

一测多评法测定丹酚酸 A 原料药中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 C

申琳, 许桂玲, 郝福, 李东, 侯金才*

神威药业集团有限公司, 河北 石家庄 051430

摘要: 目的 建立一测多评法测定丹酚酸 A 原料药中特定杂质迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 C。方法 采用 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 0.2%磷酸-乙腈, 梯度洗脱, 检测波长 286 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25 °C, 样品室温度 4 °C, 进样量 20 μL。以丹酚酸 A 为内标, 建立丹酚酸 A 原料药中特定杂质 (紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C) 的相对校正因子; 分别采用一测多评法和外标法测定丹酚酸 A 原料药中特定杂质, 并比较一测多评法计算值与外标法实测值的差异性。结果 丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 C、迷迭香酸、紫草酸均在 0.2~20 μg/mL 与峰面积呈良好线性关系。在线性浓度范围内, 迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 与丹酚酸 A 间的相对校正因子分别为 1.52、2.09、2.33、1.06。一测多评法计算值与外标法实测值无显著性差异。结论 一测多评法可用于丹酚酸 A 原料药中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的测定。

关键词: 丹酚酸 A 原料药; 迷迭香酸; 紫草酸; 丹酚酸 B; 丹酚酸 C; 一测多评法; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2018)01-0032-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2018.01.008

Determination of rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, and salvianolic acid C in salvianolic acid A crude drug by quantitative analysis of multi-components with single marker

SHEN Lin, XU Gui-ling, HAO Fu, LI Dong, HOU Jin-cai

Shineway Pharmaceutical Group Co., Ltd, Shijiazhuang 051430, China

Abstract: Objective To establish quantitative analysis of multi-components with single marker (QAMS) for determination of specified impurities, such as rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, and salvianolic acid C in salvianolic acid A crude drug. **Methods** HPLC method was carried out on Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 0.2% phosphoric acid and acetonitrile solution with gradient elution. The detection wavelengths were 286 nm. The flow rate was 1.0 mL/min with injection volume of 20 μL. The column temperature and sample room temperature was set at 25 °C and 4 °C, respectively. Salvianolic acid A was used as the internal reference substance to establish determination of specified impurities (rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, and salvianolic acid C) in salvianolic acid A crude drug. The relative correlation factors (RCFs) of rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, and salvianolic acid C were calculated and established. The contents of specified related substance were determined by the external standard method (ESM) and QAMS method, respectively. The QAMS method was validated through comparison of the results obtained by the two different methods. **Results** The linear ranges of rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, and salvianolic acid C were all 0.2 — 20 μg/mL. The values of RCFs of rosmarinic acid, lithospermic acid, salvianolic acid B, and salvianolic acid C were 1.52, 2.09, 2.33, and 1.06, respectively. The two methods had no significant difference in content results. **Conclusion** QAMS method can be used for the determination of specified impurities (lithospermic acid, rosmarinic acid, salvianolic acid B and salvianolic acid C) in salvianolic acid A crude drug.

Key words: salvianolic acid A crude drug; rosmarinic acid; lithospermic acid; salvianolic acid B; salvianolic acid C; quantitative analysis of multi-components with a single marker (QAMS); HPLC

收稿日期: 2017-07-24

基金项目: 北京市国家重大研发计划匹配项目 (Z161100002616024)

作者简介: 申琳 (1985—), 女, 工程师, 从事药物质量研究和质量控制。Tel: (0316)5759866-8708 E-mail: shenlin9662@163.com

*通信作者 侯金才 (1969—), 男, 博士, 硕士生导师, 从事新药开发与项目管理。Tel: (0316)5759866 E-mail: jincaihou@126.com

丹酚酸A是神威药业集团有限公司研制的中药1类新药,是丹参药材经提取、转化,最后经大孔树脂柱色谱等分离纯化制备而成。丹酚酸A对心肌、脑组织缺血再灌注损伤具有保护作用,同时具有良好的抗氧化、抗肝损伤作用,在临床中拟用于冠心病、心绞痛的治疗^[1-2]。杂质控制是药品质量标准中重要的安全性控制项目,虽有文献报道过丹酚酸A有关物质的研究,但主要关注点在于定性研究(如结构鉴定、推测)和单个特定杂质研究^[3-5]。丹酚酸A原料药在制备过程中,丹参药材中其他酚酸类成分如迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B作为工艺杂质会残留到原料中,同时丹酚酸A自身放置过程中也容易降解变为丹酚酸C。因此应将上述4个杂质作为特定杂质来控制。考虑到迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B等对照品稳定性差且不易大量获得的情况,本研究选择丹酚酸A对照品为内标,建立了一测多评法测定丹酚酸A原料药中特定杂质迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸C的定量测定方法,并对方法的可靠性进行了验证。

1 材料

Waters 2695型高效液相色谱仪, Thermo U3000型高效液相色谱仪, Agilent 1200型高效液相色谱仪, 梅特勒-托利多MS 105DU分析天平。

迷迭香酸对照品(质量分数98.6%,批号111871-201404,中国食品药品检定研究院),丹酚酸B对照品(质量分数93.7%,批号111562-201212,中国食品药品检定研究院),紫草酸对照品(质量分数99.6%,批号15022407,北京盈泽纳新化工技术研究院),丹酚酸C对照品(质量分数99.9%,批号15011305,北京盈泽纳新化工技术研究院),丹酚酸A对照品(质量分数99.2%,批号为RS150401,神威药业集团有限公司)。丹酚酸A原料药(神威药业集团有限公司,批号20150302、20150518、20150720、20151115)。乙腈、磷酸(色谱纯, Fisher),水(超纯水,自制),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相0.2%磷酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~15 min, 10%~20% B; 15~60 min, 20%~28% B; 60~70 min, 28%~45% B),检测波长286 nm,体积流量1.0 mL/min,柱温25 °C,

样品室温度4 °C,进样量20 μL。

2.2 溶液的制备

取迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸A、丹酚酸C对照品适量,分别精密称定,加50%乙醇溶解并稀释制成各成分质量浓度均约为5 μg/mL的混合溶液,摇匀,作为对照品溶液。

取丹酚酸A原料药样品适量,精密称定,置25 mL量瓶中,加50%乙醇溶解,并稀释制成0.5 mg/mL的溶液,摇匀,作为供试品溶液。

2.3 专属性试验

2.3.1 固态样品高温、高湿、光照破坏试验 分别取经过高温60 °C、高湿75%、光照5 000 lx条件下裸样放置10 d的丹酚酸A原料药样品适量,精密称定,加50%乙醇溶液溶解,并定量稀释制成质量浓度为0.5 mg/mL的考察溶液,进样测定。

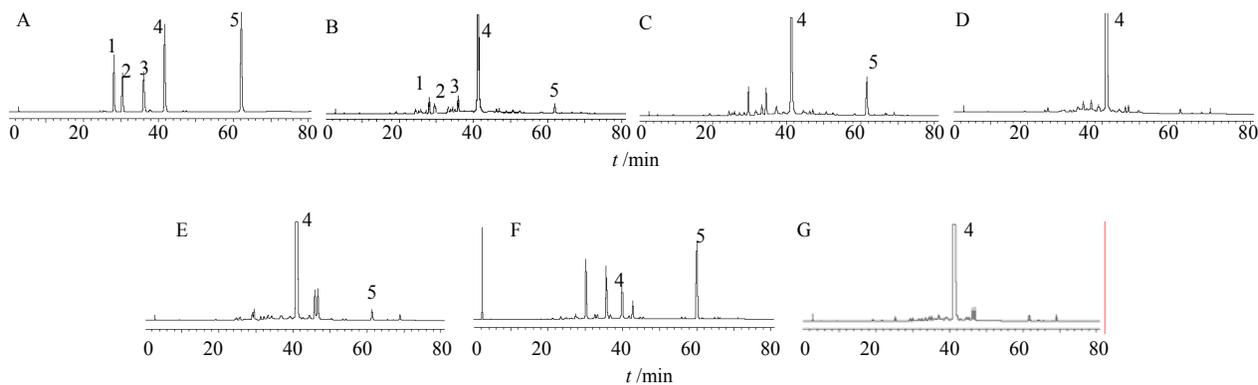
2.3.2 氧化破坏试验 取丹酚酸A原料药样品12.5 mg,置25 mL量瓶中,加入30%过氧化氢溶液2 mL,再加入少量50%甲醇溶液溶解,密封,室温下放置1 h,后加入50%乙醇溶液稀释至刻度,摇匀,进样测定。

2.3.3 高温水解破坏试验 取丹酚酸A原料药样品12.5 mg,精密称定,置25 mL量瓶中,加50%乙醇溶液溶解,并稀释至刻度,摇匀,密封,置80 °C水浴加热1 h,取出放置室温,进样测定。

结果表明,丹酚酸A原料药对热、光、湿度、氧均有一定敏感性,其敏感性顺序为氧>热>光>湿度。丹酚酸C在每个条件下均有不同程度的增加,是值得关注的重点降解产物。照上述色谱条件对混合对照品溶液进行测定,迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸A、丹酚酸C之间分离度良好,各试验的图谱见图1。

2.4 线性关系考察

取丹酚酸A、丹酚酸B、丹酚酸C、迷迭香酸、紫草酸对照品适量,精密称定,置同一量瓶中,加50%乙醇溶解,并定量稀释制成质量浓度分别为20、10、4、2、1、0.4、0.2 μg/mL的线性溶液。精密吸取各20 μL分别注入不同品牌的液相色谱仪,记录色谱图。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标进行线性回归分析,回归方程见表1。结果表明:丹酚酸A、丹酚酸B、丹酚酸C、迷迭香酸、紫草酸均在0.2~20 μg/mL(相当于测试浓度0.04%~4.00%)与峰面积呈良好线性关系。



1-迷迭香酸 2-紫草酸 3-丹酚酸 B 4-丹酚酸 A 5-丹酚酸 C
1-rosmarinic acid 2-lithospermic acid 3-salvianolic acid B 4-salvianolic acid C

图1 对照品(A)、丹酚酸A原料药(B)、高温破坏固体样品(C)、高湿破坏样品(D)、光照破坏样品(E)、氧化破坏样品(F)、高温破坏液体样品(G)

Fig. 1 HPLC Chromatograms of reference substances (A), salvianolic acid A crude drug (B), solid sample destroyed with high temperature (C), sample destroyed with high humidity (D), sample destroyed with illumination (E), sample destroyed with oxidation (F), and liquid sample destroyed with high temperature (G)

表1 特定杂质的线性关系考察结果

Table 1 Results of linearity study for specified impurities

成分	回归方程及相关系数			
	Thermo U3000		Waters 2695	
迷迭香酸	$Y=0.6590X+0.0144$	$r=1.0000$	$Y=33393X-2823.2$	$r=0.9999$
紫草酸	$Y=0.4878X+0.0050$	$r=1.0000$	$Y=24235X-2786.1$	$r=0.9999$
丹酚酸B	$Y=0.4300X+0.0085$	$r=1.0000$	$Y=21774X-1030.0$	$r=0.9996$
丹酚酸A	$Y=1.0017X+0.0857$	$r=0.9995$	$Y=50682X+4441.3$	$r=0.9998$
丹酚酸C	$Y=0.9429X+0.0162$	$r=1.0000$	$Y=48775X-3302.3$	$r=0.9999$

2.5 检测限、定量限考察

精密量取 2.4 项下的线性溶液 0.2 μg/mL 适量，加 50%乙醇定量稀释制成相应成分的定量限浓度、检测限浓度，使其色谱峰峰高约为基线噪音的 10、3 倍。结果迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的检测限均 ≤0.02%，定量限均 ≤0.04%。

2.6 精密度试验

精密吸取 2.2 项下的同一混合对照品溶液 20 μL，连续进样 6 次，结果迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 峰面积的 RSD 值分别为 0.11%、0.13%、0.24%、0.15%。

2.7 稳定性试验

取批号 20150302 丹酚酸 A 原料药样品，制备供试品溶液，精密吸取 20 μL，分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测定，结果迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的峰面积 RSD 值分别为 0.43%、0.61%、0.75%、0.54%。

2.8 重复性试验

取批号 20150302 丹酚酸 A 原料药样品，重复配制 6 份供试品溶液，进样测定，按外标法计算，结果迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的质量分数分别为 0.20%、0.11%、0.28%、0.08%，RSD 值分别为 0.82%、1.15%、1.37%、0.92%。

2.9 回收率试验

取批号 20150302 丹酚酸 A 原料药样品 6 份，每份 12.5 mg，精密称定，分别置不同的 25 mL 量瓶中，分别加入混合对照品溶液，制备供试品溶液，进样测定，计算，结果迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的平均回收率分别为 100.3%、99.1%、99.0%、100.2%，RSD 值分别为 1.03%、1.22%、1.61%、0.96%。

2.10 相对校正因子的建立

2.10.1 相对校正因子的计算 利用内标物丹酚酸 A 回归直线斜率与特定杂质回归直线斜率的比值计

算相对校正因子, 结果见表2。

表2 相对校正因子考察结果

Table 2 Results of relative correction factor (RCF)

成分	相对校正因子
迷迭香酸	1.52
紫草酸	2.09
丹酚酸 B	2.33
丹酚酸 A	1.00
丹酚酸 C	1.06

2.10.2 不同仪器对于相对校正因子的影响 分别考察了 Thermo U3000 型、Waters 2695 型高效液相色谱仪对相对校正因子的影响, 结果各成分相对校正因子 RSD 值均小于 2.0%, 表明不同色谱仪对相对校正因子无显著性影响, 结果见表3。

表3 不同仪器测得的相对校正因子

Table 3 RCF tested by different instruments

成分	相对校正因子	
	Thermo U3000	Waters 2695
迷迭香酸	1.52	1.52
紫草酸	2.09	2.09
丹酚酸 B	2.33	2.33
丹酚酸 A	1.00	1.00
丹酚酸 C	1.04	1.06

2.10.3 不同色谱柱对相对校正因子的影响 分别考察 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 YMC Triart-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 对各成分相对校正因子的影响, 结果各成分相对校正因子 RSD 均小于 2.0%, 表明不同色谱柱对相对校正因子无显著性影响, 结果见表4。

2.11 特定杂质的色谱峰定位 根据丹酚酸 A 的保

留时间、待测成分的相对保留时间以及紫外吸收特征实现目标成分的定位。分别考察了采用不同品牌的高效液相色谱仪的相对保留时间, 结果见表5。

表4 不同色谱柱测得的相对校正因子

Table 4 RCF tested by different columns

成分	相对校正因子	
	Zorbax Eclipse XDB-C ₁₈	YMC Triart-C ₁₈
迷迭香酸	1.52	1.53
紫草酸	2.09	2.09
丹酚酸 B	2.33	2.33
丹酚酸 A	1.00	1.00
丹酚酸 C	1.06	1.05

表5 相对保留时间考察结果

Table 5 Results of relative retention time

仪器	相对保留时间			
	迷迭香酸	紫草酸	丹酚酸 B	丹酚酸 C
Thermo U3000	0.67	0.73	0.87	1.49
Waters 2695	0.68	0.73	0.87	1.49
Agilent 1200	0.67	0.73	0.87	1.50
均值	0.67	0.73	0.87	1.49

2.12 一测多评法与外标法测定结果的比较

2.12.1 一测多评法样品制备 取丹酚酸 A 对照品适量, 精密称定, 加 50%乙醇溶解并稀释制成 0.5 μg/mL 的溶液, 摇匀, 作为对照品溶液; 取 3 批丹酚酸 A 原料药样品适量, 精密称定, 加 50%乙醇溶解并稀释制成 0.5 mg/mL 的溶液, 摇匀, 作为供试品溶液。采用一测多评法计算样品中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的质量分数 (n=2)。

2.12.2 外标法样品制备 取 3 批丹酚酸 A 原料药样品, 制备供试品溶液, 测定峰面积, 按外标法计算样品中迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的质量分数 (n=2), 结果见表6。

表6 丹酚酸 A 原料药中特定杂质的测定结果

Table 6 Results of specified impurities in salviolic acid A crude drug

批号	迷迭香酸/%		紫草酸/%		丹酚酸 B/%		丹酚酸 C/%	
	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法	外标法	一测多评法
20150518	0.19	0.19	0.05	0.05	0.29	0.30	0.05	0.05
20150720	0.18	0.18	0.07	0.07	0.23	0.24	0.06	0.06
20151115	0.21	0.21	0.07	0.07	0.34	0.35	0.07	0.07

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

文献^[3-6]报道,丹酚酸 A 及酚酸类成分检测流动相多为酸水溶液-乙腈系统,采用梯度洗脱程序。本试验在文献基础上对流动相、梯度洗脱程序、柱温、流速进行了优化研究,最终确定较优的色谱条件。丹酚酸 A 在高温、高湿、光照、高热水解、氧化破坏条件下,特定杂质(迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C)能够达到有效分离,其他杂质均不干扰测定,由此表明该方法专属性强;同时线性关系、检测限、重复性均得到了良好的证明。

3.2 相对校正因子的确定与色谱峰的定位

选择以丹酚酸 A 为内标,建立迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的相对校正因子,并对其不同仪器的重现性研究,结果显示不同仪器所获得的相对校正因子一致。

在特定的色谱条件下,色谱峰的保留时间是比较固定的,因此以相对保留时间来定位 4 个杂质色谱峰。经过对不同品牌液相的考察,结果显示,仪器对相对保留时间的影响较小,参数基本稳定。实际检测时,也可以利用紫外吸收光谱、峰纯度等辅助信息进一步来明确色谱峰的定位。

3.3 一测多评法与外标法测定结果的比较

一测多评法是只测定 1 个成分即可实现多个成分的同步测定,主要应用于中药多指标的测定。近年来,该方法广泛应用于药物质量和质量控制^[7-10]。本实验分别采用一测多评法与外标法对丹酚酸 A 原料药中特定杂质进行定量检测,并运用 *t* 检验对二者的差异性进行统计学分析,结果没有显著性差异。

综上所述,本实验确定的一测多评法可应用于

丹酚酸 A 原料药中特定杂质迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 的定量检测。

参考文献

- [1] 魏礼洲,刘卫平,费舟,等.丹酚酸 A 对大鼠脑缺血/再灌注损伤及抗氧化酶活性的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(23): 4447-4450.
- [2] 马林,颜巍,陈娟,等.丹酚酸 A 对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(3): 272-276.
- [3] Xu J, Zeng S, Chen X, et al. Isolation and identification of degradation products of salvianolic acid A by NMR and LC-MS [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(2): 260-266.
- [4] 李志刚,阮爱华,孙学伟,等.注射用丹酚酸 A 相关物质分析研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2): 348-351.
- [5] 于翠翠,刘军锋,车鑫,等.丹酚酸 A 中有关物质含量的测定方法 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 94-97.
- [6] 彭九嫚,柴尧,潘旻,等.丹参中酚酸类成分在不同工艺条件下转化关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5): 67-70.
- [7] 罗祖良,仇峰,韦日伟,等.相对校正因子在中药多指标测定中的应用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1448-1452.
- [8] 张静娇,刘俊有,季雪.一测多评法测定香丹注射液丹参素钠、原儿茶醛、迷迭香酸、丹酚酸 B 含量 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(9): 50-53.
- [9] 张诚贤,杨红霞,陈褚建,等.一测多评法同时测定止痢宁片中四个萜类内酯的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(12): 2158-2162.
- [10] 陈晶晶,周媛,黄晓蕾,等.基于一测多评的舒血宁注射液定量测定方法研究 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1890-1896.