

HPLC-ESI/MS 对肌萎灵冻干粉指纹图谱特征峰的鉴定

王贵金, 贾继明, 郑亚杰, 刘兴国, 宋剑^{*}(河北以岭医药研究院, 石家庄 050035)

摘要:目的 采用液相色谱-质谱联用法对肌萎灵冻干粉特征峰进行指认鉴定。方法 采用 Symmetry C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为乙腈-水-1%乙酸, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 30 ℃; 离子源为大气压电喷雾电离源(ESI), 雾化气压力: 275.8 kPa; 辅助气压力: 137.9 kPa; 毛细管温度: 340 ℃; 喷雾电压: 4.2 kV。选择正负离子扫描方式, 记录总离子流(TIC)色谱图及其特征碎片。结果 肌萎灵冻干粉指纹图谱特征峰标出 12 个峰, 其中 7 个色谱峰为人参主要成分, 另外 5 个峰为淫羊藿主要成分。结论 本试验确定了肌萎灵冻干粉主要功效的化学物质基础及其来源, 对肌萎灵冻干粉化学表征及质量评价有重要的参考价值。

关键词: 液相色谱-质谱联用法; 肌萎灵冻干粉; 指纹图谱

中图分类号: R917.103

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)13-1318-03

Identification of the Fingerprint Characteristic Peak of Jiweiling Freeze-dried Powder by HPLC-ESI/MS

WANG Guijin, JIA Jiming, ZHENG Yajie, LIU Xingguo, SONG Jian^{*}(Hebei Yiling Pharmaceutical Institute, Shijiazhuang 050035, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC-ESI/MS method for the identification of the fingerprint characteristic peak of Jiweiling freeze-dried powder. **METHODS** With a Symmetry C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), acetonitrile-water-1% acetic acid was used as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, eluted in gradient mode and column temperature maintained at 30 ℃. The sample was determined by mass spectrum with API-ESI ionization source. The pressure of atomization room was 275.8 kPa, the pressure of adjunctive gas was 137.9 kPa, the temperature of capillary was 340 ℃, the atomization voltage was 4.2 kV. The positive and negative canner mode was selected, the total ion current(TIC) chromatography and characteristic fragment ions were recorded. **RESULTS** Twelve major chromatographic peaks were marked in the fingerprint characteristic peak of Jiweiling freeze-dried powder. Seven chromatographic peaks were founded in Ginseng Radix et Rhizoma, five chromatographic peaks were founded in Epimedii Folium. **CONCLUSION** The chemical constituents and the sources of Jiweiling freeze-dried powder is identified. And it is quite valuable for the quality evaluation as well as chemical characterization of Jiweiling freeze-dried powder.

KEY WORDS: LC-MS; Jiweiling freeze-dried powder; fingerprint

液相色谱指纹图谱已成为中药质量控制的重要手段, 适当的指纹图谱技术基本上能够控制中药产品的内在质量, 较一两个指标性化学成分定性定量更能保证产品质量的稳定和均一。高效液相色谱与质谱联用^[1-7], 在成分分离的同时, 可在线提供各指纹峰的结构信息。通过相关文献信息和对照品的峰谱数据, 就可以对指纹图谱中的指纹峰的结构进行鉴定。因此, 液相色谱与质谱的联用, 对阐明 HPLC 指纹图谱中的基本化学成分提供了重要的帮助。

肌萎灵冻干粉由人参和淫羊藿 2 味中药组成,

用于治疗运动神经元疾病、进行性肌营养不良症、硬皮病、多发性硬化、多发性神经炎、多发性肌炎、先天性肌病等疾病所致的肌肉萎缩, 也可用于重症肌无力的治疗^[8]。全方由人参和淫羊藿 2 味中药组成, 药味化学成分复杂, 本试验在结合药材与制备工艺的基础上建立了成品的标准指纹图谱, 通过与对照品紫外图谱和质谱信息的比对, 对指纹图谱中的特征峰进行了鉴定。

1 仪器与试剂

Waters 2695-996 型液相色谱仪(美国 Waters 公司); Finnigan TSQ 三级四极杆串联质谱仪, ESI

基金项目: 国际科技合作计划项目(2008DFA30810); “重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09102-140)

作者简介: 王贵金, 男, 硕士, 工程师 Tel: (0311)85901304

E-mail: gujiinwang@126.com ^{*}通信作者: 宋剑, 男, 硕士, 副主任

药师 Tel: (0311)85901304 E-mail: songjian@yiling.cn

接口(美国 Waters 公司); 乙腈为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。肌萎灵冻干粉(实验室自制, 批号: 081201)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Symmetry C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-1%乙酸梯度洗脱, 0~23 min: 乙腈-水-1%乙酸(20 : 60 : 20); 23~50 min: 乙腈-水-1%乙酸(20~47 : 60~33 : 20)]; 检测波长: 203 nm; 柱温: 30 ℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 进样量: 15 μL。

2.2 质谱条件

ESI喷雾电压 4.2 kV, 加热毛细管温度 340 ℃, 雾化气压力 275.8 kPa, 辅助气压力 137.9 kPa, SIM 检测模式, 采用一级全扫描质谱和多级全扫描质谱方式测定。

2.3 供试品溶液的制备

精密称取肌萎灵冻干粉 0.5 g 置于 25 mL 量瓶中, 加 50%乙腈定容至刻度, 摇匀, 取 2 mL 溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液供色谱分析用。

3 结果

3.1 成分分析

精密量取供试品溶液 15 μL, 注入液相色谱-

质谱联用仪, 按“2.1”和“2.2”项下条件测定, 结果见图 1、2。

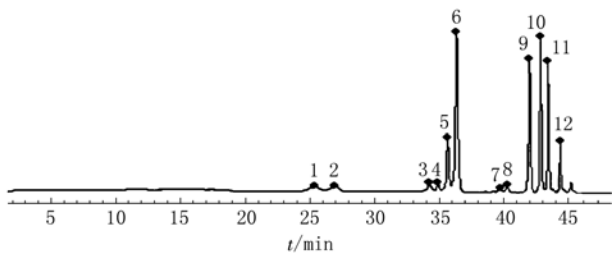


图 1 肌萎灵供试品指纹图谱特征峰图

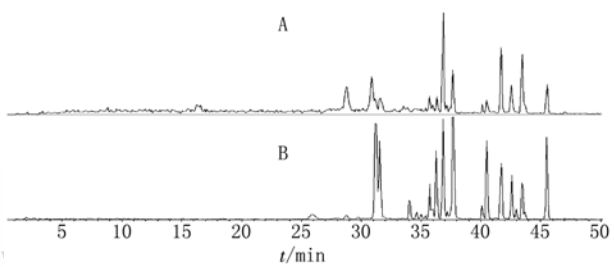


图 2 肌萎灵供试品正负离子流图

A-正离子流图; B-负离子流图

3.2 质谱解析

通过液相色谱中与对照品保留时间的比较, 结合一级质谱及多级碎片离子的数据将指纹图谱特征峰进行指认鉴定, 归属结果见表 1, 现以峰 1 为例。

表 1 肌萎灵冻干粉中指纹图谱特征峰质谱归属

峰号	化合物	相对分子量	准分子离子峰	归属	主要碎片离子	归属	药材
1	人参皂苷 Rg1	800	799	[M-H] ⁻	476 638	[M-H-2(Glc- H ₂ O)] ⁻ [M-H-(Glc- H ₂ O)] ⁻	人参
2	人参皂苷 Re	946	945	[M-H] ⁻	475 783	[M-H-2(Glc-H ₂ O)-(Rha-H ₂ O)] ⁻ [M-H-(Glc- H ₂ O)] ⁻	
3	朝藿定 a	838	837	[M-H] ⁻	873 675	[M-H+2 H ₂ O] ⁻ [M-H-(Glc- H ₂ O)] ⁻	淫羊藿
4	朝藿定 b	808	807	[M-H] ⁻	645 843	[M-H-(Glc- H ₂ O)] ⁻ [M-H+2 H ₂ O] ⁻	
5	朝藿定 c	822	821	[M-H] ⁻	659 857	[M-H-(Glc- H ₂ O)] ⁻ [M-H+2 H ₂ O] ⁻	
6	淫羊藿苷	676	675	[M-H] ⁻	711 512	[M-H+2 H ₂ O] ⁻ [M-H-(Glc- H ₂ O)] ⁻	
7	乙酰基朝藿 b	850	849	[M-H] ⁻	885 687	[M-H+2 H ₂ O] ⁻ [M-H-(Glc- H ₂ O)] ⁻	
8	人参皂苷 Rf	800	799	[M-H] ⁻	476 457	[M-H-2(Glc- H ₂ O)] ⁻ [M-H-2(Glc- H ₂ O)- 2 H ₂ O] ⁻	人参
9	人参皂苷 Rb1	1 108	1 107	[M-H] ⁻	783 945	[M-H-2(Glc- H ₂ O)] ⁻ [M-H-(Glc- H ₂ O)] ⁻	
10	人参皂苷 Rc	1 078	1 077	[M-H] ⁻	460 783	[M-H-(Araf-H ₂ O)-3(Glc-H ₂ O)] ⁻ [M-H-(Araf-H ₂ O)-(Glc-H ₂ O)] ⁻	
11	人参皂苷 Rb2	1 078	1 077	[M-H] ⁻	460 945	[M-H-(Arap-H ₂ O)-3(Glc-H ₂ O)] ⁻ [M-H-(Arap-H ₂ O)] ⁻	
12	人参皂苷 Rd	946	945	[M-H] ⁻	783 621	[M-H-(Glc- H ₂ O)] ⁻ [M-H-2(Glc- H ₂ O)] ⁻	

人参皂苷 Rg1 结构式见图 3, 一级质谱与多级质谱见图 4, 相对分子量为 800, 准分子离子峰 m/z 为 799, 归属为 $[M-H]^-$, 主要碎片离子 m/z 835, 为人参皂苷 Rg1 减掉一个 H 结合 2 个 H_2O 所得, 其他主要碎片离子 m/z 638, 456 分别为人参皂苷 Rg1 去掉一个葡萄糖残基和水及去掉两个葡萄糖残基和水所得, 与对照品的保留时间及碎片离子完全一致, 表明 1 号峰为人参皂苷 Rg1。

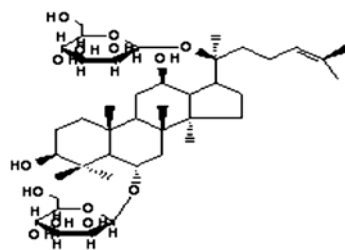


图 3 人参皂苷 Rg1 结构式图

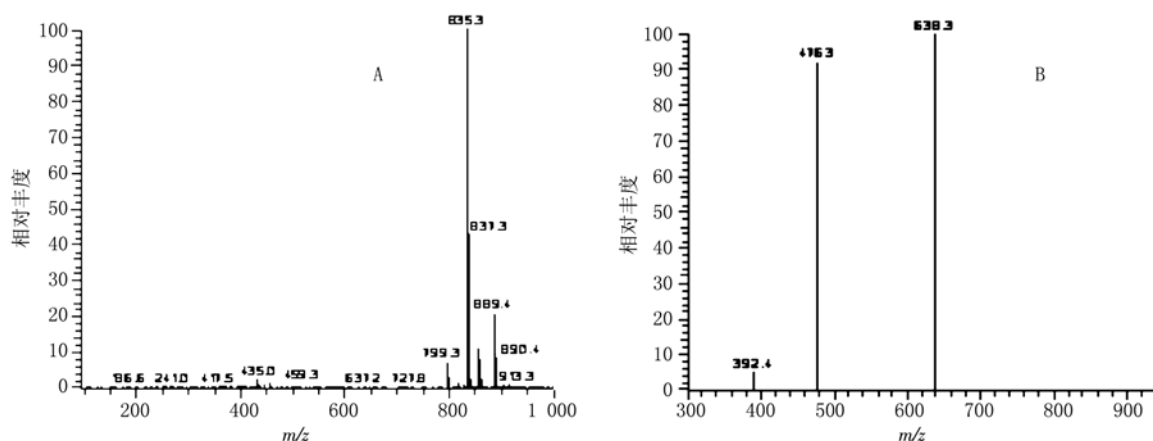


图 4 人参皂苷 Rg1 一级质谱和多级质谱图

A-一级质谱图; B-多级质谱图

3 讨论

中药复方成分极其复杂, 研究难度很大, 本试验采用 LC-MS 在对肌萎灵冻干粉的分析中共鉴别出 12 个化学成分, 该方法能对中药复杂化学成分进行快速定性, 为中药复方化学成分研究提供了新思路, 同时确定了成分的来源与归属, 为建立指纹图谱提供了定性依据。

参考文献

- [1] LI Z H, NI K Y, DU G H. Identification of the major components in the effective component group of Xiao-xu-ming decoction by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem(分析化学研究报告), 2007, 35(2): 233-239.
- [2] XU Q X, LIU Z Q, WANG Y, et al. Toxicity components in decoction of Bawei Dihuang recipe and ginseng decoction by ESI-MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2005, 36(1): 63-66.
- [3] LIN L, LIU J X, ZHANG Y, et al. Pharmacokinetic studies of ginsenoside Rg1, Re, Rb1 and Rd in rats by LC-MS/MS method [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2009, 44(5): 373-377.
- [4] RAN X R, YANG H H, LIANG Q L, et al. Difference analysis of mass spectra and its application to research of Chinese multiherb remedy [J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2007, 28(2): 250-253.
- [5] LIANG Q D, MA B P, LI W H, et al. Determination of monosaccharide and disaccharide in condensed Siwu decoction by HPLC-ELSD [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2004, 29(4): 334-339.
- [6] ZHAO X F, SUN Y Q. High performance liquid chromatography/electro-spray ionization-mass spectrometry analysis of Liuwei Dihuang pills [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2003, 21(5): 500-502.
- [7] ZHOU H L, WU G L, HU X J, et al. Determination of ropivacaine in guinea pig serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2008, 43(13): 1022-1024.
- [8] 吴以岭. 一种治疗肌肉萎缩及重症肌无力的药物及其制备方法: 中国, 200410096779.8 [P]. 2007-12-12.

收稿日期: 2011-01-21