

HPLC 法测定糖痹通络颗粒中原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、 β -蜕皮激素和络石苷

俞凡, 王一清, 戴国梁, 严倩华, 曹阳, 余江毅*

南京中医药大学附属医院(江苏省中医院), 江苏 南京 210029

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定糖痹通络颗粒中原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、 β -蜕皮激素、络石苷。**方法** 采用 ACE 5 C₁₈-AR 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 检测波长 260 nm (原儿茶酸、 β -蜕皮激素)、280 nm (对香豆酸、阿魏酸、络石苷)、360 nm (羟基红花黄色素 A); 体积流量 1 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}$ C; 进样量 5 μ L。**结果** 原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、 β -蜕皮激素、络石苷在各自线性范围内线性关系良好($r \geq 0.9995$), 平均加样回收率分别为 103.63%、96.93%、103.18%、97.09%、102.38%、100.08%, RSD 值分别为 1.01%、0.88%、1.27%、0.90%、1.35%、1.05%。**结论** 该方法简单准确、稳定可靠、重复性好, 可用于糖痹通络颗粒的质量控制。

关键词: 糖痹通络颗粒; 原儿茶酸; 羟基红花黄色素 A; 对香豆酸; 阿魏酸; β -蜕皮激素; 络石苷; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)12-2980-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.12.010

Determination of protocatechuic acid, hydroxysafflor yellow A, *p*-coumaric acid, ferulic acid, β -ecdysterone, and tracheloside in Tangbi Tongluo Granules by HPLC

YU Fan, WANG Yi-qing, DAI Guo-liang, YAN Qian-hua, CAO Yang, YU Jiang-yi

The Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine (Jiangsu Hospital of Chinese Medicine), Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the simultaneous determination of protocatechuic acid, hydroxysafflor yellow A, *p*-coumaric acid, erulic acid, β -ecdysterone, and tracheloside in Tangbi Tongluo Granules. **Methods** The analysis was performed on ACE 5 C₁₈-AR column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m). The mobile phase was acetonitrile - 0.1% phosphoric acid solution with gradient elution. The detection wavelength was set at 260 nm (protocatechuic acid and β -ecdysterone), 280 nm (*p*-coumaric acid, ferulic acid, and tracheloside), 360 nm (hydroxysafflor yellow A). The flow rate was 1.0 mL/min, temperature of column was set at 40 $^{\circ}$ C, and the volume of injection was 5 μ L. **Results** Protocatechuic acid, hydroxysafflor yellow A, *p*-coumaric acid, erulic acid, β -ecdysterone, and tracheloside showed good linear relationships within their respective linear ranges ($r \geq 0.9995$), whose average recoveries were 103.63%, 96.93%, 103.18%, 97.09%, 102.38%, and 100.08% with RSD values of 1.01%, 0.88%, 1.27%, 0.90%, 1.35%, and 1.05%, respectively. **Conclusion** The method is simple accurate, stable reliable, and repeatable, which can be used to control the quality of Tangbi Tongluo Granules.

Key words: Tangbi Tongluo Granules; protocatechuic acid; hydroxysafflor yellow A; *p*-coumaric acid; ferulic acid; β -ecdysterone; tracheloside; HPLC

糖痹通络方由石斛、牛膝、鸡血藤、络石藤、钩藤、川芎、当归、地龙、红花组成, 已在江苏省中医院内分泌科临床使用多年, 治疗糖尿病周围神

经病变的效果显著。内分泌科已将此方剂申请成为院内制剂, 委托制剂部制成颗粒剂, 便于患者服用。方中石斛益胃生津、滋阴清热, 牛膝散瘀血、消痈

收稿日期: 2023-09-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82174293, 81774117); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(82004286); 江苏省中医药科技发展计划项目(ZD202208); 江苏省中医药科技发展计划项目(ZT202206)

作者简介: 俞凡(1993—), 女, 江苏南京人, 主管中药师, 研究生在读, 从事中药效应与安全性评价。E-mail: 1904055535@qq.com

***通信作者:** 余江毅, 男, 主任中医师, 教授, 博士生导师, 研究方向为糖尿病及其并发症的防治。E-mail: yujiangyi2007@163.com

肿、补肝肾、强筋骨，钩藤清热平肝、息风定惊，鸡血藤、络石藤活血通络，川芎、当归、地龙、红花活血行气通络止痛。根据《中国药典》2020 年版一部和相关研究报道^[1-6]，络石苷、阿魏酸、 β -蜕皮激素、羟基红花黄色素 A 分别是络石藤、当归和川芎、牛膝、红花中含量测定的指标性成分，而原儿茶酸经常用于鸡血藤的含量测定，作为鸡血藤药材质量控制的重要成分^[7]。对香豆酸是红花中重要组成成分，经常作为红花的质量控制成分^[8]，此外，对香豆酸也存在于当归、铁皮石斛中^[9-10]；现代药理研究表明，对香豆酸具有清除自由基、抑制脂质过氧化、抗炎、预防和改善糖尿病、神经保护作用^[11]。本实验采用 HPLC 法同时测定糖痹通络颗粒中原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、 β -蜕皮激素、络石苷，为完善糖痹通络颗粒的质量控制标准提供参考。

1 材料

Agilent HP 1100 型高效液相色谱系统，配有 Chem Station A.10.02 色谱工作站；CPA225D 电子天平；Millipore Q-A10 型超纯水仪；Thermomicro17 型高速冷冻离心机；KH5200E 超声波清洗机；WH-2 微型旋涡混合仪。

糖痹通络颗粒样品由江苏省中医院制剂部提供，规格 12 g/袋，批号分别为 210922、210923、210924；原儿茶酸（批号 MUST-22041413，质量分数 99.87%）、羟基红花黄色素 A（批号 MUST-22062311，质量分数 99.82%）、对香豆酸（批号 MUST-22050303，质量分数 99.96%）、阿魏酸（批号 MUST-22052411，质量分数 99.96%）、 β -蜕皮激素（批号 MUST-22061107，质量分数 99.12%）、络石苷（批号 MUST-22061312，质量分数 98.46%）对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 ACE 5 C₁₈-AR 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 μ m）；流动相乙腈（A）-0.1%磷酸水溶液（B），梯度洗脱（0~5 min，5%~8% A；5~8 min，8% A；8~10 min，8%~9% A；10~15 min，9%~10% A；15~20 min，10%~12% A；20~30 min，12%~18% A；30~32 min，18% A；32~37 min，18%~20% A；37~45 min，20%~25% A；45~50 min，25%~30% A；50~55 min，30%~40% A；55~60 min，

40%~60% A；60~62 min，60%~5% A）；检测波长 260 nm（原儿茶酸、 β -蜕皮激素）、280 nm（对香豆酸、阿魏酸、络石苷）、360 nm（羟基红花黄色素 A）；体积流量 1 mL/min；柱温 40 $^{\circ}$ C；进样量 5 μ L。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、 β -蜕皮激素、络石苷对照品适量，加甲醇配制成质量浓度分别为 1.07、0.93、1.18、1.07、1.13、1.20 mg/mL 的贮备液，再分别吸取上述对照品储备液适量，加 50%甲醇溶液定容并制成质量浓度分别为 21.4、55.8、47.2、64.2、79.1、192.0 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取 2 g 糖痹通络颗粒，加入 10 mL 甲醇，混合均匀，超声 30 min，12 000 r/min 离心 10 min，取 500 μ L 上清液，加入 500 μ L 纯水，涡旋 30 s，再 12 000 r/min 离心 10 min，取 200 μ L 上清液放入进样瓶内衬管中，即得。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按照糖痹通络颗粒的处方和工艺，分别制备缺络石藤、红花、牛膝的阴性样品，按照供试品溶液的制备项下方法制得各阴性样品溶液。

2.3 专属性试验

取糖痹通络颗粒供试品、混合对照品溶液、各阴性样品溶液，进样测定，结果见图 1。可见原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、 β -蜕皮激素、络石苷的保留时间分别为 8.75、20.78、25.81、30.71、33.93、45.90 min，各成分在对应位置无干扰。

2.4 线性关系考察

精密吸取对照品溶液，50%甲醇依次稀释 2、4、8、16、32 倍，进样测定。以各成分的质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标进行回归，结果见表 1。可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液，连续进样 6 次，测定峰面积孩子，计算得原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、 β -蜕皮激素、络石苷峰面积的 RSD 值分别为 0.84%、1.28%、1.18%、1.37%、1.00%、1.14%。

2.6 稳定性试验

精密称取批号 210922 的糖痹通络颗粒 2 g，制备供试品溶液，常温下放置，在 0、2、4、6、8、12、24 h 分别测定峰面积，计算得原儿茶酸、羟基

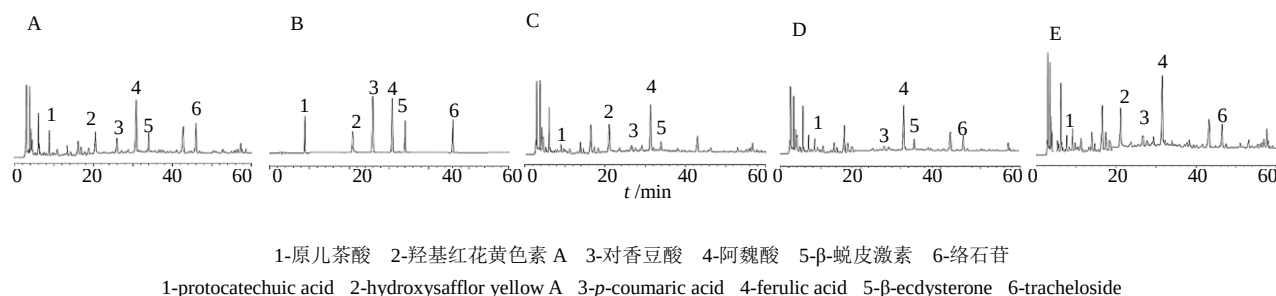


图 1 糖痹通络颗粒 (A)、混合对照品 (B)、缺络石藤阴性样品 (C)、缺红花阴性样品 (D) 和缺牛膝阴性样品 (E) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of Tangbi Tongluo Granules (A), mixed reference substances (B), negative sample without *Trachelospermi Caulis* (C), negative sample without *Carthamii Flos* (D), negative sample without *Achyranthis Bidentatae Radix* (E)

表 1 各成分线性关系

Table 1 linear relationships of various components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
原儿茶酸	$Y=15.474\ 0\ X+1.178\ 1$	0.999 8	0.67~21.40
羟基红花黄色素 A	$Y=7.749\ 6\ X-2.057\ 7$	0.999 5	1.74~55.80
对香豆酸	$Y=22.634\ 0\ X+2.940\ 8$	0.999 9	1.48~47.20
阿魏酸	$Y=15.074\ 0\ X-0.182\ 6$	0.999 9	2.01~64.20
β-蜕皮激素	$Y=4.383\ 4\ X+1.196\ 5$	0.999 9	2.47~79.10
络石苷	$Y=2.652\ 8\ X+2.220\ 9$	0.999 9	6.00~192.00

红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、β-蜕皮激素、络石苷峰面积的 RSD 值分别为 1.53%、1.75%、1.69%、1.97%、1.18%、0.83%，表明供试品溶液中各成分在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

精密称取批号 210922 的糖痹通络颗粒 6 份，制备供试品溶液，进样测定峰面积，计算得原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、β-蜕皮激素、络石苷质量分数的 RSD 值分别为 1.82%、1.54%、1.13%、1.86%、1.63%、0.90%。

2.8 回收率试验

精密称取批号 210922 的糖痹通络颗粒样品 6 份，各约 1 g，分别加入原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、β-蜕皮激素、络石苷对照品 0.064 2、0.230 4、0.047 2、0.226 8、0.159 6、0.673 2 mg，制备供试品溶液，进样，根据测得的结果计算回收率。结果显示原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、β-蜕皮激素、络石苷的平均加样回收率分别为 103.63%、96.93%、103.18%、97.09%、102.38%、100.08%，RSD 值分别为 1.01%、0.88%、1.27%、0.90%、1.35%、1.05%。

2.9 样品测定

精密称取不同批次糖痹通络颗粒 2 g，制备供试品溶液，进样测定，平行 3 次，标准曲线法计算其中原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、β-蜕皮激素、络石苷质量分数，结果见表 2。

3 讨论

本实验考察了甲醇、30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇超声提取的方法，发现甲醇提取时基线最低，峰形最好，所以选择甲醇提取。本实验也考察了甲醇超声 15、30、45 min 的方法，发现甲醇超声处理 30 min 效率最高，所以选择超声 30 min。

本实验考察了 Zorbax SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 ACE 5 C₁₈-AR 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)，发现 ACE 5 C₁₈-AR 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 的分离效果更优，所以选择该色谱柱。

本实验考察了流动相甲醇-0.1%磷酸溶液、甲醇-乙腈 (1:1, 含 0.1%磷酸)、乙腈-0.1%磷酸水溶液，发现乙腈-0.1%磷酸水溶液的分离度最优，分离的效率也最高，峰形也最好看。以磷酸盐作为流动相，必须要减压抽滤，否则不仅会对色谱柱造成损伤，还会导致峰的保留时间出现漂移的情况。

表 2 糖痹通络颗粒中原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、 β -蜕皮激素和络石苷的测定结果 ($n=3$)Table 2 Determination of protocatechuic acid, hydroxysafflor yellow A, *p*-coumaric acid, ferulic acid, β -ecdysterone, and tracheloside in Tangbi Tongluo Granules ($n=3$)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	原儿茶酸	羟基红花黄色素 A	对香豆酸	阿魏酸	β -蜕皮激素	络石苷
210922	0.055 2	0.248 7	0.036 9	0.218 9	0.171 2	0.680 4
210923	0.050 0	0.254 8	0.041 8	0.228 6	0.197 9	0.703 1
210924	0.048 4	0.286 0	0.039 6	0.224 1	0.180 1	0.751 3

由于糖痹通络颗粒中 6 个成分在相同的波长条件下响应值不高, 所以选择波长切换法测定各成分。羟基红花黄色素 A 在 403 nm 处吸收峰最高^[12], 但鉴于设备条件的限制, 无法达到此波长。经过多次试验, 把波长设置在 360 nm。在该波长条件下, 基线整体比较平稳, 不会出现突然拔高的现象。经全波长扫描法确认 β -蜕皮激素在 240 nm 左右吸收峰最高^[13], 但是把波长设定在 260 nm 处, 峰形最好, 原儿茶酸在 260 nm 处的吸收峰也较高。而络石苷在 270、280 nm 处都有吸收峰^[14-15], 但在 280 nm 处吸收峰峰形最好, 且对香豆酸、阿魏酸在 280 nm 处均有吸收, 所以选择该波长。

本实验建立 HPLC 法同时测定糖痹通络颗粒中原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、 β -蜕皮激素、络石苷, 结果表明该方法简单准确、稳定可靠、重复性好, 可用于糖痹通络颗粒的质量控制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 胡杨, 丁晓倩, 严辉. 川芎质量标准的研究 [J]. 中成药, 2021, 43(3): 692-699.
- [2] 梁乙川, 伍清芳, 刘素娟. HPLC 法同时测定川芎药材中 10 种成分含量 [J]. 中药材, 2019, 42(1): 136-138.
- [3] 王小燕, 常军民, 郭常润. 怀牛膝饮片的质量标准及指纹图谱研究 [J]. 中国药房, 2020, 31(24): 3000-3006.
- [4] 章碧静, 吕伟旗, 陈健苗. 络石藤两种木脂素含量测定与相关性分析 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2021, 31(3): 265-268.
- [5] 李鑫辉, 王静雯, 林丽美. 丹参通络解毒汤中羟基红花黄色素 A 和丹酚酸 B 的含量测定 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(4): 158-161.
- [6] 王昭懿, 陈扬, 邹秦文, 等. 复方马红散中羟基红花黄色素 A 与 ZnO 的含量测定方法研究 [J]. 世界中医药, 2020, 15(13): 1903-1907.
- [7] 杨冉冉. 中药鸡血藤的质量控制及对斑马鱼抗血栓作用的初步研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [8] 黄恩堂, 张洁, 袁惠, 等. 化积口服液定性定量方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(3): 490-492.
- [9] 王莹, 孙嘉辰, 李霞, 等. 基于建立成分活性权重函数的当归酒炙工艺评价研究 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3014-3021.
- [10] 黄彪, 何伟, 吴建鸿, 等. UPLC-MS/MS 同时测定铁皮石斛茎、叶、花中酚类组分的含量 [J]. 食品科学, 2021, 42(10): 262-268.
- [11] 管西芹, 毛近隆, 唐迎雪, 等. 对香豆酸的药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(17): 4162-4170.
- [12] 彭红, 付建武, 余日跃. 复方当归注射液中羟基红花黄色素 A 和阿魏酸的含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 2925-2927.
- [13] 杨柳, 姜海, 苏晓琳. HPLC-DAD-ELSD 法同时测定牛膝中 β -蜕皮甾酮、人参皂苷 R₀、竹节参皂苷 IVa 的含量 [J]. 中医药信息, 2019, 36(3): 87-91.
- [14] 谭兴起, 郭良君, 孔飞飞. HPLC 法测定络石藤中络石苷元的含量 [J]. 安徽医药, 2011, 15(3): 308-310.
- [15] 孔铭, 张健, 姚楠, 等. HPLC 同时测定络石藤中 5 个化学成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 93-96.

[责任编辑 解学星]