

HPLC 法同时测定藏茵陈胶囊中 7 种有效成分

田成旺^{1,2}, 张铁军², 蒋伶活^{1,3}

1. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

摘要: 目的 建立同时测定藏茵陈胶囊中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮和齐墩果酸的反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 法。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.02%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温为 30 ℃; 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷、当药醇苷和 1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮的检测波长为 254 nm, 齐墩果酸的检测波长为 210 nm。结果 獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、龙胆苦苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮和齐墩果酸分别在 2.8~56.0、1.2~24.0、0.6~12.0、2.0~40.0、1.2~24.0、0.6~12.0、12.0~240.0 μg/mL 与色谱峰面积呈良好线性关系; 加样回收率分别为 98.9%、101.2%、96.5%、98.6%、96.9%、97.8%、99.3%, RSD 依次为 1.14%、1.72%、1.31%、1.25%、1.37%、1.78%、2.23%。结论 该方法简便、准确, 重复性好, 为藏茵陈胶囊的质量控制提供实验依据。

关键词: 藏茵陈胶囊; 有效成分; 高效液相色谱法; 龙胆苦苷; 獐牙菜苷; 芒果苷; 当药醇苷

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)06-0705-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.06.014

Simultaneous determination of seven active components in Zangyinchen Capsule by HPLC

TIAN Cheng-wang^{1,2}, ZHANG Tie-jun², JIANG Ling-huo^{1,3}

1. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

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

3. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Key words: Zangyinchen Capsule; active components; HPLC; gentiopicroside; sweroside; mangiferin; swertianolin

藏茵陈胶囊收载于卫生部药品标准中药成方制剂 [WS-10411(ZD-0411)-2002], 具有清热解毒、舒肝利胆、退黄的功效, 临床应用较为广泛。藏茵陈胶囊现行标准中对藏茵陈胶囊中齐墩果酸进行定量测定并规定了其量的限度^[1]。现代研究表明, 藏茵陈中含有环烯醚萜、咕吨酮、三萜等多种类别的化学成分^[2-4], 其中环烯醚萜类代表成分包括獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷等, 具有抗炎、促进肝损伤细胞修复等药理活性^[5-6], 咕吨酮类代表成分包括芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮等, 具有抑制转氨酶升高、抗乙肝病毒等药理活性^[7-8],

这些活性均与藏茵陈胶囊的功效相关。故现行标准中只对三萜类代表成分齐墩果酸进行定量测定尚不能有效地控制药品的内在质量。有关藏茵陈药材中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷等多成分的定量测定方法已有相关报道^[9-13], 但关于藏茵陈胶囊中多指标成分定量测定方法的研究尚未见报道。本实验采用梯度洗脱法, 首次建立了藏茵陈胶囊中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮、齐墩果酸 7 种指标成分同时测定的 RP-HPLC 方法; 结果表明, 该方法简便、快速、灵敏度高, 为该药的质量控制提供了依据。

收稿日期: 2012-11-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001627); 天津市科技支撑计划项目 (11ZCKFSY01200)

作者简介: 田成旺, 男, 副研究员, 主要从事中药新药的基础及开发研究。Tel: (022)23006843 E-mail: tiancw@tjpr.com

*通信作者 张铁军, 男, 研究员。Tel: (022)23006848 E-mail: zhangtj@tjpr.com

网络出版时间: 2013-01-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130109.1532.011.html>

1 仪器与试剂

Dionex 高效液相系统 (美国戴安公司), 配有 DAD 检测器和 Chromeleon 色谱工作站; Sartorius 电子天平 (十万分之一); AS3120 超声仪 (美国 Autoscience 公司)。

獐芽菜苦苷、獐芽菜苷、龙胆苦苷、芒果苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基-咕吨酮、齐墩果酸对照品均购自中国食品药品检定研究院, 批号依次为 0785-200203、111742-200501、110770-200712、111607-200301、111744-200501、110709-200505; 当药醇苷, 自制, 经熔点法和 HPLC-DAD 检测质量分数在 98% 以上。甲醇为色谱纯, 流动相用水为双蒸水 (自制), 其余试剂均为分析纯。藏茵陈胶囊购自天津协和药店, 青海大地药业有限公司生产, 批号分别为 20111101、20111201、20120101。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Diamonsil C₁₈ (200 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇-0.02%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 32%甲醇; 15~40 min, 32%~70%甲醇; 40~42 min, 70%~95%甲醇; 42~50 min, 95%甲醇; 50~52 min, 95%~32%甲醇; 52~60 min, 32%甲醇; 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C; 测定獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷和芒果苷、当药醇苷和 1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基-咕吨酮的采集时间为 0~40 min, 检测波长 254 nm; 测定齐墩果酸的采集时

间为 42~50 min, 检测波长 210 nm。理论板数以獐芽菜苦苷和齐墩果酸色谱峰计算均不低于 9 000, 供试品色谱图中, 其他杂质色谱峰与待测物质色谱峰的分离度应符合要求。

2.2 对照品溶液制备

取对照品獐芽菜苦苷、獐芽菜苷、龙胆苦苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基-咕吨酮、齐墩果酸适量, 精密称定, 用甲醇配制成含獐芽菜苦苷 70 μg/mL、獐芽菜苷 15 μg/mL、龙胆苦苷 30 μg/mL、芒果苷 50 μg/mL、当药醇苷 30 μg/mL、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基-咕吨酮 15 μg/mL 和齐墩果酸 300 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得。

2.3 供试品溶液制备

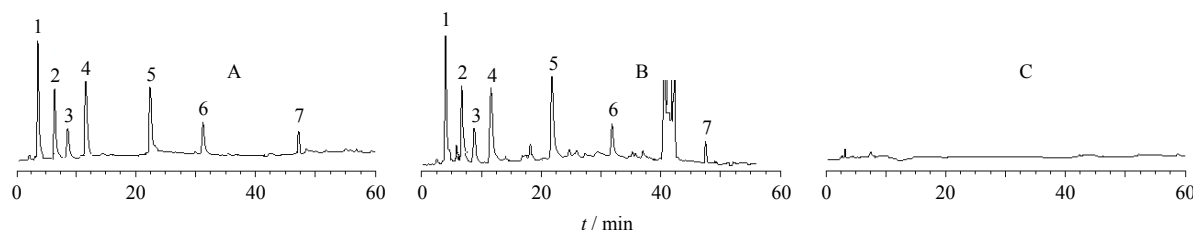
取藏茵陈胶囊内容物 0.5 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入甲醇约 45 mL, 超声 (100 W, 40 kHz) 处理 30 min, 放冷, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.4 空白对照溶液制备

根据藏茵陈胶囊标准, 由相关辅料制得藏茵陈阴性胶囊, 按照供试品溶液的制备方法制得阴性空白对照溶液。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 按照“2.1”~“2.4”项方法进行试验, 结果供试品中各待测成分色谱峰的分离度均大于 1.5, 其他杂质峰及空白对照溶液对待测成分均无干扰。见图 1。



1-獐芽菜苦苷 2-龙胆苦苷 3-獐芽菜苷 4-芒果苷 5-当药醇苷 6-1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基-咕吨酮 7-齐墩果酸

1-swertiamarin 2-gentiopicroside 3-sweroside 4-mangiferin 5-swertianolin 6-1-hydroxy-3, 4, 5-trimethoxy xanthone 7-oleanolic acid

图 1 混合对照品 (A)、藏茵陈胶囊样品 (B) 和阴性样品 (C) 的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixture reference substance (A), Zangyinchén Capsule sample (B), and negative sample (C)

2.5.2 线性关系考察 精密吸取按“2.2”项下方法制备的混合对照品储备液 1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、17.5、20.0 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 以甲醇定容, 摇匀, 即得系列质量浓度的混合对照品溶液。分别吸取上述系列混合对照品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积积分值 (Y)

对质量浓度 (X) 进行线性回归, 得回归方程, 见表 1。取混合对照品储备液不断稀释后进样分析, 以 3 倍信噪比确定检测限, 结果见表 1。

2.5.3 精密度试验 精密吸取“2.5.2”项下中间质量浓度梯度点的混合对照品溶液 10 μL, 连续进样 6 次, 按上述色谱条件测定峰面积值。求得日内精密

度 RSD; 连续分析 4 d, 每天进样 1 次, 求得日间精密度 RSD, 结果见表 2。

2.5.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (批号 20111101), 分别于 0、2、4、6、8、12 h, 按上述色谱条件测定峰面积。结果供试品溶液在 12 h 内色

谱峰面积无明显变化, 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮和齐墩果酸的 RSD 分别为 1.33%、1.46%、1.28%、1.16%、1.05%、1.67%、1.98%, 表明供试品溶液在制备后 12 h 内保持稳定。

表 1 7 种成分的线性回归方程及检测限

Table 1 Linear regression equations and detection limits of seven components

成分	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>	检测限 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
獐牙菜苦苷	$Y=481.58X+67.11$	2.8~56.0	0.999 5	0.18
龙胆苦苷	$Y=447.43X+88.26$	1.2~24.0	0.999 8	0.08
獐牙菜苷	$Y=418.09X+39.79$	0.6~12.0	0.999 3	0.05
芒果苷	$Y=598.22X+125.32$	2.0~40.0	0.999 9	0.08
当药醇苷	$Y=556.78X+101.35$	1.2~24.0	0.999 7	0.08
1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮	$Y=433.26X+68.92$	0.6~12.0	0.999 6	0.06
齐墩果酸	$Y=25.46X+152.35$	12.0~240.0	0.999 1	1.00

表 2 7 种成分的日内及日间精密度结果

Table 2 Intra-day and inter-day precisions of seven components

成分	日内 RSD / %		日间 RSD / %	
	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间
獐牙菜苦苷	1.23	0.67	1.56	0.55
龙胆苦苷	1.11	0.85	1.75	0.76
獐牙菜苷	1.52	0.59	2.01	0.89
芒果苷	0.67	1.01	1.16	0.94
当药醇苷	0.98	1.22	1.35	1.12
1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮	1.25	1.16	1.87	1.28
齐墩果酸	1.34	0.97	1.78	1.01

2.5.5 重复性试验 取同一批样品 (批号 20111101) 6 份, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定各物质的量。结果獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮和齐墩果酸的平均质量分数分别为 5.13、1.52、1.14、7.31、3.82、0.85、22.01 mg/g, RSD 分别为 1.02%、1.13%、1.45%、0.97%、1.14%、1.49%、1.77%。

2.5.6 加样回收率试验 取已测定的藏茵陈胶囊内容物 (批号 20111101) 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 每份中分别精密加入獐牙菜苦苷 (1.28 mg/mL)、龙胆苦苷 (0.38 mg/mL)、獐牙菜苷 (0.28 mg/mL)、芒果苷 (1.83 mg/mL)、

当药醇苷 (0.95 mg/mL) 和 1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮 (0.21 mg/mL) 6 种对照品溶液各 1.0 mL 以及齐墩果酸对照品溶液 (2.75 mg/mL) 2.0 mL, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算回收率。结果獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮和齐墩果酸的平均回收率分别为 98.9%、101.2%、96.5%、98.6%、96.9%、97.8%、99.3%, RSD 依次为 1.14%、1.72%、1.31%、1.25%、1.37%、1.78%、2.23%。

2.6 样品测定

取 3 批藏茵陈胶囊, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件进样测定, 采用外标法计算, 结果见表 3。

3 讨论

用甲醇溶液分别配制獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基-咕吨酮和齐墩果酸对照品溶液, 进行紫外扫描, 根据紫外扫描可知, 獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷在 237 nm 处有最大吸收, 而芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮的最大吸收峰在 254 nm 处, 齐墩果酸的最大吸收峰在 210 nm 处, 同时参考相关文献^[10-13], 确定本实验中齐墩果酸的检测波长为 210 nm, 其余 6 个成分的检测波长为 254 nm。

根据指标性成分的理化性质和色谱行为, 比较了以甲醇、乙腈与水、甲酸-水、磷酸-水构成的洗

表3 藏茵陈胶囊中7种成分的测定结果 ($n=3$)Table 3 Determination of seven components in Zangyinchen Capsule ($n=3$)

批 号	质量分数 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)						
	獐芽菜苦苷	龙胆苦苷	獐芽菜苷	芒果苷	当药醇苷	1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮	齐墩果酸
20111101	5.13	1.52	1.14	7.31	3.82	0.85	22.01
20111201	3.78	0.89	1.35	5.45	3.12	0.65	20.67
20120101	6.24	1.22	0.45	6.27	1.06	0.65	21.34
批 号	RSD / %						
	獐芽菜苦苷	龙胆苦苷	獐芽菜苷	芒果苷	当药醇苷	1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮	齐墩果酸
20111101	1.02	1.23	1.14	0.89	0.65	1.32	1.57
20111201	0.87	1.01	1.21	0.92	0.57	1.25	1.33
20120101	1.11	1.03	1.17	0.75	0.98	1.42	1.78

脱系统。结果表明,以乙腈-水(或酸水)为系统各成分的分离效果不理想,甲醇-水(或甲酸水)系统色谱峰的对称性不好,经优化后的甲醇-磷酸水系统各成分的分离效果较好,各色谱峰的分离度和理论塔板数均符合要求。

有关 HPLC 法分别测定獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基-咕吨酮、齐墩果酸的方法已有报道^[10-13],但尚未见同时检测以上 7 种成分的方法。本实验采用梯度洗脱的方法,使得藏茵陈胶囊中獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮和齐墩果酸 7 种成分在同一张色谱图上得到有效分离,为该方建立了一种快速的质量控制方法。

本实验测定了藏茵陈胶囊不同批次样品中獐芽菜苦苷、龙胆苦苷、獐芽菜苷、芒果苷、当药醇苷、1-羟基-3, 4, 5-三甲氧基咕吨酮、齐墩果酸的量,结果表明齐墩果酸的量均满足标准要求^[1],且较为稳定,但其他 6 种成分不同批次之间差异较大,这些成分量的差异与临床用药安全、有效的关联性规律,还需以后进一步开展深入的研究工作。

参考文献

- [1] 中国卫生部部颁标准 [S]. WS-10411(ZD-0411)-2002, 2002.
- [2] 范叔清,周松,卢志强,等.藏茵陈化学成分和药理作用研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(2): 227-228.

- [3] 周永福,黄飞燕,文荣荣,等.川西獐牙菜的化学成分研究 (II) [J]. 云南民族大学学报:自然科学版, 2011, 20(1): 14-16.
- [4] 尚军,张国燕,杨淳彬,等.川西獐牙菜的化学成分研究 [J]. 青海师范大学学报:自然科学版, 2008, 24(4): 66-67.
- [5] 刘占文,陈长勋,金若敏,等.龙胆苦苷的保肝作用研究 [J]. 中草药, 2002, 33(1): 47-50.
- [6] 杨慧玲,刘建全.9种“藏茵陈”原植物中的7种有效化学成分研究 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1233-1237.
- [7] 邓家刚,杨柯,郑作文,等.芒果苷在鸭体内抑制鸭乙型肝炎病毒感染的实验研究 [J]. 广西中医学院学报, 2007, 10(1): 1-3.
- [8] 韦健全,郑子敏,潘勇,等.芒果苷对乙醇引起肝损伤的保护作用 [J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(5): 732-733.
- [9] 田成旺,张铁军. HPLC 测定藏茵陈中獐芽菜苦苷和龙胆苦苷 [J]. 中草药, 2006, 37(3): 442-443.
- [10] 李悦.藏茵陈类药材中活性成分的含量测定及提取纯化工艺研究 [D]. 天津: 天津大学, 2009.
- [11] 孙磊,田金改,金红宇,等. HPLC 法测定印度獐牙菜中 5 种有效成分含量 [J]. 中国药事, 2010, 24(7): 687-689.
- [12] Tian L Y, Chen J C, Huang F J, et al. Simultaneous determination of four active components in *Swertia* by RP-HPLC [J]. *Chin J Nat Med*, 2008, 6(6): 444-449.
- [13] 孙亚捷,李向东,胡芳弟,等. HPLC 法测定印度獐牙菜中两种黄酮类成分的含量 [J]. 兰州大学学报:医学版, 2005, 31(4): 57-59.