

类药材炙珠的代表性应用。这种可靠的、低成本、高效、环保的炮制胶珠的方法也可在其他中药胶材中推广应用。

参考文献:

[1] 张保国<sup>1</sup> 阿胶的现代炮制研究[J] 河南大学学报: 医学科学

版, 2003, 2(2): 124  
[2] 中国药典[S]1 一部1 2005  
[3] 李光甫, 任玉珍<sup>1</sup> 中药炮制工程学[M] 北京: 化学工业出版社, 2007  
[4] 樊绘曾, 刘或曦<sup>1</sup> 阿胶蛋白质定量方法的比较[J]1 中国中药杂志, 1994, 19(4): 224

## 六味地黄丸的 HPLC 指纹图谱和模式识别研究

赵洪芝<sup>1,2</sup>, 孟宪生<sup>3\*</sup>, 叶挺祥<sup>1,2</sup>, 刘征辉<sup>1,2</sup>, 程 奕<sup>1,2</sup>, 罗国安<sup>3</sup>

(11 天津海世达检测技术有限公司, 天津 300381; 2 天津市现代中药质量检验中心, 天津 300381;

3 清华大学 化学系, 北京 100084)

**摘要:** 目的 研究六味地黄丸的质量控制方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C<sub>18</sub> (250 mm@4.6 mm, 5 Lm), 乙腈-水梯度洗脱, 柱温: 30 °C, 体积流量: 1.0 mL/min, 检测波长为 236 nm, 并利用聚类分析法和主成分分析法分析结果。结果 通过聚类分析将不同厂家和批次的 25 个样品分为 3 类, 不同剂型的六味地黄制剂 HPLC 指纹图谱存在明显的差异。主成分分析分类结果与聚类分析分类结果一致, 经主成分分析, 8 个共有峰可综合为 3 个主成分, 其累积贡献率达 821.844%, 马钱苷的相对峰面积为六味地黄丸指纹图谱中影响比较大的指标。结论 此方法可较系统地用于六味地黄丸的质量控制。

**关键词:** 六味地黄丸; 指纹图谱; 模式识别

中图分类号: R284.2; R286.02

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)01-0048-04

### HPLC Fingerprint and chemical pattern recognition of Liuwei Dihuang Pills

ZHAO Hongzhi<sup>1,2</sup>, MENG Xiansheng<sup>3</sup>, YE Tingxiang<sup>1,2</sup>, LIU Zhenghui<sup>1,2</sup>,  
CHENG Yi<sup>1,2</sup>, LUO Guoan<sup>3</sup>

(11 Tianjin High Standard Quality Testing Laboratory, Tianjin 300381, China; 2 Tianjin Center for Quality Testing of TCM, Tianjin 300381, China; 3 Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** Objective To establish a method for the quality control of Liuwei Dihuang Pills. Methods HPLC Method was developed to establish the fingerprint of Liuwei Dihuang Pills. The separation was performed on Agilent Zorbax SB C<sub>18</sub> (250 mm@4.6 mm, 5 Lm) column gradient eluted with the mobile phase consisting acetonitrile and water at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 236 nm. Hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA) were applied to investigating the test data. Results The HCA result showed that 25 samples from various manufacturers and various batches can be divided into three groups. The differences between various dosage forms could be obvious. The classification result according to PCA was consistent with the HCA. The PCA showed that eight common peaks were integrated into three principal components (PC) and their accumulation contributing rate amounted to 821.844%. The PCA result showed that the relative peak area of loganin was the discriminating factor of the fingerprint of Liuwei Dihuang Pills. Conclusion This method can be used for quality control for Liuwei Dihuang Pills.

**Key words:** Liuwei Dihuang Pills; fingerprint; chemical pattern recognition

<sup>1</sup> 收稿日期: 200903210  
基金项目: 天津市科技发展计划项目 (05SYSYGX25000)  
作者简介: 赵洪芝 (1981), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事中药质量控制及化学计量学方面的研究。  
Tel: (022) 27950255 Fax: (022) 27950378 E-mail: zhao\_hong\_zhi@126.com  
\* 通讯作者 孟宪生 Tel: (010) 62772263 Fax: (010) 62781688 E-mail: mxswv@126.com

六味地黄丸是中医补益剂中滋阴补肾的代表方剂,用于肾阴亏损,头晕耳鸣,腰膝酸软,骨蒸潮热,盗汗遗精,消渴等症。其配方由熟地黄、山茱萸(制)、牡丹皮、泽泻、山药、茯苓等 6 味药材组成。5 中国药典 2005 年版一部六味地黄丸项下规定检测丹皮酚和马钱苷的量作为质量控制标准。但是六味地黄丸的成分十分复杂,生产厂家众多,为全面评价其质量,需借助现代分析手段进行研究,建立新的评价方法。中药指纹图谱技术是一种表征中药所含成分与其质量关系的有效手段,现已成为国内外广泛接受的中药质量评价模式<sup>[1-4]</sup>。本课题组前期采用薄层扫描法评价了六味地黄丸(胶囊)<sup>[5]</sup>。本实验建立了六味地黄丸的 HPLC 指纹图谱,结合聚类分析法和主成分分析法等模式识别方法,为中药的质量控制提供一种直观、简便、有效的手段。

### 1 仪器与试剂

Waters alliance 2695 高效液相色谱仪,其配置有自动进样器、2996 二极管阵列检测器、柱温箱。

乙腈(色谱纯,美国 Fisher),超纯水(Millipore);其他试剂为分析纯。丹皮酚对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 1107082200505);马钱苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号为 1116402200803)。六味地黄丸(胶囊)样品为市售品,共收集了 15 个生产厂家的 25 个样本,见表 1。

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

编号	生产厂家	批号	剂型	编号	生产厂家	批号	剂型
1	A	6032931	水蜜丸	14	E	109426	大蜜丸
2	A	7031337	水蜜丸	15	E	109429	大蜜丸
3	B	B058220	水蜜丸	16	C	640005	大蜜丸
4	B	B058207	水蜜丸	17	C	640006	大蜜丸
5	B	B058227	水蜜丸	18	J	070101	浓缩丸
6	C	6420009	水蜜丸	19	K	20060918	浓缩丸
7	C	6420011	水蜜丸	20	K	20070539	浓缩丸
8	D	0506028	水蜜丸	21	K	20070611	浓缩丸
9	E	111409	水蜜丸	22	L	97060379	浓缩丸
10	F	0605707	水蜜丸	23	M	20070426	浓缩丸
11	G	051102	水蜜丸	24	N	060701	浓缩丸
12	H	060503	胶囊	25	O	061274	浓缩丸
13	I	070301	胶囊				

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件: Agilent Zorbax SB C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm@4.6 mm, 5 Lm); 流动相: 乙腈/超纯水, 线性梯度洗脱程序: 0~ 8 min, 乙腈由 1% 线性增至 12%; 8~ 21 min, 乙腈保持 12%; 21~ 40 min, 乙腈由 12% 线性增至 90%; 40 min 后乙腈保持 90% 至 50 min; 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长: 236 nm;

进样量: 10 LL。

2.2 供试品溶液的制备: 取本品水蜜丸切碎, 取约 1 g; 大蜜丸取约 1.3 g; 浓缩丸取约 0.3 g; 胶囊取约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 60 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取马钱苷对照品、丹皮酚对照品适量, 加甲醇分别制成含马钱苷 14 Lg/mL、丹皮酚 18 Lg/mL 的溶液, 即得。

#### 2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验: 取同一供试品溶液在上述条件下连续测定 6 次, 计算指纹峰的保留时间和峰面积的 RSD 值, 相对保留时间 RSD 分别为 0.23%、0.24%、0.57%、0.64%、0.013%、0.003%、0.25%, 相对峰面积 RSD 为 1.05%、0.82%、0.26%、0.63%、1.63%、1.66%、0.23%, 各色谱峰相对保留时间稳定, 各主要色谱峰相对峰面积基本一致, RSD 小于 2.0%。

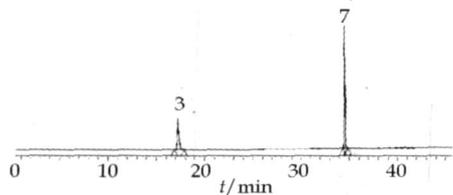
2.4.2 稳定性试验: 取同一供试品溶液在上述条件下, 分别在 0、3、6、9、12、16 h 测定其指纹图谱, 各色谱峰保留时间 RSD 分别为 0.22%、0.58%、0.66%、0.01%、0.41%、0.041%、0.28%, 各色谱峰保留时间稳定, 各主要色谱峰, 相对峰面积 RSD 分别为 1.69%、0.92%、0.32%、0.49%、1.53%、2.82%、1.02%, 均小于 2.0%, 表明样品溶液在 16 h 内稳定。

2.4.3 重复性试验: 平行取 6 份供试品溶液, 进样测定, 计算指纹峰的保留时间和峰面积的 RSD 值, 结果相对保留时间 RSD 分别为 0.069%、0.067%、0.12%、0.108%、1.29%、0.027%、0.065%, 相对峰面积的 RSD 分别为 2.82%、1.10%、1.20%、1.93%、2.31%、1.54%、2.42%, 各主要色谱峰相对峰面积 RSD 小于 3.0%。

2.5 样品测定: 取不同厂家的 25 批样品, 分别制备供试品溶液, 进样测定, 确定 8 个主要色谱峰为共有峰。马钱苷、丹皮酚对照品色谱图见图 1, 2 号样品的 HPLC 指纹图谱见图 2, 用 5 中药色谱的指纹图谱评价系统 6 软件(2004A) 进行色谱峰的匹配, 25 批样品的叠加谱图见图 3。

### 3 模式识别研究

3.1 聚类分析法: 以 25 个不同厂家和批次的六味地黄丸(胶囊)为研究对象, 进行指纹图谱研究, 获得包括丹皮酚(7 号峰)在内的 8 个色谱峰, 将 7 号峰



3-马钱苷 7-丹皮酚  
3-loganin 7-paeonol

图 1 对照品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatogram of reference substances

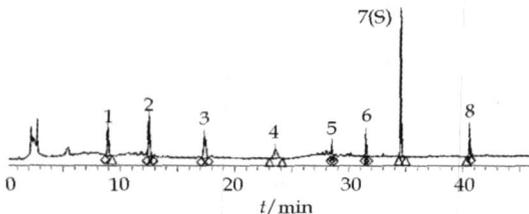


图 2 六味地黄丸的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC Fingerprint of Liuwei Dihuang Pills

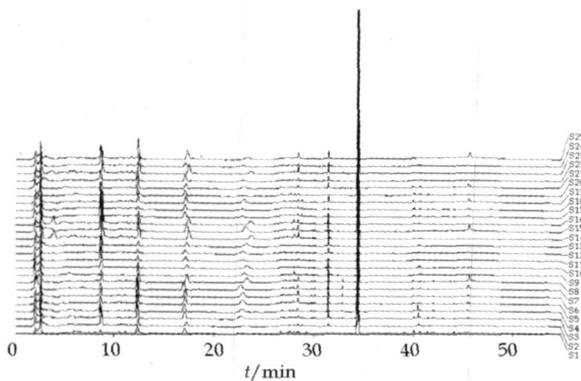


图 3 样品的高效液相色谱叠加图

Fig. 3 HPLC Chromatograms of samples

设为参比峰,规定其相对保留时间和相对峰面积为 1,其他各峰面积均按相对峰面积折算,将各色谱峰相对于内参比色谱峰的峰面积量化,得到 25 @8 阶原始数据矩阵,运用 SPSS 统计分析软件对其进行聚类分析(Hierarchical clustering analysis),利用欧氏距离(Euclidean)作为样品的测度,采用离差平方和法(Ward's Method)进行聚类,将 25 个样品分为 3 类,见图 4。

可以看出,25 个样品总共可以分为 3 类,其中,16、17、7、2、15、10、14、1、6、9、24 为第 1 类;4、20、3、5、25、19、21、23、22 为第 2 类;12、13、18、8、11 为第 3 类。C 厂家的样品(4、7、16、17)和 E 厂家(9、14、15)无论水蜜丸和大蜜丸均为在第一类中,说明 C 和 E 厂家的样品质量相近,而水蜜丸和大蜜丸质量相差并不大。而所取的 B 厂家样品(2、3、5 号)比较紧凑,证明这几个批号六味地黄丸质量比较稳定。

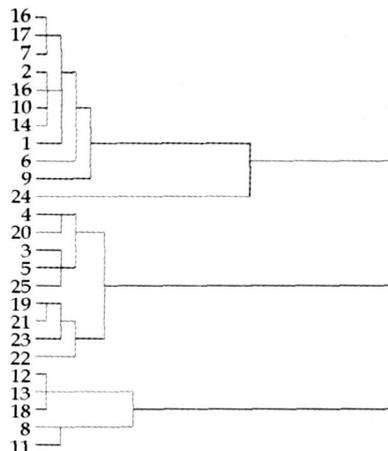


图 4 六味地黄丸(胶囊)样品的聚类谱系图

Fig. 4 Hierarchical cluster analysis figure of Liuwei DiHuang Pills (Capsula)

12、13 号为胶囊制剂,在聚类谱图中距离非常相近,说明胶囊与其他剂型相差较大。浓缩丸除 N 厂家(24 号)和 J 厂家(18 号)以外,均在第 2 类中,说明浓缩丸和水蜜丸之间质量有一定差异。

3.2 主成分分析:主成分分析是将原来众多具有一定相关性的指标重新组合成一组新的相互无关的综合指标来代替原来指标的统计方法,也是数学上处理降维的一种方法<sup>[6]</sup>。主成分分析有许多同义词,如特征值分解(eigen vector decomposition)、奇异值分解(singular value decomposition)、抽象因子分析(abstract factor analysis)、主因子分析(principal factor analysis)、特征矢量投影(eigen vector projection)、K2L projection 等。本实验应用 SPSS 统计分析软件对此 25 个样本进行了主成分分析,即将它们投影至低维空间来看它们之间的微细差别,先将 25 @8 的原始数据矩阵经标准化处理,再对其进行运算,主成分个数提取原则为主成分对应的特征值大于 1 的前 m 个主成分。主成分分析结果如下:第一主成分的特征值 K1 = 31 535,方差贡献率为 50.1 505%;第二主成分的特征值:K2 = 11 260,方差贡献率为 18.1 003;第三主成分的特征值 K3 = 11 004,方差贡献率为 14.1 336%。3 个主成分的累计方差贡献率为 82.1 844%,故选取前 3 个得分矢量来作图,3 个主成分的得分图见图 5。图中每个点对应 1 个样本。可知,此 25 个样本可分为 3 类,与聚类分析结果一致,即可验证聚类结果图,聚类结果合理。

初始因子载荷矩阵中,每一个载荷量表示主成分与对应变量的相关系数见表 2。将主成分载荷矩阵中的数据除以主成分相对应的特征值开平方根便

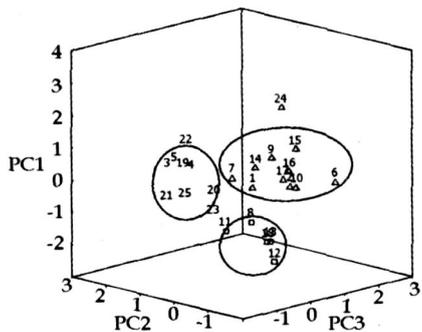


图 5 主成分得分图

Fig 5 Principal component analysis score

表 2 初始因子载荷矩阵

Table 2 Matrix of initial factors

峰位	主成分		
	1	2	3
1	0.1512	0.432	-0.608
2	0.1886	-0.265	0.270
3	0.1928	-0.0397	0.0144
4	0.1772	0.439	-0.125
5	0.1706	-0.610	0.134
6	0.1729	0.233	0.126
8	-0.1044	0.618	0.715

得到两个主成分中每个指标所对应的系数,经计算可得主成分的模型为:  $F_1 = 0.1272 X_1 + 0.1471 X_2 + 0.1494 X_3 + 0.1411 X_4 + 0.1376 X_5 + 0.1388 X_6 - 0.1024 X_8$ ;  $F_2 = 0.1385 X_1 - 0.1236 X_2 - 0.1035 X_3 + 0.1391 X_4 - 0.1543 X_5 + 0.1207 X_6 + 0.1551 X_8$ ;  $F_3 = -0.1607 X_1 + 0.1269 X_2 + 0.1014 X_3 - 0.125 X_4 + 0.1134 X_5 + 0.126 X_6 + 0.1714 X_8$ 。  $F_1$ 、 $F_2$ 、 $F_3$  分别表示 3 个主成分,  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_8$  分别表示各个色谱峰(峰 1、2、3、4、5、6、7、8)的相对于标准峰(峰 7)的相对峰面积。而 3 个主成分中,  $F_1$  是特征值最大的,即是 / 信息最多 0 的指标,而第一主成分中系数最大的为  $X_3$ ,即为峰 3 相对于峰 7 的面积,从对照品色谱图(图 2)可知,峰 3 为马钱苷,峰 7 为丹皮酚,证明马钱苷的量在六味地黄丸的质量控制中起相对比较重要的作用。

#### 4 讨论

中成药系复方制剂,其化学成分甚为复杂,其作用往往是多种成分协同作用的结果,而不仅仅是其

中某几个有效成分的个别功效。本实验对收集到的 25 个六味地黄丸样品进行了 HPLC 指纹图谱研究,并使用聚类分析及主成分分析化学模式识别的方法,对其数据进行了分析,两种方法分类结果可以互相印证,表明方法合理,说明将指纹图谱和模式识别结合进行质量控制是一种行之有效的办法。且使用主成分分析表明,马钱苷在六味地黄丸质量中起相对重要的作用,5 中国药典 2005 年版一部的马钱苷、丹皮酚为质量控制指标,有效地控制了六味地黄丸的药品质量。

在供试品溶液制备条件的选择中比较了回流提取和超声提取、提取溶剂(50% 甲醇、甲醇、含 1% 甲酸的甲醇、乙醇、甲醇 2 乙醚)、提取时间(15、30、45、60、90min)、样品用量(0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 g)对六味地黄丸的提取效果。结果表明,在指定的色谱分析条件下,本实验中采用的供试品溶液制备方法提取效果最好,能够最大限度地反映其特征。

在色谱条件优化中,经过多次尝试最终确定了乙腈 2 水的流动相体系,在优化的色谱条件下,样品能够得到较好的分离。为了使尽量多的化合物被检测,采用 Waters 公司 2996 检测器及 Empower 工作站的特殊功能 MAX PLOT(最大值图),提取各色谱成分最大吸收的色谱图与不同波长的色谱图进行比较,当选择 236 nm 为检测波长时,色谱成分检出率最多,满足了最大信息量化的原则,所以选择 236 nm 为检测波长。

#### 参考文献:

- [1] 易伦朝,谢培山,梁逸曾,等 1 液相色谱特定(指纹)图谱分析用于陈皮的质量考察[J] 药物分析杂志,2006,26(7):919-921
- [2] 鄢燕,汤宏敏,饶毅,等 1 血府逐瘀口服液的高效液相色谱指纹图谱研究[J] 中草药,2009,40(4):566-568
- [3] 聂磊,罗国安,曹进,等 1 中药二维信息指纹图谱模式识别[J] 药学报,2004,39(2):136-139
- [4] 聂磊,曹进,罗国安,等 1 中药指纹图谱相似度评价方法的比较[J] 中成药,2005,27(3):249-251
- [5] 刘征辉,孟宪生,叶挺祥,等 1 薄层扫描法评价六味地黄丸(胶囊)质量的模式识别研究[J] 中草药,2009,40(11):1743-1746
- [6] 许禄 1 化学计量学[M] 北京:科学出版社,2004