

# UPLC法同时测定冠心丹参胶囊中紫草酸和迷迭香酸的含量

张福君<sup>1\*</sup>, 张冬璇<sup>2</sup>(1.天津中医药大学第一附属医院药学部,天津 300192;2.解放军第254医院,天津 300000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2560-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.38

**摘要** 目的:建立同时测定冠心丹参胶囊中紫草酸和迷迭香酸含量的方法。方法:采用超高效液相色谱法。色谱柱为ACQUITY UPLC-BEH C<sub>18</sub>,流动相为0.1%甲酸-甲醇溶液(梯度洗脱),流速为0.3 ml/min,检测波长为280 nm,柱温为30 ℃,进样量为5 μl。结果:紫草酸和迷迭香酸的检测质量浓度线性范围分别为0.019~0.76、0.005~0.2 mg/ml( $r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 7$ );精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;加样回收率分别为97.34%~101.24%(RSD=1.57%, $n=6$ )、98.30%~100.39%(RSD=0.86%, $n=6$ )。结论:该方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于冠心丹参胶囊中紫草酸和迷迭香酸的含量测定。

**关键词** 超高效液相色谱法;冠心丹参胶囊;紫草酸;迷迭香酸

## Simultaneous Determination of Lithospermic Acid and Rosmarinic Acid in Guanxin Danshen Capsule by UPLC

ZHANG Fujun<sup>1</sup>, ZHANG Dongxuan<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300192, China; 2.No.254 Hospital of the Liberation Army, Tianjin 300000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the simultaneous determination of lithospermic acid and rosmarinic acid in Guanxin danshen capsule. METHODS: UPLC was performed on the column of ACQUITY UPLC-BEH C<sub>18</sub> with mobile phase of 0.1% formic acid-methanol solution (gradient elution) at a flow rate of 0.3 ml/min, detection wavelength was 280 nm, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 5 μl. RESULTS: The linear range was 0.019-0.76 mg/ml for lithospermic acid ( $r=0.999\ 9$ ) and 0.005-0.2 mg/ml for rosmarinic acid ( $r=0.999\ 7$ ); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 97.34%-101.24% (RSD=1.57%,  $n=6$ ) and 98.30%-100.39% (RSD=0.86%,  $n=6$ ). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the contents determination of lithospermic acid and rosmarinic acid in Guanxin danshen capsule.

**KEYWORDS** UPLC; Guanxin danshen capsule; Lithospermic acid; Rosmarinic acid

冠心丹参胶囊为中药复方制剂,主要由丹参、三七、降香油等3味中药材组成,具有活血化瘀、理气止痛的功效,临床多用于治疗胸痹、冠心病、心绞痛等症。冠心丹参胶囊制备过程中用乙醇和水分别提取了丹参的脂溶性成分和水溶性成分,2015年版《中国药典》(一部)中只对该制剂的脂溶性成分丹参酮Ⅱ<sub>A</sub>含量进行了规定<sup>[1]</sup>,而未对其水溶性成分(丹参总酚酸等)进行相关规定,不能全面真实地反映冠心丹参胶囊的质量。

丹参总酚酸中含有紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸A、丹酚酸B、丹酚酸C等,具有防治心血管疾病的功效,可保护心肌细胞、抗心肌细胞缺氧损伤、清除自由基等<sup>[2-3]</sup>。丹参总酚酸可检测到紫草酸和迷迭香酸;紫草酸和迷迭香酸也可在大鼠的含药血浆中检测到<sup>[4-5]</sup>。目前,现有文献报道大多采用高效液相色谱(HPLC)法且只测定了冠心丹参胶囊中的指标性活性成分<sup>[6-7]</sup>。因此,为了更好地控制冠心丹参胶囊的质量,笔者采用超高效液相色谱(UPLC)法同时测定冠心丹参胶囊中紫草酸和迷迭香酸的含量。

## 1 材料

\*主管药师。研究方向:中药鉴定。电话:022-27452779。E-mail:shuomingshu2009@126.com

## 1.1 仪器

Acquity UPLC仪,包括二元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、Empower2色谱工作站(美国Waters公司);XS105型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);BT25S型万分之一电子天平(德国Sartorius公司);KQ-500型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:250 W,频率:33 kHz)。

## 1.2 药品与试剂

冠心丹参胶囊(国药控股深圳中药有限公司,批号:121102、120202、121101);紫草酸对照品(批号:MUST-12101114,纯度>99%)、迷迭香酸对照品(批号:MUST-13020702,纯度>99%)均购自成都曼斯特生物科技有限公司;甲醇为色谱纯,甲酸为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC-BEH C<sub>18</sub>(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:0.1%甲酸(A)-甲醇溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);检测波长:280 nm;柱温:30 ℃;进样量:5 μl。

### 2.2 溶液的制备

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	A, %	B, %	流速, ml/min
0	85	15	0.3
3	85	15	0.3
9	40	60	0.3
13	15	85	0.3
16	15	85	0.3
17	85	15	0.3
20	85	15	0.3

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密称取紫草酸对照品、迷迭香酸对照品适量,置于同一100 ml量瓶中,加甲醇定容,制成每1 ml溶液中含紫草酸1.9 mg、迷迭香酸0.5 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品内容物适量,研细,精密称取5.0 g,置于100 ml具塞棕色锥形瓶中,精密加入75%甲醇50 ml,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再次称定质量,用75%甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按冠心病丹参胶囊的处方比例和制备工艺,取缺少丹参的其他中药材,按“2.2.2”项下供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液,即得。

### 2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,理论板数按紫草酸峰和迷迭香酸峰计均>6 000,各成分分离度>1.5。结果表明,阴性对照溶液对测定无干扰。色谱见图1。

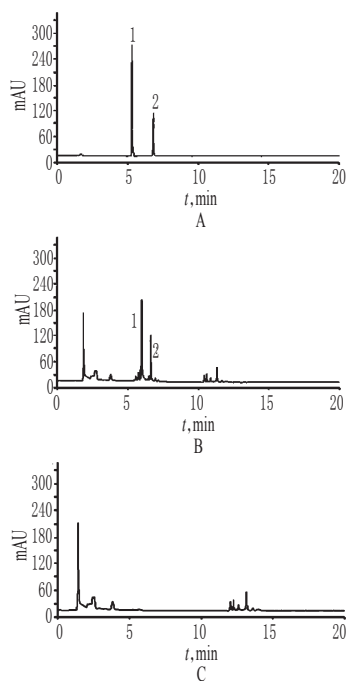


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.迷迭香酸;2.紫草酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A.mixed reference; B.test sample; C.negative control; 1.rosmarinic acid; 2.lithospermic acid

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.10、0.50、1.00、2.00、4.00 ml,分别置于10 ml量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得不同质量浓度的系列混合对照品溶液。取上述系列混合对照品溶液各5 μl,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x, mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得紫草酸的回归方程为 $y=2\ 348\ 173x+9\ 214$  ( $r=0.999\ 9$ )、迷迭香酸的回归方程为 $y=5\ 435\ 150x-1\ 867.25$  ( $r=0.999\ 7$ )。结果表明,紫草酸和迷迭香酸的检测质量浓度线性范围分别为0.019~0.76、0.005~0.2 mg/ml。

### 2.5 精密度试验

精密量取“2.2.1”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,紫草酸和迷迭香酸峰面积的RSD分别为0.75%、0.66% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

精密量取同一供试品溶液(批号:121102)适量,分别于放置0、3、6、9、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,详见表2。由表2可知,供试品溶液在24 h内稳定性良好。

表2 稳定性试验结果( $n=6$ )Tab 2 Results of stability test ( $n=6$ )

待测成分	放置时间, h	含量, mg/g	RSD, %
紫草酸	0	1.13	0.82
	3	1.132	
	6	1.131	
	9	1.127	
	12	1.12	
	24	1.108	
迷迭香酸	0	0.615	0.55
	3	0.61	
	6	0.617	
	9	0.611	
	12	0.611	
	24	0.608	

### 2.7 重复性试验

取同一批样品(批号:121102)适量,精密称定,按“2.2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各成分的含量,详见表3。由表3可知,本方法重复性良好。

### 2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:121102)6份,每份2.5 g,分别精密加入紫草酸对照品和迷迭香酸对照品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表4。

### 2.9 样品含量测定

取3批样品内容物适量,研细,精密称定,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各成分的含量,结果见表5。

## 3 讨论

表3 重复性试验结果(n=6)

Tab 3 Results of reproducibility test (n=6)

待测成分	测定次数	含量,mg/g	RSD,%
紫草酸	1	1.14	1.73
	2	1.13	
	3	1.14	
	4	1.13	
	5	1.12	
	6	1.09	
迷迭香酸	1	0.62	1.51
	2	0.63	
	3	0.64	
	4	0.62	
	5	0.61	
	6	0.62	

表4 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 4 Results of recovery tests (n=6)

待测成分	取样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
紫草酸	2.502	2.813	2.821	5.622	99.57	98.97	1.57
	2.501	2.821	2.821	5.581	97.84		
	2.501	2.815	2.821	5.573	97.77		
	2.503	2.822	2.821	5.678	101.24		
	2.501	2.823	2.821	5.569	97.34		
	2.502	2.818	2.821	5.641	100.07		
迷迭香酸	2.503	1.529	1.531	3.066	100.39	99.23	0.86
	2.502	1.528	1.531	3.061	100.13		
	2.502	1.528	1.531	3.038	98.63		
	2.501	1.529	1.531	3.047	99.15		
	2.504	1.532	1.531	3.044	98.76		
	2.503	1.527	1.531	3.032	98.30		

表5 样品含量测定结果(n=3,mg/g)

Tab 5 Results of contents determination of samples (n=3, mg/g)

批号	紫草酸	迷迭香酸
121102	1.129	0.613
120202	1.132	0.652
121101	1.124	0.622

### 3.1 提取溶剂和超声时间的选择

本试验在制备冠心病丹参胶囊的供试品溶液时,采用超声提取的方式,对提取溶剂(50%、75%、85%甲醇)、提取时间(15、30、45、60 min)进行了考察,参考相关文献<sup>[8-9]</sup>并综合考虑试验效果、经济实用性等因素,最终确定本试验的提取溶剂为75%甲醇、超声提取时间为30 min。

### 3.2 检测波长的选择

在预试验时,笔者曾取紫草酸和迷迭香酸的混合对照品溶液在200~400 nm紫外波长下扫描,结果两种物质在280 nm波长处均有较强吸收,且灵敏度高,色谱图杂质峰干扰少,因此本试验选择280 nm为检测波长<sup>[10-11]</sup>。

### 3.3 流动相的选择

在流动相的选择上,由于紫草酸、迷迭香酸属于极性较强的酚酸类化合物,仅采用甲醇-水或乙腈-水进行梯度洗脱难以获得较好的分离效果,因此考虑在流动相中加入一定比例的有机酸溶液,来抑制由于酚酸类成分的解离而导致色谱峰拖尾的现象<sup>[12]</sup>。笔者考察了不同比例的甲酸、醋酸、磷酸溶液分离效果,最终确定0.1%甲酸-甲醇溶液为本试验的流动相。

综上所述,本方法操作简便、结果准确、重复性好,可用于冠心病丹参胶囊中紫草酸和迷迭香酸的含量测定。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:1 310.
- [2] 赵磊,蒲小平. 丹参粉针剂对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(14):39.
- [3] 刘娟,刘颖. 丹参药理活性成分研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(7):15.
- [4] 林晓斐,林力,张颖,等. 丹参提取物中5种酚酸类成分在大鼠血浆中的LC-MS/MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(8):93.
- [5] 林力,刘建勋,张颖,等. LC-MS/MS法同时测定犬血浆中丹酚酸A、丹酚酸B、紫草酸和迷迭香酸及其在丹参提取物的药代动力学研究应用[J]. 世界科学技术, 2012, 14(3):1 567.
- [6] 王建国,万慧杰,朱贺年. HPLC测定冠心病丹参胶囊中人参皂苷Rb<sub>1</sub>、人参皂苷Rg<sub>1</sub>、三七皂苷R<sub>1</sub>[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):98.
- [7] 张黎莉,倪健,原素敏,等. 高效液相色谱法测定冠心病丹参胶囊中丹酚酸B的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2007, 14(2):39.
- [8] 杨小英,马启珍,刘帅. 不同剂型冠心病丹参制剂中丹参酮IIA含量的比较分析[J]. 中国药房, 2009, 20(21):1 640.
- [9] 刘芷,贾英等. 五味子的UPLC指纹图谱研究[J]. 中草药, 2014, 45(11):1 631.
- [10] 张翠英,董梁等. 人参药材皂苷类成分UPLC特征图谱的质量评价方法[J]. 药学报, 2010, 45(10):1 296.
- [11] 母会丹,朱靖博,等. 白芍化学成分UPLC/Q-TOF-MS分析[J]. 分析实验室, 2013, 32(7):113.
- [12] 朱婉婷,王淑美,等. UPLC法测定冠脉康片中3种成分含量[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(6):29.

(收稿日期:2015-12-17 修回日期:2016-03-31)

(编辑:刘 柳)

《中国药房》杂志——《国际药文摘》(IPA)收录期刊,欢迎投稿、订阅