

青蛙七中异黄酮类成分质量控制研究*

何姬¹, 刘妍如^{1**}, 段金廛^{2**}, 唐志书^{1,3**}, 宋忠兴¹, 赵艳婷¹, 游雪莲¹, 张德柱⁴, 杨国伟⁵
(1. 陕西中医药大学 陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心, 咸阳 712083; 2. 南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心江苏省方剂高技术研究重点实验室, 南京 210023; 3. 中国中医科学院, 北京 100700; 4. 陕西盘龙药业集团股份有限公司, 商洛 711400; 5. 山西省检验检测中心(山西省标准计量技术研究院), 太原 030002)

摘要 目的: 依据对青蛙七主要成分的表征结果, 建立青蛙七薄层色谱(TLC)定性鉴别方法及一测多评(QAMS)的含量测定方法。方法: 首先, 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用(UPLC-Q TOF MS/MS)技术对青蛙七的主要成分进行表征, 使用 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液(A) - 乙腈溶液(B)为流动相进行梯度洗脱, 正离子模式下采集信息; 其次, 通过 TLC 建立定性鉴别方法; 最后, 建立 QAMS 方法, 采用 Agilent 5 TC - C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为 0.05% 磷酸水(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱, 以鸢尾黄素为内参物, 建立其与鸢尾苷及野鸢尾黄素的相对校正因子, 并通过校正因子计算 3 个异黄酮类成分的含量。同时与外标法(ESM)进行比较, 以验证 QAMS 法的准确性和可行性。结果: UPLC-Q TOF MS 共表征出青蛙七中 5 个含量较高的异黄酮类成分(鸢尾苷、鸢尾甲苷 B、鸢尾黄素、野鸢尾黄素、鸢尾黄酮 A)。建立了鸢尾苷、鸢尾甲苷 B、鸢尾黄素、野鸢尾黄素 4 个成分的 TLC 鉴别法。在一定的浓度范围内, 鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素 3 个成分线性关系良好($r > 0.999$), 平均加样回收率为 97.7%~100.8%, RSD 为 1.1%~2.9%, 鸢尾苷、野鸢尾黄素的相对校正因子分别为 1.114 5、0.827 0, 在不同试验条件下重现性良好(RSD < 5%); 采用 QAMS 法测定的 10 个不同产地青蛙七中 3 个成分含量与 ESM 的实测值之间无显著性差异。结论: 以表征的青蛙七药材的成分为基础, 选择含量较高且稳定的成分建立的 TLC 和 QAMS 方法简便、稳定, 可用于青蛙七药材定性定量分析及质量评价。

关键词: 青蛙七; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱联用; 鸢尾苷; 鸢尾甲苷 B; 鸢尾黄素; 野鸢尾黄素; 薄层色谱; 一测多评法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)08-1310-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2023-0208

Quality control study of isoflavones in *Iris tectorum* Maxim.*

HE Ji¹, LIU Yan - ru^{1**}, DUAN Jin - ao^{2**}, TANG Zhi - shu^{1,3**}, SONG Zhong - xing¹,
ZHAO Yan - ting¹, YOU Xue - lian¹, ZHANG De - zhu⁴, YANG Guo - wei⁵

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Chinese Medicine Resources Industrialization Collaborative Innovation Center, Xianyang 712083, China; 2. Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4. Shaanxi Panlong Pharmaceutical Group Co., Ltd, Shangluo 711400, China; 5. Shanxi Inspection and Testing Center (Shanxi Institute of Standards and Metrology), Taiyuan 030002, China)

Abstract Objective: To establish methods of thin-layer chromatography (TLC) qualitative identification and

* 陕西省科技厅重点产业创新链(群)项目(编号 2020ZDLSF05-08); 国家自然科学基金面上项目(82173970)和陕西省高层次人才特殊支持计划 & 青年拔尖人才支持计划(陕组通字[2018]33 号)

** 通信作者 刘妍如 Tel:(029)38182207; E-mail:yanzi_2203@aliyun.com

段金廛 Tel:(025)85811291; E-mail:dja@njucm.edu.cn

唐志书 Tel:(010)64089180; E-mail:tzs6565@163.com

第一作者 Tel:(029)38182207; E-mail:674629128@qq.com

quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) according to the characterization results of the main components of *Iris tectorum* Maxim. . **Methods:** Firstly, the main components of *Iris tectorum* were characterized by ultra performance liquid chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q TOF MS/MS) technology, using an ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with gradient elution using 0.1% formic acid-water (A) - acetonitrile (B) as mobile phase, and the data were collected in positive ion mode. In addition, the qualitative identification method was established by the TLC. Finally, quantitative analysis was performed on an Agilent 5 TC - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was 0.05% phosphoric acid water (A) - acetonitrile (B) with gradient elution. The QAMS method was established by using tectorigenin as an internal standard to establish its relative correction factor with tectoridin and irigenin, and the contents of three isoflavones were calculated by the correction factor. At the same time, the accuracy and feasibility of the QAMS method was verified by the external standard method (ESM). **Results:** Five isoflavones were characterized (tectoridin, iristectorin B, tectorigenin, irigenin and iristectorigenin A) by UPLC-Q TOF MS/MS. A TLC identification method for four components, tectoridin, iristectorin B, tectorigenin and irigenin was established. In this study, the linearity of the three components of tectoridin, tectorigenin and irigenin were good in a certain concentration range ($r > 0.999$), with the average recoveries of 97.7% - 100.8% and the RSDs of 1.1% - 2.9%, and the relative correction factors of tectoridin and irigenin were 1.114 5 and 0.827 0, respectively. And the repeatability of the correction factors was good under different experimental conditions (RSD < 5%). There was no significant difference between the contents of the three analytes in ten different batches of *Iris tectorum* determined by QAMS and ESM. The contents of tectorigenin, tectoridin and irigenin in 10 batches of *Iris tectorum* from different habitats determined by QAMS were not significantly different from those determined by ESM. **Conclusion:** Based on the characterized components of *Iris tectorum* medicinal materials, the TLC and QAMS methods with high-content and stable ingredients are established. The methods are simple and stable, which can be used for qualitative and quantitative analysis and quality evaluation of *Iris tectorum*.

Keywords: *Iris tectorum* Maxim.; UPLC-Q TOF MS/MS; tectoridin; iristectorin B; tectorigenin; irigenin; TLC; QAMS

青蛙七为鸢尾科植物鸢尾 *Iris tectorum* Maxim. 的根状茎,是“太白七药”之一^[1],始载于《神农本草经》,异名有鸢根(出自《蜀本草》)、天蜈蚣(出自《湖南中草药》)、土知母(出自《四川中医药志》)等^[2],其味苦、辛,性寒,有毒,具有消肿止痛,祛风湿,治疗关节炎等作用^[3]。青蛙七作为盘龙七片中的组方药材,在抗风湿、治疗关节炎等临床功效中有着重要作用,引起广泛关注^[4]。然而,有关青蛙七质量标准的研究较少^[1,5-6],药材质量难以控制。本文首先采用 UPLC-Q TOF MS/MS 对青蛙七的主要成分进行分析,表征出鸢尾苷、鸢尾甲苷 B、鸢尾黄素、野鸢尾黄素、鸢尾黄酮 A 5 个在抗炎镇痛方面具有显著效果的异黄酮类成分^[7-10];选择其中含量较高且稳定的鸢尾苷、鸢尾甲苷 B、鸢尾黄素、野鸢尾黄素 4 个成分建立 TLC 定性鉴别方法,同时建立鸢尾苷、鸢尾黄素、

野鸢尾黄素的 QAMS 定量分析方法,以期完善青蛙七的质量控制标准。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Triple TOF™ 5600+ 三重四极杆飞行时间质谱仪(爱博才思公司);Agilent 1260 Infinity II 高效液相色谱仪(安捷伦公司);Waters e2695 Acquity H-CLASS 高效液相色谱仪(沃特世公司);Shimadzu LC-2030C 3D Plus 高效液相色谱仪(岛津公司);色谱柱 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)(沃特世公司);色谱柱(Agilent 5 TC - C₁₈、Diamonsil Plus - C₁₈、Ultimate XB - C₁₈)规格均为(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)(安捷伦公司);CPA225D 十万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声

仪器有限公司); 硅胶 HSGF₂₅₄ 预制板(烟台华阳新材料科技有限公司); 硅胶 HSGF₂₅₄ 预制板(烟台江友新材料科技有限公司); 薄层色谱硅胶 GF₂₅₄ 玻璃板(青岛海浪化工有限公司); 聚酰胺薄膜(浙江台州路桥四甲生化塑料厂)。

1.2 试药

对照品: 鸢尾苷(CAS号 611-40-5, 批号 MUST-21062204, 纯度 98.86%)、鸢尾黄素(CAS号 548-77-6, 批号 MUST-21102607, 纯度 99.41%) 均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 野鸢尾黄素(CAS号 548-76-5, 批号 HR2214W3, 纯度 ≥ 98%)、鸢尾甲苷 B(CAS号 94396-09-5, 批号 HR2657W1, 纯度 ≥ 98%) 均购自宝鸡辰光生物科技有限公司。

10 批青蛙七样品(批号分别为 20200910、20220501、20220802、20220502、20220803、20220503、20210802、20220530、20220504、20220505, 编号 1~10) 分别采购于陕西省太白县、陕西省眉县、甘肃省成县、陕西省宁强县、甘肃省武都区、陕西省略阳县、甘肃省清水县、陕西省陈仓区、陕西省凤县、陕西省太白县, 经陕西中医药大学白吉庆教授鉴定为鸢尾科植物鸢尾 *Iris tectorum* Maxim. 的干燥根。

甲醇(分析纯, 成都市科隆化学品有限公司); 乙腈(色谱纯, 默克公司); 磷酸(批号 STBH5476, 西格玛奥德里奇公司); 水为超纯水(密理博超纯水机制备)。

2 方法与结果

2.1 UPLC-Q TOF MS/MS 技术表征青蛙七的主要成分

2.1.1 色谱条件

采用 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A) - 乙腈溶液(B), 梯度洗脱(0~2 min, 0.2%B→12%B; 2~8 min, 12%B→13%B; 8~14 min, 13%B→30%B; 14~24 min, 30%B→45%B), 体积流量 0.2 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 样量 2 μL。

2.1.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(ESI), 正离子模式下, 采用信息依赖采集、动态背景扣除和高灵敏度模式采集数据。离子扫描范围 *m/z* 100~2 000, 正离子模式下源喷射电压为 5 500 V, 裂解电压为 80 V, 碰撞能量为 35 V, 正离子模式下, 雾化气和辅助气为氮气, 皆为 344.74 kPa, 气帘气为 241.32 kPa, 雾化温度 550 °C。

2.1.3 成分表征结果

青蛙七药材中 5 个异黄酮类成分表征正离子模式总离子流图及二级碎片 MS/MS 谱见图 1。通过 Peakview 2.2 查看采集数据, 以 AB SCIEX master view 1.1.0.0 中药成分数据库(TCM library 1.0) 作为异黄酮成分匹配库。通过比对精确质量数、同位素峰度比以及碎片离子裂解规律等信息, 初步从青蛙七中鉴定并确定了 5 个主要的异黄酮类成分(见表 1)。

2.2 TLC 定性方法

2.2.1 对照品溶液的制备

分别取鸢尾苷、鸢尾甲苷 B、鸢尾黄素、野鸢尾黄素的对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 各成分的溶液, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

取样品粉末 1 g, 精密称量, 置锥形瓶中, 加甲醇 8 mL 超声(250 W, 40 kHz) 处理 30 min, 滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.2.3 TLC 条件

取对照品溶液、供试品溶液各 1 μL, 分别点于同一硅胶 HSGF₂₅₄ (烟台华阳新材料科技有限公司) 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-甲酸(10:1:0.2) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 日光下检视。

2.2.4 TLC 鉴别研究

在“2.2.3”项薄层色谱条件下, 10 批青蛙七药材的供试品溶液色谱图(图 2) 中, 与对照品溶液相应位置上均显示相同颜色的斑点(批号 20220505 的样品在野鸢尾黄素处无对应斑点除外), 斑点比移值(图中斑点从上至下) 分别为 0.77、0.69、0.35、0.26, 符合比移值在 0.2~0.8 范围的要求, 说明建立的 TLC 方法可以区分不同产地青蛙七药材的质量。

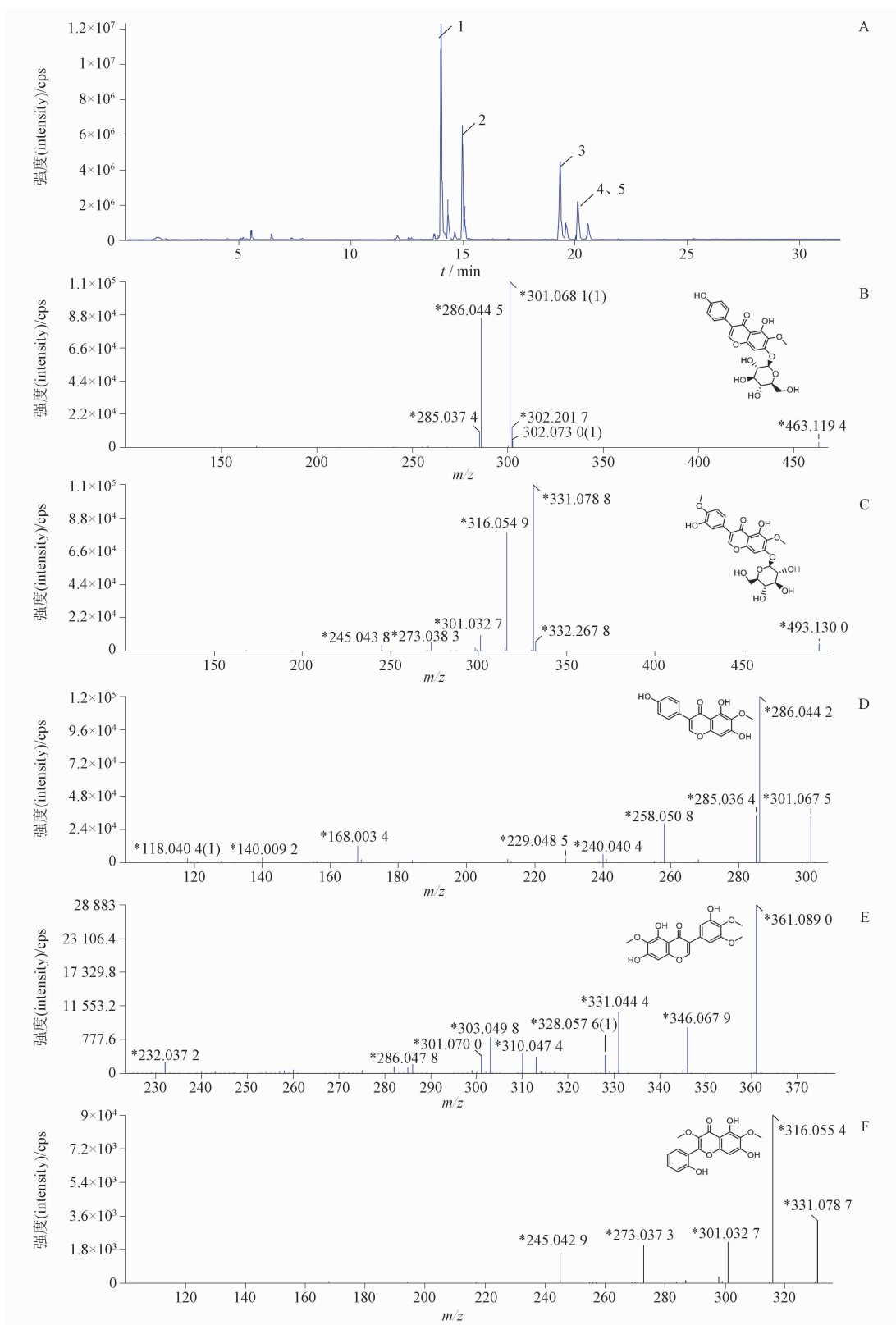
2.3 高效液相色谱定量分析

2.3.1 色谱条件

采用 Agilent 5 TC - C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05% 磷酸水(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0~1 min, 20%B→20%B; 1~14 min, 20%B→22%B; 14~20 min, 22%B→28%B; 20~22 min, 28%B→30%B; 22~30 min, 30%B→55%B), 体积流量为 1 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 10 μL。

2.3.2 混合对照品溶液的制备

精密称取鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素的对照品适量, 用甲醇溶解, 制成质量浓度分别为 200、50、20 μg·mL⁻¹ 的对照品储备液。将各对照品储备液混合, 加入甲醇逐级稀释成系列浓度混合对照品溶液(鸢尾苷质量浓度分别为 66.67、53.33、42.67、34.13、27.31、21.85、



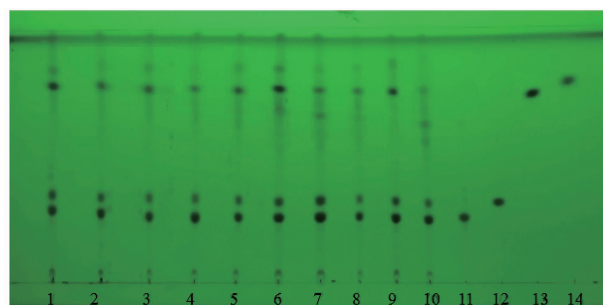
A. 总离子流图(TIC chromatogram) 1, B. 鸢尾苷(tectoridin) 2, C. 鸢尾甲苷 B(iristectorin B) 3, D. 鸢尾黄素(tectorigenin) 4, E. 野鸢尾黄素(irigenin) 5, F. 鸢尾黄酮 A(iristectorigenin A)

图 1 青蛙七中 5 个异黄酮类成分表征正离子模式总离子流图(A)及 MS/MS 谱图(B~F)

Fig. 1 TIC chromatogram (A) and MS/MS spectra (B - F) of 5 characterized components in *Iris tectorum* under positive ion mode

表1 青蛙七中5个主要的异黄酮类成分
Tab.1 Five main isoflavones in *Iris tectorum*

化合物名称 (compound name)	t_R / min	化学式 (molecular formula)	相对分子质量 (relative molecular mass)	碎片离子及结构信息 (fragment ion and structural information) m/z
鸢尾苷(tectoridin)	14.01	$C_{22}H_{22}O_{11}$	462.12	$463[M+H]^+$, $301[M+H-Glu]^+$, $286[M+H-Glu-CH_3]^+$
鸢尾甲苷 B(iristectorin B)	14.97	$C_{23}H_{24}O_{12}$	492.13	$493[M+H]^+ \rightarrow 331[M+H-Glu]^+ \rightarrow 316[M+H-Glu-CH_3]^+ \rightarrow 301[M+H-Glu-2CH_3]^+ \rightarrow 273[M+H-rha-2CH_3-CO]^+ \rightarrow 245[M+H-Glu-2CH_3-2CO]^+$
鸢尾黄素(tectorigenin)	19.31	$C_{16}H_{12}O_6$	300.06	$301[M+H]^+$, $286[M+H-CH_3]^+$, $258[M+H-CH_3-CO]^+$, $240[M+H-CH_3-CO-H_2O]^+$
野鸢尾黄素(irigenin)	20.08	$C_{18}H_{16}O_8$	360.08	$361[M+H]^+$, $346[M+H-CH_3]^+$, $331[M+H-2CH_3]^+$, $303[M+H-2CH_3-CO]^+$
鸢尾黄酮 A(iristectorigenin A)	20.12	$C_{17}H_{14}O_7$	330.07	$331[M+H]^+$, $316[M+H-CH_3]^+$, $301[M+H-2CH_3]^+$, $273[M+H-2CH_3-CO]^+$



1~10. 1~10号样品(batch samples No. 1-10) 11. 鸢尾苷(tectoridin) 12. 鸢尾甲苷 B(iristectorin B) 13. 鸢尾黄素(tectorigenin) 14. 野鸢尾黄素(irigenin)

图2 10批青蛙七的薄层鉴别图

Fig.2 TLC chromatograms for 10 batches of *Iris tectorum Maxim*

17.48 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 鸢尾黄素质量浓度分别为 16.67、13.33、10.67、8.53、6.83、5.46、4.37 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 野鸢尾黄素质量浓度分别为 6.67、4.27、2.73、1.75、1.12、0.72 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3.3 供试品溶液的制备 取样品粉末(过3号筛)约0.5 g,精密称量,置具塞锥形瓶中,精密加入70%乙醇25 mL,密塞,称量,超声(250 W,50 kHz)处理1 h,放冷,再称量,用70%乙醇补足减失的量,摇匀,滤过,精密量取续滤液1 mL,置50 mL量瓶中,加70%乙醇稀释至刻度,摇匀,即得^[11]。

2.3.4 系统适用性考察 在“2.3.1”项色谱条件下,样品中3个待测成分色谱峰峰形良好,与相邻峰的分离度 >1.5 。混合对照品以及青蛙七样品色谱图见图3。

2.3.5 线性关系考察 取“2.3.2”项下混合对照品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进行测定,记录色

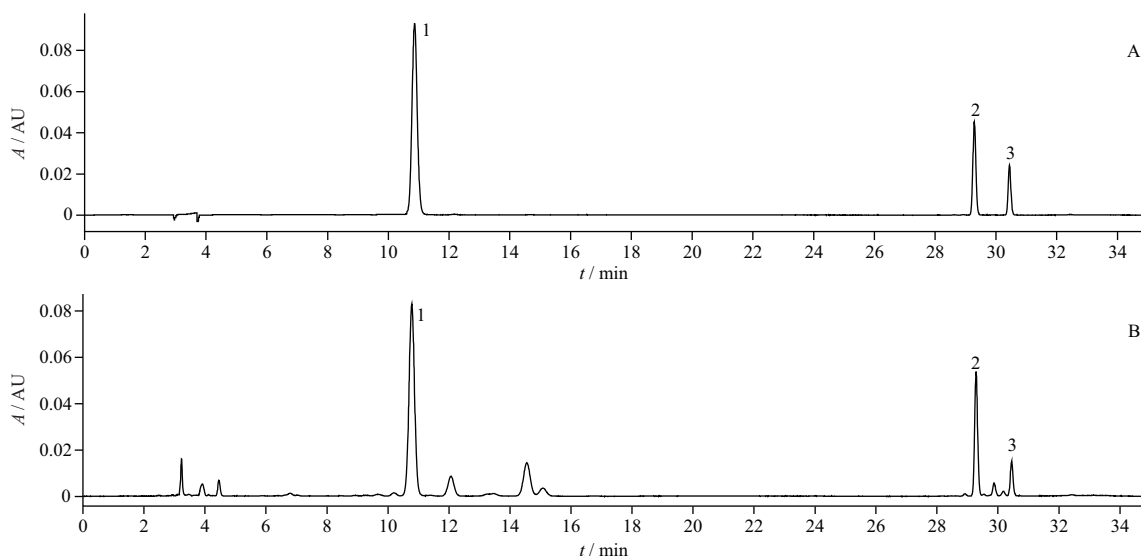
谱图。以被测化合物质量浓度 $X(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ 为横坐标,相应峰面积为 Y 纵坐标,绘制标准曲线。青蛙七不同化合物的线性范围为0.72~66.67 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,且相关系数均 >0.999 ,表明各对照品线性关系良好。3个异黄酮类成分的线性方程、相关系数、线性范围及定量限($S/N > 10$)结果见表2。

2.3.6 精密度试验 取“2.3.3”项下的青蛙七供试品溶液(批号20200910),按“2.3.1”项下色谱条件,1 d内测定6次,考察日内精密度;连续测定3 d,考察日间精密度。计算鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素峰面积的日内精密度RSD分别为0.76%、0.77%、1.1%,日间精密度RSD分别为0.77%、0.73%、0.83%,表明此方法精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取“2.3.3”项下的青蛙七供试品溶液(批号20200910),按“2.3.1”项下色谱条件,分别于制备后0、3、6、9、12、24 h进样测定,计算显示间隔进样所测得鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素峰面积的RSD分别为1.5%、1.4%、1.3%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.8 重复性试验 取青蛙七样品(批号20200910)6份,按“2.3.3”项下方法平行制备供试品溶液,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。计算鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素含量的RSD分别为0.90%、1.1%、1.4%,表明此方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 精密称取6份青蛙七样品(批号20200910),每份约0.5 g,置25 mL具塞锥形瓶中,加入与供试品溶液中鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素含量相等的对照品,按“2.3.3”项方法制备



1. 鸢尾苷 (tectoridin) 2. 鸢尾黄素 (tectorigenin) 3. 野鸢尾黄素 (irigenin)

图3 混合对照品(A)和青蛙七样品(B)的HPLC图谱

Fig. 3 Results of linear equations, linear ranges, limit of quantitation for three isoflavone components

表2 3个异黄酮类成分线性方程、线性范围、定量限结果

Tab. 2 Results of linear equations, linear ranges, limit of quantitation for three isoflavone components

成分 (component)	线性方程 (linear equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/(μg · mL ⁻¹)	定量限 (limit of quantitation)/(μg · mL ⁻¹)
鸢尾苷 (tectoridin)	$Y = 27\ 734X - 11\ 159$	0.999 7	17.48 ~ 66.67	0.46
鸢尾黄素 (tectorigenin)	$Y = 30\ 893X - 4\ 557$	0.999 6	4.37 ~ 16.67	0.13
野鸢尾黄素 (irigenin)	$Y = 37\ 436X - 1\ 730.90$	0.999 7	0.72 ~ 6.67	0.24

供试溶液,在“2.3.1”项色谱条件下进行测定,记录各成分峰面积,计算加样回收率。测得鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素的平均加样回收率分别为 99.8%、97.7%、100.8%,RSD 分别为 1.1%、2.9%、2.5%,表明方法准确度良好。

2.4 QAMS 方法的建立

2.4.1 相对校正因子准确度考察 以鸢尾黄素为内参物,鸢尾苷及野鸢尾黄素为待测成分。分别称量 3 份鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素的对照品,按照“2.3.2”项下方法配制 6 个系列浓度混合对照品溶液,每个浓度进样 2 针,用最小二乘法以浓度对峰面积进行线性回归(应代入原点),按公式(1)计算 2 个标准曲线斜率比值的倒数,即得相对校正因子^[12]。

$$f_{s/x} = f_s/f_x = 1/k_{s/x} = k_s/k_x = A_s C_x / A_x C_s \quad (1)$$

式中, $f_{s/x}$ 为内参物 s 与待测成分 x 的相对校正因子, $k_{s/x}$ 为内参物 s 与待测成分 x 的相对斜率比值, A_s 为内参物的峰面积, C_s 为内参物的质量浓度, A_x 为待测成

分峰面积, C_x 为待测成分的质量浓度。将表 3 中标准曲线斜率的平均值代入公式(1),计算得鸢尾苷、野鸢尾黄素的相对校正因子 $f_{s/x}$ 分别为 1.114 5、0.827 0, $f_{s/x}$ 的 RSD 均 < 1%,表明相对校正因子准确度良好。

表3 鸢尾苷及野鸢尾黄素的标准曲线斜率平均值

Tab. 3 The mean slope of the standard curve of tectorigenin and irigenin

标准曲线斜率平均值 (average of the slopes of the standard curve)	鸢尾苷 (tectoridin)	鸢尾黄素 (tectorigenin)	野鸢尾黄素 (irigenin)
平均值 1 (average 1)	27 691	30 860	37 471
平均值 2 (average 2)	27 910	31 122	37 392
平均值 3 (average 3)	27 734	30 893	37 436

2.4.2 相对校正因子重复性考察 分析“2.4.1”项中得到的鸢尾苷、野鸢尾黄素相对校正因子 $f_{s/x}$ 准确

度的数据,结果显示鸢尾苷、野鸢尾黄素的相对校正因子 $f_{s/x}$ 的RSD分别为0.040%、0.19%,表明此方法重复性良好。

2.4.3 相对校正因子稳定性考察 取“2.3.2”项下鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素质量浓度分别为42.67、10.67、4.27 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液进行考察,按“2.3.1”项下色谱条件分别于制备后0、3、6、9、12、24 h进样,记录峰面积,并计算相对校正因子。显示间隔进样所测得鸢尾苷、野鸢尾黄素相对校正因子 $f_{s/x}$ 的RSD分别为0.32%、0.24%,表明此混合对照品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4.4 不同流速对相对校正因子的影响 取“2.4.3”项下的混合对照品溶液,在“2.3.1”其他色谱条件不变的情况下,分别考察流速为0.8、0.9、1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的相对校正因子 $f_{s/x}$,计算RSD。结果流速为0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,鸢尾苷、野鸢尾黄素的相对校正因子 $f_{s/x}$ 分别为1.118 3、0.822 9;流速为0.9 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,鸢尾苷、野鸢尾黄素的相对校正因子 $f_{s/x}$ 分别为1.113 6、0.823 3;流速为1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 时,鸢尾苷、野鸢尾黄素的相对校正因子 $f_{s/x}$ 分别为1.105 3、0.823 7。3种流速下求得上述成分相对校正因子的RSD分别为0.59%、0.045%。表明不同体积流量的变化对鸢尾苷、野鸢尾黄素的相对校正因子 $f_{s/x}$ 无明显影响。

2.4.5 不同柱温对相对校正因子的影响 取“2.4.3”项下的混合对照品溶液,在“2.3.1”项中其他色谱条件不变的情况下,分别考察柱温为39、39.5、40 $^{\circ}\text{C}$ 的相对校正因子 $f_{s/x}$,计算RSD。柱温为39 $^{\circ}\text{C}$ 时,鸢尾苷、野鸢尾黄素的相对校正因子 $f_{s/x}$ 分别为1.115 9、0.821 7;柱温为39.5 $^{\circ}\text{C}$ 时,鸢尾苷、野鸢尾黄素的相对校正因子 $f_{s/x}$ 分别为1.115 7、0.824 9;柱温为40 $^{\circ}\text{C}$ 时,鸢尾苷、野鸢尾黄素的相对校正因子 $f_{s/x}$ 分别为1.105 3、0.823 7。3种柱温下求得上述成分相对校正因子的RSD分别为0.55%、0.20%,表明柱温的变化对各成分的相对校正因子 $f_{s/x}$ 无明显影响。

2.4.6 不同波长对校正因子的影响 取“2.6.3”项下的混合对照品溶液,在“2.3.1”项中其他色谱条件不变的情况下,分别考察波长为263、264、265、266、267 nm的相对校正因子 $f_{s/x}$,结果RSD均 $<2\%$,表明测量波长的变化对各成分的相对校正因子 $f_{s/x}$ 无明显影响,见表4。

表4 不同波长对相对校正因子的影响

Tab. 4 Effects of different wavelengths on relative correction factors

波长 (wavelength)/nm	$f_{\text{鸢尾黄素/鸢尾苷}}$ ($f_{\text{tectorigenin/tectoridin}}$)	$f_{\text{鸢尾黄素/野鸢尾黄素}}$ ($f_{\text{tectorigenin/irigenin}}$)
263	1.100 2	0.833 3
264	1.103 1	0.828 6
265	1.106 2	0.823 1
266	1.107 5	0.815 5
267	1.110 9	0.809 1
平均值(mean)	1.105 6	0.821 9
STDEV	0.004 1	0.009 8
RSD	0.37%	1.2%

2.4.7 不同仪器对校正因子的影响 取“2.4.3”项下的混合对照品溶液,在“2.3.1”项中其他色谱条件不变的情况下,考察5台高效液相色谱仪对各待测成分的相对校正因子有无显著影响,计算结果RSD均 $<3\%$,表明无明显影响,见表5。

表5 不同仪器对相对校正因子的影响

Tab. 5 Effects of different instruments on relative correction factors

仪器 (instrument)	$f_{\text{鸢尾黄素/鸢尾苷}}$ ($f_{\text{tectorigenin/tectoridin}}$)	$f_{\text{鸢尾黄素/野鸢尾黄素}}$ ($f_{\text{tectorigenin/irigenin}}$)
Waters e2695 (SN:F14SM7551A)	1.113 0	0.830 1
Waters e2695 (SN:C20SM7392A)	1.106 2	0.823 1
Waters e2695 (SN:C20SM7400A)	1.122 2	0.821 7
Agilent 1260 (SN:DEAAC28906)	1.178 3	0.823 7
Shimadzu LC-2030C 3D Plus (SN:L21455915050 AE)	1.134 4	0.823 5
平均值(mean)	1.130 8	0.824 4
STDEV	0.028 6	0.003 2
RSD	2.5%	0.39%

2.4.8 不同色谱柱对校正因子的影响 取“2.4.3”项下的混合对照品溶液,在“2.3.1”项中其他色谱条件不变的情况下,选用Waters e2695 (SN:F14SM7551A)液相色谱仪,考察5根色谱柱对各待测成分的相对校正因子有无显著影响,计算结果RSD均 $<3\%$,表明不同色谱柱的变化对各成分的 $f_{s/x}$ 无明显影响,见表6。

2.4.9 相对保留时间法对色谱峰的定位 取“2.4.3”项下的混合对照品溶液,在“2.3.1”项其他色谱条件不变的情况下,计算待测成分在5台不同

表 6 不同色谱柱对相对校正因子的影响

Tab. 6 Effects of different columns on relative correction factors

色谱柱 (column)	$f_{\text{鸢尾黄素/鸢尾苷}}$ ($f_{\text{tectorigenin/tectoridin}}$)	$f_{\text{鸢尾黄素/野鸢尾黄素}}$ ($f_{\text{tectorigenin/irigenin}}$)
Agilent 5 TC - C ₁₈ (SN:542144)	1.102 4	0.823 3
Agilent 5 TC - C ₁₈ (SN:480966)	1.063 6	0.806 1
Agilent 5 TC - C ₁₈ (SN:574377)	1.105 3	0.823 7
Ultimate XB - C ₁₈ (SN:60200303429)	1.106 9	0.823 8
Diamonsil Plus - C ₁₈ (SN:6012199)	1.136 3	0.820 4
平均值(mean)	1.102 9	0.819 5
STDEV	0.025 9	0.007 6
RSD	2.4%	0.93%

的高效液相色谱仪和 5 根不同的色谱柱下的相对保留时间($t_{x/s}$)及 RSD。结果各待测成分相对保留时间的 RSD 均 < 5%, 表明采用相对保留值法对待测成分定位是合理的。结果见表 7。

2.4.10 QAMS 法与 ESM 测定结果比较 取 10 批样品,按“2.3.3”项制备供试品溶液,按“2.3.1”项色谱条件进行测定,采用 ESM 计算青蛙七药材中 3 个异黄酮类成分的含量,并且与 QAMS 法的计算结果进行比较,以相对误差(RE)来表示 2 种方法测得结果的差异,以验证 QAMS 法测得青蛙七含量的准确性。结果显示 2 种方法所测定的结果无显著差异,说明 QAMS 法用于测定青蛙七药材中 3 个异黄酮类成分的含量具有可行性,见表 8。

表 7 不同仪器、色谱柱对相对保留时间的影响

Tab. 7 Effects of different instruments and columns on relative retention time

仪器 (instrument)	色谱柱 (column)	$t_{\text{鸢尾苷/鸢尾黄素}}$ ($t_{\text{tectorigenin/tectoridin}}$)	$t_{\text{野鸢尾黄素/鸢尾黄素}}$ ($t_{\text{tectorigenin/irigenin}}$)
Waters e2695 (SN:F14SM7551A)	Agilent 5 TC - C ₁₈ (SN:574377)	0.364 2	1.041 1
Waters e2695 (SN:C20SM7392A)		0.373 4	1.039 4
Waters e2695 (SN:C20SM7400A)		0.373 5	1.029 9
Agilent 1260 (SN:DEAAC28906)		0.403 8	1.034 4
Shimadzu LC - 2030C 3D Plus (SN:L21455915050 AE)		0.395 6	1.036 3
Waters e2695 (SN:F14SM7551A)	Agilent 5 TC - C ₁₈ (SN:542144)	0.384 9	1.038 0
	Agilent 5 TC - C ₁₈ (SN:480966)	0.358 6	1.051 7
	Agilent 5 TC - C ₁₈ (SN:574377)	0.373 4	1.039 4
	Ultimate XB - C ₁₈ (SN:60200303429)	0.347 9	1.042 0
	Diamonsil Plus - C ₁₈ (SN:6012199)	0.350 5	1.040 1
平均值(mean)		0.372 6	1.039 2
STDEV		0.018 3	0.005 7
RSD		4.9%	0.54%

3 讨论与总结

3.1 TLC 条件的选定

本研究考察了青蛙七的薄层点样量(1、2、3、5 μL),展开剂(三氯甲烷-甲醇-甲酸、三氯甲烷-丙酮-甲酸^[1]、石油醚-乙酸乙酯^[13])及其比例,不同厂家(烟台华阳新材料科技有限公司、烟台江友新材料科技有限公司)及不同类型(青岛海辰化工有限公司 GF₂₅₄、聚酰胺薄膜)的薄层板,不同检视条件(喷 AlCl₃ 显色剂^[14]、日光)。对选定的条件分别进行方法学考察(0、1、2、3 d),最终建立了“2.2.3”项的薄层色谱条件,区分不同产地青蛙七

药材的质量。

3.2 内参物的选定

鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素均是以 3-苯基苯并吡喃酮为母核的多羟基酚类,故可用这 3 个成分建立 QAMS 的方法。鸢尾黄素对照品性质稳定、价廉易得,色谱峰容易辨识,与同类化合物分离度良好。故最终选定的鸢尾黄素作为内参物,计算其与待测成分之间的相对校正因子。

3.3 提取溶剂的选择

考察了提取溶剂(70% 甲醇^[15]、70% 乙醇^[11]、甲醇^[16]),以鸢尾苷色谱峰面积与称样量比值为评价

表 8 各成分含量测定结果

Tab. 8 Results of content determination of various constituents

批号 (batch)	鸢尾黄素 (tectoridin)/(g · g ⁻¹)	鸢尾苷 (tectorigenin)			野鸢尾黄素 (irigenin)		
		QAMS/(g · g ⁻¹)	ESM/(g · g ⁻¹)	RE/%	QAMS/(g · g ⁻¹)	ESM/(g · g ⁻¹)	RE/%
20200910	0.030 2	0.095 7	0.096 0	-0.30	0.006 4	0.006 4	-0.54
20220501	0.013 7	0.072 9	0.072 0	1.14	0.001 9	0.001 9	-0.60
20220802	0.031 8	0.100 4	0.100 9	-0.50	0.006 8	0.006 9	0.97
20220502	0.028 8	0.091 9	0.092 2	-0.31	0.006 1	0.006 1	-0.48
20220803	0.014 4	0.077 1	0.076 1	1.31	0.002 1	0.002 0	0.82
20220503	0.029 1	0.091 8	0.092 1	-0.32	0.006 2	0.006 2	-0.49
20210802	0.014 4	0.076 7	0.076 0	0.91	0.002 1	0.002 1	0.83
20220530	0.029 0	0.091 5	0.091 9	-0.36	0.006 1	0.006 2	-0.49
20220504	0.028 9	0.091 2	0.091 6	-0.35	0.006 1	0.006 2	-0.48
20220505	0.013 1	0.069 3	0.068 4	1.26	0.001 9	0.001 9	1.09

指标,计算得3种提取溶剂条件下鸢尾苷的面积/称样量分别为86 530 475.71、88 263 453.93、83 899 260.59,比较发现选择用70%乙醇作为提取溶剂,提取更完全,且峰形较好,基线平稳,综合考虑选用70%乙醇作为提取溶剂。

3.4 检测波长的选择

选择254、265、296 nm为备选波长^[11,15],以鸢尾苷色谱峰面积与称样量之比为考察指标,计算得3种波长条件下鸢尾苷的面积/称样量分别为73 681 787.29、88 263 453.93、19 553 628,最终选用265 nm为鸢尾苷的检测波长。

3.5 流动相选择

对流动相体系进行考察,分别考察了水相和有机相的选择和配比,包括甲醇-0.05%磷酸、乙腈-水、乙腈-0.05%磷酸水、乙腈-0.1%磷酸水。HPLC色谱结果表明,当有机相为甲醇体系时,各峰的分度不佳,乙腈体系各峰分度度较好,且峰形较佳。综合比较,采用乙腈-磷酸水溶液流动相体系比较合适。对乙腈-磷酸水溶液进行比例调整后,乙腈-0.05%磷酸水可实现特征峰的良好分离,因此选用。

3.6 柱温的选择

选择30、35、40℃为备选柱温,以鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素的色谱峰形、分离度、对称因子、理论塔板数等参数为考察指标,结果表明当柱温为40℃时,各色谱峰基线平稳,分离度较好,且干扰少,故选择40℃为柱温。

4 结论与展望

本文首先采用UPLC-Q TOF MS/MS技术表征

出青蛙七中5个主要的异黄酮成分,然后建立了鸢尾苷、鸢尾甲苷B、鸢尾黄素、野鸢尾黄素4个成分的TLC定性鉴别方法,并以鸢尾黄素为参照物,建立了QAMS法同时测定鸢尾苷、鸢尾黄素、野鸢尾黄素3个成分。本研究为青蛙七的质量控制提供了更方便、更准确的评价模式,弥补了青蛙七研究的缺失。

由于有关青蛙七药材的质量标准研究极少,部分对照品难以获得,故本文在成分表征部分仅展示了其与对照品信息匹配的异黄酮成分,并结合预实验结果,筛选出青蛙七药材TLC、QAMS的质控成分。中药材是多成分协同发挥功效,为尽可能完善青蛙七药材的质控标准,后续将参考同科属药材的成分信息,结合柱色谱分离、红外光谱、核磁共振光谱等方法,分离和鉴定青蛙七药材的成分,并在本文建立的质控方法基础上继续优化。同时,由于渠道有限,本文仅收集到10批青蛙七药材,后续应收集更多批药材,考察所建立方法的普适性。

参考文献

- [1] 代文胜,徐金波,孙静. 中药材青蛙七的质量标准研究[J]. 宁夏医学杂志, 2017, 39(12): 1122
DAI WS, XU JB, SUN J. Quality standard research of Chinese medicine Qingwaqi[J]. Ningxia Med J, 2017, 39(12): 1122
- [2] 高学敏,谢晓林. 中国七药[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2013: 1
GAO XM, XIE XL. National Qi Yao[M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 2013: 1
- [3] 宋小妹,刘海静. 太白七药研究与应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011

- SONG XM, LIU HJ. Research and Application of Taibai Qi Yao [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011
- [4] 刘玉枝. 盘龙七片的质量标准提升研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2021
- LIU YZ. Study on The Improvement of The Quality Standard of Panlongqi Tablets[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2021
- [5] 张向红. 射干的鉴别及药理作用[J]. 海峡药学, 2009, 21(5): 83
- ZHANG XH. Identification and pharmacological effects of *Belamcanda chinensis*[J]. Strait Pharm J, 2009, 21(5): 83
- [6] 毛水龙. 国家 05 版药典一部中射干与川射干名称之我见[C]//中华中医药学会第九届中药鉴定学术会议, 2008: 174
- MAO SL. The 05th edition of the National Pharmacopoeia of the name of *Belamcanda Rhizoma* and *Iridis Tectori Rhizoma* in a my opinion[C]//The 9th Academic Conference on Chinese Medicine Appraisal of Chinese Medicine, 2008: 174
- [7] 周洪旭, 张毅, 杨新勇, 等. 一测多评法测定川射干中 8 个异黄酮类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(6): 1072
- ZHOU HX, ZHANG Y, YANG XY, et al. Simultaneous determination of 8 isoflavones in *Iris tectorum* Maxim. by quantitative analysis of multi-components with single marker[J]. Chin J Pharm Anal, 2022, 42(6): 1072
- [8] 凌悦, 陈金鹏, 叶晴, 等. 射干的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(5): 1595
- LIN Y, CHEN JP, YE Q, et al. Research progress of *Belamcanda chinensis* and predictive analysis of its quality markers[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(5): 1595
- [9] 高小明, 陆超, 邸子真. 野鸢尾黄素对气道炎症反应豚鼠 5-LOX 下游炎症反应代谢物的影响[J]. 实用中医内科杂志, 2022, 36(6): 30
- GAO XM, LU C, DI ZZ. Effect of Iridigenin on the downstream inflammatory metabolites of 5-LOX in guinea pigs with airway inflammation [J]. Intern Med J Pract Tradit Chin Med Sci, 2022, 36(6): 30
- [10] 张婧涵, 张晓瑞, 李国信, 等. 线性回归色谱峰定位法在射干药材多组分同时测定中的应用[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(7): 1149
- ZHANG JH, ZHANG XR, LI GX, et al. Application of linear regression chromatographic peak positioning method in simultaneous determination of multiple components in *Rhizoma Belamcandae* [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(7): 1149
- [11] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 213
- ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 213
- [12] 郑昊. 一测多评及双标多测法对陈皮中黄酮类成分测定的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2021
- ZHENG H. Study on the Determination of Flavonoids in *Citri Reticulatae Pericarpium* Quantitative Analysis of Multi-components by Single-marker and Two Reference Substances for Determination of Multiple Components[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2021
- [13] 梁丽娟, 董婷霞, 詹华强, 等. 射干的质量标准研究[J]. 中国药房, 2013, 24(11): 1023
- LIANG LJ, DONG TX, ZHAN HQ, et al. Study on the quality standard of *Belamcanda chinensis* [J]. China Pharm, 2013, 24(11): 1023
- [14] 张倩玉. 不同产地射干化学成分对比研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2019
- ZHANG QY. A comparative study on the chemical composition of different origins of *Belamcanda Chinensis* [D]. Shenyang: Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2019
- [15] 邓杰华, 周云峰, 邓见春, 等. 射干与川射干的鉴别研究[J]. 药品评价, 2021, 18(14): 844
- DENG JH, ZHOU YF, DENG JC, et al. Studies on the identification of *Belamcanda Rhizoma* and *Iridis Tectori Rhizoma* [J]. Drug Eval, 2021, 18(14): 844
- [16] 张德柱. 盘龙七片质量标准的研究[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(4): 218
- ZHANG DZ. Study on the improvement of the quality standard of Panlongqi tablets [J]. Northwest Pharm J, 2008, 23(4): 218

(本文于 2023 年 4 月 7 日收到)