

成分分析

基于双标线性校正技术的白及多组分定性分析*

林昶¹, 刘苏情¹, 张静¹, 杨聪¹, 钱海兵^{1**}, 杨长福¹, 赵君²

(1. 贵州中医药大学, 贵阳 550000; 2. 贵州同德药业股份有限公司, 铜仁 554300)

摘要 目的: 运用高效液相色谱 (HPLC) 法对白及中的 6 个成分进行分析, 通过双标线性校正技术, 对成分的保留时间进行预测, 探讨其在色谱峰定性上的可行性和准确性, 并将该方法与相对保留时间法进行比较。**方法:** 采用高效液相色谱法, 以水为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱 (0~11 min, 12%B; 11~58 min, 12%B → 68%B; 58~65 min, 68%B → 12%B), 流速为 0.9 mL·min⁻¹, 进样量为 5 μL, 柱温为 30 °C, 检测波长为 280 nm。通过测定 16 根不同 C₁₈ 色谱柱上 6 个成分的实际保留时间, 计算出标准保留时间。以天麻素 (峰 1) 和手参苷 III (峰 4) 作为双标成分, 运用双标线性校正技术预测其他成分的保留时间, 并在另外 3 个未知 C₁₈ 色谱柱上进行验证。利用 RRT 法, 以白及苷 (峰 5) 为参照化合物, 预测其他 5 个成分的保留时间。**结果:** 建立了对白及 6 个成分的定性分析方法, 可以准确预测白及中各个成分的保留时间。6 个成分的标准保留时间分别为天麻素 4.279 min、手参苷 III 32.145 min、山慈菇素 I 27.220 min、2-O-葡萄糖基白及苷 28.603 min、白及苷 33.509 min、山药素 III 45.504 min。**结论:** 双标线性校正法可以提高对各组分保留时间的预测能力, 从而提高分析结果的准确性和可靠性。

关键词: 白及; 双标线性校正技术; 相对保留时间法; 标准保留时间; 色谱峰定性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2025)03-0392-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0317

Qualitative determination of multiple components in Bletillae Rhizoma by linear calibration using two reference substances*

LIN Chang¹, LIU Su-qing¹, ZHANG Jing¹, YANG Cong¹,QIAN Hai-bing^{1**}, YANG Chang-fu¹, ZHAO Jun²

(1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550000, China;

2. Guizhou Tongde Pharmaceuticals Co., Ltd, Tongren 554300, China)

Abstract Objective: To analyze six components in Bletillae Rhizoma using high-performance liquid chromatography. Through the linear calibration using two reference substances method, the retention time of the components was predicted, and the feasibility and accuracy of this technique in the qualitative identification of

* 贵州省科技计划项目: 黔产白及产地加工一体化加工技术研究在白及多糖智能化提取加工与应用 (黔科合支撑 [2022] 重点 023-02); 贵州省高等学校中药 (民族药) 药性与效应研究重点实验室资助项目 (黔教技 [2023] 18 号); 贵州中医药大学国家与省级科技创新人才团队培育项目 (贵中医 TD 合字 [2023] 3 号)

** 通信作者 Tel: 13984350701; E-mail: 279753407@qq.com

第一作者 Tel: 15285966608; E-mail: 375718640@qq.com

chromatographic peaks were explored. This method was also compared with the relative retention time (RRT) method.

Methods: High-performance liquid chromatography was employed using an Ultimate XB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of water (A) and acetonitrile (B), with a gradient elution as follows: 0–11 min, 12% B; 11–58 min, 12% B to 68% B; 58–65 min, 68% B to 12% B. The flow rate was 0.9 mL · min⁻¹, the injection volume was 5 μL, the column temperature was maintained at 30 °C, and the detection wavelength was set at 280 nm. By measuring the actual retention time of the six components on 16 different C₁₈ chromatographic columns, the standard retention time was calculated. Gastrodin (Peak 1) and gymnadenin III (Peak 4) were used as the double-standard compounds. The linear calibration using two reference substances method was used to predict the retention time of other components, and the prediction was verified on another three unknown C₁₈ chromatographic columns. With the relative retention time (RRT) method, using blettiloside (Peak 5) as the reference compound, the retention times of the other five components were predicted. **Results:** A qualitative analysis method for the six components in *Bletillae Rhizoma* was established, which could accurately predict the retention times of each component in *Bletillae Rhizoma*. The standard retention times of the six components as follows: gastrodin 4.279 min, gymnadenin III 32.145 min, pleione bulbocodioides factor I 27.220 min, 2-*O*-glucosylbletilloside 28.603 min, blettiloside 33.509 min, and batatasin III 45.504 min. **Conclusion:** The linear calibration using two reference substances method can improve the prediction ability of the retention time of each component in *Bletillae Rhizoma*, thereby enhancing the accuracy and reliability of the analysis results.

Keywords: *Bletillae Rhizoma*; liner calibration with two reference substances; relative retention time; relative retention time; peak localization in chromatography

中药质量控制是确保中药产品安全、有效和符合规范的重要环节。中药成分的复杂性与多样性使得其质量控制具有一定挑战性,不同批次、不同产地的中药原料可能存在质量差异,需要针对性的控制措施。随着现代技术的发展,高效液相色谱、气相色谱、质谱及其联用等现代技术被广泛应用于中药质量控制,提高了对中药成分的分析 and 检测的精准度和可靠性。中药标准物质在中药质量控制中扮演着至关重要的角色,是保障中药产品质量的重要手段之一,但中药标准物质存在制备复杂,代表性不足,标准化难度大和成本高昂等缺点,给标准物质的使用与发展带来了挑战^[1]。目前,一测多评法与替代对照品法多作为减少标准物质,增加检测成分的常用方法^[2-6],2020年版《中华人民共和国药典》中,黄连、银黄口服液等产品采用相对保留时间(relative retention time, RRT)法进行定性分析。然而,由于色谱柱不同导致的色谱峰定位误差较大,RRT法的适用性受到限制。

双标线性校正(linear calibration with two reference substances, LCTRC)法基于一个原理,即待测试成分在不同的色谱柱中的保留时间呈线性相关,通过选用2种比较物质来对多个色谱峰进行定性鉴定^[7-8]。利用这一技术,显著提升了色谱峰识别的准确度和色谱

柱的通用性,还节约了检测成本。目前,该方法已经广泛应用于多组分色谱峰定性分析及含量测定中^[9-15]。

白及是兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎,气微,味苦,性微寒,归肺、肝、胃经^[16],具有止血补肺、生肌止痛等功效,常用于治疗内外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂等病症^[17]。目前,对于白及的相关文献报道多集中于白及苷(militarine)的含量测定及多糖提取工艺的研究^[18-19],对其相关的定性分析还处于空缺阶段。查阅文献发现,白及中的指标成分为天麻素、山慈菇素 I、2-*O*-葡萄糖基白及苷、手参苷 III、白及苷、山药素 III^[20-22]。本研究运用 HPLC 法,对白及中上述 6 个成分进行定性分析,以期对白及质量控制提供参考,拓宽双标线性校正法在中药分析中的应用。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-16 型高效液相色谱仪(苏州岛津仪器有限公司),SK8200LHC 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司),WP-UP-WF-20 型微量分析型超纯水机(四川沃特尔水处理设备有限公司),ME204E/02X 型万分之一电子天平(梅特勒-托利多有限公司)。

1.2 试药

对照品天麻素(批号 PS012103,纯度 98.5%)、山慈菇素 I(批号 PS012009,纯度 98.0%)、2-O-葡萄糖基白及苷(批号 PS011099,纯度 98.0%)均购自成都普思生物科技有限公司,手参苷 III(批号 WP23051303,纯度 98%)、白及苷(批号 WP23091501,纯度 8%)、山药素 III(批号 WP24010210,纯度 98%)均购自四川省维克奇生物科技有限公司。乙腈、甲醇为色谱纯,购自安徽天地高纯溶剂有限公司;水为实验室超纯水系统制备所得。

白及药材采集自贵州省黔东南苗族侗族自治州

三穗县,经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

16 根色谱柱,编号 col 1~col 16,规格为 250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 详细信息见表 1。以水(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~11 min, 12%B; 11~58 min, 12%B → 68%B; 58~65 min, 68%B → 12%B), 流速为 0.9 mL · min⁻¹, 进样量为 5 μL, 柱温为 30℃, 检测波长为 280 nm。方法学考察均使用 col 1 色谱柱。

表 1 色谱柱信息表

Tab. 1 Information of columns 1

色谱主编号 (column)	品牌 (brand)	型号 (type)	色谱主编号 (column)	品牌 (brand)	型号 (type)
col 1	Ultimate	XB-C ₁₈	col 9	Xtimate	C ₁₈
col 2	GL Sciences	Wondasil C ₁₈	col 10	Ultimate	LP-C ₁₈
col 3	迪马(Dima)	Kromasil 100A C ₁₈	col 11	Ultimate	AQ-C ₁₈
col 4	中谱科技(ZHONGPU TECHNOLOGY)	RD-C ₁₈	col 12	ZORBAX	Eclipse XDB-C ₁₈
col 5	中谱红	AQ-C ₁₈	col 13	Pntulips	QS-C ₁₈
col 6	Thermo	Hypersil GOLD aQ C ₁₈	col 14	ACE	5 C ₁₈
col 7	依利特(Elite)	Suoersil ODS2	col 15	GRACE	Alltima C ₁₈
col 8	中谱红	PR-C ₁₈	col 16	GL Sciences	Wondasil C ₁₈ -WR

2.2 混合对照品溶液的制备

取天麻素、2-O-葡萄糖基白及苷、山慈菇素 I、手参苷 III、山药素 III、白及苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 2.621 3、0.412 7、3.051 6、0.653 2、4.560 7、1.912 6 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液;分别精密称取天麻素、2-O-葡萄糖基白及苷、山慈菇素 I、山药素 III、白及苷的对照品储备液各 50 μL,手参苷 III 对照品储备液 100 μL,置于同一 1 mL 量瓶中,加 50% 甲醇定容,摇匀,滤过,即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取白及粉末(过 3 号筛)约 0.5 g,精密称定,加入 50% 甲醇 25 mL,称量,加热回流处理 60 min,放冷后再次称量,用 50% 甲醇补足损失的量,摇匀,3 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取离心液蒸干,残渣用甲醇溶解,转移至 25 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.4 方法学考察

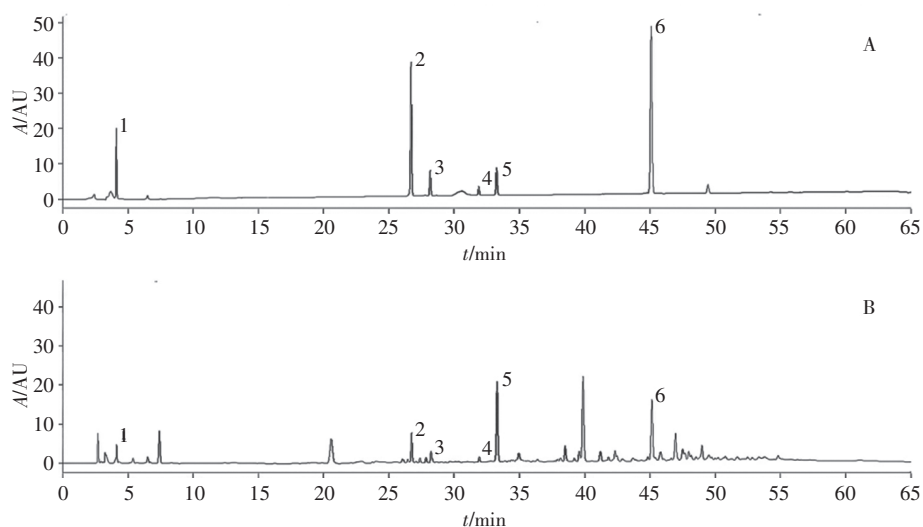
2.4.1 精密度试验 取白及样品(批号 20231013),按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下,使用色谱柱 col 1 连续进样测定 6 次,结果显示天麻素、山慈菇素 I、2-O-葡萄糖基白及苷、手参苷 III、白及苷、山药素 III 保留时间的 RSD 分别为 0.32%、0.080%、0.076%、0.057%、0.059%、0.053%,

表明该方法具有良好的精密度。

2.4.2 重复性试验 取白及样品(批号 20231013)6 份,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下,使用色谱柱 col 1 进行测定,结果显示天麻素、山慈菇素 I、2-O-葡萄糖基白及苷、手参苷 III、白及苷、山药素 III 保留时间的 RSD 分别为 0.045%、0.037%、0.031%、0.024%、0.024%、0.021%,表明该方法具有良好的重复性。

2.4.3 稳定性试验 取白及样品(批号 20231013),按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下,使用 col 1 色谱柱分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 进样,结果显示天麻素、山慈菇素 I、2-O-葡萄糖基白及苷、手参苷 III、白及苷、山药素 III 保留时间的 RSD 分别为 0.082%、0.043%、0.052%、0.053%、0.051%、0.045%,表明该方法具有良好的稳定性。

2.4.4 色谱柱耐用性试验 取白及样品(批号 20231013),按照“2.3”项下方法制备供试品溶液。在上述色谱条件下,使用上述 16 根不同色谱柱(col 1~col 16)分别分别进样测定,考察 6 个成分的分离效果。结果显示采用 col 13、col 14、col 15 色谱柱的色谱图中存在色谱柱分离度较差的问题,其余色谱柱均可将 6 个对照品色谱峰较好分离。图 1 为样品的代表性图谱。



1. 天麻素 (gastrodin) 2. 山慈菇素 I (shancigusuin I) 3. 2-O-葡萄糖基白及苷 (dactylorhin A) 4. 手参苷 III (gymnoside III)
5. 白及苷 (militarine) 6. 山药素 III (batatasin III)

图 1 混合对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 色谱图 (col 1)

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and sample (B) (col 1)

3 双标线性校正法定性研究

3.1 双标的选择和标准保留时间的计算

王龙星等^[23]研究发现,在不同色谱柱及色谱系统中,保持相同的操作条件下的保留时间均呈线性相关。在对各成分进行色谱峰的定位时,不同对照品保留时间也不同,因此,可以得到样品的实际保留时间,在 16 根色谱柱中, col 13、col 14 和 col 15 无法将 6 个成分分离,其余 13 根色谱柱的数据均可以进行分析。孙磊等^[6]将标准保留时间 (standard retention time, SRT) 定义为不同色谱柱上各成分的实际保留时间的均值。以 6 个成分的 SRT 为横坐标 (天麻素 4.279 min、2-O-葡萄糖基白及苷 28.553 min、山慈菇素 I 27.179 min、手参苷 III 32.145 min、山药素

III 45.339 min、白及苷 33.145 min), 实际保留时间为纵坐标,可以得到 13 根色谱柱中各成分的拟合结果,见图 2。线性回归方程和相关系数见表 2。结果显示,各色谱柱上不同成分的线性关系良好。

3.2 双标化合物的确定和优化

采用 DRS Origin 软件对 13 根色谱柱的数据进行分析,系统通过方法优化,对保留时间偏差、预测准确率和色谱柱符合率自动进行计算,得到天麻素与手参苷 III 组合的预测正确率为 100%, 色谱柱符合率为 80.77%。根据预测结果,将天麻素与手参苷 III 作为白及高效液相色谱的双标化合物,以色谱柱 col 1 为例,将这 2 个成分的标准保留时间 (天麻素 4.279 min、手参苷 III 32.145 min) 作为横坐标,实际保留时间 (天麻素

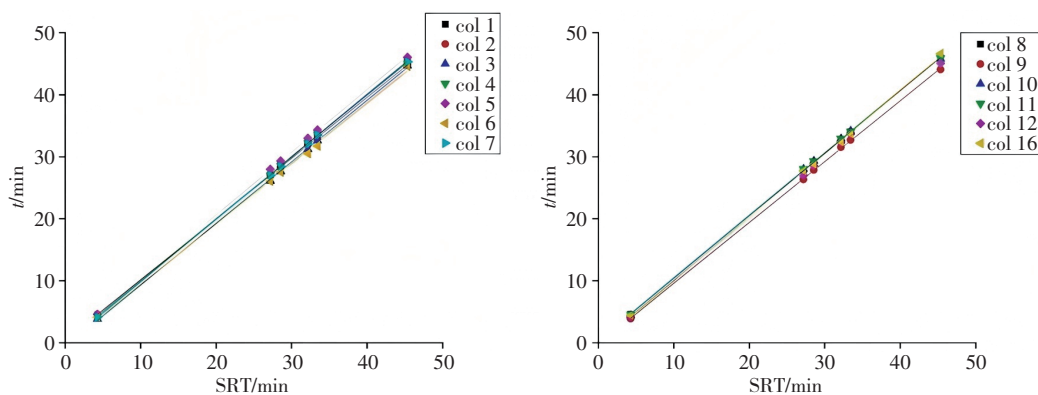


图 2 13 根色谱柱保留时间关系

Fig. 2 Retention time relationship of 13 chromatographic columns

表 2 13 根色谱柱上保留时间的线性方程和相关系数

Tab. 2 Linear equations and correlation coefficients of retention time on 13 chromatographic columns

色谱柱 (column)	线性方程 (linear equation)	r
col 1	$Y=1.006 5X-0.174 5$	1.000
col 2	$Y=0.980 7X+0.340 1$	0.999 9
col 3	$Y=0.993 5X-0.630 4$	0.999 7
col 4	$Y=0.996 9X+0.053 4$	0.999 8
col 5	$Y=1.011 6X+0.377$	0.999 9
col 6	$Y=0.976X-0.367 5$	0.998 8
col 7	$Y=1.003 8X-0.187 5$	1.000
col 8	$Y=1.007 2X+0.351 8$	1.000
col 9	$Y=0.981 9X-0.237 7$	0.999 8
col 10	$Y=1.010 8X+0.298 3$	0.999 7
col 11	$Y=1.009 1X+0.384 4$	0.999 8
col 12	$Y=0.999 8X-0.033 3$	0.999 8
col 16	$Y=1.022 1X-0.174 2$	0.999 5

4.164 min、手参苷 III 32.220 min) 为纵坐标, 得到两点方程 $Y=1.006 8X-0.143 7$, 之后将其余 4 个成分的标准保

留时间代入方程 (X 值), 得到 4 个成分的预测保留时间分别为山慈菇素 I 27.220 min、2-O-葡萄糖基白及苷 28.603 min、白及苷 33.509 min、山药素 III 45.504 min。实际保留时间依次为 27.038、28.514、33.597、45.447 min, 偏差的绝对值依次为 0.041、0.050、0.084、0.165 min, 均不超过 0.5 min, 满足要求^[24], 表明在色谱柱 col 1 上, 该双标成分的预测结果良好。

3.3 LCTRS 法与 RRT 法的对比

将 LCTRS 法与 RRT 法这 2 种对照品替代法在定性分析中的准确性进行比较, LCTRS 法以天麻素与手参苷 III 作为双标化合物, RRT 法则以白及苷进行参照, 相对保留时间法的均值分别为天麻素 0.128、山慈菇素 I 0.813、2-O-葡萄糖基白及苷 0.854、手参苷 III 0.962、山药素 III 1.357。如表 3~5 所见, 除最大绝对偏差外, 其余 5 项指标都表明 LCTRS 法相较于 RRT 法在定性分析上的优势更大, 适用范围广, 能够更准确地预测成组分的保留时间。

表 3 LCTRC 法和 RRT 法预测结果比较

Tab. 3 Comparison of results predicted by LCTRC method and RRT method

指标 (indexes)	LCTRS	RRT
最大绝对偏差 (maximum absolute deviation) /min	1.554	1.495
最大相对偏差 (maximum relative deviation) /%	3.61	9.10
绝对偏差 ≤ 0.3 min 百分比 (the percentage that absolute deviation ≤ 0.3 min) /%	76.92	70.77
相对偏差 ≤ 5% 百分比 (the percentage that relative deviation ≤ 5%) /%	100	93.85
绝对偏差 ≤ 0.5 min 的适用色谱柱数量 (the number of applicable columns with absolute deviation ≤ 0.5 min)	8	7
相对偏差 ≤ 5% 的适用色谱柱数量 (the number of applicable columns with relative deviation ≤ 5%)	13	9

表 4 2 种方法在各色谱柱上保留时间预测值的绝对偏差 (min)

Tab. 4 The absolute deviation of retention time prediction values on each chromatographic column for the two methods

色谱柱 (column)	天麻素 (gastrodin)		山慈菇素 I (shanciguisin I)		2-O-葡萄糖基白及苷 (dactylorhin A)		手参苷 III (gymnoside III)		白及苷 (militarine)		山药素 III (batataasin III)	
	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT
col 1	/	-0.135	0.041	-0.280	0.050	-0.186	/	-0.090	0.084	/	0.165	-0.135
col 2	/	0.347	0.013	0.452	0.141	0.229	/	0.295	0.441	/	0.599	0.329
col 3	/	0.379	-0.232	-0.420	-0.040	-0.211	/	-0.162	0.143	/	0.536	0.460
col 4	/	-0.057	-0.186	-0.306	-0.039	-0.156	/	-0.144	0.138	/	-0.396	-0.586
col 5	/	0.193	0.053	0.072	-0.021	-0.005	/	-0.030	0.028	/	-0.402	-0.540
col 6	/	0.068	0.242	0.250	0.397	0.408	/	-0.017	0.009	/	1.554	1.495
col 7	/	-0.156	-0.110	-0.242	-0.022	-0.149	/	-0.140	0.130	/	0.004	-0.133
col 8	/	0.232	0.125	0.212	0.008	0.090	/	0.042	-0.043	/	-0.184	-0.237
col 9	/	-0.301	-0.292	-0.266	-0.120	-0.071	/	0.083	-0.111	/	-0.574	-0.312
col 10	/	0.031	0.168	0.222	0.070	0.128	/	0.044	-0.055	/	-0.627	-0.581
col 11	/	0.188	0.197	0.359	0.024	0.187	/	0.140	-0.150	/	-0.412	-0.297
col 12	/	-0.133	-0.270	-0.369	-0.102	-0.196	/	-0.107	0.095	/	-0.494	-0.592
col 16	/	0.091	0.350	0.347	0.025	0.019	/	-0.039	0.033	/	0.993	0.890

表 5 2 种方法在各色谱柱上保留时间预测值的相对偏差 (%)

Tab. 5 The relative deviation of retention time prediction values on each chromatographic column for the two methods

色谱柱 (column)	天麻素 (gastrodin)		山慈菇素 I (shanciguisin I)		2-O-葡萄糖基白及苷 (dactylorhin A)		手参苷 III (gymnoside III)		白及苷 (militarine)		山药素 III (batatasin III)	
	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT
col 1	/	-3.144	0.150	-0.974	0.155	-0.554	/	-0.278	0.250	/	0.363	-0.296
col 2	/	8.256	0.048	1.612	0.445	0.696	/	0.935	1.344	/	1.336	0.739
col 3	/	9.096	-0.877	-1.508	-0.128	-0.648	/	-0.517	0.439	/	1.214	1.039
col 4	/	-1.316	-0.682	-1.067	-0.119	-0.464	/	-0.446	0.410	/	-0.871	-1.284
col 5	/	4.401	0.189	0.247	-0.065	-0.015	/	-0.091	0.082	/	-0.866	-1.159
col 6	/	1.678	0.937	0.921	1.300	1.284	/	-0.056	0.029	/	3.610	3.470
col 7	/	-3.630	-0.406	-0.847	-0.069	-0.446	/	-0.436	0.388	/	0.010	-0.293
col 8	/	5.337	0.453	0.732	0.025	0.265	/	0.129	-0.127	/	-0.399	-0.513
col 9	/	-7.198	-1.098	-0.952	-0.381	-0.216	/	0.263	-0.340	/	-1.285	-0.704
col 10	/	0.713	0.606	0.760	0.213	0.375	/	0.135	-0.161	/	-1.351	-1.253
col 11	/	4.318	0.712	1.233	0.073	0.550	/	0.428	-0.439	/	-0.890	-0.644
col 12	/	-3.090	-0.986	-1.285	-0.314	-0.582	/	-0.331	0.283	/	-1.085	-1.297
col 16	/	2.103	1.278	1.205	0.076	0.057	/	-0.122	0.099	/	2.176	1.946

3.4 样品分析

使用 3 根新的色谱柱 (col 17、col 18 和 col 19), 对已建立的 2 种方法进行验证, 结果见表 6、7。将 2 种方法得到的预测值与实测值进行分析, 结果表

明, LCTRC 法所得到的各成分的绝对偏差与相对偏差均低于 RRT 法, 可较好地预测白及样品中各个指标成分在 3 根新色谱柱上的保留时间, 且准确度更高。

表 6 3 根色谱柱上保留时间预测值的绝对偏差 (min)

Tab. 6 The absolute deviation of retention time prediction values on 3 chromatographic columns

色谱柱 (column)	天麻素 (gastrodin)		山慈菇素 I (shanciguisin I)		2-O-葡萄糖基白及苷 (dactylorhin A)		手参苷 III (gymnoside III)		白及苷 (militarine)		山药素 III (batatasin III)	
	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT
col 17	/	0.368	0.201	0.431	-0.023	0.200	/	0.200	-0.194	/	0.469	0.586
col 18	/	-0.184	-0.113	-0.214	-0.004	-0.099	/	-0.081	0.076	/	-0.328	-0.363
col 19	/	-0.190	-0.089	-0.225	0.026	-0.105	/	-0.122	0.118	/	-0.141	-0.234

表 7 3 根色谱柱上保留时间预测值的相对偏差 (%)

Tab. 7 The relative deviation of retention time prediction values on 3 chromatographic columns

色谱柱 (column)	天麻素 (gastrodin)		山慈菇素 I (shanciguisin I)		2-O-葡萄糖基白及苷 (dactylorhin A)		手参苷 III (gymnoside III)		白及苷 (militarine)		山药素 III (batatasin III)	
	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT	LCTRC	RRT
col 17	/	8.663	0.755	1.538	-0.072	0.445	/	0.631	-0.432	/	1.042	1.305
col 18	/	-4.247	-0.413	-0.746	-0.011	-0.214	/	-0.250	0.165	/	-0.714	-0.789
col 19	/	-4.416	-0.329	-0.792	0.082	-0.231	/	-0.381	0.260	/	-0.311	-0.515

4 讨论

4.1 检测波长的选择

本实验考察了 270 nm 和 280 nm 2 种检测波长, 通过测量样品的吸收度, 确定最大吸收波长, 结合色谱峰的分离效果, 最终选择 280 nm 作为检测波长, 白及 6 个成分的吸收效果较好, 其他组分的干扰较小。

4.2 方法适用性

中药通常蕴含多种特征成分, 这些成分的类型丰富多样。LCTRC 法能同时对多个不同类型的成分进行有效处理, 无需针对每种类型的成分构建独立的分析方法。本研究选用的 6 个成分共分为 3 种类型 (天麻素为苷类; 山慈菇素 I、山药素 III 为联苜类;

2-O-葡萄糖基白及苷、手参苷Ⅲ、白及苷为酯类)。因此, LCTRC法不仅对相同类型的成分有较好的预测效果, 对不同类型成分的预测效果也较好, 减少了实验操作的复杂性, 适用于中药成分分析中的大规模数据处理需求。

4.3 应用

作为替代对照品法的一种, LCTRC法对于对照品较为昂贵或无法获取相应对照品的情况展现了较大的优势。通过利用双标成分来调整和校正数据, 在确保双标成分能够较好预测的情况下, LCTRC法能够提供一种有用的替代方案, 模拟对照品的效果, 从而在缺乏对照品或对照品昂贵的情况下仍能进行准确的定性分析。同时为复杂成分的分析提供了更加简便的方法, 使之能够同时检测不同类型成分, 通用性强。

对目标成分的准确定位是中药材含量测定的前提。在中药材研究过程中, 定性分析也是十分重要的一环。根据实验结果显示, LCTRC法对于白及多种成分的定性分析有较大优势。相较于RRT法, LCTRC法可以提高对各组分保留时间的准确预测能力, 从而提高分析结果的准确性和可靠性, 且不受色谱柱类型限制, 可以适用于不同类型的成分, 从而扩大了其在不同分析条件下的适用范围, 减少检验成本。但是, 双标线性校正技术目前仅能用于高效液相色谱的定性分析上, 对于高效液相色谱的含量测定、气相色谱及质谱分析仍需要更加深入的研究。

参考文献

- [1] 李天娇, 包永睿, 王帅, 等. 中药质量控制与评价创新方法研究进展及应用[J]. 中草药, 2022, 53(20): 6319
LI TJ, BAO YR, WANG S, *et al.* Research progress and application of innovative methods for quality control and evaluation of traditional Chinese medicine[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(20): 6319
- [2] 王清君, 孙磊, 刘峰, 等. 标准物质的发展和与挑战与数字化新形式[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(18): 1537
WANG QJ, SUN L, LIU F, *et al.* Progress and challenges of reference standards and their new form: digital reference standards(DRS)[J]. *Chin Pharm J*, 2016, 51(18): 1537
- [3] 李灿琳, 刘海洋, 李思, 等. 一测多评法测定大花龙胆中环烯醚萜类和黄酮类成分的含量[J]. 中草药, 2024, 55(2): 614
LI CL, LIU HY, LI S, *et al.* Determination of iridoids and flavonoids in *Gentiana szechenyii* by quantitative analysis of multi-components with single marker[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(2): 614
- [4] 彭思源, 邓元辉, 丁婵, 等. 基于HPLC指纹图谱与一测多评法结合的桑黄品质评价研究[J]. 中国药理学杂志, 2024, 59(6): 531
PENG SY, DENG YH, DING C, *et al.* Quality evaluation of *Sanghuangporus* by HPLC fingerprint combined with quantitative analysis of multi-components with a single-marker method[J]. *Chin Pharm J*, 2024, 59(6): 531
- [5] 万鸣, 黄超, 陈树和, 等. 替代对照品法同时测定茯苓中多种三萜酸类成分的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(3): 265
WAN M, HUANG C, CHENG SH, *et al.* Simultaneous determination of triterpenoid acids in *Poria cocos* by substituting reference substance method[J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2023, 43(3): 265
- [6] 刘航, 魏长勇, 余敏灵. 替代对照品法测定甘草流浸膏中甘草苷和甘草酸含量[J]. 现代医药卫生, 2021, 37(1): 47
LIU H, WEI CY, YU ML. Content determination of liquiritin and glycyrrhizic acid in licorice liquid extract by substitute reference substance method[J]. *J Mod Med Health*, 2021, 37(1): 47
- [7] 孙磊, 金红宇, 逢瑜, 等. 双标多测法 I——双标线性校正技术用于色谱峰的定性[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(8): 1424
SUN L, JIN HY, PANG Y, *et al.* Two reference substances for determination of multiple components(I): linear calibration using two reference substances for identification of chromatographic peaks[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(8): 1424
- [8] 孙磊, 逢瑜, 金红宇, 等. 双标多测法 II——检测波长选择对定量分析的影响[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1578
SUN L, PANG Y, JIN HY, *et al.* Two reference substances for determination of multiple components(II): influence of detection wavelength selection on quantitative analysis[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(9): 1578
- [9] 栾永福, 臧远芳, 刘洪超, 等. 基于双标线性校正法的银黄口服液多组分定性分析[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(6): 1091
LUAN YF, ZANG YF, LIU HC, *et al.* Qualitative determination of multiple components in Yinhuang oral liquid by linear calibration using two reference substances[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(6): 1091
- [10] 赵一擎, 张红伟, 王晓燕, 等. 双标线性校正法用于一清颗粒的多指标成分定性分析[J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(12): 1021
ZHAO YQ, ZHANG HW, WANG XY, *et al.* Determination of multiple components in Yiqing granules by liner calibration with two reference substances[J]. *Chin Pharm J*, 2022, 57(12): 1021
- [11] 张毅, 周洪旭, 孟大利, 等. 双标线性校正法用于川黄芩的多成分定性分析[J]. 食品与药品, 2022, 24(6): 487
ZHANG Y, ZHOU HX, MENG DL, *et al.* Multicomponent qualitative analysis of *Scutellariae Amoena Radix* by linear calibration using two reference substances[J]. *Food Drug*, 2022, 24(6): 487
- [12] 张琳琳, 董婷, 陈碧莲, 等. 双标线性校正法用于延胡索中5个生物碱的定性分析[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(1): 77
ZHANG LL, DONG T, CHENG BL, *et al.* Simultaneous qualitative analysis of five alkaloids in *Corydalis Rhizoma* by the method of liner calibration with two reference substances[J]. *Chin J Pharm Anal*,

- 2023, 43(1): 77
- [13] 牛艳, 栾永福, 许丽丽, 等. 双标线性校正法用于槐角炭的指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(9): 1652
NIU Y, LUAN YF, XU LL, *et al.* Fingerprint analysis of Sophorae Fructus Carbonisata by linear calibration using two reference substances[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(9): 1652
- [14] 张红伟, 赵一擎, 王晓燕, 等. 双标线性校正法辅助色谱峰定位对牛黄上清制剂的多指标成分定性分析[J]. 中国药学杂志, 2022, 57(5): 385
ZHANG HW, ZHAO YQ, WANG XY, *et al.* Determination of multiple components in Niu Huang Shang Qing preparations by chromatographic peak identification assisted with liner calibration with two reference substances[J]. *Chin Pharm J*, 2022, 57(5): 385
- [15] 杨超, 李洋, 周娟. 双标线性校正法对茵栀黄胶囊液相色谱峰的定性分析[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(5): 906
YANG C, LI Y, ZHOU J. Qualitative analysis of chromatographic peaks based on liner calibration with two reference substances—taking Yinzhihuang capsules as an example[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(5): 906
- [16] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 106
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 106
- [17] 刘珈羽, 冯靖雯, 方皓, 等. 白及粉末入药历史沿革概述[J]. 中成药, 2018, 40(1): 176
LIU JY, FENG JW, FANG H, *et al.* Overview of the historical evolution of the use of Bletillae Rhizoma in medicine[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2018, 40(1): 176
- [18] 刘娜, 袁金凤, 彭诗涛, 等. 基于 militarine 含量结合 UPLC 指纹图谱的不同产地白及饮片质量分析[J]. 天津中医药, 2020, 37(5): 583
LIU N, YUAN JF, PENG ST, *et al.* Quality analysis of Bletillae Rhizoma slices from different producing areas based on the militarine content determination and establishment of fingerprint by UPLC[J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2020, 37(5): 583
- [19] 高笛, 罗成, 周凯, 等. 响应面法优化白及多糖提取工艺[J]. 海峡药学, 2024, 36(1): 30
GAO D, LUO C, ZHOU K, *et al.* Optimize the extraction technology of *Bletilla striata* polysaccharide by response surface method[J]. *Strait Pharm J*, 2024, 36(1): 30
- [20] 张涵瑞, 方敬贤, 孙志滢, 等. 基于指纹图谱和成分定量评价不同采收时间的白及质量[J]. 中药材, 2023, 46(9): 2254
ZHANG HR, FANG JX, SUN ZY, *et al.* Evaluate the quality of *Bletilla striata* from Hubei at different harvest time based on fingerprint mapping and quantitative analysis of components[J]. *J Chin Med Mater*, 2023, 46(9): 2254
- [21] 罗芳, 俞昉, 张琳晗, 等. 白及中的化学成分鉴定及对金葡萄菌的抑制机理研究[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(11): 1894
LUO F, YU Y, ZHANG LH, *et al.* Study on the chemical constituents from *Bletilla striata* and its antibacterial mechanism against *Staphylococcus aureus*[J]. *Nat Prod Res Dev*, 2023, 35(11): 1894
- [22] 陈长芬, 蒋赛, 娄华勇, 等. 黔产白及中糖苷类化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50(20): 4879
CHEN CF, JIANG S, LOU HY, *et al.* Glycoside constituents from *Bletilla striata*[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(20): 4879
- [23] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫森. 一种提高色谱指纹谱保留时间重现性的新方法[J]. 分析化学, 2003, 31(10): 1232
WANG LX, XIAO HB, LIANG XM. A new method for improving the reproducibility of retention time in chromatographic fingerprint spectra[J]. *Chin J Anal Chem*, 2003, 31(10): 1232
- [24] 陈蓉, 张超, 张华锋, 等. 双标线性校正法辅助色谱恒定性用于双黄连制剂的多组分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 40
CHEN R, ZHANG C, ZHANG HF, *et al.* Determination of multiple components in Shuanghuanglian preparations by liner calibration with two reference substances assisted with chromatographic peaks identification[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(8): 40

(本文于 2024 年 5 月 14 日收到)