

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.013

二黄益肾汤质量标准研究*

田雪芬, 郭文厂, 李冬冬[△], 黄秀贞

(山东省济宁市中医院, 山东 济宁 272100)

摘要:目的 建立二黄益肾汤的质量控制标准。方法 原药材经水提、浓缩、纯化;采用薄层色谱鉴别方中大黄、白术2味药材;采用反相高效液相色谱法分别测定丹参素、原儿茶醛、淫羊藿苷的含量。结果 薄层色谱法能准确定性鉴定大黄、白术,斑点清晰,阴性对照无干扰;丹参素、原儿茶醛、淫羊藿苷质量浓度分别在 6.1~97.6 μg/mL ($r=1.000\ 0$), 1.688~27.000 μg/mL ($r=1.000\ 0$), 8.063~129.000 μg/mL ($r=1.000\ 0$)范围内与峰面积线性关系良好,平均回收率分别为 99.58%, 101.44%, 99.80%, RSD 分别为 2.36%, 1.30%, 1.08% ($n=6$)。结论 该方法简单合理,专属性强,准确可靠,重复性好,定性和定量分析准确,可用于二黄益肾汤的质量控制。

关键词:二黄益肾汤;薄层色谱法;反相高效液相色谱法;质量标准;丹参素;原儿茶醛;淫羊藿苷

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)11-0048-05

Quality Standard of Erhuang Yishen Decoction

TIAN Xuefen, GUO Wenchang, LI Dongdong, HUANG Xiuzhen

(Jining Hospital of TCM, Jining, Shandong, China 272100)

Abstract: Objective To establish the quality control standard for Erhuang Yishen Decoction. **Methods** Medicinal materials were extracted with water, which were further concentrated and purified. Thin layer chromatography (TLC) was used for the qualitative identification of *Rheum officinale* and *Atractylodes macrocephala*. Reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) was used for the quantitative determination of salvanic acid A and protocatechuic aldehyde in *Salvia miltiorrhiza*, as well as icariin in *Epimedium brevicornu*. **Results** TLC could accurately detected the presence of *Rheum officinale* and *Atractylodes macrocephala*. The concentration of salvanic acid A, protocatechuic aldehyde and icariin showed good linearity in the ranges of 6.1~97.6 μg/mL ($r=1.000\ 0$), 1.688~27.000 μg/mL ($r=1.000\ 0$) and 8.063~129.000 μg/mL ($r=1.000\ 0$), respectively. The average recoveries were 99.58%, 101.44%, 99.80%, and the RSDs were 2.36%, 1.30%, 1.08% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The method is simple and reasonable, strong in specificity, accurate and reliable, good in repeatability, accurate in qualitative and quantitative analysis, and can be used for quality control of Erhuang Yishen Decoction.

Key words: Erhuang Yishen Decoction; thin layer chromatography; reversed phase high performance liquid chromatography; quality standard; salvanic acid A; protocatechuic aldehyde; icariin

二黄益肾汤系山东省济宁市中医院肾病科的临床经验方,由丹参、炒白术、大黄、炙淫羊藿等10味中药组方,具有补益脾肾、降浊排毒、活血通络之功效,用于气虚湿瘀型慢性肾功能不全(CKD 3~4期)的治疗。为确定其制备工艺的合理性,全面有效控制质量,保障临床用药安全、有效,本研究中采用薄层色谱(TLC)法对方中大黄和白术进行了定性鉴别,采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定丹参中丹参素和原儿茶醛及淫羊藿中淫羊藿苷的含量,为进一步完善二黄益肾汤的质量标准提供依据。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司);AB-135S型电子天平(Mettler Toledo公司,精度为十万分之一);KQ-500DB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为300 W,频率为25 kHz);ZF-8型

暗箱三用紫外分析仪(上海一科仪器有限公司)。

1.2 试药

大黄对照药材(批号为120984-201202),白术对照药材(批号为120925-201611),丹参素钠对照品(纯度≥98%,批号为110855-201614),原儿茶醛对照品(纯度≥99%,批号为110810-201608),淫羊藿苷对照品(纯度≥98%,批号为110766-201721),均购自中国食品药品检定研究院;二黄益肾汤(济宁市中医院制剂室自制,批号分别为20181217,20181219,20181221,规格为每瓶150 mL);甲醇,乙腈(色谱纯,Avantor Performance Materials, Inc., USA; GC≥99.9%);娃哈哈纯净水;丹参(批号为201803201)、炒白术(批号为201804122)、大黄(批号为201801291)、炙淫羊藿(批号为201803266)等10味药材均由济宁邦尔中药饮片有限公司提供,经济宁市中医院刘会芳副主任中药师鉴定为正品,均符合《中国药典(一部)》相关规定。

*基金项目:山东省济宁市科技助推新旧动能转换计划项目[2017SMNS005]。

第一作者:田雪芬,女,硕士研究生,主管药师,研究方向为中药质量分析,(电子信箱)tianxuefenhao@163.com。

[△]通信作者:李冬冬,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为医院制剂新药研发,(电子信箱)LDD340@163.com。

2 方法与结果

2.1 样品制备

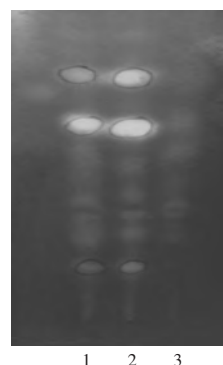
按处方称取丹参、炒白术、大黄、炙淫羊藿等10味药材,其中炒白术、砂仁、莪术混合加10倍量水,浸泡0.5 h,采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,冷藏备用;大黄加12倍量水,浸泡0.5 h,煮沸5 min,滤过,备用;其余6味药材与提取挥发油的药渣和蒸馏后的水溶液、大黄药渣混合,加14倍量水,浸泡0.5 h,煎煮1 h,倾出煎液;药渣再加10倍量水,煎煮40 min,倾出煎液,合并2次煎液,滤过;将滤液浓缩至约350 mL,放冷至室温,搅拌下加入大黄滤液,冷藏、静置过夜,滤过,滤液加热至沸,放冷,加入上述挥发油,加纯化水至450 mL,混匀,即得样品。

2.2 薄层色谱鉴别

大黄:取样品(批号为20181014)30 mL,加盐酸2 mL,加热回流30 min,立即冷却,用乙醚提取2次,每次40 mL,合并乙醚液,溶剂挥干,残渣加三氯甲烷1 mL使溶解,作为供试品溶液。取大黄对照药材0.5 g,加甲醇20 mL,超声处理20 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水10 mL使溶解,按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液。取除大黄外的其余药材,按处方和样品制备工艺制备不含大黄的阴性对照品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照药材溶液。照2015年版《中国药典(一部)》通则0502中TLC法,吸取供试品溶液8 μ L和对照药材溶液6 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(7.5:2.5:0.6, V/V/V)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置氨蒸气中熏至斑点显色清晰^[1-3]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,置紫外光灯(365 nm)下检视,显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。详见图1。

白术:取样品(批号为20181014)90 mL,加乙醚振

摇提取2次,每次100 mL,合并乙醚液,溶剂挥干,残渣加环己烷1 mL使溶解,作为供试品溶液。另取白术对照药材2.0 g,加水50 mL,加热回流30 min,放冷,滤过,用乙醚提取2次,每次60 mL,合并乙醚液,挥干,残渣加环己烷1 mL使溶解,作为对照药材溶液。取除白术外的其余药材,按处方和样品制备工艺制备不含白术的阴性对照品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照药材溶液。照2015年版《中国药典(一部)》通则0502中TLC法,吸取上述3种溶液各10 μ L,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(2:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,在105 $^{\circ}$ C加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视^[1,4]。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的荧光斑点,阴性对照无干扰。详见图2。



1. 供试品溶液 2. 对照药材溶液 3. 阴性对照药材溶液

图2 白术薄层色谱图

2.3 丹参素和原儿茶醛含量测定

2.3.1 色谱条件^[5-7]

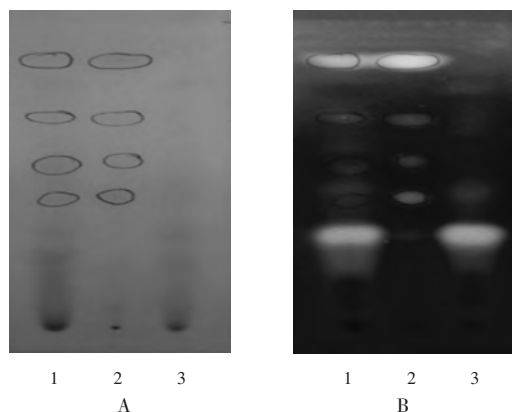
色谱柱:Purospher star RP-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(流动相A),0.4%冰醋酸-水溶液(流动相B),0~35 min时3%~10%(A);检测波长:280 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;流速:0.8 mL/min;进样量:8 μ L。

2.3.2 溶液制备

分别取丹参素钠对照品1.07 mg和原儿茶醛对照品0.27 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.097 6 g/L的丹参素对照品贮备液(1 mg丹参素钠相当于0.912 mg丹参素)和0.027 0 g/L的原儿茶醛对照品贮备液。按2.1项下方法制备样品,精密量取5 mL,置10 mL棕色容量瓶中,加50%甲醇稀释至刻度,摇匀,离心,取上清液,过滤,即得供试品溶液。

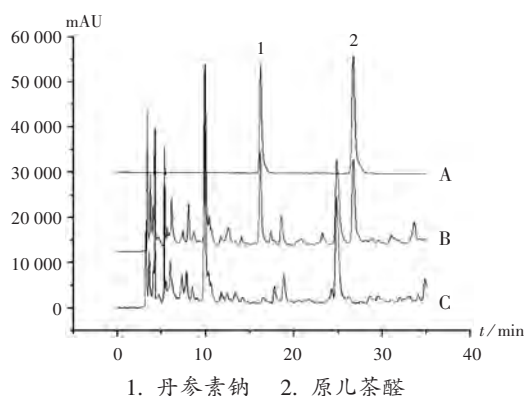
2.3.3 方法学考察

专属性试验:按处方和制备工艺制备不含丹参的阴性对照样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。分别精密吸取上述3种溶液各10 μ L,注入液相色谱



1. 供试品溶液 2. 对照药材溶液 3. 阴性对照药材溶液
A. 日光 B. 紫外光灯(365 nm)

图1 大黄薄层色谱图



1. 丹参素钠 2. 原儿茶醛
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液
图3 丹参高效液相色谱图

谱仪,按拟订色谱条件进样测定。色谱图见图3。

线性关系考察:精密量取上述对照品贮备液,用甲醇逐级稀释成6.1,12.2,24.4,48.8,73.2,97.6 $\mu\text{g/mL}$ 系列质量浓度的丹参素对照品溶液和1.688,3.375,6.750,13.500,20.250,27.000 $\mu\text{g/mL}$ 系列质量浓度的原儿茶醛对照品溶液,精密吸取上述对照品溶液各16 μL ,按拟订色谱条件依法分别进样,记录峰面积。以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性拟合,得丹参素的回归方程 $Y_{\text{丹}} = 13\,035.912 X_{\text{丹}} - 4\,369.223$, $r = 1.000\,0$ ($n = 6$);原儿茶醛的回归方程 $Y_{\text{原}} = 71\,310.237 X_{\text{原}} - 6\,841.460$, $r = 1.000\,0$ 。结果表明,丹参素和原儿茶醛的质量浓度分别在6.1~97.6 $\mu\text{g/mL}$,1.688~27.000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取上述对照品混合贮备液8 μL ,按拟订色谱条件进样测定,连续进样6次。结果丹参素和原儿茶醛峰面积的 RSD 分别为0.96%和1.40% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为20181219),精密吸取供试品溶液10 μL ,按拟订色谱条件分别于0,4,8,12,16,24 h时进样测定。结果丹参素和原儿茶醛含量的 RSD 分别为2.67%和2.08% ($n = 6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为20181219),依法制备供试品溶液6份,按拟订色谱条件进样测定,各进样1次。结果丹参素和原儿茶醛含量的 RSD 分别为2.54%和1.21% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:平行取6份已知含量的样品(批号为20181219)45 mL,分为平行2份3个水平,分别加入含量相当量80%,100%,120%的丹参素和原儿茶醛混合对照品,依法制备供试品溶液,进样10 μL ,记录色谱图,测量丹参素和原儿茶醛的峰面积,代入回归方程计算。结果丹参素的平均回收率为99.58%, RSD 为2.36% ($n = 6$);原儿茶醛的平均回收率为101.44%,

RSD 为1.30% ($n = 6$)。

定量限、检测限确定:取上述对照品贮备液逐级稀释,取信噪比(S/N)为10的作为定量限,丹参素和原儿茶醛的定量限分别为11.146,1.013 ng;取 S/N 为3的作为检测限,丹参素和原儿茶醛的检测限分别为1.793 ng和0.006 80 ng。

2.3.4 样品含量测定

取3批样品,按供试品溶液制备方法平行制备2份,按拟订色谱条件分别进样测定,计算样品中丹参素和原儿茶醛的含量。结果见表1。

表1 样品含量测定结果($\text{mg}/100\text{ mL}$, $n = 3$)

批号	丹参素	原儿茶醛	淫羊藿苷
20181217	17.80	8.20	16.15
20181219	17.54	8.30	16.09
20181221	18.02	8.32	16.17

2.4 淫羊藿苷含量测定

2.4.1 色谱条件^[8-9]

色谱柱:Purospher Star RP-C₁₈柱(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相:以乙腈-0.1%磷酸溶液(26:74, V/V);流速:0.8 mL/min;检测波长:269 nm;进样量:8 μL 。

2.4.2 溶液制备

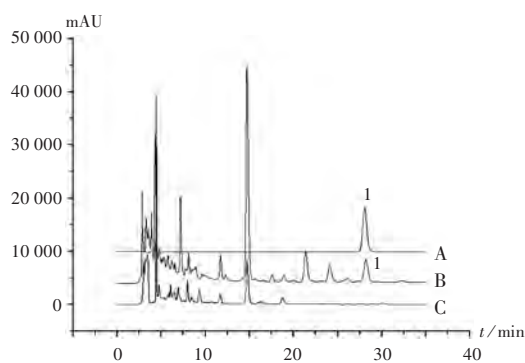
取淫羊藿苷对照品1.29 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.129 g/L的淫羊藿苷对照品贮备液。精密吸取样品(批号为20181217)5 mL,置50 mL容量瓶中,加甲醇40 mL,超声处理(功率为300 W,频率25 kHz)20 min,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,滤过,续滤液浓缩至5 mL,即得供试品溶液。

2.4.3 方法学考察

专属性试验:按处方和制备工艺制备不含淫羊藿的阴性对照样品,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照品溶液。分别精密吸取上述3种溶液各10 μL ,注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定。色谱图见图4。

线性关系考察:精密量取上述对照品贮备液,用甲醇逐级稀释成8.063,16.125,32.250,64.500,96.750,129.000 $\mu\text{g/mL}$ 系列质量浓度的对照品溶液,精密吸取上述对照品溶液各16 μL ,按拟订色谱条件及方法分别进样,记录峰面积。以对照品溶液质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性拟合,得淫羊藿苷的回归方程 $Y = 33\,267.217 X + 10\,163.538$, $r = 1.000\,0$ ($n = 6$)。结果表明,淫羊藿苷质量浓度在8.063~129.000 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

精密度试验:精密吸取上述对照品贮备液10 μL ,按拟订色谱条件连续进样6次,记录淫羊藿苷的峰面积。



1. 淫羊藿苷
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液
图4 淫羊藿高效液相色谱图

结果的 RSD 为 0.48% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取样品(批号为 20181217), 依法制备供试品溶液, 精密吸取 $5\ \mu\text{L}$, 按拟订色谱条件分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 时进样测定。结果淫羊藿苷含量的 RSD 为 2.49% ($n=6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

重复性试验: 取样品(批号为 20181217), 依法制备供试品溶液 6 份, 按拟订色谱条件进样测定。结果淫羊藿苷含量的 RSD 为 1.84% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 平行取 6 份已知含量的样品各 $10\ \text{mL}$, 分为平行 2 份 3 个水平, 分别加入含量相当量 80%, 100%, 120% 的淫羊藿苷对照品粉末, 依法制备供试品溶液, 每次进样 $5\ \mu\text{L}$, 记录色谱图, 测量淫羊藿苷的峰面积, 代入回归方程计算。结果淫羊藿苷的平均回收率为 99.80% , RSD 为 1.08% ($n=6$)。

定量限、检测限确定: 取上述对照品贮备液逐级稀释, 取信噪比 (S/N) 为 10 的作为定量限, 淫羊藿苷的定量限为 $1.954\ \text{ng}$; 取 S/N 为 3 的作为检测限, 淫羊藿苷的检测限为 $0.279\ \text{ng}$ 。

2.4.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 20181217, 20181219, 20181221)样品, 依法平行制备 2 份供试品溶液, 按拟订色谱条件分别进样测定, 计算含量。结果见表 1。

3 讨论

3.1 薄层色谱鉴别要求

对白术进行薄层色谱鉴别时, $105\ ^\circ\text{C}$ 加热至紫外灯下检视, 主斑点不清晰, $105\ ^\circ\text{C}$ 加热时间略长, 但羧甲基纤维素未碳化变黑后, 主斑点显色清晰。对大黄进行薄层鉴别时, 参考 2015 年版《中国药典(一部)》中八正合剂相应药材的鉴别方法, 方法简单、合理, 斑点显色清晰, 分离效果好。

3.2 丹参中有效成分含量分析指标确定

丹参中有效成分主要为脂溶性的丹参酮类和水溶性的酚酸类化合物, 2015 年版《中国药典(一部)》规定了丹参的含量测定成分为丹参酮类和丹酚酸 B。丹参酮类化合物具有脂溶性高、对光和温度不稳定、半衰期短等缺点。GONG 等^[10]报道了丹酚酸 B 受热后降解为丹酚酸 A、咖啡酸、丹酚酸 C、丹参素、原儿茶醛等, 其降解产物可作为以丹酚酸 B 为指标进行含量分析的物质基础。原儿茶醛具有抗氧化、抑制血小板聚集、改善肾脏血液循环、减轻急性肾损伤引起的肾小管坏死的作用^[11]; 丹参素可降低肾小管上皮细胞转分化为成纤维细胞的比率, 维持肾小管上皮细胞的正常形态^[12]。对含有丹参的中药复方制剂进行含量测定时, 多以丹参素和原儿茶醛作为指标^[13]。故本试验中选择了丹参中的 2 种水溶性成分(丹参素和原儿茶醛)为指标进行含量分析。

3.3 流动相选择

流动相采用了甲醇(B) - 0.4% 冰醋酸水溶液(C) 等度洗脱^[14], 结果发现峰形拖尾较严重, 样品中化合物的峰高被压得很低。选择流动相乙腈(B) - 0.4% 冰醋酸水溶液(C) 梯度洗脱, $0\sim7\ \text{min}$ 时 $2\%\sim5\%$ (B), $7\sim35\ \text{min}$ 时 $5\%\sim13\%$ (B)^[15], 但原儿茶醛与其前面一个未知峰未分开。经多次调整梯度洗脱的流动相比比例, 但峰形越来越无法分开, 因此减少梯度洗脱比例变化的幅度, 采用乙腈(B) - 0.4% 冰醋酸水溶液(C) 梯度洗脱, $0\sim40\ \text{min}$ 时 $3\%\sim9\%$ (B)、 $0\sim35\ \text{min}$ 时 $3\%\sim11\%$ (B), 前者出峰时间较长, 后者原儿茶醛与其前面一个峰相邻太近。最后采用 $0\sim35\ \text{min}$ 时 $3\%\sim10\%$ (B) 的比例, 则丹参素和原儿茶醛可完全与杂峰分离, 且峰形和出峰时间较好。

3.4 淫羊藿流动相和检测波长选择

淫羊藿中多以淫羊藿苷为指标进行含量测定^[15-16]。曾考察乙腈 - 水 (25:75, 26:74, 28:72, 30:70, V/V), 其中流动相比比例为 25:75 时出峰时间太长, 为 28:72 和 30:70 时基线不稳, 为 26:74 时样品分离度良好, 略有拖尾。故确定用乙腈 - 0.1% 磷酸水溶液 (26:74, V/V) 作为淫羊藿苷的流动相。使用二极管阵列检测器 (PDA) 进行了全波长扫描 ($190\sim800\ \text{nm}$), 结果淫羊藿样品在 $269\ \text{nm}$ 波长处淫羊藿苷有较大吸收, 且杂质成分干扰少, 故选择 $269\ \text{nm}$ 作为淫羊藿苷的检测波长。

参考文献:

- [1] 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, 2015: 459, 995.
- [2] 沈 烨, 曹桂萍. 清热合剂的质量新标准研究[J]. 海峡药学, 2017, 29(3): 76-79.
- [3] 米婷婷, 范开华, 蒲志强, 等. 肾衰康颗粒的质量标准研究[J].