

丹参主根和须根中主要酚酸类成分的分析

赵玉雪

(浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 杭州 311300)

摘 要:通过超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UHPLC-Q-TOF/MS)联用技术对丹参主根和须根中的主要酚酸类成分进行有效的鉴定和相对定量分析. 色谱分离采用沃特世 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相(体积分数为 0.2% 的甲酸-乙腈)以 0.3 mL/min 流速梯度洗脱, 采用氘代 L-苯丙氨酸(L-phe-d5)作为内标, 质谱扫描以负离子模式采集数据. 建立了一个可以对丹参酚酸类成分进行鉴定和相对定量的方法. 采用该方法对丹参的主根和须根进行鉴定和相对定量分析, 发现丹参主根和须根中的主要活性成分种类和含量水平无明显差异.

关键词:丹参; 酚酸类成分; UHPLC-Q-TOF/MS

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 1673-1670(2022)02-0125-04

0 引言

与原儿茶醛不同, 丹参素在治疗心血管类疾病的药理作用方面, 除了可以通过降低炎症因子表达防止动脉粥样硬化, 降低 Ca^{2+} 超载、清除自由基以保护心肌细胞外, 还可以通过抑制心肌肥大、优化心肌能量代谢、改善心肌血流动力、降低心肌氧摄取率、抑制心肌纤维化来发挥功效^[1]. 更重要的是丹参素的毒副作用小, 因此其具有更好的开发利用前景. 其他小分子化合物, 如咖啡酸等, 作用机制类似, 具有相似的药理活性. 而较为复杂的酚酸类成分, 如迷迭香酸、丹酚酸 A、丹酚酸 B 等, 其药理作用机制与小分子化合物类似. 以丹酚酸 B 为例, 可以通过降低超敏 C 反应蛋白、同型半胱氨酸、低密度脂蛋白胆固醇表达来延缓动脉粥样硬化的进程, 通过清除自由基对心肌再灌注损伤起保护作用, 同时降低炎症因子的表达和 Ca^{2+} 超载来重构修复心肌组织, 改善血管内皮功能, 改善微循环, 扩展冠状血管以改善不稳定型心绞痛的预后^[2-8].

1 仪器和试剂

1.1 仪器

安捷伦 1290A Infinity II 超高效液相色谱仪配 G7120A 二元高压泵、G7167B 自动进样器、G7167-60005 控温箱、G7116B 柱温箱及

G7117BDAD 检测器; 6530A 四极杆-飞行时间质谱配双喷流电喷雾离子源(Dual AJS ESI); 控制及数据处理系统为 MassHunter 化学工作站(B. 08. 00).

1.2 试剂

丹参素钠、肉桂酸、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸、丹酚酸 A 和丹酚酸 B 标准品, 购买自上海源叶生物有限公司; L-苯丙氨酸、原儿茶醛和原儿茶酸标准品, 来源于中国药品生物制品检定所; 紫草酸标准品, 购买自大连美仑生物有限公司; 质谱级甲醇和乙腈, 购于德国默克有限公司; 超纯水, 由 Milli-Q 系统制备(美国 Millipore 公司).

2 试验

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱: 沃特世 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相为甲酸-乙腈(体积分数为 0.2%), 梯度洗脱; 体积分数为 5% ~ 95% 的乙腈(0 ~ 20 min), 后运行时间: 3 min; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL; 柱温: 35 °C.

2.1.2 质谱条件

采用双喷流电喷雾离子源, 负离子模式扫描, 以高纯 N_2 作为雾化电离气, 设置干燥气温度 350 °C, 流速 11 L/min, 雾化气压 310.275 kPa, 鞘气温度、流速设置与干燥气相同, 毛细管电压 4 kV, 碎

收稿日期: 2022-01-03

作者简介: 赵玉雪(1995—), 女, 山东省菏泽市人, 浙江农林大学林业与生物技术学院硕士研究生, 主要从事药用植物活性成分及质量评价研究.

片电压 120 V, 锥孔电压 60 V, 采集范围为 $m/Z = 100 \sim 3\ 200$. 仪器使用前以调谐液对仪器进行校正, 使用过程中不间断加入参比液进行质量校准.

2.2 对照品和供试品溶液的配制

分取 1 mg 对照品配成终浓度为 1 mg/mL 的母液, 等体积混合后稀释至浓度均为 2 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液. 供试品材料为陕西商洛 GAP 基地栽培的丹参株系采收的成熟种子, 培植在湿度 75%, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$ 的温室中, 经过 10 个月培育后采收, 将其根系拆分为主根和须根, 分别晾干后取适量磨粉过 40 目筛, 分取 0.1 mg 粉末置于 10 mL 容量瓶, 加入甲醇

至刻度线, 称重, 超声 30 min, 冷却后补足失重. 取 100 μL 提取液于 35 $^{\circ}\text{C}$ 、2 000 r/min 转速下挥干, 10 倍体积复溶, 复溶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min 后分取上清作为供试品溶液.

3 结果

3.1 对照品溶液的 UHPLC-Q-TOF/MS 成分分析

用 UHPLC-Q-TOF/MS 对丹参 11 种酚酸类成分进行定性分析, 负离子模式下提取特征离子色谱图, 见图 1(a). 主要成分的保留时间及主要碎片离子峰数据见表 1.

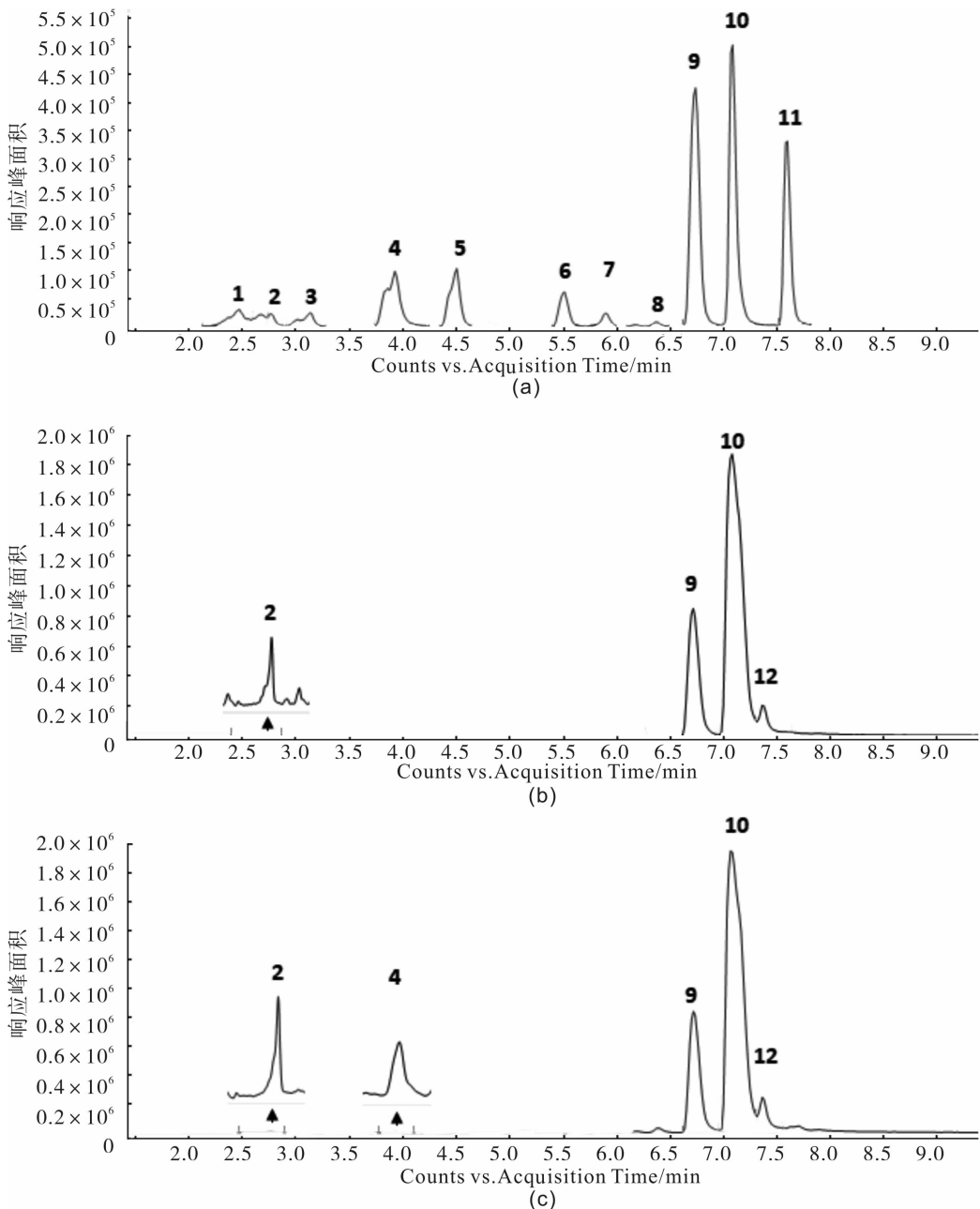


图 1 丹参负离子模式下提取特征离子色谱

表 1 丹参 11 种酚酸类成分的定性分析数据

序号	t_R/min	预计质荷比 m/Z	实测质荷比 m/Z	离子模式	分子式	化合物
1	2.466	164.071 7	164.071 3	$[M-H]^-$	$C_9H_{10}NO_2$	L-苯丙氨酸
2	2.760	197.045 0	197.045 9	$[M-H]^-$	$C_9H_{10}O_5$	丹参素
3	3.129	153.019 3	153.018 9	$[M-H]^-$	$C_7H_6O_4$	原儿茶酸
4	3.924	137.024 4	137.024 8	$[M-H]^-$	$C_7H_6O_3$	原儿茶醛
5	4.504	179.035 0	179.034 8	$[M-H]^-$	$C_9H_8O_4$	咖啡酸
6	5.515	163.039 5	163.040 7	$[M-H]^-$	$C_9H_8O_3$	肉桂酸
7	5.904	193.050 6	193.050 8	$[M-H]^-$	$C_{10}H_{10}O_4$	阿魏酸
8	6.376	537.103 8	537.104 0	$[M-H]^-$	$C_{27}H_{22}O_{12}$	紫草酸
9	6.720	359.077 2	359.078 0	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{16}O_8$	迷迭香酸
10	7.089	717.146 1	717.147 0	$[M-H]^-$	$C_{36}H_{30}O_{16}$	丹酚酸 B
11	7.603	493.114 0	493.114 5	$[M-H]^-$	$C_{26}H_{22}O_{10}$	丹酚酸 A
12	7.368	717.146 1	717.146 9	$[M-H]^-$	$C_{36}H_{30}O_{16}$	尚未明确

3.2 丹参供试品成分鉴定

以同样的色谱质谱条件分别对丹参主根须根供试品溶液进行定性分析,特征离子色谱图见图 1(b)、图 1(c)。图中 12 号化合物保留时间为 7.368 min,负离子模式下主要获得 717.146 9 的分子离子峰,推测其为丹酚酸 B 的同分异构体,因丹酚酸 B 的同分异构体丹酚酸 E、丹酚酸 L、异丹酚酸 B 结构相似,MS²(二级质谱)仍无法鉴定,需其

他分析方法做进一步鉴定。

3.3 丹参主根须根中主要活性成分相对定量分析

以内参 L-phe-d5 作校正后,主根须根中主要活性成分含量见表 2。受样品提取溶剂、提取方法选择的影响,样品提取率低,某些化合物未达到检测下限,但以已检测出的化合物做统计学分析,主根、须根中主要活性成分含量无统计学差异。

表 2 主要活性成分含量

单位: $\mu\text{g}/\text{mg}$

样品	丹参素	原儿茶醛	迷迭香酸	丹酚酸 B
20-7X 须根	0.188 367 7	0.042 409 0	2.018 025 3	17.651 973
20-7Z 主根	0.039 015 1	N. D.	1.134 268 4	21.593 894
91-5X 须根	0.061 370 8	N. D.	0.772 118 1	13.017 337
91-5Z 主根	0.032 764 2	N. D.	1.249 695 9	15.518 506
106-10X 须根	N. D.	N. D.	0.678 111 7	16.369 764
106-10Z 主根	0.018 002 6	N. D.	0.698 537 7	18.228 386

4 分析与讨论

在中国药典中,对鉴定丹参酚酸类成分所用的提取溶剂为体积分数为 80% 的甲醇,笔者为获取更多的化合物信息数据而选择纯甲醇用作提取溶剂。该操作导致供试品溶液中酚酸类成分提取率不高,影响了药材在质谱上的检测,导致某些化合物没有响应,故仍需进一步优化该检测方法,提高检测的灵敏度。

以已鉴定出的丹参素、丹酚酸 B 等主要活性

成分来看,丹参主根、须根中主要酚酸类成分含量无明显差异。尉广飞等发现,与主根相比,直径相对较细的须根中脂溶性的丹参酮类成分含量相对较高。以上研究均表明,与主根相比,须根具有相似的药用活性^[9]。但是实际炮制过程中一般是去须根然后主根切厚片制成丹参饮片,这种炮制方法在一定程度上是对丹参原药材的浪费。因此,需要在饮片炮制加工过程中不去细条和须根,或者将提取的须根酚酸类成分用于总酚酸盐注射液或丹红注射液等临床常用制剂的制备,以实现丹参药材的合理

利用并缓解丹参药材供不应求的情况。

参考文献:

- [1] 龚博, 朱彦, 樊官伟. 丹参素心血管药理作用研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2015(3):188-192.
- [2] 黄幼霞, 黄荣桂, 郑兴中. 迷迭香酸药理作用的研究进展[J]. 海峡药学, 2010(5):17-20.
- [3] 林秀芬. 中药丹参药理的研究进展[J]. 天津医科大学学报, 2004(增刊1):60-62.
- [4] 宋伟. 丹参的药理作用的研究进展[J]. 北方药学, 2013(5):52-53.

- [5] 王蓉. 丹酚酸 B 药理作用的研究概况[J]. 中医药导报, 2011(4):130-132.
- [6] 湛月娥, 徐江平. 丹酚酸 B 药理作用的研究进展[J]. 华南国防医学杂志, 2007(2):37-39, 54.
- [7] 樊宏伟, 肖大伟, 余黎, 等. 金银花及其有机酸类化合物的体外抗血小板聚集作用[J]. 中国医院药学杂志, 2006(2):145-147.
- [8] 戈升荣, 俞一心, 谢更新. 丹酚酸的药理作用研究进展[J]. 中药材, 2002(9):683-686.
- [9] 尉广飞, 李翠, 刘谦, 等. 丹参根部直径与其活性成分含量间的相关性研究[J]. 中成药, 2015(8):1780-1784.

(责任编辑:王彦江)

Analysis of the Main Phenolic Components in the Main and Fibrous Roots of *Salviae miltiorrhizae*

ZHAO Yuxue

(School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A&F University, Hangzhou, Zhejiang 311300, China)

Abstract: The UHPLC-Q-TOF/MS combined technology is used to effectively identify and quantitatively analyze the main phenolic acids in the taproot and fibrous roots of *Salviae miltiorrhizae*. The chromatographic separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) with a mobile phase (0.2% formic acid-acetonitrile) eluting in a gradient at a flow rate of 0.3 mL/min. Deuterated L-phenylalanine (L-phe-d5) was used as an internal standard, and the mass spectrometry scan was performed in negative ion mode to collect data. A method was developed that allows the identification and relative quantification of phenolic acid components of *Salviae miltiorrhizae*. Through the identification and relative quantification of the main and fibrous roots of *Salviae miltiorrhizae* with the proposed method, it is revealed that there is no significant differences in the types and levels of the main active ingredients between the main and fibrous roots of *Salviae miltiorrhizae*.

Key words: *Salviae miltiorrhizae*; phenolic acids; UHPLC-Q-TOF/MS

