

## 采用 HPLC-MS/MS 技术确定当归芍药散中 2 个新化合物来源

杨楠<sup>1</sup>, 乔善义<sup>2</sup>, 孟繁华<sup>2</sup>

(1. 沈阳药科大学中药学院, 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室, 辽宁 沈阳 110016;

2. 军事医学科学院, 毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:** 中医经典名方当归芍药散(DSS)在古代用于治疗痛经等妇科疾病, 现代广泛用于痛经、老年痴呆、更年期综合征和黄褐斑等 40 多种疾病的治疗。在筛选该方镇痛活性部位的研究中, 发现 DSS 中的 A-N-30 部位具有镇痛活性, 从中分离得到 2 个新化合物(1)和(2), 并鉴定了它们的化学结构。为进一步对 2 个新化合物进行活性和结构修饰等研究, 需确定 2 个新化合物的来源, 然后大量制备。采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)技术, 在电喷雾正离子检测模式下, 以一级质谱扫描、子离子扫描和多反应离子监测(MRM)方式, 同时检测该方剂的 6 个组成药材, 以 2 个新化合物为对照品, 确定它们均来源于白术。

**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS); 来源; 当归芍药散; 白术

中图分类号: O 657. 63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997(2010)03-0152-04

## Attribution of Danggui Shaoyao San's New Compounds by HPLC-MS/MS

YANG Nan<sup>1</sup>, QIAO Shan-yi<sup>2</sup>, MENG Fan-hua<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Structure-Based Drug Design & Discovery of Ministry of Education, School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China;  
2. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medicine, Beijing 100850, China)

**Abstract:** As a traditional Chinese medicine, Danggui Shaoyao San(DSS) was mainly used for gynecological disease in ancient times, and nowadays used for senile dementia, gynecological disease, hypoimmunity and so on. In our research for the active fraction of DSS, DSS-A-N-30 was found to have an analgesic activity. Two new compounds were isolated from DSS-A-N-30 and identified their chemical structures. To further study the activity and structural modification of the two new compounds, a sensitive and specific method was developed for the attribution of them in DSS-A-N-30 by using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS). Experiments were performed on a triple-quadrupole tandem mass spectrometer using positive electrospray ionization(ESI), and multiple reaction monitoring(MRM) was applied. The results show that the two new compounds are attributed to *Atractylodes macrocephala* Koidz. .

**Key words:** high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS); attribution; Danggui Shaoyao San; *Atractylodes macrocephala* Koidz.

收稿日期: 2009-11-23; 修回日期: 2010-01-29

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2006BAI08B03-08), 国家十一五重大专项“重大新药创制”课题(2009ZX09301-002)资助

作者简介: 杨楠(1984~), 女(汉族), 山东人, 硕士研究生, 天然药物化学专业。E-mail: yangnan616@yahoo. cn

通信作者: 乔善义(1961~), 男(汉族), 山东人, 博士, 研究员, 从事中药及天然药物化学研究。E-mail: crbj611202@sina. com

当归芍药散(Danggui Shaoyao San, DSS) 出自《金匱要略》, 全方由当归、白术、白芍、茯苓、泽泻、川芎六味药组成, 是治疗妇科诸症的经典名方<sup>[1]</sup>。近代药理学研究表明, 该方对下丘脑-垂体-生殖腺(卵巢)轴、中枢神经系统、凝血系统、孕育等均有影响, 临床用于痛经、老年性痴呆、更年期综合征和黄褐斑等 40 多种疾病的治疗<sup>[2]</sup>。在对 DSS 进行镇痛活性部位追踪时, 发现并确定其 A-N-30 部位具有较好的镇痛活性<sup>[3]</sup>, 从中分离得到 2 个新化合物(1)和(2), 并鉴定了它们的化学结构<sup>[4]</sup>。

由于 2 个新化合物在 DSS-A-N-30 中的含量很少, 所以确定新化合物的来源是下一步对其进行化学研究和药理研究的关键。随着高效液相色谱-串联质谱(HPLC/MS-MS)联用技术的广泛应用, 尤其是电喷雾(ESI)等软电离技术的快速发展, 高效液相色谱-串联质谱直接用于中药复杂体系中微量化合物的定性分析已逐渐成为中药研究的热点<sup>[5-6]</sup>。本工作采用 ESI 源, 在正离子检测模式下, 以一级质谱扫描、子离子扫描和多反应离子监测(MRM)方式, 对 2 个新化合物对照品和当归芍药散各单味药材 A-N-30 部位进行分析, 快速确认 2 个新化合物的来源。

## 1 试验部分

### 1.1 样品与试剂

当归、芍药、川芎、白术、泽泻、茯苓: 均购自北京普生霖药业有限公司, 并经生药学鉴定; 对照品化合物(1)和(2): 由军事医学科学院毒物药物研究所植物化学室制备, 纯度达 95% 以上。

除液相色谱所用试剂为色谱纯外, 其他试剂均为化学纯或分析纯。

### 1.2 主要仪器与试验条件

**1.2.1 主要仪器** API 3000 液相色谱-串联质谱联用仪; 美国 ABI 公司产品, 配有 Turbo Ion-spray 离子源及 Analyst 1.4 数据处理系统; Agilent 1100 高效液相色谱仪; 美国 Agilent 公司产品, 配有四元梯度泵和自动进样器。

**1.2.2 色谱条件** Hypersil ODS C<sub>18</sub> 色谱柱(150 × 4.6 mm × 5 μm); 流动相为 A: (10 mmol · L<sup>-1</sup>) CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, B: CH<sub>3</sub>OH; A : B 为 100 : 0 (0 min) ~ 70 : 30 (50 min) ~ 10 : 90 (10 min) ~ 0 : 100 (15 min); 流速 0.5 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量 20 μL。

**1.2.3 质谱条件** 电喷雾离子源(Turbo Ions-

pray), 正离子扫描, 检测方式为一级质谱扫描、子离子扫描和 MRM, 喷雾电压 4 500 V, 离子源温度 400 °C, 雾化气 8 unit, 卷帘气 11 unit, 碰撞气 4 unit。

### 1.3 样品制备

分别取 50 g DSS 各单味药材, 8 倍量沸水煎煮 3 次, 每次 2 h, 离心煎煮液, 上清液减压浓缩至浸膏。浸膏进行 HP-20 大孔吸附树脂柱层析, 上样流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 洗脱流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 用水、5% 乙醇和 30% 乙醇依次洗脱(水: 10 个柱床体积; 5% 乙醇: 7 个柱床体积; 30% 乙醇: 6 个柱床体积)。30% 乙醇洗脱部位浓缩除醇后, 冷冻干燥, 得各单味药 A-N-30 部位<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱分析

对照品化合物(1)和(2)在电喷雾离子化正离子检测模式下的一级和二级全扫描质谱图示于图 1 和图 2。由图中可见, 在一级质谱中化合物(1)和(2)的基峰为其准分子离子  $m/z$  254, 分别对化合物(1)和(2)的准分子离子  $m/z$  254 进行二级质谱分析, 主要产生  $m/z$  236、218、206 和 188 等系列碎片离子。分别对 DSS 中 6 个单味药 A-N-30 部位做一级和二级质谱分析, 在白术 A-N-30 部位的一级质谱中有准分子离子  $m/z$  254 的基峰, 对白术 A-N-30 部位中准分子离子  $m/z$  254 进行二级质谱分析, 主要产生  $m/z$  236、218、206 和 188 等系列碎片离子。因此, 基本判断白术 A-N-30 部位中含有化合物(1)和(2), 白术的一级和二级全扫描质谱图示于图 3。

### 2.2 液相色谱-质谱联用分析

鉴于以上谱图分析, 为进一步确定化合物(1)和(2)是否来源于白术 A-N-30 部位, 对化合物(1)、(2)和白术 A-N-30 部位进行液相色谱-质谱联用分析。由于对准分子离子峰  $m/z$  254 进行二级质谱分析时, 化合物(1)、(2)和白术 A-N-30 部位同时产生  $m/z$  206 和  $m/z$  188 的碎片离子, 所以在 MRM 扫描方式下, 分别对对照品化合物(1)、(2)和白术 A-N-30 部位同时选择多反应离子监测对  $m/z$  254 → 206 和  $m/z$  254 → 188, 结果示于图 4。结果显示, 化合物(1)的保留时间为 44 min; 化合物(2)的保留时间为 36 min; 白术 A-N-30 部位色谱图中 2 个化合物的保留时间分别为 36 min 和 44 min。白术中所含 2 个

化合物的保留时间分别与对照品化合物(2)和(1)的保留时间一致,并且质谱行为一致,因此判断白术 A-N-30 部位中含有化合物(1)和(2)。由于化合物(1)和(2)是同分异构体,尽管分离得到的对照品化合物(1)和(2)纯度很高,但在各自

化合物中仍然有微量另一同分异构体存在,所以在对照品化合物(1)的色谱图中检测到保留时间为 36 min 的化合物(2),在对照品化合物(2)色谱图中检测到保留时间为 44 min 的化合物(1)。

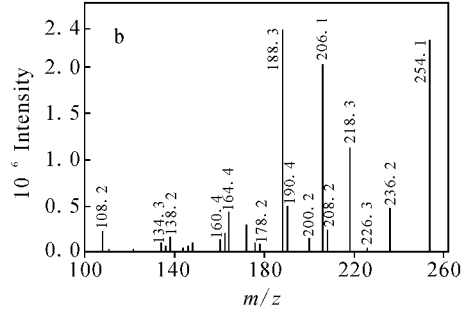
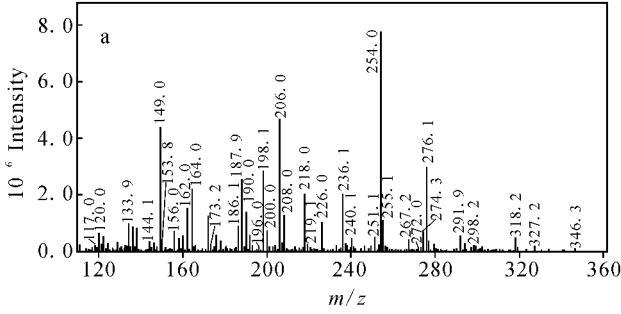


图 1 化合物(1)的一级(a)和二级(b)全扫描质谱图

Fig. 1 The ESI-MS spectra(a) and MS-MS spectra(b) of compound(1)

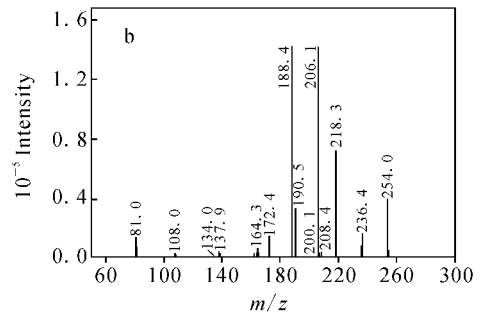
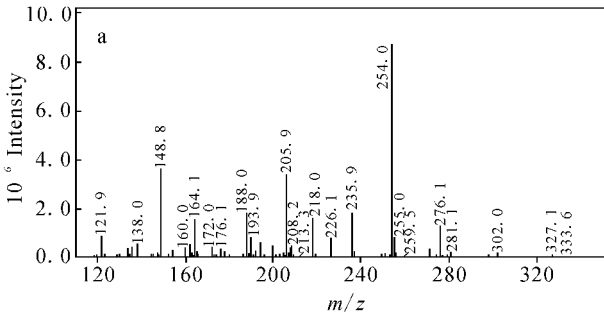


图 2 化合物(2)的一级(a)和二级(b)全扫描质谱图

Fig. 2 The ESI-MS spectra(a) and MS-MS spectra(b) of compound(2)

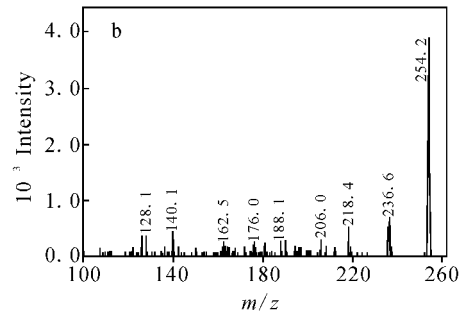
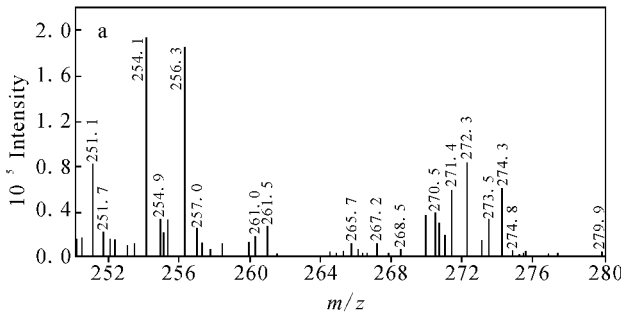


图 3 白术 A-N-30 部位的一级(a)和二级(b)全扫描质谱图

Fig. 3 The ESI-MS spectra(a) and MS-MS spectra(b) of the fraction A-N-30 from *Atractylodes macrocephala* Koidz.

### 3 结论

本工作采用 HPLC-MS/MS 技术确认了 DSS 中 2 个新化合物(1)和(2)来源于白术,为进一步对 2 个新化合物进行大量制备以及开展活性研究奠定了基础。该方法快速、简便、准确,

可应用于中药及复方制剂中各成分来源的分析及相关研究。采用 HPLC-MS/MS 方法定性分析化合物来源时,最好应该有确定结构的对照品与其对照,如果没有确定结构的对照品,也许会有色谱行为、一级和二级质谱行为一致的同分异

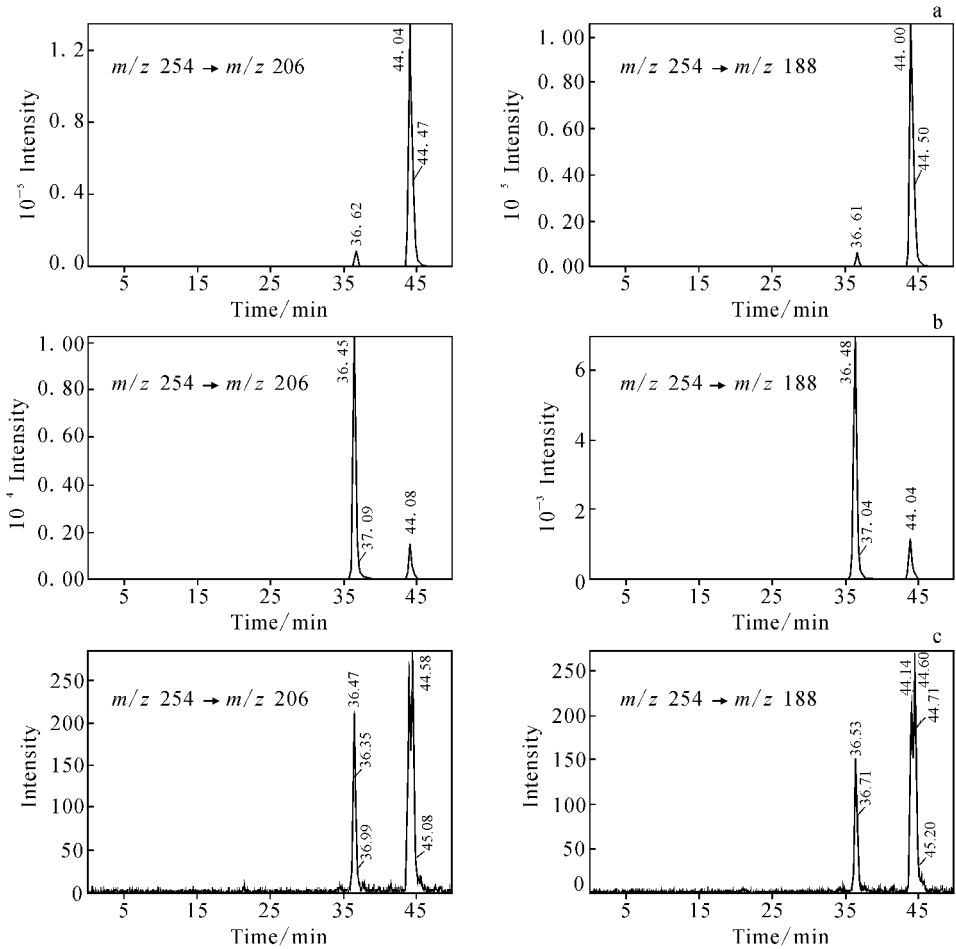


图 4 化合物(1),化合物(2)和白术 A-N-30 部位的 MRM 色谱图

a. 化合物(1); b. 化合物(2); c. 白术 A-N-30 部位

Fig. 4 MRM chromatograms of compound (1), compound (2) and the fraction A-N-30 from *Atractylodes macrocephala* Koidz.

a. compound (1); b. compound (2); c. the fraction A-N-30 from *Atractylodes macrocephala* Koidz.

构体存在的可能,而无法准确判断究竟为哪一个异构体。因此,使用 HPLC-MS/MS 技术在确定中药及复方制剂中成分来源时,有确定结构的对照品是关键一步;如果没有对照品,宜进行更多级质谱分析,观察其碎片情况,也许同分异构体的碎片会有一定的差异,据此差异作出符合实际情况的判断,结论会更可靠。

#### 参考文献:

- [1] 彭怀仁.《中医方剂大辞典》四分册[M].北京:人民卫生出版社,1995:391.
- [2] 尚玮玮,乔善义.当归芍药散研究概况[J].中国中药杂志,2006,31(8):630-633.
- [3] 刘国云.当归芍药散活性部位 DSS-A-N-30 对大鼠离体子宫平滑肌收缩的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2007,21(5):427-433.

- [4] 胡绪玮.当归芍药散活性部位的研究[D].沈阳:沈阳药科大学,2008.
- [5] ZHOU D Y, XU Q, XUE X Y, et al. Identification of O-dikgycosyl flavanones in Fructus aurantii by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006, 42(4): 441-448.
- [6] SHI P Y, HE Q, SONG Y, et al. Characterization and identification of isomeric flavonoid O-dikgycosides from genus citrus in negative electrospray ionization by ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 598(1): 110-118.
- [7] 胡绪玮,乔善义,李辰,等.当归芍药散活性部位 DSS-A-N-30 中一种新的单萜苷[J].中国中药杂志, 2008, 33(11): 78-80.