

左、右归丸及其拆方中马钱苷的变化规律

杜丽霞^{1,2}, 何文智¹, 刘晓阳¹, 王智民³, 任艳玲^{1*}

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847; 2. 哈尔滨市中医医院, 哈尔滨 150076;
3. 辽宁中医药大学第一临床学院, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**建立左、右归丸及其拆方的马钱苷含量测定方法,为左、右归丸及其拆方质量控制提供标准。**方法:**采用HPLC法,ZOREAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水梯度洗脱,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长240 nm,进样量20 μL,柱温30℃。**结果:**所建方法能较好测定马钱苷的含量变化,出峰位置前后均无杂峰干扰,峰形完整,马钱苷在0.289 0~7.225 0 μg($r=0.999\ 6$)呈良好的线性关系,平均回收率为99.70%,RSD 1.5%。稳定性、精密度和加样回收率均符合定量要求,含量测定结果显示马钱苷在共同药方中含量最高,右归丸和滋肾阴药中含量相似,左归丸中含量偏低。**结论:**该方法简便、重复性好,结果准确可靠,可为左、右归丸及其拆方的质量控制提供参考价值 and 指导意义。

[关键词] 左归丸; 右归丸; 马钱苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)21-0056-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014210056

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140915.1111.006.html>

[网络出版时间] 2014-09-15 11:11

Variation of Loganin in Zuogui Wan, Yougui Wan and Their Disassembled Prescriptions

DU Li-xia^{1,2}, HE Wen-zhi¹, LIU Xiao-yang¹, WANG Zhi-min³, REN Yan-ling^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110847, China;
2. Heilongjiang Harbin of TCM Hospital, Harbin 150076, China;
3. First Clinical College, Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China)

[Abstract] **Objective:** To set up a HPLC method for the determination of loganin in Zuogui Wan, Yougui Wan and their disassembled prescriptions. It can provide a quality control standard for Zuogui Wan, Yougui Wan and their disassembled prescriptions. **Method:** HPLC, a ZOREAX SB-C₁₈ column served as the solid phase, the mobile phase was acetonitrile-water in gradient elution mode. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the sample volume was 20 μL each time, the detection wave length was 240 nm and the column temperature was 30℃. **Result:** The topic establishing method can better determine the content variation of loganin. Both before and after the peak position without impurity peak interference, and the peak was intact. The linear range of loganin was 0.289 0~7.225 0 μg ($r=0.999\ 6$). The average recoveries were 99.70%, with RSD of 1.5%. Stability, precision and the rate of sample recovery were all well. According to the results, the content of loganin in common prescription was the highest, while it was low in Zuogui Wan. Yougui Wan and kidney-Yin-nourishing drug has a similar level. **Conclusion:** The method is simple, accurate and reliable with good reproducibility. It can be used

[收稿日期] 20140303(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373527)

[第一作者] 杜丽霞,在读硕士,主管中药师,从事中药药理研究,Tel:0451-88029218,E-mail: xiaomao3650@163.com

[通讯作者] *任艳玲,博士,教授,博士生导师,从事中药理论及应用的研究,Tel:024-31207267,E-mail: yanlingren@tom.com

to provide the reference value and guiding significance for Zuogui Wan, Yougui Wan and their disassembled prescriptions' quality control.

[**Key words**] Zuogui Wan; Yougui Wan; loganin

左归丸收载于《中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第一册)》,由熟地黄、炒山药、枸杞子、山茱萸、鹿角胶、菟丝子、牛膝、龟板胶组成,具有滋阴补肾、填精益髓的功效。右归丸载于《中国药典》(2010年版),由熟地黄、炒山药、枸杞子、山茱萸、鹿角胶、菟丝子、当归、肉桂、杜仲、附子组成,为温补肾阳的代表方剂,具温补肾阳、填精益髓之功效。山茱萸为两方中主要药味,马钱苷为其主要成分,具有显著增强免疫功能等作用,是山茱萸主要活性成分之一。近几年来,对山茱萸单味中药制剂和由其组成的复方制剂左归丸中马钱苷的含量测定方法已有文献报道^[1-6],为山茱萸和复方制剂左归丸的质量控制提供了依据,但未见左、右归丸两复方成分中马钱苷的含量测定比较。本实验建立左、右归丸及其拆方中马钱苷的 HPLC 色谱分析方法,为左、右归丸及其拆方中马钱苷的含量变化提供依据,进而明确左、右归丸及其拆方水煎液的药效作用的物质基础和含量,为阐明左、右归丸组方规律以及其深层次的开发研究奠定了重要基础。

1 材料

1.1 主要药物及试剂 左归丸(组成:熟地黄 24 g、炒山药 12 g、枸杞子 12 g、山茱萸 12 g、鹿角胶 12 g、菟丝子 12 g、川牛膝 9 g、龟板胶 12 g),右归丸(组成:熟地黄 24 g、炒山药 12 g、枸杞子 12 g、山茱萸 12 g、鹿角胶 12 g、菟丝子 12 g、当归 9 g、肉桂 6 g、杜仲 9 g、附子 6 g),共同药方(组成:熟地黄 24 g、炒山药 12 g、枸杞子 12 g、山茱萸 12 g、鹿角胶 12 g、菟丝子 12 g),滋肾阴药方(组成:熟地黄 24 g、炒山药 12 g、枸杞子 12 g、山茱萸 12 g、龟板胶 12 g),补肾阳药方(组成:肉桂 6 g、杜仲 9 g、制附 6 g、鹿角胶 12 g、菟丝子 12 g),中药饮片购买于辽宁中医药大学附属第一医院;马钱苷对照品(购于中国食品药品检定研究院,批号 111640-201005);色谱乙腈(天津市大茂化学试剂厂,批号 20131210),色谱甲醇(国药集团化学试剂有限公司,批号 20130924);纯水为实验室自制。

1.2 仪器 LC-20 型高效液相色谱仪(日本岛津),TB-25 型电子分析天平(北京丹佛仪器有限公司),KQ-5200B 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 ZOREAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 240 nm,柱温 30 ℃,流动相水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 17 min, 89% ~ 11% B; 18 ~ 35 min, 86% ~ 14% B; 36 ~ 40 min, 89% ~ 11% B),流速 1.0 mL·min⁻¹,进样体积 20 μL。在此条件下,样品色谱中马钱苷的峰达到基线分离,且阴性对照无干扰。见图 1。

2.2 对照品溶液的制备 取马钱苷对照品适量,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,制成质量浓度为 289 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 取左归丸、右归丸、共同药方、滋肾阴药方、补肾阳药方各组水煎液适量,蒸干,取干燥品适量,研细,取约 1 g,精密称定,置 10 mL 量瓶,加入 7 mL 甲醇,超声(功率 100 W,频率 40 kHz)提取 20 min,放冷,用甲醇定容至刻度,摇匀,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备 取不含山茱萸的左归丸阴性样品,按供试品溶液的制备方法制备,即得。

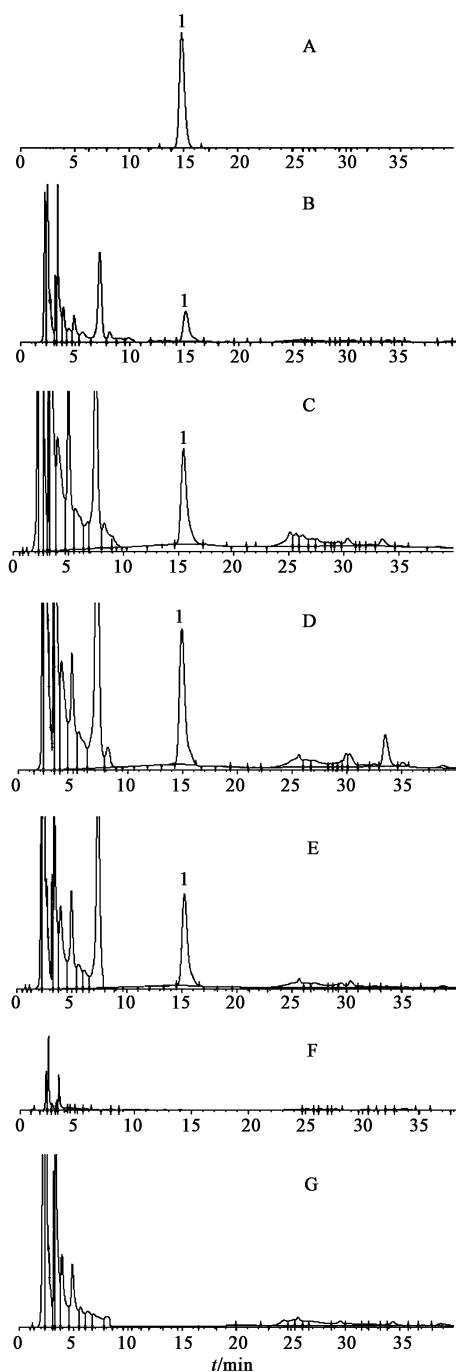
2.5 线性范围的考察 精密吸取马钱苷对照品溶液(289 mg·L⁻¹),按 2.1 项下色谱条件,分别进样 1, 5, 10, 15, 20, 25 μL,记录马钱苷峰面积,以进样量(μg)为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。标准曲线为 $Y = 879.870X - 20.025$, $r = 0.9996$ 。结果马钱苷进样量在 0.289 0 ~ 7.225 0 μg 呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 20 μL,连续进样 6 次,记录峰面积,计算得 RSD 1.27%,表明方法精密度良好。

2.7 稳定性试验 精密吸取左归丸样品溶液 20 μL,按 2.1 项下色谱条件,于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样测定,得出马钱苷峰面积的 RSD 1.39%,表明该方法测定马钱苷在 24 h 内稳定。

2.8 重复性试验 取左归丸样品干燥粉末约 1 g, 6 份,精密称定,按照供试品溶液的制备方法制备,按 2.1 项下色谱条件,进样分析,测定每份样品中马钱苷的含量,结果马钱苷平均质量分数为 821.29 μg·g⁻¹, RSD 1.07%。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的左归丸样品



A. 对照品; B. 左归丸供试品;
C. 右归丸供试品; D. 共同药方供试品;
E. 滋阴药方供试品; F. 补阳药方供试品;
G. 不含山茱萸的左归丸阴性样品; 1. 马钱苷

图 1 左归丸、右归丸及拆方 HPLC

干燥粉末约 0.5 g, 6 份, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入一定量的对照品, 照供试品溶液制备方法制备, 进样测定, 计算加样回收率并计算 RSD < 3%, 表明回收率良好, 见表 1。

2.10 样品测定 取各组样品干燥粉末约 1 g, 3

表 1 马钱苷加样回收率试验

取样量 /g	样品中量 / μg	加入量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
0.502 1	420.24	411.17	830.48	99.77		
0.506 2	423.67	407.34	829.83	99.71		
0.499 8	418.32	428.63	838.63	98.06	99.70	1.5
0.508 5	425.60	408.23	825.45	97.95		
0.506 7	424.09	423.69	849.03	100.29		
0.503 3	421.25	422.23	853.57	102.39		

份, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 按照供试品溶液的制备方法制备, 按 2.1 项下色谱条件, 进样分析, 按外标法计算马钱苷的含量, 结果见表 2。

表 2 左、右归丸及其拆方中马钱苷的含量

名称	马钱苷的含量 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$			平均值 / $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	RSD /%
	1	2	3		
左归丸	849.63	836.97	828.86	838.49	1.0
右归丸	2 327.98	2 310.71	2 244.37	2 294.35	1.6
共同药方	3 168.60	3 164.46	3 274.83	3 202.63	1.6
滋阴阴药方	2 159.90	2 131.77	2 105.01	2 132.23	1.1
补肾阳药方	-	-	-	-	-

注: “-”代表无。

3 讨论

左、右归丸均始载于明·张介宾《景岳全书》。在治疗上重视虚证, 善用温补, 且重视滋阴, 在补肾方面尤具特色。左归丸治肾水不足, 真阴衰弱, 方中以熟地黄、山药、山茱萸、龟板胶、枸杞子等滋补肾之阴精, 佐以鹿角胶、菟丝子温阳补肾, 于阳中求阴, 以增生化之功^[7]。右归丸以熟地黄性味甘温, 配合山药、山茱萸、枸杞子滋阴补肾, 填精补髓, 于阴中求阳, 滋阴生气; 鹿角胶咸温纯阳, 为血肉有情之品, 补肾而温督脉, 并能生精血, 强筋骨; 菟丝子温肾壮阳; 肉桂、附子温肾助阳祛寒; 当归、杜仲养血强筋, 诸药互相配合, 共奏温补元阳之功^[8]。本课题组前期研究发现, 两方均可通过补肾填精对骨髓间充质干细胞进行成骨诱导分化^[9-11]。基于二者的功效, 利用撤药分析法对补肾填精方“左归丸”和“右归丸”进行拆方分析, 分为以“滋补肾阴”立法的左归丸和滋肾阴药方及以“温补肾阳”立法的右归丸和补肾阳药方, 以及二者的共同复方药成分共同药方。

本实验参照了文献^[12-13]和《中国药典》(2010年版)右归丸含量测定项目^[14], 以马钱苷作为对照品, 采用高效液相色谱法, 建立并优化左、右归丸及其拆方成分中马钱苷的含量测定方法, 参考有关文

献^[15-17],比较了不同的流动相,发现采用水-乙腈为流动相进行梯度洗脱时,样品中马钱苷峰分离度较好,观察山茱萸(马钱苷)在左、右归丸及其拆方中的含量变化。

本研究通过对几组组方中马钱苷的含量进行测定。结果显示马钱苷在左、右归丸及其拆方中的含量有所变化,共同药方中马钱苷含量最高,提示马钱苷在左、右归丸补肾功效中可能发挥了重要的作用;右归丸含量其次,说明马钱苷在右归丸中与其他中药配伍发挥补肾阳的辅助作用;滋肾阴药方中含量略低,说明马钱苷和滋肾阴药方中其他中药配伍发挥滋肾阴的作用;左归丸中含量偏低,而前期实验结果显示左归丸在大多数情况下发挥强于滋肾阴药的滋阴补肾,填精益髓的作用,有时和滋肾阴药作用同等,说明马钱苷在左归丸中可能与其他中药配伍发挥强于滋肾阴药方的滋阴补肾的作用,有待进一步考证。

本法经方法学考察具灵敏度高,准确,重复性好等特点。本实验可为左、右归丸及其拆方的质量控制及左、右归丸的配伍提供参考价值和指导意义,更为进一步揭示左、右归丸及其拆方功效物质基础及作用机制提供科学依据。

[参考文献]

- [1] 宋平顺,王兰霞,丁永辉. HPLC 测定山茱萸不同炮制品中马钱苷的含量[J]. 中成药,2008,30(5):707.
- [2] 周函钰,杨培培,丛晓东,等. 炮制前后山茱萸煎液、溶出层面的比较研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(22):3888.
- [3] Cai H, Cao G, Cai B H. Rapid simultaneous identification and determination of the multiple compounds in crude Fructus Corni and its processed products by HPLC-MS/MS with multiple reaction monitoring mode[J]. Pharmaceutical Biology, 2013, 51(3):273.
- [4] 贺娟妮,刘晓,牟朝丽,等. 山茱萸中3种环烯醚萜苷

的响应曲面优化微波提取及 HPLC 测定[J]. 中药材,2011,34(7):1118.

- [5] 水彩红,曹红. HPLC 法测定山茱萸药材及六味地黄胶囊中马钱苷的含量[J]. 中国药品标准,2005,6(4):17.
- [6] 孟建升,王伟丽,杨文文,等. HPLC 法测定左归丸中马钱苷的含量[J]. 中国中医药现代远程教育,2012,10(18):152.
- [7] 易自刚. 张景岳补肾方配伍特色浅析[J]. 新中医,2007,39(11):88.
- [8] 喻嵘,吴勇军,陈大舜. 明清医家对张景岳阴阳互济法及其左、右归方的探析[J]. 中国中医基础医学杂志,2000,6(3):49.
- [9] 何文智,宋囡,王智民,等. 左、右归丸及其拆方对骨髓间充质干细胞成骨增殖和成骨诱导的影响[J]. 中国骨质疏松杂志,2013,19(7):697.
- [10] 宋囡,何文智,王智民,等. 左、右归丸及其拆方对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中国病理生理杂志,2013,29(7):1268.
- [11] 刘立萍,任艳玲,李然,等. 左归丸含药血清通过 JNK 信号通路诱导 MC3T3 成骨细胞分化的研究[J]. 中成药,2012,34(8):1433.
- [12] 李成网. 高效液相色谱法测定左归丸中马钱苷含量[J]. 医药导报,2007,26(4):419.
- [13] 孙琳林,陈海玲,卢林,等. 高效液相色谱法测定左归丸中马钱苷的含量[J]. 中华中医药学刊,2012,30(8):1792.
- [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,2010:633.
- [15] 谭德,古锐,张艺,等. HPLC 测定藏药翼首草中马钱苷的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(24):3472.
- [16] 陈学艳,王艳,李晶,等. 山茱萸不同炮制品中莫诺苷和马钱苷含量测定[J]. 天津中医药,2010,27(3):254.
- [17] 王晓燕. 不同采收期山茱萸中马钱苷的含量测定[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(9):2025.

[责任编辑 顾雪竹]