

清肾颗粒中白花蛇舌草的质量控制标准

石金敏^{1,2}, 高家荣³, 贾陆², 李烧烧^{1*}, 顾雪竹¹

(1. 中国中医学科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 郑州大学药学院, 郑州 450003;
3. 安徽中医学院第一附属医院, 合肥 230031)

[摘要] 目的: 建立清肾颗粒中白花蛇舌草的质量控制标准。方法: 采用薄层色谱法对制剂中的白花蛇舌草进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法测定制剂中白花蛇舌草的去乙酰车叶草酸甲酯的含量。色谱条件: Kromasil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水 (3.5:96.5), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 236 nm。结果: 薄层色谱清晰, 阴性无干扰, 重复性良好, 去乙酰车叶草酸甲酯在 0.042 ~ 1.354 μg 呈良好的线性关系 ($r = 1.0000$) 平均回收率 99.96% (RSD 1.66%)。结论: 该方法可操作性强, 重复性好, 可用于清肾颗粒中白花蛇舌草的质量控制。

[关键词] 清肾颗粒; 白花蛇舌草; 去乙酰车叶草酸甲酯; 质量标准

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0063-03

[doi] 10.11653/syfy2014010063

Quality Standard of *Olden landia diffusa* in Qingshen Granule

SHI Jin-min^{1,2}, GAO Jia-rong³, JIA Lu², LI Rao-rao^{1*}, GU Xue-zhu¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. College of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;
3. First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, china)

[Abstract] **Objective:** To study on quality standard of *Olden landia diffusa* in the Qingshen granule. **Method:** Thin-layer chromatography was used to identify *O. landia diffusa*. The content of deacetyl asperulosidicacid methyl ester was determined by HPLC. The HPLC consisted of Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), acetonitrile-water (3.5:96.5) as mobile phase, flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength at 236 nm. **Result:** The study on the quality control showed that the characteristic of identification by HPLC was distinct, accurate and reproducible. The linear range of deacetyl asperulosidicacid methyl ester was 0.042-1.354 μg ($r = 1.0000$). the average recovery was 99.96% with RSD of 1.66%. **Conclusion:** The methods are accurate and quick in qualitative identification and quantitative assay of this preparation, can be used for the quality control of Qingshen granule.

[Key words] Qingshen granule; *Olden landia diffusa*; deacetyl asperulosidicacid methyl ester; quality standard

慢性肾功能衰竭, 简称慢性肾衰, 已成为严重威

胁人类健康的一类重大疾病。清肾颗粒由大黄、白花蛇舌草、黄连等药组成, 具有清热化湿、祛瘀泄浊的功效, 用于治疗慢性肾功能衰竭。白花蛇舌草在该制剂中为臣药, 来源于茜草科植物白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* (Wild.) Roxb. 的干燥全草^[1-2], 是一种常用中药, 用于治疗毒蛇咬伤、癌肿等。本文采用薄层色谱法对清肾颗粒中的白花蛇舌草进行了定性鉴别研究, 采用 HPLC 对该制剂中去乙酰车叶草酸甲酯进行了含量测定研究, 以建立该制剂中白

[收稿日期] 20130214(002)

[基金项目] 北京自然科学基金面上项目(7112097); 中国中医科学院自选课题(ZZ2006096, 2011xycz-12)

[第一作者] 石金敏, 硕士研究生, 从事天然药物化学研究, Tel: 010-64014411-2975, E-mail: weian510@163.com

[通讯作者] * 李烧烧, Tel: 010-64014411-2975, E-mail: leerao@163.com

花蛇舌草的质量控制标准。

1 材料

KX-30DE 型数控超声波清洗器, 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪。

Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱购自北京曹达贸易有限公司, ADS-8 型大孔吸附树脂购自郑州勤实科技有限公司, 去乙酰车叶草酸甲酯化学对照品(批号 111786-200801, 供含量测定用); 白花蛇舌草对照药材(批号 121183-201003), 均购自中国食品药品检定研究院。甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司), 水为娃哈哈纯净水, 其他试剂均为分析纯。清肾颗粒由安徽中医学院第一附属医院提供, 批号为 20120726, 20120811, 20120821。

2 定性鉴别^[3-6]

取本品 10 g, 研细, 加甲醇 50 mL, 超声处理(300 W, 频率 24 kHz) 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 5 mL 使溶解, 作为供试品溶液。取缺白花蛇舌草阴性对照样品, 同法制备阴性对照溶液。另取白花蛇舌草对照药材 1.5 g, 加水 50 mL, 回流提取 15 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加乙醇 5 mL 使溶解, 作为对照药材溶液。取去乙酰车叶草酸甲酯 2 mg 加甲醇使溶解, 制成 1 g·L⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VIB) 试验, 吸取上述 4 种溶液各 4 μL, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上。以三氯甲烷-甲醇-水(5:1.5:0.1) 为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷以 10% 硫酸于 105 °C 加热至斑点显色清晰。供试品溶液色谱中, 与对照品和对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点而阴性对照品溶液无干扰。

3 含量测定^[7-8]

3.1 色谱条件 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-水(3.5:96.5), 检测波长 236 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 理论塔板数按去乙酰车叶草酸甲酯峰计算不低于 3 000。

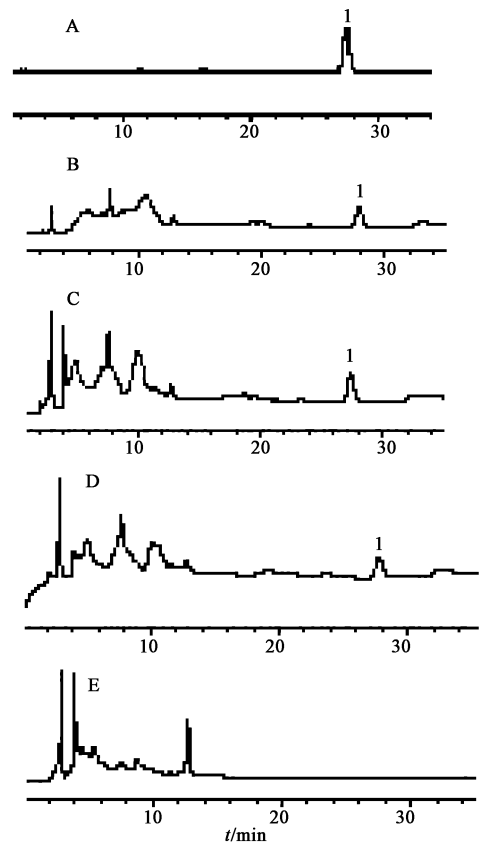
3.2 对照品溶液的制备 精密称取去乙酰车叶草酸甲酯对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 22 μg 的溶液, 即得。

3.3 供试品溶液的制备 取本品 10 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加水 40 mL, 称定质量, 超声处理(300 W, 频率 24 kHz) 30 min, 放冷, 再称定质量, 用水补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 10 mL, 通过 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱(内径为 1.5 cm, 柱高为 20 cm), 用水 200 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 继用 50% 甲醇 200 mL 洗脱, 收集洗脱液,

蒸干, 残渣加 50% 甲醇溶解, 定容至 10 mL 量瓶, 取续滤液, 制样, 即得。

3.4 阴性对照溶液的制备 按处方比例分别称取除白花蛇舌草以外的其余药味, 按照制备工艺制成缺白花蛇舌草的阴性样品, 按 3.3 项下供试品溶液制备方法, 即得。将上述 4 种溶液分别进样 10 μL, 测定, 阴性对照无干扰。

3.5 专属性试验 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 按照 3.1 色谱条件进行测定, 结果表明去乙酰车叶草酸甲酯与样品中的其他成分均能完全分离, 处方中其他药无干扰, 见图 1。



A. 对照品; B, C, D. 3 批样品
(批号 20120726, 20120811, 20120821);

E. 阴性; 1. 去乙酰车叶草酸甲酯

图 1 清肾颗粒 HPLC

3.6 线性关系考察 取去乙酰车叶草酸甲酯对照品适量, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀。以甲醇逐级稀释, 分别得到质量浓度为 135.40, 67.70, 33.85, 16.93, 8.46, 4.23 mg·L⁻¹ 去乙酰车叶草酸甲酯对照品溶液, 精密吸取上述不同浓度的对照品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积。以进样质量(μg) 为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y) 绘制标准曲线, 计算回归方程为 Y =

$1.4 \times 10^6 X - 4.06 \times 10^3$ ($r = 1.000 0$),结果表明,去乙酰车叶草酸甲酯的进样量在 $0.042 \sim 1.354 \mu\text{g}$ 与峰面积良好的线性关系。

3.7 方法学考察

3.7.1 精密度试验 取 20120821 样品,采用 3.3 项下的方法制备供试品溶液,精密吸取 $10 \mu\text{L}$,连续进样 6 次,计算去乙酰车叶草酸甲酯峰面积 RSD 1.43%,表明仪器精密度良好。

3.7.2 稳定性试验 取同一样品,采用 3.3 项下的方法制备供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样 $10 \mu\text{L}$,测定峰面积,计算 RSD 2.46%,表明 24 h 内供试品溶液稳定性较好。

3.7.3 重复性试验 取同一份样品(批号 20120821)6 份,采用 3.3 项下的方法制备供试品溶液,测定峰面积,计算去乙酰车叶草酸甲酯平均含量为 $0.093 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,RSD 1.69%,表明样品制备方法重复性良好。

3.7.4 回收率试验 采用加样回收法,精密称取同一样品(已知去乙酰车叶草酸甲酯含量为 $0.093 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)6 份,每份约 5 g,精密加入适量去乙酰车叶草酸甲酯,同法制备供试品溶液,测定去乙酰车叶草酸甲酯的含量,结果表明方法回收率良好,见表 1。

表 1 去乙酰车叶草酸甲酯回收率测定

NO.	检出量 /mg	样品中 含量/mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	0.987 6	0.524 6	97.11	99.96	1.66
2	1.010 6	0.524 6	101.93		
3	1.002 4	0.524 6	100.20		
4	1.004 8	0.524 6	100.73		
5	1.004 3	0.524 6	100.61		
6	0.997 4	0.524 6	99.17		

注:加入量均是 $0.476 8 \text{ mg}$ 。

3.8 样品测定 取 3 批样品,批号分别为 20120726, 20120811, 20120821, 按照 3.3 项下方法分别制备供试品溶液,分别制备供试品溶液,分别吸取 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,测定去乙酰车叶草酸甲酯峰面积,分别计算含量,3 批制剂中去乙酰车叶草酸甲酯的含量依次为 $0.083, 0.068, 0.093 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。根据测定结果,拟定本品每袋(10 g)含去乙酰车叶草酸甲酯($\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$)计,不得少于 0.55 mg 。

4 讨论

4.1 对照物质的选择 白花蛇舌草具有抗肿瘤、调

节免疫、抗菌消炎等作用,临床应用广泛^[9],现代研究表明该药可用于治疗肝癌、食道癌、宫颈癌等疾病。其有效成分包括萜类、黄酮类等有效成分,其中去乙酰车叶草酸甲酯为主要的萜类成分之一^[10]。因此选择该成分为清肾颗粒中白花蛇舌草的指标性成分。

4.2 含量测定中供试品溶液的制备

4.2.1 柱填料的选择 曾经尝试不通过柱填料、通过 ADS-8 和 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱填料,发现通过 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱填料死吸附较少,洗脱液杂质较少,色谱峰形较好,故选择 Diaion HP-20 大孔吸附树脂柱填料。

4.2.2 洗脱液的选择 曾经尝试用水 200 mL 洗脱,弃去洗脱液后,继用 40%, 50%, 80% 甲醇洗脱,发现用 50% 甲醇洗脱,基本将去乙酰车叶草酸甲酯洗脱完全且杂质峰较少,峰形较好,故选择用水 200 mL 洗脱,弃去洗脱液后,继用 50% 甲醇制备供试品溶液。

4.3 含量测定流动相选择 曾经尝试乙腈-水(3.5:96.5)、乙腈-水(4:96),发现流动相比比例为(3.5:96.5)时,目标色谱峰的分度度好,故选择该比例为流动相。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 23.
- [2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药志[M]. 南宁:广西壮族自治区人民出版社,1963:275.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:735.
- [4] 文萍,王凤林,余良忠,等. 肝复康片质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):74.
- [5] 马睿,代龙,孙明江,等. 白芪龙胶囊的质量标准研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):52.
- [6] 余晶晶,黄一平,吴德康. 胃安宁颗粒质量标准研究[J]. 中国药房,2008,19(12):912.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:735.
- [8] 李勇军,何迅,郑林,等. 蒲葶颗粒的定性定量研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(4):24.
- [9] 宋明艳,李克. 白花蛇舌草的化学成分及功效研究综述[J]. 亚太传统医药,2012,8(4):198.
- [10] 朱大诚,高永涛,马晓鹏. 白花蛇舌草化学成分的研究进展[J]. 江西中医学院学报,2011,23(2):84.

[责任编辑 顾雪竹]