

肾衰康浓缩丸质量标准研究

刘桂珍¹ 刘纪青² 廖朝峰¹ 周国波¹

(1 深圳市宝安人民医院 广东 深圳 518001 2 深圳市中医院 广东 深圳 518033)

摘要 目的 建立肾衰康浓缩丸质量控制方法。方法 采用 TLC 鉴别肾衰康浓缩丸中大黄、丹参 采用 HPLC-ELSD 对制剂中黄芪甲苷进行含量测定,流动相为乙腈-水(30:70),流速 1 mL/min,柱温 28℃,漂移管温度 42℃,氮气 355kPa。结果 大黄、丹参的 TLC 鉴别斑点清晰、专属性强,黄芪甲苷在 1.0μg-10.0μg 之间呈良好的线性关系($r=0.9997, n=5$),平均回收率为 99.81%,RSD 为 1.73% ($n=6$)。结论 所建立的方法简便准确、专属性强、重现性好,可作为控制肾衰康浓缩丸质量的方法。

关键词 肾衰康浓缩丸 黄芪甲苷 HPLC-ELSD 丹参 大黄 TLC 质量标准

中图分类号 R285, R927.11 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 14-2767-03

Study on Quality Standard of Shenshuaikang Concentrated Pill

LIU Gui-zhen¹, LIU Ji-qing², LIAO Chao-feng¹, ZHOU Guo-bo¹

(1 Shenzhen Bao'an People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518001;

2 Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518033)

ABSTRACT Objective: To establish the quality standard of Shenshuaikang concentrated pill. **Methods:** Salviae Miltiorrhizae Radis et Rhizoma, Rhei Radis et Rhizoma were identified by TLC. The content of Astragaloside IV was determined by HPLC. Hypersil-C18 column was used(4.6 mm× 150 mm, 5μm). The mobile phase was consisted of acetonitrile-water (30:70). The flow rate was 1.0 ml/min, and column temperature was at 28℃, The evaporation temperature was 42℃, Pressure of Nitrogen gas was 355kPa. **Results:** The spots on TLC plates were clear without interference. The linearity range of Astragaloside IV was 1.0μg~10.0μg, ($r=0.9997, n=5$). The average recovery of Astragaloside IV was 99.81%, and RSD was 1.73% ($n=6$). **Conclusions:** This method is accurate, reliable and reproducible, which can be used for the quality control of Shenshuaikang Concentrated Pill.

Key words: Shenshuaikang Concentrated Pill; Astragaloside IV; HPLC-ELSD; Salviae Miltiorrhizae Radis et Rhizoma; Rhei Radis et Rhizoma; TLC; Quality standards

Chinese Library Classification(CLC): R285, R927.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2767-03

肾衰康浓缩丸是深圳市中医院协定处方,成分主要为黄芪、丹参、大黄等。其活血化淤,益气养阴,解毒泄浊等功能可用于各种原因所致的慢性肾功能不全氮质血症期和尿毒症早期等疾病的治疗。临床以汤剂使用多年,疗效突出,但携带、使用不便,我们将其改进剂型制成浓缩丸。本方益气为君药,丹参活血、大黄利下解毒共为臣药,本研究采用 HPLC-ELSD 测定黄芪甲苷含量,采用 TLC 鉴别丹参、大黄,为肾衰康浓缩丸质量标准的制定提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪(LC-20AT, ELSD-LT II 型检测器, LC-solution 工作站, 日本岛津公司) Sartorius BP 211D 电子天平(十万分之一, 德国 Sartorius 公司) KQ5200DE 数控超声清洗仪(频率 40KHz, 功率 200W, 昆山市超声仪器有限公司) 硅胶 G、硅胶 H 薄层板(青岛海洋化工厂)。

1.2 试药

黄芪甲苷(批号 110781-200512)、丹参酮 II A 对照品(批号 110766-200416) 大黄酸(批号 110757-200206)、大黄对照药材

(批号 120902-200609) 丹参对照药材(批号 020923-200610), 均由中国药品生物制品检定所提供。色谱纯乙腈、甲醇(Tedia Company)、水为超纯水,其余试剂均为分析纯,3 批肾衰康浓缩丸(批号 100308、100509、100617)及阴性样品均为自制。

1.3 制备工艺

取 100 倍处方量药材,加 40000ml 水提取 2 小时,滤出药液,药渣加 30000ml 水提取 2 小时,合并药液,滤过,滤液浓缩至稠膏(相对密度为约 1.10, 80℃热测),放冷,加乙醇使乙醇浓度达 60%,搅拌均匀,密闭,静置 24 小时,取上清液回收乙醇,浓缩成稠膏(相对密度为 1.30, 80℃热测),稠膏加淀粉 120g、糊精 360g 混匀,制丸,65-75℃烘干,1g 活性炭包衣,制成 1000g,即得。

1.4 含量测定

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil-C18 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5μm) 流动相为乙腈-水(30:70),流速 1 mL/min,柱温 28℃,漂移管温度 42℃,氮气 355kPa,增益 5,进样量为 10μL。

1.4.2 溶液的制备

1.4.2.1 对照品溶液 精密称取干燥器中保持 72h 以上的黄芪甲苷对照品,用色谱甲醇制成每 1ml 含 0.5mg 的溶液,即得。

1.4.2.2 供试品溶液 本品粉碎,精密称取 20g,加甲醇 50ml,精密称重,超声处理 30min,冷却至室温,加甲醇补足差重,滤过,

作者简介 刘桂珍, (1971-), 本科, 主管药师, 研究方向 临床药学
(收稿日期 2011-04-05 接受日期 2011-04-30)

滤液蒸干,残渣加水 20ml,微热使溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取 4 次,每次 30ml,合并正丁醇层,用氨试液洗涤 2 次,每次 40ml,弃去氨液,正丁醇液蒸干,残渣加水 10ml 使溶解,通过已处理好的 D101 型大孔树脂柱(内径 1.5cm,长 12cm),分别以水 50ml、10%乙醇 50ml、40%乙醇 30ml 洗脱,弃去洗脱液,再用 70%乙醇 80ml 洗脱,收集洗脱液,蒸干,残渣加甲醇至 10ml,用 0.45μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

1.4.2.3 阴性对照溶液 取除黄芪外的其他处方量药材,按制备工艺制备缺黄芪的阴性样品,再按 "1.4.2.2" 项下方法,制成阴性样品溶液。

1.4.2.4 标准曲线的制备 取 1.4.2.1 下的对照品溶液,吸取 2、5、10、15、20μL 进样,按上述色谱条件测定,记录峰面积。以峰面积的对数值为纵坐标,进样量的对数值为横坐标,得黄芪甲苷回归方程 $Y=1.3092X+6.3708(r=0.9997,n=5)$ 。结果表明黄芪甲苷在 1.0μg~10.0μg 范围内线性良好。

2 结果

2.1 TLC 鉴别

2.1.1 丹参 取肾衰康浓缩丸 10g,粉碎,加甲醇 30 ml,超声处理 30min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10ml,微热使溶解,用乙醚振摇提取 3 次,每次 30ml,合并乙醚层,水浴挥干,残渣加乙酸乙酯 1ml 使溶解,作为供试品溶液;另取丹参对照药材 1g,同法制成对照药材溶液;另取丹参酮 IIA 对照品,加乙酸乙酯制成每 1ml 含 1mg 的溶液,作为对照品溶液;另取除丹参外的其他药味,同法制成阴性溶液。照薄层色谱法实验,吸取上述四种溶液各 10μL,分别点于同一含羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 薄层板上,以石油醚 (60~90℃) - 乙酸乙酯 (4:1) 为展开剂,展开,取出,晾干。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的红色斑点,阴性样品无干扰,见图 1。

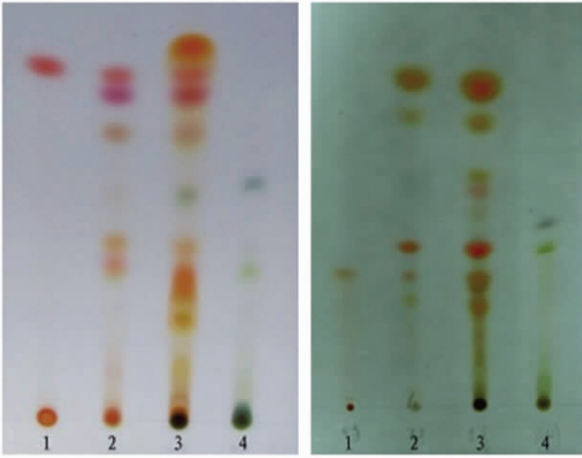


图 1 Figure 1 图 2 Figure 2

1-Astragaloside IV 2-standard crude drug 3-sample 4-negative
图 1 丹参酮 IIA TLC 鉴别图 图 2 大黄酸 TLC 鉴别图

Figure 1 TLC chromatograms of Tanshinone IIA Figure 2 TLC chromatograms of Rhein

2.1.2 大黄 取肾衰康浓缩丸 10g,粉碎,加甲醇 30 ml,超声处理 30min,滤过,滤液蒸干,残渣加水 10ml 使溶解,,加盐酸 1ml,超声 10min,用乙醚振摇提取 2 次,每次 40ml,合并乙醚

层,水浴挥干,残渣加三氯甲烷 1ml 使溶解,作为供试品溶液;另取大黄对照药材 0.1g,同法制成对照药材溶液;取大黄酸对照品,加甲醇制成每 1ml 含 1mg 的溶液,作为对照品溶液;再取除大黄外的其他药味,同法制成阴性溶液。照薄层色谱法实验,吸取上述四种溶液各 5μL,分别点于同一含羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 H 薄层板上,以石油醚 (30~60℃) - 甲酸乙酯 - 甲酸 (15:5:1) 上层溶液为展开剂,展开,取出,晾干。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显相同的橙黄斑点,氨气中熏 10min,斑点变红色,阴性样品无干扰,见图 2。

2.2 专属性试验

分别吸取对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液,按照 "1.4.2.1" 项下色谱条件进样。结果表明,阴性样品无干扰,见图 3。

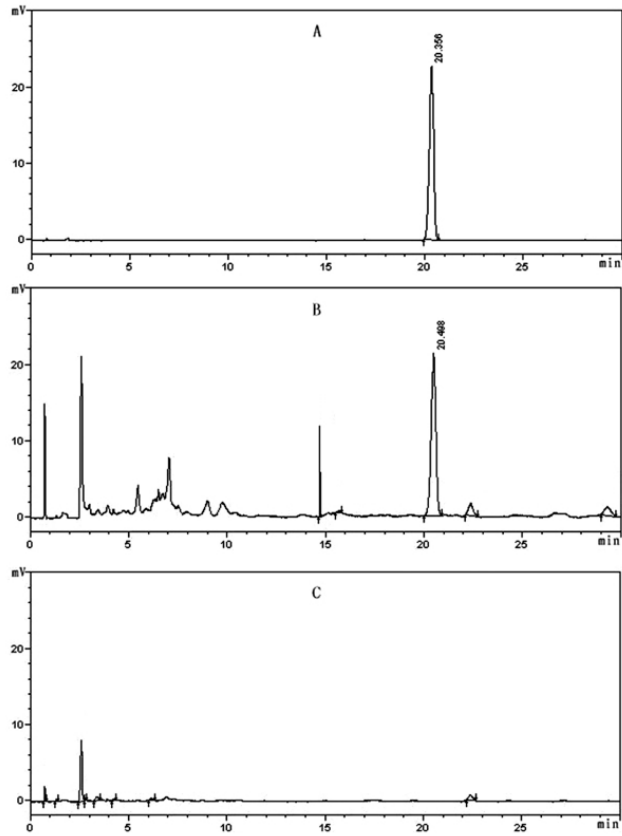


图 3 黄芪甲苷高效液相色谱图
A.对照品 B.供试品 C.阴性对照品

Figure 3 HPLC chromatograms of Astragaloside IV (A), sample (B) and negative (C)

2.3 精密度试验

取 "1.4.2.1" 项下的对照品溶液,连续进样 6 次,测定黄芪甲苷峰面积 RSD 为 1.25%,符合要求。

2.4 重复性试验

取同一批号样品 20 g,精密称定,共 6 份,分别按 "1.4.2.1" 项供试品溶液制备操作,按 "1.4.1" 项下色谱条件分析测定。结果样品中黄芪甲苷平均含量为 0.2543mg /g,RSD 为 1.83%。

2.5 稳定性试验

取同一批号样品 20g,精密称定,按照 "1.4.2.1" 项下供试

品溶液制备操作,按"1.4.1"项下色谱条件分析,分别在0,2,4,8,12,24h进样,测得峰面积的RSD为1.42%。结果表明供试品在24h内稳定性良好。

2.6 加样回收率试验

取已知含量的同一批肾衰康浓缩丸粉碎,取6份,每份10g,精密称重,分别加入0.5mg/ml的对照品溶液5.00ml,按供试品溶液制备项下操作,按上述色谱条件测定含量,计算回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)
Table 1 Results of recovery test (n=9)

Sampling amount (g)	Sample contents (mg)	Sample amounts (mg)	Measurd total(mg)	Recovery(%)	Average recovery (%)	RSD% (n=6)
10.1213	2.5738	2.5	5.0331	98.37	99.81	1.73
10.0342	2.5517	2.5	5.0627	100.44		
10.3095	2.6217	2.5	5.1054	99.35		
9.8972	2.5169	2.5	5.0033	99.46		
9.879	2.5399	2.5	5.0778	101.52		
10.1519	2.5816	2.5	5.0746	99.74		

Note: The astragaloside iv content in sample is 0.2543mg /g

2.7 样品含量测定

取3个批号的肾衰康浓缩丸样品,按照"1.4.2.1"项下供试

品溶液制备操作,按"1.4.1"项下色谱条件分析测定,计算含量,结果见表2。

表2 样品中含量测定结果
Table 2 Results of samples assay

Batch number	Astragaloside iv content in sample(mg/g)	Average content(mg/g)
100308	0.2543	0.2493
100509	0.2426	
100617	0.2511	

3 讨论

因为药材等原因,暂定肾衰康浓缩丸中黄芪甲苷含量不低于0.2mg/g,为本品的质量标准制定提供参考。

目前黄芪甲苷的含量测定以采用比色法、薄层扫描法^[1]、HPLC-UV法^[2]、HPLC-示差折光检测器等常规方法为主,但因其其在200nm左右有微弱吸收,导致测定很不稳定^[3]。ELSD是通用型质量检测器,其对无紫外吸收或紫外吸收较弱的皂苷类化合物灵敏度高,结果可靠,可作为黄芪药材及其制剂品质评价的依据。因此我们在应用HPLC-ELSD法过程中,不受外界环境干扰,试剂在检测中全部蒸发,灵敏度、稳定性及重现性较好^[4-5]。宋平顺^[6-8]等研究认为甲醇提取黄芪甲苷效果较好,且超声提取比回流提取、索氏提取提取率高,故本研究采用甲醇超声提取,本研究试采用药典黄芪含量测定的方法^[9]、甲醇-水(80:20)^[10]、乙腈-水(30:70)为流动相,结果因本品成分复杂,前三种方法无法达到基线分离,乙腈比例为乙腈-水(30:70)时,本品中黄芪甲苷达到基线分离,且峰形对称,理论塔板大于10000,方法重现性好,专属性强,精密度高。TLC鉴别本品中丹参、大黄斑点清晰、阴性无干扰,方法操作简单、重现性好。本方法可用于控制肾衰康浓缩丸质量。

参 考 文 献(References)

[1] 宋金荣.薄层扫描法测定归脾丸中黄芪甲苷的含量[J].齐鲁药事,

2004,4 22-23
Song Jin-rong. Determination of Astragaloside IV in Guipi Pills by TLC[J]. Qi lu pharmaceutical aaffairs, 2004,4:22-23
[2] Yan-li Zhang.Quantitative analysis of astragaloside IV in traditional Chinese medicine'Huang-Qi-Si-Wu' Capsules by HPLC/UV[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2010,3:223-228
[3] 王慧森. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法在中药研究中的应用[J].中医研究,2008,08 51-64
Wang Hui-sen.The application of High Perform ance L iqu id Chrom atography in Traditional Chinese Medicinal Research [J]. Traditional Chinese Medicinal Research, 2008,08:61-64
[4] 李峰,裴俊俊.HPLC-ELSD 法对肺痹片中黄芪甲苷的含量测定[J].山东中医药大学学报,2007,31 (4) 507-509
Li Feng, Fei Jun-jun. Determination of astragaloside IV in Radix Astragali of Feilao tablets by HPLC-ELSD[J]. Journal of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2007,31 (4) :507-509
[5] 梁卫青.HPLC-ELSD 测定视脉宁颗粒中黄芪甲苷的含量[J].中国中医药科技,2010,05:432-433
Liang Wei-qing. Determination of astragaloside IV in Shi Mailing particle by HPLC-ELSD [J].Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2010,05:432-433
[6] 宋平顺,卫玉玲,赵建邦,等.HPLC-ELSD 测定黄参胶囊中黄芪甲苷的含量[J].中成药,2008,30(4) 629-630 (下转第 2782 页)

- processing by p53 [J]. Nature, 2009, 460(7254): 529-533
- [9] Xu L, Yao X, Chen X, et al. Msk is required for nuclear import of TGF- β /BMP-activated Smads [J]. J Cell Biol, 2007, 178(6): 981-994
- [10] Yao X, Chen X, Cottonham C, et al. Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (33): 22867-22874
- [11] Yu B, Bi L, Zheng B, et al. The FHA domain proteins DAWDLE in Arabidopsis and SNIP1 in humans act in small RNA biogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(29): 10073-10078
- [12] Newman M A, Thomson J M, Hammond S M. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing [J]. RNA, 2008, 14(8): 1539-1549
- [13] Piskounova E, Viswanathan S R, Janas M, et al. Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28 [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (31): 21310-21314
- [14] Roush S, Slack F J. The let-7 family of microRNAs [J]. Trends Cell Biol, 2008, 18(10): 505-516
- [15] Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, et al. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(8): 987-993
- [16] Ozsolak F, Poling L L, Wang Z, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters [J]. Genes Dev, 2008, 22(22): 3172-3183
- [17] Corcoran D L, Pandit K V, Gordon B, et al. Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data [J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5279
- [18] Diederichs S, Haber D A. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression [J]. Cell, 2007, 131(6): 1097-1108
- [19] Kim M S, Oh J E, Kim Y R, et al. Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers [J]. J Pathol, 2010, 221(2): 139-146
- [20] Qi H H, Ongusaha P P, Myllyharju J, et al. Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability [J]. Nature, 2008, 455(7211): 421-424
- [21] Lujambio A, Esteller M. How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs [J]. Cell Cycle, 2009, 8(3): 377-382
- [22] Lujambio A, Calin G A, Villanueva A, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(36): 13556-13561
- [23] Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, et al. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function [J]. Cancer Res, 2007, 67(4): 1419-1423
- [24] Nasser M W, Datta J, Nuovo G, et al. Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1 [J]. J Biol Chem, 2008, 283 (48): 33394-33405
- [25] Davis B N, Hilyard A C, Nguyen P H, et al. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha [J]. Mol Cell, 2010, 39(3): 373-384

(上接第 2769 页)

- Song Ping-shun, Wei Yu-ling, Zhao Jian-bang. Determination of astragaloside **IV** in Radix Astragali of Ginseng capsule by HPLC-ELSD [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2008,30(4):629-630
- [7] 潘涛, 夏新华. HPLC-ELSD 法测定胎乐颗粒中黄芪甲苷的含量[J]. 中国医药导报, 2010, 7 (13) :54-55
- Pan Tao, Xia Xin-hua. Content determination of Astragaloside in Taile Granules by HPLC-ELSD [J]. China Medical Herald, 2010, 7 (13) :54-55
- [8] 王景. HPLC 测定归脾丸(浓缩丸)中黄芪甲苷的含量[J]. 中国当代医药, 2010, 26 :46-47
- Wang Jing. Determination of Astragaloside IV in Guipi pill (Concentrated Pills) by HPLC[J]. China Modern Medicine, 2010, 26:46-47
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2010 年版(一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2010 :283
- State pharmacopoeia committee. prc codex[M]. Bei Jing: chinese medical science press, 2010:283
- [10] 郑国华, 冯其麟. 高效液相色谱-蒸发光散射检测器法测定复方甲亢片黄芪甲苷含量[J]. 医药导报, 2008, 27(11) :1398-1399
- Zheng Guo-hua, Feng Qi-lin. Determination of astragaloside **IV** in Tablet-Fufangjiakang by HPLC-ELSD [J]. Herald of Medicine, 2008, 27(11) :1398-1399