

紫草中萘醌类化学成分的快速高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术分析^Δ

毛艳^{1*}, 张瑞萍², 贺金华^{1#}, 贺玖明², 蔡晓翠¹, 严欢¹, 康雨彤¹(1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐830004; 2.天然药物活性物质与功能国家重点实验室/中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 北京100050)

中图分类号 R283.65;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)43-4090-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.43.20

摘要 目的:对紫草中萘醌类化学成分进行快速分离与鉴别。方法:采用快速高效液相色谱-飞行时间质谱(RRLC/Q-TOF/MS)法。色谱柱为Agilent SB-C₁₈(100 mm×4.6 mm, 1.8 μm),流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液(梯度洗脱),流速为0.4 ml/min,柱温为30℃;使用甲喷雾离子源,正、负离子扫描模式,载气温度为450℃,质量扫描范围(*m/z*)为100~1 000。结果:推断出紫草中可能含有紫草素、β-羟基异戊酰紫草素、乙酰紫草素、β-乙酰氧基异戊酰紫草素、异丁酰紫草素、β,β-二甲基丙烯酰紫草素和α-甲基-正丁酰紫草素等10种化学成分。结论:该方法快速、高效,可为紫草的药效学和质量控制研究奠定基础。

关键词 紫草;萘醌;快速高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术

Analysis of Naphthaquinones in *Arnebia euchroma* by RRLC/Q-TOF-MS

MAO Yan¹, ZHANG Rui-ping², HE Jin-hua¹, HE Jiu-ming², CAI Xiao-cui¹, YAN Huan¹, KANG Yu-tong¹(1.Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 2.State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines/Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To separate and identify naphthaquinones in *Arnebia euchroma* rapidly. METHODS: RRLC/Q-TOF/MS was adopted. The separation was performed on Agilent SB-C₁₈(100 mm×4.6 mm, 1.8 μm)column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid (gradient elution) at the flow rate of 0.4 ml/min. The column temperature was 30℃. ESI was employed, and the sample was analyzed in the positive and negative-ion mode. The temperature of carrier gas was 450℃, mass scanning rang (*m/z*) was from 100-1 000. RESULTS: 10 kinds of naphthaquinones were identified by MS as sldkonin, β-hydroxyisovalerylshikonin, acetylshikonin, β-acetoxyisovalerylshikonin, isobutylshikonin, β, β-dimethylacrylshikonin and α-methylbutyrylalkannin etc, etc. CONCLUSIONS: The method is rapid and effective, and can provide experimental basis for pharmacodynamics and quality control of *A. euchroma*.

KEYWORDS *Arnebia euchroma*; Naphthaquinones; RRLC/Q-TOF/MS

定238、289 nm为检测波长,其能准确、快速地对鼻渊宁颗粒中两种成分的含量进行测定。

综上所述,本试验所建立的方法简便、快速、专属性强,结果准确、可靠,精密度好,可用于鼻渊宁颗粒的质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:20.
- [2] 金涛.高效液相色谱法测定康乐洗液中栀子苷的含量[J].中国医院药学杂志,2010,30(22):1 956.

- [3] 陈艳霞,宫立孟.HPLC法测定肝宁丸中栀子苷的含量[J].中国药师,2012,15(7):1 037.
- [4] 茅向军,许乾丽.HPLC法测定鑫肝乐胶囊中栀子苷的含量[J].药物分析杂志,2001,21(6):437.
- [5] 严安定,张永,高建.RP-HPLC法同时测定不同品种栀子及栀子金花丸中栀子苷[J].中成药,2012,34(5):965.
- [6] 肖佳尚,李晓蒙,叶向阳.复方三黄消炎片中栀子苷含量测定研究[J].中国药品标准,2006,7(5):34.
- [7] 周永梅,冯鑫,王巨存,等.HPLC法测定结肠炎散Ⅱ号中靛玉红的含量[J].天津药学,2007,19(5):22.
- [8] 韩光,孙茂峰,王荔.板蓝根含片中靛玉红的含量测定[J].中国药学杂志,2001,36(6):419.
- [9] 黄勤挽,王瑾,苏娟,等.双波长HPLC法同时测定杜仲雄花中3种成分的含量[J].中国药房,2011,22(7):2 565.

(收稿日期:2014-06-09 修回日期:2014-09-09)

Δ 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No.201233146-8)

* 助理研究员,硕士研究生。研究方向:药物新制剂与新剂型。电话:0991-2322941。E-mail:maoyan7529@163.com

通信作者:研究员,硕士研究生导师。研究方向:天然产物与化学。电话:0991-2326572。E-mail:hejh1216@163.com

紫草 *Arnebia euchroma* 为紫草科植物新疆紫草的干燥根, 是新疆的特色药材, 主要分布于新疆天山和昆仑山山区等地, 现收载于2010年版《中国药典》(一部)中。其气特异, 味微苦、涩, 具有清热凉血、活血解毒、透疹消斑之功效^[1]。快速高效液相色谱-飞行时间质谱(RRLC/Q-TOF/MS)联用技术是一种新兴且发展迅速的质谱(MS)技术, 具有分析周期短、灵敏度高的特点, 其多级MS提供的碎片离子信息, 不仅可以鉴定已知化合物, 还可以通过不同化合物的裂解规律和碎片离子信息来推断未知化合物(尤其是其中的重要微量活性成分), 从而指导化合物的选择性分离和提取试验, 因此成为研究天然产物的有效手段。近年来, 对新疆紫草的研究主要集中在紫草素及其衍生物的抗肿瘤、抗炎、抗菌活性等方面^[2-3], 而对其他活性成分的研究较少。为此, 本研究采用RRLC/Q-TOF/MS联用技术对新疆紫草中萘醌类化合物进行MS分析, 以为新疆紫草的药效物质基础研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱(HPLC)仪, 包括二极管阵列检测器、二元梯度泵、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、4~40℃恒温箱(美国Agilent公司); QSTARTM Elite型Q-TOF/MS仪, 配有电喷雾(ESI)源及Analyst QS 2.0数据处理系统(美国AB Sciex公司); 3-30K型高速冷冻离心机(德国Sigma公司); XP205型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司, 精度: 0.01 mg); UMV-2型涡旋混合器(北京优晟联合科技有限公司)。

1.2 试剂

乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯(德国Merck公司); 水为纯净水(杭州娃哈哈公司); 其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

紫草药材(采自新疆伊犁霍城大西沟镇, 野生), 由新疆维吾尔自治区药物研究所何江副研究员鉴定为紫草科植物新疆紫草 *A. euchroma* 的干燥根。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

称取紫草药材约25 g(过4号筛), 精密称定, 置圆底烧瓶中, 精密加入10倍量的石油醚, 80℃水浴加热回流提取2次, 每次2 h, 滤过(过300目滤布), 合并滤液, 摇匀, 经0.22 μm微孔滤膜滤过, 取滤液作为供试品溶液。

2.2 HPLC条件

色谱柱: Agilent SB-C₁₈(100 mm×4.6 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1%甲酸(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~5 min, 45% B; 5~10 min, 45% → 75% B; 10~40 min, 75% → 100% B; 40~50 min, 100% B); 流速: 0.4 ml/min; 柱温: 30℃; 进样量: 10 μl。

2.3 MS条件

采用正、负离子检测模式, 电喷雾(ESI)离子源, 使用的气体均为氮气(N₂)。MS扫描方式: 能量相关二级MS(MS^F), 在一个MS数据采集周期内设定高、低碰撞能量的两个TOF谱扫

描, 即Experiment 1和Experiment 2。负离子扫描模式: 喷雾电压为4.5 kV, 解簇电压(DP)为60 V, 入口电压(EP)为10 V, 聚焦电压(FP)为215 V, 碰撞电压(CE)为35V; 正离子扫描模式: 喷雾电压为5.5 kV, DP电压为60 V, EP电压为10 V, FP电压为215 V, CE电压为35 V。雾化气压力: 60 psi; 干燥气压力: 70 psi; 温度: 450℃; 质量扫描范围(*m/z*): 100~1 000。

3 结果

精密吸取“2.1”项下的供试品溶液10 μl, 按上述色谱、MS条件进样测定。紫草的RRLC/Q-TOF/MS总离子流图见图1。根据萘醌类化合物的质谱裂解规律, 参照紫草已报道成分的MS数据^[4-7], 共推测出10个成分的分子结构。紫草中化学成分的鉴别结果见表1。

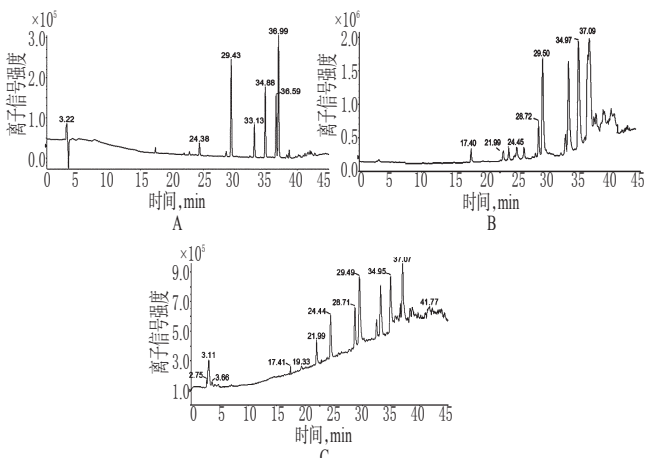


图1 紫草的RRLC/Q-TOF/MS总离子流图

A. 正离子检测模式; B. 负离子检测模式; C. HPLC图

Fig 1 TIC of *A. euchroma* analyzed by RRLC/Q-TOF/MS

A. cation mode; B. anion mode; C. HPLC chromatogram

表1 紫草中化学成分的鉴别结果

Tab 1 Identification of chemical components for *A. euchroma*

序号	保留时间, min	[M-H] ⁻ /[2M+Na-2H] ⁻	分子式	误差, ppm	分子量	化合物名称
1	17.40	315.123 4	C ₁₈ H ₁₅ O ₅ ⁻	0.710	342.11	未知化合物
2	19.33	287.222 8/597.440 1	C ₁₈ H ₁₅ O ₅ ⁻	0.605	288.09	紫草素
3	21.96	345.278 5/691.581 7	C ₁₈ H ₁₅ O ₆ ⁻	0.708	346	未知化合物
4	24.38	287.092 1/597.174 1	C ₁₈ H ₁₅ O ₅ ⁻	0.700	288.09	紫草素
5	28.72	387.174 3/797.291 5	C ₁₈ H ₁₇ O ₆ ⁻	0.805	388.17	β-羟基异戊酰紫草素
6	29.43	329.102 6/681.194 7	C ₁₈ H ₁₇ O ₆ ⁻	0.665	329.10	β-乙酰基异戊酰紫草素
7	33.13	429.154 8/881.299 6	C ₂₁ H ₂₅ O ₆ ⁻	0.356	430.15	β-乙酰基异戊酰紫草素
8	34.88	357.133 9/737.257 4	C ₁₈ H ₁₅ O ₆ ⁻	0.645	358.13	异丁酰紫草素
9	36.59	369.145 0/761.281 8	C ₁₈ H ₁₅ O ₆ ⁻	0.681	370.14	β,β-二甲基丙烯酰紫草素
10	36.99	371.149 4/765.288 6	C ₁₈ H ₁₅ O ₆ ⁻	0.465	372.14	α-甲基-正丁酰紫草素

紫草中7种萘醌类化子成分的MS图见图2。

由图2可见, 化合物4为紫草素, 在负离子模式下, 其准分子离子峰 *m/z* 为287, 二级MS可见 *m/z* 为218的碎片离子, 是准分子离子峰[M-H]⁻发生丙烯基裂解脱去异戊烯基(C₅H₉)所得。

化合物5为β-羟基异戊酰紫草素, 其准分子离子峰 *m/z* 为

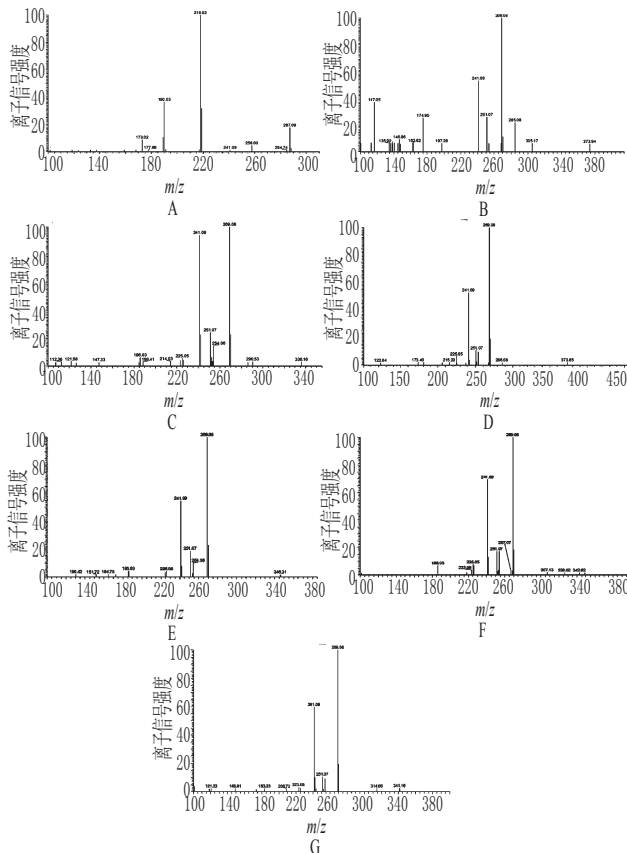


图2 紫草中7种萘醌类化学成分MS图
A~G.化合物4~10

Fig 2 MS/MS spectrum of 7 kinds of naphthaquinones in *L. erythrorhizon*

A~G.chemical compound 4~10

387, 二级MS可见 m/z 为269和241的基峰,来源于准分子离子峰依次脱去异戊酰氧醇基和乙烯基所得。

化合物6为乙酰紫草素,其准分子离子峰 m/z 为329,二级MS可见 m/z 为269和241的基峰,来源于准分子离子峰依次脱去一分子乙酸和乙烯基所得的碎片。

化合物7为 β -乙酰氧基异戊酰紫草素,其准分子离子峰 m/z 为429,二级MS可见 m/z 为269和241的碎片,是准分子离子峰依次分别脱去乙酰氧基异戊酰基和乙烯所得。

化合物8为异丁酰紫草素,其准分子离子峰 m/z 为357;化合物9为 β , β -二甲基丙烯酰紫草素,其准分子离子峰 m/z 为369,其二级MS可见 m/z 为269和241的碎片,分别是准分子离子峰依次脱去异丁酰氧基和乙烯所得。

化合物10为 α -甲基-正丁酰紫草素,其准分子离子峰 m/z 为371,二级MS亦见 m/z 为269和241的碎片,是准分子离子峰依次为脱去正戊酰氧基和乙烯所得。

4 讨论

本研究采用MS^E数据采集处理模式^[8-9],通过在一个MS周期内,设定高、低碰撞能量的两个全扫描,从而简便、快速地获得所含组分的离子信息:通过低碰撞能量获得液相流出组分的完整信息,从而获得准分子离子峰;通过高碰撞能量可同时获得流出组分(可能未完全分离)的子离子信息;最后,根据保留时间及离子强度的变化对母离子及其相应子离子进行关联,从而建立不依赖强度、无需离子选择即可获得二级图谱的MS分析方法。该方法具有无需选择、信息全面的特点,一次分析可快速获取所有液相色谱洗脱成分的MS数据。

本研究不仅丰富了紫草中萘醌化合物的MS裂解反应研究,而且所建立的分析方法对于快速、准确地从复杂混合物中寻找及发现活性成分具有借鉴价值。本研究结果可为后期开展紫草中有效成分的提取工艺及其质量控制研究提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 320.
- [2] Kaith BS, Kaith NS, Chauhan NS. Anti-inflammatory effect of *Arnebia euchroma* root extracts in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 1996, 55(1): 77.
- [3] Li HM, Tang YL, Zhang ZH. Compounds from *Arnebia euchroma* and Their Related Anti-HCV and Antibacterial Activities[J]. *Planta Med*, 2012(78): 39.
- [4] 赵海青, 刘军锋, 刘珂, 等. 新疆紫草羟基萘醌类化学成分的研究及对PDE4的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 96.
- [5] 陈璐璐, 周若龙, 杨柳, 等. 紫草中萘醌类化合物的质谱鉴别及3种成分的UPLC同时测定[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(1): 77.
- [6] 冯文文, 李国玉, 谭勇, 等. 软紫草与硬紫草萘醌类化学成分的研究[J]. 中国现代中药, 2010, 12(7): 15.
- [7] 刘虹. 中药新疆紫草活性成分研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [8] 田亚平. 抗肿瘤候选新药CAT体内代谢及其药物代谢组学LC-MS/MS分析方法研究[D]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院, 2012.
- [9] 戎晓娟, 张瑞萍, 贺金华, 等. 应用LC-MS/MS法筛选室心艾维西木口服液质量控制中的含量测定指标[J]. 中国药房, 2014, 25(23): 2 157.

(收稿日期: 2014-06-07 修回日期: 2014-07-14)