昆明学院学报　2020，42（3）：99～104　ISSN 1674－5639　CN 53－1211/G4
Journal of Kunming University

HPLC 法测定明目地黄丸中马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量

禄美云
（昆明市食品药品检验研究院 药品检验中心，云南 昆明 650100）

摘要：《中国药典》2015 年版采用 3 组不同色谱分析条件分别对明目地黄丸中的马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量进行测定，该方法操作复杂，且费时．因此，为简化明目地黄丸中有效成分的测定方法，对《中国药典》中该中成药的高效液相色谱法的色谱条件进行优化，改变波长程序和改进供试品制备方法，实现了仅用 1 组色谱系统就可同时测定明目地黄丸中马钱苷、芍药苷、丹皮酚的含量，且该方法操作简便、快捷、准确度高．

关键词：高效液相色谱法；明目地黄丸；马钱苷；芍药苷；丹皮酚
中图分类号：R917　**文献标识码**：A　**文章编号**：1674－5639（2020）03－0099－06
DOI：10.14091/j.cnki.kmxyxb.2020.03.021

Determination of Loganin, Paeoniflorin and Paeonol in Mingmu Dihuang Pills by HPLC

LU Meiyun
（Drug Inspection Center, Kunming Food and Drug Inspection Research Institute, Kunming, Yunnan, China　650100）

Abstract: The contents of loganin, paeoniflorin and paeonol in Mingmu Dihuang Pills were determined by three different chromatographic analysis conditions in Chinese Pharmacopoeia 2015. The method was complex and time-consuming. Therefore, in order to simplify the determination method of the effective components in Mingmu Dihuang Pills, the chromatographic conditions of the traditional Chinese medicine in the Chinese Pharmacopoeia were optimized, and the wavelength program was changed. Meanwhile, the preparation method of the sample was improved, so as to realize the simultaneous determination of loganin and paeoniflorin and paeonol in Mingmu Dihuang Pills with only one set of chromatographic systems. The improved method is simple, fast and accurate.
Key words: HPLC; Mingmu Dihuang pills; loganin; paeoniflorin; paeonol

明目地黄丸是中成药中成分较为复杂的一种，原质量检测标准收载于《中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂：第 9 册》，但该标准中只有茯苓、当归和山药这 3 味药的显微鉴别．之后，又收载于《中华人民共和国药典》[1] 2015 版（以下简称《中国药典》）中，在该药典中明目地黄丸的处方是由熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、白芍、煅石决明等 12 味药组成，其具有养肝明目的功效，临床用于肝肾虚、视物畏光、模糊不清等病症的治疗．其中：马钱苷为酒萸肉中的主要药效成分，具有调节免疫、抗炎和抗休克等药理作用[2-6]；牡丹皮具有清热散淤之功效，而丹皮酚为其主要有效成分之一；芍药苷有抗心肌缺血、抑制血小板聚集、镇痛、镇静等作用[7-9]，是白芍和牡丹皮的主要成分．结构式见图 1～图 3．

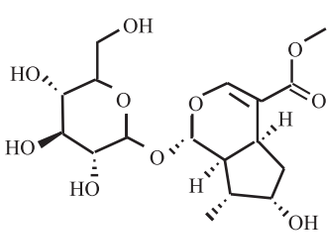

图1　马钱苷的结构式

收稿日期：2019－09－04
作者简介：禄美云（1983—），女，云南通海人，主管（中）药师，主要从事中药材、中药饮片、中成药的检验研究．

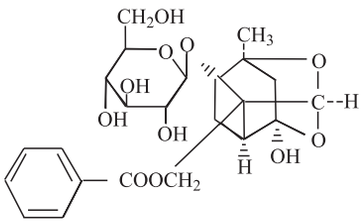

图2　芍药苷的结构式

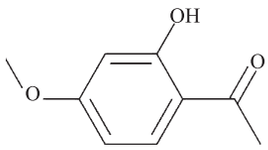

图3　丹皮酚的结构式

《中国药典》不仅将明目地黄丸中的酒萸肉、白芍、牡丹皮 3 味药中的主要药效成分马钱苷、芍药苷、丹皮酚作为指标性成分，并对其含量进行测定，进而对明目地黄丸的质量进行控制，同时还规定：本药品含酒萸肉以马钱苷计算，含牡丹皮以丹皮酚计算，含白芍和牡丹皮以芍药苷计算，且大蜜丸每丸中上述 3 种成分分别不得少于 2.0，3.6，5.4 mg. 由于这 3 种药效成分的极性相差较大，因此《中国药典》采用 3 组色谱条件分别对明目地黄丸中马钱苷、芍药苷、丹皮酚的含量进行测定，所用方法操作复杂、费时. 此外，还有采用在线二维柱切换－超高效液相色谱法测定明目地黄丸中莫诺苷、马钱苷、芍药苷及丹皮酚含量的报道[10－12]，这种方法虽然分离效率较高，但实验需采用两种类型的色谱柱，导致操作复杂. 因此，为简化明目地黄丸（大蜜丸）中有效成分的含量测定方法，本文通过优化检测条件，实现只采用 1 套色谱条件，1 次进样分析，就可同时定性分析及定量测定 3 种有效成分的含量，从而建立了一种快捷、高效的测定方法.

由于上述 3 种中成药成分的物理、化学性质相差较大，其中：马钱苷易溶于水，较少溶于乙醇；芍药苷在碱性条件下不稳定，而在酸性条件下稳定；丹皮酚易溶于甲醇. 因此《中国药典》采用不同的提取溶剂和条件对酒萸肉、白芍、牡丹皮中 3 种有效成分进行提取，导致操作费时[13－15]. 综合分析以上 3 种成分的性质，本文选择 50% 的甲醇为供试品中 3 种成分的提取溶剂和对照品的制备溶剂[16]，通过大量实验探索优化出不同于《中国药典》和其他文献的色谱条件及方法，对明目地黄丸中 3 种主要药效成分同时提取，提高了样品前处理的效率，并简化了 3 种有效成分样品提取步骤. 通过一系列实验验证，证明所用方法准确、精密，具有实际应用价值，可用于明目地黄丸（大蜜丸）的质量控制.

1　仪器与试药

1.1　仪器

实验所用主要仪器如表 1 所示.

表 1　主要仪器

仪器	厂家
安捷伦高效液相色谱仪 1260（配可变波长程序）	安捷伦科技有限公司
电子分析天平（1/10 000）	梅特勒－托利多仪器（上海）有限公司
隔膜真空泵、隔膜真空泵溶剂过滤器、有机系微孔过滤膜（0.45 μm）、针式滤头	天津津腾实验室设备有限公司
超纯水系统	默克密里博实验室设备上海有限公司
电热恒温水浴锅	北京市永光明医疗仪器有限公司
微量分析天平（1/100 000）	奥豪斯仪器上海有限公司

1.2　试药

实验用试剂与试药见表 2.

表 2　试剂与试药

试药与试剂	纯度	厂家
明目地黄丸（大蜜丸）	–	云南腾药制药股份企业（批号：161240）
磷酸	分析纯	四川西陇科学有限公司
甲醇	色谱纯	默克股份两合公司
乙腈	色谱纯	默克股份两合公司
马钱苷	99.2%	中国食品药品检定研究院（批号：111640-201707）
芍药苷	95.7%	中国食品药品检定研究院（批号：110736-201741）
丹皮酚	99.9%	中国食品药品检定研究院（批号：110708-201409）

2　实验部分

2.1　色谱条件

色谱柱 Eclipse XDB-C18（5 m，4.6 mm × 250 mm），流动相 A（0.1% 磷酸水溶液）-B（乙腈腈），流量为 1.0 mL/min，马钱苷、芍药苷的检测波长为 236 nm，丹皮酚的检测波长为 274 nm，柱温 35 ℃，进样量 5 μL（自动进样器）. 在此检测

条件下，各待测组分分离度符合要求，马钱苷、芍药苷、丹皮酚的出峰时间分别为 10.08，16.41，43.81 min. 相应的理论塔板数按马钱苷、芍药苷、丹皮酚计算应分别不低于 4 000，4 500，3 500. 流动相梯度和检测波长见表 3 和表 4.

表 3　流动相梯度程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	85	15
20	85	15
30	40	60
45	40	60
50	85	15
60	85	15

表 4　波长检测程序

时间/min	λ/nm
0	236
20	274
40	274
50	236
60	236

2.2　对照品溶液的制备

精密称取对照品马钱苷 13.32 mg、芍药苷 12.95 mg 和丹皮酚 10.42 mg 分别于 25 mL 容量瓶中，以 50% 甲醇为溶剂定容，摇匀，再取定容后的马钱苷和丹皮酚对照品溶液 2 mL、芍药苷对照品溶液 5 mL，二次定容到 50 mL 容量瓶中，制成每 1 mL 中含马钱苷 21.14 μg、丹皮酚 16.65 μg、芍药苷 49.57 μg 的混合溶液，混合溶液用一次性针头式滤器（孔径 0.45 μm）过滤，取滤液，采用自动进样器进样 5 μL 进行分析.

2.3　供试品溶液的制备

取明目地黄丸（大蜜丸），剪碎，分别精密称定 8 份，每份 1 g，置具塞锥形瓶中，并精密加入 50% 甲醇 25 mL，密塞后称定质量，平均分成 4 份，分别加热回流 45，60，75，90 min，放冷后称定其质量，并用 50% 甲醇补足减失的质量，滤过后续滤液用孔径为 0.45 μm 的一次性针头式滤器过滤，取滤液，采用自动进样器进样 5 μL 进行分析.

2.4　线性关系考察

按 2.2 项下制备 5 个不同质量浓度的混合对照品溶液，分别进样 5 μL，再按 2.1 项下的色谱条件进样测定，记录色谱图. 以对照品质量浓度、峰面积分别为横坐标和纵坐标，并进行线性回归，结果见图 4、图 5、图 6，线性关系见表 5.

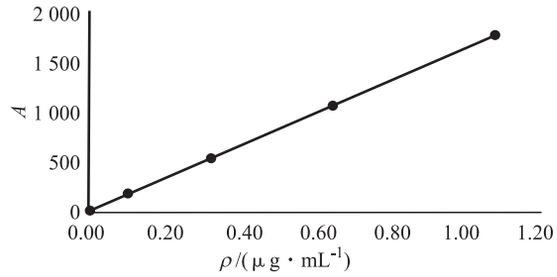

图4　马钱苷的标准工作曲线

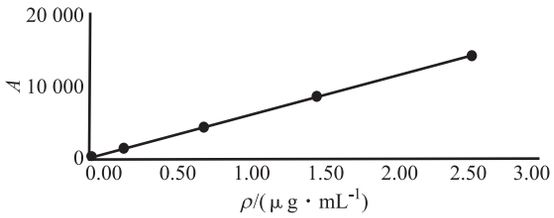

图5　芍药苷的标准工作曲线

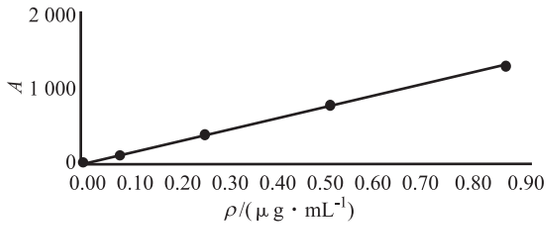

图6　丹皮酚的标准工作曲线

表 5　3 种有效成分的线性方程与线性范围

有效成分	回归方程	相关系数（r）	线性范围/(mg · mL^{-1})
马钱苷	$y = 1\,626.251\,99x + 3.772\,63$	0.999 74	0.021 14 ~ 1.057 00
芍药苷	$y = 1\,536.834\,75x - 14.218\,88$	0.999 09	0.049 57 ~ 2.478 50
丹皮酚	$y = 5\,125.198\,57x - 24.974\,05$	0.999 55	0.016 65 ~ 0.832 50

2.5　精密度实验

取混合对照品溶液，连续进样 6 针，每针 5 μL，记录各目标成分峰面积. 得到马钱苷、芍药苷、丹皮酚的峰面积的 *RSD* 值分别为 0.19%，0.30%，0.59%，表明仪器的精密度良好，能满足实验定量分析的要求.

2.6 重复性实验

取同一批号明目地黄丸（大蜜丸）供试品 24 g，按照 2.3 项下制备样品 6 份，进样分析，记录各目标成分峰面积，并计算各成分的质量分数. 得到马钱苷、芍药苷、丹皮酚质量分数的 *RSD* 值分别为 0.91%，0.39%，0.44%，表明 3 种有效成分质量分数测定的重复性符合《中国药典》要求（待测定成分质量分数在 0.1% 以内，重复性要求 *RSD*≤3%）.

2.7 稳定性实验

取制备好的同一份供试品溶液，分别在 0，2，4，8，12，24 h 吸取 5 μL，按 2.1 项下色谱条件进样测定. 在上述 6 个时间段内，溶液中的马钱苷、芍药苷、丹皮酚的峰面积稳定，*RSD* 分别为 0.85%，1.20%，0.67%，表明该供试品溶液至少可稳定 24 h.

2.8 准确度实验

使用加标回收率考察准确度. 精密量取已知质量浓度的同一样品 6 份（每份 3 mL）置 25 mL 量瓶中，分别精密加入 2.2 项下制备好的混合对照品溶液 0.8，1.0，1.2 mL，定容，进样 5 μL 进行测定，计算回收率，加标回收率的计算公式为：加标回收率 =［(实际测定值 - 试样测定值)/加标量］× 100%. 由表 6 ~ 表 8 可见，3 种有效成分质量浓度测定的准确度符合《中国药典》要求（待测定成分质量分数在 0.1% 以内，回收率限度在 90% ~ 108%）.

表 6 马钱苷的回收率实验结果

样品号	加入量/（μg · mL^{-1}）	样品量/（μg · mL^{-1}）	测得量/（μg · mL^{-1}）	回收率/%	*RSD*/%	平均回收率/%
1	0.676	13.560	14.203	95.11	2.71	97.59
2	0.676	13.560	14.198	94.37		
3	0.845	13.560	14.409	100.47		
4	0.845	13.560	14.388	97.98		
5	1.014	13.560	14.581	100.69		
6	1.014	13.560	14.543	96.94		

表 7 芍药苷的回收率实验结果

样品号	加入量/（μg · mL^{-1}）	样品量/（μg · mL^{-1}）	测得量/（μg · mL^{-1}）	回收率/%	*RSD*/%	平均回收率/%
1	1.586	29.301	30.824	96.02	2.05	98.43
2	1.586	29.301	30.852	99.79		
3	1.982	29.301	31.228	97.22		
4	1.982	29.301	31.274	99.54		
5	2.379	29.301	31.605	96.84		
6	2.379	29.301	31.708	101.17		

表 8 丹皮酚的回收率实验结果

样品号	加入量/（μg · mL^{-1}）	样品量/（μg · mL^{-1}）	测得量/（μg · mL^{-1}）	回收率/%	*RSD*/%	平均回收率/%
1	0.532	29.783	30.303	97.74	1.76	100.32
2	0.532	29.783	30.311	99.24		
3	0.666	29.783	30.446	99.54		
4	0.666	29.783	30.461	101.80		
5	0.799	29.783	30.592	101.25		
6	0.799	29.783	30.601	102.37		

2.9　样品提取时间优化

取明目地黄丸（大蜜丸），剪碎，分别精密称定 8 份，每份 1 g，置于具塞锥形瓶中，并精密加入 50% 甲醇 25 mL，密塞，称定其质量，以两份为单位平均分成 4 份，每份加热回流 45，60，75，90 min，放冷，然后称定其质量，用 50% 甲醇补足加热回流过程中减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液用一次性针头式滤器（孔径 0.45 μm）过滤，取滤液，采用自动进样器进样 5 μL 进行分析，记录色谱图. 结果表明，提取 60 min即可完全提取，且其最终各成分的含量符合《中国药典》规定. 提取结果见表 9，色谱图见图 7、图 8.

表 9　样品提取时间及筛选结果

回流时间/min	取样量/g	马钱苷/（mg·g^{-1}）	芍药苷/（mg·g^{-1}）	丹皮酚/（mg·g^{-1}）
45	1.039 3	0.348	0.750	0.749
	1.035 1	0.347	0.748	0.749
60	1.035 8	0.341	0.751	0.761
	1.033 6	0.312	0.753	0.776
75	1.039 4	0.347	0.764	0.762
	1.033 6	0.344	0.754	0.721
90	1.036 7	0.349	0.743	0.773
	1.037 3	0.351	0.743	0.771

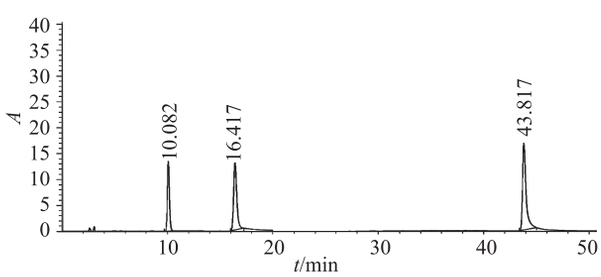

图7　马钱苷、芍药苷和丹皮酚混合对照品的谱图

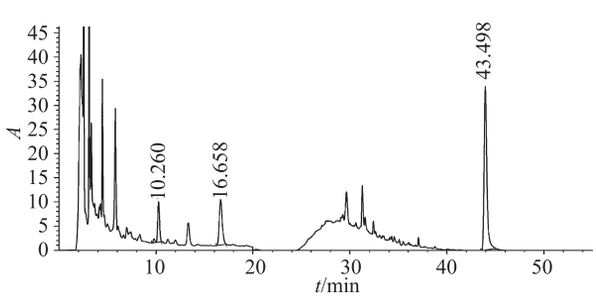

图8　马钱苷、芍药苷和丹皮酚含量的谱图

2.10　样品实际测定结果

本实验采用明目地黄丸（大蜜丸）（云南腾药制药股份有限公司：批号 161240），平均每丸质量 9 g. 按《中国药典》的规定，最终测得每丸中马钱苷、芍药苷及丹皮酚的含量，结果见表 10.

表 10　每丸中马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量

序号	马钱苷/（mg·丸$^{-1}$）	芍药苷/（mg·丸$^{-1}$）	丹皮酚/（mg·丸$^{-1}$）
供试品 1	3.46	6.88	7.09
	3.18	6.96	7.19
供试品 2	2.89	6.96	7.07
	3.53	6.90	6.87
供试品 3	2.90	6.93	6.95
	3.18	6.92	6.94

3　讨论

3.1　色谱柱选择

本实验在条件筛选时，曾采用 XTERRA RP-C18（18.5 μm，4.6 mm × 150 mm）色谱柱进行检测分析，然而用短柱分析时，马钱苷、芍药苷、丹皮酚的出峰时间分别为 5.702，9.602，31.563 min，出峰时间太短，易导致对照品和样品的峰型不符合要求. 此外，丹皮酚由于受到流动相酸性的影响，导致供试品峰不能与杂峰完全分离. 最主要的是马钱苷、芍药苷、丹皮酚的理论塔板数不能达到《中国药典》规定的数值，只有改用长柱才能满足分析的需要，因此本实验选用 Eclipse XDB-C18（5 μm，4.6 mm × 250 mm）色谱柱.

3.2　检测波长选择

《中国药典》关于明目地黄丸的含量测定是，马钱苷的检测波长为 236 nm，芍药苷的为 230 nm，丹皮酚的为 274 nm. 而本实验采用可变波长程序，3 种有效成分的检测波长仍用《中国药典》的规定. 在实验中，筛选出波长改变时间程序，在该色谱条件下马钱苷、芍药苷、丹皮酚的峰形和分离度均较好，无杂峰的干扰.

3.3　溶剂提取方法选择

本实验采用加热回流提取方法，以 50% 的甲醇为溶剂，对 45，60，75，90 min 这 4 个时间段逐一考察. 结果表明，60 min 的提取效果较好，在此

时间段内样品的主峰与杂峰分离度很好.

3.4 柱温选择

分别考察柱温 35 ℃和 40 ℃对样品测定的影响，结果显示，温度对测定结果的影响较小，因此选择柱温为 35 ℃.

3.5 流动相筛选

考察流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液，其比例分别为 V(乙腈)∶V(0.1%磷酸溶液) = 12∶88、V(乙腈)∶V(0.1%磷酸溶液) = 15∶85 和 V(乙腈)∶V(0.1%磷酸溶液) = 20∶80. 而流动相的比例对样品的测定影响较大，当 V(乙腈)∶V(0.1%磷酸溶液) = 15∶85 为流动相时，马钱苷、芍药苷、丹皮酚与杂质峰的分离度最佳，且峰形最好. 因此，本实验采用该流动相.

4 结语

1）实验结果表明，通过加热回流可有效提取明目地黄丸中的马钱苷、芍药苷和丹皮酚，且供试品的前处理较简便，在所建立的流动相和色谱条件下，无杂峰影响，能满足明目地黄丸中相关成分含量测定的基本要求.

2）《中国药典》中采用 3 套不同的色谱条件测定明目地黄丸中马钱苷、芍药苷、丹皮酚的含量，操作费时且样品前处理较繁琐. 而本文建立了 1 套可以同时测定 3 种有效成分的色谱条件，此色谱条件主要是针对《中国药典》中 3 种成分的提取溶剂、供试品前处理方法和检测波长进行改进，改进后的操作方法简便、高效、节省时间、准确度高. 因此，所建立的方法可用于明目地黄丸中马钱苷、芍药苷、丹皮酚的含量测定.

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部［M］. 2015 年版. 北京：中国医药科技出版社，2015：1058－1059.

[2] 杜小伟，范力力，王京辉，等. 不同产地制山茱萸中马钱苷的含量测定［J］. 中国中药杂志，2006，31（17）：1446－1447.

[3] 陆君，徐艳红，崔巍，等. 不同厂家明目地黄丸牡丹皮的含量对比分析［J］. 中外医疗，2012，31（10）：5.

[4] 程巧鸳，陈碧莲. 高效液相色谱法测定明目地黄丸（浓缩丸）中丹皮酚含量［J］. 医药导报，2012，31（5）：630－632.

[5] 崔巍，杜一男，何玉川，等. 不同厂家明目地黄丸芍药苷的含量对比分析［J］. 中国卫生产业，2011，8（6）：54－56.

[6] 梁云，贾忠，韩世龙，等. HPLC 测定明目地黄丸（浓缩丸）中马钱苷的含量［J］. 中国现代中药，2013，15（4）：317－319.

[7] 崔巍，杜一男，何玉川，等. 不同厂家明目地黄丸芍药苷的含量对比分析［J］. 中国卫生产业，2011（17）：54－56.

[8] 戴冰，王成元，邹双华，等. 不同来源山茱萸中马钱苷含量的测定［J］. 湖南中医学院学报，2006，26（1）：21－22.

[9] 李文兰，扈正婷，季宇彬，等. 马钱苷肠吸收机制的研究［J］. 中国中药杂志，2008，33（9）：1052－1055.

[10] 汪海孙，刘倍顺. 高效液相色谱法测定中成药丹皮酚的含量［J］. 中成药研究，1996，8（1）：12.

[11] 刘洪，许惠琴. 山茱萸及其主要成分的药理研究进展［J］. 南京中医药大学学报，2003，19（4）：254－256.

[12] 褚燕琦，李玮，张兰，等. 山茱萸环烯醚萜苷对蛋白磷酸酶抑制剂冈田酸拟阿尔采末病细胞模型的作用［J］. 中国药理学通报，2006，22（8）：960－963.

[13] 赵洪芝，孟宪生，叶挺祥，等. 双波长融合高效液相测定六味地黄丸中马钱苷、丹皮酚的含量［J］. 中国中医药杂志，2008，33（19）：2182－2184.

[14] LIU J L，LIU G Y，WANG R Y，et al. Determination of paeonol in extract of Cortex Moutan by RP-HPLC［J］. Strait Pharm J，2014，26（1）：81－82.

[15] 魏惠珍，邱伟华，饶毅，等. HPLC 法测定六味地黄丸中马钱苷和丹皮酚［J］. 中草药，2010，41（3）：405－407.