

丹皮药材的高效液相色谱-质谱/质谱研究

梁琼麟¹ 温华珍^{1,2} 王玉莉¹ 罗国安^{*1,2} 王义明¹

¹ (清华大学化学系, 北京 100084) ² (江西中医学院药理学系, 南昌 330006)

摘 要 采用高效液相色谱-质谱/质谱建立了丹皮药材的指纹图谱方法。丹皮药材中的主要成分得到较好分离, 指纹峰重现性好, 通过多维联用技术获得各指纹峰的保留时间、分子量及结构信息, 推测出 15 个指纹峰的可能组成。结果表明: 所建立的丹皮指纹图谱信息量丰富, 对丹皮药材的化学表征及质量评价有重要的参考价值。

关键词 丹皮, 高效液相色谱-质谱/质谱, 指纹图谱

1 引言

丹皮是毛茛科植物牡丹 (*Paeonia suffruticosa* Andr.) 的干燥根皮, 产于安徽、山东、甘肃、四川等地, 其味辛、苦, 性凉, 有清热、凉血、和血、消瘀的功效, 可治疗热入血分、吐血、阑尾炎初起及跌打损伤等^[1,2]。现代药理研究表明, 丹皮不仅用作镇痛剂、解痉药、抗炎剂^[3], 而且常配合不同的中药制剂用于治疗血液循环障碍性疾病^[4]。丹皮药效成分有丹皮酚 (paeonol)、牡丹酚原苷 (paeonolide)、牡丹酚苷 (paeonoside)、芍药苷 (paeoniflorin)、羟基芍药苷 (oxypaeoniflorin)、苯甲酰芍药苷 (benzoylpaeoniflorin) 和五没食子酸葡萄糖苷 (1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl-beta-D-glucose PGG)^[5]。吴少华^[6]等从丹皮中分离出白桦脂酸 (betulinic acid)、白桦脂醇 (betulin)、齐墩果酸 (oleanolic acid)、6-羟基香豆素 (6-hydroxycoumarin) 和没食子酸 (gallic acid) 等。

指纹图谱是一种对中药整体化学特征进行表征的重要方法^[7,8], 而液相色谱与串联质谱联用技术 (LC/MS/MS) 能够提供的丰富化学信息, 已广泛应用于中药色谱指纹图谱指纹峰的结构鉴定^[9~11]。本实验研究了丹皮药材的 HPLC 指纹图谱, 并通过 LC/MS/MS 鉴别了主要指纹峰的化学结构。其中有一部分成分在芍药属的其他植物中有报道^[12]而尚未见于丹皮药材的报道, 对进一步开展丹皮药材的化学研究有重要的参考价值。

2 实验部分

2.1 仪器、试剂与材料

液相色谱-质谱联用仪为 Agilent 1100 HPLC/MSD Trap (包括 G1312A 二元泵; G13158 二极管阵列检测器; VL 型离子阱质谱仪)。色谱纯乙腈 (Fisher 公司), 分析纯甲酸, 自制二次蒸馏水。丹皮酚、没食子酸、芍药苷对照品 (中国药品生物制品检定所)。安徽、四川、山东和山西丹皮药材; 丹皮饮片 (北京市同仁堂药店)。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Altima C₁₈ 分析柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 0.4% 甲酸水溶液 (A 相)-乙腈 (B 相); 梯度洗脱, 时间程序如下: 0 min → 50 min → 60 min, 乙腈 (B 相) 0% → 40% → 85%; 检测波长: 254 nm, 流速: 1.0 mL/min, 进样量 20 μL; 柱温为室温。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子化源, 分别以正、负离子模式检测; 雾化气压力: 0.175 MPa, 干燥气流速: 8.0 L/min; 干燥气温度: 350 °C; 毛细管电压: 3500 V; 采用全扫描方式, 扫描范围 *m/z* 100 ~ 1500。

2.2.3 样品处理 将不同产地的丹皮药材粉碎后过 0.45 mm 孔径筛, 分别精密称取药材粉末 2.5 g, 加入 250 mL 二次水, 回流 60 min 后, 过滤, 滤液用 250 mL 的容量瓶定容; 进样前用 0.2 μm 滤膜过滤。

2004-12-30 收稿; 2005-06-21 接受

本文系国家自然科学基金重点项目 (No. 9020905) 和科技部“十五”攻关项目 (No. 2002BA90629-3) 资助

称取丹皮酚、没食子酸、芍药苷对照品,分别溶于一定量的甲醇得到 100 mg/L 的对照品溶液,用于化合物确认。

3 结果与讨论

3.1 丹皮药材指纹图谱

在上述实验条件下,获取丹皮药材的液相指纹图谱(如图 1)和质谱总离子流图(如图 2),根据不同产地的丹皮药材确定了 15 个共有峰。

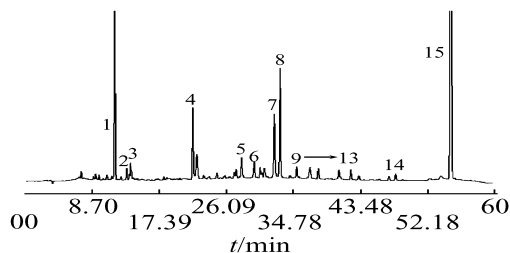


图 1 丹皮水提液在波长 254 nm 的高效液相色谱图

Fig 1 The chromatograph of the aqueous extraction of *Moutan Cortex* at 254 nm

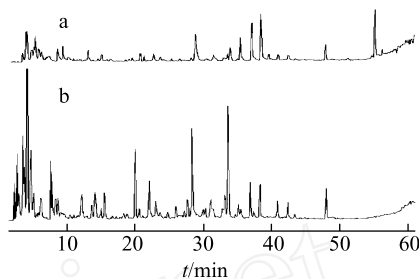


图 2 丹皮水提液在正模式 (a) 和负模式 (b) 的总离子流图

Fig 2 The mass spectrometry-total ion current chromatograph in positive (a) and negative (b) ion mode for the aqueous extraction of *Moutan Cortex*

3.2 指纹图谱方法学考察

平行配制 5 份供试品溶液,在上述色谱条件下测定。以指纹峰的保留时间和峰面积值为指标分别计算 RSD,考察方法的重复性;另取同一供试品溶液,连续进样 5 次和分别在 0、4、8、16 和 24 h 进样,以指纹峰的保留时间和峰面积值为指标计算 RSD,考察方法的精密度和样品稳定性,结果见表 1。保留时间的 RSD 小于 2%,峰面积的 RSD 均小于 5%,表明该分析方法稳定可靠。

表 1 指纹图谱方法学稳定性考察

Table 1 The evaluation of stability of the method

峰号 Peak	保留时间 Retention time (min)	峰面积 Area of peak	保留时间 RSD (% , n = 5) Retention time			峰面积 RSD (% , n = 5) Area of peak		
			重复性 Repeatability	稳定性 Stability	精密度 Precision	重复性 Repeatability	稳定性 Stability	精密度 Precision
1	11.131	2167	1.097	1.808	1.106	2.840	1.477	1.414
2	12.820	101.21	0.674	1.153	0.682	3.675	2.432	2.417
3	13.296	159.27	0.685	1.427	0.785	3.539	2.685	1.507
4	21.193	759.44	0.889	1.553	1.071	2.744	2.512	1.192
5	27.675	268.77	0.550	0.896	0.637	1.436	3.151	3.721
6	28.943	162.16	0.960	1.672	1.213	4.518	1.222	1.116
7	31.491	765.56	0.907	1.667	1.210	2.586	2.318	2.579
8	32.328	1193.7	0.773	1.426	1.023	3.530	3.144	3.158
9	34.648	154.43	0.546	1.021	0.743	3.540	3.028	3.284
10	36.183	243.68	0.807	1.330	1.015	4.747	2.748	3.660
11	37.230	128.62	0.736	1.344	0.989	3.235	2.457	1.667
12	40.259	125.29	0.343	0.676	0.481	4.485	0.892	0.777
13	41.829	123.61	0.308	0.604	0.422	4.122	3.359	1.801
14	47.740	76.795	0.157	0.343	0.202	2.976	3.079	1.576
15	54.624	6951.1	0.427	0.661	0.508	4.961	2.410	1.011

3.3 LC/MS/MS 定性分析

用 LC/MS/MS 对丹皮指纹图谱的特征峰进行定性时,首先通过 (-) ESI/MS 和 (+) ESI/MS 的一级扫描,检测到各指纹峰在不同模式下的分子离子峰,确定可能分子量,然后通过正、负离子的二级质谱对指纹峰进行结构分析,并且与文献报道的成分结构进行对照,推测出色谱峰的可能组成,如表 2 所示。

表 2 各指纹峰的一级质谱和二级质谱鉴别
Table 2 MS and MS/MS spectra for the identification of fingerprint peaks

色谱峰 编号 Peak No	保留时间 Retention time t_R (min)	正离子模式 In positive mode (m/z)		负离子模式 In negative mode (m/z)		分子量 M. W.	化合物推测 Compound presumed
		准分子离子 M. I	二级碎片 MS/MS fragmentation	准分子离子 M. I	二级碎片 MS/MS fragmentation		
1	11. 13	171	127 153	169	125	170	没食子酸 Gallic acid ^a
2	12. 82	512	315	493	313 169 241 283 331 403	494	Paeonidanin
3	13. 30	482	447 465	463	403 373 343 301 445	464	3, 4, 5-Trihydroxybenzoic acid; 3-O-Apio furanosyl- (1→6)-glucopyranoside
4	21. 19	514	179 335 317	495	465 137 327 333	496	羟基芍药苷 Oxy-paeoniflorin
5	27. 68	498	179 301 319 463 151	525	449 479	480	芍药苷 Paeoniflorin ^a
6	28. 94	771	305 431 601 233	787	635 465 617	788	1, 2, 3, 6-Tetra- O-galloyl-beta-d-glucose
7	31. 49	650	315 301 331 279 493 475 631 457 510 614	631	613 491 271 509 479	632	Paeoniflorin; 6'-O-(3, 4, 5-trihydroxybenzoyl)
8	32. 33	771	601 431 305 279 261 413 449 233	469	769 393 169 317 617	940	五没食子酰葡萄糖苷 PGG
9	34. 65	634	317 179 283 443 616	615	585 431 281 239 477 495 447 179 597	616	Paeoniflorin; 4'-Hydroxy, 6'-O-(4-hydroxybenzoyl)
10	36. 18	-	-	647	647 525 601 259 423	648	Paeoniflorin; 4'-Hydroxy, 6'-O-(3, 4, 5-trihydroxybenzoyl)
11	37. 23	618	179 283 301 265 461 478 583	599	551 569 581 447 477 429 281 431 403	600	Paeoniflorin, 6'-O-(4-hydroxybenzoyl)
12	40. 26	618	317 267 179 427 582	599	569 477 403 447 333	600	Paeoniflorin 4'-Hydroxy, 6'-benzoyl
13	41. 83	648	317 297 179 612	629	599 477 333	630	Paeoniflorin; 4'-Hydroxy, 6'-O-(4-methoxybenzoyl)
14	47. 74	602	179 301 267 427 566	629	553 583 431	584	苯甲酰芍药苷 Benzoyl-paeoniflorin
15	54. 62	167	149 121 125	-	-	166	丹皮酚 Paeonol ^a

a 推断结果已通过相应的对照品确认 (confirmed with corresponding reference standards)

通过分析发现丹皮药材中主要为丹皮酚类成分、没食子酸类成分和芍药苷类成分。在负离子模式下,丹皮指纹峰的化学成分准分子离子峰多为 $[M - H]^-$ 峰,如 1、2、3、4、6、7、9、10、11、12 及 13 号峰;少数为 $[M + HCOO]^-$ 峰,如 5 和 14 号峰,并且还出现双电荷离子,如 8 号峰的准分子离子峰。正离子模式下的准分子离子峰多为 $[M + NH_4]^+$,如 2、3、4、5、7、9、11、12、13 及 14 号峰,少数为 $[M + H]^+$ 峰,如 1 和 15 号峰。另外,由于正离子模式中,化合物更容易丢失中性小分子,6 号峰的母离子 771 是碎片峰 $[M + H - H_2O]^+$,8 号峰的母离子 771 是碎片峰 $[M + H - 170]^+$,其中丢失的 170 是没食子酸。

丹皮酚是丹皮药材中含量最大的成分,分子量为 166,由于流动相呈酸性,而丹皮酚酸性很弱,质子不易离去,因此在负离子模式下检测信号极弱。正离子模式下的准分子离子峰 167 为 $[M + H]^+$ 峰,二级碎片 149、121 和 125 分别为 $[M + H - H_2O]^+$ 、 $[M + H - H_2O - CO]^+$ 和 $[M + H - CH_2CO]^+$ 的峰。

1、3、6、8 号峰为没食子酸类成分,这类成分由于没食子酸结构上的羧基和羟基,所以容易丢失小分子 CO_2 、 H_2O 和 CO ,如正离子模式下二级碎片 127、153 和 125 峰分别是 $[M + H - CO_2]^+$ 、 $[M + H - H_2O]^+$ 和 $[M + H - H_2O - CO]^+$ 。而 1、2、3、4、6 五没食子酸葡萄糖苷 (PGG) 的准分子离子是一个典型的双电荷离子,负离子的准分子离子峰为 469,在一级扫描中同时存在 939 的峰,而且负离子 469 的二级碎片中出现比 469 大的碎片 769,可以推测 469 可能为多电荷离子或者是 939 的碎片,通过分子量计算,推断 469 为双电荷离子 $[M - 2H]^-$,该峰的分子量为 940;正离子的准分子离子峰 771 为 $[M + H - 170]^+$,进一步确证了对分子量的推断。同时正离子模式和负离子模式产生的二级碎片中,几乎都是丢失中性小分子 18、170、152 和 125 的峰,这些丢失的中性小分子也正好是没食子酸分子和没

食子酸的特征碎片离子; PGG 为 5 个没食子酸和一个葡萄糖脱去 5 分子水缩合而成。

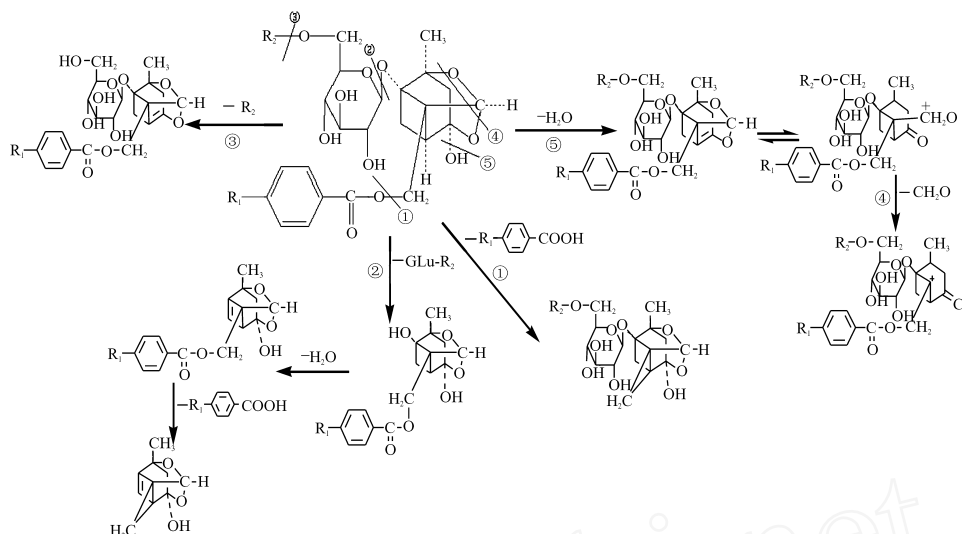


图 3 芍药苷类成分的可能裂解途径

Fig 3 The possible fragmentation pathway of Paeoniflorin

2、4、5、6、9、10、11、12、13 及 14 号峰为芍药苷类成分,这类物质可能的裂解位置如图 3 所示。与苯甲酸相连的酯基,与糖相连的糖苷键,苷元上的缩酮基、甲氧基和羰基,以及羟基;通常容易丢失中性碎片苯甲酸(分子量 122)、葡萄糖分子(分子量 162)、CO(分子量 28)、H₂O(分子量 18)和甲醛 CH₂O(分子量 30);在这些碎片离子中,以碎片 179 和丢失的中性小分子 140(苯甲酸 + H₂O)最为重要。因为在其他芍药苷类成分的推断中,它们出现的频率较高。如 4 号峰的正离子模式中碎片存在 179,说明可能和芍药苷有相同母核,同时存在与芍药苷类似的一系列峰,和芍药苷相应的碎片分子量相差 16,可能相差一个羟基,从碎片上可以确定羟基在苯甲酰,即为羟基芍药苷;另外从负离子模式的质谱特征也可以证实该推断。同理对其他指纹峰的化学成分进行推断,指纹峰中芍药苷类成分推测出 10 个成分。

References

- Huang Taikang(黄泰康). *Handbook of Constituent and Pharmacology of Usual Chinese Traditional Herbal Drugs*(常用中药成分与药理手册). Beijing(北京): Chinese Medical Science and Technology Press(中国医药科技出版社), 1998: 1040 ~ 1045
- A Grand Dictional of Traditional Chinese Medicine(中药大辞典). Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Press(上海科学技术出版社), 1998: 1127 ~ 1130
- Shon Y H, Nan K S. *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, 90: 415 ~ 419
- Harada M, Yamahita A. *Yakugaku Zasshi*, 1969, 89: 1205 ~ 1211
- Choi B M, Kim H J, Oh G S. *Neuroscience Letters*, 2002, 328: 185 ~ 189
- Wu Shaohua(吴少华), Ma Yunbao(马云保), Luo Xiaodong(罗晓东). *Chinese Traditional and Herbal Drugs*(中草药), 2002, 33(8): 679 ~ 680
- Cao Jin(曹进), Xu Yan(徐燕), Zhang Yongzhi(张永知), Wang Yiming(王义明), Luo Guoan(罗国安). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 2004, 32(7): 875 ~ 878
- Cao Jin(曹进), Xu Yan(徐燕), Zhang Yongzhi(张永知), Wang Yiming(王义明), Luo Guoan(罗国安). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), 2004, 32(4): 469 ~ 473
- Qu J, Liang Q L, Luo G, Wang Y M. *Anal. Chem.*, 2004, 76(8): 2239 ~ 2247
- Hu P, Liang Q L, Luo G A, Zhao Z Z, Jiang Z H. *Chem. Pharm. Bull.*, 2005, 53(6): 677 ~ 683
- Qu J, Wang Y M, Luo G A. *J. Chromatogr. A*, 2001, 928(2): 155 ~ 162
- Ivanka N K, Mario F S. *Phytochemistry*, 1998, 48(3): 511 ~ 514

Investigation of Cortex Moutan by Liquid Chromatography Coupling with Tandem Mass Spectrometry

Liang Qiongli¹, Wen Huazhen^{1,2}, Wang Yuli¹, Luo Guoan^{*1,2}, Wang Yiming¹

¹ (Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084)

² (Department of Pharmacy, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006)

Abstract A high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric (HPLC/MS/MS) method was developed to establish the fingerprint of Cortex Moutan, a Chinese medicinal herb. The major constituents among Cortex Moutan from different origins were separated well by HPLC and the fingerprint had a good repeatability. Fifteen peaks in the fingerprint were identified by LC/MS/MS according to their retention time, molecular weight and fragmentation information. The result showed that the presented fingerprint of Cortex Moutan contained plenty of information, which was quite valuable for the quality evaluation as well as chemical characterization of this Chinese herb.

Keywords Cortex Moutan, high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric, fingerprint

(Received 30 December 2004; accepted 21 June 2005)

第一届全国生命分析化学学术报告与研讨会通知

随着生命科学研究的迅速发展,生命科学与其他学科的交叉已成为新的科学发展趋势。以方法和手段为研究要素的分析化学,早就与生物科学研究产生交叉。生命分析化学在为生物科学研究做出贡献的同时,也不断面临生命科学提出的种种挑战。随着功能基因组学、结构基因组学、蛋白组学、代谢组学、糖组学等重大研究计划的不断提出,以及化学生物学、系统生物学等新型学科的诞生,生命分析化学正面临新的更严峻的挑战。无疑,这将有力地推动我国生命分析化学的发展,以及与分析化学相关的科学研究,对国家安全、经济发展和国民生活质量都具有重大的战略意义和现实价值。

由国家自然科学基金委员会化学科学部主办,中国科学院化学研究所、北京大学和清华大学承办的“第一届全国生命分析化学学术报告与研讨会”定于2006年3月24~26日在北京召开。会议旨在形成自由研讨的氛围,集小智为大智,集零散为整体,由弱以图强,以期形成我国生命分析化学研究的战略思路,壮大我国生命分析化学研究群体,开创我国生命分析化学科学研究的新局面。

我们欢迎所有相关研究领域的学者、学生以及仪器厂商踊跃报名参加会议,特别欢迎分析化学以外学科的科学工作者,比如生物化学、分子生物学、药理学、基础医学、临床医学、遗传学、法医学、生化工程、环境生物学、海关检验检疫以及理论、计算机学者莅临研讨。有意参加研讨会的各方代表请尽快将报名回执和论文摘要一并通过Email邮件方式直接发送给会议联系人。

本次会议除有关学术报告外,还将设立5~8个生命分析化学重大学术问题主题讨论会,欢迎代表们提出您认为有价值的讨论主题或建议。拟议讨论的主题:1. 生物样品的制备,2. 组学研究中的关键分析技术与突破,3. 空间生物分析,4. 临床、医药与法学分析新方法,5. 单细胞分析与分子检测,6. 化学生物学方法学,7. 生物图像分析,8. 仪器技术。

论文摘要格式:论文摘要篇幅限A4纸1页,版心为15×23 cm。题目用三号黑体;作者、单位、地址以及摘要正文用五号宋体;图标、表题及参考文献用六号宋体。

报名回执和论文摘要提交截止日期:2005年12月31日(以收到邮件为准)。

参会费用:注册费500元/人,研究生240元/人(凭研究生证),会议食宿自理。

联系人:苏磊:Email: sulei@iccas.ac.cn, 电话: 010-62646525

齐莉:Email: qili@iccas.ac.cn, 电话: 010-62618240

毛兰群:Email地址: lqmao@iccas.ac.cn, 电话: 010-62646525

地址: 北京中关村北一街2号,中国科学院化学研究所,100080