

肾衰康颗粒的质量标准研究^Δ

米婷婷^{1*}, 范开华², 蒲志强², 张明², 王钦^{1#}(1.四川医科大学药学院, 四川泸州 646000; 2.成都军区总医院药剂科, 成都 610083)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)03-0372-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.03.29

摘要 目的:建立肾衰康颗粒质量标准。方法:采用薄层色谱(TLC)法对制剂中黄芪、大黄进行定性鉴别。采用高效液相色谱法测定制剂中大黄素和大黄酚的含量:色谱柱为Agilent HC-C₁₈,流动相为甲醇-0.1%磷酸(85:15, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μl。结果:黄芪、大黄的TLC图斑点清晰,分离度好。大黄素和大黄酚检测质量浓度线性范围分别为1.9~60.8、1.6~51.2 μg/ml(*r*均为0.999 9);精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3%;加样回收率分别为95.76%~103.66%(RSD=2.83%, *n*=9)、97.24%~104.34%(RSD=2.65%, *n*=9)。结论:所建标准可用于肾衰康颗粒的质量控制。

关键词 肾衰康颗粒;质量标准;大黄素;大黄酚;薄层色谱法;高效液相色谱法

Study on the Quality Standard of Shenshuaikang Granule

MI Tingting¹, FAN Kaihua², PU Zhiqiang², ZHANG Ming², WANG Qin¹(1.School of Pharmacy, Sichuan Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 2.Dept. of Pharmacy, Chengdu Military General Hospital, Chengdu 610083, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standards for Shenshuaikang granule. METHODS: TLC was used for the qualitative identification of Astragali Radix and Rhei Radix et Rhizoma in the preparation. HPLC was used for the contents determination of emodin and chrysophanol, the column was Agilent HC-C₁₈ with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid (85:15, V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 30 ℃ and the injection volume was 10 μl. RESULTS: TLC showed clear spots and good separation. The linear range was 1.9-60.8 μg/ml for emodin(*r*=0.999 9, *n*=6) and 1.6-51.2 μg/ml for chrysophanol (*r*=0.999 9), RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%, recoveries were 95.76%-103.66% (RSD=2.83%, *n*=9) and 97.24%-104.34% (RSD=2.65%, *n*=9), respectively. CONCLUSIONS: The standard can be used for the quality control of Shenshuaikang granule.

KEYWORDS Shenshuaikang granule; Quality standard; Emodin; Chrysophanol; TLC; HPLC

肾衰康颗粒为成都军区总医院自制制剂,由黄芪、大黄、枸杞子、甘草、党参、白术等14味中药材组成,具有健脾补肾、益气养血、活血化瘀、泻浊排毒等功效^[1]。该制剂以前只对黄芪、大黄两味药材进行了定性鉴别,为更好地控制该制剂质量,保证用药安全、有效,笔者在对黄芪、大黄采用薄层色谱(TLC)法进行鉴别的同时,采用高效液相色谱(HPLC)法测定了制剂中大黄素和大黄酚的含量,以为肾衰康颗粒的质量标准建立提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,包括G1311A泵、G1315A紫外检测器(美国Agilent公司);AB-135S型精密电子天平、AE-200S型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);VGT-1990QTD型超声仪(江苏精密仪器有限公司);TGL-18G-C型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);DU730型紫外分光光度计(美国Beckman公司);硅胶G、H薄层板(青岛海陵硅胶干燥剂有限公司)。

^Δ 基金项目:军队医疗机构制剂标准提高科研专项课题(No.14ZJZ18-2)

* 硕士研究生。研究方向:药物化学。E-mail:342836517@qq.com
通信作者:教授。研究方向:药物化学。E-mail:wq_ring@163.com

1.2 药品与试剂

肾衰康颗粒(成都军区总医院制剂中心自制,批号:140901、141201、150228,规格:10 g/袋);黄芪对照药材(批号:121462-201304)、大黄对照药材(批号:120902-201010)、大黄素对照品(批号:110756-200110,纯度≥98%)、大黄酚对照品(批号:110796-201319,纯度≥98%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 定性鉴别

2.1.1 黄芪^[2] 取样品内容物10 g,研细,加甲醇30 ml,超声(功率:200 W,频率:40 kHz,下同)提取30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加水20 ml使溶解,用水饱和正丁醇提取2次,每次20 ml,合并正丁醇液,用氨试液洗涤2次,每次20 ml,弃去氨试液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取黄芪对照药材1 g,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按肾衰康颗粒处方和制备工艺制备缺黄芪的阴性样品,再按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2010年版《中国药典》(一部)附录VIB]^[3]试验,吸取上述3种溶液各5 μl,分别点于同一硅胶G薄层板上,以乙酸乙酯-丁酮-甲酸-水(5:3:1:1, V/V/V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇试液,于105 ℃加

热至斑点显色清晰,日光下检视。结果显示,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,且阴性对照无干扰,详见图1。

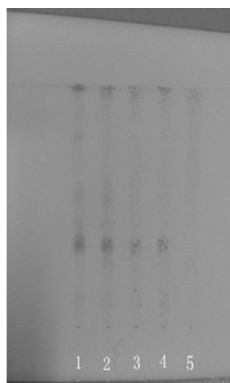


图1 黄芪的薄层色谱图

1.对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 1 TLC chromatograms of Astragali Radix

1.control medicinal material; 2-4.test samples; 5.negative control

2.1.2 大黄 取样品内容物10 g,研细,加甲醇30 ml,超声30 min,滤过,取滤液15 ml,蒸干,残渣加水10 ml使溶解,再加盐酸1 ml,加热回流30 min,立即冷却,用乙醚分2次振摇提取,每次20 ml,合并乙醚液,蒸干,残渣加三氯甲烷1 ml使溶解,作为供试品溶液。另取大黄对照药材0.2 g,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按肾衰康颗粒处方和制备工艺制备缺大黄的阴性样品,再按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。按TLC法[2010年版《中国药典》(一部)附录VIB]^[9]试验,吸取上述3种溶液各5 μ l,分别点于同一硅胶H薄层板上,以石油醚(30~60 $^{\circ}$ C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1, V/V/V)为展开剂,置于氨蒸气饱和的展开缸内,展开,取出,晾干,置紫外光灯(365 nm)下检视。结果显示,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,且阴性对照无干扰,详见图2。

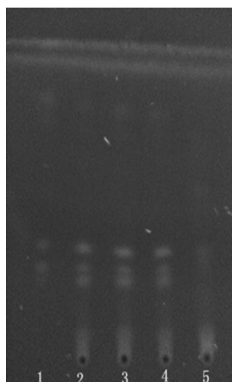


图2 大黄的薄层色谱图

1.对照药材;2~4.供试品;5.阴性对照

Fig 2 TLC chromatograms of Rhei Radix et Rhizoma

1.control medicinal material; 2-4.test samples; 5.negative control

2.2 含量测定^[4-7]

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱:Agilent HC-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-0.1%磷酸(85:15, V/V);流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ l。在上述色谱条件下,理论板数以各待测成分峰计均不少于3 000,分离度均>1.5,各成分基线分离良好。色谱见图3。

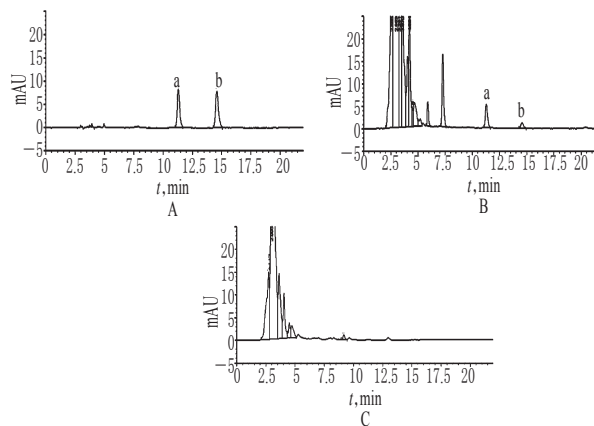


图3 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.阴性对照;a.大黄素;b.大黄酚

Fig 3 HPLC chromatograms

A.reference substance; B.test samples; C.negative control; a.emodin; b.chrysophanol

2.2.2 对照品溶液的制备 分别取大黄素、大黄酚对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 ml均含10 μ g的大黄素、大黄酚单一对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取装量差异项下的样品内容物适量,研细,取约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 ml,密塞,称定质量,超声处理20 min,放冷,称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,以半径为13.5 cm、3 000 r/min离心5 min,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按肾衰康颗粒处方和制备工艺制备缺大黄的阴性样品,按“2.2.3”项下方法制成阴性对照溶液。

2.2.5 线性关系考察 分别取大黄素、大黄酚对照品适量,精密称定,加甲醇溶解分别制成每1 ml含76 μ g大黄素、64 μ g大黄酚的单一对照品溶液。分别量取上述大黄素对照品溶液适量,加甲醇制成质量浓度分别为1.9、3.8、7.6、15.2、30.4、60.8 μ g/ml的系列大黄素对照品溶液。精密吸取上述系列大黄素对照品溶液各10 μ l,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以大黄素质量浓度(x, μ g/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=30.978x-4.7453$ ($r=0.9999$)。结果表明,大黄素检测质量浓度线性范围为1.9~60.8 μ g/ml。分别量取上述大黄酚对照品溶液适量,加甲醇制成质量浓度分别为1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、51.2 μ g/ml的系列大黄酚对照品溶液。精密吸取上述系列大黄酚对照品溶液各10 μ l,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以大黄酚质量浓度(x, μ g/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=40.503x-6.2159$ ($r=0.9999$)。结果表明,大黄酚检测质量浓度线性范围为1.6~51.2 μ g/ml。

2.2.6 精密度试验 取“2.2.2”项下对照品溶液适量,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,大黄素、大黄酚峰面积的RSD分别为0.57%、0.51%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:141201)适量,分别于放置0、2、4、8、12、24 h时进样测定,记录峰面积。结果,大黄素、大黄酚峰面积的RSD为2.01%、2.88%($n=6$),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.2.8 重复性试验 精密称取同一批样品(批号:141201)适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.2.1”项

下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,大黄素、大黄酚峰面积的RSD为1.98%、1.10%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取已知含量样品(批号:141201)适量,共9份,分别加入高、中、低质量的大黄素、大黄酚对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,计算各成分含量并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

待测成分	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, %
大黄素	0.500 3	0.035 3	0.028 2	0.063 9	101.42	99.56	2.83
	0.500 5	0.035 3	0.028 2	0.064 5	103.66		
	0.501 5	0.035 4	0.028 2	0.064 5	103.41		
	0.499 1	0.035 2	0.038 4	0.072 2	96.35		
	0.501 0	0.035 3	0.038 4	0.073 4	99.15		
	0.498 9	0.035 2	0.038 4	0.071 9	95.76		
	0.499 8	0.035 2	0.042 3	0.077 1	98.99		
	0.501 3	0.035 3	0.042 3	0.076 7	97.78		
	0.501 0	0.035 3	0.042 3	0.077 4	99.55		
	大黄酚	0.500 0	0.007 9	0.006 3	0.014 5		
0.500 5		0.007 9	0.006 3	0.014 3	101.93		
0.501 5		0.007 9	0.006 3	0.014 1	98.74		
0.499 1		0.007 9	0.007 9	0.016 0	102.66		
0.501 0		0.007 9	0.007 9	0.015 8	99.94		
0.498 9		0.007 9	0.007 9	0.015 6	97.24		
0.499 8		0.007 9	0.009 5	0.017 1	97.36		
0.501 3		0.007 9	0.009 5	0.017 4	100.37		
0.501 0		0.007 9	0.009 5	0.017 8	104.34		

2.2.10 样品含量测定 取3批样品各适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.1”项下色谱条件进样测定并计算各成分含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of contents determination of samples($n=3$)

批号	大黄素含量, mg/g	大黄酚含量, mg/g
140901	0.070 5	0.015 8
141201	0.070 4	0.015 6
150228	0.070 4	0.015 6

3 讨论

在TLC鉴别中,本研究对方中14味药材中的12味均进行了检测,结果发现其余10味药材存在重复性差、阴性对照有干扰或在与对照药材色谱相应位置上未显相同颜色的斑点等问

题,故仅纳入黄芪、大黄2味药材进行TLC鉴别。

黄芪的TLC鉴别中,用超声提取替代以往的加热回流,操作简单、易行,且提取率与加热回流相当。萃取时用水饱和的正丁醇代替乙酸乙酯,避免了乙酸乙酯萃取时易造成的乳化现象;同时,水饱和正丁醇可实现深度萃取,使萃取效率提高。

预试验考察了不同试剂对含量测定中样品提取效果的影响,最终发现甲醇提取效果最好。在提取时间的考察中,笔者分别对15、30、45、60 min进行了比较,发现30 min便能较好提取,再延长提取时间对提取效果无较大影响。

预试验还对含量测定中使用不同流动相(甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%乙酸、甲醇-0.1%磷酸)下供试品的响应情况进行了对比。结果表明,使用甲醇-水作为流动相,各目标峰分离效果不佳;而在甲醇-0.1%乙酸流动相中,各目标峰之间分离效果较好,但乙酸易挥发,重复性较差。因此,最终确定了甲醇-0.1%磷酸作为流动相进行含量测定。

综上所述,本研究所建标准可用于肾衰康颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 谭秋,王晓光,魏连波.肾衰康冲剂防治慢性肾衰竭的实验研究[J].中医药学刊,2006,24(7):1 333.
- [2] 樊莉,周世文.黄芪天麻胶囊的质量标准研究[J].中国药房,2013,24(35):3 314.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录34.
- [4] 韩桂茹,赵志军,许红辉,等.多种药材与制剂中大黄酚与大黄素含量测定改进方法[J].药物分析杂志,2008,28(3):461.
- [5] 谭晓虹,张丹参,张力,等.高效液相色谱法测定兔血浆中大黄酚的含量[J].时珍国医国药,2006,17(7):1 194.
- [6] 黄小瑜,黄诺嘉.胆石通胶囊质量标准提高研究[J].中成药,2009,31(4):558.
- [7] 崔红彬,蒋俊春,孟建升,等.HPLC法测定复方龙胆大黄口服液中大黄素的含量[J].中国药师,2009,12(1):134.

(收稿日期:2015-08-10 修回日期:2015-09-22)

(编辑:张 静)

国家卫生计生委副主任王国强访问上海合作组织秘书处

本刊讯 2015年12月21日,应上海合作组织秘书长梅津采夫邀请,国家卫生计生委副主任、国家中医药管理局局长王国强访问上海合作组织秘书处,与梅津采夫等进行了会谈。

王国强对上海合作组织秘书处的邀请表示感谢,祝贺上海合作组织近几年取得的长足进步,并对梅津采夫秘书长在任期间,对上海合作组织成员国之间传统医学特别是中医药合作所做出的努力表示高度的赞赏和由衷的感谢。希望梅津采夫回国履新后,继续推动俄卫生部与我国国家中医药管理局

进一步就中医师执业、药品及器械准入等问题进行沟通交流。

梅津采夫通报了自2015年2月与王国强副主任会谈后的工作落实进展情况,并表示他在此前上海合作组织总理会及理事会发言中,建议成员国的卫生机构将中西医经验结合起来,继续推动传统医学合作。萨哈林州州长科热米亚科表示,希望今后可以商议在萨哈林州进行中医药领域合作项目,利用萨哈林州丰富的矿泥温泉资源,与郊区疗养院和市区医院合作建立中医中心。