

HPLC-DAD-ESI-MS法定性分析木香顺气丸甲醇提取物中的化学成分

王嘉林^{1*}, 王斯坦²(1. 洛阳市食品药品检验所, 河南 洛阳 471023; 2. 无锡瑞年实业有限公司, 江苏 无锡 214092)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)15-2147-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.15.48

摘要 目的: 建立定性分析木香顺气丸甲醇提取物中多种化学成分的方法。方法: 采用高效液相色谱(HPLC)-二极管阵列(DAD)-电喷雾电离质谱(ESI-MS)法。色谱柱为Eclipse XDB C₁₈, 二元线性梯度洗脱, 柱温为35℃; ESI离子源泉, 正负离子分别扫描。结果: 通过与DAD、ESI、MS联用, 获得8个化合物的准分子离子峰[M+H]⁻及分子加钠峰[M+Na]⁺; 同时利用质谱的碰撞诱导解离(CID)技术, 获得二级质谱信息, 并结合保留时间和参考文献信息, 对8个化合物进行了确证。得到黄酮类成分柚皮苷、异柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、甘草苷, 木脂素类成分厚朴酚、和厚朴酚以及生物碱类成分辛弗林。结论: 该方法可定性分析木香顺气丸中的有效组分。

关键词 高效液相色谱-二极管阵列-电喷雾电离质谱法; 木香顺气丸; 甲醇提取物

Qualitative Analysis of the Chemical Composition of Methanol Extracts from Muxiang Shunqi Pills by HPLC-DAD-ESI-MS

WANG Jia-lin¹, WANG Si-tan²(1. Luoyang Institute for Food and Drug Control, Henan Luoyang 471023, China; 2. Wuxi Real Industrial Co., Ltd., Jiangsu Wuxi 214092, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the qualitative analysis of chemical compositions of methanol extracts from Muxiang shunqi pills. METHODS: HPLC-DAD-ESI-MS was conducted. The column was Eclipse XDB C₁₈ with binary linear gradient elution and the column temperature of 35℃, ion source of ESI and respective scanning of positive and negative ions. RESULTS: With the combination of DAD, ESI and MS, molecular ion peak [M+H]⁻ and molecular plus sodium peak [M+Na]⁺ of 8 compounds were obtained. Collision-induced dissociation (CID) technology was used to collect the MS² information and 8 compounds were obtained with the combination of retention time and reference papers. We got flavonoid glycosides (naringin, isonaringin, hesperidin, neohesperidin and liquiritin), lignans (maganolol, honokiol) and alkaloid (synephrine). CONCLUSIONS: The method can be used to analyse the active components of Muxiang shunqi pills.

KEYWORDS HPLC-DAD-ESI-MS; Muxiang shunqi pills; Methanol extracts

木香顺气丸由木香、陈皮、枳壳、青皮、槟榔、香附、厚朴、甘草等10味中药组成, 具有行气化湿、健脾和胃的功效, 主要用于治疗湿浊、阻滞气机、胸膈痞闷、脘腹胀痛、呕吐恶心、暖气纳呆。木香顺气丸中主要的成分为木香中挥发性的倍半萜和倍半萜内酯成分, 陈皮、青皮和枳壳中的二氢黄酮类成分,

以及厚朴中的木脂素类成分。关于测定木香顺气丸中成分的高效液相色谱(HPLC)法已有报道^[1-4], 2010年版《中国药典》中木香顺气丸项下对厚朴酚和与厚朴酚进行了含量测定。作者前期已对木香顺气丸甲醇提取物指纹图谱进行了研究^[5], 色谱指纹图谱通过色谱峰相对保留时间对复杂基质组分进行

- (11):885.
- [2] 师永清, 康淑荷, 王爱军. HPLC法同时测定黄连双清丸中栀子苷、芍药苷、黄芩苷、盐酸小檗碱和大黄素的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1612.
- [3] 李文霞, 宋平顺. HPLC法同时测定三黄片中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 药学进展, 2011, 35(4): 178.
- [4] 周国莉, 林晓莲, 程聪. HPLC法测定复方黄连液中盐酸小檗碱的含量[J]. 中医药导报, 2010, 16(8): 80.
- [5] 李茂林. 复方黄连素片中盐酸小檗碱含量测定方法改进[J]. 中国药业, 2013, 22(14): 68.
- [6] 唐丽琴, 刘圣, 李鑫, 等. HPLC测定复方黄连胶囊中盐酸小檗碱的含量[J]. 中成药, 2003, 25(9): 765.
- [7] 朱琴, 黄湘杰. HPLC法同时测定三黄散中黄芩苷和盐酸小檗碱的含量[J]. 中国药师, 2014, 17(8): 1432.
- [8] 金杏芳. 高效液相色谱法测定复方黄连胶囊中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国药业, 2012, 21(11): 21.
- [9] 周静安. RP-HPLC法同时测定炎可宁糖衣片中盐酸小檗碱和黄芩苷的含量[J]. 中医药学刊, 2005, 23(10): 155.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 282.

* 主管药师。研究方向: 天然药物活性成分分析。电话: 0379-63936617。E-mail: latova@163.com

(收稿日期: 2015-01-27 修回日期: 2015-03-27)

(编辑: 申琳琳)

质量控制^[6-7]。近年来,HPLC-电喷雾电离质谱(ESI-MS)技术在中药领域得到广泛应用,由于ESI具有软电离的特征,能够得到分子离子峰,通过碰撞诱导解离(CID)能够得到化合物二级或多级MS信息,从而推断出化合物结构,能更加准确地识别各色谱峰,对木香顺气丸有效组分的研究有更大的意义。为此,笔者应用HPLC-二极管阵列(DAD)-ESI-MS技术对木香顺气丸中的复杂组分进行了分析。

1 材料

6410型三重串联四极杆质谱(美国Agilent公司);1200型HPLC仪,包括DAD检测器、Mass Hunter工作站(美国Agilent公司);十万分之一分析天平(德国Sartorius公司);KQ-100DE医用超声波清洗仪(昆山超声仪器有限公司);乙腈为色谱纯(德国Merck公司),水为娃哈哈纯净水。

橙皮苷对照品(批号:110721-201316)、柚皮苷对照品(批号:110722-201111)、辛弗林对照品(批号:110727-201107)、厚朴酚对照品(批号:110730-201112)、和厚朴酚对照品(批号:110730-201112)、新橙皮苷对照品(批号:111857-201102)均购自中国食品药品检定研究院;市售木香顺气丸(购自北京同仁堂制药有限公司,批号:9083109);自制木香顺气丸[为笔者依照《中国药典》处方自制,处方所需药材及饮片购自洛阳市百佳好一生同仁堂药店,经本所魏清芳主任药师鉴定均符合2010年版《中国药典》(一部)项下要求]。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

色谱柱:Eclipse XDB C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温:35℃;DAD检测器检测波长:280 nm;二元线性梯度洗脱(梯度洗脱程序见表1);进样量:2 μl;流速:0.4 ml/min;ESI离子源;干燥气温度:350℃;干燥气流速:12 L/min;雾化气压力:15 psi;正负离子分别扫描;毛细管电压:4 kV;碎裂电压:135 V。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Procedures of gradient elution

时间,min	水,%	乙腈,%	梯度曲线
0	95	5	线性
25	60	40	线性
55	30	70	线性

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 精密称取样品3 g,置于100 ml量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率:150 W,频率:40 kHz)30 min,放置2 h后定容,过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液 精密称取橙皮苷、柚皮苷、厚朴酚、和厚朴酚、辛弗林对照品各10 mg,置于100 ml量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率:150 W,频率:40 kHz)30 min,放置2 h后定容,摇匀;精密称取上述溶液用甲醇稀释1 000倍,作为对照品溶液。

2.3 结果

在电子轰击电离(EI)质谱下黄酮类化合物的分子离子峰不易获得;ESI-MS是一种软电离模式,易得到[M-H]⁻、[M+Na]⁺等加和分子离子峰。在正负模式下,得到碎裂电压在135 V情况下的质谱总离子流色谱图(TIC),以及280 nm下的紫外图谱,详见图1。在得到一级全扫描图谱之后,提取不同特征m/z的信息,然后确定保留时间,分段进行子离子扫描,得到二级质谱信息详见表2、表3、图2。

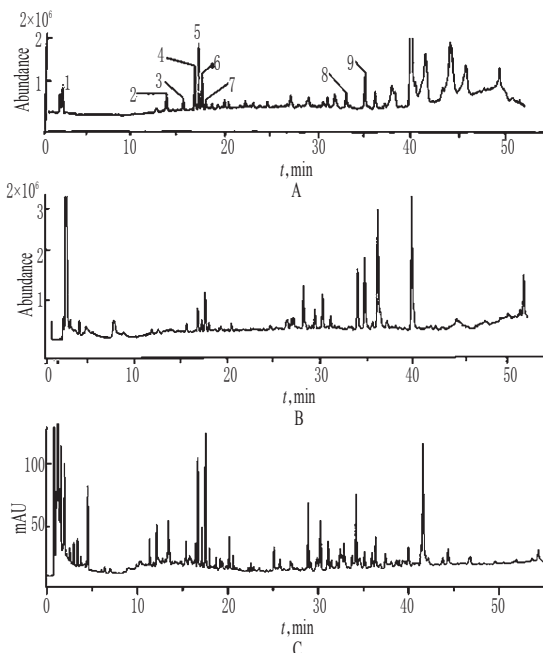


图1 木香顺气丸甲醇提取物的色谱图

A.质谱总离子流色谱图-正模式;B.质谱总离子流色谱图-负模式;C.紫外280 nm色谱图

Fig 1 Chromatogram of methanol extracts from Muxiang shunqi pills

A.MS TIC-positive mode; B.MS TIC-negative mode; C.UV chromatogram of 280 nm

表2 5个对照品的质谱及紫外分析结果

Tab 2 Results of MS and UV analysis of 5 references

化合物	保留时间,min	[M±H] [±] m/z	[M+Na] [±] m/z	其他离子 m/z	UV _{280nm} , nm
辛弗林	1.61	167.2	未测定	未测定	276
柚皮苷	16.30	579.3	601.3	未测定	285 330
橙皮苷	16.80	609.3	未测定	未测定	285 329
厚朴酚	34.20	265.1	未测定	未测定	206 272
和厚朴酚	36.10	265.1	未测定	未测定	206 272

3 讨论

3.1 质谱裂解分析

厚朴中主要含有木脂素类成分,而大部分属于新木脂素类,包括厚朴酚、和厚朴酚^[8]。厚朴酚、和厚朴酚为同分异构体,但是在反相色谱固定相上保留时间不同,虽准分子离子相同,但其裂解方式不同。厚朴酚失去1个H₂O分子,得m/z为247;而和厚朴酚碎裂后丰度最高(m/z为223.1),即为空间位置2个—OH脱水。辛弗林,化学结构类似麻黄碱,属于肾上腺α受体兴奋药。由于辛弗林极性大,在反相液相色谱模式条件下不易在色谱柱上保留,但在HPLC-ESI-MSI-MS上依旧能够检测出来,因其结构中含有仲氮原子,所以在正模式下响应要远远比负模式下高。峰6、峰7的一级质谱图具有类似的信息:m/z609.3为[M-H]⁻的准分子离子峰;m/z631.4为[M+Na]⁺的分子加钠峰;m/z672.4为[M+H₂O+Na-H]⁻的分子加钠加水峰;m/z401的碎片峰为为黄酮苷脱去1分子己糖(162 u)并且加1分子水的产物。从这些信息以及紫外吸收特征,判断峰6、峰7为一对同分异构体。同时提取m/z609.3得到图2提取离子色谱

表3 木香顺气丸甲醇提取物 TIC 图谱特征峰的分析结果
 Tab 3 Analysis results of the characteristic peaks of methanol extracts TIC from Muxiang shunqi pills

峰号	保留时间, min	[M-H] ⁻ m/z	[M+Na-H] ⁻ m/z	[M+Na-H] ⁻ m/z	其他碎片离子 m/z	UV λ _{max} , nm	分析结果
1	1.61	166.1	未测定	未测定	144 203 309	276	辛弗林
2	12.98	未测定	未测定	未测定	410 273 613 421	未测定	ND
3	14.99	417.1	未测定	未测定	480 335 401 507	275	甘草苷
4	16.35	579.2	642	601	401 295 189	285 331	异柚皮苷
5	16.82	579.3	642	601	401 295 189	285 330	柚皮苷
6	17.20	609.3	672	631	301 507 295	285 329	橙皮苷
7	17.66	609.3	672	631	301 507 295	285 329	新橙皮苷
8	34.11	265.0	未测定	未测定	247 245 189	272 206	厚朴酚
9	36.20	265.0	未测定	未测定	223 245 147	272 206	和厚朴酚
10	41.50	205.0	未测定	未测定	未测定	278 226	ND

注:ND表示不确定

Note:ND means it was not determined

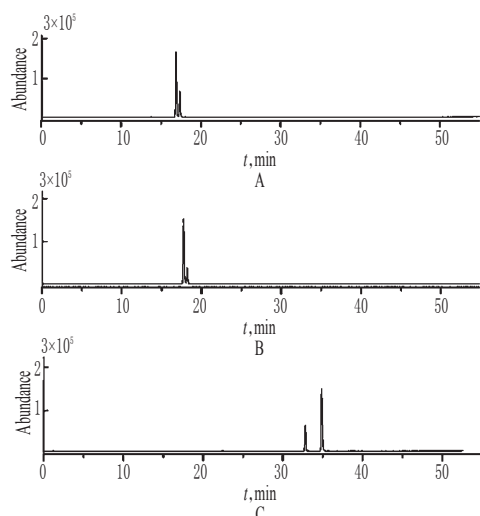


图2 提取离子色谱图

A.m/z为579.3;B.m/z为609.3;C.m/z为265.0

Fig 2 Atlas of EIC extracts

A.m/z was 579.3; B.m/z was 609.3; C.m/z was 265.0

(EIC)图,图谱中只显示出一对双峰,根据文献[9],推断峰7为新橙皮苷,而结合保留时间证实推断结果正确;而根据文献[9-10]报道 m/z 579.3为[M-H]⁻准分子离子峰,而其中另外一个峰度较大的峰 m/z 642.2为[M+2Na+H₂O]⁻和 m/z 601.3为[M+Na-H]⁻的分子加钠加水峰。峰4、峰5得到的一级图谱一致,同时结合紫外吸收和保留时间的推断,可以推断峰4、峰5分别为异柚皮苷和柚皮苷。运用EIC图谱提取分子质量为579.3的图谱,得到2个比邻的EIC峰,证实这2个化合物为同分异构体。一个根据保留时间已经证实是柚皮苷,而另外一个则为异柚皮苷。同时根据文献信息以及一级图谱、二级图谱,推断峰3、峰8为新圣草苷及新枸桔苷。

3.2 流动相的选择

本试验采用乙腈-水为流动相,考虑到本品成分复杂,若添

加甲酸或者乙酸虽会提高含有氮原子的辛弗林的响应,但同时会抑制黄酮类和木质素类化合物的响应;若添加乙酸氨则会有相反的效果。因为在整个采集中要进行正负模式的同时扫描,所以考虑用乙腈-水为流动相。

因为体系中含有双键的成分比较多,考虑到在紫外区的吸收,参考文献[11],发现黄酮类化合物在220 nm与280 nm波长范围内有最大吸收,且指纹区组分主要为黄酮类,故选择280 nm作为吸收波长。

中药复方指纹图谱是保证中药安全、有效、质量稳定的一个重要研究方法,以往试验往往根据HPLC的保留时间对中药的每个组分进行考察,但是对于未知组分的结构特征以及化学成分并不清楚。而应用HPLC-DAD-ESI-MS,则可以得到丰富的信息,如保留时间、特征峰、准分子离子峰以及紫外吸收等,并结合参考文献信息,可对复杂成分进行推断并定性。

参考文献

- [1] 师健友,童荣生,李晋奇,等.HPLC测定木香顺气丸中的木香烃内酯[J].华西药理学杂志,2013,28(4):417.
- [2] 孙全明,柯红梅,熊贤锋.HPLC法同时测定开胸顺气丸中4种成分的含量[J].中国药品标准,2010,11(2):131.
- [3] 孙全明,朱朝德,李春雨.HPLC测定木香顺气丸中的4种有效成分[J].华西药理学杂志,2008,23(2):215.
- [4] 魏清芳,辛爱玲,王嘉林.HPLC法测定木香顺气丸中辛弗林的含量[J].安徽医药,2010,14(11):1290.
- [5] 魏清芳,王嘉林.木香顺气丸甲醇提取物的HPLC指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(8):110.
- [6] 刘文,蒋世云.中药指纹图谱研究与应用进展[J].中国药房,2011,22(19):1819.
- [7] 詹雪艳,史新元,段天璇,等.色谱指纹图谱相似度方法的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(2):248.
- [8] 李棣华.厚朴研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2012,14(9):220.
- [9] 周大勇,徐青,薛兴亚,等.高效液相色谱-电喷雾质谱法测定枳壳中黄酮苷类化合物[J].分析化学,2006,34(特刊):31.
- [10] Fang T, Wang Y, Ma Y, et al. A rapid LC/MS/MS quantitation assay for naringin and its two metabolites in rats plasma[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006,40(2):454.
- [11] 田燕.紫外-可见光谱在黄酮类鉴定中的应用[J].大连医科大学学报,2002,24(3):213.

(收稿日期:2014-05-07 修回日期:2014-06-23)

(编辑:余庆华)