

HPLC 同时测定通脉颗粒中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、阿魏酸和葛根素的含量

鲁晓光¹, 陈星¹, 李军², 孙云峰² (1.河南省南阳市食品药品监督管理局, 河南 南阳 473061; 2.辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110847)

摘要:目的 建立通脉颗粒中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、阿魏酸和葛根素的 HPLC 测定方法。方法 采用 Welch Ultimate XD-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%三氟乙酸为流动相, 梯度洗脱, 双波长检测(282, 305 nm), 柱温 35 °C, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果 丹参素、丹酚酸 B、原儿茶醛、葛根素和阿魏酸的线性范围分别为 3.117~62.33 μg·mL⁻¹ ($r=0.9987$), 4.044~80.88 μg·mL⁻¹ ($r=0.9985$), 1.280~25.60 μg·mL⁻¹ ($r=0.9979$), 7.964~159.3 μg·mL⁻¹ ($r=0.9928$), 1.980~39.60 μg·mL⁻¹ ($r=0.9991$); 平均回收率分别为 101.6%(RSD=1.62%), 99.7%(RSD=1.76%), 97.4%(RSD=1.19%), 99.9%(RSD=1.52%), 102.2%(RSD=1.56%)。结论 该方法操作简便、快速, 结果准确, 可用于通脉颗粒的质量控制。

关键词: 丹参素; 原儿茶醛; 丹酚酸 B; 阿魏酸; 葛根素; 通脉颗粒; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)10-1373-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.10.003

引用本文: 鲁晓光, 陈星, 李军, 等. HPLC 同时测定通脉颗粒中丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、阿魏酸和葛根素的含量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(10): 1373-1376.

Simultaneous Determination of Tanshinol, Protocatechualdehyde, Salvianolic Acid B, Ferulic Acid and Puerarin in Tongmai Particles by HPLC

LU Xiaoguang¹, CHEN Xing¹, LI Jun², SUN Yunfeng² (1.Nanyang Institute for Food and Drug Control, Nanyang 473061, China; 2.Basic Medical College of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the simultaneous determination of tanshinol, protocatechualdehyde, salvianolic acid B, ferulic acid and puerarin in Tongmai particle by HPLC. **METHODS** The Welch Ultimate XD-C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-0.1% trifluoroacetic acid in gradient mode. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ with UV detection wavelength at 282 nm and 305 nm. The column temperature was maintained at 35 °C. **RESULTS** The linear ranges of tanshinol, salvianolic acid B, protocatechualdehyde, puerarin and ferulic acid were in the range of 3.117~62.33 μg·mL⁻¹ ($r=0.9987$), 4.044~80.88 μg·mL⁻¹ ($r=0.9985$), 1.280~25.60 μg·mL⁻¹ ($r=0.9979$), 7.964~159.3 μg·mL⁻¹ ($r=0.9928$), 1.980~39.60 μg·mL⁻¹ ($r=0.9991$) with average recoveries of 101.6%(RSD=1.62%), 99.7%(RSD=1.76%), 97.4%(RSD=1.19%), 99.9%(RSD=1.52%), 102.2%(RSD=1.56%), respectively. **CONCLUSION** This method is simple, fast and accurate, which is suitable for quality control of Tongmai particles.

KEY WORDS: tanshinol; protocatechualdehyde; salvianolic acid B; ferulic acid; puerarin; Tongmai particles; HPLC

通脉颗粒系临床常用药, 具有活血通脉之功效, 用于缺血性心脑血管疾病、动脉硬化、脑血栓、脑缺血、冠心病、心绞痛等病症。处方由丹参^[1]、川芎、葛根 3 味药材组成。其中丹参主要含有水溶性的丹参酚酸类和脂溶性的二萜类成分。近年来研究表明, 丹参水溶性成分原儿茶醛、丹参素、丹酚酸 B 的扩张心脑血管作用较二萜醌类的丹参酮更强, 是抗心肌缺血的主要成分。川芎含有生物碱类、酚酸类和苯酞类成分, 其酚酸类成分阿魏酸能增加冠脉血流量, 保护缺血心肌, 有利于改善心肌对氧的供需失衡, 还具有抗血小

板聚集作用。葛根含有异黄酮类成分葛根素, 具有活血化瘀、改善微循环、扩张冠状动脉和脑血管、降低心肌耗氧量等作用。通脉颗粒在国内有 50 余家企业生产, 质量标准有 20 余个, 但是其仅对单一成分的含量进行测定, 而目前关于通脉颗粒的报道^[2-12]也未见同时对制剂处方中所有药材中主要有效成分丹参素、原儿茶醛、葛根素、阿魏酸、丹酚酸 B 进行含量测定方法的报道。为了更简便、全面地对通脉颗粒进行质量评价, 本实验建立了 HPLC 含量测定方法, 为更有效地进行通脉颗粒质量评价提供参考。

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助项目(2015M570257)

作者简介: 鲁晓光, 男, 主管药师 Tel: 13633997151 E-mail: 87931473@qq.com

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695-2996 高效色谱系统(美国 Waters 公司, 包括四元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器); SB3200 超声波清洗器(美国必能信超声有限公司); XS205 分析天平(瑞士梅特勒-托利多集团)。

1.2 试剂与试剂

丹参素钠(批号: 110855-200508, 纯度: 99.5%)、原儿茶醛(批号: 110810-201007, 纯度: 98.2%)、丹酚酸 B(批号: 111562-201615, 纯度: 96.2%)、阿魏酸(批号: 110773-201614, 纯度: 99.1%)和葛根素(批号: 110752-201313, 纯度: 95.5%)均购自中国食品药品检定研究院; 通脉颗粒(南阳市食品药品监督管理局委托仲景宛西制药股份有限公司制备, 批号: 160301, 160302, 160303, 160401, 160402, 160403, 规格: 每袋 10 g); 乙腈(色谱纯, 美国天地有限公司); 甲醇、三氟乙酸均为分析纯(国药集团化学试剂北京有限公司); 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Welch Ultimate XD-C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%三氟乙酸(B), 梯度洗脱(0~20 min, 5%A; 20~30 min, 5%→9%A; 30~60 min, 9%A; 60~80 min, 9%→22%A; 80~110 min, 22%A); 体积流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35 ℃; 检测波长: 282 nm(丹参素、原儿茶醛), 305 nm(丹酚酸 B、阿魏酸、葛根素); 进样量: 10 μL。

2.2 混合对照品溶液

精密称取丹参素钠(按分子量转换成丹参素)、丹酚酸 B、原儿茶醛、阿魏酸和葛根素对照品 16.98, 10.51, 13.05, 9.99, 20.85 mg, 分别置 50, 50, 100, 50, 50 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储存液, 再分别精密吸取 10, 20, 10, 10, 20 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液, 即制成浓度分别为 31.166 7, 40.442 5, 12.80 2, 19.800 2 和 79.647 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液

取通脉颗粒, 研细, 精密称取 0.5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70%甲醇溶液 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 40 kHz)

3 min, 放冷, 再称定质量, 用 70%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.4 阴性样品溶液

按通脉颗粒处方制得分别不含丹参、葛根和川芎的样品, 按“2.3”项下方法分别制备成不含丹参的阴性样品溶液、不含葛根的阴性样品溶液和不含川芎的阴性样品溶液。

2.5 专属性试验

取混合对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各适量, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 记录色谱图, 见图 1, 结果丹参素、原儿茶醛、葛根素、阿魏酸和丹酚酸 B 的色谱峰保留时间分别为 11.9, 22.4, 51.3, 70.8 和 95.2 min 左右, 理论板数均>5 000, 各成分互不干扰, 阴性样品溶液 1~3 对测定无干扰。

2.6 线性关系考察

按“2.1”项下色谱条件进样分析, 设定混合对照品溶液进样体积分别为 1.0, 3.0, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 和 20.0 μL。以组分浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 进行线性回归。结果丹参素、丹酚酸 B、原儿茶醛、葛根素和阿魏酸的线性回归方程分别为 $Y=7\ 280.5X-7\ 025.8(r=0.998\ 7)$, $Y=10\ 995.4X-116\ 64.1(r=0.998\ 5)$, $Y=44\ 143.1X-28\ 312.6(r=0.997\ 9)$, $Y=17\ 916.6X-82\ 458.8(r=0.982\ 8)$; $Y=43\ 293.4X-30\ 741.5(r=0.999\ 1)$; 分别在 3.117~62.33, 4.044~80.88, 1.280~25.60, 7.964~159.3, 1.980~39.60 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.7 仪器精密度试验

精密吸取混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 测得丹参素、丹酚酸 B、原儿茶醛、葛根素和阿魏酸的峰面积及其保留时间, 计算 RSD, 其峰面积 RSD 分别为 1.48%, 1.77%, 1.14%, 0.89%, 1.49%, 保留时间 RSD 分别为 0.72%, 0.48%, 0.36%, 0.51%, 0.63%, 结果表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

精密吸取供试品溶液(批号: 160301), 分别按“2.1”项下色谱条件, 在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 重复进样, 记录丹参素、丹酚酸 B、原儿茶醛、葛根素和阿魏酸的峰面积, 测得其 RSD 分别为 0.97%, 1.81%, 1.23%, 0.52%和 1.26%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

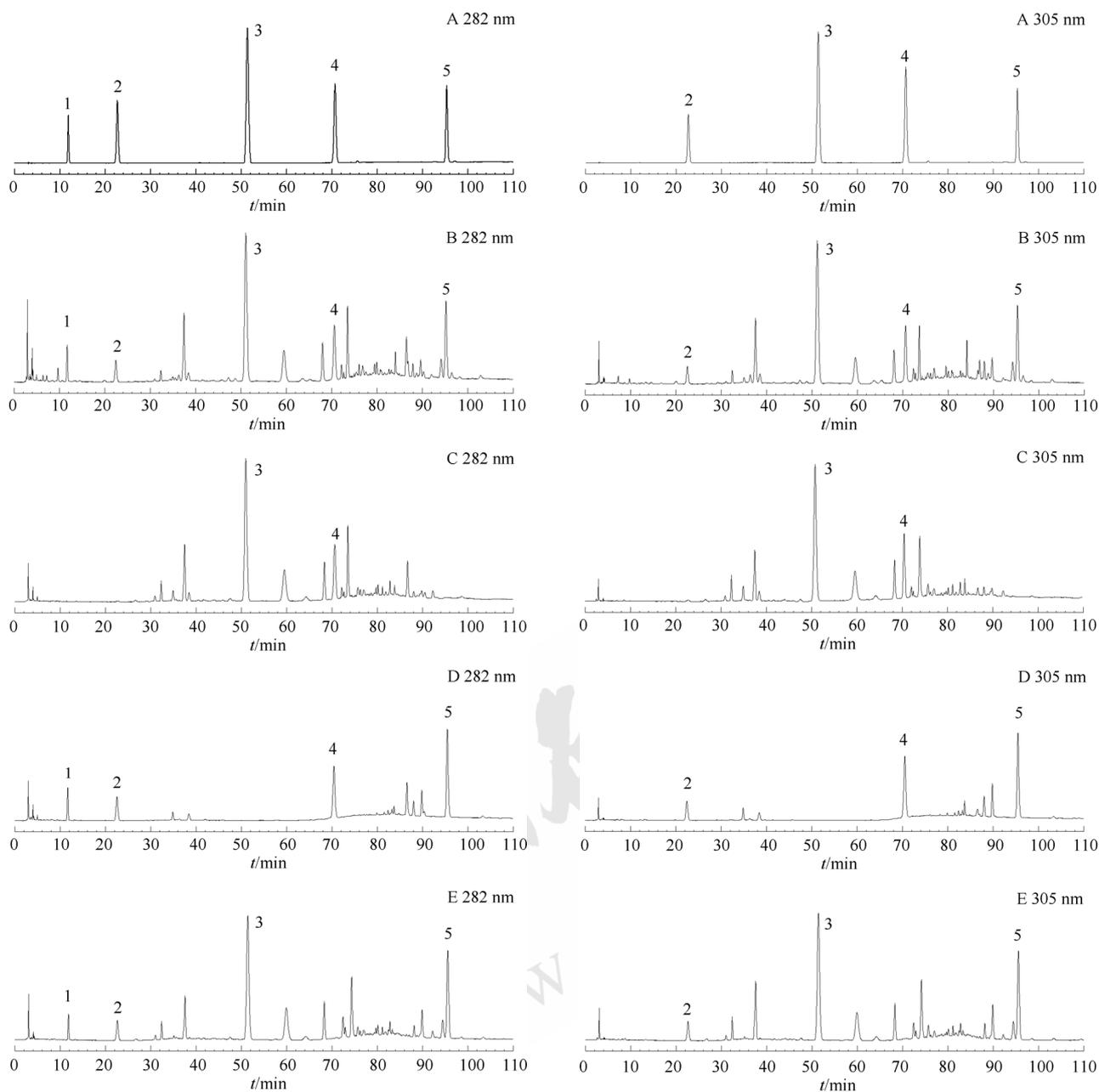


图1 高效液相色谱图

A-混合对照品; B-样品; C-缺丹参的阴性样品; D-缺葛根的阴性样品; E-缺川芎的阴性样品; 1-丹参素; 2-原儿茶醛; 3-葛根素; 4-阿魏酸; 5-丹酚酸 B。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-mixture reference substance; B-sample; C-negative sample without *Salvia miltiorrhiza*; D-negative sample without *Puerariae Radix*; E-negative sample without *Ligusticum chuanxiong* Hort; 1-tanshinol; 2-protocatechualdehyde; 3-puerarin; 4-ferulic acid; 5-salvianolic acid B.

2.9 重复性试验

取同一批号样品(批号: 160301), 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 测得其峰面积 RSD 分别为 1.73%, 1.77%, 1.54%, 0.89%和 1.12%, 结果表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取已知含量的样品(批号: 160301)6 份, 每份

约 0.25 g。置具塞锥形瓶中, 每 2 份样品中分别精密加入混有一定量的混合对照品溶液(精密量取丹参素、丹酚酸 B、原儿茶醛、葛根素和阿魏酸对照品储存溶液各 5, 10, 2, 10, 3 mL, 置 50, 100, 200 mL 量瓶中, 加入甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀)25 mL, 按“2.3”项下方法制成供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条分别测定。计算平均回收率, 结果见表 1。

表 1 加样回收率实验结果(n=6)

Tab. 1 Results of recovery test(n=6)

| 组分 | 样品含量/mg | 加入量/mg | 测得量/mg | 回收率/% | 平均回收率/% | RSD/% |
|-------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| 丹参素 | 0.282 4 | 0.155 8 | 0.433 2 | 0.988 6 | 101.6 | 1.62 |
| | 0.294 9 | 0.155 8 | 0.453 9 | 1.007 1 | | |
| | 0.292 3 | 0.233 8 | 0.540 2 | 1.026 8 | | |
| | 0.295 7 | 0.233 8 | 0.547 5 | 1.034 0 | | |
| | 0.285 5 | 0.311 7 | 0.606 5 | 1.015 7 | | |
| | 0.280 1 | 0.311 7 | 0.606 2 | 1.024 3 | | |
| 丹酚酸 B | 0.614 0 | 0.252 8 | 0.877 5 | 1.012 3 | 99.7 | 1.76 |
| | 0.641 0 | 0.252 8 | 0.869 5 | 0.972 8 | | |
| | 0.635 5 | 0.505 5 | 1.138 3 | 0.997 6 | | |
| | 0.642 8 | 0.505 5 | 1.172 7 | 1.021 2 | | |
| | 0.620 8 | 0.758 3 | 1.367 2 | 0.991 4 | | |
| | 0.609 0 | 0.758 3 | 1.350 3 | 0.987 6 | | |
| 原儿茶醛 | 0.049 1 | 0.064 1 | 0.110 4 | 0.975 3 | 97.4 | 1.19 |
| | 0.051 3 | 0.064 1 | 0.113 2 | 0.980 9 | | |
| | 0.050 8 | 0.096 1 | 0.145 6 | 0.991 2 | | |
| | 0.051 4 | 0.096 1 | 0.142 6 | 0.966 8 | | |
| | 0.049 7 | 0.128 2 | 0.170 4 | 0.957 8 | | |
| | 0.048 7 | 0.128 2 | 0.171 8 | 0.971 2 | | |
| 葛根素 | 1.215 7 | 0.497 8 | 1.696 5 | 0.990 1 | 99.9 | 1.52 |
| | 1.269 2 | 0.497 8 | 1.738 2 | 0.983 7 | | |
| | 1.258 3 | 0.995 6 | 2.276 6 | 1.010 1 | | |
| | 1.272 6 | 0.995 6 | 2.272 3 | 1.001 8 | | |
| | 1.229 1 | 1.493 4 | 2.782 1 | 1.021 9 | | |
| | 1.205 8 | 1.493 4 | 2.660 0 | 0.985 5 | | |
| 阿魏酸 | 0.093 3 | 0.099 0 | 0.194 8 | 1.013 0 | 102.2 | 1.56 |
| | 0.097 4 | 0.099 0 | 0.196 3 | 0.999 5 | | |
| | 0.096 6 | 0.148 5 | 0.252 1 | 1.028 6 | | |
| | 0.097 7 | 0.148 5 | 0.250 6 | 1.017 9 | | |
| | 0.094 4 | 0.198 0 | 0.299 6 | 1.024 6 | | |
| | 0.092 6 | 0.198 0 | 0.304 1 | 1.046 5 | | |

2.11 样品含量测定

精密称取 6 批样品(批号: 160301, 160302, 160303, 160401, 160402, 160403), 按“2.3”项下方法制成供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样。照外标法(峰面积)计算含量, 结果见表 2。

表 2 样品含量测定结果(n=3)

Tab. 2 Results of content determination of samples(n=3)

| 批次 | 含量/mg·g ⁻¹ | | | | |
|--------|-----------------------|-------|------|------|------|
| | 丹参素 | 丹酚酸 B | 原儿茶醛 | 葛根素 | 阿魏酸 |
| 160301 | 1.15 | 2.50 | 0.20 | 4.95 | 0.38 |
| 160302 | 1.24 | 2.77 | 0.22 | 4.60 | 0.39 |
| 160303 | 1.02 | 2.35 | 0.18 | 4.73 | 0.38 |
| 160401 | 1.45 | 2.86 | 0.24 | 4.89 | 0.40 |
| 160402 | 1.28 | 2.61 | 0.25 | 4.85 | 0.38 |
| 160403 | 1.37 | 2.44 | 0.27 | 4.79 | 0.34 |

3 讨论

通过 DAD 在 190~400 nm 全波长扫描得知, 丹参素最大吸收峰波长为 282 nm, 原儿茶醛最大吸收峰波长为 207, 230, 282, 310 nm, 葛根素最大吸收峰波长为 249, 305 nm, 阿魏酸最大吸收峰波长为 221, 236, 322 nm, 丹酚酸 B 最大吸收峰

波长为 286 nm, 经综合考虑: 阿魏酸 301~307 nm 波长有比较好的吸收值, 而丹酚酸 B 在 303~308 nm 波长也有比较好的吸收值, 所以选择丹参素、原儿茶醛紫外检测波长为 282 nm, 丹酚酸 B、阿魏酸、葛根素紫外检测波长为 305 nm。

本实验经查询相关资料, 选定甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、70%乙醇、50%乙醇 6 种溶液, 超声和回流 2 种方式, 10, 20, 30, 40, 50 min 5 个时间段, 实验结果显示, 采用 70%甲醇溶液提取各组份含量相对较高, 超声比回流提取各组份含量相对较高, 提取时间在 30 min 后无明显增加。综上考虑, 选择 70%甲醇溶液超声 30 min 作为供试品溶液的制备方法。

分别考察了甲醇-1%冰乙酸梯度洗脱系统、乙腈-1%冰乙酸梯度洗脱系统、乙腈-0.02%磷酸梯度洗脱系统、乙腈-0.1%甲酸梯度洗脱系统、乙腈-0.1%三氟乙酸梯度洗脱系统, 实验结果显示, 乙腈-0.1%三氟乙酸梯度洗脱系统分离效果最佳, 遂选择此流动相。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2015: 40, 76, 333.
- [2] YU L R, HE X Y, HUANG Y R. Simultaneous determination of paeoniflorin, salvianolic acid B and hydroxysafflor yellow A in Guanxinkang granules by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2015, 32(5): 561-564.
- [3] LI B J, XIANG C, YANG X W, et al. Fingerprints of Tongmai Keli by HPLC-DAD-MS [J]. Acta Pharm Sin(药理学学报), 2010, 245(11): 1410-1414.
- [4] CUI X B, ZHANG K W, CHI Y M, et al. Determination of content of kakkonein and ferulic acid in Tongmai granule with double-wavelength gradient elution [J]. Acta Acad Med Nanjing(南京中医药大学学报), 2005, 21(2): 125-126.
- [5] PAN Y. Simultaneous determination of Danshensu, ferulic acid and puerarin in Tongmai granules by HPLC [J]. China Pharm(中国药房), 2011, 22(4): 376-378.
- [6] QIN W. Determination of puerarin contents in Tongmai granules by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2005, 14(7): 38-39.
- [7] XIAO X H, LIU X L, SUO Z R, et al. RP-HPLC-ECD determination of 3 compounds in Tongmai granules [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(12): 1924-1927.
- [8] 蒋万浪, 袁祥慧. 高效液相色谱法测定通脉颗粒中丹酚酸 B 含量[J]. 中国药业, 2006, 15(18): 27.
- [9] 郭宇洁, 孟硕, 徐辉, 等. 通脉颗粒的定性定量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(11): 13-15.
- [10] 李君海, 徐建, 杨波, 等. RP-HPLC 法测定通脉颗粒中葛根素的含量[J]. 长春中医药大学学报, 2012, 28(1): 152-153.
- [11] YANG Y, LIU X, LUO X J, et al. Study on quality standard of Tongmai granules [J]. Drug Standards Chin, 2006, 7(2): 52-54.
- [12] 赵磊, 余晓晖, 武晓玉, 等. 通脉颗粒质量控制方法的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2008, 28(8): 664-665.

收稿日期: 2017-05-08

(本文责编: 曹粤锋)