

[科研报道]

HPLC 法同时测定舒肝利胆丸中 5 种成分的含量

毕映燕, 李季文, 徐志伟, 李俊江*
(甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定舒肝利胆丸中甘草苷、橙皮苷、迷迭香酸、槲皮素、柴胡皂苷 a 的含量。方法 分析采用 Waters Symmetry Shield 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 1.0 mL/min; 柱温 20 °C; 检测波长 210、237、283、330、368 nm。结果 甘草苷、橙皮苷、迷迭香酸、槲皮素、柴胡皂苷 a 在各自范围内线性关系良好 ($r>0.9995$), 平均加样回收率 98.41%~102.42%, RSD 1.78~2.81%。结论 该方法准确、稳定、快速, 可用于舒肝利胆丸的质量控制。

关键词: 舒肝利胆丸; 甘草苷; 橙皮苷; 迷迭香酸; 槲皮素; 柴胡皂苷 a; 含量测定; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)02-0549-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.02.031

舒肝利胆方由醋柴胡、金钱草、白豆蔻、荆芥、生白芍、郁金、天花粉、麸炒枳壳、紫苏子、白芥子、炙甘草、干姜、大枣等药味组成, 诸药合用共奏疏肝利胆、清热祛湿, 理气止痛之功, 主要用于慢性胆囊炎的治疗。前期为方便患者服用, 在保留原物质的基础上拟将其开发为舒肝利胆浓缩丸。

现代药理研究证实, 胆囊炎的发病机理与炎症反应、代谢紊乱、胆汁滞留等相关^[1]。柴胡中柴胡皂苷具有抗炎, 促进胆汁酸排泄的作用^[2], 为疏肝利胆药效活性部位。金钱草黄酮类成分具有降低胆汁黏度, 促进胆汁流动的作用^[3]。紫苏子水溶性酚酸类成分迷迭香酸具有保肝的药理活性^[4]。甘草中甘草苷、枳壳中橙皮苷通过发挥保肝、抗炎、调节代谢等作用^[5-9], 达到治疗胆囊炎目的。该方在我院以协定处方应用多年, 但尚无舒肝利胆方及其制剂的质量控制报道, 也未见同时测定柴胡皂苷 a、槲皮素、迷迭香酸、橙皮苷、甘草苷含量的研究。因此, 本实验建立 HPLC 法同时测定上述 5 种有效成分的含量, 为全面控制舒肝利胆丸质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器 PEA10 型高效液相色谱仪 (美国珀金埃尔默仪器公司); HS6150 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); LX 系列电子分析天平 (瑞士普利赛斯公司); HWS26 型电热恒温水浴锅 (郑州长城科工贸有限公司)。

1.2 试剂与药物 舒肝利胆丸 (中试产品, 批号 20210701、20210802、20210803) 为甘肃省中医院自制。甘草苷 (批号 111610-201607, 纯度 98%)、橙皮苷 (批号 110721-201818, 纯度 98%)、迷迭香酸 (批号 111871-201706, 纯度 98%)、槲皮素 (批号 100081-201610, 纯度

98%)、柴胡皂苷 a (批号 20736-09-8, 纯度 98%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈 (色谱纯, 山东禹王集团化工分公司); 甲醇 (分析纯, 天津市博迪化工有限公司); 磷酸 (色谱纯, 天津大茂化学试剂厂); 水为实验室自制。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 精密称取对照品甘草苷 21.60 mg、橙皮苷 20.50 mg、迷迭香酸 41.20 mg、槲皮素 0.80 mg、柴胡皂苷 a 21.20 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 得质量浓度分别为甘草苷 2.16 mg/mL、橙皮苷 2.05 mg/mL、迷迭香酸 4.12 mg/mL、槲皮素 0.08 mg/mL、柴胡皂苷 a 2.12 mg/mL 的溶液, 即得, 4 °C 保存备用。

2.1.2 供试品溶液制备 将舒肝利胆丸置于研钵中, 研成细粉状, 取 2.0 g, 加甲醇 20 mL, 称定质量, 超声 (300 W、40 kHz) 提取 40 min, 室温下放置 20 min, 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.45 μm 滤膜过滤, 取续滤液, 即得^[10]。

2.1.3 阴性样品溶液制备 按处方配比和生产工艺, 分别制备缺醋柴胡、缺金钱草、缺枳壳、缺紫苏子、缺甘草的阴性样品, 按“2.1.2”项下方法制备, 即得。

2.2 色谱条件 Waters Symmetry Shield 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm); 流动相乙腈 (A) -0.1% 磷酸 (B), 梯度洗脱 (0~12 min, 17% A; 12~18 min, 17%~22% A; 18~24 min, 22%~30% A; 24~32 min, 30%~38% A; 32~45 min, 38%~80% A; 45~55 min, 80%~17% A); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 20 °C; 检测波长 0~18 min 237 nm (甘草苷), 18~24 min 283 nm (橙皮苷), 24~28 min

收稿日期: 2023-08-18

基金项目: 兰州市科技发展计划项目 (2020-ZD-40); 甘肃省药品监管科学研究项目 (2023GSMPA040)

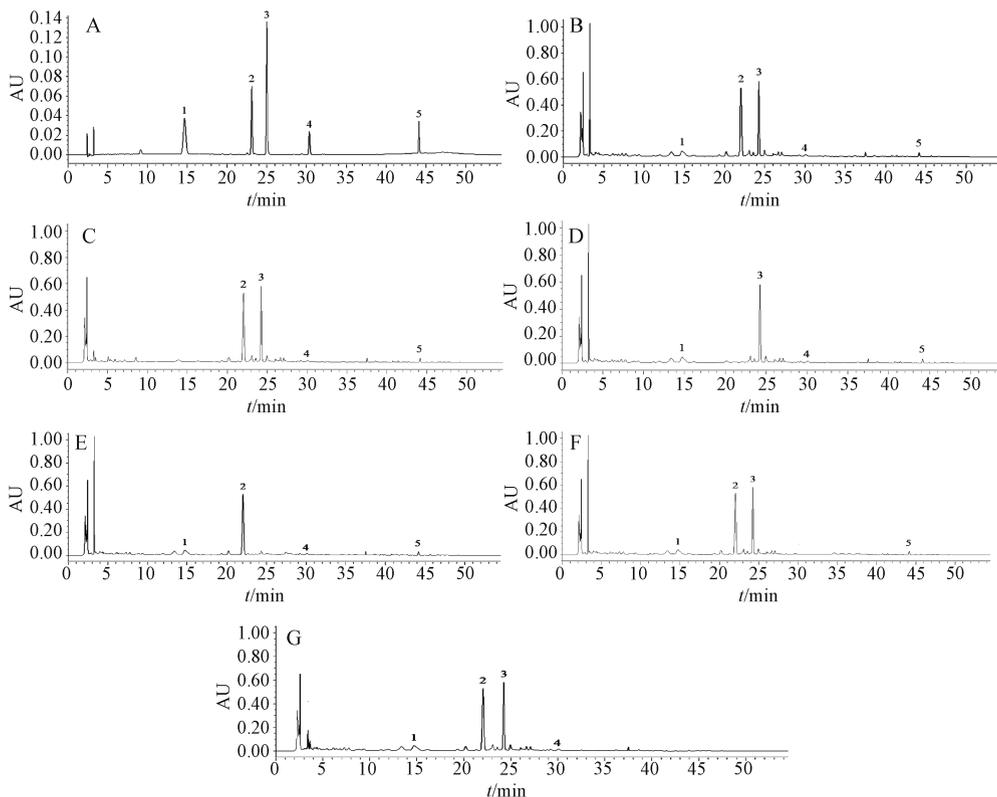
作者简介: 毕映燕 (1984—), 女, 硕士, 主管药师, 从事中药质量控制研究。Tel: 18919118499, E-mail: mediumhao@163.com

* 通信作者: 李俊江 (1972—), 男, 主任中药师, 从事中药制剂开发研究。Tel: 13830018992, E-mail: 2271442179@qq.com

330 nm (迷迭香酸), 28~35 min 368 nm (槲皮素), 35~55 min 210 nm (柴胡皂苷 a); 进样量 10 μL^[11-13]。

2.3 系统适用性考察和专属性试验 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液适量, 在“2.2”项色谱条件下进样

测定。结果, 供试品溶液中甘草苷、橙皮苷、迷迭香酸、槲皮素、柴胡皂苷 a 保留时间与对照品溶液中一致, 与相邻色谱峰分离度大于 1.5, 阴性无干扰, 理论塔板数以甘草苷计不低于 4 000, 见图 1。



1. 甘草苷 2. 橙皮苷 3. 迷迭香酸 4. 槲皮素 5. 柴胡皂苷 a

注: A 为对照品, B 为供试品, C~G 分别为缺甘草、缺枳壳、缺紫苏子、缺金钱草、缺醋柴胡阴性样品。

图 1 各成分 HPLC 色谱图

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.1.1”项下对照品适量, 甲醇逐级稀释成系列质量浓度, 在“2.2”项色谱条件下进样测定。以对照品峰面积 (Y) 对其质量浓度 (X) 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。

表 1 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/(μg·mL ⁻¹)
甘草苷	$Y=3\ 616X-4\ 106.9$	0.999 5	10.8~108
橙皮苷	$Y=4\ 306.8X-7\ 715$	0.999 8	41~410
迷迭香酸	$Y=5\ 818.7X+2\ 933$	0.999 7	16.46~164.6
槲皮素	$Y=25\ 512X-386.33$	0.999 5	0.075~0.75
柴胡皂苷 a	$Y=4\ 822.4X-3\ 873.3$	0.999 8	42.4~424

2.5 精密度试验 取对照品溶液适量, 在“2.2”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得甘草苷、橙皮苷、迷迭香酸、槲皮素、柴胡皂苷 a 峰面积 RSD 分别为 1.02%、0.85%、0.62%、0.93%、1.16%, 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验 取供试品溶液 (批号 20210701) 适量, 于 0、4、8、12、18、24 h 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 测得甘草苷、橙皮苷、迷迭香酸、槲皮素、柴胡皂苷 a 峰面积 RSD 分别为 1.85%、0.95%、1.17%、0.93%、1.16%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好^[14]。

2.7 重复性试验 取本品 (批号 20210701) 适量, 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 测得甘草苷、橙皮苷、迷迭香酸、槲皮素、柴胡皂苷 a 峰面积 RSD 分别为 1.73%、1.25%、1.17%、1.81%、1.44%, 表明该方法重复性良好^[13-15]。

2.8 加样回收率试验 精密称取本品 (批号 20210701) 1.0 g, 精密加入对照品溶液 (未稀释) 适量, 按“2.1.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 计算回收率。结果, 甘草苷、橙皮苷、迷迭香酸、槲皮素、柴胡皂苷 a 的平均加样回收率分别为 100.42%、99.94%、100.54%、102.22%、98.41%, RSD 分别为 2.59%、1.78%、2.11%、2.81%、2.62%。

2.9 样品测定 取 3 批样品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.2”项色谱条件下进样测定, 计算含量, 结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测波长选择 采用 A10 PAD 检测器, 对甘草苷、橙皮苷、迷迭香酸、槲皮素、柴胡皂苷 a 进行波长扫描, 发现最大吸收波长分别为 237、283、330、368、210 nm。比较不同波长下色谱图, 发现杂质对所测成分的干扰较少,

表2 各成分含量测定结果 (mg/g, n=3)

批号	甘草苷	橙皮苷	迷迭香酸	槲皮素	柴胡皂苷 a
20210701	0.265 9	2.794 3	0.277 2	0.001 3	1.889 4
20210802	0.286 3	2.645 8	0.264 5	0.001 3	1.967 2
20210803	0.274 1	2.785 8	0.266 0	0.001 2	2.009 0
平均值	0.275 4	2.742 0	0.269 2	0.001 3	1.955 2
RSD/%	3.73	3.04	2.57	2.24	3.10

并且较易检出。为提高分离度,结合所测成分出峰时间,确定波长切换方式为0~18 min 237 nm (甘草苷),18~24 min 283 nm (橙皮苷),24~28 min 330 nm (迷迭香酸),28~35 min 368 nm (槲皮素),35~55 min 210 nm (柴胡皂苷 a)^[16-17]。

3.2 流动相、色谱柱选择 本实验考察了甲醇、乙腈分别与不同体积分数的磷酸、甲酸、醋酸溶液组成的流动相,发现乙腈作为有机相时基线较平稳,进一步筛选乙腈与不同浓度磷酸、甲酸、醋酸组成的流动相,发现迷迭香酸在磷酸系统下峰对称性优于甲酸、醋酸系统,因此选择乙腈-0.1%磷酸作为流动相,并分别比较 Agilent C₁₈、Waters C₁₈、Kromasil C₁₈ 色谱柱,发现3种色谱柱均可用于含量测定^[18-24]。

3.3 提取方法选择 本实验考察了回流,超声,浸渍提取方式对5种有效成分提取率的影响,发现浸渍提取方式提取率低、耗时长,回流、超声提取对5种成分提取率影响较小,但后者操作简便,故选用超声提取^[25-27]。分别比较超声提取20、40、60 min对5种成分的影响,发现40、60 min对提取率影响不大,因此选择40 min作为提取时间。

4 结论

本实验建立 HPLC 法同时测定甘草苷、橙皮苷、迷迭香酸、槲皮素、柴胡皂苷 a 的含量,该方法操作简单、重复性好,可用于舒肝利胆丸的质量控制,同时也为其他医院制剂质量控制提升提供参考。

参考文献:

[1] 李徐恩,陈烨娜,袁杰,等.柴胡疏肝利胆汤治疗慢性胆囊炎的疗效观察[J].中国中医药科技,2023,30(3):609-611.

[2] 吕恬仪,刘亚楠,任越,等.基于特征图谱及网络药理学的大柴胡汤质量标志物研究[J].药科学报,2022,57(5):1477-1485.

[3] 但文超,刘子彰,何庆勇,等.基于国家专利的中药复方干预慢性胆囊炎的数据挖掘研究[J].世界科学技术(中医药现代化),2021,23(6):2043-2050.

[4] 张琛武,郭佳琪,郭宝林,等.紫苏中酚酸类成分研究进展[J].中国现代中药,2017,19(11):1651-1658.

[5] 王迎春,马永彝,甄亚钦,等.基于指纹图谱和网络药理学的芍药甘草汤抗肝损伤活性成分及含量测定研究[J].世界科学技术(中医药现代化),2022,24(8):3030-3042.

[6] 冯媛君.基于数据挖掘探究刘朝霞教授治疗慢性胆囊炎的

用药规律分析[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2022.

[7] 曹伊媛,陈颖,周慧,等.基于网络药理学研究柴胡疏肝散治疗急性胰腺炎的作用机制[J].陕西中医,2020,41(7):994-998.

[8] 江宝瑞,丁宏,王跃,等.枳壳的药理研究进展[J].云南中医中药杂志,2022,43(6):70-75.

[9] 王慧,钟国跃,张寿文,等.枳壳化学成分、药理作用的研究进展及其质量标志物的预测分析[J].中华中医药学刊,2022,40(9):184-192;284.

[10] 张亚莉,刘颖,谢诗婷,等.生发片中蒽醌类成分分析及其在不同生产工艺中的传递性[J].中成药,2022,44(1):215-218.

[11] 李俊江,陈志伟,毕映燕,等.舒肝利胆浓缩丸提取工艺优化[J].中成药,2023,45(9):3037-3041.

[12] 何艳,胡小祥,李叶婧,等.HPLC法同时测定小儿青翘颗粒中9种成分[J].中成药,2023,45(5):1433-1437.

[13] 许爱珍,李欢,张宏,等.痹通冲剂中羟基红花黄色素A和葛根素的含量测定[J].中国医院用药评价与分析,2019,19(6):721-723;728.

[14] 朱应成,余静,刘亮镜,等.HPLC法同时测定退赤胶囊中8种成分[J].中成药,2020,42(10):2575-2578.

[15] 樊亚,邵卫华,程贺丽.HPLC法同时测定妇康消肿丸中4种成分[J].中成药,2017,39(9):1957-1959.

[16] 成颜芬,江华娟,王琳,等.经典名方桃红四物汤化学指纹图谱及9种成分含量测定研究[J].中草药,2020,51(3):653-661.

[17] 毕映燕,李盛华,李喜香,等.HPLC法同时测定消肿止痛颗粒中5种成分[J].中成药,2021,43(8):2006-2009.

[18] 曹凡,宋忠兴,胡锦涛,等.金茵利胆复方制剂化学成分及药理作用的研究进展[J].中成药,2021,43(5):1265-1268.

[19] 徐王磊,应力健.HPLC法测定柴胡疏肝散中8个成分含量及主成分分析[J].中药材,2023,46(2):424-428.

[20] 杨蕾.HPLC-DAD同时测定少阳感冒颗粒中8个成分的含量[J].食品与药品,2022,24(6):538-543.

[21] 王辉,张雁.UHPLC法同时测定苏子降气丸中10个成分含量的研究[J].药物分析杂志,2020,40(3):554-561.

[22] 潘力,李勇,陈吉生.HPLC法同时测定贞术调脂浓缩丸中5种成分[J].中成药,2022,44(7):2104-2107.

[23] 金蕾,张贵萍,王温才.基于UPLC的疏风解毒胶囊指纹图谱及多成分含量测定[J].中国现代中药,2021,23(4):698-703.

[24] 李静华,王丽琼.HPLC法同时测定木香顺气丸中6种成分[J].中成药,2022,44(9):2789-2792.

[25] 赵李妮,李慧慧,梁振纲,等.高效液相色谱法同时测定除湿止痒软膏中9种成分含量[J].中国药业,2023,32(8):77-81.

[26] 李喜香,王雪梅,邱连利,等.HPLC-PDA法同时测定糖止丸中6种成分[J].中成药,2023,45(8):2501-2504.

[27] 兰贺燕,阎姝,汤湧.HPLC方法同时测定清热利胆片中10个成分含量[J].药物分析杂志,2019,39(4):644-651.