HPLC 法同时测定丹芎通脉颗粒中 5 种活性成分

赵永明[1]，王 金[1]，郭春燕[1*]，张丹参[2*]

1. 河北北方学院 药学系，河北 张家口 075000
2. 河北科技大学，河北 石家庄 050018

摘 要：目的 建立 HPLC 法同时测定丹芎通脉颗粒中丹酚酸 B、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、没食子酸和咖啡酸的方法。**方法** 采用 Thermo ODS-2 Hypersil（250 mm×4.6 mm，5 μm）色谱柱，以 0.1%乙酸水溶液-甲醇为流动相，梯度洗脱，体积流量 1.0 mL/min，检测波长为 286 nm，柱温 30 ℃。**结果** 丹芎通脉颗粒中丹酚酸 B、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、没食子酸和咖啡酸分别在 3.18～50.88 μg/mL（r＝0.999 0）、2.00～32.00 μg/mL（r＝0.999 5）、6.00～96.00（r＝0.999 6）、0.60～9.60 μg/mL（r＝0.999 4）和 1.00～16.00 μg/mL（r＝0.999 5）与峰面积呈良好线性关系；平均回收率分别 98.12%、97.23%、98.51%、99.11%和 97.01%（n＝6）。**结论** 该方法准确可靠，简单、快速，重复性好，可用于丹芎通脉颗粒中丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸和咖啡酸成分的质量控制。

关键词：丹芎通脉颗粒；丹酚酸 B；羟基红花黄色素 A；阿魏酸；没食子酸；咖啡酸；HPLC

中图分类号：R286.02 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2014)19 - 2793 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.19.012

Simultaneous determination of five active components in Danxiong Tongmai Granule by HPLC

ZHAO Yong-ming[1], WANG Jin[1], GUO Chun-yan[1], ZHANG Dan-shen[2]

1. Department of Pharmacy, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China
2. Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China

Abstract: Objective To establish an HPLC method for the content determination of salvianolic acid B, fumalic acid, hydroxysafflor yellow A, gallic acid, and caffeic acid in Danxiong Tongmai Granule. **Methods** The determination was carried out by HPLC, using Thermo ODS-2 Hypersil (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) chromatographic column. The mobile phase was 0.1% acetic acid solution-methyl alcohol, gradient elution, and UV detection wavelength was set at 286 nm. The column temperature was set at 30 ℃. The injection volume was 10 μL. **Results** Under the above chromatographic conditions, there was a good linearity between the absorption peak area and the concentration in the ranges of 3.18—50.88 μg/mL (r = 0.999 0) for salvianolic acid B, 2.00—32.00 μg/mL (r = 0.999 5) for fumalic acid, 6.00—96.00 (r = 0.999 6) for hydroxysafflor yellow A, 0.60—9.60 μg/mL (r = 0.999 4) for gallic acid, and 1.00—16.00 μg/mL (r = 0.999 5) for caffeic acid, respectively. **Conclusion** This method is simple, fast, accurate, reliable, and reproducible, and it is proper for the content determination of salvianolic acid B, fumalic acid, hydroxysafflor yellow A, gallic acid, and caffeic acid in Danxiong Tongmai Granule at the same time.

Key words: Danxiong Tongmai Granule; salvianolic acid B; hydroxysafflor yellow A; fumalic acid; gallic acid; caffeic acid; HPLC

丹芎通脉颗粒（国药准字 Z20010082）是四川恩威中医药研究开发公司研制的第三类中药新药，由丹参、红花、川芎、赤芍、延胡索、枸杞子、制何首乌、香附等天然药物组成，对冠心病、高血压、高血脂等疾病有较好疗效。众所周知，中药中的化学成分是中药发挥药效的物质基础。研究表明，丹酚酸 B 是丹参中的主要药效成分之一，具有加强心肌收缩力、扩张血管、抗血栓、改善微循环等作用[1-4]；

收稿日期：2014-04-09

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81274005）；河北省卫生厅项目（20090588，20110173）；河北省教育厅项目（Z2011304）

作者简介：赵永明（1978—），女，讲师，研究方向为中药药物分析。Tel: (0313)4029286 E-mail: zym2167@163.com

***通信作者** 张丹参，女，博士，教授，博士生导师。

郭春燕，女，博士，教授，硕士生导师。

阿魏酸是川芎中的主要药效成分之一，具有抑制血小板聚集、抑制血栓形成等作用[5-6]；羟基红花黄色素 A 是红花的主要药效成分之一，有活血、祛瘀止痛之功效[7]；没食子酸、咖啡酸对脑缺血再灌注大鼠具有保护作用[8-9]。

目前关于丹芎通脉颗粒的研究报道较少，主要集中在临床作用研究[10-11]，尚未见质量控制方面的文献报道。本研究建立 HPLC 法同时测定丹芎通脉颗粒中丹酚酸 B、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、没食子酸、咖啡酸定量的方法。研究结果表明该方法准确可靠、灵敏、快速，可为丹芎通脉颗粒相关成分的质量控制提供快速准确的检测方法。

1　仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；AB135—S 型电子天平，瑞士梅特勒-托利多；JPCQ0628 型全数字超声波发生器，武汉嘉鹏电子有限公司。没食子酸（批号 110831-200302，质量分数为 96.5%）、咖啡酸（批号 110885-200102，质量分数为 96.5%）、羟基红花黄色素 A（批号 11637-201308，质量分数为 96.5%）、丹酚酸 B（批号 111562-201212，质量分数为 95.4%）、阿魏酸（批号 110773-201313，质量分数为 99.6%），所有对照品均购自中国食品药品检定研究院，供定量测定用。丹芎通脉颗粒（批号为 140304、131204、1204002），四川恩威制药有限公司；甲醇（色谱纯，Sigma 公司），超纯水，其他试剂均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　混合对照品溶液的配制

分别精密称取丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A、没食子酸、咖啡酸、阿魏酸对照品适量，加水超声溶解，摇匀，制成含丹酚酸 B 50.88 μg/mL、阿魏酸 32.00 μg/mL、羟基红花黄色素 A 96.00 μg/mL、没食子酸 9.60 μg/mL、咖啡酸 16.00 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.2　供试品溶液的配制

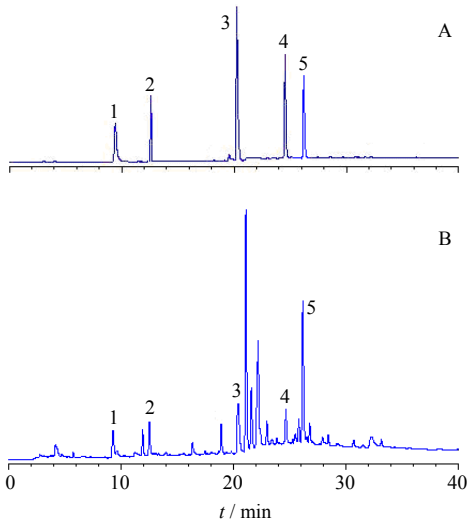
称取丹芎通脉颗粒适量，加超纯水溶解，制成 2.0 mg/mL 溶液，用 0.45 μm 微孔滤膜滤过，作为供试品溶液，待测。

2.3　色谱条件

色谱柱为 Thermo ODS-2 Hypersil（250 mm×4.6 mm，5 μm）；检测波长 286 nm；体积流量 1 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 20 μL；流动相为甲醇-0.1%乙酸水溶液，梯度洗脱：0～5 min，5%甲醇；5～30 min，5%～60%甲醇；30～40 min，60%甲醇。

2.4　专属性试验

在“2.3”项色谱条件下丹酚酸 B、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、没食子酸、咖啡酸的混合对照品溶液和丹芎通脉颗粒供试品溶液的 HPLC 色谱图见图 1，混合对照品溶液及丹芎通脉颗粒供试品溶液中 5 种成分达到基线分离。



1-没食子酸　2-羟基红花黄色素 A　3-咖啡酸　4-阿魏酸　5-丹酚酸 B
1-gallic acid　2-hydroxysafflor yellow A　3-caffeic acid　4-fumalic acid　5-salvianolic acid B

图 1　混合对照品 (A) 和丹芎通脉颗粒样品 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1　HPLC of mixed reference substance (A) and sample solution (B)

2.5　线性关系考察

分别精密吸取混合对照品溶液适量，加水稀释至不同质量浓度，摇匀，制得系列混合对照品溶液，HPLC 测定。以峰面积积分值为纵坐标（Y），对照品质量浓度为横坐标（X）进行线性回归，得回归方程：丹酚酸 B Y=4.658 X+4.765，r=0.999 0；阿魏酸 Y=54.34 X+9.92，r=0.999 5；羟基红花黄色素 A Y=22.69 X+19.21，r=0.999 6；没食子酸 Y=37.96 X+40.12，r=0.999 4；咖啡酸 Y=88.42 X+29.99，r=0.999 5；结果表明丹酚酸 B、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、没食子酸和咖啡酸进样量分别在 3.18～50.88、2.00～32.00、6.00～96.00、0.60～9.60、1.00～16.00 μg/mL 线性关系良好。

2.6　精密度试验

精密吸取混合对照品溶液，其中丹酚酸 B、阿

魏酸、羟基红花黄色素 A、没食子酸、咖啡酸的质量浓度分别为 12.72、8.00、24.00、2.40、4.00 μg/mL，在“2.3”项色谱条件下，连续进样 6 次，记录保留时间和峰面积，计算丹酚酸 B、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、没食子酸、咖啡酸保留时间的日内精密度，保留时间的 RSD 分别为 0.05%、0.03%、0.05%、0.06%、0.10%，峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.6%、1.8%、1.1%、1.2%；连续 6 d 进样，计算保留时间和峰面积的日间精密度，保留时间的 RSD 分别为 0.06%、0.1%、0.08%、0.07%、0.5%，峰面积的 RSD 分别为 1.9%、1.7%、1.9%、1.7%、1.4%。结果表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取丹芎通脉颗粒按“2.2”项下方法制成供试品溶液，室温放置，分别于 0、3、6、9、12、16 h 进样测定，在“2.3”项色谱条件下，进样分析，记录峰面积。结果丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、咖啡酸峰面积的 RSD 分别为 2.1%、2.2%、2.5%、1.9%、2.1%，结果表明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.8 重复性试验

取丹芎通脉颗粒，按“2.2”项下方法制成供试品溶液，平行 6 次，在“2.3”项色谱条件下分别测定，计算每种对照品的色谱峰面积。结果丹酚酸 B、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、没食子酸和咖啡酸的质量分数平均值分别为 90.10、1.55、12.36、1.92、0.21 mg/g；RSD 分别为 2.2%、2.1%、1.06%、1.6%、1.9%。结果表明，该方法的重复性良好。

2.9 回收率试验

精密量取已测定的丹芎通脉颗粒供试品溶液 2.0 mL，平行 9 份，置 5 mL 量瓶中，分别精密加入一定质量浓度的混合对照品溶液 2.0 mL，加水定容至刻度，摇匀，在“2.3”项色谱条件下进样分析，记录峰面积，计算加样回收率。结果丹酚酸 B、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、没食子酸和咖啡酸的平均回收率分别为 98.12%、97.23%、98.51%、99.11%、97.01%，RSD 分别为 2.25%、2.30%、2.11%、2.43%、2.37%。结果表明，平均回收率在 97.01%～99.11%，RSD＜2.43%，说明该方法准确度好。

2.10 样品测定

取丹芎通脉颗粒不同批次样品，按“2.2”项下方法制成供试品溶液，取供试品溶液适量，在“2.3”项色谱条件下进样分析，记录峰面积，用回归方程计算 5 种化合物的量，测定结果见表 1。

表 1 丹芎通脉颗粒 5 种成分的测定结果（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

Table 1 Contents of five active components in Danxiong Tongmai Granule ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

批号	丹酚酸 B / (mg·g^{-1})	羟基红花黄色 A / (mg·g^{-1})	阿魏酸 / (mg·g^{-1})	没食子酸 / (mg·g^{-1})	咖啡酸 / (mg·g^{-1})
140304	93.35±2.12	12.52±0.14	1.58±0.03	1.99±0.04	0.23±0.01
131204	90.10±2.01	12.36±0.13	1.55±0.03	1.92±0.03	0.21±0.01
1204002	89.52±1.82	12.78±0.46	1.52±0.03	1.95±0.04	0.22±0.01

3 讨论

丹芎通脉颗粒由丹参、红花、川芎等组成，根据《中国药典》2010 年版规定，丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A、阿魏酸分别为丹参、红花、川芎的指标性成分，所以本研究建立丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A、阿魏酸等成分的测定方法。200～410 nm 波长扫描结果表明，丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸、咖啡酸 5 种化合物在 286 nm 处均有较强吸收，且分离效果好。所以选择 286 nm 为本实验的检测波长。实验中分别对乙酸浓度进行考察，结果表明乙酸质量分数为 0.1%时，色谱峰对称度和分离度最好。由于没食子酸和其他几种成分的极性差异较大，采用等度洗脱时，其他物质保留时间显著延长，检测灵敏度下降，而采用甲醇-水梯度洗脱系统则取得了好的分离效果，丹芎通脉颗粒中 5 种活性成分在 40 min 内即可完成分析，且与其他组份能达到基线分离。本实验建立的色谱条件测定快速、结果准确，稳定性好，是一种测定丹芎通脉颗粒中丹酚酸 B、羟基红花黄色素 A、阿魏酸、没食子酸和咖啡酸测定的可靠方法，可为丹芎通脉颗粒质量控制提供实验依据。

参考文献

[1] 潘雪梅, 韦 辉, 刘 毅, 等. 不同产地丹参药材质量研究 [J]. 中草药, 2011, 42(9): 1833-1836.

[2] 吴继超, 王 彬, 田 振, 等. 丹酚酸 B 对异丙肾上腺素所致乳鼠心肌细胞肥大的保护作用 [J]. 中草药, 2013, 44(17): 2422-2426.

[3] 张 萌, 张伯礼, 高秀梅, 等. 丹酚酸 B 和丹参酮 II_A

不同配比对肿瘤坏死因子 α 损伤大鼠心脏微血管内皮细胞的影响 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 63-65.

[4] 李自强, 刘志东, 顾 慧, 等. 药物溶出/吸收仿生系统研究丹酚酸 B 缓释片释放规律 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 367-373.

[5] 王惠珍, 晋 玲, 张恩和. 海拔对当归中阿魏酸量的影响及关键因子分析 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 219-223.

[6] 赵文红, 李 静, 胡蒋宁, 等. 阿魏酸对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用研究 [J]. 营养学报, 2010, 32(6): 579-583.

[7] 王 天, 傅风华, 韩 冰, 等. 羟基红花黄色素 A 对实验性心肌梗死大鼠的保护作用及机制 [J]. 中草药, 2007, 38(12): 1853-1856.

[8] 于艳华, 卜丽梅, 赵丽红, 等. 没食子酸对缺血再灌注损伤大鼠的保护作用 [J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(20): 2935-2937.

[9] 石 斌, 杨俊卿, 姜 蓉, 等. 咖啡酸对全脑缺血再灌注模型大鼠脑损伤的保护作用研究 [J]. 中国药房, 2011, 22(9): 795-798.

[10] 唐 平, 秦 方, 张廷杰, 等. 丹芎通脉颗粒对脑血管疾病动脉弹性及其相关因素影响的临床观察 [J]. 四川医学, 2009, 30(4): 487-489.

[11] 姚 鹏, 赵丽霞, 吕庆超. 丹芎通脉颗粒治疗冠心病心绞痛的临床研究 [J]. 中外医疗, 2011, 30(1): 22-24.