

# HPLC 测定明目地黄丸(浓缩丸)中马钱苷的含量

程巧鸳\*, 谭春梅

(浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

**[摘要]** 目的:建立 HPLC 测定明目地黄丸(浓缩丸)中马钱苷的含量。方法:采用 Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为[四氢呋喃-乙腈-甲醇(1:8:4)-0.05% 磷酸溶液](8:92), 检测波长为 236 nm, 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 40 ℃, 外标法计算含量。结果:马钱苷在 40.43 ~ 1 213.02 ng 有良好线性关系( $r=1.000 0$ ), 平均回收率为 98.2%, RSD 0.4% ( $n=6$ )。结论:此方法前处理简便, 准确可靠, 可作为该制剂的质控方法之一。

**[关键词]** 明目地黄丸(浓缩丸); 马钱苷; 高效液相色谱; 含量

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0068-04

## Determination of Loganin in Mingmu Dihuang Pill by RP-HPLC

CHENG Qiao-yuan\*, TAN Chun-mei

(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a RP-HPLC method to determine the content of loganin in Mingmu Shangqing pill. **Method:** The analysis was performed on a Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with tetrahydrofuran-acetonitrile-methanol (1:8:4) -0.05% phosphoric acid (8:92) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, and at a column temperature of 40 ℃. The detection wavelength was at 236 nm. The content was calculated with external standard method. **Result:** The linear range of loganin was 40.43-1 213.02 ng ( $r=1.000 0$ ). The average recovery was 98.2%, and the RSD was 0.8% ( $n=6$ ) **Conclusion:** This method was simple, accurate, reliable and suitable to be applied to the quality control for the preparation.

**[Key words]** Mingmu Dihuang pill; loganin; HPLC; content

明目地黄丸(浓缩丸)是由熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、白芍、山药、枸杞子、菊花等 12 味药组成的中药复方制剂,具有滋阴、养肝、明目功效,用于肝肾阴虚、目涩畏光、视物模糊、迎风流泪。方中酒萸肉具有补益肝肾、涩精固脱之功效,马钱苷为其主要有效成分之一<sup>[1]</sup>,具有显著增强机体免疫功能等作用。原标准收载于《卫生部药品标准中药成方制剂》第 9 册,仅有茯苓、山药、当归的显微鉴别,无含量测定质控项目<sup>[2]</sup>。本文拟采用高效液相色谱法测定明目地黄丸(浓缩丸)中马钱苷的含量,为

控制制剂质量提供理论依据。

### 1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪,配备 2487 紫外检测器;日本岛津 LC-20AT 型,二极管阵列检测器(测定最大吸收波长用)。马钱苷对照品(批号 111640-200503,纯度 99.2%,含量测定用)由中国药品生物制品检定所提供,四氢呋喃、乙腈和甲醇为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。明目地黄丸(浓缩丸)7 批,3 个生产企业(征集,批号 10F15, 10F16, 10E14, 90207, 90802, 100502, 90601),批号 10F15 作为方法与研究用样品。

### 2 色谱条件

Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相[四氢呋喃-乙腈-甲醇(1:8:4)-0.05% 磷酸溶液](8:92), 检测波长 236 nm, 柱温 40 ℃, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 进样量为 10 μL。

**[收稿日期]** 20110516(016)

**[基金项目]** 国家“十一五”科技支撑“重大新药创制”专项课题(2009ZX09308)

**[通讯作者]** \*程巧鸳,博士,主管中药师,从事中药质量及其安全性研究, Tel:0571-86459425, E-mail: cqy\_427@126.com

### 3 方法与结果

#### 3.1 供试品溶液的制备

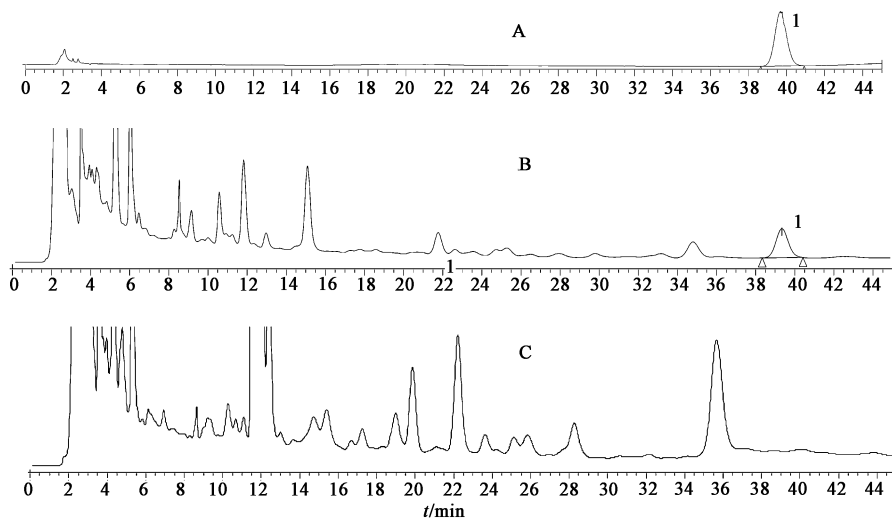
**3.1.1 样品溶液的制备** 取本品适量,研细,取约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇50 mL,称定质量,超声处理(功率400 W,120 KHz)30 min,放冷,再称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液即得。

**3.1.2 阴性空白对照溶液的制备** 根据质量标准中的处方比例,先制备阴性空白溶液,再按样品溶液

制备方法制备缺酒萸肉的阴性空白对照溶液。

**3.1.3 对照品溶液的制备** 取马钱苷对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成每1 mL含15  $\mu\text{g}$ 的溶液,即得。

**3.2 系统适应性试验** 取马钱苷对照品溶液、阴性空白对照溶液和样品溶液,按上述色谱条件下进样10  $\mu\text{L}$ ,结果色谱分离良好,阴性无干扰,理论板数以马钱苷峰计可达10 000以上,见图1。



A. 对照品;B. 样品;C. 阴性空白;1. 马钱苷

图1 明目地黄丸液相色谱

**3.3 测定波长的选择** 取马钱苷对照品溶液,在含量测定条件下,以HPLC-DAD法测定,得到紫外吸收光谱图,最大吸收波长为238 nm,见图2。参考《中国药典》2011年版一部明目地黄丸酒萸肉含量测定项下的检测波长<sup>[2]</sup>,最后确定测定波长为236 nm。

40.43 ~ 1 213.02 ng 有良好线性关系。

#### 3.5 精密度试验

**3.5.1 仪器精密度** 精密吸取同一供试品溶液,连续进样6次,所得峰面积RSD 1.0% ( $n=6$ )。

**3.5.2 重复性试验** 称取同一批样品(批号10F15)各6份,按拟定的含量测定方法测定,结果平均含量为0.866  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,RSD 0.8% ( $n=6$ )。

**3.6 稳定性试验** 取同一份样品溶液,在0,2,4,6,8,12,24 h,测定马钱苷峰面积。结果表明,RSD 0.4%,所制备的供试品溶液至少在24 h内保持稳定。

**3.7 准确度(以回收率表示)** 精密称取样品(批号10F15)6份,各精密加入马钱苷对照品溶液2 mL ( $202.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),按正文样品溶液制备法制备,并依法测定,结果平均回收率98.2%,RSD 0.4% ( $n=6$ ),见表1。

**3.8 样品测定** 按3.1.1项下制备样品溶液,照上述色谱条件进样测定,外标法计算含量,结果见表2。

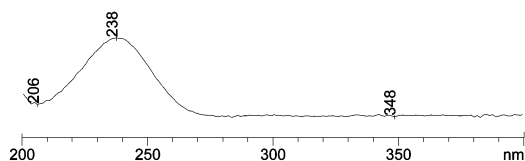


图2 马钱苷紫外光谱扫描

**3.4 线性关系考察** 精密吸取马钱苷对照品溶液( $20.22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )2.0,4.0,6.0,10.0  $\mu\text{L}$ 和对照品溶液( $202.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )6.0  $\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,测得峰面积。以色谱峰面积为纵坐标,以进样量(ng)为横坐标,进行线性回归,得线性方程为 $Y = 1 108.6X - 8 677.4$  ( $r = 1.000 0$ ),表明马钱苷在

表 1 明目地黄丸中马钱苷加样回收率试验

No.	称样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.504 0	0.436 4	0.404 3	0.832	97.79	98.2	0.4
2	0.506 3	0.438 4	0.404 3	0.834	97.76		
3	0.501 6	0.434 3	0.404 3	0.833	98.50		
4	0.504 6	0.436 9	0.404 3	0.835	98.42		
5	0.502 6	0.435 2	0.404 3	0.832	98.14		
6	0.505 0	0.437 3	0.404 3	0.836	98.73		

表 2 明目地黄丸(浓缩丸)中马钱苷的含量测定

生产企业	批号	含量/mg·g <sup>-1</sup>		平均含量 /mg·g <sup>-1</sup>	RSD /%
		1 次	2 次		
企业 1	10F15	0.873	0.862	0.867	0.7
	10F16	0.819	0.820	0.820	0.1
	10E14	1.032	1.047	1.040	0.8
企业 2	090207	0.650	0.646	0.648	0.2
	090802	1.134	1.153	1.144	0.9
	100502	0.952	0.947	0.949	0.3
企业 3	090601	1.264	1.255	1.259	0.4

#### 4 讨论

**4.1 提取条件的选择**<sup>[4]</sup> 笔者曾以 50% 甲醇为溶剂,比较超声和回流两种提取方法对含量的影响。结果两种方法对马钱苷的含量影响不大,但由于超声提取更加简便,故采用超声提取方法。另曾比较了不同超声提取时间 30,45,60 min。结果超声时间对含量测定影响不大,但为了提高效率,选择超声提取 30 min。比较了 30%,50%,70% 甲醇和甲醇 4 种溶剂。结果除甲醇外,其余 3 种溶剂对测定结果影响不大,综合考虑,选择与《中国药典》2010 年版一致的 50% 甲醇为提取溶剂。

**4.2 柱温和流动相的比较**<sup>[5]</sup> 分别考察了柱温为 20℃,40℃ 时对样品测定的影响;考察了流动相为 [四氢呋喃-乙腈-甲醇(1:8:4)-0.05% 磷酸溶液](8:92) 和乙腈-水(15:85) 时对样品测定的影响。结果发现,柱温仅对保留时间有影响,对样品分离无影响,考虑到出峰时间,选择柱温为 40℃,与 2011 年版《中国药典》一部一致。流动相对样品测定影

响较大,乙腈-水(15:85) 为流动相时,马钱苷峰的分度、峰形,基线均比 [四氢呋喃-乙腈-甲醇(1:8:4)-0.05% 磷酸溶液](8:92) 差,故选择后者作为流动相。从以上实验结果看,本方法前处理简单,重复性好,可作为该制剂的质量控制项目之一。

明目地黄丸(浓缩丸)是国家“十一五”科技支撑“重大新药创制”专项课题——中药标准研究平台品种,也是国家药典委员会 2010—2011 年度药品标准提高品种,原标准仅收录了显微鉴别项,无法有效控制产品质量,因此在标准提高任务中拟建立 3~5 个专属性薄层色谱鉴别,并建立方中马钱苷、丹皮酚和芍药苷的含量测定方法,本实验即为该标准提高任务之一。从测定结果看,不同厂家由于生产工艺不尽相同,含量差异较大,故亟待对原质量标准进行修订,进一步完善质量标准,加强工艺控制步骤,提高产品质量的可控性,使临床用药更为安全、有效。

#### [参考文献]

- [1] 袁菊丽,姜红波. 山茱萸的化学成分及药理作用[J]. 化学与生物工程,2011,28(5):7.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准:中药成方制剂第九册[S]. 1998:94.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010:815.
- [4] 魏惠珍,邱伟华,饶毅,等. HPLC 法测定六味地黄片中马钱苷和丹皮酚[J]. 中草药,2010,41(3):405.
- [5] 牛晓静,施钧瀚. HPLC 同时测定安渴胶囊中马钱苷和葛根素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):90.

[责任编辑 蔡仲德]