

[12] Sudbery P E. Growth of *Candida albicans* hyphae[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(10): 737-748.

[13] Hogan D A, Sundstrom P. The Ras/Camp/PKA signaling pathway and virulence in *Candida albicans*[J]. *Future Microbiol*, 2009, 4(10): 1263-1270.

[14] Mancera E, Porman A M, Cuomo C A, *et al*. Finding a missing gene: EFG1 regulates morphogenesis in candida tropicalis[J]. *G3 (Bethesda)*, 2015, 5(5): 849-856.

[15] Padmavathi A R, Bakkiyaraj D, Thajuddin N, *et al*. Effect of 2, 4-di-tert- butylphenol on growth and biofilm formation by an opportunistic fungus *Candida albicans*[J]. *Biofouling*, 2015, 31(7): 565-574.

[16] Mayer F L, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms[J]. *Virulence*, 2013, 4(2): 119-128.

HPLC 法评估补肾强身胶囊中酒女贞子的质量

张鹏程，张崇生*，倪赞
(温州市食品药品检验科学研究院，浙江 温州 325008)

摘要：**目的** HPLC 法评估补肾强身胶囊中酒女贞子的质量。**方法** 建立 HPLC 法测定补肾强身胶囊中红景天苷和特女贞苷的含有量，通过测定不同炮制时间两者的含有量，探讨女贞子在炮制过程中的变化规律，通过配对样本 *t* 检验分析补肾强身胶囊和酒女贞子中特女贞苷含有量和红景天苷含有量的比值（比值）。**结果** 红景天苷和特女贞苷分别在 2.956~118.2、12.46~498.2 μg/mL 范围内线性关系良好（*r*≥0.999 8），平均回收率分别为 103.78%、103.81%，RSD 分别为 1.2%、0.7%。21 h 内随着炮制时间的延长，酒女贞子中红景天苷含有量逐渐升高，特女贞苷含有量逐渐降低，比值逐渐变小。*t* 检验表明补肾强身胶囊和酒女贞子的比值无显著差异。29 批样品红景天苷、特女贞苷含有量和比值范围分别为 0.09~0.60 mg/粒、0.60~3.62 mg/粒和 1.5~31.7。**结论** 该方法准确有效，重现性好，可为提高补肾强身胶囊质量标准提供依据。

关键词：补肾强身胶囊；酒女贞子；红景天苷；特女贞苷；HPLC

中图分类号：R284.1 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2020)11-2970-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.027

Quality assessment of wine-steamed *Ligustri Lucidi Fructus* in Bushen Qiangshen Capsules by HPLC

ZHANG Peng-cheng，ZHANG Chong-sheng*，NI Zan
(Wenzhou Institute for Food and Drug Control, Wenzhou 325008, China)

KEY WORDS: Bushen Qiangshen capsules; wine-steamed *Ligustri Lucidi Fructus*; salidroside; specnuezhenide; HPLC

补肾强身胶囊由淫羊藿、金樱子、菟丝子、酒女贞子和烫狗脊 5 味药材组方而成，主治腰酸足软、头晕耳鸣、眼花心悸、阳痿遗精等症状^[1]。酒女贞子为方中臣药，其制法为取净女贞子，照酒炖法或酒蒸法（通则 0213）炖至酒吸尽或蒸透^[2]。女贞子酒制后凉滑之性缓和，滋补肝肾作用增强^[3-4]。较多文献研究表明女贞子炮制后环烯醚萜

苷类成分如特女贞苷含有量降低，红景天苷含有量升高^[5-8]。

补肾强身胶囊现行标准有卫生部药品标准中药成方制剂第四册标准和多个企业注册标准，这些标准过于简单，无法有效控制内在质量。2015 年版《中国药典》标准除性状外无法有效区分生品女贞子和炮制品，制成中成药后更无法评估药材质量。

收稿日期：2019-12-10
基金项目：2020 年温州市基础性科研项目（Y2020193）
作者简介：张鹏程（1987—），男，硕士，主管药师，从事药物分析研究。Tel: 13600671565, E-mail: zpc@zju.edu.cn
* 通信作者：张崇生（1974—），男，硕士，副主任药师，从事药物分析研究。Tel: (0577) 88536561, E-mail: 1018763742@qq.com

纪鑫等^[8]研究发现合格酒女贞子中特女贞苷与红景天苷比值(比值)不大于8;赵淑淑等^[9]通过建立薄层色谱和特女贞苷含有量测定方法完善和提高酒女贞子配方颗粒的质量标准;范妙璇等^[10]通过HPLC测定二至丸中的特女贞苷、红景天苷和酪醇的含有量,综合评价其质量。然而这些研究均未涉及中成药中酒女贞子炮制相关的指标。

因此,本实验建立HPLC法测定补肾强身胶囊中红景天苷和特女贞苷的含有量,通过两者含有量比值分析酒女贞子的炮制程度,以此评估10个生产企业29批样品中酒女贞子的质量。

1 材料

1.1 仪器 Shimadzu LC-20AD 高效液相色谱(日本岛津公司);XS205DU 分析天平(十万分之一,瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司);SB-5200D 超声波清洗器(宁波生物科技股份有限公司);TGL-16C 高速离心机(上海安亭科学仪器厂);Milli-Q Integral 5 超纯水器(德国 Millipore 公司);美的 WH2237 电磁炉(美的集团股份有限公司);不锈钢多层蒸锅(君汇商用厨具直销店)。

1.2 试剂与药物 对照品红景天苷(批号110818-201708)、特女贞苷(批号111926-201605)均购于中国食品药品检定研究院。原药材购于浙江华宇药业股份有限公司,经温州市食品药品检验科学研究院谢秉湘副主任中药师鉴定均为对应药材正品。29批补肾强身胶囊均来自2019年浙江省药品质量考核抽检样品。乙醇为分析纯;乙腈为色谱纯;黄酒酒精度为14.5%。

2 方法与结果

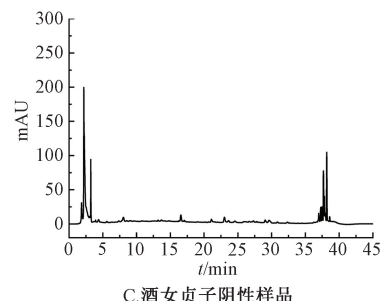
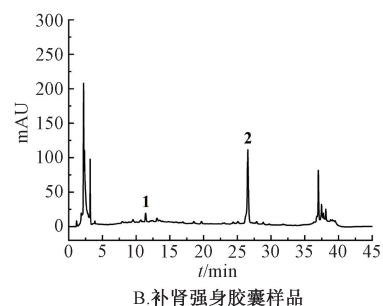
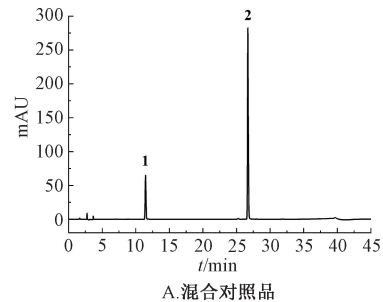
2.1 补肾强身胶囊与酒女贞子制备 按卫生部药品标准中药成方制剂第四册处方比例制备9批补肾强身胶囊样品,按处方比例除去酒女贞子制备1批酒女贞子阴性样品。参照2015年版《中国药典》女贞子项下酒女贞子制备中的酒蒸法和文献[8]制备酒女贞子。分别取3批女贞子饮片各400 g,加入100 g 黄酒闷润15 h,分装至平皿中,每份50 g,放入蒸锅,电磁炉上蒸制,待蒸锅中蒸气饱满后开始计时,分别于蒸制3、6、9、12、15、18、21、24 h 时各取一份样品,晾干24 h 后,60℃干燥5 h,作为实验室自制的不同炮制时间的酒女贞子样品。

2.2 混合对照品溶液制备 取红景天苷对照品约12.5 mg,精密称定,加甲醇定容至25 mL,作为红景天苷对照品贮备液。取特女贞苷对照品约

12.5 mg,精密称定,精密加入红景天苷对照品贮备液5 mL,甲醇定容至25 mL,混匀,即得。

2.3 供试品溶液制备 取补肾强身胶囊10粒,倾出内容物,研细混匀,称取约0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%乙醇50 mL,称定质量,超声(250 W, 40 kHz)处理30 min,放冷至室温,用50%乙醇补足减失的质量,摇匀,离心取上清,经0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液,即得。取酒女贞子粉末(过5号筛),称取约0.25 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备。

2.4 色谱条件 采用Agilent ZORBAX SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~10 min, 5% A~15% A; 10~30 min, 15% A~25% A; 30~35 min, 25% A~50% A; 35~45 min, 50% A~5% A);体积流量1.0 mL/min;柱温40℃;检测波长224 nm;进样量10 μL。色谱图见图1。



1. 红景天苷 2. 特女贞苷
1. salidroside 2. specnuezhenide

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.5 线性关系考察 分别精密吸取混合对照品溶

液 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0 mL 置 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，制成不同质量浓度的混合对照品溶液，在“2.4”项条件下进样，记录色谱图。以质量浓度为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)进行回归，得红景天苷、特女贞苷的回归方程分别为 $Y=1.354\times10^7X+4\,479.98$ ($r=0.999\,8$)； $Y=1.356\,5\times10^7X+29\,081.9$ ($r=0.999\,9$)。结果表明红景天苷、特女贞苷分别在 2.956 ~ 118.2、12.46~498.2 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL ，在“2.4”项条件下连续进样 6 次，测得红景天苷、特女贞苷峰面积 RSD 均为 0.1%，表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取供试品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项条件下，分别于 0、3、6、9、12 h 进样，测得红景天苷、特女贞苷

的 RSD 分别为 0.3%、0.4%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.8 专属性试验 取酒女贞子阴性样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项条件下进样，在与对照品色谱峰相应的位置上，无干扰色谱峰出现，表明专属性好。

2.9 重复性试验 精密称取供试品 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项条件下进样，测得红景天苷、特女贞苷含有量分别为 0.299、14.871 mg/g，RSD 分别为 1.2%、0.6%，表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取已知含有量的供试品约 0.25 g，共 6 份，分别精密加入 5 mL 混合对照溶液，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项条件下进样，依法测定红景天苷、特女贞苷含有量，计算回收率，结果见表 1。

表 1 各成分加样回收率试验结果 ($n=6$)

Tab. 1 Results of recovery tests for various constituents ($n=6$)

成分	样品量/mg	加入量/mg	测得总量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
红景天苷	0.495	0.591	1.110	104.06	103.78	1.2
	0.492	0.591	1.107	104.06		
	0.494	0.591	1.099	102.37		
	0.498	0.591	1.103	102.37		
	0.496	0.591	1.121	105.75		
	0.494	0.591	1.109	104.06		
特女贞苷	2.208	2.491	4.794	103.81	103.81	0.7
	2.194	2.491	4.770	103.41		
	2.203	2.491	4.779	103.41		
	2.221	2.491	4.787	103.01		
	2.212	2.491	4.828	105.02		
	2.203	2.491	4.799	104.22		

2.11 样品含有量测定 取实验室不同炮制时间的酒女贞子样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项条件下进样，依法测定红景天苷、特女贞苷的峰面积，采用外标法计算含有量。

结果发现，随着炮制时间的延长 (0~21 h)，实验室炮制的酒女贞子样品中红景天苷含有量逐渐升高，特女贞苷含有量逐渐降低，21 h 后两者均降低；比值逐渐变小，见表 2。

表 2 炮制过程中酒女贞子成分变化 ($n=2$)

Tab. 2 Constituent changes of *Ligustri Lucidi Fructus* during processing ($n=2$)

时间/h	1 [#]			2 [#]			3 [#]		
	红景天苷/%	特女贞苷/%	比值	红景天苷/%	特女贞苷/%	比值	红景天苷/%	特女贞苷/%	比值
0	0.08	2.85	35.6	0.04	0.78	19.5	0.07	2.01	28.7
3	0.09	2.72	30.2	0.07	0.68	9.7	0.13	2.16	16.6
6	0.13	2.21	17.0	0.10	0.61	6.1	0.18	1.67	9.3
9	0.21	1.67	8.0	0.12	0.47	3.9	0.26	1.51	5.8
12	0.45	1.65	3.7	0.17	0.29	1.7	0.37	1.15	3.1
15	0.54	1.42	2.6	0.20	0.22	1.1	0.54	1.03	1.9
18	0.62	0.97	1.6	0.22	0.15	0.7	0.63	0.82	1.3
21	0.87	0.89	1.0	0.24	0.15	0.6	0.69	0.63	0.9
24	0.61	0.47	0.8	0.26	0.10	0.4	0.48	0.31	0.6

注:1[#]女贞子产自浙江,2[#]女贞子产自安徽,3[#]女贞子产自广东。

取实验室制备的 9 批补肾强身胶囊样品和对应的酒女贞子药材，按“2.3”项下方法制备供试品

溶液，在“2.4”项条件下进样，依法测定红景天苷、特女贞苷的峰面积，采用外标法计算含有量。

结果表明，按照补肾强身胶囊处方计算，9 批酒女贞子的特女贞苷平均转移率为 93.29%，RSD 为 4.88%。

取 29 批抽检样品，按“2.3”项下方法处理，依法测定红景天苷、特女贞苷的峰面积，采用外标法计算其含有量，结果见表 3。

表 3 各成分含有量测定结果 (n=2)
Tab.3 Results of content determination of various constituents (n=2)

编号	生产企业	红景天苷/ (mg·粒 ⁻¹)	特女贞苷/ (mg·粒 ⁻¹)	比值
1	A	0.18	0.84	4.7
2		0.18	1.21	6.8
3		0.18	1.54	8.7
4		0.21	1.76	8.4
5		0.12	1.83	15.5
6		0.15	1.85	12.2
7		0.09	1.85	20.3
8		0.09	2.31	26.7
9		0.09	2.42	27.3
10		0.09	2.82	31.7
11	B	0.33	2.49	7.6
12	C	0.51	3.05	5.9
13	D	0.39	0.60	1.5
14		0.30	0.66	2.2
15		0.38	1.35	3.5
16		0.38	1.37	3.6
17		0.36	1.39	3.8
18		0.30	1.64	5.4
19		0.29	1.91	6.5
20		0.60	2.65	4.5
21		0.24	0.87	3.6
22		0.18	2.47	13.5
23		0.39	2.40	6.2
24		0.12	3.62	30.5
25	I	0.29	3.00	10.3
26	J	0.24	3.39	14.1
27		0.18	3.55	20.0
28		0.18	3.60	20.2
29		0.18	3.60	20.0

注：A.贵州百灵企业集团正鑫药业有限公司、B.黑龙江天宏药业股份有限公司、C.吉林海通制药有限公司、D.吉林玉仁制药股份有限公司、E.江西新赣江药业有限公司、F.陕西盘龙制药集团有限公司、G.上海雷允上药业有限公司、H.四川依科制药有限公司、I.太极集团四川绵阳制药有限公司、J.云南铭鼎药业有限公司、K.浙江海鹤药业有限公司。

3 讨论

3.1 提取溶剂选择 参照相关文献^[8,11-12]，分别考察了不同体积分数甲醇、乙醇溶液的提取效果，结果表明 50%乙醇效果最佳。

3.2 含有量测定限度 29 批样品中特女贞苷含有量范围为 0.60~3.62 mg/粒。根据 2015 年版《中国药典》的规定，以 9 批实验室制备样品的平均转移率为转移率，暂定特女贞苷含有量为每粒不得少于 0.65 mg，29 批样品中仅有 1 批未达到标准，表明各企业对特女贞苷含有量控制较好。

3.3 酒女贞子炮制程度分析 3 批实验室炮制女

贞子的研究表明，1[#]和 3[#]女贞子炮制 9 h，2[#]炮制 6 h 后性状符合法定标准，与文献 [8] 的结果不一致，可能是黄酒用量、蒸气压力等因素的差异所致。将酒女贞子和对应样品的比值进行配对样本 t 检验，表明 95% 置信区间内两者无显著差异，样品中的比值可反映原料的炮制程度。参照文献 [8]，暂定样品比值不大于 8，29 批样品中有 15 批大于 8，且企业 A、F 不同批次差异较大，表明各企业存在较大的酒女贞子炮制不足的风险。

3.4 企业调研 调研结果表明：企业 A 1~4 号样品女贞子炮制时用酒量大于其他批，故比值远小于其他批；企业 C、D 炮制时酒蒸分别 3、4~6 h，比值小于 8，炮制效果较好；企业 I 炮制时酒蒸仅为 10~15 min，比值大于 8，炮制效果不佳；其余企业均直接采购酒女贞子药材，其法定标准与女贞子相差无几，故市场上原料炮制程度千差万别。因此，建议在补肾强身胶囊标准中新增比值用于评估女贞子炮制程度的指标，敦促各企业制定科学规范的炮制工艺，有效控制产品质量。

参考文献：

[1] 卫生部药品标准·中药成方制剂第四册[S].
[2] 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.
[3] 霍雨佳,岳琳,刘颖,等. 酒制对女贞子饮片主要化学成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1): 26-30.
[4] 周爱香,富杭育,沈鸿,等. 女贞子不同炮制品药理作用的比较[J]. 中药材, 1993, 16(8): 25-29.
[5] 张学兰,侯杰,李慧芬,等. 炮制对女贞子中特女贞苷含量的影响[J]. 中药材, 2009, 32(4): 498-500.
[6] 侯杰. 女贞子炮制前后主要有效成分变化规律研究[D]. 济南：山东中医药大学，2009.
[7] 姜秋,蒋海强,李慧芬,等. 女贞子酒蒸过程中 5 种苯乙醇类成分的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16): 60-63.
[8] 纪鑫,刘晓谦,李春,等. 基于 UPLC 技术的女贞子中主要成分炮制变化规律研究及酒女贞子特色质量标准的探讨[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(24): 4862-4868.
[9] 赵淑淑,姚俊霞,李哲,等. 酒女贞子配方颗粒质量标准研究[J]. 中国药业, 2019, 28(13): 41-43.
[10] 范妙璇,谭成,王萌萌,等. 基于 5 种特征性成分综合评价二至丸的质量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 88-92.
[11] 吴修红,孙泽,杨恩龙,等. 酒女贞子 HPLC 指纹图谱的建立及多成分含量的测定[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 273-277.
[12] 韩疏影,项洋洋,王星,等. 女贞子“一测多评”法测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(23): 73-77.