

不同厂家生产的丹参注射液 色谱指纹图谱的比对研究

t 徐 曼 刘爱华 张金兰

(北京大学药学院,天然药物与仿生药物国家重点实验室 北京 100083)

崔亚君 果德安

(中国科学院上海生命科学研究院药物研究所 /上海中药现代化研究中心 上海 201203)

摘 要:目的:比较不同厂家丹参注射液的质量,并应用对照品对照和高效液相色谱-质谱联用技术对其主要成分进行定性分析。方法:采用 Zorbax Extend C18 色谱柱,以乙腈-0.05% 三氟乙酸水溶液为流动相梯度洗脱,流速为 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长为 288nm,测定了 18 个不同厂家生产的丹参注射液的 HPLC-UV 指纹图谱以及代表性厂家注射液的 HPLC-DAD-MS 图谱。结果:18 个不同厂家生产的丹参注射液在所含化学成分的数目和含量上差异显著;利用对照品对照和 HPLC-DAD-MS 技术指认了丹参注射液中的 15 个酚酸类成分。结论:本方法可用于测定不同来源的丹参注射液的色谱指纹图谱,并为丹参注射液的全面质量评价和生产工艺监控提供了可行的方法。

关键词:丹参 丹参注射液 指纹图谱 高效液相色谱-质谱联用

丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 的干燥根及根茎^[1]。现代药理学研究表明^[2],丹参对心脑血管系统、消化系统、呼吸系统、中枢神经系统、免疫系统等均有保护作用。丹参的化学成分主要为脂溶性的二萜醌类和水溶性的酚酸类两大类。早期的研究工作主要针对丹参的脂溶性成分,20 世纪 80 年代初国内学者开始对丹参及同属植物中的水溶性成分进行分离和鉴定研究工作,从中分离得到

20 多个化合物,其中酚酸类化合物为主要成分。药理实验证明酚酸类成分具有很强的心、脑血管方面的活性^[3]。以丹参水溶性成分为活性成分的丹参注射液为丹参经加工制成的灭菌水溶液,具有活血化瘀,通脉养心的作用,主要用于治疗冠心病,心绞痛等疾病^[4]。丹参注射液近年在临床上应用广泛,特别是在心脑血管疾病、肝病、肾炎、肺炎、肺心病、胰腺炎、降压、五官科、儿科等方面的治疗作用,且用药安全,副作用小。目前丹参注射液的生产厂家众多,注射液中所含化学成分的含量也有很大差别,所以开展丹参水溶性成分

收稿日期:2006211220

修回日期:2007201222

教育部长江学者和创新团队奖励计划项目(9852220632112):基于中药资源的创新药物研究,负责人:果德安。

联系人:果德安,教授,本刊学术副主编,主要从事中药质量控制及其体内代谢研究, Tel 021-50272789, E-mail gda5958@163.com。

的研究对于控制丹参注射液质量具有重要意义。我们先前的工作主要针对同一厂家不同批号的丹参注射液^[7]。本文首次对比了 18 个不同厂家生产的丹参注射液的指纹图谱, 并通过与对照品对照和应用高效液相色谱 - 质谱联用技术对丹参注射液中的成分进行了分析, 共指认了 15 个丹参酚酸类成分, 并分析了其化学成分的异同, 为全面控制丹参注射液的质量, 加强生产工艺控制提供了可行的质量控制方法。

一、材料与方 法

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪 (Agilent Technologies Germany), 配有二极管阵列检测器。LCQTM Advantage 离子阱质谱仪 (Finnigan San Jose CA, USA), 配有 ESI 离子源及 Finnigan Xcalibur 数据处理系统。乙腈为色谱纯 (加拿大 Caledon 公司), 双蒸水, 其他试剂均为分析纯。丹参注射液由 18 个厂家邮寄, 来源见表 1。对照品丹参素、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 C 由本室人员从丹参药材中分离获得, 并通过 UV, IR, NMR, MS 等方法对其进行结构确认, 纯度均大于 99% (HPLC 测定); 对照品原儿茶醛、迷迭香酸购自江西本草天工科技有限责任公司, 纯度均大于 98% (HPLC 测定); 对照品原儿茶酸、香草酸、咖啡酸、阿魏酸购自中国药品生物制品检定所, 纯度均大于 98% (HPLC 测定)。结构式见图 1。

2 色谱条件

(1) 液相色谱条件。

Agilent Zorbax Extend C18 (250mm @4.6mm ID, 5Lm) 色谱柱 (Agilent); Agilent Zorbax Extend C18 保护柱 (20mm @4mm ID, 5Lm); 流动相采用乙腈 (A) - 0.10% 三氟乙酸水溶液 (B) 进行梯度洗脱: 0~7min 由 2% A 升至 10% A, 7~20min 由 10% A 升至 23% A, 20~35min 由 23% A 升至 27% A, 35~50min 由 27% A 升至 60% A; 流速: 0.8mL/min; 检测波长: 288nm; 柱温: 20℃; 进样量: 20Ll

(2) 液相色谱 - 质谱联用条件。

液相色谱条件同上, 流动相改为乙腈 (A) - 0.4%

甲酸水溶液 (B); 质谱条件: ESI 离子源; 负离子检测; 扫描范围: m/z 100~1000; 鞘气流速 30arb; 辅助气流速 5arb; 电喷雾电压 4.50kV; 毛细管温度 350℃; 毛细管电压 - 9.00V; 管透镜补偿电压 - 50.00V。

3 溶液配制

(1) 对照品溶液的制备。

分别精密称取 10 个酚酸类成分对照品适量, 置于 2mL 容量瓶中, 70% 甲醇溶解并定容至刻度, 配制成浓度已知的混合对照溶液 (100~500Lg/mL), 备用。

(2) 供试品溶液的制备。

精密取丹参注射液 1.0mL, 精密加入蒸馏水 3.0mL, 混合均匀, 过 0.22Lm 微孔滤膜, 即得。

二、实验结果

1 不同厂家生产的丹参注射液指纹图谱分析

将来自 18 个不同生产厂家的丹参注射液 (见表 1) 进行 HPLC-UV 分析, 记录色谱图 (见图 2)。

表 1 18 个丹参注射液样品的生产厂家及其批号

编号	批号	生产厂家
1	041005	江苏安格药业有限公司
2	040823	云南大理药业有限公司
3	041005	浙江康恩贝制药有限公司
4	040802	四川成都天台山制药有限公司
5	040619	浙江正大青春宝药业有限公司
6	20041207	浙江宁波天真制药有限公司
7	040401	吉林东北虎药业股份有限公司
8	041204	四川雅安三九药业有限公司
9	020101	上海第一制药厂
10	040404	上海通用药业有限公司
11	020707	吉林辉南辉发制药股份有限公司
12	1101	四川宜宾制药厂
13	041106	上海通用总公司
14	03080011	上海新冈制药厂
15	040701	上海中西制药有限公司
16	040907	江西桔都药业有限公司
17	041202	四川升和制药有限公司
18	041113	山西万荣三九药业有限公司

(1)数据对比法。

从图 2中可以看出不同厂家生产的丹参注射液在所含化学成分数目及其含量上存在很大差异。对丹参注射液指纹图谱中特征峰的峰面积(见表 2)进行比较,得出下面结果:¹ 18个丹参注射液样品中丹参素和原儿茶醛的峰面积均大于多酚酸类成分的峰面积,说明药材中的主成分(丹酚酸 B及其它多酚酸类成分)经提取、纯化等工艺过程后,大多转变成单聚体小分子丹参素和原儿茶醛。² 丹参药材中含量最高,活性最强的成分为丹酚酸 B⁵¹,但在浙江杭州正大青春宝药业有限公司(批号为 040619, NO. 5),吉林东北虎药业股份有限公司(批号为 040401, NO. 7),上海第一制药厂(批号为 020101, NO. 9),上海通用药业有限公司第三公司(批号为 040404, NO. 10),吉林辉南辉发制药股份有限公司(批号为 020707, NO. 11)和江西桔都药业有限公司(批号为 040907, NO. 16)生产的丹参注射液样品中丹酚酸 B的峰面积值远远小于 18个厂家生产的丹参注射液样品中丹酚酸 B峰面积的平均值,其中 NO. 7,

NO. 10和 NO. 11丹参注射液样品中不仅丹酚酸 B的含量偏低,而且其它酚酸类成分的峰面积值也远远小于平均值,说明这些批次的注射液质量欠佳。» 浙江康恩贝制药有限公司(批号为 041005, NO. 3),四川成都天台山制药有限公司(批号为 040802, NO. 4),上海通用总公司(批号为 041106, NO. 13)和四川升和制药有限公司(批号为 041202, NO. 17)生产的丹参注射液

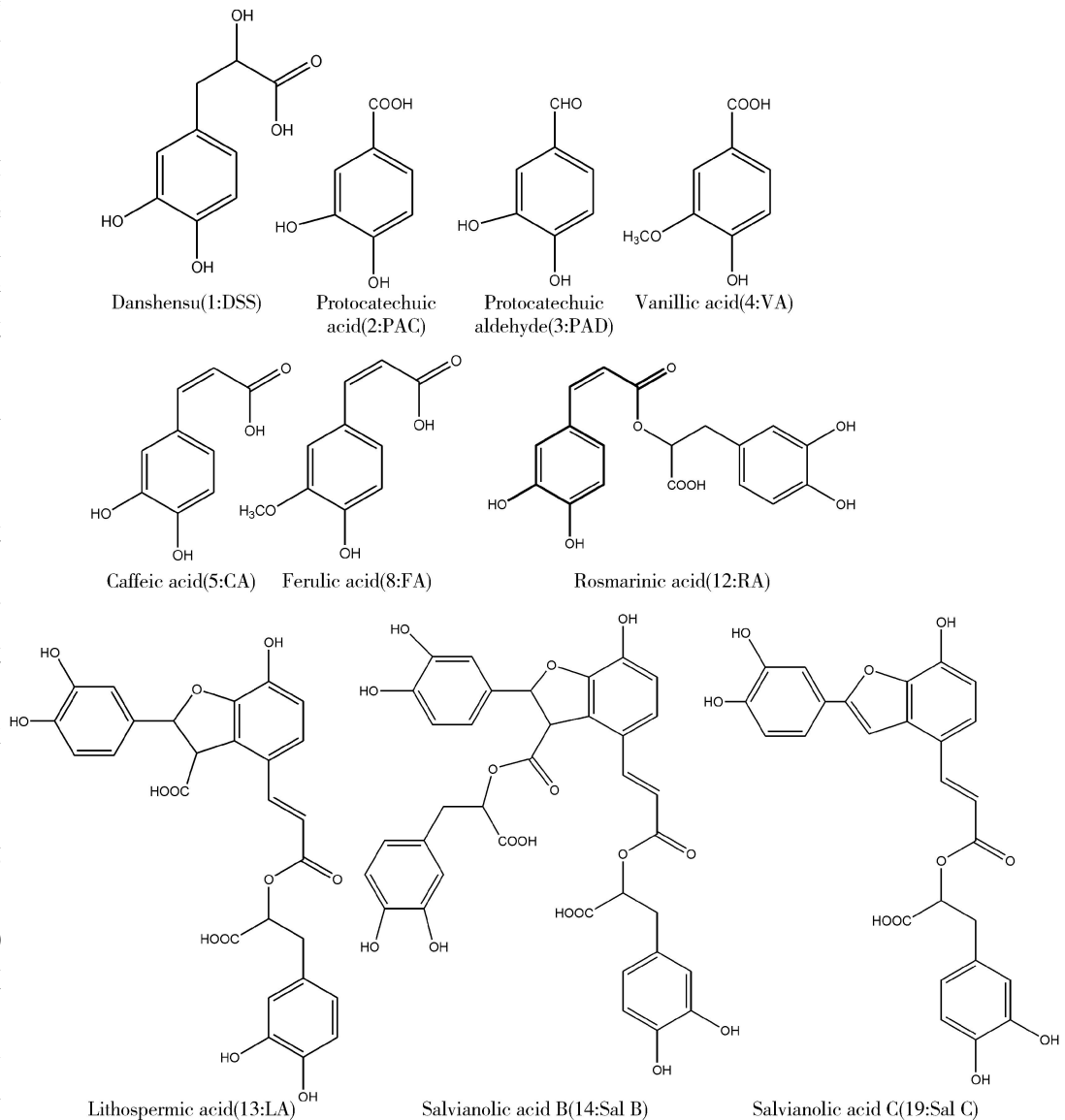


图 1 10个酚酸类成分的结构式(括号中化合物编号与图 3中色谱峰的编号相一致)

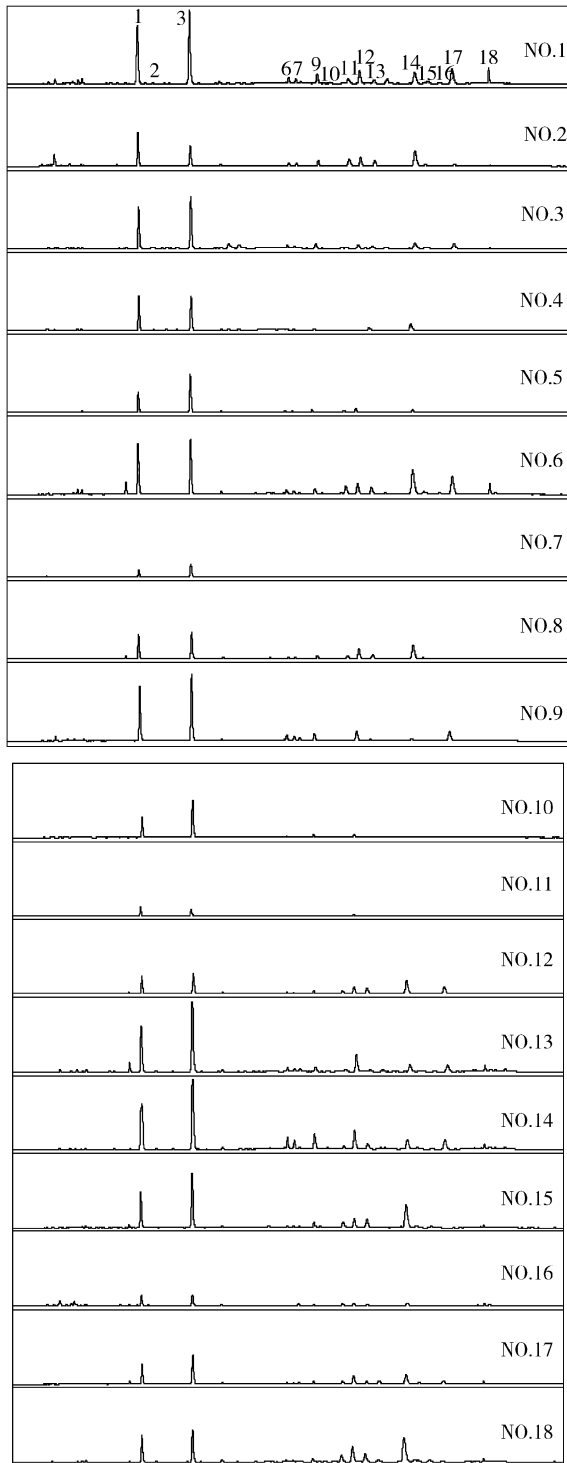


图2 不同厂家生产的丹参注射液的 HPLC 指纹图谱
(NO. 1~ 18 见表 1)

虽含有各活性成分,但每个活性成分的峰面积值均小于平均值,注射液活性成分的整体含量较低。 $\frac{1}{4}$ 云南大理药业有限公司(批号为 040823 NO. 2),四川雅安三九药业有限公司(批号为 041204 NO. 8),四川宜宾制药厂(批号为 1101 NO. 12),和山西万荣三九药业有限公司(批号为 041113 NO. 18)生产的丹参注射液样品中各酚酸类成分的峰面积值均接近 18 个厂家生产的丹参注射液样品中酚酸类成分峰面积的平均值。 $\frac{1}{2}$ 江苏安格药业有限公司(批号为 041005, NO. 1),浙江宁波天真制药有限公司(批号为 20041207, NO. 6),上海中西药业股份有限公司新冈制药厂(批号为 03080011, NO. 14)和上海中西制药有限公司(批号为 040701, NO. 15)生产的丹参注射液各成分含量较高,多酚酸类成分保留较好,各活性成分峰面积值均大于各酚酸类成分峰面积的平均值。

(2) 软件分析法。

采用 / 中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A) 软件进行数据处理, 18 个不同厂家生产的丹参注射液色谱指纹图谱经软件系统生成可反映注射液质量的对照图谱, 以此为基准, 计算样本图谱与对照图谱的相似度, 根据相似度计算结果, 将 18 个不同厂家生产的丹参注射液分为 3 类, 见表 3。第 1 类: 5 个厂家生产的丹参注射液的指纹图谱与对照图谱的相似度大于 0.950 说明这些批次的丹参注射液所含酚酸类成分全面, 质量较好; 第 2 类: 8 个厂家生产的丹参注射液的指纹图谱与对照图谱的相似度介于 0.850 和 0.1950 之间, 这些批次的注射液所含的酚酸类成分也较全面, 但部分成分的比例与对照图谱不完全一致; 第 3 类: 注射液指纹图谱与对照图谱的相似度小于 0.850 的有 5 个厂家生产的丹参注射液, 这些批次的注射液所含化学成分的整体含量偏低, 注射液质量欠佳, 占总分析样品的 27.8%。

2 丹参注射液的 HPLC-MS 分析

丹参注射液及混合对照品溶液分别在上述 HPLC-MS 条件下进样分析, 液相色谱图及总离子流图见图 3 根据化合物的质荷比及相关文献^[6-7], 对图中的主要色谱峰进行了 MS 归属, 相关数据见表 4。通过与对

表 2 丹参注射液指纹图谱中共有峰的峰面积值

色谱峰名称 样品编号	DSS [*]	PAD [*]	SalD	RA [*]	LA [*]	SalB [*]
1	21346.4	23160.3	4160.2	6558.1	2817.3	6809.5
2	8743.5	6438.8	2391.4	4130.8	3098.6	8190.7
3	10465.5	15464.4	1904.3	1926.5	1557.6	3183.4
4	8847.6	10074.9	901.4	477.1	1555.8	3282.5
5	5097.3	11413.3	1239.9	1820.7	833.9	1569.8
6	15314.6	16729.4	2834.1	5078.8	4193.8	14299.4
7	1607.7	3718.7	128.6	91.4	20.1	43.5
8	5965	7928.1	1211.9	4618.6	2082	7348.9
9	15364.7	20341.8	3055.5	4693.6	1333.7	1535
10	6639.2	14144.5	1283.1	1674.5	499.5	708.8
11	2785.8	2390.1	402.7	627.9	316.7	409.3
12	5461.6	7736.1	1464.4	3764.4	3742	9001.7
13	18730	32510	2861.8	10174.2	2104.9	5473.7
14	28092.5	33953.3	8215.1	11977.1	4866	8381
15	13380.3	21625.8	3145.2	5099.8	5868.7	16919.6
16	3391.1	4551.6	560.2	1368.5	926.7	1757.1
17	6477.4	10910.3	1332.5	4570.4	1570.9	6138.7
18	8761.6	12171.3	1725	9052.1	5263.3	17420.3
平均值	10359.5	14181.3	2156.5	4316.9	2369.5	6248.5

* 已与标准品比对。

DSS: danshensu; PAD: protocatechuic aldehyde; SalD: salvianolic acid D; RA: rosmarinic acid; LA: lithospermic acid; SalB: salvianolic acid B

表 3 相似度评价结果

分类	相似度范围	样品编号
N	0.950- 0.999	1, 13, 14, 15, 17
O	0.850- 0.950	3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11,
O	0.450- 0.850	2, 7, 12, 16, 18

acid(12), lithospermic acid(13), salvianolic acid B(14), isosalvianolic acid B(15), salvianolic acid L(16), salvianolic acid A(17)和 isosalvianolic acid C(18)。

三、实验讨论

丹参注射液中含有大量的酚酸类化合物,且极性范围跨度较大,故采用梯度洗脱;化合物均含有若干个酚羟基,呈弱酸性,故采用酸性缓冲系统。采用二极管阵列检测器对检测波长进行了考察,结果表明酚酸类化合物在 288nm 处均呈现良好的紫外吸收,色谱信息最为丰富,故选用 288nm 作为检测波长。

照品对照和 HPLC-MS 分析,指认了丹参注射液中的 15 个酚酸类成分,分别为 danshensu(1), protocatechuic acid(2), protocatechuic aldehyde(3), salvianolic acid I(6 or 7), salvianolic acid H(6 or 7), salvianolic acid D(9), salvianolic acid N(10), salvianolic acid E(11), rosmarinic

目前,丹参注射液的质量标准收载于部颁标准第二十册(WS3-B-3766-98),其中只对原儿茶醛进行了含量测定;然而丹酚酸 B 在药材中含量最高^[8],且具有纤溶,增加冠脉流量等作用,是主要的活性成分,在丹参注射液的指纹图谱中,各厂家生产的丹酚酸 B 的含量最大可相差 10 倍,所以有必要增加对丹酚酸 B 的含量测定,以全面控制丹参注射液的质量。

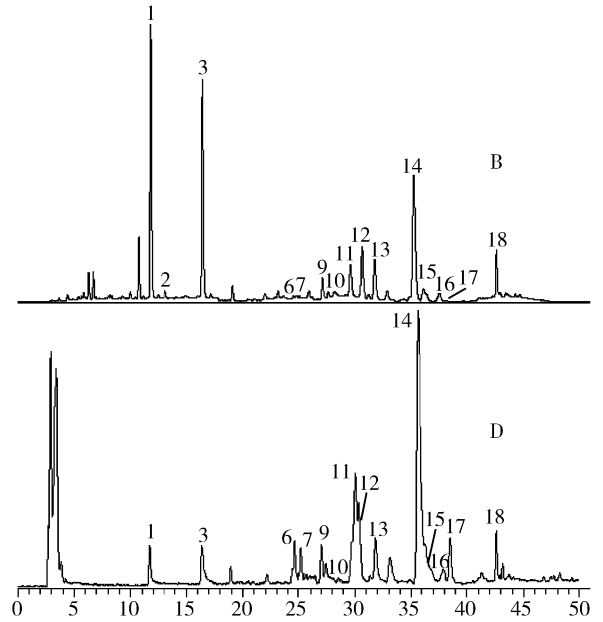
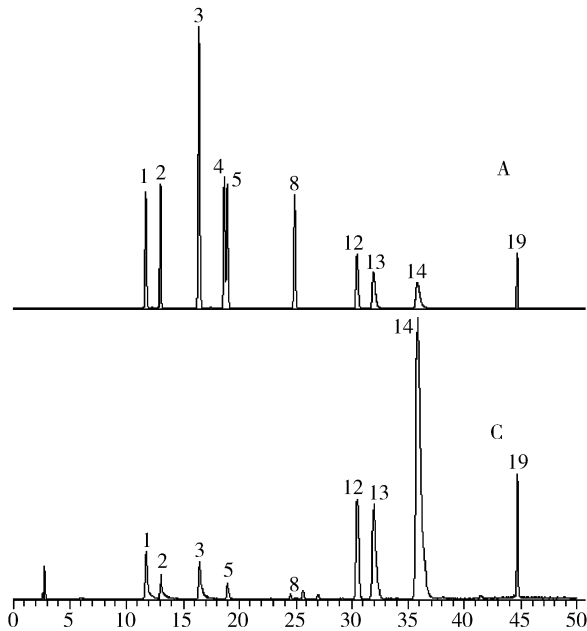


图 3 LC-MS 色谱图:混合标准溶液 (A) 及丹参注射液样品 (B); 总离子流图:混合标准溶液 (C) 及丹参注射液样品 (D). Danshensu (1), protocatechuic acid (2), protocatechuic aldehyde (3), vanillic acid (4), caffeic acid (5), ferulic acid (8), rosmarinic acid (12), lithospermic acid (13), salvianolic acid B (14), salvianolic acid C (19)

表 4 代表性丹参注射液样品中各色谱峰的数据及其指认

Peak No	t_R /min	[M - H] ⁻ (m/z)	K_{max} /nm	Assignment
1	11.75	197	238 280	Danshensu*
2	13.09	153	260 292	Protocatechuic acid ^f
3	16.36	137	234 280 312	Protocatechuic aldehyde ^g
6	24.63	537	256 288 312	Salvianolic acid I/H
7	25.23	537	252 290 322	Salvianolic acid I/H
9	27.04	417	250 320	Salvianolic acid D
10	28.07	535	254 288	Salvianolic acid N
11	29.99	717	250 330	Salvianolic acid E
12	30.43	359	246 330	Rosmarinic acid ^f
13	31.80	537	254 290 310	Lithospermic acid ^f
14	35.62	717	204 232 256 288 308	Salvianolic acid B ^g
15	36.67	717	256 288 310	Isosalvianolic acid B
16	37.93	717	256 288 310	Salvianolic acid L
17	38.55	493	256 288 310	Salvianolic acid A
18	42.47	491	242 290 330	Isosalvianolic acid C

* 已与标准品匹配

对 18 个不同厂家生产的丹参注射液的色谱图进行对比分析,可以看出同一样品所含化学成分的数目和含量存在很大差异。这主要是由于各厂家所选的丹参药材不统一,药材品质有很大差别,其次各厂家对丹参药材的加工工艺也有所区别,导致丹参注射液的质量差异明显。此外丹参注射液中丹参素和原儿茶醛的含量明显大于多酚酸类成分的含量,但在药材中多酚酸类成分,特别是丹酚酸 B 的含量明显大于前者,这说明在注射液加工过程中,调节 PH 值以及静置、煎煮时间的长短等均会影响酚酸类成分的含量。考察不同厂家生产的丹参注射液的产品说明书,只标识每次给药剂量为 10mL~20mL,若根据含量折算,则给药剂量会有很大差别,这必然会影响到临床疗效。因此为确保丹参注射液的质量和疗效,进行丹参注射液的指纹图谱研究,规范丹参注射液制备工艺势在必行。

指纹图谱技术被用于注射液的质量控制,其优点在于可全面反映注射液的化学成分及其相对比例。但指纹图谱是通过色谱图的整体信息对注射液的质量进行评价,而忽略了各色谱峰所代表化学成分的信息,无法全面准确的反映中药的内在质量。高效液相色谱-质谱联用技术可以用来指认各色谱峰,此二者的结合可提高指纹图谱进行注射液质量控制的特征性,更好的应用于注射液质量评价,生产加工工艺的控制以及新药开发研究。

本文采用 HPLC-UV 的方法,建立丹参注射液的指纹图谱,为丹参注射液的质量控制提供有效方法;应

用 HPLC-MS 技术,结合对照品对照方法指认了丹参注射液中 15 个活性成分,并通过对比色图特征峰的峰面积值进行比较以及相似度评价,对 18 个不同厂家生产的丹参注射液进行了对比研究,分析了其在化学成分组成和含量上的异同,为丹参注射液的全面而系统的质量控制奠定了坚实的基础。

参考文献

- 1 卫生部药典委员会,中华人民共和国药典(一部),北京,人民卫生出版社,2005B52~53.
- 2 杜冠华,张均田.丹参现代研究概况与进展.医药导报,2004 23(6) B355~360
- 3 李认书,李永强.丹酚酸的研究进展.时珍国医国药,2003,14(6) B371~373
- 4 常效春,杨振华,韩恩祥.复方丹参注射液临床应用新进展.中国综合临床,2004 20(8) B764~766.
- 5 赵淑娟,章国瑛,刘涤,等.丹参水溶性酚酸类化合物药理及生物合成途径研究进展.中草药,2004 35(3) B341~344
- 6 Zeng GF, Xiao HB, Liu K. Identification of phenolic constituents in Radix Salviae miltiorrhizae by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2006, 20 B499~506
- 7 Zhang JL, Cui M, He Y. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2005, 36B1029~1035.
- 8 陶金成,钱文璟,宋少刚,等.不同厂家复方丹参注射液质量考察.中国药房,2005 16(12)B937~939.

A Comparative Study of Danshen Injections from Selected Pharmacies Using HPLC Fingerprints

Xu Man, Liu Ahua, Zhang Jinlan

(State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs School of Pharmaceutical Sciences Peking University Beijing 100083 China)

Cui Yajun, Guo Dean

(Shanghai Research Center for TCM Modernization, Shanghai Institute of Materia Medica, Shanghai Institutes for Biological Sciences Chinese Academy of Sciences Shanghai 201203 China)

This paper compared the quality of Danshen injections rolled out from different pharmacies and identified the key

components using HPLC- DAD- MS. 18 Danshen injection samples collected from different pharmacies were analyzed on a Zorbax Extend C18 column with a gradient of acetonitrile and 0.05% TFA at a flow rate of $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, and detected at 288nm. Meanwhile, a typical injection was analyzed using HPLC- DAD- MS technique. The investigation results suggest that the 18 Danshen injection samples analyzed have a large difference in both quantity and content regarding the key constituents. 15 peaks of salvanolic acids were identified through comparing with the benchmarks and HPLC- MS analysis. It is concluded that the established HPLC fingerprint process is both reliable and specific, and can be used for the comprehensive quality control of Danshen injections.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza*; Danshen injection; fingerprint; HPLC- MS

(责任编辑: 王 瑀, 责任编审: 张志华, 责任译审: 邹春申)

(Continued from Page 49)

Effects of An Gong Qing Kai Ling Injection on Proinflammatory Factors and Adhesion Molecules in Spontaneous Hypertensive Rats Having Intracerebral Hemorrhage

Xu Ya, Li Pengtao, Chen Jie, Ji Xu

(Beijing University of Chinese Medicine, 100029 Beijing)

This paper studies the effects of An Gong Qing Kai Ling Injection on the level of TNF- α , IL-1B in the brain tissue, and sICAM-1 in the serum of SHR s having an intracerebral hemorrhage in an attempt to understand the links and effects of An Gong Qing Kai Ling Injection in repressing inflammatory reactions. In the study, SHR s were randomly divided into six groups: normal model, low-dose treatment, middle-dose, high-dose, and positive control. Intracerebral hemorrhage was induced in SHR s using collagenase X. RIA (radioimmunoassay) was employed to measure the concentration of TNF- α and IL-1B in SHR s brain tissues following the attack of cerebral hemorrhage. sICAM-1 determination was made using an ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), in line with the manufacturer's instruction. Results showed that after 48h and 7 days of intracerebral hemorrhage induction, the median TNF- α , IL-1B and sICAM-1 levels in the model was higher than that of control ($P < 0.01$). The median TNF- α , IL-1B and sICAM-1 levels in the treated groups was lower than that of model ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The median TNF- α , IL-1B and sICAM-1 levels in the high-dose group was lower than that of the positive group ($P < 0.01$). It is found that An Gong Qing Kai Ling Injection is of a noticeable effect on reducing the level of inflammatory factors, especially in the 48 hours after the onset. In addition, it cuts down the level of sICAM-1 in a dose-dependent manner. It is concluded that An Gong Qing Kai Ling Injection has a noticeable effect in preventing the onset of inflammation, allowing efficient regulation of TNF- α without eliminating the constitutive levels that are required for the cell survival.

Keywords: intracerebral hemorrhage; inflammation; proinflammatory factor; adhesion molecule; An Gong Qing Kai Ling Injection

(责任编辑: 王 瑀, 责任编审: 张志华, 责任译审: 邹春申)