UPLC-DAD 法同时测定珍龙醒脑胶囊中的 9 种成分

魏　霞[1,2]，谢强胜[2]，祝清芬[2]，王海苹[3]，刘　娜[2]，武继彪[1*]

1. 山东中医药大学 基础医学院，山东 济南　250355
2. 山东省食品药品检验研究院，山东 济南　250100
3. 山东金诃药物研究开发有限公司，山东 济南　250100

摘　要：目的　建立同时测定珍龙醒脑胶囊中没食子酸、肉桂酸、甘草苷、西红花苷 I、西红花苷 II、桂皮醛、丁香酚、甘草次酸、麝香酮等 9 种成分的 UPLC-DAD 方法。**方法**　采用 RP-UPLC 法，Agilent Zorbax C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm），流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈，体积流量 0.3 mL/min，梯度洗脱，柱温 35 ℃，进样量为 1 μL。分别对待测物考察其提取溶剂、线性范围、精密度、重复性、稳定性、加样回收率等方法学内容。**结果**　9 种指标成分没食子酸在 0.2～20.0 mg/L（r＝0.999 0）、西红花苷 I 在 0.022～2.200 mg/L（r＝0.999 3）、西红花苷 II 在 0.02～2.00 mg/L（r＝0.999 6）、甘草苷在 0.093～1.860 mg/L（r＝0.999 4）、肉桂酸在 0.020 4～2.040 0 mg/L（r＝0.999 9）、桂皮醛在 0.042～4.200 mg/L（r＝0.999 9）、丁香酚在 0.95～95.00 mg/L（r＝0.999 9）、甘草次酸在 0.012 9～1.290 0 mg/L（r＝0.998 9）、麝香酮在 0.073 8～7.380 0 mg/L（r＝0.999 0）线性关系良好；精密度 RSD≤1.02%；重复性良好，RSD≤1.13%；加样回收率在 93.8%～112.1%，RSD≤1.28%。供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定。3 批次供试品中没食子酸、西红花苷 I 和 II、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛、丁香酚、甘草次酸、麝香酮质量分数分别为 0.422～0.448、0.093～0.105、0.096～0.112、0.026 8～0.028 5、0.142～0.153、0.140～0.158、1.519～1.547、0.007 55～0.008 04、0.117～0.121 mg/g。**结论**　本法快速、灵敏度高、准确度高、专属性好，为珍龙醒脑胶囊的质量控制提供依据。

关键词：珍龙醒脑胶囊；UPLC；没食子酸；肉桂酸；甘草苷；西红花苷 I；西红花苷 II；桂皮醛；丁香酚；甘草次酸；麝香酮

中图分类号：R286.02　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2015)13 - 1926 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.13.012

Simultaneous determination of nine components in Zhenlong Xingnao Capsule by UPLC-DAD

WEI Xia[1,2], XIE Qiang-sheng[2], ZHU Qing-fen[2], WANG Hai-ping[3], LIU Na[2], WU Ji-biao[1]

1. Basic Medical College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China
2. Shandong Institute of Food and Drug Control, Jinan 250100, China
3. Shandong Jinhe Drug Research and Development Co., Ltd., Jinan 250100, China

Abstract: Objective　To develop an UPLC-DAD method for simultaneous determination of gallic acid, cinnamic acid, licorice glycosides, crocin I, crocin II, cinnamic aldehyde, eugenol, glycyrrhetinic acid, and muscone in Zhenlong Xingnao Capsule. **Methods**　Analysis was performed on a RP-UPLC method and an Agilent Zorbax C_{18} chromatographic column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) eluted with 0.1% formic acid (mobile phase A) and acetonitrile (mobile phase B), the flow rate was 0.3 mL/min, gradient elution and column temperature was 35 ℃, the injection volume was 1 uL. Respectively to measure their extraction solvent, linear range, precision, repeatability, stability, and recovery rate. **Results**　The nine components were well separated and showed good linearity, such as gallic acid 0.2—20.0 mg/L (r = 0.999 0), crocin I 0.022—2.200 mg/L (r = 0.999 3), crocin II 0.02—2.00 mg/L (r = 0.999 6), licorice glycosides 0.093—1.860 mg/L (r = 0.999 4), cinnamic acid 0.020 4—2.040 0 mg/L (r = 0.999 9), cinnamic aldehyde 0.042—4.200 mg/L (r = 0.999 9), eugenol 0.95—95.00 mg/L (r = 0.999 9), glycyrrhetinic acid 0.012 9—1.290 0 mg/L (r = 0.998 9), and

收稿日期：2015-03-03

基金项目：山东省中医药科技发展计划项目（2011-238）

作者简介：魏　霞，女，2013 级博士研究生，主管药师，研究方向为心脑血管药理。Tel: 13869136776　E-mail: myweixia@126.com

*通信作者　武继彪，男，教授，博士研究生导师，研究方向为心脑血管药理。E-mail: wujibiao63@126.com

muscone 0.073 8—7.380 0 mg/L (r = 0.999 0). The precision was good, RSD was 1.02% or less, The repeatability is good in terms of RSD of 1.13% or less and the recovery rate was 93.8%—112.1% (RSD 1.28% or less). Test solution was stable at room temperature within 24 h. The contents of three batches of the gallic acid, crocin I, crocin II, licorice glycosides, cinnamic acid, cinnamic aldehyde, eugenol, glycyrrhetinic acid, and muscone were 0.422—0.448, 0.093—0.105, 0.096—0.112, 0.026 8—0.028 5, 0.142—0.153, 0.140—0.158, 1.519—1.547, 0.007 55—0.008 04, 0.117—0.121 mg/g, respectively. **Conclusion** The method is rapid and has high sensitivity, high accuracy, and good specificity, It can be applied to the quality control of Zhenlong Xingnao Capsule.

Key words: Zhenlong Xingnao Capsule; UPLC; gallic acid; cinnamic acid; licorice glycosides; crocin I; crocin II; cinnamic aldehyde; eugenol; glycyrrhetinic acid; muscone

珍龙醒脑胶囊是公元 8 世纪藏医医圣宇妥·元丹贡布创制的治疗“白脉病”的良方，始载于《四部医典》，是治疗脑血管疾病的经典藏药验方。处方由珍珠、天竺黄、西红花、丁香、肉豆蔻、檀香、紫檀香、沉香、余甘子、肉桂、甘草、人工麝香等 29 味中药组成，全粉末入药，具有开窍醒神、清热通络等功效，用于痰瘀阻络所致的中风、语言謇涩、半身不遂、口眼歪斜等症状[1]。有文献报道本品能够消退颈动脉粥样斑块，减少副作用，提高临床依从性[2]；降低脑缺血再灌注大鼠血小板聚集率、降低脑指数、使脑梗死体积变小[3]；降低脑缺血再灌注小鼠脑含水量、丙二醛（MDA）水平，升高超氧化物歧化酶（SOD）、Na^+,K^+-ATP 和 Ca^{2+}-ATP 酶活性等[4]。

本品原标准中只对肉桂中桂皮醛进行了 HPLC 定量测定[1]，其他药味并未进行定量，只用 1 种成分衡量珍龙醒脑胶囊的质量是不足的，多指标成分定量测定方法更能客观地体现制剂的质量。本实验测定的 9 种成分分别为丁香、肉桂、西红花、余甘子、人工麝香和甘草的主要药效成分，也为文献报道较多的具有抗炎、抗氧化、抗血栓形成、抑制血小板聚集作用的药效成分[5-15]，是本品治疗脑中风的作用基础。虽文献中有液相法测定本品中西红花苷 I、II 和胆酸等的报道[16-17]，但未见有珍龙醒脑胶囊中多种成分同时测定的报道。因此，为了更好地控制该制剂的质量，本实验采用 UPLC 法梯度洗脱与分段变波长检测法，首次对西红花、丁香、人工麝香、肉桂、甘草、余甘子等药味中的 9 个指标成分进行了定量测定。结果表明，该方法节省溶剂、快速、灵敏度高，为更加全面控制该制剂质量提供了重要参考依据。

1 仪器与材料

Agilent1290 超高效液相色谱仪，美国安捷伦公司，包括二元泵，自动进样器，DAD 二极管阵列检测器；Mettler MS Toledo MS 电子天平，十万分之一；KQ5200 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司。

对照品没食子酸（批号 110831-200803，质量分数 90.1%）、甘草次酸（批号 110723-200612，质量分数 99.5%）、甘草苷（批号 111610-201106，质量分数 93.7%）、肉桂酸（批号 110786-200503，质量分数 99.9%）、麝香酮（批号 110719-201215，质量分数 99.6%）、桂皮醛（批号 110710-201418，质量分数 99.4%）、西红花苷 I（批号 111588- 201303，质量分数 92.6%）、西红花苷 II（批号 111589-201103，质量分数 91.9%）、丁香酚（批号 110725-201213，质量分数 99.7%），购于中国食品药品检验研究院。珍龙醒脑胶囊，规格为每粒 0.3 g，为金诃藏药股份有限公司生产，批号为 20131008、20130110、20130701。阴性对照样品，由山东金诃药物研究开发有限公司提供。乙腈、丙酮、甲醇、甲酸均为色谱纯，均购自美国 Fisher 公司，水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈，梯度洗脱：0～6.0 min，10%～30%乙腈；6.0～13.0 min，30%～60%乙腈；13.0～18.0 min，60%～90%乙腈；18.0～19.5 min，90%乙腈；19.5～19.7 min，90%～10%乙腈；19.7～23.0 min，10%乙腈；分段变波长测定：0～3.0 min 为 274 nm（没食子酸），3.0～5.0 min 为 440 nm（西红花苷 I、II），5.0～6.0 min 为 237 nm（甘草苷），6.0～7.0 min 为 270 nm（肉桂酸），7.0～9.0 min 为 280 nm（丁香酚、桂皮醛），9.0～13.0 min 为 254 nm（甘草次酸），13.0～23.0 min 为 283 nm（麝香酮）；体积流量为 0.3 mL/min；柱温为 35 ℃；进样量为 1 μL。

2.2 对照品溶液的制备

取没食子酸、肉桂酸、甘草苷、西红花苷 I、

西红花苷 II、桂皮醛、丁香酚、甘草次酸、麝香酮对照品适量，精密称定，用 80%甲醇配制成含没食子酸 20 μg/mL、肉桂酸 2.04 μg/mL、甘草苷 1.86 μg/mL、西红花苷 I 2.2 μg/mL、西红花苷 II 2.0 μg/mL、桂皮醛 4.2 μg/mL、丁香酚 95 μg/mL、甘草次酸 0.258 μg/mL、麝香酮 7.38 μg/mL 的混合对照品溶液，即得。

2.3　供试品溶液的制备

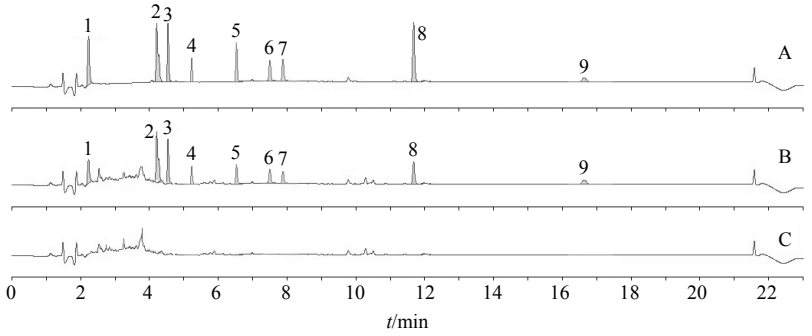
取本品内容物约 1 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，精密加入 80%甲醇 25 mL，称定质量，超声（功率 250 W，频率 45 kHz）处理 40 min，水浴温度 30 ℃，取出放冷，称定质量，用 80%甲醇水溶液补足减失的质量，摇匀，用 0.22 μm 滤膜滤过，弃去初滤液，取续滤液作为供试品溶液。

2.4　阴性对照样品溶液的制备

取阴性对照样品约 1 g，精密称定，置于具塞锥形瓶中，按“2.3”项下方法制得阴性对照样品溶液。

2.5　专属性考察

按照“2.2”～“2.4”项下方法制得待测溶液，精密吸取适量，按照“2.1”项下色谱条件进行检测，结果供试品溶液中目标分析物的色谱法理论板数和分离度均较好，阴性对照样品对供试品溶液检测无干扰。对照品、供试品及阴性对照样品溶液的色谱图见图 1。



1-没食子酸　2-西红花苷 I　3-西红花苷 II　4-甘草苷　5-肉桂酸　6-桂皮醛　7-丁香酚　8-甘草次酸　9-麝香酮

1-gallic acid　2-crocin I　3-crocin II　4-licorice glycosides　5-cinnamic acid　6-cinnamic aldehyde　7-eugenol　8-glycyrrhetinic acid　9-muscone

图 1　混合对照品 (A)、供试品 (B) 和阴性对照样品 (C) 溶液的 UPLC 图

Fig. 1　UPLC of mixed reference substances (A), sample (B), and negative reference sample (C)

2.6　线性范围考察

精密吸取按“2.2”项下方法制备的没食子酸、肉桂酸、甘草苷、西红花苷 I、西红花苷 II、桂皮醛、丁香酚、甘草次酸、麝香酮混合对照品储备溶液 0.1、0.5、1.0、3.0、5.0、10.0 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，以 80%甲醇水溶液稀释至刻度，摇匀，即得系列对照品溶液。分别吸取上述混合对照品溶液各 1 μL，注入超高效液相色谱仪进行测定，记录色谱峰面积。以峰面积积分值为纵坐标（Y），质量浓度为横坐标（X）绘制标准曲线，进行线性回归，得回归方程和各待测成分 r 值分别为没食子酸：Y＝22.899 X－9.932 1，r＝0.999 0，线性范围为 0.2～20.0 mg/L；西红花苷 I：Y＝191.37 X－10.065 1，r＝0.999 3，线性范围为 0.022～2.200 mg/L；西红花苷 II：Y＝105.24 X－2.827 2，r＝0.999 6，线性范围为 0.02～2.00 mg/L；甘草苷：Y＝96.771 X＋0.942 2，r＝0.999 4，线性范围为 0.093～1.860 mg/L；肉桂酸：Y＝651.09 X－14.358，r＝0.999 9，线性范围为 0.020 4～2.040 0 mg/L；桂皮醛：Y＝588.69 X－20.853，r＝0.999 9，线性范围为 0.042～4.200 mg/L；丁香酚：Y＝1.339 3 X－1.894 7，r＝0.999 9，线性范围为 0.95～95.00 mg/L；甘草次酸：Y＝172.4 X－1.341，r＝0.998 9，线性范围为 0.012 9～1.290 0 mg/L；麝香酮 Y＝0.713 6 X－0.046，r＝0.999 0，线性范围为 0.073 8～7.380 0 mg/L。

2.7　精密度考察

精密吸取“2.2”项下混合对照品溶液（没食子酸 20 μg/mL、肉桂酸 2.04 μg/mL、甘草苷 1.86 μg/mL、西红花苷 I 2.2 μg/mL、西红花苷 II 2.0 μg/mL、桂皮醛 4.2 μg/mL、丁香酚 95 μg/mL、甘草次酸 0.258 μg/mL、麝香酮 7.38 μg/mL）1 μL，连续进样 6 次，按照“2.1”项下色谱条件测定峰面积。结果没食子酸、肉桂酸、甘草苷、西红花苷 I、西红花苷 II、桂皮醛、丁香酚、甘草次酸、麝香酮峰面积 RSD 分别为 0.95%、0.99%、0.97%、1.01%、0.99%、0.96%、1.02%、0.95%、1.04%（n＝6），结

果表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性考察

取供试品溶液（批号为 20130110），分别在 0、2、4、8、10、16、24 h，按照“2.1”项下色谱条件进行测定，计算其峰面积。结果供试品溶液在 24 h 内色谱峰面积无明显变化，其中没食子酸、肉桂酸、甘草苷、西红花苷 I、西红花苷 II、桂皮醛、丁香酚、甘草次酸、麝香酮峰面积 RSD 分别为 0.98%、0.89%、0.99%、0.97%、1.06%、0.94%、1.05%、0.99%、1.01%（n＝7），结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 重复性考察

取同一批号样品（批号为 20130110）6 份，按照“2.3”项下供试品溶液制备方法，按照色谱条件依次测定各待测物质量分数。结果没食子酸、肉桂酸、甘草苷、西红花苷 I、西红花苷 II、桂皮醛、丁香酚、甘草次酸、麝香酮的平均质量分数分别为 0.448、0.142、0.026 8、0.093、0.102、0.145、1.547、0.007 55、0.117 mg/g，RSD 分别为 1.02%、0.96%、0.93%、1.07%、0.96%、0.92%、1.01%、1.09%、1.13%（n＝6）。

2.10 加样回收率考察

取同一批供试品样品（批号为 20130110）9 份，每份约 0.5 g，精密称定，分成 3 组，每组 3 份，分别加入“2.2”项下混合对照品溶液 1、3、5 mL，按“2.3”项下供试品溶液制备方法制得供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进样，记录色谱峰峰面积，计算回收率。结果没食子酸、肉桂酸、甘草苷、西红花苷 I、西红花苷 II、桂皮醛、丁香酚、甘草次酸、麝香酮的平均回收率分别为 112.1%、96.0%、104.2%、105.3%、98.6%、93.8%、101.6%、110.2%、105.5%，RSD 分别为 0.96%、0.99%、1.04%、1.21%、1.10%、0.96%、1.08%、1.09%、1.28%（n＝9）。

2.11 样品测定

取 3 批珍龙醒脑胶囊，按照“2.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下色谱条件进行测定，采用外标一点法进行计算，结果见表 1。由表中数据可知，3 批次供试品中没食子酸、西红花苷 I 和 II、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛、丁香酚、甘草次酸、麝香酮质量分数分别为 0.422～0.448、0.093～0.105、0.096～0.112、0.026 8～0.028 5、0.142～0.153、0.140～0.158、1.519～1.547、0.007 55～0.008 04、0.117～0.121 mg/g。结果表明本品各批次之间差异较小，上述 9 种成分可以作为该品种质量控制指标。

表 1 珍龙醒脑胶囊中指标性成分的测定结果 (n = 2)

Table 1 Contents of index components in Zhenlong Xingnao Capsule (n = 2)

批号	质量分数/(mg·g^{-1})								
	没食子酸	西红花苷 I	西红花苷 II	甘草苷	肉桂酸	桂皮醛	丁香酚	甘草次酸	麝香酮
20131008	0.422	0.105	0.112	0.028 5	0.149	0. 140	1.532	0.007 61	0.119
20130110	0.448	0.093	0.102	0.026 8	0.142	0. 145	1.547	0.007 55	0.117
20130701	0.434	0.098	0.096	0.027 7	0.153	0. 158	1.519	0.008 04	0.121

3 讨论

本制剂的制法为药粉粉碎后，研细，过筛混匀后制得，参考《中国药典》2010 年版一部相关中药饮片含量测定项下以及参考文献中样品处理方法，进行了水溶液、甲醇、80%甲醇、50%丙酮-甲醇溶液以及 50%丙酮-水溶液等溶媒提取比较，其中没食子酸、西红花苷 I 和 II 水溶性强，麝香酮、丁香酚等组分水溶性较差，综合实验结果表明以 80%甲醇为最佳提取溶媒；比较了回流提取法和超声提取方法，结果表明两种提取方法没有显著性差异，因而确定超声提取法。

按照“2.1”项下色谱条件，分别考察了 Agilent Zorbax C_{18}、Waters acquity uplc HSS C_{18} 和 Cortecs UPLC C_{18} 色谱柱，结果表明色谱峰分离效果相当，说明分析方法以及供试品对色谱柱适用范围广。

色谱分离效果除了取决于色谱柱外，还与流动相选择有关。本实验中考察了不同性质的 9 种指标成分，比较了乙腈-水、乙腈-0.01 mol/L 醋酸铵溶液和乙腈-0.1%甲酸溶液等洗脱体系，分别进行梯度洗脱和等度洗脱，实验结果表明乙腈-0.1%甲酸水溶液梯度洗脱系统分离效果最好。

经方法学验证，本研究建立的方法具有较好的精密度、重复性、稳定性、加样回收率，方法采用 UPLC 法，操作简便，分析快速，专属性强，能够较好地测定制剂中没食子酸、肉桂酸、甘草苷、西红花苷 I、西红花苷 II、桂皮醛、丁香酚、甘草次酸

和麝香酮的量，可为珍龙醒脑胶囊提供较好的质量控制体系，为有效和安全监管提供依据。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理局国家药品标准 [S]. WS-10708(ZD-0708)-2002-2010Z, 2002.

[2] 孙 杰, 李 静, 张 华. 珍龙醒脑胶囊治疗颈动脉粥样硬化斑块临床观察 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(10): 101-102.

[3] 高 伟, 焦 波. 珍龙醒脑胶囊对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(1): 19-21.

[4] 高 伟, 张会鲜, 孙建云, 等. 珍龙醒脑胶囊对小鼠脑缺氧及脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(22): 4958-4960.

[5] 魏 霞, 祝清芬, 王海苹, 等. 珍龙醒脑胶囊对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1791-1796.

[6] Fatehi M, Rashidabady T, Fatehi-Hassanabad Z. Effects of *Crocus sativus* petals' extract on rat blood pressure and on responses induced by electrical field stimulation in the rat isolated vas deferens and guinea-pig ileam [J]. *J Ethnopharmacol*, 2003, 84(2/3): 199-203.

[7] 吕丽莉, 张作平, 黄 伟, 等. 麝香酮对局灶性脑缺血大鼠模型的保护作用及对 BBB 转运功能的影响 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(2): 31-35.

[8] 黄敬群, 罗晓星, 王四旺, 等. 桂皮醛对抗血小板聚集和血栓形成的特点 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(31): 34-36.

[9] 覃 瑶, 王 欣, 李恒华, 等. 甘草次酸衍生物的抗炎活性及水钠潴留作用的研究 [J]. 华西药学杂志, 2013, 28(4): 338-340.

[10] 董方圆, 王杰军. 甘草次酸及其衍生物的抗炎机制 [J]. 大连医科大学学报, 2014, 36(2): 195-197.

[11] 谢晓艳, 刘洪涛, 张 吉, 等. 没食子酸体外抗氧化作用研究 [J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(3): 319-322.

[12] 陶 莉, 望运玲, 武双婵, 等. 丁香酚对大鼠局灶性脑缺血/再灌注神经保护作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1146-1150.

[13] 卜丽梅, 关凤英, 乔 萍, 等. 没食子酸对大鼠缺血再灌注损伤后细胞凋亡的保护作用及机制研究 [J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(11): 1693-1697.

[14] 孙雅煊, 刘 婷, 戴雪伶, 等. 甘草苷抗脑缺血再灌注炎性损伤研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(23): 353-355.

[15] 赵春贵, 张立伟, 王 晖, 等. 肉桂酸及其衍生物抗氧化活性研究 [J]. 食品科学, 2005, 26(1): 218-222.

[16] 刘宪勇, 李振山, 付素心, 等. HPLC 法测定珍龙醒脑胶囊中胆酸的含量 [J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(2): 15-16.

[17] 任松鹏, 孙绪丁, 赵延霞, 等. HPLC 法测定珍龙醒脑胶囊中西红花的含量 [J]. 中外医疗, 2014, 33(5): 20.