·技术研究·

一测多评法测定藏药小米辣中 3 种辣椒碱的含量

过立农[1]，崔淦[2]，刘杰[1]，马双成[1]，咎珂[1*]，郑健[1*]（1. 中国食品药品检定研究院，北京 100050；2. 首都医科大学中医药学院，北京 100069）

摘要 目的： 建立藏药小米辣中 3 种辣椒碱类化学成分含量测定的一测多评法，探讨一测多评法在民族药质量控制中的应用。**方法：** 采用超高压液相色谱法，使用 Waters ACQUITY BEH C18（2.1 mm×100 mm, 1.7 μm）色谱柱，流动相为乙腈－水（50 ∶ 50），流速：0.2 mL·min^{-1}，柱温 30 ℃，检测波长 280 nm，进样量 1 μL。以辣椒素为内参物，分别建立二氢辣椒素、降二氢辣椒素相对于辣椒素的相对校正因子，分别采用外标法和一测多评法测定 3 种辣椒碱的含量，并通过相对标准偏差（RSD）和 Pearson 系数比较二者结果的相对误差。**结果：** 降二氢辣椒素、辣椒素、二氢辣椒素进样量分别在 2.21~22.1 ng、8.96~89.6 ng、3.75~37.5 ng 范围内线性关系良好；降二氢辣椒素和二氢辣椒素相对于辣椒素的相对校正因子分别为 0.970 和 1.159；且在不同实验条件下重现性良好（RSD ＜ 3.0%）；一测多评法的计算结果与外标法测得结果无显著差异。10 批不同产地小米辣样品中降二氢辣椒素、辣椒素和二氢辣椒素的含量范围分别为 0.0281%~0.0534%、0.258%~0.389% 和 0.115%~0.209%。**结论：** 建立的一测多评法可作为小米辣中 3 种辣椒碱类化学成分的含量测定方法，一测多评法为民族药质量控制提供了一个新的模式与方法。

关键词： 藏药；小米辣；降二氢辣椒素；辣椒素；二氢辣椒素；一测多评法；超高效液相色谱法

中图分类号：R917；R284.1 **文献标识码：**A **文章编号：**1002-7777(2017)07-0760-08
doi:10.16153/j.1002-7777.2017.07.009

Simultaneous Determination of the Contents of Three Kinds of Capsaicinoid in Tibetan Medicine *Capsicum Frutescens* L. by QAMS

Guo Linong[1], Cui Gan[2], Liu Jie[1], Ma Shuangcheng[1], Zan Ke[1*], Zheng Jian[1*] (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Objective: To establish a quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS) for determination of the contents of three kinds of capsaicinoid in Tibetan medicine *Capsicum frutescens* L., and to discuss application of QAMS in quality control of ethnic medicines. **Methods:** The method of UPLC was used with a Waters ACQUITY BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) column. The mobile phase was composed of acetonitrile-water (50 ∶ 50) with isocratic elution at the flow rate of 0.2 mL · min^{-1}. The detection wavelength was 280 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 1 μL. Capsaicin was selected as an internal standard to establish the relative correction factors (RCFs) of dihydrocapsaicin and nordihydrocapsaicin

基金项目：十二五国家科技重大专项（编号 2014ZX09304307-002）
作者简介：过立农，主管药师；Tel：（010）67095739；E-mail：826075517@qq.com
通信作者：咎珂，副研究员；Tel：（010）67095739；E-mail：6206310@qq.com
郑健，研究员；Tel：（010）67095739；E-mail：bjzj825@163.com

with reference to capsaicin respectively. Both external standard method (ESM) and QAMS were employed for the determination of the contents of three kinds of capsaicinoid. Meanwhile, relative standard deviation (RSD) and Pearson coefficient between QAMS and ESM were analyzed to evaluate QAMS. **Results:** There were good linearity in the range of 2.21-22.1 ng for nordihydrocapsaicin, 8.96-89.6 ng for capsaicin, and 3.75-37.5 ng for dihydrocapsaicin, respectively. RCFs of nordihydrocapsaicin and dihydrocapsaicin with reference to capsaicin were 0.970 and 1.159, respectively, and repeatability was good in different experimental conditions (RSD ＜ 3.0%). There were no significant differences between the quantitative results of the two methods. The contents of nordihydrocapsaicin, capsaicin and dihydrocapsaicin in 10 batches of samples of *Capsicum frutescens* L. were 0.0281%-0.0534%, 0.258%-0.389% and 0.115%-0.209%, respectively. **Conclusion:** QAMS method is feasible and credible, which can be used to determine three kinds of capsaicinoid in *Capsicum frutescens* L. and can be applied as a new strategy and method for the quality control of ethnic medicines.

Keywords： Tibetan medicine; *Capsicum frutescens* L.; nordihydrocapsaicin; capsaicin; dihydrocapsaicin; QAMS; UPLC

小米辣是茄科辣椒属小米辣*Capsicum frutescens* L.的果实，收录于《卫生部药品标准藏药第一册》中，具有提升胃温、杀虫的功效，用于胃寒、痔疮等疾病[1]。小米辣分布于云南南部，生于山腰路旁，野生或栽培[2]。小米辣味极辣，通常作调味品，辣椒碱类成分是其主要活性成分。辣椒素和二氢辣椒素在同属植物辣椒中含量测定研究较多[3-8]。关于小米辣药材的含量测定报道较少，张幸福等建立HPLC法测定了辣椒素和二氢辣椒素的含量[9-11]。同时测定小米辣中辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素3种辣椒碱的含量尚未有报道。张晶等采用HPLC法测定了同属植物辣椒中这3种辣椒碱的含量[12]。采用一测多评法测定辣椒碱类成分的研究未见报道。

“一测多评”法（quantitative analysis of multi-components by single marker, QAMS）作为一种对多指标质量控制的有效方法，克服了对照品短缺这一问题；即只测定某个代表性成分（易得、廉价、有效），同时可计算出其它待测有效成分的含量，是一种适合中药特点的多指标质量评价的新模式[13-15]。

本研究建立超高压液相色谱法（UPLC），以辣椒素对照品作为内标物，计算其与二氢辣椒素、降二氢辣椒素的相对校正因子，并考察方法耐用性及系统适用性，以验证一测多评法在小米辣多指标质量控制中应用的适用性及可行性。

1 仪器与试药

Thermo Ulitimate 3000型超高压液相色谱仪（热电公司），H-Class型超高压液相色谱仪（沃特世公司），QUINTIX313-1CN型万分之一电子天平（Sartorius公司），MSE125S型十万分之一电子天平（Sartorius公司），KQ-300DV型超声波清洗器（江苏昆山市超声仪器有限公司），Milli-Q去离子水发生器（密理博公司）。

辣椒素（批号110839-201205）和二氢辣椒素（批号111666-201303）由中国食品药品检定研究院提供，降二氢辣椒素（批号KB5MDG26）由上海源叶生物技术有限公司提供，HPLC-DAD（面积归一化法）检测纯度均大于98.0%。甲醇、乙腈均为色谱纯，为Fisher公司产品；水为Milli-Q纯化水。

药材均来自产地采集，10批正品药材（编号1～10）经中国食品药品检定研究院民族药室鉴定为茄科辣椒属小米辣*Capsicum frutescens* L. 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 一测多评方法学考察

2.1.1 色谱条件

色谱柱：Waters ACQUITY BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)；流动相：乙腈-水（50∶50）；流速：0.2 mL·min^{-1}，柱温30 ℃，检测波长280 nm，进样量1 μL。各峰与邻峰的分离度均大于1.5，理论塔板数按辣椒素计算在3000以上。

对照品及供试品的色谱图见图1。

2.1.2 对照品溶液的制备

精密称取降二氢辣椒素、辣椒素、二氢辣椒素对照品适量，加甲醇制成每1 mL分别含11.05、44.80、18.75 μg的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

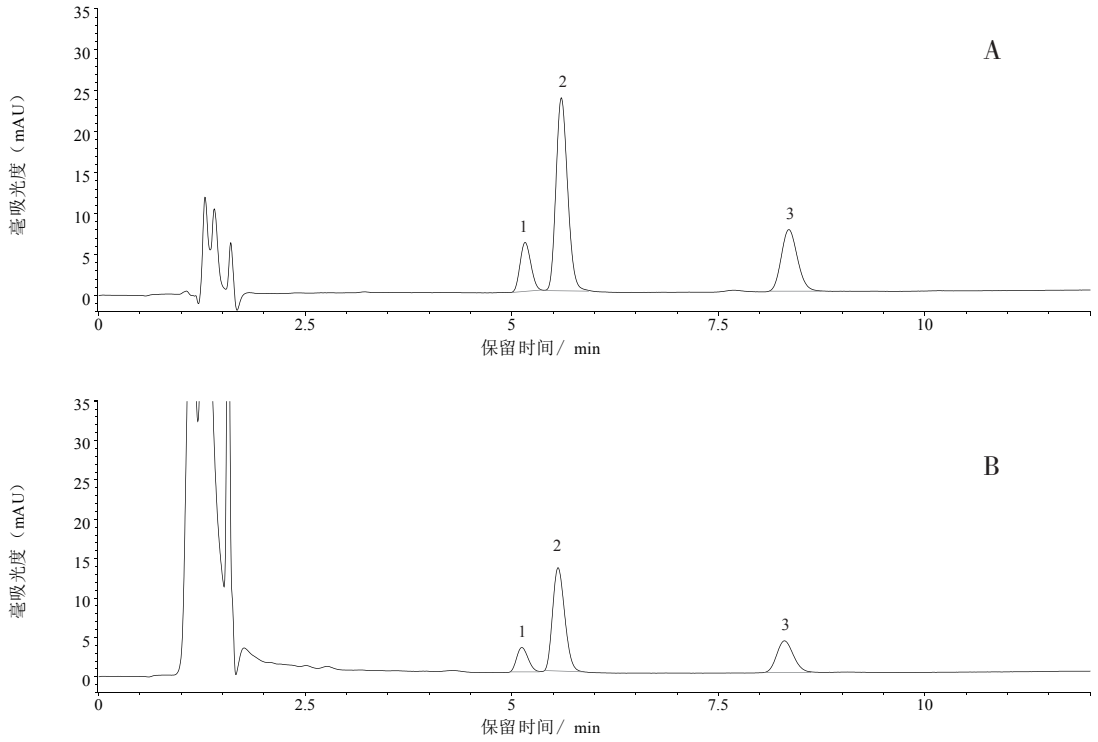
取本品粉末（过四号筛）约0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇–四氢呋喃（1∶1）混合溶液25 mL，密塞，称定重量，超声处理（功率300 W，频率35 kHz）30 min，放冷，再称定重量，用甲醇–四氢呋喃（1∶1）混合溶液补足减失的重量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.1.4 线性范围考察

精密吸取上述混合对照品溶液0.2、0.5、1、1.5、2 μL，进样分析，每个浓度进样2次，取平均值。以进样量对峰面积积分值进行回归处理，得降二氢辣椒素、辣椒素和二氢辣椒素的标准曲线，结果见表1，表明各化合物在相应范围内线性关系良好。

2.1.5 校正因子计算

以辣椒素为内标，按公式 $f_{ks}=\frac{f_k}{f_s}=\frac{W_k\times A_s}{W_s\times A_k}$，计算辣椒素对降二氢辣椒素和二氢辣椒素的相对校正因子，结果见表2。



A. 混合对照品溶液；B. 供试品溶液；1. 降二氢辣椒素；2. 辣椒素；3. 二氢辣椒素。

图 1 藏药小米辣的 UPLC 色谱图

表 1 3 种辣椒碱的标准曲线

成分	标准曲线	线性范围 /ng	*r*
降二氢辣椒素	$y=7.869x+0.137$	2.21~22.1	0.9999
辣椒素	$y=31.14x+0.152$	8.96~89.6	0.9999
二氢辣椒素	$y=11.42x-0.950$	3.75~37.5	0.9999

表 2 辣椒素对降二氢辣椒素和二氢辣椒素的相对校正因子

进样体积 / μL	$f_{辣椒素/降二氢辣椒素}$	$f_{辣椒素/二氢辣椒素}$
0.2	0.969	1.168
0.5	0.966	1.163
0.8	0.963	1.161
1.0	0.975	1.155
2.0	0.976	1.150
平均	0.970	1.159
RSD/%	0.58	0.61

2.1.6 精密度试验

精密吸取同一混合对照品溶液1 μL，连续进样6次，记录降二氢辣椒素、辣椒素和二氢辣椒素的峰面积，其峰面积的RSD分别为0.47%、0.42%和0.92%。表明仪器精密度良好。

2.1.7 稳定性试验

取同一份供试品溶液（1号样品），分别于配制后0、2、4、8、12、24 h进样测定，结果降二氢辣椒素、辣椒素和二氢辣椒素峰面积的RSD分别为0.54%、1.02%、1.61%，表明处理后的样品在24 h内稳定。

2.1.8 重复性试验

称取同一批药材粉末（1号样品）0.5 g，共5份，精密称定，按“2.1.3”节方法制备供试品溶液，测定降二氢辣椒素、辣椒素和二氢辣椒素的百分含量分别为0.031%、0.389%和0.206%，RSD分别为1.16%、0.81%和0.58%。

2.1.9 加样回收率

取同一批已知含量的样品粉末（1号样品）约0.25 g，共6份，精密称定，分别置具塞锥形瓶中，精密加入浓度为降二氢辣椒素0.0806 mg·mL^{-1}、辣椒素0.948 mg·mL^{-1}、二氢辣椒素0.502 mg·mL^{-1}的对照品溶液各1 mL，再精密加入甲醇–四氢呋喃（1∶1）混合溶液22 mL，余下操作按“2.1.3”节方法制备供试品溶液，测定，计算加样回收率，结果见表3～表5。

表 3 降二氢辣椒素的加样回收率试验结果（n=6）

称样量 / g	样品中的量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD/ %
0.2506	0.0777	0.0806	0.1566	97.89		
0.2513	0.0779	0.0806	0.1586	100.12		
0.2508	0.0777	0.0806	0.1572	98.64		
0.2514	0.0779	0.0806	0.1548	95.41	97.77	1.73
0.2489	0.0772	0.0806	0.1564	98.26		
0.2494	0.0773	0.0806	0.1549	96.28		

表 4 辣椒素的加样回收率试验结果（n=6）

称样量 /g	样品中的量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD/ %
0.2506	0.9748	0.948	1.9088	98.52		
0.2513	0.9776	0.948	1.9235	99.78		
0.2508	0.9756	0.948	1.9136	98.95	98.06	1.28
0.2514	0.9779	0.948	1.9015	97.43		
0.2489	0.9682	0.948	1.8812	96.31		
0.2494	0.9702	0.948	1.8935	97.39		

表 5 二氢辣椒素的加样回收率试验结果（n=6）

称样量 / g	样品中的量 / mg	加入量 / mg	测得量 / mg	回收率 / %	平均回收率 / %	RSD/ %
0.2506	0.5162	0.502	1.0058	97.53		
0.2513	0.5177	0.502	1.0154	99.14		
0.2508	0.5166	0.502	1.0025	96.79	98.12	1.22
0.2514	0.5179	0.502	1.0098	97.99		
0.2489	0.5127	0.502	1.0145	99.96		
0.2494	0.5138	0.502	1.0023	97.31		

2.2 校正因子重现性考察

2.2.1 色谱柱及高效液相色谱仪考察

取“2.1.2”节混合对照品溶液，分别进样0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 μL测定，按“2.1.5”节方法计算辣椒素对降二氢辣椒素、二氢辣椒素的相对校正因子(relative correction factors, RCF)。

试验考察了2台高效液相色谱系统：Thermo Ulitimate 3000、Waters H-Class，以及5种色谱柱：Waters ACQUITY BEH C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)，Waters CORTECS C18（2.1 mm × 100 mm, 1.6 μm），Waters ACQUITY HSS T3 C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)，Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18（2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm），ZORBAX Eclipse Plus C18（2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm），柱间RCF的RSD＜1%，说明RCF在不同色谱柱和仪器上的耐用性均较好，见表6。

2.2.2 实验室考察

采用建立的一测多评试验方法在2个实验室进行试验，使用Waters ACQUITY BEH C18（2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm）色谱柱，进行测定，结果见表7。不同实验室测得的RCF相差不大，RSD＜0.6%，说明该方法耐用性较好。

2.3 待测组分色谱峰的定位

通过相对保留时间进行待测组分色谱峰的定位，结果见表8。由表8可知，各待测成分的相对保留值RSD＜3.0%，在不同仪器及规格色谱柱下目标成分的相对保留时间，可正确判断出目标峰的准确峰位置。

2.4 一测多评法与外标法测定结果的比较

精密吸取供试品溶液各1 μL，注入高效液相色谱仪，测定。采用一测多评法与外标法计算小米辣中降二氢辣椒素、辣椒素和二氢辣椒素的含量，结果见表9。采用SPSS19.0软件计算2种方法的降二氢辣椒素和二氢辣椒素含量之间的Pearson系数。结果表明，2种方法所测的含量相似度极高；另其含量间的相对标准偏差亦在3%以内，表明2种方法所得的各批次药材的含量不存在显著性差异，一测多评法在小米辣辣椒碱中的应用是可行的。

表 6 不同色谱柱和仪器测得的相对校正因子

仪器	色谱柱	相对校正因子	
		$f_{辣椒素/降二氢辣椒素}$	$f_{辣椒素/二氢辣椒素}$
Thermo Ulitimate 3000	Waters ACQUITY BEH C18	0.964	1.154
	Waters CORTECS C18	0.966	1.152
	Waters ACQUITY HSS C18	0.969	1.161
	ZORBAX Eclipse Plus C18	0.962	1.162
	ZORBAX SB C18	0.955	1.157
Waters H-Class	Waters ACQUITY BEH C18	0.976	1.169
	ZORBAX Eclipse Plus C18	0.971	1.163
平均值		0.966	1.160
RSD/%		0.70	0.50

表 7 不同实验室测得的相对校正因子

进样量/μL	实验室 1		实验室 2	
	$f_{辣椒素/降二氢辣椒素}$	$f_{辣椒素/二氢辣椒素}$	$f_{辣椒素/降二氢辣椒素}$	$f_{辣椒素/二氢辣椒素}$
0.2	0.956	1.145	0.955	1.148
0.5	0.968	1.152	0.966	1.158
1.0	0.967	1.159	0.964	1.154
1.5	0.963	1.147	0.969	1.159
2.0	0.961	1.157	0.961	1.151
平均值	0.963	1.152	0.963	1.154
RSD/%	0.50	0.52	0.55	0.40

表 8 不同仪器及规格色谱柱下目标成分的相对保留时间

仪器	色谱柱	相对保留时间	
		$\Delta t_{辣椒素/降二氢辣椒素}$	$\Delta t_{辣椒素/二氢辣椒素}$
Thermo Ulitimate 3000	Waters ACQUITY BEH C18	1.10	0.66
	Waters CORTECS C18	1.05	0.70
	Waters ACQUITY HSS C18	1.09	0.68
	ZORBAX Eclipse Plus C18	1.07	0.69
	ZORBAX SB C18	1.06	0.65
Waters H-Class	Waters ACQUITY BEH C18	1.08	0.67
	ZORBAX Eclipse Plus C18	1.06	0.69
平均值		1.07	0.68
RSD/%		1.68	2.57

表 9 外标法 (ESM) 和一测多评法 (QAMS) 测定小米辣中 3 种辣椒碱成分的比较 %

编号	产地	批号	降二氢辣椒素			辣椒素	二氢辣椒素		
			ESM	QAMS	RSD	ESM	ESM	QAMS	RSD
1	文山州砚山县	20160701	0.0302	0.0310	1.85	0.389	0.200	0.206	2.09
2	文山州马关县	20160702	0.0272	0.0281	2.30	0.351	0.181	0.187	2.31
3	红河州个旧市	20160703	0.0297	0.0304	1.65	0.362	0.190	0.195	1.84
4	红河州弥勒市	20160704	0.0349	0.0355	1.21	0.383	0.192	0.197	1.82
5	普洱市宁洱县	20160801	0.0324	0.0331	1.51	0.364	0.205	0.209	1.37
6	临沧市永德县	20160802	0.0275	0.0281	1.53	0.361	0.184	0.190	2.27
7	德宏州陇川县	20160803	0.0526	0.0534	1.07	0.285	0.187	0.193	2.23
8	大理州宾川县	20160901	0.0507	0.0513	0.83	0.330	0.198	0.204	2.11
9	大理州云龙县	20160902	0.0394	0.0401	1.25	0.277	0.139	0.143	2.01
10	楚雄州禄丰县	20160903	0.0334	0.0342	1.67	0.258	0.111	0.115	2.50
Pearson 系数				0.999				1.000	

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择

考察了甲醇、甲醇–四氢呋喃（1∶1）2种溶剂对小米辣中3种生物碱提取效率的影响，由于辣椒碱极性较小，甲醇–四氢呋喃（1∶1）提取效率更好，故选择甲醇–四氢呋喃（1∶1）作为提取溶剂。以甲醇–四氢呋喃（1∶1）25 mL为溶剂，分别超声20、30、40 min，结果30 min、40 min均较20 min提取完全，30 min、40 min的提取效果差异不大，故确定以甲醇–四氢呋喃（1∶1）超声提取30 min，3种辣椒碱提取率较高, 分离度较好, 干扰的杂质峰较少, 且方法简单，成本较低。

3.2 波长的选择

对降二氢辣椒素、辣椒素和二氢辣椒素进行全波长扫描，其紫外吸收峰相似，均在280 nm处有最大吸收，故选择280 nm为检测波长。

3.3 校正因子的考察

为了验证所建立的3种辣椒碱成分的一测多评法的适用性及可行性，本研究进行了方法学考察以及系统适用性试验。通过在2台液相色谱仪：Thermo Ultimate 3000和Waters H–Class、5根不同品牌及型号的色谱柱，以及2个不同实验室的考察，结果表明降二氢辣椒素、二氢辣椒素与辣椒素之间的相对校正因子具有良好的重现性。

3.4 结论

本研究首次将一测多评法应用于小米辣药材的质量评价中，以辣椒素为内参物，分别建立二氢辣椒素、降二氢辣椒素相对于辣椒素的相对校正因子，分别采用外标法和一测多评法测定3种辣椒碱的含量，并通过相对标准偏差（RSD）和Pearson系数比较二者结果的相对误差。该法所得3种辣椒碱类成分含量与传统外标法所测得含量之间没有显著性差异，说明一测多评法可作为小米辣药材质量控制的有效方法之一；与外标法相比，能较大程度地节约多成分含量测定的检验成本，并有利于控制药材的质量，可为其他民族药多成分定量提供技术参考。

参考文献：

[1] 卫生部药品标准：藏药第一册 [S]. 1995：7.

[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志：第67卷第1分册[M]. 北京：科学出版社，1978：63.

[3] 戴雄泽，刘志敏. 辣椒素类物质研究进展 [J]. 辣椒杂志，2005，（4）：13–16.

[4] 王穗平，夏延斌. 辣椒素类物质测定方法的研究进展 [J]. 中国食品添加剂，2005，（2）：110–113.

[5] 董新荣，刘仲华，杨建奎，等. 辣椒素类物质的化学研究进展[J]. 天然产物研究与开发， 2004，16（5）：486–489.

[6] 冯峰，刘文媛，郭青龙，等. HPLC法测定辣椒总碱中辣椒碱及二氢辣椒碱的含量 [J]. 西北药学杂志，2001，16（6）：243–244.

[7] 韩晓岚，胡云峰，赵学志，等. 高效液相色谱法测定辣椒素及二氢辣椒素 [J]. 中国食物与营养，2009，（11）：43–46.

[8] 王旭，王富华，钟红舰，等. 高效液相色谱法测定食品中的辣椒素、二氢辣椒素 [J]. 食品科学，2008，29（7）：378–381.

[9] 王海英，孙楠，孙悦宁. HPLC法对小米辣中辣椒素含量测定的研究 [J]. 中国民族医药杂志，2013，（7）：42–43.

[10] 张幸福，骆桂法，刘海青. 藏药小米辣的定性定量方法研究 [J]. 药物分析杂志，2014，34（5）：929–933.

[11] 吴奕敏，李光光，杨崇，等. 小米辣辣椒素类物质含量测定 [J]. 华南农业大学学报，2014，35（5）：52–56.

[12] 张晶，孙长波，石磊岭，等. RP–HPLC法测定辣椒中辣椒素、二氢辣椒素和降二氢辣椒素含量 [J]. 药物分析杂志，2011，31（2）：244–246.

[13] 于晓，戴衍朋，周倩，等. 一测多评法测定艾叶中6个有机酸类成分的含量 [J]. 药物分析杂志，2016，36（12）：2131–2138.

[14] 陆兔林，石上梅，蔡宝昌，等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展 [J]. 中草药，2012，43（12）：2525–2529.

[15] 黄涛阳，王晖，翁艳君，等. 一测多评法测定白屈菜中5种生物碱的含量 [J]. 中药材，2016，39（10）：2298–2301.

（收稿日期 2017年3月21日 编辑 王雅雯）