

[质 量]

排石颗粒中 5 种指标成分和总黄酮的测定

黄萌萌^{1,2}, 陈 彦^{1,2*}, 刘聪燕^{1,2}, 瞿 鼎^{1,2}
(1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028; 2. 江苏省中医药研究院, 中药组分与微生物生态研究中心, 江苏 南京 210028)

摘要: **目的** 测定排石颗粒(连钱草、木通、徐长卿等)中 5 种指标成分和总黄酮的含有量。**方法** RP-HPLC 法测定排石颗粒 50% 甲醇提取液中各成分含有量, 分析采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 以乙腈-0.05% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 检测波长 240 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃。紫外分光光度法测定总黄酮的含有量。**结果** 绿原酸、马钱苷、芦丁、迷迭香酸、甘草酸铵分别在 18.88 ~ 604.00、18.50 ~ 592.00、20.25 ~ 648.00、18.75 ~ 600.00、18.81 ~ 602.00 μg/mL 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 97.9%、100.7%、103.3%、96.4%、102.4%, RSD 分别为 1.4%、0.4%、2.7%、1.2%、2.3%。20 批样品中总黄酮含有量均符合药典要求, 而指标成分含有量均有一定差异, 其中马钱苷变化最明显, 芦丁和甘草酸铵次之。**结论** 该方法简便、准确、可靠, 可用于排石颗粒的质量控制。

关键词: 排石颗粒; 指标成分; 总黄酮; RP-HPLC; 紫外分光光度

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)01-0085-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.01.016

Determination of five marker components and total flavonoids in Paishi Granules

HUANG Meng-meng^{1,2}, CHEN Yan^{1,2*}, LIU Cong-yan^{1,2}, QU Ding^{1,2}
(1. Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Research Center for Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

ABSTRACT: **AIM** To determine the contents of five marker components and total flavonoids in Paishi Granules (a medication to remove stones in the body, containing *Glechomae Herba*, *Akebiae Caulis*, *Cynanchi Paniculati Radix* et *Rhizoma*, etc.). **METHODS** The content determination of various components in 50% methanol extract of Paishi Granules was accomplished by RP-HPLC. The analysis was performed on a 30 ℃ thermostatic Aglient SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.05% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 240 nm. The content of total flavonoids was detected by ultraviolet spectrophotometry. **RESULTS** Chlorogenic acid, loganin, rutin, rosmarinic acid and ammoninm glycyrrhizinate showed good linear relationships within the ranges of 18.88 – 604.00, 18.50 – 592.00, 20.25 – 648.00, 18.75 – 600.00 and 18.81 – 602.00 μg/mL, whose average recoveries were 97.9%, 100.7%, 103.3%, 96.4% and 102.4% with the RSDs of 1.4%, 0.4%, 2.7%, 1.2% and 2.3%, respectively. The contents of total flavonoids in twenty batches of samples all met pharmacopeia requirements, while those of marker components were found to be different, among which loganin displayed the most significant change, followed by rutin and ammoninm glycyrrhizinate. **CONCLUSION** This simple, accurate and reliable method can be used for the quality control of Paishi Granules.

KEY WORDS: Paishi Granules; marker components; total flavonoids; RP-HPLC; ultraviolet spectrophotometry

收稿日期: 2016-01-24

作者简介: 黄萌萌(1987—), 女, 研究实习员, 从事中药制剂质量评价研究。Tel: 15952052285, E-mail: huangmengmengfish@126.com

* 通信作者: 陈 彦 (1968—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药新制剂、新剂型研究。Tel: 13805157904, E-mail: ychen202@hotmail.com

排石颗粒收载于《中国药典》2015 版，由连钱草、盐车前子、木通、徐长卿、石韦、忍冬、滑石、瞿麦、苘麻子、甘草 10 味药材制备而成，具有清热利水，通淋排石作用，临床用于治疗下焦湿热所致的石淋，症见腰腹疼痛、排尿不畅或伴有血尿，泌尿系结石等症状^[1]，疗效较好^[2-6]。目前，《中国药典》采用紫外分光光度法对其中总黄酮含量进行测定，但排石颗粒为多厂家品种，化学成分较为复杂，仅根据其含量难以全面控制该药物质量，并且难以实现对不同产品质量的差异化评价。现有关于排石颗粒质量评价的研究较少^[7-9]，由于绿原酸^[10]、马钱苷^[11]、迷迭香酸^[12]、甘草酸铵^[13]等均具有保肝利胆功效，为利胆排石中药的主要药效成分，故本实验以绿原酸、马钱苷、芦丁、迷迭香酸、甘草酸铵为指标成分，建立 HPLC 法同时测定其含量，以紫外分光光度法测定总黄酮含量，并对 4 个厂家 20 批样品进行比较和聚类分析，以期对排石颗粒质量标准提升提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Agilent1260 高效液相色谱仪（配置四元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器）；电子天平（梅特勒-托利多仪器上海有限公司）；UV-1800PC 型紫外可见分光光度计（上海凤凰光学仪器有限公司）；KH-500E 型超声波清洗器（昆山禾创超声仪器有限公司）；XP6 型精密天平（梅特勒-托利多仪器有限公司）；TGL-16C 型离心机（上海安亭科学仪器制造厂），微量移液器（200、1 000 μL，德国 Eppendorf 公司）。

1.2 试药 乙腈为色谱纯（德国 Merck 公司）；磷酸为分析纯（南京化学试剂有限公司）；甲醇为分析纯（江苏汉邦科技有限公司）；水为娃哈哈纯净水（杭州娃哈哈有限公司）。绿原酸（批号 110753-200413，含量 ≥ 98%）；马钱苷（批号 111640-201005，含量 ≥ 99%）、芦丁（批号 10080-201408，含量 94%）、迷迭香酸（批号 111871-201404，含量 ≥ 98%），甘草酸铵（批号 110731-201418，含量 ≥ 93%）对照品均购自中国食品药品检定研究院。市售排石颗粒购自药店，共 4 个厂家 20 批（表 1），其中含糖型每袋装 20 g，无糖型每袋装 5 g。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法同时测定指标成分含量

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 150 mm，5 μm）；Agilent C₁₈ ODS 保护

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

批号	厂家	规格/(g·袋 ⁻¹)
S1	A	20
S2	A	20
S3	A	5
S4	B	20
S5	B	20
S6	B	20
S7	B	5
S8	C	20
S9	C	20
S10	C	5
S11	D	20
S12	D	20
S13	D	20
S14	D	20
S15	D	20
S16	D	20
S17	D	20
S18	D	20
S19	D	20
S20	D	5

柱（4.6 mm × 12.5 mm，5 μm）；流动相乙腈（A）- 0.05% 磷酸（B），梯度洗脱（0 ~ 5 min，5% ~ 8% A；5 ~ 18 min，8% ~ 12% A；18 ~ 24 min，12% ~ 19% A；24 ~ 35 min，19% ~ 24% A；35 ~ 50 min，24% ~ 45% A；50 ~ 55 min，45% ~ 90% A；55 ~ 65 min，5% A）；检测波长 240 nm；体积流量 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 20 μL。HPLC 色谱图见图 1。

2.1.2 对照品溶液制备 精密称取绿原酸、马钱苷、芦丁、迷迭香酸、甘草酸铵对照品适量，50% 甲醇溶解，定容于 5 mL 棕色量瓶中，配制成质量浓度分别为 0.604、0.592、0.648、0.600、0.602 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 精密称取含有蔗糖的排石颗粒内容物 2 g，无蔗糖排石颗粒内容物 0.5 g，置于具塞锥形瓶中，精密加入 25 mL 50% 甲醇，称定质量，超声（250 W、45 kHz）30 min，放至室温，50% 甲醇补足减失质量，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.1.4 线性关系考察 将对照品溶液稀释 2、4、8、16、32 倍，各取 20 μL，在“2.1.1”项色谱条件下进样。以峰面积为纵坐标（Y），质量浓度（μg/mL）为横坐标（X）进行线性回归，得回归方程分别为绿原酸 $Y = 8.065\ 9X - 38.343\ 8$ ($R^2 = 0.999\ 7$)、马钱苷 $Y = 4.399\ 7X - 12.076\ 6$ ($R^2 = 0.999\ 9$)、芦丁 $Y = 7.536\ 1X - 27.609\ 0$ ($R^2 = 0.999\ 5$)、迷迭香酸 $Y = 4.468\ 6X - 15.639\ 3$ ($R^2 =$

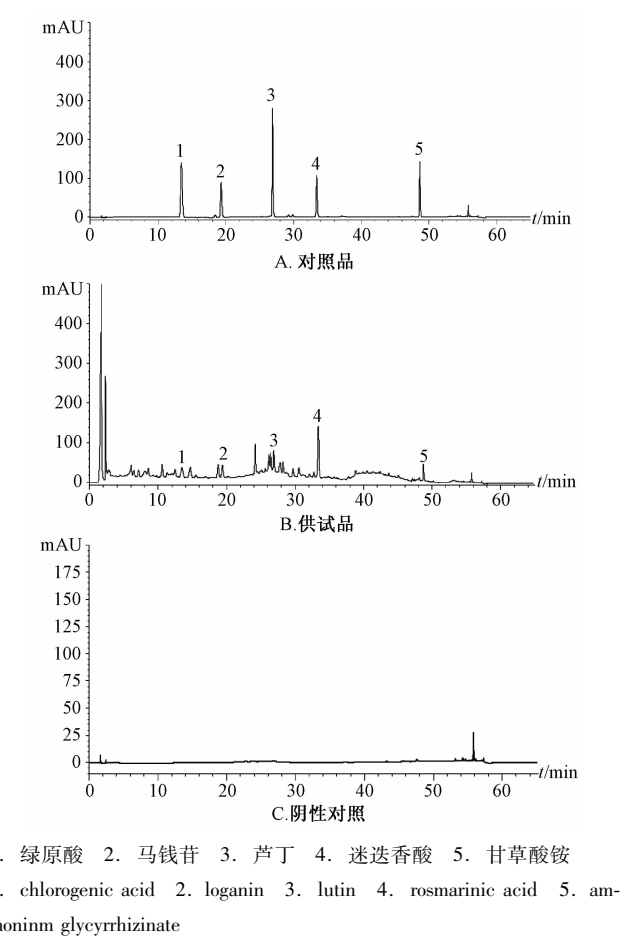


图1 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms

0.999 9)、甘草酸铵 $Y = 4.337\ 3X - 55.662\ 2$ ($R^2 = 0.999\ 8$), 分别在 18.88 ~ 604.00、18.50 ~ 592.00、20.25 ~ 648.00、18.75 ~ 600.00、18.81 ~ 602.00 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.1.5 精密度试验 取同一混合对照品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样 5 次, 测得绿原酸、马钱苷、芦丁、迷迭香酸、甘草酸铵峰面积 RSD 分别为 0.3%、0.4%、0.9%、1.2%、0.4%; 同一样品连续进样 3 d, 每天 2 针, 测得绿原酸、马钱苷、芦丁、迷迭香酸、甘草酸铵峰面积 RSD 分别为 0.5%、0.7%、1.8%、1.5%、0.6%, 表明仪器精密性良好。

2.1.6 稳定性试验 取供试品 (S11) 溶液, 于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测得绿原酸、马钱苷、芦丁、迷迭香酸、甘草酸铵峰面积 RSD 分别为 0.5%、0.2%、1.8%、1.6%、0.4%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.7 重复性试验 取同一样品 (S11), 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项

色谱条件下测定, 测得绿原酸、马钱苷、芦丁、迷迭香酸、甘草酸铵含有量 RSD 分别为 1.2%、1.7%、2.2%、0.9%、2.3%, 表明该方法重复性良好。

2.1.8 加样回收率试验 精密称取含有量已知的排石颗粒 (S11) 9 份, 每份 1 g, 按样品各成分含有量的 80%、100%、120% 精密加入相应的对照品溶液, 各 3 份, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下测定, 记录色谱峰峰面积, 结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果 (n=9)						
Tab. 2 Results of recovery tests (n=9)						
成分	取样量/ g	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/% (RSD/%)
绿原酸	1.004 2	0.431 8	0.360 0	0.779 6	96.6	97.9 (1.4)
	0.998 8	0.429 5	0.360 0	0.786 2	99.1	
	0.999 4	0.429 7	0.360 0	0.779 4	97.1	
	0.998 8	0.429 5	0.450 0	0.869 4	97.8	
	1.000 8	0.430 3	0.450 0	0.879 2	99.7	
	0.999 4	0.429 7	0.450 0	0.870 5	97.9	
	0.999 8	0.429 9	0.540 0	0.945 4	95.5	
	0.999 6	0.429 8	0.540 0	0.965 6	99.2	
	0.999 5	0.429 8	0.540 0	0.957 6	97.7	
	1.004 2	0.632 6	0.512 0	1.148 2	100.7	
马钱苷	0.998 8	0.629 2	0.512 0	1.145 8	100.9	100.7 (0.4)
	0.999 4	0.629 6	0.512 0	1.143 5	100.4	
	0.998 8	0.629 2	0.640 0	1.270 6	100.2	
	1.000 8	0.630 5	0.640 0	1.277 7	101.1	
	0.999 4	0.629 6	0.640 0	1.272 8	100.5	
	0.999 8	0.629 9	0.768 0	1.402 2	100.6	
	0.999 6	0.629 7	0.768 0	1.409 5	101.5	
	0.999 5	0.629 7	0.768 0	1.399 2	100.2	
	1.004 2	0.522 2	0.416 0	0.930 6	98.2	
	0.998 8	0.519 4	0.416 0	0.938 2	100.7	
芦丁	0.999 4	0.519 7	0.416 0	0.959 8	105.8	103.3 (2.7)
	0.998 8	0.519 4	0.520 0	1.055 7	103.1	
	1.000 8	0.520 4	0.520 0	1.072 8	106.2	
	0.999 4	0.519 7	0.520 0	1.052 5	102.5	
	0.999 8	0.519 9	0.624 0	1.184 9	106.6	
	0.999 6	0.519 8	0.624 0	1.154 6	101.7	
	0.999 5	0.519 7	0.624 0	1.172 4	104.6	
	1.004 2	2.169 1	1.760 0	3.849 6	95.5	
	0.998 8	2.157 4	1.760 0	3.870 4	97.3	
	0.999 4	2.158 7	1.760 0	3.895 6	98.7	
迷迭香酸	0.998 8	2.157 4	2.200 0	4.254 2	95.3	96.4 (1.2)
	1.000 8	2.161 7	2.200 0	4.274 8	96.0	
	0.999 4	2.158 7	2.200 0	4.302 5	97.4	
	0.999 8	2.159 6	2.640 0	4.679 2	95.4	
	0.999 6	2.159 1	2.640 0	4.709 4	96.6	
	0.999 5	2.158 9	2.640 0	4.685 2	95.7	
	1.004 2	0.612 6	0.488 0	1.118 2	103.6	
	0.998 8	0.609 3	0.488 0	1.096 7	99.9	
	0.999 4	0.609 6	0.488 0	1.128 6	106.3	
	0.998 8	0.609 3	0.610 0	1.244 9	104.2	
甘草酸铵	1.000 8	0.610 5	0.610 0	1.226 8	101.0	102.4 (2.3)
	0.999 4	0.609 6	0.610 0	1.247 5	104.6	
	0.999 8	0.609 9	0.732 0	1.356 8	102.0	
	0.999 6	0.609 8	0.732 0	1.349 2	101.0	
	0.999 5	0.609 7	0.732 0	1.336 5	99.3	

2.1.9 样品含有量测定 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 2 份,取 20 μ L 进样,在“2.1.1”项色谱条件下测定,外标法计算含有量,结果见表 3。

表 3 含有量测定结果 (mg/袋, n = 2)
Tab. 3 Results of content determination (mg/bag, n = 2)

批次	绿原酸	马钱苷	芦丁	迷迭香酸	甘草酸铵	总黄酮
S1	11.00	85.40	39.20	50.60	41.60	392.83
S2	10.80	124.60	36.20	45.60	41.00	381.28
S3	10.15	53.20	46.15	37.15	58.70	494.31
S4	14.40	25.60	21.40	24.40	25.40	356.89
S5	8.40	31.80	21.40	28.00	27.20	326.20
S6	14.80	17.20	24.40	27.20	24.40	363.39
S7	18.65	15.75	11.50	26.65	14.25	389.78
S8	11.80	22.40	36.00	36.40	61.60	412.98
S9	12.40	27.80	19.00	29.40	31.80	336.26
S10	9.00	15.40	31.80	49.65	52.55	469.07
S11	8.60	12.60	10.40	43.20	12.20	328.79
S12	9.40	12.20	10.20	47.20	13.80	368.93
S13	8.20	11.20	9.40	35.60	13.40	308.17
S14	8.20	12.20	9.40	39.20	11.40	294.17
S15	8.60	12.00	9.80	39.00	11.60	323.76
S16	8.00	11.40	9.60	36.20	11.00	342.03
S17	8.60	11.40	10.00	46.40	11.60	353.72
S18	9.60	13.00	10.60	45.80	12.60	314.74
S19	9.80	12.40	7.40	47.60	14.00	346.24
S20	13.50	26.35	17.00	45.40	22.70	371.05

2.2 紫外分光光度法测定总黄酮含有量 按照《中国药典》2015 版^[1]项下方法测定总黄酮含有量,结果见表 3。

2.3 不同厂家样品比较

2.3.1 含有量分析 《中国药典》2015 版规定,排石颗粒每袋含总黄酮不得少于 0.12 g (以无水芦丁计),即 120 mg/袋,含糖与无糖型均按此标准进行质量评定。紫外分光光度法测定结果表明,20 批样品中总黄酮含有量在 294.17 ~ 494.31 mg/袋范围内,均符合药典要求,并高出规定 2 ~ 4 倍。另外,同一厂家无糖型样品总黄酮含有量略高于含糖型,不同厂家各批样品间有一定差异,但总体较小,不能实现差异化评价。

4 个厂家绿原酸、马钱苷、芦丁、迷迭香酸、甘草酸铵含有量分别在 8.00 ~ 18.65、11.20 ~ 124.60、7.40 ~ 46.15、24.40 ~ 50.60、11.00 ~ 61.60 mg/袋范围内,其中绿原酸与迷迭香酸含有量差异相对较小,最高与最低值相差 1 倍,D 厂家迷迭香酸含有量略高于其他厂家,而绿原酸稍低于其他厂家;马钱苷含有量差异较大,最高与最低值相差约 10 倍,A 厂家显著高于其他厂家,S2 样品

高达 124.60 mg/袋;芦丁含有量最高与最低值相差约 6 倍,D 厂家普遍低于其他厂家;A、C 厂家甘草酸铵含有量高于 B、D 厂家;不同厂家无糖型样品中各指标成分含有量普遍高于含糖型,与总黄酮基本一致。综上所述,A 厂家各指标成分含有量相对较高,而 D 厂家相对较低,同一厂家各批次样品基本一致,差异较小。

2.3.2 聚类分析 将表 2 数据输入 SPSS 19.0 软件进行系统聚类,并采用组间均连法,以欧式平方距离为分类依据,总黄酮含有量为变量,结果见图 2A,可见 20 批样品可聚为 2 类,其中 B、D 厂家与 A、C 厂家含糖型样品聚为 I 类,A、C 厂家无糖型样品聚为 II 类。再以总黄酮、各指标成分含有量为变量进行聚类分析,结果见图 2B,可见 20 批样品聚为 4 类,D 厂家所有样品聚为 I 类,B 厂家所有样品与 C 厂家 S9 样品聚为 II 类,A 厂家含糖型样品 S1 和 S2 聚为 III 类,A 厂家无糖型 S3 样品与 C 厂家 S8 和 S10 样品聚为 IV 类。由此可知,选择总黄酮、各指标成分含有量作为变量进行聚类分析时,能够更好地区别不同厂家产品,从而实现差异化评价。

3 讨论和结论

排石颗粒为多厂家产品,处方中含有连钱草、盐车前子等 10 味药材,成分复杂,不同厂家产品的质量很难保持一致,仅以总黄酮含有量为指标难以控制其质量,而且无法对其进行差异化评价,阻碍中药产品整体质量的提升^[14]。目前,针对中药标准化程度不高、标准体系不健全、缺乏优质质量评价技术标准等问题,国家中医药管理局开展了中药标准化项目申报工作,倡导对多家企业生产的同一品种制定优质产品标准,故因此建立中成药多指标成分的控制标准为企业优质产品发展之必然^[15-16]。

本实验比较了甲醇-磷酸、乙腈-醋酸、乙腈-磷酸、甲醇-乙腈-磷酸等洗脱系统,发现以乙腈-0.05% 磷酸为流动相进行梯度洗脱时,目标成分分离效果较好,分离度符合要求,分析时间合适。提取溶剂和提取时间考察结果表明,25 mL 50% 甲醇超声提取 30 min 时,目标成分提取效率较高。再采用 HPLC 法对 4 个厂家 20 批样品中 5 种指标成分和总黄酮含有量进行分析,并通过聚类分析比较其一致性和稳定性,发现各样品中总黄酮含有量均符合药典规定,但 5 种指标成分存在一定的差异。

综上所述,本研究建立了排石颗粒质量多指标

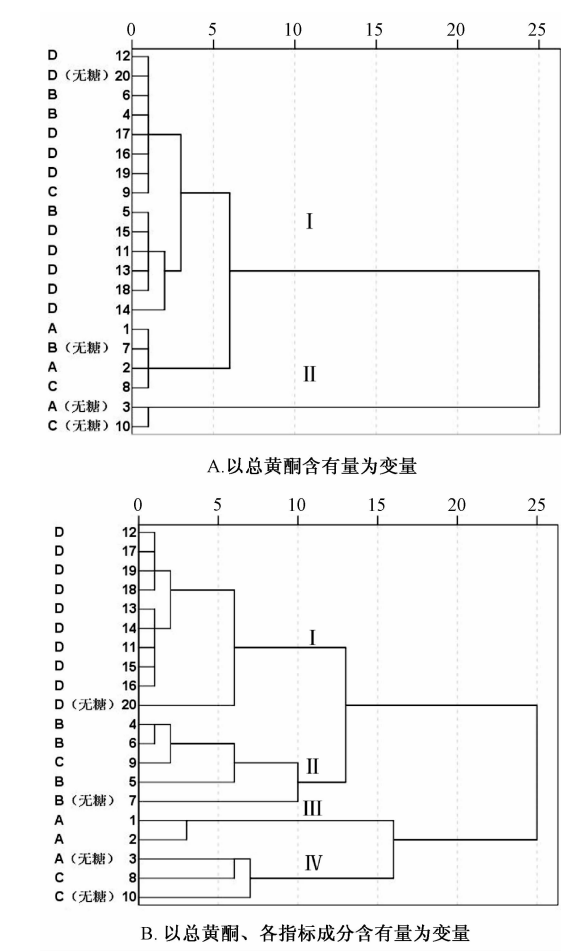


图 2 聚类分析图
Fig. 2 Cluster analysis images

成分评价方法，可以实现不同厂家的差异化评价。但中药质量标准可能与临床安全性和有效性评价存在不一致性，故仍需进一步结合药效指标以探明该药物药效物质基础，建立能真正反映中药疗效的的质量评价体系。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015 年版一

部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：1483-1484.

[2] 张 丽，朴晋华，张 蕻. 排石颗粒主要药效学研究[J]. 中国药物与临床，2005，5(7)：532-533.

[3] 柳春兴，邢建国. 排石颗粒的药理作用研究[J]. 中国现代药物应用，2007，1(9)：33-34.

[4] 付 蕾. 排石颗粒对泌尿系结石患者结石大小、排石时间影响的临床研究[J]. 国际医药卫生导报，2015，21(12)：1717-1719.

[5] 孙业庆，王慎鸿，谭洪鳌. 排石颗粒合坦索罗辛治疗体外冲击波碎石后输尿管结石疗效观察[J]. 浙江中医药大学学报，2011，35(6)：871-873.

[6] 王 慧. 不同碎石方法联合排石颗粒治疗输尿管结石的临床观察[J]. 中国中医急症，2013，22(5)：836-837.

[7] 胡军林，陈晓颢，周 伟. 同时测定排石颗粒中迷迭香酸、当药苷和马钱苷含量的 HPLC 法的建立[J]. 深圳中西医结合杂志，2014，6(6)：151-152.

[8] 毛康荣，陈国强. HPLC 测定排石颗粒中芦丁的含量[J]. 中国中药杂志，2004，29(7)：707.

[9] 胡军林，陈晓颢，周 伟. 排石颗粒特征图谱研究[J]. 四川中医，2014，8(8)：66-69.

[10] 刘 颖，郭明晔，白根本. 绿原酸的研究进展[J]. 中药材，2012，35(7)：1180-1185.

[11] 纪海霞，马宏达，赵庆春，等. 高效液相色谱法测定益肝防石颗粒中马钱苷的含量[J]. 中国药师，2014，17(3)：514-515.

[12] 翟宏宇，郝羚竹. HPLC 法同时测定消炎利胆片中 4-甲氧基-5-羟基铁屎米酮和迷迭香酸的含量[J]. 中国医药指南，2013，11(32)：15-16.

[13] 黄继英，韩 冰，张顺财，等. 甘草酸铵通过抑制 HMGB1 的表达减轻 ConA 诱导的免疫性肝损伤[J]. 胃肠病学和肝病学杂志，2012，21(3)：264-267.

[14] 李鸿彬，李认书. 对上市中成药再评价制度的回顾与思考[J]. 中草药，2015，46(2)：293-296.

[15] 张 萍，杨 燕，鄢 丹，等. 多指标成分含量测定与指纹图谱分析在中药制备工艺与质量控制中的应用[J]. 中华中医药杂志，2010，25(1)：120-123.

[16] 翟 宇，沈 岚，李青颖，等. 基于指纹图谱分析与多指标成分定量测定的扶正化癥胶囊质量评价研究[J]. 中成药，2012，34(3)：389-393.