

[ 科研报道 ]

HPLC 法同时测定益肾泄浊合剂中 5 种成分的含量

冯子芳<sup>1</sup>, 袁晓航<sup>1</sup>, 陈晓伟<sup>1</sup>, 胡敏敏<sup>1</sup>, 张文明<sup>1</sup>, 顾丽红<sup>1</sup>, 杨庆有<sup>1,2</sup>, 卞振华<sup>1\*</sup>  
(1. 南京中医药大学无锡附属医院, 江苏 无锡 214074; 2. 无锡转化医学中心, 江苏 无锡 214000)

**摘要:** **目的** 建立 HPLC 法同时测定益肾泄浊合剂中没食子酸、莫诺苷、马钱苷、毛蕊异黄酮苷、大黄酸的含量。**方法** 分析采用 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 磷酸-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 254 nm。**结果** 5 种成分在各自范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.999\ 6$ ), 平均加样回收率 97.28%~101.93%, RSD 2.56%~2.84%。**结论** 该方法准确可靠, 可用于益肾泄浊合剂的质量控制。

**关键词:** 益肾泄浊合剂; 化学成分; 含量测定; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: B 文章编号: 1001-1528(2024)01-0217-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.01.037

目前, 慢性肾脏病对人类健康造成严重危害, 患病率达 10%~12%, 容易与心血管疾病合并而导致高致残率、高病死率、预后不良等, 是全球公共卫生的重要议题<sup>[1-2]</sup>。益肾泄浊合剂 (苏药制备字 Z20220028000) 是无锡市中医医院的院内制剂, 由黄芪、酒萸肉、紫苏叶、法半夏、黄连、薏苡仁、熟大黄、燀桃仁、积雪草组成, 肾内科以健脾益肾、化瘀泄浊为指导, 根据治病宜谨守病机的原则创立本方, 针对早中期慢性肾脏病疗效较好<sup>[3]</sup>。环烯醚萜苷类 (莫诺苷、马钱苷等)、有机酸 (没食子酸) 及其酯类<sup>[4]</sup> 为其君药山茱萸的主要活性成分, 其中莫诺苷和马钱苷不仅含量最高, 而且是特征性成分<sup>[5]</sup>, 没食子酸还具有抗氧化、抗癌等作用<sup>[6]</sup>; 大黄中的蒽醌类是一种具有抗炎、保护心血管等作用的重要活性成分, 包括大黄酸、大黄酚等<sup>[7]</sup>。

前期已有对于其临床疗效及提取工艺的研究<sup>[8-9]</sup>, 未见质量标准的研究报道, 本研究参考前期报道, 建立 HPLC 法测定益肾泄浊合剂中含量高、易提取的君药黄芪 (毛蕊异黄酮苷)、山茱萸 (莫诺苷、马钱苷、没食子酸)、佐药大黄 (大黄酸) 的含量, 为制剂质量的整体控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪、DAD 二极管阵列检测器 (美国 Agilent 公司); DHG-9101-OSA 电热恒温鼓风干燥箱 (常州普天仪器制造有限公司); BSA224S-CW 电子天平 (德国 Sartorius 公司); KQ-500DE 数控超声清洗机 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 没食子酸 (批号 C1309C72105, 纯度  $\geq 98\%$ )、莫诺苷 (批号 Z1208B45504, 纯度  $\geq 97\%$ )、马钱苷 (批号 P22F10F81444, 纯度  $\geq 98\%$ )、毛蕊异黄酮苷 (批号 J19HB174062, 纯度  $\geq 98\%$ )、大黄酸 (批号 T06J10F92311, 纯度  $\geq 98\%$ ) 对照品均购自上海源叶生物科技有限公司。乙腈为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 其他试剂均为分析纯; 水 (杭州娃哈哈集团有限公司)。

中药饮片均来源于苏州市天灵中药饮片有限公司, 经无锡市中医医院副主任中药师王卿鉴定为正品, 具体见表 1。

表 1 中药饮片信息

| 名称  | 基原   | 产地  | 批号     |
|-----|------|-----|--------|
| 黄芪  | 蒙古黄芪 | 内蒙古 | 210130 |
| 酒萸肉 | 山茱萸  | 浙江  | 210220 |
| 紫苏叶 | 紫苏   | 江苏  | 210107 |
| 法半夏 | 半夏   | 湖北  | 210115 |
| 黄连  | 黄连   | 四川  | 210115 |
| 薏苡仁 | 薏米   | 贵州  | 210113 |
| 熟大黄 | 掌叶大黄 | 甘肃  | 210105 |
| 燀桃仁 | 桃    | 陕西  | 210118 |
| 积雪草 | 积雪草  | 江苏  | 210128 |

益肾泄浊合剂 (每 1 mL 相当于饮片 1.18 g) 由无锡市中医医院制剂室制备 (制备工艺<sup>[9]</sup> 为加 12 倍量水浸泡 30 min, 煎煮 2 次, 每次 1.5 h), 共 10 批 (S1~S10), 批号 20221201~20221210。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 参考前期报道, Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>

收稿日期: 2023-08-09

基金项目: 江苏省研究生科研创新计划项目 (KYCX20\_1513); 无锡市中医药管理局科技项目 (ZYKJ202105); 无锡市卫生健康委科研项目 (2020ZHYB17); 无锡市“双百”医疗卫生中青年后备拔尖人才计划项目 (HB2020059); 无锡市中医医院院内课题 (ZYYYB21025)

作者简介: 冯子芳 (1993—), 女, 硕士, 主管中药师, 从事中药检验、质量分析研究。E-mail: 798772485@qq.com

\* 通信作者: 卞振华 (1987—), 男, 博士, 副主任中药师, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础、作用机制研究。E-mail: 20193096@njucm.edu.cn

色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.1% 磷酸 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~10 min, 2%~4% B; 10~15 min, 4%~6% B; 15~20 min, 6%~7% B; 20~22 min, 7%~10% B; 22~32 min, 10% B; 32~40 min, 10%~13% B; 40~50 min, 13% B; 50~90 min, 13%~52% B; 90~95 min, 52% B; 95~100 min, 52%~2% B); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 254 nm; 进样量 10 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量, 加入 70% 甲醇制成每 1 mL 分别含没食子酸 99.20 μg、莫诺苷 154.40 μg、马钱苷 97.60 μg、毛蕊异黄酮苷 39.20 μg、大黄酸 49.60 μg 的溶液, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液 精密吸取益肾泄浊合剂 1.5 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇超声 (40 kHz、100 W) 处理 10 min, 冷却至室温, 稀释至刻度, 即得。

2.2.3 阴性样品溶液 参考文献 [10] 报道, 根据处方工艺<sup>[9]</sup>, 按“2.2.2”项下方法分别制备缺山茱萸、缺黄芪、缺大黄的阴性样品, 即得。

2.3 方法学考察 参考文献 [11] 报道。

2.3.1 专属性考察 分别取对照品、供试品、阴性样品溶液适量, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 可见色谱峰分离度较好, 阴性无干扰, 缺山茱萸阴性样品溶液中无没食子酸、莫诺苷、马钱苷峰, 缺黄芪阴性样品溶液中无毛蕊异黄酮苷峰, 缺大黄阴性样品溶液中无大黄酸峰, 表明该方法专属性良好, 色谱图见图 1。

2.3.2 线性关系考察 参考文献 [12] 报道, 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液适量, 70% 甲醇稀释成不同质量浓度, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。以对照品质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 结果见表 2, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。

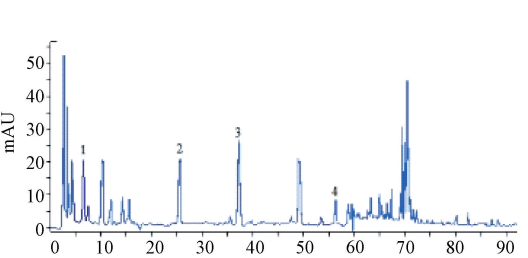
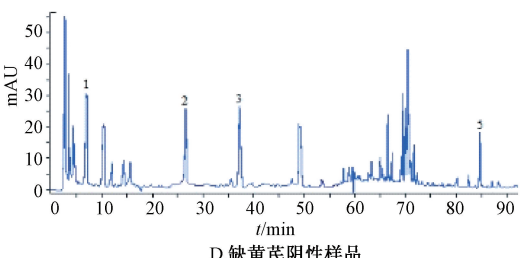
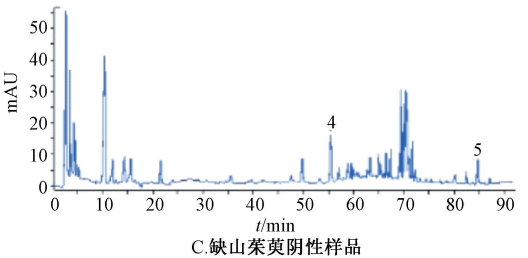
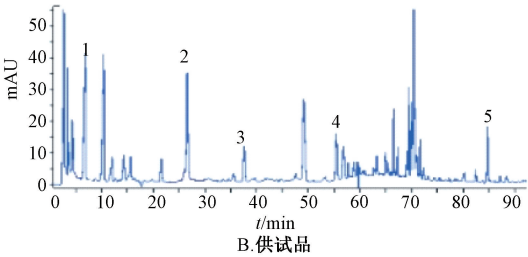
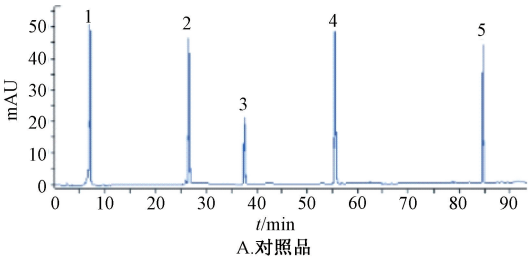
表 2 各成分线性关系

| 成分     | 回归方程              | <i>r</i> | 线性范围/(μg·mL <sup>-1</sup> ) |
|--------|-------------------|----------|-----------------------------|
| 没食子酸   | $Y=16.586X-2.544$ | 0.999 9  | 4.96~49.60                  |
| 莫诺苷    | $Y=9.491X-3.277$  | 0.999 8  | 7.72~77.20                  |
| 马钱苷    | $Y=7.730X-0.013$  | 0.999 9  | 4.88~48.80                  |
| 毛蕊异黄酮苷 | $Y=46.917X+1.113$ | 0.999 9  | 1.96~19.60                  |
| 大黄酸    | $Y=25.805X-2.692$ | 0.999 6  | 2.48~24.80                  |

2.3.3 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液适量, 稀释 5 倍, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得没食子酸、莫诺苷、马钱苷、毛蕊异黄酮苷、大黄酸峰面积 RSD 分别为 0.16%、0.70%、0.16%、0.11%、0.07%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 精密量取益肾泄浊合剂 (批号 20221205, S5) 6 份, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得没食子酸、莫诺苷、马钱苷、毛蕊异黄酮苷、大黄酸峰面积 RSD 分别为 1.81%、1.00%、0.98%、1.00%、1.01%, 表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 精密量取同一份益肾泄浊合剂 (批号



1. 没食子酸 2. 莫诺苷 3. 马钱苷 4. 毛蕊异黄酮苷 5. 大黄酸

图 1 各成分 HPLC 色谱图

20221205, S5), 于 0、2、4、8、16、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得没食子酸、莫诺苷、马钱苷、毛蕊异黄酮苷、大黄酸峰面积 RSD 分别为 1.43%、0.31%、0.42%、0.52%、0.52%, 表明溶液 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 参考文献 [13] 报道, 精密量取各成分含量已知的益肾泄浊合剂 (S5) 0.75 mL, 共 6 份, 置于 10 mL 量瓶中, 精密加入含没食子酸 130.10 μg/mL、莫诺苷 422.00 μg/mL、马钱苷 160.30 μg/mL、毛蕊异黄酮苷 40.20 μg/mL、大黄酸 65.30 μg/mL 的对照品溶液 1 mL,

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定。结果，没食子酸、莫诺苷、马钱苷、毛蕊异黄酮苷、大黄酸平均加样回收率分别为 102.15%、103.82%、100.30%、97.76%、97.97%，RSD 分别为 2.70%、2.64%、2.83%、2.59%、2.58%。

2.3.7 样品含量测定 按“2.2.2”项下方法制备 10 批益肾泄浊合剂的供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含量，结果见表 3。

表 3 各成分含量测定结果（ $\mu\text{g/mL}$ ）

| 编号  | 没食子酸  | 莫诺苷   | 马钱苷   | 毛蕊异黄酮苷 | 大黄酸  |
|-----|-------|-------|-------|--------|------|
| S1  | 19.97 | 42.00 | 19.18 | 4.31   | 5.36 |
| S2  | 19.49 | 42.08 | 19.18 | 4.33   | 5.37 |
| S3  | 19.43 | 42.11 | 19.19 | 4.34   | 5.37 |
| S4  | 20.01 | 42.18 | 19.32 | 4.35   | 5.39 |
| S5  | 20.09 | 42.38 | 19.33 | 4.36   | 5.40 |
| S6  | 19.91 | 42.19 | 19.35 | 4.37   | 5.43 |
| S7  | 19.83 | 42.42 | 19.35 | 4.37   | 5.42 |
| S8  | 19.62 | 42.27 | 19.28 | 4.35   | 5.39 |
| S9  | 20.04 | 42.39 | 19.35 | 4.37   | 5.41 |
| S10 | 20.14 | 42.29 | 19.58 | 4.32   | 5.35 |
| 平均值 | 19.85 | 42.23 | 19.31 | 4.35   | 5.39 |

3 讨论

3.1 指标成分选择 本方以黄芪、山茱萸为君药，2020 年版《中国药典》将毛蕊异黄酮苷作为黄芪质量控制成分<sup>[14]</sup>，专属性强，疗效确切。山茱萸中含量最高的一类化合物是环烯醚类，这些化合物大多与糖分子结合成环烯醚萜苷<sup>[15]</sup>，其主要成分莫诺苷和马钱苷含量高达 85%，是主要的有效成分，在糖尿病、肾病、炎症的治疗上效果较好，同时也是 2020 年版《中国药典》中山茱萸的质量控制成分<sup>[14,16-18]</sup>。现代研究表明，山茱萸含有的有机酸及其酯类成分，对肾虚、月经过多气血虚弱等患者疗效较好<sup>[19-20]</sup>。大黄为佐药，吴新程<sup>[21]</sup>研究表明，大黄酸的抗纤维化作用是通过调节 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路来实现的。钟瑜萍等<sup>[22]</sup>研究发现，大黄-黄芪配伍可减轻慢性肾衰大鼠蛋白尿的临床症状，减少肾脏的病理损害，从而保护肾脏功能，提高肾小球滤过率。

3.2 色谱柱选择 通过查阅文献<sup>[23-24]</sup>，采用不同色谱柱（Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>、YMC-Pack ODS-AC<sub>18</sub>、Waters XBridge C<sub>18</sub>）测定各成分含量，发现均能较好地分离，无显著差异，表明该方法适用性较好。

3.3 流动相选择 考察不同流动相对色谱峰分离的影响，采用甲醇-0.1% 磷酸、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸进行梯度洗脱，发现乙腈的洗脱效果优于甲醇，加入一定量的磷酸可以改善峰形，因此选择乙腈-0.1% 磷酸作为流动相。

3.4 柱温选择 对色谱峰在不同柱温（25、30、35℃）下的出峰情况进行考察，发现柱温降低，色谱峰保留时间延后，相反则提前出峰；为 25℃时，各成分出峰时间明显延后，洗脱时间较长，分离效率较低；为 35℃时，没食子酸保留时间在 5 min 内，与溶剂峰重合，最终确定为 30℃。

3.5 检测波长选择 对没食子酸、莫诺苷、马钱苷、毛蕊异黄酮苷和大黄酸进行全波长扫描，最终确定为 254 nm，此时益肾泄浊合剂中各成分紫外吸收较好，杂质干扰较小。

4 结论

本实验建立 HPLC 法同时测定益肾泄浊合剂中 5 种成分（没食子酸、莫诺苷、马钱苷、毛蕊异黄酮苷和大黄酸）的含量，该方法准确、可靠、重复性好，可为该方质量评价和控制提供依据。

参考文献：

[ 1 ] Magistroni R, D' Agati V D, Appel G B, *et al.* New developments in the genetics, pathogenesis, and therapy of Ig A nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2015, 88(5): 974-989.

[ 2 ] 杜律律. 影响慢性肾脏病急性加重患者预后的尿相关生物标记物研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2016.

[ 3 ] 姚 静, 孙欣光, 董 蓉, 等. HPLC-CAD 一测多评法同时测定黄芪中 6 种成分含量[J]. *药学学报*, 2021, 56(2): 557-564.

[ 4 ] 胡本祥, 彭 亮, 杨冰月, 等. “秦药”的现代研究概况[J]. *中草药*, 2018, 49(21): 4949-4959.

[ 5 ] 周祥德, 黄小兰, 阳文武, 等. HPLC 法同时测定还少胶囊中 4 种成分的含量[J]. *中国药房*, 2020, 31(20): 2508-2511.

[ 6 ] 唐 凯, 南美娟, 张化为, 等. HPLC 法同时测定不同产地山茱萸果核中 4 种成分[J]. *中成药*, 2020, 42(3): 670-675.

[ 7 ] 王亦君, 冯舒涵, 程锦堂, 等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(13): 227-234.

[ 8 ] 马济佩, 邵 君, 谢 婷. 稳肾合剂对早中期慢性肾功能衰竭患者肾功能影响的初步观察[J]. *辽宁中医杂志*, 2010, 37(12): 2380-2381.

[ 9 ] 费倩倩, 唐静月, 张文明, 等. 多指标权重正交试验优选益肾泄浊合剂制备工艺[J]. *中国药师*, 2022, 25(5): 889-893.

[ 10 ] 冯子芳, 费逸明, 袁晓航, 等. 一测多评法同时测定葆肾合剂中 5 种成分的含量[J]. *中国医药科学*, 2022, 12(1): 51-54; 132.

[ 11 ] 冯子芳, 费逸明, 袁晓航, 等. 高效液相色谱波长切换法同时测定葆肾合剂中 6 种成分的含量[J]. *中南药学*, 2021, 19(1): 114-117.

[ 12 ] 于琳琳, 王 婧, 丁惠玲, 等. HPLC 法同时测定五虎汤加味中 6 种成分[J]. *中成药*, 2023, 45(2): 386-389.

[ 13 ] 张文明, 袁晓航, 卞振华, 等. 一测多评法同时测定养血生发合剂中 7 种成分含量[J]. *中国药师*, 2021, 24(5): 954-959.

[ 14 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 92.

[ 15 ] 杨 青, 余永亮, 许兰杰, 等. 山茱萸化学成分研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(21): 25-27.

[ 16 ] 叶贤胜. 中药山茱萸的化学成分和生物活性研究[D].

北京：北京中医药大学，2017.

[17] 雷小小, 苏艳莹, 李美云, 等. 山茱萸环烯醚萜苷中马钱苷和莫诺苷的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(1): 104-108.

[18] 明凯利, 王海丁, 张馨之, 等. 补肾健骨胶囊中莫诺苷与马钱苷含量测定[J]. 中国药师, 2022, 25(3): 534-537.

[19] 王紫仰, 吴慧珍, 李安哲, 等. 山茱萸化学成分及药理作用研究[J]. 广州化工, 2023, 51(3): 20-22.

[20] 薛 冬, 汤加兵. 山茱萸总苷类提取物研究新进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2020, 20(76): 80-81.

[21] 吴新程. 大黄酸对 IgA 肾病大鼠肾间质纤维化的影响与机制[D]. 南昌：南昌大学, 2019.

[22] 钟瑜萍, 李海燕, 宫仁豪, 等. 大黄-黄芪不同配伍比例对慢性肾衰竭大鼠 24 hUPQ、Scr、BUN 及肾脏形态学的影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(4): 63-66.

[23] 卞振华, 刘 顺, 朱旭祥. 正交试验优选清热解毒合剂制备工艺研究[J]. 中国药师, 2019, 22(8): 1438-1441.

[24] 廖禹程, 丁 一, 张娟利, 等. 祛风止痛胶囊 HPLC 指纹图谱建立及 7 种成分同时测定[J]. 中成药, 2022, 44(10): 3111-3114.

## 川芎挥发油环糊精包合物种类、质量比筛选

李 超<sup>1,2</sup>, 刘云华<sup>2</sup>, 刘玉红<sup>2</sup>, 黄志芳<sup>2</sup>, 陈 燕<sup>2</sup>, 易进海<sup>1,2\*</sup>  
(1. 西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000; 2. 四川省中医药科学院中药材品质及创新中药研究四川省重点实验室, 四川 成都 610041)

**摘要：**目的 筛选川芎挥发油环糊精包合物种类、质量比。方法 分别制备  $\beta$ -环糊精、羟丙基- $\beta$ -环糊精包合物，HPLC 法同时测定藁本内酯、洋川芎内酯 A 含量，经典恒温法计算有效期。结果 藁本内酯降解符合一级动力学过程。质量比 1:8、1:10、1:12、1:15 的羟丙基- $\beta$ -环糊精包合物有效期分别为 2.8、5.5、7.9、15.4 个月，而质量比 1:8、1:10、1:12、1:15 的  $\beta$ -环糊精包合物有效期分别为 52.0、62.9、72.3、89.6 个月。结论 提高环糊精用量比例时川芎挥发油包合物稳定性明显提升，以  $\beta$ -环糊精包合物更明显，最优质量比为 1:8，此时有效期大于 4 年。  
**关键词：**川芎挥发油；羟丙基- $\beta$ -环糊精包合物； $\beta$ -环糊精包合物；种类；质量比；稳定性；有效期；经典恒温法  
**中图分类号：**R943 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2024)01-0220-06  
**doi:**10.3969/j.issn.1001-1528.2024.01.038

川芎挥发油为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 根茎中的重要有效部位之一，其主要成分为苯酞内酯类化合物，以高含量的藁本内酯、洋川芎内酯 A 为代表<sup>[1]</sup>，临床上常用于治疗偏头痛、心脑血管疾病等<sup>[2-4]</sup>，但由于苯酞类成分稳定性、水溶性、生物利用度差，大大限制了其临床应用。

$\beta$ -环糊精、羟丙基- $\beta$ -环糊精是目前中药制剂中应用最广泛的包合材料，具有较好的溶解性、安全性、稳定性，还可在一定程度上提升生物利用度。钟应淮等<sup>[5]</sup>发现，藁本内酯等苯酞类成分在大鼠体内存在较强的首过效应，制成  $\beta$ -环糊精包合物后其生物利用度增加了 2.2 倍。周成梁等<sup>[6]</sup>报道，藁本内酯生物利用度差，经  $\beta$ -环糊精包合后可

增加 2.7 倍。

研究药物稳定性、预测有效期是保证制剂质量和临床疗效的关键。目前，关于挥发油包合物的研究大多涉及包合方法的筛选、工艺参数的优化，以损失量少、包合率高为目的，但挥发油成分在包合物中的稳定性鲜有报道。藁本内酯极不稳定，温度是影响其稳定性的首要因素<sup>[7-8]</sup>，本实验采用经典恒温加速试验对川芎挥发油环糊精包合物进行热稳定性研究，依据阿伦尼乌斯方程的热降解动力学原理进行有效期预测，筛选其种类、质量比，以期解决川芎挥发油及其相关制剂的稳定性难题。

### 1 材料

1.1 仪器 DNP-9052 型电热恒温培养箱（上海精宏实验

收稿日期：2023-09-06  
基金项目：国家科技重大专项“重大新药创制”项目（2018ZX09201018-029）；国家中药标准化项目（ZYBZH-Y-SC-40）；国家中医药管理局-中央财政转移支付地方项目（A-2023N-8）；四川省科技厅重点实验室中药材品质及创新中药研究项目（A-2022N-47）  
作者简介：李 超（1999—），男，硕士，研究方向为中药化学成分及其质量评价。Tel:（028）85210843, E-mail: 1965862966@qq.com  
\* 通信作者：易进海（1963—），男，博士，研究员，研究方向为中药化学成分及其质量评价。Tel:（028）85210843, E-mail: yijinhai63@163.com