

参考文献:

- [1] 曹书华, 王今达. 血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(8): 489-491.
- [2] 张畔, 曹书华, 崔克亮, 等. 血必净对多脏器功能障碍综合征单核细胞 HLA-DR 表达影响的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(1): 21-23.
- [3] 茅尧生, 吕铁, 孙雪东, 等. 血必净注射液对脓毒性休克患者血流动力学和氧代谢的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(10): 627-628.
- [4] 蔡庆勇, 牛义民, 梁贵友, 等. 血必净注射液对心肌挫伤后家兔心肌细胞凋亡及其相关蛋白表达的影响[J]. 中国中医药现代远程教育, 2006, 4(9): 20-22.
- [5] 孔飞飞, 沈洁, 谭兴起, 等. 血必净注射液致药物不良反应 14 例文献分析[J]. 中国新药杂志, 2012, 1(1): 100-103.
- [6] 李桂莲. 血必净注射液致过敏性休克 1 例[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(30): 3777.
- [7] 韩炜, 杨玉林, 康廷国. HPLC 法测定红花地上部分中木犀草苷和木犀草素的含量[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(6): 1315-1317.
- [8] 杨日丽, 刘静. HPLC 法测定红花中羟基红花黄色素 A 含量的研究[J]. 广东化工, 2007, 34(7): 112-114.
- [9] 胡杰, 李月婷, 侯靖宇. UPLC-MS 同时测定赤芍中五个指标成分的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27: 282-285.
- [10] 吕光华, 程世琼, 陈金泉, 等. HPLC 测定川芎药材和饮片中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量及其质量评价指标[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 194-198.
- [11] 赵鸣舒, 赵希贤. 双波长高效液相色谱法测定丹参中多种成分的含量[J]. 中国药事, 2010, 24(8): 804-806.
- [12] 毕映燕, 胡芳弟, 封士兰, 等. 高效液相色谱法同时测定复方当归栓中 5 种活性组分的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2402-2405.
- [13] 冀兰鑫, 黄浩, 姜民, 等. HPLC 测定血必净注射液内 11 种主要成分[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2395-2398.
- [14] 刘杰, 许文, 李煌, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定白芍饮片中 10 种成分[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 635-643.

HPLC 法同时测定当飞利肝宁胶囊中 7 种成分

龙玉堂, 陈浩, 刘晶

(南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定当飞利肝宁胶囊(水飞蓟和当药)中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药醇苷、花旗松素、水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾的含有量。方法 该药物 75% 甲醇提取液的分析采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm); 以甲醇-0.1% 甲酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 254 nm 和 288 nm。结果 7 种成分在各自范围内线性关系良好($r > 0.999$)，平均加样回收率 96.78% ~ 100.45%，RSD 均小于 2.0%。结论 该方法快速准确, 重复性好, 可用于当飞利肝宁胶囊的质量控制。

关键词: 当飞利肝宁胶囊; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)06-1187-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.016

Simultaneous determination of seven constituents in Dangfei Liganning Capsules by HPLC

LONG Yu-tang, CHEN Hao, LIU Jing

(The First Hospital Affiliated to Nanhua University, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of swertiamarin,

收稿日期: 2016-11-15

作者简介: 龙玉堂(1983—), 男, 硕士, 主管药师, 从事药物分析、药物制剂研究。Tel: 15717586119, E-mail: longyutanghengyang@163.com

gentiopicrin, swertianolin, taxifolin, silychristin, silydianin and silybin in Dangfei Liganning Capsules (*Silybi Fructus and Swertiae Herba*). **METHODS** The analysis of 75% methanol extract of this drug was performed on a 30 °C thermostatic Kromasil C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.1% formic acid flowing at 0.9 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 254 nm and 288 nm. **RESULTS** Seven constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r > 0.999\ 0$), whose average recoveries were 96.78% – 100.45% with the RSDs of less than 2.0%. **CONCLUSION** This accurate and reproducible method can be used for the rapid quality control of Dangfei Liganning Capsules.

KEY WORDS: Dangfei Liganning Capsules; chemical constituents; HPLC

当飞利肝宁胶囊由水飞蓟、当药2味药材加工而成,处方源于《卫生部颁药品标准》中药成方制剂第17册^[1],具有清利湿热,益肝退黄之功效,用于湿热郁蒸而致的黄疸、急性黄疸型肝炎、传染性肝炎、慢性肝炎而见湿热症候者。目前,2015年版《中国药典》^[2]仅对水飞蓟中的水飞蓟宾作了定量测定,也未检索到该制剂多组分含有量同时测定的报道。水飞蓟富含黄酮类成分,主要包括花旗松素、水飞蓟亭、水飞蓟宁和水飞蓟宾;当药为龙胆科植物瘤毛獐牙菜的干燥全草,具有清湿热,健胃的功效,主要用于湿热黄疸、胁痛、痢疾腹痛、食欲不振等症状的治疗,其主要成分为獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药醇苷。本实验采用HPLC法对当飞利肝宁胶囊中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药醇苷、花旗松素、水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾的含有量同时进行测定,可为有效控制其质量提供科学依据,以确保临床用药的安全。

1 仪器与试药

Agilent 1100系列四元梯度泵高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); XS205DU电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-500DA数控超声波清洗器(成都一科仪器设备有限公司)。

獐牙菜苦苷(110785-201404,含有量98.3%)、龙胆苦苷(110770-201515,含有量99.1%)、花旗松素(111816-201102,含有量98.9%)、水飞蓟宾(110856-201506,含有量96.3%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;当药醇苷对照品(23445-00-3,含有量98.0%)购自上海酶联检测技术有限公司;水飞蓟亭(33889-69-9,含有量98.0%)、水飞蓟宁(29782-68-1,含有量98.0%)对照品均购自上海纯优生物科技有限公司。当飞利肝宁胶囊(四川美大康药业股份有限公司,每粒装0.25 g,批号151005、151103、160103)。甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm);流动相甲醇(A)-0.1%甲酸(B),梯度洗脱(0~13 min, 12.0% A; 13~27 min, 12.0%→35.0% A; 27~48 min, 35.0%→60.0% A; 48~55 min, 60.0%→12.0% A);0~27 min时在254 nm^[3-5]下检测獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药醇苷,27~55 min在288 nm^[6-9]下检测花旗松素、水飞蓟亭、水飞蓟宁和水飞蓟宾;体积流量0.9 mL/min;柱温30 °C;进样量10 μL。

2.2 溶液制备

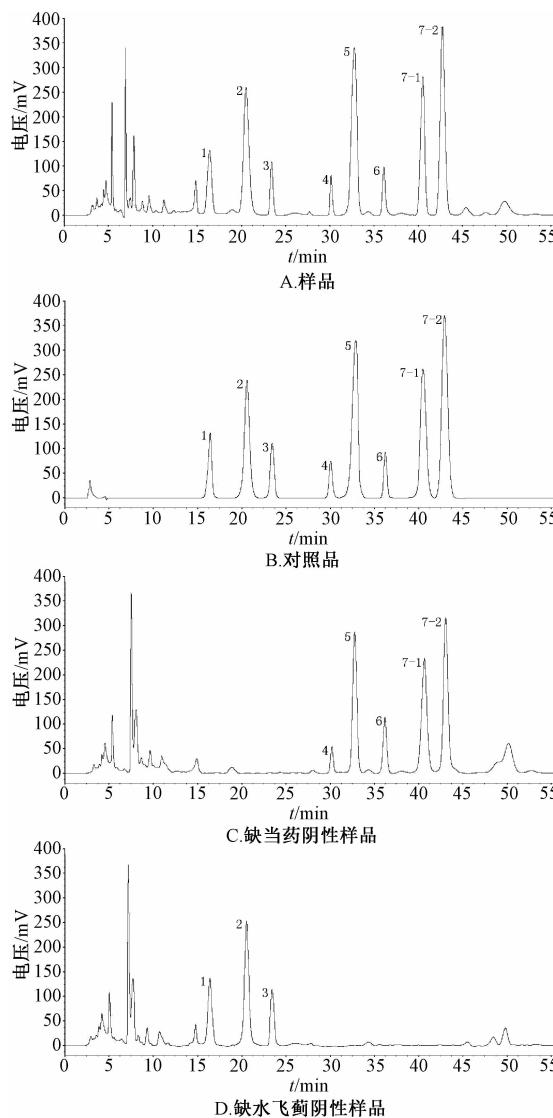
2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量,75%甲醇制成含獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药醇苷、花旗松素、水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾0.598、0.874、0.440、0.532、1.256、0.418、2.172 mg/mL的对照品贮备液,分别量取5.0、5.0、5.0、2.5、5.0、5.0、5.0 mL,置于同一100 mL量瓶中,75%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,倾出内容物,精密称取约0.2 g,置于50 mL量瓶中,加入75%甲醇适量,超声(500 W、40 kHz)30 min,放冷,75%甲醇定容至刻度,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性样品溶液 按当飞利肝宁胶囊处方,分别制备不含当药、水飞蓟的阴性样品,按“2.2.2”项下方法制成相应溶液。

2.3 专属性考察 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液适量,在“2.1”项色谱条件下检测,结果见图1。由图可知,各成分分离度符合要求,理论塔板数均大于3 000,阴性无干扰。

2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL,置于20 mL量瓶中,75%甲醇稀释至刻度,摇匀。以质量浓度为横坐标



注：水飞蓟宾（7）为非对映异构体，由水飞蓟宾A（7-1）和水飞蓟宾B（7-2）组成，本实验视为一种成分

1. 章牙菜苦苷 2. 龙胆苦苷 3. 当药醇苷 4. 花旗松素
5. 水飞蓟亭 6. 水飞蓟宁 7. 水飞蓟宾
1. swertiamarin 2. gentiopicrin 3. swertianolin 4. taxifolin
5. silychristin 6. silydianin 7. silybin

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

(X)，峰面积为纵坐标(Y)进行回归，结果见表1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验 取对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，连续6次，测得章牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药醇苷、花旗松素、水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾峰面积RSD($n=6$)分别为0.92%、1.05%、0.99%、0.91%、1.07%、0.83%、1.13%，表明仪器精密度良好。

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r
章牙菜苦苷	$Y = 6.5413 \times 10^5 X + 279.5$	2.99 ~ 59.80	0.9995
龙胆苦苷	$Y = 1.0917 \times 10^6 X + 400.8$	4.37 ~ 87.40	0.9999
当药醇苷	$Y = 6.8104 \times 10^5 X - 382.1$	2.20 ~ 44.00	0.9991
花旗松素	$Y = 5.0062 \times 10^5 X - 168.7$	2.66 ~ 53.20	0.9997
水飞蓟亭	$Y = 1.3891 \times 10^6 X + 472.3$	6.28 ~ 125.60	0.9993
水飞蓟宁	$Y = 7.1158 \times 10^5 X - 241.6$	2.09 ~ 41.80	0.9998
水飞蓟宾	$Y = 1.6569 \times 10^6 X - 357.0$	10.86 ~ 217.20	0.9992

2.6 重复性试验 取同一批样品(批号151005)6份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，测得章牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药醇苷、花旗松素、水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾含有量RSD分别为0.92%、1.24%、1.56%、0.69%、1.24%、1.56%、0.76%，表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号151005)，室温下于0、2、4、8、12、24 h在“2.1”项色谱条件下测定，测得章牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药醇苷、花旗松素、水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾峰面积RSD分别为1.13%、0.75%、1.15%、1.31%、0.92%、1.02%、0.79%，表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取样品(批号151005)，倾出内容物，精密称取6份，每份约0.1 g，置于50 mL量瓶中，精密加入对照品溶液25 mL、75%甲醇20 mL，超声(500 W、40 kHz)30 min，放冷，75%甲醇定容至刻度，摇匀，过滤，取续滤液，在“2.1”项色谱条件下测定。结果见表2。

2.9 样品含有量测定 取3批样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，结果见表3。

3 讨论

3.1 流动相选择 本实验考察了乙腈-水^[10]、甲醇-水^[11]、甲醇-0.05%磷酸^[4]、甲醇-0.5%磷酸^[12]、甲醇-0.1%甲酸^[6]，发现采用乙腈-水时，花旗松素和水飞蓟宾峰形较差，拖尾现象严重；采用甲醇-水、甲醇-0.02%磷酸、甲醇-0.05%磷酸时，花旗松素和水飞蓟宾峰形均有所改善，但还不够理想；采用甲醇-0.1%甲酸时，各成分峰形较佳，分离效果良好。因此，选择流动相为甲醇-0.1%甲酸。

表2 各成分加样回收率试验结果($n=6$)Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents ($n=6$)

成分	称样量/原有量/加入量/测得量/				回收率/%	平均回收率/(RSD/%)
	g	mg	mg	mg		
獐牙菜苦苷	0.100 6	0.720 3	0.747 5	1.459 3	98.86	98.66
	0.102 3	0.732 5	0.747 5	1.470 8	98.77	(1.38)
	0.099 1	0.709 6	0.747 5	1.452 5	99.38	
	0.101 9	0.729 6	0.747 5	1.447 6	96.05	
	0.098 5	0.705 3	0.747 5	1.453 0	100.03	
	0.100 1	0.716 7	0.747 5	1.455 7	98.86	
龙胆苦苷	0.100 6	1.135 8	1.092 5	2.228 6	100.03	98.26
	0.102 3	1.155 0	1.092 5	2.219 3	97.42	(1.45)
	0.099 1	1.118 8	1.092 5	2.200 8	99.04	
	0.101 9	1.150 5	1.092 5	2.217 9	97.70	
	0.098 5	1.112 1	1.092 5	2.196 2	99.23	
	0.100 1	1.130 1	1.092 5	2.180 6	96.16	
当药醇苷	0.100 6	0.550 3	0.550 0	1.097 3	99.45	97.34
	0.102 3	0.559 6	0.550 0	1.090 2	96.47	(1.19)
	0.099 1	0.542 1	0.550 0	1.073 5	96.62	
	0.101 9	0.557 4	0.550 0	1.089 7	96.78	
	0.098 5	0.538 8	0.550 0	1.071 1	96.78	
	0.100 1	0.547 5	0.550 0	1.086 1	97.93	
花旗松素	0.100 6	0.363 2	0.332 5	0.696 2	100.15	98.10
	0.102 3	0.369 3	0.332 5	0.699 5	99.31	(1.54)
	0.099 1	0.357 8	0.332 5	0.681 9	97.47	
	0.101 9	0.367 9	0.332 5	0.687 4	96.09	
	0.098 5	0.355 6	0.332 5	0.678 2	97.02	
	0.100 1	0.361 4	0.332 5	0.689 0	98.53	
水飞蓟亭	0.100 6	1.565 3	1.570 0	3.148 9	100.87	100.45
	0.102 3	1.591 8	1.570 0	3.165 2	100.22	(0.58)
	0.099 1	1.542 0	1.570 0	3.102 1	99.37	
	0.101 9	1.585 6	1.570 0	3.168 0	100.79	
	0.098 5	1.532 7	1.570 0	3.113 7	100.70	
	0.100 1	1.557 6	1.570 0	3.139 5	100.76	
水飞蓟宁	0.100 6	0.485 9	0.522 5	1.000 9	98.56	96.78
	0.102 3	0.494 1	0.522 5	0.999 2	96.67	(0.94)
	0.099 1	0.478 7	0.522 5	0.981 1	96.15	
	0.101 9	0.492 2	0.522 5	0.994 3	96.10	
	0.098 5	0.475 8	0.522 5	0.980 7	96.63	
	0.100 1	0.483 5	0.522 5	0.987 9	96.54	
水飞蓟宾	0.100 6	2.850 0	2.715 0	5.508 9	97.93	99.49
	0.102 3	2.898 2	2.715 0	5.595 2	99.34	(1.05)
	0.099 1	2.807 5	2.715 0	5.521 1	99.95	
	0.101 9	2.886 8	2.715 0	5.566 0	98.68	
	0.098 5	2.790 5	2.715 0	5.513 7	100.30	
	0.100 1	2.835 8	2.715 0	5.570 5	100.73	

表3 各成分含有量测定结果($n=3$, mg/g)Tab. 3 Results of content determination of various constituents ($n=3$, mg/g)

批号	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	当药醇苷	花旗松素	水飞蓟亭	水飞蓟宁	水飞蓟宾
151005	7.16	11.29	5.47	3.61	15.56	4.83	28.33
151103	6.53	9.77	5.15	3.93	17.27	5.08	31.18
160103	8.02	12.96	5.91	3.49	13.94	4.97	27.71

3.2 提取条件优化 本实验对提取溶剂(甲醇、

75% 甲醇、50% 甲醇)和提取时间(20、30、40 min)进行了比较,发现以75% 甲醇为提取溶剂时,各成分含有量较高,同时提取30 min 和40 min 时差异不大,但獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药醇苷含有量高于提取20 min 时。因此,最终选择75% 甲醇提取30 min。

3.3 检测波长选择 本实验将各对照品溶液在200~400 nm 波长范围内进行扫描,发现獐牙菜苦苷、龙胆苦苷和当药醇苷在254 nm 处均有较大吸收,参考文献[3-5],最终将其设定为254 nm;花旗松素、水飞蓟亭、水飞蓟宁和水飞蓟宾在288 nm 处均有较大吸收,参考文献[6-9],最终将其设定为288 nm。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 卫生部药品标准(中药成方制剂): 第17册[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1998; 99.
- [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; 839-840.
- [3] 保怡, 吉文鹤, 马玉花, 等. HPLC 测定四川及青海地区獐牙菜植物中6种主要成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(24): 2036-2038.
- [4] 田峦莺, 陈家春, 方进波, 等. 高效液相法同时测定獐牙菜属植物中四种活性成分[J]. 中国天然药物, 2008, 6(6): 444-449.
- [5] 马春光, 甘瑛琳, 马占林. 反相高效液相色谱法测定大籽獐牙菜中当药黄素、当药醇苷的含量[J]. 医学动物防治, 2015, 31(11): 1283-1285.
- [6] 刘佳鑫, 齐文, 彭希凤, 等. HPLC 法同时测定水飞蓟果实不同部位及其提取物中水飞蓟亭等7种黄酮类成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(1): 56-62.
- [7] 定天明, 田颂九, 张正行, 等. 胶束电动毛细管色谱法测定水飞蓟素及其制剂中主要有效成分含量[J]. 药学学报, 2000, 35(10): 778-781.
- [8] 李伟, 于秀玲. 反相高效液相色谱法测定复方益肝灵片中水飞蓟宾和异水飞蓟宾的含量[J]. 中医临床研究, 2016, 8(19): 37-38.
- [9] 张春晓, 陈华, 刘友彬, 等. 从水飞蓟柏及水飞蓟壳中提取水飞蓟素及水飞蓟宾的比较研究[J]. 中成药, 2013, 35(10): 2137-2141.
- [10] 余小磊, 卢燕, 陈道峰, 等. 国产日本当药中獐牙菜苦苷与当药苷的HPLC 含量测定及其品质评价[J]. 药学研究, 2015, 34(5): 262-265.
- [11] 鲁燕滨, 王玉凤, 陈林, 等. 两种测定水飞蓟胶囊中总黄酮含量方法的比较分析[J]. 海南师范大学学报: 自然科学版, 2015, 28(2): 163-166.
- [12] 李洪英, 方洪壮. HPLC 法同时测定水飞蓟4种黄酮的含量[J]. 学术论坛, 2010(2): 51-52, 55.