

# UPLC-LTQ-Orbitrap 快速鉴定丹参川芎嗪注射液中化学成分

孙进华<sup>1</sup>, 李先荣<sup>2\*</sup>

(1. 东南大学附属中大医院, 南京 210000; 2. 山西省中医药研究院, 太原 030012)

**[摘要]** 目的:采用超高效液相结合二维线性离子阱静电轨道阱组合式高分辨质谱(UPLC-LTQ-Orbitrap)对丹参川芎嗪注射液化学成分进行快速分析和鉴别。方法:采用ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),以乙腈-0.1%甲酸水为流动相进行梯度洗脱,流速300 μL·min<sup>-1</sup>,进样量5 μL。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),负离子模式下检测,质量扫描范围m/z 100~1 000。结果:从丹参川芎嗪注射液中共鉴别出15个化学成分。结论:UPLC-LTQ-Orbitrap方法能快速鉴别丹参川芎嗪注射液中的化学成分,为丹参川芎嗪注射液的药效物质研究奠定基础。

**[关键词]** 丹参川芎嗪注射液;超高效液相结合二维线性离子阱静电轨道阱组合式高分辨质谱;化学成分

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0064-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150064

## Rapid Identification of Chemical Constituents in Danshen-chuanxiongqin Injection by Using UPLC-LTQ-Orbitrap Mass Spectrometer

SUN Jin-hua<sup>1</sup>, LI Xian-rong<sup>2\*</sup>

(1. Southeast University, Affiliated Zhongda Hospital, Nanjing 210000, China;

2. Shanxi Province Institute of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To quickly analyze and identify the chemical constituents in Danshen-chuanxiongqin injection by using UPLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometer. **Method:** The separation was performed on ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) with acetonitrile (A) and 0.1% formic acid solution (B) as the mobile phase for gradient elution. The sample size was 5 μL. Electrospray ion source (ESI) was applied for qualitative analysis under the negative ion mode. The flow rate was 300 μL·min<sup>-1</sup> and mass scan range was m/z 100-1 000. **Result:** Fifteen chemical compounds were identified from Danshen-chuanxiongqin injection. **Conclusion:** UPLC-LTQ-Orbitrap method be used to quickly identify the chemical components of Danshen-chuanxiongqin injection, laying a foundation for further studying the pharmacodynamics substances of Danshen-chuanxiongqin injection.

**[Key words]** Danshen-chuanxiongqin injection; UPLC-LTQ-Orbitrap; chemical constituents

丹参<sup>[1]</sup>首载于《神农本草经》,具有活血祛瘀、养血安神、调经止痛等功效<sup>[2-4]</sup>,是最常用的活血化瘀中药。其主要化学成分<sup>[5-6]</sup>为脂溶性的二萜醌类化合物和水溶性的酚酸类化合物。川芎嗪<sup>[7]</sup>是从中药川芎中分离得到的生物碱类成分,具有活血化瘀,抗血小板凝集,扩张小动脉,改善微循环等作用<sup>[8-10]</sup>。丹参川芎嗪注射液是由丹参药材和川芎嗪组成的复方制剂,临床上广泛应用于闭塞性脑血管

疾病,如脑血栓、脑供血不全、脑栓塞及其他缺血性心血管疾病<sup>[11-12]</sup>。已有文献研究报道丹参药材和注射液中的化学成分<sup>[13]</sup>,但丹参川芎嗪注射液中的化学成分尚无文献报道。中药的化学成分是其发挥药效的物质基础,因此深入研究丹参川芎嗪注射液中的化学物质基础,有望进一步明确其药效物质基础,为建立科学的质量控制方法与安全性评价方法提供实验依据。本试验采用UPLC-LTQ-Orbitrap,通

**[收稿日期]** 20150624(019)

**[第一作者]** 孙进华, 硕士, 药师, 从事中药制剂分析研究, Tel: 13951656724, E-mail: kathy1982112@sohu.com

**[通讯作者]** \*李先荣, 主任药师, 从事中药方剂研究, Tel: 0351-4668028, E-mail: xr-li@163.com

过其准分子离子峰的质荷比,保留时间和碎片离子,对丹参川芎嗪注射液的化学成分进行鉴定<sup>[14-15]</sup>。

## 1 材料

Accela 600 pump 高效液相色谱仪与 LTQ-Orbitrap XL 质谱,配有电喷雾离子源 (ESI), Xcalibur 2.1 工作站(美国 Thermo Scientific 公司); R200D 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司), Millipore Synergy UV 型超纯水机(美国 Millipore)。

对照品丹参素(批号 FY11710802)购于江苏南通飞宇生物科技有限公司。丹参川芎嗪注射液(贵州拜特制药有限公司批号 20141103, 20141116, 20141209, 20150209)来源于东南大学附属中大医院。甲醇和乙腈为色谱级。其他试剂均为分析纯。

## 2 方法和结果

**2.1 供试品溶液的制备** 取丹参川芎嗪注射液用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤,即得。

**2.2 对照品溶液的制备** 取对照品丹参素适量,加 50% 甲醇溶液溶解,制成对照品母液。取对照品母液适量,置于 10 mL 量瓶中,用 50% 甲醇稀释,即得对照品溶液。取适量对照品溶液,用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤,即得。

**2.3 色谱条件** ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  色谱柱(2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ );液相条件:流动相乙腈-0.1% 甲酸水梯度洗脱(0 ~ 5 min, 2% ~ 20% 乙腈; 5 ~ 10 min, 20% ~ 80% 乙腈; 10 ~ 15 min, 80% 乙腈; 15 ~ 16 min, 80% ~ 2% 乙腈; 16 ~ 18 min, 2% 乙腈),进样体积 5  $\mu\text{L}$ ,流速 300  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**2.4 质谱条件** 电喷雾离子源负离子检测模式( $\text{ESI}^-$ ),毛细管电压 30 V,喷雾电压 3.0 kV,毛细管温度 350  $^{\circ}\text{C}$ ,鞘气 30 arb,辅助气 10 arb, CID 碰撞池碰撞能量 35%,一级扫描分辨率为 FWHM 30 000,二级扫描分辨率为 FWHM 15 000,扫描范围为  $m/z$  100 ~ 1 000。数据采集系统为 Xcalibur 2.1。

**2.5 数据处理** 利用 Xcalibur 2.1 工作站进行数据处理:采用分子式预测模块,对所有的母离子和碎片离子的分子式进行预测,质量精度误差在 5 ppm 以内。

**2.6 色谱质谱分析** 采用 UPLC-LTQ-Orbitrap,分析了丹参川芎嗪注射液的化学成分。其基峰离子流程图见图 1。在该色谱质谱条件下,成分分离度良好。根据高分辨质谱数据,保留时间和多级碎片离子,推测鉴定了丹参川芎嗪注射液中 15 个化学成分。具体色谱质谱数据见表 1。

**2.7 对照品裂解规律** 丹参川芎嗪注射液中主要

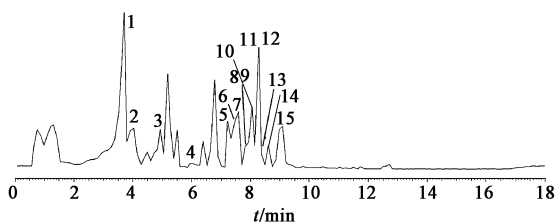


图 1 丹参川芎嗪注射液在负离子模式下的基峰离子流  
Fig. 1 Salvia miltiorrhiza and ligustrazine injection base peak of ion flow in negative ion mode

成分为酚酸类和生物碱类,为了更好的质谱响应行为,质谱选择负离子检测模式。在负离子模式下,丹参素的准分子离子峰为 $[\text{M} - \text{H}]^- m/z$  197.045 0 (2.8 ppm,  $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_5$ )。经碰撞诱导解离(CID),产生了丢失  $\text{H}_2\text{O}$  的基峰离子 179.034 6 (3.8 ppm,  $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4$ ),此外还分别丢失  $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ ,  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2\text{O} + \text{CO} + \text{CO}$ ,形成了 135.044 7 (4.8 ppm,  $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2$ ), 153.055 4 (5.2 ppm,  $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_3$ ) 和 123.044 5 (3.6 ppm,  $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_3$ ) 的碎片离子。基峰离子 179.034 6 进一步通过丢失  $\text{CO}_2$  和  $\text{CO}_2 + \text{CO}$ ,产生了 135.044 9 (6.2 ppm,  $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2$ ) 和 107.050 1 (8.9 ppm,  $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}$ ) 的碎片离子。其多级质谱图,见图 2。

**2.8 结构鉴定** 通过与对照品的质谱数据和保留时间相对照,化合物 1 准确鉴定为丹参素。

化合物 2 和化合物 3 的准分子离子峰分别为  $m/z$  137.024 0 (5.0 ppm,  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3$ ) 和 153.019 0 (5.0 ppm,  $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4$ )。在二级质谱中,分别通过丢失 1 分子的  $\text{CO}$  和 1 分子的  $\text{CO}_2$ ,产生了 109.028 9 (4.5 ppm,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2$ ) 和 109.029 1 (6.4 ppm,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_2$ ) 的碎片离子,推测此 2 个化合物具有相同的子结构。根据文献[16]推测化合物 3 和 4 分别为原儿茶醛和原儿茶酸。

化合物 4 的准分子离子峰为 193.050 1 (2.9 ppm,  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_4$ )。其二级质谱中,产生了由母离子丢失  $\text{CH}_3$  和  $\text{CH}_3 + \text{CO}_2$  的碎片离子  $m/z$  178.026 4 (2.0 ppm,  $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ ) 和 134.037 0 (5.7 ppm,  $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$ )。通过 mass bank 数据库检索,鉴定化合物 4 为异阿魏酸。

化合物 5 和化合物 13 的准分子离子峰分别为  $m/z$  493.115 0 (4.2 ppm,  $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$ ) 和 493.114 3 (2.9 ppm,  $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$ ),均通过丢失  $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$ ,产生了 295.060 5 (1.4 ppm,  $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_5$ ) 和 295.060 4 (1.0 ppm,  $\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{O}_5$ ) 的碎片离子。根据文献[17]推测化合物 13 为丹酚酸 A,推测化合物 5 为丹酚酸

表 1 丹参川芎嗪注射液中化学成分的色谱及质谱数据

Table 1 GC and MS of chemical component of Danshen-chuanxiangqing injection

No.	$t_R$	理论值 $m/z$	实测值 $m/z$	误差 /ppm	分子式 [M - H] <sup>-</sup>	MS	鉴定
1	3.70	197.044 4	197.045 0	2.8	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	MS <sup>2</sup> [197]: 179.034 6 (100), 135.044 7 (8), 153.055 4(3), 123.044 5(2) MS <sup>3</sup> [179]: 135.044 9 (100), 107.050 1(5)	丹参素
2	3.92	153.018 2	153.019 0	5.0	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	MS <sup>2</sup> [153]: 109.029 1(100)	原儿茶酸
3	4.95	137.023 3	137.024 0	5.0	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	MS <sup>2</sup> [137]: 109.028 9(100)	原儿茶醛
4	5.95	193.049 5	193.050 1	2.9	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	MS <sup>2</sup> [193]: 178.026 4 (100), 134.037 0 (98), 149.060 3(23)	异阿魏酸
5	7.22	493.112 9	493.115 0	4.2	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	MS <sup>2</sup> [493]: 295.060 5 (100)	丹酚酸 A 同分异构体
6	7.58	417.081 6	417.083 2	3.8	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>10</sub>	MS <sup>2</sup> [417]: 373.091 0 (100), 175.039 4 (85), 197.044 8(32), 399.070 4(18) MS <sup>3</sup> [373]: 175.039 3 (100), 197.044 6 (40), 179.034 2(20)	丹酚酸 D
7	7.70	551.118 4	551.120 7	4.1	C <sub>28</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	MS <sup>2</sup> [551]: 321.040 1(100)	紫草酸单甲酯
8	7.81	717.145 0	717.147 6	3.6	C <sub>36</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	MS <sup>2</sup> [717]: 519.090 6 (100), 321.038 1(23) MS <sup>3</sup> [519]: 321.038 5 (100), 339.049 3(60)	丹酚酸 B
9	7.93	359.076 1	359.077 6	4.2	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub>	MS <sup>2</sup> [359]: 161.024 0 (100), 179.034 8(50)	迷迭香酸
10	8.04	717.145 0	717.147 6	3.6	C <sub>36</sub> H <sub>29</sub> O <sub>16</sub>	MS <sup>2</sup> [717]: 519.090 6 (100), 321.038 1(18) MS <sup>3</sup> [519]: 321.038 7 (100), 339.049 3(20)	丹酚酸 E
11	8.15	253.049 5	253.050 8	5.0	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	MS <sup>2</sup> [253]: 225.055 0 (100)	1,5-二羟基-3-甲基蒽醌
12	8.15	269.080 8	269.082 0	4.3	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>4</sub>	MS <sup>2</sup> [269]: 254.057 3 (100), 159.044 7(52) MS <sup>3</sup> [254]: 145.029 1 (100)	异欧前胡素
13	8.27	493.112 9	493.114 3	2.9	C <sub>26</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	MS <sup>2</sup> [493]: 295.060 4 (100)	丹酚酸 A
14	8.61	565.134 0	565.135 3	2.2	C <sub>29</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>	MS <sup>2</sup> [565]: 321.040 1 (100), 367.080 6 (90), 339.049 6(20) MS <sup>3</sup> [321]: 277.049 3 (100), 249.054 5 (80), 293.044 2(30)	紫草酸二甲酯
15	9.09	491.097 2	491.099 0	3.6	C <sub>26</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	MS <sup>2</sup> [491]: 293.044 0 (100), 311.054 4(35)	丹酚酸 C

A 的同分异构体。

化合物 6 的准分子离子峰分别为  $m/z$  417.083 2 (3.8 ppm, C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>O<sub>10</sub>), 通过丢失 CO<sub>2</sub>, 产生了 373.091 0 (-2.1 ppm, C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub>) 的碎片离子。根据文献[17]推测化合物 6 为丹酚酸 D。

化合物 7 和化合物 14 的准分子离子峰分别为  $m/z$  551.120 7 (4.1 ppm, C<sub>28</sub>H<sub>23</sub>O<sub>12</sub>) 和 565.135 3 (2.2 ppm, C<sub>29</sub>H<sub>25</sub>O<sub>12</sub>)。其二级碎片离子均为 321.040 1 (2.3 ppm, C<sub>18</sub>H<sub>9</sub>O<sub>6</sub>), 推测此 2 个化合物具有相同的子结构。根据文献[16]推测化合物 9, 10 分别为紫草酸单甲酯和紫草酸二甲酯。

化合物 8, 10 的保留时间分别为 7.81 和 8.04 min, 其准分子离子峰均为  $m/z$  717.147 6 (3.6 ppm, C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>)。通过 CID 裂解, 产生了 519, 321, 339 的碎片离子。通过 339 离子的强度<sup>[18]</sup>, 化合物 6 和化合物 7 分别鉴定为丹酚酸 B 和丹酚酸 E。

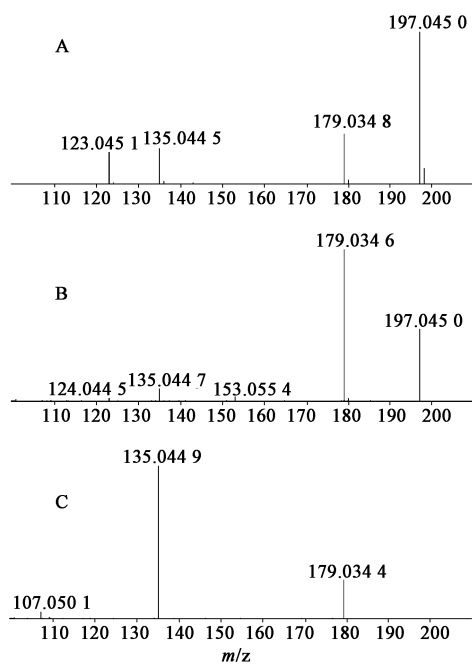
保留时间为 7.93, 一级质谱中准分子离子峰为

$m/z$  359.077 6, 其分子式为 C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>O<sub>8</sub>。二级质谱中, 丢失 198 和 180, 产生了 161.024 0 (4.2 ppm, C<sub>9</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>) 和 179.034 8 (5.1 ppm, C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>O<sub>4</sub>) 的碎片离子。根据文献[16]推测化合物 9 为迷迭香酸。

化合物 11 的准分子离子峰为  $m/z$  253.050 8 (5.0 ppm, C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>)。在二级质谱中, 通过丢失 1 分子 CO, 形成 225.055 0 (1.7 ppm, C<sub>14</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub>) 的碎片离子。根据文献[19]推测化合物 11 为 1,5-二羟基-3-甲基蒽醌。

化合物 12 的准分子离子峰为  $m/z$  269.082 0 (4.3 ppm, C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>)。在二级质谱中, 通过丢失 1 分子 CH<sub>3</sub>, 形成 254.057 3 (-0.2 ppm, C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>) 的碎片离子。根据文献[20]推测化合物 12 为异欧前胡素。

化合物 15 的准分子离子峰为  $m/z$  491.099 0 (3.6 ppm, C<sub>26</sub>H<sub>19</sub>O<sub>10</sub>)。在二级质谱中, 通过丢失 1 分子 C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>, 形成 293.044 0 (-1.5 ppm,



A. MS 质谱; B. MS<sup>2</sup> 质谱 (母离子为 197); C. MS<sup>3</sup> 质谱 (母离子为 179)

图 2 丹参素的 ESI-MS<sup>n</sup> 质谱

Fig. 2 ESI-MS<sup>n</sup> mass spectrometry of tanshinol

C<sub>17</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>) 的碎片离子。根据文献 [16] 推测化合物 11 为丹酚酸 C。

### 3 讨论

本试验中比较了甲醇-水系统, 和乙腈-水系统, 发现乙腈-水系统能够更好使丹参川芎嗪注射液中的化学成分得到分离, 且柱压更低, 因此选用乙腈-水系统作为流动相。此外流动相中, 还添加了 0.1% 的甲酸, 可使其中的主要成分有更好的色谱峰形和质谱信号响应值。因此最终选择了乙腈-0.1% 甲酸水系统为流动相系统进行梯度洗脱。

为了深入地研究丹参川芎嗪注射液中的化学物质基础, 采用 UPLC-LTQ-Orbitrap, 对丹参川芎嗪注射液进行了系统的成分分析, 从中鉴定出 15 个化学成分。本研究基本阐明了丹参川芎嗪注射液的化学成分, 可为其化学成分的进一步研究, 明确注射液的药效物质基础和质量控制研究提供依据。

#### 【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, 2010: 71-72.  
[2] 赵娜, 郭治昕, 赵雪, 等. 丹参的化学成分与药理作用[J]. 国外医药: 植物药分册, 2007, 22(4): 155-160.  
[3] 陈雯, 郜凤香, 郭丽丽, 等. 丹参总酚酸对心肌缺血再灌注损伤保护作用的机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 242-245.  
[4] 吕冬梅, 王岚, 梁日欣, 等. 丹参毛状根对麻醉大鼠心

肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(3): 27-29.

[5] 刘静, 戴忠, 王钢力, 等. 丹参活性成分及相关分离分析方法研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 288-295.  
[6] 吴宏伟, 陈建新, 杨洪军, 等. 丹参成分组合与抗氧化活性相关性分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 68-71.  
[7] 曹阳, 王铁杰, 王玉, 等. HPLC 法测定不同产地川芎中川芎嗪的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(3): 278-280.  
[8] 阮琴. 川芎挥发油川芎嗪对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 浙江中医杂志, 2009, 44(9): 642-643.  
[9] 王玉良, 巴彦坤. 川芎嗪对心血管组织的药理和电生理作用——一种新的“钙拮抗剂”? [J]. 中西医结合杂志, 1985, 5(5): 291-294, 260, 320.  
[10] 宫伟星. 川芎嗪心血管药理的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 1990, 10(11): 33-34.  
[11] 牛文华, 牛小媛, 刘凤琴. 早期应用丹参川芎嗪注射液对局灶性脑缺血-再灌注损伤大鼠血-脑屏障通透性的影响[J]. 中国医药导报, 2010, 7(5): 12-13.  
[12] 王安荔, 张清奇. 丹参川芎嗪注射液对老年急性脑梗死患者 NFDS 评分及 Barthel 指数的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(5): 921-923.  
[13] 李安平, 杨锡, 丁永辉, 等. 一测多评 HPLC 法测定丹参注射液中 7 个水溶性成分含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1534-1540.  
[14] 张亚中. 基于超高效液相-四级杆-飞行时间串联质谱的白花蛇舌草注射液主成分分析[J]. 中草药, 2013, 44(7): 829-833.  
[15] 孟月华, 黄何松, 余黄鹏, 等. 液质联用技术鉴定预知子提取物中的主要化学成分[J]. 中草药, 2013, 44(12): 1562-1567.  
[16] 杨雅欣, 廖尚高, 王正, 等. 血人参水溶性化学成分的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(23): 63-67.  
[17] Zhang J L, Cui M, He Y, et al. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods[J]. J Pharmaceut Biomed, 2005, 36(5): 1029-1035.  
[18] 董昕, 徐立, 姜子洋. 丹参药材中水溶性及脂溶性成分的电喷雾离子阱质谱研究[J]. 中国药学杂志, 2010, 45(14): 1048-1054.  
[19] 黄孝春, 郭跃伟, 王峥涛, 等. 苍白秤钩风化学成分的研究[J]. 中草药, 2003, 34(2): 9-12.  
[20] 孙明谦, 卢建秋, 张宏桂. 呋喃香豆素类化合物电喷雾质谱裂解途径[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 82-85.

【责任编辑 顾雪竹】