

高效液相色谱法同时测定定眩丸中4种成分的含量

张鑫, 杨晓霞, 郑俭, 柴国林*

(兰州佛慈制药股份有限公司, 兰州 730300)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱法同时测定定眩丸中四个成分的含量测定方法。**方法** 采用 COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 mm ID × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.3% 磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长为 240 nm (莫诺昔、马钱苷), 274 nm (丹皮酚), 316 nm (阿魏酸); 柱温为 30°C; 进样量为 10 μL。**结果** 上述 4 个成分分别在一定的浓度范围内与峰面积的线性关系良好, 平均加样回收率分别为 100.23%、100.39%、99.87%、99.02%, RSD 分别为 1.01%、1.07%、1.29%、0.82%。**结论** 该研究建立的 HPLC 同时测定定眩丸中 4 个成分含量的方法简便、准确、重复性好, 灵敏度高, 可为定眩丸的质量控制提供参考。

关键词: 定眩丸; 高效液相色谱; 含量测定; 质量控制

0 引言

定眩丸为兰州佛慈制药股份有限公司独家产品, 用于头目眩晕, 耳鸣耳聋心惊失眠, 手面麻木, 潮热盗汗, 痰多胸闷等症^[1]。现代药效学研究证明还具有镇静催眠、抗眩晕作用^[1], 疗效确切。主要由山茱萸(制)、牡丹皮、当归、川芎、等中药组成。具有滋补肝肾, 清热化痰的功效。山茱萸具有补益肝肾、涩精固脱等功效^[2], 常用于眩晕耳鸣、腰膝酸痛、阳痿遗精等症, 所含的环烯醚萜苷类化合物有马钱苷、莫诺昔^[3], 是其主要活性成分。川芎-当归药对, 具有扩张血管, 增加冠脉血量, 改善心肌缺血和抑制血小板凝聚等药理作用^[4]。阿魏酸作为川芎和当归的有效成分, 是当归和川芎质量检测中的一个必要指标^[5], 牡丹皮的传统功效为清热凉血、活血化瘀, 具有抗炎、解热、抗血小板聚集、抗血栓形成、改善血液流变性、等与传统功效相对应的药理作用, 丹皮酚是牡丹皮的主要活性成分^[6]。原有质量标准中采用薄层扫描法仅对山茱萸中的熊果酸含量做了测定^[7], 并不能完全反映定眩丸的内在质量, 因此本研究对其山茱萸、当归、川芎及牡丹皮建立了相应含量测定方法, 为提高该产品的质量控制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验所用 9 批定眩丸样品均来自兰州佛慈制药股份有限公司。莫诺昔(批号 111998-202104, 质量百分数为 96.8%); 马钱苷(批号 111640-201808, 质量百分数为 99.0%); 丹皮酚(批号 110708-201908, 质量百分数为 99.8%); 阿魏酸(批号 110773-201915, 质量百分数为 99.4%)以上对照品均来自中国

食品药品检定研究院。乙腈(色谱纯, 批号 50102, 质量百分数为 99.9%, 迪马科技); 甲醇(色谱纯, 批号 50101 质量百分数为 99.9%, 迪马科技); 磷酸(色谱纯, 批号为 2024090, 质量百分数为 85%)。

1.2 仪器

LC-20AB 型高效液相色谱仪、SIC-20AC 自动进样器、SPD-M20A 二极管阵列检测器、C10-20AC 柱温箱, 均购自日本岛津公司; XPE105 型电子天平(梅特勒仪器有限公司); SK-S26 电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司); 超纯水仪(四川优普超纯科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 液相色谱条件

采用 COSMOSIL 5C18-MS-II (4.6 mm ID × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈(A)-0.3% 磷酸溶液(B), 按以下方式进行梯度洗脱, (0~5 min, 5%~8% A; 5~20 min, 8%~8% A; 20~35 min, 8%~18% A; 35~45 min, 18%~45%; 45~55 min, 45%~90% A), 流速为 1.0 mL/min; 莫诺昔、马钱苷的检测波长为 240 nm, 丹皮酚的为 274 nm, 阿魏酸的为 316 nm; 柱温为 30°C; 进样量为 10 μL。理论板数按马钱苷峰计应不低于 4000, 各主峰之间的分离度应大于 1.5。

1.3.2 对照品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的四种对照品适量, 加 80% 甲醇溶解, 制成每 1 mL 分别含 39.80 μg 莫诺昔、44.14 μg 马钱苷、7.46 μg 阿魏酸、92.35 μg 丹皮酚的混合对照品溶液。

1.3.3 供试品溶液的制备

取定眩丸水蜜丸 30 丸, 研磨, 过三号筛, 精密称取约 1 g,

基金项目: 甘肃省重点研发(编号 2021GSMMPA-KL01、2021GSMMPA-KL02)

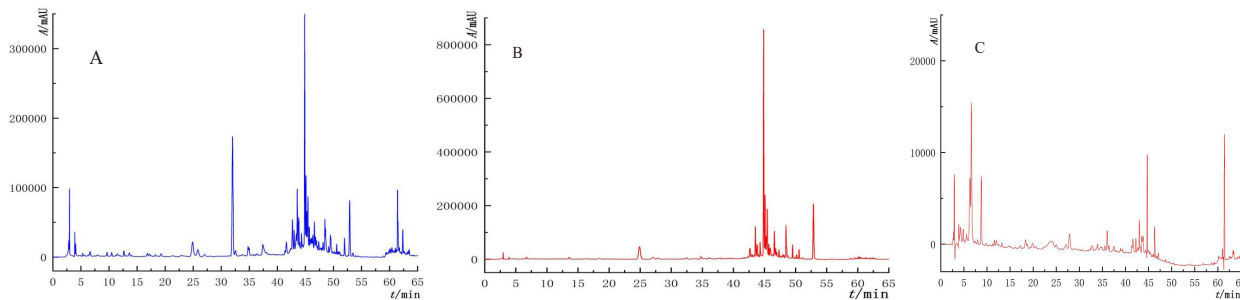
第一作者: 张鑫, 工程师, 主要研究方向为中药鉴定及制剂质量控制。

* 通信作者: 柴国林, 正高级工程师, 主要研究方向为中药鉴定中药现代化质量控制研究。E-mail: 3136174195@qq.com

置锥形瓶中, 加80%甲醇50 mL, 密塞称定重量, 加热回流1小时, 放冷; 加80%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 以0.45 μm微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

1.3.4 阴性样品溶液的制备

按定眩丸水丸的处方工艺, 分别制备缺酒萸肉、缺当归、川芎或缺牡丹皮的样品溶液, 按1.3.1项下色谱条件测定, 色谱图如图1所示, 显示阴性样品无干扰。



注: A——240 nm, 山茱萸阴性; B——316 nm, 当归、川芎阴性; C——274 nm 牡丹皮阴性

图1 专属性试验在不同波长下的色谱图

2 结果与分析

2.1 测定结果

取对照品溶液和定眩丸样品溶液, 进样测定, 混合对照品及样品溶液色谱图如图2~3。理论板数按马钱苷峰计为18400, 符合系统色谱条件要求, 4个成分之间均可达到分离要求。

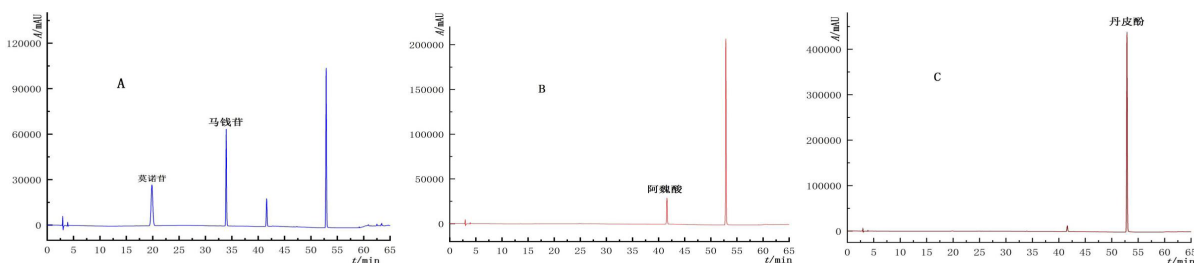
2.2 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 mL, 分别置10 mL容量瓶中, 加80%甲醇定容, 摇匀,

分别配制成对照品溶液, 按1.3.1项下色谱条件进行测定, 绘制计算浓度与峰面积的线性回归方程, 绘制标准曲线, 并分别按照信噪比S/N=3和S/N=10时测定检测限和定量。结果见表1可知, 四种成分分别在各自浓度范围内, 线性关系良好, 且各自最低浓度均能达到检出限与定量限。

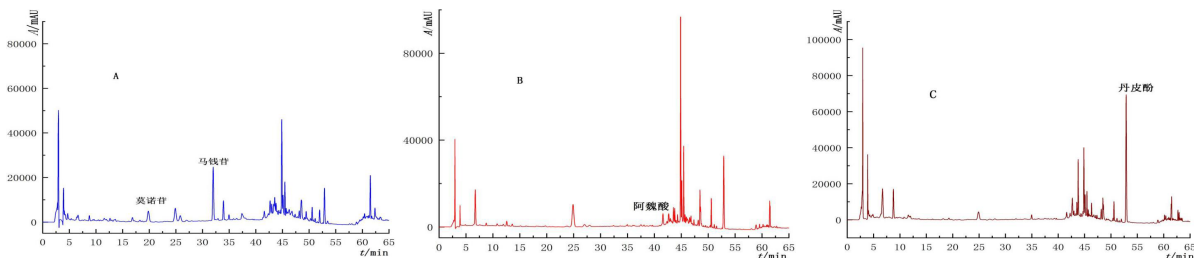
2.3 精密度试验

取1.3.2项下制得的对照品溶液, 按1.3.1项下的色谱条件连续进样6次, 记录峰面积。结果由表2可知, RSD分别为0.18%、0.15%、0.21%、0.23%, 均小于2.0%, 表明仪器精密度良好。



注: A——240 nm; B——316 nm; C——274 nm

图2 混合对照品在不同波长下的色谱图



注: A——240 nm; B——316 nm; C——274 nm

图3 供试品在不同波长下的色谱图

表1 定眩丸中4个成分的线性关系及检出限、定量限考察结果

待测成分	回归方程	r	线性范围(μg/mL)	检出限(μg/mL)	定量限(μg/mL)
莫诺苷	$y = 18364357.2276x + 1728.6169$	0.9999	1.99~31.84	0.22	0.68
马钱苷	$y = 16558901.7192x + 1728.6169$	0.9999	2.21~35.32	0.41	0.81
阿魏酸	$y = 51919627.8073x + 17733.7323$	0.9999	0.37~5.97	0.01	0.08
丹皮酚	$y = 52873726.8979x + 1127.8704$	0.9999	4.62~73.88	0.12	0.38

表2 精密度试验结果

成分	峰面积						平均值	RSD(%)
	1	2	3	4	5	6		
莫诺昔	729854	729338	732614	729365	729605	729105	729980	0.18
马钱苷	717106	714913	716360	715840	716067	714067	715726	0.15
阿魏酸	392586	391658	392118	391754	392405	390240	391794	0.21
丹皮酚	4636717	4632003	4645078	4647388	4652024	4662024	4645872	0.23

2.4 重复性试验

取同一个的定眩丸样品,按1.3.3项下方法制备供试品溶液,平行6份,按1.3.1项下的色谱条件进样分析,记录峰面积并计算含量及平均值。结果如表3所示,四种成分的平均含量分别为0.268、0.226、0.04、0.513 mg/g, RSD分别为0.57%、1.39%、1.70%、0.34%,结果表明本法的重复性良好。

2.5 加样回收率试验

精密称取已知含量的供试品9份,供试品按1.3.3项下操作制备供试品溶液,分别加入一定量的1.3.2项下的对照品溶液,混合均匀,按1.3.1项下的色谱条件进样并测定含量,计算回收率。结果如表4所示,四种成分的平均回收率为分别为99.02%~100.39%, RSD分别为0.82%~1.29%,表明该方法具有良好的准确度。

2.6 样品含量测定

取6批定眩丸样品溶液,照1.3.3项制备供试品溶液,精密吸取供试品溶液10 μL,在1.3.1项下色谱条件下进样分析,测定峰面积,计算样品中四种含量,见表5。

表3 重复性试验结果

成分	1	2	3	4	5	6	平均值 (mg/g)	RSD(%)
莫诺昔	0.268	0.266	0.271	0.269	0.268	0.269	0.268	0.57
马钱苷	0.226	0.223	0.232	0.226	0.226	0.223	0.226	1.39
阿魏酸	0.043	0.042	0.043	0.042	0.043	0.042	0.042	1.70
丹皮酚	0.514	0.510	0.511	0.514	0.513	0.513	0.513	0.34

表4 四种成分的加样回收率结果

成分	取样量(g)	样品中成分含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
莫诺昔	0.5007	0.138	0.24	0.380	101.43	100.23%	1.01%
	0.5022	0.138	0.24	0.383	101.89		
	0.5031	0.138	0.24	0.380	100.66		
	0.5085	0.140	0.12	0.259	99.88		
	0.5062	0.139	0.12	0.257	98.71		
	0.5055	0.139	0.12	0.258	99.19		
	0.5048	0.139	0.36	0.497	99.84		
	0.5077	0.140	0.36	0.500	100.44		
	0.5034	0.139	0.36	0.497	100.00		
马钱苷	0.5007	0.126	0.26	0.390	99.59	100.39	1.07
	0.5022	0.127	0.26	0.393	100.62		
	0.5031	0.127	0.26	0.390	99.53		
	0.5085	0.128	0.13	0.262	101.25		
	0.5062	0.128	0.13	0.260	101.57		
	0.5055	0.127	0.13	0.260	102.25		
	0.5048	0.127	0.40	0.523	99.51		
	0.5077	0.128	0.40	0.527	99.85		
	0.5034	0.127	0.40	0.524	99.32		
阿魏酸	0.5007	0.300	0.55	0.847	98.74	99.87	1.29
	0.5022	0.301	0.55	0.858	101.36		
	0.5031	0.302	0.55	0.849	99.52		
	0.5085	0.305	0.28	0.578	98.78		
	0.5062	0.303	0.28	0.578	98.12		
	0.5055	0.303	0.28	0.581	99.34		
	0.5048	0.303	0.83	1.150	101.94		
	0.5077	0.304	0.83	1.141	100.69		
	0.5034	0.302	0.83	1.136	100.32		
丹皮酚	0.5007	0.024	0.04	0.069	99.36	99.02	0.82
	0.5022	0.024	0.04	0.069	100.38		
	0.5031	0.024	0.04	0.069	98.99		

续表

成分	取样量(g)	样品中成分含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
丹皮酚	0.5085	0.025	0.02	0.047	98.26	99.02	0.82
	0.5062	0.025	0.02	0.047	98.45		
	0.5055	0.025	0.02	0.047	99.66		
	0.5048	0.024	0.07	0.090	97.88		
	0.5077	0.025	0.07	0.091	98.52		
	0.5034	0.024	0.07	0.091	99.68		

表5 定眩丸含量测定结果(mg/g)

编号	莫诺昔	马钱苷	阿魏酸	丹皮酚
S1	0.246	0.206	0.032	0.553
S2	0.269	0.211	0.035	0.534
S3	0.221	0.203	0.041	0.523
S4	0.215	0.214	0.038	0.512
S5	0.252	0.223	0.027	0.572
S6	0.249	0.196	0.034	0.501
S7	0.257	0.224	0.041	0.487
S8	0.225	0.219	0.030	0.516
S9	0.242	0.187	0.039	0.461
平均值	0.242	0.209	0.035	0.518

3 讨论与结论

预实验过程中,分别将莫诺昔、马钱苷、丹皮酚、阿魏酸对照品按1.3.1项下色谱条件下进样分析,分别记录在波长190~800 nm范围内光谱图,确定具有最大吸收的波长,结果显示莫诺昔、马钱苷、丹皮酚、阿魏酸的最佳检测波长分别为240、274、316 nm。

前期考察了甲醇-水、乙腈-水系统及甲醇-磷酸溶液、乙腈-磷酸溶液^[7-11]等流动相配比,经过反复试验发现乙腈-0.3%磷酸溶液洗脱能力更强,四种成分均具有良好的峰型且与相邻杂峰之间无干扰。故最终确定采用乙腈-0.3%磷酸溶液为流动相,进行梯度洗脱的方法检测。

分别考察了回流、超声2种提取方法制备供试品溶液,结果使用加热回流的方式提取的四种成分含量更高,故选择用甲醇回流提取方法;又通过改变甲醇浓度比较提取效果结果,80%甲醇溶液提取更完全。使用80%加热回流分别提取0.5、1、1.5、2 h,发现回流1 h后指标成分的四种成分含量不再增加;因此使用80%甲醇加热回流提取1.5小时制备供试品溶液。

通过对9批不同批次的定眩丸进行含量测定可以看出莫诺昔含量范围为0.215~0.269 mg/g,马钱苷含量范围为0.187~0.224 mg/g,阿魏酸含量范围为0.027~0.041 mg/g,丹皮酚含量范围为0.461~0.572 mg/g,由此可见上述四种成分的含量均具有差异性。这可能是由于采用了不同含量的原料造成了含量的差异性。

由于定眩丸由山茱萸、牡丹皮、当归、等10余种中药组成,所含有效成分复杂。现有标准针对阿魏酸、丹皮酚、熊果酸三种成分进行了薄层色谱鉴别及采用薄层扫描法对熊果酸含量进行了测定。并未对阿魏酸、丹皮酚的含量进行检测,且熊果酸的测定具有提取过程复杂、检测灵敏度低、准确性差等缺

陷。《中华人民共和国药典(2020版)》选择莫诺昔、马钱苷作为山茱萸的指标性成分。本实验建立了高效液相色谱法同时测定阿魏酸、丹皮酚、莫诺昔、马钱苷含量的方法,分别对当归、川芎、牡丹皮、山茱萸有效成分含量做了检测,进一步完善和提高了质量标准。由于定眩丸成分的复杂性与多样性本研究涉及的检测成分的种类目前还不够完整,测定的成分种类有待提高,以后随着方法的不断完善可以增加定眩丸中其他药材的特征性成分检测。

本研究通过对检测波长、流动相和提取方法的优化,建立了高效液相色谱法测定定眩丸中四种有效成分的方法具有良好的准确性、重复性及操作简便、灵敏度高的特点。这些结果为定眩丸含量标准的提高及其他成分的质量控制和稳定性考察提供了重要的理论依据与实践参考,也有利于企业对定眩丸原料及产品质量实行更加有效地控制。

参考文献

- [1] 耿铁海. 新药“定眩丸”的研制简介[J]. 中药新药与临床药理. 1991, (z1): 61-62.
- [2] 张程荣, 曹岗, 张云, 等. 山茱萸的化学、药理与炮制研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(09): 2002-2005.
- [3] 冯飞艳, 行冰玉. 山茱萸中主要活性成分含量测定方法研究进展[J]. 化工管理, 2023, (18): 58-62.
- [4] 张莹莹, 张科, 宋崑, 等. “川芎-当归”药对主要活性成分的网络药理学研究[J]. 安徽医药, 2023, 27(01): 19-24.
- [5] 周鸿, 黄含含, 张静泽, 等. 川芎-当归药对研究进展[J]. 中成药. 2015, 37(01): 184-188.
- [6] 张树蓉, 赵宏苏, 佟沫儒, 等. 牡丹皮化学成分、药理作用及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析[J]. 中草药, 2022, 53(16): 5215-5224.
- [7] 新药转正中药标准第二十二册: WS3—05(Z-87)—99(Z)[S]. 北京: 卫生部, 1999: x22-654.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 29-30.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 139-140.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 42-43.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 179.