补肾祛瘀颗粒的质量标准研究Δ

卢婉妃[1*],顾超群[2],马佳丽[2],袁　强[2#](1.钦州市中医医院临床药学科,广西 钦州　535000;2.浙江中医药大学药学院,杭州　310053)

中图分类号　R286　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408(2019)09-1230-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2019.09.16

摘　要　目的:建立补肾祛瘀颗粒的质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对补肾祛瘀颗粒中的金樱子、菟丝子、制何首乌、紫草进行定性鉴别;采用紫外分光光度法测定补肾祛瘀颗粒中总多糖的含量;采用高效液相色谱(HPLC)法对补肾祛瘀颗粒中芦丁、槲皮素、金丝桃苷进行含量测定,色谱柱为BDS C_{18},流动相为乙腈-0.08%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为370 nm,进样量为10 μL。结果:4种药材的TLC供试品色谱与对照品或对照药材在相应位置上呈现相同斑点或荧光。葡萄糖、芦丁、槲皮素、金丝桃苷的检测质量浓度线性范围分别为0.003～0.018 mg/mL、0.225～7.20 μg/mL、0.07～2.24 μg/mL、1.25～39.88 μg/mL(r=0.999 5或0.999 9,n=6),精密度、稳定性、重复性试验的RSD均≤3.80%(n=6),平均回收率分别为102.2%、101.2%、100.9%、101.0%(RSD=1.28%、2.93%、2.41%、1.59%,n=6),平均含量分别为0.46 g/g、5.48 μg/g、8.18 μg/g、102.88 μg/g(n=3)。结论:本研究建立的补肾祛瘀颗粒的质量标准准确可靠,可为补肾祛瘀颗粒的质量控制提供科学依据。

关键词　补肾祛瘀颗粒;质量标准;薄层色谱法;紫外分光光度法;多糖;高效液相色谱法;芦丁;槲皮素;金丝桃苷

Study on Quality Standard of Bushen Quyu Granules

LU Wanfei[1], GU Chaoqun[2], MA Jiali[2], YUAN Qiang[2](1.Dept. of Clinical Pharmacy, Qinzhou Municipal Hospital of TCM, Guangxi Qinzhou 535000, China; 2.College of Pharmacy, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE: To establish the quality standard for Bushen quyu granules. METHODS: TLC was used for qualitative identification of *Rosa laevigata*, *Cuscuta chinensis*, processed *Fallopia multiflora* and *Lithospermum erythrorhizon* in

[5] 方芳,谢伶俐,宁雪坚,等.麦门冬汤加减联合顺铂对A549细胞化疗增敏的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(4):49-56.
[6] 王美江,齐琳.外周血干细胞输注对肺腺癌免疫行为的影响[J].中国组织工程研究,2017,21(9):1402-1407.
[7] 丁瑞麟,谢芳,胡月,等.载内皮抑素壳聚糖纳米粒联合顺铂对小鼠Lewis肺癌移植瘤的治疗作用[J].第三军医大学学报,2017,39(2):116-122.
[8] 缪苗苗,张艳霞,吴勇杰,等.蛇葡萄素钠协同卡铂对肺癌Lewis细胞增殖的抑制作用[J].中国药房,2015,26(19):2664-2666.
[9] 康荻,李彧,朱曼,等.肺痿论治干预肺纤维化大鼠肺功能的实验研究[J].世界中医药,2017,12(2):390-393.
[10] 刘珺,吴晨雯,熊绍军.经方麦门冬汤预防放射性肺损伤及其对血浆TGF-β1的影响[J].实用癌症杂志,2016,31(12):1947-1950.
[11] LI Y, QI K, ZU L, et al. Anti-apoptotic brain and reproductive organ-expressed proteins enhance cisplatin resistance in lung cancer cells via the protein kinase B signaling pathway[J]. *Thoracic Cancer*, 2016, 7(2): 190-198.
[12] 王布,张志华,顾鑫,等.川芎嗪注射液联合顺铂注射剂对Lewis肺腺癌小鼠移植瘤生长及血管生成的抑制作用[J].中国临床药理学杂志,2016,32(22):2085-2088.
[13] PAN J, WU X, WANG X, et al. NEAT1 upregulates EGCG-induced CTR1 to enhance cisplatin sensitivity in lung cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 43337-43351.
[14] 师林,柯斌,黄圆圆,等.加味龟鹿二仙胶汤联合顺铂对小鼠Lewis肺癌PI3K/AKT/mTOR通路的影响[J].中成药,2017,39(10):2148-2152.
[15] 邓日强,程江涛,张宏华,等.蚤休薯蓣皂苷联合顺铂抑制小鼠移植瘤生长及转移[J].中南医学科学杂志,2016,44(5):504-509.
[16] 李珍,叶志华,冯娟娟.痰热清注射液辅助化疗对小鼠Lewis肺癌的抑瘤效果及其作用机制[J].山东医药,2016,56(20):25-28.

Δ基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81873049);浙江省中药现代化项目计划(No.浙经信医化〔2010〕421号)

*主管药师,硕士。研究方向:医院药学、临床药学。电话:0777-3788267。E-mail:Luwf1986@163.com
#通信作者:教授,博士。研究方向:中药药效物质基础及创新药物。电话:0571-86613778。E-mail:Yuanqiang0825@sina.com

(收稿日期:2018-12-28　修回日期:2019-02-24)
(编辑:林　静)

Bushen quyu granules. And then, the content of total polysaccharides in Bushen quyu granules was determined by UV spectrophotometry. HPLC method was used for the content determination of rutin, quercetin and hyperin in Bushen quyu granules. The determination was performed on BDS C_{18} column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.08% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was set at 370 nm. The sample size was 10 μL. RESULTS: TLC test sample chromatogram of 4 medicinal materials showed the same spot or fluorescence at the corresponding position with the reference substance and control medicinal materials. The linear range of glucose, rutin, quercetin and hyperin were 0.003-0.018 mg/mL, 0.225-7.20 μg/mL, 0.07-2.24 μg/mL and 1.25-39.88 μg/mL (r=0.999 5 or 0.999 9, n=6). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all less than 3% (n=6). Average recoveries were 102.2%, 101.2%, 100.9%, 101.0% (RSD=1.28%, 2.93%, 2.41%, 1.59%, n=6). Average contents were 0.46 g/g, 5.48 μg/g, 8.18 μg/g and 102.88 μg/g (n=3). CONCLUSIONS: Established quality standard of Bushen quyu granules is accurate and reliable, and can provide scientific reference for quality control of Bushen quyu granules.

KEYWORDS Bushen quyu granules; Quality standard; TLC; UV spectrophotometry; Total polysaccharide; HPLC; Rutin; Quercetin; Hyperin

免疫球蛋白A(IgA)肾病是最常见的原发性肾小球疾病,约占原发性肾小球疾病的20%～47%[1],是以免疫复合物沉积于系膜区为特征的肾小球肾炎,多以血尿、蛋白尿、高血压及肾功能损伤为主要临床表现[2-3],该病常由于病程迁延而发展成慢性肾衰。目前对于IgA肾病的发病机制尚不清楚,至今仍无非常有效的治疗方法,在患有IgA肾病的患者中,有30%～40%在10年后进展为终末期肾病(ESRD)[1]。中医对IgA肾病患者进行辨证论治时,发现本虚是IgA肾病发病的根本原因,在疾病过程中,往往因虚致实,产生以热毒、湿热、瘀血为主的标实之证,而热毒、湿热、瘀血又成为使病情恶化加重的病理因素[2-3]。补肾祛瘀方由金樱子、菟丝子、紫草、制何首乌和三七组成,金樱子、菟丝子为君药,具补肝益肾,涩肠止泻之功效;紫草为臣药,具清热凉血、活血、解毒透疹之功效;三七具化瘀止血、活血定痛之功效,何首乌具补肝肾,芡实具益肾固精之功效[4],三者共为佐药。临床上多以该方汤剂为主,但是由于汤剂不便患者携带及服用,现笔者将其制成补肾祛瘀颗粒。

为确保补肾祛瘀颗粒临床用药的安全性和有效性,保证产品质量,本课题组参照2015年版《中国药典》(一部)中药材的相关规定对补肾祛瘀颗粒中的药材金樱子、菟丝子、制何首乌、紫草采用薄层色谱(TLC)法进行定性鉴别,以紫外分光光度法、高效液相色谱法(HPLC)对补肾祛瘀颗粒中君药主要化学成分总多糖、芦丁、槲皮素、金丝桃苷进行定量分析,为补肾祛瘀颗粒的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters 2695Series HPLC仪(美国Waters公司);UV-2550紫外可见分光光度计(日本岛津公司);AB135十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);Sartorius-BS110S分析天平(德国Sartorius公司);HH-2数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

1.2 药品与试剂

D-无水葡萄糖对照品(批号:110833-200503)、芦丁对照品(批号:100080-200707)、金丝桃苷对照品(批号:111521-201205)、槲皮素对照品(批号:100081-200907)、制何首乌对照药材(批号:121454-200703)、紫草(新疆)对照药材(批号:121430-201103)、金樱子对照药材(批号:121047-201003)均购自中国食品药品检定研究院;金樱子(批号:110827)、菟丝子(批号:110302)、芡实(批号:110215)、紫草(批号:101018)、制何首乌(批号:110307)、三七(批号:110210)原药材均购自浙江中医药大学中药饮片厂,经浙江中医药大学药学院宋捷民教授鉴定为真品;乙腈、甲醇均为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

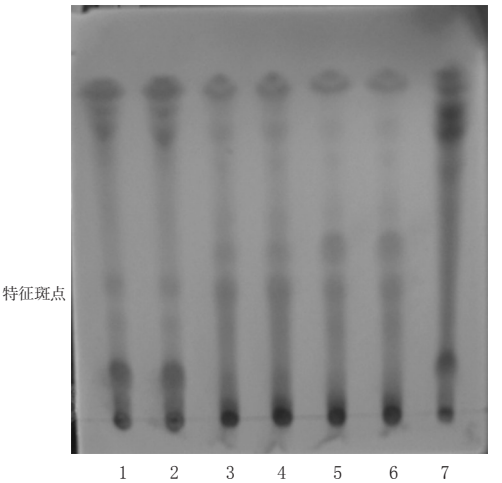
2.1 补肾祛瘀颗粒的制备

取处方量的金樱子、菟丝子、芡实药材,加12倍量水,回流提取3次,每次1.5 h,提取后过滤(药渣备用),浓缩,浓缩液加入适量无水乙醇(乙醇终体积分数为80%),静置24 h,过滤,滤液减压干燥,得浸膏(得率为10.22%),再烘干,粉碎成粉末;上述药渣加入处方量紫草和制首乌,加入10倍量的80%乙醇,回流提取3次,每次1.5 h,过滤浓缩,减压干燥得浸膏(得率为11.81%)。将粉末、浸膏和处方量的三七粉混合,加入1.5倍的辅料糊精,加入辅料总质量4%的木糖醇,混合均匀,喷以75%乙醇制软材、制粒、整粒,包装(每袋18 g,相当于生药材59 g)。共制得10批补肾祛瘀颗粒(批号分别为20170808、20170809、20170810、20170811、20170812、20170813、20170814、20170815、20170816、20170817),存于干燥缸中备用。

2.2 补肾祛瘀颗粒的定性鉴别

2.2.1 金樱子的TLC鉴别 取补肾祛瘀颗粒(批号:20170814,下同)3 g,研细,加80%乙醇30 mL,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,再加水20 mL使溶解,用乙酸乙

酯提取2次，每次30 mL，合并乙酸乙酯部位，蒸干，加甲醇2 mL溶解，作为金樱子供试品溶液。取金樱子对照药材1.0 g，同上述方法制备金樱子对照药材溶液。取金樱子原药材1.0 g，同上述方法制备金樱子原药材溶液。取缺金樱子和菟丝子处方药材（2种药材化学成分相近），同上述方法制备阴性样品溶液。按照2015年版《中国药典》（四部）通则0502[4]进行试验，分别吸取上述4种溶液各2 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸（5∶5∶1∶0.1，*V*/*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以10%硫酸乙醇溶液，于110℃加热至斑点显色清晰。结果，在金樱子供试品溶液色谱与对照药材溶液色谱相应的位置上，显示相同斑点，阴性样品没有干扰。金樱子的TLC图见图1。



注：1、2.金樱子供试品溶液；3、4.金樱子对照药材溶液；5、6.金樱子原药材溶液；7.阴性样品溶液

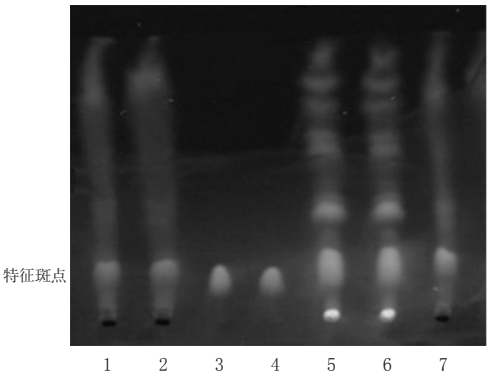
Note：1，2. sample solution of *R. laevigata*；3，4. control medicinal materials solution of *R. laevigata*；5，6. crude medicinal materials solution of *R. laevigata*；7. negative sample solution

图1　金樱子的TLC图

Fig 1　TLC of *R. laevigata*

2.2.2　菟丝子的薄层鉴别　取补肾祛瘀颗粒3 g，研细，加甲醇40 mL，加热回流30 min，滤过，滤液浓缩至5 mL，作为菟丝子供试品溶液。另取金丝桃苷对照品，加甲醇制成每1 mL含1 mg金丝桃苷的溶液，作为金丝桃苷对照品溶液。取菟丝子原药材1.0 g，同上述方法制得菟丝子原药材溶液。取缺金樱子和菟丝子的处方药材，混合，同上述方法制得阴性样品溶液。按照2015年版《中国药典》（四部）通则0502[4]进行试验，分别吸取上述4种溶液各2 μL，分别点于同一聚酰胺薄膜上，以甲醇-冰醋酸-水（4∶1∶5，*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以三氯化铝溶液，置于紫外光灯（波长：365 nm）下检视。结果，在菟丝子供试品溶液色谱与对照品溶液色谱、对照药材色谱相应的位置上，显示相同斑点，阴性样品没有干扰。菟丝子的TLC图见图2。

2.2.3　紫草的薄层鉴别　取补肾祛瘀颗粒3 g，研细，加



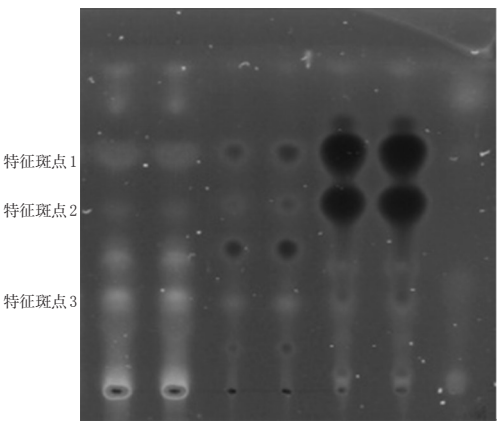
注：1、2.菟丝子供试品溶液；3、4.金丝桃苷对照品溶液；5、6.菟丝子原药材溶液；7.阴性样品溶液

Note：1，2. sample solution of *C. chinensis*；3，4. reference solution of hyperin；5，6. crude medicinal materials solution of *C. chinensis*；7. negative sample solution

图2　菟丝子的TLC图

Fig 2　TLC of *C. chinensis*

石油醚（60～90 ℃）20 mL，超声处理20 min，滤过，滤液浓缩至约1 mL，作为紫草供试品溶液。取紫草对照药材适量，研细，取粉末0.25 g，同上述方法制备紫草对照药材溶液。取紫草原药材1.0 g，同上述方法制备紫草原药材溶液。取缺紫草的处方药材，同上述方法制备方法制得阴性对照品溶液。按照2015年版《中国药典》（四部）通则0502[4]进行试验，分别吸取上述4种溶液各4 μL，分别点于同一硅胶G薄层板上，以环己烷-甲苯-乙酸乙酯-甲酸（5∶5∶0.5∶0.1，*V*/*V*/*V*/*V*）为展开剂，展开，取出，晾干，喷以10%氢氧化钾甲醇溶液，观察。结果，在紫草供试品溶液色谱与对照药材溶液色谱相应的位置上，显示相同斑点，阴性样品没有干扰。紫草的TLC图见图3。



注：1、2.紫草供试品溶液；3、4.紫草对照药材溶液；5、6.紫草原药材溶液；7.阴性样品溶液

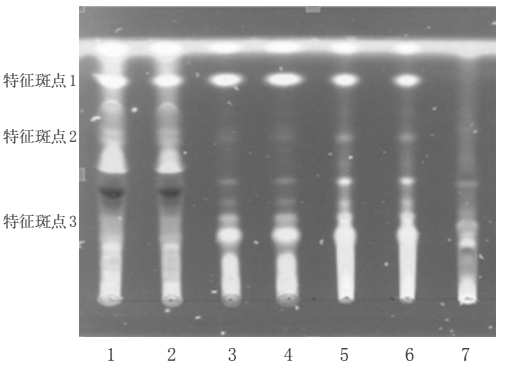
Note：1，2. sample solution of *L. erythrorhizon*；3，4. control medicinal materials solution of *L. erythrorhizon*；5，6. crude medicinal materials solution of *L. erythrorhizon*；7. negative sample solution

图3　紫草的TLC图

Fig 3　TLC of *L. erythrorhizon*

2.2.4　制首乌的薄层鉴别　取补肾祛瘀颗粒3 g，研细，

加乙醇50 mL，加热回流1 h，滤过，滤液浓缩至3 mL，作为制首乌供试品溶液。取制首乌对照药材适量，研细，取粉末0.25 g，同上述方法制备制首乌对照药材溶液。取制首乌原药材1.0 g，同上述方法制备制首乌原药材溶液。取缺制首乌的处方药材，同上述方法制备方法制得阴性样品溶液。按照2015年版《中国药典》（四部）通则0502[4]进行试验，分别吸取上述4种溶液各2 μL，分别点于同一硅胶H薄层板上，以三氯甲烷-甲醇（7∶3，*V*/*V*）为展开剂，展开至约3.5 cm，取出，晾干，再以三氯甲烷-甲醇（20∶1，*V*/*V*）为展开剂，展开至约7 cm，取出，晾干，置紫外光灯（365 nm）下检视。结果，在制首乌供试品溶液色谱与对照药材溶液色谱相应的位置上，显示相同斑点，阴性样品没有干扰。制何首乌的TLC图见图4。



注：1、2.制首乌供试品溶液；3、4.制首乌对照药材溶液；5、6.制首乌原药材溶液；7.阴性样品溶液

Note：1，2. sample solution of processed *F. multiflora*；3，4. control medicinal materials solution of processed *F. multiflora*；5，6. crude medicinal materials solution of processed *F. multiflora*；7. negative sample solution

图4　制何首乌的TLC图

Fig 4　TLC of processed *F. multiflora*

2.3　补肾祛瘀颗粒总多糖含量测定

2.3.1　溶液的制备　（1）对照品溶液制备：取105 ℃干燥至恒质量的*D*-无水葡萄糖对照品适量，精密称定，加水稀释成质量浓度为0.6 mg/mL的溶液，即得。（2）供试品溶液的制备：取补肾祛瘀颗粒粉末约0.5 g，精密称定，置于50 mL量瓶中，加水至刻度线，超声30 min，放冷，定容到刻度线，过滤，取续滤液0.2 mL加水定容至25 mL，即得。

2.3.2　测定波长的选择　参考相关文献[5-7]方法，取“2.3.1”项下对照品溶液1 mL，置于25 mL量瓶中，定容，吸取2 mL至具塞试管，加入1 mL苯酚，摇匀，迅速沿着试管壁滴加5 mL浓H_2SO_4，摇匀，放置5 min，置沸水中加热15 min，取出，冷却至室温，得供试溶液。另以蒸馏水2 mL，同上述方法操作，得空白对照溶液。取适量上述2种溶液于紫外可见分光光度计400～600 nm波长处扫描，结果，在489 nm波长处有最大吸收峰，因此选定其为测定波长。

2.3.3　线性关系考察　取“2.3.1”项下对照品溶液各0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL，定容至10 mL量瓶中，得系列溶液。再分别各取2 mL溶液，加入1 mL苯酚、5 mL浓H_2SO_4，于沸水中加热15 min，冷却至室温。然后于489 nm波长处测定吸光度，以吸光度为纵坐标（*y*），系列溶液的质量浓度为横坐标（*x*），进行线性回归，得回归方程为$y=61.095x+0.001$（$r=0.999\ 5$，$n=6$），结果表明，葡萄糖检测质量浓度线性范围为0.003～0.018 mg/mL。

2.3.4　精密度试验　取“2.3.1”项下供试品溶液适量，重复测定6次，并计算总多糖含量。结果，总多糖含量的RSD＝0.19%（$n=6$），表明本方法精密度良好。

2.3.5　稳定性试验　取“2.3.1”项下供试品溶液2 mL，按“2.3.2”项下“加入1 mL苯酚……冷却至室温”方法操作，每隔10 min测定溶液吸光度值（50 min后停止测定）。结果，总多糖含量的RSD＝0.9%（$n=6$），表明供试品溶液在50 min内的稳定性良好。

2.3.6　重复性试验　取同一批号（批号：20170808）的样品6份，按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液，然后按“2.3.2”项下“加入1 mL苯酚……冷却至室温”方法操作，测定总多糖含量。结果，6份样品总多糖含量的RSD＝2.53%（$n=6$），表明本方法重复性良好。

2.3.7　加样回收率试验　取已知总多糖含量的样品6份，分别加入一定比例的对照品溶液制成供试品溶液，按“2.3.2”项下“加入1 mL苯酚……冷却至室温”方法操作，测定总多糖含量。结果，总多糖平均回收率为102.2%（RSD＝1.28%，$n=6$），详见表1。

表1　总多糖回收率结果

Tab 1　Result of recovery of total polysaccharide

样品含量，mg	加入量，mg/mL	实际测得量，mg/mL	回收率，%	平均回收率，%	RSD，%
0.024 3	0.024 0	0.048 6	101.3	102.2	1.28
0.024 3	0.024 0	0.049 2	103.8		
0.024 3	0.024 0	0.049 1	103.3		
0.024 3	0.024 0	0.048 4	100.4		
0.026 7	0.024 0	0.051 1	101.7		
0.029 1	0.024 0	0.053 8	102.9		

2.3.8　样品含量测定　取3批样品（批号：20170808、20170809、20170810），“2.3.1”项下方法制备样品溶液，然后按“2.3.2”项下“加入1 mL苯酚……冷却至室温”方法操作，测定样品中总多糖的含量。结果补肾祛瘀颗粒中总多糖平均含量为0.46 g/g，详见表2。

2.4　补肾祛瘀颗粒中芦丁、槲皮素、金丝桃苷的含量测定

2.4.1　色谱条件　色谱柱为BDS C_{18}（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相为乙腈（A）-0.08%磷酸（B）（A∶B，*V*/*V*），梯度洗脱；流速为1 mL/min；柱温为30 ℃；检测波长为370 nm；进样量为10 μL。梯度洗脱条件见表3。

表2　样品中总多糖含量测定结果

Tab 2　Results of content determination of total polysaccharide in samples

样品批号	取样量,g	总多糖含量,g/g	平均总多糖含量,g/g
20170808	0.500 0	0.45	0.46
20170809	0.500 2	0.46	
201708010	0.500 1	0. 46	

表3　梯度洗脱条件

Tab 3　Gradient elution conditions

时间,min	A,%	B,%
0	18	82
4	18	82
7	24	76
10	35	65
16	50	50
22	18	82

2.4.2　溶液的制备　(1)混合对照品溶液的制备:取芦丁、槲皮素、金丝桃苷对照品适量,精密称定,用甲醇制成质量浓度分别为7.20、2.24、39.88 μg/mL的混合对照品溶液。(2)供试品溶液的制备:取补肾祛瘀颗粒(批号:20170808)2 g,研细,精密称定,用70%甲醇40 mL超声提取1 h,然后用石油醚萃取3次,每次10 mL,取甲醇层加10 mL乙酸乙酯和5 mL水继续萃取,取水层用乙酸乙酯继续萃取3次,10 mL/次,除去水层,蒸干乙酸乙酯层,用甲醇定容至2 mL,摇匀,滤过,即得。(3)阴性供试品溶液的制备:以甲醇溶液为阴性供试品溶液。

2.4.3　专属性考察　取"2.4.2"项下的3种溶液各10 μL,按"2.4.1"项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,供试品溶液与对照品溶液中各相邻峰间分离度均大于1.5,以芦丁、槲皮素、金丝桃苷计,理论板数均>2 000。高效液相色谱图见图5。

2.4.4　线性关系考察　精密吸取"2.4.2"项下混合对照品溶液适量,稀释成系列质量浓度溶液,按"2.4.1"项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以系列溶液质量浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y)进行线性回归。结果芦丁、槲皮素、金丝桃苷的回归方程分别为y=14 287x−394、y=49 778x−679.16、y=17 706x−2 170.1(r均为0.999 9,n=6),检测质量浓度线性范围分别为0.225～7.20、0.07～2.24、1.25～39.88 μg/mL。

2.4.5　检测限与定量限考察　分别精密称取芦丁、槲皮素、金丝桃苷对照品适量,用甲醇制成质量浓度为6.99、2.10、37.66 μg/mL的溶液,然后按一定比例稀释,按"2.4.1"项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限;当信噪比为3:1时,得检测限。结果,芦丁、槲皮素、金丝桃苷的定量限分别为0.09、0.04、0.015 μg/mL,检测限分别为0.05、0.01、0.004 μg/mL。

2.4.6　精密度试验　精密吸取"2.4.2"项下混合对照品溶液10μL,按"2.4.1"项下色谱条件进样测定6次,记录芦丁、槲皮素、金丝桃苷的峰面积。结果,芦丁、槲皮素、金丝桃苷峰面积的RSD分别为1.45%、1.99%、1.86%(n=6),表明仪器精密度良好。

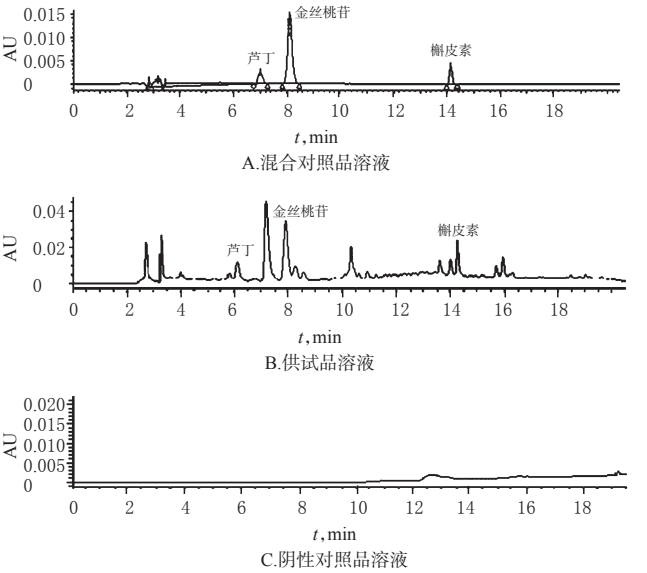


图5　高效液相色谱图

Fig 5　HPLC chromatograms

2.4.7　稳定性试验　取"2.4.2"项下供试品溶液适量,分别于室温放置0、2、4、6、8、12 h时,按"2.4.1"项下色谱条件进样测定,记录芦丁、槲皮素、金丝桃苷的峰面积。结果,芦丁、槲皮素、金丝桃苷峰面积的RSD分别为3.80%、1.35%、2.28%(n=6)。表明供试品溶液中芦丁、槲皮素、金丝桃苷的稳定性良好。

2.4.8　重复性试验　取同一批号(批号:20170808)的样品,按"2.4.2"项下方法制备供试品溶液6份,再按"2.4.1"项下色谱条件进样测定,记录芦丁、槲皮素、金丝桃苷的峰面积。结果,芦丁、槲皮素、金丝桃苷峰面积的RSD值分别为2.96%、1.97%、2.80%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.4.9　加样回收率试验　取已知芦丁、槲皮素、金丝桃苷含量的样品6份,精密称定,加入一定量的芦丁、槲皮素、金丝桃苷对照品,按"2.4.1"项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。结果,芦丁、槲皮素、金丝桃苷平均回收率分别为101.2%、100.9%、101.0%,RSD分别为2.93%、2.41%、1.59%(n=6),测定结果见表4。

2.4.10　样品含量测定　取3批(批号:20170808、20170809、20170810)样品,研细,取粉末约1 g,精密称定,按"2.4.2"项下方法制备供试品溶液,再按"2.4.1"项下色谱条件进样测定,记录芦丁、槲皮素、金丝桃苷的峰面积并计算含量。结果,3批样品中的芦丁、槲皮素、金丝桃苷平均含量分别为5.48、8.18、102.88 μg/g,RSD分别为1.90%、2.31%、1.46%,详见表5。

表4　芦丁、槲皮素、金丝桃苷的回收率结果

Tab 4　Results of recovery of rutin, quercetin and hyperin

样品	样品中含量，μg	加入量，μg	测得量，μg	回收率，%	平均回收率，%	RSD，%
芦丁	0.657 6	0.63	1.272	97.5	101.2	2.93
	0.632 8	0.63	1.244	97.4		
	0.646 6	0.63	1.269	102.3		
	0.712 4	0.63	1.368	104.1		
	0.685 0	0.63	1.331	102.5		
	0.690 5	0.63	1.341	103.3		
槲皮素	0.654 4	0.672	1.328	100.2	100.9	2.41
	0.695 3	0.672	1.347	97.0		
	0.678 9	0.672	1.350	99.8		
	0.768 9	0.672	1.457	102.4		
	0.777 1	0.672	1.461	101.8		
	0.785 3	0.672	1.484	103.9		
金丝桃苷	13.374	13.2	26.559	99.9	101.0	1.59
	13.786	13.2	26.868	99.1		
	13.580	13.2	26.802	100.2		
	14.403	13.2	27.880	102.1		
	14.506	13.2	28.167	103.5		
	14.197	13.2	27.538	101.1		

表5　样品中芦丁、槲皮素、金丝桃苷含量测定结果

Tab 5　Results of content determination of rutin, quercetin and hyperin in samples

样品批次	芦丁，μg/g	槲皮素，μg/g	金丝桃苷，μg/g
1	5.40	8.10	103.35
2	5.60	8.05	104.10
3	5.45	8.40	101.20
平均含量	5.48	8.18	102.88
RSD，%	1.90	2.31	1.46

3　讨论

相关研究发现，将汤剂加工制备成颗粒，不仅保留了有效成分，还能方便消费者使用[8]。本研究对补肾祛瘀颗粒中金樱子、菟丝子、紫草、制何首乌药材采用TLC法进行定性鉴定，由于药材中金樱子与菟丝子的化学成分相似[9-12]，因此，笔者在TLC鉴别试验中制备阴性样品时，同时缺少这2种药材。结果表明TLC分离效果良好，斑点显示清晰；以紫外分光光度法测定补肾祛瘀颗粒中总多糖，结果表明定量分析方法精密度、稳定性、重复性良好。相关研究报道，治疗IgA肾病相关药物的有效成分多为多糖类、黄酮类[13-15]，因此为补肾祛瘀颗粒治疗IgA肾病提供了依据。笔者根据本试验结果，初步拟定补肾祛瘀颗粒质量标准限度值（按含量测定结果平均值的80%计算），确定每1 g补肾祛瘀颗粒总多糖含量不得低于0.37 g、芦丁不得低于4.38 μg、槲皮素不得低于6.54 μg、金丝桃苷不得低于82.30 μg。

综上所述，本文采用多指标综合评价补肾祛瘀颗粒的质量，与单一指标评价相比更具有科学性，本文也初步拟定了补肾祛瘀颗粒中总多糖、芦丁、槲皮素、金丝桃苷的质量控制标准，为补肾祛瘀颗粒质量控制及质量标准的制定提供科学依据。

参考文献

[1] 王骞. IgA肾病的中西医治疗进展[J].现代中西医结合杂志，2018，27(8)：898-901.

[2] LI S，LIU ZH. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in China：analysis based on 13 519 renal biopsies[J]. *Kidney Int*，2004，66(3)：920-923.

[3] 刘永芳，陈帮明，王金象，等. 240例IgA肾病中医体质类型与本虚证的分布特征研究[J].中国中医药现代远程教育，2017，15(5)：52-54.

[4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：四部[S]. 2015年版.北京.中国医药科技出版社，2015：11，136，175，221，309，340.

[5] 刘相文，侯林，崔清华，等.金樱子多糖的提取优化及其体外抗病毒活性研究[J].中药材，2017，40(7)：1679-1682.

[6] 张培全，谭茵，张超.菟丝子提取物清除自由基作用的研究[J].中南药学，2012，10(3)：171-174.

[7] 牛晓红，柏冬，宋剑南.桂枝汤水提液中总多糖含量测定[J].中国实验方剂学杂志，2013，19(13)：66-68.

[8] 林伟豪，陈连剑，高崇凯，等. HPLC法测定并比较茵陈蒿煎剂与配方颗粒中有效成分的含量[J].中国药房，2016，27(15)：2102-2106.

[9] 冯阳，陈玉梅，辛华.金樱子黄酮类成分的UPLC-Q-TOF-MS分析[J].中国实验方剂学杂志，2017，23(12)：71-75.

[10] 胡丽萍，王跃飞，宋殿荣，等. HPLC-UV-MS法同时测定菟丝子中5种成分的含量[J].中药材，2010，33(8)：1277-1279.

[11] 傅亮，楚清脆，管月清，等.中药菟丝子中生物活性成分的毛细管电泳-电化学检测[J].色谱，2005，23(5)：524-527.

[12] 陈清杰，杨洁，甘露珍，等. HPLC法同时测定野豌豆中芦丁、金丝桃苷、槲皮素的含量[J].中国药师，2015，18(5)：861-862.

[13] 冷斌.白茅根多糖对IgA肾病大鼠免疫调节及肾纤维化的干预[D].桂林：桂林医学院，2013.

[14] 陈萍，万毅刚，王朝俊，等.黄蜀葵花制剂治疗慢性肾脏病的机制和疗效[J].中国中药杂志，2012，37(15)：2252-2256.

[15] 陈佳丽，楼婷婷，田文慧，等.正交试验法优选补肾祛瘀颗粒的提取工艺[J].中国实验方剂学杂志，2015，21(3)：20-23.

（收稿日期：2018-10-25　修回日期：2019-01-23）

（编辑：唐晓莲）