

HPLC 法测定儿肾康丸中的特女贞苷含量

唐安福, 苏倩雯, 贡磊, 汤 昊, 王曙东

[摘要] 目的 为提高儿肾康丸的质量, 建立特女贞苷的含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法, 流动相为甲醇-水; 色谱柱: Heder-ODS-2 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 25 ℃; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 224 nm; 进样量: 10 μL。结果 特女贞苷在 10.73~120.90 μg/mL 范围内成良好的线性关系, 平均回收率为 98.60% (RSD=2.22%)。结论 所采用的方法简便可行, 重现性好, 定量方法准确可靠。

[关键词] 儿肾康丸; 特女贞苷; 高效液相色谱法
[中图分类号] R927.11 [文献标志码] A [文章编号] 1672-271X(2017)01-0013-03
[DOI] 10.3969/j.issn.1672-271X.2017.01.004

HPLC determination of specnuezhenide in Ershenkang pill

TANG An-fu, SU Qian-wen, GONG Lei, TANG Hao, WANG Shu-dong
(Department of Pharmaceuotion, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

[Abstract] Objective To improve the quality of Ershenkang pill and establish the standard. Methods A HPLC (high-performance liquid chromatography) method was used with Heder-ODS-2 C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) and a mobile phase of Methanol-Water. Flow rate was 1.0 mL/min, column temperature was 25 ℃, the detection wavelength was 224 nm and sample loop volume was 10 μL. Results The linear relationship of specnuezhenide content was good in the range of 10.73~120.90 μg/mL and the average recovery was 98.60% (RSD=2.22%). Conclusion The method is simple, accurate, reliable, and has good reproducibility.

[Key words] Ershenkang pill; Specnuezhenide; HPLC

儿肾康丸为南京军区南京总医院院内制剂, 处方由黄芪、茯苓、白术等共七味中药组成, 具有滋阴降火, 清热利湿的功效, 临床上用于治疗慢性肾炎、肾病综合征、蛋白尿等。该制剂原质量标准仅采用薄层色谱法鉴别法, 不能全面反映该制剂质量^[1-2]。为提高制剂质量标准^[3-4], 本实验采用高效液相色谱法, 测定儿肾康丸中特女贞苷的含量, 进一步提升制剂质量标准^[5-7]。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 对照品特女贞苷(121056-200503)购自中国食品药品检定研究院; 儿肾康丸为本院制剂科配制(规格: 60 g/瓶, 批号为 130817、140329、141122、150210、150509)。甲醇为色谱纯(美国天地); 其他试剂均为分析纯。高效液相色谱仪 Waters 1525, 2487 紫外检测器; XS105 型十万分

之一电子天平(梅特勒尔-托利多公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: Heder-ODS-2 C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水梯度洗脱见表 1; 检测波长: 224 nm; 柱温: 25 ℃; 流速: 1.0 mL/min; 进样量为 10 μL。特女贞苷的保留时间约为 34.5 min。

表 1 流动相梯度

时间(min)	流动相 A% (水)	流动相 B% (甲醇)
0~10	75→62	25→38
10~32	62	38
32~35	62→75	38→25

1.2.2 溶液的制备 对照品溶液的制备: 精密称取对照品特女贞苷 4.16 mg, 置于 25 mL 量瓶中, 加稀乙醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。供试品溶液的制备: 取本品适量, 研碎, 混匀, 取约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入稀乙醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 浸泡 30 min, 超声提取(功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 再称定重量, 用稀

基金项目: 全军医疗机构制剂标准提高科研项课题(13ZJZ13)
作者单位: 210002 南京, 南京军区南京总医院制剂科
通讯作者: 汤 昊, E-mail: tang_hao0518@sina.com
引用格式: 唐安福, 苏倩雯, 贡磊, 等. HPLC 法测定儿肾康丸中的特女贞苷含量[J]. 东南国防医药, 2017, 19(1): 13-15.

乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。阴性对照溶液的制备:按处方比例称取缺少女贞子的处方药材,同本品制备工艺制备成阴性制剂,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照溶液。

1.2.3 专属性试验 精密吸取上述对照品、供试品及阴性对照溶液各 10 μL ,按上述色谱条件进行测定。特女贞苷线性关系考察:分别精密量取特女贞苷对照品溶液 0.625, 1.25, 2.5, 5.0, 7.5 mL 至 10 mL 容量瓶中,用稀乙醇稀释至刻度,按“2.1”项下方法进行测定,每个浓度对照品溶液进样 2 次,计算峰面积值并计算其平均值,以对照品浓度为横坐标(X),平均峰面积值为纵坐标(Y),进行线性回归,并计算回归方程。精密度试验:取“2.2”项下的特女贞苷对照品溶液,按上述色谱条件连续进样 5 次,计算特女贞苷峰面积的相对标准偏差(RSD)。

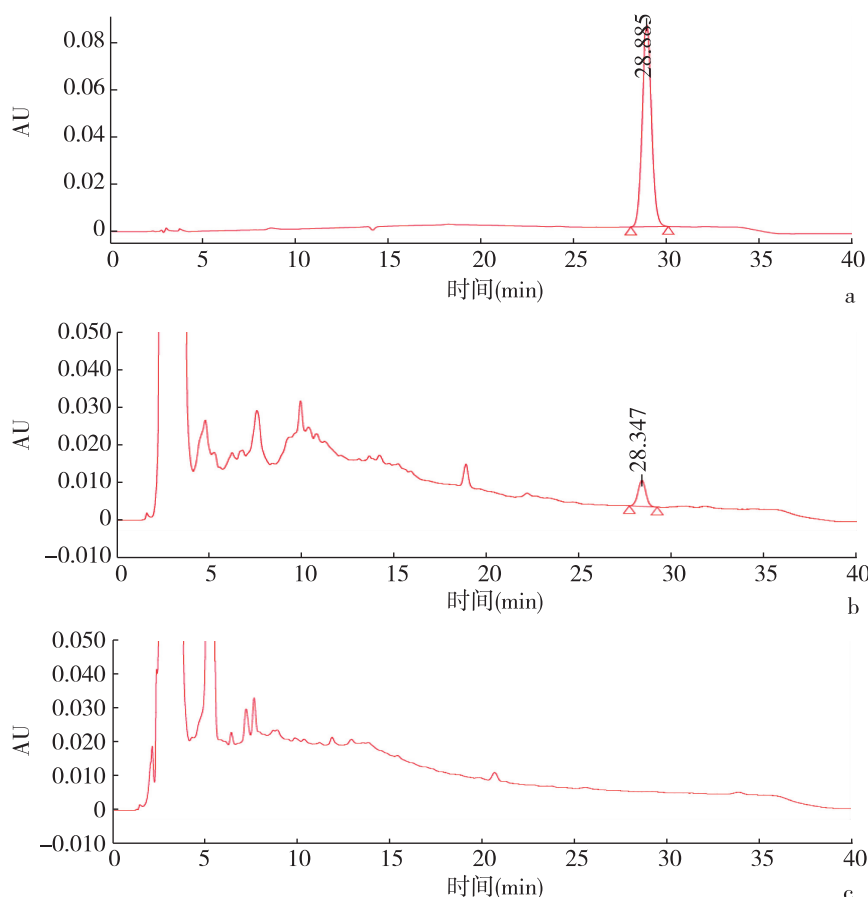
1.2.4 稳定性试验 取同一批号的样品(批号为 140329),按“2.2”项下样品溶液的制备方法进行测定,在常温下分别于 0、1、2、4、8 h 进样,计算特女贞苷峰面积 RSD。重复性试验:取同一批号的样品

(批号为 140329)6 份,按“2.2”项下样品溶液的制备方法进行测定,测定特女贞苷的含量并计算其 RSD。加样回收率试验:精密称取特女贞苷对照品 1.2 mg,置入 50 mL 容量瓶中,加稀乙醇至刻度,摇匀,即得对照品储备液。精密称取已知含量的儿肾康丸样品(批号为 140329,其中特女贞苷含量为 0.447 mg/g)细粉 9 份,每份 0.25 g,平均分成 3 组,分别精密加入上述对照品储备液 3 mL、5 mL 和 7 mL,按“2.2”项下供试品溶液制备方法处理,进样测定,记录峰面积,并计算回收率。

2 结果

2.1 专属性试验 结果表明,供试品色谱中,在与对照品色谱相应的保留时间处,有同一色谱峰,而阴性对照溶液在相应保留时间处则无峰出现,表明其对样品测定无干扰。结果见图 1。

2.2 特女贞苷线性回归方程 $Y = 13236X + 6677$, $R^2 = 0.999$ ($n = 5$)。结果表明,特女贞苷的浓度在 10.73 ~ 120.90 $\mu\text{g/mL}$ 之间,与峰面积呈良好的线性关系。



a:特女贞苷对照品;b:儿肾康丸样品;c:阴性样品

图1 特女贞苷方法专属性考察

2.3 精密度试验 特女贞苷峰面积的 RSD 为 0.18%, 结果表明该方法的精密度良好。

2.4 稳定性试验 特女贞苷峰面积 RSD 为 1.81%, 表明样品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.5 重复性试验 测得特女贞苷平均含量为 444.18 μg/g, 其 RSD 为 1.52%, 表明方法重复性良好。

2.6 加样回收率试验 特女贞苷的平均回收率为 98.60%, RSD 为 2.22%。结果见表 2。

表 2 加样回收率试验

取样量 (g)	样品含量 (mg)	对照品加 入量(mg)	测得含量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD (%)
0.2511	0.1122	0.07	0.1798	96.51		
0.2497	0.1116	0.07	0.1810	99.19		
0.2510	0.1122	0.07	0.1791	95.57		
0.2509	0.1122	0.1166	0.2251	96.91		
0.2523	0.1128	0.1166	0.2271	98.04	98.60	2.22
0.2498	0.1117	0.1166	0.2304	101.80		
0.2498	0.1117	0.1633	0.2713	97.76		
0.2510	0.1122	0.1633	0.2777	101.35		
0.2514	0.1124	0.1633	0.2761	100.25		

2.7 样品含量测定 取 8 批儿肾康丸(批号分别为 110210、120325、121230、130817、140329、141122、150210、150509), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下方法进行含量测定, 结果含量分别为 0.35、0.40、0.41、0.45、0.45、0.39、0.39、0.38 mg/g。

3 讨论

3.1 指标成分的选择 女贞子性偏寒凉, 能补益肝肾之阴, 适用于肝肾阴虚证^[8]。其化学成分主要含有三萜类成分如齐墩果酸、熊果酸等, 黄酮类化合物如槲皮素、木犀草素等, 环烯醚萜苷类如特女贞苷、女贞苷等, 另外还含有脂肪酸类、磷脂、多糖等成分^[9]。其中特女贞苷为女贞子最重要的有效成分, 现代药理研究表明其具有抑菌、抗炎、抗衰老、降血脂和降血糖等药理作用^[10]。《中国药典》2015 年版收载的女贞子药材饮片质量标准^[11]中也以特女贞苷为指标性成分进行含量控制。因而本实验增加了特女贞苷的含量测定。

3.2 提取条件的选择 预实验对特女贞苷提取时间(30 min、45 min 和 60 min)进行了考察, 结果发现提取时间在 60 min 时, 特女贞苷提取率较高; 同时对提取溶剂的用量(药材与溶剂固液比为 1:80、1:100、1:120)进行了考察, 结果发现药材与提取溶

剂固液比为 1:100 时, 特女贞苷提取率较高。故最终确定特女贞苷提取条件为加入 100 倍量稀乙醇, 超声提取 60 min。实验结果也表明, 在此条件下特女贞苷提取率较高。

3.3 测定波长的选择 通过预实验, 精密称取一定量的对照品, 进行紫外扫描^[12], 测得最大吸收波长为 224 nm。

3.4 流动相的选择 参照《中国药典》2015 年版收载的女贞子^[11]中特女贞苷的含量测定方法, 并通过预实验调整, 实验最终选择甲醇-水(梯度洗脱见表 1)为最佳流动相^[13]。

本文建立了儿肾康丸中特女贞苷含量测定的方法, 并对该方法进行了全面方法学考察, 结果表明, 该方法阴性无杂质干扰, 特女贞苷分离度好, 重现性好, 定量方法准确可靠, 可作为本制剂的质量控制标准^[14-15]。

【参考文献】

[1] 唐安福, 徐云燕, 贡磊, 等. 前列安胶囊部分中药成分定性定量研究[J]. 医学研究生学报, 2015, 28(11): 1185-1188.

[2] 汤 溟, 崔恩忠, 唐安福, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射法测定气血双补口服液黄芪甲苷的含量[J]. 医学研究生学报, 2013, 26(3): 287-289.

[3] 汤 溟, 唐安福, 崔恩忠, 等. 活肾丸质量标准研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(8): 1827-1829.

[4] 唐安福, 贡磊, 崔恩忠, 等. 肝宝颗粒质量标准研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(9): 2089-2091.

[5] 王 闾, 孟 慧, 许 勇. 复方甘草软膏的制备及含量测定方法的建立[J]. 东南国防医药, 2015, 17(4): 389-392.

[6] 赵 丹, 许绍兰, 李 蔚, 等. 健脾和胃颗粒质量标准的研究[J]. 东南国防医药, 2015, 17(6): 598-601.

[7] 崔恩忠, 陈美惠, 贡磊, 等. 寒痹丸质量标准的研究[J]. 东南国防医药, 2016, 18(3): 281-283.

[8] 高学敏. 中药学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 375-376.

[9] 张娜娜, 张振巍, 石磊. 女贞子抗肿瘤活性成分提取工艺考察[J]. 中国药师, 2015, 18(2): 215-219.

[10] 王 硕, 王隶书, 程东岩, 等. 正交试验法优选更年安舒颗粒提取工艺[J]. 中国药师, 2015, 18(7): 1125-1128.

[11] 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: 45-46.

[12] 王曙东, 盛 华, 崔恩忠, 等. 清肾丸定性定量研究[J]. 中南药学, 2015, 12(7): 674-677.

[13] 崔恩忠, 唐安福, 刘文雅, 等. 高效液相色谱法测定益肾丸中特女贞苷的含量[J]. 医学研究生学报, 2015, 28(1): 79-81.

[14] 钟桂香, 严 佳, 黄爱文, 等. 高效液相色谱法测定氯化铵甘草口服液中吗啡、愈创甘油醚和甘草的含量[J]. 东南国防医药, 2014, 16(3): 229-232.

[15] 丁 妍, 丁 敏, 贾晓斌, 等. 康复灵颗粒质量标准研究[J]. 医学研究生学报, 2015, 28(10): 1075-1078.

(收稿日期: 2016-05-26; 修回日期: 2016-08-23)
(本文编辑: 黄攸生; 英文编辑: 王建东)