

高效液相色谱法测定知柏地黄丸中马钱苷及菝葜皂苷元的含量

刘海兰¹ 骆桂法² 张巍云¹

(1 青海省中医院药剂科, 西宁, 810000; 2 青海省药品检验检测院, 西宁, 810016)

摘要 目的:通过高效液相色谱法测定知柏地黄丸中有效成分马钱苷及菝葜皂苷元的含量。方法:选取高效液相色谱法对知柏地黄丸中成分的含量进行测定。色谱条件采用 C₁₈ 色谱柱(型号为 Eclipse XDB), 该色谱柱的长度为 250 mm, 色谱柱内径为 4.6 mm, 色谱柱填料颗粒直径为 5 μm。进样量为 20 μL, 流动相采用乙腈(A 相)和 0.1% 磷酸水溶液(B 相)的二元体系进行梯度洗脱。高效液相色谱法(HPLC)严谨性考察, 包括线性关系、精密性、重复性、稳定性和加样回收试验考察, 结果:阴性对照品溶液 1 在与马钱苷对照品溶液和供试品溶液色谱图相同时间处未见相同色谱峰; 阴性对照品 2 在与菝葜皂苷元对照品溶液和供试品溶液色谱图相同时间处未见相同色谱峰。线性考察结果显示回归方程、相关系数和线性范围分别是:马钱苷在 0.040 54~4.054 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 其回归方程为 $Y = 611.16X + 5\,664.1$ ($r = 0.999\,7$); 菝葜皂苷元进样量在 0.440 01~4.353 μg 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系, 回归方程 $Y = 1.639\,7X + 11.549$ ($r = 0.999\,8$)。精密性试验:RSD = 0.79%; 稳定性试验:色谱峰相对峰面积 RSD 平均值 1.716%; 重复性试验:色谱峰相对峰面积 RSD 平均值 2.011%。马钱苷对照品溶液、菝葜皂苷元对照品溶液平均回收率分别为 105.719%、98.865%, RSD 分别为 1.29%、1.36%。201805026、201806013、201807085 等 3 个不同批次号的知柏地黄丸中, 马钱苷成分和菝葜皂苷元成分的含量差异无统计学意义。结论:高效液相色谱法的操作简单, 结果具有较好的精密性、稳定性和重复性, 可作为知柏地黄丸质量控制的有效方法, 而不同批次知柏地黄丸中有效成分含量未见明显差异。

关键词 高效液相色谱法; 知柏地黄丸; 马钱苷; 菝葜皂苷元; 精密性; 稳定性; 重复性; 专属性

Determination of Loganin and Sarsasapogenin in Zhibai Dihuang Pills by HPLC

Liu Hailan¹, Luo Guifa², Zhang Weiyun¹

(1 Pharmaceutical Preparation Section of Qinghai Provincial Hospital of TCM, Xi'ning 810000, China;

2 Qinghai Provincial Pharmaceutical Examination and Test Institution, Xi'ning 810016, Qinghai)

Abstract Objective: To determine the content of loganin and sarsasapogenin in Zhibai Dihuang Pills by HPLC. **Methods:** The chromatographic conditions were determined by C₁₈ column (type Eclipse XDB). The length of the column was 250 mm, the diameter of the packing particles in the column was 5 micron, and the inner diameter of the column was 4.6 mm. A binary system of acetonitrile (A phase) and 0.1% phosphoric acid aqueous solution (B phase) was used for gradient elution. The method of high performance liquid chromatography (HPLC) was rigorous, including linear relationship, precision, repeatability, stability and sample recovery test. Based on the rigorous premise of HPLC, the content of Zhibai Dihuang Pills was determined. **Results:** 1) Negative reference solution 1 did not show the same chromatographic peak at the same time as loganin reference solution and test solution, while negative reference solution 2 did not show the same chromatographic peak at the same time as sarsasapogenin reference solution and test solution. The results showed that loganin and sarsapogenin had good specificity. 2) Linear regression equation, correlation coefficient and linear range were: loganin had good linear relationship with peak area in the range of 0.040 54~4.054 μg, and the regression equation was $Y = 611.16X + 5\,664.1$ ($r = 0.999\,7$); sarsapogenin injection was 0.44 μg, and the regression equation $Y = 1.639\,7X + 11.549$ ($r = 0.999\,8$) was obtained. 3) The precision test showed that the RSD was 0.79%. The stability test showed that the RSD average value of the relative peak area was 1.716%. It indicated that the stability of Zhibai Dihuang Pills was good within 24 hours. The value was 2.011%, indicating that the solution of Zhibai Dihuang Pills had good reproducibility. 4) The results showed that the average recoveries of loganin and sarsapogenin were 105.719% and 98.865% and RSD were 1.29% and 1.36% respectively, suggesting that the high-phase liquid phase detection method was reliable. 5) The contents of strychnine and sarsapogenin in Zhibai Dihuang Pills of different batches, such as 201805026, 201806013 and 201807085, were not significantly different. **Conclusion:** The HPLC method is simple, accurate, stable and reproducible. It can be used as an effective method for quality control of Zhibai Dihuang Pills. There was no significant difference in the content of active ingredients in different batches of

Zhibai Dihuang Pills.

Key Words High performance liquid chromatography; Zhibai Dihuang Pills; Loganin; Sarsapogenin; Precision; Stability; Repeatability; Specificity

中图分类号:R289.4;R2847 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.08.014

知柏地黄丸是由中药知母、黄柏、熟地黄、山药、山茱萸(制)、牡丹皮、茯苓、泽泻,以蜂蜜为辅料制作而成的中成药,知柏地黄丸出自《医宗金鉴》,是在六味地黄丸的基础上加了知母和黄柏两味药,全方共奏滋肝脾肾阴,清相火泄湿浊之效^[1]。根据《药性论》所述山茱萸曰:“止月水不定,补肾气,兴阳道,添精髓,疗耳鸣,止老人尿不节”。即山茱萸具有补益肝肾,涩精固脱的功效,临床主要用于遗尿^[1]、崩漏^[1-2]、阳痿^[1,3-4]等病证;山茱萸的主要成分含有马钱苷,药理学研究发现,马钱苷能有效增强小鼠的抗疲劳能力和提高小鼠的记忆力等^[5-6]。根据《用药法象》所描述知母曰:“泻无根之肾火,疗有汗之骨蒸,止虚劳之热,滋化源之阴”。即知母具有清热泻火、生津润燥之功,用于骨蒸潮热和内热消渴疗效奇佳,现代药理学显示,知母的主要成分之一为菝葜皂苷元^[7-8]。有研究发现,菝葜皂苷元能有效改善骨质疏松,同时能够上调超氧化物歧化酶的表达水平,增强大鼠的抗氧化能力^[9-10]。尽管知柏地黄丸在临床上已经使用多年,且疗效良好,但是对其药物的有效成分进行定量分析的研究仍较少,未能有效建立一种中药质量评定方法,不利于本品的产品质量控制。高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)是目前在中药成分研究领域中最为广泛使用的分析方法之一,其具有应用范围广、检测分析快、药物分离、检出灵敏度高、操作自动简便等优点^[11-12],本研究使用 HPLC 对知柏地黄丸中马钱苷和菝葜皂苷元这 2 个成分含量进行测定。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 高效液相(型号:1200 型),其中该色谱系统还包括以下主要适配零件和系统,如二极管阵列 DAD 检测器(型号:G1315D 型)、四元梯度泵(型号:G1311A 型)、柱温箱(型号:G1316A 型)、在线脱气机和化学工作站(型号:G1322A 型)。购买于上海精密仪器仪表公司的电子分析天平(型号:FA1004N 型)和超声波清洗器(型号:KQ-100DE);购买于法国 MILIPORE 公司的超纯水系统(型号:Mili-RO Plus 型);上海科导超声仪器有限公司;双光束紫外可见分光光度计(型号:MQK-UV1800 型)购买于上海米青科实业有限公司。

1.2 试药 于中国药品生物制品检定所购买马钱苷对照品和菝葜皂苷元对照品,批号分别为 11640-200502、11074-20041。于美国 Fisher 公司购买色谱纯乙腈和甲醇,批号分别为:102489、101437。于上海拓国沪试实验室器材股份有限公司购买的磷酸分析纯(AR 级,批号:20170412)。

1.3 分析药品 知柏地黄丸(由九芝堂股份有限公司,国药准字 Z11020152),选择 201805026、201806013、201807085 等 3 个不同批次。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 C₁₈ 色谱柱(型号为 Eclipse XDB),该色谱柱的长度为 250 mm,色谱柱内径为 4.6 mm,色谱柱填料颗粒直径为 5 μm,柱温 25 ℃。进样量为 20 μL,流动相采用乙腈(A 相)和 0.1% 磷酸水溶液(B 相)的二元体系进行梯度洗脱,具体的梯度洗脱程序和流速见表 1。

表 1 梯度洗脱程序(流速 1.0 mL/min)

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0 ~ 10	12	88
10 ~ 11	12 ~ 40	88 ~ 60
11 ~ 25	40	60
25 ~ 26	40 ~ 12	60 ~ 88
26 ~ 29	12	88

2.2 对照品溶液的配制 精密称取马钱苷对照品,加 80% 甲醇制成每毫升含马钱苷 30 μg 的溶液,即得马钱苷对照品溶液。精密称取菝葜皂苷元对照品适量,加甲醇制成每 1.0 mL 含 0.2 mg 的溶液,即得菝葜皂苷元对照品溶液。混合对照品即取适量菝葜皂苷元对照品溶液和马钱苷对照品溶液混合均匀即得。

2.3 供试品溶液的配制 精密称定知柏地黄丸 1 g,置于具塞锥形瓶中,用量筒精密加入乙醇 20 mL,称定重量并记录,浸泡过夜。超声处理(功率 250 W,频率 30 kHz)20 min,待冷却后称定重量并记录,用乙醇补足重量差,摇匀,取滤过液待用。精密量取滤过液 10 mL,蒸干,加水 and 盐酸分别为 10 mL、1 mL,采用加热回流法 2 h 后关火,取出冷却至 25 ℃,一边滴加 40% 氢氧化钠溶液一边均匀振摇充分混合,至溶液颜色由橙黄突变为橙红停止滴加 40% 氢氧化钠溶液;在此基础上用三氯甲烷振摇提

取 2 次,30 mL/次,合并 2 次三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取过滤液,即得知柏地黄丸供试品溶液。阴性对照品溶液 1,知柏地黄丸去山茱萸后同供试品溶液提取方法即得;阴性对照品溶液 2,知柏地黄丸去知母后同供试品溶液提取方法即得。

2.4 专属性试验 取 20 μL 马钱苷对照品溶液、菝葜皂苷元对照品溶液、供试品溶液和各自对应的阴性对照品溶液,根据 2.1 的色谱条件进行专属性试验,结果显示阴性对照品溶液 1 在与马钱苷对照品溶液和供试品溶液色谱图相同时间处未见相同色谱峰;阴性对照品 2 在与菝葜皂苷元对照品溶液和供试品溶液色谱图相同时间处未见相同色谱峰。提示马钱苷和菝葜皂苷元具有良好的专属性。见图 1。

2.5 线性关系考察 精密称取马钱苷对照品 10.14 mg,放置 25 mL 量瓶中,加入 80% 甲醇溶解并稀释至刻度定容,即得含马钱苷 0.405 3 mg/mL 的马钱苷对照品溶液,分别精密吸取 2、3、5、10、20 μL,按照“2.1”项下色谱方法进样。以峰面积积分值(Y)的自然对数为纵坐标,以进样量的自然对数(X)为横坐标,进行线性回归。结果表明,马钱苷在 0.040 54~4.054 μg 范围内与峰面积良好的线性关系,其回归方程为 $Y = 611.16X + 566.4.1$ ($r = 0.9997$)。精密量取浓度为 0.217 3 mg/mL 的菝葜皂苷元对照品溶液适量,同马钱苷线性回归方法,得回归方程 $Y = 1.6397X + 11.549$ ($r = 0.9998$)。结果表明,菝葜皂苷元进样量在 0.440 01~4.353 μg 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。见表 2。

2.6 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液,在一组相同的测量程序、相同测试地点和相同的色谱条件等情况下,连续进样 6 次,进样 20 μL/次。结果显

示, $RSD = 0.79\%$,表明高效液相仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 由于固定相的有限稳定性,为确保每一次研究之间的结果误差最小,进行指纹图谱对比研究之前,取同一批号供试品溶液以确定供试品溶液的稳定性,分别室温放置 0、4、8、12、24 h 后进行 HPLC 检测,各色谱峰相对峰面积的 $RSD < 3\%$ 则说明稳定性良好,本研究稳定性结果显示色谱峰相对峰面积 RSD 平均值 1.716%,提示知柏地黄丸供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验 为确保研究的客观性,进行指纹图谱对比研究之前,需要进行短时间内的 HPLC 连续重复性测试,精密量取 6 份同一批号供试品溶液,进样量 20 μL,连续进样,各色谱峰相对峰面积的 $RSD < 3\%$ 表示重复性良好,本研究结果显示色谱峰相对峰面积 RSD 平均值 2.011%,提示知柏地黄丸供试品溶液的重复性良好。见表 3。

2.9 回收率试验 精密吸取已知含量的知柏地黄丸供试品溶液 6 份,均为 1 mL/份,分别置于 10 mL 容量瓶中,每一份均精密加入等量已知浓度的 0.405 3 mg/mL 马钱苷对照品溶液、0.217 3 mg/mL 菝葜皂苷元对照品溶液,加入超纯水稀释至刻度定容混合均匀后,进行加样回收试验的检测,根据 2.1 的色谱条件进行检测并计算加样回收率。结果显示马钱苷对照品溶液、菝葜皂苷元对照品溶液平均回收率分别为 105.719%、98.865%, RSD 分别为 1.29%、1.36%,提示高相液相检测方法所测加样回收率结果可靠。见表 4。

表 2 对照品线性关系考察结果

成分	回归方程	相关系数	线性范围(μg)
马钱苷	$Y = 611.16X + 566.4.1$	0.9997	0.040 54~4.054
菝葜皂苷元	$Y = 1.6397X + 11.549$	0.9998	0.440 01~4.353

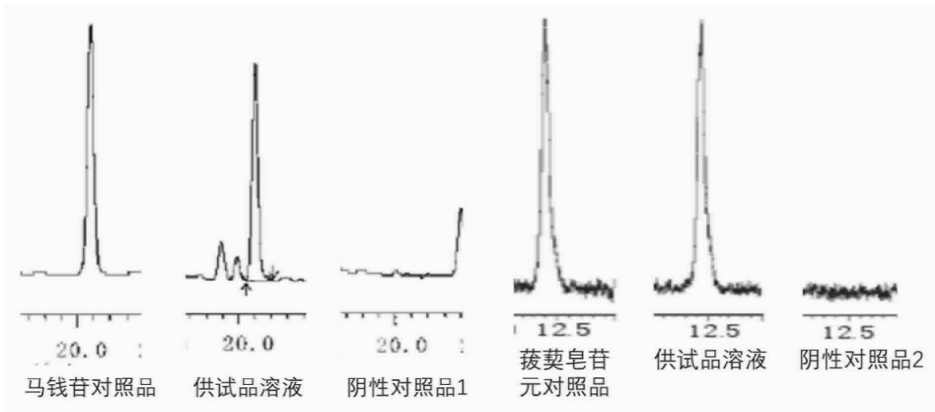


图 1 专属性高效液相色谱图

表 3 重复试验相似度评价结果

项目	重复度 1	重复度 2	重复度 3	重复度 4	重复度 5	重复度 6	平均值	RSD(%)
重复度 1	1.000	0.994	0.997	0.991	0.993	0.996	0.995	2.016
重复度 2	0.995	1.000	0.993	0.991	0.994	0.998	0.995	1.998
重复度 3	0.993	0.997	1.000	0.993	0.998	0.996	0.996	2.022
重复度 4	0.996	0.997	0.993	1.000	0.993	0.994	0.996	2.015
重复度 5	0.991	0.998	0.998	0.993	1.000	0.995	0.996	1.997
重复度 6	0.997	0.995	0.993	0.996	0.991	1.000	0.995	2.018

表 4 加样回收试验结果

成分	样品中 含量	添加量	测得量	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
马钱苷	1.003	0.775	1.691	111.481	113.103	1.29
	1.003	0.775	1.694	114.236		
	1.003	0.775	1.692	113.592		
	1.316	0.101	0.209	100.731	100.189	
	1.316	0.101	0.207	98.474		
	1.316	0.101	0.210	101.362		
	0.502	0.388	0.807	103.734	103.865	1.36
	0.502	0.388	0.805	103.912		
	0.502	0.388	0.808	103.948		
	0.356	0.261	0.613	98.911	98.949	
菝葜皂苷元	0.356	0.261	0.608	96.809		
	0.356	0.261	0.619	101.126		
	0.297	0.218	0.511	98.918	98.979	
	0.297	0.218	0.509	98.295		
	0.297	0.218	0.513	99.724		
	0.238	0.174	0.409	99.414	98.666	
	0.238	0.174	0.406	97.546		
	0.238	0.174	0.408	99.037		

2.10 样品检测结果 取 201805026、201806013、201807085 等 3 个不同批次号的知柏地黄丸,根据 2.2 供试品溶液配制,每批样品都根据 2.1 的色谱条件进行重复测试 3 次,知柏地黄丸中成分的含量取 3 次测定的平均值,结果显示,3 个不同批次的知柏地黄丸中马钱苷成分和菝葜皂苷元成分的含量未见明显差异。见表 5。

表 5 3 个不同批次知柏地黄丸中成分含量(mg/g)

成分	201805026	201806013	201807085
马钱苷	0.774	0.779	0.776
菝葜皂苷元	0.297	0.296	0.298

3 讨论

知柏地黄丸出自于清代吴谦·《医宗金鉴》,另据李明权考证,知柏地黄丸最早是以“滋阴八味丸”的名称出现于明代张介宾所著的《景岳全书·新方八阵》。知柏地黄丸为《中华人民共和国药典》2015 年版 1 部收载品种,是滋阴清热的经典名方,应用广泛,对阴虚火旺型糖尿病、老年干燥症、女性更年期综合征、肾病综合征等均具有良好的治疗效果。近

年来经中医辨证后灵活使用,对慢性咽炎、急性尿路感染等疾病也有较好疗效。利用现代药理学研究方法建立阴虚模型对其细胞水平和分子水平的药理作用机制研究也证明了其治疗阴虚的作用。知柏地黄丸中的君药为知母,而知母有效成分为多种甾体皂苷,其皂苷主要为菝葜皂苷元。知母根茎中含甾体皂苷约为 6%^[14],有知母皂苷 A1、A2、A3、A4、B1、B2 等。菝葜皂苷元为知母中几种主要甾体皂苷的母核皂苷元,因此,可通过测定菝葜皂苷元的含量对知母药材的质量进行控制,进而有效、准确地控制知柏地黄丸的质量。

山茱萸是知柏地黄丸中关键的臣药之一,目前有关山茱萸含量测定方法的研究颇多,主要是以熊果酸、齐墩果酸和马钱苷等为含量检测指标。山茱萸中熊果酸含量测定的文献报道虽比较多,但熊果酸并非山茱萸的特有成分,它存在于山楂、马鞭草、车前草、紫珠、女贞子、怀牛膝等许多药材中,并且熊果酸与齐墩果酸均属三萜酸,这 2 种成分在天然植物中又是共生共存的,在化学结构上是差向异构体,两者的极性也几乎无差别^[15]。有实验表明,在薄层板上应用《中华人民共和国药典》条件无法分离开,实验中所测得实际熊果酸含量其实是熊果酸与齐墩果酸含量的总和^[16-17]。马钱苷为山茱萸主要有效成分,测定其含量,可为山茱萸及其制剂提供质量控制的有效手段。在提取方法的选择上,以马钱苷和菝葜皂苷元含量作为考察指标,对提取溶剂进行考察:取样品 1 g 3 份,分别精密加入甲醇,80% 甲醇,50% 甲醇 25 mL,超声 30 min。用 80% 甲醇提取的含量较高,所以选用 80% 甲醇作为提取溶剂。对提取方式及时间进行考察:取样品 1 g 6 份,精密加入 80% 甲醇 25 mL,取其中 3 份回流,提取时间分别为 20,30,40 min;取另外 3 份超声,提取时间分别为 20,30,40 min。回流和超声 2 种提取方式对含量结果影响不大,因超声操作较为简便,且 20 min 能将马钱苷和菝葜皂苷元提取完全,故选择超声处理(功率 250 W,频率 49 kHz)20 min。

综上所述,采用高效液相色谱法操作简便,结果准确,重复性好,加样回收率高,可用于知柏地黄丸的质量控制。在对具有多种有效成分,且相互间可发生直接影响的知柏地黄丸来说,检测药物有效成分,单一的对一种成分或少数几个有效成分进行检测,仍不足以较为全面地体现出知柏地黄丸的质量控制效果,故而未来将进一步结合检测多种有效成分,更全面反映知柏地黄丸的质量评价,以期对知柏地黄丸的质量控制及药理研究工作提供相关思路。

参考文献

- [1]郭跃山. 知柏地黄丸用途讨论[J]. 首都医药, 2014, 10(4): 54-55.
- [2]孙冰. 知柏地黄丸、归脾丸联合行为干预治疗更年期综合征临床研究[J]. 山东中医药大学学报, 2006, 30(1): 55-56.
- [3]宾东华, 韩忠, 何清湖. 知柏地黄丸在男性不育中的应用[J]. 中国性科学, 2016, 25(12): 84-87.
- [4]赵文, 王祖龙, 李鹏超, 等. 知柏地黄丸治疗男科疾病探源[J]. 四川中医, 2017, 35(11): 29-31.
- [5]臧晓霞, 章文超, 林英秀. 知柏地黄丸联合坤泰胶囊治疗更年期综合征的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2016, 31(12): 2029-2032.
- [6]方伟进, 李艳, 曹珊珊, 等. 山茱萸果核提取物耐疲劳和耐缺氧作

- 用研究[J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2011, 29(3): 167-169.
- [7]朱建新, 李旺. 知母的研究进展[J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2018, 34(2): 56-60.
- [8]翁丽丽, 陈丽, 宿莹, 等. 知母化学成分和药理作用[J]. 吉林中医药, 2018, 38(1): 90-92.
- [9]孙小东. 知柏地黄丸治疗老年人骨质疏松症的疗效观察[J]. 广西中医药大学学报, 2015, 18(2): 30-31.
- [10]刘昌铭, 毛连根, 杨粟, 等. 基于 iTRAQ 技术研究滋阴降火方药知柏地黄丸对阴虚“上火”SD 大鼠血清蛋白组的影响[J]. 世界中医药, 2017, 12(12): 2876-2880.
- [11]马晓彬, 许立君. 高效液相色谱法在药品检验中的应用和效果[J]. 海峡药学, 2017, 29(2): 78-79.
- [12]姚洛芫, 吴萌萌. 高效液相色谱法在药物分析领域中的应用刍议[J]. 黑龙江科技信息, 2016, 34(11): 129.
- [13]魏海婷. 补肾止带汤治疗肝肾阴虚型老年性阴道炎 29 例[J]. 光明中医, 2018, 33(2): 207-208.
- [14]朱富涛, 黄雪峰, 孔令义. 知母中甾体皂苷类成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(11): 1497-1501, 1570.
- [15]霍利民. 山茱萸炮制的历史沿革及现代研究[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(9): 148-149.
- [16]刘毅, 金传山, 许甜甜. 高效液相色谱法测定山茱萸中熊果酸与齐墩果酸的含量[J]. 安徽中医学院学报, 2013, 32(3): 85-87.
- [17]吴莉, 江伟, 刘永忠. RP-HPLC 法测定知柏地黄丸中熊果酸含量[J]. 江西中医药, 2015, 65(10): 69-70.

(2018-10-29 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

投稿须知: 关于表格

凡能用文字说明者, 尽量不用表格。一篇文章中, 表格应控制在 3~5 个之内。表格均应有简要的表题。表序号一律用阿拉伯数字, 分别按其在正文中出现的先后次序连续编码, 并在正文中标示。即使只有 1 张表, 也须标示“表 1”。

表: 表附在正文内, 一律采用“三线表”, 其内容不可与文字有差异。表内不设备注栏, 如有需说明的事项(如 P 值等), 以简练文字写在表的下方, 表内依次用 *、△、▲、□、■ 号标注在相应内容的右上角。表内参数的单位应尽量相同, 放在表的右上方; 如各栏参数的单位不同, 则放在各栏的表头内。均值 ± 标准差, 用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 置于表题后的括号内。表内数据要求同一指标保留的小数位数相同, 一般比可准确测量的精度多 1 位。统计学处理结果统一用 *、△、▲、□、■ 表示 $P < 0.05$; **、△△、▲▲、□□、■■ 表示 $P < 0.01$, P 为大写, 斜体。