

丹参水提取物成分的定性与半定量研究

张伟涛^{1,2}, 李德坤^{2,3}, 岳洪水², 侯建³, 刘丽芳^{1*}, 鞠爱春^{2,3*}

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

3. 天士力控股集团有限公司, 天津 300410

摘要: 目的 利用 Q-TOF-MS 技术对丹参水提取物中的成分进行定性研究, 并且利用 Q-Trap-MS 技术对部分未知成分进行半定量研究。方法 采用 Waters Acquity UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%甲酸水体系梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 30 °C。Q-TOF-MS 检测采用负离子 ESI 模式, 电压 2.5 kV, 离子源温度 110 °C, 雾化气温度 350 °C, 雾化气流量 800 L/h。Q-Trap-MS 检测采用负离子 ESI 模式, 离子喷射电压: -4 500 V; 温度 450 °C; 源内气体 1 (GS1, N₂) 压力 310 kPa; 源内气体 2 (GS2, N₂) 压力 310 kPa; 气帘气体 (N₂) 压力 138 kPa; 应用多重反应监测 (MRM) 模式进行半定量分析。结果 鉴定出丹参水提取物中成分 26 个, 其中有 15 个为常见的酚酸类物质, 另有 11 个含量较低且研究较少的已知物质; 在 Q-Trap-MS 中进行了方法学的考察, 并测定出了 11 种未知成分的含量。结论 实现了对丹参水提取物高效快速的物质定性, 同时也为无对照品且含量较低的成分的含量测定提供了新的思路。

关键词: 丹参水提取物; 丹酚酸; 液质联用; 定性; 半定量

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)15-3598-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.15.013

A qualitative and semi-quantitative study of *Salvia miltiorrhiza* aqueous extracts

ZHANG Wei-tao^{1,2}, LI De-kun^{2,3}, YUE Hong-shui², HOU Jian³, LIU Li-fang¹, JU Ai-chun^{2,3}

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. Tasly Holding Group, Tianjin 300410, China

Abstract: Objective To qualitative research the composition of *Salvia miltiorrhiza* aqueous extracts by using Q-TOF-MS and to establish a semi-quantitative analysis method of some active components in *S. miltiorrhiza* aqueous extracts based on Q-Trap-MS. **Methods** The chromatographic separation was performed on a Waters Acquity UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column with the mobile phase consisting of acetonitrile and 0.1% formic acid for gradient elution. The flow rate was 0.3 mL/min, and the column temperature was 30 °C. In Q-TOF-MS, electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in negative ion mode. The capillary voltage was set at 2.5 kV. The nebulization gas was set to 800 L/h at 400 °C, and the source temperature was 100 °C. In Q-Trap-MS, electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in negative ion mode. The ionspray voltage was set to -4 500 V at 450 °C. The pressure of source gas 1 (GS1, N₂) and source gas 2 (GS2, N₂) were both 45 psi, and the pressure of curtain gas (N₂) was 20 psi. Semi-quantification analysis was performed with multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** A total of 26 components of *S. miltiorrhiza* aqueous extracts were identified, of which 15 components were common phenolic acids. The two reference substances had good linearity ranges ($r \geq 0.9976$), and the values of precision, repeatability, stability and recovery met the demand of Chinese Pharmacopoeia. The content of 11 unknown compositions was determined. **Conclusion** The composition identification of *S. miltiorrhiza* aqueous extracts was realized with a high effective and rapid method, and a new idea for the content determination of unknown components was provided.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* aqueous extracts; salvianolic acid; UPLC/MS; qualitation; semi-quantification

收稿日期: 2019-03-12

基金项目: 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设 (17PTSJJC00090)

作者简介: 张伟涛 (1993—), 男, 江苏泰州人, 硕士在读, 主要从事中药分析研究。

*通信作者 刘丽芳, 女, 教授, 研究方向为现代中药分析和中药新药研究。E-mail: liulifang69@126.com

鞠爱春, 男, 高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。E-mail: juach@tasly.com

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 始载于《神农本草经》, 具有活血祛瘀、通经止痛和清心除烦的功效^[1-2]。丹参的有效成分有水溶性和脂溶性 2 大类, 本实验中的丹参水提取物为水溶性成分, 以丹酚酸 B (salvianolic acid B) 和紫草酸 (lithospermic acid) 等酚酸类物质为主要成分。目前, 丹参水提取物中的含量较高的主要成分研究已经很多^[3-7], 本实验基于四极杆-飞行时间质谱技术 (Q-TOF-MS) 进一步分析了丹参水提取物中的化学成分^[8-9]; 并对部分用常规手段难以检测的低含量成分, 基于四极杆-线性离子阱质谱 (Q-Trap-MS) ^[10-11] 技术与方法进行了半定量研究。半定量的方法目前研究尚少^[12-16], 但对没有对照品的物质来说却极为重要。

对于 Q-TOF-MS 的定性研究, 除了运用传统的 MS^E 模式, 本课题还采用了 MS/MS 模式, 该模式有 Trap CE Control 和 Transfer CE Control 2 个碰撞室, 可以得到比 MS^E 模式更清晰准确的二级和三级的碎片信息, 对于物质的裂解规律解析和结构定性有很大的帮助。另外, 对于 Q-Trap-MS 的半定量研究, 其原理类似于一测多评的方法^[17-19], 一测多评法在《中国药典》2015 年版中已有应用^[1], 对于没有对照品的物质来说, 该方法能提供 1 个相对准确的物质含量的信息。利用该半定量方法, 经质谱检测 5 批丹参水提取物发现其中 11 种成分的总质量分数在 15.28~21.35 μg/g。本实验中丹参水提取物成分的半定量研究是在多重反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式下进行^[20], MRM 模式在一级扫描下选择特定的母离子, 碰撞碎裂后, 在二级扫描中分析该母离子产生的子离子。由于 MRM 模式对母离子和子离子进行双重的筛选, 可显著降低质谱信号的噪音干扰, 提高待测物质的信噪比, 从而提高待测物质的检测灵敏度, 实现对低含量物质定量分析的目的。

1 仪器与材料

AcquityTM UPLC 超高效液相色谱系统、Synapt G2 Q-TOF-MS 质谱系统、MassLynx V4.1 质谱工作站、Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 美国 Waters 公司; AB SCIEX Q-Trap 5500 液质联用系统, 岛津 UPLC 超高效液相系统 (配备 DGU-20A5R 脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, LC-30AD 液相泵); KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司;

XS105 型十万分之一天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司。水为超纯水, Milli-Q 型超纯水系统, 德国 Millipore 公司; 甲醇、乙腈, 质谱纯, 德国 Merck 公司; 甲酸, 质谱纯, 美国 Sigma 公司; 其余试剂均为分析纯。

对照品丹酚酸 B (批号 111562-201716, 质量分数 94.1%), 购自中国食品药品检定研究院; 紫草酸 (批号 FY18351203, 质量分数 96.3%), 购自南京飞宇生物科技有限公司。5 批丹参水提取物批号分别为 20100201、20110503、20111205、20111206、2014A02, 均由天津天士力之骄药业有限公司提供, 该提取物由水煮沸提取而得。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

称取丹酚酸 B 对照品 0.91 mg 和紫草酸对照品 0.99 mg, 分置 100 mL 量瓶中, 加纯水溶解, 定容至刻度。再分别稀释 2、10、50、100、200、500 和 1 000 倍, 备用。

2.2 供试品溶液的制备

称取 5 批丹参水提取物各约 1 mg, 分置 2 mL 量瓶中, 加纯水溶解, 定容至刻度, 备用。

2.3 色谱条件

2.3.1 UPLC/Q-TOF-MS/MS 液相条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 30 °C, 样品室温度 4 °C。流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱, 0~3 min, 10%~19%乙腈; 3~10 min, 19%~23%乙腈; 10~12 min, 23%~30%乙腈; 12~14 min, 30%~50%乙腈; 14~20 min, 50%~90%乙腈; 20~21 min, 90%~10%乙腈; 21~22 min, 10%乙腈; 进样量 5 μL, 体积流量 0.3 mL/min。

2.3.2 UPLC/Q-Trap-MS/MS 液相条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 40 °C。流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0.5~12 min, 10%~35%乙腈; 12~15 min, 35%~70%乙腈; 15~17 min, 70%~100%乙腈; 17~18.4 min, 100%乙腈; 18.4~19 min, 100%~10%乙腈; 进样量 3 μL, 体积流量 0.3 mL/min。另外, 在检测未知成分时, 将色谱柱流出液在 0~6 min 进废液, 6~8.4 min 进质谱, 8.4~10.6 min 进废液, 10.6~15 min 进质谱, 15~19 min 进废液。检测紫草酸和丹酚酸 B 对照品时, 0~19 min 进质谱。

2.4 质谱条件

2.4.1 UPLC/Q-TOF-MS/MS 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式, 毛细管电压 2.5 kV, 锥孔电压 40 V, 提取锥孔电压 5 V, 离子源温度 110 °C, 脱溶剂气体 (N_2) 温度为 350 °C, 脱溶剂气体流量 800 L/h, 锥孔气流量 50 L/h, 采集频率 0.2 s。用亮氨酸脑啡肽作为内标 (Lock SprayTM) 进行质量实时校正, 体积流量为 5 μ L/min。同样质谱条件下的 3 种质谱检测模式分别为 (1) MS^E Continuum 扫描模式检测, 扫描时碰撞能量为 20~30 eV, 质量扫描范围 m/z 100~1 500。(2) MS/MS 模式下检测, 碰撞室 Trap CE Control 使用线性能量扫描 20~30 eV, 且碰撞室 Transfer CE Control 关闭。

2.4.2 UPLC/Q-Trap-MS/MS 质谱条件 离子源为电喷雾离子源 (负离子模式); 离子喷射电压: -4 500 V; 温度: 450 °C; 源内气体 1 (GS1, N_2) 压力:

310 kPa; 源内气体 2 (GS2, N_2) 压力: 310 kPa; 气帘气体 (N_2) 压力: 138 kPa; 应用 MRM 模式进行半定量分析, 待测物质质谱参数见表 1, 表中参数的选择依据按照“2.6.1”项和“2.6.2”项下说明。

2.5 基于 Q-TOF-MS 的定性研究

2.5.1 丹参多酚酸的裂解规律 取紫草酸和丹酚酸 B 对照品溶液, 按“2.3.1”和“2.4.1”项条件进样分析。丹参水提取物中大部分都是酚酸类物质, 丹参多酚酸是基于丹参素的聚合体, 下面以紫草酸和丹酚酸 B 为例来探讨酚酸类物质的裂解规律和骨架结构。紫草酸 (m/z 538) 结构不是很稳定, 在离子源内就发生裂解, 脱去中性碎片 CO_2 , 生成大量的 m/z 493 的二级碎片离子。该碎片又在 MS^E 模式下进一步裂解, 碎片 m/z 493 丢失 1 分子丹参素 ($C_9H_{10}O_5$, m/z 198), 生成 m/z 295 的三级碎片离子。结果见图 1。

表 1 Q-Trap-MS 中 MRM 模式参数

Table 1 MRM mode parameters of Q-Trap-MS

待测物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	DP/V	EP/V	CE/V	CXP/V
紫草酸	493	295	-65	-10	-15	-12
X1	521	323	-65	-10	-15	-12
X2	551	321	-65	-10	-15	-12
X3	565	321	-65	-10	-15	-12
丹酚酸 B	717	519	-51	-10	-24	-16
X4	715	535	-51	-10	-24	-16
X5	731	533	-51	-10	-24	-16
X6	735	537	-51	-10	-24	-16
X7	745	547	-51	-10	-24	-16

X 代表未知物质

X is for unknown substance

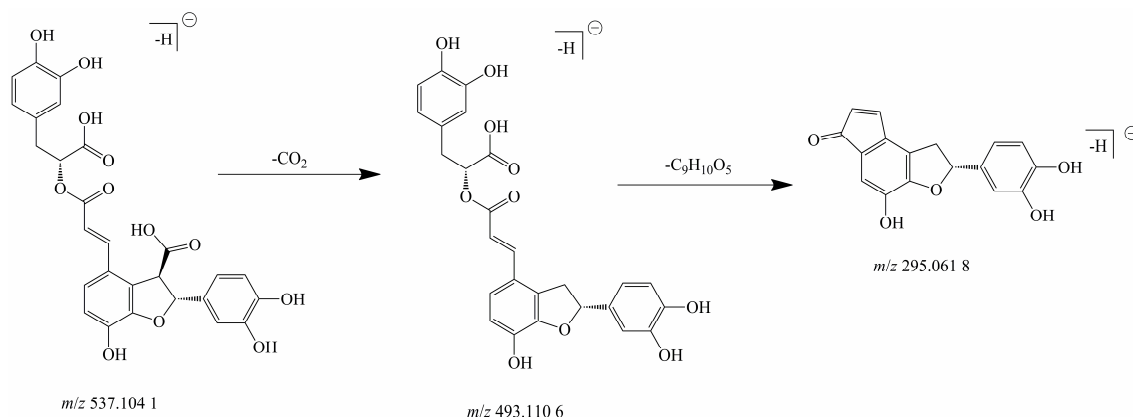


图 1 紫草酸负离子模式下的裂解规律

Fig. 1 Possible fragment pathway of lithospermic acid in negative mode

丹酚酸 B 在负离子模式下,失去 1 个 H,得到分子离子峰 m/z 717,在 MS^E 模式下进行裂解,丢失 1 分子丹参素 ($C_9H_{10}O_5$, m/z 198) 得到二级碎片离子 m/z 519,三级碎片离子 m/z 339 和 m/z 321 分别为 m/z 519 脱去 1 分子咖啡酸 ($C_9H_8O_4$, m/z 180)

和 1 分子丹参素 ($C_9H_{10}O_5$, m/z 198) 产生的。此外, m/z 339 再丢失 1 分子 CO_2 即得四级碎片离子 m/z 295,而 m/z 321 再丢失 1 分子 CO 即得四级碎片离子 m/z 293。结果见图 2。

2.5.2 丹参水提取物中的成分鉴定 取供试品 (批

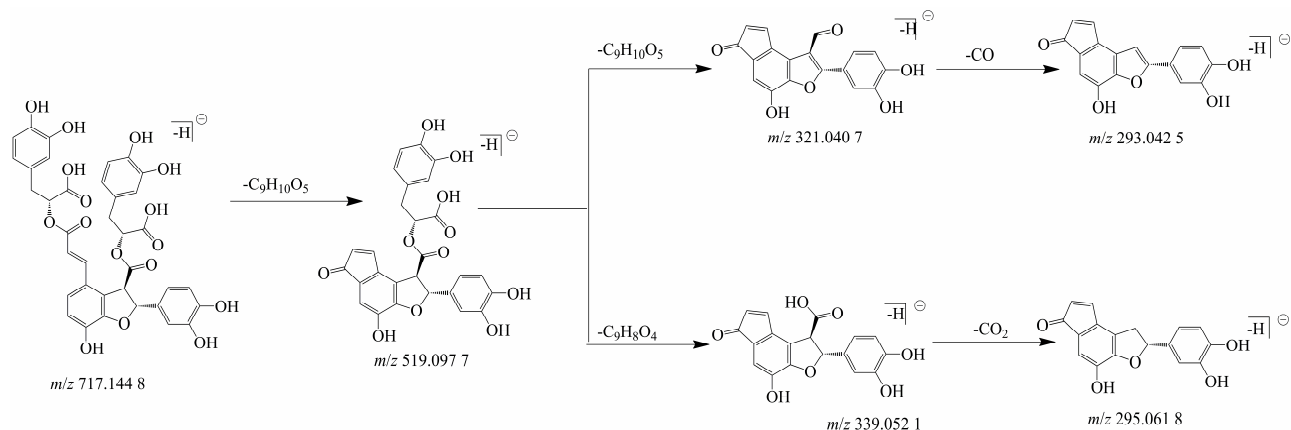


图 2 丹酚酸 B 负离子模式下的裂解规律

Fig. 2 Possible fragmentation pattern of salvianolic acid B in negative mode

号 2014A02) 溶液,按“2.3.1”和“2.4.1”项条件进样分析,得到色谱图。通过 UPLC/Q-TOF-MS/MS 的高分辨质谱数据,从丹参水提取物中共检出化学成分 33 个。根据飞行时间质谱测得的精确相对分子质量,应用 MassLynx 质谱分析软件计算可能的分子组成,并结合各个成分峰的二级质谱碎片信息和丹参已知化合物的文献报道^[21-23],对色谱峰进行分析,鉴定了 26 个可能的成分。其中,共有 15 个常见的已知酚酸^[23-32],剩下 11 个含量较低且研究较少的未知物质 X1~X7。经进一步的查阅文献和碎片离子的分析,推测 X2 为紫草酸单甲酯, X3 为紫草酸双甲酯, X1 和 X4~X7 为酚酸类的物质,且 X6 和 X7 各有 3 种同分异构体。结果见表 2。

2.6 基于 Q-Trap-MS 的半定量研究

经对各物质离子碎片及相对分子质量研究,发现 X1 与紫草酸相对分子质量接近,且有相近的骨架碎片;另外, X2 和 X3 为紫草酸单甲酯和紫草酸双甲酯。所以,选用紫草酸作为 X1~X3 的对照品进行半定量。其中, X4~X7 与丹酚酸 B 的相对分子质量接近,且有相近的骨架碎片,所以选用丹酚酸 B 作为这 4 种未知物的对照品进行半定量。紫草酸和丹酚酸 B 以及各自同类物质的碎片信息见表 3。

2.6.1 确定未知物的最佳母离子和子离子对 取供试品 (批号 2014A02) 溶液,按“2.3.1”和“2.4.1”

项条件进样分析,第 1 个四极杆的相对分子质量分别设置为 521.1 (X1)、551.1 (X2)、565.1 (X3)、715.1 (X4)、731.2 (X5)、735.2 (X6) 和 745.2 (X7),选取相应保留时间响应最高的碎片离子作为子离子。结果见表 2,由结果可知, X1、X5~X7 均是丢失 1 分子丹参素 ($C_9H_{10}O_5$, m/z 198) 生成响应最高的二级碎片离子,而 X4 则是丢失 1 分子咖啡酸 ($C_9H_8O_4$, m/z 180) 生成响应最高的二级碎片离子。其中, X2 (紫草酸单甲酯) 和 X3 (紫草酸双甲酯) 也是丢失 1 分子丹参素 ($C_9H_{10}O_5$, m/z 198) 和甲酯化结构,形成丹酚酸类物质的骨架结构。以上结果也印证了“2.5”项对丹酚酸类物质定性的研究。

2.6.2 完善 MRM 模式的质谱参数 配制对照品丹酚酸 B 和紫草酸溶液各约 50 ng/mL,分别直接推入 Q-Trap-MS 的质谱中,各自筛选出最佳的 4 个参数去溶剂电压 (DP)、进口电压 (EP)、碰撞能电压 (CE) 和出口电压 (CXP) 的数值,并把紫草酸的 4 个参数数值直接应用到 X1~X3 的参数中,把丹酚酸 B 的 4 个参数数值直接应用到 X4~X7 中。结果见表 1。“2.5.1”项下已研究过,紫草酸会发生大量的源内裂解生成二级碎片 m/z 493,遂选 m/z 493 作为紫草酸 MRM 模式的母离子。各物质的谱图见图 3。

2.6.3 线性关系、检测限和定量限 精密吸取 3 μ L “2.1”项下系列质量浓度的对照品溶液,按“2.3.2”

表 2 丹参水提取物中 26 个化学成分

Table 2 Identification of 26 compounds from *S. miltiorrhiza* water extract

峰号	母离子	子离子	分子式	精确相对分子质量	误差/($\times 10^{-6}$)	t_R/min	鉴定结果	文献
1	137.021 5	109	C ₇ H ₆ O ₃	138.031 7	-17.5	3.03	原儿茶醛	24
2	179.037 2	135	C ₉ H ₈ O ₄	180.042 3	15.6	3.63	咖啡酸	24
3	197.046 7	179, 135	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.052 8	8.6	1.78	丹参素	25
4	313.074 6	269	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.079 0	10.9	4.68	丹酚酸 F	26
5	339.052 1	321, 295	C ₁₈ H ₁₂ O ₇	340.058 3	4.7	6.79	丹酚酸 G	27
6	359.079 8	179, 161	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360.084 5	8.6	8.53	迷迭香酸	28
7	417.085 6	373, 197, 175	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	418.090 0	8.2	6.94	丹酚酸 D	24
8	491.100 5	293	C ₂₆ H ₂₀ O ₁₀	492.105 6	5.5	14.09	丹酚酸 C	29
9	493.110 7	295	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	494.121 3	-5.7	11.56	丹酚酸 A	30
10	521.134 3	161, 323	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	522.455 4	9.2	5.94	X1	20
11	537.104 1	493, 295	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	538.111 1	1.5	5.35	丹酚酸 H/L	23
12	537.104 1	493, 295	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	538.111 1	1.5	5.74	丹酚酸 H/L	23
13	537.104 1	493, 295	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	538.111 1	1.5	9.12	紫草酸	28
14	551.113 6	293, 321	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₂	552.483 0	-9.8	13.04	X2	23
15	565.136 8	321, 293	C ₂₉ H ₂₆ O ₁₂	566.509 5	3.9	13.72	X3	23
16	715.129 9	535, 321	C ₃₆ H ₂₈ O ₁₆	716.597 9	0	13.43	X4	23
17	717.144 8	519, 321	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.153 4	-1.1	7.95	丹酚酸 E	24
18	717.144 8	519, 339, 321	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.153 4	-1.1	10.84	丹酚酸 B	31
19	717.144 8	519, 339, 321	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	718.153 4	-1.1	12.50	丹酚酸 Y	32
20	731.163 0	533, 353	C ₃₇ H ₃₂ O ₁₆	732.640 4	2.5	12.87	X5	23
21	735.157 5	537, 295	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₇	736.629 1	1.9	6.19	X6-1	23
22	735.157 5	537, 295	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₇	736.629 1	1.9	6.86	X6-2	23
23	735.157 5	537, 295	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₇	736.629 1	1.9	7.56	X6-3	23
24	745.173 3	547, 295	C ₃₈ H ₃₄ O ₁₆	746.667 0	-4.8	14.03	X7-1	23
25	745.173 3	547, 295	C ₃₈ H ₃₄ O ₁₆	746.667 0	-4.8	14.23	X7-2	23
26	745.173 3	547, 295	C ₃₈ H ₃₄ O ₁₆	746.667 0	-4.8	14.30	X7-3	23

表 3 紫草酸和丹酚酸 B 以及其各自同类物质的碎片信息

Table 3 Fragment information of lithospermic acid and salvianolic acid B and their respective substances

物质名称	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)
紫草酸	537.104 1	109.026 9、135.045 6、185.025 8、295.061 8、493.110 6
X1	521.134 3	135.045 6、161.022 9、179.031 3、197.040 5、323.075 4、359.071 5
X2	551.113 6	109.026 9、197.040 5、231.027 1、293.042 5、321.040 7、339.052 1、353.066 3、519.097 7
X3	565.136 8	109.026 9、197.040 5、245.046 7、293.042 5、321.040 7、339.052 1、367.079 0、519.087 6
丹酚酸 B	717.144 8	109.026 9、135.045 6、179.031 3、185.019 9、197.046 7、249.051 2、277.050 4、279.028 5、321.040 7、339.052 1、519.097 7
X4	715.129 9	135.045 6、179.031 3、185.019 9、197.046 7、267.064 9、279.028 5、293.042 5、321.040 7、339.052 1、491.100 5、519.087 6、535.087 1
X5	731.163 0	135.045 6、179.031 3、197.046 7、309.075 3、335.057 9、353.066 3、507.129 2、533.114 3、551.123 8
X6-1、X6-2、X6-3	735.157 5	185.019 9、269.043 1、295.061 8、321.040 7、339.052 1、357.058 7、493.110 6、519.097 7、537.104 1
X7-1、X7-2、X7-3	745.173 3	185.019 9、197.040 5、201.017 7、295.061 8、321.040 7、339.052 1、519.087 6、547.123 2

项和“2.4.2”项条件进样分析,以对照品的峰面积(Y)对相应的质量浓度(X)进行线性回归,得到回归方程、线性关系数和线性范围;以各化合物的

3 倍信噪比(S/N)相对应的质量浓度为最低检测限(LLOD),以各化合物的 10 倍 S/N 相对应的质量浓度为最低定量限(LLOQ)。结果见表 4。

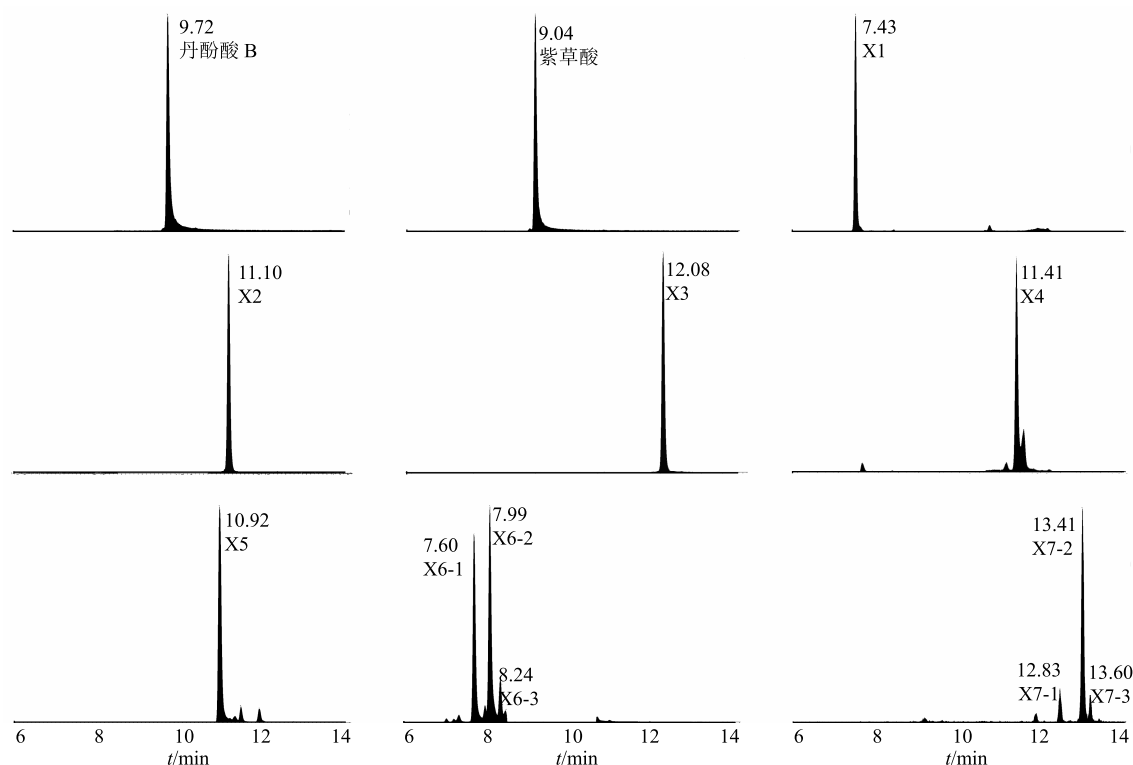


图 3 紫草酸、丹酚酸 B 与 X1~X7 的色谱图

Fig. 3 Mass spectrum of lithospermic acid, salvianolic acid B, and X1—X7

表 4 紫草酸和丹酚酸 B 的标准曲线

Table 4 Standard curves of lithospermic acid and salvianolic acid B

对照品	标准曲线	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	检测限/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
紫草酸	$Y=8\,433.2\,X-179\,436$	0.999 6	9.9~4 950.0	0.56	1.85
丹酚酸 B	$Y=9\,244.9\,X+365\,666$	0.997 6	9.1~4 550.0	0.23	0.78

2.6.4 精密度 精密度的测定分为日内精密度和日间精密度,并且测定了低、中、高 3 个质量浓度的精密度。

(1) 日内精密度:取“2.1”项下紫草酸对照品溶液(19.8、49.5、99 ng/mL)和丹酚酸 B 对照品(18.2、45.5、91 ng/mL),按“2.3.2”和“2.4.2”项条件进样分析,分别连续进样 5 针。结果见表 5。

(2) 日间精密度:取“2.1”项下紫草酸对照品溶液(19.8、49.5、99 ng/mL)和丹酚酸 B 对照品(18.2、45.5、91 ng/mL),按“2.3.2”和“2.4.2”项条件进样分析,分别每天进样 3 针,连续进样 3 d。结果见表 5。

2.6.5 重复性和加样回收率 平行配制同一批丹参水提取物样品(批号 20110503),约 5 μg/mL,共 6 份,按“2.3.2”和“2.4.2”项条件进样分析,以紫草酸计,峰面积 RSD 为 7.45%,保留时间 RSD 为 0.08%;以丹酚酸 B 计,峰面积 RSD 为 6.11%,保留时间 RSD 为 0.05%。

2.6.6 加样回收率 首先通过紫草酸的标准曲线计算丹参水提取物(批号 20110503)约 5 μg/mL 中的准确紫草酸的量,再分别在该溶液中加入 80%、100%和 120%量的紫草酸,按“2.3.2”和“2.4.2”项条件进样分析,最后计算溶液中紫草酸预测量与实际量的比值,加样回收率分别为 96.59%、97.65%

和 97.59%。

2.6.7 含量测定 取“2.2”项下 5 批丹参水提取物的供试品溶液,按“2.3.2”和“2.4.2”项条件进样分析,并将未知物的峰面积分别代入紫草酸和丹酚酸 B 的标准曲线里,计算未知物的含量。其中, X2 因含量太低,无法计算面积。结果见表 6。

3 讨论

3.1 色谱-质谱条件考察

丹参水提取物中多为水溶性成分,且绝大部分为酚酸类物质,在选用色谱柱的时候,因考虑到样品的特殊性,并参考其他的文献,最后选用 Acquity UPLC HSS T3 柱,展现了良好的分离效果。另外,

表 5 紫草酸和丹酚酸 B 3 种不同质量浓度的精密度

Table 5 Precision of three different concentrations of lithospermic acid and salvianolic acid B

成分	质量浓度/ (ng·mL ⁻¹)	日内精密度 (n = 5)		日间精密度 (n = 9)	
		峰面积 RSD/%	保留时间 RSD/%	峰面积 RSD/%	保留时间 RSD/%
紫草酸	19.8	3.16	0.09	9.38	0.18
	49.5	3.35	0.06	12.92	0.19
	99.0	1.58	0.06	12.57	0.20
丹酚酸 B	18.2	1.71	0.09	15.81	0.14
	45.5	1.79	0.05	3.79	0.18
	91.0	1.55	0.05	1.42	0.15

表 6 丹参水提取物中 11 种成分的含量测定

Table 6 Content determination of 11 components in *S. miltiorrhiza* water extracts

待测物	<i>t_R</i> /min	质量分数/(μg·g ⁻¹)				
		20100201	20110503	20111205	20111206	2014A02
X1	7.43	0.57	0.27	0.43	0.49	0.66
X2	11.10	—	—	—	—	—
X3	12.08	1.58	0.20	0.43	0.25	2.03
X4	11.41	1.41	0.82	1.50	1.77	0.58
X5	10.92	12.48	9.13	8.97	8.88	8.75
X6-1	7.60	1.04	1.40	2.44	2.44	2.36
X6-2	7.99	1.45	1.93	2.83	2.66	2.91
X6-3	8.24	0.21	0.37	0.45	0.37	0.50
X7-1	12.83	0.02	0.02	0.01	0.03	0.35
X7-2	13.41	0.86	1.03	0.81	0.89	2.87
X7-3	13.60	0.05	0.11	0.04	0.05	0.34
总含量	—	19.67	15.28	17.91	17.83	21.35

因大部分成分含有羧基,易脱 1 个氢离子,形成 [M-H]⁻,所以在用 Q-TOF-MS 进行分析的时候,选用负离子模式。

3.2 Q-TOF-MS 定性分析

在对丹参水提取物中的成分进行定性研究时,并未使用对照品,而是通过查阅文献和数据库的方式进行定性。先建立已报导的丹参的质谱谱库(包含母离子、子离子和保留时间),再比对质谱图中各

成分的碎片离子和保留时间,从而确定物质的结构。一定程度上节省了资源,也加快了定性分析的时间,更加方便后期对丹参更深入的研究。

3.3 Q-Trap-MS 半定量分析

丹参水提取物中包括同分异构体共 11 种未知成分的含量较低而丹酚酸 B 和紫草酸等成分含量特别高,使检测器达到饱和,遂使保留时间在 8.4~10.6 min 的成分(丹酚酸 B、紫草酸等)经色谱后

直接进入废液,而不进入质谱检测器。这样,提高 11 种待测物质量浓度的同时,也不会有过多的酚酸类的物质进入质谱,产生残留或影响检测器灵敏度。

通过 Q-Trap-MS 进行半定量的关键是要确保待测物质与对照品结构类型一致,这样产生的碎片离子类型才能相似或一致,使其响应接近;另外,需相对分子质量接近,将对照品的碰撞能 CE 等 4 个质谱参数应用到未知物的时候,才能使这些参数相对最优。同时,未知物的最佳母离子和子离子对也先通过 Q-TOF-MS 的 MS/MS 模式得到。半定量虽不能准确获得样品中未知物的含量,但对样品整体中物质的分布具有极为重要的意义,为无对照品或同时对多种成分的测定提供了新的途径。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 曾慧婷,宿树兰,朱悦,等. 丹参酚酸类成分生物合成途径及调控机制研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3324-3331.
- [3] 陈俞材,方莲花,杜冠华. 丹参水溶性化合物抗心肌缺血作用的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 162-165.
- [4] 任红微,于涛. 丹参多酚酸盐的研究进展及临床应用 [J]. 天津中医药大学学报, 2015, 34(1): 59-63.
- [5] 梁文仪,陈文静,杨光辉,等. 丹参酚酸类成分研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 806-812.
- [6] 赵国欣,孙浩冉,姚虹. 液质联用法测定不同形态丹参药品中 3 种水溶性成分含量 [J]. 中州大学学报, 2017, 34(2): 105-108.
- [7] 徐静瑶,刘小琳,佟玲,等. 注射用丹参多酚酸 UPLC 的指纹图谱与组分分析 [J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(2): 131-139.
- [8] 王洋,陈涛,潘霖,等. 液质联用技术在丹参成分分析中的应用 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3494-3502.
- [9] 赵洪芝,王静,姜民,等. 丹参总酚酸提取物 UPLC 指纹图谱及成分定性研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 620-622.
- [10] 孟繁磊,魏春雁,蔡红梅,等. ASE-UPLC-Q-TRAP-MS 技术筛查和确证分析土壤中 23 种除草剂残留 [J]. 农药, 2018, 57(7): 516-519.
- [11] 陈舒舒,石婧婧,邹立思,等. UFLC-Q-TRAP-MS/MS 同时测定五味子中木脂素及有机酸类成分 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(10): 2104-2111.
- [12] Wang L, Yao Z P, Li P, et al. Global detection and semi-quantification of *Fritillaria* alkaloids in *Fritillariae Ussuriensis Bulbus* by a non-targeted multiple reaction monitoring approach [J]. *J Separ Sci*, 2016, 39(2): 287-295.
- [13] Hao H, Cui N, Wang G, et al. Global detection and identification of nontarget components from herbal preparations by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry and a strategy [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(21): 8187-8194.
- [14] Zhou J L, Li P, Li H J, et al. Development and validation of a liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry method for relative and absolute quantification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1177(1): 126-137.
- [15] Zhou J L, Xin G Z, Shi Z Q, et al. Characterization and identification of steroidal alkaloids in *Fritillaria* species using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(45): 7109-7122.
- [16] Wang D, Jiang Y, Wu K, et al. Evaluation of antitumor property of extracts and steroidal alkaloids from the cultivated *Bulbus Fritillariae ussuriensis* and preliminary investigation of its mechanism of action [J]. *BMC Compl Alter Med*, 2015, 15(1): 29.
- [17] 梁文仪,袁永兵,陈文静,等. 一测多评技术在 3 种丹参制剂质量控制中的可行性分析 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4179-4185.
- [18] 陆兔林,石上梅,蔡宝昌,等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(12): 2525-2529.
- [19] 秦昆明,杨冰,胡静,等. 一测多评法在中药多组分质量控制中的应用现状与思考 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 725-731.
- [20] 程汉兴,孙爱华,王宇光,等. 多反应监测方法评估丹参和人参对大鼠肝药酶的调控作用 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3647-3655.
- [21] 王红蕾,齐崴,吴小东,等. 丹参水溶性多酚酸的多级串联电喷雾离子阱质谱断裂机理解析 [J]. 质谱学报, 2008(3): 129-136.
- [22] Lu Y, Foo L Y. Polyphenolics of *Salvia*—A review [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59(2): 117-140.
- [23] Sun W, Tong L, Miao J, et al. Separation and analysis of phenolic acids from *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by off-line two-dimensional hydrophilic interaction chromatography $\times$ reversed-phase liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1431: 79-88.
- [24] Ai C, Li L. Salvianolic acids D and E: Two new depsides from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Planta Med*, 1992, 58(2): 129-136.

- 197-199.
- [25] 陈政雄, 顾文华, 黄慧珠, 等. 丹参中水溶性酚性酸成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 1981(9): 24-25.
- [26] Ai C B, Li L N. Synthesis of tetramethyl salvianolic acid F and (±)-trimethyl przewalskinic acid A [J]. *Chin Chem Lett*, 1996, 7(5): 427-430.
- [27] Ai C B, Li L N. Salvianolic acid G, a caffeic acid dimer with novel tetracyclic skeleton [J]. *Chin Chem Lett*, 1991, 2: 17-18.
- [28] 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(6): 13-18.
- [29] Jiang R W, Lau K M, Hon P M, *et al.* Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12(2): 237-246.
- [30] Li L N, Tan R, Chen W M. Salvianolic acid A, a new depside from roots of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Planta Med*, 1984, 50(3): 227-228.
- [31] Ai C B, Li L N. Stereostructure of salvianolic acid B and isolation of salvianolic acid C from *Salvia miltiorrhiza* [J]. *J Nat Prods*, 1988, 51(1): 145-149.
- [32] Gong J, Ju A, Zhou D, *et al.* Salvianolic acid Y: A new protector of PC12 cells against hydrogen peroxide-induced injury from *Salvia officinalis* [J]. *Molecules*, 2015, 20(1): 683-692.