

一测多评法测定贵州产切面红色土茯苓中 3种活性成分的含量

陈香伶, 杜洪志, 何席呈, 董立莎*
(贵阳中医学院, 贵阳 550025)

[摘要] **目的:**建立贵州产切面红色土茯苓中5-O-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷及落新妇苷的一测多评分析方法,并验证该方法的可靠性和准确性。**方法:**以落新妇苷为内参物,通过方法学考察,建立贵州产切面红色土茯苓中5-O-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷对落新妇苷的相对校正因子,根据建立的相对校正因子计算22批药材中5-O-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷的含量,并比较外标工作曲线法、外标一点法与一测多评法的结果,验证一测多评法的准确性和科学性。**结果:**建立的5-O-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷相对于落新妇苷的相对校正因子重复性和耐用性良好;一测多评法计算的22批贵州产切面红色土茯苓药材样品中5-O-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷含量与外标工作曲线法、外标一点法的含量测定结果无明显差异($RSD < 4.0\%$);样品含量分析结果表明样品中5-O-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷和落新妇苷的含量差异较大,分别为 $0.1063\% \sim 2.692\%$, $0.03129\% \sim 0.6771\%$, $0.5812\% \sim 4.897\%$ 。**结论:**建立的一测多评法准确可靠,可用于贵州产切面红色土茯苓的多成分质量评价。

[关键词] 一测多评法; 贵州产切面红色土茯苓; 5-O-咖啡酰基莽草酸; 落新妇苷; 黄杞苷

[中图分类号] R284.1;R289;R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)15-0093-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181509

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180516.0925.014.html>

[网络出版时间] 2018-05-16 14:17

Determination of Three Bioactive Components in Smilacis Glabrae Rhizoma by Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker

CHEN Xiang-ling, DU Hong-zhi, HE Xi-cheng, DONG Li-sha^{1*}

(Guiyang University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) of 5-O-caffeoyl shikimic acid, engeletin and astilbin of Guizhou red-section Smilacis Glabrae Rhizoma, and verify the reliability and accuracy of this method. **Method:** With astilbin as the standard substance, the relative correction factors (RCF) of 5-O-caffeoyl shikimic acid and engeletin to astilbin of Guizhou red-section Smilacis Glabrae Rhizoma were established by methodological tests. The established RCF was used to calculate the content of 5-O-caffeoyl shikimic acid and engeletin of 22 batches of medicinal samples, compare the results of the one point external standard method and the external standard working curve method, and verify the accuracy and scientificity of QAMS. **Result:** The RCF of 5-O-caffeoyl shikimic acid and engeletin to astilbin had a good reproducibility and durability. The three methods used to determine the content of 5-O-caffeoyl shikimic acid and engeletin of 22 batches Guizhou red-section Smilacis Glabrae Rhizoma showed no significant difference ($RSD < 4.0\%$). The determination results of 5-O-caffeoyl shikimic acid, engeletin and astilbin were different, which were in the range of $0.1063\% \sim 2.692\%$, $0.03129\% \sim 0.6771\%$, $0.5812\% \sim 4.897\%$. **Conclusion:** The QAMS is accurate and

[收稿日期] 20171118(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460588)

[第一作者] 陈香伶,在读硕士,从事中药及民族药药效物质基础研究,Tel:0851-88308060,E-mail: 3070307615@qq.com

[通信作者] *董立莎,教授,从事中药及民族药药效物质基础研究,Tel:0851-88308060,E-mail: dlsha1216@aliyun.com

reliable, which can be used to evaluate the multi-component quality of Guizhou red-section *SmilacisGlabraeRhizoma*.

[Key words] quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); Guizhou red-section *SmilacisGlabraeRhizoma*; 5-*O*-caffeoyl shikimic acid; astilbin; engeletin

土茯苓为百合科植物光叶菝葜的干燥根茎^[1],具有除湿、解毒、通利关节之功,其应用广泛,药食同源。本课题组前期调研发现,土茯苓有切面红色和白色之分,不同切面颜色的土茯苓在主要化学成分及药效上存在明显的差异^[2-3],贵州产的土茯苓切面均为红色,是具有地域特点的苗族常用药材,资源丰富,有较大的研究价值^[4]。

土茯苓含有黄酮类、有机酸、萜丙素等多种化学成分,其所含落新妇苷具有抗炎^[5-6]、选择性免疫抑制^[7-9]、抗抑郁^[10]、抗氧化^[11]等活性;5-*O*-咖啡酰基莽草酸及黄杞苷具有抗氧化^[11-12]、抗癌^[12]、抗炎^[13]等多种药理活性,故落新妇苷,5-*O*-咖啡酰基莽草酸,黄杞苷为该药材中的活性成分。2015年版《中国药典》中土茯苓仅以落新妇苷作为质量控制指标,难以体现该药材的整体质量,因此本试验以落新妇苷,5-*O*-咖啡酰基莽草酸及黄杞苷成分为含量测定指标,以期土茯苓药材的内在质量控制提供依据,但其活性成分的对照品制备困难,较难实现多指标的定量检测。一测多评法(quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS)正好有效地解决了这一困难,该方法是以价廉易得的对照品为内标物,通过建立与其他各成分的相对校正因子从而实现同步测定其他各成分的含量^[14]。目前,该方法已广泛运用于中药材的多成分质量评价,其中生姜、黄连、丹参等中药材的一测多评法已收入2015年版《中国药典》。然而,一测多评法在贵州产切面红色土茯苓中的报道甚少,因此本试验以贵州产切面红色土茯苓为研究对象,建立其中5-*O*-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷对落新妇苷的一测多评分析方法,以进一步完善该药材的质量评价体系,为一测多评法在该药材中的应用奠定研究基础,也为贵州药用新资源的开发和利用提供一定的科学依据。

1 材料

LC-20AT型高效液相色谱仪(LC-20AT型输液泵, SERIAL型紫外检测器,日本岛津公司),依利特色谱柱 Hypersil ODS2 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 1100系列高效液相色谱仪(G1311A型四元溶剂泵, G1322A型在线脱气机, G1315B型DAD检测器,美国Agilent公司); Hedera ODS-2 C₁₈ 色谱柱

(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 600型半制备液相色谱仪(A08DG2 639M型四元溶剂泵, 2489型紫外-可见光检测器,美国Waters公司); Sun Fire Prep C₁₈半制备液相色谱柱(10 mm × 150 mm, 10 μm); Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); XS205型1/10万电子天平(瑞士梅特勒托利多公司); AB 104-N型1/1万分析天平(梅特勒上海有限公司); KQ5200型超声提取器(昆山市超声仪器有限公司); 702N型进口 HAMILTON液相进样针(规格25 μL, 贵阳东新化工有限公司); 手动微量进样器(上海安亭微量进样器厂); YE4A329170型Top Pette单道移液器[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司]; SZ-96型自动纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂)。

落新妇苷, 黄杞苷(四川维克奇生物科技有限公司, 批号140430, 140518, HPLC纯度均>99%); 5-*O*-咖啡酰基莽草酸采用Waters 600半制备液相制备, HPLC检测纯度>98%, 可用于含量测定; 乙腈、甲醇为色谱纯(德国Merck公司); 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯, 蒸馏水为实验室自制。

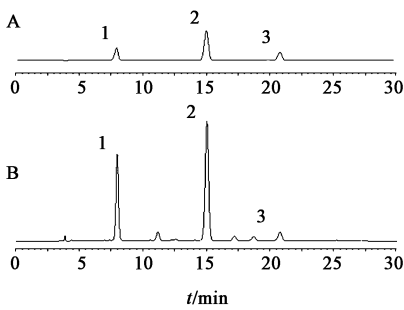
贵州产切面红色土茯苓样品原植物由贵阳中医学院生药教研室董立莎教授鉴定为百合科植物光叶菝葜 *Smilax glabra* 的根茎, 凭证标本保存于贵阳中医学院生药重点实验室。

2 方法与结果

2.1 一测多评法色谱条件的建立 依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相 A 为水相 0.1% 甲酸-10% 甲醇-水, 流动相 B 为有机相 乙腈, 梯度洗脱(0.01 ~ 21 min, 13% ~ 18% B; 21 ~ 26.01 min, 13% B); 柱温 20 °C; 流速 1 mL · min⁻¹; 检测波长 291 nm。在上述色谱条件下, 各成分分离度良好, 见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取落新妇苷, 黄杞苷, 5-*O*-咖啡酰基莽草酸对照品各适量, 置 10 mL 的棕色量瓶中, 加甲醇溶解定容至刻度, 摇匀, 配制成落新妇苷 0.494 g · L⁻¹, 黄杞苷 0.058 0 g · L⁻¹, 5-*O*-咖啡酰基莽草酸 0.270 g · L⁻¹ 的对照品储备液, 4 °C 保存备用。

2.3 供试品溶液的制备 称取土茯苓样品 0.4 g (过二号筛), 精密称定, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 分别精密加入 50% 乙醇 30 mL, 称定质量, 静置



1. 5-*O*-咖啡酰基莽草酸; 2. 落新妇苷; 3. 黄杞苷; A 混合对照品; B. 样品

图 1 混合对照品和贵州产切面红色土茯苓样品 HPLC 色谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed standards and Guizhou red-section *Smilacis Glabrae Rhizoma*

30 min。摇匀,超声(200 W,40 kHz)提取 30 min,放冷,以 50% 乙醇补足减失的质量,摇匀,过滤,取续滤液,过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.4 HPLC 方法学考察

2.4.1 线性关系考察

精密量取 2.2 项下混合对照品,配制一系列浓度对照品溶液,取 10 μL 注入高效液相色谱仪,测定峰面积值,以峰面积为纵坐标,进样量(μg)为横坐标绘制标准曲线,得 5-*O*-咖啡酰基莽草酸的线性回归方程 $Y = 2.0000 \times 10^6 X + 1.9212 \times 10^4$ ($r = 0.9999$),表明进样量在 0.270 ~ 5.400 μg 线性关系良好;落新妇苷线性回归方程 $Y = 3.0000 \times 10^6 X - 1.5441 \times 10^5$ ($r = 0.9999$),表明进样量在 0.490 ~ 9.880 μg 线性关系良好;黄杞苷线性回归方程 $Y = 2.0000 \times 10^6 X - 2.1215 \times 10^4$ ($r = 0.9999$),表明进样量在 0.060 ~ 1.160 μg 线性关系良好。

2.4.2 精密度试验

精密量取 2.2 项下同一浓度混合对照品溶液 10 μL ,连续进样 6 次,5-*O*-咖啡酰基莽草酸、落新妇苷及黄杞苷峰面积 RSD 分别为 0.9%,0.8%,1.0%,表明仪器精密度良好。

2.4.3 稳定性试验

精密量取 2.3 项下同一浓度供试品溶液 10 μL ,分别在 0,2,4,6,8,10,12,24 h 不同的时间点注入高效液相色谱仪,5-*O*-咖啡酰基莽草酸、落新妇苷及黄杞苷峰面积 RSD 分别为 2.0%,1.8%,1.6%,表明方法稳定性良好。

2.4.4 重复性试验

取同一批土茯苓药材 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液。测得 5-*O*-咖啡酰基莽草酸、落新妇苷和黄杞苷的质量分数分别为 2.77%,3.53%,0.47%,RSD 分别为 1.9%,2.3%,2.1%,表明方法重复性良好。

2.4.5 加样回收率试验

精密称取同一批土茯苓药材粉末 0.2 g,平行制备样品 6 份,根据样品减半称样后 5-*O*-咖啡酰基莽草酸、落新妇苷和黄杞苷的含量,加入等量的混合对照品,按 2.3 项下方法制备供试品溶液并测定。结果 5-*O*-咖啡酰基莽草酸、落新妇苷、黄杞苷平均加样回收率分别为 100.96%,99.31%,97.46%,RSD 分别为 1.9%,2.0%,2.1%,表明该方法准确度良好,见表 1。

2.5 相对校正因子的测定及重复性试验

按 2.2 项下方法平行制备 8 份不同浓度的混合对照品溶液,测定 5-*O*-咖啡酰基莽草酸、落新妇苷及黄杞苷的峰面积,根据在一定线性范围内,被测物质的量(W)与其色谱的响应值(峰面积, A)的正比关系 $W = fA$,计算 5-*O*-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷分别对落新妇苷相对校正因子(RCF),测定的 5-*O*-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷对落新妇苷的相对校正因子重复性较好。见表 2。

2.6 相对校正因子的耐用性考察

采用岛津 LC-20AT 型,Agilent 1100 型和 Waters 600 型高效液相色谱系统;Hedera ODS-2 C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm),Hypersil ODS2 C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 和 Diamonsil C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱,考察不同仪器和色谱柱对 RCF 的影响。结果不同的仪器和不同色谱柱对 5-*O*-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷的 RCF 的影响较小,RSD 分别为 2.9%,2.8%,表明所建立的 5-*O*-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷对落新妇苷的相对校正因子耐用性良好。见表 3。

2.7 待测组分色谱峰的定位

取 2.2 项下混合对照品溶液 10 μL ,按 2.1 项下色谱条件进样分析。考察相对保留时间比值法(RTR)和保留时间差值法在不同仪器和色谱柱中的重复性。结果表明,用相对保留时间的比值定位(RSD < 3.0%)比用保留时间差值定位(RSD > 5.0%)重复性较好,故本试验采用待测成分与内参物相对保留时间比值法进行色谱峰的定位,5-*O*-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷对落新妇苷的 RTR 的 RSD 分别为 2.3%,2.0%。见表 4。

2.8 样品含量分析

按 2.3 项下方法制备供试品溶液,每个样品平行制备 3 份,按 2.1 项下方法进样分析,将一测多评法测定的 22 批贵州产切面红色土茯苓样品中 5-*O*-咖啡酰基莽草酸、落新妇苷及黄杞苷含量计算结果与外标工作曲线法和外标一点法比较,验证一测多评法准确性,含量测定结果和数据分析见图 2,3 及表 5。

采用 SPSS 16.0 统计软件,将分析结果以相对

表 1 5-O-咖啡酰基莽草酸、落新妇苷和黄杞苷加样回收率

Table 1 Recovery test of 5-O-caffeoyl shikimic acid and astilbin and engeletin on HPLC

成分	称样量/g	测得量/mg	样品中量/mg	加入量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
5-O-咖啡酰基莽草酸	0.200 4	11.195	5.551	5.50	102.62	100.96	1.9
	0.200 0	10.965	5.540	5.50	98.64		
	0.199 8	11.086	5.534	5.50	100.95		
	0.200 0	11.226	5.540	5.50	103.38		
	0.200 1	11.103	5.543	5.50	101.09		
	0.200 3	10.996	5.548	5.50	99.05		
落新妇苷	0.200 4	14.161	7.074	7.000	101.24	99.31	2.0
	0.200 0	13.934	7.060	7.000	98.20		
	0.199 8	13.820	7.053	7.000	96.67		
	0.200 0	13.900	7.060	7.000	97.71		
	0.200 1	14.132	7.064	7.000	100.97		
	0.200 3	14.144	7.071	7.000	101.04		
黄杞苷	0.200 4	1.891	0.941 9	0.950 0	99.91	97.46	2.1
	0.200 0	1.853	0.940 0	0.950 0	96.11		
	0.199 8	1.847	0.939 1	0.950 0	95.57		
	0.200 0	1.869	0.940 0	0.950 0	97.79		
	0.200 1	1.848	0.940 5	0.950 0	95.53		
	0.200 3	1.890	0.941 4	0.950 0	99.85		

表 2 相对校正因子的测定 (n=8)

Table 2 Results of reference correction factors (RCF) tests (n=8)

No.	落新妇苷		5-O-咖啡酰基莽草酸			黄杞苷				
	进样量/ μg	峰面积	进样量/ μg	峰面积	$f_{5\text{-}O\text{-咖啡酰基莽草酸/落新妇苷}}$	RSD/%	进样量/ μg	峰面积	$f_{\text{黄杞苷/落新妇苷}}$	RSD/%
1	0.490	1 107 028	0.270	489 769	1.245 5	2.0	0.060	125 512	1.080 0	2.0
2	1.240	3 153 553	0.680	1 376 787	1.256 1		0.150	344 603	1.107 0	
3	2.470	6 311 888	1.350	2 695 601	1.279 8		0.290	700 487	1.057 9	
4	3.710	9 564 753	2.030	4 108 504	1.273 8		0.440	1 070 642	1.059 5	
5	4.940	12 707 836	2.700	5 397 414	1.286 8		0.580	1 427 401	1.045 3	
6	6.180	16 040 165	3.380	6 688 546	1.311 6		0.730	1 813 669	1.044 7	
7	7.410	19 044 093	4.050	7 968 552	1.306 2		0.870	2 159 512	1.035 4	
8	9.880	25 683 199	5.400	10 676 079	1.314 8		1.160	2 859 867	1.054 4	

偏差及 RSD 指标进行数据之间的差异性比较发现,一测多评法测定的 22 批样品中 5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷含量计算结果与外标工作曲线法、外标一点法测定结果无明显差异, RSD 均 < 4.0%, 表明贵州产切面红色土茯苓中 5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷对落新妇苷的相对校正因子具有较好的可信度, 所建立一测多评法具有良好的重复性。

在 SPSS 16.0 统计软件上以 3 种不同的含量分

析方法及同一分析方法中不同成分含量之间的差异画出箱式图, 由图 2 可知, 3 种方法测定的 22 批样品中 5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷的含量箱图中的中位数位置、四分位间距框的位置、高度与区间大小基本一致, 且无离群值, 说明 3 种含量测定方法之间的差异较小, 建立的一测多评法是可行的。由图 3 可直观地看出检测的 22 批样品中落新妇苷, 5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷的含量箱图中的中位数位

表 3 不同仪器和色谱柱的 RCF

Table 3 Determination of RCF by different instruments and columns

仪器	色谱柱	$f_{5-O-咖啡酰基}$	$f_{黄杞苷/落新妇苷}$
		莽草酸/落新妇苷	黄杞苷/落新妇苷
岛津 LC-20AT 型	Hedera ODS-2 C ₁₈	1.313	1.093 6
	Diamonsil C ₁₈	1.289	1.089 0
	Hypersil ODS2 C ₁₈	1.302	1.102 1
Agilent 1100 型	Hedera ODS-2 C ₁₈	1.265	1.065 4
	Diamonsil C ₁₈	1.237	1.073 5
	Hypersil ODS2 C ₁₈	1.274	1.057 8
Waters 600 型	Hedera ODS-2 C ₁₈	1.225	1.041 5
	Diamonsil C ₁₈	1.224	1.012 4
	Hypersil ODS2 C ₁₈	1.216	1.035 6

表 4 HPLC 不同仪器和色谱柱的 RTR

Table 4 Determination of RTR by different instruments and columns on HPLC

仪器	色谱柱	$RTR_{5-O-咖啡酰基}$	$RTR_{黄杞苷}$
		莽草酸/落新妇苷	落新妇苷
岛津 LC-20AT 型	Hedera ODS-2 C ₁₈	0.399	1.499
	Diamonsil C ₁₈	0.393	1.478
	Hypersil ODS2 C ₁₈	0.395	1.486
Agilent 1100 型	Hedera ODS-2 C ₁₈	0.390	1.478
	Diamonsil C ₁₈	0.384	1.463
	Hypersil ODS2 C ₁₈	0.389	1.467
Waters 600 型	Hedera ODS-2 C ₁₈	0.376	1.415
	Diamonsil C ₁₈	0.372	1.424
	Hypersil ODS2 C ₁₈	0.380	1.436

置、四分位间距框的位置、高度与区间大小相差都比较大,说明样品中这三者的含量差异是比较大的。

由数据分析结果可知 22 批土茯苓药材中以落新妇苷含量最高,5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷的质量分数次之,分别为 0.581 2% ~ 4.897%, 0.106 3% ~ 2.692%, 0.031 29% ~ 0.677 1%。目前落新妇苷,5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷已明确为土茯苓中的活性成分,故以这 3 种活性成分作为其含量测定指标具有一定的科学性,对于贵州产切面红色土茯苓的质量控制研究也较准确、合理。

3 讨论

3.1 内参物的选择 切面红色土茯苓为贵州省大宗传统特色药材,其蕴藏量大,并有资源优势,其主要药效成分为黄酮类化合物,研究表明其乙酸乙酯部位具有显著抗炎活性^[15-16]。在 2015 年版《中国

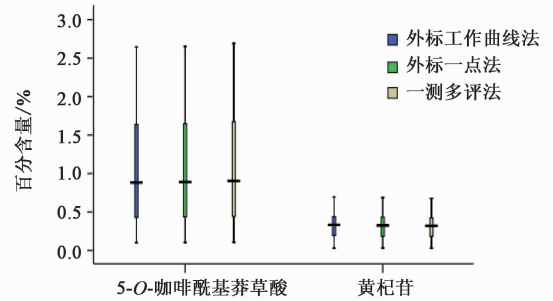


图 2 三种方法测定贵州产切面红色土茯苓中 5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷的含量箱型(95%的置信区间)

Fig. 2 Box plot of 5-O-caffeoyl shikimic acid and engeletin in Guizhou red-section Smilacis Glabrae Rhizoma by three methods (95% confidence interval)

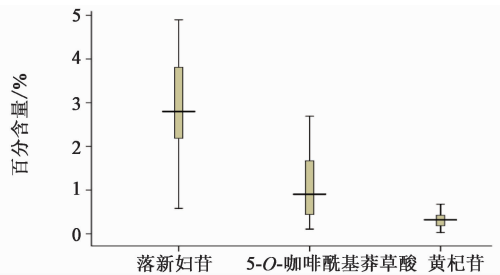


图 3 一测多评法测定 22 批贵州产切面红色土茯苓中 3 种活性成分的含量箱型(95%的置信区间)

Fig. 3 Box plot of 5-O-caffeoyl shikimic acid and engeletin in Guizhou red-section Smilacis Glabrae Rhizoma by QAMS (95% confidence interval)

药典》中仅对落新妇苷进行了含量限定,但是土茯苓中的其他成分亦有重要的药理作用,故仅控制落新妇苷的量难以真实反映药材的内在质量。因此本文以价廉易得的落新妇苷为内参物,建立 5-O-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷对落新妇苷的相对校正因子,实现了对贵州产切面红色土茯苓中 5-O-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷及落新妇苷含量的同步测定,既节约了分析成本,又增加了质控指标,达到了多指标评价土茯苓药材内在质量的目的。

3.2 一测多评法结果分析 一测多评法实质是一种基于内标校正,通过外标法测定没有对照品的目标物含量的分析方法,可以实现中药的多成分分析。本试验以落新妇苷为内参物,建立 5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷对落新妇苷的一测多评分析方法,并通过相对校正因子计算待测成分含量,结果一测多评法测定的 22 批切面红色土茯苓样品中 5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷的含量与外标工作曲线法、外标一点法含量测定值差异较小,相对偏差分别在 1.76% ~ 4.29%, 2.64% ~ 4.74%; RSD 分别为 0.7% ~ 3.6%, 1.1% ~ 2.6%,结果表明 3 种方法计

表 5 3 种测定方法计算 5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷含量结果比较(n=3)

Table 5 Comparison on contents of 5-O-caffeoyl shikimic acid by three methods(n=3)

No.	样品来源	落新妇苷	5-O-咖啡酰基莽草酸					黄杞苷				
			A	B	C	相对偏差	RSD	A	B	C	相对偏差	RSD
1	贵州省安顺市龙宫镇	3.388	2.014 0	2.022 0	2.053 0	1.92	1.0	0.440 4	0.432 5	0.422 7	4.09	2.1
2	贵州省赫章县	1.078	0.610 6	0.617 8	0.627 4	2.72	1.4	0.167 2	0.161 2	0.160 5	4.11	2.3
3	贵州省贵阳市水田镇	2.204	0.257 1	0.264 3	0.268 4	4.29	2.2	0.307 1	0.299 2	0.295 9	3.72	1.9
4	贵州省贵阳市水田镇相思河	1.611	0.429 4	0.436 7	0.443 0	3.12	1.6	0.193 4	0.185 5	0.184 5	4.74	2.6
5	贵州省龙里县	2.679	1.205 0	1.212 0	1.231 0	2.14	1.1	0.415 9	0.408 0	0.402 1	3.38	1.7
6	贵州省贵阳市森林故事	3.153	0.646 2	0.653 4	0.663 8	2.69	1.4	0.278 9	0.270 9	0.267 2	4.29	2.2
7	贵州省安顺市西秀区	2.185	0.943 2	0.950 5	0.965 3	2.32	1.2	0.249 0	0.241 1	0.239 1	4.07	2.2
8	贵州省织金县猫场镇	3.810	1.697 0	1.704 0	1.730 0	1.93	1.0	0.548 6	0.540 6	0.523 3	4.71	2.4
9	贵州省织金县少普乡	2.784	0.406 0	0.413 2	0.419 7	3.32	1.7	0.102 2	0.099 42	0.098 99	3.20	1.7
10	贵州省龙里县湾寨乡	4.133	1.638 0	1.645 0	1.670 0	1.94	1.0	0.696 2	0.688 2	0.677 1	2.78	1.4
11	贵州省普安县	4.670	2.531 0	2.538 0	2.577 0	1.80	1.0	0.569 8	0.561 9	0.551 1	3.33	1.7
12	贵州省六盘水市	0.581 6	0.101 4	0.108 6	0.107 3	2.81	3.6	0.130 1	0.126 2	0.125 4	3.69	2.0
13	贵州省都匀市水泥厂	2.812	0.823 3	0.830 5	0.843 2	2.39	1.2	0.381 2	0.373 3	0.375 3	2.64	1.1
14	贵州省铜仁市思南县	0.581 2	0.101 4	0.104 6	0.106 3	3.07	2.4	0.031 0	0.032 3	0.031 29	4.12	2.2
15	贵州省贵阳市百花湖	3.128	1.149 0	1.156 0	1.164 0	2.16	0.7	0.257 4	0.249 4	0.249 1	3.29	1.9
16	贵州省贵阳市清镇打鼓乡	3.716	2.645 0	2.652 0	2.692 0	1.76	1.0	0.596 9	0.588 9	0.573 8	3.94	2.0
17	广西省百色德保县马隘镇	4.892	1.169 0	1.179 0	1.196 0	2.29	1.2	0.391 1	0.383 2	0.371 3	4.12	2.6
18	贵州省清镇市	4.897	1.118 0	1.126 0	1.143 0	2.21	1.1	0.223 6	0.215 6	0.214 8	4.04	2.2
19	贵州省贵阳市	2.506	0.822 9	0.830 1	0.843 1	2.43	1.2	0.358 7	0.350 7	0.344 1	4.16	2.1
20	贵州省花溪区	2.654	1.686 0	1.693 0	1.720 0	2.00	1.1	0.363 1	0.355 2	0.347 8	4.31	2.2
21	贵州省花溪区黔陶乡	3.818	0.753 6	0.760 8	0.772 5	2.48	1.3	0.499 7	0.491 8	0.482 4	3.52	1.8
22	贵州省安顺市普定县	1.149	0.144 9	0.148 1	0.150 3	3.65	1.8	0.193 4	0.185 4	0.185 0	4.46	2.5

注:各样品含量测定均按干燥品计算;A.外标工作曲线法;B.外标一点法;C.一测多评法;落新妇苷含量用外标工作曲线法进行计算。

算的 5-O-咖啡酰基莽草酸和黄杞苷含量相关性良好,该方法准确、可靠,重复性良好。

3.3 相对校正因子的重复性和耐用性考察 一测多评法的建立受到诸多因素的影响,不同型号仪器、色谱柱以及流动相比比例,pH,柱温,流速等变化都会使相对校正因子发生变化,从而引入误差。因此测定各待测成分的相对校正因子,并对其进行耐用性和重复性考察是一测多评法成功建立的关键^[17-20]。为此本试验在 HPLC 平台上通过不同仪器和色谱柱对 RCF 和 RTR 进行重复性和耐用性考察,结果表明建立的相对校正因子具有良好的重复性和耐用性,最终确定了贵州产切面红色土茯苓中 5-O-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷对落新妇苷的相对校正因子。再通过考察在不同仪器和色谱柱下相对保留时间比值法和保留时间差值法的重复性,最终采用相对保留时间比值法对相应成分色谱峰进行准确定位。

本试验以落新妇苷为内标物,建立贵州产切面红色土茯苓中 5-O-咖啡酰基莽草酸、黄杞苷对落新妇苷的一测多评分析方法,通过对 22 批样品的测定,验证了一测多评法的准确性,并对其通用性进行了探讨,研究结果为贵州产切面红色土茯苓的多成分质量评价体系和一测多评法在该药材中的应用提供了良好的实验依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:18.
[2] 杜洪志,农亨,董立莎,等. 不同采集地土茯苓中(切面红色、白色)总糖及多糖含量分析与体外抗氧化作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(14):39-43.
[3] 葛向前,吴曙光,陈秀芬,等. 断面红棕色及类白色土茯苓抗炎作用的比较研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(6):103-105.

- [4] 邱德文,杜江. 中华本草·苗药卷. 下篇[M]. 贵阳: 贵州科技出版社,2005:47.
- [5] LU C L, ZHU Y F, HU M M, et al. Optimization of astilbin extraction from the rhizome of *Smilax glabra*, and evaluation of its anti-inflammatory effect and probable underlying mechanism in lipopolysaccharide-induced RAW264. 7 macrophages[J]. *Molecules*, 2015, 20(1): 625-644.
- [6] DONG L, ZHU J, DU H, et al. Astilbin from *Smilax glabra* Roxb. attenuates inflammatory responses in complete freund's adjuvant-induced arthritis rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 1-10.
- [7] ZHENG Z G, DUAN T T, BAO H, et al. Macrophage biospecific extraction and HPLC-ESI-MSn analysis for screening immunological active components in *Smilacis Glabrae Rhizoma*[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 77(2):44-48.
- [8] TANG J, GUO J, FAN J, et al. Metabolite profiling of astilbin in rat sera using UPLC/MS(E) and impact of its metabolites on immunosuppressive activity[J]. *J Chromatogr B*, 2013, 929(7):56-62.
- [9] DI T T, RUAN Z T, ZHAO J X, et al. Astilbin inhibits Th17 cell differentiation and ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions in BALB/c mice via Jak3/Stat3 signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 32(2):32-38.
- [10] LV Q Q, WU W J, GUO X L, et al. Antidepressant activity of astilbin: involvement of monoaminergic neurotransmitters and BDNF signal pathway [J]. *Biological*, 2014, 37(6):987-995.
- [11] YANG G, ZHAO X, WEN J, et al. Simultaneous fingerprint, quantitative analysis and anti-oxidative based screening of components in *Rhizoma Smilacis Glabrae* using liquid chromatography coupled with charged aerosol and coulometric array detection [J]. *J Chromatogr B*, doi:10.1016/j.jchromb.2017.02.012.
- [12] ZENG X, WANG Y, QIU Q, et al. Bioactive phenolics from the fruits of *Livistona chinensis* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(1):104.
- [13] WU H, ZHAO G, JIANG K, et al. Engeletin alleviates lipopolysaccharide-induced endometritis in mice by inhibiting TLR4-mediated NF- κ B activation[J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(31):6171-6178.
- [14] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. *中国中药杂志*, 2006, 31(23):1925-1928.
- [15] 农亨,杜洪志,董立莎,等. 光叶菝葜抗炎有效部位筛选[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(2):63-65.
- [16] 金晓敏,张晓熙,郭璐,等. 基于 NLRP3 炎性体轴土茯苓总黄酮对痛风性关节炎的作用和机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(4):90-95.
- [17] 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.
- [18] 朱晶晶,王智民,高慧敏,等. 一测多评法在中药质量评价中的应用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(16):220-228.
- [19] 刘宏,雷露静,白玉琴,等. 一测多评法同时测定蒙药三子散中 7 种指标成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(18):58-63.
- [20] 于雪娥,秦建平,李家春,等. 一测多评法同时测定淫羊藿总黄酮胶囊中 7 种黄酮类成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(7):79-85.

[责任编辑 顾雪竹]