

RP-HPLC法同时测定五酯片中10种木脂素类成分的含量^Δ

张琳^{1*}, 窦志华¹, 蔡卫华^{2#}, 王建新², 陈霞¹, 王征宇¹(1.南通市第三人民医院药剂科, 江苏南通 226006; 2.南通市第三人民医院肝胆外科, 江苏南通 226006)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)24-3422-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.24.32

摘要 目的:建立同时测定五酯片中五味子酯戊、戈米辛J、当归酰戈米辛H、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素10种木脂素类成分的含量。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为Symmetry C₁₈,流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为225 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:五味子酯戊、戈米辛J、当归酰戈米辛H、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素检测进样量线性范围分别为2.25~67.5 ng($r=0.999\ 6$)、2.1~63 ng($r=0.999\ 8$)、28~840 ng($r=0.999\ 9$)、124.6~3 738 ng($r=0.999\ 9$)、22.7~681 ng($r=0.999\ 9$)、32.7~981 ng($r=0.999\ 9$)、47~1 410 ng($r=0.999\ 9$)、208~6 240 ng($r=0.999\ 9$)、5.36~160.8 ng($r=0.999\ 9$)、4.48~134.4 ng($r=0.999\ 8$);定量限分别为14.17、13.32、9.33、11.37、14.62、19.88、14.66、12.50、16.40、13.55 ng,检测限分别为4.62、4.60、3.08、3.76、4.81、6.74、4.93、4.16、5.86、5.03 ng;精密密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为96.36%~100.00%(RSD=1.83%, $n=6$)、95.00%~100.00%(RSD=2.07%, $n=6$)、95.00%~98.00%(RSD=1.22%, $n=6$)、95.37%~98.91%(RSD=1.29%, $n=6$)、95.62%~103.71%(RSD=2.85%, $n=6$)、97.33%~102.67%(RSD=2.00%, $n=6$)、95.00%~99.33%(RSD=1.75%, $n=6$)、97.24%~104.93%(RSD=2.63%, $n=6$)、95.00%~97.50%(RSD=1.42%, $n=6$)、96.00%~102.00%(RSD=2.45%, $n=6$)。结论:该方法结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于五酯片中10种木脂素类成分含量的同时测定。

关键词 五酯片;木脂素;反相高效液相色谱法;含量测定

Simultaneous Determination of 10 Lignanoids in Wuzhi Tablets by RP-HPLC

ZAHNG Lin¹, DOU Zhihua¹, CAI Weihua², WANG Jianxin², CHEN Xia¹, WANG Zhengyu¹(1.Dept. of Pharmacy, Nantong Third People's Hospital, Jiangsu Nantong 226006, China; 2.Dept. of Hepatobiliary Surgery, Nantong Third People's Hospital, Jiangsu Nantong 226006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of schizanthrin E, gomisin J, angeloylgomisin H, schisantherin A, schisantherin B, schisanhenol, anwuligan, schizandrin A, schizandrin B and schizandrin C in Wuzhi tablets. METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on Symmetry C₁₈ column with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set 225 nm, and the column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The linear ranges of schizanthrin E, gomisin J, angeloylgomisin H, schisantherin A, schisantherin B, schisanhenol, anwuligan, schizandrin A, schizandrin B and schizandrin C were 2.25-67.5 ng ($r=0.999\ 6$), 2.1-63 ng ($r=0.999\ 8$), 28-840 ng ($r=0.999\ 9$), 124.6-3 738 ng ($r=0.999\ 9$), 22.7-681 ng ($r=0.999\ 9$), 32.7-981 ng ($r=0.999\ 9$), 47-1 410 ng ($r=0.999\ 9$), 208-6 240 ng ($r=0.999\ 9$), 5.36-160.8 ng ($r=0.999\ 9$), 4.48-134.4 ng ($r=0.999\ 8$). The limits of quantitation were 14.17, 13.32, 9.33, 11.37, 14.62, 19.88, 14.66, 12.50, 16.40, 13.55 ng. The limits of detection were 4.62, 4.60, 3.08, 3.76, 4.81, 6.74, 4.93, 4.16, 5.86, 5.03 ng. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were less than 3.0%; the recoveries were 96.36%-100.00% (RSD=1.83%, $n=6$), 95.00%-100.00% (RSD=2.07%, $n=6$), 95.00%-98.00% (RSD=1.22%, $n=6$), 95.37%-98.91% (RSD=1.29%, $n=6$), 95.62%-103.71% (RSD=2.85%, $n=6$), 97.33%-102.67% (RSD=2.00%, $n=6$), 95.00%-99.33% (RSD=1.75%, $n=6$), 97.24%-104.93% (RSD=2.63%, $n=6$), 95.00%-97.50% (RSD=1.42%, $n=6$), 96.00%-102.00% (RSD=2.45%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The developed method is accurate, sensitive and reproducible, and it can be used for content determination of 10 lignanoids in Wuzhi tablets.

KEYWORDS Wuzhi tablet; Lignanoids; RP-HPLC; Content determination

^Δ 基金项目:江苏省药学会 Shire 生物药学基金立项课题(No. S201608);南通市卫生计生委青年医学人才科研立项课题(No. WQ2016017);南通市科技计划(指导性)项目(No. YYZ16017);南通市科技计划项目(No. MS22015086)

* 主管中药师, 硕士。研究方向:中药质量控制。E-mail: Juezhangyan@163.com

通信作者:主任医师。研究方向:肝胆外科。电话:0513-85116027。E-mail:377511542@qq.com

五酯片是由南五味子乙醇提取物制成的保肝中药制剂,能降低血清丙氨酸转氨酶,临床上常用于药物肝损伤、酒精性肝炎的治疗^[1-2]。近年来,临床及实验研究表明五酯制剂可作为辅助药物,联合他克莫司用于肝脏、肾脏等实体器官移植患者的治疗^[3-6],不但提高了他克莫司的血药浓度和生物利用度^[7-9],降低了他克莫司的

临床使用剂量,减轻了患者经济负担,还减轻了因长期使用他克莫司而导致的肝肾损伤^[10]。五酯片收载于国家食品药品监督管理局国家药品标准 WS-10557 (ZD-0557)-2002-2012Z,其有效成分为五味子总木脂素,该标准是以五味子酯甲为对照品,用紫外分光光度法测定其含量,但该方法操作烦琐,且标准中仅测定了五味子酯甲这1种木脂素类成分;2015年版《中国药典》(一部)“南五味子”项下也仅以五味子酯甲作为其质量控制指标^[11],因南五味子乙醇提取物中含有多种木脂素类成分,以上测定方法均不能客观反映五酯片的质量情况。鉴于此,本课题组采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)建立了同时测定五酯片中10种木脂素类成分的含量,以期全面控制该制剂的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695型HPLC仪,包括四元泵、自动进样器、在线脱气装置、2998PDA检测器、Empower3工作站(美国Waters公司);SK5200H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);BT 25S型电子分析天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

五酯片(广西方略药业集团有限公司,批号:1402011、1409003、1501016、1505014、1506008,规格:0.31 g/片);五味子酯戊对照品(批号:151031006)、戈米辛J对照品(批号:151031011)、当归酰戈米辛H对照品(批号:151031013)、五味子酯甲对照品(批号:151031003)、五味子酯乙对照品(批号:151031020)、五味子酚对照品(批号:151031004)、安五酯素对照品(批号:151031021)、五味子丙素对照品(批号:151031002)均购自上海将来生物科技有限公司;五味子甲素对照品(批号:110764-201111)、五味子乙素对照品(批号:1100765-200710)均购自中国食品药品检定研究院,以上对照品纯度均 $\geq 98\%$;乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~25 min, 0→50% A; 25~35 min, 50%→55% A; 35~55 min, 55%→50% A; 55~70 min, 50%→65% A; 70~80 min, 65%→70% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:225 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取五味子酯戊、戈米辛J、当归酰戈米辛H、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、安五酯素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素对照品各适量,置于同一5 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为混合对照品贮备液。精密吸取上述混合

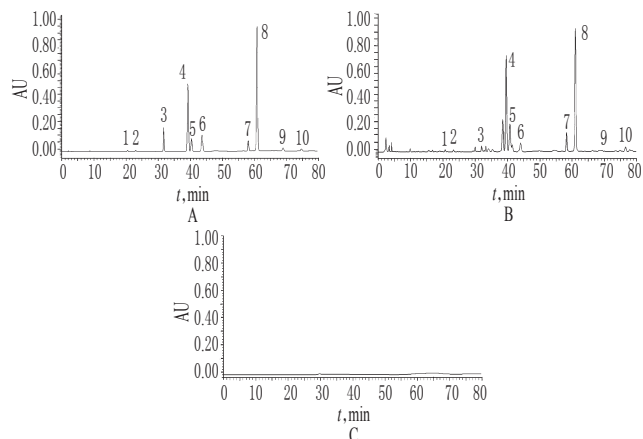
对照品贮备液适量,置于10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,制成上述10种木脂素类成分的质量浓度分别为2.25、2.1、28、124.6、22.7、32.7、47、208、5.36、4.48 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品20片,去除包衣,研细,取约0.55 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加甲醇30 mL,称定质量,超声(功率:200 W,频率:53 kHz,下同)处理30 min,取出,放至室温,再次称定质量,加甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺制备不含上述10种木脂素类成分的阴性样品,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

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“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,各成分均能达到基线分离,分离度 > 1.5 ;理论板数以五味子酯戊峰计 > 5000 ,保留时间为20.501 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;1.五味子酯戊;2.戈米辛J;3.当归酰戈米辛H;4.五味子酯甲;5.五味子酯乙;6.五味子酚;7.安五酯素;8.五味子甲素;9.五味子乙素;10.五味子丙素

A. mixed control; B. test sample; C. negative control; 1. schizanthenerin; 2. gomisin J; 3. angeloylgomisin H; 4. schizanthenerin A; 5. schizanthenerin B; 6. schisanhenol; 7. anwuligan; 8. schizandrin A; 9. schizandrin B; 10. schizandrin C

图1 高效液相色谱法

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液1、2、5、10、15、20、30 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(LOQ)与检测限(LOD)考察

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LOQ;当信噪比为3:1时,得

LOD。结果,五味子酯戊、戈米辛J、当归酰戈米辛H、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素的LOQ分别为14.17、13.32、9.33、11.37、14.62、19.88、14.66、12.50、16.40、13.55 ng, LOD分别为4.62、4.60、3.08、3.76、4.81、6.74、4.93、4.16、5.86、5.03 ng。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围,ng
五味子酯戊	$y=5.30 \times 10^6 x-2123$	0.999 6	2.25~67.5
戈米辛J	$y=6.34 \times 10^6 x-4258$	0.999 8	2.1~63
当归酰戈米辛H	$y=6.39 \times 10^6 x-38782$	0.999 9	28~840
五味子酯甲	$y=6.55 \times 10^6 x-155300$	0.999 9	124.6~3738
五味子酯乙	$y=6.82 \times 10^6 x-39412$	0.999 9	22.7~681
五味子酚	$y=7.69 \times 10^6 x-83449$	0.999 9	32.7~981
安五脂素	$y=2.35 \times 10^6 x-25379$	0.999 9	47~1410
五味子甲素	$y=7.03 \times 10^3 x-412417$	0.999 9	208~6240
五味子乙素	$y=8.78 \times 10^6 x-15748$	0.999 9	5.36~160.8
五味子丙素	$y=86.60 \times 10^6 x-8381$	0.999 8	4.48~134.4

2.6 精密度的试验

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样,重复测定6次,记录峰面积。结果,五味子酯戊、戈米辛J、当归酰戈米辛H、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素峰面积的RSD分别为2.68%、2.46%、0.72%、0.84%、1.08%、1.03%、1.67%、0.76%、1.06%、0.62%(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:1501016)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,五味子酯戊、戈米辛J、当归酰戈米辛H、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素峰面积的RSD分别为0.83%、1.78%、0.61%、0.88%、1.45%、2.31%、0.77%、0.84%、1.67%、0.77%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同一批号(批号:1501016)的样品适量,精密称定,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。结果,五味子酯戊、戈米辛J、当归酰戈米辛H、五味子酯甲、五味子酯乙、五味子酚、安五脂素、五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素峰面积的RSD分别为2.53%、0.71%、1.32%、0.61%、0.77%、0.91%、0.86%、0.62%、0.97%、0.65%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号:1501016)适量,共6份,精密称定,各置于具塞锥形瓶中,分别加入一定质量的待测成分对照品,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。

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,%
五味子酯戊	0.233	0.063	0.055	0.116	96.36	97.88	1.83
	0.226	0.064	0.055	0.119	100.00		
	0.231	0.065	0.055	0.118	96.36		
	0.238	0.065	0.055	0.118	96.36		
	0.224	0.063	0.055	0.117	98.18		
	0.221	0.063	0.055	0.118	100.00		
戈米辛J	0.233	0.063	0.060	0.122	98.33	97.22	2.07
	0.226	0.061	0.060	0.118	95.00		
	0.231	0.063	0.060	0.122	98.33		
	0.238	0.064	0.060	0.121	95.00		
	0.224	0.061	0.060	0.121	100.00		
	0.221	0.060	0.060	0.118	96.67		
当归酰戈米辛H	0.233	0.167	0.200	0.357	95.00	95.75	1.22
	0.226	0.162	0.200	0.354	96.00		
	0.231	0.166	0.200	0.356	95.00		
	0.238	0.163	0.200	0.354	95.50		
	0.224	0.161	0.200	0.351	95.00		
	0.221	0.158	0.200	0.354	98.00		
五味子酯甲	0.233	3.331	3.500	6.733	97.20	96.73	1.29
	0.226	3.231	3.500	6.693	98.91		
	0.231	3.302	3.500	6.687	96.71		
	0.238	3.402	3.500	6.740	95.37		
	0.224	3.202	3.500	6.575	96.37		
	0.221	3.159	3.500	6.512	95.80		
五味子酯乙	0.233	1.074	1.050	2.095	97.24	98.62	2.85
	0.226	1.041	1.050	2.083	99.24		
	0.231	1.064	1.050	2.068	95.62		
	0.238	1.097	1.050	2.117	97.14		
	0.224	1.032	1.050	2.121	103.71		
	0.221	1.018	1.050	2.055	98.76		
五味子酚	0.233	0.330	0.300	0.632	100.67	99.44	2.00
	0.226	0.320	0.300	0.618	99.33		
	0.231	0.327	0.300	0.635	102.67		
	0.238	0.337	0.300	0.629	97.33		
	0.224	0.318	0.300	0.615	99.00		
	0.221	0.313	0.300	0.606	97.67		
安五脂素	0.233	1.506	1.500	2.931	95.00	96.10	1.75
	0.226	1.460	1.500	2.950	99.33		
	0.231	1.493	1.500	2.939	96.40		
	0.238	1.538	1.500	2.964	95.07		
	0.224	1.448	1.500	2.885	95.80		
	0.221	1.428	1.500	2.853	95.00		
五味子甲素	0.233	3.810	3.550	7.401	101.15	101.16	2.63
	0.226	3.696	3.550	7.230	99.55		
	0.231	3.777	3.550	7.229	97.24		
	0.238	3.892	3.550	7.617	104.93		
	0.224	3.663	3.550	7.254	101.15		
	0.221	3.614	3.550	7.269	102.96		
五味子乙素	0.233	0.040	0.040	0.079	97.50	96.25	1.42
	0.226	0.039	0.040	0.078	97.50		
	0.231	0.040	0.040	0.078	95.00		
	0.238	0.041	0.040	0.079	95.00		
	0.224	0.038	0.040	0.076	95.00		
	0.221	0.038	0.040	0.077	97.50		
五味子丙素	0.233	0.044	0.050	0.095	102.00	98.67	2.45
	0.226	0.043	0.050	0.091	96.00		
	0.231	0.044	0.050	0.092	96.00		
	0.238	0.045	0.050	0.095	100.00		

续表 2

Continued tab 2

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, %
	0.224	0.042	0.050	0.091	98.00		
	0.221	0.042	0.050	0.092	100.00		

表 3 样品含量测定结果($n=3$, mg/g)Tab 3 Results of contents determination of samples($n=3$, mg/g)

样品批号	五味子酯戊	戈米辛J	当归酰戈米辛H	五味子酯甲	五味子酯乙	五味子酚	安五脂素	五味子甲素	五味子乙素	五味子丙素
1402011	0.410 0	0.037 3	0.344 5	0.042 5	1.158 9	0.322 6	19.741 6	6.376 6	2.152 1	9.123 7
1409003	0.256 0	0.009 5	0.271 0	0.028 3	0.811 7	0.204 1	12.522 0	5.598 4	1.664 5	7.764 2
1501016	0.282 2	0.014 4	0.270 8	0.026 7	0.717 0	0.234 2	14.295 9	4.607 9	1.417 5	6.462 3
1505014	0.260 7	0.121 4	0.251 1	0.029 0	0.622 2	0.216 6	13.050 7	4.305 7	1.471 3	6.489 5
1506008	0.302 0	0.122 2	0.268 4	0.028 7	0.705 0	0.280 1	14.158 8	4.380 9	1.476 0	6.665 9

3.1 检测波长的选择

本课题组采用二极管阵列检测器,在 200~400 nm 波长范围内对待测成分对照品溶液进行了全波长扫描。结果显示,10 种木脂素类成分在 210~250 nm 波长间呈现最大紫外吸收,综合考虑,最终选择 225 nm 为本试验的检测波长。

3.2 流动相和洗脱方式的选择

本试验曾考察了以甲醇-水、乙腈-水、甲醇-磷酸溶液(0.05%~0.2%)、乙腈-磷酸溶液(0.05%~0.2%)等为流动相进行等度和梯度洗脱时的色谱情况。结果,选用乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时,基线噪音小,待测成分色谱峰形尖锐,分离度均>1.5,因此本试验选择上述流动相和洗脱方式。

3.3 提取方法和提取时间的考察

本课题组考察了不同的提取方法(超声和回流法)以及提取时间(30、45、60 min)。结果,超声提取 30 min,待测成分的提取率最高,因此选择上述方式进行样品的提取。

综上所述,本方法结果准确、灵敏度高、重复性好,可用于五酯片中 10 种木脂素类成分含量的同时测定。

参考文献

- [1] 王国平,张忠臣,夏晨梅.五酯片治疗酒精性肝炎的疗效观察[J].中国药物与临床,2013,13(8):1097-1098.
- [2] 付凤侠.五酯片防治肺结核药物肝损害 110 例[J].河南中医,2014,34(9):1711-1712.
- [3] 翁国斌,高文波,任雨,等.五酯片对同种异体肾移植术后普乐可复血药浓度影响的观察[J].中国药学杂志,2009,44(11):857-860.
- [4] 马卫成,黄建军,姚许平,等.五酯片与他克莫司联合应用

2.10 样品含量测定

取 5 批样品各适量,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,记录峰面积并计算样品含量,结果见表 3。

3 讨论

对肾移植患者的临床疗效及药物经济学评价[J].中国临床药理学杂志,2010,19(3):173-175.

- [5] 刘龙山,王长希,傅茜,等.五酯片用于肾移植患者对他克莫司药代动力学的影响及长期疗效观察[J].器官移植,2012,3(1):33-36.
- [6] 聂峰,孙煦勇,胡赞,等.五酯片对口服他克莫司肾移植受者的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2011,12(3):223-225.
- [7] Qin XL, Bi HC, Wang CX, *et al.* Study of the effect of Wuzhi tablet (Schisandra sphenanthera extract) on tacrolimus tissue distribution in rat by liquid chromatography tandem mass spectrometry method[J]. *Biomed Chromatogr*,2010,24(4):399-405.
- [8] Qin XL, Yu T, Li LJ, *et al.* Effect of long-term co-administration of Wuzhi tablet (Schisandra sphenanthera extract) and prednisone on the pharmacokinetics of tacrolimus[J]. *Phytomedicine*,2013,20(3/4):375-379.
- [9] Qin XL, Chen X, Zhong GP, *et al.* Effect of Tacrolimus on the pharmacokinetics of bioactive lignans of Wuzhi tablet (Schisandra sphenanthera extract) and the potential roles of CYP3A and P-gp[J]. *Phytomedicine*,2014,21(5):766-772.
- [10] 蒋进发,魏思东,陈国勇.五酯胶囊对肝移植受者他克莫司浓度的影响[J].中国临床药理学杂志,2012,28(6):411-413.
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015 年版.北京:中国医药科技出版社,2015:244.

(收稿日期:2017-01-10 修回日期:2017-03-28)

(编辑:刘柳)