

文章编号: 1006-2858(2011)12-0949-06

HPLC 等吸收双波长法同时测定桂附地黄丸中 5 种成分的含量

车磊, 孙国祥

(沈阳药科大学 药学院 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立同时测定桂附地黄丸中没食子酸、5-羟甲基糠醛、马钱苷、芍药苷和丹皮酚 5 种成分的反相高效液相色谱分析方法。方法 色谱柱为 Sciencome Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 流动相 A 为体积分数为 0.1% 的磷酸溶液、B 为体积分数为 0.1% 的磷酸甲醇溶液 梯度洗脱 柱温(30.00 ± 0.15) °C 检测波长为 190 ~ 400 nm DAD 检测。结果 没食子酸、5-羟甲基糠醛、马钱苷、芍药苷和丹皮酚分别在 0.06 ~ 1.60、0.06 ~ 1.60、0.05 ~ 0.60、0.05 ~ 0.60 和 0.12 ~ 3.20 g·L⁻¹ 内峰面积与质量浓度呈良好的线性关系。5 种成分的平均回收率分别为 98.7%、101.2%、99.0%、98.5% 和 99.6%。结论 该方法可用于桂附地黄丸的质量控制。

关键词: 桂附地黄丸; 等吸收双波长法; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 马钱苷; 芍药苷; 丹皮酚
中图分类号: R 917 **文献标志码:** A

桂附地黄丸(Guifudihuang pills, GFDHP)出自金匱肾气方,由肉桂、附子(制)、熟地黄、山茱萸(制)、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻八味药组成。功擅温补肾阳,用于肾阳不足,腰膝酸冷,肢体浮肿,小便不利或反多,痰饮喘咳,消渴^[1]。君药熟地黄含有 5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl-2-furaldehyde 5-HMF),是熟地黄限量控制的客观指标之一^[2]。臣药之一山茱萸主要成分为马钱苷(loganin, LGN)和没食子酸(gallic acid, GA),有补益肝肾,涩精固脱的功效^[3]。佐药之一牡丹皮的主要成分为丹皮酚(paeonol, POL)和芍药苷(paeoniflorin, PNF),有清热凉血,活血化瘀的功效^[4]。5 种成分的化学结构见图 1。有文献对上述各活性成分的定量分析方法进行过报道^[5-7],而关于 GFDHW 的质量控制方法仅对其中的单一或两组

分进行定量研究^[8-10]。2010 年版《中华人民共和国药典》也仅以 LGN 和 POL 含量作为质控指标,对其他成分无含量控制标准。试验中发现在选定的色谱系统条件下, LGN 和 PNF 的色谱峰完全重叠。考虑到 2 种物质的紫外吸收光谱有差异,应用 Agilent1100 配有的 DAD 检测器和 ChemStation 工作站,利用等吸收双波长法对谱图进行处理,不经色谱分离即可实现对 2 组分的定量分析。有报道采用等吸收双波长法对组分进行分析测定^[11-12],但未见 GFDHW 有关方面的研究。本文作者采用 HPLC 等吸收双波长法同时对 GFDHW 中的 GA、5-HMF、LGN、PNF 和 POL 5 种成分进行含量测定^[13-15],具有简便、准确、无干扰的特点,对全面有效地控制该制剂的质量具有重要意义。

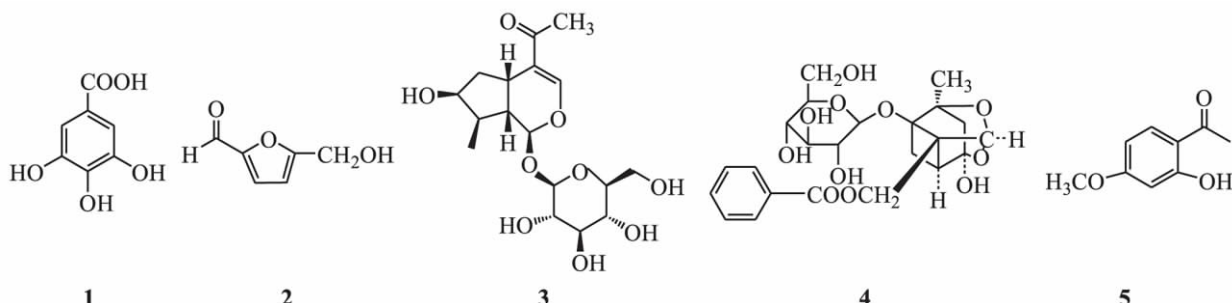


Fig. 1 Structures of gallic acid(1) 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde(2) loganin(3) paeoniflorin(4) paeonol(5)

收稿日期: 2011-04-08

作者简介: 车磊(1985-) 女(汉族) 黑龙江佳木斯人, 硕士研究生, E-mail chelei1985@126.com; 孙国祥(1962-) 男(汉族) 辽宁凌源人, 教授, 主要从事中药指纹图谱及其信息学研究, Tel. 024-23986286, E-mail gxswmwys@163.com。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(配有 DAD 检测器,美国 Agilent 公司),ChemStation 工作站,RE-52 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),Sartorius-BS110S 分析天平(北京赛多利斯天平有限公司),KDM 型控温电热套(山东鄄城华鲁仪器公司)。

甲醇(色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司),乙醇(分析纯,沈阳市富康消毒药剂厂),磷酸(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司),水为去离子水(沈阳药科大学水站)。

没食子酸(gallic acid,GA,批号 110831-200803)对照品、5-羟甲基糠醛(5-hydroxymethyl-2-fural dehyde,5-HMF,批号 111626-200905)对照品、马钱苷(loganin,LGN,批号 111640-200503)对照品、芍药苷(paeoniflorin,PNF,批号 110736-200933)对照品、丹皮酚(paeonol,POL,批号 110708-200505)对照品,均购自中国药品生物制品检定所。

12 批桂附地黄丸均为市售品,编号为 S1-S12。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Sciencelhome Kromasil C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相 A 为体积分数为 0.1% 的磷酸溶液,B 为体积分数为 0.1% 的磷酸甲醇溶液,梯度洗脱(0~10 min,体积分数为 5%~15% B;10~30 min,体积分数为 15%~60% B;30~40 min,体积分数为 60%~85% B;40~45 min,体积分数为 85%~100% B;45~60 min,体积分数为 100% B);流速:1.0 mL·min⁻¹;紫外检测波长:190~400 nm;柱温:(30±0.15)℃;进样量:3 μL;洗脱时间:60 min。

2.2 对照品溶液制备

取 GA、5-HMF 和 POL 3 种对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为 GA 5 g·L⁻¹、5-HMF 5 g·L⁻¹和 POL 10 g·L⁻¹的混合溶液,作为混合对照品溶液。

分别取 LGN 和 PNF 对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 LGN-PNF(g·L⁻¹):0.60-0、0.55-0.05、0.50-0.10、0.40-0.20、0.30-

0.30、0.20-0.40、0.10-0.50、0.05-0.55 和 0-0.60 的 9 组混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

取桂附地黄丸适量(约相当于原药材 6 g),精密称定,加乙醇 40 mL,回流提取 1.5 h,滤过,残渣加体积分数为 50% 的乙醇 25 mL 继续回流提取 1 h,滤过。合并 2 次滤液,减压浓缩至约 15 mL,用体积分数为 75% 的乙醇定容至 25 mL,摇匀,作为供试品溶液。

2.4 阴性样品供试液制备

按处方比例分别称取除熟地黄、山茱萸和牡丹皮以外的其余药味,按“2.3”条方法操作,分别制成缺少 5-HMF、GA、和 POL 的阴性样品,作为阴性样品供试液。

2.5 HPLC-DAD 等吸收双波长法原理

色谱峰重叠但在线吸收光谱有差异的 a、b 2 组分混合物,要消除 b 的干扰以测定 a,可从 b 的吸收光谱图上选择两个吸光度相等的波长 λ₁ 和 λ₂,测定混合物的色谱峰面积差,根据色谱峰面积差值来计算 a 的含量,同法可测定 b。波长选择的原则: a. 干扰组分 b 在这 2 个波长处应具有相等吸光度(色谱峰面积差几乎为 0),即 ΔA^b = A_{λ₁}^b - A_{λ₂}^b = 0; b. 待测组分在这 2 个波长处的吸收峰面积差值 ΔA^a 应足够大(色谱峰面积差越大越好)。在 LGN 和 PNF 的单一对照品溶液的 HPLC-DAD 在线光谱中进行双波长的选择。Agilent ChemStation 工作站可以得到 2 个谱图的差谱,应用等吸收双波长法原理可消去双组分重叠峰中某一个组分对色谱峰的贡献,求得另一组分的含量。

2.6 样品溶液提取方法的选择

考察了以水、体积分数分别为 25%、50%、75%、95% 的乙醇和甲醇为提取溶剂,按“2.3”条方法制备 GFDHP 供试液,其中前 3 者经体积分数为 80% 乙醇醇沉 12 h。将上述各供试液进样分析,记录色谱图。通过比较色谱图最终确定用体积分数为 95% 的乙醇 40 mL,回流提取 1.5 h,滤过,残渣加体积分数为 50% 的乙醇 25 mL 继续回流提取 1 h,滤过;合并 2 次滤液,减压浓缩至约 15 mL,用体积分数 75% 的乙醇定容至 25 mL。

2.7 检测波长的选择

GFDHP 主要含糖类、三萜类和有机酸类等化学成分,在 200~250 nm 处有较强的紫外吸收。在 210、230、246、265、280 nm 5 个波长处进行测

定, 尤以 230 nm 波长下, 出峰多, 分离好, 响应值高, 因此确定在 230 nm 波长处测定 GFDHP 中 GA、5-HMF 和 POL 3 组分含量。但 PNF 和 LGN 在此色谱条件下色谱峰完全重叠, 作者利用 DAD 检测器记录 190-400 nm 信号, 依据 2 组分的紫外吸收光谱特征, 应用等吸收双波长法作为 GFDHP 中 PNF 和 LGN 的定量方法。选定 PNF 的测定波长为 231 nm, 参比波长为 245 nm; LGN 的测定波长为 245 nm, 参比波长为 218 nm; 见图 2、3。

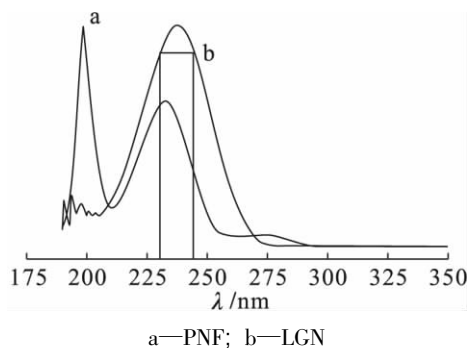


Fig. 2 The choice of PNF wavelength

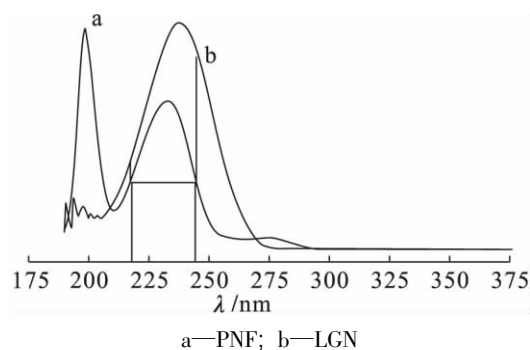


Fig. 3 The choice of LGN wavelength

2.8 系统适用性试验

分别取 GA、LGN、PNF、POL 对照品溶液、5 种对照品混合溶液、S1 供试品溶液和各种阴性样品供试液, 每种溶液各为 3 μ L 进样分析, 记录色谱图(见图 4)。结果以 POL 峰计算理论塔板数为 12 225; 除 LGN 与 PNF 色谱峰完全重叠外, GA、5-HMF 和 POL 与相邻组分的分离度均大于 1.5, 达到基线分离, 表明可对此 5 种成分同时进行定量分析。

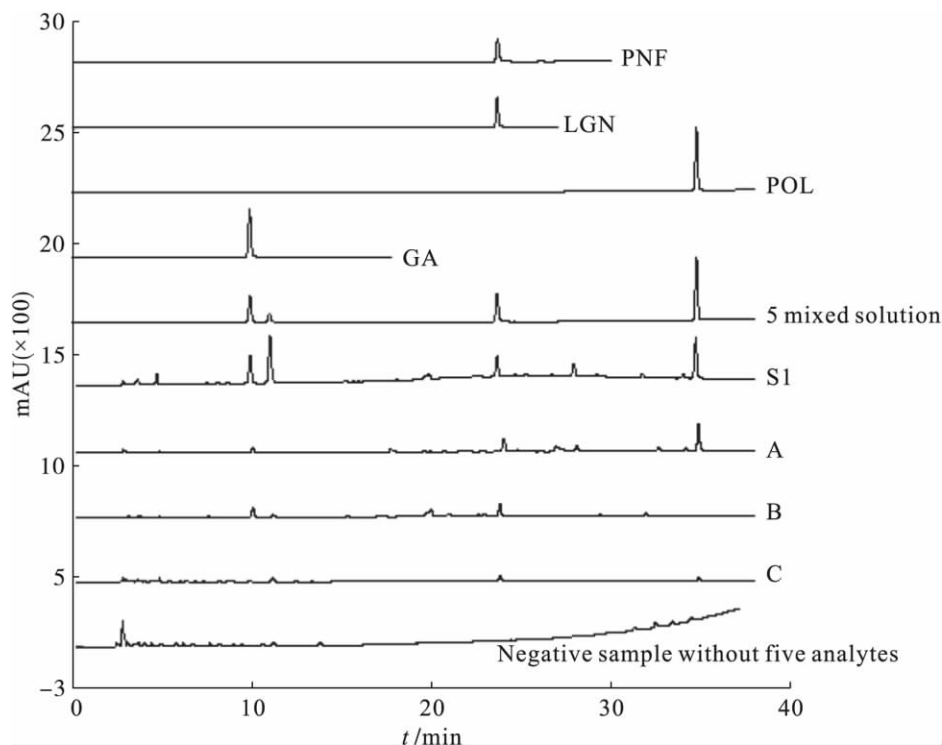


Fig. 4 The chromatograms of PNF standard, LGN standard, POL standard, GA standard, 5 mixed solution, sample 1 (S1), negative sample without *Rehmannia glutinosa* Libosch (A), negative sample without *Paenonia suffruticosa* Andr (B), negative sample without *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc (C) and negative sample without five analytes

2.9 方法学考察

2.9.1 线性关系考察

精密量取混合对照品溶液 0.12、0.20、0.40、1.00、2.00 和 3.20 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 得 3 组分系列混合标准

溶液。分别进样 3 μ L, 记录色谱图。以标准溶液的质量浓度(ρ)为横坐标, 以 230 nm 处的峰面积(A)为纵坐标, 制作标准曲线。取 LGN-PNF 的 9 组混合对照品溶液, 分别进样 3 μ L, 记录色谱图。以标准溶液的质量浓度(ρ)为横坐标, 以峰

面积差值(ΔA)为纵坐标,制作标准曲线。线性方程、线性范围及相关系数如表1所示。

Table 1 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients of the five components

| Analyte | Regression equation | r | $\rho_{\text{linear range}} / (\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ |
|---------|---------------------------------|---------|---|
| GA | $A = 2\,295.1\rho + 20.6$ | 0.999 8 | 0.06-1.60 |
| 5-HMF | $A = 1\,395.7\rho + 7.0$ | 0.999 8 | 0.06-1.60 |
| POL | $A = 3\,176.7\rho + 82.7$ | 0.999 6 | 0.12-3.20 |
| LGN | $\Delta A = 1\,622.4\rho - 0.4$ | 0.999 8 | 0.05-0.60 |
| PNF | $\Delta A = 1\,633.6\rho + 3.2$ | 0.999 7 | 0.05-0.60 |

2.9.2 精密度试验

精密量取5组分混合对照品溶液3 μL ,在上述色谱条件下测定,重复进样分析6次,记录色谱图。测得GA、5-HMF、LGN、PNF和POL峰面积的RSD分别为0.9%、1.5%、1.3%、1.6%和1.8%,表明仪器精密度良好。

2.9.3 稳定性试验

精密量取S1(批号:80080543)供试品溶液3 μL ,分别在配制完0、3、5、7、9、12 h进样,记录峰面积。测得GA、5-HMF、LGN、PNF和POL峰面积的RSD分别为1.2%、1.3%、1.7%、1.3%和1.0%,表明样品在12 h内稳定。

2.9.4 重复性试验

取S1(批号:80080543)样品,按“2.3”条分别制备6份供试品溶液,在上述色谱条件下测定,记录色谱图,计算供试品中GA、5-HMF、LGN、PNF和POL的含量。测得其含量的RSD分别为0.7%、1.1%、1.7%、1.7%和0.5%,表明方法重复性良好。

2.9.5 回收试验

精密称取已知含量的S8(批号:100407)6份,每份样品中分别精密加入质量浓度为5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的GA对照品溶液2.0 mL、5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的5-HMF对照品溶液1.8 mL、6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的PNF对照品溶液0.7 mL、6 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LGN对照品溶液0.9 mL和10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的POL对照品溶液0.8 mL。按所建立的方法进行处理和测定,记录色谱图,5种成分的平均回收率分别为98.7%、101.2%、99.0%、98.5%和99.6%。

2.9.6 样品含量测定

将12批GFDHP的供试品溶液分别进样检测,记录色谱图,用标准曲线分别计算供试液中5组分的含量,并换算成其在桂附地黄丸制剂中的含量,结果见表2。将12批样品含量结果进行聚类分析见图5。当类间距离大于10时,12批样品质量可被明显的划分为3类,除S1和S8外,其余同一厂家不同批号的样品均被划分为一类,说明本方法能够从整体上鉴别出GFDHP的质量。

Table 2 Contents of the five components in GFDHW

| Sample | Factory | Batch No. | $w/\%$ | | | | |
|--------|--|-----------|--------|-------|------|------|------|
| | | | GA | 5-HMF | LGN | PNF | POL |
| 1 | Lanzhou Taibao Pharmaceutical Co., LTD | 80080543 | 0.39 | 0.22 | 0.11 | 0.08 | 0.10 |
| 2 | Lanzhou Taibao Pharmaceutical Co., LTD | 80081220 | 0.39 | 0.34 | 0.16 | 0.11 | 0.42 |
| 3 | Lanzhou Taibao Pharmaceutical Co., LTD | 80090112 | 0.32 | 0.28 | 0.15 | 0.10 | 0.47 |
| 4 | Lanzhou Taibao Pharmaceutical Co., LTD | 80100102 | 0.19 | 0.36 | 0.14 | 0.10 | 0.39 |
| 5 | Henan Wanxi Pharmaceutical Co., LTD | 090205 | 0.40 | 0.38 | 0.18 | 0.17 | 0.21 |
| 6 | Henan Wanxi Pharmaceutical Co., LTD | 090703 | 0.36 | 0.30 | 0.18 | 0.15 | 0.17 |
| 7 | Henan Wanxi Pharmaceutical Co., LTD | 081106 | 0.31 | 0.36 | 0.15 | 0.16 | 0.18 |
| 8 | Henan Wanxi Pharmaceutical Co., LTD | 100407 | 0.34 | 0.30 | 0.19 | 0.14 | 0.36 |
| 9 | Anqing Huidafeng Pharmaceutical Co., LTD | 080514 | 0.66 | 0.24 | 0.10 | 0.15 | 0.34 |
| 10 | Jiangxi Zhangshu Pharmaceutical Co., LTD | 091001 | 0.31 | 0.45 | 0.10 | 0.11 | 0.22 |
| 11 | Sichuan Mianyang Pharmaceutical Co., LTD | 55080001 | 0.29 | 0.47 | 0.11 | 0.07 | 0.24 |
| 12 | Beijing Tong Pharmaceutical Co., LTD | 7032667 | 0.18 | 0.13 | 0.13 | 0.13 | 0.35 |

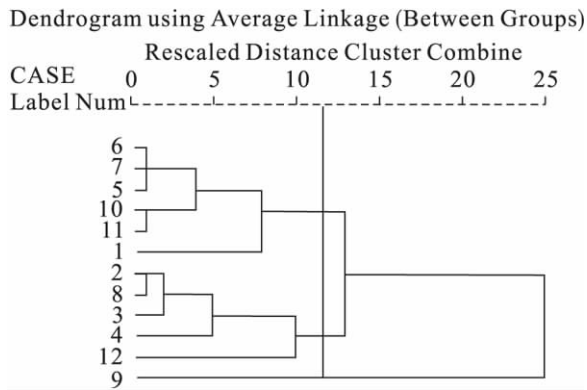


Fig. 5 Twelve batches of GFDHP cluster analysis diagram by the five component contents

3 结论

本文作者建立了一种同时测定 GFDHW 中 5 种有效成分的反相高效液相色谱法。应用等吸收双波长法对色谱峰重叠的两组分实现了定量分析,为 HPLC 实验中色谱峰重叠组分的含量测定提供了一种新的方法。对五种组分的含量测定结果进行聚类分析,表明本方法能够从整体上控制 GFDHW 的质量。分析方法简便、准确,为全面控制该制剂的质量提供了一种简单、可行的定量分析方法。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 981-982.

[2] 秦向阳, 孙晓莉, 李晓晔, 等. 反相高效液相色谱法测定参血敏胶囊中 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 360-361.

[3] 戴建子, 张志豪, 唐蕾, 等. 山茱萸化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药业, 2006, 15(2): 74-75.

[4] 张健萍, 李连珍, 赵红江, 等. 牡丹皮的化学成分、药理作用及临床应用研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(5): 295-297.

[5] 秦向阳, 周军, 李晓晔, 等. RP-HPLC 法测定熟地黄中 5-羟甲基糠醛的含量[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(6): 510-511.

[6] 罗燕子. HPLC 法测定山茱萸中没食子酸的含量[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(4): 18-19.

[7] 王祝举, 唐力英, 赫炎, 等. 高效液相色谱法测定牡丹皮中芍药苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(8): 12-13.

[8] 钟镜金, 杨仙芳. HPLC 法测定桂附地黄丸中桂皮醛的含量[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(2): 415-416.

[9] 焦少珍, 李宇, 韩凤梅, 等. RP-HPLC 法测定桂附地黄丸中芍药苷和丹皮酚[J]. 中草药, 2007, 38(6): 855-856.

[10] 曾敏华. 桂附地黄丸中马钱苷的含量测定[J]. 中医药导报, 2008, 14(9): 79-80.

[11] 王春艳, 张志. 双波长分光光度法测定复方吲哚美辛栓中吲哚美辛的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2004, 21(4): 303-304.

[12] 张锦. 双波长等吸收法测定泻痢停片中两主成份的含量[J]. 华西药学杂志, 2002, 17(2): 142-143.

[13] 丁晓菊, 赵云丽, 高晓霞, 等. 高效液相色谱法同时测定厚朴温中胶囊中的 7 种有效成分[J]. 色谱, 2009, 27(1): 107-110.

[14] 董丽, 孙祥德, 李琴. 高效液相色谱双波长检测法测定维 C 银翘片中 4 种组分的含量[J]. 色谱, 2010, 28(2): 204-208.

[15] 毕雨萌, 孙国祥, 杨宏涛. RP-HPLC 法同时测定银杏达莫注射液四种成分的含量[J]. 中成药, 2007, 29(11): 1620-1623.

Determination of the five components in Guifudihuang pills by HPLC with dual wave length-equal absorbance

CHE Lei, SUN Guo-xiang

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for the simultaneous determination of the five components in Guifudihuang pills (GFDHP, traditional Chinese medicines). **Methods** GFDHP was separated by

RP-HPLC on Scienhome Kromasil C₁₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm) column with the gradient elution solvent composed of 0.1% (φ) phosphoric acid water and 0.1% (φ) phosphoric acid methanol. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was maintained at (30.00 ± 0.15) °C, and UV detection wavelengths were set from 190 to 400 nm to determine the contents of the five components. **Results** Good linear relationships were obtained between peak area and concentrations of the five components, and the calibration curves were linear in the ranges of 0.06–1.60, 0.06–1.60, 0.05–0.60, 0.05–0.60, 0.12–3.20 g·L⁻¹ for the gallic acid, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, loganin, paeoniflorin and paeonol, respectively. The average recoveries were 98.7%, 101.2%, 99.0%, 98.5% and 99.6%, respectively. **Conclusions** This method is simple and accurate. It can be used for the quality control of the GFDHP.

Key words: Guifudihuang pills (GFDHP); dual wave length-equal absorbance; gallic acid; 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde; loganin; paeoniflorin; paeonol

(上接第 948 页)

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 73–74.
- [2] 宋振巧, 王洪刚, 王建华. 栝楼的研究进展 [J]. 山东农业科学, 2005(5): 72–75.
- [3] LOUIS C, GERARD D, YAYA S. Heteromacrocycles from ring-closing metathesis of unsaturated furanic ethers [J]. Synthetic Communications, 2003, 33(24): 4285–4295.
- [4] 郝峰, 邓君, 王彦涵. 藏药短管兔耳草的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(7): 869–871.
- [5] DAE H C, SEONG H S, DOO O J. A method for preparation of unnatural (R)-malic acid derivatives with phenylsilanes [J]. Synthetic communications, 2003, 33(4): 515–519.

Isolation and identification of constituents from fruit of *Trichosanthes kirilowii* Maxim.

FAN Xue-mei, CHEN Gang, SU Shan-shan, LU Xuan, PEI Yue-hu

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: **Objective** To isolate and identify the chemical constituents of the butanol extract part of the fruit of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. ethanol extract. **Methods** The chemical constituents of *T. kirilowii* Maxim. were studied by multiple chromatographical techniques (such as silica gel chromatography, Sephadex LH-20, prepertion HPLC and etc.) and these compounds were identified by analysis of the spectral data and chemical properties. **Results** On the basis of physio-chemical evidence and spectral analysis, the structures of the 4 compounds were identified as follows: furan-2,5-diyl dimethanol (1), chrysoerid-7-O-β-D-glucoside (2), dibutyl 2-hydroxysuccinate (3), [2,2'-Bioxazolidine]-3,3'-diethanol (4). **Conclusions** All the mentioned compounds are isolated from this genus for the first time, and compound 4 is isolated from natural products for the first time.

Key words: Fructus trichosanthis; chemical constituent; structure identification