

## [质 量]

# HPLC 法同时测定灯盏细辛注射液中 10 种成分

刘光丽<sup>1</sup>，徐文龙<sup>1</sup>，王 张<sup>2\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院，四川 成都 611137；2. 成都中医药大学民族医药学院，四川 成都 611137)

**摘要：**目的 建立 HPLC 法同时测定灯盏细辛注射液（灯盏细辛）中 5-咖啡酰基奎宁酸、绿原酸、4-咖啡酰基奎宁酸、咖啡酸、1, 3-二咖啡酸酰奎宁酸、野黄芩苷、异绿原酸 B、3, 5-二咖啡酰基奎宁酸、灯盏花甲素、4, 5-二咖啡酰基奎宁酸的含有量。方法 该药物水提液的分析采用 Inertsil® ODS-3 色谱柱（250 mm × 4.6 mm, 5 μm）；流动相 0.4% 磷酸-乙腈，梯度洗脱；体积流量 0.9 mL/min；柱温 30 °C；检测波长 327 nm。结果 10 种成分在各自范围内线性关系良好 ( $r \geq 0.9990$ )，平均加样回收率 94.11% ~ 100.64%，RSD 1.12% ~ 2.77%。结论 该方法简便准确，重复性好，可用于灯盏细辛注射液的质量控制。

**关键词：**灯盏细辛注射液；化学成分；HPLC

中图分类号：R927.2

文献标志码：A

文章编号：1001-1528(2017)12-2521-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.12.015

## Simultaneous determination of ten constituents in Dengzhan Xixin Injection by HPLC

LIU Guang-li<sup>1</sup>，XU Wen-long<sup>1</sup>，WANG Zhang<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. Department of Ethnopharmacology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of 5-caffeoylequinic acid, chlorogenic acid, 4-caffeoylequinic acid, caffeic acid, 1, 3-dicaffeoylquinic acid, scutellarin, isochlorogenic acid B, 3, 5-dicaffeoylquinic acid, apigenin-7-O-glucuronide and 4, 5-dicaffeoylquinic acid in Dengzhan Xixin Injection [ *Erigeron breviscapus* (Vaniot.) Hand. -Mazz. ]. **METHODS** The analysis of aqueous extract of this drug was performed on a 30 °C thermostatic Inertsil® ODS-3 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of 0.4% phosphoric acid-acetonitrile flowing at 0.9 mL/min in a gradient elution manner, and the detection wavelength was set at 327 nm. **RESULTS** Ten constituents showed good linear relationships within their own ranges ( $r \geq 0.9990$ ), whose average recoveries were 94.11% – 100.64% with the RSDs of 1.12% – 2.77%. **CONCLUSION** This simple, accurate and reproducible method can be used for the quality control of Dengzhan Xixin Injection.

**KEY WORDS:** Dengzhan Xixin Injection；chemical constituents；HPLC

灯盏细辛又名灯盏花，为菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vaniot.) Hand. -Mazz. 的干燥全草，首载于《滇南本草》<sup>[1]</sup>，分布于西南各省，是苗族、彝族、藏族、傣族等 10 个少数民族的习用药<sup>[2-3]</sup>。其性辛、微苦、温，归心、肝经，

具有祛风散寒、活血通络止痛的功效，用于风寒湿痹痛、胸痹心痛、中风瘫痪、牙痛等<sup>[2]</sup>，临幊上用于治疗偏瘫<sup>[4]</sup>，并得到大量推广及运用<sup>[5]</sup>。现代研究表明，灯盏细辛治疗缺血性中风的作用机制涉及改善微循环、抗凝血、抗神经元凋亡、抗自由

收稿日期：2017-02-06

基金项目：四川省应用基础研究计划重点项目（2016JY0017）

作者简介：刘光丽（1991—），女，硕士，从事中药理论与应用研究。Tel: 13709075521, E-mail: hbbdxhz@163.com

\* 通信作者：王 张（1980—），男，副研究员，研究方向为民族药药理学。Tel: (028) 61800074, 13558727112, E-mail: wzcqcd@163.com

基、保护血脑屏障、抗炎、扩血管、抗脑水肿等<sup>[6]</sup>。

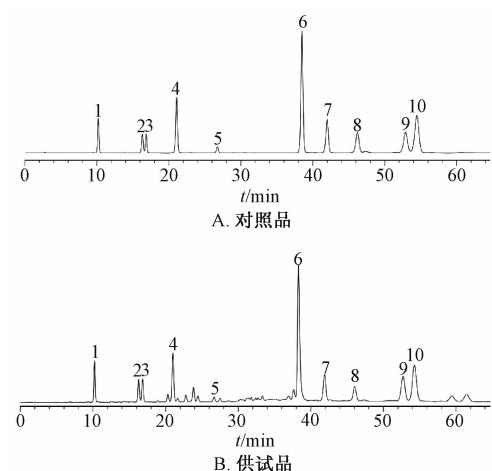
灯盏细辛化学成分基本明确,制剂品种繁多,主要含有黄酮类和咖啡酸类化合物,一般认为其主要有效成分和质控指标为野黄芩苷<sup>[7]</sup>和1,5-二咖啡酰奎宁酸<sup>[8]</sup>。灯盏细辛注射液为灯盏细辛干燥全草经提取制成的中药注射液,主要含野黄芩苷和总咖啡酸酯,已有文献报道测定其中各成分的含有量<sup>[9-11]</sup>。本实验采用HPLC法同时测定该制剂中5-咖啡酰基奎宁酸、绿原酸、4-咖啡酰基奎宁酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、野黄芩苷、异绿原酸B、3,5-二咖啡酰基奎宁酸、灯盏花甲素、4,5-二咖啡酰基奎宁酸10种成分的含有量,为提高其质量控制水平提供参考。

## 1 材料

LC-2010A HT岛津高效液相色谱仪,主要由脱气单元、低压梯度单元、泵单元、混合器、自动进样器、柱温箱及UV-VIS检测器组成;BP121S电子天平(德国Sartorius公司);优普超纯水制造系统(成都超纯科技有限公司)。灯盏细辛注射液由云南生物谷药业股份有限公司生产,国药准字Z53021569,批号20141131、20151141、20160447、20160637,每支装10 mL。5-咖啡酰基奎宁酸(批号13122601)、绿原酸(批号11111001)、4-咖啡酰基奎宁酸(批号14011403)、咖啡酸(批号0211-0020)、1,3-二咖啡酰基奎宁酸(批号14052201)、野黄芩苷(批号09051102)、异绿原酸B(批号11101301)、3,5-二咖啡酰基奎宁酸(批号11101302)、灯盏花甲素(批号141029-01)、4,5-二咖啡酰基奎宁酸(批号11102803)对照品均购自成都普思生物科技股份有限公司,含有量均大于98%。乙腈为色谱纯,由安徽天地高纯溶剂有限公司提供;甲醇为分析纯,由西格玛奥德里奇贸易有限公司提供;磷酸购自成都市科龙化工试剂厂(批号2016050401);水为超纯水(由优普系列超纯水机制备)。

## 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Inertsil<sup>®</sup> ODS-3色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温30 ℃;检测波长327 nm<sup>[12]</sup>;体积流量0.9 mL/min;流动相A为0.4%磷酸, B为乙腈,梯度洗脱(0~25 min, 90%~83% A; 25~26 min, 83%~80% A; 26~65 min, 0~80% A);进样量10 μL。在上述色谱条件下,各成分分离度较好,符合HPLC含有量测定要求,色谱图见图1。



1. 5-咖啡酰基奎宁酸 2. 绿原酸 3. 4-咖啡酰基奎宁酸  
4. 咖啡酸 5. 1, 3-二咖啡酰基奎宁酸 6. 野黄芩苷 7. 异绿原酸B  
8. 3, 5-二咖啡酰基奎宁酸 9. 灯盏花甲素 10. 4, 5-二咖啡酰基奎宁酸  
1. 5-caffeoylequinic acid 2. chlorogenic acid 3. 4-caffeoylequinic acid  
4. caffeic acid 5. 1, 3-dicaffeoylequinic acid 6. scutellarin  
7. isochlorogenic acid B 8. 3, 5-dicaffeoylequinic acid 9. apigenin-7-O-glucuronide 10. 4, 5-dicaffeoylequinic acid

图1 各成分HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of various constituents

### 2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取5-咖啡酰基奎宁酸1.42 mg、绿原酸0.76 mg、4-咖啡酰基奎宁酸1.10 mg、咖啡酸1.40 mg、1,3-二咖啡酰基奎宁酸0.28 mg、野黄芩苷6.81 mg、异绿原酸B2.19 mg、3,5-二咖啡酰基奎宁酸1.67 mg、灯盏花甲素2.39 mg、4,5-二咖啡酰基奎宁酸3.25 mg,分别置于5 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,制得对照品贮备液,各精密吸取0.5 mL于5 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得0.028 4、0.015 1、0.022 0、0.028 1、0.005 5、0.136 2、0.043 8、0.033 5、0.047 9、0.064 9 mg/mL对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密吸取注射液1 mL于5 mL量瓶中,超纯水稀释并定容至刻度,0.45 μm微孔滤膜过滤,即得<sup>[2]</sup>。

2.3 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下对照品贮备溶液适量,甲醇稀释,制得8份不同质量浓度的对照品溶液,各精密移取10 μL注入色谱仪,在“2.1”项色谱条件下进样。以各成分峰面积为纵坐标(Y),进样量为横坐标(X)进行回归,结果见表1,表明各成分在各自范围内线性关系良好。

表1 各成分线性关系

Tab. 1 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/μg
5-咖啡酰基奎宁酸	$Y = 2 \times 10^6 X + 62960$	0.9990	0.0567 ~ 0.5673
绿原酸	$Y = 4 \times 10^6 X + 1741.6$	0.9995	0.0303 ~ 0.3025
4-咖啡酰基奎宁酸	$Y = 2 \times 10^6 X + 24672$	0.9990	0.0440 ~ 0.4402
咖啡酸	$Y = 7 \times 10^6 X + 30973$	0.9996	0.0562 ~ 0.5617
1,3-二咖啡酰基奎宁酸	$Y = 4 \times 10^6 X + 7789.4$	0.9998	0.0111 ~ 0.1106
野黄芩苷	$Y = 4 \times 10^6 X + 59033$	1.0000	0.2725 ~ 2.7245
异绿原酸B	$Y = 4 \times 10^6 X + 11243$	0.9999	0.0876 ~ 0.8762
3,5-二咖啡酰基奎宁酸	$Y = 5 \times 10^6 X + 18472$	0.9999	0.0669 ~ 0.6693
灯盏花甲素	$Y = 3 \times 10^6 X + 42426$	0.9996	0.0957 ~ 0.9574
4,5-二咖啡酰基奎宁酸	$Y = 5 \times 10^6 X + 29880$	0.9999	0.1298 ~ 1.2980

2.4 精密度试验 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液进样6次,测得5-咖啡酰基奎宁酸、绿原酸、4-咖啡酰基奎宁酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、野黄芩苷、异绿原酸B、3,5-二咖啡酰基奎宁酸、灯盏花甲素、4,5-二咖啡酰基奎宁酸峰面积RSD分别为1.23%、0.39%、0.98%、0.69%、1.15%、0.54%、0.63%、1.50%、0.56%、1.11%,表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 精密移取注射液1mL(批号20141131),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,平行6份,各精密吸取10μL注入色谱仪,测得5-咖啡酰基奎宁酸、绿原酸、4-咖啡酰基奎宁酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、野黄芩苷、异绿原酸B、3,5-二咖啡酰基奎宁酸、灯盏花甲素、4,5-二咖啡酰基奎宁酸含有量RSD分别为0.94%、1.16%、1.16%、1.40%、2.25%、1.14%、1.56%、2.93%、1.99%、2.34%,表明方法重复性良好。

2.6 稳定性试验 精密吸取注射液1mL,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,于0、2、4、8、12、24h注入色谱仪,测得5-咖啡酰基奎宁酸、绿原酸、4-咖啡酰基奎宁酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、野黄芩苷、异绿原酸B、3,5-二咖啡酰基奎宁酸、灯盏花甲素、4,5-二咖啡酰基奎宁酸峰面积RSD分别为0.67%、2.00%、1.92%、2.11%、1.86%、1.62%、1.55%、1.37%、1.59%、1.31%,表明溶液在24h内稳定性良好。

2.7 加样回收率试验 取含有量已知的注射液9份,每份0.5mL,加入已知含有量80%、100%、120%3个水平的对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,测得5-咖啡酰基奎宁酸、绿原酸、4-咖啡酰基奎宁酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、野黄芩苷、异绿原酸B、3,5-二咖啡酰基奎宁酸、灯盏花甲素、4,5-二咖啡酰基奎宁酸含有量RSD分别为0.67%、2.00%、1.92%、2.11%、1.86%、1.62%、1.55%、1.37%、1.59%、1.31%,表明方法回收率良好。

酸、咖啡酸、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、野黄芩苷、异绿原酸B、3,5-二咖啡酰基奎宁酸、灯盏花甲素、4,5-二咖啡酰基奎宁酸平均加样回收率分别为98.28%、97.99%、100.64%、97.88%、98.30%、99.97%、98.47%、98.10%、94.11%、97.58%,RSD分别为2.77%、1.37%、2.30%、1.97%、1.83%、1.12%、2.14%、1.35%、2.18%、1.55%。

2.8 样品含有量测定 精密吸取各批次注射液1mL,平行3次,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下测定,结果见表2。

表2 各成分含有量测定结果(mg/mL, n=3)

Tab. 2 Results of content determination of various constituents (mg/mL, n=3)

批号	20151141	20160447	20160637
5-咖啡酰基奎宁酸	0.097	0.136	0.099
绿原酸	0.039	0.051	0.038
4-咖啡酰基奎宁酸	0.072	0.096	0.070
咖啡酸	0.088	0.131	0.098
1,3-二咖啡酰基奎宁酸	0.007	0.011	0.009
野黄芩苷	0.500	0.511	0.489
异绿原酸B	0.179	0.182	0.179
3,5-二咖啡酰基奎宁酸	0.087	0.096	0.092
灯盏花甲素	0.236	0.177	0.089
4,5-二咖啡酰基奎宁酸	0.209	0.221	0.217

### 3 讨论

本实验对不同流动相体系(甲醇-水、甲醇-0.4%磷酸、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸、乙腈-0.4%磷酸)、波长(250、300、327、335、350 nm)、体积流量(0.8、0.9、1.0 mL/min)、柱温(20、30、40℃)进行了考察,发现在“2.1”项色谱条件下10种成分均能得到较好的分离效果。然后,根据2015年版《中国药典》一部,将灯盏细辛注射液用纯水稀释5倍,作为最佳

供试品溶液制备方法<sup>[2,9-11]</sup>。

含有量测定结果显示,5-咖啡酰基奎宁酸、绿原酸、4-咖啡酰基奎宁酸、1,3-二咖啡酰基奎宁酸、野黄芩苷、异绿原酸B、3,5-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-二咖啡酰基奎宁酸较稳定,3批样品之间差异较小, RSD均小于3%;咖啡酸、灯盏花甲素差异较大,可能是受药材来源、生产工艺等因素的影响。

研究表明,野黄芩苷、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸具有促进大脑皮层神经细胞存活、保护脑神经活性的作用<sup>[12]</sup>;绿原酸、3,4-二咖啡酰基奎宁酸、3,5-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-二咖啡酰基奎宁酸、4-咖啡酰基奎宁酸、5-咖啡酰基奎宁酸具有一定的抗氧化活性<sup>[13]</sup>;咖啡酸、咖啡酸苯乙酯具有抗氧化、抗炎、镇痛、免疫调节、抗菌、抗病毒等多种药理作用<sup>[14]</sup>。临床研究发现,灯盏细辛注射液<sup>[15-16]</sup>用于治疗急性脑梗死时,患者血清中 MMP-9 水平明显降低;动物实验也证实灯盏细辛注射液<sup>[17]</sup>、灯盏花素注射液<sup>[18-19]</sup>可通过降低脑组织中 MMP-9 水平来保护血脑屏障损伤,降低血管通透性,减少水分、炎症介质等物质进入脑组织,从而实现脑保护作用。因此,本实验同时测定了灯盏细辛注射液中 10 种成分的含有量,可为进一步研究该制剂治疗急性脑梗死的有效成分及其在脑组织中的分布情况提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 明·兰 茂著,于乃义,丁兰馥,胡月英等整理. 滇南本草[M]. 昆明: 云南科学技术出版社, 2007.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 138, 707-708.
- [3] 贾敏如,李星炜. 中国民族药志要[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 218.
- [4] 王 宁,杨兆祥,杨生元. 灯盏细辛研究开发的惠顾和展望[J]. 云南中医中药杂志, 2012, 33(5): 69-72.
- [5] 崔军莉. 120 mg/d 灯盏花素治疗脑血管病随机平行对照研

- 究[J]. 实用中医内科杂志, 2014, 28(6): 69-70.
- [6] 郭 婷,黎元元. 灯盏细辛注射液药理和毒理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(18): 2820-2823.
- [7] 张志朋,杨兆祥,李鹏辉,等. 灯盏花乙素和灯盏花甲素合成中糖苷化反应研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10(10): 16-22.
- [8] 李 菁,于德泉. 灯盏花化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(11): 1458-1462.
- [9] 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): 1681-1683.
- [10] 周 玲,谢丽艳,徐 洁,等. HPLC 同时测定灯盏细辛注射液中 6 种主要成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 78-81.
- [11] 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): 458-459.
- [12] Chen X, Sadowska G B, Zhang J, et al. Neutralizing anti-interleukin-1 $\beta$  antibodies modulate fetal blood-brain barrier function after ischemia [J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 73: 118-129.
- [13] 陶 鑫,许 栋,王秀兰,等. 兴安毛连菜中有机酸化学成分及其抗氧化活性的研究[J]. 中草药, 2016, 47(4): 544-548.
- [14] 杨九凌,祝晓玲,李成文,等. 咖啡酸及其衍生物咖啡酸苯乙酯药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志, 2013, 48(8): 577-582.
- [15] 周治平,杨国帅,王爱岳. 灯盏细辛注射液对急性脑梗死患者 MMP-9 的影响[J]. 现代预防医学, 2011, 38(13): 2660-2661.
- [16] 侯凌波. 灯盏细辛对血瘀型急性脑梗死 VEGF、MMP-9、EPCs 血清学水平的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [17] 卫景沛,梁宪红,林金嬉,等. 灯盏细辛对大鼠缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 中国医药导报, 2009, 6(25): 22-24.
- [18] 卢晓梅,赵 红,张海鹏,等. 灯盏花素对脑缺血再灌注小鼠明胶酶及血脑屏障通透性的影响[J]. 中国医科大学学报, 2006, 35(5): 481-483.
- [19] 徐 露,苏祖禄. 麝香酮联合灯盏花素对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(13): 1390-1393.