



肝苏颗粒质量标准提升研究

陶朝阳, 史鹏杰, 周鑫, 孙连娜

Study on quality standard improvement for Gansu granules

TAO Chaoyang, SHI Pengjie, ZHOU Xin, SUN Lianna

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202207061>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

复方颠茄合剂质量标准研究

Study on quality standard of Compound Belladonna Mixture

药学实践与服务. 2017, 35(3): 256-258 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.03.015

康咳灵合剂质量标准研究

Quality standards for Kangkeling mixture

药学实践与服务. 2017, 35(6): 539-542 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.014

复方黑参颗粒质量标准研究

Study on quality standard of compound Heishen granules

药学实践与服务. 2017, 35(6): 543-546 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.06.015

三藤口服液的质量标准研究

Research on quality standard of Santeng oral solution

药学实践与服务. 2017, 35(4): 350-352,384 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.015

香苏胃痛胶囊质量标准研究

Establishment of quality standards for Xiangsu Weitong Capsule

药学实践与服务. 2018, 36(3): 265-269,288 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.03.016

益视明目颗粒质量标准研究

The quality standard research for YI SHI MINGMU granules by HPLC method

药学实践与服务. 2017, 35(4): 355-358 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.017



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 研究报告 ·

肝苏颗粒质量标准提升研究

陶朝阳¹, 史鹏杰², 周鑫², 孙连娜² (1. 西藏军区总医院药物制剂研究中心, 西藏 拉萨 850007; 2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

[摘要] 目的 建立肝苏颗粒质量标准, 有效控制药品质量。方法 以乔松素-7-O-β-D-葡萄糖苷为指标性成分, 改进肝苏颗粒的薄层鉴别方法; 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.5% 甲酸水溶液为流动相, 以 280nm 检测波长, 建立乔松素-7-O-β-D-葡萄糖苷的 HPLC 含量测定方法。结果 采用所建立的 TLC 方法鉴别肝苏颗粒时, 特征斑点分离度良好、清晰; 定量分析结果显示乔松素-7-O-β-D-葡萄糖苷的质量浓度在 2.4~240 μg/ml 范围内与峰面积呈良好线性关系($r=0.9999$), 平均加样回收率为 100.76%, RSD 为 0.66%, 准确度良好。结论 本实验所建立的 TLC 鉴别方法和 HPLC 含量测定方法专属性强、重现性好, 可以作为肝苏颗粒质量控制的提高标准。

[关键词] 肝苏颗粒; 质量标准; 薄层色谱法; 乔松素-7-O-β-D-葡萄糖苷; 高效液相色谱法

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-2024(2022)06-0546-04

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202207061

Study on quality standard improvement for Gansu granules

TAO Chaoyang¹, SHI Pengjie², ZHOU Xin², SUN Lianna² (1. Pharmaceutical Preparation Research Center of General Hospital of Tibet Military Region, Lhasa 850007, China; 2. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective** To establish the quality standard of Gansu granules (GGs) and effectively control the quality of GGs. **Methods** TLC identification method of Gansu granules was improved by using pinocembrin-7-O-β-D-glucoside as the indicator. In HPLC analysis, Agilent ZorbaxSB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used as a chromatographic column, and acetonitrile-0.5% formic acid solution was used as the mobile phase. The detection wavelength of 280 nm was used to analyze the content of pinocembrin-7-O-β-D-glucoside in GGs. **Results** The separation of characteristic spots was good and clear when the established TLC method was used to identify Gansu granules. Quantitative analysis showed that the concentration of pinocembrin-7-O-β-D-glucoside has a good linear relationship with the peak area in the range of 2.4-240 μg/ml ($r=0.9999$). The average sample recovery rate of pinocembrin-7-O-β-D-glucoside is 100.76% with RSD value of 0.66%. The accuracy was good. **Conclusion** The TLC identification method and HPLC content determination method established in this experiment have strong specificity and good reproducibility, and can be used as an improved standard for the quality control of Gansu granules.

[Key words] Gansu granules; quality standards; TLC; pinocembrin-7-O-β-D-glucoside; HPLC

肝苏颗粒是由苗药赶黄草(*Penthorum chinense Pursh*)加工制成的单方制剂, 1998 年被列为基本药物, 在临床上主要用于治疗酒精性肝损伤、慢性乙型肝炎等疾病^[1], 目前收载于《卫生部药品标准中药成方制剂第十三册》(下称《部颁标准》)^[2]。近年来对肝苏颗粒的研究主要集中于药理与临床研究, 药理研究表明肝苏颗粒对 CCl₄ 致化学性、胆管阻塞

性和免疫性大鼠肝纤维化模型均有治疗作用, 可明显抑制肝脏脂质过氧化损伤, 改善肝功能和减轻肝脏纤维化^[2-4]; 临床上, 明确了采用肝苏颗粒联合西药共同作用, 在治疗慢性乙型肝炎、保肝降酶、退黄上均具有高于单用西药的治疗效果^[5-8], 但其制剂质量控制的研究较少, 鉴于《部颁标准》发布时间久远, 随着研究进展及分析技术与设备的进步, 应制定更为科学、完善的标准, 以保证制剂稳定、临床用药安全。

[基金项目] 国家重点研发计划资助(2019YFC1711000)

[作者简介] 陶朝阳, 博士, 研究方向: 中药质量标准研究, Tel: 0891-6858350, Email: taozhaoyang73@163.com

[通信作者] 孙连娜, 博士, 副教授, 研究方向: 中药品质评价, Tel: 021-51322211, Email: sssnmr@163.com

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪、DAD 紫外检

测器、Chemstation 色谱工作站(美国 Agilent 公司);XS105DU 电子天平、XS104 电子天平(梅特勒公司);HSW-24 四孔水浴锅、SY-360H 超声仪(上海诚献仪器设备有限公司);DHG-9053A 鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司);DL-I-15 台式封闭电炉(天津恒瑞科教仪器有限公司);ATS 4 全自动点样仪(瑞士 CAMAG 公司)。

1.2 药品与试剂

乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷为本课题组分离纯化而得,采用高效液相色谱法以峰面积归一化法测定其纯度均大于 98%;15 批含糖型肝苏颗粒均由四川古蔺肝苏药业有限公司提供,(批号:190401、190402、190403、190404、190405、190406、190407、190408、190409、190410、190411、190412、190111、190119、190123,分别编号为 GSKL1~GSKL15,规格:9g/袋);乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,水为杭州娃哈哈纯净水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 TLC 鉴别

取肝苏颗粒适量,研细(过 3 号筛),取 1.0 g,精密称定,精密加入 10 ml 80% 甲醇,称定重量,超声提取 15 min(功率 350 W,频率 53 kHz),取出放至室温,用 80% 甲醇补足失重,摇匀,过 0.45 μ m 微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。取乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷标准品适量,精密称定,置于容量瓶,加入 80% 甲醇定容至刻度线,制成每 1 ml 含乔松苷 1 mg 的标准品溶液,作为对照品溶液。吸取供试品溶液 5 μ l、对照品溶液 2 μ l,分别点于同一高效硅胶 G 薄层板上,以二氯甲烷-甲醇-甲酸(7:1:0.1)为展开剂,展开,取出,晾干。喷以 5% 三氯化铝乙醇溶液,晾干,热风吹至斑点显色清晰,置紫外光(365 nm)下检视。根据图 1 显示,供试品色谱与对照品色谱中乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷在相同位

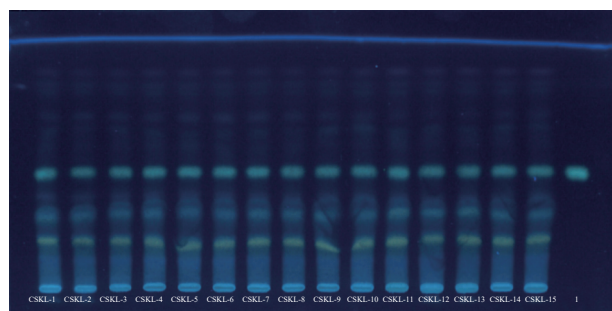


图 1 肝苏颗粒 TLC 色谱图

1. 乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷;
GSKL-1~GSKL-15. 15 个批次肝苏颗粒供试品

置显示相同颜色斑点。

2.2 乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷的含量测定

2.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m);流动相: 乙腈(A)-0.5% 甲酸水溶液(B);梯度洗脱: 0~10 min, 28% \rightarrow 30% A; 10~17.5 min, 30% \rightarrow 34.5% A; 17.5~20 min, 34.5% \rightarrow 90% A;检测波长: 280 nm(紫外检测时间 20 min);柱温: 30 $^{\circ}$ C;流速: 1.0ml/min;进样量: 10 μ l。

2.2.2 对照品溶液的配制

取乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷对照品适量,精密称定,加 80% 甲醇制成质量浓度分别为 0.24 mg/ml 的对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备

取肝苏颗粒适量,研细(过 3 号筛),取粉末 1.0 g,精密称定,置 100 ml 具塞锥形瓶中,精密加入 25 ml 80% 甲醇溶液,称定重量,超声处理 15 min,取出放至室温,用 80% 甲醇补足失重,摇匀,取样过 0.45 μ m 微孔滤膜,取续滤液即得。

2.2.4 专属性考察

取提取溶剂 80% 甲醇与对照品储备液、样品溶液,按上述色谱条件进样 10 μ l,记录色谱图,结果见图 2。根据结果,乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷分离效果良好,分离度大于 1.5,理论塔板数不低于 7700。

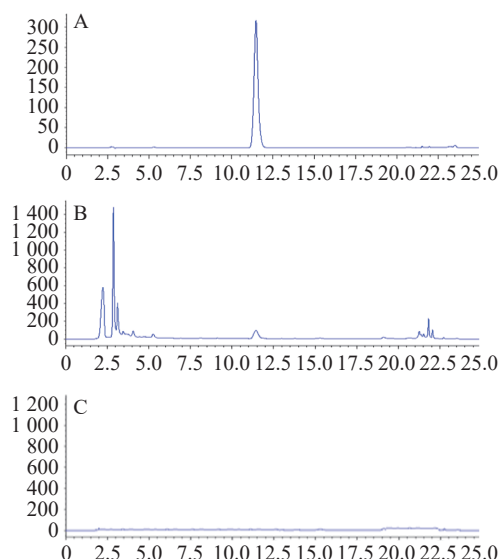


图 2 肝苏颗粒中乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷的 HPLC 色谱图

A. 乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷对照品;
B. 肝苏颗粒样品; C. 80% 甲醇溶剂

2.2.5 线性关系考察

量取对照品储备液(240 μ g/ml)适量,依次用 80% 甲醇稀释成 240、120、60、24、4.8、2.4 μ g/ml,

以进样质量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷的标准曲线为: $Y=2323.5748X+2.0537$, $r=0.9999$,表明乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷在2.4~240 $\mu\text{g/ml}$ 范围内线性关系良好。

2.2.6 精密密度试验

精密吸取对照品溶液(240 $\mu\text{g/ml}$)10 μl ,在上述液相色谱条件下连续进样6次,测定峰面积,结果显示乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷的平均峰面积RSD为0.13%,表明仪器精密密度良好。

2.2.7 重复性试验

取肝苏颗粒(GSKL-10),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液6份,测定峰面积,结果显示乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷峰的平均峰面积为1789.29,RSD为2.12%,表明该方法重复性良好。

2.2.8 稳定性试验

取肝苏颗粒(GSKL-10),按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2.1”项下色谱条件,分别于0、4、8、12、24 h进样,结果显示乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷的平均峰面积为1788.29,RSD为0.67%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.2.9 加样回收率试验

分别称取肝苏颗粒(GSKL-10)6份已知含量的样品约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,按照接近1:1的量计算所需添加的乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷对照品溶液,加入到样品中,按“2.2.3”项下方法平行制成6份供试品溶液,进样10 μl ,记录峰面积,结果显示乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷的平均回收率为100.76%,RSD为0.66%,说明该方法准确度较好,计算结果见表1。

表1 乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷加样回收率试验结果($n=6$)

样品编号	样品中含量(mg)	加入量(mg)	测得总量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
GSKL-10	0.96	0.95	1.9306	102.17	100.76	0.66
		0.95	1.9102	100.02		
		0.95	1.9146	100.48		
		0.95	1.9162	100.65		
		0.95	1.9162	100.65		
		0.95	1.9156	100.59		

2.2.10 样品含量测定

分别取每批肝苏颗粒适量,研细(过3号筛),取粉末1.0 g,精密称定,按“2.2.3”项下的方法制成供试品溶液,每批样品平行制备2份,每份进样3次,进样量10 μl ,记录峰面积,计算乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷的含量,结果见表2。

表2 15批肝苏颗粒中乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷的含量测定结果($\bar{x}\pm\text{SD}$)

样品编号	含量(mg/袋)
GSKL-1	17.87 \pm 0.13
GSKL-2	19.02 \pm 0.07
GSKL-3	19.19 \pm 0.40
GSKL-4	18.67 \pm 0.14
GSKL-5	18.37 \pm 0.07
GSKL-6	18.84 \pm 0.08
GSKL-7	18.00 \pm 0.01
GSKL-8	15.99 \pm 0.02
GSKL-9	17.17 \pm 0.01
GSKL-10	17.31 \pm 0.03
GSKL-11	17.50 \pm 0.02
GSKL-12	20.93 \pm 0.16
GSKL-13	20.12 \pm 0.16
GSKL-14	15.30 \pm 0.06
GSKL-15	17.46 \pm 0.08

3 讨论

3.1 薄层色谱条件优化

肝苏颗粒目前没有被中国药典收录,仅收载于《中华人民共和国卫生部部颁标准中药成方制剂十三册》附录中,其中将槲皮素作为薄层鉴别项下的主要成分,但是槲皮素的含量较低,且专属性较差。按照部颁标准的方法制备供试品溶液,方法较为繁琐且样品浓稠不易展开。本研究结合前期关于肝苏颗粒活性成分的报道^[9-12],选择了乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷为特征成分进行薄层鉴别。在本实验中,综合考察了供试品的点样体积(2 μl 、5 μl)对薄层展开的影响,发现样品点样量5 μl 、对照品点样量2 μl 并点成条带状,视检结果最佳。为了进一步考察薄层鉴别的适用性,本研究还对实验室温度(4 $^{\circ}\text{C}$ 、22 $^{\circ}\text{C}$)、湿度(30%、70%)以及不同品牌硅胶板(MachereyNagel牌、黄海牌、银龙牌)进行了考察,发现本实验建立的肝苏颗粒薄层鉴别方法耐用性较好,可以更好的实现肝苏颗粒质量标准提升。

3.2 含量测定成分的选择

文献研究发现,乔松素-7-O- β -D-葡萄糖在肝苏颗粒中的含量较高,且具有较高的专属性,因此,在本研究中将其作为肝苏颗粒的含量测定的指标性成分。同时,在确定含量测定成分的基础上,为了充分获得肝苏颗粒中的乔松素-7-O- β -D-葡萄糖的含量,本研究对供试品溶液的提取方法(超声、回

流)、提取溶剂(水、不同体积分数的甲醇)、提取料液比(1:25、1:50、1:100)及提取时间(0.25、0.5、0.75 h)等进行了考察,最终确定采用80%甲醇(1:25)超声提取0.25 h作为肝苏颗粒供试品溶液的制备方法。

3.3 高效液相色谱条件的优化

本研究采用二极管阵列检测器对待测成分进行了全波长光谱扫描,结果显示,待测成分在280 nm波长处均有较强吸收,基线较平稳,分离度较好,且测定不受杂质的干扰,故最终选择280 nm作为检测波长。本研究考察了2种流动相体系(乙腈-水、甲醇-水)对色谱峰峰形的影响,发现乙腈-水系统能够实现乔松素-7-O- β -D-葡萄糖的分离度,但是出现了较为严重的拖尾现象。通过对乔松素-7-O- β -D-葡萄糖结构的分析发现,其中含有较多的酚羟基,因此在水相中添加酸(0.5%甲酸)会大大改善乔松素-7-O- β -D-葡萄糖拖尾的现象,故选择乙腈-0.5%甲酸溶液作为流动相。当然,在本研究中还对肝苏颗粒中乔松素-7-O- β -D-葡萄糖的含量测定的耐用性进行了考察,通过外标一点法分别对不同仪器不同色谱柱 [Atlantis®T3 (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)、DikmaDiamondsilC₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μ m)]、不同柱温(20、25、30 °C)、不同流速(0.8、1.0、1.2 ml/min)进行考察,发现均能够满足乔松素-7-O- β -D-葡萄糖的含量测定,说明本研究建立的乔松素-7-O- β -D-葡萄糖含量测定方法具有很强的普适性。

综上,本文建立的肝苏颗粒薄层鉴别及乔松素-7-O- β -D-葡萄糖含量测定的方法,解决了现行标准中供试品制备繁琐、指标性成分含量低且专属性差的难点,具有精密度高、重复性好和稳定有效的特点。综合考虑测定结果及肝苏颗粒制备过程中该成分的转移率,拟定本品每袋含乔松素-7-O- β -D-葡萄糖苷(C₂₁H₂₂O₉)计,不得少于12.0 mg,可用于肝苏颗粒药品质量的控制。

【参考文献】

- [1] 郑洋,王佳慧,赵铁建.肝苏颗粒治疗慢性乙型肝炎疗效的Meta分析[J].中国现代医学杂志,2018,28(31):47-52.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第十三册[M].北京,人民卫生出版社,1997:87.
- [3] 谢君.肝苏颗粒对肝纤维化影响的实验研究[D].成都:成都中医药大学,2017.
- [4] 谢君,谢晓芳,李梦婷,等.肝苏颗粒对胆总管阻塞性肝纤维化大鼠肝功能和病理损伤的影响[J].中药与临床,2018,9(2):48-51.
- [5] 谢君,谢晓芳,代良萍,等.肝苏颗粒对四氯化碳致肝纤维化大鼠肝功能和病理损伤的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(8):117-123.
- [6] 高占华.肝苏颗粒的保肝降酶及退黄作用临床效果分析[J].承德医学院学报,2019,36(1):42-44.
- [7] 胡淑华,冯佩璐,江雪,等.肝苏颗粒联合替比夫定治疗慢性乙型肝炎的疗效观察[J].现代药物与临床,2018,33(6):1506-1509.
- [8] 李毅,赵川,杨凤.肝苏颗粒联合拉米夫定和阿德福韦酯治疗乙型肝炎肝硬化的疗效观察[J].现代药物与临床,2016,31(8):1209-1212.
- [9] WANG A Q, LI M X, HUANG H M, et al. A review of *Penthorum chinense* Pursh for hepatoprotection: traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicology and clinical trials[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251: 112569.
- [10] WANG A Q, LIN L G, WANG Y T. Traditional Chinese herbal medicine *Penthorum chinense* Pursh: a phytochemical and pharmacological review[J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(4): 601-620.
- [11] ZHOU F Y, WANG A Q, LI D, et al. Pinocembrin from *Penthorum chinense* Pursh suppresses hepatic stellate cells activation through a unified SIRT3-TGF- β -Smad signaling pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 341: 38-50.
- [12] SUN Z L, ZHANG Y Z, ZHANG F, et al. Quality assessment of *Penthorum chinense* Pursh through multicomponent qualification and fingerprint, chemometric, and antihepatocarcinoma analyses[J]. *Food Funct*, 2018, 9(7): 3807-3814.

[收稿日期] 2022-07-18 [修回日期] 2022-09-06

[本文编辑] 陈盛新