

HPLC 法测定六味地黄胶囊中的毛蕊花糖苷、马钱苷、芍药苷和丹皮酚

徐灿辉¹, 何维为¹, 何云飞²

1. 益阳市食品药品检验所, 湖南 益阳 413000

2. 南华大学, 湖南 衡阳 421001

摘要: 目的 建立同时测定六味地黄胶囊中毛蕊花糖苷、马钱苷、芍药苷和丹皮酚 4 种成分含量的高效液相色谱 (HPLC) 测定方法。方法 应用 HPLC-梯度洗脱法, 采用 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 1%冰醋酸为流动相 A, 乙腈为流动相 B 进行梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 230 nm。结果 毛蕊花糖苷、马钱苷、丹皮酚和芍药苷测定浓度的线性范围分别为 6~60、15~150、50~500 μg/mL 和 5~50 μg/mL, *r* 值均大于 0.999, 平均加样回收率分别为 98.3%、99.3%、99.0%和 99.0%, 相对标准偏差 (RSD) 值均小于 0.9% (*n*=9)。结论 该实验方法简便、结果准确, 可有效用于六味地黄胶囊的质量控制。

关键词: 高效液相色谱; 六味地黄胶囊; 毛蕊花糖苷; 马钱苷; 芍药苷; 丹皮酚

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2014)03-0257-03

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.03.015

Simultaneous determination of four constituents in Liuwei Dihuang Capsule by HPLC

XU Can-hui¹, HE Wei-wei¹, HE Yun-fei²

1. Yiyang Institutes for Food and Drug Control, Yiyang 413000, China

2. University of South China, Hengyang 421001, China

Abstract: Objective An HPLC method was established for determining four constituents (verbascoside, loganin, paeoniflorin, and paeonolium) in Liuwei Dihuang Capsule. **Methods** HPLC-gradient elution method was applied. The column was Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was 1% acetic acid solution (A) and acetonitrile (B). The detection wavelength was set at 245 nm. **Results** The linear range of density was 6—60 μg/mL for verbascoside, 15—150 μg/mL for loganin, 50—500 μg/mL for paeonolium, and 5—50 μg/mL for paeoniflorin, respectively. The correlation coefficient of all curves were better than 0.999. The average recoveries of four analytes were 98.3% for verbascoside, 99.3% for loganin, 99.0% for paeonolium, and 99.0% for paeoniflorin, and the RSD values were less than 0.9% (*n* = 9). **Conclusion** The developed HPLC method could be used for the quality control of Liuwei Dihuang Capsule.

Key words: HPLC; Liuwei Dihuang Capsules; verbascoside; loganin; paeoniflorin; paeonolium

六味地黄胶囊是由熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻 6 种中药制成的复方制剂, 为滋阴补肾的经典代表方剂, 广泛应用于治疗肾阴亏损、头晕耳鸣、腰膝酸软、骨蒸潮热、盗汗遗精、消渴等病症^[1-2]。其质量标准收载于《中国药典》2010 年版一部, 采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定牡丹皮中丹皮酚含量和采用薄层扫描法测定酒萸肉中熊果酸含量。现代研究表明, 酒萸肉中的主要有效成分是马钱苷^[3], 将马钱苷作为指标性成分测定六味地黄制剂中酒萸肉的含量已被广泛采用^[4-6], 同

时, 对方中牡丹皮所含的芍药苷的测定也多有研究报道^[6-7], 但是对主药熟地黄所含成分的测定少有报道。为了较全面控制产品质量并简化含量测定方法, 本实验以毛蕊花糖苷、马钱苷、芍药苷和丹皮酚为指标性成分采用 HPLC 法梯度洗脱对 4 种成分同时定量测定, 以控制方中熟地黄、酒萸肉和牡丹皮的质量。

1 仪器与试剂

岛津 LC—20AT 高效液相色谱仪 (DAD 检测器) LC solution 工作站, GB204 电子分析天平 (梅

收稿日期: 2013-12-03

作者简介: 徐灿辉 (1981—), 男, 湖南益阳人, 硕士, 主管药师, 从事药品检验与质量标准研究。Tel: 18397438678 E-mail: 18397438678@163.com

特勒-托利多仪器有限公司), CG-300 超声仪 (张家港市港威超声电子有限公司), 毛蕊花糖苷对照品 (批号 111530-200706)、马钱苷对照品 (批号 111640-201005)、丹皮酚对照品 (批号 110708-200506)、芍药苷对照品 (批号 110736-201337) 均购自中国食品药品检定研究院, 六味地黄胶囊 (北京亚东生物制药有限公司, 批号 1212045; 敖东药业洮南药业股份有限公司, 批号 20130502; 修正药业集团股份有限公司, 批号 120703)。乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 1%冰乙酸为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 按表 1 进行线性梯度洗脱。检测波长 230 nm, 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃。取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。按峰面积外标法计算含量。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 分别取毛蕊花糖苷对照品、马钱苷对照品、丹皮酚对照品和芍药苷对照品, 精密称定, 用 70%甲醇溶解并定量稀释制成质量浓度分别为 2.5、0.75、0.25、0.30 mg/mL 的溶液, 作为对照品的储备溶液。分别精密量取上述 4 种对照品的储备溶液 2 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 加 70%甲醇稀释至刻度, 作为对照品溶液。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	90	10
10	90	10
30	70	30
50	64	38
55	90	10
60	90	10

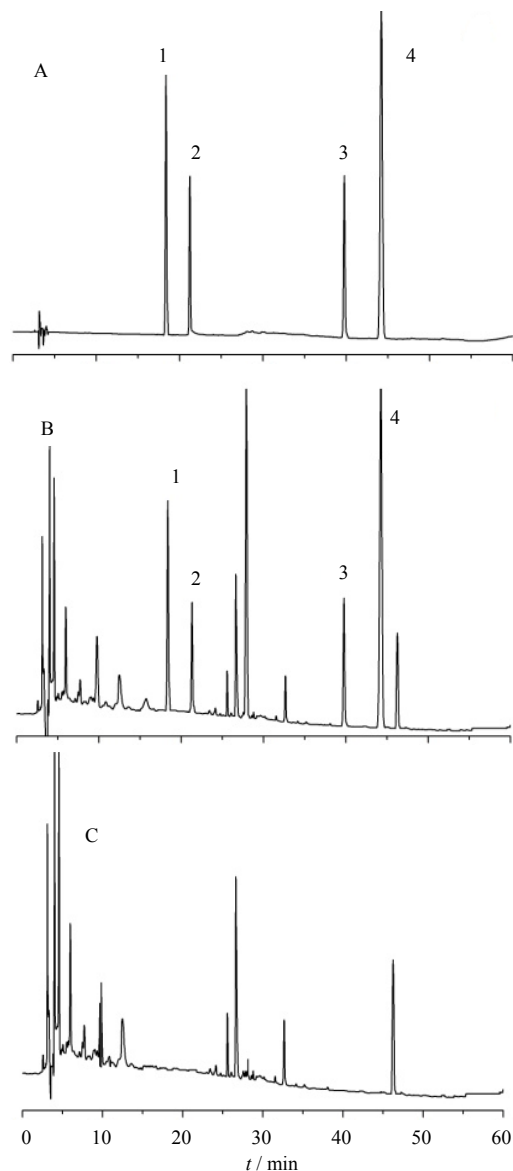
2.2.2 供试品溶液 取本品 20 粒, 精密称定, 取内容物混匀, 精密称取约 2.0 g, 置 50 mL 量瓶中, 加入 70%甲醇适量, 超声处理 30 min, 放冷, 加 70%甲醇稀释至刻度, 滤过, 续滤液作为供试品溶液。

2.2.3 阴性样品溶液 按处方量制备缺熟地黄、酒萸肉和牡丹皮的样品, 同供试品溶液制备方法制备

阴性样品溶液。

2.3 专属性考察

取对照品溶液、供试品溶液和阴性样品溶液分别注入色谱仪, 记录色谱图, 见图 1, 结果表明阴性样品溶液不干扰测定。



1-马钱苷 2-芍药苷 3-毛蕊花糖苷 4-丹皮酚

1- loganin, 2- paeoniflorin, 3- verbascoside 4- paeonolum

图 1 混合对照品 (A)、供试品 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC of mixture reference substances (A), sample (B), and negative sample (C)

2.4 线性关系考察

分别精密量取上述 4 种对照品的储备溶液 0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 加 70%的甲醇稀释至刻度, 照上述色

谱条件试验,记录色谱图以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归,得到4种分析物的回归方程、相关系数,结果见表2。

表2 4种成分的线性范围及回归方程
Table 2 Regression equations and linear ranges of four constituents

成分	线性方程	r	线性范围
毛蕊花糖苷	$Y=28\ 842X+20\ 237$	0.999 7	6~60
马钱苷	$Y=28\ 418X+58\ 988$	0.999 6	15~150
丹皮酚	$Y=19\ 879X+71\ 701$	0.999 8	50~500
芍药苷	$Y=28\ 052X+26\ 122$	0.999 1	5~50

2.5 精密度试验

取样品(批号20130502)依法制成的供试品溶液连续进样6次,记录色谱图,4成分峰面积平均值的RSD值分别为0.54%、0.69%、0.96%、0.68%,表明本法精密度良好。

2.6 稳定性

取样品(批号20130502)依法制成的供试品溶液,每隔2 h进样1次,共6次,记录色谱图,4成分峰面积平均值的RSD值分别为1.28%、1.05%、1.46%、0.99%,表明样品溶液在12 h内稳定。

2.7 加样回收率

分别取用本法测定含量的本品(批号20130502)约1.0 g,精密称定,共9份,分别按样品中所含各成分的80%、100%、120%计算,加一定量的4种对照品的储备溶液,按供试品溶液制备方法处理,按上述色谱条件测定,计算回收率。结果毛蕊花糖苷、马钱苷、丹皮酚和芍药苷的平均加样回收率分别为98.3%、99.3%、99.0%、99.0%,RSD值分别为0.88%、0.75%、0.64%、0.83%。

2.8 样品测定

取3个不同生产厂家不同批号的样品,按照本文方法进行处理,每批平行处理3份,在上述色谱条件下进行分析,并计算各分析物含量,结果见表4。

表4 六味地黄胶囊中4种成分的含量测定结果

Table 4 Determination of four components in Liuwei Dihuang Capsule ($n=3$)

批号	毛蕊花糖苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	马钱苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	丹皮酚/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	芍药苷/ ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
20130502	0.64	1.61	5.72	0.51
1212045	0.82	1.85	6.88	0.71
120703	0.70	1.88	6.59	0.61

3 讨论

由于4种成分的极性差别较大,同时测定时必须用梯度洗脱才能有效分离。根据各成分的理化性质和色谱行为,分别采用了以甲醇-水、乙腈-纯水和1%冰乙酸溶液-乙腈构成的洗脱系统。结果表明,以甲醇-水为系统基线的波动较大,各成分的分离效果不理想,乙腈-纯水系统色谱峰拖尾明显,1%冰乙酸溶液-乙腈系统各成分的色谱峰峰型对称,理论塔板数高,分离度好。

通过调取DAD检测的紫外光谱可知毛蕊花糖苷、马钱苷、丹皮酚和芍药苷的最大吸收波长分别为334、236、274、230 nm,考虑到芍药苷在4种成分中含量较低,而且其他3种成分在230 nm均有较强吸收,因此,选择芍药苷的最大吸收波长作为检测波长,均能满足定量测定的要求。

实验分别用乙醇、50%甲醇、70%的甲醇和甲醇作为溶剂对样品分别进行冷浸、回流和超声提取。结果表明,70%甲醇超声提取完全且杂质干扰峰较少,对超声处理15、20、25、30、35 min进行考察,结果表明,超声处理25 min后各成分含量不再增加,考虑到样品的差异性,选择超声处理30 min。

本实验通过HPLC法梯度洗脱,能快速、准确地对六味地黄胶囊中毛蕊花糖苷、马钱苷、丹皮酚和芍药苷定量测定,可作为六味地黄胶囊质量标准改进的参考。

参考文献

- [1] 喻 箴,熊亚星. 六味地黄胶囊治疗眩晕肾阴虚证临床疗效分析 [J]. 云南中医学院学报, 2005, 28(2): 13-15.
- [2] 韦咏莲. 六味地黄胶囊治疗2型糖尿病疗效观察 [J]. 华夏医学, 2004, 17(1): 59.
- [3] 李平忠,孙 晶. 山茱萸化学成分及其药用与营养价值研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2013, 41(4): 1493-1494.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [5] 温建丽,李艳红. HPLC法测定六味地黄胶囊中酒萸肉的含量 [J]. 科学之友, 2010, (5): 15-16.
- [6] 段 彬,魏玉辉. HPLC法同时测定六味地黄丸中3种成分含量 [J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(4B): 6-67.
- [7] 潘桂玲,韩 强. 高效液相色谱法测定六味地黄胶囊中芍药苷含量的实验研究 [J]. 临床合理用药, 2010, 3(24): 1-2.