

HPLC 法测定八珍液中地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸

汪青梅¹, 熊永爱², 魏谭军^{1*}

1. 达州市中西医结合医院, 四川 达州 635000

2. 成都中医药大学 药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定八珍液中的地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸的方法。方法 Kromasil C₁₈ 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.05%磷酸溶液, 梯度洗脱; 检测波长: 203 nm (0~34 min, 检测地黄苷 A 和地黄苷 D)、210 nm (34~65 min, 检测去氢土莫酸和茯苓酸); 体积流量 1.0 mL/min。结果 地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸分别在 5.76~115.20、4.05~81.00、6.10~122.00、6.35~127.00 μg/mL 线性关系良好; 平均回收率分别为 98.90%、99.08%、98.71%、97.95%, RSD 值分别为 1.49%、1.19%、1.63%、0.92%。结论 该方法操作简便, 准确, 重复性好, 可作为八珍液的质量控制方法。

关键词: 八珍液; 地黄苷 A; 地黄苷 D; 去氢土莫酸; 茯苓酸; 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(2016)01-0025-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.01.006

Determination of rehmaionoside A, rehmaionoside D, dehydrotumulosic acid, and pachymic acid in Bazhen Solution by HPLC

WANG Qing-mei¹, XIONG Yong-ai², WEI Tan-jun¹

1. Dazhou Hospital of Integrated traditional Chinese and Western Medicine, Dazhou 635000, China

2. School of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for simultaneous determination of rehmaionoside A, rehmaionoside D, dehydrotumulosic acid, and pachymic acid in Bazhen Solution. **Methods** The determination was carried out on Kromasil C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile - 0.05% phosphoric acid solution with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was set at 30 °C, and the detection wavelengths were 203 nm in 0 — 34 min (determination of rehmaionoside A and rehmaionoside D) and 210 nm in 34 — 65 min (determination of dehydrotumulosic acid and pachymic acid). **Results** There were good linear relationships of rehmaionoside A, rehmaionoside D, dehydrotumulosic acid, and pachymic acid in the concentration ranges of 5.76 — 115.20 μg/mL, 4.05 — 81.00 μg/mL, 6.10 — 122.00 μg/mL, and 6.35 — 127.00 μg/mL. The average recoveries were 98.90%, 99.08%, 98.71%, and 97.95% with RSD 1.49%, 1.19%, 1.63%, and 0.92%, respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate, and repeated, which can be used in quantity control for Bazhen Solution.

Key words: Bazhen Solution; rehmaionoside A; rehmaionoside D; dehydrotumulosic acid; pachymic acid; HPLC

八珍液收载于《卫生部颁药品标准》(中药成方制剂第十册)^[1], 由熟地黄、茯苓、党参、白术(麸炒)、白芍、当归、川芎、甘草 8 味中药组成, 具有补气益血的功效, 用于气血两虚、面色萎黄、食欲不振、四肢乏力、月经过多。现标准仅规定了性状、鉴别、相对密度、乙醇量以及制剂通则的检查项^[1]。为了确保八珍液产品的质量稳定和疗效的一致性,

本实验采用波长切换 HPLC 梯度洗脱法同时测定八珍液中去氢土莫酸、茯苓酸、地黄苷 A、地黄苷 D, 为八珍液的质量标准的提高提供依据。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪, 配备 Empower Pro 色谱工作站以及 G1315B 可变波长检测器。

乙腈为色谱纯, 磷酸为分析纯; 甲醇为分析纯;

收稿日期: 2015-10-26

作者简介: 汪青梅 (1966—), 女, 主管中药师, 从事医院药学及中药制剂工作。Tel: (0818)2140899 E-mail: wangqingmeiqingmei@163.com

*通信作者 魏谭军 (1984—), 男, 硕士, 从事医院制剂的研究与开发。Tel: (0818)2288358 E-mail: 404477285@qq.com

去氢土莫酸对照品(批号 6754-16-1, 质量分数 99.0%)、茯苓酸对照品(批号 29070-92-6, 质量分数 98.0%)、地黄苷 A 对照品(批号 81720-05-0)、地黄苷 D 对照品(批号 81720-08-3, 质量分数 98.0% 以上)均购于成都普瑞法科技开发有限公司; 八珍液购于广东万年青制药有限公司, 规格 10 mL/支, 批号分别为 140201、140502、141103。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱(200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.05%磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~15 min, 65.0% A; 15~34 min, 65.0% A→75.0% A; 34~55 min, 75.0% A; 55~65 min, 75.0%→65% A)^[2-5]; 检测波长: 203 nm^[2](0~34 min, 检测地黄苷 A 和地黄苷 D)、210 nm^[6-7](34~65 min, 检测去氢土莫酸和茯苓酸); 体积流量 1.0 mL/min。理论塔板数按地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸计算均不得低于 2 000。

2.2 对照品溶液的制备

取地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸、茯苓酸对照品各适量, 精密称定, 加 50%甲醇溶解并稀释, 制成质量浓度分别为 0.576、0.405、0.610、0.635 mg/mL 的对照品储备液。

分别吸取地黄苷 A 对照品储备液 2.5 mL、地黄苷 D 对照品储备液 2.0 mL、去氢土莫酸对照品储备液 1.5 mL、茯苓酸对照品储备液 1.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用 50%甲醇稀释至刻度, 制成分别含地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸、茯苓酸 28.8、16.2、18.3、12.7 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

精密量取八珍液 5.0 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用 50%甲醇稀释至刻度, 并称定总质量, 超声波超声处理 30 min, 放冷, 用 50%甲醇补足缺失的质量, 充分振摇均匀, 用 0.45 μm 微孔滤头滤过, 取续滤液, 即得。

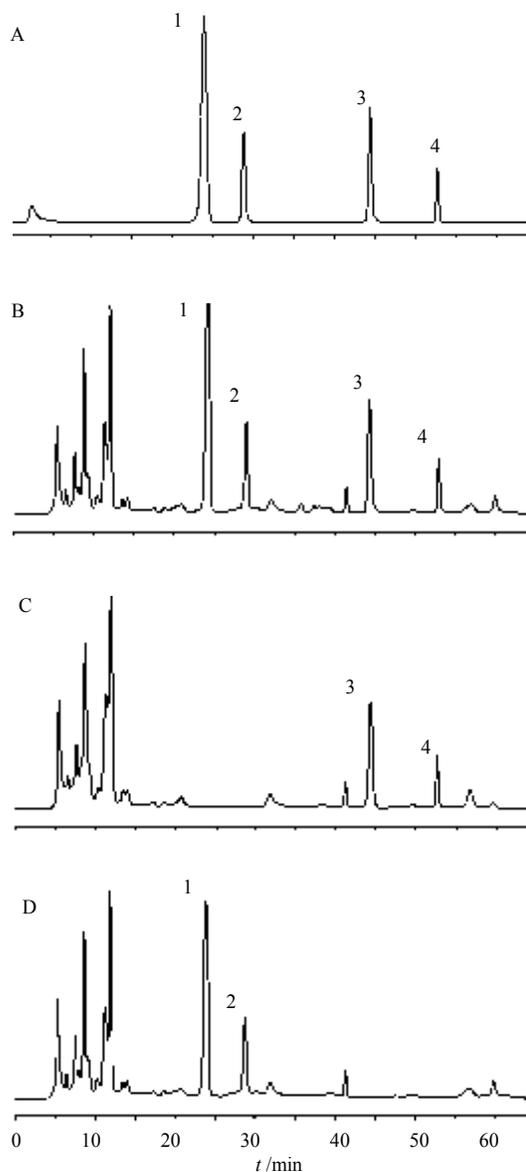
2.4 阴性对照专属性实验

按照八珍液处方比例分别称取缺熟地黄和茯苓的其余药材各 1 份, 严格按照生产工艺流程分别制成缺熟地黄和茯苓的阴性样品。再按照“供试品溶液的制备”项下方法分别制得阴性溶液。取缺熟地黄、茯苓阴性溶液、混合对照品溶液和供试品溶液各 20 μL, 在上述色谱条件下依法进行测定。结果在与地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸 A

对照品色谱图相应的保留时间处, 供试品溶液色谱图中有相应吸收峰, 而阴性样品色谱图中未显示对应的吸收峰, 说明阴性无干扰, 色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察

分别精密吸取质量浓度分别为 0.576、0.405、0.610、0.635 mg/mL 的地黄苷 A、地黄苷 D、去氢



1-地黄苷 A 2-地黄苷 D 3-去氢土莫酸 4-茯苓酸
1-rehmannioside A 2-rehmannioside D 3-dehydrotumulosic acid
4-pachymic acid

图 1 混合对照品(A)、八珍液(B)、缺熟地黄阴性样品(C)、缺茯苓阴性样品(D)的色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A), Bazhen Solution (B), negative sample without *Rehmanniae Radix* (C) and *Poria* (D)

土莫酸、茯苓酸对照品储备液各 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL，将其分别置于 10 mL 量瓶中，并用甲醇稀释成系列质量浓度的混合对照品溶液，分别进样 20

μL 进行测定。以测得的峰面积作为纵坐标，质量浓度作为横坐标，绘制标准曲线，得回归方程，结果见表 1。

表 1 线性关系考察结果
Table 1 Results of linear relation test

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
地黄苷 A	$Y=1.4167 \times 10^6 X-238.1$	0.999 6	5.76~115.20
地黄苷 D	$Y=7.6241 \times 10^5 X-127.9$	0.999 2	4.05~81.00
去氢土莫酸	$Y=9.0151 \times 10^5 X+432.7$	0.999 0	6.10~122.00
茯苓酸	$Y=4.9173 \times 10^5 X-138.5$	0.999 4	6.35~127.00

2.6 重复性试验

取批号 140201 八珍液样品 6 份，制备供试品溶液，每次进样量为 20 μL，测定峰面积，分别计算地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸的质量浓度，结果地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸、茯苓酸质量浓度的 RSD 值分别为 0.81%、0.92%、0.86%、1.08%。

2.7 稳定性试验

取批号 140201 八珍液样品，制备供试品溶液，在室温下放置 0、2、4、8、12、24 h，分别进样，每次进样量为 20 μL，测定地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸的峰面积值，计算得地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸峰面积的 RSD 值分别为 1.03%、0.85%、0.73%、0.91%，结果表明供试品溶液自制备起 24 h 内很稳定。

2.8 精密度试验

取混合对照品溶液，重复进样 6 次，进样量分别为 20 μL，记录地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸的峰面积，计算得地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸峰面积的 RSD 值分别为 0.88%、1.01%、1.02%、0.95%。

2.9 加样回收率试验

取批号 140201 八珍液样品 2.5 mL，共 9 份，置 50 mL 量瓶中，分别精密加入混合对照品溶液 20、25、30 mL 各 3 份，用 50% 甲醇稀释至刻度，并称定总质量，超声波超声 30 min，放冷，再称定总质量，采用 50% 甲醇补足缺失的质量，充分振摇均匀，用 0.45 μm 微孔滤头过滤，取续滤液，作为加样供试品试液。分别进样 20 μL，测定峰面积值，结果地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸的平均回收率分别为 98.90%、99.08%、98.71%、

97.95%，RSD 值分别为 1.49%、1.19%、1.63%、0.92%。

2.10 样品测定

取 3 个批号八珍液，制备供试品溶液。在上述色谱条件下，分别精密吸取混合对照品溶液和供试品溶液各 20 μL，注入高效液相色谱仪中，测定，采用外标法计算八珍液中地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸的质量浓度，结果见表 2。

表 2 八珍液中地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸的测定结果 (n=3)

Table 2 Determination of rehmaionoside A, rehmaionoside D, dehydrotumulosic acid, and pachymic acid in Bazhen Solution (n=3)

批号	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)			
	去氢土莫酸	茯苓酸	地黄苷 A	地黄苷 D
140201	0.174	0.132	0.279	0.153
140502	0.181	0.129	0.288	0.155
141103	0.170	0.135	0.271	0.163

根据测定的地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸质量浓度平均值的 85%，暂定本品含地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸不得低于 0.23、0.13、0.14、0.11 mg/mL。

3 讨论

为能兼顾地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸的提取溶剂要求，选取 50% 甲醇为提取溶剂，同时考察了超声提取时间和水浴回流时间对八珍液中地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸提取率的影响。分别选取超声提取 20、30、40 min 进行考察，考察不同提取时间下，样品中地黄苷 A、地黄苷 D、去氢土莫酸和茯苓酸质量浓度的高低，从

而优化最佳的超声提取时间。结果超声处理 30、40 min 所测定各组分的结果相差不大, 而超声提取 20 min 时质量浓度明显低于 30、40 min 的, 因此八珍液供试品溶液制备的提取时间优选为 50% 甲醇超声提取 30 min。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部颁药品标准(中药成方制剂第十册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 8.
- [2] 刘明, 李更生, 王慧森. 7 种地黄丸中地黄苷 D 的含量测定 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28, (13): 1130-1131.
- [3] 车爽, 李清, 霍艳双, 等. 波长转换 RP-HPLC 法同时测定茯苓不同部位中 5 种三萜酸含量 [J]. 药学学报, 2010, 45(4): 494-497.
- [4] 金晓勇, 贾晓斌, 陈彦, 等. HPLC 测定不同产地茯苓中猪苓酸 C 和去氢土莫酸 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1150-1152.
- [5] 邬兰, 王金波, 邓媛媛, 等. HPLC-ELSD 法测定不同产地茯苓中茯苓酸的含量 [J]. 中国药师, 2011, 14(11): 1568-1570.
- [6] 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.
- [7] 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.