

中药红毛五加化学成分的高效液相色谱/电喷雾电离/质谱/质谱(HPLC/ESI/MS²)分析

王祝伟, 孙毓庆

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要 建立了中药红毛五加化学成分的高效液相色谱/电喷雾电离/质谱/质谱(HPLC/ESI/MS²)定性分析方法。液相色谱条件: Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm); 乙腈-水(用冰醋酸调 pH 为 3.0)梯度洗脱, 流量 0.8 mL/min, 柱温 30 °C; 二极管阵列检测器(DAD)检测波长 254 nm。质谱条件: Agilent 离子阱质谱仪; 电喷雾离子(ESI)源; 正离子检出模式。采用该方法得到了红毛五加的紫外(UV)色谱图、总离子流色谱图(TIC)和萃取离子色谱图(EIC), 以及相应色谱峰的 EIC/MS² 的质谱图, 对其进行解析, 鉴别出红毛五加中的鸟苷、腺苷和紫丁香树脂苷成分。方法简便、快捷和准确。

关键词 高效液相色谱; 电喷雾电离; 质谱; 鸟苷; 腺苷; 紫丁香树脂苷; 红毛五加; 中药
中图分类号 O658 文献标识码 A 文章编号 1000-871X(2003)06-0554-04

High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization/Mass Spectrometry² Analysis of *Acanthopanax giraldii* Harms

WANG Zhuwei, SUN Yuqing

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry/mass spectrometry(HPLC/ESI/MS²) method has been developed for the qualitative analysis of *Acanthopanax giraldii* Harms. The separation was performed on Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm) with gradient elution of acetonitrile-water (the pH was adjusted to 3.0 with acetic acid) as mobile phase with a flow rate of 0.8 mL/min at 30 °C. The photodiode array detector(DAD) was set at 254 nm. The MS analysis was carried out on an Agilent 1100 series ion trap mass spectrometer with an electrospray ionization source in the positive ion mode. The ultraviolet (UV) chromatogram, total ion current chromatogram(TIC) and extracted ion chromatogram(EIC) of the sample and ESI/MS² spectra of the peaks in the chromatograms were obtained. Guanosine, adenosine and liri dendrin in the *Acanthopanax giraldii* Harms were identified. This method is easy to run, fast and accurate.

Key words: high performance liquid chromatography; electrospray ionization; mass spectrometry; guanosine; adenosine; liri dendrin; *Acanthopanax giraldii* Harms; Chinese traditional medicine

中药红毛五加是五加科植物 *Acanthopanax giraldii* Harms 的地上茎皮。据考证《神农本草》中记载的豺漆五加即当今的红毛五加。红毛五加具有通关节强筋骨之功效。现代药理研究表明, 红毛五加有解热镇痛^[1]、抗炎^[2]、抗病毒^[3]、保肝^[4]、抗肿瘤^[5]和增强免疫力^[6]等多种药理作用。急性和亚急性实验结果表明, 红毛五加毒性甚小, 较大剂量、较长时间用药均安全^[7]。

红毛五加与刺五加是五加科同科属的近缘植

物。红毛五加与刺五加在化学成分和药理作用方面有着很多相同点。红毛五加广泛分布在我国四川、甘肃、青海、宁夏等地, 资源丰富, 有广泛的开发前景。目前, 对刺五加的研究开发已经比较全面, 而对红毛五加的研究仅局限在药理作用及化学成分^[8,9]方面, 对于红毛五加的质量控制方法研究的文献仅有一篇^[10]。尚无文献报道有关红毛五加化学成分的高效液相色谱/质谱(LC/MS)分析情况。本实验采用高效液相色谱/电喷雾电离/质谱/质谱方法对红毛

五加中化学成分进行定性分析,鉴定出红毛五加中鸟苷、腺苷和紫丁香树脂苷3个成分,其分子结构式

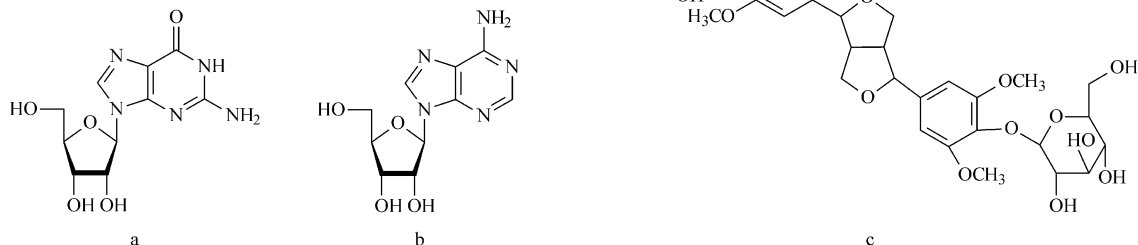


图1 鸟苷(a)、腺苷(b)和紫丁香树脂苷(c)的分子结构式
Fig. 1 Molecular structures of guanosine (a), adenosine (b) and liriodendrin (c)

1 实验部分

1.1 试剂与样品

乙腈为色谱纯,美国DIKMA公司产;水为娃哈哈纯净水;其他试剂均为分析纯。红毛五加产于四川省,由沈阳药科大学孙启时教授鉴定。

1.2 仪器及条件

美国Agilent公司1100 series液相色谱-SL型多级离子阱质谱联用仪。数据处理系统为美国Agilent公司化学工作站(Chemstation)。

1.2.1 液相色谱部分

Agilent 1100型高效液相色谱仪,包括低压四元梯度泵、二极管阵列检测器(DAD 190~950 nm)、自动进样器、柱温箱、在线脱气机。

色谱柱:Zorbax SB-C₁₈(250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B)溶液(用冰醋酸调pH 3.0),二元线性梯度洗脱,2% A(0 min) $\xrightarrow{20 \text{ min}}$ 15% A(20 min) $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 25% A(35 min) $\xrightarrow{10 \text{ min}}$ 35% A(45 min)(其中百分数值均为体积分数,下同);检测波长 254 nm;流速 0.8 mL/min;柱温 30 °C;自动进样,进样量 5 μL。

1.2.2 质谱部分

Agilent 1100 series SL型多级离子阱质谱仪;电喷雾离子源(ESI);正离子检出模式;雾化气压力 0.24 MPa(35 psi);干燥气(氮气)流量 9 L/min;干燥气温度 350 °C;电喷雾电压 4 kV;扫描范围 m/z 100~1 000;离子电荷控制(ICC) 30 000。采用自动二级质谱和自动参数设置(Smart Parameter Setting, SPS)模式。柱后分流比 1:10。

1.3 样品的处理

将红毛五加茎皮粉碎,称取 5 g,分别用 100 和

见图1),为进一步深入开发红毛五加以及研究红毛五加的质量控制方法奠定了基础。

50 mL 去离子水加热回流提取 2 次(60 和 30 min),合并提取液,过滤,减压浓缩至约 15 mL,加入 95% 乙醇适量,进行醇沉,使乙醇浓度达 70%。在低温(4 °C左右)下放置 24 h 后取上清液,减压浓缩后用水定容至 25 mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液作为 HPLC/MS 分析样品。

2 结果与讨论

2.1 色谱图

通过对红毛五加茎皮水提液样品进行 DAD 190~400 nm 紫外(UV)扫描和离子阱质谱 m/z 100~1 000 全扫描,得到紫外色谱图和总离子流色谱(TIC)图(见图2)。

利用质谱工作站所提供的提取离子功能,分别萃取出 m/z 为 284, 268, 765 的提取离子,并获得萃取离子流色谱图(EIC)。上述 3 种提取离子的保留时间分别为 9.6, 10.5, 29.2 min。由于总离子流色谱图与紫外色谱图之间有 0.4 min 的延迟,则 EIC 为 m/z 284, 268, 765 的提取离子色谱峰所对应的紫外色谱图中色谱峰的保留时间分别为 9.2, 10.1, 28.8 min。

2.2 一级和二级质谱解析

在正离子模式下,经常会同时出现 $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$ 等一系列准分子离子峰。

EIC 中 m/z 284 峰的一级和二级质谱图分别如图 3-a, b 所示。 m/z 284.0 为 $[M+H]^+$ 离子峰, 152.4 为其失去 1 个核糖分子的碎片离子峰,即 $[M+H]^+ - 132$; 322.1 为 $[M+K]^+$ 离子峰, 190.5 为其失去 1 个核糖分子的碎片离子峰,即 $[M+K]^+ - 132$ 。因此可以确认图 2-b 中保留时间为 9.6 min (EIC 为 m/z 284) 的色谱峰是鸟苷峰。

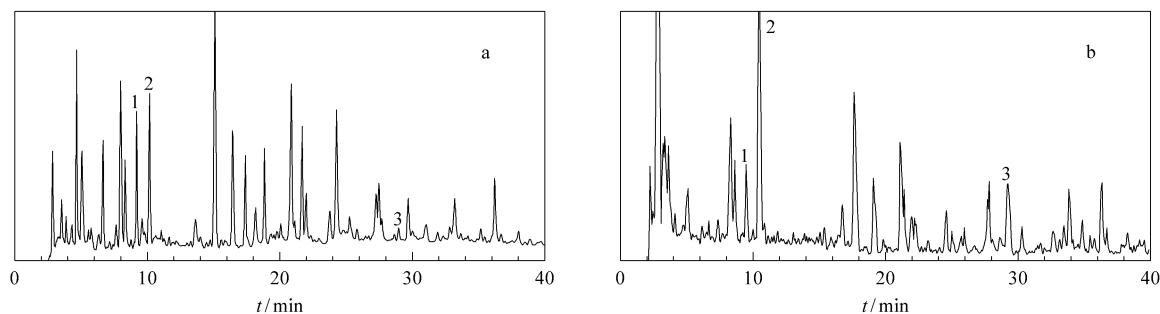


图 2 红毛五加水提液的紫外色谱图 (a) 和总离子流色谱图 (b)

Fig.2 UV chromatogram (a) and TIC chromatogram (b) of the extract of *Acanthopanax giraldui* Harms

HPLC conditions: Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm) was used with gradient elution of acetonitrile and water (pH 3.0 with acetic acid) as mobile phase with a flow rate of 0.8 mL/min at 30 °C. The column effluent was monitored at UV 254 nm with diode array detector (DAD). MS conditions: electrospray ionization; positive detection mode; nebulizer gas pressure, 0.24 MPa (35 psi); drying gas flow rate, 9 L/min; drying temperature, 350 °C.

1. guanosine; 2. adenosine; 3. liriiodendrin.

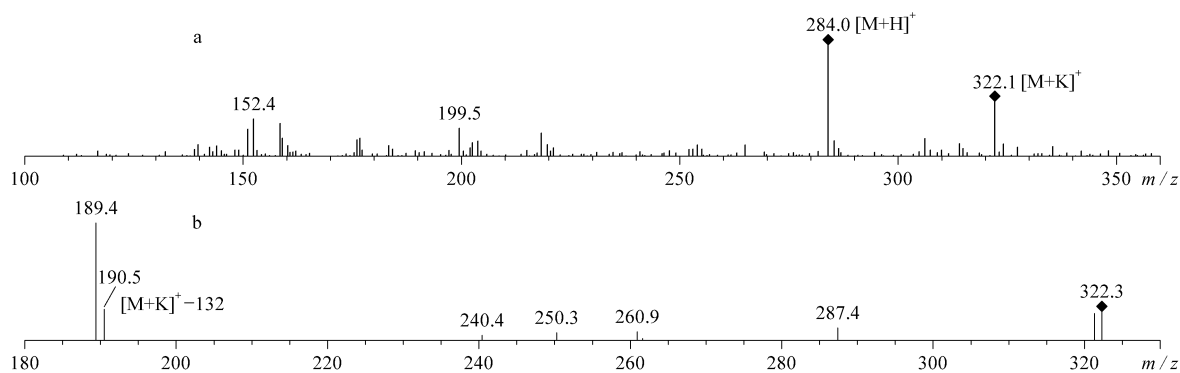


图 3 鸟苷的一级 (a) 和二级 (b) 质谱图

Fig.3 ESI mass (a) and mass² (b) spectra of guanosine

EIC 中 m/z 268 峰的一级和二级质谱图分别如图 4-a, b 所示。 m/z 267.9 为 $[M+H]^+$ 离子峰, 136.2 为其失去 1 个核糖分子的碎片离子峰, 即

$[M+H]^+ - 132$ 。因此可以确认图 2-b 中保留时间为 10.5 min (EIC 为 m/z 268) 的色谱峰是腺苷峰。

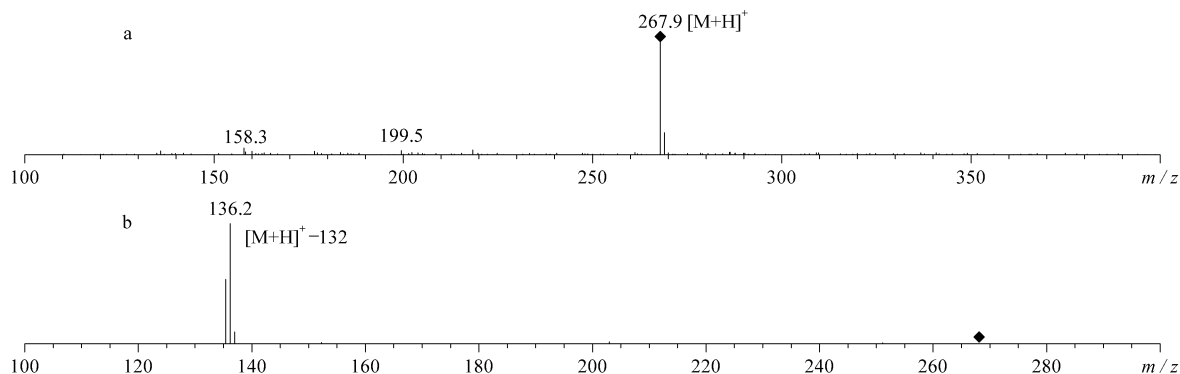


图 4 腺苷的一级 (a) 和二级 (b) 质谱图

Fig.4 ESI mass (a) and mass² (b) spectra of adenosine

EIC 中 m/z 765 峰的一级和二级质谱图分别如图 5-a, b 所示。 m/z 765.4 为 $[M+Na]^+$ 离子峰, 603.3 和 441.6 分别为其失去 1 个葡萄糖分子和 2 个葡萄糖分子的碎片离子峰, 即分别为 $[M+Na]^+ - 162$ 和 $[M+Na]^+ - 162 - 162$; 781.2

为 $[M+K]^+$ 离子峰, 图 5-c 为其二级质谱图。 m/z 763.3 为 $[M+K]^+$ 峰失去 2 个水分子的碎片离子峰, 619.2 为 $[M+K]^+$ 峰失去 1 个葡萄糖分子的碎片离子峰, 465.5 为 $[M+K]^+$ 峰失去 1 个葡萄糖分子及 $C_8H_9O_3$ 的碎片离子峰 ($C_8H_9O_3$ 碎片结构见图

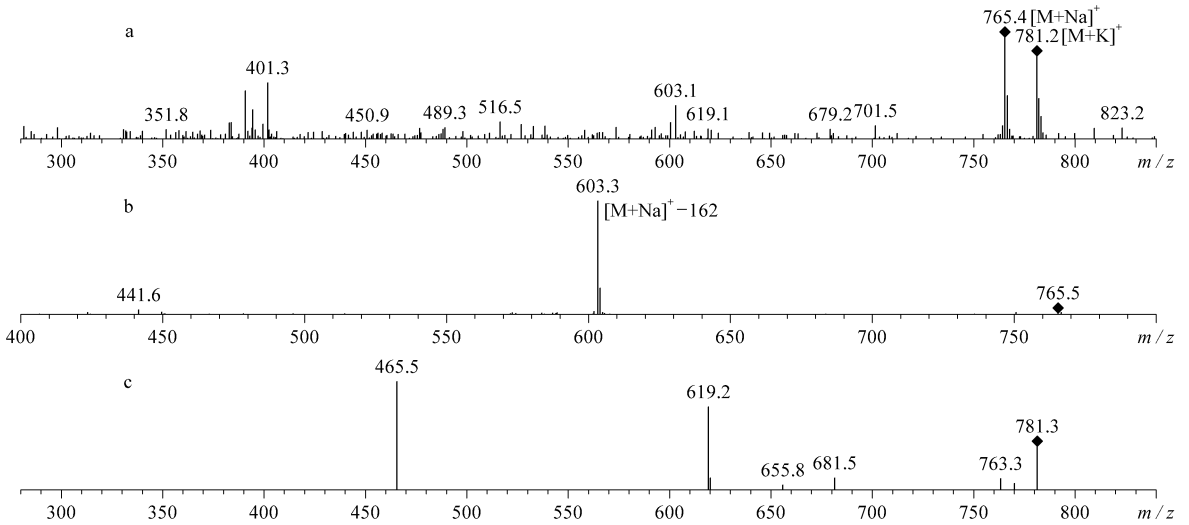


图5 紫丁香树脂苷的一级(a)和二级(b,c)质谱图
Fig.5 ESI mass (a) and mass²(b,c) spectra of liriodendrin

6)。因此可确认图 2-b 中保留时间为 29.2 min (EIC 为 m/z 765) 的色谱峰是紫丁香树脂苷。

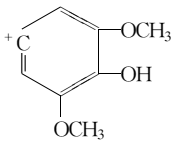


图6 $C_8H_9O_3^+$ 碎片结构式

Fig.6 The structure of the $C_8H_9O_3^+$ fragment

2.3 讨论

提取方法的考察:本实验先后采用 0%、25%、50%、75%、100% 系列浓度的甲醇或乙醇为提取溶剂,对红毛五加茎皮进行加热回流提取。比较各提取液的色谱图发现,水提液的色谱图中色谱峰数最多,这样有利于对红毛五加进行 HPLC/MS 定性分析,所以最终选用水为提取溶剂。为了防止水提液中的多糖、蛋白质、鞣质的极性大分子杂质干扰测定并污染色谱柱,采用了水提醇沉法将这些杂质除去。

2.4 结论

用 HPLC/ESI/MS² 法鉴定了红毛五加中鸟苷、腺苷和紫丁香树脂苷成分。以乙腈-水(冰醋酸调 pH 为 3.0)为流动相梯度洗脱, DAD 串联离子阱质谱检测。通过对 m/z 284、268、765 的提取离子色谱图及其一级和二级质谱的碎片离子进行分析,鉴别出 TIC 中保留时间分别为 9.6、10.5、29.2 min 的色谱峰依次为鸟苷、腺苷和紫丁香树脂苷,其相对应的紫外色谱图中色谱峰的保留时间分别为 9.2、10.1、28.8 min。运用 LC/MS 进行定性分析具有准确度高、灵敏度高的特点,而且能解决因缺乏对照品而无法进行定性研究的困难。所述实验工作为进一步阐明红毛五加茎皮水提液中其他化学成分及红毛五加质量控制方法的建立奠定了基础。

参考文献:

- [1] Deng Hongzhu, Sun Shiyong, Li Shuyu. China Journal of Chinese Materia Medica, 1994, 19(1): 38
邓虹珠, 孙士勇, 李淑玉. 中国中药杂志, 1994, 19(1): 38
- [2] Dang Yuelan, Luo Qin, Li Shuyu. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2000, 16(1): 14
党月兰, 骆勤, 李淑玉. 中药药理与临床, 2000, 16(1): 14
- [3] Zhang Lixia, Liu Hong, Chang Yaping, Bi Wuxie, Yang Guizhen. China Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 1999, 5(3): 25
张莅峡, 刘泓, 常雅萍, 毕无邪, 杨贵贞. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(3): 25
- [4] Dang Yuelan, Li Shuyu. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2002, 18(1): 7
党月兰, 李淑玉. 中药药理与临床, 2002, 18(1): 7
- [5] Li Xingyu. Journal of Gansu Science, 1998, 10(3): 75
李兴玉. 甘肃科学学报, 1998, 10(3): 75
- [6] Jiang Zhiquan, Zhang Chongjie, Wang Chengxiao, Yang Peiquan, Li Guangxi, Du Hong. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 1993, 8(4): 211
江之泉, 章崇杰, 汪成孝, 杨培全, 李光喜, 杜烘. 华西药科学杂志, 1993, 8(4): 211
- [7] Dang Yuelan, Feng Shilan, Tian Zhiping. Journal of Lanzhou Medical College, 2002, 28(3): 31
党月兰, 封士兰, 田志平. 兰州医学院学报, 2002, 28(3): 31
- [8] Kong Deyun, Jin Huifang, Luo Siqi. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 1992, 23(5): 215
孔德云, 金惠芳, 罗思齐. 中国医药工业杂志, 1992, 23(5): 215
- [9] Zhao Yuqing, Yuan Changlu, Li Xian, Wu Lijun. China Journal of Chinese Materia Medica, 1991, 16(7): 421
赵余庆, 袁昌鲁, 李铤, 吴立军. 中国中药杂志, 1991, 16(7): 421
- [10] Feng Shilan, Chen Liren, Zhao Fuhu, Zhao Wenjun, Li Jianzhong, Liu Duiping. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2001, 18(2): 125
封士兰, 陈立仁, 赵富虎, 赵文军, 李建忠, 柳对平. 中国现代应用药学杂志, 2001, 18(2): 125