

基于 HPLC-Q-TOF/MS 和 GC/MS 的香丹注射液化学成分分析

高 添¹, 杨凌鉴^{1,2}, 盛鑫康¹, 师白梅¹, 韩焰青¹, 贾 璞^{1*}, 张亚军¹, 王世祥¹, 于 洁¹, 郑晓晖^{1*}

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 2. 安康学院化学化工学院, 陕西 安康 725000)

摘要: **目的** 基于 HPLC-Q-TOF/MS 和 GC/MS 法分析香丹注射液的化学成分。**方法** 水溶性成分分析采用 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.05% 甲酸水-甲醇, 梯度洗脱; 柱温 30 ℃; 电喷雾离子源正负离子模式下对色谱流出物进行质谱检测, 利用对照品、二级质谱信息及文献对各主要色谱峰进行归属; 挥发油分析采用 HP-5MS 毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm, 0.25 μm); 程序升温, 进样口温度 260 ℃; 体积流量 1.5 mL/min; 进样量 1 μL; 分流比 1:1; EI 离子源, 通过标准谱库检索并结合文献对主要色谱峰进行鉴定。**结果** 香丹注射液中共鉴定出 53 个水溶性成分和 9 个挥发性成分。**结论** 该方法准确稳定, 重复性好, 可用于香丹注射液的成分分析。

关键词: 香丹注射液; 化学成分; HPLC-Q-TOF/MS; GC/MS

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)02-0345-08

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.021

Analysis of chemical constituents of Xiangdan Injection by HPLC-Q-TOF/MS and GC/MS

GAO Tian¹, YANG Ling-jian^{1,2}, SHENG Xin-kang¹, SHI Bai-mei¹, HAN Yan-qing¹, JIA Pu^{1*}, ZHANG Ya-jun¹, WANG Shi-xiang¹, YU Jie¹, ZHENG Xiao-hui^{1*}

(1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. School of Chemistry & Engineering, Ankang University, Ankang 725000, China)

KEY WORDS: Xiangdan Injection; chemical constituents; HPLC-Q-TOF/MS; GC/MS

香丹注射液是由丹参水提物与降香饱和芳香水按一定比例配伍精制而成的中药制剂, 属于国家基本药物, 具有扩张血管和增强冠脉血流量等作用, 临床上常用于治疗由血瘀等诱发的冠心病、心肌缺血及脑血管相关疾病^[1-3]。目前, 香丹注射液的化学成分研究多局限于单一药材成分或个别指标成分进行定性定量检测^[4-5], 而个别成分的分析难以阐明制剂的有效成分。因此, 全面分析香丹注射液化学成分轮廓对于明确制剂的药效物质基础具有重要意义。

近年来, 高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱 (HPLC-Q-TOF/MS) 和气相色谱-质谱联用技术

(GC/MS) 等色谱-质谱联用技术凭借其具有的高分离性、高分辨率以及高灵敏度等优势, 在不需对对照品的情况下能提供化合物结构表征所需的精确质量数、元素组成、质谱碎片等信息, 在中药非挥发性成分和挥发性成分的定性检测方面得到了日益广泛地应用^[6-7]。

本研究首次采用 HPLC-Q-TOF/MS 结合 GC/MS 的分析方法对香丹注射液中化学成分进行定性分析, 采用高分辨质谱分析结合对照品比对及相关文献共鉴定出 53 个水溶性化合物, 主要为酚酸类、有机酸类、丹参酮类和氨基酸类等。采用标准质谱图库检索结合文献资料参考, 共鉴定出 9 个挥发性

收稿日期: 2018-05-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603259); 教育部“创新团队发展计划”滚动支持 (IRT_15R55); 陕西省重点研发计划项目 (2017ZDCXL-SF-01-02-01); 西北大学校级大学生创新创业训练 (2018297)

作者简介: 高 添 (1991—), 女, 硕士生, 从事中药代谢与分析研究。Tel: (029) 88302686

* 通信作者: 贾 璞, 女, 讲师, 从事中药复方代谢及分析研究。Tel: (029) 88302686, E-mail: jiapu77@126.com

郑晓晖, 男, 教授, 从事药物代谢与分析研究。Tel: (029) 88302686, E-mail: zhengxh@nwu.edu.cn

成分,较为全面地揭示了其化学组成,以期为香丹注射液的质量控制和药效物质基础研究提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Agilent 1260 HPLC-6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 联用系统、Agilent 6890N GC/5973N MSD 气相色谱-质谱联用仪系统(美国 Agilent 公司);VER-TEX26 型快速混匀器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);优普 UPD-II-10T 超纯水机(四川优普超纯科技有限公司);XS105DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);KQ5200DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药 丹参素钠(DSS)、原儿茶酸(PA)、原儿茶醛(PAL)、香草酸(VA)、咖啡酸(CA)、迷迭香酸(RA)、丹酚酸 B(Sal B)对照品(均购自于中国食品药品检定研究院,批号分别为 110855-201311、110809-201205、110810-200205、110776-200402、110885-200102、111871-201203、111562-201212,含有量均大于 98%);紫草酸(LA)对照品(批号 PCM-SM-006,含有量大于 98%)购自天津万象恒远科技有限公司;丹酚酸 A(Sal A)对照品(批号为 DST160928-009,含有量大于 98%)购自成都德思特生物技术有限公司;香丹注射液(四川升和药业股份有限公司,国药准字 Z51021309,批号 1510203,规格 10 mL×5 支);上述对照品与注射剂均于 4℃条件下冷藏备用。

色谱纯甲醇及乙腈、质谱级甲酸及甲酸铵(美国 Fisher Scientific 公司);超纯水(电阻率为 18.25 MΩ)由优普 UPD-II-10T 超纯水机系统制备;其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱-质谱联用条件

2.1.1 HPLC-Q-TOF/MS 条件 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相 0.05% 甲酸水(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~25 min, 7%~15% B; 25~45 min, 15%~25% B; 45~80 min, 25%~50% B; 80~100 min, 50%~80% B; 100~115 min, 100% B; 115~120 min, 5% B);柱温 30℃;体积流量 0.6 mL/min;柱后分流比为 3:1;进样量 20 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI);采用正负离子 2 种模式进行检测;负离子条件下毛细管电压 3 500 V;正离子模式下为 4 000 V;干燥气体积流量 10 L/min;干燥气温度 350℃;雾化气压力

275.8 kPa;碎裂电压 135 V;扫描范围 100~1 100 *m/z*;采样频率 0.2 s;碰撞能分别设为 10、20、30、40 eV;采集数据前利用调谐液校准质量轴,保证质量测定误差小于 10×10⁻⁶。见图 1。

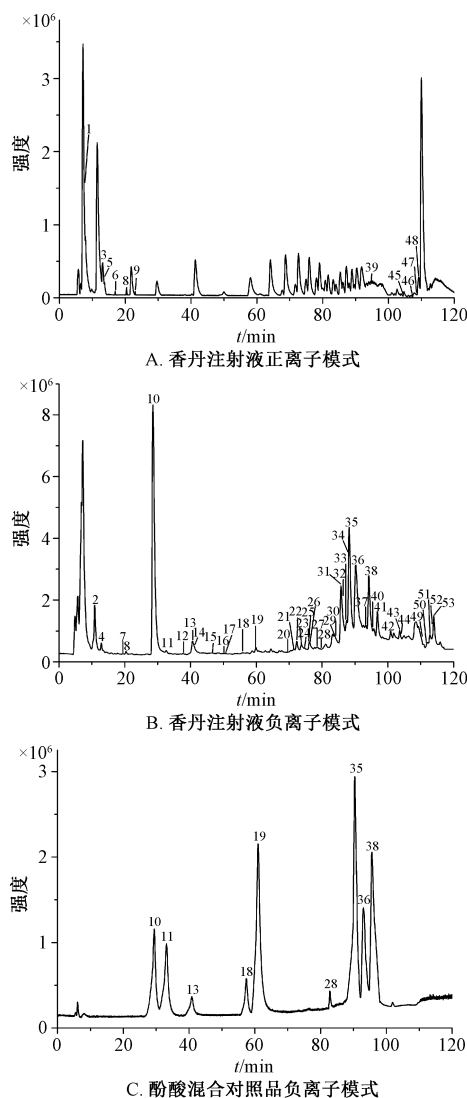


图 1 各样品总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of various samples

2.1.3 GC/MS 条件 Agilent HP-5 MS 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm);程序升温,初始温度 60℃,保持 0 min,以 1.5℃/min 的速率升温至 110℃,保持 5 min,再以 1.5℃/min 的速率升温至 120℃,保持 10 min,接着以 2℃/min 的速率升温至 160℃,保持 5 min,最后以 20℃/min 的速率升温至 260℃,保持 0 min;载气氦气;体积流量 1.5 mL/min;分流比 1:1;进样体积 1 μL;进样口温度 260℃;气质接口温度 260℃;电离方式电子轰击(EI);电离能量 70 eV;扫描范围 *m/z* 30~600;扫描间隔 0.5 s。

2.2 溶液制备

2.2.1 酚酸混合对照品溶液制备 精密称取丹参素钠、原儿茶酸、原儿茶醛、香草酸、咖啡酸、紫草酸、迷迭香酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A 对照品各 5.0 mg，置于 5.0 mL 的棕色量瓶中，用甲醇定容，得到 1.0 mg/mL 的各酚酸混合对照品贮备液。再用甲醇稀释，得到 25 mg/L 各酚酸混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备

2.2.2.1 HPLC-Q-TOF/MS 供试品溶液 精密量取同一批次香丹注射液 1.0 mL，置于 5.0 mL 量瓶中，用超纯水定容，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.2.2.2 GC/MS 供试品溶液 精密量取同一批次的香丹注射液 10.0 mL，置于 20.0 mL 的具塞试管

中，用 5.0 mL 二氯甲烷萃取 3 次，合并萃取液，经无水硫酸钠干燥后，将萃取液自然挥发至约 0.5 mL，即得。

3 结果

3.1 水溶性成分 按“2.2.2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.1.1”项条件下进样，利用质谱数据获取各成分结构鉴定所需的母离子及子离子在合理测定误差内的精确质量数、计算其元素组成。香丹注射液中水溶性成分在正离子和负离子模式采集的总离子流图以及酚酸混合对照品在负离子模式采集的 TIC 图见图 1。通过对照品比对、质谱裂解规律分析和文献报道，从香丹注射液水溶性成分中鉴定出 53 个化合物，其中包括 31 个酚酸、5 个丹参酮、8 个有机酸、4 个氨基酸、3 个核苷、2 个其他类化合物，见表 1。

表 1 香丹注射液 HPLC-Q-TOF/MS 分析

Tab. 1 HPLC-Q-TOF/MS analysis of Xiangdan Injection									
序号	t _R /min	相对分子量	分子式	误差(×10 ⁻⁶)	实测分子量		二级碎片离子	化合物	来源 离子模式
1	7.392	116.070 6	C ₅ H ₉ NO ₂	4.80	116.070 1	70.065 9		脯氨酸 ^[8]	丹参 +
2	11.278	128.035 3	C ₅ H ₇ NO ₃	-4.92	128.036 0	128.031 9, 82.031 2		焦谷氨酸 ^[8]	丹参 -
3	13.108	132.101 9	C ₆ H ₁₃ NO ₂	3.95	132.101 4	86.095 3		异亮氨酸 ^[9]	丹参 +
4	13.217	117.019 3	C ₄ H ₆ O ₄	-0.95	117.019 4	99.009 0, 73.030 5		琥珀酸 ^[10-11]	丹参 -
5	13.356	245.076 8	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	3.76	245.075 9	113.033 2		尿苷 ^[12]	丹参 +
6	16.936	268.104 0	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	0.15	268.104 0	136.059 5, 119.033 5		腺苷 ^[13]	丹参 +
7	19.544	282.084 4	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	2.03	282.083 8	150.043 0, 133.014 6, 108.021 3		鸟苷 ^[14]	丹参 -
8	20.372	164.071 7	C ₉ H ₁₁ NO ₂	-1.67	164.072 0	147.045 5, 103.056 0, 72.009 7		苯丙氨酸 ^[15]	丹参 -
		166.086 3	C ₉ H ₁₁ NO ₂	2.47	166.085 8	120.080 4, 103.054 2, 93.070 1			+
9	23.032	127.039 0	C ₆ H ₆ O ₃	1.46	127.038 8	109.027 0, 81.031 6		5-羟甲基糠醛 ^[16]	丹参 +
10	28.590	197.045 5	C ₉ H ₁₀ O ₅	0.83	197.045 4	179.034 5, 135.044 7, 123.044 9		丹参素 ^a	丹参 -
11	32.616	153.019 3	C ₇ H ₆ O ₄	3.29	153.018 8	109.029 6		原儿茶酸 ^a	丹参 -
12	37.719	299.077 2	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	2.12	299.076 6	299.075 5, 137.025 1		<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid- <i>O</i> -glucoside ^[17]	丹参 -
13	40.635	137.024 4	C ₇ H ₆ O ₃	-0.77	137.024 5	108.021 7, 92.026 8		原儿茶醛 ^a	丹参 -
14	41.182	181.050 6	C ₉ H ₁₀ O ₄	1.52	181.050 4	163.036 8, 135.044 2, 119.050 3		3,4-二羟基苯基丙酸 ^[18]	丹参 -
15	46.732	357.061 6	C ₁₈ H ₁₄ O ₈	1.01	357.061 2	339.053 5, 313.071 4, 253.049 7,		紫丹参萘酸 A ^[18]	丹参 -
16	50.659	211.061 2	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	1.00	211.061 0	193.048 6, 178.030 0, 165.057 9,		丹参素甲酯 ^[11]	丹参 -
17	51.106	151.040 1	C ₈ H ₈ O ₃	-1.53	151.040 3	135.005 5, 121.026 9		香兰素 ^[19]	降香 -
18	56.491	167.035 0	C ₈ H ₈ O ₄	3.07	167.034 5	152.010 8, 123.045 0, 108.021 4		香草酸 ^a	丹参 -
19	59.887	179.035 0	C ₉ H ₈ O ₄	0.33	179.034 9	135.044 9		咖啡酸 ^a	丹参 -
20	69.078	371.098 4	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	-1.63	371.099 0	163.039 8, 119.050 4		4-(2-carboxyethenyl)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dihydro-7-hydroxy-3-methylester, [2α, 3β, 4(<i>E</i>)-3-benzofurancarboxylic acid] ^[18]	丹参 -
21	71.783	163.040 1	C ₉ H ₈ O ₃	6.98	163.038 9	119.050 2, 93.035 5		对香豆酸 ^[18]	丹参 -
22	72.264	537.103 8	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	1.41	537.103 1	493.111 6, 339.051 0, 295.061 3		丹酚酸 I ^[18]	丹参 -
23	73.722	537.103 8	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	-1.66	537.104 8	493.110 0, 339.050 9, 295.060 1, 185.023 3		丹酚酸 H ^[18]	丹参 -
24	75.279	193.050 6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-0.46	193.050 7	178.025 3, 134.035 7		阿魏酸 ^[20]	丹参 -
25	76.091	313.071 8	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	-0.31	313.071 9	295.061 2, 269.082 5, 203.035 4, 159.042 8		丹酚酸 F ^[21]	丹参 -

续表 1

序号	t_R/min	相对分子量	分子式	误差($\times 10^{-6}$)	实测分子量	二级碎片离子	化合物	来源	离子模式
26	76.174	537.103 8	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	-1.30	537.104 5	493.113 7, 295.060 7, 185.023 2	丹酚酸 J ^[22]	丹参	-
27	78.361	193.050 6	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	-1.08	193.050 8	178.026 3, 134.037 5	异阿魏酸 ^[23]	丹参	-
28	80.614	537.103 8	$\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	-0.81	537.104 3	493.111 3, 339.051 5, 295.060 8	紫草酸 ^a	丹参	-
29	83.861	339.051 0	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_7$	0.49	339.050 9	321.043 6, 295.062 3, 280.037 4	丹酚酸 G ^[18]	丹参	-
30	84.126	717.146 1	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	-0.47	717.146 5	519.093 7, 339.051 0, 321.040 7, 295.061 1	丹酚酸 B 的异构体 ^[24-25]	丹参	-
31	85.717	417.082 7	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	-2.84	417.083 9	373.091 5, 197.045 4, 175.039 8	丹酚酸 D ^[26]	丹参	-
32	86.081	717.146 1	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	-0.10	717.146 2	519.091 3, 339.050 8, 321.040 0, 295.060 3	异丹酚酸 B ^[24-25]	丹参	-
33	87.523	493.114 0	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	1.91	493.113 1	313.071 4, 295.060 1, 277.050 3, 185.023 7	异丹酚酸 A ^[27]	丹参	-
34	87.954	539.113 6	$\text{C}_{34}\text{H}_{20}\text{O}_7$	-7.91	539.111 2	539.113 9	丹酚酸 S/T ^[28]	丹参	-
35	88.235	359.077 2	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	0.72	359.077 0	197.044 1, 179.033 4, 161.023 0	迷迭香酸 ^a	丹参	-
36	90.224	717.146 1	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	-3.17	717.148 4	519.092 1, 339.050 1, 321.040 1, 295.060 8	丹酚酸 B ^a	丹参	-
37	93.305	717.146 1	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	1.56	717.145 0	519.093 7, 339.051 8, 321.041 3, 295.061 3	丹酚酸 E ^[24-25]	丹参	-
38	94.216	493.114 0	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	1.02	493.113 5	313.069 4, 295.060 8, 185.024 5	丹酚酸 A ^a	丹参	-
39	94.855	329.138 4	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_5$	0.57	329.138 2	311.131 6, 293.113 2, 267.138 9	氢化二羟基丹参酮 II _A ^[28]	丹参	+
40	95.045	565.135 1	$\text{C}_{29}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	-2.41	565.136 5	367.083 6, 321.039 3, 245.044 8	乙基紫草酸 ^[18]	丹参	-
41	96.801	491.098 4	$\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	0.17	491.098 2	311.055 3, 293.044 7, 249.055 0, 197.045 0	异丹酚酸 C ^[10,18]	丹参	-
42	100.860	491.098 4	$\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	-1.44	491.099 1	311.052 6, 293.044 0, 197.047 1	丹酚酸 C ^[10,18]	丹参	-
43	103.557	331.155 1	$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_5$	-2.82	331.156 0	313.154 9	paramiltioic acid ^[24]	丹参	-
44	103.843	357.061 6	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_8$	5.25	357.059 7	313.071 0, 295.059 7, 269.080 8, 159.044 4	原紫草酸 ^[24]	丹参	-
45	104.481	293.080 8	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_4$	1.31	293.080 4	249.090 6, 231.099 9, 193.104 1, 178.078 2	羟基丹参酮 I ^[28]	丹参	+
46	107.496	327.122 7	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_5$	5.06	327.121 1	309.112 4, 269.120 2, 223.077 7	羟基丹参酮 II _B ^[28]	丹参	+
47	108.835	315.159 1	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$	-3.39	315.160 1	297.147 5, 269.154 4	丹参酮 V ^[28]	丹参	+
48	109.203	297.148 5	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$	1.91	297.148 0	269.155 0, 253.158 0, 238.134 4, 211.113 0	隐丹参酮的异构体 ^[28]	丹参	+
49	110.387	199.170 4	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$	-0.66	199.170 5	181.161 2	月桂酸 ^[29]	丹参	-
50	111.985	227.201 7	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	-0.55	227.201 8	209.191 3	肉豆蔻酸 ^[29]	丹参	-
51	112.773	279.233 0	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	-0.85	279.233 2	261.221 5	亚油酸 ^[29]	丹参	-
52	113.667	255.233 0	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	0.01	255.233 0	237.221 1	棕榈酸 ^[29]	丹参	-
53	113.966	281.248 6	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	-2.81	281.249 4	263.236 4	油酸 ^[29]	丹参	-

注: +和-分别表示正离子模式和负离子模式,a 表示与对照品对照

3.1.1 酚酸类成分鉴定 在香丹注射液中共检测出 31 个酚酸类物质,其中 30 个来自丹参,1 个来自降香,该类成分在负离子模式下响应较好。丹酚酸中含有丹参素、原儿茶酸、咖啡酸及其二聚体或

多聚体的结构,且二级质谱中常出现丹参素,咖啡酸以及咖啡酰氧基等中性丢失。以化合物 **36** 为例,在负离子模式下,生成了准分子离子峰 m/z 717.14 ($[\text{M}-\text{H}]^-$),子离子 m/z 519.09, m/z 339.05,

m/z 321.04, m/z 295.06, 表明母离子 717.14 ($[M-H]^-$) 分别丢失了一分子丹参素, 一分子丹参素加一分子咖啡酸, 两分子丹参素, 一分子丹参素加一分子咖啡酸以及一分子二氧化碳。通过对照品和文献 [24-25] 比对, 确定化合物 **36** 为丹酚酸 B, 其二级质谱图和质谱裂解途径见图 2。

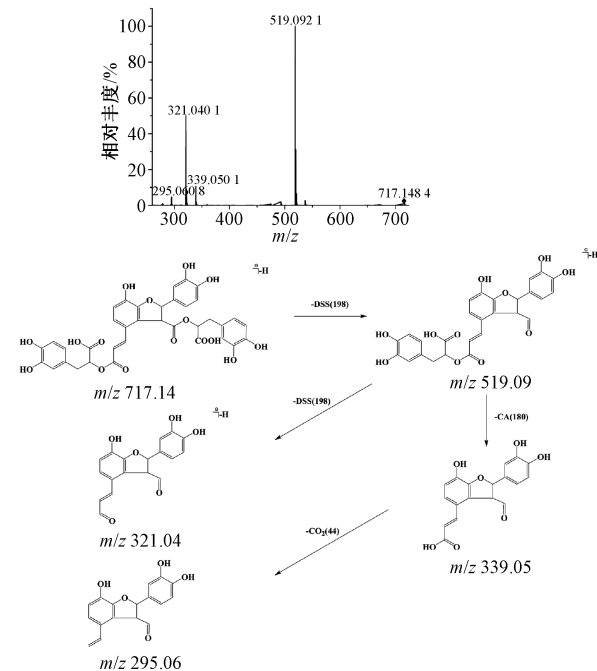


图2 丹酚酸 B 质谱裂解模式

Fig.2 Mass spectra and fragment pathway of salvianolic acid B

3.1.2 有机酸类成分鉴定 在香丹注射液中共检测到 8 个有机酸类成分, 均来源于丹参, 该类化合物在负离子模式下响应较好。由于该类化合物中含有羧基基团, 因此其分子离子峰在裂解过程中存在 44 Da(CO_2) 的中性丢失。以色谱峰 4 为例, 其准分子离子峰 $[M-H]^-$ 的质荷比为 m/z 117.019 4, 在外加碰撞能量的作用下, 该离子又进一步碎裂生成 $[M-H-CO_2]^-$ 的碎片离子 m/z 73.030 5, 其生成机制为脱去一分子 CO_2 , 根据文献 [10-11], 将其鉴定为琥珀酸, 其二级质谱图和质谱裂解途径见图 3。

3.1.3 丹参酮类成分鉴定 丹参酮类成分正离子模式下响应较好。正离子模式下, 共检测到 5 个该类化合物, 均来自于丹参。以化合物 **45** 为例, 母离子为 m/z 293.080 4 ($[M+H]^+$), 由于脱去一分子羟基和一分子羰基, 生成了特征性子离子 m/z 249.090 6, 该子离子继续丢失一分子水形成子离子 m/z 231.09, 根据文献 [28], 其质谱信息与羟

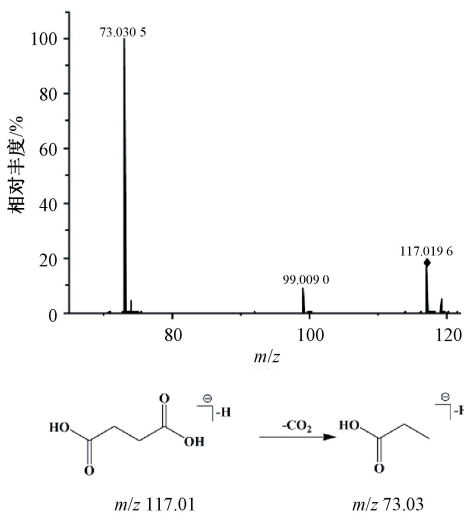


图3 琥珀酸质谱裂解模式

Fig.3 Mass spectra and fragment pathway of succinic acid

基丹参酮 I 一致, 因此, 将化合物 **45** 归属为羟基丹参酮 I, 其二级质谱图和质谱裂解途径见图 4。

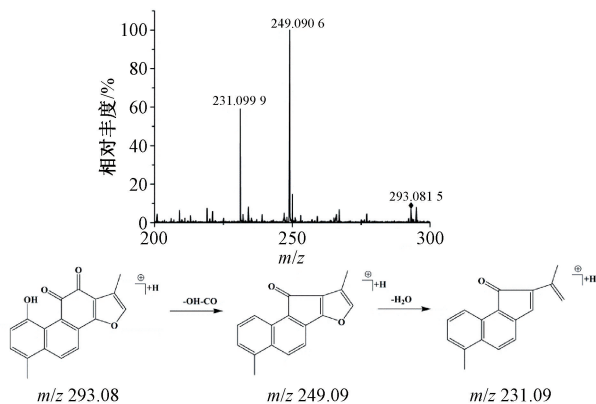


图4 羟基丹参酮 I 质谱裂解模式

Fig.4 Mass spectra and fragment pathway of hydroxytanshinone I

3.1.4 氨基酸类化合物鉴定 通过在质谱时间窗内提取离子流图共发现 4 个物质的色谱峰分别为化合物 **1~3**、**8**, 根据文献 [8-9, 15] 中检索化合物的一级二级质谱信息, 确定这 4 个物质分别为脯氨酸、焦谷氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸, 且均来自于丹参。以化合物 **1** 为例, 有 1 个分子离子峰 m/z 116.070 1 ($[M+H]^+$), 其主要的碎片离子为 m/z 70.060 1, 其形成机理是通过母离子丢失一分子甲酸而得到, 基于文献 [8], 推测化合物 **1** 为脯氨酸, 见图 5。

3.1.5 核苷类化合物鉴定 化合物 **5~6** 质子化后得到分子离子峰 $[M+H]^+$, 其质荷比分别为 m/z 245.075 9 和 268.104 0, 进一步脱去核糖残基得到

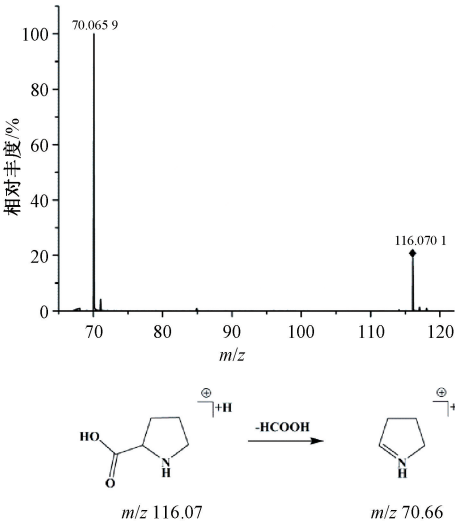


图 5 脯氨酸质谱裂解模式

Fig. 5 Mass spectra and fragment pathway of proline

子离子 m/z 113. 033 2 和 m/z 136. 059 5, 根据已有文献 [12-13], 确定化合物 5~6 分别为尿苷、腺苷; 化合物 7 首先去质子化得到准分子离子峰 m/z 282. 084 4 ($[M-H]^-$), 然后脱去一分子核糖得到 m/z 150. 043 0 ($[M-H-132]^-$), 接着脱去一分子氨 (NH_3) 得到碎片离子 m/z 133. 013 8 $[M-H-132-17]^-$, 结合文献 [14], 推断化合物 7 为鸟苷, 见图 6。

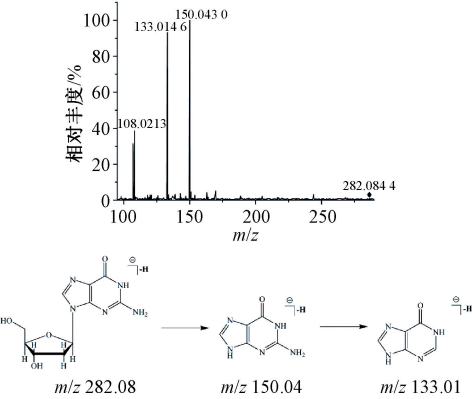


图 6 鸟苷质谱裂解模式

Fig. 6 Mass spectra and fragment pathway of guanosine

3.2 挥发性成分 在“2. 1. 2”项条件下, 对香丹注射液 GC/MS 分析供试品溶液进行定性分析, 获取香丹注射液挥发性成分 GC/MS 总离子流图, 见图 7。将香丹注射液二氯甲烷萃取液总离子流图中各色谱峰在 NIST 库中进行检索, 并与文献资料进行比对, 确定出香兰素^[22-32]、橙花叔醇^[32-34]、2, 4-二甲基-2, 6-庚二烯醛^[32, 35]等 9 个化合物, 见表 2。

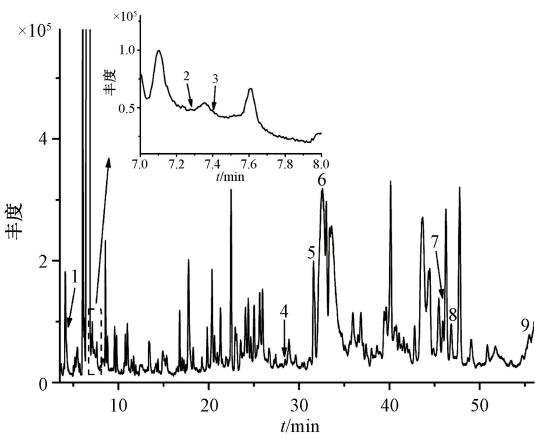


图 7 挥发性成分 GC/MS 总离子流图
Fig. 7 GC-MS total ion current chromatogram of volatile constituents

表 2 挥发性成分 GC/ MS 分析
Tab. 2 GC/MS analysis of of volatile constituents

序号	保留时间 t_R /min	分子式	m/z	成分	鉴定 依据
1	4. 344	$C_{10}H_{16}$	136	蒎烯 ^[32]	N, R
2	7. 290	$C_{10}H_{16}$	136	红樟油 ^[32]	N, R
3	7. 400	$C_{10}H_{18}O$	154	桉树脑 ^[32]	N, R
4	28. 461	$C_{10}H_{12}O_2$	164	丁香油酚 ^[32]	N, R
5	31. 143	$C_{12}H_{12}$	156	1,4-二甲基萘 ^[22]	N, R
6	32. 604	$C_8H_8O_3$	152	香兰素 ^[22, 32]	N, R
7	46. 126	$C_{15}H_{26}O$	222	橙花叔醇 ^[32-34]	N, R
8	46. 751	$C_9H_{14}O$	138	2,4-二甲基-2,6-庚二烯醛 ^[32, 35]	N, R
9	55. 514	$C_9H_{14}O$	138	2-(5-甲基呋喃)丙醛 ^[34]	N, R

注: N 表示 Nist 谱库, R 表示文献

4 讨论

4.1 挥发性成分提取溶剂考察 本研究对提取溶剂进行了考察, 分别尝试了石油醚、二氯甲烷及乙酸乙酯 3 种溶剂, 发现当提取溶剂为二氯甲烷时, GC/MS 中检测的色谱峰个数较多, 且提取过程中不出现乳化现象, 因而采用二氯甲烷作为萃取溶剂。

4.2 条件优化

4.2.1 HPLC-Q-TOF/MS 条件优化 液相色谱条件和质谱采集参数是影响液相色谱-质谱高效分离和灵敏检测的关键因素^[36-38]。在流动相选择方面, 由于甲醇表现出与乙腈相似的分离效果且较为廉价, 因而本实验选择甲醇作为有机相; 在水相添加剂的选择方面, 本研究分别选取了 0. 05% 甲酸水-甲醇、0. 1% 甲酸水-甲醇、0. 2% 甲酸水-甲醇、1 mmol/L 甲酸铵-甲醇、2 mmol/L 甲酸铵-甲醇、5 mmol/L 甲酸铵-甲醇等 6 种不同的流动相体系, 当水相中甲酸的比例为 0. 05% 时, 香丹注射液中

各成分的质谱响应最好，分辨率最佳；在洗脱方式选择方面，香丹注射液中成分复杂且部分成分极性十分接近，因而，本研究采用了梯度洗脱的方式；在柱温选择方面，当柱温为 30 ℃ 时，香丹注射液中各成分分离较好。

在质谱采集模式选择方面，本研究发现，负离子模式下香丹注射液中酚酸类、有机酸等成分的质谱响应较好，正离子模式下丹参酮类、氨基酸等成分的质谱响应较好，因而本研究同时采用正负离子 2 种模式对香丹注射液水溶性成分进行检测。其次，对毛细管电压、碎裂电压、雾化气压力、干燥气温度、干燥气流速等质谱参数进行了优化。

4.2.2 GC-MS 条件优化 温度是影响 GC/MS 分离检测的重要因素^[39]。由于香丹注射液中挥发性成分较为复杂，采用恒温的方式无法达到良好效果，且降低了质谱检测的分辨率，因而本研究采用程序升温条件，各挥发性成分的分离和分辨率较好。

4.3 成分分析 近年来，关于香丹注射液中水溶性成分的检测多集中在丹参素、原儿茶醛、丹参酚酸 B 等酚酸类成分，未涉及其他成分的报道^[40]。本研究在前人基础上，采用 HPLC-Q-TOF/MS 法对香丹注射液中的水溶性成分进行表征，不仅检出 31 个酚酸，还检出丹参酮、有机酸、氨基酸、核苷等其他 4 类成分共 22 个化合物，其中酚酸类化合物占 60%，表明丹参酚酸类成分为香丹注射液的主要成分。

在香丹注射液挥发性成分的 GC/MS 分析中，共检出香兰素、橙花叔醇等 9 个化合物，与文献[22]报道的成分基本一致，并未检出文献[41-43]中报道的降香挥发油中氧化石竹烯、没药烯、金合欢烯等成分，推测可能与香丹注射液制剂中降香药材的来源以及制剂的加工形式有关。

本研究建立的 HPLC-Q-TOF/MS 和 GC/MS 分析方法较为全面地表征了香丹注射液中的化学成分，不仅完善了香丹注射液的质量控制方法，还可为该制剂体内药效物质基础研究奠定基础。

参考文献:

[1] 李 斐, 孟运莲. 香丹注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(1): 25-27.
[2] 李淑英. 香丹注射液对气滞血瘀证疗效与安全性再评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21): 318-320.
[3] 尹永芹, 朱俊访, 沈志滨, 等. 神经网络分析香丹注射液抗心肌缺血有效成分的谱效相关性研究[J]. 中草药, 2009,

40(8): 1284-1287.
[4] 穆象山, 张 强, 房信胜, 等. HPLC-DAD 同时测定香丹注射液中 7 种丹参酚酸类成分[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(12): 56-58.
[5] 袁继承, 尹永芹, 沈志滨, 等. HPLC 法测定香丹注射液中丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、丹酚酸 B 和丹酚酸 A[J]. 中草药, 2009, 40(S1): 128-131.
[6] Xia Y Y, Liu F L, Feng F, *et al.* Characterization, quantitation and similarity evaluation of *Codonopsis lanceolata* from different regions in China by HPLC-Q-TQF-MS and chemometrics[J]. *J Food Compos Anal*, 2017, 62: 134-142.
[7] Zhai W Y, Liu J H, Liu Q, *et al.* Rapid identification and global characterization of multiple constituents from the essential oil of *Cortex Dictamni* based on GC-MS[J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(12): 2671-2681.
[8] Kang H J, Yang H J, Kim M J, *et al.* Metabolomic analysis of meju during fermentation by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS) [J]. *Food Chem*, 2011, 127(3): 1056-1064.
[9] Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, Jurado-Gámez B, *et al.* Optimization study for metabolomics analysis of human sweat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1333: 70-78.
[10] Liu A H, Guo H, Ye M, *et al.* Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1161(1): 170-182.
[11] Zeng G F, Xiao H B, Liu J X, *et al.* Identification of phenolic constituents in *Radix Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/electrosprayionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2006, 20(3): 499-506.
[12] Liu M H, Tong X, Wang J Y, *et al.* Rapid separation and identification of multiple constituents in traditional Chinese medicine formula Shenqi Fuzheng Injection by ultra-fast liquid chromatography combined with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2013, 74: 141-155.
[13] Lu Z W, Wang Q, Wang M L, *et al.* Using UHPLC Q-Trap/MS as a complementary technique to in-depth mine UPLC Q-TOF/MS data for identifying modified nucleosides in urine [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1051: 108-117.
[14] Yang G, Zhang H, Chen T M, *et al.* Metabolic analysis of osteoarthritis subchondral bone based on UPLC/Q-TOF-MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(16): 4275-4286.
[15] Zhu B J, Cao H T, Sun L M, *et al.* Metabolomics-based mechanisms exploration of Huang-Lian Jie-Du decoction on cerebral ischemia via UPLC-Q-TOF/MS analysis on rat serum[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 216: 147-156.
[16] Zhen J, Villaniab T S, Guo Y, *et al.* Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves[J]. *Food Chem*, 2016, 190: 673-680.

- [17] Parejo I, Jauregui O, Sánchez-Rabaneda F S, *et al.* Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(12): 3679-3687.
- [18] Zhang Q Q, Dong X, Liu X G, *et al.* Rapid separation and identification of multiple constituents in Danhong Injection by ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(2): 147-160.
- [19] Hao M L, Beta T. Qualitative and quantitative analysis of the major phenolic compounds as antioxidants in barley and flaxseed hulls using HPLC/MS/MS[J]. *J Sci Food Agric*, 2012, 92(10): 2062-2068.
- [20] Gruz J, Novák O, Strnad M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS[J]. *Food Chem*, 2008, 111(3): 789-794.
- [21] 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.
- [22] 王少敏, 胡 青, 季 申. GC/MS 法和 UPLC/Q-TOF-MS 法研究丹香冠心注射液中的有效成分[J]. 中成药, 2012, 34(1): 78-84.
- [23] Guo W W, Beta T. Phenolic acid composition and antioxidant potential of insoluble and soluble dietary fibre extracts derived from select whole-grain cereals[J]. *Food Res Int*, 2013, 51(2): 518-525.
- [24] Tang J F, Li W X, Tan X J, *et al.* A novel and improved UHPLC-QTOF/MS method for the rapid analysis of the chemical constituents of Danhong injection[J]. *Anal Methods*, 2016, 8: 2904-2914.
- [25] Chen H, Zhang X M, Wang X M, *et al.* Qualitative analysis and simultaneous quantification of phenolic compounds in the aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* by HPLC-DAD and ESI/MSn[J]. *Phytochem Analysis*, 2011, 22(3): 247-257.
- [26] Wang J, Wei N, Zhao H Z, *et al.* Global chemome study by LC coupled with DAD and ESI-Q-TOF MS of a composite traditional chinese medicine Qishenyiqi Dropping Pills [J]. *Chromatographia*, 2010, 72(5-6): 431-440.
- [27] Chen X F, Lou Z Y, Zhang H, *et al.* Identification of multiple components in Guanxinning injection using hydrophilic interaction liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(11): 1661-1674.
- [28] Zhao X, Yang D H, Xu F, *et al.* The *in vivo* absorbed constituents and metabolites of Danshen decoction in rats identified by HPLC with electrospray ionization tandem ion trap and time-of-flight mass spectrometry[J]. *Biomed Chromatogr*, 2015, 29: 285-304.
- [29] Persson X M T, Błachnio-Zabielska A U, Jensen M D. Rapid measurement of plasma free fatty acid concentration and isotopic enrichment using LC/MS[J]. *J Lipid Res*, 2010, 51(9): 2761-2765.
- [30] Rameshkumar A, Sivasudha T, Jeyadevi R, *et al.* Profiling of phenolic compounds using UPLC - Q-TOF-MS/MS and nephroprotective activity of Indian green leafy vegetable *Merremia emarginata* (Burm. f.) [J]. *Food Res Int*, 2013, 50(1): 94-101.
- [31] Lv X J, Sun Z, Wang P L, *et al.* Chemical profiling and quantification of Dan-Deng-Tong-Nao-capsule using ultra high performance liquid chromatography coupled with high resolution hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry[J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2018, 148: 189-194.
- [32] 刘洪玲. GC-MS 法分析降香挥发油化学成分[J]. 中成药, 2009, 31(6): 915-917.
- [33] Zheng L H, Wang L, Guo X, *et al.* Essential oil composition from the seeds of *Dalbergia odorifera* T. Chen grown in Hainan, China[J]. *J Food Agric Environ*, 2011, 9(3&4): 26-28
- [34] 李天略, 纪明慧, 舒火明, 等. 微波辅助提取-气相色谱-质谱法测定花梨木挥发油成分[J]. 理化检验 (化学分册), 2009, 45(8): 907-909.
- [35] 郭丽冰, 王 蕾, 廖华卫. 降香 CO₂超临界萃取物的 GC-MS 分析[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(1): 12-13.
- [36] Li Z F, Wang Y W, Ouyang H, *et al.* A novel dereplication strategy for the identification of two new trace compounds in the extract of *Gastrodia elata* using UHPLC/Q-TOF-MS/MS[J]. *J Chromatogr B*, 2015, 988: 45-52.
- [37] Zhu T T, Liu X, Wang X L, *et al.* Profiling and analysis of multiple compounds in rhubarb decoction after processing by wine steaming using UHPLC-Q-TOF-MS coupled with multiple statistical strategies[J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(15): 3081-3090.
- [38] Yuan L, Zhang Z Z, Hou Z G, *et al.* Rapid classification and identification of complex chemical compositions in traditional Chinese medicine based on UPLC-Q-TOF/MS coupled with data processing techniques using the KuDieZi injection as an example [J]. *Anal Methods*, 2015, 7: 5210-5217.
- [39] Santivañez-Veliz M, Moreno-Viguri E, Pérez-Silanes S, *et al.* Development, validation and application of a GC-MS method for the simultaneous detection and quantification of neutral lipid species in *Trypanosoma cruzi*[J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1061-1062: 225-232.
- [40] 姚卫峰, 刘 卉, 陈 汀, 等. 基于 UPLC-TOF-MS 基峰强度色谱图轮廓的香丹注射液快速质量分析[J]. 中国药房, 2010, 21(47): 4468-4470.
- [41] 刘海燕, 范玫玫, 何明珍, 等. 降香挥发油的研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(11): 附 3-5.
- [42] 赵祥升, 魏建和, 甘炳春, 等. GC 法同时测定降香中 4 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(3): 395-399.
- [43] 张 波, 李 佳, 刘红燕, 等. 降香挥发油的研究进展[J]. 中国药师, 2014, 17(8): 1403-1406.