

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00195

一测多评法测定芹菜籽中芹菜甲素、芹菜乙素和新蛇床内酯

徐娜, 陈海生*

第二军医大学药学院天然药物化学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 建立一测多评法同时测定芹菜籽中芹菜甲素、芹菜乙素和新蛇床内酯的含量, 验证该方法在芹菜籽中应用的准确可行性。**方法** 以芹菜籽原料药中主要成分芹菜甲素、芹菜乙素和新蛇床内酯为指标, 在一定范围内建立芹菜甲素与芹菜乙素、芹菜甲素与新蛇床内酯的校正因子。测定芹菜甲素的含量, 测得校正因子 $f_{\text{芹菜甲素/芹菜乙素}} = 0.226$; 用校正因子测定芹菜乙素和新蛇床内酯的含量, 测得校正因子 $f_{\text{芹菜甲素/新蛇床内酯}} = 0.702$, 同时, 采用外标法测定 6 批不同批次中 3 个成分的含量, 以验证一测多评法的准确性和科学性。**结果** 不同仪器所得相对校正因子的 RSD 为 4.4%~6.7%, 同一台仪器不同色谱柱所得相对校正因子的 RSD 为 2.3%~3.6%, 建立的校正因子重现性良好, 原料药中采用校正因子计算的含量值与外标法实测值之间没有明显差异。**结论** 在缺乏对照品的情况下, 该方法可用于芹菜籽中多成分质量评价研究。

[关键词] 一测多评法; 相对校正因子; 芹菜籽提取物; 芹菜甲素; 芹菜乙素; 新蛇床内酯

[中图分类号] R 931.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)02-0195-04

Quantitative analysis of multi-components with single marker in simultaneous determination of 3-n-butylphthalide, sedenenolide, and sedanolide in celery seed extract

XU Na, CHEN Hai-sheng*

Department of Natural Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To develop a quantitative analysis of multi-components with single marker (QAMS) and validate its accuracy and feasibility for simultaneously determining 3-n-butylphthalide (b), sedenenolide (sen), and sedanolide (san) in celery seed extracts (CSE). **Methods** Three main effective components, 3-n-butylphthalide, sedenenolide, and sedanolide, were selected as analytes for evaluating the quality of CSE. The relative correction factors (RCF, f) of 3-n-butylphthalide to the other two thalides were calculated: $f_{\text{b/sen}} = 0.226$, $f_{\text{b/san}} = 0.702$. The external standard method was used to determine the title compounds in 6 batches of CSE and the results were compared with those of QAMS. **Results** The RSD of RCF calculated by different instruments was between 4.4%-6.7%. The RSD of RCF calculated by the same instrument with different chromatographic columns was between 2.3%-3.6%. The established RCF had a good reproducibility. The quantitative results of three thalides determined by external standard method and QAMS method were not significantly different. **Conclusion** The present method can serve as a new mode to determine multi-components in CSE when standard substances are unavailable.

[Key words] quantitative analysis of multi-components by single marker; relative correction factor; celery seed extracts; 3-n-butylphthalide; sedenenolide; sedanolide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(2): 195-198]

芹菜籽为芹菜的种子, 常应用于调味品和食品中, 它含有丰富的维生素及挥发性芳香成分, 有极好的药用价值。印度传统医学中, 芹菜籽常用来补充维生素、镇静、解热镇痛、利尿、消炎、解痉挛^[1], 我国传统中医认为芹菜籽具有散气、消肿、利尿、降低血

压等功效。目前其主要用于治疗高血压、降血脂、抗氧化等^[2], 本课题组前期对青芹籽进行研究, 发现其乙酸乙酯部位有良好的黄嘌呤氧化酶抑制活性和抗炎镇痛、降尿酸作用, 可作为抗痛风原料药(未发表资料)。

[收稿日期] 2012-11-15 **[接受日期]** 2013-01-05

[基金项目] 上海市中药现代化基金(09DZ1974000), 上海市重点学科建设项目(B906). Supported by Foundation for Modernization of Traditional Chinese Medicine of Shanghai (09DZ1974000) and Project for Key Discipline Construction of Shanghai (B906).

[作者简介] 徐娜, 硕士. E-mail: woshixuna1986@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81871250, E-mail: haishengc@hotmail.com

根据苯酐类含量测定的文献报道^[3-6],芹菜甲素和新蛇床内酯的含量测定主要通过高效液相色谱(HPLC)外标法进行检测。目前为止,还没有关于芹菜乙素含量测定的报道,由于芹菜乙素单体不稳定,不易得,本研究采用校正因子一测多评法(QAMS),同时测定芹菜乙素、芹菜甲素和新蛇床内酯的含量,首次建立校正因子法测定芹菜乙素含量,为芹菜籽药材质量标准的建立奠定基础。

1 仪器和试剂

LC-10AT液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司),紫外检测器,自动进样器,在线脱气;LC Solution 色谱工作站(Shimadzu 公司)。Agilent 1100 高效液相色谱系统,Agilent Chemstation 工作站(美国 Agilent 公司);色谱柱 Diamonsil C₁₈(美国 Dikma 公司,4.6 mm×250 mm,5 μm),Diamonsil C₁₈(2)(4.6 mm×250 mm,5 μm),Waters symmetry C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)。BSA124S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。SK5200H 型超声仪(上海科导超声仪器有限公司)。

色谱纯乙腈、甲醇(美国 J. T. Baker 公司);分析纯甲醇、乙醇(国药集团化学试剂有限公司);Milli-Q 纯水系统制备的去离子水(美国 Millipore 公司);乙酸、磷酸(国药集团化学试剂有限公司)。对照品芹菜甲素、芹菜乙素、新蛇床内酯均为自制,HPLC 纯度均>98%(面积归一化法);芹菜籽原料药为自制。

2 方法和结果

2.1 原理 在一定的线性范围内,成分的量(质量或浓度)与检测器响应成正比,即:W=f×A。在多指标质量评价时,以药材中某一典型组分(有对照品供应者)为内标,建立该组分与其他组分之间的相对校正因子,通过校正因子计算其他组分的含量。这种测定一个成分,实现对多个成分定量的方法命名为 QAMS^[7-9]。

校正因子定义如下:假设某样品中含有 i 个组分,存在

$$W_i/A_i = f_i (i=1, 2, \dots, k, \dots, m) \quad (1)$$

式中 A_i为组分 i 的峰面积;W_i为组分 i 的质量。选取其中一组分 k 为内标,建立组分 k 与其他组分 m 之间的相对校正因子,有

$$f_{k/m} = f_k/f_m = (W_k \times A_m)/(W_m \times A_k) \quad (2)$$

由此可导出定量计算公式:

$$W_m = (W_k \times A_m)/(f_{k/m} \times A_k) \quad (3)$$

式中 A_k为内标物峰面积,W_k为内标物质量;A_m为组分 m 的峰面积,W_m为组分 m 的质量。

2.2 方法学考察

2.2.1 色谱条件的确定 色谱柱为 Diamonsil C₁₈(美国 Dikma 公司,4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相为乙腈-0.3%磷酸水(50:50)溶液;双波长检测 235 nm(芹菜甲素、新蛇床内酯)和 270 nm(芹菜乙素);流速为 1.0 mL/min,柱温 30℃。图谱见图 1。

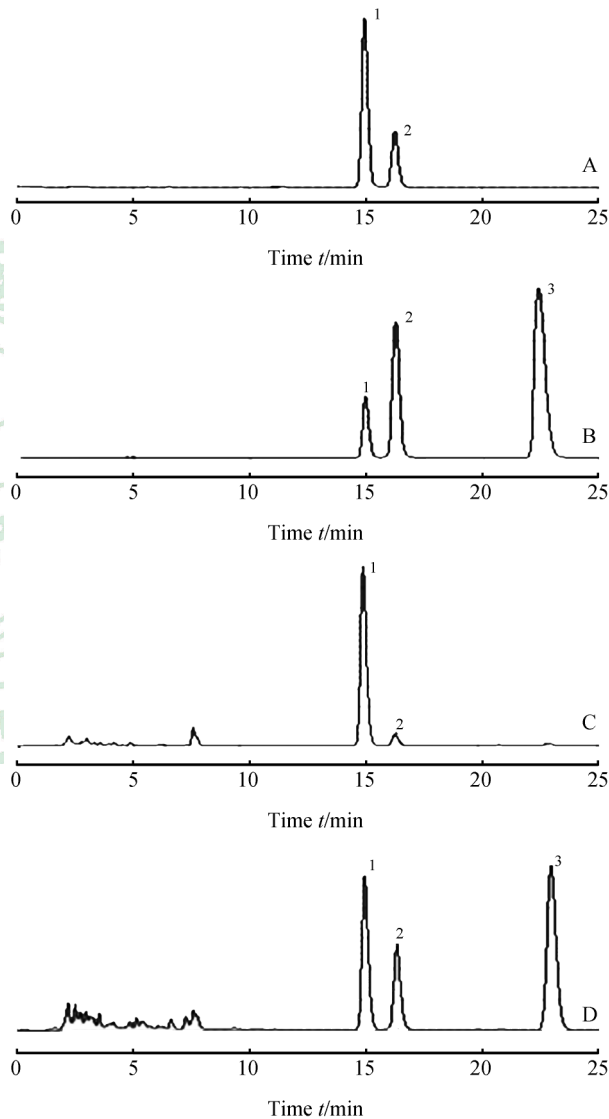


图 1 对照品(A 270 nm, B 235 nm)和样品(C 270 nm, D 235 nm)的 HPLC 图谱

Fig 1 HPLC of reference substance (A 270 nm, B 235 nm) and sample (C 270 nm, D 235 nm)

1: Sedenenolide; 2: 3-n-butylphthalide; 3: Sedanolide

2.2.2 对照品溶液制备 分别精密称定芹菜甲素 10.2 mg、芹菜乙素 10.8 mg、新蛇床内酯 10.2 mg,

各置于 50 mL 容量瓶中,用甲醇溶解稀释至刻度,制得各单一对照品溶液,分别量取不同体积单一对照品溶液,稀释制成系列浓度混合对照品溶液,保存于 4℃ 冰箱,备用。

2.2.3 供试品溶液制备 取供试品约 20 mg,置于 25 mL 的容量瓶中,甲醇稀释至刻度。

2.2.4 线性范围 将 2.2.2 项下制得的对照品混合溶液,每个浓度进样 3 次,每次 10 μ L,以进样量 $C(\mu\text{g})$ 为横坐标,平均峰面积 A 为纵坐标作标准曲线,芹菜甲素:线性方程 $A=47\ 152C-91\ 583$, $r=0.999\ 7$,线性范围 0.228~3.86 μg ; 芹菜乙素:线性方程 $A=18\ 874C-75\ 344$, $r=0.999\ 5$,线性范围为 0.204~3.32 μg ; 新蛇床内酯:线性方程 $A=18\ 706\ 507C-2\ 111$, $r=1.000$,线性范围 0.224~3.60 μg 。结果表明各化合物在相应的范围内线性关系良好。

2.2.5 检测限和定量限 定量限按信噪比 $S/N=10.6$ 计为 9.0 ng,检测限按 $S/N=3.4$ 计为 2.5 ng。

2.2.6 校正因子计算 根据公式(1)和(2),以芹菜甲素(甲)为内参物,结合 2.2.2 项所制系列浓度对照品溶液所得峰面积数据,计算芹菜乙素(乙)、新蛇床内酯(蛇)的校正因子如下: $f_{\text{甲}/\text{乙}}=f_{\text{甲}}/f_{\text{乙}}=0.226$, $f_{\text{甲}/\text{蛇}}=f_{\text{甲}}/f_{\text{蛇}}=0.702$ 。

2.2.7 精密度实验 精密吸取同一供试品溶液 10 μ L 于同一天内连续进样 5 次,记录芹菜甲素、芹菜乙素、新蛇床内酯的峰面积,得出日内精密度的 RSD 分别为 0.9%、2.5%、1.2%;吸取同一供试品溶液 10 μ L 连续进样 3 d,每天 3 次,记录以上 3 个成分的峰面积,得出日间精密度的 RSD 分别为 1.8%、3.5%、2.6%。结果表明仪器较为稳定。

2.2.8 重复性实验 精密称取同一批号的原料药 20 mg,共 6 份,按 2.2.3 项下方法制备样品溶液,测定 6 份样品中芹菜甲素、芹菜乙素、新蛇床内酯的含量, RSD 分别为 1.9%、3.1%、2.5% ($n=6$),结果表明该方法的重复性良好。

2.2.9 稳定性实验 精密吸取同一供试品溶液 10 μ L,分别于配制后的 0、2、4、8、12、24、48 h 测定峰面积值,芹菜甲素、芹菜乙素和新蛇床内酯在 0、1、2 d 内峰面积的 RSD 分别为 2.8%、3.4%、2.6%。结果表明处理后的样品在 48 h 内稳定。

2.2.10 加样回收率 取已知含量的原料药 6 份,每份 20 mg,精密称定,分别按各成分在原料药中的含量精密加入对照品芹菜甲素 2.5 mg、芹菜乙素 6.0 mg、

新蛇床内酯 4.0 mg,按 2.2.3 项下方法制备样品溶液,测定,计算加样回收率。芹菜甲素、芹菜乙素、新蛇床内酯的平均加样回收率分别为 101.2%、98.9%、99.7%,RSD 分别为 2.5%、3.7%、2.1%。

2.3 校正因子的系统适应性考察

2.3.1 色谱柱及高效液相色谱仪考察 实验考察了 Shimadzu LC-10AT 和 Agilent 1100 两种高效液相色谱系统,考察了 Dikma 一代柱 Diamonsil C_{18} (4.6 mm \times 250 mm,5 μ m)、Dikma 二代柱 Diamonsil C_{18} (2)(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m)、Waters symmetry C_{18} (4.6 mm \times 250 mm,5 μ m)3 种色谱柱,芹菜乙素、新蛇床内酯的校正因子依次为 0.215~0.242、0.687~0.729,其中,不同仪器所得相对校正因子的 RSD 为 4.4%~6.7%,同一台仪器不同色谱柱所得相对校正因子的 RSD 为 2.3%~3.6%。详见表 1。

表 1 不同仪器和色谱柱测得的相对校正因子(f)

Tab 1 Relative correction factor (f) measured by different instruments and chromatographic columns

| Instrument | Chromatographic column | $f_{\text{b}/\text{Sen}}$ | $f_{\text{b}/\text{San}}$ |
|------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Shimadzu LC-10AT | Diamonsil C_{18} | 0.221 | 0.687 |
| | Diamonsil C_{18} (2) | 0.227 | 0.695 |
| | Waters symmetry C_{18} | 0.215 | 0.729 |
| Agilent 1100 | Diamonsil C_{18} | 0.232 | 0.689 |
| | Diamonsil C_{18} (2) | 0.242 | 0.725 |
| RSD (%) | | 4.41 | 2.66 |

b: 3-n-butylphthalide; Sen: Sedenenolide; San: Sedanolide; RSD: Relative standard deviation

2.3.2 待测组分色谱峰的定位 中药成分复杂,色谱图中除待测组分的色谱峰外,还存在很多其他色谱峰,因此对待测组分色谱峰正确定位是准确测定的前提。本实验考察了待测组分与内参物保留时间差值的变化情况,见表 2。3 种成分在不同色谱柱和色谱仪上保留时间有所差别,但芹菜甲素相对于芹菜乙素、新蛇床内酯的保留时间差值变化不大。因此,选择采用待测组分与内参物保留时间的差值定位。实验所得芹菜甲素与芹菜乙素、新蛇床内酯的时间差均值分别为 1.245、6.367 min;RSD 分别为 2.30%、1.08%。

2.3.3 QAMS 与外标法结果比较 按 2.2.3 项下方法制备 6 批供试品溶液,分别进样测定。采用外标法和 QAMS 计算芹菜乙素和新蛇床内酯的含量

(表3)。结果表明所建立 QAMS 具有较好的可信度,可以用于芹菜籽质量标准的研究。

表 2 不同仪器和色谱柱测得的保留时间(RT)差
Tab 2 Retention time (RT) measured by different instruments and chromatographic columns

| Instrument | Chromatographic column | RT _b -RT _{sen} | RT _{san} -RT _b |
|--------------|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Shimadzu | Diamonsil C ₁₈ | 1.261 | 6.396 |
| LC-10AT | Diamonsil C ₁₈ (2) | 1.279 | 6.452 |
| | Waters symmetry C ₁₈ | 1.252 | 6.387 |
| Agilent 1100 | Diamonsil C ₁₈ | 1.207 | 6.279 |
| | Diamonsil C ₁₈ (2) | 1.225 | 6.318 |
| RSD (%) | | 2.30 | 1.08 |

b: 3-n-butylphthalide; sen: Sedanenolide; san: Sedanolide;
RSD: Relative standard deviation

表 3 外标法和一测多评法测定芹菜乙素和新蛇床内酯含量结果

Tab 3 Results of ESM and QAMS in determining sedenenolide and sedanolide contents

| Batch No. | Sedenenolide | | Sedanolide | |
|-----------|--------------|-------|------------|-------|
| | ESM | QAMS | ESM | QAMS |
| 1 | 29.61 | 29.35 | 19.15 | 19.18 |
| 2 | 31.01 | 30.73 | 19.41 | 19.44 |
| 3 | 30.61 | 30.36 | 18.36 | 18.39 |
| 4 | 28.71 | 28.39 | 21.85 | 21.88 |
| 5 | 29.87 | 29.65 | 20.45 | 20.48 |
| 6 | 30.06 | 29.87 | 20.53 | 20.56 |

ESM: External standard method; QAMS: Quantitative analysis of multi-components by single marker

3 讨论

流动相体系考察:根据预实验,本实验考察了不同浓度的乙腈-0.3%磷酸水、甲醇-水、甲醇-0.3%磷酸水为流动相对色谱分离的影响,发现磷酸水可以防止芹菜甲素、芹菜乙素、新蛇床内酯的色谱峰拖尾,而用甲醇-水作为流动相不能将3个苯酞在合理的时间内有效分离,考虑到磷酸对色谱柱的影响,经过条件摸索,将流动相体系定为乙腈-0.3%磷酸水(50:50)。

检测波长的选择:经过二极管阵列检测器分析,芹菜甲素最大吸收在228 nm,芹菜乙素最大吸收在275 nm,新蛇床内酯最大吸收在222 nm处,为了减小干扰,选择235 nm为芹菜甲素和新蛇床内酯的检测波长,270 nm为芹菜乙素的检测波长。

多指标综合质量控制模式已成为中药质量评价和控制的发展趋势。多指标质量控制模式需要足够

量的化学对照品,而芹菜甲素、芹菜乙素和新蛇床内酯的单体分离难度大,且芹菜乙素单体结构很不稳定,难分离。王智民等^[10]提出“一测多评”的想法,并已成功运用于木通中3种有效成分及人参与三七药材中多种人参皂苷含量的同步测定^[11]。其中,黄连的一测多评评价标准已被2010年版《中华人民共和国药典》采纳^[12]。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Maruyama T, Abbaskhan A, Choudhary M I, Tsuda Y, Goda Y, Farille M, et al. Botanical origin of Indian celery seed (fruit) [J]. J Nat Med, 2009, 63: 248-253.

[2] Cheng M C, Lin L Y, Yu T H, Peng R Y. Hypolipidemic and antioxidant activity of mountain celery (*Cryptotaenia japonica* Hassk) seed essential oils [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 3997-4003.

[3] 李倩, 刘伟, 罗祖良, 杨美华. 一测多评法测定丹参中丹参酮 II A、隐丹参酮、丹参酮 I、二氢丹参酮 I 的含量 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37: 4642-4646.

[4] 魏玉平, 刘俊, 廖杰, 赵玉兰, 周春喜, 石兴明, 等. GAP 基地川芎药材中苯酞类成分的监测 [J]. 中国药理学杂志, 2004, 40: 815-816.

[5] Cavalcante R M, Lima D M, Fernandes G M, Duavi W C. Relation factor: a new strategy for quality control in the determination of pesticides in environmental aqueous matrices [J]. Talanta (Oxford), 2012, 93: 212-218.

[6] 王漪檬, 张晖芬, 闫宝庆, 陈晓辉, 毕开顺. HPLC 法同时测定川芎药材中3种有效成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009(12): 2109-2112.

[7] 蔡海霞, 陈君, 李萍. 一测多评法测定黄芪中4种异黄酮的含量 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35: 2712-2717.

[8] 李岑, 杨红霞, 肖远灿, 杜玉枝, 魏立新. 一测多评法测定藏药当佐中没食子酸、羟基红花黄色素-A、桂皮醛及胡椒碱的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011(9): 1658-1663.

[9] 尹萌, 孟月兰, 闻琰毓. 关黄柏中生物碱类成分的“一测多评” [J]. 中草药, 2011, 42: 1093-1096.

[10] 王智民, 高慧敏, 付雪涛, 王维皓. “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: 1925-1928.

[11] 朱晶晶, 王智民, 匡艳辉, 张启伟, 高其品, 马妮. 一测多评法同步测定人参与三七药材中多种人参皂苷的含量 [J]. 药学学报, 2008, 43: 1211-1216.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 285.