

一测多评法同时测定桔梗中 3 种桔梗皂苷的含量

蒋龄周¹, 龚祖芳² (1.南通市第六人民医院, 江苏 南通 226000; 2.精华制药集团股份有限公司制剂研究所, 江苏 南通 226000)

摘要: 目的 探索一测多评法同时测定桔梗中 3 种桔梗皂苷含量的可行性。方法 采用 HPLC-ELSD 为检测手段, 考察桔梗提取物在不同色谱系统和不同色谱柱上的色谱行为, 确定 3 种待测成分的色谱峰定位方法。以桔梗皂苷 D 为内标, 建立其与桔梗皂苷 D₃、桔梗皂苷 E 的相对校正因子; 通过外标法测定桔梗皂苷 D 的含量, 并由建立的相对校正因子计算出其他 2 种桔梗皂苷的含量; 将计算的结果与外标法测定结果相比较, 以验证“一测多评”法在桔梗质量评价中的可行性。结果 方法重复性和耐用性良好, 在 10 批桔梗药材的含量测定中, 一测多评法计算结果与外标法测定结果无显著差异。结论 一测多评法可用于同时测定桔梗中多种皂苷的含量。

关键词: 桔梗; 一测多评; 桔梗皂苷

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)05-0729-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.05.022

引用本文: 蒋龄周, 龚祖芳. 一测多评法同时测定桔梗中 3 种桔梗皂苷的含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(5): 729-732.

Determination of Three Ingredients in Platycodonis Radix by Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker

JIANG Lingzhou¹, GONG Zufang² (1.The Sixth People's Hospital of Nantong, Nantong 226000, China; 2.Preparation Research Institute, Jinghua Pharmaceutical Group Co., Ltd., Nantong 226000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the feasibility of determination of three ingredients in Platycodonis Radix by quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS). **METHODS** With HPLC-ELSD as its detect method, chromatographic patterns of Platycodonis Radix extract in different chromatography instruments and columns were studied for positioning chromatography peaks of three ingredients. Then platycodin D was used as reference to create RCF with platycodin D₃ and platycodin E, meanwhile, the content of platycodin D was determined by external standard method(ESM) and the contents of platycodin D₃ and platycodin E were calculated by RCF. The results measured by ESM and QAMS were compared to discuss the feasibility of determination of three ingredients in Platycodonis Radix by QAMS. **RESULTS** The method had good repetition and durability, 10 batches of Platycodonis Radix were analyzed and the results showed there was no significant differences between two methods. **CONCLUSION** QAMS can be used to determinate several platycodins in Platycodonis Radix.

KEY WORDS: Platycodonis Radix; quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS); platycodin

一测多评法自 2006 年王智民等^[1]提出来以后得到了广泛认可, 并在中药材和成药制剂的质量评价中得到了广泛应用^[2]。该模式采用样品中一种典型成分(对照品可得、稳定、价格低廉者)为内标, 建立内标与其他待测组分间的相对校正因子(relative correction factor, RCF), 通过 RCF 计算其他待测组分的含量, 达到多组分同步测定的目的。目前该方法已收载于中国药典 2015 年版一部, 用于黄连的含量测定^[3]。

桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq) A.DC.的干燥根, 归肺经, 具有宣肺利咽、祛痰排脓之效。桔梗的化学成分研究始于 20 世纪 40 年代, 迄今已发现 40 余种皂苷类成分^[4]。中国药典关于桔梗药材的质量评价曾采用重量法测总

皂苷含量^[5], 但由于桔梗中的多糖类成分难以完全分离, 该法重复性差, 后来采用 HPLC-ELSD 测定桔梗皂苷 D 含量, 规定桔梗皂苷 D 不得<0.1%作为桔梗质量控制标准^[3]。笔者认为单一指标难以反映桔梗质量优劣, 因此首次以相对稳定且对照品易得的桔梗皂苷 D 为内标, 采用一测多评的方法, 建立桔梗中主要活性成分桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D₃、桔梗皂苷 E 的含量测定方法, 并将该方法与传统外标法测定结果进行比较, 探索一测多评法用于桔梗质量评价的可行性。

1 仪器与试剂

Ultimate 3000 高效液相色谱系统(美国 DineX 公司); ELSD-2000ES 型蒸发光散射检测器(美国 Alltech 公司); Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters

作者简介: 蒋龄周, 男, 副主任中药师 Tel: 13921612815 E-mail: jlz626493@163.com

2424 型蒸发光散射检测器(美国 Waters 公司); Shimadzu LC-20A 高效液相系统(日本岛津公司); ELSD-3300 型蒸发光散射检测器(美国 Alltech 公司); AUW-220D 型电子分析天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司)。

桔梗皂苷 D 对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 111851-201406, 纯度: 98.8%); 桔梗皂苷 D₃(批号: 11707-20130115)、桔梗皂苷 E(批号: 11709-20130219)韩国 B & C Biopharm, 纯度均 >98%; 桔梗药材 10 批, 经南通市药检所中药室龚旭东主任中药师鉴定, 均符合中国药典 2015 年版一部关于桔梗的要求; 乙腈为色谱纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 外标法含量测定^[6-7]

2.1.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱 0~18 min, 15%→20%A, 18~25 min, 20%→25%A, 25~45 min, 25%→28%A, 45~56 min, 28%→32%A, 56~80 min, 32%→90%A; 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 柱温: 30 °C, 进样量: 10 μL。ELSD 检测器; 漂移管温度: 105 °C, N₂ 流速: 3.0 mL·min⁻¹。结果见图 1。

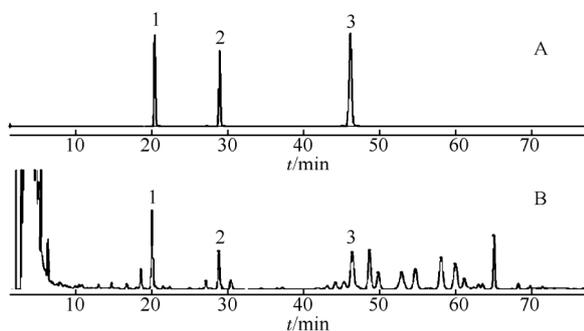


图 1 高效液相色谱图
A-混合对照品; B-供试品; 1-桔梗皂苷 E; 2-桔梗皂苷 D₃; 3-桔梗皂苷 D。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixed reference substances; B-sample; 1-platycodin E; 2-platycodin D₃; 3-platycodin D.

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D₃ 和桔梗皂苷 E 对照品适量, 置 50 mL 棕色量瓶中, 加甲醇制成浓度分别为 158.8, 105.2, 202.7 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取桔梗药材粉末(过二号筛) 2 g, 置锥形瓶中, 加 50% 甲醇 50 mL, 超声提取 0.5 h, 过滤, 反复 3 次, 收集续滤液至蒸发皿中, 浓缩至近干, 残留物加甲醇溶解并定

容至 10 mL。进样前以 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

2.1.4 线性关系考察 精密量取混合对照品溶液 0.1, 0.5, 1, 3, 5 mL, 置 5 mL 棕色量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 制成混合对照品的梯度溶液。精密吸取各梯度溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 以峰面积的常用对数为纵坐标(Y), 各对照品浓度的常用对数为横坐标(X), 绘制标准曲线。将梯度对照品溶液中的低浓度溶液逐步稀释, 按信噪比 S/N=3 和 S/N=10 计算方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)(n=6, RSD 分别为 1.21%和 1.37%), 结果见表 1。

表 1 桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D₃ 和桔梗皂苷 E 的线性关系考察

Tab. 1 Linear relations of platycodin D, platycodin D₃ and platycodin E

对照品	线性范围/ μg·mL ⁻¹	线性方程	r	LOD/ μg·mL ⁻¹	LOQ/ μg·mL ⁻¹
桔梗皂苷 D	3.17~158.80	Y=1.019 2X-0.689 0	0.999 8	0.35	1.05
桔梗皂苷 D ₃	2.10~105.20	Y=1.026 1X-0.624 4	0.999 2	0.63	1.89
桔梗皂苷 E	4.05~202.70	Y=0.977 5X-0.504 8	0.999 0	0.70	2.10

2.1.5 仪器精密度考察 将“2.1.4”项下的混合对照品溶液(1 mL→5 mL)在 1 d 内每 4 h 进样一次, 每次 10 μL, 记录保留时间和峰面积, 考察日内精密度; 同一对照品溶液连续 6 d 每天进样一次, 记录峰保留时间和峰面积, 考察日间精密度。结果表明, 保留时间 RSD 日内<1.0%, 日间<2%, 峰面积 RSD 日内<1.5%, 日间<2.5%, 仪器精密度符合要求。

2.1.6 稳定性考察 取同一份桔梗供试品溶液, 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样, 记录色谱峰面积, 桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D₃ 和桔梗皂苷 E 峰面积的 RSD 分别为 0.91%, 1.02%, 1.44%, 表明供试品溶液中这 3 种桔梗皂苷在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性考察 分别精密称取 6 份同批桔梗药材粉末(过 2 号筛), 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积, 代入回归方程计算含量。6 份供试品溶液中桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D₃ 和桔梗皂苷 E 的平均含量分别为 0.158%, 0.079%, 0.206%, RSD 分别为 2.28%, 3.06%, 1.97%, 表明方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率考察 精密称取“2.1.7”项下

已知含量的同一批桔梗药材粉末共 9 份, 每份 1.0 g, 分成 3 组, 各组分别精密加入高、中、低浓度的桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D₃ 和桔梗皂苷 E 对照品溶液适量, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1.1”项下色谱条件进样分析, 计算加样回收率, 结果见表 2。

表 2 加样回收率考察结果

Tab. 2 Result of recovery tests

组 分	原含量/ μg	加入量/ μg	检出量/ μg	加样回 收率/%	平均加样 回收率/%	RSD/ %
桔梗皂苷 D	1.58	1.26	2.79	98.23	97.60	0.59
		1.58	3.08	97.46		
		1.89	3.37	97.11		
桔梗皂苷 D ₃	0.79	0.63	1.35	95.07	96.55	1.33
		0.79	1.54	96.46		
		0.95	1.69	97.12		
桔梗皂苷 E	2.06	1.65	3.60	97.03	98.21	1.29
		2.05	4.03	98.05		
		2.47	4.51	99.55		

2.2 一测多评法

2.2.1 待测组分色谱峰的定位 在一测多评法的运用中, 能否在不同的色谱体系中对待测组分的色谱峰进行准确定位是关键。目前学者们常用的色谱峰定位方法包括相对保留值法、时间校正法、对照提取物法等^[8-10]。本实验发现在相同的色谱条件下, 3 种皂苷出峰顺序一致, 且以桔梗皂苷 D 为内标, 其他待测组分在不同色谱柱上的相对保留值相近, RSD<5%, 结果见表 3, 因此本实验采用相对保留时间法作为色谱峰定位方法。

表 3 不同色谱体系下 3 种桔梗皂苷的相对保留值测定

Tab. 3 Relative retention value determination of 3 kind of platycodon under different chromatograph system

仪 器	色 谱 柱	相对保留值		
		桔梗皂 苷 E	桔梗皂 苷 D ₃	桔梗皂 苷 D
Ultimate 3000	Agilent TC-C ₁₈	0.425	0.595	1.00
	BOS Hypersil C ₁₈	0.417	0.577	1.00
	Diamonsil C ₁₈	0.406	0.606	1.00
	Hypersil Gold C ₁₈	0.430	0.610	1.00
Waters 2695	Agilent TC-C ₁₈	0.435	0.628	1.00
	BOS Hypersil C ₁₈	0.424	0.601	1.00
	Diamonsil C ₁₈	0.447	0.623	1.00
	Hypersil Gold C ₁₈	0.420	0.634	1.00
Shimadzu LC-20A	Agilent TC-C ₁₈	0.453	0.622	1.00
	BOS Hypersil C ₁₈	0.434	0.589	1.00
	Diamonsil C ₁₈	0.436	0.623	1.00
	Hypersil Gold C ₁₈	0.448	0.617	1.00
	平均值	0.431	0.610	1.00
	RSD/%	3.21	2.82	0

2.2.2 RCF 的计算 以桔梗皂苷 D 为内标, 按公式(1)计算桔梗皂苷 D₃ 和桔梗皂苷 E 的 RCF, 结果见表 4。

$$f_{i/s} = \frac{A_i/C_i}{A_s/C_s} \quad (1)$$

$f_{i/s}$ 为其他组分相对于内标桔梗皂苷 D 的 RCF, A_i 为待测组分的峰面积, A_s 为内标桔梗皂苷 D 的峰面积, C_i 为待测组分的浓度, C_s 为内标桔梗皂苷 D 的浓度。

2.2.3 相对校正因子的重复性考察 考察了混合对照品溶液在 Ultimate 3000、Waters 2695、Shimadzu LC-20A 3 种高效液相系统和 Agilent TC-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), BOS Hypersil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), Diamonsil C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), Hypersil Gold C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 4 种不同品牌色谱柱上 RCF 的变化情况, 结果表明, 桔梗皂苷 D₃ 和桔梗皂苷 E 的 RCF 分别为 1.044, 1.031, RSD<2%, 表明建立的 RCF 在不同的色谱系统以及不同的色谱柱上具有良好的重复性, 结果见表 4。

表 4 RCF 重复性考察结果

Tab. 4 Inspection result of RCF reproducibility

仪 器	色 谱 柱	相对校正因子	
		桔梗皂苷 E	桔梗皂苷 D ₃
Ultimate 3000	Agilent TC-C ₁₈	1.023	1.045
	BOS Hypersil C ₁₈	1.029	1.028
	Diamonsil C ₁₈	1.032	1.035
	Hypersil Gold C ₁₈	1.056	1.017
Waters 2695	Agilent TC-C ₁₈	1.033	1.032
	BOS Hypersil C ₁₈	1.037	1.028
	Diamonsil C ₁₈	1.045	1.037
	Hypersil Gold C ₁₈	1.056	1.029
Shimadzu LC-20A	Agilent TC-C ₁₈	1.067	1.016
	BOS Hypersil C ₁₈	1.064	1.022
	Diamonsil C ₁₈	1.048	1.032
	Hypersil Gold C ₁₈	1.039	1.046
	平均值	1.044	1.031
	RSD/%	1.37	0.92

2.2.4 一测多评法与外标法测定结果比较 为验证一测多评法及建立的校正因子用于桔梗含量测定的准确性, 将一测多评法的结果与传统外标法结果进行比较, 结果显示, 2 种方法测得的含量没有显著性差异, 相对误差<5%。可见建立的校正因子准确可靠, 一测多评法能够用于同时测定桔梗中 3 种桔梗皂苷的含量, 结果见表 5。

表 5 一测多评法与外标法测定 10 批桔梗中 3 种桔梗皂苷含量的结果

Tab. 5 Result of content determination of 3 kinds platycodin in 10 batches Platycodin Radix by QAMS and ESM

编号	桔梗皂苷 D		桔梗皂苷 D ₃		桔梗皂苷 E		
	外标法/mg·g ⁻¹	外标法/mg·g ⁻¹	一测多评法/mg·g ⁻¹	相对误差/%	外标法/mg·g ⁻¹	一测多评法/mg·g ⁻¹	相对误差/%
1	1.582	0.790	0.810	-2.5	2.029	2.063	1.6
2	1.476	0.684	0.698	-2.0	1.958	1.987	1.5
3	1.358	0.679	0.690	-1.6	1.852	1.879	1.4
4	1.802	0.814	0.833	-2.3	2.194	2.225	1.4
5	1.654	0.820	0.841	-2.6	2.082	2.120	1.8
6	1.593	0.808	0.826	-2.2	2.120	2.156	1.7
7	1.564	0.733	0.749	-2.2	1.907	1.938	1.6
8	1.732	0.804	0.820	-2.0	2.086	2.121	1.7
9	1.540	0.729	0.745	-2.2	1.982	2.016	1.7
10	1.329	0.658	0.671	-2.0	1.899	1.933	1.8

3 讨论

3.1 方法优势

桔梗成分多样, 作用机制和作用靶点尚未完全明了, 建立一套科学的、全方位的质量评价标准一直是桔梗研究中的难点。由于对照品短缺、多组分同时测定成本高昂等原因, 桔梗的质量评价停留在以单一组分作为评价指标的模式。本实验采用一测多评法, 以桔梗皂苷 D 为内标, 实现 3 种桔梗皂苷同时测定, 为全面评价桔梗药材的质量提供技术参考。

3.2 检测指标的选择及内标的确定

药理研究表明, 桔梗皂苷是中药桔梗中的主要有效成分, 目前已发现的皂苷成分多达 40 余种, 要准确测定各种皂苷含量几乎不可能。本实验选取含量较高的桔梗皂苷 D、桔梗皂苷 D₃ 和桔梗皂苷 E 作为评价指标, 对桔梗的质量进行评价。其中桔梗皂苷 D 对照品在国内市场可得, 且从色谱图上可以看出, 在桔梗皂苷 D 的保留时间处出峰较多, 若采用其他组分作为内标, 将难以对桔梗皂苷 D 的色谱峰准确定位。因此将桔梗皂苷 D 作为内标, 既能保障对照品的供应, 又能对其准确定位。

3.3 色谱条件的优化

桔梗皂苷无强的发色基团, 紫外响应低, 且检测波长(210 nm)接近末端吸收, 干扰较大, 因此本实验采用通用的蒸发光散射检测器对各指标进行定量分析。参考文献[6-7], 采用乙腈-0.1%磷酸作为流动相, 对供试品进行梯度洗脱, 并优化了洗脱程序, 使待测组分达到基线分离。考察了 Agilent TC-C₁₈, BOS Hypersil C₁₈, Diamonsil C₁₈, Hypersil Gold C₁₈, Promosil C₁₈ 和 Wondasil C₁₈ 6 种不同的色谱柱, 结果显示, Agilent TC-C₁₈, BOS Hypersil C₁₈, Diamonsil C₁₈, Hypersil Gold C₁₈ 分离效果较好, 使较难分离的桔梗皂苷 D 与相邻峰

的分离度达到基线分离, 桔梗皂苷 D₃ 和桔梗皂苷 E 与相邻峰的分离度>1.5。因此选择这 4 种色谱柱作为样品分离柱, 进行一测多评重复性的考察。

REFERENCES

- [1] WANG Z M, GAO H M, FU X T, et al. Multi-components quantitation by one marker new method for quality evaluation of Chinese herbal medicine [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2006, 31(23): 1925-1928.
- [2] YI R Z, WANG J Y, BAO Y R, et al. Quantitative analysis of multi-components of Shanlvcha Jiangya capsules by combining HPLC fingerprint with QAMS method [J]. Chin J New Drug(中国新药杂志), 2015, 24(15): 1786-1790.
- [3] 中国药典.一部. [S]. 2015: 1127.
- [4] GUO W J. Studies on constituents and quality control of saponins in *Platycodon grandiflorum* A. DC [D]. Peking Union Medical College, 2009.
- [5] LI W T, ZHU M, MA L K, et al. Fingerprint analysis of *Platycodonis Radix* by HPLC-ELSD [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2011, 17(22): 50-53.
- [6] YE J, XIAO M T, TANG X C, et al. HPLC-ELSD for determining of the content of three platycodins in Radix Platycodin [J]. J Xi'an Jiaotong Univ(西安交通大学学报), 2010, 31(5): 640-643.
- [7] LIN S X, ZHANG Q H, XI P Y, et al. Determination of six ingredients in *Gardenia jainioides* fruits with quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2015, 38(3): 531-535.
- [8] LI C F, WANG X Q, WANG S W, et al. Simultaneous quantitative analysis of four phenylethanoid glycosides in *Orobancha cernua* Loeffling by multi-components with single marker [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(10): 1231-1235.
- [9] ZHANG S R, WU T, WEI S, et al. Study of QAMS with forsythin as the internal reference substance for quality evaluation in Shanxi Forsythiae Fructus [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(3): 304-308.
- [10] JIANG M F, HU X R, LIN R C, et al. Methodology study of multi-component quantitative analysis of Sanhuang tablets by single marker [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2015, 35(12): 2148-2157.

收稿日期: 2016-06-11

(本文责编: 曹粤锋)