

HPLC 法测定杞菊地黄丸中莫诺苷、马钱苷和丹皮酚的含量*

李润泽^{1,2}, 常增荣², 傅欣彤², 郭洪祝^{2**}, 张英涛^{1**}

(1. 北京大学药学院, 北京 100191; 2. 北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要 目的: 建立一种快速、准确和实用的 HPLC 方法, 用于同时测定杞菊地黄丸中莫诺苷、马钱苷和丹皮酚的含量。方法: 采用 Phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈 - 0.3% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C, 检测波长为 240 nm (莫诺苷、马钱苷) 和 274 nm (丹皮酚)。结果: 莫诺苷、马钱苷、丹皮酚质量浓度分别在 2.242 ~ 44.84 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$)、2.130 ~ 42.60 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$)、5.068 ~ 101.4 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$) 范围内, 与峰面积线性关系良好; 平均回收率分别为 96.2% (RSD = 0.44%)、96.0% (RSD = 0.21%)、103.0% (RSD = 0.65%)。结论: 本方法可作为杞菊地黄丸中莫诺苷、马钱苷和丹皮酚含量同时测定的方法, 适用于杞菊地黄丸的质量控制。

关键词: 中药成方制剂; 杞菊地黄丸; 莫诺苷; 马钱苷; 丹皮酚; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2015)02 - 0351 - 04

Determination of morroniside, loganin and paeonol in Qiju Dihuang pills by HPLC*

LI Run - ze^{1,2}, CHANG Zeng - rong², FU Xin - tong²,

GUO Hong - zhu^{2**}, ZHANG Ying - tao^{1**}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 2. Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

Abstract Objective: To establish a rapid, accurate and feasible HPLC method for simultaneous determination of morroniside, loganin and paeonol in Qiju Dihuang pills. **Methods:** The separation was carried out on a Phenomenex Gemini C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column, the mobile phase consisting of 0.3% phosphoric acid solution (B) - acetonitrile (A) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, with the column temperature of 40 °C, the detection wavelength at 240 nm for morroniside and loganin and 274 nm for paeonol. **Results:** The calibration curve was liner over the range of 2.242 - 44.84 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9999$) for morroniside, 2.130 - 42.60 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$) for loganin and 5.068 - 101.4 μg · mL⁻¹ ($r = 1.000$) for paeonol. The average recovery of the three components was 96.2% (RSD = 0.44%), 96.0% (RSD = 0.21%), and 103.0% (RSD = 0.65%), respectively. **Conclusion:** The method can be used for simultaneous determination of morroniside, loganin and paeonol in Qiju Dihuang pills, and it is applicable for quality control of Qiju Dihuang pills.

Keywords: traditional Chinese patent medicines; Qiju Dihuang pills; morroniside; loganin; paeonol; HPLC

杞菊地黄丸出自《麻疹全书》,由枸杞子、菊花、熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻组成,是在六味地黄丸原方基础上加入了枸杞和菊花而成,为常用中药成方制剂。具有滋阴补肾之功效,目前临床主要用于肝肾阴亏的眩晕、耳鸣、目涩畏光、视物昏花等症。中国药典 2010 年版一部以检测马钱苷

和丹皮酚作为质控指标^[1],这对于杞菊地黄丸的质量控制是很局限的,而且马钱苷和丹皮酚的测定采用了 2 种色谱条件,操作烦琐,限制了质控的效率。在查阅分析相关文献^[2-11]的基础上,本文建立了一种同时测定杞菊地黄丸中莫诺苷、马钱苷和丹皮酚含量的 HPLC 方法。

* 国家药品标准提高暨 2015 版药典科研项目

** 通信作者 郭洪祝 Tel: (010) 83226434; E-mail: guohz@bidc.org.cn

张英涛 Tel: (010) 82801599; E-mail: zytal988@163.com

第一作者 Tel: (010) 83221414; E-mail: lirunzhebianqiangda@126.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪, 配备二极管阵列检测器(PDA); XA 205 电子分析天平(梅特勒-托利多公司); SB-25-12DT 超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司); Cascade LS Water 纯水机(PALL 公司)。

1.2 试剂 杞菊地黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 批号 1013247; 药都制药集团股份有限公司, 批号 130201; 广西梧州三鹤药业有限公司, 批号 140202; 昆明中药厂有限公司, 批号 130504; 山西华康药业股份有限公司, 批号 20140101); 对照品: 莫诺苷为实验室自制, 纯度大于 98%; 马钱苷(批号 111640-200401) 和丹皮酚(批号 0708-9704) 均由中国食品药品检定研究院提供, 含量测定用。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Gemini C₁₈ 110A(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.3% 磷酸水溶液(B) 梯度洗脱(0~5 min 5% A → 8% A; 5~20 min 8% A; 20~35 min 8% A → 20% A; 35~45 min 20% A → 60% A; 45~55 min 60% A); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 240 nm(莫诺苷、马钱苷)、274 nm(丹皮酚); 柱温: 40 °C。莫诺

苷、马钱苷和丹皮酚的理论塔板数不低于 5 000。

2.2 混合对照品溶液的制备 精密称取对照品莫诺苷 11.21 mg、马钱苷 10.65 mg 与丹皮酚 25.34 mg, 置同一 100 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇水溶液适量使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品储备溶液; 精密量取 1 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇水溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液(莫诺苷、马钱苷、丹皮酚质量浓度分别为 22.42、21.30 和 50.68 μg · mL⁻¹)。

2.3 供试品溶液的制备 取大蜜丸或小蜜丸, 剪碎, 取约 1.2 g, 精密称定, 或取水蜜丸, 研细, 取约 0.8 g, 精密称定; 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇水溶液 25 mL, 密塞, 称量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称量, 用 70% 甲醇水溶液补足减失的量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 测定法 分别精密吸取混合对照品溶液与供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定。

2.5 专属性试验 取不含酒萸肉的阴性样品、不含牡丹皮的阴性样品, 照“2.3”项下方法, 分别制备酒萸肉阴性样品溶液和牡丹皮的阴性样品溶液。按上述色谱条件, 依法测定, 结果阴性样品无干扰, 本测定方法专属性较强, 见图 1。

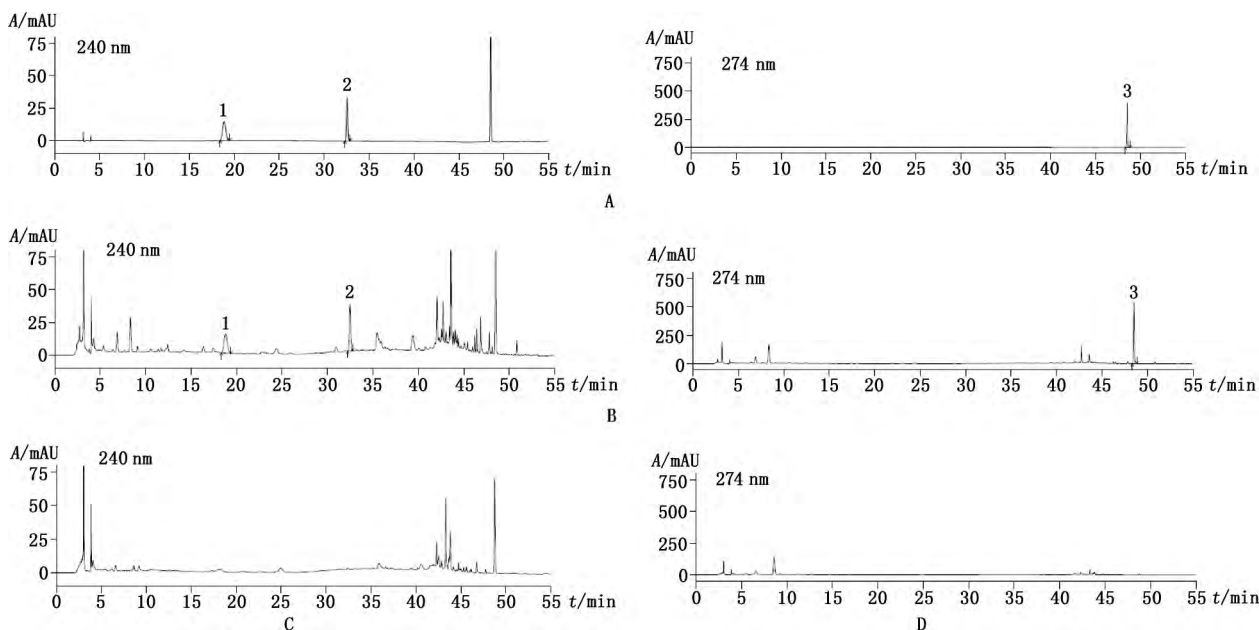


图 1 混合对照品(A)、样品(B)、缺酒萸肉阴性样品(C)和缺牡丹皮阴性样品(D)色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances(A), samples(B), negative samples without Fructus Corni(C) and negative samples without Moutan Cortex(D)

1. 莫诺苷(morroniside) 2. 马钱苷(loganin) 3. 丹皮酚(paeonol)

2.6 线性关系考察 精密量取混合对照品储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL, 分别置 5 mL 量瓶中, 加 70% 甲醇水溶液定容至刻度, 摇匀, 依法测定峰面积, 以峰面积 (A) 对分析物浓度 (C) 作线性回归, 得莫诺苷、马钱苷、丹皮酚回归方程:

$$A = 1.691 \times 10^4 C + 851.8 \quad r = 0.9999$$

$$A = 1.574 \times 10^4 C + 539.8 \quad r = 1.000$$

$$A = 4.625 \times 10^4 C + 1.391 \times 10^3 \quad r = 1.000$$

线性范围分别为 2.242 ~ 44.84、2.13、0 ~ 42.60、5.068 ~ 101.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.7 精密度试验 取同一供试品溶液连续进样 5 次, 每次进样 10 μL , 记录所测各组积分面积, 结果莫诺苷、马钱苷和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.24%、0.09% 和 0.07%。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、8、16、24、48 h 进样, 记录所测各组积分面积, 计算莫诺苷、马钱苷和丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.36%、0.45% 和 0.07%。3 种成分在 48 h 内基本稳定。

2.9 重复性试验 取同一批样品, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 测定含量。莫诺苷、马钱苷和丹皮酚的平均质量分数分别为 0.046%、0.047% 和 0.141%, 其 RSD 分别为 1.7%、1.3% 和 0.46%, 表明本方法重复性良好。

2.10 回收率试验 精密称取已测知含量的同一批样品(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 批号 1013247) 0.6 g, 共 6 份, 分别精密加入混合对照品溶液 12.5 mL, 再精密加入 70% 甲醇水溶液 12.5 mL, 按“2.3”项下方法制备供试溶液并进样测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 3 种成分加样回收试验
Tab. 1 The results of recovery test

成分 (component)	样品中量 (original) / mg	加入量 (added) /mg	平均回收率 (average recovery) /%	RSD/ %
莫诺苷 (morrisoniside)	0.27	0.224 2	96.2	0.44
马钱苷 (loganin)	0.28	0.266 3	96.0	0.21
丹皮酚 (paeonol)	0.88	0.861 5	103.0	0.65

2.11 样品含量测定 分别精密称取不同厂家的杞菊地黄丸约 1.2 g, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下条件进样测定, 每批样品测定 2 份, 计算样品中莫诺苷、马钱苷和丹皮酚的含量, 结果见表 2。

表 2 杞菊地黄丸中各成分含量测定 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
Tab. 2 Contents of each component in Qiju Dihuang pills

厂家(factory)	批号 (batch No.)	莫诺苷 (morrisoniside)	马钱苷 (loganin)	丹皮酚 (paeonol)
北京同仁堂科技(Beijing Tongrentang Tec.)	1013247	4.17	4.31	12.87
	12011977	4.32	4.22	10.04
	14010232	3.29	4.17	12.54
	13010230	6.57	5.23	10.95
广西梧州三鹤药业(Guangxi Wuzhou Sanhe Pharm.)	140202	4.60	4.28	8.16
药都制药(Yaodu Pharm.)	130301	8.09	4.11	10.73
昆明中药厂(Kunming Chinese Medicine Factory)	130304	8.65	5.74	9.64
山西华康药业(Shanxi Huakang Pharm.)	20140101	5.15	5.81	6.38

3 讨论

3.1 前处理考察 实验中考察了不同浓度的甲醇进行提取溶媒的筛选实验, 包括 40%、50%、60%、70%、80% 甲醇水溶液和甲醇的考察, 结果表明在 70% 甲醇水溶液中, 莫诺苷、马钱苷和丹皮酚三者的提取较充分。考察了以 70% 甲醇水溶液为溶剂, 分别超声提取 30、45 和 60 min, 回流提取 30、

45、60 和 90 min, 结果以 70% 甲醇水溶液回流提取 60 min, 莫诺苷、马钱苷和丹皮酚三者的峰面积均较高, 故选择 70% 甲醇水溶液回流 60 min 提取制备供试品溶液。

3.2 流动相考察 实验中考察了不同系统的流动相进行梯度洗脱程序筛选试验, 包括①乙腈-水溶液、②甲醇-水溶液、③乙腈-0.3% 磷酸水

溶液和④甲醇-0.3%磷酸水溶液。结果表明乙醇-0.3%磷酸水溶液梯度洗脱系统最好,色谱峰峰形佳,且各色谱峰分离良好,保留时间适宜,故选择该流动相系统测定杞菊地黄丸中莫诺苷、马钱苷和丹皮酚含量。

3.3 检测波长的选择 本实验采用了DAD检测器对样品进行测定,在分析时进行200~400 nm紫外扫描,确定莫诺苷、马钱苷和丹皮酚最大吸收波长分别为240、236和274 nm,因此选用240 nm处检测莫诺苷和马钱苷两组分,274 nm处检测丹皮酚组分。

3.4 小结 2010年版中国药典一部中,杞菊地黄丸中马钱苷和丹皮酚的含量测定分别使用不同的前处理方法、不同的流动相体系进行测定,本实验简化了前处理过程,实现了采用同一梯度洗脱系统,将莫诺苷、马钱苷和丹皮酚在同一色谱条件下分离,利用PDA检测器的特点,采用了双波长同时检测,同时测定杞菊地黄丸样品中的莫诺苷、马钱苷和丹皮酚含量。本方法操作简单,且精密度、重复性、回收率均符合中国药典要求,为同一检测方法同时测定杞菊地黄丸中多种成分的研究提供一定的参考。

参考文献

- [1] ChP 2010. Vol I (中国药典2010年版.一部) [S]. 2010: 747
- [2] LIU PX(刘朋欣), LIU CX(刘春欣), ZHU Y(朱岩). Determination of logannin in Qiju Dihuang oral liquid by HPLC(HPLC法测定杞菊地黄口服液中的马钱苷的含量) [J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医药) 2012, 25(1): 16
- [3] PAN Y(潘莹), GUO XL(郭小龙), CHEN Y(陈勇), et al. Determination of logannin, paeoniforin and paeonol in Qijudihuang pills by HPLC(HPLC法测定杞菊地黄丸中马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量) [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报) 2007, 38(2): 133

- [4] LIANG GJ(梁贵键), ZHU L(朱莉), ZHANG H(张华), et al. Determination of the contents of paeonol in Cortex Muotan and Qijudihuang pills by RP-HPLC(RP-HPLC法测定牡丹皮和杞菊地黄丸中丹皮酚的含量) [J]. J Air Force General Hosp(空军总医院学报) 2005, 21(4): 206
- [5] LI X(李娴), WANG BJ(王本杰), YUAN GY(袁桂艳), et al. Determination of four effective constituents in Liuwei Dihuang pills by HPLC(六味地黄丸中四种活性成分的HPLC法测定) [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志) 2010, 41(2): 126
- [6] SUN GX(孙国祥), WU B(吴波). Quality identification of Qijudihuang pills by digitized HPLC fingerprints(用高效液相色谱数字化指纹图谱鉴定杞菊地黄丸质量) [J]. Cent South Pharm(中南药学) 2010, 8(4): 299
- [7] SUN GX(孙国祥), WU B(吴波), BI KS(毕开顺). Quantitative identification Qijudihuang pill by integrating overall information method based on parallel five wavelength high performance liquid chromatographic fingerprints(平行五波长高效液相色谱指纹图谱全息整合法质量鉴定杞菊地黄丸的整体质量) [J]. Chin J Chromatogr(色谱) 2010, 28(9): 877
- [8] CHEN XY(陈学艳), WANG Y(王艳), LI J(李晶), et al. Determination of morroniside and logannin in Fructus Corni by different processes(山茱萸不同炮制品中莫诺苷和马钱苷含量测定) [J]. Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药) 2010, 27(3): 254
- [9] ZHU S(朱砂), LIANG JR(梁晋如), HE J(何姣). HPLC simultaneous determination of three iridoid glucosides in Fructus Corni from different sources and different harvest periods(HPLC法同时测定不同产地及不同采收时间山茱萸中3个环烯醚萜苷的含量) [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志) 2012, 32(7): 1235
- [10] LI W(李伟), XU HQ(许惠琴), TAO YH(陶玉茜), et al. Simultaneous determination of logannin and morroniside in total glucosides from *Cornus officinalis* by HPLC(RP-HPLC法测定山茱萸环烯醚萜总苷中马钱苷和莫诺苷含量) [J]. J Nanjing Univ TCM 2014, 30(1): 90
- [11] LIU JL(刘经亮), LIU GY(刘纲勇), WANG RY(王如意), et al. Determination of paeonol in extract of Cortex Moutan by RP-HPLC(RP-HPLC法测定牡丹皮提取物中丹皮酚的含量) [J]. Strait Pharm J(海峡药学) 2014, 26(1): 81

(本文于2014年7月1日收到)