

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)19-0073-07
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.19.016



超高效液相色谱指纹图谱法和一测多评法评价不同产地 西红花质量*

张梦奇, 王琼芬[△], 李彬, 刘婷, 张红萍, 石婧, 徐虹, 郑国平

(浙江省舟山市食品药品检验检测研究院, 浙江 舟山 316000)

摘要:目的 建立西红花药材的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱及测定药材中苦番红花素、西红花苷-I、西红花苷-II、西红花苷-III、西红花苷-IV 5种活性成分含量的一测多评(QAMS)法,评价不同产地西红花药材的质量。方法 采用UPLC法建立西红花药材的指纹图谱,色谱柱为Waters Acquity UPLC HSS T3柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相为乙腈-水(梯度洗脱),流速为0.3 mL/min,检测波长为254 nm(0~8 min,苦番红花素),440 nm(8~25 min,西红花苷-I、西红花苷-II、西红花苷-III、西红花苷-IV),柱温为25℃,进样量为4 μL。利用相似度评价、聚类分析、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)分析药材样品的质量差异性。以西红花苷-I为内参物,建立西红花苷-I与苦番红花素、西红花苷-II、西红花苷-III、西红花苷-IV的相对校正因子($f_{s/i}$),测定各成分的含量,并与外标法测定结果比较。结果 建立了30批西红花药材的UPLC指纹图谱,确定了11个共有峰,指认峰1为苦番红花素,峰4为西红花苷-I,峰6为西红花苷-II,峰10为西红花苷-III,峰7为西红花苷-IV;30批西红花药材指纹图谱的相似度为0.983~0.999。30批西红花药材可聚为4类,并呈现一定的产地规律性;OPLS-DA共确定5种西红花差异性成分,变量重要性投影(VIP)值从大到小依次为峰8>峰9>峰11>峰10(西红花苷-III)>峰2。5种成分的 $f_{s/i}$ 的RD均低于2.0%,且不同色谱柱、色谱仪、流速和柱温对 $f_{s/i}$ 影响较小(RSD均<2.0%)。与外标法结果的相对平均偏差均小于2.0%,无显著差异($P>0.05$)。结论 所建立的方法准确、便捷,可用于不同产地西红花药材的质量评价。

关键词:西红花;超高效液相色谱法;指纹图谱;一测多评法;聚类分析;正交偏最小二乘法-判别分析;质量评价

Quality Evaluation of Croci Stigma from Different Producing Areas Based on HPLC Fingerprints and QAMS

ZHANG Mengqi, WANG Qiongfeng, LI Bin, LIU Ting, ZHANG Hongping, SHI Jing, XU Hong, ZHENG Guoping

(Zhoushan Institute for Food and Drug Control, Zhoushan, Zhejiang, China 316000)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprints of Croci Stigma and a quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method for the content determination of five active ingredients (picrocrocin, crocin I, crocin II, crocin III, and crocin IV) in Croci Stigma, and to evaluate the quality of Croci Stigma from different producing areas. **Methods** UPLC method was used to establish the fingerprint of Croci Stigma, and the

*基金项目:浙江省基础公益研究计划项目[LGC21H280001];浙江省市场监督管理局科研计划项目[ZC2021B094]。

第一作者:张梦奇,女,硕士,主管药师,研究方向为药品质量控制与评价,(电子信箱)123618347@qq.com。

[△]通信作者:王琼芬,女,大学本科,主任药师,研究方向为药品质量评价,(电子信箱)wqf6512@aliyun.com。

- [5] MCCAFFERTY DF, WOOLFSON AD. A Comparative Assessment of a New Antacid Formulation Based On Magaldrate [J]. Journal of Clinical and Hospital Pharmacy, 1983, 8(4): 349-355.
- [6] 黎明. 薄层色谱扫描法测定蛇胆川贝液中牛磺胆酸含量[J]. 中国药业, 2007, 16(17): 23.
- [7] 陈蓉, 陈伟, 顾炳仁. TLCs同时测定珠黄散中4种胆汁酸含量[J]. 中国执业药师, 2016, 13(7): 7-16.
- [8] 孟高渊, 东云华, 杨庆, 等. 血清中胆汁酸的气相色谱分析[J]. 现代预防医学, 1993, 20(4): 222-224.
- [9] 王文娟, 邓文平, 王猛, 等. 高效液相色谱法同时测定胆汁中9种结合型胆汁酸[J]. 重庆医科大学学报, 2009, 34(1): 59-62.
- [10] 汪裕, 王炳生, 童赛雄, 等. 高效液相测定胆汁结合胆汁酸方法的改进[J]. 世界华人消化杂志, 2001, 9(2): 219-221.
- [11] 黎永军, 胡咏泉, 陈卫刚, 等. 胆囊切除后胆汁反流对胃窦黏膜上皮细胞病理学影响[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(26): 2702-2707.
- [12] 游庆明. 联用铝碳酸镁与潘立酮治疗胆汁反流性胃炎的效果分析[J]. 当代医药论丛, 2015, 13(23): 206-207.
- [13] 周利民. 铝碳酸镁片联合熊去氧胆酸胶囊治疗胆汁反流性胃炎168例[J]. 中国药业, 2013, 22(11): 136-137.
- [14] 李贵新, 李萍, 高兵. 反相高效液相色谱法测定结合胆汁酸及肝硬化患者血清结合型胆汁酸分析[J]. 四川大学学报(医学版), 2004, 35(1): 117-119.
- [15] 刘菁菁, 肖尚红, 柴龙会, 等. 狐胆汁中结合型胆汁酸成分的RP-HPLC检测[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41(8): 136-138.
- [16] 岑淑姬. 高效液相色谱法测定蛇胆陈皮散中牛磺胆酸含量[J]. 中国药业, 2007, 16(19): 30-31.

(收稿日期: 2023-08-02)

chromatographic column was Waters Acquire UPLC HSS T3 column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the detection wavelengths were 254 nm (0-8 min, picrocrocin) and 440 nm (8-25 min, crocin I, crocin II, crocin III, and crocin IV), the column temperature was 25 °C, and the injection volume was 4 μL. The quality differences of Croci Stigma were evaluated by similarity evaluation, cluster analysis (CA), and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA). The relative correction factors ($f_{s/i}$) of picrocrocin, crocin II, crocin III and crocin IV were established with crocin I as internal reference, and then the content of each component was determined and compared with the results of the external standard method (ESM). **Results** UPLC fingerprints of thirty batches of Croci Stigma were established, eleven common peaks were determined, and five components were identified, namely picrocrocin (peak 1), crocin-I (peak 4), crocin-II (peak 6), crocin-III (peak 10), and crocin-IV (peak 7). The similarity of fingerprints of 30 batches of Croci Stigma was in the range of 0.983-0.999, and 30 batches of Croci Stigma could be clustered into four categories and showed a certain geographical pattern. Five different components of Croci Stigma were identified by the OPLS-DA, with a variable importance of projection (VIP) value ranking as peak 8 > peak 9 > peak 11 > peak 10 (crocin III) > peak 2. The *RDs* of the $f_{s/i}$ of five components were lower than 2.0%, and the influence of different chromatographic columns, chromatographs, flow rates, and column temperatures on $f_{s/i}$ was relatively less (*RSD* < 2.0%). The relative average deviation between the content of the five components in 30 batches of Croci Stigma determined by the QAMS and the ESM was lower than 2.0%, with no significant difference (*P* > 0.05). **Conclusion** The established method is accurate and convenient, which can be used for the quality evaluation of Croci Stigma from different producing areas.

Key words: Croci Stigma; UPLC; fingerprint; QAMS; cluster analysis; OPLS-DA; quality evaluation

西红花为鸢尾科植物番红花 *Crocus sativus* L. 的干燥柱头,原产于地中海、欧洲南部地区和伊朗,现我国多个省份均有栽培。西红花不仅是世界著名的天然香料和食用染料,也是名贵的中药材,收载于2020年版《中国药典(一部)》,具有活血化瘀、凉血解毒、解郁安神等功效^[1-2]。其发挥药效的主要物质基础为类胡萝卜素及其糖苷类衍生物,包括西红花苷类(西红花苷-I、西红花苷-II、西红花苷-III和西红花苷-IV)、苦番红花素、西红花酸和西红花醛^[3-4]。有关西红花的研究主要集中于指标成分定量测定^[5],也有用于质量评价的指纹图谱研究^[6-7],但尚未见结合化学模式识别用于产地区分的相关报道。指纹图谱结合化学模式识别分析可有效表征和评价中药的内在和整体质量,并解释药材复杂成分的隐藏规律,客观评价不同产地间的品质差异^[8]。西红花相关对照品主要提取于西红花药材^[9],检测成本高。一测多评(QAMS)是适合中药特点的多指标成分质量评价新模式,在中药多指标成分的含量测定中应用广泛^[10],可大幅降低检测成本。故本研究中建立了西红花的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,采用相似度评价、聚类分析和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)对市售西红花药材的质量进行综合评价;并建立了以西红花苷-I作为内参物,测定苦番红花素及4种西红花苷类成分的QAMS法,旨在为不同产地西红花药材的质量控制和评价提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 Infinity II型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); Waters Arc型超高效液相色谱仪(美国Waters公司); Shimadzu LC-30A型超高效液相色谱仪

(日本Shimadzu公司); XSE205DU型电子天平(梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司,精度为0.01 mg); KQ-300VDE型双频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为300 W,频率为45 kHz); Milli-Q型超纯水仪(美国Milipore公司)。

1.2 试药

苦番红花素对照品(批号为112056-202102,含量为97.3%),西红花苷-I对照品(批号为111588-201704,含量为88.4%),西红花苷-II对照品(批号为111589-201705,含量为92.2%),均购自中国食品药品检定研究院;西红花苷-III对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号为wkq-21081003,含量为99.75%);西红花苷-IV对照品(成都乐美天医药科技有限公司,批号为DST201110-181,含量为98.07%);甲醇、乙腈(色谱纯, J. T. Baker公司);水为Milli-Q自制水,其他试剂均为分析纯;30批西红花药材样品均购自浙江省内药品批发、零售企业,经浙江省舟山市食品药品检验检测研究院郑国平主任中药师鉴定为正品,样品信息见表1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC HSS T3柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0~6 min时15%A→30%A, 6~12 min时30%A, 12~14 min时30%A→35%A, 14~16 min时35%A→50%A, 16~20 min时50%A→60%A, 20~25 min时60%A); 流速: 0.3 mL/min; 检测波长: 254 nm(0~8 min, 苦番红花素), 440 nm(8~25 min, 西红花苷-I、西红花苷-II、西红花苷-III和西红花苷-IV); 柱温: 25 °C; 进样量: 4 μL。

表1 30批西红花药材样品信息
Tab. 1 Information of 30 batches of Croci Stigma

编号	批号	产地	编号	批号	产地
S1	20211201	伊朗	S16	20201123	浙江
S2	20200401	伊朗	S17	20191119	浙江
S3	210926	伊朗	S18	191024	浙江
S4	18061601	西藏	S19	200402	浙江
S5	A200102	西藏	S20	19121101	浙江
S6	77120319	西藏	S21	19151101	浙江
S7	1710157	浙江	S22	181123	江苏
S8	1912075	浙江	S23	190417	江苏
S9	1912181	浙江	S24	077120319	江苏
S10	200617	浙江	S25	171203	安徽
S11	191228	浙江	S26	191105	安徽
S12	181202	浙江	S27	190926	安徽
S13	190115T	浙江	S28	200318	安徽
S14	200304	浙江	S29	18061601	安徽
S15	20181201	浙江	S30	191110	安徽

2.2 溶液制备

分别取苦番红花素、西红花苷 - I、西红花苷 - II、西红花苷 - III 和西红花苷 - IV 对照品各适量,精密称定,加稀乙醇制成质量浓度分别为 18.27, 28.85, 9.95, 2.96, 1.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。取西红花药材细粉 10 mg,精密称定,置 50 mL 棕色容量瓶中,加稀乙醇适量,置冰浴中超声处理 20 min,放至室温,加稀乙醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.3 UPLC 指纹图谱建立与分析

2.3.1 方法学考察

精密密度试验:精密量取 2.2 项下供试品溶液适量,

按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,以峰 4 为参照峰,分别计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果的 RSD 分别为 0.19% ~ 1.94% 和 0.06% ~ 0.24% ($n = 6$),表明方法精密密度良好。

稳定性试验:取样品(编号 S16),按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰 4 为参照峰,分别计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果的 RSD 分别为 0.21% ~ 1.84% 和 0.03% ~ 0.37% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温下放置 12 h 内稳定性良好。

重复性试验:取样品(编号 S16),取稳定性试验项下供试品溶液 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以峰 4 为参照峰,计算各共有峰的相对峰面积和相对保留时间。结果的 RSD 分别为 0.17% ~ 2.23% 和 0.04% ~ 0.95% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

2.3.2 指纹图谱生成与相似度评价

取 30 批(编号为 S1 - S30)西红花药材各适量,精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)对色谱图进行分析,将 S1 样品的图谱作为参照图谱,时间窗为 0.1 min,采用中位数法,经过多点校正和全谱峰匹配,生成对照指纹图谱(R),共标识 11 个共有峰,详见图 1。通过与混合对照品溶液色谱图进行比对,指出 5 个共有峰,其中,峰 1 为苦番红花素,峰 4 为西红花苷 - I (参照峰 S),峰 6 为西红花苷 - II,峰 7 为西红花苷 - IV,峰 10 为西红花苷 - III,详见图 2。30 批样品指纹图谱相似度为 0.983 ~ 0.999,详见表 2。所有样品相似度均大于 0.98,表明不同产地、

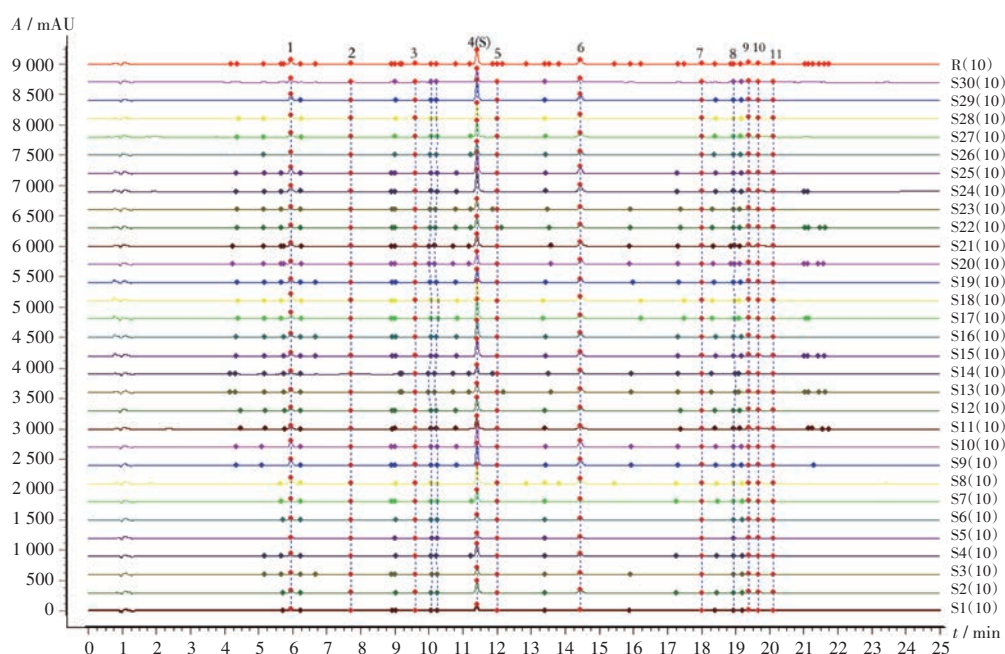
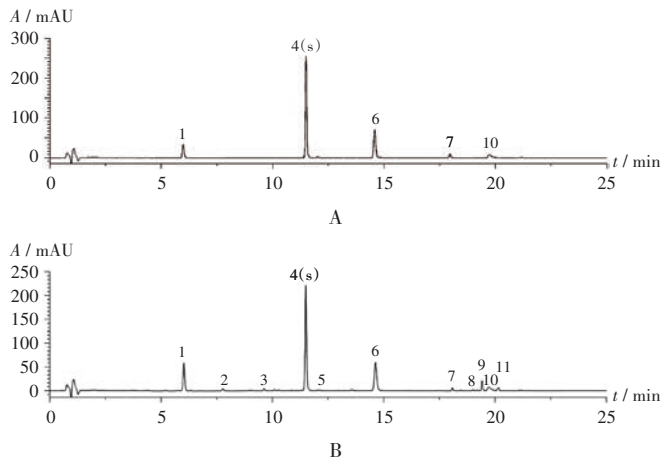


图1 30批西红花药材超高效液相色谱叠加指纹图谱和对照指纹图谱

Fig. 1 UPLC overlay fingerprints of 30 batches of Croci Stigma and the reference fingerprint

不同批次西红花药材所含成分基本一致,药材整体质量较稳定,所建立的指纹图谱可用于西红花药材的质量评价。



1. 苦番红花素 4. 西红花苷 - I 6. 西红花苷 - II
7. 西红花苷 - IV 10. 西红花苷 - III
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图2 超高效液相色谱图

1. Picrocrocin 4. Crocin I 6. Crocin II 7. Crocin IV 10. Crocin III
A. Mixed reference solution B. Test solution

图2 UPLC chromatograms

表2 30批西红花药材指纹图谱相似度评价结果

Tab.2 Results of the similarity evaluation of fingerprints of 30 batches of Croci Stigma

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
S1	0.999	S11	0.987	S21	0.983
S2	0.990	S12	0.987	S22	0.984
S3	0.997	S13	0.993	S23	0.984
S4	0.990	S14	0.993	S24	0.989
S5	0.988	S15	0.987	S25	0.989
S6	0.998	S16	0.987	S26	0.988
S7	0.995	S17	0.993	S27	0.988
S8	0.992	S18	0.993	S28	0.988
S9	0.987	S19	0.992	S29	0.994
S10	0.987	S20	0.983	S30	0.993

2.4 聚类分析

以30批西红花药材的11个共有峰的峰面积为变量,导入SPSS 26.0统计学软件,采用组间联接,以平方欧氏距离法进行系统聚类分析,并绘制谱系图,结果见图3。当欧氏距离为20时,30批西红花药材样品可聚为两大类,其中,编号为S1, S2, S3(产地伊朗)的样品聚为一类,剩余批次聚为二类(国产)。当欧氏距离为5时,30批西红花药材样品可聚为4类。其中,一类为编号为S1 - S3(产地伊朗)的样品;二类为编号为S4 - S6(产地西藏), S8, S10, S12, S13(产地浙江), S22(产地江苏)的样品;三类为编号为S25 - S30(产地安徽)的样品;其余批次为四类(产地浙江、江苏)。由聚类分析结果可知,

产地为伊朗的西红花与产地为我国的差异明显,而我国不同产地之间也存在一定差异,但产地为浙江、西藏、江苏的药材质量较相似,可用聚类分析法对药材样品进行产地区分。

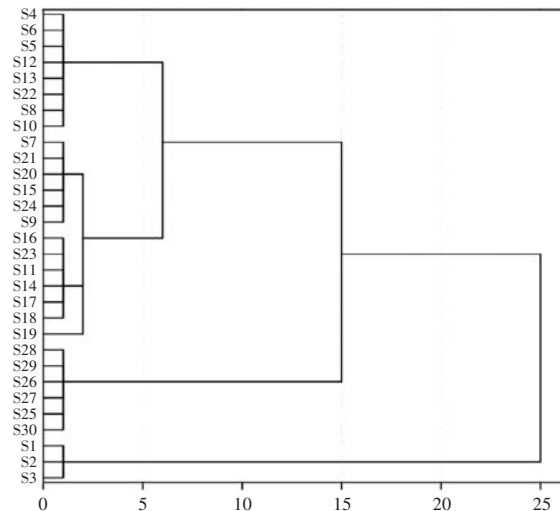


图3 30批西红花药材的聚类分析树状图

Fig. 3 Cluster analysis diagram of 30 batches of Croci Stigma

2.5 OPLS - DA

将30批西红花药材的11个共有峰的峰面积作为变量,导入SIMCA 14.1软件进行OPLS - DA分析,获得相应模型,得分图见图4。可见,30批西红花药材样品聚为4类,编号为S1 - S3的样品聚为一类(产地伊朗)、编号为S4 - S6的样品聚为二类(产地西藏)、编号为S25 - S30的样品聚为三类(产地安徽)编号为S7 - S24的样品聚为四类(产地浙江、江苏),各组样品聚类良好、分离明显。模型的自变量模型参数 $R^2X(\text{cum})$ 为0.809(> 0.5),因变量模型参数 $R^2Y(\text{cum})$ 为0.800(> 0.5),表明模型稳定性及预测力较好;累积预测能力参数 $Q^2(\text{cum})$ 为0.751(> 0.5),且 $R^2Y(\text{cum}) - Q^2(\text{cum}) = 0.049 < 0.3$ 。表明预测模型具有较好的准确性和可靠性^[11]。

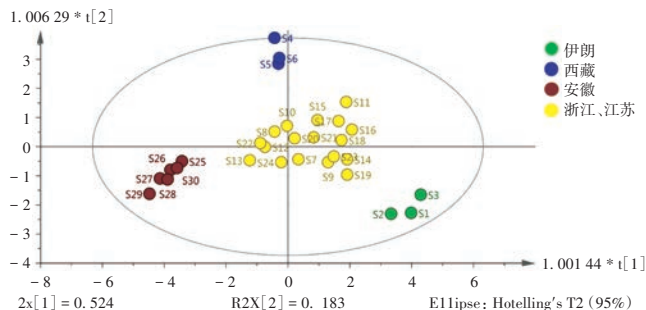


图4 30批西红花药材的OPLS - DA模型得分图

Fig. 4 OPLS - DA scores diagram of 30 batches of Croci Stigma

为进一步检验模型的有效性或样本间是否存在差异,利用SIMCA 14.1软件对已建立的OPLS - DA模型进行置换检验,设置迭代次数为200次,结果见图5。可见,代表模型解释能力 R^2 为(0, 0.0645),模型预测能力 Q^2 为(0, -0.38),均小于原始值,表明所建模型未过拟

合^[12],可用于有效区分不同产地的西红花药材。

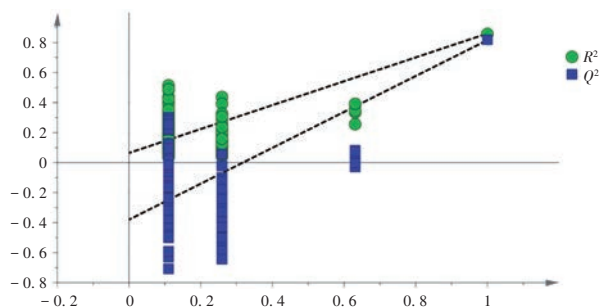


图5 OPLS-DA模型置换检验图

Fig. 5 OPLS-DA model permutation test diagram

变量重要性投影(VIP)值可衡量各共有峰的表达式对样本分类判别的影响强度和解释能力^[13],且当VIP > 1.0时,表示该变量对于所建模型的贡献度高于平均水平^[14]。以此为筛选标准,共筛选出5种贡献较大的成分,依次为峰8、峰9、峰11、峰10(西红花苷-III)、峰2。详见图6。

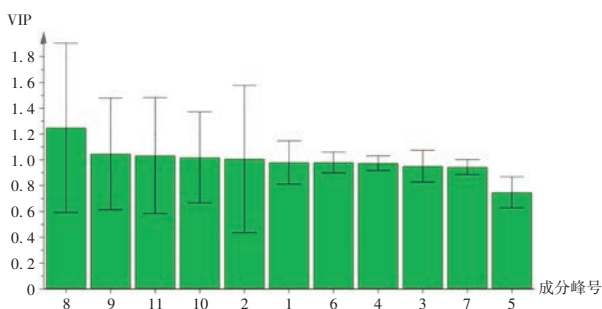


图6 共有峰峰面积的VIP图

Fig. 6 VIP plot of the common peak area

2.6 含量测定方法学考察

线性关系考察:分别精密量取2.2项下混合对照品溶液0.1,0.2,0.5,1.0,2.0,5.0 mL,分别置10 mL棕色容量瓶中,用稀乙醇定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液,按2.1项下色谱条件依次进样测定,以待测成分质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表3,表明各成分在相应质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

表3 5种成分的线性关系考察与检测限、定量限确定结果

Tab. 3 Results of the linear relation test, LOD and LOQ of five components

成分	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOD($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LOQ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
苦番红花素	$Y=17.171X-7.5361$	0.9999	1.83~91.36	0.0274	0.0914
西红花苷-I	$Y=61.683X-45.646$	0.9999	2.89~144.27	0.0173	0.0577
西红花苷-II	$Y=72.608X-14.603$	0.9998	1.00~49.74	0.0149	0.0497
西红花苷-III	$Y=49.31X-3.0925$	1.0000	0.30~14.82	0.0356	0.1186
西红花苷-IV	$Y=33.625X-0.1088$	0.9999	0.12~5.91	0.0355	0.1182

检测限(LOD)与定量限(LOQ)确定:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,用稀乙醇逐级稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,以各仪器信噪比(S/N)为10:1

时的待测成分质量浓度为LOQ,以 S/N 为3:1时的质量浓度为LOD。结果见表3。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果苦番红花素、西红花苷-I、西红花苷-II、西红花苷-III、西红花苷-IV峰面积的RSD分别为0.17%,0.22%,0.30%,0.51%,0.43% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取西红花药材(编号为S16)细粉适量,精密称定,共6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果苦番红花素、西红花苷-I、西红花苷-II、西红花苷-III、西红花苷-IV的RSD分别为0.55%,0.18%,0.15%,0.73%,1.09% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取重复性试验项下供试品溶液,分别于室温放置0,2,4,8,10,12 h按2.1项下色谱条件进样测定,记录各成分峰面积,并计算含量。结果苦番红花素、西红花苷-I、西红花苷-II、西红花苷-III、西红花苷-IV含量的RSD分别为1.12%,1.59%,1.63%,1.71%,1.92% ($n=6$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

加样回收试验:取西红花药材(编号为S16)细粉10 mg,精密称定,置100 mL棕色容量瓶中,共6份,按2.2项下方法制备质量浓度分别为112.64,99.81,33.24,8.93,3.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液,精密量取混合对照品溶液8,10,12 mL,分别加入相应供试品溶液中,按2.2项下方法制备供试品加标溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,并计算加样回收率。结果苦番红花素、西红花苷-I、西红花苷-II、西红花苷-III、西红花苷-IV的平均加样回收率分别为100.47%,99.79%,99.87%,100.27%,99.73%,RSD分别为0.94%,0.89%,1.18%,1.23%,1.74% ($n=6$),表明方法准确性良好。

2.7 QAMS建立

相对校正因子(RCF, $f_{s/i}$)计算:在中药材多成分指标质量评价时,以该药材中某一代表成分为内参物,通过建立该内参物与其他待测成分的 $f_{s/i}$ 计算其他待测组分的含量^[15],实现中药材多成分同步测定。本研究中采用多点校正法,取线性关系考察项下系列混合对照品溶液,依次进样测定,记录峰面积。以西红花苷-I作为内参物,按公式 $f_{s/i} = (A_s \times M_i) / (A_i \times M_s)$ 计算苦番红花素、西红花苷-II、西红花苷-III、西红花苷-IV的 $f_{s/i}$ 及RSD。其中, A_s 和 A_i 分别为内参物和待测成分的峰面积, M_s 和 M_i 分别为内参物和待测成分对照品的质量浓度。结果 $f_{s/i}$ 分别为3.577,0.844,1.251,1.781,RSD分别为0.88%,0.82%,1.39%,1.98% ($n=6$)。

耐用性试验:分别考察不同色谱柱[(Waters Acquity UPLC HSS T3柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm),月旭 Ultimate UHPLC C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm),Agilent Poroshell 120 SB - C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm)],不同品牌色谱仪(Agilent 1260型、Waters Arc型、Shimadzu LC - 30A型),不同流速(0.25, 0.30, 0.35 mL/min),不同柱温(25, 30, 35 °C)对各成分 $f_{s/i}$ 的影响。结果 $f_{s/i}$ 的RSD均低于2.0%,表明不同色谱条件对苦番红花素、西红花苷 - II、西红花苷 - III、西红花苷 - IV的 $f_{s/i}$ 均无显著影响。

待测成分色谱峰定位:分别考察了苦番红花素、西红花 - II、西红花苷 - III、西红花苷 - IV与西红花苷 - I

间的相对保留时间($R_{i/s} = t_i / t_s$)和保留时间差($t_i - t_s$)在不同色谱仪和色谱柱中的重复性。结果表明,相对保留时间的波动较小,其重复性明显优于保留时间差,故本研究中选择相对保留时间作为待测成分色谱峰定位依据。

样品含量测定:取30批(编号为S1 - S30)样品各适量,精密称定,分别制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,采用外标法(ESM)测定苦番红花素、西红花苷 - I、西红花苷 - II、西红花苷 - III、西红花苷 - IV的含量;同时采用QAMS法以西红花苷 - I为内参物,计算苦番红花素、西红花 - II、西红花苷 - III和西红花苷 - IV的含量,并与ESM法测定结果进行比较,结果见表4。可见,各成分QAMS法计算值和外标实测值间无显

表4 QAMS法与ESM法测定西红花药材中5种成分含量比较(%, n = 3)

Tab. 4 Comparison of content determination results of five components in Croci Stigma determined by QAMS and ESM (%, n = 3)

样品 编号	苦番红花素				西红花苷 - II			西红花苷 - III			西红花苷 - IV		
	ESM法	ESM法	QAMS法	RD	ESM法	QAMS法	RD	ESM法	QAMS法	RD	ESM法	QAMS法	RD
S1	8.900	8.821	8.996	0.98	3.176	3.212	0.56	0.416	0.407	-1.09	0.348	0.352	0.57
S2	8.577	8.311	8.461	0.89	3.055	3.084	0.47	0.405	0.395	-1.25	0.337	0.341	0.59
S3	8.891	8.409	8.567	0.93	3.216	3.255	0.60	0.542	0.539	-0.28	0.376	0.380	0.53
S4	5.337	7.827	7.939	0.71	1.789	1.761	-0.79	0.930	0.943	0.69	0.228	0.230	0.44
S5	5.639	8.433	8.559	0.74	1.914	1.886	-0.74	0.919	0.930	0.59	0.225	0.226	0.22
S6	5.626	8.052	8.161	0.67	1.856	1.825	-0.84	0.957	0.969	0.62	0.261	0.263	0.38
S7	7.335	7.420	7.535	0.77	2.470	2.477	0.14	0.798	0.807	0.56	0.277	0.280	0.54
S8	6.869	6.636	6.698	0.46	2.258	2.249	-0.20	0.661	0.662	0.08	0.193	0.195	0.52
S9	6.946	8.828	8.996	0.94	2.434	2.438	0.08	0.463	0.455	-0.87	0.269	0.271	0.37
S10	6.582	7.576	7.671	0.62	2.276	2.264	-0.26	0.778	0.783	0.32	0.234	0.236	0.43
S11	8.956	9.948	10.143	0.97	2.960	2.975	0.25	1.016	1.032	0.78	0.358	0.362	0.56
S12	6.286	7.844	7.949	0.66	2.077	2.057	-0.48	0.508	0.499	-0.89	0.256	0.258	0.39
S13	6.22	7.103	7.174	0.50	2.055	2.033	-0.54	0.452	0.441	-1.23	0.229	0.230	0.22
S14	8.622	9.604	9.791	0.96	3.006	3.026	0.33	0.688	0.689	0.07	0.302	0.305	0.49
S15	7.558	8.969	9.116	0.81	2.551	2.547	-0.08	0.966	0.978	0.62	0.304	0.306	0.33
S16	9.269	11.002	11.237	1.06	3.223	3.247	0.37	0.841	0.849	0.47	0.352	0.356	0.56
S17	8.554	10.673	10.898	1.04	2.844	2.855	0.19	0.904	0.915	0.60	0.309	0.312	0.48
S18	9.426	8.916	9.068	0.85	3.127	3.149	0.35	0.468	0.458	-1.08	0.327	0.330	0.46
S19	9.769	12.952	13.274	1.23	3.388	3.421	0.48	0.609	0.605	-0.33	0.342	0.345	0.44
S20	8.178	9.707	9.891	0.94	2.751	2.758	0.13	0.869	0.878	0.52	0.188	0.189	0.27
S21	8.205	8.351	8.479	0.76	2.870	2.882	0.21	0.817	0.824	0.43	0.290	0.293	0.51
S22	6.249	8.020	8.127	0.66	2.172	2.153	-0.44	0.533	0.524	-0.85	0.215	0.217	0.46
S23	9.460	10.035	10.229	0.96	3.235	3.259	0.37	0.927	0.938	0.59	0.330	0.333	0.45
S24	7.495	7.561	7.656	0.62	2.532	2.530	-0.04	0.724	0.726	0.14	0.266	0.269	0.56
S25	5.142	5.294	5.267	-0.26	2.057	2.026	-0.76	0.594	0.585	-0.76	0.130	0.130	0.00
S26	3.941	5.507	5.501	-0.05	1.881	1.847	-0.91	0.536	0.526	-0.94	0.114	0.114	0.00
S27	4.513	6.358	6.371	0.10	1.917	1.877	-1.05	0.538	0.527	-1.03	0.111	0.111	0.00
S28	5.104	7.711	7.783	0.46	2.085	2.053	-0.77	0.214	0.213	-0.23	0.153	0.154	0.33
S29	4.874	7.106	7.158	0.36	1.908	1.872	-0.95	0.168	0.171	0.88	0.133	0.134	0.37
S30	6.023	6.828	6.864	0.26	2.137	2.107	-0.71	0.500	0.487	-1.32	0.145	0.146	0.34

著差异,相对偏差(RD)低于2.0%。同时,采用SPSS 22.0统计学软件对2种方法所测得含量进行 t 检验,结果显示,2种方法无显著差异($P > 0.05$)。以上述5种成分的总量计,浙江、伊朗产药材含量较高,安徽产药材含量最低。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

2020年版《中国药典(一部)》收录的西红花药材含量测定方法采用高效液相色谱(HPLC)法,梯度洗脱时间约为60 min,检测时间较长。本研究中采用UPLC法,将检测时间缩短至25 min内,有效提高了检测效率,还减少了有机溶剂的使用量。同时,采用梯度洗脱,在保留时间为15~25 min处获得多个分离良好的其他西红花苷成分(西红花苷-Ⅲ、西红花苷-Ⅳ等),但上述成分在常规HPLC法检测中难以获得良好分离。通过二极管阵列检测器于190~800 nm波长范围内进行全波长扫描发现,苦番红花素于254 nm波长处有最大吸收,而其他西红花苷类成分于440 nm波长处响应较强,故采用波长切换法,以保证检测灵敏度。优化色谱条件后,各成分间分离良好,可满足西红花药材指纹图谱及QAMS法分析的要求。

3.2 指纹图谱建立、聚类分析与OPLS-DA

本研究中建立了西红花药材的UPLC指纹图谱,共检出11个共有峰。相似度评价结果显示,30批西红花药材相似度为0.983~0.999,表明不同产地西红花药材的化学成分种类差异小。聚类分析和OPLS-DA结果均将30批西红花药材分为4类,聚类分析可实现伊朗、安徽和其他产地西红花的有效区分,而OPLS-DA模型可实现伊朗、西藏、安徽产地西红花的有效区分,但仍无法有效区分浙江和江苏2个产地的西红花药材,两者质量高度相近。通过VIP预测值排序筛选出5个贡献度较大的成分,分别为峰8、峰9、峰11、峰10(西红花苷-Ⅲ)、峰2,可作为西红花产地区分的标志物。

3.3 QAMS法测定结果分析

QAMS法可有效解决对照品不易获得、化学性质不稳定、价格昂贵、溶液制备烦琐等含量测定不利因素。本研究发现,西红花药材中西红花苷-I含量较高、化学性质较稳定且价格低,故选用西红花苷-I作为内参物。方法学验证、方法耐用性考察,结果显示,西红花苷-I对苦番红花素、西红花苷-II、西红花苷-Ⅲ、西红花苷-Ⅳ的 $f_{s/i}$ 有较好的重复性,同时QAMS法计算含量与ESM法实测含量无显著差异($RD < 2.0%$),建立的QAMS法适用于西红花中多指标成分的含量测定。含量测定结果显示,不同产地、不同批次西红花苦番红花素和西红花苷类成分总含量差异较大。其中,产地为伊

朗和浙江的西红花各成分总含量较高,产地为安徽的西红花药材含量较低,且含量较低样品普遍为生产日期均早、包装材料密封性差的样品。因此,西红花内在品质除与其药材产地相关外,还与储存时间、储存方式相关。

3.4 方法评价

本研究中建立的UPLC指纹图谱结合QAMS法准确、可靠、便捷,且检测成本低,可用于西红花药材的质量评价及产地区分。

参考文献

- [1] KHORASANCHI Z, SHAFIEE M, KERMANSHAHI F, et al. Crocus sativus a natural food coloring and flavoring has potent anti-tumor properties[J]. *Phytomedicine*, 2016, 43: 21.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 134-135.
- [3] 陈祥慧, 谭何新, 张磊. 西红花中类胡萝卜素生物合成途径研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(19): 4702-4709.
- [4] 胡静, 唐小慧, 饶桦静, 等. 西红花色泽与化学成分含量的相关性分析[J]. *中草药*, 2018, 41(8): 1918-1922.
- [5] 王萌萌, 徐步斌, 周斌, 等. HPLC法测定西红花不同部位中西红花苷-I和苷-II[J]. *中成药*, 2019, 41(5): 1102-1105.
- [6] 邢越阳, 高崎, 张雪, 等. 西红花HPLC指纹图谱建立及成分分析[J]. *中成药*, 2019, 41(1): 134-140.
- [7] 曾水云, 杨四海, 黄昌华. 西红花药材高效液相色谱指纹图谱研究及不同产地药材谱比较[J]. *中成药*, 2004, 26(9): 3-6.
- [8] 陈丽华, 肖发林, 黄诗雨, 等. 中药质量评价研究思路及创新发展趋势[J]. *中草药*, 2021, 52(9): 2541-2547.
- [9] 王平, 童应鹏. 一种西红花活性组分的提取制备方法: CN104083544B [P]. 2017-06-06.
- [10] 李俊霞, 刘松, 游秋霞. 高效液相色谱-一测多评法同时测定金佛止痛丸中8种成分含量[J]. *中国药业*, 2022, 31(15): 71-75.
- [11] 熊瑞, 武娟, 张兴兴, 等. 基于化学计量学的重楼(加格略)生品和蒸制品饮片HPLC指纹图谱研究[J]. *中草药*, 2022, 53(18): 5663-5672.
- [12] 郑燕, 江媛, 缪雨静, 等. 基于UPLC-Q-TOF/MS技术的补骨脂炮制机理研究[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(3): 600-604.
- [13] 韩金芮, 王慧娟, 支青, 等. PCA-HCA-OPLS联合建立太子参内在品质等级评价模型[J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(7): 1745-1748.
- [14] 郭丽, 杨忠杰, 于晓涛, 等. 南、北五味子药材的HPLC指纹图谱建立及化学模式识别分析[J]. *中国药房*, 2020, 31(18): 2224-2229.
- [15] 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.

(收稿日期: 2023-03-06; 修回日期: 2023-05-10)