

# HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> 联用技术表征 大川芎方效应组分中主要化学成分

沈岚<sup>1,2\*</sup>, 林晓<sup>1,2</sup>, 梁爽<sup>1</sup>, 洪燕龙<sup>1</sup>, 袁莹<sup>1</sup>, 冯怡<sup>1,2</sup>, 徐德生<sup>3</sup>, 阮克锋<sup>1</sup>

(1. 上海中医药大学中药现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203;

2. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 3. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200021)

**[摘要]** 目的: 采用 HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> 联用技术研究大川芎方效应组分的主要化学成分, 为其体内物质基础研究及质量标准的完善奠定基础。方法: 通过建立大川芎方效应组分指纹图谱, 将其复杂的化学成分表征出来, 并采用 HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> 联用技术对各化学成分进行结构鉴定和推测。结果: 推断出川芎效应组分中的 3 个化学成分和天麻效应组分中的 8 个化学成分。结论: 大川芎方效应组分的化学成分研究有助于阐明其效应物质基础并完善其质量标准。

**[关键词]** 大川芎方; 效应组分; 液质联用; 化学成分

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)07-0128-07

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20120215.1250.001 **[网络出版时间]** 2012-02-15 12:50

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120215.1250.001.html>

## Characterization on Central Ingredients of Active Components in Dachuanxiong Fang based on HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>

SHEN Lan<sup>1,2\*</sup>, LIN Xiao<sup>1,2</sup>, LIANG Shuang<sup>1</sup>, HONG Yan-long<sup>1</sup>, YUAN Ying<sup>1</sup>,  
FENG Yi<sup>1,2</sup>, XU De-sheng<sup>3</sup>, RUAN Ke-feng<sup>1</sup>

(1. Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Department of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,

Shanghai 201203, China; 3. Affiliated Shuguang Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate central ingredients of active components in Dachuanxiong fang (DF) by HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>, so that the quality of DF as well as its preparations can be effectively and systemically controlled and the substance basis of DF can be explored. **Method:** HPLC fingerprint spectrum of the active parts of Dachuanxiong fang was established. HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> was developed for identification of the active parts of Dachuanxiong fang. **Result:** Three components of the active parts of chuanxiong and 8 components of the active parts of tianma were identified. **Conclusion:** Research on central ingredients of active components in Dachuanxiong fang is favorable to the clarification of its active substance basis and perfection of quality standard.

**[Key words]** Dachuanxiong fang; active components; HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>; ingredients

大川芎方源于金·刘完素《宣明论方》,由川芎、

天麻两味药组成,具有活血化瘀、平肝息风、通络止痛之功效,是临床治疗偏头痛的经典中药复方。偏头痛药效学研究包括药物对脑内神经递质 5-羟色胺(5-HT)的影响。大川芎方物质基础研究<sup>[1]</sup>表明,天麻醇提取部位和川芎醇提取部位抗血小板释放 5-HT 作用和阻滞血管内皮细胞钙通道的作用均最强,说明其是大川芎方治疗作用的重要物质基础。

**[收稿日期]** 20111110(003)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年科学基金项目(30801548);上海市教育委员会科研创新项目(12ZZ124, 11zz111);上海市自然科学基金(11ZR1434500);上海市教委重点学科资助(J50302)

**[通讯作者]** \* 沈岚, 博士, Tel: 021-51322211, E-mail: alansusu@sina.com

本课题组在此基础上对大川芎方治疗偏头痛的物质基础进行了提取、纯化研究<sup>[2-3]</sup>,得到了大川芎方效应组分,即川芎效应组分-天麻效应组分。配比研究表明,川芎效应组分-天麻效应组分(4:3)对冰醋酸引起的扭体反应有明显的抑制作用,即对偏头痛的治疗发挥镇痛作用;还可以显著提高硝酸甘油模型大鼠血浆中 5-HT 的含量,即对头痛发作期颅外扩张的血管起收缩作用,从而缓解头痛症状。

然而大川芎方的药效物质基础尚不明确,效应组分中的可控指标较少,为进一步阐明其作用机制及建立完善的质量标准带来了困难。以往制剂仅以阿魏酸与天麻素作为其质量评价的指标成分,而本课题组研究显示,阿魏酸在川芎药材中含量仅为 1.23%,在富集后的川芎效应组分中含量提高至 5.82%;天麻素在天麻药材中含量仅为 5.67%,在富集后的天麻效应组分中含量提高至 8.45%,可见无论在药材中还是在效应组分中,两者含量均相对较低,很难全面地反映出效应组分的质量,并进行有效的控制。除此之外,有效成分川芎嗪<sup>[4]</sup>在川芎药材中含量仅为 0.1%,在大川芎方制剂中很难被检测到;另一有效成分藁本内酯<sup>[5]</sup>为挥发性成分,其结构极其不稳定,两者也均不宜为大川芎方及其相关制剂中的指标性成分。

因此,阐明大川芎方效应组分的物质基础,确定除阿魏酸、天麻素外更多的有效成分,从而更有效的控制大川芎方效应组分及其制剂的质量,建立完善的质量标准,已成为研究的当务之急。本文建立了大川芎方效应组分的指纹图谱,将其复杂的化学成分表征出来,并采用 HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> 联用技术对各化学成分进行分析,为其体内物质基础研究及质量标准的完善奠定基础。

## 1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),LCQ deca 型质谱仪(美国 Finnigan 公司),FA 2104 N 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

阿魏酸对照品(批号 0773-9910)、天麻素对照品(批号 110807-200205)均购于中国药品生物制品检定所,川芎药材经本校生药教研室赵志礼教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎(产地四川,批号 060508,060605,060706,060805,060912,061026,061103,061215,070102,070203)、天麻药材为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* BL. 的干燥块茎(产地四川,批号 060810,060905,061012,060829,060910,060911,061221,070110,

070211,070302),均购于上海康桥饮片公司。甲醇、乙腈(Sigma 公司,色谱纯),冰醋酸(国药集团化学试剂有限公司,分析纯),95% 药用乙醇;高效液相用水为超纯水(自制)。

## 2 方法与结果

### 2.1 川芎效应组分指纹图谱的建立

**2.1.1 色谱条件** Kromasile-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,55 μm);流动相甲醇-0.5% 醋酸梯度洗脱,梯度程序见表 1,柱温 25 °C,流速 1 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 280 nm。

表 1 流动相梯度洗脱变化程序

t/min	流速/mL·min <sup>-1</sup>	甲醇/%	0.5% 冰醋酸/%
0	1.00	10.0	90.0
10.0	1.00	25.0	75.0
18.0	1.00	30.0	70.0
50.0	1.00	34.0	66.0
55.0	1.00	10.0	90.0

**2.1.2 供试品溶液的制备** 取川芎粗粉一定量,加 12 倍量 70% 乙醇,提取 2 次(2,1.5 h),滤过,合并滤液,减压回收乙醇,浓缩至 0.5 g·mL<sup>-1</sup>,5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,取上清液,上 HPD-100 大孔树脂,吸附流速 1 BV·h<sup>-1</sup>,蒸馏水洗至近无色后用 50% 乙醇洗脱 4 BV,收集醇洗脱液,用 50% 乙醇定容至 1.00 g·mL<sup>-1</sup>,作为川芎效应组分溶液。精密量取 1.00 g·mL<sup>-1</sup> 的川芎效应组分溶液 2.50 mL 于 10 mL 量瓶中,加 50% 乙醇稀释至刻度,摇匀后经 0.45 μm 水相微孔滤膜滤过,作为川芎效应组分 HPLC 供试品溶液和 LC-MS<sup>2</sup> 供试品溶液。

**2.1.3 对照品溶液的制备** 取阿魏酸对照品约 6 mg,精密称定,置 25 mL 量瓶中,用甲醇定容,作为供试品溶液,进样前经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

**2.1.4 参照物的选择** 保留时间为 29.6 min 的色谱峰是指纹图谱中峰面积较大、出峰时间适中且稳定的色谱峰,经与对照品对照确定为阿魏酸的吸收峰,故选择阿魏酸作为参照物。结果见图 1,2。

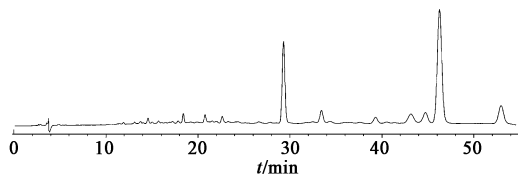


图 1 川芎效应组分 HPLC 指纹图谱

### 2.1.5 方法学考察

**2.1.5.1 精密度试验** 取同一批次川芎效应组分

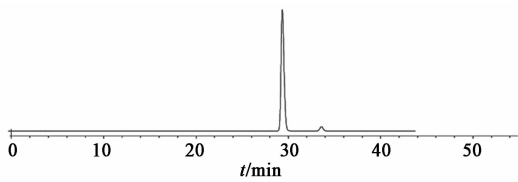


图 2 阿魏酸对照品 HPLC

溶液,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,连续进样 5 次,测定 HPLC 指纹图谱。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD < 5%,表明仪器精密密度良好。

**2.1.5.2 重现性试验** 取同一批次川芎效应组分溶液,按 2.1.2 项下方法平行制备 5 份供试品溶液,测定 HPLC 指纹图谱。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 5%,表明此方法重现性良好。

**2.1.5.3 稳定性试验** 取同一批次川芎效应组分溶液,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12 h 进样分析,测定 HPLC。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 5%,

表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

**2.1.6 指纹图谱的测定及结果** 按 2.1.2 项下方法制备 10 批川芎效应组分供试品溶液,测定 HPLC 色谱图,记录 55 min 的色谱图谱。结果见图 3。将 10 批样品的指纹图谱输入相似度软件计算相似度,结果表明:川芎效应组分的相似度均在 0.9 以上,结果见表 2。

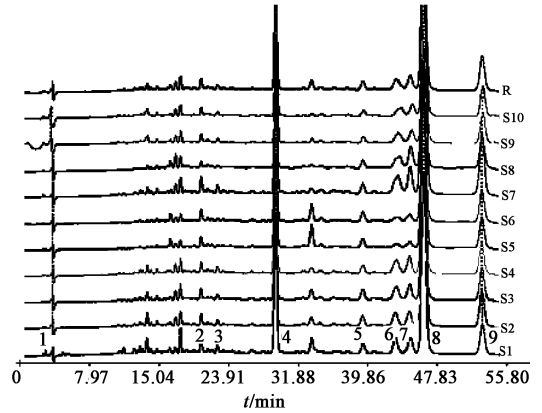


图 3 川芎效应组分 10 批样品指纹图谱

表 2 川芎效应组分 10 批样品指纹图谱相似度测定

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1	0.985	0.986	0.988	0.986	0.989	0.98	0.959	0.973	0.974
S2	0.985	1	0.999	0.998	0.991	0.987	0.994	0.988	0.989	0.99
S3	0.986	0.999	1	0.999	0.989	0.985	0.992	0.987	0.988	0.988
S4	0.988	0.998	0.999	1	0.988	0.986	0.993	0.985	0.988	0.988
S5	0.986	0.991	0.989	0.988	1	0.998	0.989	0.974	0.989	0.99
S6	0.989	0.987	0.985	0.986	0.998	1	0.987	0.966	0.986	0.987
S7	0.98	0.994	0.992	0.993	0.989	0.987	1	0.993	0.993	0.989
S8	0.959	0.988	0.987	0.985	0.974	0.966	0.993	1	0.985	0.979
S9	0.973	0.989	0.988	0.988	0.989	0.986	0.993	0.985	1	0.995
S10	0.974	0.990	0.988	0.988	0.99	0.987	0.989	0.979	0.995	1

**2.2 天麻效应组分指纹图谱的建立**

**2.2.1 色谱条件** Kromasile-C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 55 μm); 流动相乙腈-1% 醋酸梯度洗脱, 梯度程序见表 3, 柱温 25 °C, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 270 nm。

表 3 流动相梯度洗脱变化程序

t/min	流速/mL·min <sup>-1</sup>	乙腈/%	1% 冰醋酸/%
0.0	0.80	2.00	98.0
15.0	0.80	2.00	98.0
40.0	0.80	25.0	75.0

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取一定量天麻粗粉, 加 10 倍量 70% 乙醇, 提取 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤

液, 减压回收乙醇, 浓缩至相当于生药 0.5 g·mL<sup>-1</sup>, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液, 减压浓缩至相当于生药 4.0 g·mL<sup>-1</sup>, 加乙醇至醇含量 70%, 静置 24 h, 滤过, 加 40% NaOH 溶液调 pH 8.00, 静置 24 h, 滤过, 用 70% 乙醇溶液定容至 1.0 g·mL<sup>-1</sup>, 作为天麻效应组分溶液。精密量取天麻效应组分 1.0 g·mL<sup>-1</sup> 的溶液 2.00 mL 于 5, 25 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀后经 0.45 μm 水相微孔滤膜滤过, 作为天麻效应组分 HPLC 供试品溶液和 LC-MS<sup>2</sup> 供试品溶液。

**2.2.3 对照品溶液的制备** 取天麻素对照品约 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容, 作为

对照品溶液,进样前经 0.45 μm 微孔滤膜滤过。

**2.2.4 参照物的选择** 保留时间为 11.0 min 的色谱峰是图谱中峰面积最大、出峰时间适中且稳定的色谱峰,经对照品对照认定为天麻素的吸收峰,结果见图 4,5。故选择天麻素作为参照物。

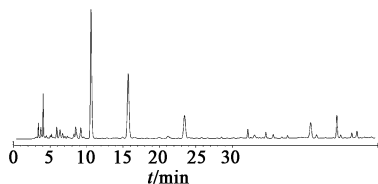


图 4 天麻效应组分指纹图谱

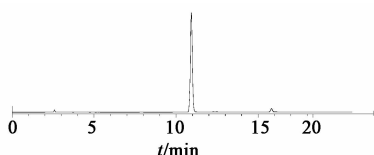


图 5 天麻素对照品 HPLC

## 2.2.5 方法学考察

**2.2.5.1 精密度试验** 取同一批次天麻效应组分溶液,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,连续进样 5 次,测定 HPLC 指纹图谱。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 5%,表明仪器精密度良好。

**2.2.5.2 重现性试验** 取同一批次天麻效应组分

溶液,按 2.2.2 项下方法平行制备 5 份供试品溶液,测定 HPLC 指纹图谱。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 5%,表明方法重现性良好。

**2.2.5.3 稳定性试验** 取同一批次天麻效应组分溶液,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别在 0, 2, 4, 8, 12 h 进样分析,测定 HPLC。结果显示,各共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD < 5%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

**2.2.6 指纹图谱的测定及结果** 制备 10 批天麻效应组分溶液,按 2.2.2 项下方法平行制备 10 份供试品溶液,测定 HPLC,记录 40 min 的色谱图谱,结果见图 6。将 10 批样品的指纹图谱输入相似度计算软件计算相似度,结果表明,天麻效应组分的相似度均在 0.9 以上,结果见表 4。

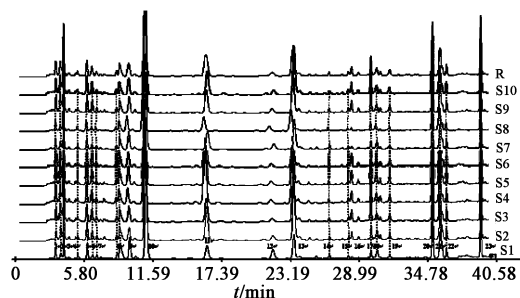


图 6 天麻效应组分 10 批样品指纹图谱

表 4 天麻效应组分 10 批样品指纹图谱相似度

批号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
S1	1	0.968	0.966	0.919	0.971	0.959	0.989	0.975	0.966	0.966
S2	0.968	1	0.992	0.975	0.995	0.993	0.99	0.973	0.992	0.991
S3	0.966	0.992	1	0.957	0.997	0.985	0.989	0.969	0.982	0.985
S4	0.919	0.975	0.957	1	0.965	0.985	0.953	0.938	0.958	0.957
S5	0.971	0.995	0.997	0.965	1	0.992	0.991	0.98	0.997	0.997
S6	0.959	0.993	0.985	0.985	0.992	1	0.982	0.976	0.986	0.985
S7	0.989	0.99	0.989	0.953	0.991	0.982	1	0.979	0.989	0.989
S8	0.975	0.973	0.969	0.938	0.98	0.976	0.979	1	0.968	0.969
S9	0.966	0.992	0.982	0.958	0.997	0.986	0.989	0.968	1	0.963
S10	0.966	0.991	0.985	0.957	0.997	0.985	0.989	0.969	0.963	1

## 3 采用液质联用技术推断大川芎方效应组分中的主要化学成分

### 3.1 川芎效应组分主要成分研究

**3.1.1 样品制备方法** 对照品溶液的配制:取阿魏酸对照品约 3 mg,精密称定,置 25 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度。川芎效应组分供试品溶液的配制见 2.1.2 项。

**3.1.2 分析方法** Kromasile-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 55 μm),流动相 甲醇-0.5% 醋酸梯度洗脱,

梯度程序见表 1 中“0 ~ 18 min”,柱温 25 °C,流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 280 nm。

质谱条件 ESI 源,源电压 4.00 kV,正离子检测,辅助气流速 5 arb,鞘气流速 60 arb,毛细管温度 275 °C,毛细管电压 3 V。采用全离子扫描方式,扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 000。MS<sup>n</sup> 碰撞能量 40%。

**3.1.3 结果** 取川芎效应组分供试品溶液,进行液质联用分析,所得 PDA 色谱图及总离子流图见图 7。

为了进一步确认川芎效应组分中各成分的化学

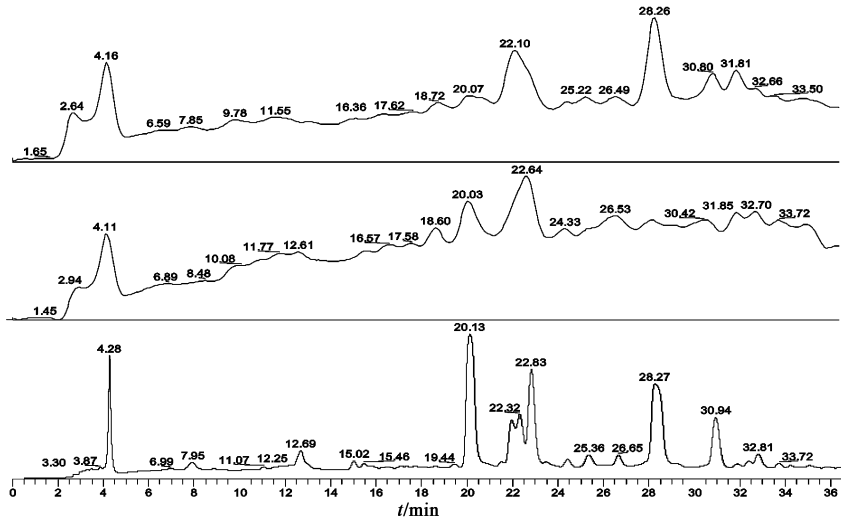


图 7 川芎效应组分 PDA 色谱图及总离子流

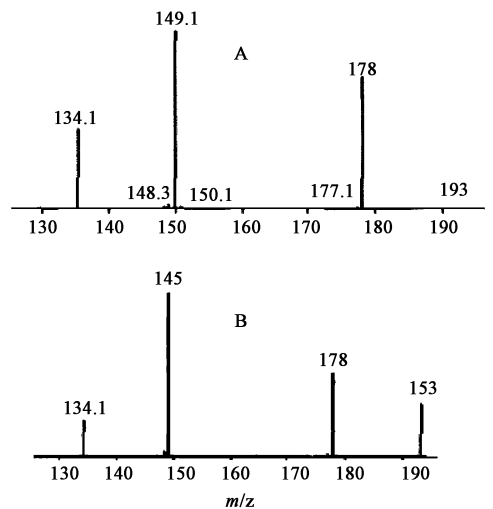
表 5 川芎效应组分各化学成分 HPLC-PDA-MS 数据及结果推测

peak	Uv RT/min	$\lambda_{max}/nm$	MS(M + H) <sup>+</sup>	MS(2M + Na) <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> (M + H)	鉴定或推断结果
1	20.1	235 S, 325 s	195		177	ferulic acid
2	22.8	230, 290, 330 s	517	105 5	354, 191	unknown constituents
3	25.3	280 s	571		409, 391	unknown constituents
4	26.7	230, 290, 330 s	517	105 5	354, 191	unknown constituents
5	28.2	280 s	225	471	247, 207, 180, 145	senkyunolide I
6	30.8	280 s	225	471	247, 207, 180, 145	senkyunolide H

结果,按 3.1.2 项下方法进行 HPLC-PDA-MS 分析,结果见表 5。

川芎的化学成分复杂,含有生物碱、有机酸类、内酯类等多种成分。其中很多化学成分具有良好的生物活性,如有关阿魏酸的研究表明其可以抑制血小板释放 5-HT 阻止颅内血管异常收缩,打断血管异常舒缩的恶性循环,达到治疗偏头痛的效果<sup>[6]</sup>,其质谱图谱见图 8。

川芎的活性组分之一川芎内酯类化合物具有明显的舒张血管、改善微循环、抑制血小板聚集、拮抗动脉粥样硬化的形成等作用<sup>[7]</sup>。通过质谱鉴定发现,川芎效应组分中主要含有内酯类成分,且表现出一定质谱特征。在质谱中,大多数化合物不仅存在  $[M + H]^+$  准分子离子峰,还存在  $[M + Na]^+$  为主的峰。如洋川芎内酯 H、I 的一级质谱中出现了  $m/z$  225  $[M + H]^+$ ,  $m/z$  247  $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  471  $[2M + Na]^+$  的离子峰。在二级质谱中主要表现脱一氧化碳,出现了  $m/z$  165  $[M + H - CO - CH_2]^+$ ,  $m/z$  179  $[M + H - CO]^+$  等碎片离子。22.8 min 的色谱峰的准分子离子峰为  $m/z$  517  $[M + H]^+$ , 一级质谱中  $m/z$  1 055  $[2M + Na]^+$  峰,  $m/z$  499  $[M + H - H_2O]^+$  峰,同



A. 阿魏酸对照品; B. 川芎效应组分

图 8 川芎效应组分中保留时间为 20 min 色谱峰的二级质谱时,其二级质谱显示  $m/z$  363, 191, 161 等为其他苯酐类化合物的质谱裂解规律特征峰,推测可能为苯酐二聚物的衍生物<sup>[8]</sup>。

### 3.2 天麻效应组分主要成分研究

3.2.1 样品制备方法 对照品溶液的配制:取天麻素对照品约 6 mg,精密称定,置 100 mL 棕色量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度。天麻效应组分供试

品溶液的配制见 2.2.2 项。

**3.2.2 分析方法** 色谱条件:Kromasile C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 55 μm), 流动相乙腈-1% 醋酸, 梯度程序见表 6, 柱温 25 °C, 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长 270 nm。

质谱条件 ESI 源, 源电压 4.00 kV, 正离子检测, 辅助气流速 5 arb, 鞘气流速 60 arb, 毛细管温度

275 °C, 毛细管电压 3 V。采用全离子扫描方式, 扫描范围  $m/z$  100 ~ 1 000。MS<sup>n</sup> 碰撞能量 40%。

**3.2.3 结果** 取天麻效应组分供试品溶液进行液质联用分析, 所得 PDA 色谱图及总离子流图见图 9。

为了进一步确认川芎效应组分中各成分的化学结果, 按 3.2.2 项下方法进行 HPLC-PDA-MS 分析, 结果见表 6。

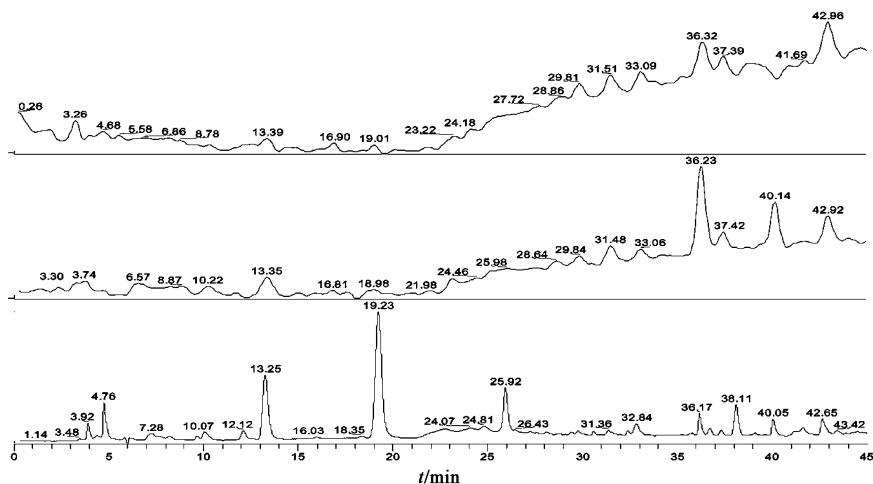


图 9 天麻效应组分 PDA 色谱图及总离子流

表 6 天麻效应组分各化学成分 HPLC-PDA-MS 数据及结果推测

peak	Uv RT/min	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\text{MS}[\text{M}-\text{H}]^-$	$\text{MS}[\text{M} + \text{NH}_4]^+$	$\text{MS}^2[\text{M}-\text{H}]^-$	鉴定或推断结果
1	13.2	220, 270 s	285		161, 123	gastrodin
2	32.8	236, 273 s	412	434	339, 308, 285, 233, 179, 162	s-(4-hydroxybenzyl)-glutathion
3	36.1	220, 270 s	995	746	459, 441, 423, 397, 369, 263, 173, 161	parishin
4	36.7	220, 270 s	727	746	459, 441, 423, 397, 369, 263, 173, 161	parishin C
5	37.4	220, 270 s	727	746	459, 441, 423, 397, 369, 263, 173, 161	parishin B
6	38.1	284 s	121	123	93	p-hydroxybenzaldehyde
7	40.1	220, 270 s	727	746	459, 441, 423, 397, 369, 263, 173, 161	parishin B
8	42.6	220, 270 s	487		441, 423, 397, 369, 299, 263, 173, 161	parishin

天麻为传统名贵中药, 文献报道其主要含有酚类成分, 还有少量的含氮化合物如核苷类和氨基酸类化合物<sup>[9]</sup>。通过质谱鉴定发现, 天麻效应组分中主要含有酚类成分, 且表现出一定的质谱特征, 见图 10。

酚类化合物的一级质谱特征: 正离子模式下, 酚类化合物则主要显现较强的加氨离子  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 。负离子模式下, 酚类多表现较强的  $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。

酚类化合物的二级质谱特征: 简单酚类化合物的质谱较简单, 主要表现为官能团酚羟基和羰基的特征断裂。例如: 对羟基苯甲醛的负离子二级质谱中主要的碎片离子为  $m/z$  95  $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^-$  出现酚羟基易脱一氧化碳的特征断裂; 天麻素作为对羟基苯甲醇的葡萄糖苷, 其负离子二级质谱中除了对羟基

苯甲醇的特征离子外, 主要表现苷键断裂产生的 2 个互补离子  $m/z$  123 和  $m/z$  161。

天麻素和柠檬酸的聚合物即巴利森苷类化合物, 相应的质谱较复杂, 不仅有聚合键(酯苷键)的断裂, 还有组成单体各自的特征断裂。例如: 由三分子天麻素和一分子柠檬酸聚合脱水形成的巴利森苷, 其负离子质谱中主要显现 2 个酯苷键的断裂, 表现为连续的失去天麻素残基(-268u) 得到碎片离子  $m/z$  727 和 459, 还有一系列离子  $m/z$  441, 423, 397, 379, 369, 来自于叔醇羟基的脱水和酯苷键水解后产生的游离羧基所表现的脱二氧化碳或邻二羧基的脱水。此外, 还有天麻素残基相关的离子  $m/z$  263, 161 和柠檬酸的特征离子  $m/z$  173, 129, 111<sup>[10]</sup>。

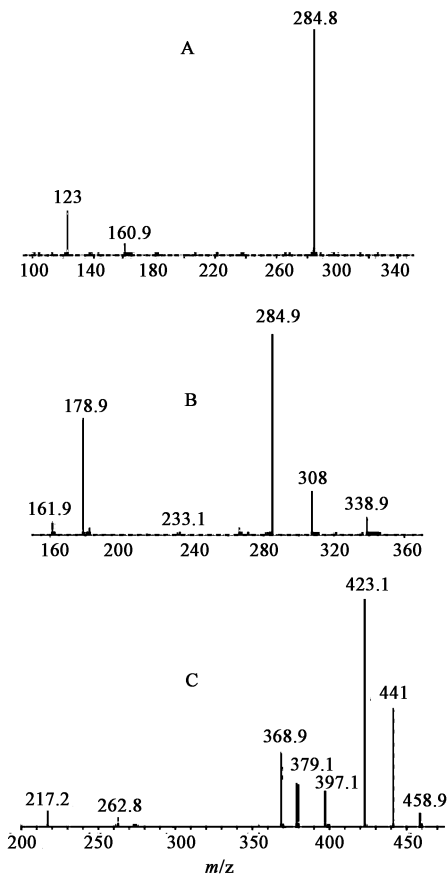


图 10 天麻效应组分中 gastrodin (A), s-(4-hydroxybenzyl)-glutathion (B), parishin B (C) 的二级质谱

#### 4 讨论

HPLC 具有分离复杂样品的功能,通过建立 HPLC 指纹图谱可以全面、有效地将中药复杂的化学成分表征出来,为各成分的分析奠定基础,同时图谱的特征性参数可以成为中药质量控制的参考指标。而 HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> 联用技术结合了液相色谱的强分析能力与质谱的高灵敏度和能提供相对分子质量的信息以及二级管阵列紫外检测提供的光谱信息,使复杂体系的同时分离、分析成为可能。本文采用比指纹信息更为准确、丰富的 HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> 联用技术确认指纹图谱所表征出的各化学成分,通过质谱及光谱分析,推断出川芎效应组分中的 3 个化学成分和天麻效应组分中的 8 个化学成分。

川芎效应组分的 HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> 数据表明:保留时间为 28.2, 30.8 min 的成分为同分异构体,经与质谱库数据对比确认为洋川芎内酯的同分异构体;保留时间 22.8, 26.7 min 的成分为同分异构体,但在文献中未见报道,由其 MS<sup>2</sup> 特征初步推断为苯酐二聚物的衍生物。本课题组近年来利用现代血清药物化学及脑脊液药物化学手段对大川芎方进行了系统的研究,确定了洋川芎内酯 I (senkyunolide I)

为其主要入血入脑成分,且此成分在硝酸甘油造模后,脑脊液中相应色谱峰的响应值明显增大,提示此成分在偏头痛发作时更易通过 BBB。在此基础上,进一步进行了洋川芎内酯 I 抗偏头痛作用的药效学实验及体内药代动力学研究,其结果初步证实,洋川芎内酯类化合物既是川芎脑靶向作用的物质基础,同时也是抗偏头痛的药效物质基础。因此,川芎效应组分中洋川芎内酯类物质的确认为大川芎方抗偏头痛的物质基础研究奠定了基础。

天麻效应组分的 HPLC-DAD-MS 数据表明:其主要成分为巴利森苷的同分异构体,因此表现出相似的光谱特征和质谱特征。虽然天麻效应组分 HPLC 图谱中保留时间为 19, 25 min 的色谱峰有较强的响应值,但在质谱图中相应保留时间色谱峰的丰度较低,几乎无法检测到。这可能是由于天麻所含化学成分多为结构较简单的对羟苄基衍生物,这类成分相对分子质量较小,与 HPLC-ESI 相比更适合采用 GC-EI-MS 进行分析。

#### [参考文献]

- [1] 王兴,王一涛,杨明. 大川芎方药代动力学研究[D]. 成都:成都中医药大学,2002.
- [2] 洪燕龙,冯怡,徐德生,等. 大川芎方治疗偏头痛效应组分的提取、纯化工艺研究[J]. 中药材,2007,30(6):721.
- [3] 郑琴,伍振峰,邱玲玲,等. 大川芎方中川芎提取纯化工艺及其镇静镇痛作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(15):6.
- [4] Li S, Wang Z, Fang, X, et al. ChemInform abstract: synthesis of z-ligustilide [J]. Chem Inform, 1993, 23:2909.
- [5] 罗永明,潘家佑,丁科平,等. 茶芎挥发油中抗惊有效成分的分离和鉴定[J]. 中草药,1996,27(8):456.
- [6] 肖少华. 川芎素的药理研究与应用进展[J]. 交通医学,1998,12(4):484.
- [7] 黄伟晖,宋纯清. 当归的化学与药理学研究进展[J]. 中国中药杂志,2001,21(3):147.
- [8] Lin L Z, He X G, Lian L Z, et al. Liquid chromatographic-electrosprap mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of Z-ligustilide [J]. J Chromatogr A, 1998, 810:71.
- [9] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草. 第 8 卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:716.
- [10] 王莉. 天麻化学物质基础及质量控制方法研究[D]. 大连:中国科学院化学物理研究所,2007.

[责任编辑 邹晓翠]