

一测多评法测定透骨香中儿茶素、 白珠树苷、滇白珠苷 A 的含量

陈青凤¹, 刘佳¹, 乔里¹, 刘丽娜^{1,2}, 龙庆德¹, 王爱民^{1,2}, 李勇军^{1,2*}

(1. 贵阳医学院药学院 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004;

2. 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 建立透骨香中儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 的一测多评含量测定方法。方法: 采用高效液相色谱, 以中药透骨香为研究对象, 以儿茶素为内参物, 建立其与白珠树苷、滇白珠苷 A 的相对校正因子, 并进行含量测定, 实现一测多评。同时采用外标法测定 28 批透骨香中儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 的含量, 验证一测多评法的准确性。结果: 建立的校正因子重复性良好, 采用校正因子计算的含量值与外标法实测值之间无显著差异。结论: 以外标法测定儿茶素, 利用相对校正因子实现对白珠树苷和滇白珠苷 A 测定是准确的、可行的, 一测多评法可以用于特定的不同类型成分间的测定。

[关键词] 一测多评法; 相对校正因子; 高效液相色谱; 透骨香

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0126-05

[doi] 10.11653/syjf2013180126

Simultaneous Quantitative Analysis of Three Components in *Gaultheria yunnanensis* by Multi-Components Assay by Single Marker

CHEN Qing-feng¹, LIU Jia¹, QIAO Li¹, LIU Li-na^{1,2}, LONG Qing-de¹, WANG Ai-ming^{1,2}, LI Yong-jun^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicines and Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education, Guiyang 550004, China;

2. Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for simultaneously determining catechin, gaultherin and gaultheroside A in *G. yunnanensis*. **Method:** A HPLC method was developed as QAMS to determine the three principal components in *Gaultheria yunnanensis*. Catechin was selected as the internal reference substance, and 2 relative correction factors (RCFs) to catechin were calculated. The method was evaluated by comparison of the quantitative results between external standard method and QAMS method. **Result:** No significant differences between the quantitative results of QAMS method and external standard method were observed. **Conclusion:** It is feasible and suitable to determine catechin, gaultherin and gaultheroside A in *Gaultheria yunnanensis* by QAMS, and this method can be used for a certain different types of compounds.

[Key words] quantitative analysis multi-components by single marker (QAMS); related correction factor (RCF); HPLC; *Gaultheria yunnanensis*

透骨香为杜鹃花科植物滇白珠的干燥全株, 具有清热解毒、活血化瘀、祛风除湿的功效, 用于风湿

[收稿日期] 20130312(025)

[基金项目] 贵州省中药现代化项目(20075016); 贵州省中药现代化项目(20115081)

[第一作者] 陈青凤, 硕士研究生, 从事中药质量标准及药物分析研究, Tel: 18798000075, E-mail: 007doing@sina.com

[通讯作者] * 李勇军, 硕士, 教授, 从事中药工艺、质量控制及天然产物研究, Tel: 0851-6908468, E-mail: liyongjun026@126.com

痹症、眩晕、咳嗽哮喘、跌扑肿痛等症^[1]。文献^[2-5]报道透骨香含有挥发油、有机酸、三萜类、黄酮类、香豆素类、木脂素类等多种化学成分,其正丁醇提取部位有较好的抗风湿性关节炎和镇痛作用^[6-7]。为有效控制透骨香药材质量,作者对正丁醇部位的主要化学成分进行分析、分离制备研究,从中分离得到具有代表性和专属性的活性成分儿茶素^[8-9]、白珠树苷^[10]、滇白珠苷 A^[6]。其中儿茶素对照品廉价且较易得到,而白珠树苷,滇白珠苷 A 不易分离纯化获得,本实验以儿茶素对照品为内参物,建立透骨香中该成分与其余待测成分白珠树苷及滇白珠苷 A 的相对校正因子,计算出其余成分的含量,实现多成分的同时测定,为透骨香药材的质量控制及评价提供一种新的技术手段。

1 材料

岛津 Prominence UFLC 高效液相色谱仪,SPD-20A 检测器,LC solution 工作站(日本岛津公司),Agilent 1100 型高效液相色谱仪,阵列二极管检测器,Chemstation 工作站(美国安捷伦公司),Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm),Waters XBridge C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm),AE 240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司),CQ-250A-ST 型超声波清洗机(上海跃进医用光学器械厂)。

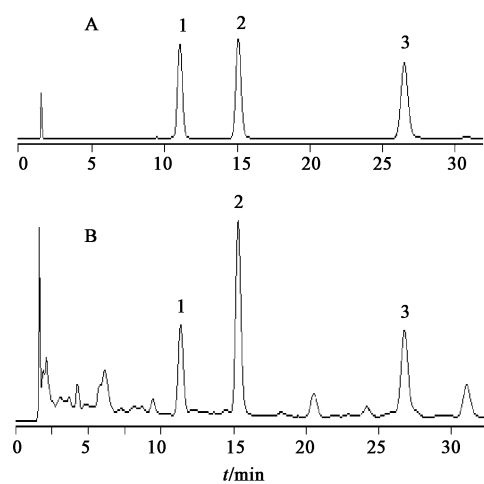
儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 对照品(批号依次为 20111125, 20111216, 20111203, 本实验室自制,经 HPLC 检查,用峰面积归一化法计算,纯度 > 98%);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯;透骨香药材采购于贵阳市三桥药材市场,经贵阳医学院生药教研室龙庆德副教授鉴定为杜鹃花科植物滇白珠 *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehd. 的干燥根与茎。

2 方法与结果

2.1 方法学考察

2.1.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),柱温 35 °C,流速 1.0 mL · min⁻¹,检测波长 230 nm,流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸水(B),梯度洗脱 0 ~ 30 min, 20% ~ 26% A。上述色谱条件下,各组分分离度良好。色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定儿茶素、白珠树苷及滇白珠苷 A 对照品 5.05, 15.09, 7.68 mg, 分别置于 5 mL 量瓶中,加甲醇溶液至刻度,制得各单一对照品溶液,分别精密吸取 2 mL 置于 10 mL 量瓶中,



1. 儿茶素; 2. 白珠树苷; 3. 滇白珠苷 A

图 1 对照品(A)和样品(B)的 HPLC

加甲醇溶液至刻度,混合稀释制成每 1 mL 分别含儿茶素 0.202 mg,白珠树苷 0.604 mg,滇白珠苷 A 0.307 mg 的混合对照品溶液保存于 4 °C 冰箱,备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 取透骨香粉末(过 40 目筛)约 1.0 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇溶液 50 mL,称重,超声 40 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过。精密吸取滤液 25 mL 通过聚酰胺柱(聚酰胺 30 ~ 60 目, 1 g, 内径为 1.2 cm),用乙醇 100 mL 洗脱,收集流穿液与乙醇洗脱液,水浴蒸干,残渣用甲醇适量溶解,转移至 5 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,即得。

2.1.4 检测波长的选择 分别将儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 进行全波长扫描,结果儿茶素在 206, 280 nm,白珠树苷在 206, 230, 286 nm,滇白珠苷 A 在 208, 277 nm 有最大吸收。3 种成分均在 220 ~ 240 nm 有较强吸收的光谱信息,为保证各成分都具有适宜的灵敏度,因此选择 230 nm 作为检测波长。

2.1.5 线性关系考察 精密吸取 2.1.2 混合对照品溶液 1, 2, 4, 8, 16, 20 μL, 进样分析,每个体积进样 3 次,取平均值。按 2.1.1 项色谱条件测定,记录峰面积,以进样量($X, \mu\text{g}$)为横坐标,以平均峰面积(Y)为纵坐标,得儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 的回归方程,结果表明各化合物在相应范围内线性关系良好,见表 1。

2.1.6 校正因子计算 在上述色谱条件下,分别测定不同进样体积时各成分的峰面积,根据相对校正因子计算公式^[11-12],分别计算其他成分白珠树苷、滇白珠苷 A 与内参物儿茶素的相对校正因子。结

表 1 3 种成分的线性关系和范围

化学成分	回归方程	r	线性范围/ μg
儿茶素	$Y = 2.00 \times 10^6 X + 1.88 \times 10^4$	1.000 0	0.202 ~ 4.04
白珠树苷	$Y = 5.70 \times 10^5 X - 2.52 \times 10^3$	0.999 9	0.604 ~ 12.08
滇白珠苷 A	$Y = 1.00 \times 10^6 X - 1.78 \times 10^3$	0.999 9	0.307 ~ 6.14

果见表 2。

2.1.7 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL 连续进样 6 次,记录峰面积,结果儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 峰面积的 RSD 分别为 0.44%, 0.53%, 0.58%, 表明仪器的精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL , 分别于配制后的 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样分析, 记录峰面积, 儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 在 24 h 内峰面积的 RSD 分别为 1.5%, 0.42%, 0.39%。表明处理后的供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 称取同一批透骨香药材粉末(过 40 目筛)约 1 g, 6 份, 精密称定, 按 2.1.3 方法制备供试品溶液, 测定, 结果儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 的平均质量分数分别为 0.039%, 0.33%, 0.092%, RSD 分别为 0.82%, 0.76%, 0.86%。

表 2 3 种成分的相对校正因子

进 样 体 积/ μL	相对校正因子	
	$f_{\text{白珠树苷/儿茶素}}$	$f_{\text{滇白珠苷A/儿茶素}}$
1	3.653	1.870
2	3.664	1.864
4	3.523	1.786
8	3.489	1.763
16	3.478	1.773
20	3.501	1.780
平均值	3.551	1.806
RSD/%	2.4	2.7

2.1.10 加样回收率 精密称取 0.5 g 已知含量的透骨香药材粉末(过 40 目筛)6 份, 分别按各成分在药材中的含量精密加入对照品溶液, 相当于儿茶素 0.21 mg, 白珠树苷 1.70 mg, 滇白珠苷 A 0.46 mg。按供试品溶液处理方法制备样品, 测定, 计算加样回收率, 儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 的加样回收率分别为 95.8%, 99.4%, 101.1%, RSD 分别为 1.6%, 2.4%, 2.9%。结果见表 3。

表 3 儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 的加样回收率

化学成分	称量/mg	含量/mg	加入量/mg	实测量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
儿茶素	503.2	0.199 2	0.211	0.397 5	94.0	95.8	1.6
	503.9	0.199 5	0.211	0.402 9	96.4		
	507.1	0.200 8	0.211	0.401 9	95.4		
	502.0	0.198 7	0.211	0.398 2	94.5		
	500.1	0.198 0	0.211	0.404 7	98.0		
	501.5	0.198 5	0.211	0.402 8	96.8		
白珠树苷	503.2	1.705	1.7	3.370 0	97.9	99.4	2.4
	503.9	1.707	1.7	3.365 0	97.4		
	507.1	1.718	1.7	3.395 0	98.5		
	502.0	1.701	1.7	3.364 0	97.7		
	500.1	1.694	1.7	3.445 0	102.9		
	501.5	1.699	1.7	3.437 0	102.1		
滇白珠苷 A	503.2	0.461 1	0.462	0.934 2	102.4	101.1	2.9
	503.9	0.461 8	0.462	0.910 2	97.1		
	507.1	0.464 7	0.462	0.923 1	99.2		
	502.0	0.460 0	0.462	0.948 2	105.7		
	500.1	0.458 3	0.462	0.930 3	102.2		
	501.5	0.459 6	0.462	0.922 8	100.3		

2.2 校正因子的重复性考察

2.2.1 色谱柱及高效液相色谱仪考察 试验分别考察了 Prominence UFLC, Agilent 1100 两种高效液相色谱系统和 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), Waters Symmetry C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), Waters XBriage C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 3 种色谱柱。精密吸取 2.1.2 混合对照品溶液 1, 2, 4, 8, 16, 20 μL, 进行测定, 按 2.1.6 项下计算儿茶素对白珠树苷、滇白珠苷 A 的相对校正因子。结果见表 4。

表 4 不同仪器和不同色谱柱测得的相对校正因子

仪器	色谱柱	相对校正因子	
		$f_{\text{白珠树苷/儿茶素}}$	$f_{\text{滇白珠苷A/儿茶素}}$
UFLC	Eclipse XDB-C ₁₈	3.551	1.806
	Symmetry C ₁₈	3.705	1.900
	XBriage C ₁₈	3.545	1.973
Agilent1100	Eclipse XDB C ₁₈	3.303	1.851
	Symmetry C ₁₈	3.339	1.920
平均值		3.489	1.890
RSD/%		4.8	3.4

2.2.2 待测组分色谱峰的定位 分别采用相对保留值和保留时间差 2 种参数作为色谱峰定位标准, 考察了其在不同品牌仪器和不同规格色谱柱上的重复性。结果表明各成分间保留时间差变化较明显, 而各成分间相对保留值变化不大, RSD < 5%。因此本研究选用相对保留值作为目标色谱峰的定位指标比较合适。根据相对保留值再结合峰形及化合物的 UV 光谱判断, 即能够判断目标峰的准确位置。结果见表 5。

表 5 不同仪器和色谱柱测得的相对保留值

仪器	色谱柱	相对保留值	
		$r_{\text{白珠树苷/儿茶素}}$	$r_{\text{滇白珠苷A/儿茶素}}$
UFLC	Eclipse XDB-C ₁₈	1.35	2.36
	Symmetry C ₁₈	1.30	2.19
	XBriage C ₁₈	1.47	2.45
Agilent1100	Eclipse XDB C ₁₈	1.38	2.47
	Symmetry C ₁₈	1.37	2.38
平均值		1.37	2.37
RSD/%		4.5	4.7

2.3 一测多评法与常规法结果比较 将收集的 28 批透骨香药材, 按供试品溶液处理方法制备样品及上述的色谱条件, 分别精密吸取 10 μL 注入高效液

相色谱仪。采用外标一点法和 QAMS 法分别计算透骨香药材中儿茶素、白珠树苷和滇白珠苷 A 的含量。常规的外标法实测含量值与一测多评法计算的含量值用相对偏差来进行比较, 相对偏差在 3% 以内, 表明 2 种方法测得成分含量值没有显著性差异, 说明透骨香药材应用一测多评法进行多指标成分质量评价是可行的。见表 6。

表 6 外标法和一测多评法测定透骨香中儿茶素、白珠树苷、滇白珠苷 A 的含量 %

No.	产地	儿茶素		白珠树苷		滇白珠苷 A	
		外标法	外标法	QAMS	外标法	QAMS	
1	安顺 1	0.039 2	0.326	0.308	0.091 6	0.091 9	
2	安顺 2	0.035 8	0.276	0.269	0.103	0.104	
3	安顺 3	0.026 5	0.102	0.103	0.054 9	0.057 1	
4	安顺 4	0.101	0.413	0.410	0.096 5	0.099 3	
5	毕节 1	0.048 5	0.211	0.206	0.093 0	0.094 2	
6	毕节 2	0.050 2	0.142	0.145	0.033 7	0.035 5	
7	清镇 1	0.044 8	0.125	0.122	0.105	0.106	
8	清镇 2	0.058 2	0.156	0.154	0.109	0.115	
9	龙里 1	0.104	0.221	0.216	0.210	0.213	
10	龙里 2	0.054 4	0.393	0.391	0.121	0.124	
11	关岭 1	0.101	0.605	0.590	0.098 9	0.100	
12	关岭 2	0.072 0	0.434	0.435	0.064 9	0.067 4	
13	晴隆 1	0.102	0.836	0.825	0.106	0.112	
14	晴隆 2	0.103	0.889	0.867	0.144	0.146	
15	贵定	0.072 5	0.413	0.403	0.116	0.118	
16	高坡 1	0.059 7	0.158	0.154	0.105	0.107	
17	高坡 2	0.060 6	0.130	0.129	0.095 5	0.098 3	
18	高坡 3	0.067 2	0.181	0.182	0.073 4	0.076 5	
19	花溪	0.071 2	0.337	0.333	0.077 9	0.082 3	
20	息烽	0.046 9	0.221	0.221	0.108	0.112	
21	铜仁	0.097 0	0.424	0.422	0.127	0.131	
22	贵阳 1	0.054 9	0.417	0.414	0.111	0.114	
23	贵阳 2	0.029 9	0.266	0.267	0.043 8	0.045 6	
24	贵阳 3	0.050 3	0.254	0.255	0.069 4	0.072 4	
25	遵义	0.046 0	0.123	0.124	0.116	0.121	
26	六盘水	0.064 5	1.16	1.19	0.062 8	0.066 2	
27	开阳	0.032 7	0.308	0.316	0.040 3	0.042 4	
28	习水	0.052 4	0.239	0.245	0.047 4	0.049 9	

3 讨论

作者采用超声、回流、索氏进行提取, 结果显示, 3 种提取方法提取效果相差不大, 而甲醇超声提取完全, 方法简单, 故采用超声提取。以甲醇、70% 甲

醇、50% 甲醇、30% 甲醇作为透骨香药材的提取溶剂,结果表明甲醇提取效率最高,因此选用甲醇作为提取溶剂。提取时间考察了 10, 20, 30, 40, 50 min, 结果分析, 40 min 与 50 min 较 30 min 提取完全, 且 40 min 与 50 min 差异较小, 故确定提取时间为 40 min。作者在透骨香药材对照品分离制备过程中, 发现存在大量的鞣质成分, 该类成分是致高效液相色谱上分离效果差的主要原因。通过聚酰胺柱处理除去鞣质进行高效液相色谱分析, 结果该法处理后分离效果好, 重复性好。

本研究选用易得及廉价的儿茶素对照品为内标, 建立儿茶素与白珠树苷、滇白珠苷 A 相对校正因子, 通过对 28 批透骨香药材测定, 验证了 QAMS 法的准确性, 并对一测多评法的技术适用性和应用可行性进行了探讨研究。结果表明, 试验建立的校正因子比较可信, 一测多评法推算的含量与实测法所得含量基本一致。说明一测多评法能够在对照品短缺的情况下, 用于透骨香药材多指标成分含量测定, 可作为透骨香药材质量控制的有效方法之一。

[参考文献]

[1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳: 贵州科技社, 2003: 308.
[2] 杨基森, 马永骥, 吴静澜, 等. 透骨香油载体吸附物及其稳定性研究[J]. 中国中药杂志, 1998, 28(1): 29.

[3] 熊玉兰, 肖冰, 马小军, 等. 滇白珠抗风湿性关节炎活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 48.
[4] 张治针, 果德安, 李长岭, 等. 滇白珠木脂素苷的研究[J]. 药学报, 1999, 34(2): 128.
[5] 马学毅, 魏涛, 崔建军, 等. 贵阳滇白珠精油化学成分研究[J]. 分析测试通报, 1992, 11(1): 63.
[6] 熊玉兰, 肖冰, 马小军, 等. 滇白珠抗风湿性关节炎活性成分研究[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(19): 2516.
[7] 张治针, 果德安, 李长龄, 等. 滇白珠抗菌抗炎和镇痛活性的实验研究[J]. 西北药学杂志, 1999, 14(2): 60.
[8] 贾智若, 李兵, 李耀华, 等. 反相高效液相色谱法测定杜仲中儿茶素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 117.
[9] 唐丽琴. IL-1 α 对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞前列腺素受体脱敏的影响及木瓜苷和儿茶素的作用[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2007.
[10] Zhang B, He X L, Ding Y, et al. Gaultherin, a natural salicylate derivative from *Gaultheria yunnanensis*: towards a better non-steroidal anti-inflammatory drug[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 530(1): 166.
[11] 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.
[12] 丁黎艳, 周露, 王丽娜, 等. 一测多评法测定补骨脂中不同类型成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 152.

[责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2014 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。1994 年创刊, 2002 年, 被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录, 成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升, 已相继被《中国科学引文数据库》、波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等知名检索系统收录。

本刊是中医药行业一本独具特色的学术期刊, 其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有: 中医动态、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、流行病学调查、临床论著、实验研究、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学、综述等。

本刊为月刊, 大 16 开国际开本, 136 页, 国内外公开发售, 每册定价 10 元, 全年 120 元。国内邮发代号: 82-670; 国外代号: M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址: 北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部, 邮编: 100700, 电话: 010-64014411-3278, E-mail: Lxx@mail.cintcm.ac.cn。