

张清峰,陈继光,郑国栋. HPLC 指纹图谱鉴定市售土茯苓真伪及质量研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(11):151-153.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.11.039

HPLC 指纹图谱鉴定市售土茯苓真伪及质量研究

张清峰,陈继光,郑国栋

(江西农业大学食品科学与工程学院/江西省天然产物与功能食品重点实验室,江西南昌 330045)

摘要:土茯苓是常用的中药及食品原料。应用 HPLC 指纹图谱对 54 批市售土茯苓样品进行真伪鉴定,同时测定土茯苓中主要黄酮成分——落新妇苷的含量,并根据《中华人民共和国药典》土茯苓中落新妇苷不得低于 0.45% 的要求进行质量判定。结果表明,市售土茯苓伪品比例为 24.1%,符合《中华人民共和国药典》质量要求的仅为 44.4%。市售土茯苓伪品众多,质量良莠不齐是一个亟待解决的问题。

关键词:土茯苓;HPLC 指纹图谱;鉴定;质量

中图分类号:S567.3⁺20.37;R284.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)11-0151-03

土茯苓是百合科菝葜属植物光叶菝葜的干燥根茎,为《中华人民共和国药典》记载的中药材,也是民间常用的食材,是制作传统食品龟苓膏的主要原料,也常用于煲汤。《中华人民共和国药典》记载土茯苓具有除湿、解毒、通利关节的功效^[1]。现代药理研究显示,土茯苓提取物有抗氧化^[2]、降血糖^[3]、抑制肝癌细胞增殖和诱导其凋亡的作用^[4],并有独特的抗慢性炎症和选择性免疫抑制作用^[5-6]。化学成分研究表明,落新妇苷、黄杞苷等黄酮成分是土茯苓的主要功效物质^[7]。2010 版《中华人民共和国药典》以落新妇苷含量评价土茯苓质量,要求含量不低于 0.45%^[1],另外土茯苓也含有白藜芦醇、丁香酸、莽草酸、5-O-咖啡酰莽草酸等芪类及酚酸类物质^[8-9]。

百合科菝葜属植物在我国广泛分布,据报道有 79 种之多^[10]。《中华人民共和国药典》收录菝葜和土茯苓 2 种中药,但还有许多都作为地方药材使用。各地使用土茯苓的历史沿革不一致,导致市场上出现长期以其他菝葜属和肖菝葜属的植物作代用品的现象,如菝葜属的菝葜、肖菝葜属的华肖菝葜和短柱肖菝葜等。目前市场流通的土茯苓多为经加工制得的饮片,难以从商品药材性状作真伪鉴别,因此各地区使用的土茯苓药材质量参差不齐,严重影响了土茯苓及其制剂的疗效。笔者前期研究发现,不同品牌龟苓膏样品中来源于土茯苓的黄酮成分落新妇苷含量差异巨大,有些甚至检测不到^[11]。其中一个原因可能是市场上流通的土茯苓质量良莠不齐,且伪品众多,龟苓膏生产厂家可能因缺乏相应技术而误用了土茯苓伪品或次品。因此,笔者建立了土茯苓的 HPLC 指纹图谱,可以方便鉴别土茯苓及其混淆品^[12]。本研究收集了市场上流通的 54 份土茯苓样品,利用 HPLC 指纹图谱方法对其进行真伪及质量调查研究。

收稿日期:2017-01-08

基金项目:江西省自然科学基金(编号:20122BAB214005);江西省天然产物与功能食品重点实验室开放基金(编号:2015003)。

作者简介:张清峰(1983—),男,福建宁化人,博士,副教授,主要从事天然产物分析与利用、功能食品成分研究。E-mail:zhqf619@126.com。

1 材料与方法

1.1 试剂与原料

色谱纯乙腈(沃凯)购自国药集团化学试剂有限公司。落新妇苷标品(≥98%)购自上海同田生物有限公司。54 份土茯苓样品,其中 20 份购自网络(表 1 样品序号 1~20),34 份购自江西省南昌市及樟树市实体店。其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

HPLC 为安捷伦 1260 系统,配自动进样器和二极管阵列检测器。色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm i.d.,5 μm)。

1.3 色谱条件

流动相为乙腈(A)和 0.1% 醋酸-水(B);流速为 1 mL/min;进样量 10 μL;检测波长 291 nm;柱温 40 °C;线性梯度洗脱程序为 0~15 min,16.0%~21.0%(A);15~40 min,21.0%~40.0%(A)。

1.4 土茯苓供试样品溶液的制备

土茯苓样品经粉碎后过 40 目筛,精密称取粉末 0.5 g,置于具塞锥形瓶中,加入 25 mL 60% 乙醇,密塞后称质量,超声提取 30 min,再称质量,用 60% 乙醇补足减失的质量。上清液经 0.45 μm 滤膜过滤,作为供试品溶液进行 HPLC 分析。

2 结果与分析

2.1 土茯苓指纹图谱及鉴定标准

本研究前期建立了土茯苓的 HPLC 标准指纹图谱,如图 1 所示^[12]。土茯苓 HPLC 指纹图谱中主要有 9 个色谱峰,通过质谱联用峰 1、峰 2、峰 3、峰 4、峰 5、峰 6、峰 7、峰 8、峰 9 分别鉴定 5-O 咖啡酰莽草酸、新落新妇苷、落新妇苷、花旗松素、新异落新妇苷、异落新妇苷、黄杞苷、异黄杞苷、白藜芦醇^[12],各化合物化学结构如图 2 所示。峰 1、峰 2、峰 3、峰 5、峰 6、峰 7 为所有土茯苓样品的共有色谱峰,而峰 4、峰 8、峰 9 在一些样品中因含量过低,可能检测不到^[13]。因此,在土茯苓样品真伪鉴定过程中,样品色谱图与土茯苓标准指纹图谱一致或同时含有峰 1、峰 2、峰 3、峰 5、峰 6、峰 7 的判定为土茯苓,否则判定为伪品。通过 DAD 检测器,可同时获得各峰的

紫外吸收图谱用于与指纹图谱对照,峰2、峰3、峰4、峰5、峰6、峰7、峰8的紫外吸收图类似,都在290 nm有最大吸收,因为它们都是二氢黄酮类物质;峰1的最大吸收波长为327 nm,峰9的最大吸收波长为330 nm(图3)。

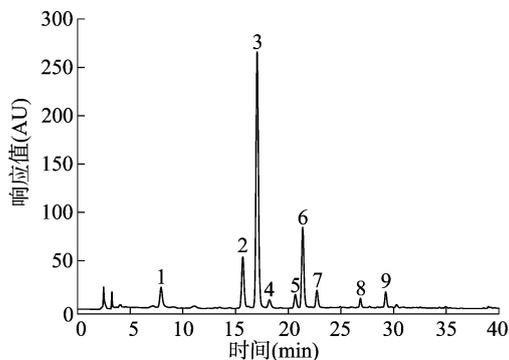
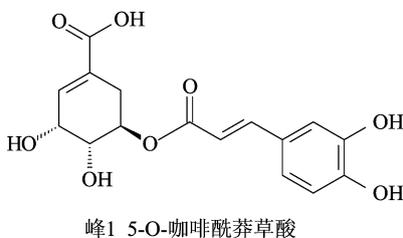
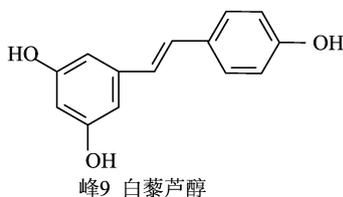


图1 土茯苓样品 HPLC 色谱图



峰1 5-O-咖啡酰莽草酸



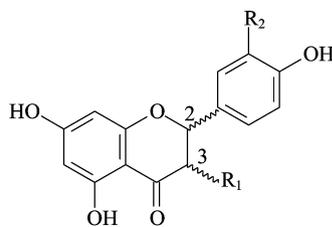
峰9 白藜芦醇

2.2 土茯苓落新妇苷含量测定

《中华人民共和国药典》2010版以落新妇苷含量评估土茯苓质量,要求含量不低于0.45%。将不同浓度的落新妇苷标准溶液按“1.3”节色谱条件进行分析,以落新妇苷的峰面积(y)与相对应的浓度(x)进行线性回归分析,得定量回归方程: $y = 18.6x - 0.2$; $r^2 = 0.993$,用于土茯苓样品中落新妇苷含量测定。

2.3 市售土茯苓真伪及质量判定结果

将54批市售土茯苓制得的样品溶液按“1.3”节的色谱条件进行HPLC分析,获得的液相色谱图按“2.1”节进行真伪判定。表1结果表明,54份样品中有13个样品经指纹图谱分析为伪品,占24.1%。其中网购样品中有5个,占网购样品的25%;实体店购买的有8个,占实体店所购样品的23.5%。由此可知,市售土茯苓中约1/4为伪品,且网店与实体店所售土茯苓伪品比例相当。部分土茯苓伪品的液相色谱



构像

峰	R ₁	R ₂	C ₂	C ₃	名称
2	ORha	OH	S	S	新落新妇苷
3	ORha	OH	R	R	落新妇苷
4	OH	OH	R	R	花旗松素
5	ORha	OH	S	R	新异落新妇苷
6	ORha	OH	R	S	异落新妇苷
7	ORha	H	R	R	黄杞苷
8	ORha	H	R	S	异黄杞苷

图2 土茯苓色谱图中各峰化学结构

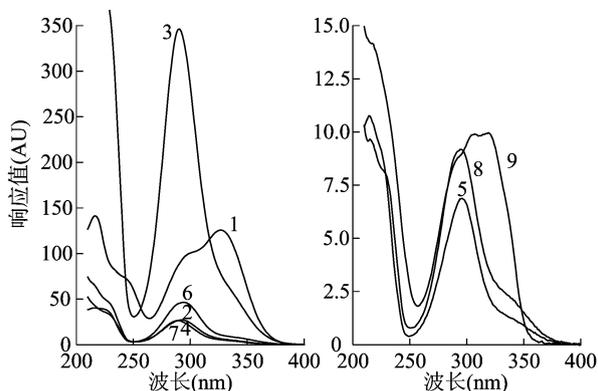


图3 土茯苓色谱图中各峰紫外吸收光谱

谱图见图4。将这些伪品粉碎后混入饲料给小鼠喂食,部分伪品会引起小鼠中毒死亡。

将色谱图中峰3的峰面积按“2.2”节中落新妇苷的定量标准线换算,获得土茯苓中落新妇苷含量。2010版《中华人民共和国药典》规定土茯苓饮片中落新妇苷的含量不能低于0.45%^[1]。对54批土茯苓样品测定结果表明,落新妇苷含量参差不齐,差异巨大,含量范围为0.042%~3.063%。只有24个土茯苓样品符合《中华人民共和国药典》落新妇苷含量规定,合格率仅为44.4%。其中通过网络购买的有9个,占

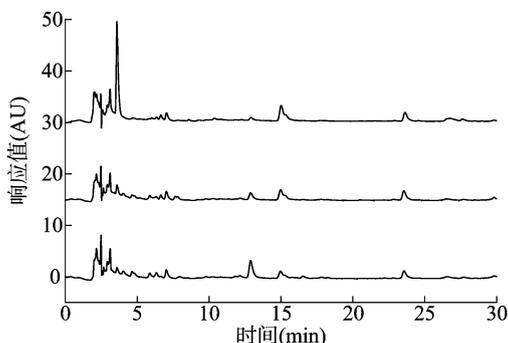


图4 一些土茯苓伪品 HPLC 色谱图

所有网购样品的45%;实体店购买的有15个,占实体店样品的44.1%,网店与实体店所售土茯苓质量无差异。

根据土茯苓真伪及质量判定结果,市售土茯苓样品中,接近1/4为伪品,超过半数质量不符合2010版《中华人民共和国药典》规定的标准。土茯苓是常用的中药及食品原料,中药讲究配伍,质量不符合要求的土茯苓会影响疗效,而伪品甚至会带来中毒的风险。笔者前期对龟苓膏样品的分析结果表明,一些标签中注明使用了土茯苓原料的龟苓膏样品中检测不到落新妇苷,不同品牌龟苓膏样品中落新妇苷含量差异巨大^[12]。市售土茯苓伪品众多、质量良莠不齐可能是造成这一

表1 54批土茯苓样品真伪及质量判定结果

样品序号	是否土茯苓	落新妇苷含量 (%)	是否符合药典要求	样品序号	是否土茯苓	落新妇苷含量 (%)	是否符合药典要求
1	是	0.203	否	28	是	1.680	是
2	是	2.792	是	29	是	1.370	是
3	是	2.184	是	30	是	0.478	是
4	是	2.778	是	31	是	0.880	是
5	是	0.424	否	32	是	0.242	否
6	是	0.291	否	33	是	0.069	否
7	否	0.000	否	34	是	0.046	否
8	否	0.000	否	35	是	0.190	否
9	是	0.357	否	36	是	0.736	是
10	是	0.497	是	37	是	2.190	是
11	否	0.000	否	38	是	0.457	是
12	是	0.692	是	39	是	0.063	否
13	是	3.063	是	40	是	0.461	是
14	是	2.030	是	41	否	0.000	否
15	是	2.107	是	42	否	0.000	否
16	是	0.270	否	43	否	0.000	否
17	否	0.000	否	44	否	0.000	否
18	否	0.000	否	45	否	0.000	否
19	是	0.465	是	46	否	0.000	否
20	是	0.265	否	47	是	0.259	否
21	是	0.479	是	48	否	0.000	否
22	是	0.487	是	49	是	0.054	否
23	是	2.020	是	50	是	3.050	是
24	是	0.097	否	51	是	0.258	否
25	是	1.490	是	52	是	0.459	是
26	是	1.970	是	53	是	0.127	否
27	否	0.000	否	54	是	0.042	否

现象的原因。而笔者建立的土茯苓指纹图谱可以很好地帮助厂家解决土茯苓原料质量问题。

3 结论

通过土茯苓 HPLC 标准指纹图谱对 54 批市售土茯苓样品进行真伪鉴定和质量判定,结果表明土茯苓伪品比例为 24.1%,符合《中华人民共和国药典》质量要求的土茯苓仅为样品总数的 44.4%。部分土茯苓伪品喂食小鼠后甚至有中毒死亡现象。土茯苓是常用的中药及食品原料。市售土茯苓伪品众多、质量良莠不齐是一个亟待解决的问题。土茯苓指纹图谱方法简便、准确,可为土茯苓的真伪鉴别及质量控制提供参考依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:17-18.
- [2] Zhang Q F, Zhang Z R, Cheung H Y. Antioxidant activity of *Rhizoma Smilacis Glabrae* extracts and its key constituent - astilbin[J]. Food Chemistry, 2009, 115(1):297-303.
- [3] Fukunaga T, Miura T, Furuta K, et al. Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Smilax glabra* in normal and diabetic mice[J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 1997, 20(1):44-46.
- [4] Sa F, Gao J L, Fung K P, et al. Anti - proliferative and pro - apoptotic effect of *Smilax glabra* Roxb. extract on hepatoma cell lines [J]. Chemico - Biological Interactions, 2008, 171(1):1-14.
- [5] Jiang J, Wu F, Lu J, et al. Anti - inflammatory activity of the aqueous extract from *Rhizoma Smilacis Glabrae* [J]. Pharmacological Research, 1997, 36(4):309-314.
- [6] Jiang J Y, Xu Q. Immunomodulatory activity of the aqueous extract from rhizome of *Smilax glabra* in the later phase of adjuvant - induced arthritis in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 85(1):53-59.
- [7] 张清峰, 张汉扬, 上官新晨, 等. 高效液相法同时测定土茯苓中五种多酚成分[J]. 现代食品科技, 2013, 29(9):2275-2278.
- [8] Zhang Q F, Li S C, Lai W P, et al. β - cyclodextrin facilitates simultaneous analysis of six bioactive components in *Rhizoma Smilacis Glabrae* by capillary zone electrophoresis[J]. Food Chemistry, 2009, 113(2):684-691.
- [9] Chen L, Yin Y, Yi H, et al. Simultaneous quantification of five major bioactive flavonoids in *Rhizoma Smilacis Glabrae* by high - performance liquid chromatography [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, 43(5):1715-1720.
- [10] Chen X, Tetsuo K. Flora of China [M]. Beijing: Science Press, St Louis: Missouri Botanical Garden Press, 2000:96-115.
- [11] Zhang Q F, Cheung H Y. The content of astilbin and taxifolin in concentrated extracts of *Rhizoma Smilacis Glabrae* and turtle jelly vary significantly[J]. Food Chemistry, 2010, 119(3):907-912.
- [12] Zhang Q F, Cheung H Y, Zeng L B. Development of HPLC fingerprint for species differentiation and quality assessment of *Rhizoma Smilacis Glabrae* [J]. Journal of Natural Medicines, 2013, 67(1):207-211.