

当归的指纹图谱和 Q-TOF-MS 质谱联用研究*

★ 罗丹¹ 刘智华² 潘纯国² 朱根华^{1**} (1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004; 2. 江西省肿瘤医院 南昌 330029)

摘要:目的:用高效液相色谱法建立当归药材的指纹图谱,为其品质控制提供依据。方法:采用 Phenomenex luna C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);乙腈-0.5% 醋酸水溶液为流动相,梯度洗脱,检测波长为 270 nm,流速 1 ml/min。结果:建立了当归药材的 HPLC 指纹图谱。HPLC-MS 鉴定出阿魏酸,洋川芎内酯,川芎内酯 A,丁基苯酞,E-藜本内酯,Z-藜本内酯,E-丁烯基酞内酯和 Z-丁烯基苯酞共 8 个化学成分。结论:采用该法可为控制当归药材的内在质量提供依据。

关键词:当归;液质联用;指纹图谱

中图分类号:R 284.1 文献标识码:B

High performance liquid chromatography -mass spectrometry analysis of Radix Angelica Sinensis

LUO Dan¹, LIU Zhi-hua², PAN Chun-guo², ZHU Gen-hua¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004;

2. Jiangxi Cancer hospital, Nanchang 330029

Abstract: Objective: To analyze the chemical components in Danggui (the roots of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels). Methods: HPLC-MS/MS was used to identify the main components in Danggui. The mobile phase of HPLC consisted of 0.5% acetic acid in water and MeOH, analytical column was Phenomenex (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), flow rate 1.0 mL/min, injected volume 10 μL. Results: The ionization source was ESI in positive ion mode. Results Seven compounds in Danggui were tentatively identified via HPLC-MS/MS. Conclusion: It provides an accurate and fast method to control the quality of Danggui.

Key words: Danggui; HPLC-MS/MS; Fingerprint

当归为伞形科植物当归 *Angelica Sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,药用历史悠久,历代本草均有记载,始载于《神农本草经》,谓之“当归味温,主呢逆上气”被列为中品。主产于我国甘肃岷县和宕昌,另外云南、四川、陕西、湖北等地亦有种植。当归性甘、辛、温,入肝、心、脾经。具补血,活血,调经,润肠之功效^[1-4]。应用 HPLC 法建立当归的指纹图谱,并对当归中的 8 种成分进行了定性研究,为建立其质量标准的提供实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 型高效液相色谱仪(DAD 检测器、

自动进样器、柱温箱); ChemStation 工作站(Agilent 科技有限公司,美国),中药色谱指纹图谱相似度评价系统(国家药典委员会,2004A 版), Millipore-Q 超纯水仪(Millipore Corporation,美国), KQ-700DE 型数控超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司), BS224S 型电子天平(赛多利斯,北京)。美国 Waters ACQUITY UPLC/Q-TOF-MS 系统,采用电喷雾电离(ESI),二元高压泵、在线脱气装置、自动进器、柱温箱和 TUV 检测器。数据采集与处理采用 Masslynx 4.1 软件。甲醇为色谱纯(美国,TECHNICAL 公司),甲酸为色谱纯(美国,DIMA 公司),水为超纯水器所制(德国,Sartorius 公司)。

* 基金项目:学位与研究生教育教学改革研究项目(YJ11A013),江西省科技计划项目(1031)

** 通讯作者:朱根华,男,讲师,主要研究方向,中药分析。Tel: 0791 - 7118658, E-mail: zgh7903@126.com

1.2 试剂

甲醇(色谱纯、默克公司),乙酸(色谱纯,Dikma),超纯水自制,实验中当归药材来自于甘肃。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Phenomenex luna C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相:采用梯度洗脱,A相0.5%的乙酸水溶液,B相为乙腈;流速:1 ml/min,DAD检测器,柱温 25°C 线性洗脱程序见表 1。采用二极管阵列检测器对检测波长进行了考察,分别记录波长在 210、270、330 nm 的色谱图。结果在 270 nm 处各色谱峰均有较好的紫外吸收,色谱信息最为丰富,并且分离度较好,可使主要色谱峰基本达到基线分离,分离效果较好,如图 1。

2.2 供试品的制备

取当归药材粉碎,准确称取 0.5g 于具塞三角烧瓶中,加 50% 甲醇水溶液 10 mL,超声提取 30 min,离心 5 min,0.45 μm 膜滤过,备用。

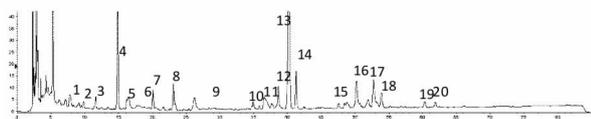


图 1 当归 270nm 色谱图

2.3 方法学考察

2.3.1 精密性试验 分别精密吸取同一供试品溶液 10 μl 按照上述色谱条件连续进样 5 次,记录指纹图谱。以 13 号峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间和相对峰面积稳定, RSD% < 3.0,表明精密性良好。

2.3.2 重复性试验 按照样品溶液制备方法处理同一样品 5 份,各吸取 10 μl 按照上述色谱条件连续进样 6 次,记录指纹图谱。以 13 号峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间和相对峰面积稳定, RSD% < 3.0,表明该试验方法的重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液分别在 0, 2, 4, 8, 12 h 按照上述色谱条件连续进样 5 次,记录指纹图谱。以 13 号峰为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间和相对峰面积稳定, RSD% < 3.0,表明样品溶液在 12h 内稳定。

2.6 当归药材

HPLC-MS 定性研究 本实验通过 HPLC-MS-ESI 正离子扫描获得了当归指纹图谱的一些结构信

息,对指纹图谱中的部分色谱峰进行了结构归属的初步判断,结合文献报道,初步鉴定出 8 个指纹成分的化学结构,见图 2,图 3,表 1。

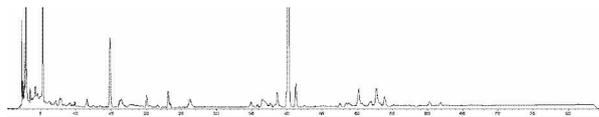


图 2 当归 270nm 色谱图

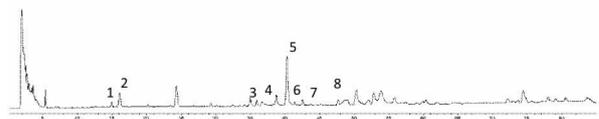


图 3 当归总离子流图(正模式)

表 1 HPLC-MS 分析结果

编号	保留时间/min	[M+1] ⁺ 测定值	[M+1] ⁺ 理论值	误差值	分子式	化合物名称
1	14.9	195.0646	195.0657	-5.8134	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸
2	16.0	225.1105	225.1127	-9.7029	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	洋川芎内酯 I
3	34.9	193.1209	193.1229	-10.1229	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	川芎内酯 A
4	38.7	191.1017	191.1027	-28.8060	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	丁基苯酐
5	40.2	191.1032	191.1027	-20.9566	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	Z-藜本内酯
6	41.3	189.0906	189.0916	-5.0494	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	E-丁烯基内酯
7	42.5	191.1037	191.1027	-18.3401	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	E-藜本内酯
8	47.6	189.0936	189.0916	10.8158	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	Z-丁烯基内酯

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

3.1.1 检测波长的选择 利用 DAD 检测器,对样品进行全波长扫描,确定最佳检测波长为 270 nm。

3.1.2 流动相及洗脱方法的选择 通过考察乙腈-0.5% 醋酸,甲醇-水,甲醇-0.5% 醋酸,乙腈-水等多种流动相,最终确定流动相为:甲醇-0.5% 醋酸,通过不同比例的甲醇-0.5% 醋酸对样品洗脱能力的考察和摸索,本实验最终采用不断调节流动相比例和极性,并能达到最佳的分离效果的梯度洗脱作为实验条件。

3.1.3 流速的选择 本实验考察了不同流速(0.8, 1.0, 1.2 mL/min)对色谱图的影响,1.2 mL/min 和 0.8 mL/min 的流速分离效果差,1.0 mL/min 的流速分离效果好且时间合适,符合指纹图谱 1 h 的适宜时间,因此流速选择 1.0 mL/min。

3.2 样品提取方法的选择

本实验分别采用超声和回流提取方法,发现两种方法所得组分相当,由于回流提取法较复杂,故本实验采用超声提取法,根据不同种醇在不同浓度时的提取结果,得出甲醇提取效率充分,且 70% 的甲醇提取效率最佳,最后确定样品提取方法为 70% 甲醇超声提取。

为了更有效地控制当归药材的质量,使其符合现代中药研究及质量控制要求,本实验对该药材建立 HPLC 指纹图谱,结果表明,这种方法稳定,可靠

夏天无提取物基本理化性质研究*

★ 吴安明^{1**} 桂婵² 徐兰² 杨小妹³ 何雁² 简晖^{2***} (1. 江西天施康中药股份有限公司 鹰潭 335000; 2. 江西中医学院 南昌 330004; 3. 深圳市南山区蛇口人民医院 深圳 518067)

摘要:目的:以毕枯枯林、原阿片碱、延胡索乙素和巴马汀为指标,测定夏天无提取物的表观溶解度和表观油水分配系数,考察其在高温高湿强光照条件下的稳定性,并研究其粉体学性质。方法:采用摇瓶法测定表观油水分配系数,按中国药典(2010版)原料药稳定性试验指导原则进行影响因素试验。结果:37℃下,介质的 pH 越大,夏天无提取物和 4 个指标成分的表观溶解度越小,但表观油水分配系数越大。高温高湿强光照条件下,4 个指标成分均稳定。夏天无提取物粉末流动性不佳,不易吸湿。结论:建立的方法可准确测定夏天无提取物及其指标成分的表观溶解度和表观油水分配系数等,为夏天无提取物的剂型设计以及其他药学研究提供实验依据。

关键词:夏天无提取物;表观油水分配系数;表观溶解度;稳定性;粉体学性质

中图分类号:R 944.2⁺⁷ **文献标识码:**A

Study on the basic physicochemical properties of *Corydalis decumbens* extract

WU An-ming¹, GUI Chan², XU Lan², YANG Xiao-mei³, HE Yan²

1. Jiangxi Herbi-sky Co. Ltd, Yingtan 335000, China;
2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
3. Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000, China

并且简便,同时充分体现其综合化,宏观化和可量化等优于其他鉴别手段的优势,该法可用以对中药材和中成药进行真伪鉴别,评价原料药材,半成品和成品质量的均一性和稳定性等,本实验同时利用 HPLC-MS 等手段在获得较多结构信息的同时,对当归化学成分进行了初步定性分析,鉴定出 8 个化合物,可为当归化学成分的进一步研究及质量控制提供参考^[6-8]。

通过 HPLC-TOF-MS 确定的精确质量数、可能分子式,并对 HPLC-TRAP-MSⁿ 可采用正离子模式和负离子模式两种,预实验发现,正离子模式比负离子模式相比出峰多,响应好。这可能与当归中为有机酸,生物碱类的物质,其比较容易形成 $[M+1]^+$ 或 $[M+Na]^+$, 在负离子模式下都有很好的响应,最后确定采用采集正离子模式下的总离子流图。HPLC-TOF/MS, 利用所得化合物离子的精确质荷比进行分子式匹配。

参考文献

- [1] 沈敬仁. 浅谈当归功效[J]. 天津中医, 1996, 13(6): 34.
- [2] 黄伟晖, 宋纯青. 当归的化学和药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(3): 147-151.
- [3] 韦玮, 龚苏晓, 张铁军, 等. 当归多糖类成分及其理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2009, 32(2): 130-134.
- [4] 裴媛, 谭初兵, 徐为人, 等. 当归苯酞类和萜类成作用的虚拟评价[J]. 中草药, 2010, 41(6): 938-941.
- [5] 陈耀祖, 陈能煜, 马学毅, 等. 当归化学成分分析研究-毛细管气相色谱-质谱法鉴定当归挥发油成分[J]. 高等学校化学学报, 1984, 5(1): 124-148.
- [6] 罗国安. 中药指纹图谱-质量控制与新药研发(第一版)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 11-12.
- [7] 乔善磊. 中药色谱指纹图谱相似度评价研究[D]. 第二军医大学药物分析学, 2004, 5.
- [8] 罗国安, 王义明. 中药指纹图谱的分类和发展[J]. 中国新药杂志, 2002, 11: 46-51.

(收稿日期: 2011-11-26)

* 基金项目: 科技人员服务企业行动项目(2009GJC50010)

** 作者简介: 吴安明, 男, 高级工程师, 研究方向: 中药制剂, Tel: 13870107333 E-mail: wuanming0217@163.com

*** 通讯作者: 简晖, 男, 教授, 研究生导师, 研究方向: 中药新剂型, Tel: 13870065130 E-mail: jianhui126@126.com