

高效液相色谱法同时测定三七伤药片中 新北美圣草苷和柚皮苷的含量

折慧¹,刘越²,王国海²,杨瑞瑞²,郭耀武^{1,2}

(1. 陕西中医药大学,陕西 咸阳 712046;2. 陕西省食品药品检验所,陕西 西安 710065)

摘要:目的 建立三七伤药片中同时测定新北美圣草苷和柚皮苷含量的方法。**方法** 以甲醇为溶剂,进行超声提取;色谱柱:Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈-0.1% 磷酸溶液(17:83),流速:1 mL·min⁻¹,检测波长:283 nm,柱温35 ℃。**结果** 新北美圣草苷在 87.55~1 313.25 ng 范围内线性关系良好($r=0.999\ 4$),平均回收率为 99.13%,RSD=1.21% ($n=6$),柚皮苷在 80.4~1 206 ng 范围内线性关系良好($r=0.999\ 6$),平均回收率为 96.78%,RSD=3.34% ($n=6$)。**结论** 高效液相色谱法(HPLC)可以同时测定新北美圣草苷和柚皮苷的含量,方法简便、准确、灵敏度高、重现性好,可用于三七伤药片中骨碎补的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法;三七伤药片;骨碎补;新北美圣草苷;柚皮苷

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.015

Simultaneous determination of neoeriocitrin and naringin in sanqi shangyao tablets by HPLC

SHE Hui¹, LIU Yue², WANG Guohai², YANG Ruirui², GUO Yaowu^{1,2}

(1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China;

2. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi 710065, China)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of neoeriocitrin and naringin in Sanqi Shangyao Tablets. **Methods** Samples were prepared by ultrasonic extraction with methanol; the Agilent C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) chromatographic column and the mobile phase of acetonitrile-0.1% aqueous phosphoric acid (17:83) were used for isocratic elution with the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹ and the detective wavelength at 283 nm. The column temperature was set at 35 ℃. **Results** The linear correlation of the neoeriocitrin was good in the range of 87.55~1 313.25 ng ($r=0.999\ 4$), the recovery rate was 99.13% and RSD was 1.21% ($n=6$). The linear correlation of the naringin was good in the range of 80.4~1 206 ng, the recovery rate was 96.78% and RSD was 3.34% ($n=6$). **Conclusions** This HPLC method could simultaneously determine the concentrations of neoeriocitrin and naringin. The method is simple, accurate, sensitive and reliable, which can be used for the quality control of Sanqi Shangyao Tablets.

Key words: HPLC; Sanqi shangyao tablets (powder); Drynaria fortune; Neoeriocitrin; Narinin

三七伤药片由三七、制草乌、雪上一枝蒿、冰片、骨碎补、红花、接骨木及赤芍 8 味中药组成,其标准收载于《中国药典》2015 年版一部,该制剂具有舒筋活血、散瘀止痛之功效,对跌打损伤、风湿瘀阻、关节痹痛、急慢性扭挫伤、神经痛等症状的疗效显著^[1-2],而骨碎补具有补肾强骨、养伤止痛之功效,是三七伤药片发挥疗效的重要组方药味。现行标准含量测定项下规定骨碎补以柚皮苷为指标性成分进行测定,该方法具有专属性不强的问

题,因为柚皮苷来源广泛,廉价易得,极易出现在生产过程中以柚皮苷提取物替代骨碎补投料的现象;另一方面,根据相关文献报道^[3-4],骨碎补中主要药效成分为柚皮苷和新北美圣草苷,由于其相似的化学结构,一般薄层色谱很难将两者有效区分及鉴别,并且市售新北美圣草苷价格昂贵,较难获得。基于上述原因,为了更好的控制三七伤药片的质量,参考文献方法^[5-8],我们使用硅胶柱色谱及其相关手段,从骨碎补药材中制备分离得到新北美圣草苷,并采用高效液相色谱法^[9-14],同时测定三七伤药片中新北美圣草苷和柚皮苷的含量,能够较为全面地控制三七伤药片中骨碎补药材的质量。

基金项目:陕西省科技统筹创新工程计划项目(2013KTCQ03-14)

通信作者:郭耀武,男,主任药师,研究方向:中药鉴定的研究, E-mail:gyw85262539@163.com

1 仪器与试药

Alliance-HT 高效液相色谱仪(美国沃特斯公司),岛津 LC-20AD 高效液相色谱仪,配有二极管阵列检测器(日本岛津公司);BS224S 电子分析天平、BP211D 电子分析天平(德国塞多利斯公司);KQ-500DE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

水为超纯水;乙腈为色谱纯;甲醇为分析纯。新北美圣草苷对照品为自制(纯度以 98% 计);柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 110722-201312,含量以 94.7% 计);三七伤药片阴性样品和供试品均为某企业提供,批号分别为 20150301、20150201、20150510 均为糖衣片,药品片芯重 0.3 g。

2 方法与结果

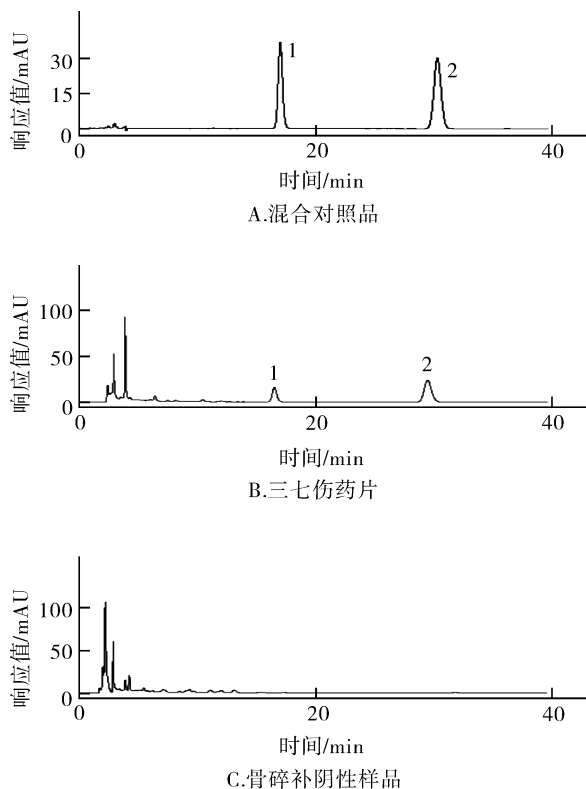
2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent C₁₈ (5 μm, 250 mm × 4.6 mm);流动相:以乙腈-0.1% 磷酸溶液(17:83)为流动相,等度洗脱;流速:1 mL · min⁻¹;检测波长:283 nm;柱温:35 °C;进样量 10 μL。

2.2 混合对照品溶液配制 精密称取新北美圣草苷对照品 17.51 mg,置于 100 mL 量瓶(A)中,加甲醇使溶解,定容至刻度,摇匀,作为对照品储备溶液;精密称取柚皮苷对照品 8.04 mg,置于 100 mL 量瓶(B)中,从 A 中精密量取对照品溶液 50 mL 溶液置于 B 中,加甲醇使溶解,定容至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液,其新北美圣草苷和柚皮苷的浓度分别为:87.55 mg · L⁻¹ 和 80.40 mg · L⁻¹。

2.3 供试品溶液配制 取本品 10 片,除去糖衣,精密称定,研细,取约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 KHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。同法制备阴性样品溶液。

2.4 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液按“2.1”项下色谱条件分析,结果阴性样品在与对照品色谱相同保留时间位置上未出现相应的色谱峰,见图 1。

2.5 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下新北美圣草苷和柚皮苷的混合对照品溶液 1、2、5、10、13、15 μL,分别按“2.1”项下色谱条件进样分析,以进样量 X(ng)为横坐标,以峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线。新北美圣草苷回归方程为:Y = 1 206.2X + 139 383.626 5, r = 0.999 4,柚皮苷回归方程为:Y = 2106.5X + 73138, r = 0.9996,结



注:1. 新北美圣草苷;2. 柚皮苷。

图1 专属性实验色谱图

果表明,新北美圣草苷和柚皮苷进样量分别在 87.55 ~ 1 313.25 ng 和 80.4 ~ 1 206 ng 范围内,与峰面积呈良好线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液,按照上述色谱条件,连续进样 6 次,依次测定峰面积,并计算 RSD。结果新北美圣草苷和柚皮苷峰面积的 RSD 分别为 0.39% 和 0.59%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10 μL,按“2.1”项下色谱条件,在 0、2、4、8、12、24 h 分别进样测定峰面积,结果新北美圣草苷和柚皮苷峰面积的 RSD 分别为 1.10%、0.10%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验 精密称取同一供试品三七伤药片样品(批号:20150510),按“2.3”项下制备方法平行制备 6 份样品,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,新北美圣草苷和柚皮苷的平均含量分别为 1.601 mg · g⁻¹ 和 2.595 mg · g⁻¹,其 RSD 分别为 2.15% 和 1.16%。结果表明重复性良好。

2.9 回收率试验 采用加样回收法,精密加入一定量的新北美圣草苷和柚皮苷混合对照品溶液,挥干溶剂,再精密称取已知含量的三七伤药片(批号:20150510)约 0.25 g,按“2.2”项下方法制备

供试品溶液,分别进样测定含量,计算回收率,新北美圣草苷、柚皮苷平均回收率分别为 99.13%、96.78%、RSD 分别为 1.21%、3.34%,具体见表 1、2。

表 1 新北美圣草苷回收率试验结果

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%
0.251 0	0.402	0.52	0.911	97.88
0.250 6	0.401	0.52	0.920	99.81
0.251 2	0.402	0.52	0.917	99.04
0.250 4	0.400	0.52	0.911	98.27
0.250 9	0.400	0.52	0.926	101.15
0.250 9	0.401	0.52	0.914	98.65

表 2 柚皮苷回收率试验结果

取样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%
0.251 0	0.649	0.79	1.459	102.54
0.250 6	0.650	0.79	1.397	94.56
0.251 2	0.652	0.79	1.400	94.69
0.250 4	0.650	0.79	1.400	94.94
0.250 9	0.651	0.79	1.403	95.19
0.250 9	0.651	0.79	1.431	98.74

2.10 含量测定 按“2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行分析。对收集的 1 个生产厂家 3 批次的三七伤药片中新北美圣草苷和柚皮苷的含量进行测定,结果见表 3。

表 3 三七伤药片中新北美圣草苷和柚皮苷含量测定结果/mg·g⁻¹

编号	批号	新北美圣草苷	柚皮苷
1	20150201	2.760	2.566
2	20150301	1.626	1.810
3	20150510	1.601	2.595

3 讨论

3.1 样品制备条件优选 实验研究过程中,首先对不同提取溶剂甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、乙醇、70% 乙醇、50% 乙醇进行了优化研究,研究结果显示,甲醇提取效果较好;对超声提取 20、30、40、60 min 以及加热回流提取 30 min、1、2、3 h 进行了对比研究,研究结果表明,超声处理 30 min 较为适宜;对溶剂用量 25、50、100 mL 进行了对比研究,结果表明,溶剂用量 25 mL 为宜;对样品取样量 0.25、0.5、1.0 g 进行了对比研究,研究结果表明,取约 0.5 g 较为适宜。

3.2 检测波长的选择 应用 DAD 检测器在 190 ~ 400 nm 范围内对新北美圣草苷和柚皮苷进行光谱

扫描,结果表明新北美圣草苷和柚皮苷在 283 nm 出均有最大吸收,故选择 283 nm 作为检测波长。

3.3 流动相的选择 本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸溶液、乙腈-0.1% 甲酸溶液、乙腈-0.1% 磷酸溶液 5 种流动相系统,结果显示,以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相,所得新北美圣草苷和柚皮苷峰形较好,且出峰时间较为适宜,未出现杂质峰干扰,因此采用乙腈-0.1% 磷酸溶液为流动相进行等度洗脱测定三七伤药片中的新北美圣草苷和柚皮苷。

本研究建立的 HPLC 法能有效的测定三七伤药片中柚皮苷和新北美圣草苷的含量,样品中各组分能较好分离,方法简便、专属性强、重现性好,可用于三七伤药片中骨碎补的质量控制,也给其它含有骨碎补药材的中药复方的质量控制提供借鉴和参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:482.

[2] 胡晓茹,杨美丽,王明娟,等. 三七伤药片质量评价与研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(4):299-304.

[3] 范兴,杨成梓,曾伟生,等. HPLC 法测定烫骨碎补中柚皮苷的含量[J]. 海峡药学,2013,25(11):74-76.

[4] 蔡清宇,徐开燕,谭海龙,等. 骨碎补及其常见混淆品的鉴别[J]. 解放军药学报,2014,30(1):73-75.

[5] 李遇伯,孟繁浩,潘晓峰,等. HPLC 同时测定骨碎补药材中新北美圣草苷和柚皮苷的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(6):808-810.

[6] 岳春华,李顺祥. 从骨碎补中制备新北美圣草苷和柚皮苷对照品的研究[J]. 中草药,2008,39(4):529-531.

[7] 刘珂弟,乔雪,梁永红,等. 骨碎补的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中草药,2011,42(3):510-513.

[8] 刘玲玲,曲玮,梁敬钰. 骨碎补化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2012,24(1):5-8.

[9] 胡晓茹,杨美丽,孙磊,等. 三七伤药片超高效液相色谱特征图谱的研究[J]. 药物分析杂志,2014,34(10):1755-1761.

[10] 熊梦玲,刘凯南,高厚明,等. 骨碎补高效液相指纹图谱的构建与应用[J]. 中国药业,2010,20(5):4-5.

[11] 李建明,冯四林,邱连建,等. 骨碎补药材 HPLC 指纹图谱的构建及质量控制[J]. 中国医药指南,2011,9(34):57-58.

[12] 朱国婵,李建明,邱连建,等. 骨碎补药材 HPLC 指纹图谱与鉴别[J]. 中国现代药物应用,2011,5(19):58-59.

[13] 杨美丽,戴忠,胡晓茹,等. UPLC 法同时测定三七伤药片中 4 个成分含量[J]. 药物分析杂志,2014,34(5):924-928.

[14] 白俊鹏,尚振萃,蒋晓文,等. 骨碎补高效液相指纹图谱研究及主要成分含量测定[J]. 国际药学研究杂志,2015,42(3):398-403.