

HPLC 法测定桂附地黄丸中山茱萸新苷的含量

许树军¹ 邹淑君^{2*} 田园¹ 贾艳君²

(1. 黑龙江中医药大学实验实训中心, 黑龙江哈尔滨 150040;

2. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 目的: 研究高效液相色谱仪测定桂附地黄丸中山茱萸新苷含量。方法: 采用 SinoChrom ODS-BP 液相色谱柱(批号: 1DD29A0, 柱长: 250mm, 柱内径: 4.6mm, 填料平均粒径: 5mm); 流动相: 乙腈-磷酸(0.3%), 柱温: 30℃, 检测波长: 240nm, 进样量: 10mL, 流速: 1.0mL·min⁻¹。结果: 山茱萸新苷在 0.05~0.5mg·mL⁻¹ 范围内其浓度与其峰面积积分线性关系良好, 线性方程为 $Y=318.2X+5.029$ ($r=0.9972$, $n=6$), 方法学考察结果为稳定性 RSD 为 1.8%、精密度 RSD 为 0.4%、重复性 RSD 为 1.6%, 平均加样回收率为 96.81%, RSD 为 1.24% ($n=9$)。结论: 本法数据准确, 重复性好, 所得结果稳定, 可用于桂附地黄丸中山茱萸新苷的含量测定。

关键词: 桂附地黄丸; 山茱萸新苷; 含量测定; HPLC 法

一、引言

桂附地黄丸最初的处方出自张仲景的《金匮要略》, 方名为崔氏八味丸、肾气丸, 《医方集解》中提出其组方原理: 六味地黄丸处方加入附子和肉桂, 治疗相火不足, 虚羸少气, 益火之原, 以消阴翳, 尺脉弱, 进而将其命名为桂附八味丸。由于处方源于六味地黄丸, 后代医家称其为桂附地黄丸。桂附地黄丸是由熟地黄(160g)、肉桂(20g)、泽泻(60g)、茯苓(60g)、附子(制)(20g)、牡丹皮(60g)、山药(80g)、酒萸肉(80g) 八味中药组成, 主治温补肾阳。现代医学研究表明其与其他药物联合使用, 可以治疗糖尿病、肾病患者的肾功能、帕金森综合征、脑动脉供血不足而引起的眩晕脾肾虚证, 为了更好的研究和发现其新的功效, 对其成分及其含量的研究显得更加重要。

目前主要检测的是该药物中的马钱苷、莫诺苷、桂皮醛以及丹皮酚等成分的含量, 测定方法多使用 HPLC 法, 而鲜有可以稳定检测出该药中山茱萸新苷的方法。

二、仪器、药品与试剂

(一) 仪器

Thermo Ultimate 3000 型高效液相色谱仪(赛默飞世尔仪器有限公司), SB25-12 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司), DZKW-4 型电热恒温水浴锅(北京中兴伟业世纪仪器有限公司), XS105DU 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

(二) 药品

酒萸肉(黑龙江众信中药饮片有限公司, 批号: 20221001), 桂附地黄丸(浓缩丸)(仲景宛西制药股份有限公司, 批号: 231103, 240103, 240105), 桂附地黄丸(浓缩丸)(九芝堂股份有限公司, 批号: 202308215, 202308016, 202308218), 桂附地黄丸(水蜜丸)(北京同仁堂科技发展股份有限公司, 批号: 23031832, 23031839, 23031843)。

(三) 试剂

山茱萸新苷($\geq 98\%$)(合肥博美生物科技有限公司, 批号: 131189-57-6), 色谱甲醇(北京迪马科技有限公司, 批号: 70116), 色谱乙腈(北京迪马科技有限公司, 批号: 70122), 甲醇(天津市永大化学试剂有限公司, 批号: 20160914)、磷酸(天津耀华化学试剂有限责任公司, 批号: 20200210) 为分析

纯。

二、方法与结果

(一) 色谱条件

色谱柱: sinoChrom ODS-BP 色谱柱(250mm×4.6mm, 5mm), 乙腈为 A 相, 0.3% 磷酸溶液为 B 相, 梯度洗脱: 0~20min, 7% A; 20~50min, 7~20% A; 50~65min, 20% A。柱温: 30℃, 检测波长: 240nm, 进样体积: 10mL, 流速: 1.0mL·min⁻¹。

(二) 对照品溶液的制备

精密称定山茱萸新苷对照品, 加入色谱甲醇配制浓度为 0.5mL·min⁻¹, 即得 a 溶液。

(三) 桂附地黄丸供试品溶液的制备

取桂附地黄丸(水蜜丸), 研磨, 过 80 目筛, 精密称定细粉, 置于 50mL 的具塞锥形瓶中, 加入 50% 甲醇溶液 25mL, 超声 45min, 功率 250W, 频率 33kHz, 滤过, 滤液水浴浓缩, 转移至 10mL 容量瓶中, 50% 甲醇定容, 过 0.45mm 滤膜, 即得 b 溶液。

(四) 酒萸肉药材供试品溶液的制备

取适量酒萸肉药材, 烘干, 粉碎后过 80 目筛, 精密称取约 0.3g, 置于 50mL 具塞锥形瓶中, 按照 2.3 项下的方法制备成酒萸肉药材供试品 c 溶液。

(五) 阴性对照溶液的制备

按照桂附地黄丸的处方比例和制备方法, 制备缺少酒萸肉的阴性样品, 按照 2.3 项下的方法, 制备缺少酒萸肉的阴性对照 d 溶液。

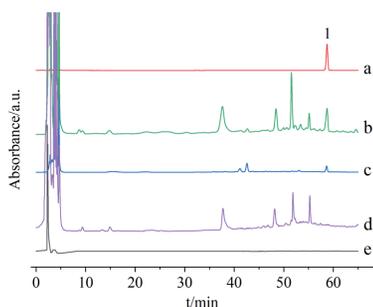
(六) 空白溶液的制备

50% 甲醇溶液, 滤过, 即得 e 溶液。

(七) 方法学考察

1. 专属性试验

分别精密吸取上述 a、b、c、d、e 溶液 10 μ L, 然后按 2.1 项下的色谱条件测定, 测定结果见图 1, 桂附地黄丸供试品 b 与酒萸肉药材供试品 c 的色谱曲线均在对照品 a 的色谱曲线相对应的保留时间上检测出茱萸新苷的吸收峰, 且该吸收峰与相邻的峰达到基线分离, 缺少酒萸肉的阴性对照样品 d 与空白样品 e 在与对照品 a 相对应的保留时间上没有色谱峰被检出, 表明阴性样品与试剂对山茱萸新苷的含量测定无明显干扰。



1) 1 山茱萸新苷; 2) a 对照品溶液; 3) b 桂附地黄丸; 4) c 阳性溶液; 5) d 阴性溶液; 6) e 空白溶液

图1 桂附地黄丸专属性 HPLC 谱图

2. 线性关系考察

精密移取 2.2 项下 a 溶液 0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mL, 分别置于 2 mL 量瓶中, 加入色谱甲醇, 定容, 摇匀, 即得 0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$ 山茱萸新苷对照品溶液。精密吸取上述溶液各 10 mL, 按 2.1 项下条件测定, 以吸收峰面积积分作为纵坐标, 溶液浓度作为横坐标作图, 线性回归, 得到线性方程为 $Y = 318.2X + 5.029$ ($r = 0.9972$, $n = 6$), 见图 2。结果表明: 山茱萸新苷浓度在 0.05~0.5 $\text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的范围内, 与峰面积积分呈现出良好的线性关系。

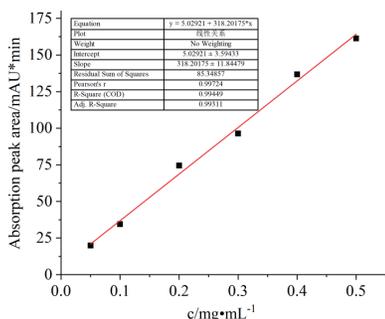


图2 线性回归方程图

3. 精密度试验

取 2.2 项下 a 溶液, 按 2.1 项下方法, 连续进样 6 次, 测定并记录山茱萸新苷的吸收峰面积积分值, 计算 RSD 为 0.4%, 表明本法仪器精密度良好。

4. 稳定性试验

精密吸取 2.3 项下供试品溶液 10 μL , 按 2.1 项下的色谱条件分别在 0h、2h、4h、6h、8h、10h、12h 进行检测, 结果显示供试品溶液中的山茱萸新苷在 12h 内色谱峰的面积积分值基本保持稳定, RSD 为 1.8%。

5. 重复性试验

精密称量 2.3 项下样品粉末 6g, 共 6 份。按照 2.3 项下的方法制备样品, 按照 2.1 项下的色谱条件进行试验, 试验结果显示山茱萸新苷的含量 RSD 为 1.6%。

6. 加样回收率试验

精密称量 2.3 项下样品粉末 9 份, 每份约 0.6g, 平均分成 3, 每组分别加入与供试品中待测组分含量之比为 1: 1, 1: 1.5, 1: 2 的对照品, 按 2.3 项下方法分别制备 9 个样品, 按 2.1 项下色谱条件进行试验, 记录色谱图后按 2.7.2 项下线性方程计算相应浓度, 依据相应的浓度值计算平均回收率为 96.81%, RSD 为 1.24%。结

果表明, 回收率的测定结果符合相应浓度下准确度的要求。

(八) 样品含量测定

分别称取不同批次的桂附地黄丸浓缩丸和水蜜丸药品细粉 mg, 按 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 按照 2.1 项下的色谱条件进行检测, 获得茱萸新苷色谱峰面积 w, 按 2.7.2 项下线性方程, 根据公式 $(10w - 50.29) / 318.2$ 计算茱萸新苷的含量, 见表 1。

表1 桂附地黄丸的山茱萸新苷含量测定

序号	剂型	品牌	批号	取样量 /g	山茱萸新苷含量 / $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
1	浓缩丸	仲景宛西制药	231103	3.001	0.2213
1			240103	2.998	0.1937
1			240105	3.002	0.2186
2	浓缩丸	九芝堂	202308215	3.001	0.1963
2			202308218	3.002	0.2106
2			202308016	3.001	0.2094
3	水蜜丸	北京同仁堂	23031832	6.001	0.1369
3			23031839	5.998	0.1472
3			23031843	6.008	0.1295

三、讨论

根据山茱萸新苷的结构可知, 其属于环烯醚萜苷, 分子结构中含有 3 个酚羟基, 属于极性比较大的化合物。首先应用正丁醇: 冰醋酸: 水 = 4: 5: 1 为展开剂, 硅胶 GF254 薄层板展开, 254nm 紫外光下检视, 对 2.3 项下提取物进行定性分析, 然后采用 HPLC 法测定其含量。试验实施方便, 准确、重复性好, 测定结果稳定。该实验可以完善桂附地黄丸水蜜丸或浓缩丸的质量控制。不同厂家、不同批次、不同剂型的桂附地黄丸中山茱萸新苷含量存在微小的差异, 这可能与实验过程中系统误差、不同剂型制备的工艺、药材产地等因素有关。

参考文献:

- [1] 高志礼, 王宁, 潘瑾等. 金匱肾气丸历史演变考证 [J]. 山东中医药大学学报, 2023, 47 (3): 349-355.]
- [2] 中华人民共和国药典: 2020 年版. 一部 / 国家药典委员会编. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.5: 1435-1436.
- [3] 林珍, 郭露薇, 季利芬等. 桂附地黄丸联合厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39 (03): 690-694.
- [4] 吕昌迎. 桂附地黄丸加血府逐瘀汤对卒中后帕金森综合征的影响 [J]. 内蒙古中医药, 2023, 42 (10): 28-29.
- [5] 张成明, 詹根龙, 徐庆等. 苓桂术甘汤合桂附地黄丸加减治疗脑动脉供血不足性眩晕临床研究 [J]. 新中医, 2023, 55 (16): 10-15.
- [6] 陈玲玲, 支荣荣, 陈晓勇. GC 法同时测定冰珍去翳滴眼液中冰片和苯氧乙醇的含量 [J]. 药学与临床研究, 2022, 30 (04): 331-333.

* 基金项目: 黑龙江省中医药管理局项目 (ZHY2024-109); 黑龙江省卫生健康委科研课题 (20231313050520)

作者简介: 许树军 (1973-), 男, 汉族, 内蒙赤峰人, 高级实验师, 硕士, 从事中药质量标准研究。

* 通信联系人: 邹淑君, 博士, 副教授, 从事药物分析及中药研究。