

HPLC 测定增液汤中麦冬皂苷 D’的含量

巩克民¹,赵怀清²,季宏建^{3*},张鹏威⁴,孙剑华¹

(1. 盐城卫生职业技术学院 药学院,江苏 盐城 224005; 2. 沈阳药科大学 药学院,沈阳 110016;
3. 盐城市第三人民医院药学部,江苏 盐城 224005; 4. 海南医学院药学院,海口 571101)

[摘要] 目的:建立 HPLC 测定增液汤中麦冬皂苷 D’含量的方法。方法:采用 DiamonsilTM C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm, 5 μm),柱温 33 ℃,流动相水-乙腈(体积比 52:48),流速 0.80 mL·min⁻¹,检测波长 208 nm。结果:麦冬皂苷 D’的质量浓度在 0.018~0.180 g·L⁻¹与峰面积呈良好的线性关系($r=0.999\ 9$),平均回收率为 99.4%,RSD 0.73% ($n=9$)。结论:该方法简便、准确,可用于增液汤的质量控制。

[关键词] 增液汤;麦冬皂苷 D’;反相高效液相色谱法

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)08-0086-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014080086

Content Determination of the Ophiopogonin D’ in
Zengye Decoction by HPLC

GONG Ke-min¹, ZHAO Huai-qing², JI Hong-jian^{3*}, ZHANG Peng-wei⁴, SUN Jian-hua¹

(1. School of Pharmacy, Yancheng Institute of Health Science, Yancheng 224005, China;
2. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;
3. Pharmaceutical Dept, Yancheng Third People’s Hospital, Yancheng 224005, China;
4. School of Pharmacy, Hainan Medical University, Haikou 571101, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for the determination of the content of ophiopogonin D’ in Zengye decoction. **Method:** The DiamonsilTM C₁₈ (4.6 mm×200 mm, 5 μm) was used at 33 ℃. The mobile phase consisted of a mixture of water-acetonitrile (52:48) at a flow rate of 0.80 mL·min⁻¹, the detection wavelength was set at 208 nm. **Result:** The calibration curve was linear within the ranges of 0.018–0.180 g·L⁻¹ ($r=0.999\ 9$) for ophiopogonin D’. The average recovery of ophiopogonin D’ was 99.4% (RSD 0.73%, $n=9$). **Conclusion:** This method is simple, accurate. It can be used for the quality control of Zengye decoction.

[Key words] Zengye decoction; ophiopogonin D’; HPLC

增液汤来源于清朝吴鞠通的《温病条辨》,君药

为玄参,臣药为生地、麦冬。具有养阴润燥、增液生津的功效^[1],用来治疗阳明温病、津液不足、肠燥便秘^[2],又可用于内伤阴虚液亏诸症^[3-4]。麦冬为臣药,主要含有多糖、甾体皂苷、高异黄酮等成分,甾体皂苷类是防治心血管疾病的重要物质^[5-8]。已有使用 HPLC-ELSD 测定麦冬中麦冬皂苷 D’含量的报道^[9-11],ELSD 价格昂贵,在药物研究中普及率低,方法不易推广。本文建立了测定增液汤中麦冬皂苷 D’含量的 HPLC 测定法,从而为全面控制增液汤的质量,提供参考。

[收稿日期] 20130724(003)

[基金项目] 海南省重点科技计划项目(ZDXM20120095);浙江省公益技术研究社会发展项目(2012C23082);海南医学院科研培育基金项目(HY2010-011)

[第一作者] 巩克民,讲师,硕士,从事药物质量控制方法和药动学研究, Tel:0515-88159951,13626204909, E-mail:gkm110016@163.com

[通讯作者] *季宏建,主管药师,硕士,从事临床药学、药物动力学研究, Tel:13485259110, E-mail:hongjianji2006@163.com

1 材料

1.1 仪器 日本 SHIMADZU LC-10A 型高效液相色谱系统(DGU-4A 脱气机,CBM-10A 信息总线模块,LC-10AD 输液泵,SPD-M10A 二极管阵列检测器,SIL-10A 自动进样器,CTO-10A 柱温箱,Class-Lc 10 工作站)。RE-85Z 型旋转蒸发仪(上海青浦沪西科学仪器厂),TGL-16 G 型离心机(上海安亭科学仪器厂),HH-4 型电热恒温水浴锅(常州国华科学仪器厂),BS-124S 型电子分析天平(北京赛多利斯公司)。

1.2 药材与药品 玄参、地黄、麦冬均购自沈阳天益堂药店,经沈阳药科大学孙启时教授鉴定为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl 的干燥根,玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的干燥块根,百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker-Gawl 的干燥块根。药材经 60 ℃ 烘箱干燥 6 h,粉碎,过 40 目筛,密封保存于干燥器中。麦冬皂苷 D' 对照品(纯度 99.5%,四川雅安制药厂)。

1.3 试剂 乙腈、甲醇为色谱纯(江苏汉邦科技有限公司),液相用水重蒸水(实验室自制),无水乙醇、正丁醇为分析纯(沈阳化学试剂厂)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Dikma Diamonsil™ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×200 mm,5 μm),柱温 33 ℃,流动相水-乙腈(52:48),流速 0.80 mL·min⁻¹,检测波长 208 nm,进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

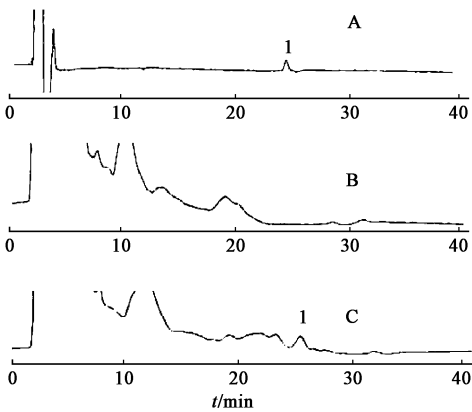
2.2.1 对照品储备液制备 精密称取麦冬皂苷 D' 对照品约 9.0 mg,置于 25 mL 量瓶中,用 20 mL 色谱甲醇溶解,超声处理 2 min,用色谱甲醇稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液,置于 4 ℃ 冰箱中储存备用。

2.2.2 供试品溶液制备^[12-13] 按处方比例,精密称取 3 味药材(玄参 1.0 g,生地 0.80 g,麦冬 0.80 g),置 50 mL 圆底烧瓶中,加入 12 倍量 70% 乙醇,水浴回流 1.5 h,过滤,重复提取 4 次,合并滤液,减压蒸干,残渣以水溶解,定量转移至分液漏斗中,加水至 10 mL。以水饱和的正丁醇 20 mL 萃取 3 次,合并正丁醇层,减压蒸干,残渣以色谱甲醇溶解后,定量转移至 10 mL 量瓶,稀释至刻度,摇匀。以 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,上清液过 0.45 μm 滤膜,取续滤液即得。

2.2.3 阴性溶液的制备 按处方比例精密称取除麦冬外 2 味药材(玄参 1.0 g,生地 0.80 g),制备麦

冬阴性样品。制备过程如下:将上述 2 味药材置 50 mL 圆底烧瓶中,加入 21.6 mL 的 70% 乙醇,水浴回流提取 4 次,每次 1.5 h,分别过滤,合并滤液,减压蒸干,残渣定量转移至分液漏斗中,加水至 10 mL。以水饱和的正丁醇萃取 3 次,每次用量为 20 mL,合并正丁醇层,减压蒸干,残渣以色谱甲醇定量转移至 10 mL 量瓶,并稀释至刻度,摇匀。以 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,上清液过 0.45 μm 滤膜,取续滤液即得。

2.3 系统适用性试验 在 2.1 项下色谱条件,分别取 2.4 项下浓度为 0.090 g·L⁻¹ 的对照品溶液,2.2.2 项下供试品溶液、2.2.3 项下阴性溶液进样分析,记录色谱图,理论塔板数按麦冬皂苷 D' 计算不低于 7 000,与相邻组分的分离度 >1.5,典型色谱图见图 1。



A. 对照品;B. 麦冬阴性;
C. 样品;1. 麦冬皂苷 D'

图 1 麦冬皂苷 D' 含量测定 HPLC

2.4 标准曲线的绘制 分别精密吸取 2.2.1 项下的对照品储备液 5.00,4.00,2.50,1.50,0.50 mL,分别置于 10 mL 量瓶中,色谱甲醇稀释至刻度,制备 0.018,0.054,0.090,0.144,0.180 g·L⁻¹ 的系列对照品溶液,进样分析。以麦冬皂苷 D' 色谱峰面积(Y)对质量浓度(X)作图,得回归方程为 $Y = 2.448 \times 10^6 X - 4.144 \times 10^3$ ($r = 0.9999$),麦冬皂苷 D' 在 0.018 ~ 0.180 g·L⁻¹ 线性关系良好。

2.5 精密度试验 取 2.4 项下 0.090 g·L⁻¹ 的对照品溶液,在 2.1 的色谱条件下,连续进样 6 次,计算麦冬皂苷 D' 色谱峰面积的 RSD 1.8% ($n = 6$),表明精密度良好。

2.6 方法重复性试验 按 2.2.2 方法,平行制备 6 份样品,测定麦冬皂苷 D' 含量,计算 RSD 1.7% ($n = 6$)。

2.7 稳定性试验 取 2.2.2 项下的供试品溶液,室温放置,分别于 0,2,4,8,12,16 h 进样分析,计算麦冬皂苷 D' 色谱峰面积的 RSD 1.6% ($n=6$),表明样品溶液在 16 h 内比较稳定。

2.8 回收率试验 取已知含量的供试品溶液适量,精密加入对照品储备液适量,依法测定,平均回收率为 99.4%,RSD 0.73% ($n=9$),结果见表 1。

表 1 麦冬皂苷 D' 加样回收率试验($n=9$)

样品 中含量	加样量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.034 17	0.072	0.105 1	98.5		
0.034 17	0.072	0.105 6	99.2		
0.034 17	0.072	0.106 0	99.7		
0.034 17	0.144	0.177 5	99.5		
0.034 17	0.144	0.176 9	99.1	99.4	0.73
0.034 17	0.144	0.179 6	101.0		
0.034 17	0.252	0.282 9	98.7		
0.034 17	0.252	0.284 4	99.3		
0.034 17	0.252	0.285 7	99.8		

2.9 含量测定 按 2.2.2 项下制备样品溶液,外标两点法测定含量,结果增液酒中数冬皂苷 D' 平均含量为 $0.336\ 7\ \text{mg}\cdot\text{s}^{-1}$,RSD 1.4%。

3 讨论

3.1 色谱条件优化^[9-11] 调节柱温、流动相的组成、配比以及流速,发现以乙腈-水(48:52),流速 $0.80\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,柱温 33℃;麦冬皂苷 D' 与其他物质得到了良好的分离,分析时间适中。

3.2 检测波长选择 用乙腈配制恰当浓度的麦冬皂苷 D' 溶液,在 190~400 nm 进行紫外扫描,最大吸收波长在 208 nm 处。为了提高检测的灵敏度,选择 208 nm 作为检测波长。

3.3 检测方法优化^[14-18] 采用水解、显色法测定麦冬皂苷类成分含量,但是这种方法步骤繁琐,很多因素会影响水解反应、显色反应,导致方法的重复性很差。本文在笔者前期研究^[12-13]的基础上,对提取工艺进行了合理优化,使麦冬皂苷类成分提取率大幅提高,同时采用了合理的纯化处理方法(水饱和正丁醇萃取、高速离心机离心、微孔滤膜过滤),消除了糖类等物质的干扰,进而建立了 HPLC-UV 法。该方法简便、准确、重复性好,使增液汤中麦冬皂苷类成分的测定方法便于推广。

问药,2011,9(6):101.

[2] 薛会才,徐艳. 益气增液汤治疗小儿习惯性便秘 46 例[J]. 实用中医药杂志,2011,27(12):841.

[3] 安莲英. 养阴增液法治疗妊娠恶阻 45 例[J]. 陕西中医,2008,29(7):865.

[4] 徐智和. 方剂学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1999:157.

[5] 程金波,卫洪昌,章枕,等. 麦冬提取物抗犬心肌缺血的药效学实验[J]. 中国病理生理杂志,2001,17(8):810.

[6] 周跃华,徐德生,冯怡,等. 麦冬提取物对小鼠心肌营养血流量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2003,9(1):22.

[7] 金立玲,闵暘. 麦冬总皂苷(DMD)抗实验性大鼠心肌缺血[J]. 中国药理通讯,2004,21(3):11.

[8] 邓州,李卫平,何开环,等. 小麦冬总皂苷对局灶性脑缺血损伤的保护及抗凝血作用研究[J]. 中国药房,2007,18(30):2332.

[9] 姚令文,王钢力,王峰,等. HPLC-ELSD 法测定川麦冬中麦冬皂苷 D' 的含量[J]. 中草药,2004,35(12):1419.

[10] 吴笑如,徐德生,冯怡,等. HPLC-ELSD 法测定川麦冬须根大孔树脂富集物中麦冬皂苷 D, D' 的含量[J]. 中成药,2006,28(11):1638.

[11] 贾诚,叶正良,姜秀晶,等. ELSD-HPLC 法测定麦冬药材中麦冬皂苷 D、D' 含量[J]. 现代中药研究与实践,2012,26(3):79.

[12] 巩克民,赵怀清,任洁,等. 增液汤提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2005,11(3):5.

[13] 巩克民,赵怀清,王学娅. 增液汤提取方法优化[J]. 辽宁中医药大学学报,2013,15(1):62.

[14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:144.

[15] 徐江滔,汤谷平,吴敏,等. 薄层扫描法测定麦冬皂苷类成分[J]. 药物分析杂志,1997,17(3):164.

[16] 余伯阳,吴骏,代世俊,等. 等吸收波长消去法测定麦冬类皂苷成分[J]. 中国药科大学学报,1996,27(5):316.

[17] 唐晓清,余伯阳,徐德然,等. HPLC-ELSD 法测定麦冬中甾体皂甙元的含量[J]. 中国药科大学学报,2001,32(4):270.

[18] 胡正芳,蒋畅,秦民坚,等. HPLC-ELSD 法测定不同产地与采收期短葶山麦冬中短葶山麦冬皂苷 C 的含量[J]. 中国中药杂志,2010,35(19):2508.

[责任编辑 顾雪竹]

[参考文献]

[1] 刘和亮. 浅谈《温病条辨》中的养阴生津法[J]. 求医