

·质量分析研究·

HPLC 法同时测定桂附地黄丸中马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸的含量

张学婷, 刘启德, 曾 武, 杨 蕾, 宓穗卿, 王宁生(广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 建立桂附地黄丸中马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸含量同时测定的高效液相色谱法。**方法** 采用 Phenomenex Synergi Fusion RP 80A 色谱柱 (250 nm × 4.6 nm, 4 μm); 流动相为乙腈-0.05 %磷酸溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 1 mL·min⁻¹, 检测波长为 234 nm 和 274 nm, 柱温为 30 ℃。**结果** 马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸的线性范围分别为 5.3408 ~ 48.0672 μg·mL⁻¹($r=0.9999$), 4.8256~43.4303 μg·mL⁻¹($r=0.9996$), 10.8134~97.3206 μg·mL⁻¹($r=0.9999$), 4.1240~37.116 μg·mL⁻¹($r=0.9999$)。平均加样回收率分别为马钱苷100.7 %, RSD=0.85 %($n=6$); 芍药苷 101.1 %, RSD=1.98 %($n=6$); 丹皮酚 98.9 %, RSD=0.55 %($n=6$); 没食子酸 99.8 %, RSD=1.25 %($n=6$)。**结论** 该方法操作简便、准确, 重复性好, 可用于桂附地黄丸的质量控制。

关键词: 桂附地黄丸; 马钱苷; 芍药苷; 丹皮酚; 没食子酸; HPLC

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0201-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.022

Determination of Loganin, Paeoniflorin, Paeonol and Gallic Acid in *Guifu Dihuang Pills* by HPLC

ZHANG Xueting, LIU Qide, ZENG Wu, YANG Lei, MI Suiqing, WANG Ningsheng (Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To develop a simple high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of loganin, paeoniflorin, paeonol and gallic acid in *Guifu Dihuang pills*. **Methods** The HPLC method was validated on Phenomenex Synergi Fusion-RP column (250 nm × 4.6 nm, 4 μm) with a mobile phase of acetonitrile-0.05 % phosphoric acid at a flow rate of 1 mL/min and a column temperature of 30 ℃. The detection wavelengths were set at 234 nm and 274 nm. **Results** The calibration curve of the loganin, paeoniflorin, paeonol and gallic acid showed good linearity relationship in the range of 5.3408 ~ 48.0672 μg·mL⁻¹($r=0.9999$), 4.8256 ~ 43.4303 μg·mL⁻¹($r=0.9996$), 10.8134 ~ 97.3206 μg·mL⁻¹($r=0.9999$), 4.1240~37.1160 μg·mL⁻¹($r=0.9999$), respectively. The average recovery was 100.7 % for loganin, 101.1 % for paeoniflorin, 98.9 % for paeonol and 99.8 % for gallic acid, and the standard deviations were 0.85 %, 1.98 %, 0.55 % and 1.25 %, respectively($n=6$). **Conclusion** The developed method is simple and rapid with excellent specificity, accuracy and precision, which can be used for the quality control of *Guifu Dihuang Pills*.

Keywords: *Guifu Dihuang pills*; Loganin; Paeoniflorin; Paeonol; Gallic acid; HPLC

桂附地黄丸是由《金匱要略·血痹虚劳病脉证并治第六》中的肾气丸演变而来, 原肾气方由干地黄八两, 山药四两, 山茱萸四两, 茯苓三两, 泽泻三两, 牡丹皮三两, 桂枝、附子各一两组成为^[1], 清代吴谦在

收稿日期: 2013-11-14

作者简介: 张学婷, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药有效性与安全性评价。Email: 13798096310@163.com。通讯作者: 刘启德, 研究员, 研究方向: 中药复方药理。Email: lqd@gzhtcm.edu.cn。

基金项目: 广东省 211 工程三期重点学科建设项目[粤发改社(2009)972 号]; 广东省自然科学基金(9451040701002867)。

《医宗金鉴》中将肾气丸中的干地黄易为熟地黄，桂枝易为肉桂，名八味地黄丸，即今之桂附地黄丸^[2]。今收载于《中华人民共和国药典》2010 版(一部)，功擅温补肾阳，用于肾阳不足，腰膝酸冷，肢体浮肿，小便不利或反多，痰饮喘咳，消渴^[3]。方中山茱萸和牡丹皮为君药，主要成分为马钱苷(loganin)和没食子酸(gallic acid)，牡丹皮的主要成分为丹皮酚(paeonol)和芍药苷(paeoniflorin)，同时也含有没食子酸成分。4 种成分的化学结构见图 1。《中国药典》仅分别以马钱苷和丹皮酚的含量作为质控指标^[4]，尚无建立同时测定的方法，且对其他成分的含量未做要求。本文在文献^[5-10]基础上，建立了一种双波长同时测定桂附地黄丸中马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸的 HPLC 方法。

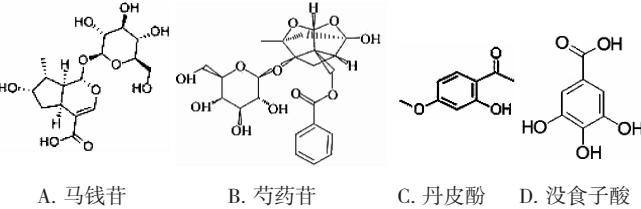


图 1 化学结构式

Figure 1 Chemical structural formula

1 仪器与试剂

Waters515 HPLC 高效液相色谱仪，Waters 色谱工作站，Waters 2998PAD 检测器；AUW220D 型电子天平，日本岛津公司；KQ-100 型超声波清洗器，昆山市超声波仪器有限公司；马钱苷、芍药苷、没食子酸、丹皮酚，均购自中国食品药品检定研究院，批号分别为：MUST-12052813，110736-201136，110831-201204，110708-200506；乙腈为色谱纯，甲醇，磷酸为分析纯；桂附地黄丸，北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂，批号：12030997，12031226 和 12031664。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Synergi Fusion RP 80A (250 nm × 4.6 nm，4 μm)；以乙腈为流动相 A，0.05 %磷酸溶液为流动相 B，梯度洗脱见表 1，体积流量为 1 mL·min⁻¹，检测波长为 234 nm 和 274 nm，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL。

2.2 标准品溶液的制备 精密称取马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸标准品 16.76，15.08，27.03，

表1 梯度洗脱顺序

Table 1 Gradient elution mode of mobile phase		
时间 /min	乙腈(A) /%	0.05%磷酸(B) /%
0~20	2~11	98~89
20~38	11~17	89~83
38~43	17	83
43~44	17~38	83~62
44~60	38	62

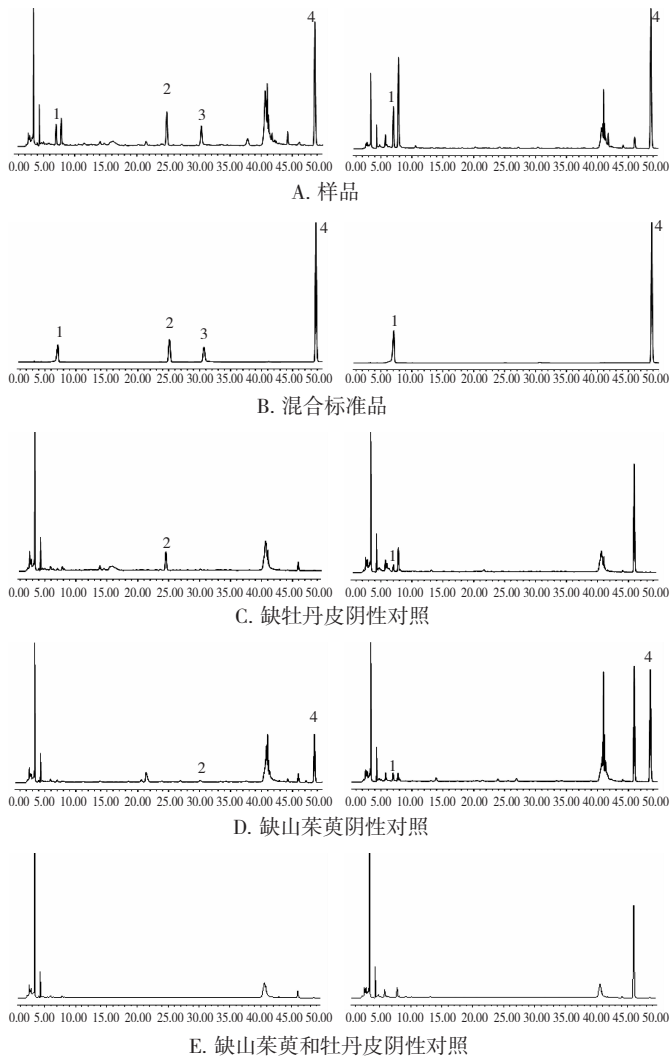
10.31 mg，分别置于 5 mL 容量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得 4 种标准品储备液，浓度分别为 3.3380，3.0160，5.4067，2.0620 mg·mL⁻¹。分别精密量取马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸对照品储备液 0.4，0.4，0.5，0.5 mL，置于 10 mL 的容量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得 4 种混合标准品工作液，浓度依次为 0.1335，0.1206，0.2703，0.1031 mg·mL⁻¹。

2.3 供试品溶液的制备 取供试品适量，打成细粉，精密称取 2.0 g，置具塞锥形瓶中，加入 50 %甲醇 50 mL，密塞，称定质量，超声处理 45 min，放冷，再称定质量，用 50 %甲醇补足减失的质量，摇匀，过 0.45 μm 滤膜，取续滤液作为供试品溶液。

2.4 阴性对照溶液的制备 按照桂附地黄丸处方比例分别制成缺山茱萸(马钱苷)阴性对照品、缺牡丹皮(芍药苷、丹皮酚)阴性对照品以及缺山茱萸和牡丹皮(马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸)的阴性对照品，再按 2.3 项下方法制备成牡丹皮阴性对照液，山茱萸阴性对照液，牡丹皮和山茱萸阴性对照液。

2.5 方法专属性考察 取标准品溶液，供试品溶液和阴性对照溶液，按照 2.1 项下色谱条件进行测定，记录色谱图。结果在与标准品相对应的色谱峰位处无干扰峰出现，见图 1。说明在此实验条件下，样品中的其他成分不干扰马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸的含量测定，且分离度良好。

2.6 线性关系考察 分别精密移取 4 种混合对照品溶液 0.2，0.5，0.8，1.0，1.2，1.5，1.8 mL，于 5 mL 容量瓶中，加甲醇溶液定容至刻度，摇匀，得 7 个浓度系列的混合对照品溶液。按上述色谱条件测定，以峰面积(A)对分析物浓度(C)作线性回归，得马钱苷回归方程：A=32004C+16846，r=0.9999，线性范围：5.3408~48.0672 μg·mL⁻¹；芍药苷回归方程：A=23033C+21189，r=0.9996，线性范围：4.8256~43.4303 μg·mL⁻¹；丹皮酚回归方程：A=112271C+



1. 没食子酸; 2. 马钱苷; 3. 芍药苷; 4. 丹皮酚
图 2 样品(A)、混合标准品(B)、缺牡丹皮阴性对照(C)、缺山茱萸阴性对照(D)、缺山茱萸和牡丹皮阴性对照(E)在 234 nm(左图)、274 nm(右图)的 HPLC 色谱图
Figure 2 HPLC chromatograms of *Guifu Dihuang* pills (A), mixed reference substances (B), negative sample without Moutan Cortex (C), negative sample without Corni Fructus (D), negative sample without Corni Fructus and Moutan Cortex (E) at 234 nm and 274 nm

115548, $r=0.9999$, 线性范围: 10.8134~97.3206 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 没食子酸回归方程: $A=103838C-49602$, $r=0.9999$, 线性范围: 4.124~37.116 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7 精密度试验 取同一份供试品溶液同 1 天连续进样 6 次, 记录所测各组积分面积, 计算日内精密度; 3 天内每天重复测定两次, 计算日间精密度。结果表明, 马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸的日内和日间精密度分别小于 0.65 %, 1.96 %。

2.8 重复性试验 取同一批样品(批号: 12030977)平行制备 6 份供试品溶液, 测定各成分色谱峰面积,

结果测得马钱苷平均质量分数为 0.6457 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 1.45 %; 芍药苷平均质量分数为 0.5735 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 值为 1.89 %; 丹皮酚质量分数为 1.05892 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 值为 0.32 %; 没食子酸平均质量分数为 0.2961 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 1.06 %, 结果表明方法的重复性良好。

2.9 稳定性试验 同一供试品溶液, 分别于 0, 3, 6, 9, 12, 15 h 进样测定, 马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸峰面积的 RSD 值分别为 0.49 %、2.16 %、1.59 %和 0.26 %, 结果表明供试品溶液在 15 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验 精密称取已知含量的桂附地黄丸样品(批号: 12030997)1.0 g, 共 6 份, 分别准确加入马钱苷、芍药苷、丹皮酚和没食子酸对照品储备液 0.19, 0.19, 0.19, 0.14 mL, 按照 2.3 项下方法制备样品并测定, 计算回收率, 结果见表 2~ 表 5。

表 2 马钱苷加样回收率结果($n=6$)

Table 2 Results of recovery test of loganin					
取样量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.6456	0.6342	1.2860	100.4	100.7 ± 0.86	0.85
0.6458	0.6342	1.2952	101.1		
0.6460	0.6342	1.3018	101.7		
0.6456	0.6342	1.2899	100.8		
0.6454	0.6342	1.2693	99.2		
0.6458	0.6342	1.2941	101.1		

表 3 芍药苷加样回收率结果($n=6$)

Table 3 Results of recovery test of paeoniflorin					
取样量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.5734	0.5622	1.1618	102.3	101.1 ± 1.15	1.98
0.5736	0.5622	1.1425	100.5		
0.5737	0.5622	1.1533	101.5		
0.5734	0.5622	1.1470	101.0		
0.5733	0.5622	1.1572	101.9		
0.5736	0.5622	1.1258	99.1		

表 4 丹皮酚加样回收率结果($n=6$)

Table 4 Results of recovery test of paeonol					
取样量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1.0587	1.0472	2.0985	99.7	98.9 ± 0.55	0.55
1.0591	1.0472	2.0817	98.8		
1.0593	1.0472	2.0658	98.1		
1.0587	1.0472	2.0854	99.0		
1.0585	1.0472	2.0823	98.9		
1.0590	1.0472	2.0933	99.4		

2.11 样品的测定 取 3 个不同批号的桂附地黄丸样品($n=3$), 进行含量测定, 结果见表 6。

表 5 没食子酸加样回收试验结果(n=6)

Table 5 Results of recovery test of gallic acid

取样量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD/%
0.2960	0.2961	0.5791	99.0	99.8 ± 1.02	1.25
0.2962	0.2961	0.5748	98.3		
0.2962	0.2961	0.5963	101.2		
0.2960	0.2961	0.5847	100		
0.2959	0.2961	0.5817	99.5		
0.2961	0.2961	0.5866	100.3		

表 6 样品的含量测定结果(n=3)

Table 6 Content determination results of samples

批号	马钱苷 /mg·g ⁻¹	RSD/%	芍药苷 /mg·g ⁻¹	RSD/%	丹皮酚 /mg·g ⁻¹	RSD/%	没食子酸 /mg·g ⁻¹	RSD/%
12030997	0.6457	1.45	0.5735	1.89	1.0589	0.32	0.2961	1.06
12031226	0.6725	0.74	0.6114	2.15	1.1726	0.25	0.31	1.42
12031664	0.6411	0.51	0.5723	1.66	1.0575	0.24	0.2959	1.30

接近，故选用 234 nm 和 274 nm 同时作为检测波长，能兼顾 4 种物质的检测灵敏度，达到良好分离检测的目的。

比较了甲醇 -1 %酸，乙腈 - 水，乙腈 -0.05 %磷酸流动相系统，由于该复方所含化学成分复杂，杂质对目标物测定干扰严重，经优化最后确定采用乙腈 -0.05 %磷酸系统，基线平稳，梯度洗脱法能将待测物与杂质完全分离，并取得对称性较好峰形和较高的理论塔板数。

比较了 50 %甲醇、70 %甲醇、甲醇为提取溶媒时提取率的高低，甲醇浓度越高，丹皮酚的溶出率略高，而其他 3 种物质的溶出率略低，考虑到丹皮酚的响应值已经很高，故选择 50 %甲醇作为提取溶媒。同时比较了 50 %乙醇回流 2 h 与超声不同提取方法对含量测定的影响，结果表明，回流和超声提取结果有较大差异，前者方法中，马钱苷的含量非常高，而后者超声方法中，丹皮酚含量远远高于前者，而其他两种物质相差不大，考虑到超声便于操作，且对这几种待测物质没有特殊趋向选择，故选用超声作为提取方法。同时对超声间进行考察，分别超声 30，45，60 min，发现以上时间均可达到分散和提取完全的目的，超声 45 min 和 60 min 效果相当，但峰面积均高于 30 min，最后确定超声时间为 45 min。

本文的分析方法操作简便、准确，为全面控制

3 讨论

用紫外二极管检测器在波长范围 210 ~ 400 nm 内进行扫描，结果马钱苷、芍药苷、丹皮酚、没食子酸最大吸收波长为 236 nm，232 nm，274 nm 和 215 nm。考虑到许多物质在远紫外区到近紫外区 200 ~ 220 nm 内存在紫外末端吸收，故选择次较大的紫外吸收波长 271 nm 作为没食子酸的检测波长。由于马钱苷和芍药苷以及丹皮酚和没食子酸的最大吸收波长

该制剂的质量提供了简单、可行的定量分析方法，为中药质量评价提供方法学参考，具有一定的现实意义。

参考文献：

[1] 刘献琳. 金匱要略要语释[M]. 山东: 山东科学技术出版社, 1981: 216.

[2] 吴谦. 医宗金鉴[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 998.

[3] 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, 2010: 980.

[4] 张得钧, 董凡晖. 同时测定浓缩桂附地黄丸中丹皮酚和马钱苷含量方法的建立[J]. 青海医学院学报, 2011, 32(3): 192-195.

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

[6] 焦少珍, 李宇, 韩凤梅, 等. RP-HPLC 法测定桂附地黄丸中芍药苷和丹皮酚[J]. 中草药, 2007, 38(6): 855-856.

[7] 林林, 刘广楨, 尹宁宁. HPLC 法测定金匱肾气丸中马钱苷、芍药苷、毛蕊花糖苷和丹皮酚[J]. 中成药, 2012, 34(11): 2131-2140.

[8] 潘莹, 郭小龙, 陈勇, 等. HPLC 法测定杞菊地黄丸中马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 133-135.

[9] 车磊, 孙国祥. HPLC 等吸收双波长法同时测定桂附地黄丸中 5 种成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(12): 938-954.

[10] 张力力, 杨晓燕, 张琦. HPLC 法测定藏成药八味小檗皮散中没食子酸含量[J]. 西南民族大学学报, 2012, 38(5): 780-784.

(编辑: 宋威)