

一测多评法测定苦丁茶冬青中 6 种成分的量

冯琳琳^{1,2}, 于敏², 李美娟^{1,2}, 焦安妮², 焦连庆^{2*}, 赵春芳^{1*}

1. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021

2. 吉林省中医药科学院, 吉林 长春 130012

摘要: **目的** 建立一测多评法 (QAMS) 同时测定苦丁茶冬青 *Ilex kudingcha* 中 6 种成分的方法。 **方法** 采用液质联用法确定了供试品中山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 D 的质量分数。采用 HPLC 法, 以苦丁冬青皂苷 C 为内参物, 测定了另外 5 种成分的相对校正因子, 并利用相对校正因子计算其他 5 种成分的量。同时采用外标法 (ESM) 对这 6 种成分进行测定, 比较 ESM 和 QAMS 的差异, 验证 QAMS 的可行性及准确性。 **结果** 利用 QAMS 法计算得到的苦丁茶冬青中 6 种成分的量与 ESM 测定值之间无显著性差异。 **结论** 采用 QAMS 测定苦丁茶冬青中 6 种成分的量简便、可行、准确。

关键词: 苦丁茶冬青; 山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷; 异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷; 苦丁冬青皂苷 C; 苦丁冬青皂苷 A; 苦丁冬青皂苷 E; 苦丁冬青皂苷 D; 一测多评; 相对校正因子; 高效液相色谱法

中图分类号: R286.022

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)14-2955-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.14.025

Determination of six components in *Ilex kudingcha* with quantitative analysis of multi-components by single marker

FENG Lin-lin^{1,2}, YU Min², LI Mei-juan^{1,2}, JIAO An-ni², JIAO Lian-qing², ZHAO Chun-fang¹

1. College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China

2. Jilin Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021, China

Abstract: Objective To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for the simultaneous determination of six components in *Ilex kudingcha* by HPLC. **Methods** The purity of kaempferol-3-*O*- β -D-rutinoside, isorhamnetin-3-*O*- β -D-rutinoside, kudioside C, kudioside A, kudioside E, and kudioside D was determined by HPLC-MS in test sample taking kudioside C as internal standard, relative correction factors of the other five compounds were determined, and their contents were calculated. At the same time, the contents of these six components were determined by external standard method (ESM), and the difference between ESM and QAMS was compared to verify the feasibility and accuracy of QAMS method. **Results** There was no significant difference of the six components' contents calculated between QAMS method and ESM method. **Conclusion** It is convenient, feasible, and accurate to measure the content of six components in *I. kudingcha* by QAMS method.

Key words: *Ilex kudingcha* C. J. Tseng; kaempferol-3-*O*- β -D-rutinoside; isorhamnetin-3-*O*- β -D-rutinoside; kudioside C; kudioside A; kudioside E; kudioside D; quantitative analysis of multi-components by single marker; relative correction factor; HPLC

苦丁茶冬青 *Ilex kudingcha* C. J. Tseng 是冬青科冬青属苦丁茶种乔木的干燥叶, 日常可作为代茶饮料饮用, 入药有清热、解暑等作用, 主要用于头痛、目赤、痢疾等症, 是治疗感冒、中暑类非处方药甘和茶的成分之一^[1]。现代药理学研究表明其有降血压、调血脂、抗氧化等作用, 含有皂苷、多酚、多

糖、黄酮等化学成分^[2-4]。本实验首次采用一测多评法 (QAMS) 对苦丁茶冬青中 6 种成分进行测定, 建立了只需要 1 种对照品对多种成分进行测定的方法, 为苦丁茶的多指标质量控制提供更简便的方法。

1 仪器与试剂

LC-20A 型高效液相色谱仪, SPD-M20A 二极

收稿日期: 2017-03-31

基金项目: 吉林省科技计划项目 (20150311037YY); 吉林省卫生计生科研计划项目 (2014ZZ206); 吉林省中医药科技项目 (2014-ZD28)

作者简介: 冯琳琳 (1991—), 女, 在读硕士, 研究方向为天然产物活性成分及其质量控制研究。Tel: (0431)85619704 E-mail: 1006048838@qq.com

*通信作者 赵春芳 (1967—), 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为天然产物活性成分及其质量控制研究。

Tel: (0431)85619704 E-mail: zhaocf@jlu.edu.cn

焦连庆 (1965—), 男, 研究员, 教授, 研究方向为中药药效物质基础及作用机制研究。Tel: (0431)86058671 E-mail: jllq51@tom.com

管阵列检测器(日本岛津公司); BT25S 型十万分之一电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司); AS5150A 型超声仪(奥特赛斯机器有限公司); AK-400A 粉碎机(温岭市奥力中药机械有限公司); LTQ XL 质谱仪(美国 Thermo 公司)。

10 批药材中 5 批购买自海南省(海南 1~5), 3 批购买自广西省(广西 1~3), 2 批购买自贵州省(贵州 1~2), 均由吉林省中医药科学院牛志多研究员鉴定为冬青科冬青属植物苦丁茶冬青 *Ilex kudingcha* C. J. Tseng 的干燥茎叶。

对照品山奈酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 D 为实验室自制(海南产苦丁茶冬青 70%乙醇浸提物, 浸膏用水溶解后, 分别用醋酸乙酯、水饱和正丁醇进行萃取, 取正丁醇萃取部位粉末上硅胶柱, 再经 C_{18} 填料及半制备型高效液相分离得到化合物, 由核磁、质谱等手段确定为奈酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 D), 经 HPLC 法检测质量分数均大于 98%; 水为超纯水, 乙腈、甲醇为色谱纯, 其余试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 岛津 C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈(A)-水(B), 二元梯度洗脱: 0~15 min, 15%A; 15~65 min, 15%~42%A, 柱温 35 $^{\circ}$ C; 检测波长 210 nm; 进样量 20 μ L。

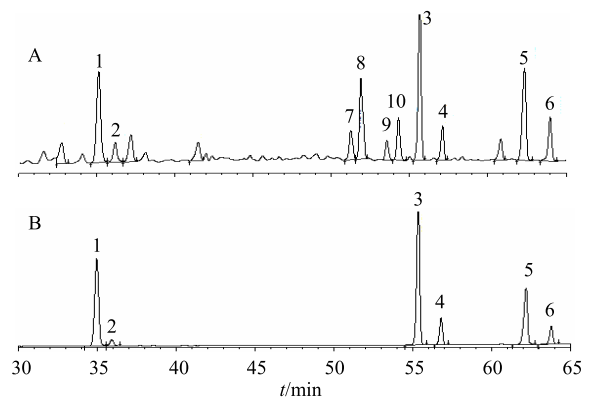
2.1.2 质谱条件 采用负离子模式, 毛细管温度 250 $^{\circ}$ C, 去溶剂气为氮气, 体积流量为 0.75 L/min, 喷雾电压 4.0 kV, 透镜电压-125 V。

2.1.3 对照品溶液的配制 精密称取山奈酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 D 对照品适量, 用甲醇溶解、定容, 制

成质量浓度分别为 156、20、970、188、866、220 μ g/mL 的混合对照品溶液, 避光低温保存。

2.1.4 供试品溶液的配制 精密称取 1.0 g 苦丁茶冬青药材粉末(过 60 目筛), 定量转移至 50 mL 量瓶中, 加入 70%乙醇适量, 超声提取 1 h, 加 70%乙醇至刻度, 摇匀, 0.45 μ m 滤膜滤过, 即得。

2.1.5 供试品中各成分峰的确认 供试品 HPLC 谱图(图 1)中各成分峰与对照品峰保留时间接近, 在 HPLC-MS 谱图中供试品中无杂质峰, 且供试品各成分峰与对照品准分子离子峰一致。



1-山奈酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷 2-异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷
3-苦丁冬青皂苷 C 4-苦丁冬青皂苷 A 5-苦丁冬青皂苷 E
6-苦丁冬青皂苷 D
1-kaempferol-3-*O*- β -D-rutinoside 2-isorhamnetin-3-*O*- β -D-rutinoside
3-kudinoside C 4-kudinoside A 5-kudinoside E 6-kudinoside D

图 1 苦丁茶冬青样品(A)和混合对照品(B)的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC of *I. kudingcha* sample (A) and reference substances (B)

2.1.6 线性关系的考察 分别精密吸取混合对照品 1、5、10、15、20、25、30 μ L, 注入液相色谱仪, 按“2.1.1”项所述的色谱条件进行测定, 以对照品进样量对峰面积进行线性回归, 得到山奈酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 D 回归方程及线性范围。见表 1。

表 1 线性关系测定结果

Table 1 Linear relationships and range of six components

成分	线性方程	线性范围/ μ g	<i>r</i>
山奈酚-3- <i>O</i> - β -D-芸香糖苷	$Y=2.5 \times 10^6 X-200\ 558$	0.15~ 4.69	0.999 5
异鼠李素-3- <i>O</i> - β -D-芸香糖苷	$Y=1.2 \times 10^6 X-12\ 923$	0.02~ 0.60	0.999 6
苦丁冬青皂苷 C	$Y=4.7 \times 10^5 X-161\ 831$	0.97~29.10	0.999 7
苦丁冬青皂苷 A	$Y=4.3 \times 10^5 X-29\ 875$	0.19~ 5.64	0.999 6
苦丁冬青皂苷 E	$Y=2.4 \times 10^5 X-40\ 677$	0.87~26.00	0.999 5
苦丁冬青皂苷 D	$Y=2.5 \times 10^5 X+27\ 152$	0.22~ 6.60	0.999 7

2.1.7 精密度试验 精密吸取苦丁茶冬青供试品溶液 20 μL , 按照“2.1.1”项所述的色谱条件连续进样 6 次, 结果显示, 山柰酚-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 D 峰面积积分值的 RSD 分别为 0.32%、0.88%、1.06%、0.67%、0.70%、0.76%, 表明本方法具有良好的精密度。

2.1.8 稳定性试验 精密吸取苦丁茶冬青供试品溶液 20 μL , 分别在 0、2、4、6、16、24 h, 按照上述色谱条件进样 20 μL , 进行分析。结果显示, 山柰酚-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 D 峰面积的 RSD 分别为 1.90%、2.25%、1.69%、2.06%、1.07%、2.62%, 表明供试品在避光条件下 24 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 精密称取苦丁茶冬青 6 份, 按“2.1.3”项方法平行操作, 按照“2.1.1”项所述的色谱条件进样 20 μL , 分别测定这 6 种成分的量。结果显示, 山柰酚-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 D 量的平均质量分数分别为 0.50%、0.27%、3.10%、0.67%、4.18%、1.47%, RSD 分别为 2.36%、2.33%、2.79%、2.48%、2.22%、2.02%, 表明本方法重复性良好。

2.1.10 加样回收率试验 精密称取已测定的苦丁茶冬青 6 份, 每份各 1.0 g, 精密加入山柰酚-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 D 对照品溶液 200 μL , 按照供试品溶液的制备方法制备并进行测定, 结果山柰酚-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 C、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬

青皂苷 D 的平均回收率分别为 98.94%、100.57%、99.87%、101.17%、99.91%、101.09%, RSD 分别为 1.51%、1.40%、1.76%、1.37%、1.41%、1.36%。

2.2 相对校正因子 (f) 的确定

2.2.1 f 计算^[5] 苦丁茶冬青中的苦丁冬青皂苷 C 比较稳定, 质量分数较高, 且容易分离得到, 所以选择苦丁冬青皂苷 C (c) 作为内标计算校正因子, 分别计算山柰酚-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷 (1)、异鼠李素-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷 (2)、苦丁冬青皂苷 A (a)、苦丁冬青皂苷 E (e)、苦丁冬青皂苷 D (d) 的 f , 分别为 4.73、0.60、0.91、0.51、0.58, RSD 分别为 1.73%、0.66%、0.56%、2.15%、2.40%, 见表 2。

表 2 苦丁茶冬青中其他 5 种成分的 f

Table 2 Relative correction factor of five other components in *Ilex kudingcha*

进样量/ μL	f				
	$f_{c/1}$	$f_{c/2}$	$f_{c/a}$	$f_{c/e}$	$f_{c/d}$
5	4.59	2.59	0.91	0.53	0.60
10	4.68	2.57	0.91	0.50	0.58
15	4.74	2.60	0.91	0.50	0.57
20	4.74	2.60	0.92	0.51	0.57
25	4.80	2.62	0.91	0.51	0.56
30	4.81	2.61	0.92	0.51	0.57
平均值	4.73	2.60	0.91	0.51	0.58
RSD/%	1.73	0.66	0.56	2.15	2.40

2.2.2 待测组分数谱峰的定位 利用相对保留时间 ($r_{k/s}$, k 为待测组分, s 为对照物) 定性, 测得山柰酚-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、异鼠李素-3-*O*- β -*D*-芸香糖苷、苦丁冬青皂苷 A、苦丁冬青皂苷 E、苦丁冬青皂苷 D 的 $r_{k/s}$, 依次为 0.63、0.65、1.03、1.12、1.15, RSD 依次为 0.65%、0.63%、0.50%、0.03%、0.02%, 见表 3。

表 3 苦丁茶冬青中其他 5 种成分的相对保留时间

Table 3 Relative retention time of five other components in *Ilex kudingcha*

进样量/ μL	相对保留时间				
	$r_{c/1}$	$r_{c/2}$	$r_{c/a}$	$r_{c/e}$	$r_{c/d}$
5	0.63	0.65	1.03	1.12	1.15
10	0.63	0.65	1.03	1.12	1.15
15	0.63	0.65	1.03	1.12	1.15
20	0.62	0.64	1.02	1.12	1.15
25	0.63	0.65	1.03	1.12	1.15
30	0.63	0.65	1.02	1.12	1.15
平均值	0.63	0.65	1.03	1.12	1.15
RSD/%	0.65	0.63	0.50	0.03	0.02

2.2.3 f 的重现性考察 实验考察了岛津 C₁₈、Luna C₁₈、Diamonsil C₁₈ 3 种色谱柱对 f 的影响,结果表明,同一仪器不同色谱柱,测定得到 f 的 RSD 值均小于 3%,表明在不同色谱柱下, f 的重

现性良好。见表 4。

利用 $r_{k/s}$ 进行色谱峰的定位,结果显示,在不同色谱柱下 $r_{k/s}$ 波动较小,测定得到 $r_{k/s}$ 的 RSD 值均小于 3%,表明在不同色谱柱下, $r_{k/s}$ 的重现性良好,见表 5。

表 4 不同色谱柱下校正因子

Table 4 Correction factors by different chromatographic columns

色谱仪	色谱柱	$f_{c/1}$	$f_{c/2}$	$f_{c/a}$	$f_{c/e}$	$f_{c/d}$
岛津 LC-20A	岛津 C ₁₈	4.74	2.63	0.90	0.50	0.59
	Luna C ₁₈	4.79	2.59	0.91	0.51	0.57
	Diamonsil C ₁₈	4.68	2.58	0.90	0.52	0.56
平均值		4.74	2.60	0.90	0.51	0.57
RSD/%		1.16	1.02	0.64	1.96	2.66

表 5 不同色谱柱下色谱峰定位

Table 5 Chromatographic peak positions by different chromatographic columns

色谱仪	色谱柱	$r_{c/1}$	$r_{c/2}$	$r_{c/a}$	$r_{c/e}$	$r_{c/d}$
岛津 LC-20A	岛津 C ₁₈	0.62	0.65	1.03	1.12	1.15
	Luna C ₁₈	0.65	0.66	1.05	1.15	1.13
	Diamonsil C ₁₈	0.64	0.68	1.05	1.16	1.17
平均值		0.64	0.66	1.05	1.14	1.15
RSD/%		2.40	2.30	1.46	1.82	1.74

2.3 QAMS 和外标法 (ESM) 的比较

取 10 个不同产地批次的苦丁茶冬青药材样品,按“2.1.3”项下的方法制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液 20 μ L,用“2.1.1”项下色谱条件进行

测定,分别采用 QAMS 和 ESM 对样品中的 6 种成分计算质量分数。表 6 结果显示, QAMS 和 ESM 所测得的量非常接近或相同,表明 QAMS 可以用于苦丁茶冬青中 6 种成分的测定。

表 6 QAMS 与 ESM 测定苦丁茶冬青药材中 6 种成分的量

Table 6 Comparison of contents of six components in *Ilex kudingcha* by QAMS and ESM

批次	苦丁冬青皂苷 C/%	山柰酚-3-O-β-D-芸香糖苷/%		异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷/%		苦丁冬青皂苷 A/%		苦丁冬青皂苷 E/%		苦丁冬青皂苷 D/%	
	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM	QAMS	ESM
海南 1	3.22	0.50	0.50	0.18	0.19	0.71	0.73	4.27	4.26	1.56	1.55
海南 2	3.97	0.63	0.61	0.16	0.17	0.82	0.84	4.58	4.56	1.54	1.52
海南 3	3.14	0.49	0.50	0.17	0.18	0.69	0.70	4.17	4.16	1.52	1.51
海南 4	4.06	0.64	0.62	0.26	0.26	0.97	0.98	4.58	4.57	1.52	1.50
海南 5	3.10	0.49	0.50	0.18	0.18	0.73	0.73	4.08	4.08	1.51	1.49
广西 1	3.42	0.60	0.61	0.17	0.18	0.90	0.89	4.03	4.03	1.50	1.51
广西 2	3.08	0.50	0.51	0.20	0.19	0.85	0.87	4.50	4.49	1.53	1.52
广西 3	3.10	0.62	0.61	0.18	0.18	0.74	0.73	4.29	4.28	1.48	1.50
贵州 1	3.88	0.62	0.62	0.20	0.21	0.85	0.86	4.10	4.12	1.50	1.51
贵州 2	3.69	0.53	0.55	0.24	0.23	0.77	0.78	4.51	4.51	1.56	1.57

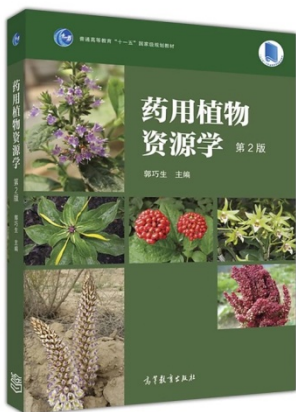
3 讨论

本实验首次运用 QAMS 建立了苦丁茶冬青中 6 个成分同时测定的方法,解决了多成分的质量控制需要多种对照品的问题,可用于苦丁茶冬青的质量控制。在检测波长的选择上,6 个成分的最大吸收波长分别为山柰酚-3-*O*- β -D-芸香糖苷 265、348 nm,异鼠李素-3-*O*- β -D-芸香糖苷 255、355 nm,苦丁冬青皂苷 C 225 nm,苦丁冬青皂苷 A 225 nm,苦丁冬青皂苷 E 260 nm,苦丁冬青皂苷 D 260 nm,考虑到 210 nm 处测定色谱峰数量多,基线也比较稳定,因此检测波长定为 210 nm。

参考文献

- [1] 王 新,陆慧宁,林少琨. 苦丁茶冬青叶化学成分及药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(3): 366-370.
- [2] 舒任庚,姚敏娜,闵 雷. 不同植物来源苦丁茶的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 江西中医学院学报, 2008, 20(6): 91-94.
- [3] 刘丽香,梁兴飞,孙 怡,等. 苦丁茶提取物多酚含量与抗氧化活性的测定 [J]. 茶叶科学, 2008(4): 289-293.
- [4] 胡 婷. 苦丁茶中有效成分的分离纯化、鉴定及其活性研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
- [5] 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.

书讯:《药用植物资源学》正式出版



本书是普通高等教育“十一五”国家级规划教材,采用“纸质教材+数字课程”形式出版。

本书由《中草药》杂志编委、南京农业大学郭巧生教授主编,并先后组织了全国 30 余所高等院校及 10 余家专业研究单位的 70 多位长期在一线从事有关科研、教学的专家召开了 4 次教材修订会,在第 1 版的基础修订完成,并由高等教育出版社出版发行。全书共分总论、各论及附录三大部分。总论部分共分 8 章,主要介绍药用植物资源学的基本概念、研究内容及发展历史等,并从国内外药用植物资源的种类、分布、蕴藏量、活性成分及其时(间)空(间)变化规律和评价方法、多样性保护、可持续利用以及相关资源经济等方面介绍了药用植物资源学的基本理论和方法。各论部分精选了 65 种资源研究和开发利用较好的药用植物进行详细介绍。其中 20 种置于纸质教材中,45 种置于数字课程中。附录部分也通过数字课程呈现,主要收录了国内外有关药用植物资源保护和开发利用方面的公约、条列及保护名录等。数字课程内容还包括总论各章后的参考文献和关键词,以及全书有关的大量图片等,以供教学人员选用。

本书是高等农林、中医药院校中药或药用植物类专业的教材和教学参考书。亦可供有关中药材生产经营和资源开发利用及从事其他经济作物研究和生产的专业技术人员参考。