

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.013

滋阴补肾丸质量标准研究

汪爱霞¹, 孙 芸², 郭文宾¹

(1. 甘肃河西制药有限责任公司, 甘肃 张掖 734000; 2. 甘肃省张掖市食品药品检验检测中心, 甘肃 张掖 734000)

摘要:目的 完善滋阴补肾丸的质量标准。方法 采用薄层色谱法对滋阴补肾丸处方中的人参、黄芪、五味子、山药、山茱萸进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法测定黄芪中黄芪甲苷的含量, 用蒸发光散射检测器检测, 雾化器温度为 99.3 ℃, 气体为氮气, 流速为 2.7 L/min, 采用外标二点法对数方程计算含量。结果 薄层色谱图斑点清晰, 阴性对照无干扰; 黄芪甲苷进样量在 11.31~67.86 μg, $r=0.999\ 0$ ($n=6$) 范围内与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率为 97.64%, RSD 为 1.70% ($n=9$)。结论 该方法专属性强、重复性好, 可为建立滋阴补肾丸的质量标准提供参考。

关键词: 滋阴补肾丸; 薄层色谱法; 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法; 黄芪甲苷; 质量标准

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)15-0051-04

Quality Standard of Ziyin Bushen Pills

WANG Aixia¹, SUN Yun², GUO Wenbin¹

(1. Gansu Hexi Pharmaceutical Co. Ltd., Zhangye, Gansu, China 734000; 2. Gansu Zhangye Food and Drug Inspection and Testing Center, Zhangye, Gansu, China 734000)

Abstract: **Objective** To improve the quality standard of Ziyin Bushen Pills. **Methods** Qualitative identification of ginseng, schisandra, yam, and cornus in the prescription of Ziyin Bushen Pills was conducted by thin layer chromatography (TLC); determination of astragaloside IV in astragalus was conducted by high performance liquid chromatography (HPLC). Detection was done by evaporative light scattering detector; the atomizer temperature was 99.3 ℃, the gas was nitrogen and the flow rate was 2.7 L/min; the external standard two-point method was used to calculate the content by the logarithmic equation. **Results** TLC showed clear spots, with no interference with the negative contrast; the injection volume of astragaloside IV in the range of 11.31–67.86 μg had a good linear relationship with the peak area ($r=0.999\ 0$), and the average sample recovery was 97.64%, the RSD was 1.70% ($n=9$). **Conclusion** This method is highly specific and reproducible, which can provide a reference for establishing the quality standard of Ziyin Bushen Pills.

Key words: Ziyin Bushen Pills; thin layer chromatography; high performance liquid chromatography–evaporative light scattering detection; astragaloside IV; quality standard

滋阴补肾丸为包衣水丸, 由生晒参、五味子(制)、山药、锁阳、黄芪、巴戟天、山茱萸等中药组方, 具有滋阴壮阳、益精填髓功效, 主要用于腰膝酸痛、梦遗滑精、阳痿早泄等症。该制剂收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第七册)》, 有显微鉴别项, 无其他定性或

定量指标。本研究中采用薄层色谱(TLC)法对人参、山药、五味子、山茱萸对照药材进行定性鉴别, 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定黄芪中黄芪甲苷的含量^[1-10], 为该制剂的质量控制提供检验依据。现报道如下。

第一作者: 汪爱霞, 女, 大学本科, 主管药师, 主要从事中药研发和检验工作, (电子信箱)765306860@qq.com。

法可对小规格高浓度(3 mL:0.5 g)奥硝唑注射液进行无菌检查。

参考文献:

- [1] 范巍巍, 张 岩. 奥硝唑氯化钠注射液无菌检查方法建立[J]. 科技创新导报, 2015(10):50.
- [2] 梅运红, 赵 静. 一种奥硝唑注射液[P]. CN106309359A, 2017-01-11.
- [3] 陈燕华, 柯 洪, 黄永亮. 某三级甲等医院药品短缺现状与对策研究[J]. 中国药业, 2019, 28(17):76-78.
- [4] 马士洪, 肖 璜, 袁 宇, 等. 泊沙康唑注射液无菌检查方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(9):1568-1672.
- [5] 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, 2015:136-140.
- [6] 杨晓莉, 李 辉, 绳金房, 等. 2015年版《中国药典》无菌检查

法解读[J]. 中国药业, 2015, 24(24):7-11.

- [7] 闵 红, 谢毓华, 杨晓莉, 等. 注射用甲磺酸左氧氟沙星无菌方法学研究[J]. 中国药业, 2019, 28(16):38-40.
- [8] 应国红, 邓 颖, 冯丰姿. β -内酰胺酶类抗生素无菌检查方法学研究[J]. 中国现代应用药学, 2009, 26(4):312-314.
- [9] 刘雅华. 抗生素无菌检查法最佳冲洗条件选择的实验探索[J]. 贵州医药 2003, 27(9):832-838.
- [10] 李 红. 无菌、微生物限度及细菌内毒素检查方法学验证中常见问题及分析[J]. 全科口腔医学杂志, 2019, 6(2):26-30.
- [11] 赵新霞, 杨淑先, 王海波, 等. 聚山梨酯 80 对药品微生物限度检查的影响[J]. 中国药品标准, 2019, 20(3):224-230.
- [12] 肖甜甜, 姜 儒, 刘知源, 等. 注射用盐酸多西环素无菌检查方法学考察[J]. 中国药师, 2019, 22(1):191-193.

(收稿日期:2019-10-28;修回日期:2020-02-10)

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2030 型高效液相色谱仪,包括 SIL-20AC 自动进样器、LC-20AD 四元泵、CTO-20AC 柱温箱(日本岛津公司);Alltech 6000 型蒸发光散射检测器(美国奥泰公司);AG-135 型电子天平(精度为十万分之一),ME204E 型电子天平(精度为万分之一),均由梅特勒-托利多仪器有限公司提供;ZFC-2 型三用紫外分析仪(上海康禾光电仪器有限公司);KQ5200DE 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为 240 W,频率为 45 kHz)。

1.2 试药

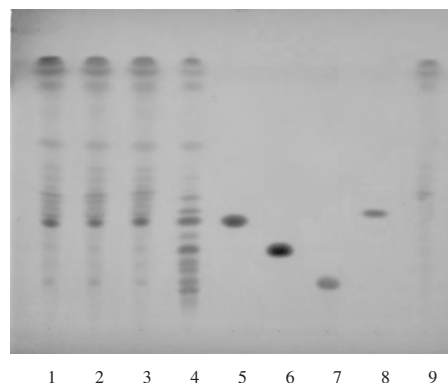
人参皂苷 R_{b1} 对照品(批号为 110704-201827),人参皂苷 R_{g1} 对照品(批号为 110703-201731),人参皂苷 R_e 对照品(批号为 110754-201827),黄芪甲苷对照品(批号为 110781-200613,含量以 100% 计),五味子醇甲对照品(批号为 110857-201714),熊果酸对照品(批号为 110742-200517),人参对照药材(批号为 120917-201110),五味子对照药材(批号为 120922-201610),山药对照药材(批号为 121137-201606),山茱萸对照药材(批号为 121495-201303),均购自中国食品药品检定研究院;滋阴补肾丸(甘肃河西制药有限公司,批号分别为 170501,170502,171201,规格为每袋 5 g);阴性样品(甘肃河西制药有限公司自制);硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(批号为 20180803),硅胶 G 薄层板(批号为 20190506),均购自青岛海洋化工厂;甲醇(批号为 63Y1811CR,纯度为 99.9%),乙腈(批号为 32Y1906HB,纯度为 99.9%),均为色谱纯,均购自美国 ACS 恩科化学有限公司,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 薄层色谱鉴别

人参和黄芪:取样品适量,研细,取约 6 g,精密称定,置索氏提取器中,加甲醇适量,加热回流提取 7 h,提取液回收甲醇至干,残渣加水 25 mL,微热使溶解,用乙醚轻摇洗涤 2 次,每次 20 mL;水溶液再用水饱和的正丁醇振摇提取 6 次,每次 20 mL,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 3 次,每次 40 mL,正丁醇液回收溶剂至干,残渣用甲醇溶解,转移至 10 mL 容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μ m)滤过,取续滤液作为供试品溶液。同法制备人参对照药材溶液。再取人参皂苷 R_{b1} 对照品、人参皂苷 R_{g1} 对照品、人参皂苷 R_e 对照品及黄芪甲苷对照品,分别加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。取不含人参和黄芪的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述供试品溶液与对照药材溶液各

10 μ L,对照品溶液 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-水(15:40:22:10, V/V/V/V) 10 $^{\circ}$ C 以下放置的下层溶液为展开剂,展开,展距 18 cm,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。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 1。

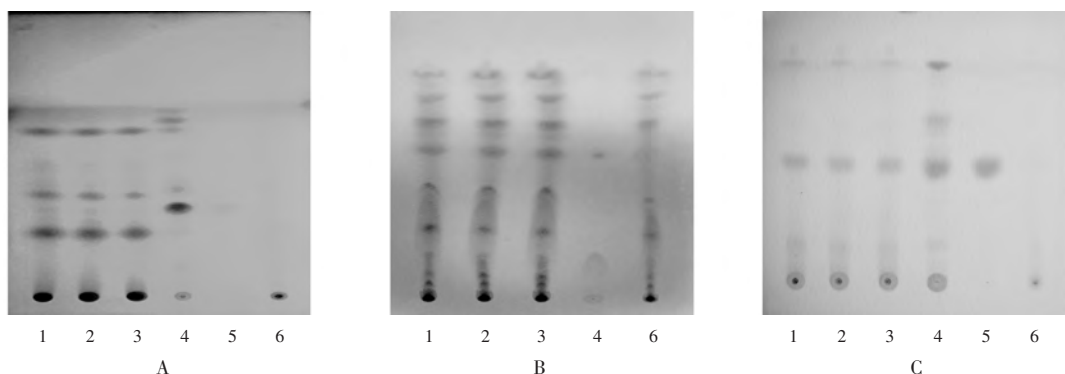


1-3. 供试品溶液 4. 人参对照药材溶液 5. 人参皂苷 R_{g1} 对照品溶液 6. 人参皂苷 R_e 对照品溶液 7. 人参皂苷 R_{b1} 对照品溶液 8. 黄芪甲苷对照品溶液 9. 阴性对照品溶液

图 1 人参和黄芪薄层色谱图

五味子:取样品 6 g,研细,加 70% 甲醇 30 mL,加热回流 1 h,滤过,滤液蒸干,残渣用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液 20 mL 溶解,用乙酸乙酯振摇提取 2 次,每次 20 mL,分取乙酸乙酯液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取五味子对照药材 1 g,同法制备对照药材溶液。再取五味子醇甲对照品,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。取不含五味子的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 4 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲醇(15:5:0.3, V/V/V)为展开剂,展开,展距 15 cm,取出,晾干,在紫外光(254 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 2 A。

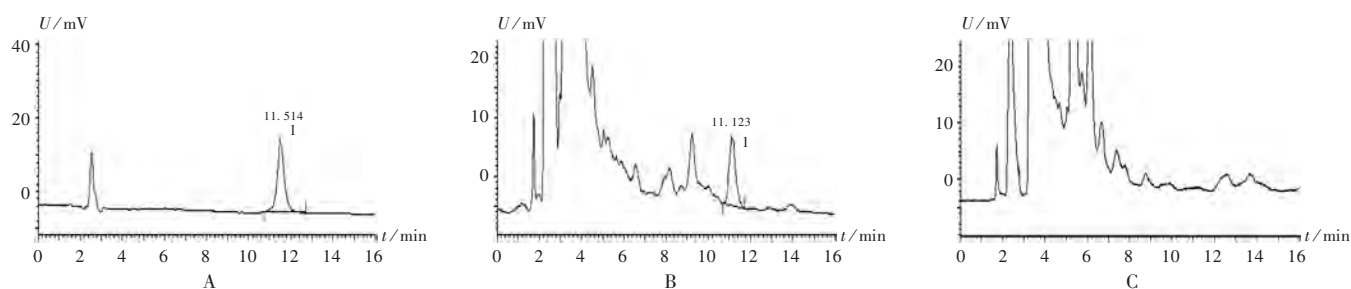
山药:取样品 5 g,研细,加甲醇 30 mL,超声处理 30 min,滤过,滤液回收溶剂至干,残渣加水 20 mL 使溶解,再加盐酸 1 mL,加热回流 1 h,冷却,用三氯甲烷振摇提取 2 次,每次 25 mL,合并三氯甲烷液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取山药对照药材 2 g,同法制备对照药材溶液。取不含山药的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 3 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-丙酮(9:1.5, V/V)为展开剂,展



1-3. 供试品溶液 4. 对照药材溶液 5. 对照品溶液 6. 阴性对照品溶液

A. 五味子 B. 山药 C. 山茱萸

图2 五味子、山药和山茱萸薄层色谱图



1. 黄芪甲苷

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图3 高效液相色谱-蒸发光散射检测器色谱图

开,展距 17 cm,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 ℃ 加热至斑点清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 2 B。

山茱萸:取样品 5 g,研细,加水 30 mL,放置使溶散,用滤纸滤过,药渣再用水 30 mL 洗涤,在室温干燥至呈松软的粉末状,于 100 ℃ 烘干,连同滤纸一并置索氏提取器内,加乙醚适量,加热回流提取 4 h,提取液回收乙醚至干,残渣用石油醚(30~60 ℃)浸泡 2 次,每次 15 mL(浸泡约 2 min),倾去石油醚,残渣加无水乙醇-三氯甲烷(3:2, V/V)混合液 3 mL,微热使溶解,作为供试品溶液。取山茱萸对照药材 1 g,加乙酸乙酯 10 mL,超声处理 15 min,滤过,滤液蒸干,残渣加无水乙醇 2 mL 使溶解,作为对照药材溶液。另取熊果酸对照品,加无水乙醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液,作为对照品溶液。取不含山茱萸的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。照薄层色谱法试验,吸取上述 4 种溶液各 5 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以环己烷-三氯甲烷-乙酸乙酯(20:5:8, V/V/V)为展开剂,展开,展距 8 cm,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,在 105 ℃ 加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液和对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰。详见图 2 C。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS2 C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(35:65, V/V);检测器:蒸发光散射检测器;流速:1 mL/min; N_2 流速:2.7 L/min;柱温:30 ℃;进样量:5, 20 μ L;雾化器温度:99.3 ℃。

2.2.2 溶液制备

取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 2 mg 的溶液,作为对照品贮备溶液。精密量取对照品贮备液 5 mL,加甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,即得对照品溶液。按 2.1 项下方法制备供试品溶液。取不含黄芪药材的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2.2 项下 3 种溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果阴性对照无干扰,专属性强。色谱图见图 3。

线性关系考察:取黄芪甲苷对照品 11.31 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加甲醇稀释并定容,摇匀,得对照品母液(质量浓度为 0.226 2 mg/mL),再分别精密吸取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mL,分别置 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,稀释成不同质量浓度的对照品溶液,按拟订色谱条件分别进样 10 μ L,测定色谱峰,

计色谱峰面积,以黄芪甲苷进样量的对数(X)为横坐标、峰面积积分值的常用对数(Y)为纵坐标作标准曲线,得黄芪甲苷回归方程 $Y = 1.5703X + 5.5295$, $r = 0.9990$ ($n=6$)。结果表明,黄芪甲苷进样量在 11.31 ~ 67.86 μg 范围内与峰面积线性关系良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,按拟订色谱条件分别于 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 时进样 20 μL 测定,记录黄芪甲苷色谱峰的峰面积。结果的 RSD 为 0.66% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

精密度试验:精密吸取黄芪甲苷对照品溶液 10 μL ,注入液相色谱仪,连续进样 6 次,按拟订色谱条件测定峰面积。结果的 RSD 为 0.14% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为 171201)样品共 6 份,精密称定,依法制备供试品溶液,并测定含量。结果黄芪甲苷平均含量为 0.070 mg/g, RSD 为 2.16% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为 171201)3.0 g,精密称定,共 9 份,分别精密加入 2.2 项下高、中、低剂量的黄芪甲苷对照品贮备液,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 黄芪甲苷加样回收试验结果($n=9$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
3.0058	0.2104	0.1810	0.3878	98.01		
3.0026	0.2102	0.1810	0.3894	99.01		
3.0014	0.2101	0.1810	0.3847	96.46		
3.0021	0.2101	0.2262	0.4281	96.37		
3.0046	0.2103	0.2262	0.4335	98.67	97.64	1.70
3.0072	0.2105	0.2262	0.4270	95.71		
3.0089	0.2106	0.2714	0.4762	97.86		
3.0065	0.2105	0.2714	0.4838	100.70		
3.0109	0.2108	0.2714	0.4713	95.98		

2.2.4 样品含量测定

取滋阴补肾丸 3 批,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,以外标两点法对方程计算含量。结果批号分别为 170501, 170502, 171201 的 3 批样品中黄芪甲苷含量分别为 0.0669, 0.0674, 0.0700 mg/g, 平均 0.0681 mg/g。

3 讨论

3.1 提取条件优化

通过试验,对提取溶剂(甲醇、70% 甲醇溶液和 50% 甲醇溶液)、提取方法(超声、索氏提取)和提取时间(4 h 和 7 h)进行比较。结果表明,用甲醇索氏提取 7 h 为最优提取条件。

3.2 测定方法选择

黄芪甲苷含量测定方法有 HPLC 法(紫外检测器与蒸发光散射检测器)、薄层扫描法、荧光法等^[11-13]。该制剂药味较多,成分复杂,薄层色谱定量测定方法重复性及稳定性较差,选用薄层色谱法进行黄芪甲苷定性鉴别。黄芪甲苷属四环三萜类皂苷, λ_{max} 为 200.08 nm,为紫外末端吸收,紫外检测灵敏度低,干扰因素多^[14],不适用于紫外检测器。HPLC 法(蒸发光散射检测器)为质量型通用检测器,其响应大小决定于被分析物质颗粒的数量和大小,而不受流动相溶剂的干扰,不要求被检测组分有特定的化学结构^[15],适用于结构中无共轭体系、紫外吸收较弱的化合物,选用该方法灵敏度高,重复性好,结果无干扰。

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: 302, 743, 777, 994, 1516.
- [2] 刘翠华, 吕畅. HPLC 法鉴别黄芪与红芪中黄芪甲苷含量的研究[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(9): 24-25.
- [3] 张火旺, 蔡勇科, 吴志国, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定养阴生津片中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业, 2016, 25(20): 53-55.
- [4] 夏玉凤, 杨勤, 薛丽琼, 等. 玉屏风口服液的质量标准研究[J]. 中成药, 2003, 25(12): 21-24.
- [5] 莫美红, 刘仔. 何氏养肾方颗粒质量标准研究[J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(8): 236-238.
- [6] 张凤瑞, 周贤, 刘炎, 等. 当归补血汤中黄芪的鉴别及黄芪甲苷的含量测定[J]. 吉林中医药, 2013, 33(3): 289-291.
- [7] 袁林, 冉丽娟. HPLC-ELSD 法测定芪香益肾颗粒黄芪甲苷含量[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(24): 3777-3778.
- [8] 林帅军, 崔燕兵, 邢志霞, 等. HPLC-ELSD 法测定乙肝益气解郁颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中医药导报, 2017, 23(5): 47-49.
- [9] 朱克旭, 李永宏, 刘冰冰. HPLC-ELSD 法测定芪心合剂中黄芪甲苷的含量[J]. 安徽医药, 2011, 15(11): 1364-1365.
- [10] 翁燕, 陆超, 蔡云珊, 等. 益气活血颗粒质量标准研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(11): 1625-1630.
- [11] 王红, 杨慈海, 宋军, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定抗栓通络丸中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业, 2016, 25(4): 75-77.
- [12] 张莲珠. HPLC 测定黄芪甲苷概况[J]. 中成药, 2005, 27(5): 587-589.
- [13] 谢紫薇, 谭天林, 王璇萍, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定健儿宝颗粒中黄芪甲苷含量[J]. 中国药业, 2016, 25(13): 77-79.
- [14] 张丽, 佟巍, 龚海英, 等. 双波长薄层色谱扫描法测定复方黄芪胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 武警医学院学报, 2008, 17(6): 492-494.
- [15] 欧阳春华. 黄芪甲苷含量测定几种常用方法的比较[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3(15): 139-141.

(收稿日期: 2019-12-03; 修回日期: 2020-02-26)