

滋肾养阴颗粒的质量标准研究

林启焰¹, 王晗雪¹, 汪毓文¹, 程雪梅¹, 谢帆², 李文艳², 王长虹^{1*}

1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 上海市复方中药重点实验室, 上海中药标准化研究中心, 上海 201203
2. 上海市浦东新区公利医院, 上海 201315

摘要: **目的** 建立滋肾养阴颗粒(ZYG)的定性定量方法。**方法** 山茱萸的薄层色谱(TLC)鉴别;以氯仿-甲醇(3:1)为展开剂,5%香草醛-硫酸为显色剂;墨旱莲、泽泻、牡丹皮的 TLC 鉴别:以石油醚(60~90℃)-三氯甲烷-醋酸乙酯(3:1:2)作为展开剂,采用不同的检视方法,对 ZYG 中多味药材同时鉴别。采用 Boston C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈-0.1%三氟乙酸水溶液为流动相,梯度洗脱,检测波长 254 nm,对 ZYG 中莫诺昔、马钱昔、金丝桃昔、特女贞昔、丹皮酚的量进行测定。**结果** 可用莫诺昔和马钱昔对 ZYG 中的山茱萸进行定性鉴别;在同一展开条件下,分别在 254 nm 下对 ZYG 中的牡丹皮进行鉴别;在 366 nm 下对 ZYG 中的墨旱莲进行鉴别;用 5%磷钼酸乙醇为显色剂,于日光下对 ZYG 中的泽泻进行鉴别;所建立的 2 个 TLC 方法,各斑点清晰,Rf 值适中,分离度良好。以莫诺昔、马钱昔、金丝桃昔、特女贞昔和丹皮酚为指标成分进行方法学研究,其对应的线性范围分别为 4.432~110.8、4.192~104.8、4.040~101.0、4.132~103.3、4.076~101.9 μg/mL,各指标成分的相关系数均大于 0.999 7,平均加样回收率在 96.57%~98.67%,方法的日内精密密度小于 2%,日间精密密度小于 3%。方法的稳定性与重复性良好。**结论** 该方法准确灵敏,易于操作,专属性强,重复性好,可用于 ZYG 的质量控制。

关键词: 滋肾养阴颗粒;质量标准;莫诺昔;马钱昔;金丝桃昔;特女贞昔;丹皮酚

中图分类号: R283.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2017)16-3338-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.013

Studies on quality specification of Zishen Yangyin Granules

LIN Qi-yan¹, WANG Han-xue¹, WANG Yu-wen¹, CHENG Xue-mei¹, XIE Fan², LI Wen-yan², WANG Chang-hong¹

1. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, the MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, the Key Laboratory of Complex Prescription, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai R&D Centre for Standardization of Chinese Medicine of Chinese Medicine, Shanghai 201203, China
2. Shanghai Pudong New Area Gongli Hospital, Shanghai 201315, China

Abstract: Objective To establish methods of qualitative identification and quantitative determination for Zishen Yangyin Granules (ZYG). **Methods** The TLC method was used to identify the herb by mixture of chloroform-methanol (3:1) as a developing solvent on high performance silica gel precoated plate (HSGF₂₅₄) and using 5% vanillic aldehyde sulfuric acid as a chromogenic reagent for qualitative identification of *Corni Fructus*; TLC identification of *Eclipta prostrata*, *Alismatis Rhizoma*, and *Moutan Cortex* was performed on high performance silica gel precoated plate (HSGF₂₅₄) with petroleum ether (60—90℃)-chloroform-ethyl acetate (3:1:2) as developing solvent. The same developing method was used to identify *E. prostrata*, *A. Rhizoma*, and paeonol in *M. Cortex* of ZYG by different detected method at the same time. The contents of morroniside, loganin, hyperoside, specnuezhenide, and paeonol were analyzed by high performance liquid chromatography on C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-0.1% trifluoroacetic acid by gradient elution. The detection wavelength was set at 254 nm. **Results** Morroniside and loganin were used to identify *C. Fructus* in ZYG, paeonol in *M. Cortex* can be identified at 254 nm; Some substances in *E. prostrata* can be identified at 366 nm; Some substances in *A. Rhizoma* can be detected in sunlight, with 5% phosphomolybdic acid in ethanol as a chromogenic reagent. The TLC separation was desirable with moderate Rf value and clear spot. The methodology validation for the assay of morroniside, loganin, hyperoside, specnuezhenide, and paeonol presented that they were in good linear correlation in the ranges of 4.432—110.8, 4.192—104.8, 4.040—101.0, 4.132—103.3, and 4.076—101.9 μg/mL. The correlation coefficients of indicator were over

收稿日期: 2017-07-25

作者简介: 林启焰 (1995—), 男, 硕士研究生, 从事中药新制剂与体内过程研究。E-mail: 2698491045@qq.com

*通信作者 王长虹 (1964—), 男, 研究员, 博士生导师, 从事中药新制剂与体内过程研究。Tel: (021)51322511 E-mail: wchcxm@163.com

0.999 7. The average recoveries were between 96.57% and 98.67%. The RSD value of intra-day precision was less than 2% and the RSD value of inter-day precision was less than 3%. The method has good stability and reproducibility. **Conclusion** The methods of quality control are specific, reproducible, accurate, and suitable, which can be successfully applied to the quality control of ZYG.

Key words: Zishen Yangyin Granules; quality standard; morroniside; loganin; hyperoside; specnuezhenide; paeonol

滋肾养阴颗粒 (ZYG) 是由生地黄、菟丝子、茯苓、女贞子、黄精、山茱萸、山药、泽泻、旱莲草、牡丹皮 10 味药组成, 具有益肝肾和滋阴养血的功效^[1], 对围绝经期综合征患者体内的固醇类激素特别是雌激素的水平有重要影响^[2], 可显著改善其临床证候。目前该方在临床上已应用有 20 余年, 临床疗效确切, 主要用于更年期综合征、妇女月经紊乱、烦躁易怒、烘热汗出等症^[3]。ZYG 属于医院制剂, 原剂型为汤剂, 现将其改为颗粒剂^[4], 以便于贮存携带, 提高患者的顺应性。为确保颗粒剂的质量, 需对该颗粒剂的质量标准进行研究。目前仅有该方的整体临床疗效或单味药材和提取工艺的研究^[4-9], 质量控制尚未见报道。本研究建立了山茱萸、泽泻、旱莲草、牡丹皮的 TLC 鉴别方法和 ZYG 中的莫诺昔、马钱昔、金丝桃昔、特女贞昔、丹皮酚的 HPLC 测定方法, 以期为其临床用药安全提供保障。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695-2489 高效液相色谱仪 (四元泵、自动进样器、DAD 检测器、柱恒温箱; 美国 Waters 公司); Empower 色谱操作系统; KQ-250DB 数控超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); Satorius BSA 124S-CW 万分之一电子分析天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); Milli-Q Integral 水纯化系统 (美国 Millipore 公司); 薄层色谱自动点样仪、Reprostar 3 薄层色谱摄影仪 (瑞士 CAMAG 公司)。

1.2 材料

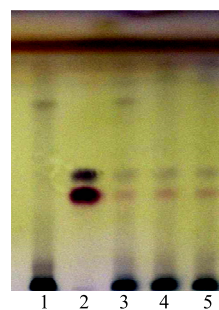
硅胶板 (德国 HGF₂₅₄, 批号 610282, MACHEREY-NAGEL DC-Fertigplatten SILG 200×100), ZYG 样品 (自制, 批号分别为 21802、21701、21801; 规格为每袋装量 20 g), 乙腈与三氟乙酸均为色谱级 (美国 Fisher 公司)。水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。对照品莫诺昔 (批号 20150812)、马钱昔 (批号 20150915)、金丝桃昔 (批号 20140920)、特女贞昔 (批号 20160522)、丹皮酚 (批号 20161219), 上海中药标准化研究中心提供, 质量分数>98%。对照药材墨旱莲 *Eclipta prostrata* L. (批号 958-9201)、泽泻 *Alisma plantago-aquatica* Linn. (批号 120983-200503)、山茱萸 *Cornus*

officinalis Sieb. et Zucc. (批号 120986-200509) 购自中国食品药品检定研究院, 并由上海中医药大学中药研究所王长虹研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 山茱萸的 TLC 鉴别^[10] 按《中国药典》2015 年版定量测定项下供试品溶液制备方法制备 ZYG 供试品溶液; 另称取除山茱萸外的处方药材同法制备缺山茱萸阴性样品溶液; 取莫诺昔、马钱昔对照品适量, 加甲醇制成质量浓度均为 0.5 mg/mL 的溶液, 作为混合对照品溶液。按《中国药典》2015 年版薄层色谱法 (通则 0502) 试验, 吸取供试品溶液、缺山茱萸阴性样品溶液各 10 μL、混合对照品溶液 5 μL, 分别点于同一硅胶 HGF₂₅₄ 薄层板上, 以氯仿-甲醇 (3:1) 作为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸试液, 于 105 °C 加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显示相同颜色的斑点。阴性样品在相应位置无干扰斑点。见图 1。



1-缺山茱萸阴性 2-混合对照品 3~5-ZYG 供试品溶液 (批号 21802、21701、21801)

1-negative sample without *Corni Fructus* 2-mixed reference substances
3—5-ZYG samples (Lot 21802, 21701, and 21801)

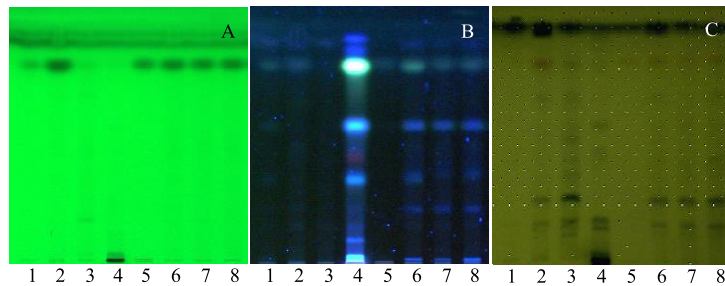
图 1 ZYG 中山茱萸的 TLC 图

Fig.1 TLC of *C. Fructus* in ZYG

2.1.2 墨旱莲、牡丹皮、泽泻的 TLC 鉴别^[10] 取 ZYG 适量, 研细, 称取约 5 g, 加水 50 mL, 加热回流 30 min, 滤过, 取滤液, 用 50 mL 石油醚 (60~90 °C) 振摇提取 1 次, 蒸干石油醚提取液, 残渣加石油醚 (60~90 °C) 1 mL 使溶解, 作为供试品溶液。称取除泽泻药材外的处方药材, 总量 15.2 g, 加水 250 mL, 提取 2 h, 提取 1 次, 滤过, 取滤液 50 mL, 同法制成缺泽泻阴性样品溶液。称取除墨

旱莲药材外的处方药材, 总量 14.9 g, 加水 250 mL, 提取 2 h, 提取 1 次, 滤过, 取滤液 50 mL, 同法制成缺墨旱莲阴性样品溶液。称取泽泻对照药材约 2 g, 加水 50 mL, 加热回流 30 min, 同法制成泽泻对照药材溶液。称取墨旱莲对照药材约 2 g, 加入 70% 甲醇 20 mL, 超声处理 1 h, 滤过, 滤液作为墨旱莲对照药材溶液。称取丹皮酚对照适量, 加甲醇制成含丹皮酚 0.5 mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。按照《中国药典》2015 年版薄层色谱法 (通则 0502) 试验, 吸取上述 4 种溶液各 15~20 μ L, 分别点于

同一硅胶 HGF₂₅₄ 薄层板上, 以石油醚 (60~90 $^{\circ}$ C) -三氯甲烷-醋酸乙酯 (3:1:2) 作为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254、366 nm) 下检视。在 254 nm 下, 供试品色谱中, 在丹皮酚相应位置上, 显相同颜色的斑点; 在 366 nm 下, 供试品色谱中, 在墨旱莲对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点; 再喷以 5% 磷钼酸乙醇, 在 105 $^{\circ}$ C 加热至斑点显色清晰。在与泽泻对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点; 各阴性样品在相应位置均无干扰斑点。见图 2。



1-缺泽泻阴性 2-缺墨旱莲阴性 3-泽泻 4-墨旱莲 5-丹皮酚 6~8-ZYG 供试品 (批号 21802、21701、21801) A-254 nm B-366 nm C-日光
1-negative sample without *Alismatis Rhizoma* 2-negative sample without *Eclipta prostrata* 3-*Alismatis Rhizoma* reference herb 4-*Eclipta prostrata* reference herb 5-paeonol 6~8-ZYG samples (Lot 21802, 21701, 21801) A-254 nm B-366 nm C-daylight

图 2 ZYG 中墨旱莲、牡丹皮、泽泻 TLC 图

Fig. 2 TLC of *E. prostrata*, *M. Cortex*, *A. Rhizoma* in ZYG

所建立 TLC 方法可对 ZYG 中的山茱萸进行鉴别, 并且实现了同一展开条件下, 同时对 ZYG 中的墨旱莲、泽泻以及牡丹皮药材进行鉴别, 有利于 ZYG 质量的控制。

2.2 定量测定^[11]

2.2.1 色谱条件 Boston C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 三氟乙酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~7 min, 8% A; 7~25 min, 8%~20% A; 25~35 min, 20% A; 35~55 min, 20%~75% A; 检测波长为 254 nm。色谱图见图 3。

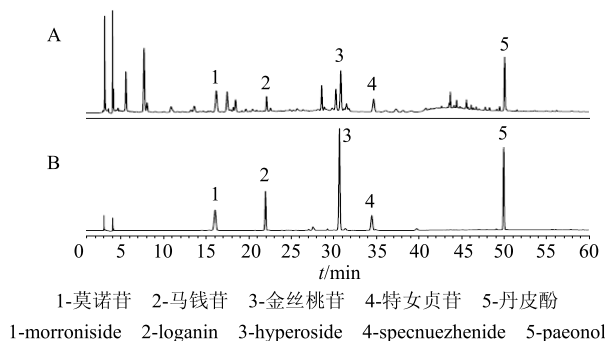


图 3 ZYG 供试品 (A) 和混合对照品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 3 HPLC of ZYG sample (A) and mixed reference substances (B)

2.2.2 对照品溶液的制备 分别取莫诺昔、马钱昔、金丝桃昔、特女贞昔和丹皮酚对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成含莫诺昔、马钱昔、金丝桃昔、特女贞昔和丹皮酚 1.108、1.048、1.010、1.033、1.019 mg/mL 的对照品溶液, 作为贮备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取 ZYG 适量 (批号 21701), 研细, 取约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 1 h, 放冷, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足减失质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2.4 标准曲线的绘制 分别取各对照品贮备液到同一 10 mL 量瓶中, 依次稀释, HPLC 分析, 分别以对照品的质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y), 得相应的回归方程, 结果表明, 各成分在相应的质量浓度范围内线性关系良好。见表 1。

2.2.5 精密度试验 取 66.48、39.89、20.87 μ g/mL 3 个质量浓度的混合对照品溶液, 测定峰面积。同 1 d 内连续进样 6 次, 计算日内精密度, RSD 均小于 2%; 连续 3 d 进样, 计算日间精密度, RSD 均小于 3%。结果表明, 各指标成分日内、日间精密度良好。

表 1 各指标成分线性考察

Table 1 Linear relation test of index components

指标成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
莫诺昔	$Y=13\,429\,X+849.98$	0.999 9	4.432~110.8
马钱昔	$Y=14\,521\,X+65.857$	0.999 7	4.192~104.8
金丝桃昔	$Y=50\,813\,X-3\,821.6$	0.999 5	4.040~101.0
特女贞昔	$Y=10\,381\,X-2\,812.4$	0.999 6	4.132~103.3
丹皮酚	$Y=28\,989\,X+3\,232$	0.999 7	4.076~101.9

2.2.6 重复性试验 取 ZYG 适量,按供试品溶液制备方法,平行制备 6 份供试品溶液,进 HPLC,计算峰面积。莫诺昔、马钱昔、金丝桃昔、特女贞昔和丹皮酚质量分数分别为 1.799、0.758 7、0.698 3、1.253、1.581 mg/g, RSD 分别为 0.36%、1.76%、0.61%、1.08%和 0.37%。结果表明方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 取 ZYG 适量,按供试品溶液制备方法制备,分别于 0、2、4、6、10、14、24、48、72、96 h 进 HPLC 测定,计算峰面积的 RSD 均小于 3%。结果表明,供试品溶液在 96 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 取 ZYG 适量,研细,取约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,按 ZYG 中各成分量的 50%、100%、150%加入各对照品溶液,按“2.2.3”项下方法制备样品,进 HPLC 测定,计算回收率。结果表明,各指标成分的加样回收率为 95%~105%, RSD 值为 0.71%~1.92%,符合要求。

2.2.9 ZYG 测定 对 3 批自制 ZYG 中的 5 个指标成分进行定量测定,结果见表 2。

表 2 ZYG 测定结果

Table 2 Determination results of ZYG

批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	莫诺昔	马钱昔	金丝桃昔	特女贞昔	丹皮酚
21801	1.663	0.696 5	0.601 8	1.235	1.382
21701	1.799	0.758 7	0.698 3	1.253	1.581
21802	1.763	0.723 3	0.687 3	1.435	1.479
均值	1.742	0.726 2	0.662 5	1.308	1.481

3 讨论

在墨旱莲、牡丹皮、泽泻的 TLC 鉴别中,实现了在同一展开条件下,不同检视方法,达到对 ZYG 中 3 味药材同时鉴别的目的,缩短了鉴别时间,降低了鉴别成本。

本实验所建立的测定方法可同时对 ZYG 中的莫诺昔、马钱昔、金丝桃昔、特女贞昔和丹皮酚进行定量测定,为制剂质量的优劣提供科学的评价依据。

选取莫诺昔、马钱昔、金丝桃昔、特女贞昔、丹皮酚作为指标成分,与药典中相应药材的质控指标相吻合,通过前期课题组的研究,莫诺昔、马钱昔和丹皮酚均可直接吸收入血,且丹皮酚在体内会产生一系列代谢产物^[12],特女贞昔的降解产物红景天昔亦在血清中有所发现,故本研究所选指标能在一定程度上代表制剂的整体药效。

参考文献

- [1] 李文艳,吴昆仑,姚佳晨,等. 滋肾养阴汤对去卵巢大鼠性激素水平及抗氧化能力的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(4): 673-676.
- [2] 唐蕊蕊,吴昆仑,都乐亦,等. 滋阴补肾方对围绝经期综合征患者雌激素及雌激素受体的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(2): 27-30.
- [3] 吴昆仑,唐蕊蕊,都乐亦,等. 滋阴补肾方治疗围绝经期综合征对性激素水平的影响 [J]. 中成药, 2010, 32(2): 347-348.
- [4] 林启焰,谢凡,程雪梅,等. 正交试验优化滋肾养阴颗粒剂提取工艺 [J]. 中成药, 2017, 39(1): 213-215.
- [5] 阮豪骥,吴昆仑. 围绝经期肾阴虚症妇女经中医治疗前后血清性激素水平的变化 [J]. 检验医学, 2011, 26(2): 88-90.
- [6] 吴昆仑,都乐亦,唐蕊蕊,等. 滋阴补肾方治疗肾阴虚型围绝经期综合征 42 例 [J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(1): 56-57.
- [7] 阮豪骥,吴昆仑. 滋阴补肾方治疗围绝经期肾阴虚证 58 例 [J]. 陕西中医, 2010, 31(7): 797-798.
- [8] 谢晓梅,戴淑娟,王伟,等. 牡丹皮配方颗粒质量标准研究 [J]. 中成药, 2008, 14(3): 15-17.
- [9] 赵万里,许文,丘建芳,等. UFLC 同时测定泽泻中 6 种三萜类成分含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 64-68.
- [10] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [11] 罗云,郝伟伟,王洁,等. 高效液相色谱法测定六味地黄浓缩丸特征图谱及 4 种主要成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(10): 748-751.
- [12] Liu H X, Hu Y, He Y Q, et al. Ultra-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric determination (UPLC-ESI-MS) of *O*-demethylated metabolite of paeonol in vitro: Assay development, human liver microsome activities and species differences [J]. *Talanta*, 2009, 79: 1433-1440.