

HPLC 测定柔肝胶囊中 5 种活性成分的含量

束艳, 宿树兰, 钱大玮*, 段金廛, 蒋海峰

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的: 建立柔肝胶囊含量测定的质量控制方法。方法: 应用 HPLC-DAD 法测定其中丹酚酸 B、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素的含量。采用 Apollo C₁₈ 柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm), 以 4% 醋酸水溶液和乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 检测波长 286, 426 nm。应用 HPLC-ELSD 法测定其中牛磺熊去氧胆酸的含量。采用 Apollo C₁₈ 柱(4.6 mm ×250 mm, 5 μm), 以乙腈-乙酸-乙酸铵缓冲液(pH 4.5)为流动相, 等度洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, ELSD 漂移管温度 80 ℃, 雾化气体压力 35 psi, 喷雾器温度 36 ℃。结果: 丹酚酸 B、姜黄素类成分、牛磺熊去氧胆酸的线性关系良好($r=0.9993\sim0.9999$), 线性范围分别为 0.148 0~1.850, 0.125 6~1.570, 0.043 2~0.540 0, 0.033 6~0.420 0, 0.972 0~12.15 μg; 精密度、重复性、稳定性的 RSD 都低于 3%; 加样回收率为 97.8%~101.7%。结论: 本方法简便快捷、结果准确且重现性好, 可用于柔肝胶囊的质量控制。

[关键词] 柔肝胶囊; 丹酚酸 B; 姜黄素类成分; 牛磺熊去氧胆酸; 高效液相色谱法; 含量测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)18-0071-05

HPLC Determination of Five Active Substances in Rougan Capsule

SHU Yan, SU Shu-lan, QIAN Da-wei*, DUAN Jin-ao, JIANG Hai-feng

(Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] Objective: To establish a determination method for quality control of Rougan capsule. **Method:** The contents of salvianolic acid B, curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin in Rougan capsule were determined by HPLC-DAD. These compounds were analyzed with a Apollo C₁₈ column (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) by gradient elution using 4% acetic acid-acetonitrile as the mobile phase, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was maintained at 30 ℃ and the wavelength was detected at 286 and 426 nm. The content of tauroursodeoxycholic acid in Rougan capsule was determined by HPLC-ELSD. It was analyzed with a Apollo C₁₈ column (4.6 mm ×250 mm, 5 μm) by isocratic elution using acetonitrile-acetic acid-ammonium acetate solution (pH 4.5) as the mobile phase, the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, the temperature of the drift tube was set at 80 ℃, the pressure of nebulizing gas (air) was at 35 psi, the temperature of the atomizer was at 36 ℃. **Result:** All these compounds were linear in the range of 0.148 0-1.850, 0.125 6-1.570, 0.043 2-0.540 0, 0.033 6-0.420 0 and 0.972 0-12.15 μg ($r=0.9993\sim0.9999$), respectively. The RSDs of the precision, reproducibility and stability test were less than 3%; the average recovery of the method was in the range of 97.8%-101.7%. **Conclusion:** The established method is simple, accurate, and repeatable and can be used for quality control of Rougan capsule.

[Key words] Rougan capsule; salvianolic acid B; curcumin constituents; tauroursodexychoic acid; HPLC; determination

[收稿日期] 20100818(005)

[第一作者] 束艳, 在读硕士, 研究方向: 生物药剂学, Tel: 025-85811917, E-mail: shuyan3423@163.com

[通讯作者] * 钱大玮, 硕士生导师, 教授, 研究方向: 中药质量控制与生物药剂学, Tel: 025-85811916, E-mail: qiandw05@yahoo.com.cn

柔肝胶囊为新研发的中药制剂产品,主要由丹参、姜黄、熊胆粉、黄芪组成,具有益气活血、解毒散结之功效,临床适用于湿热毒邪久盛、伤正耗气、瘀结肝络、虚损生积之症。丹参活性成分主要为水溶性成分丹酚酸 B,具有较强的抗脂质过氧化、抑制血小板聚集、抗肝纤维化等作用^[1]、姜黄活性成分主要为姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素,具有抗氧化、抑制血管重构、抗动脉粥样硬化等作用^[2]、熊胆粉活性成分主要为结合型胆汁酸牛磺熊去氧胆酸,具有解毒、镇静、抗惊、解痉等作用^[3-4]。关于这 5 种成分的含量测定方法已见报道的主要有高效液相色谱法、紫外分光光度法^[5-9],其中高效液相色谱法报道较多。本文采用 HPLC-DAD 法同时测定柔肝胶囊中丹酚酸 B、姜黄素、去甲氧基姜黄素和双去甲氧基姜黄素成分的含量;采用 HPLC-ELSD 法测定其中牛磺熊去氧胆酸的含量。本研究所建立的方法前处理简便、快速、可靠,可用于控制该制剂的质量。

1 材料

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2998 二极管阵列检测器, Waters 2424 蒸发光散射检测器, Empower² 色谱工作站;电子天平(BT125,赛多利斯科学仪器有限公司);KQ-250E 型超声波清洗器;EPED 超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司)。

1.2 试药 柔肝胶囊(规格 0.4 g/粒);丹酚酸 B(111562-201009)、姜黄素(110823-200603)、牛磺熊去氧胆酸钠(110816-200507),以上对照品均购自中国药品生物制品检定所(供含量测定用);去甲氧基姜黄素(A0087)、双去甲氧基姜黄素(A0088)对照品,均购自成都曼思特生物科技有限公司(经 HPLC 纯度检查,用面积归一化法计算,纯度均达到 98%);乙腈(HPLC 级, TEDIA 公司);乙酸(分析纯,上海化学试剂有限公司);乙酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);超纯水(自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 HPLC-DAD 色谱条件 Apollo C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-4% 乙酸水(B);梯度洗脱(0 ~ 17 min, 20% ~ 30% A, 17 ~ 23 min, 30% ~ 55% A, 23 ~ 35 min, 55% A ~ 55% A);柱温 30 °C;流速 1 mL·min⁻¹;检测波长丹酚酸 B 为

286 nm(图 1A-C),姜黄素类成分为 426 nm(图 1D-F);进样量为 10 μL。

2.1.2 HPLC-ELSD 色谱条件 Apollo C₁₈ 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相乙腈(A)-乙酸-乙酸铵缓冲液(B)(按《中国药典》方法配制, pH 4.5);等度洗脱(0 ~ 15 min, 30% ~ 30% A);柱温 30 °C;流速 0.8 mL·min⁻¹;ELSD 漂移管温度 80 °C,雾化气体压力 35 psi,喷雾器温度 36 °C;进样量为 10 μL(图 1G-I)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品丹酚酸 B、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素适量,分别用甲醇溶解并稀释至 25 mL 量瓶中,摇匀,制成每 1 mL 含丹酚酸 B 370 μg、姜黄素 314 μg、去甲氧基姜黄素 108 μg、双去甲氧基姜黄素 84 μg 的对照品储备液;精密吸取上述各对照品储备液 2 mL,同置于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得每 1 mL 含丹酚酸 B 74 μg、姜黄素 62.8 μg、去甲氧基姜黄素 21.6 μg、双去甲氧基姜黄素 16.8 μg 的混合对照品溶液。精密称取对照品牛磺熊去氧胆酸钠适量,加甲醇溶解,摇匀,制得每 1 mL 含牛磺熊去氧胆酸 486 μg。

2.2.2 供试品溶液的制备 取本品胶囊内容物,混匀,取约 0.5 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理 30 min,静置放冷,称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,静置,取上清液,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2.3 阴性对照样品溶液的制备 按处方配比,分别制备缺丹参阴性对照样品、缺姜黄阴性对照样品、缺熊胆粉阴性对照样品,按供试品溶液的制备项下方法制备,即得。

2.2.4 测定法 分别吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照样品溶液各 10 μL,在上述色谱条件下进样分析,结果见图 1。从图 1 结果可以看出,各被测组分与其他组分均达到基线分离,分离度 R > 1.5,丹酚酸 B、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素和牛磺熊去氧胆酸阴性对照均无干扰。

2.3 线性关系考察及检出限

2.3.1 HPLC-UV 测定线性关系考察及检出限 分别吸取混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL,在 2.1.1 项下的色谱条件下进样测定。以对照品量 X

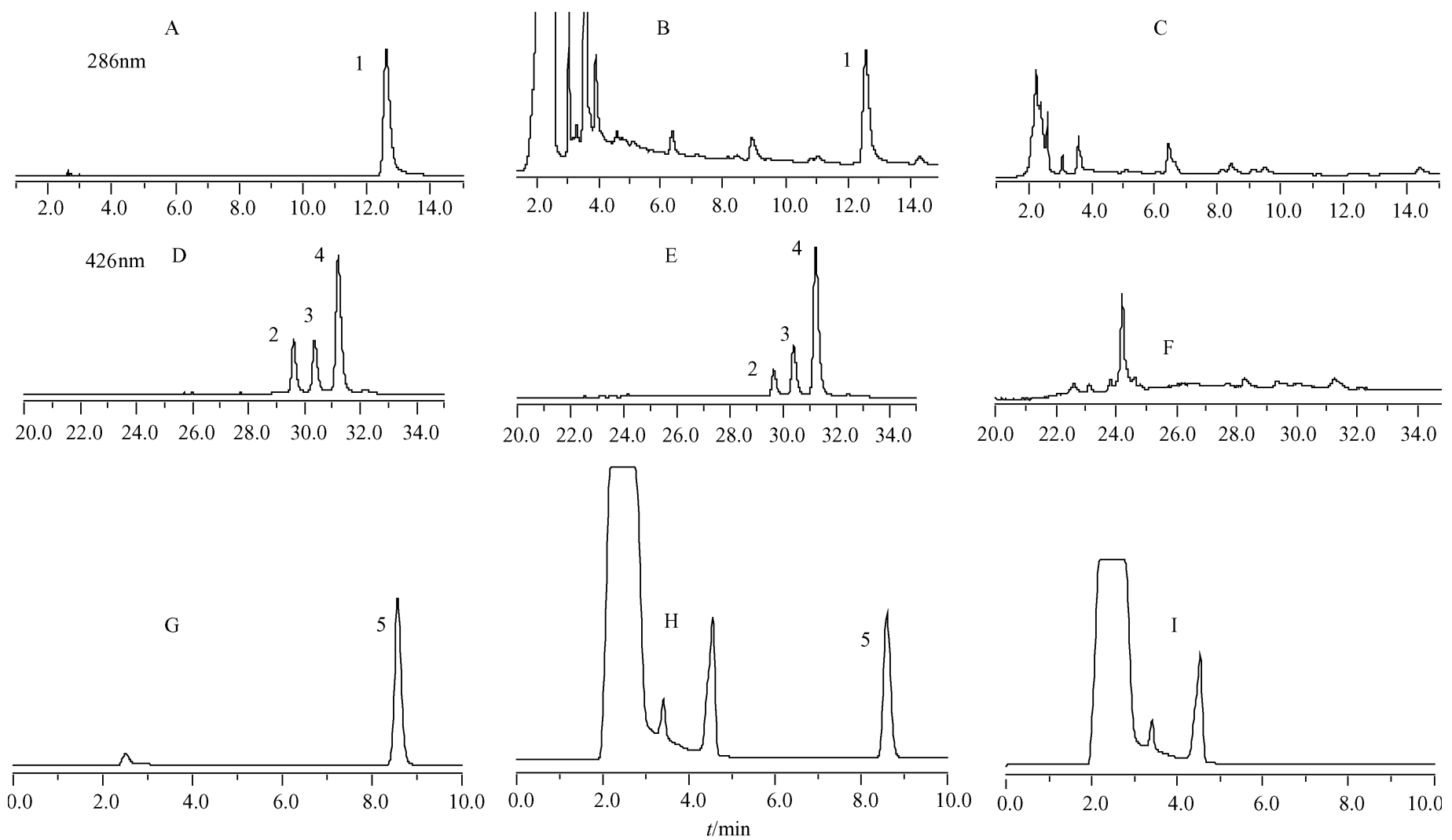


图 1 柔肝胶囊 HPLC

A. 丹酚酸 B 对照品; B. 供试品; C. 缺丹参阴性样品; D. 姜黄素类对照品; E. 供试品; F. 缺姜黄阴性样品;
G. 牛磺熊去氧胆酸钠对照品; H. 供试品; I. 缺熊胆粉阴性样品;

1. 丹酚酸 B; 2. 双去甲氧基姜黄素; 3. 去甲氧基姜黄素; 4. 姜黄素; 5. 牛磺熊去氧胆酸钠

(μg) 为横坐标, 色谱峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程。将混合对照品溶液进行稀释并分析, 当信噪比为 3 时, 分别测得丹酚酸 B 及姜黄素类成分的检出限, 结果见表 1。

2.3.2 HPLC-ELSD 测定线性关系考察及检出限

分别吸取牛磺熊去氧胆酸钠对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL , 在 2.1.2 项下的色谱条件下进样测定。以对照品量 X (μg) 的常用对数为横坐标, 峰面积常用对数为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程。将对照品溶液进行稀释并分析, 当信噪比为 3 时, 测得牛磺熊去氧胆酸的检出限, 结果见表 1。

表 1 柔肝胶囊中 5 种活性成分的线性关系 检出限 ($n=6$)

成分	回归方程	r	线性范围 / μg	IOD / μg
丹酚酸 B	$Y=1.23 \times 10^6 X-3.50 \times 10^4$	0.9999	0.1480 ~1.850	3.00
姜黄素	$Y=8.65 \times 10^6 X-9.70 \times 10^4$	0.9999	0.1256 ~1.570	2.50
去甲氧基姜黄素	$Y=9.63 \times 10^6 X-5.51 \times 10^4$	0.9999	0.0432 ~0.5400	1.10
双去甲氧基姜黄素	$Y=1.18 \times 10^7 X-1.13 \times 10^5$	0.9996	0.0336 ~0.4200	0.80
牛磺熊去氧胆酸	$Y=1.44X+5.97$	0.9993	0.9720 ~12.15	97.2

2.4 精密度试验 取混合对照品溶液 10 μL , 在 2.1.1 项下的色谱条件下连续进样 6 次; 取牛磺熊

去氧胆酸钠对照品溶液 10 μL , 在 2.1.2 项下的色谱条件下连续进样 6 次。以色谱峰面积计算, RSD 分别为丹酚酸 B 1.4%, 姜黄素 1.0%, 去甲氧基姜黄素 1.2%, 双去甲氧基姜黄素 1.4%, 牛磺熊去氧胆酸 1.3%。结果表明, 仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验 取供试品溶液分别于配置后 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 h 进样测定, 计算各色谱峰面积的 RSD。姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、牛磺熊去氧胆酸色谱峰面积的 RSD 分别为 0.6%, 2.2%, 2.7%, 2.0%。丹酚酸 B 色谱峰面积的 RSD 在 16 h 内为 3.7%, 在 12 h 内为 2.0%。结果表明, 姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、牛磺熊去氧胆酸在 24 h 稳定, 丹酚酸 B 在 12 h 内稳定。

2.6 重复性实验 取同一批样品(批号 20091120) 6 份, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别进样 10 μL , 按上述色谱条件测定, 分别进样 10 μL , 测定上述 5 种活性成分的含量。结果丹酚酸 B、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、牛磺熊去氧胆酸含量的 RSD 分别为 2.0%, 0.96%, 2.5%, 2.4%, 1.1%。结果表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率实验 称取已知含量的样品(批号 20091120) 6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 分别加入丹酚酸 B、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素对照品储备液各 3.5, 2.5, 2.5, 2.5 mL, 分别精密加入牛磺熊去氧胆酸钠对照品适量(约 6.5 mg), 按 2.2.2 项下方法制备所需供试品溶液, 测定, 计算, 结果见表 2~6。

表 2 丹酚酸 B 回收率实验 (n=6)

称样量 /g	已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.250 3	1.355	1.30	2.64	99.2	99.4	0.9
0.253 7	1.373	1.30	2.66	99.4		
0.255 0	1.380	1.30	2.65	98.1		
0.255 4	1.382	1.30	2.67	99.4		
0.257 9	1.396	1.30	2.69	99.9		
0.258 1	1.397	1.30	2.70	100.6		

表 3 姜黄素回收率 (n=6)

称样量 /g	已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.250 3	0.817	0.785	1.580	97.2	97.8	0.6
0.253 7	0.828	0.785	1.593	97.5		
0.255 0	0.832	0.785	1.598	97.6		
0.255 4	0.834	0.785	1.600	97.6		
0.257 9	0.842	0.785	1.614	98.3		
0.258 1	0.843	0.785	1.617	98.6		

表 4 去甲氧基姜黄素回收率 (n=6)

称样量 /g	已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.250 3	0.265	0.270	0.528	97.3	98.0	0.9
0.253 7	0.269	0.270	0.530	96.7		
0.255 0	0.270	0.270	0.535	98.0		
0.255 4	0.271	0.270	0.535	97.9		
0.257 9	0.273	0.270	0.541	99.1		
0.258 1	0.274	0.270	0.541	98.8		

表 5 双去甲氧基姜黄素回收率 (n=6)

称样量 /g	已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.250 3	0.210	0.210	0.423	101.4	101.6	1.2
0.253 7	0.213	0.210	0.423	99.9		
0.255 0	0.214	0.210	0.427	101.3		
0.255 4	0.215	0.210	0.426	100.7		
0.257 9	0.217	0.210	0.432	102.6		
0.258 1	0.217	0.210	0.434	103.4		

表 6 牛磺熊去氧胆酸回收率 (n=6)

称样量 /g	已知量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.250 3	6.26	6.63	12.76	102.8	101.7	0.7
0.253 7	6.34	6.72	12.82	101.1		
0.255 0	6.38	6.67	12.85	101.8		
0.255 4	6.39	6.76	12.89	100.8		
0.257 9	6.45	6.81	13.04	101.4		
0.258 1	6.45	6.90	13.18	102.1		

2.8 样品测定 称取 3 批样品, 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液各 2 份, 进样 10 μ L, 在上述色谱条件下进行含量测定, 并计算含量。结果见表 7。

表 7 柔肝胶囊中丹酚酸 B、姜黄素类成分、牛磺熊

批次	去氧胆酸测定 (n=2)				mg/粒
	丹酚酸 B	姜黄素	去甲氧基姜黄素	双去甲氧基姜黄素	
20091203	2.60	1.59	0.52	0.41	10.78
20100324	2.40	1.45	0.47	0.37	11.23
20100408	2.79	1.66	0.54	0.43	13.45

3 讨论

3.1 检测方法的选择 本实验采用 HPLC-DAD 及 HPLC-ELSD 法测定柔肝胶囊中丹酚酸 B、姜黄素类成分及牛磺熊去氧胆酸的含量。利用 DAD 检测器能同时采集多个波长数据的便利条件, 样品在同一色谱条件下进行一次分析能同时得到丹酚酸 B、姜黄素类成分的图谱, 出峰时间适中, 峰形对称, 分离度符合要求。熊胆粉中的主要成分是结合型胆汁酸, 它的紫外检测波长比较低, 为 205 nm。本研究曾参考文献[10], 试图用 HPLC-UV 法来测定熊胆粉中牛磺熊去氧胆酸的含量, 但基线漂移严重, 影响测定结果。因此, 采用 HPLC-ELSD 法测定其中牛磺熊去氧胆酸的含量。

3.2 流动相的优化 酚羟基、羧基在水溶液中容易发生电离, 极性增强, 在固定相表面形成双重保留机理, 色谱峰拖尾严重, 定量分析误差较大, 因此分析丹酚酸 B 及姜黄素类成分时要加入少量酸性溶液调节流动相。本试验优化了乙腈-0.1% 甲酸、乙腈-0.1% 磷酸及乙腈-4% 冰乙酸, 结果表明, 上述 3 种流动相对丹酚酸 B 的分离效果都较好, 但前两种流动相对姜黄素类成分的分离并没有取得较好峰形和较高分离度, 故选乙腈-4% 冰乙酸作为流动相。赵

勇等^[11]报道,在用 HPLC-ELSD 法测定熊胆粉中结合型胆汁酸的含量时,因其在反相色谱柱中保留时间短,故需在流动相中加入缓冲液控制流动相的 pH,延长在色谱柱中的保留时间。又因 ELSD 不允许流动相中使用难挥发的缓冲盐,故选择醋酸-醋酸铵缓冲液。实验证明乙腈-乙酸-醋酸铵缓冲液(pH 4.5)(30:70)作为流动相能得到满意的色谱图。

3.3 提取方法的选择 本文分别考察了 50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇等不同提取溶剂,超声、回流等不同提取方法,并进行了提取时间为 15, 30, 60, 90 min,提取次数为 1, 2 次的考察。结果表明,以 70% 甲醇超声 30 min 1 次即可提取完全,因此确定该提取方法。

3.4 ELSD 参数的选择 ELSD 参数主要有喷雾器温度、漂移管温度、气体压力。本试验分别比较了气体压力为 30, 35, 40 psi, 漂移管温度为 60, 70, 80, 喷雾器温度为 30, 36, 42 时对色谱图的影响。结果显示,当气体压力为 35 psi、漂移管温度为 80、喷雾器温度为 36 时,基线平稳,色谱峰形对称。

[参考文献]

[1] 戈升荣,俞一心,谢更新. 丹酚酸的药理作用研究进

展[J]. 中药材, 2002, 25(9): 683.

- [2] 汪海慧,成扬. 姜黄素药理作用的研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2007, 21(6): 73.
- [3] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海:上海人民出版社, 1977: 2584.
- [4] 王浴生,薛春生,邓文龙,等. 中药药理与应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983: 1227.
- [5] 张启伟,张颖,李计萍,等. 高效液相色谱法测定丹参中丹酚酸 B[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(12): 848.
- [6] 李广胜,王光新. 丹参口服液中总酚酸性成分的含量测定[J]. 时珍国医国药, 2001, 12(8): 683.
- [7] 白文莉,张树云,郭菊玲,等. 比色法测定姜黄中有效成分的含量[J]. 中国药事, 2007, 21(10): 840.
- [8] 赵欣,袁丹,王启隆,等. 姜黄提取物中姜黄素类成分定量分析法研究[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(6): 643.
- [9] 王勇,卢端萍. 熊胆中胆汁酸含量测定方法研究概括[J]. 海峡药学, 2005, 17(5): 186.
- [10] 张贇华,刘建忠,彭霞,等. HPLC 法比较熊胆粉及猪胆粉、牛胆粉、羊胆粉和鸡胆粉中胆汁酸类成分[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(3): 487.
- [11] 赵勇,孙文基. HPLC-ELSD 法测定熊胆粉中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(1): 127.

[责任编辑 顾雪竹]