

UPLC 法测定通塞脉微丸中绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸的含量^{*}王皓,狄留庆^{**},文红梅,赵晓莉,陶金华,汪海鸿

(南京中医药大学,南京 210029)

摘要 目的:建立同时测定通塞脉微丸中绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸 4 种成分的超高效液相色谱(UPLC)分析方法。方法:采用 Waters AcquityUPLC 系统,AcquityUPLC BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.7 μm)色谱柱,以乙腈-0.1% 甲酸水为流动相,梯度洗脱,双波长检测($\lambda_1=276$ nm, $\lambda_2=327$ nm),柱温 35℃。结果:绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸在 16 min 内即达到基线分离,在测定的浓度范围内线性关系良好($r\geq 0.9997$),各成分的平均回收率在 95.1%~98.2%,RSD<4.0%。结论:UPLC 分离效果及重复性好,且快速、简便,可作为通塞脉微丸的质量控制方法。

关键词: 通塞脉微丸;绿原酸;阿魏酸;甘草苷;肉桂酸;超高效液相色谱

中图分类号:R917

文献标识码:A

文章编号:0254-1793(2011)04-0655-04

UPLC determination of chlorogenic acid,ferulic Acid,liquiritin and cinnamic acid in Tongsaimai pellets^{*}WANG Hao,DI Liu-qing^{**},WEN Hong-mei,ZHAO Xiao-li,
TAO Jin-hua,WANG Hai-hong

(College of Pharmacy,Nanjing University of Chinese Medicine,Nanjing 210029,China)

Abstract Objective: To establish a ultra performance liquid chromatography(UPLC) method for simultaneous determination of 4 components—chlorogenic acid,ferulic acid,liquiritin and cinnamic acid in Tongsaimai pellets.

Methods: The analyses were performed on a Waters AcquityUPLC system equipped with a binary solvent manager,a sampler manager,a column compartment and a PDA detector,connected to Waters Empower 2 software. An AcquityUPLC BEH C₁₈ column (50 mm×2.1 mm,1.7 μm) was used for all analyses. The investigated compounds were separated with gradient mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% formic acid. Chlorogenic acid,ferulic acid,liquiritin and cinnamic acid were determined by dual wavelength of 276 nm(λ_1) and 327 nm(λ_2),and column temperature 35℃. **Results:** Four components could be well separated at the baseline in 16 min. The average recovery was 95.1% to 98.2% with RSD<4.0%. **Conclusion:** The developed UPLC method is simple,sensitive and accurate with good repeatability,which is available for quality control of Tongsaimai pellets.

Key words: Tongsaimai pellets; chlorogenic acid; ferulic acid; liquiritin; cinnamic acid; ultra performance liquid chromatography(UPLC)

通塞脉微丸是在国家中药保护品种《通塞脉片》的基础上二次开发而成的治疗以缺血性脑中风的新型中药制剂^[1,2]。该药由金银花、当归、黄芪、玄参、甘草 6 味药组成,含有挥发油、黄酮、皂苷、酚酸四大类化学成分,其中绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸是通塞脉微丸中主要活性成分^[3],也是国家药品标准中各药材的主要质控指标。由于制剂中成分

复杂,应用 HPLC 分析通常难以获得良好的基线分离,尤其阿魏酸与甘草苷由于结构近似,以往的测定方法中阿魏酸往往与甘草苷重合,或者需要更长的分析时间以实现两者分离^[4,5]。本研究采用了 1.7 μm 小粒径色谱柱填料的超高效液相色谱则提供了高流速下的较高的分析效率^[6],所测定的 4 种成分绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸仅在 16 min 内即达

^{*} 国家科技部 863 计划(2003AA2Z3247);国家自然科学基金项目(30873401);江苏省自然科学基金项目(BK2005150);江苏省“青蓝工程”科技创新团队支持计划

^{**} 通讯作者 Tel: (025) 86798226; E-mail: diliuqing928@163.com

到了良好分离,保证了快速分析及准确可靠的结果。

1 仪器与试药

Acquity™ 超高效液相色谱系统(美国 Waters 公司),包括在线真空脱气机、高压二元梯度泵、控温自动进样器、柱温箱、光敏二极管阵列检测器(PDA)和 Empower 2 工作站软件;BP211D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司);TGL-18C-C 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);KQ-250 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

乙腈(美国 Tedia 公司,色谱纯);重蒸去离子水(实验室制备);甲酸(上海化学试剂有限公司,分析纯);甲醇(上海化学试剂有限公司,分析纯)。

对照品绿原酸(批号 110753-200413)、阿魏酸(批号 110773-200611)、甘草苷(批号 111610-200604)、肉桂酸(批号 110786-200503)均由中国药品生物制品检定所提供,均为供含量测定用规格。通塞脉微丸剂由本院自制,批号分别为 20100124, 20100226, 20100302。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: A(乙腈) - B(0.1% 甲酸水溶液); 梯度洗脱见表 1; 双波长检测: λ₁ = 276 nm(检测甘草苷、肉桂酸), λ₂ = 327 nm(检测绿原酸、阿魏酸); 柱温: 35 °C; 进样量: 1 μL。此色谱条件下,4 个成分分离良好,见图 1、图 2。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedures

时间 (time) /min	流动相 A (mobile phase A) /%	流动相 B (mobile phase B) /%	流速 (flow rate) /mL · min ⁻¹
0.00	10.0	90.0	0.4
2.00	14.0	86.0	0.4
3.60	14.0	86.0	0.4
3.80	10.0	90.0	0.4
5.20	10.0	90.0	0.4
5.40	19.0	81.0	0.4
7.50	19.0	81.0	0.4
7.70	20.0	80.0	0.4
12.00	20.0	80.0	0.4
12.20	60.0	40.0	0.4
14.50	60.0	40.0	0.4
14.70	10.0	90.0	0.4
16.00	10.0	90.0	0.4

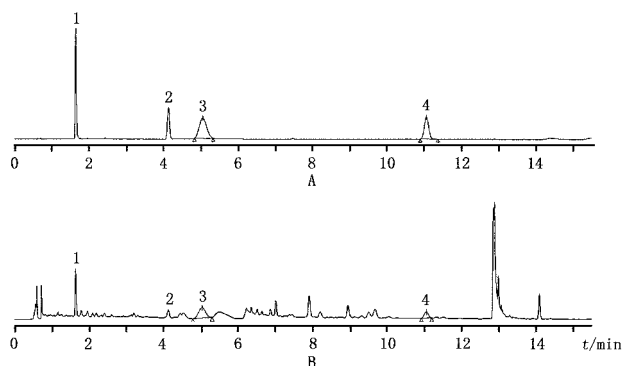


图 1 276 nm 处超高效液相色谱图

Fig 1 UPLC chromatograms at 276 nm

A. 对照品(reference substance) B. 样品(sample)

1. 绿原酸(chlorogenic acid) 2. 阿魏酸(ferulic acid) 3. 甘草苷(liquiritin) 4. 肉桂酸(cinnamic acid)

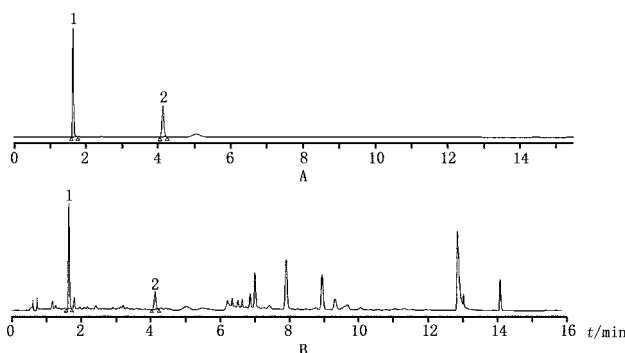


图 2 327 nm 处超高效液相色谱图

Fig 2 UPLC chromatograms at 327 nm

A 对照品(reference substance) B. 样品(sample)

1. 绿原酸(chlorogenic acid) 2. 阿魏酸(ferulic acid)

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取通塞脉微丸,混匀,研细,取 0.8 g,精密称定,置 50 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇 40 mL,超声(40 kHz, 500 W) 25 min,然后冷却至室温,摇匀并定容至 50 mL,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液备用。

2.2.2 对照品混合储备液 精密称取对照品绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸各适量,以 50% 甲醇溶解,摇匀并定容,制成含绿原酸 574.00 μg · mL⁻¹、阿魏酸 155.00 μg · mL⁻¹、甘草苷 532.00 μg · mL⁻¹、肉桂酸 86.00 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

2.2.3 阴性供试品溶液 绿原酸来源于金银花,阿魏酸来源于金银花、当归,甘草苷来源于甘草,肉桂酸来源于玄参,按通塞脉微丸的生产工艺制备缺金银花,当归、甘草、玄参的阴性制剂,并按照供试品溶液的制备方法制备阴性供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 空白干扰试验 取阴性供试品溶液进样 1 μL , 测定, 得 UPLC 图谱, 结果表明阴性制剂对所测组分无干扰。

2.3.2 线性关系、检测限 (LOD) 及定量限 (LOQ)

精密吸取按“2.2.2”项下方法制成的绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸 4 个成分的对照品混合储备液, 用倍比稀释的方法以 50% 甲醇制成 5 个浓度点

的系列对照品混合溶液, 在上述色谱条件下, 分别进样 1 μL , 每个浓度平行进样 2 针, 测量峰面积值。以对照品峰面积平均值 Y 与对照品浓度 X ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行线性回归, 结果见表 2。将混合对照品溶液用 50% 甲醇不断进行稀释后作 UPLC 分析, 得到 5 个成分的 LOD 值 ($S/N = 3$) 和 LOQ 值 ($S/N = 10$), 结果见表 2。

表 2 各成分的线性回归方程及 LOD、LOQ 测定结果
Tab 2 Linear regression equation, LOD and LOQ data for 4 compounds

成分 (compound)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	LOD / ng	LOQ / ng
绿原酸(chlorogenic acid)	$Y = 7.411 \times 10^3 X - 6.043 \times 10^4$	0.9997	35.88 ~ 574.00	0.13	0.31
阿魏酸(ferulic acid)	$Y = 1.313 \times 10^3 X - 2.001 \times 10^4$	0.9997	9.69 ~ 155.00	0.10	0.32
甘草苷(liquiritin)	$Y = 4.368 \times 10^3 X - 2.975 \times 10^4$	0.9998	33.25 ~ 532.00	1.11	3.69
肉桂酸(cinnamic acid)	$Y = 1.636 \times 10^4 X - 1.381$	0.9998	5.38 ~ 86.00	0.17	0.57

2.3.3 精密度考察 取“2.3.2”项下各对照品线性范围中间浓度点的对照品混合溶液, 连续进样 6 次, 每次 1 μL , 测定各成分的峰面积, 分别计算其 RSD。结果绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸的 RSD 分别为 1.1%, 0.13%, 0.35%, 0.51%, 表明精密度良好。

2.3.4 重复性考察 取通塞脉微丸 (批号 20100124), 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 平行试验 6 份。分别取上述供试品溶液 1 μL , 进样, 测定峰面积, 计算各成分的含量和 RSD。结果绿原酸, $11.99 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、0.75%; 阿魏酸, $1.90 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、1.40%; 甘草苷, $13.42 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、2.69%; 肉桂酸, $1.27 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、0.90%, 结果表明方法具有良好的重复性。

2.3.5 稳定性试验 取通塞脉微丸 (批号 20100124), 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12 h 各取 1 μL 进样测定各成分的峰面积, 计算 RSD。结果绿原酸 0.48%、阿魏酸 0.51%、甘草苷 0.32%、肉桂酸 1.5%。表明, 供试品溶液在室温条件下 12 h 内测定结果稳定。

2.3.6 加样回收率考察 精密称取已测知含量的通塞脉微丸样品 0.4 g 共 6 份, 分别加入一定量的 4 个化合物的对照品, 按照“2.2.1”项下方法制备供试溶液, 进样 1 μL , 按上述色谱条件测定, 分别计算回收率。其平均回收率及 RSD 值见表 3。

表 3 4 种成分的加样回收率结果 ($n = 6$)
Tab 3 Recovery of 4 investigated compounds

成分 (compound)	加入量 (added) / μg	检出量 (found) / μg	回收率 (recovery) / %	RSD / %
绿原酸(chlorogenic acid)	143.50	140.78	98.1	0.95
阿魏酸(ferulic acid)	38.75	38.06	98.2	2.5
甘草苷(liquiritin)	133.00	126.53	95.1	1.8
肉桂酸(cinnamic acid)	21.50	20.78	96.6	3.6

2.4 样品测定 分别取 3 批通塞脉微丸, 按照“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 每批平行 2 份, 每份进样 2 次, 进样 1 μL , 按本文所述的色谱条件对绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸进行含量测定, 结果见表 4。

表 4 样品中 4 种成分含量测定
Tab 4 Contents of 4 compounds in samples

批号 (Lot No.)	绿原酸(chlorogenic acid)		阿魏酸(ferulic acid)		甘草苷(liquiritin)		肉桂酸(cinnamic acid)	
	$C/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/ %	$C/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/ %	$C/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/ %	$C/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/ %
20100124	11.97	0.65	1.90	0.84	13.86	0.05	1.27	0.40
20100226	11.66	0.07	1.87	0.07	13.33	0.29	1.25	0.16
20100302	11.76	0.28	1.87	0.33	13.37	0.58	1.28	0.86

3 结果与讨论

3.1 本研究建立了 UPLC 双波长法同时测定通塞脉微丸中绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸 4 个成分含量,所测 4 个成分分别归属金银花、当归、甘草、玄参 4 味药材,且 UPLC 法与 HPLC 法相比,分析时间短,分离效率高,重复性好,准确简便,因此此法可以更加全面、快速、有效地控制本产品质量。

3.2 本研究曾选用不同溶剂系统作为流动相进行试验,如乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1% 磷酸水、乙腈-0.5% 甲酸水、乙腈-1.0% 甲酸水等溶剂系统。结果表明,乙腈-1.0% 甲酸水梯度洗脱对通塞脉微丸的分离效果最好。

3.3 本研究分别对 4 个对照品溶液的紫外扫描图谱分析,得知绿原酸、阿魏酸、甘草苷、肉桂酸的最大吸收波长分别为 327 nm, 320 nm, 276 nm, 278 nm。因此本研究选用双波长检测,于 276 nm 波长处检测甘草苷、肉桂酸;于 327 nm 波长处检测绿原酸和阿魏酸。在此条件下,所需检测的各峰分离度及峰形均较佳,灵敏度也较高。

3.4 为了尽可能全面反映药材的化学信息,本研究对供试品溶液制备方法进行考察。选择甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇、25% 甲醇、水 5 个溶剂进行提取,结果 50% 甲醇提取的样品信息量较多,峰面积较大;对回流、超声提取方法进行了比较,结果超声法所得峰面积为回流法的 95% 以上,考虑到操作的方便性,确定选择超声法;选择不同超声提取次数,结果 1 次超声 25 min 即能提取完全。

参考文献

- 1 LI Wei-dong(李伟东), DI Liu-qing(狄留庆), YANG Ya-xiang(羊亚香). Study on extraction techniques of compound Tongsaimeipian(复方通塞脉片提取工艺的研究). *J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol*(河北中医药药理报), 2004, 19(4): 24
- 2 WANG Ai-yun(王爱云), LU Yin(陆茵), JI Jian-bing(季建兵), et al. Study on the antithrombotic effects of Tongsaimeipellets(通塞脉微丸对动物体内血栓形成的影响). *Pharmacol Clin Chin Mater Med*(中国药理与临床), 2009, 25(6): 84
- 3 LI Wei-dong(李伟东), CAI Bao-chang(蔡宝昌). Study on chemical constituents in the active fractions of Tongsaimeipellets(通塞脉微丸活性部位群化学成分的研究). *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*(南京中医药大学学报), 2009, 25(3): 187
- 4 CHI Yu-mei(池玉梅), CUI Xiao-bing(崔小兵), CHEN Wei(陈维), et al. Determination of chlorogenic acid and ferulic acid and liquiritin in Tong Sai Mai tinypil by dual wavelength high-performance liquid chromatography with gradient elution(HPLC 双波长梯度洗脱同时测定通塞脉微丸中绿原酸、阿魏酸、甘草苷的含量). *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2007, 42(17): 1348
- 5 ZHOU Jun(周军), SUN Yan(孙艳), ZHANG Jing(张晶), et al. RP-HPLC analysis of paeoniflorin, ferulic acid, cinnamic acid and glycyrrhizic acid in Shiquan Dabu syrups(HPLC 法测定十全大补糖浆中芍药苷、阿魏酸、肉桂酸及甘草酸的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2009, 29(9): 1501
- 6 HAO Jia-ming(郝桂明), TANG Su-fang(唐素芳). Applications of ultra performance liquid chromatography in pharmaceutical analysis(超高效液相色谱在药物分析中的应用). *Tianjin Pharm*(天津药学), 2009, 21(6): 64

(本文于 2010 年 3 月 18 日收到)