

## 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

柏冬<sup>1,3</sup>, 范斌<sup>2</sup>, 牛晓红<sup>2</sup>, 宋剑南<sup>3\*</sup>

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700;

3. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700)

**摘要:**目的 建立同时测定桂枝汤中多个有效成分的系统内标方法(SIS)。方法 以桂枝汤中芍药苷为内标, 测定芍药苷与甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸之间的相对校正因子, 利用该相对校正因子计算甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸, 并与外标一点法(ACV)测定结果进行比较, 以验证方法的准确性和可行性。结果 ACV 与 SIS 测定 5 批桂枝汤中的 5 种成分的结果无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 可以准确测定桂枝汤中 5 种成分。结论 SIS 方法既能同时测定中药中多个成分的量, 又能简化实验操作, 有望成为适合中药特点的多指标质量评价新模式。

**关键词:** 桂枝汤; 系统内标法(SIS); 高效液相色谱法; 多指标测定

中图分类号: R286.02 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)03-0387-04

## Determination of paeoniflorin, liquiritin, cinnamic acid, cinnamic aldehyde, and glycyrrhizic acid in Guizhi Decoction by HPLC method with sample's internal standard

BAI Dong<sup>1,3</sup>, FAN Bin<sup>2</sup>, NIU Xiao-hong<sup>2</sup>, SONG Jian-nan<sup>3\*</sup>

(1. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Medical Experiment Center, China

Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China; 3. Institute of Basic Theory,

China Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

**Abstract: Objective** To establish a new content determination method, sample's internal standard, based on simultaneous determination of five components in Guizhi Decoction by HPLC under multiple UV wavelengths. **Methods** Peoniflorin in Guizhi Decoction was chosen as the internal standard, and the related correction factors of liquiritin, cinnamic acid, cinnamic aldehyde, and glycyrrhizic acid compared with peoniflorin were measured. The contents of these four components could be calculated by the related correction factors. This method was named to be 'sample's internal standard' (SIS). The method was evaluated by comparison of the quantitative results between angle cosine value (ACV) and SIS method. **Results** No significant differences were found in the quantitative results of the five components in five batches of Guizhi Decoction by ACV and SIS methods ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The SIS method not only can determine multiple index in Chinese materia medica (CMM) simultaneously, but also be simple and accurate. It will be a good quality evaluation pattern for CMM.

**Key words:** Guizhi Decoction; sample's internal standard (SIS); HPLC; multiple index determination

中药成分测定发展的趋势是多指标测定<sup>[1,2]</sup>, 但传统多指标测定方法存在着对照品消耗量大, 操作复杂、繁琐、易导致误差的缺陷。为此, 本实验在前期建立的多波长 HPLC 法同时测定桂枝汤中 5 种有效成分的基础上, 参考“一测多评”<sup>[3-5]</sup> 和内标多控<sup>[6]</sup> 测定方法, 建立了使用一种对照品同时测定

样品中多个有效成分的“系统内标”(SIS)测定方法。本法改进了“一测多评”法的不足之处, 且在本实验中对该方法的系统适应性进行了探讨, 尝试建立一种既能反映中药有效成分多样化, 又能降低对照品的使用数量, 减少误差, 提高测定结果准确性的测定方法。

收稿日期: 2009-06-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30572334)

作者简介: 柏冬(1983—), 男, 安徽人, 博士研究生, 研究方向为药物分析。Tel: (010) 64014411-2505 E-mail: abai2000\_0@163.com

\*通讯作者 宋剑南 E-mail: sjn2003@sina.com

### 1 仪器与试剂

Agilent 1100 HPLC (四元泵、自动进样器、DAD 检测器); Agilent 1200 HPLC 高效液相色谱仪(四元泵、自动进样器、DAD 检测器); MILLIPORE Simplicity 超纯水器。

乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸对照品均购至中国药品生物制品检定所,供定量测定用。桂枝、炒白芍、炙甘草、大枣、生姜均购自北京同仁堂药店,由北京中医药大学刘春生教授鉴定,符合《中国药典》2005 年版规定。

### 2 方法和结果

2.1 系统内标法(SIS)计算方法<sup>[7]</sup>:利用成分 A 对照品溶液获得质量浓度  $C_A$  与检测器的响应信号(峰面积或峰高)  $Y$  之间的回归方程  $Y = K_A \times C_A$  及其线性范围 ( $r > 0.999 5$ ),  $K_A$  即成分 A 的校正因子,同法获得成分 B 的校正因子  $K_B$ 。计算成分 A 与成分 B 之间相对校正因子:  $f = K_B / K_A$  (公式 1)。利用外标法测定样品中成分 A 的质量浓度  $C_a$  (成分 A 为内标);通过测定样品中成分 A 与成分 B 的峰面积 ( $A_a$ 、 $A_b$ ),利用校正因子  $f$  测定样品中成分 B 的质量分数  $C_b$ :  $C_b = A_b / A_a \times C_a / f$  (公式 2)。

#### 2.2 系统内标法(SIS)方法学考察

2.2.1 色谱条件:色谱柱 Diamond  $C_{18}$  (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相 0.1%磷酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序依次为:(0~34 min) A-B (85/15), (35~54 min) A-B (62/38);体积流量 1.0 mL/min;柱温 25℃;检测波长:230 nm (检测芍药苷)、250 nm (检测甘草酸)、280 nm (检测甘草苷、肉桂酸、桂皮醛),记录全部光谱数据。

2.2.2 对照品溶液的制备:精密称取对照品芍药苷 12.5 mg、甘草苷 7.5 mg、肉桂酸 3.0 mg、桂皮醛 30 mg、甘草酸 6 mg,置于同一 50 mL 量瓶中,用甲醇定容,配成混合对照品储备液。将储备液用甲醇稀释成含芍药苷 0.15 mg/mL、甘草苷 0.09 mg/mL、肉桂酸 0.036 mg/mL、桂皮醛 0.36 mg/mL、甘草酸

0.072 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备:根据处方分别称取炒白芍 9 g、桂枝 9 g、炙甘草 6 g、生姜 9 g、大枣 3 枚加入 8 倍量的水,浸渍 30 min,煎煮 30 min,滤过,滤液浓缩定容至 250 mL,取溶液过 0.45 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

2.2.4 色谱图:分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 10 μL 进样,在上述的色谱条件下进样测定,色谱图见图 1。芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸分离良好,不受其他成分的干扰。

1-芍药苷 2-甘草苷 3-肉桂酸 4-桂皮醛 5-甘草酸  
1-paeoniflorin 2-liquiritin 3-cinnamic acid  
4-cinnamic aldehyde 5-glycyrrhizic acid

图 1 混合对照品(A)和桂枝汤(B)的色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A) and Guizhi Decoction (B)

2.2.5 相对校正因子的测定:将混和对照品储备液用甲醇稀释,得到分别含芍药苷 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mg/mL,甘草苷 0.03、0.06、0.09、0.12、0.15 mg/mL,肉桂酸 0.012、0.024、0.036、0.048、0.060 mg/mL,桂皮醛 0.12、0.24、0.36、0.48、0.60 mg/mL 和甘草酸 0.024、0.048、0.072、0.096、0.12 mg/mL 的系列质量浓度混合对照品溶液,分别进样 10 μL,记录 5 种成分峰面积。利用峰面积对进样量做直线回归,求得芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸线性回归方程 ( $L_1$ 、 $L_2$ )、相关系数及线性区间,结果见表 1。

表 1 回归方程、相关系数及线性范围

Table 1 Regression equation, correlation coefficient, and linearity range

| 成分  | 回归方程 $L_1 (Y = aX + b)$            | 回归方程 $L_2 (Y = aX)$        | 线性范围/ng       |
|-----|------------------------------------|----------------------------|---------------|
| 芍药苷 | $Y = 1.233 X + 24.02, r = 0.999 9$ | $Y = 1.238 X, r = 0.999 6$ | 500 ~ 2 500   |
| 甘草苷 | $Y = 1.490 X + 10.19, r = 0.999 6$ | $Y = 1.503 X, r = 0.999 6$ | 300 ~ 1 500   |
| 肉桂酸 | $Y = 8.833 X - 7.63, r = 0.999 9$  | $Y = 8.830 X, r = 0.999 9$ | 120 ~ 600     |
| 桂皮醛 | $Y = 2.823 X + 1.395, r = 0.999 9$ | $Y = 2.823 X, r = 0.999 9$ | 1 200 ~ 6 000 |
| 甘草酸 | $Y = 0.865 X - 5.924, r = 0.999 9$ | $Y = 0.862 X, r = 0.999 9$ | 240 ~ 1 200   |

利用公式 1 计算各成分的  $k$  及  $f$  (芍药苷为内标), 结果见表 2。

表 2 5 种成分的校正因子及相对校正因子

Table 2 Correlation factors and related correction factors of five components

| 成分  | $k$   | $f$     |
|-----|-------|---------|
| 芍药苷 | 1.238 | 1       |
| 甘草苷 | 1.503 | 1.214 1 |
| 肉桂酸 | 8.830 | 7.132 5 |
| 桂皮醛 | 2.823 | 2.280 3 |
| 甘草酸 | 0.862 | 0.696 3 |

2.2.6  $f$  的重现性考察: 取 5 种成分的混合对照品, 分别考察了两种液相色谱仪 (Agilent 1100 HPLC 及 Agilent 1200 HPLC) 测定的  $f$  在同一仪器、同一天内测定结果, 不同日期测定结果及不同仪器之间的重现性, 结果见表 3。结果表明,  $f$  在不同仪器中的重现性良好 (RSD < 3.0%)。

2.2.7 待测成分色谱峰的判断: 系统内标法 (SIS) 需解决在不使用对照品时如何判断样品中其他 4 个成分色谱峰的保留时间及该色谱峰是否与其他色谱峰完全分离。对此本研究通过以下方法解决。

表 3 相对校正因子的重现性考察 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 3 Reproducibility of related correction factors ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 仪器           | $f$ 甘草苷/芍药苷 | $f$ 肉桂酸/芍药苷       | $f$ 桂皮醛/芍药苷       | $f$ 甘草酸/芍药苷       |                   |
|--------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Agilent 1100 | 日内 $f$      | 1.213 $\pm$ 0.017 | 7.133 $\pm$ 0.079 | 2.274 $\pm$ 0.025 | 0.692 $\pm$ 0.008 |
|              | RSD/ %      | 1.4               | 1.1               | 1.3               | 1.2               |
|              | 日间 $f$      | 1.214 $\pm$ 0.021 | 7.127 $\pm$ 0.091 | 2.275 $\pm$ 0.031 | 0.692 $\pm$ 0.013 |
|              | RSD/ %      | 1.7               | 1.3               | 1.4               | 1.9               |
| Agilent 1200 | 日内 $f$      | 1.213 $\pm$ 0.016 | 7.119 $\pm$ 0.078 | 2.272 $\pm$ 0.034 | 0.688 $\pm$ 0.013 |
|              | RSD/ %      | 1.3               | 1.1               | 1.5               | 1.9               |
|              | 仪器之间        | RSD/ %            | 1.3               | 1.1               | 1.2               |

表 4 不同仪器中 5 种成分的保留时间和分离度 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 4 Relative retention time and resolution of five components measured by different instruments ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 仪器           | 芍药苷         | 甘草苷            | 肉桂酸            | 桂皮醛            | 甘草酸            |                |
|--------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Agilent 1100 | $t_R$ / min | 16.1 $\pm$ 0.2 | 31.7 $\pm$ 0.2 | 44.1 $\pm$ 0.1 | 48.4 $\pm$ 0.5 | 54.4 $\pm$ 0.3 |
|              | 分离度         | > 3.2          | > 4.8          | > 3.2          | > 2.8          | > 1.8          |
|              | $t_R$ / min | 15.6 $\pm$ 0.3 | 31.1 $\pm$ 0.3 | 43.7 $\pm$ 0.4 | 47.1 $\pm$ 0.4 | 53.3 $\pm$ 0.4 |
| Agilent 1200 | 分离度         | > 3.1          | > 4.7          | > 3.0          | > 2.6          | > 1.7          |

表 5 不同色谱柱中 5 个成分的保留时间和分离度 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 5 Relative retention time and resolution of five components measured by different columns ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

| 色谱柱       | 芍药苷         | 甘草苷            | 肉桂酸             | 桂皮醛            | 甘草酸            |                |
|-----------|-------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|
| Diamonsil | $t_R$ / min | 16.1 $\pm$ 0.1 | 31.7 $\pm$ 0.12 | 44.1 $\pm$ 0.1 | 48.4 $\pm$ 0.2 | 54.4 $\pm$ 0.3 |
|           | 分离度         | > 3.2          | > 4.8           | > 3.2          | > 2.8          | > 1.8          |
|           | $t_R$ / min | 16.8 $\pm$ 0.2 | 32.6 $\pm$ 0.2  | 45.7 $\pm$ 0.1 | 49.5 $\pm$ 0.4 | 56.1 $\pm$ 0.3 |
| Agilent   | 分离度         | > 3.5          | > 4.8           | > 3.8          | > 3.4          | > 2.5          |

(2) 利用各成分色谱峰的紫外吸收光谱进一步确认: 通过 (1) 初步确定各成分的  $t_R$ , 再利用各色谱峰的紫外吸收光谱图进一步确认, 并判断该色谱峰是否有其他色谱峰的干扰<sup>[9]</sup>, 见图 2。甘草苷色谱

(1) 利用各成分的保留时间进行判断: 取同一桂枝汤供试品溶液, 考察供试品中 5 种成分在同一色谱柱 Diamonsil-C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) 不同液相色谱仪 (Agilent 1100 HPLC 及 Agilent 1200 HPLC) 中保留时间及分离度的变化, 结果见表 4。结果表明在相同色谱条件下, 同一色谱柱, 在不同型号色谱仪中 5 种成分均得到良好分离, 且相对保留时间  $t_R$  基本稳定。

取同一桂枝汤供试品溶液, 比较不同色谱柱 Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Diamonsil C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)、Agilent Zorbax SB C<sub>18</sub> (250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m) 在同一色谱仪中, 该色谱条件下 5 种成分保留时间及分离度的变化, 结果见表 5。结果表明 Kromasil 及 Agilent Zorbax SB 均能将桂枝汤中 5 种成分良好分离, 且保留时间变化不大。但 Kromasil 色谱柱在相同色谱条件下, 未能将样品中 5 种成分良好分离。这是因为不同色谱柱对化合物的分离能力不完全相同, 因此实验时需对色谱柱进行考察, 选择合适的色谱柱<sup>[8]</sup>。

峰的  $t_R$  为 30 ~ 33 min, 通过甘草苷色谱峰不同时间点紫外光谱图, 进一步确认, 且色谱峰质量分数较好, 无干扰。桂皮醛、肉桂酸和甘草酸的色谱峰位置判断及峰纯度检测同甘草苷。

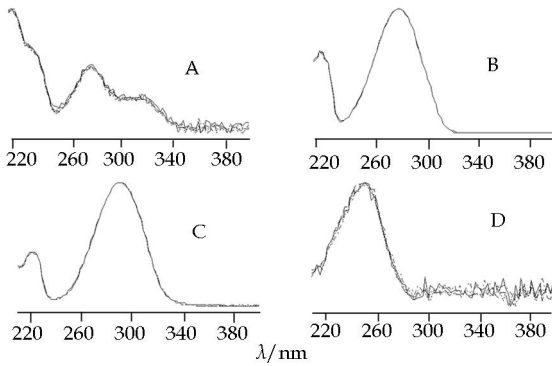


图 2 甘草苷(A)、肉桂酸(B)、桂皮醛(C)和甘草酸(D) 色谱峰不同时间点紫外吸收光谱图

Fig. 2 UV Absorption spectra of liquiritin (A), cinnamic acid (B), cinnamic aldehyde (C), and glycyrrhizic acid (D) at various time points

表 6 外标一点法(ACV)和系统内标法(SIS)测定桂枝汤中 5 种成分的结果

Table 6 Determination of five compounds in Guizhi Decoction detected by ACV and SIS methods

| 样品 | 芍药苷/<br>(mg · mL <sup>-1</sup> ) | 甘草苷/(mg · mL <sup>-1</sup> ) |         | 肉桂酸/(mg · mL <sup>-1</sup> ) |         | 桂皮醛/(mg · mL <sup>-1</sup> ) |         | 甘草酸/(mg · mL <sup>-1</sup> ) |         |
|----|----------------------------------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|------------------------------|---------|
|    |                                  | ACV                          | SIS     | ACV                          | SIS     | ACV                          | SIS     | ACV                          | SIS     |
| 1  | 0.064 5                          | 0.065 2                      | 0.065 2 | 0.033 5                      | 0.033 5 | 0.304 6                      | 0.304 6 | 0.055 7                      | 0.055 7 |
| 2  | 0.067 7                          | 0.062 0                      | 0.061 2 | 0.035 2                      | 0.035 8 | 0.309 8                      | 0.309 6 | 0.054 6                      | 0.054 2 |
| 3  | 0.065 1                          | 0.068 4                      | 0.067 9 | 0.032 3                      | 0.032 1 | 0.302 5                      | 0.302 8 | 0.056 3                      | 0.057 2 |
| 4  | 0.061 3                          | 0.062 6                      | 0.061 5 | 0.031 8                      | 0.032 9 | 0.299 4                      | 0.299 7 | 0.053 4                      | 0.055 1 |
| 5  | 0.063 2                          | 0.063 9                      | 0.063 7 | 0.033 8                      | 0.033 4 | 0.300 4                      | 0.300 5 | 0.058 5                      | 0.059 1 |

的紫外吸收光谱与其相似,如果不使用对照品,较难分辨。文献报道中多采用不同质量浓度对照品溶液所测得的峰面积与成分质量比值的算术平均值作为  $k^{[3-5]}$ 。但由文献可以看成分在不同质量浓度计算所得的  $k$  之间有一定误差。本实验利用“最小二乘”法通过计算回归方程的方法求出  $k$ ,且要求其  $r > 0.999 5$ ,较文献中方法更为合理,同时可以限定  $k$  的使用范围。

对于测定成分色谱峰的判断,本方法通过各成分保留时间初步判断各色谱峰位置,再根据各峰的 DAD 紫外吸收光谱图进一步确认。

通过与外标法测定结果相比较,证明本方法测定结果准确,既能反映中药有效成分多样化,可以降低对照品的使用数量,减少误差,提高测定结果的准确性,有望成为适合中药特点的多指标质量评价新模式。

2.2.8 样品测定:分别精密吸取供试品溶液、对照品溶液 10  $\mu$ L 注入高效液相色谱仪测定,分别采用外标一点法(ACV)(测定法)和系统内标法(SIS)(计算法)测定桂枝汤中芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛、甘草酸,结果见表 6。

利用配对  $t$  检验比较 SIS 和 ACV 实验测定的结果,统计结果表明,  $P = 0.31 > 0.05$ ,两种方法测得的结果没有显著性差异,SIS 可准确测定样品中 5 种成分。

### 3 讨论

SIS 需要解决两个关键问题:1)如何获得稳定、可靠的  $f$ ;2)如何对测定成分的峰进行确认。内标物的选择应符合以下条件:内标物性质稳定,容易获得;该成分在样品较难以分离,尤其是干扰成分

### 参考文献:

- [1] 丰加涛,金郁,王金成,等.基于定量指纹图谱技术的中药质量[J].色谱,2008,26(2):180-185.
- [2] 中国药典[S].一部,2005.
- [3] 王智民,高慧敏,付雪涛.“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,2006,31:1925-1930.
- [4] 匡艳辉,朱晶晶,王智民.一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量[J].中国药理学杂志,2009,44(5):390-394.
- [5] 朱晶晶,匡艳辉,王智民.一测多评法同步测定人参和三七药材中多种人参皂苷的含量[J].药学报,2008,43(12):1211-1216.
- [6] 王跃生,饶毅,魏惠珍,等.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[J].中草药,2008,39(9):1316-1319.
- [7] Sun P, Wang X D, Alquier L, et al. Determination of relative response factors of impurities in paclitaxel with high performance liquid chromatography equipped with ultraviolet and charged aerosol detectors [J]. J Chromatogr A, 2008, 1177: 87-91.
- [8] 谢培山.中药色谱指纹图谱[M].北京:人民卫生出版社,2005.
- [9] 李博岩,梁逸曾,谢培山.光谱相关色谱及在中药色谱指纹图谱分析中的应用[J].分析化学,2003,31(7):799-801.