

· 研究报告 ·

益视明目颗粒质量标准研究

缪 婧, 童晓东 (南通市中医院, 江苏 南通 226001)

[摘要] **目的** 建立益视明目颗粒的质量标准。**方法** 用薄层色谱法(TLC)鉴别制剂中的枸杞子、丹参;用高效液相色谱法(HPLC)定量测定丹参素钠的含量。色谱柱:Kromasil C₁₈柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流速:0.4 ml/min;检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μl;流动相:甲醇-0.5%醋酸水溶液(10:90)。**结果** 薄层色谱斑点清晰可见、阴性干扰小,可用于鉴别益视明目颗粒中的枸杞、丹参;丹参素钠在2.00~60.00 μg/ml范围内线性关系良好, $r=0.9997(n=6)$,平均加样回收率105.6%,RSD=1.60%。**结论** 建立的方法简便、准确、可靠性高、重现性好,可作为控制益视明目颗粒质量的有效方法。

[关键词] 益视明目颗粒;质量标准;丹参素钠

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)04-0355-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.017

The quality standard research for YI SHI MINGMU granules by HPLC method

MIAO Jing, TONG Xiaodong (Nantong Hospital of TCM, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective** To establish the quality standard for YI SHI MINGMU granules. **Methods** TLC method was used to identify Lycium barbarum L and Salvia miltiorrhiza. HPLC method was used to quantitatively analyze the concentration of Tanshinol sodium. The analysis was carried out on a column of Kromasil C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm) with a mobile phase of methanol and 0.5% acetic acid at the flow rate of 0.4 ml/min. Column temperature was 30 ℃. The detection wavelength was 280 nm. **Results** The linearity range of Tanshinol sodium was 2.00~60.00 μg/ml, $r^2=0.9997(n=6)$, with the average recoveries of 105.62%, RSD=1.60%. **Conclusion** This method is accurate, simple, reliable and reproducible. It can be used for the quality control of YI SHI MINGMU granules.

[Key words] YI SHI MINGMU granules; quality standard; Tanshinol sodium

益视明目颗粒是南通市中医院的院内制剂,由本院老中医经总结历代论述经验并结合现代制备工艺制备,由枸杞子、当归、丹参、党参、女贞子等十六味药材组成,具有滋阴补肾、补血养肝、安神定志等功效,可用于治疗青少年远视以及真、假性近视,视疲劳,白内障初起以及术后恢复,视网膜色素变性等。枸杞子、丹参等几味药为方中君药,以枸杞多糖(LBP)为主成分的枸杞子滋补肝肾、益精明目^[1,2],以脂溶性丹参酮、水溶性丹参酚酸和丹参素为主要成分的丹参活血通经、养气安神^[3]。结合益视明目颗粒的制剂工艺,选用薄层色谱鉴别法(TLC)对君药枸杞子、丹参做定性鉴别,采用高效液相色谱法(HPLC)定量测定益视明目颗粒中丹参(丹参素)的含量,为益视明目颗粒的质量标准制定提供科学、合

理的依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 PTT-A200 电子天平(福州华志科技仪器厂),DL-I-15 台式封闭电炉(天津市泰斯特仪器厂),HHS-11.2, DYX-DHS 电热恒温水浴锅(江苏省张家港市医疗器械厂),FS-300N 超声波萃取仪(上海生析超声仪器厂),ZF-I 型三用紫外分析仪(上海顾村光电仪器厂),电子分析天平(Newclassic ME-104,上海梅特勒-托利多仪器厂),台式离心机(TD4,湖南凯达科学仪器厂),超纯水机(EPED-S2-30DH,南京易普达科技),戴安高效液相色谱仪(U3000,赛默飞世尔科技)。

1.2 试药 益视明目颗粒(批号:20151207、20160115、20160321),丹参素钠对照品(中国药品生物制品检定所,批号:10085-200507),枸杞子、丹参对照药材,薄层层析用硅胶G薄层板(中国青岛海洋化工厂),甲醇为进口色谱纯(TEDIA, LOT 15045040),其余试剂均为分析纯。

[作者简介] 缪 婧,本科,主管药师.Tel:(0513)85126377;Email:whyhclear@163.com

[通讯作者] 童晓东.Tel:(0513)85126140;Email:924822769@qq.com

2 薄层鉴别

2.1 枸杞子的薄层鉴别

2.1.1 供试品溶液的制备 取本品 15.0 g, 加热水 50 ml 溶解, 放置冷却, 滤过, 滤液用乙酸乙酯共 45 ml 分别振摇提取 3 次, 合并乙酸乙酯溶液, 水浴挥干, 残渣溶解于 1 ml 乙酸乙酯, 作为供试品溶液。

2.1.2 对照药材溶液的制备 取枸杞子对照药材 2.0 g, 加水 50 ml, 煎煮 15 min, 放置冷却, 滤过, 按“2.1.1”项下方法制成对照药材溶液。

2.1.3 阴性对照溶液的制备 取除枸杞子以外的其余药材, 按照制剂的提取工艺制成不含枸杞子的益视明目颗粒, 按“2.1.1”项下方法制得阴性对照溶液。

2.1.4 枸杞子的薄层层析 取枸杞子对照药材溶液、益视明目颗粒供试品溶液、阴性对照品溶液各 5 μl, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 展开剂为甲苯-乙酸乙酯-甲酸(10 : 4 : 0.2), 展开后取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。在薄层色谱中, 供试品在对照药材相应位置显相同荧光色斑点, 而阴性样品在对照药材相应位置无斑点, 实验结果见图 1。

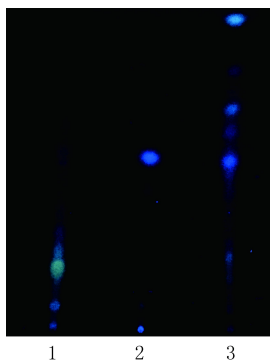


图 1 枸杞子的薄层鉴别

1. 阴性对照; 2. 对照药材; 3. 供试品

2.2 丹参的薄层鉴别

2.2.1 供试品溶液的制备 取本品 15.0 g, 加热水 50 ml 溶解, 放置冷却过滤, 滤液用 10% 盐酸调 pH 至 2.0, 用乙酸乙酯共 45 ml 分别振摇提取 3 次, 合并乙酸乙酯溶液, 水浴挥干, 残渣用 1 ml 甲醇溶解, 作为供试品溶液。

2.2.2 对照药材溶液的制备 取丹参对照药材 2.0 g, 加入水 50 ml, 煎煮 15 min, 放置冷却滤过, 按“2.2.1”项下方法制成对照药材溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 精密称取丹参素钠对照品 1 mg, 加入甲醇制成浓度为 1 mg/ml 的对照品

溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 取除丹参以外的其余药材, 按照制剂的提取工艺和处方比例, 制得缺丹参的益视明目颗粒, 按“2.2.1”项下方法制得阴性对照溶液。

2.2.5 丹参的薄层层析 取丹参对照药材溶液、益视明目颗粒供试品溶液、丹参素钠对照溶液、阴性对照溶液各 5 μl, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 展开剂为氯仿-丙酮-甲酸(8 : 5 : 2), 经展开后取出, 晾干, 在氨蒸汽环境下熏至板上斑点显色清晰, 置紫外光灯(365 nm)下检视。在薄层色谱中, 供试品在对照药材及对照品相应位置显相同荧光色斑点, 阴性样品在对照药材相应位置无斑点, 实验结果见图 2。

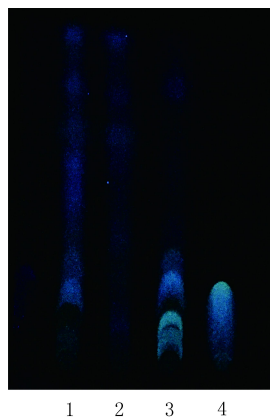


图 2 丹参的薄层鉴别

1. 供试品; 2. 阴性对照; 3. 对照药材; 4. 对照品

3 含量测定

3.1 色谱条件 色谱柱: Kromasil C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流速: 0.4 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 280 nm; 进样量: 10 μl; 流动相: 甲醇-0.5% 的醋酸水溶液(10 : 90)。

3.2 溶液的制备

3.2.1 对照品溶液 精密称取丹参素钠对照品(五氧化二磷干燥 24 h)适量, 加入 50% 甲醇配制成浓度为 20 μg/ml 的溶液, 即得对照品溶液。

3.2.2 供试品溶液 精密称取益视明目颗粒 5 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇 25 ml, 密封瓶塞, 称重, 超声 25 min, 静置冷却, 再称重, 用 50% 甲醇补足失重, 过滤, 滤液为供试品溶液。

3.2.3 阴性对照溶液 取除丹参以外的其余药材, 按照制剂的提取工艺和处方比例, 制得缺丹参的益视明目颗粒, 按“2.2.1”项下方法制得阴性对照溶液。

3.3 系统适用性试验 按照以上色谱条件, 精密吸

取益视明目颗粒供试品溶液、丹参素钠对照品溶液、阴性对照溶液各 10 μl, 分别注入高效液相色谱仪。供试品色谱中, 在与对照品保留时间一致的位置上,

有相同色谱峰, 分离效果良好, 且阴性对照品在该处无干扰。理论塔板数按丹参素钠峰计算应不低于 3 000, 丹参素钠分离度为 6.40(图 3)。

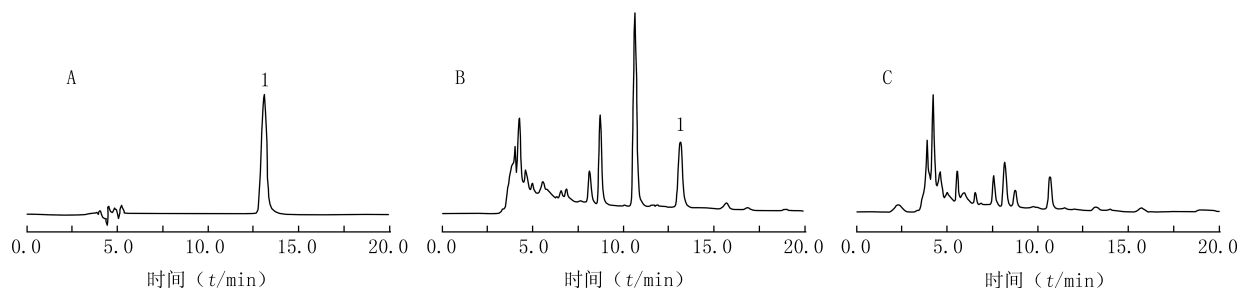


图3 益视明目颗粒 HPLC 图

A. 对照品; B. 供试品; C. 阴性对照; 1. 丹参素钠

3.4 线性关系的考察 精密称取丹参素钠对照品, 加 50% 甲醇制成浓度为 2.00、6.00、10.00、20.00、40.00、60.00 μg/ml 的溶液, 在上述色谱条件下, 分别精密吸取 10.0 μl 加样注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 以丹参素钠峰面积为 Y , 进样浓度 (μg/ml) 为 X , 计算得回归方程 $Y = 0.196X - 0.1268$ ($r = 0.9997$)。线性范围: 2.00 ~ 60.00 μg/ml。

3.5 精密度试验 在上述色谱条件下, 精密吸取丹参素钠 (20.00 μg/ml) 对照品溶液 10 μl, 重复进样 6 次, 计算丹参素钠峰面积的相对标准偏差, $RSD = 0.46\%$, 表明该方法精密度良好。

3.6 重复性试验 精密称取批号: 20160321 的供试品共 6 份, 按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液, 依“3.1”项下条件, 测定峰面积, 并计算含量。结果显示, 丹参素钠的含量分别为 0.231 7、0.228 8、0.233 1、0.233 0、0.228 3、0.228 3 mg/g, 平均含量 0.230 5 mg/g, $RSD = 1.01\%$, 表明重复性良好。

3.7 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、6、8 h 进样 10 μl, 记录丹参素钠峰面积, 计算 RSD 为 0.29%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

3.8 加样回收率试验 精密称取已知含量的样品 6 份, 每份 0.45 g, 加入丹参素钠对照品溶液 5.00 ml, 按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液, 依“3.1”项下条件, 测定峰面积, 并计算加样回收率。结果见表 1。

3.9 含量测定 取 3 批样品 (批号: 20151207、20160115、20160321), 每批 3 份, 按“3.2.2”项下方法制备供试品溶液, 依“3.1”项下条件, 测定峰面积, 并计算含量, 结果见表 2。

表 1 益视明目颗粒加样回收率试验结果 ($n=6$)

序号	样品含量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.099 7	0.100 0	0.207 2	107.5	105.6	1.60
2	0.101 2	0.100 0	0.205 8	104.6		
3	0.100 6	0.100 0	0.207 8	107.2		
4	0.100 9	0.100 0	0.207 3	106.4		
5	0.099 7	0.100 0	0.202 9	103.2		
6	0.098 7	0.100 0	0.203 5	104.8		

表 2 益视明目颗粒含量测定结果 (mg/g)

批号	丹参素钠含量	平均含量
20151207	0.231 6	0.232 4
	0.232 9	
	0.232 8	
20160115	0.2291	0.228 8
	0.228 6	
	0.228 6	
20160321	0.229 7	0.230 3
	0.231 8	
	0.229 3	

4 讨论

本实验采用 TLC 法对益视明目颗粒中丹参进行了薄层鉴别, 由于丹参素在自然界中不稳定, 因此选择其钠盐作为对照品^[4], 在选择展开剂的过程中加入了少量甲酸, 改变其存在状态。同时, 在进行含量测定的过程中, 使用了酸性流动相。通过多次实验, 调整了流动相比率和流速, 确保目标成分在适合的保留时间分离, 并与相邻峰有较好的分离度, 最终确定流动相为甲醇-0.5% 醋酸水溶液 (10 : 90), 流速为 0.4 ml/min。该检测方法操作简便, 目标峰分离度好且峰形对称, 方法学验证结果良好, 适用于益视明目颗粒中丹参素的含量测定。

益视明目颗粒对改善视疲劳具有良好的临床基础,使用人群广泛。作为院内制剂,其质量控制方法已落后于市场同类产品,应及时更新其检测标准。本实验进一步完善了益视明目颗粒的质量控制方法,以使其更安全、有效地为患者使用。

【参考文献】

[1] 汪建龙.枸杞多糖药理作用的研究进展[J].时珍国医国药,

2005,16(10):1032-1033.

[2] 郑汉成,蔡少青.药用植物学与生药学[M].4版.北京:人民卫生出版社,2004:393.
 [3] 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,2015:76-77.
 [4] 闫根全.丹参素钠的提取及注射用丹参素钠的研制[D].成都:四川大学,2007:6-123.

[收稿日期] 2016-10-16 [修回日期] 2017-01-06

[本文编辑] 李睿旻

(上接第340页)

极化能引起细胞凋亡因子的释放,最终导致细胞死亡。Hseu等^[11]研究发现,线粒体损伤与初期ROS的水平升高有关,随之引起细胞色素c释放进入细胞质和caspases激活,从而导致细胞凋亡。

本研究结果发现,用泽漆提取物处理MDA-MB-231细胞,可引起ROS的大量释放。PI染色法试验表明,泽漆提取物最终导致MDA-MB-231细胞的凋亡。而提前加入ROS抑制剂NAC,显著抑制了细胞凋亡,进一步证明泽漆提取物诱导的细胞凋亡是由其引起的ROS大量释放导致的。线粒体途径的细胞凋亡可由细胞支架破裂、DNA损伤和ROS蓄积引起^[12]。Caspase-9是线粒体途径的启动因子,可由细胞色素c的释放或与Apaf-1结合而激活。激活后的caspase-9随之募集和激活执行caspase,主要为caspase-3。Caspase-3由procaspase-3裂解为激活形式,可剪切PARP,从而导致细胞最终死亡^[7]。研究发现,PARP是一种DNA修复酶,其碎片可作为线粒体途径细胞凋亡的标志性产物^[10]。细胞凋亡过程中,发现procaspase-9发生裂解,而caspase-3则是引起细胞凋亡的执行因子^[12]。Western blot试验结果显示,泽漆提取物处理后的细胞procaspase-9、procaspase-3和PARP水平明显降低,caspase-3及PARP水平明显升高,且呈剂量依赖性,表明泽漆提取物很可能通过线粒体途径引起MDA-MB-231细胞凋亡。而提前加入ROS抑制剂NAC和caspase抑制剂Z-VAD-FMK能使泽漆提取物诱导凋亡的DNA碎片明显减少,进一步证明了上述推断。综上所述,泽漆提取物可有效抑制MDA-MB-231细胞的生长,诱导其凋亡,其作用机制可能与ROS生成过量所致的线粒体损伤途径有关。

【参考文献】

[1] Campbell RA, Bhat-nakshatri P, Patel NM, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance

[J]. J Biol Chem, 2001, 276(13): 9817-9824.

[2] Hseu YC, Lee CC, Chen YC, et al. Antrodia salmonea in submerged culture exhibits antioxidant activities in vitro and protects human erythrocytes and low-density lipoproteins from oxidative modification[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 66(4): 150-157.
 [3] Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers[J]. Nature, 2012, 486(7403): 395-399.
 [4] Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options[J]. Lancet Oncol, 2007, 8(3): 235-244.
 [5] Wang K, Zhang C, Bao J, et al. Synergistic chemopreventive effects of curcumin and berberine on human breast cancer cells through induction of apoptosis and autophagic cell death[J]. Sci rep, 2016, 6: 26064.
 [6] Jeong HS, Choi HY, Lee ER, et al. Involvement of caspase-9 in autophagy-mediated cell survival pathway[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(1): 80-90.
 [7] Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors[J]. Cell, 2000, 102(1): 1-4.
 [8] 杨莉,陈海霞,高文远.泽漆化学成分及药理作用研究进展[J].中草药,2007,38(10):1585-1589.
 [9] D'Anneo A, Carlisi D, Lauricella M, et al. Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(10): e891.
 [10] Elumalai P, Gunadharini DN, Senthikumar K, et al. Induction of apoptosis in human breast cancer cells by nimbolide through extrinsic and intrinsic pathway[J]. Toxicol Lett, 2012, 215(2): 131-142.
 [11] Hseu YC, Lee CC, Chen YC, et al. The anti-tumor activity of Antrodia salmonea in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells is mediated via the induction of G(1) cell-cycle arrest and apoptosis in vitro or in vivo[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 153(2): 499-510.
 [12] McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013, 5(4): a008656.

[收稿日期] 2017-05-27 [修回日期] 2017-07-03

[本文编辑] 李睿旻