，开展同一区域内不同海拔对野马追醇溶性浸出物与金丝桃苷成分含有量积累的影响分析，以减少经度、纬度等环境因子与海拔因子间互作关联性对药材质量评价的影响。此外，本实验收集的资源中，部分省市如重庆只收集到 1 个种质，区域代表性不强，其他分布区如云南、江西等地未收集到种质，后续工作将加强对上述产地野马追药材的收集与质量评价工作。

参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：313-314.
- [2] 贺宗毅，梁旭明，张小梅，等. 多指标评价技术研究不同产地野马追药材质量[J]. 中药材，2017，40(7)：1647-1650.
- [3] Huo J, Yang S P, Ding J, et al. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Eupatorium lindleyanum* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(9)：1470-1475.
- [4] 钱士辉，杨念云，段金廒，等. 野马追中黄酮类成分的研究 [J]. 中国中药杂志，2004，29(1)：50-52.
- [5] 肖晶，王刚力，魏锋，等. 野马追化学成分的研究 [J]. 中草药，2004，35(8)：855-856.
- [6] 罗敏敏，李春华，王易芬. HPLC 测定野马追中野马追内酯 A, B 和金丝桃苷的含量 [J]. 中国现代应用药学，2012，29(11)：1018-1022.
- [7] 陈健. 野马追提取物化学成分的 GC/MS 分析研究 [J]. 金陵科技学院学报，2004，20(1)：30-33.
- [8] 周远大，吴妍，朱深银，等. 野马追抗菌、止咳、平喘作用 [J]. 中国药房，2001，12(12)：716-718.
- [9] 彭蕴茹，窦洁，黄芳，等. 复方野马追胶囊抗流感病毒实验研究 [J]. 中成药，2008，30(5)：650-654.
- [10] 唐春萍，江涛，陈志燕. 野马追对豚鼠离体气管平滑肌收缩功能的影响 [J]. 中药药理与临床，2002，18(6)：30-32.
- [11] 张旭东，邓波，淮虎银. 影响江苏省道地药材野马追产量的生态因子分析 [J]. 中国野生植物资源，2005，24(5)：52-55.
- [12] 斯晓秋，陈黎. HPLC 法同时测定野马追中金丝桃苷、槲皮素和山柰素 [J]. 中草药，2008，39(8)：1254-1255.
- [13] 张晓玲，段金廒，钱大伟. LC-MS/MS 联用技术分析野马追及复方野马追胶囊中的黄酮类成分 [J]. 中国药科大学学报，2008，39(2)：147-150.
- [14] 钟鸣，张宝璟，王超，等. 排钱草药材质量评价方法的研究 [J]. 中成药，2016，38(1)：130-133.
- [15] 胡青，于泓，冯睿，等. UHPLC/QTOF 法下连翘提取物 HPLC 指纹图谱的建立 [J]. 中成药，2018，40(3)：749-753.
- [16] 张贻昌，王明耿. 中药产品质量过程控制的重要性 [J]. 中成药，2012，34(8)：1581-1585.