

# 益肾丸质量标准的研究

倪江洪 袁冬梅 谢虞升 王曙东 夏曙辉(南京 210002 南京军区南京总医院)

**摘要** 目的: 为有效控制益肾丸的质量, 探索质量控制的标准; 方法: 采用薄层色谱法对本品中的君药进行定性鉴别, 用甲醇提取、乙醚洗涤、正丁醇萃取、氢氧化钾洗涤法制备样品, 以正丁醇-醋酸异戊酯-水(4: 1: 5)上层液为展开剂, 单波长线性薄层扫描法, 检测波长为 515nm, 对益肾丸中黄芪甲苷的含量进行定量研究; 结果: 标准曲线  $r=0.9993$ , 重现性  $RSD=1.47\%$  ~

1.91%, 精密度 RSD= 3.95% ~ 5.50%, 益肾丸中黄芪甲苷含量 0.061 mg/g, RSD= 4.22%; 加样回收率平均为 95.23%, RSD = 1.2% (n= 6), 本文方法稳定可靠, 可作为该制剂的质量控制标准之一。

关键词 益肾丸; 薄层色谱鉴别; 黄芪甲苷; 薄层扫描法

## Study on quality standards for Yishen Pill

Ni Jiang hong, Yuan Dong mei, Xieyu Sheng, Wangshu Dong, xiashu hu (General Hospital of Nanjing Command, PAL, Nanjing 210002, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** to study the quality control standard of Yishen Pill; **METHOD:** Codonopsis piosula (Franch) Nannf, Radix Angelica sinensis, Rhizoma, Radix Astragalini in Yishen Pill were identified by TLC. The content of main effective constituent in Huangqi, astragalini was determined by TICS; **RESULTS:** The method was reliable, with a good reproducibility and linear relationship ( $r= 0.9993$ ) The average recovery was 95.23% (RSD= 1.2%, n= 6); **CONCLUSION:** It can be used as quality control of Yishen Pill.

**KEY WORDS** Yishen Pill, TLC, astragalini, TLCS

益肾丸是我院自行研制, 用于治疗慢性肾病的中成药制剂, 主要成分为黄芪、白术、当归、党参、柴胡等。具有健脾益气功效, 消除肾脏病人的尿蛋白作用, 临床疗效确切, 效果明显。为有效控制质量, 我们采用薄层色谱法对本品中的党参等药进行定性鉴别, 用薄层扫描法测定黄芪甲苷含量。

### 1 仪器、药品与试剂

薄层扫描仪 TLC SCANNER II, 点样仪 LINOMAT IV, 双槽层析缸(以上均为瑞士 CAMAG 产品); 自动铺板机 (PBQ I 型, 重庆南岸新力实验电气厂); 十万分之一电子秤 (Mettler-AE240); 恒温磁力搅拌器 (85-2 型上海司乐仪器厂); 电热恒温真空干燥箱 (DZ 60 创新医疗器械厂), 硅胶 G (薄层层析用, 青岛海洋化工厂生产); 黄芪甲苷、阿魏酸对照品(中国药品生物制品检定所提供); 益肾丸(本院制剂科生产批号 990416, 990705, 990806, 990918, 991109); 黄芪、党参、当归、白术对照药材均经过鉴定; 所用试剂均为分析纯。

### 2 实验条件

2.1 薄层板的制备 硅胶 G 加 0.7% 羧甲基纤维素钠溶液 (1: 3) 研匀, 制板, 规格 10× 20cm, 厚度 0.6mm, 室温晾干, 经 105℃ 活化 1h, 置干燥器中备用。

2.2 仪器参数 单色器带宽: 10nm, 狭缝宽度: 0.3mm, 狭缝长度: 5mm, 扫描速度: 5mm/s, 扫描波长: 515nm。

2.3 测定波长的选择 吸取含量测定中的对照品溶液、阳性对照溶液、供试品溶液及缺黄芪空白对照溶液各 6μl, 按含量测定法进行点样、展开、显色, 于 200~ 700nm 波长范围内进行扫描, 得最大吸收波长为 515nm。

### 3 薄层定性鉴别

#### 3.1 党参的鉴别

3.1.1 阳性对照液的制备 称取党参粉末 5g, 加 2N 盐酸 70ml, 置恒温磁力搅拌器 80℃ 水解 3h, 滤过, 滤液置分液漏斗中, 用氯仿萃取 3 次 (30, 30, 20ml), 合并 3 次萃取液, 水浴挥干, 加氯仿至 2ml 备用。

3.1.2 供试品溶液的制备 称取益肾丸 10g, 研碎, 加 2N

盐酸 100ml 余同阳性对照液。

3.1.3 缺党参空白对照液的制备 按处方比例称取不含党参的药材, 以阳性对照液的制备方法制得空白对照液。

3.1.4 薄层层析 吸取阳性对照液、空白对照液和供试液各 10μl, 点于硅胶 G 板上; 以氯仿-丙酮 (4: 1) 为展开剂, 展开时间 15min 晾干; 喷以 10% 硫酸乙醇液, 烘烤数分钟显色。结果益肾丸提取液在硅胶 G 板上与党参对照液相应位置有相同的黑色斑点, 而空白对照溶液在相同位置无斑点。

#### 3.2 当归的鉴别<sup>[1]</sup>

3.2.1 对照液的制备 取阿魏酸对照品制成 1mg/ml 的甲醇液备用。

3.2.2 阳性对照液的制备 取当归粗末 5g, 加甲醇 20ml 放置 24h 浸提, 滤过, 滤液备用。

3.2.3 供试液的制备 取益肾丸 10g, 研碎, 加甲醇 20ml 放置 24h 浸提, 滤过, 滤液备用。

3.2.4 缺当归空白对照液的制备 按处方比例称取不含当归的药材, 以阳性对照液的制备方法制得空白对照液。

3.2.5 薄层层析 吸取对照液、阳性对照液、空白对照液和供试液各 6μl, 点于硅胶 G 板上; 以氯仿-苯 (2: 2) 为展开剂, 展开时间 10min; 晾干, 于紫外灯 (366nm) 下检测, 结果益肾丸提取液在硅胶 G 板上与对照液和阳性对照液在相应位置上有相同的蓝色荧光斑点, 而空白对照溶液在相同位置无蓝色荧光斑点。

#### 3.3 白术的鉴别<sup>[2]</sup>

3.3.1 阳性对照液的制备 取白术粗末 3g, 加石油醚 (60~ 90℃) 15ml, 60℃ 水浴浸渍 1h, 滤过, 滤液水浴挥干加石油醚至 1ml 备用。

3.3.2 供试液的制备 取益肾丸 10g, 加石油醚 30ml, 余同阳性对照液的制备。

3.3.3 缺白术空白对照液的制备 按处方比例称取不含白术的药材, 以阳性对照液的制备方法制得空白对照液。

3.3.4 薄层层析 吸取对照液和供试液各 6μl, 点于硅胶 G

板上;以石油醚-乙酸乙酯(5:0.1)为展开剂,展开时间10min;取出,晾干;喷以5%对二甲氨基苯甲醛的10%硫酸乙醇液,烘烤数分钟显色;结果在硅胶G板上益肾丸提取液与对照液在相应位置上有相同的紫红色斑点,而空白对照溶液在相同位置无斑点。

### 3.4 黄芪的鉴别

取黄芪甲苷含量测定下的黄芪阳性对照溶液、黄芪甲苷对照液、益肾丸供试品溶液、缺黄芪空白对照溶液各6 $\mu$ l于硅胶G板上,依含量测定法展开、显色。结果供试品及阳性对照溶液与黄芪甲苷对照溶液在相应位置有相同的棕褐色斑点,而空白对照溶液在相同位置无斑点。

## 4 黄芪甲苷含量测定

### 4.1 试液的制备

4.1.1 对照品溶液的制备 精密称取真空干燥至恒重的黄芪甲苷对照品,加甲醇超声溶解,制成浓度为1.00mg/ml的对照液。

4.1.2 供试品溶液的制备<sup>[3]</sup> 取本品研细,精密称取约20g,加甲醇50ml,回流提取1h,滤过,残渣加甲醇50ml,回流提取1h,滤过,合并两次滤液,水浴挥去甲醇。提取物加蒸馏水50ml,溶解,置分液漏斗中,用乙醚洗涤3次(30ml,30ml,20ml),弃去乙醚层,水层挥去乙醚。水层用水饱和的正丁醇萃取3次(30ml,30ml,20ml),弃去水层,合并正丁醇萃取液,用正丁醇饱和的1%氢氧化钾溶液洗涤3次(20ml,20ml,20ml),弃去碱液,用正丁醇饱和的水洗至中性,正丁醇液水浴挥干。残渣加甲醇溶解,并定容至2ml。

4.1.3 缺黄芪空白对照溶液的制备 按处方比例称取不含黄芪的药材,以供试品溶液的制备方法制得黄芪空白对照液。

4.1.4 黄芪阳性对照溶液的制备 取黄芪研细,精密称取约3g,以供试品溶液的制备方法制得黄芪阳性对照液。

### 4.2 方法学试验

4.2.1 标准曲线 吸取黄芪甲苷对照溶液用自动点样器点样,点样量为2,4,6,8,10 $\mu$ l,以正丁醇-醋酸异戊酯-水(4:1:5)的上层溶液为展开剂。用10%硫酸乙醇为显色剂喷雾,烘烤数分钟显色。展开显色后扫描测定。以点样量( $\mu$ l)为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=168.35X+288.6$ , $Y=0.9993$ ,表明在2~10 $\mu$ g范围内,点样量与斑点峰面积呈线性关系。

4.2.2 空白干扰试验 取黄芪阳性对照溶液、黄芪甲苷对照液、供试品溶液、缺黄芪空白对照溶液点于同一块薄层板上,依法展开,显色,扫描。结果黄芪甲苷对照溶液、供试品及黄芪阳性对照溶液在相应位置有相应吸收峰,而黄芪阴性对照溶液在相应位置无吸收峰。

4.2.3 稳定性试验 每隔一定时间(15min,0.5h,1h,以后每隔1h测定1次)测样品峰面积,8h内测定结果稳定(RSD=0.8%)。

4.2.4 精密度测定 板内差:在同一块硅胶G板上分别点对照品溶液,4 $\mu$ l 6个点,RSD=1.91%,6 $\mu$ l 6个点,RSD=1.

47%,8 $\mu$ l 6个点,RSD=1.80%。板间差:在6块硅胶G板上均点样4 $\mu$ l,6 $\mu$ l,8 $\mu$ l,RSD分别为5.50%,3.95%,4.54%。

### 4.3 样品含量测定

分别精密吸取对照液4,8 $\mu$ l和供试液6 $\mu$ l,点于同一块硅胶G板上,按上述条件测定,以外标二点法计算黄芪甲苷含量,结果见表1,平均含量为1g益肾丸含黄芪甲苷0.061mg,RSD=4.72%。

表1 样品中黄芪甲苷含量测定结果(n=6)

批号	平均含量(mg/g)	RSD(%)
990416	0.064 $\pm$ 0.003	3.71
990705	0.058 $\pm$ 0.002	3.44
990806	0.063 $\pm$ 0.002	4.09
990918	0.062 $\pm$ 0.002	3.48
991109	0.059 $\pm$ 0.002	4.04

### 4.4 加样回收率试验

精密称取已被测定含量的益肾丸(6份),研碎,置圆底烧瓶中,分别加入上述黄芪甲苷对照液,按供试液制备方法制备,点于硅胶G板上,展开后显色,依法扫描测定,平均回收率为95.23%,RSD=1.2。结果见表2。

表2 加样回收率试验结果

编号	样品量 mg	加入量 mg	测得总量 mg	回收率 (%)	RSD (%)
1	0.1053	0.12	0.2193	94.97	
2	0.1102	0.12	0.2227	93.75	
3	0.1047	0.12	0.2200	96.08	1.2
4	0.1121	0.12	0.2272	95.91	
5	0.1089	0.12	0.2215	93.83	
6	0.1078	0.12	0.2240	96.83	

## 5 讨论

5.1 据文献报道党参可用薄层层析来作党参皂苷的鉴别,但经试验层析分离效果不理想,改用酸水解,将党参皂苷水解成苷元后再进行薄层层析,结果分离效果很好,而斑点的成分有待进一步确证。

5.2 益肾丸中的黄芪甲苷含量为0.061mg/g,加样回收率平均为95.23%,RSD=1.2%(n=6),标准曲线 $Y=0.9993$ ,重现性RSD=1.47%~1.91%,精密度RSD=3.95%~5.50%;本实验方法稳定可靠,可作为该制剂的质量控制方法之一。

## 参考文献

- 1 刘训红,王玉玺,房克慧等.中药材薄层色谱鉴别.第一版.天津.天津科学技术出版社,1990;137
- 2 康廷国.中成药薄层色谱鉴别,第一版.北京.人民卫生出版社,1995,177
- 3 秦海林,赵天增,高令杰等.人参皂苷与黄芪甲苷的薄层色谱分析.中国中药杂志,1995,27(4):216

收稿日期:2000-06-07