

HPLC法测定复方益肝灵片中五味子醇甲的含量

古海锋, 张小茜, 郭洪祝

(北京市药品检验所, 北京 100035)

摘要 目的: 建立 HPLC 法测定复方益肝灵片中五味子醇甲的含量。方法: 采用 C_{18} 色谱柱, 型号: SHISEDO CAPCELL PAK C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m), 流动相: 甲醇-水 (60:40); 流速: 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, 检测波长: 250 nm, 柱温: 40 $^{\circ}$ C。结果: 五味子醇甲进样量在 0.038~0.38 μ g 范围内线性关系良好, 其回归方程为: $Y = 1.720 \times 10^6 X + 1.692 \times 10^3$, 相关系数 (r) 为 0.9999, 精密密度 RSD 为 0.6% ($n=6$), 重复性试验 RSD 为 0.3% ($n=6$), 方法回收率为 101.5% (RSD=0.8%, $n=6$)。结论: 实验结果表明该方法简便, 灵敏, 专属性强, 重复性好, 可作为复方益肝灵片的质量控制方法。

关键词: HPLC; 复方益肝灵片; 五味子醇甲

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)02-0295-03

HPLC determination of schizandrol A in compound Yiganling tablets

GU Hai-feng ZHANG Xiao-qian, GUO Hong-zhu

(Beijing Institute for Drug Control Beijing 100035 China)

Abstract Objective To establish an HPLC method of the determination of schizandrol A in compound Yiganling tablets. **Methods** The content of schizandrol A was determined by C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) ODS column, the mobile phase was consisted of methanol-water (60:40), the flow rate was 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹, the detection wavelength was at 286 nm, the temperature of column was 40 $^{\circ}$ C. **Results** The calibration curve of schizandrol A was linear in the range of 0.038-0.38 μ g, the linear equation was $Y = 1.720 \times 10^6 X + 1.692 \times 10^3$, $r = 0.9999$. The precision (RSD) was 0.6% ($n=6$). The reproducibility (RSD) of this method was 0.3% ($n=6$). The average recovery of schizandrol A was 101.5% (RSD=0.8%, $n=6$). **Conclusions** The method is easy, sensitive, specific and accurate with good reproducibility. It can be used for quality control of schizandrol A in compound Yiganling tablets.

Key words HPLC; compound Yiganling tablets; schizandrol A

复方益肝灵片由水飞蓟素、五味子两味药材加工而成, 具有益肝滋肾、解毒去湿等作用。用于肝肾阴虚、湿毒未清所引起的胁痛、纳差、腹胀、腰酸乏力、尿黄等症或慢性肝炎转氨酶增高者^[1], 是临床治疗急慢性肝炎的常用中药。处方中水飞蓟素和五味子都具有保肝作用^[2], 原质量标准收载于《卫生部药品标准》中药成方制剂第 12 册, 只标示了水飞蓟素的含量, 未标示五味子的含量^[3], 不够全面。为全面控制复方益肝灵片的质量, 本文建立了五味子中主要成分五味子醇甲的高效液相测定方法, 实验结果表明该方法简便、准确, 重复性好, 可作为该制剂质量控制方法。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪 (SPD-M 20A

紫外-可见光检测器, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱); 电子天平 (CP225D, 十万分之一)。五味子醇甲对照品购自中国药品生物制品检定所 (供含量测定用, 批号 110857-200405); 复方益肝灵片由北京双鹤现代医药技术有限责任公司提供, 批号为 070304、070308、070311; 甲醇, HPLC 专用, 由 LANSKAN LTD 出品; 水为纯水机净化水 (纯水机型号 Millipore Milli-Q bioce 型纯水器)。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液 精密称取五味子醇甲对照品 10 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇适量使溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 (每 1 mL 中含五味子醇甲 20 μ g)。

2.2 供试品溶液 取本品 20 片, 除去糖衣, 精密称定, 研细, 取 0.5 g 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 置水浴上加热回流 30 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液用微孔滤膜 (0.45 μm) 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 阴性空白溶液 按处方比例, 取不含五味子的样品 0.5 g 精密称定, 按“2.2”项下方法操作, 制备阴性空白溶液。

3 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱为 SHISEIDO CAPCELL PAK C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm), 流动相: 甲醇-水 (60:40), 流速: 1.0 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 检测波长: 250 nm, 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。分离度大于 1.5 理论板数按五味子醇甲峰计算, 应不低于 3000 见图 1。

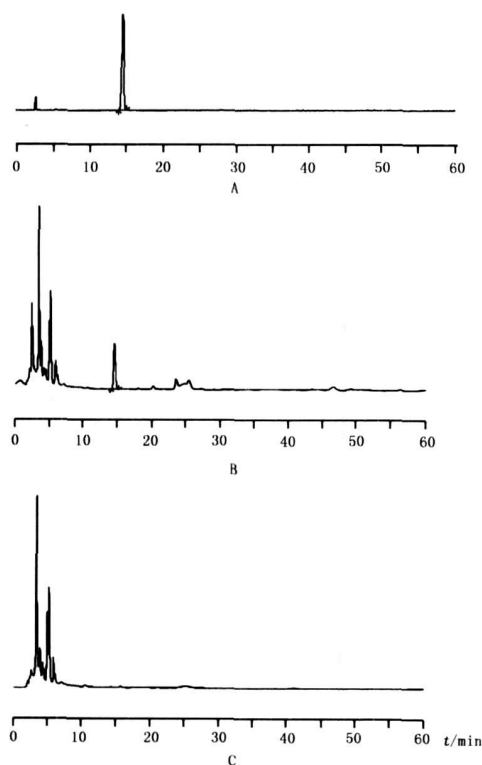


图 1 五味子醇甲对照品 (A)、复方益肝灵片样品 (B) 及缺五味子的空白制剂 (C) HPLC 色谱图

Fig 1 Chromatograms of reference substance (A), compound Yiganling tablets (B) and negative sample of compound Yiganling tablets (C)

4 方法与结果

4.1 五味子醇甲线性关系考察 精密量取五味子醇甲对照品溶液 (18.9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 分别进样 2.0 4.0 6.0 10.0 20.0 μL , 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积, 以五味子醇甲对照品进样量为横坐标, 峰面积值为纵坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为:

$$Y = 1.720 \times 10^6 X + 1.692 \times 10^3 \quad r = 0.9999$$

结果表明, 五味子醇甲进样量在 0.038~0.38 μg 范围内线性关系良好。

4.2 精密度试验 精密吸取供试品溶液, 进样 10 μL , 连续进样 5 次, 求得峰面积 RSD 为 0.6% ($n = 5$)。

4.3 稳定性试验 精密吸取供试品溶液, 分别于配制后 0, 1, 4, 8, 15, 24 h 进样 10 μL , 依法测定。结果表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定, 求得峰面积 RSD 为 0.8% ($n = 6$)。

4.4 重复性试验 取同一批样品 (批号 070304) 6 份进行测定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 求得峰面积 RSD 为 0.3% ($n = 6$)。

4.5 回收率试验 采用加样回收法, 精密称取已知含量的同一批号的样品 (批号为 070304, 含量为 2.07 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) 0.25 g 精密加入五味子醇甲对照品 (0.0126 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的甲醇溶液 50 mL, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液及“3”项下色谱条件测定, 计算回收率, 结果回收率分别为 101.9%, 101.3%, 102.1%, 102.5%, 101.2%, 100.2%; 平均加样回收率为 101.5%, RSD 为 0.8% ($n = 6$)。结果表明回收试验良好。

4.6 样品测定 精密吸取“2.1”项下对照品溶液和“2.2”项下供试品溶液各 10 μL , 注入液相色谱仪, 3 批样品 (批号: 070304, 070308, 070311), 中五味子醇甲的含量分别为 0.70, 0.76, 0.58 $\text{mg} \cdot \text{片}^{-1}$ 。

5 讨论

5.1 流动相的选择 根据文献, 流动相曾采用甲醇-水 (50:50)^[4]、甲醇-水 (60:40)^[5]、乙腈-0.1% 磷酸 (42:58)^[6]、甲醇-乙腈-水 (15:15:10)^[2]、乙腈-水 (45:55)^[7], 结果采用甲醇-水 (60:40) 流动相分离效果最好。

5.2 检测波长的选择 取五味子醇甲对照品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 用二极管阵列检测器在 200~400 nm 波长范围检测, 结果在 250 nm 波长处有最大吸收, 故采用 250 nm 作为检测波长。

5.3 提取溶剂的选择 参考 2005 年版中国药典五味子中五味子醇甲的含量测定项, 精密称取同批样品 (070304) 0.5 g 分别精密量取 75% 甲醇 50 mL, 甲醇 50 mL, 乙醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 置水浴上加热回流 30 min 取出, 放冷, 用相应溶剂补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 即得, 进样 10 μL , 结果表明, 采用甲醇测得峰面积值较高, 故选定甲醇为溶剂, 见表

表 1 提取溶剂的比较

Tab 1 The comparison of solvent extraction

溶剂 (solvent)	取样量 (weight of sample) /g	峰面积 (peak area)
75% 甲醇 (75% methanol)	0.5045	356063
甲醇 (methanol)	0.5045	359427
乙醇 (ethanol)	0.5046	349417

5.4 提取方法的考察 精密称取同批样品 (070304) 0.5 g 精密量取甲醇 50 mL, 密塞, 称定重量, 分别置水浴上加热回流 30 min 和超声处理 30 min 取出, 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 即得, 进样 10 μ L, 结果表明采用加热回流 30 min 的提取方法测得峰面积更高, 故采用加热回流的提取方法, 见表 2。

表 2 加热回流和超声提取方法的比较

Tab 2 The comparison of heating return and ultrasonic extraction

提取方式 (extraction method)	取样量 (weight of sample) /g	峰面积 (peak area)
加热回流 (heating return)	0.5050	359614
超声处理 (ultrasonic extraction)	0.5042	353427

5.5 提取时间的考察 采用甲醇 50 mL 为溶剂, 采取加热回流方式提取, 时间分别为 10、20、30、60 min 放冷, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 用微孔滤膜 (0.45 μ m) 滤过, 即得, 进样 10 μ L。结果表明, 采用加热回流 30 min 方式提取测得峰面积较高, 故选定加热回流 30 min 提取方式, 见表 3。

表 3 提取时间的比较

Tab 3 The comparison of extraction time

提取时间 (extraction time) /min	取样量 (weight of sample) /g	峰面积 (peak area)
10	0.4996	354408
20	0.4996	355099
30	0.4999	362735
60	0.4996	354292

5.6 不同色谱柱 另外取 A ltech Apollo C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 150 mm) 和 K romasil KR 100- 5 C₁₈ (5 μ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm) 2 种不同品牌色谱柱, 按“ 3” 项下条件进行试验。分别依法分离测定, 均能获得满意的分离效果。

5.7 结论 本方法简便、准确, 重复性好, 可作为复方益肝灵片的质量控制方法。

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005 Vol I (一部): 44
- 2 GUO Leng- qiu (郭冷秋), ZHANG Peng(张鹏), HUANG Li- li (黄莉莉). The investigation of pharmacological function in *Schisan- dra chinensis*(Turcz.) Baill (五味子药理作用研究进展). *J Chin Med Pharmacol*(中医药学报), 2006, 34(4): 51
- 3 CHEN Hong(陈虹), HU X iao- guo(胡孝国), ZHANG Lei(张磊), et al. Determination of schizandrol A in compound Y i gan ling tablet by HPLC (HPLC 法测定复方益肝灵中五味子醇甲的含量). *Med J Chin PAPF* (武警医学), 2003, 14(12): 737
- 4 LI Y ing(李英), CHEN Zhong- lian(陈忠梁). Determination of tan- shion d I A and schizandrol A in Anshenbu xin pill by HPLC (HPLC 测定安神补心丸中五味子醇甲和丹参酮 II A 含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26(7): 538
- 5 LI X i(李希), X IE Shou- de(谢守德), CAO Ding- zhi(曹定知), et al. Determination of schizandrol A in Zhichuan capsule by HPLC (HPLC 测定止喘胶囊中五味子醇甲的含量). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 31(15): 1292
- 6 YU He- yong(虞和勇), WU Mei- zhen(吴美珍). Determination of schizandrol A in Hu ilishen granule by HPLC (HPLC 测定回力神颗粒中五味子醇甲的含量). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2006, 30(12): 942
- 7 KANG Si- he(康四和), DENG Hai- yin(邓海英). Determination of schizandrol A in Yi qi yangxue medicinal wine by HPLC (HPLC 法测定益气养血补酒中五味子醇甲的含量). *China Pharm* (中国药师), 2003, 6(6): 351

(本文于 2007 年 12 月 3 日收到)