

HPLC 法同时测定排石颗粒中 3 个酚酸类成分的含量*

邓会云¹, 邓渝², 周雷罡², 袁铭铭², 王茜², 潘蕾^{2**}, 周国平^{2**}

(1. 江西南昌济生制药厂, 南昌 330015; 2. 江西省药品检验检测研究院,
江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029)

摘要 目的: 建立同时测定排石颗粒中咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 3 个酚酸类成分含量的高效液相色谱法。方法: 采用 SunFire C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈 (A)–0.1% 甲酸水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 330 nm, 柱温 30 °C。结果: 咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 进样量分别在 0.026 8~0.535 0 μg ($r=0.999\ 9$)、0.261 8~5.236 0 μg ($r=0.999\ 9$) 和 0.010 2~0.203 6 μg ($r=0.999\ 9$) 范围内与峰面积呈现良好的线性关系; 平均回收率 ($n=6$) 分别为 95.6%、99.0% 和 97.6%, RSD 分别为 1.1%、1.1% 和 1.4%; 13 批样品中咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 含量范围分别为 15.06~25.33、118.24~264.13 和 8.78~18.30 μg · g⁻¹。结论: 该方法可用于排石颗粒的质量控制。

关键词: 排石颗粒; 咖啡酰甘醇酸; 迷迭香酸; 丹酚酸 A; 酚酸类成分; 连钱草; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2018) 07-1243-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.07.21

Simultaneous determination of three phenolic acids in Paishi granules by HPLC*

DENG Hui-yun¹, DENG Yu², ZHOU Lei-gang², YUAN Ming-ming²,
WANG Xi², PAN Lei^{2**}, ZHOU Guo-ping^{2**}

(1. Jiangxi Nanchang Jisheng Pharmaceutical Factory, Nanchang 330015, China; 2. Jiangxi Institute for Drug Control,
Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China)

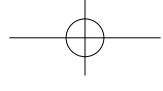
Abstract Objective: To establish an HPLC method for the simultaneous determination of three phenolic acids in Paishi granules, namely, caffeoylglycolic acid, rosmarinic acid and salvianolic acid A. **Methods:** The SunFire C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used, the mobile phase was acetonitrile (A)–0.1% phosphoric acid (B) with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The detection wavelength was 330 nm and the column temperature was at 30 °C. **Results:** The linear ranges of caffeoylglycolic acid, rosmarinic acid and salvianolic acid A were 0.026 8–0.535 0 μg ($r=0.999\ 9$), 0.261 8–5.236 0 μg ($r=0.999\ 9$) and 0.010 2–0.203 6 μg ($r=0.999\ 9$), respectively. The average recoveries ($n=6$) were 95.6% (RSD=1.1%), 99.0% (RSD=1.1%) and 97.6% (RSD=1.4%)

* 江西省重点研发计划项目 (20171BBG70104)

** 通信作者 周国平 Tel: 13870868633; E-mail: 13870868633@139.com

潘蕾 Tel: (0791) 88158637; E-mail: panlei@163.com

第一作者 Tel: 13707091150; E-mail: 502885489@qq.com



respectively. The contents of caffeoylglycolic acid, rosmarinic acid and salvianolic acid A in thirteen batches of samples were $15.06\text{--}25.33\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $118.24\text{--}264.13\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and $8.78\text{--}18.30\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** The method can be used to control the quality of Paishi granules.

Keywords: Paishi granules; caffeoylglycolic acid; rosmarinic acid; salvianolic acid A; phenolic acids; Glechomae Herba; assay; HPLC

排石颗粒是由连钱草、盐车前子、木通、徐长卿、石韦、忍冬藤、滑石、瞿麦、苘麻子、甘草 10 味中药加工制成的复方制剂^[1-2]。具有清热利水及通淋排石的功效,临床用于治疗下焦湿热所致的石淋,症见腰腹疼痛,排尿不畅或伴有血尿,泌尿系结石等症状^[3-4],疗效较好^[5-7]。该药标准收载于《中华人民共和国药典》2015 版一部^[8]。现有标准项目有性状、熊果酸薄层色谱鉴别及总黄酮含量测定,其检测项目专属性较差。连钱草是方中君药,文献报道连钱草中酚酸类化合物有利于减少草酸钙沉积,有效抑制结石的形成,使尿液变成酸性而溶解化散结石,同时改善组织细胞的代谢和功能,加速尿液排放,促进微结石排出体外^[9],因此,酚酸类化合物是连钱草排石的主要活性成分,迷迭香酸、丹酚酸 A 和咖啡酸为连钱草中主要的酚酸类化合物,其中丹酚酸 A 在抗氧化,抗肺纤维化,抗肿瘤,心肌缺血保护,神经保护和防治糖尿病及并发症等多方面有着显著的药理活性和药效作用^[10]。咖啡酰甘醇酸(caffeoylglycolic acid)为一种天然的酚类化合物,具有抗炎活性^[11-12]。迷迭香酸具有抗氧化、抗炎、抗菌、抗病毒等多种生物活性^[13]。已有文献报道采用高效液相色谱法测定连钱草或排石颗粒中迷迭香酸的含量^[14-15],但同时测定排石颗粒中连钱草的 3 个酚酸成分未见报道,本研究采用高效液相色谱法对排石颗粒中 3 个酚酸类活性成分咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 进行了含量测定,在样品中的 3 个成分可以达到完全分离,测定方法准确,专属性好,为评价和控制排石颗粒的质量提供科学的依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1260 型高效液相色谱仪,包括 G1311C 四元泵、在线脱气机、G1315D DAD、G1329B 自动进样器、LC1260 色谱工作站、G1316A 柱温箱; Sartorius BT25S 电子天平(十万分之一), Sartorius BSA124S-CW 电子天平(万分之一)。

1.2 试药 对照品咖啡酰甘醇酸和丹酚酸 A 为本课题组自制,通过 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、MS 等手段确

证了其结构,经 HPLC 法检测,纯度 $>98\%$ (面积归一法);迷迭香酸对照品(批号 111871-201414)购自中国食品药品检定研究院,纯度 $>98\%$ 。水为娃哈哈饮用纯净水,乙腈(Sigma 公司)为色谱纯,甲醇及乙醇(上海振兴化工一厂)、甲酸(西陇科学股份有限公司)为分析纯。13 批排石颗粒样品以及连钱草药材和缺连钱草的阴性样品均由江西济生制药厂提供。

2 溶液的制备

2.1 混合对照品溶液 取咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 的对照品适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度分别为 26.75 、 261.80 和 $10.18\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合溶液,即得。

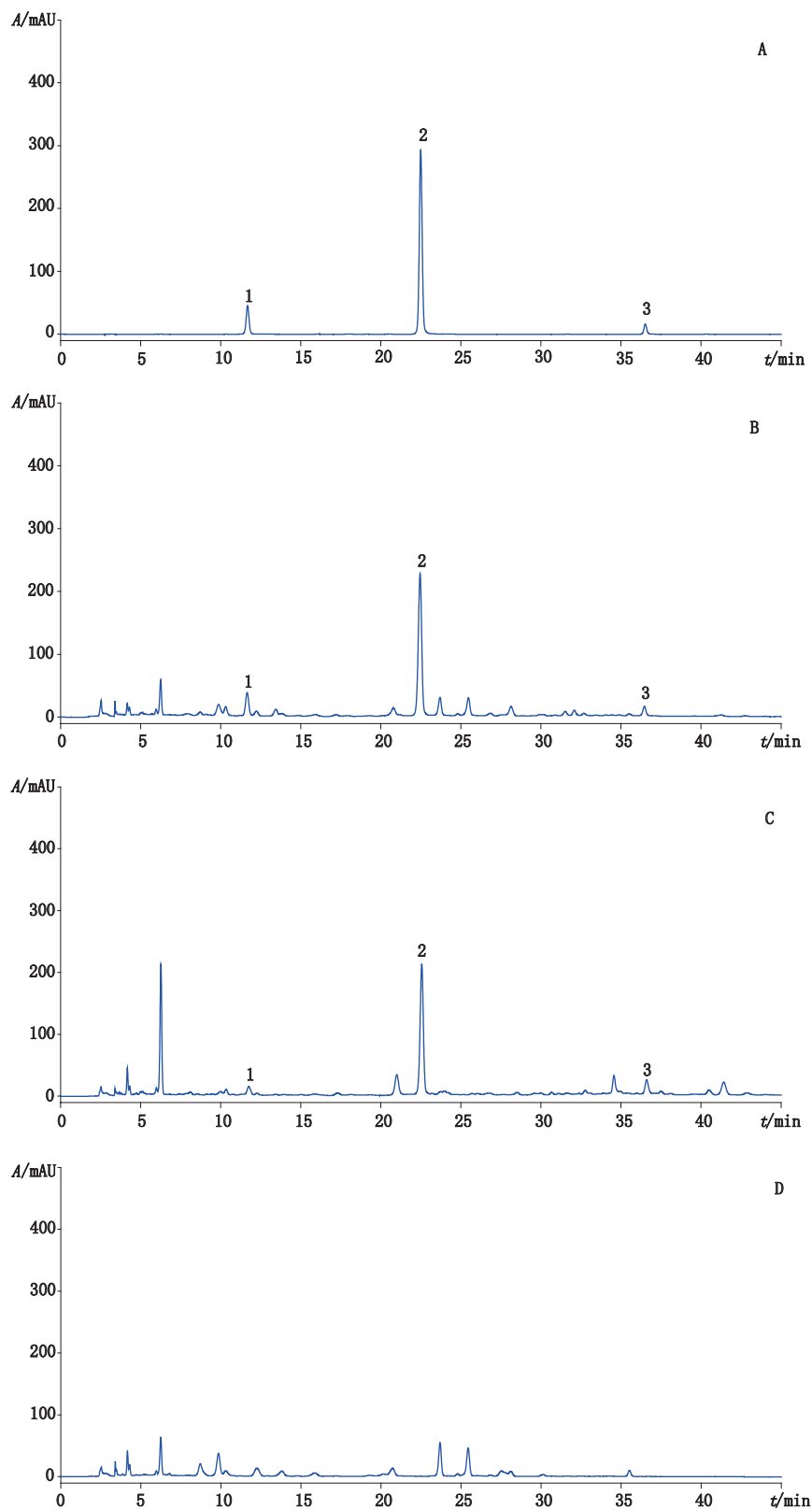
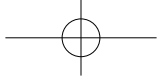
2.2 供试品溶液 取排石颗粒粉末(过 3 号筛)约 10 g ,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇水 50 mL ,密塞,称量,加热回流 1 h ,放冷,再称量,用 70% 乙醇补足减失的量,摇匀,滤过,精密量取续滤液 25 mL ,蒸干,残渣加 30 mL 水使溶解,置于分液漏斗中,用乙酸乙酯萃取 4 次,每次 40 mL ,收集乙酸乙酯部分,蒸干,残渣加甲醇适量使溶解,转移至 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,即得。

2.3 连钱草药材溶液 取连钱草药材粉末(过 2 号筛)约 1 g ,精密称定,同供试品溶液制备方法制得连钱草药材溶液。

2.4 阴性样品溶液 取缺连钱草的阴性样品粉末(过 3 号筛)约 10 g ,精密称定,同供试品溶液制备方法制得阴性样品溶液。

3 色谱条件

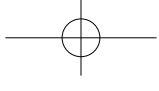
色谱柱: Waters SunFire C₁₈($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\ \mu\text{m}$); 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相: 乙腈(A)- 0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱($0\text{--}15\text{ min}$, $20\%\text{A}$; $15\text{--}20\text{ min}$, $20\%\text{A}\rightarrow 25\%\text{A}$; $20\text{--}25\text{ min}$, $25\%\text{A}$; $25\text{--}30\text{ min}$, $25\%\text{A}\rightarrow 31\%\text{A}$; $30\text{--}45\text{ min}$, $31\%\text{A}$); 流速: $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长: 330 nm ; 进样量: $10\ \mu\text{L}$; 分析时间: 45 min ; 样品色谱中与各对照品对应的吸收峰的理论板数均不低于 3000 。在上述色谱条件下,色谱图见图 1。



1. 咖啡酰甘醇酸 (caffeoylglycolic acid) 2. 迷迭香酸 (rosmarinic acid) 3. 丹酚酸 A (salvianolic acid A)

图1 混合对照品 (A)、排石颗粒样品 (B)、连钱草药材 (C) 和缺连钱草阴性样品 (D) 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of reference substances (A), Paishi granules sample (B), Glechomae Herba (C) and negative sample without Glechomae Herba (D)



4 方法学考察

4.1 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL , 分别按“3”项下色谱条件进样分析, 以进样量 X (μg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 进行线性回归处理。得咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 的回归方程:

$$Y=4\,360.481\,0X-1.215\,0 \quad r=0.999\,9$$

$$Y=2\,876.622\,9X-10.432\,3 \quad r=0.999\,9$$

$$Y=4\,135.421\,1X-2.012\,2 \quad r=0.999\,9$$

结果表明, 咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 进样量分别在 0.026 8~0.535 0、0.261 8~5.236 0 和 0.010 2~0.203 6 μg 范围内与峰面积呈现良好的线性关系。

4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 10 μL , 按“3”项下色谱条件连续进样 6 次, 依次测定峰面积。结果咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 0.33%、0.22% 和 0.38%, 表明仪器精密度良好。

4.3 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 10 μL , 按“3”项下色谱条件, 在 24 h 内于 0、1、2、4、8、12、24 h 分别进样测定, 结果咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 峰面积的 RSD ($n=7$) 分别为 0.49%、0.83% 和 1.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.4 重复性试验 取同一批排石颗粒粉末 (过 3 号筛) 6 份, 各约 10 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“3”项下色谱条件进样测定, 测得咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 平均含量 ($n=6$) 分别为 23.98、258.06 和 12.07 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 0.55%、0.63% 和 0.71%。

4.5 回收率试验 精密称取“4.4”项下已知含量的排石颗粒粉末 (过 3 号筛) 6 份, 每份约 5 g, 精密称定, 每份分别精密加入含咖啡酰甘醇酸 (2.568 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)、迷迭香酸 (25.720 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和丹酚酸 A (1.222 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的混合对照品溶液 50 mL, 按“2.2”项下方法制备供试溶液, 并按“3”项下色谱条件进样测定, 计算回收率。结果咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 的平均回收率 ($n=6$) 分别为 95.6%、99.0% 和 97.6%, RSD 分别为 1.1%、1.1% 和 1.4%。

4.6 色谱柱耐用性试验 取同一批排石颗粒粉末 (过 3 号筛) 约 10 g, 精密称定, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别采用 SunFire C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)、CAPCELL PAK C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm,

5 μm)、Phenomenex C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm) 3 种品牌的色谱柱, 按“3”项下色谱条件进行测定, 结果无明显差别。

5 样品含量测定

分别取不同批次的排石颗粒粉末 (过 3 号筛), 每批样品取 2 份, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“3”项下色谱条件进行分析, 测定峰面积, 用外标法计算出咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 的含量, 结果见表 1。

表 1 样品含量测定结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=2$)

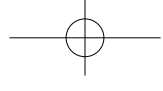
Tab. 1 Results of concent determination of samples

样品编号 (sample No.)	咖啡酰甘醇酸 (caffeoylglycolic acid)	迷迭香酸 (rosmarinic acid)	丹酚酸 A (salvianolic acid A)
140807	20.93	136.52	11.26
150320	15.06	133.8	8.78
150506	15.98	118.24	9.82
150608	20.22	140.95	8.82
150802	17.97	143.42	9.27
160518-1	25.33	178.8	12.51
160613-1	19.58	131.74	10.24
160614-2	22.45	141.09	11.33
161116-2	23.24	224.68	16.01
170107-1	23.95	256.72	12.06
170109-2	21.14	250.51	11.04
170212-1	23.96	264.13	17.73
170213-2	21.34	247.28	18.30

6 讨论

6.1 检测波长的选择 应用 DAD 检测器在 190~400 nm 范围内对咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 进行光谱扫描; 结果表明, 在 330 nm 波长附近 3 个酚酸素类成分均有最大吸收, 干扰少且稳定, 故选择 330 nm 作为检测波长。

6.2 提取方式的考察 提取方法考察了回流提取法和超声提取法对咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 含量测定的影响; 结果显示, 回流提取法提取更完全, 故选择回流提取法; 提取溶剂考察了水、甲醇溶液 (30% 甲醇水溶液、50% 甲醇水溶液、70% 甲醇水溶液、乙醇溶液 (30% 乙醇水溶液、50% 乙醇水溶液、70% 乙醇水溶液、95% 乙醇水溶液), 结果显示, 采用 70% 乙醇水溶液提取时 3 个酚酸类含量均



较高;提取时间考察了 0.5、1、1.5 h,结果显示 1 h 可提取完全;提取溶剂的体积考察了 50、100 mL,结果显示无差别,故将提取体积定为 50 mL。

6.3 流动相的确定 考察了乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液 4 个溶剂系统;结果显示,以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相,所得色谱峰峰形较好,分离效果最佳。

6.4 小结 本实验通过对 13 批排石颗粒中咖啡酰甘醇酸、迷迭香酸和丹酚酸 A 3 个酚酸类成分的含量进行测定,结果显示,各批次含量有一定差异,可能与连钱草药材的产地和采收时间有关;比较迷迭香酸的含量,发现批次越新,含量相对越高,可能与迷迭香酸的稳定性有关,需要对其进一步进行长期实验的研究。本实验所建立的定量方法的色谱峰分离效果较好,基线较平,重复性较好,为进一步完善排石颗粒的质量评价方法提供参考依据。

参考文献

- [1] 黄芳,张宁,吴杰连. HPLC 法测定排石颗粒中芦丁含量[J]. 科技经济市场, 2012(1): 12
HUANG F, ZHANG N, WU JL. Determination of rutin in Paishi granules by HPLC[J]. Sci Technol Econy Mark, 2012(1): 12
- [2] 李胜迎,董红,闫卫东,等. RP-HPLC 测定排石颗粒中延胡索乙素的含量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(12): 1875
LI SY, DONG H, YAN WD, et al. Determination of tetrahydropalmatine in Paishi granules by RP-HPLC[J]. Chin J Pharm Anal, 2006, 26(12): 1875
- [3] 黄萌萌,陈彦,刘聪燕,等. 排石颗粒中 5 种指标成分和总黄酮的测定[J]. 中成药, 2017, 39(1): 85
HUANG MM, CHEN Y, LIU CY, et al. Determination of five marker components and total flavonoids in Paishi granules[J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39(1): 85
- [4] 胡军林,陈晓颀,周伟. 排石颗粒特征图谱研究[J]. 四川中医, 2014, 32(8): 66
HU JL, CHEN XY, ZHOU W. Study on fingerprints of Paishi granules[J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2014, 32(8): 66
- [5] 张丽,朴晋华,张蕪. 排石颗粒主要药效学研究[J]. 中国药物与临床, 2005, 5(7): 532
ZHANG L, PU JH, ZHANG H. Study on main pharmacodynamics of Paishi granules[J]. Chin Remed Clin, 2005, 5(7): 532
- [6] 王慧. 不同碎石方法联合排石颗粒治疗输尿管结石的临床观察[J]. 中国中医急症, 2013, 22(5): 836
WANG H. Clinical observation of different gravel methods combined with row stone granules in the treatment of ureteral calculi[J]. J Emerg Tradit Chin Med, 2013, 22(5): 836
- [7] 柳春兴,邢建国. 排石颗粒的药理作用研究[J]. 中国现代药物应用, 2007, 1(9): 33
LIU CX, XING JG. Study on pharmacological action of Paishi granules[J]. Chin J Mod Drug Appl, 2007, 1(9): 33
- [8] 中华人民共和国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 1483
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 1483
- [9] 杨念云,刘培,郭建民. 连钱草提取物对肾结石模型大鼠的防治作用[J]. 中国现代应用药学, 2011, 31(8): 918e
YANG NY, LIU P, GUO JM. Preventive effects of *Glechoma longituba* extract on experimental renal calculus in rats[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2011, 36(19): 2603
- [10] 张莉,张维库,赵莹,等. 丹酚酸 A 的研究与进展[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(19): 2603
ZHANG L, ZHANG WK, ZHAO Y, et al. Research and development of salvianolic acid A[J]. China J Chin Mater Med, 2011, 36(19): 2603
- [11] CHOO YY, LEE S, NGUYEN PH, et al. Caffeoylglycolic acid methyl ester, a major constituent of sorghum, exhibits anti-inflammatory activity via the Nrf2/heme oxygenase pathway[J]. Rsc Adv, 2015, 5(23): 17786
- [12] NGUYEN PH, ZHAO BT, LEE JH, et al. Isolation of benzoic and cinnamic acid derivatives from the grains of *Sorghum bicolor* and their inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells[J]. Food Chem, 2015, 168: 512
- [13] 周丹,刘艾林,杜冠华. 迷迭香酸的药理研究进展,中国新药杂志, 2011, 20(7): 594
ZHOU D, LIU AL, DU GH. Advances in pharmacological studies of rosmarinic acid[J]. Chin J New Drugs, 2011, 20(7): 594
- [14] 田萍,王道平,朱海燕,等. 高效液相色谱法测定连钱草中的迷迭香酸的含量[J]. 贵州大学学报(自然科学版),深圳中西医结合杂志, 2008, 25(2): 169
TIAN P, LI DP, ZHU HY, et al. Determination of rosmarinic acid in *Glechoma longituba* by HPLC[J]. J Guizhou Univ(Nat Sci), 2008, 25(2): 169
- [15] 胡军,林陈晓,周伟. 同时测定排石颗粒中迷迭香酸、当药苷和马钱苷含量的 HPLC 法的建立[J]. 深圳中西医结合杂志, 2014, 24(6): 151
HU J, LIN CX, ZHOU W. Simultaneous determination of rosmarinic acid, sweroside and login in Pai Shi granules by HPLC[J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2014, 24(6): 151

(本文于 2017 年 10 月 31 日收到)