

HPLC-UV-ESI-MSⁿ 法分离鉴定葛根素原料药中 4 种有关物质

王鹏远, 吴彩胜, 吴松, 张金兰

(中国医学科学院&北京协和医学院, 药物研究所, 北京 100050)

Separation and Characterization of 4 Related Impurities in Puerarin Bulk Drug by HPLC-UV-ESI-MSⁿ

WANG Peng-yuan, WU Cai-sheng, WU Song, ZHANG Jin-lan

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: A rapid, accurate and simple HPLC-UV-ESI-MSⁿ method was developed for the separation and characterization of related impurities in puerarin bulk drug. The molecular structures and mechanism for the fragmentations of the related impurities were proposed by the MSⁿ results obtained, and confirmed by ESI-FTICR-MS which provided accurate molecular formulations at high mass resolution. The molecular structures of the four related impurities are identified as 3'-hydroxy-puerarin, genistin-8-C-glucoside, neopuerarin B and neopuerarin A on the basis of fragmentation mechanism and reference data.

Key words: puerarin; related impurity; HPLC-UV-ESI-MSⁿ; FTICR-MS; 3'-hydroxy-puerarin; genistin-8-C-glucoside; neopuerarin B; neopuerarin A

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0071-02

葛根素 (Puerarin) 是由豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根中提取分离得到的 8-β-D-葡萄糖吡喃糖-4',7-二羟基异黄酮。当前, 有关葛根素及其制剂引发药物不良反应病例屡有报道, 原因可能与其中的不明杂质有关。LTQ-FTICR-MS 这种新的混合型质谱综合 LTQ 的稳定性、多样性、MSⁿ 能力和 FT 的高分辨、精确质量测定能力, 可以在获得微量组分多级质谱碎片的同时对其进行分子组成的测定。本工作采用 HPLC-UV-ESI-MSⁿ 法快速分离鉴定葛根素原料药中有关物质, 通过 MSⁿ 数据推断其结构, 并使用高分辨质谱数据确证。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Surveyor LC Plus 高效液相系统, 线性离子阱-傅里叶变换离子回旋共振质谱仪 (LTQ FTICR-MS): 美国 Finnigan 公司产品, 配有电喷雾离子源 (ESI) 及 Tune Plus 工作软件和 Xcalibur 2.0.7 数据处理系统。甲醇、乙腈和乙酸均为色谱纯; 水为纯净水; 葛根素对照品购于中检所; 葛根素原料药两批, 由中国医学科学院药物研究所吴松研究员提供。

1.2 分析条件与方法

Agilent ZORBAX Eclipse[®] XDB C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm×5 μm); 流动相: 水 (用乙酸调 pH 为 3.0) 和乙腈, 梯度洗脱; 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL 或 20 μL; 检测波长: 250 nm; 分流比: 7:3。ESI 离子源, 正离子检测模式; 喷雾电压: 3.5 kV; 毛细管温度: 275 °C;

基金项目: 卫生行业科研专项项目 (200802038)

作者简介: 王鹏远 (1985~), 男, 山西芮城人, 硕士研究生, 从事药物分析工作。E-mail: wpy@imm.ac.cn

通信作者: 张金兰 (1969~), 女, 内蒙古呼和浩特人, 研究员, 从事药物分析工作。E-mail: zhjl@imm.ac.cn

鞘气 (N₂) 流速: 35 arb; 辅助气 (N₂) 流速: 10 arb; 扫尾气 (N₂) 流速: 3 arb; Tube Lens: 110 V; 碰撞能量: 35 V; 扫描范围: 100 ~ 800 u.

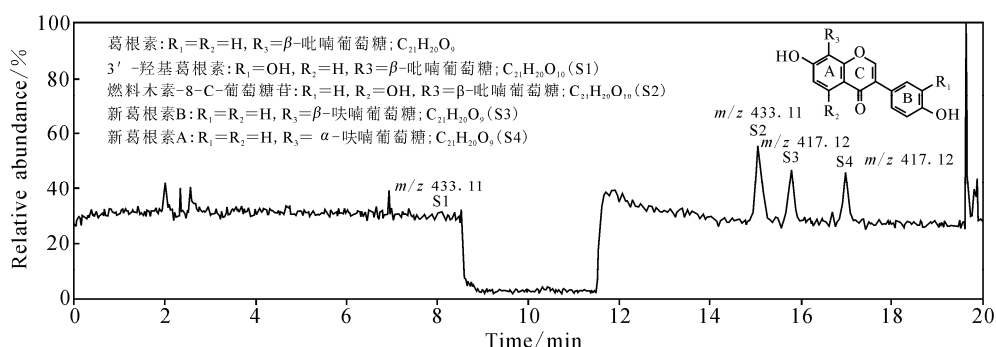
将葛根素对照品和葛根素原料药的甲醇溶液分别以浓度为 0.1 g·L⁻¹ 和 2.0 g·L⁻¹ 注入 HPLC-ESI-LTQ-FTICR MS 液质联用仪, 采集并记录 UV 图和质谱图。

2 结果与讨论

2.1 HPLC-ESI-MSⁿ 分析

从葛根素原料药 (第 I 批) 的总离子流图 (图 1) 中可以明显观察到有关物质 S1、S2、S3 和 S4 的 [M+H]⁺ 峰, 为两对同分异构体, 葛根素的 [M+H]⁺ 峰也是 *m/z* 417, S1、S2 的 [M+H]⁺ 峰比其多 16 u, 可能为葛根素的羟基化产物。通过分别对 *m/z* 433 和 *m/z* 417 的 MS² 图谱进行中性丢失碎片为 120 u 的提取, 可以观察到 4 种有关物质都有显著的 [M+H-120]⁺ 峰, 提示它们都为碳苷类化合物^[1-2]。

S1 和 S2 的 MS²、MS³ 和 MS⁴ 谱图基本相同, 主要都是在糖环上发生脱 H₂O 和脱 CH₂O 反应, 形成特征碎片离子 *m/z* 415、397、379、367、351、337、319、313、309、295、291、281、269、263 和 253; 但是, 在 MS⁵ 图谱中, S2 的碎片离子 *m/z* 191 比 S1 的 *m/z* 175 刚好多出 16 u, 提示 S2 的羟基化位置在 A 环, 而 S1 在 B 环, 且 S1 中 *m/z* 337 离子裂解产生了碎片离子 *m/z* 203 和 161, 进一步证明了 S1 的羟基化位置在 B 环, 再根据二者的 UV 图特征和在反相色谱中的保留行为特征, 即可确定 S1 为 3'-羟基葛根素, S2 为染料木素-8-C-葡萄糖苷^[1-2]。S3、S4 与葛根素是同分异构体, 它们的 MSⁿ 数据及 UV 图谱基本相同, 说明三者可能是相同母核, 通过与文献数据比对^[2], 并结合其 UV 特征吸收峰以及在反相色谱中保留行为特征, 确定 S3 为新葛根素 B, S4 为新葛根素 A。



2.2 ESI-FTICR-MS² 分析

由葛根素对照品和原料药的高分辨质谱数据可知, 葛根素、S1、S2、S3 和 S4 的 [M+H]⁺ 峰分别为 *m/z* 417.117 95、433.112 95、433.112 92、417.118 01 和 417.118 01, 经软件精确质量检索得其元素组成分别为 C₂₁H₂₁O₉ (计算值为 417.118 01, 误差为 -0.14 × 10⁻⁶)、C₂₁H₂₁O₁₀ (计算值为 433.112 92, 误差为 0.06 × 10⁻⁶)、C₂₁H₂₁O₁₀ (计算值为 433.112 92, 误差为 0)、C₂₁H₂₁O₉ (计算值为 417.118 01, 误差为 0) 和 C₂₁H₂₁O₉ (计算值为 417.118 01, 误差为 0), 非常准确的得出葛根素及其有关物质的分子组成, 再根据高分辨二级质谱数据可以确定各主要碎片的分子组成, 进而得出丢失碎片的分子组成, 为根据 LTQ-MSⁿ 数据推断化合物物质谱裂解机制提供了准确可靠的信息。

参考文献:

- [1] 张璐, 陈民辉, 蔡美明, 等. HPLC 和 LC-MSⁿ 分析葛根素及其注射剂中的有关物质[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(6): 361-365.
- [2] ZHANG H J, YANG X P. Profiling and quantification of isoflavone-C-glycosides impurities in puerarin injection by liquid chromatography coupled to ESI-Ion trap mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2009, (49): 843-847.