

· 中药工业 ·

血必净注射液中有有效成分的 HPLC 法定量检测<sup>△</sup>

李娣, 曹雪晓, 蒲位凌, 孙立丽, 任晓亮\*

(天津中医药大学 中药学院, 天津 300193)

**[摘要]** **目的:** 建立不同波长下同时测定血必净注射液中多种指标成分的质量控制方法。**方法:** HPLC-DAD法, 采用 Agilent Eclipse XDB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇(A)-0.3% 甲酸水(B)为流动相(梯度洗脱), 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 检测波长 230、280、390、323 nm, 进样量 10 μL, 对丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I 五种指标成分同时进行含量测定。**结果:** 测得血必净注射液中五种指标成分在 线性范围内均具有良好的线性关系( $r > 0.999 6$ ), 精密性(RSD < 1.05%)、重复性(RSD < 2.84%)均符合要求, 平均回收率为 98.85% ~ 103.22% (RSD < 1.27%)。三个批次血必净注射液中丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I 的平均含量分别为 14.2、464.5、1 489.2、27.8、60.6 μg·mL<sup>-1</sup>。**结论:** 该方法简便、快速、准确, 可为血必净注射液全面质量控制标准的建立提供参考。

**关键词:** 血必净注射液; 质量控制; HPLC-DAD; 含量测定

**Research on Quality Control Method of Xuebijing Injection**

LI Di, CAO Xue-xiao, PU Wei-ling, SUN Li-li, REN Xiao-liang\*

(College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for quality control of Xuebijing Injection based on the simultaneous determination of various index components. **Methods:** HPLC-DAD method was used for simultaneous determination of five index components, including danshensu, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid and senkyunolide I. The separation was carried on an Agilent Eclipse XDB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 mm) with the mobile phase consisting of methanol (A)-0.3% formic acid solution (B) by using gradient elution. The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup> and column temperature was 35 °C. The detection wavelengths were set at 230, 280, 390 and 323 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results:** The measured five active index components in Xuebijing Injection exhibited a good linear relationship within the linear range ( $r > 0.999 6$ ), precision (RSD < 1.05%) and repeatability (RSD < 2.84%) were conform to the requirements, the average recovery was 98.85% - 103.22% (RSD < 1.27%). The average content of danshensu, hydroxysafflor yellow A, paeoniflorin, ferulic acid and senkyunolide I in three batches of Xuebijing Injection were 14.2, 464.5, 1 489.2, 27.8 and 60.6 μg·mL<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** The established method is simple, rapid and accurate, which can provide reference for the establishment of comprehensive quality control standard of Xuebijing Injection.

**[Keywords]** Xuebijing Injection; quality control; HPLC-DAD; content determination

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180316003

血必净注射液是我国著名的急救医学专家王今达教授, 根据中西医结合“菌、毒、炎并治”的新理论和临床经验<sup>[1]</sup>, 以血府逐瘀汤组方为基础研发而成的中药复方注射液。其属于国家中药保护品种, 由红花、赤芍、川芎、丹参、当归 5 味中药制成, 适用于感染诱发的全身炎性反应综合征, 即脓毒症<sup>[2]</sup>。血必净注射液成分复杂, 其抗炎机制具有多

靶点作用<sup>[3-4]</sup>, 其中丹参素可明显抑制钙离子载体<sup>[5]</sup>; 洋川芎内酯 I 可保护因过氧化氢诱导的 PC12 细胞损伤<sup>[6]</sup>; 芍药苷能调节一氧化氮水平及抑制细胞内钙超载<sup>[7-8]</sup>; 阿魏酸可抑制小胶质细胞活化和保护脂多糖诱导 PC12 细胞损伤<sup>[9-10]</sup>; 羟基红花黄色素 A 可抑制炎症介质释放和降低炎性因子表达<sup>[11-12]</sup>, 从而表现抗炎作用。此五种成分结构各不相同, 如

<sup>△</sup> [基金项目] 国家自然科学基金面上基金项目(81473543, 81774149)

\* [通信作者] 任晓亮, 副教授, 研究方向: 中药质量评价研究; Tel: (022)59596221, E-mail: xiaoliang\_ren@sina.com

图1所示。

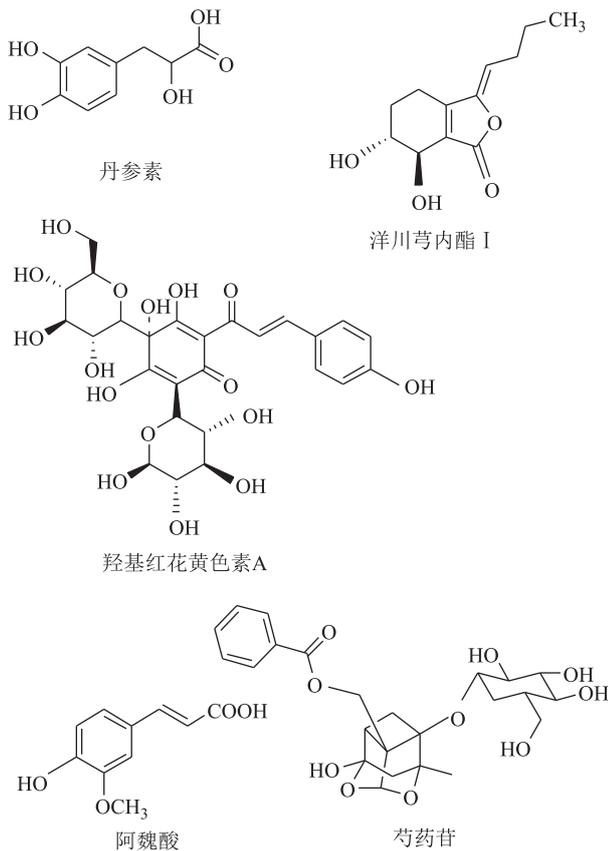


图1 五种成分的化学结构式

目前,血必净注射液的检测方法主要是 HPLC<sup>[13-15]</sup>。本实验为了更方便有效地控制血必净注射液的质量,根据其药理作用和各活性成分发挥药理作用的机制,分别从红花、赤芍、川芎、丹参和当归等五味中药中选择具有抗菌消炎活性的羟基红花黄色素 A、芍药苷、洋川芎内酯 I、丹参素和阿魏酸为活性指标成分<sup>[16-20]</sup>,建立了一种简便、快速、准确的同时测定血必净注射液多种活性指标成分的质量控制方法,力图为血必净注射液全面质量控制标准的建立提供参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 试剂

血必净注射液(天津红日药业股份有限公司,规格:每支 10 mL,三批批号分别为:1205301、1208171、1311081);芍药苷对照品(天津中新药业研究中心,纯度 $\geq 98\%$ ),丹参素对照品(天津中新药业研究中心,纯度 $\geq 98\%$ ),洋川芎内酯 I 对照品(南京拓海生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$ ),羟基

红花黄色素 A 对照品(中国食品药品检定研究院,含量以 92.5% 计,批号:11637-201106),阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,含量以 99.6% 计,批号:110773-201012)。甲醇(天津市大茂化学试剂厂,分析纯),甲醇(美国 sigma 公司,色谱纯),甲酸(美国 Meridian Medical Technologies 公司,色谱纯)。

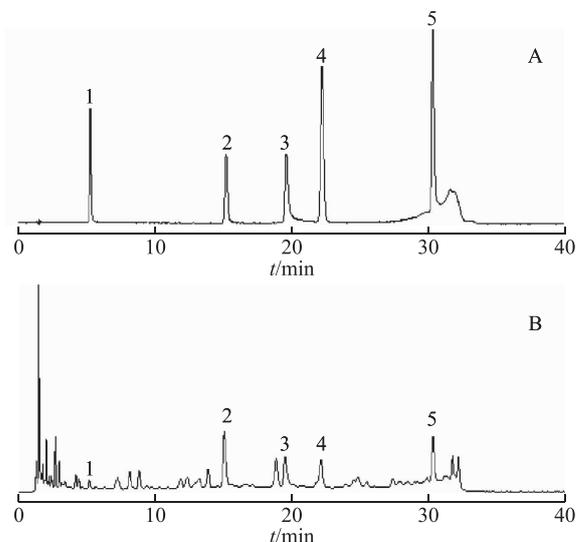
### 1.2 仪器

Waters e2695 system 高效液相色谱仪, DAD 检测器(美国 Waters 公司), BT1250D 分析天平(德国 Sartorius 公司), XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流速: 1 mL · min<sup>-1</sup>; 柱温: 35 °C; 检测波长:  $\lambda_1 = 280$  nm (丹参素、洋川芎内酯 I),  $\lambda_2 = 390$  nm (羟基红花黄色素 A),  $\lambda_3 = 323$  nm (阿魏酸),  $\lambda_4 = 230$  nm (芍药苷); 进样量: 10 μL; 流动相: 甲醇(A)-0.3% 甲酸水(B), 梯度洗脱。梯度洗脱条件: 0 ~ 6 min, 8% ~ 12% A; 6 ~ 11 min, 12% ~ 18% A; 11 ~ 26 min, 18% ~ 30% A; 26 ~ 30 min, 30% ~ 45% A; 30 ~ 31 min, 45% ~ 8% A; 31 ~ 40 min, 8% A。该色谱条件下,五种指标成分的色谱图如图2所示,各化合物均得到良好分离。



注: 1. 丹参素; 2. 羟基红花黄色素 A; 3. 芍药苷; 4. 阿魏酸; 5. 洋川芎内酯 I。

图2 280 nm 下混合对照品(A)和血必净注射液(B)的 HPLC 色谱图

## 2.2 溶液配制

2.2.1 对照品储备液 分别精密称取丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸和洋川芎内酯 I 对照品适量,置于 10 mL 棕色容量瓶中,以 50% 甲醇定容,得到浓度分别为 1034、2190、1082、1024、960  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的对照品储备液,精密量取各对照品溶液适量制成混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取 2 mL 血必净注射液完

全转移至 10 mL 棕色容量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,以同样方法平行制备三份,作供试品溶液。

## 2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系 分别吸取混合对照品溶液适量,用近中性水逐级稀释成一系列不同浓度的对照品溶液,摇匀,HPLC 测定。以对照品质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得各成分的线性回归方程见表 1。

表 1 血必净注射液五种对照品的线性回归方程

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
丹参素	$Y = 7\ 289.2 X + 1\ 784.7$	0.999 6	0.4 ~ 20.7
羟基红花黄色素 A	$Y = 24\ 183.4 X - 7\ 361.6$	0.999 8	2.0 ~ 102.2
芍药苷	$Y = 11\ 537.7 X + 10\ 419.2$	0.999 8	30.0 ~ 1493.1
阿魏酸	$Y = 61\ 384.4 X - 7\ 521.8$	0.999 9	0.4 ~ 20.5
洋川芎内酯 I	$Y = 42\ 467.0 X - 1\ 532.8$	0.999 9	0.4 ~ 18.1

2.3.2 精密度试验 配制各成分与测定样品响应相近的混标溶液,按 2.1 项下色谱条件进样 6 针测定峰面积,计算精密度。丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I 五种成分的 RSD 分别为 1.05%、0.43%、0.09%、0.09%、0.96%,5 种成分的 RSD 值均小于 1.05%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 重复性试验 按 2.2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,依照 2.1 项下色谱条件进样测定峰面积,计算 RSD 值。丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I 五种成分的 RSD 分别为 2.84%、0.83%、0.49%、1.11%、1.25%,各成分 RSD 值均小于 2.84%,表明该方法重复性良好。

2.3.4 加样回收率试验 精密量取已知含量的血必净注射液样品 1 mL,置于高温灭菌 10 mL 的棕色容量瓶中,再分别精密加入适量对照品储备液溶液,甲醇定容,摇匀,制成供试液。平行 6 份,按 2.1 项下的色谱条件将上述 6 份样品溶液分别进样 10  $\mu\text{L}$ ,进行测定。计算丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I 五种成分的平均回收率和 RSD 值( $n=6$ ),结果见表 2。计算得到血必净注射液中 5 种成分的平均回收率为 98.85% ~ 103.22%,RSD 小于 1.27%,表明该方法加样回收率符合要求。

表 2 血必净注射加样回收率试验结果( $n=6$ )

成分	样品中 量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	检出量/ $\mu\text{g}$	平均回收 率/ $\mu\text{g}$	RSD (%)
丹参素	1.43	1.45	2.86	98.85	1.02
羟基红花黄色素 A	43.05	43.8	86.38	98.93	0.80
芍药苷	148.95	151.48	298.83	98.95	0.96
阿魏酸	2.80	2.56	5.45	103.22	1.27
洋川芎内酯 I	6.05	5.76	11.96	102.66	1.25

## 2.4 指标成分含量测定

按照 2.2.2 项下方法制备分别配制供试品溶液 3 份(三个批次),按 2.1 项下的色谱条件分别进样 10  $\mu\text{L}$ ,根据 2.3.1 中的线性范围计算可得,分别取三批次的平均值,得到血必净注射液中丹参素、羟基红花黄色素 A、芍药苷、阿魏酸、洋川芎内酯 I 的平均含量分别为  $14.2 \pm 0.2$ 、 $464.5 \pm 1.4$ 、 $1\ 489.2 \pm 4.0$ 、 $27.8 \pm 0.2$ 、 $60.6 \pm 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

## 3 讨论

### 3.1 指标成分的选择

血必净注射液是由红花、当归、赤芍、川芎、丹参五种药材提取加工制成的注射液,由于中药本身的复杂性,笔者根据以下两个因素选择了五种成分作为定量测定的指标成分。首先,综合血必净注射液相关药理作用以及其中各活性成分药理作用的作用机制,从其中选择五种相关性较大的成分作为

定量评价指标,保证指标成分发挥的药理作用能够部分代表血必净制剂的药理作用。其次,根据《中华人民共和国药典》(2015版)及相关文献,从每种药材中选择一种具有明显药理活性的成分作为指标成分,即分别从红花、当归、赤芍、川芎、丹参中选择了羟基红花黄色素A、阿魏酸、芍药苷、洋川芎内酯和丹参素,且这五种指标成分化学结构类型多样,有黄酮、有机酸、萜类及内酯,这使得实验结果更具有普遍性和适用性。

### 3.2 色谱条件的选择

血必净注射液的成分复杂,为提高分析灵敏度,减少测定干扰,实验采用梯度洗脱。发现甲醇的洗脱效果优于乙腈。流动相考察了甲醇-0.2%的磷酸水、甲醇-0.2%的甲酸水以及甲醇-0.3%的甲酸水,结果发现甲醇-0.3%的甲酸水得到的色谱峰峰形和分离度较好。在检测波长的选择上,虽然在280 nm检测波长下的色谱峰最多,反映的成分信息更全面,但因五种成分结构各异,在同一波长下检测灵敏度较低,因此,本实验选用DAD检测器,根据五种成分的最大吸收波长,提取不同波长下的色谱图分别定量测定五种成分,用以提高分析准确度。

### 4 结论

在中药类市场国际化的大趋势之下,我国中药材的出口贸易快速增长,但随之而来的质量安全问题却阻碍了我国中药材产品进入国际市场,使我国的中药材安全性遭受到了质疑<sup>[21]</sup>。现行的中药质量标准主要依照化学药品的质量标准模式建立,即选定某一中药的“有效成分”,建立相应的定量标准,然而,对于成分复杂的复方制剂而言,只建立某单一成分的含量测定在很大程度上存在着片面性。因此,本实验基于血必净注射液的药味组成、化学成分和药理作用,选择具有抗菌消炎活性的丹参素、羟基红花黄色素、芍药苷、阿魏酸、洋川芎内酯I为活性指标成分,使用HPLC-DAD法在不同波长下同时测定5种成分。此方法简便、快速、准确,可为血必净注射液全面质量控制标准的建立提供参考。

### 参考文献

- [1] 李志军.“三证三法”及“菌毒炎并治”治疗脓毒症的研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2012,18(6):553-554.
- [2] 张继翔,李家瑞,乔佑杰,等.血必净注射液治疗脓毒症

- 急性肾损伤的临床疗效及对炎症因子的影响[J].天津中医药,2016,33(1):13-17.
- [3] 吴江莹,刘晓新.血必净注射液的抗炎作用机制研究进展[J].检验医学与临床,2013,10(15):2030-2032.
- [4] 马世堂等,刘培勋,龙伟,等.血必净抗炎作用药效物质基础和靶点作用效应[J].物理化学学报,2009,25(10):2080-2086
- [5] 李晔,王四旺,张邦乐,等.丹参素的药理活性与药物动力学研究进展[J].西北药学杂志,2011,26(4):310-312.
- [6] 唐静,陈维,余彦,等.顺式萹苈内酯在大鼠体内外的代谢及其代谢物的药理活性研究[J].四川大学学报(医学版),2009,40(5):839-842.
- [7] 郑世存,李晓宇,欧阳兵,等.芍药苷药理作用研究新进展[J].中国药物警戒,2012,9(2):100-103.
- [8] 刘玲,李瑞芳,王等,等.芍药苷减轻LPS致小鼠急性脑损伤的抗炎机制[J].中药材,2016,39(2):411-415.
- [9] 黄浩,马增春,王宇光,等.阿魏酸对脂多糖损伤的PC12细胞和大鼠海马神经元细胞的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2016,30(4):330-337.
- [10] 吴建良,沈敏敏,杨水新,等.阿魏酸对小胶质细胞炎症反应的抑制作用[J].中国药理学通报,2015,31(1):97-102.
- [11] 刘永刚,李芳君,汤芳.羟基红花黄色素A对大鼠心肌细胞缺血再灌注损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2015,31(1):71-74.
- [12] 刘金莲,王海芳,马淑惠,等.羟基红花黄色素A通过抑制动脉内皮细胞中TNFR1/NF- $\kappa$ B信号通路而发挥抗炎作用[J].细胞与分子免疫学杂志,2015,31(7):945-948.
- [13] 余胜利.HPLC法测定血必净注射液中丹参素含量[J].中西医结合研究,2011,3(4):179-181.
- [14] 冀兰鑫,黄浩,姜民,等.HPLC测定血必净注射液内11种主要成分[J].中国中药杂志,2010,35(18):2395-2398.
- [15] 张韻慧,胡文文,任斯嘉,等.HPLC法同时测定血必净中多指标成分的含量[J].光谱实验室,2013,30(5):2305-2308.
- [16] 梁文仪,陈文静,杨光辉,等.丹参酚酸类成分研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(5):806-812.
- [17] 杨小虎,王丹丹,朱彦.羟基红花黄色素A的现代研究新进展[J].湖南中医药大学学报,2013,33(3):102-106.
- [18] 李曦,张丽宏,王晓晓,等.当归化学成分及药理作用研究进展[J].中药材,2013,36(6):1023-1028.
- [19] 陆小华,马骁,王建,等.赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J].中草药,2015,46(4):595-602.
- [20] 张丽娟,刘继勇,姚翀,等.洋川芎内酯类化合物药理作用研究进展[J].中国药学杂志,2015,50(13):1081-1084.
- [21] 姜振俊,张红梅,于志斌,等.中国中药材出口面对的国际市场标准[J].中国现代中药,2018,20(2):217-223,238.

(收稿日期 2018-03-16)