

HPLC-DAD 法同时测定九味肝泰胶囊的 9 种成分

杨帆¹, 傅琳²

1. 天津医科大学第二医院, 天津 300210

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: **目的** 建立 HPLC-DAD 法同时测定九味肝泰胶囊中尿囊素、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄酚的方法。**方法** 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Ultimate AQ-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为 0.5%磷酸水溶液- (乙腈-甲醇 20:80), 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃。**结果** 尿囊素、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄酚 9 种成分能够达到良好分离; 其线性范围分别为 1.6~160.0 μg/mL ($r=0.9997$)、1.2~120.0 μg/mL ($r=0.9996$)、1.2~120.0 μg/mL ($r=0.9996$)、0.4~40.0 μg/mL ($r=0.9992$)、4.0~400.0 μg/mL ($r=0.9998$)、0.4~40.0 μg/mL ($r=0.9991$)、0.16~16.0 μg/mL ($r=0.9991$)、0.08~8.00 μg/mL ($r=0.9990$)、0.2~20.0 μg/mL ($r=0.9992$), 平均加样回收率分别为 99.3%、100.2%、99.8%、98.3%、99.9%、97.8%、97.8%、102.2%、101.9%, RSD 分别为 0.6%、0.5%、0.7%、1.1%、0.3%、0.9%、1.4%、1.5%、1.2%。9 批次样品中尿囊素、人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、三七皂苷 R₁、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄酚质量浓度分别为 3.634~3.655、2.523~2.611、2.405~2.424、0.802~0.829、10.362~10.623、0.901~0.921、0.334~0.366、0.142~0.160、0.462~0.479 mg/g。**结论** 本方法操作简便, 测定结果准确可靠, 可用于九味肝泰胶囊的质量控制。

关键词: 九味肝泰胶囊; 尿囊素; 人参皂苷 R_{g1}; 人参皂苷 R_{b1}; 三七皂苷 R₁; 黄芩苷; 五味子醇甲; 姜黄素; 大黄素; 大黄酚; HPLC-DAD

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)05-1117-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.014

Simultaneous determination of nine constituents in Jiuwei Gantai Capsules by HPLC-DAD

YANG Fan¹, FU Lin²

1. The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300210, China

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

Abstract: Objective To establish HPLC-DAD method for the simultaneous determination of allantoin, ginsenoside R_{g1}, ginsenoside R_{b1}, notoginsenoside R₁, baicalin, schisandrin, curcumin, emodin and chrysophanol in Jiuwei Gantai Capsules (JGC). **Methods** The chromatographic separation was achieved on an Ultimate AQ-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) with mobile phase consisted of (0.1% phosphate)-(acetonitrile-methanol 20:80) for gradient elution, at the flow rate of 1.0 mL/min; The column temperature was 35 ℃. **Results** The linear ranges of allantoin, ginsenoside R_{g1}, ginsenoside R_{b1}, notoginsenoside R₁, baicalin, schisandrin, curcumin, emodin, and chrysophanol were 1.6—160.0 μg/mL ($r=0.9997$), 1.2—120.0 μg/mL ($r=0.9996$), 1.2—120.0 μg/mL ($r=0.9996$), 0.4—40.0 μg/mL ($r=0.9992$), 4.0—400.0 μg/mL ($r=0.9998$), 0.4—40.0 μg/mL ($r=0.9991$), 0.16—16.0 μg/mL ($r=0.9991$), 0.08—8.00 μg/mL ($r=0.9990$), and 0.2—20.0 μg/mL ($r=0.9992$), respectively. The average recoveries ($n=6$) were 99.3% (RSD = 0.6%), 100.2% (RSD = 0.5%), 99.8% (RSD = 0.7%), 98.3% (RSD = 1.1%), 99.9% (RSD = 0.3%), 97.8% (RSD = 0.9%), 97.8% (RSD = 1.4%), 102.2% (RSD = 1.5%), and 101.9% (RSD = 1.2%), respectively. The content of the allantoin, ginsenoside R_{g1}, ginsenoside R_{b1}, notoginsenoside R₁, baicalin, schisandrin, curcumin, emodin, and chrysophanol in nine batches were 3.634—3.655, 2.523—2.611, 2.405—2.424, 0.802—0.829, 10.362—10.623, 0.901—0.921, 0.334—0.366, 0.142—0.160, and 0.462—0.479 mg/g, respectively. **Conclusion** The method is accurate, sensitive, credible, and repeatable, which can be applied to the quality control of JGC.

收稿日期: 2018-11-09

作者简介: 杨帆 (1989—), 女, 初级药师, 主要研究方向为医院药学。Tel: 13752036659 E-mail: 770897590@qq.com

Key words: Jiuwei Gantai Capsules; allantoin; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Rb₁; notoginsenoside R₁; baicalin; schisandrin; curcumin; emodin; chrysophanol; HPLC-DAD

九味肝泰胶囊收载于《中国药典》2015 年版一部^[1]与《中成药地方标准》内科肝胆分册^[2],由三七、酒大黄、黄芩、五味子、郁金、姜黄、蒺藜、山药、蜈蚣 9 味中药组成,具有化瘀通络、疏肝健脾的作用,适用于气滞血瘀兼肝郁脾虚所致的胁肋痛或刺痛、抑郁烦闷、食欲不振、食后腹胀脘痞、大便不调及胁下痞块等的治疗。临床上主要治疗脂肪肝、肝硬化、乙型肝炎等^[3-9]。《中国药典》2015 年版中该中成药含量测定指标成分为大黄酚、大黄素与五味子醇甲,文献研究中^[10-14]还对黄芩苷、姜黄素进行测定,为了更加全面地控制该中成药的质量,本实验参考药典与文献研究,确定了 9 种物质作为其指标成分,山药中的尿囊素能修复上皮组织,促进皮肤溃疡和伤口愈合,具有生肌作用^[15];三七中的人参皂苷 Rg₁ (Rg₁) 具有抗心律失常等作用^[16-18]、人参皂苷 Rb₁ (Rb₁) 具有保护中枢神经系统的作用^[19-20];黄芩中黄芩苷具有抗炎作用^[21];姜黄与郁金中的姜黄素具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、保肝的药理活性^[22];大黄中的大黄素与大黄酚具有抗炎、抗病毒的作用^[23]。多指标控制可较为客观地评价该中成药的质量,为后续的物质基础研究奠定基础。本实验采用梯度洗脱法与分段变波长检测法,首次建立了尿囊素、Rg₁、Rb₁、三七皂苷 R₁ (R₁)、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄酚 9 种指标成分同时测定的 HPLC 方法,结果表明,该方法准确、高效。

1 仪器与试药

Agilent 1260 高效液相色谱仪,包括自动进样器,二极管阵列检测器,美国 Agilent 公司; XPE105 型电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司。

对照品尿囊素(批号 111501-200202,质量分数 100%)、Rg₁(批号 110703-201832,质量分数 92.4%)、Rb₁(批号 110704-201827,质量分数 91.2%)、R₁(批号 110745-201820,质量分数 93.1%)、黄芩苷(批号 110715-201720,质量分数 93.5%)、五味子醇甲(批号 110857-201714,质量分数 99.9%)、姜黄素(批号 110823-201706,质量分数 98.7%)、大黄素(批号 110756-201512,质量分数 98.7%)、大黄酚(批号 110796-201621,质量分数 99.2%),由中国食品药品检定研究院提供;乙腈、

甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯,天津科密欧公司。9 批九味肝泰胶囊,批号 170811、171011、171018、171201、171202、180204、180205、180206、180404,湖南新汇制药股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱 Ultimate AQ-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 柱温 35 °C; 流动相 A 为乙腈-甲醇(20:80), 流动相 B 为 0.5% 磷酸水溶液; 梯度洗脱: 0~10 min, 8% A; 10~18 min, 8%~23% A; 18~26 min, 23%~33% A; 26~32 min, 33%~43% A; 32~44 min, 43%~63% A; 44~50 min, 8% A; 体积流量为 1.0 mL/min; 分段变波长测定: 0~10.0 min 为 224 nm, 10.0~18.0 min 为 203 nm, 18.0~22.0 min 为 280 nm, 22.0~26.0 min 为 250 nm, 26.0~32.0 min 为 430 nm, 32.0~44.0 min 为 254 nm, 44.0~50.0 min 为 224 nm。进样量为 20 μL。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液制备

精密称取尿囊素、Rg₁、Rb₁、R₁、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄酚适量,分别置于 50 mL 量瓶中,加甲醇-水(1:1)溶解并稀释至刻度,得各对照品储备液,备用。再精密吸取各对照品储备液适量置 10 mL 量瓶中,甲醇-水(1:1)稀释至刻度,得含尿囊素 160.11 μg/mL、Rg₁ 120.23 μg/mL、Rb₁ 120.08 μg/mL、R₁ 40.03 μg/mL、黄芩苷 400.15 μg/mL、五味子醇甲 40.21 μg/mL、姜黄素 16.13 μg/mL、大黄素 8.21 μg/mL、大黄酚 20.20 μg/mL 的混合对照品溶液,备用。

2.3 供试品溶液制备

取装量差异项下的本品内容物,混匀,取 1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加 5 mol/L 硫酸溶液 30 mL,加热回流 30 min,放冷,再加氯仿,加热回流 4 次,每次 30 mL、加热回流 20 min,分取氯仿液,合并,用水洗涤 2 次,每次 15 mL,氯仿液蒸干,残渣用甲醇适量使溶解,转移至 25 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,以 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液制备

按九味肝泰胶囊处方比例和工艺,分别制备缺少三七药材的阴性对照样品;缺少大黄药材的阴性

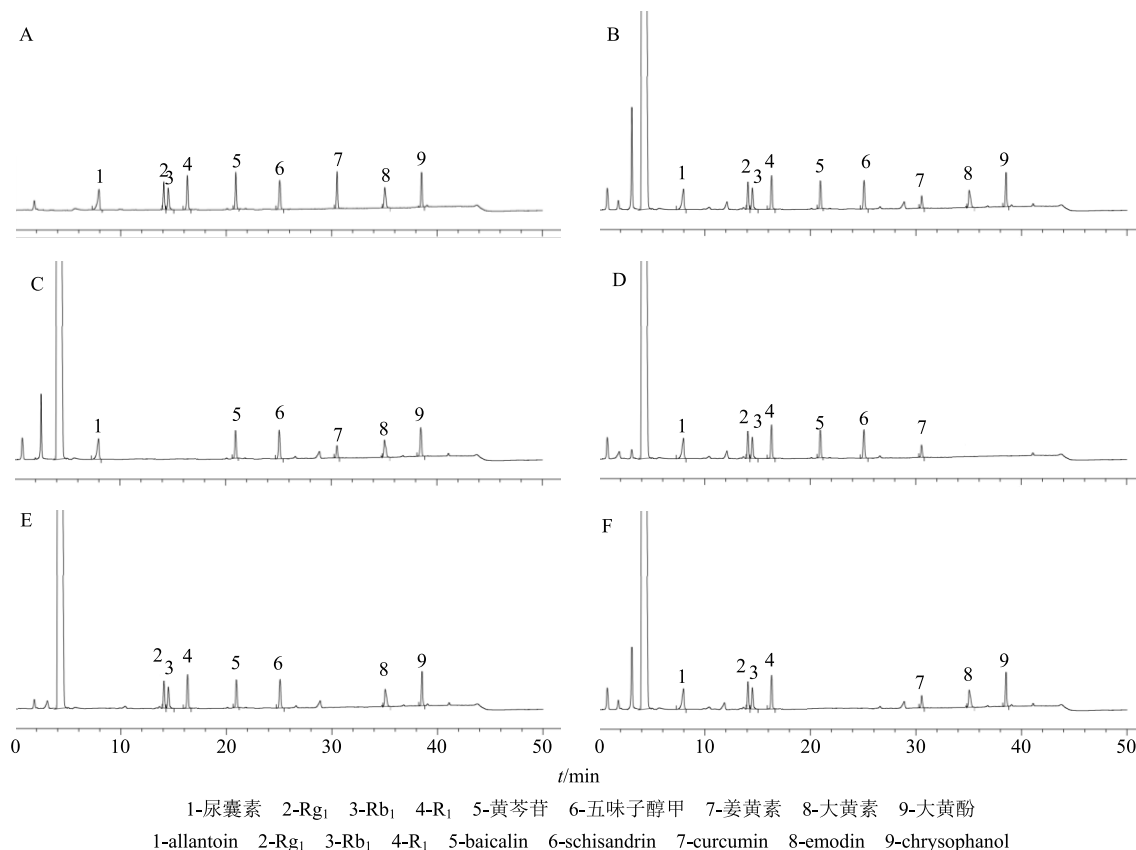


图 1 混合对照品 (A)、样品 (B)、缺三七 (C)、缺大黄 (D)、缺山药、姜黄、郁金 (E)、缺黄芩、五味子阴性样品 (F) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of mixed reference substances (A), samples (B), blank sample without *Notoginseng Radix et Rhizoma* (C), blank sample without *Rhei Radix et Rhizoma* (D), blank sample without *Dioscoreae Rhizoma*, *Curcumae longae Rhizoma*, *Curcumae Radix* (E), and blank sample without *Scutellariae Radix*, *Schisandrae Chinensis Fructus* (F)

对照样品：缺少山药、姜黄、郁金药材的阴性对照样品；缺少黄芩、五味子药材的阴性对照样品；并按“2.3”项下方法制备各阴性对照溶液。

2.5 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 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 mL，分别置于 50 mL 量瓶中，以甲醇-水（1：1）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 20 μ L，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。

2.6 精密度试验

精密吸取同一对照品溶液 20 μ L，重复进样 6 次，记录峰面积。结果显示，尿囊素、Rg₁、Rb₁、R₁、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄酚的峰面积 RSD 值分别为 1.2%、0.6%、1.5%、0.5%、0.9%、0.8%、0.8%、0.5%、1.1%，表明该试验方法精密度良好。

表 1 线性回归方程

Table 1 Linear regression equations

成分	回归方程	线性范围/ (μ g·mL ⁻¹)	<i>r</i>
尿囊素	$Y=1\,472.2\,X-156.32$	1.6~160.0	0.999 7
Rg ₁	$Y=5\,734.1\,X-587.36$	1.2~120.0	0.999 6
Rb ₁	$Y=1\,183.5\,X-138.38$	1.2~120.0	0.999 6
R ₁	$Y=10\,374\,X-10\,527$	0.4~40.0	0.999 2
黄芩苷	$Y=11\,838\,X-3\,072.1$	4.0~400.0	0.999 8
五味子醇甲	$Y=11\,573\,X-403.64$	0.4~40.0	0.999 1
姜黄素	$Y=14\,863\,X-5\,323.7$	0.16~16.00	0.999 1
大黄素	$Y=12\,747\,X-1\,537.3$	0.08~8.00	0.999 0
大黄酚	$Y=14\,637\,X-1\,476.2$	0.2~20.0	0.999 2

2.7 重复性试验

取同一批九味肝泰胶囊（批号 170811）6 份，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，结果显示，尿囊素、Rg₁、Rb₁、R₁、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄

酚的平均质量分数分别为 3.641、2.533、2.416、0.829、10.362、0.911、0.357、0.153、0.472 mg/g, RSD 分别为 0.5%、0.8%、0.9%、0.7%、0.4%、1.0%、1.1%、0.9%、1.3%, 表明该方法的重复性良好。

2.8 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液(批号 170811)各 20 μ L, 按“2.1”项下色谱条件分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测定, 结果显示尿囊素、Rg₁、Rb₁、R₁、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄酚的平均质量分数分别为 3.655、2.524、2.402、0.819、10.342、0.903、0.352、0.146、0.464 mg/g, RSD 分别为 1.1%、1.3%、0.8%、1.2%、1.5%、0.9%、1.6%、1.7%、1.7%, 表明供试品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.9 加样回收率试验

取同一批号样品(批号 170811)9 份, 每份约 0.5 g, 精密称定, 分成 3 组, 分别按已知质量分数的 50%、100%、150% 3 个水平加入混合对照品溶液, 按“2.3”项下方法制备, 依法测定, 计算回收

率。尿囊素、Rg₁、Rb₁、R₁、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄酚的平均回收率分别为 99.3%、100.2%、99.8%、98.3%、99.9%、97.8%、97.8%、102.2%、101.9%, RSD 分别为 0.6%、0.5%、0.7%、1.1%、0.3%、0.9%、1.4%、1.5%、1.2%, 表明该方法的准确度良好。

2.10 样品测定

取收集到的 9 批样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定, 用外标法计算样品中尿囊素、Rg₁、Rb₁、R₁、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄酚的量, 结果见表 2。9 批次供试品中尿囊素、Rg₁、Rb₁、R₁、黄芩苷、五味子醇甲、姜黄素、大黄素和大黄酚质量分数分别为 3.634~3.655、2.523~2.611、2.405~2.424、0.802~0.829、10.362~10.623、0.901~0.921、0.334~0.366、0.142~0.160、0.462~0.479 mg/g, 9 批样品中各成分的含量相对比较平行, 其中黄芩苷的含量最高, 五味子醇甲、姜黄素、大黄酚、R₁的含量较低, 大黄素的含量最低。

表 2 样品测定结果

Table 2 Determination results of samples

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)								
	尿囊素	Rg ₁	Rb ₁	R ₁	黄芩苷	五味子醇甲	姜黄素	大黄素	大黄酚
170811	3.641±0.001	2.533±0.003	2.416±0.004	0.829±0.001	10.362±0.004	0.911±0.001	0.357±0.001	0.153±0.001	0.472±0.001
171011	3.637±0.003	2.611±0.002	2.411±0.003	0.810±0.001	10.434±0.005	0.901±0.003	0.366±0.002	0.159±0.002	0.475±0.001
171018	3.634±0.002	2.523±0.001	2.413±0.002	0.814±0.002	10.623±0.003	0.915±0.001	0.347±0.003	0.157±0.003	0.470±0.001
171201	3.648±0.002	2.541±0.001	2.405±0.001	0.802±0.002	10.572±0.005	0.913±0.001	0.364±0.001	0.154±0.002	0.479±0.002
171202	3.641±0.002	2.557±0.001	2.407±0.003	0.815±0.001	10.519±0.003	0.910±0.001	0.334±0.001	0.164±0.001	0.477±0.002
180204	3.646±0.001	2.541±0.002	2.419±0.002	0.813±0.001	10.502±0.003	0.916±0.002	0.348±0.001	0.148±0.002	0.479±0.002
180205	3.655±0.003	2.565±0.002	2.420±0.002	0.822±0.002	10.388±0.006	0.921±0.002	0.352±0.002	0.142±0.003	0.465±0.001
180206	3.647±0.001	2.568±0.003	2.424±0.002	0.821±0.001	10.411±0.001	0.914±0.002	0.360±0.002	0.155±0.001	0.462±0.002
180404	3.652±0.003	2.552±0.001	2.422±0.001	0.816±0.001	10.472±0.003	0.913±0.001	0.347±0.002	0.160±0.002	0.467±0.001

3 讨论

本实验首次建立了 HPLC 法同时测定九味肝泰胶囊中 9 种指标成分的方法, 该方法快速、高效、准确。

由于中成药成分复杂, 目前中成药的质量研究不仅仅针对单一成分, 更多地是针对多种成分进行控制研究^[24]。多指标控制的难点是将多种成分在同种色谱条件下进行有效分离, 本实验对于色谱条件进行了系统的筛选, 分别考察了乙酸体系、甲酸体系、磷酸体系、纯水体系等, 优选磷酸体系; 同

时对于不同品牌的十八烷基硅胶填料色谱柱进行了筛选, 最终确定了色谱柱型号。中成药含量测定的难点之一是供试品溶液的制备, 制备条件的差异会对测定结果产生影响, 本实验在药典中供试品溶液制备的基础上, 对回流时间和回流次数分别进行了考察, 最终确定供试品溶液的制备方法。

在后续的研究中, 将对九味肝泰胶囊中各成分在体内的代谢过程进行系统的研究与分析, 以确定该中成药真正的作用机制, 同时进一步明确其有效的指标成分。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 国家药品标准. 中成药地方标准上升国家标准部分. 内科肝胆分册 [S]. 2002.
- [3] 邓立记. 九味肝泰胶囊与阿德福韦酯片联合治疗乙型肝炎后早期肝硬化的疗效分析 [J]. 临床医学工程, 2011, 18(7): 1022-1023.
- [4] 向 华, 施 莉, 韦 炜, 等. 恩替卡韦联合九味肝泰胶囊治疗失代偿期乙型肝炎肝硬化疗效观察 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 24(7): 599-601.
- [5] 季雪良, 常 峰, 金 凤, 等. 九味肝泰胶囊联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎临床研究 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2013, 23(4): 203-205.
- [6] 杨增强, 陈 悦, 吴文琴, 等. 九味肝泰联合恩替卡韦对慢性乙型肝炎早期肝硬化患者肝纤维化及肝功能的影响 [J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(6): 1191-1194.
- [7] 李 鹏. 九味肝泰胶囊治疗代偿期酒精性肝硬化临床研究 [J]. 中国处方药, 2016, 14(2): 92-93.
- [8] 王欣玲, 罗 霞, 孙建琴, 等. 九味肝泰胶囊联合恩替卡韦治疗儿童慢性乙型肝炎的临床研究 [J]. 现代药物与临床, 2017, 32(1): 96-100.
- [9] 秦雪琴, 陈 悦, 吴文琴, 等. 九味肝泰胶囊联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎肝硬化的临床疗效观察 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2016, 26(6): 361-363.
- [10] 文 屏, 王建文, 蔡珊珊. UPLC 法测定九味肝泰胶囊中人参皂苷 R_{g1} 及三七皂苷 R_1 的含量 [J]. 中国当代医药, 2014, 21(10): 9-15.
- [11] 蔡步林, 王 艳, 丁 野, 等. 九味肝泰胶囊质量标准的研究 [J]. 中国药师, 2012, 15(10): 1442-1444.
- [12] 熊建文, 张 群, 吴 灿. 高效液相色谱法测定九味肝泰胶囊中大黄素含量 [J]. 中南药学, 2003, 1(4): 234-236.
- [13] 郑冰珊, 陈晓城. 高效液相色谱法测定九味肝泰胶囊中黄芩苷含量 [J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(5): 677-678.
- [14] 叶优苗, 张建方, 陈宗良. 高效液相色谱法测定九味肝泰胶囊中姜黄素含量 [J]. 中国药业, 2013, 22(11): 41-42.
- [15] 白 雁, 朱凤云, 王 东, 等. HPLC 法测定不同产地山药中尿囊素的含量 [J]. 中草药, 2003, 34(2): 179-180.
- [16] 李 渊, 周 玥, 王亚平, 等. 人参皂苷 R_{g1} 基于 SIRT6/NF- κ B 信号通路对辐射致造血干/祖细胞衰老的保护作用 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4497-4501.
- [17] 贾继明, 王宗权, 吴立军, 等. 人参皂苷 R_{b1} 的药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(12): 1371-1377.
- [18] 孙宪昌, 郭 俊, 姜明春, 等. 人参皂苷 R_{g1} 通过 Akt-Nrf2 信号通路拮抗顺铂诱导的豚鼠耳毒性作用研究 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3309-3317.
- [19] 安 明, 赵国君, 韦新成. 人参皂苷 R_{g1} 保护心血管和中枢神经系统的药理活性研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(1): 75-77.
- [20] 刘 舒, 吕金晓, 郑蓓诗, 等. 人参皂苷 R_{b1} 改善术后疲劳综合征大鼠中枢炎症反应的机制研究 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2104-2110.
- [21] 文 敏, 李 雪, 付守廷. 黄芩苷药理作用研究新进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(2): 158-162.
- [22] 刘安昌, 娄红祥, 赵丽霞. 姜黄素药理活性及体内代谢 [J]. 现代药物与临床, 2004, 19(1): 1-5.
- [23] 马继雄. 大黄素药理作用研究进展 [J]. 青海师范大学学报: 自然科学版, 2011, 27(4): 48-51.
- [24] 钱钧强, 石 芸, 傅 琳, 等. HPLC-DAD 法同时测定参芪十一味颗粒的 11 种成分 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1344-1349.