doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.19.022

黄精质量控制方法改进*

程 闯,胡卫南,方倍倩,颜伟华,宋剑锋,黄 华,郑 明△

(浙江省衢州市食品药品检验研究院,浙江 衢州 324000)

摘要:目的 提高黄精的质量控制标准。**方法** 采用超高效液相色谱－四极杆飞行时间串联质谱(UPLC/Q－TOF－MS)法快速分析黄精中的主要化学物质,确定其中具有代表性的蔗糖、果糖、葡萄糖3种糖类成分;建立同时测定3种糖类成分含量的高效液相色谱－示差检测(HPLC－RID)法,色谱柱为Carbosep Coregel－87C(钙型)柱(300 mm×7.8 mm,9 μm),流动相为纯水,流速为0.6 mL/min,柱温为80 ℃,示差检测器光学设备温度为45 ℃,进样量为10 μL。**结果** 黄精样品中蔗糖、葡萄糖、果糖均在15 min内达到基线分离;检测限分别为0.09,0.06,0.06 mg/mL,定量限分别为0.03,0.02,0.02 mg/mL;质量浓度分别在0.024 3～0.486 9 mg/mL,0.012 2～0.243 4 mg/mL,0.029 8～0.595 7 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好(r=1.000,n=5);精密度、重复性、稳定性试验的*RSD*均小于2.0%(n=6);平均回收率分别为98.63%,101.40%,102.81%,*RSD*分别为1.18%,1.39%,1.58%(n=6);27批黄精样品中蔗糖、葡萄糖、果糖含量范围分别为15.57～62.35 mg/g,13.04～43.15 mg/g,184.24～506.95 mg/g。**结论** 该方法操作简单,缩短了分析时间,结果准确,重复性和稳定性均较好,可用于黄精的质量控制。

关键词:黄精;超高效液相色谱－四极杆飞行时间串联质谱法;高效液相色谱－示差检测器法;蔗糖;果糖;葡萄糖;质量控制

中图分类号:R932;R286.0 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)19－0084－04

Improvement of Quality Control Method of Polygonati Rhizoma

CHENG Chuang, HU Weinan, FANG Beiqian, YAN Weihua, SONG Jianfeng, HUANG Hua, ZHENG Ming

(*Quzhou Institute for Food and Drug Control, Quzhou, Zhejiang, China 324000*)

Abstract: Objective To improve the quality control standard of Polygonati Rhizoma. **Methods** The ultra－high－performance liquid chromatography/quadrupole time－of－flight tandem mass spectrometry(UPLC/Q－TOF－MS) method was used to quickly analyze the main chemical substances in Polygonati Rhizoma, and determine the three representative sugar components of sucrose, fructose and glucose. A HPLC－refractive index detector(HPLC－RID) method was established for the simultaneous determination of three sugar components. The chromatographic column was Carbosep Coregel－87C(calcium type) column(300 mm×7.8 mm, 9 μm), the mobile phase was pure water, the flow rate was 0.6 mL/min, the column temperature was 80 ℃, the temperature of optical equipment of RID was 45 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The sucrose, glucose and fructose in Polygonati Rhizoma reached baseline separation within 15 min. The minimum limits of detection(LODs) of sucrose, glucose and fructose were 0.09, 0.06 and 0.06 mg/mL, respectively, and the minimum limits of quantitative(LOQs) of sucrose, glucose and fructose were 0.03, 0.02 and 0.02 mg/mL, respectively. The mass concentration of sucrose, glucose and fructose showed a good linear relationship with peak area in the ranges of 0.024 3－0.486 9 mg/mL, 0.012 2－0.243 4 mg/mL and 0.029 8－0.595 7 mg/mL(r=1.000, n=5), respectively. The *RSD*s of precision, repeatability and stability tests were less than 2.0% (n=6). The average recoveries of sucrose, glucose and fructose were 98.63%, 101.40% and 102.81% with *RSD*s of 1.18%, 1.39% and 1.58% (n=6), respectively. The content of sucrose, glucose and fructose in 27 batches of Polygonati Rhizoma was in the ranges of 15.57－62.35 mg/g, 13.04－43.15 mg/g and 184.24－506.95 mg/g, respectively. **Conclusion** The method is simple, it can shorten the analysis time, and has accurate results, good repeatability and stability, which can be used for the quality control of Polygonati Rhizoma.

Key words: Polygonati Rhizoma; UPLC/Q－TOF－MS; HPLC－RID; sucrose; fructose; glucose; quality control

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 cyrtonema* Hua 的干燥根茎,按形状不同,习称“大黄精”“鸡头黄精”“姜形黄精”,春、秋二季采挖,除去须根,洗净,置沸水中略烫或蒸至透心,干燥。2020年版《中国药典(一部)》记载其功能与主治为补气养阴、健脾、润肺、益肾,用于脾胃气虚、体倦乏力、胃阴不足、口干食少、肺虚燥咳、劳嗽咳血、精血不足、腰膝酸软、须发早白、内热消渴等证。目前,多采用九蒸九晒法炮制,可消除生黄精的部分刺激性及毒副作用,增强疗效。现代药理学研究表明,黄精九蒸九晒后其色、香、味等均有变化,黄精多糖抗应激、雄激素样壮阳作用及免

*基金项目:浙江省衢州市市场监督管理局标准化试点项目[衢市监标准〔2019〕15号];中共衢州市委人才项目质量控制与药理分析科技创新团队[衢委人才〔2020〕3号];浙江省衢州市科学技术局重点实验室项目[衢市科发高〔2015〕8号]。

第一作者:程闯,男,大学本科,工程师,研究方向为药物制剂学,(电话)0570－8358023(电子信箱)86847348@qq.com。

△通信作者:郑明,男,硕士,副主任药师,研究方向为药物分析,(电子信箱)zhengming_nol@126.com。

疫功能、抗贫血作用均有不同程度增强，毒性明显降低[1-2]。近年来，黄精被大量用于治疗新型冠状病毒肺炎、急性肺损伤、肺结核、肺癌等[3-6]，还具有抑菌、抗炎、抗疲劳、增强免疫等多种生物活性[7-9]，但因其成分复杂、极性较大、水溶性强等特点，难以进行定性和定量分析。现行质量标准以无水葡萄糖为对照品，以蒽酮－硫酸为显色剂，采用紫外－可见分光光度法测定黄精多糖的含量[10]。但该方法操作复杂，重复性差。为了更好地控制黄精药材的质量，避免上市流通的质量参差不齐，亟需建立一种简单、准确、快速的质量控制方法。本研究中采用超高效液相色谱－四极杆飞行时间串联质谱（UPLC/Q－TOF－MS）仪快速筛查出其中的 25 种化学成分，选择样品中含量稳定、具有代表性的蔗糖、葡萄糖、果糖 3 种糖类成分，建立了同时测定其含量的高效液相色谱－示差检测器（HPLC－RID）法，以有效控制黄精药材的质量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

SCIEX ExionLC™ 液相系统，SCIEX X500R QTOF 质谱系统（美国 SCIEX 公司）；Agilent1260 型高效液相色谱仪（美国 Agilent 公司），配有 G1322A 型真空脱气机，G1311C 型四元泵，G1329B 型自动进样器，G1316A 型柱温箱，G1362A 型检测器；Mettler XS205 型电子分析天平（梅特勒－托利多公司，精度为 0.000 1 g）；JAC 5020 型超声波清洗器（功率为 500 W，频率为 40 kHz）。

1.2 试药

蔗糖对照品（批号为 111507－201704，含量为 100%），无水葡萄糖对照品（批号为 110833－201707，含量为 99.9%），果糖对照品（批号为 100231－201904，含量为 99.6%），均购自中国食品药品检定研究院；水为纯化水，其他试剂均为分析纯。27 批次黄精饮片由衢州市内 3 家企业提供，根据不同工艺处理方法分别编号为 Ga，Gb，Gc，各 9 批。详见表 1。

表 1 27 批次黄精饮片 3 种工艺处理方法

Tab. 1 Three processing methods of 27 batches of Polygonati Rhizoma decoction pieces

工艺	蒸制温度（℃）	蒸制时间（h）	干燥方式
工艺一（Ga）	120	1	60 ℃烘干
工艺二（Gb）	100	1	60 ℃烘干
工艺三（Gc）	100	1	日光晒制

2 方法与结果

2.1 UPLC/Q－TOF－MS 和 HPLC－RID 条件与分析

2.1.1 UPLC/Q－TOF－MS 条件与分析

色谱条件：色谱柱为 Thermo Scientific C_{18} 柱（100 mm×2.0 mm，1.9 μm）；流动相为 2 mmol/L 乙酸铵－0.1%甲酸水（A）－甲醇（B），梯度洗脱（程序见表 2）；流速为 0.2 mL/min；进样量为 2 μL。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Tab. 2 Gradient elution program of the mobile phase

时间（min）	流动相 B（%）		时间（min）	流动相 B（%）	
	a	b		a	b
0～0.5	20	20	12.0～17.0	98	98
0.5～6.0	20～70	20～70	17.1～20.0	20	20
6.0～12.0	70～98	70～98			

注：a 为负离子模式，b 为正离子模式。

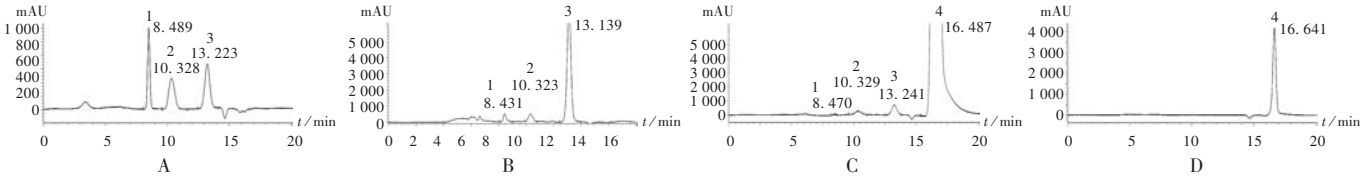
Note：a is negative ion mode and b is positive ion mode.

质谱条件：采用电喷雾离子源（ESI），负离子模式，质量扫描范围质荷比（m/z）为 70～1 300，离子源喷雾电压为 4.5 kV，离子源温度为 550 ℃，去簇电压为－50 V，碰撞能量为－35 V，碰撞能量叠加为（－35±15）V，气帘气压力为 35 psi，雾化气 GS_1 和辅助气 GS_2 压力均为 50 psi，数据采集时间为 20 min；正离子模式，质量扫描范围 m/z 为 70～1 300，喷雾电压为 5.5 kV，离子源温度为 550 ℃，去簇电压为 50 V，碰撞能量为 35 V，碰撞能量叠加为（35±15）V，气帘气压力为 35 psi，雾化气 GS_1 和辅助气 GS_2 压力均为 50 psi，数据采集时间为 20 min。

触发二级方法为信息依赖扫描性获取模式（IDA），动态背景扣除（DBS）为触发二级的条件，满足该条件的优先进行二级扫描，共扫描出有代表性的化学物质 25 种。Qtof 共鉴定出 25 个化学成分，包括异鼠李素－3－*O*－新橙皮苷、牡荆素鼠李糖苷、薯蓣皂苷元、（6a*R*，11a*R*）－3－羟基－9，10－二甲氧基紫檀烷、甲基麦冬二氢高异黄酮 B、木犀草素、山柰素、山柰酚、燃料木素、甘草素、5－羟甲基糠醛、1，4 苯醌、大黄酸、芦荟大黄素、*D*－半乳糖、*D*－甘露糖、无水葡萄糖、亚油酸、水杨酸、水合儿茶素、精氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、蔗糖、果糖。27 批样品中，黄精药材中普遍存在的甲基麦冬二氢高异黄酮 B、5－羟甲基糠醛的检出率均为 100.00%，薯蓣皂苷元的检出率为 80.00%，但不同来源和不同品种黄精含量差异很大；蔗糖、葡萄糖、果糖的检出率均为 100.00%，且含量稳定。故最终确定了蔗糖、葡萄糖、果糖 3 种糖类成分含量的测定方法。

2.1.2 HPLC－RID 条件及系统适应性试验

检测器：安捷伦 G1362A 1260RID 型 RID；色谱柱：Carbosep Coregel－87C（钙型）柱（300 mm×7.8 mm，9 μm）；流动相：纯水；流速：0.6 mL/min；柱温：80 ℃；RID 光学设备温度：45 ℃；进样量：10 μL。在此色谱条件下，取混



1. 蔗糖 2. 葡萄糖 3. 果糖 4. 黄精多糖

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液A(水提取物) C. 供试品溶液B(80%乙醇回流提取物) D. 供试品溶液C(残渣提取物)

图1 高效液相色谱图

1. Sucrose 2. Glucose 3. Fructose 4. Polygonatum polysaccharide

A. Mixed reference solution B. Test solution A(water extract) C. Test solution B(80% ethanol reflux extract) D. Test solution C(residue extract)

Fig. 1 HPLC chromatograms

合对照品溶液及供试品溶液A,B,C分别进样,结果各待测组分分离度均大于1.5,理论板数均大于5 000。色谱图见图1。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液

取蔗糖、葡萄糖、果糖对照品适量,精密称定,置50 mL容量瓶中,加甲醇制成每1 mL分别含蔗糖0.5 mg、葡萄糖0.5 mg、果糖0.5 mg的溶液,即得。

2.2.2 供试品溶液

水提取物:取样品1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加水100 mL,密塞,摇匀,浸泡30 min,超声处理(<40 ℃)30 min,取出,立即过滤,弃去初滤液,即得供试品溶液A。

80%乙醇回流提取物:取样品1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加80%乙醇150 mL,置水浴中加热回流1 h,趁热过滤,残渣用80%热乙醇洗涤3次,每次10 mL,收集80%乙醇提取物,即得供试品溶液B。

残渣提取物:取80%乙醇回流提取物项下残渣及滤纸置烧瓶中,加水150 mL,置沸水浴中加热回流1 h,趁热过滤,残渣及烧瓶用热水洗涤4次,每次10 mL,合并滤液与洗液,即得供试品溶液C。

2.3 方法学考察

线性关系考察:取蔗糖、葡萄糖、果糖对照品各适量,精密称定,分别用水溶解成质量浓度为0.486 9,0.243 4,0.595 7 mg/mL的混合对照品贮备液,精密吸取混合对照品贮备液1.00,2.00,5.00,10.00,20.00 mL,分别置20 mL容量瓶中,加水定容,即得系列混合对照品溶液。精密量取上述不同质量浓度的混合对照品溶液,按2.1.2项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、对照品溶液质量浓度(X,mg/mL)为横坐标进行线性回归。结果见表3,表明蔗糖、葡萄糖、果糖均在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限确定:取同一批样品(编号为Ga 5),依法制备供试品溶液,用水稀释,取10 μL注入液相色谱仪,记录色谱图。以信噪比(S/N)为3时的质量浓度为检测限,以S/N为10时的质量浓度为定量限。结果见表3。

精密度试验:取2.2.1项下混合对照品溶液适量,按2.1.2项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果见表3,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批样品(编号为Ga 5),依法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,4,8,12,24,48 h时进样测定,记录峰面积。结果见表3,表明供试品溶液在常温下48 h内稳定。

重复性试验:取同一批样品(编号为Ga 5),按2.2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1.2项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表3,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(编号为Ga 5)1 g,精密称定,共9份,依法制备供试品溶液,平均分为3组,按高、中、低浓度(150%,100%,50%)分别加入一定量

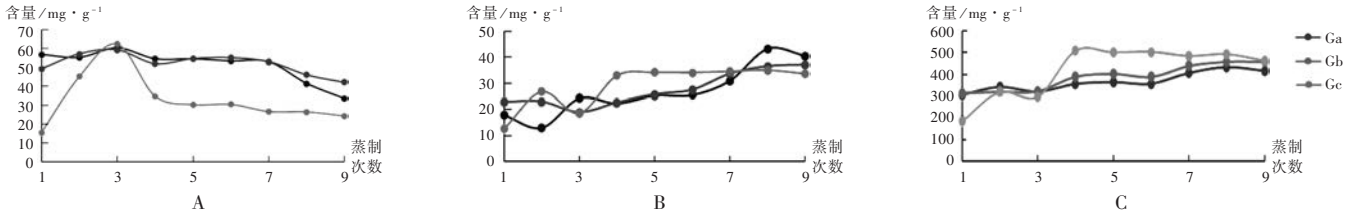
表3 黄精药材中3种糖类成分方法学考察结果

Tab. 3 Results of methodological investigations of three sugar components in Polygonati Rhizoma

成分	回归方程	r	线性范围 (mg/mL)	检测限 (mg/mL)	定量限 (mg/mL)	精密度试验 RSD(%)	稳定性试验 RSD(%)	重复性试验 含量(mg/g)	重复性试验 RSD(%)	加样回收试验 $\bar{X}$(%)	加样回收试验 RSD(%)
A	Y=15 752 X+159.59	1.000	0.024 3~0.486 9	0.09	0.03	0.87	0.51	56.76	1.79	98.63	1.18
B	Y=15 649 X-272.07	1.000	0.012 2~0.243 4	0.06	0.02	0.95	0.77	25.54	1.12	101.40	1.39
C	Y=15 226 X+460.24	1.000	0.029 8~0.595 7	0.06	0.02	1.25	0.81	305.35	1.33	102.81	1.58

注:A为蔗糖,B为葡萄糖,C为果糖。表4同。

Note: A is sucrose, B is glucose and C is fructose, as well as Tab. 4.



A. 蔗糖 B. 葡萄糖 C. 果糖

图 2 不同蒸制次数黄精饮片中 3 种糖类成分的含量变化

A. Sucrose B. Glucose C. Fructose

Fig. 2 Content change of three sugar components in Polygonati Rhizoma prepared with different steaming and sun – drying times

的蔗糖、葡萄糖、果糖对照品，按 2. 1. 2 项下方法进样 10 μL 测定，记录峰面积，并计算回收率。结果见表 3。

耐用性试验：选择不同柱温、流速、流动相 pH、品牌钙型色谱柱测定同一批样品（编号为 Ga5）的含量。结果表明，色谱柱温度为（80 ± 1）℃，流速为（0. 6 ± 0. 1）mL/min，流动相 pH 介于 5. 5 ~ 7. 0 时，测定结果稳定，若样品峰面积过大，应稀释至合适浓度再进样。

2. 4 样品含量测定

取 27 批样品，每批取 3 份，按 2. 2. 2 项下方法制备供试品溶液，按 2. 1. 2 项下条件进样测定，按线性回归方程计算各成分的含量。结果见表 4。

表 4 27 批不同蒸制次数黄精饮片中 3 种糖类成分含量测定结果（mg/g，$n = 3$）

Tab. 4 Content determination of three sugar components in 27 batches of Polygonati Rhizoma prepared with different steaming and sun – drying times（mg/g，$n = 3$）

编号	Ga			Gb			Gc		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	56. 76	17. 96	305. 22	49. 21	22. 81	314. 02	15. 57	12. 51	184. 21
2	55. 23	13. 04	341. 04	57. 12	22. 94	319. 21	45. 17	26. 69	320. 10
3	60. 22	24. 22	320. 60	59. 14	18. 88	321. 94	62. 35	18. 54	297. 23
4	54. 49	22. 36	355. 32	51. 94	22. 59	388. 70	34. 74	32. 93	506. 90
5	54. 45	25. 27	363. 31	54. 62	25. 74	402. 41	30. 31	34. 12	500. 43
6	53. 35	25. 48	356. 46	55. 08	27. 46	388. 01	30. 41	34. 06	502. 53
7	52. 91	30. 94	405. 13	52. 99	33. 66	438. 82	26. 64	34. 46	483. 91
8	41. 41	43. 15	432. 23	46. 04	36. 52	458. 50	26. 43	34. 91	492. 11
9	33. 51	40. 44	415. 21	42. 10	37. 07	458. 21	24. 31	33. 54	462. 83

2. 5 不同蒸制次数的黄精小分子糖含量测定

取 27 批次 3 种不同工艺制备的黄精饮片，依法制备供试品溶液，依法进样测定，绘制蔗糖、葡萄糖、果糖的含量变化趋势图（见图 2）。结果蔗糖含量在三制时达到顶峰，然后逐渐降低；葡萄糖和果糖含量在七制前逐步升高，七制后趋于稳定。

3 讨论

由图 2 可知，3 种不同工艺、不同蒸制次数黄精小分子糖的含量变化趋势，可以指导药企优化改良黄精蒸制工艺，在提高黄精饮片质量方面取得了进展。

现行黄精质量标准中用 80% 乙醇回流提取进行含量测定，由图 1 可知，80% 乙醇除将黄精中的单糖、二糖等小分子糖提取出来外，也提取了大量黄精多糖，故不能准确反映原黄精饮片中的多糖含量，且该方法加样回收试验难度较大。按此方法检测，结合图 2 黄精多糖的含量变化趋势分析，现有产品中不合格率高达 80% 。而黄精近年来曾被作为国考核和省考核品种，皆因其含量测定方法有待商榷而无法出具含量测定报告，故黄精的含量测定标准需提高。

本研究中建立的 HPLC – RID 法操作简便，缩短了分析时间，结果准确，重复性、回收率、稳定性、耐用性均较好，蔗糖、葡萄糖、果糖在以上 27 批样品中均检出，且含量较高，数值稳定，可用于黄精饮片的质量控制。下一步将结合药效提升检测质量。

参考文献

[1] 吴丰鹏，李芹英，吴彦超，等. 九蒸九制对黄精多糖单糖组成及其抗氧化性的影响[J]. 食品工业科技，2021，42(2)：42 – 46.

[2] 秦宇雯，张丽萍，赵 祺，等. 九蒸九晒黄精炮制工艺的研究进展[J]. 中草药，2020，51(21)：5631 – 5637.

[3] 深圳市老年医学研究所. 一种用于新冠肺炎感染恢复期的中药组合物及其制备方法：CN202010890639. 7[P]. 2020 – 11 – 27.

[4] 黄凤玉. 滇黄精对急性肺损伤模型大鼠的炎症因子及体内氧自由基的影响[J]. 天津中医药，2019，36(2)：181 – 184.

[5] 赵英华. 黄精汤及制剂治疗肺结核和耐药性肺结核的疗效观察[J]. 健康大视野，2018(7)：120 – 121.

[6] 张 翠，卫成峰，贾法玲，等. 泰山黄精对乌拉坦所致小鼠肺癌及抗炎作用研究[J]. 泰山学院学报，2013，35(3)：113 – 116.

[7] 周建波，李 晶，张 梅. 黄精多糖的生物活性及其药理作用综述[J]. 昆明学院学报，2020，42(3)：93 – 98.

[8] 马怀芬，方欢乐，刘卓越. 黄精多糖抗疲劳作用的研究[J]. 现代交际，2017(9)：190.

[9] 郑春艳，汪好芬，张庭廷. 黄精多糖的抑菌和抗炎作用研究[J]. 安徽师范大学学报(自然科学版)，2010，33(3)：272 – 275.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[J]. 北京：中国医药科技出版社，2020：319 – 320.

(收稿日期：2021 – 01 – 21；修回日期：2021 – 03 – 30)