

uid chromatography/electrospray ion trap multiple-stage mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2001, 73 (10): 2171-2177.

[8] Xie J, Zhu L, Luo H, Zhou L, *et al* Direct extraction of specific phamacophoric flavonoids from ginkgo leaves using a molecularly imprinted polymer for quercetin [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 934 (1): 1-11.

[9] Matsui J, Miyoshi Y, Doblhoff-Dier O, Takeuchi T. A molecularly imprinted synthetic polymer receptor selective for atrazine [J]. *Anal Chem*, 1995, 67 (23): 4404-4408.

[10] 袁怀波, 赵国华, 李洪军, 等. 利用大孔吸附树脂纯化葛根异黄酮的研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2003, 129 (12), 62-65.

[11] Yu W, Zhao Y, Shu B. The radical scavenging activities of radix puerariae isoflavonoids: A chemiluminescence study [J]. *Food Chem*, 2004, 86 (4): 525-529.

HPLC-MSⁿ 法分析复方苦参注射液的化学成分

刘 倩¹, 张宏桂^{2*}, 刘永刚¹, 郑玉胜²
(1. 吉林大学药学院, 吉林 长春 130021; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029)

关键词: 复方苦参注射液; 化学成分; 生物碱; HPLC-MSⁿ
摘要: 目的: 明确复方苦参注射液 (苦参 白土苓) 的化学成分, 建立含苦参的复方制剂 HPLC-MSⁿ 鉴定方法。方法: 应用 HPLC-ESI/MSⁿ 方法, 其中, 液相色谱采用梯度洗脱, 质谱用正离子模式检测。结果: 从复方苦参注射液中分离鉴定了 11 种化学成分。结论: 本法简便、快速, 可用于中药复方化学成分的分析。
中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-1528 (2006) 10-1488-03

Analysis of chemical components in Compound Kushen Injection by HPLC-MSⁿ

L U Qian¹, ZHANG Hong-gui², L U Yong-gang¹, ZHENG Yu-sheng²
(1 Pharmacy College, Jilin University, Changchun 130021, China; 2 Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

KEY WORDS: Compound Kushen Injection; chemical components; alkaloid; HPLC-MSⁿ
ABSTRACT: **A M:** To study the chemical components in Compound Kushen Injection (Radix Sophorae Flavescentis), and to develop a method to identify the composition contained Radix Sophorae Flavescentis. **METHODS:** The sample was analysed with gradient elution by HPLC. Agilent MS TRAP equipped with ESI source was used as detector and operated in positive ion mode. **RESULTS:** 11 components were identified in Compound Kushen Injection. **CONCLUSION:** This method is simple, rapid and can be used for the analysis of components in Compound Kushen Injection.

复方苦参注射液由苦参和白土苓组成, 具有清热利湿、凉血解毒、散结止痛的功能, 用于癌性疼痛的出血^[1]。与其他苦参注射液相比, 由于组方合理, 增加了新的药理作用, 即对环磷酰胺抑制肿瘤有明显的增效作用, 对大剂量环磷酰胺的毒副作用有明显的减毒作用^[2]。文献报道其主要化学成分为氧化苦参碱、苦参碱、苦参黄酮、土茯苓皂苷^[3]等。本文用高效液相色谱-电喷雾质谱 (HPLC-

ESI/MSⁿ) 法对复方苦参注射液的化学成分进行了分析。
1 仪器和试剂
1.1 仪器 Agilent 1100 HPLC/MSD/TRAP XCT PLUS 系统, 含在线真空脱气机、高压二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器、电喷雾 (ESI) 接口, HP Chem station Rev A 0.803 色谱工作站。

收稿日期: 2006-01-16
作者简介: 刘 倩 (1978~), 女, 吉林人, 吉林大学药学院博士生, 研究方向: 中药化学, 电话: 13146691425, E-mail: liuqian01101@163.com
通讯作者: 张宏桂, 男, 教授, 博士生导师, E-mail: zhanghongzxcv@21cn.com

1.2 试药 复方苦参注射液(批号:20050616,山西振东金晶制药有限公司)、苦参碱标准品(批号110805-200306)、氧化苦参碱标准品(批号110780-200405)、槐定碱标准品(批号110784-200303)、氧化槐果碱(批号111652-200301)均购自中国药品生物制品鉴定所,甲醇(色谱纯)、氨水(分析纯)、水为二蒸水。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 本品直接作为供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备 取苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱对照品适量,加甲醇溶解,制成苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱对照品溶液。

2.3 色谱条件及分析方法

色谱柱: Hypersil BDS (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: A: 0.1% 氨水, B: 甲醇; 梯度洗脱: 0.01 min: A-B (80:20), 30 min: A-B (80:20), 50 min: A-B (40:60), 记录时间: 60 min; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 25℃。紫外检测波长: 210 nm, 检测方式: ESI(+); 扫描范围 m/z 100~700, 干燥气流速: 12 L/min; 干燥气温度: 350℃, 雾化室压: 50 psi; 毛细管电压: 4 000 eV; 进样量: 5 μL。

3 实验结果

3.1 液相色谱 在 210 nm 色谱条件下,苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱和氧化槐果碱及其他成分得到了很好的分离,液相色谱图见图 1。

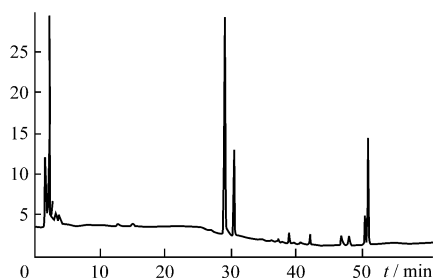


Fig 1 The HPLC chromatogram of Compound Kushen Injection (210 nm)

图 1 复方苦参注射液 HPLC 图谱

3.2 LC-MS 总离子流图 在上述质谱条件下得到的总离子流图显示各峰实现了较好分离(见图 2)。

经质谱鉴定,复方苦参注射液的主要成分为苦参碱、氧化苦参碱、槐定碱、氧化槐果碱均为苦参碱型生物碱,此外尚有金雀花碱型、无叶豆碱型、羽扇豆碱型生物碱,其中含有大量同分异构体。苦参碱、槐定碱及它们的构型异构体的质谱行为相似,二级

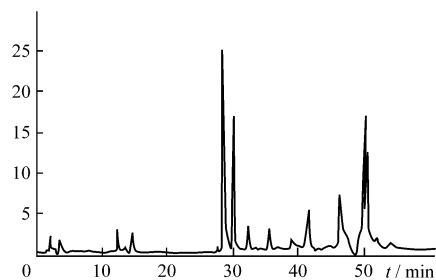


Fig 2 The HPLC-MSⁿ TIC of Compound Kushen Injection

图 2 复方苦参碱的 HPLC-MSⁿ TIC 图

质谱中 $M/2$ 150、148 的碎片离子为其特征裂解碎片,还有各环逐级裂解的碎片产物。可借此区别相同分子量(饱和环)的苦参碱型生物碱和其它类型生物碱。不同化合物中 2 个离子碎片的丰度不同,可能与 5、6 位氢的伸展方向不同而导致离子抑制程度不同有关。氧化生物碱在一级质谱中显示的 $[2M + H]^+$, 丰度很高,准分子离子丰度较低。羟基生物碱 $[2M + H]^+$, 丰度很低,准分子离子丰度较高,可以区别二者。

3.3 化学成分鉴定

化合物 1: m/z 205.0 ($[M + H]^+$),符合 N 甲基金花雀碱,其二级质谱给出 m/z 145.9 的碎片离子,如果 7-17, 9-11 两个单键断裂可形成此碎片离子,参考相关文献^[4~9],鉴定化合物 1 为 N 甲基金花雀碱(N-methylcytisine)。

化合物 2: m/z 247.1 ($[M + H]^+$),根据苦参和白土芥中的化学成分检索,符合槐果碱和 7,11 去氢苦参碱,二级质谱给出 m/z 148.0 的碎片离子,符合槐果碱的质谱特征,7,11 去氢苦参碱的双键在 C 环上,不能给出 m/z 148 碎片离子,故鉴定为槐果碱(Sophocarpine)。

化合物 3: m/z 249.1 ($[M + H]^+$),与苦参碱标准品液相色谱保留时间及质谱行为一致,为苦参碱(matrine)。一级质谱为 m/z 249.1 ($[M + H]^+$)及丰度很低的 $[2M + 1]^+$,其二级质谱给出 m/z 150、148.0,为苦参碱 A、B 环的碎片离子,及 m/z 231 ($[M + H - H_2O]^+$)的碎片离子。

化合物 4: m/z 249.1 ($[M + H]^+$),与槐定碱标准品液相色谱保留时间及质谱行为一致,为槐定碱(sophoridine),其二级质谱给出 m/z 150、147.9 的碎片离子,为槐定碱 A、B 环的碎片离子,及 m/z 231 ($[M + H - H_2O]^+$)的碎片离子。

化合物 5: m/z 261.1 ($[M + H]^+$),根据苦参和白土芥中的化学成分检索,符合鹰喙叶碱二级质谱给出 m/z 243.0 和 m/z 114.1 的碎片离子,前者为

13位羟基脱一分子水形成,后者符合 7-17, 9-11 两个单键断裂形成的碎片离子,故鉴定为鹰觚叶碱 (baptifoline)。

化合物 6: m/z 263. 1 ($[M + H]^+$), 525. 3 ($[2M + H]^+$), 根据苦参和白土苓中的化学成分检索,符合黄叶槐碱, N 氧化槐果碱, 9 α 羟基槐果碱, 二聚体的丰度较低, 准分子离子丰度较高, 推断它不是 N-氧化物, 而是羟基化合物。排除 N 氧化槐果碱。其二级质谱给出 m/z 246. 0 碎片离子, 前者为脱水形成, 黄叶槐碱应该有脱乙醇分子的碎片, 即应该有 m/z 231 的碎片离子, 所以不是黄叶槐碱, 而是 9 α -羟基槐果碱 (9 α -hydroxysophocarpine)。

化合物 7: m/z 265. 2 ($[M + H]^+$), 与氧化苦参碱标准品液相色谱保留时间及质谱行为一致, 为氧化苦参碱 (oxymatrine)。其一级质谱为丰度很高的 $[2M + H]^+$, 二级质谱为脱一分子水的碎片离子 m/z 247. 0。

化合物 8: m/z 265. 1 ($[M + H]^+$), 与氧化苦参碱, 槐醇和氧化槐定碱相符。其一级质谱 $[2M + 1]^+$ 丰度很低, 准分子离子丰度较高, 推断不是 N 氧化物, 可以排除氧化苦参碱、氧化槐定碱, 故鉴定化合物 8 为槐醇 (sophoranol)。

化合物 9: m/z 281. 1 ($[M + H]^+$), 根据苦参和白土苓中的化学成分检索, 可能为 5 α , 9 α -二羟基苦参碱和羟基苦参碱-N 氧化物, 其一级质谱为丰度较低的二聚体和丰度较高的准分子离子峰, 与 5 α , 9 α -二羟基苦参碱质谱特征相同。二级质谱分给出脱一分子水 m/z 263. 0 的, 三级质谱给出 m/z 263 脱一分子水 m/z 245 的碎片离子, 鉴定化合物 14 为 5 α , 9 α -二羟基苦参碱 (5 α , 9 α -dihydroxy-matrine)。

化合物 10: m/z 303. 2 ($[M + H]^+$), 根据苦参和白土苓中的化学成分检索, 可能为 (-) 乙酰基鹰觚叶碱, 二级质谱给出了其脱乙酰基的 m/z 243. 0 的碎片, 验证了它是 (-) 乙酰基鹰觚叶碱 ((-)-accnylbaptifoline)。

化合物 11: m/z 263. 3 ($[M + H]^+$), 与氧化槐果碱标准品液相色谱保留时间及质谱行为一致, 为氧化槐果碱 (oxysophocarpine)。其一级质谱为丰度很高的 $[2M + H]^+$ 和丰度较高的 $[M + H]^+$, 二级质谱为脱一分子水的碎片离子 m/z 247. 0。

4 讨论

4.1 在上述色谱条件下, 做了苦参碱, 氧化苦参碱, 槐定碱、氧化槐果碱标准品的液相色谱和质谱, 结果发现: 三种标准品色谱图和质谱图, 同上述复方苦参

碱注射液中对成分在保留时间, 准分子离子和碎片离子有很好的重现性, 验证了上述结果的准确性。

4.2 苦参中有大量的生物碱类异构体, 为化学成分解析带来了一定困难, 但根据其质谱行为可以判断它是否为苦参碱类生物碱。饱和环苦参碱类生物碱的碎片离子具有 A、B 环 150、148 的特征碎片离子。

4.2.1 $[M + H]^+$ 249. 1, 二级质谱给出 m/z 150. 0、148 的特征碎片离子和 m/z 231. 0 的碎片离子, 符合苦参碱类生物碱质谱行为, 推断它为苦参碱和槐定碱的苦参碱类生物碱异构体。

4.2.2 $[M + H]^+$ 249. 2, 二级质谱给出 m/z 150、148 0 的碎片离子, 与苦参碱及槐定碱一致, 液相色谱的保留时间也很相近, 为苦参碱和槐定碱的苦参碱类生物碱异构体。

4.2.3 $[M + H]^+$ 249. 1, 二级质谱给出丰度很高的 m/z 231. 0 碎片离子, 不符合苦参碱类生物碱的质谱行为, 推断它为苦参碱和槐定碱的非苦参碱类生物碱异构体。

4.3 N 氧化物的一级质谱 $[2M + H]^+$, 丰度很高, 为判断 N 一氧化生物碱提供了参考。

4.3.1 $[M + H]^+$: 263. 1, $[2M + H]^+$ 525. 3, 二聚体的丰度较高, 为一个 N 氧化物。

4.3.2 $[M + H]^+$ 265. 1, 二级质谱给出 m/z 247. 1 和 205. 0 的碎片离子, 不符合苦参碱类生物碱的质谱行为, 一级质谱 $[2M + H]^+$ 丰度很低, 不是 N 氧化物, 所以它是一个非苦参碱类羟基生物碱化合物。

4.4 中药复方物质基础研究是中药现代化的核心问题之一, 对复方化学成分的研究有可能从本质上阐明复方作用的物质基础, 可为优化处方, 制定科学的制剂工艺, 提高制剂质量提供依据^[10]。HPLC-MSⁿ 法集色谱分离及质谱定性检测能力于一体, 对于复杂混合物的每一个组分具有良好的分离和表征能力, 可以简便快速的获得各化合物的分子结构信息, 进行定性分析。复方苦参注射液中的化学成分主要为生物碱类化合物, 本实验采用 HPLC-MSⁿ 法分析了复方苦参注射液的化学成分。本法快速, 简便, 避免了传统的分离单体成分再做结构鉴定的繁琐, 克服了液相色谱无法定性鉴别的难题, 可用于中药复方化学成分的研究。

参考文献:

- [1] 卫生部药品标准 [S], 中药成方制剂第十四册。
- [2] 山西金晶药业有限公司. 复方苦参注射液 [P], 中国专利: 1171960, 1998-02-04。
- [3] 程 晶, 胡健莉, 吴红革. 岩舒注射液对中老年肿瘤患者免疫

功能的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11 (6): 478-479.

[4] 苗抗立, 张建中, 黄 颖, 等. 苦参的化学成分及药理的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13 (2): 69-73.

[5] 郑永权, 姚建仁, 邵向东, 等. 苦参的化学成分及农业应用研究概况 [J]. 农药管理与科学, 2000, 21 (1): 24-26.

[6] 李 丹, 左海军, 高慧媛, 等. 苦参的化学成分 [J], 2004, 21 (5): 346-348.

[7] 从浦珠, 李笋玉. 天然有机质谱学 [M]. 北京: 中国医药科技出版社. 2002: 453-457.

[8] 从浦珠, 苏克蔓. 分析化学手册 (第九分册) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 721.

[9] 马仁玲. 中药苦参指纹图谱和苦参生物碱在动物体内药代动力学及代谢的研究 [D]. 南京, 中国药科大学, 2004.

[10] 赵建荣, 李晓玫. 中药复方物质基础研究的现状与进展 [J]. 中草药, 2003, 34 (11): 963-966.

反相高效液相色谱法制备广金钱草黄酮对照品

王国光, 卢尧伟, 赵素容, 吴祖泽
(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

关键词: 广金钱草; 对照品; 6-C葡萄糖-8-C木糖洋芹素

摘要: 目的: 建立广金钱草黄酮对照品 6-C葡萄糖-8-C木糖洋芹素 (vicenin-2) 的反相高效液相色谱制备方法。方法: 结合萃取、大孔树脂柱层析、重结晶等方法, 用反相高效液相色谱法对广金钱草的乙醇提取物进行分离纯化, 以 HPLC 对分离产物进行纯度和含量测定。结果: 从广金钱草中分离纯化出黄酮对照品 vicenin-2 纯度可以达到 98.5% 以上。结论: 该方法简单、准确、重现性好, 产品纯度高, 可作为中药药效物质基础研究中的对照品。

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 1001-1528 (2006) 10-1491-02

Preparation of reference substance of flavonoid in Desmodium styracifolium by RP-HPLC

WANG Guo-guang, LU Yan-wei, ZHAO Su-rong, WU Chu-tse
(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

KEY WORDS: Desmodium styracifolium; reference substance; vicenin-2

ABSTRACT: A M: To develop an RP-HPLC method for preparing the reference substance of vicenin-2 in Desmodium styracifolium. METHODS: Ethanol-extract of desmodium styracifolium was isolated and purified by RP-HPLC combining solvent extraction with column chromatography and recrystallization. The purity and content of vicenin-2 were identified by HPLC. RESULTS: The flavonoids were completely separated under this chromatographic condition. The purity of the reference substance was 99.0% or above. CONCLUSION: The method is simple, accurate, better on repeatability, and effective to yield high-purity product. It can be used as reference substance for the research of herbal medicine.

随着中药研究和药效物质基础研究的不断深入, 对中药对照品的需求也日益增加。因此, 高纯度的对照品的制备尤为重要。

广金钱草为常用中药, 具有清热除湿、利尿通淋之功效^[1], 其有效部位黄酮类特质是天然植物中广泛存在的一大类化合物^[2-4], 其中的黄酮品 vicenin-2

成分含量高、稳定性好, 可为广金钱草原药材的质量提供依据。目前, 黄酮类化合物主要是从天然植物广金钱草中分离提取。这类生物活性物质的分离纯化, 用柱层析分离过程复杂, 耗时多, 结果也不稳定, 且分离纯化的产物多为混合物, 不宜用作总黄酮定量分析的标准品。高效液相色谱法 (HPLC) 是分离

收稿日期: 2005-04-12
作者简介: 王国光 (1969~), 男, 博士, 江苏连云港人, 研究方向: 天然药物分离提纯。电话: 010-66931425。

