

HPLC 波长切换同时测定知柏地黄丸中 莫诺昔、马钱苷和丹皮酚的含量

李桂本*, 王海波, 李振国

(河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定知柏地黄丸中莫诺昔、马钱苷、丹皮酚的含量。方法:采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈(A)-0.3% 磷酸溶液(B)为流动相, 梯度洗脱 (0~5 min, 5%~7% A; 5~26 min, 7% A; 26~45 min, 7%~20% A; 45~55 min, 20%~60% A; 55~65 min, 60% A), 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 波长切换 (0~45 min, 在 240 nm 波长下检测莫诺昔和马钱苷; 46~65 min, 在 274 nm 波长下检测丹皮酚)。结果:莫诺昔、马钱苷和丹皮酚的线性范围分别为 0.055 5~1.11 μg ($r=0.999 9$), 0.076 4~1.528 μg ($r=0.999 9$), 0.098 2~1.964 μg ($r=0.999 9$); 平均回收率分别为 100.6%, 101.6%, 101.9%, RSD 分别为 2.5%, 1.8%, 1.5%。结论:该方法操作简便、准确, 重复性好, 可用于知柏地黄丸的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 波长切换; 知柏地黄丸; 莫诺昔; 马钱苷; 丹皮酚

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)16-0048-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015160048

Simultaneous Determination of Morroniside, Loganin and Paeonol in Zhibai Dihuang Pills by HPLC Wavelength Switching Technology LI Gui-ben*, WANG Hai-bo, LI Zhen-guo (Henan Provincial Food and Drug Control Institute, Zhengzhou 450003, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneously determining three components in Zhibai Dihuang pills, i. e. morroniside, loganin and paeonol. **Method:** The Phenomenex C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was adopted and eluted in gradient (0-5 min, 5%-7% A; 5-26 min, 7% A; 26-45 min, 7%-20% A; 45-55 min, 20%-60% A; 55-65 min, 60% A) with the mobile phase of acetonitrile (A) -0.3% phosphoric solution (B). The flow rate was 1 mL·min⁻¹. The column temperature was 40 °C. The detection wavelength was set at 240 nm for morroniside and loganin in the first 45 minutes, and then switched to 274 nm for paeonol between the 46 and 65 minutes. **Result:** The linear ranges of morroniside, loganin and paeonol were between 0.055 5-1.11 μg ($r=0.999 9$), 0.076 4-1.528 μg ($r=0.999 9$), 0.098 2-1.964 μg ($r=0.999 9$), respectively. The average recoveries of morroniside, loganin and paeonol were 100.6%, 101.6% and 101.9%, respectively, and the relative standard deviations were 2.5%, 1.8% and 1.5%, respectively. **Conclusion:** This method is simple, accurate and highly reproducible and so can be used to control the quality of Zhibai Dihuang pills.

[Key words] HPLC; wavelength switching; Zhibai Dihuang pills; morroniside; loganin; paeonol

知柏地黄丸为《中国药典》收录品种,由山茱萸(制)、牡丹皮、熟地黄等 8 味中药组成,具有滋阴降火的功效。用于阴虚火旺、潮热盗汗、口干咽痛、耳鸣遗精、小便短赤^[1]。2010 年版《中国药典》采用高效液相色谱法分别测定山茱萸中马钱苷和牡丹

皮中丹皮酚的含量,山茱萸的含量测定提取方法操作繁琐,且仅测定马钱苷的含量,不足以全面评价山茱萸药材的质量。山茱萸具有抗菌、抗炎、调节免疫、降血糖、治疗肾病等重要的药用价值,马钱苷和莫诺昔同属环烯醚萜苷类,马钱苷具有调

[收稿日期] 20140920(009)

[基金项目] 2015 年版《中国药典》课题(ZS-183)

[通讯作者] *李桂本, 硕士, 主管药师, 从事中药质量分析及中药质量标准研究, Tel:0371-63388283, E-mail: water_lj@163.com

节免疫、抗炎和抗休克作用,莫诺苷具有苦补健胃和预防糖尿病性血管病的作用^[2-4]。我国山茱萸资源主要分布在秦岭、伏牛山以南和浙江天目山区,浙江杭州、河南南阳、山西阳城和陕西汉中是我国山茱萸主产区。不同产区山茱萸的化学成分存在较大差异,马钱苷含量较高的是山西阳城和河南南阳,莫诺苷含量较高的是浙江杭州和山西阳城,同时测定二者含量,能进一步说明山茱萸药材质量的优劣^[5-6]。为了更好的控制制剂质量,本研究利用高效液相色谱法同时测定药品中莫诺苷、马钱苷和丹皮酚的含量。

1 材料

2695型高效液相色谱仪(2998 二极管阵列检测器,美国 Waters),XR 205SM-DR 型分析天平(Precisa),Milli-Q 型超纯水仪(Millipore 公司)。

莫诺苷对照品(批号 2013047,北京市药品检验所提供),马钱苷(批号 111640-201005,含量以 99.2% 计)、丹皮酚(批号 110708-200506)对照品均由中国食品药品检定研究院提供。乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。共收集水蜜丸 8 个厂家 12 批样品;小蜜丸 2 个厂家 6 批样品;大蜜丸 5 个厂家 8 批样品。

2 方法与结果

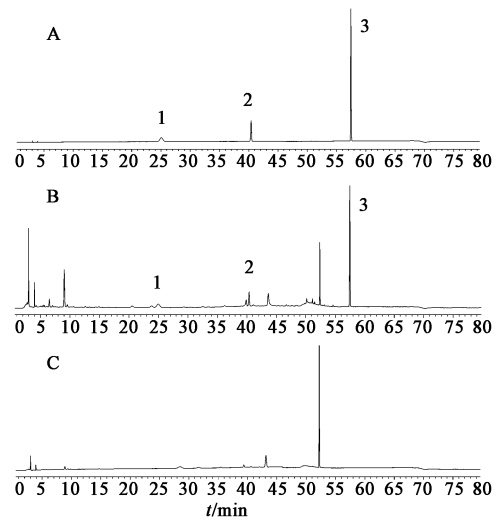
2.1 对照品溶液的制备 精密称取莫诺苷、马钱苷和丹皮酚对照品适量,用 50% 甲醇制成分别为 55.5, 76.4, 98.2 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备 取本品水蜜丸,研碎,取 0.7 g,精密称定;取小蜜丸或质量差异项下的大蜜丸,剪碎,混匀,取约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,加热回流 1 h,取出,放冷,再称定质量,用 50% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得供试品溶液。

2.3 阴性对照溶液的制备 按照处方制备缺山茱萸(制)、牡丹皮的阴性样品。按 2.2 项下方法制备阴性样品溶液。

2.4 色谱条件 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-0.3% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 5%~7% A; 5~26 min, 7% A; 26~45 min, 7%~20% A; 45~55 min, 20%~60% A; 55~65 min, 60% A);流速 1 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,检测波长为 0~45 min, 240 nm 检测莫诺苷和马钱苷, 46~65 min, 274 nm 检测丹皮酚;进样量 10 μL,各待测组分分离度均 > 1.5,理论塔板数均不低

于 8 000。混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液色谱见图 1。



A. 混合对照品; B. 供试品; C. 阴性对照品; 1. 莫诺苷; 2. 马钱苷; 3. 丹皮酚

图 1 知柏地黄丸 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of Zhibai Dihuang pill

2.5 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶液 1, 3, 6, 10, 15, 20 μL, 注入液相色谱仪, 分别测定峰面积。以对照品进样量(μg)为横坐标, 峰面积积分为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程为 $Y_{\text{莫诺苷}} = 1.756 \times 10^6 X - 5.408 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{马钱苷}} = 1.645 \times 10^6 X - 6.368 \times 10^4$ ($r = 0.9999$), $Y_{\text{丹皮酚}} = 5.191 \times 10^6 X - 2.217 \times 10^5$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 莫诺苷在 0.055 5 ~ 1.11 μg, 马钱苷在 0.076 4 ~ 1.528 μg, 丹皮酚在 0.098 2 ~ 1.964 μg 与峰面积呈良好线性关系。

2.6 精密度试验 精密称取同一批知柏地黄丸, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液。按 2.4 项下色谱条件连续进样 6 次, 测得莫诺苷、马钱苷、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 2.3%, 1.1%, 0.2%。

2.7 稳定性试验 精密称取同一批知柏地黄丸, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液。按 2.4 项下色谱条件分别在 0, 3, 6, 9, 12, 15 h 进样测定, 每次进样 10 μL, 测得莫诺苷、马钱苷、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 2.8%, 1.1%, 0.4%。

2.8 重复性试验 精密称取同一批知柏地黄丸粉末 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液。按 2.4 项下色谱条件进行测定, 得莫诺苷、马钱苷、丹皮酚的平均质量分数分别为 0.445 5, 0.850 8, 1.487 4 mg·g⁻¹, RSD 分别为 2.0%, 2.0%, 2.2%。

2.9 回收率试验 精密称取已知含量的样品

0.35 g, 共 6 份, 置锥形瓶中, 分别精密加入混合对照品的 50% 甲醇溶液(莫诺昔 $9.62 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 马钱苷 $14.111 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 丹皮酚 $23.875 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 25 mL, 按

2.2 项下方法制备供试品溶液。精密吸取对照品溶液与供试品溶液, 分别注入液相色谱仪, 测定回收率, 结果见表 1。

表 1 知柏地黄丸加样回收率试验

Table 1 Results of recovery test of Zhibai Dihuang pill

成分	称样量/mg	样品中量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
莫诺昔	0.355 3	0.158 3	0.240 5	0.396 8	99.17	100.6	2.5
	0.352 0	0.156 8	0.240 5	0.390 3	97.09		
	0.355 9	0.158 6	0.240 5	0.400 4	100.54		
	0.351 5	0.156 6	0.240 5	0.402 0	102.04		
	0.358 6	0.159 8	0.240 5	0.400 6	100.12		
	0.355 8	0.158 5	0.240 5	0.409 8	104.49		
马钱苷	0.355 3	0.302 3	0.352 8	0.659 1	101.13	101.6	1.8
	0.352 0	0.299 5	0.352 8	0.656 7	101.25		
	0.355 9	0.302 8	0.352 8	0.658 2	100.74		
	0.351 5	0.299 1	0.352 8	0.651 0	99.74		
	0.358 6	0.305 1	0.352 8	0.675 3	104.93		
	0.355 8	0.302 7	0.352 8	0.662 3	101.93		
丹皮酚	0.355 3	0.528 5	0.596 9	1.133 5	101.36	101.9	1.5
	0.352 0	0.523 6	0.596 9	1.133 2	102.13		
	0.355 9	0.529 4	0.596 9	1.136 0	101.63		
	0.351 5	0.522 8	0.596 9	1.132 5	102.14		
	0.358 6	0.533 4	0.596 9	1.156 9	104.46		
	0.355 8	0.529 2	0.596 9	1.124 9	99.80		

2.10 样品测定 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.4 项下色谱条件进行测定 11 批知柏地黄丸含量, 结果见表 2。

表 2 知柏地黄丸样品含量测定

Table 2 Determination results of Zhibai Dihuang pill $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$

剂型	批号	莫诺昔	马钱苷	丹皮酚
水蜜丸	130101	0.446	0.851	1.487
	120901	0.441	0.814	1.424
	131003	0.381	0.708	1.297
	130862	0.229	0.672	1.182
	13032649	0.601	0.578	1.462
	140250	0.551	0.570	1.087
	1401001	0.857	0.856	1.436
	140201	1.414	0.702	1.405
	1308201	0.653	0.719	1.139
	12120004	0.421	0.716	1.146
131062	0.332	0.669	1.200	
296138	0.613	0.745	1.726	

续表 2

剂型	批号	莫诺昔	马钱苷	丹皮酚
小蜜丸	131101	0.810	0.505	1.167
	130501	0.644	0.558	0.994
	130302	1.025	0.671	1.258
	201304007	0.549	0.707	1.103
	201208019	0.778	0.593	0.936
大蜜丸	201208047	0.589	0.589	0.968
	13011248	0.405	0.505	1.167
	12012301	0.505	0.502	1.265
	131203	0.300	0.637	0.899
	130102	0.525	0.346	1.189
	130501	0.856	0.414	0.959
	140101	0.861	0.403	1.132
1311126	0.196	0.412	0.673	
140104	0.535	0.570	0.847	

3 讨论

3.1 提取溶剂的选择 莫诺苷、马钱苷是山茱萸中的水溶性成分^[7],丹皮酚在水中溶解性差,易溶于甲醇等溶剂^[8],综合考虑,确定本试验提取溶媒为50%甲醇溶液。

3.2 提取方法的选择 以50%甲醇溶液为溶剂,分别进行超声30,45,60 min,及加热回流30,60,90 min。试验结果表明,加热回流提取效果优于超声提取,且加热回流60 min和90 min效果相当,故提取方法确定为加热回流1 h。

3.3 检测波长的选择 用紫外二极管阵列检测器在200~450 nm对3个成分进行光谱扫描,莫诺苷、马钱苷、丹皮酚的最大吸收波长分别为240,237,274 nm,莫诺苷与马钱苷的最大吸收波长几乎一致,结合液相色谱图,将波长设定为0~45 min,240 nm,46~65 min,274 nm。

3.4 流动相的选择 曾选用乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B)梯度洗脱^[9-10],甲醇(A)-水(B)梯度洗脱^[11],由于样品成分复杂,在上述条件下,各待测成分与杂质未能得到良好的分离,为使峰形最优,最终确定流动相为乙腈(A)-0.3%磷酸溶液(B),梯度洗脱。

3.5 耐用性试验 分别选用3根不同商品规格的色谱柱,Phenomenex Luna C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),CHROM-MATRIX Innovation C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),Agela Venusil XBP C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)测定同1份样品并考察分离度,各成分测定结果的RSD均<3%,分离度符合含量测定要求。因此,知柏地黄丸中莫诺苷、

马钱苷、丹皮酚含量测定条件较宽泛,具有较好的耐受性。

[参考文献]

- [1] 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, 2010:820-821.
- [2] 韩淑燕,潘扬,杨光明,等. 超临界CO₂萃取山茱萸成分研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12):1148-1150, 1183.
- [3] 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):254-256.
- [4] 刘轶华,朱红丽. 山茱萸的现代药理研究及应用[J]. 中国医药指南, 2012, 10(31):601-602.
- [5] 闫润红,赵平,刘养清,等. 不同产地山茱萸中莫诺苷和马钱素含量的研究[J]. 山西中医学院, 2009, 10(2):21-23.
- [6] 袁菊丽,姜红波. 山茱萸的主要化学成分及药理作用[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(5):7-9.
- [7] 皮文霞,许桂玲,郭戎,等. 山茱萸 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中药材, 2010, 33(4):530-532.
- [8] 李雪,王芳,赵晓宏,等. 丹皮酚溶解性能的测定[J]. 中医学报, 2013, 28(2):221-223.
- [9] 程世云,邓祖磊,黄丽丹,等. 山茱萸药材 HPLC 特征图谱研究[J]. 中国药事, 2012, 26(12):1353-1356.
- [10] 李娴,王本杰,袁桂艳,等. 六味地黄丸中四中活性成分的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(2):126-128.
- [11] 刘少静,杨黎彬,赵宁,等. HPLC 法测定山茱萸生品中中 5-羟甲基糠醛、莫诺苷和马钱苷含量[J]. 安徽医药, 2011, 15(8):961-962.

[责任编辑 顾雪竹]