

参附益肾胶囊的质量标准研究

盛春帅*,周 鹃,李海霖*(青海省中医院,西宁 810000)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)33-4735-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.33.43

摘要 目的:建立参附益肾胶囊的质量标准。方法:检测制剂中手参的显微特征;采用薄层色谱法(TLC)对制剂中丹参、大黄、甘草、红景天、肉桂进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中黄芪甲苷的含量;色谱柱为Phenomenex Luna-C₁₈,流动相为乙腈-水(35:65, V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃。结果:制剂中手参显微特征显著。丹参、大黄、甘草、红景天、肉桂TLC图斑点清晰,分离度好。黄芪甲苷检测进样量线性范围为0.832 8~4.164 0 μg($r=0.999\ 9$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤2.03%;加样回收率为95.02%~104.33%(RSD=3.80%, $n=6$)。结论:该研究所建标准可用于参附益肾胶囊的质量控制。

关键词 参附益肾胶囊;质量标准;薄层色谱法;高效液相色谱法;黄芪甲苷

Study on Quality Standard of Shenfu Yishen Capsule

SHENG Chunshuai, ZHOU Juan, LI Hailin(Qinghai Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xining 810000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for Shenfu yishen capsule. METHODS: The microscopic characteristics of *Gymnadenia conopsea* were detected; TLC was adopted for the qualitative identification of *Salvia miltiorrhiza*, *Rheum palmatum*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Rhodiola rosea* and *Cortex cinnamomi*; HPLC was used for the content determination of astragaloside: the column was Phenomenex Luna-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-water (35:65, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, column temperature was 30 ℃. RESULTS: Microscopic identification features of *G. conopsea* were exclusive, TLC identification of *S. miltiorrhiza*, *R. palmatum*, *G. uralensis*, *R. rosea* and *C. cinnamomi* was well separated and specific; the linear range of astragaloside was 0.832 8-4.164 0 μg ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were no higher than 2.03%; recovery was 95.02%-104.33% (RSD=3.80%, $n=6$). CONCLUSIONS: The standard can effectively control the quality of Shenfu yishen capsule.

KEYWORDS Shenfu yishen capsule; Quality standard; TLC; HPLC; Astragaloside A

动相中加入了十六烷基三甲基溴化铵离子对试剂,使样品离子在流动相中与离子对试剂的反离子生成无荷电的疏水性离子对,从而改善峰形和分离度。

3.2 检测波长的考察

笔者分别对3个被测成分进行190~400 nm全波长扫描,结果表明,山柽苷甲酯最大吸收波长为238 nm,木犀草素最大吸收波长为254、354 nm,芹菜素最大吸收波长为258、342 nm,由于在238 nm波长处木犀草素和芹菜素的含量很低,而348 nm波长处可更好地测定木犀草素和芹菜素的含量,因此本试验设置两个波长来检测3个成分的含量。

3.3 供试品提取方法的考察

在预试验中,笔者分别考察了不同提取方式(水回流提取法、水提醇沉提取法)、不同体积分数甲醇(100%、80%、60%、40%)、不同料液比(1:160、1:80、1:40、1:20)和不同提取时间(30、60、90 min)。结果表明,0.5 g药材粉末中加60%甲醇40 ml,回流提取60 min时有效成分含量较高。

综上所述,本方法操作简便,精密性、稳定性、重复性好,可用于独一味中山柽苷甲酯、木犀草素、芹菜素含量的同时测定。

* 主管药师。研究方向:中药制剂。E-mail:shengcs8587@163.com

通信作者:主任药师。研究方向:中药制剂。E-mail:3345666989@qq.com

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:262.
- [2] 青海高原生物研究所植物室.青藏高原药物图鉴[M].西宁:青海人民出版社,1978:108.
- [3] 张凤,孙连娜,陈万生.不同产地独一味中苯乙醇苷类的含量测定与品质评价[J].中国中药杂志,2008,33(11):1346.
- [4] 朱斌,龚念,彭崇胜,等.独一味镇痛作用及其有效成分研究[J].中国药理学与毒理学杂志,2012,26(3):442.
- [5] Zhang F, Wu ZJ, Sun LN, et al. Iridoid glucosides and a C₁₅-norisoprenoid from *Lamiophlomis rotata* and their effects on NF-κB activation[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012,22(13):4447.
- [6] 汪茜,孙秋艳,杨婷,等.独一味巴布膏抗炎作用研究[J].中药药理与临床,2010,26(1):49.
- [7] 张泉龙,邱建国,李茂星,等.独一味环烯醚萜苷外用止血作用研究[J].医药导报,2011,30(7):877.
- [8] Li M, Jia Z, Hu Z, et al. Experimental study on the hemostatic activity of the Tibetan medicinal herb *Lamiophlomis rotata*[J]. *Phytother Res*, 2008,22(6):759.

(收稿日期:2016-06-22 修回日期:2016-09-13)

(编辑:张 静)

糖尿病肾病是糖尿病引起的危害性极大的一种慢性并发症。近些年,随着来我院内分泌、肾病专科就诊患者的不断增加,我院专家通过多年的临床观察,发现由于高海拔地区,自然氧气稀薄,清气不足,加之寒盛易伤阳气、干燥多风易伤阴津,使该地区糖尿病肾病多以阳虚血瘀型为主,故采用黄芪、午参、水蛭、大黄、附子等中、藏药组方,且在临床治疗糖尿病肾病、慢性肾炎、慢性肾功能不全中取得了很好的效果。为方便患者并配合临床治疗,医院将此组方制成胶囊作为医院制剂供临床使用。为有效控制该制剂质量,笔者对该制剂中的藏药手参进行了显微鉴别;对丹参、大黄、甘草、红景天、肉桂进行了薄层色谱法(TLC)鉴别;对制剂中主要成分黄芪甲苷采用高效液相色谱法(HPLC)进行了含量测定^[1-4]。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括Ⅱ蒸发光散射检测器、四元泵(美国Agilent公司);BX51型显微镜(日本Olympus公司);BT224S型电子天平、XS105DU型电子天平(德国Sartorius公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:50 kHz)。

1.2 药品与试剂

参附益肾胶囊(青海省中医院自制,批号:20140822、20141202、20140925,规格:0.4 g/粒);丹酚酸B对照品(批号:111562-201212,纯度>98%)、大黄素对照品(批号:110756-201319,纯度>98%)、红景天苷对照品(批号:110818-201206,纯度>98%)、肉桂酸对照品(批号:110786-200503,纯度>98%)、黄芪甲苷对照品(批号:110831-200302,纯度>98%)、大黄对照药材(批号:120902-201010)、甘草对照药材(批号:120904-201318)、红景天对照药材(批号:121412-200902)均购自中国食品药品检定研究院;硅胶G薄层板(青岛海洋化工厂);甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

手参、红景天药材,购自青海省九康药材饮片有限公司,由本院赵克宏副主任药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 显微鉴别^[5-7]

以处方中原粉药材入药的手参为对照,取本品适量,置显微镜下观察,可见草酸钙针晶束长24~50 μm,散在或存在于类圆形或椭圆形黏液细胞中,详见图1。

2.2 定性鉴别

2.2.1 丹参 取本品内容物3 g,研细,加70%乙醇30 ml,加热回流1 h,放冷,滤过,取滤液蒸干,残渣加水10 ml使溶解,用稀盐酸调pH至2,用乙酸乙酯振摇提取2次,每次20 ml,合并乙酸乙酯提取液,蒸干,残渣加乙醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取丹酚酸B对照品,加70%乙醇制成丹酚酸B质量浓度为1 mg/ml的对照品溶液。按参附益肾胶囊处方和工艺制备缺丹参的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对

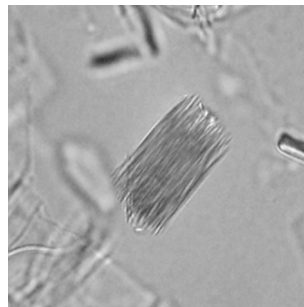


图1 手参的显微图

Fig 1 Microscopic characteristics of *Gymnadenia conopsea*

照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[8]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以甲苯-三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸(2:3:4:0.5:2, V/V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以3%三氯化铁乙醇溶液,置日光灯下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图2。

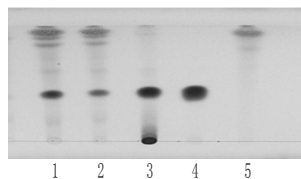


图2 丹参的薄层色谱图

1~3.供试品;4.对照品;5.阴性对照

Fig 2 TLC chromatograms of *Salvia miltiorrhiza*

1-3.test samples; 4.reference substance; 5.negative control

2.2.2 大黄 取本品内容物2 g,研细,加甲醇20 ml,超声处理20 min,滤过,取滤液蒸干,残渣加水10 ml使溶解,再加盐酸1 ml,置水浴上加热回流30 min,立即冷却,用乙醚振摇提取2次,每次20 ml,合并乙醚提取液,蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取大黄素对照品,加甲醇制成大黄素质量浓度为1 mg/ml的对照品溶液。再取大黄对照药材0.2 g,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按参附益肾胶囊处方和工艺制备缺大黄的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[8]试验,吸取上述4种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以石油醚(30~60℃)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)的上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图3。

2.2.3 甘草 取本品内容物5 g,研细,加甲醇20 ml,超声处理30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 ml溶解,用水饱和的正丁醇提取2次,每次20 ml,合并正丁醇溶液,蒸干,残渣加甲醇2 ml使溶解,作为供试品溶液。另取甘草对照药材1 g,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按参附益肾胶囊处方和工艺制备缺甘草的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2015年版《中国药典》(四部)]^[8]试验,吸取上述3种溶液各10 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-甲酸-冰乙酸-水(15:1:1:2, V/V/V/V)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇,于105℃下加热至斑点显

色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图4。

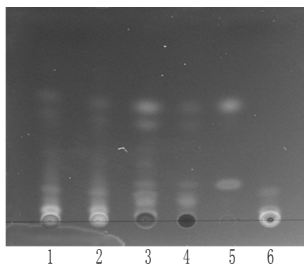


图3 大黄的薄层色谱图

1~3.供试品;4.对照药材;5.对照品;6.阴性对照

Fig 3 TLC chromatograms of *Rheum palmatum*

1-3.test samples; 4.control medicinal herb;5.reference substance; 6.negative control

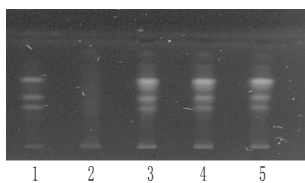


图4 甘草的薄层色谱图

1~3.供试品;4.对照药材;5.阴性对照

Fig 4 TLC chromatograms of *Glycyrrhiza uralensis*

1-3.test samples; 4.control medicinal herb;5.negative control

2.2.4 红景天 取本品内容物 5 g,研细,加甲醇 20 ml,超声处理 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加甲醇 2 ml 使溶解,作为供试品溶液。另取红景天苷对照品,加甲醇制成红景天苷质量浓度为 1 mg/ml 的对照品溶液。再取红景天对照药材 5 g,同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按参附益肾胶囊处方和制备工艺制备缺红景天的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按 TLC 法[2015 年版《中国药典》(四部)]^[9] 试验,吸取上述 4 种溶液各 10 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-甲醇-丙酮-水(6:3:1:1, V/V/V/V) 的下层溶液为展开剂,展开,取出,晾干,置碘蒸气中熏约 3 min,置日光下检视。结果,供试品色谱中,在与对照药材和对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图 5。

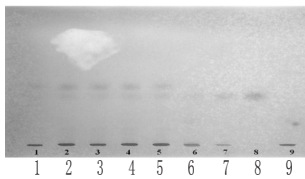


图5 红景天的薄层色谱图

1~5.供试品;6.对照药材;7~8.对照品;9.阴性对照

Fig 6 TLC chromatograms of *Rhodiola rosea*

1-5.test samples; 6.control medicinal herb; 7-8.reference substances; 9.negative control

2.2.5 肉桂 取本品内容物 5 g,研细,加乙酸乙酯 40 ml,超声处理 20 min,滤过,滤液低温挥干,残渣加无水乙醇 1 ml 使溶解,作为供试品溶液。另取肉桂酸对照品,加无水乙醇制成肉桂酸质量浓度为 1 mg/ml 的对照品溶液。按参附益肾胶囊处

方和工艺制备缺肉桂的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按 TLC 法[2015 年版《中国药典》(四部)]^[9] 试验,吸取上述 3 种溶液各 10 μl,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正己烷-乙醚-冰乙酸(5:5:0.1, V/V/V) 为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果,供试品色谱中,在与对照品色谱相应位置上显相同颜色的斑点,阴性对照无干扰,详见图 6。

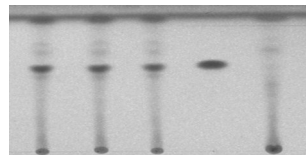


图6 肉桂的薄层色谱图

1~3.供试品;4.对照品;5.阴性对照

Fig 6 TLC chromatograms of *Cortex cinnamomi*

1-3.test samples; 4.reference substance; 5.negative control

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Phenomenex Luna-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(35:65, V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃。在上述色谱条件下,理论板数以黄芪甲苷峰计≥4 000;各成分基线分离良好,分离度>1.5;供试品溶液色谱图中,在与黄芪甲苷对照品色谱峰相应的位置上,有相同的色谱峰,阴性略有干扰,但从峰值上看,干扰极小,详见图 7。

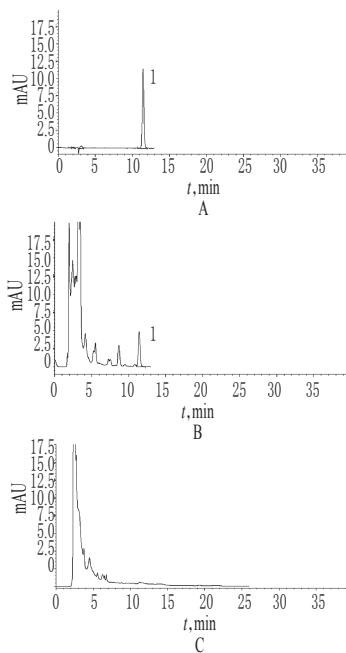


图7 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.黄芪甲苷

Fig 7 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test sample; C.negative control; 1. astragaloside

2.3.2 对照品溶液的制备 精密称取黄芪甲苷对照品 0.010 41 g,置于 50 ml 量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成黄芪甲苷质量浓度为 0.208 2 mg/ml 的对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备 取本品内容物适量,研细,取 10 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加水 50 ml,称定质量,超声处理

40 min,放冷,称定质量,用水补足减失的质量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 ml,用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次,每次 20 ml,合并正丁醇提取液,用氨试液洗涤 3 次,每次 30 ml,弃去,分取正丁醇液,蒸干,残渣用甲醇溶解并转移至 5 ml 量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.3.4 阴性对照溶液的制备 按参附益肾胶囊处方和工艺制备缺黄芪的阴性样品,并按“2.3.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3.5 线性关系考察 分别精密量取“2.3.2”项下对照品溶液 4、8、12、16、20 μl ,按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以黄芪甲苷进样量($x, \mu\text{g}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得黄芪甲苷回归方程为 $y=3.5649+1281.1x$ ($r=0.9999$)。结果表明,黄芪甲苷检测进样量线性范围为 0.8328~4.1640 μg 。

2.3.6 精密度试验 取“2.3.2”项下对照品溶液适量,按“2.3.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,黄芪甲苷峰面积的 $\text{RSD}=0.30\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.3.7 稳定性试验 取“2.3.3”项下供试品溶液(批号:20140925)适量,分别于室温下放置 0、2、3、4、6、8 h 时按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芪甲苷峰面积的 $\text{RSD}=0.53\%$ ($n=6$),表明供试品溶液在 8 h 内基本稳定。

2.3.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:20140925)适量,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,共 6 份,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,黄芪甲苷的平均含量为 0.31 mg/g , $\text{RSD}=2.03\%$ ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.3.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:20140925)适量,共 6 份,分别加入一定质量的黄芪甲苷对照品,按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test($n=6$)

取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
4.955 8	1.511 5	1.523 0	3.100 4	104.33		
5.013 4	1.529 1	1.523 0	3.070 1	101.18		
5.111 7	1.559 1	1.523 0	3.082 9	100.05	99.61	3.80
4.927 7	1.616 3	1.523 0	3.063 3	95.02		
5.000 4	1.640 1	1.523 0	3.140 9	98.54		
5.128 6	1.682 2	1.523 0	3.182 8	98.53		

2.3.10 样品含量测定 取 3 批样品适量,分别按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.3.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表 2。

3 讨论

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of content determination($n=3$)

样品批号	黄芪甲苷含量, mg/粒
20141202	0.124
20140822	0.108
20140925	0.121

本制剂为水提取的复方制剂,因而在 TLC 鉴别成分中以水溶性成分为对照品,除丹参素钠分离效果不好外,丹酚酸 B、大黄素、红景天苷、肉桂酸,分离效果均较好,斑点清晰,因此将以上成分作为对照品列入标准。

考虑到黄芪提取方法的影响因素,笔者对提取过程中氨水洗涤因素、大孔吸附树脂因素、漂移管温度等进行了相关试验,最终确定了以氨水洗涤,选用 D101 型大孔吸附树脂柱,漂移管温度设定为 50 $^{\circ}\text{C}$,这也使试验结果更加可靠。

从 HPLC 测定结果来看,由单方配方颗粒制成的样品含量略高于由药材提取制成的样品,这可能是药材混合提取时,各成分之间有相互抑制的作用,从而导致黄芪甲苷含量略低^[9-10]。

综上所述,本研究所建标准可用于参附益肾胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:23、76、86、136、154.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:藏药:第一册[S].北京:人民卫生出版社,1995:25、29、126、231.
- [3] 国家食品药品监督管理局.国家食品药品监督管理局标准(试行)[S].YBZ12512005.
- [4] 国家食品药品监督管理局.国家食品药品监督管理局标准(试行)[S].YBZ16142009.
- [5] 青海省药品检验所,青海省藏医药研究所.中国藏药:第一卷[M].上海:上海科学技术出版社,1996:548.
- [6] 青海省药品检验所,青海省藏医药研究所.中国藏药:第二卷[M].上海:上海科学技术出版社,1996:310.
- [7] 徐国钧.中药材粉末显微鉴别[M].北京:人民卫生出版社,1986:52、416.
- [8] 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,2015:57.
- [9] 赵陆华.中药高效液相色谱法应用[M].北京:中国医药科技出版社,2005:326.
- [10] 周训蓉,杨亮.金乌健骨胶囊的质量标准研究[J].中国药房,2015,26(30):4247.

(收稿日期:2015-11-01 修回日期:2016-03-16)

(编辑:张 静)