

益肾清利颗粒的质量标准研究^{*}

孙 贤¹, 谈瑄忠^{1△}, 赵 颖¹, 毛春琴²

(1. 南京市中医院, 江苏 南京 210001; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 摸索和建立益肾清利颗粒的质量控制方法。**方法** 采用高效液相色谱法以及薄层色谱鉴定法, 对益肾清利颗粒组方中的药味黄芪、山茱萸、泽泻、三七进行定性鉴别; 对益肾清利颗粒组方中的有效成分马钱苷进行含量测定。**结果** 定性鉴别薄层斑点清晰, 测定 3 批制剂马钱苷的含量; 系统耐用性试验、专属性试验、线性范围、精密密度试验、重复性试验、加样回收率试验均符合要求。**结论** 该方法安全、可靠、可用于益肾清利颗粒的质量控制。

关键词: 益肾清利颗粒; 薄层色谱; 高效液相色谱; 马钱苷

中图分类号: R286.0 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)03-0017-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.03.005

益肾清利颗粒为我院临床使用多年的经验方, 其临床疗效好、安全、无毒副作用, 深受广大患者的青睐, 该方主要由黄芪、山茱萸、泽泻、三七、炒白术、杜仲、石韦、白花蛇舌草 8 味药^[1-13]组成, 具有健脾益肾, 补气养阴, 清利湿热的作用, 用于治疗慢性肾炎, 脾肾气阴两虚、湿热内蕴证。本实验研究预将益肾清利颗粒开发成新医院制剂, 将提高本制剂的方便性、安全性、有效性, 更好地为广大患者服务, 本文主要对益肾清利颗粒进行质量标准研究。

1 仪器、试剂

高效液相色谱仪 Agilent1100 LC 型 (美国安捷伦公司); 色谱柱为 Hypersil ODS2 柱 (250mm×4.6mm, 5μm), 柱号: E1922461 (大连依利特科技公司); 电子天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司)。

硅胶板, 规格 50mm×100mm, 乙腈为色谱纯, 其余所用试剂均为分析纯。马钱苷对照品, 批号: 110736-200627 (中国食品药品检定研究院)。

益肾清利颗粒: 自制, 批号分别为 20070908、20070910、20070912。

2 性状

内容物为棕色至棕褐色的颗粒; 气微香, 味苦、微甜。

3 鉴别

3.1 黄芪的薄层色谱鉴别^[14]

取本颗粒 5g, 研细, 加水 40mL, 超声提取 30min, 经过滤后, 水饱和的正丁醇将滤液振摇提取 2 次, 每次 35mL, 正丁醇提取液合并, 水浴上进行蒸干。残渣再加蒸馏水 3~5mL 使其溶解, 放冷, 采用 D101 型大孔树脂 150g 进行纯化, 加水 50mL 后洗脱, 弃去水液, 再用 40% 的乙醇 30mL 进行洗脱, 弃去 40% 的乙醇洗脱液, 再用 70% 的乙醇 50mL 进行洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 然后用甲醇定容到 2mL 的容量瓶中, 作为供试品溶液。再取黄芪对照药材 3g, 同供试品溶液的制备法制成对照药材溶液。最后取缺黄芪的阴性样品部分, 同供试品溶液制备方法制成阴性样品溶液。我们将按照薄层色谱法 (《中国药典》2010 年版一部附录 VI B) 的试验, 吸取上述 3 种溶液各 20μL, 在硅胶 G365 的薄层板上进行点样, 展开剂为乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水 (5:3:1:1) 的下层溶液, 展开, 取出, 晾干后, 再喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105℃ 的烘箱中烘至斑点显色清晰。在薄层板上, 与对照药材相应的位置上, 日光下显相同的棕褐色斑点。阴性制剂在相应的位置上无斑点。结果见图 1。

3.2 山茱萸的薄层色谱鉴别^[15]

取本颗粒 3g, 加乙酸乙酯溶液 10mL 后, 进行

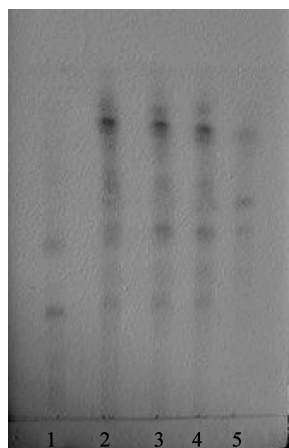
^{*} 基金项目: 江苏省中医药局资助项目 (LB11005)

收稿日期: 2016-03-10

作者简介: 孙贤 (1974-), 女, 江苏南京人, 主管中药师, 研究方向: 中药复方质量控制。

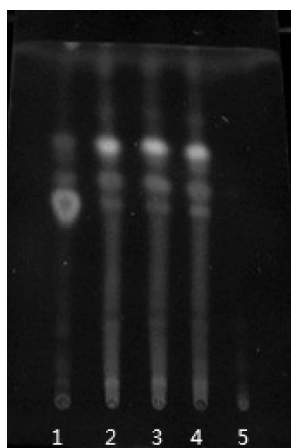
△通信作者: 谈瑄忠, E-mail: txz282@sohu.com

超声处理 15min, 滤过后, 将滤液蒸干, 蒸干的蒸发皿加无水乙醇 2mL 定容至容量瓶中, 作为供试品溶液。取山茱萸对照药材 0.5g, 按照供试品溶液的制备方法制成对照药材溶液。取山茱萸的处方药材, 按照上述方法, 制成阴性溶液。我们将按照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B)试验, 吸取上述 3 种溶液各 15 μ L, 在硅胶 G365 板上进行点样, 展开剂为三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2), 展开, 取出, 晾干后, 再喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 的烘箱中烘至斑点显色清晰。在薄层板上, 与对照药材相应的位置上, 显相同的紫红色斑点; 在紫外光灯(365nm)下查看, 显相同的橙黄色荧光斑点, 阴性制剂在相应的位置上无斑点。结果见图 2。



1: 黄芪对照药材; 2-4: 样品液; 5: 阴性对照

图 1 黄芪薄层色谱图



1: 山茱萸对照药材; 2-4: 样品液; 5: 阴性对照

图 2 山茱萸薄层色谱图

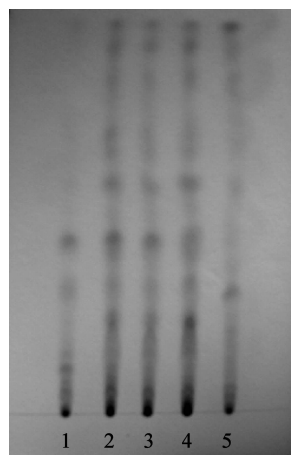
3.3 泽泻的薄层色谱鉴别^[15]

取本颗粒 8g, 加甲醇溶液 25mL 回流提取 1h, 滤过, 滤液水浴蒸干, 残渣加水 20mL 使其溶解, 转移至分液漏斗中, 用乙酸乙酯振摇提取 4 次, 每次 10mL, 合并乙酸乙酯液, 用水 10mL 进行洗涤 1 次, 将蒸发皿中的乙酸乙酯溶液放置水浴上蒸干, 残渣用乙酸乙酯溶液定容至 2mL 的容量瓶中, 作为供试品溶液。称取泽泻对照药材 2g, 按上述方法制成对照药材溶液。再取缺泽泻的处方药材, 制成阴性样品, 再按照供试品溶液制备方法制成阴性样品溶液。我们按照薄层色谱(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取以上 3 种溶液各 10 μ L, 在 G365 硅胶板上进行点样, 以三氯甲烷-甲醇(25:1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干后, 再喷以 10% 的硫酸乙醇溶液, 在 105 $^{\circ}$ C 的烘箱内烘至斑点显色清晰。在

薄层色谱中, 在与对照药材相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性制剂在相应的位置上无斑点。结果见图 3。

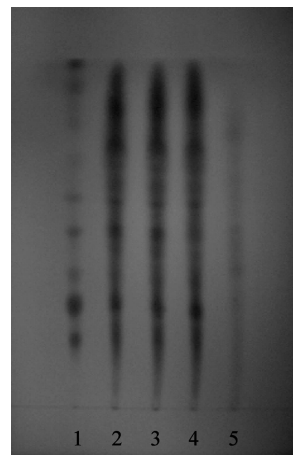
3.4 三七的薄层色谱鉴别^[16]

取本颗粒 2g, 加水 5mL, 搅匀, 再加水饱和的正丁醇 5mL, 密塞, 振摇 10min, 放置 2h, 离心, 取上清液, 加 3 倍量的正丁醇饱和的水, 摇匀, 放置使分层(必要时离心), 取正丁醇层, 放入蒸发皿中后水浴上蒸干, 残渣加甲醇溶液 1mL 定容至 1mL 的容量瓶中, 作为供试品溶液。称取三七对照药材 0.5g, 同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。取缺三七的组方, 制成阴性样品, 再按照上述溶液的制备方法制成阴性样品溶液。我们按照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取上述两种溶液各 10 μ L, 在硅胶 G365 板上进行点样, 以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)10 $^{\circ}$ C 以下放置的下层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干后, 再喷以硫酸溶液(1 $\rightarrow$ 10), 在 105 $^{\circ}$ C 的烘箱内烘至斑点显色清晰。在薄层色谱中, 与对照药材相应的位置上, 显相同颜色斑点, 阴性制剂在相应的位置上无斑点。结果见图 4。



1: 泽泻对照药材; 2-4: 样品液; 5: 阴性对照

图 3 泽泻薄层色谱图



1: 三七对照药材; 2-4: 样品液; 5: 阴性对照

图 4 三七薄层色谱图

4 检查

按照 2010 版《中国药典》颗粒剂项下的方法, 对益肾清利颗粒进行检查, 结果均符合规定。

5 含量测定^[17-18]

5.1 色谱条件

色谱柱: 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(250mm $\times$ 4.6mm, 粒度 5 μ m); 流动相: 乙腈-水(14.2:

85.8);检测波长为 240nm;流速 $1.0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温: 35.0°C ;理论板数按马钱苷峰计算应不低于5 000。

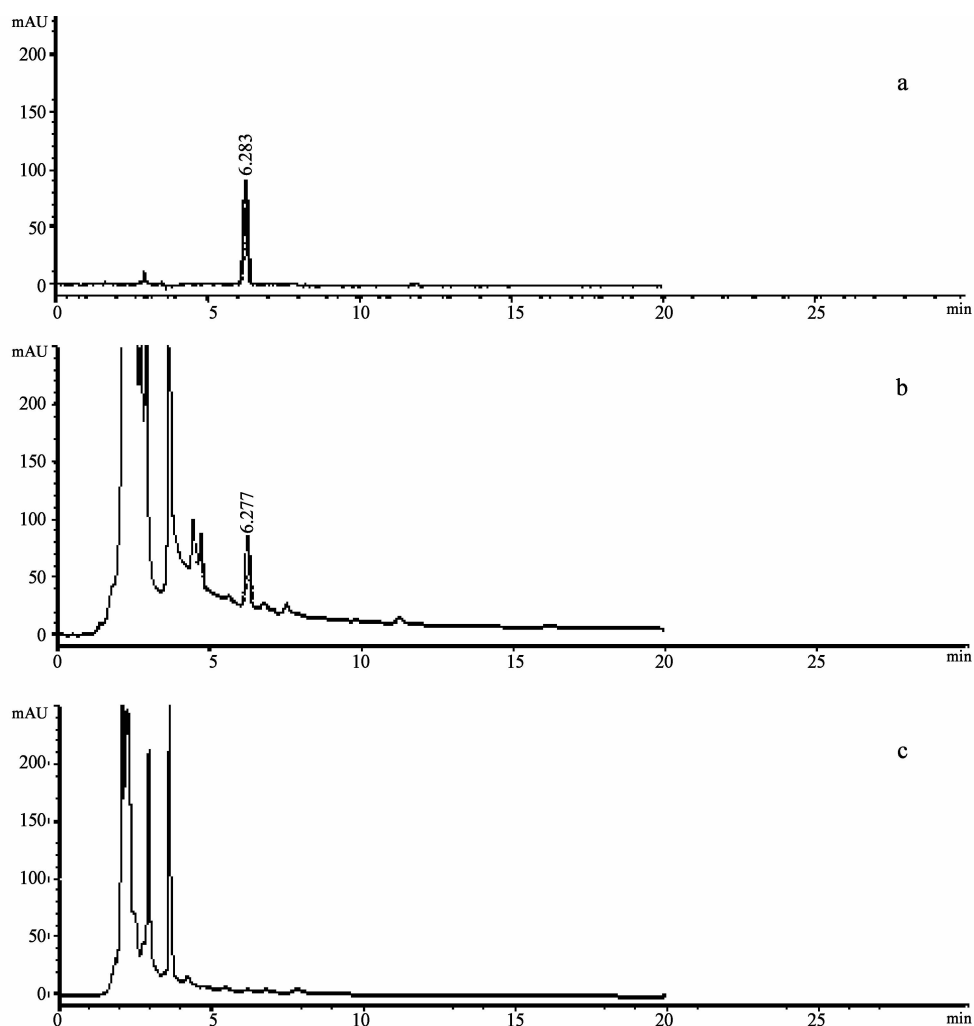
5.2 系统耐用性

流动相的选择上选用了不同比例的有机试剂和水进行色谱分离,分别为乙腈-水(14:86)、乙腈-水(14.2:85.8)以及乙腈-水(14.5:85.5),最终结果表

明,乙腈-水(14.2:85.8)为流动相时分离效果最佳。

5.3 专属性试验

将制备好的对照品溶液、样品溶液和阴性制剂,摇匀,注入液相色谱仪中,进样量为 $10\mu\text{L}$,色谱条件同上,测定,结果表明,在马钱苷色谱峰处无干扰。结果见图 5。



a. 马钱苷对照品; b. 样品; c. 阴性样品

图5 HPLC 图谱

5.4 供试品溶液提取制备条件的考察

以马钱苷含量为指标,以马钱苷的提取率为主要因素,选用 $L_9(3^4)$ 正交试验,考察提取方法、提取溶媒、提取时间、提取次数的影响,同时考虑生产实际,最终确定本品供试品溶液的制备方法为:取本品适量(约相当于山茱萸药材 0.1g),研细,精密称定,放置于具塞锥形瓶中,精密加入 60% 甲醇 25mL,密塞,称定重量,将其回流 30min 后,放冷,再

称定重量,补足减失的重量(60%甲醇),摇匀,滤过后,即得。

5.5 标准曲线

精密称取一定量的马钱苷对照品,加甲醇制成 0.506mg/mL 的马钱苷对照品溶液,即得。准确精密的吸取上述对照品溶液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5mL,定容至 2mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,使其浓度分别是 $0.025\ 3, 0.050\ 6, 0.075\ 9, 0.101\ 2, 0.126\ 5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,

各对照品液分别进样 10 μ L, 以峰面积平均值和对照品浓度进行回归处理, 得回归方程为: $Y = 15987.166X - 10.73$, 相关系数 $r = 0.9999$; 线性关系范围为 0.253~1.265 μ g。

5.6 稳定性试验

取供试品溶液, 每隔 1.0h 进样 10 μ L, 测定峰面积, 结果 $RSD(\%) = 2.02$, 表明供试品溶液在 10h 内的稳定性符合要求。

5.7 精密度试验

取同一批号供试品溶液, 连续进样 6 次, 测定其峰面积, 结果 $RSD(\%) = 0.98$, 表明本方法精密度符合要求。

5.8 重复性试验

取装量差异项下的供试品内容物, 研细, 取约 0.54g, 精密称定, 置圆底烧瓶中, 按供试品溶液制备方法制备样品, 平行试验 5 份, 进样量 10 μ L, 测定其马钱苷的含量, 结果 $RSD(\%) = 2.58$, 表明本方法的重复性良好, 适用于含量测定。

5.9 加样回收率试验

精密吸取马钱苷含量为 0.82mg $\cdot$ g⁻¹ 的供试品 0.27g 6 份, 各精密加入浓度为 0.506mg $\cdot$ mL⁻¹ 马钱苷对照品溶液 0.45mL, 放置在锥形瓶中(具塞), 精密加入 60% 甲醇 25mL, 称定重量后, 加热回流 30min, 放冷 30min, 再重新称定重量, 用 60% 甲醇补足减失的重量, 摇匀, 再滤过后, 取续滤液进样, 注入液相色谱仪中, 测定, 外标两点计算马钱苷含量。结果平均加样回收率为 101.04%, 相对标准偏差 $RSD(\%) = 2.41$ 。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果表

编号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	加样回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.2277	0.2277	0.4530	98.95	101.04	2.41
2	0.2292	0.2277	0.4532	98.38		
3	0.2373	0.2277	0.4764	105.01		
4	0.2315	0.2277	0.4606	100.62		
5	0.2341	0.227	0.4636	100.79		
6	0.2366	0.2277	0.4700	102.50		

5.10 3 批样品马钱苷含量测定结果

取装量差异项下的供试品, 研细, 取约 0.54g, 精密称定, 按上述供试品溶液制备方法进行制备, 得到了供试品溶液。测定的马钱苷的含量如下表 2 所示。

表 2 3 批样品含量测定结果表

样品批号	马钱苷含量/(mg $\cdot$ g ⁻¹ 颗粒)	平均值/(mg $\cdot$ g ⁻¹ 颗粒)	RSD/%
070908	0.82	0.81	2.24
	0.81		
	0.79		
070910	0.81	0.82	1.61
	0.83		
	0.81		
070912	0.79	0.79	1.06
	0.80		
	0.80		

6 讨论

本文采用 TLC 方法对益肾清利颗粒中的黄芪、山茱萸、泽泻和三七进行鉴别, 斑点分离清晰, 阴性对照无干扰, 专属性强, 完善了制剂质量标准。此外, 笔者对本制剂处方其它药材也进行了相应的 TLC 鉴别实验, 由于斑点显色不清晰, 有拖尾现象等原因, 因此没有列入标准正文中。

益肾清利颗粒为临床固本益肾的良方, 对湿热引起的肾炎, 脾虚具有良好的治疗作用。马钱苷属环烯醚萜苷类, 是山茱萸中的主要药效成分之一。具有对非特异性免疫功能有增强作用, 能促进巨噬细胞吞噬功能, 延缓衰老。所以本制剂选用马钱苷作为质量标准的含测指标成分。通过对本品不同批次测定结果, 暂定本制剂每袋含山茱萸以马钱苷($C_{17}H_{26}O_{10}$)计, 不得少于 12mg。

参考文献:

- [1] 郭立忠. 中药黄芪化学成份与药理活性研究分析[J]. 中国卫生标准管理, 2015, 6(31): 119-121.
- [2] 吴清平. 中药黄芪的药理作用及临床应用效果观察[J]. 中国医药指南, 2013, 11(30): 535-536.
- [3] 熊明彪. 黄芪的药理作用及临床研究进展[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(10): 70-71.
- [4] 张亚莉. 黄芪中主要化学成分的研究现状[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 4(2B): 151-152.
- [5] 赵筱萍, 陆琳, 张玉峰, 等. 泽泻中肾毒性成分的辨析研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 758-761.
- [6] 袁菊丽, 姜红波. 山茱萸的主要化学成分及药理作用[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(5): 7-9.
- [7] 陈曦. 泽泻的研究现状与进展 [J]. 中国民族民间医药, 2011(9): 50-51.
- [8] 梁晋如. 山茱萸的化学成分及其生物活性研究[D]. 西安:

- 西北大学,2014.
- [9] 程琛舒. 山茱萸化学成分的研究 [D]. 合肥: 安徽大学, 2011.
- [10] 邱美榕,马少丹,阮时宝. 泽泻汤组成药物化学成分的研究现状 [J]. 中国中医药现代远程教育,2013,11(22): 119-120.
- [11] 李志红. 中药三七的化学成分和药理作用 [J]. 内蒙古中医药,2014,33(26):37.
- [12] 夏鹏国,张顺仓,梁宗锁,等. 三七化学成分的研究历程和概况[J]. 中草药,2014,45(17):2564-2570.
- [13] 赵静,乔晶,胡俊,等. 三七的化学成分研究进展[C]//中华中医药学会中药化学分会第九届学术年会论文集(第一册). 厦门:中华中医药学会,2014:8.
- [14] 汪祺,张聿梅,戴忠,等. 黄芪中皂苷类成分的特征薄层图谱鉴别[J]. 中国药事,2011,25(12):1227-1229.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:26
- [16] 邱立杰,王晓云. 三七跌打膏的薄层色谱鉴别[J]. 中国药师,2009,12(7):981-982.
- [17] 戴冰,王诚元,邹双华,等. 不同来源山茱萸中马钱苷含量的测定[J]. 湖南中医学院学报,2006,26(1):21-22.
- [18] 水彩红, 曹红. HPLC 法测定山茱萸药材及六味地黄胶囊中马钱苷的含量[J]. 中国药品标准,2005,6(4): 17-20.

(编辑:徐建平)

Quality Standard of Yishen Qingli Granule

SUN Xian¹, TAN Xuanzhong¹, ZHAO Ying¹, MAO Chunqin²

(1. Nanjing Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210001, China;

2. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: **Objective** Establish the quality standards of kidney clear the granule. To better control the quality of the kidney clean the granule. **Methods** By thin layer chromatography (TLC), the kidney pellet formula ingredients of astragalus membranaceus, dogwood, alisma, notoginseng for qualitative identification; Using high performance liquid chromatography(HPLC) method for kidney clear the granule characteristics of effective composition content of loganin horse money. **Results** Qualitative identify the contents of the TLC spots were clear, determine the content of three groups of agents loganin were 0.81 mg, 0.82 mg/g and 0.79 mg/g/g; System durability test, the specificity test, linear range, precision test, repeatability test, sample recovery rate test conform to the requirements. **Conclusion** This method is safe, reliable, and can be used for kidney clear quality control of the granule.

KEY WORDS: Yishen Qingli Granule; TLC; HPLC; loganin

欢迎订阅, 欢迎投稿!