

基于 HPLC-DAD-MS 的当归补血汤化学成分分析

王 平^{1,2*}, 梁逸曾²

(1. 大连医科大学 辽宁 大连 116044; 2. 中南大学, 湖南 长沙 410083)

[摘要] 目的:分析中药复方当归补血汤的化学成分。方法:采用 HPLC-DAD-MS 方法分析。色谱柱为 Thermo Hypersil-Hypurity_{C₁₈} (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) 分析柱,柱温 40 °C。流动相为 H₂O-CH₃OH(梯度洗脱),流速为 0.2 mL · min⁻¹。二极管阵列扫描范围:200 ~ 370 nm。质谱采用大气压化学电离 (APCI+) 离子源,扫描范围:100 ~ 650 (m/z)。结果:通过与已有的文献报道的质谱、紫外光谱和保留行为比较可以初步定性 10 个化合物。结论:因为能够同时提供分子量、紫外光谱和保留行为,所以 LC-DAD-MS 是一个分析中药复方化学成分的有力工具。

[关键词] 当归补血汤;黄芪;当归;高效液相-二极管阵列-质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)02-0028-04

Chemical Composition Analysis of Dangguibuxue Decoction by HPLC-DAD-MS

WANG Ping^{1,2*}, LIANG Yi-zeng²

(1. Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Central South University, Changsha 410083, China)

[Abstract] **Objective:** To study chemical components of Dangguibuxue decoction. **Methods:** The compounds were separated on a Hypersil-Hypurity C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 5 μm) analytical column. The column temperature was set at 40 °C. Mobile phase consisted of methanol and water using a gradient elution. The flow rate was set at 0.2 mL · min⁻¹. UV spectra were obtained by scanning from 200 nm to 370 nm. The APCI-MS spectra were obtained in the positive ion mode scanning from m/z 100 to 650. **Results:** The peaks were identified by comparing their UV spectra, their molecular weights and their retention behaviors with data reported in the literature. The ten components seem to be tentatively identified. **Conclusions:** Because of providing UV and molecular mass as well as retention time, LC-DAD-MS is a powerful tool for the chemical analysis of Traditional Chinese Medicines.

[Key words] Dangguibuxue Decoction; Radix Astragali; Radix Angelicae Sinensis; HPLC-DAD-MS

当归补血汤由黄芪、当归组成,芪归用量 5:1。具有益气升血、扶正固本、托里排毒之功效。其中当归非挥发性的化学成分主要为^[1-2]:苯酞类,有机酸,多糖等。黄芪非挥发性的化学成分主要有^[3]:皂甙类、黄酮类、糖类和氨基酸类等。

目前,对于当归补血汤的化学成分研究主要是先分离纯化,获得不同极性部位后再分别进行指纹

图谱分析,如挥发油、异黄酮与阿魏酸、皂苷类部位^[4-6]。采用一种分析条件对多组分同时分析的研究鲜有报道。MS 可用于中药材中各种化合物的检测,均可产生较好的响应,同时,又可以通过 DAD 得到紫外信息,因此,HPLC-DAD-MS 适合于分析复杂的中药样品。本研究利用 HPLC-DAD-MS 研究中药复方当归补血汤的化学成分,现报道如下。

1 仪器与试剂

岛津 LCMS-2010 高效液相色谱-质谱联用仪。包括 2 台 LC-10ADvp 泵,FCV-10ALvp 四元低压梯度流路阀,DGU-14AM 在线真空脱气机,CTO-10Avp 柱温箱,7725i 进样阀 (Rheodyne, USA), SPD-

[收稿日期] 2009-07-10

[基金项目] 辽宁省教育厅科研计划项目(2008174)

[通讯作者] *王 平, Tel: (0411)86110391; E-mail: error_114@163.com

M10Avp 二极管阵列检测器, 质谱为 LCMS-2010 单级四极杆, 大气压化学电离离子源, 数据采集和处理由 LCMS solution2.02 软件完成。

乙醇为分析纯, 甲醇为光谱纯, 二次去离子蒸馏水。

当归是伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根, 由甘肃省岷县 GAP 实验园区提供, 自然晾干, 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. Var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根, 购于长沙中华国药局 (产地: 内蒙), 经湖南中医学院彭源贵教授鉴定。黄芪甲苷对照品 (纯度 >95.1%) 购于中国药品生物制品检验所。

2 方法与结果

2.1 色谱、二极管阵列、质谱测定条件

色谱柱为 Thermo Hypersil-Hypurity_{C₁₈} (5 μm, 150 mm × 2.1 mm), 柱温 40 °C。色谱洗脱条件为: 流动相组成为 A(H₂O), B(CH₃OH); 洗脱剂 B 在 0 ~ 20 min 为 20% ~ 55%, 在 20 ~ 50 min 为 55% ~ 90%, 在 50 ~ 80 min 为 90%, 在 80 ~ 85 min 为 90% ~ 20%。使用前流动相经 0.22 μm 滤膜过滤并超声脱气。流速为 0.2 mL · min⁻¹。

检测方式: Maxplot, 扫描范围: 200 ~ 370 nm。

大气压化学电离 (APCI) 离子源, 离子化模式: 正离子化模式; 全离子扫描 (SCAN), 扫描范围: 100 ~ 650 (m/z); 探针 (probe) 温度 250 °C。曲型脱溶剂装置 (CDL) 温度 250 °C; 加热块 (block) 温度 200 °C; 探针 (probe) 电压 4.5 kV; 检测电压 1.6 kV; Q-array 电压: 25 V; CDL: -50 V; RF: 150 V; 雾化气体流速 2.5 L。

2.2 供试品溶液的制备

将干燥的药材粉碎并过 40 目筛。称取当归 30 g 和黄芪 150 g, 用 70% 乙醇 (1.8 L, 10 倍量) 浸泡过夜, 超声提取 1 h, 滤过。滤液留用, 残渣加 70% 乙醇 (1.44 L, 8 倍量) 超声提取 40 min, 滤过, 两次滤液合并。在真空旋转蒸发器 (50 °C) 中浓缩制成浓度为 1.8 g (当归补血汤) mL⁻¹ 的口服液, 置 4 °C 冰箱中备用。

3 讨论

3.1 色谱和质谱条件的选择

在 LC-MS 分析中, 离子化模式的选择以基峰的强度为依据。为了确定离子化模式, 当归补血汤口服液分别在 ESI, APCI 不同接口下的正负离子模式下测定其质谱。在两种离

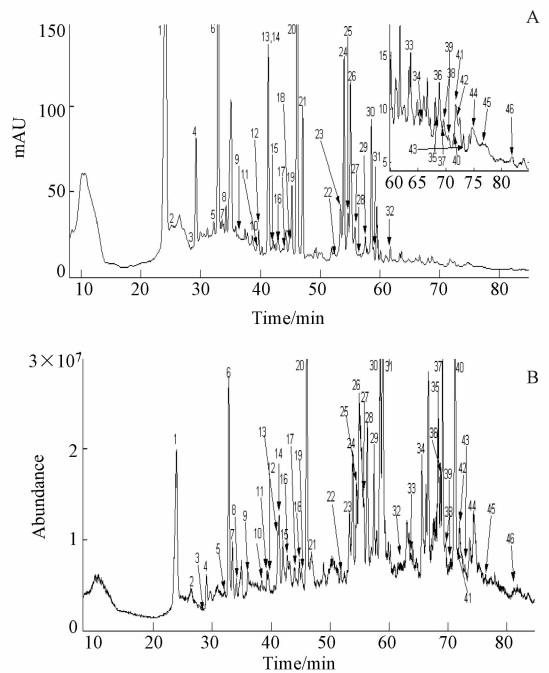


图 1 当归补血汤口服液的 LC-DAD 和 LC-MS 指纹图谱
A. LC-DAD(254 nm) 指纹图谱; B. LC-MS 指纹图谱

子化模式下, 正离子的基峰强度均大于负离子的, APCI 的离子化效率均高于 ESI 的。所以, 选择 APCI 正离子扫描模式来研究当归补血汤的成分。

在选择扫描范围时, 黄芪甲苷 (分子量, 784) 作为当归补血汤的主要活性成分之一被考察。首先, 选择质荷比 100 ~ 850 来检测黄芪甲苷的对照品。结果显示, 在该条件下, 它的基峰是 437。为了降低噪声, 扫描范围应该减小。根据文献报道, 在当归和黄芪的小分子中最大的质荷比是 551。因此, 选择了扫描范围为质荷比 100 ~ 650 来测定当归补血汤的化学成分。

基于峰型的对称性和峰的分离性, 色谱条件被反复优化。在实验中分别选用了甲醇/水和乙腈/水来试验, 前者得到了很好的分离。所以在本实验中, 选择甲醇/水作为流动相。因为当归补血汤包含了太多成分, 所以需要比较长的分析时间。

3.2 利用 LC-DAD-MS 分析当归补血汤的化学成分

目前分析中药复方的化学成分, 多先分离, 再检测。当归补血汤是包含了几百个化学成分的极其复杂的混合物, 包括当归的有机酸、苯酚类、多糖和黄芪的黄酮类、皂苷类、多糖类等等。对于一些化合物, 他们不具有或具有很弱的紫外吸收, 所以 DAD 检测器不适合检测这类物质。质谱检测器可以很好

的解决这一问题。它对中药的多种成分均能够检测,且有较好的响应。因此,利用 LC-DAD-MS 分析中药复方当归补血汤是一个可行的方法。

(B) 分别是 LC-DAD 和 LC-MS 的指纹图谱。仔细观察图 1, 可以发现在 60 ~ 75 min 区间, LC-MS 谱比 LC-DAD 的峰要多些。表 1 列出了 46 个主要组分的质谱、紫外光谱和保留时间。

图 1 显示了当归补血汤指纹图谱。图 1 (A) 和

表 1 当归补血汤 HPLC-DAD-MS 指纹图谱中各色谱峰的保留时间、质谱和紫外光谱数据

峰号	保留时间 (min)	最大吸收波长 (nm)	质谱数据	化合物
1	24. 13	258,288	447,285	Calycosin-7-O-β-D-glycoside
2	25. 08	252,298	473,269	
3	28. 64	282	219,191/219,191	
4	29. 21	280	463,301	(6aR,11aR)-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan-3-O-β-D-glucoside
5	32. 19	281,325	219	
6	32. 96	255,302	431,269	Ononin
7	33. 59	282	301	L-3-Hydroxy-9,10-dimethoxyl-pterocarpane
8	34. 23	280	489	
9	36. 23	278	303	
10	38. 65	280	515	
11	39. 49	280,325	301	
12	39. 82	279	269,473	
13	41. 23	250,302	269	Formononetin
14	41. 55	277	303	(3R)-7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavan
15	42. 17	280	225,193	Sedanenolide
16	42. 91	228,278	223,191,173	
17	44. 12	280	499	
18	44. 94	276,325	191,223	E-Ligustilide
19	45. 27	—	277,163,191	
20	46. 19	275,325	191,223	Z-Ligustilide
21	47. 10	212,235,261,313	189,221	Z-Butylidenephthalide
22	52. 57	222,278	277	
23	53. 43	282	191,223	
24	53. 99	282	191,223	
25	54. 68	226,278	191,223	
26	55. 08	226,277	191,223	
27	55. 72	285	555,279	
28	56. 37	277	437,419,455,279	
29	57. 59	280	243,225,257	
30	58. 62	295	191,223	
31	59. 01	—	437,419,455,	Astragaloside IV
32	61. 75	280	337,313	
33	63. 65	281	423,337	
34	65. 54	275	407,389,425	
35	68. 34	275	279	
36	68. 74	275	313	
37	69. 06	—	337,263,245	
38	69. 52	—	339	
39	70. 48	—	282	
40	71. 15	—	263	
41	71. 65	—	313	
42	72. 05	—	339,265	
43	73. 14	350	363	
44	74. 58	—	485,265,483/485,265,483	
45	76. 50	—	341	
46	81. 80	—	338	

Bold: the predominant ion mass peaks, m/z (100%)

3.3 鉴定化合物 由于能够同时提供分子量、紫外光谱和保留行为,LC-DAD-MS 被视为是一个鉴定化合物结构的有力工具。所以,可以通过与已有的文献报道比较分子量、紫外光谱和保留行为鉴定化学组分的化学结构^[2, 3, 7-13]。本文初步定性了当归补血汤的 10 个化合物: Calycosin-7-O- β -D-glycoside (峰 1), (6aR, -11aR)-Hydroxy-9, 10-dimethoxypterocarp-3-O- β -D-glycoside (峰 4), Ononin (峰 6), L-3-Hydroxy-9, 10-dimethoxy-pterocarpane (峰 7), Formononetin (峰 13), (3R)-7, 2'-Dihydroxy-3', 4'-dime-thoxyisoflavan (峰 14), Sedanenolide (峰 15), E-Ligustilide (峰 18), Z-Ligustilide (峰 20), Z-Butylidene-nephthalide (峰 21)。

通过比较对照品和当归补血汤的保留时间和质谱,判定峰 31 是黄芪甲苷。另外,峰 13 和 14 是重叠峰。它们的紫外光谱通过化学计量学的分辨方法得到。

以峰 6 为例说明化合物鉴定的过程。首先,先观察其质谱,初步判定化合物类别。因为其质谱中存在着 $[M + H]^+$ 和 $[M + H-glc]^+ [10]$, 所以它属于黄酮类。质荷比 431 $[M + H]^+$ 和 269 $[M + H-glc]^+$ 与文献中报道的 Ononin 一致^[7, 8, 10]。进一步检查其紫外光谱,发现与文献中的 Ononin 一致^[13, 14, 16]。所以这个化合物初步定性为 Ononin。其它 9 个峰以同样的方式定性。在鉴定峰 18 和 20 过程中,遇到了顺反异构体。峰 18 和 20 的紫外光谱和分子量与文献中的 Z-ligustilide 和 E-Ligustilide 一致^[2, 11]。此时,要考虑它们的流出顺序(保留行为)^[2, 11]。所以,峰 18 和 20 判定为是 Z-ligustilide 和 E-Ligustilide。

在初步定性的化合物中,来自于黄芪的黄酮类(峰 1, 4, 6, 7, 13, 14), 来自于当归的苯酞类(峰 15, 18, 20, 21)和来自于黄芪的三萜皂苷(峰 31)均是当归补血汤的主要活性成分^[2, 3]。

通过与文献比较它们的质谱、紫外光谱和保留行为,初步定性了 10 个活性成分。HPLC-DAD-MS 方法使同时快速的分析中药复方中多个化学成分成为可能。

[参考文献]

[1] 马瑞军,王 钦,陈学林,等. 当归的研究进展[J]. 中草药, 2002, 33(3): 280.
[2] Wangner H, Bauer R, Xiao PG, *et al.* Chinese drug monographs and analysis. World Health Organization.

Geneva, 2001, 14:1.
[3] Wangner H, Bauer R, Xiao P G, *et al.* Chinese drug monographs and analysis. World Health Organization. Geneva, 1997, 8:1.
[4] 黄水清,黄月纯,魏 刚,等. 当归补血汤 HPLC 指纹图谱研究(I)[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(3):192.
[5] 黄水清,魏 刚,黄月纯,等. 当归补血汤挥发油的气相色谱——质谱指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(8):1.
[6] 黄月纯,黄水清,刘东辉,等. 当归补血汤煎剂中醋酸乙酯部位的主要化学成分分析[J]. 中国药房, 2005, 16(16):1275.
[7] Xiao H B, Krucker M, Albert K, *et al.* Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection[J]. J. chromatogr. A, 2004, 1032:117.
[8] Lin L Z, He X G, Lindenmaiera M, *et al.* Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry study of the flavonoids of the roots of *Astragalus mongholicus* and *A. membranaceus* [J]. J. chromatogr. A, 2000, 876:87.
[9] Zschocke S, Liu J-H, Stuppner H, *et al.* Comparative study of roots of *Angelica sinensis* and related umbelliferous drugs by thin layer chromatography, high-performance liquid chromatography, and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Phytochem Anal, 1998, 9: 283.
[10] Li R, Fu T J, Ji Y Q, *et al.* A study of the roots of *astragalus monghoticus* and *astragalus membraneus* by high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33(12): 1676.
[11] Lin LZ, He XG, Lian LZ, *et al.* Liquid chromatography-electrospray mass spectrometry study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of Z-ligustilide[J]. J. chromatogr. A, 1998, 810:71.
[12] Wang Y L, Liang Y Z, Chen B M, *et al.* LC-DAD-APCI-MS based screening and analysis of the absorption and metabolite components in plasma from a rabbit administered an oral solution of danggui [J]. Anal Bioanal Chem., 2005, 383 (2): 247.
[13] Lu G H, Chan K, Liang YZ, *et al.* Development of high-performance liquid chromatographic fingerprintings for distinguishing Chinese *Angelica* from related umbelliferae herbs[J]. J chromatogr. A, 2005, 1073: 383.