

## 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

晏媛<sup>1</sup>, 刘世霆<sup>1</sup>, 许重远<sup>1</sup>, 罗奇志<sup>2</sup>, 谭亚非<sup>1</sup>, 陈志良<sup>1</sup> (1 南方医科大学南方医院药学部, 2 中心实验室, 广东广州 510515)

**摘要:**目的 确定复方蒲公英灌肠液中的活性成分。方法 利用三维高效液相色谱对复方蒲公英灌肠液的乙酸乙酯部分分离分析, 采用液相色谱-质谱联用技术对其色谱图谱进行确定。结果 通过质谱的质荷比(M/Z)及色谱保留时间的相互比较, 确定了咖啡酸、阿魏酸和原儿茶醛 3 种活性成分。结论 液质联用技术可用于复方蒲公英灌肠液的定性分析。

**关键词:** 高效液相色谱; 液质联用; 复方蒲公英灌肠液

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)04-0447-03

## High-performance liquid chromatography combined with mass spectrum analysis for chromatographic fingerprinting of compound dandelion enema

YAN Yuan<sup>1</sup>, LIU Shi-ting<sup>1</sup>, XU Zhong-yuan<sup>1</sup>, LUO Qi-zhi<sup>2</sup>, TAN Ya-fei<sup>1</sup>, CHEN Zhi-liang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Science, Nanfang Hospital, <sup>2</sup>Central Laboratory, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract: Objective** To identify the active components of compound dandelion enema, a preparation from 7 traditional Chinese herbal drugs for treatment of gynecological diseases. **Methods** Three-dimensional high-performance liquid chromatography (3D-HPLC) was employed to separate the ethyl acetate extract of compound dandelion Enema, and HPLC combined with mass spectrum (MS) analysis used for chromatographic fingerprinting. **Result** By comparing the ionic fragments of MS and retention time of each peak, the main active components in compound dandelion enema were determined, including caffeic acid, ferulic acid and protocatechualdehyde. **Conclusion** HPLC coupled with mass spectroscopy can be used for qualitative analysis of compound dandelion enema.

**Key words:** high-performance liquid chromatography; mass spectroscopy; compound dandelion enema

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<sup>[1-3]</sup>。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 μg/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 μm 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

收稿日期: 2004-09-13

作者简介: 晏媛 (1972-), 女, 现为南方医科大学在读硕士研究生, 主管药师, 研究方向: 药物分析, 电话: 020-61641888-87215

(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<sup>[4]</sup>

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  $\mu\text{l}$ , 注入液相色谱仪中, 记录 40 min 色谱图 (图 1)。

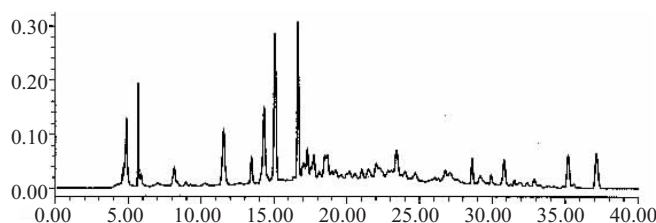


图 1 复方蒲公英灌肠液 HPLC/UV 图谱

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)。

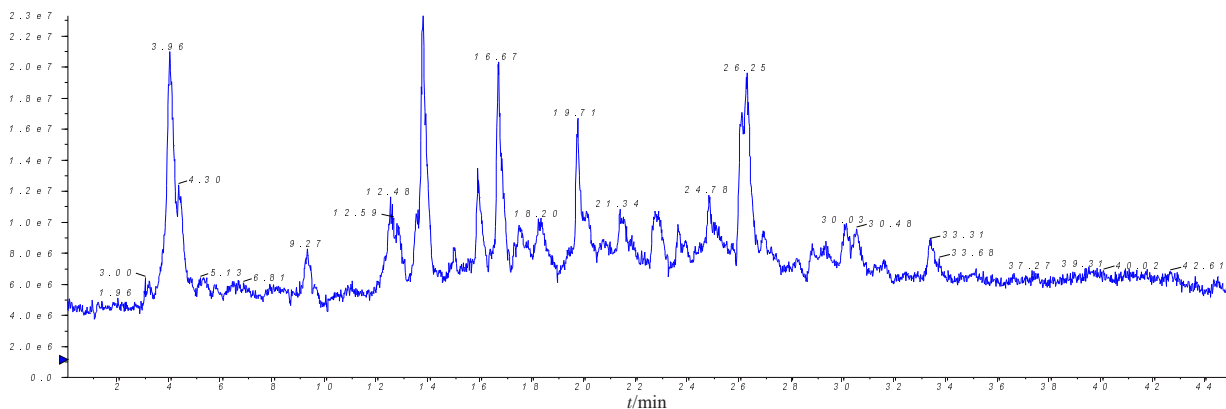


图 2 复方蒲公英灌肠液的总离子流色谱图

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.  $e7: 10^{-7}$ ;  $e6: 10^{-6}$

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。

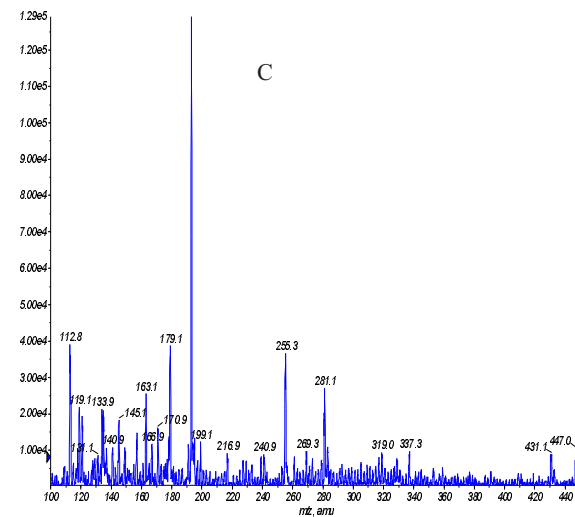
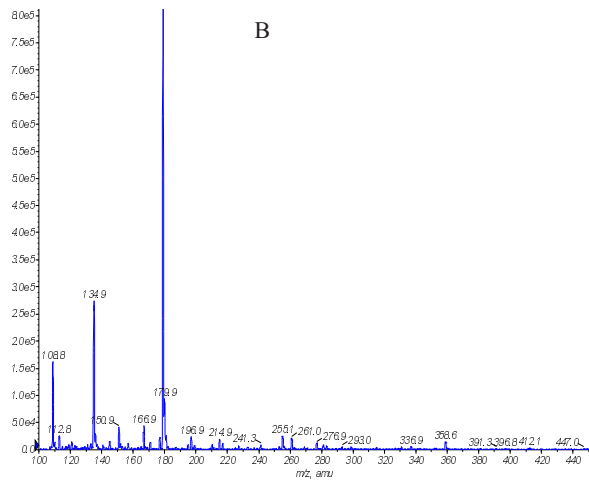
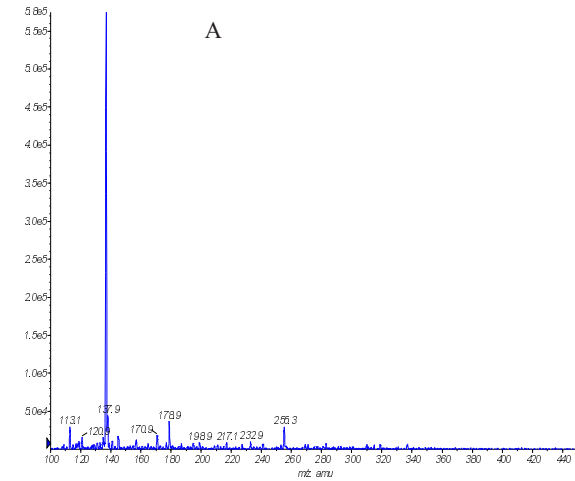


图 3 原儿茶醛、咖啡酸和阿魏酸的离子扫描图  
**Fig.3 Full scan MS-MS spectra of protocatechualdehyde, caffeic acid and ferulic acid**  
 A: Protocatechualdehyde ; B: Caffeic acid ; C: Ferulic acid  
 e5: 10<sup>-5</sup>; e4: 10<sup>-4</sup>

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    |
|----------------|---------------------------|----------------------|
| 12.48~12.68    | 138                       | Protocatechualdehyde |
| 13.74~13.94    | 180                       | Caffeic acid         |
| 15.80~16.05    | 432                       |                      |
| 16.64~16.77    | 164                       |                      |
| 17.38~17.58    | 194                       | Ferulic acid         |
| 19.62~19.82    | 188                       |                      |
| 26.15~26.35    | 330                       |                      |
| 33.21~33.41    | 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,应用中药指纹图谱进行表达是解决中药

(下转 453 页)

们,瘫痪情况对前路手术早期并发症发生具有显著的影响。为了减少和避免早期并发症的发生,最重要的是要根据患者不同的病情特点,因病施治,充分做好术前准备和患者的围手术期处理,将患者的风险降至最低。

**致谢:** 感谢第一军医大学统计学教研室安胜利老师给予的殷切指导!

#### 参考文献:

- [1] 金大地, 瞿东滨. 脊柱前路内固定的并发症[A]. 见: 胥少汀. 骨科手术并发症预防及处理[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002. 199-200.
- [2] 袁文, 贾连顺, 陈德玉, 等. AO 颈椎前路带锁钢板内植物并发症[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2001, 11(2): 103-5.  
Yuan W, Jia LS, Chen DY, et al. Complications of AO anterior screw-plate system[J]. Chin J Spine Spinal Cord, 2001, 11(2): 103-5.
- [3] 吴琼华, 陈正形, 陈其昕, 等. 328 例颈椎前路手术并发症的分析[J]. 中国骨伤, 2002, 15(7): 400-2.  
Wu QH, Chen ZX, Chen QX, et al. Analysis of the complication of anterior approach for surgery of the cervical spine[J]. Chin J Orthop Trauma, 2002, 15(7): 400-2.
- [4] 姚建华, 胥少汀, 季新民, 等. 颈椎前路减压并发脊髓损伤加重的

原因分析[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 1999, 9(5): 274-5.

Yao JH, Xu SD, Ji XM, et al. Analysis with injury of spinal cord during anterior cervical decompression [J]. Chin J Spine Spinal Cord, 1999, 9(5): 274-5.

- [5] 孙天胜, 刘智, 时述山. 脊髓型颈椎病前路减压的危险因素[J]. 中华外科杂志, 2002, 40(4): 318.  
Sun TS, Liu Z, Shi SS. Danger factors of anterior decompression of cervical spondylosis[J]. Chin J Surg, 2002, 40(4): 318.
- [6] 杨克勤. 颈椎前路减压及融合术的经验[J]. 中华骨科杂志, 1988, 6: 319.  
Yang KQ. Experience about anterior decompression and interbody fusion[J]. Chin J Orthop, 1988, 6: 319.
- [7] 饶振玉. 前路手术治疗颈椎病的疗效观察及发病探讨[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 1993, 3(1): 53.  
Yao ZY. Observation of curative effect of the anterior cervical surgery of the cervical spondylosis and discussion of its reason [J]. Chin J Spine Spinal Cord, 1993, 3(1): 53.
- [8] 瞿东滨, 金大地. 前路减压合并自行设计的蝶形钢板内固定系统治疗颈椎间盘突出症[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(3): 254-6.  
Qu DB, Jin DD. Anterior decompression and instrument with cervical butterfly-like locking plate system herniated cervical intervertebral discs[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(3): 254-6.
- [9] 刘建青, 沈炳华, 孙冰. 脊髓型颈椎病前路手术围手术期治疗问题的探讨[J]. 颈腰痛杂志, 2000, 21(4): 315-7.

(上接 449 页)

质量科学控制难题的一项有力措施<sup>[5]</sup>。WHO 草药评价指南<sup>[6]</sup>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<sup>[7]</sup>, 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.