

## 基于多成分定量测定的六味地黄浓缩丸质量分析

石伟<sup>1,3</sup>, 李家春<sup>2,3</sup>, 刘汉清<sup>1</sup>, 王振中<sup>2,3</sup>, 杨素德<sup>2,3</sup>, 孙仙玲<sup>1,3</sup>, 靳瑞婷<sup>1,3</sup>, 李云<sup>1,3</sup>, 萧伟<sup>2,3\*</sup>

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

**摘要:** 目的 建立同时测定六味地黄浓缩丸中多成分的定量分析方法。方法 以六味地黄浓缩丸中没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、熊果酸的量为考察指标, 采用 RP-HPLC 法, Agilent TC-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱, 以乙腈-0.02%三氟乙酸为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃; 检测波长: 0~60 min, 238 nm, 60~70 min, 210 nm; 并结合聚类分析法, 比较了 20 个不同厂家六味地黄浓缩丸之间的质量差异。结果 不同厂家的六味地黄浓缩丸中的 7 种成分均有检出, 且其量存在差异, 其中芍药苷差异较大。聚类分析结果显示, 该 20 个厂家产品被分为 2 类, 2 类产品所测成分之间存在着较为明显的差异, 其中编号 4、6、8、9、11、14 和 16 的厂家样品被归为一类, 质量差异相对较小; 其余厂家产品被归为一类, 产品之间 7 个成分的量差异不大。结论 方法学考察结果表明该方法符合测定要求, 并提出通过多成分测定控制六味地黄浓缩丸质量的建议, 可以为质量评价提供参考。

**关键词:** 六味地黄浓缩丸; 高效液相色谱法; 聚类分析; 没食子酸; 5-羟甲基糠醛; 莫诺苷; 马钱苷; 芍药苷; 丹皮酚; 熊果酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)07-1002-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.07.012

## Quality analysis of Liuwei Dihuang Concentrated Pills based on multi-index components

SHI Wei<sup>1,3</sup>, LI Jia-chun<sup>2,3</sup>, LIU Han-qing<sup>1</sup>, WANG Zhen-zhong<sup>2,3</sup>, YANG Su-de<sup>2,3</sup>, SUN Xian-ling<sup>1,3</sup>, JIN Rui-ting<sup>1,3</sup>, LI Yun<sup>1,3</sup>, XIAO Wei<sup>2,3</sup>

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

**Abstract: Objective** To establish a determination method for the simultaneous determination of the multiple components in Liuwei Dihuang Concentrated Pills (LDCP). **Methods** The contents of gallic acid, 5-hydroxymethyl furfural, morroniside, loganin, paeoniflorin, paeonol, and ursolic acid were used as observing indexes. HPLC method, Agilent TC-C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column using acetonitrile-0.02% TFA as mobile phase, gradient elution volume flow was 1.0 mL/min, column temperature was 30 ℃; Detection wavelengths were 0—60 min, 238 nm, 60—70 min, and 210 nm; Cluster analysis method was used to compare the differences of LDCP among 20 different manufacturers. **Results** The seven ingredients in LDCP from different manufacturers were determined. There was difference among them, the contents of paeoniflorin showed appreciable difference. The products from 20 manufacturers were divided into two categories by the cluster analysis, and showed obvious difference between them. The numbers 4, 6, 8, 9, 11, 14 and 16 were classified into one group, which quality difference was relatively minor; The products from other manufacturers belonged to one category and there were little differences among the seven components. **Conclusion** The methodology research shows that this method could fit the demand of determination and provides some guidance to advance the quality evaluation of LDCP.

**Key words:** Liuwei Dihuang Concentrated Pills; HPLC; cluster analysis; gallic acid; 5-hydroxymethyl furfural; morroniside; loganin; paeoniflorin; paeonol; ursolic acid

收稿日期: 2014-09-09

基金项目: 国家科技部重大新药创制项目 (2013ZX09402203); 现代中药创新集群与数字制药技术平台

作者简介: 石伟 (1987—), 男, 江苏南通人, 南京中医药大学 2012 级硕士研究生, 研究方向为中药化学。

Tel: 18888130365 E-mail: swv2012@163.com

\*通信作者 萧伟, 男, 博士生导师, 研究员, 研究方向为中药新剂型的研究与开发。Tel: (0518)81152337 E-mail: wzzh-nj@163.net

六味地黄方为滋阴补肾的经典名方,由熟地黄、山茱萸、牡丹皮、山药、泽泻、茯苓6味药材组成。临床上多用于治疗肾阴亏虚、腰膝酸软、盗汗遗精等症<sup>[1-3]</sup>。现代药理研究发现,该方具有改善肾功能、保肝、抗衰老、抗疲劳、耐缺氧、增强免疫、促进新陈代谢等多种作用<sup>[4-5]</sup>。目前,六味地黄制剂生产厂家众多,上市剂型包括浓缩丸、软胶囊、大小蜜丸、硬胶囊、片剂、颗粒剂、口服液等,其中浓缩丸在OTC领域销量较高,其质量控制亦是研究的难点和热点。《中国药典》2010年版仅对六味地黄浓缩丸中的马钱苷、丹皮酚进行控制<sup>[6]</sup>,显然对于成分复杂的六味地黄丸,不足以反映其真实质量。有研究者探索采用对照提取液的方式对六味地黄丸的质量进行控制,取得了一定效果<sup>[7]</sup>。本研究建立了通过切换波长同时测定六味地黄浓缩丸中7种主要成分的反相HPLC法,并借助聚类分析法对测定结果进行差异性分析,旨在为增加六味地黄浓缩丸的质量控制指标提供一定的参考依据。

### 1 仪器与材料

岛津高效液相色谱仪,日本岛津公司;XP6电子天平、BP211D型电子分析天平, Mettler Toledo。

对照品没食子酸(批号110831-200803,质量分数90.1%)、5-羟甲基糠醛(5-HMF,批号

110626-201308,质量分数>98%)、马钱苷(批号110640-201005,质量分数99.2%)、芍药苷(批号110736-201136,质量分数94.9%)、丹皮酚(批号110708-200506,质量分数>98%)、熊果酸(批号110742-201220,质量分数为99.3%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。莫诺昔系由军事医学科学院从山茱萸药材中分离所得,经<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR结构鉴定,HPLC峰面积归一化法分析测得质量分数为95.7%。乙腈,色谱纯;水为自制纯化水;其余试剂均为分析纯。本实验所采用的熟地黄 *Rehmanniae Radix Praeparata* (玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根的炮制加工品)、山茱萸 *Corni Fructus* (山茱萸科山茱萸属植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉)、牡丹皮 *Moutan Cortex* (毛茛科芍药属植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮)、茯苓 [多孔菌科茯苓属植物真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw) Wolf 的干燥菌核]、泽泻 [泽泻科泽泻属植物泽泻 *Alisma orientalis* (Sam) Juzep. 的块茎] 和山药 (薯蓣科薯蓣属植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥根茎) 6味药材购自连云港康济大药房,经江苏康缘药业股份有限公司吴舟执业药师鉴定均为正品。

表1 六味地黄浓缩丸的编号、生产厂家及批号

Table 1 Code number, manufacturers, and batch numbers of Liuwei Dihuang Concentrated Pills

编号	生产厂家	批号	编号	生产厂家	批号
1	河南宛西制药股份有限公司	130920	11	黑龙江葵花药业股份有限公司	20120307
2	吉林金宝药业股份有限公司	141002	12	哈药集团世一堂制药厂	1308704
3	北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂	12072083	13	东芝堂药业(安徽)有限公司	140301
4	湖北炎黄本草药业有限公司	20130101	14	吉林济邦药业有限公司	20121102
5	安徽华佗国药股份有限公司	20130910	15	江西药都樟树制药有限公司	130409
6	九芝堂股份有限公司	201305021	16	上海宝龙安庆药业有限公司	140310
7	芜湖张恒春药业有限公司	1404081	17	陕西天洋制药有限责任公司	20140329
8	兰州佛慈制药股份有限公司	13E160	18	江苏颐海药业有限责任公司	140101
9	通药制药集团股份有限公司	140313	19	湖北隆中药业集团有限公司	140404
10	雷允上药业有限公司	MB9006	20	神威药业集团有限公司	140313

### 2 方法与结果

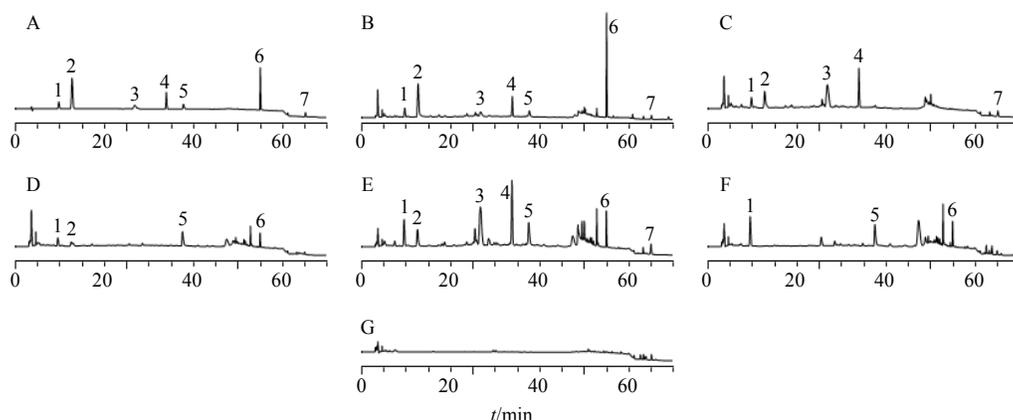
#### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent TC-C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.02%三氟乙酸水溶液,梯度洗脱:0~5 min, 4%乙腈;5~30 min, 4%~16%乙腈;30~40 min, 16%乙腈;40~55 min, 16%~

92%乙腈;55~70 min, 92%~95%乙腈;体积流量为1.0 mL/min;柱温为30℃;检测波长:0~60 min, 238 nm;60~70 min, 210 nm。色谱图见图1。

#### 2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取没食子酸、5-HMF、莫诺昔、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、熊果酸对照品适量,精密



1-没食子酸 2-5-HMF 3-莫诺昔 4-马钱苷 5-芍药苷 6-丹皮酚 7-熊果酸  
1-gallic acid 2-5-HMF 3-morroniside 4-loganin 5-paeoniflorin 6-paeonol 7-ursolic acid

图1 混合对照品 (A), 六味地黄浓缩丸样品 (B) 及缺牡丹皮 (C)、缺山茱萸 (D)、缺熟地黄 (E)、缺熟地黄+山茱萸 (F) 和缺熟地黄+山茱萸+牡丹皮 (G) 阴性样品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), Liuwei Dihuang Concentrated Pills sample (B), negative sample without *Moutan Cortex* (C), without *Corni Fructus* (D), without *Rehmanniae Radix Praeparata* (E), without *Rehmanniae Radix Praeparata* + *Corni Fructus* (F), and *Rehmanniae Radix Praeparata* + *Corni Fructus* + *Moutan Cortex* (G)

称定, 置棕色量瓶中, 加甲醇分别制成含没食子酸 37.8  $\mu\text{g/mL}$ 、5-HMF 188.5  $\mu\text{g/mL}$ 、莫诺昔 21.2  $\mu\text{g/mL}$ 、马钱苷 34.6  $\mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 22.9  $\mu\text{g/mL}$ 、丹皮酚 39.9  $\mu\text{g/mL}$ 、熊果酸 24.5  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取质量差异下的六味地黄浓缩丸样品, 研细, 精密称取 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 水浴回流 (70  $^{\circ}\text{C}$ ) 30 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, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 即得。

### 2.4 阴性对照溶液

按处方比例分别称取除熟地黄, 除山茱萸(制), 除牡丹皮, 除熟地黄和山茱萸(制), 除牡丹皮、山茱萸(制)、熟地黄以外的其余药味, 按六味地黄浓缩丸制备工艺分别制备缺熟地黄, 缺山茱萸(制), 缺牡丹皮, 缺熟地黄及山茱萸, 缺熟地黄、山茱萸(制)、牡丹皮阴性样品, 按“2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

### 2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ , 按“2.1”色谱条件, 进样, 测定, 连续 6 次。以没食子酸、5-HMF、莫诺昔、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、熊果酸的峰面积计算, 其 RSD 分别为 0.40%、0.33%、0.33%、0.33%、0.86%、0.34%、0.34%, 结果表明, 仪器精密度良好。

### 2.6 线性关系考察

取没食子酸、5-HMF、莫诺昔、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、熊果酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成所需浓度的对照品溶液, 即得。分别吸取上述溶液 10  $\mu\text{L}$ , 注入高效液相色谱仪, 测定, 以峰面积平均值为纵坐标 (Y), 对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 得回归方程、相关系数 (r) 和线性范围, 分别为没食子酸:  $Y=10\ 160\ 895 X-5\ 687.5$ ,  $r=0.999\ 8$ , 线性范围 3.8~75.6  $\mu\text{g/mL}$ ; 5-HMF:  $Y=12\ 986\ 231 X-26\ 220$ ,  $r=0.999\ 7$ , 线性范围 18.845~376.9  $\mu\text{g/mL}$ ; 莫诺昔:  $Y=19\ 711\ 638 X-6\ 364.9$ ,  $r=0.999\ 8$ , 线性范围 2.12~42.4  $\mu\text{g/mL}$ ; 马钱苷:  $Y=18\ 918\ 031 X-9\ 313.8$ ,  $r=0.999\ 8$ , 线性范围 3.46~69.2  $\mu\text{g/mL}$ ; 芍药苷:  $Y=16\ 380\ 034 X-8\ 502$ ,  $r=0.999\ 7$ , 线性范围 2.29~45.8  $\mu\text{g/mL}$ ; 丹皮酚:  $Y=25\ 552\ 672 X-7\ 906.1$ ,  $r=0.999\ 7$ , 线性范围 3.99~79.8  $\mu\text{g/mL}$ ; 熊果酸:  $Y=54\ 664\ 962 X-1\ 788.3$ ,  $r=0.999\ 8$ , 线性范围 2.45~49.0  $\mu\text{g/mL}$ 。结果表明, 没食子酸、5-HMF、莫诺昔、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、熊果酸在各自的质量浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

### 2.7 稳定性试验

精密吸取“2.3”项供试品溶液, 分别于制备后 0、2、6、8、10、12、24 h 分别进样, 按“2.1”项色谱条件测定, 以没食子酸、5-HMF、莫诺昔、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、熊果酸峰面积计算, 结果

RSD 值分别为 0.85%、1.42%、1.63%、1.31%、1.47%、0.63%、1.06%，结果表明供试品溶液放置 24 h 稳定。

### 2.8 重复性试验

按“2.3”项下的方法，制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项色谱条件测定，结果没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、熊果酸平均质量分数分别为 1.92、6.82、0.82、1.72、0.89、1.99、0.12 mg/g，RSD 值分别为 1.05%、1.49%、1.47%、0.85%、1.57%、1.48%、0.81%，RSD 值均小于 2%，表明该方法重复性良好。

### 2.9 回收率试验

精密称取已测定的样品（样品 1，研细）粉末 0.25 g，共 6 份，精密加入没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、熊果酸对照品适

量，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，测定 7 个指标性成分的量，计算回收率。结果没食子酸、5-HMF、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、熊果酸的平均回收率分别为 97.68%（RSD 1.74%）、100.82%（RSD 1.69%）、98.74%（RSD 1.03%）、100.70%（RSD 1.53%）、98.61%（RSD 1.94%）、100.33%（RSD 1.19%）、100.66%（RSD 2.15）。结果显示，准确性较好。

### 2.10 样品的测定

取不同厂家六味地黄丸，按“2.3”项下的方法制备供试品溶液，每次进样量 10 μL。取“2.2”项下的对照品溶液，进样 10 μL。按“2.1”项下色谱条件测定，记录峰面积，计算 7 种成分的量，结果见表 2。

表 2 六味地黄浓缩丸中 7 种成分测定结果

Table 2 Determination of seven major components in Liuwei Dihuang Concentrated Pills

编号	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )						
	没食子酸	5-HMF	莫诺苷	马钱苷	芍药苷	丹皮酚	熊果酸
1	1.89	7.75	0.95	1.77	0.88	2.11	0.12
2	3.40	5.68	0.94	2.06	1.05	2.61	0.20
3	2.48	3.88	1.64	2.13	0.72	2.34	0.19
4	0.56	0.08	1.73	1.47	0.30	2.41	0.17
5	1.52	2.90	1.11	1.80	0.33	2.83	0.16
6	1.20	1.63	1.55	1.85	0.25	2.83	0.15
7	0.88	5.28	0.79	1.82	0.15	1.73	0.21
8	1.25	1.11	1.50	1.81	0.30	2.13	0.12
9	0.35	2.41	1.82	2.52	0.08	2.46	0.13
10	1.62	3.88	0.59	1.65	0.70	3.40	0.16
11	1.81	0.88	1.72	1.76	1.38	2.01	0.13
12	1.71	2.38	1.16	1.71	1.04	2.71	0.15
13	0.88	3.57	0.71	1.60	0.32	2.10	0.13
14	0.68	0.52	1.86	1.83	0.10	2.12	0.15
15	1.05	4.84	0.64	1.71	0.27	2.58	0.14
16	0.47	1.82	1.24	1.77	0.05	1.96	0.14
17	1.16	3.62	0.76	1.65	0.15	1.93	0.14
18	0.96	5.39	1.64	2.26	0.00	2.45	0.12
19	1.19	4.31	1.58	2.35	0.51	2.47	0.14
20	1.82	2.40	0.84	1.85	0.56	2.71	0.14

### 2.11 系统聚类分析

应用 SPSS 18.0 软件，采用组间均联法 (between-groups Linkage)，选用夹角余弦 (cosine) 作为刻度，将上述 20 个测试样品进行聚类分析，结果见图 2。通过聚类分析，根据各样品之间的距离

差异将该 20 个不同厂家的样品分为 2 类，其中，编号 4、6、8、9、11、14 和 16 的厂家样品被归为一类，质量差异相对较小；其余厂家产品被归为一类，产品之间 7 种成分的量差异不大。该树状图能够直观地反映不同厂家生产的六味地黄浓缩丸中检测成

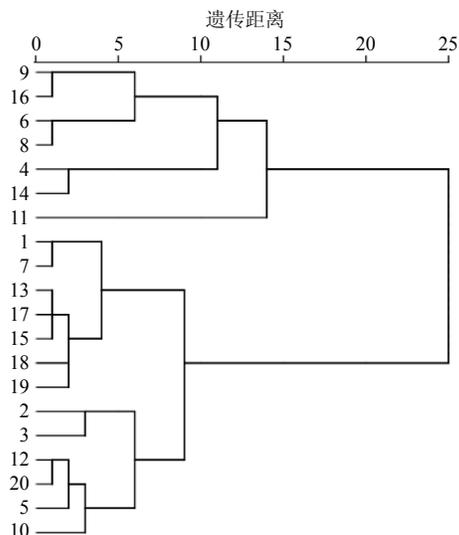


图 2 20 个厂家的六味地黄浓缩丸聚类分析树状图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis on of Liuwei Dihuang Concentrated Pills from 20 manufacturers

分之间所存在的差异。

### 3 讨论

本实验比较了乙腈-0.1%甲酸<sup>[8]</sup>、乙腈-0.015%磷酸水溶液<sup>[9]</sup>和乙腈-0.02%三氟乙酸水溶液 3 种流动相系统，结果采用乙腈-0.02%三氟乙酸水溶液待测成分分离效果最佳，且梯度洗脱才能检出所测成分。应用二极管阵列检测器在 210~400 nm 扫描，结果选取 238 nm 作为检测波长，能检测除熊果酸以外其他成分，鉴于熊果酸为末端吸收（210 nm），本实验采用切换波长法同时测定样品中 7 种成分的量。结果表明此方法切实可行，可以用于同时测定样品中的指定成分的量。

本实验建立了一种简便、快捷测定六味地黄浓缩丸中没食子酸、5-HMF、莫诺昔、马钱苷、芍药苷、丹皮酚、熊果酸 7 种成分的定量分析方法。并通过聚类分析法，以 7 种成分的量指标，对 20 个厂家的样品进行分类，图谱结果佐证了不同厂家产品各成分量之间存在差异，其中芍药苷差别最大，这可能与投料药材或者工艺过程有关。中药通常以复方形式存在，呈现出多成分、多靶点、多通路调控机体的特点，由此达到治疗疾病的目的<sup>[10]</sup>，因此，中药质量控制需要同时控制多个成分的量，从而使中药疗效更稳定。

综上所述，不同厂家生产的同一品种仅依靠 2 个指标来评价，不足以反映中药多组分、多靶点的特性，应尽可能多地对其药效成分进行研究<sup>[4,11-13]</sup>，

但是分别检测多个成分费时、费力，同时测定多种成分量的方法可以实现中药材及其制剂的有效质量控制，亦可以减少资源的浪费。通过对比定量测定结果，可以发现各厂家马钱苷和丹皮酚的量均符合《中国药典》2010 年版规定<sup>[6]</sup>，且其量差别较小；但其他成分（芍药苷、5-HMF、没食子酸和莫诺昔）差别较大，因此建议完善企业内部质量控制标准，同时对原料来源和工艺过程严格把关，以保证该产品的疗效。本研究从多成分测定的角度出发，通过切换波长法，建立了一种可以同时测定浓缩丸中 7 种成分量的方法，为六味地黄浓缩丸质量评价的提升提供一定的参考依据。

### 参考文献

- [1] 张尊如, 陈建国. 六味地黄丸滋阴功效的思考 [J]. 中成药, 2006, 28(8): 1244-1245.
- [2] 何福财. 六味地黄丸加针灸治疗老年 2 型糖尿病肾阴亏虚证的临床研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2007.
- [3] 曹占花. 阿卡波糖联合六味地黄丸治疗早期糖尿病肾病的临床疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(5): 760-762.
- [4] 唐庆, 胡慧, 王全胜, 等. 六味地黄加味胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏蛋白激酶 C 活性及结缔组织生长因子的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(1): 77-81.
- [5] 王喜军, 张宁, 孙晖, 等. 六味地黄丸的血清药物化学研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(4): 29-32.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [7] 郝延军, 赵晓笠, 桑育黎, 等. 六味地黄丸对照提取液的实验研究 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 180-182.
- [8] 封亮, 贾晓斌, 李长春, 等. HPLC 同时测定六味地黄浓缩丸中 4 种主要成分的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(1): 59-61.
- [9] 罗云, 郝伟伟, 王洁, 等. 高效液相色谱法测定六味地黄浓缩丸特征图谱及 4 种主要成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(10): 748-751.
- [10] 刘娟, 周瑶, 张广献, 等. 六味地黄丸入血成分增效自杀基因杀伤肝癌细胞的缝隙连接机制 [J]. 广州中医药大学学报, 2014, 31(1): 103-108.
- [11] Liang X, Li H, Li S. A novel network pharmacology approach to analyse traditional herbal formulae: the Liu-Wei-Di-Huang pill as a case study [J]. *Mol BioSyst*, 2014, 10(5): 1014-1022.
- [12] 戴冰. 六味地黄方含药血清及其入血成分对大鼠前脂肪细胞增殖、分化的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2006.
- [13] 王喜军, 孙文军, 张宁, 等. 六味地黄丸血中移行成分的分离及结构鉴定 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(4): 277-280.