

## 高效液相色谱/二极管阵列检测/质谱/质谱(HPLC/DAD/MS<sup>2</sup>) 联用在板蓝根注射液成分鉴定中的应用

金 郁, 肖珊珊, 孙毓庆

(沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

**摘要** 用 HPLC/DAD/MS<sup>2</sup> 联用仪, 鉴定了板蓝根注射液中含有的核苷类物质。色谱条件: Luna C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm); 甲醇-水梯度洗脱, 流量 0.8 mL/min; 柱温 25 °C。用二极管阵列检测器记录各个色谱峰的紫外吸收光谱, 色谱检测波长 254 nm。质谱条件: 电喷雾离子源(ESI); 正离子检测, 扫描范围  $m/z$  50~800。记录质量色谱图和各个色谱峰的一级、二级质谱图, 并对质谱结果进行解析, 通过与对照品比较, 确定板蓝根注射液样品中含有腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷及腺嘌呤等 5 种成分。

**关键词** 液相色谱; 质谱; 腺苷; 鸟苷; 尿苷; 胞苷; 腺嘌呤; 板蓝根注射液; 中药

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-871X(2003)06-0558-04

## High Performance Liquid Chromatography/Photodiode Array Detection /Mass Spectrometry<sup>2</sup>(HPLC/DAD/MS<sup>2</sup>) Identification of Ingredients of Banlangen Injection

JIN Yu, XIAO Shanshan, SUN Yuqing

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

**Abstract**: The determination of the ingredients of Banlangen (a Chinese traditional medicine) injection has been carried out by HPLC/DAD/MS<sup>2</sup>. The separation was performed on a Luna C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm i. d., 5 μm) with gradient elution of water-methanol as mobile phase with a flow rate of 0.8 mL/min at 25 °C. The detection wavelength was 254 nm and the UV spectra of peaks were obtained by a photodiode array detector (DAD). The electrospray ionization (ESI) source and positive scan mode were used to get mass chromatogram, MS and MS<sup>2</sup> spectra. The Banlangen injection ingredients of adenine, guanosine, uridine, cytidine and adenosine were identified.

**Key words**: liquid chromatography; mass spectrometry; adenosine; guanosine; uridine; cytidine; adenine; Banlangen injection; Chinese traditional medicine

板蓝根注射液为十字花科植物菘蓝(*Isatis indigotica Fort.*)的根以水煮醇沉法提取后制成的灭菌水溶液。临床上用于预防和治疗扁桃体炎、腮腺炎和流行性乙型肝炎, 还可用于治疗多种皮肤病及代谢性疾病。已报道的板蓝根的化学成分有生物碱类化合物<sup>[1,2]</sup>、甾醇类化合物<sup>[2]</sup>、芥子苷类化合物<sup>[3]</sup>、含硫类化合物<sup>[4]</sup>、多种氨基酸<sup>[2]</sup>、核苷<sup>[4,5]</sup>和多糖<sup>[6]</sup>等; 近期, 又在板蓝根中发现了一些新的生物碱, 如依靛蓝双酮<sup>[7]</sup>、依靛蓝酮<sup>[8]</sup>。目前, 对于板蓝根注射液中的化学成分尚无文献报道。本实验采用 HPLC/DAD/MS/MS 联用法, 对板蓝根注射液的化学成分进行鉴定, 根据其分子离子峰的质荷比

( $m/z$ )及特征碎片进行质谱解析, 用对照品进行验证和确认。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 series LC-MSD 液-质联用仪。包括: Agilent SL 型多级离子阱质谱仪、低压四元梯度泵、二极管阵列检测器(DAD)、自动进样器、柱温箱、Chemstation 化学工作站等。

甲醇为色谱纯, 水为娃哈哈纯净水。

胞苷(Fluka, 批号 266008), 尿苷(从 Sigma 进口, 上海化学试剂站分装, 批号 950906), 鸟苷(中国

收稿日期: 2003-07-22

作者简介: 金郁, 女, 1976年生, 硕士研究生。

通讯联系人: 孙毓庆, 男, 教授, 博士生导师, Tel/Fax: (024) 23842602, E-mail: sunyq@21cn.com.

基金项目: 国家药典委员会指定课题(板蓝根注射液指纹图谱研究)。

科学院生物化学研究所,批号 8601022),腺嘌呤(上海丽珠东风生物技术有限公司,编号 2001),腺苷(Sigma,批号 022k1270)。

板蓝根注射液由山西晋新双鹤药业有限责任公司提供。

### 1.2 色谱条件

色谱柱:Luna C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm);流动相:水(A)-甲醇(B),线性梯度洗脱,5%B~60%B(0~40 min),流量 0.8 mL/min;检测波长 254 nm;柱温 25 ℃。

### 1.3 质谱条件

电离源:电喷雾离子源(ESI);检测方式:正离子检测;扫描范围: $m/z$  50~800;干燥气温度:350 ℃;干燥气流量:9.0 L/min;雾化气压强:0.24 MPa(35.0 psi);毛细管电压:4 kV。

### 1.4 溶液的配制

#### 1.4.1 供试品溶液

精密量取板蓝根注射液 2.5 mL 置于 10 mL

容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,作为板蓝根注射液的供试品溶液。

#### 1.4.2 对照品溶液

分别称取尿苷、鸟苷、腺苷、胞苷和腺嘌呤对照品适量置于 25 mL 容量瓶中,用 50%(体积分数)甲醇溶解、定容。该溶液中各对照品的质量浓度均约为 40 mg/L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 成分的确认

取供试品溶液 3 μL,按上述条件进行检测,所得的液相色谱图和总离子流色谱图(TIC)见图 1。将二者进行比较可以看出很多没有紫外吸收的成分在总离子流色谱图上有响应,说明通过这两种检测方式的互补可得到更多的信息。在总离子流色谱图上出现了一组比较密集的色谱峰,其  $m/z$  相差 44。因供试品溶液中含有吐温 80,故推测  $m/z$  减少 44 为其结构中丢失了一个 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O 片段。

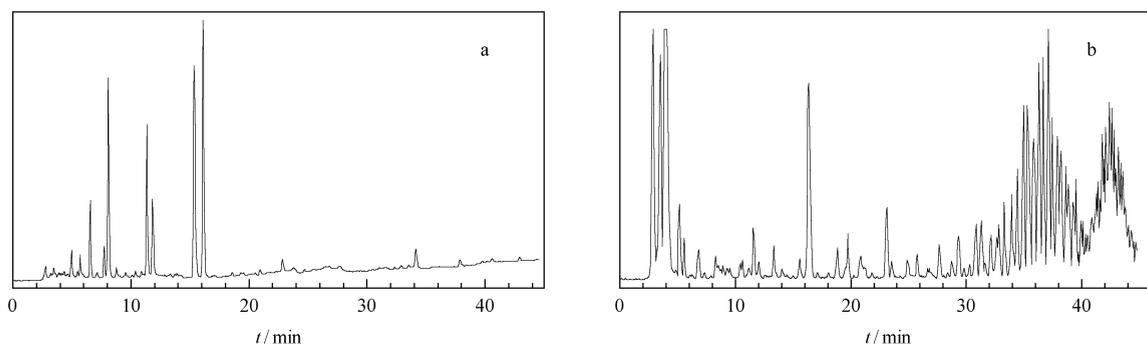


图 1 板蓝根注射液的液相色谱图(a)和总离子流色谱图(b)

Fig.1 HPLC (a) and TIC (b) chromatograms of Banlangen injection

The separation was performed on a Luna C<sub>18</sub> column(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm) with gradient elution of water-methanol as mobile phase with a flow rate of 0.8 mL/min at 25 ℃. The detection wavelength was 254 nm. MS conditions: electrospray ionization; positive detection mode; nebulizer gas pressure, 0.24 MPa(35.0 psi); drying gas flow rate, 9.0 L/min; drying temperature, 350 ℃; capillary voltage, 4 kV.

取供试品溶液和各对照品溶液,按上述条件进行 HPLC/DAD/MS<sup>2</sup> 检测,供试品及对照品的液相色谱图见图 2,各色谱峰的质谱归属结果见表 1,各色谱峰的一级质谱图和二级质谱图见图 3。由质谱解析结果及与对照品的色谱保留时间、紫外光谱的对比,可确认板蓝根注射液中含有腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷和腺嘌呤等 5 种成分。

### 2.2 讨论

(1)本实验所采用的流动相兼顾了液相色谱和液-质联用两者的分离要求。由于中药化学成分复杂,所以液-质联用采用的溶剂系统不可能对每个峰都是最优的。本实验所采用的液-质联用条件主要是针对要定性的几个峰。

(2)采用 HPLC/DAD/MS<sup>2</sup> 联用方式可得到

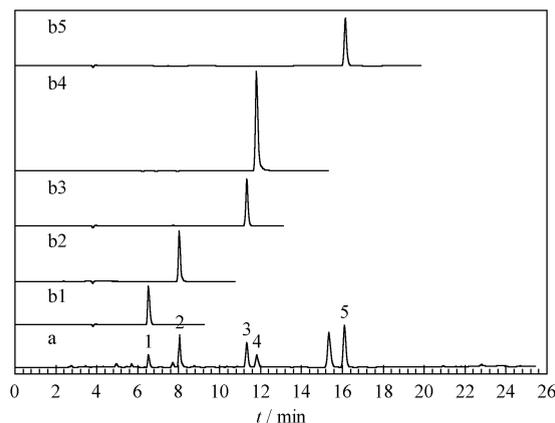


图 2 供试品(a)和对照品(b)的液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of sample (a) and reference (b)

HPLC conditions are the same as in Fig. 1.

1. cytidine; 2. uridine; 3. guanosine; 4. adenine; 5. adenosine.

表 1 图 2-a 中各色谱峰的质谱归属  
Table 1 The MS and MS<sup>2</sup> attribution corresponding to peaks in the Fig. 2-a

Peak No.	Compound	M <sub>r</sub>	MS (m/z)	Attribution	MS <sup>2</sup> (m/z)	Attribution
1	cytidine	243	244	[M + H] <sup>+</sup>		
			266	[M + Na] <sup>+</sup>	134	[M + Na - rib] <sup>+</sup>
			487	[2M + H] <sup>+</sup>		
			509	[2M + Na] <sup>+</sup>	266	[2M + Na - 243] <sup>+</sup>
2	uridine	244	267	[M + Na] <sup>+</sup>	135	[M + Na - rib] <sup>+</sup>
3	guanosine	283	284	[M + H] <sup>+</sup>		
			306	[M + Na] <sup>+</sup>	174	[M + Na - rib] <sup>+</sup>
			322	[M + K] <sup>+</sup>		
4	adenine	135	136	[M + H] <sup>+</sup>		
5	adenosine	267	268	[M + H] <sup>+</sup>	136	[M + H - rib] <sup>+</sup>
			290	[M + Na] <sup>+</sup>		

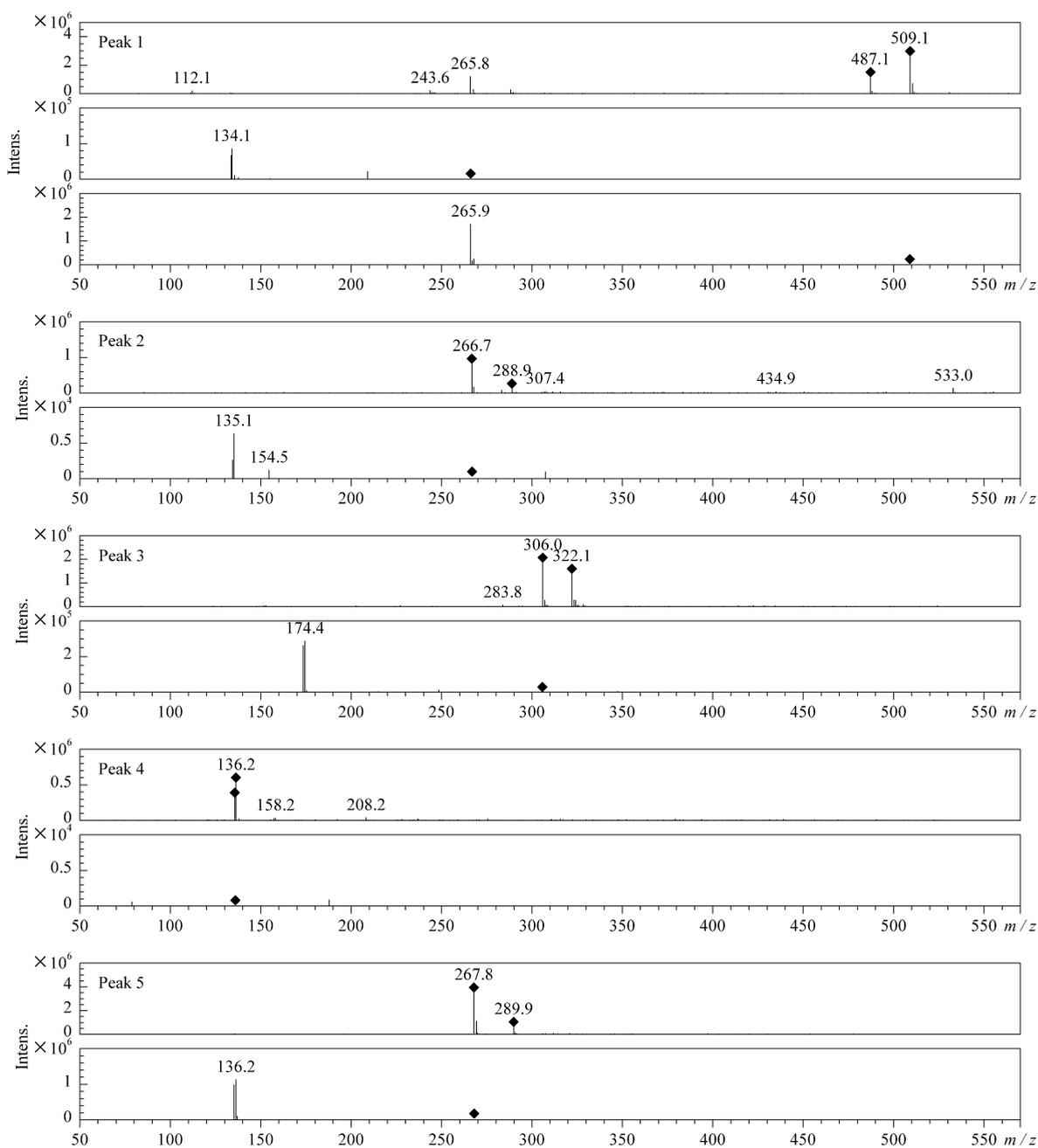


图 3 图 2-a 中各色谱峰的一级质谱图和二级质谱图

Fig. 3 MS spectra and MS<sup>2</sup> spectra corresponding to peaks in the Fig. 2-a

每个色谱峰的保留时间、紫外光谱图、相对分子质量和特征碎片四方面的信息。除了手性化合物以外,从概率上来说,要找到四方面的信息完全相同的两个化合物的可能性是微乎其微的。本实验就是以此为依据,对板蓝根注射液所含的化学成分进行定性鉴别。同时也可利用其他未知成分的这种多维化学特征的相对惟一性(可视为“准标准品”),判断该成分是某一化学成分。待确定了该成分的药效后,即可制备这些“准标准品”,进行结构确定。该法是中药成分研究的一种有效手段。

### 参考文献:

[1] Li Ling, Liang Huaqing, Liao Shixuan, Qiao Chuazhuo, Yang Genjin, Dong Tongyi, Li Xiulu. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 1993, 28(3):238  
李玲,梁华清,廖时萱,乔传卓,杨根金,董同义,李修祿.

药学学报,1993,28(3):238

- [2] Zhang Shixing. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1983, 14(6):7  
张时行. *中草药*, 1983, 14(6):7
- [3] Elliott M C. *Phytochemistry*, 1970, 9:1629
- [4] Huang Qiaoshu, Yoshihira K, Natori S. *Planta Med*, 1981, 42(3):308
- [5] You Song, Yao Xinsheng, Chen Yingjie. *Bulletin of Chinese Materia Medica*, 1988, 13(2):31  
游松,姚新生,陈英杰. *中药通报*, 1988, 13(2):31
- [6] Xu Yimin, Lu Chengping, Wang Yongzhen. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 1991, 11(6):357  
许益民,陆成平,王永珍. *中西医结合杂志*, 1991, 11(6):357
- [7] Liu Yunhai, Qin Guowei, Ding Shuiping. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2001, 33(12):1057  
刘云海,秦国伟,丁水平. *中草药*, 2001, 33(12):1057
- [8] Liu Yunhai, Qin Guowei, Ding Shuiping. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2002, 33(2):97  
刘云海,秦国伟,丁水平. *中草药*, 2002, 33(2):97

### ·机构介绍·

## 中国科学院大连化学物理研究所现代分析中心

中国科学院大连化学物理研究所现代分析中心集科研、开发、分析测试于一体,专门从事分析化学研究与应用,已有50余年学科与技术积累。我中心在开展学科研究的同时,面向社会开展各类分析服务,并已通过中国实验室国家认可委员会(CNAL)组织的实验室认可和计量认证。中心有一批具有较高学术水平、经验丰富的研究人员和掌握先进分析测试手段的技术人员,有包括二噁英和多氯联苯分析及无机、色谱、质谱、红外分析等在内的现代分析研究与检测实验室,配有高分辨率质谱仪(HRGC/HRMS)、GC、HPLC、GC/MS、LC/MS、GC/AED、GC/FTIR、GC/TOFMS、Finnigan Trace MS、显微傅里叶变换红外光谱系统、火焰/石墨炉原子吸收光谱仪(GFAA)等先进的仪器设备。我中心严格遵循质量第一、客户至上的质量方针,以雄厚的实力,全面面向社会服务。现主要从事分析方法发展、专用设备开发、委托检测等工作。检测对象涉及化学化工、环境科学、天然物质、化肥与农药、药物、食品与添加剂、矿产品、水质和气体分析、物证科学等领域。主要分析测试项目有:二噁英(PCDD、PCDF)、多氯联苯(PCB)、多环芳烃(PAH)、石化、农残、手性、元素分析等。同时可提供各种质优价廉的气相色谱毛细管柱、气相色谱填充柱、液相色谱柱、固相萃取柱及各种色谱配件,并开展企业合作、技术交流、合作项目申请及包括二噁英分析在内的技术人员培训等。

### 我们期望与各界朋友真诚合作,共创辉煌!

详细内容请见我中心的专业网站:<http://www.anacn.dicp.ac.cn>

联系人:陈吉平, Tel/Fax:(0411)3606605

地址:大连市中山路161号 邮编:116011

中国科学院大连化学物理研究所  
现代分析中心  
2003年11月