



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102145146 B

(45) 授权公告日 2013.04.24

(21) 申请号 201110084707.1

(22) 申请日 2007.09.13

(62) 分案原申请数据

200710121722.2 2007.09.13

(73) 专利权人 北京亚东生物制药有限公司

地址 100083 北京市昌平区科技园区振兴路  
8号

(72) 发明人 付立家 付建家

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/90 (2006.01)

A61K 36/9062 (2006.01)

A61P 13/08 (2006.01)

审查员 程心旻

权利要求书7页 说明书27页

(54) 发明名称

一种治疗泌尿系统疾病的药物组合物的检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种治疗泌尿系统疾病的中药组合物的检测方法。本发明药物组合物由粉萆薢 200-400 重量份、石菖蒲 30-90 重量份、甘草 100-200 重量份、乌药 50-120 重量份、益智仁(炒) 20-80 重量份、菟丝子 200-300 重量份、茯苓 80-160 重量份等原料药组成,本发明组合物质量控制方法中采用高效液相色谱法对薯蓣皂甙元、甘草酸进行含量测定,对粉萆薢、石菖蒲、甘草、益智仁(炒)、乌药进行定性薄层鉴别。本发明组合物具有分清化浊,温肾利湿之功效,用于肾不化气,清浊不分,小便频数,时下白浊。

1. 一种治疗泌尿系统疾病的药物组合物的检测方法,其特征在于该方法包括如下鉴别方法和含量测定方法:

该组合物是由如下重量配比的原料药制成的:

粉萆薢 200-400 重量份      石菖蒲 30-90 重量份      甘草 100-200 重量份  
乌药 50-120 重量份      炒益智仁 20-80 重量份;

鉴别方法:

(1) 粉萆薢

取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加 2mol/L 的盐酸 20-60ml,回流 1 小时,滤过,药渣用 10% 碳酸钠溶液洗至中性,用 20ml 乙醚超声处理 10-40 分钟,滤过,滤液浓缩至 0.5-2.0ml,作为供试品溶液;另取粉萆薢对照药材 0.5-2.0g,同法制成对照药材溶液;照中国药典 2005 年版一部附录 VIB 项下的薄层色谱法试验,分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5-20  $\mu$ l,点于同一硅胶 G 薄层板上以 6-15 : 0.3 的三氯甲烷-丙酮为展开剂,饱和 5-15 分钟展开;取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主斑点;

(2) 薯蓣皂苷元

取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,置 100mL 具塞锥形瓶中,加乙醇水浴回流提取 2-4 次,每次 20mL,每次 20-40min,合并提取液,回收溶剂至干,残渣加 2mol/L 盐酸 10-30mL,沸水回流 2-4h,取出,冷却,移置分液漏斗中,加氯仿萃取 2-4 次,每次 10mL,合并氯仿液,水浴蒸至约 3mL,作为供试品溶液;取薯蓣皂苷元对照品适量,加甲醇制成每 1mL 含 0.5-2.0mg 的对照品溶液;分别吸取对照品溶液 3-8  $\mu$ l,供试品溶液 5-15  $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以 5-10 : 3 的沸程为 60 ~ 90 $^{\circ}$ C 石油醚-醋酸乙酯为展开剂,展开,取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;

(3) 甘草

取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加乙醚 20-60mL,加热回流 0.5-2.0h,滤过,药渣加甲醇 10-40mL,超声 10-40min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 40mL 使溶解,用水饱和正丁醇提取 2-4 次,每次 20mL,合并正丁醇液,用 10-30mL 水洗涤,蒸干,残渣加甲醇 3mL 使溶解,作为供试品溶液;取甘草对照药材 1g,供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液 3-8  $\mu$ l,供试品溶液各 5-15  $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板,以 10-20 : 1 : 1 : 1-5 的乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水为展开剂展开,取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰,置 365nm 紫外光灯下检视;在供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;

(4) 乌药

取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加氯仿 20-60mL,超声 20-40min 过滤,滤液蒸干,残渣加甲醇 0.5-2.0mL 使溶解,作为供试品溶液;取乌药对照药材 0.5-2.0g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5-15  $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以 3-8 : 1 的沸程 60 ~ 90 $^{\circ}$ C 石油醚-乙酸乙酯为展开剂展开,取出晾干后喷以 2% 香草醛硫酸溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色

清晰；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；

#### (5) 炒益智仁

取本药物组合物制剂内容物适量，研细，取相当于生药材 1-3g 的细粉，加沸程 60～90℃ 的石油醚 20-40ml，超声处理 20-60 分钟，滤过，滤液挥干，残渣加 1ml 无水乙醇使溶解，作为供试品溶液；取益智仁对照药材 1-3g，与供试品溶液制备同法制成对照药材溶液；分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l，点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上 5-12 : 2 的以环己烷-乙酸乙酯为展开剂，饱和 5-15 分钟，展开，取出，晾干，置 254nm 紫外光灯下检视；供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；

#### (6) 石菖蒲

取本药物组合物制剂内容物适量，研细，取相当于生药材 1-3g 的细粉，加乙醚 20-40ml，超声处理 20-60 分钟，滤过，滤液浓缩至约 0.5-2.0ml，作为供试品溶液。另取石菖蒲对照药材 0.5-2.0g，与供试品溶液的制备同法得对照药材溶液；分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 3-10 $\mu$ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上以 5-12 : 2 的沸程 60～90℃ 石油醚-乙酸乙酯为展开剂，展开，取出，晾干，置 365nm 紫外光灯下检视；在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的主荧光斑点；

#### 含量测定

##### (1) 粉萆薢的含量测定

照中国药典 2005 年版一部附录 VI D 项下的高效液相色谱法测定；

色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，30 : 40-100 的甲醇-乙腈为流动相；检测波长为 150-250nm；理论板数按薯蓣皂甙元峰计算应不低于 3000；对照品溶液的制备精密称取干燥至恒重的薯蓣皂甙元对照品适量，加甲醇制成每 1ml 含 0.1-0.5mg 的对照品溶液；

供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物，研细，精密称取相当于生药材 0.5-2.0g 的药粉，置 100ml 具塞三角瓶中，加乙醇水浴回流三次，每次 10-30ml，每次 20-40min，合并提取液，回收溶剂至干，残渣加 2mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 10-30ml，沸水回流 2-4h，取出冷却，移至分液漏斗中，加氯仿萃取三次，每次 5-15ml，合并氯仿液，回收溶剂至干，残渣加甲醇使溶解，移至 10ml 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，经 0.45 $\mu$ m 为孔滤膜过滤，取续滤液作为供试品溶液；

测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 $\mu$ l，注入液相色谱仪，测定，即得；本品每 1g 含粉萆薢以薯蓣皂甙元 C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub> 计，不得少于 1.5mg；

##### (2) 甘草的含量测定

照中国药典 2005 年版一部附录 VI D 项下的高效液相色谱法测定；

色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，28 : 50-90 : 2 的乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸为流动相；检测波长为 250nm；理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于 2000；

对照品溶液的制备取甘草酸单铵盐对照品约 2-6mg，精密称定，置 20ml 量瓶中，用流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，即得，每 1ml 含甘草酸单铵盐对照品 0.1-0.3mg，折合甘草酸为 0.0980-0.2939mg；

供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物，研细，精密称取相当于生药材 0.5-3g

的药粉,置具塞三角瓶中,精密加入流动相 10-40ml,称定重量,250W,20kHz 超声处理 20-40 分钟,放冷,再称定重量,用流动相补足减失的重量,摇匀,滤过,即得;

测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10  $\mu$  l,注入液相色谱仪,测定,即得;

本品每 1g 含甘草以甘草酸  $C_{42}H_{62}O_{16}$  计,不得少于 2.5mg。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其特征是该组合物由如下重量比的原料药制成的:

粉萆薢 325-400 重量份      石菖蒲 30-55 重量份      甘草 100-155 重量份

乌药 85-120 重量份      炒益智仁 45-80 重量份

3. 一种治疗泌尿系统疾病的药物组合物的检测方法,其特征在于该方法包括如下鉴别方法和含量测定方法:

该组合物由如下重量比的原料药制成的:

粉萆薢 200-400 重量份      石菖蒲 30-90 重量份      甘草 100-200 重量份

乌药 50-120 重量份      炒益智仁 20-80 重量份      菟丝子 200-300 重量份

茯苓 80-160 重量份

鉴别方法:

(1) 粉萆薢

取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加 2mol/L 的盐酸 20-60ml,回流 1 小时,滤过,药渣用 10% 碳酸钠溶液洗至中性,用 20ml 乙醚超声处理 10-40 分钟,滤过,滤液浓缩至 0.5-2.0ml,作为供试品溶液;另取粉萆薢对照药材 0.5-2.0g,同法制成对照药材溶液;照中国药典 2005 年版一部附录 VI B 项下的薄层色谱法试验,分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5-20  $\mu$  l,点于同一硅胶 G 薄层板上以 6-15 : 0.3 的三氯甲烷-丙酮为展开剂,饱和 5-15 分钟展开;取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主斑点;

(2) 薯蓣皂苷元

取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,置 100mL 具塞锥形瓶中,加乙醇水浴回流提取 2-4 次,每次 20mL,每次 20-40min,合并提取液,回收溶剂至干,残渣加 2mol/L 盐酸 10-30mL,沸水回流 2-4h,取出,冷却,移置分液漏斗中,加氯仿萃取 2-4 次,每次 10mL,合并氯仿液,水浴蒸至约 3mL,作为供试品溶液;取薯蓣皂苷元对照品适量,加甲醇制成每 1mL 含 0.5-2.0mg 的对照品溶液;分别吸取对照品溶液 3-8  $\mu$  l,供试品溶液 5-15  $\mu$  l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以 5-10 : 3 的沸程为 60 ~ 90 $^{\circ}$ C 石油醚-醋酸乙酯为展开剂,展开,取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;

(3) 甘草

取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加乙醚 20-60mL,加热回流 0.5-2.0h,滤过,药渣加甲醇 10-40mL,超声 10-40min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 40mL 使溶解,用水饱和正丁醇提取 2-4 次,每次 20mL,合并正丁醇液,用 10-30mL 水洗涤,蒸干,残渣加甲醇 3mL 使溶解,作为供试品溶液;取甘草对照药材 1g,供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液 3-8  $\mu$  l,供试品溶液各 5-15  $\mu$  l 点于

同一硅胶 G 薄层板,以 10-20 : 1 : 1 : 1-5 的乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水为展开剂展开,取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105℃ 烘至斑点显色清晰,置 365nm 紫外光灯下检视;在供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;

#### (4) 乌药

取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加氯仿 20-60mL,超声 20-40min 过滤,滤液蒸干,残渣加甲醇 0.5-2.0mL 使溶解,作为供试品溶液;取乌药对照药材 0.5-2.0g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5-15  $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以 3-8 : 1 的沸程 60 ~ 90℃ 石油醚-乙酸乙酯为展开剂展开,取出晾干后喷以 2% 香草醛硫酸溶液,105℃ 烘至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;

#### (5) 炒益智仁

取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加沸程 60 ~ 90℃ 的石油醚 20-40ml,超声处理 20-60 分钟,滤过,滤液挥干,残渣加 1ml 无水乙醇使溶解,作为供试品溶液;取益智仁对照药材 1-3g,与供试品溶液制备同法制成对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5  $\mu$ l,点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上 5-12 : 2 的以环己烷-乙酸乙酯为展开剂,饱和 5-15 分钟,展开,取出,晾干,置 254nm 紫外光灯下检视;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;

#### (6) 石菖蒲

取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加乙醚 20-40ml,超声处理 20-60 分钟,滤过,滤液浓缩至约 0.5-2.0ml,作为供试品溶液。另取石菖蒲对照药材 0.5-2.0g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 3-10  $\mu$ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上以 5-12 : 2 的沸程 60 ~ 90℃ 石油醚-乙酸乙酯为展开剂,展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视;在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主荧光斑点;

### 含量测定

#### (1) 粉萆薢的含量测定

照中国药典 2005 年版一部附录 VI D 项下的高效液相色谱法测定;

色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,30 : 40-100 的甲醇-乙腈为流动相;检测波长为 150-250nm;理论板数按薯蓣皂甙元峰计算应不低于 3000;

对照品溶液的制备精密称取干燥至恒重的薯蓣皂甙元对照品适量,加甲醇制成每 1ml 含 0.1-0.5mg 的对照品溶液;

供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物,研细,精密称取相当于生药材 0.5-2.0g 的药粉,置 100ml 具塞三角瓶中,加乙醇水浴回流三次,每次 10-30ml,每次 20-40min,合并提取液,回收溶剂至干,残渣加 2mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 10-30mL,沸水回流 2-4h,取出冷却,移至分液漏斗中,加氯仿萃取三次,每次 5-15ml,合并氯仿液,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,移至 10ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45  $\mu$ m 为孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液;

测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10  $\mu$ l,注入液相色谱仪,测定,即得;本品每 1g 含粉萆薢以薯蓣皂甙元 C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub> 计,不得少于 1.5mg;

## (2) 甘草的含量测定

照中国药典 2005 年版一部附录 VI D 项下的高效液相色谱法测定；

色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，28 : 50-90 : 2 的乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸为流动相；检测波长为 250nm；理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于 2000；

对照品溶液的制备取甘草酸单铵盐对照品约 2-6mg，精密称定，置 20ml 量瓶中，用流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，即得，每 1ml 含甘草酸单铵盐对照品 0.1-0.3mg，折合甘草酸为 0.0980-0.2939mg；

供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物，研细，精密称取相当于生药材 0.5-3g 的药粉，置具塞三角瓶中，精密加入流动相 10-40ml，称定重量，250W，20kHz 超声处理 20-40 分钟，放冷，再称定重量，用流动相补足减失的重量，摇匀，滤过，即得；

测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10  $\mu$  l，注入液相色谱仪，测定，即得；本品每 1g 含甘草以甘草酸 C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub> 计，不得少于 2.5mg。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征是该组合物是由如下重量比的原料药制成的：

粉萆薢 320 重量份      石菖蒲 60 重量份      甘草 160 重量份  
乌药 80 重量份      炒益智仁 40 重量份

5. 如权利要求 3 所述方法，其特征是该组合物是由如下重量比的原料药制成的：

粉萆薢 320 重量份      石菖蒲 60 重量份      甘草 160 重量份  
乌药 80 重量份      炒益智仁 40 重量份      菟丝子 240 重量份  
茯苓 120 重量份

。

6. 如权利要求 1-5 任一所述的方法，其特征是该药物组合物的剂型是：颗粒剂、胶囊剂、片剂、丸剂。

7. 如权利要求 5 所述的方法，其特征是该药物组合物丸剂的制备为：

以上七味，粉萆薢、石菖蒲、益智仁、茯苓碎成 80 目或 100 目细粉，其余药味加入逆流提取罐中加 4 倍量水，60℃连续逆流提取 1h；以提取液为赋形剂泛丸，50 ~ 60℃干燥；将滑石粉粉碎成 150 目极细粉包衣，打光，50 ~ 60℃干燥，即得。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于该方法包括如下鉴别方法和含量测定方法：

## (1) 粉萆薢

供试品溶液制备：取本药物组合物制剂内容物适量，研细，取相当于生药材 2g 的细粉，加 2mol/L 的盐酸 40ml，回流 1 小时，滤过，药渣用 10% 碳酸钠溶液洗至中性，用 20ml 乙醚超声处理 30 分钟，滤过，滤液浓缩至 1ml，作为供试品溶液；另取粉萆薢对照药材 1g，同法制成对照药材溶液；照中国药典 2005 年版一部附录 VI B 项下的薄层色谱法试验，分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 10  $\mu$  l，点于同一硅胶 G 薄层板上以 9.7 : 0.3 的三氯甲烷-丙酮为展开剂，饱和 10 分钟展开；取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液，105℃烘至斑点显色清晰，供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的主斑点；

## (2) 薯蓣皂苷元

供试品溶液制备：取本药物组合物制剂内容物适量，研细，取相当于生药材 1g 的细粉，置 100ml 具塞锥形瓶中，加乙醇水浴回流提取 3 次，每次 20ml，每次 30min，合并提取液，回

收溶剂至干。残渣加 2mol/L 盐酸 20mL,沸水回流 3h,取出,冷却,移置分液漏斗中,加氯仿萃取 3 次,每次 10mL,合并氯仿液,水浴蒸至约 3mL,作为供试品溶液;取薯蓣皂苷元对照品适量,加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的对照品溶液;分别吸取对照品溶液 5 $\mu$ l,供试品溶液 10 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以 7 : 3 的沸程 60 ~ 90 $^{\circ}$ C 石油醚-醋酸乙酯为展开剂,展开,取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;

### (3) 甘草

供试品溶液制备:取本药物组合物相当于生药材 2g 的细粉,加乙醚 40mL,加热回流 1h,滤过,药渣加甲醇 30mL,超声 30min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 40mL 使溶解,用水饱和正丁醇提取 3 次,每次 20mL,合并正丁醇液,用 20mL 水洗涤,蒸干,残渣加甲醇 3mL 使溶解,作为供试品溶液;取甘草对照药材 1g,供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液 5 $\mu$ l,供试品溶液 10 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板,以 15 : 1 : 1 : 2 的乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水为展开剂展开,取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰,置 365nm 紫外光灯下检视,在供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点;

### (4) 乌药

供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,取相当于生药材 2g 的细粉,加氯仿 40mL,超声 30min 过滤,滤液蒸干,残渣加甲醇 1mL 使溶解,作为供试品溶液;取乌药对照药材 1g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 10 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以 5 : 1 的沸程 60 ~ 90 $^{\circ}$ C 石油醚-乙酸乙酯为展开剂展开,取出晾干后喷以 2% 香草醛硫酸溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;

### (5) 炒益智仁

供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加沸程 60 ~ 90 $^{\circ}$ C 石油醚 30mL,超声处理 30 分钟,滤过,滤液挥干,残渣加 1mL 无水乙醇使溶解,作为供试品溶液;取益智仁对照药材 2g,与供试品溶液制备同法制成对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l,点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上以 8 : 2 的环己烷-乙酸乙酯为展开剂,饱和 10 分钟,展开,取出,晾干,置 254nm 紫外光灯下检视,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;

### (6) 石菖蒲

供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加乙醚 30mL,超声处理 40 分钟,滤过,滤液浓缩至约 1mL,作为供试品溶液。另取石菖蒲对照药材 1g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上以 8 : 2 的沸程 60 ~ 90 $^{\circ}$ C 石油醚-乙酸乙酯为展开剂,展开,取出,晾干,置 365nm 紫外光灯下检视,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主荧光斑点;

### 含量测定

#### (1) 粉萆薢的含量测定

照中国药典 2005 年版一部附录 VI D 项下的高效液相色谱法测定;

色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,30 : 70 的甲醇-乙腈为流动相 ;检测波长为 206nm ;理论板数按薯蓣皂甙元峰计算应不低于 3000 ;

对照品溶液的制备精密称取干燥至恒重的薯蓣皂甙元对照品适量,加甲醇制成每 1ml 含 0.3mg 的对照品溶液 ;

供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物,研细,精密取相当于生药材 2g 的药粉,置 100ml 具塞三角瓶中,加乙醇水浴回流三次,每次 20ml,每次 30min,合并提取液,回收溶剂至干,残渣加  $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸 20mL,沸水回流 3h,取出冷却,移至分液漏斗中,加氯仿萃取三次,每次 10ml,合并氯仿液,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,移至 10ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经  $0.45 \mu\text{m}$  为孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液 ;

测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各  $10 \mu\text{l}$ ,注入液相色谱仪,测定,即得 ;本品每 1g 含粉萆薢以薯蓣皂甙元  $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$  计,不得少于 1.5mg ;

## (2) 甘草的含量测定

照中国药典 2005 年版一部附录 VID 项下的高效液相色谱法测定 ;

色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,28 : 70 : 2 的乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸为流动相 ;检测波长为 250nm ;理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于 2000 ;

对照品溶液的制备取甘草酸单铵盐对照品约 4mg,精密称定,置 20ml 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得,每 1ml 含甘草酸单铵盐对照品 0.2mg,折合甘草酸为 0.1959mg ;

供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物,研细,精密取相当于生药材 2g 的药粉,置具塞三角瓶中,精密加入流动相 25ml,称定重量,250W,20kHz 超声处理 30 分钟,放冷,再称定重量,用流动相补足减失的重量,摇匀,滤过,即得 ;

测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各  $10 \mu\text{l}$ ,注入液相色谱仪,测定,即得 ;

本品每 1g 含甘草以甘草酸  $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$  计,不得少于 2.5mg。



## 一种治疗泌尿系统疾病的药物组合物的检测方法

[0001] 本发明为分案申请,原案申请号为 200710121722.2,原案申请日为 2007 年 9 月 13 日,原案发明名称为:一种治疗泌尿系统疾病的药物组合物及其质量控制方法。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及一种治疗泌尿系统疾病的药物组合物,尤其涉及一种以粉萆薢、菟丝子、石菖蒲、甘草、乌药、益智仁(炒)、茯苓为原料制备而成的治疗慢性前列腺炎的丸剂,属于中药技术领域。

### 背景技术

[0003] 肾盂肾炎、乳糜尿、前列腺炎、痛风、慢性肾炎、慢性盆腔炎等急慢性泌尿系统疾病的临床症状虽然表现不一,然而中医辨证研究发现这些疾病均存在正虚邪实的病理状态,正虚为脾肾不足,邪实为湿热蕴结,中医多采用利湿化浊法治疗,疗效不够理想。这与其偏重利湿化浊而不能固本有关。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种治疗泌尿系统疾病的药物组合物;本发明的另一目的在于提供该药物组合物的质量控制方法。

[0005] 本发明所述的治疗泌尿系统疾病的药物组合物是由如下重量比的原料药制成的:

[0006] 粉萆薢 200-400 重量份      石菖蒲 30-90 重量份      甘草 100-200 重量份

[0007] 乌药 50-120 重量份      益智仁(炒)20-80 重量份

[0008] 本发明所述的治疗泌尿系统疾病的药物组合物还可以是由如下重量比的原料药制成的:

[0009] 粉萆薢 325-400 重量份      石菖蒲 30-55 重量份      甘草 100-155 重量份

[0010] 乌药 85-120 重量份      益智仁(炒)45-80 重量份

[0011] 本发明所述的治疗泌尿系统疾病的药物组合物还可以是由如下重量比的原料药制成的:

[0012] 粉萆薢 200-400 重量份      石菖蒲 30-90 重量份      甘草 100-200 重量份

[0013] 乌药 50-120 重量份      益智仁(炒)20-80 重量份      菟丝子 200-300 重量份

[0014] 茯苓 80-160 重量份

[0015] 本发明所述的治疗泌尿系统疾病的药物组合物还可以是由如下重量比的原料药制成的:

[0016] 粉萆薢 320 重量份      石菖蒲 60 重量份      甘草 160 重量份

[0017] 乌药 80 重量份      益智仁(炒)40 重量份

[0018] 本发明所述的治疗泌尿系统疾病的药物组合物还可以是由如下重量比的原料药

制成的：

[0019] 粉萆薢 320 重量份 石菖蒲 60 重量份 甘草 160 重量份

[0020] 乌药 80 重量份 益智仁（炒）40 重量份 菟丝子 240 重量份

[0021] 茯苓 120 重量份

[0022] 方中萆薢利湿化浊为治白浊之要药，茯苓渗湿，石菖蒲化湿通窍；乌药温肾散寒，益智仁固肾，则菟丝子益肾填精之功益胜；甘草和中解毒，兼引诸药直趋精室，诸药和用治湿而不伤阴，补阴而不腻湿，共奏除湿固本之效。

[0023] 本发明的药物组合物可以通过本领域的常规技术制备成各种制剂，如：颗粒剂、胶囊剂、片剂、软胶囊、丸剂。

[0024] 本发明组合物优选丸剂的制备方法：

[0025] 粉萆薢 320 重量份 石菖蒲 60 重量份 甘草 160 重量份

[0026] 乌药 80 重量份 益智仁（炒）40 重量份

[0027] 以上五味，粉碎成 100 目细粉，混匀，用水泛丸，50～60℃干燥；将滑石粉碎成 150 目极细粉包衣，打光，50～60℃干燥，制成 20000 丸。

[0028] 本发明组合物优选丸剂的制备方法：

[0029] 粉萆薢 320 重量份 石菖蒲 60 重量份 甘草 160 重量份

[0030] 乌药 80 重量份 益智仁（炒）40 重量份 菟丝子 240 重量份

[0031] 茯苓 120 重量份

[0032] 以上七味，粉萆薢、石菖蒲、益智仁、茯苓碎成 80 目或 100 目细粉，其余药味加入逆流提取罐中加 4 倍量水，60℃连续逆流提取 1h。以提取液为赋形剂泛丸，50～60℃干燥；将滑石粉粉碎成 150 目极细粉包衣，打光，50～60℃干燥，即得。

[0033] 本发明药物组合物质量控制方法包括如下鉴别方法和 / 或含量测定中的一种或几种：

[0034] 鉴别方法：

[0035] 1. 粉萆薢

[0036] 取本药物组合物制剂内容物适量，研细，取相当于生药材 1-3g 的细粉，加 2mol/L 的盐酸 20-60ml，回流 1 小时，滤过，药渣用 10% 碳酸钠溶液洗至中性，用 20ml 乙醚超声处理 10-40 分钟，滤过，滤液浓缩至 0.5-2.0ml，作为供试品溶液；另取粉萆薢对照药材 0.5-2.0g，同法制成对照药材溶液；照薄层色谱法（中国药典 2005 年版一部附录 VI B）试验，分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5-20 $\mu$ l，点于同一硅胶 G 薄层板上以三氯甲烷-丙酮（6-15：0.3）为展开剂，饱和 5-15 分钟展开；取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液，105℃烘至斑点显色清晰，供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的主斑点。

[0037] 2. 薯蓣皂苷元

[0038] 取本药物组合物制剂内容物适量，研细，取相当于生药材 1-3g 的细粉，置 100ml 具塞锥形瓶中，加乙醇水浴回流提取 2-4 次，每次 20ml，每次 20-40min，合并提取液，回收溶剂至干，残渣加 2mol/L 盐酸 10-30ml，沸水回流 2-4h，取出，冷却，移置分液漏斗中，加氯仿萃取 2-4 次，每次 10ml，合并氯仿液，水浴蒸至约 3ml，作为供试品溶液；取薯蓣皂苷元对照品适量，加甲醇制成每 1ml 含 0.5-2.0mg 的对照品溶液；分别吸取对照品溶液 3-8 $\mu$ l，供试品

溶液 5-15 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}$ C) - 醋酸乙酯 (5-10 : 3) 为展开剂,展开,取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

### [0039] 3. 甘草

[0040] 取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加乙醚 20-60mL,加热回流 0.5-2.0h,滤过,药渣加甲醇 10-40mL,超声 10-40min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 40mL 使溶解,用水饱和正丁醇提取 2-4 次,每次 20mL,合并正丁醇液,用 10-30mL 水洗涤,蒸干,残渣加甲醇 3mL 使溶解,作为供试品溶液;取甘草对照药材 1g,供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液 3-8 $\mu$ l,供试品溶液 5-15 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板,以乙酸乙酯 - 甲酸 - 冰醋酸 - 水 (10-20 : 1 : 1 : 1-5) 为展开剂展开,取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰,置紫外光灯 (365nm) 下检视;在供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

### [0041] 4. 乌药

[0042] 取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加氯仿 20-60mL,超声 20-40min 过滤,滤液蒸干,残渣加甲醇 0.5-2.0mL 使溶解,作为供试品溶液;取乌药对照药材 0.5-2.0g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液 5-15 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}$ C) - 乙酸乙酯 (3-8 : 1) 为展开剂展开,取出晾干后喷以 2% 香草醛硫酸溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

### [0043] 5. 益智仁 (炒)

[0044] 取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}$ C) 20-40ml,超声处理 20-60 分钟,滤过,滤液挥干,残渣加 1ml 无水乙醇使溶解,作为供试品溶液;取益智仁对照药材 1-3g,与供试品溶液制备同法制成对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液 2-10 $\mu$ l,点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上以环己烷 - 乙酸乙酯 (5-12 : 2) 为展开剂,饱和 5-15 分钟,展开,取出,晾干,置紫外光灯 (254nm) 下检视;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

### [0045] 6. 石菖蒲

[0046] 取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1-3g 的细粉,加乙醚 20-40ml,超声处理 20-60 分钟,滤过,滤液浓缩至约 0.5-2.0ml,作为供试品溶液。另取石菖蒲对照药材 0.5-2.0g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 3-10 $\mu$ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上以石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}$ C) - 乙酸乙酯 (5-12 : 2) 为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯 (365nm) 下检视;在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主荧光斑点。

### [0047] 含量测定

#### [0048] 1. 粉萆薢的含量测定

[0049] 萆薢为方中君药,为薯蓣科植物,具有利湿去浊,祛风除痹之功效,含有多种甾体皂甙及皂甙元,皂甙元为其主要活性成分,本质量控制方法对薯蓣皂甙元 (C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>) 进行了含量测定。

[0050] 照高效液相色谱法 (中国药典 2005 年版一部附录 VI D) 测定;

[0051] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 甲醇-乙氰(30 : 40-100) 为流动相; 检测波长为 150-250nm; 理论板数按薯蓣皂甙元峰计算应不低于 3000;

[0052] 对照品溶液的制备精密称取干燥至恒重的薯蓣皂甙元对照品适量, 加甲醇制成每 1ml 含 0.1-0.5mg 的对照品溶液。

[0053] 供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物, 研细, 精密称取相当于生药材 0.5-2.0g 的药粉, 置 100ml 具塞三角瓶中, 加乙醇水浴回流三次, 每次 10-30ml, 每次 20-40min, 合并提取液, 回收溶剂至干。残渣加  $2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸 10-30mL, 沸水回流 2-4h, 取出冷却, 移至分液漏斗中, 加氯仿萃取三次, 每次 5-15ml, 合并氯仿液, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 移至 10ml 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 $\mu\text{m}$  为孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

[0054] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 $\mu\text{l}$ , 注入液相色谱仪, 测定, 即得; 本品每 1g 含粉萆薢以薯蓣皂甙元 ( $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_3$ ) 计, 不得少于 1.5mg;

[0055] 2. 甘草的含量测定

[0056] 甘草为方中佐使药, 具有补脾益气、清热解毒、缓急止痛、调和诸药等功效, 甘草酸为甘草中的主要活性成分, 为了保证产品质量, 选择测定甘草中甘草酸作为质量控制的一个指标。

[0057] 照高效液相色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI D) 测定;

[0058] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸(28 : 50-90 : 2) 为流动相; 检测波长为 250nm; 理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于 2000;

[0059] 对照品溶液的制备取甘草酸单铵盐对照品约 2-6mg, 精密称定, 置 20ml 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1ml 含甘草酸单铵盐对照品 0.1-0.3mg, 折合甘草酸为 0.0980-0.2939mg);

[0060] 供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物, 研细, 精密称取相当于生药材 0.5-3g 的药粉, 置具塞三角瓶中, 精密加入流动相 10-40ml, 称定重量, 超声处理(250W, 20kHz) 20-40 分钟, 放冷, 再称定重量, 用流动相补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 即得;

[0061] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 $\mu\text{l}$ , 注入液相色谱仪, 测定, 即得;

[0062] 本品每 1g 含甘草以甘草酸 ( $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$ ) 计, 不得少于 2.5mg;

[0063] 本发明药物组合物质量控制方法包括如下鉴别方法和/或含量测定中的一种或几种:

[0064] 鉴别方法:

[0065] 1. 粉萆薢

[0066] 供试品溶液制备: 取本药物组合物制剂内容物适量, 研细, 取相当于生药材 2g 的细粉, 加 2mol/L 的盐酸 40ml, 回流 1 小时, 滤过, 药渣用 10% 碳酸钠溶液洗至中性, 用 20ml 乙醚 超声处理 30 分钟, 滤过, 滤液浓缩至 1ml, 作为供试品溶液; 另取粉萆薢对照药材 1g, 同法制成对照药材溶液; 照薄层色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI B) 试验, 分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 10 $\mu\text{l}$ , 点于同一硅胶 G 薄层板上以三氯甲烷-丙酮

(9.7 : 0.3) 为展开剂,饱和 10 分钟展开;取出晾干后喷以 10%硫酸乙醇溶液,105℃烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主斑点。

#### [0067] 2. 薯蓣皂苷元

[0068] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 1g 的细粉,置 100mL 具塞锥形瓶中,加乙醇水浴回流提取 3 次,每次 20mL,每次 30min,合并提取液,回收溶剂至干。残渣加 2mol/L 盐酸 20mL,沸水回流 3h,取出,冷却,移置分液漏斗中,加氯仿萃取 3 次,每次 10mL,合并氯仿液,水浴蒸至约 3mL,作为供试品溶液;取薯蓣皂苷元对照品适量,加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的对照品溶液;分别吸取对照品溶液 5 $\mu$ l,供试品溶液 10 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚 (60 ~ 90℃) - 醋酸乙酯 (7 : 3) 为展开剂,展开,取出晾干后喷以 10%硫酸乙醇溶液,105℃烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

#### [0069] 3. 甘草

[0070] 供试品溶液制备:取本药物组合物相当于生药材 2g 的细粉,加乙醚 40mL,加热回流 1h,滤过,药渣加甲醇 30mL,超声 30min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 40mL 使溶解,用水饱和正丁醇提取 3 次,每次 20mL,合并正丁醇液,用 20mL 水洗涤,蒸干,残渣加甲醇 3mL 使溶解,作为供试品溶液;取甘草对照药材 1g,供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液 5 $\mu$ l,供试品溶液 10 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板,以乙酸乙酯 - 甲酸 - 冰醋酸 - 水 (15 : 1 : 1 : 2) 为展开剂展开,取出晾干后喷以 10%硫酸乙醇溶液,105℃烘至斑点显色清晰,置紫外光灯 (365nm) 下检视,在供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

#### [0071] 4. 乌药

[0072] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,取相当于生药材 2g 的细粉,加氯仿 40mL,超声 30min 过滤,滤液蒸干,残渣加甲醇 1mL 使溶解,作为供试品溶液;取乌药对照药材 1g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液 10 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚 (60 ~ 90℃) - 乙酸乙酯 (5 : 1) 为展开剂展开,取出晾干后喷以 2%香草醛硫酸溶液,105℃烘至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

#### [0073] 5. 益智仁 (炒)

[0074] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加石油醚 (60 ~ 90℃) 30mL,超声处理 30 分钟,滤过,滤液挥干,残渣加 1mL 无水乙醇使溶解,作为供试品溶液;取益智仁对照药材 2g,与供试品溶液制备同法制成对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液 5 $\mu$ l,点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上以环己烷 - 乙酸乙酯 (8 : 2) 为展开剂,饱和 10 分钟,展开,取出,晾干,置紫外光灯 (254nm) 下检视,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

#### [0075] 6. 石菖蒲

[0076] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加乙醚 30mL,超声处理 40 分钟,滤过,滤液浓缩至约 1mL,作为供试品溶液。另取石菖蒲对照药材 1g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上以石油醚 (60 ~ 90℃) - 乙酸乙酯 (8 : 2)

为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主荧光斑点。

[0077] 含量测定

[0078] 1. 粉萆薢的含量测定

[0079] 萆薢为方中君药,为薯蓣科植物,具有利湿去浊,祛风除痹之功效,含有多种甾体皂甙及皂甙元,皂甙元为其主要活性成分,本质量控制方法对薯蓣皂甙元( $C_{27}H_{42}O_3$ )进行了含量测定。

[0080] 照高效液相色谱法(中国药典2005年版一部附录VI D)测定;

[0081] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇-乙腈(30:70)为流动相;检测波长为206nm;理论板数按薯蓣皂甙元峰计算应不低于3000;

[0082] 对照品溶液的制备精密称取干燥至恒重的薯蓣皂甙元对照品适量,加甲醇制成每1ml含0.3mg的对照品溶液。

[0083] 供试品溶液的制备 取本药物组合物制剂内容物,研细,精密取相当于生药材2g的药粉,置100ml具塞三角瓶中,加乙醇水浴回流三次,每次20ml,每次30min,合并提取液,回收溶剂至干。残渣加 $2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸20mL,沸水回流3h,取出冷却,移至分液漏斗中,加氯仿萃取三次,每次10ml,合并氯仿液,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,移至10ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经0.45 $\mu\text{m}$ 为孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

[0084] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 $\mu\text{l}$ ,注入液相色谱仪,测定,即得;本品每1g含粉萆薢以薯蓣皂甙元( $C_{27}H_{42}O_3$ )计,不得少于1.5mg。

[0085] 2. 甘草的含量测定

[0086] 甘草为方中佐使药,具有补脾益气、清热解毒、缓急止痛、调和诸药等功效,甘草酸为甘草中的主要活性成分,为了保证产品质量,选择测定甘草中甘草酸作为质量控制的一个指标。

[0087] 照高效液相色谱法(中国药典2005年版一部附录VI D)测定;

[0088] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,乙腈-0.2mol/L醋酸铵-冰醋酸(28:70:2)为流动相;检测波长为250nm;理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于2000;

[0089] 对照品溶液的制备取甘草酸单铵盐对照品约4mg,精密称定,置20ml量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(每1ml含甘草酸单铵盐对照品0.2mg,折合甘草酸为0.1959mg);

[0090] 供试品溶液的制备 取本药物组合物制剂内容物,研细,精密取相当于生药材2g的药粉,置具塞三角瓶中,精密加入流动相25ml,称定重量,超声处理(250W,20kHz)30分钟,放冷,再称定重量,用流动相补足减失的重量,摇匀,滤过,即得;

[0091] 测定法 分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 $\mu\text{l}$ ,注入液相色谱仪,测定,即得;

[0092] 本品每1g含甘草以甘草酸( $C_{42}H_{62}O_{16}$ )计,不得少于2.5mg。

### 具体实施方式

[0093] 下述实验例和实施例进一步说明但不下限于本发明

[0094] 实验例 1. 质量检测方法的筛选

[0095] 鉴别方法的筛选

[0096] 1. 粉萆薢

[0097] 方法一：

[0098] 供试品溶液制备：取本药物组合物制剂内容物适量，研细，取相当于生药材 2g 的细粉，置 100mL 具塞锥形瓶中，加乙醇水浴回流提取 3 次，每次 20mL，每次 30min，合并提取液，回收溶剂至干。残渣加 2mol/L 盐酸 20mL，沸水回流 3h，取出，冷却，移置分液漏斗中，加氯仿萃取 3 次，每次 10mL，合并氯仿液，水浴蒸至约 3mL，作为供试品溶液；

[0099] 阴性对照溶液制备：按处方比例称取除粉萆薢之外的处方中药材，按制备工艺制成缺粉萆薢阴性对照样品，照“供试品溶液的制备”同法制得阴性对照溶液。

[0100] 对照品溶液制备：取薯蓣皂苷元对照品适量，加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的对照品溶液；

[0101] 薄层板：硅胶 G；

[0102] 点样：分别吸取对照品溶液 5 $\mu$ l，供试品溶液 10 $\mu$ l；

[0103] 展开剂：石油醚（60 ~ 90 $^{\circ}$ C）- 醋酸乙酯（7 : 3）；

[0104] 显色：取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液，105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰；

[0105] 斑点检视：供试品色谱中，在与对照品色谱相应的位置上，显相同颜色的斑点；且阴性无干扰。

[0106] 方法二：

[0107] 供试品溶液制备：取本药物组合物制剂内容物适量，研细，取相当于生药材 2g 的细粉，加 2mol/L 的盐酸 40ml，回流 1 小时，滤过，药渣用 10% 碳酸钠溶液洗至中性，用 20ml 乙醚超声处理 30 分钟，滤过，滤液浓缩至 1ml，作为供试品溶液；

[0108] 阴性对照溶液制备：按处方比例称取除粉萆薢之外的处方中药材，按制备工艺制成缺粉萆薢阴性对照样品，照“供试品溶液的制备”同法制得阴性对照溶液。

[0109] 对照品溶液制备：另取粉萆薢对照药材 1g，同法制成对照药材溶液；

[0110] 薄层板：硅胶 G；

[0111] 点样：分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 10 $\mu$ l；

[0112] 展开剂：三氯甲烷 - 丙酮（9.7 : 0.3）为展开剂，饱和 10 分钟；

[0113] 显色：取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液，105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰；

[0114] 斑点检视：供试品色谱中，在与对照药材色谱相应的位置上，显相同颜色的主斑点，且阴性无干扰。

[0115] 结论：从以上结果看出，方法一和方法二均可作为处方中粉萆薢的可靠鉴别方法。

[0116] 2. 石菖蒲

[0117] 方法一：

[0118] 供试品溶液制备：取本药物组合物制剂内容物适量，研细，取相当于生药材 2g 的细粉，加乙醚 30ml，超声处理 40 分钟，滤过，滤液浓缩至约 1ml，作为供试品溶液。

[0119] 对照药材溶液制备：另取石菖蒲对照药材 1g，与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液；

[0120] 阴性对照溶液制备：按处方比例称取除石菖蒲之外的处方中药材，按制备工艺制

成缺石菖蒲阴性对照样品,照“供试品溶液的制备”同法制得阴性对照溶液。

[0121] 薄层板:硅胶 G;

[0122] 点样:分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 5ul;

[0123] 展开剂:石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(8:2);

[0124] 显色:展开,取出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视;

[0125] 斑点检视:在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主荧光斑点,且阴性无干扰。

[0126] 方法二:

[0127] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加入挥发油测定器中,加水 80ml,提取挥发油,得约 0.1ml,作为供试品溶液。

[0128] 对照药材溶液制备:另取石菖蒲对照药材 5g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;

[0129] 阴性对照溶液制备:按处方比例称取除石菖蒲之外的处方中药材,按制备工艺制成缺石菖蒲阴性对照样品,照“供试品溶液的制备”同法制得阴性对照溶液。

[0130] 薄层板:硅胶 G;

[0131] 点样:分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各 1ul;

[0132] 展开剂:石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(8:2);

[0133] 显色:展开,取出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视;

[0134] 斑点检视:供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,未见相同颜色的荧光斑点;再以碘蒸气熏至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,未见相同颜色的斑点。

[0135] 结论:根据以上试验结果,选择方法一作为本药物组合物中石菖蒲的鉴别方法。

[0136] 3. 甘草

[0137] 方法一:

[0138] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加乙醚 40mL,加热回流 1h,滤过,药渣加甲醇 30mL,超声 30min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 40mL 使溶解,用水饱和正丁醇提取 3 次,每次 20mL,合并正丁醇液,用 20mL 水洗涤,蒸干,残渣加甲醇 3mL 使溶解,作为供试品溶液;

[0139] 对照药材溶液制备:取甘草对照药材 1g,照供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;

[0140] 阴性对照溶液制备:按处方比例称取处方中除甘草之外的药材,按制备工艺制成缺甘草阴性对照样品,照“供试品溶液的制备”同法制得阴性对照溶液。

[0141] 薄层板:硅胶 G;

[0142] 点样:分别吸取对照品溶液 5ul,供试品溶液和阴性对照溶液各 10ul;

[0143] 展开剂:乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15:1:1:2);

[0144] 显色:取出晾干后喷以 10%硫酸乙醇溶液,105℃烘至斑点显色清晰;

[0145] 斑点检视:置紫外光灯(365nm)下检视,在供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点,且阴性无干扰;

[0146] 方法二:



[0147] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加盐酸 1ml、三氯甲烷 15ml,加热回流 1 小时,放冷,滤过,滤液蒸干,残渣加乙醇 2ml 使溶解,作为供试品溶液。;

[0148] 对照药材溶液制备:取甘草对照药材 1g,供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;

[0149] 阴性对照溶液制备:按处方比例称取处方中除甘草之外的药材,按制备工艺制成缺甘草阴性对照样品,照“供试品溶液的制备”同法制得阴性对照溶液。

[0150] 薄层板:硅胶 G;

[0151] 点样:分别吸取对照品溶液 3-8ul,供试品溶液和阴性对照溶液各 5-15ul;

[0152] 展开剂:苯-石油醚(30~60℃)-乙酸乙酯-冰醋酸(10:5:4:0.6);

[0153] 显色:取出,晾干,喷以 10%磷钼酸乙醇溶液,加热至斑点显色清晰;

[0154] 供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

[0155] 斑点检视:置紫外光灯(365nm)下检视,在供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,未见相同颜色的荧光斑点。

[0156] 结论:根据以上试验结果,选择方法一作为本药物组合物中甘草的鉴别方法。

#### [0157] 4. 乌药

[0158] 方法一:

[0159] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加石油醚(30~60℃)30ml,振摇,放置 30 分钟,超声处理(保持水温低于 30℃)10 分钟,滤过,滤液挥干,残渣加乙酸乙酯 1ml 使溶解,作为供试品溶液。

[0160] 对照药材溶液制备:取乌药醚内酯对照品,用乙酸乙酯溶解,制成每 1ml 含 0.75mg 的溶液,作为对照品溶液;

[0161] 阴性对照溶液制备:按处方比例称取处方中除乌药之外的药材,按制备工艺制成缺乌药的阴性对照样品,照“供试品溶液的制备”同法制得阴性对照溶液。

[0162] 薄层板:硅胶 H;

[0163] 点样:分别吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 5ul;

[0164] 展开剂:甲醇-乙酸乙酯(15:1);

[0165] 显色:取出,晾干,喷以 1%香草醛硫酸溶液;

[0166] 斑点检视:供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,未见相同颜色的斑点。

[0167] 方法二:

[0168] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加氯仿 40ml,超声 30min 过滤,滤液蒸干,残渣加甲醇 1ml 使溶解,作为供试品溶液;

[0169] 对照药材溶液制备:取乌药对照药材 1g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;

[0170] 薄层板:硅胶 G;

[0171] 阴性对照溶液制备:按处方比例称取处方中除乌药之外的药材,按制备工艺制成缺乌药的阴性对照样品,照“供试品溶液的制备”同法制得阴性对照溶液。

[0172] 点样:分别吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 10ul;

- [0173] 展开剂:石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(5:1);
- [0174] 显色:取出晾干后喷以2%香草醛硫酸溶液,105℃烘至斑点显色清晰;
- [0175] 斑点检视:供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;且阴性无干扰。
- [0176] 结论:根据以上试验结果,选择方法二作为本药物组合中乌药的鉴别方法。
- [0177] 5. 益智仁(炒)
- [0178] 方法一:
- [0179] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材2g的细粉,加乙醚40mL,浸渍提取2.5h,并时时振摇,滤过,滤液挥干,残渣加乙醚1mL使溶解,作为供试品溶液。
- [0180] 对照药材溶液制备:取益智仁(炒)对照药材0.3g,加乙醚25mL,按“供试品溶液的制备”同法制得对照药材溶液。
- [0181] 阴性对照溶液制备:按处方比例称取除益智仁(炒)之外的处方中药材,按制备工艺制成缺益智仁(炒)阴性对照样品,按“供试品溶液的制备”同法制得阴性对照溶液。
- [0182] 薄层板:硅胶G
- [0183] 点样:分别吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各5μL
- [0184] 展开剂:环己烷-丙酮(7:3)
- [0185] 显色:取出晾干后喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃烘至斑点显色清晰
- [0186] 斑点检视:供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,未见相同颜色的斑点;
- [0187] 方法二:供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材2g的细粉,加石油醚(60~90℃)30mL,超声处理30分钟,滤过,滤液挥干,残渣加1mL无水乙醇使溶解,作为供试品溶液;
- [0188] 对照药材溶液制备:取益智仁对照药材2g,与供试品溶液制备同法制成对照药材溶液;
- [0189] 阴性对照溶液制备:按处方比例称取除益智仁(炒)之外的处方中药材,按制备工艺制成缺益智仁(炒)阴性对照样品,按“供试品溶液的制备”同法制得阴性对照溶液。
- [0190] 薄层板:硅胶GF<sub>254</sub>;
- [0191] 点样:分别吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各5μL;
- [0192] 展开剂:环己烷-乙酸乙酯(8:2),饱和10分钟;
- [0193] 显色:展开,取出,晾干,置紫外光灯(254nm)下检视;
- [0194] 斑点检视:供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点;且阴性无干扰。
- [0195] 结论:根据以上试验结果,选择方法二作为本药物组合中乌药的鉴别方法。
- [0196] 含量测定方法的筛选
- [0197] 粉萆薢的含量测定
- [0198] 采用高效液相色谱法测定本发明药物中的薯蓣皂甙元(C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>)的含量,粉萆薢含量以薯蓣皂甙元计,以完善本发明的质量检测方法,部分试验结果见下:
- [0199] 试验仪器:高效液相色谱仪:岛津,LC-10Atvp(威马龙色谱站)

[0200] 分析天平：梅特勒，AE240

[0201] 色谱柱：迪玛公司 (Zorbax C184.6×150mm, 5 μ m)

[0202] 对照品：薯蓣皂甙元；购于中国药品生物制品检定所批号：132859-200508

[0203] ①色谱条件的优化实验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；甲醇-乙腈 (30 : 70 为流动相；检测波长为 206nm, 流速, 1.0ml · min<sup>-1</sup> 理论板数按薯蓣皂甙元峰计算应不低于 3000。

[0204] 分别配制以下比例的流动相，分别按以上色谱条件进样对照品、样品溶液，结果见下表 1。

[0205] 表 1 色谱条件的优化

[0206]

甲醇：乙腈 30 : 40	甲醇：乙腈 30 : 50	甲醇：乙腈 30 : 60	甲醇：乙腈 30 : 70	甲醇：乙腈 30 : 80
色谱峰不能完 全分离	色谱峰不能 完全分离	色谱峰不能 完全分离	分离良好	出现拖尾现 象

[0207] 实验结果表明，优选流动相为甲醇：乙腈 30 : 70。

[0208] ②含量检测的方法学考察

[0209] 对本发明药物所采用的含量检测方法，从线性关系、稳定性、精密度、重现性、回收率等方面进行了相关方法学考察，具体方法及结果如下：

[0210] 稳定性试验精密吸取同一本药物组合物供试品溶液 5μl，分别于配制后 0、2、4、6、8、24 小时，依法测定，结果见表 2：

[0211] 表 2 稳定性测定结果

[0212]

时间 (h)	0	2	4	6	12	24
--------	---	---	---	---	----	----

[0213]

峰面积	2314762	2315477	2318392	2314453	2410760	2313405
RSD (%)	1.67%					

[0214] 结果表明薯蓣皂苷元在 24h 内基本稳定。

[0215] 线性关系考察取薯蓣皂苷元对照品溶液 (1.2mg/ml) 摇匀，分别精密吸取 1.0、1.5、2.0、2.5、5.0、7.5、10.0ml 注入 10ml 量瓶中，精密量取 1 μ l 注入高效液相色谱仪，测定峰面积，结果见表 3，并绘制标准曲线。

[0216]  $Area = 4.23 \times 10^7 X + 4.53 \times 10^5$  (R = 0.9998)

[0217] 表 3 薯蓣皂苷元钠对照品线性关系考察结果

[0218]

进样量 (ug)	峰面积 (10 <sup>5</sup> )
0.12	55.29
0.18	80.67
0.24	106.05
0.30	131.43
0.60	258.33
0.90	384.23
1.20	512.13

[0219] 结果表明,薯蓣皂苷元在 0.12 ~ 1.2mg/ml 范围内线性关系良好。

[0220] 精密度试验精密吸取同一薯蓣皂苷元对照品溶液 (54.6 μg/ml) 5 μl, 重复进样 6 次, 结果见表 4: 表 4 薯蓣皂苷元对照品精密度试验结果

[0221]

次数	1	2	3	4	5	6
峰面积	1944979	1993266	2055170	2050802	1964657	1958425
RSD (%)	1.92					

[0222] 结果显示相对标准偏差小于 2%, 说明精密度良好。

[0223] 重现性试验按正文方法, 取同一批号本发明药物组合物制剂制备 5 份样品进行测定, 结果见表 5: 表 5 样品重现性试验结果

[0224]

样品	1	2	3	4	5
含量 (mg/g)	2.7153	2.6564	2.6107	2.6327	2.6274
平均含量 (mg/g)	2.6485				
RSD (%)	1.54				

[0225] 结果显示 5 份样品中薯蓣皂苷元的含量平均为 2.6485mg/g, 其 RSD 值为 1.54%, 符合试验要求, 表明该方法重现性好。

[0226] 回收率试验

[0227] 采用加样回收, 精密称取已知含量的同一批号的样品约 0.24g, 分别精密加入薯蓣皂苷元对照品溶液 (54.6 μg/ml) 15ml, 按正文供试品溶液的制备方法及上述色谱条件测定, 以下式计算回收率, 结果见表 6。

[0228]

$$\text{回收率}\% = \frac{\text{测出薯蓣皂苷元含量} - \text{样品中薯蓣皂苷元}}{\text{加入薯蓣皂苷元对照品}} \times 100\%$$

[0229] 表 6 加样回收率试验结果

[0230]

试验号	取样量 g	样品中量 mg	加入的量 (mg)	测出的量 (mg)	回收率%	平均回收率(%)	RSD (%)
1	0.2390	0.6330	0.648	1.2630	97.23		
2	0.2402	0.6362	0.648	1.2765	98.82		
3	0.2410	0.6383	0.648	1.2939	101.17	99.43	1.49
4	0.2394	0.6341	0.648	1.2806	99.78		
5	0.2406	0.6372	0.648	1.2861	100.13		

[0231] 结果表明：薯蓣皂苷元回收率在 97%~101.2% 之间，平均回收率为 99.43%，符合规定。

[0232] 从以上试验结果可以看出，对本发明药物制剂中的有效成份薯蓣皂苷元进行含量检测控制，以控制处方中丹参的生药量，方法稳定、科学，可以有效保证药物质量和疗效，这也是本发明药物疗效与同类产品比较更显著的原因。

[0233] 甘草的含量测定

[0234] 采用高效液相色谱法测定本发明药物中的甘草酸的含量，甘草含量以甘草酸计，以完善本发明的质量检测方法，部分试验结果见下：

[0235] 试验仪器：高效液相色谱仪：岛津，LC-10Atvp（威马龙色谱站）

[0236] 分析天平：梅特勒，AE240

[0237] 色谱柱：迪玛公司（Zorbax C184.6×150mm, 5 μm）

[0238] 对照品：甘草酸单铵盐：购于中国药品生物制品检定所批号：131435-200405

[0239] ①色谱条件的优化实验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸（28：70：2）为流动相；检测波长为 250nm；理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于 2000。

[0240] 分别配制以下比例的流动相，取甘草酸单铵盐对照品约 4mg，精密称定，置 20ml 量瓶中，用流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，即得对照品溶液；取本品，研细，精密称取 2g，置具塞三角瓶中，精密加入流动相 25ml，称定重量，超声处理（250W, 20kHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用流动相补足减失的重量，摇匀，滤过，即得样品溶液。

[0241] 分别按以上色谱条件进样对照品、样品，结果见下表 7：

[0242] 表 7 色谱条件的优化

[0243]

乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸 28:50:2	乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸 28:60:2	乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸 28:70:2	乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸 28:80:2	乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸 28:90:2
色谱峰不能完全 分离	色谱峰不能完全 分离	分离良好	出现托尾现象	出现托尾现象

[0244] 实验结果表明,优选流动相为乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸 28:70:2。

[0245] ②含量检测的方法学考察

[0246] 对含量检测方法,从线性关系、稳定性、精密度、重现性、回收率等方面进行了相关方法学考察,具体方法及结果如下:

[0247] 稳定性试验精密吸取同一本药物组合物供试品溶液 5ul,分别于配制后 0、2、4、6、8、24 小时,依法测定,结果见表 8:

[0248] 表 8 稳定性测定结果

[0249]

时间(h)	0	2	4	6	12	24
峰面积	588723	586324	586481	583872	584792	587691
RSD(%)	1.14%					

[0250] 结果表明甘草酸单铵盐在 24 小时内基本稳定。

[0251] 线性关系考察取甘草酸单铵盐对照品溶液 (0.2039mg/ml) 摇匀,分别精密量取 0.5,1,2,4,6,8mL 置 10mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,按上述色谱条件测定,精密吸取 5ul 注入高效液相色谱仪,测定峰面积,结果见表 9,并绘制标准曲线。

[0252]  $Area = 5.97 \times 10^7 X - 2.50 \times 10^5$  ( $R = 0.9999$ )

[0253] 表 9 甘草酸单铵盐对照品线性关系考察结果

[0254]

进样量 (ug)	0.0510	0.1020	0.2039	0.4078	0.6117	0.8156
面积	2794700	5839400	11922830	24095660	36268490	48441320

[0255] 结果表明:甘草酸在 0.0102 ~ 0.1631mg/ml 范围内线性关系良好。

[0256] 精密度试验精密吸取同一甘草酸单铵盐对照品溶液 (40.78 μg/ml) 5 μl,重复进样 6 次,结果见表 10:

[0257] 表 10 甘草酸单铵盐对照品精密度试验结果

[0258]

次数	1	2	3	4	5	6
峰面积	10694386	10658561	10638546	10685648	10653542	10646587
RSD(%)	0.21					

[0259] 结果显示相对标准偏差小于 2%，说明精密度良好。

[0260] 重现性试验按正文方法，取同一批号本发明药物组合物制剂制备 5 份样品中甘草酸进行测定，结果见表 11：

[0261] 表 11 样品重现性试验结果

[0262]

样品	1	2	3	4	5
含量(mg/g)	3.1584	3.0148	2.9854	2.96247	3.0164
平均含量(mg/g)	3.0275				
RSD(%)	1.2				

[0263] 结果显示 5 份样品中甘草酸的含量平均为 2.6485mg/g，其 RSD 值为 1.2%，符合试验要求，表明该方法重现性好。

[0264] 回收率试验

[0265] 采用加样回收，精密称取已知含量的同一批号的样品约 2.0g，分别精密加入甘草酸单铵盐对照品溶液 (40.78 μg/ml) 40ml，再加入流动相 10ml，按正文供试品溶液的制备方法以及上述色谱条件测定，以下式计算回收率，结果见表 12。

[0266]

$$\text{回收率}\% = \frac{\text{测出甘草酸含量} - \text{样品中甘草酸含量}}{\text{加入甘草酸对照品的量}} \times 100\%$$

[0267] 表 12 加样回收率试验结果

[0268]

试验号	取样量 g	样品中量 mg	加入的量 (mg)	测出的量 (mg)	回收率%	平均回收率(%)	RSD (%)
1	2.0485	5.7612	1.6312	1.2630	97.85		
2	2.0258	5.6974	1.6312	1.2765	101.64		
3	1.9854	5.5837	1.6312	1.2939	100.38	99.90	1.72
4	2.0743	5.8338	1.6312	1.2806	98.34		
5	1.9956	5.6124	1.6312	1.2861	101.28		

[0269] 结果表明：甘草酸回收率在 97.85%~101.64% 之间，平均回收率为 99.90%，符合规定。

[0270] 从以上试验结果可以看出，对本发明药物制剂中的有效成份甘草酸进行含量检测

控制,以控制处方中甘草的生药量,方法稳定、科学,可以有效保证药物质量和疗效,这也是本发明药物疗效与同类产品比较更显著的原因。

[0271] 实验例 2. 药效学实验

[0272] 1.1 实验材料

[0273] 药物组 I(共 660g):粉萆薢 320g、石菖蒲 60g、甘草 160g、乌药 80g、益智仁(炒)40g

[0274] 药物组 II(共 660g):粉萆薢 207g、石菖蒲 39g、甘草 104g、乌药 52g、益智仁(炒)26g、菟丝子 155g、茯苓 77g

[0275] 丙酸睾丸素注射液,上海第九制药厂生产;

[0276] 前列康片,浙江云山制药厂生产。己烯雌酚片,北京向阳制药厂生产;

[0277] 戊巴比妥钠,上海医药采购站进口分装;

[0278] 睾酮、雌二醇、促卵泡生成素、促黄体生成素、催乳素放免测试盒,天津德普生物技术和医学产品有限公司生产;

[0279] 动物 Wistar 种雄性大鼠,中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供。

[0280] 1.2 实验方法

[0281] 取 300 ± 20g Wistar 大鼠 60 只,随机分组,无菌操作下分别对大鼠 ip1%戊巴比妥钠生理盐水 2ml/kg,大鼠麻醉后,摘除双侧睾丸。一周后,随机取出 10 只去势大鼠,断头处死后取前列腺各叶称湿重并测总体积,烘干后称干重,对剩余 50 只大鼠随机分为 5 组,每组 10 只,均 sc 丙酸睾丸素 1mg/300g 体重,每天 1 次,连续 30d,同时空白对照组 ig 同体积自来水;实验组药物组 I、药物组 II 分别 ig 相应药液,剂量为 6.5g 生药/kg 体重;前列康组和己烯雌酚组 ig 剂量分别为 1.7g/kg 和 1.7mg/kg。各组用药以水溶解,调成相应浓度。每天 1.0ml/100g 体重 ig1 次,连续 30d。每周称量一次体重,以调节给药用量,在 ig 第 30 天后,于次日晨将所有空腹大鼠断头处死。取前列腺各叶及精囊腺,以感量 1mg 扭力天平称湿重,容积法测前列腺体积,取一侧头叶称湿重并在 37℃烘干后称干重,做干/湿重比值测定。

[0282] 取前叶前列腺固定于 10%写福尔马林液中常规石蜡制片,HE 镜检,另侧前叶做生理新鲜冰冻切片,做 SDH, ACP 及 ALP 三种酶组织化学染色,常规镜检,根据酶活性产物色泽深浅,按四级分计数每只动物前列腺中三种酶活性的高低。

[0283] 2. 结果和讨论

[0284] 2.1 疗前前列腺的体积,湿重和干/湿重比值

[0285] 取去势一周的大鼠 10 只,断头处死后取前列腺测体积并称湿重,烘干测干/湿重比值。见表 13。

[0286] 表 13 治疗前去势大鼠前列腺的体积、湿重和干/湿比值

[0287]



组别	单位/只	单位/100g 体重
	X±SD	X±SD
体积 (cm <sup>3</sup> )	0.38 ± 0.11	0.14 ± 0.04
湿重 (mg)	204.2 ± 66.2	61.6 ± 20.6
干/湿重比值	0.16 ± 0.02	0.013 ± 0.007
一侧头叶干重 (mg)	12.46 ± 3.76	4.04 ± 1.28

[0288] 2.2 治疗后大鼠的体重及前列腺的体积、湿重和干 / 湿重比值

[0289] 30d 后, 称重, 处死所有大鼠, 取前列腺称湿重、测体积及测干 / 湿重比值。结果见表 14 ~ 18。

[0290] 表 14 本发明药物组合物对去势大鼠体重的影响

[0291]

组别	动物数(只)	体重 (g)	t-检验*
		X±SD	
空白对照组	10	421.8 ± 22.2	P<0.01
药物组 I	10	424.6 ± 30.8	P<0.01
药物组 II	10	421.4 ± 28.6	P<0.01
前列康组	10	344.7 ± 32.3	
己烯雌酚组	10	421.4 ± 34.9	P<0.01

[0292] \* 与前列康组比较。

[0293] 表 15 本发明药物组合物对去势大鼠前列腺体积的影响

[0294]

组别	动物数 (只)	cm <sup>3</sup> /只	cm <sup>3</sup> /100g 体重
		X±SD	X±SD
空白对照	10	1.04 ± 0.13	0.25 ± 0.04
药物组 I	10	0.76 ± 0.26*	0.18 ± 0.06*
药物组 II	10	0.63 ± 0.13**	0.15 ± 0.02. **※
前列康	10	0.69 ± 0.17*	0.20 ± 0.05*
己烯雌酚	10	0.58 ± 0.08**	0.14 ± 0.03**※

[0295] 与空白对照组比较 : \*P < 0.05 ; \*\*P < 0.01 ; 与药物组 I 比较 ※P < 0.05

[0296] 表 16 本发明药物组合物对去势大鼠前列腺湿重的影响

[0297]

组别	动物数 (只)	mg/只 X±SD	mg/100g 体重 X±SD
空白对照	10	1124.1 ± 245.7	266.5 ± 63.4
药物组 I	10	709.2 ± 245.7**	167.1 ± 61.3*
药物组 II	10	607.7 ± 112.4**	144.2 ± 23.4**※
前列康	10	647.7 ± 156.7	187.9 ± 60.1*
己烯雌酚	10	591.6 ± 101.5	140.4 ± 62.6**※

[0298] 与空白对照组比较 : \*P < 0.05 ; \*\*P < 0.01 ; 与药物组 I 比较 ※P < 0.05

[0299] 表 17 本发明药物组合物对去势大鼠前列腺一侧头叶干重的影响

[0300]

组别	动物数 (只)	mg/只 X±SD	mg/100g 体重 X±SD
空白对照	10	15.02 ± 4.7	3.56 ± 1.11
药物组 I	10	13.25 ± 4.2	3.12 ± 0.91

[0301]

药物组 II	10	11.84 ± 3.6	2.81 ± 1.22*※
前列康	10	11.58 ± 3.75	3.36 ± 0.85
己烯雌酚	10	11.93 ± 4.1	2.83 ± 0.93*※

[0302] 与空白对照组比较 : \*P < 0.05 ; \*\*P < 0.01 ; 与药物组 I 比较 ※P < 0.05

[0303] 表 18 本发明药物组合物对去势大鼠前列腺干 / 湿重比值的影响

[0304]

组别	动物数(只)	X±SD	t-检验.*
空白对照组	10	0.150 ± 0.016	P>0.05
药物组 I	10	0.158 ± 0.024	
药物组 II	10	0.156 ± 0.021	
前列康组	10	0.160 ± 0.033	
己烯雌酚组	10	0.181 ± 0.046	

[0305] 从上述结果表明, 药物组 I、药物组 II 和己烯雌酚对实验大鼠的体重无明显影响 (P > 0.05) ; 而前列康组大鼠的体重较各组均显著降低。

[0306] 结果还表明, 药物组 I、药物组 II 能明显减小前列腺的体积。

[0307] 从表 17, 表 18 可以看出, 药物组 I、药物组 II 能够明显降低前列腺的湿重, 但各组

间的干 / 湿重比值差异不显著。

[0308] 2.3 治疗前治疗后前列腺体积和湿重的变化率

[0309] 以治疗前大鼠前列腺的体积和湿重为 100%，比较用药前后的变化率。结果表明，药物组 I、药物组 II 能够明显降低前列腺体积和湿重的变化率。

[0310] 表 19 本发明药物组合物对去势大鼠前列腺体积和湿重变化率的影响 (%)

[0311]

	空白对照组	药物组 I	药物组 II	前列康组	己烯雌酚组
体积	97.10	35.07	20.28	41.54	7.39
湿重	326.7	148.3	130.4	152.2	122.2

[0312] 2.4 治疗后大鼠前列腺的病理形态镜检

[0313] 取前列腺做 HE 镜检及 SDH, ACP, ALP 酶组织化学染色。可见药物组 I、药物组 II 抑制睾酮所诱导的前列腺小叶增殖及腺上皮细胞分泌前列腺液, 而对前列腺腺上皮细胞高度没有明显影响。见表 20

[0314] 表 20 本发明药物组合物对去势大鼠前列腺组织中三种酶活性的影响 (X ± SD)

[0315]

组别	动物 (只)	SDH 腺上皮细胞	ACP		ALP	
			腺上皮细胞浆 物	腺腔内含 物	腺上皮细胞浆 物	腺腔内含 物
空白 对照 组	10	2.1 ± 0.9	2.8 ± 0.4	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.3	2.7 ± 0.9

[0316]

药物 组 I	10	1.8 ± 0.9*	2.3 ± 0.9* 0.1	2.9 ± 0.3	2.9 ± 0.1	2.1 ± 1.0
药物 组 II	9	1.6 ± 0.6** ※	1.4 ± 0.5**※ 0.9	2.6 ± 0.3	2.6 ± 0.9* ※	1.6 ± 0.9**
前列 康组	9	1.8 ± 0.8*	1.8 ± 0.8	2.1 ± 0.5	2.2 ± 0.7**	1.9 ± 0.7
己烯 雌酚 组	10	1.6 ± 0.7** ※	1.6 ± 0.5**※ ± 0.5	2.6 ± 0.3	2.6 ± 0.5*	2.1 ± 1.0

[0317] 与空白又寸对照组比较 : \*P < 0.05 ; \*\*P < 0.01 ; 与药物组 I 比较 ※P < 0.05

[0318] 3 小结

[0319] 通过本次实验, 我们观察到药物组 I、药物组 II 可以明显抑制大鼠前列腺的增生。

表现在明显减少前列腺的体积,降低前列腺的湿重和干重及大鼠精囊腺的湿重,抑制前列腺小叶增殖及腺上皮细胞分泌前列腺液,具有雌性激素样作用,对于丙酸睾丸素所诱导的大白鼠前列腺增生具有良好疗效;且药物组 I 明显优于药物组 II。前列康使大鼠的体重显著降低,药物组 I、药物组 II 对体重无明显影响。

[0320] 下述实施例均能够实现上述实验例所述的效果

[0321] 实施例 1.

[0322] 粉萆薢 320g 石菖蒲 60g 甘草 160g

[0323] 乌药 80g 益智仁(炒)40g 菟丝子 240g

[0324] 茯苓 120g

[0325] 以上七味,依照本领域常规技术制成临床接受的制剂,如:颗粒剂、胶囊剂、片剂、软胶囊、丸剂。

[0326] 实施例 2. 片剂

[0327] 粉萆薢 200g 石菖蒲 90g 甘草 100g

[0328] 乌药 120g 益智仁(炒)20g 菟丝子 300g

[0329] 茯苓 80g

[0330] 以上七味加 8 倍量水煎煮 3 次,每次 1 小时,合并煎液,浓缩至相对密度为 1.28 ~ 1.30,加入淀粉 500g,羧甲基纤维素钠 20g,混匀,制成颗粒,干燥,整粒,压片,包衣,制成 1000 片,即得。

[0331] 粉萆薢的鉴别方法:

[0332] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加 2mol/L 的盐酸 40ml,回流 1 小时,滤过,药渣用 10% 碳酸钠溶液洗至中性,用 20ml 乙醚 超声处理 30 分钟,滤过,滤液浓缩至 1ml,作为供试品溶液;另取粉萆薢对照药材 1g,同法制成对照药材溶液;照薄层色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI B) 试验,分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 10 $\mu$ l,点于同一硅胶 G 薄层板上以三氯甲烷-丙酮(9.7 : 0.3) 为展开剂,饱和 10 分钟展开;取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主斑点。

[0333] 甘草的含量测定

[0334] 照高效液相色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI D) 测定;

[0335] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸(28 : 70 : 2) 为流动相;检测波长为 250nm;理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于 2000;

[0336] 对照品溶液的制备取甘草酸单铵盐对照品约 4mg,精密称定,置 20ml 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(每 1ml 含甘草酸单铵盐对照品 0.2mg,折合甘草酸为 0.1959mg);

[0337] 供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物,研细,精密取相当于生药材 2g 的药粉,置具塞三角瓶中,精密加入流动相 25ml,称定重量,超声处理(250W,20kHz)30 分钟,放冷,再称定重量,用流动相补足减失的重量,摇匀,滤过,即得;

[0338] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 $\mu$ l,注入液相色谱仪,测定,即得;

[0339] 本品每 1g 含甘草以甘草酸 ( $C_{42}H_{62}O_{16}$ ) 计, 不得少于 2.5mg。

[0340] 实施例 3. 胶囊剂

[0341] 粉萆薢 400g 石菖蒲 30g 甘草 200g

[0342] 乌药 50g 益智仁 (炒) 80g 菟丝子 200g

[0343] 茯苓 160g

[0344] 以上七味加 8 倍量水煎煮 3 次, 每次 1 小时, 合并煎液, 浓缩至相对密度为 1.28 ~ 1.30, 加入糊精 500g, 混匀, 制成颗粒, 干燥, 整粒, 制成 1000 粒即得。

[0345] 鉴别:

[0346] 乌药

[0347] 供试品溶液制备: 取本药物组合物制剂内容物适量, 取相当于生药材 2g 的细粉, 加氯仿 40mL, 超声 30min 过滤, 滤液蒸干, 残渣加甲醇 1mL 使溶解, 作为供试品溶液; 取乌药对照药材 1g, 与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液; 分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 10 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上, 以石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}$ C) - 乙酸乙酯 (5 : 1) 为展开剂展开, 取出晾干后喷以 2% 香草醛硫酸溶液, 105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰; 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

[0348] 益智仁 (炒)

[0349] 供试品溶液制备: 取本药物组合物制剂内容物适量, 研细, 取相当于生药材 2g 的细粉, 加石油醚 (60 ~ 90 $^{\circ}$ C) 30mL, 超声处理 30 分钟, 滤过, 滤液挥干, 残渣加 1mL 无水乙醇使溶解, 作为供试品溶液; 取益智仁对照药材 2g, 与供试品溶液制备同法制成对照药材溶液; 分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l, 点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上以环己烷 - 乙酸乙酯 (8 : 2) 为展开剂, 饱和 10 分钟, 展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯 (254nm) 下检视, 供试品色谱中, 在与对照药材色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点。

[0350] 含量测定

[0351] 1. 粉萆薢的含量测定

[0352] 照高效液相色谱法 (中国药典 2005 年版一部附录 VI D) 测定;

[0353] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 甲醇 - 乙腈 (30 : 70) 为流动相; 检测波长为 206nm; 理论板数按薯蓣皂甙元峰计算应不低于 3000;

[0354] 对照品溶液的制备精密称取干燥至恒重的薯蓣皂甙元对照品适量, 加甲醇制成每 1mL 含 0.3mg 的对照品溶液。

[0355] 供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物, 研细, 精密取相当于生药材 2g 的药粉, 置 100mL 具塞三角瓶中, 加乙醇水浴回流三次, 每次 20mL, 每次 30min, 合并提取液, 回收溶剂至干。残渣加 2mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 盐酸 20mL, 沸水回流 3h, 取出冷却, 移至分液漏斗中, 加氯仿萃取三次, 每次 10mL, 合并氯仿液, 回收溶剂至干, 残渣加甲醇使溶解, 移至 10mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 $\mu$ m 为孔滤膜过滤, 取续滤液作为供试品溶液。

[0356] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 $\mu$ l, 注入液相色谱仪, 测定, 即得; 本品每 1g 含粉萆薢以薯蓣皂甙元 ( $C_{27}H_{42}O_3$ ) 计, 不得少于 1.5mg;

[0357] 2. 甘草的含量测定

[0358] 照高效液相色谱法 (中国药典 2005 年版一部附录 VI D) 测定;

[0359] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 乙腈 -0.2mol/L

醋酸铵-冰醋酸(28 : 70 : 2)为流动相;检测波长为250nm;理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于2000;

[0360] 对照品溶液的制备取甘草酸单铵盐对照品约4mg,精密称定,置20ml量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(每1ml含甘草酸单铵盐对照品0.2mg,折合甘草酸为0.1959mg);

[0361] 供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物,研细,精密取相当于生药材2g的药粉,置具塞三角瓶中,精密加入流动相25ml,称定重量,超声处(250W,20kHz)30分钟,放冷,再称定重量,用流动相补足减失的重量,摇匀,滤过,即得;

[0362] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各10 $\mu$ l,注入液相色谱仪,测定,即得;

[0363] 本品每1g含甘草以甘草酸(C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>)计,不得少于2.5mg;

[0364] 实施例4. 软胶囊

[0365] 粉萆薢 320g 石菖蒲 60g 甘草 160g

[0366] 乌药 80g 益智仁(炒) 40g 菟丝子 240g

[0367] 茯苓 120g

[0368] 以上七味加8倍量水煎煮3次,每次1小时,合并煎液,浓缩至相对密度为1.28~1.30,减压干燥,粉碎,加入植物油适量,搅匀,制成软胶囊600粒,即得。

[0369] 鉴别方法:

[0370] 1. 粉萆薢

[0371] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,取相当于生药材2g的制剂,加2mol/L的盐酸40ml,回流1小时,滤过,药渣用10%碳酸钠溶液洗至中性,用20ml乙醚超声处理30分钟,滤过,滤液浓缩至1ml,作为供试品溶液;另取粉萆薢对照药材1g,同法制成对照药材溶液;照薄层色谱法(中国药典2005年版一部附录VI B)试验,分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各10 $\mu$ l,点于同一硅胶G薄层板上以三氯甲烷-丙酮(9.7 : 0.3)为展开剂,饱和10分钟展开;取出晾干后喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主斑点。

[0372] 2. 甘草

[0373] 供试品溶液制备:取本药物组合物相当于生药材2g的制剂,加乙醚40mL,加热回流1h,滤过,药渣加甲醇30mL,超声30min,滤过,滤液蒸干,残渣加水40mL使溶解,用水饱和正丁醇提取3次,每次20mL,合并正丁醇液,用20mL水洗涤,蒸干,残渣加甲醇3mL使溶解,作为供试品溶液;取甘草对照药材1g,供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液5 $\mu$ l,供试品溶液各10 $\mu$ l点于同一硅胶G薄层板,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15 : 1 : 1 : 2)为展开剂展开,取出晾干后喷以10%硫酸乙醇溶液,105℃烘至斑点显色清晰,置紫外光灯(365nm)下检视,在供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

[0374] 3. 乌药

[0375] 供试品溶液制备:取本药物组合物相当于生药材2g的制剂,加氯仿40mL,超声30min过滤,滤液蒸干,残渣加甲醇1mL使溶解,作为供试品溶液;取乌药对照药材1g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各10 $\mu$ l点于

同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60 ~ 90℃)-乙酸乙酯(5 : 1)为展开剂展开,取出晾干后喷以 2% 香草醛硫酸溶液,105℃烘至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

[0376] 4. 益智仁(炒)

[0377] 供试品溶液制备:取本药物组合物相当于生药材 2g 的制剂,加石油醚(60 ~ 90℃)30ml,超声处理 30 分钟,滤过,滤液挥干,残渣加 1ml 无水乙醇使溶解,作为供试品溶液;取益智仁对照药材 2g,与供试品溶液制备同法制成对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l,点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上以环己烷-乙酸乙酯(8 : 2)为展开剂,饱和 10 分钟,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254nm)下检视,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

[0378] 5. 石菖蒲

[0379] 供试品溶液制备:取本药物组相当于生药材 2g 的制剂,加乙醚 30ml,超声处理 40 分钟,滤过,滤液浓缩至约 1ml,作为供试品溶液。另取石菖蒲对照药材 1g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上以石油醚(60 ~ 90℃)-乙酸乙酯(8 : 2)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主荧光斑点。

[0380] 含量测定

[0381] 1. 粉萆薢的含量测定

[0382] 照高效液相色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI D)测定;

[0383] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇-乙腈(30 : 70)为流动相;检测波长为 206nm;理论板数按薯蓣皂甙元峰计算应不低于 3000;

[0384] 对照品溶液的制备精密称取干燥至恒重的薯蓣皂甙元对照品适量,加甲醇制成每 1ml 含 0.3mg 的对照品溶液。

[0385] 供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物,研细,精密取相当于生药材 2g 的药粉,置 100ml 具塞三角瓶中,加乙醇水浴回流三次,每次 20ml,每次 30min,合并提取液,回收溶剂至干。残渣加 2mol·L<sup>-1</sup> 盐酸 20mL,沸水回流 3h,取出冷却,移至分液漏斗中,加氯仿萃取三次,每次 10ml,合并氯仿液,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,移至 10ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45 $\mu$ m 为孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

[0386] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 $\mu$ l,注入液相色谱仪,测定,即得;本品每 1g 含粉萆薢以薯蓣皂甙元(C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>)计,不得少于 1.5mg;

[0387] 2. 甘草的含量测定

[0388] 照高效液相色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI D)测定;

[0389] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸(28 : 70 : 2)为流动相;检测波长为 250nm;理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于 2000;

[0390] 对照品溶液的制备取甘草酸单铵盐对照品约 4mg,精密称定,置 20ml 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(每 1ml 含甘草酸单铵盐对照品 0.2mg,折合甘草酸为 0.1959mg);

[0391] 供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物,研细,精密取相当于生药材 2g 的

药粉,置具塞三角瓶中,精密加入流动相 25ml,称定重量,超声处 (250W,20kHz) 30 分钟,放冷,再称定重量,用流动相补足减失的重量,摇匀,滤过,即得;

[0392] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 $\mu$ l,注入液相色谱仪,测定,即得;

[0393] 本品每 1g 含甘草以甘草酸 ( $C_{42}H_{62}O_{16}$ ) 计,不得少于 2.5mg。

[0394] 实施例 5. 颗粒剂

[0395] 粉萆薢 320g 石菖蒲 60g 甘草 160g

[0396] 乌药 80g 益智仁(炒)40g 菟丝子 240g

[0397] 茯苓 120g

[0398] 以上七味加 8 倍量水煎煮 3 次,每次 1 小时,合并煎液,浓缩至相对密度为 1.28 ~ 1.30,加入蔗糖 350g,糊精 150g,混匀,制成颗粒,干燥,整粒,制成 1000g 即得。

[0399] 鉴别方法:

[0400] 1. 粉萆薢

[0401] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加 2mol/L 的盐酸 40ml,回流 1 小时,滤过,药渣用 10% 碳酸钠溶液洗至中性,用 20ml 乙醚超声处理 30 分钟,滤过,滤液浓缩至 1ml,作为供试品溶液;另取粉萆薢对照药材 1g,同法制成对照药材溶液;照薄层色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI B) 试验,分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 10 $\mu$ l,点于同一硅胶 G 薄层板上以三氯甲烷-丙酮(9.7 : 0.3) 为展开剂,饱和 10 分钟展开;取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主斑点。

[0402] 2. 薯蓣皂苷元

[0403] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂适量,研细,取相当于生药材 1g 的细粉,置 100mL 具塞锥形瓶中,加乙醇水浴回流提取 3 次,每次 20mL,每次 30min,合并提取液,回收溶剂至干。残渣加 2mol/L 盐酸 20mL,沸水回流 3h,取出,冷却,移置分液漏斗中,加氯仿萃取 3 次,每次 10mL,合并氯仿液,水浴蒸至约 3mL,作为供试品溶液;取薯蓣皂苷元对照品适量,加甲醇制成每 1mL 含 1mg 的对照品溶液;分别吸取对照品溶液 5 $\mu$ l,供试品溶液 10 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60 ~ 90 $^{\circ}$ C)-醋酸乙酯(7 : 3) 为展开剂,展开,取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

[0404] 3. 甘草

[0405] 供试品溶液制备:取本药物组合物相当于生药材 2g 的细粉,加乙醚 40mL,加热回流 1h,滤过,药渣加甲醇 30mL,超声 30min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 40mL 使溶解,用水饱和正丁醇提取 3 次,每次 20mL,合并正丁醇液,用 20mL 水洗涤,蒸干,残渣加甲醇 3mL 使溶解,作为供试品溶液;取甘草对照药材 1g,供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液 5 $\mu$ l,供试品溶液各 10 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板,以乙酸乙酯-甲酸-冰醋酸-水(15 : 1 : 1 : 2) 为展开剂展开,取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰,置紫外光灯(365nm) 下检视,在供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的荧光斑点。

[0406] 4. 乌药



[0407] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂适量,取相当于生药材 2g 的细粉,加氯仿 40mL,超声 30min 过滤,滤液蒸干,残渣加甲醇 1mL 使溶解,作为供试品溶液;取乌药对照药材 1g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液和各 10 $\mu$ l 点于同一硅胶 G 薄层板上,以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(5:1)为展开剂展开,取出晾干后喷以 2%香草醛硫酸溶液,105 $^{\circ}$ C 烘至斑点显色清晰;供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

[0408] 5. 益智仁(炒)

[0409] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)30ml,超声处理 30 分钟,滤过,滤液挥干,残渣加 1ml 无水乙醇使溶解,作为供试品溶液;取益智仁对照药材 2g,与供试品溶液制备同法制成对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l,点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上以环己烷-乙酸乙酯(8:2)为展开剂,饱和 10 分钟,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254nm)下检视,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

[0410] 6. 石菖蒲

[0411] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加乙醚 30ml,超声处理 40 分钟,滤过,滤液浓缩至约 1ml,作为供试品溶液。另取石菖蒲对照药材 1g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-乙酸乙酯(8:2)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主荧光斑点。

[0412] 含量测定

[0413] 1. 粉萆薢的含量测定

[0414] 照高效液相色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI D)测定;

[0415] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,甲醇-乙腈(30:70)为流动相;检测波长为 206nm;理论板数按薯蓣皂甙元峰计算应不低于 3000;

[0416] 对照品溶液的制备精密称取干燥至恒重的薯蓣皂甙元对照品适量,加甲醇制成每 1ml 含 0.3mg 的对照品溶液。

[0417] 供试品溶液的制备取本药物组合物制剂,研细,精密取相当于生药材 2g 的药粉,置 100ml 具塞三角瓶中,加乙醇水浴回流三次,每次 20ml,每次 30min,合并提取液,回收溶剂至干。残渣加 2mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 盐酸 20mL,沸水回流 3h,取出冷却,移至分液漏斗中,加氯仿萃取三次,每次 10ml,合并氯仿液,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,移至 10ml 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经 0.45 $\mu$ m 为孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

[0418] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 $\mu$ l,注入液相色谱仪,测定,即得;本品每 1g 含粉萆薢以薯蓣皂甙元(C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>)计,不得少于 1.5mg;

[0419] 2. 甘草的含量测定

[0420] 照高效液相色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI D)测定;

[0421] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸(28:70:2)为流动相;检测波长为 250nm;理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于 2000;

[0422] 对照品溶液的制备取甘草酸单铵盐对照品约 4mg,精密称定,置 20ml 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得(每 1ml 含甘草酸单铵盐对照品 0.2mg,折合甘草酸为 0.1959mg);

[0423] 供试品溶液的制备取本药物组合物制剂,研细,精密取相当于生药材 2g 的药粉,置具塞三角瓶中,精密加入流动相 25ml,称定重量,超声处理(250W,20kHz)30 分钟,放冷,再称定重量,用流动相补足减失的重量,摇匀,滤过,即得;

[0424] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 $\mu$ l,注入液相色谱仪,测定,即得;

[0425] 本品每 1g 含甘草以甘草酸(C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>)计,不得少于 2.5mg;

[0426] 实施例 6. 丸剂

[0427] 粉萆薢 320g 石菖蒲 60g 甘草 160g 乌药 80g 益智仁(炒)40g

[0428] 以上五味,粉碎成 100 目细粉,混匀,用水泛丸,50~60℃干燥;将滑石粉碎成 150 目极细粉包衣,打光,50~60℃干燥,制成 20000 丸。

[0429] 【功能主治】分清化浊,温肾利湿。用于肾不化气,清浊不分,小便频数,时下白浊。

[0430] 【用法用量】口服,一次 6~9g,一日 2 次。

[0431] 【规格】每 20 粒重 1g

[0432] 鉴别方法:

[0433] 1. 粉萆薢

[0434] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加 2mol/L 的盐酸 40ml,回流 1 小时,滤过,药渣用 10% 碳酸钠溶液洗至中性,用 20ml 乙醚超声处理 30 分钟,滤过,滤液浓缩至 1ml,作为供试品溶液;另取粉萆薢对照药材 1g,同法制成对照药材溶液;照薄层色谱法(中国药典 2005 年版一部附录 VI B)试验,分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 10 $\mu$ l,点于同一硅胶 G 薄层板上以三氯甲烷-丙酮(9.7:0.3)为展开剂,饱和 10 分钟展开;取出晾干后喷以 10% 硫酸乙醇溶液,105℃烘至斑点显色清晰,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主斑点。

[0435] 2. 益智仁(炒)

[0436] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加石油醚(60~90℃)30ml,超声处理 30 分钟,滤过,滤液挥干,残渣加 1ml 无水乙醇使溶解,作为供试品溶液;取益智仁对照药材 2g,与供试品溶液制备同法制成对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l,点于同一硅胶 GF<sub>254</sub> 薄层板上以环己烷-乙酸乙酯(8:2)为展开剂,饱和 10 分钟,展开,取出,晾干,置紫外光灯(254nm)下检视,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点。

[0437] 3. 石菖蒲

[0438] 供试品溶液制备:取本药物组合物制剂内容物适量,研细,取相当于生药材 2g 的细粉,加乙醚 30ml,超声处理 40 分钟,滤过,滤液浓缩至约 1ml,作为供试品溶液。另取石菖蒲对照药材 1g,与供试品溶液的制备同法制得对照药材溶液;分别吸取对照药材溶液、供试品溶液各 5 $\mu$ l,分别点于同一硅胶 G 薄层板上以石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(8:2)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365nm)下检视,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的主荧光斑点。

[0439] 含量测定

[0440] 甘草的含量测定

[0441] 照高效液相色谱法（中国药典 2005 年版一部附录 VI D）测定；

[0442] 色谱条件与系统适用性试验以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，乙腈-0.2mol/L 醋酸铵-冰醋酸（28：70：2）为流动相；检测波长为 250nm；理论板数按甘草酸单铵盐峰计算应不低于 2000；

[0443] 对照品溶液的制备取甘草酸单铵盐对照品约 4mg，精密称定，置 20ml 量瓶中，用流动相溶解并稀释至刻度，摇匀，即得（每 1ml 含甘草酸单铵盐对照品 0.2mg，折合甘草酸为 0.1959mg）；

[0444] 供试品溶液的制备取本药物组合物制剂内容物，研细，精密取相当于生药材 2g 的药粉，置具塞三角瓶中，精密加入流动相 25ml，称定重量，超声处理（250W，20kHz）30 分钟，放冷，再称定重量，用流动相补足减失的重量，摇匀，滤过，即得；

[0445] 测定法分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液各 10 $\mu$ l，注入液相色谱仪，测定，即得；

[0446] 本品每 1g 含甘草以甘草酸（ $C_{42}H_{62}O_{16}$ ）计，不得少于 2.5mg。