

## 液质联用技术对复方蒲公英灌肠液的色谱指纹图谱的分析

复方蒲公英灌肠液是由南方医院药学部与临床合作研制的临床验方,由蒲公英、败酱草等7味中药组成,临床主要用于慢性盆腔炎、异位妊娠等妇科疾病。鉴于中药方剂具有复杂的化学成分,目前有许多先进分离分析、鉴定方法,例如薄层扫描法(TCL)、高效逆流色谱(HSCCC)、高效液相色谱(HPLC)以及高效毛细管电泳(HPCE)等,而HPLC/MS/MS联用技术结合了质谱和色谱的优点,且质谱具极高的检测灵敏度和特异性,非常适合中药及中药复方等复杂样品的分析[1][2][3]。本实验针对复方蒲公英灌肠液的指纹图谱,力图用HPLC/MS/MS等对其乙酸乙酯部分进行研究,建立指纹图谱提供定性鉴别。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验仪器及试剂

HPLC/MS系统:API2000型串连三级四级杆质谱仪(Applied Biosystems公司),使用ESI离子源,Analyst1.3工作软件,高效液相色谱仪PE series 200,四元泵;HPLC系统:Waters公司高效液相色谱仪,Waters515型泵,996二极管阵列检测器,Millennium32工作站;超纯水器(Mill-Qplus USA)。

咖啡酸、阿魏酸和原儿茶醛对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号分别为885-200001,0773-9910,0810-9803);复方蒲公英灌肠液(南方医院药学部提供);乙腈为色谱纯(天津四友生物医学技术有限公司)、冰醋酸、乙酸乙酯、甲醇等化学试剂均为分析纯。

#### 1.2 分析溶液的制备

1.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取咖啡酸、阿魏酸和原儿茶醛对照品2.5 mg于10 ml容量瓶中,用甲醇溶解并定容至10 ml,再分别精密吸取2 ml置10 ml容量瓶中,用甲醇稀释并定容,分别得咖啡酸、阿魏酸和原儿茶醛对照品溶液(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。

1.2.2 供试品溶液的制备 精密量取复方蒲公英灌肠液10 ml置分液漏斗中,用石油醚(15 ml)萃取3次,弃去醚液,再用乙酸乙酯(15 ml)萃取3次,合并乙酸乙酯液,减压回收乙酸乙酯至干,残渣用甲醇溶解并定容至10 ml,以0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤至样品小瓶中备用。

#### 1.3 分离分析条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil BDS C18分析柱(5  $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 4.6 mm), BDS C18保护柱(大连依利特科学仪器有限公司),流动相A为乙腈;流动相B为水(乙酸调pH为3.2);梯度洗脱条件:流动相A从10%到80%,分析时间为40 min,时间为0, 38, 40 min; A(%)为10, 80, 80;流速: 0.7 ml/min;检测波长: 254 nm;柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量: 10  $\mu\text{l}$ ,柱后分流0.35 ml/min进质谱仪(表1)。

表1 流动相的梯度

Tab.1 Gradient of the mobile phase

Time (min)	Flow rate (ml/min)	Solvent A (%)	Solvent B (%)
0	0.7	10	90
38	0.7	80	20
40	0.7	80	20

1.3.2 质谱分析条件 所有实验均采用电喷雾离子源(ESI);负离子检测;离子喷雾电压(IS)-4200;温度(TEM)150;聚簇电压(DP)-32;入口电压(EP)-315;聚焦电压(FP)-11;气帘气(CUR)30;氮气流速(GS1)40;辅助氮气流速(GS2)45;扫描范围(-Q 100~450),采用负谱全离子扫描方式采集数据。

### 2 结果

### 2.1 流动相选择[4]

综合考虑到与液质联用对流动相的要求及样品为乙酸乙酯提取部分等因素后，分别用甲醇-水，乙腈-水，乙腈-水(含乙酸)等体系对样品进行洗脱，最终确立以乙腈-水(乙酸调pH为3.2)作为流动相的二元梯度洗脱的色谱条件。

### 2.2 HPLC/UV系统

2.2.1 波长的选择 在210 nm~400 nm UV吸收波长范围内，选定较有代表性的254、280、323 nm 3个波长通过二极管阵列检测器996对色谱图进行在线分析，考虑到在254 nm波长处得到的峰数目较多，故确定指纹图谱检测波长为254 nm。

2.2.2 结果 在上述色谱条件下，精密吸取样品溶液10  $\mu$ l，注入液相色谱仪中，记录40 min色谱图(图1)。

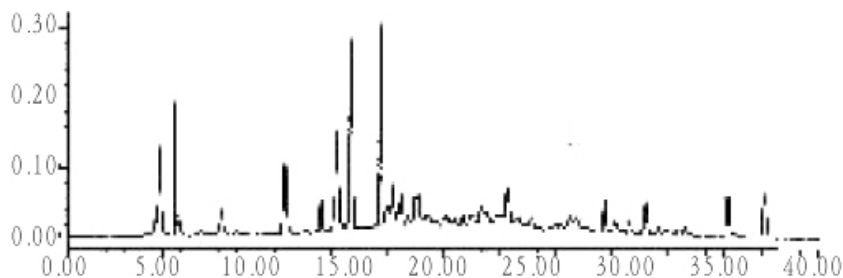


图1 复方蒲公英灌肠液HPLC/UV图谱  
Fig.1 HPLC/UV chromatogram of the compound dandelion enema

### 2.3 HPLC/MS系统

在上述色谱条件下及MS负离子扫描条件下，将供试品溶液注入HPLC/MS系统，用质谱监测各组分的色谱分离情况，同时进行质谱分析，并记录负离子扫描条件下的总离子色谱图(TIC) (图2)。

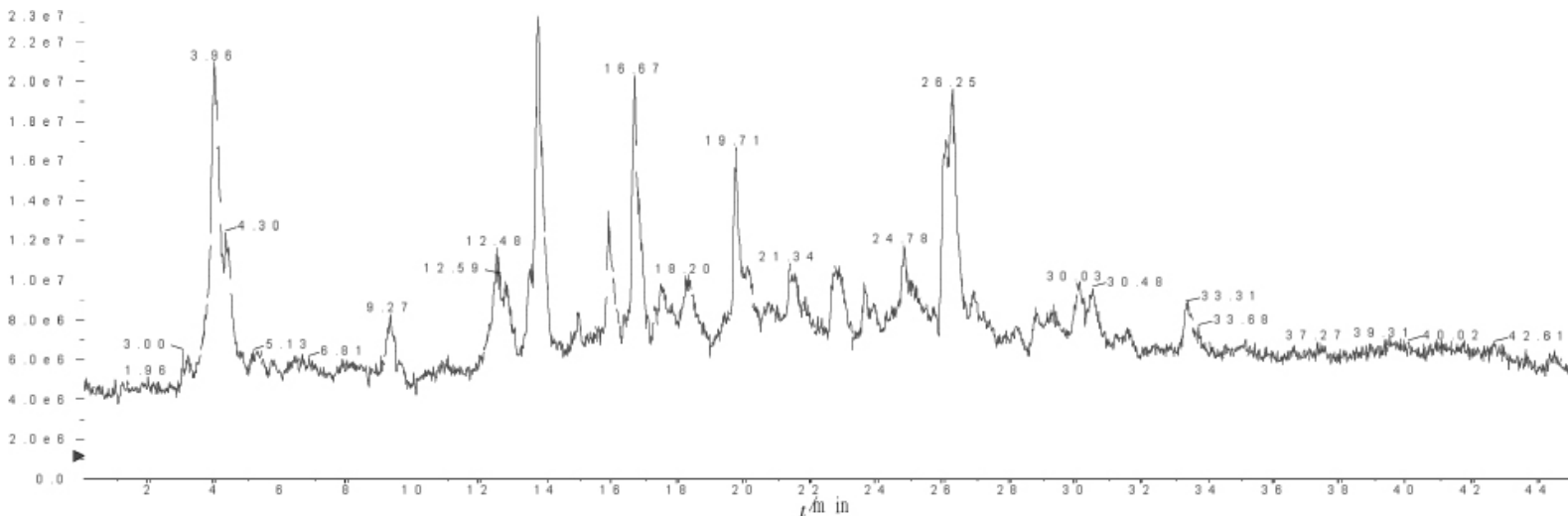


图2 复方蒲公英灌肠液的总离子流色谱图  
Fig.2 Total ion chromatogram of the compound dandelion enema  
t=12.48 for protocatechualdehyde, 13.74 for caffeic acid, and 17.38 for ferulic acid. e7: 10<sup>-7</sup>; e6: 10<sup>-6</sup>

在LC/MS/MS分析中，对总离子流图中显示的每种化学成分，均可得到其相对分子质量，二级质谱图及保留时间，(色谱图上各峰的保留时间及其对应的主化学成分的相对分子质量见表2)。根据保留时间、相对分子质量结合相关文献可初步判断，对有对照品的化学成分，可作对照品的MS/MS，进行对比确认，即可对化合物精确定性。采用这些方法，我们确定三个酚酸类化合物：原儿茶醛(相对分子质量138)，咖啡酸(相对分子质量180)，阿魏酸(相对分子质量194)，(图3)。对没有对照品的化学成分，则需根据其MS/MS图谱和其它相关信息进行质谱解析，这工作有待进一步研究。

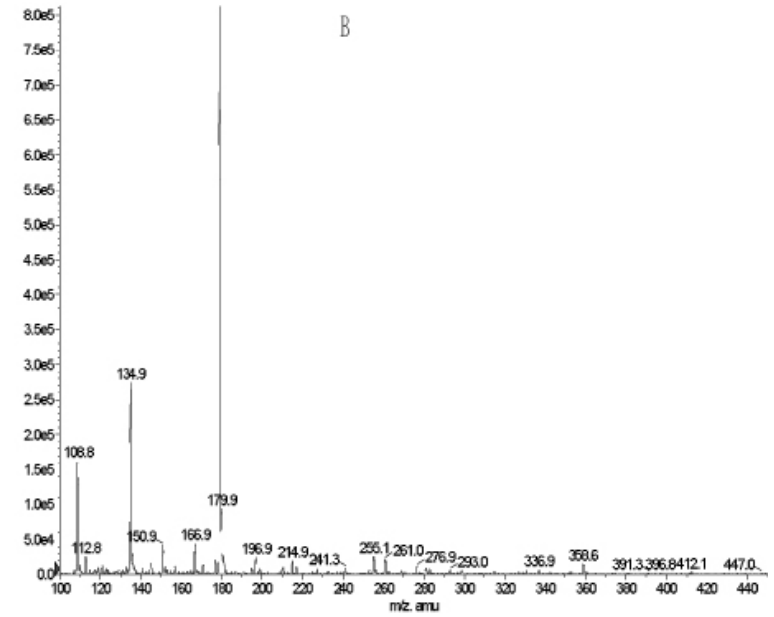
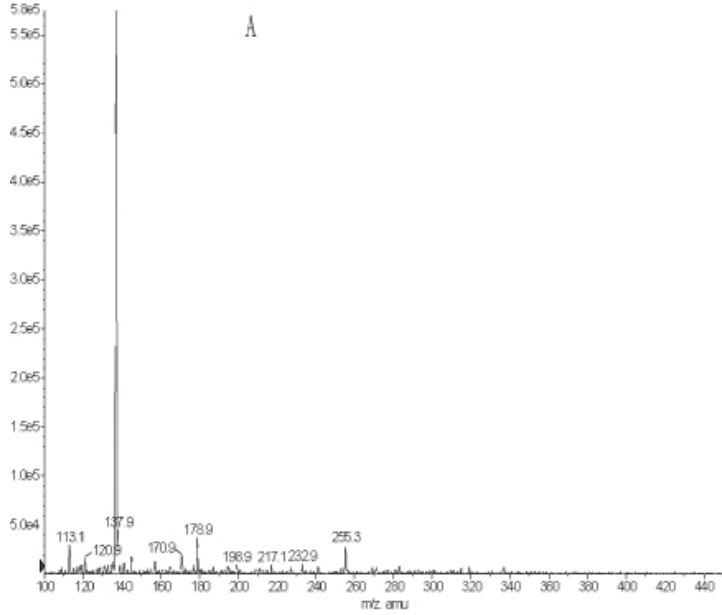


图3 原儿茶醛、咖啡酸和阿魏酸的离子扫描图  
 Fig.3 Full scan MS-MS spectra of protocatechualdehyde, caffeic acid and ferulic acid  
 A: Protocatechualdehyde ; B: Caffeic acid; C: Ferulic acid

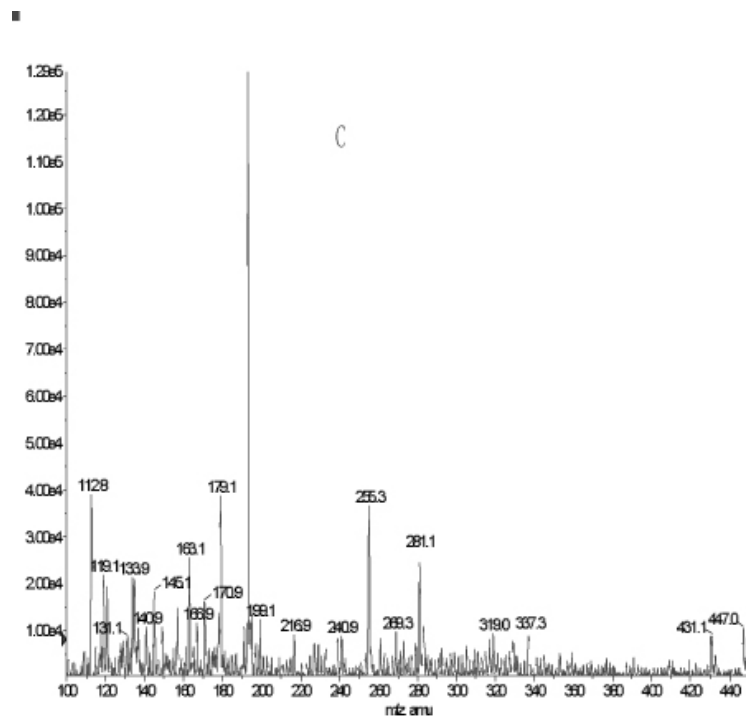


表 2 HPLC-MS 各主要峰的保留时间和对应相对分子质量

Tab.2 Relative molecular weight and retention time of major peaks

Retention time	Relative molecular weight	Probable compound
12.48 <sup>-</sup> 12.68	138	Protocatechualdehyde
13.74 <sup>-</sup> 13.94	180	Caffeic acid
15.80 <sup>-</sup> 16.05	432	
16.64 <sup>-</sup> 16.77	164	
17.38 <sup>-</sup> 17.58	194	Ferulic acid
19.62 <sup>-</sup> 19.82	188	
26.15 <sup>-</sup> 26.35	330	
33.21 <sup>-</sup> 33.41	312	

### 3 讨论

在同一色谱柱,柱效稳定,相同色谱系统的条件下,所得到的色谱图谱稳定,重复性好。因所选用的LC/MS联用系统缺乏紫外检测器和色谱工作站,暂不能实现对液相色谱行为的在线紫外检测,实验所列出的HPLC/MS图谱与不同色谱系统下(Waters的515-515-996)得出的HPLC/UV图谱存在较大差异,且同样条件下,样品在LC/MS中出峰较慢,所有LC/MS中样品以终浓度多运行了5 min。

与UV相比,质谱总离子流图中,各色谱峰的信号响应的差异不十分明显,UV图谱中的强峰在电喷雾质谱中可能过载降低离子化效率,使质谱信号降低,而某些低浓度成分在UV中出峰较弱,但因其易离子化,可产生较强的质谱信号。

所分离的样品溶液含酚酸类化合物,而酚酸类化合物因具有羧基、羟基等活性基团,可失去质子而产生负离子信号,故实验选择负离子扫描。负谱离子峰信号相对较弱,本实验中阿魏酸在质谱中响应值就比较低,但在离子流色谱图中,响应值相对有所提高,这可能与流动相的酸性使其变得容易解离有关。目前对中药复方成分多样复杂,多靶点作用的特性已基本形成共识。为能较全面表达中药防治疾病药效物质基的真实面貌,应用中草药指纹图谱进行表达是解决中药质量科学控制难题的一项有力措施[5]。WHO草药评价指南[6]中指出:如果中草药制剂的活性成分不能鉴别,可以通过色谱指纹图谱证明产品质量的一致。LC/MS/MS提供了一种快速、准确的测定中药有效成分的方法[7],高分离能力的HPLC与高鉴定能力的MS相结合,能对样品实现在线分析,解决了对照品缺乏的难题,必将在中药等复杂样品的分析中起到越来越重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] 安登魁. 现代药物分析选论[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000. 443.
- [2] 王义明, 张思巨, 罗国安, 等. 用LC/ESI-MS/MS研究肉苁蓉与其代用品中的苯乙醇苷类化合物[J]. 药学报, 2000, 35(11): 839.  
Wang YM, Zhang SJ, Luo GA, et al. Analysis of phenylethanoid glycosides in the extract of herba Cistanchis by LC/ESI-MS/MS[J]. Acta Pharm Sin, 2000, 35(11): 839.
- [3] 王子灿, 乔善义, 马安德, 等. 高效液相色谱-质谱联用技术分析刺五加抗疲劳化学成分[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(4): 355.  
Wang ZC, Qiao SY, Ma AD, et al. High-performance liquid chromatography combined with mass spectrum analysis for identifying the anti-fatigue components in Acanthopanax Senticosus Harms[J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 355.
- [4] Li Z, Wang L, Yang G, et al. Study on the determination of polyphenols in tobacco by HPLC coupled with ESI-MS after solid-phase extraction[J]. J Chromatogr Sci, 2003, 41(1): 36.
- [5] Lazarowych N. Use of fingerprinting and marker compounds for Identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products[J]. Drug Informat J, 1998, 32: 497-512.
- [6] WHO. Guidelines for the assessment of herbal medicines[S]. 1996.
- [7] Carini M, Aldini G, Furlanetto S, et al. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from Helichrysum stoechas[J]. J Pharm Biomed Anal, 2001, 24(3):517-26.

#### 参考文献:

- [1] 安登魁. 现代药物分析选论[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000. 443.
- [2] 王义明, 张思巨, 罗国安, 等. 用LC/ESI-MS/MS研究肉苁蓉与其代用品中的苯乙醇苷类化合物[J]. 药学报, 2000, 35(11): 839.  
Wang YM, Zhang SJ, Luo GA, et al. Analysis of phenylethanoid glycosides in the extract of herba Cistanchis by LC/ESI-MS/MS[J]. Acta Pharm Sin, 2000, 35(11): 839.
- [3] 王子灿, 乔善义, 马安德, 等. 高效液相色谱-质谱联用技术分析刺五加抗疲劳化学成分[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(4): 355.  
Wang ZC, Qiao SY, Ma AD, et al. High-performance liquid chromatography combined with mass spectrum analysis for identifying the anti-fatigue components in Acanthopanax Senticosus Harms[J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(4): 355.
- [4] Li Z, Wang L, Yang G, et al. Study on the determination of polyphenols in tobacco by HPLC coupled with ESI-MS after solid-phase extraction[J]. J Chromatogr Sci, 2003, 41(1): 36.
- [5] Lazarowych N. Use of fingerprinting and marker compounds for Identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products[J]. Drug Informat J, 1998, 32: 497-512.
- [6] WHO. Guidelines for the assessment of herbal medicines[S]. 1996.

[7] Carini M, Aldini G, Furlanetto S, et al. LC coupled to ion-trap MS for the rapid screening and detection of polyphenol antioxidants from *Helichrysum stoechas*[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2001, 24(3):517-26.

---

[回结果列表](#)