

(33:66:1)。

References

- [1] Yan Y H. Simple separation method of geniposide in *Gardenia jasminoides* Ellis [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 4(4): 227-229.
- [2] Wang B Q. *Quality Standard and Standard Substance of Chinese*

nese Traditional Patent Medicine (中成药质量标准与标准物质研究) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1986.

- [3] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [4] Chen F K. *Determination of Active Constituents in Common Chinese Herbal Medicine* (常用中草药有效成分含量测定) [M]. Beijing: Peoples Medical Publishing House, 1997.

HPLC 法定量分析熊胆中胆酸类化合物

朱丽玢¹, 洪筱坤^{2*}

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 上海中医药大学 化学教研室, 上海 201203)

国外常采用离子抑制色谱法^[1,2]和离子对色谱法^[3,4]分别测定结合型胆酸和游离型胆酸来实现胆酸类化合物的分离, 该方法无法一次性测定含胆酸类物质中胆酸类化合物的种类和含量。在洗脱方式上, 因为胆酸类化合物的 UV 检测波长很低 (205 nm), 而洗脱剂又是在该波长下有一定吸收的乙腈、甲醇等溶剂, 因而均采用等梯度洗脱, 这样就无法一次性分离极性相差较大的结合型和游离型胆汁酸。本实验建立了分离胆酸类化合物的双泵双比例反相离子抑制高效液相色谱法, 效果良好。

1 仪器与材料

P-E series 200 pump, 235C 二极管阵列检测器, 1022 plus 工作站。

乙腈 (HPLC 级), 水为市售 Spaklin 纯蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。胆酸 (CA)、脱氧胆酸 (DCA)、脱氢胆酸 (DHCA)、牛磺胆酸 (TCA)、牛磺去氧胆酸 (TDCA)、鹅去氧胆酸 (CDCA)、牛磺鹅去氧胆酸 (TCDCA)、牛磺熊去氧胆酸 (TUDCA) 对照品为 Sigma 产品; 熊去氧胆酸 (UDCA) 由上海医科大学提供。

熊胆样品由国家中药制药工程技术研究中心提供, 经叶愈青教授鉴定为熊科动物黑熊 *Selenarctos tibetanus* Cuvier 的胆囊。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制: 精确称取 CA、DCA、UDCA、CDCA、DHCA、TCA、TDCA、TUDCA、TCDCA 对照品适量, 用甲醇溶解, 配成浓度分别为 2 mg/mL 的单个对照品溶液。再精确称取上述对照品适量, 用甲醇溶解, 配成各组份浓度均为 2 mg/

mL 的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备: 将熊胆风干后研成粉末 (密度约为 1 g/cm³), 精确称取约 100 mg, 加 25 倍体积的甲醇, 混合后超声 15 min, 2 500 r/min 离心 10 min, 吸取上清液置 10 mL 量瓶中, 重复 3 次, 补充甲醇溶液至刻度, 进样前用 4.5 μm 滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 流动相 pH 值的选择: 实验考察了在 pH 2.5~6.0 时混合对照品溶液的分离情况。结果表明: 流动相的 pH 值对各组份的保留时间及分离度的影响是至关重要的。随着流动相 pH 值的降低, 分离效率也越来越好。考虑到柱的承受能力, 本实验选择流动相的 pH 值为 3。

2.4 缓冲溶液浓度的选择: 本实验考察了磷酸盐浓度为 2~50 mmol/L 时混合对照品溶液的分离情况。缓冲溶液浓度的增加提高了各组份的 K 值, 这是由于流动相的离子强度增加的缘故。但各组份的分离度并无明显改进, 为了避免不必要的麻烦 (柱的堵塞), 选用缓冲溶液的浓度为 5 mmol/L。

2.5 流动相组成比例对分离的影响: 首先考察了等梯度分离时的情况。在乙腈含量为 60% 时, TDCA、DHCA、CA、DCA、UDCA、CDCA 6 种组份得到分离, 而 TCA、TUDCA、TCDCA 则混在一起出峰。当乙腈含量为 25% 时, 先洗脱出柱的成分虽然可以分开但极性小的成分由于保留时间过长而引起的区带扩散导致峰形过宽, 甚至未见洗出。而试图采用梯度洗脱时, 基线漂移严重。因而, 考虑采用分级洗脱方式, 首先用低乙腈含量的洗脱剂分离极性大的组份, 再在适当的时候换上高乙腈含量的洗脱剂以使极性

* 收稿日期: 2004-01-25

* 通讯作者

小的成分在保证分离度的情况下得以尽快洗出。实验采用最佳洗脱条件为先用 35% 乙腈洗脱 40 min 后,再换成 73% 乙腈洗脱 40 min。

2.6 色谱条件: 分析柱为 Phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 保护柱为 C₁₈ (40 mm × 4.6 mm, 10 μm) (中国科学院上海药物研究所), 流动相为乙腈-2 mmol/L 磷酸缓冲溶液 (37:63, 洗脱, 40 min; 73:27, 再洗脱 40 min), 体积流量为 1 mL/min, 检测波长为 205 nm, 柱温为室温。

2.7 线性关系的考察: 精确吸取混合对照品溶液 2、5、10、15 和 20 μL 进样, 按照色谱条件测定各组份峰面积值。以峰面积 Y 为纵坐标, 进样量 X 为横坐标, 计算回归方程, 结果见表 1。

表 1 各组份的线性方程 (n = 5)

Table 1 Linear equation of ingredients (n = 5)

组份	方程	线性范围 /μg	相关系数 r
CA	$Y = 4.5835 \times 10^5 X + 9.8806 \times 10^3$	1.79~17.9	0.997 6
DCA	$Y = 9.8376 \times 10^5 X + 4.5590 \times 10^4$	2.28~22.8	0.998 3
DHCA	$Y = 6.2444 \times 10^6 X + 2.7865 \times 10^5$	0.53~5.3	0.994 9
UDCA	$Y = 4.6833 \times 10^5 X - 3.9076 \times 10^5$	4.13~41.3	0.998 4
CDCA	$Y = 1.3270 \times 10^6 X - 6.0894 \times 10^5$	2.37~23.7	0.993 9
TCA	$Y = 3.4764 \times 10^5 X + 4.8832 \times 10^3$	2.25~22.5	0.998 9
TDCA	$Y = 2.1739 \times 10^6 X - 8.7954 \times 10^4$	2.15~21.5	0.999 1
TUDCA	$Y = 1.3898 \times 10^5 X - 9.8529 \times 10^3$	0.27~2.7	0.998 8
TCDCa	$Y = 1.2892 \times 10^5 X + 2.9675 \times 10^4$	2.06~20.6	0.998 5

2.8 稳定性试验: 取混合对照品溶液每隔 30 min 分析一次, 共测 5 次, 测得各组份的峰保留时间和峰面积, 结果的 RSD 见表 2。

表 2 精密度试验结果 (n = 5)

Table 2 Results of precision test (n = 5)

组 份	RSD/%	
	保留时间	峰面积
CA	2.4	3.6
DCA	2.9	4.9
DHCA	1.9	1.3
UDCA	1.8	2.9
CDCA	3.6	1.2
TCA	1.6	1.1
TDCA	2.2	2.8
TUDCA	0.9	2.3
TCDCa	2.8	2.6

2.9 回收率试验: 采用加样回收法。精确称取样品 B 43 mg, 分别精确加入各对照品 2 mg, 一式 5 份, 按照供试品溶液制备方法处理, 最后定容至 2 mL, 在选定的色谱条件下, 每份平行进样 3 次, 进样量 20 μL, 结果见表 3。

2.10 熊胆样品的分析: 对每个样品供试液平行测定 3 次, 结果见表 4。

表 3 回收率试验结果 (n = 5)

Table 3 Results of recovery test (n = 5)

组 份	平均回收率/%	RSD/%
CA	93.46	1.31
DCA	90.38	3.66
DHCA	103.69	2.89
UDCA	98.68	2.93
CDCA	105.02	1.06
TCA	95.15	3.28
TDCA	92.18	2.08
TUDCA	99.86	0.88
TCDCa	104.69	3.15

表 4 熊胆中各组份的测定结果 (n = 3)

Table 4 Results of bile acid ingredients in FelUrsi (n = 3)

样 品	来 源	含 量/%								
		CA	DCA	DHCA	UDCA	CDCA	TCA	TDCA	TUDCA	TCDCa
A	四川阿坝	2.990	0.093	-	-	1.284	-	2.140	30.030	29.80
B	四川阿坝	2.315	1.171	-	-	1.001	2.690	4.030	42.860	9.04
C	四川阿坝	3.616	1.348	-	2.137	1.423	-	1.930	32.160	25.42
D	四川阿坝(吊胆)	4.126	1.374	-	1.925	1.748	-	-	36.830	33.63
E	四川阿坝(偏胆)	4.329	2.065	-	-	2.877	0.820	0.845	52.060	8.48
F	云南	2.518	2.956	-	-	1.672	0.690	1.410	62.890	7.66

3 讨论

3.1 TUDCA 是熊胆的特征成分, 但在 6 个熊胆样品中含量差异较大, 其中样品 F 中含量最大。引流熊胆所含胆汁酸成分及其含量在各地熊胆中无明显差异。从外观上比较颜色深的熊胆所含胆汁酸成分比较复杂, 如样品 D、E 及引流熊胆 A。其结合型胆汁酸的含量较颜色浅的 B、C、F 样品少而非结合型胆汁酸含量则较高。文献报道中品质最优的云胆 F 样品中 TUDCA 的含量最高, 而其他类型胆汁酸的含量均很少。因此, 仅就胆汁酸组份而言, 质优的熊胆即意味着所含胆汁酸组份单一 TUDCA 量高。

3.2 目前尚无便于广泛推广应用的分离分析熊胆中胆汁酸的方法。气相色谱法不能直接分析结合型胆汁酸, 必须将结合型胆汁酸预先用碱液水解成游离胆汁酸, 衍生化后再进行气相色谱分析^[8], 因而比较繁琐; 薄层色谱多数采用硅胶薄层, 方法简便, 但分离效率低, 无法区分 TUDCA 与 TCDCa 等^[4]; 液相色谱法在分析中将胆汁酸的羧基酯化, 同时引入具有紫外吸收的基团, 需要衍生, 只适用于游离型胆汁酸与甘氨酸结合型胆汁酸的分离, 不适用于分离牛磺酸型胆汁酸, 还存在反应液中的副产物无法去除, 石胆酸的归属很难确定等缺点^[1,3,5], 利用固定相化酶作检测器的液相色谱法须将 3α-羟基甾体氧化酶作成固相化酶引入到液相色谱系统中去, 制作难度高, 不利于推广^[6]。张启明等采用 HPLC 法直接测定结合型胆汁酸的含量, 方法简便易行。但只能

测定熊胆中结合型的胆汁酸^[7]。

3.3 本法首次在常规条件下一性分离9种结合及游离型胆汁酸,仅基线在改变洗脱溶剂比例时会抬高,但总的来说并不影响其定量的可靠性。

References

- [1] Muraca M, Ghoo Y. Glyco-7 α -dihydroxy-5 β -cholic acid as internal standard for high-pressure liquid chromatographic analysis of conjugated bile acids [J]. *J Lipid Res*, 1985, 26: 1009-1011.
- [2] Ghoo Y, Rutgeerts P, Vantrappen G. Tauro-7 α , 12 α -dihydroxy-5 β -cholic acid as internal standard in the gas-liquid chromatographic analysis of bile acid methyl ester acetates [J]. *J Lipid Res*, 1983, 24: 1376-1379.
- [3] Zeng W G, Tian S J, Tu G S. Analysis of bile acids by HPLC

- [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1989, 9(5): 284.
- [4] Hofmann A. Thin-layer adsorption chromatography of free and conjugated bile acids on silic acid [J]. *J Lipid Res*, 1962, 3: 127-128.
- [5] Nakayama F, Nakagaki M. Quantitative determination of bile acids in bile with reverse-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1980, 183: 287-291.
- [6] Reid A D, Baker P R. High performance liquid chromatography of bile acids with a reversed-phase radial compression column [J]. *J Chromatogr*, 1982, 247: 149-156.
- [7] Zhang Q M, Yuan H N. Determination of conjugated bile acids in *Fel Ursi* by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1993, 13(5): 321-323.
- [8] Patrick P H, Elliott W H. Analysis of bile acids in seerols by high-performance liquid chromatography with a microbore column [J]. *J Chromatogr*, 1985, 347: 155-162.

RP-HPLC 法测定芪参胶囊中丹参酮 II_A 的含量

李 钦^{1,2}, 韩 光^{1,2}, 许启太¹, 贾天柱², 程铁峰^{1*}

(1. 河南大学药学院, 河南 开封 475001; 2. 辽宁中医学院, 辽宁 沈阳 110032)

芪参胶囊主要由黄芪、丹参、人参、茯苓、三七、玄参、水蛭等组成, 具有益气活血、化瘀止痛功效, 用于冠心病稳定型心绞痛证属气虚血瘀者。丹参为主要君药, 主要成分为丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参素、原儿茶醛等, 其中丹参酮 II_A 为主要活性成分。丹参酮 II_A 的测定方法有高效液相色谱法^[1~3]、超临界流体萃取联用毛细管气相色谱法^[4]等。芪参胶囊质量标准中采用薄层扫描法测定丹参酮 II_A 的含量。为了提高其标准, 本实验采用 HPLC 法测定丹参酮 II_A 的含量, 结果符合有关规定, 可用于该制剂的质量控制。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10A 液相色谱仪, CR-3A 记录仪, SPD-10A V 检测器, SIL-10A 自动进样器。

丹参酮 II_A 对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 0766-9909, 供含量测定用), 甲醇、乙腈为色谱纯, 水为重蒸馏水。芪参胶囊由新谊医药集团生产, 规格: 0.5 g/粒, 批号: 20031012、20031015、20031018)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Shim pack CLC-ODS (150 mm × 6.0 mm); 柱温: 40 °C; 流动相: 甲醇-乙腈-水 (35 : 40 : 25); 体积流量: 1.0 mL/min; 检测波长:

270 nm。在上述色谱条件下, 丹参酮 II_A 峰的保留时间约为 18.6 min, 与共存的其他成分分离良好, 以丹参酮 II_A 峰计算色谱柱的理论板数为 6 263。

2.2 对照品溶液制备: 精密称取丹参酮 II_A 对照品适量, 加甲醇溶解, 制成每 4 μg/mL 的溶液, 置棕色量瓶中备用。

2.3 供试品溶液制备: 取本品装量差异项下内容物, 研细, 精密称取 3 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称重, 超声处理(功率 250 W, 频率 33 kHz) 20 min, 取出, 放冷, 称重, 补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 溶液置棕色瓶中备用。

2.4 空白试验: 按处方比例及工艺自制不含丹参的阴性样品, 按供试品溶液的制备方法处理, 进样。结果处方中其他药材和辅料不干扰测定, 见图 1。

2.5 线性关系的考察: 精密称取丹参酮 II_A 对照品 10.50 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密吸取 1 mL 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成 0.004 2 μg/mL 的溶液。分别精密吸取 3、5、7、9、11 μL 溶液进样, 测定色谱峰面积。以进样量为横坐标, 色谱峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归得回归方程: $Y = 1\,022\,773.81 X - 8\,525.15$, $r = 0.999\,9$ 。结果表明丹参酮 II_A 在

* 收稿日期: 2004-03-27

作者简介: 李 钦(1965—), 男, 河南中牟人, 博士研究生, 副教授, 研究方向为中药质量标准及炮制工艺。

Tel: (0378) 5956970 E-mail: liqin@henu.edu.cn