

中药标准组分的高效液相色谱/质谱联用(HPLC/MS)表征*

□金郁 章飞芳 肖远胜 薛兴亚 徐青 梁鑫森**

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘要: 高效液相色谱/质谱联用表征是化学表征的重要内容, 本文通过高效液相色谱/质谱联用方法系统表征中药标准组分, 采用了电喷雾电离源(ESI)、大气压化学电离源(APCI)的正负离子扫描模式, 获取标准组分在统一分析条件下, 不同表征模式中化合物的光谱、质谱信息。通过对不同标准组分中大量表征数据的比对和分析可发现和归纳色谱、质谱规律, 用于不同药材的成分差异性研究, 以及由系统制备得到的同种药材不同层次标准组分中成分与含量的变化, 为制备成分的确定和高效制备条件及参数的优化提供基础。建立包含分析方法的标准组分色谱质谱数据库, 结合色谱、质谱规律, 实现已知化合物的搜索匹配与自动质谱解析; 预测和发现结构类似的未知化合物, 提高研究效率, 加强中药物质基础研究的系统性和深入性。

关键词: 中药标准组分 液质联用 化学表征

随着中药现代化进程的深入, 虽然在中药继承与发展的具体方式与方法存在着争议, 但一般认同, 中药质量标准的建设与提高, 是发展以继承传统中医药理论并融合国际化质量控制标准为主要内容的现代创新中药的必经历程。然而, 国际化中药标准的建设和提高与中药化学物质基础研究的深入密不可分。以阐明中药化学物质基础为主要任务的中药系统分离分析表征, 一直以来都是中药标准化研究中的难点和重点。鉴于中药所含化合物数量及其性状差异等因素的复杂性, 使中药的化学表征存在很大

困难。由系统制备所得到的中药标准组分使中药的复杂性得以简化, 并且实现了标准化, 可以通过系统表征来深入研究中药的物质基础, 而物质基础的研究又为质量标准的制定提供了依据。

液相色谱质谱联用技术结合了色谱的分离和质谱的定性优势。紫外与质谱双检测模式的应用, 不仅提高了分离分析效率, 在单次分析中能获得复杂样品中丰富的化合物结构信息, 而且其检测的高灵敏度与互补性拓宽了其适用范围, 是复杂体系研究的有力工具。液相色谱质谱联用技术近年来发展迅速, 特别是各种软电离技术的发展, 促进了其在中药研究领域的广泛应用, 如中药的成分分析^[1-2], 体内药动

组稿日期: 2006-04-20

修回日期: 2006-06-05

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213): 基于现代理论和技术的复方中药系统研究, 负责人: 梁鑫森; 国家自然科学基金重点项目(20235020): 中药药效组分的指纹图谱分析的方法研究, 负责人: 梁逸曾。

** 联系人: 梁鑫森, 本刊编委, 博士, 研究员, 主要从事组分中药的研究, Tel: 0411-84379519, Email: liangxm@dicp.ac.cn。

(World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica) 99

学研究^[3-4],指纹图谱研究^[5-6],微量或者痕量成分的定性定量^[7]等。对中药标准组分的系统化学表征,液相色谱质谱联用技术是一个最为重要的研究模式。特别是在化合物数目与结构未知情形下,液相色谱质谱联用技术以其可靠的分离、检测能力、宽泛的适用范围以及丰富的化合物结构信息获取能力而成为人们首选的系统表征方式。

标准组分的制备是中药标准化建设的有益尝试。对标准组分的液相色谱质谱联用系统表征应遵循完善、标准、重复、普适等原则。根据中药化合物极性范围大、分子结构复杂等特点,选择液相色谱/二级管阵列检测器(DAD)/离子阱质谱联用方式能在中药标准组分的系统表征中充分发挥出液相色谱质谱联用的技术优点。标准组分是以组分可重复获取为基础,其成分组成有相应的稳定范围。在标准组分的系统表征中,液相色谱质谱联用方法的使用主要是对标准组分的成分进行初步、快速地分离分析以完成定性定量研究,为中药材物质基础研究、标准组分制备、标准组分表征提供数据信息,并为标准化过程控制和质量标准的建立提供基本数据。因此,统一而普适性的分离分析方法是对大量的标准组分进行系统表征的基本要求。在优化条件下采用液相色谱质谱联用系统表征标准组分,将获得的大量数据进行整理,归纳,并以色谱、光谱、质谱等数据形式建立数据库。同时通过对已知化合物的鉴定,总结色谱质谱规律,形成数据真值与规律有机结合的功能数据库。

1. 标准组分的液质联用表征方法

因为中药所含的化合物繁多,而且在复杂的化合物群中存在着有机酸、生物碱、多酚类、萜类等不同分子类型化合物,所以在离子源的选择上,根据化合物极性范围大的特点,选择了电喷雾电离源(ESI)及大气压电离源(APCI)两种源作为互补,系统表征标准组分,同时根据这些类别的离子化性能差异性,选用单一的扫描模式难以获得理想而准确的结构信息,尤其是正离子模式与负离子模式都具有自身的特点,如正离子模式扫描能获得较多结构碎片信息,而负离子模式能获得较为单一而清晰的分子离子峰信息,有助于对混合峰的辅助定性等工作的开展,应当

采用正负离子两种扫描方式。为了实现比较的功能,液相色谱分析采用了统一的分离条件。这样每个标准组分都可以得到四张总离子流色谱图,分别是ESI源的正离子扫描图、ESI源的负离子扫描图、APCI源的正离子扫描图和APCI源的负离子扫描图,并且进行了二级质谱的检测。同时得到了标准组分的液相色谱图和每个色谱峰的紫外光谱图。这些数据为质谱库建立、质谱规律的推断和化合物的目标制备提供基本的信息。实验结果表明,不同的离子源,同一种离子源的不同扫描方式可以得到互补的信息。例如川芎的ESI源正负扫描显示,化合物1、2、4在正离子扫描时有响应,而化合物3、5在负离子扫描有响应,结果见图1。大量的标准化数据可用于对比和总结各类化合物在不同离子源下及不同扫描方式下的响应强度、化合物稳定性、裂解有无异同等规律,为以后更为深入的质谱分析做出指导。随着系统分离的开展,标准组分的不断丰富,特别是标准品库的建立,将为液质联用表征提供丰富的对象,当然在深层次的液质联用表征时,还需根据表征对象的特点,对液质联用的实验条件,比如流动相、添加剂、离子源、扫描方式、毛细管电压等进行全面的优化,优化的条件将作为该组分或该同系组分的标准实验条件,实现表征过程的标准化。

2. 药材、标准组分差异性比对

(1) 同科同属不同药材的比对。

标准化数据的获得易于实现各种药材之间的比较,特别是一些同科属的药材,它们的化学组成有可能有一定的相似性,这种广泛的比较对于化合物的定性会起辅助作用,而且也可能通过这种物质基础的差异来寻找药理作用异同,从而为制备和活性成分筛选提供目标。例如当归和川芎都是伞形科植物,从分析结果看来,两者的液相色谱图有一定的相似性,见图2。从质谱数据进行比较,发现了很多相同的成分,如分别从川芎和当归提取组分ESI源正离子模式下的总离子流色谱图中提取 m/z 195, 225, 191, 189的萃取离子色谱图(见图3),可以看出,二个组分在相同的保留时间有相同质荷比的峰出现,并且进一步的二级质谱信息比较也有相同

的裂解碎片,初步的定性这些化合物为苯胺类化合物,如川芎内酯 H、I(m/z 225)、藁本内酯(m/z 191)、丁烯基苯酞(m/z 189), m/z 195 是阿魏酸。这说明二者的主要成分都是苯胺类成分,但是在量上有差别,这些苯胺类成分可能是二者共同的药效物质基础。

(2)相同药材不同层次标准组分的对比。

中药标准组分是经过系统分离制备而得到的,随着制备的深入,标准组分由复杂变得简单,使我们对于中药这个复杂体系的认识过程采取一种由简单到复杂的渐进方法。那么同一种药材在纵向各种标准组分之间的液质联用表征可以用于了解物质在各种制备过程中的流向,特别是在分离过程中有些微量的化合物得到了富集,如果这些成分是与其它物质共流出的,那么紫外是没有办法确定的,但是质谱可以很好地监测到,并且提供了较高的检测灵敏度,这种监测为新化合物的发现以及化合物制备锁定了目标。以丹参在大孔树脂上的标准组分表征为例,其中编号为 MCCM00213 的组分是大孔树脂的上样组分, MCCM0021311 是在通用型树脂上以 20% 醇进行洗脱的组分, MCCM0021312 是以 95% 醇进行洗脱的组分, MCCM0021313 在通用型树脂上不被吸附的组分上专用型树脂,然后用 95% 的醇进行洗脱所得到的组分。在液质联用表征的负离子总离子流图中提取 m/z 537 离子,可以看到 MCCM00213 组分中有 7 个化合物分子量是 538,经过大孔树脂的系列分离,再通过液质联用的表征可以看到(见图 4),化合物 1,2 在通用型树脂上不易被吸附,而在专用型树脂

上有很好的吸附和洗脱。化合物 5 在通用型树脂上相对不容易洗脱,而且化合物 7 得到了很好的富集,以化合物 5 和 7 的相对峰面积对比上样组分的相对

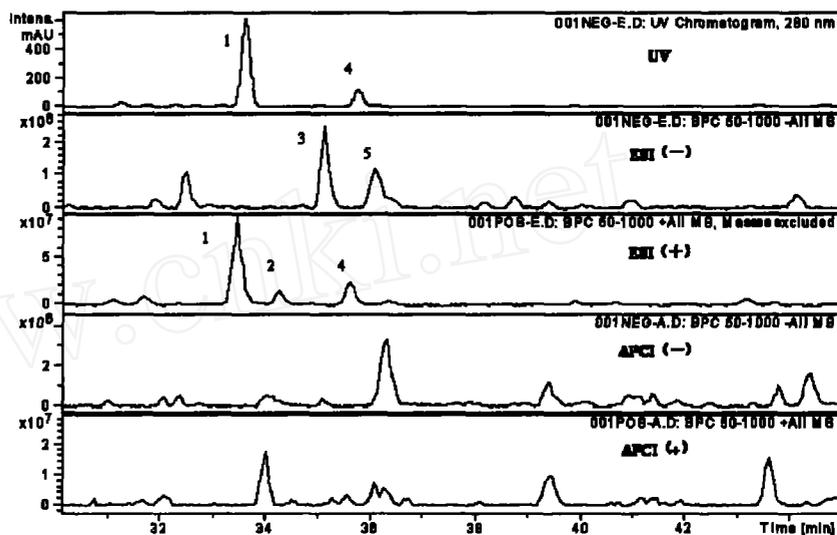


图 1 川芎总提组分的液质联用表征(部分图谱)

色谱柱: Hypersil ODS2 色谱柱(250 mm×4.6mm i.d., 5 μ m);
流动相组成: A 相为 0.5% 的甲酸水溶液; B 相为 0.5% 的甲酸乙腈溶液;
梯度洗脱条件: 在 0-40min 内, B 相从 5% 线性增加到 30%, 在 40-60min, B 相从 30% 线性增加到 65%, 然后在这个比例保持 20min;
流量: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 280nm, 采集 190-400nm 的光谱数据; 柱温: 30℃。
质谱条件: 电离源: 电喷雾电离源(ESI), 大气压化学电离源(APCI); 检测方式: 正离子检测, 负离子检测; 扫描范围: 50-1000 m/z ; 干燥气温度: 350℃; 干燥气流速: 8.0 L·min⁻¹; 雾化气压力: 35.0 psi; 毛细管电压: 3500 V, 二级质谱的电压从 0.3-2.0V 线性变化。

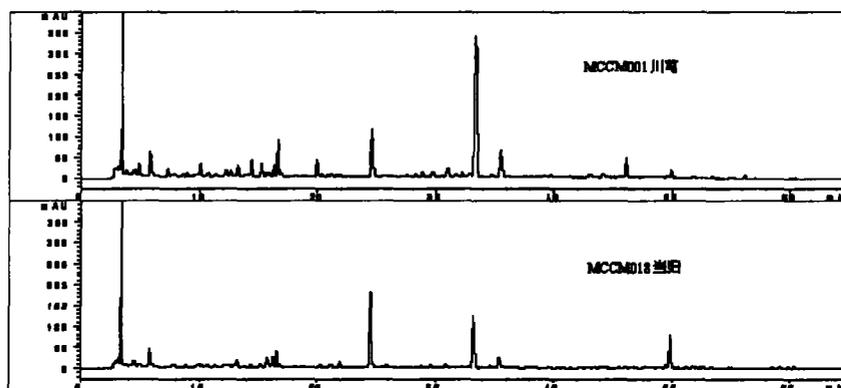


图 2 川芎(MCCM001)与当归(MCCM018)总提组分的液相色谱图

(分析条件同图 1)

峰面积,粗略计算约富集了四倍。现在文献报道在丹参中的分子量为 537 的化合物共有 4 个,这提示我们可能有新化合物或者在丹参中没有报道的化合物存在。这种同一药材纵向的标准组分表征为系统全面地了解药材和复方的物质基础提供了有效途径。

3. 已知化合物的鉴定和色谱、质谱规律的研究

类组分及同系组分是标准组分中两类重要的分子群。同系组分中的化合物具有相同的结构骨架,不同的取代基和取代位点,这些成分既具有结构的相似性又具有结构的多样性,在质谱裂解上遵循一定的规律产生相同的碎片信息,这些碎片成为该类成分的特征碎片。质谱裂解规律的推断与总结可以使我们在中药众多的化合物中开展已知和未知化合物的筛选定性工作。以质谱规律作指导,进行类化合物和同系化合物定性研究,具有快速、简捷的优点。现在对于中药中的黄酮类^[8]、酚酸类^[9]和生物碱类^[10]的质谱裂解规律都已经有了了一定的认识。比如黄酮苷元的裂解主要发生在 C 环,受不同的取代基影响较大,黄酮苷的裂解规律可以一定程度上确定糖的连接顺序,糖内连接方式,糖的连接位点。在我们现有的组分中有大量的黄酮类化合物,其结构类型非常丰富,我们将对黄酮的裂解规律从同系成分的角度加以深入探讨,使黄酮类的质谱规律能够在大量代表性样本的质谱解析中得以完善。在对丹参中酚酸类成分的质谱规律研究中我们发现,这些酚酸类成分是以丹参素和咖啡酸的聚合物形式存在,所以多聚体能在质谱上观察到连续丢失 CO₂、丹参素和咖啡酸的碎片,规律性很明显,裂解途径清晰。随着标准品库的建立,我们会得到结构

丰富的质谱表征样本,这对于质谱规律的确认和细化提供了非常有利的条件。

4. 未知化合物的筛选和鉴定

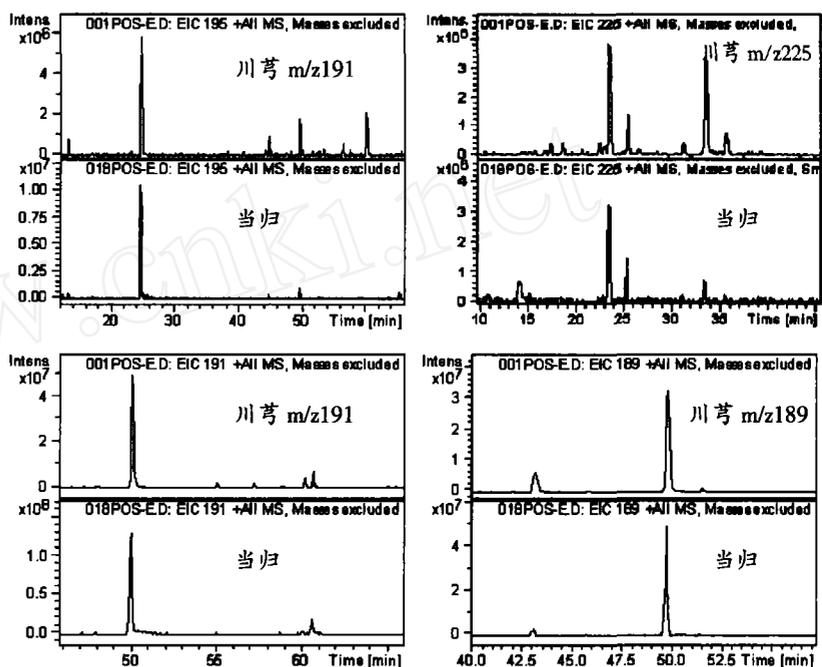


图3 川芎(MCCM001)与当归(MCCM018)萃取离子色谱图

(分析条件同图1)

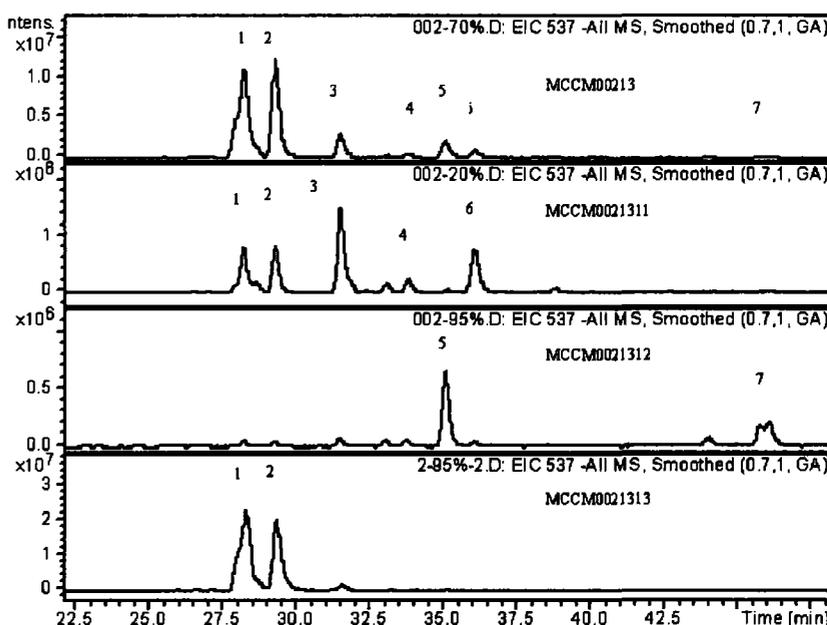


图4 丹参中 m/z 537 的萃取离子色谱图

(分析条件同图1)

由于中药的复杂性,对每一个化合物都进行分离制备而定性是不现实的,特别是微量组分,利用质谱规律可以实现从已知发现未知,并且对未知成分有个初步的结构判断,同时为制备提供了信息和目标。通过对酚酸类成分质谱规律的研究,现已经对其中的28个酚酸类或其酯类成分进行了定性。在对枳壳的质谱表征过程中我们发现了多甲基黄酮的存在。这些多甲基黄酮在质谱上会产生丢甲基和丢甲氧基的自由基离子,并且会进一步产生脱水,脱一氧化碳的中性丢失碎片,以此规律表征出枳壳中的29个多甲基黄酮。未知化合物的快速筛选对于中药物质基础的认识是非常重要的。随着质谱规律研究的深入,这种未知化合物的筛选工作将借助于数据库的方式来实现。

5. 质谱库的建立

气相色谱质谱联用现已有标准谱库可进行化合物的搜索定性,相对而言,液质联用以软电离源(ESI、APCI)所获得的质谱分析结果在不同的仪器及分析条件下有一定的差异性,但是其在统一的、标准分离分析条件下所获得数据应在仪器的稳定范围内,尤其是一些类化合物及同系化合物的主要质谱裂解方式,在ESI和APCI模式下的质谱同样在一定程度上能反映化合物的结构特征。因此,以标准化操作获取大量标准组分系统液相色谱质谱表征的数据建立光谱和质谱数据库具有一定的可行性。在质谱库的建立过程中首先将四张总离子流色谱图中的色谱峰进行编号,以一张谱图的编号为基准,在这张谱图不能体现而在其它谱图体现出的峰采用了小数编号,相同的物质给相同的编号,按照编号将每个色谱峰的质谱信息输入质谱库,在质谱库中还可记录每个化合物的保留时间和检测条件。现已将每个标准组分建立一个独立质谱库,可进行同一种药材不同层次组分相互的搜索匹配,也可进行不同药材的各组分跨库搜索匹配,特别是可以完成在多个质谱库的同时检索。以丹参为例,现将丹参总提物的标准组分的四张总离子流谱图(见图5)按上述方法建立质谱库,谱库名称为MCCM002,共录

入质谱图清晰的67个成分,因为丹参的成分研究工作相对比较系统和深入,所以在谱库的建立过程录入了已定性成分的分子式、结构式、分子量等信息。

质谱库的建立可以完成成分的快速搜索定性,如泽兰和丹参同为唇形科植物,在它们中间可能含有相同的化学成分。为了对泽兰的化学成分情况有个初步快速的了解,对其在ESI源负离子模式下的扫描图进行自动的多级质谱图搜索,在域值为10000的条件下共得到126个化合物的一级质谱和二级质谱,其中因为在一级质谱上有的化合物发生了断裂,碎片离子峰超过了域值,所以被当成新的化合物检测出来,导致有少量化合物的重叠。因为一级谱通常伴有共流出化合物的信息,不适合进行谱库的搜索和匹配,所以以特定母离子的二级谱进行搜索,对实验条件给以适合的权重等级,加以保留时间的限制条件,在MCCM002的谱库中进行搜索,匹配度大于950的有6个化合物,结果见表1。如果两个化合物在色谱上保留相同,有相同的分子量和碎片特征以及紫外吸收,那么基本可以准确定性。泽兰中38号化合物的搜索结果见图6,其与谱库中的23号化合物迷迭香酸有较高的匹配值,进一步的紫外光谱图比较验证了搜索的准确性。搜索说明泽兰中含有和丹参中相似的酚酸类成分,同时也能看到大量分子量相同的化合物与谱库中的结果不能匹配,因为在植物中存在大量的同分异构体,这种相互的比较和验证增加了单独依靠文献报道进行质谱定性的准确性。而且这个初步的谱图处理和搜索匹配工作非常迅速,还可根据其化学成分的文献报道情况在其它谱库中进行搜索,快速获得尽可能多的信息。

表1 泽兰总提组分在丹参总提组分质谱库(MCCM002)的搜索结果

化合物编号	保留时间 (t_R)	准分子离子峰 ([M-H] ⁻)	谱库中峰号	匹配度	化合物定性
10	8.1	197	8	997	丹参素
38	33.5	359	23	986	迷迭香酸
39	33.7	493	25	996	未知
47	36.6	717	26	998	丹参酚酸 B
64	43.0	492	34	985	丹参酚酸 A
108	64.4	485	43.1	991	未知

目前, 在我们建立的质谱库中录入的是大量未定性化合物的质谱信息, 随着物质基础研究的不断深入, 质谱库中的大量化合物将被准确性, 在这些

基本质谱库的基础上, 进一步构建出同系组分质谱库, 类组分质谱库, 深入开展质谱规律的研究, 增加质谱库的自动质谱解析功能, 实现未知化合物的快速筛选与定性。

液质联用表征是中药标准组分表征的重要手段, 通过液质联用分析从微观上可以得到众多化合物的分子量信息、分子结构信息和紫外光谱信息等, 从宏观上可以得到药材或者复方总体的物质基础概况。表征过程中实现标准化有利于数据的比较分析, 大量的数据处理是表征工作的重点和难点, 数据库的建立有利于提高表征工作的效率, 为深层次的数据挖掘提供了有利工具。我们现在已经完成 36 味中药总提组分和部分系统分离的标准组分的液质联用表征, 基本数据已经录入数据库, 还将进一步完成相应的 14 味中药总提组分、溶剂分配组分、大孔树脂柱分离组分、工业色谱组分的表征工作。

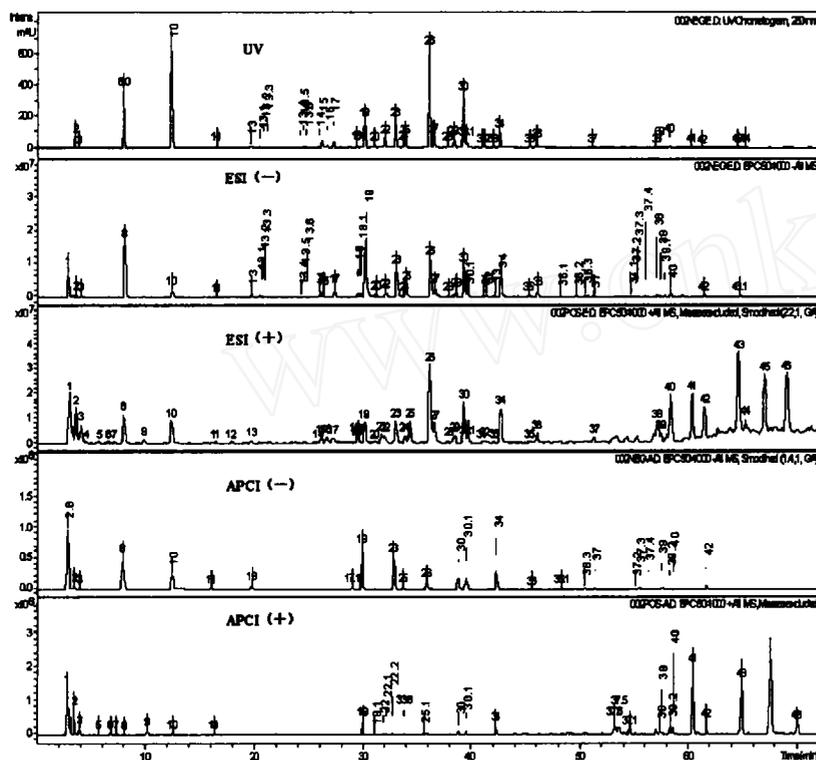


图 5 丹参总提组分的总离子流色谱图

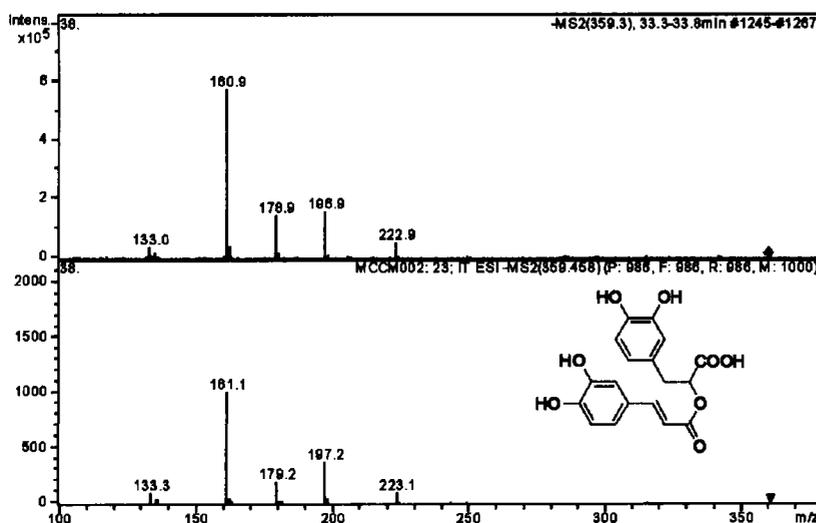


图 6 化合物 38 在丹参谱库(MCCM002)中的搜索结果 (分析条件同图 1)

参考文献

- 1 Min Ye, De-an Guo. Analysis of bufadienolides in the Chinese drug ChanSu by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem-mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; 19: 1881-1892.
- 2 Federico Ferreres, Carla Sousa, Mulangu Justin, et al. Characterization of the Phenolic Profile of Boerhaavia diffusa L. by HPLC-PAD-MS/MS as a Tool for Quality Control. *Phytochem. Anal.* 16, 451-458 (2005).
- 3 Liang Wang, Marilyn E. Morris. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for quercetin and conjugated quercetin metabolites in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B*, 821 (2005) 194-201.
- 4 Wang YL, Liang YZ, Chen BM, et al. LC-DAD-APCI-MS-based screening and analysis

- of the absorption and metabolite components in plasma from a rabbit administered an oral solution of danggui. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383 (2005): 247~254.
- 5 Jin-lan Zhang, Ming Cui, Yun He, Hai-lan Yu, De-an Guo. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1280~1286 (2000).
 - 6 Luhua Zhao, Chaoyu Huang, Zhen Shan, et al. Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC-MS. *Journal of Chromatography B*, 821 (2005) 67~74.
 - 7 Nianbai Fang, Shanggong Yu, Ronald L. Prior. LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 3579~3585.
 - 8 Nour-Eddine Es-Safi1, Lucien Kerhoas1, Paul-Henri Ducrot. Application of positive and negative electrospray ionization, collision-induced dissociation and tandem mass spectrometry to a study of the fragmentation of 6-hydroxyluteolin 7-O-glucoside and 7-O-glucosyl-(1→3)-glucoside. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005; 19: 2734~2742.
 - 9 Guifeng Zeng, Hongbin Xiao, Jianxun Liu, Xinmiao Liang. Identification of phenolic constituents in *Radix Salvia miltiorrhizae* by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; 20: 499~506.
 - 10 Daowu Wang, Zhiqiang Liu, Mingquan Guo et al. Structural elucidation and identification of alkaloids in *Rhizoma Coptidis* by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2004; 39: 1356~1365.

The characterization of standard multi-components Chinese medicine by high performance liquid chromatography/mass spectrometry(HPLC/MS)

Jin Yu, Zhang Feifang, Xiao Yuansheng, Xue Xingya, Xu Qing, Liang Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

The high performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC/MS) is one of important contents of chemical characterization. The standard multi-components of traditional Chinese medicine were characterized by HPLC/MS in both ESI and APCI, negative and positive ion modes. The relative standard analytical method was developed to obtain MS and spectrum data which were used to compare, analyse and conclude the rule of chromatography and MS. The data were also used to compare the difference of standard multi-components of traditional Chinese medicine obtained from the systemic separation, which will help to identify the components in the separation. The data obtained by HPLC/MS might be an important basis of confirmation of separation aim and optimizations of separation condition. Hence, the database based on abundant HPLC/MS information including method was developed. The informatics database combined with the rule of chromatography and MS will facilitate realization of search and match of known compound automatically. The auto MS parse and prediction of unknown compounds might play an important role on improvement of the efficiency of research. The systematic and further investigation on chemical constitution of TCM can be strengthened.

Keyword: Multi-Component Chinese Medicine (MCCM); High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry; Chemical Characterization

(责任编辑:王 瑀, 责任编审:柳 莎, 张志华, 责任译审:熊艳艳)