

· 药物分析 ·

高效液相色谱法同时测定3种不同剂型六味地黄丸中4种成分的含量

王灵霞¹, 朱东亮², 柴逸峰³ (1. 新疆军区乌鲁木齐综合库药材分库, 新疆 乌鲁木齐 830002; 2. 新疆军区联勤部药品仪器检验所, 新疆 乌鲁木齐 830063; 3. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 建立 HPLC 法测定 3 种不同剂型六味地黄丸中没食子酸、马钱苷、芍药苷和丹皮酚含量的方法。方法 色谱柱为 Agilent ZorbaxSB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为二元梯度系统, 其中溶剂 A 为乙腈, 溶剂 B 为 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱:(0~3 min, A 为 3%; 3 min, A 为 5%; 28 min, A 为 22%; 40 min, A 为 60%), 流速:1 ml/min; 柱温:25 °C; 检测波长:240 nm; 自动进样 10 μl。结果 没食子酸、马钱苷、芍药苷和丹皮酚浓度分别在 6.296~318.9 μg/ml($r=0.9998$)、1.952~99.04 μg/ml($r=0.9997$)、6.186~309.3 μg/ml($r=0.9998$)和 7.147~214.4 μg/ml($r=0.9997$) 范围内呈现良好的线性, 精密实验 RSD 均小于 2%, 加样回收率 98.2%~102.3%。结论 该测定方法简便、准确, 分离效果好, 能同时测定 4 种成分的含量, 适用于不同剂型六味地黄丸的质量控制。

[关键词] 六味地黄丸; 高效液相色谱法; 含量测定; 没食子酸; 马钱苷; 芍药苷; 丹皮酚

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)04-0296-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.04.016

Simultaneous determination of contents of four components in three different dosage forms of Liuweidihuang by HPLC

WANG Ling-xia¹, ZHU Dong-liang², CHAI Yi-feng³ (1. Department of Pharmaceutical equipment, Urumqi Integrated Warehouse of Xinjiang Military Region, Urumqi 830002, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control of Xinjiang Military Region, Urumqi 830063, China; 3. School of Pharmacy, Second military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To develop a new high performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of four major components (gallic acid, loganin, paeoniflorin and paeonol) in different dosage forms of Liuweidihuang. **Methods** The chromatography condition was with Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (4.6 × 250 mm, 5 μm); mobile phase was A: ACN, B: 0.1% formic acid, gradient elution, 0~3 min, A: 3%~5%; 3~18 min, A: 5%~22%; 18~60 min, A: 22%~60%, flow speed was 1.0 ml/min, temperature of column was 25 °C, inject volume was 10 μl, detection wavelength was 240 nm. **Results** The linearity was obtained over 6.296~318.9 μg/ml($r=0.9998$) for gallic acid, 1.952~99.04 μg/ml($r=0.9997$) for loganin, 6.186~309.3 μg/ml($r=0.9998$) for paeoniflorin and 7.147~214.4 μg/ml($r=0.9997$) for paeonol. The RSDs of precision of the samples were both less than 2%. The average recovery was between 98.2%~102.3%. **Conclusion** The present method, with satisfactory efficacy, was accurate and simple which could simultaneously determine four components, and could be used for quality control of different dosage forum of Liuweidihuang.

[Key words] Liuweidihuang, HPLC, content determination, gallic acid, loganin, paeoniflorin, paeonol

六味地黄丸是补肾名方, 最早记载可以追溯至北宋名医钱乙所著《小儿药证直决》, 主要用于治疗头晕耳鸣、腰膝酸软、遗精盗汗等症, 六味地黄丸由熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、丹皮和茯苓六味药材组成^[1], 临床应用广泛。目前临床常用的六味地黄丸剂分为蜜丸、浓缩丸和胶囊等。

目前药典测定六味地黄丸含量的方法为 HPLC 法, 测定其中的丹皮酚和马钱苷的含量, 作为牡丹皮

和山茱萸的质量控制方法^[1]。文献报道中的测定方法多为 HPLC 法同时测定其中的 1~3 种化学成分, 且多测定其中的一种剂型^[2-4]。本测定选择 4 个化学成分作为指标成分, 即没食子酸、马钱苷、芍药苷和丹皮酚, 其中没食子酸和马钱苷作为山茱萸的指标性成分, 芍药苷和丹皮酚作为丹皮中的指标性成分, 建立同时测定 4 种成分的 HPLC 方法, 测定不同厂家、不同剂型中 4 种成分的含量, 实验方法准确、简便、灵敏, 可用于控制六味地黄丸的质量控制, 为提高六味地黄丸质量控制标准提供参考。

1 仪器和试剂

[作者简介] 王灵霞 (1968-), 女, 主管药师。Tel: 18699195659, E-mail: sstick2008@163.com.

[通讯作者] 柴逸峰。Tel: (021) 81871201, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn.

美国 Agilent 公司 1100 系列液相色谱(包括自动进样器、四元泵、二极管阵列检测器)。ORION MODEL 828 型 pH 计;METTLER AE240 电子天平;BRANSON SB3200-T 型超声仪。

乙腈为 HPLC 级(美国 Fisher 公司);乙醇为分析醇(上海国药集团);水为娃哈哈纯净水;其余试剂均为分析纯。没食子酸、马钱苷、芍药苷和丹皮酚购自中国药品生物制品检定所,纯度均在 98% 以上。六味地黄丸样品购自药店(表 1),用粉碎机粉碎,过 40 目筛等预处理。

表 1 样品信息表

序号	厂家	批号	剂型	序号	厂家	批号	剂型
1	同仁堂	8012117	蜜丸	8	仲景	812608	浓缩丸
2	同仁堂	8034243	蜜丸	9	仲景	812104	浓缩丸
3	同仁堂	8032857	蜜丸	10	佛慈	2007155	浓缩丸
4	九芝堂	070904	蜜丸	11	佛慈	2008184	浓缩丸
5	九芝堂	070313	蜜丸	12	佛慈	2008236	浓缩丸
6	同仁堂	7071016	浓缩丸	13	康缘	080909	软胶囊
7	同仁堂	8070635	浓缩丸	14	同仁堂	8173902	软胶囊

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZorbaxSB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为二元梯度系统,其中溶剂 A 为乙腈,溶剂 B 为 0.1% 甲酸水溶液,梯度洗脱:(0 min, A 为 3%;3 min, A 为 5%;28 min, A 为 22%;40 min, A 为 60%),流速:1 ml/min;柱温:25 ℃;检测波长:240 nm;自动进样 10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品储备液 分别精密称取没食子酸、马钱苷、芍药苷和丹皮酚对照品 15.94、15.46、10.72 和 19.85 mg,分别置于 50、50、50、25 ml 容量瓶中,以 60% 甲醇溶解,摇匀,定容,即得对照品储备溶液。置于 4 ℃ 冰箱保存。分别精密称取没食子酸、马钱苷、芍药苷和丹皮酚对照品 3.23、3.15、2.32 和 7.86 mg,置 10 ml 量瓶中,作为混合对照品溶液,供系统适应性实验用。

2.2.2 供试品溶液 分别称取各个批号六味地黄丸适量(相当于原药材 2.5 g),加 60% 甲醇 25 ml,超声处理 30 min,放至室温,补足减失的重量,摇匀,经微孔滤膜滤过,取续滤液,即得六味地黄丸药材样品溶液。

其中浓缩丸每 8 丸相当于原药材 3 g,精密称定 20 丸重量,换算成相当于原药材 2.5 g 的重量,精密称定;水蜜丸每 4 g 相当于原药材 3 g,根据不同厂家剂量的不同换算成相当于原药材 2.5 g 的重量,精密称定;大蜜丸每 6 g 相当于原药材 3 g,换算成相当于原药材 2.5 g 的重量,精密称定。软胶囊因与原药材没有确切的换算关系,故按照每日 3 次,每次服用的量记为相当于原药材 3 g,换算成相当于原药材 2.5 g,取内容物进行精密称定。

2.3 系统适用性实验 取“2.2.2”项下样品溶液(同仁堂浓缩丸,批号:7071016)和混合对照品溶液各 10 μl,注入 HPLC 仪,按“2.1 色谱条件”项下实验,结果表明样品中所要测定的 4 个色谱峰分离度均大于 1.5,拖尾因子 0.90 ~ 1.10 之间,理论塔板数均大于 5 000,见图 1。

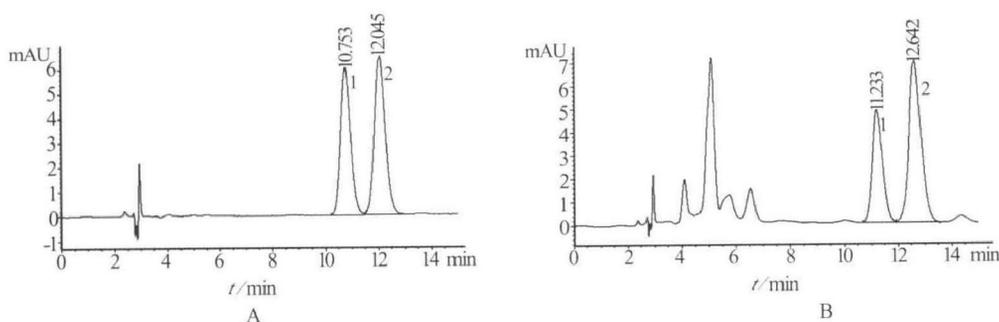


图 1 六味地黄丸 HPLC 色谱图

A-混合对照品溶液;B-样品溶液;1-没食子酸;2-马钱苷;3-芍药苷;4-丹皮酚

2.4 线性关系考察 分别取对照品储备液,稀释成 6 个浓度梯度的对照品溶液,按“色谱条件”项下实验,以色谱峰面积(A)对浓度(C)作线性回归,结果表明,没食子酸在 6.296 ~ 318.9 μg/ml 范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $A = 3.938C - 2.602$ ($r = 0.9998, n = 3$);马钱苷在 1.952 ~ 99.04 μg/ml 范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $A = 2.461C -$

0.7484 ($r = 0.9997, n = 3$);芍药苷在 6.186 ~ 309.3 μg/ml 范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $A = 2.934C - 1.432$ ($r = 0.9998, n = 3$);丹皮酚在 7.147 ~ 214.4 μg/ml 范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $A = 8.115C - 2.137$ ($r = 0.9997, n = 3$)。

2.5 精密度实验 分别取低、中、高 3 种浓度的混合对照品溶液,在上述色谱条件下,重复进样 3 次,每次进

样间隔时间日内精密为4 h, 日间精密为24 h, 记录峰面积, 代入线性回归方程, 计算4种成分的含量。没食子酸低、中、高浓度(10.63、53.15、318.9 $\mu\text{g/ml}$)的日内RSD分别为0.59%、1.22%和0.31%, 日间RSD分别为1.81%、0.94%和0.41%; 马钱苷低、中、高浓度(3.301、16.50、99.04 $\mu\text{g/ml}$)日内RSD分别为1.74%、1.33%和0.92%, 日间RSD分别为0.83%、0.72%和0.96%; 芍药苷低、中、高浓度(10.31、51.55、309.3 $\mu\text{g/ml}$)日内RSD%分别为0.34%、0.64%和0.63%, 日间RSD分别为1.64%、0.86%和1.38%; 丹皮酚低、中、高浓度(14.29、71.47、214.4 $\mu\text{g/ml}$)日内RSD分别为1.34%、0.77%和0.65%, 日间RSD分别为1.55%、1.69%和1.33%。结果表明所建立的HPLC法重现性好, 且测定时间内样品溶液稳定性良好。

2.6 重复性实验 精密称取六味地黄丸样品(同仁堂浓缩丸, 批号:7071016)5份, 按“2.2.2”项下

方法分别制备样品溶液, 按测定4种成分的含量, 计算其RSD, 结果没食子酸、马钱苷、芍药苷和丹皮酚的RSD分别为1.25%、0.95%、1.21%和1.69%, 说明方法重复性良好, 符合含量测定要求。

2.7 回收率实验 取已知含量的六味地黄丸样品(同仁堂浓缩丸, 批号:7071016), 精密称定6份, 分别精密加入没食子酸、马钱苷、芍药苷和丹皮酚对照品溶液适量, 按“供试品溶液的制备”项下方法制备溶液, 测定4种有效成分的含量。结果测得平均回收率分别为98.29%、100.42%、102.21%和102.23%, RSD分别为1.48%、1.53%、1.83%和0.93%。

2.8 样品含量测定 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.2.1”项下方法制备对照品溶液, 分别进样10 μl , 记录峰面积, 平行测定3次, 按外标法分别计算没食子酸、马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量, 结果见表2。

表2 六味地黄丸含量测定结果($n=3$, mg/g)

序号	厂家	批号	剂型	没食子酸	马钱苷	芍药苷	丹皮酚
1	同仁堂	8012117	大蜜丸	0.143 0 \pm 0.001 1	0.205 5 \pm 0.008 4	0.262 9 \pm 0.008 1	0.664 9 \pm 0.014 8
2	同仁堂	8034243	水蜜丸	0.320 1 \pm 0.010 9	0.628 7 \pm 0.006 9	0.752 7 \pm 0.010 5	1.463 9 \pm 0.005 7
3	同仁堂	8032857	水蜜丸	0.584 5 \pm 0.012 3	0.624 4 \pm 0.005 8	0.814 1 \pm 0.009 2	1.416 1 \pm 0.018 6
4	九芝堂	070904	水蜜丸	0.513 3 \pm 0.003 8	1.121 5 \pm 0.004 3	0.194 1 \pm 0.007 4	1.197 5 \pm 0.009 9
5	九芝堂	070313	水蜜丸	0.483 2 \pm 0.014 1	1.060 9 \pm 0.014 9	0.302 1 \pm 0.012 4	1.024 3 \pm 0.005 2
6	同仁堂	7071016	浓缩丸	1.624 5 \pm 0.008 8	1.542 0 \pm 0.013 6	0.650 2 \pm 0.005 7	0.366 8 \pm 0.011 8
7	同仁堂	8070635	浓缩丸	1.521 9 \pm 0.009 6	1.510 1 \pm 0.014 5	0.813 6 \pm 0.017 6	1.623 9 \pm 0.018 2
8	仲景	0808608	浓缩丸	1.451 9 \pm 0.016 2	1.224 4 \pm 0.019 6	0.682 7 \pm 0.010 9	2.169 0 \pm 0.013 7
9	仲景	0812104	浓缩丸	1.452 1 \pm 0.011 3	1.426 0 \pm 0.015 7	0.689 3 \pm 0.007 6	1.553 5 \pm 0.015 7
10	佛慈	2007155	浓缩丸	1.388 8 \pm 0.029 2	1.849 8 \pm 0.012 1	0.522 4 \pm 0.011 2	0.629 0 \pm 0.014 6
11	佛慈	2008184	浓缩丸	1.163 5 \pm 0.008 8	1.832 7 \pm 0.016 1	0.907 7 \pm 0.008 1	1.771 7 \pm 0.010 1
12	佛慈	2008236	浓缩丸	0.815 4 \pm 0.014 7	1.772 0 \pm 0.026 4	0.431 5 \pm 0.013 7	1.972 4 \pm 0.023 1
13	康缘	080909	软胶囊	1.315 1 \pm 0.014 5	2.497 7 \pm 0.036 2	0.480 9 \pm 0.011 8	2.550 0 \pm 0.037 2
14	同仁堂	8173902	软胶囊	1.296 4 \pm 0.004 3	1.694 4 \pm 0.007 3	0.865 5 \pm 0.003 7	3.837 5 \pm 0.028 8

3 结果与讨论

3.1 检测波长的选择 利用二极管阵列检测器在线采集4个成分200~400 nm的紫外光谱, 4个成分的最佳检测波长分别为: 没食子酸265 nm, 马钱苷240 nm, 芍药苷235 nm, 丹皮酚270 nm, 综合考虑在240 nm处每种物质都有较好的吸收, 并且基线平稳, 响应值也较高, 故选择240 nm作为检测波长。

3.2 不同剂型之间的质量差异 本法测定了三种常见的剂型, 即蜜丸(含水蜜丸和大蜜丸)、浓缩丸和软胶囊剂, 蜜丸和浓缩丸, 是目前市场上的主流剂型, 能够相对准确地反映目前六味地黄丸的质量状况。含量测定的结果表明, 以每g含量计算, 浓缩丸和软胶囊相对含量较高, 且4个成分含量差异不大, 推测其主要原因三种剂型均是浓缩后入药, 主要的浓缩工艺差异小, 通常是各味药材分别提取后混合

入药, 故含量高于蜜丸和滴丸等剂型。

3.3 减慢丹皮酚在贮存期内的含量下降是制剂稳定性研究的关键 丹皮酚作为六味地黄丸中一个重要的化学指标成分, 具有保护心血管、抗肿瘤和抗菌消炎作用^[5-8]。含量测定的结果表明, 各个厂家或剂型的样品中丹皮酚的含量随贮存期的上升而急速下降, 而且产品均在有效期以内, 这可能将显著影响其在人体内的药效, 提示目前的六味地黄丸应加强制剂稳定性研究, 实现制剂质量的稳定性。

【参考文献】

- [1] 中国药典2010版. 一部[S]. 2010: 597.
- [2] 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.
- [3] 曹小勇, 江海, 秦公伟. 三个不同厂家浓缩六味地黄丸中

- 丹皮酚含量分析[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2189.
- [4] 段 彬, 魏玉辉. HPLC法同时测定六味地黄丸中3种成分含量[J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(11): 66.
- [5] 张 硕, 高海青, 张岫美. 丹皮酚抑制大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤脑组织细胞间黏附分子-1和血管细胞黏附分子-1的表达[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(1): 5.
- [6] 冯巧巧, 周 勇, 张岫美, 等. 丹皮酚对麻醉犬冠脉结扎致心肌梗死的保护作用[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(5): 320.
- [7] 孙国平, 沈玉仙, 张玲玲, 等. 丹皮酚对 HepA 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(2): 160.
- [8] 刘春云, 武延章, 周大喜. 丹皮酚抗菌作用的研究[J]. 生物学杂志, 2000, 17(3): 23.
- [收稿日期] 2013-05-27
[修回日期] 2013-06-13

(上接第 292 页)

表 4 替硝唑螺内酯乳膏长期试验结果 [(25 ± 2) °C、RH(60 ± 10) %]

批号	时间(月)	性状	均匀性	分层现象	含量(%)		微生物限度
					替硝唑	螺内酯	
110328	0	类白色	符合规定	符合规定	100.2	100.8	符合规定
	3	类白色	符合规定	符合规定	99.0	100.1	符合规定
	6	类白色	符合规定	符合规定	97.6	99.2	符合规定
	9	类白色	符合规定	符合规定	96.1	98.5	符合规定
	12	类白色	符合规定	符合规定	94.9	97.3	符合规定
110329	0	类白色	符合规定	符合规定	102.7	104.2	符合规定
	3	类白色	符合规定	符合规定	101.4	103.3	符合规定
	6	类白色	符合规定	符合规定	100.0	102.1	符合规定
	9	类白色	符合规定	符合规定	98.6	101.3	符合规定
	12	类白色	符合规定	符合规定	97.1	100.2	符合规定
110330	0	类白色	符合规定	符合规定	102.4	101.2	符合规定
	3	类白色	符合规定	符合规定	101.2	100.5	符合规定
	6	类白色	符合规定	符合规定	99.8	99.5	符合规定
	9	类白色	符合规定	符合规定	98.7	98.6	符合规定
	12	类白色	符合规定	符合规定	97.5	97.5	符合规定

因处方中替硝唑和螺内酯的含量比为 20 : 3, 而替硝唑在 238 nm 波长处的吸收也较强, 故选择了 238 nm 作为检测波长。在选择流动相时, 考察甲醇-水 (70 : 30) 为流动相, 结果替硝唑出峰时间太快且与杂质峰不能较好分离。以 0.02 mol/L 磷酸氢二铵-乙腈 (45 : 55) 为流动相, 结果出峰时间较快, 替硝唑峰、螺内酯峰的对称性不佳。而选用 0.05 mol/L 磷酸二氢钾 (用磷酸调 pH 至 3.5)-乙腈 (50 : 50)、乙腈-水 (50 : 50) 为流动相比较, 所得的峰形基本相同, 替硝唑峰、螺内酯峰与其他峰均能较好分离。最终选择乙腈-水 (50 : 50) 为流动相及溶剂, 替硝唑峰、螺内酯峰与其他峰分离度大于 3.0, 且不拖尾, 保留时间恒定, 既减少了系统干扰, 又降低了对色谱柱的损害。

稳定性试验表明, 不同放置温度, 该乳膏的性状、均匀性、分层现象、微生物限度均无明显变化, 替硝唑和螺内酯的含量均随时间延长逐渐下降, 从表 3 可以看出, 经过加速试验, 6 个月替硝唑下降了 4.37%, 螺内酯下降了 3.10%; 从表 4 可以看出, 经过长期试验, 12 个月替硝唑下降了 5.27%, 螺内酯

下降了 3.73%, 替硝唑和螺内酯含量变化均在标准规定的范围内, 考虑温度可能是影响替硝唑螺内酯乳膏稳定性的主要因素之一, 故可将该乳膏剂的有效期定为 12 个月。该乳膏中替硝唑的降解产物 2-甲基-5-硝基咪唑和螺内酯的降解产物坎利酮量的变化有待进一步研究。

【参考文献】

- [1] 彭贤东, 唐志立, 龙凤, 等. 替硝唑螺内酯乳膏治疗寻常痤疮 62 例[J]. 中国药业, 2010, 19(17): 77.
- [2] 中国药典 2010 版. 二部[S]. 附录, 2010: 199.
- [3] 张雅雅, 何 标. 复方替硝唑霜的制备及含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(22): 1908.
- [4] 王菊荣, 王月军, 叶 勇, 等. HPLC 法测定复方药物微乳膏中螺内酯的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(12): 1883.
- [5] 李 超, 张 勉. HPLC 法测定螺内酯片的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(17): 1610.
- [6] 彭贤东, 唐志立, 龙凤, 等. 替硝唑螺内酯乳膏的制备及质量控制[J]. 中国药业, 2010, 19(5): 34.

[收稿日期] 2012-07-16

[修回日期] 2012-08-13