

# 高效液相色谱法测定肝泰胶囊中水飞蓟宾的含量

王雯佳<sup>1\*</sup>, 张纯<sup>1</sup>, 檀密艳<sup>1</sup>, 高申<sup>2</sup> (1. 第二军医大学长征医院药学部, 上海市 200003; 2. 第二军医大学药学院, 上海市 200433)

中图分类号 R927.2 文献标识码 A 文章编号 1001-0408(2006)22-1736-02

**摘要** 目的: 建立以高效液相色谱法测定肝泰胶囊中水飞蓟宾含量的方法。方法: 色谱柱为 Diamonsil C<sub>18</sub>, 流动相为磷酸二氢钾-甲醇(45:55), 流速为 1.0ml/min, 检测波长为 288nm, 内标为山奈酚, 柱温为(25±2)℃, 进样量为 20μl。结果: 水飞蓟宾检测浓度在 0.126~1.26mg/ml 范围内线性关系良好( $r=0.9998$ ), 平均加样回收率为 102.9% (RSD=1.50%)。结论: 本方法简便、准确、重现性好, 可用于本品的含量测定。

**关键词** 高效液相色谱法; 肝泰胶囊; 水飞蓟宾; 含量

## Assaying of Silybin in Gantai Capsule by HPLC

WANG Wenji, ZHANG Chun, TAN Miyan (Dept. of Pharmacy, Changzheng Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

GAO Shen (School of Pharmacy, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish an HPLC method for the assaying of silybin in Gantai capsule. METHODS: The assay was performed on Diamonsil C<sub>18</sub> column. The mobile phase consisted of potassium dihydrogen phosphate solution-methanol (45:55) with a flow rate at 1.0ml/min, detection wavelength at 288nm, column temperature at (25±2)℃. The sample size was 20μl and the internal standard was kaempferol. RESULTS: There was a good linear relationship within the concentration range of 0.126~1.26 mg/ml ( $r=0.9998$ ) for silybin. The average recovery was 102.9% (RSD=1.50%). CONCLUSION: The method was simple, accurate and reproducible, and suitable for the assaying of silybin in Gantai capsule.

**KEY WORDS** HPLC; Gantai capsule; Silybin; Content

肝泰胶囊系第二军医大学长征医院药学部自制, 主要成分为水飞蓟素卵磷脂复合物。水飞蓟素是从菊科植物水飞蓟 (*Silybum marianum*) 果实中提取分离得到的黄酮类化合物, 因其具有明显的保护和稳定肝细胞作用, 对各种肝脏疾病都有不同的治疗效果, 临床上主要用于急、慢性肝炎的治疗<sup>[1]</sup>。其为水飞蓟宾 (Silybin, SLB) 等的混合物, 有关水飞蓟素中水飞蓟宾的含量测定, 文献报道有薄层扫描 (TLC) 法、紫外-可见分光光度 (UV-VIS) 法、高效液相色谱 (HPLC) 法, 但 TLC 法的分离度不理想, UV-VIS 测定的结果为水飞蓟素中总黄酮的含量, 而先前的 HPLC 法条件复杂, 基线易漂移。本文中笔者采用以磷酸二氢钾 (1.4g→500ml) - 甲醇为流动相, 山奈酚为内标的 HPLC 法测定肝泰胶囊中水飞蓟宾的含量, 取得满意效果, 方法简便, 结果准确, 重现性好。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪, 包括 600 色谱泵、996PDA 紫外检测器、Millennium 32 色谱工作站 (美国 Waters 公司); 320 型 pH 计 (瑞士梅特勒-托利多公司); AE240 电子分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司)。

### 1.2 试剂

肝泰胶囊 (第二军医大学长征医院自制, 批号: 030908、040122、040705); 山奈酚对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 110861-200303); 水飞蓟宾对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号: 0856-9902); 甲醇为色谱纯, 磷酸二氢钾为分析纯。

## 2 方法与结果<sup>[2]</sup>

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> (250mm×4.6mm, 5μm); 流动相: 磷酸二氢钾 (1.4g→500ml) - 甲醇 (45:55); 检测波长: 288nm; 流速: 1.0ml/min; 柱温: (25±2)℃; 进样量: 20μl。

## 参考文献

- [1] 胡慧廉, 丁乃立, 吴莲珍, 等. 顶空气相色谱法测定硫酸软骨素中有机溶剂残留[J]. 化学分析计量, 2006, 15(1): 21.
- [2] 刘虹, 马福勤, 张福义. 气相色谱法测定盐酸多西环素中乙醇的含量[J]. 现代科学仪器, 2002, 3: 33.

- [3] 王瑞生, 闫占军, 赵欣慧. 气相色谱法测定天然胡萝卜素胶丸中石油醚的残留量[J]. 中国民族医药杂志, 2005, 11(5): 40.
- [4] 史建勋, 茅海琼. 毛细管气相色谱法测定阿奇霉素中的丙酮残留量[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(1): 61.
- [5] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 (二部) [S]. 2005 年版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 V III.

\* 主管药师. 研究方向: 医院药学. 电话: 021-63610109-73718. E-mail: w@enjji@sohu.com

(收稿日期: 2006-01-06 修回日期: 2006-02-06)

## 2.2 系统适应性试验

以甲醇为溶剂分别配制肝泰胶囊样品溶液、水飞蓟宾对照品溶液、山奈酚内标溶液、肝泰胶囊样品和山奈酚内标的混合溶液、水飞蓟宾对照品和山奈酚内标的混合溶液,在“2.1”项色谱条件下各进样 20 $\mu$ l,记录色谱,详见图 1。

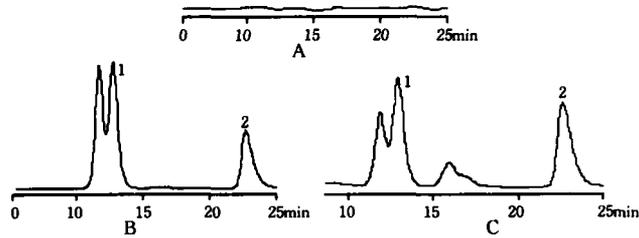


图 1 高效液相色谱

A. 阴性对照品; B. 水飞蓟宾对照品+ 内标; C. 样品+ 内标; 1. 水飞蓟宾; 2. 山奈酚

Fig 1 HPLC

A. negative control; B. standard silybin plus internal standard; C. sample plus internal standard; 1. silybin; 2. kaempferol

由图 1 可知,水飞蓟宾对照品和样品中水飞蓟宾色谱峰均为 2 个矢量光谱图完全重叠的色谱峰(为水飞蓟宾与异水飞蓟宾重叠峰),但与原料中其它成分的色谱峰及内标物的色谱峰分离良好。

## 2.3 内标溶液的制备

准确称取山奈酚对照品 20mg,置于 50ml 容量瓶中,加甲醇适量,超声使之溶解,冷却后定容,摇匀,制成每 1ml 含 4mg 的山奈酚内标溶液。

## 2.4 线性关系考察

准确称取水飞蓟宾对照品 12.6mg,置于 10ml 容量瓶中,加内标溶液适量,超声使之溶解,冷却后用内标溶液定容,摇匀,制成对照品贮备液。再取对照品贮备液适量,用内标溶液依次稀释为含水飞蓟宾 0.126、0.252、0.504、1.008、1.26mg/ml 的对照品溶液,精密吸取各对照品溶液 20 $\mu$ l 进样测定。计算水飞蓟宾的峰面积(即水飞蓟宾与异水飞蓟宾两峰面积之和)与内标的峰面积之比(Y),并以其为纵坐标,浓度(X)为横坐标进行线性回归,得回归方程为  $Y = 3.93X + 8.65 \times 10^{-3}$  ( $r = 0.9998$ )。结果表明,水飞蓟宾检测浓度在 0.126~1.26mg/ml 范围内与峰面积积分值线性关系良好。

## 2.5 精密度试验

试验在 0.2、0.6、1.2mg/ml 3 个浓度水平进行,于同日测定 5 次,计算日内精密度,求得相对标准差(RSD)分别为 1.12%、1.54%、1.86%;连续 5d 内进行测定,各 1 次,计算日间精密度,RSD 分别为 2.52%、2.14%、2.96%。

## 2.6 加样回收率试验

取已知含量的样品 9 份,准确加入一定量的水飞蓟宾对照品,按“2.7”项下方法操作,以内标法计算回收率,结果详见表 1。

## 2.7 样品含量测定

取肝泰胶囊 10 粒,倾出内容物,混合均匀,准确称取约 0.16g,置于 10ml 容量瓶中,加内标溶液适量,超声使之溶解,冷却后过滤,用内标溶液稀释至刻度,摇匀,进样 20 $\mu$ l 测定。按

表 1 加样回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery test

加入量(mg/ml)	测得量(mg/ml)	回收率(%)	$\bar{x}$ (%)	RSD(%)
0.212	0.219	103.5		
0.208	0.213	102.5		
0.225	0.232	102.9		
0.524	0.544	103.8		
0.518	0.534	103.1	102.9	1.50
0.512	0.523	102.1		
0.847	0.863	101.9		
0.839	0.862	102.7		
0.854	0.885	103.6		

内标对比法计算原料药中水飞蓟宾的含量<sup>[2]</sup>,结果详见表 2。

表 2 样品含量测定结果

Tab 2 Results of sample assaying

批号	含量(mg/粒)
030908	13.06
040122	12.98
040705	13.12

## 3 讨论

笔者曾采用多种文献报道的 HPLC 法测定肝泰胶囊中水飞蓟宾的含量<sup>[3,4]</sup>,效果均不理想,样品峰和杂质峰分离度较差、基线易漂移,出峰时间长,不适宜本品的含量测定。本文以磷酸二氢钾(1.4g $\rightarrow$ 500ml)-甲醇(45:55)为流动相,山奈酚为内标进行试验,水飞蓟宾的出峰时间为 12min,结果准确,重现性好,操作简便,适用于水飞蓟宾的含量测定。

本试验中分别选择芦丁、槲皮素、黄芩苷、山奈酚作为内标物,前三者对样品峰均有干扰,而山奈酚在上述色谱条件下与样品峰和杂质峰完全分开,峰形尖锐对称,所以选择山奈酚为本法的内标物。

由于水飞蓟宾色谱峰为 2 个矢量光谱图完全重叠的色谱峰,为水飞蓟宾的非对映异构体,计算含量时以两峰面积之和为定量指标<sup>[4]</sup>。

水飞蓟素主要有效成分为水飞蓟宾、异水飞蓟宾、水飞蓟宁和水飞蓟亭,其最大吸收均在 288nm 波长附近,目前国内外大多采用 UV-VIS 法测定其含量,并以水飞蓟宾作对照品来折算水飞蓟素的含量。笔者用 UV-VIS 法测定了 3 批肝泰胶囊中水飞蓟素含量分别为 38.32、39.09、38.10mg,其水飞蓟宾所占水飞蓟素的比率为 33.2%~34.4%。因此,可以考虑用 HPLC 法测定水飞蓟宾的含量来控制水飞蓟素的质量。暂定肝泰胶囊的水飞蓟宾含量范围为 11.7mg~14.3mg。

## 参考文献

- [1] 余江南,童珊珊,徐希明,等. HPLC 法测定水飞蓟宾脂质纳米粒在小鼠肝脏中的药物浓度[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(6): 461.
- [2] 孙庆. 分析化学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 298.
- [3] 姚水宝,扬水新,施红敏. 梯度高效液相色谱法分离测定利加隆片中水飞蓟宾的含量[J]. 药品检测, 2001, 10(8): 13.
- [4] 定天明,田颂九,张正行,等. 水飞蓟素制剂中有效成分 HPLC 分离测定[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(3): 304.

(收稿日期: 2006-01-23 修回日期: 2006-02-23)