

超高效液相色谱-质谱联用同时测定丹参中7种成分含量

赵国欣, 刘萌, 李领川, 周晓莉*

(郑州工程技术学院 化工食品学院, 郑州 450044)

[摘要] 目的:建立同时测定丹参中原儿茶醛,丹酚酸B,迷迭香酸,丹参酮I,丹参酮II_A,隐丹参酮,二氢丹参酮7种成分含量的超高效液相色谱-质谱联用分析方法。方法:采用 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm),以0.1% 甲酸溶液-甲醇为流动相梯度洗脱,流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 30 °C。采用电喷雾离子源(ESI),正负离子交替扫描模式,选择反应离子检测(SRM)。结果:7种成分在 1~460 μg·L⁻¹有良好的线性关系,平均回收率 83.41%~116.05%,检测限 0.046~0.5 μg·L⁻¹,RSD 均 < 4.7%。结论:该方法快捷、准确、重复性好、灵敏度高,可同时测定丹参药品中7种成分的含量,可用于丹参药材及其制剂的研究和质量控制。

[关键词] 超高效液相色谱-质谱联用; 原儿茶醛; 丹酚酸B; 迷迭香酸; 丹参酮I; 丹参酮II_A; 隐丹参酮; 二氢丹参酮; 选择反应离子监测

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)01-0060-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017010060

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0953.066.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:53

Simultaneous Determination of 7 Components in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* by UPLC-MS/MS

ZHAO Guo-xin, LIU Meng, LI Ling-chuan, ZHOU Xiao-li*

(Institute of Chemical Industry and Food, Zhengzhou Institute of Technology, Zhengzhou 450044, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a UPLC-MS/MS (Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry) method for simultaneous determination of 7 components in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*: protocatechualdehyde, salvianolic acid B, rosmarinic acid, tanshinone I, tanshinone II_A, cryptotanshinone and dihydrotanshinone. **Method:** The separation and analysis were performed on Hypersil Gold C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm), with 0.1% acetic acid solution-methanol as the mobile phase for gradient elution. The column temperature was set at 30 °C with flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in alternating positive and negative mode. Selective reaction monitoring (SRM) mode was used to quantify the 7 compounds. **Result:** The 7 compounds showed good linear relationship in the range of 1-460 μg·L⁻¹. The average recovery rates were 83.41%-116.05%; the detection limits were 0.046-0.5 μg·L⁻¹ and the relative standard deviation was less than 4.7%. **Conclusion:** This method is rapid, accurate, reproducible and sensitive, and has been successfully applied in the simultaneous quantification of 7 components in *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*. It can be used for the study of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* and its prescriptions as well as for quality control.

[Key words] UPLC-MS/MS; protocatechualdehyde; salvianolic acid B; rosmarinic acid; tanshinone I; tanshinone II_A; cryptotanshinone; dihydrotanshinone; SRM

[收稿日期] 20151030(005)

[基金项目] 河南省重点科技攻关项目(152102210016,152102310130)

[第一作者] 赵国欣, 硕士, 讲师, 从事仪器分析检测研究工作, Tel:15238320443, E-mail:zhaoguoxin2008@126.com

[通讯作者] *周晓莉, 博士, 教授, 从事仪器分析检测、功能化材料等方面工作, Tel:0371-68229126, E-mail:7722xiaoli@163.com

丹参为唇形科植物丹参的干燥根及根茎,是重要的传统中药。具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦的功效,临床上主要用于治疗心血管系统疾病^[1-2]。丹参的药效活性成分主要有两类,一类为脂溶性的二萜类化合物,如丹参酮 I,丹参酮 II_A,隐丹参酮以及二氢丹参酮等;二类为水溶性的多聚酚酸类成分,如丹酚酸 B,原儿茶醛以及迷迭香酸等。

目前,有文献报道了利用液相色谱-质谱联用(LC-MS)方法定性分析丹参注射液的主要成分^[3]。但丹参含量的定量测定方法多采用高效液相色谱法^[4-8]。近年来也有文献报道了利用高效液相色谱-二极管阵列(HPLC-DAD)法检测^[9-11],但检测指标往往仅限于水溶性或脂溶性一类成分。虽有文献采用超高效液相色谱法(UPLC)同时测定了丹参中水溶性和脂溶性成分^[12],但是色谱条件比较复杂,分析时间较长,且灵敏度不够高。本文采用超高效液相色谱-质谱联用(UPLC-MS/MS)的方法同时快速检测丹参中水溶性和脂溶性 7 种成分含量,操作简便,线性范围宽,可在 7 min 内完成一次色谱分析,为综合评价丹参的内在质量提供一种快速、准确地分析方法。

1 材料

UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪,TSQ Quantum Access Max 型三重四级杆液质联用仪(Thermo, USA),Milli-Q System 超纯水仪(Millipore, USA),XSE205DU 型半微量分析天平(Mettler Toledo, 瑞士),KQ-50B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品丹参酮 I(批号 110867-200406),隐丹参酮(批号 110852-200806),丹参酮 II_A(批号 110766-200619),原儿茶醛(批号 110810-201007),丹酚酸 B(批号 111562-201313)均由中国食品药品检定研究院提供;二氢丹参酮(批号 MUST-14062317,纯度 > 98%),迷迭香酸(批号 MUST-14020115,纯度 > 98%)由成都曼思特生物科技有限公司提供。甲醇、甲酸为色谱纯,水为超纯水;复方丹参片(内蒙古仁泽药业有限公司,批号 20120323),复方丹参片(广东一力集团制药有限公司,批号 3141002),复方丹参滴丸(天士力制药集团股份有限公司,批号 13102),丹参注射液(四川升和药业股份有限公司,批号 1409209)均为市场购买。

2 方法与结果

2.1 对照品储备液 分别精密称定 7 种对照品,原儿茶醛 10.0 mg,丹酚酸 B 9.2 mg,迷迭香酸 9.2

mg,丹参酮 I 10.4 mg,丹参酮 II_A 9.6 mg,隐丹参酮 9.8 mg,二氢丹参酮 10.0 mg,加甲醇分别溶解并定容至 10 mL,于 4 °C 下冷冻保存。

2.2 混合对照品储备液 分别精密量取 2.1 项下对照品溶液 1.0 mL,用甲醇定容至 100 mL,制成混合对照品溶液(原儿茶醛 10.0 mg·L⁻¹,丹酚酸 B 9.2 mg·L⁻¹,迷迭香酸 9.2 mg·L⁻¹,丹参酮 I 10.4 mg·L⁻¹,丹参酮 II_A 9.6 mg·L⁻¹,隐丹参酮 9.8 mg·L⁻¹,二氢丹参酮 10.0 mg·L⁻¹),于 4 °C 下冷冻保存。

2.3 供试品溶液

2.3.1 固体样品^[12] 精密称定固体样品 1.0 g(片剂需去糖衣,研细),加甲醇分别溶解于 100 mL 量瓶中,定容,超声处理 15 min,静置放冷,再用甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤。

2.3.2 液体样品^[9] 精密量取丹参注射液 5.0 mL,置于 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤。取滤液,稀释一定比例即得。

2.4 色谱条件 Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm),流动相 0.1% 甲酸溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0 ~ 1 min, 10% B; 1 ~ 8 min, 10% ~ 90% B; 8 ~ 10 min, 90% ~ 10% B),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,进样量 5 μL。

2.5 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),检测模式正负离子交替检测,喷雾电压 3 kV,蒸气压温度 400 °C,鞘气压力 275.8 kPa;辅助气压力 68.95 kPa,毛细管(离子传输管)温度 320 °C,检测方式选择反应离子检测(SRM)。各组分监测离子对相关参数设定见表 1。

表 1 质谱参数

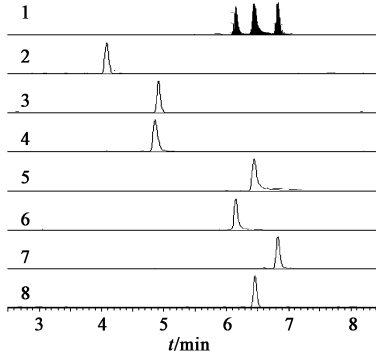
Table 1 MS parameters

成分	保留时间 /min	母离子 /m/z	子离子 /m/z	碰撞能量 /eV
原儿茶醛	4.04	137	136 ¹⁾ , 108	22, 25
丹酚酸 B	4.86	717	321 ¹⁾ , 519	32, 21
迷迭香酸	4.91	359	161 ¹⁾ , 197	20, 20
丹参酮 I	6.44	277	249 ¹⁾ , 178	20, 36
丹参酮 II _A	6.83	295	277 ¹⁾ , 249	17, 22
隐丹参酮	6.47	297	251 ¹⁾ , 254	22, 25
二氢丹参酮	6.16	279	261 ¹⁾ , 233	16, 22

注: ¹⁾ 为定量离子。

2.6 线性关系考察 精密量取 2.2 项下配制的混合对照品储备液 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mL 置 100 mL 量瓶中,用 50% 甲醇水溶液稀释定容。再从

上述已配好约 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液中取 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 mL 置 100 mL 量瓶中, 用 50% 甲醇水溶液稀释定容, 共得到 10 个对照品溶液。上述对照品溶液分别经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后, 进行 UPLC-MS/MS 分析, 色谱图见图 1。



1. 总离子流; 2. 原儿茶醛; 3. 迷迭香酸; 4. 丹酚酸 B; 5. 丹参酮 I; 6. 二氢丹参酮 7. 丹参酮 II_A 8. 隐丹参酮 (图 2 同)

图 1 7 种对照品提取离子 (定量) UPLC-MS/MS

Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of 7 standard substances

将上述系列混合对照品溶液分别按 2.4 和 2.5 项下色谱-质谱条件进样分析, 以 7 种成分的质量浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 为横坐标, 以峰面积为纵坐标进行线性回归。结果见表 2。

表 2 7 种成分的回归方程和相关系数

Table 2 Regression equations and correlation coefficients of 7 chemical drugs

成分	线性范围 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回归方程	<i>r</i>
原儿茶醛	0.10 ~ 1 000	$Y = 59.514 2 + 332.338 X$	0.997 6
丹酚酸 B	0.092 ~ 460	$Y = 2 229.26 + 1 034.6 X$	0.998 4
迷迭香酸	0.184 ~ 920	$Y = -480.366 + 878.123 X$	0.999 3
丹参酮 I	0.208 ~ 1 040	$Y = 33 773.6 + 35 015.4 X$	0.991 7
丹参酮 II _A	0.192 ~ 960	$Y = 23 250.1 + 52 522 X$	0.997 4
隐丹参酮	0.196 ~ 980	$Y = 20 395.6 + 37 924.9 X$	0.996 3
二氢丹参酮	1 ~ 1 000	$Y = 46 382.1 + 45 241.4 X$	0.993 6

2.7 检测限和定量限的测定 分别取 2.1 项下单一对照品储备液适量, 用 50% 甲醇稀释, 按 2.4 和 2.5 项下色谱-质谱条件测定方法检出限和定量限。其结果分别为原儿茶醛 ($0.05, 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 丹酚酸 B ($0.046, 0.092 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 迷迭香酸 ($0.092, 0.184 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 丹参酮 I ($0.104, 0.208 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 丹参酮 II_A ($0.096, 0.192 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 隐丹参酮 ($0.098, 0.196 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), 二氢丹参酮 ($0.5, 1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.8 加样回收率试验 取 $100 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹参注射液 100 mL, 分别加入 2.2 项下混合对照品储备液适量, 制成高、中、低 3 个浓度混合对照品溶液, 每个浓度溶液 6 份, 回收率见表 3。

表 3 7 种成分的加样回收率 ($n=6$)

Table 3 Recoveries of 7 chemical drugs ($n=6$)

成分	样品中量 $/\mu\text{g}$	加入量 $/\mu\text{g}$	测得量 $/\mu\text{g}$	回收率 $/\%$	RSD $/\%$
原儿茶醛	2.71	1	3.61	90.04	1.6
	2.71	10	14.31	116.05	1.1
	2.71	100	91.66	88.95	1.9
丹酚酸 B	0.08	0.92	1.09	109.97	4.3
	0.08	9.2	8.43	90.81	3.7
	0.08	92	86.88	94.35	4.5
迷迭香酸	2.15	0.92	3.19	112.53	3.2
	2.15	9.2	12.24	109.66	3.8
	2.15	92	91.33	96.93	2.5
丹参酮 I	0	1.04	1.12	107.85	2.3
	0	10.4	11.09	106.64	1.2
	0	104	89.13	85.71	0.8
丹参酮 II _A	0	0.96	1.01	105.71	2.2
	0	9.6	10.58	110.21	1.0
	0	96	83.33	86.81	0.7
隐丹参酮	0	0.98	1.04	106.38	3.3
	0	9.8	10.18	103.85	0.9
	0	98	85.86	87.62	0.7
二氢丹参酮	0	1	1.05	105.03	4.7
	0	10	11.21	112.11	0.9
	0	100	83.42	83.41	1.3

注: 称样量经计算均为 10 mg。

由表 3 可看出, 低浓度平均回收率在 90.04% ~ 112.53%, RSD < 4.7%; 中浓度平均回收率为 90.81% ~ 116.05%, RSD < 3.8%; 高浓度平均回收率为 83.41% ~ 96.93%, RSD < 4.5%。结果表明, 各成分回收率良好。

2.9 重复性试验 取同一份供试品溶液 6 份, 分别于 0, 6, 12, 18, 24 h 平行进样测定, 结果显示各成分的峰面积 RSD 的平均值分别为原儿茶醛 0.9%, 丹酚酸 B 1.2%, 迷迭香酸 0.8%, 丹参酮 I 0.5%, 丹参酮 II_A 0.8%, 隐丹参酮 1.1%, 二氢丹参酮 0.9%, 表明供试品溶液在 24 h 内保持稳定。

2.10 样品测定 将上述分析方法用于不同类型丹参药物 7 种成分的测定, 进行 UPLC-MS/MS 分析,

色谱见图 2。定量测量结果见表 4。不同类型的丹参药物中活性成分的含量存在明显的差异。

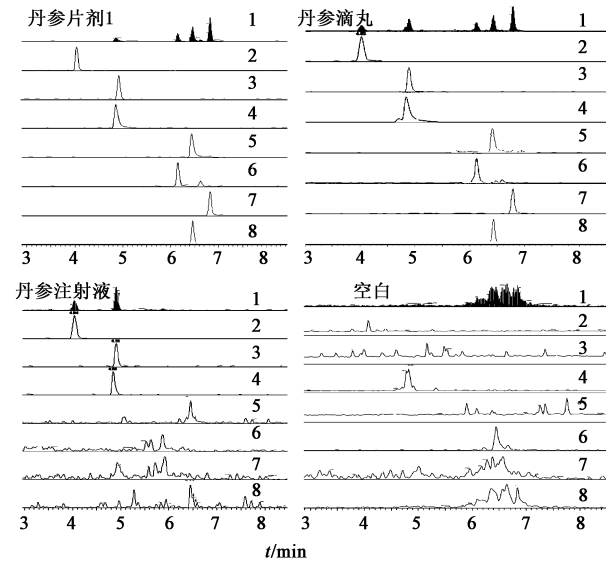


图 2 不同类型丹参药物的 UPLC-MS/MS
Fig 2 UPLC-MS/MS chromatograms of different types of Danshen

表 4 不同类型丹参样品中 7 种成分测定

Table 4 Determination results of different types of Danshen

样品	原儿茶醛	丹酚酸 B	迷迭香酸	丹参酮 I	丹参酮 II _A	隐丹参酮	二氢丹参酮
丹参片剂 1/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	21.104	1 052.46	750.7	226.42	692	442.506	126.548
丹参片剂 2/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	50.595	7 001.24	682.53	418.82	654.12	501.64	254.54
丹参滴丸/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	1 416.158	402.614	831.226	10.687	21.473	17.189	9.413
丹参注射液/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	268.088	7.981	213.477	-	-	-	-

注：“-”表示未检测到。

[参考文献]

[1] 马丙祥,董宠凯. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国药房, 2014, 25(7): 663-665.
 [2] 王伟辰,吴学辉,郑芳. 丹参药理学研究进展[J]. 海峡药学, 2013, 25(10): 24-25.
 [3] 施超欧,陶萍. 丹参注射液主要成分的 HPLC 及 LC-MS 定性分析[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 5(3): 29-33.
 [4] 刘梅,夏鑫华,俞桂新,等. 丹参药材超高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 广州中医药大学学报, 2009, 26(6): 559-564.
 [5] 翟学佳,徐锦凤. 高效液相色谱法同时测定丹参药材水溶性和脂溶性成分的含量[J]. 医药导报, 2009, 28(10): 1345-1348.
 [6] 赵静,李玉琴,段瑞,等. 高效液相色谱法测定百花丹参 3 种炮制品中 5 种酚酸类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(23): 154-157.
 [7] 张锋忠,骆天功. HPLC 法测定丹参益坤口服液中丹

3 讨论

3.1 液质条件选择 分别对测定过程中的液相流动相和质谱参数进行筛选和优化。当采用甲醇-水作为流动相时,液相分离效果差。在水相中加入 0.1% 甲酸时,分离效果明显提高。因此采用了 0.1% 甲酸-甲醇作为流动相梯度洗脱。因本实验是同时分析丹参样品中 7 种水溶性和脂溶性成分的含量,所以采用电喷雾离子源(ESI)正负离子交替扫描,选择反应离子检测(SRM)模式。

3.2 含量分析 测定了丹参片剂、丹参滴丸、丹参注射液 3 种不同类型的丹参药物中活性成分的含量,发现存在明显的差异。其中丹参片剂中脂溶性和水溶性成分含量都比较大;丹参滴丸中水溶性成分含量明显高于脂溶性成分的含量;但在丹参注射液中却仅检测到水溶性成分,几乎检测不到脂溶性成分含量。

本文对丹参药品中 7 种水溶性和脂溶性成分含量进行了液质分析,为丹参药材及其制剂的研究和质量控制提供了依据。

参酮 II_A、丹参酮 I 及隐丹参酮的含量[J]. 中药材, 2015, 38(8): 1745-1746.
 [8] 张琳琳,王淳,宋志前,等. HPLC 同时测定白花丹参中丹参酮 II_A、隐丹参酮、丹参酮 I 和二氢丹参酮 I 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 62-65.
 [9] 张雪,褚文静,刘伟娜,等. 高效液相色谱二极阵列检测法同时测定丹参滴注液中四种水溶性成分的含量[J]. 分析科学学报, 2010, 26(1): 109-112.
 [10] 王伟,张雪,褚文静,等. 高效液相二极阵列检测法同时测定丹参粉剂剂中 4 种水溶性成分的含量[J]. 中成药, 2011, 33(2): 266-269.
 [11] 汤杰,宋冰娜,郑盼,等. HPLC 测定冠心病丹参胶囊中主成分的含量[J]. 中国现代中药, 2015, 17(10): 1078-1082.
 [12] 李耿,孟繁蕴,杨洪军,等. UPLC 法同时测定丹参中 11 种成分的含量[J]. 中国药房, 2014, 25(19): 1766-1768.

[责任编辑 顾雪竹]