

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.06.015

尿毒营养合剂质量标准研究*

杨亮, 曾真, 李正胜, 朴春梅, 周训蓉[△]

(贵州中医药大学第二附属医院, 贵州 贵阳 550003)

摘要:目的 建立尿毒营养合剂的质量标准。方法 采用薄层色谱(TLC)法对制剂中的黄芪、茯苓、白术、山药进行定性鉴别;采用高效液相色谱(HPLC)法测定黄芪甲苷含量,色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(34:66, V/V),流速为 1 mL/min,检测器为蒸发光散射检测器(ELSD),柱温为 30 ℃,漂移管温度为 60 ℃。结果 黄芪、茯苓、白术、山药的 TLC 图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。黄芪甲苷进样量在 0.87~17.31 μg 范围内的自然对数值与峰面积自然对数值线性关系良好;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 3.0%;平均加样回收率为 105.28%, RSD 为 2.20% (n=6)。结论 所建立的方法可用于尿毒营养合剂的质量控制。

关键词:尿毒营养合剂;黄芪甲苷;薄层色谱法;高效液相色谱法;质量标准

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)06-0054-04

Quality Standard of Niaodu Yingyang Mixture

YANG Liang, ZENG Zhen, LI Zhengsheng, PU Chunmei, ZHOU Xunrong

(The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou, China 550003)

Abstract: Objective To establish the quality standard of Niaodu Yingyang Mixture. **Methods** Thin-layer chromatography(TLC) method was adopted for the qualitative identification of *Radix Astragalus membranaceus*, *Poria cocos*, *Rhizoma Atractylodis macrocephalae* and *Rhizoma Dioscorea oppositifolia* in Niaodu Yingyang Mixture. High-performance liquid chromatography(HPLC) method was adopted for the content determination of astragaloside IV, the chromatographic column was Waters Symmetry C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water(34:66, V/V), the flow rate was 1 mL/min, the detector was evaporative light scattering detector(ELSD), the column temperature was 30 ℃, and the drift tube temperature was 60 ℃. **Results** The TLC spots of *Radix Astragalus membranaceus*, *Poria cocos*, *Rhizoma Atractylodis macrocephalae* and *Rhizoma Dioscorea oppositifolia* were clear and well separated without negative interference. The linear range of astragaloside IV was 0.87-17.31 μg. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 3.0%. The average recovery of astragaloside IV was 105.28% with RSD of 2.20% (n=6). **Conclusion** The established method can be used for the quality control of Niaodu Yingyang Mixture.

Key words: Niaodu Yingyang Mixture; astragaloside IV; TLC; HPLC; quality standard

全球慢性肾脏病(CKD)患者数量呈增长趋势,已成为威胁人类健康的重要疾病之一^[1]。CKD 导致的高磷血

症和一些慢性磷酸钙稳态紊乱,统称 CKD 相关矿物质及骨代谢紊乱(CKD-MBD),是 CKD 的主要并发症,严

*基金项目:贵州省贵阳市科技计划项目[筑科合同[2019]-9-4-17号;筑科合同[2019]-9-4-18号]。

第一作者:杨亮,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为中药安全性和有效性,(电子信箱)brightnet@qq.com。

[△]通信作者:周训蓉,女,大学本科,主任药师,教授,研究方向为医院药学,(电子信箱)2398662779@qq.com。

- 西北药学杂志,2009,24(6):459-460.
- [7] 王丛丛. 高效液相色谱与薄层扫描法测定大山楂丸中熊果酸含量比较[J]. 世界最新医学信息文摘,2015,15(18):35-36.
- [8] 杨群,曹军,陶静. 降脂宁片的薄层色谱研究[J]. 中国现代药物应用,2011,5(18):1-2.
- [9] 陈健,张越,王洪兰,等. 当归标准汤剂 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量研究[J]. 中草药,2019,50(20):4942-4949.
- [10] 刘雪枫,梁希晨,岳栋芳,等. 高效液相色谱法测定当归芍药散不同极性部位中阿魏酸和芍药苷的含量[J]. 甘肃中医药大学学报,2019,36(1):33-38.
- [11] 李荃曼. HPLC 测定当归苦参丸中阿魏酸的含量[J]. 青海医药杂志,2019,49(1):40-41.
- [12] 姬蕾. 中药决明子和钩藤的质量控制研究[D]. 北京:北京中医药大学,2019.
- [13] 杨国静. 决明子商品规格等级及其质量特征研究[D]. 郑州:河南中医药大学,2018.
- [14] 朱琳,张志同,陈隽,等. UPLC 法测定决明子中 4 种蒽醌类成分的含量[J]. 药学与临床研究,2019,27(6):433-436.
- [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,2015:31,133,145.
- [16] 卫向锋,孙婷婷,张红,等. 多动安颗粒质量标准研究[J]. 中国药业,2020,29(9):131-134.
- [17] 申玉龙,徐达,金艳敏,等. 高效液相法测定决明子 4 种成分含量[J]. 中国药业,2020,29(9):134-136.

(收稿日期:2020-05-17;修回日期:2020-07-10)

重影响血液透析患者的预后^[2-3]。目前,西医的诊疗方案不能完全改善 CKD-MBD 状态^[4]。尿毒营养合剂为我院医院制剂,根据 CKD-MBD 患者脾肾亏虚、浊毒内蕴、血络瘀阻的病机特点,以黄芪、白术、党参、山药益气健脾,茯苓、薏苡仁健脾利湿,地锦草、大黄泻火解毒,建曲消食和胃,肉苁蓉、黄精补肾填精,纵观全方,既补后天之脾气,亦补先天之肾精,化痰泄浊,补泻兼施,使脾气健运,胃复和降,肾精充盈,诸证自除。前期临床研究表明,该制剂可改善维持性血液透析患者矿物质和骨代谢状况及中医临床症状积分^[5]。本研究采用薄层色谱(TLC)法定性鉴别黄芪、茯苓、白术和山药,采用高效液相色谱(HPLC)法测定君药黄芪主要成分黄芪甲苷的含量^[6],为尿毒营养合剂质量标准的建立提供依据。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent1260 Infinity II 型高效液相色谱仪,包括蒸发光散射检测器(ELSD),均购自美国 Agilent 公司;MS105DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);KQ-500DA 型超声波清洗器(江苏省昆山市超声仪器有限公司);HH-4 型恒温水浴锅(江苏省常州澳华仪器有限公司);TG-18 型高速离心机(山东博科生物有限公司)。

1.2 试剂

尿毒营养合剂(批号分别为 160501,160502,160503),缺黄芪、茯苓、白术、山药的阴性样品,均由医院制剂室提供;黄芪甲苷对照品(批号为 110781-201616,含量为 97.4%),黄芪对照药材(批号为 120974-201612),茯苓对照药材(批号为 121117-201502),白术对照药材(批号为 120925-201610),山药对照药材(批号为 121137-201504),均购自中国食品药品检定研究院;硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂、浙江台州黄岩区路桥生化塑料厂);硅胶 HSG 薄层板(烟台江友硅胶开发有限公司);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 黄芪

取样品适量,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液约 25 mL,加水 20 mL,混匀,用正己烷振摇提取 2 次,每次 40 mL,弃去正己烷液,合并水液;用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次,每次 40 mL,合并水饱和的正丁醇液;用氨试液洗涤 2 次,每次 50 mL,合并水饱和的正丁醇液;用水洗涤 2 次,每次 50 mL,合并正丁醇液,蒸干,残渣加甲醇 1 mL 使溶解,作为供试品溶液^[7]。取黄芪甲苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 1 mg 的对照品溶液。取黄芪对照药材粉末 2 g,精密称定,同法制备对照药材溶液。取缺黄芪的阴性样品适量,同法制备阴性对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 项下方法试验^[8],分别量取上述 4 种溶液各 10 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2, V/V/V) 5~10 $^{\circ}$ C 条件下放置 12 h 的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液及对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰^[9-10],详见图 1A。

2.1.2 茯苓

取样品适量,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液约 25 mL,加水 20 mL,混匀,用正己烷振摇提取 2 次,每次 40 mL,合并正己烷液,挥干,残渣加正己烷 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取茯苓对照药材 1 g,精密称定,加水适量,煎煮 30 min,放冷,滤过,同法制备对照药材溶液。取缺茯苓的阴性样品适量,同法制备阴性对照品溶液^[11]。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 项下方法试验,分别量取上述 3 种溶液各 20 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙醚(1:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。

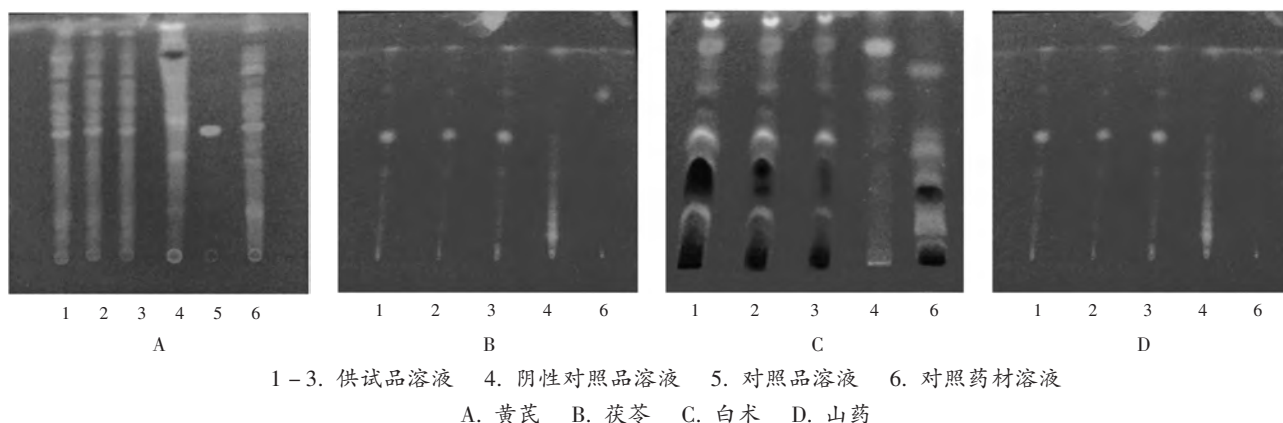


图1 薄层色谱图

1-3. test solution 4. negative reference solution 5. reference solution 6. reference material solution
A. *Radix Astragalus membranaceus* B. *Poria cocos* C. *Rhizoma Atractylodis macrocephalae* D. *Rhizoma Dioscorea oppositifolia*

Fig. 1 TLC chromatograms

结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰^[9-10],详见图1B。

2.1.3 白术

取样品适量,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液约 25 mL,用乙酸乙酯振摇提取 2 次,每次 40 mL,合并乙酸乙酯液,挥干,残渣加乙酸乙酯 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。取白术对照药材 1 g,精密称定,加水适量,煎煮 30 min,放冷,滤过,同法制备对照药材溶液。取缺白术的阴性样品适量,同法制备阴性对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 项下方法试验^[7],分别量取上述 3 种溶液各 10 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯(9:1, V/V)为展开剂^[12],展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰^[9-10],详见图 1C。

2.1.4 山药

取样品适量,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液约 25 mL,用三氯甲烷振摇提取 2 次,每次 40 mL,合并三氯甲烷液,挥干,残渣加三氯甲烷 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。另取山药对照药材 1 g,精密称定,加水适量煎煮 30 min,放冷,滤过,同法制备对照药材溶液。取缺山药的阴性样品适量,同法制备阴性对照品溶液。按 2015 年版《中国药典(四部)》通则 0502 项下方法试验^[7],分别量取上述 3 种溶液各 10 μ L,点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-乙酸乙酯(12:1, V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,加热至斑点显色清晰^[13]。结果供试品溶液色谱中,在与对照药材溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图 1D。

2.2 含量测定^[8]

2.2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-水(34:66, V/V);流速:1 mL/min;检测器:ELSD;柱温:30 $^{\circ}$ C;漂移管温度:60 $^{\circ}$ C^[8]。

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 含黄芪甲苷 0.8 mg 的溶液,即得对照品溶液。取 2.1.1 项下供试品溶液,置 5 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得供试品溶液^[14]。按尿毒营养合剂处方及工艺制备缺黄芪的阴性样品,同法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

系统适用性试验:取 2.2.2 项下对照品溶液、供试品溶液各适量,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,色谱图见图 2。结果理论板数按黄芪甲苷峰计应不低于 3 000,分离度均大于 4 000。

专属性试验:取 2.2.2 项下对照品溶液及阴性对照品溶液各适量,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,色谱图见图 2。结果阴性对照品溶液色谱图中,在与黄芪甲苷对照品溶液色谱相同保留时间处无干扰峰,表明专属性良好。

线性关系考察:取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为 0.865 3 mg/mL 的对照品溶液,精密量取 1, 2, 5, 10, 20 μ L,按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以黄芪甲苷进样量的自然对数值(X)为横坐标、峰面积自然对数值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=1.5413X-3.7802(r=0.9950)$ 。结果表明,黄芪甲苷进样量在 0.87 ~ 17.31 μ g 范围内的自然对数值与峰面积自然对数值线性关系良好。

精密度试验:取 2.2.2 项下对照品溶液适量,按 2.2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果黄芪甲苷峰面积自然对数值的 RSD 为 0.23% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取 2.2.2 项下供试品溶液适量,分别于室温下放置 0, 1, 4, 8, 13, 20, 40 h 时按 2.2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果黄芪甲苷峰面积的 RSD 为 0.84% ($n=7$),表明供试品溶液在室温放置 40 h 内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为 160501)适量,精密称

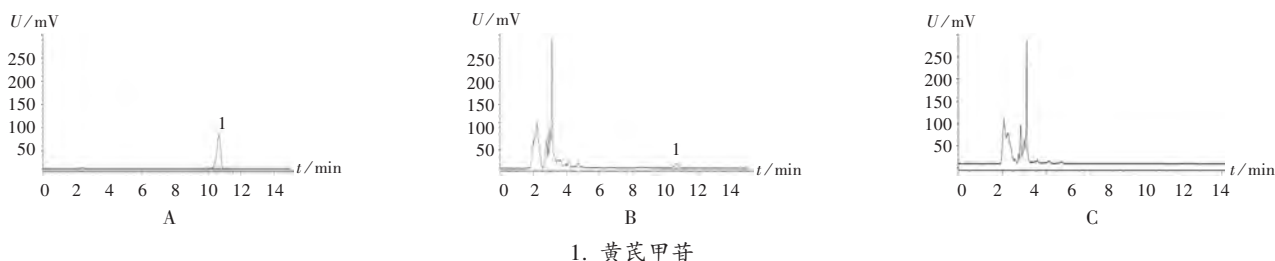


图2 高效液相色谱图

1. astragaloside IV

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

定,共6份,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果黄芪甲苷含量平均值为0.03135 mg/mL, RSD为2.90% ($n=6$),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160501)适量,共6份,分别加入一定质量浓度的黄芪甲苷对照品溶液,按2.2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery tests($n=6$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.3919	0.4326	0.8490	105.66	105.28	2.20
0.3919	0.4326	0.8477	105.36		
0.3919	0.4326	0.8430	104.28		
0.3919	0.4326	0.8344	102.29		
0.3919	0.4326	0.8450	104.74		
0.3919	0.4326	0.8649	109.34		

2.2.4 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按2.2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.2.1项下色谱条件进样测定,平行测定3次,记录峰面积,并计算样品含量。结果见表2。

表2 样品中黄芪甲苷含量测定结果(mg/mL, $n=2$)

Tab. 2 Results of content determination of astragaloside IV in the samples(mg/mL, $n=2$)

批次	1	2	$\bar{X}$
160501	0.0318	0.0301	0.0309
160502	0.0323	0.0318	0.0320
160503	0.0313	0.0318	0.0316

3 讨论

预试验中比较了样品加乙醚振摇及样品浓缩加硅藻土,以甲醇、水饱和的正丁醇分别加热回流提取样品前处理方法,结果均出现斑点分离不佳、拖尾严重或提取过程乳化较严重的现象。参考文献[15]考察展开剂,黄芪TLC鉴别中考察了三氯甲烷-甲醇-水(30:10:1, V/V/V)和三氯甲烷-甲醇(10:1, V/V),茯苓TLC鉴定考察了石油醚(60~90℃)-乙醚(3:2, V/V)和石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(1:1, V/V),白术TLC鉴别中考察了石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(5:1, 50:1, V/V),山药TLC鉴定考察了正丁醇-冰醋酸-水(4:1, V/V)和乙酸乙酯-甲醇-浓氨试液(9:1:0.5, V/V/V),结果均欠佳。TLC耐用性分别考察了25℃下不同相对湿度(35%, 59%, 75%),以及相对湿度59%时不同温度(10, 25, 35℃)对TLC结果的影响,结果文中所用定性鉴别方法耐用性均较好。

黄芪甲苷作为尿毒营养合剂方中君药黄芪的有效成

分^[16],因其无紫外吸收的结构特性,提取纯化及检测方法较其他成分更复杂。预试验中,供试品溶液制备方法对比了加硅藻土、乙醚、振摇提取结果。色谱条件考察了不同厂家C₁₈柱,不同流动相[乙腈-水(32:68, V/V)和0.1%甲酸(冰醋酸)-乙腈等]的流动性,不同柱温(30, 35, 40℃),不同漂移管温度(50, 60, 70℃)对含量测定结果的影响。结果黄芪甲苷分离度欠佳,阴性样品中某些成分存在干扰,最终建立了文中所用制备方法及其色谱条件。

综上所述,该研究所建立的方法可用于尿毒营养剂的质量控制。

参考文献

- [1] ELIAS RM, DALBONI MA, COELHO ACE, et al. CKD-MBD: from the Pathogenesis to the Identification and Development of Potential Novel Therapeutic Targets[J]. Current Osteoporosis Reports, 2018, 16(6):693-702.
- [2] RODELO-HAAD C, SANTAMARIA R, MUÑOZ-CASTAÑEDA JR, et al. FGF23, Biomarker or Target? [J]. Toxins, 2019, 11(3):175.
- [3] LUO L, CHEN Q. Effect of CKD-MBD phenotype on health-related quality of life in patients receiving maintenance hemodialysis: A cross-sectional study[J]. J Int Med Res, 2020, 48(2):1-17.
- [4] PAZIANAS M, MILLER PD. Current Understanding of Mineral and Bone Disorders of Chronic Kidney Disease and the Scientific Grounds on the Use of Exogenous Parathyroid Hormone in Its Management[J]. Journal of Bone Metabolism, 2020, 27(1):1-13.
- [5] 李正胜, 卢晶晶, 谢娟, 等. 尿毒营养膏对维持性血透患者矿物质和骨代谢的影响[J]. 贵阳中医学院学报, 2016, 38(5):40-42.
- [6] 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, 2015:28-29, 103-104, 240-241, 302-303.
- [7] 张蓓, 罗旭明, 李默影, 等. 芪仙地花颗粒质量标准的研究[J]. 中成药, 2019, 41(3):521-525.
- [8] 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, 2015:57-60.
- [9] 周亚萍, 谈瑛忠, 毛春芹, 等. 芪术益气润肠颗粒质量控制方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(3):67-71.
- [10] 钟文雨, 于士龙, 汪宇. 芪桑口服液质量标准提高研究[J]. 中国药业, 2019, 28(4):22-24.
- [11] 梁君昭, 窦建卫, 袁倩倩, 等. 桂参通脉胶囊质量标准研究[J]. 河北中医, 2015, 37(10):1557-1559.
- [12] 范桂强, 宋更申, 路伦, 等. 六味颈康胶囊质量标准的建立[J]. 中国药师, 2016, 19(8):1605-1608.
- [13] 曹云飞. 消癥颗粒的制备工艺与质量标准研究[D]. 济南:山东中医药大学, 2016.
- [14] 罗春颖. 腰痛片及腰痛胶囊质量标准的研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2018.
- [15] 崔恩忠, 唐安福, 贡磊, 等. 消石通颗粒质量标准研究[J]. 中国药业, 2019, 28(11):50-52.
- [16] 薛志红. 参芪养心颗粒制备工艺及质量标准研究[D]. 合肥:安徽中医药大学, 2016.

(收稿日期:2020-05-12;修回日期:2020-07-26)