

中药川芎超临界 CO₂ 提取液的液相色谱 - 电喷雾多级质谱研究

滕久委¹, 李德良¹, 罗安东²

(1. 中国广州分析测试中心 广东省化学危害应急检测技术重点实验室, 广东 广州 510070;

2 广州合诚三先生物科技有限公司, 广东 广州 510620)

摘 要: 采用 HPLC - MSⁿ 技术分析和鉴定了中药川芎超临界 CO₂ 提取液中的主要成分: 洋川芎内酯 A、Z 藁本内酯、新蛇床内酯、3-丁基苯酞和苯酞二聚体。液相色谱 - 离子阱质谱联用在正离子电喷雾电离、自动多级质谱模式下进行分析。样品在 ECL IPSE XDB C₁₈ 色谱柱上以含 0.25% 乙酸水溶液和含 0.25% 乙酸甲醇梯度洗脱分离。对藁本内酯等苯酞内酯电喷雾电离后的碰撞裂解机理进行了探讨。Z 藁本内酯的碰撞裂解的两个主要途径为: 侧链断裂脱烯和开环脱水再脱羧。实验中没有观察到孤立的脱羧过程。而这些主要成分的加钠离子的碰撞裂解过程完全不同。

关键词: 川芎; 藁本内酯; 高效液相色谱 - 多级质谱联用; 超临界 CO₂ 萃取; 碰撞裂解

中图分类号: O657.63; Q949.763.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2007)03 - 0356 - 04

Identification and Characterization of Supercritical Fluid Extracts of *Rhizoma Chuanxiong* by High Performance Liquid Chromatography - Ion Trap Mass Spectrometry

TENG Jiu-wei¹, LI De-liang¹, LUO An-dong²

(1. Guangdong Key Laboratory of Chemical Emergency Test, China National Analytical Center, Guangzhou 510070, China; 2. Guangzhou Honsea Sunshine Bio Science & Technology Co., Guangzhou 510620, China)

Abstract: Main constituents, senkyunolide A, Z-ligustilide, neocnidilide, 3-butylphthalide, and ligustilide dimers, in supercritical CO₂ fluid extracts of *Rhizoma Chuanxiong*, a popular Chinese traditional medicine, have been identified and characterized by high performance liquid chromatography - ion trap mass spectrometry. Separations were carried out on an ECL IPSE XDB C₁₈ column by gradient elution with 0.25% acetic acid and methanol (containing 0.25% acetic acid). An Agilent 1100 series LC / MSD XCT system was operated under positive ESI and auto MSⁿ modes for mass spectrometric analysis. Collision-induced dissociation (CID) fragmentation of these phthalides was investigated and elucidated. Phthalides primarily underwent two ESI CID pathways: side-chain cleavage with losses of alkenes and ring-opening with elimination of H₂O followed by losses of CO. Direct neutral loss of CO was not observed. Sodium adduct ions demonstrated completely different CID pathways.

Key words: *Rhizoma Chuanxiong*; Ligustilide; HPLC - MSⁿ; Supercritical fluid extraction; Collision-induced dissociation

常用中药川芎 (*Rhizoma Chuanxiong*) 为伞形科植物川芎 (*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 的根茎, 主产四川灌县、重庆等地, 具有行气活血、祛风止痛之功效。在中医临床上以川芎为主药的复方制剂, 大量用于临床治疗头痛、冠心病等症^[1]。它同时也是卫生部公布的可直接用于保健食品的物品之一。有时还被用做烹饪中的调味品。

至今已有 30 多种川芎化学成分被分离和鉴定, 它们主要包括含氮化合物、酚酸类化合物、以及内酯 (苯酞) 类化合物^[1-4]。其中含氮化合物有川芎嗪 (四甲基吡嗪)、三甲胺、腺嘌呤、腺苷、胆碱、尿嘧啶等; 酚酸类化合物有阿魏酸、瑟丹酸、香草醛、咖啡酸、棕榈酸、大黄酚、松柏醇阿魏酸酯等; 内酯 (苯酞) 类化合物主要为藁本内酯、3-丁基苯酞、3-丁烯基苯酞、新蛇床内酯、洋川芎内酯 A 至 Q、

收稿日期: 2006 - 04 - 26; 修回日期: 2006 - 07 - 12

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (5000565)

作者简介: 滕久委 (1962 -), 男, 湖南怀化人, 博士, Tel: 020 - 37656307, E-mail: jt2000w@yahoo.com

苯酐二聚物 (如 riligustilide, levistolide A) 等。

常用的川芎化学成分分析方法为 GC - MS^[4-6]。有研究表明^[7], 因为中川芎主要成分藁本内酯 (ligustilide)、洋川芎内酯 (senkyunolide)、3-丁烯基苯酐 (3-butyphthalide) 等在高温或光照下不稳定, GC 的高温检测条件对川芎的定量测定有不利影响。近年来液相色谱联用技术在川芎的检测中得到广泛应用, 已报道的方法包括 HPLC/UV^[7], HPLC - NMR^[8], 以及 HPLC - MS^[9-10]。至今未见以多级质谱 (MSⁿ) 研究川芎的报道。

鉴于川芎的化学成分复杂, 例如, 含十几种结构相近具有苯酐内酯母核结构的化合物, 并且不易获得它们的标准物或参照物, 本文采用液相色谱 - 电喷雾离子阱多级质谱联用技术, 鉴定了以超临界 CO₂ 流体萃取法 (SFE) 提取的川芎挥发油的主要成分。并且对苯酐内酯类化合物的碰撞裂解 (CD) 的途径和机理进行了研究。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Agilent 1100 系列 LC/MSD XCT 液相色谱离子阱质谱联用仪, 配有 G1312A 二元泵、G1313A 自动进样器、G1315A 二极管阵列检测器 (DAD)。HA 48 型超临界萃取装置 (南通市华安超临界萃取有限公司)。

甲醇为色谱纯, 德国 E. Merck 产品; 无水乙醇 (分析纯, 广东光华化学厂); 其它试剂均为分析纯。川芎购自四川都江堰, 经有关专家鉴定核实。各批川芎均保留标本。

1.2 超临界 CO₂ 流体萃取 (SFE)

将川芎原料粉碎成 350 ~ 800 μm, 取 12 kg 装入超临界萃取釜, 萃取釜上装有精馏柱, 用一定量 95% 的食用乙醇做夹带剂, 调节萃取温度为 40 ~ 60 °C, 萃取压力为 20 ~ 35 MPa, CO₂ 流量为 200 ~ 300 kg/h, 萃取时间为 1.5 ~ 5 h; 调节分离温度为 45 ~ 60 °C, 分离压力为 8 ~ 15 MPa, 川芎中有效成分溶解于 CO₂ 中, 通过减压阀, 川芎油解析于分离釜中。产品从分离釜中放出, 经离心分离抛光、除水, 为红棕色或浅红棕色澄清透明的油状物, 充氮包装。避光冷藏。

1.3 实验条件

色谱分离在 Agilent ECL IPSE XDB C₁₈ 色谱柱 (4.6 × 150 mm, 5 μm) 上进行。

流动相 A 为水 (含 0.25% 乙酸), 流动相 B 为甲醇 (含 0.25% 乙酸)。梯度洗脱程序: 0 ~ 1 min 70% B; 1 ~ 21 min 70% ~ 85% B; 21 ~ 23 min 85% ~ 100% B; 23 ~ 26 min 100% B; 26 ~ 31 min 70% B 平衡色谱柱, 26 min 停止采集数据。流速 0.50 mL/min。DAD 在 190 ~ 400 nm 范围同时监测。

质谱条件: 电喷雾电离, 正离子模式, 质量监控范围 m/z 100 ~ 800, 干燥气为氮气 (N₂), 温度 350 °C, 流速 10 L/min, 雾化压力为 3.4 × 10⁵ Pa, 碎裂电压为 1.0 V。川芎挥发油以 50% 甲醇稀释 10 000 倍, 约 4 °C 保存。进样量为 10 μL。

2 结果与讨论

图 1 为样品的 LC - MS 总离子流色谱图。实验结果显示, 川芎提取物几乎不含极性组分, 在 50% 有机相以前不出峰。为了节省分析时间, 梯度洗脱从 70% 有机相开始。主要组分在 15.8、19.5 和 20.2 min 出峰, 它们的相对峰面积之和大于 80%。

川芎提取物 10 个主要成分的 ESIMS 数据列于表 1 中。表 2 为它们相应的碰撞裂解多级质谱 (MSⁿ) 数据。组分 3 和 9 因为不能确定的相对分子质量或假定的相对分子质量与已知川芎成分不符而未被鉴定。表 2 的 MSⁿ 数据进一步验证了表 1 的鉴定结果。本方法不能区分组分 1 立体异构体洋川芎内酯 H 和 I。伞形科植物中自然存在的苯酐二聚体有 riligustilide、levistolide A 等, 另外, 藁本内酯在高

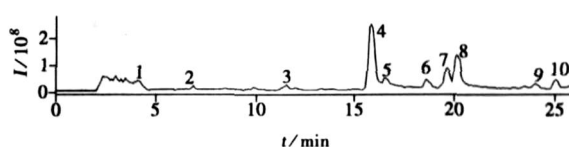


图 1 川芎超临界 CO₂ 流体萃取提取物的 LC - MS 总离子流色谱图

Fig. 1 TIC chromatogram of Rhizoma Chuanxiong extract

浓度长期保存时经光或热诱导也容易生成相对分子质量均为 380 的聚合物^[7]。这些同分异构体的 CDMS² 和 MS³ 非常相似, 因此也不能确定组分 9 的准确结构。对 E 和 Z 藁本内酯及其同分异构体 3-丁基苯酐的鉴定参考了它们文献报道的含量和出峰次序。图 2 给出了已鉴定出的川芎提取物主要成分的结构式。

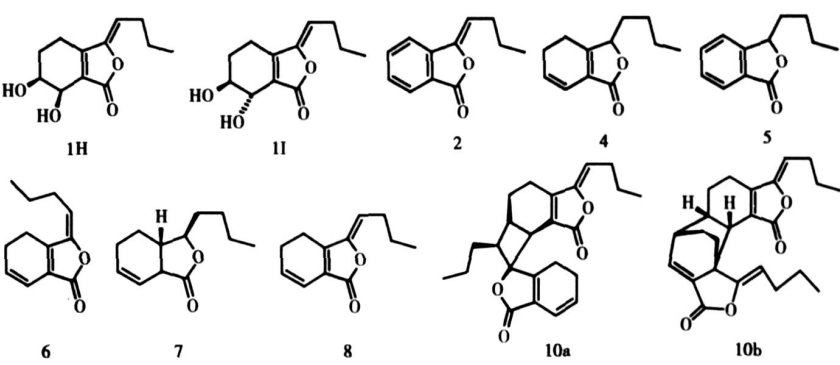


图 2 川芎提取物的主要成分

Fig. 2 Structures of main constituents in *Rhizoma Chuanxiong* extract
1H. senkyunolide H; 1I senkyunolide I; 2 3-butylenephthalide; 4 senkyunolide A;
5 3-butyphthalide; 6 E-ligustilide; 7. neocnidilide; 8. Z-ligustilide; 10. ligustilide
dimers a riligustilide; b levistolide A

表 1 川芎提取物主要成分的质谱数据及分析结果

Table 1 LC-MS data of <i>Rhizoma Chuanxiong</i> extract and identifications of its constituents									
Peak	<i>I_R</i> /%	<i>t_R</i> /min	MS <i>m/z</i>				Other ions	Results	
			[<i>M</i> + <i>H</i>] ⁺	[<i>M</i> + <i>Na</i>] ⁺	[2 <i>M</i> + <i>Na</i>] ⁺				
1	~3	4.2	224.8 (weak)	246.9	470.9	206.9 (<i>M</i> + <i>H</i> - <i>H</i> ₂ O)		Senkyunolide H / I (洋川芎内酯 H / I)	
2	<0.2	6.9	188.9	211.0	-	228.9 (<i>M</i> + <i>Na</i> + <i>H</i> ₂ O)		3-Butylenephthalide (3-丁烯基苯酐)	
3	<0.2	11.6	162.9	184.9	378.8	130.9, 279.0		Uncertainty	
4	45.0	15.8	192.9	214.9	406.9	146.9 (<i>M</i> - <i>H</i> ₂ O - CO + <i>H</i>), 384.5 (<i>M</i> ₂ + <i>H</i>)		Senkyunolide A (洋川芎内酯 A)	
5	6.6	16.5	191.0	213.1	-			3-Butyphthalide (3-丁基苯酐)	
6	4.6	18.6	190.9	212.9	-			E-Ligustilide (E-藁本内酯)	
7	11.5	19.5	194.9	216.9	411.0	148.9, 177.0 (<i>M</i> + <i>H</i> - <i>H</i> ₂ O)		Neocnidilide (新蛇床内酯)	
8	24.5	20.2	190.9	212.9	403.1			Z-Ligustilide (Z-藁本内酯)	
9	<0.2	24.1				279.1, 319.1, 437		Uncertainty	
10	~3	25.1	381.0	-	-	190.9 (<i>M</i> /2 + <i>H</i>), 398.1 (<i>M</i> + <i>H</i> ₂ O + <i>H</i>)		Ligustilide dimers (苯酐二聚体)	

表 2 川芎提取物主要成分的碰撞裂解多级质谱数据及分析

Table 2 Tandem MS ⁿ data of main constituents in <i>Rhizoma Chuanxiong</i> extract									
Peak	Compound	Parent ion		MS ² <i>m/z</i>			MS ³		
							Parent ion	Daughter ions <i>m/z</i>	
1	Senkyunolide H / I	207	133, 165 (- C ₃ H ₆), 179 (- C ₂ H ₄), 189 (- H ₂ O)				189	105, 117, 161, 171	
2	3-Butylenephthalide	189	143 (- C ₄ H ₈), 161 (- C ₂ H ₄), 171 (- H ₂ O)				161	105, 119, 133, 143	
4	Senkyunolide A	193	105, 137 (- C ₄ H ₈), 147 (- H ₂ O - CO), 175 (- H ₂ O)				147	105, 119	
5	3-Butyphthalide	191	105, 145, 147, 173				173	105, 117, 145	
6	E-Ligustilide	191	147, 173				147	105, 117, 119	
7	Neocnidilide	195	149 (- H ₂ O - CO), 159, 177 (- H ₂ O)				149	105, 107, 121	
8	Z-Ligustilide	191	105, 107, 117, 135 (- C ₄ H ₈), 145 (- H ₂ O - CO), 149 (- C ₃ H ₆), 155 (C), 163 (- C ₂ H ₄), 173 (- H ₂ O)				173	105, 117, 131, 145, 155	
10	Ligustilide dimers	381	191				191	105, 145, 155, 163, 173	

Lin 等研究一组用于医药的内酯以及它们水解产生的相应羧酸的 ESI 碰撞裂解^[9]。他们的结果显示, 在 ESI 正离子模式下内酯碰撞裂解时主要是脱羧 (CO), 不能脱水 (H₂O), 大多数内酯也没有中性丢失质量 46 (H₂O + CO)。而相应羧酸的行为恰好相反, 脱水 (H₂O) 和丢失质量 46 (H₂O + CO), 但不单独脱羧 (CO)。表 2 中数据显示川芎的主要成分藁本内酯 (ligustilide)、洋川芎内酯 A (senkyunolide A)、新蛇床内酯 (neocnidilide) 等苯酐内酯的碰撞裂解的两个主要途径为: 侧链断裂脱烯 (C_nH_{2n}) 和开环脱水再脱羧 (H₂O + CO)。藁本内酯等的中性丢失质量 28 应该是脱乙烯 (C₂H₄)。否则不能解释结构非常相似的洋川芎内酯和新蛇床内酯没有 - 28 碎裂。图 3 给出了 Z-藁本内酯的碰撞裂解途径。其它的苯酐内酯的碰撞裂解途径应该非常相近。图 3 中所示的 *m/z* 105 离子是这类苯酐内酯裂解时共有的丰度相当

高的一个特征离子, 它的结构非常稳定。藁本内酯碰撞裂解中一个让人困惑的现象是其准分子离子的 -36 碎裂, 产生相当强的 m/z 155 $[M - 36 + H]^+$ 。它的脱水产物 $[M - H_2O + H]^+$ m/z 173 的进一步碎裂也能失去 18 而产生这个离子。这一过程似乎是丢失两个水, 但却很难从结构上解释。这个问题的解决有待更深入的研究。本研究中也观察到了天然产物 ESIMS 常见的加合离子。川芎的主要成分的加钠离子 $[M + Na]^+$ 和 $[2M + Na]^+$, 与准分子离子 $[M + H]^+$ 的丰度相近, 但它们的碰撞裂解规律有很大的不同。加钠离子 $[M + Na]^+$ 的裂解很难控制, 碰撞能量小时没有碎裂离子, 甚至产生进一步的加合离子; 碰撞能量大时却又观察不到任何离子。而 $[2M + Na]^+$ 裂解很有规律, 只生成 $[M + Na]^+$ 。藁本内酯二聚物裂解生成唯一的 m/z 191 离子, 它的 MS³ 与藁本内酯的 MS² 非常吻合。

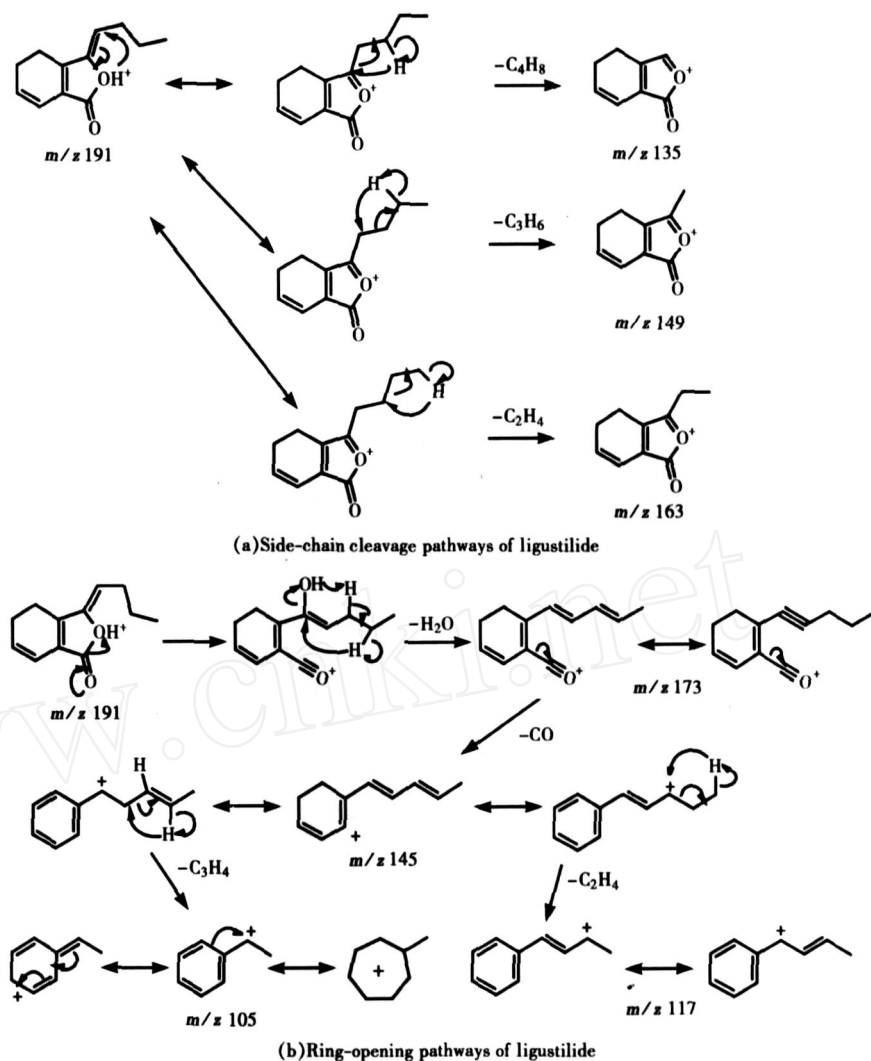


图 3 Z-藁本内酯的碰撞裂解途径

Fig. 3 Proposed ESICD pathways of Z-ligustilide

a 侧链断裂脱烯 (side-chain cleavage); b 开环脱水再脱羰 (ring-opening)

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 30 - 31.
- [2] KOBAYASHI M, ITOHASHI H. Studies on the constituents of umbelliferae plants. Structures of three new ligustilide derivatives from Ligusticum wallichii [J]. Chem Pharm Bull, 1987, 35(12): 4789 - 4792.
- [3] 吴广通, 石力夫, 胡晋红, 等. 超临界流体萃取法测定川芎中藁本内酯含量的研究 [J]. 药学学报, 1998, 33(6): 457 - 460.
- [4] 张达磊, 李桂生. 川芎挥发油的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(7): 664 - 666.
- [5] 原永芳, 周 践, 郑晓梅, 等. 超临界流体 CO₂ 萃取川芎挥发油化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35(2): 84 - 87.
- [6] 丁明玉, 马帅武, 刘德麟. 川芎和当归挥发油成分的比较研究 [J]. 生命科学仪器, 2005, 3(3): 38 - 41.
- [7] YAN R, LI S L, CHUNG H S, et al. Simultaneous quantification of 12 bioactive components of Ligusticum chuanxiong Hort. by high-performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 37(1): 87 - 95.
- [8] ZSCHOCKE S, KLABER I, BAUER R, et al. HPLC - coupled spectroscopic techniques (UV, MS, NMR) for the structure elucidation of phthalides in Ligusticum chuanxiong [J]. Mol Divers, 2005, 9(1 - 3): 33 - 39.
- [9] 孔 亮, 于志远, 邹汉法, 等. 高效液相色谱与质谱联用分析测定川芎中有效成分阿魏酸与藁本内酯 [J]. 分析化学, 2000, 28(2): 186 - 189.
- [10] 李松林, 林 鸽, 钟凯声, 等. 应用 HPLC - DAD - MS 联用技术研究中药川芎指纹图谱 [J]. 药学学报, 2004, 39(8): 621 - 626.
- [11] YIL, BANDU M L, DESA R E H. Identifying lactone hydrolysis in pharmaceuticals: A tool for metabolite structural characterization [J]. Anal Chem, 2005, 77(20): 6655 - 6663.