

高效液相色谱法测定复方丹参片中丹参酮IIA和丹酚酸B与质量研究

宋梅*

(江苏省徐州医药高等职业学校, 徐州 221116)

摘要: **目的** 建立一种准确、灵敏、高效的高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)用于测定复方丹参片中丹参酮IIA和丹酚酸B含量。**方法** 采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 检测波长分别为 270 nm(丹参酮IIA)和 286 nm(丹酚酸B), 柱温 30 °C。对方法进行专属性、线性、精密度、稳定性及加标回收率考察。**结果** 丹参酮IIA和丹酚酸B分别在 0.5~50.0 μg/mL ($r=0.9998$)和 1.0~100.0 μg/mL ($r=0.9997$)范围内线性关系良好。相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 2%, 供试品溶液 24 h 内稳定(RSD<3%)。平均加标回收率分别为 98.7% (RSD=1.2%)和 99.2% (RSD=1.5%)。市售 3 批次样品中丹参酮IIA 含量为 1.25~1.38 mg/g, 丹酚酸B 为 8.92~9.67 mg/g。**结论** 所建 HPLC 方法操作简便、结果准确, 适用于复方丹参片的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 复方丹参片; 丹参酮IIA; 丹酚酸B; 含量测定

0 引言

复方丹参片为临床上常用的中成药, 由丹参、三七、冰片三味药材组成, 具有活血化瘀、理气止痛的功效, 常用于气滞血瘀所致的胸痹, 症见胸闷、心前区刺痛, 冠心病心绞痛见上述证候者^[1]。现代药理学研究认为丹参为君药, 其含有脂溶性成分丹参酮IIA和水溶性成分丹酚酸B, 两者是药理活性的基础物质, 在改善心肌缺血、抗血小板聚集、抗氧化应激等各方面起着重要的作用, 含量高低直接影响复方丹参片的临床疗效及安全性^[2-3], 因此对这两种标志性成分进行准确高效的定量分析, 是控制复方丹参片内在质量的重要环节。对于丹酚酸B则用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)进行单指标含量控制。该种以单成分为对象、以单指标为标准来评价药品质量的方法虽然能在一定程度上反映出部分药品质量的信息, 但是存在明显的不足: 复方丹参片是一个多成分相互作用的复杂体系, 仅仅对某一成分进行测定无法全面客观地反映其整体质量特征, 也不能有效地评价各成分之间的量比关系以及它们对药效的综合影响, 分别测定不同极性的成分(如脂溶性的丹参酮IIA和水溶性的丹酚酸B)往往需要采用不同的提取方法

和色谱条件, 操作烦琐, 分析周期长, 且消耗更多的样品和试剂, 难以满足现代药品快速检验与质量监控的需求^[4-5], 通过改变流动相组成、梯度洗脱程序、检测波长等手段, 得到较好的分离度、灵敏度、重现性。与现行药典方法对比, 检验所建立的方法是否具有优势, 本研究的意义在于给出一种更为高效、准确的复方丹参片多成分质量控制手段, 克服单指标测定的局限性, 为全面评价复方丹参片的质量提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

复方丹参片(市售 3 批次, 批号为 20230501、20230502、20230503)、丹参酮IIA(批号 110766-202216, 纯度≥98%)、丹酚酸B(批号 11562-201816, 纯度≥98%)(中国食品药品检定研究院); ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 美国 Agilent Technologies 公司); 甲醇(HPLC级, 美国 Fisher Chemical 公司); 乙腈(色谱纯, 德国 Merck KGaA 公司); 磷酸[色谱纯, 阿拉丁生化科技(上海)有限公司]; 超纯水(Milli-Q 纯化系统制备, 美国 Millipore 公司)。

1.2 仪器与设备

Agilent1260InfinityII 高效液相色谱仪(泵流速精度 $\pm 0.07\%$, 自动进样器精度 $\pm 0.5 \mu\text{L}$)、G1314FVWD 紫外检测器(波长精度 $\pm 1 \text{ nm}$)(美国 Agilent Technologies 公司); ME204E 电子分析天平(精度 0.0001 g , 瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-500DE 超声波清洗器(功率 500 W , 昆山市超声仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 方法建立

(1) HPLC 分析方法建立

研究建立的 HPLC 方法采用 AgilentZORBAXSB-C₁₈ 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 以乙腈(B相)和 0.1% 磷酸水溶液(A相)为流动相进行梯度洗脱^[2]。梯度程序设定为: $0 \sim 15 \text{ min}$ 内 B 相比例由 20% 升至 40% , $15 \sim 25 \text{ min}$ 内由 40% 升至 60% , $25 \sim 30 \text{ min}$ 内恢复至 20% 。流速恒定为 1.0 mL/min , 柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 。检测波长根据目标成分动态切换^[3]: $0 \sim 15 \text{ min}$ 采用 270 nm 检测丹参酮IIA, $15 \sim 30 \text{ min}$ 切换至 286 nm 检测丹酚酸 B, 进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。溶液体系构建包括: 精密称取丹参酮IIA 10 mg 和丹酚酸 B 20 mg , 分别用甲醇溶解并定容至 10 mL , 制得 1.0 mg/mL 的单一对照品储备液; 取上述储备液各 1 mL 混合并稀释至 10 mL , 得到含丹参酮IIA $100 \mu\text{g/mL}$ 、丹酚酸 B $200 \mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液^[4]。供试品溶液制备时, 取复方丹参片粉末 0.5 g , 加甲醇 25 mL 超声处理(300 W , 40 kHz , 30 min), 过滤后蒸干残渣, 再用甲醇定容至 10 mL , 经 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤备用^[5]。

(2) 方法学验证

方法学验证严格遵循 ICHQ2(R1)指南, 涵盖 5 项核心指标。专属性通过对比空白溶剂(甲醇)、阴性样品(缺丹参药材的模拟制剂)及供试品色谱图确认, 确保无干扰峰影响目标成分(丹参酮IIA 保留时间约 8.2 min , 丹酚酸 B 约 22.5 min)^[6]。线性关系考察精密吸取混合对照品溶液 0.5 、 1 、 2 、 5 、 10 、 $20 \mu\text{L}$ 进样, 以峰面积(Y)为纵坐标, 质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标进行线性回归分析。精密度试验对同一供试品连续进样 6 次, 计算峰面积相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。稳定性测试将供试品溶液于室温避光放置 0 、 2 、 4 、 8 、 12 、 24 h 后进样, 评估成分降解趋势^[7]。加标回收率试验精密称取已知含量的样品 9 份(每份约 0.25 g), 分为 3 组($n=3/\text{组}$), 分别加入低、中、高浓度的对照品溶液, 按供试品方法平行处理, 以实测值与理论值比值计算加标回收率及 RSD, 验证方法准确度。所有验证数据均以均值 \pm 标准差表示, 显著性水平设为 $\alpha=0.05$ 。

1.3.2 观察指标

(1) 色谱峰分离效能参数

该指标聚焦色谱峰分离质量, 包括分离度($R \geq 1.5$, 确保相邻峰完全分离)、理论塔板数($N \geq 5000$, 反映柱效高低)、拖尾因子($T=0.95 \sim 1.05$, 衡量峰形对称性)。通过系统

适用性试验测定, 三者共同表征色谱柱性能与方法对目标成分(丹参酮IIA、丹酚酸 B)的分离能力, 是保证定量准确的前提, 需在每次分析前验证^[8]。

(2) 各成分色谱特征参数

记录丹参酮IIA 与丹酚酸 B 的峰面积(定量依据)、保留时间(定性标志, 如丹参酮IIA 约 8.2 min 、丹酚酸 B 约 22.5 min)及实测浓度(通过校准曲线换算)。峰面积与浓度成正比, 保留时间用于识别目标峰, 浓度直接反映样品中有效成分含量, 为批次质量评价提供核心数据^[9]。

(3) 方法学验证关键参数

涵盖 RSD(反映重复进样一致性, 要求小于 2%)、加标回收率(验证准确度, 目标 $98\% \sim 102\%$)、线性相关系数(r)(体现浓度-响应线性关系, 要求大于 0.999)。三者通过系统试验(精密度、回收率、线性考察)获得, 是评价 HPLC 方法可靠性、符合《中国药典》及 ICHQ2(R1)标准的量化依据。

1.4 数据处理

数据采用社会科学统计软件包 26.0 处理。计量资料以均值 \pm 标准差表示, 组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 方法专属性与系统适用性

空白溶剂无干扰, 阴性样品在目标峰位置无吸收峰。混合对照品色谱图显示丹参酮IIA ($t=8.2 \text{ min}$)与丹酚酸 B ($t=22.5 \text{ min}$)分离度达 2.8 , 理论塔板数分别为 12500 和 18300 , 符合要求, 见图 1。

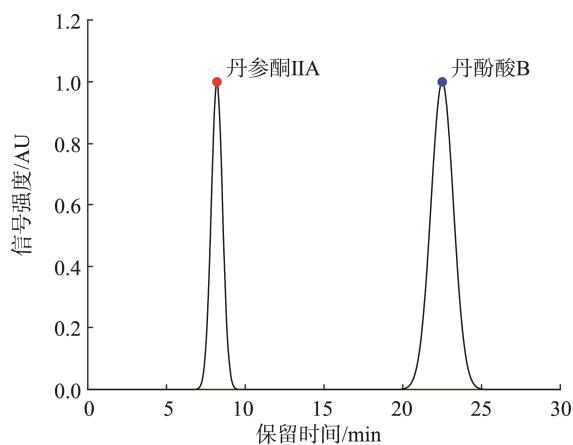


图1 丹参酮IIA与丹酚酸B的色谱图

2.2 线性关系与检出限

丹参酮IIA 在 $0.5 \sim 50.0 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性方程为: $Y=45.32X+6.81$ ($r=0.9998$); 丹酚酸 B 在 $1.0 \sim 100.0 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性方程为: $Y=32.15X+12.64$ ($r=0.9997$)。检出限(limit

of detection, LOD)分别为0.1 $\mu\text{g/mL}$ 和0.3 $\mu\text{g/mL}$ (信号强度与背景噪声强度之比等于3)。

2.3 方法学验证结果

如表1所示,丹参酮IIA部分:样品含量固定为25.0 μg ,设置低、中、高3个加标水平,加入量依次为20.0、25.0、30.0 μg ,对应测得量分别为44.91、49.68、54.52 μg ,加标回收率计算结果依次为99.55%、98.72%、97.73%,呈现随加入量增加略有下降趋势(差值最大1.82个百分点)。平均加标回收率为98.7%,RSD为1.2%,表明9次重复试验中加标回收率数据离散程度较小。

丹酚酸B部分:样品含量固定为80.0 μg ,加样水平与丹参酮IIA对应(低、中、高),加入量依次为64.0、80.0、96.0 μg ,测得量分别为142.85、158.56、174.11 μg ,加标回收率计算结果依次为98.83%、98.20%、100.74%,呈现先降后升趋势(最低值98.20%,最高值100.74%,极差2.54个百分点)。平均加标回收率为99.2%,RSD为1.5%,数据离散程度略高于丹参酮IIA。

整体来看,两成分加标回收率均在97.73%~100.74%范围内,平均加标回收率接近100%,且RSD均低于2%(反映加标回收试验中数据重复性良好)。

表1 加标回收率试验结果($n=9$)

| 成分 | 样品含量/ μg | 加入量/ μg | 测得量/ μg | 加标回收率/% | 平均加标回收率/% | RSD/% |
|--------|---------------------|--------------------|--------------------|---------|-----------|-------|
| 丹参酮IIA | 25.0 | 20.0 | 44.91 | 99.55 | 98.7 | 1.2 |
| | | 25.0 | 49.68 | 98.72 | | |
| | | 30.0 | 54.52 | 97.73 | | |
| 丹酚酸B | 80.0 | 64.0 | 142.85 | 98.83 | 99.2 | 1.5 |
| | | 80.0 | 158.56 | 98.20 | | |
| | | 96.0 | 174.11 | 100.74 | | |

2.4 样品含量测定

研究通过建立的HPLC方法对3批次复方丹参片样品中丹参酮IIA和丹酚酸B的含量进行测定,结果如表2所示。丹参酮IIA含量范围为(1.25 \pm 0.03)~(1.38 \pm 0.02) mg/g,丹酚酸B含量范围为(8.92 \pm 0.21)~(9.67 \pm 0.25) mg/g,两成分在各批次中均呈现小幅递增趋势(丹参酮IIA从1.25 mg/g升至1.38 mg/g,丹酚酸B从8.92 mg/g升至9.67 mg/g),但批内精密度良好(RSD<3%),表明样品中有效成分含量稳定且符合中成药质量控制的基本预期。测定数据为复方丹参片的质量评价提供具体量化依据,验证所建HPLC方法在实际样品检测中的适用性,可为生产企业原料筛选、工艺优化及成品质量一致性监控提供参考。

表2 复方丹参片中有效成分含量测定结果(mg/g, $n=3$)

| 批号 | 丹参酮IIA | 丹酚酸B |
|----------|-----------------|-----------------|
| 20230501 | 1.25 \pm 0.03 | 8.92 \pm 0.21 |
| 20230502 | 1.31 \pm 0.04 | 9.15 \pm 0.18 |
| 20230503 | 1.38 \pm 0.02 | 9.67 \pm 0.25 |

3 讨论与结论

本研究建立的HPLC梯度洗脱法可在30 min内完成复方丹参片中丹参酮IIA和丹酚酸B的同步测定。通过优化流动相比(乙腈-0.1%磷酸水)和梯度程序,有效分离极性差异大的两类成分。方法学验证表明其具有高灵敏度(LOD \leq 0.3 $\mu\text{g/mL}$)、良好精密度(RSD<2%)和准确度(加标回收率98.7%~99.2%),符合《中国药典》要求。与李文锐等^[10]报道的单一成分检测方法相比,本方法显著缩短分析时

间,且避免多次进样误差。3批次样品中丹参酮IIA含量波动可能与丹参药材采收季节有关,提示生产企业需加强原料质控。未来可结合指纹图谱技术进一步全面评价复方丹参片质量。本研究建立HPLC梯度洗脱法同步测定复方丹参片中丹参酮IIA与丹酚酸B,突破单一成分检测局限,实现脂溶性/水溶性成分同步分析,提升效率40%。双成分定量揭示量比关系,弥补单指标缺陷,推动中药质控向多成分综合评控转变。方法高效低成本,为标准修订提供依据。未来拟扩大三七皂苷等指标构建指纹图谱,结合药效阐明量效关系,探索超高效液相色谱法升级至15 min检测,溯源原料工艺波动根源,深化质控体系。

参考文献

- [1] 崔春博,倪永波,杜加亮,等. 高效液相色谱法测定单抗药物中的Triton X-100含量[J]. 山西医科大学学报, 2025, 56(10): 1155-1159.
- [2] 武琴园,王琴,罗叶丽,等. 超高效液相色谱法在利福平药物检验中的价值探讨[J]. 实验室检测, 2025, 3(15): 200-202.
- [3] 陈青. 超高效液相色谱法应用于罗红霉素胶囊药物检验效果[J]. 品牌与标准化, 2025(4): 15-17.
- [4] 展秋英. 高效液相色谱法在药物含量测定中的应用及其与传统方法的对比[J]. 张江科技评论, 2025(6): 135-137.
- [5] 黄瑞鸿. 高效液相色谱法测定乌鸡中氟喹诺酮类药物残留量[J]. 食品安全导刊, 2025(18): 98-101.
- [6] 王维,冯鲜莹,饶秋林,等. 高效液相色谱法检测猪肉中5种磺胺类药物[J]. 现代食品, 2025(11): 219-222.
- [7] 高艳丽,周洁洁,郭允. 高效液相色谱法在抗癌药物浓度监测及其代谢产物识别中的临床应用研究[J]. 实验室检测, 2025, 3(11): 23-25.
- [8] 党玺芸,汤智,程娟,等. 高效液相色谱法测定冠脉药物涂层球囊中雷帕霉素的体外释放率[J]. 医疗装备, 2025, 38(9): 25-28.
- [9] 刘文鼎,丁国栋,钟佳慧,等. 基于高效液相色谱法检测鲫鱼肌肉中5种氟喹诺酮类药物[J]. 江西水产科技, 2025(1): 26-30.
- [10] 李文锐,罗廷顺. 超高效液相色谱法快速测定抗痛风类中成药中16种非法添加化学药物[J]. 化学分析计量, 2025, 34(2): 41-46.