

## 益肾排毒丸中有效成分含量测定及指纹图谱研究

邓 斌<sup>1</sup>, 王秋燕<sup>2</sup>, 周成高<sup>2</sup>, 张琪琳<sup>1\*</sup>

1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 药剂科, 湖北 武汉 430022

2. 华中科技大学同济医学院 药学院, 湖北 武汉 430030

**摘要:** 目的 建立一种 RP-HPLC 同时测定益肾排毒丸中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚等 3 种成分含量的方法及指纹图谱。方法 采用 Agilent TC-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈 (A) -0.2% 甲酸溶液 (B) 梯度洗脱 (0~20 min, 20%~40% A; 20~30 min, 40% A; 30~35 min, 90% A; 35~40 min, 20% A), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长 260 nm。结果 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚分离度较好, 且在各自浓度范围内呈现出良好的线性关系,  $r = 0.999 2$ ; 精密度可靠 (RSD 为 0.63%~0.74%); 样品在 12 h 内稳定; 方法重复性良好 (RSD 为 1.39%~2.00%); 3 种成分的平均加样回收率分别为 100.3%、100.5%、103.2%, RSD 均小于 2.0%。采用 HPLC 可准确有效测出益肾排毒丸中有效成分的含量。指纹图谱研究得共有峰 32 个, 指认了其中 6 个成分, 益肾排毒丸各批次间一致性较好, 质量相对稳定。结论 该方法简便易行、稳定可靠, 可更好用于益肾排毒丸的质量控制。

**关键词:** 益肾排毒丸; 高效液相色谱法; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 大黄素; 大黄素甲醚

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2019) 04-0658-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.04.010

## Study on determination of active components content and fingerprint of Yishen Paidu Pills

DENG Bin<sup>1</sup>, WANG Qiuyan<sup>2</sup>, ZHOU Chenggao<sup>2</sup>, ZHANG Qilin<sup>1</sup>

1. Department of Pharmacy, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei 430022, China

2. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei 430030, China

**Abstract: Objective** To establish an RP-HPLC method for simultaneous determination of the contents of three ingredients (calycosin glycoside, emodin, physcion) and fingerprint in Yishen Paidu Pills. **Methods** The analysis was performed on Agilent TC-C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile (A) and 0.2% formic acid (B) in a liner gradient mode as follows: 0—20 min, 20%—40% A; 20—30min, 40% A; 30—35 min, 90% A; 35—40 min, 20% A. The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 30 ℃ and the detective wavelength was at 260 nm. **Results** The standard curves of three ingredients showed good linearity in their concentration ranges with  $r = 0.999 2$ . Precision was reliable (RSD in 0.63%—0.74%). Samples were stable in 12 h and the repeatability of method was excellent (RSD in 1.39%—2.0%). The average recovery of the three ingredients were 100.3%, 100.5% and 103.2%, respectively with RSD less than 2.0%. The contents of three ingredients in Yishen Paidu Wan can be determined accurately and effectively by HPLC. Fingerprints study of Yishen Paidu Pills indicated that they have good consistency among different batches and the quality were relatively stable. **Conclusion** The method is rapid, simple and accurate, and can be better applied for the quality control of Yishen Paidu Pills.

**Key words:** Yishen Paidu Pills; HPLC; calycosin glycoside; emodin; physcion

益肾排毒丸由黄芪、大黄、水蛭、僵蚕 4 味中药组成, 是华中科技大学同济医学院附属协和医院在

民间验方和现代医学理论及文献的基础上研制出的浓缩水丸。益肾排毒丸具有益气扶正、升清降

收稿日期: 2018-07-27

基金项目: 国家自然科学基金(81803799); 中央高校基本科研业务费专项资金(2017KFYXJJ252); 湖北省自然科学基金(2017CFB273)

第一作者: 邓 斌, 博士, 主管药师, 主要从事天然大分子物质结构分析与制剂研究。E-mail: bindeng@hust.edu.cn

\*通信作者: 张琪琳, 博士, 主管药师, 主要从事中药有效成分结构、药理作用及机制研究。Tel: (027)85726073 E-mail: qilinzhang88@163.com

油、活血化瘀利水等功效,适用于慢性肾功能不全和急慢性肾炎等,经过20余年的临床应用,已取得显著疗效<sup>[1-2]</sup>。黄芪和大黄分别为处方中的君药和臣药,前期研究对于益肾排毒丸的质量评价和质量控制,主要以臣药-大黄的有效成分如大黄酸、大黄酚、大黄素等的含量作为评价指标,还未对君药黄芪的主要有效成分如黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷等的含量进行测定<sup>[3-4]</sup>。因此,为更好地控制制剂质量,保证制剂的疗效,本研究首次建立HPLC同时测定益肾排毒丸中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚等3种成分的含量。该方法稳定可靠,简便易行,能同时测定处方中君臣药的代表性成分,可更加全面的反映制剂质量,适用于益肾排毒丸的质量控制。

## 1 材料

Agilent1260 高效液相色谱仪,Agilent化学工作站,BS 224 S型及EX125DZH型电子天平,DK-98-1型电热恒温水浴锅。

对照品毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号111920-201606,纯度97.6%)、大黄素(批号110756-201512,纯度98.7%)、大黄素甲醚(批号110758-201616,纯度99.0%)均购自中国食品药品检定研究院,供含量测定用乙腈为色谱纯,水为去离子水,其他试剂均为分析纯。益肾排毒丸(批号20170117、20170216、20170309,规格50 g/瓶)由华中科技大学同济医学院附属协和医院药剂科提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适应性试验

色谱柱为Agilent TC-C<sub>18</sub> (250mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-0.2%甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~20 min, 20%~40% A; 20~30 min, 40% A; 30~35 min, 90% A; 35~40 min, 20% A);柱温为30℃;体积流量为1.0 mL/min;检测波长260 nm;进样体积10 μL。理论塔板数按毛蕊异黄酮葡萄糖苷峰计算应不低于3 000,按大黄素峰计算应不低于4 000,按大黄素甲醚峰算应不低于3 000。

### 2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚适量,加入甲醇制成单一对照品储备液,质量浓度分别为0.2、0.36、0.04 mg/mL,取储备液毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素各1 mL,取储备液大黄素甲醚7 mL至10 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成混合对照品溶液A<sub>1</sub>,其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚质量浓度分

别为20.2、36.1、30.8 μg/mL。取混合对照品溶液A<sub>1</sub> 5 mL至10 mL量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成混合对照品溶液A<sub>2</sub>,其中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚质量浓度分别为10.1、18.05、15.4 μg/mL。

### 2.3 供试品溶液的制备

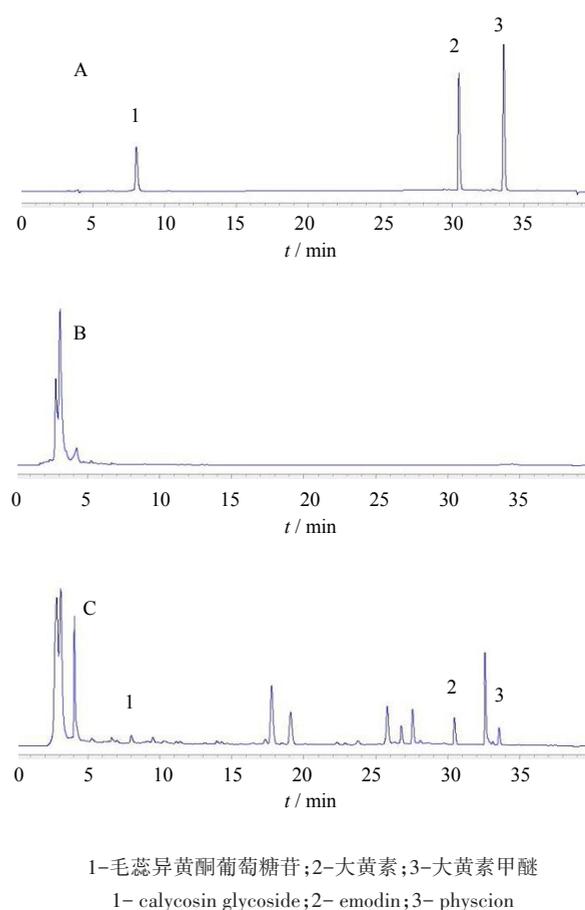
取益肾排毒丸,研细,取约2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,称定质量,加热回流1 h,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

### 2.4 阴性对照溶液的制备

按处方配比及制法,制成不含大黄、黄芪的阴性样品,按供试品溶液的制备方法制成阴性对照溶液。

### 2.5 专属性试验

分别精密吸取混合对照品溶液A<sub>2</sub>,供试品溶液及阴性对照溶液10 μL,按上述色谱条件进行分析,记录色谱图,结果见图1。毛蕊异黄酮葡萄糖苷出



1-毛蕊异黄酮葡萄糖苷;2-大黄素;3-大黄素甲醚  
1- calycosin glycoside;2- emodin;3- physcion

图1 对照品(A)、阴性对照样品(B)和益肾排毒丸(C)的HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC of reference substance (A), negative sample (B) and Yishen Paidu Pills (C)

峰时间约为7.9 min,理论板数为39 000;大黄素出峰时间约为30.4 min,理论板数为800 000;大黄素甲醚出峰时间为33.5 min,理论板数为1 100 000;阴性样品对主峰无干扰。

## 2.6 线性关系的考察

分别精密吸取混合对照品溶液 $A_1$  0.1、0.2、0.4、

0.6、0.8、1.0 mL,置10 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,分别精密吸取上述6个浓度的混合对照品溶液10  $\mu$ L,注入液相色谱仪测定。以质量浓度为横坐标( $X$ ),峰面积平均值( $Y$ )作为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程。结果见表1,各成分在线性范围内线性关系良好。

表1 标准曲线与线性范围

Table 1 Standard curve and linear range

化合物	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	线性关系	$r$
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	2.02~20.2	$Y=22.778X$	0.999 2
大黄素	3.61~36.1	$Y=27.856X$	0.999 2
大黄素甲醚	3.08~30.8	$Y=38.72X$	0.999 2

## 2.7 重复性试验

精密称取益肾排毒丸(批号20170309)6份,按照2.3项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的峰面积,结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚平均质量分数分别为0.113、0.219、0.094 mg/g, RSD分别为1.39%、1.91%、2.00%,表明该方法重复性良好。

## 2.8 精密度试验

取对照品溶液 $A_2$ ,按2.1项下色谱条件重复进样6次,每次进样量10  $\mu$ L,测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的峰面积,结果RSD分别为0.74%、0.63%、0.71%,表明仪器精密度良好。

## 2.9 稳定性试验

精密称取益肾排毒丸(批号20170309)1份,按照2.3项下方法制备1份供试品溶液,于室温下放置,分别在0.2、4、6、8、12 h进样测定,结果RSD分别为1.57%、0.67%、1.25%,表明供试品溶液在12 h内稳定。

## 2.10 加样回收率试验

精密称取已知含量的益肾排毒丸(批号20170309)9份,每份样品称样量为1 g,分别精密加入毛蕊异黄酮葡萄糖苷高、中、低质量浓度(126.3、113.0、87.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )1 mL。分别按照2.3项下供试品溶液方法制备样品。精密称取已知含量的益肾排

毒丸(批号20170309)9份,每份样品称样量为1 g,分别精密加入大黄素高、中、低质量浓度(278.2、220.2、177.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )1 mL。分别按照2.3项下供试品溶液方法制备样品。精密称取已知含量的益肾排毒丸(批号20170309)9份,每份样品称样量为0.5 g,分别精密加入大黄素甲醚高质量浓度(16.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )3.6 mL、中质量浓度(24.238  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )1.7 mL、低质量浓度(16.04  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )2.2 mL。分别按照2.3项下供试品溶液方法制备样品。以上各浓度对照品溶液均为新鲜配制。进样体积10  $\mu$ L,按照2.1项下色谱条件测定,结果毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚的平均回收率为100.29%、100.51%、103.16%,RSD值分别为1.65%、1.60%、1.39%。

## 2.11 样品含量测定

取3个批号(批号20170117、20170216、20170309)的益肾排毒丸,按2.3项下的方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件测定,结果(表2)表明3批益肾排毒丸中,大黄素与大黄素甲醚含量批次间差异不大,毛蕊异黄酮葡萄糖苷批次间有差异,规定益肾排毒丸中大黄素不得少于0.15 mg/g,大黄素甲醚不得少于0.07 mg/g,毛蕊异黄酮葡萄糖苷不得少于0.07 mg/g。

## 2.12 益肾排毒丸指纹图谱初步研究

取益肾排毒丸(批号20170117、20170216、

表2 样品测定结果( $n=3$ )

Table 2 Content of samples ( $n=3$ )

批号	毛蕊异黄酮葡萄糖苷/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	大黄素/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$	大黄素甲醚/ $(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$
20170117	0.100 $\pm$ 0.0011	0.237 $\pm$ 0.0025	0.099 $\pm$ 0.0011
20170216	0.097 $\pm$ 0.001	0.238 $\pm$ 0.0015	0.101 $\pm$ 0.0015
20170309	0.109 $\pm$ 0.001	0.227 $\pm$ 0.005	0.099 $\pm$ 0.0005

20170309、20180108、20180109、20180110), 分别按 2.3 项下的方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 图谱导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版), 以 S1(批号 20170117)为参照峰, 以中位数生成对照图谱, 时间窗宽度为 0.10, 自动匹配后

生成对照谱图, 匹配出共有峰 32 个, 指认其中 6 个, 分别为毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚, 见图 2。6 批益肾排毒丸样品相似度分别为 1.000、1.000、0.999、0.998、1.000、1.000, 表明批次间一致性较好, 质量相对稳定。

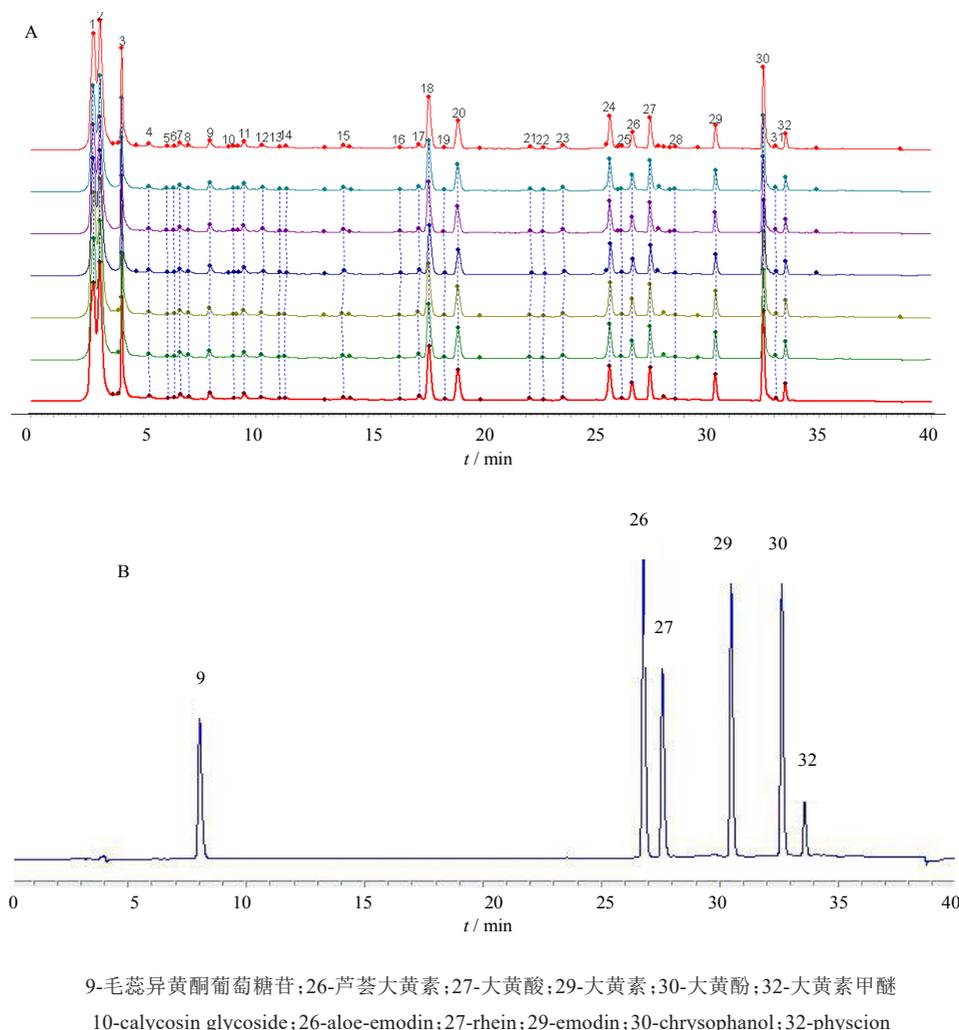


图 2 6 批益肾排毒丸的 HPLC 指纹图谱 (A) 及对照指纹图谱 (R) 和混合对照品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC fingerprint of Yishen Paidu Pills (A), reference fingerprint (R) and HPLC of mixed reference substance (B)

### 3 讨论

医院制剂的质量标准一般应首选处方中君药(主药)、贵重药、毒性药制定含量测定项目。如有困难时则可选择处方中其他药味的已知成分或者具备能反应内在质量的指标成分建立含量测定方法<sup>[5-6]</sup>。以往的研究仅以益肾排毒丸中臣药-大黄的 代表性成分作为含量测定指标, 未测定处方中君药 黄芪的代表性成分的含量, 不足以全面控制产品质量。因此, 本研究选取益肾排毒丸中黄芪和大黄的 3 种代表性成分作为指标, 建立新的含量测定方法。

《中国药典》2015 版一部收录的黄芪含量测定

的成分为黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷。黄芪甲苷结构中缺乏共轭基团, 需用蒸发光检测器检测; 而毛蕊异黄酮葡萄糖苷与大黄的主要有效成分游离蒽醌的化学极性相近, 最大吸收波长相近, 都可用紫外检测器检测<sup>[7]</sup>。文献报道, 黄酮类是黄芪中主要有效成分, 具有免疫调节、抗炎、抗病毒等功效, 而毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为黄芪中黄酮类主要成分, 是其指标性成分<sup>[9]</sup>。考虑到含量测定方法应简单、快速、有效等原则, 因而本研究选取毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为处方中君药-黄芪的指标性成分进行含量测定。

蒽醌类物质是大黄的主要活性成分, 同时也是

药典收载的大黄含量测定的指标成分,包括芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚和大黄素甲醚等<sup>[8]</sup>。文献报道,大黄素具有抗肾间质纤维化<sup>[10]</sup>,减轻肾脏局部炎性反应<sup>[11]</sup>,利尿<sup>[12]</sup>等作用;大黄素甲醚能抑制白介素-6释放,减少胶原蛋白IV及纤维连接蛋白的产生从而有抗糖尿病肾病作用<sup>[13]</sup>,作为有效成分基础,毛蕊异黄酮葡萄糖苷色谱峰、大黄素色谱峰、大黄素甲醚色谱峰与其他组分的色谱峰可达到基线分离,被测峰与相邻峰的峰分离度大于1.5,所以本研究选取这3种化合物作为指标性成分。另外,药典规定水蛭用凝血酶滴定法对抗凝血酶活性进行测定,僵蚕无含量测定方法,均不适用于本研究的含量测定法。因此,本研究也未测定水蛭和僵蚕相关成分的含量。

本实验含量测定方法主要参照2015版《中国药典》。选取的检测波长,参照2015版药典中黄芪含量测定的波长,为260 nm;供试品制备方法参照2015版药典中大黄“游离蒽醌”测定项下和黄芪“毛蕊异黄酮葡萄糖苷”测定项下的供试品制备方法;流动相比较甲醇-0.1%磷酸系统与乙腈-0.2%甲酸系统,发现在乙腈-0.2%甲酸系统下梯度洗脱时,分离效果更好。

本研究首次采用HPLC同时测定益肾排毒丸中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、大黄素、大黄素甲醚3种成分含量,填补了该制剂质控标准中对君药-黄芪质量控制的缺失,同时结合指纹图谱研究,能够更全面地控制益肾排毒丸的质量,且方法稳定可靠,简便易行,为完善该制剂的质量标准提供了新的依据。

#### 参考文献

- [1] 于丽秀,杨玉,何秋月,等.肾炎滴丸的制备与药效学考察[J].医药导报,2015:617.
- [2] 黄杰,许传文,刘建社.前列腺素E1脂微球载体制剂联合肾衰丸对慢性肾衰竭大鼠肾脏保护作用的研究[J].中国现代医学杂志,2012,22:39.
- [3] 张毓红,宋丽丽,吕永宁,等.高效液相色谱法测定肾衰丸中大黄酸和大黄酚的含量[J].中国医院药学杂志,2008,28:854.
- [4] 王虎,陈华庭,徐楚鸿.肾衰丸中大黄素的含量测定[J].中国医院药学杂志,2005,25:833.
- [5] 董自波,李超,邵建国.HPLC同时测定蒲地蓝消炎口服液中7个成分的含量[J].中国中药杂志,2015,40:1747.
- [6] 田娟,王维皓,高慧敏,等.HPLC测定复方苦参注射液苦参碱、槐定碱和氧化苦参碱的含量[J].中国中药杂志,2007,32:222.
- [7] 胡芳弟,赵健雄,封士兰,等.黄芪的高效液相色谱指纹图谱及主成分含量测定[J].中药材,2004,27:831.
- [8] 张村,李丽,肖永庆,等.大黄5种饮片中游离蒽醌类成分比较研究[J].中国中药杂志,2009,34:1914.
- [9] 滕红梅,咎亚玲,贾鹏,等.不同产地黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的比较[J].江苏农业科学,2016,44(04):226-228.
- [10] 秦建华,陈明.大黄素抗肾间质纤维化研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2006,7:185.
- [11] Li H, Chen H, Li H, et al. Regulatory effects of emodin on NF- $\kappa$ B activation and inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages [J]. Int J Mol Med, 2005, 16: 41-47.
- [12] Zhang H, Zhou C, Wu Y. Effect of emodin on small intestinal peristalsis of mice and relevant mechanism [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11: 3147-3150.
- [13] Yang Y, Yan Y M, Wei W, et al. Anthraquinone derivations from *Rumex* plants and endoohytic *Aspergillus fumigatus* and their effects on diabetic nephropathy [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23: 3905-3909.