不同产地伸筋草的质量评价Δ

张　蕊[1,2,3*]，冯晓川[1,2,3]，徐延昭[4]，许保海[1,2,3#]（1.首都医科大学附属北京积水潭医院中药房，北京　100035；2.北京大学第四临床医学院，北京　100035；3.国家骨科医学中心，北京　100035；4.中国食品药品检定研究院，北京　100050）

中图分类号　R917；R284　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）22-2732-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.22.05

摘　要　目的　评价不同产地伸筋草的质量。**方法**　以6省产的16批伸筋草为样品，采用一测多评（QAMS）法检测伸筋草中α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草蕊宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇含量，并与外标法结果进行比较；根据《中国药典》附录方法检测浸出物和总灰分。将上述指标结合主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析、加权逼近理想排序（TOPSIS）法评价其质量。**结果**　16批样品中伸筋草蕊宁醇含量为0.183～0.446 mg/g；以伸筋草蕊宁醇为内参物，按QAMS法测得α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇的含量分别为1.250～2.097、0.690～1.184、0.035～0.102、0.076～0.150、0.356～0.570、0.085～0.229、0.238～0.855 mg/g，与外标法结果无显著差异；浸出物为12.18%～22.78%，总灰分为3.16%～6.11%。主成分分析显示S1～S6、S7～S11、S12～S16分别聚为3类。α-玉柏碱、β-谷甾醇、伸筋草蕊宁醇、β-玉柏碱和21-表千层塔烯二醇的变量重要性投影值均大于1。加权TOPSIS法评价结果显示，S14样品的质量最优（相对贴近度为0.709 2）。**结论**　云南绥江县伸筋草质量最优。本研究建立的QAMS法结合化学计量学和加权TOPSIS分析可用于不同产地伸筋草的质量评价。

关键词　伸筋草；高效液相色谱法；化学计量学方法；正交偏最小二乘判别分析法；加权TOPSIS法；质量评价；一测多评法

Quality evaluation of *Lycopodium japonicum* from different producing areas

ZHANG Rui[1,2,3], FENG Xiaochuan[1,2,3], XU Yanzhao[4], XU Baohai[1,2,3] (1. Dept. of Chinese Pharmacy, Beijing Jishuitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100035, China; 2. The Fourth Clinical Medical College of Peking University, Beijing 100035, China; 3. National Center for Orthopedics, Beijing 100035, China; 4. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To evaluate the quality of *Lycopodium japonicum* from different producing areas. **METHODS** Sixteen batches of *L. japonicum* from six provinces were used as samples. The contents of α-obscurine, β-obscurine, lycopodine, lycodoline, lyclaninol, 21-episerratenediol, stigmasterol and β-sitosterol in *L. japonicum* were detected by quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS). The results were compared with the results of external standard method. The extract and total ash were measured according to the appendix of *Chinese Pharmacopoeia*. Principal component analysis, orthogonal partial least squares-discriminant analysis and weighted technique for order preference by similarity to ideal solution (TOPSIS) methods were combined to evaluate its quality. **RESULTS** The contents of lyclaninol in the 16 batches of *L. japonicum* were 0.183-0.446 mg/g. Using lyclaninol as internal reference material, the contents of α-obscurine, β-obscurine, lycopodine, lycodoline, 21-episerratenediol, stigmasterol and β-sitosterol were 1.250-2.097, 0.690-1.184, 0.035-0.102, 0.076-0.150, 0.356-0.570, 0.085-0.229 and 0.238-0.855 mg/g, respectively, with no significant difference from the results of external standard method. The extract was 12.18%-22.78%, and the total ash was 3.16%-6.11%. Principal component analysis showed that samples S1-S6, S7-S11, S12-S16 could be clustered into 3 categories. The variable importance in projection values for α-obscurine, β-sitosterol, lyclaninol, β-obscurine and 21-episerratenediol were all greater than 1. The weighted TOPSIS evaluation results showed that sample S14 had the best quality (J_b= 0.709 2). **CONCLUSIONS** *L. japonicum* from Suijiang county of Yunnan province had the best quality. The established QAMS combined with chemometric and weighted TOPSIS methods can be used for quality evaluation of *L. japonicum* from different producing areas.

KEYWORDS　*Lycopodium japonicum*; HPLC; chemometric methods; OPLS-DA; weighted TOPSIS method; quality evaluation; QAMS

Δ**基金项目**　国家中医药管理局2023年全国中药特色技术传承人才培训项目（No.国中医药人教函〔2023〕96号）；北京市医院管理中心“青苗”计划（No.QML20230407）；北京市属医院科研培育计划（No.PZ2021005）；北京积水潭医院高层次人才“学科骨干”计划专项（No.XKGG202214）

＊**第一作者**　副主任药师，硕士。研究方向：中药品质评价、协定处方与制剂开发。电话：010-58516713。E-mail：otx776@163.com

＃**通信作者**　主任药师。研究方向：中药及制剂研发。电话：010-58516553。E-mail：nhdizw@163.com

伸筋草为石松科植物石松 *Lycopodium japonicum* Thunb.的干燥全草，具有祛风除湿、舒筋活络之功效，临床用于治疗关节酸痛、屈伸不利等[1]。现代研究发现，伸筋草主要含有生物碱类、三萜类、甾体类、黄酮类和苯丙素类等化学成分[2]，可显著抑制破骨细胞活性，具有良好的抗炎和镇痛作用[3-5]。伸筋草收录于2020年版《中国药典》（一部），但质量控制未涉及含量检测项[1]。其原产于热带山区，现主要分布于东北、华东、中南和西南地区，主产于贵州、浙江、湖北、江苏、云南等省，为贵州省道地药材之一，龙里、贵定等地为其主产区。由于中药所含化学成分易受种属、产地气候土壤、采收时间及炮制方法的影响，为确保其临床治疗效果，本研究收集贵州、云南、湖北、湖南、浙江、江苏等6省不同产地的16批伸筋草药材，采用一测多评（quantitative analysis of multi-components by single-marker，QAMS）法同时测定伸筋草中α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇共8个有效成分的含量，并采用化学计量学方法[6]和加权逼近理想排序（technique for order preference by similarity to ideal solution，TOPSIS）法[7]对伸筋草的质量进行评价，旨在为伸筋草道地研究提供数据支撑，也为伸筋草质量差异性控制提供科学的试验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Waters e2695型高效液相色谱仪（美国Waters公司）、Primaide 1430型高效液相色谱仪（日本Hitachi公司）、EL2401型电子分析天平（瑞士Mettler Toledo公司）等。

1.2 主要药品与试剂

β-谷甾醇对照品（批号PRF8031544，纯度96.2%）和豆甾醇对照品（批号PRF8071843，纯度98.8%）均购自成都普瑞法科技开发有限公司；石松灵碱对照品（批号CFS202201，纯度98.2%）、伸筋草萜宁醇对照品（批号CFS202001，纯度98.0%）和21-表千层塔烯二醇对照品（批号CFS202301，纯度98.5%）均购自武汉天植生物技术有限公司；α-玉柏碱对照品（批号HY134036-146505，纯度99.6%）、β-玉柏碱对照品（批号HY-N11498-23126，纯度98.2%）和石松碱对照品（批号HY-114372-22154，纯度98.7%）均购自上海皓元生物医药科技有限公司；乙腈（色谱纯）和磷酸（色谱纯）均购自美国Roe Scientific公司。

16批伸筋草药材（编号S1～S16）均经首都医科大学附属北京积水潭医院中药房许保海主任药师按2020年版《中国药典》标准，鉴定为石松科植物石松 *L. japonicum* Thunb.的干燥全草，产地信息见表1。

表1 16批伸筋草样品产地信息

编号	产地	批号	编号	产地	批号
S1	浙江磐安县	220803	S9	湖南桑植县	230902
S2	浙江天台县	230705	S10	湖南华容县	230701
S3	浙江仙居县	220901	S11	湖南龙山县	230801
S4	江苏东海县	220802	S12	云南砚山县	230902
S5	江苏丹阳市	230701	S13	云南宾川县	220701
S6	江苏句容市	230906	S14	云南绥江县	230803
S7	湖北竹山县	230801	S15	贵州龙里县	230902
S8	湖北鹤峰县	230701	S16	贵州贵定县	231001

2 方法与结果

2.1 QAMS法测定多成分含量

2.1.1 混合对照品溶液制备

取各对照品适量，精密称定，用50%甲醇溶解，分别制成每1 mL含α-玉柏碱0.310 mg、β-玉柏碱0.166 mg、石松碱0.018 mg、石松灵碱0.024 mg、伸筋草萜宁醇0.096 mg、21-表千层塔烯二醇0.130 mg、豆甾醇0.052 mg和β-谷甾醇0.148 mg的单一贮备液；精密吸取上述单一贮备液各1 mL，置于同一10 mL容量瓶中，加50%甲醇定容，摇匀，即得上述成分质量浓度分别为31.00、16.60、1.80、2.40、9.60、13.00、5.20和14.80 μg/mL的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备

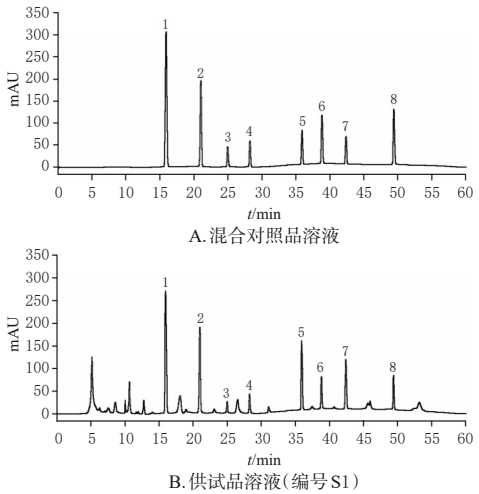
取伸筋草样品粉末约0.6 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加50%甲醇25 mL，密塞，称定质量；加热回流提取60 min，放冷，再次称定质量，用50%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件

以Nucleosil C_{18}为色谱柱；以0.05%磷酸（A）-乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0～12 min，20.0%B；12～31 min，20.0%B→56.0%B；31～53 min，56.0%B→85.0%B；53～60 min，85.0%B→20.0%B），运行时间为60 min；检测波长为256 nm（0～31 min检测α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱和石松灵碱）、210 nm（31～60 min检测伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇）；柱温为30 ℃；流速为1.0 mL/min；进样量为10 μL。取混合对照品溶液和供试品溶液（编号S1）进样测定，记录色谱图（图1），结果显示，α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇色谱峰均能达到基线分离，供试品溶液中8个成分色谱峰与对照品出峰位置基本一致。

2.1.4 线性关系考察

按“2.1.1”项下方法，分别准确量取各单一贮备液适量，采用逐级稀释法，用50%甲醇制得6个浓度梯度的混合对照品溶液；再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定，记录α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜



A. 混合对照品溶液

B. 供试品溶液（编号S1）

1：α-玉柏碱；2：β-玉柏碱；3：石松碱；4：石松灵碱；5：伸筋草萜宁醇；6：21-表千层塔烯二醇；7：豆甾醇；8：β-谷甾醇。

图1　混合对照品溶液和供试品溶液的色谱图

宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇的峰面积。以峰面积为纵坐标（y）、质量浓度为横坐标（x）进行线性回归，结果见表2。

表2　8个成分的线性关系考察结果

成分	不同梯度的质量浓度/（μg/mL）						回归方程	线性范围/（μg/mL）	r
	1	2	3	4	5	6			
α-玉柏碱	1.55	3.10	7.75	15.50	31.00	38.75	y=1.034 3×10^6x−351.4	1.55～38.75	0.999 6
β-玉柏碱	0.83	1.66	4.15	8.30	16.60	20.75	y=9.622 5×10^5x+1 055.2	0.83～20.75	0.999 1
石松碱	0.09	0.18	0.45	0.90	1.80	2.25	y=4.067 0×10^5x+235.7	0.09～2.25	0.999 5
石松灵碱	0.12	0.24	0.60	1.20	2.40	3.00	y=5.266 5×10^5x−446.1	0.12～3.00	0.999 7
伸筋草萜宁醇	0.48	0.96	2.40	4.80	9.60	12.00	y=5.997 0×10^5x+1 529.7	0.48～12.00	0.999 4
21-表千层塔烯二醇	0.65	1.30	3.25	6.50	13.00	16.25	y=7.898 8×10^5x−282.9	0.65～16.25	0.999 2
豆甾醇	0.26	0.52	1.30	2.60	5.20	6.50	y=7.439 8×10^5x−2 332.5	0.26～6.50	0.999 7
β-谷甾醇	0.74	1.48	3.70	7.40	14.80	18.50	y=8.916 8×10^5x+1 361.9	0.74～18.50	0.999 1

2.1.5　精密度、稳定性与重复性试验

（1）精密度试验：按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液（编号S1），再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定6次，结果显示，α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇峰面积的RSD分别为0.84%、1.05%、1.64%、1.59%、0.62%、1.28%、1.43%和1.11%（n=6），表明方法精密度良好；（2）稳定性试验：按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液（编号S1），室温放置0、2、4、8、12、18、24 h时进样测定，结果显示，上述8个成分峰面积的RSD分别为1.18%、1.25%、1.91%、1.72%、0.74%、1.37%、1.51%和1.29%（n=7），表明供试品溶液在室温下放置24 h稳定性良好；（3）重复性试验：取同批次伸筋草（编号S1）样品6份，分别按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，记录峰面积，采用外标法（external standard method，ESM）计算上述8个成分的含量，结果显示，上述8个成分含量的RSD分别为1.28%、1.31%、1.82%、1.75%、0.95%、1.49%、1.64%和1.37%（n=6），表明方法重复性良好。

2.1.6　加样回收率试验

取同批次伸筋草（编号S1）样品9份，每份约0.3 g，精密称定，按已知各成分含量的80%、100%、120%加入混合对照品溶液，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，每个比例制备3份，再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定。结果显示，α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇的平均加样回收率分别为100.07%、99.30%、97.42%、97.86%、98.77%、99.14%、96.91%和99.46%，RSD分别为0.76%、1.39%、1.48%、1.76%、1.37%、1.24%、1.42%和1.18%（n=9）。

2.1.7　相对校正因子计算

取“2.1.4”项下6个质量浓度梯度的混合对照品溶液各10 μL，按“2.1.3”项下色谱条件进样测定，以伸筋草萜宁醇为内参物，计算相对校正因子（f）：$f=\frac{c_s\times A_i}{c_i\times A_s}$。式中$c_s$和$c_i$分别代表待测成分和内参物的质量浓度，$A_s$和$A_i$分别代表待测成分和内参物的峰面积，取6个浓度的平均f值作为定量的f值[8－9]。结果见表3。

表3　不同混合对照品溶液f值的测定结果

序号	α-玉柏碱	β-玉柏碱	石松碱	石松灵碱	21-表千层塔烯二醇	豆甾醇	β-谷甾醇
1	0.587 4	0.616 6	1.456 2	1.158 0	0.766 1	0.833 1	0.665 7
2	0.584 4	0.614 3	1.467 1	1.168 5	0.766 3	0.831 6	0.688 4
3	0.590 2	0.645 5	1.491 1	1.172 9	0.778 1	0.833 3	0.686 9
4	0.585 3	0.620 7	1.474 1	1.157 1	0.757 1	0.826 8	0.667 2
5	0.573 5	0.623 9	1.449 9	1.131 2	0.759 2	0.807 9	0.662 0
6	0.583 9	0.623 7	1.486 2	1.147 3	0.762 2	0.809 1	0.681 2
平均值	0.584 1	0.624 1	1.470 8	1.155 8	0.764 8	0.823 6	0.675 2
RSD/%	0.97	1.79	1.11	1.31	0.98	1.45	1.72

2.1.8　f值的耐用性考察

考察不同仪器及色谱柱、流速、柱温对f值的影响。仪器包括Waters e2695型和Primaide 1430型，色谱柱包括Nucleosil C_{18}、Jupiter 300 C_{18}、Discovery HS C_{18}，流速包括0.8、1.0、1.2 mL/min，柱温包括25、30、35 ℃。取“2.1.1”项下混合对照品溶液进样测定，结果显示，使用不同仪器和不同色谱柱时，α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇的平均f值分别为0.583 7、0.629 1、1.472 7、1.159 2、0.768 2、0.822 6、0.674 4；不同流速下，上述成分的平均f值分别为0.583 0、0.625 3、1.469 1、1.152 1、0.766 3、0.821 5、0.675 6；不同柱温下，上述成分的平均f值分别为0.584 7、0.627 5、1.471 3、1.155 3、0.766 6、0.824 1、0.675 9，上述RSD均小于2.0%。

2.1.9　相对保留时间计算

记录“2.1.8”项下使用不同仪器和不同色谱柱时α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇色谱峰的保留时间，以伸筋草萜宁醇为内参物，采用相对保留时间（RT）法[8]定位待测成分的色谱峰，考察不同仪器和色谱柱对RT的影响，结果见表4。

表4　不同仪器和色谱柱对RT的影响

仪器	色谱柱	α-玉柏碱	β-玉柏碱	石松碱	石松灵碱	21-表千层塔烯二醇	豆甾醇	β-谷甾醇
Waters e2695	Nucleosil C_{18}	0.443 9	0.584 8	0.695 5	0.786 4	1.081 8	1.180 3	1.377 3
	Jupiter 300 C_{18}	0.446 2	0.591 3	0.702 9	0.796 2	1.086 9	1.196 4	1.385 0
	Discovery HS C_{18}	0.453 7	0.603 7	0.708 3	0.803 5	1.098 5	1.203 7	1.406 7
Primaide 1430	Nucleosil C_{18}	0.435 9	0.574 6	0.683 5	0.776 9	1.074 1	1.171 6	1.361 9
	Jupiter 300 C_{18}	0.441 6	0.589 1	0.692 7	0.783 4	1.086 2	1.180 9	1.378 2
	Discovery HS C_{18}	0.452 4	0.602 5	0.705 2	0.798 6	1.096 6	1.198 3	1.395 6
平均值		0.445 6	0.591 0	0.698 0	0.790 8	1.087 4	1.188 5	1.384 1
RSD/%		1.51	1.86	1.32	1.29	0.84	1.06	1.13

2.1.10　16批伸筋草样品含量测定

取16批伸筋草样品，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，每批制备3份，再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定。采用ESM计算样品中α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇的含量；再以伸筋草萜宁醇为内参物，利用QAMS法计算样品中其他成分的含量。运用SPSS 26.0统计软件对两种方法所得数据进行独立样本t检验，结果显示，两种方法所得含量差异无统计学意义（$P>0.05$），但批次间各成分含量差异较大，结果见表5。

2.2　16批伸筋草样品的浸出物和总灰分测定

分别参照2020年版《中国药典》（四部）通则2201浸出物测定法、2302灰分测定法[10]测定16批伸筋草样品的浸出物和总灰分，每批样品测定2次，结果见表6。

2.3　16批伸筋草样品的化学计量学分析

以16批伸筋草中8个成分的含量（伸筋草萜宁醇采用ESM法，其余成分采用QAMS法，下同）、浸出物、总灰分结果为变量，利用SIMCA 14.1软件对16×10矩阵数据进行主成分分析（图2，图中每一点代表一个样品）。结果显示，16批伸筋草大致聚为3类，S1～S6样品为一类，S7～S11样品为一类，S12～S16样品为一类，且所有检测数据无异常（所有数据点均在95%置信区间内）。在此基础上构建正交偏最小二乘法-判别分析（orthogonal partial least squares-discrimination analysis，OPLS-DA）模型（图3），结果模型参数$R^2X=0.929$、$R^2Y=0.837$、$Q^2=0.795$，均大于0.5[11]，表明建立的模型稳定可靠、预测能力好。进一步分析变量重要性投影（variable importance for projection，VIP），以VIP＞1为标准提取质量差异因子[6]，结果（图4）显示，VIP＞1的成分有α-玉柏碱、β-玉柏碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇和β-谷甾醇，表明这5个成分对伸筋草的质量差异贡献较大。

2.4　16批伸筋草样品的加权TOPSIS分析

2.4.1　数据归一化处理

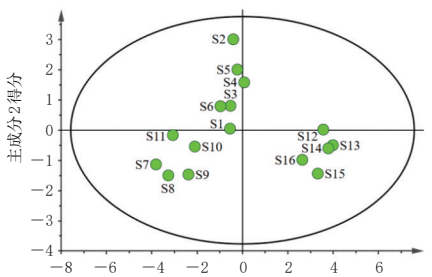
本研究以8个成分的含量、浸出物和总灰分结果为指标数据进行加权TOPSIS分析，由于各指标数据量纲不同，变量间差异较大，所以要将各个变量的数据进行归一化处理[12]。8个成分含量和浸出物属于越大越优型指标，根据公式$Z_{bc}=\frac{X_{bc}-\min(x_c)}{\max(x_c)-\min(x_c)}$进行归一化处理；总灰分属于越小越优型指标，根据公式$Z_{bc}=\frac{\max(x_c)-X_{bc}}{\max(x_c)-\min(x_c)}$进行归一化处理。式中，$Z_{bc}$为归一化后数据，$X_{bc}$为检测数据，b为样品编号，c为检测指标。结果见表7。

表5　16批伸筋草样品含量测定结果（$n=3$，mg/g）

样品编号	伸筋草萜宁醇	α-玉柏碱		β-玉柏碱		石松碱		石松灵碱		21-表千层塔烯二醇		豆甾醇		β-谷甾醇	
	（ESM）	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS
S1	0.319	1.619	1.574	0.821	0.798	0.056	0.055	0.093	0.091	0.458	0.471	0.167	0.163	0.524	0.513
S2	0.446	1.695	1.651	0.998	0.975	0.062	0.061	0.120	0.117	0.586	0.570	0.108	0.105	0.397	0.386
S3	0.368	1.567	1.523	0.941	0.917	0.075	0.073	0.103	0.101	0.479	0.468	0.124	0.127	0.481	0.486
S4	0.394	1.653	1.610	0.913	0.888	0.064	0.065	0.112	0.109	0.504	0.518	0.149	0.145	0.585	0.569
S5	0.383	1.442	1.477	0.944	0.970	0.071	0.069	0.117	0.114	0.564	0.548	0.126	0.123	0.469	0.458
S6	0.332	1.406	1.374	0.942	0.919	0.074	0.075	0.095	0.093	0.499	0.490	0.116	0.113	0.427	0.415
S7	0.200	1.279	1.250	0.736	0.717	0.036	0.035	0.074	0.076	0.447	0.459	0.087	0.085	0.261	0.267
S8	0.183	1.264	1.298	0.709	0.690	0.038	0.039	0.081	0.079	0.459	0.448	0.096	0.098	0.244	0.238
S9	0.281	1.402	1.374	0.792	0.774	0.045	0.044	0.082	0.080	0.351	0.356	0.104	0.107	0.288	0.296
S10	0.306	1.561	1.522	0.734	0.755	0.048	0.047	0.084	0.082	0.442	0.434	0.125	0.122	0.512	0.498
S11	0.260	1.373	1.339	0.764	0.744	0.044	0.043	0.076	0.078	0.482	0.494	0.095	0.093	0.285	0.277
S12	0.294	2.069	2.017	1.139	1.110	0.097	0.095	0.148	0.144	0.450	0.438	0.187	0.184	0.799	0.785
S13	0.249	1.973	1.928	1.205	1.184	0.091	0.092	0.143	0.139	0.419	0.413	0.207	0.202	0.721	0.730
S14	0.307	2.154	2.097	1.179	1.146	0.104	0.102	0.147	0.150	0.387	0.398	0.234	0.229	0.834	0.827
S15	0.240	2.101	2.051	1.002	1.027	0.086	0.088	0.132	0.129	0.392	0.383	0.217	0.211	0.869	0.855
S16	0.271	2.024	1.971	1.084	1.056	0.081	0.079	0.126	0.123	0.381	0.372	0.170	0.174	0.712	0.698
P		0.758		0.800		0.935		0.848		0.911		0.907		0.926	

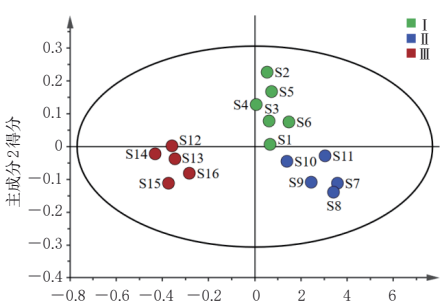
表6　16批伸筋草样品的浸出物和总灰分测定结果（$n=2$，%）

编号	浸出物	总灰分	编号	浸出物	总灰分
S1	18.62	5.11	S9	15.85	5.87
S2	16.06	4.36	S10	12.18	6.03
S3	16.57	5.39	S11	15.62	6.11
S4	17.92	4.72	S12	22.01	4.06
S5	18.34	4.93	S13	22.78	3.16
S6	17.16	5.26	S14	19.92	5.22
S7	13.67	5.90	S15	21.42	4.37
S8	14.81	5.84	S16	20.75	3.91



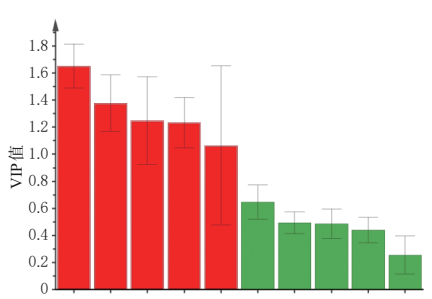
$R^2X[1]=0.717$　$R^2X[2]=0.177$　Ellipse:Hotelling's T^2(95%)

图2　16批伸筋草样品的主成分分析得分图



$R^2X[1]=0.802$　$R^2X[2]=0.127$　Ellipse:Hotelling's T^2(95%)

图3　16批伸筋草样品的OPLS-DA得分图



1:α-玉柏碱;2:β-玉柏碱;3:石松碱;4:石松灵碱;5:伸筋草萜宁醇;6:21-表千层塔烯二醇;7:豆甾醇;8:β-谷甾醇;9:浸出物;10:总灰分。

图4　16批伸筋草样品中各指标的VIP值

2.4.2　正理想解和负理想解确定

以α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇、β-谷甾醇含量，浸出物和总灰分共10个指标的VIP值（1.651 6、1.234 1、0.441 9、0.494 3、1.247 2、1.065 5、0.646 9、1.377 4、0.487 4和0.255 7）为权重[13]，将归一化处理的数据与各成分权重相乘，得加权决策矩阵。以矩阵中各成分的最大值为正理想解（Z_c^+），最小值为负理想解（Z_c^-）。

表7　16批伸筋草样品中8个成分含量、浸出物和总灰分的归一化处理结果

样品编号	α-玉柏碱	β-玉柏碱	石松碱	石松灵碱	伸筋草萜宁醇	21-表千层塔烯二醇	豆甾醇	β-谷甾醇	浸出物	总灰分
S1	0.382 5	0.218 6	0.298 5	0.202 7	0.517 1	0.537 4	0.541 7	0.445 7	0.607 5	0.661 0
S2	0.473 4	0.576 9	0.388 1	0.554 1	1.000 0	1.000 0	0.138 9	0.239 9	0.366 0	0.406 8
S3	0.322 3	0.459 5	0.567 2	0.337 8	0.703 4	0.523 4	0.291 7	0.401 9	0.414 2	0.755 9
S4	0.425 0	0.400 8	0.447 8	0.445 9	0.802 3	0.757 0	0.416 7	0.536 5	0.541 5	0.528 8
S5	0.268 0	0.566 8	0.507 5	0.513 5	0.760 5	0.897 2	0.263 9	0.356 6	0.581 1	0.600 0
S6	0.146 4	0.463 6	0.597 0	0.229 7	0.566 5	0.626 2	0.194 4	0.286 9	0.469 8	0.711 9
S7	0	0.054 7	0	0	0.064 6	0.481 3	0	0.047 0	0.140 6	0.928 8
S8	0.056 7	0	0.059 7	0.040 5	0	0.429 9	0.090 3	0	0.248 1	0.908 1
S9	0.146 4	0.170 0	0.134 3	0.054 1	0.372 6	0	0.152 8	0.094 0	0.346 2	0.920 0
S10	0.321 1	0.131 6	0.179 1	0.081 1	0.467 7	0.364 5	0.256 9	0.421 4	0	0.971 9
S11	0.105 1	0.109 3	0.119 4	0.027 0	0.292 8	0.644 9	0.055 6	0.063 2	0.324 5	1.000 0
S12	0.905 5	0.850 2	0.895 5	0.918 9	0.422 1	0.383 2	0.687 5	0.886 5	0.927 4	0.305 1
S13	0.800 5	1.000 0	0.850 7	0.851 4	0.251 0	0.266 4	0.812 5	0.797 4	1.000 0	0
S14	1.000 0	0.923 1	1.000 0	1.000 0	0.471 5	0.196 3	1.000 0	0.954 6	0.730 2	0.698 3
S15	0.945 7	0.682 2	0.791 0	0.716 2	0.216 7	0.126 2	0.875 0	1.000 0	0.871 7	0.410 2
S16	0.851 2	0.740 9	0.656 7	0.635 1	0.334 6	0.074 8	0.618 1	0.745 5	0.808 5	0.254 2

2.4.3　相对贴近度计算及质量排序

在加权TOPSIS评价应用中，通常以相对贴近度（J_b）为指标，其中$0<J_b<1$，J_b值越大，代表被评价样品质量越优[14]。根据公式$D_b^+=\sqrt{\sum_{c=1}^{10}(Z_{bc}-Z_c^+)^2}$、$D_b^-=\sqrt{\sum_{c=1}^{10}(Z_{bc}-Z_c^-)^2}$、$J_b=\frac{D_b^-}{D_b^++D_b^-}$[13]分别计算16批伸筋草样品的最优向量欧氏距离（D_b^+）、最差向量欧氏距离（D_b^-）和J_b，并根据J_b值的大小对样品质量进行排序，结果见表8。

表8　16批伸筋草样品的质量评价结果

编号	D_b^+	D_b^-	J_b	排序	编号	D_b^+	D_b^-	J_b	排序
S1	1.882 1	1.363 4	0.420 1	10	S9	2.666 3	0.658 0	0.197 9	14
S2	1.635 7	2.018 3	0.552 4	6	S10	2.178 7	1.110 3	0.337 6	12
S3	1.791 7	1.482 1	0.452 7	9	S11	2.615 9	0.869 5	0.249 5	13
S4	1.525 0	1.784 3	0.539 2	7	S12	1.054 5	2.458 3	0.699 8	2
S5	1.737 3	1.728 5	0.498 7	8	S13	1.326 7	2.342 6	0.638 4	3
S6	2.088 5	1.292 3	0.382 2	11	S14	1.097 2	2.676 0	0.709 2	1
S7	2.917 6	0.582 5	0.166 4	15	S15	1.429 8	2.428 2	0.629 4	4
S8	2.941 2	0.540 1	0.155 1	16	S16	1.451 8	2.132 9	0.595 0	5

3　讨论

3.1　指标成分及内参物的选择

伸筋草能祛风除湿、舒筋活络，具有抗炎、镇痛、抗氧化、兴奋中枢神经、抑制乙酰胆碱酯酶、抗菌、抗血小板凝聚及治疗骨科疾病等作用。现代研究发现，α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱和石松灵碱等为伸筋草中的主要生物碱类成分，其能显著减轻弗氏完全佐剂诱导的关节炎大鼠的关节肿胀，改善其滑膜病变，尤其是α-玉柏碱能有效减轻氧化应激和炎症，具有较好的抗炎作用[15]；伸筋草生物碱对佐剂性关节炎大鼠具有明显的抗炎作用[16]，其可通过调节细胞因子的水平抑制类风湿因子，从而达到治疗或减轻类风湿关节炎的目的。伸筋草萜

宁醇、21-表千层塔烯二醇为伸筋草中的主要三萜类成分，具有抑菌和抑制乙酰胆碱酯酶活性等作用[5]。β-谷甾醇和豆甾醇为其主要的甾体类成分，其中β-谷甾醇能通过抑制表皮细胞和巨噬细胞中炎症小体NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3的激活，抑制半胱氨酸蛋白酶1的产生及丝裂原活化蛋白激酶信号通路的活化，从而减少细胞中炎症因子的生成，发挥抗炎作用[17]。本研究选取α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇等有效成分为检测指标，若采用常规的多指标成分定量检测方法，对照品使用量大，检测成本高，不利于方法的普及应用。QAMS法能利用中药成分间存在的内在函数和比例关系，通过检测多指标成分中某个代表性成分（即内参物）含量和计算*f*值实现多个成分含量的同步检测。在上述8个成分中，伸筋草萜宁醇为伸筋草的特征成分，质量较为稳定、易得，含量和出峰时间较为居中，符合内参物选取要求；同时，以伸筋草萜宁醇为内参物在不同仪器和色谱柱条件下所建立的*f*值适用性良好，且不同流速和柱温对*f*值无显著影响。故本研究最终选取伸筋草萜宁醇为内参物。

3.2 检测波长的确定

伸筋草中α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇在200～400 nm波长内有较好的吸收。采用紫外扫描法对混合对照品溶液进行检测，综合8个成分最大吸收情况，分别采用不同波长对比考察发现，α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱和石松灵碱在256 nm波长处均有较大吸收，伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇在210 nm波长处信号响应值均较高，故采用上述两个波长检测以上8个成分的含量。

3.3 样品质量评价结果分析

本试验比较了采用QAMS法和ESM测得的16批伸筋草样品中α-玉柏碱、β-玉柏碱、石松碱、石松灵碱、伸筋草萜宁醇、21-表千层塔烯二醇、豆甾醇和β-谷甾醇的含量差异，结果显示，两种方法的测定结果未见显著差异，但每一成分在批次间存在一定的差异；同时总灰分的测定结果出现个别批次超出2020年版《中国药典》一部限度要求（不得超过6.0%），这可能与产地环境有关。利用化学计量学对16批伸筋草样品中8个成分含量、浸出物及总灰分数据进行分析，主成分分析得分图显示各批次散点不够集中，表明各批次间质量差异较大；相邻产区的伸筋草聚在一组，提示相邻产区的伸筋草质量较为相近。VIP值＞1的成分有α-玉柏碱、β-谷甾醇、伸筋草萜宁醇、β-玉柏碱和21-表千层塔烯二醇，表明以上5个成分是伸筋草的质量差异因子，建议将这5种质量差异成分纳入其质控标准中，为进一步评价伸筋草综合质量提供参考。加权TOPSIS法结果显示，16批伸筋草样品的J_b为0.155 1～0.709 2，表明各批次间伸筋草质量差异较大，其中S14样品（云南绥江县伸筋草）的质量最优。

综上所述，贵州、云南、湖北、湖南、浙江、江苏6省中云南绥江县产伸筋草质量最优。本研究建立的QAMS法结合化学计量学和加权TOPSIS分析可用于不同产地伸筋草的质量评价。但本研究也存在一定不足，如样品产地和批次量收集有限。后续本课题组将继续扩大样品收集产地和收集批次，同时对海拔、气候（光照、温度和降水量等）、土壤环境等影响样品质量的关键数据进行收集分析，以期为进一步提升伸筋草质控水平和道地研究提供更为全面的数据支持。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[M]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：184.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China：part Ⅰ[M]. 2020 edition. Beijing：China Medical Science and Technology Press，2020：184.

[2] 任琴，徐康平，刘阳，等. 伸筋草的化学成分研究[J]. 中南药学，2020，18(3)：466-469.
REN Q，XU K P，LIU Y，et al. Chemical constituents from Lycopodii Herba[J]. Cent South Pharm，2020，18(3)：466-469.

[3] 王继坤，宋长红，关秀锋. 伸筋草的化学成分及药理作用研究进展[J]. 化学工程师，2021，35(7)：55-57.
WANG J K，SONG C H，GUAN X F. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Lycopodium clavatum*[J]. Chem Eng，2021，35(7)：55-57.

[4] 滕希峰，刘雅兰，杨菲，等. 马尾伸筋草化学成分及抗骨质疏松活性研究[J]. 天然产物研究与开发，2022，34(2)：226-231.
TENG X F，LIU Y L，YANG F，et al. Chemical constituents from *Lycopodium fargesii* and their anti-osteoporotic activity[J]. Nat Prod Res Dev，2022，34(2)：226-231.

[5] 刘雅兰. 三种植物的化学成分及其抑制破骨细胞产生活性的研究[D]. 广州：广东药科大学，2020.
LIU Y L. Study on the chemical composition and inhibition of osteoclast production activity of three plants[D]. Guangzhou：Guangdong Pharmaceutical University，2020.

[6] 万雄飞，梁美锋，廖念，等. 多成分定量分析结合化学计量学和熵权TOPSIS法综合评价益肺清化膏质量[J]. 中

国药房，2024，35(15)：1837-1843.
WAN X F，LIANG M F，LIAO N，et al. Comprehensive evaluation of Yifei qinghua ointment by multi-component quantitative analysis combined with chemometrics and entropy weight TOPSIS[J]. China Pharm，2024，35(15)：1837-1843.

[7] 王换，刘惠，王志坚，等. 基于一测多评、加权TOPSIS与GRA融合模型的松龄血脉康胶囊质量评价[J]. 中药新药与临床药理，2024，35(9)：1413-1419.
WANG H，LIU H，WANG Z J，et al. Quality evaluation of Songling xuemaikang capsules based on the hybrid model combining QAMS，weighted TOPSIS and grey relational analysis[J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol，2024，35(9)：1413-1419.

[8] 孙越鹏，王梦雪，宋丹，等. 基于一测多评多组分定量质控联合主成分分析、正交偏最小二乘法-判别分析及熵权逼近理想解排序法的盐沙苑子饮片综合质量评价[J]. 中草药，2023，54(24)：8077-8085.
SUN Y P，WANG M X，SONG D，et al. Comprehensive quality evaluation of salt-Astragali Complanati Semen based on QAMS multi-component quantitative quality control combined with PCA，OPLS-DA and EW-TOPSIS method[J]. Chin Tradit Herb Drugs，2023，54(24)：8077-8085.

[9] 沈洁，王琴，熊维建，等. HPLC-一测多评法测定参芪延肾颗粒中淫羊藿药材中的6个黄酮类成分的含量[J]. 中国药房，2019，30(17)：2327-2331.
SHEN J，WANG Q，XIONG W J，et al. Content determination of 6 flavonoids in *Epimedium brevicornu* from Shenqi yanshen granules based on HPLC-QAMS[J]. China Pharm，2019，30(17)：2327-2331.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：四部[M]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：232，234.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China：part Ⅳ[M]. 2020 edition. Beijing：China Medical Science and Technology Press，2020：232，234.

[11] 肖会敏，杨旭，黄新文，等. 基于HPLC指纹图谱及多成分含量的化学模式识别法评价小血藤质量[J]. 西北药学杂志，2022，37(5)：1-7.
XIAO H M，YANG X，HUANG X W，et al. Quality evaluation of *Schisandra propinqua* var. *sinensis* based on HPLC fingerprint and multi-component content determination[J]. Northwest Pharm J，2022，37(5)：1-7.

[12] 张兆芳，王耀鹏，宋治荣，等. 正交设计结合熵权法优选扶正屏风颗粒成型工艺[J]. 亚太传统医药，2023，19(11)：76-79.
ZHANG Z F，WANG Y P，SONG Z R，et al. Optimization of forming process of Fuzheng pingfeng granules by orthogonal design combined with entropy weight method[J]. Asia Pac Tradit Med，2023，19(11)：76-79.

[13] 张蕊，冯晓川，王培，等. 基于HPLC多成分、化学计量学联合熵权TOPSIS法的铁线透骨草综合质量评价[J]. 国际中医中药杂志，2023，45(8)：997-1003.
ZHANG R，FENG X C，WANG P，et al. Comprehensive quality evaluation of Herba Clematidis Intricatae based on HPLC multi-index components，chemometrics combined with EW-TOPSIS method[J]. Int J Tradit Chin Med，2023，45(8)：997-1003.

[14] 周丹，徐俊燕，张乐怡，等. 基于HPLC-QAMS多指标成分定量控制联合多元统计分析及加权TOPSIS法的食凉茶综合质量评价[J]. 中国药师，2023，26(12)：499-509.
ZHOU D，XU J Y，ZHANG L Y，et al. Comprehensive quality evaluation of Shiliang tea based on HPLC-QAMS combined with multivariate statistical analysis and E-TOPSIS method[J]. China Pharm，2023，26(12)：499-509.

[15] 刘雨露，朱子贵，张建新，等. α-玉柏碱减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. 药物分析杂志，2022，42(2)：287-293.
LIU Y L，ZHU Z G，ZHANG J X，et al. Reduced myocardial ischemia reperfusion injury in rats with α-obscurine[J]. J Pharmac Anal，2022，42(2)：287-293.

[16] 刘静，年华，徐熠，等. 伸筋草生物碱对佐剂性关节炎大鼠的抗炎作用及机制研究[J]. 药物评价研究，2019，42(5)：869-872.
LIU J，NIAN H，XU Y，et al. Anti-inflammatory effect and mechanism of shenjincao alkaloids on adjuvant arthritis rats[J]. Drug Evaluation Research，2019，42(5)：869-872.

[17] LIAO P C，LAI M H，HSU K P，et al. Identification of β-sitosterol as *in vitro* anti-inflammatory constituent in *Moringa oleifera*[J]. J Agric Food Chem，2018，66(41)：10748-10759.

（收稿日期：2024-06-18　修回日期：2024-10-29）
（编辑：邹丽娟）