

HPLC-“内标”多控法测定四逆散中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸和新橙皮苷

王跃生¹,饶毅^{1*},魏惠珍¹,吴有根²,张洁²,方海红²,陈银芳²

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心,江西 南昌 330006; 2. 江西中医药大学,江西 南昌 330006)

摘要:目的 以四逆散为研究载体,建立“内标”多控法中药复方质量评价模式,并对该评价模式进行方法学考察。方法 选取芍药苷作为四逆散中各成分的参照“内标”,在不同的波长下测定各成分相对于内标成分的校正因子,利用校正因子和芍药苷对四逆散中柚皮苷、橙皮苷、甘草酸和新橙皮苷进行测定。结果 芍药苷 0.281 2~1.687 0 μg($r=0.999\ 6$)、柚皮苷 0.570 0~3.420 0 μg($r=0.999\ 4$)、橙皮苷 0.050 2~0.301 2 μg($r=0.999\ 9$)、新橙皮苷 0.523~3.138 0 μg($r=0.999\ 9$)、甘草酸镁 0.331 0~1.986 0 μg($r=0.999\ 8$)与峰面积呈良好线性关系。**结论** 建立四逆散中柚皮苷、橙皮苷、甘草酸和新橙皮苷相对于芍药苷的校正因子,比较外标法与“内标”多控法测定的结果,表明“内标”多控法对中药复方多成分质量控制是可行的、实用的。

关键词:四逆散;芍药苷;柚皮苷;橙皮苷;新橙皮苷;甘草酸镁;“内标”多控法;高效液相色谱

中图分类号:R286.1 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2008)09-1316-04

Determination of peoniflorin, naringin, aurantiamarin, neohesperidin, and ammonium glycyrrhizinate in Sini Powder by HPLC -“internal standard” multi-control method

WANG Yue-sheng¹, RAO-Yi^{1*}, WEI Hui-zhen¹, WU You-gen², ZHANG Jie²,
FANG Hai-hong², CHEN Yin-fang²

(1. The National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objective To establish a new quality evaluation method for Chinese compound medicine, using the “internal standard” in Sini Powder reference substance and to calculate multi-components simultaneously. **Methods** Relative correction factors (RCF) of naringin, aurantiamarin, neohesperidin, ammonium glycyrrhizinate, and a characteristic component peoniflorin as marker, were calculated in the chromatographic conditions for the determination of Sini Powder as a research model. The content of peoniflorin was determined by external standard method, and those of naringin, aurantiamarin, neohesperidin, and ammonium glycyrrhizinate were calculated by RCF compared with peoniflorin. The accuracy of the new method was evaluated by comparing the calculated contents with the determined contents. **Results** The linear response ranges of peoniflorin, naringin, aurantiamarin, neohesperidin, and ammonium glycyrrhizinate were 0.281 2~1.687 0 μg ($r=0.999\ 6$), 0.570 0~3.420 0 μg ($r=0.999\ 4$), 0.050 2~0.301 2 μg ($r=0.999\ 9$), 0.523~3.138 0 μg ($r=0.999\ 9$), 0.331 0~1.986 0 μg ($r=0.999\ 8$). **Conclusion** For the first time, “internal standard” multi-control method is adopted in HPLC determination for five reference substances in Sini Powder. The assay demonstrates that the method is feasible and available for the quality control of Sini Powder and it is to be a new quality evaluation pattern for Chinese compound medicines.

Key words: Sini Powder; peoniflorin; naringin; aurantiamarin; neohesperidin; ammonium glycyrrhizinate; “internal standard” multi-control method; HPLC

四逆散为《伤寒论》中的经典名方,由柴胡、白芍、枳壳、甘草4味中药组成,方中各组成药味有效部位及有效成分研究较多且药理作用相对明确。对照品是控制药品质量的关键,然而中药复方有的对

照品价格非常昂贵,有的不稳定,使质量控制难以实施;即使对照品价格适宜且比较稳定,现行国家标准也是采用各个成分逐一检测来控制中药复方质量,这给生产检验带来诸多不便。

收稿日期:2008-04-25

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI08B03)

作者简介:王跃生(1960-),山东青岛人,教授,硕士研究生导师,研究方向为中药复方质量标准控制。

Tel:(0791)7119658 E-mail:wylw915@163.com

* 通讯作者 饶毅 Tel:(0791)7119609 E-mail:raoyi99@126.com

大量研究实验发现,在同一中药复方各成分间存在着一定的比例关系,只要各成分的量符合该比例关系,中药复方的质量能基本得到全面控制。为此,笔者提出了“内标”多控法的中药复方质量评价模式。其基本思想是:在复方中选定一两个分离度好、性质稳定而且对照品较容易获得的成分,作为“内标”成分(此成分不是外加的内标物质,而是复方中本身含有的成分,因其作用与内标物质相类似,故命此名),取各个成分的对照品与“内标”成分的对照品,测定相对响应值作为校正因子,在测定中,只需要用选定的内标性对照品,其余成分的计算则用校正因子折算。因此本实验以四逆散为例,采用“内标”多控法中药复方质量评价模式对其中不同性质和种类的成分芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸和新橙皮苷同时进行测定,对“内标”多控法中药复方质量评价模式可行性进行了探索和论证。

1 仪器与试药

Waters 2695~2996 高效液相色谱系统,Empower 工作站(Waters 公司);Agilent1100 高效液相系统(Agilent 公司);LC—10AT 高效液相色谱系统(岛津公司)。

芍药苷(批号 110736-200526)、柚皮苷(批号 110722-200309)、橙皮苷(批号 110721-200512)、甘草酸铵(批号 110731-200511)对照品由中国药品生物制品检定所提供,新橙皮苷对照品由中药固体制剂制造技术国家工程研究中心对照品室制备,经光谱确定结构,HPLC 面积归一化法计算质量分数为 99.34%。四逆散为自制样品,乙腈为色谱级,水为 Milli-Q 超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 方法原理:采用测定各对照品相对于内标性对照品的“相对校正因子”方法,将测得的“相对校正因子”载入到各品种项下,用内标性对照品结合校正因子的方法进行质量控制。

$$f = (C_i/A_i)/(C_r/A_r)$$

式中 f 为校正因子, C_i, A_i 为内标性成分的质量浓度和峰面积, C_r, A_r 为待测成分的质量浓度和面积

2.2 内标性成分的选择:白芍为四逆散君药,其有效成分芍药苷对照品易获得,价格适中,并且易于检测,与其他成分分离良好,故将其列为内标性成分。

2.3 色谱条件和系统适用性试验:色谱柱为依利特

Hyersil ODS₂、Thermo Hypersil-Keystone ODS、VP-ODS;流动相:乙腈(A)-1%冰醋酸(B),梯度洗脱,0~25 min,20%A;25~55 min,65%A;55 min以后,95%A;检测波长:250、280 nm;柱温:30 °C;体积流量:1.0 mL/min。理论塔板数以芍药苷计不低于 2 000。色谱图见图 1。

2.4 对照品溶液的配制:分别取对照品适量,精密称定,用甲醇溶解,配制成每毫升含芍药苷 56.24 μg、柚皮苷 114 μg、橙皮苷 10.04 μg、新橙皮苷 104.6 μg、甘草酸铵 66.2 μg(以含甘草酸 91.23% 计)的混合对照品溶液。

2.5 供试品溶液的制备^[1]:取四逆散 0.4 g,精密称定,置回流瓶中,精密加入 25 mL 稀乙醇,称定质量,在水浴上回流 2 h,冷却,用稀乙醇补足质量,滤过,作为供试品溶液。临用前过 0.45 μm 滤膜。

2.6 阴性对照溶液的制备:按处方比例分别配制缺白芍、枳壳、甘草的阴性样品,按供试品溶液的制备方法制备各阴性对照溶液。

2.7 校正因子的测定及线性范围:精密吸取混合对照品溶液 5、8、10、15、20、25、30 μL,注入色谱仪,记录各色谱峰峰面积,计算各成分校正因子,见表 1。以进样量(X)对峰面积积分值(Y)进行回归处理,回归方程、线性范围见表 2。

表 1 四逆散中各成分的校正因子

Table 1 RCF for different components in Sini Powder

进样量/μL	f (柚皮苷)	f (橙皮苷)	f (新橙皮苷)	f (甘草酸铵)
30	12.123 1	14.012 3	12.101 2	1.992 3
25	13.504 8	15.642 1	12.872 0	2.043 1
20	11.860 3	13.395 0	12.163 8	1.998 5
15	11.962 5	13.460 1	11.904 3	2.102 1
10	12.451 0	14.065 4	11.780 5	1.977 4
8	12.263 6	13.800 1	11.668 1	1.986 9
5	12.176 9	13.669 8	12.073 2	2.005 5
均值	12.334 6	14.006 4	12.080 4	2.015 1
RSD/%	4.47	5.46	3.25	2.17

2.8 校正因子耐用性考察

2.8.1 不同色谱仪器对校正因子的影响:选用 Thermo Hypersil-Keystone ODS (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 分别在 LC-10AT、Waters 2695~2996 和 Agilent1100 高效液相色谱仪上测定, 计算 f 值, 结果见表 3。不同仪器对校正因子的影响均不显著, 校正因子值是相对稳定的数值。

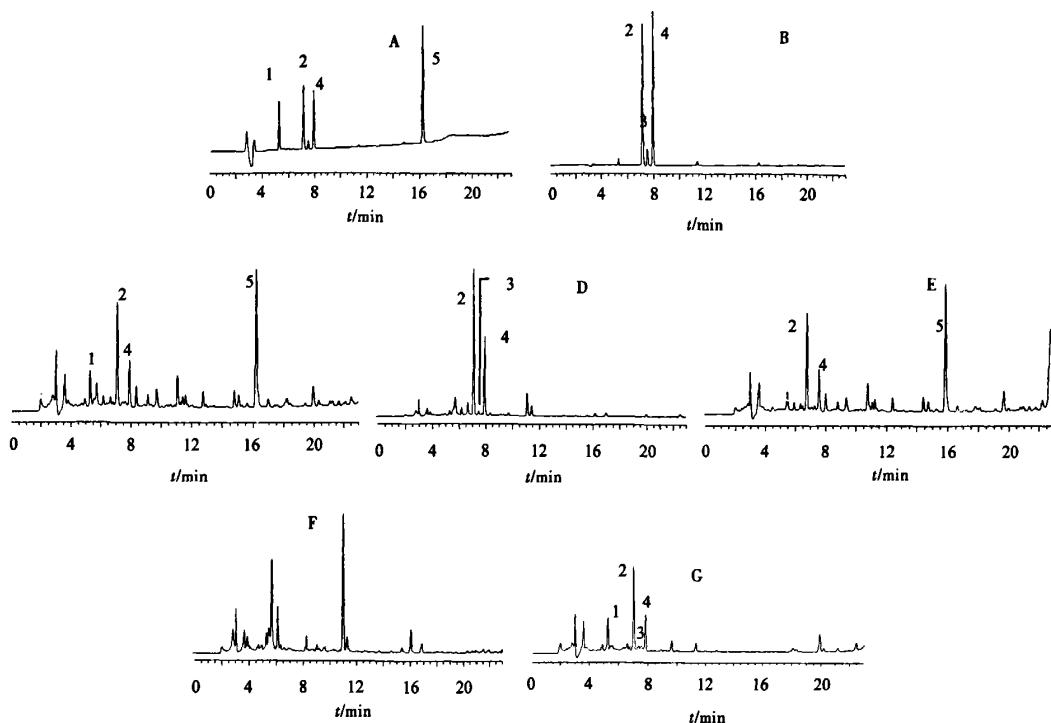


图1 对照品在 250 nm(A)、280 nm(B), 样品在 250 nm(C)、280 nm(D), 缺白芍样品(250 nm)(E), 缺枳壳样品(280 nm)(F), 缺甘草样品(250 nm)(G)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substance at 250 nm (A), 280 nm (B), sample at 250 nm (C), 280 nm (D), negative sample without *Radix Paeoniae Alba* at 250 nm (E), without *Fructus Citri Aurantii Amarae* at 280 nm (F), and without *Radix Glycyrrhizae* at 250 nm (G)

表2 四逆散各成分的线性方程及线性范围

Table 2 Linearity equations and linear range of components in Sini Powder

成分	线性方程	线性范围/ μ g	r
芍药苷	$Y=18\ 027\ X+6\ 902.1$	0.281~1.687 2	0.999 6
柚皮苷	$Y=139\ 186\ X+52\ 837$	0.570 0~3.420 0	0.999 4
橙皮苷	$Y=137\ 753\ X+1\ 889.4$	0.050 2~0.301 2	0.999 9
新橙皮苷	$Y=164\ 311\ X+28\ 105$	0.523 0~3.138 0	0.999 9
甘草酸铵	$Y=43\ 533\ X+7\ 454.1$	0.331 0~1.986 0	0.999 8

表3 不同液相色谱仪对校正因子的影响

Table 3 Influence of different liquid chromatographic instruments on RCF

色谱仪	f(柚皮苷)	f(橙皮苷)	f(新橙皮苷)	f(甘草酸铵)
Waters 色谱仪	11.962 5	13.860 1	11.971 7	1.998 0
LC-10AT 色谱仪	12.219 7	14.079 9	12.168 3	2.110 0
Agilent 色谱仪	12.547 3	14.342 1	12.036 4	2.034 5
平均值	12.243 2	14.094 0	12.058 8	2.047 5
RSD/%	2.39	1.71	0.83	2.79

2.8.2 不同色谱柱对校正因子的影响:HPLC 测定时会用到不同品牌或不同批号的同类型色谱柱,用同一台液相色谱仪,分别用3种不同品牌的色谱柱测定5种混合对照品,考察不同色谱柱对校正因子的影响,结果见表4。不同色谱柱对校正因子的影响均不显著,校正因子值是相对稳定的数值。

表4 不同色谱柱对校正因子的影响

Table 4 Effect of different chromatographic columns on RCF

色谱柱	f(柚皮苷)	f(橙皮苷)	f(新橙皮苷)	f(甘草酸铵)
依利特 Hypersil ODS ₂	11.541 6	14.264 5	11.943 2	1.998 0
Thermo Hypersil-Keystone ODS	11.962 5	13.460 1	12.322 1	1.947 0
VP-ODS	12.689 4	14.476 1	11.863 1	2.100 0
均值	12.064 5	14.066 9	12.042 8	2.015 0
RSD/%	4.81	3.81	2.04	3.87

2.8.3 不同柱温对校正因子的影响:用同台高效液相色谱仪,分别在20、25、30℃的柱温下,考察各成

表5 不同柱温对校正因子的影响

Table 5 Influence of changing in column temperature on RCF

色谱柱温度	f(柚皮苷)	f(橙皮苷)	f(新橙皮苷)	f(甘草酸铵)
20 ℃	11.973 5	13.781 2	12.012 3	1.979 7
25 ℃	12.042 3	13.974 2	11.993 2	1.986 9
30 ℃	11.994 2	14.012 5	12.125 3	2.005 5
均值	12.003 3	13.922 6	12.043 6	1.990 7
RSD/%	0.29	0.89	0.59	0.67

分的校正因子,结果见表5。柱温对校正因子的影响均不显著,校正因子值是相对稳定的数值。

2.9 精密度试验:精密吸取供试品溶液 20 μL,连续进样 6 次,记录峰面积,计算各成分峰面积的 RSD,结果芍药苷 0.82%、柚皮苷 0.40%、橙皮苷 1.91%、新橙皮苷 1.32%、甘草酸 1.18%。

2.10 稳定性试验:取同一供试品溶液,室温放置,分别于 0、4、8、12、24 h 进样 20 μL,记录各成分的峰面积,计算 RSD 值,结果芍药苷 1.11%、柚皮苷 0.94%、橙皮苷 1.15%、新橙皮苷 1.21%、甘草酸 1.02%。结果表明各成分在 24 h 内基本稳定。

2.11 重现性试验:取四逆散约 0.4 g,共 6 份,精密称定,按供试品溶液的制备方法处理,测定,计算各成分的平均质量分数,结果芍药苷 5.436 2 mg/g、柚皮苷 20.101 8 mg/g、橙皮苷 0.535 8 mg/g、新橙皮苷 11.743 2 mg/g、甘草酸 11.464 8 mg/g, RSD 分别为 1.86%、0.99%、2.24%、1.13%、1.65%。

2.12 加样回收率试验:取四逆散粉末(过 4 号筛)9 份,每份约 0.2 g,精密称定,分别加入相当于样品中各成分质量 80%、100%、120% 的对照品,制备供试品溶液,进样测定,计算加样回收率,结果芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸的平均回收率分别为 99.7%、100.2%、99.4%、98.9%、99.8%,RSD 分别为 2.40%、2.62%、2.31%、2.81%、1.56%。

2.13 四逆散中各成分的测定:分别精密吸取对照品混合溶液、供试品溶液各 20 μL 注入高效液相色谱仪,采用外标法计算各成分平均质量分数。再分别精密吸取内标对照品溶液、供试品溶液各 20 μL 注入高效液相色谱仪,进样测定,计算芍药苷的质量分数,采用校正因子法折算其他各成分的质量分数,结果见表 6。

3 讨论

本实验通过以四逆散为载体,对“内标”多控法

表6 外标法与“内标”多控法测定的结果比较(n=3)

Table 6 Comparison of determination by external reference method with that by “internal standard” multi-control (n=3)

成分	质量分数/(mg·g⁻¹)		RSD/%
	外标法	“内标”多控法	
芍药苷	5.466 2	5.466 2	0.00
柚皮苷	20.013 2	20.546 1	1.86
橙皮苷	0.511 0	0.513 2	0.30
新橙皮苷	11.757 4	11.815 4	0.35
甘草酸	11.843 7	12.222 3	2.22

中药复方质量评价模式的可行性和方法的耐用性进行了探讨。结果表明“内标”多控法中药复方质量评价模式推算的测定结果与用相对对照品实测所得结果没有显著性差异,说明该中药复方质量评价模式的合理可行。

有文献报道采用校正因子法测定同一类化合物几种成分^[2,3],由于所测物质的性质相似,其所用的校正因子法可靠性值得研究;还有文献报道用替代对照品法测定复方中的某种成分的量^[4],因外加替代物质,又引入了新的误差,对检测结果有一定的影响。本实验采用“内标”多控法,结合校正因子,在同一色谱条件下,以芍药苷为“内标性”成分,同时测定四逆散中不同类别和性质的成分,回收率高,准确度高。

甘草酸在 250 nm,柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷在 280 nm 左右有最大紫外吸收,芍药苷在 232 nm 处有最大紫外吸收,以芍药苷为内标时,为了准确测定各成分的校正因子,选择了 250 nm 及 280 nm 作为检测波长。

采用本法可不提供定量用柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草酸铵对照品,只需鉴别和定位用的对照品即可,采用经济实惠且易获得的芍药苷对照品进行定量分析,就可以对四逆散中 5 种成分进行定量,为中药复方全面质量控制提供了一种新方法、新思路。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 黄信,郑阳,曾泽玉,等. HPLC 校正因子法测定牛蒡子提取物中总木脂素含量[J]. 成都中医药大学学报,2005,28(4):42~44.
- [3] 王智民,高慧敏,付雪涛,等.“一测多评”法中药质量控制评价模式方法学研究[J]. 中国中药杂志,2006,31(23):1925~1928.
- [4] 谢元超,金少鸿. 替代对照品法用于丹参和复方丹参片含量测定的研究[J]. 药物分析杂志,2007,27(4):497~502.

HPLC-“内标”多控法测定四逆散中芍药苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸和新橙皮苷

作者: 王跃生, 饶毅, 魏惠珍, 吴有根, 张洁, 方海红, 陈银芳, WANG Yue-sheng, RAO-Yi, WEI Hui-zhen, WU You-gen, ZHANG Jie, FANG Hai-hong, CHEN Yin-fang
作者单位: 王跃生, 饶毅, 魏惠珍, WANG Yue-sheng, RAO-Yi, WEI Hui-zhen(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西, 南昌, 330006), 吴有根, 张洁, 方海红, 陈银芳, WU You-gen, ZHANG Jie, FANG Hai-hong, CHEN Yin-fang(江西中医药大学, 江西, 南昌, 330006)
刊名: 中草药 [STIC PKU]
英文刊名: CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS
年, 卷(期): 2008, 39(9)
被引用次数: 12次

参考文献(4条)

1. 中华人民共和国药典(一部) 2005
2. 黄信; 郑阳; 曾泽玉 HPLC校正因子法测定牛蒡子提取物中总木脂素含量[期刊论文]-成都中医药大学学报 2005(04)
3. 王智民; 高息敏; 付雪涛 “一测多评”法中药质量控制评价模式方法学研究[期刊论文]-中国中药杂志 2006(23)
4. 谢元超; 金少鸿 替代对照品法用于丹参和复方丹参片含量测定的研究[期刊论文]-药物分析杂志 2007(04)

本文读者也读过(5条)

1. 阙红玉. 谢跃生. 王跃飞. 戚爱棣. 潘桂湘. 刘虹. KAN Hong-yu. XIE Yue-sheng. WANG Yue-fei. QI Ai-di. PAN Gui-xiang. LIU Hung HPLC法测定小鼠血浆中杠柳毒苷的血药浓度[期刊论文]-中草药 2008, 39(10)
2. 魏惠珍. 谢菲. 饶毅. 杜艳龙. 金浩鑫. 李新南. WEI Hui-zhen. XIE Fei. RAO Yi. DU Yan-long. JIN Hao-xin. LI Xin-nan 内标多控法测定枳实、枳壳、青皮和陈皮中黄酮类成分含量[期刊论文]-中国实验方剂学杂志 2010, 16(14)
3. 张金莲. 何敏. 谢一辉. 姚冬琴. 余润民. 张的凤. ZHANG Jin-lian. HE Min. XIE Yi-hui. YAO Dong-qin. YU Run-min. ZHANG Di-feng 高效液相色谱法测定枳壳饮片中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量[期刊论文]-中国实验方剂学杂志 2010, 16(6)
4. 魏惠珍. 杜艳龙. 饶毅. 王跃生. 罗晓健. 邱伟华. WEI Hui-zhen. DU Yan-long. RAO Yi. WANG Yue-sheng. LUO Xiaojian. QIU Wei-hua 单一内标多控法同步测定杏香兔耳风中绿原酸和3, 5-二咖啡酰基奎宁酸的含量[期刊论文]-江西医学院学报 2009, 49(11)
5. 谢贞建. 焦士蓉. 李恺. 童永鑫. XIE Zhen-jian. JIAO Shi-rong. LI Kai. TONG Yong-xin RP-HPLC法测定不同产地枳实中的柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷[期刊论文]-西华大学学报(自然科学版) 2009, 28(2)

引证文献(12条)

1. 阎维维 舒筋定痛片的质量标准研究[期刊论文]-中草药 2010(7)
2. 张建业. 冯向东 HPLC法同时测定八珍益母丸中芍药苷和甘草酸铵的含量[期刊论文]-中国药师 2011(7)
3. 罗祖良. 仇峰. 韦日伟. 覃禹. 张坤. 覃洁萍. 杨美华 相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展[期刊论文]-中草药 2012(7)
4. 黄燕萍. 黄远飞 HPLC法同时测定胃安胶囊中芍药苷和柚皮苷的含量[期刊论文]-中国药事 2011(4)
5. 柏冬. 范斌. 牛晓红. 宋剑南 HPLC-系统内标法测定桂枝汤中芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸[期刊论文]-中草药 2010(3)
6. 魏惠珍. 杜艳龙. 饶毅. 王跃生. 罗晓健. 邱伟华 单一内标多控法同步测定杏香兔耳风中绿原酸和3, 5-二咖啡酰基奎宁酸的含量[期刊论文]-江西医学院学报 2009(11)

7. 张红伟. 张振凌 "一测多评"法在中药质量控制中的研究进展[期刊论文]-海峡药学 2010(11)
8. 雷定超. 鄂秀辉. 张兰兰. 周水平. 闫希军 HPLC同时测定糖敏灵丸中5种成分的含量[期刊论文]-中国实验方剂学杂志 2012(13)
9. 谢晚晴. 连凤梅. 姬航宇. 陈欣燕. 全小林 中药量效关系研究进展[期刊论文]-中医杂志 2011(19)
10. 孙志明. 李小娜 四逆散复方的研究进展[期刊论文]-现代中西医结合杂志 2011(25)
11. 李倩. 罗祖良. 杨小丽. 刘伟. 杨美华 中药质量控制方法研究述评[期刊论文]-中医学报 2012(4)
12. 高慧敏. 宋宗华. 王智民. 钱忠直. 张启伟 适合中药特点的质量评价模式——QAMS研究概述[期刊论文]-中国中药杂志 2012(4)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200809013.aspx