大于0.05,表明采用QAMS计算出的含量和外标法所测得的含量差异无统计学意义,提示本研究建立的校正因子可靠,能够实现在槲皮素和山柰酚-3-O-芸香糖苷对照品缺乏的情况下,通过芦丁与槲皮素和山柰酚-3-O-芸香糖苷之间相对保留时间进行色谱峰定性,利用芦丁和校正因子计算槲皮素和山柰酚-3-O-芸香糖苷的含量。由于《中华人民共和国药典》2015年版一部"槐花"药材含量测定项下只测定芦丁的含量,本次试验所用槐花药材样本来源较广,可以认为此次采集的样本基本上可以反映全国主产地槐花药材的原始质量状态。因此本试验研究建立的QAMS含量测定方法可以作为槐花药材国家标准修订的重要参考依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版.一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015:354.

[2] 钱文文,辛宝,史传道.槐花的营养保健功能及食品开发前景[J].农产品加工,2016(9):59-61.

[3] 余祥雄,梁泽明,肖性龙,等.五种药食同源花提取物体外协同抗氧化作用[J].食品工业科技,2019,40(8):254-259

[4] 马艳琴,郭珊珊,马进,等.不同槐花炮制品中总黄酮含量的比较研究[J].时珍国医国药,2018,29(1):76-78.

[5] 夏虹,彭茂民.高效液相色谱法同时测定槐花中芦丁、槲皮素和山柰酚的含量[J].应用化工,2014,43(10):1919-1921.

[6] 马利华,郁曼曼.槐花多酚降糖作用的研究[J].食品科技,2019,44(3):211-215.

[7] 韩玲玲,樊海瑞,林明珠,等.槐花醇提物对2型糖尿病合并高尿酸血症小鼠疗效研究[J].中药材,2017,40(11):2697-2700.

[8] 张伟云,王丽荣,许长江,等.槐花提取物降血糖活性研究[J].上海中医药杂志,2017,51(5):93-97.

[9] HE X,BAI Y,ZHAO Z,et al.Local and traditional uses,phytochemistry,and pharmacology of Sophora japonica L.:a review[J].J Ethnopharmacology,2016,187(5):160-182.

[10] 李卓悦,冯玉祥,张洪影,等.国槐花活性多糖抗氧化和免疫增强作用的研究[J].山东畜牧兽医,2018,39(6):1-3.

[11] 赵丹,杨赛,宾东华.槐花散联合马应龙麝香痔疮栓治疗Ⅰ、Ⅱ期内痔出血42例疗效观察[J].湖南中医杂志,2019,35(4):59-60.

[12] 康永强,贾育新,范珉钰,等.槐花治疗青少年鼻衄16例体会[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(20):226,228.

[13] 李荣乔,贾东升,温春秀,等.槐花多糖对免疫抑制小鼠免疫功能的影响研究[J].食品研究与开发,2016,37(24):155-159.

[14] 陈忠杰,李利红,李存法,等.槐花多糖对小鼠免疫调节作用的试验[J].中国兽医杂志,2016,52(3):115-117.

[15] 蒋楠,王富静,封亮,等.基于非酶糖基化反应的槐花抑制AGEs形成的活性组分筛选[J].中国中药杂志,2019,44(14):3100-3106.

[16] 乐琴琴,张宏宇,杨梅辉,等.槐花米提取物对尿素酶的抑制活性[J].吉首大学学报(自然科学版),2017,38(4):59-62.

[17] 皮文霞,赵文望,蔡宝昌,等.槐花对照提取物的制备及槐花中4个黄酮类成分的含量测定[J].中国药房,2018,29(19):2652-2656.

(收稿日期:2019-06-20,修回日期:2019-08-12)

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.12.009

◇药物分析◇

高效液相色谱法同时测定女金胶囊等四种中成药中橙皮苷和丹皮酚的含量

李燕[1],同晓霞[1],杨晓莉[2]

作者单位:[1]陕西省延安市药品检验所生测室,陕西 延安 716000;

[2]陕西省食品药品监督检验研究院微生物室,陕西 西安 710065

通信作者:杨晓莉,女,副主任药师,研究方向为食品药品质量分析,E-mail:yangxiaoli0206@163.com

摘要:目的 建立一种利用高效液相色谱法同时检测女金胶囊、调经丸、舒尔经颗粒、活血止痛膏四种中成药中橙皮苷和丹皮酚含量的方法。**方法** 以女金胶囊为例,取供试品10粒,内容物混匀,精密称取0.2 g,置50 mL量瓶中,超声提取,甲醇定容;采用Agilent ZORBAX SB-C_{18}(4.6 mm×250 mm,5 μm)色谱柱进行分离,0.2%磷酸溶液与甲醇梯度洗脱,柱温30 ℃,紫外检测器定量检测。**结果** 橙皮苷和丹皮酚在质量浓度为0.2~20.0 μg/mL范围内线性关系良好;相关系数$R^2>0.995$;检测限:橙皮苷为0.05 μg/mL、丹皮酚为0.08 μg/mL;橙皮苷和丹皮酚3个浓度点(0.2、1.0和10 μg/mL)回收率分别在92.6%~100.9%、90.6%~98.2%之间;方法重复性($n=6$)在5.0%以内。**结论** 该方法具有前处理简单、检出限低、准确度高等优点,可用于女金胶囊等四种中成药中橙皮苷和丹皮酚的含量的测定。

关键词:色谱法,高压液相; 二极管阵列检测器; 中成药; 橙皮苷; 丹皮酚; 女金胶囊; 调经丸; 舒尔经颗粒; 活血止痛膏

Simultaneous determination of *Hesperidin* and *Paeonol* in *Nujin* capsule and other four Chinese patent medicines by high performance liquid chromatography

LI Yan[1], TONG Xiaoxia[1], YANG Xiaoli[2]

Author Affiliations: [1]*TBioassay room, Yan'an Institute of Drug control, Yan'an, Shaanxi* 716000, *China*; [2]*Microbiology room, Shaanxi Institute of Food and Drug Supervision and Inspection, Xi'an, Shaanxi* 710065, *China*

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of *Hesperidin* and *Paeonol* in *Nujin* capsule, *Tiaojing* pill, *Shuerjing* granule and *Huoxue Zhitong* ointment by high performance liquid chromatography. **Methods** Taking *Nujin* capsule as an example, 10 test samples were taken, the contents were mixed, 0.2 g was precisely weighed and placed in a 50 mL measuring bottle, extract by ultrasound, and fix the volume with methanol; agilent ZORBAX SB-C_{18} (4.6 mm×250 mm, 5 μm) column was selected for separation, and the gradient was eluted with 0.2% phosphoric acid solution and methanol. Column temperature was maintained at 30 ℃, UV-detector was selected for quantitative detection. **Results** *Hesperidin* and *Paeonol* showed good linear relationship in the range 0.3-20.0 μg/mL ($R^2 > 0.995$). Detection limit of *Hesperidin* and *Paeonol* was 0.05 μg/mL and 0.08 μg/mL, respectively. The recovery rates of *Hesperidin* and *Paeonol* at three concentration points (0.2, 1.0, 10 μg/mL) were 92.6%-100.9% and 90.6%-98.2% respectively; the method repeatability of *Hesperidin* and *Paeonol* was both within 5.0% ($n = 6$). **Conclusion** The method has the advantages of simple pretreatment, low detection limit and high accuracy. It can be used for the determination of *Hesperidin* and *Paeonol* in four Chinese patent medicines such as female gold capsules.

Key words: Chromatography, high pressure liquid; Diode array detector; Chinese patent drugs; *Hesperidin*; *Paeonol*; *Nujin* capsule; *Tiaojing* pill; *Shuerjing* granule; *Huoxue Zhitong* ointment

女金胶囊、调经丸、舒尔经颗粒、活血止痛膏等中药成方制剂，具有祛寒止痛、活血通络、理气止痛等功效。这几种中成药中均含有陈皮和牡丹皮成分，陈皮为芸香科植物，其性温、味苦等，具有理气健脾、燥湿化痰等功效，橙皮苷为中药陈皮药材中的有效成分[1-3]；牡丹皮具有清热凉血、活血散瘀的功效，具有保肝护肾、镇静、抗炎、解热镇痛等多重药理作用，丹皮酚为中药材牡丹皮中的有效成分[4-6]。由于这几种中成药使用范围较广，所含药味繁多，一直难以建立橙皮苷和丹皮酚含量测定的方法[7-16]。为更好的控制产品的质量，保障人民群众的用药安全与有效，本研究于2017年6—10月建立一种利用高效液相色谱仪，以橙皮苷和丹皮酚为检测指标，定量测定上述中成药中橙皮苷和丹皮酚的含量的方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪：安捷伦1200主机（安捷伦科技有限公司）；检测器：G4212A多波长检测器（美国agilent）；色谱柱：Agilent ZORBAX SB-C_{18}液相色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）（安捷伦科技有限公司）；电子天平：梅特勒XS205DU（梅特勒科技有限公司）；数控超声波清洗机：SK3300LH型（广州沪瑞明仪器有限公司）；涡旋混合器：T25，3 000~18 000 r/min（广州IKA公司）；高速冷冻离心机：H2100R型（湘仪离心机公司）；纯水仪：Milli-Q（密理博科技有限公司）。

1.2 材料 标准物质：橙皮苷（含量96.1%，批号110721—201617，中国食品药品检定研究院）；丹皮酚（含量99.9%，批号110708—201407，中国食品药品检定研究院）。

1.3 试剂 甲醇：色谱纯（德国默克公司）；磷酸：分析纯（国药集团上海化学试剂有限公司）；纯化水：自制。

1.4 色谱参数 Agilent ZORBAX SB-C_{18}液相色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流速1.0 mL/min；柱温30 ℃；进样量20 μL；流动相A：甲醇；流动相B：0.2%磷酸溶液；检测波长：279 nm；扫描波长：190~400 nm。梯度洗脱设置见表1。

表1 梯度洗脱设置

流动相组分	流动相比例/%				
	0 min	4 min	16 min	20 min	24 min
A	10	10	80	10	10
B	90	90	20	90	90

1.5 溶液制备 对照品混合储备溶液：取橙皮苷和丹皮酚对照品各约25 mg，精密称定，置于同一

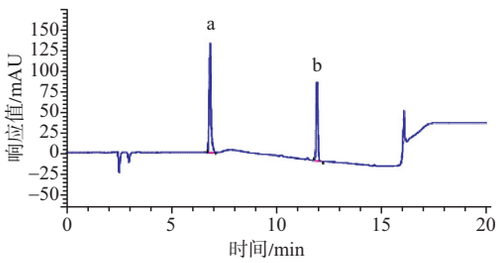
个25 mL量瓶中，加甲醇约15 mL溶解，用甲醇定容至刻度，摇匀（橙皮苷和丹皮酚质量浓度均为：1.0 μg/mL）。标准曲线溶液：取对照品混合储备溶液适量，制成浓度分别为0.2、0.4、1.0、5.0、10.0、20.0 μg/mL的标准溶液，用甲醇定容至刻度，摇匀。

供试品溶液：取中成药（以女金胶囊为例），取供试品10粒，分别精密称定重量，倾出内容物，计算装量差异；取装量差异项下内容物，研钵研成细粉，取约0.2 g，精密称定，置50 mL量瓶中，加甲醇约30 mL，超声提取约20 min；放置至室温，加甲醇定容至刻度，摇匀；取上述溶液，0.45 μm滤膜过滤，弃去初滤液，取续滤液作为供试品溶液。

2　结果

2.1　检测波长的选择　取橙皮苷对照品一定量，配制含有橙皮苷质量浓度为5.0 μg/mL的标准溶液，同法配制丹皮酚5.0 μg/mL的标准溶液。取上述标准溶液，在波长190~400 nm范围内进行紫外扫描，橙皮苷在（274±2）nm范围内有最大吸收；丹皮酚在（284±2）nm范围内有最大吸收。为提高橙皮苷和丹皮酚检测灵敏度，故选择279 nm作为色谱检测波长。

2.2　流动相的选择　试验分别选择0.2%磷酸溶液与甲醇体系和0.2%磷酸溶液与乙腈体系对橙皮苷和丹皮酚进行洗脱。试验证明，选择乙腈体系时，橙皮苷出峰速度较快，出峰时间在4.21 min，但基质干扰较严重，定量结果不准确；选择甲醇体系时，橙皮苷和丹皮酚能够较好的分离，且甲醇相对于乙腈对试验人员及环境的影响更小，故试验选择0.2%磷酸溶液与甲醇体系作为流动相，典型谱图见图1。



注：a为橙皮苷；b为丹皮酚

图1　以0.2%磷酸溶液与甲醇体系作为流动相测定橙皮苷和丹皮酚含量的高效液相典型谱图

2.3　线性关系考察　取对照品混合储备溶液适量，制成浓度分别为0.2、0.4、1.0、5.0、10.0、20.0 μg/mL的标准溶液，用甲醇定容至刻度，摇匀；取上述溶液分别进样分析，以各对照品溶液的浓度（X）与其对应的峰面积（Y）做线性拟合曲线，结果橙皮苷和丹皮酚在0.2~20.0 μg/mL浓度范围内均呈良好的线性关系；取对照品溶液，逐级稀释至各对照品色谱峰峰高分别达到3倍信噪比，计算检出限。结果见表2。

表2　曲线方程、相关系数及检出限

组分名称	曲线方程	相关系数R^2值	线性范围/（μg/mL）	检出限/（μg/mL）
橙皮苷	$y=3.523x-1.042$	0.999 5	0.2~20.0	0.05
丹皮酚	$y=1.115x+0.846$	0.999 6	0.2~20.0	0.08

2.4　回收率试验　取已知含量的供试品样品，精密称取约0.2 g，分别加入适量的对照品混合储备溶液，配制低、中、高3个质量浓度的供试品溶液，每个质量浓度制备3份，按1.4设置仪器参数，待仪器稳定后，进样分析。结果表明，橙皮苷回收率在92.6%~100.9%之间；丹皮酚回收率在90.6%~98.2%之间。结果见表3。

2.5　精密度考察　取供试品样品，按1.5供试品溶液配制方法进行样品前处理，得到供试品溶液。按1.4设置仪器参数，待仪器稳定后，进样分析。同一样品连续进样6次，结果表明，橙皮苷测定结果精密度的相对标准偏差为0.92%；丹皮酚测定结果精密度的相对标准偏差为1.11%。

表3　回收率试验结果

加标点	取样量/g	含量/%		加入量/（μg/mL）	扣本底结果/（μg/mL）		橙皮苷回收率/%	相对标准偏差/%	丹皮酚回收率/%	相对标准偏差/%
		橙皮苷	丹皮酚		橙皮苷	丹皮酚				
低浓度/%	0.213 4				0.189 2	0.181 2	94.6		90.6	
	0.203 7			0.2	0.185 2	0.185 4	92.6	1.53	92.7	3.38
	0.201 6				0.190 8	0.193 6	95.4		96.8	
中浓度/%	0.204 6				0.957 2	0.953 2	95.7		95.3	
	0.210 4	0.46	0.25	1.0	0.973 1	0.949 3	97.3	0.87	94.9	1.64
	0.198 7				0.961 2	0.977 8	96.1		97.8	
高浓度/%	0.200 7				9.721 1	9.293 1	97.2		92.9	
	0.206 8			10.0	9.952 5	9.821 8	99.5	1.88	97.8	3.07
	0.199 9				10.090 6	9.779 5	100.9		98.2	

2.6 重复性与稳定性 取供试品样品,按1.5供试品溶液配制方法进行样品前处理,得到供试品溶液。同法配制6份供试品溶液。按1.4设置仪器参数,待仪器稳定后,进样分析。结果表明,橙皮苷测定结果重复性的相对标准偏差为3.14%;丹皮酚测定结果重复性的相对标准偏差为2.76%;再取重复性溶液1份,室温下放置0、2、4、8、12、24 h,按1.4设置仪器参数,待仪器稳定后,进样分析。测得橙皮苷和丹皮酚的峰面积的相对标准偏差为3.51%和2.71%,结果表明,在此试验条件下,供试品溶液能够稳定放置24 h。

2.7 方法应用实例 《中国药典》2015年版中,女金胶囊、调经丸、舒尔经颗粒、活血止痛膏均未建立橙皮苷[17]191和丹皮酚[17]172的含量测定方法,采用药典方法检测陈皮和牡丹皮中橙皮苷和丹皮酚时,需要分开配制标准溶液和样品溶液,检测效率偏低、溶剂用量大、环境友好度低。取上述四种中成药样品,按1.5供试品溶液配制方法进行样品前处理,得到供试品溶液;按1.4设置仪器参数,待仪器稳定后,进样分析,测定橙皮苷和丹皮酚的含量;同时参照《中国药典》2015年版一部中陈皮和牡丹皮中橙皮苷和丹皮酚测定方法,对上述中成药进行检测。结果表明,该方法可同时测定橙皮苷和丹皮酚的含量,检测结果与药典基本一致。结果见表4。

表4 样品检测结果/%

样品名称	本试验方法检测结果		《中国药典》2015年版方法检测结果	
	橙皮苷含量	丹皮酚含量	橙皮苷含量	丹皮酚含量
女金胶囊	0.46	0.25	0.42	0.22
调经丸	0.27	0.29	0.28	0.27
舒经颗粒	0.31	0.42	0.33	0.41
活血止痛膏	0.72	0.16	0.75	0.15

3 讨论

本试验研究建立一种利用高效液相色谱法检测女金胶囊等四种中成药中橙皮苷和丹皮酚定量检测的方法。首先对试验的色谱条件进行了优化:优化了检测波长、流动相体系;考察了方法的线性曲线、回收率、检出限、精密度、重现性、稳定性等,结果表明,该方法适用于女金胶囊等四种中成药中橙皮苷和丹皮酚含量的检测,对制假、售假中成药等不法商贩形成威慑,为国家中成药标准制定和中成药风险监测提供技术依据。试验证明,该方法具有前处理简单、检出限低、准确度高等优点,可以用于上述女金胶囊等四种中成药的质量控制。

参考文献

[1] 李娜,李玎,陈萍.大鼠体内清金固本胶囊中橙皮苷药代动力学分析[J].中国药业,2017,26(24):1-4.

[2] 刘正兵,宫剑滨.橙皮苷及橙皮素对心血管系统保护作用及机制的研究进展[J].东南国防医药,2017,19(5):504-507.

[3] 李纯,栗建明,顾利红,等.甲基橙皮苷原料药的成分分析[J].中成药,2017,39(11):2415-2418.

[4] 胡云飞,徐国兵.牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展[J].安徽医药,2014,18(4):589-592.

[5] 任正婷,张帆.丹皮酚联合γ射线对脑胶质瘤细胞凋亡程度及凋亡基因表达的影响[J].海南医学院学报,2017,23(23):3191-3195.

[6] 赵静怡,张树峰,姚银辉,等.丹皮酚对大鼠急性心肌梗死后核因子-kBp65通路的影响[J].中国老年学杂志,2017,37(1):22-24.

[7] 张景艳,张宏,王磊,等.高效液相色谱法测定去滞散中柚皮苷和新橙皮苷的含量[J].中国兽药杂志,2017,51(12):36-41.

[8] 邱烺,吴晓玲,谢子婷,等.浊点萃取-HPLC法测定陈皮中橙皮苷和川陈皮素的含量[J].中药材,2017,40(9):2125-2127.

[9] 闫一夫,姚志湘,刘柳,等.基于色谱-光谱仪联用和子空间夹角法分析丹皮酚含量[J].中成药,2016,38(1):114-117.

[10] 程雪,谈瑄忠,苏联麟,等.RP-HPLC法同时测定桑杏口服液中芦丁、橙皮苷、牛蒡苷和甘草苷的含量[J].中国药房,2017,28(6):812-815.

[11] 吴震,钟庆全,刘小娟.高效液相色谱法检测化妆品中没食子酸、芍药苷和丹皮酚[J].海峡药学,2017,29(12):69-72.

[12] 涂元红,金阳,刘文.HPLC法测定复方降脂茶中丹酚酸B的含量[J].贵阳中医学院学报,2017,39 (4):24-25.

[13] 关晶,景振龙,童立芬,等.水蒸气蒸馏法提取牡丹皮中丹皮总酚的工艺优选[J].北京医学,2017,39(7):745-747.

[14] 李玥.HPLC法测定筋络通颗粒中橙皮苷的含量[J].西北药学杂志,2010,25(1):6-7.

[15] 张恒,饶坤林,向韩.橙皮苷药理活性研究进展[J].中南药学,2016,14(10):1097-1100.

[16] 陈克莉,陈道鸽,张玉宾,等.橙皮苷提取方法的研究进展[J].食品工业,2016,37(12):204-207.

[17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2015年版.一部[M].北京:中国医药科技出版社,2015.

(收稿日期:2018-08-24,修回日期:2018-11-12)