

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.20.008

高效液相色谱-二极管阵列检测法同时测定二冬宁脑丸中 橙皮苷、芍药苷及阿魏酸含量

张桂平¹, 杨荣波², 王平晟²

(1. 河南省南阳市食品药品检验所, 河南 南阳 473000; 2. 河北省南阳市中医院, 河南 南阳 473000)

摘要:目的 建立同时测定二冬宁脑丸中橙皮苷、芍药苷和阿魏酸含量的高效液相色谱-二极管阵列检测法。方法 色谱柱为 Welch Materials C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-1% 乙酸溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 284 nm(橙皮苷)、230 nm(芍药苷)、321 nm(阿魏酸), 柱温为 35 ℃, 进样量为 10 μL。结果 橙皮苷、芍药苷和阿魏酸质量浓度分别在 40.24~402.40 μg/mL, 11.128~111.280 μg/mL, 1.066~10.664 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9994$, $n=6$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2% ($n=6$); 平均加样回收率分别为 98.97%, 98.62%, 102.10%, RSD 分别为 1.25%, 1.19%, 1.45% ($n=6$)。结论 该方法操作简便、准确, 精密度、稳定性、重复性均较好, 可用于同时测定二冬宁脑丸中橙皮苷、芍药苷和阿魏酸的含量。

关键词: 二冬宁脑丸; 橙皮苷; 芍药苷; 阿魏酸; 高效液相色谱-二极管阵列检测法; 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)20-0023-04

Simultaneous Determination of Hesperidin, Paeoniflorin and Ferulic Acid in Erdong Ningnao Pills by HPLC-PDA

ZHANG Guiping¹, YANG Rongbo², WANG Pingsheng²

(1. Nanyang Institute for Food and Drug Control, Nanyang, Henan, China 473000; 2. Nanyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanyang, Henan, China 473000)

Abstract: Objective To establish an HPLC-PDA method for the simultaneous determination of hesperidin, paeoniflorin and ferulic acid in Erdong Ningnao Pills. **Methods** The chromatographic column was Welch Materials C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-1% acetic acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was set at 284 nm for hesperidin, 230 nm for paeoniflorin and 321 nm for ferulic acid, the column temperature was 35 ℃ and the sample size was 10 μL. **Results** The linear range was 40.24-402.40 μg/mL for hesperidin, 11.128-111.280 μg/mL for paeoniflorin, 1.066-10.664 μg/mL for ferulic acid ($r \geq 0.9994$, $n=6$). RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2% ($n=6$), the

第一作者: 张桂平, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药制剂与质量标准, (电子信箱)342612402@qq.com。

标准中的滴定法无显著差异, 可用于山楂药材和小儿麦
枣咀嚼片中枸橼酸的含量测定。同时, HPLC 法灵敏度高、
分析速度快、抗干扰强, 更适用于中成药及基质复杂样
品中枸橼酸含量的测定。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 31.
- [2] WS-10409(ZD-0409)-2002-2012Z, 国家食品药品监督管理局药品标准[S].
- [3] 刘 鲲, 刘 娜, 张玉珂. 山楂免疫和保健作用研究[J]. 光明中医, 2017, 32(18): 2727-2730.
- [4] 于蓓蓓, 闫雪生, 孙丹丹. 山楂药理作用及其机制研究进展[J]. 中南药学, 2015, 13(7): 745-748.
- [5] 曲永鑫. 山楂、大枣、枸杞、菊花天然复合保健饮料的工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 710-713.
- [6] 楼陆军, 罗洁霞, 高 云. 山楂的化学成分和药理作用研究概述[J]. 中国药业, 2014, 23(3): 92-94.
- [7] 金高娃, 章飞芳, 薛兴亚, 等. 反相高效液相色谱法测定山楂

中的有机酸[J]. 分析化学, 2006, 34(7): 987-990.

- [8] 蔡少芳, 江海燕, 欧艳萍. 山楂不同炮制品有机酸含量测定[J]. 中成药, 2000, 22(12): 841-842.
- [9] 王玉团. 山楂提取物的质量标准研究[J]. 药学研究, 2015, 34(7): 387-390.
- [10] 雷成康, 郭 玲. 山楂中有机酸含量测定方法的改进[J]. 中药材, 2010, 33(5): 745-747.
- [11] 耿 铮, 车 慧, 薛 阳, 等. 枸橼酸盐合剂中总枸橼酸盐及枸橼酸含量测定方法研究[J]. 解放军药学报, 2018, 34(1): 51-52.
- [12] 杨 滨, 李 化, 汤树良, 等. 高效液相色谱法测定山楂中枸橼酸的含量[J]. 中国药理学杂志, 2004, 40(9): 697-699.
- [13] 周 艳, 裴建峰, 李连珍, 等. 山楂不同炮制品有机酸含量测定[J]. 黑龙江科技信息, 2009(32): 61.
- [14] 熊建飞, 周光明, 许 丽, 等. 离子色谱法测定山楂和乌梅中的有机酸[J]. 食品科技, 2012, 37(9): 284-287.
- [15] 伍小燕, 陈 朝, 黄权芳, 等. HPLC 法测定复方大黄酒液中的枸橼酸的含量[J]. 中医通报, 2013, 12(2): 58-60.

(收稿日期: 2019-03-18)

average recoveries were 98.97%, 98.62%, 102.10%, respectively, and RSDs were 1.25%, 1.19%, 1.45% ($n=6$), respectively.

Conclusion The method is simple and accurate, it has good precision, stability and repeatability, which can be used for the simultaneous determination of hesperidin, paeoniflorin and ferulic acid in Erdong Ningnao Pills.

Key words: Erdong Ningnao Pills; hesperidin; paeoniflorin; ferulic acid; HPLC-PDA; content determination

二冬宁脑丸由天冬、麦冬、地龙、僵蚕、珍珠母、陈皮、赤芍、川芎等14味药材组方,具有滋阴潜阳、化痰祛瘀功效,临床主要用于治疗阴虚阳亢痰瘀互结所致半身不遂、口眼歪斜、言语蹇涩或不语、感觉减退或消失等症。方中陈皮主要成分为橙皮苷,具有理气健脾、燥湿化痰等功效^[1];赤芍主要成分为芍药苷,具有保肝、抗肿瘤、神经保护、心脏保护、抗血栓、抗氧化、抗内毒素等多种药理作用^[2];川芎主要成分为阿魏酸,有抗血小板凝集、抗血栓、抗菌、消炎、抗肿瘤、抗突变、增加免疫力等功效^[3]。本试验中采用高效液相色谱-二极管阵列检测(HPLC-PDA)法同时测定二冬宁脑丸中橙皮苷、芍药苷和阿魏酸含量。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪,包括SPD-M20A检测器(日本Shimadzu公司);XS205型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);SK5200H型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试药

二冬宁脑丸(南阳市中医院,批号分别为20161117, 20170103, 20170225, 20171017, 20171220, 20180123,规格为每瓶30g);橙皮苷对照品(批号为110721-201617,含量96.1%),芍药苷对照品(批号为110736-201741,含量95.7%),阿魏酸对照品(批号为110773-201614,含量99.0%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Welch Materials C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-1%乙酸溶液(B),梯度洗脱(0~15 min时30% A, 15~40 min时30% A→35% A, 40~42 min时35% A→30% A, 42~45 min时30% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:284 nm(橙皮苷), 230 nm(芍药苷), 321 nm(阿魏酸);柱温:35℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取阿魏酸对照品13.46 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加70%乙醇溶解并定容,摇匀,得对照品溶液I;取橙皮苷对照品52.34 mg和芍药苷对照品14.54 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加入对照品溶液I 10 mL溶解,并加入70%乙醇定容,摇匀,得每1 mL含橙皮苷0.503 0 mg、芍药苷0.139 1 mg、

阿魏酸0.013 33 mg的混合对照品贮备液,取4 mL,置10 mL容量瓶中,加70%乙醇定容,摇匀,即得混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品适量,研细,混匀,精密称定1.5 g,置具塞锥形瓶中,加70%乙醇25 mL,称定质量,浸泡过夜后,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理30 min,放冷,再称定质量,用70%乙醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

阴性对照溶液:按二冬宁脑丸处方和工艺分别制备缺陈皮、赤芍、川芎的阴性样品,分别制备阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取上述对照品溶液、供试品溶液各适量,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。理论板数按橙皮苷、芍药苷及阿魏酸峰计均应不低于3 000,分离度均大于1.5,基线分离良好。

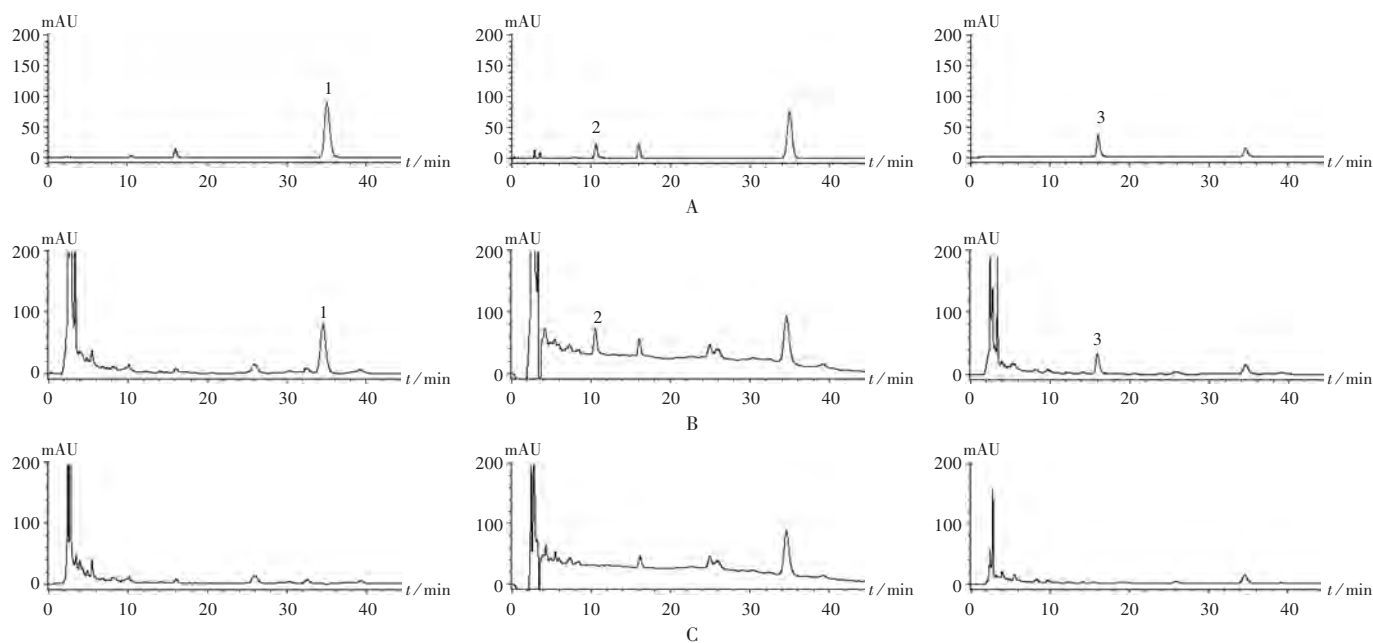
专属性试验:取对照品溶液、阴性对照溶液各适量,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。阴性对照溶液在与橙皮苷、芍药苷、阿魏酸对照品溶液相同保留时间处无干扰峰,表明专属性良好。

线性关系考察:分别精密量取混合对照品贮备液0.8, 1.5, 2.5, 4.0, 6.0, 8.0 mL,置10 mL容量瓶中,加70%乙醇定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液。量取10 μL,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得橙皮苷、芍药苷、阿魏酸回归方程分别为 $Y=18\,181X+70\,935$ ($r=0.999\,7$, $n=6$)、 $Y=12\,538X+8\,370.5$ ($r=0.999\,5$, $n=6$)、 $Y=67\,272X-3\,143$ ($r=0.999\,4$, $n=6$)。结果表明,橙皮苷、芍药苷、阿魏酸质量浓度在40.24~402.40 μg/mL、11.128~111.280 μg/mL、1.066~10.664 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取混合对照品溶液适量,按拟订色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果橙皮苷、芍药苷、阿魏酸峰面积的RSD分别为0.52%, 0.74%, 0.81% ($n=6$),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20170225)适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 8, 12, 24 h时按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果橙皮苷、芍药苷、阿魏酸峰面积的RSD分别为0.68%, 1.24%, 1.37% ($n=6$),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为20170225)6份,精密



1. 橙皮苷 2. 芍药苷 3. 阿魏酸
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照溶液(由左至右分别为缺陈皮、赤芍、川芎)

图1 高效液相色谱图

表1 加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)			样品含量(mg)			加入量(mg)			测得量(mg)			回收率(%)			$\bar{X}$ (%)			RSD(%)		
A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.704 5	0.704 5	0.704 5	2.264 3	0.577 0	0.056 0	2.012 0	0.556 4	0.053 3	4.220 3	1.133 7	0.110 4	97.22	100.05	102.06						
0.691 9	0.691 9	0.691 9	2.223 8	0.566 7	0.055 0	2.012 0	0.556 4	0.053 3	4.231 8	1.108 6	0.110 5	99.80	97.39	104.13						
0.712 2	0.712 2	0.712 2	2.289 0	0.583 3	0.056 6	2.012 0	0.556 4	0.053 3	4.290 0	1.126 5	0.110 3	99.45	97.63	100.75	98.97	98.62	102.10	1.25	1.19	1.45
0.705 1	0.705 1	0.705 1	2.266 2	0.577 5	0.056 1	2.012 0	0.556 4	0.053 3	4.250 2	1.123 0	0.110 7	98.61	98.04	102.44						
0.711 4	0.711 4	0.711 4	2.286 4	0.582 6	0.056 6	2.012 0	0.556 4	0.053 3	4.265 4	1.141 7	0.111 7	98.36	100.49	103.38						
0.702 8	0.702 8	0.702 8	2.258 8	0.575 6	0.055 9	2.012 0	0.556 4	0.053 3	4.278 8	1.121 4	0.109 1	100.40	98.09	99.81						

注:A为橙皮苷,B为芍药苷,C为阿魏酸。

称定,依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果橙皮苷、芍药苷、阿魏酸平均含量分别为3.214,0.819,0.080 mg/g, RSD分别为0.71%,0.95%,1.16% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为20170225)适量,共6份,分别加入一定质量浓度的混合对照品溶液,依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表1。

2.4 样品含量测定

取6批样品各适量,依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,每批平行测定3次,取平均值,记录峰面积并计算样品含量。结果见表2。

表2 样品含量测定结果(mg/g, $n=3$)

批号	橙皮苷	芍药苷	阿魏酸	批号	橙皮苷	芍药苷	阿魏酸
20161117	3.016	0.715	0.081 3	20171017	3.187	0.834	0.080 4
20170103	2.845	0.796	0.072 2	20171220	3.352	0.767	0.068 6
20170225	3.214	0.819	0.079 5	20180123	2.981	0.803	0.071 7

3 讨论

检测波长选择:取3种对照品进行全波长扫描,结果橙皮苷、芍药苷和阿魏酸分别在284,230,321 nm波长处有最大吸收,故本试验中在不同波长处测定3种成分,结果稳定。

流动相选择:采用不同比例的甲醇-0.05%磷酸溶液、甲醇-0.05 mol/L磷酸二氢钾溶液、甲醇-1%乙酸溶液^[4-5]、乙腈-1%乙酸溶液^[6-8]作流动相进行比较,结果采用甲醇-1%乙酸溶液梯度洗脱时,各待测成分色谱峰峰形良好,分离度均大于1.5%,且阴性对照无干扰。

提取溶剂选择:使用不同比例的甲醇和乙醇冷浸过夜后超声30,60 min进行提取,结果发现,以70%乙醇为提取溶剂,冷浸过夜后超声30 min,芍药苷提取效率比以甲醇为提取溶剂时稍降低,但橙皮苷和阿魏酸提取效率最高,且干扰最少。

综上所述,本研究中建立的方法操作简便、准确,精密度、稳定性、重复性均较好,可用于同时测定二冬宁