

HPLC-TOF/MS 分析丹参酒炙前后化学成分的变化

吴鹏¹, 李慧芬^{1*}, 张学兰¹, 崔伟亮², 蒋海强¹, 孟艳¹, 王均秀¹

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

[摘要] 目的:采用高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术(HPLC-TOF/MS)分析丹参酒炙前后主要化学成分的变化,为揭示丹参炮制原理及制定丹参饮片的质量标准提供参考。方法:HPLC 分离采用 Halo[®] C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~3 min,0%~10% A;3~8 min,10%~40% A;8~25 min,40%~70% A;25~36 min,70%~100% A),流速 0.25 mL·min⁻¹;质谱定性采用飞行时间质谱,ESI 离子源,正离子模式下扫描,采用对照品定位、质谱数据、数据库匹配和文献参照对各离子峰进行归属,通过丹参酒炙前后离子峰数目和峰面积的比较,研究其化学成分变化。结果:生丹参和酒丹参中分别推测出中 16,14 种化合物。丹参酒炙后,紫草酸或丹酚酸 H,丹参酮 II_B 色谱峰消失,隐丹参酮、丹参新醌乙、丹参酮 II_A 和丹参新醌的峰面积显著降低,二氢丹参酮 I 和丹参酮 I 的峰面积增加。结论:丹参酒炙后化学成分的种类和含量变化显著,部分丹参酮类和丹酚酸类成分产生质变或量变,推测丹参酒炙后活血祛瘀作用增强与所含成分转化成体内更易吸收的活性成分有关。

[关键词] 丹参; 酒炙品; 丹酚酸类; 丹参酮类; 丹参新醌; 高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术

[中图分类号] R283.1;R283.2;R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0006-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110006

Changes of Chemical Components in Raw and Processed Products of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* by HPLC-TOF/MS

WU Peng¹, LI Hui-fen^{1*}, ZHANG Xue-lan¹, CUI Wei-liang²,
JIANG Hai-qiang¹, MENG Yan¹, WANG Jun-xiu¹

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;
2. Shandong Institute for Food and Drug Control, Ji'nan 250101, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the chemical components in raw and processed products of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* by high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS). **Method:** Separation was performed on a Halo[®] C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 2.7 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid water with gradient elution. TOF-MS with electrospray ionization (ESI) ion source was applied for qualitative analysis under positive ion mode. Combining with standard reference positioning, MS data, literatures and database matching, ion peak number and peak area of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* before and after being processed were compared. **Result:** Sixteen components and fourteen components were obtained from raw and processed *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, respectively. After being processed with wine, the peaks of lithospermic acid or salvianolic acid H and tanshinone II_B were disappeared. Peak areas of cryptotanshinone, neotanshinone B, tanshinone II_A and miltirone decreased significantly. Peak areas of dihydrotanshinone I and tanshinone I increased. **Conclusion:** Changes of type and content of chemical components in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* are remarkable after being processed with

[收稿日期] 20150603(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503251);2015年山东省高校科技计划项目(J15LM05);2015-2016年度山东省中医药发展计划项目(2015-020);国家公共卫生专项——中药炮制技术传承基地建设(2015)

[第一作者] 吴鹏,在读硕士,从事中药新药研发与中药炮制原理研究,E-mail:935369647@qq.com

[通讯作者] *李慧芬,博士,讲师,从事中药新药研发与中药炮制原理研究,E-mail:lhfen007@126.com

wine, part of tanshinones and salvianolic acids have qualitative and quantitative change. It speculates that enhance of blood stasis is related to chemical components of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* transformed into the active components which can be absorbed easily.

[Key words] *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; processed products with wine; tanshinones; salvianolic acids; miltirone; HPLC-TOF/MS

丹参具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痈之功效^[1],其主要含有水溶性酚酸类和脂溶性二萜醌类活性成分。水溶性成分主要包括丹酚酸 A、B、C、D、E、G 及丹参素、原儿茶醛、迷迭香酸等,具有抗氧化、抗凝血、抗血栓、抗心肌缺血等作用,是丹参活血祛瘀的主要活性成分;脂溶性成分主要包括丹参酮 II_A,丹参酮 II_B,隐丹参酮,丹参酮 I,丹参酮 V 等,具有改善血液循环、抑制血小板聚集、提高耐缺氧能力、改善冠状动脉供血等药理作用^[2-5]。2015 年版《中国药典》收录了丹参和酒丹参 2 种饮片规格。丹参酒炙后寒凉之性缓和,活血祛瘀、调经止痛之功增强^[6]。但迄今丹参酒炙前后化学成分的变化未见系统研究,丹参酒炙增强活血祛瘀药效的物质基础尚不明确,炮制机制亦尚未阐明,影响了酒丹参炮制工艺的规范化、质量标准的科学化及临床药效的重复性。本实验采用 HPLC-TOF/MS 技术分析丹参酒炙前后化学成分变化,为揭示丹参炮制原理及制定丹参饮片的质量标准提供参考和依据。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪和 6230 型 TOF LC/MS 联用仪(美国 Agilent 公司)。丹酚酸 B,隐丹参酮,丹参酮 I,丹参酮 II_A 对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 111562-200403,0852-9601,0867-200205,110766200416,纯度均 ≥98%),乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,水为自制超纯水,其余试剂均为分析纯。丹参饮片购自山东百味堂中药饮片有限公司,经山东中医药大学中药鉴定教研室李峰教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* 干燥根和根茎切制成的厚片;酒丹参(自制,按 2015 年版《中国药典》酒丹参炮制项下规定炮制)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备 精密称取丹酚酸 B,隐丹参酮,丹参酮 I,丹参酮 II_A 对照品适量,分别置于 1 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,分别制成 1.07,1.00,1.11,0.72 g·L⁻¹ 的对照品溶液。分别精密吸取上述 4 种对照品溶液 0.01 mL 置同一量瓶中,加甲醇稀释至 1 mL,摇匀,得质量浓度分别为 10.7,10.0,11.1,7.2 mg·L⁻¹ 的混合溶液。

2.2 供试品溶液的制备 分别精密称取各样品粉末(过 40 目筛)0.5 g,加入 80% 甲醇 20 mL,称定质量,超声提取 30 min,放冷,补足失重,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,精密吸取上清液 1 mL 于 10 mL 量瓶中,加 80% 甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.3 液相色谱-质谱联用分析条件

2.3.1 色谱条件 Halo® C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,2.7 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~3 min,0%~10% A;3~8 min,10%~40% A;8~25 min,40%~70% A;25~36 min,70%~100% A),进样量 2 μL,流速 0.25 mL·min⁻¹,柱温 35 ℃。

2.3.2 质谱条件 在 HPLC-TOF/MS 正离子模式下采集数据,离子源为电喷雾电离源(ESI),干燥气量 11 L·min⁻¹,雾化器压力 241.3 kPa,质谱扫描范围 *m/z* 50~1 000,干燥气温 350 ℃。

2.4 丹参中化学成分数据库的建立 根据丹参药材化学成分研究文献[4,7-9],收集了 52 种水溶性和脂溶性成分的信息,并建立相应的化学成分数据库。

2.5 样品成分分析 精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 2 μL,按 2.3 项下分析条件进行检测。根据混合对照品、丹参生品和酒炙品 HPLC-TOF/MS 正离子模式下获得的分子离子峰质谱数据,分析并推测出生丹参中 16 种化合物,酒丹参中 14 种化合物,结果见表 1 和图 1。

2.5.1 根据对照品定位和质谱数据分析 2 号峰(*t_R* 11.382 min)获得的分子离子峰经数据库匹配,分子式为 C₃₆H₃₀O₁₆,其保留时间和质谱行为与丹酚酸 B 对照品一致,据此推断为丹酚酸 B。8 号峰(*t_R* 20.335 min)获得的分子离子峰经数据库匹配,分子式为 C₁₉H₂₀O₃,其保留时间和质谱行为与隐丹参酮对照品一致,据此推断为隐丹参酮。11 号峰(*t_R* 24.187 min)获得的分子离子峰经数据库匹配,分子式为 C₁₈H₁₂O₃,其保留时间和质谱行为与丹参酮 I 对照品一致,据此推断为丹参酮 I。15 号峰(*t_R* 28.038 min)获得的分子离子峰经数据库匹配,分子式为 C₁₉H₁₈O₃,其保留时间和质谱行为与丹参酮 II_A

表 1 丹参生制品中化学成分的 HPLC-TOF/MS 分析

Table 1 HPLC-TOF/MS analysis of chemical components in raw and processed products of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*

峰号	t_R /min	分子离子峰			m/z			分子式	推测结果	酒炙后峰 面积变化
		$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+K]^+$	理论值	实测值	偏差/ppm			
1	11.082	539.120 4	561.098 3	577.073 1	538.111 1	538.110 7	0.743 5	$C_{27}H_{22}O_{12}$	紫草酸或丹酚酸 H	消失
2	11.382	719.159 4	741.141 8	757.108 3	718.153 4	718.148 8	6.406 7	$C_{36}H_{30}O_{16}$	丹酚酸 B	-
3	15.250	297.112 2	319.095 6	335.069 0	296.104 9	296.105 2	1.013 5	$C_{18}H_{16}O_4$	紫丹参丙素或丹参新醌甲	-
4	16.134	311.127 7	333.110 7	349.083 4	310.120 5	310.120 8	0.967 7	$C_{19}H_{18}O_4$	丹参酮 II _B	消失
5	16.684	311.128 3	333.110 2	349.083 9	310.120 5	310.120 8	0.967 7	$C_{19}H_{18}O_4$	丹参醌	-
6	17.569	311.185 2	333.167 3	349.140 0	310.120 5	310.120 8	0.967 7	$C_{19}H_{18}O_4$	紫丹参甲素	-
7	20.019	279.101 4	301.083 6	317.057 3	278.094 3	278.094 2	0.359 7	$C_{18}H_{14}O_3$	二氢丹参酮 I	增加
8	20.335	297.148 8	319.130 7	335.104 2	296.141 2	296.141 3	0.337 8	$C_{19}H_{20}O_3$	隐丹参酮	降低
9	20.886	281.117 4	303.099 2	319.073 3	280.109 9	280.110 1	0.714 3	$C_{18}H_{16}O_3$	丹参新醌乙	降低
10	23.387	297.148 4	319.130 4	335.104 2	296.141 2	296.141 2	0	$C_{19}H_{20}O_3$	异隐丹参酮	-
11	24.187	277.085 4	299.067 6	315.041 4	276.078 6	276.078 5	0.362 3	$C_{18}H_{12}O_3$	丹参酮 I	增加
12	25.687	279.101 8	301.083 7	317.057 3	278.094 3	278.094 5	0.719 4	$C_{18}H_{14}O_3$	二氢丹参酮 I 异构体	降低
13	26.855	279.158 8	301.140 1	317.116 3	278.094 3	278.094 5	0.719 4	$C_{18}H_{14}O_3$	二氢丹参酮 I 异构体	-
14	27.155	279.158 8	301.141 7	317.115 0	278.094 3	278.094 5	0.719 4	$C_{18}H_{14}O_3$	二氢丹参酮 I 异构体	-
15	28.038	295.133 4	317.115 1	333.089 2	294.125 6	294.126 1	1.700 7	$C_{19}H_{18}O_3$	丹参酮 II _A	降低
16	29.156	283.169 0	305.151 4	321.125 1	282.162 0	282.162 0	0	$C_{19}H_{22}O_2$	丹参新酮	降低

注:二氢丹参酮 I 异构体为二氢异丹参酮 I 或 1,2-二氢丹参醌或次甲丹参醌;“-”表示无明显变化。

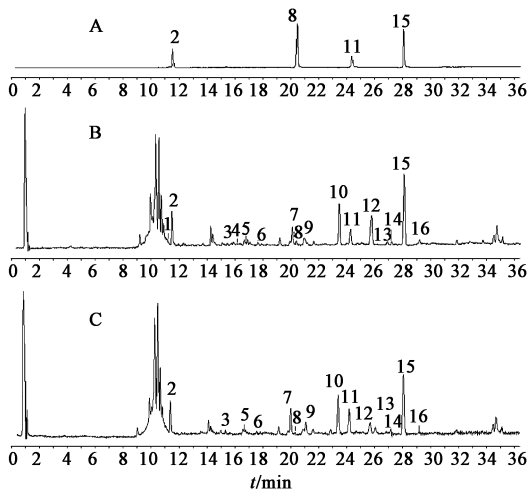


图 1 混合对照品 (A), 生丹参 (B), 酒丹参 (C) 的 HPLC-TOF/MS 正离子模式总离子流

Fig.1 Total ion chromatograms of mixed reference (A), raw products (B) and processed products (C) of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* in positive ion mode

对照品一致,据此推断为丹参酮 II_A。

2.5.2 根据质谱数据和文献参照分析 1 号峰(t_R 11.082 min)获得的分子离子峰有 341.068 2 $[M+H-C_9H_{10}O_5]^+$ 的碎片离子,经数据库匹配,分子式为 $C_{27}H_{22}O_{12}$,推断为紫草酸或丹酚酸 H。通过分析 3 号峰(t_R 15.25 min)获得的分子离子峰,且有 279.161 4 $[M+H-H_2O]^+$ 的碎片离子,经数据库匹配,分子式为 $C_{18}H_{16}O_4$,参考文献[4]推断为紫丹参丙素或丹参新醌甲。4 号峰(t_R 16.134 min),5 号峰

(t_R 16.684 min),6 号峰(t_R 17.569 min)分别获得了不同的分子离子峰,且分别有 281.116 1 $[M+H-2CH_3]^+$, 296.967 4 $[M+H-CH_3]^+$, 296.969 4 $[M+H-CH_3]^+$ 的碎片离子,经数据库匹配,分子式均为 $C_{19}H_{18}O_4$,参考文献推断 4 号峰为丹参酮 II_B,5 号峰为丹参醌,6 号峰为紫丹参甲素^[4,7]。7 号峰(t_R 20.019 min),12 号峰(t_R 25.687 min),13 号峰(t_R 26.855 min),14 号峰(t_R 27.155 min)分别获得了不同的分子离子峰,且均有 235.010 0 $[M+H-CO_2]^+$ 的碎片离子,经数据库匹配,分子式均为 $C_{18}H_{14}O_3$,参考文献推断 7 号峰为二氢丹参酮 I,12,13 和 14 号峰为二氢异丹参酮 I 或其同分异构体 1,2-二氢丹参醌、次甲丹参醌^[4,7,8,10]。9 号峰(t_R 20.886 min)获得的分子离子峰经数据库匹配,分子式为 $C_{18}H_{16}O_3$,参考文献推断为丹参新醌乙^[8]。10 号峰(t_R 23.387 min)获得 m/z 297.148 4 $[M+H]^+$, 319.130 4 $[M+Na]^+$, 335.104 2 $[M+K]^+$ 的分子离子峰,且有 279.159 0 $[M+H-H_2O]^+$ 的碎片离子,经数据库匹配,分子式为 $C_{19}H_{20}O_3$,已知 8 号峰为隐丹参酮,参考文献[8-9]推断 10 号峰为异隐丹参酮。16 号峰(t_R 29.156 min)获得 m/z 283.169 0 $[M+H]^+$, 305.151 4 $[M+Na]^+$, 321.125 1 $[M+K]^+$ 的分子离子峰,且有 255.943 1 $[M+H-CO]^+$ 的碎片离子,经数据库匹配,分子式为 $C_{19}H_{22}O_2$,参考文献[8]推断为丹参新酮。以丹参新酮为例,其质谱峰及裂解过程,见图 2,3。

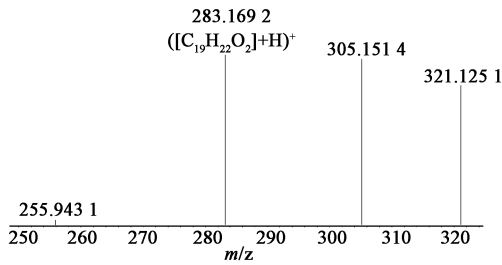


图 2 丹参新酮正离子模式下 MS

Fig. 2 MS spectra of miltirone in positive ion mode

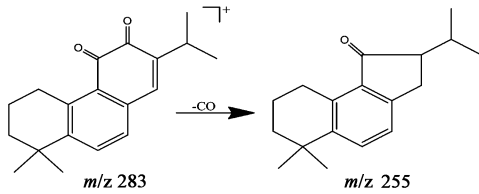


图 3 丹参新酮裂解过程

Fig. 3 Fragmentation of miltirone

3 讨论

采用 HPLC-TOF/MS 联用技术对丹参生品和酒炙品的化学成分进行快速分离与分析,根据对照品定位、质谱数据、数据库匹配技术和相关文献报道,推测出了生丹参中 16 种化合物和酒丹参中 14 种化合物。该方法快速、灵敏、分辨率高,为深入探讨丹参饮片药效物质基础及阐明其酒炙增效机制提供了便捷的检测技术。

中药炮制过程是药物中化学分量变和质变的过程,关系到中药药性变化、功能主治改变和临床应用的调整^[11]。本文研究结果表明丹参酒炙后,紫草酸或丹酚酸 H,丹参酮 II_B 峰消失,隐丹参酮、丹参新醌乙、丹参酮 II_A 和丹参新酮的峰面积显著降低,二氢丹参酮 I 和丹参酮 I 的峰面积增加,还有其他未知峰也出现了不同程度的变化。提示在丹参酒炙过程中,紫草酸或丹酚酸 H,丹参酮 II_B,隐丹参酮,丹参新醌乙,丹参酮 II_A,丹参新酮发生了质变,二氢丹参酮 I 和丹参酮 I 发生了量变,且存在未知成分向二氢丹参酮 I 和丹参酮 I 转化。上述成分的变化可能是丹参酒炙增强活血祛瘀功效的主要物质基础。

据文献报道,大鼠口服丹参提取物后丹参酮 II_A 和丹参素能快速被吸收,但隐丹参酮吸收较差^[12]。大鼠静脉注射丹参提取物后,隐丹参酮在其体内可转化为丹参酮 II_A^[13]。推测丹参酒炙后活血祛瘀作用增强与丹参酮类成分转化成体内更易吸收的活性成分有关。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北

京:中国医药科技出版社,2015:76-77.

[2] 王逸平,宣利江. 中药现代化的示范性成果-丹参多酚酸盐及其注射用丹参多酚酸盐的研究与开发[J]. 中国科学院院刊,2005,20(5):377-380.

[3] Hu P, Liang Q L, Luo G A, et al. Multi-component HPLC fingerprinting of Radix Salviae Miltiorrhizae and its LC-MS-MS identification [J]. Chem Pharm Bull, 2005, 53 (6): 677-683.

[4] Liu M, Li Y G, Zhang F, et al. Chromatographic fingerprinting analysis of Danshen root (Salvia Miltiorrhiza Radix et Rhizoma) and its preparations using high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI/MS) [J]. J Sep Sci, 2007, 30 (14): 2256-2267.

[5] Zhou L, Zuo Z, Chow M S. Danshen; an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. J Clin Pharmacol, 2005, 45 (12): 1345-1359.

[6] 李慧芬, 张学兰. 丹参炮制历史沿革研究 [J]. 中华中医药学刊, 2006, 24 (11): 2058-2059.

[7] 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.

[8] Liu A H, Lin Y H, Yang M, et al. Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSⁿ [J]. J Chromatogr B, 2007, 846 (1/2): 32-41.

[9] 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, 2013, 932 (1/2): 92-99.

[10] 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, 2010, 878 (13/14): 915-924.

[11] 吴慧, 单国顺, 赵文龙, 等. 不同麦麸对白术炮制品质量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (6): 55-60.

[12] Zhang Y, Akao T, Nakamura N, et al. Extremely low bioavailability of magnesium lithospermate B, an active components from *Salvia miltiorrhiza* in rat [J]. Planta Med, 2004, 70 (2): 138-142.

[13] Xue M, Cui Y, Wang H Q, et al. Reversed-phase liquid chromatographic determination of cryptotanshinone and its active metabolite in pig plasma and urine [J]. J Pharm Biomed Anal, 1999, 21 (1): 207-213.

[责任编辑 刘德文]