

HPLC 法测定中成药复方女贞子胶囊中齐墩果酸的含量

刘奕麟

昆明市食品药品检验所 昆明 650032

【摘要】目的 建立了 HPLC 法测定复方女贞子胶囊中齐墩果酸的含量。**方法** 采用 C18 柱 (4.6×250mm, 5μm), 流动相: 乙腈-水 (90:10); 流速: 1.0mL/min, 柱温: 30℃, 检测波长: 205nm。**结果** 齐墩果酸在 0.1020mg·mL⁻¹ ~ 3.0612mg·mL⁻¹ 范围内浓度与峰面积线性关系良好 (R²=0.9998)。平均加样回收率为 100.0%, RSD 为 1.2% (n=6)。**结论** 新方法操作简便, 准确稳定, 可用于复方女贞子胶囊的质量控制, 为复方女贞子胶囊的标准提升供依据。

【关键词】 高效液相色谱法; 复方女贞子胶囊; 齐墩果酸; 含量测定

【中图分类号】 R927.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1672-0415 (2021) 01-102-02

复方女贞子胶囊由女贞子 (480g)、鹿仙草 (800g)、淫羊藿 (480g)、九香虫 (480g)、败酱草 (400g)、黄精 (400g)、金荞麦 (400g)、苦参 (160g) 组成, 具有清热解毒、活血化瘀, 软坚散结^[1] 的功效。其临床应用主要在妇科疾病用药, 主治泌尿系统的肿瘤, 如肾透明细胞癌、宫颈鳞癌等, 目前癌症的发病率在发达国家中占居民死亡的第一位, 占发展中国家居第二位^[2], 而在妇科癌症发病率中, 宫颈癌的发病率较高。复方女贞子胶囊的主药为女贞子, 女贞子为木犀科植物女贞 (Ligustrum lucidum Ait) 的干燥成熟果实^[3]。有研究表明, 齐墩果酸是女贞子的重要活性成分之一, 具有抗菌^[4]、抗病毒^[5]、护肝肾^[6]、调血脂^[7]、降血糖^[8]、抗肿瘤^[9] 等多种药理作用。含有女贞子的中成药发展较快, 但基础研究较为薄弱, 质量标准也尚未完善^[10]。该制剂的质量标准收载于云南省中药材标准 (滇 ZJGF/2011-033S), 未建立含量测定方法, 故本文探索了复方女贞子胶囊中齐墩果酸的高效液相色谱 (HPLC) 测定方法, 为其质量控制提供依据。

1 仪器、试剂及材料

MS205 电子天平, Thermo UltiMate3000 分析型液相色谱仪 (附二极管阵列检测器), DZKW-D-6 电热恒温水浴锅, SK8210HP 超声波清洗机, 超纯水系统, GM-0.33A 隔膜真空泵。

甲醇 AR、75% 甲醇、乙酸乙酯 AR, 乙腈 (色谱纯), 实验用水 (超纯水)。

齐墩果酸对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号: 110709-201607); 复方女贞子胶囊 (云南黄家医圈中医肿瘤医院, 0.4g/粒, 批号: 170803)。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备

取齐墩果酸对照品约 20mg, 精密称定, 置 50mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 即得。

2.1.2 供试品溶液的制备

取样品内容物约 0.5g, 精密称定, 置锥形瓶中, 平行操作 3 份, 精密加入甲醇 25mL, 密塞, 精密称定, 加热回流提取 30min, 冷却, 再次精密称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 静置, 取上清液, 用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 (4.6×250mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (90:10); 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 205nm; 进样量: 10 μL; 柱温: 30℃; 齐墩果酸峰与相邻峰之间的分离度应大于 1.5; 理论板数按齐墩果酸峰计应不低于 3000。

3 结果

3.1 专属性

取溶剂空白、阴性样品、齐墩果酸对照品溶液、供试品溶液分别进样分析, 记录色谱图。溶剂空白和阴性样品在齐墩果酸对照相应处无色谱峰, 齐墩果酸对照品色谱峰的保留时间为 8.933min (如图 1), 供试品溶液在对照处有相应色谱峰出现, 保留时间为 8.880min (如图 2), 齐墩果酸与相邻色谱峰分离度均大于 1.5, 理论塔板数大于

3000。结果表明, 该方法检测齐墩果酸专属性良好。

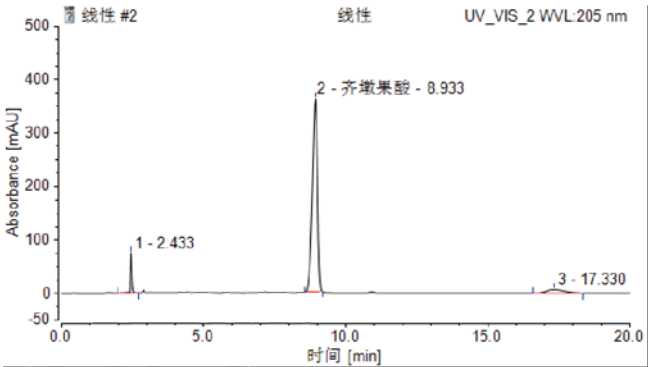


图 1: 对照品溶液

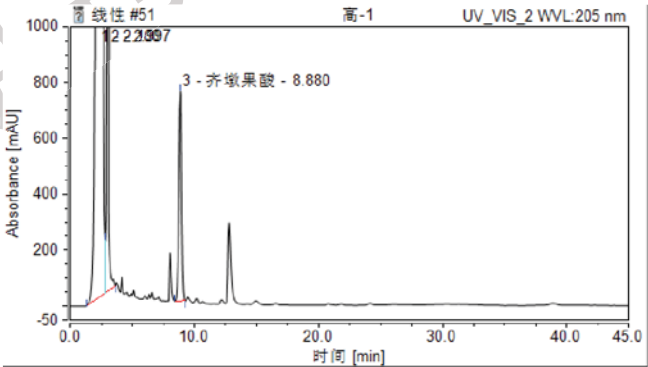


图 2: 供试品溶液

3.2 准确度

取已知含量供试品约 0.25g, 精密称定, 置 25mL 量瓶中, 精密加入标准贮备液适量 (制备高、中、低浓度的加样回收率试验样品各 3 份), 按 “2.2.2” 项下操作, 制得加样回收率试验溶液, 在上述色谱条件下测定, 齐墩果酸的平均回收率为 100.0%, RSD 为 1.2% (n=9)。结果表明, 该方法准确度高, 相关数据见下表。

编号	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
高-1	5.3668	10.2040	15.7031	100.8496	99.95	1.2
高-2	5.8068	10.2040	16.2100	101.2441		
高-3	5.7982	10.2040	15.8953	99.3319		
中-1	5.8885	5.1020	10.9529	99.6578		
中-2	5.7595	5.1020	10.7552	99.0213		
中-3	5.8003	5.1020	10.6951	98.0994		
低-1	5.7638	2.0408	7.7565	99.3836	99.8412	
低-2	5.7552	2.0408	7.9675	102.1998		
低-3	5.9616	2.0408	7.9897	99.8412		

3.3 精密度

3.3.1 方法重复性

按“2.2.2”操作,平行制备6份供试品溶液,在上述色谱条件下,测定峰面积。测得供试品中齐墩果酸含量平均值为21.48332mg·g⁻¹,RSD为1.1%(n=6)。

3.3.2 中间精密密度

不同实验人员按建立的新方法操作,分别应用不同品牌液相色谱仪定,在上述色谱条件下测定,计算测得供试品中齐墩果酸含量的RSD值均未超过2.0%(n=6)。结果表明,该方法中间精密密度良好。

3.4 线性

取齐墩果酸对照品约0.25g,精密称定,置25ml量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成浓度约为10mg·mL⁻¹的标准贮备液。再精密量取标准贮备液适量,用流动相稀释成浓度为0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0mg·mL⁻¹的系列标准品溶液。在上述色谱条件下测定,得回归方程为:Y=63.8943X+15.733,R²=0.9998(n=6)。结果表明,齐墩果酸在0.1020mg·mL⁻¹~3.0612mg·mL⁻¹浓度范围内与峰面积线性关系良好。

3.5 耐用性

取供试品溶液,在上述色谱条件下,分别在0、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24h处进样,测定峰面积。计算齐墩果酸峰面积的RSD为1.8%(n=6)。结果表明,室温24h内该溶液的稳定性良好。

4 讨论

4.1 检测波长

在上述色谱条件下,二极管阵列检测器可同时采集200nm、205nm、210nm三个波长下的液相色谱图进行比对。通过对比可知,齐墩果酸的甲醇溶液在200nm处有最大吸收,兼顾考虑减少杂质和溶剂末端吸收影响,选定205nm作为本方法的检测波长。

4.2 提取条件

以齐墩果酸的提取率为指标,考察不同提取方式(超声提取法、加热回流提取法),不同比例的提取溶剂(100%甲醇、75%甲醇、50%甲醇)、不同提取时间(30min、60min、120min),进行提取试验。结果表明,采用100%甲醇加热回流30min提取方式效果最佳。

4.3 流动相的选择

乙腈做洗脱强度调节剂,其峰形和分离效果明显优于含甲醇及其他有机溶剂的流动相体系。将流动相体系乙腈-水在不同比例(90:10)~(40:60)之间调整,发现乙腈-水(90:10)时,齐墩果酸色谱峰保留时间缩短,峰形变得尖锐,且能与各相邻峰良好分离。

5 结论

本实验对复方女贞子胶囊处方中女贞子的主要活性成分齐墩果酸提取方式进行了探讨,建立了齐墩果酸的HPLC测定含量方法,检测波长设定为205nm,并按照《中国药典》2020年版(四部)分析方法验证指导原则进行了方法学验证。实验结果表明,建立的新方法准确、灵敏,重复性、专属性强,回收率高,可以用于复方女贞子胶囊的质量控制及标准提升,也为市场监管部门的监管工作提供可靠依据。

参考文献

- [1] 滇 ZJGF/2011-033, 云南省中药材标准[S].
- [2] 王宁,刘硕,杨雷,张希,袁延楠,李慧超,季加孚.2018全球癌症统计报告解读[J].肿瘤综合治疗电子杂志,2019,05(01):94.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020:47-48.
- [4] 胡焱,何淞,王瑶.齐墩果酸的抗菌作用研究进展[J].中国新药杂志,2017,26(3):304-308.
- [5] 孙瑞娜.女贞子抗丙型肝炎病毒活性成分及其作用机制研究[D].南昌:江西农业大学,2014.
- [6] 张明发,沈雅琴.齐墩果酸和熊果酸调血脂、抗肥胖药理作用研究进展[J].药物评价研究,2015,38(1):90-97.
- [7] 廖忻,陈文莹,杨杰也琦,等.齐墩果酸的来源及护肾作用研究进展[J].安徽农业通报,2018,24(6):156-160.
- [8] 孙雅文,张明发,沈雅琴.女贞子及其活性成分降血糖、调血脂、抗肥胖作用研究进展[J].药物评价研究,2016,39(6):1086-1091.
- [9] 李春玲,李磊,蒯振琰,等.新型齐墩果酸类似物的合成及体外抗肿瘤活性研究[J].中国医药工业杂志,2017,48(12):1731-1737.
- [10] 孙道涵,彭平,石任,等.女贞子化学成分研究进展及市场应用现状[C].北京:北京中医药大学,2014:281.

(上接第100页)

受检者往往需要服用尿素[13C]呼气试验诊断试剂盒,由于幽门螺杆菌将会分泌尿素水解酶,而服用该试剂后,可与其发生反应,进而形成二氧化碳,经肺部排出。医务人员通过对该气体进行收集,通过检测,进一步对其是否具有碳13标记进行判断,从而明确患者是否感染幽门螺杆菌。相关研究^[10]表明,在幽门螺杆菌感染患者中,应用碳13呼气检测,敏感度、特异度分别为91.25%、86.69%,阳性、阴性预测值分别为88.53%、92.68%。

结合本文研究,经病理学检查,阳性率为64.44%,经碳13呼气检测,阳性率为63.33%,两组差异不具有统计学意义,P>0.05。将病理学检查设置为金标准,观察碳13呼气检测灵敏度、特异性,其分别为96.55%、93.75%。这说明,碳13呼气检测诊断价值十分良好。

综上所述,在幽门螺杆菌检测中,应用碳13呼气检测,具有较高的特异性与灵敏性,并且操作存在无创性特点,相对安全,可在临床中予以推广。

参考文献

- [1] 龙云,何燕,卜琪,等.根除幽门螺杆菌对老年功能性消化不良的治疗作用[J].中国微生态学杂志,2020,32(11):1289-1292.
- [2] 熊晓芳,张广政,高霖,等.清胃健脾法治疗幽门螺杆菌阳

性慢性萎缩性胃炎临床研究[J].新中医,2020,52(22):70-72.

- [3] 余红梅.碳13呼气检测在幽门螺杆菌感染中的诊断价值[J].中国医疗器械信息,2020,26(21):138-139.
- [4] 张婉丽,闵榴芳.幽门螺杆菌感染与老年消化性溃疡的相关性研究[J].贵州医药,2020,44(10):1557-1558.
- [5] 毛家琪,庄丽维.幽门螺杆菌感染的诊疗进展[J].医学综述,2020,26(21):4253-4257.
- [6] 张彦亭,杨振威,原姗姗,等.不同分型幽门螺杆菌感染消化性溃疡患者血清胃蛋白酶原、共刺激分子CD₄₀、α防御素表达及检测意义[J].陕西医学杂志,2020,49(10):1310-1313.
- [7] 赵锦绣.幽门螺杆菌的相关研究进展[J].继续医学教育,2020,34(09):61-63.
- [8] 黎杨杨,林裕锋,陈冬玲.血清幽门螺杆菌抗体联合胃蛋白酶原检测在胃癌和癌前病变筛查中的作用[J].中国当代医药,2020,27(25):187-189+193.
- [9] 张睿祺,张哲,陈东,等.荧光定量PCR法与免疫组织化学法检测胃黏膜活检标本中幽门螺杆菌感染的比较[J].中华病理学杂志,2020,49(09):934-937.
- [10] 李红,杨天阔,申亚琳,等.幽门螺杆菌药敏检测方法研究进展[J].中华医学杂志,2020,100(30):2393-2396.

(上接第101页)

总而言之,血液生化检测分析各阶段中针对影响因素做针对性的质控管理,可以有效的优化管理效果。

参考文献

- [1] 何泽波.血液生化检测分析各阶段质控影响因素的探讨[J].家庭医药·就医选药,2020,(10):124.

[2] 宋霞.血液生化检测分析各阶段质控影响因素的探讨[J].中国农村卫生,2020,12(13):60-61.

- [3] 邵魁巍.血液生化检测分析各阶段的质控影响因素[J].饮食保健,2020,7(31):259-260.
- [4] 赵越,修云霞,于琦,等.临床血液生化检验标本分析过程中影响检测准确性的单因素分析[J].中国当代医药,2019,26(21):151-154.