应用高效液相色谱-质谱联用技术研究通脉颗粒的指纹图谱

李蓓佳^{1,2},向 诚¹,杨秀伟¹,吴立军²,果德安¹,叶 敏 1*

(1. 北京大学药学院天然药物与仿生药物国家重点实验室, 北京 100191; 2. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:为了比较全面并且快速地阐明中药复方通脉颗粒的化学组成,本文建立了通脉颗粒的高效液相色谱 (HPLC-UV) 指纹图谱,并利用液相-二极管阵列-质谱联用 (LC-DAD-MS) 技术,从通脉颗粒中鉴定了 22 个化 合物,并归属了各化合物的单味药来源。结果显示通脉颗粒的主要成分包括染料木素 8-C-葡萄糖苷、葛根素、 大豆素 8-C-芹糖 (1,6)-O-葡萄糖苷、大豆苷以及丹酚酸 B。又对 10 批来自不同生产厂家的样品进行 HPLC 分析, 发现各样品的化学组成相似,但主要色谱峰的面积差异显著。该研究比较全面地阐明了通脉颗粒的化学组成,为 此中药复方制剂的质量控制奠定基础。

关键词:通脉颗粒;指纹图谱;HPLC-DAD-MS 中图分类号: R917 文献标识码:A 文章编号: 0513-4870 (2010) 11-1410-05

Fingerprints of Tongmai Keli by HPLC-DAD-MS

LI Bei-jia^{1,2}, XIANG Cheng¹, YANG Xiu-wei¹, WU Li-jun², GUO De-an¹, YE Min^{1*}

(1. The State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China;

2. College of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: In order to clarify the chemical composition of Tongmai Keli, a HPLC fingerprint was established, and the 22 peaks were characterized by LC-DAD-MS. The herbal sources of these peaks were assigned. The results implied that genistin 8-C-glucoside, puerarin, daidzein 8-C-apiosyl (1, 6)-O-glucoside, daidzin, and salvianolic acid B were the main constituents of in Tongmai Keli. Ten batches of Tongmai Keli produced by different pharmaceutical companies were analyzed. Although different batches contained similar compounds, the contents of major compounds were significantly different. The method established in this study could be used for the quality control of Tongmai Keli.

Key words: Tongmai Keli; fingerprint; HPLC-DAD-MS

通脉颗粒是中药保护品种, 收载于卫生部药品 标准,具有活血通脉的功效,是临床治疗动脉硬化、 脑血栓、冠心病、心绞痛等心脑血管疾病的常用方剂。 该复方由丹参、川芎、葛根三味药组成。其中丹参含 有水溶性的丹参酚酸类 (如丹酚酸 B) 和脂溶性的二

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-82802024, E-mail: yemin@bjmu.edu.cn

萜类成分 (如丹参酮 II A)^[1]; 川芎含有生物碱类 (如 川芎嗪)、酚酸类 (如阿魏酸) 和苯酞类成分 (如藁本 内酯)[2]; 葛根含有异黄酮类成分 (如葛根素和大豆 苷)^[3]。然而,通脉颗粒的化学组成目前报道甚少。此 外, 通脉颗粒在国内有 40 余家企业生产, 不同厂家 产品的质量能否保证一致性、也未见深入的报道。通 脉颗粒质量标准方面的研究,目前仅见数篇^[4-6]报道 主要集中于制剂中丹参素、葛根素、阿魏酸、原儿茶 醛、丹参酮 IIA 等少数几个指标性成分的含量测定, 难以全面反映通脉颗粒的化学组成,从而有效地控

收稿日期: 2010-03-20.

基金项目:国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目 (2009ZX09502-006); 北京大学医学部 985 项目 (985-2-119-121).

制产品质量。HPLC 指纹图谱可较全面地反映中药复 方的化学组成及其相对含量,LC-MS 技术可以进一 步鉴定化学成分的结构^[7]。综合运用 HPLC 及 LC-MS 技术,可以全面快速地阐明中药及其复方的化学物 质基础,是解决中药质量控制的有力手段。

本研究首次建立了简便快速的 LC-DAD-MS 分 析方法,鉴定了通脉颗粒的 22 个化学成分,其中 7 个成分经与对照品对照予以确认。在此基础上,比较 了 10 批来源于不同生产厂家的通脉颗粒样品的成分 差异。该研究比较全面地阐明了通脉颗粒的化学组成, 为此中药复方制剂的质量控制奠定基础。

材料与方法

仪器与试剂 Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (Agilent Technologies, Germany), 配有四元梯度泵、恒 温箱及二极管阵列检测器。该仪器通过 ESI 电离源连 接到LCQ Advantage 型离子阱质谱仪 (ThermoFisher, San Jose, CA)。色谱纯乙腈购自 Merck 公司, ACS 级 甲酸购自 J.T. Baker 公司, 超纯水为自制, 其他试剂 均为分析纯 (北京化学试剂公司)。不同厂家的通脉 颗粒 (TM01~TM09) 购于各地药店, TM10 为自制, 所用药材饮片购自北京联康大药房。对照品葛根素 (puerarin)、大豆苷 (daidzin)、藁本内酯 (ligustilide)、 盐酸川芎嗪 (ligustrazine)购自南京泽朗公司; 丹参 素 (danshensu)、染料木苷 (genistin)、迷迭香酸 (rosmarinic acid)、紫草酸 (lithospermic acid)、丹酚酸 B (salvianolic acid B)、阿魏酸 (ferulic acid)、丹参酮 IIA (tanshinone II A)、隐丹参酮 (cryptotanshinone) 及 原儿茶醛 (protocatechuic aldehyde) 为本实验室自制 并鉴定结构, 纯度均大于 95%。

色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ (美国 Agilent 公司, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm)。流动相为乙 腈 (A) - 0.1% (v/v) 甲酸水溶液 (B),梯度洗脱: 0~ 5 min, 10%~12% A; 5~13 min, 12%~15% A; 13~ 15 min, 15%~17% A; 15~20 min, 17%~23% A; 20~30 min, 23%~30% A; 30~40 min, 30%~100% A; 40~45 min, 100% A。流速为 1.0 mL·min⁻¹。柱温: 30 ℃。检测波长: 260 nm。

质谱条件 ESI 源; 鞘气与助气均为高纯氮气, 碰撞气为高纯氦气; 鞘气流速: 50个单位; 助气流速: 10个单位; 扫描范围: *m*/z 180~1 000; 源电压: 4.5 kV; 毛细管温度: 320 ℃; 负离子模式, 毛细管电压: -20 V; 管透镜补偿电压: -70 V; 正离子模式, 毛细 管电压:+20 V, 管透镜补偿电压:+70 V。柱后分流比: 5:1。

对照品溶液制备 分别精密称取各对照品 1 mg, 溶于 1 mL 甲醇中, 备用。

供试品溶液制备 通脉颗粒 TM01~TM09 每份 各称取 10g(相当于每味药材各 5g),加 80℃蒸馏水 搅拌溶解,转移至 100 mL 量瓶中,加水至刻度,摇 匀,即得。TM10 依照《中华人民共和国卫生部药品 标准中成药成方制剂》(第 4 册)自制:取葛根、丹参、 川芎药材各 5g,加水煎煮两次,第 1 次 1.5 h,第 2 次 1 h,合并煎液,趁热过滤后蒸干,以 80℃蒸馏水 100 mL 溶解,摇匀,即得。以上样品于分析前经 0.45 µm 微孔滤膜过滤,吸取续滤液 10 µL 注入高效液相 色谱仪检测。

结果

1 方法学考察

采用优化的实验方法,10 批样品的 HPLC-UV 指纹图谱有17个共有峰,分别以这些共有峰的保留 时间和峰面积的 RSD 值为指标进行方法学考察。取 TM10样品供试液,在上述 HPLC 条件下,连续进样 5次,考察仪器精密度;另取同批样品5份,分别制 备供试品溶液并进样分析,考察实验重现性;再将同 一份供试品溶液分别于样品制备后0、4、8、24 和 48 h 进样分析,考察供试品溶液的稳定性。结果显示, 各峰保留时间与峰面积的 RSD 值均小于5%,表明实 验方法稳定可靠。

2 通脉颗粒指纹图谱的建立

对来自 9 个不同厂家的产品以及自制样品分别 作 HPLC 测定, 以通脉颗粒中含量较丰富且稳定存在 的特征性成分葛根素 (峰6) 为参照峰, 采用 "中药 色谱指纹图谱相似度评价系统 (2004A)"软件生成 模式指纹图谱,自动标定的共有峰为峰 2~13 和峰 18~21 (图 1),并进行相似度分析。10 个样品与模式 指纹图谱比较的相似度均大于 0.95,各峰的相对峰 面积 RSD 值均小于 6%。

3 指纹峰的 LC-MS 结构鉴定

为了全面阐明通脉颗粒的化学组成,采用 LC-MS/MS 技术对 HPLC 指纹图谱的 22 个主要色谱峰的 结构进行指认与鉴定,选用 TM01 (购于同仁堂) 和 TM10 (自制样品)进行 LC-MS 检测,以 TM10 的质谱 数据进行分析,结果见表 1。其中 7 个色谱峰经与对 照品比对,保留时间、紫外光谱、质谱均一致,分别



Figure 1 HPLC-UV chromatograms of different Tongmai Keli and their HPLC-UV fingerprints. Peaks 1: Danshensu; 2: Daidzein 7-*O*-glucoside-8-*C*-glucoside; 3: Daidzein 7, 4'-di-*O*-glucoside; 4: Genistein 8-*C*-glucoside; 5: Genistein 8-*C*-apiosyl-*O*-glucoside; 6: Puerarin; 7: Daidzein 8-*C*-apiosyl (1, 6)-*O*-glucoside; 8: Daidzin; 9: 3'-Methoxydaidzin; 10: Genistein 8-*C*-apiosyl-*O*-glucoside; 11: Daidzein *C*-glucoside; 12: Genistin; 13: Formononetin 8-*C*-apiosyl (1–6)-*O*-glucoside; 14: 4'-Methoxypuerarin; 15: Salvianolic acid D; 16: Salvianolic acid E; 17: Rosmarinic acid; 18: Lithospermic acid; 19: 3'-Methoxypuerarin 8-*C*-apiosyl (1–6)-*O*-glucoside; 20: Formononetin; 21: Salvianolic acid B; 22: Coniferyl ferulate. *Common peak

 Table 1
 Identification of chemical compounds in Tongmai Keli by LC-DAD-ESI/MS.
 *Confirmed by comparing with pure standards;

 n/a: Not available; P: From Puerariae Lobatae; S: From Salviae Miltiorrhizae; L: From Ligusticum chuanxiong

No.	<i>Rt</i> /min	λ_{max}/nm	m/z				Name	Source
			$[M-H]^-$	(-)-MS/MS	$[M+H]^+$	(+)-MS/MS	- Nume	Source
1*	5.02	n/a	197	n/a	n/a	n/a	Danshensu	S
2	5.31	252, 306 (h)	577	487, 457, 295	579	489, 459, 297	Daidzein 7-O-glucoside-8-C-glucoside	Р
3	7.00	252, 298 (h)	577	415	579	417, 255	Daidzein 7, 4'-di-O-glucoside ^[3]	Р
4	8.33	n/a	431	341, 311, 283	433	415, 397, 313	Genistein 8-C-glucoside ^[3]	Р
5	9.57	n/a	563	431, 341, 311,	565	433, 415, 313	Genistein 8-C-apiosyl-O-glucoside ^[8]	Р
6^*	12.11	262, 308 (h)	415	325, 295, 267	417	297	Puerarin	Р
7	13.36	252, 284 (h)	547	325,295, 267,	549	417, 399, 29	Daidzein 8-C-apiosyl (1, 6)-O-glucoside ^[3]	Р
8^*	17.03	254, 296 (h)	415	253	417	255	Daidzin	Р
9	18.68	250, 280 (h)	445	430, 283	447	285	3'-Methoxydaidzin	Р
10	19.27	262, 302 (h)	563	431, 341, 311,	565	433	Genistein 8-C-apiosyl-O-glucoside	Р
11	20.54	252, 304 (h)	415	325, 295	417	327, 297	Daidzein C-glucoside	Р
12*	22.69	262, 326 (h)	431	269	433	271	Genistin	Р
13	23.12	244, 295 (h)	561	339, 309, 281	563	431,413, 311	Formononetin 8-C-apiosyl (1-6)-O-glucoside	Р
14	23.51	244, 295 (h)	429	30981	431	413, 395, 311	4'-Methoxypurarin	Р
15	24.12	244, 316	417	373, 197, 175,	n/a	n/a	Salvianolic acid D ^[9]	S
16	25.83	244, 330	717	519, 339, 321	n/a	n/a	Salvianolic acid E ^[9]	S
17^{*}	26.40	238, 330	359	197, 179, 161	n/a	n/a	Rosmarinic acid	S
18^{*}	26.98	242, 312	537	n/a	n/a	n/a	Lithospermic acid	S
19	27.37	238, 324	577	445, 355, 325,	579	447, 429, 327	3'-Methoxypuerarin 8-C-apiosyl (1-6)-O-glucoside	Р
20	28.15	250, 304 (h)	267	252	269	254, 237	Formononetin ^[8]	Р
21*	28.77	232, 308	717	519	n/a	n/a	Salvianolic acid B	S
22	35.42	n/a	355	n/a	n/a	n/a	Coniferyl ferulate ^[10]	L

鉴定为丹参素 (1)、葛根素 (6)、大豆苷 (8)、染料木 苷 (12)、迷迭香酸 (17)、紫草酸 (18) 和丹酚酸 B (21)。其他色谱峰通过分析 UV 光谱、负离子与正离 子模式检测的 MS 及 MS/MS 谱图 (图 2), 并参考各 单味药化学成分的文献报道, 以及文献对同类型化 合物质谱裂解规律的研究结果, 初步推导了可能的



Figure 2 HPLC-UV chromatogram of Tongmai Keli (A), its crude drugs (B–D), TIC chromatogram in both negative (E) and positive (F) modes. A: Tongmai Keli; B: *Puerariae Lobatae Radix*; C: *Chuanxiong Rhizoma*; D: *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; Peaks as shown in Figure 1; *Confirmed by comparing with pure standards

化学结构。

异黄酮类化合物的 UV 图谱特征性很强, 均在 240~265 nm 显示较强的 II 带吸收, 在 300 nm 附近 显示 I 带肩峰。此外, 大豆素糖苷的 I 带大多出现在 250 nm 附近 (如化合物2), 而染料木素糖苷因有5-OH 取代, 其II带大多出现在260 nm附近 (如化合物10), 由此可辅助推导苷元结构[11]。所有异黄酮类化合物均 显示 [M-H] ~ 及 [M+H] * 峰, 可准确地判断其相对分子 质量。苷元的结构以及糖基取代根据 MS/MS 数据推 导。葛根黄酮既有碳苷又有氧苷,其多级质谱图差异 显著。例如, 化合物 2 与 3 为同分异构体, 其相对分 子质量均为 578。化合物 3 的二级质谱显示依次失去 162的碎片峰 (负离子模式, m/z 577→415→253, 正 离子模式, m/z 579→417→255), 是氧苷的典型裂解 方式。而化合物2的二级质谱中,162的中性丢失不 太明显, 较强的碎片峰是由于丢失 90 或 120 (负离子 模式, m/z 577→457, 487), 是碳苷的典型裂解特征^[12]。 由此, 化合物 2 与 3 的结构分别推导为大豆素 7-O-葡 萄糖苷-8-C-葡萄糖苷与大豆素 7,4'-二-O-葡萄糖苷。

化合物 17、18 为来源于丹参的成分,其质谱数 据与文献^[9]报道基本一致,故而初步鉴定为丹酚酸 D 和丹酚酸 E。

化合物 22 来源于川芎,其准分子离子峰与文献^[10]报道一致,初步鉴定为阿魏酸柏松内酯 (coniferyl ferulate)。

4 通脉颗粒中各成分来源

将以上鉴定的化合物的各色谱峰与单味药的 HPLC 图谱比对,分别归属其来源。在 22 个主要色 谱峰中,15 个为异黄酮类化合物均来自葛根;6 个为 丹酚酸类成分来自丹参;尽管川芎作为活血、行血的 药味,具有较重要的配伍意义,但是其化学成分在本 实验的色谱图中并未有较突出的体现,仅化合物 22 来自川芎 (图 2)。

实验还考察了其他可能用于通脉颗粒质量控制的指标性成分:丹参酮IIA、隐丹参酮及藁本内酯,这3种对照品的出峰时间均在40min以后,而原药材及制剂的HPLC色谱图中,并未有上述色谱峰的出现。 虽然水溶性成分阿魏酸在原药材及制剂的HPLC色 谱图中的出峰处均可见微弱紫外吸收,但质谱正负 离子模式下却未检测到其准分子离子峰。

以上现象与通脉颗粒的提取方法密切相关。部颁标准收载的通脉颗粒为水煎剂,有文献报道川芎水提液中阿魏酸含量较高,但随着加热浸出时间的延长会缓慢分解;其次,水不适合藁本内酯等疏水性成分的提取^[13]。这可能是本实验中川芎的特征成分出现较少的原因。实验结果表明:应尽量选用水溶性成分对通脉颗粒进行质量控制。

5 不同批次通脉颗粒的比较

LC-MS 技术从通脉颗粒中检测到 22 个化合物, 根据其色谱峰面积的大小,主要成分包括染料木素 8-C-葡萄糖苷 (4)、葛根素 (6)、大豆素 8-C-芹糖 (1, 6)-O-葡萄糖苷 (7)、大豆苷 (8) 以及丹酚酸 B (21)。 相似度分析表明 10 个样品相似度均大于 0.95,各峰 的相对峰面积 RSD 值均小于 6%,说明各样品的化学 组成具有一定的相似性 (图 1)。然而,各样品中化合 物的含量差异显著。例如,虽然 TM01 和 TM05 的相 似度分别为 0.979 和 0.996,但前述 5 个主要色谱峰在 前者中的峰面积均分别相当于后者的 4 倍以上 (表 2);再如,TM05 的图谱中 10 min 以前明显有很多色 谱峰,而在其他厂家样品中均很弱。以上结果表明, 不同厂家生产的通脉颗粒的质量存在着比较显著的 差异,这可能是由于原料药材质量差异,以及各厂家 生产工艺不统一所致。为了有效地控制此中药复方制 剂的质量,有必要对多个主要成分进行定量分析,制 定合理的含量范围。

Table 2Areas of common peaks 4, 6, 7, 8, 21 and index ofsimilarity of TM01 and TM05

Sampla		Index of					
Sample	No.4	No.6	No.7	No.8	No.21	similarity	
TM01	4 999.109	20 731.34	10 079.67	4 544.014	8 202.916	0.996	
TM05	968.753	6 275.089	2 406.394	1 040.563	904.348	0.979	

讨论

通脉颗粒的化学成分主要为酚性化合物,把流动 相调整为弱酸性有利于改善峰形,提高分离度。作者 尝试了在水相中添加 0.05% 和 0.1% 甲酸,其中 0.1% 甲酸可明显改善分离。此外,对色谱柱、柱温以及流 动相进行优化。最后确定 Zorbax SB-C₁₈色谱柱于 30 ℃ 以乙腈-水梯度洗脱,大多数色谱峰可实现基线分离, 而且分离时间仅需 40 min。紫外检测波长设为 260 nm 时,色谱峰数最多,且基线良好,可较全面地反映样 品的化学组成。

对样品的提取方法进行了优化,分别考察了水、 30%甲醇、50%甲醇和100%甲醇溶解颗粒,结果表 明以10倍量水于80℃提取样品,色谱峰数最多且吸 收度合适,故直接采用水提取样品即可。

结论

本文从中药复方通脉颗粒中检测鉴定了 22 个化 合物,并归属了各化合物的单味药来源,从而基本阐 明了该复方制剂的化学组成。对 10 批来自不同生产 厂家的样品进行 HPLC 分析,发现各样品的化学组成 相似,但主要色谱峰的面积差异显著。因此,还需要 建立定量分析方法,从而对通脉颗粒的质量进行全 面的控制。

References

- Liu AH, Lin YH, Yang M, et al. Development of the fingerprints for the quality of the roots of *Salvia miltiorrhiza* and its related preparations by HPLC-DAD and LC-MSn [J]. J Chromatogr B, 2007, 846: 32–41.
- [2] Li SL, Lin G, Zhong KS, et al. Study on fingerprint of

Rhizoma Chuanxiong by HPLC-DAD-MS [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2004, 39: 621-626.

- [3] Dong Y, XU B, Lin L, et al. Advances in studies on chemical components of *Pueraria DC*. [J]. Food and Mechinery (食品 与机械), 2005, 21: 85-88.
- [4] Lei JC, Yu JQ, Yao D. Determination of Tanshinone II A in Tong Mai Granules by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学杂志), 2006, 23: 917-918.
- [5] Guo YJ, Meng S, Xu H, et al. Qualitative and quantitative analysis of Tongmai Keli [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2008, 14: 13-15.
- [6] Xiao XH, Liu XL, Suo ZR, et al. RP-HPLC-ECD determination of 3 compounds in Tongmai granules [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27: 1924–1927.
- [7] Zhang M, Wang YM, Luo GA. Multi-dimensional fingerprints of Japan Jiuxin pill [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2006, 41: 1161-1165.
- [8] Kinjo JE, Furasawa JI, Baba J, et al. Studies on the constituents of *Pueraria lobata*. III. Isoflavonoids and related compounds in the roots and the voluble stems [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35: 4846–4850.
- [9] Liu AH, Guo H, Ye M, et al. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using highperformance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2007, 1161: 170–182.
- [10] Li SL, Chan SSK, Li G, et al. Simultaneous analysis of seventeen chemical ingredients of *Ligusticum chuanxiong* by on-line high performance liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry [J]. Planta Med, 2003, 69: 445– 451.
- [11] Liu GZ, Ma JY, Chen YZ, et al. Investigation of flavonoid profiles of *Scutellaria baicalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216: 4809–4814.
- [12] March R, Brodbelt J. Analysis of flavonoids: tandem mass spectrometry, computational methods, and NMR [J]. J Mass Spectrom, 2008, 43: 1581–1617.
- [13] Kong L, Yu ZY, Zou HF, et al. Determination of the active ingredients in *Rhizoma Chuanxiong* by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2004, 11: 1421-1425.