

HPLC-DAD 法测定益气聪明丸中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷

鲍明敏¹, 元晓敏^{2*}, 刘会艳³

1. 安阳市食品药品检验检测中心 化学室, 河南 安阳 455000

2. 安阳市第三人民医院 药剂科, 河南 安阳 455000

3. 鹤壁市食品药品检验检测中心 药品检验科, 河南 鹤壁 456000

摘要: 目的 建立 HPLC-DAD 法同时测定益气聪明丸中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷。方法 Waters X-bridge C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.5%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 257 nm (蔓荆子黄素)、315 nm (异阿魏酸)、251 nm (葛根素)、230 nm (芍药苷); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 25 ℃; 进样体积: 10 μL。结果 异阿魏酸、芍药苷、葛根素和蔓荆子黄素分别在 0.098~9.830、0.199~19.900、0.239~23.900、0.237~23.700 μg/mL 线性良好, 平均回收率分别为 99.57%、99.64%、99.13%、99.64%, RSD 值分别为 1.79%、1.35%、0.67%、1.43%。结论 建立的方法简便快捷、准确可靠, 可用于益气聪明丸的质量控制。

关键词: 益气聪明丸; 蔓荆子黄素; 异阿魏酸; 葛根素; 芍药苷; HPLC-DAD

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)06-1244-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.06.012

Determination of vitexicarpin, ferulic acid, puerarin, and paeoniflorin in Yiqi Congming Pills by HPLC-DAD

BAO Ming-min¹, YUAN Xiao-min², LIU Hui-yan³

1. Department of Chemistry, Anyang Food and Drug Inspection and Testing Center, Anyang 455000, China

2. Department of Pharmacy, Anyang Third People's Hospital, Anyang 455000, China

3. Department of Drug Inspection, Hebi Food and Drug Inspection and Testing Center, Hebi 456000, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-DAD method for simultaneous determination of vitexicarpin, ferulic acid, puerarin, and paeoniflorin in Yiqi Congming Pills. **Methods** HPLC analysis was performed on Waters X-bridge C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile - 0.5% phosphoric acid solution by gradient elution. The detection wavelength was set at 257 nm (vitexicarpin), 315 nm (ferulic acid), 251 nm (puerarin), and 230 nm (paeoniflorin). The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25 ℃, and the sample volume was 10 μL. **Results** Vitexicarpin, ferulic acid, puerarin, and paeoniflorin showed good linear relationships in concentration range 0.098 — 9.830, 0.199 — 19.900, 0.239 — 23.900, and 0.237 — 23.700 μg/mL, respectively. The recoveries were 99.57%, 99.64%, 99.13%, and 99.64% with values of 1.79%, 1.35%, 0.67%, and 1.43%, respectively. **Conclusion** The method is simple, fast, accurate, and reliable, and can be applied to the quality control of Yiqi Congming Pills.

Key words: Yiqi Congming Pills; vitexicarpin; ferulic acid; puerarin; paeoniflorin; HPLC-DAD

益气聪明丸由升麻、葛根、黄柏、白芍、蔓荆子、党参、黄芪、炙甘草 8 味中药经粉碎、过筛、制丸、干燥等工艺制备而成, 具有益气升阳、聪耳明目的功效, 临床主要用于治疗视物昏花、耳聋耳鸣等症^[1-2]。近年来, 随着我国人口老龄化趋势的加

重和数码产品的普遍使用, 许多老年朋友、青少年患有视物昏花、耳聋耳鸣等症状, 因此益气聪明丸的临床应用也越来越多^[3-5]。益气聪明丸是《中国药典》2020 年版一部新收录的中药制剂^[6], 含量测定项中分别使用 2 个不同色谱方法测定葛根素和芍药

收稿日期: 2022-03-08

作者简介: 鲍明敏 (1985—), 女, 河南林州人, 主管药师, 本科, 从事食品药品检验检测。E-mail: linzhong756522@163.com

*通信作者: 元晓敏 (1985—), 女, 河南林州人, 主管药师, 硕士, 研究方向为临床药学。

昔,方法效率较低,且不能全面地体现益气聪明丸的质量水平。为提高益气聪明丸的质量控制水平,本研究建立了益气聪明丸中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷4种成分的HPLC-DAD法同时测定的分析方法。

1 仪器与试药

安捷伦 Infinity 1260 型液相色谱仪,配备在线脱气机、四元泵、二极管阵列检测器、open-lab 软件工作站(美国安捷伦科技公司);梅特勒 XS 205 型十万分之一电子天平(瑞士梅特勒公司);Millipore Milli-q academic 型超纯水仪(美国密理博科技公司);CD-E30 型超声仪[亦为超声技术(深圳)有限公司]。

荆子黄素(批号 111554-201705,质量分数 98.3%)、异阿魏酸(批号 111698-201904,质量分数 99.3%)、葛根素(批号 110752-201816,质量分数 95.4%)、芍药苷(批号 110736-202145,质量分数 94.6%)对照品均购于中国食品药品检定研究院;益气聪明丸(陕西华西制药股份有限公司生产,规格 9 g/袋,批号 20210326、20210509、20210721);甲醇、乙腈(色谱纯试剂,德国 Merck 试剂公司);磷酸盐(优级纯试剂,上海化学试剂厂);实验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Waters X-bridge C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.5%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~2 min, 5% A; 2~10 min, 5%~37% A; 10~19 min, 37%~61% A; 19~25 min, 61%~89% A; 25~30 min, 89% A; 30~30.1 min, 89%~

5% A; 30.1~35 min, 5% A);检测波长:257 nm(蔓荆子黄素)、315 nm(异阿魏酸)、251 nm(葛根素)、230 nm(芍药苷);体积流量:1.0 mL/min;柱温:25℃;进样体积:10 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品储备溶液的制备 取蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷对照品适量,加90%甲醇分别制备质量浓度 98.30、198.6、238.5、236.5 μg/mL 的各对照品储备溶液,摇匀,即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密移取蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷对照品储备溶液 1.0 mL,置同一个 10 mL 量瓶中,加90%甲醇至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取益气聪明丸样品适量,研细,精密称取 0.5 g,置 50 mL 量瓶中,加90%甲醇适量,超声提取 30 min(超声功率 220 W、频率 50 kHz),放冷,加90%甲醇至刻度,摇匀,0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性样品溶液的制备 按益气聪明丸中药材比例和制备方法,分别制备缺蔓荆子、升麻、葛根和白芍的阴性样品,按供试品溶液的制备方法处理,分别制备缺对应药材的阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液,分别进样 10 μL,收集谱图,见图 1。结果在益气聪明丸供试品溶液谱图中,蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷的色谱峰保留时间与对照品溶液一致,在 4 种阴性样品溶液中 4 种成分的色谱峰对应位置无干扰峰,提示 4 种成分分离良好,方法专属性良好。

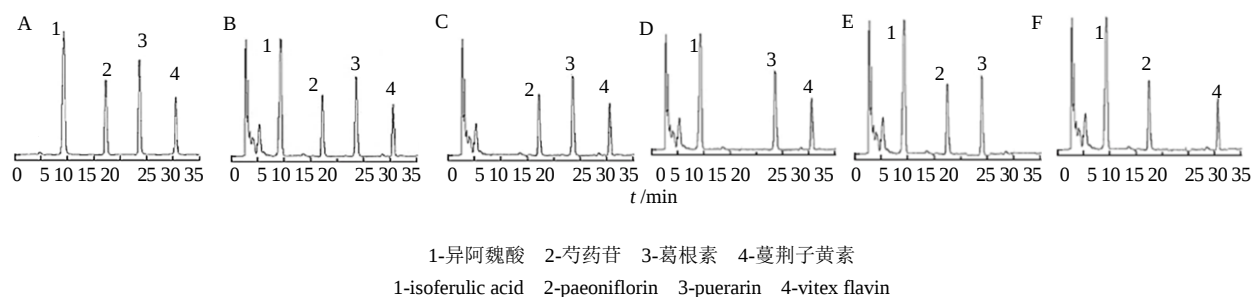


图1 对照品(A)、益气聪明丸(B)、缺升麻阴性样品(C)、缺白芍阴性样品(D)、缺蔓荆子阴性样品(E)、缺葛根阴性样品(F)的HPLC图谱

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A), Yiqi Congming Pills (B), negative sample without *Cimicifugae Rhizoma* (C), negative sample without *Paeoniae Radix Alba* (D), negative sample without *Viticis Fructus* (E), negative sample without *Puerariae Lobatae Radix* (F)

2.4 线性关系考察

取蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷对照品储备溶液, 分别精密移取 10、50、100、500、1 000 μL , 置 5 只 10 mL 量瓶中, 加 90% 甲醇制备

含 4 种成分的系列溶液, 分别进样 10 μL , 收集谱图。根据谱图中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷的峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 1。

表 1 标准曲线和线性范围
Table 1 Curve equation and range

名称	曲线方程	r^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
异阿魏酸	$Y=13.53 X+31.76$	0.999 6	0.098~9.830
芍药苷	$Y=28.57 X+12.84$	0.999 7	0.199~19.900
葛根素	$Y=8.93 X+13.48$	0.999 7	0.239~23.900
蔓荆子黄素	$Y=9.75 X+11.59$	0.999 5	0.237~23.700

2.5 精密度试验

取蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷对照品溶液, 连续进样 6 次, 收集谱图, 根据谱图中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷的峰面积计算得其 RSD 值分别为 1.12%、1.36%、1.41%、1.07%。

2.6 重复性试验

取批号 20210326 益气聪明丸样品 6 份, 制备供试品溶液, 进样 10 μL , 收集谱图, 根据谱图中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷的峰面积计算质量分数, 结果蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷质量分数的 RSD 值分别为 2.07%、1.59%、2.07%、2.14%。

2.7 稳定性试验

取批号 20210326 益气聪明丸样品适量, 制备供试品溶液, 放置 0、3、6、9、12、18、24 h 后取样, 分别进样 10 μL , 收集谱图。根据谱图中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷的峰面积计算得其 RSD 值分别为 1.42%、1.76%、1.81%、1.36%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验

取批号 20210326 益气聪明丸样品, 研细, 取 0.25 g, 同法称取 6 份, 分别置 50 mL 量瓶中, 精密加入对照品储备溶液适量, 制备供试品溶液, 分别进样 10 μL , 收集谱图, 计算回收率。结果异阿魏酸、葛根素、芍药苷和蔓荆子黄素的平均回收率分别为 99.57%、99.64%、99.13%、99.64%, RSD 值分别为 1.79%、1.35%、0.67%、1.43%。

2.9 样品测定

取益气聪明丸样品适量, 制备供试品溶液, 每份制备 2 份, 依次进样 10 μL , 收集谱图, 根据标准曲线法计算益气聪明丸供试品中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷的质量分数, 结果见表 2。《中国药典》2020 年版一部中, 益气聪明丸中对葛根素和芍药苷进行了活性成分指标要求, 即要求益气聪明丸中含葛根素、芍药苷分别不得少于 1.40、0.34 mg/g; 对于本研究结果, 建议增加异阿魏酸和蔓荆子黄素的要求, 即益气聪明丸含异阿魏酸、葛根素、芍药苷和蔓荆子黄素分别不得少于 0.30、1.40、0.34、0.12 mg/g。

表 2 益气聪明丸中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷的测定结果 ($n=2$)

Table 2 Determination of vitexicarpin, ferulic acid, puerarin, and paeoniflorin in Yiqi Congming Pills ($n=2$)

批号	质量分数/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$			
	异阿魏酸	芍药苷	葛根素	蔓荆子黄素
20210326	0.383 5	0.443 7	1.581 5	0.153 6
20210509	0.334 1	0.462 1	1.637 2	0.144 9
20210721	0.355 6	0.457 3	1.601 8	0.151 7

3 讨论

取对照品溶液, 进样 10 μL , 设置波段扫描范围为 190~400 nm, 记录蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷的光谱图, 结果蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷最大吸收波长分别在 257、315、251、230 nm 处。该波长范围较广, 因此采用单波长无法同时检测蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷 4 种成分。实验选择二极管阵列检测器, 采用不同成分对应不同波长的方法, 即波长切换法定性、定量检测供试品中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷。

高效液相色谱法检测中药制剂中指标成分常用的流动相有甲醇、乙腈体系。本实验分别选择乙腈-水、甲醇-水、0.5%磷酸溶液-乙腈和 0.5%磷酸溶液-甲醇作为流动相体系, 考察蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷 4 种成分分离、分析时间和干扰的影响情况。结果选择甲醇-水体系时, 4 种成分的分离时间较长, 检测效率低下; 选择乙腈-水体系时, 部分色谱峰发生分叉现象, 定量结果不准确; 选择 0.5%磷酸溶液-乙腈时, 4 种成分分离良好, 无基质干扰, 且分析时间较短。故实验选择 0.5%磷酸溶液-乙腈作为流动相体系。

益气聪明丸由 8 味中药组成, 基质较为复杂, 因此选择最佳的提取条件对基质干扰等起到重要

的作用。实验分别考察选择 70%、75%、80%、85%、90%、95% 甲醇溶液对益气聪明丸中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷的提取效果, 结果选择 90% 甲醇溶液时提取效果最佳; 确定提取溶剂后, 分别考察超声时间和超声功率的影响, 最终确定最佳的提取条件为: 85% 甲醇溶液作为提取溶剂, 超声功率控制 220 W, 时间控制 30 min。

综上, 本实验研究建立益气聪明丸中蔓荆子黄素、异阿魏酸、葛根素和芍药苷 4 种成分的 HPLC-DAD 法同时测定的分析方法, 方法简便快捷、准确可靠, 可用于益气聪明丸的质量控制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 唐立海, 朱寿光, 杨光英, 等. 益气聪明丸质量标准提高研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2017, 34(4): 580-586.
- [2] 黄惠莲, 宋丽莉, 张雪, 等. 益气聪明丸质量标准研究 [J]. 中国现代药物应用, 2007, 1(2): 3-5.
- [3] 黄青. 益气聪明丸治疗视疲劳的临床总结 [J]. 临床医药实践, 2016, 25(5): 387-389.
- [4] 杨志萍. 益气聪明丸治疗突发性耳聋 50 例疗效观察 [J]. 中国实用医药, 2013, 8(14): 144-145.
- [5] 王霞, 苗莉. 益气聪明丸治疗突发性耳聋 27 例 [J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(27): 3463-3464.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1504.

[责任编辑 解学星]