

心脉安的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 定性分析和 UHPLC-QTRAP-MS/MS 含量测定

张薇^{1,2}, 李楚源¹, 王德勤¹, 郭海彪¹, 孙晓波^{2*}, 徐科一^{1*}, 殷玮³

1. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 广州医药研究总院有限公司, 广东 广州 510240

摘要: 目的 应用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术分析心脉安中的化学成分, 同时建立一种快速同时测定心脉安中 15 种成分含量的 UHPLC-QTRAP-MS/MS 方法。方法 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相系统进行梯度洗脱, 采用加热电喷雾离子源 (HESI), 正、负离子模式下采集数据, 分析推定心脉安化学成分。并采用 Waters ACQUITY UPLC CSH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱, 电喷雾离子源 (ESI), 采用多反应监测模式 (MRM) 正负离子同时对心脉安中 15 个成分进行定量分析。结果 根据精确相对分子质量数据和多级质谱碎片离子, 结合对照品比对或文献报道, 共从心脉安中分析推定 109 个主要化学成分, 包括 31 个三萜类 (主要是三萜皂苷类)、25 个黄酮类、15 个苯丙素类、13 个甾体、9 个单萜类、7 个醌类、9 个其他类化合物。在优化的液相-质谱条件下, 人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷、芍药苷、芍药内酯苷、麦冬皂苷 D、鲁斯可皂苷元在测定浓度范围内线性关系良好 ($r \geq 0.995$), 平均加样回收率 ($n=6$) 为 91.8%~106.5%, RSD 为 1.9%~4.5%, 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 4.6%。结论 该研究基本阐明了心脉安的化学物质基础, 建立的 UHPLC-QTRAP-MS/MS 含量测定方法, 重复性和专属性好, 稳定可控, 可用于心脉安的质量控制。

关键词: 心脉安; UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; UHPLC-QTRAP-MS/MS; 三萜类; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rg₁; 丹参酮 I; 黄芪甲苷; 芍药苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)06-1743-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.006

Identification of chemical constituents of Xinmai'an by UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS and determination of its content by UHPLC-QTRAP-MS/MS

ZHANG Wei^{1,2}, LI Chu-yuan¹, WANG De-qin¹, GUO Hai-biao¹, SUN Xiao-bo², XU Ke-yi¹, YIN Wei³

1. Hutchison Whampoa Guangzhou Bai Yunshan Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

3. Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 510240, China

Abstract: Objective The UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS was developed for the identification of chemical constituents in Xinmai'an. and an UHPLC-QTRAP-MS/MS method was also established for rapid and simultaneous determination of the content of 15 components in Xinmai'an. **Methods** ACQUITY UHPLC HSS T3 chromatography column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) was used with 0.1% formic acid (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase in gradient elution. The data were collected by heated electrospray ion source (HESI) under positive and negative mode. Besides, Waters ACQUITY UPLC CSH C₁₈ chromatography column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used with 0.1% formic acid water (A)-acetonitrile (B) as mobile phase for gradient elution. Multiple reaction monitoring (MRM) in positive and negative ion mode by using electrospray ion source (ESI) was performed for

收稿日期: 2022-12-29

基金项目: 名优中成药产学研深度融合发展服务平台 (20212210006)

作者简介: 张薇 (1992—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及中药质量控制研究。E-mail: 751305770@qq.com

*通信作者: 孙晓波 (1958—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为心脑血管及糖尿病药理学。E-mail: sun-xiaobo@163.com

徐科一 (1965—), 男, 本科, 高级经济师, 研究方向为中药大健康。E-mail: 553555422@qq.com

quantitative analysis of 15 compounds in Xinmai'an. **Results** Based on the accurate mass measurements, mass fragmentation patterns combined with comparison of reference or literature reports, a total of 109 major compounds including 31 triterpenoids (mainly triterpene saponins), 25 flavonoids, 15 phenylpropanoids, 13 steroids, 9 monoterpenes, 7 quinones, and 9 other compounds were tentatively identified and speculated. Besides, under the optimized MS/MS condition, the linearity ranges of ginsenoside Re, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rb₂, ginsenoside Rc, ginsenoside Rd, danshensu, salvianolic acid B, tanshinone I, cryptotanshinone, tanshinone II_A, calycosin glucoside, astragaloside IV, paeoniflorin, albiflorin, ophiopogonin D, and ruscogenin were with good linearity ($r \geq 0.9958$). The average recovery rate of 15 compounds in the samples were in the range of 91.8%—106.5%, and the RSD range was from 1.9% to 4.5%. The RSD values of precision, stability and repeatability test were all less than 4.6%. **Conclusion** The results of this study clarified the chemical substance basis of Xinmai'an, and the method of UHPLC-QTRAP-MS/MS had good repeatability, high specificity, stability and controllability, which could be used for quality control of Xinmai'an.

Key words: Xinmai'an; UHPLC-Q Exactive-Orbitrap-MS; UHPLC-QTRAP-MS/MS; triterpenoids; ginsenoside Re; ginsenoside Rg₁; tanshinone I; astragaloside IV; paeoniflorin

心脉安片由人参、黄芪、丹参、赤芍、麦冬、冰片 6 味药组成，具有益气、养阴、活血定悸之功效，用于心悸气阴两虚兼心血瘀阻证（轻中度冠心病室性早搏）。现代药理研究表明心脉安片能使动作电位时程与有效不应期的比值 $APD_{90}/ERP < 1$ ，从而发挥其抗心律失常作用^[1]。心脉安片有明显对抗乌头碱、氯仿、氯化钡及结扎冠脉等所致心律失常的作用^[2]。多项临床试验证明心脉安片明显减少冠心病室性早搏患者室性早搏的次数，对气阴两虚兼心血瘀阻型冠心病所致室性早搏疗效确切，具有较好安全性^[3-5]。但其化学物质基础研究薄弱，目前执行的国家药品标准 YBZ12852004-2009Z 仅对丹参酮 II_A 和丹酚酸 B 进行含量测定，难以反映复方的整体特点，不利于心脉安片的全面质量控制和进一步深入研究。

UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 是一种快速、灵敏度高、分离能力高、准确的数据采集技术，被广泛应用于中药复杂化学成分的结构鉴定。刘坤等^[6]采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术鉴定树舌灵芝的化学成分。UHPLC-QTRAP-MS/MS 具有高选择性、高通量和高灵敏度的特点，可分离复杂中药化学成分，检测通量多，耗时短。Xu 等^[7]采用 UHPLC-QTRAP-MS/MS 技术同时测定枸杞 7 种单糖的含量。

本研究基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术，建立心脉安中主要化学成分的分析方法，结合精确相对分子质量数据、碎片离子和对照品比对等手段进行结构推定。并采用 UHPLC-QTRAP-MS/MS 技术，选取覆盖组方 5 个单味药的特征性成分以及活性成分（人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人

参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷、芍药苷、芍药内酯苷、麦冬皂苷 D、鲁斯可皂苷元）为指标成分，建立心脉安多指标成分含量测定方法，为心脉安质量标准的提升奠定一定的基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo Scientific™ Q Exactive™ 组合型四极杆-Orbitrap 质谱仪，美国 Thermo Scientific 公司；超高效液相色谱三重四极杆质谱联用（UHPLC-QTRAP-MS/MS）系统，包括 LC-30AD UHPLC 超高效液相色谱仪（含二元梯度泵-自动进样器-柱温箱），日本岛津公司；Sciex QTRAP 5500 三重四极杆质谱，美国 Sciex 公司；Milli-Q Reference 超纯水仪，美国 Millipore 公司；Secura 125-1CN 型电子天平，德国 Sartorius 公司；SIGMA 3-18KS 型冷冻离心机，美国 Sigma 公司；HYCD-205 型医用冷藏冷冻箱，海尔集团公司。

1.2 试剂

色谱级乙腈及色谱级甲醇，美国 Sigma-Aldrich 公司；色谱级甲酸，上海阿拉丁生化科技有限公司；超纯水来自超纯水机自制。

对照品人参皂苷 Rg₁（批号 110703-202034，质量分数 94.0%）、人参皂苷 Rb₂（批号 111715-201203，质量分数 93.8%）、人参皂苷 Rd（批号 111818-202104，质量分数 97.3%）、丹酚酸 B（批号 111562-201917，质量分数 96.6%）、丹参酮 I（批号 110867-201607，质量分数 96.5%）、隐丹参酮（批号 110852-201807，质量分数 99.0%）、丹参酮 II_A

(批号 110766-202022, 质量分数 98.9%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 111920-201907, 质量分数 96.8%)、黄芪甲苷(批号 110781-2021118, 质量分数 96.8%)、芍药苷(110736-202145, 质量分数 94.6%)、鲁斯可皂苷元(批号 111909-201906, 质量分数 98.0%)均购于中国食品药品检定研究院; 人参皂苷 Rc(批号 8799, 质量分数 98.0%)、丹参素(批号 7830, 质量分数 98.0%)、芍药内酯苷(批号 8409, 质量分数 90.5%)、麦冬皂苷 D(批号 9815, 质量分数 98.0%)均购于上海诗丹德标准技术服务有限公司; 人参皂苷 Re(批号 RSF-R02001906001, 质量分数 98.0%)、人参皂苷 Rb₁(批号 RSF-R01201907001, 质量分数 98.0%)均购于成都瑞芬思生物科技有限公司。

3批心脉安干膏粉(批号 21041401、21041402、21041403), 均由广州白云山和记黄埔中药有限公司现代中药研究院提供。

人参为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎; 丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎; 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Ege. var. *mongholicus* (Ege.) Hsiao 的干燥根; 赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根; 麦冬为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl. 的干燥块根。人参(批号 2011001)产地吉林, 购于北京同仁堂健康药业有限公司; 丹参(批号 2012001)产地山东, 购于广东天生药业有限公司; 黄芪(批号 2010001)产地甘肃, 购于北京同仁堂健康药业(福州)有限公司; 麦冬(批号 2011001)产地四川, 购于广东汇群药业有限公司; 赤芍(批号 2011001)产地内蒙古, 购于广东汇群药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 心脉安的 UHPLC-Q Exactive-Orbitrap-MS 定性分析

2.1.1 UHPLC 分析条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 自动进样器温度: 8.0 °C, 柱温 35 °C, 体积流量 0.4 mL/min; 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈溶液(B), 洗脱梯度: 0~0.5 min, 5% B; 0.5~11.0 min, 5%~95% B; 11.0~12.0 min, 95% B; 12.0~12.1 min, 95%~5% B; 12.1~15.0 min, 5% B; 进样量 3 μL。

2.1.2 质谱条件 Thermo Scientific™ Q Exactive™ 组合型四极杆-Orbitrap 质谱仪; 离子源: 加热电喷雾离子源(HESI); 扫描方式: 数据依赖性扫描(DDA)模式进行正、负离子全扫描; 扫描范围: m/z 100~1200。源参数: 喷雾电压: 3 000.00 V(+), -3 000.00 V(-); 离子传输管温度: 325.00 °C; 鞘气体积流量: 45.00 units; 辅助气体流量: 11.00 units(+), 11.25 units(-); 加热温度: 350.00 °C; S-Lens 电压: 50.00 V。

2.1.3 对照品溶液的制备 精密称取人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rb₂、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rd、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷、芍药苷、芍药内酯苷、麦冬皂苷 D、鲁斯可皂苷元对照品适量于样品瓶中, 加入相应体积的甲醇溶解, 制备成 1.00 mg/mL 的对照品储备溶液。

2.1.4 供试品溶液的制备 精密称取人参、丹参、黄芪、赤芍、麦冬药材粉末, 以及心脉安干膏粉各 200 mg, 置于 10 mL 离心管中, 精密加入 75% 甲醇 4 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 10 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液通过 0.22 μm 微孔滤膜, 取滤液, 即得供试品溶液。

2.1.5 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 成分推定 本研究利用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 对心脉安的化学成分进行定性分析。通过高分辨质谱及二级质谱的碎片离子推测化合物的结构式, 再结合文献进一步比对或与对照品比对, 共推定出 109 个化合物, 并对化合物的药材来源进行了归属。正离子下推定化合物 22 种, 负离子下推定化合物 87 种, 包括 31 个三萜类(主要是三萜皂苷类)、25 个黄酮类、15 个苯丙素类、13 个甾体、9 个单萜类、7 个醌类和 9 个其他类化合物, 三萜类和黄酮类化合物是心脉安中的主要成分。其中, 17 个成分可通过与对照品比较保留时间、一级质谱和多级质谱信息得到确证。其他化合物均利用质谱裂解规律, 同时参考文献中质谱碎片信息及裂解规律进行推定。结果见图 1 和表 1。

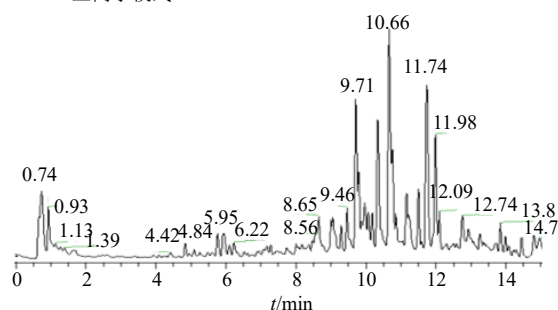
C21(保留时间为 7.71 min)的正离子图谱显示其加和分子离子峰为 $[M+HCOO]^-$ m/z 845.493 7, 确定分子式为 C₄₂H₇₂O₁₄, m/z 637.430 5 为脱去 1 分子葡萄糖形成, 475.379 9 为脱去 2 分子葡萄糖形成, 根据调研文献中人参皂苷类成分结构推测, 该化合

物为人参皂苷 Rf^[8]。

C38 (保留时间为 5.74 min) 的负离子图谱显示其分子离子峰为 $[M-H]^-$ m/z 493.114 7, 确定分子式为 $C_{26}H_{22}O_{10}$, 313.072 1 $[M-C_9H_8O_4]^-$, 295.061 6 $[M-C_9H_{10}O_5]^-$, 185.023 8 $[M-C_9H_{10}O_5-C_6H_6O_2]^-$ 等主要的碎片离子。根据调研文献中苯丙素类成分结构推测, 该化合物为丹酚酸 A^[12]。

C58 (保留时间为 6.09 min) 的正离子图谱显示其分子离子峰为 $[M+H]^+$ m/z 269.080 5, 确定分子式为 $C_{16}H_{12}O_4$, m/z 251.070 1 为脱去 1 分子水形成, m/z 223.074 9 为脱去 1 分子水和甲氧基。根据文献中黄酮类成分结构推测, 该化合物为芒柄花素^[16-17]。

正离子模式



C74 (保留时间为 3.86 min) 的负离子图谱显示其分子离子峰为 $[M-H]^-$ m/z 169.013 5, 确定分子式为 $C_7H_6O_5$, m/z 125.023 3 为断裂 1 分子 $[COO]^-$, 根据调研文献中没食子酸类成分结构推测, 该化合物为没食子酸^[20-22]。

C91 (保留时间为 7.19 min) 的负离子图谱显示其加和分子离子峰为 $[M+HCOO]^-$ m/z 387.108 9, 确定分子式为 $C_{19}H_{18}O_6$, m/z 341.109 2 为 $[M-H]^-$ 母离子峰, m/z 179.034 2 为苯基相连的六元环断裂羰基后形成的碎片, m/z 135.044 1 为苯并五元环碎片。根据调研文献中麦冬黄烷酮类成分结构推测, 该化合物为甲基麦冬黄烷酮 A^[23,25-26]。

负离子模式

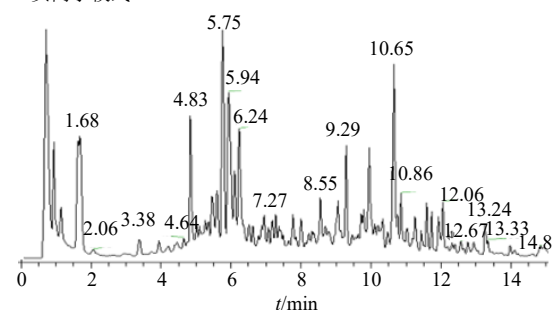


图 1 心脉安 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 的 TIC 图

Fig. 1 TIC chromatograms of UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS of Xinmai'an

表 1 心脉安正、负离子模式下的化合物推定及化合物归属

Table 1 Identification of chemical constituents from Xinmai'an in positive and negative ion mode

编号	化合物	电离方式	分子式	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	t_R /min	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	归属	参考文献
C1	floralginsenoside P	$[M+HCOO]^-$	$C_{53}H_{90}O_{23}$	1 139.584 9	1 139.585 9	6.27	0.878	1 093.583 1, 961.534 4, 637.433 4	人参	8
C2	人参皂苷 III	$[M+HCOO]^-$	$C_{48}H_{80}O_{19}$	1 005.527 0	1 005.533 9	6.29	6.862	959.524 7, 911.206 7, 797.467 2, 635.423 5	人参	8
C3	人参皂苷 F ₅	$[M+HCOO]^-$	$C_{41}H_{70}O_{13}$	815.479 3	815.482 4	6.36	3.801	769.476 3, 637.433 2, 475.378 6	人参	8
C4	三七皂苷 N	$[M+HCOO]^-$	$C_{48}H_{82}O_{19}$	1 007.542 7	1 007.547 1	6.50	4.367	961.540 4, 799.488 4, 637.435 1, 475.381 0	人参	8
C5	人参皂苷 Rg ₉	$[M+HCOO]^-$	$C_{42}H_{70}O_{13}$	827.479 3	827.483 3	6.71	4.834	781.475 3, 619.423 0	人参	8
C6	三七皂苷 R ₁	$[M+HCOO]^-$	$C_{47}H_{80}O_{18}$	977.532 1	977.533 1	6.87	1.023	931.529 9, 884.443 5, 475.377 3	人参	8-9
C7	人参皂苷 I/II	$[M-H]^-$	$C_{48}H_{82}O_{20}$	977.532 0	977.533 1	6.87	1.125	931.529 9, 884.443 5, 769.469 5, 475.377 3	人参	8
C8	人参皂苷 Rg ₁ [*]	$[M+HCOO]^-$	$C_{42}H_{72}O_{14}$	845.489 9	845.492 9	6.92	3.548	799.487 1, 637.433 5, 475.380 4, 391.284 5	人参	8
C9	人参皂苷 Rb ₁ [*]	$[M+HCOO]^-$	$C_{54}H_{92}O_{23}$	1 153.601 0	1 153.611 1	6.93	8.755	1 107.598 0, 945.544 7, 783.491 3, 459.382 9	人参	8-11

续表 1

编号	化合物	电离方式	分子式	理论值 (<i>m/z</i>)	实测值 (<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> /min	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	归属	参考文献
C10	malonyl-ginsenoside Rb ₁	[M-H] ⁻	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	1 193.595 4	1 193.601 3	6.99	4.943	1 149.610 1, 1 107.596 8, 1 089.589 7, 945.546 9	人参	8
C11	三七皂苷 R ₂	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	769.473 8	769.476 3	7.08	3.249	637.433 2, 475.379 8, 391.287 9	人参	8, 9
C12	人参皂苷 Rc/Rb ₂ [*]	[M+HCOO] ⁻	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 123.590 0	1 123.592 5	7.11	2.225	1 077.588 5, 915.539 0, 783.492 9	人参	8, 10
C13	malonyl-ginsenoside Rc/Rb ₂	[M-H] ⁻	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₅	1 163.584 9	1 163.590 2	7.16	4.555	1 119.598 9, 1 077.599 0, 927.528 7, 783.490 7	人参	8
C14	人参皂苷 Rg ₂	[M+HCOO] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.494 9	829.497 1	7.20	2.652	783.492 2, 637.435 9, 475.379 9, 391.285 7	人参	8, 10- 11
C15	人参皂苷 Ro	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	955.490 3	955.493 7	7.27	3.558	793.440 7, 469.385 4, 455.353 5	人参	8, 10- 11
C16	人参皂苷 Rh ₁ /F ₁	[M+HCOO] ⁻	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	683.437 0	683.439 6	7.30	3.804	637.435 1, 554.238 8, 475.380 7	人参	8-10
C17	人参皂苷 Re/Rd [*]	[M+HCOO] ⁻	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	991.549 7	991.550 8	7.51	1.109	945.545 2, 783.491 4, 621.438 8, 459.385 0	人参	8
C18	malonyl-ginsenoside Re	[M-H] ⁻	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	1 031.542 7	1 031.543 2	7.53	0.485	987.556 0, 945.545 1, 927.534 2, 621.444 0	人参	8
C19	pseudoginsenoside Rs ₁	[M-H] ⁻	C ₅₀ H ₈₄ O ₁₉	987.552 8	987.556 0	7.55	3.240	945.545 5, 927.534 5, 783.490 2, 621.436 5	人参	8
C20	chikusetsusaponin IVa	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	793.437 4	793.439 8	7.62	3.025	569.386 2, 455.354 0, 329.657 5	人参	8
C21	人参皂苷 Rf	[M+HCOO] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	845.489 9	845.493 7	7.71	4.494	799.487 0, 637.430 5, 475.379 9, 391.288 0	人参	8
C22	三七皂苷 Fe	[M+HCOO] ⁻	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	961.537 2	961.540 8	7.95	3.744	915.535 1, 753.483 5, 621.437 9, 375.291 3	人参	8
C23	人参皂苷 F ₂	[M+HCOO] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.494 9	829.492 4	8.51	-3.014	783.488 4, 695.973 4, 621.440 9	人参	8, 10- 11
C24	人参皂苷 Rg ₃	[M+HCOO] ⁻	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	829.494 9	829.497 3	8.94	2.893	783.492 1, 713.286 6, 621.439 8, 375.291 1	人参	8, 10- 11
C25	人参皂苷 Rs ₃	[M+HCOO] ⁻	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₄	871.505 5	871.508 5	8.97	3.442	825.502 7, 783.491 9, 765.481 6, 621.437 9	人参	8
C26	人参皂苷 F ₄	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.478 9	765.480 8	10.11	2.482	603.425 5, 490.150 0, 383.149 5	人参	8, 10
C27	香草醛	[M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₃	151.039 5	151.039 2	1.61	1.986	133.028 6, 123.044 1, 95.048 9, 81.033 4	丹参	
C28	咖啡酸	[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 4	179.034 3	1.71	-0.559	151.039 1, 135.044 1, 117.033 3, 107.049 0	丹参	12
C29	咖啡酰酒石酸	[M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	311.040 3	311.040 4	2.54	0.322	179.034 3, 149.008 2, 135.044 1	丹参	13
C30	原儿茶酸	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₄	153.018 8	153.018 4	4.25	-2.614	135.007 7, 118.552 1, 109.028 3, 92.000 1	丹参	12
C31	阿魏酸	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.050 1	193.050 1	4.46	0.000	178.026 4, 149.059 9, 134.036 3, 121.064 6,	丹参	14
C32	yunnaneic acid D	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₂	539.119 0	539.120 3	5.01	2.411	493.231 9, 341.066 3, 297.076 7, 179.034 2	丹参	15

续表 1

编号	化合物	电离方式	分子式	理论值 (<i>m/z</i>)	实测值 (<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> /min	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	归属	参考文献
C33	紫草酸	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	537.103 3	537.104 8	5.15	2.793	493.114 5, 295.061 4, 185.023 7, 109.028 3	丹参	12
C34	丹酚酸 D	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417.082 2	417.081 2	5.18	-2.398	373.093 2, 197.045 0, 175.039 3, 135.043 9	丹参	12
C35	异迷迭香酸苷	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	521.129 5	521.130 5	5.25	1.919	359.077 0, 323.077 6, 179.034 2, 161.023 5	丹参	15
C36	丹酚酸 B*	[M-H] ⁻	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	717.145 6	717.146 9	5.64	1.813	537.104 6, 519.093 8, 493.116 0, 321.040 7	丹参	12
C37	迷迭香酸	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.076 7	359.077 9	5.71	3.342	197.045 0, 179.034 2, 161.023 6, 135.044 1	丹参	12
C38	丹酚酸 A	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	493.113 5	493.114 7	5.74	2.434	313.072 1, 295.061 6, 185.023 8, 109.028 3	丹参	12
C39	丹参素*	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.045 0	197.045 4	5.92	2.030	179.034 2, 151.038 8, 135.044 1, 123.044 0	丹参	12
C40	原儿茶醛	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₃	137.023 9	137.023 3	5.96	-4.379	93.033 3, 85.649 7, 66.475 9	丹参	12
C41	3'- <i>O</i> -甲基丹酚酸 B	[M-H] ⁻	C ₃₇ H ₃₂ O ₁₆	731.161 2	731.163 1	6.31	2.599	551.118 5, 533.109 5, 353.067 3, 335.056 6	丹参	12
C42	甲基丹酚酸 I/H	[M-H] ⁻	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₂	551.118 9	551.120 1	6.33	2.177	519.093 4, 507.129 7, 353.067 1, 321.040 8	丹参	15
C43	丹酚酸 F	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313.071 2	313.072 2	6.36	3.194	269.082 4, 225.091 0, 197.096 5	丹参	12
C44	丹酚酸 C	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₀ O ₁₀	491.097 8	491.099 0	6.50	2.444	311.056 7, 293.046 1, 135.044 1	丹参	12
C45	新隐丹参酮	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	315.159 6	315.158 6	9.93	-3.173	297.148 1, 279.137 7, 251.142 4, 197.095 8	丹参	12
C46	丹参酮 I*	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₂ O ₃	277.086 5	277.085 6	10.22	-3.248	259.075 2, 249.090 8, 221.096 4, 193.100 9	丹参	12
C47	隐丹参酮*	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	297.149 1	297.147 8	10.30	-4.375	279.137 0, 251.142 9, 209.095 9	丹参	12
C48	二氢丹参酮 I	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	279.102 1	279.101 3	10.33	-2.866	261.090 6, 233.095 8, 205.101 1, 169.064 5	丹参	12
C49	丹参酮 II _B	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	311.128 3	311.127 4	10.42	-2.893	293.117 5, 267.137 5, 252.114 0	丹参	12
C50	丹参酮 II _A *	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	295.133 4	295.132 4	10.71	-3.388	277.121 6, 249.126 7, 225.127 2	丹参	12
C51	丹参新酮	[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	283.169 8	283.169 0	12.02	-2.825	265.158 9, 240.114 1, 223.111 7, 195.116 5	丹参	12
C52	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.129 1	447.128 5	5.12	-1.342	285.075 5, 270.052 2, 253.048 8, 137.023 3	黄芪	16-17
C53	calycosin-7- <i>O</i> -glc-6"- <i>O</i> -malonate	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃	533.129 5	533.129 0	5.59	-0.938	285.075 4, 270.051 8, 253.049 1, 137.022 8	黄芪	16
C54	pratensein 7- <i>O</i> -glucoside	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.124 0	463.123 2	5.63	-1.727	421.668 3, 301.070 4, 286.046 7, 241.049 2	黄芪	16
C55	calycosin-7- <i>O</i> -Glc-6"- <i>O</i> -acetate	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	489.139 7	489.139 2	5.95	-1.022	457.786 0, 285.075 5, 270.052 0, 253.048 7	黄芪	16
C56	芒柄花苷	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	431.134 2	431.132 5	6.04	-3.943	325.002 0, 269.080 7, 254.056 9, 213.091 0	黄芪	16-17
C57	pratensein-7- <i>O</i> -glucoside-6"- <i>O</i> -malonate	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₄	549.124 4	549.123 5	6.08	-1.639	463.120 7, 301.070 3, 286.047 0, 184.073 2	黄芪	16
C58	芒柄花素	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	269.081 4	269.080 5	6.09	-3.345	251.070 1, 223.074 9, 205.064 0, 154.025 4	黄芪	16-17

续表 1

编号	化合物	电离方式	分子式	理论值 (<i>m/z</i>)	实测 (<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> /min	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	归属	参考文献
C59	3-羟基-9,10-二甲氧基紫 檀烷	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	301.107 6	301.106 8	6.32	-2.657	269.079 5, 241.086 2, 191.070 1, 167.070 2	黄芪	16
C60	7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧 基异黄烷	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	303.123 2	303.122 4	6.43	-2.639	193.085 8, 167.070 1, 123.044 1, 105.070 5	黄芪	17
C61	黄芪异黄烷苷	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	465.176 1	465.176 1	6.46	0.000	303.122 7, 249.076 9, 167.070 2, 123.044 2	黄芪	18
C62	formononetin-7- <i>O</i> -Glc-6"- <i>O</i> -malonate	[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	517.134 6	517.134 3	6.46	-0.580	499.340 4, 269.080 6, 254.057 4, 137.022 3	黄芪	16
C63	毛蕊异黄酮	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.076 3	285.075 4	6.50	-3.157	270.052 0, 253.049 3, 225.054 1, 160.064 4	黄芪	16-17
C64	黄芪甲苷 IV*	[M+H] ⁺	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	785.468 7	785.470 9	6.88	2.801	717.501 5, 623.414 0, 455.351 6, 143.106 5	黄芪	13, 19
C65	formononetin-7- <i>O</i> -Glc-6"- <i>O</i> -acetate	[M+H] ⁺	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀	473.144 8	473.143 5	6.96	-2.748	440.491 1, 269.080 4, 254.057 2, 170.584 1	黄芪	16
C66	黄芪甲苷 VI	[M+HCOO] ⁻	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₉	991.511 4	991.514 6	7.15	3.227	945.508 9, 858.651 9, 783.456 3, 630.674 6	黄芪	13, 19
C67	5,7,4'-三羟基-3'-甲氧基异 黄酮	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.055 6	299.056 5	7.30	3.009	284.033 0, 256.037 0, 227.034 9, 195.796 1	黄芪	17
C68	乙酰黄芪皂苷 I	[M+HCOO] ⁻	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₇	955.490 3	955.493 3	7.90	3.140	697.549 1, 497.115 0, 435.113 6, 321.083 4	黄芪	13, 18
C69	黄芪甲苷 II	[M+HCOO] ⁻	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	871.469 1	871.471 7	8.32	2.983	825.465 9, 765.446 9, 495.035 0, 412.217 7	黄芪	17-18
C70	黄芪皂苷 I	[M+HCOO] ⁻	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	913.479 7	913.481 9	8.95	2.408	867.467 3, 825.469 6, 179.054 9	黄芪	17-18
C71	去苯甲酰基芍药苷	[M+HCOO] ⁻	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	421.134 6	421.135 3	1.08	1.662	375.130 2, 345.119 4, 213.076 5, 195.065 7	赤芍	20
C72	牡丹酮-1- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	[M+HCOO] ⁻	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	405.139 7	405.141 4	1.15	4.196	359.135 3, 197.081 3, 179.070 6	赤芍	20
C73	儿茶素	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289.071 2	289.072 3	3.84	3.805	245.082 3, 203.071 0, 149.023 5, 109.028 4	赤芍	20-22
C74	没食子酸	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₅	169.013 7	169.013 5	3.86	-1.183	125.023 3, 97.028 2, 69.033 3	赤芍	20-22
C75	没食子酰芍药苷	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	631.166 3	631.167 7	4.78	2.218	509.129 3, 313.057 1, 169.013 5, 121.028 4	赤芍	20-22
C76	羟基芍药苷	[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	495.150 3	495.151 8	4.82	3.029	449.147 6, 327.110 5, 165.054 8, 137.023 5	赤芍	20-22
C77	芍药苷*	[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	479.155 3	479.156 0	4.82	1.461	449.145 8, 327.109 1, 165.054 9, 121.028 4	赤芍	20-22
C78	没食子酸乙酯	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.045 0	197.045 1	5.02	0.507	169.013 5, 125.023 4, 111.007 6	赤芍	20
C79	四没食子酰葡萄糖	[M-H] ⁻	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787.099 4	787.102 1	5.04	3.430	635.091 1, 617.079 4, 465.067 7, 169.013 5	赤芍	20
C80	芍药内酯苷*	[M+HCOO] ⁻	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	525.160 8	525.162 1	5.22	2.475	479.155 9, 449.145 5, 327.108 8, 121.028 3	赤芍	20-22
C81	1,2,3,4,6-penta- <i>O</i> -galloyl-β- <i>D</i> -glucose	[M-H] ⁻	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.110 4	939.113 9	5.33	3.727	769.090 6, 617.080 0, 447.058 2, 169.013 5	赤芍	23
C82	苯甲酰羟基芍药苷	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₃	599.176 5	599.178 5	6.06	3.338	581.167 5, 431.135 1, 281.067 2, 137.023 5	赤芍	20-21
C83	芍药苷元	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	317.102 5	317.103 9	6.66	4.415	273.114 3, 248.033 5, 168.005 6, 151.002 8	赤芍	
C84	没食子酸甲酯	[M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₅	183.029 3	183.029 3	6.73	0.000	168.005 7, 140.010 7, 127.002 8, 112.984 4	赤芍	21

续表 1

编号	化合物	电离方式	分子式	理论值 (<i>m/z</i>)	实测 (<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> /min	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片	归属	参考文献
C85	没食子酸丁酯	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	225.076 3	225.076 9	6.75	2.666	207.102 2, 181.122 7, 168.005 2	赤芍	
C86	苯甲酰芍药苷	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	583.181 6	583.180 0	6.90	-2.744	553.172 3, 431.135 5, 165.054 8, 121.028 4	赤芍	20-22
C87	ophiofurospiside F	[M+HCOO] ⁻	C ₄₅ H ₇₄ O ₂₀	979.475 0	979.466 8	5.29	-8.372	933.472 5, 787.415 0, 607.349 4, 445.297 7	麦冬	23-24
C88	ophiofurospiside L	[M+HCOO] ⁻	C ₅₀ H ₈₂ O ₂₃	1 095.522 3	1 095.524 5	5.36	2.008	1 077.513 5, 861.351 9, 627.303 2, 467.213 7	麦冬	24
C89	ophiofurospiside I	[M-H] ⁻	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₄	1 079.527 4	1 079.531 0	5.56	3.335	917.477 0, 771.420 3, 591.356 2	麦冬	23-24
C90	ophiofurospiside K	[M-H] ⁻	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₃	1 063.532 5	1 063.535 6	5.99	2.915	901.483 4, 755.431 4, 593.371 0	麦冬	23-24
C91	甲基麦冬黄烷酮 A	[M+HCOO] ⁻	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	387.108 0	387.108 9	7.19	2.325	341.109 2, 320.475 3, 179.034 2, 135.044 1,	麦冬	23, 25-26
C92	麦冬皂苷 R	[M+HCOO] ⁻	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₅	815.406 5	815.409 2	7.58	3.311	769.403 4, 623.344 0, 443.281 4	麦冬	25
C93	麦冬黄烷酮 F	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	373.128 7	373.129 6	7.95	2.412	358.105 6, 254.042 7, 183.065 6, 168.041 9	麦冬	23
C94	14-hydroxy sprengerinin C	[M+HCOO] ⁻	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₇	915.459 0	915.462 0	8.00	3.277	869.455 8, 737.413 3, 591.353 1	麦冬	23
C95	鲁斯可皂苷元*	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	431.316 1	431.314 9	8.36	-2.782	413.304 0, 395.293 3, 346.646 9, 269.189 4	麦冬	
C96	甲基麦冬黄烷酮 B	[M+HCOO] ⁻	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	371.113 1	371.114 0	8.77	2.425	356.090 6, 341.067 1, 297.076 0, 161.023 4	麦冬	23
C97	麦冬黄烷酮 A	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	327.086 9	327.087 8	8.79	2.752	312.064 6, 236.032 8, 191.034 3, 123.043 8	麦冬	25-26
C98	麦冬黄烷酮 E	[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₂₀ O ₇	359.113 1	359.114 0	8.82	2.506	344.090 5, 169.049 8, 154.026 1	麦冬	25-26
C99	deacetyl ophiopojaponin A	[M+HCOO] ⁻	C ₄₆ H ₇₂ O ₁₈	957.469 5	957.470 6	9.05	1.149	911.466 2, 869.455 6, 851.444 5, 737.413 8	麦冬	23
C100	麦冬皂苷 D*	[M+HCOO] ⁻	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆	899.464 0	899.466 8	9.21	3.113	853.460 4, 835.443 5, 721.417 9, 575.358 6	麦冬	24
C101	麦冬黄烷酮 B	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	313.107 6	313.108 6	9.63	3.194	224.033 0, 192.042 1, 164.046 7, 135.007 4	麦冬	
C102	甲基麦冬黄烷酮 A	[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₁₆ O ₆	339.086 9	339.087 8	9.84	2.654	311.093 0, 217.049 9, 179.034 3	麦冬	23, 25
C103	麦冬皂苷 P/Q	[M+HCOO] ⁻	C ₄₆ H ₇₂ O ₁₇	941.474 6	941.477 7	9.95	3.293	895.471 7, 853.460 8, 721.417 8	麦冬	24
C104	麦冬皂苷 B	[M+HCOO] ⁻	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₂	767.421 8	767.422 9	10.02	1.433	721.418 3, 575.363 3, 424.027 9	麦冬	24
C105	麦冬皂苷 C	[M+HCOO] ⁻	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₈	931.453 9	931.448 4	10.02	-5.905	853.460 7, 721.423 0, 648.563 8	麦冬	24
C106	甲基麦冬黄烷酮 B	[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	327.124 2	327.123 2	10.35	3.057	238.047 8, 206.058 1, 178.062 9, 165.054 8	麦冬	23, 25-26
C107	麦冬黄烷酮 D	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	369.097 4	369.098 3	10.46	2.438	342.107 0, 219.029 5, 191.034 2, 164.010 1	麦冬	
C108	麦冬皂苷 A	[M+HCOO] ⁻	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₃	809.432 3	809.434 0	10.81	2.100	763.428 6, 721.418 3, 685.397 3, 575.354 3	麦冬	23
C109	麦冬黄烷酮 C	[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₁₆ O ₇	355.081 8	355.082 8	11.22	2.816	327.088 3, 307.062 7, 193.013 6, 164.047 4	麦冬	

*经过对照品验证的化学成分

* Chemical composition verified by reference

2.2 UHPLC-QTRAP-MS/MS 含量测定

2.2.1 UHPLC 分析条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC CSH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 35 °C, 体积流量 0.3 mL/min; 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-乙腈溶液 (B), 洗脱梯度: 0~0.3 min, 50% B; 0.3~1.2 min, 50%~95% B; 1.2~3.0 min, 95% B; 3.0~3.1 min, 95%~50% B; 3.1~4.0 min, 50% B; 进样量 3 μL。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 数据采集模式为多反应监测(MRM)模式正负离子同时检测。

喷雾电压: 5500 V (+), -4500 V (-); 雾化温度 500.0 °C; 气帘气: 137.9 kPa; 喷雾气: 206.84 kPa; 辅助加热气: 206.84 kPa; 去簇电压: 60.0 V; 入场电压: 10.0 V; 出场电压: 25.0 V。各定量成分的参数设定见表 2。17 种化合物的 MRM 色谱图见图 2。

2.2.3 供试品溶液的制备 取心脉安干膏粉约 50.0 mg, 精密称定, 置于 10 mL 离心管中, 加入 75% 甲醇 5.0 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 10 000 r/min 下离心 10 min, 取上清液通过 0.22 μm 微孔滤膜, 取滤液, 为使不同化合物稀释后能够在定量限之内,

表 2 15 种化合物的多反应监测模式信息

Table 2 MRM information of 15 analytes

成分	t _R /min	离子模式	离子对 (m/z)	碰撞能量/eV
人参皂苷 Re	0.35	ESI ⁻	945.6/637.4	-56
人参皂苷 Rg ₁	0.36	ESI ⁻	845.5/799.7	-34
人参皂苷 Rb ₁	0.37	ESI ⁻	1 107.7/945.5	-58
人参皂苷 Rd	0.41	ESI ⁻	945.6/621.6	-58
丹参素	0.40	ESI ⁻	197.0/135.0	-24
丹酚酸 B	0.78	ESI ⁻	717.3/320.7	-25
丹参酮 I	1.40	ESI ⁺	277.0/193.1	28
隐丹参酮	1.42	ESI ⁺	297.1/254.0	20
丹参酮 II _A	1.59	ESI ⁺	295.1/262.0	21
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.38	ESI ⁺	447.2/285.1	35
黄芪甲苷	0.44	ESI ⁺	785.4/143.1	81
芍药苷	0.38	ESI ⁺	525.1/449.3	25
芍药内酯苷	0.38	ESI ⁺	481.0/197.0	15
麦冬皂苷 D	0.83	ESI ⁻	853.4/721.4	-41
鲁斯可皂苷元	1.61	ESI ⁺	431.5/287.3	24

用 50%甲醇分别稀释 10、100、1000、10 000 倍, 即为供试品溶液。

2.2.4 对照品溶液的制备

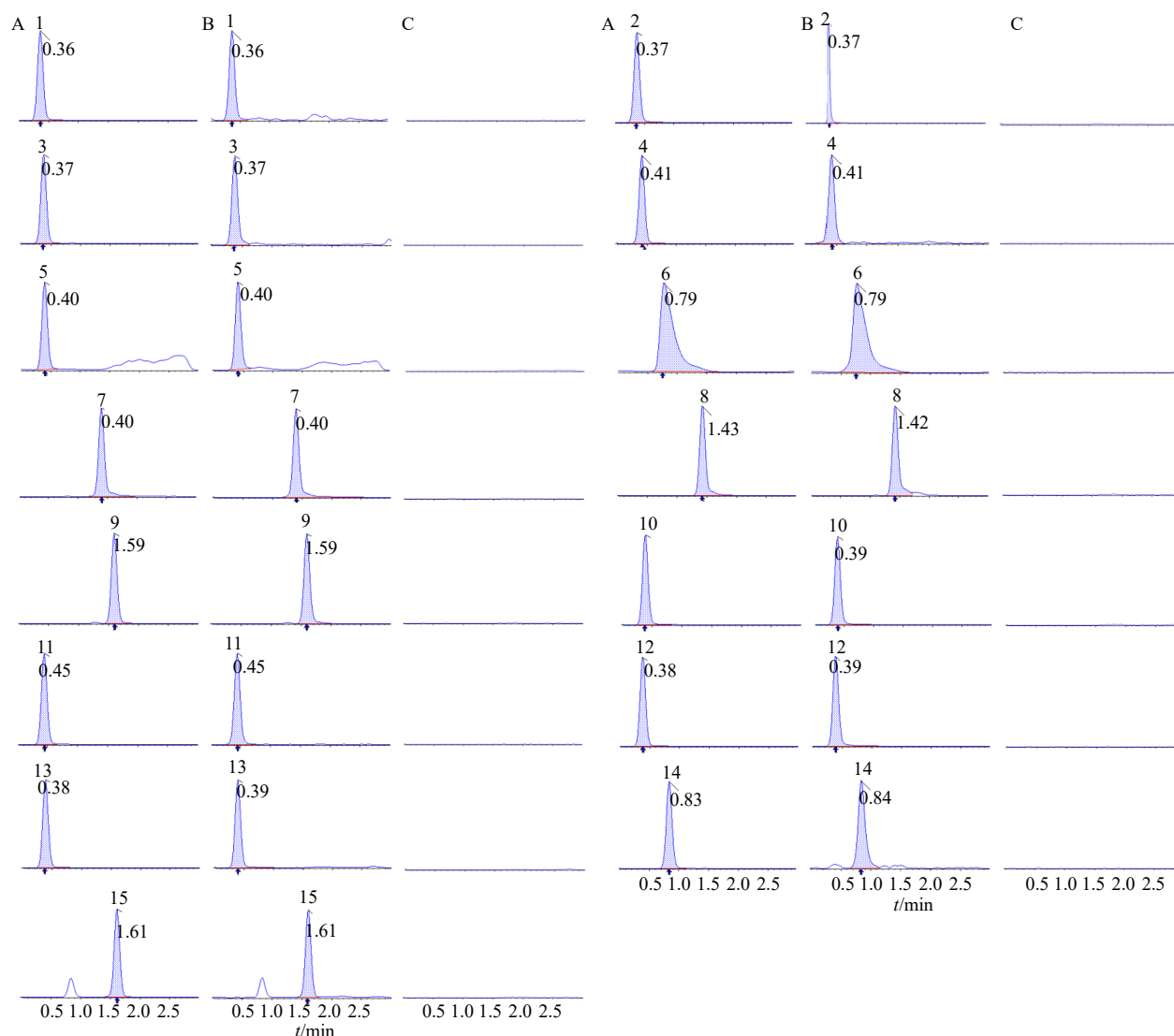
(1) 对照品储备液的制备: 精密称取人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、丹参素、丹酚酸 B、丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 II_A、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、黄芪甲苷、芍药苷、芍药内酯苷、麦冬皂苷 D、鲁斯可皂苷元对照品适量于样品瓶中, 加入相应体积的甲醇溶解, 制备成 1.00 mg/mL 的对照品储备溶液。

(2) 混合对照品溶液的制备: 精密吸取 15 种对照品溶液, 混合稀释, 配制成含人参皂苷 Re (10.0 μg/mL)、人参皂苷 Rg₁ (10.0 μg/mL)、人参皂苷 Rb₁ (10.0 μg/mL)、人参皂苷 Rb₂ (10.0 μg/mL)、

人参皂苷 Rc (10.0 μg/mL)、人参皂苷 Rd (10.0 μg/mL)、丹参素 (10.0 μg/mL)、丹酚酸 B (10.0 μg/mL)、丹参酮 I (1.00 μg/mL)、隐丹参酮 (0.200 μg/mL)、丹参酮 II_A (0.400 μg/mL)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (0.200 μg/mL)、黄芪甲苷 (2.00 μg/mL)、芍药苷 (1.00 μg/mL)、芍药内酯苷 (1.00 μg/mL)、麦冬皂苷 D (0.400 μg/mL)、鲁斯可皂苷元 (0.080 μg/mL) 的混合溶液, 用 50%甲醇依次稀释得一系列混合对照品溶液。

2.2.5 方法学考察

(1) 专属性考察: 分别取心脉安供试品溶液、混合对照品溶液以及空白溶液各 3 μL, 按“2.2.1”和“2.2.2”项下条件进行检测, 色谱图见图 2。实验结果表明, 各化合物所选峰之间无干扰, 方法专



1-人参皂苷 Re 2-人参皂苷 Rg₁ 3-人参皂苷 Rb₁ 4-人参皂苷 Rd 5-丹参素 6-丹酚酸 B 7-丹参酮 I 8-隐丹参酮 9-丹参酮 II_A 10-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 11-黄芪甲苷 12-芍药苷 13-芍药内酯苷 14-麦冬皂苷 D 15-鲁斯可皂苷元
1-ginsenoside Re 2-ginsenoside Rg₁ 3-ginsenoside Rb₁ 4-ginsenoside Rd 5-danshensu 6-salvianolic acid B 7-tanshinone I 8-cryptotanshinone 9-tanshinone II_A 10-calycosin glucoside 11-astragaloside IV 12-paeoniflorin 13-albiflorin 14-ophiopogonin D 15-ruscogenin

图 2 混合对照品溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和空白对照品溶液 (C) 的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of mixed standard solutions (A), test solution (B), and blank solution (C)

属性良好。

(2) 线性范围及定量限考察：精密量取“2.2.4”项下的混合对照品溶液，用 50% 甲醇进行逐级稀释，得到混合对照品溶液浓度的 1/20、1/25、1/50、1/100、1/200、1/500、1/1000、1/2000 倍的系列混合对照品溶液，稀释得系列混合对照品溶液，按“2.2.1”和“2.2.2”项下的 UHPLC-QTRAP-MS/MS 条件检测，以各对照品质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，对定量成分进行线性回归。结果表明 15 个定量成分在线性范围内线性良好 (表 3)，符合分

析测试要求。

(3) 重复性考察：按“2.2.3”项下方法平行制备 6 份心脉安供试品溶液，按“2.2.1”和“2.2.2”项下的 UHPLC-QTRAP-MS/MS 条件检测，随行当日标准曲线。记录峰面积响应值，根据标准曲线计算 15 种被测成分的含量的 RSD 值为 1.5%~4.4%。结果表明，各定量成分的重复性良好。

(4) 精密度考察：取高、中、低质量浓度的混合对照品溶液，分别按“2.2.1”和“2.2.2”项下分析测试条件连续进样 6 次，记录峰面积响应值。计

表 3 回归方程、线性范围考察结果
Table 3 Results of regression equations and linear ranges

化合物	回归方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	<i>r</i>
人参皂苷 Re	$Y=233.00 X-6.36$	5.00~500.00	0.998 6
人参皂苷 Rg ₁	$Y=6.98 \times 10^3 X-326.00$	5.00~500.00	0.999 2
人参皂苷 Rb ₁	$Y=181.00 X-475.00$	5.00~500.00	0.997 6
人参皂苷 Rd	$Y=279.00 X-211.00$	5.00~500.00	0.997 9
丹参素	$Y=173.00 X+841.00$	5.00~500.00	0.998 5
丹酚酸 B	$Y=219.00 X+75.80$	5.00~500.00	0.999 5
丹参酮 I	$Y=3.59 \times 10^4 X+4.51 \times 10^3$	0.50~50.00	0.999 1
隐丹参酮	$Y=4.26 \times 10^5 X+1.17 \times 10^3$	0.10~10.00	0.997 4
丹参酮 II _A	$Y=7.25 \times 10^4 X+486.00$	0.20~20.00	0.997 1
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y=5.47 \times 10^4 X+2.78 \times 10^3$	0.10~10.00	0.998 0
黄芪甲苷	$Y=3.70 \times 10^3 X-75.40$	1.00~100.00	0.997 8
芍药苷	$Y=1.73 \times 10^4 X-1.50 \times 10^3$	0.50~50.00	0.999 6
芍药内酯苷	$Y=7.06 \times 10^3 X+304$	0.50~50.00	0.996 7
麦冬皂苷 D	$Y=4.25 \times 10^3 X-69.60$	0.20~20.00	0.998 6
鲁斯可皂苷元	$Y=2.16 \times 10^4 X+288.00$	0.04~4.00	0.995 8

算 15 种被测成分峰面积的 RSD 值,考察日内精密度。连续操作 3 d,计算定量成分的峰面积及其 RSD 值,作为方法日间精密度。结果 15 种化合物的日内、日间精密度 RSD 均小于 4.6%。

(5) 加样回收率考察:取 25 mg 已知含量的心脉安干膏粉(S1)6 份,精密称定,加入与样品中各成分含量相近的混合对照品溶液,按“2.2.3”项下方法处理得到待测供试品溶液,供试品溶液按照“2.2.1”和“2.2.2”项下定量测试条件进样分析,利用当日随行的标准曲线计算各定量成分的含量,15 个定量成分的平均回收率分别为 103.4%、106.5%、105.1%、94.8%、95.3%、102.5%、103.1%、103.8%、97.6%、93.5%、94.9%、92.6%、91.8%、94.7%、94.4%,RSD 值分别为 3.5%、4.3%、3.2%、3.4%、3.7%、2.7%、2.5%、1.9%、3.6%、2.7%、4.5%、3.7%、3.8%、4.1%、2.8%。结果 15 个化合物的加样回收率为 91.8%~107.8%,RSD 值小于 4.5%,表明该方法准确度满足测试要求。

(6) 稳定性考察:按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,在 4 ℃放置 0、4、8、24 h 后,按“2.2.1”和“2.2.2”项下方法对 15 种成分进行测定,记录峰面积响应值,计算 RSD 值为 1.5%~4.6%。

2.2.6 样品定量测定 取待测样品,按照“2.2.3”

项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”和“2.2.2”项下方法测定并计算各待测组分的量,结果见表 4。

3 讨论

3.1 心脉安的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 定性分析

本研究首次采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术对心脉安中化学成分进行分析,同时采用正、负离子 2 种扫描模式,通过结构信息互补,较为全面地推定心脉安的主要化学成分。其中,黄酮类在正、负离子扫描模式下有较好响应;三萜皂苷、苯丙素类化合物在负离子扫描模式下有较好响应;醌类化合物在正离子模式下有较强的响应,在负离子模式下则响应较弱。实现了心脉安中 109 个化合物的快速辨识,所推测和鉴定的化合物中涵盖了 31 个三萜类、25 个黄酮类、15 个苯丙素类、13 个甾体、9 个单萜类、7 个醌类、9 个其他类化合物,为心脉安中化学成分的定性分析提供一种高效、快速的分析方法。为心脉安后续的入血实验研究和关键成分定量控制提供了理论基础。

3.2 UHPLC-QTRAP-MS/MS 含量测定

3.2.1 检测方法的选择 心脉安中皂苷类成分没有紫外吸收,采用紫外或二极管阵列检测器时只能在末端吸收波长下进行检测,由于多数成分含量较

表 4 心脉安中 15 种化学成分定量测定结果

Table 4 Content of 15 analytes in Xinmai'an

成分	质量分数/(mg·g ⁻¹)		
	21041401	21041402	21041403
人参皂苷 Re	0.367 0±0.036 3	0.378 0±0.020 6	0.362 0±0.032 5
人参皂苷 Rg ₁	0.727 0±0.063 9	0.734 0±0.072 8	0.704 0±0.056 3
人参皂苷 Rb ₁	0.533 0±0.035 0	0.522 0±0.028 1	0.548 0±0.012 8
人参皂苷 Rd	0.232 0±0.020 2	0.225 0±0.016 9	0.234 0±0.038 7
丹参素	9.610 0±0.844 0	9.890 0±0.711 0	9.430 0±0.754 0
丹酚酸 B	42.700 0±2.810 0	41.800 0±2.610 0	43.500 0±2.250 0
丹参酮 I	2.440 0±0.285 0	2.530 0±0.213 0	2.570 0±0.304 0
丹参酮 II _A	5.300 0±0.465 3	5.274 0±0.543 8	5.413 0±0.487 6
隐丹参酮	3.920 0±0.453 0	4.130 0±0.429 0	4.050 0±0.334 0
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	0.387 0±0.025 5	0.383 0±0.020 6	0.398 0±0.023 8
黄芪甲苷	0.071 3±0.003 9	0.072 7±0.002 7	0.069 5±0.003 5
芍药苷	6.010 0±0.493 0	6.120 0±0.732 0	5.880 0±0.645 0
芍药内酯苷	0.147 0±0.011 2	0.149 0±0.009 4	0.142 0±0.009 9
麦冬皂苷 D	0.012 3±0.001 2	0.012 3±0.001 1	0.012 6±0.001 0
鲁斯可皂苷元	0.002 8±0.000 2	0.002 8±0.000 2	0.002 7±0.000 2

低,基线干扰大,因此选择了质谱检测器,以 MRM 方式进行测定,可以避免其他成分的干扰,专属性强,可准确用于心脉安样品的测定,有效地提高心脉安片的质量控制水平。

3.2.2 色谱条件的优化 心脉安中 15 种成分完全色谱分离较难,分别试用了不同的流动相组合(甲醇、乙腈和水)及添加不同的电解质(甲酸及乙酸),结果表明仅有 0.1%甲酸水溶液-乙腈作为流动相进行梯度洗脱,15 种成分的色谱峰峰形好,响应值稳定,分析时间短,且无其他干扰。

3.2.3 指标性成分的选择 基于本研究采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术对心脉安全方进行检识分析,共检识得到 109 个化学成分;对文献报道心脉安中主要成分研究进展剖析发现,心脉安中含有大量具有心血管保护作用的成分,如人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rg₁、黄芪甲苷、丹参酮 II_A、丹酚酸 B、芍药苷、芍药内酯苷、麦冬皂苷 D 等^[27-34];《中国药典》2020 年版规定各单味药质控指标性成分。综上,选择 15 个涵盖 5 个组方药味代表性结构类型的成分作为指标成分。

3.2.4 含量测定结果分析 本研究采用 UHPLC-QTRAP-MS/MS 技术建立心脉安多指标成

分含量测定研究方法,同时进一步考察这些成分在 3 批次产品中的含量变化,样品检测结果显示批次间产品含量差异较小,表明样品质量较好且相对稳定,为建立现代化心脉安质量标准提供科学依据。

3.3 小结

本实验运用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术对心脉安进行了全面系统地解析,为进一步开展心脉安全全面质量控制研究、药效及安全性评价提供了物质基础支撑。建立的 UHPLC-QTRAP-MS/MS 含量测定方法可在 4 min 内同时测定心脉安中 15 种成分,该方法样品处理简单、分析时间短、灵敏度高、专属性好、结果准确可靠,重复性好,对于心脉安的质量控制及后续研究具有重要意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 许实波,项辉,李锐.中成药结代停对豚鼠心肌细胞动作电位的影响[J].中山大学学报论丛,1994(6): 115-117.
- [2] 李锐,廖惠芳,廖习珍,等.结代停药效学研究[J].中药药理与临床,1997,13(1): 30-34.
- [3] 李玉峰,鲁卫星.心脉安片治疗冠心病室性早搏 40 例

- 临床观察 [J]. 北京中医药大学学报, 2003, 26(3): 67-69.
- [4] 邱晓军, 邓国忠. 心脉安片治疗冠心病室性早搏 40 例疗效观察 [J]. 成都中医药大学学报, 2003, 26(1): 23-25.
- [5] 邵雪松. 心脉安片治疗冠心病室性早搏临床观察 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(9): 183-185.
- [6] 刘坤, 殷九一, 程华, 等. UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 整合网络药理学探讨树舌灵芝有效成分及其防治新型冠状病毒肺炎的可行性 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(2): 267-274.
- [7] Xu J, Wang R, Liu J L, *et al.* Determination of monosaccharides in *Lycium barbarum* fruit polysaccharide by an efficient UHPLC-QTRAP-MS/MS method [J]. *Phytochem Anal*, 2021, 32(5): 785-793.
- [8] Shi J J, Cai Z C, Chen S Y, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of saponins in the flower bud of *Panax ginseng* (Ginseng Flos) by UFLC-Triple TOF-MS/MS and UFLC-QTRAP-MS/MS [J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(3): 287-296.
- [9] Huang X, Liu Y, Zhang N, *et al.* UPLC orbitrap HRMS analysis of *Panax quinquefolium* L. for authentication of *Panax* genus with chemometric methods [J]. *J Chromatogr Sci*, 2018, 56(1): 25-35.
- [10] Li S L, Lai S F, Song J Z, *et al.* Decocting-induced chemical transformations and global quality of Du-Shen-Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC-Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(4): 946-957.
- [11] Wu W, Lu Z Y, Teng Y R, *et al.* Structural characterization of ginsenosides from flower buds of *Panax ginseng* by RRLC-Q-TOF MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(2): 136-143.
- [12] Yang S T, Wu X, Rui W, *et al.* UPLC/Q-TOF-MS analysis for identification of hydrophilic phenolics and lipophilic diterpenoids from *Radix Salviae Miltiorrhizae* [J]. *Acta Chromatogr*, 2015, 27(4): 711-728.
- [13] 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.
- [14] 张亦琳, 潘高, 延永, 等. ESI-Q-TOF-MS 直接进样法比较陕西五个不同地区丹参的化学成分差异 [J]. 广西植物, 2019, 39(4): 490-498.
- [15] Xia L, Liu H L, Li P, *et al.* Rapid and sensitive analysis of multiple bioactive constituents in Compound Danshen Preparations using LC-ESI-TOF-MS [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(18): 3156-3169.
- [16] Zhang J, Xu X J, Xu W, *et al.* Rapid characterization and identification of flavonoids in *Radix astragali* by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(6): 945-952.
- [17] 施怀生, 毕小凤, 史宪海. UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用分析黄芪根及其茎叶中黄酮和皂苷类成分 [J]. 世界中西医结合杂志, 2018, 13(3): 357-361.
- [18] 信悦, 白晶. 复方黄芪生脉饮化学成分的分析 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2021, 37(1): 21-25.
- [19] Liu Q F, Jiao Z, Liu Y, *et al.* Chemical profiling of San-Huang Decoction by UPLC-ESI-Q-TOF-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 131: 20-32.
- [20] 刘杰, 陈琳, 范彩荣, 等. 基于 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 的白芍和赤芍主要成分定性定量研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1762-1770.
- [21] 周海玲, 许舜军, 周若龙, 等. 白芍、赤芍化学成分的高效液相色谱-飞行时间串联质谱分析 [J]. 中药材, 2018, 41(7): 1637-1640.
- [22] Liu E H, Qi L W, Peng Y B, *et al.* Rapid separation and identification of 54 major constituents in Buyang Huanwu Decoction by ultra-fast HPLC system coupled with DAD-TOF/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(8): 828-842.
- [23] Lyu C G, Kang C Z, Kang L P, *et al.* Structural characterization and discrimination of *Ophiopogon japonicas* (Liliaceae) from different geographical origins based on metabolite profiling analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 185: 113212.
- [24] 晏仁义, 马凤霞, 余河水, 等. UPLC-Q-TOF-MS^E 结合相对保留时间在线快速鉴定麦冬中甾体皂苷类成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(24): 43-50.
- [25] Liu C H, Jin Q, Zhou D Z, *et al.* Influence of ultrafiltration membrane on ophiopogonins and homoisoflavonoids in *Ophiopogon japonicus* as measured by ultra-fast liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass spectrometry [J]. *Chin J Nat Med*, 2017, 15(2): 121-141.
- [26] 王子健, 刘颖, 刘思焱, 等. UPLC-HRMSⁿ 结合高能诱导裂解快速鉴定麦冬中高异黄酮类成分 [J]. 质谱学报, 2016, 37(6): 481-491.
- [27] 刘岩, 赵世萍, 董晞, 等. 甘草苷及人参皂苷对乌头碱导致心肌细胞离子通道 mRNA 表达变化的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(5): 359-361.

- [28] 王浩, 邹茜. 人参皂苷 Rg₁ 调节沉默信息调节因子 1 对抗晶状体上皮细胞衰老的影响 [J]. 世界中医药, 2021, 16(7): 1095-1098.
- [29] Lu C, Sun Z J, Wang L. Inhibition of L-type Ca²⁺ current by ginsenoside Rd in rat ventricular myocytes [J]. *J Ginseng Res*, 2015, 39(2): 169-177.
- [30] 曹瑀莹, 杜丙秀, 李劲恒, 等. 人参皂苷 Re 对异丙肾上腺素诱导离体灌流大鼠心脏心律失常的调节作用 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6234-6244.
- [31] 郑鹏, 王俊帅, 占大钱, 等. 丹参酮 II_A 通过 NLRP3/Caspase-1 信号通路对心肌纤维细胞的保护作用 [J]. 世界中医药, 2021, 16(6): 916-919.
- [32] 龚奥娣, 孙敬和. 黄芪甲苷对心肌缺血心律失常大鼠模型 Ca²⁺ 浓度影响初步研究 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(8): 11-12.
- [33] 李凤. 芍药苷预处理对大鼠缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡及自噬的调控作用 [D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [34] 王佳. 麦冬皂苷 D 诱导 CYP2J3 增强 SERCA2a/PLB 相互作用的分子机制 [D]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- [责任编辑 王文倩]