

基于高效液相色谱结合化学计量学方法评价 六味地黄浓缩丸质量一致性*

劳永真^{1,2}, 章军¹, 刘艳萍¹, 赵桢熠¹, 郭丛¹, 徐凌川², 刘安^{1**}, 刘艳^{1**}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 山东中医药大学, 济南 250355)

摘要 目的: 建立质量一致性评价方法评价不同厂家间六味地黄浓缩丸质量一致性。方法: 首先采用高效液相色谱测定六味地黄浓缩丸中6个指标成分含量, 分析同厂家不同批次和不同厂家产品的含量差异; 其次构建质量一致性参数即批内含量一致性差异(P_A)、批间含量一致性差(P_B)和指纹图谱相似率(P_C), 以评估不同厂家产品质量均一性; 最后以一致性参数为变量, 运用主成分分析(PCA)对7个厂家的六味地黄浓缩丸样品的一致性进行拟合与区分。结果: 7个厂家的35批次六味地黄浓缩丸样品的6个指标成分含量总计为1.48~2.99 mg·丸⁻¹, 不同成分含量RSD为4.9%~29.7%, 7家产品的 P_A 为4.2%~15.1%, P_B 为26.4%~49.5%, P_C 为92.9%~98.2%, 不同厂家间样品含量均一性存在一定差异, 且产品的批次间含量差异值明显, P 为64.5~75.8, 表明不同厂家样品一致性差异较小, 但在一定条件下, 7个厂家样品可划分为三类, B、J为一类, Z、R为一类, X、F、S为一类。结论: 本研究提供了一种简单有效的方法用于评估和区分市售六味地黄浓缩丸产品的质量一致性, 可为六味地黄浓缩丸生产厂家的样品质量均一性评价提供参考。

关键词: 六味地黄浓缩丸; 质量一致性; 批内一致性差异; 批间一致性差异; 主成分分析; 质量分类

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)03-0532-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.03.19

Quality consistency of Liuwei Dihuang concentrated pills was evaluated by high performance liquid chromatography combined with stoichiometry*

LAO Yong-zhen^{1,2}, ZHANG Jun¹, LIU Yan-ping¹, ZHAO An-yi¹,
GUO Cong¹, XU Ling-chuan², LIU An^{1**}, LIU Yan^{1**}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Abstract Objective: To establish a quality consistency assessment method to evaluate the consistency of product quality of Liuwei Dihuang concentrated pills (LDCP) among different manufacturers. **Methods:** Firstly, high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the content of the six index components in LDCP, and analyze the content differences between different batches of the same manufacturer and the current product quality of different manufacturers. Secondly, quality consistency parameters, *i. e.*, intra-batch content

* 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A04405)

** 通信作者 刘艳 Tel:15210954615; E-mail: yliu1980@icmm.ac.cn

刘安 Tel:(010)64089808; E-mail: aliu@icmm.ac.cn

第一作者 Tel:17862987282; E-mail: yongzhenLL@163.com

consistency differences (P_A), inter-batch content consistency differences (P_B), and fingerprint similarity (P_C), were constructed to assess the consistency of product quality among the different manufacturers. And lastly, the consistency parameters were taken as the variables and subjected to the principal component analysis (PCA) to classify the consistency of the LDCC samples of the seven manufacturers to be fitted and differentiated.

Results: The contents of the six index components in thirty-five batches of LDCC samples from seven manufacturers totaled 1.48–2.99 mg per pill, the RSDs of the contents of different components were 4.9%–29.7%, and the consistency parameters of the seven products were 4.2%–15.1% for P_A , 26.4%–49.5% for P_B , and 92.9%–98.2% for P_C . There were some differences in the homogeneity of contents in samples from different manufacturers, and the contents of the product varied significantly between batches, with P value of 64.5–75.8, indicating that the difference in the consistency of samples from different manufacturers was relatively small. But under certain conditions, the seven manufacturers can be classified into three categories, with B and J as a category, Z and R as a category, and X, F, and S as a category. **Conclusion:** This study provides a simple and effective method for monitoring and distinguishing the quality consistency of commercially available LDCC products, and the experimental results can provide a reference for the sample quality homogeneity of LDCC manufacturers.

Keywords: Liuwei Dihuang concentrated pills; quality consistency; intra-batch consistency differences; inter-batch consistency differences; principal component analysis; quality classification

六味地黄丸是常用滋阴补肾类中成药,由熟地黄、酒萸肉、山药、茯苓、泽泻、牡丹皮六味中药组成,处方中熟地黄为君药,酒萸肉、山药均为具有补益作用的臣药,泽泻、牡丹皮、茯苓均为具有泻下作用的佐药,三补三泻六味合用达到滋阴补肾作用。六味地黄浓缩丸(Liuwei Dihuang concentrated pills, LDCC)具有携带和服用方便等特点,是目前市场上同系列产品中销售额最大的主流品种。

目前,对 LDCC 的质量差异研究有很多,如詹国平等^[1]按照 2015 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)规定项对不同厂家的产品质量进行分析,发现不同厂家样品均已达到国家标准所规定的基本要求,但丹皮酚、马钱苷含量上存在明显差异;夏昀卿等^[2]将指纹图谱技术和“组分结构”理论联合使用模式对 LDCC 的质量进行控制与评价,发现不同厂家生产的各批次样品指纹图谱相似度、牡丹皮组分结构的构成要素的含量以及量比关系差别较大;冯霞霞等^[3]对 LDCC 中马钱苷、莫诺苷和丹皮酚含量检测,对比不同厂家之间的样本间存在明显差异;张小博^[4]按照 2010 年版《中华人民共和国药典》的质量标准对市售 LDCC 样品常规检查及测定含量考察其质量,发现 7 个厂家共 25 批样品的水分、溶散时限及含量均符合规定,但不同批次间的含量数值有较大波动、不同厂家间溶散时限差异较大;封亮^[5]通过

HPLC 色谱法对药材与成品制剂比较,发现不同厂家成品之间存在一定质量差异, Ji 等^[6]建立 LDCC 的指纹图谱,结合化学计量学分析,发现多数厂家样品之间一致性较差, Bo 等^[7]建立五波长全融合指纹图谱和多组分定量相结合的方法将 22 批次 LDCC 质量一致性进行评价,这些研究方法对监控 LDCC 质量控制具有重要参考意义。然而,以往研究在样本收集时随机性较大,缺乏对同厂家产品的批次和批次间样品质量的细致考察,评价结果仅能给出品种质量差异大小的宏观概念^[8],无法追溯厂家内部与厂家之间产品质量一致性的影响因素。

本研究建立了一种操作简便的对 LDCC 中 6 个指标成分定性定量的 HPLC 检测方法,在样本选择方面将成药质量与生产过程相关联,收集确定数量的各自厂家的相同批号($n_1 = 5$)、不同批号($n_2 = 5$)的样品,从批内一致性(P_A)、批间一致性(P_B)、指纹图谱相似率(P_C)3 个维度评估 7 个厂家 35 批次 LDCC 的质量一致性,揭示不同厂家产品质量差异,同时采用主成分分析方法对不同生产厂家样品进行质量一致性分类区分,实验结果为规范和促进该产品质量提升提供数据参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ME204T/02 型万分之一天平(梅特勒-托利多

仪器有限公司); XSR105/A 型十万分之一天平(梅特勒-托利多公司); 1260 型高效液相色谱仪(Agilent 公司, 包括 G1311B 型四元梯度泵, G1329B 型自动进样器, G1316A 型柱温箱, G4212A 型二极管阵列检测器); KQ-250DB 超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

纯净水(广州屈臣氏食品饮料有限公司); 色谱级乙腈(上海星可高纯溶剂有限公司); 色谱级磷酸(北京迈瑞达科技有限公司); 分析级甲醇(天津富宇精细化工有限公司)。

1.3 试药

对照品没食子酸(BCY-000550, 纯度 $\geq 98\%$), 马钱苷(批号 BCY-000532, 纯度 $\geq 98\%$), 莫诺苷(批号 BCY-000536, 纯度 $\geq 98\%$), 芍药苷(批号 BCY-000094, 纯度 $\geq 98\%$), 丹皮酚(批号 BCY-000262, 纯度 $\geq 98\%$)均购于江西佰草源生物科技有限公司, 5-羟甲基糠醛(批号 PS020460, 纯度 $\geq 95\%$)购买于成都普思生物科技股份有限公司。LD-CP 分别来自 7 个不同生产厂家, 详细信息见表 1。

表 1 供试品厂家及批号信息

Tab. 1 Manufacturers and batch number

厂家编号 (No. of manufacturers)	批号 (batch number)
B	17073471*, 20073206, 20071827, 20071816, 20073109
J	202101120*, 202103032, 202101130, 202012018, 202101120
F	20A34*, 20031, 200782, 19F384, 19K536
S	2011121*, 2012126, 2101121, 2102051, 2103035
Z	180229*, 180427, 210125, 21010802, 201021
R	210203*, 210508, 210519, 210520, 210602
X	200705*, 201005, 201007, 201211, 210410

注(note): 同厂家带*批号样品收集数量为 n_1 ($n_1=5$); 不同厂家样品收集批号数量为 n_2 ($n_2=5$) [n_1 ($n_1=5$) mean the quantity of samples collected with * batch number from the same manufacturer; n_2 ($n_2=5$) mean the number of batch numbers collected by different manufacturers]

2 方法与结果

2.1 含量测定方法

2.1.1 对照品溶液制备 分别取没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚的对照品适量, 用 50% 甲醇溶解, 分别配制成每 1 mL 含 34.4、

94.8、27.2、41.4、8.1、44.2 μg 的混合对照品溶液, 备用。

2.1.2 供试品溶液制备 取本品数粒研成粉末, 精密称定约 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 mL, 称量, 超声(功率 250 W, 频率 40 kHz) 提取 20 min, 冷却至室温, 用 50% 甲醇补足减失的量, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.1.3 色谱条件 采用 Waters HSS T3 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.08% 磷酸(A) - 乙腈(B), 梯度洗脱(0 ~ 3 min, 95%A; 3 ~ 12 min, 95%A \rightarrow 90%A; 12 ~ 25 min, 90%A \rightarrow 78%A; 25 ~ 30 min, 78%A \rightarrow 72%A; 30 ~ 32 min, 72%A \rightarrow 50%A, 32 ~ 40 min, 50%A \rightarrow 15%A, 40 ~ 45 min, 15%A), 流速为 0.8 mL \cdot min⁻¹, 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 216、232、238、274、284 nm, 进样体积为 10 μL 。238 nm 检测波长下 HPLC 色谱图如图 1。

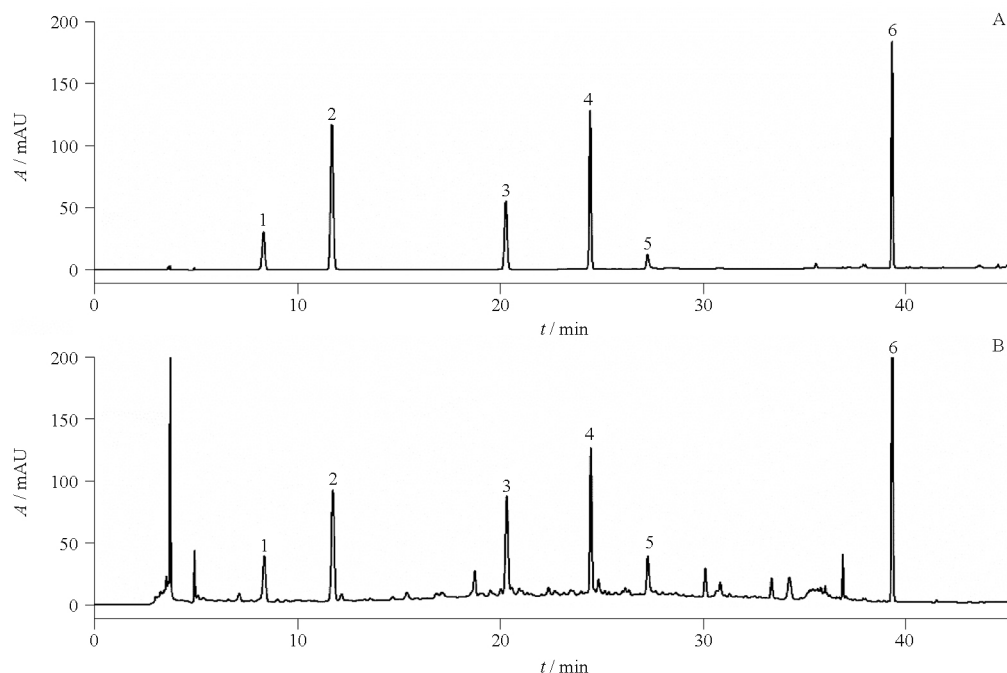
2.2 方法学验证

2.2.1 线性及范围 精密称取没食子酸 11.57 mg、5-羟甲基糠醛 15.62 mg、莫诺苷 11.34 mg、马钱苷 10.28 mg、芍药苷 13.03 mg、丹皮酚 16.17 mg 于 25 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇溶解并定容至刻度, 精密量取上述混合对照品溶液 1 mL, 分别稀释 1、2、4、8、16、32、64 倍, 滤过, 按“2.1.3”项下色谱条件分别进样测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 分别得到 5 个成分浓度与峰面积之间的线性回归方程, 且在相应范围内各成分的回归系数均不小于 0.999 1, 表明 5 个成分的校准曲线具有良好的线性相关性, 结果如表 2 所示。

2.2.2 精密度试验 取 200705 号样品, 按“2.1.2”项方法制备供试品溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件, 连续进样 6 次, 结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚峰面积的 RSD 分别为 0.10%、0.10%、0.10%、0.10%、1.9%、0.20%, 表明仪器精密度良好。

2.2.3 稳定性试验 选择 200705 样品的一供试品溶液分别在 0、2、4、8、12、24 h 时进样, 计算没食子酸等 6 个成分峰面积的 RSD, 结果没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚的 RSD 分别为 0.20%、1.3%、2.6%、2.4%、1.7%、0.10%, 表明该供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.2.4 重复性试验 取 200705 批号样品平行制备 6 份供试品, 按“2.1.3”项下色谱条件, 分别进样然后



1. 没食子酸 (gallic acid) 2. 5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural) 3. 莫诺昔 (morroneiside) 4. 马钱苷 (loganin) 5. 芍药苷 (paeoniflorin) 6. 丹皮酚 (paeonol)

图 1 混合对照品 (A) 和 LDCP (B) 高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference (A) and LDCP (B)

表 2 6 个成分线性关系及范围

Tab. 2 Linear relationships and ranges of six components

成分 (component)	线性方程 (linear equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/(mg · mL ⁻¹)
没食子酸 (gallic acid)	$Y = 105.48X + 124.6$	0.999 1	1.45 ~ 185.19
5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural)	$Y = 85.45X + 0.254 5$	0.999 8	12.37 ~ 197.89
莫诺昔 (morroneiside)	$Y = 19.01X + 13.531$	0.999 6	1.29 ~ 164.80
马钱苷 (loganin)	$Y = 19.40X + 21.039$	0.999 6	1.75 ~ 224.33
芍药苷 (paeoniflorin)	$Y = 15.57X - 1.439 7$	0.999 2	0.26 ~ 16.30
丹皮酚 (paeonol)	$Y = 59.72X + 112.74$	0.999 2	3.77 ~ 241.12

计算没食子酸等 6 个成分含量的 RSD, 结果显示没食子酸、5-羟甲基糠醛、莫诺昔、马钱苷、芍药苷、丹皮酚的 RSD 分别为 0.50%、0.90%、1.3%、1.6%、1.7%、1.2%, 结果表明该实验方法重复性良好。

2.2.5 准确性试验 精密称取没食子酸等 6 个成分的对照品适量, 制成每 1 mL 含没食子酸 399.2 μg、5-羟甲基糠醛 554.8 μg、莫诺昔 356.8 μg、马钱苷 444.8 μg、芍药苷 162.4 μg 和丹皮酚 495.2 μg 的混合溶液。精密称取已知含量的 200705 号样品 0.25 g, 按“2.1.2”项方法制备供试品共 6 份。按 1:1 分别精密加入混合对照品溶液, 按“2.1.3”项色谱条件

测定, 分别计算 6 个成分的加样回收率及 RSD, 6 个成分的回收率结果介于 99.4%~102.2% 之间, 结果见表 3。

2.3 指标成分定量结果

35 批次不同样品的 6 个指标成分总量范围为 1.48~2.99 mg · 丸⁻¹ (如表 4 所示), 其中莫诺昔和马钱苷总计在 0.37~1.18 mg · 丸⁻¹ (莫诺昔 0.14~0.71 mg · 丸⁻¹, 马钱苷 0.19~0.47 mg · 丸⁻¹), 丹皮酚含量 0.32~0.81 mg · 丸⁻¹, 没食子酸含量在 0.24~0.53 mg · 丸⁻¹, 5-羟甲基糠醛含量在 0.09~1.26 mg · 丸⁻¹, 芍药苷含量在 0.05~0.20 mg · 丸⁻¹。

表 3 6 个成分加样回收率结果
Tab.3 Results of recovery rate of six components

成分 (component)	取样量 (sampling quality)/ g	样品含量 (content)/ mg	测得量 (detected)/ mg	加入量 (added)/ mg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/ %	RSD/ %
没食子酸(gallic acid)	0.251	0.39	0.77	0.37	101.9	102.1	0.6
	0.251	0.39	0.77	0.37	102.2		
	0.251	0.39	0.77	0.37	102.9		
	0.251	0.39	0.77	0.37	102.1		
	0.250	0.39	0.77	0.37	102.1		
	0.250	0.39	0.77	0.37	101.1		
5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural)	0.254	1.09	2.30	1.22	99.2	100.1	1.1
	0.252	1.08	2.29	1.22	99.3		
	0.254	1.09	2.32	1.22	101.1		
	0.254	1.09	2.32	1.22	101.1		
	0.255	1.09	2.30	1.22	99.0		
	0.255	1.09	2.32	1.22	101.0		
莫诺昔(morroniside)	0.251	0.30	0.63	0.32	99.7	101.8	2.0
	0.251	0.30	0.64	0.32	103.4		
	0.251	0.30	0.63	0.32	99.7		
	0.251	0.30	0.63	0.32	101.5		
	0.250	0.30	0.64	0.32	104.6		
	0.250	0.30	0.63	0.32	102.2		
马钱昔(loganin)	0.251	0.48	0.95	0.45	103.9	101.9	1.1
	0.251	0.48	0.94	0.45	101.6		
	0.251	0.48	0.94	0.45	102.7		
	0.251	0.48	0.94	0.45	101.1		
	0.250	0.48	0.93	0.45	100.8		
	0.250	0.48	0.94	0.45	101.4		
芍药昔(paeoniflorin)	0.254	0.10	0.20	0.10	98.3	99.4	3.6
	0.252	0.10	0.21	0.10	103.5		
	0.254	0.10	0.21	0.10	102.4		
	0.254	0.10	0.20	0.10	100.9		
	0.255	0.10	0.20	0.10	93.7		
	0.255	0.10	0.20	0.10	97.8		
丹皮酚(paeonol)	0.254	0.48	1.02	0.52	102.9	102.2	1.4
	0.252	0.48	1.01	0.52	100.8		
	0.254	0.48	1.03	0.52	103.7		
	0.254	0.48	1.02	0.52	103.1		
	0.255	0.48	1.01	0.52	100.1		
	0.255	0.48	1.02	0.52	102.6		

按照 2020 年版《中国药典》^[10] 要求, LDCP 含莫诺昔和马钱昔的总量计, 每丸不得少于 0.37 mg、含丹皮

酚每丸不得少于 0.32 mg, 则所有样品均为合格产品。另外, 通过对比各厂家样品含量($\bar{x} \pm \text{RSD}$), 发

现各成分含量存在不均一性,7个厂家的莫诺昔与马钱苷和含量的RSD为6.8%~23.2%、丹皮酚RSD为6.0%~19.5%、没食子酸的RSD为7.2%~20.8%、芍药苷的RSD为8.7%~29.7%,5-羟甲基糠醛的RSD为4.9%~26.6%。

将来自相同厂家的5个不同批号样品的相同成分含量的均值代表该厂家该成分的含量($\bar{x} \pm \text{RSD}$)水平(结果如表4、图2所示),发现不同厂家间相同成分含量差异明显:5-羟甲基糠醛差异最大,Z厂家

平均含量最高($1.02 \text{ mg} \cdot \text{丸}^{-1}$),S厂家平均含量最低($0.12 \text{ mg} \cdot \text{丸}^{-1}$),2个厂家相差8倍有余;芍药苷含量差异次之,Z厂家($0.17 \text{ mg} \cdot \text{丸}^{-1}$)与X厂家($0.05 \text{ mg} \cdot \text{丸}^{-1}$)两者含量差4倍,莫诺昔与马钱苷和的含量最高的F厂家($1.06 \text{ mg} \cdot \text{丸}^{-1}$)与最低的R厂家($0.44 \text{ mg} \cdot \text{丸}^{-1}$)差2.4倍;丹皮酚平均含量差约2倍,没食子酸平均含量差异最小(S厂家 $0.48 \text{ mg} \cdot \text{丸}^{-1}$,R厂家 $0.31 \text{ mg} \cdot \text{丸}^{-1}$,极值含量差1.5倍)。由此也体现出质量一致性控制的必要性。

表4 35批次LDCP的6指标成分含量

Tab.4 Content of six index components in 35 batches of LDCP

厂家 (manufacturer)	批号 (batch number)	含量(content)/(mg·丸 ⁻¹)(mg per pill)					总计 (total)
		莫诺昔+马钱苷 (morroneide + loganin)	丹皮酚 (paeonol)	没食子酸 (gallic acid)	芍药苷 (paeoniflorin)	5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural)	
B	17073471	0.57	0.32	0.37	0.06	0.55	1.87
	20073206	0.55	0.37	0.42	0.15	0.80	2.29
	20071827	0.61	0.36	0.44	0.11	0.56	2.08
	20071816	0.56	0.36	0.40	0.10	0.51	1.93
	20073109	0.65	0.51	0.38	0.12	0.44	2.10
均值($\bar{x} \pm \text{RSD}$)(average value)		0.59 ± 6.9%	0.38 ± 19.5%	0.40 ± 7.2%	0.11 ± 28.1%	0.57 ± 23.7%	-
J	202101120	0.55	0.46	0.36	0.13	0.46	1.97
	202103032	0.56	0.47	0.36	0.14	0.66	2.18
	202101130	0.68	0.51	0.43	0.13	0.54	2.29
	202012018	0.38	0.37	0.24	0.10	0.40	1.48
	202101120	0.42	0.38	0.30	0.10	0.40	1.61
均值($\bar{x} \pm \text{RSD}$)(average value)		0.52 ± 23.2%	0.44 ± 14.2%	0.34 ± 20.8%	0.12 ± 16.1%	0.49 ± 22.0%	-
F	20A34	1.03	0.40	0.36	0.15	0.17	2.11
	20031	1.10	0.40	0.37	0.16	0.11	2.13
	200782	0.84	0.35	0.28	0.12	0.14	1.74
	19F384	1.18	0.35	0.38	0.14	0.09	2.14
	19K536	1.14	0.37	0.33	0.15	0.12	2.10
均值($\bar{x} \pm \text{RSD}$)(average value)		1.06 ± 12.9%	0.37 ± 6.0%	0.34 ± 11.3%	0.15 ± 9.6%	0.12 ± 25.2%	-
S	2011121	0.60	0.40	0.53	0.20	0.30	2.03
	2012126	0.67	0.48	0.46	0.15	0.31	2.06
	2101121	0.66	0.49	0.38	0.08	0.29	1.89
	2102051	0.66	0.43	0.48	0.16	0.32	2.07
	2103035	0.58	0.43	0.53	0.17	0.29	2.00
均值($\bar{x} \pm \text{RSD}$)(average value)		0.63 ± 6.8%	0.45 ± 8.1%	0.48 ± 13.5%	0.15 ± 29.7%	0.30 ± 4.9%	-
Z	180229	0.62	0.75	0.51	0.18	0.76	2.82
	180427	0.53	0.69	0.44	0.18	1.14	2.99
	210125	0.44	0.63	0.41	0.17	1.26	2.93
	21010802	0.48	0.70	0.41	0.14	1.26	2.99
	201021	0.71	0.81	0.51	0.17	0.70	2.91

表4(续)

厂家 (manufacturer)	批号 (batch number)	含量(content)/(mg·丸 ⁻¹)(mg per pill)					总计 (total)
		莫诺昔+马钱苷 (morrnisode + loganin)	丹皮酚 (paeonol)	没食子酸 (gallic acid)	芍药苷 (paeoniflorin)	5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural)	
均值($\bar{x} \pm RSD$)(average value)		0.56 ± 19.6%	0.72 ± 9.5%	0.46 ± 11.5%	0.17 ± 9.6%	1.02 ± 26.6%	-
R	210203	0.56	0.52	0.34	0.11	0.73	2.26
	210508	0.45	0.52	0.33	0.11	1.04	2.45
	210519	0.37	0.42	0.27	0.11	1.16	2.32
	210520	0.41	0.43	0.32	0.14	0.95	2.25
	210602	0.42	0.39	0.30	0.10	0.91	2.12
均值($\bar{x} \pm RSD$)(average value)		0.44 ± 16.9%	0.46 ± 13.3%	0.31 ± 8.6%	0.11 ± 14.5%	0.96 ± 16.6%	-
X	200705	0.73	0.45	0.30	0.05	0.44	1.98
	201005	0.78	0.46	0.35	0.05	0.54	2.17
	201007	0.78	0.51	0.38	0.05	0.48	2.20
	201211	0.78	0.48	0.39	0.05	0.54	2.24
	210410	0.54	0.50	0.26	0.05	0.49	1.84
均值($\bar{x} \pm RSD$)(average value)		0.72 ± 14.3%	0.48 ± 5.6%	0.34 ± 16.6%	0.05 ± 8.7%	0.50 ± 8.1%	-

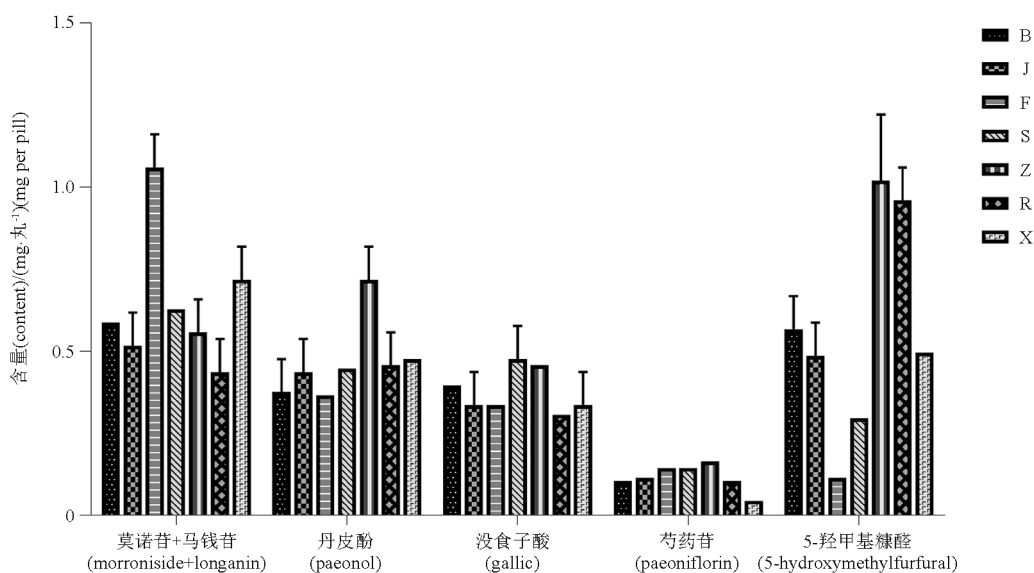


图2 7个不同厂家6个成分含量

Fig.2 Contents of six components in samples from seven different manufacturers

2.4 质量一致性评价与化学计量分析

2.4.1 方法 为考察同一品种样品质量一致性结果,本实验从含量、指纹图谱2个方面进行评价分析,引用批内一致性差异值(P_A)、批间一致性差异值(P_B)、指纹图谱相似率(P_C)3个参数。

P_A 指 n_1 个样品的相同指标成分含量之间的一致性, P_B 指 n_2 个样品的相同指标成分含量之间的一致性。测定并计算出多个样品相同成分的含量,该成

分含量极差值与均值的百分比即为该成分的 $P_{A/B}$ 。(注:① $P_{A/B} = (\text{含量极大值} - \text{含量极小值}) / \text{含量平均值} \times 100\%$,②当所测指标为非单一成分时,一致性差异值($P_{A/B}$)等于各指标成分一致性差异值的均值^[9])。

P_C 是同厂家不同批号样品之间的指纹图谱相似率,将相同厂家不同批号 LDCP 供试品按照“2.1.3”项色谱条件进样分析,选取 238 nm 波长下图谱作为

指纹图谱,将各色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2.0版),采用中位数法,时间窗宽度为0.1 min,经多点校正、全峰匹配后生成的图谱为参照图谱,计算各图谱与参照图谱的相似度,取最小值的百分值即为 P_c 。

以7个厂家的3个一致性参数为变量,采用SIMCA-P 13.0软件对7厂家以主成分特征值和方差累计贡献率进行PCA,以新提取的主成分为变量,统计7个厂家样品分类。

2.4.2 结果 如表5所示, P_A 在4.2%~15.1%,F、S、X厂家的 P_A 值均小于10%,即相同批号不同包装单位的样品6个成分的含量相对极差较小,反映出在原料确定情况下该厂家的设备工艺稳定性良好,B、J、Z、R4个厂家 $P_A > 10%$,相比于F、S、X厂家,这几个厂家需要提高制剂工艺稳定性;7个厂家 P_B 在26.4%~49.5%,S、X厂家的 P_B 值约小于30%,但B、J2个厂家 $P_B > 40%$,相比较可知B、J2个厂家样品因制药原料质量、设备工艺影响因素表现出质量均一性较差;7个厂家 P_c 值在92.9%~98.2%之间,即所有厂家内部样品相似度较好,且相互之间差异较小。

表5 7个不同厂家LDCP含量一致性差异

Tab.5 Consistency differences of contents among samples from seven different manufacturers

厂家(manufacturer)	$P_A/\%$	$P_B/\%$	$P_c/\%$
B	11.9	43.1	96.9
J	15.1	48.8	98.2
Z	10.1	37.3	92.9
R	11.4	38.0	94.7
F	4.2	31.8	97.6
S	6.3	29.5	96.7
X	9.4	26.4	96.4

基于定性定量一致性参数可知:批次间一致性较批次内一致性差异大,说明各生产厂家在设备工艺稳定性一定的前提下,药材原料对成品质量影响更大,即当前确保产品质量均一保证原料质量是关键;F、S、X3个厂家样品 P_A 、 P_B 值均较其余4个厂家小,且 P_c 值均高于96%,表明这几个厂家生产设备工艺与原料药材相对稳定从而表现出样品质量一致性较好。

7厂家样品PCA分析,散点得分图如图3所示(2个主成分累计贡献率为93.8%),如图可见,7个厂家零散分布于3个坐标象限,B、J分布于第一象限且距离较近,说明这2个厂家样品质量相似,F、S、X3个厂家分布于第二象限且互相之间距离较近,说明3个厂家间质量差异小,剩余Z、R2个厂家分布于第四象限坐标轴处且与其他厂家距离较远,说明这几个厂家间存在一定质量差异。

为将以上7个厂家样品质量进行量化表征,在PCA模式下对新提取的主成分p1、主成分p2与3个一致性参数变量因子进行关联统计,2个主成分因子对3个变量参数的表达式分别为 $p1 = 0.698P_A + 0.709P_B + 0.103P_c$ 和 $p2 = -0.175P_A + 0.029P_B + 0.984P_c$,依据各厂家3个变量参数实际数值分别计算各厂家新的主成分因子p1、p2。2个主成分因子在坐标轴上的贡献率分别为0.602和0.336,根据其在坐标轴上的贡献率,设置一致性区分因子(P)计算公式,即 $P = 0.602p1 + 0.336p2$,参数统计如表6所示,根据P值,7个厂家可分为三类,B、J2个厂家 $P > 70$,可分为一类,Z、R2个厂家 $65 < P < 70$,可以分为一类,X、F、S3个厂家P值均近似等于65,可以分为一类;现有7个厂家样品P值相接近,但在一定条件下仍然可以分为3个不同种类,说明现有厂家间存在一定程度的质量差异。

3 讨论

药典规定LDCP以每丸含酒萸肉以莫诺昔和马钱苷的总量计,含牡丹皮以丹皮酚计,由测定结果发现,3个成分在符合药典要求底线前提下,表现出一定的差异性,这种结果也证实了建立一种区别于药典检测指标成分的含量检测方法,对于判别、区分同一品种不同厂家样品之间质量差异的必要性。本研究在药典规定的含量测定指标基础上另加5-羟甲基糠醛、没食子酸、芍药苷3个质控指标成分,且5-羟甲基糠醛为方中君药熟地黄加工过程产物,监控其含量可以评估熟地黄质量。有报道称5-羟甲基糠醛含量过高对人体内脏具有损害作用^[11],对5-羟甲基糠醛进行合理控制非常重要;没食子酸是臣药酒萸肉的有效成分之一、芍药苷是牡丹皮中的有效成分之一,2个成分均具有抗菌、抗肝损伤作用^[12-13],虽非药典指标,但对评价药品质量亦具有补充作用。

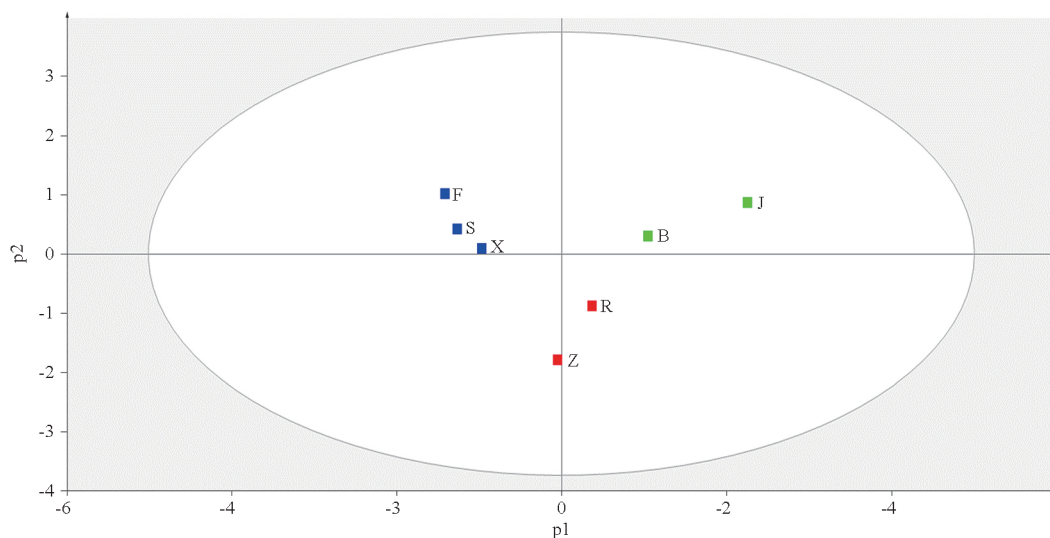


图3 7个厂家样品的PCA得分散点图

Fig. 3 PCA distribution of samples from seven manufacturers

表6 7个厂家变量因子和P

Tab. 6 Seven factory - variable factors and P

厂家(factory)	p1	p2	P
B	79.9	68.1	71.8
J	86.1	66.3	75.8
Z	73.3	67.0	66.9
R	75.4	67.9	68.6
F	68.4	74.9	65.3
S	67.8	74.1	64.7
X	67.6	73.7	64.5

研究过程中对样品进行了包括提取溶剂、料液比、提取时间在内的前处理单因素变量考察,确定最优参数;样品指纹图谱检测波长选取 238 nm,是因为该波长下各成分响应较好,有较好的峰形和分离度;采用含量一致性与整体相似性评价,既监督了定性成分,又兼顾了定量指标,定量与定性相结合,既能评价真伪,又能判断优劣^[14], P_A 、 P_B 和 P_C 3个参数在一定程度上反映生产工艺与原料对成药质量的影响^[8],具有一定科学性。本研究构建产品一致性评价模型,实现从 35 批次样品的多指标成分含量结果,到 7 个生产厂家的批内、批间含量一致性及指纹图谱相似率参数,再到一致性区分因子的逐步代表性简化,最终以 P 值反映不同厂家样品质量一致性差异,实验结果对于区分药品质量差异具有参考意义。

中医药高质量发展的关键核心是建立科学合理

的中药质量评价体系和高质量的评价标准,以实现中医药产业的正向引导^[15]。随着“健康中国”战略的实施,人民的健康保健意识不断提升,侧面带动了具有滋补功效类中药大品种如六味地黄丸等销售额的逐年攀升,其品质影响人民的健康,因此建立合适高效的分析评价方法区分相同品种的质量差异具有重要意义。本研究为市售 LDCC 产品质量一致性评价提供了参考实例和科学数据,期望能推进中成药质量提升,保障中成药的质量安全稳定。

参考文献

- [1] 詹国平,朱丽芳,蔡家宝,等. 不同厂家六味地黄浓缩丸的质量分析[J]. 北方药学,2022,19(12):1
ZHAN GP, ZHU LF, CAI JB, *et al.* Quality analysis of Liuwei Dihuang concentrated pills from different manufacturers [J]. J North Pharm, 2022, 19(12):1
- [2] 夏昀卿,李如,高松,等. 不同厂家六味地黄浓缩丸组分结构特征与质量控制探究[J]. 中国中药杂志,2020,45(14):3369
XIA YQ, LI R, GAO S, *et al.* Structure characteristics and quality control of Liuwei Dihuang concentrated pills from different manufacturers [J]. Chin J Chin Mater Med, 2020, 45(14):3369
- [3] 冯霞霞,易红,闫利华,等. 从六味地黄制剂多剂型间的质量差异探索中成药质量控制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(2):138
FENG XX, YI H, YAN LH, *et al.* Discussion for quality control of chinese patent drugs from quality difference among different dosage forms of Liuwei Dihuang preparations [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(2):138
- [4] 张小博. 不同厂家六味地黄浓缩丸的质量分析[J]. 中国民族

- 民间医药, 2016, 25(10):23
- ZHANG XB. Quality comparative analysis of Liuweidihuang concentrated pills with different manufacturers [J]. *Chin J Ethno-med Ethnopharm*, 2016, 25(10):23
- [5] 封亮, 贾晓斌, 范晨怡, 等. HPLC 测定六味地黄浓缩丸及药材的指纹图谱[J]. *中成药*, 2008, 30(12):1720
- FENG L, JIA XB, FAN CY, *et al.* Fingerprint analysis of Liuwei Dihuang concentrated pills and its crude durgs by HPLC [J]. *Chin Tradit Patent Med*, 2008, 30(12):1720
- [6] YE J, ZHANG X, DAI WX, *et al.* Chemical fingerprinting of Liuwei Dihuang Pill and simultaneous determination of its major bioactive constituents by HPLC coupled with multiple detections of DAD, ELSD and ESI-MS [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2009, 49(3):638
- [7] YAN B, YANG LP, MA DD, *et al.* Comprehensively evaluating the quality consistency of Liuwei Dihuang pill by five-wavelength overall fused HPLC fingerprints combined with simultaneous determination and antioxidant activity [J]. *J Chromatogr Sci*, 2017, 55(10):1026
- [8] ZHAO AY, XIAO LK, CHEN S, *et al.* Comprehensive quality consistency evaluation strategy and analysis of compound danshen tablet [J]. *J Pharm Biomed*, 2022, 219:114951
- [9] 赵桢熠. 以复方丹参制剂等三种制剂为示范的中成药“一致性”质量评价策略及应用研究[D]. 太原:山西医科大学, 2021
- ZHAO AY. The Quality Evaluation Strategy and Application Study on “Consistency” of Chinese Patent Drugs Using the Fufang Danshen Preparations and Other Three preparation as the Demonstration [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2021
- [10] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020:195
- ChP 2020. Vol I [S]. 2020:195
- [11] 朱秀清, 雷文华, 黄雨洋, 等. 5-羟甲基糠醛在食品中的变化及其安全性研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(15):4983
- ZHU XQ, LEI WH, HUANG YY, *et al.* Research progress in changes of 5-hydroxymethylfurfural in food and its safety [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(15):4983
- [12] 刘青, 彭红艳, 马春霞, 等. 不同植物来源单宁和没食子酸对常见致病菌的体外抑菌效果研究[J]. *中国畜禽种业*, 2022, 18(9):37
- LIU Q, PENG HY, MA CX, *et al.* Study on *in vitro* bacteriostatic effect of tannin and gallic acid from different plant sources on common pathogenic bacteria [J]. *Chin Livest Poul Breed*, 2022, 18(9):37
- [13] 李聪, 周威. 芍药苷对伴刀豆球蛋白诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(5):427
- LI C, ZHOU W. Protective effect of paeoniflorin on acute liver injury induced by concanavalin A in mice [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2022, 38(5):427
- [14] 李天娇, 包永睿, 王帅等. 中药质量控制与评价创新方法研究进展及应用[J]. *中草药*, 2022, 53(20):6319
- LI TQ, BAO YR, WANG S, *et al.* Research progress and application of innovative methods for quality control and evaluation of traditional Chinese medicine[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(20):6319
- [15] 马双成, 王莹. 我国中药质量控制模式及思路研究进展十年回顾[J/OL]. *中国药学杂志*, 2023 [2023-11-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2162.R.20230104.2122.001.html>
- MA SC, WANG Y. Review on the research progress of traditional Chinese medicine quality control models and ideas in the past decade[J/OL]. *Chin Pharm J*, 2023. [2023-11-21]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2162.R.20230104.2122.001.html>

(本文于 2023 年 4 月 11 日收到)