

基于一测多评法研究畲药食凉茶黄酮类物质动态变化规律

王伟影，毛菊华，王发英，陈卫平*

丽水市食品药品与质量技术检验检测院，浙江 丽水 323000

摘要：目的 一测多评 (QAMS) 法测定畲药食凉茶中 4 种黄酮类成分，并以其研究食凉茶黄酮类物质的动态变化规律。方法 以芦丁为参照物，分别建立其与山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰素的相对校正因子 (f)，并计算食凉茶中各成分量，实现 QAMS。同时采用外标法验证 QAMS 法的准确性和可行性。结果 芦丁与山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山柰素的 f 分别为 1.158、0.475 6、0.431 9，RSD 分别为 0.73%、1.55%、1.58%；QAMS 法测定结果与外标法测定结果无显著差异。不同月份食凉茶中黄酮类成分质量分数差异明显，2 个来源食凉茶之间的量差异亦较明显。结论 以芦丁为参照物同时测定山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰素的 QAMS 法可用于畲药食凉茶的定量分析。以黄酮类物质为指标，食凉茶的最佳采收期为 7 月和 8 月。

关键词：一测多评法；相对校正因子；畲药；食凉茶；芦丁；山柰酚-3-O-芸香糖苷；槲皮素；山柰素；采收期

中图分类号：R286.022 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2017)12 - 2532 - 06

DOI：10.7501/j.issn.0253-2670.2017.12.027

Study on dynamic change of flavonoids in traditional SHE medicine-Shiliang Tea by quantitative analysis of multi-components by single-marker

WANG Wei-ying, MAO Ju-hua, WANG Fa-ying, CHEN Wei-ping

Lishui Institute for Food and Drug & Quality and Technology Control, Lishui 323000, China

Abstract: Objective To establish an assay method of flavonoids (four components) in traditional SHE medicine-Shiliang Tea by quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS), and to analyze the dynamic change of flavonoids at different harvest time and different collection places. **Methods** With rutin as the internal reference substance, the relative correction factor (RCF) of kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin, and kaempferol was calculated. Then the contents of four components were calculated, and the accuracy and feasibility of method was evaluated through external standard method. **Results** The RCF of rutin to kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin, and kaempferol were 1.158 with RSD 0.73%, 0.475 6 with RSD 1.55%, 0.431 9 with RSD 1.58%, respectively. There was no significant difference of assay results between QAMS method and external standard method. While the differences of content between different harvest months and two different species were significant. **Conclusion** The QAMS method with rutin as internal reference substance can be used for quantitative analysis of four flavonoids in Shiliang Tea. It is suggested that the best harvest time of Shiliang Tea for flavonoids is in July and August.

Key words: QAMS; RCF; traditional SHE medicine; Shiliang Tea; rutin; kaempferol-3-O-rutinoside; quercetin; kaempferol; harvest time

畲药食凉茶有 2 个来源，蜡梅科 (Calycanthaceae) 植物柳叶蜡梅 *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu 和浙江蜡梅 *Chimonanthus zhejiangensis* M. C. Liu 的干燥叶。夏秋两季叶茂盛时采收，除去杂质，抢水洗，阴干或低温干燥，是一味民间特别是畲族常用药材，曾被誉为江西四大著名药材之一。畲族主要用于治疗伤食所致的痞满

证和慢性胃炎、胃及十二指肠溃疡引起的胃胀、胃痛、泛酸等，还用于防治感冒和流行性感冒^[1]。现代研究表明，食凉茶的活性成分除挥发油外，还有黄酮、香豆素、蒽醌等非挥发性成分，其中以黄酮类成分为多^[2-4]，黄酮类物质具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤等药理作用^[5]。结合前期研究^[6]，本实验采用一测多评 (QAMS) 法^[7-8]，选取芦丁为参照

收稿日期：2017-01-11

基金项目：丽水市高层次人才培养项目（2015RC25）；浙江省食品药品监督管理与产业发展研究会项目（ZYH2016013）

作者简介：王伟影，女，副主任药师，研究方向为药物分析与质量控制。Tel: (0578)2661121 E-mail: onlyying0508@gmail.com

*通信作者 陈卫平，男，副主任药师，研究方向为药物分析与质量控制。Tel: (0578)2661101 E-mail: cwp.790515@163.com

物,通过建立芦丁与山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰素的相对校正因子^[9],计算出其他成分的量,最大限度降低检测成本,提高检验质量和效率,为畲药食凉茶多指标定量测定提供全新的分析模式;在此分析模式基础上,研究食凉茶不同月份黄酮类物质的量,为确定最佳采收期提供参考。

1 材料

1.1 仪器

电子天平(XS105DU,瑞士梅特勒公司);仪器Agilent 1260高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);DAD检测器;Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),(美国安捷伦公司);智能超声波清洗器(DL-360D,上海之信仪器有限公司);Waters e2695高效液相色谱仪(美国Waters公司);Waters XbridgeTM C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),(美国Waters公司);Phenomenex Luna C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),(美国Phenomenex公司);Inertsil[®] ODS-3 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),(日本岛津公司)。

1.2 试剂

芦丁(批号100080-200707,质量分数90.5%)、槲皮素(批号100081-200907,质量分数96.5%)、山柰素(批号110861-201209,质量分数93.2%),均购自中国食品药品检定研究院;山柰酚-3-O-芸香糖苷(批号14225,质量分数≥98.0%),购自上海抚养实业有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯(Merck),磷酸为色谱纯(科密欧),水为娃哈哈纯净水。

1.3 药材

食凉茶为蜡梅科植物柳叶蜡梅 *Chimonanthus salicifolius* S. Y. Hu、浙江蜡梅 *Chimonanthus zhejiangensis* M. C. Liu的干燥叶,自行采集,经由丽水市食品药品与质量技术检验检测院李水福主任中药师鉴定(表1),分别粉碎,过2号筛,备用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[6]

Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱(美国安捷伦公司);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液,梯度洗脱(0~10 min, 18%~30%乙腈;10~24 min, 30%~45%乙腈),体积流量为1.0 mL/min;柱温30 °C;检测波长为360 nm;进样量为10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取芦丁、山柰酚-

表1 食凉茶药材信息

Table 1 Information of Shiliang Tea

编号	采收期	来源	品种
LYLM-1	5月	浙江省松阳县	柳叶蜡梅
LYLM-2	6月	浙江省松阳县	柳叶蜡梅
LYLM-3	7月	浙江省松阳县	柳叶蜡梅
LYLM-4	8月	浙江省松阳县	柳叶蜡梅
LYLM-5	9月	浙江省松阳县	柳叶蜡梅
LYLM-6	10月	浙江省松阳县	柳叶蜡梅
ZJLM-1	5月	浙江省云和县	浙江蜡梅
ZJLM-2	6月	浙江省云和县	浙江蜡梅
ZJLM-3	7月	浙江省云和县	浙江蜡梅
ZJLM-4	8月	浙江省云和县	浙江蜡梅
ZJLM-5	9月	浙江省云和县	浙江蜡梅
ZJLM-6	10月	浙江省云和县	浙江蜡梅

3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰素对照品适量,分别加70%甲醇制成芦丁262.5 μg/mL、山柰酚-3-O-芸香糖苷809.6 μg/mL、槲皮素340.6 μg/mL、山柰素341.4 μg/mL的溶液,作为储备液。精密吸取4种储备液制成芦丁90.50 μg/mL、山柰酚-3-O-芸香糖苷64.76 μg/mL、槲皮素27.25 μg/mL、山柰素27.31 μg/mL的混合溶液,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品粉末0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,密塞,称定质量,30 °C以下超声处理60 min,放冷至室温,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,用0.45 μm的微孔滤膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性实验 取“2.2.1”与“2.2.2”项下溶液,按“2.1”项下色谱条件进行检测,记录色谱图(图1),芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰素与其他成分均可达到基线分离,分离度均大于1.5,理论塔板数均在20 000以上,具有良好的分离效果。

2.3.2 线性关系考察 分别吸取系列质量浓度的混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图。以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行回归分析。结果表明,各成分在各自浓度范围内呈良好的线性关系。见表2。

2.3.3 精密度试验 取“2.2.1”项制备的对照品溶液,按“2.1”色谱条件连续进样5次,计算芦丁峰面积的RSD为0.23%,山柰酚-3-O-芸香糖苷峰面积的RSD为0.19%,槲皮素峰面积的RSD为0.11%,山柰素峰面积的RSD为0.31%,结果显示精密度良好。

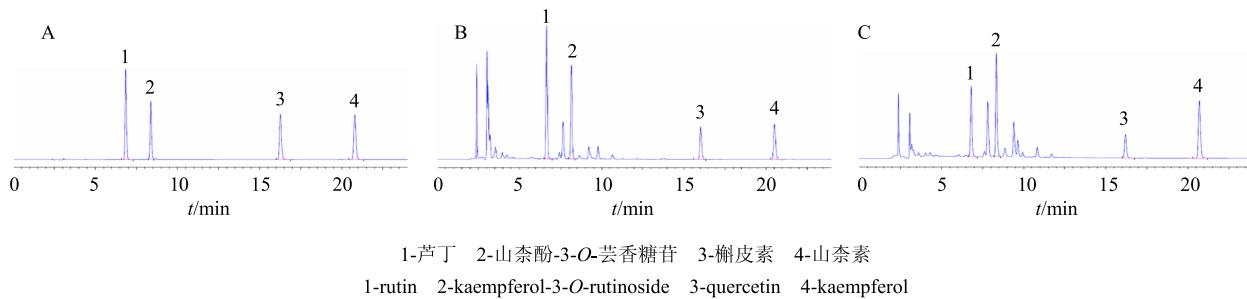


图1 对照品(A)、柳叶蜡梅(B)和浙江蜡梅(C)的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC of reference substance (A), *Chimonanthus salicifolius* (B), and *Chimonanthus zhejiangensis* (C)

表2 4种黄酮类成分的线性关系

Table 2 Linear equations of four flavonoids

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL⁻¹)
芦丁	$Y=8.0165X-11.1820$	0.9999	4.525~452.800
山柰酚-3-O-芸香糖苷	$Y=7.0457X+13.8418$	1.0000	8.096~809.600
槲皮素	$Y=18.8572X-1.5392$	1.0000	0.654~85.150
山柰素	$Y=19.9128X-4.6836$	1.0000	2.048~136.600

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液(编号LYLM-1)，分别在0、2、4、8、12、18、30 h按“2.1”项下色谱条件进样，结果芦丁峰面积的RSD为0.81%，山柰酚-3-O-芸香糖苷峰面积的RSD为0.67%，槲皮素峰面积的RSD为1.03%，山柰素峰面积的RSD为0.93%，表明供试品溶液在30 h内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批食凉茶(编号LYLM-1)，平行取样6份，照“2.2.2”项下制备，按“2.1”项下色谱条件测定，计算芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰素的质量分数分别为0.89、1.08、0.20、0.87 mg/g，RSD分别为1.53%、1.72%、1.91%、1.65%，表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 取已测定的食凉茶6份，各0.25 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，分别精密加入芦丁对照品溶液(226.2 μg/mL)1 mL、山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品溶液(269.9 μg/mL)1 mL、槲皮素对照品溶液(51.09 μg/mL)1 mL、山柰素对照品溶液(227.6 μg/mL)1 mL，再分别精密加入70%甲醇20 mL，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，测定芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰素的量，计算回收率，芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素、山柰素的回收率分别为100.67%、100.41%、100.17%、99.572%，RSD值分别为1.05%、0.83%、1.35%、1.08%。

2.4 相对校正因子(f)的确定

2.4.1 f的计算 取“2.2.1”项下对照品溶液，分别进样1、2、5、8、10、15 μL，按“2.1”项下色谱条件测定，以芦丁为参照物，计算山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山柰素的f，结果见表3。

表3 食凉茶中3种成分的f值

Table 3 RCF of kaempferol-3-O-rutinoside, quercetin, and kaempferol

进样量/μL	f _{芦丁/山柰酚-3-O-芸香糖苷}	f _{芦丁/槲皮素}	f _{芦丁/山柰素}
1	1.154	0.4839	0.4437
2	1.152	0.4800	0.4352
5	1.156	0.4752	0.4303
8	1.156	0.4709	0.4286
10	1.156	0.4710	0.4291
15	1.154	0.4663	0.4258
平均值	1.155	0.4746	0.4321
RSD/%	0.15	1.37	1.50

2.4.2 f重现性考察 取“2.2.1”项下对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别考察Agilent 1260、Waters e2695高效液相色谱仪和Agilent Zorbax SB-C₁₈、Waters XbridgeTM C₁₈、Phenomenex Luna C₁₈、Inertsil[®] ODS-3 C₁₈色谱柱对山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山柰素的f的影响，结果见表4，RSD均小于2%，表明该方法重现性好。

2.4.3 f的确定 依据相关技术指南^[10]，综合影响f

表4 不同色谱仪、不同色谱柱测得的 f
Table 4 RCF of different instruments and columns

仪器	色谱柱	$f_{\text{芦丁/山柰酚-3-O-芸香糖苷}}$	$f_{\text{芦丁/槲皮素}}$	$f_{\text{芦丁/山柰素}}$
Agilent 1260	Agilent Zorbax SB-C ₁₈	1.156	0.471 0	0.429 1
	Waters Xbridge TM C ₁₈	1.151	0.469 7	0.424 3
	Phenomenex Luna C ₁₈	1.161	0.474 7	0.430 8
	Inertsil [®] ODS-3 C ₁₈	1.172	0.475 6	0.426 7
Waters e2695	Agilent Zorbax SB-C ₁₈	1.171	0.473 3	0.430 0
	Waters Xbridge TM C ₁₈	1.153	0.478 0	0.433 9
	Phenomenex Luna C ₁₈	1.172	0.472 2	0.430 8
	Inertsil [®] ODS-3 C ₁₈	1.145	0.495 9	0.448 9
平均值		1.160	0.476 3	0.431 8
RSD/%		0.93	1.75	1.74

的因素, 取各次实验获得的 f 的平均值, 最终确定山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山柰素的 f 分别为1.158、0.475 6、0.431 9, RSD分别为0.73%、1.55%、1.58%。

2.5 待测组分色谱峰的定位

取“2.2.1”项下对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别考察Agilent 1260、Waters e2695高效液相色谱仪和Agilent Zorbax SB-C₁₈、Waters XbridgeTM C₁₈、Phenomenex Luna C₁₈、Inertsil[®] ODS-3 C₁₈色谱柱, 测定并计算待测组分山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山柰素与参照物芦丁的

相对保留时间(t_R)。结果见表5, 山柰酚-3-O-芸香糖苷的 t_R 波动较小, RSD均小于5%;而槲皮素与山柰素的 t_R 波动较大, RSD超过了5%, 由表5中数据可见Agilent Zorbax SB-C₁₈与Waters XbridgeTM C₁₈色谱柱稳定性好, 槲皮素与山柰素的 t_R 波动小, Phenomenex Luna C₁₈与Inertsil[®] ODS-3 C₁₈色谱柱稳定性较差, 槲皮素与山柰素的 t_R 波动较大。建议使用Agilent Zorbax SB-C₁₈与Waters XbridgeTM C₁₈色谱柱, 以满足采用 t_R 对色谱峰进行定位。

表5 不同色谱仪、不同色谱柱测得各成分的相对保留时间
Table 5 Relative retention time of different instruments and columns

仪器	色谱柱	t_R 芦丁/山柰酚-3-O-芸香糖苷	t_R 芦丁/槲皮素	t_R 芦丁/山柰素
Agilent 1260	Agilent Zorbax SB-C ₁₈	1.22	2.41	3.08
	Waters Xbridge TM C ₁₈	1.23	2.40	3.06
	Phenomenex Luna C ₁₈	1.24	2.58	3.31
	Inertsil [®] ODS-3 C ₁₈	1.18	2.20	2.74
Waters e2695	Agilent Zorbax SB-C ₁₈	1.22	2.37	3.02
	Waters Xbridge TM C ₁₈	1.23	2.37	3.03
	Phenomenex Luna C ₁₈	1.16	2.01	2.50
	Inertsil [®] ODS-3 C ₁₈	1.18	2.18	2.71
平均值		1.21	2.31	2.93
RSD/%		2.38	7.62	8.88

2.6 QAMS与外标法(ESM)测定结果比较

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 分别采用QAMS法与ESM法计算芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山柰素的量, 结果见表6。ESM法实测值与QAMS计算值

的相对误差(RE) 小于5%, 表明2种方法测得结果无显著差异, 说明建立的QAMS法在食凉茶的多指标成分质量评价中应用是可行的。

2.7 食凉茶中黄酮类物质动态变化规律

QAMS法与ESM法测定结果无显著差异, 说

表 6 QAMS 与 ESM 测定结果比较 ($n = 3$)
Table 6 Comparison of results by two methods ($n = 3$)

编号	芦丁/ ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	山柰酚-3-O-芸香糖苷			槲皮素			山柰素		
		ESM/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	QAMS/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RE/%	ESM/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	QAMS/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RE/%	ESM/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	QAMS/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)	RE/%
LYLM-1	0.87	1.09	1.11	1.83	0.21	0.22	4.76	0.87	0.90	3.45
LYLM-2	0.34	1.52	1.56	2.63	0.14	0.14	0.00	0.81	0.83	2.47
LYLM-3	1.14	6.54	6.65	1.68	0.24	0.25	4.17	1.21	1.24	2.48
LYLM-4	0.87	2.99	3.04	1.67	0.10	0.10	0.00	0.46	0.48	4.35
LYLM-5	0.18	0.33	0.34	3.03	0.03	0.03	0.00	0.08	0.08	0.00
LYLM-6	0.30	0.64	0.65	1.56	0.04	0.04	0.00	0.12	0.12	0.00
ZJLM-1	3.15	3.22	3.20	0.62	0.64	0.66	3.13	2.00	2.04	2.00
ZJLM-2	3.35	5.26	5.25	0.19	0.60	0.62	3.33	1.50	1.53	2.00
ZJLM-3	3.29	5.60	5.60	0.00	0.32	0.33	3.13	0.78	0.80	2.56
ZJLM-4	5.05	7.48	7.50	0.27	0.20	0.21	5.00	0.37	0.38	2.70
ZJLM-5	2.38	4.48	4.47	0.22	0.21	0.22	4.76	0.51	0.52	1.96
ZJLM-6	4.61	6.21	6.20	0.16	0.15	0.15	0.00	0.30	0.31	3.33

明建立的 QAMS 法在食凉茶的多指标成分质量评价中应用是可行的。由测定结果可见，食凉茶 2 个来源品种之间黄酮类物质质量差别较大，浙江蜡梅呈现明显的整体优势，5~10 月中浙江蜡梅黄酮类物质的质量分数(总量)高于柳叶蜡梅最高月份的有 4 个月；不同采收期黄酮类物质差别较大，由图 2、3 可知，柳叶蜡梅与浙江蜡梅黄酮类物质均以 9 月份为最低；柳叶蜡梅中黄酮类物质(总量)呈现“低-高-低”的趋势(4 种成分变化趋势与总量一致)，7 月是其黄酮类物质累积最多的月份，且优势明显，其中以山柰酚-3-O-芸香糖苷量为主；浙江蜡梅中黄酮类物质(总量)呈现“低-高-低-高”的趋势，8 月份是其黄酮类物质累计最多的月份，但优势不甚明显，其中以芦丁和山柰酚-3-O-芸香糖苷量为主，芦丁与山柰酚-3-O-芸香糖苷变化趋势与总量变化趋势一致，而槲皮素与山柰素则是与总量变化趋势不一致，呈现一直下降的趋势。以黄酮类物质为指标，建议将柳叶蜡梅的采收期定为 7 月，而浙江蜡梅 5~10 月均可采收，其中以 8 月份为优。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择^[6]

本课题组前期研究所得的色谱条件可同时测定食凉茶中芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷、槲皮素和山柰素 4 种黄酮类物质，在 25 min 内完成分离，且 4 种成分的分离效果均良好。

3.2 参照物的选择

本实验所选的 4 种黄酮类物质中，芦丁是最价

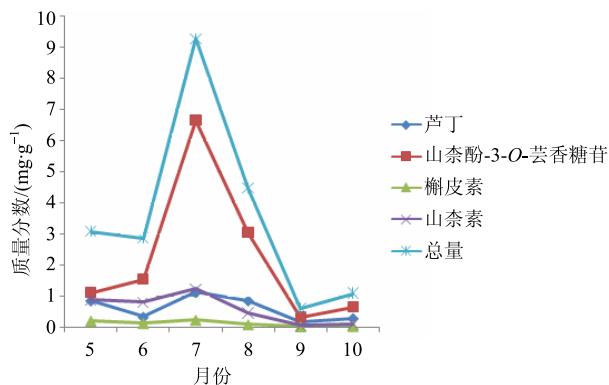


图 2 柳叶蜡梅中黄酮类物质分布图

Fig. 2 Content distribution of flavonoids in *C. salicifolius*

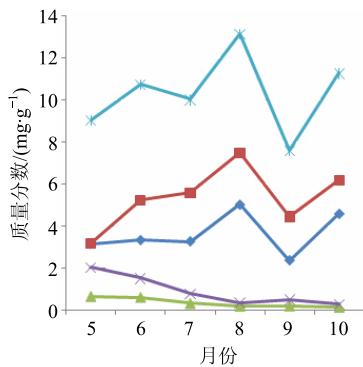


图 3 浙江蜡梅中黄酮类物质分布图

Fig. 3 Content distribution of flavonoids in *C. zhejiangensis*

廉易得的，且其性质又稳定，故选择芦丁为参照物进行 QAMS 的分析。

3.3 色谱峰的定位

色谱峰的准确定位是保证 QAMS 法应用的前

提,采用保留时间差或相对保留值等参数定位色谱峰。本实验考察了同一色谱条件下的 t_R ,结果显示槲皮素与山柰素的相对保留值受色谱柱影响较大,使用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 与 Waters XbridgeTM C₁₈ 色谱柱稳定性好, RRT 波动小;而 Phenomenex Luna C₁₈ 与 Inertsil[®] ODS-3 C₁₈ 色谱柱稳定性较差, RRT 波动较大。建议在采用相对保留值对色谱峰进行定位时使用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 与 Waters XbridgeTM C₁₈ 色谱柱。

参考文献

- [1] 胡剑影,李水福. 畜药食凉茶 [J]. 传统医药, 2009, 18(10): 78.
- [2] 潘心禾,史小娟,张新凤,等. 柳叶蜡梅化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 99-102.
- [3] 贺建云. 食凉茶的化学成分研究 [D]. 长沙: 中南民族大学, 2010.
- [4] 孙丽仁,何明珍,冯育林,等. 山蜡梅叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1214-1216.
- [5] 张培成. 黄酮化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [6] 王伟影,毛菊华,余华丽,等. 畜药“食凉茶”质量标准改进 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(1): 204-207.
- [7] 徐晶晶,徐超,刘斌. 一测多评法测定薄荷药材中 4 种黄酮苷的含量 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(3): 234-239.
- [8] 陈繁华,邬伟魁,颜倩茹,等. 一测多评法在中药制剂质量评价中的研究 [J]. 中国医药指南, 2013, 26(29): 481-482.
- [9] 罗祖良,仇峰,韦日伟,等. 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.
- [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.