

HPLC 法测定八味肾气丸中去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷

赵 婉, 刘 娜, 雷建林

西安交通大学第二附属医院, 陕西 西安 710004

摘要: 目的 建立同时测定八味肾气丸中去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇、桃叶珊瑚苷 4 个成分的高效液相色谱测定方法。方法 采用 Hypersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 0.1%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 0~18 min, 241 nm (去氢土莫酸); 18~50 min, 210 nm (茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷); 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL。结果 去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷分别在 3.35~67.00 μg/mL、3.50~70.00 μg/mL、3.07~61.40 μg/mL、3.25~65.00 μg/mL 线性良好, *r* 值均大于 0.999 0, 平均回收率分别为 96.72%、97.87%、98.21%、98.09%, RSD 值分别为 1.08%、0.95%、0.64%、1.22% (*n*=6)。结论 该方法简便, 结果准确, 可用于八味肾气丸中去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇、桃叶珊瑚苷的质量控制。

关键词: 八味肾气丸; 去氢土莫酸; 茯苓酸; 梓醇; 桃叶珊瑚苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2015)05 - 0523 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.05.010

Determination of dehydrotumulosic acid, pachymic acid, catalpol, and aucubin in Bawei Shenqi Pills by HPLC

ZHAO Wan, LIU Na, LEI Jian-lin

Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of dehydrotumulosic acid, pachymic acid, catalpol, and aucubin in Bawei Shenqi Pills. **Methods** The analysis was performed on Hypersil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile - 0.1% phosphoric acid solution as mobile phases for gradient elution. Detection with variable wavelength was used, and set at 241 nm for dehydrotumulosic acid, 210 nm for pachymic acid, catalpol, and aucubin. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 25 °C with injection volume of 20 μL. **Results** The calibration curve was linear over the concentration range of 3.35 — 67.00 μg/mL for dehydrotumulosic acid, 3.50 — 70.00 μg/mL for pachymic acid, 3.07 — 61.40 μg/mL for catalpol, and 3.25 — 65.00 μg/mL for aucubin, respectively. The correlation coefficients of all curves were above 0.999 0. The average recoveries were 96.72%, 97.87%, 98.21%, and 98.09% with RSD 1.08%, 0.95%, 0.64%, and 1.22% (*n*=6), respectively. **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be used in quantity control of dehydrotumulosic acid, pachymic acid, catalpol, and aucubin in Bawei Shenqi Pills.

Key words: Bawei Shenqi Pills; dehydrotumulosic acid; pachymic acid; catalpol; aucubin; HPLC

八味肾气丸由茯苓、熟地黄、山药 (麸炒)、五味子 (醋制)、肉桂、泽泻 (盐制)、附子 (制)、牡丹皮 8 味中药组成的复方制剂, 具有温补肾阳的功效, 用于肾阳不足、腰痛膝软、消渴水肿、肾虚咳嗽、小便频数、大便溏泻等的治疗^[1]。八味肾气丸治疗肾阴阳两虚型高血压的临床疗效显著^[2]。本品为黑褐色的大蜜丸, 气香, 味甜、微苦。原质量标准仅对其中的熟地黄进行了定性鉴别研究^[1]。为了

全面控制产品的有效性和质量一致性, 本实验以茯苓中的去氢土莫酸、茯苓酸和熟地黄中的梓醇、桃叶珊瑚苷作为指标性成分, 采用多波长 HPLC 梯度洗脱法对 4 种成分同时测定, 以控制八味肾气丸的产品质量, 为完善该制剂质量标准提供依据。

1 仪器与试药

安捷伦 1200 高效液相色谱仪, 包括 G1315B 可变波长检测器、Chemstation 色谱工作站; QSJ004

收稿日期: 2015-01-07

作者简介: 赵 婉 (1982—), 女, 主管药师, 本科, 从事医院药学和药物检验分析研究工作。Tel: 15399055091 E-mail: zhaowan15399055091@163.com

型超声波清洗器（东莞市嘉应科技有限公司）。

梓醇（批号 110808-201210，质量分数 98.1%）、桃叶珊瑚苷（批号 111761-200601，质量分数 100.0%）对照品均购自中国食品药品检定研究院；去氢土莫酸（批号 6754-16-1，质量分数 100.0%）、茯苓酸（批号 29070-92-6，质量分数 98.0%）对照品均购自成都瑞芬思生物科技有限公司；八味肾气丸，大蜜丸，规格为 9 g/丸，由三普药业有限公司生产；甲醇、乙腈均为色谱纯；磷酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Hypersil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈 (A) - 0.1% 磷酸溶液 (B)，梯度洗脱 (0~18 min, 5.0% A; 18~29 min, 5.0% → 12.0% A; 29~43 min, 12.0% → 20.0% A; 43~50 min, 20.0% → 5.0% A)；检测波长：0~18 min, 241 nm (去氢土莫酸)^[2]；18~50 min, 210 nm (茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷)^[3]；体积流量为 1.0 mL/min；柱温 25 °C；进样量 20 μL。此系统条件下所测组分与其他组分分离效果良好，理论塔板数按茯苓酸计不得低于 2 500，分离度均大于 2.0。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 精密称取去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇、桃叶珊瑚苷对照品各 8.375、8.751、7.674、8.125 mg，分别置于 25 mL 量瓶中，加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度，制成质量浓度分别为 0.335、0.350、0.307、0.325 mg/mL 对照品储备溶液。各精密吸取上述 4 种对照品储备溶液 2.0、1.5、5.0、3.0 mL 置于同一个 50 mL 量瓶中，加 50% 甲醇稀释至刻度，摇匀，即得质量浓度分别为 0.0134、0.0105、0.0307、0.0195 mg/mL 混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取八味肾气丸适量，剪碎，取 4.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50% 甲醇 50 mL，称定质量，超声处理 (200 W，频率 40 kHz) 30 min，放冷，再称定质量，用 50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液即得。

2.2.3 阴性对照溶液的制备 按八味肾气丸处方比例和制备工艺分别制成缺茯苓的样品、缺熟地黄的样品，按照供试品溶液的制备项下方法制备缺茯苓和熟地黄的阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

分别精密吸取供试品溶液、混合对照品溶液、缺茯苓和熟地黄的阴性样品溶液各 20 μL，分别注

入液相色谱仪，记录色谱图。结果在与去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷对照品色谱图相应的保留时间处，供试品溶液色谱图中有各组分对应的吸收峰；而缺茯苓的阴性样品溶液色谱图中未显示去氢土莫酸和茯苓酸峰；缺熟地黄的阴性样品溶液色谱图中未显示梓醇、桃叶珊瑚苷峰，见图 1。

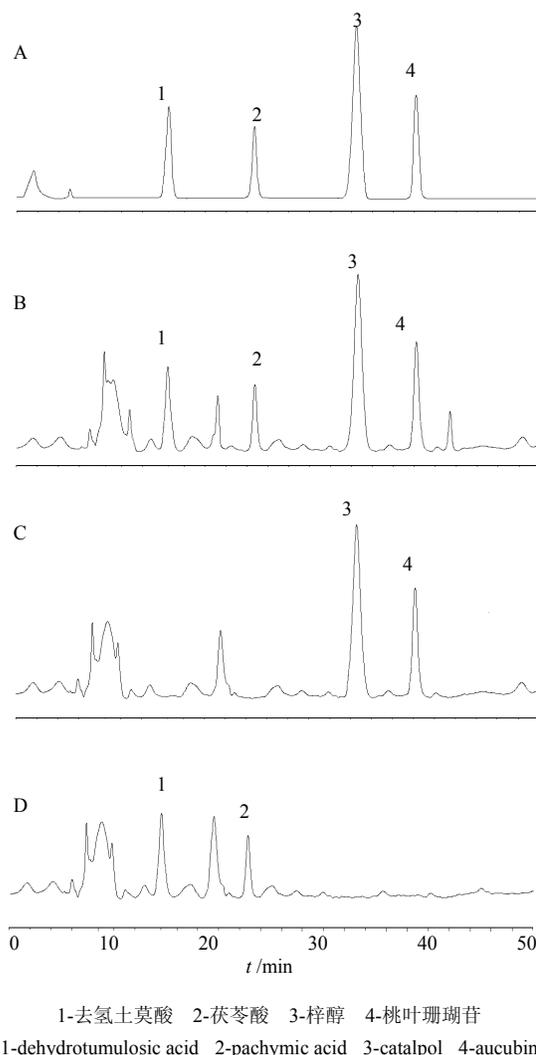


图 1 混合对照品 (A)、八味肾气丸 (B)、缺茯苓的阴性样品 (C) 和缺熟地黄的阴性样品 (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Bawei Shenqi Pills (B), negative sample without *Poria* (C), and negative sample without *Rehmannia Radix Preparata* (D)

2.4 线性关系考察

分别精密吸取各对照品储备溶液 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mL，分别置于 5 个 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇稀释至刻度，摇匀，进行分析测定，以峰面积对质量浓度绘制标准曲线，得到 4 种成分的回归方程、相关系数，见表 1。

表1 4个成分的线性方程、相关系数及线性范围
Table 1 Linear equations, correlation coefficient, and linear range of four components

成分	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	线性方程	<i>r</i>
去氢土莫酸	3.35~67.00	$Y=3.4109\times 10^4 X-511.7$	0.999 2
茯苓酸	3.50~70.00	$Y=2.7642\times 10^4 X+290.5$	0.999 8
梓醇	3.07~61.40	$Y=4.3715\times 10^4 X+492.3$	0.999 5
桃叶珊瑚苷	3.25~65.00	$Y=3.0406\times 10^4 X+449.1$	0.999 7

2.5 精密度试验

取混合对照品溶液连续进样6次,分别记录4种成分的峰面积,结果去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷峰面积的RSD值分别为0.94%、1.25%、0.62%、1.06%。

2.6 重复性试验

取批号130815八味肾气丸样品适量,平行称取6份,制备供试品溶液,进样测定,计算各成分的质量分数,结果去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷质量分数的RSD值分别为1.01%、1.34%、0.86%、1.27%。

2.7 稳定性试验

取批号130815八味肾气丸的同一供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、12 h进样分析,记录各组峰面积值,结果去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷峰面积的RSD值分别为0.83%、1.07%、

1.03%、0.98%,结果表明供试品溶液在12 h内基本稳定。

2.8 回收率试验

取批号130815八味肾气丸样品(含去氢土莫酸为0.161 mg/g,茯苓酸为0.134 mg/g,梓醇为0.363 mg/g,桃叶珊瑚苷为0.237 mg/g)适量,剪碎,分别取2.0 g,共6份,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入混合对照品溶液25 mL,制备供试品试液,进样测定,计算回收率,结果去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷的平均回收率分别为96.72%、97.87%、98.21%、98.09%,RSD值分别为1.08%、0.95%、0.64%、1.22% ($n=6$)。

2.9 样品测定

取3批八味肾气丸样品,制备供试品溶液,进样测定,外标法计算样品中去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷的质量分数,结果见表2。

表2 八味肾气丸中去氢土莫酸、茯苓酸、梓醇和桃叶珊瑚苷的测定结果 ($n=3$)

Table 2 Determination of dehydrotumulosic acid, pachymic acid, catalpol, and aucubin in Bawei Shenqi Pills ($n=3$)

批号	去氢土莫酸		茯苓酸		梓醇		桃叶珊瑚苷	
	均值/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%						
130815	0.161	1.64	0.134	1.29	0.363	1.68	0.237	1.93
130912	0.153	0.38	0.126	0.46	0.382	1.83	0.251	1.05
131107	0.178	1.81	0.147	1.80	0.355	0.90	0.228	1.83

3 讨论

3.1 流动相的选择

在流动相的选择中,曾考察了不同比例的乙腈-水^[4]、甲醇-水^[5]、乙腈-0.1%磷酸溶液^[6-12]、乙腈-0.5%磷酸溶液^[2, 13]为流动相梯度洗脱,结果发现,采用乙腈-0.1%磷酸溶液按文中比例梯度洗脱时,各组分色谱峰分离度较好,且基线平稳,故采用乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱。

3.2 提取溶剂和方法的考察

为了尽可能提取所测的目标成分,考察了供试

品溶液的制备方法。选取甲醇、75%甲醇、50%甲醇及乙醇作为提取溶剂进行对比试验,结果以50%甲醇提取的样品峰面积最大;选取超声(200 W,频率40 kHz)和回流2种提取方法进行考察,结果2种方法提取效率相当,考虑到超声提取较回流提取操作方法简便,易于操作,选取超声作为样品的提取方法;同时对不同超声提取时间(20、30、40、50 min)进行对比考察,实验数据表明提取30 min后各时间点的提取效率基本一致,因此超声提取的时间选为30 min。故最终选取50%甲醇超声(200 W,

频率 40 kHz)提取 30 min 作为供试品溶液制备的最佳提取方法。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 国家药品标准: 中药成方制剂第八册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 7.
- [2] 沈玉萍, 杨欢, 陈斌, 等. 反相高效液相色谱法测定中药茯苓中 4 种三萜酸的含量 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(5): 388-390.
- [3] 马运明, 郭建华, 田成旺, 等. HPLC 法测定鲜地黄中梓醇和桃叶珊瑚苷 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1348-1350.
- [4] 余进, 谢媛媛, 王义明, 等. 反相高效液相色谱法同时测定地黄中 5 种成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2013, 48(1): 73-76.
- [5] 方东军, 赵润琴, 张晓娟. HPLC 法测定茯苓中茯苓酸的含量 [J]. 中医药信息, 2012, 29(3): 54-56.
- [6] 王勤, 袁小龙. HPLC 测定增液承气口服液梓醇含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(1): 83-84, 87.
- [7] 赵群涛, 张红伟, 方永凯, 等. HPLC 法同时测定芪黄疏糖胶囊中梓醇和毛蕊花糖苷的含量 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(5): 1200-1202.
- [8] 赵燕, 玄振玉, 黄孝春. 用 HPLC 法测定地黄茎叶中梓醇的含量 [J]. 药学服务与研究, 2012, 12(2): 148-149.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 116-117, 224, 附录 30, 附录 36.
- [10] 高晓霞, 于治国, 赵云丽, 等. HPLC 法同时测定茯苓中去氢茯苓酸和茯苓酸的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2010, 27(4): 295-298.
- [11] 许永, 赵成. HPLC 法同时测定养血安神片中梓醇与毛蕊花糖苷的含量 [J]. 安徽医药, 2014, 18(10): 1859-1861.
- [12] 王军栋, 李玲, 张立庆. 调血祛斑胶囊的质量控制方法研究 [J]. 中国药师, 2014, 17(7): 1109-1111.
- [13] 张靓琦, 贾英, 罗洁, 等. 超高效液相色谱法同时测定茯苓中去氢土莫酸等 6 种活性成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(13): 1080-1083.