

高效液相色谱法测定浓缩乳腺丸有效成分*

赵灿,段宏章,张奇,张延柳,单世光,曲福军,王伟

(哈尔滨医科大学附属第二医院药学部,150086)

摘要 目的 建立浓缩乳腺丸中有效成分吉马酮、芍药苷、柴胡皂苷(d)及阿魏酸的高效液相色谱(HPLC)测定方法。方法 醇提并水提法制备浓缩乳腺丸。Diamonsil-C₁₈(4.6 mm×200 mm,5 μm)色谱柱,4种有效成分流动相分别为,吉马酮:乙腈:磷酸水溶液(50:50,pH 3.23);芍药苷:甲醇:水(25:75);柴胡皂苷(d):甲醇:乙腈:水(20:35:45);阿魏酸:甲醇:水:冰醋酸(32:68:0.5)。流速均为1.0 mL·min⁻¹,检测波长(λ)分别为210,230,201,323 nm。进样体积均为20 μL,柱温分别为35,25,25,25℃。结果 4种有效成分在其对应线性范围内与峰面积呈良好的线性关系,r依次为0.999 9,0.999 8,0.999 5,0.999 5;平均提取回收率分别为75.91%,82.38%,75.04%,67.67%。结论 该实验所建立的HPLC法可用于浓缩乳腺丸中相关有效成分的含量测定,方法灵敏,操作简便,测定结果准确可靠,可用于浓缩乳腺丸的质量控制。

关键词 乳腺丸;吉马酮;芍药苷;柴胡皂苷(d);阿魏酸;色谱法;高效液相

中图分类号 R286;R927.2

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2012)06-0793-06

Determination of Active Components in Concentrated Breast Pills by HPLC

ZHAO Can, DUAN Hong-zhang, ZHANG Qi, ZHANG Yan-liu, SHAN Shi-guang, QU Fu-jun, WANG Wei
(Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

ABSTRACT Objective To establish a method about high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine concentration of germacrone, peoniflorin, saikoside (d), and ferulic acid in concentrated breast pills. **Methods**

Concentrated breast pills were prepared by ethanol and water extraction. Diamonsil-C₁₈ column (4.6 mm×200 mm, 5 μm) was used. Mobile phases of the four active components were as follows: germacrone, methyl cyanides: phosphoric acid solution (50:50, pH 3.23); peoniflorin, methanol: water (25:75); saikoside (d), methanol: methyl cyanides: water (20:35:45); ferulic acid, methanol: water: glacial acetic acid (32:68:0.5). Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. Wavelength was 210, 230, 201 and 323 nm, respectively. Injection volume was 20 μL. Column temperature was 35, 25, 25 and 25℃, respectively.

Results The peak area of each of the active component showed a good linear relationship with the concentration in the corresponding linear range, r values were: 0.999 9, 0.999 85, 0.999 5, 0.999 5. The average extraction recoveries were: 75.91%, 82.38%, 75.04%, 67.67%. **Conclusion** This method is simple and reliable; it can be used for the determination of active components in the concentrated breast pills.

KEY WORDS Breast pills; Germacrone; Peoniflorin; Saikoside (d); Ferulic acid; High-performance liquid chromatography

乳腺丸为我院制剂室生产的复方中药制剂(批准文号:黑药制字 Z20100163,规格:每丸 10 g),临床应用 20 余年,疗效较好。由于该制剂为大蜜丸,存在服用量大、味苦、患者顺应性差等问题,影响了该制剂的临床应用。浓缩乳腺丸(规格为每丸 0.05 g)是在乳腺丸的基础上研制的新剂型,由莪术、赤芍、柴胡、当归、丝瓜络等中药经醇提、水提等工艺制成的浓缩丸,具有疏肝理气、软坚散结、活血化淤之功效。用于治疗

癥瘕积聚、乳腺肿块。处方中莪术具有滋补肾阴、柔筋通络、行气镇痛的作用,挥发油为其有效部位,其中吉马酮含量较高。赤芍具有清热凉血、散淤镇痛的作用,芍药苷是赤芍主要活性单体成分^[1]。柴胡具有和解里、疏肝、升阳举陷的功效,主要用于寒热往来、胸胁胀痛、月经不调等症^[2],其主要有效成分为柴胡皂苷(a、c、d)。当归具有补血活血、调经镇痛、提高机体免疫力的作用^[3],其中阿魏酸具有抗血小板聚集,抑制血小板 5-羟色胺释放,抑制血小板血栓素 A₂ 的生成,增强前列腺素活性,镇痛,缓解血管痉挛等作用^[4-5]。笔者建立对浓缩乳腺丸中有效成分吉马酮、芍药苷、柴胡皂苷(d)及阿魏酸的含量测定的反相高效液相色谱(HPLC)法,为该制剂制备工艺、质量标准等研究奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters2010 高效液相色谱仪(600 泵,717

收稿日期 2011-11-14 修回日期 2012-01-18

基金项目 * 黑龙江省科学委员会重大课题(G99C20-4)

作者简介 赵灿(1986-),女,河北石家庄人,硕士,从事新药研究工作。电话:0451-86605262, E-mail: xiaocan@163.com。

通讯作者 王伟(1956-),男,辽宁丹东人,主任药师,学士,从事中药新药研究。电话:0451-86605262, E-mail: wangwei529529@sina.com。

进样器,996PAD 紫外检测器),pHS-3C 型酸度计(上海伟业仪器厂),KQ-250 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),LO4-2 型低速离心机(北京医用离心机厂)。

1.2 试药 处方中中药饮片均购自于哈尔滨世一堂药店(附有质量合格报告单),并按照《中华人民共和国药典》(2010 年版)进行检验,结果符合标准。浓缩乳腺丸为哈尔滨医科大学附属第二医院药学部生产(每克相当于生药 3.981 g,规格:每粒 0.05 g,每瓶 100 粒,批号:20110812)。吉马酮对照品(批号:111665-200902,含量 98.8%),芍药苷对照品(批号:110736-200934,含量 95.7%),柴胡皂苷(d)对照品(批号:110778-200506),阿魏酸对照品(批号:110773-201012,含量 99.6%)均由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

2.1.1 吉马酮 精密称取干燥至恒重的吉马酮对照品 10 mg,以甲醇作溶剂,制得 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。取 1 mL 移至 10 mL 量瓶,加甲醇至刻度,得 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,作为母液备用。取母液适量,配制成 $0.500, 0.060, 0.015 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液备用。

2.1.2 芍药苷 精密称取干燥至恒重的芍药苷对照品 10 mg,以甲醇作溶剂,配成 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。取 2 mL 移至 10 mL 量瓶,加甲醇至刻度,得 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,作为母液备用。取母液适量,配制成 $0.40, 0.10, 0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,备用。

2.1.3 柴胡皂苷(d) 精密称定干燥至恒重的柴胡皂苷(d)对照品 10 mg,加甲醇配制成 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。取 2.5 mL 移至 10 mL 量瓶,用甲醇加至刻度,得 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,作为母液备用。同法将柴胡皂苷(d)逐级稀释成 $0.50, 0.10, 0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液备用。

2.1.4 阿魏酸 精密称定干燥至恒重的阿魏酸对照品 10 mg,加甲醇溶解,移入 5 mL 量瓶加甲醇定容,制成 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,取 2.5 mL 移至 10 mL 量瓶,用甲醇加至刻度,得 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,作为母液备用。取母液适量配制成 $0.50, 0.10, 0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液备用。

2.2 供试品溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 1 精密称取浓缩乳腺丸 1 g,加入乙醚 10 mL,超声提取两次,每次 20 min,合并两次

提取液,过滤, $35 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴蒸干,再加入甲醇 1 mL 溶解, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液作为吉马酮供试品溶液。

2.2.2 供试品溶液 2 精密称取浓缩乳腺丸 0.1 g,加入甲醇 10 mL,超声提取两次,每次 20 min,合并两次提取液,过滤, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴蒸干,再加入 1 mL 甲醇溶解, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清液作为芍药苷供试品溶液。

2.2.3 供试品溶液 3 精密称定浓缩乳腺丸 1 g,加甲醇 20 mL, 5% 氨水 1 mL,超声提取两次,每次 30 min,合并两次提取液,过滤, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴蒸干,加甲醇 1 mL 溶解, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,取上清液作为柴胡皂苷(d)供试品溶液。

2.2.4 供试品溶液 4 精密称定浓缩乳腺丸 1 g,加甲醇 10 mL,超声提取两次,每次 30 min,合并两次提取液,过滤, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴蒸干,加甲醇 1 mL 溶解, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,取上清液作为阿魏酸供试品溶液。

2.3 阴性溶液的制备 按处方及制备工艺制备,分别制备不含莪术、赤芍、柴胡和当归的 4 种阴性浓缩丸。按“2.2”法制备浓缩乳腺丸的相应阴性溶液。

2.4 色谱条件 色谱柱: Diamonsil- C_{18} (4.6 mm \times 200 mm, 5 μm)。流动相: 吉马酮为乙腈:水(50:50,磷酸调 pH 3.23); 芍药苷为甲醇:水(25:75); 柴胡皂苷(d)为甲醇:乙腈:水(20:35:45); 阿魏酸为甲醇:水:冰醋酸(32:68:0.5)。流速均为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长(λ): 吉马酮为 210 nm; 芍药苷为 230 nm,柴胡皂苷(d)为 201 nm,阿魏酸为 323 nm。进样体积均为 20 μL 。柱温: 吉马酮为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 芍药苷为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 柴胡皂苷(d)为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 阿魏酸为 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.5 专属性考察 照上述色谱条件,分别取对照品溶液、供试品溶液、阴性溶液注入高效液相色谱仪,记录色谱图,结果见图 1~4。

2.6 线性关系考察

2.6.1 吉马酮标准曲线 称取吉马酮阴性浓缩丸 6 g,平均分成 6 份,分别加入“2.1.1”项 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 500, 150, 60, 30 μL , 以及 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 150, 75 μL , 即得每克阴性粉末中含有吉马酮的质量分别为 $0.5, 1.5 \times 10^{-1}, 6.0 \times 10^{-2}, 3.0 \times 10^{-2}, 1.5 \times 10^{-2}, 7.5 \times 10^{-3} \text{ mg}$ 。低温烘干后,6 份样品分别按“2.2.1”项方法制备供试品溶液。按“2.4”项吉马酮色谱条件进样分离。以浓度(C)为横坐标,以峰面积(A)为纵坐标进行回归,结果吉马酮的标准曲

线方程为 $C = 5 \times 10^{-8} A + 2.17 \times 10^{-3}$, $r = 0.9999$, 且在 $7.5 \times 10^{-3} \sim 0.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

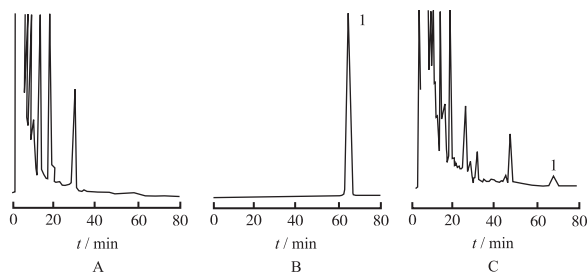


图 1 3 种吉马酮溶液的 HPLC 图谱

A. 阴性溶液; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. 吉马酮

Fig. 1 HPLC chromatogram of 3 kinds of germacrone solutions

A. negative control solution; B. reference solution; C. sample;

1. germacrone

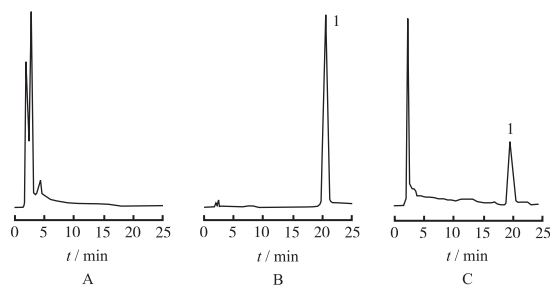


图 2 3 种芍药苷溶液的 HPLC 图谱

A. 阴性溶液; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. 芍药苷

Fig. 2 HPLC chromatogram of 3 kinds of peoniflorin solutions

A. negative control solution; B. reference solution; C. sample;

1. peoniflorin

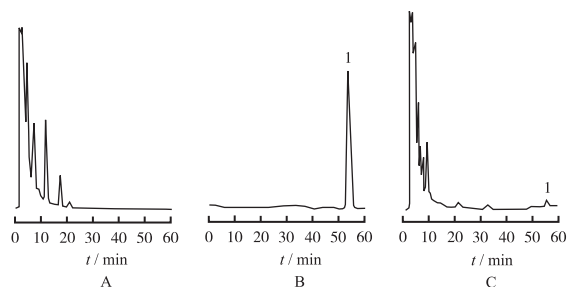


图 3 3 种柴胡皂苷 (d) 溶液的 HPLC 图谱

A. 阴性溶液; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. 柴胡皂苷

Fig. 3 HPLC chromatogram of 3 kinds of saikoside (d) solutions

A. negative control solution; B. reference solution; C. sample;

1. saikoside (d)

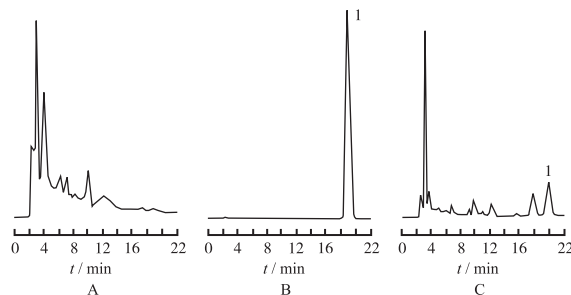


图 4 3 种阿魏酸溶液的 HPLC 图谱

A. 阴性溶液; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. 阿魏酸

Fig. 4 HPLC chromatogram of 3 kinds of ferulic acid solutions

A. negative control solution; B. reference solution; C. sample;

1. ferulic acid

2.6.2 芍药苷标准曲线 称取芍药苷阴性浓缩丸 0.6 g, 平均分成 6 份, 分别加入“2.1.2”项 2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 600, 200, 100, 50, 25 和 0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 25 μL , 即得每克阴性粉末中含有芍药苷的质量分别为 12.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.1 mg。低温烘干后, 6 份样品分别按“2.2.2”项方法制备样品溶液。按“2.4”项芍药苷色谱条件进样分离。以浓度 (C) 为横坐标, 以峰面积 (A) 为纵坐标进行回归, 结果芍药苷的标准曲线方程为 $C = 5 \times 10^{-8} A + 1.19 \times 10^{-3}$, $r = 0.9998$, 且在 $0.1 \sim 12.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.6.3 柴胡皂苷 (d) 标准曲线 称取柴胡阴性浓缩丸 7 份, 每份 1.0 g, 分别加入“2.1.3”项下 2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 500, 250, 100, 50 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 100, 40, 20 μL , 即每克柴胡阴性粉末中含有柴胡皂苷 (d) 分别为 1.0, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg。低温烘干后, 7 份样品分别按“2.2.3”项方法制备样品溶液。按“2.4”项柴胡皂苷 (d) 色谱条件进样分离。以浓度 (C) 为横坐标, 以峰面积 (A) 为纵坐标进行回归, 结果柴胡皂苷 (d) 的标准曲线方程为 $C = 2.5 \times 10^{-7} A + 1.39 \times 10^{-3}$, $r = 0.9995$, 且在 $0.01 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.6.4 阿魏酸标准曲线 称取当归阴性浓缩丸 7 份, 每份 1.0 g, 分别加入“2.1.4”项内 2.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 500, 250, 100, 50 μL 和 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 100, 40, 20 μL , 即每克当归阴性粉末中加入阿魏酸的质量分别为 1.00, 0.50, 0.20, 0.10, 0.05, 0.02, 0.01 mg。低温烘干之后, 7 份样品分别按“2.2.4”项方法制备样品溶液。按“2.4”项阿魏酸色谱条件进样分离。以浓度 (C) 为横坐标, 以峰面积 (A) 为纵坐标

进行回归,结果阿魏酸的标准曲线为 $C = 1.43 \times 10^{-8}A + 3.24 \times 10^{-3}$, $r = 0.9995$,且在 $0.01 \sim 1.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.7 精密度及回收率实验

2.7.1 吉马酮 按照“2.6.1”项制备吉马酮浓度为 $0.500, 0.060, 0.015 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 样品溶液,每种浓度制备5个平行样,日内测定,计算日内精密度。连续5d测定,计算日间精密度,并计算相对回收率。将每个样品测得的峰面积代入标准曲线,得样品的测得值,该测得值除以吉马酮投入值乘以百分之百,计算相对回收率。取上述高、中、低浓度样品,处理后进样,得峰面积,另取高、中、低浓度对照品溶液进样,得峰面积,两个峰面积比值乘以百分之百,计算绝对回收率。结果高、中、低浓度日内精密度 RSD 分别为 $1.78\%, 1.25\%, 2.43\%$ 。日间精密度 RSD 分别为 $1.33\%, 2.95\%, 5.22\%$ 。绝对回收率分别为 $(79.37 \pm 1.78)\%, (75.07 \pm 1.25)\%, (73.29 \pm 2.43)\%$,平均回收率为 75.91% 。相对回收率分别为 $(113.40 \pm 1.78)\%, (113.38 \pm 1.25)\%, (116.22 \pm 2.43)\%$ 。

2.7.2 芍药苷 按照“2.6.2”项制备芍药苷浓度为 $4.0, 1.0, 0.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的样品溶液,每种浓度平行制备5份,同“2.7.1”项测定并计算日内精密度、日间精密度、相对回收率和绝对回收率。结果高、中、低浓度的内精密度 RSD 分别为 $0.69\%, 1.52\%, 2.90\%$ 。日间精密度 RSD 分别为 $1.54\%, 1.96\%, 7.29\%$ 。绝对回收率分别为 $(86.50 \pm 0.69)\%, (86.41 \pm 1.52)\%, (74.23 \pm 2.90)\%$,平均回收率为 82.38% ;相对回收率分别为 $(87.50 \pm 0.69)\%, (85.00 \pm 1.52)\%, (80.00 \pm 2.90)\%$ 。

2.7.3 柴胡皂苷(d) 按照“2.6.3”项制备柴胡皂苷(d)浓度为 $0.50, 0.10, 0.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的样品溶液,每种浓度平行制备5份,同“2.7.1”项测定并计算日内精密度、日间精密度、相对回收率和绝对回收率。结果高、中、低浓度日内精密度 RSD 分别为 $3.37\%, 2.59\%, 6.55\%$ 。日间精密度 RSD 分别为 $2.42\%, 2.26\%, 3.98\%$ 。绝对回收率分别为 $(73.28 \pm 3.37)\%, (73.30 \pm 2.59)\%, (78.53 \pm 6.55)\%$,平均回收率为 75.04% 。相对回收率分别为 $(96.16 \pm 3.37)\%, (100.26 \pm 2.59)\%, (115.07 \pm 6.55)\%$ 。

2.7.4 阿魏酸 按照“2.6.4”项制备阿魏酸高浓度为 $0.50, 0.10, 0.02 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的样品溶液,每个浓度平行制备5份,同“2.7.1”项测定并计算日内精密度、日间精密度、相对回收率和绝对回收率。结果高、中、低浓度日内精密度 RSD 分别为 $5.85\%, 5.60\%, 6.50\%$ 。

日间精密度的 RSD 分别为 $2.66\%, 2.51\%, 2.81\%$ 。绝对回收率分别为 $(71.69 \pm 5.85)\%, (70.21 \pm 5.60)\%, (61.11 \pm 6.50)\%$,平均回收率为 67.67% 。相对回收率分别为 $(96.16 \pm 5.85)\%, (96.01 \pm 5.60)\%, (93.69 \pm 6.50)\%$ 。

2.7.5 吉马酮加样回收率 称取已知含量的浓缩乳腺丸供试品6份,每份5g,精密称定,分别加入吉马酮对照品 0.10 mg 。按“2.2.1”项方法处理,测定含量并计算加样回收率。结果平均加样回收率为 $(105.08 \pm 5.90)\%$,RSD 为 5.61% ,见表1。

表1 吉马酮加样回收率实验结果
Tab.1 Recovery of germacrone

取样量/ g	原有量		加入量		测得量	回收率/ %
	mg		mg			
4.997 6	0.107 8	0.100 0	0.100 0	0.214 8	107.00	
5.000 1	0.109 4	0.100 0	0.100 0	0.216 8	107.40	
4.982 3	0.106 3	0.100 0	0.100 0	0.212 4	106.10	
5.007 8	0.109 9	0.100 0	0.100 0	0.217 5	107.60	
5.109 6	0.110 1	0.100 0	0.100 0	0.219 3	109.20	
4.967 2	0.102 5	0.100 0	0.100 0	0.195 7	93.20	

2.7.6 芍药苷加样回收率 称取已知含量的浓缩乳腺丸供试品6份,每份0.1g精密称定,分别加入芍药苷对照品 0.40 mg 。按“2.2.2”项方法处理,之后测定含量并计算加样回收率。结果加样回收率为 $(104.94 \pm 2.90)\%$,RSD 为 2.76% ,见表2。

表2 芍药苷加样回收率实验结果
Tab.2 Recovery of peoniflorin

取样量/ g	原有量		加入量		测得量	回收率/ %
	mg		mg			
0.105 5	0.442 5	0.400 0	0.400 0	0.876 0	108.38	
0.103 9	0.439 8	0.400 0	0.400 0	0.862 0	105.55	
0.102 1	0.431 3	0.400 0	0.400 0	0.858 0	106.68	
0.099 6	0.409 9	0.400 0	0.400 0	0.813 0	100.78	
0.100 4	0.418 5	0.400 0	0.400 0	0.827 0	102.13	
0.101 7	0.427 6	0.400 0	0.400 0	0.852 0	106.10	

2.7.7 柴胡皂苷(d)加样回收率 称取已知含量的浓缩乳腺丸供试品6份,每份1g,精密称定,分别加入柴胡皂苷(d)对照品 $25.0 \mu\text{g}$ 。按“2.2.3”项方法处理,之后测定含量并计算加样回收率。结果加样回收率为 $(95.01 \pm 1.90)\%$,RSD 为 2.00% ,见表3。

2.7.8 阿魏酸加样回收率 称取已知含量的浓缩乳腺丸供试品6份,每份1g,精密称定,分别加入阿魏酸对照品 0.10 mg 。按“2.2.4”项方法处理,之后测定含

量并计算加样回收率。结果加样回收率为 $(104.78 \pm 3.70)\%$, RSD 为 3.53%, 见表 4。

表 3 柴胡皂苷(d)加样回收率实验结果

Tab.3 Recovery of saikoside (d)

取样量/ g	原有量 μg	加入量 μg	测得量 μg	回收率/ %
1.004 5	25.72	25.00	50.14	97.68
1.004 4	25.71	25.00	49.94	96.92
1.052 3	26.94	25.00	50.67	94.92
1.008 9	25.83	25.00	49.24	93.64
0.952 9	24.39	25.00	47.85	93.84
1.038 7	26.59	25.00	49.85	93.04

表 4 阿魏酸加样回收率实验结果

Tab.4 Recovery of ferulic acid

取样量/ g	原有量 mg	加入量 mg	测得量 mg	回收率/ %
0.998 7	0.102 4	0.100 0	0.208 5	106.10
1.000 4	0.104 0	0.100 0	0.208 6	104.60
1.058 3	0.108 5	0.100 0	0.212 9	104.40
1.001 7	0.104 8	0.100 0	0.208 2	103.40
0.959 9	0.100 7	0.100 0	0.207 3	106.60
1.059 0	0.108 7	0.100 0	0.212 3	103.60

2.8 稳定性实验 同一供试品溶液在室温放置条件下,在 24 h 内不同时间分别测定吉马酮、芍药苷、柴胡皂苷(d)、阿魏酸的峰面积,计算 RSD 值。结果 RSD 值均 $<8\%$, 供试品溶液在室温条件下放置 24 h 稳定。

2.9 样品含量测定 取浓缩乳腺丸 3 批,按“2.2”项方法处理,按上述色谱条件测定并计算含量,结果见表 5。

3 讨论

3.1 流动相的选择 根据文献,吉马酮的流动相曾选择 40% 乙腈^[6],对照品在约 33 min 出峰,供试品没有出峰。之后更换流动相为乙腈:磷酸水溶液(50:50, pH 2.82),峰的分度不好;将 pH 调到 3.23,出现较好的峰形,经光谱图和保留时间一致确定此峰为吉

马酮的色谱峰。曾采用 60% 甲醇作为芍药苷流动相,出峰时间太短;选用《中华人民共和国药典》方法,甲醇:磷酸二氢钾 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (40:65) 供试品样品液中没有出现相应的色谱峰。最终选择 25% 甲醇作为流动相,有较好的峰形及适宜的保留时间,且供试品的光谱图与对照品相一致。

浓缩乳腺丸由十三味中药饮片制得,成分比较复杂,并且所测定的有效成分的极性相差特别大,且在实验中尝试用一种流动相进行分离,未得到较好分离效果,分离度 <1.5 。所以未选用同一种流动相测定浓缩乳腺丸中吉马酮、芍药苷、柴胡皂苷(d)、阿魏酸 4 种有效成分的含量。

3.2 检测波长的选择 芍药苷在选择检测波长时,采用紫外分光光度法在 200 ~ 400 nm 扫描吸收光谱,结果表明芍药苷在 230 nm 处有最大吸收,与文献一致,故选定 230 nm 为检测波长。

3.3 提取溶剂的选择 在提取溶剂的选择上,由于吉马酮是莪术挥发油中的成分,易溶于乙醚,因此采用乙醚作为提取溶剂超声提取,能够得到较好的提取效果。由于柴胡皂苷(d)在提取过程中受酚类或酸性成分的影响,易使环氧醚键开环,转化为柴胡皂苷 b1、b2,因而通常采用弱碱性溶剂提取原生柴胡皂苷(d)。本实验通过提取方法比较,选择了 5% 氨水甲醇溶液为提取溶剂,超声提取 30 min 两次的提取方法^[7]。

3.4 色谱峰的确定 在测定浓缩乳腺丸供试品中阿魏酸的含量时,由于环境变更或系统差异,供试品中各个色谱峰的保留时间有时会相对减少。在供试品色谱图中 18 min 附近有两个色谱峰,可能不容易确定哪一个是阿魏酸的色谱峰,通过以下两点可以确定时间较靠后一个色谱峰是阿魏酸的色谱峰,其一,18.88 min 时出现峰的光谱图与对照品几乎完全一致,在 323 nm 处有最大吸收,在 238.7 nm 处有次吸收,与 17 min 时出现峰的光谱图有很大差异。其二,在做加样回收率时,加入对照品,18.88 min 时峰高明显增高,峰面积变成 2 倍。

笔者采用反相 HPLC 测定了浓缩乳腺丸中吉马

表 5 样品含量测定结果

Tab.5 Results of content determination of samples

批号	吉马酮		芍药苷		柴胡皂苷		阿魏酸	
	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/ %	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/ %	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/ %	含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	RSD/ %
	20110812	39.88		8 536.16		56.08		260.04
20110818	39.04	1.07	8 476.96	0.35	55.64	0.55	253.24	1.39
20110824	39.56		8 500.32		56.24		258.60	

酮、芍药苷、柴胡皂苷(d)和阿魏酸的含量,并进行了方法学考察,结果表明此法可行,重复性良好,可用于该制剂的质量控制。

参考文献

[1] 赵建学,郭海燕,陆玮婷,等. 芍药苷对肝纤维化模型大鼠血清 TNF- α 、IL-6 与 IL-10 的影响[J]. 医药导报,2010,29(2):168-170.

[2] 胡铁娟,浦锦宝,梁卫青,等. 柴胡提取物中柴胡皂苷 d 及总皂苷的含量测定[J]. 中国中医药科技,2011,18(1):46-47.

[3] 夏明,董晓烨. 当归养血丸中阿魏酸的含量测定[J]. 医药

导报,2010,29(1):103-104.

[4] 梁娜,孙少平,刘斌,等. 阿魏酸的研究进展[J]. 黑龙江中医药,2009,52(3):39-40.

[5] 赵子明,曹英莉. 高效液相色谱法测定浓缩当归丸中阿魏酸含量[J]. 中国药业,2010,19(10):30.

[6] 刘金英,阙伟东,戴诗文. 温莪术药材中的桉牛儿酮含量测定[J]. 中国医药指南,2009,15(7):86-87.

[7] 刘伟,董诚明,范婷,等. 正交实验法优选柴胡中柴胡皂苷提取工艺[J]. 中国医院药学杂志,2008,28(16):1350-1352.

DOI 10.3870/yydb.2012.06.040

高效液相色谱法测定眩痛定胶囊中天麻素的含量

王芳,雷健,胡雪莲,曹健

(第三军医大学新桥医院药学部,重庆 400037)

摘要 目的 建立高效液相色谱法测定眩痛定胶囊中天麻素的含量。方法 采用 Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μ m),流动相为乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97),检测波长为 220 nm,流速 0.8 mL \cdot min⁻¹,柱温 25 $^{\circ}$ C。结果 天麻素质量浓度在 10.38~31.14 μ g \cdot mL⁻¹ 范围内与峰面积线性关系良好, $r=0.9999(n=5)$;平均回收率为 99.45%,RSD=2.11%($n=9$)。结论 该方法重复性好,简便易行,可用于眩痛定胶囊的质量控制。

关键词 眩痛定胶囊;天麻素;色谱法,高效液相;含量测定

中图分类号 R286;R927.2 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2012)06-0798-02

眩痛定胶囊是我院研制的非标准制剂,由天麻、白芷、元胡、白术、全蝎、蒿本、川芎等 7 味中药材经加工制成的复方制剂,具有镇痉息风、通络镇痛等功效,临床主要用于治疗眩晕、头痛以及各种原因引起的周围神经痛和关节肌肉痛等症。为控制胶囊质量,笔者以方中君药天麻的主要成分天麻素为指标,参考文献[1-4],采用高效液相色谱法测定眩痛定胶囊中天麻素含量,现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Waters 600 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),ME235s 型电子天平(德国 Sartorius),CSF-1A 型超声波发生器(上海超声波仪器厂)。

1.2 试药 天麻素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110807-200205),眩痛定胶囊(每粒 0.45 g,本院自制,批号:100220,101013,110919),缺天麻的阴

性对照胶囊(自制),乙腈为色谱纯,水为超纯水(自制),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil ODS 柱(4.6 mm \times 150 mm,5 μ m);流动相:乙腈-0.05% 磷酸溶液(3:97);检测波长:220 nm;流速:0.8 mL \cdot min⁻¹;柱温:25 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取天麻素对照品 5.21 mg,置 50 mL 量瓶,用乙腈-水(3:97)混合溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 2 mL 置 10 mL 量瓶,用乙腈-水(3:97)混合溶液稀释至刻度,即得 0.020 8 mg \cdot mL⁻¹天麻素对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品 10 粒,精密称定,取胶囊内容物,研细,精密称取细粉约 1.0 g,置具塞锥形瓶中,精密加稀乙醇 30 mL,密塞,称定质量,浸泡 1 h,超声处理 40 min,放冷,称定质量,用稀乙醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液 10 mL,浓缩至近干,残渣用乙腈-水(3:97)混合溶液溶解转移至 10 mL 量瓶中,并用乙腈-水(3:97)混合溶液定容至刻度,摇匀,以孔径 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤

收稿日期 2011-11-10 修回日期 2012-01-12

作者简介 王芳(1967-),女,重庆人,药师,主要从事药品检验工作。电话:023-68774712,E-mail:wf1216868@163.com。

通讯作者 曹健(1968-),女,重庆人,副主任药师,主要从事药品检验工作。电话:023-68774712,E-mail:gdy007@mail.

tmmu.com.cn。