

Determination of Corilagin and Salvianolic Acid B in Fu Zheng Rou Gan by HPLC

Lifei Song¹, Changqing Liu^{1*}, Mansha Li¹, Jianjun Yang², Changqing Li²

¹Guangzhou Zeli Pharmatech Co., Ltd., Guangzhou Guangdong

²Guangzhou Zhongze Biological Technology Co., Ltd., Guangzhou Guangdong

Email: songlifei@21cn.com, *474420675@qq.com

Received: Nov. 2nd, 2015; accepted: Nov. 23rd, 2015; published: Nov. 27th, 2015

Copyright © 2015 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To establish a high liquid chromatography method of determining Corilagin and Salvianolic acid B in Fu Zheng Rou Gan. **Method:** Chromatographic column: Inertsil® ODS-SP (5 microns, 4.6 × 250 mm). The mobile phase is acetonitrile-0.2% phosphoric acid (gradient elution) with detection wavelength 210 nm; the flow rate is 1.0 mL/min; the column temperature is 35°C and the inject volume is 5 µL. **Result:** In the range of 0.061 - 0.510 µg, the linear relationship of Corilagin is good ($r = 0.9997$), and the average sample recovery rate is 101.41% (RSD = 1.68%, $n = 6$). In the range of 0.504 - 4.203 µg, the linear relationship of Salvianolic acid B is also good ($r = 0.9999$), and the average sample recovery rate is 103.30% (RSD = 1.11%, $n = 6$). **Conclusion:** The method is sensitive, rapid and accurate and can be used for quality control of this granule.

Keywords

Fu Zheng Rou Gan, Content Determination, Corilagin, Salvianolic Acid B, HPLC

HPLC测定扶正柔肝颗粒柯里拉京和丹酚酸B的含量

宋力飞¹, 刘常青^{1*}, 李曼莎¹, 阳建军², 李常青²

¹广州泽力医药科技有限公司, 广东 广州

²广州中泽生物技术有限公司, 广东 广州

Email: songlifei@21cn.com, *474420675@qq.com

*通讯作者。

文章引用: 宋力飞, 刘常青, 李曼莎, 阳建军, 李常青. HPLC测定扶正柔肝颗粒柯里拉京和丹酚酸B的含量[J]. 药物资讯, 2015, 4(4): 43-49. <http://dx.doi.org/10.12677/pi.2015.44006>

收稿日期：2015年11月2日；录用日期：2015年11月23日；发布日期：2015年11月27日

摘要

目的：建立高效液相色谱法(HPLC)测定复方扶正柔肝颗粒中柯里拉京和丹酚酸B含量的方法。方法：色谱柱：Inertsil® ODS-SP (5 μm, 4.6 × 250 mm)；流动相：乙腈-0.2%磷酸(梯度洗脱)；检测波长为210 nm；流速为1.0 mL/min；柱温35℃；进样量5 μL。结果：柯里拉京在0.061~0.510 μg的范围内线性关系良好($r = 0.9997$)，平均加样回收率为101.41% (RSD = 1.68%, $n = 6$)；丹酚酸B在0.504~4.203 μg的范围内($r = 0.9999$)线性关系良好，平均加样回收率为103.30% (RSD = 1.11%, $n = 6$)。结论：本法灵敏、快速、准确，可用于复方扶正柔肝颗粒的质量控制。

关键词

扶正柔肝颗粒，含量测定，柯里拉京，丹酚酸B，HPLC

1. 引言

在我国，肝癌发病人数每年超过30万，其中80%以上的肝癌是在慢性肝炎、肝硬化基础上发生，而乙型肝炎病毒持续感染是导致慢性肝炎、肝纤维化和肝硬化发生的第一大原因，与肝癌发生的相关率高达80% [1] [2]。流行病学调查结果显示：目前我国乙型肝炎病毒携带者约1.2亿人，乙型肝炎患者约为2800万人，慢性乙型肝炎患者约有25%~40%发展为肝硬化或肝癌；国家每年仅直接用于病毒性肝炎治疗的医疗费用高达300亿元以上，其中慢性肝炎、肝纤维化的治疗费用占了很大的比例。通过抗病毒、抗肝纤维化治疗，减轻肝组织病变，阻断肝硬化形成，是防止肝癌发生的关键因素。

扶正柔肝颗粒由叶下珠、丹参、柴胡、甘草、苦参、人参等中药配伍而成，具有清热解毒、疏肝解郁、活血化痰及补气健脾功效，主要应用于肝纤维化、肝硬化和慢性肝炎治疗。扶正柔肝颗粒作为一种具有抗肝癌和抗肝纤维化双重作用的中药制剂，可以针对病因——抑制乙肝病毒复制，并通过抗肝纤维化作用抑制癌前病变——肝硬化的形成，从而阻断肝癌的发生；该复方可抑制肝癌细胞增殖和诱导细胞凋亡，发挥直接抗癌作用，是预防和治疗肝癌的有效中药制剂。为有效控制本品的内在质量，特对其中的特征性成分柯里拉京和丹酚酸B进行含量测定。本试验以柯里拉京和丹酚酸B为检测指标，建立了复方扶正柔肝颗粒HPLC含量测定方法。

2. 仪器与试剂

岛津LC-10AT vp PLus型高效液相色谱仪(自动进样，SPD-20A检测器)。

柯里拉京对照品(中国药品生物制品检定所，批号111623-200301；供含量测定用)；丹酚酸B对照品(中国药品生物制品检定所，批号111562-200605；供含量测定用)。乙腈为色谱纯(DIKMARURE)，水为怡宝纯化水，其余化学试剂均为分析纯。复方扶正柔肝颗粒由广州泽力医药科技有限公司生产(批次：T20140101, T20140501, T20140801)。

3. 实验方法与结果

3.1. 色谱条件

色谱柱为Inertsil® ODS-SP (5 μm, 4.6 mm × 250 mm)；流动相：乙腈-0.2%磷酸(梯度洗脱，洗脱梯度如表1所示)，检测波长为210 nm，流速为1 mL/min，柱温35℃，进样量5 μL。HPLC色谱图如图1所示。

3.2. 对照品溶液的制备

分别精密称取柯里拉京对照品 5.1 mg 和丹酚酸 B 对照品 42.0 mg，置 50 mL 棕色具塞容量瓶中，加 50% 乙醇溶解并稀释至刻度，摇匀；精密吸取 10 mL 置 50 mL 量瓶中，加 50% 乙醇至刻度，摇匀，即得每 1 mL 含柯里拉京 0.0204 mg，丹酚酸 B 0.168 mg 的对照品混合溶液。

3.3. 标准曲线和线性范围

取柯里拉京和丹酚酸 B 对照品混合溶液，分别吸取 3、5、10、15、20、25 μ L 注入高效液相色谱仪，测定。以柯里拉京和丹酚酸 B 对照品进样量(μ g)为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。线性回归方程柯里拉京 $Y = 2054966X + 17329$ ($r = 0.9997$)，如图 2 所示；丹酚酸 B $Y = 1988937X + 44923$ ($r = 0.9999$)，如图 3 所示。由测定结果可知，柯里拉京在 0.061~0.510 μ g 范围内，丹酚酸 B 在 0.504~4.203 μ g 范围内线性关系良好(r 柯里拉京 = 0.9997, r 丹酚酸 B = 0.9999)。

3.4. 供试品溶液的制备

取复方扶正柔肝颗粒 0.2 g (精密称定，批号 T20140101)，置锥形瓶中，精密加入 50% 乙醇 50 mL，密塞，称定重量，超声处理 20 min (全溶，呈澄清溶液)，冷却至室温，再称定重量，50% 乙醇补足重量，摇匀，过 0.45 μ m 微孔滤膜即得。

Table 1. The program list of Gradient elution

表 1. 梯度洗脱程序表

保留时间 t/min	流动相 A 0.2% 磷酸(%)	流动相 B 乙腈(%)
0	89	11
25	89	11
30	76	24
55	76	24
60	5	95

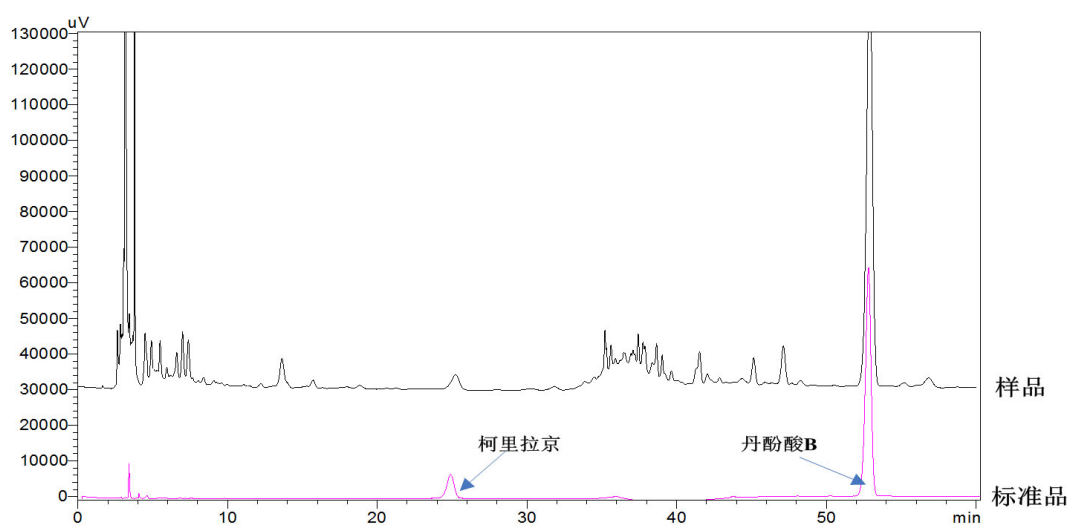


Figure 1. The chromatogram of Corilagin and Salvianolic acid B in Fu Zheng Rou Gan by HPLC

图 1. 扶正柔肝颗粒 HPLC 含量测定色谱图

3.5. 方法学考察实验

1) 精密度试验

精密称取扶正柔肝颗粒 0.2005 g, 置 150 mL 具塞锥形瓶内, 精密移取 50%乙醇 50 mL, 称重, 超声 20 min, 使呈澄清溶液, 冷却至室温, 补重, 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液, 进样 10 μL , 测定, 结果如表 2 所示。

由实验结果可知, 柯里拉京及丹酚酸 B 的 RSD 值均在 2% 以内, 说明仪器精密度良好。

2) 重复性试验

平行称取叶下珠复方 II 号颗粒六份(批号 T20140101), 每份 0.2 g (精密称定), 加至 150 mL 具塞锥形瓶内, 精密称定为: a) 0.2005; b) 0.2008; c) 0.2003; d) 0.2007; e) 0.2005; f) 0.2004。精密移取 50%乙醇 50 mL 加入锥形瓶内, 称重, 超声 20 min, 使呈澄清溶液, 冷却至室温, 相应溶剂补足失重, 吸取溶液并过 0.45 μm 微孔滤膜即得供试品溶液, 六个平行样品分别进样 10 μL , 测定, 结果如表 3 所示。

由实验结果可知, 柯里拉京及丹酚酸 B 含量的 RSD 值均在 2.5% 以内, 说明本法重现性良好。

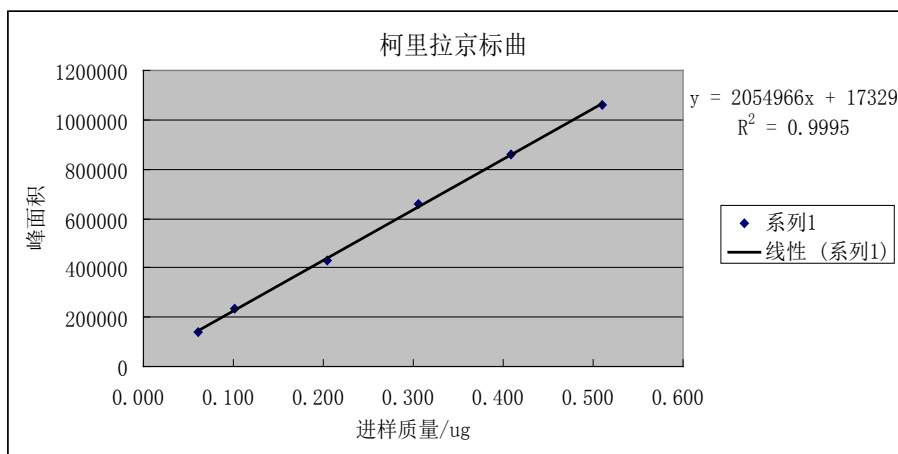


Figure 2. The standard curve of Corilagin

图 2. 柯里拉京标准曲线图

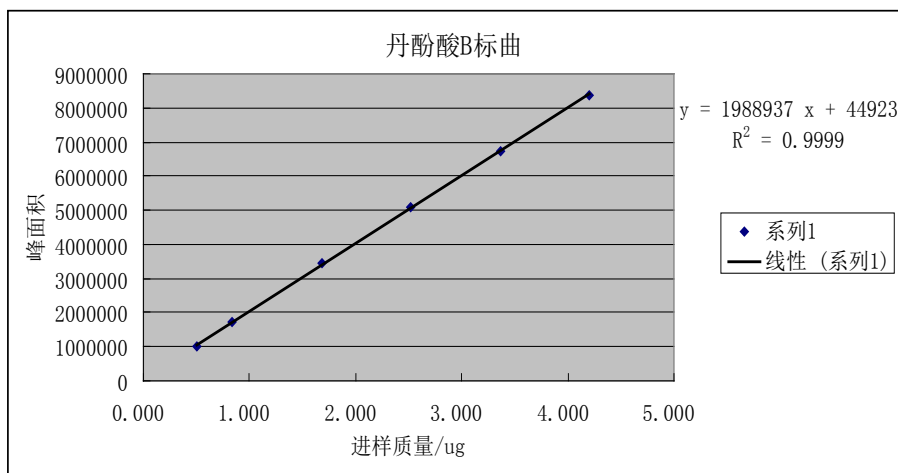


Figure 3. The standard curve of Corilagin Salvianolic acid B

图 3. 丹酚酸 B 标准曲线图

Table 2. The result of precision experiment
表 2. 精密度试验结果

	柯里拉京				丹酚酸 B					
	保留时间	RSD	峰面积	含量/mg·g ⁻¹	RSD	保留时间	RSD	峰面积	含量/mg·g ⁻¹	RSD
精密度-1	25.229		176,615	1.933		52.893		3,475,096	43.008	
精密度-2	24.843		174,842	1.911		52.593		3,411,867	42.215	
精密度-3	24.779	1.09%	177,427	1.943	1.38%	52.594	0.30%	3,502,207	43.348	1.01%
精密度-4	24.518		177,499	1.944		52.445		3,438,748	42.552	
精密度-5	24.521		176,398	1.930		52.506		3,427,804	42.415	
精密度-6	24.619		171,757	1.874		52.521		3,476,437	43.025	

Table 3. The result of reproducibility experiment
表 3. 重现性试验结果

	柯里拉京				丹酚酸 B					
	保留时间	RSD	峰面积	含量/mg·g ⁻¹	RSD	保留时间	RSD	峰面积	含量/mg·g ⁻¹	RSD
重复性-1	25.229		176,615	1.933		52.893		3,475,096	43.008	
重复性-2	24.660		175,098	1.912		52.551		3,370,383	41.633	
重复性-3	24.725	0.84%	173,695	1.899	2.32%	52.576	0.24%	3,445,516	42.680	1.42%
重复性-4	24.717		172,797	1.885		52.583		3,417,555	42.245	
重复性-5	24.753		175,081	1.914		52.603		3,438,134	42.545	
重复性-6	24.808		166,406	1.810		52.617		3,348,219	41.438	

3) 稳定性试验

取同一批号供试品溶液各 5 μL，分别于 0 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h 注入高效液相色谱仪测定。结果如表 4 所示。

由测定结果可知，柯里拉京峰面积的 RSD 为 1.95%，丹酚酸 B 峰面积的 RSD 为 1.37%，表明供试品溶液在 24h 内稳定。

4) 加样回收率试验

分别精密称取六份已知含量的扶正柔肝颗粒 0.1 g (批号 T20140101)，分置 50 mL 容量瓶内；精密称定为 a) 100.1 mg；b) 100.0 mg；c) 100.1 mg；d) 99.9 mg；e) 100.2 mg；f) 100.1 mg。分别精密移取对照品混合液(浓度：柯里拉京 0.019 mg/mL，丹酚酸 B 0.403 mg/mL 的混合标准溶液)各 10 mL 加入六个容量瓶中，采用供试品的制备方法同法制备样品，得待测样品溶液。测定结果如表 5 所示。

由实验结果可知，柯里拉京和丹酚酸 B 的加样回收实验的回收率均在 95%~105% 之间，说明样品制备方法是合适的。

3.6. 样品测定

分别取三个不同批次的扶正柔肝颗粒，精密称定，按照“2.4”项下供试品溶液的制备，同法制备样品溶液，进样，测定，结果如表 6 所示。

Table 4. The result of stability test

表 4. 稳定性试验结果

	柯里拉京		丹酚酸 B	
	峰面积	RSD	峰面积	RSD
稳定性-1	176,615	1.95%	3,475,096	1.37%
稳定性-2	177,427		3,502,207	
稳定性-3	184,804		3,409,820	
稳定性-4	177,733		3,399,709	
稳定性-5	183,617		3,379,498	
稳定性-6	181,789		3,439,900	

Table 5. The result of recovery test

表 5. 加样回收率试验结果

称样量/ mg	柯里拉京						丹酚酸 B					
	样品含 量/mg	加标 量/mg	检出量 /mg	回收 率	均值%	RSD%	样品含 量/mg	加标 量/mg	检出量 /mg	回收 率	均值	RSD%
100.1	0.1894	0.19	0.381	100.85	101.41%	1.68	4.230	4.03	8.342	101.93	103.30	1.11
100.0	0.1892	0.19	0.379	99.89			4.226	4.03	8.343	102.06		
100.1	0.1894	0.19	0.386	103.49			4.230	4.03	8.401	103.33		
99.9	0.1890	0.19	0.384	102.64			4.222	4.03	8.414	103.84		
100.2	0.1896	0.19	0.378	99.17			4.234	4.03	8.420	103.67		
100.1	0.1894	0.19	0.384	102.43			4.230	4.03	8.470	104.96		

Table 6. The result of Corilagin and Salvianolic acid B in Fu Zheng Rou Gan of three batches by HPLC

表 6. 三批次扶正柔肝颗粒含量测定结果

批次	取样量/g	柯里拉京含量 mg/g	均值	丹酚酸 B 含量 mg/g	均值
T20140101	0.2005	1.8956	1.8928 (RSD = 0.15%)	42.2416	42.2594 (RSD = 0.04%)
	0.2016	1.8930		42.2712	
	0.2035	1.8899		42.2655	
T20140501	0.2050	1.9002	1.8956 (RSD = 0.29%)	42.1388	42.2395 (RSD = 0.21%)
	0.2033	1.8969		42.2895	
	0.2012	1.8896		42.2901	
T20140801	0.2040	1.9055	1.9023 (RSD = 0.24%)	42.3025	42.1662 (RSD = 0.53%)
	0.2011	1.8971		42.2899	
	0.2022	1.9043		41.9062	

4. 讨论

在测定指标的选择中, 结合复方中各药味的功效主治并参考相关文献[3]-[24], 最终选择叶下珠药材中的柯里拉京和丹参药材中的丹酚酸 B 作为扶正柔肝颗粒的含量测定指标; 在扶正柔肝颗粒含量测定方法考察过程中, 曾对检测波长、流动相的选择及优化、色谱柱等进行了系统的研究, 最终选定的测定方

法对待测成分分离效果好, 稳定、无干扰, 可用于本复方的质量控制。

基金项目

广东省重大科技专项(2012A080202009); 广州市创新基金项目(2013J4400040)。

参考文献 (References)

- [1] 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协作委员会, 中华医学会肝病学会分会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治专家共识[J]. 临床肿瘤学杂志, 2009, 14(3): 259-269.
- [2] 冯良, 曾小云, 谭盛葵. 乙型肝炎病毒感染与原发肝癌的相关风险研究[J]. 广西医科大学学报, 2007, 24(6): 824-882.
- [3] 万振先, 詹永成, 薛德钧. 叶下珠化学成分的研究[J]. 江西中医学院学报, 1999, 11(2): 79.
- [4] 沙东旭, 刘英华, 王龙顺, 等. 叶下珠化学成分的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(3): 176-178.
- [5] 米志宝, 陈鸿珊, 张习坦, 等. 用嗜肝 DNA 病毒模型筛选抗病毒中草药[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(1): 43-45.
- [6] 贺浪冲, 岐琳, 吕居娴, 等. 陕西叶下珠药用开发研究III: 提取物体外灭活 HBV 抗原作用[J]. 西北药学杂志, 1996, 11(1): 11-14.
- [7] 张美义, 白万明, 邹静, 等. 云南珠子草的调查及其抗病毒作用[J]. 中国中药杂志, 1992, 17(5): 259-260.
- [8] 陈征途, 朱宇同, 方宏勋, 等. 三种叶下珠属植物在体外细胞培养中抗 HBV 作用的初步研究[J]. 广州中医药大学学报, 1997, 14(2): 102-104.
- [9] 徐大文, 马海伦, 任中原, 等. 苦味叶下珠抗乙型肝炎病毒的研究[J]. 天津医药, 1994, (12): 717-721.
- [10] 刘庄, 傅希贤, 张乃临, 等. 中草药叶下珠不同品种和制剂体外抗乙型肝炎病毒的实验研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1997, 11(3): 282-285.
- [11] 陈压西, 郭树华, 张定凤, 等. 重庆麻鸭乙肝动物模型的建立及应用-21 种中药抗鸭乙型肝炎病毒初筛的研究[J]. 肝脏病杂志, 1993, 1(2): 89-92.
- [12] 米志高. 中草药抗鸭乙型肝炎病毒的效果[J]. 中西医结合肝病杂志, 1994, 4(4): 24-26.
- [13] 陈压西, 郭树华, 张定凤, 等. 不同产地叶下珠及其联合用药抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(4): 225-227.
- [14] 邓学龙, 朱宇同, 郭兴伯, 等. 先天和后天感染鸭乙型肝炎病毒, 广州鸭外周血中病毒血症的动态比较及应用[J]. 广州中医药大学学报, 1999, 16(1): 56-60.
- [15] 王新华, 邓学龙, 朱宇同, 等. 叶下珠复方体内抗鸭乙型肝炎病毒作用的实验研究[J]. 广州中医药大学学报, 1997, 14(4): 247-249.
- [16] 周世文, 徐传福, 周宁, 等. 叶下珠对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. 中草药, 1994, 17(12): 31-32.
- [17] 唐明增. 叶下珠及其复方抗小鼠免疫性肝损伤的实验研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 广州中医药大学, 2002, 19-21.
- [18] 万金志, 罗上武, 张均倡, 等. 肝丹对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. 中草药, 1998, 29(9): 614-615.
- [19] Kinoshita, S., Inoue, Y., Nakama, S., et al. (2007) Antioxidant and Hepatoprotective Actions of Medicinal Herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and Its Tannin Corilagin. *Phytomedicine*, **14**, 755-762.
- [20] Liu, P., Hu, Y.Y., Liu, C., et al. (2002) Clinical Observation of Salvianolic Acid B in Treatment of Liver Fibrosis in Chronic Hepatitis B. *World Journal of Gastroenterology*, **8**, 679-685.
- [21] 刘平, 森泽成司, 沟口靖弘. 丹酚酸 B 镁盐抗大鼠 β -半乳糖胺肝损伤的作用[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(6): 352-353.
- [22] 胡义扬, 刘平, 刘成, 等. 丹参提取物对 CCL4 和 DMN 诱导的大鼠肝纤维化的影响[J]. 上海中医药杂志, 1999, 33(10): 7-10.
- [23] 徐列明, 刘成, 刘平. 丹参酚性酸 B 对大鼠传代肝星状细胞增殖形态和合成细胞外基质的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 1996, 4(2): 86-89.
- [24] 周扬, 顾杰, 徐列明. 丹参酚酸 B 盐对肝硬化大鼠门静脉高压及肝组织中内皮素-1 的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2007, 15(1): 4-7.