

酸乙醇溶液,水溶性部位采用 5% 香草醛浓硫酸溶液作为显色剂。水溶性部位的薄层与液相色谱图谱相比,前者在特征表达和直观辨认等方面更具优势。

3.3 高效液相色谱条件的选择:据文献报道<sup>[5-7]</sup>和通过色谱条件的优化,最后确定了本实验的流动相条件,即甲醇-水和乙腈-甲醇-0.2% 磷酸梯度洗脱。通过对 6 个品牌色谱柱的比较,最后选用了 Zorbax SB C<sub>18</sub> 色谱柱,其分离效果相对较好。

3.4 “白化”丹参成因考察:通过河南栾川“白化”丹参与产自河南伊川、四川中江的丹参产地的土壤样本分析,生长“白化”丹参的地区的土壤中 Mg、Zn 元素量较高(“白化”丹参 Mg 5.2%,伊川 Mg 2.7%,四川中江 Mg 3.4%;“白化”丹参 Zn 0.02%,其他两种不含有 Zn 元素),土壤的 pH 值也较高(“白化”7.01,伊川 6.70,四川中江 6.45),这是否是丹参“白化”的直接因素,待进一步证实。丹参的“白化”说明在特殊生长环境下具有邻醌结构的丹参酮类成分的醌式很可能发生变化,或者不能形成邻醌,因而不显红色,文献报道,邻醌结构是丹参酮类成分的活性中心<sup>[8]</sup>,由此推断丹参“白化”后对功效肯定有直接影响。

3.5 “白化”丹参成分分析: TLC 图谱试验结果表明,“白化”丹参的二萜醌类脂溶性有效成分量很低,以致于主要的成分如丹参酮 II<sub>A</sub>、隐丹参酮、二氢丹参酮等均难以检出,所以根的表皮及断面均不见红色。而酚酸类水溶性有效成分量较高,与正常丹参样品无异。这种野生丹参“白化”现象是值得野生变栽培的 GAP 管理中注意的问题。

References:

- [1] Xiao P G. *Modern Chinese Materia Medica* (新编中药志) [M]. Vol 1. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
- [2] *Ch P* (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [3] Li W. Extraction and expression of fingerprint characteristics for Danshen by the plate chromatography [J]. *World Sci Technol—Modern Tradit Chin Med Mater Med*, 2003, 5(1): 58-61.
- [4] Li J. Separation and quantitative determination of seven aqueous depsides in *Salvia miltiorrhiza* by HPLC scanning [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1993, 28(7): 543-547.
- [5] Liu Y. Studies on the HPLC fingerprint of Danshen crude drugs [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33(2): 127-130.
- [6] Zeng L J. Study on the chromatography fingerprint of compound Danshen Tablet for its quality assessment [J]. *Guangdong Coll Pharm* (广东药学院学报), 2002, 18(3): 182-184.
- [7] Li L. Development of HPLC fingerprint bar code technique for authentication and quality assessment of *Radix Salviae Miltiorrhiza* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(7): 649-653.
- [8] Sun C J. The synthesis of the compounds of tanshinone [J]. *Acta Pharm Sin* (药学学报), 1985, 20(1): 39-43.

## 丹参脂溶性成分的 ESIMS 行为及其特征图谱研究

韩凤梅, 张 玲, 陈怀侠, 陈 勇\*

(湖北大学 中药生物技术省级重点实验室, 湖北 武汉 430062)

摘 要: 目的 研究脂溶性丹参酮类成分的 ESIMS 规律, 建立丹参药材脂溶性丹参酮类成分提取物 ESIMS 特征图谱。方法 应用电喷雾离子阱质谱 (ESI-ITMS) 技术研究丹参酮类成分的 ESIMS 规律; 用 95% 乙醇超声提取丹参药材中丹参酮类物质, 在正离子方式检测模式下, 直接进样应用一级全扫描质谱建立其特征 ESIMS 图谱。结果 丹参酮类物质在 ESIMS 一级正离子全扫描时, 易捕获一个质子形成分子离子, 且都易形成二聚体加合 Na<sup>+</sup> 离子峰; 分子离子在二级质谱中易发生脱水、脱羰基和 A 环开环裂解。丹参药材中丹参酮类物质的 ESIMS 图谱重现性与特征性较好, 易于解析。结论 丹参脂溶性成分 ESIMS 图可用于丹参药材及复方丹参中丹参酮类成分的快速鉴别。

关键词: 丹参药材; 脂溶性成分; 电喷雾-质谱; 指纹图谱

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2006)01-0122-04

### EISMS Performance and fingerprint of lipophilic constituents from *Radix Salviae Miltiorrhiza*

HAN Fengmei, ZHANG Ling, CHEN Huai-xia, CHEN Yong

(Hubei Province Key Laboratory of Bio-Technology of Traditional Chinese Medicine, Hubei University, Wuhan 430062, China)

\* 收稿日期: 2005-02-10

基金项目: 科技部“十五”攻关项目 (2001BA701A 01); 湖北省青年杰出人才科学基金项目 (2002AC004)

\* 通讯作者 陈 勇 Tel/Fax: (027) 88663590 E-mail: cy101610@npc.gov.cn

**Abstract: Objective** To elucidate the ESI/MS performance of lipophilic tanshinones and to establish a fingerprint of lipophilic tanshinones of *Radix Salviae Miltiorrhiza*. **Methods** The lipophilic tanshinones were extracted by ultrasonic wave with 95% ethanol from *Radix Salviae Miltiorrhiza* and the extracts were analyzed directly in positive ion mode by electrospray ion trap mass spectrometry (ESI/MS). **Results** The lipophilic tanshinones were easily to form molecular ions  $[M + H]^+$  and dimeric sodium adduct ions  $[2M + Na]^+$  in positive ion mode, molecular ions of lipophilic tanshinones were fragmented through losing  $H_2O$ ,  $CO$  and A-ring cleavages in ESI/MS<sup>2</sup>. The ESI/MS fingerprints of lipophilic tanshinone extracts with 14 selected characteristic peaks analyzed with SPSS software were characteristic and stable. **Conclusion** Lipophilic tanshinones have similar ESI/MS performance; the ESI/MS fingerprint is a useful tool for a rapid and special identification of lipophilic tanshinones in selected traditional Chinese medicine.

**Key words:** *Radix Salviae Miltiorrhiza*; lipophilic tanshinones; ESI/MS; fingerprint

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为唇形科植物的干燥根及根茎, 其有效成分为脂溶性成分(主要是丹参酮类)和水溶性成分(主要是丹酚酸类)两大部位。目前已分离和鉴定的丹参脂溶性成分有 40 余种, 大部分为邻醌型的丹参酮类, 如隐丹参酮、丹参酮 I、丹参酮 II<sub>A</sub> 等<sup>[1]</sup>。近年来已有多篇文献报道丹参水溶性提取部位的 HPLC 指纹图谱<sup>[2,3]</sup>和红外光谱指纹图谱<sup>[4]</sup>。丹参脂溶性成分指纹图谱研究文献报道较少, 曾有文献报道了丹参脂溶性成分的薄层色谱指纹图谱和高分辨电喷雾飞行时间质谱图 (TOF-ESI/MS)<sup>[5]</sup>, 结合二级质谱技术, TOF-ESI/MS 能准确地确认 15 个丹参酮组分。

电喷雾离子阱质谱 (electrospray ion trap mass spectrometry, ESI/MS) 是近年来迅速发展并逐步完善起来的一种软电离质谱, 特别适用于极性大、热不稳定的天然化合物分析, 因其具有高特异性、高灵敏度以及多级质谱 (MS<sup>n</sup>) 等技术特点, 可直接用于混合物成分分析<sup>[6]</sup>。其一级质谱通常不产生碎片离子, 各种样品 (包括生物大分子) 都可以得到准分子离子或其多电荷离子峰, 因而可得到复杂样品的化学物质组成信息<sup>[7]</sup>。笔者曾研究了丹参水溶性部位特征 ESI/MS 指纹图谱<sup>[8]</sup>, 本实验研究了丹参酮类物质的电喷雾质谱规律, 分析了丹参脂溶性提取物的 ESI/MS 一级全扫描图谱, 试图建立一种较文献方法相对简便、快速与特异的丹参药材脂溶性提取物特征指纹图谱。

## 1 实验部分

1.1 仪器与试剂: 美国 Finnigan LCQ<sup>DUO</sup> 液相色谱-电喷雾离子阱质谱系统 (TSP P4000 泵, TSP AS3000 自动进样器, xcalibur<sup>TM</sup> 数据处理软件); 丹参酮 II<sub>A</sub> (批号 0766-200213)、隐丹参酮 (批号 852-9903)、丹参对照药材 (批号 923-200006) 购自中国

药品生物制品检定所。

1.2 质谱条件: ESI 离子源, 离子阱检测器, 扫描范围: 100~1000  $m/z$ ; 离子源喷射电压 5.0 kV; 毛细管电压 46 V; 毛细管温度 200 °C; 鞘气 (N<sub>2</sub>) 流速为 40 个单位, 自动进样器直接进样, 流动相为 100% 甲醇, 正离子检测。

1.3 丹参酮对照品溶液制备: 精密称取丹参酮 II<sub>A</sub> 2.09 mg 和隐丹参酮 2.45 mg, 分别溶于 2.5 mL 甲醇中作供试液。

1.4 供试品制备: 精密称取 0.3 g 丹参药材, 加 95% 乙醇 10 mL 置离心管中, 超声提取 (设定功率 280 W) 35 min。离心取上清液定容至 10 mL 容量瓶中。

## 2 结果

2.1 丹参酮 II<sub>A</sub> 和隐丹参酮的 ESI/MS 行为: 在上述电喷雾条件下, 一级质谱丹参酮 II<sub>A</sub> 和隐丹参酮易结合一个质子带正电, 基峰为分子离子峰  $m/z [M + H]^+$ ; 且都易形成一个较弱的二聚体加合 Na<sup>+</sup> 离子峰  $m/z [2M + Na]^+$ 。若采用源碰撞诱导解离 (source collision induced dissociation, sCID) 检测方式 (碰撞能量为 20 eV), 则二聚峰消失, 基峰仍为分子离子峰。

丹参酮 II<sub>A</sub> 在一级质谱中获取一个质子后, 其分子离子可能以烯醇式状态存在<sup>[9]</sup>, 在二级质谱 (碰撞能量为 30 eV) 中容易脱去一分子水形成  $m/z 277 [M + H - 18]^+$  碎片峰,  $m/z 249$  是  $m/z 277$  再失去一个羰基的碎片离子  $[M + H - 18 - 28]^+$ ,  $m/z 253$  是 A 环开环失去 C<sub>3</sub>H<sub>5</sub> 得到的碎片离子  $[M + H - 42]^+$ ,  $m/z 266$  是 A 环开环失去 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> 得到的碎片离子  $[M + H - 29]^+$ 。隐丹参酮的 ESI/MS 规律和丹参酮 II<sub>A</sub> 比较类似, 都属于 A 环未芳香化的丹参酮类, 容易在 C<sub>11</sub> 位形成烯醇式, 进而失去

一分子水得到较高丰度的碎片离子  $[M + H - 18]^+$ 。二者的二级质谱碎片信息见表 1, 以丹参酮 II<sub>A</sub> 为例, 推测丹参酮类物质的碎裂机制, 见图 1。

表 1 丹参酮 II<sub>A</sub> 和隐丹参酮 ESIMS<sup>2</sup> 二级质谱数据

Table 1 ESIMS<sup>2</sup> Data of tanshinone II<sub>A</sub> and cryptotanshinone

峰号	丹参酮 II <sub>A</sub>			隐丹参酮		
	$m/z$	MS <sup>2</sup> ions	RI/%	$m/z$	MS <sup>2</sup> ions	RI/%
1	277.3	M + H - H <sub>2</sub> O	100.0	279.4	M + H - H <sub>2</sub> O	100.0
2	249.3	M + H - H <sub>2</sub> O - CO	8.4	251.4	M + H - H <sub>2</sub> O - CO	62.7
3	253.3	M + H - C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	7.9	268.3	M + H - C <sub>3</sub> H <sub>6</sub>	10.0
4	266.2	M + H - C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	2.9	227.4	M + H - C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	7.2

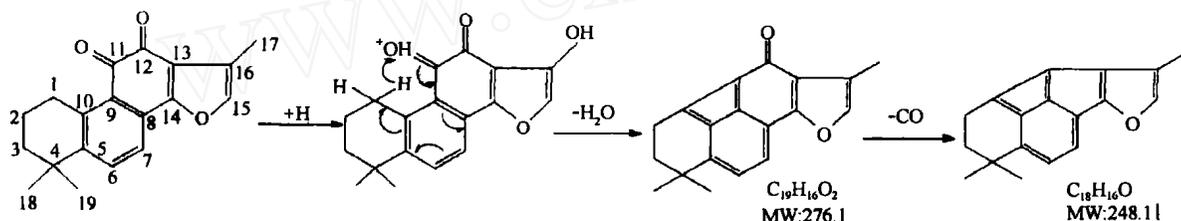


图 1 丹参酮 II<sub>A</sub> 二级质谱碎片产生可能机制

Fig 1 Proposed fragmentation pathway of tanshinone II<sub>A</sub> in ESIMS<sup>2</sup>

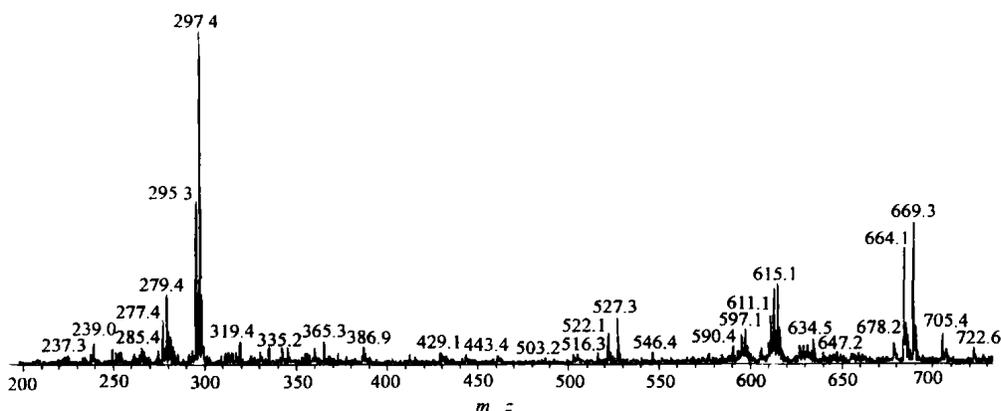


图 2 脂溶性丹参酮提取物 ESIMS 全扫描谱图

Fig 2 Full-scan ESIMS spectrum of lipophilic tanshinone extracts

图 2 中相对丰度较高的离子峰按  $m/z$  顺序依次为 277.3、279.4、282.5、295.4、296.4、297.4、298.4、319.4、527.4、597.3、605.4、613.3、615.1、678.5、684.3、685.3、689.5 和 705.4。经分析发现  $m/z$  296.4、298.4 和 685.3 分别为  $m/z$  295.4、297.4 和 684.3 的同位素峰;  $m/z$  611.1、615.1 分别为丹参酮 II<sub>A</sub> 和隐丹参酮的二聚加钠离子  $[2M + Na]^+$ ,  $m/z$  613.3 为隐丹参酮脱氢二聚加钠加合离子  $[M - M + Na]^+$ 。为了考察丹参脂溶性提取物 ESIMS 全扫描图的特征性, 选择了  $m/z$  277.3、279.4、282.5、295.4、297.4、319.4、527.4、605.4、

2.2 丹参对照药材脂溶性成分的 ESIMS 谱图及其指纹特征分析: 取丹参脂溶性成分提取液 1 mL, 离心取上清 200  $\mu$ L, 用甲醇稀释到 1 mL 后进样分析, 进样量 10  $\mu$ L, 质谱图见图 2。

图 2 中分子离子峰  $m/z$  297.4 和 295.4 的二次质谱碎片分别与隐丹参酮和丹参酮 II<sub>A</sub> 一致。分子离子峰  $m/z$  279 质谱丰度较高, 但由于丹参酮类化合物中相对分子质量为 278 的物质有 4 种, 分别为次甲丹参酮、1,2-二氢丹参酮、二氢丹参酮-I 和二氢异丹参酮, 仅根据其 ESIMS 特征还不能推断该分子离子对应于哪种物质。

613.3、615.1、678.5、684.3、689.5 和 705.4 共 14 个峰作为研究对象。这些峰主要分布在  $m/z$  297.4 附近和  $m/z$  615.1 附近, 而丹参酮类物质的相对分子质量正好分布在 252~338<sup>[10]</sup>, 说明选择上述峰来考察 ESIMS 图的特征性具有一定合理性。图 2 中 10 个主要质谱峰的质谱分析结果见表 2。

同样的条件下做阴性对照样品, 将所得空白样质谱图与对照药材质谱图对比, 证实所选 14 峰所对应的物质均来自药材。

### 2.3 丹参脂溶性成分 ESIMS 特征峰考察

2.3.1 精密度试验: 取同一份丹参药材提取液, 在

表 2 10 个主要质谱峰的质谱数据  
Table 2 MS<sup>n</sup> Data of ten major peaks

m/z	化合物	RI/%	MS <sup>n</sup> 碎片 (RI/%)
297.4	隐丹参酮 (M <sub>1</sub> )	100	279(100), 251(63), 268(10), 227(7)
295.4	丹参酮 II <sub>A</sub> (M <sub>2</sub> )	53	277(100), 249(10), 253(8), 266(8)
689.4	未知物 (M <sub>3</sub> )	48	527(100) 365(100) 203(100) *
279.4	次甲丹参酮或二氢丹参酮 I (M <sub>4</sub> )	23	261(100), 204(65.4)
527.4	未知物 (M <sub>5</sub> )	21	365(100) 203(100)
615.1	[2M <sub>1</sub> +Na] <sup>+</sup>	20	319(100) 296(100) 279(100)
613.3	[M <sub>1</sub> M <sub>1</sub> +Na] <sup>+</sup>	15	319(100) 296(100) 279(100)
611.1	[2M <sub>2</sub> +Na] <sup>+</sup>	13	317(100) 294(100) 277(100)
277.3	丹参酮 I (M <sub>6</sub> )	16	259(100), 249(61), 321(57.1), 339(10.1)
282.5	丹参新酮 (M <sub>7</sub> )	8	262(100), 267(60), 253(32)

\* “ ” 前后的数据分别代表母离子及其子离子的碎片离子

\* Data before and after “ ” represent parent ions and daughter ions, respectively

上述实验条件下连续进样 5 次, 测定各离子强度, 并计算 14 特征峰的相对标准偏差, 结果 RSD 值均小于 5%。

2.3.2 稳定性试验: 取同一份丹参对照药材提取液, 在上述实验条件下每隔 2 h 进样一次, 共 5 次, 测定离子强度, 并计算 14 特征峰的相对标准偏差, 其 RSD 值均小于 10%。

2.3.3 重现性试验: 取丹参药材平行提取液 5 份, 在上述实验条件下进样分析, 测定各样品离子强度, 并计算 14 特征峰的相对标准偏差。结果表明, 各峰 RSD (%) 值分布在 1.9~ 9.5, 平均 RSD (%) 值为 5.6。

### 3 结论

脂溶性丹参酮类物质具有相似 ESI-MS 行为, 如丹参酮 II<sub>A</sub> 和隐丹参酮, 在 ESI-MS 一级正离子全扫描时, 易捕获一个质子形成分子离子, 且都易形成一个弱二聚体加合 Na<sup>+</sup> 离子峰, 分子离子在二级质

谱中易发生脱水、脱羧基和 A 环开环裂解, 裂解规律可用于鉴别丹参脂溶性化合物。丹参脂溶性成分 ESI-ITMS 图重现性与特征性较好, 易于解析, 可用于丹参药材及复方丹参中丹参脂溶性成分的快速指纹鉴别。

### References:

- [1] Luo H W, Ji J. Identification of tanshinones with related compounds by high performance thin layer chromatography and mass spectrometric analysis [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1989, 24(5): 341-317.
- [2] Zhang Z J, Li Q, Wang W, et al. Study on fingerprints of *Radix Salviae Miltiorrhiza* and is NJECT DN by HPLC-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (12): 1074-1076.
- [3] Zhao L M, Liang X T, Li N L. Two minor phenolic glycosides from *Salvia Cavaleriei* [J]. *J Chin Pharm Sci* (中国药学报. 英文版), 1997, 6(2): 57-64.
- [4] Ni L J, Li P, Zheng R, et al. Quantitative analysis of similarity between IR spectrum s of extracts of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2002, 24(2): 79-82.
- [5] Yu W J, He J, Shen J C, et al. Detemination of fat-soluble components in Danshen by high-resolution electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2003, 24(4): 621-623.
- [6] Xu Y Z, Ma Y, Wang W J, et al. The application of ESI-MS on the saponin glycoside [J]. *J Spectrom* (质谱学报), 1999, 20(1): 20-26.
- [7] Pierluigi M, Piorgio P. Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2000, 23: 61-68.
- [8] Chen Y, Zhang L, Wang S M. Studies of electrospray mass law and the characteristic fingerprint of water-soluble compound of *Radix Salviae Miltiorrhiza* [J]. *Chin J Anal Chem* (中国分析化学杂志), 2004, 32(11): 1485.
- [9] Wu F Y, Dai D S, Wang Y M, et al. Application of high-speed countercurrent chromatography-electrospray ionization mass spectrometry in analysis of traditional Chinese herbs [J]. *Chen J Chin Univ* (高等学校化学学报), 2002, 23: 1698-1700.
- [10] Xu R S. *Natural Products Chemistry* (天然产物化学) [M]. Beijing: Science Press, 1997.

## 氮、磷、钾配合施用对福田白菊产量和品质的影响

刘大会<sup>1</sup>, 朱端卫<sup>1\*</sup>, 周文兵<sup>1</sup>, 刘伟<sup>1</sup>, 陈科力<sup>2\*</sup>

(1. 华中农业大学资源与环境学院, 湖北 武汉 430070; 2. 湖北中医学院 药理学系, 湖北 武汉 430061)

摘要: 目的 研究氮、磷、钾 3 种养分对福田白菊产量和品质的影响。方法 采用湖北省麻城市福田河镇白菊种植基地土壤进行盆栽土培试验。结果 在盆栽条件下施肥对白菊产量和品质的影响效应为氮 > 磷 > 钾; 氮、磷、钾 3 要素配合施用能促进白菊的正常生长发育, 显著提高白菊的经济学产量、生物学产量、外观品质、茶用和药用品质。

\* 收稿日期: 2005-03-25

基金项目: 湖北省重点攻关项目 (2001A A 304A)

作者简介: 刘大会 (1976- ), 男, 湖北武汉人, 华中农业大学资源与环境学院在读博士研究生, 主要从事药用植物营养生理与规范化施肥方面的研究。

\* 通讯作者 朱端卫 Tel: (027) 87287184 E-mail: zhudw@mail.hzau.edu.cn