

HPLC 同时测定灯盏细辛注射液中 6 种主要成分的含量

周玲¹, 谢丽艳¹, 徐洁¹, 居文政^{2*}, 张军², 谈恒山³

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210009; 2. 南京中医药大学附属医院临床药理科, 南京 210029;
3. 南京军区总医院, 南京 210002)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 同时测定灯盏细辛注射液中绿原酸、咖啡酸、1,3-*O*-二咖啡酰奎宁酸、灯盏花乙素、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸含量的方法。方法: Agilent Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 柱温 30 °C, 检测波长 327 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 进样量 20 μL。结果: 绿原酸、咖啡酸、1,3-*O*-二咖啡酰奎宁酸、灯盏花乙素、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸的线性范围分别为 0.079 ~ 5.065 ($r = 0.999\ 9$), 0.080 ~ 5.120 ($r = 0.999\ 9$), 0.074 ~ 4.750 ($r = 0.999\ 9$), 0.391 ~ 25.050 ($r = 0.999\ 9$), 0.038 ~ 2.423 ($r = 0.999\ 9$), 0.487 ~ 7.792 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 8$), 加样回收率分别为 96.72% (RSD 1.76%), 96.64% (RSD 1.69%), 101.81% (RSD 1.81%), 98.16% (RSD 2.22%), 99.02% (RSD 2.57%), 97.02% (RSD 1.52%)。结论: 方法简便、快捷, 准确、重复性好, 可为灯盏细辛注射液提供质量控制依据。

[关键词] 灯盏细辛注射液; 绿原酸; 咖啡酸; 1,3-*O*-二咖啡酰奎宁酸; 灯盏花乙素; 3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸; 4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0078-04

Simultaneous Determination of Six Major Compounds in Dengzhanxixin Injection by HPLC

ZHOU Ling¹, XIE Li-yan¹, XU Jie¹, JU Wen-zheng^{2*}, ZHANG Jun², TAN Heng-shan³

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

2. Department of Clinical Pharmacology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 3. General Hospital of Armed Forces of Nanjing, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an HPLC method for determination of six major compounds in Dengzhanxixin injection, including chlorogenic acid, caffeic acid, 1,3-*O*-dicafeoylquinic acid, scutellarin, 3,5-dicafeoylquinic acid and 4,5-dicafeoylquinic acid. **Method:** The analysis was carried on a Zorbax SB-C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column. The mobile phase was composed of acetonitrile-0.1% formic acid with gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was set at 327 nm. The column temperature was at 30 °C, The injection volume was 20 μL. **Result:** The linear ranges of six compounds were as follows: 0.079-5.065 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$) for chlorogenic acid, 0.080-5.120 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$) for caffeic acid, 0.074-4.750 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$) for 1,3-*O*-dicafeoylquinic, 0.391-25.050 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$) for scutellarin, 0.038-2.423 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 9$) for 3,5-dicafeoylquinic acid, and 0.487-7.792 mg·L⁻¹ ($r = 0.999\ 8$) for 4,5-dicafeoylquinic acid. The average recoveries were 96.72% (RSD 1.76%), 96.64% (RSD 1.69%), 101.81% (RSD 1.81%), 98.16% (RSD 2.22%), 99.02% (RSD 2.57%), 97.02% (RSD

[收稿日期] 20110503(008)

[基金项目] 国家重大新药创制项目(2008ZX09312-004);江苏省中医药领军人才项目(LJ200906)

[第一作者] 周玲, 硕士, 中药学专业, E-mail: zhouling286034705@163.com

[通讯作者] * 居文政, 主任药师, 博士生导师, 研究方向: 中药临床药代动力学, Tel: 025-86617141-80518, E-mail: wzhu333@163.com

1.52%) respectively. **Conclusion:** The method is convenient, rapid and accurate with good reproducibility and could be used for the quality control of Dengzhanxixin injection.

[**Key words**] Dengzhanxixin injection; chlorogenic acid; caffeic acid; 1,3-*O*-dicafeoylquinic acid; scutellarin; 3,5-dicafeoylquinic acid; 4,5-dicafeoylquinic acid

灯盏细辛注射液为菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand-Mazz 的干燥全草经提取制成的中药注射液^[1],具有活血化瘀、通络止痛的功效^[2],临床用于心脑血管疾病,如急性脑梗死、急性脑出血、冠心病、肺心病等。该制剂中主要含有黄酮类和酚酸类两大类成分,黄酮类以灯盏花乙素为代表,被公认为灯盏细辛注射液的主要有效成分,酚酸类包括咖啡酸、绿原酸及二咖啡酰基奎宁酸系列同分异构体等,因其显著的抗炎保肝、抗氧化、抗凝血等多种生物活性^[3]而被广泛研究^[4-8]。为建立灯盏细辛注射液更完善的质量标准,明确该制剂中各种有效成分的含量以进行更深入的药理药代方面的研究,本文以绿原酸、咖啡酸、1,3-*O*-二咖啡酰奎宁酸(1,3-DCQA)、灯盏花乙素、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸(3,5-DCQA)、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸(4,5-DCQA)为指标成分,采用 HPLC 进行了含量测定。

1 仪器与试药

Agilent 1100(包括脱气机、四元泵、自动进样器、恒温箱、紫外检测器), Chem Station 色谱工作站, Mettler AE240 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司), Micro-17R 型冷冻离心机(美国 Thermo 公司), Direct-Q5 型超纯水机(法国 Millipore 公司), KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

灯盏细辛注射液(云南生物谷灯盏花药业有限公司,批号 200811432, 20100334, 20100935, 20101130), 绿原酸、1,3-DCQA、灯盏花乙素、3,5-DCQA(中国药品生物制品检定所,批号 1107532-200413, 111717-200501, 8422-200102, 111782-200801, 含量均 >98%), 咖啡酸、4,5-DCQA(成都曼思特生物科技有限公司,含量均 >98%), 实验用水为超纯水,甲酸、甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

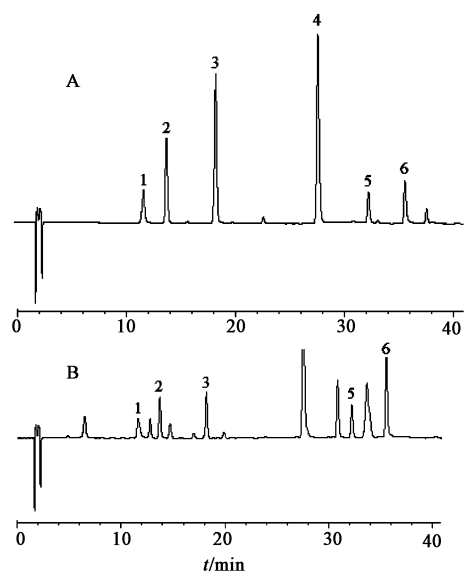
2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

2.1.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 检测波长

327 nm, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 进样量 20 μL, 流动相 A-乙腈, B-0.1% 甲酸, 梯度洗脱: 0 ~ 4 min (7% ~ 7% A), 4 ~ 15 min (7% ~ 13% A), 15 ~ 23 min (13% ~ 16% A), 23 ~ 38 min (16% ~ 22% A), 38 ~ 41 min (22% ~ 5% A)。

2.1.2 系统适用性试验 在上述色谱条件下, 绿原酸、咖啡酸、1,3-DCQA、灯盏花乙素、3,5-DCQA、4,5-DCQA 的理论塔板数不低于 3 000, 与其他峰分离度均 >1.5, 对照品及供试品的色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 绿原酸; 2. 咖啡酸;
3. 1,3-DCQA; 4. 灯盏花乙素; 5. 3,5-DCQA; 6. 4,5-DCQA

图 1 灯盏细辛注射液 HPLC

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、咖啡酸、1,3-DCQA、灯盏花乙素、3,5-DCQA、4,5-DCQA 各对照品适量, 分别溶于 10 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得各对照品储备液, 备用。另精密移取各储备液适量于同一 5 mL 量瓶中, 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得质量浓度分别为 5.065, 5.120, 4.750, 25.050, 2.423, 7.792 mg · L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密移取 1 mL 灯盏细辛注射液于 50 mL 量瓶中, 50% 甲醇定容至刻度, 摇

匀,12 000 r·min⁻¹离心 10 min,上清液即为供试品溶液。

2.3 线性关系考察 精密吸取 2.2.1 项下的混合对照品溶液适量,倍比稀释成 6 个不同浓度的混合对照品溶液,各取 20 μL 进行 HPLC 测定。以各成分的峰面积(A)为纵坐标,进样浓度(C)为横坐标进行线性回归,得标准曲线方程 $A_{\text{绿原酸}} = 56.9C - 0.89$ ($r = 0.9999$), $A_{\text{咖啡酸}} = 121C - 0.331$ ($r = 0.9999$), $A_{1,3\text{-DCQA}} = 236C - 0.317$ ($r = 0.9999$), $A_{\text{灯盏花乙素}} = 63C - 1.90$ ($r = 0.9999$), $A_{3,5\text{-DCQA}} = 99.8C - 0.541$ ($r = 0.9999$), $A_{4,5\text{-DCQA}} = 44.7C - 4.89$ ($r = 0.9998$)。

2.4 精密度试验 精密移取 1 mL 灯盏细辛注射液(批号 200811432),按 2.2.2 项方法制备供试品溶液,重复进样 6 次,记录峰面积,结果表明:绿原酸、咖啡酸、1,3-DCQA、灯盏花乙素、3,5-DCQA、4,5-DCQA 的 RSD 分别为 0.94%, 1.20%, 0.68%, 0.06%, 1.26%, 1.59%。

2.5 重复性试验 精密移取 1 mL 灯盏细辛注射液(批号 200811432),按 2.2.2 项方法制备供试品溶液,平行操作 6 份,测得绿原酸、咖啡酸、1,3-DCQA、灯盏花乙素、3,5-DCQA、4,5-DCQA 的平均质量浓度分别为 49.269,5.931,17.719,250.284,12.805,66.485 mg·L⁻¹,RSD 分别为 0.94%, 1.20%, 0.68%, 0.06%, 1.26%, 1.59%,保留时间的 RSD 分别为 0.06%, 0.07%, 0.05%, 0.03%, 0.02%, 0.02%。

2.6 稳定性试验 取灯盏细辛注射液,依 2.2.2 项下制备供试品溶液,室温放置,分别于 0,2,4,8,12 h 按 2.1.1 项下进行分析。测得绿原酸、咖啡酸、1,3-DCQA、灯盏花乙素、3,5-DCQA、4,5-DCQA 的 RSD 分别为 1.28%, 0.55%, 0.82%, 1.66%, 1.55%, 1.33%,表明 6 个成分在室温放置 12 h 均稳定。

2.7 回收率试验 取已知含量的灯盏细辛注射液 0.5 mL,分别加入适量的绿原酸、咖啡酸、1,3-DCQA、灯盏花乙素、3,5-DCQA、4,5-DCQA 对照品储备液,按 2.2.2 项方法制备供试品溶液,平行操作 6 份,HPLC 检测各成分的含量,计算回收率,见表 1。

2.8 含量测定 按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,测定 3 个批次灯盏细辛注射液中绿原酸、咖啡酸、1,3-DCQA、灯盏花乙素、3,5-DCQA、4,5-DCQA 的含量,见表 2。

3 讨论

灯盏细辛是从民间有效方剂中发掘出来的对治

表 1 6 种成分加样回收率试验(n=6)

测定成分	样品中 含量/μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	均值 /%	RSD /%
绿原酸	43.17	44.45	85.69	95.66	97.26	1.72
	43.17	44.45	85.54	95.32		
	43.17	44.45	86.68	97.89		
	43.17	44.45	86.07	96.52		
	43.17	44.45	87.21	99.09		
	43.17	44.45	87.21	99.09		
咖啡酸	27.30	25.35	51.28	94.60	96.64	1.69
	27.30	25.35	51.57	95.75		
	27.30	25.35	51.83	96.76		
	27.30	25.35	51.54	95.61		
	27.30	25.35	52.26	98.49		
	27.30	25.35	52.30	98.63		
1,3-DCQA	22.10	19.99	42.13	100.19	101.81	1.81
	22.10	19.99	42.29	100.96		
	22.10	19.99	42.38	101.42		
	22.10	19.99	42.16	100.34		
	22.10	19.99	43.09	104.97		
	22.10	19.99	42.69	102.97		
灯盏花乙素	192.60	200.40	394.79	100.89	98.16	2.22
	192.60	200.40	384.07	95.54		
	192.60	200.40	392.44	99.72		
	192.60	200.40	385.87	96.44		
	192.60	200.40	392.21	99.61		
	192.60	200.40	386.50	96.75		
3,5-DCQA	17.39	23.34	39.82	96.11	99.02	2.57
	17.39	23.34	40.13	97.44		
	17.39	23.34	40.33	98.32		
	17.39	23.34	40.28	98.10		
	17.39	23.34	41.41	102.85		
	17.39	23.34	41.00	101.18		
4,5-DCQA	82.16	110.55	188.20	95.92	97.02	1.52
	82.16	110.55	189.58	97.17		
	82.16	110.55	188.09	95.83		
	82.16	110.55	187.88	95.63		
	82.16	110.55	191.48	98.89		
	82.16	110.55	191.27	98.70		

表2 灯盏细辛注射液中6种主要成分的含量

mg·L⁻¹

批号	绿原酸	咖啡酸	1,3-DCQA	灯盏花乙素	3,5-DCQA	4,5-DCQA	总酚酸
20100334	83.30	56.75	43.67	449.37	50.65	248.53	482.89
20100935	92.17	58.36	33.65	463.81	61.71	319.90	565.79
20101130	118.09	87.45	5.34	455.32	58.72	293.17	562.77

注:总酚酸 = 绿原酸 + 咖啡酸 + 1,3-DCQA + 3,5-DCQA + 4,5-DCQA。

疗脑血管病中风及其后遗症偏瘫有良好疗效的中药材,自20世纪80年代,灯盏细辛注射液制剂已用于临床。研究发现^[9],灯盏花乙素和一系列二咖啡酰基奎宁酸酯类化合物均为其主要活性成分。根据《中国药典》2010年版一部^[2],灯盏细辛注射液中黄酮类以灯盏花乙素、总酚酸类以1,3-*O*-二咖啡酰基奎宁酸建立了质量标准;水文波等^[10]测定了其中绿原酸和野黄芩苷的含量;王晓明等^[11]测定了其中绿原酸、咖啡酸、1,3-DCQA和野黄芩苷的含量。本文采用HPLC同时测定灯盏细辛注射液中绿原酸、咖啡酸、1,3-DCQA、灯盏花乙素、3,5-DCQA、4,5-DCQA的含量,所建立的方法稳定、可靠,更全面,检测成分都得到了良好的分离,在有条件的情况下,该方法适用于药液色谱图中其他未知峰化合物的定量,同时也可作为完善灯盏细辛注射液质量标准的参考。

经DAD全波长扫描确定327 nm为最佳测定波长,同时对检测峰之外的色谱峰进行观测,发现327 nm均可以作为最佳检测波长,对其中的某些色谱峰进行定性,发现绿原酸前后的2个峰分别为新绿原酸和隐绿原酸,欲以其为指标成分进行进一步的研究。本实验的稀释溶剂经文献参考^[11]及实验验证确定50%甲醇为最佳稀释溶剂。

含量测定结果显示,3批灯盏细辛注射液中灯盏花乙素和总酚酸含量稳定,表明其生产工艺稳定,但1,3-DCQA的含量在20101130批次药液中出现偏低,反复试验发现可能是受药材来源的影响,具体原因有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 许黎君,居文政,陈为烤,等. 灯盏细辛注射液对小鼠肝微粒体细胞色素P450含量的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学,2008,13(10):1122.

- [2] 中国药典.一部[S]. 2010:707.
- [3] 王英锋,谢亮亮,刘锁,等. HPLC法测定杏香兔耳风中绿原酸和3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(3):430.
- [4] 张卫东,H A Thi Bang Tam,陈万生,等. 中药灯盏细辛中酚酸类化合物的结构与活性研究[J]. 中国新药杂志,2002,37(8):579.
- [5] Park W H, Kim S H, Kim C H, et al. A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 4,5-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of *Euonymus alatus*: isolation and structure determination [J]. Toxicology, 2005, 207: 383.
- [6] Jang D S, Yoo N H, Kim N H, et al. 3,5-di-*O*-caffeoyl-epi-quinic acid from the leaves and stems of *erigeron annuus* inhibits protein glycation, aldose reductase, and cataractogenesis [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33: 329.
- [7] 赵平,王爱民,王永林,等. HPLC测定珍珠滴丸中4,5-*O*-二咖啡酰基-奎宁酸的含量[J]. 中国中药杂志,2007,32(18):1938.
- [8] Karl Schram, Petra Miketova, Jiri Slanina, et al. Mass spectrometry of 1,3- and 1,3-dicaffeoylquinic acids [J]. J Mass Spectrom, 2004, 39: 384.
- [9] 孙汉董,赵勤实. 防治心脑血管疾病药物——灯盏细辛酚的研究与开发[J]. 化学进展,2009,21(1):77.
- [10] 水文波,贺庆,徐隽佳,等. 灯盏细辛注射液中绿原酸和野黄芩苷的含量测定[J]. 中国中药杂志,2008,33(4):458.
- [11] 王晓明,王跃飞,潘桂湘,等. HPLC同时测定灯盏细辛注射液中4种有效成分的含量[J]. 中国中药杂志,2008,33(14):1681.

[责任编辑 邹晓翠]