

HPLC 法测定三才封髓丸中地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱

白 荣

三峡大学仁和医院, 湖北 宜昌 443001

摘要:目的 建立 HPLC 法同时测定三才封髓丸中地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱的方法。方法 采用 Phenomenex RP 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; 0~28 min 地黄苷 A 和地黄苷 D 检测波长为 203 nm, 28~60 min 黄柏碱和木兰花碱的检测波长为 225 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量 20 μL。结果 地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱在 4.52~90.40、4.10~82.00、5.35~107.00、5.28~105.60 μg/mL 线性关系良好; 平均回收率分别为 98.86%、96.95%、99.15%、96.98%, RSD 值分别为 1.38%、1.24%、1.28%、0.85%。结论 建立的方法简便、准确、灵敏度高、重复性好, 可用于三才封髓丸的质量控制。

关键词: 三才封髓丸; 地黄苷 A; 地黄苷 D; 黄柏碱; 木兰花碱; 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)11 - 1324 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.11.005

Determination of rehmannioside A, rehmannioside D, phellodendrine, and magnoflorine in Sancai Fengsui Pills by HPLC

BAI Rong

Renhe Hospital, China Three Gorges University, Yichang 443001, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of rehmannioside A, rehmannioside D, phellodendrine, and magnoflorine in Sancai Fengsui Pills. **Methods** The HPLC method was carried out on a Phenomenex RP C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 30 °C with injection volume of 20 μL. The detection wavelength for rehmannioside A and rehmannioside D was set at 203 nm, and that for phellodendrine and magnoflorine was set at 225 nm. **Results** Rehmannioside A, rehmannioside D, phellodendrine, and magnoflorine had good linearity in the ranges of 4.52 — 90.40 μg/mL, 4.10 — 82.00 μg/mL, 5.35 — 107.00 μg/mL, and 5.28 — 105.60 μg/mL, respectively. And the average recoveries were 98.86%, 96.95%, 99.15%, and 96.98% with RSD values of 1.38%, 1.24%, 1.28%, and 0.85%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, and sensitive, with good repeatability, which can be used to evaluate the quality of Sancai Fengsui Pills.

Key words: Sancai Fengsui Pills; rehmannioside A; rehmannioside D; phellodendrine; magnoflorine; HPLC

三才封髓丸收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中药成方制剂第 9 册, 由熟地黄、黄柏 (酒炒)、党参、砂仁、肉苁蓉 (酒浸)、天冬、甘草 (炙) 7 味中药组成, 具有益肾固精的功效, 用于肾气虚弱、梦遗失精等症的治疗。三才封髓丸现行的质量标准相对简单, 仅对性状、检查项作了规定, 鉴别项仅对部分药材做了定性的研究^[1]。本研究采用高效液相色谱梯度洗脱法同时对三才封髓丸中地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱进行测定, 结果

表明该方法灵敏度高、重复性好, 可用于三才封髓丸的质量控制。

1 仪器与试剂

安捷伦 1200 型高效液相色谱仪, G1315B 可变波长检测器; KQ-500B 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), AB135-S 型十万分之一电子天平 (瑞士梅特勒 - 托利多公司)。

三才封髓丸购于杭州胡庆余堂药业有限公司, 每 50 丸质量为 3 g, 批号分别为 1415503、1415507、

收稿日期: 2015-09-23

作者简介: 白 荣 (1962—), 女 (回族), 河北邢台人, 三峡大学第二临床医学院药学教研室 (三峡大学仁和医院) 副主任药师, 研究方向: 医院药学、药物分析及药物制剂。Tel: 13487265279 E-mail: bairongsanxia@163.com

1415508; 地黄苷 A (批号 81720-05-0, 质量分数为 98.0%)、地黄苷 D (批号 81720-08-3, 质量分数为 98.0%)、木兰花碱 (批号 2141-09-5, 质量分数 98.0%) 对照品均购于上海源叶生物科技有限公司, 黄柏碱对照品 (批号 6873-13-18, 质量分数为 97.0%) 购于上海纯优生物科技有限公司; 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 磷酸、甲醇均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

Phenomenex RP 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), 梯度洗脱条件^[2-6]见表 1; 0~28 min 地黄苷 A 和地黄苷 D 检测波长为 203 nm^[7-9], 28~60 min 黄柏碱和木兰花碱的检测波长为 225 nm^[10]; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 30 °C; 进样量 20 μL。理论塔板数均不低于 3 500, 此系统条件下各组分分离效果良好。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program of mobile phase

t/min	A/%	B/%
0~14	35.0	65.0
14~28	35.0→40.0	65.0→60.0
28~51	40.0→75.0	60.0→25.0
51~60	75.0→35.0	25.0→65.0

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取地黄苷 A 对照品 9.04 mg、地黄苷 D 对照品 8.20 mg、黄柏碱对照品 10.70 mg 和木兰花碱对照品 10.56 mg, 分别置 20 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇溶解并稀释至刻度, 制成地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱质量浓度分别为 0.452、0.410、0.535、0.528 mg/mL 的对照品储备液。分别精密量取各对照品储备液 2.5、1.5、4.0、2.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇稀释并加至刻度, 制成地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱质量浓度分别为 22.6、12.3、42.8、26.4 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

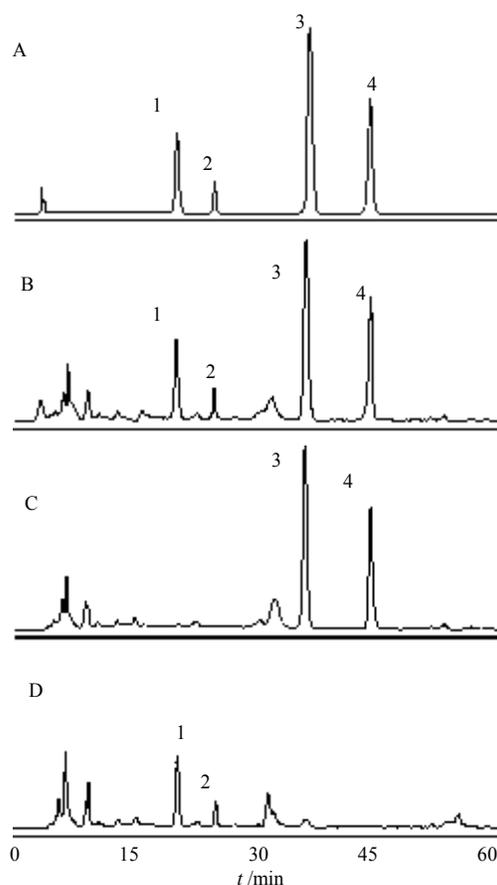
取三才封髓丸适量, 研成细粉, 取约 2.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇溶液 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 60 min, 取出放冷, 称定质量, 用 50% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性样品溶液的制备

按照三才封髓丸质量标准中规定的药味比例, 以相同工艺分别制备缺熟地黄和黄柏的阴性样品。按照供试品溶液的制备项下方法操作, 即得缺熟地黄、黄柏的阴性样品溶液。

2.5 专属性试验

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液、缺熟地黄和黄柏的阴性样品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。结果表明, 在对照品色谱峰保留时间相应位置上, 供试品溶液有相同保留时间色谱峰, 阴性样品溶液在此位置则无, 表明阴性样品对所测成分无干扰。



1-地黄苷 A 2-地黄苷 D 3-黄柏碱 4-木兰花碱
1-rehmannioside A 2-rehmannioside D 3-phellodendrine 4-magnoflorine

图 1 混合对照品 (A)、三才封髓丸样品 (B)、缺熟地黄阴性样品 (C) 和缺黄柏的阴性样品 (D) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Sancai Fengsui Pills (B), sample without *Rehmanniae Radix Preparata* (C), and sample without *Phellodendri Cortex* (D)

2.6 线性关系考察

分别精密吸取对照品储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 分别用 50% 甲醇溶

液稀释成系列对照品溶液。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 建立线性方程, 结果见表 2。

表 2 回归方程、相关系数和线性范围

Table 2 Regression equation, correlation coefficients and linear ranges

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
地黄苷 A	$Y=7.9425 \times 10^5 X+516.7$	0.999 3	4.52~90.40
地黄苷 D	$Y=3.8917 \times 10^5 X-219.6$	0.999 8	4.10~82.00
黄柏碱	$Y=1.2042 \times 10^6 X-157.8$	0.999 4	5.35~107.00
木兰花碱	$Y=1.0151 \times 10^6 X+293.4$	0.999 6	5.28~105.60

2.7 精密度试验

精密吸取混合对照品溶液 20 μL , 按上述色谱条件测定, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算得地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱、木兰花碱峰面积的 RSD 值分别为 0.73%、0.89%、1.02%、0.98%。

2.8 重复性试验

取批号 1415503 的三才封髓丸样品 6 份, 制备供试品溶液, 依法测定, 计算地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱的质量分数, 结果其 RSD 值分别为 0.85%、0.73%、1.15%、1.02%。

2.9 稳定性试验

取批号 1415503 三才封髓丸样品, 制备供试品溶液, 分别于 0、2、6、8、12、24 h 进样, 依法测定峰面积, 结果地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱峰面积的 RSD 值分别为 0.95%、0.77%、1.18%、0.69%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.10 回收率试验

取批号 1415503 的三才封髓丸 (含地黄苷 A 0.561 mg/g、地黄苷 D 0.329 mg/g、黄柏碱 1.026 mg/g、木兰花碱 0.637 mg/g) 6 份, 适量, 研成细粉, 取约 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入混合对照品溶液 25 mL, 制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 计算回收率, 结果地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱的平均回收率分别为 98.86%、96.95%、99.15%、96.98%, RSD 值分别为 1.38%、1.24%、1.28%、0.85%。

2.11 样品测定

取 3 批三才封髓丸样品, 制备供试品溶液, 依法进样测定, 采用外标法计算三才封髓丸样品中地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱的质量分数, 结果见表 3。

表 3 三才封髓丸中地黄苷 A、地黄苷 D、黄柏碱和木兰花碱的测定结果 ($n=3$)

Table 3 Determination of rehmannioside A, rehmannioside D, phellodendrine, and magnoflorine in Sancai Fengsui Pills ($n=3$)

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)			
	地黄苷 A	地黄苷 D	黄柏碱	木兰花碱
1415503	0.561	0.329	1.026	0.637
1415507	0.579	0.338	1.032	0.647
1415508	0.512	0.304	0.992	0.613

3 讨论

3.1 流动相的选择

分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸溶液、乙腈-0.5% 磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 对比基线和分离效果, 结果显示乙腈-0.1% 磷酸溶液进行梯度洗脱分离效果好。

3.2 提取溶剂的选择

分别采用甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇作为提取溶剂, 进行考察比较, 结果显示 50% 甲醇提取效果最佳, 故选用 50% 甲醇作为提取溶剂

3.3 提取时间的考察

对不同超声提取时间 (30、60、90 min) 进行比较, 结果表明超声处理 60 min 和 90 min 各组分峰面积差异不大, 超声处理 60 min 可基本提取完全, 超声处理 30 min 时地黄苷 A 和地黄苷 D 峰面积明显小于超声处理 60、90 min 的峰面积, 黄柏碱和木兰花碱峰面积差异不大。故选取超声处理 60 min 作为供试品的制备的最佳提取方法。

本实验建立的方法能有效地测定三才封髓丸中 4 种主要成分, 样品中各组分分离度良好, 方法简

便、重现性好,能够更有效地控制产品质量,可为提高和完善该制剂的质量标准提供参考依据。

参考文献

- [1] 卫生部药品标准中药成方制剂第九册 [S]. WS3-B-1679-94. 1994: 10.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 116-117, 286-287, 附录 30, 附录 36.
- [3] 李更生, 王慧森. HPLC 法测定地黄中地黄苷 D 的含量 [J]. 中草药, 2003, 34(8): 752-754.
- [4] 张留记, 屠万倩, 杨冉, 等. 不同产地地黄中地黄苷 D 的测定 [J]. 分析试验室, 2008, 27(3): 56-58.
- [5] 李跃辉, 胡慧冰, 王银等. 不同产区与采收期黄柏中小檗碱与黄柏碱含量对比研究 [J]. 中国医药导报, 2014, 11(11): 90-93.
- [6] 祝晨蒨, 林朝展, 莫建霞. HPLC 法测定黄柏药材中小檗碱与黄柏碱的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(4): 262-264.
- [7] 李更生, 刘明, 王慧森, 等. 地黄与熟地黄中地黄苷 A、D 的比较分析 [J]. 中成药, 2008, 30(1): 93-96.
- [8] 王慧森, 刘明, 李更生. HPLC 测定地黄中地黄苷 A、D [J]. 中草药, 2007, 38(11): 1732-1733.
- [9] 岳超, 高杰, 石上梅, 等. HPLC 测定地黄炮制前后 3 种苷类物质的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(4): 71-74.
- [10] 潘明凤, 冯锐, 罗鸿, 等. 黄柏中黄柏碱和木兰花碱含量的反相高效液相色谱法测定 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 35-36.