

## 不同大小亚贡叶化学成分比较

孙云超<sup>1</sup>, 王巍<sup>1</sup>, 王晓彤<sup>1</sup>, 李德伟<sup>1</sup>, 冉小库<sup>1</sup>, 窦德强<sup>1\*</sup>, 董锋<sup>2</sup>

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2. 珍奥集团股份有限公司, 辽宁大连 116600)

**[摘要]** 目的:比较不同大小亚贡叶的高效液相指纹图谱,并对亚贡叶中绿原酸和沼菊素进行含量测定。方法:采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.4% 磷酸水,梯度洗脱(0 ~ 60 min, 5% ~ 85% 乙腈),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 0 ~ 18 min, 327 nm, 18.1 ~ 60 min, 210 nm;进样量 10 μL,柱温 30 °C。结果:建立不同大小亚贡叶指纹图谱,较大的亚贡叶样品绿原酸含量高(1.588 2 mg·g<sup>-1</sup>),较小的亚贡叶样品沼菊素含量高(5.637 4 mg·g<sup>-1</sup>)。结论:亚贡叶样品中绿原酸、沼菊素含量与叶子大小有相关性。该方法操作简便,结果准确,重复性好,实验结果可用于指导亚贡叶的质量控制。

**[关键词]** 亚贡叶; 指纹图谱; 绿原酸; 沼菊素

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0052-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060052

**Comparison on Chemical Constituents from Different Size of Yacon Leaves** SUN Yun-chao<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, WANG Xiao-tong<sup>1</sup>, LI De-wei<sup>1</sup>, RAN Xiao-ku<sup>1</sup>, DOU De-qiang<sup>1\*</sup>, DONG Feng<sup>2</sup> (1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. Zhen Ao Co. Ltd., Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish an HPLC fingerprint of different size of yacon leaves, and determine the content of chlorogenic acid and enhydrin. **Method:** The fingerprints were obtained on a Kromasil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with the gradient elution solvent system composed of acetonitrile and 0.4% phosphoric acid. The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was maintained at 30 °C, and the detection wavelength was 0-18 min, 327 nm, 18.1-60 min, 210 nm. **Result:** The fingerprint of yacon leaves was established. Larger leaves samples with high content of chlorogenic acid (1.588 2 mg·g<sup>-1</sup>), and the small yacon leaves with high content of enhydrin (5.637 4 mg·g<sup>-1</sup>). **Conclusion:** The chlorogenic acid and enhydrin content in yacon leaves was correlated with the size. This method is easy to operate with the high exactitude and the excellent repetition for the quantitative analysis of yacon leaves.

**[Key words]** yacon; HPLC fingerprint; chlorogenic acid; enhydrin

亚贡源自西班牙文 yacon,国内音译为亚贡或雅贡,别名雪莲薯、雪莲果和菊薯等,为菊科多年生草本植物<sup>[1]</sup>。原产于南美洲安第斯山脉,引种到新西兰、日本、美国、欧洲各国后得到了深入广泛的研究开发。在21世纪初由日本引入我国,目前在我国辽宁、海南、云南、四川、贵州、台湾等地均有种植。亚贡叶具有有降血糖、抗氧化、抗菌、抗真菌、护肝的作用,绿原酸、沼菊素分别为亚贡叶酚酸类、内酯类成

分中的主要活性成分<sup>[2-5]</sup>。为了更好开发利用亚贡叶资源和质量控制,本课题对不同大小亚贡叶进行指纹图谱研究,对其化学成分绿原酸、沼菊素进行含量测定,可以为合理利用亚贡这一国内新资源提供科学依据,同时又为新药的质量控制打下基础。

### 1 材料

**1.1 仪器** 1260 系列高效液相色谱仪(真空脱气机、四元泵、柱温箱、紫外检测器、HP1260 化学工作

**[收稿日期]** 20140119(005)

**[基金项目]** 辽宁省教育厅项目(L2013364);辽宁省高等学校创新团队课题(LT2013020)

**[第一作者]** 孙云超,在读硕士,从事中药化学和中药质量控制评价研究, Tel:18640283512, E-mail:18640283512@163.com

**[通讯作者]** \* 窦德强,博士,教授,从事中药化学和新药研发研究, Tel:0411-87406497, E-mail:deqiangdou@126.com

站,美国安捷伦科技有限公司);Acculab 型 1/1 万分天平、CP225D 型 1/10 万分天平 (Sartorius group)。

**1.2 试药与试剂** 取海城样品 (批号 20130925), 经药用植物教研室王冰教授鉴定为菊科多年生草本植物亚贡 *Smallanthus sonchifolius* 的叶按照叶片大小进行分类, 样品信息见表 1。

表 1 亚贡叶样品信息及测试编号

Table 1 The sample information and test number of yacon leaves

样品编号	叶片大小	样品编号	叶片大小
H1	>20 cm	H4	10 ~ 15 cm
H2	18 ~ 20 cm	H5	< 10 cm
H3	15 ~ 18 cm	H6	其他 (茎芽及周围叶)

**1.3 试剂** 沼菊素对照品 (自制, 经 HPLC 面积归一化法检测纯度 > 98%), 绿原酸对照品 (批号 110753-200413) 购于中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈为色谱纯, 磷酸 (分析纯), 水为超纯水。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 取亚贡叶粉末 (过四号筛) 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入 50% 甲醇 25 mL, 超声提取 30 min, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取沼菊素、绿原酸对照品适量于量瓶中, 加入 60% 乙醇溶解并定容至刻度, 制得分别为 0.044, 0.044 g · L<sup>-1</sup> 的沼菊素、绿原酸对照品溶液。

**2.3 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A) - 0.4% 磷酸水 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 10% ~ 25% A; 10 ~ 25 min, 25% ~ 50% A; 25 ~ 30 min, 50% A; 30 ~ 40 min, 50% ~ 60% A; 40 ~ 50 min, 60% ~ 80% A; 50 ~ 55 min, 80% ~ 85% A; 55 ~ 60 min, 85% A), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 检测波长前 18 min 为 327 nm, 18 min 以后为 210 nm, 进样体积 10 μL。

### 2.4 方法学考察

**2.4.1 精密性试验** 取供试品溶液连续进样 6 次, 共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 结果表明实验用仪器精密性良好。

**2.4.2 稳定性试验** 对同一个样品在 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定, 比较共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%。结果显示所制得的样品在 24 h 时间内稳定。

**2.4.3 重复性试验** 取同一样品 6 份, 按供试品溶

液方法进行制备, 平行测定, 考察各共有峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%, 表明试验重复性良好。

**2.5 不同大小亚贡叶指纹图谱分析** 试验在优化的色谱条件下测定了 6 种大小规格的亚贡叶指纹图谱, 其指纹图谱由中“药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版进行数据处理, 得到指纹图谱见图 1, 共有指纹图谱见图 2。

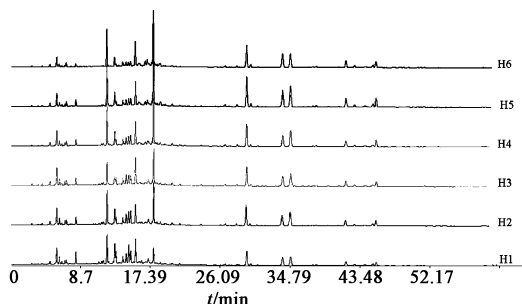


图 1 亚贡叶 HPLC 指纹谱

Fig. 1 HPLC Fingerprint of yacon leaves

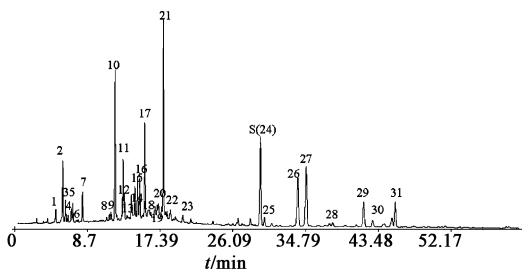


图 2 亚贡叶共有指纹谱

Fig. 2 Common fingerprint of yacon leaves

**2.6 相似度分析**<sup>[6-7]</sup> 在相似度分析中, 以相关系数、夹角余弦表示的相似度, 都是特征变量上变化模式的相似性, 在样品鉴别真伪上提供样品间亲疏程度的相似性是有优势的。利用相关系数可以确定两种属性之间的关系, 其计算公式为:

$$\text{相关系数} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

向量夹角余弦法是将中药指纹谱数据视为多维空间中的向量, 使指纹谱的相似性问题转化为多维空间中的两个向量间的相似性问题, 其计算公式为:

$$\text{夹角余弦} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^n x_i^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n y_i^2}}$$

对不同大小亚贡叶样品运用上述方法进行相似  
度比较。结果表明除 H1 号样品的相系数为 0.870  
9 外,其他 5 个样品的相关系数、夹角余弦和中药色  
谱指纹图谱相似度评价系统输出的相似度都 >0.9。  
样品 H2, H3, H4, H6 相似度良好。见表 2。

**2.7 不同大小亚贡样品共有特征峰峰面积** 根据  
色谱峰面积与化学成分的含量成正比,将不同大小  
亚贡的叶子指纹共有峰单位质量的峰面积列表,比  
较指纹共有峰所示组分的含量变化。运用 SPSS  
20.0 对不同亚贡叶子大小样品与各个保留时间下  
峰面积进行双变量相关回归统计结果见表 3。

表 2 亚贡叶样品相似度

Table 2 Similarity evaluation of leaves of yacon

样品编号	相关系数	夹角余弦	相似度
H1	0.870 9	0.908 8	0.909 0
H2	0.991 9	0.993 8	0.994 0
H3	0.991 8	0.993 8	0.994 0
H4	0.992 8	0.994 1	0.994 0
H5	0.982 1	0.985 3	0.986 0
H6	0.982 6	0.985 2	0.985 0

表 3 亚贡叶样品共有特征峰峰面积

Table 3 Common peaks area of yacon leaves

峰序号	相对保留 时间	峰面积						RSD /%	相关系数
		H1	H2	H3	H4	H5	H6		
1	0.17	325.4	364.9	392.1	345.2	376.1	264.6	14	0.397
2	0.20	1 825.5	1 894.6	2 026.1	1 678.0	1 473.7	1 103.7	20	0.867 <sup>1)</sup>
3	0.21	755.9	724.9	670.4	524.9	414.3	281.1	34	0.976 <sup>2)</sup>
4	0.23	401.9	382.8	378.2	278.9	196.2	160.3	35	0.968 <sup>2)</sup>
5	0.24	421.3	476.6	504.9	454.1	450.6	393.8	9	0.408
6	0.28	1 129.0	772.9	731.9	639.1	700.1	361.0	34	0.861 <sup>1)</sup>
7	0.35	71.7	30.8	35.3	22.1	18.7	9.8	69	0.857 <sup>1)</sup>
8	0.39	248.3	210.1	188.9	139.1	103.8	78.5	40	0.979 <sup>2)</sup>
9	0.39	388.7	270.9	276.6	247.1	164.0	107.7	40	0.978 <sup>2)</sup>
10	0.41	3 101.6	3 479.4	3 782.8	4 034.1	4 663.8	4 044.3	14	-0.836 <sup>1)</sup>
11	0.44	1 735.9	1 391.6	1 487.3	1 339.7	1 259.2	1 017.4	17	0.929 <sup>2)</sup>
12	0.45	1 066.0	613.0	597.2	1 066.0	416.6	268.6	47	0.898 <sup>1)</sup>
13	0.48	840.2	723.8	746.7	840.2	692.9	591.5	11	0.902 <sup>1)</sup>
14	0.49	943.3	949.6	956.7	943.3	740.9	545.5	21	0.874 <sup>1)</sup>
15	0.50	1 981.3	1 249.2	1 147.2	1 981.3	789.9	500.9	47	0.911 <sup>1)</sup>
16	0.51	1 313.2	1 317.2	1 217.9	1 313.2	780.8	546.1	30	0.972 <sup>2)</sup>
17	0.53	2 691.3	2 321.5	2 505.9	2 691.3	2 819.7	2 891.3	8	-0.683
18	0.55	275.9	171.3	113.1	275.9	75.0	17.5	77	0.889 <sup>1)</sup>
19	0.57	224.2	350.6	395.8	224.2	610.7	620.9	36	-0.986 <sup>2)</sup>
20	0.58	685.1	757.1	846.6	685.1	207.2	208.1	62	0.832 <sup>1)</sup>
21	0.61	1 602.8	4 230.0	4 763.5	1 602.8	7 094.3	5 766.0	39	-0.814 <sup>1)</sup>
22	0.63	223.1	287.7	257.2	354.5	598.3	543.5	42	-0.944 <sup>2)</sup>
23	0.91	173.2	238.3	224.2	271.9	310.7	170.9	24	-0.215
S24	1.00	2 389.5	3 397.5	3 220.0	3 769.0	5 265.8	3 826.0	26	-0.776
25	1.02	222.9	288.2	261.8	302.6	526.8	526.4	38	-0.958 <sup>2)</sup>
26	1.15	1 855.6	2 398.3	2 270.8	3 546.0	3 879.5	3 190.8	27	-0.890 <sup>1)</sup>
27	1.19	1 920.0	3 053.3	2 815.2	3 385.8	4 702.7	3 101.2	29	-0.689
28	1.42	786.0	1 107.3	1 015.8	1 235.8	1 837.3	1 405.2	29	-0.849 <sup>1)</sup>
29	1.46	245.3	284.4	260.4	288.4	439.6	437.4	27	-0.946 <sup>2)</sup>
30	1.53	366.0	468.4	456.0	448.4	677.7	591.8	22	-0.898 <sup>1)</sup>
31	1.55	568.5	981.0	949.1	1 146.8	1 594.6	1 103.6	32	-0.763

注:6. 绿原酸;S24. Enhydrin;其中 S 为 Enhydrin 是亚贡叶中主要成分之一,研究用 S 为参比。<sup>1)</sup>代表  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>代表  $P < 0.01$ 。

根据相关分析结果亚贡叶前 18 号峰有 15 个峰面积与叶子大小呈正相关,19~31 号峰有 9 个峰面积与叶子大小呈负相关。

**2.8 样品含量测定** 根据本实验室前期对亚贡叶中有效成分含量测定的研究<sup>[8-9]</sup>,本实验在相同的色谱条件下分别对绿原酸、沼菊素,注入高效液相色谱仪中,测其色谱峰面积,计算不同大小亚贡叶含主要成分含量,再测定样品的含水量,计算干重样品含量。结果表明亚贡叶以 H1(20 cm 以上)样品中绿原酸含量最高,而对应的沼菊素含量最低;H5(10 cm 以下)样品中绿原酸含量较低,而所对应的沼菊素含量最高。结果见表 4。

表 4 海城样品中主要成分含量测定

Table 4 Contents of four components in yacon leaves mg·g<sup>-1</sup>

样品 编号	干重样品含量	
	绿原酸	沼菊素
H1	1.804 8	4.002 7
H2	1.218 3	5.620 3
H3	1.165 8	5.380 1
H4	1.016 4	6.289 5
H5	1.098 7	8.673
H6	0.567 1	6.303 5

根据相关分析结果亚贡叶样品绿原酸含量与叶子大小呈正相关,沼菊素含量与叶子大小呈负相关(除去 H6 茎芽及周围的叶)。

**2.9 不同大小亚贡叶样品含水量比较及以干燥品计样品中主要成分含量** 根据 2010 年版《中国药典》附录 IX H 第一法测定,测定方法如下:亚贡叶供试品粉碎过二号筛,混合均匀后,取供试品 2 g,平铺于干燥至恒重的扁形称量瓶中,厚度不超过 5 mm,疏松供试品不超过 10 mm,精密称定,打开瓶盖在 105℃干燥 5 h,将瓶盖盖好,移置干燥器中,冷却 30 min,精密称定,再在上述温度干燥 1 h,冷却,称重,至连续 2 次冷却称重的差异不超过 5 mg 为止。根据减失的质量,计算供试品中含水量(%)平均值分别为 11.96%,10.77%,11.66%,11.58%,10.37%,10.54%。

### 3 讨论

中药指纹图谱具有较高的直观性并在一定程度上反映了中药内在的化学成分的种类及相对比例含量等多方面的信息。建立了一种全新的质量控制方法,揭示同一药材不同样品间的相似程度和差异性,本实验采用高效液相法对海城产地不同大小的亚贡叶进行指纹图谱分析。

最合适的梯度下全部成分在 60 min 内洗脱完毕。采用二极管阵列检测器,检测波长范围为 200~400 nm,进行色谱分析,经比较发现样品酚酸类成分(大极性部分)在 327 nm 处有最大吸收,内酯类成分(小极性部分)在 210 nm 处,有最大吸收,亚贡叶的组分成分信息量较多,响应值较高且色谱图中基线较平稳,故选择检测波长前 18 min 为 327 nm,18 min 后切换波长为 210 nm。实验分别对 3 种不同型号的色谱柱进行考察,Zorbax SB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5 μm),Kromasil C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5 μm)和 Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5 μm)。结果选用分离效果好最好的 Kromasil C<sub>18</sub>(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱。

亚贡叶中主要含有酚酸类和内酯<sup>[5]</sup>。前期实验发现高温提取一些成分分解,所以选择低温提取方法<sup>[10]</sup>。实验分别对水,30%,50%,70% 甲醇的提取溶剂和超声提取 50 min 内的时间进行考察,结果表明 50% 甲醇 25 mL 超声提取 30 min 的效率高(总峰面积较大)、成分较多。

实验采用相关系数、夹角余弦、中药色谱指纹图谱相似度评价系统输出的相似度对海城不同大小亚贡叶样品指纹图谱进行分析比对,较大(>20 cm)的亚贡叶中绿原酸含量高,而沼菊素含量低,和其他尺寸的亚贡叶样品相似度低。除较大的亚贡叶样品外其他尺寸亚贡叶样品间相似度良好,尺寸适中(20~10 cm)的亚贡叶样品相似度大于 0.99。经过对叶子大小与各个保留时间下的色谱峰面积进行双变量相关回归,得出不同大小亚贡叶样品中各个峰面积与叶子尺寸有相关趋势。共有峰 1~18 号所对应的化学成分随着叶子的长大,含量呈增加趋势,而共有峰 19~31 号所对应的化学成分随着叶子的长大,含量呈降低趋势。1~18 号色谱峰以酚酸类成分为主,而 19~31 号色谱峰以内酯类为主,说明亚贡叶在生长过程中酚酸类的积累逐渐增加,内酯类成分在生长过程中可能逐渐转化为酚酸类成分。

结合海城干重样品主要成分含量相关分析和其柱形图可以清晰的看出,较大的亚贡叶(20 cm 以上)中绿原酸含量较高,而较小的亚贡叶(10 cm 以下)中沼菊素含量较高,茎芽及周围叶由于是新生长出来的,没有经过长时间的生长,化学成分积累较少,各个化学成分含量低,绿原酸、沼菊素含量都很低。大小适中的亚贡叶样品(20~10 cm)绿原酸、沼菊素的含量差别并不大。结果提示,亚贡叶越大绿原酸含量越高,而相对较小的叶子沼菊素含量高

于大的叶子,结合相似度分析,叶子大小适中的亚贡叶样品相似度良好,化学成分含量差别并不,质量可控性高。

[参考文献]

[1] 金文闻,余龙江,孟思进,等.亚贡的植物学及其药理作用研究概况[J].中草药,2006,37(4):633-636.  
[2] Breda Simonovska, Irena Vovk, Samo Andrenek, et al. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers [J]. J Chromatogr A, 2003, 1016(1):89-98.  
[3] Makiko Takenaka, Xiao Jun Yan, Hiroshi Ono, et al. Caffeic acid derivatives in the roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) [J]. J Agr Food Chem, 2003, 51(3):793-796.  
[4] Katerina Valentova, Ladislav Cvak, Alexandr Muck. Antioxidant activity of extracts from the leaves of

*Smallanthus sonchifolius* [J]. Eur J Nutr, 2003, 42(1):61-66.  
[5] 丘鹰昆,窦德强,康廷国,等.亚贡及同属植物化学成分研究进展[J].中国现代中药,2011,13(7):45-51.  
[6] 王玺,王文宇,张克荣,等.中药 HPLC 指纹图谱相似性研究的探讨[J].沈阳药科大学学报,2003,20(5):360.  
[7] 苗爱东,孙殿甲. Excel2002 在中药指纹图谱相似度计算中应用[J].药学进展,2003,27(1):51.  
[8] 杨子欣,李德伟,等.亚贡叶不同提取条件的 HPLC 指纹图谱研究[J].辽宁中医药大学学报,2013,15(6):45-47.  
[9] 盖阔,田芳,窦德强,等. HPLC 测定亚贡叶中绿原酸及咖啡酸含量[J].中国现代中药,2008,10(1):17-19.  
[10] 盖阔,窦德强,史跃满,等.亚贡叶提取工艺研究[J].现代中药研究与实践,2009,23(5):47-50.

[责任编辑 顾雪竹]

---

## 《中国实验方剂学杂志》声明

本刊近期发现有某些网站使用类似本刊网站的域名,冒用本刊名义,收取高额审稿费及版面费。

现本刊郑重声明:①本刊不会以任何名义收取任何审稿费。

②<http://www.syfjxzz.com> 为本刊唯一域名。

对于假冒本刊名义、侵犯本刊权利的不正当行为,本刊将通过法律程序进行维权。