

一测多评法测定手参中不同类型成分的含量

徐晓雪, 李晓鹏, 韩伟健, 郭娜, 林晓彤, 钟旭, 许枏*
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

[摘要] **目的:**建立手参中熊果苷,天麻素,4-羟基苯甲醇,militarine,loroglossin的一测多评含量测定方法,为手参的质量控制提供依据。**方法:**采用高效液相色谱法,以天麻素作为内参物,建立与其他4个指标成分间的相对校正因子(RCF),并利用校正因子对熊果苷,4-羟基苯甲醇,militarine,loroglossin的含量进行计算,实现一测多评(计算法);同时采用外标法测定10批手参中上述5种成分的含量,并比较计算值与测定值之间的差异,验证一测多评的合理性、可行性和重复性。**结果:**天麻素对熊果苷,4-羟基苯甲醇,militarine,loroglossin的相对校正因子分别为3.083 1(2.0%),1.562 2(2.1%),1.545 0(1.7%),1.742 5(1.9%);采用相对校正因子计算10批手参药材中5种成分的计算值与测定值的RSD均<3%,表明两者无显著差异。**结论:**建立的一测多评法准确可行,可以用于同时测定手参中天麻素,militarine,loroglossin等5种成分的含量。

[关键词] 手参;一测多评;相对校正因子;高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)18-0040-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015180040

Determination of Five Components in *Gymnadenia Conopsea* Rhizoma Based on QAMS XU Xiao-xue, LI Xiao-peng, HAN Wei-jian, GUO Na, LIN Xiao-tong, ZHONG Xu, XU Nan* (School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a quantitative analysis of multi-components by single-marker (QAMS) method for the simultaneous determination of five components (gastrodin, militarine, loroglossin, arbutin, 4-hydroxybenzenemethanol) in *Gymnadenia Conopsea* Rhizoma, in order to provide basis for the quality control. **Method:** Gastrodin was used as the internal reference substance, and the relative correlation factors (RCF) with militarine, loroglossin, arbutin and 4-hydroxybenzenemethanol were determined by HPLC-UV. The contents of the four components were calculated according to the RCF, respectively. The contents of these components in 10 batches of *Gymnadenia Conopsea* Rhizoma were determined by the external standard method. The rationality, feasibility, and repeatability of the QAMS method were verified by comparing the results obtained from the two different methods. **Result:** RCF of gastrodin-arbutin, gastrodin-4-hydroxybenzenemethanol, gastrodin-militarine and gastrodinloroglossin were 3.083 1 (2.0%), 1.562 2 (2.1%), 1.545 0 (1.7%), 1.742 5 (1.9%), respectively. For the five components, there was no significant difference between the calculated and determined values RSD (<3%) of the 10 batches by the two different methods. **Conclusion:** The method established in this study is accurate and feasible and can be used for the determination of five components in *Gymnadenia Conopsea* Rhizoma simultaneously.

[Key words] *Gymnadenia Conopsea* Rhizoma; quantitative analysis of multi-components by single-marker; relative correlation factors; HPLC

手参是传统蒙、藏族药^[1-3],有益气补血、生精止渴、消痰和止痛理气等功效^[4]。现代研究表明,手参具有提高脑内海马区的抗氧化酶活力,可清除

脑内氧化自由基,改善学习记忆能力等作用,是极具开发前景的阿兹海默症(Alzheimer's disease, AD)治疗药物,可通过抑制AD患者脑中胆碱酯酶

[收稿日期] 20150507(021)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2012BAI28B00)

[第一作者] 徐晓雪,在读硕士,从事天然药物的活性成分研究,Tel:0411-87586014,E-mail:xiaoxue29@icloud.com

[通讯作者] *许枏,博士,教授,从事天然药物的活性成分研究,Tel:0411-87586014,E-mail:xudanbs@163.com

(acetylcholinesterase, AchE) 活性、抑制 tau 蛋白异常过度磷酸化和调节淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的异常代谢从而改善记忆脑区的神经传递功能, 延缓 AD 疾病的发展进程, 发挥对 AD 患者增加记忆及认知行为的疗效^[5-6]。目前临床上已开发多种复方制剂, 如复方手参益智胶囊、复方手参丸等。手参中的熊果苷, *militarine*, *loroglossin*, 4-羟基苯甲醇是手参的活性成分^[7-8], 具有抗衰老^[9]、提高记忆力、扩张血管等作用^[10], 但这些成分的分纯化方法复杂, 尤其是苯基酯类化合物难以获得较高纯度, 给多指标成分含量测定带来对照品紧缺的麻烦。因此, 本文探索采用一测多评法 (quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS), 即以价廉易得的天麻素对照品为内参物, 实现对手参中天麻素, 熊果苷, *militarine*, *loroglossin*, 4-羟基苯甲醇等两种类型 5 种成分含量的同步测定。

1 仪器与试剂

1100 系列高效液相色谱仪 (包括四元泵、自动进样器、柱温箱、检测器、工作站, 美国安捷伦公司), LC-20 型高效液相色谱仪 (包括二元泵、自动进样器、柱温箱、检测器、工作站, 日本岛津公司), CP225D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司)。天麻素 (中国食品药品检定研究院, 批号 110807-200205, 含量 > 98%); *militarine*, *loroglossin*, 4-羟基苯甲醇和熊果苷均为本实验室自制 (纯度分别为 98.7%, 96.9%, 98.3%, 97.4%)。甲醇为色谱纯, 水为高纯水, 其余试剂均为分析纯。手参饮片购自安国药材市场, 由辽宁中医药大学王冰教授鉴定为手参 *Gymnadenia conopsea* 的干燥根茎。

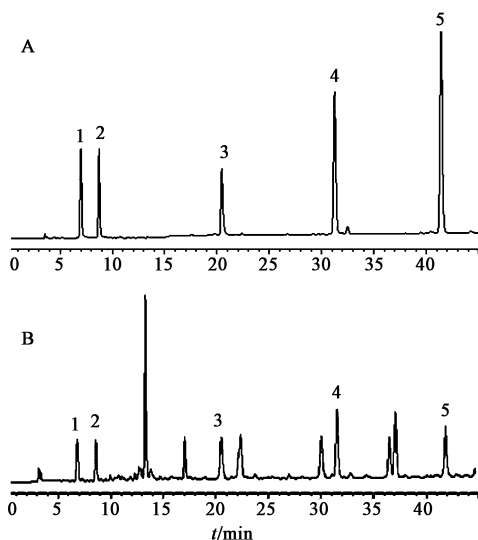
2 方法与结果

2.1 校正因子计算公式^[11] $f_{km} = f_k / f_m = W_k \times A_m / W_m \times A_k$, 其中 A_k 为内参物峰面积, W_k 为内参物浓度; A_m 为其他组分 m 峰面积, W_m 为其他组分 m 浓度。

2.2 方法学考察

2.2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 10 min, 10% ~ 30% A; 10 ~ 22 min, 30% ~ 40% A; 22 ~ 40 min, 40% ~ 55% A; 40 ~ 45 min, 55% ~ 70% A), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 220 nm, 柱温 25 °C, 进样量 15 μL。在上述色谱条件下, 各组分分离度良好, 见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取熊果苷, 天麻



A. 对照品; B. 供试品; 1. 熊果苷; 2. 天麻素; 3. 4-羟基苯甲醇; 4. *loroglossin*; 5. *militarine*

图 1 手参 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substance and sample

素, 4-羟基苯甲醇, *militarine*, *loroglossin* 对照品适量, 分别置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇制成约为 1 g·L⁻¹ 的单一对照品储备液, 备用。精密量取各对照品储备液适量至同一量瓶中, 制成含熊果苷, 天麻素, *militarine*, *loroglossin*, 4-羟基苯甲醇分别为 0.020 5, 0.020 0, 0.030 9, 0.050 3, 0.100 9 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取手参药材粉末 1 g, 精密称定, 置于 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 80% 甲醇 50 mL, 密塞, 称重, 超声处理 (功率 250 W, 频率 45 kHz) 30 min, 滤过, 用 80% 甲醇 20 mL 分次洗涤容器和药渣, 洗液与滤液合并, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇溶解, 转移至 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 线性关系 分别精密吸取上述混合对照品溶液 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL 注入液相色谱仪, 测定峰面积。以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线。结果表明, 各对照品溶液在一定范围内线性关系良好, 见表 1。

表 1 5 种对照品的线性关系

Table 1 Linear equations of five constituents

化合物	回归方程	r	线性范围/μg
熊果苷	$Y = 6.3541 \times 10^2 X + 6.4324$	0.9995	0.0410 ~ 0.4100
天麻素	$Y = 2.1262 \times 10^3 X + 0.9702$	0.9998	0.0400 ~ 0.4000
4-羟基苯甲醇	$Y = 1.5948 \times 10^3 X - 26.546$	0.9990	0.0618 ~ 0.6180
<i>militarine</i>	$Y = 1.4234 \times 10^3 X - 6.1134$	0.9992	0.1006 ~ 1.0060
<i>loroglossin</i>	$Y = 1.2698 \times 10^3 X - 21.141$	0.9991	0.2018 ~ 2.0180

2.2.5 精密度 精密吸取混合对照品溶液 15 μL , 连续进样 6 次, 测定峰面积。计算混合对照品中熊果苷, 天麻素, 4-羟基苯甲醇, *militarine*, *loroglossin* 峰面积的 RSD 分别为 1.1%, 0.6%, 0.7%, 0.9%, 1.3%。表明仪器精密度较好。

2.2.6 稳定性 取手参药材(批号 20131106)供试品溶液 15 μL , 分别于样品制备后的 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h 进样, 测定峰面积。结果熊果苷, 天麻素, 4-羟基苯甲醇, *militarine*, *loroglossin* 峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 1.7%, 1.9%, 0.9%, 1.1%。表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性 取手参药材(批号 20131106)粉末 1 g, 平行 6 份, 精密称定, 按 2.2.3 项下的方法制备供试品溶液, 进样 15 μL , 测定峰面积。结果熊果苷, 天麻素, 4-羟基苯甲醇, *militarine*, *loroglossin* 峰面积的 RSD 分别为 1.0%, 1.2%, 0.9%, 0.8%, 1.0%。表明本方法重复性较好。

2.2.8 加样回收率试验 取已知含量的手参药材(批号 20131106)粉末 0.5 g, 共 6 份, 精密称定, 分别按样品含量-对照品量(1:1)的大致比例加入 2.2.2 项下的混合对照品溶液, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 精密吸取上述供试品溶液 15 μL , 测定峰面积, 计算回收率, 结果见表 2。

表 2 手参中 5 种成分的加样回收率 ($n=6$)

Table 2 Sample recovery rate of five constituents ($n=6$)

成分	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	平均回 收率/%	RSD /%
熊果苷	0.106 3	0.102 5	0.204 6	95.90	0.7
天麻素	0.139 4	0.100 0	0.236 0	96.63	0.2
4-羟基苯甲醇	0.163 5	0.154 5	0.31 16	95.86	0.6
<i>militarine</i>	0.257 7	0.251 5	0.502 7	97.40	1.1
<i>loroglossin</i>	0.560 6	0.504 5	1.046 2	96.27	1.5

注: 称样量均为 0.501 4 mg。

2.3 相对校正因子的确定

2.3.1 手参中待测指标相对校正因子的计算 以天麻素为内参物, 建立天麻素与其他成分的相对校正因子, 按 2.1 项下公式分别计算熊果苷(a), 4-羟基苯甲醇(b), *militarine*(c), *loroglossin*(d) 与内参物天麻素(e)间的相对校正因子(f), 结果见表 3。

2.3.2 不同仪器及不同色谱柱考察 取 2.2.2 项下的混合对照品溶液, 进样 15 μL 测定, 计算天麻素对熊果苷, 4-羟基苯甲醇, *militarine*, *loroglossin* 的校正因子。该实验分别考察了不同高效液相色谱系统

表 3 5 种成分的相对校正因子

Table 3 Relative correlation factors of five constituents

进样体积/ μL	$f_{e/a}$	$f_{e/b}$	$f_{e/c}$	$f_{e/d}$
2	2.988 1	1.551 1	1.548 1	1.724 4
4	3.126 3	1.602 8	1.511 4	1.754 9
8	3.047 6	1.521 4	1.584 2	1.694 4
12	3.157 4	1.543 2	1.533 0	1.791 5
16	3.077 2	1.600 5	1.531 1	1.754 5
20	3.102 1	1.554 3	1.561 9	1.735 4

(Agilent 1100, 岛津 LC-20) 及不同色谱柱 Kromasil C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), Hypersil C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) 对相对校正因子的影响, 结果表明熊果苷, 4-羟基苯甲醇, *militarine*, *loroglossin* 与内参物天麻素间的相对校正因子重复性良好 (RSD < 3%), 见表 4。

表 4 不同仪器和色谱柱对 5 种成分的相对校正因子影响

Table 4 Relative correlation factors of five constituents on different instruments and columns

仪器	色谱柱	相对校正因子			
		$f_{a/b}$	$f_{a/c}$	$f_{a/d}$	$f_{a/e}$
Agilent 1100	Kromasil C ₁₈	3.076 8	1.557 4	1.550 4	1.740 8
	Hypersil C ₁₈	3.112 1	1.537 6	1.524 2	1.698 3
岛津 LC 20	Kromasil C ₁₈	3.064 5	1.601 2	1.564 6	1.735 1
	Hypersil C ₁₈	3.103 3	1.586 3	1.594 3	1.722 4

2.4 待测组分数谱峰的定位 分别计算各待测组分与内参物天麻素的相对保留时间作为色谱峰定位标准, 并考察了不同仪器和色谱柱中各待测成分色谱峰与天麻素色谱峰的相对保留时间, 结果表明被测成分在不同仪器和色谱柱中的相对保留时间波动小 (RSD < 3%)。因此, 利用相对保留时间进行峰的定位是可行的, 结果见表 5。

表 5 不同仪器和色谱柱测得的相对保留时间

Table 5 Retention time (t_R) of five constituents on different instruments and columns

仪器	色谱柱	t_R			
		e/a	e/b	e/c	e/d
Agilent 1100	Kromasil C ₁₈	0.602 1	0.811 4	1.204 3	1.465 1
	Hypersil C ₁₈	0.611 4	0.823 7	1.210 7	1.452 6
岛津 LC 20	Kromasil C ₁₈	0.624 3	0.832 3	1.221 9	1.517 3
	Hypersil C ₁₈	0.617 6	0.826 4	1.231 3	1.493 8

2.5 一测多评法与外标法测定结果比较 按 2.2.3 项下的方法, 制备 10 批手参药材的供试品溶液, 精密吸取各 15 μL , 进样测定峰面积。分别采用

外标法与一测多评法计算手参药材中熊果苷,天麻素,4-羟基苯甲醇, militarine, loroglossin 的含量,结果

见表 6。经 *t* 检验,表明一测多评法与外标法测得含量之间无显著性差异。

表 6 一测多评法与外标法测得的 5 种成分的质量分数比较

样品	天麻素		熊果苷		4-羟基苯甲醇		militarine		loroglossin	
	外标法	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	外标法	QAMS	
20110105	0.218	0.211	0.209	0.326	0.321	0.514	0.511	1.308	1.304	
20110824	0.160	0.203	0.204	0.312	0.314	0.498	0.495	0.996	0.998	
20110502	0.281	0.115	0.116	0.654	0.656	0.531	0.533	1.212	1.215	
20110728	0.271	0.209	0.207	0.320	0.318	0.710	0.712	1.414	1.411	
20111109	0.174	0.155	0.154	0.353	0.350	0.521	0.518	1.619	1.614	
20120206	0.283	0.216	0.218	0.430	0.432	0.434	0.436	1.224	1.227	
20130411	0.269	0.178	0.175	0.338	0.335	0.548	0.545	1.196	1.198	
20130606	0.214	0.265	0.267	0.515	0.514	0.312	0.306	0.800	0.806	
20130815	0.276	0.219	0.215	0.324	0.320	0.506	0.510	1.511	1.513	
20131106	0.278	0.212	0.211	0.326	0.329	0.514	0.517	1.118	1.116	

3 讨论

比较了甲醇-水,乙腈-水,甲醇-磷酸水,甲醇-冰乙酸水等多种流动相,最终确定甲醇(A)-0.1%磷酸水(B),梯度洗脱(0~10 min,10%~30% A;10~22 min,30%~40% A;22~40 min,40%~55% A;40~45 min,55%~70% A);流速 1.0 mL·min⁻¹,样品分离度良好,峰型对称。由于 5 个对照品结构类似,紫外吸收相近,在 220 nm 处有较大吸收,故实验选取 220 nm 为测定波长。

为了验证所建立的 5 种成分一测多评法的适用性及可行性,进行了方法学考察、待测组分色谱峰的定位,校正因子的重复性考察。通过不同的高效液相色谱仪、不同色谱柱的考察,结果表明天麻素与熊果苷, militarine, loroglossin, 4-羟基苯甲醇之间的相对校正因子具有良好的重复性。在考察待测组分色谱峰的定位时,选择了偏差较小的相对保留时间作为色谱峰的定位依据。结果表明,在所使用的色谱条件下,根据内参物天麻素的保留时间,通过相对保留值计算能够准确判断另外 4 种被测成分色谱峰的准确位置。

本研究将一测多评法应用于手参的质量评价中,并建立了 2 种类型 5 种成分含量测定方法。结果显示,所建立的一测多评法与传统的外标法所得数据无显著性差异,表明本方法不仅可以节省对照品,而且可以节省时间,仅以天麻素为对照品,实现手参中多指标含量的测定。

[参考文献]

[1] 李敏,王春兰.手参属植物化学成分及药理活性研究

进展[J].中草药,2006,37(8):1264-1268.

[2] 邹成林,刘锋林.藏医与中医对手参的应用探讨[J].甘肃中医学院学报,2001,18(4):43-44.

[3] 杨永昌.藏药志[M].西宁:青海人民出版社,1995:246.

[4] 朗楷永,陈心启,罗毅波,等.中国植物志[M].北京:科学出版社,1999:228-388.

[5] 张丹,王亚芳,张建军.藏药旺拉提取物 CE 对亚急性衰老小鼠学习记忆及抗氧化能力的影响[J].中国新药杂志,2005,14(11):1301-1304.

[6] 杨蓓蓓,李帅,张瑞萍,等.HPLC 测定藏药手掌参拉旺中 4 种有效成分的含量[J].中国中药杂志,2009,34(14):1819-1822.

[7] 旺其格,全喜.蒙药手掌参研究进展[J].中国民族民间医药,2011,9(18):1-2.

[8] Toshio Morikawa, Haihui Xie, Hisashi Matsuda¹, et al. Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XVII. 1) constituents with radical scavenging effect and new glucosyloxybenzyl 2-isobutylmalates from *Gymnadenia conopsea* [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54(4):506-513.

[9] 中国医学科学院药物研究所.中草药现代研究[M].北京:中国协和医科大学出版社,2010:497-508.

[10] 陈义辉,李哲,穆海玉,等.手掌参临床应用研究[J].健康必读,2012,11(2):428-430.

[11] 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.

[责任编辑 顾雪竹]