

UPLC 法同时测定乐脉颗粒中 11 种成分

李 耿^{1,2}, 王秀丽³, 刘金欣², 周晓腾², 侯静怡², 孟繁蕴^{2*}

1. 中日友好医院 全国中西医结合心血管病中心, 北京 100029

2. 北京师范大学 中药资源保护与利用北京市重点实验室, 北京 100875

3. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102

摘要: **目的** 建立采用 UPLC 同时测定乐脉颗粒中主要成分没食子酸、丹参素、原儿茶醛、绿原酸、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 的方法。**方法** 采用 UPLC 色谱系统, 色谱柱为 BEH C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 以 0.5% 甲酸水溶液 (A) -乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0~12 min, 97%~73% A; 12~13 min, 73%~5% A; 体积流量为 0.4 mL/min; 检测波长: 芍药苷为 230 nm, 没食子酸、丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、丹酚酸 A 为 280 nm, 绿原酸、阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸为 324 nm, 羟基红花黄色素 A 为 400 nm。**结果** 本方法可在 12.5 min 内完成一次色谱分析, 11 种成分的色谱峰均有良好的分离度, 方法精密度、重复性的 RSD 均小于 2.0%, 各成分均有较宽的线性范围和良好的线性关系 ($r \geq 0.999\ 6$); 回收率 97.2%~102.7%, RSD 0.50%~1.42%。**结论** 本方法快捷、准确、重复性好, 能同时测定乐脉颗粒中 11 种主要成分, 可较全面地控制乐脉颗粒的质量。

关键词: 乐脉颗粒; UPLC; 羟基红花黄色素 A; 芍药苷; 阿魏酸; 丹酚酸 B; 丹酚酸 A

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)11-1435-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.015

Simultaneous determination of eleven components in Lemai Granules by UPLC

LI Geng^{1,2}, WANG Xiu-li³, LIU Jin-xin², ZHOU Xiao-teng², HOU Jing-yi², MENG Fan-yun²

1. National Integrative Medicine Center for Cardiovascular Disease, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

2. Protection and Utilization of Traditional Chinese Medicine of Beijing Area Major Laboratory, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

3. College of Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Abstract: **Objective** To establish a UPLC method for the simultaneous determination of eleven compounds, gallic acid, tanshinol, protocatechuic aldehyde, chlorogenic acid, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid, rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, and salvianolic acid A in Lemai Granules. **Methods** Eleven compounds in Lemai Granules were simultaneously determined by UPLC with BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm). The mobile phase consisted of 0.5% methanoic acid solution (A)-acetonitrile (B) with gradient elution: 0—12 min, 97%—73% A; 12—13 min, 73%—5% A; at the flow rate of 0.4 mL/min, the determination wavelength was paeoniflorin at 230 nm; gallic acid, tanshinol, protocatechuic aldehyde, salvianolic acid B, and salvianolic acid A at 280 nm; chlorogenic acid, ferulic acid, rosmarinic acid, and lithospermic acid at 324 nm; hydroxysafflor yellow A at 400 nm. **Results** Eleven components were separated clearly and respectively within 12.5 min. The RSD values of precision and reproducibility were all less than 2.0%. The linear relationship between the concentration and peak areas of the eleven compounds was all linear ($r \geq 0.999\ 6$). The average recoveries were 97.2%—102.7% with RSD of 0.50%—1.42%. **Conclusion** The method is rapid, simple, reliable, and accurate, and could be used to simultaneously determine the eleven compounds above mentioned in Lemai Granules and for the comprehensive quality control of Lemai Granules.

Key words: Lemai Granules; UPLC; hydroxysafflor yellow A; paeoniflorin; ferulic acid; salvianolic acid B; salvianolic acid A

收稿日期: 2013-03-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072999); 中央高校基本科研业务费专项资金资助

作者简介: 李 耿 (1978—), 男, 主管药师, 博士, 从事中药质量研究。

Tel: (010)84205625 Fax: (010)64217748 E-mail: ligeng001@yahoo.com.cn

*通信作者 孟繁蕴 Tel: (010)58807656 E-mail: mfy@bnu.edu.cn

网络出版时间: 2013-04-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130417.0835.002.html>

乐脉颗粒是临床常用中药复方制剂,由丹参、川芎、赤芍、红花、香附、木香、山楂7味药材加工制成,具有行气活血、化瘀通脉的功效,用于气滞血瘀型冠心病、心绞痛和多发性脑梗死的治疗^[1]。《中国药典》2010年版一部中,仅对方剂中的臣药之一赤芍中的芍药苷进行定量测定^[1],难以有效控制该药的质量;文献报道^[2-8]该制剂的定量测定多采用HPLC法,仅对丹参或红花等某一味药进行控制,未能全面有效地控制制剂中主要成分的量,且分析时间较长,一次进样分析至少需要40 min。本研究采用UPLC技术,建立了同时测定乐脉颗粒中没食子酸、丹参素、原儿茶醛、绿原酸、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸A 11种主要成分的方法,可在12.5 min内完成一次色谱分析,此方法快捷、准确,重复性好,可较全面地控制乐脉颗粒中主要成分的量。

1 仪器与试药

UPLC Accuricy系统(美国Waters公司),包括二元超高压溶剂系统、自动进样恒温样本管理器、二极管阵列检测器、Empower 3色谱工作站;Thermo NANOpure Diamond Ro⁺纯水系统(美国Thermo Fisher Scientific公司);CP225D电子分析天平(德国Sartorius集团);KQ5200DE超声波仪(江苏昆山市超声仪器有限公司)。

对照品没食子酸(批号110831-200302)、绿原酸(批号110753-200413)、丹参素(批号110855-200507)、原儿茶醛(批号110810-200506)、羟基红花黄色素A(批号111637-200503)、芍药苷(批号110810-200506)、阿魏酸(批号1089-050103)、丹酚酸B(批号111562-200504)、丹酚酸A(批号111737-201103)购自中国药品生物制品检定所,迷迭香酸(批号1189-060824)购自中药固体制剂制造技术国家工程中心,紫草酸(批号20216-201107)购自南昌贝塔生物科技有限公司,各对照品质量分数均>98%。甲酸(分析纯,北京化工厂),提取用甲醇(分析纯,北京化工厂);色谱用乙腈(色谱纯,美国Fisher公司);色谱用水:Thermo超纯水机制备超纯水。乐脉颗粒为本院药房的市售样品,由四川川大华西药业有限公司生产,批号分别为120208、120803、120905、121003、121018、121106、121120。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取本品10袋,精密称定内容物,获取平均装量。

称取内容物约0.25 g,精密称定,置150 mL具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,称定质量,超声处理30 min(功率280 W,频率40 kHz),放置室温,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,过0.22 μm的微孔滤膜,取续滤液作为供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备

精密称定阿魏酸对照品2.69 mg,置于50 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,制成质量浓度为53.8 μg/mL的阿魏酸对照品储备液。精密称取对照品没食子酸1.80 mg、丹参素1.53 mg、原儿茶醛2.64 mg、绿原酸1.16 mg、羟基红花黄色素A 0.990 mg、芍药苷2.25 mg、迷迭香酸1.24 mg、紫草酸2.32 mg、丹酚酸B 4.15 mg、丹酚酸A 1.40 mg,置100 mL量瓶中,精密加入阿魏酸对照品储备液10 mL,用甲醇溶解并定容,即得没食子酸、丹参素、原儿茶醛、绿原酸、羟基红花黄色素A、芍药苷、阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸A质量浓度分别为18.0、15.3、26.4、11.6、9.90、22.5、5.38、12.4、23.2、41.5、14.0 μg/mL的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件

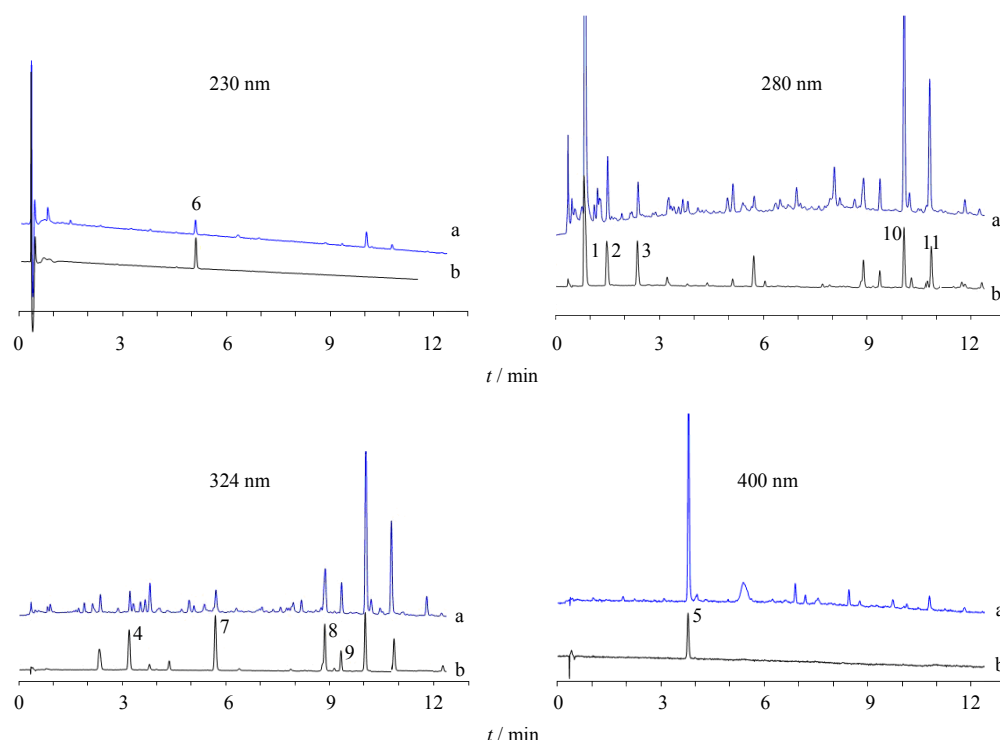
色谱柱为Waters Acquity UPLC BEH C₁₈柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为0.5%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~12 min, 97%~73% A; 12~13 min, 73%~5% A;体积流量为0.4 mL/min;检测波长:芍药苷为230 nm,没食子酸、丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、丹酚酸A为280 nm,绿原酸、阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸为324 nm,羟基红花黄色素A为400 nm;进样量为2 μL;柱温为30℃;样品管理器温度为4℃。理论塔板数以羟基红花黄色素A和丹酚酸B峰计算分别为53 126和44 512。对照品和乐脉颗粒样品的色谱图见图1。

2.4 线性关系考察

依次精密量取混合对照品溶液0.20、0.50、1.00、1.50、2.00、3.00、5.00 μL,分别进样,测定峰面积。分别以各色谱峰面积积分值(Y)对其质量浓度(X)进行线性回归,得回归方程,结果见表1。

2.5 精密度试验

取乐脉颗粒(批号120208)供试品溶液,按上述色谱条件连续进样6次,测定各成分峰面积积分值,其RSD分别为没食子酸0.89%、丹参素0.63%、原儿茶醛0.25%、绿原酸1.11%、羟基红花黄色素A 0.33%、芍药苷0.44%、阿魏酸0.91%、迷迭香酸0.75%、紫草酸0.41%、丹酚酸B 0.49%、丹酚酸A



1-没食子酸 2-丹参素 3-原儿茶醛 4-绿原酸 5-羟基红花黄色素 A 6-芍药苷 7-阿魏酸 8-迷迭香酸 9-紫草酸 10-丹酚酸 B 11-丹酚酸 A
1-gallic acid 2-tanshinol 3-protocatechuic aldehyde 4-chlorogenic acid 5-hydroxysafflor yellow A 6-paeoniflorin 7-ferulic acid 8-rosmarinic acid
9-lithospermic acid 10-salvianolic acid B 11-salvianolic acid A

图 1 乐脉颗粒样品 (a) 和混合对照品 (b) 的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatograms of Lemai Granules sample (a) and mixed reference substances (b)

表 1 线性关系考察结果

Table 1 Results of linear relationship

成 分	线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回归方程	r
没食子酸	1.80~45.0	$Y=11\ 680 X-5\ 126$	0.999 8
丹参素	1.24~31.0	$Y=87\ 650 X-5\ 642$	0.999 9
原儿茶醛	1.04~26.0	$Y=55\ 290 X-1\ 340$	0.999 8
绿原酸	1.16~29.0	$Y=41\ 580 X+1\ 211$	0.999 7
羟基红花黄色素 A	0.99~24.8	$Y=17\ 150 X-7\ 006$	0.999 9
芍药苷	2.25~56.2	$Y=9\ 111 X-4\ 645$	0.999 9
阿魏酸	0.538~13.4	$Y=33\ 710 X-3\ 007$	0.999 6
迷迭香酸	1.24~31.0	$Y=11\ 990 X+3\ 104$	0.999 9
紫草酸	2.32~58.0	$Y=4\ 674 X+156$	0.999 8
丹酚酸 B	4.15~104	$Y=4\ 873 X-4\ 623$	0.999 9
丹酚酸 A	2.40~60.0	$Y=3\ 196 X+2\ 117$	0.999 7

0.31%。结果表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取乐脉颗粒 (批号 120208) 供试品溶液, 按上述色谱条件, 在 24 h 内每隔 4 h 测定各成分峰面积积分

值, 其 RSD 分别为没食子酸 1.23%、丹参素 0.98%、原儿茶醛 0.65%、绿原酸 1.02%、羟基红花黄色素 A 0.74%、芍药苷 0.55%、阿魏酸 0.78%、迷迭香酸 0.55%、紫草酸 0.37%、丹酚酸 B 0.77%、丹酚酸 A 1.82%。结果表明供试品溶液各成分在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取乐脉颗粒 (批号 120208), 平行取样 5 份, 按“2.1”项下方法分别制备供试品溶液, 测定计算各成分的量, 其 RSD 分别为没食子酸 0.97%、丹参素 0.43%、原儿茶醛 0.55%、绿原酸 1.37%、羟基红花黄色素 A 0.67%、芍药苷 0.77%、阿魏酸 0.62%、迷迭香酸 0.77%、紫草酸 0.71%、丹酚酸 B 0.19%、丹酚酸 A 0.35%。结果表明方法重复性良好。

2.8 回收率试验

精密称定已测定的乐脉颗粒 (批号 120208) 样品共 6 份, 每份 0.125 g, 置 150 mL 具塞锥形瓶中, 分别精密加入各对照品溶液适量, 按“2.1”项下方法平行制备成供试品溶液, 进样测定, 计算各成分回收率, 结果没食子酸 99.4%、丹参素 98.0%、原儿茶醛 97.9%、绿原酸 97.4%、羟基红花黄色素 A

98.2%、芍药苷 102.7%、阿魏酸 100.4%、迷迭香酸 98.4%、紫草酸 97.2%、丹酚酸 B 99.0%、丹酚酸 A 97.6%，各成分 RSD 分别为 0.59%、0.79%、1.13%、1.42%、0.69%、0.50%、0.90%、1.20%、0.88%、0.86%、1.21%。

2.9 样品测定

取 7 个不同批号的乐脉颗粒样品，按“2.1”项下方法制备供试品溶液，各进样 2 μL ，记录峰面积，按外标法计算各样品中各成分的量，重复 3 次，取平均值，结果见表 2。

表 2 样品测定 ($n=3$)
Table 2 Determination of samples ($n=3$)

批号	质量分数 / ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)										
	没食子酸	丹参素	原儿茶醛	绿原酸	羟基红花黄色素 A	芍药苷	阿魏酸	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	丹酚酸 A
120208	5.522 4	1.977 4	0.168 1	0.256 4	0.269 5	3.405 5	0.093 0	0.996 6	0.927 7	10.223 4	6.934 7
120803	5.758 3	1.851 9	0.160 9	0.231 7	0.270 3	3.307 3	0.130 7	0.793 7	0.891 5	8.867 2	6.717 0
120905	5.874 5	1.999 1	0.170 7	0.263 8	0.269 5	3.416 8	0.112 9	0.955 4	0.876 1	9.480 4	6.878 0
121003	5.321 2	2.000 9	0.169 9	0.241 9	0.271 1	3.415 8	0.142 0	0.799 4	0.941 5	10.387 9	7.015 7
121018	5.238 2	1.955 3	0.167 3	0.254 9	0.257 8	3.400 7	0.106 4	0.854 1	0.932 2	10.854 1	6.903 5
121106	5.741 9	1.801 4	0.169 4	0.231 1	0.291 2	3.279 5	0.113 7	0.931 6	0.841 2	11.103 0	7.658 1
121120	5.559 4	1.846 8	0.171 6	0.265 7	0.274 4	3.334 7	0.098 6	0.903 4	0.876 5	10.548 5	6.979 0

3 讨论

分别考察了甲醇和乙腈作为色谱流动相有机相，结果显示有机相为乙腈时，低波长区基线较平，乙腈比甲醇在低波长区干扰小；考察了纯水、乙酸、甲酸、磷酸、磷酸缓冲溶液作为流动相水相，结果显示甲酸可以显著提高分离效果，但过多的甲酸加入会明显增高低波长区域的基线。最终选择了 0.5% 甲酸水溶液-乙腈组成的流动相系统。经多次调整梯度洗脱程序，最终以本研究中的梯度洗脱程序能够使所检测的 11 种成分的色谱峰达到基线分离。

本实验采用二极管阵列紫外检测器，在 200~400 nm 分别对各对照品溶液进行了全波长扫描，以选择检测波长，结果没食子酸、丹参素、原儿茶醛、绿原酸、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、芍药苷、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 分别在 270、279、279、324、324、400、230、324、308、286、286 nm 波长处有最大吸收，且各成分紫外吸收差异较大，在同一波长下检测难免误差较大，因此本研究选择在多波长处分别检测，芍药苷为 230 nm，没食子酸、丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B、丹酚酸 A 综合为 280 nm，阿魏酸、迷迭香酸、紫草酸、绿原酸综合为 324 nm，羟基红花黄色素 A 为 400 nm；不仅待测成分响应信号较好，而且可有效减少其他成分干扰。

乐脉颗粒处方中含有的脂溶性化学成分，如丹参中丹参酮 II_A、川芎中藁本内酯、木香中的木香烃

内酯等成分均未检出，考虑到乐脉颗粒的制法工艺采用水煎煮的方式，因此，成药中以水溶性化学成分为主。本实验分别考察了不同浓度的甲醇和乙醇对乐脉颗粒提取效果，结果以 70% 甲醇为最佳，5 种成分基本都能有效提取；继而又对提取方式（超声提取、回流提取）、超声时间、溶剂用量等因素进行了进一步考察，因丹酚酸 B、丹酚酸 A、羟基红花黄色素 A 等成分热稳定性不好，较高温度、较长提取时间都会造成成分损失，最终选择采用 70% 甲醇 50 mL 对 0.25 g 乐脉颗粒内容物超声提取 30 min 作为供试品的提取方法。

乐脉颗粒是由 7 味中药制成的复方中成药制剂，如采用传统的阴性样品法进行检测方法学的专属性考察，不仅操作繁琐，而且难以反映方法的专属性。处方中多种药材含同一化学成分，如丹参、川芎中均含有迷迭香酸，红花、香附中都含有山柰酚，采用阴性样品法，则易出现假阳性干扰结果。本研究利用 PDA 检测器所采集的三维信息，比较样品中的各待测成分峰和对应标准品色谱峰的紫外吸收图谱，验证了检测方法的专属性。

鉴于中药复方制剂化学成分的复杂性，有必要进一步对中药制剂的主要有效成分进行多组分量的同时测定，从而保证药品质量，全面提升药品质量控制标准。本实验以乐脉颗粒为研究对象，建立了 UPLC 法在 12.5 min 内即可完成一次进样色谱分离，同时准确测定乐脉颗粒中 11 种代表性成分量的方

法,避免了测定单个成分的繁琐步骤,该方法准确、可靠、简便,可用于乐脉颗粒及其中间体的质量控制。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 马彬峡, 陈恒冲, 吴春高, 等. RP-HPLC 法同时测定乐脉颗粒中丹参素、原儿茶醛、芍药苷和阿魏酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1122-1125.
- [3] 陈恒冲, 马彬峡, 吴春高, 等. RP-HPLC 同时测定乐脉颗粒中阿魏酸和丹酚酸 B 含量 [J]. 中成药, 2009, 31(4): 554-556.
- [4] 王欣眉, 蒋 慧, 徐小平. HPLC 同时测定乐脉颗粒中的丹酚酸 B 和丹参素钠 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23(4): 476-477.
- [5] 唐 颖, 朱玉晓, 王淑云, 等. HPLC 法测定乐脉颗粒中丹参素、羟基红花黄色素 A 和芍药苷 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 539-541.
- [6] 张静静, 叶利明, 付春梅. 压力液体提取乐脉颗粒处方中的多种活性成分 [J]. 华西药学杂志, 2012, 27(2): 177-178.
- [7] 孟 珺, 付春梅, 刘丽娟, 等. HPLC 法测定乐脉颗粒中羟基红花黄色素 A 的含量 [J]. 中国药事, 2009, 23(3): 284-285.
- [8] 方鲁延, 黄 勋, 徐 佳. RP-HPLC 法测定乐脉颗粒中去氢木香内酯的含量 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 214-215.