

HPLC 法测定强肝胶囊中龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B

马旭伟^{1,4}, 韦 辉^{2,3}, 刘素香³, 刘 毅³, 张铁军^{3*}, 陈常青^{3*}

1. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017

2. 天津中医药大学, 天津 300193

3. 天津药物研究院, 天津 300193

4. 石家庄汉康生化药品有限公司, 河北 石家庄 050091

摘要: 目的 建立同时测定强肝胶囊中龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 3 种成分的高效液相色谱分析方法。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.05%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL; 检测波长 230 nm。结果 龙胆苦苷在 0.151~1.51 μg 线性关系良好 ($r=0.999\ 6$), 芍药苷在 0.075 2~0.752 0 μg 线性关系良好 ($r=0.999\ 8$), 丹酚酸 B 在 0.113 2~1.358 4 μg 线性关系良好 ($r=0.999\ 5$); 平均回收率分别为龙胆苦苷 99.5%、芍药苷 101.95%、丹酚酸 B 102.74%, RSD 分别为 1.02%、1.77%、1.81%。结论 该方法准确、重现性好、可用于强肝胶囊的质量控制。

关键词: 强肝胶囊; 龙胆苦苷; 芍药苷; 丹酚酸 B; 高效液相色谱; 质量控制

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)06-1125-04

Determination of gentiopicroside, paeoniflorin, and salvianolic acid B in Qianggan Capsule by HPLC

MA Xu-wei^{1,4}, WEI Hui^{2,3}, LIU Su-xiang³, LIU Yi³, ZHANG Tie-jun³, CHEN Chang-qing³

1. Heibei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

4. Shijiazhuang Hankang Biologic Co., Ltd., Shijiazhuang 050091, China

Key words: Qianggan Capsule; gentiopicroside; paeoniflorin; salvianolic acid B; HPLC; quality control

强肝胶囊由茵陈、板蓝根、丹参、白芍、秦艽等 16 味中药组成, 有清热利湿、补脾养血、益气解郁之功效^[1]。研究表明强肝胶囊有较强的抗肝纤维化作用, 具有保护肝细胞, 促进肝细胞再生, 恢复肝功能和抑制纤维化作用^[2-4]。其中多种成分具有保肝作用, 龙胆苦苷作为裂环烯醚萜苷类成分, 是秦艽的主要有效成分, 对化学性及免疫性肝损伤均有保护作用^[5]。白芍总苷为白芍的主要活性成分, 对各种化学性肝损伤均有明显的保护作用。丹酚酸 B 是丹参的水溶性代表性成分, 具有潜在的保肝和抗肝纤维化作用。局颁强肝胶囊的质量标准中, 只

以芍药苷单一成分作为质控指标。文献报道^[6-7]分别对强肝胶囊中龙胆苦苷、丹参酮 II_A、甘草酸进行了测定, 单一指标成分测定难以反映中药质量的整体特征。因此本实验在其原质量标准的基础上, 建立了同时测定龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 3 种指标成分的方法, 建立多指标定量测定的质量标准体系, 进一步提升了该制剂的质量水平。

1 仪器与材料

Dionex 高效液相色谱仪 (包括 P680 四元泵、ASI-100 自动进样器、UVD170U 紫外检测器), 安捷伦液相色谱仪 1100 系列, 包括 G1310A 四元液

收稿日期: 2011-12-01

基金项目: 河北省中小企业创新基金项目

作者简介: 马旭伟 (1979—), 男, 河北石家庄人。Tel: (022)23006840 E-mail: maxuwei@126.com

*通讯作者 张铁军 Tel: (022)23006848 E-mail: tiejunzh2000@yahoo.com.cn

陈常青 Tel: (022)23006829 E-mail: chencq@tjipr.com

相梯度泵、G1313A 自动进样器、G1314A VWD 检测器、CO—201 柱温箱、安捷伦色谱工作站。AB204—N 电子天平(万分之一,瑞士,Mettler-Toledo Co.), AS3120 型超声波清洗器;双列四孔电热恒温水浴锅(山东医疗器械厂)。

龙胆苦苷(批号 110770-200712)、芍药苷(批号 0736-9710)购自中国药品生物制品检定所,丹酚酸 B 购自天津一方科技有限公司,在选定的色谱条件下,按峰面积归一化法计算,三者质量分数均在 98%以上;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,实验用水为天慈纯净水。28 批强肝胶囊样品均由石家庄东方药业有限公司提供,分别编号 S1~S28,对应批号分别为 20100651、20100538、20100426、20100322、20100317、20100214、20091250、20090310、20090924、20070925、20071245、20070205、20100543、20100540、20100431、20100316、20090204、20100646、20110308、20110311、20110309、20110307、20101259、20100647、20101258、20100606、20100412、20110310。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 230 nm, 进样量 10 μL, 流动相为乙腈(A)-0.05% 磷酸水(B), 梯度洗脱: 0~40 min, 10%~35% A; 40~50 min, 35%~100% A; 理论塔板数按龙胆苦苷峰计算不低于 3 000。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别精密称定对照品龙胆苦苷 7.55 mg、芍药苷 3.76 mg、丹酚酸 B 5.66 mg 置 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液。精密量取龙胆苦苷储备液、芍药苷储备液、丹酚酸 B 储备液 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取强肝胶囊内容物混匀, 取约 0.3 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入 70% 甲醇适量, 超声处理 30 min, 取出, 放至室温, 加 70% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

按照处方组成, 称取缺秦艽、丹参、白芍药材制备阴性样品, 称取阴性样品适量, 按照供试品溶

液的制备项下方法操作, 即得。

2.5 专属性考察

在选定的色谱条件下, 分别取供试品溶液、混合对照品溶液、阴性对照溶液进样, 记录色谱图。结果供试品溶液的色谱图在与对照品相对应的保留时间处有相同的色谱峰, 而阴性对照溶液在此处无色谱峰, 说明阴性对照对龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 的测定无干扰, 色谱图见图 1。

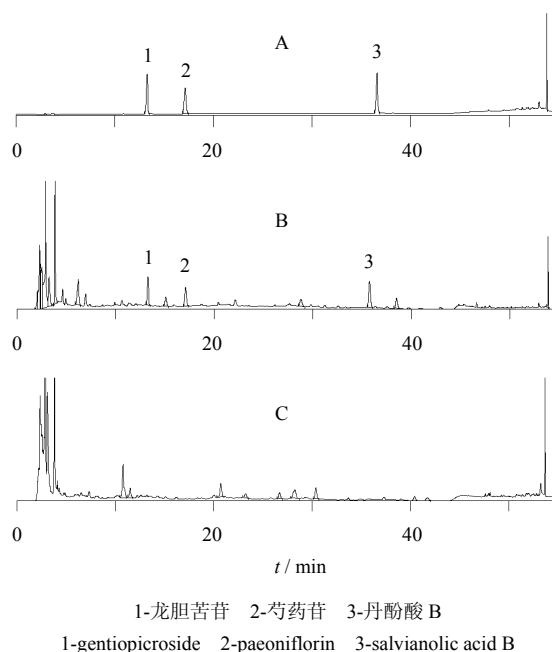


图 1 混合对照品 (A)、强肝胶囊样品 (B)、阴性对照 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A), Qianggan Capsule sample (B), and negative control (C)

2.6 线性关系考察

分别精密吸取龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 对照品储备液 0.5、1、2、3、4 mL, 至 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经微孔滤膜滤过, 取续滤液, 各进样 10 μL, 在上述色谱条件下测定峰面积。以对照品峰面积为纵坐标 (Y), 进样量为横坐标 (X) 进行线性回归, 得 3 种成分的回归方程、相关系数及线性范围, 见表 1。

2.7 精密度试验

取批号为 20100316 的样品, 按照“2.3”项下方法制备供试品溶液, 精密吸取供试品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 记录各指标成分色谱峰面积, 结果龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 值分别为 0.58%、0.74%、1.88%。

表 1 标准曲线的回归方程

Table 1 Regression equation of standard curve

成 分	回归方程	<i>r</i>	线性范围 / μg
龙胆苦苷	$Y=662.29X+2.0293$	0.999 6	0.151 0~1.51 00
芍药苷	$Y=1184.8X-0.5474$	0.999 8	0.075 2~0.752 0
丹酚酸 B	$Y=1475.4X-26.466$	0.999 5	0.113 2~1.358 4

2.8 稳定性试验

取批号为 20100316 的样品,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,密闭放置于室温中,于 0、3、6、9、12、24 h 分别进样 10 μL ,记录各指标成分色谱峰面积,结果龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 峰面积的 RSD 值分别为 0.64%、0.84%、0.72%。表明室温条件下,供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 重复性试验

取批号为 20100316 的样品 6 份,按照“2.3”项下方法制备供试品溶液,注入高效液相色谱仪测定,用外标一点法计算质量分数,结果龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 质量分数的 RSD 值分别为 1.30%、1.97%、1.81%。

2.10 加样回收率试验

取批号为 20100316 的样品 9 份,每份约 0.15 g,精密称定,分别按照 0.15 g 样品中所含被测成分 80%、100%、120%加入龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 对照品,每一个水平平行 3 份,制备供试品溶液,测定,计算回收率,结果平均加样回收率分别为 99.5%、101.95%、102.74%,RSD 值分别为 1.02%、1.77%、1.81%。

2.11 样品测定

取 28 批强肝胶囊,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,精密吸取 10 μL 进样,按上述色谱条件测定,以外标法计算龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 的质量分数,结果见表 2。

3 讨论

3.1 样品提取方法的选择

实验考察了①萃取法:70%甲醇超声提取后分别用醋酸乙酯、水饱和正丁醇萃取,结果表明,用正丁醇作萃取溶媒可以较多地将 3 种成分提取出来,但是用正丁醇萃取 5 次仍不能将龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 完全提取出来。同时考察了溶液 pH 值对各指标成分的提取效率的影响,用 HCl 调 pH 值为 3 后用正丁醇萃取,仍未完全提取,因此放弃萃取法。②大孔树脂吸附法:水提液上 HPD 大孔

表 2 强肝胶囊中龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 的测定

Table 2 Determination of gentiopicoside, paeoniflorin, and salvianolic acid B in Qianggan Capsule

批 号	龙胆苦苷 / %	芍药苷 / %	丹酚酸 B / %
20100651	0.54	0.23	0.43
20100538	0.54	0.24	0.43
20100426	0.54	0.25	0.38
20100322	0.55	0.24	0.30
20100317	0.56	0.29	0.30
20100214	0.55	0.29	0.31
20091250	0.55	0.30	0.43
20090310	0.53	0.27	0.42
20090924	0.53	0.25	0.24
20070925	0.27	0.21	0.51
20071245	0.34	0.18	0.28
20070205	0.43	0.19	0.53
20100543	0.49	0.23	0.47
20100540	0.51	0.22	0.46
20100431	0.49	0.21	0.35
20100316	0.52	0.27	0.35
20090204	0.51	0.30	0.52
20100646	0.48	0.22	0.35
20110308	0.40	0.26	0.22
20110311	0.39	0.27	0.22
20110309	0.37	0.24	0.23
20110307	0.38	0.26	0.26
20101259	0.42	0.25	0.36
20100647	0.50	0.21	0.40
20101258	0.48	0.25	0.39
20100606	0.46	0.21	0.35
20100412	0.42	0.27	0.28
20110310	0.42	0.25	0.24

树脂柱,测定水洗部分和 95%乙醇洗脱部分,结果表明,过柱后各色谱峰分离度不符合规定,更改色谱柱后仍不理想。经过一系列实验比较,降低称样量到 0.3 g 以下时,分离度较好,因此最终选择用 70%甲醇作溶剂,超声处理 30 min 最为适宜。

3.2 检测波长的选择

采用紫外分光光度计分别对龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 3 个对照品进行扫描^[8-9],结果龙胆苦苷、芍药苷、丹酚酸 B 的最大吸收波长分别为 271.5、230.5、288.0 nm。并采用 DAD 检测器对混合对照

品溶液和样品分别进行 200~400 nm 的全波长扫描, 对各波长下的色谱图进行分析比较。综合考虑, 230 nm 下各成分均有较好吸收, 特征峰明显, 且峰形较好, 适宜多指标测定。故确定 230 nm 为检测波长。

3.3 本实验建立了强肝胶囊 HPLC 多指标定量测定的方法, 在同一色谱条件下对 28 批不同批次样品中主要活性成分龙胆苦苷、芍药苷及丹酚酸 B 的量进行了测定, 各批次间指标成分的量相对稳定, 可制定合理的含量限度, 从而保证最终产品批次间的稳定, 确保制剂的安全有效。

质量评价的化学指标应与其有效性和安全性密切相关, 因此, 需要在质量研究和标准建立之初, 确定其有效部位及其物质基础。由于药物成分不一定就是体内最终起到治疗作用的有效成分, 体内过程的研究和评价对于确定中药的药效物质基础及质控指标具有重要的作用, 因此, 还需要通过药物体内过程的研究, 确定中药的最终效应成分^[10]。本研究仅针对胶囊中 3 个成分进行了质量控制, 而体内过程的研究尚未进行。为了更全面有效地控制成品质量, 应进一步开展体内过程的研究和评价, 并进行指纹图谱和谱效关系研究。

参考文献

- [1] 国家药品标准·新药转正标准 (第 35 册) [S]. 2004.
- [2] 陈四喜, 侯循亚, 李 英. 强肝胶囊治疗日本血吸虫病早期肝纤维化的临床研究 [J]. 热带病与寄生虫学, 2006, 4(2): 78-80.
- [3] 黄妙兴, 古 赛. 强肝胶囊治疗非酒精性脂肪性肝纤维化的疗效及机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2010.
- [4] 古 赛, 黄妙兴. 强肝胶囊治疗非酒精性脂肪性肝纤维化的疗效及机制研究 [J]. 中国药房, 2011, 22(36): 3421-3424.
- [5] 郭建华, 田成旺, 刘 晓, 等. 中药环烯醚萜类化合物研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(4): 293-297.
- [6] 陈 理, 孙靖霞. 高效液相色谱法测定强肝胶囊中丹参酮 II_A 及甘草酸的含量 [J]. 中国新药杂志, 2001, 10(6): 436-437.
- [7] 罗晨曲, 吕情花, 彭建军, 等. HPLC 法测定强肝胶囊中龙胆苦苷的含量 [J]. 中国药房, 2008, 19(36): 2849-2850.
- [8] 黎 阳, 刘素香, 张铁军, 等. HPLC 法测定麻仁软胶囊中 7 种成分 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 890-892.
- [9] 贾桂艳, 马 莉, 韩 锋, 等. HPLC 法测定脑通颗粒中丹酚酸 B [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 142-144.
- [10] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.