

复方丹参片的高效液相色谱/质谱特征图谱研究

马晓红, 张 铃, 蔡 敏, 陈 勇, 韩凤梅*

(湖北大学中药生物技术省重点实验室, 武汉 430062)

摘 要:研究了复方丹参片乙醇提取物电喷雾离子阱质谱(ESIMS)和(HPLC-MS)特征图谱,并对特征图谱中各主要峰进行了初步定性分析,为复方丹参片的快速指纹鉴别提供了新方法。

关键词:复方丹参片;ESIMS;HPLC;特征图谱

中图分类号:O657.63

文献标识码:A

复方丹参片具有活血化瘀,理气止痛的功效。2005 年版中国药典对此药要求采用高效液相法控制成品质量,定量测定指标为丹参酮 A^[1]。丹参酮 A 易分解不稳定,且丹参中脂溶性丹参酮类成分较多,仅以丹参酮 A 为含量测定指标不能客观评价成药质量。复方丹参片由丹参、三七和冰片组成,活性部位除脂溶性丹参酮外,还有三七皂苷类成分等。因此,要科学控制复方丹参片质量,必须制定其成品中脂溶性成分的特征图谱。

关于丹参药材脂溶性成分、水溶性成分^[2-4],三七药材脂溶性成分^[5]以及丹参注射液指纹图谱^[6]的研究已有报道,但迄今未见复方丹参制剂指纹图谱研究的文献报道。本文应用电喷雾离子阱质谱(ESIMS)和高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)研究了复方丹参片乙醇提取物的特征图谱,并对图谱中的主要特征峰进行了初步定性分析,为复方丹参片的质量控制提供了一个快速的指纹鉴别新方法。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

美国 Finnigan 公司 LCQ 型液-质联用仪,包括 TSP UV6000-ESI ion trap mass 检测器, TSP P4000 泵及 TSP AS3000 自动进样器, Highchem 公司 Mass Frontier 1.0 质谱解析软件。

乙醇、甲醇均为分析纯。

复方丹参片(广州白云山中药厂,批号:0411001)。

1.2 实验方法

1.2.1 质谱条件 ESIMS 扫描范围 m/z 150 ~ 1 300;流动相甲醇,流速 0.2 mL/min;离子化时间 5 min;鞘气(N_2)流速为 40 个单位;毛细管电压 27 V;毛细管温度 250 °C;正离子检测模式;源电压 5.0 kV,源电流 80.0 μ A。

1.2.2 HPLC-MS 条件 色谱条件: Intersil ODS₂ 色谱柱(250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 甲醇-水(80:20, V/V)为流动相,流速 0.7 mL/min,柱温 30 °C,进样体积 10 μ L, DAD 紫外(190 ~ 600 nm)和离子阱质谱同时检测。

质谱条件:ESI 离子源,扫描范围 m/z 150 ~ 1 300,离子源喷射电压 5.0 kV,毛细管电压 46 V,毛细管温度 250 °C,鞘气(N_2)流速 80 个单位,正离子检测。

1.2.3 样品供试液的制备 95%乙醇是复方丹参片制剂工艺的提取溶剂,因此,本实验选用 95%乙醇作

收稿日期:2006-11-28

修回日期:2007-01-02

基金项目:科技部十五攻关项目(No. 2001BA701A01);湖北省青年杰出人才基金(No. 2002AC004)

*通讯联系人:韩凤梅,女,副教授,从事药物分析。

为复方丹参片的提取溶剂。取复方丹参片 10 片,除去红色糖衣,粉碎后过 40 目筛,称取 200.5 mg 粉末,加 95 %乙醇 10 mL 置于离心管中,称重,超声提取(功率为 280 W) 35 min,冷却后称重,加适量乙醇补足失重、离心,取上清液,定容至 10 mL 容量瓶中做为供试液。取 95 %乙醇 400 μ L 稀释至 1 mL 做为空白对照供试液。

2 结果与讨论

2.1 复方丹参片提取物的 ESI-MS 特征图谱

复方丹参片提取物中的主要有效成分为丹参酮类和三七皂甙类。丹参酮类物质适合用正离子检测模式,一级质谱扫描图中主要是各物质的质子化分子离子 $[M + H]^+$;丹酚酸类物质适合用负离子检测模式,一级质谱扫描图中主要是各物质的脱质子化分子离子 $[M - H]^+$;三七皂甙类成分在正、负离子检测模式下均可检测,但在正离子检测模式时效果更好,一级质谱扫描图中主要是各物质的钠加合离子 $[M + Na]^+$ 。

图 1 是复方丹参片供试液在“1.2.1 质谱条件”下进样分析得到的正离子扫描图。图中主要分子离子 m/z 277.1、279.2、295.2、297.2、527.4、613.1 是丹参酮类物质,分子离子 m/z 823.5、969.6、1131.5 是三七皂苷类物质。各分子离子的多级质谱碎片信息及推导的物质名称见表 1。

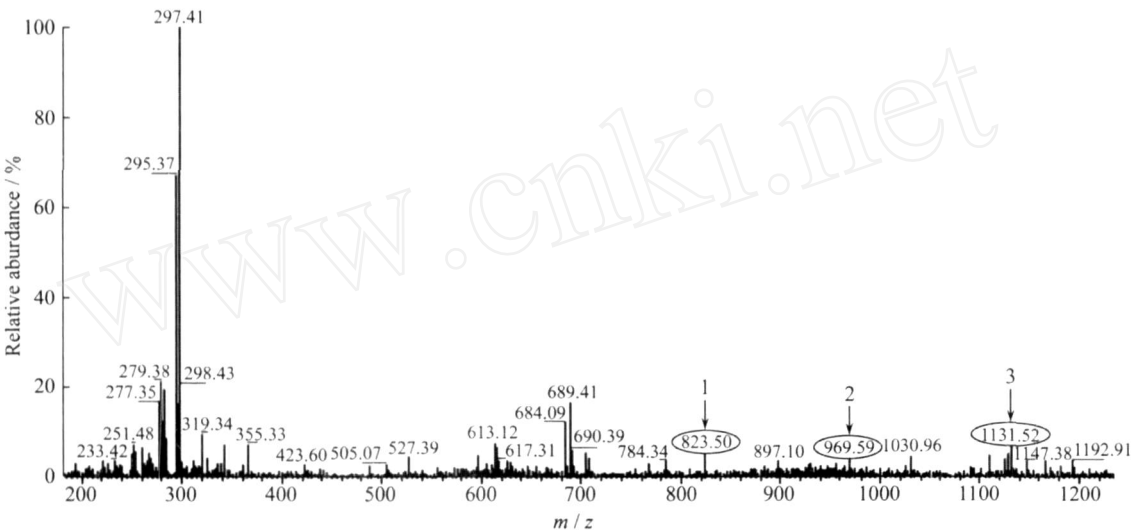


图 1 复方丹参片乙醇提取物电喷雾离子阱质谱图
Fig. 1 ESI-MS spectrum of the ethanol extract of FuFang DanShen Pian

表 1 图 1 中 12 个主要化合物的 MSⁿ 数据

Table 1 The MSⁿ data of 12 major compounds in Fig. 1

No.	Compound	$[M + Na]^+$	MS ² fragments
1	Rb ₁ (or Rb ₃ , Rc)	1131	969 →789
4	Rd	969	807 →645
5	Re	969	789
6	Rg ₁	823	643 →481
	Compound	$[M + H]^+$	MS ² fragments
7	Cryptotanshinone	297.4	279, 251, 268, 227
8	Tanshinone A	295.4	277, 249, 253, 266
9	Methylenetanshinone or dihydroxytanshinone	279.4	261, 204
10	Tanshinone	277.3	259, 249, 321, 339
11	Unknown	527.4	365 →203
12	$[M_1 - M_1 + Na]^+$	613.3	319 →296 →279

Noted: The datum before and after “→” represent the parent ions and daughter ions, respectively.

2.2 复方丹参片提取物的 LC-UV-MS 特征图谱

以甲醇-水(80 20,V/V)为流动相,实验考察了 Intersil ODS₂ (250 ×4.6 mm,5 μm)长柱、AICHRON™ Reliz SilC₁₈ (150 ×4.6 mm,5 μm)短柱和 Agilent ZORBAX C₁₈ (3.5 μm)高效柱对复方丹参片提取物分离的影响。根据流动相流速、系统压力对分离度与峰形的影响,最终选用了 Intersil ODS₂ 长柱。

复方丹参片提取物经 HPLC-MS 分析,35 min 后无色谱峰,1 h 后以甲醇冲洗色谱柱,无强保留物洗脱,故实验只考察了样品供试液 1 h 色谱分离情况(图 2)。以色谱图中第 9 号峰为参照物峰,令其保留时间和峰面积均为 1,计算其它峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各峰的精度与重复性较好,相对保留时间与峰面积的 RSD 值在 1 %~4 %(n=5)。

复方丹参片供试液经 LC-HPLC-MS 分析,色谱总离子流图(图 2a)与 PDA 检测图(图 2b)基本吻合,但总离子流图基线噪声相对较大,分辨率也差一些。根据图 2a 中各峰 MSⁿ 数据,推导图中 12 个主要谱峰对应的物质见表 2。

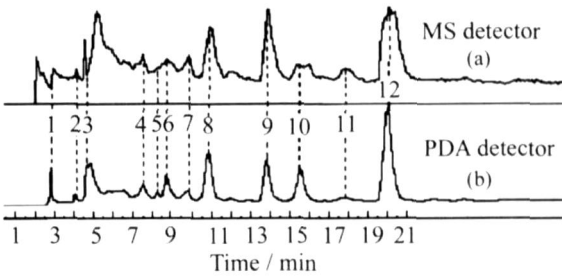


图 2 复方丹参片乙醇提取物色谱图
Fig.2 The chromatograms of the ethanol extract of Fufang Danshen Pian

表 2 图 2 中 12 个主要复合物的可能化合物
Table 2 The proposal compounds of 12 major compounds in Fig.2

No.	Time(min)	Ar(%)	Compound	λ _{max} (nm)	[M + H] ⁺	MS ⁿ (n=2~4)
1	2.9	4.8	Salvonitin	210,270	343	325
2	4.5	2.6	Unknown	212,258	689	527 →365 →203
3	5.2	34.7	Sanchinoside Rg1	208,274	823 [*]	643 →481
4	7.5	5.3	Unknown	212,234,278	263	
5	8.7	7.8	Ginsenoside Rb1	206,244	1131 [*]	969 →789
6	9.9	4.5	Methyl tanshinonate	220,274	339	321
7	11.0	10.4	Methylenetanshinone	220,250,268	279	261
8	12.5	1.3	Ginsenoside Re	208	969 [*]	789 →643
9	13.9	8.5	Cryptotanshinone	264,271,295	297	279 →261
10	16.0	4.5	Tanshinone	245	277	259
11	17.9	2.6	Dihydroxytanshinone	292	279	261
12	20.2	16.9	Tanshinone A	269	295	277 →249

Noted: ^{*}represent [M + Na]⁺; The datum before and after “ → ”represent the parent ions and daughter ions respectively.

参考文献:

[1] Chinese Pharmacopoeia(中华人民共和国药典 一部) [M]. 2000 :518.

[2] YU Wen-jia(于文佳), HE Jian(何 坚), SHEN Jin-can(沈金灿), WANG Xiao-ru, et al(王小如等), Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报) [J], 2003, 24(4) :621.

[3] NI Li-jun(倪力军), LI Peng(李 鹏), ZHENG Rong(郑 荣), ZHANG Li-guo(张立国), ZHU Li-zhong(朱立中). Chinese Traditional Patent Medicine(中成药) [J], 2002, 24(2) :79.

[4] WANG Yan(王 雁), BI Kai-shun(毕开顺). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志) [J], 2003, 28(24) :316.

[5] ZHANG Zur-jian(张尊建), LI Qian(李 茜), WANG Wei(王 伟), ZHOU Qiao-gen(邹巧根), ZHAO Lu-hua(赵陆华). Chinese Traditional and Herbal Drugs(中草药) [J], 2002, 33(12) :1074.

[6] SHI Chao-ou(施超欧), TAO Ping(陶 萍). World Science and Technology(世界科学技术) [J], 2001, 3(5) :29.

[7] Pierluigi M, Piergiorgio P. J. Pharm. Biomed. Anal. [J], 2000, 23:61.

Study on the Characteristic Fingerprints of Fufang Danshen Pian by ES-MS and HPLC-MS

MA Xiao-hong , ZHANG Ling , CAI Min , CHEN Yong , HAN Feng-mei *

(Hubei Province Key Laboratory of Bio-Technology of TCM , Hubei University , Wuhan 430062)

Abstract : The characteristic fingerprints of the 95 % ethanol extract of Fufang Danshen Pian have been studied by electrospray ion trap mass spectrometry (ES-MS) and HPLC , respectively , and the main peaks existed in the ES-MS spectra and HPLC-MS chromatogram were qualitatively analyzed. The characteristic fingerprints were valuable for the rapid fingerprint identification of Fufang Danshen Pian.

Keywords : Fufang Danshen Pian ; ES-MS ; HPLC ; Fingerprint

第十届全国青年分析测试学术报告会征文通知 (第一轮)

为展示我国青年分析工作者在分析测试领域的新成就、新进展,促进我国分析测试技术的发展,充分发挥青年分析工作者的作用,受中国分析测试协会青年学术委员会委托,第十届全国青年分析测试学术报告会将由武汉大学测试中心承办,定于 2008 年九月在武汉召开。热忱欢迎青年朋友踊跃投稿并参加会议。现将会议征文要求通知如下:

- 1、征文内容
- 涉及分析测试科学各领域及相关学科的研究论文或报告。
- 2、征文要求
- (1) 论文的主要完成人为 45 周岁以下的青年人。
- (2) 论文应突出工作的创新性,文字简练、准确,凡在国内外刊物上发表及在全国性会议上报告过的论文,不予受理。
- (3) 论文须经作者所在单位进行保密审查,并加盖公章。
- (4) 先交论文的详细摘要,字数(包括图表) ≤1500 字,格式请参阅《分析科学学报》来稿要求。
- (5) 截稿日期:2008 年 7 月 31 日。
- (6) 论文请寄:430072 武汉大学测试中心 周珂收
- 电话:(027) 68752439-8310 , E-mail : zbaiping@gmail.com
- (7) 寄交论文一式三份,并 e-mail 电子版文件。来信请注明作者姓名、性别、职务职称、单位及详细地址,以便联系。请自留底稿,录用与否一律不退稿。
- (8) 鼓励作者通过本次会议网页(YA10.instrument.com.cn)进行在线投稿,注册。在线投稿后,不需要邮寄论文。
- (9) 有关会议具体事宜,请见下一轮通知。
- 本会欢迎国内外分析仪器公司、厂家到会介绍和展出产品,有关具体事宜请通过电话与王军芝(010-68999557)或周平(027-68752136)联系。

第十届全国青年分析测试学术报告会组委会
中国分析测试协会青年学术委员会
(武汉大学测试中心 代章)
2008 年 1 月