

[质 量]

HPLC 法同时测定香丹注射液中 9 种成分

杨凌鉴^{1,2}, 任莉莉^{1,2}, 黄九林^{1,2}, 张胜海¹, 金华峰¹, 谢娟平³, 贾 璞⁴, 郑晓晖^{4*}
(1. 安康学院化学化工学院, 陕 西 安康 725000; 2. 安康学院秦巴中药资源研发中心, 陕 西 安康 725000; 3. 安康学院医学院, 陕 西 安康 725000; 4. 西北大学生命科学学院, 陕 西 西安 710069)

摘要: **目的** 建立 HPLC 同时测定香丹注射液(丹参、降香)中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 的含有量。**方法** 该药物的分析采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 μm, 5 μm); 流动相 0.2% 甲酸水-甲醇, 梯度洗脱; 体积流量 0.6 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 260、280、322 nm。**结果** 9 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.999\ 3$), 平均加样回收率 96.52%~103.14%, RSD 0.88%~2.48%。**结论** 该方法简便准确, 稳定可靠, 可用于香丹注射液的质量控制。

关键词: 香丹注射液; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)11-2849-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.005

Simultaneous determination of nine constituents in Xiangdan Injection by HPLC

YANG Ling-jian^{1,2}, REN Li-li^{1,2}, HUANG Jiu-lin^{1,2}, ZHANG Sheng-hai¹, JIN Hua-feng¹,
XIE Juan-ping³, JIA Pu⁴, ZHENG Xiao-hui^{4*}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Ankang University, Ankang 725000, China; 2. Research and Development Center for Qinba Traditional Chinese Medicine Resources, Ankang University, Ankang 725000, China; 3. School of Medicine, Ankang University, Ankang 725000, China; 4. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of danshensu, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, vanillic acid, caffeic acid, lithospermic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid B and salvianolic acid A in Xiangdan Injection (*Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma, Dalbergiae odoriferae Lignum*). **METHODS** The analysis of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent TC-C₁₈ column (250 mm×4.6 μm, 5 μm), with the mobile phase comprising of 0.2% formic acid-methanol flowing at 0.6 mL/min in gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 260, 280, 322 nm. **RESULTS** Nine constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.999\ 3$), whose average recoveries were 96.52%–103.14% with the RSDs of 0.88%–2.48%. **CONCLUSION** The simple, accurate, stable and reliable method can be used for the quality control of Xiangdan Injection. **KEY WORDS:** Xiangdan Injection; chemical constituents; HPLC

香丹注射液是将丹参水提物和降香饱和芳香水按照一定比例混合精制而成的现代中药制剂, 属于国家部颁标准(WS3-B-3289-98)收载的药物^[1-3]。

现代研究^[4-7]显示, 该制剂具有扩张血管、增强冠脉血流量等作用, 能有效干预心肌缺血、脑缺血、机体缺氧, 临床上广泛应用于冠心病、心绞痛、心

收稿日期: 2020-07-17

基金项目: 陕西省自然科学基金青年项目(2019JQ-560); 陕西省教育厅科研计划项目(19JK0016); 陕西省科技厅重点产业链项目(2019ZDLSF04-02); 陕西省大学生创新创业训练计划项目(S201911397041); 安康学院高层次人才科研专项(2018AYQDZR05)

作者简介: 杨凌鉴(1988—), 男, 博士, 讲师, 从事中药及复方质量控制、体内代谢研究。Tel: (0915) 3261415, E-mail: xxdylj@163.com

* 通信作者: 郑晓晖(1968—), 男, 博士, 教授, 从事药物代谢与分析研究。Tel: (029) 88302686, E-mail: zhengxh@nwu.edu.cn

肌梗死以及脑血管疾病的治疗，疗效显著确切。

中药疗效的发挥是多成分、多靶点协同作用的结果，故开展多成分含有量测定有利于中药材及其相关制剂的全面质量控制^[8-9]。前期报道，香丹注射液中丹参所含的酚酸是与该制剂临床疗效密切相关的主要活性物质^[10-11]，但目前其质量控制方法主要是选择丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 中的几种^[2-3,12]或全部^[10-11]进行定量分析，未涉及原儿茶酸、香草酸，而且检测波长均设置为 280 nm，可能会影响部分成分的检测灵敏度。因此，本实验在前期采用 HPLC-Q-TOF/MS 法对香丹注射液化学成分进行定性分析的基础上^[13]，建立 HPLC 法同时测定该制剂中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 的含有量，以期为其质量控制的完善提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1100 高效液相色谱仪，配置 G1312C 二元泵、G1328B 手动进样器、G1316A 柱温箱、G1315B 二极管阵列检测器、Chemstation 5.0 化学工作站（美国 Agilent 公司）；MS105DU 型电子天平（瑞士 Mettler-Toledo 公司）；KQ-250DB 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；ULUP-I-10 型超纯水机（四川优普超纯科技有限公司）；QL-901 型快速混匀器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）。

1.2 试剂与药物 丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 对照品（批号分别为 DST180302-014、DST180428-081、DST180105-011、DST180311-088、DST181018-013、DST170524-028、DST180105-027、DST180128-009、DST180201-008），均购于成都德思特生物技术有限公司，纯度均大于 98%。香丹注射液（批号 1510201、1510202、1510203，国药准字 Z51021309，10 mL×5 支），购于四川升和药业股份有限公司；色谱纯甲醇（德国 Merck 公司）；色谱纯甲酸（美国 Sigma Aldrich 公司）；其他试剂均为分析纯；水为超纯水（电阻率 18.25 MΩ），由优普 ULUP-I-10 超纯水机系统制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 0.2% 甲酸水（A）-甲醇（B），梯度洗脱（0~25 min，7%~15% B；25~45 min，15%~25% B；45~80 min，25%~

50% B；80~100 min，50%~80% B）；体积流量 0.6 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 280 nm（0~46、58~100 min，丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A）、260 nm（46~52 min，香草酸）、320 nm（52~58 min，咖啡酸）；进样量 25 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 对照品适量，置于 2.0 mL 棕色量瓶中，丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛用 50% 甲醇定容，其余对照品用甲醇定容，制得质量浓度分别为 8.00、3.20、2.40、2.60、2.00、3.00、2.80、5.20、2.20 mg/mL 的贮备液，分别精密移取 0.5 mL，甲醇稀释，即得（444.00、178.00、133.00、144.00、111.00、167.00、156.00、289.00、122.00 μg/mL），在 4 ℃ 下冷藏备用。

2.2.2 供试品溶液 精密吸取注射液 1.0 mL，置于 5.0 mL 棕色量瓶中，超纯水定容至刻度，摇匀，经 0.22 μm 水系滤膜过滤，即得，在 4 ℃ 下冷藏备用。

2.2.3 阴性样品溶液 按照处方比例和工艺流程，制备缺丹参的阴性样品，按“2.2.2”项下方法制备，即得，在 4 ℃ 下冷藏备用。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 精密吸取对照品、供试品、阴性样品溶液各 25 μL，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，各成分色谱峰与相邻峰均达到基线分离，理论塔板数按各成分计均大于 5 000，阴性无干扰，表明该方法专属性良好。

2.3.2 线性关系考察 将“2.2.1”项下对照品溶液用甲醇依次稀释至系列质量浓度，在“2.1”项色谱条件下进样测定。以溶液质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，分别以 S/N=3、S/N=10 为检测限、定量限，结果见表 1，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定 6 次，测得丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 峰面积 RSD 分别为 0.79%、0.91%、1.60%、0.92%、1.18%、1.39%、0.98%、1.07%、1.40%，表明仪器精密度良好。

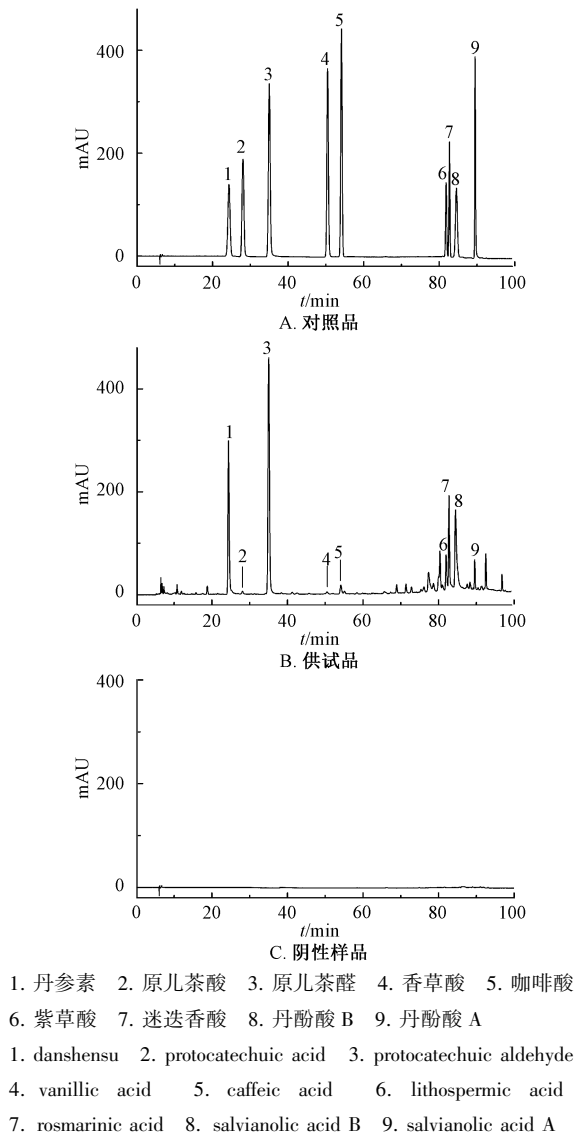


图 1 各成分 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

表 1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
丹参素	$Y=23.55X+58.78$	0.999 5	1.73~444.00	0.21	0.69
原儿茶酸	$Y=71.83X+33.16$	0.999 9	0.69~178.00	0.08	0.26
原儿茶醛	$Y=159.10X+102.90$	0.999 6	0.51~133.00	0.06	0.20
香草酸	$Y=136.70X+32.22$	0.999 8	0.56~144.00	0.07	0.23
咖啡酸	$Y=208.19X+106.10$	0.999 3	0.43~111.00	0.05	0.16
紫草酸	$Y=35.32X-17.31$	0.999 4	0.65~167.00	0.08	0.26
迷迭香酸	$Y=46.78X+13.27$	0.999 7	0.60~156.00	0.07	0.22
丹酚酸 B	$Y=36.70X-24.19$	0.999 9	1.80~288.00	0.25	0.82
丹酚酸 A	$Y=90.83X+41.39$	0.999 3	0.47~122.00	0.06	0.19

98.45%、97.79%、100.31%、99.54%、96.52%、102.69%，RSD 分别为 2.48%、2.27%、0.97%、1.32%、1.12%、1.79%、1.31%、1.04%、0.88%。

2.4 样品含有量测定 取 3 批香丹注射液，按

2.3.4 重复性试验 取同一批注射液（批号 1510203），按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 含有量 RSD 分别为 0.92%、2.30%、1.78%、1.98%、0.87%、1.06%、0.76%、0.51%、2.28%，表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验 取同一批注射液（批号 1510203），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别于 0、2、4、8、12、24 h，在“2.1”项色谱条件下进样测定，测得丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 峰面积 RSD 分别为 0.50%、1.99%、1.04%、0.99%、1.12%、1.82%、0.56%、0.60%、1.47%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密吸取各成分含有量已知的注射液（批号为 1510203）0.5 mL，置于 5 mL 棕色量瓶中，按 100% 水平加入对照品溶液 0.5 mL（丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 质量浓度分别为 1 510.20、6.15、385.61、3.92、8.09、176.38、325.95、696.46、52.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），按“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算回收率。结果，丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 平均加样回收率分别为 100.83%、101.28%、103.14%、

“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，每批平行 3 份，在“2.1”项色谱条件下进样测定，计算含有量，结果见表 2。

表 2 各成分含有量测定结果 ($\mu\text{g/mL}$, $n=3$)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents ($\mu\text{g/mL}$, $n=3$)

批号	丹参素	原儿茶酸	原儿茶醛	香草酸	咖啡酸	紫草酸	迷迭香酸	丹酚酸 B	丹酚酸 A
1510201	1 497. 98	6. 10	380. 24	4. 02	7. 99	182. 82	318. 95	699. 48	49. 03
1510202	1 502. 62	6. 06	383. 57	3. 99	8. 01	179. 31	321. 49	697. 27	47. 92
1510203	1 499. 13	6. 08	382. 74	4. 04	8. 03	181. 10	320. 36	701. 24	50. 79

3 讨论

3.1 检测指标筛选 研究表明, 丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 具有抗心脑血管缺血、抑制血小板聚集、抗炎、保肝肾、抗氧化等多种显著药理活性^[14-15]。因此, 本实验选择上述 9 种酚酸类成分作为检测指标。

3.2 色谱条件筛选 在前期研究中, 已对流动相种类、洗脱方式、柱温等参数进行了优化^[13], 故本实验仅需考虑水相添加剂和检测波长即可。所检测的成分均为酚酸类, 常用的水相添加剂有甲酸、乙酸^[16-17], 本实验对其种类和加入量进行了考察, 发现 0. 2% 甲酸水洗脱时各成分峰形最好, 色谱峰不拖尾。另外, 丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 在 280 nm 波长处有最大紫外吸收^[18], 而香草酸、咖啡酸分别在 260 nm^[19]、322 nm^[20] 波长处有最大紫外吸收, 为了确保各成分均具有最佳的检测灵敏度, 本实验采用分时间段变换波长模式进行分析。

4 结论

本实验建立 HPLC 法同时测定香丹注射液中丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 的含有量, 该方法简便准确, 稳定可靠, 可为该制剂质量控制的完善提供参考依据。

参考文献:

[1] 李跃文, 刘志强, 赵 越, 等. 香丹注射液治疗冠心病主要活性成分-靶点-通路网络分析[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(22): 1927-1935.

[2] 张静娇, 刘俊有, 季 雪. 一测多评法测定香丹注射液中丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸 B 含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(9): 50-53.

[3] 程巧鹭, 郭增喜, 陈碧莲. RP-HPLC 法同时测定香丹注射液中 5-羟甲基糠醛和酚酸类成分的含量[J]. 医药导报, 2015, 34(1): 95-98.

[4] 尹永芹, 朱俊访, 沈志滨, 等. 神经网络分析香丹注射液抗心肌缺血有效成分的谱效相关性研究[J]. 中草药, 2009, 40(8): 1284-1287.

[5] 李 斐, 张 岳. 香丹注射液对脑缺血再灌注大鼠细胞凋

亡与 FADD mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(16): 3899-3900.

[6] Shen Z B, Yin Y Q, Tang C P, *et al.* Pharmacodynamic screening and simulation study of anti-hypoxia active fraction of Xiangdan injection[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 127(1): 103-107.

[7] 仇锦春, 廖清船, 张 永, 等. 香丹注射液对急性血瘀模型大鼠血液流变性及血小板聚集的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 137-139.

[8] Zhou X, Seto S W, Chang D, *et al.* Synergistic effects of Chinese herbal medicine: a comprehensive review of methodology and current research[J]. *Front Pharmacol*, 2016, 7: 201.

[9] 余一鸣, 胡永慧, 韩立云, 等. 中药质量控制的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(12): 2557-2563.

[10] 穆象山, 张 强, 房信胜, 等. HPLC-DAD 同时测定香丹注射液中 7 种丹参酚酸类成分[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(12): 56-58.

[11] 于小静. 高效液相色谱-二极管阵列检测法同时测定香丹注射液中 7 种丹参酚酸类成分[J]. 中国药物经济学, 2014, 9(1): 47-48.

[12] 袁继承, 尹永芹, 沈志滨, 等. HPLC 法测定香丹注射液中丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A[J]. 中草药, 2009, 40(S1): 128-131.

[13] 高 添, 杨凌鉴, 盛鑫康, 等. 基于 HPLC-Q-TOF/MS 和 GC/MS 的香丹注射液化学成分分析[J]. 中成药, 2019, 41(2): 345-352.

[14] Mei X D, Cao Y F, Che Y Y, *et al.* Danshen: a phytochemical and pharmacological overview[J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(1): 59-80.

[15] Chen W, Chen G X. Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge): a prospective healing sage for cardiovascular diseases[J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(34): 5125-5135.

[16] Kim K H, Tsao R, Yang R, *et al.* Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions[J]. *Food Chem*, 2006, 95(3): 466-473.

[17] Robbins R J, Bean S R. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1038(1-2): 97-105.

[18] Liu M, Li Y G, Chou G X, *et al.* Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae*[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1157(1-2): 51-55.

[19] Tsiapara A V, Jaakkola M, Chinou I, *et al.* Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer

(PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells; Profile analysis of extracts[J]. *Food Chem*, 2009, 116(3): 702-708.

[20] Radovanovic B C, Radovanovic A N, Souquet J M. Phenolic profile and free radical-scavenging activity of Cabernet Sauvignon wines of different geographical origins from the Balkan region [J]. *J Sci Food Agric*, 2010, 90 (14): 2455-2461.

HPLC 法同时测定椒香温中止痛软膏中 8 种成分

李双双¹, 李 希^{1,2*}, 邓 谦², 施崇精², 冯建安², 黄 嫣², 王 玉²
(1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137; 2. 四川省中医药科学院中医研究所, 四川 成都 610031)

摘要: **目的** 建立 HPLC 法同时测定椒香温中止痛软膏(延胡索、肉桂、白芍等)中没食子酸、芍药内酯苷、芍药苷、延胡索乙素、延胡索甲素、迷迭香酸、脱氢紫堇碱、桂皮醛的含有量。**方法** 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.1% 磷酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 230、272 nm。**结果** 8 种成分在各自范围内线性关系良好($r>0.999\ 0$), 平均加样回收率 97.82%~101.08%, RSD 1.10%~2.38%。**结论** 该方法简便准确, 重复性好, 可用于椒香温中止痛软膏的质量控制。**关键词:** 椒香温中止痛软膏; 化学成分; HPLC
中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)11-2853-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.11.006

Simultaneous determination of eight constituents in Jiaoxiang Wenzhong Zhitong Ointment by HPLC

LI Shuang-shuang¹, LI Xi^{1,2*}, DENG Qian², SHI Chong-jing², FENG Jian-an², HUANG Yan², WANG Yu²
(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Institute of Traditional Chinese Medicine, Sichuan Academy of Traditional Chinese Medicine Sciences, Chengdu 610031, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of gallic acid, albiflorin, paeoniflorin, tetrahydropalmatine, corydaline, rosmarinic acid, dehydrocorydaline and cinnamaldehyde in Jiaoxiang Wenzhong Zhitong Ointment (*Corydalis Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex*, *Paeoniae alba Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.1% phosphoric acid flowing at 0.9 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelengths were set at 230, 272 nm. **RESULTS** Eight constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r>0.999\ 0$), whose average recoveries were 97.82% – 101.08% with the RSDs of 1.10% – 2.38%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Jiaoxiang Wenzhong Zhitong Ointment.
KEY WORDS: Jiaoxiang Wenzhong Zhitong Ointment; chemical constituents; HPLC

收稿日期: 2020-07-15
基金项目: 四川省中央引导地方科技发展专项(2018TZYD0003); 四川省中医药管理局科研项目(2018HJZX012)
作者简介: 李双双(1993—), 女, 硕士生, 从事药物新制剂、新剂型、新技术研究。E-mail: 1452992160@qq.com
* 通信作者: 李 希(1969—), 女, 硕士, 研究员, 主任中药师, 从事中药新剂型、新技术、新工艺研究。E-mail: 1836820767@qq.com