

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.19.013

高效液相色谱法同时测定和营合剂中阿魏酸和丹酚酸 B 含量*

唐静月, 张文明, 费倩倩, 卞振华, 袁晓航, 胡敏敏[△]

(江苏省无锡市中医医院, 江苏 无锡 214000)

摘要:目的 建立同时测定和营合剂中阿魏酸和丹酚酸 B 含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A) - 0.2% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min 时 5%A~10%A, 5~15 min 时 10%A~14%A, 15~25 min 时 14%A~15%A, 25~30 min 时 15%A~17%A, 30~45 min 时 17%A~21%A, 45~55 min 时 21%A~22%A, 55~63 min 时 22%A); 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 ℃; 检测波长为 321 nm; 进样量为 10 μL。结果 阿魏酸和丹酚酸 B 的质量浓度分别在 2.27~22.74 μg/mL ($r=0.999\ 9, n=6$) 和 27.05~270.48 μg/mL ($r=0.999\ 7, n=6$) 范围内与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率分别为 100.75% 和 99.06%, RSD 分别为 1.71% 和 2.24% ($n=6$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.50% ($n=6$)。每 1 mL 样品中分别含阿魏酸 7.77 μg 和丹酚酸 B 193.17 μg ($n=3$)。结论 该方法操作简便、结果准确、稳定性和重复性均良好, 可用于和营合剂中阿魏酸和丹酚酸 B 含量的测定。

关键词:和营合剂; 高效液相色谱法; 阿魏酸; 丹酚酸 B; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)19-0068-03

Simultaneous Determination of Ferulic Acid and Salvianolic Acid B in Heying Mixture by HPLC

TANG Jingyue, ZHANG Wenming, FEI Qianqian, BIAN Zhenhua, YUAN Xiaohang, HU Minmin

(Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuxi, Jiangsu, China 214000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of ferulic acid and salvianolic acid B in Heying Mixture. **Methods** The chromatographic column was Waters XBridge C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), and the mobile phase was acetonitrile (A) - 0.2% phosphoric acid aqueous solution (B) with gradient elution (5%A - 10%A at 0 - 5 min, 10%A - 14%A at 5 - 15 min, 14%A - 15%A at 15 - 25 min, 15%A - 17%A at 25 - 30 min, 17%A - 21%A at 30 - 45 min, 21%A - 22%A at 45 - 55 min and 22%A at 55 - 63 min). The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 321 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of ferulic acid and salvianolic acid B were 2.27 - 22.74 μg/mL ($r=0.999\ 9, n=6$) and 27.05 - 270.48 μg/mL ($r=0.999\ 7, n=6$), respectively. The average recoveries of ferulic acid and salvianolic acid B were 100.75% and 99.06% with RSDs of 1.71% and 2.24% ($n=6$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 2.50% ($n=6$). There were 7.77 μg of ferulic acid and 193.17 μg of salvianolic acid B each 1 mL of sample ($n=3$). **Conclusion** This method is simple, accurate, stable and repeatable, which can be used for the determination of ferulic acid and salvianolic acid B in Heying Mixture.

Key words: Heying Mixture; HPLC; ferulic acid; salvianolic acid B; content determination

和营合剂为无锡市中医医院研制的中药复方制剂, 由当归、丹参、白芍、女贞子、生地、桑叶、茯苓、合欢皮、柴胡9味中药材组方。方中, 当归、丹参通行血脉, 活血化瘀; 女贞子、白芍、桑叶、生地补益肝肾之阴, 平抑肝阳; 茯苓、合欢皮健脾宁心, 安神解郁; 柴胡升清达阳, 并可引诸药直达病所。诸药合用, 具有活血化瘀、和营退斑功效^[1], 临床主要用于治疗面部色斑、夜寐不安等证。现行质量标准收载于《江苏省食品药品监督管理局医疗机构制剂标准》JSZBZ20090058Z, 仅有性状和制剂通则检查项目, 未收载含量测定, 且有关该制剂的质量控制标准及主要成分的基础研究少有报道。为进一步控制和营合剂的质量, 保证临床用药的有效性和安全性, 本研究中建立了同时测定和营合剂中阿魏酸和丹酚酸 B

含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司); BSA224S - CW型电子天平(德国Sartorius公司, 精度为万分之一); KQ - 300E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司, 功率为300 W, 频率为40 kHz)。

1.2 试药

阿魏酸对照品(批号为B20007), 丹酚酸 B 对照品(批号为B20261), 均购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度均不低于98%; 和营合剂(医院制剂, 批号分别为20211025, 20211026, 20211027); 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为纯净水。

*基金项目: 全国中药特色技术传承人才培养项目[T20194828003]; 江苏省无锡市中医医院科研项目[ZYYB21024]。

第一作者: 唐静月, 女, 硕士研究生, 主管中药师, 研究方向为中药质量控制及质量标准, (电子信箱)tangjingyue1230@163.com。

[△]通信作者: 胡敏敏, 女, 硕士研究生, 副主任中药师, 研究方向为中药制剂制备与传承, (电子信箱)47028239@qq.com。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters XBridge C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.2% 磷酸水溶液(B), 梯度洗脱(0~5 min时 5%A~10%A, 5~15 min时 10%A~14%A, 15~25 min时 14%A~15%A, 25~30 min时 15%A~17%A, 30~45 min时 17%A~21%A, 45~55 min时 21%A~22%A, 55~63 min时 22%A); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 321 nm; 进样量: 10 μL。

2.2 溶液制备

取阿魏酸、丹酚酸B对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成每1 mL含阿魏酸22.74 μg、丹酚酸B 270.48 μg的混合对照品溶液。精密量取样品3 mL, 置5 mL容量瓶中, 加甲醇适量, 超声处理(功率为300 W, 频率为40 kHz) 10 min, 放冷, 用甲醇定容, 摇匀, 滤过, 即得供试品溶液。取不含当归和地黄、不含丹参的阴性样品, 按供试品溶液制备方法分别制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验: 精密吸取2.2项下4种溶液各适量, 按2.1项下色谱条件进样测定, 色谱图见图1。供试品溶液色谱中, 阿魏酸和丹酚酸B色谱峰有效分离, 峰形良好, 对照品溶液色谱存在相应色谱峰, 且阴性对照品溶液对测定无干扰。

线性关系考察: 精密吸取2.2项下混合对照品溶液0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 5.0 mL, 分别置5 mL容量瓶中, 加甲醇稀释并定容, 按2.1项下色谱条件进样测定, 分别以阿魏酸和丹酚酸B溶液的质量浓度为横坐标(X , μg/mL)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得阿魏酸和丹酚酸B的回归方程分别为 $Y_{\text{阿}} = 36.552 X_{\text{阿}} + 2.620$ ($r = 0.9999, n = 6$), $Y_{\text{丹}} = 5.935 X_{\text{丹}} - 119.655$ ($r = 0.9997, n = 6$)。结果表明, 阿魏酸和丹酚酸B质量浓度分别在2.27~22.74 μg/mL和27.05~270.48 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取2.2项下混合对照品溶液适量, 按

2.1项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果阿魏酸和丹酚酸B峰面积的RSD分别为0.18%和0.98% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取同一批(批号为20211025)样品, 依法制备供试品溶液, 分别于0, 2, 8, 12, 16, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果阿魏酸和丹酚酸B峰面积的RSD分别为1.76%和1.95% ($n = 6$), 表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

重复性试验: 取同一批(批号为20211025)样品6份, 依法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定。结果阿魏酸和丹酚酸B平均含量分别为7.87 μg/mL和193.38 μg/mL, RSD分别为2.27%和0.80% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 精密量取已知含量的样品(批号为20211025)1.5 mL, 共6份, 分别置5 mL容量瓶中, 加入阿魏酸和丹酚酸B对照品溶液适量, 依法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定, 计算阿魏酸和丹酚酸B的加样回收率。结果见表1。

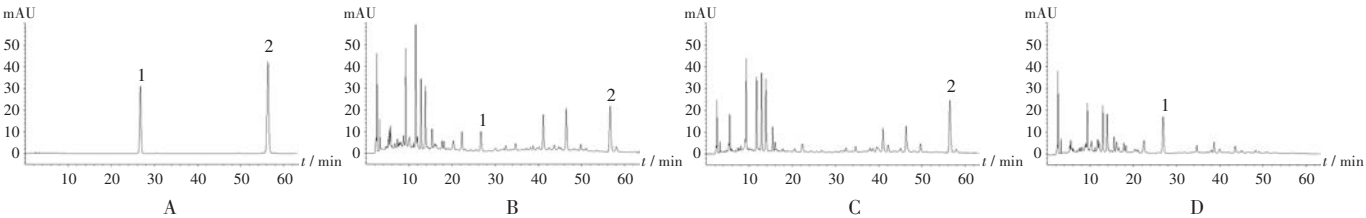
2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为20211025, 20211026, 20211027)样品, 按2.2项下方法制备供试品溶液, 按2.1项下色谱条件进样测定。结果每1 mL样品中分别含阿魏酸7.84, 7.72, 7.75 μg, 平均7.77 μg; 丹酚酸B 196.41, 192.95, 190.16 μg, 平均193.17 μg。

3 讨论

3.1 指标成分选择

方中当归具有补血活血、调经止痛、润肠通便等功效^{[2]139}, 有抗炎、免疫调节、抗抑郁、抗氧化、促进造血功能、调血脂、保肝强肾健体等药理作用^[3-5], 其主要化学成分有挥发油、有机酸、多糖类、黄酮类、氨基酸等^[6], 阿魏酸是当归酚酸类代表性成分和指标性成分; 丹参具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈等功效^{[2]79}, 有改善微循环、抗心肌缺血、防治动脉粥样硬化、抗炎、抗氧化、调血脂等多种药理作用^[7-9], 其主要



1. 阿魏酸 2. 丹酚酸B

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C, D. 阴性对照品溶液(分别为缺当归和地黄、缺丹参)

图1 高效液相色谱图

1. Ferulic acid 2. Salvianolic acid B

A. Mixed reference solution B. Test solution C, D. Negative reference solution (lacking *Angelicae Sinensis Radix* and *Rehmanniae Radix*, lacking *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, respectively)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果($n=6$)
Tab.1 Results of the recovery test ($n=6$)

样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
阿魏酸	丹酚酸B	阿魏酸	丹酚酸B	阿魏酸	丹酚酸B	阿魏酸	丹酚酸B	阿魏酸	丹酚酸B	阿魏酸	丹酚酸B
11.77	293.38	11.76	362.60	23.36	651.82	98.55	98.85				
11.77	293.38	11.76	362.60	23.66	656.58	101.11	100.17				
11.77	293.38	11.76	362.60	23.63	644.99	100.85	96.97	100.75	99.06	1.71	2.24
11.77	293.38	11.76	362.60	23.76	658.89	101.96	100.80				
11.77	293.38	11.76	362.60	23.89	661.76	103.06	101.59				
11.77	293.38	11.76	362.60	23.41	641.37	98.98	95.97				

化学成分有菲醌衍生物、酚酸类、黄酮类、挥发油、无机元素等^[10-11],其中菲醌衍生物与酚酸类化合物是丹参的主要活性成分,以脂溶性成分丹参酮类和水溶性成分丹酚酸类为代表。根据和营合剂中主要药味的活性成分及药理作用,并结合制剂工艺特点及实际情况,选择阿魏酸和丹酚酸B作为其质量控制的指标成分。经前期预试验,进行单味药制备与进样,发现全方9味药材中当归和地黄均含有阿魏酸,且地黄中阿魏酸含量不低,单独制备的缺当归阴性对照品溶液色谱图明显可见阿魏酸色谱峰,为避免阴性出现干扰,故本研究中制备缺当归和地黄的阴性对照品溶液。

3.2 色谱条件选择

考察等度洗脱和梯度洗脱2种模式发现,前者不能较好地分离极性差异大的物质,而后者可使复杂样品中性质差异较大的组分达到良好分离。分别考察甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.2%甲酸水溶液为流动相时色谱峰的分离效果,结果乙腈洗脱效果优于甲醇;其中,加0.2%磷酸水溶液和0.2%甲酸水溶液均优于纯水体系,乙腈-0.2%磷酸水溶液体系获取的色谱峰更全面,基线平稳,阿魏酸和丹酚酸B与相邻色谱峰分离效果较好,色谱峰峰形良好。故选择乙腈-0.2%磷酸水溶液(梯度洗脱)作为流动相系统。

采用二极管阵列检测器做全波长扫描,阿魏酸和丹酚酸B最大吸收波长分别为321 nm和286 nm。2020年版《中国药典(一部)》当归药材含量测定项下,阿魏酸的检测波长为316 nm。为了保证2种成分均有适宜的灵敏度和峰面积响应值,同时记录286,316,321,322,323 nm波长下的色谱峰。结果检测波长为321 nm时,阿魏酸和丹酚酸B峰面积响应值较大,灵敏度较高,与相邻色谱峰分离效果较好。故选择321 nm作为检测波长。

考察不同柱温(25,30,35℃)和不同流速(0.8,1.0 mL/min),以色谱峰峰形、分离度、色谱峰数目、信号响应强弱为指标。结果柱温为30℃时,色谱峰峰形好、数目多,分离度良好,2种成分响应值较大;流速为1.0 mL/min时2种成分与相邻色谱峰分离效果好。综

合考虑,选择柱温为30℃,流速为1.0 mL/min。

3.3 提取方法和溶剂选择

曾考察超声提取(功率为300 W,频率为40 kHz)10,20,30 min的影响,结果超声提取10 min时2种待测成分提取率较高。曾考察不同提取溶剂50%甲醇、70%甲醇、甲醇和70%乙醇,结果显示,70%乙醇提取下的色谱峰较少、峰面积较小;不同体积分数甲醇提取的色谱峰信息均较全面,2种有效成分在以甲醇为提取溶剂时的提取率最高。故选择甲醇作为提取溶剂。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法高效简便、稳定性和重复性均良好,可为制剂的整体质量控制及后期研究提供参考。

参考文献

[1] 汪文. 和营合剂结合中药面膜治疗黄褐斑68例[J]. 陕西中医,2008,29(3):291-292.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
[3] 赵静,夏晓培. 当归的化学成分及药理作用研究现状[J]. 临床合理用药杂志,2020,13(6):172-174.
[4] 任伟钰,郑宜璠,张月梅,等. 当归多糖药理作用的研究进展[J]. 时珍国医国药,2020,31(10):2484-2487.
[5] 韩四九. 中药当归的炮制及应用药理[J]. 北方药学,2019,16(11):194-195.
[6] 黄红泓,覃日宏,柳贤福. 中药当归的化学成分分析与药理作用探究[J]. 世界最新医学信息文摘,2019,19(58):127.
[7] 徐怡,陈途,陈明. 丹参的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2021,33(5):45-48.
[8] 王云龙,房岐,郑超. 丹参化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. 中国药业,2020,29(15):6-10.
[9] 万新焕,王瑜亮,周长征,等. 丹参化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药,2020,51(3):788-798.
[10] 丁凡,王拥军,张岩. 丹参活性成分的药理作用和临床应用研究进展[J]. 中华中医药杂志,2021,36(2):659-662.
[11] 郑琦,樊慧婷,张英,等. 丹参化学成分分析及其抗肿瘤药理作用的研究进展[J]. 中华中医药学刊,2020,38(4):112-116.

(收稿日期:2021-12-16;修回日期:2022-03-16)