

HPLC 法测定知柏地黄颗粒中马钱苷

席美凤

(永州市人民医院 药剂科, 湖南 永州 425006)

知柏地黄颗粒为收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》中成药分册第 5 册知柏地黄片进行剂改而成, 由知母、黄柏、熟地黄、山茱萸、茯苓、牡丹皮、山药、泽泻等组方而成, 具有滋阴降火之功效, 用于阴虚火旺, 潮热盗汗, 口干咽痛, 耳鸣遗精, 小便短赤等症。原知柏地黄片标准项下未制定定量测定。山茱萸为本品臣药, 具有补益肝肾的作用。鉴于《中国药典》2005 年版一部山茱萸项下以马钱苷定量山茱萸, 故本实验选用马钱苷作为测定指标, 拟建立 HPLC 法测定知柏地黄颗粒中马钱苷, 为该制剂生产的质量控制提供依据。

1 仪器与试药

Agilent 1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器, HP 工作站; B3200S 型超声波清洗机; Mettler AE240 型电子分析天平。

马钱苷对照品由中国药品生物制品检定所提供, 批号为 111640-200501; 乙腈为色谱纯, 水为重蒸水, 其他试剂为分析纯。知柏地黄颗粒为湖南中医药大学实验室产品, 规格为每包 5.011 4 g。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱为 Doamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 不锈钢柱; 柱温 35 °C; 流动相为醋酸缓冲液 (pH 4.5)-乙腈-水 (30:15:55); 检测波长为 236 nm; 体积流量为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μL。理论板数按马钱苷计不低于 4 000。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取马钱苷对照品

4.3 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 0.043 mg/mL 的对照品储备溶液。精密吸取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备: 取本品 4 包, 精密称定, 研细, 取约 0.85 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 100 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, 精密吸取续滤液 5 mL, 加在中性氧化铝柱 (100~200 目, 4 g, 内径 1 cm) 上, 用 40% 甲醇 50 mL 洗脱, 收集流出液与洗脱液, 蒸干, 残渣用 50% 甲醇溶解, 并转移至 2 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液制备: 取除山茱萸外的其他处方药材, 按制备工艺制备成缺山茱萸的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法制成缺山茱萸的阴性对照溶液。

2.5 空白干扰试验: 取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μL, 在上述色谱条件下进行测定, 记录色谱图 (图 1)。结果表明马钱苷与其他组分分离完全, 且峰形良好, 阴性样品不干扰测定。

2.6 线性关系的考察: 精密吸取马钱苷对照品贮备溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 于 6 个 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取上述不同质量浓度的溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录峰面积。以质量浓度对峰面积进行回归分析, 得

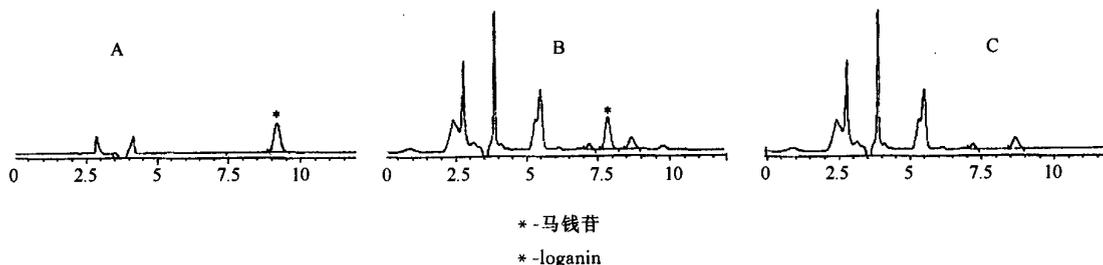


图 1 马钱苷对照品(A)、知柏地黄颗粒(B)和阴性对照(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of oganin reference substance (A), Zhibai Dihuang granule (B), and negative sample (C)

回归方程 $Y=15.70 X+0.148 31$, $r=0.999 7$ 。结果表明马钱苷在 $4.3\sim 215 \mu\text{g/mL}$ 与峰面积呈现良好的线性关系。

2.7 稳定性试验:精密吸取同一马钱苷对照品溶液和知柏地黄颗粒供试品溶液,分别于配制后 0、1、2、4、8、24 h 各进样 $10 \mu\text{L}$,记录峰面积,结果供试品溶液和对照品溶液在 24 h 内稳定,RSD 分别为 0.78% 和 0.89%。

2.8 精密度试验:精密吸取质量浓度为 $43 \mu\text{g/mL}$ 马钱苷对照品溶液 $10 \mu\text{L}$,连续进样 6 次,测定峰面积值,计算得其 RSD 为 0.18%。

2.9 重复性试验:取批号为 20050703 本品 4 包,研细,取细粉 0.85 g,精密称定,共取 6 份,制备供试品溶液,测定,结果马钱苷的质量分数为 2.982 mg/包,RSD 为 0.869%。

2.10 回收率试验:取批号为 20050703 本品(含马钱苷 2.982 mg/包)约 0.637 5 g,精密称定,共取 6 份,各精密加入 0.416 mg/mL 马钱苷对照品溶液 0.6 mL,摇匀,制备供试品溶液并依法测定,结果平均回收率为 100.0%,RSD 为 1.29。

2.11 样品测定:取 10 批样品按上述方法制备供试品溶液。分别精密吸取供试品溶液、马钱苷对照品溶液 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,测定,计算马钱苷的质量分数,结果见表 1。

根据数批成品的测定结果,暂定本品每包含马

表 1 知柏地黄颗粒中的测定结果 ($n=2$)

Table 1 Results of loganin in Zhibai Dihuang Granule ($n=2$)

批号	马钱苷/(mg·包 ⁻¹)	批号	马钱苷/(mg·包 ⁻¹)
20050702	3.150	20051023	2.754
20050703	2.985	20050912	2.901
20050704	2.679	20050913	2.532
20051021	3.273	20050914	2.388
20051022	3.012	20050915	2.823

钱苷不得少于 2.22 mg。

3 讨论

本品中君药为知母,曾摸索测定知母中菝葜皂苷元,但是由于供试品制备时需要酸水解,操作繁琐;且通过实验发现样品稳定性、重复性较差;山茱萸虽为本品臣药,但为名贵中药,常为伪品,故选用马钱苷作为定量测定指标。

在制备供试品溶液的过程中,样品超声处理后取续滤液,需进一步上氧化铝柱去除杂质。样品经上柱处理后,与杂质峰分离度较好,能够准确测得马钱苷;若样品不经上柱处理,直接进样,则杂质峰较多,分离不好,重现性较差。

曾参照《中国药典》2005 年版一部知柏地黄丸项下测定方法,采用有机溶剂混流动相,结果马钱苷峰形拖尾严重,于是换作缓冲盐溶液作流动相。经筛选发现流动相 pH 4.5 的醋酸盐缓冲液-乙腈-水 (30 : 15 : 55) 时分离效果好,峰形对称。

(上接第 995 页)

CDCl_3), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.83, 0.89 (3H, d, $J=7 \text{ Hz}$, CH_3), 1.68 (6H, s), 5.40, 5.47 (1H, m)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : 15.8, 21.3, 21.7, 23.9, 24.5, 24.7, 26.6, 30.5, 36.7, 39.1, 41.0, 121.5, 124.1, 134.4, 136.4。以上数据与文献报道对照一致^[5],确定该化合物为 α -杜松烯。

References:

[1] Shen Z B, Jin Z X, Zhang D L. Pharmacological study on psoriasis of *Dryopteris fragrans* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(5): 448-449.

[2] Shen Z B, Jin Z X, Zhang D L. Pharmacognostical studies on *Dryopteris fragrans* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(7): 661-663.
 [3] Shen Z B, Ma Y L, Jiang W X. Inhibition of *Dryopteris fragrans* against epiphyte [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(5): 735-736.
 [4] Shen Z B, Ma Y L, Jin Z X, et al. Chemical constituents of *Dryopteris fragrans* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(5): 378-379.
 [5] Ito H, Muranaka T, Mori K, et al. Ichthyotoxic phloroglucinol derivatives from *Dryopteris fragrans* and their anti-tumor promoting activity [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(8): 1190-1195.

