

· 研究报告 ·

肾衰宁颗粒指纹图谱研究及3种有效成分含量测定

宋新华¹, 陈旭娇², 邓冯沂¹, 高守红³, 彭 辉⁴ (1. 宜春学院化学与生物工程学院, 江西 宜春 336000; 2. 浙江大学第二附属医院肾内科, 浙江 杭州 310002; 3. 海军军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003; 4. 宜春市人民医院, 江西 宜春 336000)

[摘要] 目的 通过高效液相色谱法建立肾衰宁颗粒的指纹图谱, 并测定肾衰宁颗粒中3种有效成分(橙皮苷、丹酚酸B和大黄酚)的含量, 为肾衰宁颗粒的质量控制提供依据。方法 采用SunFire™ C₁₈色谱柱, 乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速1 ml/min, 检测波长254 nm, 柱温25℃, 建立肾衰宁颗粒的指纹图谱, 并对3种有效成分的含量进行测定。结果 测定10批肾衰宁颗粒的色谱图, 确立的标准指纹图谱上有22个共有峰, 各批次的指纹图谱与对照图谱之间相似度均不小于0.90, 相似度良好。方法学验证结果表明重复性、稳定性、精密度的结果均符合要求。结论 本法操作简单、可靠, 适用于肾衰宁颗粒指纹图谱的建立及含量测定, 为肾衰宁颗粒的质量控制提供依据。

[关键词] 肾衰宁颗粒; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 含量测定

[中图分类号] R284.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2020)03-0259-05

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.201911005

Research on the fingerprint and three active components assay in Shenshuaining granules by HPLC

SONG Xinhua¹, CHEN Xujiao², DENG Fengyi¹, GAO Shouhong³, PENG Hui⁴ (1. College of Chemical and Biological Engineering, Yichun University, Yichun 336000, China; 2. Department of Nephrology, School of Medicine, 2nd Affiliated Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310002, China; 3. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200003, China; 4. People's Hospital of Yichun City, Yichun 336000, China)

[Abstract] **Objective** To establish the fingerprint spectrum and assay three active components (hesperidin, salvianolic acid B and chrysophanol) in Shenshuaining granule by HPLC method. **Methods** The chromatographic separation was achieved on SunFire™ C₁₈ column with acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution as mobile phase. Gradient elution program was applied with flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength at 254 nm and the column temperature at 25℃. The fingerprint spectrum was established and three active components in Shenshuaining granule were assayed. **Results** There were 22 common peaks on the fingerprints after analyzing chromatograms from 10 batches of Shenshuaining granules. Good fingerprint similarities (≥ 0.9) between different batches and the control chromatogram were found. This method has great repeatability, stability and precision, which meets all the assay requirements. **Conclusion** A simple and reliable HPLC method was developed, which is suitable for the fingerprint establishment of Shenshuaining granules. It provides a method for the quality control of Shenshuaining granules.

[Key words] Shenshuaining granules; HPLC; fingerprinting; content determination

肾衰宁颗粒由太子参、黄连、制半夏、陈皮、茯苓、大黄、丹参、牛膝、红花、甘草等十味中药制成; 具有补气健脾, 活血化瘀, 祛浊的功效^[1]。有文献表明, 肾衰宁在治疗慢性肾脏疾病中疗效较为显

著^[2]; 在尿毒症腹膜透析患者的治疗过程中能够降低血清硫酸吡啶酯浓度^[3]; 对于慢性肾脏病的IV期患者, 在西医基础治疗的同时服用肾衰宁颗粒, 可以明显改善肾功能, 同时提升患者的治愈率, 具有较高的临床使用价值^[4]。由于中药成分复杂^[5], 使得如何控制中药的质量成为十分重要的问题。指纹图谱是在了解中药物质整体作用的基础上, 通过光谱和色谱技术获得中药化学成分的光谱或色谱图, 以鉴别中药的真伪, 评价质量的一致性和产品的稳定性, 其具有信息量大、特征性强、完整性和模糊性等特点^[6]。指纹图谱中的质量控制技术既

[基金项目] 上海市临床药学重点专科建设项目(2016-40044-002); 上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设项目(2016ZB0303)

[作者简介] 宋新华, 硕士研究生, Email: songxinhua0317@163.com

[通讯作者] 高守红, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药物分析与临床药学, Tel: (021)51322403, Email: gaoshouhong@126.com; 彭辉, 教授, 研究方向: 内分泌及代谢疾病, Email: phycjx818@163.com

能保证中药的功效,又在实现中药现代化过程中起关键性作用^[7]。因此,本实验以10个批次的肾衰宁颗粒为研究对象,拟建立肾衰宁颗粒的指纹图谱,对肾衰宁颗粒进行质量评价。

肾衰宁颗粒是由十味中药组成的复方制剂,其化学成分十分复杂,且许多复方治疗疾病的药物基础并不明显,因此检测成分必须是发挥药效的有效成分^[8],本实验针对大黄中的大黄酚(chrysophanol)^[9-10]、丹参中的丹酚酸 B(salvianolic acid B)^[11]、陈皮中的橙皮苷(hesperidin)^[9, 12]3种指标性成分,进行HPLC法含量测定。在多成分的质量控制检测成本高而对照品紧缺的情况下,能较大程度地节约检验成本,又可较全面地控制该制剂的质量,保证临床用药的有效性和安全性,同时为肾衰宁颗粒的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),包含 G1311C 四元泵, G1329B 自动进样器, G1316A 柱温箱, G4212B-DAD 二极管阵列检测器, Chemstation 色谱工作站;光电分析天平(德国 Sartorius 公司, CPA 225D 型),最大载荷 220 g,分度值 0.01 mg;冷冻真空浓缩仪(丹麦 Labogene 公司, ScanVac ScanSpeed 40 型);超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司, SK7200H 型);涡旋混匀器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司, Vortex QL-901 型)。

1.2 试剂

肾衰宁颗粒(德元堂制药集团,批号:51103111、51103009 346、51103010 471、51103011 593、51103105、51103018 486、41103033 563、51103110、61103102、61103101)。蜕皮激素(ecdysterone,批号:P11N6F5706)、甘草苷(liquiritin,批号:2O1027BA14)、甘草酸(glycyrrhizic acid,批号:230A6B1)、大黄酚(chrysophanol,批号:T31O6F5345)、丹酚酸 B(salvianolic acid B,批号:Y14M7H14804)、橙皮苷(hesperidin,批号:K02M3C1)对照品,均由上海源叶有限公司提供。大黄素(modin,批号:110756-200110)、盐酸小檗碱(berberine hydrochloride,批号:09030522)对照品,由中国食品药品检定研究院提供。甲醇、乙腈、甲酸,均为德国 Merck 公司生产,色谱纯。二氯甲烷,色谱纯。水为纯净水,娃哈哈公司生产。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters SunFire™ C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相 A: 乙腈;流动相 B: 0.1% 甲酸溶液,梯度洗脱。流速: 1 ml/min。柱温: 25 °C。进样量: 10 μl。检测波长: 254 nm。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间(t/min)	乙腈(%)	0.1%甲酸溶液(%)
0	5	95
1	23	77
18	25	75
19	30	70
31	75	25
60	85	15

2.2 对照品溶液的制备

精密依次称取丹酚酸 B、橙皮苷、大黄素标准品 10.25、10.35、10.05 mg,分别置于 10 ml 容量瓶中,以纯甲醇定容至刻度,摇匀,得储备液并将其分装后储存于-20 °C 的冰箱中。精密称取 10.10 mg 大黄酚,置于 10 ml 容量瓶中,加入少量二氯甲烷溶解,超声处理 3 min,然后用纯甲醇稀释至刻度,摇匀,得到对照品的储备液,置于-20 °C 冰箱保存。

2.3 供试品溶液的制备

取肾衰宁颗粒适量,研磨成细粉,混合均匀,精密称取 0.10 g,加适量 70% 甲醇溶液使其溶解,超声 45 min,再用 70% 甲醇溶液定容至 2 ml,冷却,过 0.45 μm 微孔滤膜后,取续滤液进样分析。

2.4 肾衰宁颗粒 HPLC 指纹图谱的建立

2.4.1 精密度试验

取肾衰宁颗粒(批号:41103033 563),按照“2.3”项制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下连续进样 5 次,通过大黄素(7号色谱峰)作为参照峰,确定相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间的 RSD 在 1.0% 以内,相对峰面积的 RSD 在 2.0% 以内,表明进样仪器的精密度良好。

2.4.2 重复性试验

取肾衰宁颗粒(批号:41103033 563),按照“2.3”项平行制备 5 份供试品溶液,测定在“2.1”项色谱条件下的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间 RSD 在 1.0% 以内,相对保留面积 RSD 在 2.0% 以内。表明该实验方法的重复性良好。

2.4.3 稳定性试验

取肾衰宁颗粒(批号: 41103033 563), 并根据“2.3”项下平行制备 5 份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下, 分别记录 0、4、8、24、36 h 的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间 RSD 在 1.0% 以内, 相对保留面积 RSD 在 2.0% 以内。表明供试样品溶液在 36 h 内稳定性好。

2.5 指纹图谱结果与分析

分别称取 10 个批次的肾衰宁粉末, 按照“2.3”项制备供试品溶液, 每个批次平行制备 3 份供试品

溶液, 记录图谱, 见图 1。利用中国药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2008A 版”的软件, 将 10 批次肾衰宁颗粒的图谱导入, 将批号为 61103102 的样品溶液用作针对相似性计算校正的参考图。结果显示, 1~9 批制剂间指纹图谱与对照图谱之间相似度均不小于 0.90, 见表 2, 表明相似度良好。对保留时间 0~60 min 内的色谱峰进行分析, 均有 22 个稳定的特征峰, 确定其为肾衰宁的共有指纹峰, 经过标准品比对, 其中, 6 号峰为橙皮苷, 14 号峰为丹酚酸 B, 21 号峰为大黄酚。

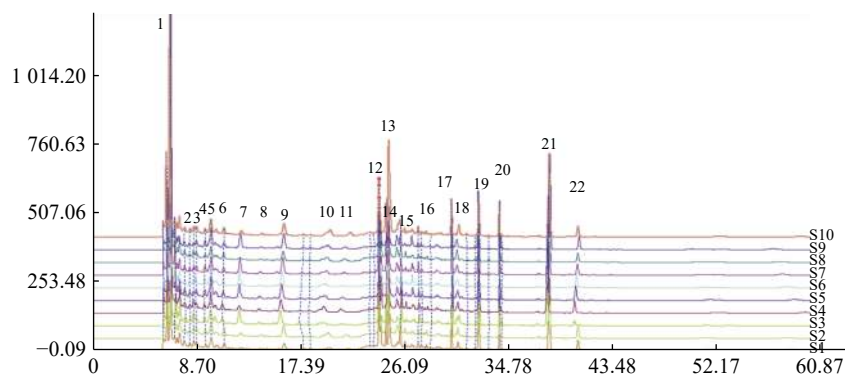


图 1 10 批肾衰宁颗粒的色谱图

表 2 10 批肾衰宁颗粒 HPLC 指纹图谱相似度

样品号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.980	0.910	0.941	0.934	0.948	0.916	0.941	0.950	0.874	0.965
S2	0.980	1.000	0.934	0.934	0.932	0.945	0.951	0.946	0.978	0.867	0.973
S3	0.910	0.934	1.000	0.952	0.947	0.937	0.972	0.940	0.945	0.914	0.973
S4	0.941	0.934	0.952	1.000	0.990	0.984	0.951	0.971	0.923	0.940	0.986
S5	0.934	0.932	0.947	0.990	1.000	0.978	0.938	0.976	0.910	0.910	0.979
S6	0.948	0.945	0.937	0.984	0.978	1.000	0.954	0.987	0.931	0.923	0.986
S7	0.916	0.951	0.972	0.951	0.938	0.954	1.000	0.949	0.966	0.913	0.979
S8	0.941	0.946	0.940	0.971	0.976	0.987	0.949	1.000	0.928	0.890	0.980
S9	0.950	0.978	0.945	0.923	0.910	0.931	0.966	0.928	1.000	0.892	0.969
S10	0.874	0.867	0.914	0.940	0.910	0.923	0.913	0.890	0.892	1.000	0.937
对照指纹图谱	0.965	0.973	0.973	0.986	0.979	0.986	0.979	0.980	0.969	0.937	1.000

2.6 肾衰宁颗粒中 3 种有效成分的含量测定

2.6.1 线性结果考察

按照“2.2”项下制备标准品溶液, 得到混合对照品色谱图见图 2。将标准品储备液用纯甲醇稀释, 丹酚酸 B 浓度梯度为: 10、20、40、80 和 100 $\mu\text{g/ml}$; 橙皮苷浓度梯度为: 40、80、160、320 和 400 $\mu\text{g/ml}$; 大黄酚浓度梯度为: 8、16、40、100 和 350 $\mu\text{g/ml}$ 。在“2.1”项色谱条件下, 分别记录 3 种成分的峰面积, 以峰面积(Y)对浓度(X)进行线性回归, 结果见表 3。

2.6.2 精密度试验

取同一对照品溶液, 根据“2.1”项下色谱条件进行测定, 重复进样 5 次, 并记录峰面积。橙皮苷、丹酚酸 B、大黄酚峰面积的 RSD 分别为 0.17%、0.20%、0.15%, 表明仪器精密度良好。

2.6.3 检测限和定量限

精密吸取橙皮苷、丹酚酸 B、大黄酚对照品溶液适量, 使用甲醇逐步稀释, 至色谱图中上述 3 种成分的峰高分别为噪音的 3 倍和 10 倍, 测得橙皮苷的检测限和定量限分别为 0.18 和 1 $\mu\text{g/ml}$; 丹酚

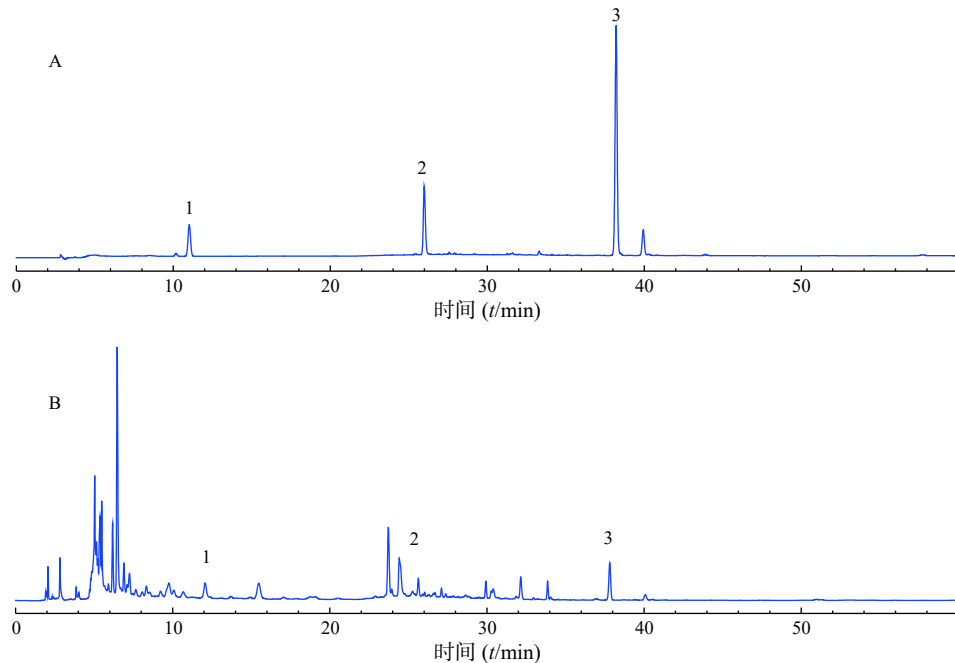


图2 混合对照品溶液(A)和供试品溶液(B)色谱图
1.橙皮苷; 2.丹酚酸 B; 3.大黄酚

表3 各成分线性关系

对照品	回归方程	<i>r</i>	线性范围($\mu\text{g/ml}$)
橙皮苷	$Y=2.3918X-2.7983$	0.9997	40~400
丹酚酸B	$Y=10.689X-5.5783$	0.9998	10~100
大黄酚	$Y=58.983X+121.99$	0.9999	7~350

酸 B 的检测限和定量限分别为 0.3 和 1.2 $\mu\text{g/ml}$; 大黄酚的检测限和定量限分别为 1 和 5 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.6.4 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号: 41103033 563), 并根据“2.1”项色谱条件在 0、2、4、8、24、36 h 测定。橙皮苷、丹酚酸 B、大黄酚的峰面积的 RSD 分别为 2.01%、2.22%、2.05%, 结果表明: 供试品在 36 h 内稳定。

2.6.5 重复性试验

取同一供试品溶液(批号: 41103033 563), 平行制备 6 份, 并根据“2.1”项色谱条件进行测定, 橙皮苷、丹酚酸 B、大黄酚的峰面积的 RSD 分别为 0.67%、2.00%、2.02%, 表明系统重复性良好。

2.6.6 加样回收率试验

精密量取肾衰宁溶液 1 ml, 分别加入 100% 含量橙皮苷对照品(理论值为 192.02 μg), 100% 含量丹酚酸 B 对照品(理论值为 62.66 μg), 100% 含量大黄酚对照品(理论值 35.22 μg), 按照“2.2”项平行制备 6 份, 并根据“2.1”的色谱条件进行测量, 按照下述公式计算加样回收率, 平均加样回收分别为

119.20%、84.69%、84.58%。结果见表 4。

回收率=(实测量-样品含量)/加入量 \times 100%。

2.6.7 样品含量测定

取 10 批肾衰宁颗粒, 按“2.2”项制备试液, 按“2.1”项色谱条件测定, 结果见表 5。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

在 190~400 nm 处全波长扫描, 盐酸小檗碱、大黄素、大黄酚、丹酚酸 B、蜕皮激素、甘草酸、甘草苷、橙皮苷分别在 345、254、254、286、250、237、237、283 nm 处有最大吸收, 通过对比分析, 在波长 254 nm 处, 上述 8 种成分具有良好的响应, 样品中相邻色谱峰的基线分离可以满足含量检测的要求。因此, 选择波长 254 nm 作为检测波长。

3.2 样品前处理的方法优化

将肾衰宁粉末直接用水溶解后进样, 发现样品出峰很少, 所测成分在色谱条件下没有吸收。后用 50%、70%、80% 的甲醇溶解样品, 发现用 70% 甲醇溶解出峰数最多, 且所测成分在此条件下均有吸收, 故选择 70% 甲醇进行样品的前处理。

3.3 流动相的选择

有文献报道, 肾衰宁含量测定使用甲醇-0.1% 磷酸^[13]、乙腈-水-1% 甲酸^[14]、乙腈-0.5% 磷酸^[15]进行 90 min 的大梯度洗脱, 发现色谱峰分不开, 且特征峰较少。经过反复实验, 确定乙腈-0.1% 甲酸

表4 加样回收率试验结果

成分	取样量(V/ml)	样品含量(m/μg)	加入量(m/μg)	测得量(m/μg)	回收率(%)	平均回收率(%)
橙皮苷	1.00	383.02	95.88	773.46	101.80	100.27
	1.00	380.39	95.88	764.91	100.26	
	1.00	380.31	95.88	763.64	99.95	
	1.00	384.46	95.88	771.17	100.83	
	1.00	385.81	95.88	772.95	100.94	
	1.00	389.20	95.88	764.32	97.81	
丹酚酸B	1.00	120.79	31.80	250.42	101.91	98.82
	1.00	122.50	31.80	251.14	101.12	
	1.00	125.56	31.80	248.78	96.87	
	1.00	127.57	31.80	254.87	100.07	
	1.00	127.74	31.80	251.44	97.25	
	1.00	127.75	31.80	249.44	95.66	
大黄酚	1.00	72.67	17.79	138.19	92.06	97.36
	1.00	69.62	17.79	135.41	92.44	
	1.00	68.46	17.79	140.83	101.69	
	1.00	71.03	17.79	141.25	98.66	
	1.00	68.98	17.79	141.57	102.00	
	1.00	71.92	17.79	141.17	97.30	

表5 10批肾衰宁样品中3种成分的测定结果

药品批号	橙皮苷(μg/ml)	丹酚酸B(μg/ml)	大黄酚(μg/ml)
61103102	66.99	42.29	44.65
51103110	83.41	39.34	42.89
51103111	94.75	41.36	44.51
51103009 346	80.57	43.21	43.44
51103011 593	83.51	42.04	42.58
51103018 486	79.94	41.94	42.96
51103010 471	90.03	41.88	44.03
41103033 563	83.48	43.01	43.94
61103101	85.92	42.93	43.85
51103105	88.04	41.76	42.94

水溶液用作梯度洗脱的流动相,分离出样品中测得的特征峰,特征峰很多,峰形良好。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2015年版(一部)[S]. 2015: 1052-1053.
[2] WANG S S, ZHANG J F, GUO M, et al. The efficacy of Shen shuaining capsule on chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 7515413.
[3] CHEN X J, GAO S H, RUAN M N, et al. Shen-Shuai-Ning granule decreased serum concentrations of indoxyl sulphate in

uremic patients undergoing peritoneal Dialysis[J]. Biosci Rep, 2018, 38(5): BSR20171694.
[4] 谢小洪, 黄鹤宁. 肾衰宁颗粒结合西医基础治疗慢性肾脏病4期疗效观察[J]. 中国处方药, 2014, 12(12): 131.
[5] LIU W, WANG D M, LIU J J, et al. Quality evaluation of *Potentilla fruticosa* L. by high performance liquid chromatography fingerprinting associated with chemometric methods[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149197.
[6] 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
[7] 易智彪, 薄雯映, 许冬瑾, 等. 太子参HPLC指纹图谱研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1308-1310.
[8] 黄慧梅, 柳润辉. 中药复方药动力学研究进展[J]. 药实践杂志, 2014, 32(2): 88-91.
[9] 李东晓, 桂雪虹, 陈为, 等. 通腑泻热灌肠液中大黄素及大黄酚含量测定[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(3): 372-377.
[10] 周萍. 高效液相色谱法测定大明胶囊中大黄酚的含量[J]. 黑龙江科技信息, 2015(27): 123.
[11] 张小红, 肖雪, 梁洁, 等. HPLC法测定林芝地区丹参中丹酚酸B含量[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(11): 45-46.
[12] 谭丽荷. 陈皮四物片中橙皮苷的含量测定[J]. 中国当代医药, 2015, 22(9): 88-90.
[13] 姚荣成, 林琼芬, 张雯洁. HPLC法测定肾衰宁胶囊中大黄素与大黄酚的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(36): 3447-3449.
[14] 杨柳, 张颖, 刘季田媛, 等. 牛膝各化学拆分组分指纹图谱研究[J]. 中医药信息, 2015, 32(6): 16-19.
[15] 胡志军, 陈建秋. HPLC测定不同基原陈皮药材中橙皮苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 95-98.

【收稿日期】 2019-11-02 【修回日期】 2020-03-18
【本文编辑】 李睿旻