中图分类号：R917；R927　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2023)22－0099－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2023.22.023

高效液相色谱法同时测定摩罗丹中 5 种成分含量

张汶婕，宗　镇，吴　陵

（安徽省铜陵市食品药品检验中心，安徽 铜陵　244000）

摘要：目的　建立同时测定摩罗丹中 5 种成分含量的高效液相色谱法。**方法**　色谱柱为 Agilent Eclipse XDB－C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相为乙腈－0.05% 磷酸水溶液(梯度洗脱)，流速为 1.0 mL/min，检测波长分别为 210 nm(哈巴苷)、230 nm(芍药苷)、280 nm(延胡索乙素、哈巴俄苷)、203 nm(人参皂苷 Rb_1)，柱温为 20 ℃，进样量为 10 μL。**结果**　哈巴苷、芍药苷、延胡索乙素、哈巴俄苷、人参皂苷 Rb_1 质量浓度分别在 0.34～3.77 μg/mL(r=0.999 4)、41.32～454.54 μg/mL(r=1.000 0)、1.41～15.52 μg/mL(r=0.999 8)、2.02～22.24 μg/mL(r=0.999 7)、72.19～794.13 μg/mL(r=0.999 9)范围内与峰面积线性关系良好(n=6)；检测限分别为 0.06，0.20，0.30，0.20，0.40 μg/mL，定量限分别为 0.17，0.62，0.70，0.50，1.25 μg/mL；精密度、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 2.0%；平均加样回收率分别为 99.43%，99.85%，97.93%，98.61%，99.77%，*RSD* 分别为 1.38%，0.30%，2.04%，1.52%，0.53%(n=9)。**结论**　该方法操作简便、结果准确、重复性好，可用于同时测定摩罗丹中 5 种成分的含量。

关键词：摩罗丹；高效液相色谱法；波长切换法；哈巴苷；芍药苷；延胡索乙素；哈巴俄苷；人参皂苷 Rb_1；含量测定

Simultaneous Determination of Five Components in Moluo Dan by HPLC

ZHANG Wenjie, ZONG Zhen, WU Ling

(Food and Drug Inspection Center of Tongling, Tongling, Anhui, China　244000)

Abstract: Objective　To establish a high－performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of five components in Moluo Dan. **Methods**　The chromatographic column was Agilent Eclipse XDB－C_{18} column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile－0.05% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelengths were 210 nm (harpagide), 230 nm (paeoniflorin), 280 nm (tetrahydropalmatine, harpagoside) and 203 nm (ginsenoside Rb_1) respectively, the column temperature was 20 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results**　The linear ranges of harpagide, paeoniflorin, tetrahydropalmatine, harpagoside and ginsenoside Rb_1 were 0.34－3.77 μg/mL (r=0.999 4, n=6), 41.32－454.54 μg/mL (r=1.000 0, n=6), 1.41－15.52 μg/mL (r=0.999 8, n=6), 2.02－22.24 μg/mL (r=0.999 7, n=6), 72.19－794.13 μg/mL (r=0.999 9, n=6) respectively. The limits of detection (LOD) of the above five components were 0.06, 0.20, 0.30, 0.20, 0.40 μg/mL respectively, the limits of quantification (LOQ) of the above five components were 0.17, 0.62, 0.70, 0.50, 1.25 μg/mL respectively. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of the above five components were 99.43%, 99.85%, 97.93%, 98.61%, 99.77%, with *RSD*s of 1.38%, 0.30%, 2.04%, 1.52%, 0.53% (n=9) respectively. **Conclusion**　This method is simple, accurate and repeatable, which can be used for the simultaneous determination of the contents of five components in Moluo Dan.

Key words: Moluo Dan; HPLC; wavelength switching method; harpagide; paeoniflorin; tetrahydropalmatine; harpagoside; ginsenoside Rb_1; content determination

摩罗丹(分蜜丸与浓缩丸)由百合、茯苓、玄参等18味中药制成，有和胃降逆、健脾消胀、通络定痛功效，可用于治疗胃疼、胀满、痞闷等。其所含成分复杂，加之中药制剂所用药材和药材饮片因产地、采收季节、炮制方法等的不同易导致质量差异较大。现行质量标准[1－2]仅针对其成分延胡索和延胡索乙素设置了薄层色谱鉴别项，文献[3－4]增加了麦冬、人参皂苷 Rg_1、没食子酸、当归、川芎的薄层色谱鉴别项，但仅对芍药苷进行了定量研究，难以有效控制其整体质量。鉴于此，本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法同时测定摩罗丹中哈巴苷、哈巴俄苷、人参皂苷 Rb_1、芍药苷、延胡索乙素的含量，以为全面评价该制剂质量提供参考。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Thermo U3000 型高效液相色谱仪[配有二极管阵列检测器(DAD)，美国 Thermo Fisher Scientific 公司]；XSE205型电子天平(瑞士MettlerToledo公司)；KH5200B型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司)。

第一作者：张汶婕，女，硕士研究生，主管药师，研究方向为中药质量检验，(电子信箱)365022859@qq.com。

1.2 试药

摩罗丹（邯郸制药股份有限公司，批号分别为00422126，00321015，00122021的产品为大蜜丸，规格为每丸9 g，批号为S00320142的产品为小蜜丸，规格为每55粒9 g）；哈巴苷对照品（批号为111729－201707，含量96.8%），芍药苷对照品（批号为110736－202145，含量94.6%），延胡索乙素对照品（批号为110726－202020，含量99.3%），哈巴俄苷对照品（批号为111730－202110，含量96.8%），人参皂苷 Rb_1 对照品（批号为110704－201223，含量95.9%），均购于中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈均为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Agilent Eclipse XDB－C_{18} 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：乙腈（A）－0.05%磷酸水溶液（B）[5－10]，梯度洗脱（0～10 min时3%A，10～11 min时3%A → 15%A，11～15 min时15%A，15～30 min时15%A → 20%A，30～40 min时20%A → 25%A，40～47 min时25%A，47～70 min时25%A → 36%A，70～75 min时36%A → 3%A）；流速：1.0 mL/min；检测波长：0～12 min时210 nm（哈巴苷），12～26 min时230 nm（芍药苷），26～55 min时280 nm（延胡索乙素、哈巴俄苷），55～75 min时203 nm（人参皂苷 Rb_1）[11]；柱温：20 ℃；进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液：取各对照品适量，精密称定，加70%甲醇，制成分别含哈巴苷0.021 4 mg/mL、芍药苷2.582 6 mg/mL，延胡索乙素0.088 2 mg/mL，哈巴俄苷0.126 4 mg/mL，人参皂苷 Rb_1 4.512 1 mg/mL的混合对照品贮备液。精密量取2 mL，置25 mL容量瓶中，加70%甲醇定容，制成含哈巴苷1.712 μg/mL、芍药苷206.6 μg/mL、延胡索乙素7.056 μg/mL、哈巴俄苷10.11 μg/mL、人参皂苷 Rb_1 361.0 μg/mL的混合对照品溶液。

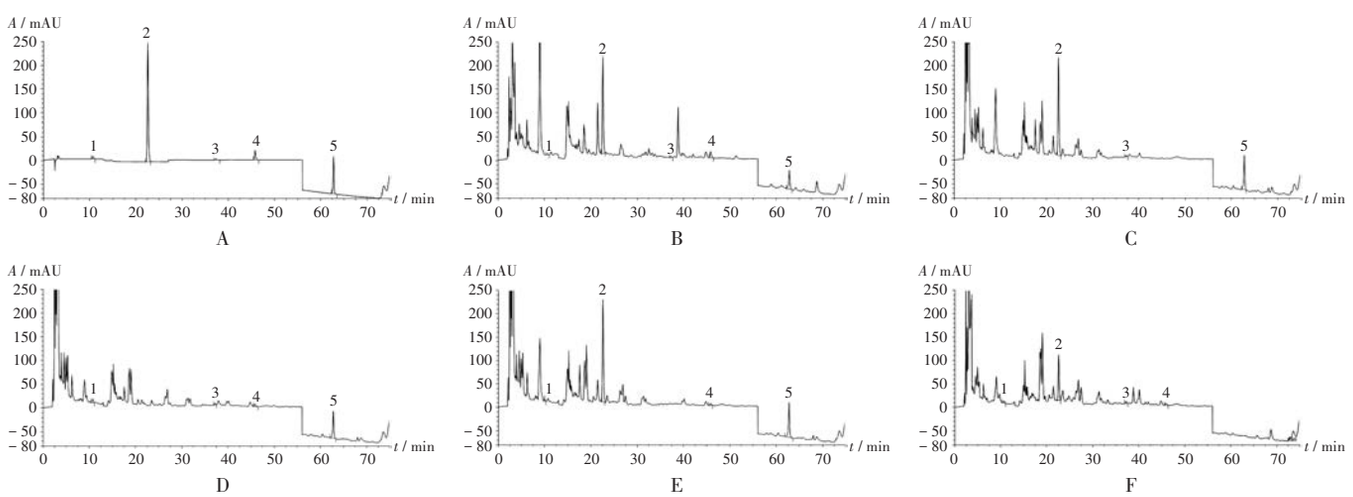
供试品溶液：取样品（剪碎）约5.0 g，精密称定，精密加入70%甲醇25 mL，称定质量，超声（功率200 W、频率40 kHz）处理45 min，室温放冷，再次称定质量，用70%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

阴性对照品溶液：按摩罗丹处方及工艺分别制备缺玄参、白芍、延胡索、三七的单一阴性样品，按供试品溶液制备方法制备相应阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验和专属性试验：分别取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果供试品溶液色谱图，在与混合对照品溶液色谱图相同保留时间处有相应色谱峰；5种成分色谱峰分离度均大于1.5，理论板数均大于5 000，且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察：精密量取2.2项下混合对照品贮备液0.4，1.2，2.0，2.8，3.6，4.4 mL，分别置25 mL容量瓶中，加70%甲醇定容，得系列混合对照品溶液。各取



1. 哈巴苷　2. 芍药苷　3. 延胡索乙素　4. 哈巴俄苷　5. 人参皂苷 Rb_1

A. 混合对照品溶液　B. 供试品溶液　C－F. 阴性对照品溶液（分别缺玄参、白芍、延胡索、三七）

图1 高效液相色谱图

1. Harpagide　2. Paeoniflorin　3. Tetrahydropalmatine　4. Harpagoside　5. Ginsenoside Rb_1

A. Mixed reference solution　B. Test solution　C－F. Negative reference solution (lacking Scrophulariae Radix, Paeoniae Radix Alba, Corydalis Rhizoma and Notoginseng Radix et Rhizoma, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表 1 线性关系及检测限、定量限考察结果（$n=6$）

Tab. 1 Results of the linear relation test, LOD and LOQ ($n=6$)

待测成分	回归方程	r	线性范围（μg/mL）	检测限（μg/mL）	定量限（μg/mL）
哈巴苷	$Y_1=16.507X_1+2.3029$	0.9994	0.34～3.77	0.06	0.17
芍药苷	$Y_2=14.346X_2-11.328$	1.0000	41.32～454.54	0.20	0.62
延胡索乙素	$Y_3=9.1837X_3+0.9933$	0.9998	1.41～15.52	0.30	0.70
哈巴俄苷	$Y_4=25.843X_4+13.798$	0.9997	2.02～22.24	0.20	0.50
人参皂苷 Rb_1	$Y_5=2.2773X_5-8.3871$	0.9999	72.19～794.13	0.40	1.25

10 μL，按 2.1 项下色谱条件进样测定，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，得回归方程与线性范围。结果见表 1。

检测限与定量限考察：精密量取 2.2 项下混合对照品溶液适量，逐步稀释，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以信噪比（S/N）分别约为 3∶1 和 10∶1 时待测成分质量浓度记为检测限和定量限。结果见表 1。

精密度试验：取 2.2 项下混合对照品溶液适量，按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。结果哈巴苷、芍药苷、延胡索乙素、哈巴俄苷、人参皂苷 Rb_1 峰面积的 *RSD* 分别为 0.79%，0.42%，1.10%，1.30%，0.56%（$n=6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取供试品（批号为 00422126）溶液适量，分别于室温下放置 0，4，8，12，16，24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果哈巴苷、芍药苷、延胡索乙素、哈巴俄苷、人参皂苷 Rb_1 峰面积的 *RSD* 分别为 1.90%，0.52%，1.00%，1.70%，0.88%（$n=6$），表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验：取同一批（批号为 00422126）样品 6 份，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算样品含量。结果哈巴苷、芍药苷、延胡索乙素、哈巴俄苷、人参皂苷 Rb_1 的平均含量分别为 0.0088，1.10，0.036，0.051，1.74 mg/g，*RSD* 分别为 1.20%，0.88%，1.50%，1.40%，1.10%（$n=6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：将已知含量的样品（批号为 00422126）剪碎，取 9 份，每份约 2.5 g，精密称定，分别精密加入 2.2 项下混合对照品贮备液 0.5，1.0，1.5 mL，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果（$n=9$）

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=9$)

待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
哈巴苷	2.5032	0.0220	0.0107	0.0323	96.26		
	2.5066	0.0221	0.0107	0.0329	100.93		
	2.5010	0.0220	0.0107	0.0327	100.00		
	2.5023	0.0220	0.0214	0.0433	99.53		
	2.5129	0.0221	0.0214	0.0436	100.47	99.43	1.38
	2.5050	0.0220	0.0214	0.0433	99.53		
	2.5101	0.0221	0.0321	0.0538	98.75		
	2.5249	0.0222	0.0321	0.0540	99.07		
	2.5099	0.0221	0.0321	0.0543	100.31		
芍药苷	2.5032	2.7535	1.2913	4.0452	100.03		
	2.5066	2.7573	1.2913	4.0459	99.79		
	2.5010	2.7511	1.2913	4.0442	100.14		
	2.5023	2.7525	2.5826	5.3296	99.79		
	2.5129	2.7642	2.5826	5.3510	100.16	99.85	0.30
	2.5050	2.7555	2.5826	5.3288	99.64		
	2.5101	2.7611	3.8739	6.6200	99.61		
	2.5249	2.7774	3.8739	6.6249	99.32		
	2.5099	2.7609	3.8739	6.6410	100.16		
延胡索乙素	2.5032	0.0901	0.0441	0.1321	95.24		
	2.5066	0.0902	0.0441	0.1334	97.96		
	2.5010	0.0900	0.0441	0.1340	99.77		
	2.5023	0.0901	0.0882	0.1739	95.01		
	2.5129	0.0905	0.0882	0.1788	100.11	97.93	2.04
	2.5050	0.0902	0.0882	0.1762	98.21		
	2.5101	0.0904	0.1323	0.2183	96.67		
	2.5249	0.0909	0.1323	0.2235	100.23		
	2.5099	0.0904	0.1323	0.2212	98.87		
哈巴俄苷	2.5032	0.1277	0.0632	0.1900	98.58		
	2.5066	0.1278	0.0632	0.1911	100.16		
	2.5010	0.1276	0.0632	0.1893	97.63		
	2.5023	0.1276	0.1264	0.2533	99.45		
	2.5129	0.1282	0.1264	0.2525	98.34	98.61	1.52
	2.5050	0.1278	0.1264	0.2556	101.11		
	2.5101	0.1280	0.1896	0.3101	96.04		
	2.5249	0.1288	0.1896	0.3157	98.58		
	2.5099	0.1280	0.1896	0.3131	97.63		
人参皂苷 Rb_1	2.5032	4.3556	2.2560	6.6062	99.76		
	2.5066	4.3615	2.2560	6.6011	99.27		
	2.5010	4.3517	2.2560	6.6105	100.12		
	2.5023	4.3540	4.5121	8.8818	100.35		
	2.5129	4.3724	4.5121	8.8801	99.90	99.77	0.53
	2.5050	4.3587	4.5121	8.8609	99.78		
	2.5101	4.3676	6.7682	11.1701	100.51		
	2.5249	4.3933	6.7682	11.0875	98.91		
	2.5099	4.3672	6.7682	11.0891	99.32		

2.4 样品含量测定

取4批样品各适量，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算5种成分的含量。结果见表3（－为未测出）。

表3 样品含量测定结果（mg/g，$n=3$）

Tab. 3 Results of content determination of five components in samples (mg/g, $n=3$)

批号	哈巴苷	芍药苷	延胡索乙素	哈巴俄苷	人参皂苷 Rb_1
00422126	0.008 8	1.10	0.036	0.051	1.74
00321015	0.002 7	1.19	0.038	0.031	1.82
00122021	0.011	1.00	0.020	0.045	0.70
S00320142	－	1.55	0.022	0.020	2.03

3 讨论

3.1 提取条件选择

预试验中分别比较了以50%，70%，100%甲醇和50%，70%，100%乙醇为提取溶剂时的提取效果。结果表明，与50%，100%甲醇比较，以70%甲醇提取时，更能兼顾到5种成分提取率，且杂质干扰少。还比较了浸泡过夜、索氏提取、超声提取（功率200 W，频率40 kHz）、加热回流法等提取方法，结果显示，浸泡过夜和索氏提取2种方法提取率均较低，超声提取法与加热回流法2种方法提取时各成分提取量无明显差异，而超声提取法更简便。最后考察提取时间，分别超声提取30，45，60 min，发现45 min时各成分可提取完全。因此，正式试验中对摩罗丹样品采用70%甲醇超声提取45 min。

3.2 指标成分选择

摩罗丹组方中，百合养阴润肺，麦冬养阴生津，石斛益胃生津，玄参滋阴降火，共为君药；蒲黄、三七止血，川芎、当归活血，茯苓、白术健脾，鸡内金健胃，共为臣药；地榆凉血止血，泽泻利水渗湿，茵陈清利湿热，九节菖蒲开窍化痰，共为佐药；白芍养血调经，乌药行气止痛，延胡索活血行气，共为使药。本研究中兼顾君臣佐使药，选取方中君药玄参主要活性成分哈巴苷、哈巴俄苷，臣药三七主要药效成分人参皂苷 Rb_1，以及使药白芍代表性成分芍药苷，延胡索主要药效成分延胡索乙素为定量研究指标成分，以全面评价摩罗丹的整体质量。

3.3 色谱条件选择

检测波长：预试验中以DAD检测器，在190～400 nm波长范围内扫描混合对照品溶液，测定各组分最大吸收波长，显示哈巴苷、人参皂苷 Rb_1 在203 nm，芍药苷在230 nm，哈巴俄苷在278 nm、延胡索乙素在282 nm波长处有最大吸收。哈巴苷的最大吸收波长属紫外末端吸收，影响定量准确性，故参考现行药典标准设定检测波长为210 nm。因282 nm与278 nm十分接近，考察后发现280 nm波长对定量无影响，故选取280 nm波长测定延胡索乙素和哈巴俄苷。

流动相：预试验中对甲醇－水、乙腈－水、甲醇－0.05%磷酸水溶液、乙腈－0.05%磷酸水溶液等流动相体系进行考察，结果显示，有机相为乙腈时洗脱能力强，基线更平稳，柱压较低，无机相中加入磷酸后，峰形和分离度均得到了改善。故选用乙腈－0.05%磷酸水溶液作为梯度洗脱的流动相。

柱温：在检测波长与流动相体系确定的情况下，柱温分别设定为20，30，40 ℃，结果显示，样品中最易受到杂质峰干扰的延胡索乙素及哈巴俄苷在20 ℃时分离度均最高，故柱温选择20 ℃。

3.4 含量分析

摩罗丹属中药成方保护品种，处方中各组分剂量和制法工艺未公开。故在预试验中对玄参饮片（购自北京同仁堂安徽连锁药店有限责任公司铜陵店）进行含量测定，结果哈巴苷含量为1.19 mg/g，哈巴俄苷含量为0.367 mg/g，差异较大。参考文献[12－15]，不同产地玄参所含哈巴苷或哈巴俄苷含量存在极显著差异，且不同加工方法也会导致两者含量有显著差异。摩罗丹与自购玄参饮片中哈巴苷、哈巴俄苷含量差异显著的原因可能在此。

3.5 方法评价

该方法操作简便，结果准确，重复性好，可用于同时测定摩罗丹中哈巴苷、芍药苷、延胡索乙素、哈巴俄苷、人参皂苷 Rb_1 的含量。

参考文献

[1] WS_3－B－3124－98，中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂（第十六册）—— 摩罗丹[S].
[2] WS_3－Bb－0099－95，中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂（第二十一册）—— 摩罗丹[S].
[3] 陈 刚，魏 梅. HPLC法测定摩罗丹中芍药苷的含量[J]. 安徽医药，2011，15(7)：845－846.
[4] 陈致憨，李春雷，霍志金. 摩罗丹质量标准及其检测方法：CN101109733[P]. 2008－01－23.
[5] 杨 帆，蒋丽娟，高艳艳，等. 基于对照品和对照提取物的2个含玄参复方和制剂定量研究[J]. 药物分析杂志，2022，42(10)：1838－1849.
[6] 杨晓彬，黄 勇，陈丹纯，等. 玄参配方颗粒含量测定和特征图谱测定方法研究[J]. 亚太传统医药，2022，18(3)：51－55.
[7] 范可青，凌 霞. 高效液相色谱－二极管阵列检测器法测定复方丹参片中12种成分及掺伪鉴别[J]. 分析测试技术与仪器，2022，28(3)：353－357.
[8] 李俊霞，刘 松，游秋霞. 高效液相色谱－一测多评法同时测定金佛止痛丸中8种成分含量[J]. 中国药业，2022，