

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.09.016

高效液相色谱法测定产后康膏中盐酸益母草碱含量*

徐宁宁¹, 朱辰奇^{2,3}, 顾依³, 景荣先², 周琴², 沈惠明², 陈志鹏³, 刘馨^{2△}

(1. 南京海辰药业股份有限公司, 江苏 南京 215000; 2. 南京医科大学附属苏州医院药学部, 江苏 苏州 215002; 3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 建立测定院内制剂产后康膏中盐酸益母草碱含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Kromasil 100-S-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸溶液(22:78, V/V), 流速为 1.2 mL/min, 检测波长为 280 nm, 进样量为 10 μL, 柱温为 20 ℃。结果 盐酸益母草碱质量浓度在 0.004 5~1.125 0 mg/mL 范围内与峰面积良好线性关系良好($R^2=0.999\ 9$); 精密度、稳定性和重复性试验结果的 RSD 均小于 1.50%; 平均加样回收率为 100.63%, RSD 为 3.99% ($n=6$)。结论 该方法专属性强, 准确度高, 可用于测定产后康膏中盐酸益母草碱的含量, 符合院内制剂快速检查要求。

关键词: 高效液相色谱法; 产后康膏; 盐酸益母草碱; 含量

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)09-0056-03

Content Determination of Leonurine Hydrochloride in Chanhoukang Paste by HPLC

XU Ningning¹, ZHU Chenqi^{2,3}, GU Yi³, JING Rongxian², ZHOU Qin², SHEN Huiming², CHEN Zhipeng³, LIU Xin²

(1. Nanjing Hicin Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing, Jiangsu, China 215000; 2. Department of Pharmacy, Suzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou, Jiangsu, China 215002; 3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu, China 210023)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the content determination of leonurine hydrochloride in the Chanhoukang Paste. **Methods** The chromatographic column was Kromasil 100-S-C₁₈ column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid solution(22:78, V/V), the flow rate was 1.2 mL/min, the detection wavelength was 280 nm, the injection volume was 10 μL, and the column temperature was 20 ℃. **Results** The linear range of leonurine hydrochloride was 0.004 5-1.125 0 mg/mL($R^2=0.999\ 9$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 1.50%, the average recovery of leonurine hydrochloride was 100.63% with RSD of 3.99% ($n=6$). **Conclusion** The method is specific and accurate, and can be used for the content determination of leonurine hydrochloride in Chanhoukang Paste, which can meet the requirements of rapid examination of hospital preparations.

Key words: HPLC; Chanhoukang Paste; leonurine hydrochloride; content

产后恶露不绝表现为子宫收缩无力, 阴道不规则出血, 伴血块或坏死蜕膜组织成分经阴道排出, 持续 10 d 以上者, 会导致感染甚至败血症^[1]。产后康膏处方来源于卫生部部颁药品标准(中药成方制剂第十五册), 用于治疗产后或流产后贫血和恶露不净, 疗效显著。产后康膏由益母草、黄芪、党参、当归、丹参、神曲、陈皮、香附、乌药、木香、生地黄、熟地黄、砂仁、杜仲、泽泻、甘草、白

芍、山楂、谷芽、麦芽 20 味中药组方。君药益母草味苦、辛, 性微寒, 用于月经不调, 痛经、经闭、恶露不尽, 水肿尿少等, 对子宫收缩和凝血系统具有双向调节作用^[2-5]。《本草衍义》中记载益母草“治产前产后诸疾, 行血养血”, 《本草蒙筌》中记载益母草“去死胎, 安生胎, 行瘀血, 生新血”^[6-8]。产后康膏在部颁药品标准中仅以薄层色谱鉴别和膏剂密度作为检查项, 不利于药品质量的控

*基金项目: 国家重点研发计划-中医药现代化研究项目[2018YFC1706905]; 江苏省苏州市科技发展计划项目[SYSD2018242, SYSD2019187, SYSD2020243]; 江苏省药学会-奥赛康医院药学基金科研项目[A202015]。

第一作者: 徐宁宁, 女, 硕士, 工程师, 研究方向为药剂学, (电子信箱)xnn13770735450@163.com。

△通信作者: 刘馨, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药剂学, (电子信箱)arron_liu@163.com。

[8] 柴龙龙, 王凤山, 王彦厚, 等. 火焰原子吸收分光光度法测定血液保存液Ⅲ中钠含量[J]. 中国药业, 2016, 25(19): 59-60.

[9] 王慧, 石克, 罗静, 等. 火焰原子吸收分光光度法测定舒筋活血丸中微量元素铁[J]. 中国药业, 2015, 24(8): 67-68.

[10] 毛睿, 杨颖, 陈乃江. 原子吸收分光光度法测定羧甲基纤维素钠中铁含量[J]. 中国药业, 2014, 23(23): 44-45.

[11] 郭雷, 宋宇, 邵天舒, 等. 微波消解-电感耦合等离子体质谱法测定整蛋白型肠内营养剂中铁、锌、铜、锰元素含

量[J]. 中国药业, 2020, 29(21): 72-74.

[12] 刘晓明, 王晓蕾, 袁浩, 等. 电感耦合等离子体光谱法(ICP-OES)测定特灵眼药中铁、铅、钙、铝、镁、硼、钠[J]. 药物评价研究, 2020, 43(11): 2229-2232.

[13] 李江, 王江瑞, 张潇, 等. 微波消解-原子吸收分光光度法测定不同产地药用忍冬中重金属[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 1054-1057.

(收稿日期: 2020-07-17; 修回日期: 2020-11-19)

制,有必要寻求新的检查项,在符合院内制剂快速检查要求的同时,提高产后康膏质量标准。本研究中以盐酸益母草碱作为产后康膏的指标成分,采用高效液相色谱法测定不同批次产后康膏中盐酸益母草碱的含量,以作为其质量控制方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

BS-124S 型电子天平(德国赛多利斯公司,精度为十万分之一);LC-2010A HT 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);MicroCL 型离心机(美国赛默飞世尔公司);Synergy UV 型纯水仪(美国密理博公司);超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为 300 W,频率为 50 kHz)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈(色谱纯,加拿大 Calepure 公司);磷酸(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);盐酸益母草碱对照品(含量大于 98%,中国食品药品检定研究院,批号为 110823-201807);产后康膏(苏州市立医院院内制剂,批号分别为 20200414,20200420,20200426);水为实验室自制。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-S-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.2% 磷酸溶液(22:78, V/V);流速:1.2 mL/min;检测波长:280 nm;进样量:10 μL;柱温:20℃。

2.2 溶液制备

取样品 2.64 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 甲醇 20 mL,超声处理(功率为 250 W,频率为 33 kHz)30 min,称定质量,用甲醇补足减失的质量,即得供试品溶液。以处方工艺制备不含益母草的样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。取盐酸益母草碱对照品适量,精密称定,置 10 mL 棕色容量瓶中,加 75% 甲醇制成质量浓度为 1.125 mg/mL 的对照品溶

液,置 4℃ 避光保存。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下 3 种溶液,加 75% 甲醇稀释,0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果见图 1。可见,相邻色谱峰之间分离度均大于 1.5,与对照品溶液色谱对应位置上有相同保留时间的色谱峰,且阴性对照无干扰,表明方法专属性良好。

线性关系考察:取 2.2 项下对照品溶液,用 75% 甲醇稀释成质量浓度为 1.125 0,0.562 5,0.225 0,0.112 5,0.022 5,0.004 5 mg/mL 的系列对照品溶液,0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 15\,161\,107.99X + 15\,832.73$, $R^2 = 0.999\,9$ ($n = 6$)。结果表明,盐酸益母草碱质量浓度在 0.004 5~1.125 0 mg/mL 范围与峰面积线性关系良好。

精密密度试验:取样品(批号为 20200414),依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,重复进样 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.29% ($n = 6$),表明仪器精密密度良好。

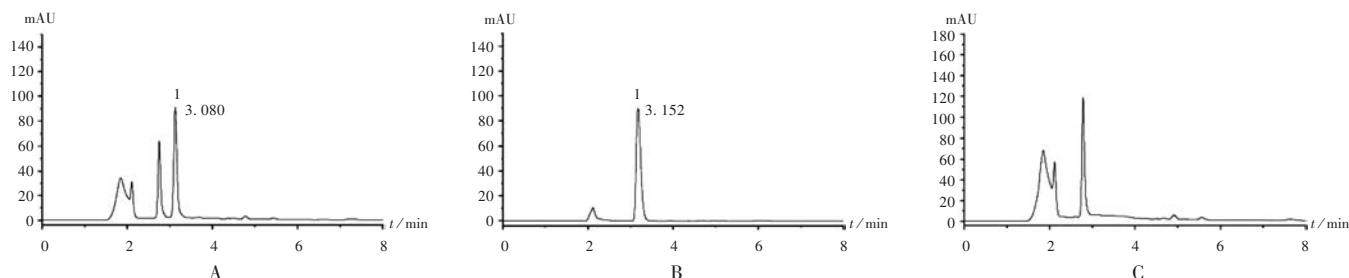
重复性试验:取样品(批号为 20200414),依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算盐酸益母草碱含量。结果的 RSD 为 1.37% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为 20200414),依法制备供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,10,12,24 h 时进样测定,计算盐酸益母草碱峰面积。结果的 RSD 为 0.96% ($n = 8$),表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

加样回收试验:取样品(批号为 20200414)适量,平行 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,进样测定,并计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 20200414,20200420,20200426)样品,依法制备供试品溶液,平行 3 份,进样,测定峰面积,用外标法计算含量。结果见表 2。



1. 盐酸益母草碱
A. 供试品溶液 B. 对照品溶液 C. 阴性供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. leonurine hydrochloride

A. Test solution B. Reference solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 盐酸益母草碱加样回收试验结果($n=6$)

Tab. 1 Results of the recovery test of leonurine hydrochloride($n=6$)

取样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.054	7.12	7.05	13.84	95.32	100.63	3.99
1.051	7.10	7.15	14.07	97.48		
1.162	7.85	7.69	15.73	102.47		
1.022	6.91	7.12	14.33	104.21		
1.087	7.34	7.36	15.10	105.43		
1.014	6.85	6.98	13.75	98.85		

表2 样品中盐酸益母草碱含量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Content determination of leonurine hydrochloride in different batches of Chanhoukang Paste($n=3$)

批号	含量(mg/g)			$\bar{X}$	RSD
	1	2	3	(mg/g)	(%)
20200414	6.757	6.742	6.756	6.7517	0.12
20200420	6.354	6.369	6.351	6.3580	0.15
20200426	6.125	6.154	6.142	6.1403	0.24

3 讨论

3.1 指标成分选择

益母草碱是产后康膏方中君药益母草的主要有效成分,通过抗血小板凝聚达到活血化瘀的作用,直接清除自由基和抑制活性氧(ROS)的产生。通过核因子激活的B细胞的 κ -轻链增强(NF- κ B)信号通路,抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)介导的炎症,可减轻大肠杆菌诱导的乳腺炎^[9-15]。因此,选择盐酸益母草碱作为产后康膏的指标成分。研究表明,盐酸益母草碱含量较高,稳定性较好,可作为指标成分。

3.2 样品处理方式选择

前期研究中,选择甲醇超声提取、乙醇超声提取和乙酸乙酯萃取3种方式处理样品。经甲醇超声和乙酸乙酯萃取,盐酸益母草碱的提取率较高,定量准确。甲醇超声提取更便捷,适用于院内制剂的快速检测,故选择甲醇超声处理。

3.3 色谱条件选择

前期研究中发现,产后康膏按照2015年版《中国药典(一部)》中益母草的盐酸益母草碱高效液相色谱法测定含量,出现明显的干扰峰,色谱峰形存在明显拖尾,且分离度差。优化色谱条件,流动相为乙腈-0.2%磷酸溶液(22:78, V/V),检测波长为280 nm,流速为1.2 mL/min,柱温为20℃。结果表明,盐酸益母草碱的色谱峰分离度高,拖尾现象显著改善,且定量准确。

3.4 方法评价

产后康膏现有理化鉴别和检查项不足以对制剂进行质量控制。使用高效液相色谱法测定产后康膏中盐酸益母草碱的含量,具有较好的准确性和先进性,保证产

后康膏质量的同时,提升其临床应用的安全性。该方法专属性强,准确度高,排除了干扰成分,且检测用时短,适用于院内制剂产后康膏的快速检测。

参考文献

- [1] 鲁景元,李兵,陈春林. 血管内介入技术在产后出血防治中的应用专家共识(2019)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019,35(12):1333-1339.
- [2] 王辉,丁研,陈德森. 益母草注射液辅助子宫前后壁贯穿缝合术防治高危难治性产后出血的临床研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化,2019,21(7):1525-1529.
- [3] 章根琴. 鲜益母草胶囊对人工流产后患者的临床疗效及其对血清HCG、E₂和P水平影响[J]. 中成药,2019,41(5):1200-1202.
- [4] 陈璐,贺晶,刘兴会,等. 益母草注射液用于阴道分娩后胎膜残留的多中心临床研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019,35(5):564-568.
- [5] 乔晶晶,吴啟南,薛敏,等. 益母草化学成分与药理作用研究进展[J]. 中草药,2018,49(23):5691-5704.
- [6] 冯群,赵红,孙蓉. 益母草临床应用和不良反应研究进展[J]. 中国药物警戒,2014,11(2):74-76.
- [7] 翁志平,梁锦杰. 益母草不同炮制品质量研究[J]. 中国民族民间医药,2019,28(11):31-34.
- [8] 谭亚杰. 益母草资源化学与质量标准研究[D]. 南京:南京中医药大学,2019.
- [9] LI YY, LIN YK, LIU XH, et al. Leonurine: From Gynecologic Medicine to Pleiotropic Agent[J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2020,26(2):152-160.
- [10] 刘娟,周勤梅,彭成,等. 细叶益母草化学成分及其抗血小板聚集活性的研究[J]. 中成药,2015,37(11):2439-2442.
- [11] 张雪,谢晓芳,熊亮,等. 益母草芳香族化合物对大鼠体外凝血功能影响[J]. 中成药,2015,37(7):1573-1575.
- [12] 袁明,赵永海,李家明,等. 丁香酸衍生物的合成及抗血小板聚集活性[J]. 中国新药杂志,2011,20(18):1801-1804.
- [13] FISKUM G, ROSENTHAL RE, VERECZKI V, et al. Protection Against Ischemic Brain Injury by Inhibition of Mitochondrial Oxidative Stress[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2004,36(4):347-352.
- [14] OHTSU A, TANAKA H, SENO K, et al. Palmitic acid stimulates interleukin-8 via the TLR4/NF- κ B/ROS pathway and induces mitochondrial dysfunction in bovine oviduct epithelial cells[J]. AJRI: American Journal of Reproductive Immunology, 2017,77(6):1-10.
- [15] SONG X, WANG T, ZHANG Z, et al. Leonurine Exerts Anti-Inflammatory Effect by Regulating Inflammatory Signaling Pathways and Cytokines in LPS-Induced Mouse Mastitis[J]. Inflammation, 2015,38(1):79-88.

(收稿日期:2020-07-11;修回日期:2020-11-20)