

HPLC法同时测定茵胆平肝胶囊中6种成分的含量^Δ

张宏梅*, 昌盛, 崔佰吉, 李星梅, 冯宪敏[#](吉林医药学院药学院, 吉林 吉林 132013)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1239-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.24

摘要 目的:建立同时测定茵胆平肝胶囊中绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Wonda SiITM-C₁₈,流动相为乙腈-0.4%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 mL/min,检测波长分别为325 nm(绿原酸和阿魏酸)、250 nm(栀子苷和甘草酸铵)、275 nm(龙胆苦苷和黄芩苷),柱温为30 ℃。结果:绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵检测进样量线性范围分别为0.087~3.480 μg($r=0.999\ 8$)、0.201~8.040 μg($r=0.999\ 7$)、0.200~8.000 μg($r=0.999\ 5$)、0.016~0.640 μg($r=0.999\ 9$)、0.105~4.200 μg($r=0.999\ 9$)、0.028~1.120 μg($r=0.999\ 5$);定量限分别为1.31、0.75、1.14、1.25、0.94、0.98 ng,检测限分别为0.87、0.67、0.96、0.93、0.60、0.88 ng;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为99.9%~101.9%(RSD=0.7%, $n=6$)、98.7%~100.9%(RSD=0.9%, $n=6$)、98.1%~101.5%(RSD=1.4%, $n=6$)、98.5%~101.3%(RSD=1.3%, $n=6$)、98.5%~101.7%(RSD=1.2%, $n=6$)、98.2%~101.4%(RSD=1.2%, $n=6$)。结论:该方法简便、结果准确,适用于茵胆平肝胶囊中绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵含量的同时测定。

关键词 茵胆平肝胶囊;绿原酸;栀子苷;龙胆苦苷;阿魏酸;黄芩苷;甘草酸铵;高效液相色谱法;含量测定

Simultaneous Determination of 6 Kinds of Components in Yindan Pinggan Capsules by HPLC

ZHANG Hongmei, CHANG Sheng, CUI Baiji, LI Xingmei, FENG Xianmin(College of Pharmacy, Jilin Medical University, Jilin Jilin 132013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of chlorogenic acid, geniposide, gentiopicroside, ferulic acid, baicalin and ammonium glycyrrhizinate in Yindan pinggan capsule. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Wonda SiITM-C₁₈ column with mobile phase consisting of acetonitrile-0.4% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.8 mL/min. The detection wavelength were set at 325 nm (chlorogenic acid, ferulic acid), 250 nm (geniposide, ammonium glycyrrhizinate) and 275 nm (gentiopicroside, baicalin). The column temperature was 30 ℃. RESULTS: The linear ranges were 0.087-3.480 μg for chlorogenic acid ($r=0.999\ 8$), 0.201-8.040 μg for geniposide ($r=0.999\ 7$), 0.200-8.000 μg for gentiopicroside ($r=0.999\ 5$), 0.016-0.640 μg for ferulic acid ($r=0.999\ 9$), 0.105-4.200 μg for baicalin ($r=0.999\ 9$) and 0.028-1.120 μg for ammonium glycyrrhizinate ($r=0.999\ 5$), respectively. The limits of quantitation were 1.31, 0.75, 1.14, 1.25, 0.94, 0.98 ng, and the limits of detection were 0.87, 0.67, 0.96, 0.93, 0.60, 0.88 ng, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recoveries were 99.9%-101.9% (RSD=0.7%, $n=6$), 98.7%-100.9% (RSD=0.9%, $n=6$), 98.1%-101.5% (RSD=1.4%, $n=6$), 98.5%-101.3% (RSD=1.3%, $n=6$), 98.5%-101.7% (RSD=1.2%, $n=6$), 98.2%-101.4% (RSD=1.2%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, can be used for simultaneous determination of chlorogenic acid, geniposide, gentiopicroside, ferulic acid, baicalin and ammonium glycyrrhizinate in Yindan pinggan capsule.

KEYWORDS Yindan pinggan capsule; Chlorogenic acid; Geniposide; Gentiopicroside; Ferulic acid; Baicalin; Ammonium glycyrrhizinate; HPLC; Content determination

茵胆平肝胶囊为国家基本药物,由茵陈、龙胆、黄芩、栀子、猪胆粉、白芍、甘草、当归八味中药材加以适宜辅料制备而成。方中茵陈为君药,龙胆、黄芩、栀子、猪胆粉四味药材共为臣药,白芍、当归、甘草为佐使;诸药合用,具有清热祛湿、泻肝胆实火、清热凉血、止咳平喘、敛阴止汗、补血调经、补脾益气等功效^[1-3],临床上主要用

于急慢性病毒性肝炎、酒精肝及脂肪肝等的治疗^[4]。

该制剂目前收录于2015年版《中国药典》(一部),其质量标准中只进行了黄芩苷的含量测定;相关文献^[5-9]中测定的成分也较少,不利于该制剂的质量控制。因此,笔者采用高效液相色谱法(HPLC)建立了同时测定该制剂中绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵含量的方法,旨在为完善该制剂的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括LC20AT二元高压梯度泵、SPDM20A二极管阵列检测器(DAD)、SIL20A自动

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.31572262);吉林省科技发展计划项目(No.20160414050GH)

* 硕士,讲师。研究方向:药物制剂与新剂型。电话:0432-64560528。E-mail: 33134016@qq.com

通信作者:副教授,博士。研究方向:病原与分子生物学。E-mail: fengxianmin28@163.com

进样器、LC-solution 色谱工作站(日本 Shimadzu 公司); CAP225D 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司); Synergy185 型超纯水仪(美国 Millipore 公司); KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:500 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

茵胆平肝胶囊(吉林医药学院自制,批号:160401、160402、160403,规格:0.5 g/粒);绿原酸对照品(批号:071229,纯度:>99.0%)、龙胆苦苷对照品(批号:100730,纯度:>98.0%)均购自上海融禾医药科技有限公司;栀子苷对照品(批号:KD1229CA12,纯度:>98.0%)、黄芩苷对照品(批号:YY20100919,纯度:>98.0%)均购自上海源叶生物科技有限公司;阿魏酸对照品(批号:110773-201313,纯度:99.6%)、甘草酸铵对照品(批号:110731-201317,纯度:92.6%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Wonda SilTM-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.4%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min,86% B;5~35 min,86%→20% B);流速:0.8 mL/min;检测波长:325 nm(绿原酸和阿魏酸)、250 nm(栀子苷和甘草酸铵)、275 nm(龙胆苦苷和黄芩苷);柱温:30 ℃。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵对照品各适量,精密称定,分别置于10 mL量瓶中,加乙腈定容,摇匀,制备绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵质量浓度分别为0.635、0.321、1.921、0.322、1.903、1.891 mg/mL的单一对照品贮备液。分别精密量取上述单一对照品贮备液各适量,置于同一10 mL量瓶中,加乙腈定容,摇匀,得绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵质量浓度分别为0.087、0.201、0.200、0.016、0.105、0.028 mg/mL的混合对照品溶液。

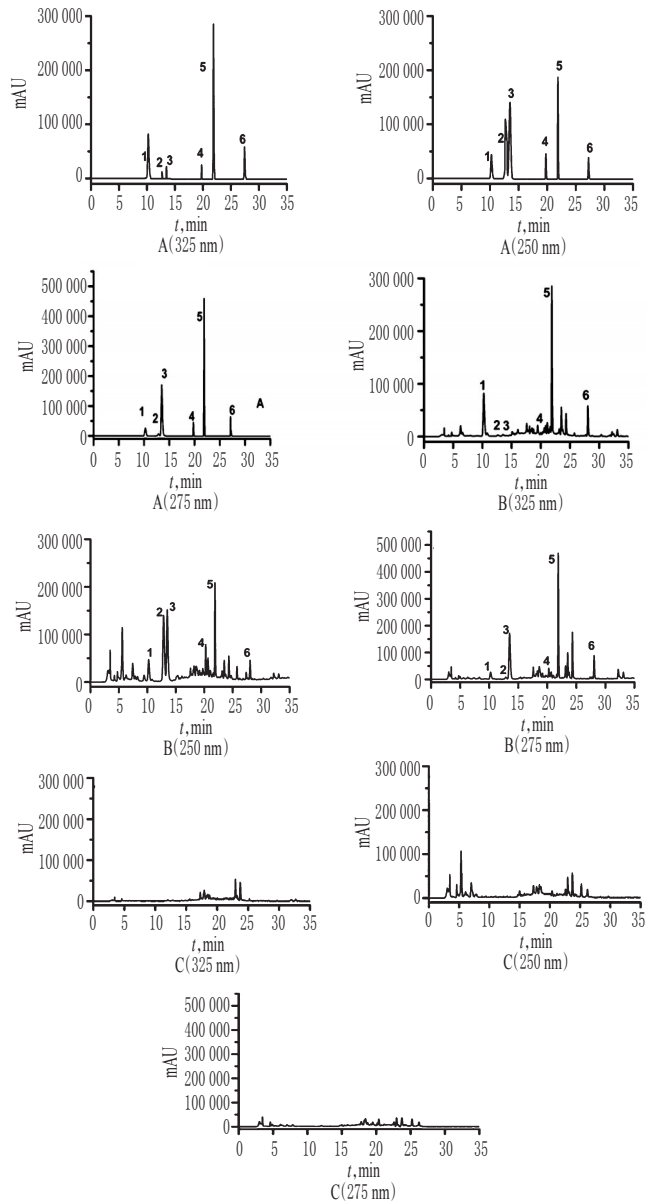
2.2.2 供试品溶液 取20粒样品内容物,置于研钵中研细,精密称取细粉3.0 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,精密加入乙腈25 mL,密塞,称定质量,超声提取30 min,放冷至室温,再次称定质量,加乙腈补足减失的质量,充分振荡混匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的制备工艺和处方比例,制备不含茵陈、栀子、龙胆、白芍、黄芩、甘草的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记

录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷和甘草酸铵峰与其他相邻峰均能达到基线分离,分离度>1.5;理论板数以黄芩苷峰计为11 000,保留时间为21.8 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.绿原酸;2.栀子苷;3.龙胆苦苷;4.阿魏酸;5.黄芩苷;6.甘草酸铵

A. mixed control; B. test sample; C. negative control; 1. chlorogenic acid; 2. geniposide; 3. gentiopicoside; 4. ferulic acid; 5. baicalin; 6. ammonium glycyrrhizinate

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、5、10、20、40 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分进样量(x, μg)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。

2.5 定量限与检测限考察

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equation and linear rang

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg
绿原酸	$y=2 \times 10^5 x + 8.533 \times 10^3$	0.999 8	0.087~3.480
栀子苷	$y=1 \times 10^5 x + 1.050 55 \times 10^5$	0.999 7	0.201~8.040
龙胆苦苷	$y=1 \times 10^5 x + 2.020 32 \times 10^5$	0.999 5	0.200~8.000
阿魏酸	$y=7 \times 10^4 x - 2.188 7 \times 10^7$	0.999 9	0.016~0.640
黄芩苷	$y=2 \times 10^5 x + 3.395 2 \times 10^4$	0.999 9	0.105~4.200
甘草酸铵	$y=1 \times 10^5 x - 2.302 5 \times 10^4$	0.999 5	0.028~1.120

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ);当信噪比为3:1时,得检测限(LOD)。结果,绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵的LOQ分别为1.31、0.75、1.14、1.25、0.94、0.98 ng, LOD分别为0.87、0.67、0.96、0.93、0.60、0.88 ng。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液5 μL ,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.1%、0.5%、0.6%、0.1%、0.1%、0.2% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:160401)适量,分别于室温下避光放置0、2、4、6、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵峰面积的RSD分别为0.6%、0.8%、0.6%、1.1%、0.5%、0.8% ($n=5$),表明供试品溶液在室温下放置8 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:160401)内容物适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算平均含量。结果,绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵的平均含量分别为1.445、2.691、3.710、0.314、4.582、0.876 mg/g, RSD分别为1.0%、0.6%、0.7%、0.8%、0.6%、0.8% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取同一批(批号:160401)已知含量的样品粉末适量,共6份,分别置于50 mL量瓶中,分别精密加入一定质量的绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草酸铵对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

2.10 样品含量测定

取3批样品内容物适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算待测成分的含量,结果见表3。

3 讨论

表2 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	取样量, g	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
绿原酸	1.504 2	2.166	2.210	4.419	101.9	101.2	0.7
	1.522 8	2.193	2.210	4.431	101.3		
	1.533 4	2.208	2.210	4.416	99.9		
	1.503 8	2.165	2.210	4.416	101.8		
	1.493 5	2.151	2.210	4.385	101.1		
	1.482 2	2.134	2.210	4.372	101.3		
栀子苷	1.504 2	4.046	4.106	8.098	98.7	100.1	0.9
	1.522 8	4.096	4.106	8.237	100.8		
	1.533 4	4.125	4.106	8.259	100.7		
	1.503 8	4.045	4.106	8.125	99.4		
	1.493 5	4.018	4.106	8.163	100.9		
	1.482 2	3.987	4.106	8.086	99.8		
龙胆苦苷	1.504 2	5.581	5.583	11.068	98.3	99.4	1.4
	1.522 8	5.650	5.583	11.142	98.4		
	1.533 4	5.689	5.583	11.358	101.5		
	1.503 8	5.579	5.583	11.188	100.5		
	1.493 5	5.541	5.583	11.020	98.1		
	1.482 2	5.499	5.583	11.075	99.9		
阿魏酸	1.504 2	0.481	0.475	0.958	100.4	99.9	1.3
	1.522 8	0.487	0.475	0.955	98.5		
	1.533 4	0.491	0.475	0.972	101.3		
	1.503 8	0.481	0.475	0.952	99.2		
	1.493 5	0.478	0.475	0.946	98.5		
	1.482 2	0.474	0.475	0.955	101.2		
黄芩苷	1.504 2	6.889	6.972	13.981	101.7	100.7	1.2
	1.522 8	6.974	6.972	13.844	98.5		
	1.533 4	7.023	6.972	14.028	100.5		
	1.503 8	6.887	6.972	13.951	101.3		
	1.493 5	6.840	6.972	13.830	100.3		
	1.482 2	6.788	6.972	13.878	101.7		
甘草酸铵	1.504 2	0.436	0.441	0.876	99.8	100.2	1.2
	1.522 8	0.442	0.441	0.888	101.1		
	1.533 4	0.445	0.441	0.878	98.2		
	1.503 8	0.436	0.441	0.876	99.8		
	1.493 5	0.433	0.441	0.879	101.1		
	1.482 2	0.430	0.441	0.877	101.4		

表3 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)

Tab 3 Results of content determination of samples ($n=3$, mg/g)

样品批号	绿原酸	栀子苷	龙胆苦苷	阿魏酸	黄芩苷	甘草酸铵
160401	1.441	2.692	3.708	0.317	4.583	0.291
160402	1.443	2.690	3.707	0.315	4.580	0.294
160403	1.439	2.693	3.705	0.319	4.578	0.288
平均含量	1.441 ± 0.002	2.692 ± 0.002	3.707 ± 0.002	0.317 ± 0.002	4.580 ± 0.003	0.291 ± 0.003

3.1 检测波长的选择

笔者采用DAD检测器全波长检测功能提取各待测成分的色谱发现,绿原酸的最大吸收波长为325 nm,阿魏酸的最大吸收波长为322 nm,栀子苷的最大吸收波长为240 nm,甘草酸铵的最大吸收波长为250 nm,龙胆苦苷的最大吸收波长为270 nm,黄芩苷的最大吸收波长为275 nm。其中,阿魏酸在325 nm和322 nm波长条件下,检测结果没有显著性差异;栀子苷在240 nm和250 nm波长条件下,检测结果没有显著性差异;龙胆苦苷在

微流控芯片非接触电导法测定异烟肼片中异烟肼的含量^Δ

童艳丽^{1*}, 冯汗志², 陈缙光² (1.广东省第二人民医院药学部, 广州 510317; 2.中山大学药学院, 广州 510006)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1242-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.25

摘要 目的: 采用微流控芯片非接触电导法测定异烟肼片中异烟肼的含量。方法: 探讨缓冲溶液的种类、浓度、pH、添加剂种类和添加量、进样时间、分离电压等因素对分离检测的影响。结果: 优选缓冲体系为 1.86 mmol/L 柠檬酸-0.14 mmol/L 柠檬酸钠缓冲溶液 (pH3.0), 不加添加剂, 进样时间为 20 s, 分离电压为 2.5 kV。优化条件下, 异烟肼检测质量浓度线性范围为 10~200 μg/mL ($r=0.999\ 3$); 定量限为 8.0 μg/mL, 检测限为 2.4 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<2.0%; 加样回收率为 97.8%~102.9% (RSD=1.9%, $n=9$)。结论: 该方法快速简便, 适用于测定异烟肼片中异烟肼的含量。

关键词 微流控芯片; 非接触电导检测; 异烟肼; 异烟肼片; 含量测定

Content Determination of Isoniazid in Isoniazid Tablets by Microfluidic Chip with Contactless Conductivity Method

TONG Yanli¹, FENG Hanzhi², CHEN Zuanguang² (1.Dept. of Pharmacy, Guangdong NO.2 Provincial People's Hospital, Guangzhou 510317, China; 2.School of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of isoniazid in Isoniazid tablet. METHODS: Microfluidic chip with contactless conductivity detection was adopted. The effects of electrophoresis parameters, such as the variety, concentration, pH, additive types and dosage, injection time and separation voltage on the separation detection were explored. RESULTS: The optimized buffer system was 1.86 mmol/L citrate-0.14 mmol/L sodium citrate buffer solution (pH3.0), no additive, the injection time was 20 s and the separation voltage was 2.5 kV. In the optimal conditions, the linear range of isoniazid was 10-200 μg/mL ($r=0.999\ 3$); the limits of quantification and detection were 8.0 μg/mL and 2.4 μg/mL; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%; recovery was 97.8%-102.9% (RSD=1.9%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method

270 nm 和 275 nm 波长条件下, 检测结果没有显著性差异。因此, 确定本试验各检测波长分别为 325 nm (绿原酸和阿魏酸)、250 nm (栀子苷和甘草酸铵)、275 nm (龙胆苦苷和黄芩苷)。

3.2 流动相的选择

笔者曾考察了甲醇-0.4%磷酸溶液、乙腈-0.2%醋酸铵溶液、乙腈-0.4%磷酸溶液 3 个不同体系的流动相, 研究发现乙腈-0.4%磷酸溶液为流动相时, 各待测成分的分离度和峰型良好、基线较稳定, 因此最终选择乙腈-0.4%磷酸溶液为本试验的流动相。

3.3 提取方法的选择

本试验进行了回流提取法和超声提取法的对比研究。结果表明, 两种方法都能够将有效成分提取完全, 但超声提取法提取时间较短 (回流提取法提取 1 h 与超声提取法提取 30 min 所得的各成分含量没有明显差异), 因此选择超声提取法作为本试验的提取方法。

综上所述, 本方法简便、结果准确, 适用于茵胆平肝胶囊中绿原酸、栀子苷、龙胆苦苷、阿魏酸、黄芩苷、甘草

酸铵含量的同时测定。

参考文献

- [1] 常学文, 王红玲. 茵胆平肝胶囊治疗酒精性肝病湿热蕴结证 41 例[J]. 河南中医, 2015, 35(9): 2101-2103.
- [2] 王敏, 龚先琼. 茵胆平肝胶囊治疗酒精性肝病 18 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2014, 30(11): 60-62.
- [3] 文晓丽, 朱诗塔, 潘浩. 肝病专科口服中成药应用分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2010, 10(11): 985-987.
- [4] 杨华升, 金瑞, 李秀惠. 茵胆平肝胶囊治疗慢性乙型肝炎疗效观察[J]. 传染病信息, 2006, 19(4): 199-200.
- [5] 汤秋华, 潘东扬. RP-HPLC 法测定茵胆平肝胶囊中黄芩苷的含量[J]. 海峡药学, 2002, 14(5): 52-54.
- [6] 陈庆辉. 高效液相色谱法测定茵胆平肝胶囊中龙胆苦苷的含量[J]. 海峡药学, 2004, 16(1): 52-54.
- [7] 林卫雄, 张旺山. HPLC 法测定茵胆平肝胶囊中绿原酸的含量[J]. 海峡药学, 2010, 22(4): 56-57.
- [8] 陈祯祯, 罗珍珠. HPLC 法同时测定茵胆平肝胶囊中栀子苷、龙胆苦苷、芍药苷的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(36): 3442-3444.
- [9] 陈东鸿. 茵胆平肝胶囊的质量标准研究[J]. 中国药房, 2011, 22(7): 637-639.

(收稿日期: 2016-08-16 修回日期: 2016-12-11)
(编辑: 刘柳)

^Δ 基金项目: 广东省科技计划项目 (No. 2014A020221098)
* 副主任药师, 硕士。研究方向: 药物分析、临床药学。电话: 020-89163249。E-mail: Tongh2008@126.com