

引用:李昕沛,李世森,宋佳,等.HPLC 同时测定注射用丹参多酚酸中三种药效成分的含量[J].陕西中医药大学学报, 2024,47(4):98-101.

## HPLC 同时测定注射用丹参多酚酸中 三种药效成分的含量<sup>\*</sup>

李昕沛<sup>1</sup> 李世森<sup>2</sup> 宋佳<sup>3</sup> 李子叶<sup>1</sup> 王新晓<sup>1\*\*</sup>

(1.西安市第五医院,陕西 西安 721182;2.空军军医大学第一附属医院,陕西 西安 710032

3.韶关市食品药品检验所,广东 韶关 512028)

**摘要:**目的 注射用丹参多酚酸中三种药效成分丹酚酸 A、迷迭香酸和紫草酸的含量测定方法的建立及应用。方法 采用 HPLC 法,色谱柱为 Inertsil ODS-3(2.1 mm×100 mm I.D., 3 μm);流动相为 0.1% 甲酸(A)-乙腈(B),梯度条件是:0~45 min:10%~30% B。流速为 0.2 mL·min<sup>-1</sup>;柱温为 40℃;检测波长为 286 nm。结果 丹酚酸 A 回归方程为  $Y=102195X-939080$ ,线性范围为 12.00~240.00 μg·mL<sup>-1</sup>, $r=0.9990$ ;迷迭香酸回归方程为  $Y=49827X-898867$ ,线性范围为 27.00~540.00 μg·mL<sup>-1</sup>, $r=0.9995$ ;紫草酸回归方程  $Y=50025X-1000000$  线性范围为 36.00~720.00 μg·mL<sup>-1</sup>, $r=0.9995$ ,三种成分的加标回收率在 88.82%~110.34%。测定了同一厂家生产的 10 种不同批次的注射用丹参多酚酸,得到丹酚酸 A 的含量在 14.61~15.38 μg·mL<sup>-1</sup>之间;迷迭香酸的含量在 42.08~58.98 μg·mL<sup>-1</sup>之间;紫草酸的含量 56.32~64.63 μg·mL<sup>-1</sup>之间。结论 该方法灵敏、准确、专属性强,可用于注射用丹参多酚酸中的丹酚酸 A、迷迭香酸和紫草酸含量的测定,适用于注射用丹参多酚酸的质量评价。

**关键词:**注射用丹参多酚酸;高效液相色谱法;含量测定;迷迭香酸;紫草酸;丹酚酸 A

中图分类号:R284

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2024)04-0098-04

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.04.019

中药注射剂是在中医理论指导下,采用现代科学技术,将中药饮片提取、纯化后制成的供注入体内的溶液、乳状液及供临用前配制成溶液的粉末或浓溶液的无菌制剂<sup>[1]</sup>。与丸剂、膏剂等传统中药剂型相比,具有起效快,生物利用度高等优点,尤其在心血管疾病、恶性肿瘤等复杂疾病的治疗中发挥着不可替代的作用<sup>[2-4]</sup>。注射用丹参多酚酸是基于我国中医药数千年的发展,取其精华,外加以先进的现代工艺为基础,将丹参的提取物进行配液,滤过,罐装,灭菌等一系列操作,加工制成的一种统一规格、统一剂量、统一质量标准的中药注射剂,适用于治疗心脑血管疾病<sup>[5-7]</sup>。注射用丹参多酚酸还被用于减缓脑梗死患者的病势发展<sup>[8-11]</sup>;与化学药物联合使用用于治疗合并的心脑血管疾病<sup>[12-14]</sup>;研究还发现注射用丹参多酚酸在脑缺血再灌注损伤中具有脑功能保护作用<sup>[15]</sup>。因此,注射用丹参多酚酸在临床上

应用广泛。

注射用丹参多酚酸的有效成分是丹参中水溶性成分丹参多酚酸,以其制成冻干粉针剂,成分包括丹参素钠、丹酚酸 B、迷迭香酸、紫草酸、丹参素钠、原儿茶醛、咖啡酸、丹酚酸 D、丹酚酸 A 以及丹酚酸 U/T 等,其中以丹酚酸 B 的含量最高<sup>[16-18]</sup>。《中华人民共和国药典》以丹酚酸 B 与迷迭香酸作为丹参总酚酸提取物的定量指标<sup>[19]</sup>。除丹酚酸 B 和迷迭香酸之外,研究发现丹酚酸 A 具有抗心肌缺血<sup>[20]</sup>、抗肝硬化<sup>[21]</sup>、抗肿瘤<sup>[22]</sup>、改善学习记忆损伤<sup>[23]</sup>等多种药理作用。对心绞痛、急性心肌梗死、视网膜中央动脉栓塞、血栓闭塞性脉管炎等有治疗作用。因此,仅控制丹酚酸 B 和迷迭香酸这两种成分的含量难以对中药的多药效成分进行综合评价。因此,简单方便地可以同时测定多种主要成分含量的方法对其质量控制及应用具有重要意义。高效液相

<sup>\*</sup> 基金项目:西安市卫健委中医药科研项目(SZY202202)

<sup>\*\*</sup> 通讯作者:王新晓,主管药师。E-mail:382990766@qq.com

色谱法(HPLC)因其样品前处理简单,操作方便,易于实现自动化和过程检测,在不同产地的中药材质量分析、中药的指纹图谱及中药注射剂中有效成分的测定中均有广泛的应用<sup>[24-26]</sup>。

本实验采用 HPLC 法,建立了同时测定注射用丹参多酚酸中丹酚酸 A、迷迭香酸和紫草酸三种主要成分含量的方法,对该定量方法进行方法学考察后将其应用于三种成分的含量测定,为注射用丹参多酚酸多指标成分的定量控制提供参考,对其更好的进行临床应用具有一定意义。

## 1 仪器与试药

**1.1 仪器** SHIMADZU LC-2040C 3D 高效液相色谱仪(日本岛津科学仪器有限公司);Sartorius 1712 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司);富勒姆 FCR1002-UF 超纯水制备机(青岛富勒姆科技有限公司);QL-901 涡旋混匀仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);SHZ-D(Ⅲ)型循环水真空泵(巩义市英峪予华仪器厂);移液枪(德国 Eppendorf);SB-5200DTD 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

**1.2 试药** 丹酚酸 A、迷迭香酸和紫草酸对照品(纯度>98%,成都普菲德生物技术有限公司);甲酸(分析纯,无锡宜兴第二化学试剂厂);乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Fisher Scientific);血必净注射液为市售药品;水为超纯水;注射用丹参多酚酸粉针剂(天津天士力之娇药业有限公司)。

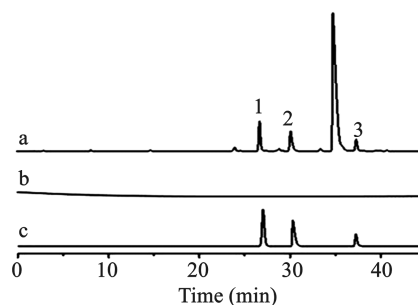
## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 称取注射用丹参多酚酸粉针剂(批号:20201005)适量,精密称定,置于 10 mL 容量瓶中,加水溶解并定容成  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,摇匀后作为供试品溶液,进样分析前用  $0.22 \text{ } \mu\text{m}$  水相微孔滤膜过滤。

**2.2 对照品溶液制备** 取丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸、紫草酸对照品适量,精密称定,置于棕色量瓶中,加纯水溶解并稀释成每 1 mL 中约含丹酚酸 A  $240 \text{ } \mu\text{g}$ ,迷迭香酸  $540 \text{ } \mu\text{g}$  和紫草酸  $720 \text{ } \mu\text{g}$  的溶液,作为混合对照品的储备溶液。

**2.3 色谱条件与系统适用性试验** Inertsil ODS-3 (2.1 mm×100 mm I.D.,  $3 \text{ } \mu\text{m}$ );流动相为 0.1%甲酸(A)-乙腈(B),梯度条件为:0~45 min:10%~30% B,45.01~55 min:100% B,55.01~65 min:10% B。流速为  $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;柱温为  $40 \text{ } ^\circ\text{C}$ ;检测波长为

$286 \text{ nm}$ ;进样量: $5 \text{ } \mu\text{L}$ 。采用外标法定量,理论塔板数不得低于 8000,待测物的色谱峰与相邻共存物之间的分离度不小于 1.5,拖尾因子不得大于 1.2,且注射用丹参多酚酸中的丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸和紫草酸与对照品的保留时间一致,无其他组分干扰,HPLC 结果如图 1 所示。



1.迷迭香酸;2.紫草酸;3.丹酚酸 A;a.注射用丹参多酚酸(20201005);b.水溶液;c.混合对照品溶液

图 1 混合对照品和样品 HPLC 图

**2.4 标准曲线的绘制** 将“2.2”对照品储液分别取 1 mL,0.8 mL,0.5 mL,0.1 mL,0.05 mL 置于容量瓶中,加入甲醇分别稀释至 1 mL,并按照 2.3 色谱条件,各进样  $5 \text{ } \mu\text{L}$ ,依次注入到高效液相色谱仪,测定峰面积值。以丹酚酸 A、迷迭香酸、紫草酸浓度( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,结果如表 1 所示。

表 1 丹酚酸 A、迷迭香酸、紫草酸的回归方程

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
丹酚酸 A	$Y = 102195X - 939080$	0.9990	12~240
迷迭香酸	$Y = 49827X - 898867$	0.9995	27~540
紫草酸	$Y = 50025X - 1000000$	0.9995	36~720

**2.5 专属性考察** 以稀释用纯水作为空白对照,按照“2.3”色谱条件进样,取混合对照品溶液作为阳性对照,相同色谱条件下,注射用丹参多酚酸的色谱图中混合对照品吸收峰的位置无干扰峰存在。结果如图 1 所示。

**2.6 检测限与定量限** 将“2.2”混合对照品储液,不断稀释,再分别按照“2.3”色谱方法进行分析,进样量为  $5 \text{ } \mu\text{L}$ ,根据目测法,找到信噪比为 3 的浓度即为检测限,信噪比为 10 的浓度即为定量限。结果如表 2~6 所示,丹酚酸 A 检测限为  $4 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,定量限为  $12 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;迷迭香酸检测限为  $8 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,定量限为  $12 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;紫草酸检测限为  $9 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,定量限为  $18 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.7 精密度考察** 将“2.2”混合对照品溶液取 2 mL,置于 10 mL 容量瓶中,并加入纯水定容,得到每 1 mL 分别含丹酚酸 A  $48\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,迷迭香酸  $108\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,紫草酸  $144\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,按照 2.3 项下色谱条件连续进样 6 次,进样量为  $5\text{ }\mu\text{L}$ ,测得丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸和紫草酸的峰面积 RSD 分别为 1.06%、0.86%、1.08%和 0.95%,实验结果表明该方法日内精密度良好。按照“2.3”项色谱条件,连续 5 日各进样分析一次,测得丹酚酸 A、迷迭香酸和紫草酸的峰面积 RSD 为分别为 4.02%、3.24%、3.61%和 3.27%,结果表明该方法日间精密度良好。

**2.8 重复性考察** 将供试品溶液(注射用丹参多酚酸,批号:20171005)分成六等份,按“2.1”中方法稀释过滤后,按照“2.3”项色谱条件,色谱柱用初始比例流动相充分平衡后,分别进样分析,各进样  $5\text{ }\mu\text{L}$ ,测得丹酚酸 A、迷迭香酸和紫草酸三种主要成分的峰面积 RSD 为 0.15%、0.68%和 1.80%,结果表明该方法具有良好的重复性。

**2.9 稳定性考察** 将供试品溶液(注射用丹参多酚酸,批号:20171005)放置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,并于 0,2,4,6,8,12,24 h 各进样  $5\text{ }\mu\text{L}$ ,记录各色谱峰面积。丹酚酸 A、迷迭香酸和紫草酸峰面积 RSD 分别为 1.30%、0.39%和 1.52%,均小于 5%。实验结果表明,供试品溶液在 24 h 内稳定,主要成分含量没有明显的变化趋势。

**2.10 加标回收率** 取同一批(注射用丹参多酚酸,批号:20171005)样品溶液,按照“2.1”条件下稀释至  $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,分成 9 份,每份 1 mL,分为 3 组,每组分别加入混合对照品溶液,配制成低、中、高三种不同浓度的样品溶液,按照 2.3 项下色谱条件进行测定,根据样品含量,加入量,测得量,计算丹酚酸 A、丹酚酸 B、迷迭香酸和紫草酸的加样回收率。实验结果如表 2,3,4 所示,丹酚酸 A 平均回收率为 107.66%,RSD 为 2.05%;迷迭香酸平均回收率为 94.31%,RSD 为 3.51%;紫草酸平均回收率为 92.36%,RSD 为 3.56%。

**2.11 样品的含量测定** 取各批次注射用丹参多酚酸样品,按“2.1”项的样品制备方法进行处理,按照“2.3”项色谱条件,各进样  $5\text{ }\mu\text{L}$ ,测定丹酚酸 A、迷迭香酸、紫草酸的峰面积,并带入“2.4”项回归方程

计算出样品的含量,样品含量测定结果如表 5 所示。10 个不同批号的注射用丹参多酚酸中丹酚酸 A 的含量在  $14.61\sim15.38\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间,迷迭香酸的含量在  $42.08\sim58.98\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间,紫草酸的含量在  $56.32\sim64.63\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间。

表 2 丹酚酸 A 加标回收率实验结果

待测组分	样品含量 ( $\mu\text{g}$ )	加入量 ( $\mu\text{g}$ )	测得量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
丹酚酸 A	15.29	13.35	29.47	106.22	107.66	2.05
	15.29	13.35	29.83	108.91		
	15.29	13.35	30.02	110.34		
	15.29	16.69	33.01	106.17		
	15.29	16.69	33.68	110.19		
	15.29	16.69	32.82	105.03		
	15.29	20.03	36.26	104.69		
	15.29	20.03	36.88	107.79		
	15.29	20.03	37.24	109.59		

表 3 迷迭香酸加标回收率实验结果

待测组分	样品含量 ( $\mu\text{g}$ )	加入量 ( $\mu\text{g}$ )	测得量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
迷迭香酸	58.98	47.46	105.64	98.31	94.31	3.51
	58.98	47.46	104.78	96.50		
	58.98	47.46	104.60	96.12		
	58.98	59.33	112.72	90.58		
	58.98	59.33	112.46	90.14		
	58.98	59.33	112.34	89.94		
	58.98	71.20	128.67	97.88		
	58.98	71.20	126.21	94.42		
	58.98	71.20	126.52	94.86		

表 4 紫草酸加标回收率实验结果

待测组分	样品含量 ( $\mu\text{g}$ )	加入量 ( $\mu\text{g}$ )	测得量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
紫草酸	64.63	50.46	112.47	94.81	92.36	3.56
	64.63	50.46	111.25	92.39		
	64.63	50.46	109.49	88.90		
	64.63	63.08	124.99	95.69		
	64.63	63.08	125.04	95.77		
	64.63	63.08	124.99	95.69		
	64.63	75.70	131.87	88.82		
	64.63	75.70	131.04	87.73		
	64.63	75.70	133.88	91.48		

表 5 样品含量测定结果( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

批号	丹酚酸 A	迷迭香酸	紫草酸
20201004	15.00	51.30	60.34
20201005	15.29	58.98	64.63
20201006	15.14	52.00	59.84
20201007	14.61	51.44	62.25
20201008	14.91	50.44	60.15
20201001	14.61	57.46	59.25
20210602	15.29	42.08	56.32
20210701	15.38	46.97	59.20
20210501	15.20	53.89	58.84
20210901	14.86	53.83	60.42

### 3 讨论

综上所述-建立的上述 HPLC 同时测定方法可以同时检测注射用丹参多酚酸中丹酚酸 A、迷迭香酸和紫草酸三种成分,方法简单易操作,精密度高,准确性好,为评价注射用丹参多酚酸的质量提供了可靠的方法依据。

在方法建立过程中,丹酚酸 A、迷迭香酸,紫草酸均为弱酸性物质,因此,在流动相 A 中加入了 0.1% 的甲酸,可以改善峰形及分离度,从而防止在分析过程中出现拖尾的现象。在 190~400 nm 范围内,三种主要成分在 286 nm 波长下均有较大吸收,因此实验最终采用 286 nm 作为检测波长。

### 参考文献

- [1] 何自会,王青,刘沫,等.中药注射剂质量控制研究进展[J].中国医药工业杂志,2021,52(5):599-610.
- [2] 徐菁,陈乐,孙丹,等.丹参川芎嗪注射液治疗皮肤病研究进展[J].陕西中医药大学学报,2019,42(2):133-136.
- [3] 刘祚汝.PDCA 管理模式在规范基层医院中药注射剂使用中的应用研究[J].陕西中医药大学学报,2019,42(1):64-68.
- [4] 董子洵,冯佳佳,常佳慧,等.中药注射剂在肿瘤领域的应用研究[J].中国研究型医院,2019,6(5):14-22.
- [5] 高文俊.丹参多酚酸盐联合氯吡格雷治疗冠心病的疗效及对血脂、血管内皮功能、血小板的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(6):745-748.
- [6] 麦兴盛,卢永昭,雷一鸣.冠心病患者颈动脉弹性的超声与斑块稳定性、血小板功能的研究[J].血栓与止血学,2019,25(3):434-436.
- [7] 邱丹,王凡,赵涛.丹参多酚酸盐治疗冠心病心绞痛的疗效及其对血液流变学、氧化应激的影响[J].安徽医药,2018,22(1):147-151.
- [8] 董丹.注射用丹参多酚酸治疗脑梗死急性期疗效及护理[J].中国

现代药物应用,2018,12(6):184-185.

- [9] 钱庆芳.注射用丹参多酚酸治疗合并肺部感染的急性轻中度脑梗塞临床疗效观察[D].长春:吉林大学,2017.
- [10] 李春颖.注射用丹参多酚酸治疗合并糖尿病的急性轻中度脑梗死患者的临床疗效观察[D].长春:吉林大学,2016.
- [11] 吕建军,郭素贞,赵伟娥,等.注射用丹参多酚酸治疗动脉硬化性脑梗塞 20 例[J].中国中医药现代远程教育,2015,13(9):53-55.
- [12] 宋巍巍,徐鹏飞,杜琳,等.注射用丹参多酚酸联合阿托伐他汀治疗缺血性脑卒中合并冠心病的临床研究[J].药物评价研究,2021,44(11):2448-2453.
- [13] 钱承嗣,蒋峻.注射用丹参多酚酸联合曲美他嗪治疗老年冠心病心绞痛患者疗效及对炎症因子、血管内皮损伤和血脂的影响[J].中国老年学杂志,2021,41(21):4614-4617.
- [14] 朱战辉,丁瑞霞,齐宏伟.注射用丹参多酚酸联合氨氯地平、阿托伐他汀对高血压患者内皮功能的影响[J].药物评价研究,2020,43(8):1656-1659.
- [15] 李汶泽,李智,万梅绪,等.注射用丹参多酚酸对脑缺血再灌注后脑功能保护作用的研究进展[J].中南药学,2022,20(11):2658-2664.
- [16] LEE HJ, CHO JY, MOON JH. Chemical conversions of salvianolic acid B by decoction in aqueous solution[J]. Fitoterapia, 2012, 83(7):1196-1204.
- [17] 田介峰,阎红,王瑞静,等.丹参多酚酸提取物化学成分的分离与鉴定[J].中草药,2018,49(21):5024-5028.
- [18] 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,2020.
- [19] 李磊,任建勋,林治荣,等.丹酚酸 A 不同给药途径对犬急性心肌缺血影响[J].中国中药杂志,2016,41(5):910-916.
- [20] 马西虎,李巍.黄芪注射液联合丹参注射液治疗过敏性紫癜肾炎 30 例[J].陕西中医学院学报,2009,32(5):38-39.
- [21] 袁鲜云,庞晓斌.丹红注射液中总黄酮、丹参素、原儿茶醛、丹酚酸 B 含量测定[J].陕西中医学院学报,2011,34(5):88-89.
- [22] WANG T, SHAN SY, HAN B, et al. Salvianolic acid A exerts anti-amnesic effect on diazepam-induced anterograde Amnesia in mice[J]. Neurochemical Research, 2011, 36(1):103-108.
- [23] 邢会香,张学花,刘红,等.UPLC-PDA 测定白术中两种活性成分及不同产地药材质量研究[J].陕西中医药大学学报,2021,44(6):67-72.
- [24] 苏永健,杜鑫,刘红娜,等.五灵胶囊 HPLC 指纹图谱研究[J].陕西中医药大学学报,2022,45(3):46-50.
- [25] 吴晓骏,田敏,彭纓. HPLC 法同时测定黄瑞香注射液原料中四种有效成分的含量[J].沈阳药科大学学报,2022,39(5):536-540.
- [26] 吴彩霞.银杏达莫联合丹参注射液治疗不稳定型心绞痛 62 例[J].陕西中医学院学报,2010,33(5):31-32.

(修回日期:2023-01-29 编辑:崔春利)