

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)08-0074-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.08.017



高效液相色谱法同时测定桂附地黄丸(浓缩丸)中5种成分含量*

孙迎春, 刘喜, 刘东风, 潘竹青

(安徽省安庆市食品药品检验中心, 安徽 安庆 246001)

摘要:目的 建立同时测定桂附地黄丸(浓缩丸)中5种成分含量的方法。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法测定样品含量。色谱柱为 Welch Ultimate XB - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 - 0.1% 磷酸水溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 236 nm(莫诺昔、马钱昔、芍药昔)、290 nm(桂皮醛、丹皮酚), 进样量为 10 μL, 柱温为 35 °C。并对样品含量进行聚类分析。结果 桂皮醛、丹皮酚、芍药昔、莫诺昔、马钱昔质量浓度分别在 0.49~24.44 μg/mL ($r = 0.9997$)、11.11~555.44 μg/mL ($r = 0.9999$)、4.53~226.51 μg/mL ($r = 0.9997$)、6.99~349.52 μg/mL ($r = 0.9999$)、6.34~317.04 μg/mL ($r = 0.9996$) 范围内与峰面积线性关系良好($n = 6$), 定量限分别为 0.17, 0.39, 0.51, 1.10, 0.58 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2%; 平均加样回收率为 96.69%, 98.19%, 99.37%, 97.50%, 98.09%, RSD 分别为 1.53%, 0.74%, 1.99%, 2.11%, 1.75% ($n = 6$)。21 批次样品聚类分为 6 类。结论 该方法操作简便、结果准确, 符合测定要求, 可用于同时测定桂附地黄丸(浓缩丸)中 5 种成分含量。

关键词: 桂附地黄丸(浓缩丸); 高效液相色谱法; 聚类分析; 含量测定

Determination of Five Components in Guifu Dihuang Pills (Concentrated Pills) by High - Performance Liquid Chromatography

SUN Yingchun, LIU Xi, LIU Dongfeng, PAN Zhuqing

(Food and Drug Inspection Center of Anqing, Anqing, Anhui, China 246001)

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of five components in Guifu Dihuang Pills (concentrated pills). **Methods** The sample content was determined by high - performance liquid chromatography (HPLC). The column was Welch Ultimate XB - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.1% phosphoric acid aqueous solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 236 nm (morroneiside, loganin, paeoniflorin) and 290 nm (cinnamaldehyde, paeonol), the injection volume was 10 μL, and the column temperature was 35 °C. The samples were analyzed by cluster analysis. **Results** Cinnamaldehyde, paeonol, paeoniflorin, morroneiside, and loganin showed good linear relationships with peak areas within the ranges of 0.49 - 24.44 μg/mL ($r = 0.9997$), 11.11 - 555.44 μg/mL ($r = 0.9999$), 4.53 - 226.51 μg/mL ($r = 0.9997$), 6.99 - 349.52 μg/mL ($r = 0.9999$), and 6.34 - 317.04 μg/mL ($r = 0.9996$) ($n = 6$), respectively. The limits of quantification were 0.17, 0.39, 0.51, 1.10, and 0.58 μg/mL, respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability tests were all less than 2%. The average recoveries were 96.69%, 98.19%, 99.37%, 97.50%, and 98.09%, and the RSD were 1.53%, 0.74%, 1.99%, 2.11%, and 1.75% ($n = 6$), respectively. Cluster analysis classified the 21 batches of samples into six categories. **Conclusion** This method is simple, accurate, and can meet the requirements for simultaneous determination of the five components in Guifu Dihuang Pills (concentrated pills).

Key words: Guifu Dihuang Pills (concentrated pills); HPLC; cluster analysis; content determination

桂附地黄丸(浓缩丸)由附子(制)、肉桂、熟地黄、山茱萸(制)、山药、牡丹皮、泽泻、茯苓 8 味药材组方, 有温补肾阳功效, 主要用于肾阳不足引起的腰膝酸冷、肢冷尿频等症状的治疗。桂附地黄丸即“金匱肾气”方, 出自东汉张仲景《金匱要略》, 因疗效显著, 被历代医家称为“补肾第一方”^[1]。研究表明, 桂附地黄丸对肾虚阳衰引起的慢性肾小球肾炎、慢性气管炎、骨质疏松、糖尿病、慢性尿路感染、不孕症、老年性尿失禁等疾病有治疗和改善作用^[2-7]。目前, 桂附地黄制剂生产厂家众多, 剂型包括蜜丸、浓缩丸、胶囊、颗粒剂、片剂、口服液等, 其中浓

缩丸销量较高。桂附地黄丸(浓缩丸)收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·中药成方制剂(第八册)》。现行标准^[8]含量测定项, 取样品 5 丸测定, 未注明是否粉碎。受药材来源、生产工艺等影响, 待测成分丹皮酚含量, 吸光度难以控制在 0.3~0.7 之间, 影响检测结果的准确性^[9-10]; 同时, 中药复方制剂成分复杂, 其疗效常是多种成分共同作用的结果^[11-12], 该标准仅规定了丹皮酚的含量测定, 无法全面反映药品质量。为此, 本研究中建立了高效液相色谱(HPLC)法同时测定肉桂活性成分桂皮醛^[13-14], 牡丹皮活性成分丹皮酚、芍药昔^[15-17], 山茱萸

* 基金项目: 安徽省药品监督管理局科技创新项目[AHYJ-KJ-202321]。

第一作者: 孙迎春, 女, 大学本科, 副主任中药师, 研究方向为中药检验及质量控制, (电子信箱)xuanqi2009@126.com。

活性成分马钱苷、莫诺苷^[18-20]的含量,并对21批次样品检测结果进行聚类分析,以期对桂附地黄丸(浓缩丸)质量控制提供依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UltiMate3000型高效液相色谱仪,包括DAD-3000型检测器,自动进样器,Chromeleon 7工作站(赛默飞世尔科技有限公司);XPE105型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,精度为0.01 mg);HH-6型数显恒温水浴锅(常州普天仪器制造有限公司);Direct-Q3型纯水机(德国Millipore公司)。

1.2 试剂

桂皮醛对照品(批号为110710-202022,含量为99.5%),丹皮酚对照品(批号为110708-201407,含量为99.9%),芍药苷对照品(批号为110736-202044,含量为96.8%),莫诺苷对照品(批号为111998-202205,含量为98.4%),马钱苷对照品(批号为111640-201707,含量为99.2%),均购于中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,磷酸、甲醇均为分析纯,水为一级超纯水;21批桂附地黄丸(浓缩丸)样品信息见表1。

表1 样品信息

Tab. 1 Information of the samples

编号	厂家	批号	编号	厂家	批号	编号	厂家	批号
S1	A	230520	S8	B	2301301	S15	E	202211196
S2	A	230623	S9	B	2303312	S16	E	202303084
S3	A	220519	S10	C	22016	S17	F	23050102
S4	A	201122	S11	C	22012	S18	F	210108
S5	A	230732	S12	D	2202030	S19	F	220704
S6	A	230625	S13	D	2307035	S20	F	22110402
S7	B	2102191	S14	E	202204038	S21	F	221106

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Welch Ultimate XB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~7 min时6%A→12%A,7~19 min时12%A,19~38 min时12%A→23%A,38~50 min时23%A→70%A,50~55 min时70%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:236 nm(芍药苷、莫诺苷、马钱苷)、290 nm(桂皮醛、丹皮酚);柱温:35℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

称取各对照品,精密称定,加50%甲醇制成每1 mL含桂皮醛0.048 87 mg、丹皮酚1.110 8 mg、芍药苷0.453 0 mg、马钱苷0.634 1 mg、莫诺苷0.699 0 mg的混合对照品贮备液;精密量取2 mL,置25 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,即得混合对照品溶液,4℃避光保存,备用。

取样品适量,研磨成细粉,取约2.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇50 mL,密塞,称定质量,加热回流1 h,放冷,再次称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按桂附地黄丸(浓缩丸)的处方和制备工艺,分别制备缺山茱萸、牡丹皮、肉桂的单一阴性样品,按上述供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各10 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果阴性对照品溶液色谱与混合对照品溶液色谱相应保留时间处均无色谱峰,表明专属性良好。详见图1。

线性关系与考察:精密量取2.2项下混合对照品贮备液0.5,1.0,3.0,5.0,10.0,25.0 mL,分别置50 mL容量瓶中,加50%甲醇稀释,制成系列混合对照品溶液。以待测成分质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程及线性范围。详见表2。

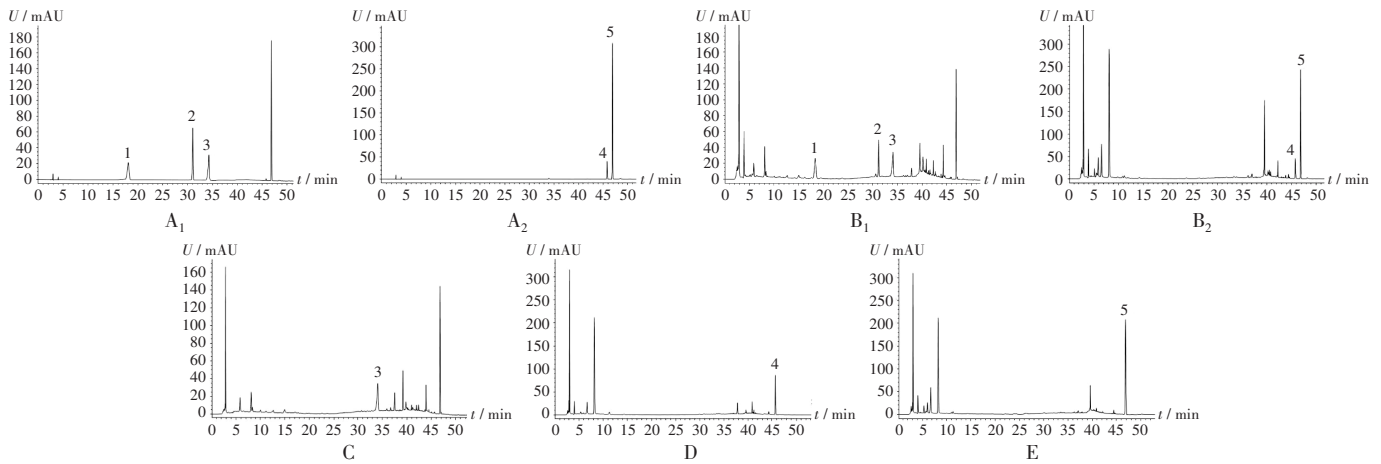
定量限考察:取2.2项下混合对照品溶液适量,逐级稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比约为10的质量浓度记作定量限。详见表2。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液10 μL,按2.1项下色谱条件连续进样6次,记录峰面积。结果桂皮醛、丹皮酚、芍药苷、莫诺苷、马钱苷峰面积的RSD分别为0.37%,0.33%,0.19%,0.44%,0.51%(n=6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(编号S4)适量,于室温放置0,6,12,18,24,36 h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果桂皮醛、丹皮酚、芍药苷、莫诺苷、马钱苷峰面积的RSD分别为1.21%,0.94%,1.17%,0.89%,1.03%(n=6),表明供试品溶液室温放置36 h内基本稳定。

重复性试验:平行称取同一批样品(编号S4)6份,各2.0 g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各成分含量。结果桂皮醛、丹皮酚、芍药苷、莫诺苷、马钱苷的平均含量分别为0.096 8,2.046 9,0.914 7,1.402 3,1.308 2 mg/g, RSD分别为1.08%,0.66%,0.81%,1.04%,0.57%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收率试验:取已知含量的样品(编号S4)粉末1.0 g各6份,置具塞锥形瓶中,精密加入2.2项下对照品贮备液2 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表3。



1. 莫诺昔 2. 马钱昔 3. 芍药昔 4. 桂皮醛 5. 丹皮酚

A₁, A₂. 混合对照品溶液(236, 290 nm) B₁, B₂. 供试品溶液(236, 290 nm) C. 缺山茱萸的阴性对照品溶液(236 nm) D. 缺牡丹皮的阴性对照品溶液(290 nm) E. 缺肉桂的阴性对照品溶液(290 nm)

图1 高效液相色谱图

1. Morroniside 2. Loganin 3. Paeoniflorin 4. Cinnamaldehyde 5. Paeonol

A₁, A₂. Mixed reference solution (236, 290 nm) B₁, B₂. Test solution (236, 290 nm) C. Negative reference solution without corni fructus (236 nm) D. Negative reference solution without corni fructus (290 nm) E. Negative reference solution without moutan cortex (290 nm)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表2 线性关系及定量限考察结果(n=6)

Tab. 2 Results of the linear relation test and limit of quantitation (n=6)

待测成分	回归方程	r	线性范围(μg/mL)	定量限(μg/mL)
桂皮醛	$Y_1 = 1.0736X_1 + 0.0184$	0.9997	0.49~24.44	0.17
丹皮酚	$Y_2 = 0.2874X_2 + 1.1617$	0.9999	11.11~555.44	0.39
芍药昔	$Y_3 = 0.2209X_3 - 0.3633$	0.9997	4.53~226.51	0.51
莫诺昔	$Y_4 = 0.1546X_4 + 0.2354$	0.9999	6.99~349.52	1.10
马钱昔	$Y_5 = 0.2067X_5 + 0.6710$	0.9996	6.34~317.04	0.58

2.4 样品含量测定

取各批次样品适量,按2.2项下方法制备供试品溶

液,按2.1项下色谱条件平行进样测定3次,记录峰面积并计算含量。结果见表4。

2.5 聚类分析

使用SPSS 21.0统计学软件分析,采用组间联接法,以平方欧式距离为测度,对21批样品进行聚类分析。结果显示,当平方欧式距离为5时,21批样品共聚为6类,编号S10-S11的样品(C厂)和S15-S16的样品(E厂)聚为第一类;虽然S18样品(F厂家)总含量与第一类样品接近,但桂皮醛含量差异显著,聚为第二类;S12、S13样品(D厂)聚为第三类,S7-S9样品(B厂)聚

表3 加样回收试验结果(n=6)

Tab. 3 Results of the recovery test (n=6)

待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	加样回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)	待测成分	取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	加样回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
桂皮醛	1.0073	0.0975	0.0982	0.1941	98.37	96.69	1.53	莫诺昔	1.0011	0.9157	0.9060	1.8474	102.84	97.50	2.11
	1.0041	0.0972	0.0982	0.1916	96.13				1.0037	0.9181	0.9060	1.8056	97.96		
	1.0074	0.0975	0.0982	0.1932	97.45				1.0026	0.9171	0.9060	1.8195	99.60		
	1.0011	0.0969	0.0982	0.1919	96.74				1.0073	1.4125	1.4208	2.7857	96.65		
	1.0037	0.0972	0.0982	0.1896	94.09				1.0041	1.4080	1.4208	2.8107	98.73		
	1.0026	0.0971	0.0982	0.1927	97.35				1.0074	1.4127	1.4208	2.7699	95.52		
丹皮酚	1.0073	2.2826	2.2240	4.4827	98.93	98.19	0.74	马钱昔	1.0011	1.4038	1.4208	2.8338	100.65		
	1.0041	2.2754	2.2240	4.4589	98.18				1.0037	1.4075	1.4208	2.7616	95.31		
	1.0074	2.2829	2.2240	4.4383	96.92				1.0026	1.4059	1.4208	2.8001	98.13		
	1.0011	2.2686	2.2240	4.4654	98.78				1.0073	1.3178	1.2784	2.5677	97.77		
	1.0037	2.2745	2.2240	4.4639	98.44				1.0041	1.3136	1.2784	2.5712	98.38		
	1.0026	2.2720	2.2240	4.4492	97.90				1.0074	1.3179	1.2784	2.6043	100.63		
芍药昔	1.0073	0.9214	0.9060	1.8271	99.97	99.37	1.99	1.0011	1.3096	1.2784	2.5498	97.01			
	1.0041	0.9185	0.9060	1.8122	98.64			1.0037	1.3130	1.2784	2.5359	95.65			
	1.0074	0.9215	0.9060	1.8025	97.24			1.0026	1.3116	1.2784	2.5784	99.09			

表4 样品含量测定结果 (mg/g, n=3)

Tab. 3 Results of content determination of samples (mg/g, n=3)

编号	桂皮醛	丹皮酚	芍药苷	莫诺苷	马钱苷
S1	0.022 8	2.195 1	0.892 0	0.964 9	1.004 0
S2	0.021 6	1.942 8	0.849 4	0.840 1	0.781 3
S3	0.107 2	2.208 4	0.971 6	1.479 5	1.195 7
S4	0.096 8	2.266 1	0.914 7	1.402 3	1.308 2
S5	0.016 2	2.046 9	0.803 3	1.068 5	1.116 0
S6	0.021 3	2.008 6	0.874 6	0.935 1	0.927 6
S7	0.039 5	1.307 0	0.597 4	0.645 1	0.653 9
S8	0.094 9	1.690 9	0.845 3	0.941 8	0.633 2
S9	0.121 4	1.549 0	0.690 8	0.936 4	0.628 8
S10	0.143 5	2.850 5	1.167 5	1.971 5	1.402 6
S11	0.150 1	2.841 3	1.159 2	1.948 2	1.287 7
S12	0.135 6	3.513 8	1.619 3	2.301 1	1.396 6
S13	0.138 8	3.297 4	1.594 7	2.234 5	1.333 9
S14	0.020 9	2.410 8	0.704 2	1.333 7	1.203 7
S15	0.022 3	2.832 7	0.893 9	1.685 5	1.372 4
S16	0.052 5	2.972 1	1.037 8	2.032 1	1.485 9
S17	0.555 5	1.957 1	0.926 1	1.730 9	1.501 2
S18	0.521 9	2.521 3	1.439 5	1.496 6	1.278 7
S19	0.494 0	1.918 5	0.937 2	1.217 1	1.452 8
S20	0.344 6	1.646 0	0.872 2	1.374 7	1.578 7
S21	0.367 2	1.677 5	0.778 6	1.322 3	1.490 0

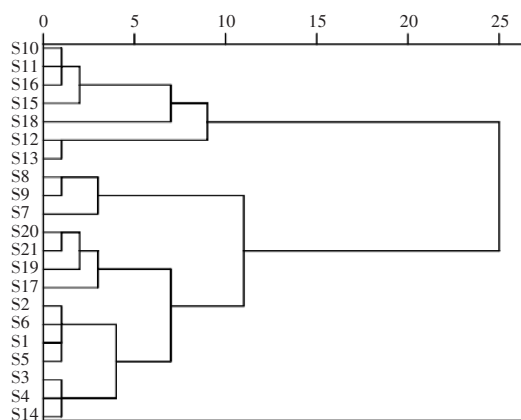


图2 21批样品聚类分析树状图

Fig. 2 Cluster analysis tree diagram of 21 batches of samples
为第四类; S17、S19 - S21 样品(F厂)聚为第五类; S1 - S6 样品(A厂)、S14 样品(E厂)聚为第六类。聚类分析结果表明, 同一厂家生产的样品中的5个成分相似度较高(S14、S18除外)。详见图2。

3 讨论

3.1 检测波长选择

采用二极管阵列检测器在190~400 nm波长范围内对样品中5种成分进行光谱扫描, 发现芍药苷在232 nm, 马钱苷在236 nm, 莫诺苷在240 nm, 桂皮醛在290 nm, 丹皮酚在274 nm波长处有最大吸收。参考文献

[21], 采用240 nm作为检测波长, 各样品中桂皮醛峰面积较小, 响应值难达到理想结果。为了检测方便并有效反映各成分含量, 选择236 nm和290 nm作为测定波长, 并比较在最大吸收波长和该测定波长下的峰形和含量差异。结果表明, 各成分峰形、分离度、含量结果均无显著差异。因此, 本研究中选择芍药苷、马钱苷、莫诺苷的检测波长为236 nm, 桂皮醛和丹皮酚的检测波长为290 nm。

3.2 提取溶剂与方法考察

考察不同体积分数的甲醇(25%, 50%, 70%, 100%)和乙醇(25%, 50%, 70%, 100%)作为提取溶剂, 经比较发现, 50%甲醇和70%甲醇提取时各成分含量接近, 均高于其他溶剂, 且杂质干扰少。考虑前者较后者更环保, 本研究中选择50%甲醇为提取溶剂。对比浸泡过夜、回流、超声提取, 结果显示浸泡过夜提取率低、耗时长, 回流提取桂皮醛、马钱苷和莫诺苷提取率高于超声提取, 丹皮酚、芍药苷无显著差异。考察提取时间30, 45, 60, 90 min, 发现60 min和90 min提取率最高。最终确定, 采用50%甲醇加热回流60 min作为样品的提取方法。

3.3 方法评价

本研究中建立的HPLC法专属性好, 适用性强, 操作简便, 准确高效, 可同时测定桂附地黄丸(浓缩丸)中5种成分的含量。聚类分析结果表明, 不同厂家样品各成分差异较大, 且即使是同一厂家, 不同批次间也存在差异, 其中以桂皮醛差异最显著。分析原因可能与制剂原料的种质、采收加工及工艺过程等有关^[22-23]。建议完善企业内部质量控制方法, 同时系统整体地提高制剂质量标准, 确保产品质量, 从而使疗效更稳定, 用药更安全。

参考文献

- [1] 沈元良. 桂附地黄丸及其衍变方考释[J]. 实用中医内科杂志, 2008, 22(5): 7.
- [2] 经媛. 桂附地黄丸干预阳虚体质的临床疗效和肠道菌群及尿液代谢组学研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2021.
- [3] 宋建平, 谢忠礼, 杨美凤, 等. 桂附地黄丸对大鼠肺纤维化形成阶段肺与脑组织中去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(9): 973-975.
- [4] 胡博, 刘妍慧, 张兆鹏. 桂附地黄丸抗去卵巢小鼠骨质疏松[J]. 中国老年学志, 2022, 42(12): 3002-3006.
- [5] 陈际连, 徐经世. 徐经世治疗糖尿病经验[J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(3): 40-41.
- [6] 徐铭悦. 基于网络药理学探究桂附地黄丸治疗慢性肾病大鼠的作用[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2022.
- [7] 杨起茅, 杨志新, 程雯. 桂附地黄丸联合氯沙坦钾治疗阳虚血瘀型Ⅲ期糖尿病肾病患者的临床效果观察[J]. 世界临床药物, 2022, 43(3): 264-270.
- [8] WS₃-B-1600-93, 卫生部药品标准·中药成方制剂(第八册)[S].
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 173.
- [10] 陈文芳. 关于桂附地黄丸(浓缩丸)含量测定方法的商榷[J].