

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.03.012

高效液相色谱法同时测定舒筋活血片中5种成分

郭 娅, 王文婷[△], 袁 林

(重庆市万州食品药品检验所, 重庆 404000)

摘要:目的 建立同时测定舒筋活血片中4-甲氧基水杨醛、羟基红花黄色素A、原儿茶酸、 α -香附酮和山柰素含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱采用Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为0.7%醋酸溶液(A)-甲醇(B)[梯度洗脱(0~13 min, 30% A, 70% B; 13~25 min, 30% A→80% A, 70% B→20% B; 25~40 min, 80% A, 20% B)], 检测波长为254 nm, 流速为1.0 mL/min, 柱温为30 $^{\circ}$ C, 进样量为10 μ L。结果 4-甲氧基水杨醛线性范围为1.92~95.76 μ g/mL($r=0.9997$), 平均回收率为100.39%, RSD为1.05%($n=6$); α -香附酮线性范围为4.22~210.90 μ g/mL($r=0.9998$), 平均回收率为98.61%, RSD为1.00%($n=6$); 原儿茶酸线性范围为2.15~107.30 μ g/mL($r=0.9997$), 平均回收率为98.84%, RSD为1.39%($n=6$); 羟基红花黄色素A线性范围为2.34~117.00 μ g/mL($r=0.9996$), 平均回收率为100.43%, RSD为0.50%($n=6$); 山柰素线性范围为0.83~41.44 μ g/mL($r=0.9998$), 平均回收率为99.20%, RSD为1.64%($n=6$)。结论 该方法准确, 重复性好, 简单易行, 可用于舒筋活血片的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 舒筋活血片; 4-甲氧基水杨醛; 羟基红花黄色素A; α -香附酮; 原儿茶酸; 山柰素; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)03-0039-03

Simultaneous Determination of Five Constituents in Shujin Huoxue Tablets by HPLC

GUO Ya, WANG Wenting, YUAN Lin

(Wanzhou Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 404000)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of 4-methoxysalicylaldehyde, hydroxysafflor yellow A, protocatechuic acid, α -cyperone and kaempferide in Shujin Huoxue Tablets. **Methods** The chromatographic column was Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), the mobile phase was 0.7% acetic acid solution(A)-methanol(B)[gradient elution (0-13 min, 30% A, 70% B. 13-25 min, 30% A→80% A, 70% B→20% B. 25-40 min, 80% A, 20% B)], the detection wavelength was 254 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 $^{\circ}$ C, and the sample size was 10 μ L. **Results** The linear concentration range of 4-methoxysalicylaldehyde was 1.92-95.76 μ g/mL($r=0.9997$), the average recovery rate was 100.39%, and RSD was 1.05%($n=6$). The linear concentration range of α -cyperone was 4.22-210.90 μ g/mL($r=0.9998$), the average recovery rate was 98.61%, and RSD was 1.00%($n=6$). The linear concentration range of protocatechuic acid was 2.15-107.30 μ g/mL($r=0.9997$), the average recovery rate was 98.84%, and RSD was 1.39%($n=6$). The linear concentration range of hydroxysafflor yellow A was 2.34-117.00 μ g/mL($r=0.9996$), the average recovery rate was 100.43%, and RSD was 0.50%($n=6$). The linear concentration range of kaempferide was 0.83-41.44 μ g/mL($r=0.9998$), the average recovery rate was 99.20%, and RSD was 1.64%($n=6$).

Conclusion The method is accurate, reproducible and simple, which can be used for the quality control of Shujin Huoxue Tablets.

Key words: HPLC; Shujin Huoxue Tablets; 4-methoxysalicylaldehyde; hydroxysafflor yellow A; α -cyperone; protocatechuic acid; kaempferide; content determination

舒筋活血片是由红花、醋香附、香加皮、狗脊和槲寄生等10味中药组方的中药制剂,可用于筋骨疼痛、活血散瘀^[1-5],收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第十三册)》^[6]。现行标准中舒筋活血片的含量检测以4-甲氧基水杨醛为指标成分,仅检测香加皮中有效成分的含量,但单一成分的检测不能完整、充分地反映和体现药物的内在质量。目前,关于测定舒筋活血片中其他成分含量的研究已有报道^[7-14]。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定舒筋活血片中4-甲氧基水杨醛、 α -香附酮、原儿茶酸、羟基红花黄色素A和山柰素5种成分的含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(安捷伦公司),包括紫外检测器;AB204S型分析天平(万分之一,梅特勒公司),MSE225S型分析天平(十万分之一,赛多利斯公司)。

1.2 试药

4-甲氧基水杨醛对照品(批号为110790-201404,纯度为99.0%), α -香附酮对照品(批号为110709-201111,纯度为99.3%),原儿茶酸对照品(批号为110810-201007,纯度为98.2%),羟基红花黄色素A对照品(批号为111637-201308,纯度为96.5%),山柰

第一作者:郭娅,女,大学本科,主管中药师,研究方向为中药材及中成药质量控制,(电子信箱)18523253737@163.com。

[△]通信作者:王文婷,女,硕士研究生,研究方向为药物分析,(电子信箱)wenting92w@163.com。

素对照品(批号为110861-201301,纯度为93.2%),均购自中国食品药品检定研究院;舒筋活血片(重庆天致药业股份有限公司,批号为180401;河南省百泉制药有限公司,批号为171125;三门峡广宇生物制药有限公司,批号为201802);甲醇为色谱纯,冰醋酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.7%醋酸溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~13 min, 30% A, 70% B; 13~25 min, 30% A→80% A, 70% B→20% B; 25~40 min, 80% A, 20% B);检测波长:254 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

取4-甲氧基水杨醛、α-香附酮、原儿茶酸、羟基红花黄色素A和山柰素对照品,精密称定,加70%甲醇制成质量浓度分别为239.4, 527.2, 268.2, 292.6, 103.6 μg/mL的对照品贮备溶液。分别精密量取上述贮备溶液各2.0 mL置同一25 mL容量瓶中,加70%甲醇定容至刻度,摇匀,即得对照品溶液。取样品20片,研细,混匀,取约2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率为500 W,频率为40 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。取缺少香加皮、香附、狗脊和红花的阴性样品,按供试品溶液项下方法制备阴性对照品溶液。

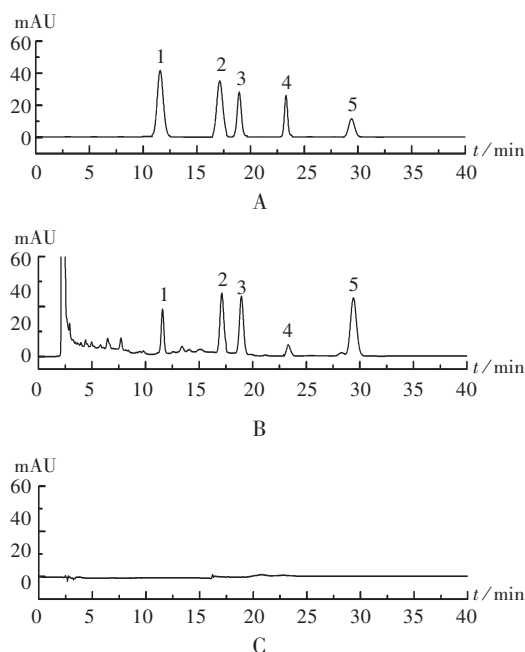
2.3 方法学考察

专属性试验:分别吸取2.2项下3种溶液各适量,精密称定,按拟订色谱条件进样分析。色谱图见图1。可见,5种被测成分分离完全,阴性对照无干扰,专属性良好。

线性关系考察:分别精密量取2.2项下5种对照品贮备溶液0.2, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0 mL,置25 mL容量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,摇匀,得系列混合对照溶液。按拟订色谱条件进样,以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

精密度试验:按拟订色谱条件,取混合对照品溶液连续进样6次,记录峰面积。结果4-甲氧基水杨醛、α-香附酮、原儿茶酸、羟基红花黄色素A和山柰素的RSD分别为0.06%, 0.10%, 0.22%, 0.69%, 0.35% (n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液(批号为180401),分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h时进样,记录峰面积。结果4-甲氧基水杨醛、α-香附酮、原儿茶酸、羟基红花黄色素A和山柰素的RSD分别为0.56%, 1.27%, 0.98%,



1. 原儿茶酸 2. 山柰素 3. 4-甲氧基水杨醛

4. α-香附酮 5. 羟基红花黄色素A

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

表1 5种成分线性回归方程和线性范围

成分	线性回归方程	r	线性范围(μg/mL)
4-甲氧基水杨醛	$Y = 11.873X + 3.6060$	0.9997	1.92~95.76
α-香附酮	$Y = 18.928X + 0.5330$	0.9998	4.22~210.90
原儿茶酸	$Y = 11.138X + 1.4907$	0.9997	2.15~107.30
羟基红花黄色素A	$Y = 10.133X - 6.3364$	0.9996	2.34~117.00
山柰素	$Y = 34.969X + 2.5510$	0.9998	0.83~41.44

0.99%, 1.08% (n=6),表明供试品溶液中5种成分在70%甲醇中24 h内稳定。

重复性试验:平行制备供试品溶液6份,进样,记录峰面积。结果4-甲氧基水杨醛、α-香附酮、原儿茶酸、羟基红花黄色素A和山柰素的RSD分别为0.92%, 2.19%, 1.64%, 0.64%, 0.91% (n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为180401)6份,每份约1.0 g,精密称定,分别按样品含量-对照品(1:1)的比例加入一定量的对照品溶液,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定,计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取3批样品各约2.0 g,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,以外标法计算含量。结果见表3。

3 讨论

3.1 提取条件优化

通过单因素试验考察,对提取溶剂(甲醇、70%甲醇和50%甲醇)、提取方法(超声、回流)和提取时间(20,

表2 加样回收试验结果($n=6$)

成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
A	1.025 6	0.217 8	0.215 5	0.431 0	98.93	100.39	1.05
	1.003 8	0.213 2	0.215 5	0.430 0	100.60		
	1.007 4	0.214 0	0.215 5	0.428 0	99.30		
	1.012 1	0.215 0	0.215 5	0.432 4	100.88		
	1.004 5	0.213 4	0.215 5	0.431 1	101.02		
	1.008 3	0.214 2	0.215 5	0.433 2	101.62		
B	1.025 6	0.206 0	0.210 9	0.415 0	99.10	98.61	1.00
	1.003 8	0.201 6	0.210 9	0.407 3	97.53		
	1.007 4	0.202 3	0.210 9	0.412 1	99.48		
	1.012 1	0.203 3	0.210 9	0.411 1	98.53		
	1.004 5	0.201 7	0.210 9	0.411 9	99.67		
	1.008 3	0.202 5	0.210 9	0.407 8	97.34		
C	1.025 6	0.143 7	0.134 1	0.276 8	99.25	98.84	1.39
	1.003 8	0.140 7	0.134 1	0.274 1	99.48		
	1.007 4	0.141 2	0.134 1	0.275 1	99.85		
	1.012 1	0.141 8	0.134 1	0.273 7	98.36		
	1.004 5	0.140 8	0.134 1	0.269 9	96.27		
	1.008 3	0.141 3	0.134 1	0.275 2	99.85		
D	1.025 6	1.245 5	1.170 4	2.419 8	100.33	100.43	0.50
	1.003 8	1.219 0	1.170 4	2.400 7	100.97		
	1.007 4	1.223 4	1.170 4	2.396 0	100.19		
	1.012 1	1.229 1	1.170 4	2.395 0	99.62		
	1.004 5	1.219 8	1.170 4	2.401 1	100.93		
	1.008 3	1.224 5	1.170 4	2.401 3	100.55		
E	1.025 6	0.069 7	0.072 5	0.141 0	98.34	99.20	1.64
	1.003 8	0.068 2	0.072 5	0.141 9	101.66		
	1.007 4	0.068 4	0.072 5	0.140 0	98.76		
	1.012 1	0.068 7	0.072 5	0.138 9	96.83		
	1.004 5	0.068 2	0.072 5	0.140 5	99.72		
	1.008 3	0.068 5	0.072 5	0.140 9	99.86		

注:A为4-甲氧基水杨醛,B为 α -香附酮,C为原儿茶酸,D为羟基红花黄色素A,E为山柰素。下表同。

表3 3批样品含量测定结果(mg/g, $n=3$)

批号	A	B	C	D	E	总含量
180401	0.2124	0.2080	0.1401	1.2144	0.0679	1.8429
171125	0.1987	0.2156	0.3529	1.3842	0.0974	2.2488
201802	0.2363	0.2421	0.2693	1.8453	0.1053	2.6983

30,40 min)进行比较,结果表明,用70%甲醇超声处理30 min为最优提取条件。

3.2 色谱条件优化

曾比较检测波长(254,300,360 nm)、0.7%醋酸溶液-甲醇比例(10:90,20:80,30:70)、不同比例的醋酸溶液(0.2%,0.5%,0.7%)对试验的影响,结果表明,当检测波长为254 nm,醋酸溶液体积分数为

0.7%,且与甲醇比例为30:70时,色谱峰峰形和分离度最佳。

3.3 研究价值

舒筋活血片目前尚未列入2015年版《中国药典》,现行标准为国家药品标准 WS_{3-B-2624-97-2011}。其含量检测中以4-甲氧基水杨醛为指标成分,仅检测香加皮中有效成分的含量,但单一成分的检测不能完全、充分地反映和体现药物的质量,本研究中以舒筋活血片为对象,采用HPLC法同时测定其中4-甲氧基水杨醛、 α -香附酮、原儿茶酸、羟基红花黄色素A和山柰素5种成分的含量。结果表明,各成分在40 min内检测完全,方法精密度、重复性、准确度均良好,可用于检测不同批次的样品,对舒筋活血片的多成分含量测定和质量控制提供了参考。

参考文献:

- [1] 张耀武,洪汉刚,周瑜博,等.舒筋活血片联合玻璃酸钠治疗膝关节骨性关节炎临床效果及对滑膜液炎症因子的影响[J].中药药理与临床,2017,33(4):199-201.
- [2] 杨宁宁,王海英,姜昭君,等.舒筋活血片联合家庭康复训练治疗急性腰痛疗效观察[J].浙江中西医结合杂志,2017,27(10):865-867.
- [3] 刘静,赵剑锋,马双成,等.HPLC法同时测定红花注射液3种活性成分[J].中成药,2015,37(11):2426-2429.
- [4] 王世宇,李文兵,卢君蓉,等.HPLC法同时测定不同产地香附药材中香附烯酮、茴香酮和 α -香附酮[J].中成药,2015,37(3):588-591.
- [5] 贾恒明,刘敏,张良,等.HPLC法测定狗脊补肾片中原儿茶酸和原儿茶醛的含量[J].解放军药学学报,2006,22(6):448-450.
- [6] 国家药典委员会.卫生部药品标准·中药成方制剂(第十三册)[M].北京:人民卫生出版社,1997:202.
- [7] 颜惠芳.HPLC测定舒筋活血片中4-甲氧基水杨醛的含量[J].现代食品与药品杂志,2007,17(1):52-55.
- [8] 杨虹,刘虹,孙巍,等.HPLC法测定舒筋活血片中杠柳毒苷[J].中草药,2007,38(2):214-216.
- [9] 程世云,班永生.舒筋活血片质量标准研究[J].安徽医药,2011,15(5):562-564.
- [10] 林斯民,吴义忠.舒筋活血片质量标准研究[J].广东药学院学报,2009,25(5):466-468.
- [11] 杜单,邓艳梅,徐建.HPLC法测定舒筋活血片中羟基红花黄色素A的含量[J].淮海医药,2013,31(1):75-76.
- [12] 张秋红,闫滨,韩文正.HPLC法测定舒筋活血片的含量[J].中国药师,2007,10(2):150-152.
- [13] 朱山寅.HPLC法测定舒筋活血片中原儿茶醛的含量[J].中华中医药学刊,2007,25(2):384-385.
- [14] 刘丙艳.HPLC法测定舒筋活血片中紫丁香苷的含量[J].中国药师,2011,14(11):1700-1701.

(收稿日期:2018-07-09)