

HPLC法测定山茱萸及知柏地黄丸中齐墩果酸、熊果酸的含量

徐德然¹, 丁晴², 王峰涛^{1*}

(1. 中国药科大学, 江苏 南京 210038; 2. 无锡市药品检验所, 江苏 无锡 214021)

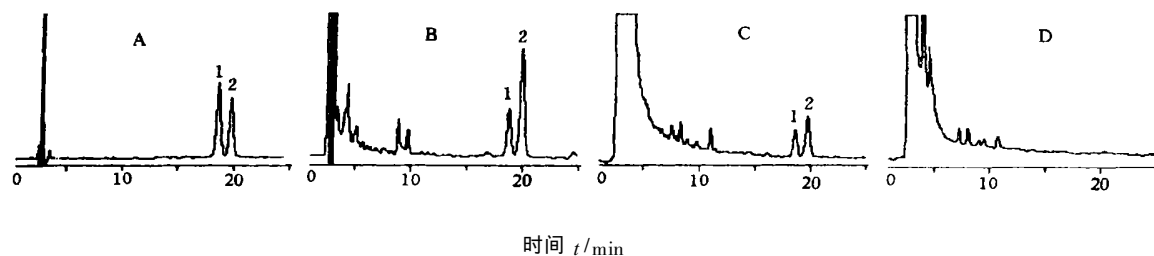
知柏地黄丸是在六味地黄丸处方基础上加黄柏、知母而成, 治两尺脉旺、阴虚火动、午热骨蒸。山茱萸为方中的臣药, 含有熊果酸、齐墩果酸、山茱萸苷、苹果酸、没食子酸等^[1]。其中熊果酸能明显降低血糖、尿糖、饮水量和排尿量, 是山茱萸抗糖尿病的有效成分^[2,3]。齐墩果酸有较强的抑菌、强心、利尿和保肝作用^[4]。《中华人民共和国药典》2000年版采用薄层扫描法测定山茱萸药材中的熊果酸含量。采用HPLC法同时测定山茱萸药材、知柏地黄丸中的齐墩果酸与熊果酸含量尚无文献报道。本实验采用RP-HPLC法, 以乙腈-甲醇-水-乙酸胺为流动相, 可使山茱萸及知柏地黄丸中齐墩果酸、熊果酸成分很好分离, 定量准确、快速。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AD高效液相色谱仪, 岛津 SPD-10A紫外检测器, 杭州英谱 VER3.41工作站。齐墩果酸对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号 0709-9803, 供含量测定用), 熊果酸对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号 742-9405, 含量测定用, 纯度大于 98%)。所用试剂均为色谱纯, 水为纯净水。

2 色谱条件

色谱柱: Shim-Pack C₁₈柱 (5 μ m, 150 mm $\times$ 4.6 mm); 流动相: 乙腈-甲醇-水-乙酸胺 (70: 16: 14: 0.5); 检测波长: 215 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 室温。色谱图见图 1。



A 对照品 B 山茱萸药材 C 知柏地黄丸 D 知柏地黄丸阴性对照 1 齐墩果酸 2 熊果酸

图 1 样品及对照品的 HPLC 图谱

3 方法与结果

3.1 线性关系的考察: 精密称定齐墩果酸、熊果酸对照品, 用甲醇配成含齐墩果酸 2.195 mg/mL 和含熊果酸 2.235 mg/mL 的混合对照品溶液。精密吸取该液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mL, 分别置 25 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀。吸取上述溶液, 分别进样 20 μ L, 以进样量为横坐标, 峰面积积分值为纵坐标, 进行线性回归, 回归方程分别为齐墩果酸: $Y = 188.287X + 855.36$, $r = 0.9998$, 线性范围: 0.18~5.27 μ g; 熊果酸: $Y = 151.941X - 692.86$, $r = 0.9997$, 线性范围: 0.18~5.36 μ g。

3.2 样品溶液的制备: 取山茱萸药材粗粉 1 g, 精密称定, 置索氏提取器内加乙醚适量, 加热回流提取 4 h, 提取液回收乙醚至干。残渣用石油醚 (30 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C) 浸提 2 次, 每次 15 mL (约 2 min), 倾去石油醚,

残渣加适量甲醇微热使溶解, 定量转移至 25 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 得山茱萸药材供试品溶液。

取知柏地黄丸 (浓缩丸) 5 g, 精密称定, 加水 30 mL, 60 $^{\circ}$ C 水浴温热使充分溶散, 放冷, 用滤纸滤过。残渣再用水 30 mL 洗涤, 滤渣室温干燥至呈松软的粉末状, 于 100 $^{\circ}$ C 烘干, 连同滤纸一并置索氏提取器内, 其余同山茱萸药材供试品制备方法中“加乙醚适量……”操作, 定量转移至 10 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 得知柏地黄丸 (浓缩丸) 供试品溶液。

3.3 阴性对照溶液的制备与测定: 按知柏地黄丸 (浓缩丸) 的处方制备不含山茱萸药材的阴性对照样品, 吸取 20 μ L, 注入色谱仪, 记录色谱图。结果表明, 阴性对照溶液对齐墩果酸、熊果酸测定无干扰。

3.4 精密度试验: 以同一混合对照品溶液进样, 每次 $20\mu\text{L}$, 重复进样 5 次, 齐墩果酸峰面积的 RSD 为 0.7%, 熊果酸峰面积 RSD 为 0.6%。

3.5 重现性试验: 精密称定同一批样品, 按供试品溶液制备的方法分别制备 5 份供试品溶液, 分别测定, 结果齐墩果酸含量的 RSD 为 2.2%, 熊果酸含量的 RSD 为 1.1%。

3.6 回收率试验: 已知含量的各样品适量, 加入一定量的齐墩果酸、熊果酸对照品, 测定, 结果山茱萸药材中齐墩果酸平均回收率为 99.3%, RSD 为 1.5% ($n=6$); 知柏地黄丸 (浓缩丸) 中齐墩果酸平均回收率为 97.4%, RSD 为 1.9% ($n=6$); 山茱萸药材中熊果酸的回收率为 101.0%, RSD 为 1.4% ($n=6$); 知柏地黄丸 (浓缩丸) 中熊果酸的回收率为 101.1%, RSD 为 1.3% ($n=6$)。

3.7 样品测定: 吸取各供试品溶液各 $10\sim 20\mu\text{L}$, 分别进样, 测定齐墩果酸、熊果酸峰面积积分值, 用外标法计算含量, 结果见表 1。

表 1 山茱萸药材及知柏地黄丸中

齐墩果酸、熊果酸的含量 ($n=3$)

品名	产地或生产厂家	批号	齐墩果酸 (mg/g)	熊果酸 (mg/g)
山茱萸	江苏		0.624	2.944
	江苏		0.728	3.102
	安徽		0.612	2.761
知柏地黄丸 (浓缩丸)	河南宛西制	980802	0.059	0.270
	药有限公司	980620	0.063	0.345
		20000809	0.054	0.282

4 讨论

齐墩果酸甲醇液 λ_{max} 为 207 nm, 熊果酸甲醇液 λ_{max} 为 206 nm。在此检测波长下, 流动相中甲醇的紫外吸收干扰较大, 基线不稳。故选择 215 nm 为检测波长。

用乙腈-甲醇-水-乙酸胺为流动相, 因乙腈无末端吸收, 与单纯使用甲醇-水为流动相比较^[5], 基线平稳。加入盐改善了峰形, 且将两峰的保留时间相对拉开, 达到基线分离, 分离度大于 1.5。

在进行回收率试验时, 曾对索氏提取法、回流、浸泡过夜后超声 3 种提取方法进行了比较。对同样数量的样品, 索氏提取法所得齐墩果酸、熊果酸均含量最高, 说明采用索氏提取法提取较为完全。

采用 HPLC 法测定山茱萸、知柏地黄丸中齐墩果酸与熊果酸含量, 精密度优于薄层扫描法, 无需显色, 结果稳定, 方法简便。为采用 HPLC 法测定杞菊地黄丸、金匱肾气丸、麦味地黄丸、明目地黄丸及女贞子、山楂、连翘、栀子中齐墩果酸与熊果酸含量提供了一种可借鉴的方法。

参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [2] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1993.
- [3] 吕曙华, 王强, 夏光成. 中药女贞子中齐墩果酸、熊果酸的高效液相色谱分析 [J]. 药物分析杂志, 1993, 13(5): 291-294.
- [4] 李广勋. 中药药理与临床 [M]. 天津: 天津科技翻译出版社, 1992.
- [5] 曾庆煜, 孙敏, 林荣禄. 十一批六味地黄丸中熊果酸测定及其分析探讨 [J]. 中成药, 1989, 11(11): 17.

RP-HPLC法同时测定蜂胶中槲皮素和山柰酚的含量

杜海燕, 郑志刚, 李婷, 刘彤, 王岩, 高旭*

(天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂, 天津 300142)

蜂胶是蜜蜂采集植物上的树脂与蜜蜂自身的分泌物混合而成的天然物质。具有显著的抗菌、防腐、消炎、抑制病毒、镇痛、增进机体免疫功能及促进组织再生等作用。蜂胶中主要含有黄酮类和萜类物质。蜂胶活性组分中, 具有代表性的是黄酮化合物中的槲皮素。文献报道多采用紫外分光光度法对蜂胶总黄酮成分进行含量测定^[1-3], 而高效液相色谱法定量

分析较少报道。本实验进行了这方面的研究, 采用 RP-HPLC 法同时测定蜂胶中槲皮素及山柰酚的含量, 并进行了方法学研究。其结果与比色法比较, 重现性好, 干扰因素少, 更能反映蜂胶的内在质量, 使蜂胶质量标准具有科学性与先进性。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-6A 高效液相色谱仪, SPD-6AV

* 收稿日期: 2002-01-10

* 天津中医学院 96 级实习生