

高效液相色谱-质谱联用技术在中药鉴定中的应用

金蕊, 王宝庆, 金哲雄

(哈尔滨商业大学药学院 哈尔滨 150076)

摘要 中药鉴定学是一门传统而古老的学问,是随着中医理论的建立和发展,中药鉴定学已成为一门系统而完善的学科。近年,国家制定了中药现代化发展规划。为了保证中药的质量,各种现代的鉴定法越来越多地在中药鉴定中被应用。利用高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)联用技术,将HPLC对复杂样品的高分离能力与MS的高选择性、高灵敏度以及能够提供分子量与结构信息的优点结合起来,可对中药质量进行比较全面的评价。本文就HPLC-MS联用技术近年来在中药材和中药制剂指纹图谱研究中的应用作一综述。

关键词 高效液相色谱-质谱联用; 中药; 鉴定

1 HPLC-MS 联用技术的发展历史

高效液相液质联用(HPLC/MS)是指高效液相液相色谱与质谱串联的技术。HPLC是目前分离复杂体系最为有效的分析工具,由于其仪器自动化、普及化程度愈来愈高,已成为中药分析最常用的仪器之一。但目前中药分析中运用的HPLC仪器绝大多数与UV或DAD检测器相联接,对于单个色谱峰仅能提供保留时间及紫外图谱等信号,而对未知成分所能提供的结构信息相当有限。MS是一种高灵敏度的检测器,且不同化合物的特征性强,可用于部分解析未知化合物的结构。中草药是一个非常复杂的化学体系,其中含有大量的次生代谢产物,其结构复杂,性质相似,有的化合物还不稳定。HPLC/MS将HPLC的高分离效能与MS的强大结构测定功能组合起来,为中药化学成分的快速分析提供了一个重要的新技术^[1-2]。

HPLC-MS主要由HPLC仪、接口(HPLC与MS之间的连接装置)、质量分析器、真空系统和计算机数据处理系统组成^[3]。混合样品通过液相色谱系统进样,由色谱柱分离。从色谱仪流出的被分离组分依次通过接口进入MS仪的离子源处并被离子化,然后离子被聚焦于质量分析器中,根据质荷比而分离,分离后的离子信号被转变为电信号,传送至计算机数据处理系统,根据MS峰的强度和位置对样品的成分和结构进行分析。目前常用的HPLC-MS联用仪具有两大分类系统,一种是从MS的离子源角度来划分,包括电喷雾离子(ESI)、大气压化学电离(APCI)和基质辅助激光解吸离子化(MALDI)等;另一种是从MS的质量分析器角度来划分,包括四级杆质谱仪(Q-MS)、离子阱质谱仪(IT-MS)、飞行时间

质谱仪(TOF-MS)、傅立叶变换质谱仪(FT-MS)^[4]。

2 HPLC-MS 联用技术在中药鉴定中的应用

2.1 中药化学成分分析

中药中的化学成分往往种类众多、结构复杂,相当一部分成分稳定性差,采用常规的分离鉴定技术难度较大。采用HPLC-MS联用技术进行中药化学成分分析,可以同时得到化合物的保留时间、在线紫外光谱、分子量及特征结构碎片等丰富的信息,具有高效快速和高灵敏度的特点,只需对样品进行简单预处理或衍生化,尤其适用于含量少、不宜分离得到或在分离过程中容易发生变化或损失的成分,因此在中药化学成分分析中得到广泛应用。

余静等^[5]采用HPLC-紫外可见分光光度(UV)-MS联用技术分别对刺五加 *Acanthopanax senticosus*(Ru-pr et Maxim) Harms药材水溶性和脂溶性成分进行指纹图谱研究,刺五加乙醇提取液所含化合物主要为苷类及部分有机酸,乙酸乙酯提取液中主要成分为苷元、有机酸类和少量苷类。MS检测器对于UV检测器是较好的补充,可以提供更多的化合物信息,从而为刺五加药材及其制剂的鉴别提供更加全面、可靠的依据。张尊建等^[6]采用HPLC-UV-MS联用技术对忍冬 *Lonicera japonica* Thunb和山银花 *Lonicera confusa* DC药材进行指纹图谱研究,得到分离度和重现性均较好的忍冬和山银花药材HPLC-UV及HPLC-MS指纹图谱,分别对忍冬指纹图谱中8个色谱峰和山银花图谱中5个色谱峰进行了初步定性,并比较了2种药材指纹图谱的差异。王源园等^[7]采用HPLC-UV-MS联用技术构建牛膝 *Achyranthes biden-*

项目基金: 哈尔滨商业大学青年骨干教师科研创新项目资助。

tata BI 药材的指纹图谱, 标示了 4 个共有峰, 并借助 HPLC-MS 联用技术对其主要色谱峰进行了初步归属。Zhao L 等^[9]采用液相色谱(LC)-MS 联用技术测定 10 批豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L 样品, 鉴定共有峰和特征峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积, 标示了 12 个共有峰, 为豆科植物补骨脂全面质量控制提供了参考。韩凤梅等^[9]研究山麦冬(*Liriope Spicata*)甲醇提取物中的物质组成情况, 建立了山麦冬 HPLC-ESI-MS 特征指纹图谱, 其中山麦冬甲醇提取物色谱图中有 17 个共有峰的重现性与精密度的 RSD < 5%, 可用于山麦冬的品质评价与品种鉴别。李松林等^[10]应用 HPLC- 二极管阵列检测器(DAD)-MS 联用技术测定四川《中药材生产质量管理规范》(GAP)示范基地 3 个公司的 9 个川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort 样品, 鉴定其共有峰和特征峰, 指定参照峰, 计算共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果, 9 个样品的色谱指纹图谱共有 21 个共有峰, 色谱图分为 4 个区; 所有样品中 21 个共有峰的相对保留时间稳定(RSD = 1%), 同一公司同一年采收的样品 13 个主要共有峰(归一化法峰面积 = 1%)的相对峰面积稳定; 而不同公司同一年采收的样品 13 个主要共有峰的相对峰面积差异非常显著($P < 0.001$), 为科学评价和有效控制其内在质量提供了可靠方法。

2.2 中药质量标准研究

目前中药质量控制主要是对一些主要成分或特征性成分进行定性鉴别及含量测定。但大量研究表明, 中药的药效并非是某几个“指标成分”或“主要成分”在起作用, 而是多成分共同作用的结果。因此, 对中药进行更为“全面”的成分分析是中药质量控制研究的必然趋势, 中药指纹图谱技术即是基于此观点而兴起的一种半定量分析技术。然而, 目前开展的指纹图谱研究大多数采用 HPLC/UV 分析方法, 很难对其中的大多数指纹峰进行指认, 导致指纹图谱难以与药物的活性直接联系起来, 亦难以用于指导制剂工艺的优化。HPLC/MS 技术则可以提供未知色谱峰丰富的结构信息, 据此推导其可能的化学结构, 从而很好地解决这一问题。张志华、王瑀等人^[11]采用 HPLC-MS 技术对丹参注射液进行了化学指纹图谱及代谢指纹图谱的研究^[7]通过选择性离子检测及提取主要色谱峰的质谱图, 并参考文献报道及对照品对照, 在丹参注射液的化学指纹图谱中指认了 12 个成分, 在大鼠静脉注射丹参注射液后血浆 HPLC/MS 代谢指纹图谱中指认了 10 个成分。在很多 HPLC/UV 分析捉襟见肘的情况下, 如检测成分紫外吸收弱, 或不能与其它成分达到基线分离, LC/MS 均

可显示出其独特的优越性, 甚至可用于中药复方的定量分析。叶敏等人^[12]建立的蟾酥药材 HPLC/MS 定性定量分析方法即是一个很好的实例, 可显著提高蟾酥药材及相关制剂的质量控制水平, 从蟾酥药材中共鉴定了 35 个蟾毒内酯类成分, 其中 4 个成分为首次发现。其实验方法不仅可以快速、灵敏地分析蟾毒内酯类成分, 还能够对蟾酥药材及相关制剂进行有效的质量控制。

2.3 中药代谢研究

HPLC-MS 联用技术在分析中药代谢产物时, 由于其选择性强、灵敏度高且可以获得复杂混合物中单一成分的质谱图, 有利于中药、中药药物代谢产物和内源性化合物的分离和鉴定。HPLC-MS 联用技术能够直接分析溶液样品, 特别适合分析复杂介质中强极性、难挥发或热不稳定的化合物, 在中药代谢产物研究中得到广泛应用。

邢杰^[13]等采用液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱测定大鼠尿样中黄芩苷及其异构体的化学结构以及其排泄情况。根据代谢物的多级质谱和紫外吸收光谱数据推测, 两种给药途径均检测到原形药黄芩苷及其异构体黄芩素 6-O-葡萄糖苷酸。孙江浩^[14]等采用 HPLC-ESI-MS 研究何首乌中二苯乙烯苷在小鼠体内的代谢产物时发现, 二苯乙烯苷在体内的代谢物为葡萄糖醛酸结合物。杜玉^[15]等采用高效液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中汉黄芩素浓度, 针对黄酮类化合物在生物体内多与葡萄糖醛酸结合, 消除半衰期较长的特点, 灵敏度提高, 使血浆中的汉黄芩素最低定量浓度为 $0.25\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

2.4 中药药物动力学研究

中药药物的有效性和安全性与药物及其代谢物在体液和组织中的浓度有关, 药物动力学研究要求对生物样本中的微量乃至痕量成分进行定量分析。而目前药物研制日趋低剂量, 使常规的分离检测技术难以满足复杂介质中痕量成分准确定量的要求。采用 HPLC-MS 联用技术进行药物动力学研究, 具有高灵敏度和高专属性特点, 不仅简化工作过程, 减少样品制备和色谱分离的时间, 而且能够同时测定样品中复方制剂的多组分浓度, 达到常规分析中的高样品通量。

杨汉煜等^[16]应用 HPLC-MS 法测定人血浆中伪麻黄碱浓度, 以 SRM 扫描方式, 以准分子离子 $m/z 166$ 作为母离子, 利用生成的主要碎片离子 $m/z 147$ 进行定量分析, 血浆中的内源性物质不干扰待测物的测定, 其定量下限可达 $5\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, 具有高度的专属性和灵敏度。符旭东^[17]等利用 HPLC-MS 法, 测定 Beagle 狗血浆中石杉碱甲, 线性范围为 $0.1 \sim 12\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, 最低定量浓度为 $0.1\text{ng} \cdot \mu\text{ml}^{-1}$, 可以检测到 Beagle 狗静注和口服 100g 石杉碱甲后 12h 的血

药浓度。Daniel L. Gustafson 等^[18]利用 LC-MS 法, 研究从欧州红豆杉 *Taxus baccata* 提取出的多烯紫杉醇在人体内发生转运和转化的药代动力学规律。

3 结语

综上所述, HPLC-MS 联用技术已在中药化学成分分析、中药质量控制、中药代谢产物鉴定和中药药物动力学研究等方面广泛应用。HPLC-MS 联用技术解决了传统液相检测器灵敏度和选择性不够的缺点, 提供了可靠、精确的相对分子质量及结构信息, 简化了试验步骤, 节省了样品准备时间和分析时间, 特别是适合亲水性强、热不稳定化合物及生物大分子的分离分析, 有着广泛的应用前景。

参考文献

- [1] Cai Z, Lee FSC, Wang XR, Yu WJ. A capsule review of recent studies on the application of mass spectrometry in the analysis of Chinese medicinal herbs. *J. Mass Spectrom.* 2002, 37: 1013~1024. A 2000, 880: 203~232.
- [2] 姜艳艳, 刘斌, 石任兵. 高效液相色谱-质谱联用技术在天然产物分离鉴定中的应用[J]. *药品评价*, 2005, 2(1): 11.
- [3] 刘样东, 梁琼麟, 罗国安, 等. 液质联用在医药领域中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(1): 110.
- [4] 孙毓庆主编. 仪器分析[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 366. 指纹图谱研究[J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(2): 148.
- [5] 余静, 李茜, 沈文斌, 等. 刺五加 HPLC-UV-MS 指纹图谱研究[J]. *中国药科大学学报*, 2003, 34(2): 148.
- [6] 张尊建, 余静, 杨春华, 等. 忍冬、山银花 HPLC-UV-MS 指纹图谱研究[J]. *中成药*, 2003, 25(11): 863.
- [7] 王源园, 张尊建, 王兴旺, 等. 牛膝的 HPLC-UV-MS 指纹图谱研究[J]. *中药材*, 2003, 26(11): 787.
- [8] Zhao L, Huang C, Shan Z, et al. Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC-MS[J]. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2005, 821(1): 67.
- [9] 韩凤梅, 李紫, 蔡敏, 等. 山麦冬的 HPLC-ESI-MS 特征指纹图谱研究[J]. *中草药*, 2005, 36(9): 1395.
- [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.
- [11] Zhang JL, Cui M, He Y, et al. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC-UV and HPLC-MS methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 36: 1029~1035.
- [12] Ye M, Guo D. Analysis of Bufadienolides in the Chinese Drug ChanSu by High-Performance Liquid Chromatography/Diode Array Detection/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19: 1881~1892.
- [13] 邢杰, 陈笑艳, 张淑秋, 等. 液相色谱-电喷雾离子阱质谱法分析大鼠尿样中的黄芩苷及其异构体[J]. *质谱学报*, 2004, 25(3): 129-133.
- [14] 孙江浩, 张兰桐, 王春英, 等. 液-质联用法测定小鼠体内二苯乙烯苷代谢物[J]. *药学学报*, 2003, 38(12): 968-970.
- [15] 杜玥, 陈笑艳, 杨汉煜, 等. 液相色谱串联质谱法测定大鼠血浆中的汉黄芩素[J]. *药学学报*, 2002, 37(5): 362-366.
- [16] 杨汉煜, 陈笑艳, 徐海燕, 等. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆中的伪麻黄碱浓度[J]. *沈阳药科大学学报*, 2001, 18(2): 116-119.
- [17] 符旭东, 平其能, 高永良, 等. 高效液相色谱-质谱-质谱联用法测定 Beagle 狗血浆中石杉碱甲[J]. *中国药科大学学报*, 2004, 35(3): 235-238.
- [18] Daniel L. Gustafson, Michael E. Long, Joseph A. Zirrolli. Analysis of docetaxel pharmacokinetics in humans with the inclusion of later sampling time-points afforded by the use of a sensitive tandem LC/MS assay[J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2003, 52(8): 159-166.

HPLC-MS Technology in the Application of the Traditional Chinese Medicine Appraisal

Rui Jin, Baoqing Wang, Zhexiong Jin

Abstract The traditional Chinese medicine appraisal study is a tradition, but the ancient knowledge, is along with the Chinese medicine theory establishment and the development, the traditional Chinese medicine appraisal study has become the discipline which a system consummates. Recent years, the country has worked out the traditional Chinese medicine modernization development project. In order to guarantee that the traditional Chinese medicine the quality, each kind of modern appraisal law more and more is applied in the traditional Chinese medicine appraisal. Uses highly effective liquid chromatography-mass spectrum (HPLC-MS) to unite with the technology, HPLC to the complex sample's high separating power and the MS high selectivity, the high sensitivity as well as can provide the molecular weight and the structure information merit unifies, may carry on quite comprehensive appraisal to the traditional Chinese medicine quality. This article united on HPLC-MS with the technology in recent years should serve as a summary in the traditional Chinese medicine and in the traditional Chinese medicine preparation fingerprint atlas research.

Key words The highly effective liquid chromatography-mass spectrum association uses; The traditional Chinese medicine; Appraises