

高效液相色谱法测定肝安胶囊中水飞蓟宾的含量

王慧, 路克军, 张洁瑾, 栾晓琳, 周燕妮, 张国庆 (第二军医大学附属东方肝胆外科医院药材料 上海 200438)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法测定肝安胶囊中水飞蓟宾的含量。方法 使用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相: 1% 冰醋酸-甲醇 = 50 : 50, 流速: 1.0 ml/min, 柱温: 30 ℃, 检测波长: 287 nm, 测定 10 批肝安胶囊中水飞蓟宾的含量。结果 水飞蓟宾在 10.28 ~ 123.36 μg/ml ($r=1$) 浓度范围内线性关系良好, 回收率为 97.00% (RSD = 0.68%)。10 批肝安胶囊中水飞蓟宾含量为 11.11 ~ 16.65 mg/粒。结论 该方法简便、准确、重复性好, 可以用于肝安胶囊的质量控制。

[关键词] 高效液相色谱法; 水飞蓟宾; 肝安胶囊; 含量测定

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)06-0459-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.06.017

Determination of silybin contents in Gan'an capsule by HPLC

WANG Hui, LU Ke-jun, ZHANG Jie-jin, LUAN Xiao-lin, ZHOU Yan-ni, ZHANG Guo-qing (Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC method for determination of silybin contents in Gan'an capsule. **Methods** Agilent Zorbax SB C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used with 1% acetic acid : methanol = 50 : 50 as the mobile phase. The flow rate was 1.0 ml/min, and the temperature was at 30℃. The detection wavelength was 287 nm. Determination of silybin contents in Gan'an capsule of 10 batches of preparations. **Results** The silybin calibration curve was at the range of 10.28 ~ 123.36 μg/ml ($r=1$) with average recovery of 97.00% (RSD = 0.68%). 10 batches of preparations silybin contents in Gan'an capsule was 11.11 ~ 16.65 mg/granule. **Conclusion** The method was simple accurate and reproducible which could be used for the quality control of Gan'an capsule.

[Key words] HPLC; silybin; Gan'an capsule; determination

肝安胶囊是第二军医大学附属东方肝胆外科医院自制制剂, 由水飞蓟素和大豆磷脂组成。临床用于急性肝炎、慢性迁延性肝炎、脂肪肝、早期肝硬化、中毒性肝炎和术后治疗。水飞蓟素从菊科植物水飞蓟 *Silybum marianum* (L.) Gaertn. 的干燥成熟果实经提取精制而得的混合物, 其主要成分为水飞蓟宾、水飞蓟宁、水飞蓟亭以及水飞蓟醇等^[1], 其中水飞蓟宾含量最高, 活性也最强。因此有关水飞蓟制剂的分析方法多集中在对水飞蓟宾的分析。目前, 测定方法主要是高效液相色谱法^[2-4]。水飞蓟素具有抗肝损伤、抗脂质过氧化、抗辐射、清除自由基及抗胃溃疡等作用, 临床应用于保肝利胆、降血脂、保护心肌、防止脑缺血、抗血小板凝集和防治动脉粥样硬化等显示出良好的疗效^[1]。肝安胶囊原质量标准中采用紫外分光光度法测定水飞蓟宾含量, 由于易受到各种因素影响, 偏差较大。HPLC法测定肝安胶囊中水飞蓟宾含量, 专属性更强、准确度更高, 可更好地用于肝安

胶囊的质量控制。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 包括在线脱气机, 四元泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器, Chemstation 色谱工作站, METTLER AE240 型电子天平, SK2200H 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 肝安胶囊由我院制剂室生产, 水飞蓟宾对照品(批号: 110856-200604, 中国药品生物鉴定所); 甲醇为色谱纯, 冰醋酸、无水乙醇为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm); 流动相: 1% 冰醋酸-甲醇 = (50 : 50); 流速: 1.0 ml/min, 柱温: 30 ℃, 检测波长: 287 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取水飞蓟宾对照品 10.28 mg, 置 10 ml 的容量瓶中, 用无水乙醇定

[作者简介] 王慧 (1978-), 女, 主管药师。E-mail: wang_ehbh@126.com.

[通讯作者] 张国庆。E-mail: guoqing_zhang91@126.com.

容,摇匀得浓度 1.028 mg/ml 母液,于 4 ℃ 保存。

2.2.2 供试品溶液的制备 取 10 粒肝安胶囊内容物混匀,精密称取 0.26 g 于 50 ml 的容量瓶,用无水乙醇定容,超声 30 min,放冷,用无水乙醇溶液补足

减少的重量,摇匀;精密量取 1 ml 上清液至 10 ml 容量瓶中,用无水乙醇定容,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取滤液,即得。

2.3 方法学考察 对照品和供试品 HPLC 图见图 1。

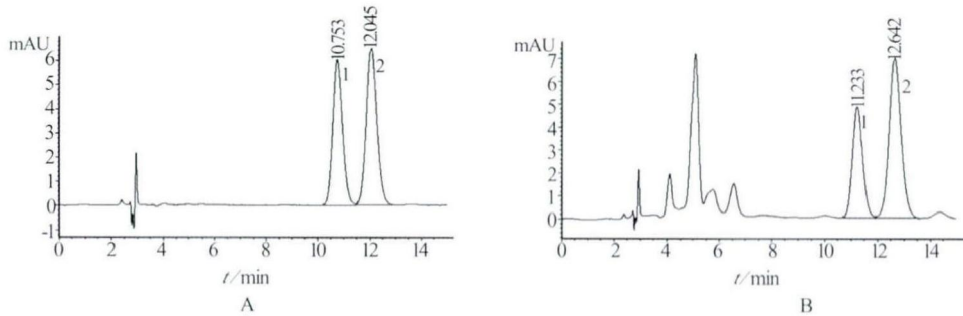


图 1 水飞蓟宾的 HPLC 图谱

A-对照品;B-供试品;1-水飞蓟宾;2-异水飞蓟宾

2.3.1 标准曲线及线性方程 配制水飞蓟宾对照品浓度为 10.28、15.42、30.84、61.68、123.36 μg/ml,以色谱峰面积(Y)对对照品浓度(X)进行线性回归,得水飞蓟宾线性方程: $Y = 11.393X - 5.0094$ ($r = 1$),表明水飞蓟宾在 10.28 ~ 123.36 μg/ml 范围内线性关系良好。

2.3.2 精密度实验 取水飞蓟宾对照品浓度为 30.84 μg/ml 溶液,在上述色谱条件下重复进样 6 次。计算水飞蓟宾峰面积 RSD = 0.75%。结果表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性实验 取肝安胶囊(批号:20111201),按“2.2.2”项下制备 6 份样品,按照“2.1”项下色谱条件进样,得水飞蓟宾含量为 15.54 mg/粒。RSD = 0.80%,结果表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性实验 取肝安胶囊(批号:20111201),按“2.2.2”项下制备样品,按 0, 2, 4, 8, 24 h 时间间隔,分别测定水飞蓟宾色谱峰面积, RSD 分别为 1.00%、1.07%、1.28%、0.97%、1.67%,结果表明供试品溶液在上述条件下保存稳定。

2.3.5 加样回收率实验 取肝安胶囊(批号:20111201) 6 份,精密称定,每份 0.26 g,含水飞蓟宾 15.54 mg,加入浓度为 1.028 mg/ml 水飞蓟宾对照品 5 ml,同法制备样品、进样,计算回收率,水飞蓟宾回收率 97.00%, RSD = 0.68%。

2.4 样品测定 按上述方法制备供试品溶液,在上述色谱峰条件下测定色谱峰面积,测定 10 批肝安胶囊中水飞蓟宾的含量,结果见表 1。

3 讨论

3.1 条件优化

表 1 10 批肝安胶囊中水飞蓟宾含量测定结果 ($n = 3$)

制剂批号	水飞蓟宾含量(mg/粒)	RSD(%)
20090901	11.11	1.56
20091101	11.22	0.93
20091201	11.82	1.27
20100901	16.62	0.20
20110101	13.99	0.69
20110301	13.87	0.24
20110601	14.22	1.04
20111001	13.98	1.24
20111201	15.54	1.00
20120301	12.99	1.08

3.1.1 色谱条件 考察了 Agilent Zorbax SB-C₁₈、Agilent ODS-HYPERSIL 两种色谱柱,结果显示前者峰型更理想;比较了 1% 冰醋酸:甲醇不同比例流动相,流动相为 1% 冰醋酸-甲醇 = 50:50 时,水飞蓟宾两个色谱峰峰形最优,分离度良好,且制剂中其他成分对待测峰测定无干扰。

3.1.2 提取条件 比较了甲醇和无水乙醇两种提取溶剂,采用超声波提取法,并比较了提取时间 30、60、90 min,实验结果表明 30 min 甲醇和无水乙醇均能达到较高的提取率。考虑到无水乙醇对人体和环境影响较小,故选择无水乙醇作为提取溶剂。

3.2 测定样品 原制剂质量标准中采用紫外分光光度法测定肝安胶囊中水飞蓟素的含量,是以水飞蓟宾(总黄酮)计算,易受到各种因素影响,而出现较大的偏差。本研究按《中华人民共和国药典》(一部)2010 版中水飞蓟含量测定方法,以水飞蓟宾两个峰面积的计算^[5],结果专属性更强,准确度更高。

【参考文献】

- [1] 任冰如,赵友谊,徐柏衡,等.水飞蓟素提取和水飞蓟宾纯化的研究[J].时珍国医国药,2012,23(3):655.
[2] 梁敏,宋粉云,吕朝霞.HPLC法测定益肝灵片中水飞蓟素的含量[J].广东药学院学报,2008,24(5):472.
[3] 周采菊,黄华瑞.HPLC法测定水飞蓟素及制剂中水飞蓟素的含量[J].中国药品标准,2008,9(3):235.

- [4] Xin RL, Yan FL, Yan XZ, et al. Determination of silymarin in microemulsion by RP-HPLC [J]. J Chin Pharm Sci, 2009, 18(2):190.
[5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典2010年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:76.

[收稿日期]2012-09-26

[修回日期]2013-03-26

(上接第417页)

表2 曲安奈德体内分布参数($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	血药浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	皮肤滞留药量 $EQ(\mu\text{g/cm})$
对照组	7.282 ± 2.103	0.223 ± 0.076
192针微针组	$10.166 \pm 2.617^{(1)}$	$0.505 \pm 0.125^{(1)}$
540针微针组	$10.409 \pm 3.309^{(1)}$	$0.474 \pm 0.151^{(1)}$

注:¹⁾ $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3.3 体内实验结果分析 由表2所示,两微针组明显提高了曲安奈德的皮肤滞留量($P < 0.05$),540针和192针微针组的皮肤滞留药量是对照组的2.13和2.26倍。同时,使用微针处理后,曲安奈德的血药浓度也分别提高了1.3倍和1.4倍。

2.4 统计学处理 数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS17.0统计软件,多组比较采用单因素方差分析,组间比较采用Q检验。

3 讨论

从前期裸鼠药动学结果显示,对照组、192针、540针微针组曲安奈德的 t_{max} 分别为(2.58 ± 0.75)、(1.98 ± 0.64)和(1.66 ± 0.53)h;考虑到曲安奈德微针组在1~2h、对照组在2~3h,血药浓度曲线相对平缓,因此本实验折中将在体实验取样时间点设定在2h。

致密的角质层是影响曲安奈德经皮渗透的重要因素,微针可以通过在皮肤产生微孔道来促进药物的渗透。但是,传统的微针贴片存在面积小、不易大面积操作的问题,滚轮微针将手柄与微针滚筒有机结合,实现了方便有效地大面积皮肤给药。目前市售的滚轮微针中,有192针和540针两种密度,本实验就选用这两种密度的滚轮微针,研究其对曲安奈德经皮渗透的影响,具有广泛的临床意义。

研究结果显示,微针可以有效提高曲安奈德的体外和在体经皮渗透,同时,使用微针后,药物的血药浓度明显增加。曲安奈德是治疗增生性瘢痕的常用药物,微针的应用促进了曲安奈德的经

皮渗透,且微创、无痛,在瘢痕治疗中具有一定的应用前景。但是,对于瘢痕的治疗仅需实现药物对局部病灶部位的有效释放,进入血液后会产生诸多不良反应。因此,在利用微针有效提高药物局部渗透的同时,减小入血药量的问题值得进一步研究解决。

【参考文献】

- [1] 黄兴汉,费路华,陈春游.HPLC法测定复方醋酸曲安奈德乳膏的含量[J].中国药师,2011,14(1):90.
[2] 胡斌,林彩,赵映兰,等.高效液相色谱法测定复方醋酸曲安奈德溶液中醋酸曲安奈德含量[J].中国药业,2010,19(21):26.
[3] 谢俊,王宇,张晓龙,等.曲安奈德治疗增生性瘢痕的疗效观察[J].临床医学与护理研究,2006,5(6):16,33.
[4] 董洪峰,刘倩,邹敏.曲安奈德治疗瘢痕疙瘩28例[J].现代临床医学,2006,34(6):443.
[5] 潘志斌.微针技术的研究进展[J].中国新药与临床杂志,2005,24(11):912.
[6] You SK, Noh YW, Park HH, et al. Effect of applying modes of the polymer microneedle-roller on the permeation of L-ascorbic acid in rats[J]. J Drug Target, 2010, 18(1):15.
[7] Zhou CP, Liu YL, Wang HL, et al. Transdermal delivery of insulin using microneedle rollers *in vivo* [J]. Int J Pharm, 2010, 392(1-2):127.
[8] 胡守莲,范玉峰,李道明.高效液相色谱法测定醋酸曲安奈德尿素乳膏中醋酸曲安奈德的含量[J].中国医药导报,2009,6(27):53.
[9] 陈浩,孙树茂,秦晓怡,等.高效液相色谱法检测兔血浆中曲安奈德的浓度[J].中国医院药学杂志,2009,29(19):1614.
[10] Liu W, Hu ML, Liu WS, et al. Investigation of the carbopol gel of solid lipid nanoparticles for the transdermal iontophoretic delivery of triamcinolone acetonide acetate [J]. Int J Pharm, 2008, 364:135.
[11] Vieira MLT, Singha RP, Derendorf H. Simultaneous HPLC analysis of triamcinolone acetonide and budesonide in microdialysate and rat plasma: Application to a pharmacokinetic study [J]. J Chromatogr B, 2010, 878:2967.
[12] 邱凯锋,劳贺存,陈露诗,等.曲安奈德经皮渗透特性研究[J].今日药学,2011,21(08):475.

[收稿日期]2013-03-22

[修回日期]2013-05-14