

◆ 中药民族药 ◆

一测多评法测定壮药三加皮中 5 个酚酸类成分的含量^{*}郭勇秀¹, 蒋林^{1,2**}, 农毅清³, 李芳婵¹, 随家宁¹, 魏博伟¹

(1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530001; 2. 广西中医药大学壮瑶药工程技术中心, 广西南宁 530001; 3. 广西-东盟食品药品安全检验检测中心, 广西南宁 530001)

摘要:为建立一种可同时测定三加皮中 5 种酚酸类成分(新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C)含量的一测多评法(QAMS),以绿原酸为内参物,采用色谱柱 phenomenex C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μL),以乙腈(C)-0.2%磷酸(A)为流动相进行梯度洗脱,流速 1.0 mL/min,柱温 30℃,检测波长 325 nm。建立新绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 与内参物绿原酸的相对校正因子,计算待测成分的含量,与外标法(ESM)测定的结果比较,评价 QAMS 的可行性与准确性。结果显示,所建立的三加皮中新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的相对校正因子重现性良好;10 个产地的三加皮中 5 种成分 QAMS 计算值与 ESM 实测值比较无显著差异。本研究建立的一测多评法(QAMS)可应用于三加皮中 5 种酚酸类成分含量测定。

关键词:三加皮 酚酸类 一测多评法 外标法 相对校正因子

中图分类号:R284 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2021)04-0416-07

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20211119.002

0 引言

三加皮是五加科植物白筋(*Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr.)的干燥根,又名蹦乐、刺三甲、刺三加、白筋、鹅掌筋、苦刺、三叶五加等。在《本草纲目》《神农本草经》《广西植物名录》《广西中药资源名

录》中均有记载,被收录在《广西壮族自治区壮药质量标准(第一卷)》,是广西特色的民间常用药用植物,其根皮可入药,其嫩叶常作为蔬菜食用。三加皮味苦,辛,凉,主要含有酚酸类、黄酮类、多糖、皂苷等成分。药理作用主要有祛风利湿、舒筋活血、清热解毒^[1],抗炎镇痛、抗疲劳、抗氧化、免疫调节、抗菌等^[2-6]。

收稿日期:2020-05-29

^{*} 广西重点研发计划项目(桂科 AB1850022),南宁市重点研发计划项目(20193117),广西高校中药提取纯化与质量分析重点实验室项目(桂教科研[2014]6号),广西高校中药制剂共性技术研发重点实验室项目(ZJGX2016006, ZJGX201502001),广西壮瑶药工程技术研究中心项目(KJT1900107)和广西中医药大学 2019 年研究生教育创新计划项目立项课题(YCSY20190037)资助。

【作者简介】

郭勇秀(1996-),女,在读硕士研究生,主要从事药品及保健食品的新产品研发。

【**通信作者】

蒋林(1965-),男,教授级高级工程师,主要从事药品及保健食品的新产品研发,E-mail:1009100482@qq.com。

【引用本文】

郭勇秀,蒋林,农毅清,等.一测多评法测定壮药三加皮中 5 个酚酸类成分的含量[J].广西科学,2021,28(4):416-422.

GUO Y X,JIANG L,NONG Y Q,et al. Determination of 5 Phenolic Acid Components in Zhuang Medicine *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. Based on Quantitative Analysis of Multi-component with Single-marker [J]. Guangxi Sciences, 2021, 28(4): 416-422.

三加皮的食用部分一直备受关注,近年来学者们对其食用部位研究出多种保健品,有柠檬薊菜茶、陈皮薊菜茶、燕麦薊菜茶、皇竹草和薊菜减茶、薊菜泡腾固体饮料、薊菜保健饼干、薊菜保健颗粒、薊菜保健硬糖等^[7-14],但对药用根部研究甚少,有学者对其根部总黄酮进行研究^[15],对根部酚酸类成分研究报道较少,未见建立根部相关的质量标准,难以对三加皮的质量进行控制,给临床用药及资源利用带来较大的困难。可见对三加皮根部进行研究,为后续建立其质量标准提供研究基础及临床用药参考是很有必要的,也为开发利用三加皮药用资源提供参考依据。

前期课题组对其质量标志物的分析发现,三加皮中所含的丰富的酚酸类成分是其活性成分之一,初步推断三加皮中含有新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B 和异绿原酸 C 等成分,此类成分都属于咖啡酰奎宁酸的酚酸类成分。据研究,该类成分有多种药理活性,如有抗炎、抗菌、抗病毒、免疫调节等作用^[16]。在研究中,单一成分难以全面反映三加皮的质量,因此需选择多成分进行质量控制分析。但采用多成分对质量控制时,部分对照品稀缺及使用量大、价格昂贵,导致测定成本增加,而一测多评法可以一种价廉、稳定易得的指标成分为内参物,通过相对校正因子测定其他成分含量,同时测定多种成分并降低实验成本。目前尚未有相关研究建立新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的一测多评方法。因此,本研究拟建立测定多种活性成分含量的一测多评法,比较一测多评法(QAMS)与外标法(ESM)测定的结果,考察 QAMS 的准确性与科学性,为合理评价壮药三加皮药材的质量提供科学依据,同时为进一步研究三加皮酚酸类成分、推广三加皮的药用价值提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

Waters e2695 UV 高效液相色谱系统(美国 Waters 公司),Agilent 1260 高效液相色谱系统(美国 Agilent 科技有限公司),Shimadzu LC-2030 Plus 高效液相色谱系统(日本岛津公司);色谱柱:phenomenex C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μL)及 Inertsil ODS-3 C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μL),Mettler Toledo XS105DU 电子分析天平,KQ5200B 型超声波清洗器

(昆山市超声仪器有限公司),密理博超纯水机(广西南宁市博美生物科技有限公司)。

对照品绿原酸(批号 110753-201817,纯度≥96.8%),购自中国食品药品检定研究院;新绿原酸(批号 DST190124-015,纯度≥98%),异绿原酸 B(批号 DST190226-037,纯度≥99.04%),异绿原酸 A(DST190113-036,纯度≥99.5%),异绿原酸 C(DST190110-038,纯度≥99.47%),均购自成都德思特生物技术有限公司。乙腈、甲醇为色谱纯,其余为分析纯,水为超纯水。

10 批三加皮药材信息见表 1,经广西中医药大学朱意麟高级鉴定师鉴定,均为五加科植物三加皮 *Acanthopanax trifoliatum*(L.)Merr. 的干燥根。

表 1 壮药三加皮样品信息

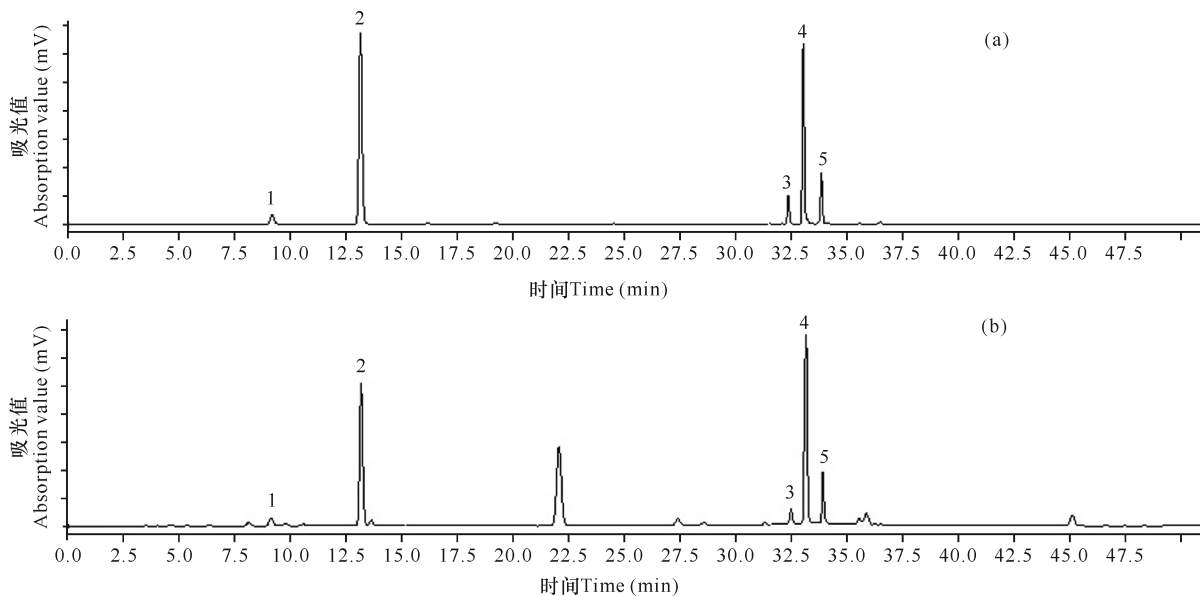
Table 1 Sample information of Zhuang medicine *Acanthopanax trifoliatum*(L.)Merr.

| 样品编号 Sample number | 产地 Place of origin |
|-----------------------|------------------------------|
| S1 | 广西桂林 Guilin, Guangxi |
| S2 | 广西钦州 Qinzhou, Guangxi |
| S3 | 广东揭阳 Jieyang, Guangdong |
| S4 | 广西防城港 Fangchenggang, Guangxi |
| S5 | 广西防城港 Fangchenggang, Guangxi |
| S6 | 四川乐山 Leshan, Sichuan |
| S7 | 广西金秀 Jinxiu, Guangxi |
| S8 | 江西赣州 Ganzhou, Jiangxi |
| S9 | 广西阳朔 Yangshuo, Guangxi |
| S10 | 广东汕头 Shantou, Guangdong |

1.2 方法

1.2.1 HPLC 法色谱条件

色谱柱:phenomenex C₁₈(4.6 mm×250 mm×5 μm);流动相:乙腈(C)-0.2%磷酸溶液(A),梯度洗脱(0-6 min,9.5% C;6-15 min,13% C;15-18 min,14% C;18-20 min,15% C;20-30 min,18% C;30-45 min,30% C;45-50 min,35% C);流速:1 mL/min;检测波长:325 nm;柱温:30℃;进样量:5 μL。以上述色谱条件下三加皮样品及混合对照品的色谱图见图 1。



1. 新绿原酸; 2. 绿原酸; 3. 异绿原酸 B; 4. 异绿原酸 A; 5. 异绿原酸 C

1. neochlorogenic acid; 2. chlorogenic acid; 3. isochlorogenic acid B; 4. isochlorogenic acid A; 5. isochlorogenic acid C

图1 混合对照品(a)和三加皮样品(b)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference (a) and *Acanthopanax trifoliate* sample (b)

1.2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称取新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品适量, 加 50% 甲醇溶解, 分别制成浓度为 1.03, 1.55, 1.16, 1.01, 1.21 mg/mL 的对照品溶液; 另取上述溶液适量, 置于同一量瓶中, 加 50% 甲醇稀释, 制成含新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的浓度分别为 0.019, 0.390, 0.200, 0.033, 0.060 mg/mL 的混合对照品溶液, 备用。

1.2.3 供试品溶液的制备

精密称取三加皮粉末约 0.5 g, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 乙醇 30 mL, 称重, 超声 30

min, 冷却, 补重, 加 50% 乙醇补足缺失重量, 过滤, 取续滤液 15 mL, 挥干, 用 50% 乙醇定容至 5 mL, 摇匀, 离心, 取上清液, 即得。

2 结果与分析

2.1 HPLC 定量方法的建立

2.1.1 线性关系考察

分别精密吸取 1.2.2 节的混合对照品溶液 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20 μ L, 按 1.2.1 节色谱条件进样测定, 记录 5 个成分的峰面积值, 以峰面积 (y) 对应进样质量 x (μ g) 进行回归分析。得各回归方程及线性范围 (表 2)。

表 2 5 种酚酸类成分线性回归方程

Table 2 Linear regression equations of 5 phenolic acids

| 成分 Component | 线性回归方程 Linear regression equation | R^2 | 线性范围 Linear range (mg/mL) |
|------------------------------|---|---------|------------------------------|
| 新绿原酸 Neochlorogenic acid | $y = 4.122 \times 10^6 x_1 - 9.689 \times 10^2$ | 0.999 9 | 0.019 - 0.380 |
| 绿原酸 Chlorogenic acid | $y = 3.400 \times 10^6 x_2 - 1.248 \times 10^5$ | 0.999 7 | 0.390 - 7.800 |
| 异绿原酸 B Isochlorogenic acid B | $y = 3.850 \times 10^6 x_3 + 7.597 \times 10^3$ | 0.999 9 | 0.033 - 0.660 |
| 异绿原酸 A Isochlorogenic acid A | $y = 4.269 \times 10^6 x_4 - 1.008 \times 10^5$ | 0.999 3 | 0.200 - 4.000 |
| 异绿原酸 C Isochlorogenic acid C | $y = 3.729 \times 10^6 x_5 + 2.100 \times 10^4$ | 0.999 7 | 0.060 - 1.200 |

2.1.2 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 5 μ L, 按 1.2.1 节色谱条件连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算得到新绿原

酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 及异绿原酸 C 峰面积的精密度 RSD 值分别为 0.05%、0.07%、0.39%、0.06%、0.75%, 表明仪器精密度良好。

2.1.3 重复性试验

取同一批三加皮供试品粉末, 精密称定, 按照 1.2.3 节的方法平行制备 6 份供试品溶液, 分别精密吸取 5 μL 进样测定, 分别计算新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 及异绿原酸 C 5 个成分平均含量及其 RSD 值, 结果得到新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 及异绿原酸 C 5 个成分平均含量分别为 1.038, 16.320, 1.840, 17.360, 5.519 mg/g, RSD 值分别为 1.1%、2.4%、2.1%、2.4%、2.4%, 表明该方法的重复性良好。

2.1.4 稳定性试验

精密吸取同一份三加皮供试品溶液 5 μL , 分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 进行测定, 分别计算新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A 及异绿原酸 C 5 个成分峰面积值, 计算 RSD 值, 结果分别为 0.90%、0.22%、1.20%、0.39%、1.30%, 表明该供试品在 12 h 内稳定性良好。

2.1.5 加样回收率试验

取同一批已知含量三加皮样品粉末, 精密称定 6 份, 每份约 0.25 g, 分别精密加入一定量的新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品, 按 1.2.3 节方法制备供试品溶液, 分别测定其峰面积, 计算回收率。新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的平均回收率分别为 100%、105%、98%、103%、104%; RSD 值分别为 2.31%、2.24%、1.90%、1.07%、1.43%, 表明该方法的准确度很高。

2.2 相对校正因子的计算

分别精密吸取 1.2.2 节的混合对照品溶液 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20 μL 测定, 以绿原酸为内参物(S), 按照公式(1)计算新绿原酸(a)、异绿原酸 B(b)、异绿原酸 A(c)、异绿原酸 C(d)的相对校正因子, 结果见表 3。

$$f_{i/S} = f_i/f_s = (W_i/A_i)/(W_s/A_s) = (W_i \times A_s)/(W_s \times A_i), \quad (1)$$

其中, A_i 、 A_s 分别为待测成分及内参物的峰面积, W_i 、 W_s 分别为待测成分及内参物的量。

2.3 相对校正因子($f_{i/S}$)的耐用性考察

2.3.1 不同高效液相色谱系统及色谱柱对 $f_{i/S}$ 的影响

精密吸取 1.2.2 节的混合对照品溶液 5 μL 测定, 分别考察 Waters e2695 UV、Agilent 1260 及 Shimadzu LC-2030 Plus 3 种色谱仪和 phenomenex C_{18}

(4.6 mm \times 250 mm, 5 μL) 及 Inertsil ODS-3 C_{18} (4.6 mm \times 250 mm, 5 μL) 2 种色谱柱对相对校正因子的影响, 并计算 RSD 值, 结果均小于 3% (表 4), 表明该法重现性良好。

表 3 壮药三加皮一测多评法测定 5 个酚酸类成分的相对校正因子 $f_{i/S}$

Table 3 Relative correction factors $f_{i/S}$ for the determination of 5 phenolic acids components in Zhuang medicine *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. by QAMS method

| 进样体积 Injection volume (μL) | $f_{a/S}$ | $f_{b/S}$ | $f_{c/S}$ | $f_{d/S}$ |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 0.817 | 0.862 | 0.822 | 0.895 |
| 3 | 0.815 | 0.862 | 0.823 | 0.899 |
| 5 | 0.814 | 0.857 | 0.823 | 0.894 |
| 8 | 0.813 | 0.859 | 0.823 | 0.882 |
| 10 | 0.812 | 0.857 | 0.823 | 0.883 |
| 15 | 0.816 | 0.861 | 0.823 | 0.890 |
| 20 | 0.830 | 0.877 | 0.823 | 0.899 |
| 平均值 Average value | 0.817 | 0.862 | 0.823 | 0.892 |
| RSD (%) | 0.76 | 0.79 | 0.08 | 0.80 |

表 4 不同色谱仪器和色谱柱下测得的相对校正因子 $f_{i/S}$ ($n = 3$)

Table 4 Relative correction factors $f_{i/S}$ ($n = 3$) measured under different chromatographic instruments and columns ($n = 3$)

| 仪器 Instrument | 色谱柱 Chromatographic column | 相对校正因子 Relative correction factor | | | |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | | $f_{a/S}$ | $f_{b/S}$ | $f_{c/S}$ | $f_{d/S}$ |
| Shimadzu LC-2030 Plus | phenomenex C_{18} | 0.816 | 0.862 | 0.801 | 0.896 |
| | Inertsil ODS-3 C_{18} | 0.807 | 0.851 | 0.821 | 0.899 |
| Agilent 1260 | phenomenex C_{18} | 0.814 | 0.870 | 0.835 | 0.925 |
| | Inertsil ODS-3 C_{18} | 0.813 | 0.870 | 0.830 | 0.932 |
| Waters e2695 UV | phenomenex C_{18} | 0.806 | 0.864 | 0.800 | 0.919 |
| | Inertsil ODS-3 C_{18} | 0.809 | 0.860 | 0.824 | 0.922 |
| 平均值 Average value | | 0.811 | 0.863 | 0.819 | 0.915 |
| RSD (%) | | 0.49 | 0.83 | 1.78 | 1.61 |

2.3.2 不同色谱柱柱温对 $f_{i/S}$ 的影响

考察不同柱温 (25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$) 对各 $f_{i/S}$ 的影响。新绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的 RSD 值依次为 0.76%、0.79%、0.08%、0.80% (表 5), 表明柱温波动对各相对校正因子 $f_{i/S}$ 无显著

影响。

表 5 不同柱温对相对校正因子 $f_{i/s}$ 的影响

Table 5 Effects of different column temperatures on relative correction factors $f_{i/s}$

| 柱温 Column temperature (°C) | $f_{a/s}$ | $f_{b/s}$ | $f_{c/s}$ | $f_{d/s}$ |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 25 | 0.812 | 0.854 | 0.820 | 0.896 |
| 30 | 0.814 | 0.858 | 0.824 | 0.895 |
| 35 | 0.812 | 0.856 | 0.823 | 0.886 |
| 平均值 Average value | 0.813 | 0.856 | 0.822 | 0.892 |
| RSD (%) | 0.76 | 0.79 | 0.08 | 0.80 |

2.3.3 不同流速对 $f_{i/s}$ 的影响

考察不同流速(0.6, 0.8, 1.0 mL/min)对各 $f_{i/s}$ 的影响。新绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的 RSD 值依次为 0.76%、0.79%、0.08%、0.80%(表 6), 表明不同流速对各相对校正因子 $f_{i/s}$ 无显著影响。

表 6 不同体积流量对相对校正因子 $f_{i/s}$ 的影响

Table 6 Effects of volume flow rate on relative correction factors $f_{i/s}$

| 流速 Current speed (mL/min) | $f_{a/s}$ | $f_{b/s}$ | $f_{c/s}$ | $f_{d/s}$ |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 0.6 | 0.812 | 0.859 | 0.841 | 0.931 |
| 0.8 | 0.812 | 0.860 | 0.842 | 0.921 |
| 1.0 | 0.799 | 0.852 | 0.841 | 0.898 |
| 平均值 Average value | 0.807 | 0.857 | 0.841 | 0.917 |
| RSD (%) | 0.76 | 0.79 | 0.08 | 0.80 |

2.4 待测成分色谱峰的定位

本研究考察了对不同色谱柱中各待测色谱峰与参照物峰的保留时间差($\Delta t_{i/s}$)及相对保留时间($t_{i/s}$)进行定位, 结果发现 $\Delta t_{i/s}$ 及 $t_{i/s}$ RSD 值均小于 5%, $\Delta t_{i/s}$ 波动较小(表 7, 8), 因此, 采用 $\Delta t_{i/s}$ 对待测组分色谱峰进行定位。

2.5 QAMS 与 ESM 测定结果的比较

取 10 批产地的三加皮样品, 按照 1.2.3 节方法制备样品溶液, 按照 1.2.1 节的色谱条件测定, 记录待测组分峰面积, 分别用 ESM 法与 QAMS 法计算其含量并对结果进行比较, 其相对误差 RE 均小于

3%(表 9), 用统计学计算, 结果表明, $P = 0.0000 < 0.05$, 2 种方法所得值无显著性差异, 由此说明 QAMS 法用于三加皮药材的多种酚酸类成分质量评价研究是可行的。

表 7 不同色谱柱下待测成分的色谱峰定位($\Delta t_{i/s}$ 法, $n = 3$)

Table 7 Chromatographic peak location for the components to be tested under different chromatographic columns ($\Delta t_{i/s}$ method, $n = 3$)

| 仪器 Instrument | 色谱柱 Chromato- graphic column | $f_{a/s}$ | $f_{b/s}$ | $f_{c/s}$ | $f_{d/s}$ |
|---------------------------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Shimadzu LC-2030 Plus | phenomenex C ₁₈ | 3.965 | 19.153 | 19.816 | 20.609 |
| | Inertsil ODS-3 C ₁₈ | 3.991 | 18.482 | 19.218 | 19.854 |
| Agilent 1260 | phenomenex C ₁₈ | 4.088 | 18.977 | 19.636 | 20.406 |
| | Inertsil ODS-3 C ₁₈ | 4.472 | 18.094 | 18.819 | 19.474 |
| Waters e2695 UV | phenomenex C ₁₈ | 4.038 | 19.205 | 19.900 | 20.711 |
| | Inertsil ODS-3 C ₁₈ | 4.113 | 18.523 | 19.270 | 19.918 |
| 平均值 Average val- ue | | 4.111 | 18.739 | 19.443 | 20.162 |
| RSD (%) | | 4.51 | 2.36 | 2.13 | 2.42 |

表 8 不同色谱柱下待测成分的色谱峰定位($t_{i/s}$ 法, $n = 3$)

Table 8 Chromatographic peak location for the components to be tested under different chromatographic columns ($t_{i/s}$ method, $n = 3$)

| 仪器 Instrument | 色谱柱 Chromatographic column | $f_{a/s}$ | $f_{b/s}$ | $f_{c/s}$ | $f_{d/s}$ |
|----------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Shimadzu LC - 2030 Plus | phenomenex C ₁₈ | 0.702 | 2.440 | 2.489 | 2.549 |
| | Inertsil ODS-3 C ₁₈ | 0.724 | 2.277 | 2.328 | 2.371 |
| Agilent 1260 | phenomenex C ₁₈ | 0.705 | 2.370 | 2.418 | 2.473 |
| | Inertsil ODS-3 C ₁₈ | 0.707 | 2.184 | 2.232 | 2.275 |
| Waters e2695 UV | phenomenex C ₁₈ | 0.694 | 2.453 | 2.506 | 2.567 |
| | Inertsil ODS-3 C ₁₈ | 0.716 | 2.278 | 2.330 | 2.375 |
| 平均值 Average value | | 0.708 | 2.334 | 2.384 | 2.435 |
| RSD (%) | | 1.50 | 4.51 | 4.45 | 4.59 |

表 9 QAMS 法与 ESM 法测得 10 批三加皮中 5 种酚酸的含量 ($n = 3$)Table 9 Content of 5 phenolic acids in ten batches of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. by QAMS and ESM ($n = 3$)

| 产地 Place of origin | 绿原酸 Chlorogenic acid | 新绿原酸 Neochlorogenic acid | | | 异绿原酸 B Isochlorogenic acid B | | | 异绿原酸 A Isochlorogenic acid A | | | 异绿原酸 C Isochlorogenic acid C | | |
|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------|--------|---------------------------------|-------|--------|---------------------------------|--------|--------|---------------------------------|--------|--------|
| | | EMS | QAMS | RE (%) | EMS | QAMS | RE (%) | EMS | QAMS | RE (%) | EMS | QAMS | RE (%) |
| S1 | 24.609 | 0.756 | 0.778 | 0.029 | 1.684 | 1.698 | 0.008 | 8.157 | 8.287 | 0.016 | 1.012 | 1.075 | 0.062 |
| S2 | 8.811 | 0.826 | 0.879 | 0.064 | 2.413 | 2.503 | 0.037 | 6.289 | 6.534 | 0.039 | 3.726 | 3.903 | 0.048 |
| S3 | 18.482 | 0.801 | 0.829 | 0.035 | 1.814 | 1.838 | 0.013 | 9.349 | 9.599 | 0.027 | 3.173 | 3.246 | 0.023 |
| S4 | 17.463 | 1.350 | 1.402 | 0.038 | 2.043 | 2.069 | 0.013 | 20.285 | 21.206 | 0.045 | 7.313 | 7.406 | 0.013 |
| S5 | 16.542 | 1.089 | 1.132 | 0.039 | 1.954 | 1.983 | 0.015 | 17.211 | 17.974 | 0.044 | 5.533 | 5.628 | 0.017 |
| S6 | 6.567 | 1.153 | 1.250 | 0.084 | 2.483 | 2.622 | 0.056 | 9.119 | 9.786 | 0.073 | 12.083 | 12.734 | 0.054 |
| S7 | 22.036 | 1.409 | 1.456 | 0.033 | 1.605 | 1.622 | 0.011 | 10.039 | 10.289 | 0.025 | 3.264 | 3.324 | 0.018 |
| S8 | 19.075 | 0.682 | 0.705 | 0.034 | 2.886 | 2.907 | 0.007 | 25.561 | 26.743 | 0.046 | 7.590 | 7.667 | 0.010 |
| S9 | 21.883 | 1.392 | 1.438 | 0.033 | 1.330 | 1.349 | 0.014 | 10.085 | 10.339 | 0.025 | 3.229 | 3.290 | 0.019 |
| S10 | 25.732 | 0.882 | 0.908 | 0.029 | 2.338 | 2.346 | 0.003 | 15.877 | 16.398 | 0.033 | 3.673 | 3.722 | 0.013 |

3 讨论

目前有文献报道三加皮根部总黄酮提取工艺^[15],但对三加皮质量控制研究甚少,因此,本研究采用 HPLC 法,建立一测多评法(QAMS)对三加皮中酚酸类成分含量进行测定。

本研究考察了不同柱温、流速、色谱柱、仪器对所建立的校正因子的影响,结果表明各成分的校正因子重现性良好。QAMS 旨在通过某一参照物峰实现对其他待测色谱峰的准确定位,常规方法通过保留时间差($\Delta t_{i/s}$)或相对保留时间($t_{i/s}$)定位,通过保留时间差或相对保留值等参数不能准确定位时,选用定性用的对照品对待测组分色谱峰进行定位^[17]。本研究应用保留时间差($\Delta t_{i/s}$)或相对保留时间($t_{i/s}$)对各成分的色谱峰进行定位,发现 $\Delta t_{i/s}$ 及 $t_{i/s}$ 在不同仪器和色谱柱中重现性较好,同时结合色谱峰峰型,可准确对目标峰的位置做出判断。研究测定了 10 批三加皮中的 5 个成分,结果显示 QAMS 与 ESM 的统计结果无显著性差异,说明选择绿原酸为内参物,可建立 QAMS 法用于三加皮药材质量控制。

如何有效建立稳定有效的对中药可控质量标准一直是热门探讨话题,中药多成分的复杂性决定了单一成分或指标测定难以评价中药的质量,由此提出多成分质量控制的模式,并可直接对药材进行质量评价。本研究通过一测多评法对多指标成分的测定反应三加皮的质量,酚酸类成分是三加皮主要活性成分之一,但新绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品昂贵,而绿原酸对照品价廉易得,化学性质相对稳定,在 10 批三加皮药材中含量较高,是三加皮的主要活性成分之一,所以选择绿原酸为内参物进

行 QAMS 分析。通过外标法测定绿原酸,用相对校正因子来计算新绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 4 种成分的含量,与外标法测定结果相比较,结果无显著差异,检测方法快速、简便、准确。一测多评法同步测定绿原酸、新绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 5 种成分的含量,符合多成分测定,不仅可全面控制三加皮的质量,解决对照品价格昂贵难获得的问题,降低检测成本,还可为三加皮质量控制提供多成分指标评价模式,对进一步利用三加皮资源及研究其保健作用和药用价值提供科学参考,为后续研究奠定基础。

此外,课题组采用高效液相色谱与 Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用,考察不同产地的三加皮成分,借助赛默飞中药成分高分辨质谱数据库 OTCML 分析,但在 HPLC 法测定其含量时,三加皮样品中有的色谱峰跟实验室的对照品没有对应上,在有关三加皮的研究文献上也没有指认出。本课题组今后会进一步对三加皮活性成分及药理药效进行深入的研究,为三加皮的临床应用进一步提供科学依据。

参考文献

- [1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准:第 1 卷 [M]. 2008 年版,壮汉双语. 南宁:广西科学技术出版社,2017.
- [2] HAMID R A, KEE TH, OTHMAN F. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic activities of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. Leaves [J]. Pharmacognosy Research, 2013, 5(2): 129-133.
- [3] 杨慧文, 张旭红, 陈婉琪, 等. 白藜茎多糖对大、小鼠的抗炎镇痛及抗疲劳作用研究[J]. 中国药房, 2015, 26(31): 4364-4367.

- [4] 李晨悦, 李冬利, 张元, 等. 不同品种筋菜的总多酚含量及抗氧化活性比较[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(10): 125-129.
- [5] 王艳, 石瑛翘, 潘育方, 等. 白筋总黄酮、多糖的体外抑菌作用研究[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(11): 37-39.
- [6] 劳景辉, 潘超美, 喻勤, 等. 白筋提取物抑制痤疮丙酸杆菌及美白活性研究[J]. 中国现代中药, 2016, 18(9): 1120-1124.
- [7] 李劲新. 一种柠檬筋菜茶的制作方法: 201810188958. 6 [P]. 2018-09-28.
- [8] 李雪壮. 一种陈皮筋菜茶的制作方法: 201410726686. 2 [P]. 2015-04-08.
- [9] 冯伟森. 一种燕麦筋菜茶及其制作方法: 201510912889. 5 [P]. 2016-04-06.
- [10] 一种含皇竹草和筋菜的减肥茶: 201610515157. 7 [P]. 2016-10-26.
- [11] 陈泽丰, 何燕, 张焜, 等. 一种筋菜泡腾固体饮料及其制备方法: 201610002061. 0 [P]. 2016-05-25.
- [12] 李冬利, 段庆, 张焜, 等. 一种筋菜保健饼干及其制备方法: 201710058716. 0 [P]. 2017-06-13.
- [13] 李冬利, 张焜, 秦莹, 等. 一种筋菜保健颗粒剂及其制备方法: 201611155520. 5 [P]. 2017-05-24.
- [14] 李冬利, 秦莹, 张焜, 等. 一种筋菜保健硬糖及其制备方法: 201611154252. 5 [P]. 2017-05-10.
- [15] 蔡凌云, 黎云祥, 陈蕉, 等. 白筋根皮总黄酮提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(4): 44-47.
- [16] 朱乃亮, 彭平, 赵丽敏, 等. 植物中常见咖啡酰奎宁酸类化合物研究进展[C]//中华中医药学会中药化学分会. 中华中医药学会中药化学分会第八届学术年会论文集. 北京: 中华中医药学会中药化学分会, 2013: 10.
- [17] 陆兔林, 石上梅, 蔡宝昌, 等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2525-2529.

Determination of 5 Phenolic Acid Components in *Zhuang Medicine Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. Based on Quantitative Analysis of Multi-component with Single-marker

GUO Yongxiu¹, JIANG Lin^{1,2}, NONG Yiqing³, LI Fangchan¹, SUI Jianing¹, WEI Bowei¹

(1. College of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530001, China; 2. Zhuang Yao Medicine Engineering Technology Center of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530001, China; 3. Guangxi Asean Center for Food and Drug Safety Control, Nanning, Guangxi, 530001, China)

Abstract: In order to establish a quantitative analysis method of multi-components by single-marker (QAMS) for simultaneous determination of 5 phenolic acid components (neochlorogenic acid, chlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, and isochlorogenic acid C) in *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr., chlorogenic acid was used as the internal reference Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μL) was used for gradient elution with acetonitrile (C) - 0.2% phosphoric acid (A) as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min, column temperature 30°C, detection wavelength 325 nm. The relative correction factors of chlorogenic acid and neochlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A, and isochlorogenic acid C were established, and the content of the components to be measured was calculated. The feasibility and accuracy of QAMS were evaluated by comparing the results with those measured by external standard method (ESM). The results showed that the established relative correction factors of neochlorogenic acid, chlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C in *A. senticosus* had good reproducibility. There was no significant difference between the calculated values of QAMS and the measured values of ESM for 5 components in *A. trifoliatum* (L.) Merr. from 10 habitats. The QAMS method established in this study can be used to determine the contents of 5 phenolic acids in *A. trifoliatum* (L.) Merr.

Key words: *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr., phenolic acid, QAMS, ESM, relative correction factors

责任编辑: 陆雁