

基于一测多评法测定类叶牡丹中6种皂苷类成分

郭玉岩¹, 吕邵娃¹, 孟涛¹, 李国玉², 高宏伟¹, 王秋红¹, 匡海学^{1*}

1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 哈尔滨商业大学, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: 目的 建立一测多评法(QAMS)测定类叶牡丹 *Caulophyllum robustum* 中 cauloside G、cauloside H、leonticin D、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C 的量。方法 以类叶牡丹皂苷成分 cauloside G 为内参物, 计算该成分与 cauloside H、leonticin D、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C 的相对校正因子, 并用获得的相对校正因子计算指标性皂苷的量, 实现 QAMS。同时用外标法测定药材中 6 种成分的量, 考察 QAMS 的可行性。结果 相对校正因子的重现性良好, 8 个产地的 17 批药材的 QAMS 计算值与外标法实测值没有显著性差异。结论 在对照品缺乏的情况下, QAMS 可用于类叶牡丹药材的质量评价, 方法准确、可靠。

关键词: 一测多评法; 相对校正因子; 类叶牡丹; cauloside G; cauloside H; leonticin D; cauloside D; cauloside B; cauloside C; 高效液相色谱

中图分类号: R286.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)08-1661-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.027

Determination of six saponins in *Caulophyllum robustum* by QAMS

GUO Yu-yan¹, LV Shao-wa¹, MENG Tao¹, LI Guo-yu², GAO Hong-wei¹, WANG Qiu-hong¹, KUANG Hai-xue¹

1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Harbin Medical University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To establish a method of quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) for simultaneous determining six saponins in *Caulophyllum robustum*. **Methods** Cauloside G was used as the internal reference standard; The relative correction factors of cauloside H, leonticin D, cauloside D, cauloside B, and cauloside C in *C. robustum* were calculated. To achieve the QAMS, the contents of indicative saponins were calculated by relative correction factors. At the same time, the external standard method was used to detect the contents of six kinds of ingredients in medicinal materials, and feasibility of QAMS was verified. **Results** The relative correction factor had good reproducibility, there were no significant differences among the calculated values of multi-evaluation and measured values of the external standard method. **Conclusion** In the absence of reference substance situation, QAMS can be used for the quality evaluation of *C. robustum*, and the method is accurate and reliable.

Key words: QAMS; relative correction factor; *Caulophyllum robustum* Maxim.; cauloside G; cauloside H; leonticin D; cauloside D; cauloside B; cauloside C; HPLC

类叶牡丹为小檗科红毛七属植物类叶牡丹 *Caulophyllum robustum* Maxim. 的根状茎及根, 具有祛风通络、活血调经、理气止痛等功效, 民间主要用于风湿、类风湿、胃腹疼痛、跌打损伤等证的治疗^[1-2]。课题组前期采用树脂分离技术, 分离获得的皂苷类成分被证明为对类风湿性关节炎有治疗作

用的活性部位群^[3], 为此, 对皂苷类成分进行质量控制, 是评价类叶牡丹药材及其制剂的质量的关键。目前, 对同属植物蓝籽牡丹的多个成分测定的研究已有报道^[4], 但还没有关于类叶牡丹药材的质量控制的统一标准。多指标质控模式虽然能够更好地控制药材质量, 但其需要对照品的种类和数量均较多,

收稿日期: 2017-01-06

基金项目: 国家“十二五”重大新药创制项目(2013ZX09102019); 国家自然科学基金资助项目(2013ZX09102019); 黑龙江省自然科学基金资助项目(H201304); 黑龙江省教育厅创新人才支持计划(051591)

作者简介: 郭玉岩(1982—), 博士, 副教授, 从事中药新药开发研究。Tel: 13845046561 E-mail: guoyuyan622@163.com

*通信作者 匡海学, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为中药及复方的药效物质基础研究及中药性味研究。

Tel: (0451)82193001 E-mail: hxkuang56@163.com

可实现性差^[5]。基于只测定 1 个成分而实现对多个目标成分进行同步监控的一测多评法 (QAMS)^[6] 为中药材及其制剂的质量评价提供了一个新思路。本实验采用 HPLC-ELSD 法建立了 6 种皂苷类成分的质量控制, 以主要代表性皂苷类成分 cauloside G 为内参物, 建立其与其他皂苷类成分 cauloside H、leonticin D、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C 的相对校正因子, 同时测定类叶牡丹药材中 6 种成分的量, 以期为类叶牡丹药材的质量控制和评价提供依据。

1 仪器与试药

Waters 2695 高效液相色谱系统, Alltech ELSD 2000 检测器; Waters 1525 高效液相色谱系统, Alltech ELSD 3300 检测器; 戴安 U3000 高效液相系统, Alltech ELSD 2000 检测器; 梅特勒 AB265-S 天平 (Mettler-Toledo Group); R-210 型旋转蒸发器 (BuCHI); 乙腈 (色谱纯, DikmaPure); 水 (超纯水); 甲酸 (天津市致远化学试剂有限公司)。对照品 cauloside H、leonticin D、cauloside G、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C (均为自制, 质量分数 > 98%); 样品购自黑龙江、河北、湖北、贵州、安徽、广西、山西、四川, 植物标本由黑龙江中医药大学王振月教授鉴定为类叶牡丹 *Caulophyllum robustum* Maxim., 样本保存在黑龙江中医药大学药学院。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 对照品溶液的制备 取 cauloside H、leonticin D、cauloside G、cauloside D、cauloside B、cauloside C 对照品适量, 精密称定, 加甲醇配制成质量浓度分别为 0.403、0.587、1.692、0.550、0.570、0.520 mg/mL 的混合对照品溶液作为储备液, 于 4 °C 保存备用, 对照品色谱图见图 1。

2.1.2 供试品溶液的制备 取样品约 2 g, 精密称定, 置锥形瓶中, 加入甲醇 50 mL, 回流提取 1 h, 放冷, 补足减失, 滤过, 取滤液 1 mL 置 5 mL 量瓶中, 甲醇定容, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 作为供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 色谱柱为 Acclaim 120 C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3 μm); 流动相为乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱, 0~7 min, 10% A; 7~7.1 min, 10%~25% A; 7.1~14 min, 25% A; 14~32 min, 25%~50% A; 32~40 min, 50%~70% A;

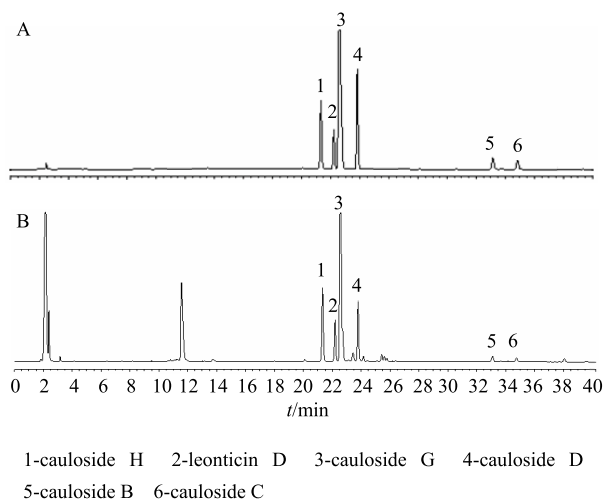


图 1 混合对照品 (A) 和类叶牡丹供试品 (B) HPLC-ELSD 图
Fig. 1 HPLC-ELSD of mixed control solution (A) and *C. robustum* testing solution (B)

体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 检测器蒸发光散射检测器 (ELSD); 漂移管温度: 100 °C; 载气体积流量 2.6 L/min; 进样量 10 μL。混合对照品、类叶牡丹供试品溶液色谱图见图 1。

2.1.4 线性关系考察 精密量取“2.1.1”项下混合对照品储备液, 分别稀释 1、2、4、8、13 倍, 配制系列质量浓度的混合对照品溶液, 分别取 10 μL 在上述色谱条件下进样分析。以对照品质量浓度的自然对数为横坐标 (X), 峰面积的自然对数为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线并进行回归计算。结果表明, 混合对照品各组分在一定范围内线性关系良好, 见表 1。

表 1 类叶牡丹中 6 种皂苷的线性方程及范围

Table 1 Linear and ranges of six saponins in *C. robustum*

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/μg
cauloside H	$Y=2.2098X+0.7415$	0.9998	31~403
leonticin D	$Y=1.9368X+0.7661$	0.9997	45~587
cauloside G	$Y=2.0903X+0.3624$	0.9990	130~1692
cauloside D	$Y=2.1184X+0.8133$	0.9997	42~550
cauloside B	$Y=1.9731X+0.2996$	0.9995	44~570
cauloside C	$Y=2.0247X+0.2398$	0.9994	40~520

2.1.5 精密度试验 取混合对照品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件重复进样 6 次, 记录 cauloside H、leonticin D、cauloside G、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C 的峰面积, 其峰面积的 RSD 分别为 1.53%、2.06%、1.84%、1.60%、1.97%、1.98%。

2.1.6 稳定性试验 取供试品溶液于室温下放置, 分别于 0、2、4、6、12、24 h 按“2.1.3”项下色谱条

件测定,记录 cauloside H、leonticin D、cauloside G、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C 的峰面积,其峰面积的 RSD 分别为 1.55%、1.82%、1.42%、1.69%、1.98%、1.92%。

2.1.7 重复性试验 取同一样品制备供试品溶液 6 份,按“2.1.3”项下色谱条件测定,测得 cauloside H、leonticin D、cauloside G、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C 的平均质量分数依次为 1.48%、1.18%、6.93%、2.36%、0.87%、0.58%; RSD 分别为 1.96%、1.67%、1.66%、1.940%、1.75%、1.59%、1.98%。

2.1.8 加样回收率试验 取已测定的类叶牡丹细粉共 6 份,精密称定,分别按样品-对照品量 1:1 的比例加入一定量混合对照品溶液,按供试品溶液制备方法制备样品进行测定,分别计算各皂苷成分 cauloside H、leonticin D、cauloside G、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C 的回收率及 RSD。结果显示各组分的平均回收率分别为 96.85%、97.78%、

96.08%、101.26%、99.25%、97.52%; RSD 分别为 1.72%、1.86%、1.74%、1.46%、1.99%、1.94%。实验结果表明,该方法准确、可靠。

2.2 相对校正因子计算^[6-9]

在上述色谱条件下,精密吸取“2.1.1”项下的混合对照品溶液,分别测定进样量为 1、2、4、8、10、20、30、40 μL 时各成分的峰面积,按公式计算。

$$f_{k/m}=f_k/f_m=(W_k\times A_m)/(W_m\times A_k)$$

$f_{k/m}$ 为内参物 k 对组分 m 的校正因子, A_k 为内参物峰面积, W_k 为内参物的质量或质量浓度, A_m 为其他组分 m 的峰面积; W_m 为其他组分 m 的质量或质量浓度

由于本实验采用的是蒸发光检测器,峰面积和进样质量浓度不呈线性,分别取自然对数后成线性,所以校正因子计算公式中峰面积和质量浓度分别取自然对数。以 cauloside G 为内参物,分别计算其对 cauloside H、leonticin D、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C 的相对校正因子,结果见表 2。

表 2 类叶牡丹药材中 6 个皂苷成分的相对校正因子

Table 2 Relative correction factor of six saponins in *C. robustum*

进样体积/ μL	相对校正因子				
	$f_{\text{cauloside G/cauloside H}}$	$f_{\text{cauloside G/leonticin D}}$	$f_{\text{cauloside G/cauloside D}}$	$f_{\text{cauloside G/cauloside B}}$	$f_{\text{cauloside G/cauloside C}}$
1	1.116	0.991	1.076	0.950	0.972
2	1.115	0.977	1.078	0.949	0.959
4	1.108	0.977	1.063	0.948	0.964
8	1.088	0.956	1.045	0.932	0.962
10	1.094	0.967	1.056	0.952	0.967
20	1.105	0.981	1.061	0.956	0.965
30	1.124	0.969	1.067	0.937	0.972
40	1.108	0.982	1.068	0.958	0.953
平均值	1.104	0.972	1.060	0.947	0.964
RSD/%	1.14	1.02	0.80	1.11	0.65

2.3 相对校正因子重现性考察^[4,5,10]

精密吸取“2.1.1”项下的混合对照品溶液 10 μL ,在上述色谱条件下,考察不同实验的 Waters 2695、Waters 1525 和戴安 U3000 3 种高效液相色谱系统和 Acclaim 120 C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm), Diamonsil C₁₈ (2) (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm) 和 Venusil ASB C₁₈ (150 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm) 3 种色谱柱对相对校正因子的影响。按“2.2”项下计算类叶牡丹中皂苷类成分 cauloside G 对 cauloside H、leonticin D、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C 的相对校正因子。结果

RSD 均小于 2%,重现性良好,见表 3。

2.4 待测组分数谱峰的定位

精密吸取“2.1.1”项下的混合对照品溶液 10 μL ,在上述色谱条件下,考察待测组分与内参物在不同色谱柱和色谱仪上相对保留时间差及相对保留时间比值的变化情况,结果表明相对保留时间比值波动较小,保留时间差波动较大,因此采用相对保留时间比值作为色谱峰定位依据,见表 4。

2.5 QAMS 与外标法结果比较研究

取不同产地类叶牡丹药材 17 批次,按“2.1.2”

表 3 不同色谱仪、色谱柱测定类叶牡丹药材中 6 种皂苷的相对校正因子

Table 3 Relative correction factor of six saponins in *C. robustum* measured by different chromatographs and columns

仪器	色谱柱	相对校正因子				
		$f_{\text{cauloside G/cauloside H}}$	$f_{\text{cauloside G/leonticin D}}$	$f_{\text{cauloside G/cauloside D}}$	$f_{\text{cauloside G/cauloside B}}$	$f_{\text{cauloside G/cauloside C}}$
Waters 2695	Acclaim 120 C ₁₈	1.119	0.985	1.064	0.946	1.098
	Venusil ASB C ₁₈	1.107	0.956	1.013	0.921	1.073
	Diamonsil C ₁₈ (2)	1.093	0.949	1.026	0.904	1.052
Waters 1525	Acclaim 120 C ₁₈	1.112	0.979	1.037	0.942	1.085
	Venusil ASB C ₁₈	1.107	0.950	1.021	0.936	1.068
	Diamonsil C ₁₈ (2)	1.082	0.946	1.024	0.919	1.055
戴安 U3000	Acclaim 120 C ₁₈	1.111	0.981	1.067	0.941	1.095
	Venusil ASB C ₁₈	1.098	0.957	1.012	0.933	1.076
	Diamonsil C ₁₈ (2)	1.105	0.949	1.029	0.909	1.051
平均值		1.103	0.960	1.032	0.930	1.072
RSD/%		1.120	1.650	1.860	1.420	1.590

表 4 不同色谱仪、色谱柱条件下待测成分的相对保留时间

Table 4 Relative retention time of components measured by different chromatographs and chromatographic conditions

仪器	色谱柱	相对保留时间				
		$t_{\text{R cauloside G/cauloside H}}$	$t_{\text{R cauloside G/leonticin D}}$	$t_{\text{R cauloside G/cauloside D}}$	$t_{\text{R cauloside G/cauloside B}}$	$t_{\text{R cauloside G/cauloside C}}$
Waters 2695	Acclaim 120 C ₁₈	1.125	1.049	1.156	1.710	1.793
	Venusil ASB C ₁₈	1.102	1.023	1.149	1.694	1.786
	Diamonsil C ₁₈ (2)	1.086	1.017	1.140	1.687	1.764
Waters 1525	Acclaim 120 C ₁₈	1.113	1.018	1.145	1.701	1.787
	Venusil ASB C ₁₈	1.078	1.011	1.141	1.689	1.761
	Diamonsil C ₁₈ (2)	1.069	1.003	1.108	1.651	1.755
戴安 U3000	Acclaim 120 C ₁₈	1.123	1.038	1.157	1.688	1.798
	Venusil ASB C ₁₈	1.101	1.021	1.146	1.695	1.776
	Diamonsil C ₁₈ (2)	1.088	1.019	1.146	1.657	1.765
平均值		1.095	1.018	1.141	1.680	1.774
RSD/%		1.900	1.150	1.470	1.200	0.930

项下操作,制成供试品溶液,采用外标法和 QAMS 分别测定、计算类叶牡丹药材中各成分的质量分数。由于测定各成分的相对校正因子均接近于 1, QAMS 计算时以内参物 cauloside G 对照品峰面积为对照^[11],内参物与待测成分峰面积分别取对数后,计算类叶牡丹中各指标性成分的量,结果显示 QAMS 与外标法实测值无显著性差异, RSD 均 < 2%,表明所建立的 QAMS 准确、稳定。见表 5。

3 讨论

笔者曾对比 HPLC-UV 与 HPLC-ELSD 2 种检测手段,测定类叶牡丹 6 种皂苷的量,结果采用 HPLC-UV 检测体系时,指标性成分干扰较大,准确度低; ELSD 检测器是质量型检测器,不受外部环境干扰,试剂在检测器中全部蒸发,不干扰测定^[12]。通过实验摸索,采用 HPLC-ELSD 检测类

叶牡丹中的皂苷类成分方法准确、可靠。

类叶牡丹所含皂苷均为五环三萜类皂苷,其基本母核结构相近,这为开展类叶牡丹一测多评研究提供了先决条件;本实验以类叶牡丹皂苷成分中含量高、获得性强的 cauloside G 为内参物,建立其与其他皂苷成分 cauloside H、leonticin D、cauloside D、cauloside B 和 cauloside C 的相关性,方法学研究表明,在不同色谱条件下各相对校正因子及相对保留时间偏差较小, RSD 均小于 2%,具有良好的重复性和可行性;由于测定各成分的相对校正因子均接近于 1,参照《中国药典》2015 年版黄连的测定方法,以内参物 cauloside G 对照品峰面积为对照,同时取对数后,进行一测多评测定,结果药材测定结果与外标法相比无显著性差异,表明所建立的 QAMS 可以用于类叶牡丹药材的质量评价。

表 5 QAMS 与外标法测定不同产地 17 批类叶牡丹药材中 6 种皂苷类成分的量

Table 5 Content of six saponins of 10 batches of *C. robustum* in different origins measured by QAMS combined with external standard method

产地	批号	cauloside G/(mg·g ⁻¹)		cauloside H/(mg·g ⁻¹)		leonticin D/(mg·g ⁻¹)		cauloside D/(mg·g ⁻¹)		cauloside B/(mg·g ⁻¹)		cauloside C/(mg·g ⁻¹)	
		外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS
黑龙江	20150801	69.30	11.60	11.44	11.81	11.66	23.82	23.41	8.74	8.63	6.37	6.27	
	20150802	71.13	12.04	11.96	12.04	11.89	23.87	23.51	8.79	8.65	6.39	6.30	
	20150803	71.04	12.01	11.85	11.95	11.78	23.57	23.25	8.78	8.63	7.04	6.96	
	20150804	68.48	11.19	11.41	12.12	12.27	23.70	23.93	8.45	8.61	7.08	7.21	
	20150805	67.04	11.02	10.90	11.90	11.73	23.71	23.41	8.66	8.56	6.89	6.79	
河北	20150901	0.80	11.99	11.85	11.97	11.80	23.73	23.36	8.44	8.35	6.13	6.04	
	20150902	68.12	12.00	11.90	11.66	11.56	22.58	22.40	8.34	8.26	5.69	5.63	
	20150903	69.63	11.21	11.19	11.92	11.80	22.20	22.62	8.43	8.33	5.81	5.75	
	20150904	66.92	11.00	10.88	11.61	11.54	22.37	22.16	8.34	8.19	6.03	5.94	
	20150905	64.86	10.80	10.68	11.30	11.18	23.23	22.93	8.21	8.07	6.39	6.32	
湖北	20150601	80.98	13.55	13.39	13.78	13.95	27.72	27.26	10.23	10.06	12.99	12.82	
	20150602	97.57	16.41	16.15	16.62	16.44	33.14	33.62	12.17	12.39	12.91	12.72	
贵州	20151001	100.18	16.77	16.58	17.06	16.87	34.16	33.72	12.70	12.45	6.55	6.64	
安徽	20151002	87.85	14.93	14.52	14.91	15.11	30.05	29.60	11.05	10.92	5.66	5.59	
广西	20151003	91.89	15.72	15.54	15.65	15.47	31.47	30.95	11.48	11.68	9.50	9.36	
山西	20151004	69.30	11.60	11.44	11.81	11.66	23.82	23.41	8.74	8.63	6.37	6.27	
四川	20151005	71.13	12.04	11.96	12.04	11.89	23.87	23.51	8.79	8.65	6.39	6.30	

本实验收集了 8 个不同产地的 17 批类叶牡丹药材进行定量测定, 测定结果表明, 不同产地药材中所含的指标性皂苷类成分差异较大, 其中以安徽、广西、四川 3 省的质量较优。为此, 为保证类叶牡丹药材的质量稳定性, 有必要建立规范化的种植模式, 以期为后续的制剂的质量稳定提供保障。

参考文献

- [1] 李国玉, 徐娜, 刘晓燕, 等. 类叶牡丹化学成分的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(10): 1431-1436.
- [2] Lü Q, Wang G, Li, G, *et al.* The treatment of rheumatoid arthritis using Chinese medicinal plants: From pharmacology to potential molecular mechanisms [J]. *J Ethnopharm*, 2015(176): 177-206.
- [3] 李国玉. 类叶牡丹抗风湿有效部位的化学成分研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2014.
- [4] Bharathi A, Wang Y H, Chidananda S R. Analytical methods for determination of magnoflorine and saponins from roots of *Caulophyllum robustum* (L.) Michx. using UPLC, HPLC and HPTLC [J]. *J Pharm Biom Anal*, 2011, 56: 895-903.
- [5] 梅国荣, 刘飞, 王福, 等. 一测多评法测定决明子中橙黄决明素、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1392-1396.
- [6] 蓝天凤, 王晓, 王岱杰, 等. 一测多评法测定丹参中 4 种丹参酮类成分 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2420-2423.
- [7] 王丹, 张晶, 赵晓宏. 一测多评法测定银杏叶提取物中总黄酮醇苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 58-62.
- [8] 郭盛, 段金彪, 朱邵晴, 等. 基于一测多评法的大枣药材三萜酸类化学成分检测分析方法的建立 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3884-3889.
- [9] 范玲, 严冬, 李爽, 等. 一测多评法测定虎杖中虎杖苷、白藜芦醇、大黄素及大黄素甲醚的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 103-107.
- [10] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 等. “一测多评法”中药质量评价模式方法学研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23): 1925-1928.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [12] 吴笑如, 徐德生, 冯怡, 等. HPLC-ELSD 测定川麦冬须根大孔树脂富集物中麦冬皂苷 D、D' 的含量 [J]. 中成药, 2006, 28(11): 1638-1640.