

# 反相高效液相色谱测定丹参注射剂的 三种有效成分\*

倪坤仪 张国清

(中国药科大学, 南京)

**提要** 本文用反相高效液相色谱法, 采用离子抑制技术分离了丹参注射剂中三种有效成分: 丹参素、原儿茶醛、原儿茶酸。并用外标法测定了它们在丹参注射液和复方丹参注射液中的含量。考察了 Waters 公司分析柱(3.9×300 mm)和径向加压柱(8×100 mm), 以及国产色谱柱(5×150 mm)分析样品, 均能获得满意的结果。比较了用多通道紫外吸收检测器和 254 nm 固定波长紫外检测器测定样品时灵敏度的差异。

**关键词** 丹参注射剂; 丹参素; 原儿茶醛; 原儿茶酸; 反相高效液相色谱法

丹参注射剂中含有多种水溶性成分, 其中丹参素、原儿茶醛和原儿茶酸经药理研究证明它们具有抗心肌缺血和增加冠脉流量等生理活性<sup>(1~3)</sup>。测定这些成分的方法有纸层析法<sup>(4~6)</sup>, 薄层层析法<sup>(7)</sup>和高效液相色谱法<sup>(8)</sup>, 但这些报道均测定了注射液中一种成分。作者用薄层层析<sup>(9)</sup>和高效液相色谱分别测定了丹参注射剂中三种成分。高效液相色谱法比薄层层析法更为简便、快速、准确。灵敏度可提高几十倍。由于此三种成分均具有一定酸性, 故在反相色谱中采用离子抑制技术, 使样品获得较为满意的分离。

## 实验部分

### 一. 仪器和药品

**仪器** Waters 510 泵, U 6 K 进样阀, 490 多通道紫外检测器, 740 数据处理机, 预柱, Guard pak C<sub>18</sub>; 柱 I:  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> 柱, 10  $\mu$ m, 3.9×300 mm; 柱 II: 径向加压柱 (Radial Pak Cartridge C<sub>18</sub>) 10  $\mu$ m, 8×100 mm。

YSB-DZ 型高效液相色谱仪(中国科学院上海分院科学仪器厂), YSB-II 型往复平流泵, DZ-1 型紫外检测器(固定波长 254 nm), XWT-264 台式记录仪, 色谱柱 YWG-C<sub>18</sub>, 10  $\mu$ m, 5×150 mm。

重蒸馏水; 甲醇 (AR), 使用前分别用 0.45  $\mu$ m HA 和 0.5  $\mu$ m FH 薄膜过滤。

**对照品** 丹参素(I), 上海第一医学院提供; 原儿茶酸(II)和原儿茶醛(III)为市售品, 经重结晶精制, 经实验, 在薄层色谱和高效液相色谱中均显一个峰。

丹参注射液及复方丹参注射液均为市售。

### 二. 实验条件的选择

**(一) 色谱条件** 用柱 I 并加一根同样固定相的保护柱, 以防中药制剂污染分析柱。流动相选用水—甲醇—冰醋酸 (80:19:1), 流速, 1.5 ml/min。紫外检测器采用 4 通道, 最多可达 12 个检测波长, 丹参素和原儿茶醛在 280 nm 下检测, 原儿茶酸在 262 nm 波长处出峰。按上述条件测得的对照品混合物和样品的色谱图分别见图 1 和图 2。

本文于 1987 年 1 月 21 日收到。

\* 本科题为国家自然科学基金资助项目

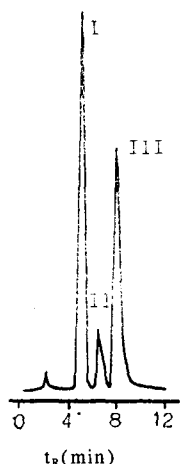


Fig 1. Separation of the mixture of standards. I. Danshensu; II. Protocatechuic acid; III. Protocatechuic aldehyde.

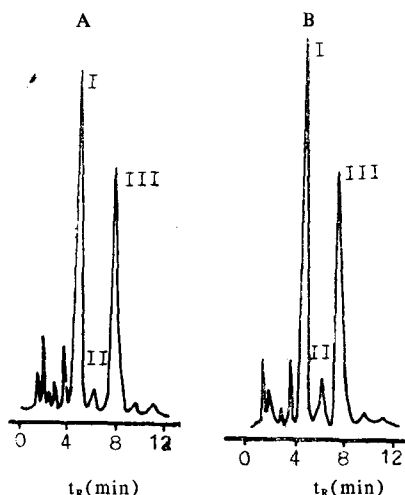


Fig 2. Separation of samples. A. *Salvia miltiorrhiza* injection; B. Compound *Salvia miltiorrhiza* injection. I. Danshensu; II. Protocatechuic acid; a III. Protocatechuic ldehyde.

## (二) 标准曲线

**贮备液的配制** 精密称取原儿茶醛 6.30 mg 和原儿茶酸 3.30 mg, 分别置于二个 25 ml 容量瓶中, 用甲醇溶解, 并加至刻度。

精密称取丹参素 4.00 mg 于 25 ml 容量瓶中, 另精密吸取原儿茶醛贮备液 2 ml 和原儿茶酸贮备液 0.5 ml 加入上述容量瓶中, 加甲醇至刻度, 10°C 以下保存。将上述标准液用微量注射器分别进样 6, 9, 12, 15, 18  $\mu$ l, 以峰高为纵坐标, 对照品  $\mu$ g 数为横坐标作图, 得 3 条基本过原点的直线。其回归方程为:

丹参素(I)	$A = 2.06 + 20.25 W$	$r = 0.9999$
原儿茶酸(II)	$A = 0.200 + 195.8 W$	$r = 0.9997$
原儿茶醛(III)	$A = -0.220 + 83.02 W$	$r = 0.9999$

丹参素的最低检出量为 22 ng, 原儿茶酸为 5 ng, 原儿茶醛为 6 ng。

**(三) 加样回收率测定** 精密吸取样品稀释液 1 ml, 加对照品混合液(丹参素浓度为 160  $\mu$ g/ml, 原儿茶醛为 21.1  $\mu$ g/ml, 原儿茶酸 2.6  $\mu$ g/ml) 1 ml, 混合均匀, 进样 6  $\mu$ l, 重复测定 6 次, 同时也分别进 6  $\mu$ l 对照品混合液和 6  $\mu$ l 样品稀释液, 计算平均回收率, 丹参素为 99.6%, 原儿茶酸 100.4%, 原儿茶醛 99.2%, 变异系数分别为 1.1%, 1.9%, 0.9%。

## 三. 样品测定

**(一) 样品液的配制** 精密吸取丹参注射液或复方丹参注射液 0.5 ml 于 5 ml 容量瓶, 加甲醇至刻度。

**(二) 样品测定** 因被测化合物的标准曲线均为过原点的直线, 故选用外标一点法测定。进样量为 3~20  $\mu$ l。表 1 列出了 A, B, C, D, E, 5 个厂家 10 个批号的丹参注射液和复方丹参注射液的测定数据。

**(三) 系统适应性测定** 按选定条件进样 15  $\mu$ l 对照品混合液, 测定各峰峰高值, 重复测定 7 次, 计算变异系数(见表 2)。结果表明, 所选系统稳定性好, 多次进样重现性好, 变异系数在 1.4~2.0% 之间。

Tab 1. Analysis of samples

Sample			<i>Salvia miltiorrhiza</i> injection						Compound <i>Salvia miltiorrhiza</i> injection			
Manufactory			A			B		C	A		D	E
Batch No.			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Content (mg/ml)	I	Average(n=5)	4.44	2.85	1.50	2.96	2.17	7.19	1.60	2.34	0.654	5.17
		CV(%)	1.2	1.5	3.3	1.1	1.8	1.0	0.7	0.2	0.9	0.4
	II	Average(n=5)	0.0434	0.0323	0.0252	0.0339	0.0206	0.0505	0.0204	0.0291	0.0058	0.0488
		CV(%)	1.1	2.5	1.7	2.7	3.5	2.2	4.0	4.5	3.8	2.9
	III	Average(n=5)	1.15	1.05	0.445	0.580	0.229	0.694	0.564	0.588	0.0446	0.762
		CV(%)	3.2	2.0	2.7	3.0	3.2	1.6	0.6	1.1	3.4	2.3

Tab 2. System suitability test

Compound	Test value (mm)							Average(mm)	CV%
I	50.0	50.3	49.2	50.6	48.7	50.3	50.3	50.1	1.5
II	8.0	8.0	8.0	8.0	7.5	7.8	8.0	7.8	2.0
III	24.8	24.2	24.0	24.2	23.8	23.9	24.0	24.1	1.4

## 讨 论

一. 本文系采用  $\mu$ Bondapak  $C_{18}$  柱安装在 Waters 公司的仪器上进行测定, 获得了较为满意的分离效果。我们也试用了 Waters 公司生产的径向加压柱以及国产 YWG- $C_{18}$  为填料的分析柱, 均能获得满意的分离效果, 见图 3。

国产 YWG- $C_{18}$  分析柱的分离效果和柱效比较好。使用此分析柱, 及中科院上海分院科学仪器厂生产的泵和 254 nm 固定波长紫外检测器, 用隔膜进样器进样。我们在国产柱上也用对照品混合液进行了系统适应性测定, 变异系数在 1.6% 左右。并测定了标准曲线, 其回归方程为:

$$\text{丹参素} \quad A = -0.160 + 2.034 W \quad r = 0.9993$$

$$\text{原儿茶醛} \quad A = -0.768 + 17.05 W \quad r = 0.9998$$

$$\text{原儿茶酸} \quad A = 0.378 + 78.84 W \quad r = 0.9992$$

将此组方程的斜率, 与前述方程的斜率比较, 丹参素灵敏度相差 10 倍左右, 原儿茶醛相差约 5 倍, 原儿茶酸 2.5 倍。这与仪器的灵敏度有关, 同时也与检测波长有关。

二. 丹参素、原儿茶醛与原儿茶酸均为具有酸性的物质, 在中性流动相中, 由于存在解离平衡, 故拖尾现象很严重。采用离子抑制技术, 在流动相中加入少量醋酸, pH 约为 3.0, 抑制了酸性物质的解离, 使丹参素、原儿茶醛、原儿茶酸这三种主成分能与其它物质很好分离。当流速为 1.0 ml/min 时, 能清楚地检测十个以上色谱峰。

三. 样品质量的考察 从表 1 结果可看出, 丹参注射液中丹参素含量最大, 其次为原儿茶醛, 原儿茶酸含量很少。不同厂家、不同批号, 三种成分含量相差也较远, 故测定丹参注射剂中这三种成分, 特别是丹参素和原儿茶醛的含量, 可作为产品质量的指标。如 D 厂生产

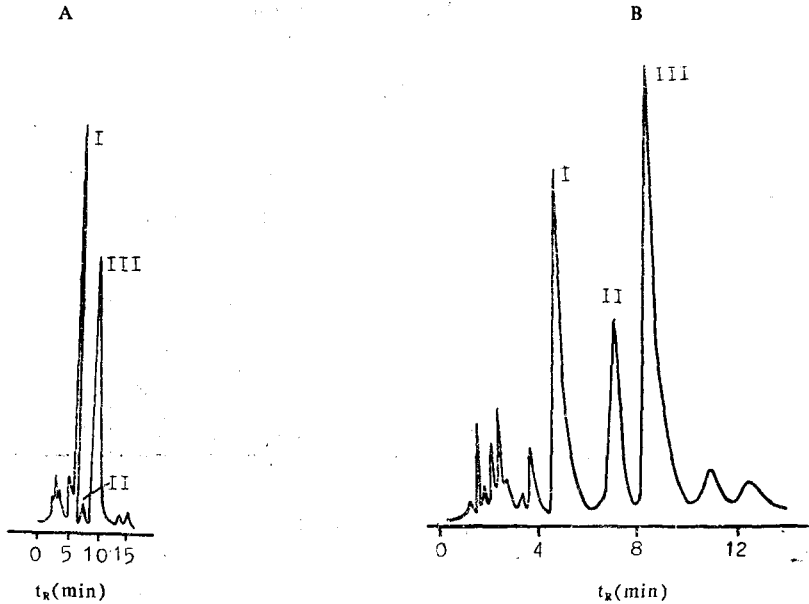


Fig 3. Chromatogram of *Salvia miltiorrhiza* injection. A. Waters Pak Cartridge column (8.0 x 100 mm), Mobile phase; water-methanol-glacial acetic acid (80:19:1), flow rate, 1.5 ml/min. UV detector of four channel. B. YWG C<sub>18</sub> column (5.0 x 150 mm), Mobile phase; water-methanol-glacial acetic acid (80:19:1), flow rate, 1.0 ml/min. 254nm detector. I. Danshensu; II. Protocatechuic acid; III. Protocatechuic aldehyde.

的注射剂三种成分含量极少，其疗效令人怀疑。B厂5号样品，稀释液过夜后即出现大量沉淀，也是其它样品未出现的现象。

四. 复方丹参注射液是由丹参和降香二味中药提取制成的，比较图2中的A与B图，丹参注射液和复方丹参注射液的色谱图无明显差别，故可用同样的方法测定复方丹参注射液中丹参的三种有效成分。

五. 紫外吸收检测器为浓度型检测器，浓度型检测器定量用峰高较好，因流速的微小变化对定量结果影响较小<sup>(10)</sup>。作者通过实验比较了用峰高定量和峰面积定量的结果，也发现用峰高定量误差较小，故本文采用峰高定量。

### 参 考 文 献

1. 江文德, 等. 丹参素及另两种水溶性丹参成分抗心肌缺血和对冠状动脉作用的研究. 上海第一医学院学报 1982;9:13.
2. 石琳, 等. 用荧光探针DPH研究原儿茶醛对血小板流动性的影响. 药学报 1984; 19:535.
3. 张遵仪, 等. 原儿茶酸衍生物的化学结构与冠脉流量、心肌耗氧量关系的探讨. 同上 1980; 15:641.
4. 倪坤仪、倪青云. 纸层析定量分析丹参注射液中原儿茶醛的含量. 药检工作通讯 1979; 9:115.
5. 何怀冰, 等. 纸层析—紫外分光光度法测定丹参注射剂中丹参素的含量. 药物分析杂志 1984; 4:212.
6. 赵学昆, 等. 纸层析定量测定丹参注射液中有有效成分——丹参素含量方法的探讨. 中成药研究 1984; (7):22.
7. 朱亚琦、于如根. 薄层扫描法测定原儿茶醛和原儿茶酸的含量. 药物分析杂志 1983; 3:265.
8. 温天明, 等. 丹参注射液质量标准的研究. 中成药研究 1984; (6):11.
9. 倪坤仪, 等. 薄层扫描测定丹参注射剂中水溶性成分. 南京药学院学报 1986; 17:265.
10. 孙传经编著. 气相色谱分析原理与技术. 北京: 化学工业出版社, 1979:98.

## REVERSED PHASE HPLC DETERMINATION OF THREE COMPONENTS IN *SALVIA MILTIORRHIZA* INJECTIONS

KY Ni and GQ Zhang

(China Pharmaceutical University, Nanjing)

**ABSTRACT** This paper describes the separation of the three components, danshensu (I), protocatechuic acid (II) and protocatechuic aldehyde (III) in *Salvia miltiorrhiza* injection and compound *Salvia miltiorrhiza* injection by reversed-phase HPLC and ion suppression technique, and the determination of these components by external standards on the basis of peak height. Stationary phase was octadecylsilane silica 10  $\mu\text{m}$ , mobile phase was composed of water-methanol-glacial acetic acid (80:19:1). Flow rate was 1.5 ml/min. UV detector was used. The samples were analyzed with Waters  $\mu\text{Bondapak C}_{18}$  column (3.9 $\times$ 300 mm), Radial Pak Cartridge  $\text{C}_{18}$  column (8 $\times$ 100 mm) and YWG  $\text{C}_{18}$  column (5 $\times$ 150 mm) (Chinese Academy of Sciences, Shanghai, Scientific Apparatus Manufactory) respectively, and satisfactory results were obtained. Sensitivities were compared, when four channel UV detector and fixed wavelength 254 nm UV detector were used. Recoveries of the compounds added to the sample were 99.6%, 100.4% and 99.2% for I, II and III respectively, and the coefficients of variation were 1.1%, 1.9% and 0.9%. The results for ten samples were given.

**Key words** *Salvia miltiorrhiza* injections; Danshensu; Protocatechuic aldehyde; Protocatechuic acid; Reversed-phase HPLC