

一测多评法测定湿疹软膏中欧前胡素、 异欧前胡素的含量

魏凤环*, 吴桂欣, 朱清利, 罗扬柱
(南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

[摘要] 目的: 采用一测多评法测定湿疹软膏中欧前胡素、异欧前胡素的含量, 验证一测多评法的适用性。方法: 以欧前胡素为内参物, 建立其与异欧前胡素的相对校正因子, 考察不同仪器、不同色谱柱对相对校正因子的影响。分别用外标法定量欧前胡素、异欧前胡素的含量, 后者与计算值进行比较。结果: 10 批湿疹软膏中欧前胡素、异欧前胡素的含量可以用一测多评法进行测定, 异欧前胡素含量的计算值与实测值间无显著差异。结论: 该方法以外标法测定欧前胡素, 以相对校正因子定量制剂中异欧前胡素的含量是可行的。

[关键词] 一测多评; 高效液相色谱法; 欧前胡素; 异欧前胡素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0125-04

Simultaneous Assay of Imperatorin and Isoimperatorin in Shizen Ointment by QAMS

WEI Feng-huan*, WU Gui-xin, ZHU Qing-li, LUO Yang-zhu
(School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a method for simultaneously determining imperatorin and isoimperatorin in Shizen ointment by single marker. **Method:** Using imperatorin as the internal reference substance, the relative correction factor (RCF) of isoimperatorin was determined by HPLC on different instruments and columns, with good reproducibility. The content of imperatorin in 10 batches of ointment was authentically determined by the external standard method, and the content of isoimperatorin was calculated by external standard method and RCF, respectively. **Result:** No significant differences between the quantitative results of QAMS method and external standard method were observed. **Conclusion:** QAMS is feasible for determination of imperatorin and isoimperatorin simultaneously, and the developed method can be used for quality control of Shizhen ointment.

[Key words] quantitative analysis of multi-components by single marker (QAMS); HPLC; imperatorin; isoimperatorin

“一测多评”法 (quantitative analysis of multi-components by single-marker, QAMS) 是一种用于多成分质量控制的分析方法, 可用于解决中药质量控制中对对照品缺乏这一瓶颈问题, 并可降低中药质量控制分析成本。该研究思路已成功应用于一些药材的质量评价, 包括白木通、人参、三七、黄芩、黄连

等, 并且黄连的一测多评标准已被 2010 年版《中国药典》采纳。

湿疹软膏的处方组成为白芷、大黄等。其中白芷为君药, 根据现代药理研究证明, 白芷中欧前胡素、异欧前胡素均具有抗菌、抗过敏的作用, 是湿疹软膏中的主要效应成分。为建立湿疹软膏的多成分同步质量控制方法, 本文采用一测多评法测定了湿疹软膏中欧前胡素、异欧前胡素的含量。

1 仪器与试剂

Agilent1100 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦),

[收稿日期] 20110909(008)

[通讯作者] * 魏凤环, 副教授, 从事中药分析和中药药动学研究, E-mail: awag7674@fimmu.com

G1315B DAD 检测器(美国安捷伦), Suplco C₁₈、Thermo ODS-2 HYPERSIL、Agilent HC-C₁₈(4.0 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, CP225D 型 1/10 万分析天平(Sartorius,)。

10 批湿疹软膏(自制), 欧前胡素(imperatorin, IA; 批号 110826-200712), 异欧前胡素(isoimperatorin, IIA; 批号 110827-200407), 均为定量用对照品, 纯度 > 99.8%; 液相用甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 QAMS 方法学考察

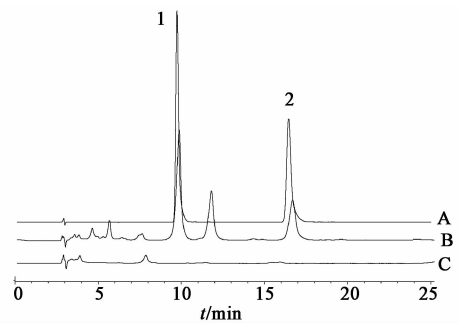
2.1.1 色谱条件 Suplco C₁₈ 色谱柱(4.0 mm × 250 mm, 5 μm), 甲醇-水(63:37)为流动相, 流速 1 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL, 柱温 35 °C, 检测波长 300 nm。

2.1.2 对照品溶液的制备 取五氧化二磷真空干燥过夜至恒重的欧前胡素、异欧前胡素对照品, 精密称定, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解, 并定容至刻度, 摇匀, 得质量浓度分别为 0.330, 0.316 g·L⁻¹ 对照品储备液; 分别精密量取各对照品溶液 2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即为混合对照品溶液。各对照品溶液 4 °C 冰箱中保存, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 取湿疹软膏约 5 g, 精密称定, 加石油醚(60~90 °C) 10 mL, 摇匀, 置装有 5 g 中性氧化铝的柱上(200~300 目, 内径 1.5 cm), 以石油醚(60~90 °C) 洗涤装软膏的锥形瓶两次(5 mL, 5 mL), 均加至柱上, 依次用 30 mL 石油醚(60~90 °C)-乙酸乙酯(9.5:0.5); 50 mL 石油醚(60~90 °C)-乙酸乙酯(8:2) 洗脱; 收集(8:2) 部分, 回收至干, 加甲醇超声溶解定容至 10 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。

2.1.4 专属性实验 取混标对照品溶液、供试品溶液、缺白芷阴性样品溶液(按照湿疹软膏的处方比例及制备方法制备出阴性软膏, 并按照供试品溶液的制备方法制备阴性样品溶液)。按照上述色谱条件分别进样分析, 见图 1。结果表明, 无其他成分干扰目标成分的测定。

2.1.5 线性和范围 精密吸取混合对照品溶液依次稀释 5 个不同的系列浓度, 按照上述色谱条件, 进样分析。以浓度(X)对峰面积(Y)进行回归, 得到欧前胡素的线性方程是 $Y = 2\ 079.25X + 2.27$ ($r = 1.000$), 线性范围 6.60 ~ 132 mg·L⁻¹; 异欧前胡素的线性方程是 $Y = 1\ 987.41X + 1.36$ ($r = 0.999\ 9$) 线



A: 对照品; B: 样品; C: 缺白芷阴性样品;

1. 欧前胡素; 2. 异欧前胡素

图 1 HPLC 色谱

性范围 6.32 ~ 126.4 mg·L⁻¹。

2.1.6 相对校正因子计算 以欧前胡素为内参物, 参照相对校正因子的公式计算异欧前胡素相对欧前胡素的相对校正因子, 结果见表 1。

表 1 相对校正因子、相对保留时间、保留时间差

稀释倍数	相对校正因子	相对保留时间	保留时间差
50	0.967	0.584	6.95
20	0.973	0.592	6.71
10	0.947	0.590	6.78
5	0.959	0.600	6.49
2.5	0.970	0.588	6.83
母液	0.981	0.591	6.75
平均值	0.966	0.591	6.95
RSD/%	1.225	0.898	2.51

2.1.7 精密度试验 精密吸取同一份供试品溶液 10 μL 连续进样 5 次, 计算欧前胡素、异欧前胡素峰面积的 RSD 值为别为 0.21%, 0.26%, 表明仪器精密度良好。

2.1.8 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别于制备后 0, 4, 8, 12, 32, 48 h, 精密吸取 10 μL, 测定峰面积, RSD 分别为 1.19%, 0.92%, 说明样品在 48 h 内稳定。

2.1.9 重复性试验 取同一批软膏样品 5 g, 6 份, 精密称定, 依法制成供试品溶液, 精密吸取 10 μL 各供试品溶液注入液相色谱仪测定, 计算欧前胡素及异欧前胡素的平均含量为别为 35.26, 16.48 μg·g⁻¹; RSD 分别为 1.31%, 1.23%。

2.1.10 加样回收率试验 取已知质量分数的软膏样品 9 份, 各约 1 g, 精密称定, 分别按已知质量分数的 50%, 100%, 150% 3 个水平加入欧前胡素和异欧前胡素对照品, 按照供试品溶液的制备方法制备样品, 测定, 计算加样回收率, 欧前胡素、异欧前胡

素的平均加样回收率分别为 99.02% ,98.96% ,RSD 分别为 2.16% ,2.43% ,结果见表 2。

表 2 湿疹软膏中 2 种成分加样回收率试验

No.	原有量/ μg		加入量/ μg		测得量/ μg		回收率/%		平均回收率/%		RSD/%	
	IA	IIA	IA	IIA	IA	IIA	IA	IIA	IA	IIA	IA	IIA
1	36.23	18.46	19.80	9.60	54.76	27.38	97.73	97.58				
2	36.23	18.46	19.80	9.60	53.78	26.84	95.98	95.65				
3	36.23	18.46	19.80	9.60	54.99	27.16	98.14	96.79				
4	36.23	18.46	39.60	19.20	75.68	37.12	99.80	98.57				
5	36.23	18.46	39.60	19.20	74.26	37.36	97.93	99.20	99.02	98.96	2.16	2.43
6	36.23	18.46	39.60	19.20	74.65	36.91	98.44	98.01				
7	36.23	18.46	59.40	28.80	94.26	47.2	98.57	99.87				
8	36.23	18.46	59.40	28.80	98.48	48.97	102.98	103.62				
9	36.23	18.46	59.40	28.80	97.19	47.91	101.63	101.38				

2.2 校正因子重复性考察 本研究考察了 3 种不同品牌的 C_{18} (4.0 mm \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱 A: Suplco; B: Thermo ODS-2HYPERLIL; C: Agilent HC- C_{18} 分别在 Agilent1100 HPLC, Agilent1200 HPLC, SHIMADAZU LC-20A 3 种液相系统上进行分析。精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定, 以欧前胡素为内参物, 计算异欧前胡素的相对校正因子、相对保留值和保留时间差, 结果见表 3。结果表明, 由于柱子的品牌及仪器的不同, 保留时间差之间有很大的差异。

表 3 不同仪器、不同色谱柱测得的异欧前胡素相对校正因子、相对保留时间和保留时间差

仪器	色谱柱	相对	相对	保留
		校正因子	保留时间	时间差
Agilent1100	A	0.947	0.584	6.95
	B	0.987	0.569	7.67
	C	0.968	0.571	9.92
Agilent1200	A	0.937	0.562	7.59
	B	0.966	0.580	7.36
	C	0.983	0.575	9.76
SHIMADAZU LC-20A	A	0.932	0.563	7.55
	B	0.945	0.599	6.88
	C	0.976	0.564	10.22
均值	0.96	0.57		
RSD/%	2.12	2.48		

2.3 外标法和 QAMS 法结果比较 分别制备 10 批湿疹软膏并取各 5 g, 精密称定, 按照供试品溶液的制备方法制备样品, 精密吸取 10 μL , 注入液相色谱仪, 测定。采用外标一点法和 QAMS 法计算欧前胡

素和异欧前胡素的含量, 结果见表 4。结果显示, 两种方法所得含量值无显著性差别 ($P=0.78$)。说明一测多评法可用于湿疹软膏中欧前胡素和异欧前胡素的多成分质量评价研究。

表 4 外标法和 QAMS 法测定样品中目标成分质量分数 ($n=3$) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

No.	欧前胡素	异欧前胡素	
	外标法	外标法	QAMS 法
1	34.19	18.46	18.41
2	33.45	17.87	17.72
3	35.29	18.22	18.79
4	34.37	18.54	18.37
5	33.28	17.32	17.16
6	36.23	18.46	18.32
7	37.15	17.23	17.09
8	37.46	16.75	16.58
9	34.78	17.28	17.39
10	36.21	16.93	16.86

3 讨论

本品是一种油脂性基质的软膏, 基质中的植物油等严重干扰低极性欧前胡素与异欧前胡素的分析。为降低基质的干扰和保护检测系统, 文中采用中性氧化铝固相萃取柱纯化样品, 为了最大限度的去掉干扰物和最大限度的保留目标物, 实验中考察了石油醚的用量、石油醚和乙酸乙酯的比例与洗脱用量。结果表明用 30 mL 石油醚洗脱, 再用 50 mL 石油醚-乙酸乙酯 (8:2) 的混合溶剂洗脱, 即可把欧前胡素和异欧前胡素洗脱完全, 去掉油脂性物质的干扰。

HPLC 测定复方南板蓝根颗粒中靛蓝和靛玉红的含量

王金鹏¹, 孙翠萍¹, 林海霞¹, 王砚², 王书林^{1*}

(1. 成都中医药大学峨眉学院, 四川 峨眉 614201; 2. 四川省食品药品检验所, 四川 成都 610036)

[摘要] 目的: 建立以高效液相色谱法测定复方南板蓝根颗粒中靛蓝和靛玉红含量的方法。方法: 色谱柱为 Agilent C₁₈ (4.60 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相甲醇-2% 磷酸(梯度洗脱); 流速 0.9 mL·min⁻¹, 检测波长 289 nm, 柱温 35 °C, 进样量 20 μL。结果: 靛蓝、靛玉红分别在 0.030 4 ~ 0.608 μg ($r=0.999\ 3$) 和 0.0993 ~ 1.986 (g) ($r=0.999\ 6$) 与峰面积积分值线性关系良好, 平均加样回收率靛蓝为 98.1% (RSD 2.31%), 靛玉红为 101.4% (RSD 2.61%)。结论: 该方法灵敏度高、简便、准确, 可用于复方南板蓝根颗粒的质量控制。

[关键词] HPLC; 复方南板蓝根颗粒; 靛蓝; 靛玉红; 含量

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)21-0128-03

Determination of Indigo Blue and Indirubin Content in Compound South Baphicacanthus Granules By HPLC

WANG Jin-peng¹, SUN Cui-ping¹, LIN Hai-xia¹, WANG Yan², WANG Shu-lin^{1*}

(1. Emei College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Emei 614201, China;
2. Sichuan Provincial Institute of Food and Drug Control, Chengdu 610036, China)

[Abstract] **Objective:** To determine indigo blue and indirubin content in Compound South Baphicacanthus Granules by HPLC. **Method:** Samples were separated by Angilent C₁₈ column (4.60 mm × 150 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of methonal-2% phosphate (by gradient elution) with flow rate at 0.9

[收稿日期] 20120611(015)

[第一作者] 王金鹏, 讲师, 从事中药质量研究, Tel:0833-5591044, E-mail:wangjin-peng@163.com

[通讯作者] *王书林, 教授, 博士生导师, 从事中药质量研究, Tel:0833-5591044, E-mail:wslgap@tom.com

欧前胡素和异欧前胡素是白芷中具代表性的成分, 药理活性显著且与白芷的功能主治相关, 是评价白芷质量的适宜指标性成分。异欧前胡素纯化制备比较麻烦, 故本实验选用欧前胡素为内参物, 建立了制剂中君药白芷所含两种成分的一测多评法。

[参考文献]

- [1] 朱晶晶, 王智民, 匡艳辉, 等. 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]. 药学学报, 2008, 43(12): 1211.
- [2] 匡艳辉, 朱晶晶, 王智民, 等. 一测多评法测定黄连中5个生物碱的含量[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(5): 390.

- [3] 朱晶晶, 王智民, 张启伟, 等. 一测多评法同时测定黄芩药材中4种黄酮类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 3229.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010: 285.
- [5] 匡艳辉, 朱晶晶, 王智民, 等. 黄连属药用植物化学成分和质量控制的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(15): 1121.
- [6] 章军, 王跃生, 李慧, 等. HPLC法同时测定元胡止痛分散片中延胡索乙素和欧前胡素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 12(15): 10.
- [7] 席海为, 马强, 李强, 等. HPLC同时测定都梁滴丸中的阿魏酸、5-甲氧基补骨脂素、欧前胡素、异欧前胡素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 81.

[责任编辑 顾雪竹]