

丹金胶囊质量标准研究

陈标妹 (广州中医药大学第一附属医院药学部, 广东广州 510000)

摘要 [目的]建立丹金胶囊质量标准。[方法]通过薄层色谱法对丹金胶囊中金银花和当归进行定性鉴别,通过高效液相色谱法对丹金胶囊中丹酚酸 B、原儿茶醛以及丹参素进行含量测定。[结果]薄层色谱斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛分别在进样量在 0.76~22.80、0.68~20.40、0.66~19.80 $\mu\text{g/mL}$ 与峰面积积分值线性关系良好($r=0.9994, 0.9997, 0.9999$), 平均回收率分别为 99%、98%、99%, RSD 分别为 1.98%、1.70%、1.97% ($n=6$)。[结论]该方法操作简便、专属性高、重复性好,可作为丹金胶囊的质量控制方法。

关键词 丹金胶囊;丹参;金银花;当归;质量标准

中图分类号 R284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)01-0186-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.01.056



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on Quality Standard of *Salvia miltiorrhiza* Capsule

CHEN Biao-mei (Department of Pharmacy, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510000)

Abstract [Objective] The research aimed to establish the quality standard for *Salvia miltiorrhiza* capsule. [Method] The quality of *Lonicera japonica* and *Angelica sinensis* in *Salvia miltiorrhiza* capsule was qualitatively identified by thin-layer chromatography. The content of salvianolic acid B, protocatechuic aldehyde and salvianic acid in *Salvia miltiorrhiza* capsule was determined by high performance liquid chromatography. [Result] The TLC spots were clear, the resolution was good, and the negative control had no interference. The salvianolic acid B, salvianic acid and protocatechuic aldehyde showed good relationship in the range of 0.76-22.80, 0.68-20.400, 0.66-19.80 $\mu\text{g/mL}$ ($r=0.9994, 0.9997, 0.9999$). The average recovery rate was 99%, 98%, 99%, RSD was 1.98%, 1.70%, 1.97% ($n=6$), respectively. [Conclusion] The method is simple in operation, high in specificity and good in repeatability, and can be used as a quality control method for *Salvia miltiorrhiza* capsule.

Key words Danjin capsule; *Salvia miltiorrhiza*; *Lonicera japonica*; *Angelica sinensis*; Quality standard

丹金胶囊由丹参、金银花以及当归 3 味中药组成,具有祛瘀活血、清热解毒的功效,尤对于痤疮患者有较好的疗效。方中丹参为君药,具有活血祛瘀、通经止痛、清心消烦、凉血消痛的功效;金银花清热解毒消痛,当归活血行血滋阴,共为臣药^[1]。目前该制剂尚未制定质量标准,为了更好地对其进行质量控制,保证疗效的稳定以及用药安全,该研究采用薄层色谱(TLC)鉴别方中的臣药金银花和当归,并采用高效液相色谱(HPLC)对君药丹参的 3 种成分(丹酚酸 B、丹参素以及原儿茶醛)进行定量测定。

1 材料与方

1.1 试药 丹金胶囊(批号 20181217A、20181217B、20181217C、20181217D、20181217E、20181217F、20181217G、20181217H、20181217I、20181217J), 缺当归丹金胶囊阴性样品、缺金银花丹金胶囊阴性样品以及缺丹参丹金胶囊阴性样品(批号 20181218、20181219、20181220), 由实验室自制;当归对照药材、金银花对照药材(批号 120546-201804、140325-201805), 购于中国药品生物制品检定研究所;对照品丹酚酸 B、原儿茶醛、丹参素、绿原酸、阿魏酸(纯度分别为 98.28%、99.63%、99.45%、99.76%、99.60%, 批号分别为 MUST-18051711、MUST-18123258、MUST-18110524、MUST-18044420、MUST-18061224), 购于成都曼思特生物科技有限公司。

1.2 仪器 戴安 U3000 型高效液相色谱仪, 检测器为 VWD 3400RS(美国 Thermo 公司); CAMAG ATS4 型全自动点样仪

(瑞士卡玛公司); Biostep VD80 薄层色谱成像系统(德国迪赛克公司)。

1.3 TLC 鉴别

1.3.1 金银花 TLC 鉴别。取 10 mg 绿原酸对照品, 加甲醇制成 1 mg/mL 的对照品溶液。称取丹金胶囊内容物 5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 超声处理 20 min, 过滤后取续滤液, 即为供试品溶液。称取金银花对照药材 0.2 g, 依法制备得对照药材溶液; 另取不含金银花的丹金胶囊内容物 5 g, 同法制备得阴性对照品溶液。分别吸取以上 4 种溶液各 2 μL , 在同一硅胶 H 薄层板上点样, 以乙酸丁酯-甲酸-水(7.0:2.5:2.5)为展开剂, 展开, 取出, 晾干后置于紫外 366 nm 下观察。

1.3.2 当归 TLC 鉴别。称取丹金胶囊内容物 5 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入乙醚 20 mL, 超声处理 20 min, 过滤, 滤液挥干, 残渣加乙醇 1 mL 使溶解, 即为供试品溶液。称取当归对照药材 0.5 g, 依法制备得对照药材溶液。另取不含当归的丹金胶囊内容物 5 g, 同法制备得阴性对照品溶液。分别吸取以上 3 种溶液各 2 μL , 在同一硅胶 G 薄层板上点样, 以正己烷-乙酸乙酯(4:1)为展开剂, 展开, 取出, 晾干后置于紫外 366 nm 下观察。

1.4 含量测定

1.4.1 对照品溶液的制备。精密称取 9.49 mg 丹酚酸 B 对照品、8.41 mg 原儿茶醛对照品和 8.30 mg 丹参素对照品, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 加 80% 甲醇稀释至刻度, 密塞, 摇匀, 制得含丹酚酸 B、原儿茶醛和丹参素分别为 0.38、0.34 和 0.33 mg/mL 的标准贮备液。精密量取 0.05、0.10、0.25、

作者简介 陈标妹(1989—), 女, 广东湛江人, 主管中药师, 从事中药饮片鉴别研究。

收稿日期 2019-07-01

0.50、1.00、1.50 mL 混合对照品贮备液,置于 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇稀释至刻度,密塞,摇匀,用于标准曲线绘制。

1.4.2 供试品溶液的制备。取本品胶囊内容物约 1 g,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加入 80% 甲醇 20 mL,密塞,超声处理 30 min,放冷,用相应溶剂定容至 25 mL,摇匀后过滤,滤液用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,即得供试品溶液。

1.4.3 阴性对照样品的制备。取不含丹参的本品胶囊内容物约 1 g,依“1.4.2”方法制得阴性对照品溶液。

1.4.4 色谱条件。Agilent ZORBAX SD C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~30 min, 25% A; 30~40 min, 25%~90% A; 40~50 min, 90% A; 50.0~50.5 min, 25% A); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 286 nm; 柱温 25 °C。

1.4.5 方法学考察。

1.4.5.1 专属性考察。取“1.4.1”“1.4.2”“1.4.3”制备的溶液按照“1.4.4”色谱条件进样分析,获取阴性样品、对照品、供试品溶液色谱图。

1.4.5.2 线性关系的考察。取“1.4.1”中配制的标准曲线溶液按照“1.4.4”色谱条件进样分析,以进样浓度(μg/mL)为横坐标、峰面积积分为纵坐标绘制标准曲线,计算得各对照品的回归方程和线性范围。

1.4.5.3 稳定性试验。取“1.4.2”项下同一份供试品,按“1.4.4”色谱条件于 0、2、4、8、12、24 h 分别进样,进样量 10 μL,测定峰面积积分值,计算 RSD。

1.4.5.4 精密度试验。取“1.4.2”项下同一份供试品,重复进样 6 次,计算峰面积的 RSD 值。

1.4.5.5 重复性试验。取同一批次样品,按“1.4.2”方法平行制备 6 份供试品,按“1.4.4”色谱条件分别进样,测定峰面积,计算平均含量和 RSD。

1.4.5.6 加样回收试验。取已知含量的样品 6 份,按照 1:1 的比例添加 3 种对照品,按“1.4.2”方法制备供试品,按“1.4.4”色谱条件分别进样,测定峰面积,计算平均回收率和 RSD。

1.4.6 样品的含量测定。为进一步考察方法的稳定性,精密称取 10 批胶囊样品内容物,按“1.4.2”方法制备样品溶液,进样测定,记录峰面积,计算含量。

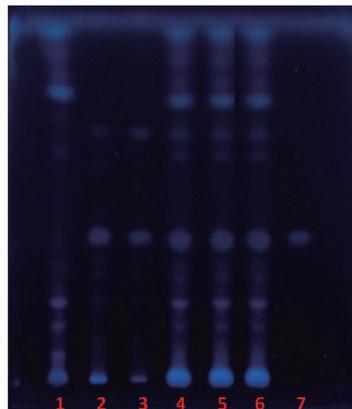
2 结果与分析

2.1 TLC 鉴别 丹金胶囊的 TLC 鉴别结果如图 1~2 所示。由图 1 可知,供试品色谱与金银花对照药材及绿原酸对照品在色谱相应位置上呈现相同颜色斑点,阴性样品无相应特征斑点。由图 2 可知,供试品色谱与当归对照药材在色谱相应位置上呈现相同颜色斑点,阴性样品无相应特征斑点。说明该鉴别方法准确、可靠。

2.2 方法学考察

2.2.1 专属性考察。由图 3 可知,在“1.4.4”色谱条件下,3 种目标化合物峰形对称,分离度大于 1.5,阴性无干扰,说明方法专属性强。

2.2.2 线性关系的考察。按“1.4.5.2”方法操作,结果发现

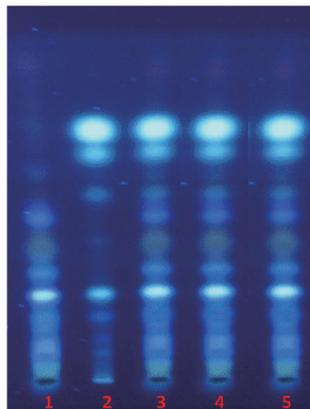


注:1. 阴性对照样品;2~3. 金银花对照药材;4~6. 供试品溶液(批号 20181217A、20181217B、20181217C);7. 绿原酸对照品

Note: 1. Negative control sample; 2~3. *Lonicera japonica* reference medicinal material; 4~6. Test sample solution (batch numbers 20181217A, 20181217B, 20181217C); 7. Chlorogenic acid reference substance

图 1 金银花鉴别薄层色谱图

Fig. 1 TLC analysis of *Lonicera japonica*



注:1. 阴性对照样品;2. 当归对照药材;3~5. 供试品溶液(批号 20181217A、20181217B、20181217C)

Note: 1. Negative control sample; 2. *Angelica sinensis* reference medicinal material; 3~5. Test sample solution (batch numbers 20181217A, 20181217B, 20181217C)

图 2 当归鉴别薄层色谱图

Fig. 2 TLC analysis of *Angelica sinensis*

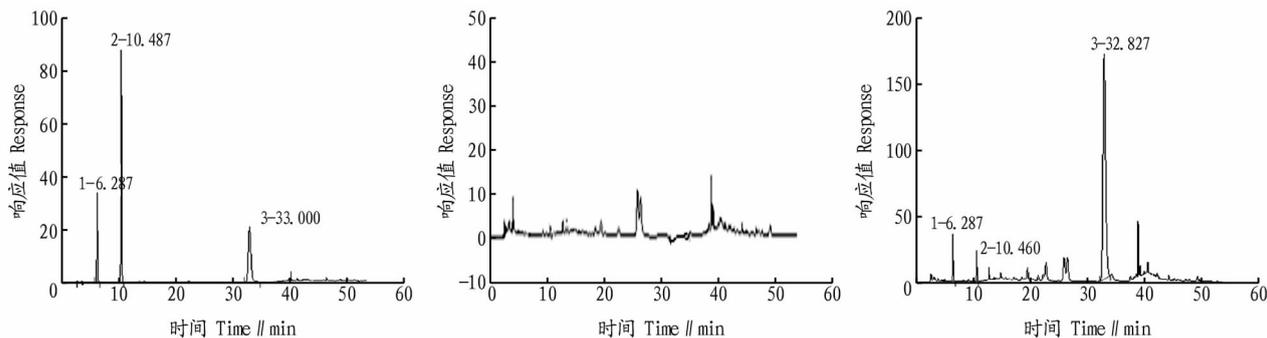
(表 1), 3 种成分标准曲线 r 均大于 0.999, 有良好的线性关系。

2.2.3 稳定性试验。按“1.4.5.3”方法操作,得丹酚酸 B、原儿茶醛、丹参素峰面积 RSD 值均小于 2%,表明样品在 24 h 内稳定性良好。

2.2.4 精密度试验。按“1.4.5.4”方法操作,得丹酚酸 B、原儿茶醛、丹参素峰面积 RSD 值分别为 0.22%、0.58%、1.45%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验。按“1.4.5.5”方法操作,得 6 份样品中丹酚酸 B、原儿茶醛、丹参素的含量 RSD 值分别为 1.34%、1.28%、1.45%,表明该方法重复性良好。

2.2.6 加样回收试验。由表 2 可见,3 种成分的加样回收率为 95%~102%,RSD 值均小于 2%,表明该方法准确度良好。



注: a. 对照品; b. 阴性对照品; c. 供试品。1. 丹参素; 2. 原儿茶醛; 3. 丹酚酸 B

Note: a. Control sample; b. Negative control sample; c. Test sample. 1. Salvianic acid; 2. Protocatechuic aldehyde; 3. Salvianolic acid B

图3 丹参 HPLC 图谱

Fig 3 HPLC analysis of *Salvia miltiorrhiza*

表1 3种成分的线性关系

Table 1 Linear relationship of three components

成分 Component	回归方程 Regression equation	线性范围 Linear range μg/mL	r
丹酚酸 B Salvianolic acid B	$y = 18.562x - 0.6578$	0.76~22.80	0.999 4
原儿茶醛 Protocatechuic aldehyde	$y = 10.4568x - 0.1245$	0.68~20.40	0.999 7
丹参素 Salvianic acid	$y = 58.8768x - 0.3568$	0.66~19.80	0.999 9

2.3 含量测定 从表3可看出, 10批次样品丹酚酸 B 含量为 0.45%~0.64%, 丹参素含量为 0.011%~0.014%, 原儿茶醛含量为 0.051%~0.058%。

3 结论与讨论

在 2015 版《中国药典》^[1] 中, 金银花鉴别项供试品的制备方法是取金银花花粉末浸泡 12 h, 虽然操作简便, 但是耗时长, 因此该研究在实际试验中采用超声 20 min 的方法, 结果所得图谱斑点清晰, 大大减少了操作时间; 对当归的鉴别过程, 《中国药典》规定用阿魏酸作为对照品, 而在实际操作过程中发现以阿魏酸为对照品时, 阴性样品会有干扰, 查阅文献发现君药丹参中也含有阿魏酸^[2-4], 因此该试验最后采用当归对照药材作为对照, 结果所得图谱表明, 供试品色谱与当归对照药材在色谱相应位置上呈现相同颜色斑点, 阴性样品无相应特征斑点。

表2 加样回收率考察结果 (n=6)

Table 2 The results of recovery tests (n=6)

成分 Component	样品含量 Sample content mg	加入量 Added amount mg	测得量 Measured amount mg	回收率 Recovery rate %	平均回收率 Average recovery rate %	RSD %
丹酚酸 B Salvianolic acid B	5.64	5.00	10.38	95	99	1.98
	5.45	5.00	10.39	99		
	5.48	5.00	10.56	101		
	5.52	5.00	10.46	99		
	5.74	5.00	10.68	99		
	5.83	5.00	10.80	99		
原儿茶醛 Protocatechuic aldehyde	0.12	0.10	0.22	96	98	1.70
	0.14	0.10	0.24	99		
	0.13	0.10	0.23	98		
	0.12	0.10	0.22	100		
	0.12	0.10	0.22	96		
	0.12	0.10	0.22	98		
	0.12	0.10	0.22	98		
丹参素 Salvianic acid	0.54	0.50	1.02	96	99	1.97
	0.55	0.50	1.05	100		
	0.54	0.50	1.03	98		
	0.54	0.50	1.03	98		
	0.54	0.50	1.04	100		
	0.54	0.50	1.04	102		
	0.53	0.50	1.04	102		

丹金胶囊君药为丹参, 研究表明, 丹参活性成分包括脂溶性的丹参酮类和水溶性的丹酚酸类^[5-8], 而丹金胶囊中丹参制备工艺为水提, 主要含丹酚酸类的成分。丹酚酸类化合物以抗氧化、抗凝血和细胞保护作用特别突出, 其中作用较强且研究较多的主要是丹酚酸 B、原儿茶醛以及丹参素等^[9-10]。因此, 该研究采用高效液相色谱法测定这 3 种成分的含量。对提取溶剂和提取时间的考察结果表明, 80% 甲醇超声提取 30 min, 有效成分可完全提取; 并且试验中采用梯

度洗脱程序, 在保证使样品得到较好分离度的同时, 又能够缩短样品保留时间, 提高检测效率。通过方法学验证也表明, 该检测方法简单、重复性好, 能够作为丹金胶囊质量控制的内部标准。

总体而言, 丹金胶囊具有较好的临床疗效。该试验建立了丹金胶囊的质量标准, 采用薄层色谱法鉴定其中的金银花与当归, 采用高效液相色谱法鉴定其中的丹参, 所建立方法

(下转第 192 页)

和 1/2MS, 该研究的结果也与前人吻合^[17]。香蕉泥和活性炭已经在多种植物中被证实对植物组培具有显著的促进作用^[18-19], 该研究中单独添加活性炭和香蕉泥效果并不显著, 但同时添加香蕉泥和活性炭对愈伤组织诱导率有显著提升, 在后续的组培中会适量添加香蕉泥和活性炭。

在实际生产中用一种培养基即可完成再生体系的建立可称作“一步法”, 一步法的优势在于能够降低工作量、提高效率, 有利于规模化生产^[20]。该研究结果显示霍山石斛九仙尊 1 号可用在培养基 MS+1.0 mg/L KT+1.0 mg/L IBA+15 g 香蕉泥+0.5 g 活性炭+30 g/L 蔗糖上一步完成愈伤组织诱导、增殖、再生的过程, 前人关于霍山石斛组培快繁的步骤通常需要更换不同的培养基组分^[13,17], 石斛属植物也是很少一步法完成^[21-22]。因此该研究的结果大大降低了霍山石斛快繁的工作量, 提高了效率, 同时为后期利用转基因研究霍山石斛药用分子机理以及基因编辑等方式奠定了重要基础。

参考文献

- [1] WANG H, CHEN N F, ZHENG J Y, et al. Isolation and characterization of eleven polymorphic microsatellite loci for the valuable medicinal plant *Dendrobium huoshanense* and cross-species amplification[J]. International journal of molecular sciences, 2012, 13(12): 16779-16784.
- [2] 郎楷永, 陈心启, 罗毅波, 等. 中国植物志: 第 17 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 1.
- [3] SOETOPO L, PURNAMANINGSIH S L. In vitro propagation of dendrobium and phalaenopsis through tissue culture for conservation[J]. Agrivita: Journal of agricultural science, 2012, 34(2): 115-126.
- [4] VELLUPILLAI M, SWARUP S, GOH C J. Histological and protein changes during early stages of seed germination in the orchid, *Dendrobium crumenatum*[J]. Journal of pomology and horticultural science, 1997, 72(6): 941-948.
- [5] 徐云鹏, 于力文. 霍山石斛种子试管苗的培养[J]. 植物生理学通讯, 1984, 20(4): 35-36.
- [6] 温云飞, 鲁润龙, 谢子立. 霍山石斛的快速繁殖和花芽诱导[J]. 植物生

- 理学通讯, 1999, 35(4): 296-297.
- [7] 谭云, 叶庆生, 刘伟. 霍山石斛 (*Dendrobium huoshanense*) 的组织培养[J]. 植物学通报, 2005, 22(1): 58-62.
- [8] 崔莹莹, 郑福山, 陈昆, 等. 霍山石斛微体快繁技术研究[J]. 西部林业科学, 2017, 46(6): 51-55.
- [9] IWASE A, HARASHIMA H, IKEUCHI M, et al. WIND1 promotes shoot regeneration through transcriptional activation of *ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1* in *Arabidopsis*[J]. The plant cell, 2016, 29(1): 54-69.
- [10] JIN Q, JIAO C Y, SUN S W, et al. Metabolic analysis of medicinal *Dendrobium officinale* and *Dendrobium huoshanense* during different growth years[J]. PLoS One, 2016, 11(1): 1-17.
- [11] 陈陆琴. 五种木本植物的组织培养及其生理生化研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2005.
- [12] YE S W, CAI C Y, REN H B, et al. An efficient plant regeneration and transformation system of ma bamboo (*Dendrocalamus latiflorus* Munro) started from young shoot as explant[J]. Frontiers in plant science, 2017, 8: 1-12.
- [13] 杨静, 何芳, 王纪, 等. 霍山石斛拟原球茎生长及植株再生过程中微观结构与元素的变化[J]. 西南林业大学学报, 2016, 36(6): 1-7.
- [14] 张旭红, 王頔, 梁振旭, 等. 欧洲百合愈伤组织诱导及植株再生体系的建立[J]. 植物学报, 2018, 53(6): 840-847.
- [15] 孙永莲. 箬箕柳组织培养体系建立及遗传转化体系初探[D]. 南京: 南京林业大学, 2017.
- [16] 周利刚. 蝴蝶兰组培快繁体系的建立[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2017.
- [17] 翟月婷. 霍山石斛试管丛生芽及原球茎继代增殖措施的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2010.
- [18] 董燕婧, 李博, 程波翔, 等. 不同添加物对铁皮石斛组培幼苗生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(6): 135-137.
- [19] 王玮玮, 汪国蓬, 孙玉东, 等. 不同浓度激素、活性炭对红颜草莓茎尖组培的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 46-48.
- [20] 任杰, 丁增成, 刘祥军, 等. “一步法”诱导三角紫叶酢浆草再生体系的形成[J]. 中国农学通报, 2009, 25(3): 60-62.
- [21] BHATTACHARYYA P, KUMARIA S, DIENGDOH R, et al. Genetic stability and phytochemical analysis of the *in vitro* regenerated plants of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid[J]. Meta gene, 2014, 2: 489-504.
- [22] KUI L, CHEN H T, ZHANG W X, et al. Building a genetic manipulation tool box for orchid biology: Identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the orchid, *Dendrobium officinale* [J]. Frontiers in plant science, 2017, 7: 1-13.

(上接第 188 页)

表 3 10 批次样品含量测定结果 ($n=2$)

Table 3 The results of 10 batch sample content determination ($n=2$)

批号 Batch number	丹酚酸 B Salvianolic acid B		丹参素 Salvianic acid		原儿茶醛 Protocatechuic aldehyde	
	含量 Content	RSD	含量 Content	RSD	含量 Content	RSD
20181217A	0.56	1.02	0.012	1.24	0.054	1.45
20181217B	0.45	0.38	0.013	1.56	0.056	1.34
20181217C	0.58	0.25	0.011	1.43	0.053	1.34
20181217D	0.64	1.34	0.012	1.45	0.054	0.86
20181217E	0.49	1.23	0.011	1.43	0.055	0.68
20181217F	0.64	1.56	0.014	1.09	0.053	0.89
20181217G	0.54	0.99	0.011	0.99	0.054	1.23
20181217H	0.56	0.86	0.013	0.59	0.055	1.34
20181217I	0.57	1.45	0.012	0.89	0.058	0.99
20181217J	0.59	1.56	0.014	1.67	0.051	0.78

简便、可靠、重复性好, 可用于丹金胶囊内在质量的控制, 保证临床疗效以及安全。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 76-77, 133-134, 221-222.
- [2] 周晓希, 孔羽, 魏宇昆, 等. RP-HPLC-DAD 同时测定丹参及丹参片中 6 种水溶性成分的含量[J]. 中药材, 2014, 37(2): 337-339.
- [3] 沙秀秀, 宿树兰, 沈飞, 等. 不同生长期丹参茎叶及花序中丹酚酸类化学成分分布与积累动态分析评价[J]. 中草药, 2015, 46(22): 3414-3419.
- [4] 李安平, 杨锡, 丁永辉, 等. 一测多评 HPLC 法测定丹参注射液中 7 个水

- 溶性成分含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1534-1540.
- [5] 秦雪玲, 张赞华, 康绍建, 等. UPLC 法同时测定丹参片中 11 个水溶性和脂溶性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(4): 652-661.
- [6] 东莎莎, 程素盼, 马天宇, 等. UPE-HILIC-DAD-ESI-TOF/MS 法测定山东产区丹参中丹酚酸类成分[J]. 山东科学, 2019(5): 1-8.
- [7] 孙锦, 林力, 彭勳, 等. 不同浓度乙醇提取丹参中 12 种成分比较研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2019, 26(9): 89-93.
- [8] 张伟涛, 李德坤, 岳洪水, 等. 丹参水提取物成分的定性定量研究[J]. 中草药, 2019, 50(15): 3598-3606.
- [9] 王梦梦, 吉兰芳, 崔树娜. 丹参功效的物质基础研究进展[J]. 中医学报, 2019(5): 944-949.
- [10] 李建平, 肖礼娥, 肖馨. 丹参口服液 4 个酚酸成分的稳定性考察及其相关性研究[J]. 海峡药学, 2019, 31(7): 33-36.