

HPLC 法同时测定柴仁胶囊中 5 种成分

张雪荣， 毛春芹， 程 雪， 张 季， 苏联麟， 陆兔林*
(南京中医药大学药学院，江苏 南京 210023)

摘要：目的 建立 HPLC 法同时测定柴仁胶囊（柴胡、酸枣仁、川芎等）中 5 种成分的含有量。方法 该药物 80% 甲醇提取液的分析采用 Merck Purospher STAR C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；以乙腈-0.1% 甲酸为流动相，梯度洗脱；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 237、290、335 nm。**结果** 斯皮诺素、阿魏酸、桂皮醛、甘草苷、甘草酸铵分别在 0.009 26~0.092 6 μg ($R^2=0.999\ 6$)、0.056 2~0.562 μg ($R^2=0.999\ 8$)、0.130~1.30 μg ($R^2=0.999\ 8$)、0.275~2.75 μg ($R^2=0.999\ 5$)、0.568~5.68 μg ($R^2=0.999\ 2$) 范围内呈良好的线性关系，平均加样回收率分别为 100.73%、100.62%、100.02%、100.41%、99.96% %，RSD 分别为 2.20%、1.37%、1.52%、1.30%、0.80%。**结论** 该方法简单准确，重复性好，可用于柴仁胶囊的质量控制。
关键词：柴仁胶囊；斯皮诺素；阿魏酸；桂皮醛；甘草苷；甘草酸铵；HPLC
中图分类号：R927.2 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2017)06-1191-04
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.017

Simultaneous determination of five constituents in Chairen Capsules by HPLC

ZHANG Xue-rong, MAO Chun-qin, CHENG Xue, ZHANG Ji, SU Lian-lin, LU Tu-lin*
(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop an HPLC method for the simultaneous content determination of five constituents in Chairen Capsules (*Bupleuri Radix*, *Ziziphi spinosae Semen*, *Chuanxiong Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of 80% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Merck Purospher STAR C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% formic acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 237, 290 and 335 nm. **RESULTS** Spinosin, ferulic acid, cinnamaldehyde, liquiritin and ammonium glycyrrhizate showed good linear relationships within the ranges of 0.009 26–0.092 6 μg ($R^2=0.999\ 6$), 0.056 2–0.562 μg ($R^2=0.999\ 8$), 0.130–1.30 μg ($R^2=0.999\ 8$), 0.275–2.75 μg ($R^2=0.999\ 5$) and 0.568–5.68 μg ($R^2=0.999\ 2$), whose average recoveries were 100.73%, 100.62%, 100.02%, 100.41% and 99.96% % with the RSDs of 2.20%, 1.37%, 1.52%, 1.30% and 0.80%, respectively. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Chairen Capsules.
KEY WORDS: Chairen Capsules; spinosin; ferulic acid; cinnamaldehyde; liquiritin; ammonium glycyrrhizate; HPLC

柴仁胶囊由柴胡、酸枣仁、川芎、肉桂、甘草、黄连、熟地黄、香附组成，具有疏肝解郁，宁心安神的作用，临床上主要用于肝郁伤神所致的焦虑和失眠。文献表明，酸枣仁具有镇静、安神、抗焦虑作用，斯皮诺素是其主要药效物质之一^[1-2]；阿魏酸是川芎主要有效成分，具有抗动脉粥样硬化、抗血小板凝集和血栓作用^[3]；肉桂具有镇静、解痉、解热等作用，肉桂醛是其主要活性成分^[4-5]；甘草中甘草酸对肝脏有保护作用，被广泛应用于多种肝病的治疗，甘草苷也被证实是甘草抗

收稿日期：2016-12-15
作者简介：张雪荣（1992—），男，硕士生，从事中药质量标准研究。E-mail: zhangxuerong1992@126.com
* 通信作者：陆兔林（1963—），男，教授，博士生导师，从事中药炮制及质量标准研究。Tel: (025) 85811835, E-mail: lutuling2005@126.com

抑郁作用的活性化合物^[6-7]。为了更好地控制柴仁胶囊质量,本实验采用 HPLC 法同时测定斯皮诺素、阿魏酸、桂皮醛、甘草苷、甘草酸铵的含有量,以期对柴仁胶囊的质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪 (配置 Waters 2998 检测器); Empower 色谱工作站; Milli-Q Integral 纯水系统 (美国 Millipore 公司); MS105DU 电子分析天平 (十万分之一,瑞士梅特勒-托利多公司); FA1104 电子分析天平 (万分之一,上海精密科学仪器有限公司); KQ-500B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂 阿魏酸 (批号 110773-200611)、桂皮醛 (批号 110710-201418) 对照品购自中国食品药品检定研究院;斯皮诺素 (批号 PO7J3S1)、甘草苷 (批号 111610-201106)、甘草酸铵 (批号 20120911) 对照品购自上海源叶生物科技有限公司。柴仁胶囊 (批号 160822、160823、160824) 为南京中医药大学炮制实验室自制 (制备方法为用水提取川芎、肉桂、香附中的挥发油,并以环糊精包合,收集所得水提取液;乙醇提取柴胡、酸枣仁、黄连,得到乙醇提取液。将上述提取后的药渣与甘草、熟地黄合并后水提,所得提取液与挥发油水提取液合并,乙醇沉淀除去多糖等杂质,抽滤后与乙醇提取液合并,减压浓缩挥去乙醇,喷雾干燥成干浸膏粉,加辅料和挥发油包合物制粒,灌装入胶囊,即得)。乙腈为色谱纯;甲酸为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

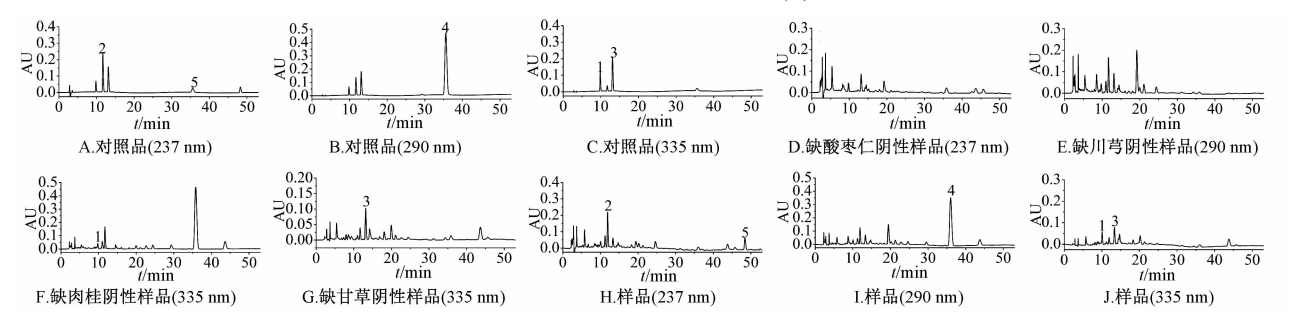
2.1 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 分别含斯皮诺素 0.926 mg、阿魏酸 1.124 mg、桂皮醛 1.303 mg、甘草苷 1.375 mg、甘草酸铵 1.136 mg 的对照品贮备液。吸取适量置于 10 mL 量瓶中,加甲醇制成每 1 mL 含斯皮诺素 18.52 μg、阿魏酸 112.4 μg、桂皮醛 260.6 μg、甘草苷 500 μg、甘草酸铵 568 μg 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备 精密称取样品 2.5 g,精密加入 25 mL 80% 甲醇,称定质量,超声 30 min,80% 甲醇补足减失的质量,过滤,取续滤液,离心,取上清液,即得。

2.3 阴性对照溶液制备 按处方比例制备缺酸枣仁、川芎、肉桂、甘草的阴性样品,按“2.2”项下方法制备相应阴性对照溶液。

2.4 色谱条件 Merck Purospher STAR C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm);以乙腈 (A) -0.1% 甲酸 (B) 为流动相,梯度洗脱 (0~10 min, 16%~24% A; 10~35 min, 24%~34% A; 35~50 min, 34%~42% A; 50~53 min, 42%~100% A);体积流量 1 mL/min;检测波长 237 nm (甘草苷和甘草酸铵)、290 nm (桂皮醛)、335 nm (斯皮诺素和阿魏酸);柱温 30℃;进样量 10 μL。

2.5 专属性试验 取对照品、供试品、阴性对照溶液,在“2.4”项色谱条件下分析,结果见图 1。由图可知,供试品溶液中各成分分离度良好 (均大于 1.5),阴性无干扰。



1. 斯皮诺素 2. 甘草苷 3. 阿魏酸 4. 桂皮醛 5. 甘草酸铵
1. spinosin 2. liquiritin 3. ferulic acid 4. cinnamaldehyde 5. ammonium glycyrrhizate

图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

2.6 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,置于 2 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度,摇匀,进样 10 μL

分析。以峰面积为纵坐标 (Y),进样量为横坐标 (X) 进行回归,结果见表 1,可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents						
成分	线性方程	R^2	线性范围/ μg			
斯皮诺素	$Y = 24\,150\,760.0X + 63\,136.6$	0.999 6	0.009 26 ~ 0.092 6			
阿魏酸	$Y = 9\,911\,334.8X + 109\,329.1$	0.999 8	0.056 2 ~ 0.562			
桂皮醛	$Y = 22\,151\,144.4X + 581\,682.3$	0.999 8	0.130 ~ 1.30			
甘草苷	$Y = 1\,988\,484.6X + 143\,294.0$	0.999 5	0.275 ~ 2.75			
甘草酸铵	$Y = 451\,904X + 53\,090$	0.999 2	0.568 ~ 5.68			

2.7 精密度试验 取同一供试品溶液，连续进样 6 次，测得斯皮诺素、阿魏酸、桂皮醛、甘草苷、甘草酸铵峰面积 RSD 分别为 1.07%、1.94%、0.68%、0.70%、1.12%，表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液，于 0、2、4、6、8、10、12 h 测定，测得斯皮诺素、阿魏酸、桂皮醛、甘草苷、甘草酸铵峰面积 RSD 分别为 1.25%、1.37%、1.30%、0.75%、1.02%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一批样品（批号 160822），按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下测定，测得斯皮诺素、阿魏酸、桂皮醛、甘草苷、甘草酸铵含有量 RSD 分别为 2.13%、1.79%、1.46%、2.32%、1.67%，表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取各对照品适量，置于量瓶中，配制成含斯皮诺素 0.028 34 mg/mL、阿魏酸 1.301 mg/mL、桂皮醛 0.592 5 mg/mL、甘草苷 1.553 mg/mL、甘草酸铵 3.751 mg/mL 的对照品溶液。精密称取含有量已知的样品（批号 160822）1 g，共 9 份，平均分成 3 组，分别加入对照品溶液 0.8、1.0、1.2 mL，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下分析，计算回收率，结果见表 2。

2.11 样品含有量测定 精密称取 3 批样品，每批 2.5 g，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.4”项色谱条件下分析，测定含有量，结果见表 3。

3 讨论

3.1 检测波长选择 查阅《中国药典》和相关文献，发现斯皮诺素、阿魏酸、肉桂醛、甘草苷、甘草酸铵的最佳吸收波长分别为 335、321、290、237 nm^[8-11]。本实验采集各成分在 200 ~ 400 nm 波长处的三维色谱图，分别选择对甘草苷和甘草酸铵有较好响应的 237 nm，以及对斯皮诺素和阿魏酸有较好响应的 335 nm 作为检测波长，并发现肉桂

表 2 各成分加样回收率试验结果（ $n=9$ ）

Tab. 2 Results of recovery tests for various constituents ($n=9$)						
成分	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
斯皮诺素	0.028 69	0.022 67	0.052 10	103.26	100.73	2.20
	0.028 54	0.022 67	0.051 34	100.57		
	0.029 45	0.022 67	0.051 98	99.38		
	0.027 51	0.028 34	0.056 33	101.69		
	0.028 64	0.028 34	0.056 13	97.00		
	0.029 14	0.028 34	0.057 16	98.87		
	0.029 45	0.034 01	0.063 41	99.85		
	0.027 96	0.034 01	0.063 31	103.94		
	0.027 49	0.034 01	0.062 19	102.03		
	1.287 9	1.041 0	2.346 5	101.69		
	1.281 0	1.041 0	2.312 0	99.04		
	1.278 9	1.041 0	2.342 1	102.13		
阿魏酸	1.293 0	1.301 0	2.576 5	98.65	100.62	1.37
	1.291 4	1.301 0	2.598 4	100.46		
	1.284 3	1.301 0	2.584 5	99.94		
	1.276 5	1.561 0	2.875 2	102.42		
	1.275 9	1.561 0	2.861 2	101.56		
	1.275 5	1.561 0	2.831 5	99.68		
	0.585 5	0.474 0	1.051 2	98.25		
	0.594 6	0.474 0	1.062 3	98.67		
	0.576 2	0.474 0	1.055 4	101.10		
	0.586 1	0.592 5	1.185 2	101.11		
	0.594 1	0.592 5	1.177 8	98.51		
	0.584 3	0.592 5	1.185 2	101.42		
桂皮醛	0.574 8	0.711 0	1.302 5	102.35	100.02	1.52
	0.581 2	0.711 0	1.283 4	98.76		
	0.593 4	0.711 0	1.304 6	100.03		
	1.520 3	1.242 0	2.763 0	100.06		
	1.540 1	1.242 0	2.810 3	102.27		
	1.533 2	1.242 0	2.806 3	102.50		
	1.528 7	1.553 0	3.072 1	99.38		
	1.523 4	1.553 0	3.082 2	100.37		
	1.515 5	1.553 0	3.081 2	100.82		
	1.534 2	1.864 0	3.371 2	98.55		
	1.527 4	1.864 0	3.381 2	99.45		
	1.516 4	1.864 0	3.386 1	100.31		
甘草苷	3.704 4	3.001 0	6.712 0	100.22	100.41	1.30
	3.712 1	3.001 0	6.665 1	98.40		
	3.701 2	3.001 0	6.693 4	99.71		
	3.684 7	3.751 0	7.492 4	101.51		
	3.708 9	3.751 0	7.468 7	100.23		
	3.711 4	3.751 0	7.462 1	99.99		
	3.709 8	4.501 0	8.212 5	100.04		
	3.704 9	4.501 0	8.190 1	99.65		
甘草酸铵	3.706 5	4.501 0	8.201 5	99.87	99.96	0.80

醛在 290 nm 处有最大吸收，而且在其他波长下的吸收急剧减少，故选择 290 nm 单独作为肉桂醛的检测波长。

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/g)

批号	斯皮诺素	阿魏酸	桂皮醛	甘草苷	甘草酸铵
151102	0.028 69	1.287 9	0.585 5	1.520 3	3.704 4
151105	0.028 34	1.290 2	0.585 1	1.505 1	3.656 7
151107	0.029 29	1.325 6	0.591 9	1.535 7	3.759 4

3.2 提取方法选择 本实验比较了不同体积分数甲醇及乙醇的提取效果,发现相对于乙醇,甲醇的提取效率更高,而且杂质较少。同时,还考察了超声提取和回流提取,发现两者提取效果相当。综合考虑,最终确定 80% 甲醇超声提取样品。

3.3 流动相选择 参考文献 [8-11],本实验考察了甲醇-水、甲醇-甲酸、乙腈-甲酸、乙腈-乙酸等流动相,发现以乙腈-甲酸为流动相的色谱图基线更平稳,峰型较好,分离度能达到含有量测定要求,故确定以其为流动相。

4 结论

柴仁胶囊属于中药复方制剂,成分复杂,仅测定单一成分不足以评价其质量。本实验选取与其功效息息相关的斯皮诺素、阿魏酸、桂皮醛、甘草苷及甘草酸铵作为检测指标,不仅可为柴仁胶囊的质量控制提供依据,更能促进中药复方质量评价标准的完善,对推进中药产品现代化具有重要意义。

参考文献:

[1] 黄海英. 基于 P-GP 转运体研究复方马蹄香抗焦虑胶囊主要成分的吸收机理[D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.

[2] 王守勇, 谢 鸣, 王 欣. 酸枣仁汤组分配方对高架十字迷宫大鼠神经肽 Y 及细胞因子的影响[J]. 中成药, 2011, 33(1): 142-145.

[3] 欧阳 臻, 潘璐琳, 汤建明, 等. 阿魏酸、川芎及复方脑得生中阿魏酸在大鼠体内的药动学研究[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 226-228.

[4] 赵 凯, 薛培凤, 屠鹏飞. 肉桂的化学成分及其生物活性研究进展[J]. 内蒙古医科大学学报, 2013, 35(1): 63-74.

[5] 梁晓艳, 郭占京, 罗佩卓, 等. 肉桂的药理作用研究概况[J]. 现代医药卫生, 2013, 29(10): 1501-1503.

[6] 赵志宇, 王卫星, 郭洪祝, 等. 甘草苷对慢性应激抑郁模型大鼠的抗抑郁作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(27): 69-72.

[7] 高雪岩, 王文全, 魏胜利, 等. 甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2695-2700.

[8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 40-41, 86-87, 136-137, 336-337.

[9] 杜 晔, 陈洪英. RP-HPLC 法同时测定柴归消癥胶囊中 6 种成分[J]. 中成药, 2015, 37(11): 2434-2438.

[10] 郭 丽, 贾金艳, 李 霞, 等. RP-HPLC 法同时测定强力天麻杜仲胶囊中 6 种成分[J]. 中成药, 2016, 38(8): 1744-1748.

[11] 黄罗生, 郭健新, 刘咏梅, 等. HPLC 测定阿魏酸含量的探讨[J]. 中成药, 2004, 26(2): 50-52.