

HPLC—一测多评法测定黄精及其饮片中6种成分的含量^Δ

左雅敏^{1*},李 琛¹,彭兴春¹,卫荣华¹,伍 庆²,郑 燕³,邓雪华^{3#}(1.湖北医药学院基础医学院,湖北十堰 442000;2.贵州师范大学山地环境信息系统与生态环境保护重点实验室,贵阳 550001;3.湖北医药学院药学院,湖北十堰 442000)

中图分类号 R284.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)13-1748-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.13.05

摘 要 目的:建立黄精及其饮片中薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、香草酸、芦丁、槲皮素及山柰酚6种成分的一测多评(QAMS)法。方法:采用高效液相色谱(HPLC)外标法同时测定黄精及其饮片中6种成分的含量[色谱柱为Diamonsil-C₁₈;流动相为乙腈-水(梯度洗脱);5-羟甲基糠醛、香草酸、芦丁、槲皮素及山柰酚检测波长为254 nm(0~60 min),薯蓣皂苷元检测波长为202 nm(60~75 min);流速为1.0 mL/min;柱温为30 ℃]。以香草酸为内标,分别计算出其余5种成分的相对校正因子(RCFs)并进行耐用性考察,并采用相对保留法对待测成分色谱峰进行准确定位,然后根据RCFs计算黄精药材中其他5种成分的含量,并与外标法测定结果进行比较。以黄精饮片进行方法验证,分别采用QAMS法和外标法测定其中6种成分的含量,比较两种方法含量测定差异。结果:HPLC方法学考察结果均符合相关要求。在线性范围内,薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、芦丁、槲皮素及山柰酚的RCFs分别为0.195、0.025、0.263、0.345、0.075,在不同试验条件下RCFs重现性良好。外标法和QAMS法两种方法测得的黄精药材及其饮片中6种成分的含量差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论:建立的QAMS法可用于同时测定黄精药材及其饮片中6种成分含量。
关键词 一测多评法;黄精;饮片;质量控制;高效液相色谱法

础。另外,本课题组还将采用气相色谱法对组方药材冰片中龙脑和异龙脑的总量进行测定,以进一步完善牛黄清胃丸的质量评价方法,全面提升该中成药的质量标准。

参考文献

[1] 药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂:第一册[S].北京:人民卫生出版社,1989:1-38.
[2] 李学红. HPLC法测定牛黄清胃丸中黄芩苷的含量[J].黑龙江医药,2014,27(3):491-493.
[3] 师永清,师永花. HPLC同时测定牛黄清胃丸中栀子苷和黄芩苷[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(11):86-88.
[4] 乌云.牛黄清胃丸中绿原酸含量的测定[J].中外医疗,2008,14(33):76.
[5] 汪存存. HPLC法测定牛黄清胃丸中大黄素和大黄酚的含量[J].中国中医药信息杂志,2008,15(6):49-50.
[6] 严永旺,肖兰,周旭,等.绿原酸的药理作用及药用研发对策[J].中国药房,2017,28(19):2729-2732.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31701294);贵州省教育厅创新群体重大项目(No.黔教合KY字[2018]014);“2011协同创新中心”建设项目(No.黔教合协同创新字[2014]04);湖北省卫计委中医药科研立项项目(No.ZY2019Q004);湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(No.B2018109);湖北医药学院人才启动金资助计划项目(No.2018QDJZR25)

* 助理实验师,主管技师,硕士。研究方向:中药质量控制。电话:0719-8875300。E-mail:460603930@qq.com

通信作者:副教授。研究方向:药用植物开发与利用。电话:0719-8843239。E-mail:291229855@qq.com

[7] 王亨.中药栀子有效成分及药理作用的研究进展[J].中国药师,2015,18(10):1782-1784.
[8] 付鹏亮,王东强,李志军.连翘酯苷药理作用研究进展[J].长春中医药大学学报,2011,27(6):1062-1063.
[9] 李国政,肖扬.枳壳黄酮药理学研究进展[J].山西中医,2017,33(11):59-62.
[10] 卢文颖.黄芩苷药理作用研究进展[J].科学技术创新,2017,21(22):66-67.
[11] 王颖,韩秀萍.甘草酸苷作用机制的研究进展[J].实用药物与临床,2018,21(1):109-113.
[12] 王亦君,冯舒涵,程锦堂,等.大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(13):227-234.
[13] 聂黎行,查祎凡,左甜甜,等.基于ICP-MS和对照制剂的牛黄清胃丸中重金属及有害元素残留量测定及风险评估[J].中国中药杂志,2019,44(1):306-311.
[14] 聂黎行,查祎凡,陈玉红,等.基于ICP-MS和对照制剂的牛黄清胃丸中石膏的质量评价[J].环境化学,2018,37(10):2322-2325.
[15] 黄传俊,杨莉,梅勇,等. HPLC切换波长法同时测定健脾止泻宁颗粒中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量[J].中国药房,2018,29(10):1324-1327.
[16] 沈静琳,丁莹. HPLC波长切换法同时测定麝香心脑乐片中7种成分[J].药物分析杂志,2018,38(3):520-526.

(收稿日期:2018-12-12 修回日期:2019-01-31)
(编辑:刘 萍)

Simultaneous Determination of 6 Ingredients in Polygonati Rhizoma and Its Decoction Piece by HPLC-QAMS

ZUO Yamin¹, LI Chen¹, PENG Xingchun¹, WEI Ronghua¹, WU Qing², ZHENG Yan³, DENG Xuehua³ (1.School of Basic Medical Science, Hubei University of Medicine, Hubei Shiyan 442000, China; 2.Key Lab of Mountain Environmental Information System and Ecoenvironmental Protection, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China; 3.School of Pharmacy, Hubei University of Medicine, Hubei Shiyan 442000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a quantitative analysis of multi-components by singer marker (QAMS) for determining the contents of diosgenin, 5-hydroxymethylfurfural, vanillic acid, rutin, quercetin, kaempferol in Polygonati Rhizoma and its decoction piece. METHODS: HPLC external standard method was used to determine the contents of 6 components in Polygonati Rhizoma and its decoction piece simultaneously [the separation was carried out on Diamonsil-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution); the detection wavelengths of 5-hydroxymethylfurfural, vanillic acid, rutin, quercetin and kaempferol were set at 254 nm(0-60 min); the detection wavelength of diosgenin was set at 202 nm (60-75 min) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 30 °C]. Using vanillic acid as internal standard, relative correction factors (RCFs) of aother 5 components were calculated and to investigate durability. Relative retention method was used to accurately locate the chromatographic peaks of the components to be determined, and then the contents of the aother 5 components in Polygonati Rhizoma were calculated according to RCFs, and the results were compared with those determined by external standard method. The method was validated by Polygonati Rhizoma decoction piece. The contents of 6 components were determined by QAMS method and external standard method respectively, and then the differences of content determination were compared between 2 methods. RESULTS: The methodology investigation results of HPLC method were in line with related requirements. Within the linear range, the RCFs of diosgenin, 5-hydroxymethylfurfural, rutin, quercetin, kaempferol were 0.195, 0.025, 0.263, 0.345 and 0.075, respectively. Under different experiment conditions, RCFs showed good reproducibility; there was no statistical significance of 6 components in Polygonati Rhizoma and its decoction piece determined by external standard method and QAMS method ($P>0.05$). CONCLUSIONS: Established QAMS method is suitable for simultaneous determination of 6 components in Polygonati Rhizoma and its decoction piece.

KEYWORDS Quantitative analysis of multi-components by singer marker; Polygonati Rhizoma; Decoction piece; Quality control; HPLC

黄精为百合科植物滇黄精(*Polygonatum kingianum* Coll.et Hemsl.)、黄精(*Polygonatum sibiricum* Red.)或多花黄精(*Polygonatum cyrtoneura* Hua)的干燥根茎^[1]。现代药理学研究表明,黄精的化学成分主要有糖类、皂苷类、黄酮类、酚酸类及生物碱类等^[2-4]。其中,皂苷类成分薯蓣皂苷元还可改善心血管功能、调节免疫等^[5];黄酮类成分芦丁、槲皮素及山柰酚等可通过参与蛋白质磷酸化、氧化还原反应及自由基清除等在抗氧化、抗衰老方面发挥重要作用^[6];酚酸类成分香草酸具有抗菌、消炎及抗血小板聚集等功能^[7]。因生黄精有麻舌感且可刺激咽喉,故临床上多通过酒制法破坏黄精中黏液质以减少毒副作用^[8-9]。而相关研究证实^[10-11],黄精酒制前后多糖含量变化较大,在炮制过程中多糖会被大量水解成低聚糖和单糖,其中的5-羟甲基糠醛就是葡萄糖等多糖在高温或弱酸等条件下脱水产生的,可作为炮制过程黄精多糖成分变化的重要指标,且其具有抗炎和改善血液流变学的功效。以上6种成分均具有较好的药理作用,具有较大的研究价值和开发潜力。

一测多评(QAMS)法是以样品中某一典型组分为内参物,建立该组分与其他组分的相对校正因子

(RCFs),以计算其他组分的量^[12],该方法已成功应用于多种药材、饮片及中成药的质量控制中^[13-14]。而王智民课题组成功建立的含淫羊藿成分的“药材-饮片-中成药”一体化QAMS质量评价模式为实现单味药材到复方的推广提供了示范和参考作用^[15]。另有研究证实,使用紫外双波长切换可有效提高检测灵敏度,实现同时测定药材中不同成分含量的目的^[16]。目前,2015年版《中国药典》(一部)^[1]仅以黄精饮片中无水葡萄糖的含量不少于4.0%作为质量标准,虽有研究采用外标法对黄精中黄酮、生物碱等成分进行了测定^[17-19],但未见QAMS法的报道。且已报道的研究多局限于探讨黄精多糖的药理作用,而同时测定多种类型化学成分的研究则报道较少。为体现中药黄精多成分、多层次和多靶点的特点,充分利用药用资源,本研究以黄精药材及其饮片为研究对象,以香草酸(酚酸类)作为内参物,建立黄精药材及其饮片中薯蓣皂苷元(皂苷类)、芦丁、槲皮素及山柰酚(黄酮类)和5-羟甲基糠醛(醛类)6种成分的QAMS法,并与高效液相色谱(HPLC)外标法进行对比,为全面建立黄精药材及饮片质量提供参考,同时为揭示黄精炮制机制提供数据支撑。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1100 型 HPLC 系统,包括四元泵、自动进样器、二极管阵列检测器(DAD)及 Agilent ChemStation B.04.02 型工作站(美国 Agilent 公司);CH-250 型超声波清洗机(北京创新德超声电子研究所);AL-204 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);WG-43 型数显电热鼓风恒温干燥箱(长春澳尔天派机电设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

薯蓣皂苷元对照品(批号:111539-200001,纯度:>99%)、5-羟甲基糠醛对照品(批号:111626-201711,纯度:>99%)、香草酸对照品(批号:110776-201503,纯度:>99%)、芦丁对照品(批号:100080-201811,纯度:>98%)、槲皮素对照品(批号:100081-201610,纯度:>99%)和山柰酚对照品(批号:110861-201812,纯度:>99%)均购自中国食品药品检定研究院;黄精药材(批号:20181201~20181210)和黄精饮片(批号:20181211~20181220)各 10 批,均购自国药集团同济堂(贵州)制药有限公司,经贵阳中医学院魏升华教授鉴定均符合 2015 年版《中国药典》(一部)相关规定,属于多花黄精 *P. cyrtonema* Hua 的干燥块茎;甲醇、乙腈(天津科密欧化学试剂有限公司,色谱纯),水为自制超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

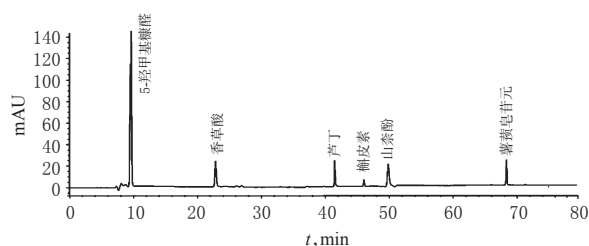
2.1 HPLC 法测定黄精药材及饮片中 6 种成分含量

2.1.1 各对照品溶液的制备 对照品贮备液:分别取薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、香草酸、芦丁、槲皮素及山柰酚对照品适量,精密称定,置于不同 10 mL 量瓶中,加 80% 甲醇溶解并定容至刻度,得质量浓度分别为 0.62、3.34、2.15、1.65、1.13、1.08 mg/mL 的对照品贮备液。混合对照品溶液:分别移取适量上述 6 种对照品贮备液,置于同一 5 mL 量瓶中,用 80% 甲醇制备成含有 0.010 2 mg/mL 薯蓣皂苷元、0.584 5 mg/mL 5-羟甲基糠醛、0.003 2 mg/mL 香草酸、0.012 5 mg/mL 芦丁、0.010 2 mg/mL 槲皮素及 0.010 6 mg/mL 山柰酚的混合标准对照品溶液;分别用 80% 甲醇将该混合对照品溶液稀释 2、5、8、10 及 50 倍,制成 5 个质量浓度的系列对照品溶液。各溶液均于 4 ℃ 冰箱保存,备用。

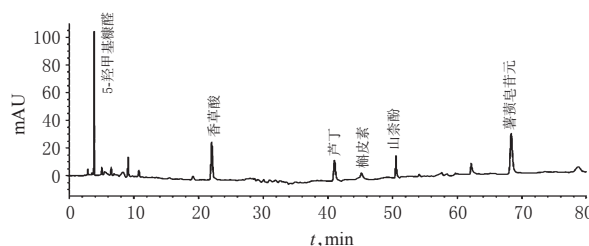
2.1.2 供试品溶液的制备 (1)黄精药材供试品溶液:根茎去除根须,洗净,于 40 ℃ 烘箱烘干,粉碎过 50 目筛,置于干燥器中。取黄精药材粉末约 1 g,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 50% 乙醇 30 mL,称定质量,超声(功率:200 W,频率:53 kHz)处理 30 min,放冷,再称定质量,用 50% 乙醇补足缺失的质量,摇匀,过滤,取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。(2)黄精饮片供试品溶液:制备方法同黄精药材。

2.1.3 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Diamon-

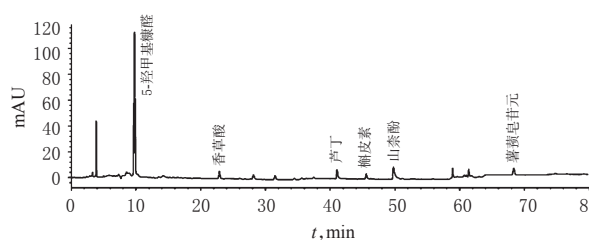
sil-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~8 min, 13% A; 8~13 min, 13%~19%; 13~30 min, 19%~25% A; 30~45 min, 25%~50% A; 45~50 min, 50%~60% A; 50~60 min, 60%~70% A; 60~62 min, 70%~90% A; 62~65 min, 90%~100% A; 70~75 min, 13% A);检测波长 5-羟甲基糠醛、香草酸、芦丁、槲皮素及山柰酚为 254 nm(0~60 min),薯蓣皂苷元为 202 nm(60~75 min);流速为 1.0 mL/min;柱温为 30 ℃;进样量为 10 μL。取“2.1.1”项下混合对照品溶液和“2.1.2”项下供试品溶液,按此色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,各成分与相邻峰间的分离度均大于 1.5,理论板数按香草酸峰计大于 5 000,色谱图见图 1。



A. 混合对照品溶液



B. 黄精药材样品溶液(批号:20181201)



C. 黄精饮片样品溶液(批号:20181211)

图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.1.4 线性关系与检测限、定量限考察 分别吸取“2.1.1”项下制成的 5 个质量浓度的系列对照品溶液各 10 μL,按“2.1.3”项下色谱条件进样分析,记录色谱图。每个质量浓度进样 3 次,取平均值,以进样质量(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,并求得信噪比(S/N)分别为 3 和 10 的对照品浓度,即为该对照品的检测限(S/N=3)和定量限(S/N=10)。结果表明,各组分在进样质量浓度范围内与其峰面积均呈良好的线性关系,结果见表 1。

2.1.5 精密度试验 取同一混合对照品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果显示,薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、香草酸、芦丁、槲皮素及山柰

酚峰面积的RSD分别为1.2%、2.3%、1.9%、0.8%、2.5%和1.9%(n=6),说明仪器精密密度良好。

表1 6种成分的线性关系及检测限、定量限考察结果(n=3)

Tab 1 Linear relationship, detection limit and limit of quantitation of 6 components(n=3)

待测成分	回归方程	r	线性范围,μg	检测限,ng	定量限,ng
5-羟甲基糠醛	y=16 177x-82.933	0.999 1	0.117 0~5.845 0	0.001 1	0.000 1
香草酸	y=63 132x-5.181	0.999 1	0.000 6~0.032 0	0.003 1	0.000 5
芦丁	y=16 963x-19.26	0.999 0	0.002 5~0.125 0	0.004 2	0.002 0
槲皮素	y=21 783x-7.703	0.999 2	0.002 0~0.102 0	0.001 5	0.000 5
山柰酚	y=46 758x+0.304	0.999 1	0.002 1~0.106 0	0.003 2	0.001 5
薯蓣皂苷元	y=11 889x+3.127	0.999 0	0.002 0~0.102 0	0.002 8	0.001 0

2.1.6 稳定性试验 取同一份黄精药材供试品(批号:20181201)溶液,分别在放置0、2、4、6、8、10、12、24、36、48、72 h时按“2.1.3”项下色谱条件进样分析,记录峰面积。结果显示,溶液中薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、香草酸、芦丁、槲皮素及山柰酚峰面积的RSD分别为1.9%、2.8%、0.7%、1.6%、0.7%和2.3%(n=11),表明制备后的供试品溶液在72 h内稳定。

2.1.7 重复性试验 称取同一份黄精药材供试品(批号:20181201)粉末约1.0 g,共6份,按照“2.1.2(1)”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.1.3”项下色谱条件进样分析,记录峰面积并计算各成分含量。结果显示,6份样品中薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、香草酸、芦丁、槲皮素及山柰酚含量的RSD分别为1.5%、0.9%、2.1%、0.5%、1.2%和1.9%(n=6),表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 称取已知含量的黄精药材(批号:20181201)粉末共9份,每3份为1组,各约0.50 g,精密称定,分别按已知含量的80%、100%、120%精密加入薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、香草酸、芦丁、槲皮素及山柰酚对照品,然后按“2.1.2(1)”项下方法制成供试品溶液,再按“2.1.3”项下色谱条件进样分析,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、香草酸、芦丁、槲皮素及山柰酚的平均回收率分别为99.8%、100.9%、101.1%、101.1%、99.9%和100.1%,RSD分别为0.3%、2.4%、1.0%、1.4%、1.9%和1.7%(n=9),表明本方法具有较好的准确度,结果见表2。

2.2 QAMS质量评价模式的建立

2.2.1 待测指标RCFs的计算 本研究比较了不同计算方法(斜率法、多点校正法)得到的RCFs。根据文献方法^[20],以香草酸为内参物计算其他5个成分的RCFs:RCFs=(W_k×A_m)/(W_m×A_k),其中,A_k为内参物峰面积,W_k为内标物质量,A_m为待测组分m峰面积,W_m为待测组分m质量。

斜率法即采用不同质量浓度的混合对照品溶液进样相同体积测定,记录峰面积与进样量,并计算RCFs,

表2 回收率试验结果
Tab 2 Results of recovery tests

待测成分	称样量,g	样品原有量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率(n=9),%	RSD(n=9),%
薯蓣皂苷元	0.501 2	0.099 7	0.079 8	0.179 0	99.4	99.8	0.3
	0.501 4	0.099 8	0.079 8	0.179 3	99.6		
	0.501 3	0.099 7	0.079 8	0.179 2	99.6		
	0.500 9	0.099 6	0.099 6	0.199 4	100.2		
	0.501 1	0.099 7	0.099 7	0.199 3	99.9		
	0.501 0	0.099 7	0.099 7	0.199 3	99.9		
	0.501 1	0.099 7	0.119 6	0.219 5	100.1		
	0.500 8	0.099 6	0.119 5	0.218 9	99.8		
	0.501 0	0.099 7	0.119 6	0.219 4	100.1		
	5-羟甲基糠醛	0.501 2	0.005 5	0.004 4	0.009 8		
5-羟甲基糠醛	0.501 4	0.005 5	0.004 4	0.010 0	102.3	100.9	2.4
	0.501 3	0.005 5	0.004 4	0.009 8	97.7		
	0.500 9	0.005 4	0.005 4	0.010 9	101.9		
	0.501 1	0.005 4	0.005 4	0.011 0	103.7		
	0.501 0	0.005 4	0.005 4	0.010 8	100.0		
	0.501 1	0.005 4	0.006 5	0.011 8	98.5		
	0.500 8	0.005 3	0.006 5	0.012 0	103.1		
	0.501 0	0.005 4	0.006 5	0.012 1	103.1		
	香草酸	0.501 2	0.005 3	0.004 2	0.009 6		
	0.501 4	0.005 3	0.004 2	0.009 5	99.5		
香草酸	0.501 3	0.005 3	0.004 2	0.009 6	102.4	101.1	1.0
	0.500 9	0.005 2	0.005 2	0.010 5	101.9		
	0.501 1	0.005 3	0.005 3	0.010 6	100.2		
	0.501 0	0.0052	0.005 2	0.010 5	101.9		
	0.501 1	0.005 3	0.006 3	0.011 7	100.1		
	0.500 8	0.005 1	0.006 1	0.011 3	101.3		
	0.501 0	0.005 2	0.006 2	0.011 5	101.6		
	芦丁	0.501 2	0.009 5	0.007 6	0.017 3		
	0.501 4	0.009 6	0.007 7	0.017 4	101.6		
	0.501 3	0.009 5	0.007 6	0.017 3	102.6		
芦丁	0.500 9	0.009 4	0.009 4	0.018 9	101.1	101.1	1.4
	0.501 1	0.009 5	0.009 5	0.019 2	101.7		
	0.501 0	0.009 4	0.009 4	0.018 7	98.9		
	0.501 1	0.009 5	0.011 4	0.020 8	98.7		
	0.500 8	0.009 3	0.011 2	0.020 7	102.2		
	0.501 0	0.009 4	0.011 4	0.020 9	100.9		
	槲皮素	0.501 2	0.0081	0.006 5	0.014 7		
	0.501 4	0.008 1	0.006 5	0.014 5	98.1		
	0.501 3	0.008 1	0.006 5	0.014 5	98.5		
	0.500 9	0.008 0	0.008 0	0.016 1	101.3		
槲皮素	0.501 1	0.008 1	0.008 1	0.016 1	98.5	99.9	1.9
	0.501 0	0.008 1	0.008 1	0.016 1	98.5		
	0.501 1	0.008 1	0.009 7	0.018 1	102.5		
	0.500 8	0.007 9	0.009 5	0.017 2	98.1		
	0.501 0	0.008 1	0.009 7	0.018 0	102.1		
	山柰酚	0.501 2	0.007 9	0.006 3	0.014 3		
	0.501 4	0.008 1	0.006 5	0.014 5	98.8		
	0.501 3	0.008 0	0.006 4	0.014 5	101.6		
	0.500 9	0.007 8	0.007 8	0.015 7	101.3		
	0.501 1	0.007 9	0.007 9	0.015 6	97.5		
山柰酚	0.501 0	0.007 9	0.007 9	0.015 9	101.3	100.1	1.7
	0.501 1	0.007 9	0.009 5	0.017 2	98.1		
	0.500 8	0.007 7	0.009 2	0.017 1	101.7		
	0.501 0	0.007 9	0.009 5	0.017 3	98.9		

分别取“2.1.1”项下制备的5个系列对照品溶液(即“2.1.4”项下线性范围数据),每份样品平行测定3次,根据各样品的平均值计算各成分的平均RCFs值。多点校

正法即采取同一质量混合对照品进样不同体积测定,记录峰面积与进样量并计算 RCFs,取“2.1.2”项下混合对照品溶液,分别进样 2、4、6、8、10 μL ,平行测定 3 次。本研究结果显示,斜率法得到的 RCFs 的相对偏差较多点校正法小,故采用斜率法进行 RCFs 计算,结果见表 3。

表 3 不同计算方法的 RCFs 值比较($n=3$)

Tab 3 Comparison of RCFs calculated by different methods($n=3$)

待测成分	斜率法		多点法	
	平均值	相对偏差, %	平均值	相对偏差, %
薯蓣皂苷元	0.195	0.52	0.198	1.68
5-羟甲基糠醛	0.025	0.67	0.027	1.59
芦丁	0.263	0.59	0.268	2.11
槲皮素	0.345	0.98	0.357	2.96
山柰酚	0.075	1.41	0.079	2.89

2.2.2 RCFs 的耐用性考察 取黄精药材样品(批号:20181201)按“2.1.2(1)”项下制备供试品溶液,在不同色谱条件进样分析,记录峰面积及各成分含量,并以香草酸为内参物,按公式计算各成分的 RCFs 值,考察不同色谱条件对 RCFs 值的影响:(1)采用 Agilent 1100 型 HPLC 系统,考察 3 种色谱柱[Diamonsil- C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、Phenomenex Luna C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)和 Hypersil ODS2 C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)]对 RCFs 值的影响,结果薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、芦丁、槲皮素及山柰酚 RCFs 值的 RSD 均 $<1.8\%$ ($n=3$),表明 RCFs 在不同色谱柱具有较好的适应性。(2)采用 Diamonsil-

C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),采用考察 3 种不同品牌仪器(Agilent 1100、Waters 2996 和岛津 2010A)对 RCFs 值的影响,结果薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、芦丁、槲皮素及山柰酚 RCFs 值的 RSD 均 $<7.1\%$ ($n=3$),表明在使用不同品牌仪器时需要进行波长校正,以获得更稳定的 RCFs 值。(3)采用 Agilent 1100 型色谱仪, Diamonsil- C_{18} 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm),考察柱温分别为 20、25、30 $^{\circ}\text{C}$ 时对 RCFs 值的影响,结果 RCFs 的 RSD $<1.5\%$ ($n=3$),表明在不同柱温下耐用性良好。(4)考察流速分别为 0.8、1.0、1.2 mL/min 时对 RCFs 值的影响,结果 RCFs 的 RSD $<2.1\%$ ($n=3$),表明在不同体积流量时具有良好的耐用性。

2.3 待测组分色谱峰的定位

采用相对保留法 $RT_{\text{Ri/Rx}}=t_{\text{Ri}}/t_{\text{Rx}}$, $\Delta t_{\text{Ri-Rx}}=t_{\text{Ri}}-t_{\text{Rx}}$ ($RT_{\text{Ri/Rx}}$ 表示待测成分 Ri 与内参物 Rx 的相对保留时间, $\Delta t_{\text{Ri-Rx}}$ 表示待测成分 Ri 与内参物 Rx 的保留时间差, t_{Ri} 表示待测成分 Ri 的保留时间, t_{Rx} 表示内参物 Rx 的保留时间)。采用 RCFs 计算和耐用性考察时记录的色谱图,即测定相对保留值在不同品牌仪器、不同色谱柱、不同柱温和流速时的重现性,计算 5 种成分的 $RT_{\text{Ri/Rx}}$ 和 $\Delta t_{\text{Ri-Rx}}$ 。结果表明,待测成分间的 $RT_{\text{Ri/Rx}}$ 较稳定, RSD $<2.0\%$ ($n=3$);但待测成分间的 $\Delta t_{\text{Ri-Rx}}$ 波动较大。因此,该方法的 $RT_{\text{Ri/Rx}}$ 适宜于薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、芦丁、槲皮素及山柰酚色谱峰的定位,结果见表 4、表 5。

表 4 不同品牌仪器和色谱柱下待测成分间的 $RT_{\text{Ri/Rx}}$ 和 $\Delta t_{\text{Ri-Rx}}$ ($n=3$)

Tab 4 $RT_{\text{Ri/Rx}}$ and $\Delta t_{\text{Ri-Rx}}$ among the components to be determined by using different brand instruments and columns ($n=3$)

仪器	色谱柱	$RT_{\text{Rs/Rs}}$	$\Delta t_{\text{Rs-Rs}}$	$RT_{\text{Rq/Rs}}$	$\Delta t_{\text{Rq-Rs}}$	$RT_{\text{Rl/Rs}}$	$\Delta t_{\text{Rl-Rs}}$	$RT_{\text{Rh/Rs}}$	$\Delta t_{\text{Rh-Rs}}$	$RT_{\text{Rsh/Rs}}$	$\Delta t_{\text{Rsh-Rs}}$
Waters 2996	Diamonsil C_{18}	3.032	45.895	0.438	-12.690	1.859	19.407	2.032	23.311	2.255	28.331
岛津 2010A	Diamonsil C_{18}	3.040	45.691	0.426	-12.791	1.831	18.517	2.041	22.121	2.223	27.114
Agilent 1100	Diamonsil C_{18}	3.038	46.005	0.432	-12.489	1.799	19.001	2.011	23.599	2.189	27.712
	Phenomenex Luna C_{18}	3.035	45.995	0.440	-12.811	1.809	19.658	2.102	21.915	2.160	28.009
	Hypersil ODS2 C_{18}	3.037	46.089	0.429	-13.260	1.812	19.799	2.099	21.365	2.178	27.878
	平均值	3.036	45.935	0.433	-12.808	1.822	19.276	2.057	22.462	2.201	27.809
	RSD, %	0.100	0.330	1.370	-2.210	1.300	2.710	2.000	4.240	1.720	1.620

注:“Rs”代表薯蓣皂苷元;“Rq”代表 5-羟甲基糠醛;“Rl”代表芦丁;“Rh”代表槲皮素;“Rsh”代表山柰酚

Note: “Rs” refers to diosgenin; “Rq” refers to 5-hydroxymethylfurfural; “Rl” refers to rutin; “Rh” refers to quercetin; “Rsh” refers to kaempferol

2.4 黄精药材 QAMS 法和外标法测定结果的比较

分别取各批次黄精药材按“2.1.2(1)”项下制备供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件测定。分别采用外标法和建立的 QAMS 法测定黄精药材中 6 种成分含量。结果表明,外标法和 QAMS 法测得的各成分含量值的相似程度均大于 0.9;相对偏差[(外标法 - QAMS 法)/QAMS 法 $\times 100\%$]的 RSD 值均小于 5% ($n=3$)。应用统计学软件 SPSS 16.0 对数据进行 t 检验分析,结果显示,2 种方法测定下 6 种成分含量差异均无统计学意义($P>0.05$),

结果见表 6。

2.5 黄精饮片含量测定方法再验证

本研究以黄精饮片中香草酸为内参物,采用建立的 RCFs 值计算饮片中其余 5 种成分的含量,并同时用外标法测定各成分含量进行结果验证。采用统计学软件 SPSS 16.0 对两组间数据进行 t 检验分析。结果显示,采用外标法和 QAMS 法测定的黄精饮片中薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、香草酸、芦丁、槲皮素及山柰酚含量的差异均无统计学意义($P>0.05$),结果见表 7。

表5 不同柱温和流速下待测成分间的 $RT_{Ri/Rx}$ 和 Δt_{Ri-Rx} ($n=3$)

Tab 5 $RT_{Ri/Rx}$ and Δt_{Ri-Rx} among the components to be determined by under different column temperatures and flow rates ($n=3$)

项目		$RT_{Rs/Rs}$	$\Delta t_{Rs/Rs}$	$RT_{Rq/Rs}$	$\Delta t_{Rq/Rs}$	$RT_{Rl/Rs}$	$\Delta t_{Rl/Rs}$	$RT_{Rh/Rs}$	$\Delta t_{Rh/Rs}$	$RT_{Rsh/Rs}$	$\Delta t_{Rsh/Rs}$
柱温,℃	20	3.033	45.811	0.431	-12.676	1.832	19.389	2.124	23.189	2.167	28.021
	25	3.030	45.682	0.422	-12.713	1.829	18.321	2.108	22.934	2.206	27.099
	30	3.038	46.099	0.421	-12.455	1.761	19.098	2.098	23.067	2.202	27.132
	平均值	3.034	45.864	0.425	-12.615	1.807	18.936	2.110	23.063	2.192	27.417
	RSD, %	0.13	0.47	1.30	-1.11	2.22	2.92	0.62	0.55	0.98	1.91
流速, mL/min	0.8	3.035	45.799	0.426	-12.365	1.809	19.115	2.099	23.011	2.199	28.088
	1.0	3.031	45.642	0.420	-12.874	1.791	18.098	2.065	24.354	2.099	26.987
	1.2	3.039	46.132	0.431	-12.799	1.812	18.233	2.001	23.001	2.154	28.998
	平均值	3.035	45.858	0.426	-12.679	1.804	18.482	2.055	23.455	2.151	28.024
	RSD, %	0.13	0.55	1.29	-2.17	0.63	2.99	2.42	3.32	2.32	3.59

注：“Rs”代表薯蓣皂苷元；“Rq”代表5-羟甲基糠醛；“Rl”代表芦丁；“Rh”代表槲皮素；“Rsh”代表山柰酚

Note: “Rs” refers to diosgenin; “Rq” refers to 5-hydroxymethylfurfural; “Rl” refers to rutin; “Rh” refers to quercetin; “Rsh” refers to kaempferol

表6 2种方法测定黄精药材中6种成分的含量(%)

Tab 6 Content of 6 components in Polygonati Rhizoma determined by two methods (%)

样品批号	香草酸	薯蓣皂苷元		5-羟甲基糠醛		芦丁		槲皮素		山柰酚	
	外标法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法
20181201	0.001 2	0.019 1	0.015 2	0.001 4	0.001 1	0.002 1	0.002 2	0.002 3	0.002 1	0.002 4	0.002 1
20181202	0.003 2	0.021 2	0.020 3	ND	ND	0.001 3	0.001 5	0.003 1	0.003 4	0.005 1	0.004 1
20181203	0.005 3	0.028 1	0.026 3	ND	ND	0.003 2	0.002 1	0.004 3	0.005 3	0.008 1	0.007 1
20181204	0.007 3	0.022 3	0.023 2	ND	ND	0.002 1	0.002 5	0.002 1	0.002 4	0.006 4	0.007 1
20181205	0.002 1	0.024 2	0.026 3	0.002 3	0.002 1	0.002 5	0.003 4	0.004 3	0.003 4	0.007 1	0.006 3
20181206	0.001 5	0.021 5	0.021 2	ND	ND	0.006 5	0.004 8	0.005 1	0.005 6	0.003 2	0.003 7
20181207	0.003 2	0.014 5	0.012 6	ND	ND	0.003 2	0.003 9	0.003 2	0.002 1	0.004 4	0.005 5
20181208	0.001 2	0.018 1	0.016 6	ND	ND	0.005 2	0.005 8	0.005 3	0.005 1	0.006 2	0.007 8
20181209	0.005 4	0.017 4	0.018 6	ND	ND	0.004 2	0.005 6	0.006 1	0.005 5	0.004 1	0.005 2
20181210	0.004 5	0.019 3	0.020 4	0.001 3	0.001 7	0.003 3	0.003 6	0.004 1	0.005 6	0.003 2	0.004 1

注：“ND”指未检测出

Note: “ND” refers to not be detected

表7 2种方法测定黄精饮片中6种成分的含量(%)

Tab 7 Contents of 6 components in Polygonati Rhizoma decoction piece determined by 2 methods (%)

样品批号	香草酸	薯蓣皂苷元		5-羟甲基糠醛		芦丁		槲皮素		山柰酚	
	外标法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法	外标法	QAMS法
20181211	0.000 7	0.006 7	0.006 3	1.011	1.102	0.001 6	0.001 2	0.001 1	0.001 3	0.001 2	0.001 4
20181212	0.001 1	0.004 6	0.003 9	0.977	0.961	0.001 8	0.002 1	0.001 3	0.001 5	0.001 9	0.001 7
20181213	0.001 2	0.008 1	0.007 5	0.988	0.970	0.010 1	0.010 1	0.002 4	0.002 6	0.002 3	0.002 1
20181214	0.000 9	0.009 2	0.008 2	0.898	0.861	0.002 1	0.002 5	0.001 9	0.001 2	0.002 9	0.002 1
20181215	0.001 5	0.012 3	0.012 8	0.766	0.712	0.001 1	0.001 2	0.001 5	0.001 2	0.001 8	0.001 5
20181216	0.000 2	0.010 6	0.010 9	0.687	0.675	0.002 3	0.001 9	0.0199	0.019 1	0.012 3	0.011 2
20181217	0.001 9	0.004 6	0.004 1	0.900	0.912	0.001 9	0.001 2	0.0121	0.010 2	0.010 1	0.009 9
20181218	0.000 4	0.002 3	0.003 8	0.877	0.911	0.017 6	0.015 6	0.001 4	0.001 0	0.001 9	0.001 4
20181219	0.001 9	0.013 2	0.015 6	1.032	1.099	0.001 1	0.001 3	0.014 3	0.012 1	0.008 9	0.007 6
20181220	0.000 4	0.003 2	0.002 9	0.812	0.832	0.008 7	0.008 3	0.010 2	0.010 0	0.001 9	0.002 1

3 讨论

在样品前处理方法上,根据待测成分的性质,本研究对不同提取溶剂及用量(甲醇、乙醇、无水乙醇等)、提取方法(超声、回流提取等)以及提取时间等分别进行了考察,结果表明以50%乙醇为提取溶剂,超声提取30 min测得的6种成分含量较高。在检测条件优化上,本研究比较了不同的流动相检测体系(甲醇-醋酸、乙腈-水

和乙腈-0.03%磷酸),发现乙腈-水体系经梯度洗脱后所得各峰分离效果最佳,且配比简单。在检测波长的选择上,本研究采用DAD检测器,通过在线紫外吸收光谱对6种化学成分进行全波长扫描,最终确定检测波长(0~60 min, $\lambda_1=254$ nm;60~65 min, $\lambda_2=202$ nm)可兼顾6种化学成分的最大吸收。

本研究首次将QAMS法结合HPLC双波长法应用

到黄精中酚酸类、皂苷类、黄酮类及醛类成分的多指标质量评价上,避免对照品不稳定、价格高等因素,选用价格低廉、性质稳定的香草酸为内参物。色谱峰的准确定位及RCFs值的确定是QAMS应用的关键。本研究采用相对保留时间结合色谱峰的全波长紫外吸收光谱对未知样品中待测色谱峰进行了准确定位。在对RCFs考察上,以香草酸为内参物,建立的薯蓣皂苷元、5-羟甲基糠醛、芦丁、槲皮素及山柰酚的RCFs具有较好的可信度,同时证实在对照品缺乏的条件下,其他成分均可作为内参物。

本研究结果发现,不同黄精饮片批次间6种成分含量的差异较大,其中5-羟甲基糠醛含量最高,而在黄精药材中却多未检测到或含量极少,表明其可能在炮制工艺过程中产生,这为本课题组进一步探讨黄精炮制机制提供了数据基础。同时,不同来源和炮制工艺对黄精饮片化学成分具有较大影响,可为黄精资源开发及栽培种植提供参考。同时也提示,对黄精药材和炮制工艺生产过程的质量控制急需加强,以实现终产品的一致性和稳定性。

综上所述,本研究成功将建立的黄精中不同类成分的QAMS质量评价模式应用于黄精药材及饮片的质量评价中,实现了中药药材、饮片统一的多指标质量评价模式。通过建立黄精及饮片中6种成分的QAMS法,并比较其与外标法测定结果的差异,结果表明在线性范围内,本研究建立的QAMS法对黄精药材和饮片具有通用性,准确性高、可行性好,可为其他中药及相关产品质量控制提供方法参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:306-307.

[2] 陶爱恩,张晓灿,杜泽飞,等.黄精属植物中黄酮类化合物及药理活性研究进展[J]. 中草药,2018,49(9):2163-2171.

[3] 王婷,苗明三.黄精的化学、药理及临床应用特点分析[J]. 中医学报,2015,30(5):714-715.

[4] 庞玉新,赵致,袁媛,等.黄精的化学成分及药理作用[J]. 山地农业生物学报,2003,22(6):547-550.

[5] SETHI G, SHANMUGAM MK, WARRIER S, et al. Pro-apoptotic and anti-cancer properties of diosgenin: a comprehensive and critical review[J]. *Nutrients*, 2018, 10(5): 645-672.

[6] TANER G, ÖZKAN VARDAR D, AYDIN S, et al. Use of in vitro assays to assess the potential cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects of vanillic and cinnamic acid[J]. *Drug Chem Toxicol*, 2017, 40(2):183-190.

[7] 张洪,张惟郁,朱伟嵘.黄酮类化合物调控肿瘤细胞自噬的研究进展[J]. 中草药,2017,48(24):5252-5262.

[8] 钟凌云,龚千峰,张的风,等.黄精炮制研究现状分析[J]. 中药材,2007,30(12):1618-1621.

[9] 秦宇雯,袁玮,陆逸林,等.九华黄精的炮制工艺沿革及现代研究[J]. 中草药,2018,49(18):4432-4438.

[10] 魏征,曾林燕,宋志前,等.顶空-气相色谱-质谱联用分析黄精炮制过程化学成分的变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(20):115-118.

[11] 常亮,陈珍珍,王栋,等. HPLC 和 GC-MS 法测定三种黄精炮制过程中 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 中国药师,2015,18(3):387-390.

[12] 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):657-660.

[13] 卿大双,罗维早,孙建彬,等.一测多评法测定黄连及其炮制品中6种生物碱[J]. 中草药,2016,47(2):324-329.

[14] 杨菲,王智民,张启伟,等.“一测多评”法测定丹参酚酸类成分的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(17):2372-2379.

[15] 冯伟红,李春,张锴镔,等.“一测多评”模式在淫羊藿药材、饮片及含淫羊藿中成药黄酮类成分检测中的一体化研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(15):2843-2854.

[16] 程俊,余佩佩,顾华,等.高效液相色谱-二极管阵列/荧光检测器串联法同时测定化妆品中8种性激素[J]. 分析试验室,2016,35(1):112-116.

[17] 宋艺君,郭涛,周晓程.不同产地黄精经不同方法炮制后多糖、5-羟甲基糠醛的含量变化[J]. 中国药房,2017,28(16):2256-2258.

[18] 马福成,马小龙,岳丽君.含黄精药物中5-羟甲基糠醛、糠醛及总黄酮同时测定的反相高效液相色谱方法研究[J]. 国际药学研究杂志,2018,45(6):455-459.

[19] 陈辉,冯珊珊,孙彦君,等.3种药用黄精的化学成分及药理活性研究进展[J]. 中草药,2015,46(15):2329-2338.

[20] 王晶晶,梁娟娟,陈两绵,等.一测多评法结合 UPLC-Q-TOF/MS 评价天舒胶囊中主要苯酚类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(22):86-93.

(收稿日期:2019-02-28 修回日期:2019-05-21)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅