

一测多评法测定百蕊草中百蕊草素 I、百蕊草素 II 和山奈酚的含量*

储晓琴¹, 蒋建勤^{1△}, 徐江慧², 洪晓琴²

(1. 中国药科大学天然药物化学教研室, 江苏 南京 211198; 2. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230012)

摘要: 目的 建立百蕊草中百蕊草素 I、百蕊草素 II 与山奈酚的一测多评含量测定方法。方法 采用 C₁₈ 色谱柱(phenomenex, 250×4.6mm, 5μm); 以甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相; 梯度洗脱(0→5→10→20→45min, 45%→50%→55%→60%甲醇); 波长 365nm; 流速 1.0mL/min; 柱温 40℃。以山奈酚为参照物, 建立其与百蕊草素 I 和百蕊草素 II 的相对校正因子, 并计算其含量, 实现一测多评。同时采用外标法测定 3 个成分的含量, 并比较二者差异, 以验证一测多评法的准确性和可行性。结果 采用一测多评法和外标法测定的含量间无显著差异, RSD<2%。结论 本文建立的一测多评法控制百蕊草的质量可行、准确。

关键词: 一测多评; 百蕊草; 相对校正因子; 山奈酚; 百蕊草素 I; 百蕊草素 II

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)02-0030-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.02.008

百蕊草为檀香科植物百蕊草(*Thesium chinense* Turcz.)的干燥全草^[1], 别名青龙草、一棵松、珊瑚草、小草、白风草等。性温, 味苦、涩, 具有补气益肾、清热解毒之功效。多用于治疗急性乳腺炎、感冒发热、扁桃体炎、各种肺炎以及呼吸道感染等症。现代药理研究表明百蕊草具有显著地抗炎、解热、镇痛、抗菌作用, 所含有的黄酮类化合物是其抗菌的有效成分^[2-4]。广泛分布于全国各地, 其中安徽、湖北等地区产量较大, 日本和朝鲜也有分布。

有文献报道了测定其中矿质元素^[5]、山奈酚及总黄酮等成分的含量^[6], 另有文献对百蕊草药材的指纹图谱进行了研究^[7], 但未见报道采用一测多评的方法来测定百蕊草中有效成分的含量, 本实验采用一测多评的方法, 测定百蕊草药材中山奈酚、百蕊草素 I 及百蕊草素 II 的含量, 方法简便、准确, 重复性好, 解决了对照品缺乏的问题, 补充完善了百蕊草的质量评价方法。

一测多评的方法已经被成功地运用到其他各种药材的含量测定上面, 如测定白芍中芍药苷与芍药内酯苷的含量^[8]、测定紫苑中 5 种黄酮类成分的含量^[9]、测定黄柏中 5 种生物碱的含量^[10]等。此法还

可以用于中药复方制剂的质量控制^[11-13]。本实验以山奈酚为内参物, 建立山奈酚与百蕊草素 I 及百蕊草素 II 的相对校正因子, 并用该校正因子进行百蕊草素 I 及百蕊草素 II 的含量计算(计算值), 实现一测多评; 同时采用外标法测定药材中百蕊草素 I、百蕊草素 II 和山奈酚的含量(实测值), 并比较计算值与实测值的差异。

1 仪器与材料

1.1 仪器

岛津高效液相色谱仪(包括 LC-20AB 泵, DAD 检测器及岛津 LC solution 色谱工作站), C₁₈ 色谱柱(phenomenex, 250×4.60mm, 5μm); KQ2200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH-S2 系列恒温水浴锅(江苏省金坛市环宇科学仪器厂); FA2104B 电子天平(上海越平科学仪器有限公司)。

1.2 材料

山奈酚对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110861-201209); 百蕊草素 I 对照品(上海煦朗实业有限公司, SY121036); 百蕊草素 II 对照品(上海煦朗实业有限公司, SY121036)。

百蕊草, 采自安徽及湖北两地, 分别有百蕊草

* 基金项目: 安徽省自然科学基金(1408085QH183)

收稿日期: 2015-11-12

作者简介: 储晓琴(1991-), 女, 在读博士研究生, 副教授, 研究方向: 中药分离、剂型设计及质量控制。

△通信作者: 蒋建勤, E-mail: cpujq@aliyun.com

药材合肥乐家老铺中药饮片有限公司(安徽,批号 11051401、11051402、11051403);百蕊草药材安徽济人药业有限公司(湖北,批号 110916、121201、121203、121215);百蕊草药材亳州千草药业饮片厂(安徽,批号 110902、110920);安徽采集地道药材(安徽,20110925),甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

C₁₈ 色谱柱 (phenomenex, 250×4.6mm, 5μm); 以甲醇-0.4%磷酸溶液为流动相; 梯度洗脱 (0→5→10→20→45min, 45%→50%→55%→60% 甲醇); 波长 365nm; 流速: 1.0mL/min; 柱温: 40℃; 进样量: 20μL。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称取百蕊草素 I、百蕊草素 II、山奈酚的对照品适量,以甲醇溶解并定容,分别制成百蕊草素 I、百蕊草素 II、山奈酚质量浓度分别为 250 μ g/mL, 50 μ g/mL, 50 μ g/mL 的对照品储备液, 分别精密吸取不同体积的对照品贮备溶液, 制成含百蕊草素 I、百蕊草素 II、山奈酚不同质量浓度的系列混合对照品溶液, 保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 备用。

2.3 供试品溶液的制备

称取 10 批 0.5g 的百蕊草药材粉末,精密称定,精密加入甲醇 25mL,称定质量,加热回流 1h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,再用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 系统适用性试验

分别精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各 20 μ L, 进样分析, 结果见图 1。此条件下, 各组分分离度良好, 理论塔板数按山奈酚计不低于 3 000。

2.4.2 线性范围

分别精密吸取系列浓度的混合对照品溶液 20 μ L, 注入液相色谱仪, 按上述色谱条件测定, 以对照品的质量浓度(X)为横坐标, 峰面积积分值(Y)为纵坐标, 进行回归处理, 得到山奈

酚的回归方程为 $Y=97144X+648.23$ ($r=0.9999$), 线性范围为 $1.0\sim 50\mu\text{g/mL}$; 百蕊草素 I 的回归方程为 $Y=30241X+2905.1$ ($r=0.9999$), 线性范围为 $0.02\sim 1.0\text{mg/mL}$; 百蕊草素 II 的回归方程为 $Y=50555X-13478$ ($r=0.9996$), 线性范围为 $0.01\sim 0.5\text{mg/mL}$ 。

2.4.3 精密度试验

取同一对照品溶液,在上述色谱条件下连续进样6次,百蕊草素 I、百蕊草素 II、山奈酚的色谱峰峰面积 RSD 分别为 0.56%,0.66%,0.75%,表明精密度良好。

2.4.4 重复性试验

取同一批百蕊草药材粉末 6 份, 精密称定, 按 2.1.3 项下的方法进行操作, 进样测定, 测得百蕊草素 I、百蕊草素 II、山奈酚的平均质量分数分别为 0.0065%, 0.8339%, 0.0358%, RSD 分别为 0.72%, 0.67%, 0.64%, 表明方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验

取同一供试品溶液，分别于制备后 0, 2, 4, 6, 8, 10h 进样测定，记录百蕊草素 I、百蕊草素 II、山奈酚的峰面积，RSD 分别为 0.53%、0.87%、0.84%，表明供试品溶液在 10h 内稳定。

2.4.6 加样回收率试验

取已知质量分数的百蕊草样品粉末 9 份,各约 0.5g,精密称定,按已知质量分数的 80%,100%,120%这 3 个水平加入百蕊草素 I、百蕊草素 II 及山奈酚对照品,按 2.3 项下操作,进样测定,计算加样

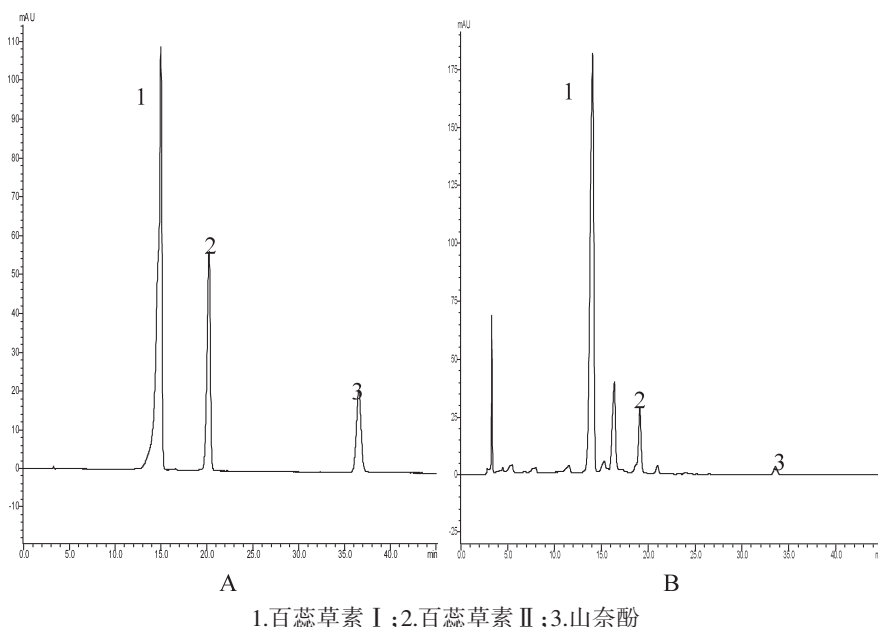


图1 混合对照品(A)和百蕊草药材供试品(B)HPLC图

回收率,结果见表 1。百蕊草素 I、百蕊草素 II、山奈酚的加样回收率分别为 97.53%,98.15%,96.57%,RSD 分别为 1.2%,0.93%,1.7%。

2.5 相对校正因子(RCF)和相对保留时间(RRT)的测定

取“2.2”项下对照品溶液,配成一系列不同浓度的标准品溶液,分别进样 20 μ L,测定百蕊草素 I、百蕊草素 II、山奈酚的峰面积。以山奈酚为参照物计算百蕊草素 I 及百蕊草素 II 的 RCF 和 RRT,求均值,计算 RSD,结果见表 1。结果表明应用不同高效液相色谱仪和不同色谱柱,各成分相对于山奈酚的 RCF 和 RRT 的 RSD 均小于 5.0%,说明该方法重现性较好。

2.6 外标法与 QAMS 法结果与比较

取 10 批百蕊草样品粉末约 0.5g,精密称定,按“2.3”项下操作,制成供试品溶液。分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液进样测定。采用外标法和一测多评法计算山奈酚、百蕊草素 I、百蕊草素 II 的含量,结果见表 2。

表 1 百蕊草药材中 3 种成分的相对校正因子(RCF)和相对保留时间(RRT)($n=6$)

仪器	RCF		RRT	
	百蕊草素 I	百蕊草素 II	百蕊草素 I	百蕊草素 II
Waters 2695	0.313	0.532	2.275	1.767
	0.326	0.536	2.257	1.727
	0.309	0.542	2.346	1.819
Shimadzu LC-20AT	0.321	0.543	2.271	1.683
	0.315	0.548	2.329	1.756
	0.313	0.552	2.285	1.732
Agilent 1100	0.315	0.548	2.249	1.735
	0.323	0.524	2.438	1.804
	0.328	0.506	2.401	1.745
均值	0.318	0.537	2.317	1.752
RSD	2.08%	2.71%	2.89%	2.35%

2 种方法所得的含量值用相对偏差来进行比较,结果表明 2 种方法测得的成分含量值没有显著性差异,相对偏差<3%,提示建立的方法具有较好的可信度。

表 2 2 种方法含量测定结果($n=6$)

百蕊草批号	山奈酚/% (外标法)	百蕊草素 I/% (外标法)	百蕊草素 I/% (QAMS)	相对偏差 /%	百蕊草素 II/% (外标法)	百蕊草素 II/% (QAMS)	相对偏差 /%
11051401	0.00341	0.311	0.315	-1.27	0.0227	0.0221	2.71
11051402	0.00502	0.751	0.759	-1.05	0.0695	0.0688	1.02
11051403	0.00518	0.744	0.733	1.50	0.0502	0.0492	2.03
121201	0.00133	0.0529	0.0536	-1.31	0.0354	0.0345	2.61
121203	0.00101	0.655	0.663	-1.21	0.0323	0.0329	-1.82
121215	0.00114	0.021	0.0213	-1.41	0.0141	0.0137	2.92
20110925	0.00382	0.0899	0.091	-1.21	0.135	0.132	2.27
110902	0.00717	0.852	0.862	-1.16	0.0351	0.0346	1.45
110916	0.00479	0.394	0.399	-1.25	0.0385	0.0376	2.39
110920	0.00284	0.996	1.008	-1.19	0.0543	0.0531	2.26

注:相对误差 $= (X_i - \mu) / \mu \times 100\%$,式中 X_i 为外标法实测值, μ 为 QAMS 法计算值

3 讨论

3.1 最佳提取方法的选择

预实验中比较了甲醇回流提取、超声提取、索氏提取法,发现甲醇回流提取法简单可行,效率高,且比较了 0.5h、1h、2h 的提取时间对于提取结果的影响,发现 1h 可以提取完全。

3.2 梯度条件的选择

通过查阅文献资料确定了以甲醇-0.4%磷酸液

为流动相,在此流动相系统下用梯度洗脱的方法进行多次不同条件的试验反复摸索,比较不同梯度条件下的色谱峰和不同化学成分之间的分离效果,最后得出最佳的梯度洗脱条件,结果见 2.1。

3.3 内标物的选择

研究发现,百蕊草含有多种黄酮类化合物^[14-15],包括百蕊草素 I(山奈酚-3-葡萄糖-鼠李糖苷)、百蕊草素 II(山奈酚-3-葡萄糖苷)等,其中百蕊草素

I、百蕊草素 II 的含量较高,是其特有成分,而山奈酚是百蕊草主要成分中多种黄酮苷的共同苷元。因此,选择山奈酚、百蕊草素 I、百蕊草素 II 作为测定指标,可以较全面的反映药材质量。因山奈酚对照品价廉易得,故本实验选用山奈酚为内参物,建立百蕊草中 3 个成分的一测多评法。

4 结论

通过实验初步建立了一测多评法用于百蕊草药材中多成分的同步测定,并且所得百蕊草药材中各成分含量与常规外标法所测得的含量无显著差异,说明在仅有一个对照品时,可通过一测多评法实现同步测定百蕊草药材中多指标成分,并且可以建立百蕊草多指标质量控制的模式。

参考文献:

- [1] 宋立人,洪恂,丁绪亮,等. 现代中药大辞典[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:813.
- [2] 刘永松,潘玲,祁克宗,等. 百蕊草提取有效提取成分对七种细菌的敏感性试验 [J]. 贵州医药,2006,30 (6):564-566.
- [3] Parveen Z,Deng Y,Saeed MK,et al. Antiinflammatory and analgesic activities of Thesium chinense Turcz. extracts and its major flavonoids,kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside[J]. Yakugaku Zasshi,2007,127(8):1275-1279.
- [4] 丁秀年,张三军,明亮. 百蕊含片对小鼠的镇痛作用[J]. 淮海医药,2001,19(1):17-18.
- [5] 罗夫来,郭巧生. 百蕊草矿质元素含量测定和主成分分析 [J]. 中国中药杂志,2010,35(10):1226-1229.
- [6] 徐国兵,黄万著,王德群,等. 百蕊草药材中山奈酚和总黄酮的含量测定[J]. 中医医学报,2008,36(1):39-41.
- [7] 汤超,许伏新,徐国兵,等. 百蕊草药材的指纹图谱研究 [J]. 中成药,2011,33(7):1102-1105.
- [8] 黄山君,杨琪伟,石燕红,等. 一测多评法测定白芍中芍药苷与芍药内酯苷的含量 [J]. 中国中药杂志,2011,36(6):780-783.
- [9] 夏成凯,郭伟娜,王甫成,等. 一测多评法测定紫菀中 5 种黄酮类成分含量[J]. 中药材,2015,38(1):112-114.
- [10] 吴珊珊,胡昌江,吕非非,等. 一测多评法测定黄柏中 5 种生物碱[J]. 中成药,2014,36(1):130-134.
- [11] 张梅,柴彦,任爱农,等. “一测多评”法同时测定清清颗粒中 10 种指标成分 [J]. 中国现代应用药学,2015,32(3):318-323
- [12] 张乔,俞洋洋,王勤辉. 六味地黄制剂多类型成分快速分析和“一测多评”方法建立 [J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(6):81-85
- [13] 赖增发,夏丽珍. “一测多评”测定木香顺气丸中木香内酯类成分[J]. 中国现代应用药学,2014,31(4):421-424
- [14] 王峥,刘近明,李绍顺. 百蕊草的研究进展[J]. 中国药师,2006,9(11):1059-1060.
- [15] 刘永松,罗曼,潘玲,等. 抗菌中草药百蕊草的研究进展 [J]. 药学进展,2006,30(6):252-256.

(编辑:徐建平)

Simultaneous Assay of Kaempferol-3-O-glucorhamnoside, Astragalin and Kaempferol and in Thesium by Quantitative Analysis of Multi-components by Single Marker

CHU Xiaoqin¹, JIANG Jianqin¹, XU Jianghui², HONG Xiaoqin²

(1. Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China;

2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method of quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for simultaneously determining kaempferol-3-O-glucorhamnoside, astragalin and kaempferol in Thesium. **Methods** The chromatographic separation was achieved on C18 chromatographic column (phenomenex, 250×4.6mm, 5μm), the mobile phase was methanol-0.4% phosphoric acid aqueous solution with gradient elution (0→5→10→20→45min, 45%→50%→55%→60% methanol). The wavelength was 365nm. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was 40℃. Kaempferol was used as the reference, the calibration factor of kaempferol-3-O-glucorhamnoside and Astragalin to that of kaempferol were calculated. And the contents of active constituents were calculated by the relative calibration factor to realize QAMS. At the same time, external standard method was used to detect the contents of the three constituents, the two methods were compared to validate the accuracy and feasibility of the new method. **Results** No significant differences were found in the quantitative results between the measured value and the calculated value. **Conclusion** The QAMS is feasible and accurate to evaluate the contents of the three active constituents in Thesium.

KEY WORDS: quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); Thesium; the calibration factor; kaempferol; kaempferol-3-O-glucorhamnoside; Astragalin