

四甲丸质量标准定量方法研究

邓曼静, 郭红玲, 肖克岳

(湖南省长沙市中医医院/长沙市第八医院, 湖南 长沙, 410001)

[摘要] 目的: 建立四甲丸中2种活性成分哈巴俄苷、肉桂酸的含量测定方法。方法: 色谱条件为C18色谱柱(4.6mm×250mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-1%醋酸水溶液, 体积比为25:75, 等度洗脱; 流速: 1mL/min, 柱温: 25℃; 检测波长: 278nm。结果: 在该色谱条件下, 哈巴俄苷、肉桂酸分离良好, 质量浓度分别在5.36~134.06 μ g/mL($r=0.9999$)、5.28~131.95 μ g/mL($r=0.9997$)时, 与其峰面积线性关系良好。加样回收率分别为103.6%(1.20%)、100.4%(1.30%)($n=6$)。结论: 本试验所建立的方法简便、准确、重复性好, 可用于四甲丸的质量控制。

[关键词] 四甲丸; 哈巴俄苷; 肉桂酸; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.10.074

A quantitative method for the quality control of Sijia pills

DENG Man-jing, GUO Hong-ling, XIAO Ke-yue

(Changsha Hospital of Traditional Chinese Medicine/Changsha Eighth Hospital, Changsha 410001, Hunan, China)

Abstract: Objective: To investigate the method for content determination of two active components, harpagoside and cinnamic acid, in Sijia pills. Methods: High-performance liquid chromatography was performed on a C18 column(4.6mm×250mm, 5 μ m) with a mobile phase of acetonitrile-1% acetic acid solution(V/V 25:75) for isocratic elution, at a flow rate of 1mL/min, a column temperature of 25℃, and a detection wavelength of 278nm. Results: Under such chromatographic conditions, harpagoside and cinnamic acid were well isolated, with a good linear relationship with peak area at a mass concentration of 5.36~134.06 μ g/mL($r=0.9999$) and 5.28~131.95 μ g/mL($r=0.9997$), respectively. The average recovery rate was 103.6%(1.20%) and 100.4%(1.30%), respectively($n=6$). Conclusion: The method established in this study is simple, convenient, and accurate, with good repeatability, and can be used for the quality control of Sijia pills.

Key words: Sijia pills; harpagoside; cinnamic acid; content determination

四甲丸由龟甲、鳖甲、浙贝母、玄参、蒺藜、珍珠母、牡蛎、黄药子8味药组成, 具有滋阴降火、软坚散结消瘿之功效, 主要用于阴虚火旺型甲亢的治疗^[1-3]。该处方是我院临床使用二十余年的经验方, 效果显著, 无毒副作用。本课题组前期已对其质量控制进行了定性研究, 为提高医院制剂质量, 使其质量更安全可控, 现对其质量控制进行定量研究。玄参为方中臣药, 具有清热凉血、滋阴降火、软坚散结的功效^[4], 为方中主要成分之一, 哈巴俄苷与肉桂酸是玄参主要的指标性成分, 且为玄参滋阴降火、软坚散结的主要活性成分, 肉桂酸还具有诱导分化肿瘤细胞的作用^[5-7]。本课题组通过研究建立了反相高效液相法测定四甲丸中哈巴俄苷、肉桂酸的定量方法, 现报告如下。

1 仪器与试剂

岛津LC-20AT型高效液相色谱仪(配备二元泵、手

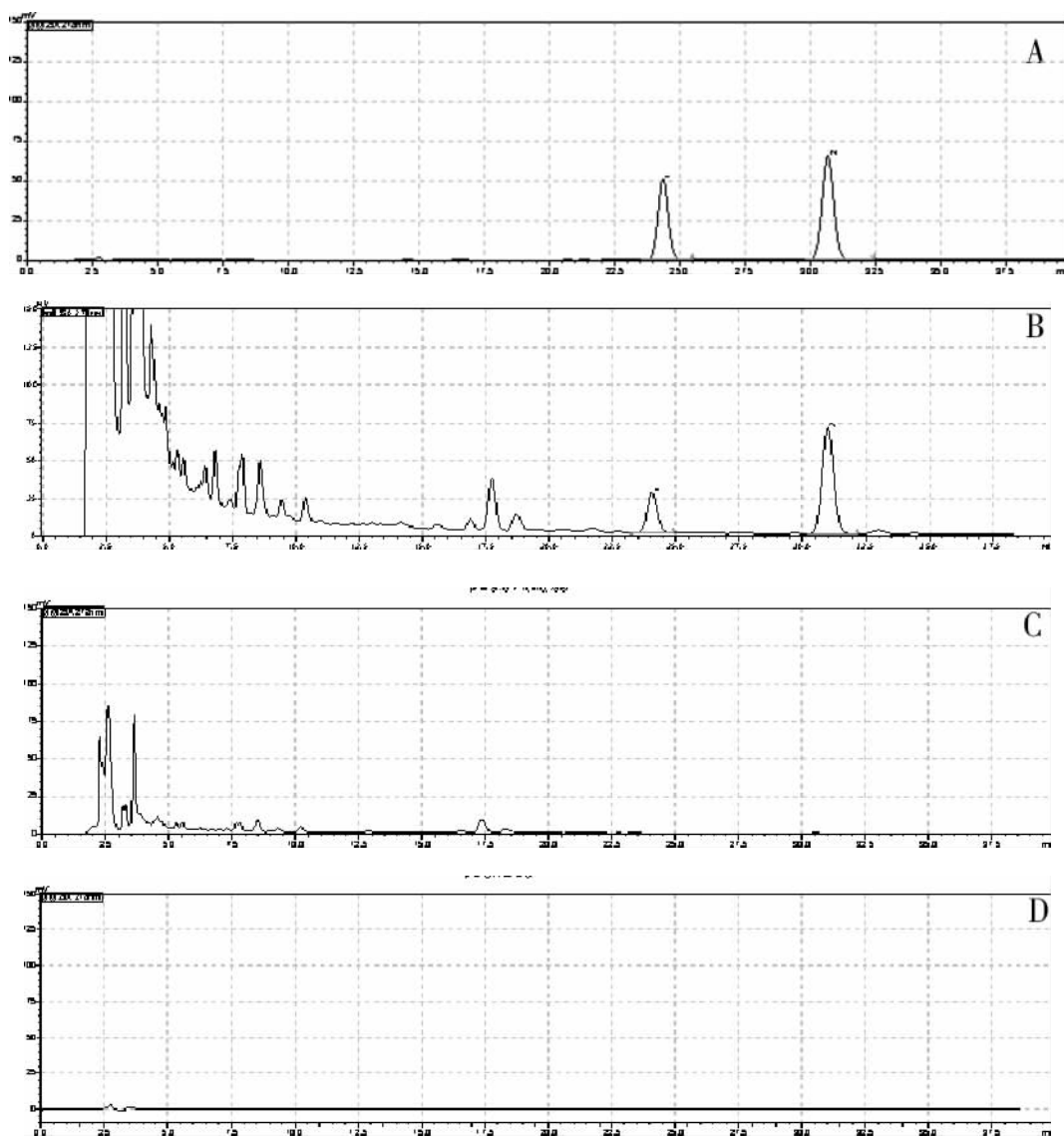
动进样、SPD-20A型单波长紫外检测器, 岛津色谱工作站); KQ-250DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器厂) ME204E型分析天平(梅特勒-托利多)。哈巴俄苷对照品(批号: 111730-201307)、肉桂酸对照品(批号: 110786-200503)均由中国食品药品检定研究院提供; 四甲丸(批号: 20140916、20141123、20150323、20150627)为本院制剂; 甲醇、乙腈均为色谱纯, 醋酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Phenomen C₁₈柱(4.6mm×250mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-1%醋酸水溶液, 体积比为25:75, 等度洗脱; 流速: 1mL/min, 柱温: 25℃; 检测波长: 278nm, 进样量10 μ L。该色谱系统条件下所测组分分离度良好, 理论塔板数按哈巴俄苷计不得低于5000。色谱图见图1。

基金项目: 湖南省中医药管理局重点资助项目(编号: 201324)

第一作者: 邓曼静, 女, 主任中药师, 研究方向: 医院药事管理与制剂研究, 中药养生与保健



A—对照品溶液;B—样品溶液;C—缺玄参阴性对照溶液;D—甲醇空白溶液

1—哈巴俄苷; 2—肉桂酸

图1 HPLC 图

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品储备液制备 (1)哈巴俄苷储备液制备。精密称取哈巴俄苷对照品 10.0mg 置于 10mL 容量瓶中,用 80% 甲醇溶液定容后,摇匀,配置成 1.0mg/mL 的对照品储备液。(2)肉桂酸储备液制备。精密称取肉桂酸对照品 10.0mg 置于 10mL 容量瓶中,用 80% 甲醇溶液定容后,摇匀,配置成 1.0mg/mL 的对照品储备液。

2.2.2 混合对照品溶液制备 分别精密量取“2.2.1”项下 2 种对照品储备液各 0.2mL,置于同一 10mL 容量瓶中,用 80% 甲醇定容,摇匀,制备成含哈巴俄苷 26.812 μ g/mL、肉桂酸 26.390 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液制备 取供试品(批号:20141122)约

10g,精密称定后,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇,称定重量。静置 1h 后,超声处理(500W,频率 40kHz)30min,冷却后,精密称定重量,用 80% 甲醇补足减失重量,过滤,取滤液用 0.45 μ m 微孔滤器过滤,即得。

2.2.4 阴性对照溶液制备 按四甲丸处方比例称取除玄参外其余各药味,按四甲丸制备工艺制备阴性样品。其余按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验 分别精密吸取 10 μ L 混合对照品溶液、供试品溶液、缺玄参阴性对照溶液、甲醇空白对照溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,结果在与哈巴俄苷、肉桂酸对照品色谱图相应保留时间处,玄参阴性对照溶液、甲醇空白溶液色谱图中均未显示哈巴俄苷、肉桂酸吸收峰。

2.4 线性关系 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液 2、5、8、10、12、15、20、50 μ L 进样,按“2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积值。分别以哈巴俄苷、肉桂酸峰面积值为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X)轴,得哈巴俄苷回归线方程为: $Y = 26227.3X - 4094.39$ ($r = 0.9999$),线性范围为 5.36 – 134.06 μ g/mL,;肉桂酸回归线方程为: $Y = 87906.9X - 154353$ ($r = 0.9997$),线性范围为 5.28 ~ 131.95 μ g/mL,在各自线性范围内与峰面积线性关系良好。

2.5 精密度试验 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液 10 μ L,在“2.1”色谱条件下连续进样 6 次,记录峰面积值,结果哈巴俄苷与肉桂酸峰面积 RSD 值分别为 0.3%、0.2%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一供试品(批号:20141122),平行称取 6 份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件测定,结果哈巴俄苷、肉桂酸峰面积 RSD 值分别为 2.7%、2.4%。结果表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品(批号:20141122)溶液,分别于 0、2、4、8、12h 按“2.1”项下色谱条件测定,记录峰面积值,结果哈巴俄苷、肉桂酸峰面积 RSD 值分别为 0.7%、0.8%。结果表明哈巴俄苷溶液、肉桂酸溶液在 12h 内稳定性均良好。

2.8 加样回收率试验 平行称取已知含量的同一批样品(批号:20141122)6 份,每份重约 5.0g,分别加入哈巴俄苷对照品储备液与肉桂酸对照品储备液各 0.2mL,其余按“2.2.3”项下方法制备加样供试品溶液。按“2.1”项下色谱条件测定,计算各组分加样回收率。结果见表 1。

表 1 哈巴俄苷、肉桂酸加样回收率试验结果 (n = 6)

成分	取样量 (g)	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
哈巴俄苷	5.1089	0.54971	0.6703	1.25515	105.2	103.6	1.2
	5.0994	0.5487	0.6703	1.24120	103.3		
	5.0785	0.5464	0.6703	1.23135	102.2		
	5.0809	0.5467	0.6703	1.24220	103.8		
	5.1058	0.5494	0.6703	1.25350	105.0		
	5.0456	0.5429	0.6703	1.22845	102.3		
肉桂酸	5.1089	0.5937	0.6596	1.26760	102.2	100.4	1.3
	5.0994	0.5926	0.6596	1.25600	100.3		
	5.0785	0.5901	0.6596	1.24355	99.1		
	5.0809	0.5904	0.6596	1.25280	100.4		
	5.1058	0.5933	0.6596	1.26405	101.7		
	5.0456	0.5863	0.6596	1.23975	99.1		

2.9 样品含量测定 取 3 批样品(批号:20140916、20150326、20150627)分别平行称取 2 份,按“2.2.3”项下方法制备样品含量测定供试溶液,按“2.1”项下色谱方法测定哈巴俄苷与肉桂酸含量,结果见表 2。

表 2 3 批样品含量测定结果 (n = 6)

批号	哈巴俄苷 (mg/g)	肉桂酸 (mg/g)
20150116	0.1338	0.0769
20150326	0.1294	0.0744
20150627	0.1214	0.0636

3 讨 论

3.1 检测波长的选择 通过文献查阅^[8-10],取“2.2.1”项下对照品储备液稀释后,置紫外-可见分光光度仪中,于 190 ~ 400nm 范围内扫描,结果显示哈巴俄苷在 280nm、肉桂酸在 279nm 处有最大吸收峰,结合文献,故选择 2010 版《中国药典》中的检测波长 278nm。

3.2 流动相的选择优化 在选定测定四甲丸中玄参中哈巴俄苷与肉桂酸含量作为定量指标成分后,其采用高效液相测定时,流动相主要有乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸溶液等^[10],但在此条件下,色谱出峰均不理想,且采用乙腈-0.1% 磷酸溶液做流动相时,基线漂移严重,对测定结果干扰较大。故最后优选用乙腈-1% 醋酸溶液,体积比为 25:75 等度洗脱,该条件下 2 种化合物与杂质均能达到良好分离,且基线较好,阴性对照无干扰。

3.3 提取溶剂的选择 本实验分别采用 50% 甲醇、80% 甲醇、甲醇提取,结果发现 80% 甲醇提取较完全,且在哈巴俄苷与肉桂酸色谱峰处干扰较少,与其他杂质分离较好,故选择用 80% 甲醇静置 1h、超声处理 30min 制备样品溶液。

参考文献

[1] 蔡进. 自拟四甲丸治疗甲状腺机能亢进症 128 例[J]. 光明中医,2004,19(4):66.

[2] 蔡进. 中西医结合治疗甲状腺机能亢进症 132 例总结[J]. 湖南中医杂志,2006,22(3):20-21.

[3] 蔡进. 四甲丸治疗甲状腺功能亢进症 40 例[J]. 湖南中医杂志,1994,10(2):57.

[4] 胡北,马宏达,赵庆春,等. HPLC 法测定参芪养心滴丸中哈巴俄苷和肉桂酸含量[J]. 中国药师,2012,15(12):1703-1705.

[5] 李文兰,杜娟,季宇彬,等. 肉桂酸的代谢与 CYP450 酶的相关性研究[J]. 中国药理学杂志,2009,44(4):266-270.

[6] 闫华,杨建国,梁华定,等. 肉桂酸与牛血清白蛋白相互作用及酒精的影响[J]. 物理化学学报,2008,24(3):543-546.

[7] 常惠礼. HPLC 测定舒脉通胶囊中肉桂酸含量及不确定度评定[J]. 中国中医药导报,2014,11(21):96-98.

[8] 卞晓霞,罗跃娥,闫利华. 一测多评法同步测定玄参药材中 2 种环烯醚萜类成分的含量[J]. 天津中医药大学学报,2014,33(2):98-100.

[9] 刘宾,梁晨,徐思思,等. 不同产地玄参饮片哈巴苷与哈巴俄苷含量比较[J]. 时珍国医国药,2014,25(3):555-556.

[10] 焦豪研,杨燕军,徐吉银,等. HPLC 法同时测定玄参破壁粉粒中哈巴俄苷和肉桂酸的含量[J]. 海峡药学,2011,23(10):71-72.

(收稿日期:2017-08-08)