

· 药剂与工艺 ·

丹参及丹参注射液指纹图谱的 HPLC-MS研究

张尊建,李 茜,王 伟,邹巧根,赵陆华^{*}
(中国药科大学 分析测试中心,江苏 南京 210009)

摘要:目的 采用 HPLC-UV-MS法对丹参药材、丹参注射液中间体及丹参注射液进行指纹图谱的研究。方法 采用 Alltima C₁₈分析柱,甲醇-水-冰醋酸梯度洗脱系统,流速:1 mL/min,检测波长:281 nm,MS同时记录总离子流(TIC)色谱图。结果 得到分离度较好的丹参药材、中间体及注射液的 HPLC-UV及 HPLC-MS指纹图谱。结论 为丹参药材、中间体及注射液的质量控制提供全面、可靠的依据。

关键词:丹参;丹参注射液;指纹图谱;HPLC-UV;HPLC-MS

中图分类号:R286.0 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2002)12-1074-03

Study on fingerprints of *Radix Salviae Miltiorrhiza* and its INJECTION by HPLC-MS

ZHANG Zun-jian, LI Qian, WANG Wei, ZOU Qiao-gen, ZHAO Lu-hua
(Center for Instrumental Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract **Object** To investigate the chromatographic fingerprints of *Radix Salviae Miltiorrhizae* (RSM), its intermediate and INJECTION by HPLC-UV-MS. **Methods** Separation was performed on an Alltima C₁₈ analytical column with the mobile phase consisting of methanol-water-acetic acid as gradient eluent at the flow rate of 1 mL/min. The UV detection was set at 281 nm and TIC was recorded by an electrospray ionization mass spectrometer in negative ion mode. **Results** The HPLC-UV and HPLC-MS fingerprints of RSM, its intermediate and INJECTION were obtained with perfect isolation. **Conclusion** The fingerprints could be used for the control of RSM, its intermediate and INJECTION.

Key words *Radix Salviae Miltiorrhizae* (RSM); RSM INJECTION; fingerprint; HPLC-UV; HPLC-MS

指纹图谱^[1]是国际公认的控制中药或天然药物质量最有效的方式之一。在药效、毒理及临床研究试验等已经确定该品种安全有效的前提下凭借实用的指纹图谱(或图像)既可以确认该产品的真伪,同时又能判断质量的稳定性。丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.的干燥根及根茎,性微寒味苦,具有活血化瘀、凉血消肿、清心除烦之功效^[2]。现代药理学研究^[3]表明丹参具有增加冠状动脉血流量、调血脂、抑制血栓形成和改善微循环等作用。丹参主要成分为水溶性酚性酸——丹参素、原儿茶醛、脂溶性二萜醌类——丹参酮II等。本实验采用 HPLC-MS技术对丹参、丹参注射液中间体及丹参注射液所含成分进行分离,得到了分离度及重现性均较好的丹参及其制剂的指纹图谱,并对所含化学成分进行了MS归属。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 LC/DAD/MS系统,含在线真空脱气机、高压二元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(DAD)、电喷雾(ES)接口。HP Chemstation Rev. A. 0. 8. 03. 色谱工作站。

甲醇(色谱纯)、冰醋酸(分析纯)、纯净水;丹参药材产自河南灵宝,经本校中药学院余伯阳教授鉴定为丹参 *S. miltiorrhiza* Bge.;丹参注射液中间体、丹参注射液为国内某药厂生产。

2 方法与结果

2.1 供试品的制备:药材供试品的制备:取2.0 g丹参药材粉末(过40目筛),加40 mL水,热回流2 h,滤过,取滤液20 mL,加乙醇20 mL,放置12 h,滤过,再用0.45 μm微孔滤膜滤过后作为丹参药材供试品。

丹参注射液中间体供试品的制备:取丹参注射液中间体0.5 mL,用水稀释至50 mL,0.45 μm微

* 收稿日期:2002-04-24

作者简介:张尊建(1960-),男,副教授,1983年毕业于南京药学院药物分析专业,先后工作于天津药物研究院、江苏徐州医学科学研究所,1994年获中国药科大学药学博士学位,现为中国药科大学分析测试中心主任,研究方向为中药色谱分析、药物波谱分析和药物现代仪器分析,目前已在各类学术期刊上发表论文30余篇。Tel (025) 3271454(O) E-mail zjzhang@sina.com

孔滤膜滤过后作为丹参注射液中间体供试品

丹参注射液供试品的制备: 取丹参注射液, 用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过后作为丹参注射液供试品

2.2 液相色谱条件及分析方法: 色谱柱: Alltima C₁₈柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇-水-冰醋酸梯度洗脱系统; 流速: 1 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 检测波长: 281 nm; 柱后分流 0.4 mL/min 进质谱仪; MS 同时记录总离子流 (TIC) 色谱图。离子极性: ESI(-); 扫描范围: 80~ 800; 干燥气流速: 10 L/min; 雾化室压: 40 psi; 毛细管电压: 4 kV; 传输电压: 70 V。取供试品各 20 μ L 分别注入 HPLC-MS 联用仪进行测定。

2.3 试验结果: 丹参药材、丹参注射液中间体及丹参注射液的 HPLC-UV 和 HPLC-MS 指纹图谱分别见图 1, 2

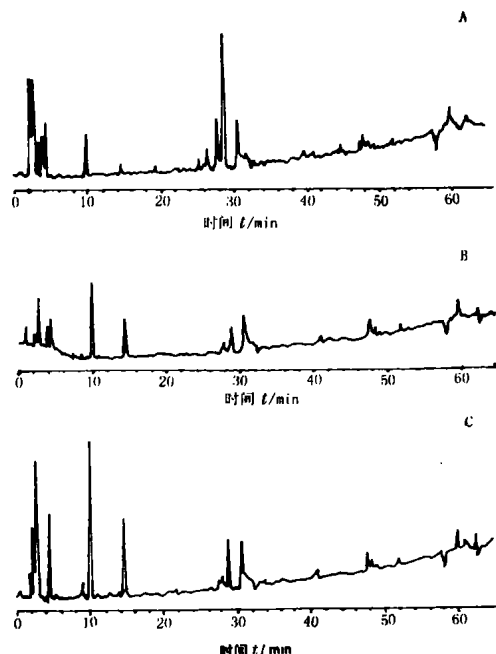


图 2 丹参药材 (A)、丹参注射液中间体 (B) 和丹参注射液 (C) 的 HPLC-MS 指纹图谱

大的成分含量相对较少, 而中间体与注射液的指纹图谱之间有很好的相关性。我们对 10 批次的注射液进行了测定, 确定了 6 个共有峰, 以 $t_R = 14.3$ min 的化合物为自身内标, 计算相对保留时间分别为: 0.580 ± 0.009 , 0.683 ± 0.008 , 2.001 ± 0.025 , 3.757 ± 0.060 , 4.098 ± 0.066 。峰面积占总峰面积 30% 以上色谱峰共 2 个, 其相对峰面积分别为: 0.348 ± 0.030 , 0.389 ± 0.054 。

用梯度洗脱法得到的丹参及其制剂 HPLC-UV 指纹图谱分离度、重现性好, 可作为鉴别丹参药材真伪优劣和注射液质量控制的依据。

3.2 HPLC-MS 指纹图谱: 实验条件下, 丹参供试品对质谱负离子检测有较好的响应。正离子检测信号较弱, 这与丹参注射液中主要含有酚酸类化合物有关。根据化合物的质荷比及相关的文献^[4, 6], 对图中的主要色谱峰进行了 MS 归属。丹参药材 HPLC-MS 色谱图中 $t_R = 9.8$ min 为丹参素, 其 $[M - H]^-$ 为 m/z 197; HPLC-UV 对照品试验表明 $t_R = 14.3$ min 的化合物为原儿茶醛, 相对分子质量为 138, 相同位置处 MS 谱图中出现原儿茶醛的 m/z 137 $[M - H]^-$ 峰, 其结果与对照品试验一致; $t_R = 19.3$ min 处 MS 谱图中表现为 m/z 179 $[M - H]^-$ 峰, 推测为丹参素的脱水产物; $t_R = 25.3$ min 处为 m/z 537 $[M - H]^-$ 峰, 是紫草酸; $t_R = 28.7$ min 处的吸收峰是丹参药材 HPLC-UV 图中最大的吸收峰, 相同保留时间处 MS 图中也有较大的吸收峰, 为 m/z 717 $[M -$

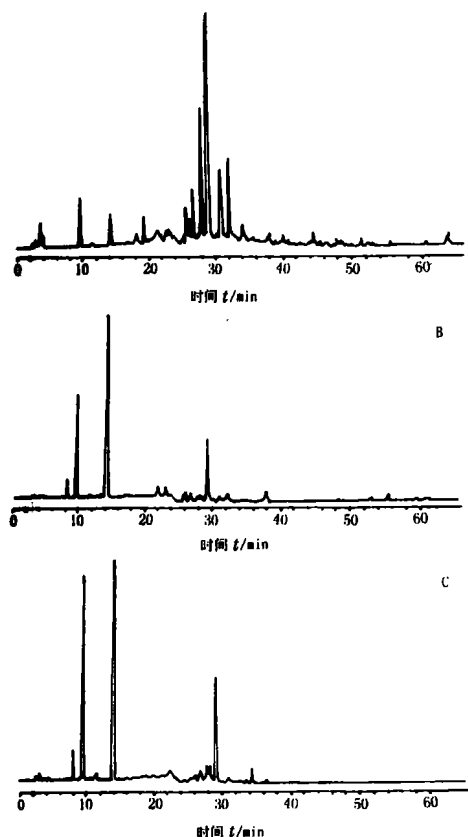


图 1 丹参药材 (A)、丹参注射液中间体 (B) 和丹参注射液 (C) 的 HPLC-UV 指纹图谱

3 讨论

3.1 HPLC-UV 指纹图谱: 由图 1 可以看出丹参药材、中间体与注射液的指纹图谱有一定的相关性。但由于注射液在制备过程中受高温煎煮, 一些成分发生变化, 与药材温水浸取液所分离得到的成分有明显差异。在中间体和注射液中一些相对分子质量较

H⁺峰,并伴有 m/z 739, 519, 359, 197碎片,推测 m/z 717为丹参酸乙的 [M- H]⁻峰; t_R= 30.5 min处出现 m/z 741(100%)峰,推测 m/z 741为紫草酸乙镁盐的 [M- H]⁻峰。紫草酸乙镁盐是丹参中酚性酸的主要成分,具有纤溶作用和增强冠脉流量的作用;在 t_R= 27.7, 31.7 min处, MS中均有 m/z 493 [M- H]⁻峰,且它们的碎片离子相似,推测为紫草酸中的二氢呋喃环开环后脱水脱羧,形成的一组顺反烯烃异构体。

丹参中间体和注射液的 HPLC-MS谱图较丹参药材少,在 t_R= 9.8, 14.3 min处分别出现 m/z 197 [M- H]⁻峰和 m/z 359 [M- H]⁻峰,与药材 HPLC-MS谱图相同。 t_R= 28.7 min处 MS表现为 m/z 359 [M- H]⁻峰,为迷迭香酸,药材中无此峰。 t_R= 28.7 min处中间体和注射液 HPLC-MS谱图中未出现丹参酸乙的 m/z 717 [M- H]⁻峰,但在 t_R= 30.5 min出现较强的紫草酸乙镁盐 m/z 741 [M-

H⁺峰。另外,药材 HPLC-MS谱图中出现的丹参素脱水产物、紫草酸、紫草酸的脱水脱羧产物,在中间体和注射液的 HPLC-MS谱图中均未出现,从而进一步说明了丹参在制备过程中所含成分发生了较大变化。我们正对上述化学成分做进一步确证。

以 MS作为检测器,可以将色谱的保留值、响应值与化合物的相对分子质量信息结合起来,实现对各主要流出组分的定性,为药材、中间体和成品制剂的鉴别及质量评价提供更加全面、可靠的依据。

参考文献:

[1] 谢培山. 中药制剂色谱指纹图谱(图像)鉴别[J]. 中成药, 2000, 22(6): 391-395.
[2] 中国药典[S]. 2000年版. 一部.
[3] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用[M]. 第2卷. 北京:学苑出版社, 1999.
[4] 周长新,罗厚蔚,丹羽正武. 丹参水溶性化学成分的研究[J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(6): 411-416.
[5] 孔德云. 丹参化学成分[J]. 中国医药工业杂志, 1989, 20(6): 279-285.
[6] 郑国耀,柿泽宽. 丹参化学成分的研究概况[J]. 中国药杂志, 1989, 24(1): 6-10.

麦冬总皂苷提取工艺的研究

周跃华,徐德生,冯怡,吴笑如,李谨谨*
(上海中医药大学,上海 200032)

摘要:目的 对麦冬总皂苷的提取工艺进行优化。方法 以麦冬皂苷 D的含量为指标,采用正交试验法对麦冬提取的条件进行考察。结果 通过试验找出了麦冬提取的优化条件。麦冬用 5~10目药材,加 10倍量 80%乙醇,热回流提取 3次,每次 1h。结论 此优选条件可充分提取麦冬总皂苷。

关键词:麦冬;皂苷;麦冬皂苷 D;正交试验

中图分类号: R284.2; R286.02 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2002)12-1076-03

Investigation on extract process for total saponins in root of *Ophiopogon japonicus*

ZHOU Yue-hua, XU De-sheng, FENG Yi, WU Xiao-tu, LI Jin-jin
(Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

Abstract **Object** To optimize the best extraction of the total saponins in the root of *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. (RO). **Methods** The extract condition of total saponins in RO was observed by orthogonal design with ophiopogonis D as index. **Results** The optimum extract condition of RO was established. The more effective way was to smash RO to 5-10 mesh and extract total saponins in RO with ten times amount of 80% alcohol thrice by refluxing, one hour each time. **Conclusion** The total saponins in RO could be fully extracted in this condition.

Key words the root of *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl. (RO); total saponins; ophiopogonis D; orthogonal design

麦冬为百合科沿阶草属植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (Thunb.) Ker-Gawl.干燥块根,是常用

滋阴中药,始载于《神农本草经》,历代重要本草都有记载。具有养阴生津、润肺清心的功能,可用于热病

* 收稿日期: 2002-06-10
* 本校 1997级本科毕业生