

# HPLC-一测多评法同时测定壮药罗汉茶中6种黄酮类成分及多元统计分析<sup>Δ</sup>

燕霞\*,朱雪妍#,何颂华,张慧,罗轶,黄清泉(广西壮族自治区食品药品检验所/国家药品监督管理局中药材质量监测与评价重点实验室,南宁 530021)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)20-2485-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.20.09



**摘要** 目的:建立同时测定罗汉茶中新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、槲皮苷和黄杞苷含量的方法,并进行多元统计分析。方法:采用高效液相色谱-一测多评法。色谱柱为Phenomenex SuperLu C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液(19:81, V/V),检测波长分别为254 nm(新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、黄杞苷)、291 nm(槲皮苷),流速为1.0 mL/min,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。以落新妇苷为内参物,计算其他5种成分的相对校正因子,再根据相对校正因子计算各成分的含量,并与外标法进行比较;采用SPSS 22.0软件进行聚类分析和主成分分析。结果:新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、槲皮苷和黄杞苷检测进样量的线性范围分别为0.007~0.311、0.871~18.184、0.002~0.119、0.052~1.251、0.105~2.202、0.020~2.319 μg( $r>0.999$ );精密性、重复性、稳定性(24 h)试验的RSD均小于3%;平均加样回收率分别为97.32%、94.89%、97.15%、96.90%、97.52%、97.53%(RSD为1.09%~2.60%, $n=6$ )。新落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、槲皮苷、黄杞苷相对于落新妇苷的平均相对校正因子分别为1.252 6、1.198 3、0.958 6、0.807 1、1.138 1。一测多评法测得新落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、槲皮苷、黄杞苷等5种成分的含量分别为0.394 2~2.067 2、0.139 1~0.804 7、2.864 8~8.554 8、4.581 2~11.371 1、1.028 9~13.401 5 mg/g;外标法测得新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、槲皮苷和黄杞苷等6种成分的含量分别为0.367 2~1.925 3、46.361 1~126.342 1、0.138 1~0.798 8、2.966 2~8.857 8、4.642 5~11.523 3、0.970 6~12.641 9 mg/g;两种方法含量测定结果的相对误差均不高于3.55%。聚类分析结果显示,9批罗汉茶样品可聚为两类,S8聚为一类、其余聚为一类。主成分分析结果显示,前2个主成分的累计方差贡献率为84.745%,分类结果与前者一致。结论:所建高效液相色谱-一测多评法准确、可行,重复性良好,可用于罗汉茶中6种黄酮类成分的同时测定,并可为其质量控制提供参考。

**关键词** 罗汉茶;高效液相色谱法;一测多评法;黄酮;含量;聚类分析;主成分分析

## Simultaneous Determination of 6 Flavonoids in Zhuang Medicine *Engelhardia roxburghiana* by HPLC-QAMS and Multivariate Statistical Analysis

YAN Xia, ZHU Xueyan, HE Songhua, ZHANG Hui, LUO Yi, HUANG Qingquan (Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute for Food and Drug Control/NMPA Key Laboratory for Quality Monitoring and Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530021, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of neoastilbin, astilbin, neoisoastilbin, isoastilbin, quercitrin and engeletin in *Engelhardia roxburghiana*, and conduct multivariate statistical analysis. METHODS: HPLC-QAMS method was adopted. The determination was performed on Phenomenex SuperLu C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid (19:81, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelengths were set at 254 nm (neoastilbin, astilbin, neoisoastilbin, isoastilbin, engeletin) and 291 nm (quercitrin). The column temperature was 30 ℃, and sample size was 10 μL. Using astilbin as internal substance, and the relative correction factors of other 5 factors were calculated. The contents of each component were calculated according to relative correction factor, and were compared with the results of external standard method. SPSS 22.0 software was used for cluster analysis and principal component analysis. RESULTS: The linear range of neoastilbin, astilbin, neoisoastilbin, isoastilbin, quercitrin and engeletin were 0.007-0.311, 0.871-18.184, 0.002-0.119, 0.052-1.251, 0.105-2.202, 0.020-2.319 μg ( $r>0.999$ ), respectively. RSDs of precision, reproducibility and stability (24 h) tests were all lower than 3%. The average recoveries were 97.32%, 94.89%, 97.15%, 96.90%, 97.52% and 97.53% (RSDs were

<sup>Δ</sup> 基金项目:广西科技计划项目(No.桂科 AB17292069);广西药品监督管理局科研计划(No.桂药科2019-12);南宁市科学研究与技术开发计划(No.20191035)

\* 主管药师,硕士。研究方向:药品质量标准。E-mail:357833410@qq.com

# 通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:中药民族药质量标准。电话:0771-5827218。E-mail:384500662@qq.com

1.09% -2.60%,  $n=6$ ), respectively. The relative correction factors of neoastilbin, neoisoastilbin, isoastilbin, quercitrin and engeletin were 1.252 6, 1.198 3, 0.958 6, 0.807 1 and 1.138 1, respectively. The contents of neoastilbin, neoisoastilbin, isoastilbin, quercitrin and engeletin measured by QAMS were 0.394 2-2.067 2, 0.139 1-0.804 7, 2.864 8-8.554 8, 4.581 2-11.371 1, 1.028 9-13.401 5 mg/g; the contents of neoastilbin,

astilbin, neoastilbin, isoastilbin, quercitrin and engeletin were 0.367 2-1.925 3, 46.361 1-126.342 1, 0.138 1-0.798 8, 2.966 2-8.857 8, 4.642 5-11.523 3, 0.970 6-12.641 9 mg/g, respectively. Relative errors of two methods was lower than or equal to 3.55%. The results of cluster analysis showed that 9 batches of samples could be clustered into two categories; S8 sample was one category and others were one category. The results of principal component analysis showed that accumulative contribution rate of former 2 principle components was 84.745%, and the results of sample classification were consistent with those of cluster analysis. CONCLUSIONS: The established HPLC-QAMS method is accurate, feasible and repeatable, and can be used for simultaneous determination of 6 flavonoids in *E. roxburghiana*, and it can provide reference for quality control.

**KEYWORDS** *Engelhardtia roxburghiana*; HPLC; QAMS; Flavonoids; Content; Cluster analysis; Principle component analysis

罗汉茶即黄杞叶,为胡桃科黄杞属植物黄杞 *Engelhardtia roxburghiana* Wall. 的干燥叶。该药收载于《广西壮族自治区壮药质量标准(第2卷)》(2011年版)<sup>[1]</sup>、《广西中药材标准(第2册)》<sup>[2]</sup>,具有清热解毒、生津解渴、解暑利湿的功效<sup>[3]</sup>。广西壮医常将罗汉茶用于治疗感冒、发热、食滞、咽炎<sup>[4]</sup>。以罗汉茶药材为原料的成方制剂罗汉茶化浊颗粒具有清热化浊、通胀活血的功效,可用于高脂血症的辅助治疗,现收载于国家药品标准 WS6015 (B-1015)-2014Z<sup>[5]</sup>。现代药理研究表明,罗汉茶的药理活性成分主要为黄杞叶总黄酮、黄杞苷、落新妇苷、槲皮苷等黄酮类成分<sup>[6]</sup>,其中以落新妇苷、黄杞苷、槲皮苷的含量较高,均为罗汉茶的特征成分,具有显著的抗炎活性<sup>[6]</sup>。罗汉茶现行质量标准包括以罗汉茶对照药材为参照的薄层鉴别和以落新妇苷为指标的含量测定<sup>[1]</sup>,虽然在定性和定量方面对其进行了相关规定,但对特征性成分的控制较为单一,不能全面评价罗汉茶的质量。

传统的含量测定通常以一个或两个成分作为对象,但仅以单一成分含量作为质量控制指标不能全面反映罗汉茶的优劣。有研究发现,由于落新妇苷的异构性和热不稳定性,易转化成新落新妇苷、异落新妇苷、新异落新妇苷等3个同分异构体<sup>[6]</sup>。因此,有必要建立多成分、多指标的罗汉茶质量控制方法<sup>[7-10]</sup>。多指标质量评价模式需要有相应的对照品,但在实际应用中发现,新落新妇苷、异落新妇苷、新异落新妇苷等对照品价格昂贵且难以获得。一测多评(QAMS)法整合了已有含量测定方法的优势,借助待测成分内在的函数和比例关系,仅以单个对照品就可以实现对多个成分的同步测定,具有节约实验耗材、简化操作步骤、节省测定时间和含量测定结果准确度高等优点<sup>[7]</sup>。基于此,本研究采用高效液相色谱—一测多评(HPLC-QAMS)法测定罗汉茶中落新妇苷、黄杞苷、槲皮苷、新落新妇苷、异落新妇苷、新异落新妇苷的含量,同时进行聚类分析和主成分分析,旨在为完善罗汉茶的质量评价提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有1260型、1100型高效液相色谱(HPLC)仪及配套的真空脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Chemstation B.04.0 色谱

工作站(美国Agilent公司),2690型HPLC仪及配套的分离单元、二极管阵列检测器、Empower 3 色谱工作站(美国Waters公司),Ultimate 3000型HPLC仪及配套的分离单元、二极管阵列检测器、Chromeleon 7 色谱工作站(美国Dionex公司),Milli-Q Advantage A10型纯水处理器(美国Millipore公司),KQ-500DA型超声清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司),CP224S型电子分析天平(德国Sartorius公司),XS205型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司)等。

### 1.2 药品与试剂

落新妇苷对照品(批号111798-201504,纯度93.9%)、黄杞苷对照品(批号111906-201102,纯度93.7%)、槲皮苷对照品(批号111538-201606,纯度90.6%)均购自中国食品药品检定研究院;新落新妇苷对照品(批号DST191209-077,纯度98%)、异落新妇苷对照品(批号DST190922-216,纯度98%)、新异落新妇苷对照品(批号DST191025-078,纯度97%)均购自成都普菲德生物技术有限公司;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

罗汉茶药材样品共9批(编号S1~S9),除S8样品采自广西桂林市外,其余样品均采自广西玉林市。经广西食品药品检验所中药民族药室黄清泉主管中药师鉴定为胡桃科黄杞属植物黄杞 *E. roxburghiana* Wall. 的干燥叶。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

以Phenomenex SuperLu C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱,以乙腈-0.1%甲酸溶液(19:81, V/V)为流动相;检测波长分别为254 nm(新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、黄杞苷)、291 nm(槲皮苷);流速为1.0 mL/min;柱温为30℃;进样量为10 μL。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别取新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、槲皮苷、黄杞苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并稀释,制成质量浓度分别为3.628、435.696、0.995、26.068、52.729、9.998 μg/mL的混合对照品溶液(I)以及质量浓度分别为20.733、1212.249、7.962、83.417、146.772、154.605 μg/mL的混合

对照品溶液(Ⅱ)。

2.2.2 供试品溶液 取罗汉茶药材粉末(过四号筛)0.25 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声(功率360 W,频率45 kHz)处理30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,再经0.22 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.2.3 空白溶液 以甲醇为空白溶液。

### 2.3 系统适用性试验

取上述混合对照品溶液(Ⅰ)、供试品溶液和空白溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图1)。由图1可知,混合对照品溶液与供试品溶液在相同保留时间处均有相应的色谱峰出现,分离度均大于2,理论板数以落新妇苷峰计均不低于60 000,空白溶液对测定无干扰。

### 2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液(Ⅰ)2、5、10、15 μL以及混合对照品溶液(Ⅱ)10、15 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分进样量为横坐标( $x, \mu\text{g}$ )、峰面积为纵坐标( $y$ )进行线性回归,结果见表1。

### 2.5 精密度试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(编号S2),按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、槲皮

苷、黄杞苷峰面积的RSD分别为1.20%、0.15%、1.36%、1.98%、0.21%、0.52%( $n=6$ ),表明方法精密度良好。

### 2.6 重复性试验

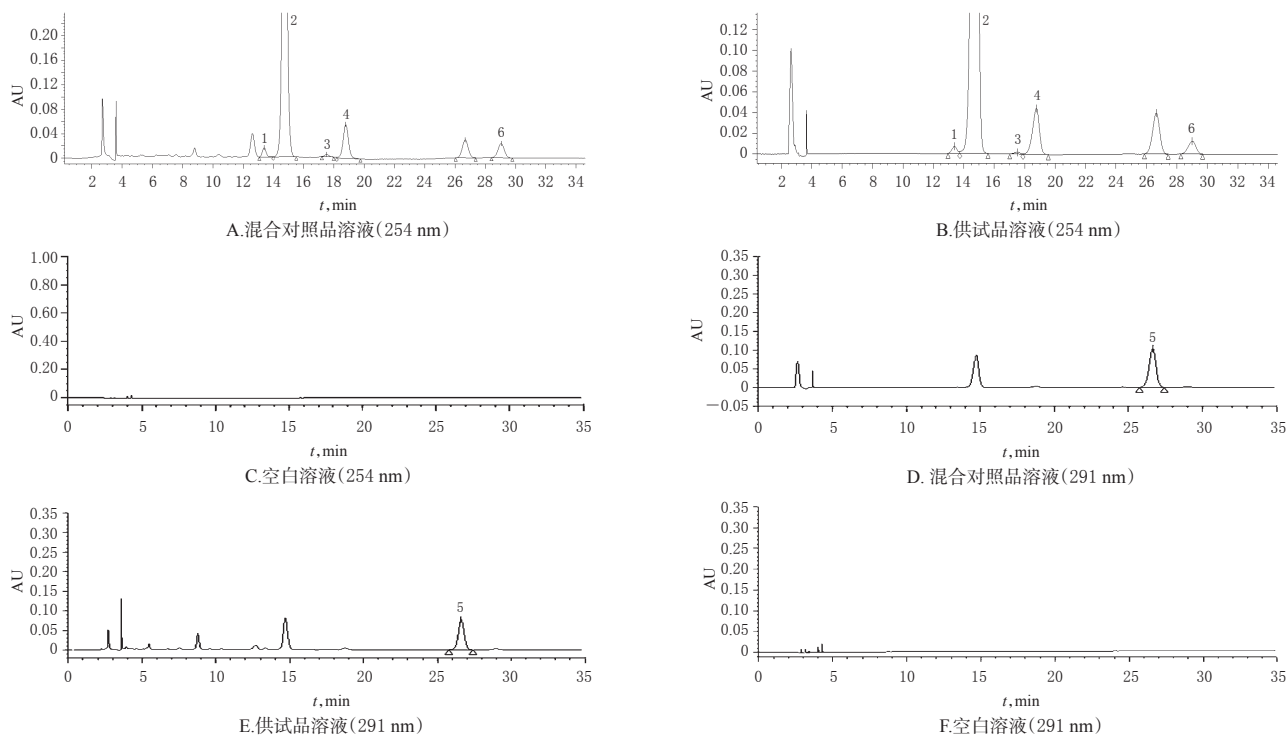
取同一罗汉茶药材粉末(编号S2)6份,每份约0.25 g,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算6种待测成分的含量。结果显示,新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、槲皮苷、黄杞苷含量的RSD分别为2.77%、2.23%、1.70%、2.22%、1.72%、2.61%( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

### 2.7 稳定性试验

取同一供试品溶液(编号S2),分别于室温下放置0、4、8、12、16、20、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果显示,新落新妇苷、落新妇苷、新异落新妇苷、异落新妇苷、槲皮苷、黄杞苷峰面积的RSD分别为1.02%、0.33%、1.43%、1.96%、0.32%、0.52%( $n=7$ ),表明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性良好。

### 2.8 加样回收率试验

取已知含量的罗汉茶药材粉末(编号S2)约0.125 g,共6份,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入混合对照品溶液(含新落新妇苷0.148 2 mg、落新妇苷6.024 9 mg、新异落新妇苷0.030 4 mg、异落新妇苷0.517 0 mg、槲皮苷0.796 1 mg、黄杞苷0.281 0 mg),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。



注:1.新落新妇苷;2.落新妇苷;3.新异落新妇苷;4.异落新妇苷;5.槲皮苷;6.黄杞苷

Note: 1. neoastilbin; 2. astilbin; 3. neoisoastilbin; 4. isoastilbin; 5. quercitrin; 6. engeletin

图1 混合对照品溶液、罗汉茶供试品溶液和空白溶液的HPLC图

Fig 1 HPLC chromatograms of mixed control, *E. roxburghiana* test sample and blank control

表 1 新落新妇昔等 6 种成分的回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges of 6 components as neoastilbin

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g}$
新落新妇昔	$y=2 \times 10^5 x - 6 490.3$	0.999 5	0.007~0.311
落新妇昔	$y=2 \times 10^5 x + 563 431.0$	0.999 8	0.871~18.184
新异落新妇昔	$y=2 \times 10^5 x - 5 088.4$	0.999 3	0.002~0.119
异落新妇昔	$y=3 \times 10^4 x + 29 860.0$	0.999 6	0.052~1.251
槲皮昔	$y=3 \times 10^4 x + 92 609.0$	0.999 6	0.105~2.202
黄杞昔	$y=3 \times 10^4 x + 9 144.8$	0.999 9	0.020~2.319

表 2 新落新妇昔等 6 种成分的加样回收率试验结果 (n=6)

Tab 2 Results of recovery tests of 6 components as neoastilbin (n=6)

待测成分	取样量, g	已知量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
新落新妇昔	0.125 7	0.141 9	0.148 2	0.284 5	96.22	97.32	2.03
	0.125 0	0.141 2	0.148 2	0.286 6	98.11		
	0.125 3	0.141 4	0.148 2	0.280 5	93.86		
	0.125 3	0.141 5	0.148 2	0.286 9	98.11		
	0.125 3	0.141 4	0.148 2	0.288 1	98.99		
	0.125 0	0.141 1	0.148 2	0.287 3	98.65		
落新妇昔	0.125 7	7.091 6	6.024 9	12.818 2	95.05	94.89	1.84
	0.125 0	7.056 1	6.024 9	12.657 3	92.97		
	0.125 3	7.070 2	6.024 9	12.653 0	92.66		
	0.125 3	7.071 9	6.024 9	12.907 8	96.86		
	0.125 3	7.069 6	6.024 9	12.880 4	96.45		
	0.125 0	7.052 2	6.024 9	12.797 7	95.36		
新异落新妇昔	0.125 7	0.040 5	0.030 4	0.070 0	97.04	97.15	1.26
	0.125 0	0.040 3	0.030 4	0.069 8	97.04		
	0.125 3	0.040 4	0.030 4	0.070 4	98.68		
	0.125 3	0.040 4	0.030 4	0.070 2	98.03		
	0.125 3	0.040 4	0.030 4	0.069 9	97.04		
	0.125 0	0.040 3	0.030 4	0.069 2	95.07		
异落新妇昔	0.125 7	0.603 6	0.517 0	1.112 9	98.51	96.90	2.45
	0.125 0	0.600 5	0.517 0	1.077 9	92.34		
	0.125 3	0.601 7	0.517 0	1.111 1	98.53		
	0.125 3	0.601 9	0.517 0	1.110 7	98.41		
	0.125 3	0.601 7	0.517 0	1.105 5	97.45		
	0.125 0	0.600 2	0.517 0	1.097 3	96.15		
槲皮昔	0.125 7	0.785 5	0.796 1	1.549 6	95.98	97.52	2.60
	0.125 0	0.781 6	0.796 1	1.527 9	93.74		
	0.125 3	0.783 1	0.796 1	1.551 9	96.57		
	0.125 3	0.783 3	0.796 1	1.580 5	100.14		
	0.125 3	0.783 1	0.796 1	1.571 8	99.07		
	0.125 0	0.781 1	0.796 1	1.574 2	99.62		
黄杞昔	0.125 7	0.326 5	0.281 0	0.597 8	96.55	97.53	1.09
	0.125 0	0.324 8	0.281 0	0.594 9	96.12		
	0.125 3	0.325 5	0.281 0	0.600 1	97.72		
	0.125 3	0.325 6	0.281 0	0.603 0	98.72		
	0.125 3	0.325 5	0.281 0	0.602 6	98.61		
	0.125 0	0.324 7	0.281 0	0.598 6	97.47		

2.9 QAMS 法

2.9.1 相对校正因子的计算 有研究指出,在一定线性范围内成分的量(质量或质量浓度)与检测器的响应值成正比<sup>[6]</sup>。基于此,本研究分别取“2.2.1”项下混合对照品溶液(I) 2、5、10、15、20、30  $\mu\text{L}$  和混合对照品溶液

(II) 2、3、5、10、15  $\mu\text{L}$ ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以落新妇昔为内参物(落新妇昔对照品易得且价格便宜),计算新落新妇昔、新异落新妇昔、异落新妇昔、槲皮昔、黄杞昔等成分的相对校正因子( $f_{si}$ ):  $f_{si} = f_s/f_i = (A_s/C_s)/(A_i/C_i)$ (式中,  $A_s$  为内参物的峰面积,  $C_s$  为内参物的质量浓度,  $A_i$  为待测成分的峰面积,  $C_i$  为待测成分的质量浓度)<sup>[6]</sup>。结果显示,新落新妇昔、新异落新妇昔、异落新妇昔、槲皮昔、黄杞昔的  $f_{si}$  分别为 1.278 0、1.215 0、0.942 4、0.819 8、1.160 3。

2.9.2 不同仪器对  $f_{si}$  的影响 取“2.2.1”项下混合对照品溶液(I) 适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别考察了不同 HPLC 仪对新落新妇昔等 5 种成分  $f_{si}$  的影响。结果显示,各成分  $f_{si}$  的 RSD 均小于 5%,表明不同型号仪器对各成分  $f_{si}$  的影响较小。结果见表 3。

表 3 不同仪器条件下新落新妇昔等 5 种成分的  $f_{si}$

Tab 3 Relative correction factors of 5 components as neoastilbin under different HPLC instruments

仪器	新落新妇昔	新异落新妇昔	异落新妇昔	槲皮昔	黄杞昔
Agilent 1260型HPLC仪	1.255 9	1.184 2	0.949 5	0.778 1	1.105 4
Agilent 1100型HPLC仪	1.306 4	1.211 6	0.975 6	0.786 5	1.137 7
Waters 2690型HPLC仪	1.278 0	1.215 0	0.942 4	0.819 8	1.160 3
Ultimate 3000型HPLC仪	1.277 7	1.138 4	0.978 0	0.824 5	1.142 2
平均值	1.279 5	1.187 3	0.961 4	0.802 2	1.136 4
RSD, %	1.62	2.98	1.88	2.91	2.01

2.9.3 不同色谱柱对  $f_{si}$  的影响 取“2.2.1”项下混合对照品溶液(I) 适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别考察不同色谱柱(规格均为 250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )对新落新妇昔等 5 种成分  $f_{si}$  的影响。结果显示,各成分  $f_{si}$  的 RSD 均小于 5%,表明不同色谱柱对各成分  $f_{si}$  的影响较小。结果见表 4。

表 4 不同色谱柱条件下新落新妇昔等 5 种成分的  $f_{si}$

Tab 4 Relative correction factors of 5 components as neoastilbin under different columns

色谱柱	新落新妇昔	新异落新妇昔	异落新妇昔	槲皮昔	黄杞昔
Phenomenex SuperLu C <sub>18</sub>	1.278 0	1.215 0	0.942 4	0.819 8	1.160 3
Agilent 5 TC-C <sub>18</sub> (2)	1.208 3	1.202 5	0.966 0	0.819 3	1.143 4
CAPCELL MGIII	1.269 2	1.180 9	0.968 9	0.808 5	1.148 2
平均值	1.251 8	1.199 5	0.959 1	0.815 9	1.150 6
RSD, %	3.03	1.44	1.51	0.78	0.76

2.9.4 不同柱温对  $f_{si}$  的影响 取“2.2.1”项下混合对照品溶液(I) 适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别考察不同柱温对新落新妇昔等 5 种成分  $f_{si}$  的影响。结果显示,各成分  $f_{si}$  的 RSD 均小于 5%,表明温度对各成分  $f_{si}$  的影响较小。结果见表 5。

2.9.5 不同流速对  $f_{si}$  的影响 取“2.2.1”项下混合对照品溶液(I) 适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别考察不同流速对新落新妇昔等 5 种成分  $f_{si}$  的影响。结果显示,改变流速时,新落新妇昔、异落新妇昔和槲皮昔  $f_{si}$  的 RSD 均大于 5%,表明流速对这 3 种成分  $f_{si}$  的影响较大,

故需在拟定方法时对其作出限定,限定流速为1.0 mL/min。结果见表6。

表5 不同柱温条件下新落新妇昔等5种成分的 $f_{si}$

Tab 5 Relative correction factors of 5 components as neoastilbin under different column temperatures

柱温, °C	新落新妇昔	新异落新妇昔	异落新妇昔	槲皮昔	黄杞昔
30	1.278 0	1.215 0	0.942 4	0.819 8	1.160 3
35	1.238 4	1.207 2	0.949 5	0.800 2	1.131 3
40	1.235 0	1.202 4	0.954 4	0.796 7	1.121 2
平均值	1.250 5	1.208 2	0.948 8	0.805 6	1.137 6
RSD, %	1.91	0.53	0.64	1.55	1.78

表6 不同流速条件下新落新妇昔等5种成分的 $f_{si}$

Tab 6 Relative correction factors of 5 components as neoastilbin under different flow rates

流速, mL/min	新落新妇昔	新异落新妇昔	异落新妇昔	槲皮昔	黄杞昔
0.8	1.320 5	1.204 2	0.919 7	0.738 2	1.118 3
1.0	1.278 0	1.215 0	0.942 4	0.819 8	1.160 3
1.2	1.182 8	1.219 7	1.045 2	0.805 4	1.230 7
平均值	1.260 4	1.213 0	0.969 1	0.787 8	1.169 8
RSD, %	5.60	0.65	6.90	5.53	4.86

2.9.6 不同检测波长对 $f_{si}$ 的影响 取“2.2.1”项下混合对照品溶液(I)适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别考察不同检测波长对新落新妇昔等5种成分 $f_{si}$ 的影响。结果显示,各成分 $f_{si}$ 的RSD均小于5%,表明检测波长对各成分 $f_{si}$ 的影响较小。结果见表7。

表7 不同检测波长条件下新落新妇昔等5种成分的 $f_{si}$

Tab 7 Relative correction factors of 5 components as neoastilbin under different detection wavelengths

检测波长, nm	新落新妇昔	新异落新妇昔	异落新妇昔	槲皮昔	黄杞昔
254.291	1.278 0	1.215 0	0.942 4	0.819 8	1.160 3
252.289	1.213 7	1.216 1	0.961 1	0.826 8	1.154 5
254.293	1.243 0	1.224 3	0.940 7	0.810 7	1.136 8
平均值	1.244 9	1.218 4	0.948 1	0.819 1	1.150 5
RSD, %	2.59	0.42	1.19	0.98	1.06

2.9.7 待测成分色谱峰的定位 对待测成分色谱峰的准确定位是实现QAMS的前提。一般而言,色谱峰的定位有两种方式,即相对保留时间( $R_{is}$ )和保留时间差( $\Delta R_{is}$ ),QAMS待测成分色谱峰一般采用前者进行定位<sup>[11-15]</sup>。在参考上述文献的基础上,本研究分别考察了不同仪器、色谱柱、柱温、流速和检测波长等条件对新落新妇昔等5种成分峰 $R_{is}$ 的影响。结果显示,上述条件变化对各成分 $R_{is}$ 的影响较小(RSD<5%)。结果见表8。

2.9.8  $f_{si}$ 与 $R_{is}$ 的确定 由于流速对新落新妇昔等5种成分的 $f_{si}$ 影响较大(其中3种成分的RSD>5%),故剔除流速因素,取其余各影响因素下 $f_{si}$ 的平均值作为最终的 $f_{si}$ 。由于不同色谱系统条件对 $R_{is}$ 均有影响,但影响均不大(RSD<5%),故取各影响因素下 $R_{is}$ 的平均值作为最

终 $R_{is}$ 。结果见表9。

表8 不同条件下新落新妇昔等5种成分的 $R_{is}$

Tab 8 Relative retention time of 5 components as neoastilbin under different conditions

影响因素	条件	相对保留时间				
		新落新妇昔	新异落新妇昔	异落新妇昔	槲皮昔	黄杞昔
仪器	Agilent 1260型HPLC仪	0.907 8	1.190 9	1.275 2	1.464 8	1.640 7
	Agilent 1100型HPLC仪	0.907 1	1.195 9	1.283 9	1.480 9	1.646 7
	Waters 2690型HPLC仪	0.910 1	1.189 0	1.274 5	1.463 2	1.633 6
	Ultimate 3000型HPLC仪	0.909 0	1.187 9	1.272 3	1.459 4	1.631 5
	平均值	0.908 5	1.190 9	1.276 5	1.467 1	1.638 1
	RSD, %	0.14	0.30	0.40	0.65	0.42
色谱柱	phenomenex SuperLu C <sub>18</sub>	0.910 1	1.189 0	1.274 5	1.463 2	1.633 6
	Agilent 5 TC-C <sub>18</sub> (2)	0.908 7	1.280 8	1.379 3	1.439 1	1.605 3
	CAPCELL MG III	0.904 5	1.205 3	1.296 0	1.477 6	1.657 1
	平均值	0.907 8	1.225 0	1.3166	1.460 0	1.632 0
	RSD, %	0.32	4.00	4.20	1.33	1.59
	柱温, °C	30	0.910 1	1.189 0	1.274 5	1.463 2
35	0.914 5	1.178 3	1.261 9	1.440 4	1.675 7	
40	0.919 4	1.166 6	1.248 1	1.415 1	1.576 8	
平均值	0.914 7	1.177 9	1.261 5	1.439 6	1.628 7	
RSD, %	0.51	0.95	1.05	1.67	3.05	
流速, mL/min	0.8	0.909 0	1.189 1	1.274 3	1.461 9	1.634 8
	1.0	0.910 1	1.189 0	1.274 5	1.463 2	1.633 6
	1.2	0.909 4	1.185 7	1.267 5	1.467 2	1.636 5
	平均值	0.909 5	1.187 9	1.272 1	1.464 1	1.635 0
	RSD, %	0.06	0.16	0.31	0.19	0.09
	检测波长, nm	254.291	0.909 0	1.189 2	1.274 9	1.811 3
252.289	0.910 1	1.187 2	1.271 6	1.814 6	1.978 7	
254.293	0.909 8	1.188 7	1.273 7	1.815 4	1.977 8	
平均值	0.909 7	1.188 4	1.273 4	1.813 8	1.976 6	
RSD, %	0.06	0.09	0.13	0.12	0.15	

表9 新落新妇昔等5种成分的 $f_{si}$ 和 $R_{is}$

Tab 9 Relative correction factors and relative retention time of 5 components as neoastilbin

指标	新落新妇昔	新异落新妇昔	异落新妇昔	槲皮昔	黄杞昔
$f_{si}$	1.252 6	1.198 3	0.958 6	0.807 1	1.138 1
$R_{is}$	0.910 0	1.195 4	1.281 5	1.458 3	1.634 6

## 2.10 外标法与QAMS法的含量测定结果

取9批罗汉茶样品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,以落新妇昔为内参物,通过 $f_{si}$ 分别计算新落新妇昔、新异落新妇昔、异落新妇昔、槲皮昔和黄杞昔的含量。同时,采用外标法测定上述供试品溶液中落新妇昔、落新妇昔、新异落新妇昔、异落新妇昔、槲皮昔和黄杞昔的含量。结果显示,两种方法含量测定结果的相对偏差(RD)均不高于3.55%,表明两种方法的测定结果无明显差异。结果见表10。

## 2.11 聚类分析

采用SPSS 22.0软件,以9批罗汉茶样品中6种待测成分的峰面积为变量,通过组间连接聚类法,以平方欧氏距离为度量标准进行聚类分析。结果显示,当类间距为20时,9批罗汉茶样品可聚为两类,其中S8聚为一类、其余聚为一类,表明分类结果与采集地相关。结果见图2。

表 10 新落新妇昔等 6 种成分的外标法与 QAMS 法的含量测定结果 (mg/g)

Tab 10 Contents of 6 components as neoastilbin measured by ESM and QAMS(mg/g)

编号	新落新妇昔			落新妇昔	新异落新妇昔			异落新妇昔			槲皮昔			黄杞昔		
	外标法	QAMS法	RD, %	外标法	外标法	QAMS法	RD, %	外标法	QAMS法	RD, %	外标法	QAMS法	RD, %	外标法	QAMS法	RD, %
S1	1.206 7	1.295 6	3.55	51.349 6	0.413 0	0.416 0	0.36	4.749 1	4.586 7	1.74	4.642 5	4.581 2	0.66	1.198 2	1.270 2	2.92
S2	1.147 1	1.231 6	3.55	56.495 1	0.461 6	0.458 2	0.37	4.864 6	4.698 2	1.74	6.349 6	6.265 7	0.67	2.645 1	2.804 1	2.92
S3	0.561 7	0.603 1	3.55	46.361 1	0.138 1	0.139 1	0.36	2.966 2	2.864 8	1.74	5.547 2	5.473 8	0.67	0.970 6	1.028 9	2.92
S4	1.131 5	1.214 9	3.55	64.867 0	0.454 8	0.458 1	0.36	4.760 4	4.597 6	1.74	6.833 2	6.742 9	0.67	3.767 8	3.994 3	2.92
S5	0.816 6	0.876 8	3.55	71.709 8	0.427 6	0.430 8	0.37	4.784 0	4.620 4	1.74	7.231 2	7.135 6	0.67	3.263 3	3.459 4	2.92
S6	0.847 0	0.908 5	3.55	60.456 8	0.518 4	0.522 3	0.37	4.122 1	3.981 2	1.74	7.070 3	6.976 8	0.67	5.592 1	5.928 2	2.92
S7	1.925 3	2.067 2	3.55	63.172 3	0.534 9	0.538 9	0.37	6.137 2	5.927 3	1.74	7.184 5	7.089 5	0.67	12.641 9	13.401 5	2.92
S8	1.118 7	1.201 1	3.55	126.342 1	0.798 8	0.804 7	0.37	8.857 8	8.554 8	1.74	11.523 3	11.371 1	0.66	9.535 0	10.108 0	2.92
S9	0.367 2	0.394 2	3.55	70.988 0	0.775 3	0.781 0	0.37	4.025 7	3.888 2	1.74	9.209 2	9.087 5	0.67	7.026 2	7.448 4	2.92

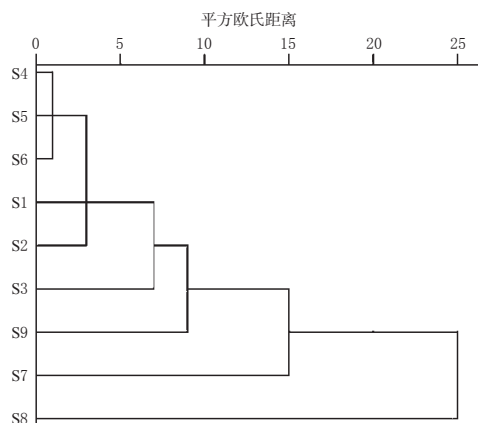


图 2 9 批罗汉茶样品的聚类分析树状图

Fig 2 Dendrogram for cluster analysis of 9 batches of *E. roxburghiana*

2.12 主成分分析

采用 SPSS 22.0 软件,以 6 种待测成分的峰面积为变量进行主成分分析。结果显示,主成分 1 的特征值为 3.792,方差贡献率为 63.204%;主成分 2 的特征值为 1.292,方差贡献率为 21.541%。以特征值大于 1 为标准<sup>[16]</sup>,选取前 2 个作为主成分。结果显示,前 2 个主成分的累计方差贡献率为 84.745%,表明前 2 个主成分可以反映样品的整体信息。结果见表 11。

表 11 6 个主成分的特征值、方差贡献及累计方差贡献率

Tab 11 Eigen value, variance contribution and cumulative variance contribution rate of 6 principle components

主成分	特征值	方差贡献率, %	累计方差贡献率, %
1	3.792	63.204	63.204
2	1.292	21.541	84.745
3	0.502	8.359	93.104
4	0.402	6.696	99.800
5	0.010	0.169	99.970
6	0.002	0.030	100

采用 SPSS 22.0 软件,以第 1、第 2 主成分为变量绘制二维投影图(图 3)。由图 3 可知, S8、S7、S9 位于图右侧,其余批次位于左侧;而 S8 位于最右侧,该结果与聚类分析结果基本一致。

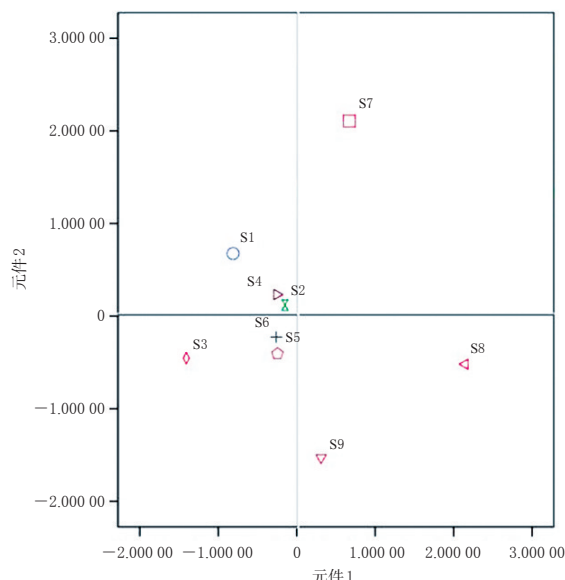


图 3 9 批罗汉茶样品的主成分分析二维投影图

Fig 3 Two dimensional projection of principal component analysis for 9 batches of *E. roxburghiana*

3 讨论

虽然本研究测定的 6 种成分均为黄酮类化合物,但采用二极管阵列检测器进行全波长扫描后发现,新落新妇昔、落新妇昔、新异落新妇昔、异落新妇昔和黄杞昔均在 254 nm 波长处有最大吸收峰,而槲皮昔则在 291 nm 波长处有最大吸收峰。在“2.1”项波长条件下,各待测成分色谱峰峰形良好,基线平稳且干扰较小,故于 254 nm 波长下检测新落新妇昔、落新妇昔、新异落新妇昔、异落新妇昔、黄杞昔,于 291 nm 波长下检测槲皮昔。本课题组前期考察了乙腈-水、甲醇-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.1% 甲酸溶液等不同流动相体系的分离效果,结果发现,在流动相中加入适量的酸可使各成分色谱峰峰形得到明显改善;当以乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相时,各成分色谱峰峰形及分离度均较好且出峰时间较适宜,故选择乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相。为使分析时间缩短并将各成分有效分离,本课题组还对等度洗脱和梯度洗脱进行了比较,结果发现,等度洗脱可以满足上述实验要求,故选择等度洗脱。

本课题组前期通过单因素实验对不同提取溶剂(水、甲醇、无水乙醇、50%乙醇)、提取方法(超声、加热回流)、提取时间(15、30、45、60 min)、提取溶剂用量(25、50、100 mL)的提取效果进行了比较,结果发现,4种不同溶剂所得样品的图谱中色谱峰数量相同,但以甲醇为提取溶剂时所得色谱峰峰面积最大,故选择甲醇为提取溶剂;两种提取方法的提取效果相当,为使实验操作方便快捷,故选择超声提取;当药材用量为0.25 g、甲醇用量为25 mL、超声提取时间为30 min时,各待测成分即可提取完全,故选择甲醇25 mL超声处理30 min为提取条件。本研究还发现,除流速外,仪器、色谱柱、温度等影响因素对新落新妇苷等5种成分的 $f_w$ 均无显著影响,这可能与使用的紫外检测器为浓度型检测器,即当进样量一定时,峰面积与流动相、流速成反比有关,同时这也解释了流速对上述5种成分 $f_w$ 的影响较大,因此在确定实验条件时,应对流动相流速进行限制。

罗汉茶中含有多种成分,如果以外标法测定各成分含量,不仅需耗费大量时间而且需要大量对照品,加之部分对照品难以获得且价格昂贵,极大程度地提高了实验成本。QAMS法能以有限的对照品作为内参物,对色谱图中大部分色谱峰进行分析,并对完整的色谱信息进行研究,可提高操作的便利性,并有效地节约实验成本。QAMS法与外标法的含量测定结果显示,两种方法所测新落新妇苷等5种成分含量之间无明显差异。

聚类分析结果显示,9批罗汉茶样品可聚为两类,S8聚为一类、其余聚为一类,表明分类结果与实际样品采集地一致,提示不同地区罗汉茶含量存在较大差异,特别是落新妇苷含量差异较大。主成分分析结果显示,前2个主成分的累计方差贡献率为84.745%;S8、S7、S9位于图右侧,其余批次位于左侧,而S8位于最右侧,该结果与聚类分析结果基本一致。这提示在罗汉茶药材相关质量标准的后续研究中,应考虑产地对其质量的影响,以建立更加合理规范的质量标准。

综上所述,所建HPLC-QAMS法准确、可行,重复性良好,可用于罗汉茶中6种黄酮类成分的同时测定,并可为其质量控制提供参考。

## 参考文献

[1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局.广西壮族自治区

壮药质量标准:第2卷[S].南宁:广西科学技术出版社,2011:178.

- [2] 广西壮族自治区卫生厅.广西中药材标准:第2册[S].南宁:广西科学技术出版社,1992:146.
- [3] 饶伟源.壮药罗汉茶研究进展[J].广西医学,2015,37(7):956-959.
- [4] 国家食品药品监督管理总局.国家药品标准颁布件:WS6015(B-1015)-2014Z[S].2015-02-28.
- [5] 张霞,傅旭春,白海波.广西地产黄杞叶指纹图谱研究[J].中国现代应用药学,2014,31(1):54-57.
- [6] 严爱娟,张文婷,赵维良,等.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[J].中草药,2018,49(15):3681-3686.
- [7] 胡瑞雪,梁元昊,徐文丽,等.一测多评法在中药中的应用及研究进展[J].药物分析杂志,2019,39(11):1968-1979.
- [8] 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.
- [9] 董惠敏,许如玲,何丹丹,等.一测多评法测定印度獐牙菜中8个口山酮类成分的含量[J].中草药,2021,52(1):241-247.
- [10] 曲佳,周军,侯文彬,等.HPLC法测定黄杞叶中落新妇苷和黄杞苷[J].中草药,2009,40(2):306-307.
- [11] 黄远,董福越,李楚源,等.一测多评法测定板蓝根中6种化学成分的含量[J].中草药,2021,52(3):845-851.
- [12] 彭瑶,曾嵘,吴尚洁,等.一测多评法测定藏药烈香杜鹃中5种黄酮类成分的含量[J].中国中药杂志,2021,46(9):2229-2236.
- [13] 许海燕,何春喜,罗思旭,等.指纹图谱与一测多评法相结合测定积雪草中5种三萜类成分[J].中国药学杂志,2021,56(3):181-188.
- [14] 刘倩芸,李新霞,迪娜·吐尔洪,等.一测多评法测定黄花柳花中5个黄酮类成分[J].上海中医药杂志,2019,53(3):100-104.
- [15] 徐文武,谢涛,吕东峰,等.一测多评法同时测定红参中11种人参皂苷的含量[J].中草药,2021,52(7):2099-2105.
- [16] 余文新,林励,李智,等.聚类分析和主成分分析法研究檀香HPLC特征图谱[J].中药材,2019,42(3):584-587.

(收稿日期:2021-04-22 修回日期:2021-08-17)

(编辑:陈宏)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅