

基于 UPLC-Q-TOF-MS 的加参片提取物化学成分分析

孙宁宁^{1,2,3}, 张可佳^{1,2,3}, 耿婉丽^{2,3}, 鄂秀辉^{2,3}, 高雯¹, 何毅^{2,3*}, 李萍^{1*}

1. 中国药科大学 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009

2. 天士力控股集团有限公司研究院 现代中药开发中心, 天津 300410

3. 天士力制药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410

摘要: 目的 通过建立超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-Q-TOF-MS)分析方法,对加参片提取物化学成分进行定性分析,确定加参片提取物的主要化学成分。方法 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以 0.1%甲酸水(A)-甲醇(B)为流动相梯度洗脱;体积流量 0.3 mL/min,采用电喷雾离子化源(ESI),MSE 扫描正负离子模式检测。结果 通过与对照品比对、数据库匹配、质谱数据分析及参考相关文献,从加参片提取物中共鉴定出 68 个化学成分,并发现了 4 个未知化合物,其中包括 13 个酚酸类成分、6 个丹参酮类成分、11 个黄酮及其苷类成分、4 个强心苷类成分、15 个三萜皂苷类成分、7 个 C₂₁ 甾体类成分、12 个其他类成分及 4 个未知成分。结论 对加参片提取物化学成分进行了较为全面的分析,为加参片的物质基础及质量控制研究打下了良好的基础。

关键词: 加参片;超高效液相色谱-串联四级杆飞行时间质谱;丹参酮类;黄酮类;强心苷类

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)02-0293-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.02.006

Analysis of chemical constituents of Jiashen Tablet extract by UPLC-Q-TOF-MS

SUN Ning-ning^{1,2,3}, ZHANG Ke-jia^{1,2,3}, GENG Wan-li^{2,3}, E Xiu-hui^{2,3}, GAO Wen¹, HE Yi^{2,3}, LI Ping¹

1. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. TCM Research Center, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To establish a method for the major content identification of Jiashen Tablet extract by using UPLC-Q-TOF-MS.

Methods The chromatographic separation was executed on a Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with methanol-0.1% formic acid in water by gradient elution. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in both positive and negative ion mode. **Results** A total of 72 compounds were found and 68 compounds among them were identified by the methods of comparing reference substance, matching Database and referencing related literature, including 13 phenolic acids, 6 tanshinones, 11 flavonoids and their glycosides, 4 cardiac glycosides, 15 triterpenoid saponins, 7 C₂₁ steroids, and 13 other components. **Conclusion** This study introduces a comprehensive analysis method of chemical constituents in Jiashen Table extract. The results afford a significant guidance for the study of active constituents and quality control research for Jiashen Tablet.

Key words: Jiashen Tablet; UPLC-Q-TOF-MS; tanshinones; flavonoids; cardiac glycosides

慢性心力衰竭(chronic congestive heart failure, CHF)是大多数心血管疾病的重要致死原因,发病率逐年上升,是全球慢性心血管疾病防治的重要内容。欧美流行病学数据显示成人 CHF 患病率为 1%~2%,并随年龄增加而增长,70 岁以上的老年人患病率已超过 10%^[1-2]。随着人口老龄化进程的加

快和高血压、冠心病、糖尿病等常见心血管病发病率的上升,CHF 患病率正在逐渐升高,我国已达 0.9%,老年人群的发病率 1.3%^[3],情况不容忽视。

加参片处方来源于我国著名的中医药专家、天津中医药大学张伯礼院士的经验方。该经验方主要是由丹参、黄芪、香加皮等 8 味中药组成,以益气

收稿日期: 2017-10-16

基金项目: 国家科技重大专项课题——中医药优势领域的创新中药关键技术开发研究(2017ZX09301005)

作者简介: 孙宁宁(1990—),女,硕士在读,研究方向为中药新药研发。E-mail: sunningning2015@126.com

*通信作者 李萍,女,教授,博士生导师,研究方向为中药活性成分群发现与质量评价研究。E-mail: liping2004@126.com

何毅,女,博士,研究方向为中药新药研发、中药现代化及国际法规与注册。E-mail: heyi@tasly.com

活血、温阳利水为治疗原则,能够有效地改善 CHF 患者的症状,提高生命质量,其疗效平稳,毒副作用少,适合 CHF 患者长期服用。在此基础上经过中医药界相关专家论证,并在制剂方面进一步改进,制成纯中药制剂加参片。目前针对加参片的物质基础研究鲜有报道。加参片提取物是加参片组方配伍后制备加参片的主要原料,本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对加参片提取物化学成分进行了全面的研究,共发现 72 个化学成分,鉴定出 68 个化学成分的结构,其中包括 13 个酚酸类成分、6 个丹参酮类成分、11 个黄酮及其苷类成分、4 个强心苷类成分、15 个三萜皂苷类成分、7 个 C₂₁甾体类成分、12 个其他类成分;为加参片物质基础和质量控制研究打下了良好的基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

超高效液相色谱(Waters ACQUITY UPLC,包括二元梯度泵、真空脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、Empower 2 工作站),Masslynx 色谱工作站(美国 Waters 公司);Waters Q-TOF Premier 质谱仪(英国 Waters MS Technologies 公司);电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);粉碎机(德国 IKA 公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司);KQ-500DV 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料

杠柳毒苷(批号 111793-200901)、东莨菪内脂(批号 110768-200504)、黄芪甲苷(批号 110781-201515)、丹酚酸 B(批号 111562-201514)、毛蕊异黄酮苷(批号 201506)、丹参素钠(批号 201314)、迷迭香酸(批号 201102)、丹参酮 II_A(批号 200619)、原儿茶醛(批号 200506)、三七皂苷 R₁(批号 110745-20061)、人参皂苷 Rg₁(批号 110703-201027)、隐丹参酮(批号 110852-200806)、芦丁(批号 100080-200306)、芒柄花素(批号 111703-201504)、人参皂苷 Rb₁(批号 110704-201625)、丹参酮 I(批号 110867-200406)、人参皂苷 Rb₃(批号 111686-201504)、咖啡酸(批号 110885-201703)、橙皮苷(批号 110721-201617)对照品均购于中国食品药品检定研究院;北五加皮苷 N(批号 MUST-16041107)、异杠柳毒苷(批号 MUST-16041102)、北五加皮苷 M(批号 MUST-16041106)、杠柳次苷(批号 MUST-16060305)、杠柳苷元(批

号 MUST-17040701)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司;4-甲氧基水杨酸(批号 15110)购自北京世纪奥科生物科技有限公司;毛蕊异黄酮(批号 20130408)、芒柄花苷(批号 20130612)、丹酚酸 A(批号 20140820)、人参皂苷 Rh₁(批号 63223-86-9)均购自天津士兰科技有限公司;三七皂苷 R₂(批号 948046-15-9)购自上海标准品科技有限公司;三七皂苷 Fa(批号 88100-04-3)购自成都普利斯生物科技有限公司。加参片提取物(批号 20161103)由天士力研究院提供。以上对照品质量分数均大于 93%。

甲醇(质谱纯,德国 Merck 公司),超纯水(Milli-Q 制备),甲酸(色谱级,德国 Merck 公司)。

2 方法

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm)。流动相 0.1% 甲酸水(A)-甲醇(B);梯度洗脱:0~3 min,10%~10% B;3~11 min,10%~20% B;11~21 min,20%~40% B;21~35 min,40%~70% B;35~37 min,70%~95% B;37~40 min,95%~10% B。体积流量 0.3 mL/min;PDA 全波长扫描;柱温 30 °C;进样量 2 μL。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源(ESI),MSE 扫描正负离子模式检测,扫描范围 m/z 50~1 500,用亮氨酸脑啡肽作校正液,进行实时校正。毛细管电压负离子模式 2.3 kV,正离子模式 2.8 kV,锥孔电压为 40 V,雾化气为高纯度氮气,体积流量为 50 L/h,碰撞气为氩气,脱溶剂气体积流量 800 L/h,脱溶剂温度为 350 °C,离子源温度为 120 °C。高能量扫描时 trap 电压为 20~60 eV。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取上述对照品适量至量瓶中,加入甲醇适量,超声使溶解,放冷,加甲醇定容至刻度,制得质量浓度为 5.8~10.1 μg/mL 的各对照品混合溶液。

2.3 供试品溶液的制备

按照加参片中药材提取工艺对各药材进行提取,其中丹参、香加皮、黄芪、三七采用稀醇提取大孔树脂纯化等技术制备提取物,桂枝、益母草等药材采用水提醇沉等技术得到提取物,经现有的内控质量标准检验为制备加参片制剂合格的加参片提取物。精密称取加参片提取物 0.8 g,置于 10 mL 量瓶中,加入 70%甲醇约 8 mL,超声处理(功率 250

W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷至室温, 70%甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

3 结果与分析

按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱与质谱条件进行进样分析, 采用正、负离子全扫描, 获得正、负离子模式下的 BPI 图, 共标定了 72 个色谱峰, 见图 1 和图 2。通过与对照品比对、数据库匹配分析及参考相关文献, 从加参片提取物中共鉴定出 68 个化学成分, 并发现 4 个未知成分。其中包括 13 个酚酸类成分、6 个丹参酮类成

分、11 个黄酮及其苷类成分、4 个强心苷类成分、15 个三萜皂苷类成分、7 个 C_{21} 甾体类成分、12 个其他类成分, 见表 1。

3.1 酚酸类化合物结构解析

在加参片提取物中共检测到 13 个酚酸类化合物, 该类成分在负离子模式下响应较好, 其中以丹参素为母核的丹酚酸类成分, 在质谱裂解中容易脱去 1 分子或 2 分子丹参素 (m/z 198), 再脱去 CO_2 (m/z 44)、 H_2O (m/z 18) 等中性分子。在负离子模式检测下, 峰 28 的一级质谱图 (图 3) 中可明显观

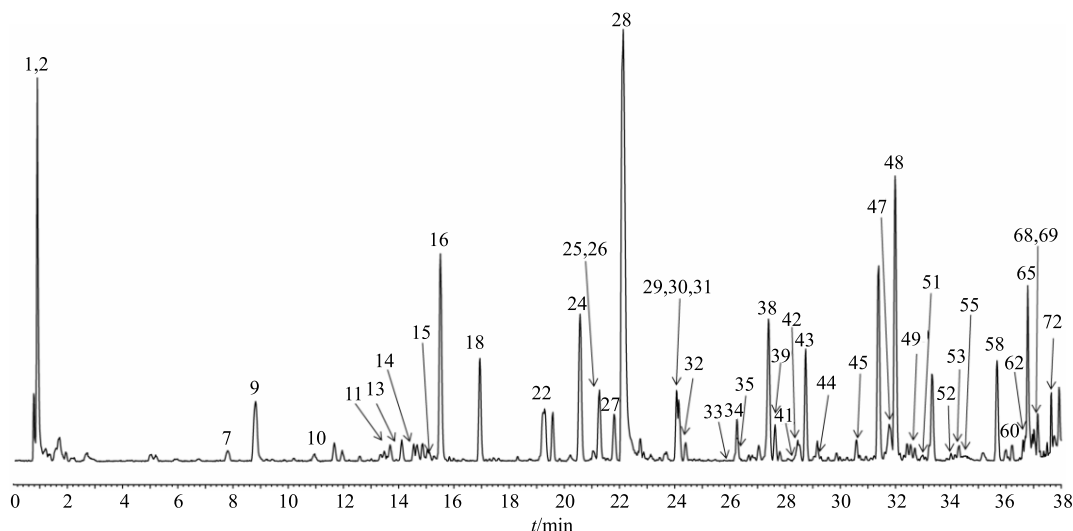


图 1 加参片提取物 UPLC-Q-TOF-MS 正离子模式下的 BPI 图

Fig. 1 Representative base peak intensity (BPI) chromatograms of Jiashen Tablet extract in positive mode by UPLC-Q-TOF-MS

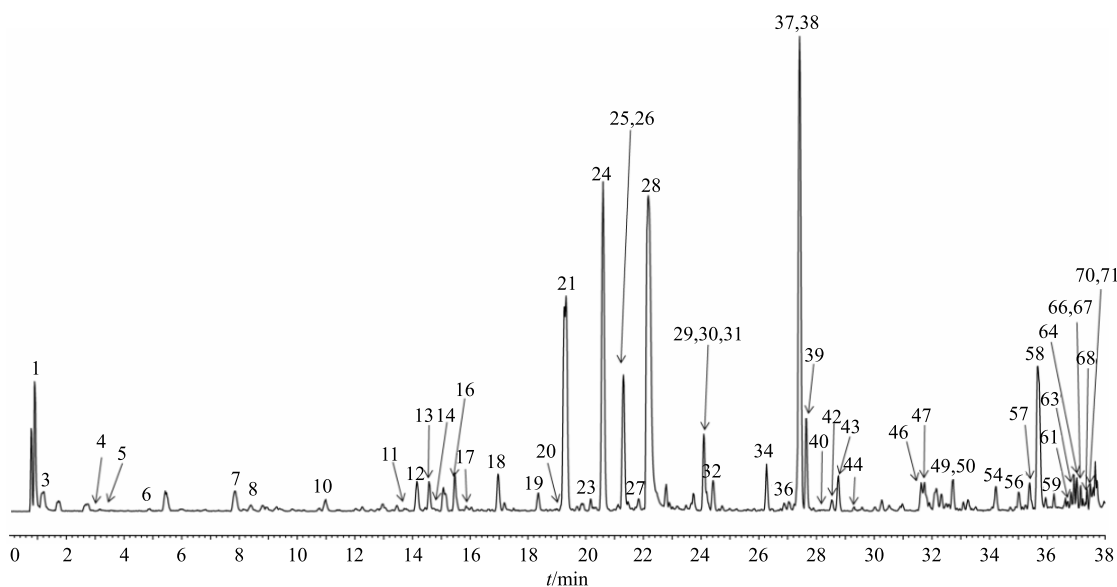


图 2 加参片提取物 UPLC-Q-TOF-MS 负离子模式下的 BPI 图

Fig. 2 Representative base peak intensity (BPI) chromatograms of Jiashen Tablet extract in negative mode by UPLC-Q-TOF-MS

表 1 加参片提取物正、负离子模式下的数据归属

Table 1 Identification of major chemical constituents in Jiashen Tablet extract by UPLC-Q-TOF-MS in positive and negative ion mode

峰号	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	化合物	碎片离子 (m/z)	来源	参考 文献
1	0.887	$\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2$	144.102 5	144.103 0 a	3.79	盐酸水苏碱	144.103 4, 84.073 0	益母草	4
2	0.913	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	377.085 1	377.085 7 f	1.59	蔗糖	341.109 3, 179.056 9, 683.226 9	香加皮、黄芪	5
3	1.169	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	191.019 2	191.019 2 c	0.00	柠檬酸	173.006 6, 147.030 9, 129.019 6	未知	6
4 [*]	2.836	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$	197.045 0	197.044 6 f	-2.02	丹参素	179.035 7, 135.045 0, 151.037 9	丹参	7-8
5	3.291	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	153.018 8	153.019 4 c	3.92	原儿茶酸	109.028 4	丹参	8
6 [*]	4.820	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	137.023 9	137.024 7 c	5.84	原儿茶醛	137.024 3, 108.022 4	丹参	7
7	7.851	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	353.087 3	353.088 3 c	1.87	5- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸	191.057 1, 179.030 3, 135.040 4	未知	6
8 [*]	8.464	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	179.034 5	179.033 7 c	-4.47	咖啡酸	135.047 7	黄芪、丹参	8
9	8.772	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{NO}_5$	310.165 4	310.165 5 e	0.32	未知	251.092 0, 207.066 0, 175.039 7, 147.044 8	未知	—
10	10.936	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	469.132 2	469.131 0 b	-2.49	4-甲氧基苯甲醛-2- <i>O</i> - β -D-木糖 (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-葡萄糖	441.122 2, 317.084 6	香加皮	9
11 [*]	13.655	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$	193.050 1	193.050 8 a	3.50	东莨菪内酯	178.026 9, 150.032 8	香加皮	10-11
12	14.166	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	197.045 0	197.045 5 d	2.77	香草醛	182.021 9, 166.997 0	香加皮	11-12
13	14.474	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	593.150 7	593.149 0 d	-2.79	(6a <i>R</i> ,11a <i>R</i>)-9,10-二甲氧基紫檀烷-3- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷-6"- <i>O</i> -丙二酸酯	473.111 1, 383.077 0, 353.066 4, 297.073 7	黄芪	5,13
14	14.718	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$	193.050 1	193.050 3 d	1.11	肉桂酸	178.026 9, 134.037 5	桂枝	14
15	15.294	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$	147.044 6	147.044 3 a	-2.04	香豆素	119.050 7, 91.036 0	黄芪	8
16	15.522	$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5$	312.155 9	312.155 4 a	-1.68	盐酸益母草碱	312.155 9, 181.050 3	益母草	4,15
17	15.773	$\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_{13}$	581.223 4	581.223 7 c	0.56	5,5"-二甲氧基落叶松脂醇-4"- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷	419.171 7	香加皮	11
18 [*]	16.878	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	491.119 0	491.120 5 d	3.15	毛蕊异黄酮-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	283.061 8, 268.039 1, 239.036 8	黄芪	7
19	18.227	$\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	537.103 3	537.103 3 d	-0.01	丹酚酸 C	491.100 6, 311.056 3, 293.043 5	丹参	7
20	18.967	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	515.119 0	515.116 9 c	-4.03	芒柄花苷-6"- <i>O</i> -丙二酸酯	353.086 5	黄芪	5,13
21 [*]	19.231	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	609.145 6	609.145 3 c	-0.49	芦丁	300.028 0, 271.061 5	黄芪	15
22	19.244	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	273.076 3	273.075 5 a	-3.02	4'-甲氧基异黄酮-7- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷		黄芪	16
23 [*]	20.063	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$	167.034 5	167.035 0 c	3.14	4-甲氧基水杨酸	123.044 6, 108.022 3	香加皮	11
24 [*]	20.522	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	633.179 6	633.178 6 b	-1.58	橙皮苷	301.072 2, 286.049 4, 1243.368 4	陈皮	17
25 [*]	21.292	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	359.076 7	359.077 1 c	1.13	迷迭香酸	197.046 1, 161.024 5	丹参	7,18-19
26 [*]	21.181	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	1 075.214 4	1 075.214 6 g	0.19	紫草酸	537.103 4, 295.061 5, 493.113 3, 359.077 1	丹参	7

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	化合物	碎片离子 (m/z)	来源	参考 文献
27 [*]	21.756	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	475.124 1	475.123 7 d	-0.75	芒柄花苷	267.069, 269.081 8, 453.116 6	黄芪	8
28 [*]	22.188	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717.145 6	717.143 8 c	-2.51	丹参酚酸 B	1435.277 2, 519.093 9, 339.053 2, 321.043 5, 295.064 1	丹参	7
29	24.103	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717.145 6	717.141 7 c	-5.44	丹酚酸 E	519.092 5, 339.050 9, 321.040 0, 295.060 7, 185.026 0	丹参	7, 20
30	24.112	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	493.113 5	493.114 3 c	1.67	丹酚酸 A	359.078 5, 313.071 8, 295.060 7, 185.025 6, 135.1, 109.029 4,	丹参	19-20
31 [*]	24.228	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.060 7	283.061 6 c	3.36	毛蕊异黄酮	268.038 7, 239.033 7, 211.039 6, 195.045 7	黄芪	7
32	24.352	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	593.187 1	593.185 9 c	-2.02	(6a <i>R</i> , 11a <i>R</i>) 9, 10-二甲氧基紫檀烷-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside-2'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃木糖苷	617.188 1, 595.199 2	黄芪	13
33	25.932	C ₂₂ H ₃₄ O ₅	401.230 4	401.230 1 a	-0.75	21- <i>O</i> -甲基-5-孕甾烯-3 β , 14 β , 17 β , 21-四醇-20-酮	383.169 3, 369.007 4	香加皮	21
34 [*]	26.239	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	977.532 1	977.530 6 d	-1.53	三七皂苷 R ₁	931.525 0, 799.475 6, 637.427 3, 475.377 5	三七	22
35 [*]	26.670	C ₂₃ H ₃₄ O ₅	413.230 4	413.230 9 b	1.21	杠柳苷元 1	391.249 0, 373.236 8, 355.224 3, 337.217 8	香加皮	23
36	26.960	C ₂₈ H ₄₂ O ₆	473.290 9	471.085 1 c	—	3 β - <i>O</i> -(4', 6'-脱氧-3'- <i>O</i> -甲基- Δ^3 - <i>D</i> -2'- 己糖)- Δ^5 -孕甾烯-17 α , 20(<i>S</i>)-二醇	519.088 7	香加皮	24
37 [*]	27.343	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.547 8	991.545 5 d	-2.27	人参皂苷 Re	945.540 4, 783.483 7, 637.432 0, 475.372 5	三七	25
38 [*]	27.413	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.489 9	845.488 5 d	-1.66	人参皂苷 Rg ₁	799.483 5, 637.430 7, 475.379 9	三七	22
39 [*]	27.583	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₃	719.361 9	719.360 9 b	-1.39	杠柳毒苷	391.248 8, 373.237 9, 355.227 9, 337.217 3	香加皮	23
40	28.227	C ₃₃ H ₅₄ O ₁₂	687.359 2	687.356 9 d	-3.28	杠柳苷 C/秦岭藤苷 C	641.351 9	香加皮	26
41	28.415	C ₂₁ H ₂₆ O ₃	327.196 0	327.193 7 a	-7.11	12 β -羟基孕烯-4, 6, 16-三烯-3, 20-二酮	675.307 9, 349.177 5, 288.978 4	香加皮	27
42 [*]	28.523	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.065 7	267.065 7 c	0.00	芒柄花素	252.042 8, 223.038 9, 195.046 6	黄芪	7
43	28.709	C ₃₃ H ₅₆ O ₁₇	747.341 6	747.211 7 b	—	低聚糖 F2	725.359 6, 723.212 6	香加皮	28
44 [*]	29.297	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₃	719.361 9	719.362 2 b	0.42	异杠柳毒苷	695.363 4, 533.310 6	香加皮	23
45 [*]	30.646	C ₃₀ H ₄₆ O ₈	557.309 1	557.308 0 b	-1.97	杠柳次苷	391.253 4, 373.237 7, 355.228 1, 337.218 5	香加皮	29
46	31.705	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.232 8	329.233 0 c	0.68	未知	353.230 2	黄芪	30
47 [*]	31.872	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	815.479 3	815.474 4 d	-6.01	三七皂苷 R ₂ (S 型)	769.472 5, 637.428 6, 475.374 8	三七	22

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	化合物	碎片离子 (m/z)	来源	参考文献
48	31.983	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	433.134 6	434.149 4 a	—	车叶草酸	887.272 8, 455.131 2	黄芪	31
49	32.709	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_9$	683.437 1	683.432 5 d	-6.66	人参皂苷 Rh_1	637.426 2, 475.364 3	三七	22, 25
50	32.709	$\text{C}_{40}\text{H}_{66}\text{O}_{16}$	825.424 9	825.426 4 b	1.82	杠柳次苷 A	663.349 3, 525.181 4	香加皮	31
51*	32.999	$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_6$	487.303 6	487.302 9 b	-1.37	杠柳新苷 N	339.169 9	香加皮	32
52	34.006	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_3$	301.084 1	301.084 6 b	1.78	二氢异丹参酮 I/1,2-二氢丹参酮/ 次甲丹参酮	279.101 7, 261.089 5, 251.164 7, 233.103 1, 195.103 7	丹参	33-35
53	34.122	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_3$	301.084 1	301.084 6 b	1.78	二氢异丹参酮 I/1,2-二氢丹参酮/ 次甲丹参酮	279.101 7, 261.089 5, 251.164 7, 233.103 1, 195.103 7	丹参	33-35
54	34.191	$\text{C}_{59}\text{H}_{100}\text{O}_{27}$	1 263.635 0	1 263.632 6 b	-1.67	三七皂苷 R_4	497.145 7, 425.378 5, 407.367 5	三七	36
55	34.360	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_3$	301.084 1	301.085 3 b	4.09	二氢异丹参酮 I/1,2-二氢丹参酮/ 次甲丹参酮	279.101 7, 261.089 5, 251.164 7, 233.103 1, 195.103 7	丹参	33-35
56*	35.025	$\text{C}_{59}\text{H}_{100}\text{O}_{27}$	1 263.637 4	1 263.635 7 b	-1.35	三七皂苷 Fa	1 107.597 0, 945.546 1, 783.484 9	三七	36
57	35.535	$\text{C}_{59}\text{H}_{100}\text{O}_{27}$	1 263.635 0	1 263.632 6 b	-3.29	三七皂苷 R_4	497.145 7, 425.378 5, 407.367 5	三七	36
58*	35.650	$\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{23}$	1 107.595 1	1 107.594 6 c	-0.45	人参皂苷 Rb_1	945.540 3, 783.486 6, 621.436 7, 459.371 3	三七	25
59	36.216	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_4$	311.222 3	311.223 9 c	5.22	未知	223.170 7, 116.941 1	黄芪	30
60	36.232	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_4$	335.219 9	335.219 1 b	-2.30	未知	277.216 2, 245.079 5, 149.023 4	黄芪	30
61*	36.633	$\text{C}_{53}\text{H}_{90}\text{O}_{22}$	1 077.584 6	1 077.581 8 c	-2.58	人参皂苷 Rb_3	945.500 9, 783.458 4	三七	25
62*	36.738	$\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{O}_9$	627.350 9	627.350 5 b	-0.64	杠柳新苷 M	605.286 1, 497.284 1	香加皮	32
63*	36.854	$\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$	829.458 6	829.456 8 d	-2.17	黄芪甲苷	783.451 2	黄芪	7
64*	36.953	$\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{O}_{15}$	871.469 2	871.466 3 d	-3.28	黄芪皂苷 II	825.461 3	黄芪	5
65*	36.784	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$	319.131 0	319.131 2 b	0.63	隐丹参酮	297.150 8, 279.141 1, 251.140 1	丹参	22
66*	37.040	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	991.547 8	991.545 5 d	-2.27	人参皂苷 Rd	945.542 6, 783.485 5, 621.432 3, 459.383 4	三七	22, 25
67*	37.040	$\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{O}_{16}$	913.479 7	913.478 1 d	-1.70	黄芪皂苷 I	867.470 5	黄芪	7
68	37.156	$\text{C}_{56}\text{H}_{92}\text{O}_{24}$	1 171.587 7	1 171.587 3 b	-0.32	Δ^5 -孕甾烯-3 β ,20 α -二醇-3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -乙酰基- β -D-吡喃洋地黄糖 (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-加拿大麻 糖]-20- <i>O</i> -[β -D-葡萄糖糖-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-葡萄糖 (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃洋地黄糖]	969.504 6, 825.424 4, 687.403 3, 597.285 2	香加皮	37
69	37.191	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_3$	301.084 1	301.085 3 b	4.09	二氢丹参酮 I	279.101 7, 261.089 5	丹参	33-35
70	37.226	$\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{O}_{15}$	871.469 2	871.468 8 d	-0.41	异黄芪皂苷 II	825.471 8	黄芪	7
71	37.502	$\text{C}_{45}\text{H}_{72}\text{O}_{16}$	913.479 7	913.476 9 d	-3.02	异黄芪皂苷 I	867.471 1	黄芪	7
72*	37.644	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_3$	295.133 4	295.133 9 a	1.69	丹参酮 II _A	317.114 9, 277.123 4, 262.099 5	丹参	38

*与对照品比对 —表示误差相对较大 a-[M+H]⁺ b-[M+Na]⁺ c-[M-H]⁻ d-[M+COOH]⁻ e-[M+NH₄]⁺ f-[M+Cl]⁻ g-[2M-H]⁻*compared with reference substance —means the error is relatively large a-[M+H]⁺ b-[M+Na]⁺ c-[M-H]⁻ d-[M+COOH]⁻ e-[M+NH₄]⁺ f-[M+Cl]⁻ g-[2M-H]⁻

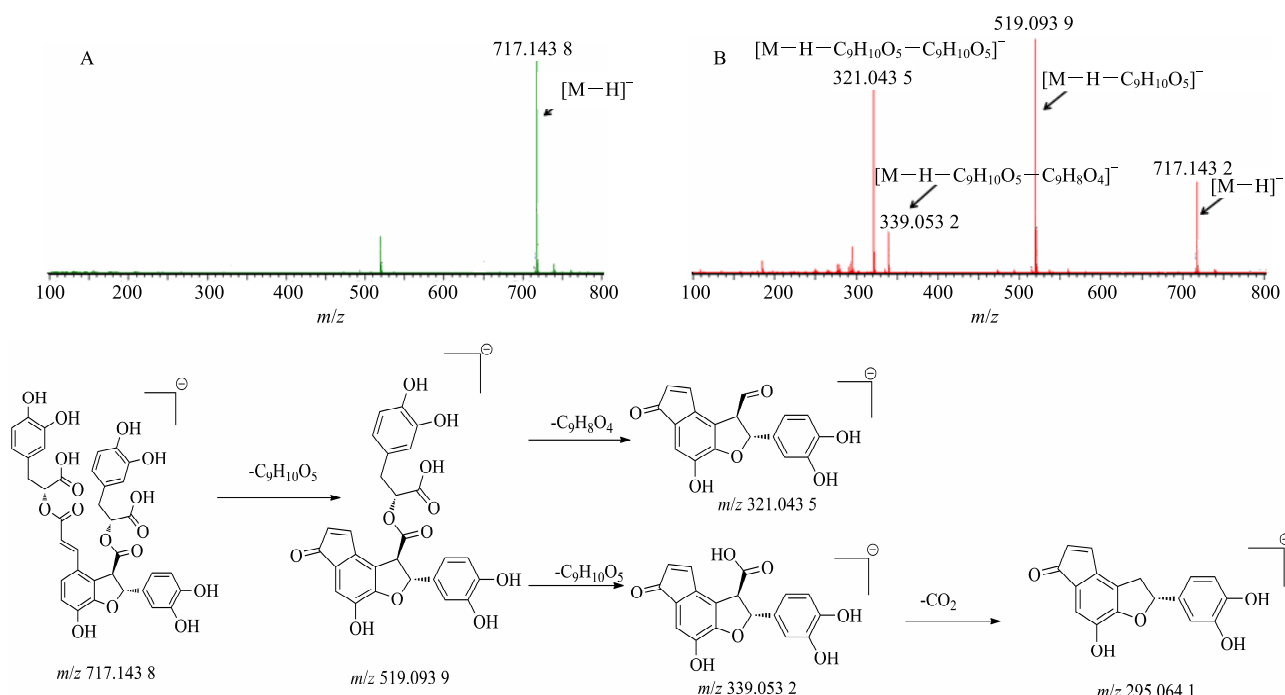


图 3 丹酚酸 B 负离子模式下一级 (A)、二级 (B) 质谱图及裂解规律

Fig. 3 Mass spectra (A: low CE mode, B: high CE mode) and possible fragment pathway of salvanolic acid B in negative mode

察到准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 717.143 8, 对分子离子峰进行 MSE 扫描裂解分析得到碎片离子 m/z 519.093 9, 为母离子 m/z 717.143 8 脱去 1 分子 $-C_9H_{10}O_5$ 碎片 (丹参素) $[M-H-C_9H_{10}O_5]^-$ 产生的, 碎片离子 m/z 339.053 2 和 m/z 321.043 5 分别为 m/z 519.093 9 脱去碎片 $-C_9H_8O_4$ 和碎片 $C_9H_{10}O_5$ 产生的, m/z 339.053 2 再脱掉 1 分子 CO_2 即得 m/z 295.064 1 的碎片离子, 通过对照品的比对、碎片离子信息和参考文献报道^[7], 鉴定峰 28 为丹酚酸 B。

3.2 丹参酮类化合物结构解析

在加参片提取物中共鉴定 6 个丹参酮类化合物, 此类化合物正离子模式下响应较好, 负离子模式下几乎无响应。峰 65 一级正离子给出 m/z 319.131 2 $[M+Na]^+$ 及 m/z 297.150 8 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 它的二级碎片离子有 m/z 279.141 1 $[M+H-H_2O]^+$ 和 m/z 251.140 1 $[M+H-H_2O-CO]^+$, 通过对照品比对及参考文献报道^[22], 确定峰 65 为隐丹参酮, 其相关裂解途径见图 4。

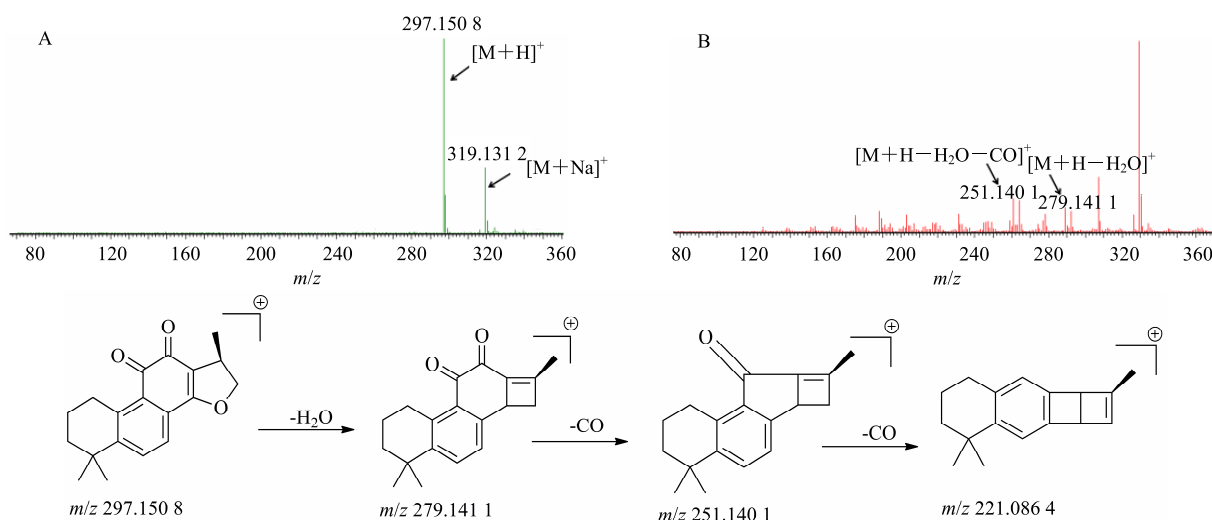


图 4 隐丹参酮正离子模式下一级 (A)、二级 (B) 质谱图及裂解规律

Fig. 4 Mass spectra (A: low CE mode, B: high CE mode) and possible fragment pathway of cryptotanshinone in positive mode

3.3 黄酮类化合物结构解析

黄酮及其苷类在负离子模式下响应值较高,在加参片提取物中共检测到 11 个黄酮类化合物,其苷元类型主要为黄酮醇类、二氢黄酮类、异黄酮类、黄烷醇类等。黄酮苷类在 ESI-MS 软电离条件下,可以获得非常强的分子离子峰,在二级质谱中,容易失去糖基形成苷原离子,也较容易发生中性丢失,生成 $[M-H-CO]^-$ 、 $[M-H-H_2O]^-$ 、 $[M-H-CH_3]^-$ 等碎片离子。例如在负离子模式下扫描,峰 18

给出明显的分子离子 m/z 491.120 5 $[M+COOH]^-$, 二级质谱以母离子失去葡萄糖残基 (m/z 162) 产生 m/z 283.061 8 $[M-H-Glc]^-$ 的碎片离子, m/z 268.039 1 和 m/z 239.036 8 则为 m/z 283.061 8 分别脱去 CH_3 和 CHO 产生的 $[M-H-Glc-CH_3]^-$ 、 $[M-H-Glc-CHO]^-$ 碎片离子, m/z 211.041 2 为 m/z 239.036 8 脱掉 1 分子 CO 形成的碎片离子, m/z 135.019 5 和 m/z 148.030 5 则为异黄酮母核 B 环 C1-C2 和 C3-C4 键断裂的碎片离子, 其相关裂解途径见图 5。

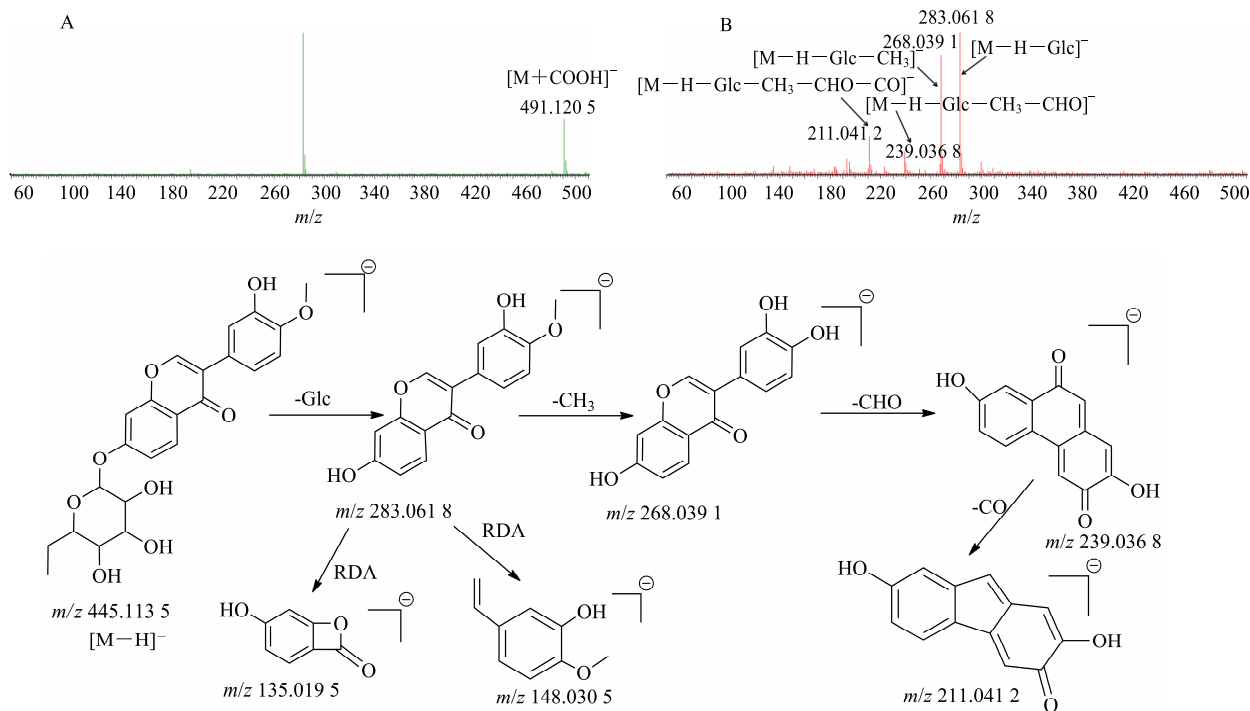


图5 毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷负离子模式下一级(A)、二级(B)质谱图及裂解规律

Fig. 5 Mass spectra (A: low CE mode, B: high CE mode) and possible fragment pathway of calycosin-7-*O*- β -*D*-glucoside in negative mode

3.4 甲型强心苷类化合物结构解析

甲型强心苷类化合物容易失去一系列的糖, 然后发生中性丢失 1 个或多个 H_2O 。从加参片提取物中共检测到 4 个甲型强心苷类化合物。峰 39 的一级正离子给出 m/z 719.360 9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 二级碎片离子有 m/z 391.248 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{Cym}]^+$ 、 m/z 355.227 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{Cym}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ 和 m/z 337.217 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{Cym}-3\text{H}_2\text{O}]^+$, 通过对照品的比对确定峰 35、39、44 及峰 45 分别为杠柳苷元 1、杠柳毒苷、异杠柳毒苷和杠柳次苷。其相关裂解途径见图 6。

3.5 三萜皂苷类化合物结构解析

在加参片提取物中共检测到 15 个三萜皂苷类化合物, 正负离子均有响应。该类化合物容易连续脱糖, 过程中存在中性丢失 1 个或多个 H_2O , 最后

形成达玛烷型、环阿拉丁型等类型甙元离子。例如在负离子模式检测下, 峰 38 给出明显的分子离子 $[M + COOH]^-$ m/z 845.488 5, 对分子离子峰进行全扫描裂解分析, 给出碎片离子 m/z 799.483 5 $[M - H]^-$ 、 m/z 637.430 7、 m/z 475.379 9。碎片离子 m/z 637.430 7 为母离子 m/z 845.488 5 脱去 1 分子葡萄糖基 $[M - H - Glc]^-$ 产生的, 碎片离子 m/z 475.379 9 为 m/z 637.430 7 继续脱去 1 分子葡萄糖基 $[M - H - Glc - Glc]^-$ 产生的。

在正离子模式下检测,峰 38 在一级质谱图中可观察到准分子离子 $[M+Na]^+$ m/z 823.483 0,在二级质谱中,主要的碎片离子有 m/z 801.486 6 $[M+H]^+$ 、 m/z 621.436 7 $[M+H-Glc-H_2O]^+$ 、 m/z 603.426 8 $[M+H-Glc-2H_2O]^+$ 、 m/z 441.373 8 $[M+H-Glc-$

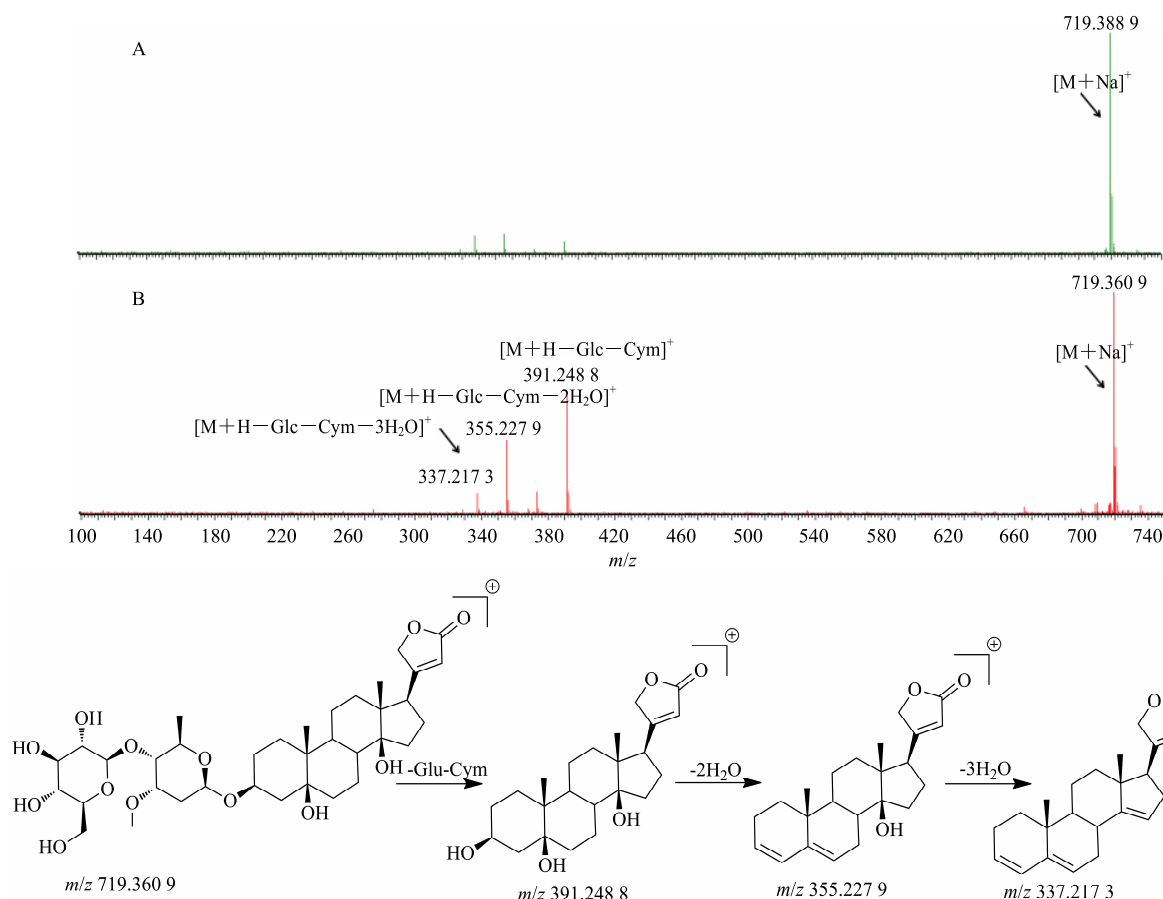


图 6 杠柳毒苷正离子模式下一级 (A)、二级 (B) 质谱图及裂解规律

Fig. 6 Mass spectra (A: low CE mode, B: high CE mode) and possible fragment pathway of periplocin in positive mode

$2\text{H}_2\text{O}-\text{Glc}]^+$ 。各峰得到的数据与文献报道一致^[22], 再通过对照品的比对, 可确定 38 号峰为人参皂苷 Rg_1 (图 7)。

3.6 C_{21} 甾体类化合物结构解析

峰 10 的准分子离子峰为 m/z 469.131 0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 含有的碎片离子 m/z 441.122 2 可能是通过中性丢失 1 分子的 CO (m/z 28) $[\text{M}+\text{Na}-\text{CO}]^+$ 产生的, 说明其分子结构中含有羰基结构。碎片离子 m/z 317.084 5 为 m/z 469.131 0 脱去苷元部分产生的双糖基碎片 $[\text{Xyl}+\text{Glc}+\text{Na}]^+$ 。通过参考文献报道^[9] 及离子碎片信息推断 10 号峰为 4-甲氧基苯甲醛-2- O - β - D -木糖 (1 $\rightarrow$ 6)- β - D -葡萄糖 (图 8)。

3.7 其他类化合物结构解析

其他类化合物包括二糖、内酯类、生物碱类等。峰 10 在负离子模式下给出准分子离子 m/z 377.085 7 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, 二级质谱图中出现 m/z 341.109 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 和 m/z 179.056 9 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ 的碎片离子及 m/z 683.226 9 $[2\text{M}-\text{H}]^-$ 的聚合离子, 通过参考文献

报道^[5]及离子碎片信息推断 10 号峰为蔗糖。峰 11 在正离子模式下出现 m/z 193.050 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准分子离子峰, 二级质谱图可观察到碎片离子 m/z 178.026 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 及 m/z 150.032 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$, 通过对照品的比对及参考文献报道^[10-11]可确定峰 11 为东莨菪碱内脂。峰 16 在正离子模式下给出较强的准分子离子 m/z 312.156 0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 碎片离子出现 m/z 181.050 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{12}\text{ON}_3]^+$, 参考文献报道^[4,15]推断峰 16 为益母草碱。

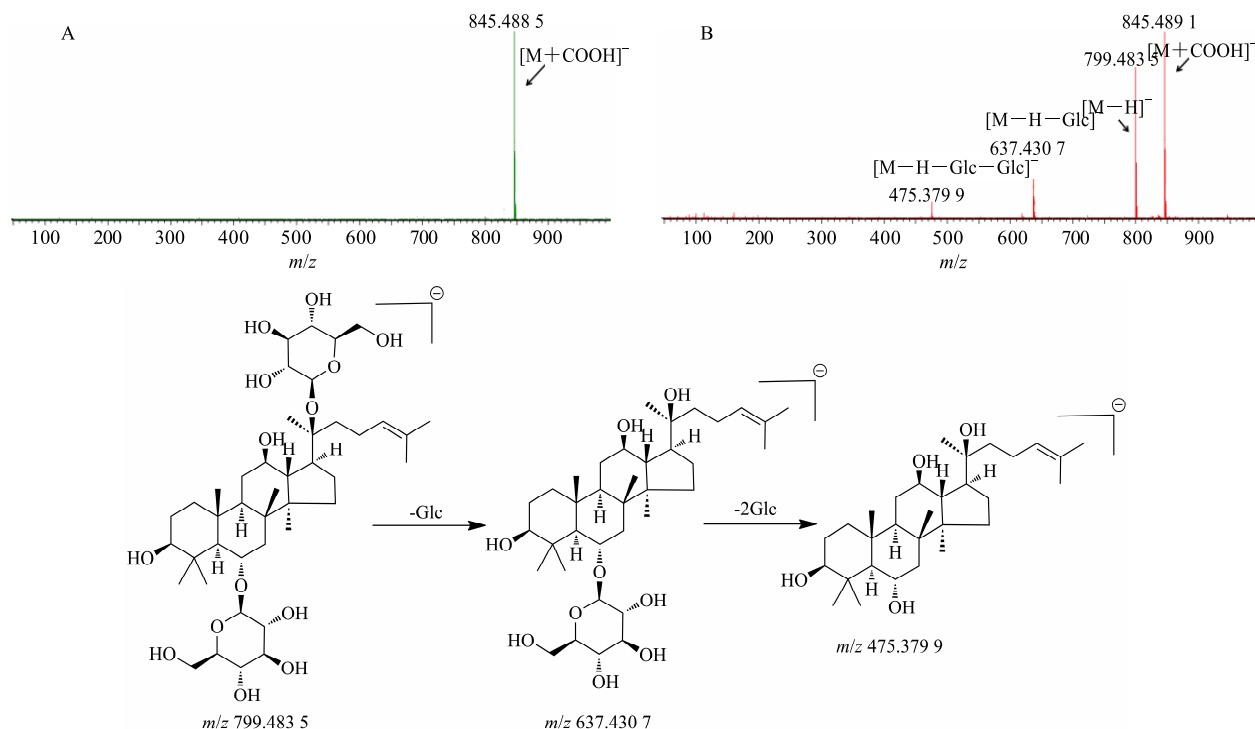
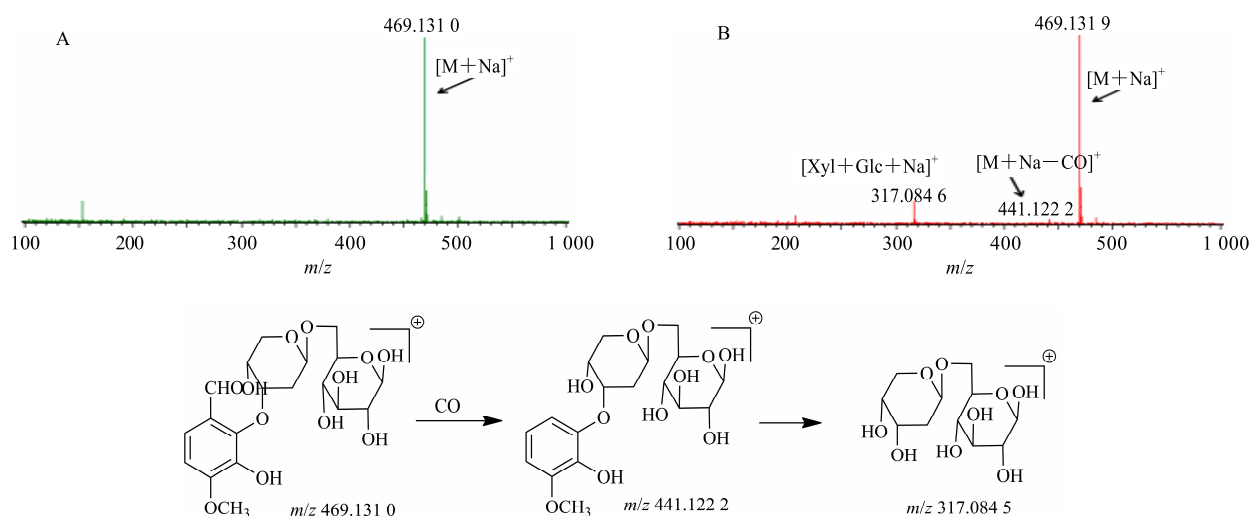
4 讨论

4.1 样品提取条件考察

本实验考察了 30%、50%、70%、100% 甲醇及纯水、70% 乙醇为提取溶剂对提取效率的影响, 结果表明 70% 甲醇最优。提取时间考察了 15、30、45、60 min, 结果发现超声 30 min 后整体峰个数及各峰峰面积基本无变化, 最终确定提取时间为 30 min。

4.2 色谱与质谱条件考察

本实验流动相考察了乙腈-水体系和甲醇-水体

图 7 人参皂苷 Rg_1 负离子模式下一级 (A)、二级 (B) 质谱图及裂解规律Fig. 7 Mass spectra (A: low CE mode, B: high CE mode) and possible fragment pathway of ginsenoside Rg_1 in negative mode图 8 4-甲氧基苯甲醛-2-O- β -D-木糖 (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-葡萄糖正离子模式下一级 (A)、二级 (B) 质谱图及裂解规律Fig. 8 Mass spectra (A: low CE mode, B: high CE mode) and possible fragment pathway of 4-methoxybenzaldehyde-2-O- β -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside in positive mode

系, 结果甲醇-水可增强样品中大极性成分的保留, 分离度较好, 加入甲酸可以优化峰形, 而且有助于化合物的离子化, 提高质谱响应。

4.3 化学成分定性分析方法

依据加参片各组药材化学成分研究文献, 收集了各药材主要化学成分, 建立相应的化学成分数

据库。通过数据库匹配分析、对照品比对及参考相关文献鉴定化学成分。对于有对照品的化合物的检测, 通过比对保留时间、质谱裂解规律进行鉴定, 本实验通过对照品比对鉴别出 33 个化合物。对于无对照品的化合物, 则通过分析质谱裂解特征及参考文献对其进行定性。对于同分异构体, 需要综合液

相色谱中化合物的保留时间及质谱行为,综合对其定性。如峰39(杠柳毒苷)与峰44(异杠柳毒苷)的保留时间分别27.583、29.297 min,二者结构为五元内酯环的镜面异构,一级质谱中出现了相同的分子离子峰,二级质谱中的碎片离子几乎无差别,已知杠柳毒苷为39号峰,参考文献报道^[23],推断44号峰为异杠柳毒苷,经对照品比对进一步验证了推断。一些响应较好的色谱峰所代表化学成分因未在数据库中而不能有效鉴别,如峰9,有待进一步研究。

4.4 化学成分药理作用探讨

本研究运用UPLC-Q-TOF-MS技术在较短时间内完成化合物的分离,将其用于成分鉴定和指认,共鉴定出加参片提取物中丹参、黄芪、香加皮等药材中的68个化学成分,并发现4个未知成分,以丹酚酸、丹参酮、三萜皂苷、强心苷类为主,多来源于君药丹参、黄芪,臣药香加皮和佐药三七。

药理研究表明,丹酚酸及丹参酮类具有抗心肌缺血缺氧、保护心肌细胞、抗动脉粥样硬化、抗血栓形成、抗心律失常等作用^[39]。贺永贵等^[40]研究发现黄芪甲苷可显著改善心功能,减少心肌梗面积,抑制线粒体肿胀,表明黄芪甲苷对心肌缺血再灌注损伤有保护作用。孙达等^[41]采用Langendorff离体心脏灌流法,比较香加皮中4种强心苷类成分的强心作用并确定其时效和量效关系。结果表明,4种强心苷类成分均能增强大鼠离体心脏功能,并兼备正性肌力作用和负性频率作用。而检测到的4种强心苷类成分既是发挥药效的有效成分,也是毒性成分,需对其重点关注。本研究对加参片提取物的化学成分进行全面分析,发现其所含有的主要成分与文献报道的慢性心力衰竭相关药理活性成分具有良好的一致性,从而在一定程度上体现潜在的药效物质群及处方配伍的合理性,为加参片的药效物质基础及质量控制研究奠定基础,对加参片化学成分体内代谢及作用机制研究具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] McMurray J J, Adamopoulos S, Anker S D, *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 of the European society of cardiology. developed in collaboration with the heart failure association (HFA) of the ESC [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(14): 1787-1847.
- [2] Mosterd A, Hoes A W. Clinical epidemiology of heart

failure [J]. *Heart*, 2007, 93(9): 1137-1146.

- [3] 顾东风, 黄广勇, 何江. 中国心力衰竭流行病学调查及其患病率 [J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31(1): 326.
- [4] 刘冰松, 陈应林. LC-MS/MS法测定复方益母草膏中有效成分的含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(4): 303-306.
- [5] 李锐, 付铁军, 及元乔, 等. 膜荚黄芪与蒙古黄芪化学成分的高效液相色谱-质谱研究 [J]. 分析化学, 2005, 33(12): 1676-1680.
- [6] Cádiz-Gurrea M D L L, Fernández-Arroyo S, Joven J, *et al.* Comprehensive characterization by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS from an *Eryngium bourgatii*, extract and their antioxidant and anti-inflammatory activities [J]. *Food Res Inter*, 2013, 50(1): 197-204.
- [7] 祁晓霞, 董宇, 单晨啸, 等. 基于UFLC-Q-TOF/MS分析黄芪-丹参药对化学成分研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2017, 33(1): 93-96.
- [8] 高越. 基于组学和网络药理学的养心氏片抗心衰作用机理研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
- [9] 王宁, 陈书红, 任风芝, 等. 香加皮的化学成分研究 [A] // 2008 中国药学会学术年会暨中国药师周论文集 [C]. 北京: 医药卫生科技出版社, 2008.
- [10] 陈书红, 杨峻山, 任风芝, 等. 香加皮的抗肿瘤活性成分研究 (I) [J]. 中草药, 2006, 37(4): 519-520.
- [11] 李金楠, 赵丽迎, 于静, 等. 香加皮化学成分的研究 [J]. 中成药, 2010, 32(9): 1552-1556.
- [12] 王磊, 殷志琦, 张雷红, 等. 杠柳根皮化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1300-1302.
- [13] 李继红, 李永吉, 李秋红, 等. 黄芪化学成分的研究 [J]. 黑龙江医药, 2004, 17(2): 97-99.
- [14] 陈永财, 钱江辉, 王彬辉, 等. “桂枝与白芍”药对化学成分UPLC-Q/TOF-MS分析 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(16): 12-15.
- [15] 田丰, 陈婷, 王晔尘, 等. HPLC-ESI-TOF-MS法快速分离与鉴别益母草药材中的多种化学成分 [J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(4): 86-89.
- [16] 张亚洲, 徐风, 易涛, 等. ESI-IT-TOF-MSⁿ方法对11个异黄酮的裂解规律研究 (英文) [J]. 中国药理学杂志, 2014, 23(9): 631-641.
- [17] 马琳, 黄小方, 欧阳辉, 等. UHPLC/Q-TOF-MS/MS快速鉴定陈皮化学成分 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(19): 33-37.
- [18] 林力, 刘建勋, 张颖, 等. LC-MS/MS法同时测定犬血浆中丹酚酸A、丹酚酸B、紫草酸和迷迭香酸及其在丹参提取物的药代动力学研究应用 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2012, 14(3): 1567-1571.
- [19] 林晓斐, 林力, 张颖, 等. 丹参提取物中5种酚酸类成分在大鼠血浆中的LC-MS/MS分析 [J]. 中国实

- 验方剂学杂志, 2015, 21(8): 93-96.
- [20] 寇学良, 杨东花, 苏英英, 等. 丹参中丹酚酸 A 和丹酚酸 B 的 ESI-MS/MS 裂解规律解析 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(10): 1026-1029.
- [21] Xu J P, Takeya K, Itokawa H. Pregnanes and cardenolides from *Periploca sepium* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(1): 344-346.
- [22] 王 邱, 冯毅凡, 芮 雯, 等. UPLC/Q-TOFMS 对三七中皂苷类成分的快速化学表征 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(8): 1233-1239.
- [23] Umehara K, Sumii N, Satoh H, *et al.* Studies on differentiation inducer. V. Steroid glycoside from *Cortex Periplocae Radicis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43(9): 1565-1568.
- [24] Itokawa H, Xu J P, Takeya K. Studies on chemical constituents of antitumor fraction from *Periploca sepium* BGE. I [J]. *Chem Pharm Bull*, 1987, 35(11): 4524-4529.
- [25] 赵 静, 秦振娟, 彭 兵, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的三七中皂苷类成分质谱裂解规律研究 [J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 98-108.
- [26] Wang L, Yin Z Q, Zhang Q W, *et al.* Five new C-21 steroidal glycosides from *Periploca sepium* [J]. *Steroids*, 2011, 76(3): 238-243.
- [27] Itokawa H, Xu J P, Takeya K, *et al.* Studies on chemical constituents of antitumor fraction from *Periploca sepium*. II. Structures of new pregnaneglycoside, periplocoside A, B and C [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(3): 982-987.
- [28] Sakuma S, Kawanishi S, Shoji J. Constituents of Chinese crude drug “wujiapi” VII [J]. *Chem Pharm Bull*, 1977, 25(8): 2055-2059.
- [29] Sakuma S, Kawanishi S, Shoji J. Constituents of Chinese crude drug “wujiapi” I [J]. *Chem Pharm Bull*, 1968, 16(2): 326-331.
- [30] 芮 雯, 冯毅凡, 石忠峰, 等. 不同产地黄芪药材的 UPLC/Q-TOF-MS 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 607-611.
- [31] 康利平, 赵 阳, 余河水, 等. 采用 UPLC-Q-TOF/MSE 鉴别芪苈强心胶囊有效部位中的化学成分 [J]. 药理学报, 2011(10): 1231-1236.
- [32] Itokawa H, Xu J P, Takeya K. Studies on chemical constituents of antitumor fraction from *Periploca sepium* IV. Structures of newpregnane glycosides, periplocosides D, E, L, M [J]. *Chem Pharm Bull*, 36(1988): 2084-2089.
- [33] 沈建芳, 汪 红, 王 强, 等. 丹参中丹参酮成分的 HPLC-MS(n) 研究 [J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(10): 944-947.
- [34] 吴 鹏, 李慧芬, 张学兰, 等. HPLC-TOF/MS 分析丹参酒炙前后化学成分的变化 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, (11): 6-9.
- [35] Wang M, Dai H, Li X, *et al.* Structural elucidation of metabolites of tanshinone I and its analogue dihydrotanshinone I in rats by HPLC-ESI-MSn [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(13): 915-924.
- [36] Liu J H, Wang X, Cai S Q, *et al.* Analysis of the constituents in the Chinese drug notoginseng by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2004, 13(4): 225-237.
- [37] Sakuma S, Kawanishi S, Shoji J. Constituents of Chinese crude drug “wujiapi” VII [J]. *Chem Pharm Bull*, 1972, 20(11): 2402-2406.
- [38] Xu Y, Huang K, Pan Y, *et al.* A rapid UFLC-MS/MS method for simultaneous determination of formononetin, cryptotanshinone, tanshinone IIA and emodin in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of Bu Shen Huo Xue formula [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 932(15): 92-99.
- [39] 丰成相. 丹参的化学成分及药理作用概况 [J]. 中国民族民间医药, 2012, 2(2): 25-26.
- [40] 贺永贵, 李王芳. 黄芪甲苷抑制 GSK-3 β 活性介导大鼠心肌缺血再灌注损伤作用的线粒体机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3): 402-406.
- [41] 孙 达, 张 静, 陈金堂, 等. 香加皮中强心苷类对大鼠离体心脏的强心作用比较 [J]. 中国中医药学刊, 2011, 29(12): 2633-2635.