

肝宝胶囊 HPLC 指纹图谱建立及 5 种成分同时测定

范兴¹, 安昌², 陈鸣², 杨成梓², 黄德福^{1*}

(1. 福建医科大学孟超肝胆医院, 福建福州 350025; 2. 福建中医药大学药学院, 福建福州 350122)

摘要: 目的 建立肝宝胶囊(青果、虎杖、谷芽等) HPLC 指纹图谱, 并同时测定 5 种成分的含有量。方法 该药物甲醇提取液的分析采用 Platisil-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相乙腈-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 305 nm。结果 13 批样品指纹图谱中有 19 个共有峰, 相似度大于 0.9。没食子酸、芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、白藜芦醇、大黄素分别在 45.19~497.05 ng ($r=0.9994$)、23.89~262.81 ng ($r=0.9996$)、194.26~2136.81 ng ($r=0.9995$)、4.45~48.95 ng ($r=0.9996$)、8.82~97.05 ng ($r=0.9996$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率(RSD)分别为 99.85% (1.56%)、99.46% (1.98%)、99.97% (1.42%)、98.95% (2.13%)、99.67% (2.01%)。结论 该方法简便、稳定、可靠, 可用于肝宝胶囊的质量控制。

关键词: 肝宝胶囊; 指纹图谱; 没食子酸; 芥子碱硫氰酸盐; 虎杖苷; 白藜芦醇; 大黄素; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)04-0752-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.04.008

Establishment of HPLC fingerprints of Ganbao Capsules and simultaneous determination of five constituents

FAN Xing¹, AN Chang², CHEN Ming², YANG Cheng-zi², HUANG De-fu^{1*}

(1. Mengchao Hepatobiliary Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350025, China; 2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish the HPLC fingerprints of Ganbao Capsules (*Canarii Fructus*, *Polygoni cuspidati Rhizoma et Radix*, *Setariae Fructus Germinatus*, etc.) and to simultaneously determine the contents of five constituents. **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Platisil-C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% phosphoric acid flowing at 1 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 305 nm. **RESULTS** There were nineteen common peaks in the fingerprints of thirteen batches of samples with the similarities of more than 0.90. Gallic acid, sinapine thiocyanate, polydatin, resveratrol and emodin showed good linear relationships within the ranges of 45.19-497.05 ng ($r=0.9994$), 23.89-262.81 ng ($r=0.9996$), 194.26-2136.81 ng ($r=0.9995$), 4.45-48.95 ng ($r=0.9996$) and 8.82-97.05 ng ($r=0.9996$), whose average recoveries (RSDs) were 99.85% (1.56%), 99.46% (1.98%), 99.97% (1.42%), 98.95% (2.13%) and 99.67% (2.01%), respectively. **CONCLUSION** This simple, stable and reliable method can be used for the quality control of Ganbao Capsules.

KEY WORDS: Ganbao Capsules; fingerprints; gallic acid; sinapine thiocyanate; polydatin; resveratrol; emodin; HPLC

肝宝胶囊为福建医科大学孟超肝胆医院名老中医的临床经验方, 是由青果、虎杖、谷芽、麦芽、

莱菔子组成的纯中药制剂, 适用于脂肪肝及急、慢性肝炎之肝热积滞证^[1-4], 临床上应用近 20 年, 疗

收稿日期: 2018-05-11

基金项目: 福建省卫生计生青年科研课题(2017-2-61); 福州市科技计划项目(2017-S-131-2)

作者简介: 范兴(1987—), 男, 硕士, 中药师, 从事中药制剂与分析研究。Tel: 15806020326, E-mail: FXTCM2007@126.com

* 通信作者: 黄德福(1975—), 男, 副主任药师, 从事药物制剂研究。Tel: (0591) 88116143, E-mail: hdf8833@126.com

效确切。但肝宝胶囊现行质量标准不全面,仅采用TLC法定性鉴别大黄素,并且尚无相应指标性成分的含有量测定,无法客观反映其内在质量。为了更有效地控制肝宝胶囊质量,保证各批次间稳定性和临床疗效,本实验建立该制剂HPLC指纹图谱,并测定其中5种成分的含有量^[5-6],以期为其质量控制提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司);KQ-250E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];Milli-Q型超纯水机(美国密理博公司)。

1.2 试药 没食子酸(批号Y09A7Y17058)对照品购自上海源叶生物科技有限公司,含有量 $\geq 98\%$;芥子碱硫氰酸盐(批号111702-200501)、虎杖苷(批号111575-200502)、白藜芦醇(批号111535-200502)、大黄素(批号110756-200110)对照品均购自中国食品药品检定研究院,含有量均 $\geq 98\%$ 。13批肝宝胶囊由福建医科大学孟超肝胆医院制剂室制备(每粒装0.34 g,批号161108、161219、161226、170218、170222、170302、170304、170308、170319、170321、170324、170401、170504,编号S1~S13)。青果、虎杖、谷芽、麦芽、莱菔子购自福建省药材有限公司,经福建中医药大学杨成梓教授鉴定均为正品,均符合2015年版《中国药典》一部相关项下规定。甲醇、乙腈为色谱纯;其他试剂均为分析纯;水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Platisil-C₁₈色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相乙腈-0.1%磷酸,梯度洗脱(0~5 min, 3%乙腈;5~10 min, 3% \rightarrow 12%乙腈;10~20 min, 12%乙腈;20~70 min, 12% \rightarrow 35%乙腈;70~75 min, 35% \rightarrow 65%乙腈;75~90 min, 65% \rightarrow 70%乙腈);体积流量1 mL/min;柱温30 $^{\circ}$ C;检测波长305 nm;进样量7 μ L。

2.2 对照品溶液制备 精密称取没食子酸、芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、白藜芦醇、大黄素对照品适量,置于棕色量瓶中,甲醇制成质量浓度分别为537.93、284.43、2 312.57、52.98、105.03 μ g/mL的溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备 精密称取胶囊内容物约0.34 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入20 mL甲

醇,密塞,称定质量,超声(250 W、40 kHz)30 min,放冷,甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,0.45 μ m微孔滤膜过滤,即得。

2.4 单味药与阴性样品溶液制备 按处方比例及工艺,分别制备缺青果、虎杖、莱菔子的阴性样品,按“2.3”项下方法制备,即得。

2.5 HPLC 指纹图谱

2.5.1 精密度试验 取胶囊内容物(编号S6),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定6次,以11号峰(虎杖苷)为参照峰,测得各共有峰相对保留时间RSD均小于0.32%,相对峰面积RSD均小于1.59%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取胶囊内容物(编号S6),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,于0、2、4、8、12、24 h在“2.1”项色谱条件下进样测定,以11号峰(虎杖苷)为参照峰,测得各共有峰相对保留时间RSD均小于0.32%,相对峰面积RSD均小于1.59%,表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 取胶囊内容物(编号S6),按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,以11号峰(虎杖苷)为参照峰,测得各共有峰相对保留时间RSD均小于0.32%,相对峰面积RSD均小于1.91%,表明该方法重复性良好。

2.6 建立方法

2.6.1 相似度评价 取胶囊内容物(编号S1~S13),按“2.3”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下进样测定,结果见图1,共标定出19个共有峰,由于11号峰(虎杖苷)峰面积较大,峰形良好,出峰时间较稳定,故选择其作为参照峰(S)。然后,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2004A版)进行分析,以S6为参照峰进行色谱峰自动匹配,采用中位数法生成对照指纹图谱,测得13批样品相似度分别为0.987、0.985、0.999、0.992、0.990、0.997、0.998、0.997、0.987、0.986、0.993、0.998、0.994,均大于0.9,表明各批次样品之间的质量相对稳定。

2.6.2 共有峰指认归属 通过各峰保留时间、紫外光谱图信息并结合对照品,确认出其中5个色谱峰,分别为4号峰没食子酸、7号峰芥子碱硫氰酸盐、11号峰虎杖苷、16号峰白藜芦醇、19号峰大黄素。然后,将各单味药材、阴性对照

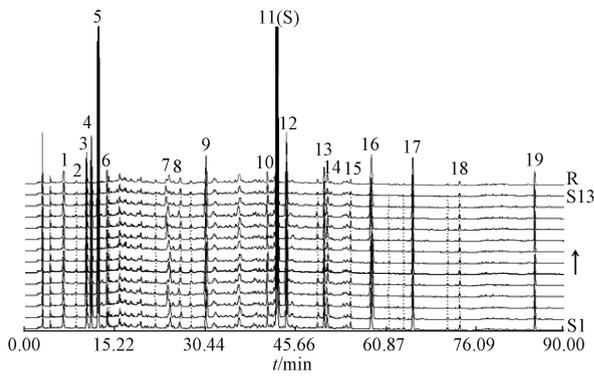
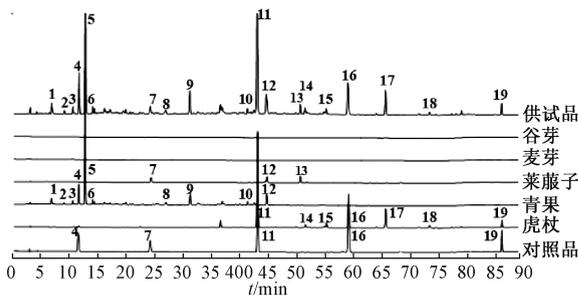


图1 13批肝宝胶囊 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of thirteen batches of Gan-bao Capsules

图谱、肝宝胶囊指纹图谱进行比对, 确认了19个共有峰主要来自青果、虎杖、莱菔子, 其中1~6、8~10号峰来自青果, 11、14~19号峰来自虎杖, 7、13号峰来自莱菔子, 12号峰来自青果和莱菔子, 见图2。



4. 没食子酸 7. 芥子碱硫氰酸盐 11. 虎杖苷 16. 白藜芦醇 19. 大黄素
4. gallic acid 7. sinapine thiocyanate 11. polydatin 16. resveratrol 19. emodin

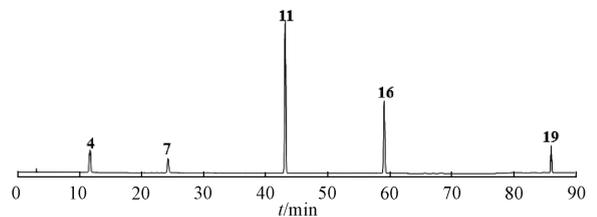
图2 各样品共有峰 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of common peaks of various samples

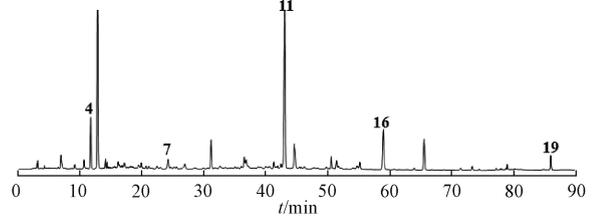
2.7 含有量测定

2.7.1 专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图3。由图可知, 阴性样品在对照品相应保留时间处无色谱峰, 表明对测定无干扰, 方法专属性良好。

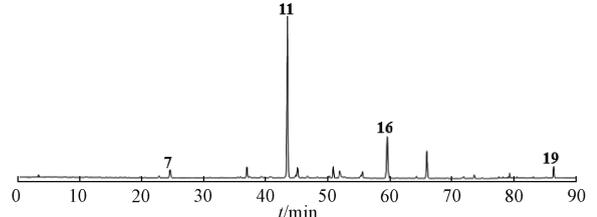
2.7.2 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 0.3、0.9、1.5、2.1、2.7、3.3 mL, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。以进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 得方程分别为没食子酸 $Y=1\ 201.9X-24\ 152$ ($r=0.999\ 4$)、芥子碱硫氰



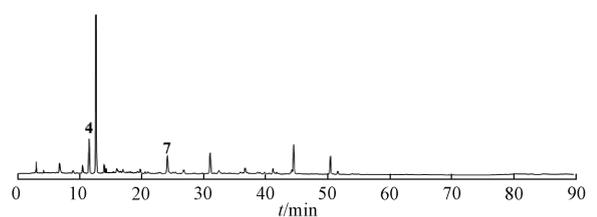
A. 对照品



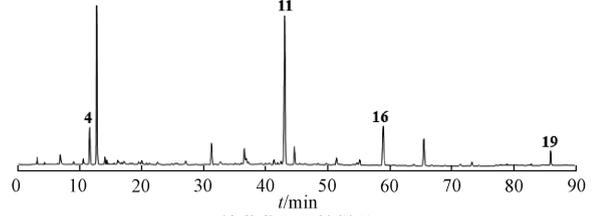
B. 供试品



C. 缺青果阴性样品



D. 缺虎杖阴性样品



E. 缺莱菔子阴性样品

4. 没食子酸 7. 芥子碱硫氰酸盐 11. 虎杖苷 16. 白藜芦醇 19. 大黄素
4. gallic acid 7. sinapine thiocyanate 11. polydatin 16. resveratrol 19. emodin

图3 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of various constituents

酸盐 $Y=1\ 329.9X-18\ 648$ ($r=0.999\ 6$)、虎杖苷 $Y=4\ 943.5X-385\ 062$ ($r=0.999\ 5$)、白藜芦醇 $Y=6\ 437.2X+7\ 355.9$ ($r=0.999\ 6$)、大黄素 $Y=2\ 116.4X-10\ 507$ ($r=0.999\ 6$), 分别在 45.19~497.05、23.89~262.81、194.26~2136.81、4.45~48.95、8.82~97.05 ng 范围内线性关系良好。

2.7.3 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得没食

子酸、芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、白藜芦醇、大黄素峰面积 RSD 分别为 0.71%、0.82%、0.78%、0.98%、0.93%，表明仪器精密度良好。

2.7.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(编号 S6)，于 0、2、4、8、12、24 h 在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、白藜芦醇、大黄素峰面积 RSD 分别为 1.06%、1.21%、0.96%、1.32%、1.17%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.7.5 重复性试验 精密称取胶囊内容物(编号 S6) 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、白藜芦醇、大黄素含有量 RSD 分别为 1.17%、1.58%、1.22%、1.76%、1.63%，表明该方法重复性良好。

2.7.6 加样回收率试验 精密称取含有量已知的胶囊(编号 S6) 9 份，每份约 0.17 g，平均分成 3 组，以 80%、100%、120% 水平分别精密加入对照品溶液[没食子酸(537.93 μg/mL) 0.60、0.75、0.90 mL，芥子碱硫氰酸盐(284.43 μg/mL) 0.69、0.86、1.03 mL，虎杖苷(2312.57 μg/mL) 0.28、0.35、0.42 mL，白藜芦醇(52.98 μg/mL) 0.50、0.62、0.74 mL，大黄素(105.03 μg/mL) 0.72、0.90、1.08 mL]，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得没食子酸、芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、白藜芦醇、大黄素平均加样回收率分别为 99.85%、99.46%、99.97%、98.95%、99.67%，RSD 分别为 1.56%、1.98%、1.42%、2.13%、2.01%。

2.7.7 样品含有量测定 取 13 批胶囊，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 1。

3 讨论

3.1 指标成分选择 肝宝胶囊中青果、虎杖同为君药，其中前者清热解毒，利咽生津，主要活性成分没食子酸具有明显保肝、抗肝纤维化作用^[7-10]，而后者利湿退黄，清热解毒，散瘀止痛，止咳化痰，主要活性成分虎杖苷、白藜芦醇、大黄素可对脂肪肝起到较好的改善作用^[11-15]；莱菔子为佐使药，消食除胀，降气化痰，能调节脾胃之气机，芥子碱硫氰酸盐为其有效成分之一。因此，本实验选择没食子酸、芥子碱硫氰酸盐、虎杖苷、白藜芦醇和大黄素作为肝宝胶囊含有量测定的指标成分。

表 1 各成分含有量测定结果 (n=3)

Tab. 1 Results of content determination of various constituents (n=3)

编号	含有量/(mg·粒 ⁻¹)				
	没食子酸	芥子碱硫氰酸盐	虎杖苷	白藜芦醇	大黄素
S1	0.835	0.283	1.030	0.060	0.143
S2	0.957	0.533	1.567	0.097	0.133
S3	0.768	0.300	1.236	0.084	0.141
S4	1.011	0.384	1.748	0.102	0.140
S5	1.021	0.335	1.645	0.106	0.181
S6	0.843	0.514	1.710	0.068	0.196
S7	0.940	0.549	1.815	0.082	0.178
S8	0.931	0.343	1.371	0.059	0.197
S9	0.965	0.393	1.151	0.104	0.130
S10	0.971	0.293	1.693	0.080	0.137
S11	0.930	0.399	1.258	0.099	0.160
S12	0.827	0.438	1.207	0.104	0.205
S13	0.853	0.372	1.296	0.104	0.184

3.2 提取条件选择 本实验比较了不同提取溶剂(70%乙醇、70%甲醇、甲醇、纯水)，发现甲醇提取效果较优，此时各成分响应较完全，色谱基线稳定。然后，比较了不同提取方法(超声、回流)及提取时间(20、30、40 min)，发现甲醇超声提取 30 min 时提取率较高，可提取完全。

3.3 色谱条件选择 本实验比较了不同流动相(甲醇-0.1%磷酸、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-3%冰醋酸、乙腈-水)，发现乙腈-0.1%磷酸梯度洗脱时分离效果最好。为了使各成分均有较好响应，本实验比较了不同检测波长(254、270、305、326 nm)，发现在 305 nm 处色谱峰较多，峰形较好，同时各成分均有吸收，分离度理想。

参考文献:

[1] 高依卿, 潘晨, 孙楠, 等. 肝宝对脂肪性肝炎和慢性乙型肝炎合并脂肪性肝炎的治疗作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2003, 13(1): 15-16.

[2] 孙楠, 高依卿, 郑秀奇. 肝宝胶囊的制备及临床疗效观察[J]. 医药产业资讯, 2005, 2(18): 58-59.

[3] 李丹, 潘晨. 水林佳联合肝宝胶囊治疗非酒精性脂肪性肝炎 35 例疗效观察[J]. 福建医药杂志, 2007, 29(6): 115-116.

[4] 李丹, 潘晨. 肝宝胶囊治疗脂肪肝的临床研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2008, 18(6): 330-331, 334.

[5] 丁慧, 顾伟伟, 季律, 等. 玉屏风散水煎液 HPLC 指纹图谱的建立及 9 种成分测定[J]. 中成药, 2017, 39(12): 2550-2554.

[6] 张华, 刘俊萍, 王菲菲, 等. 五味沙棘颗粒特征图谱及含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(9): 1627-1632.

[7] 郑雪花, 杨君, 杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展

- [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 94-98, 102.
- [8] 赵川, 李俊萱, 陈山琼, 等. 没食子酸抗实验性肝纤维化作用机制[J]. 中国公共卫生, 2016, 32(11): 1498-1501.
- [9] 马少华. 没食子酸对二甲亚硝胺致小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2010.
- [10] 王恒, 宋良科, 汤昊, 等. 不同种质青果清热利咽化学组分的研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(6): 669-672.
- [11] 陈剑明, 张声声, 吴震宇, 等. 虎杖苷对非酒精性脂肪肝保护作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(5): 1188-1191, 插页XIV-插页XV.
- [12] 元飞, 刘玮, 黄平, 等. 白藜芦醇对大鼠酒精性脂肪肝的作用及机制研究[J]. 华西药理学杂志, 2016, 31(1): 41-42.
- [13] 杨庆宇, 郜娜. 白藜芦醇通过 miRNA-122 调节神经酰胺水平而治疗非酒精性脂肪肝[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(8): 1506-1513.
- [14] 刘涛, 徐秋玲, 赵岩. 大黄素抑制 NAFLD 大鼠肝脏 TLR4 信号表达的研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(2): 201-205.
- [15] 张征波, 薛博瑜. 大黄素对非酒精性脂肪肝小鼠肝脂质沉积的作用及机制[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(9): 2423-2425.

HPLC 法同时测定温肾养肝颗粒中 4 种成分

胡玮¹, 顾丽亚², 周亚萍¹, 毛春芹², 陆兔林², 谈瑄忠^{1*}

(1. 南京市中医院, 江苏南京 210001; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏南京 210023)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定温肾养肝颗粒(肉苁蓉、乌药、白芍等)中 4 种成分的含有量。方法 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 AkzoNobel Kromasil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈-0.2% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 238、330 nm。结果 去甲异波尔多定、松果菊苷、芍药苷、毛蕊花糖苷分别在 0.008 3~0.082 6 mg/mL ($r=0.999\ 8$)、0.021 4~0.213 8 mg/mL ($r=0.999\ 8$)、0.040 7~0.407 0 mg/mL ($r=0.999\ 6$)、0.005 9~0.058 7 mg/mL ($r=0.999\ 6$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率分别为 99.55%、99.85%、99.93%、100.17%, RSD 分别为 1.43%、1.31%、0.97%、1.22%。结论 该方法简便准确, 重复性好, 可用于温肾养肝颗粒的质量控制。

关键词: 温肾养肝颗粒; 去甲异波尔多定; 松果菊苷; 芍药苷; 毛蕊花糖苷; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)04-0756-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.04.009

Simultaneous determination of four constituents in Wenshen Yanggan Granules by HPLC

HU Wei¹, GU Li-ya², ZHOU Ya-ping¹, MAO Chun-qin², LU Tu-lin², TAN Xuan-zhong^{1*}

(1. Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210001, China; 2. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of four constituents in Wenshen Yanggan Granules (*Cistanches Herba*, *Linderæ Radix*, *Paeoniae Radix Alba*, etc.). **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 30 °C thermostatic AkzoNobel Kromasil C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.2% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 238 nm and 330 nm. **RESULTS** Norisoboldine, echinacoside, paeoniflorin and acteoside showed good linear relationships within the

收稿日期: 2018-11-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81804022)

作者简介: 胡玮(1993—), 女, 硕士生, 从事中药质量标准及新药研发。Tel: 15951979398, E-mail: hwkeira@126.com

*通信作者: 谈瑄忠(1962—), 男, 研究员, 从事中药学及药事管理研究。Tel: (025) 52308543, E-mail: txz282@sohu.com