

一测多评法测定藏族药肉果草中4种成分的含量

乔媛媛, 余婷婷, 郑彩霞, 魏屹*, 谭睿*
(西南交通大学生命科学与工程学院, 成都 610031)

[摘要] 目的:建立藏族药肉果草中4种成分的一测多评定量测定方法,考察不同类型化合物之间采用相对校正因子(relative correction factors, RCF)进行含量测定的准确性和可行性。方法:以藏族药肉果草为研究对象,建立内参物毛蕊花糖苷与其他3个指标成分间的RCF因子,并利用RCF计算含量,实现一测多评。同时采用外标法测定这4个成分的含量,比较二者间的差异。结果:在一定的线性范围内,毛蕊花糖苷与梓醇、连翘苷、连翘脂素间的RCF分别为7.044 9, 2.135 0, 0.964 7;在不同试验条件下重复性良好(RSD分别为0.3%, 1.2%, 1.2%);且不同来源的肉果草中4个成分含量的一测多评法计算值与外标法测定结果间无明显差异。结论:肉果草中4个成分的一测多评法准确可行,适用于肉果草中成分的含量测定,为藏族药的多指标质量评价提供了新的参考。

[关键词] 一测多评; 藏族药; 肉果草; 相对校正因子

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0099-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220099

Simultaneous Determination of 4 Constituents in Tibetan Herb-medicine *Lancea tibetica* by HPLC-QAMS

QIAO Yuan-yuan, YU Ting-ting, ZHENG Cai-xia, WEI Yi*, TAN Rui* (School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quantitative assay of multi-components by single marker (QAMS) for determination of four bioactive components in *Lancea tibetica*, and examine the accuracy and feasibility of the relative correction factors (RCFs) between different types of compounds. **Method:** *L. tibetica* was chosen as the research object, and RCFs were determined between acteoside and catalpol, phillyrin and phillygenol. The contents of the four constituents were also calculated according to the RCFs to carry out QAMS. Difference of QAMS and external standard method was investigated to validate the accuracy and feasibility of the QAMS method. **Result:** RCFs between acteoside and catalpol, phillyrin and phillygenol were 7.044 9, 2.135 0 and 0.964 7 respectively within a certain linear range; repeatability was good in different experimental conditions (RSDs were 0.3%, 1.2% and 1.2% respectively); there was no significant differences between the quantitative results of QAMS method and external standard method for 4 constituents. **Conclusion:** It is accurate and feasible to evaluate 4 constituents of *L. tibetica* by QAMS. Therefore, this method is suitable to determine different types of components, and can provide a new reference for the quality assessment of Tibetan herb-medicine.

[Key words] quantitative analysis of multi-components by single marker; Tibetan Herb-medicine; *Lancea tibetica*; relative correction factors

肉果草是藏族医常用药材,有愈合脉管,涩脉止血,生脂,消散外部肌肿之效;其根养肺,托引肺脓;叶治诸疮;种子还可治心脏病、血瘤、舒肠绞结等。

属藏族药中的上品。近年来,国内对肉果草的研究有所增加,包括其化学成分研究、化学成分含量测定等,但采用一测多评法测定肉果草中多种成分的含

[收稿日期] 20150113(016)

[基金项目] 国家重大新药创制“科技重大专项”(2013ZX09103-002-014);国家自然科学基金面上项目(81473337);国家药典委员会2015年版《中国药典》提高项目(Q024131113010030)

[第一作者] 乔媛媛,在读硕士,从事药物分析与药品质量研究, Tel:15208112573, E-mail:1025980910@qq.com

[通讯作者] *魏屹,副教授,从事生药分析与药品质量研究, Tel:15928920660, E-mail:weiyixy@126.com;

*谭睿,博士,教授,从事中药质量标准规范化和新制剂研发工作, Tel:028-87600993, E-mail:tanrui@swjtu.ed.cn

量还未见报道^[1]。目前一测多评方法已成功应用于木通、黄连、人参等 20 种常用中药的质量评价研究,还被 2010 年版《中国药典》收录。本研究应用“一测多评”法,对肉果草的药效成分梓醇、毛蕊花糖苷、连翘苷及连翘脂素^[2-5]进行多指标质量控制研究。选择毛蕊花糖苷为内参物,建立其与梓醇、连翘苷及连翘脂素的相对校正因子,进行含量计算,降低了检测成本和时间,验证了一测多评法在不同类型成分测定中的实用性,为肉果草药材的质量控制研究提供参考。

1 材料

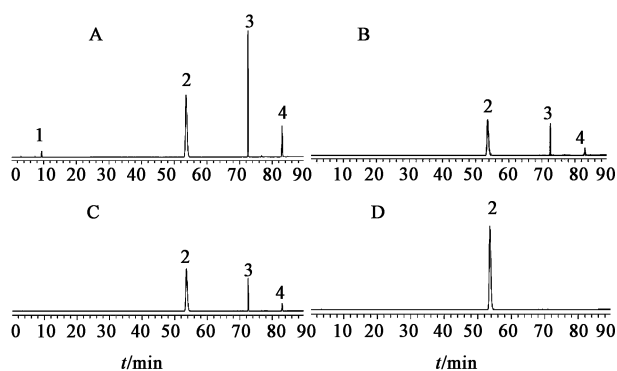
2695-2998 型高效液相色谱仪(美国 Waters), LC-6AD 型高效液相色谱仪(日本岛津)。X BridgeTM C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),Kromasil C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm),Shim-pack VP-ODS(4.6 mm×250 mm,5 μm),Phenomenex C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm) 色谱柱。梓醇(批号 110808-201210)购于中国食品药品检定研究院;毛蕊花糖苷(批号 PS12121103),连翘苷(批号 PS13030801)及连翘脂素(批号 PS13052003)均购于成都普思生物科技有限公司。9 批肉果草药材样品分别来自青海久美藏族药药业有限公司(1 号),青海金诃藏药药业股份有限公司(2 号),青海八一路药材市场(3 号),青海省药检所(4 号),西藏(5 号),甘肃(6 号),四川若尔盖县求吉乡(7 号),巴西乡(8 号)及扎达寺镇(9 号),经西南交通大学宋良科副教授鉴定为参科植物肉果草 *Lancea tibetica* 的全草。甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 X BridgeTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B)(0~13 min,0.5% A;13~25 min,0.5%~14.5% A;25~55 min,14.5% A;55~60 min,14.5%~17% A;60~75 min,17%~35% A;75~80 min,35% A;80~90 min,35%~40% A),流速 1 mL·min⁻¹,梓醇、毛蕊花糖苷、连翘苷、连翘脂素的检测波长分别为 210, 330, 278, 280 nm,柱温 40 ℃,理论塔板数按毛蕊花糖苷峰计算不低于 5 000。对照品混合溶液及样品溶液色谱图。见图 1,2。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取梓醇对照品适量,置量瓶中,加乙腈-0.1%磷酸水溶液(2:98)溶解,并定容至刻度,制得梓醇(1.50 g·L⁻¹)对照品储备液。分别精密称取连翘苷、连翘脂素对照品适量,



A. 210 nm; B. 278 nm; C. 280 nm; D. 330 nm; 1. 梓醇; 2. 毛蕊花糖苷; 3. 连翘苷; 4. 连翘脂素(图 2 同)

图 1 对照品混合溶液 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances

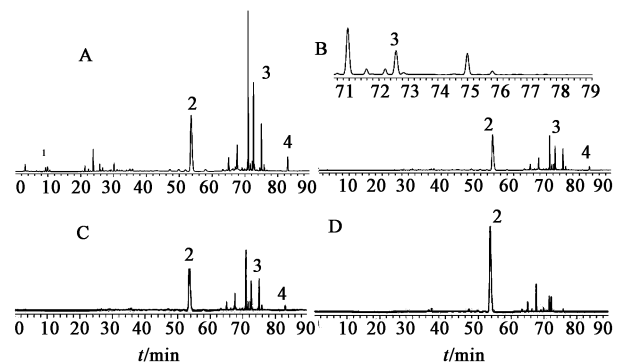


图 2 肉果草样品溶液 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of sample solution

置量瓶中,加甲醇溶解,并定容至刻度,分别制成连翘苷 7.60 g·L⁻¹,连翘脂素 1.02 g·L⁻¹的对照品储备液。精密称取毛蕊花糖苷对照品适量,再分别精密吸取上述对照品储备液适量,置量瓶中,加乙腈-0.1%磷酸水溶液(2:98)溶解,并定容至刻度。制得含梓醇、毛蕊花糖苷、连翘苷、连翘脂素质量浓度分别为 0.229 5, 0.920 0, 0.190 0, 0.0337 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取肉果草药材粉末(过二号筛)约 0.8 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 40 mL,称定质量,浸泡 30 min 后超声处理 60 min,取出,放冷,用甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过;精密量取续滤液 10 mL,浓缩溶剂至近干,残渣加乙腈-0.1%磷酸水溶液(2:98)溶解并定容至 10 mL,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 线性关系考察 取 2.1.2 项下混合对照品溶液 2, 5, 7, 10, 13, 15, 20 μL,按 2.1.1 项下色谱条件进样,记录色谱图。以色谱峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线,并进行线性回归。结果

见表 1。

表 1 4 个成分的线性关系

Table 1 Linear equations of four constituents

成分	回归方程	r	线性范围/ μg
梓醇	$Y = 194\ 434.05X + 398.53$	0.999 9	0.459 ~ 4.59
毛蕊花糖苷	$Y = 1\ 373\ 890.03X - 15\ 594.33$	0.999 9	1.84 ~ 18.4
连翘苷	$Y = 645\ 659.57X - 5\ 360.56$	0.999 9	0.38 ~ 3.8
连翘脂素	$Y = 1\ 424\ 477.84X - 1\ 340.29$	0.999 9	0.067 4 ~ 0.674

2.1.5 精密度试验 取 2.1.2 项下混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次测定。结果梓醇、毛蕊花糖苷、连翘苷和连翘脂素峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 0.1%, 0.1%, 0.9%。表明仪器精密度良好。

2.1.6 稳定性试验 取 2 号样品, 照 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果梓醇、毛蕊花糖苷、连翘苷和连翘脂素的 RSD 分别为 1.0%, 0.1%, 0.4%, 0.9%。表明供试品溶液 24 h 内稳定。

2.1.7 重复性试验 取 2 号样品, 按照 2.1.3 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.1.1 项下色谱条件进样 10 μL , 计算得梓醇、毛蕊花糖苷、连翘苷、连翘脂素平均质量分数分别为 10.15, 57.64, 9.45, 1.04 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。RSD 分别为 0.9%, 0.2%, 0.3%, 1.6%。表明本法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 称取 6 份供试品(2 号)粉末 0.4 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 分别精密加入对照品梓醇 5.0 mg, 毛蕊花糖苷 25.0 mg, 2.1.2 项下连翘苷对照品储备液(7.60 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)0.48 mL, 连翘脂素对照品储备液(1.02 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)0.33 mL, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液。按 2.1.1 项下色谱条件进样 10 μL , 测定。结果梓醇、毛蕊花糖苷、连翘苷及连翘脂素平均回收率分别为 98.53%, 98.39%, 99.32%, 98.16%。RSD 分别为 1.0%, 0.8%, 1.7%, 1.3%。

2.2 RCF 的确定 精密吸取 2.1.2 项下混合对照品溶液 1, 2, 5, 7, 10, 13, 15, 17, 20 μL , 按 2.1.1 项下色谱条件进样, 记录色谱图。以毛蕊花糖苷为内参物, 按

$$\text{下式}^{[6]} f_{si} = \frac{f_s}{f_i} = \frac{A_s \times C_i}{A_i \times C_s} \quad (A_s, \text{内参物对照品 s 峰面积};$$

C_s , 内参物对照品 s 浓度; A_i , 某待测成分对照品 i 峰面积; C_i , 某待测成分对照品 i 质量浓度) 计算梓醇、连翘苷、连翘脂素的 RCF(f_{si})。结果见表 2。

2.3 RCF 的耐用性考察 考察流动相各梯度点比例变化 $\pm 5\%$, 流速变化 $\pm 20\%$, 柱温变化 $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$, 各指标成分检测波长变化 $\pm 5, \pm 2, \pm 1, \pm 0.5\text{ nm}$ 时

表 2 肉果草中 3 个指标成分的相对校正因子

Table 2 Relative correcting factors (RCF) of three components in *Lancea tibetica* Hook. f. et Thoms

进样体积/ μL	其他成分相对于毛蕊花糖苷的 f_{si}		
	梓醇	连翘苷	连翘脂素
1	6.999 2	2.156 7	0.965 3
2	7.011 5	2.142 1	0.958 9
5	7.139 4	2.138 4	0.986 3
7	6.969 4	2.130 6	0.956 1
10	7.070 7	2.138 9	0.967 7
13	7.031 7	2.141 7	0.964 0
15	7.038 3	2.136 8	0.966 1
17	7.022 3	2.125 9	0.953 2
20	7.076 2	2.125 3	0.965 4

RCF 的影响。结果表明流动相各梯度点比例变化 $\pm 5\%$, 流速变化 $\pm 20\%$, 柱温变化 $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ 对各指标成分的 RCF 影响较小 (RSD 均 $< 5\%$); 检测波长变化 $\pm 5\text{ nm}$ 对连翘苷与连翘脂素的 RCF 影响较小 (RSD 均 $< 5\%$), 检测波长变化 $\pm 0.5\text{ nm}$ 对梓醇的 RCF 影响较小 (RSD $< 5\%$)。还考察了不同色谱系统及不同品牌色谱柱对 RCF 的影响, 结果表明 RCF 在不同色谱系统和不同色谱柱下具有良好的重复性。见表 3。

表 3 不同仪器及色谱柱对相对校正因子的影响 ($n = 2$)

Table 3 RCF determined by different instructions and columns ($n = 2$)

色谱仪	色谱柱	其他成分相对于毛蕊花糖苷的 f_{si}		
		梓醇	连翘苷	连翘脂素
Waters2695	X Bridge	7.057 1	2.136 7	0.958 4
	Kromasil	7.006 6	2.078 9	0.936 1
LC-6AD	X Bridge	7.032 1	2.112 8	0.947 7
	Kromasil	7.043 7	2.120 9	0.932 8

2.4 待测组分散谱峰的定位 取 2.1.2 项下混合对照品溶液各 10 μL , 按 2.1.1 项下色谱条件进样, 记录色谱图。考察相对保留值和保留时间差在不同品牌仪器和不同规格色谱柱中的重复性。结果表明, 梓醇色谱峰采用保留时间差法定位重复性良好 (RSD $< 5\%$), 连翘苷和连翘脂素色谱峰定位采用相对保留时间值法定位重复性良好 (RSD $< 5\%$)。见表 4, 5。

2.5 QAMS 法与外标法测定结果的比较 用外标法对 4 种成分的含量进行测定将结果与 QAMS 法计算值进行比较, 验证 QAMS 法用于肉果草多指标质量评价的准确性。结果表明 2 种方法测得的各指标成分的含量没有明显差异 (RSD 均 $< 5\%$), 见表 6。

3 讨论

进样发现 4 种成分在 210 nm 下虽然都能出峰, 但检测波长变化对梓醇、连翘苷、连翘脂素的 RCF

表 4 QAMS 法待测成分色谱峰的定位——保留时间差法 ($n = 2$)

Table 4 Retention time difference determined by different instruments and columns ($n = 2$)

仪器	色谱柱	$t_{R\text{梓醇}}$	$t_{R\text{连翘苷}}$	$t_{R\text{连翘脂素}}$
		$/t_{R\text{毛蕊花糖苷}}$	$/t_{R\text{毛蕊花糖苷}}$	$/t_{R\text{毛蕊花糖苷}}$
Waters	X Bridge	-44.217	18.960	29.394
	Shim-pack	-44.343	17.213	31.886
	Kromasil	-46.825	13.534	29.834
	Phenomenex	-42.936	18.868	32.905
LC-6AD	X Bridge	-46.902	17.129	28.069
	Shim-pack	-46.856	16.164	31.130
	Kromasil	-47.475	12.238	29.527
	Phenomenex	-45.451	16.886	31.487

表 5 QAMS 法待测成分色谱峰的定位——相对保留时间法 ($n = 2$)

Table 5 Relative retention time determined by different instruments and columns ($n = 2$)

仪器	色谱柱	$t_{R\text{梓醇}}$	$t_{R\text{连翘苷}}$	$t_{R\text{连翘脂素}}$
		$/t_{R\text{毛蕊花糖苷}}$	$/t_{R\text{毛蕊花糖苷}}$	$/t_{R\text{毛蕊花糖苷}}$
Waters	X Bridge	0.175	1.354	1.548
	Shim-pack	0.228	1.230	1.555
	Kromasil	0.237	1.221	1.486
	Phenomenex	0.220	1.343	1.598
LC-6AD	X Bridge	0.198	1.293	1.480
	Shim-pack	0.245	1.261	1.502
	Kromasil	0.2777	1.186	1.449
	Phenomenex	0.241	1.282	1.526

表 6 2 种不同方法定量测定肉果草 4 种成分的含量 ($n = 2$)

Table 6 contents of components by external standard method and QAMS ($n = 2$)

样品号	定量方法	各成分质量分数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$			
		梓醇	毛蕊花糖苷	连翘苷	连翘脂素
1	外标	11.626 5	59.466 4	8.419 4	1.372 6
	QAMS	11.612 6	59.466 4	8.413 7	1.369 5
2	外标	11.125 1	54.830 6	7.970 6	1.209 6
	QAMS	11.113 4	54.830 6	7.963 7	1.206 4
3	外标	10.081 1	57.533 3	9.420 8	1.041 3
	QAMS	10.071 3	57.533 3	9.420 2	1.037 8
4	外标	2.530 5	71.092 2	9.338 2	0.465 8
	QAMS	2.535 0	71.092 2	9.334 9	0.461 5
5	外标	5.615 4	61.612 0	7.529 2	0.621 8
	QAMS	5.613 8	61.612 0	7.519 4	0.617 8
6	外标	3.380 5	38.736 9	6.120 2	1.962 8
	QAMS	3.385 4	38.736 9	6.107 7	1.960 7
7	外标	12.266 6	54.139 2	11.949 4	0.884 1
	QAMS	12.253 0	54.139 2	11.960 4	0.882 0
8	外标	18.144 9	37.283 1	10.447 4	0.867 6
	QAMS	18.129 2	37.283 1	10.457 1	0.864 4
9	外标	20.028 1	67.995 1	12.159 6	0.536 7
	QAMS	19.994 9	67.995 1	12.168 7	0.532 6

影响均较大,且 210 nm 下连翘苷色谱峰与邻近色谱

峰分离情况不好,故分别以毛蕊花糖苷、连翘苷和连翘脂素的 最大吸收波长作为其检测波长;梓醇为末端吸收,参照《中国药典》(2010 年版)中梓醇的检测波长,选定 210 nm 为梓醇的检测波长。其中毛蕊花糖苷在 200 ~ 400 nm 均有紫外吸收,可以满足后期待测成分色谱峰的定位要求,且容易获得,故选定其为内参物。

分别考察了甲醇-水、甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-0.1% 磷酸和乙腈-水不同梯度洗脱系统。结果乙腈-0.1% 磷酸梯度洗脱作为流动相时达到基线分离度,峰形较好,故以此作为流动相。考察了超声和回流两种供试品提取方法,结果超声提取效果更好;根据 4 种成分的溶解性分别以 80% 甲醇、50% 甲醇、甲醇、乙醇为提取溶剂进行试验,结果表明以甲醇为提取溶剂时各成分的含量均较高;又考察了甲醇体积 30, 40, 50, 60 mL 对提取率的影响,结果甲醇体积 40 mL 时即可将各成分基本提取完全;最后考察了超声提取 30, 60, 90, 120 min 对提取率的影响,结果表明超声提取 60 min 时各成分已基本被提取完全。

测定结果显示肉果草样品中 4 种不同类型化合物的含量相差很大,其中苯乙醇苷类化合物毛蕊花糖苷的含量最多。不同来源肉果草样品中同一指标成分的含量也具有较大差异。试验建立的相对校正因子具有较好的耐用性,一测多评含量测定结果与传统方法含量测定结果间无显著差别,表明在对照品缺乏的情况下采用一测多评法同步测定藏药肉果草中不同类型成分的含量是可行的,为藏药的多指标质量评价提供了新的思路。

【参考文献】

[1] 王智民,高慧敏,付雪涛,等. “一测多评”法中药质量评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(23):1925-1928.
 [2] 董焯,陈长勋. 梓醇药理作用的研究进展[J]. 中成药, 2013, 35(5):1047-1049.
 [3] 黄才国,李医明,贺祥,等. 玄参中苯丙素苷 XS-8 对兔血小板 cAMP 和兔血浆中 PGI₂/TXA₂ 的影响[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(8):920.
 [4] 李双,王东强,李志军. 连翘主要有效成分的提取与药理作用[J]. 黑龙江中医药, 2011(2):46-48
 [5] 赵晨阳,邱嵘,郑荣梁. 呋喃吖啶木脂素的体外抗肿瘤活性[J]. 兰州大学学报:自然科学版, 2000, 36(4):66-68.
 [6] 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):657-658.

[责任编辑 顾雪竹]