

土茯苓黄酮类成分一测多评方法的建立及含量变化规律研究

严爱娟¹, 张文婷², 赵维良^{2*}, 黄琴伟², 郭增喜², 李文庭²

1. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100

2. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052

摘要: 目的 建立土茯苓 *Smilax glabra* 中新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷和黄杞苷的一测多评测定方法(QAMS)并研究不同生长年限土茯苓中各成分含量的动态变化规律。方法 采用高效液相色谱法,以土茯苓中的落新妇苷为内参物,计算该成分与新落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷和黄杞苷的相对校正因子,用获得的相对校正因子计算各指标成分的含量并与外标法的测定结果进行对比,考察方法的准确性和可行性。采用建立的 QAMS 法测定不同生长年限土茯苓中各指标成分的含量,研究其动态变化规律。结果 共测定不同生长年限样品 5 批 23 份,各指标成分一测多评法与外标法计算结果偏差均小于 1.0%。各指标成分含量与生长年限具有一定相关性,落新妇苷的含量与生长年限呈负相关,新落新妇苷、新异落新妇苷和异落新妇苷的含量与生长年限呈正相关,两者的变化趋势相反。结论 建立的 QAMS 法准确、可靠,可用于土茯苓中 5 个成分的定量分析。生长年限对土茯苓中 4 种落新妇苷类成分含量均具一定影响。

关键词: 土茯苓; 一测多评; 新落新妇苷; 落新妇苷; 新异落新妇苷; 异落新妇苷; 黄杞苷; 生长年限

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)15-3681-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.030

Content changes regularity of flavonoids in *Smilax glabra* by QAMS method

YAN Ai-juan¹, ZHANG Wen-ting², ZHAO Wei-liang², HUANG Qin-wei², GUO Zeng-xi², LI Wen-ting²

1. Zhejiang Pharmaceutical college, Ningbo 315100, China

2. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China

Abstract: **Objective** To establish a method of quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) for simultaneously determination of neoastilbin, astilbin, neoisoastilbin, isoastilbin, and engeletin in *Smilax glabra*, and research the tendency of content changes in different growth years by QAMS. **Methods** An HPLC method was established to determine the relative correction factors of four other flavonoids by using astilbin as the internal reference standard. Then the method was used to determine the various content of five flavonoids in different growth years and validate the feasibility and accuracy by comparing the content results determined by the external standard method with QAMS. The dynamic change regularity of flavonoids in *S. glabra* was investigated. **Results** A total of 23 samples from five batches in different growth years were simultaneously determined by external standard method and QAMS, the results deviation were all less than 1.0%. The content of five flavonoids in different growth years was different, astilbin decreased with the increase of growth years, neoastilbin, neoisoastilbin and isoastilbin had the reverse trend. **Conclusion** The established QAMS method is feasible and accurate for the simultaneous determination of five flavonoids in *S. glabra*. Growth years have a certain impact on the content of each component.

Key words: *Smilax glabra* Roxb.; QAMS; neoastilbin; astilbin; neoisoastilbin; isoastilbin; engeletin; growth year

土茯苓为百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* Roxb. 的干燥根茎^[1],化学成分以黄酮类和糖类为主,《中国药典》自 2005 年版一部开始制订了黄酮类化合物落新妇苷($C_{21}H_{22}O_{11}$)的含量测定,然而笔者在前期研究中发现该方法的回收率仅 71.1%,准确度较低,究其原因,发现问题根源为落新妇苷

的异构性和热不稳定性,加热易转化成其 3 个异构体,新落新妇苷、新异落新妇苷和异落新妇苷,故单独测定落新妇苷的含量已难以整体反映土茯苓的药材质量。一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS)是指在严格的方法学和交叉验证的基础上,在只测定某个代表

收稿日期: 2017-12-13

基金项目: 2015 版浙江省炮制规范增修订研究(ZPG-2013001)

作者简介: 严爱娟(1992—),女,助教,研究方向为生药品种鉴定与品质评价。Tel: 18767167708 E-mail: 1179861289@qq.com

*通信作者 赵维良 Tel: (0571)86452373 E-mail: zwl@zjyj.org.cn

性成分(易得、廉价、有效)的同时可计算出其他待测有效成分的含量,并使其计算值与实测值符合定量方法学要求的方法^[2-4]。将 QAMS 法应用到土茯苓的含量测定中,以相对易得的落新妇苷为内参物,同时测定土茯苓中新落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷和黄杞苷的含量,既考虑到了异构体间相互转化的情况,又可以解决新落新妇苷、新异落新妇苷及异落新妇苷制备困难、购买成本高的问题,从而更全面地反映和控制土茯苓的药材质量。

由于近年来不断有企业反映《中国药典》2015 年版中落新妇苷的含量限度过高,国产土茯苓多难达到标准中 0.45% 的限度要求,故在建立的 QAMS 法的基础上,测定了不同生长年限样品中各成分的含量,以限度问题为切入点了解土茯苓黄酮类成分的生长转化规律。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260 液相色谱仪; Agilent 1100 液相色谱仪; Waters 2695 液相色谱仪; Shimadzu LC-20A 液相色谱仪; DIKMA Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Suplco Discovery C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); Boston Boschrom ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; Agilent Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; Minispin 12 000 转离心机(德国 Eppendorf 公司); Milli-Q Advantage A 超纯水机(美国 Millipore 公司); XPE-205 型分析天平(Mettler Toledo); DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); Elmasonic P 超声波清洗仪(德国 Elma 公司)。

1.2 试剂

甲醇(Merck 公司,色谱纯); 甲酸(北京百灵威科技有限公司,色谱纯); 甲醇、乙醇购自国药集团化学试剂有限公司,分析纯; 水(Mili-Q 自制水)。

落新妇苷(批号 111798-201504,质量分数 93.9%)、黄杞苷(批号 111906-201102,质量分数 93.7%)购于中国食品药品检定研究院; 新落新妇苷(批号 16110802,质量分数 98%)、异落新妇苷(批号 16110807,质量分数 98%)、新异落新妇苷(批号 16110901,质量分数 98%)购于成都普菲德生物技术有限公司。

测定用土茯苓药材采挖自浙江省临安市於潜

镇,均经浙江省食品药品检验研究院中药所郭增喜主任中药师鉴定为百合科菝葜属植物光叶菝葜 *S. glabra* Roxb.。故本次测定尽量选取无分枝的植株,判断其相对生长年限并进行编号,每个植株均包含不同的生长年限,其中 3 个植株的编号分别为 A-1~A-6、B-1~B-5、C-1~C-6,编号 1 至 6(或 5)的相对生长年限由短至长,部分植株不完整的仅取其中的当年生嫩芽部分和生长年限较长的部分进行测定,编号分别为 N-1~N-3 和 L-1~L-3,见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	生长年限/年	部位	编号	生长年限/年	部位
A-1	1	完整植株	C-2	2	完整植株
A-2	2	完整植株	C-3	3	完整植株
A-3	3	完整植株	C-4	4	完整植株
A-4	4	完整植株	C-5	5	完整植株
A-5	5	完整植株	C-6	6	完整植株
A-6	6	完整植株	L-1	1	根茎(老)
B-1	1	完整植株	L-2	2	根茎(老)
B-2	2	完整植株	L-3	3	根茎(老)
B-3	3	完整植株	N-1	1	根茎嫩芽
B-4	4	完整植株	N-2	2	根茎嫩芽
B-5	5	完整植株	N-3	3	根茎嫩芽
C-1	1	完整植株			

2 方法与结果

2.1 相对校正因子(f)计算与色谱峰定位

在一定线性范围内成分的量(质量或浓度)与检测器的响应值呈正比。在建立土茯苓 QAMS 含量测定方法时, f 的计算公式为 $f_{si}=f_s/f_i=(A_s/C_s)/(A_i/C_i)$,由此可推导出定量计算公式为 $C_i=f_{si} \times C_s \times A_i/A_s$,式中 f_{si} 为内参物 s 对待测成分 i 的相对相对校正因子, A_s 为内参物 s 峰面积, C_s 为内参物 s 浓度, A_i 为待测成分 i 峰面积, C_i 为某待测成分对照品 i 浓度。在方法学建立时,主要是求出内参物与各待测成分间的 f 值,并将其作为一个常数用于含量测定中。

色谱峰的定位方式一般有 2 种,相对保留值和保留时间差,本实验采用相对保留值进行色谱峰的定位,具体的计算公式如下:

$$R_{is}=t_{Ri}/t_{Rs}$$

R_{is} 为相对保留值, t_{Ri} 为待测成分保留时间, t_{Rs} 为内参物保留时间

2.2 色谱条件

色谱柱为 Boston Boschrom ODS (250 mm×4.6

mm, 5 μ m); 流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 梯度洗脱程序 0~20 min, 33%A; 20~35 min, 33%~38%A; 35~45 min, 38%~43%A; 检测波长 292 nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min。在上述色谱条件下各组分的分离度良好, 结果见图 1。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取 5 种对照品适量, 配制成含落新妇苷 0.283 mg/mL、新落新妇苷 0.072 mg/mL、新异落新妇苷 0.085 mg/mL、异落新妇苷 0.074 mg/mL、

黄杞苷 0.014 mg/mL 的混合对照品溶液 (1) 和含落新妇苷 0.708 mg/mL、新落新妇苷 0.362 mg/mL、新异落新妇苷 0.425 mg/mL、异落新妇苷 0.372 mg/mL、黄杞苷 0.068 mg/mL 的混合对照品溶液 (2)。

2.4 供试品溶液的制备

取土茯苓粉末 (过 2 号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 精密加入 70%乙醇溶液 50 mL, 称定质量, 静置 30 min, 超声 30 min, 放冷, 称定质量并用 70%乙醇补足减失的质量, 12 000 r/min 离心, 取上清, 即得。

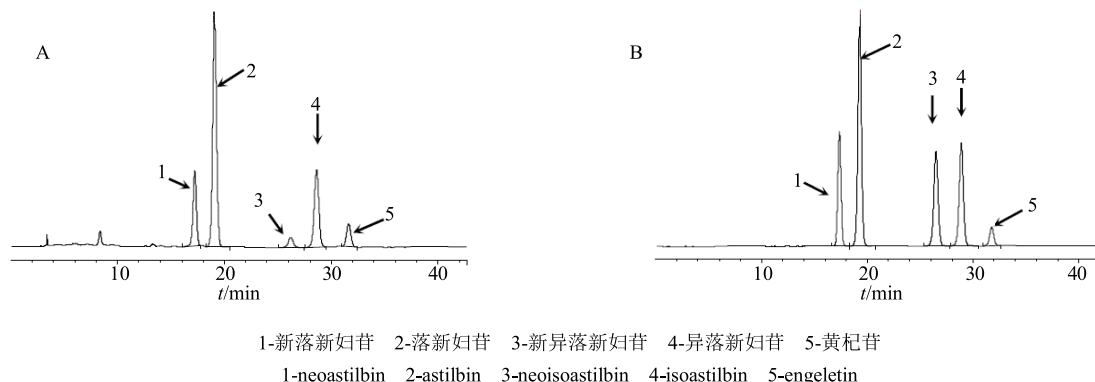


图 1 土茯苓样品 (A) 和对照品 (B) HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of testing sample solution of *S. glabra* (A) and mixed control solution (B)

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围、检测限与定量限 精密吸取“2.2”项下的混合对照品溶液 (1) 0.5、1、5、10 μ L, 混合对照品溶液 (2) 5、10、15 μ L, 注入液相色谱仪, 每个质量浓度进样 3 次, 取峰面积平均值, 以色谱峰峰面积为纵坐标 (Y), 进样量为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 计算回归方程和线性范围, 分别以信噪比 3 和 10

的质量浓度作为检测限和定量限, 结果见表 2。同时以落新妇苷为参照物, 计算各个质量浓度水平下新落新妇苷 (x)、新异落新妇苷 (xy)、异落新妇苷 (y)、黄杞苷 (h) 与落新妇苷 (1) 间的 f_{si} (f_{lx} 、 f_{lxy} 、 f_{ly} 、 f_{lh}) 和相对保留值 R_{is} (R_{xl} 、 R_{xy1} 、 R_{yl} 、 R_{hl}), 结果 f 值分别为 1.1342、1.2043、1.0129 和 0.9828, RT 值分别为 0.9017、1.3757、1.5000 和 1.6504。

表 2 土茯苓中 5 个黄酮类成分的线性范围考察结果

Table 2 Linear and ranges of five flavonoids in *S. glabra*

对照品	线性方程	线性范围/ μ g	检测限/ $(\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1})$	定量限/ $(\mu$ g $\cdot$ mL $^{-1})$
落新妇苷	$Y=2\,167.923\,3\,X-5.704\,7$, $r^2=1.000\,0$	0.141 6~10.616 8	1.072	3.573
新落新妇苷	$Y=2\,442.479\,6\,X+23.197\,1$, $r^2=1.000\,0$	0.036 2~5.434 1	1.092	3.640
异落新妇苷	$Y=2\,435.490\,7\,X+2.668\,1$, $r^2=1.000\,0$	0.037 2~5.581 1	1.271	4.238
新异落新妇苷	$Y=2\,001.115\,0\,X+25.796\,4$, $r^2=1.000\,0$	0.042 5~6.368 1	1.533	5.111
黄杞苷	$Y=2\,423.347\,4\,X+7.950\,5$, $r^2=1.000\,0$	0.006 8~1.016 6	1.254	4.179

2.5.2 重复性试验 取同一批 (A-1) 土茯苓药材粉末 6 份, 按“2.4”项中的方法制备供试品溶液, 注入液相色谱仪, 按“2.2”项中的色谱条件测定峰面积, 结果各成分的 RSD 值均小于 2.5%, 表明方法重复性较好。

2.5.3 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别在 0、4、8、12、20、28、35 h 注入液相色谱仪, 按“2.2”项中的色谱条件测定峰面积, 结果各成分的

RSD 值均小于 1.0%, 表明样品的稳定性较好, 所制备的供试品溶液在室温下至少 35 h 内稳定。

2.5.4 精密度试验 精密吸取同一份对照品溶液, 重复进样 6 次, 按“2.2”项中的色谱条件测定峰面积, 结果各成分的 RSD 值均小于 0.5%, 表明方法的精密度较好。

2.5.5 加样回收率试验 精密称取同一批 (A-1) 土茯苓样品 6 份, 每份约 0.25 g, 加入一定量的对照品

溶液(加入量约为样品中所含量的 100%),按“2.4”项中的方法制备供试品溶液并测定峰面积,计算平均回收率及 RSD 值。结果表明,土茯苓中新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷及黄杞苷的平均回收率分别为 93.2%、95.4%、93.8%、96.4%及 99.1%,RSD 分别为 1.3%、2.2%、2.7%、2.3%及 1.9%;各个对照品回收率均在 92.0%~105.0%,RSD 值均小于 3.0%,表明方法的准确度较高。

2.5.6 中间精密度 3 个不同实验人员,“2.4”项的方法制备供试品溶液,注入液相色谱仪,按“2.2”项中的色谱条件测定峰面积,每个质量浓度进样 3 次,计算 f_{si} 值和 R_{is} 值,结果 3 个实验人员测得的 f_{ix} 、 f_{ixy} 、 f_{iy} 、 f_{ih} 值分别为 1.154 5、1.204 2、0.985 4、0.991 3, R_{xl} 、 R_{xy1} 、 R_{yl} 、 R_{hl} 值分别为 0.903 7、1.369 4、1.499 2、1.660 9, f 值及 R_{is} 值的 RSD 值均小于 2.5%,表明方法的中间精密度较好。

2.5.7 液相色谱仪及色谱柱考察 试验同时考察了 Agilent 1260、Agilent 1100、Waters 2695 及 Shimadzu LC-20A 4 个品牌的液相色谱仪和 DIKMA Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Suplco Discovery C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Boston Boschrom ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 4 个厂家的色谱柱,精密吸取 f_{si} 测定用混合对照品溶液 1、3、5、7、10 μL,注入液相色谱仪,每个质量浓度进样 3 次,按“2.2”项中的色谱条件测定峰面积,计算 f_{si} 值和 R_{is} 值,结果采用不同色谱系统, f_{si} 值 RSD 小于 2.0%, R_{is} 值 RSD 小于 4.0%,但与最终确定的 R_{is} 值的偏差均小于 0.5%,表明方法重现性良好。

2.5.8 柱温考察 实验考察了 30、35、40 °C 3 个柱温,精密吸取 f_{si} 测定用混合对照品溶液 1、3、5、7、10 μL,注入液相色谱仪,每个质量浓度进样 3 次,按“2.2”项中的色谱条件测定峰面积,计算 f_{si} 值和 R_{is} 值,结果 f_{si} 值和 R_{is} 值的 RSD 值均小于 3.0%,表明柱温对 f_{si} 值和 R_{is} 值的影响较少。

2.5.9 体积流量考察 试验考察了 0.8、1.0、1.2 mL/min 3 个体积流量,精密吸取 f_{si} 测定用混合对照品溶液 1、3、5、7、10 μL,注入液相色谱仪,每个质量浓度进样 3 次,按“2.2”项中的色谱条件测定峰面积,计算 f_{si} 值和 R_{is} 值,结果 f_{si} 值的 RSD 值均小于 2.5%, R_{xl} 、 R_{xy1} 、 R_{yl} 、 R_{hl} 值的 RSD 值分别为 0.9%、3.5%、4.4%和 5.6%,但与最终确定的 R_{is} 值

的偏差均小于 3.0%,表明体积流量对 f_{si} 值的影响较小,对 R_{is} 值的影响较大。

2.5.10 波长考察 考察了 290、292、294 nm 3 个检测波长,精密吸取 f_{si} 测定用混合对照品溶液 1、3、5、7、10 μL,注入液相色谱仪,每个质量浓度进样 3 次,按“2.2”项中的色谱条件测定峰面积,计算 f_{si} 值和 R_{is} 值,结果 f_{si} 值和 R_{is} 值的 RSD 值均小于 3.0%,表明检测波长对 f_{si} 值和 R_{is} 值的影响较小。

2.6 f_{si} 值和 R_{is} 值的确定

取中间精密度试验中的 3 个不同人员测得的 f 值作为最终的相对校正因子值,考虑到不同色谱系统对 R_{is} 值的影响,故将“2.5.6”项中分析所得的 R_{is} 值和中间精密度试验中测得 R_{is} 值的平均值作为最终的 R_{is} 值。最终,各化合物的 f_{si} 值和 R_{is} 值见表 3。

表 3 土茯苓中 5 个黄酮类成分的 f_{si} 和 R_{is}

Table 3 Relative correction factors and relative retention time of five flavonoids in *S. glabra*.

待测成分	f_{si}	R_{is}
落新妇苷	1.000 0	1.000 0
新落新妇苷	1.154 5	0.903 0
新异落新妇苷	1.204 2	1.349 2
异落新妇苷	0.985 4	1.472 5
黄杞苷	0.991 3	1.651 6

2.7 外标法与 QAMS 法比较

此次外标法与 QAMS 法比较用样品均采自浙江省临安市於潜镇,在相同条件下切片烘干后进行测定。从测定结果中可以看出外标法与 QAMS 法的测定值 RSD 均 ≤1.0%,说明建立的 QAMS 法测定结果准确,部分样品图见图 2,测定结果见图 3 及表 4。

2.8 土茯苓不同生长年限含量分析

从“2.7”项的测定结果中可看出同一植株不同的生长年限各成分含量具有一定差异,不同植株间成分含量差异明显,但各成分含量变化趋势一致,落新妇苷的含量生长年限短者较年限长者高,其含量与生长年限呈负相关,新落新妇苷、新异落新妇苷和异落新妇苷的含量生长年限长者较年限短者高,其含量与生长年限呈正相关,两者的变化趋势相反。由于样品中黄杞苷的含量较低,多未达到定量限度要求,故无法进行比较。采用主成分分析(PCA)法(图 4-A)对不同生长年限测定结果进行分析,从分析结果图中可以看出不同的植株间相互分开,生长年限较长者和嫩芽相互分开,各指标成分的贡献值大小为落新妇苷>异落新妇苷>

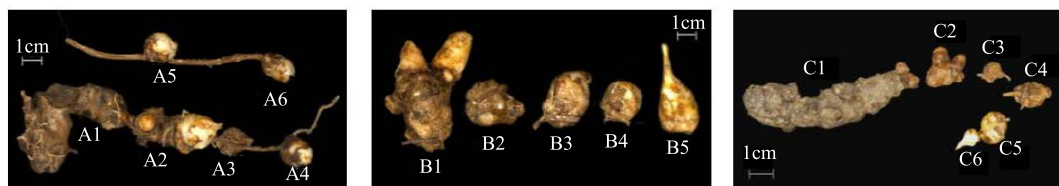


图 2 土茯苓不同生长年限样品

Fig. 2 Samples of different growth years of *S. glabra*

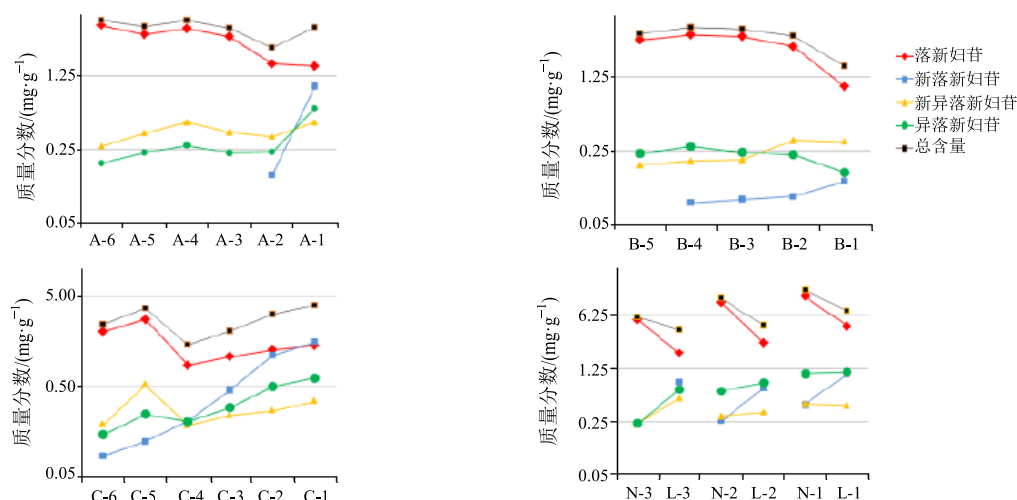


图 3 土茯苓不同植株含量分布

Fig. 3 Content distribution of different growth years in different plants of *S. glabra*

表 4 土茯苓黄酮类成分外标法与 QAMS 法含量测定结果比较

Table 4 Determination of five flavonoids in *S. glabra* by external standard method and QAMS ($n = 2$)

编号	落新妇苷/(mg·g ⁻¹)			新落新妇苷/(mg·g ⁻¹)			新异落新妇苷/(mg·g ⁻¹)			异落新妇苷/(mg·g ⁻¹)			黄杞苷/(mg·g ⁻¹)			含量总和/(mg·g ⁻¹)
	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法	QAMS	RSD/%	外标法
A-1	1.568	1.001	1.007	0.3	0.455	0.450	0.6	0.617	0.605	1.0	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.641
A-2	1.654	0.142	0.143	0.4	0.333	0.329	0.6	0.235	0.232	0.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	2.364
A-3	3.001	未检出	未检出	未检出	0.364	0.360	0.6	0.231	0.228	0.7	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.596
A-4	3.583	未检出	未检出	未检出	0.454	0.449	0.6	0.273	0.269	0.7	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	4.310
A-5	3.141	未检出	未检出	未检出	0.358	0.354	0.6	0.233	0.230	0.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.732
A-6	3.824	未检出	未检出	未检出	0.269	0.266	0.6	0.185	0.182	0.8	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	4.278
B-1	1.026	0.127	0.128	0.4	0.304	0.301	0.5	0.156	0.154	0.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	1.613
B-2	2.475	0.092	0.093	0.5	0.315	0.312	0.5	0.230	0.228	0.4	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.112
B-3	3.071	0.086	0.087	0.6	0.204	0.202	0.5	0.241	0.238	0.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.602
B-4	3.194	0.08	0.081	0.6	0.199	0.197	0.5	0.276	0.273	0.5	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.749
B-5	2.849	未检出	未检出	未检出	0.183	0.181	0.5	0.235	0.232	0.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.267
C-1	1.411	1.531	1.540	0.3	0.337	0.333	0.6	0.616	0.609	0.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.895
C-2	1.257	1.088	1.095	0.3	0.265	0.263	0.4	0.494	0.488	0.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.104
C-3	1.06	0.451	0.454	0.3	0.236	0.234	0.4	0.288	0.284	0.7	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	2.035
C-4	0.855	0.204	0.205	0.2	0.182	0.181	0.3	0.202	0.199	0.7	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	1.443
C-5	2.753	0.121	0.122	0.4	0.515	0.510	0.5	0.244	0.241	0.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.633
C-6	2.008	0.084	0.085	0.6	0.187	0.185	0.5	0.145	0.143	0.7	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	2.424
L-1	4.343	1.056	1.063	0.3	0.397	0.393	0.5	1.105	1.091	0.6	0.118	0.116	0.9	未检出	未检出	7.019
N-1	10.976	0.407	0.409	0.2	0.42	0.415	0.6	1.054	1.041	0.6	0.227	0.223	0.9	未检出	未检出	13.080
L-2	2.677	0.670	0.674	0.3	0.327	0.324	0.5	0.801	0.791	0.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	4.475
N-2	8.987	0.255	0.257	0.4	0.292	0.289	0.5	0.621	0.614	0.6	0.228	0.225	0.7	未检出	未检出	10.380
L-3	1.954	0.817	0.823	0.4	0.495	0.490	0.5	0.647	0.639	0.6	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	3.913
N-3	5.253	未检出	未检出	未检出	0.242	0.183	0.5	0.237	0.101	1.0	未检出	0.123	0.8	未检出	未检出	5.732

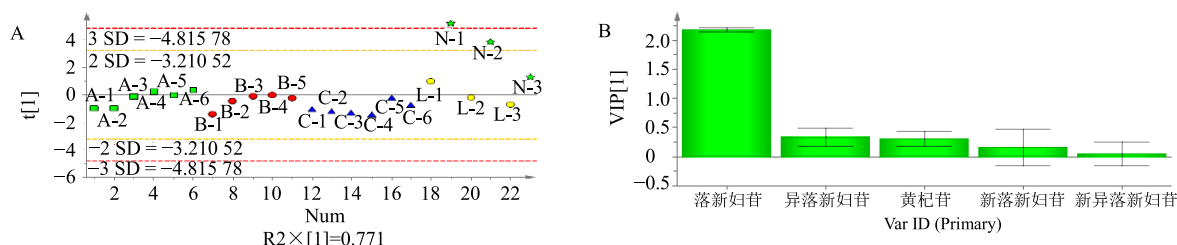


图 4 土茯苓不同生长年限 PCA (A) 及 PLS-DA (B) 分析结果

Fig. 4 PCA (A) and PLS-DA (B) results of growth years in *S. glabra*

黄杞苷>新落新妇苷>新异落新妇苷。采用偏小二乘 (PLS-DA) 法 (图 4-B) 对两者的差异变量进行分析, 结果落新妇苷的 VIP 值>1, 其余 4 个成分以 VIP 值均小于 0.5, 表明落新妇苷为主要差异成分。

3 讨论

土茯苓中黄酮类成分主要为落新妇苷及其异构体 (新落新妇苷、新异落新妇苷和异落新妇苷), 其中落新妇苷的含量最高, 以往的文献及标准中也多以落新妇苷作为指标成分, 对其质量进行控制, 然而落新妇苷为不稳定化合物, 在碱性溶液及温度较高的环境中容易分解为其异构体^[5], 故单独测定落新妇苷的含量无法避免采挖、加工、运输、储存及含量测定过程中异构体间的相互转化对结果产生的影响, 因而也无法反映药材的真实质量。文献中也有较多的土茯苓多指标含量测定方法, 然新落新妇苷、新异落新妇苷及异落新妇苷对照品较难获得, 测定的成本及难度较高, 故建立土茯苓 QAMS 含量测定方法既可以降低成本又可以较全面地控制土茯苓药材质量。

QAMS 各指标成分的计算值与实测值的相似程度受成分间母核结构的影响较大, 母核结构较相似其计算值与实测值的相似度较大^[6]。本实验 QAMS 法选择的指标成分为新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷和黄杞苷, 5 者具有相同的母核结构, 在紫外下具有相同的最大吸收波长, 样品测定结果中外标法与 QAMS 法的偏差均小于 1.0%, 方法的准确度较高。

在对 QAMS 法进行方法学考察的过程中发现, 各个条件下的 f 值的 RSD 值均小于 3.0%, R_{is} 值虽受色谱系统的影响较大, 但与最终确定的 R_{is} 值比较, RSD 值均小于 3.0%。落新妇苷在加热的状态下会逐渐转化成其异构体, 在 85 °C 的水浴中 5 min 即可转化并在液相色谱中检测到新落新妇苷、新异落新妇苷和异落新妇苷, 其异构体在 C_{18} 色谱柱的

洗脱顺序具有一定规律性, 出峰顺序根据其极性的大小排列分别为新落新妇苷→落新妇苷→新异落新妇苷→异落新妇苷^[7-8], 故在实际检验过程中, 若遇到仅靠 R_{is} 值无法进行色谱峰定位的情况时, 可借此方法, 将落新妇苷加热后进行对照定位。

本实验对供试品的提取溶剂种类、溶剂料液比、溶剂浓度及超声时间进行了考察。其中提取溶剂考察了甲醇和乙醇 2 种类型, 结果乙醇的提取效率较甲醇高, 且落新妇苷在乙醇中的稳定性较好^[3], 故选择乙醇作为提取溶剂。料液比考察了 1:17、1:25、1:50、1:100 和 1:200 这 5 个梯度, 结果均能提取完全, 本实验选择料液比 1:100。乙醇溶度考察了 30%、50%、60%、70%、80% 和 90% 这 5 个梯度, 结果 70% 的浓度提取较完全, 故提取的乙醇溶度定为 70%。超声时间考察了 10、30、40、60、80 min, 结果均能提取完全, 本实验选择 30 min。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 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.
- [3] 王迪, 吴亿晗, 李维, 等. 一测多评法测定葛根苓连丸中 7 种指标成分 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4453-4459.
- [4] 刘慧妍, 沈国滨. 一测多评法同时测定野菊花中 7 种成分 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2012-2017.
- [5] 吕邵娃, 于风明, 苏红, 等. 中药材一测多评中相对校正因子的规律性文献调查和分析 [J]. 中国药房, 2016, 27(15): 2020-2023.
- [6] 严爱娟, 郭增喜, 张文婷, 等. 土茯苓落新妇苷含量测定药典方法的改进 [J]. 中药材, 2016, 39(8): 1823-1824.
- [7] 袁久志, 窦德强, 陈英杰, 等. 土茯苓酚苷类成分研究 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 967-969.
- [8] 王映红, 李磊, 张宏桂, 等. HPLC-MS 与 HPLC-¹H-NMR 联用鉴定土茯苓中的二氢黄酮醇苷异构体 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 1281-1284.