

· 中药工业 ·

HPLC同时测定杞菊地黄丸中7个成分含量[△]

王小芳*, 郑倩倩, 路丽娟

石家庄市食品药品检验中心, 河北 石家庄 050011

[摘要] 目的: 建立高效液相色谱法(HPLC)同时测定杞菊地黄丸中莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的含量。方法: 采用 Inertsil ODS-3 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-甲醇-0.2% 冰醋酸为流动相进行梯度洗脱; 检测波长: 240 nm (莫诺苷、马钱苷、芍药苷)、348 nm (绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸)、274 nm (丹皮酚); 柱温为 30 ℃; 流速为 0.9 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL。结果: 莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸分别在 4.83~482.66 ($r=1.000\ 0$)、5.02~501.95 ($r=1.000\ 0$)、4.89~489.33 ($r=1.000\ 0$)、10.38~207.63 ($r=1.000\ 0$)、1.26~125.83 ($r=0.999\ 6$)、0.63~62.98 ($r=0.999\ 7$)、2.34~233.99 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$) 线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.73%、101.00%、98.67%、99.19%、102.56%、101.66%、100.98%, RSD 分别为 1.29%、0.51%、1.21%、1.01%、0.97%、1.07%、0.47%。结论: 该方法简便、快速、准确, 可用于杞菊地黄丸的质量控制。

[关键词] 杞菊地黄丸; 含量测定; 高效液相色谱法

[中图分类号] R286 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)11-1988-05

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20201009005

Simultaneous Determination of Seven Constituents in Qiju Dihuang Pills by HPLC

WANG Xiao-fang*, ZHENG Qian-qian, LU Li-juan

Shijiazhuang Food and Drug Inspection Center, Shijiazhuang 050011, China

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of morroniside, loganin, paeoniflorin, paeonol, chlorogenic acid, galuteolin, 3, 5-*O*-dicaffeoylquinic acid in Qiju Dihuang Pills. **Methods:** HPLC conditions are as below: Inertsil ODS-3 C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), gradient elution with acetonitrile-methanol-0.2% glacial acetic acid at the flow rate of 0.9 mL·min⁻¹, column temperature of 30 ℃, injection volume of 10 μL, detection wavelengths of 240 nm (morroniside, loganin, paeoniflorin), 274 nm (paeonol), and 348 nm (chlorogenic acid, galuteolin, 3, 5-*O*-dicaffeoylquinic acid). **Results:** Morroniside, loganin, paeoniflorin, paeonol, chlorogenic acid, galuteolin, and 3, 5-*O*-dicaffeoylquinic acid showed good linear relationship within the concentration ranges of 4.83-482.66 ($r=1.000\ 0$), 5.02-501.95 ($r=1.000\ 0$), 4.89-489.33 ($r=1.000\ 0$), 10.38-207.63 ($r=1.000\ 0$), 1.26-125.83 ($r=0.999\ 6$), 0.63-62.98 ($r=0.999\ 7$), and 2.34-233.99 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 8$), respectively. The average recoveries were 99.73%, 101.00%, 98.67%, 99.19%, 102.56%, 101.66%, and 100.98%, with the RSDs of 1.29%, 0.51%, 1.21%, 1.01%, 0.97%, 1.07%, and 0.47%, respectively. **Conclusion:** The method is simple, effective, and accurate, which can be used for quality control of Qiju Dihuang Pills.

[Keywords] Qiju Dihuang Pills; content determination; HPLC

杞菊地黄丸出自《麻疹全书》, 现收载于《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2020年版(一部), 由枸杞子、菊花、熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻8味中药组成, 可用于治

疗肝肾不足、阴虚阳浮、头晕耳鸣、羞明流泪、视物昏花症状, 临床主要用于治疗干眼症、高血压、高血脂、早期老年黄斑变性、慢性结肠炎、脑震荡后遗症等^[1-5]。

[△] **[基金项目]** 石家庄市科学技术研究与发展计划项目(191201003)

* **[通信作者]** 王小芳, 主管中药师, 研究方向: 中药分析; Tel: (0311) 85215170, E-mail: wxf240@163.com

中药复方制剂是多成分协同发挥治疗作用,仅检测单一成分不能全面评价其内在质量,多组分评价模式已成为中药质量控制的一种发展趋势。目前,关于杞菊地黄丸的质量标准研究更多的是关于莫诺苷、马钱苷和丹皮酚的含量测定^[6-10],未检索到其他成分的含量测定和多组分质量控制的文献报道。本研究采用高效液相色谱法(HPLC)梯度洗脱,选取酒萸肉中莫诺苷、马钱苷,牡丹皮中芍药苷、丹皮酚,菊花中绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸为检测目标成分,对杞菊地黄丸中7个成分进行同时测定,为全面评价该制剂质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ARC型高效液相色谱仪(美国Waters公司);CPA225D型电子天平(德国赛多利斯公司);Elmasonic P型超声波清洗仪(德国Elma公司);DK-98-II型水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司)。

1.2 试药

对照品芍药苷(批号:110736-201640,纯度:95.2%)、莫诺苷(批号:111998-201602,纯度:96.3%)、马钱苷(批号:111640-201707,纯度:99.2%)、丹皮酚(批号:110708-201407,纯度:100%)、绿原酸(批号:110753-201716,纯度:99.3%)、木犀草苷(批号:111720-201408,纯度:94.9%)、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(批号:111782-201706,纯度:97.3%)购自中国食品药品检定研究院。

杞菊地黄丸(大蜜丸)购自北京同仁堂科技发展有限公司制药厂(批号分别为16013106、17010779、17010781)、药都制药集团股份有限公司(批号分别为171101、170401)、天津达仁堂京万红药业有限公司(批号:115495)、北京御生堂集团石家庄制药有限公司(批号:17101007)、天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂(批号:5480075);杞菊地黄丸(水蜜丸)购自太极集团重庆桐君阁药厂有限公司(批号:17110015)、湖北瑞华制药有限责任公司(批号:180110);甲醇、乙腈、冰醋酸均为色谱纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Inertsil ODS-3 C_{18} 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相为乙腈(A)-甲醇(B)-0.2%冰醋酸溶液(C)梯度洗脱(0~10 min, 10%~12%A, 0~5%B; 10~20 min, 12%~14%A, 5%~10%B; 20~30 min, 14%~15%A, 10%~25%B; 30~40 min, 15%A, 25%~40%B; 40~50 min, 15%~25%A, 40%~45%B);检测波长, 240 nm (0~18.5、21~25 min, 莫诺苷、马钱苷、芍药苷)、348 nm (18.5~21.0、25~42 min, 绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸)、274 nm (42~60 min, 丹皮酚);流速:0.9 mL·min⁻¹;柱温:30℃;进样体积:10 μ L。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸各对照品适量,加70%的甲醇制成质量浓度分别为482.66、501.95、489.33、1038.15、125.83、62.98、233.99 μ g·mL⁻¹的对照品储备液,精密量取对照品储备液1 mL置25 mL量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,摇匀,制备成分别含上述成分19.31、20.08、19.57、41.53、5.03、2.52、9.36 μ g·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取剪碎的大蜜丸(批号:17010779)约1.2 g,精密称定后置具塞锥形瓶中,加入70%甲醇25 mL,密塞后称定质量,加热回流1 h,取出,放冷,再称定质量。用70%甲醇补足减失的质量,摇匀后滤过,取续滤液即得供试品溶液^[11]。

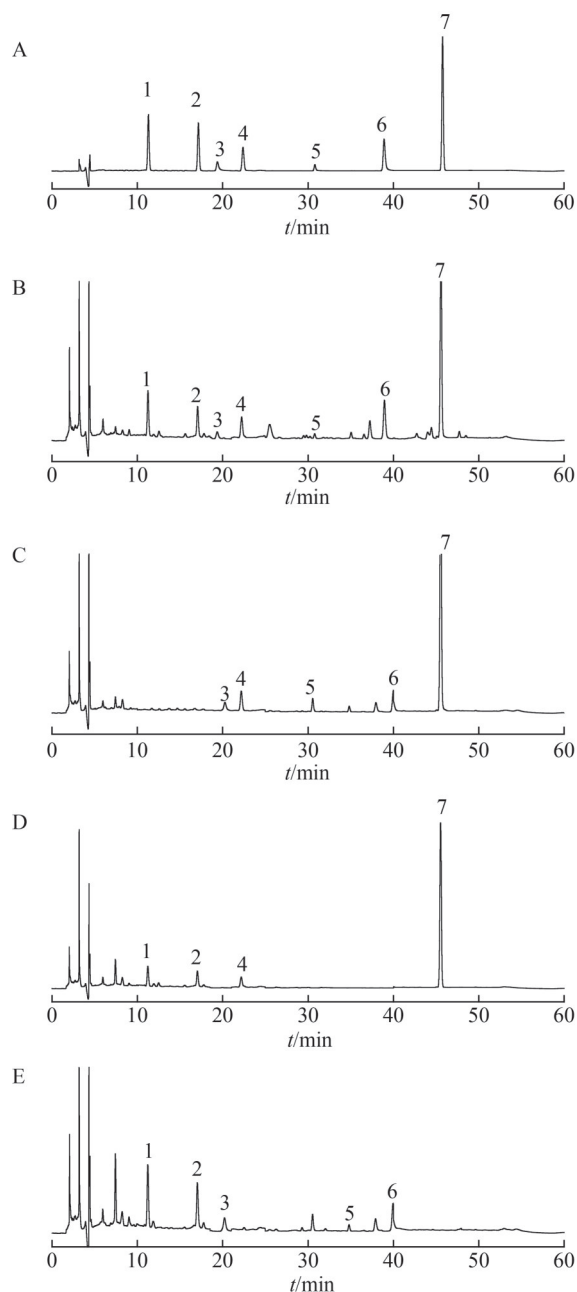
2.4 阴性样品溶液制备

按照样品处方和工艺,分别制成缺酒萸肉、牡丹皮、菊花的阴性样品,按2.3项下方法制备,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 分别取阴性样品溶液、混合对照品溶液、供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定(图1)。由图1可知,样品中各测定峰分离良好。缺牡丹皮阴性样品溶液在与芍药苷、丹皮酚色谱峰相对应的保留时间无色谱峰;缺酒萸肉阴性样品溶液在与莫诺苷、马钱苷色谱峰相对应的保留时间无色

谱峰；缺菊花阴性样品溶液在绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸色谱峰相对应的保留时间无色谱峰，表明阴性无干扰。



注：A. 对照品溶液；B. 供试品溶液；C. 缺酒萸肉样品溶液；D. 缺菊花样品溶液；E. 缺牡丹皮样品溶液；1. 莫诺苷；2. 马钱苷；3. 绿原酸；4. 芍药苷；5. 木犀草苷；6. 3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸；7. 丹皮酚。

图1 混合对照品溶液、阴性样品溶液及杞菊地黄丸样品高效液相色谱图

2.5.2 线性关系考察 取2.2项下混合对照品储备液适量，分别加70%甲醇稀释100、50、25、10、5、1倍，制得不同质量浓度的混合对照品溶液，按2.1

项下色谱条件进样分析。以质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）进行线性回归，结果见表1。由表1可知，莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸在试验范围内线性关系良好。

表1 杞菊地黄丸中7个化学成分的回归方程及线性范围

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
莫诺苷	$Y=17\,910X+5\,938.8$	1.000 0	4.83~482.66
马钱苷	$Y=20\,277X+3\,903.9$	1.000 0	5.02~501.95
芍药苷	$Y=11\,030X-15\,931.0$	1.000 0	4.89~489.33
丹皮酚	$Y=57\,079X-1\,799.9$	1.000 0	10.38~207.63
绿原酸	$Y=25\,762X-63\,386.0$	0.999 6	1.26~125.83
木犀草苷	$Y=21\,691X-18\,810.0$	0.999 7	0.63~62.98
3, 5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	$Y=40\,595X-126\,113.0$	0.999 8	2.34~233.99

2.5.3 精密度试验 取同一批供试品（批号：17010779）按2.3项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定6次，计算莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸峰面积的RSD分别为0.64%、0.80%、0.72%、0.10%、0.71%、1.02%、0.74%，表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取同一批供试品（批号：17010779），按2.3项下方法平行制备6份供试品溶液，在2.1项下色谱条件进样测定，计算6份样品的含量，莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸含量的RSD分别为1.08%、1.73%、1.08%、1.63%、1.60%、1.74%、1.14%，表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取同一样品（批号：17010779）按2.3项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件分别于0、2、4、8、12、24 h进样测定，测得莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、绿原酸、木犀草苷、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸峰面积的RSD分别为1.37%、0.70%、1.05%、0.20%、1.87%、1.15%、1.16%，表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 精密称取同一样品（批号：17010779）约0.6 g，共6份，置于具塞锥形瓶中，精密加入混合对照品溶液（莫诺苷48.266 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、马钱苷50.195 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、芍药苷48.933 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、丹皮酚103.815 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、绿原酸12.583 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、木犀草苷6.298 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸23.399 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）5 mL，再精密加入70%甲醇20 mL，

之后按2.3项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果莫诺昔、马钱昔、芍药昔、丹皮酚、绿原酸、木犀草昔、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的回收率分别为99.73%、101.00%、98.67%、99.19%、102.56%、101.66%、100.98%,RSD分别为1.29%、0.51%、1.21%、1.01%、0.97%、1.07%、0.47%,结果表明该方法的准确度良好,见表2。

2.5.7 样品含量测定 取不同厂家10批样品,按2.3项下方法制备供试品溶液,2.1项下色谱条件进样测定,计算各成分含量,结果见表3。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法

本实验对比了不同的提取溶剂(50%甲醇、70%

甲醇、80%甲醇、甲醇)、提取方法(超声提取、加热回流提取)、提取时间(30、45、60、75 min)对杞菊地黄丸中芍药昔、莫诺昔、马钱昔、丹皮酚、绿原酸、木犀草昔、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸7个成分含量的影响。最终确定制备方法为70%甲醇加热回流提取1 h^[1]。

3.2 流动相选择及优化

本实验对比了不同种类的流动相,首先参照《中国药典》2020年版采用乙腈-磷酸溶液^[1]、再采用乙腈-冰醋酸溶液梯度洗脱,结果3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的分离效果不好;后采用甲醇-磷酸溶液、甲醇-冰醋酸溶液,结果木犀草昔分离效果不好且分析时间过长;之后选择了甲醇-乙腈-冰醋酸溶液,并通过优化流动相比例,使各峰有较好的分离度,因此,最终确定以甲醇-乙腈-0.2%冰醋酸为流动相。

表2 杞菊地黄丸中7个成分含量测定的加样回收率试验

成分	样品中 含量/ μg	对照品加 入量/ μg	测得量/ μg	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/ %	成分	样品中 含量/ μg	对照品加 入量/ μg	测得量/ μg	回收 率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
莫诺苷	321.21	241.30	564.61	100.87	99.73	1.29	绿原酸	103.50	62.92	168.10	102.68	102.56	0.97
	315.87	241.30	557.12	99.98				101.78	62.92	165.74	101.65		
	317.41	241.30	553.90	98.01				101.63	62.92	167.29	104.36		
	316.08	241.30	559.30	100.79				101.85	62.92	166.07	102.07		
	315.87	241.30	558.39	100.50				103.05	62.92	167.71	102.77		
	320.05	241.30	557.11	98.24				103.45	62.92	167.50	101.80		
马钱苷	313.44	250.98	566.38	100.78	101.00	0.51	木犀草苷	48.05	31.49	80.23	102.20	101.66	1.07
	308.23	250.98	562.81	101.44				47.25	31.49	78.93	100.60		
	307.78	250.98	561.49	101.09				47.19	31.49	79.59	102.90		
	308.43	250.98	561.09	100.67				47.29	31.49	79.18	101.28		
	312.09	250.98	567.31	101.69				47.85	31.49	80.17	102.66		
	313.29	250.98	565.03	100.31				48.03	31.49	79.61	100.30		
芍药苷	382.10	244.66	620.70	97.52	98.67	1.21	3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸	286.50	116.99	405.23	101.49	100.98	0.47
	375.76	244.66	618.82	99.34				281.74	116.99	400.60	101.59		
	375.21	244.66	618.54	99.45				281.33	116.99	399.37	100.89		
	376.00	244.66	621.41	100.31				281.93	116.99	400.01	100.93		
	380.46	244.66	618.83	97.43				285.26	116.99	403.00	100.64		
	381.92	244.66	621.62	97.97				286.36	116.99	403.78	100.36		
丹皮酚	739.52	519.08	1 250.08	98.36	99.19	1.01							
	727.24	519.08	1 238.27	98.45									
	726.18	519.08	1 247.53	100.44									
	727.72	519.08	1 242.61	99.19									
	736.33	519.08	1 257.50	100.40									
	739.17	519.08	1 249.49	98.31									

表3 不同厂家杞菊地黄丸中7个成分的含量测定 ($n=2$)

厂家	批号							
		莫诺昔	马钱昔	芍药昔	丹皮酚	绿原酸	木犀草昔	3,5- <i>O</i> -二咖啡酰基奎宁酸
北京同仁堂科技发展有限公司制药厂	16013106	0.45	0.43	0.42	1.18	0.17	0.085	0.150
	17010779	0.51	0.50	0.61	1.18	0.17	0.077	0.460
	17010781	0.39	0.47	0.67	1.33	0.18	0.076	0.180
药都制药集团股份有限公司	170401	0.52	0.45	0.66	0.89	0.21	0.093	0.180
	171101	0.54	0.46	0.65	0.93	0.22	0.094	0.180
天津中新药业集团股份有限公司达仁堂制药厂	5480075	0.28	0.47	0.68	1.19	0.13	0.073	0.110
天津达仁堂京万红药业有限公司	115495	0.36	0.54	0.33	1.26	0.25	0.150	0.012
太极集团重庆桐君阁药厂有限公司	17110015	0.71	0.89	0.56	1.03	0.14	0.160	0.019
湖北瑞华制药有限责任公司	180110	0.20	0.60	0.50	1.71	0.08	0.170	0.034
北京御生堂集团石家庄制药有限公司	17101007	0.51	0.49	0.48	0.75	0.101	0.094	0.090

本实验采用HPLC同时测定了杞菊地黄丸中芍药昔、莫诺昔、马钱昔、丹皮酚、绿原酸、木犀草昔、3, 5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的含量, 该方法准确度高、重复性好, 可为该制剂质量标准的提高提供参考。

参考文献

- [1] 何剑平, 李俊, 李小敏, 等. 杞菊地黄丸对家兔实验性高脂血症及动脉粥样硬化的影响[J]. 深圳中西医结合杂志, 2002, 12(6): 332-334.
- [2] 肖西立, 李涓. 杞菊地黄丸治疗干眼症有效性及安全性的Meta分析[J]. 国际眼科杂志, 2020, 20(1): 96-102.
- [3] 苏庆侦. 杞菊地黄丸治疗老年单纯收缩期高血压疗效观察[J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(13): 17-18.
- [4] 中国社区医师编辑部. 杞菊地黄丸临床应用解析[J]. 中国社区医师, 2010, 26(30): 14.
- [5] 多芳芳, 邹志东, 王文娟, 等. 杞菊地黄丸对血管紧张素II诱导损伤的血管内皮细胞超微结构的影响[J]. 中国医药导刊, 2010, 12(10): 1751-1752.
- [6] 郑风敏, 刘会艳. HPLC法测定杞菊地黄丸(浓缩丸)中马钱昔的含量[J]. 北方药学, 2015, 12(10): 5-6.
- [7] 李长达, 温琰. 高效液相色谱法测定杞菊地黄丸中丹皮酚的含量[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(6): 123-124.
- [8] 文煜. SPE-HPLC法测定杞菊地黄丸含莫诺昔和马钱昔的量[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(3): 352-354.
- [9] 李润泽, 常增荣, 傅欣彤, 等. HPLC法测定杞菊地黄丸中莫诺昔、马钱昔和丹皮酚的含量[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 351-354.
- [10] 潘莹, 郭小龙, 陈勇, 等. HPLC法测定杞菊地黄丸中马钱昔、芍药昔和丹皮酚的含量[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 133-135.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 323-324.

(收稿日期: 2020-10-09 编辑: 王笑辉)