

现 Kp 和 KISS1R 的功能并不局限在下丘脑神经元,二者都可在外周组织表达,尤其在胰腺中高水平表达。Hauge-Evans 等^[1]的研究显示,Kp 和 KISS1R 的 mRNAs 都能在大鼠胰岛检测;在大鼠胰腺的切片上,Kp 和 KISS1R 的免疫活性定位于胰岛内的 β 细胞,而在外分泌的胰腺不能检测到。在 Bowe 等^[2]的研究中,Kp 引起大鼠胰岛剂量依赖的葡萄糖诱导 (20 mmol/L) 的胰岛素分泌增强。另外两项胰岛 β 细胞的研究中,胰岛素的促泌剂 Kp 需要 ERK1/2 的活化来介导的胰岛素释放^[12-13]。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 中的 ERK1/2 信号通路是胰岛 β 细胞的增生和凋亡的经典通路^[11],Kp 引起胰岛 β 细胞剂量依赖的葡萄糖诱导的胰岛素分泌增强需要 ERK1/2 信号通路的介导,这提示我们 Kp/KISS1R 系统也可能通过 ERK1/2 信号转导通路参与对胰岛 β 细胞的凋亡。在本研究中,根据 Bowe 等^[2]的研究方法,采用 20 mmol/L 葡萄糖生理盐水培养,1 μ mol/L Kp 干预。我们发现 Kp 干预组的胰岛 β 细胞凋亡率低于对照组;采用 ERK1/2 信号通路抑制剂 PD98059 后 Kp 抑制胰岛 β 细胞凋亡的作用渐弱;单纯加用 PD98059 对凋亡无明显影响。这提示,Kp/KISS1R 系统对胰岛 β 细胞凋亡具有抑制作用,ERK1/2 信号转导通路可能是其中一个主要的作用通路。

本研究的不足之处:因考虑到用经典的链脲佐菌素行糖尿病大鼠造模可能对胰腺组织有一定损伤,对凋亡结果产生不确定影响,因此采用 SD 大鼠,如有条件采用自发遗传性糖尿病大鼠则结论更为可靠。另外,我们还要进行免疫组化分析即基因表达层面的研究,以证实结论的可靠性。

总之,Kp/KISS1R 系统对胰岛 β 细胞凋亡具有抑制作用,ERK1/2 信号转导通路可能是其主要的通路之一,Kp 可能成为今后糖尿病临床干预的一个新靶点。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2017 年版) [J]. 中华糖尿病杂志, 2018, 10 (1): 4-67.
- [2] Bowe J E, King A J, Kinsey-Jones J S, et al. Kisspeptin stimulation of insulin secretion: mechanisms of action in mouse islets and rats [J]. Diabetologia, 2009, 52 (5): 855-862.
- [3] Rahier J, Guiot Y, Goebbels R M, et al. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes [J]. Diabetes Obes Metab, 2008, 10 (Suppl 4): 32-42.
- [4] Carlsson P O, Palm F, Andersson A, et al. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site [J]. Diabetes, 2001, 50 (3): 489-495.
- [5] Dor Y, Brown J, Martinez O I, et al. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation [J]. Nature, 2004, 429 (6987): 41-46.
- [6] Brüning J C, Winnay J, Bonner-Weir S, et al. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles [J]. Cell, 1997, 88 (4): 561-572.
- [7] Butler A E, Janson J, Bonner-Weir S, et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2003, 52 (1): 102-110.
- [8] 温俊平, 陈刚, 林丽香. Kisspeptin—连接能量与生殖的新纽带 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2016, 32 (7): 536-539.
- [9] Seminara S B, Messager S, Chatzidakis E E, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty [J]. N Engl J Med, 2003, 349 (17): 1614-1627.
- [10] Kitsou-Mylona I, Burns C J, Squires P E, et al. A role for the extracellular calcium-sensing receptor in cell-cell communication in pancreatic islets of langerhans [J]. Cell Physiol Biochem, 2008, 22 (5): 557-566.
- [11] Hauge-Evans A C, Richardson C C, Milne H M, et al. A role for kisspeptin in islet function [J]. Diabetologia, 2006, 49 (9): 2131-2135.
- [12] Horiuchi Y, Nakatsu D, Kano F, et al. Pyruvate kinase M1 interacts with A-Raf and inhibits endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by activating MEK1/ERK pathway in mouse insulinoma cells [J]. Cell Signal, 2017, 38 (10): 212-222.
- [13] Smith J T, Acohido B V, Clifton D K, et al. Kiss-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse [J]. J Neuroendocrinol, 2006, 18 (4): 298-303.

• 基础研究 •

畅脉乐胶囊的质量标准研究

福建省医疗器械与药品包装材料检验所 (福州 350001) 陈松旺 吴婷¹ 李煌¹ 翁一玲²

【摘要】 目的 建立畅脉乐胶囊的质量标准。**方法** 薄层色谱法 (TLC) 定性鉴别黄芪、丹参、首乌、天麻、赤芍、葛根;高效液相色谱法 (HPLC) 测定芍药苷、丹酚酸 B 的含量。**结果** TLC 斑点清晰, 阴性无干扰; HPLC 两种成分在各自范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9991$), 平均加样回收率 96.70%~97.16%, 相对标准偏差 (RSD) 1.23%~1.65%。**结论** 该方法重复性好, 专属性强, 可用于畅脉乐胶囊的质量控制。

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目 (卫生联合资助) (2019J01482)

1 福建中医药大学; 2 福建中医药大学附属第二人民医院

2 通信作者, Email: 935713397@qq.com

【关键词】畅脉乐胶囊；定性鉴别；含量测定

【中图分类号】R927.11 【文献标识码】A 【文章编号】1002-2600(2020)01-0127-06

Quality standard for changmaile capsules CHEN Songwang, WU Ting, LI Huang, WENG Yiling. Fujian Provincial Institute for Medical Devices and Pharmaceutical Packing Materials, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 Objective To establish the quality standard for Changmaile Capsules. **Methods** TLC was adopted in the qualitative identification of Astragalusmembranaceus, Salvia miltiorrhiza, Fallopia multiflora, Gastrodia elata, Radix Paeoniae Rubra and Radix Puerariae. HPLC was used for the content determination of paeoniflorin and salvianolic acid B. **Results** The TLC spots were clear without negative inference. Two constituents of HPLC showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.9991$), whose average recoveries were 96.70%~97.16% with the RSD of 1.23%~1.65%. **Conclusion** This reproducible and specific method can be used for the quality control of Changmaile Capsules.

【Key words】 changmaile capsule; qualitative identification; quality control

畅脉乐胶囊(闽药制字 Z05104025)为福建中医药大学附属第二人民医院的院内制剂,处方由黄芪、制首乌、天麻、丹参、郁金、赤芍、葛根等中药经科学加工后制成,具有滋肾活血、祛风通络之功效,临床具有消除血管硬化、斑块,改善微循环和血液流变学功能^[1]。方中黄芪补中益气、通畅血脉^[2],制首乌补肝肾、益精血、乌须发、抗衰老与抗氧化、改善造血功能^[3],共为君药;丹参活血化瘀、疏通脑络^[4],为臣药;再辅以郁金疏肝解郁^[5],葛根升阳强心^[6],赤芍凉血散瘀。全方补肾益气以治本,化瘀通脉以治标,标本兼顾,临床常用于防治中老年血管硬化或中风后遗症。该制剂原质控标准仅有赤芍的薄层鉴别一项,为了强化制剂标准的专属性和整体性,我们通过查阅相关文献和预实验,确立黄芪、制首乌、天麻、赤芍、葛根的 TLC 定性鉴别方法,并采用 HPLC 法测定芍药苷和丹酚酸 B 的含量,完善畅脉乐胶囊分析检验方法,以期更科学有效地控制制剂质量,探索建立基于中医临床疗效的生物评价和测定方法研究相结合的、能整体体现本制剂疗效的标准体系。

1 实验仪器与材料

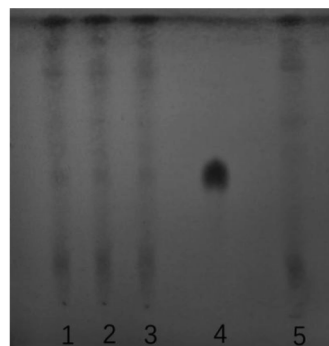
数显恒温水浴锅 HH-4 型(常州国华电器有限公司);500 g 摇摆式高速中药粉碎机 DFY-500 型(温岭市林大机械有限公司);数据超声波清洗器 KQ-500E 型(昆山市超声仪器有限公司);多功能紫外分析仪 ZF1-I 型(上海嘉鹏科技有限公司);硅胶 G 层板、高效硅胶 G 薄层板(青岛海洋化工厂);U3000 高效液相色谱仪(戴安公司);XS105 电子分析天平(METTLER TOLEDO);Milli-Q Advantage 超纯水系统(默克密理博)乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯化水;芍药苷(中国食品药品检定研究院,批号 110736-201640);丹酚酸 B(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-15051708);大黄素(中国食品药品检定研究院,批号 10756-200110);黄芪甲苷(中国食品药品检定研究院,批号 110781-200613);葛根素(上海源叶生物科技有限公司,批号 S02M9B54875);天麻素(上海源叶生物科技有限公司,批号 Y02M6K1)。3 批畅脉乐胶囊及其阴性对照均为医院自制。

2 方法与结果

2.1 TLC 定性鉴别:

2.1.1 黄芪的薄层色谱鉴别:称取畅脉乐胶囊内容物 2 g,加入甲醇 50 mL,加热回流 1 h,滤过收集滤液,蒸干,残

渣分 3 次共加水 50 mL 使之溶解,合并水溶液加三氯甲烷 30 mL/次,萃取 2 次,取水溶液用水饱和的正丁醇萃取 2 次,每次 30 mL,合并正丁醇液,每次加 50 mL 0.28% 碳酸钠溶液洗涤 3 次,取正丁醇液水浴蒸干,残渣加甲醇 2 mL 使之溶解,作为供试品溶液。根据畅脉乐胶囊处方删除黄芪同法制备阴性样品,称取 2 g,同法制得阴性溶液。取黄芪甲苷对照品 1 mg,加甲醇 1 mL 溶解后作为对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,展开剂为三氯甲烷-甲醇-水(13:7:2)的下层溶液,展开、取出、晾干,喷以 10% 硫酸乙醇溶液,置 105 $^{\circ}$ C 干燥箱至显色清晰。日光下检视,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显示相同棕褐色的斑点,阴性对照无相应斑点。黄芪的 TLC 见图 1。



注:1、2、3 分别为 3 批供试品溶液;4 对照品溶液;5 阴性对照溶液。

图 1 黄芪薄层图

2.1.2 何首乌的薄层色谱鉴别:称取畅脉乐胶囊内容物 2.5 g,加入乙醇 50 mL,加热回流 1 h,滤过收集滤液、蒸干,加乙醇 1 mL 溶解作为供试品溶液。根据畅脉乐胶囊处方删除何首乌同法制备阴性样品,称取 2.5 g,同法制成阴性对照溶液。再取大黄素对照品 1 mg 加甲醇 1 mL 溶解后作为对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 10 μ L,分别点于同一硅胶 HF254 薄层板上(黏合剂为羧甲基纤维素钠),展开剂为石油醚-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1)的上层溶液,展开、取出、晾干,置紫外光灯(254 nm)下检视。供试品色谱中,在与对照品色谱相应的位置上,显示相同颜色的荧

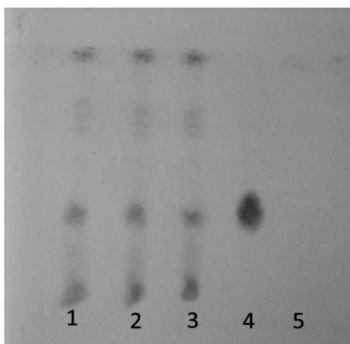
光斑点, 阴性对照无相应荧光斑点。何首乌的 TLC 见图 2。



注: 1、2、3 分别为 3 批供试品溶液; 4 对照品溶液; 5 阴性对照溶液。

图 2 何首乌薄层图

2.1.3 赤芍的薄层色谱鉴别: 称取畅脉乐胶囊内容物 2 g, 加入乙醇 10 mL, 超声提取 30 min, 过滤收集滤液、蒸干, 加乙醇 1 mL 溶解作为供试品溶液。根据畅脉乐胶囊处方剔除赤芍同法制备阴性样品, 称取 2 g 同法制成阴性对照溶液。取芍药苷对照品 1 mg, 加乙醇 1 mL 制成对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一块硅胶 G 薄层板上, 展开剂为三氯甲烷-乙酸乙酯-甲醇-甲酸 (40:5:10:0.2), 展开、取出、晾干, 喷以 5% 香草醛硫酸溶液, 置 105 $^{\circ}$ C 干燥箱中加热至斑点显色清晰。供试品色谱中在与对照品色谱相应的位置上, 显相同蓝紫色斑点, 阴性对照无斑点。赤芍的 TLC 见图 3。

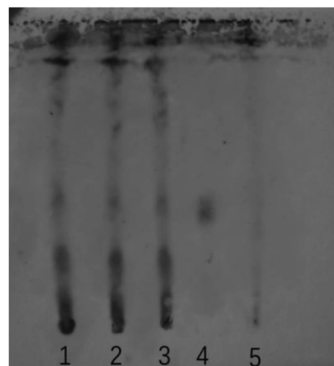


注: 1、2、3 分别为 3 批供试品溶液;
4 对照品溶液; 5 阴性对照溶液。

图 3 赤芍薄层图

2.1.4 天麻的薄层色谱鉴别: 称取畅脉乐胶囊内容物 2 g, 研细, 加无水乙醇 50 mL, 加热回流 30 min, 滤过, 滤液浓缩至约 5 mL, 加入中性氧化铝 4 g, 拌匀, 蒸干, 加无水乙醇 50 mL, 加热回流 30 min, 趁热加入活性炭 0.5 g, 振摇 30 s, 滤过, 滤液蒸干, 加乙醇 1 mL 溶解制成供试品溶液。根据畅脉乐胶囊处方剔除天麻同法制备阴性样品, 称取阴性样品 5 g, 同法制成阴性对照溶液。另取天麻素对照品 1 mg, 加乙醇 1 mL 制成对照品溶液。吸取上述 3 种溶液各 5 μ L, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 展开剂为三氯甲烷-甲

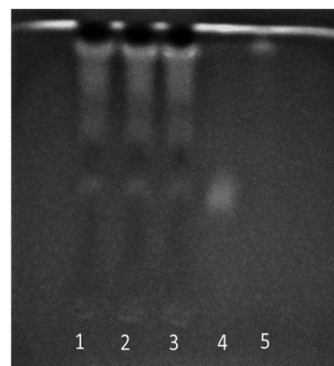
醇-冰醋酸 (6:2:0.15), 展开、取出、晾干, 喷以 10% 磷钼酸乙醇溶液, 置 105 $^{\circ}$ C 干燥箱中加热至斑点显色清晰。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显示相同颜色的斑点, 阴性对照无相应斑点。天麻的 TLC 见图 4。



注: 1、2、3 分别为 3 批供试品溶液; 4 对照品溶液; 5 阴性对照溶液。

图 4 天麻薄层图

2.1.5 葛根的薄层色谱鉴别: 称取畅脉乐胶囊内容物 5 g, 加入乙酸乙酯 20 mL, 超声 (150 W, 40 kHz) 提取 20 min, 过滤收集滤液、蒸干, 残渣加甲醇 1 mL 溶解, 作为供试品溶液。取 1 mg 葛根素对照品, 加甲醇 1 mL 溶解混匀, 作为对照品溶液。根据畅脉乐胶囊处方剔除葛根同法制备阴性样品, 取 5 g, 同法制成阴性对照溶液。吸取上述三种溶液各 5 μ L, 分别点于同一块硅胶 G 薄层板上, 展开剂为三氯甲烷-甲醇-水 (7:2.5:0.25), 展开、取出、晾干, 置紫外光灯 (254 nm) 下检视。供试品色谱中, 在与对照品色谱相应的位置上, 显示相同颜色荧光条斑, 阴性对照无相应条斑。葛根的 TLC 见图 5。



注: 1、2、3 分别为 3 批供试品溶液; 4 对照品溶液; 5 阴性对照溶液。

图 5 葛根薄层图

2.2 HPLC 含量测定:

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Thermo scientific-C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1; 紫外检测器, 检测波长为 230 nm, 流速 1 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。

表 1 HPLC 流动相梯度洗脱程序

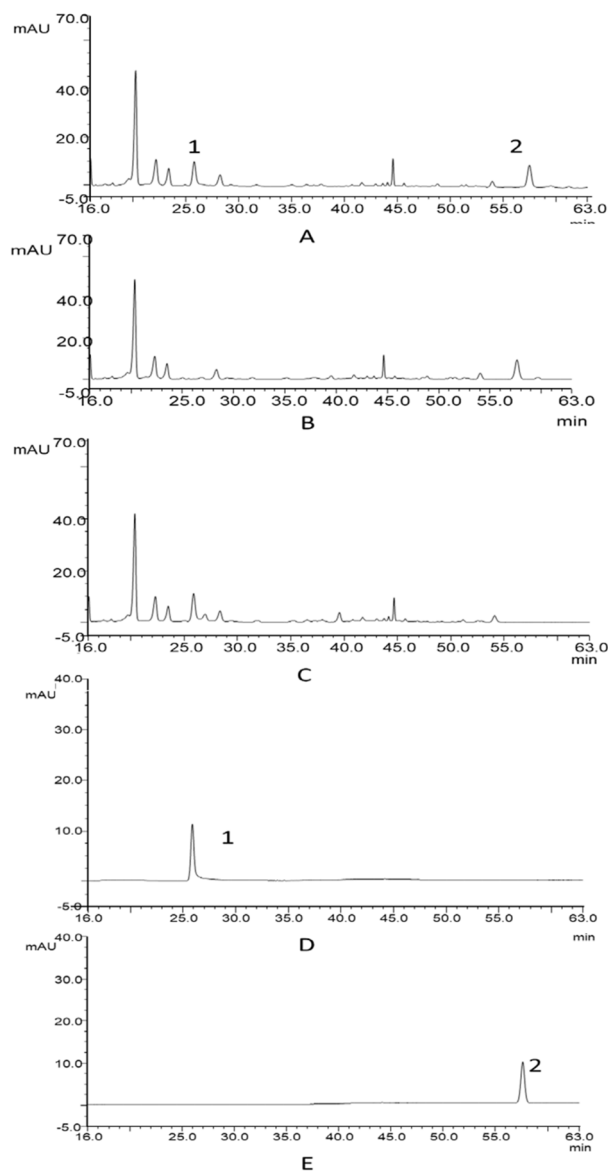
时间/min	0	35	40	58	70
A%	10	15	20	20	30
B%	90	85	80	80	70

2.2.2 溶液的制备: 1) 对照品溶液的制备: 取芍药苷对照品适量, 精密称定, 加少量甲醇溶解后, 再加甲醇至刻度线混匀, 即得 0.807 mg/mL 芍药苷的对照品储备溶液, 精密量取 1 mL, 转移至 25 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度线摇匀, 即得 (32.28 g/mL 芍药苷) 对照品溶液^[7]。取丹酚酸 B 适量置 10 mL 容量瓶, 精密称定 (6.35 mg), 加适量甲醇溶解后, 加甲醇至刻度线, 混匀即得丹酚酸 B 的对照品储备溶液 (0.635 mg/mL), 精密吸取该对照品储备液适量, 加甲醇稀释 20 倍, 即得丹酚酸 B 的对照品溶液 (31.75 μ g/mL)^[8]。2) 样品溶液的制备: 取胶囊内容物研磨至细粉, 取细粉 2 g 至具塞锥形瓶中, 精密称定, 加入 10 mL 的甲醇溶液称定重量, 超声提取 40 min, 加甲醇补足减失的重量。混匀过滤, 精密吸取续滤液 2.5 mL, 转移至 50 mL 容量瓶中, 加甲醇至刻度线混匀, 即得供试样品溶液^[9]。3) 阴性对照溶液的制备: 取根据畅脉乐胶囊处方剔除赤芍或丹参同法制备阴性样品适量, 并按照 2) 项的方法制成缺赤芍、缺丹参的阴性对照溶液。

2.2.3 专属性试验: 分别取供试样品溶液、缺赤芍阴性对照溶液、缺丹参阴性对照溶液、芍药苷对照品溶液、丹酚酸 B 对照品溶液各 10 μ L 注入液相色谱仪, 按照“2.2.1”色谱条件进行测定。结果供试样品溶液 HPLC 色谱图中, 与芍药苷或丹酚酸 B 对照品溶液相同保留时间有色谱峰存在; 而缺赤芍、缺丹参阴性对照溶液无相应的色谱峰, 本液相色谱条件对测定具有专属性。HPLC 色谱图见图 6。

2.2.4 线性关系的考察: 1) 取“2.2.2 1)”项芍药苷对照品储备液 2 mL, 分别配制成含有芍药苷 129.12、64.56、32.28、16.14、8.07 μ g/mL 的对照品溶液, 照“2.2.1”项色谱条件, 进样 10 μ L, 测定绘制标准曲线: 横坐标 (x) 为芍药苷的浓度 (μ g/mL), 纵坐标 (y) 为芍药苷色谱峰面积积分值 (mAU)。芍药苷线性回归方程: $y=0.1521x-0.3971$, 其中相关系数 $r=0.9998$, 结果表明芍药苷在 8.07~129.12 μ g/mL 浓度范围内线性关系良好。2) 照“2.2.1”项色谱条件, 取“2.2.2 1)”项对照品储备液, 分别配制成含有丹酚酸 B 127.00、63.50、31.75、16.51、8.89 μ g/mL 的对照品溶液, 进样 10 μ L, 测定绘制标准曲线: 横坐标 (x) 为丹酚酸 B 的浓度 (μ g/mL), 纵坐标 (y) 为丹酚酸 B 色谱峰面积积分值 (mAU)。丹酚酸 B 线性回归方程: $y=0.2386x-1.2355$, 其中相关系数 $r=0.9991$, 结果表明丹酚酸 B 为 8.89~127.00 μ g/mL 浓度范围内, 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验: 取“2.2.2 1)”项芍药苷对照品溶液, 在“2.2.1”色谱条件下, 连续检测 6 次。根据芍药苷峰面积的实际变化情况计算 RSD 值为 0.57%, 结果表明该方法精密度良好。



注: 样品 (A), 缺赤芍样品 (B), 缺丹参样品 (C), 芍药苷对照品 (D), 丹酚酸 B 对照品 (E); 1. 芍药苷, 2 丹酚酸 B。

图 6 HPLC 色谱图

2.2.6 稳定性试验: 取芍药苷溶液及丹酚酸 B 对照品适量, 制备方法同“2.2.2 1)”项, 制备对照品溶液, 分别放置 0、2、4、8、16、24 h 后进样, 测定峰面积, 计算芍药苷的 RSD 值为 0.89%, 丹酚酸 B 的 RSD 值为 1.23%, 结果表明两者在制备后 24 h 内稳定。

2.2.7 重复性试验: 取同一批次样品照“2.2.2 2)”项方法平行制备 6 份样品溶液, 进样分析, 计算畅脉乐胶囊中芍药苷的平均含量为 2.98 mg/g、丹酚酸 B 平均含量为 2.342 mg/g, 两者的 RSD 值分别为 1.03% 和 1.45%, 结果表明两者的重复性良好。

2.2.8 加样回收率实验: 精密称取畅脉乐胶囊内容物 0.5 g 共 12 份, 其中 6 份精密加入含有 1.623 0 mg/mL 芍药苷的对照品溶液 1 mL, 其余 6 份精密加入含有 1.214 0 mg/mL

的丹酚酸 B 对照品溶液 1 mL, 照“2.2.2.2)”项方法制备供试品溶液, 进样分析, 经计算芍药苷平均回收率为

97.16%, RSD 值为 1.23%, 丹酚酸 B 平均回收率为 96.70%, RSD 值为 1.65% (见表 2)。

表 2 加样回收率实验结果

成分	称样量/g	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
芍药苷	0.500 3	1.490 9	1.623 0	3.057 4	96.52	97.16	1.23
	0.511 2	1.5234	1.623 0	3.109 3	97.72		
	0.506 7	1.510 0	1.623 0	3.105 3	98.30		
	0.498 9	1.486 7	1.623 0	3.053 9	96.56		
	0.504 8	1.504 3	1.623 0	3.102 1	98.45		
	0.512 8	1.528 1	1.623 0	3.076 4	95.39		
丹酚酸 B	0.518 9	1.207 6	1.214 0	2.362 8	95.16	96.70	1.65
	0.506 5	1.178 7	1.214 0	2.388 4	99.64		
	0.489 6	1.139 4	1.214 0	2.317 8	97.07		
	0.515 4	1.199 5	1.214 0	2.365 4	96.04		
	0.509 1	1.184 8	1.214 0	2.358 4	96.67		
	0.492 6	1.146 4	1.214 0	2.307 3	95.63		

2.2.9 样品测定: 对 3 批不同的畅脉乐胶囊, 制备方法参照“2.2.2.2)”项样品溶液, 色谱条件同“2.2.1)”项测定, 计算其含量 (见表 3)。

表 3 芍药苷、丹酚酸 B 含量测定结果 (n=3)

批次	芍药苷含量 mg/g	丹酚酸 B 含量 mg/g
20181101	2.832 7	2.327 2
20181203	3.125 2	2.083 3
20190301	2.928 4	2.127 5
平均值	2.962 1	2.179 3

3 讨论

3.1 薄层色谱: 使用前应在 110 °C、30 min 进行活化后, 置干燥器中备用, 点样量不宜太高, 应分次点样, 点样点尽可能小, 每次可用电吹风吹干溶剂后继续在原位置点样, 超过 10 μL 时, 色谱中斑点拖尾明显, 不利于清晰分离斑点。

3.2 黄芪薄层鉴别: 萃取时振摇应当用适宜的力度, 避免萃取时乳化; 轻度乳化静置使之澄清, 乳化程度较高可加热或加适当的破乳剂。通过摸索, 以三氯甲烷-甲醇-水 (13:7:2) 混匀后下层作为展开剂, 分离效能良好。薄层板晾干后, 在薄层板上均匀喷上显色剂; 加热显色时, 温度应适宜, 若加热温度太高时间太久, 薄层板易被烤黑; 温度过低显色不明显或不显色, 均不利于结果观察。本实验结果显示在 105 °C 加热 3~5 min, 供试品色谱中样品和对照品斑点显色效果良好; 供试品斑点颜色较浅时, 可在光线较强处透光观察。

3.3 何首乌薄层鉴别: 分别用硅胶 HF254 薄层板和硅胶 G 薄层板进行预实验, 硅胶 G 薄层板出现了明显拖尾, 故采用硅胶 HF254 薄层板; 经展开、取出晾干后应立即置紫外光下检视并拍照, 久置后薄层板供试品及样品荧光将消失。

3.4 赤芍薄层鉴别: 供试液制备, 分别采用振摇提取或超声提取, 振摇提取的供试品在薄层色谱中斑点不清晰, 考虑为提取不充分等原因, 因此, 本实验采用超声提取 30 min。

5%香草醛硫酸为显色剂, 由于香草醛在溶剂中的溶解度小且容易析出, 显色剂宜新鲜配制, 放置时间不宜过长。

3.5 天麻薄层鉴别: 样品取样量太少、烤板时间不够或太长, 对供试品色谱中检视产生较大影响。经过实验, 增加取样量至 5 g, 将展开剂乙酸乙酯-甲醇-水 (9:1:0.2) 更换为三氯甲烷-甲醇-冰醋酸 (6:2:0.15), 以 10% 磷钼酸乙醇为显色剂, 烤板 5~7 min, 供试品色谱相应位置上斑点清晰。

3.6 葛根薄层鉴别: 样品取样量太少时, 未能检视到相应荧光斑点, 提示可能由于产品中葛根素含量较低, 样品增加至 5 g 提取后进行薄层鉴别, 在紫外光灯 (254 nm) 条件下检视, 鉴别效果良好。

3.7 流动相的选择: 通过比较参考文献的方法, 初始选用乙腈:0.1%磷酸水溶液=14:86 作为流动相^[10], 结果各个组分峰分离不完全, 遂改用梯度洗脱的方法, 选择分离效果最好的方法, 即“2.2.1)”项色谱条件。

3.8 本品含量测定的供试液提取条件选择: 分别对甲醇、无水乙醇、95%乙醇、70%乙醇、50%乙醇等溶剂进行观察, 发现用各浓度乙醇提取杂质峰较多且峰的对称性也较甲醇差, 确定甲醇为提取溶剂; 提取料液比先选择 1:5、1:10 进行观察, 发现提取率无明显差别, 因此选择 1:5 为提取料液比; 提取方法, 对比超声提取和回流提取, 无明显差别, 考虑超声提取操作便捷, 选择超声提取; 提取时间 10、20、30、40、50、60 min, 发现超声 40 min 后提取率基本一致, 所以选择超声 40 min。本实验最终确定畅脉乐胶囊含量测定供试液的提取条件为, 以甲醇作为溶剂, 提取药液比为 1:5, 超声提取 40 min。

综上所述, 本文确立的 TLC、HPLC 方法重复性好, 专属性强, 可用于畅脉乐胶囊的质量控制。通过加强和完善制剂处方中主要药材的专属性鉴别和含量测定研究, 着重提升能够表征中药有效性的检测能力和水平。探索指纹和特征图谱等整体控制中药成分的检测技术在畅脉乐胶囊标准中的应用, 进一步提高中药标准应对质量问题的能力。我们认为全

面提升制剂有效性控制水平, 建立基于中医临床疗效的生物评价和测定方法研究相结合的方法, 探索能够直接反映中药临床疗效的制剂标准体系将是今后中药制定标准的重要依据。

参考文献

- [1] 陈秀琳. 畅脉乐胶囊 I 号的薄层色谱鉴别 [J]. 海峡药学, 2005, 17 (6): 119-120.
- [2] 王海花, 李德成, 孙靓. 黄芪的药效成分及药理作用研究 [J]. 中国处方药, 2018, 16 (11): 22-23.
- [3] 张飘, 戚进. 制首乌药理作用研究进展 [J]. 海峡药学, 2018, 30 (11): 40-43.
- [4] 代晓光, 苏长兰. 丹参化学成分及药理研究进展 [J]. 中医药信

息, 2018, 35 (4): 126-129.

- [5] 袁晓旭, 杨明明, 赵桂琴. 郁金化学成分及药理作用研究进展 [J]. 承德医学院学报, 2016, 33 (6): 487-489.
- [6] 赖建有, 李兴波. 葛根的化学成分和药理作用和用途 [J]. 农业与技术, 2018, 38 (20): 36.
- [7] 胡雅怡, 沈萍, 沈虹. 高效液相色谱法测定退黄颗粒中芍药苷的含量 [J]. 海峡药学, 2017, 29 (12): 77-79.
- [8] 黎春彤, 何世荣, 刘皈阳, 等. 高效液相色谱法测定肾复康胶囊中丹酚酸 B 的含量 [J]. 实用药物与临床, 2016, 19 (5): 617-619.
- [9] 翁一玲, 陈松旺, 李煌. HPLC 法测定畅脉乐胶囊中芍药苷的含量 [J]. 海峡药学, 2018, 30 (8): 59-61.

• 基础研究 •

一种用于 microRNA-21 浓度检测的荧光传感方法的建立

福建医科大学附属福州市第一医院 (福州 350009) 章德昆¹ 陈婷婷² 陈 魁 王力群 龚 超 李 嵩
夏垚坤² 陈敬华²

【摘 要】 目的 建立一种用于 microRNA-21 (miRNA-21) 浓度检测的, 基于聚多巴胺纳米粒子 (PDANs) 的荧光传感方法。**方法** Ce6 标记的捕获探针 (Ce6-DNA) 在 Ca^{2+} 的介导下吸附在 PDANs 表面, 荧光被猝灭。miRNA-21 和 Ce6-DNA 杂交后, 使其从 PDANs 表面解吸附, 荧光恢复。利用荧光分光光度计分析靶标和 Ce6-DNA 反应前后荧光强度的变化, 实现对 miRNA-21 的检测。**结果** 在 5.0~200 nM 范围内, 670 nm 处的荧光强度和 miRNA-21 的浓度呈良好的线性关系, 检测限为 1.80 nM。**结论** 基于 Ce6-DNA 功能化的 PDANs 可为 miRNA-21 的定量检测提供一种简单、准确、成本低、分析速度快的新方法。

【关键词】 聚多巴胺纳米粒子; miRNA-21; DNA 探针; 荧光检测

【中图分类号】 R917 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)01-0132-03

Establishment of a fluorescence sensing method for microRNA-21 concentration detection ZHANG Dekun, CHEN Tingting, CHEN Kui, WANG Liqun, GONG Chao, LI Song, XIA Yaokun, CHEN Jinghua. The Affiliated Fuzhou Municipal First Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350009, China

【Abstract】 Objective To develop a fluorescent method based on polydopamine nanoparticles (PDANs) for microRNA-21 (miRNA-21) concentration detection. **Methods** Ce6-labeled capture probe (Ce6-DNA) was absorbed on the surface of PDANs through Ca^{2+} mediation, which resulted in the fluorescence of Ce6 being quenched. However, the Ce6-DNA was desorbed from PDANs when it hybridized with miRNA-21, which led to the recovery of fluorescence. This method could detect miRNA-21 quantitatively through measuring the change of fluorescence intensity using fluorescent spectrophotometer. **Results** There was a good linear relationship between the fluorescence intensity at 670 nm and miRNA-21 concentration from 5.0 to 200 nM. The limit of detection was 1.80 nM. **Conclusion** The Ce6-DNA functionalized PDANs can provide a simple, accurate, low-cost, and rapid novel method for miRNA-21 detection.

【Key words】 polydopamine nanoparticles; miRNA-21; DNA probe; fluorescence detection

微小 RNAs (microRNAs, miRNAs) 是一种极具潜力的液态活肿瘤标志物^[1], 其常见的检测方法^[2-3]虽然具有较好的灵敏度; 但是仍然存在着诸如引物序列设计复杂、仪器设备价格昂贵和不利于现场检测等缺点。荧光传感方法具

有操作简便、检测速度快、成本低等优点。其中, 聚多巴胺纳米粒子 (PDANs) 在构建荧光传感方法中具有广泛的应用前景。Qiang 等^[4]文献报道, 其所在的课题组利用标记荧光基团的单链 DNA 探针和 PDANs 构建了一种通用的荧光