

中药和保健品的分析

应用文集



Our measure is your success.



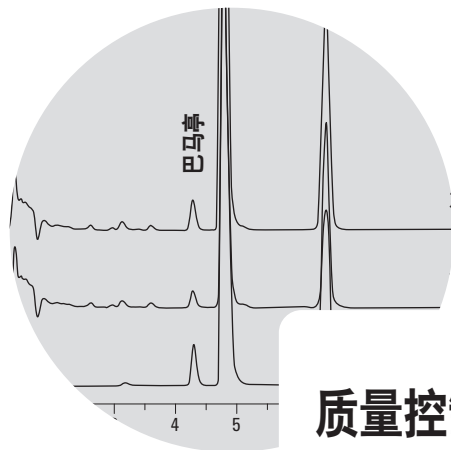
前言

本文集收纳了多篇传统草药和保健品分析方面的应用报告。按照不同的被分析物，将这些应用报告分为农药残留、重金属、残留溶剂、生物活性物质和代谢物几种类别。本文集中所有应用报告都采用安捷伦分析仪器、软件和服务开发出了相应的完整解决方案。采用的分析技术包括气相色谱（GC）、液相色谱（LC）和质谱（MS），以及串联技术，如 GC/MS、LC/MS 和 ICP-MS。每个解决方案的更详细资料可以在安捷伦网站上查阅。点击文集封底提供的网址即可。

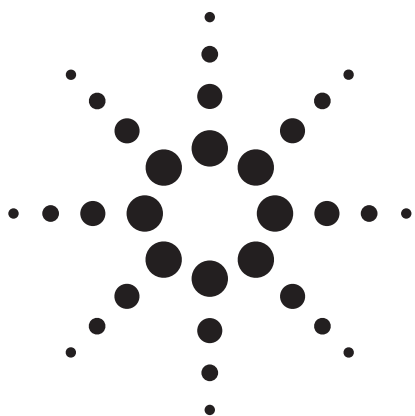
目录

前言	2
目录	3-4
质量控制分析方法的开发	5-44
白毛茛中生物碱的提取和 HPLC 分析	7
使用长的 1.8 μm 快速分离高通量色谱柱	
对甘草提取物进行高分离度反相 HPLC 分析	13
用高分离度快速液相色谱对三七进行快速、高分离度分析	19
使用带 UV 和 MS 检测的高分离度快速液相	
色谱仪建立中药制剂的可靠质控方法	25
使用 Agilent 1120 一体式液相色谱仪分析人参和西洋参	29
采用 Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器分析传统中药	33
采用 Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器分析中药	39
农药残留的检测	45-58
使用 GC/MS 筛选中药中 430 种残留杀虫剂:	
从样品制备到报告生成仅需一小时	47
安捷伦 7000A GC/MS/MS 在中药基质 ppb 级杀虫剂筛查中的应用 ..	53
重金属含量的测定	59-66
用电感耦合等离子体质谱测定中药中的毒性元素	61
残留溶剂的质量控制	67-76
以更好的精度、更高的灵敏度和更大的样品	
通量进行药物中残留溶剂的分析	
在药物质量控制中使用配置 G1888 顶空进样器的	
Agilent 7890A GC 系统	69

生物活性化合物的纯化和轮廓图分析77-118
用 Agilent 1100 系列纯化系统分离红三叶草中的 芒柄花黄素和其它植物雌激素79
人参中复杂天然产物提取物的分析——第 I 部分： 采用带精确质量检测的高分离度快速 LC-ESI TOF 解析人参皂甙的结构85
人参中复杂天然产物提取物的分析——第 II 部分： 用高分辨离子阱 LC/MS 对人参皂甙进行结构解析93
人参中复杂天然产物提取物的分析——第 III 部分： 采用 LC/MS 鉴别人参制品及人参植物的种属差异99
Agilent MassHunter——复杂天然产物提取物 LC/ESI-TOF 数据的快速计算机辅助分析 第 1 部分：用 MassHunter 工作站软件分子特征提取器 分析 Agilent 6210 TOF 数据107
Agilent MassHunter ——复杂天然产物提取物 LC/ESI-TOF 数据的快速计算机辅助分析 第 2 部分：用 MassHunter 软件的 Mass Profiler 比较不同生物来源的 Agilent 6210 TOF 数据113
代谢谱分析119-128
一种用于药物代谢物计算机辅助鉴定的多算法方法 用安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件从精确 QTOF-MS 和 MS/MS 数据中快速鉴定药物代谢物121



质量控制分析方法的开发



白毛茛中生物碱的提取和 HPLC 分析 应用报告

消费品和药物生产 QA/QC

作者

Holly A. Weber
中西部研究所
425 Volker Blvd
Kansas City, MO 64110
USA

Maureen Joseph
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

本文建立了对白毛茛根粉末中生物碱进行室温萃取，并用 Zorbax 快速分离 Eclipse XDB-C18 柱进行 HPLC 分析的方法，用该法准确测定了白毛茛中包括小檗碱和白毛茛碱在内的主要生物碱。也可以用这一萃取和 HPLC 分析方法测定其它生物碱，包括氢化小檗碱、白毛茛分碱和巴马亭。还可以应用于其它含小檗碱的植物根的分析。Eclipse XDB-C18 快速分离柱采用等度分离，所有组分在 15 分钟内实现了高分离度分离。

前言

白毛茛(goldenseal), 学名 *Hydrastis canadensis* L., 是最老的草药植物之一，其作为天然药物正在受到人们的关注。白毛茛中存在的两种主要生物碱——小檗碱和白毛茛碱——被认为是其中的活性成分。氢化小檗碱、白毛茛分碱、5-羟基小檗碱和 canadine 都是含量很小的生物碱。巴马亭与小檗碱密切相关，但在白毛茛中没有检测到，而在另一种含小檗碱的植物——黄连(*Coptis*)中却检测到了巴马亭^[1]。

白毛茛已被用作消炎药和抗生素。也用于治疗鼻充血、感冒、流感和多种肠道紊乱。该植物的整个根部都用来入药，目前市售的剂型有散装（干燥或粉末化的白毛茛根）、片剂、胶囊和酞剂。由于野生白毛茛已经被过度采集，现在大量的白毛茛由人工种植，以补充草药来源。作为草药补充物销售的白毛茛质量参差不齐，其中的活性生物碱含量差异很大。因此，迫切需要一种简单的方法进行生物碱的萃取和分析，以评价产品的质量。图 1 显示了白毛茛中生物碱的化学结构。

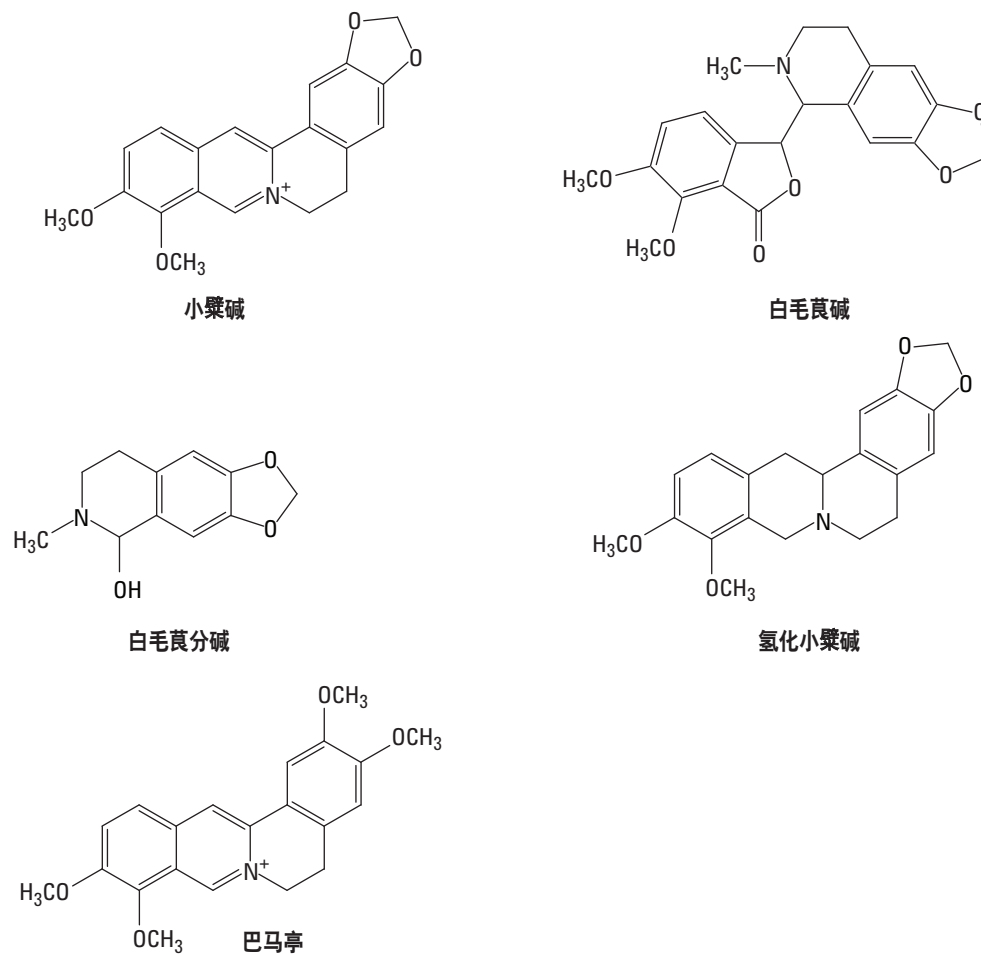


图 1. 白毛茛及相关植物中主要生物碱的结构

实验部分

萃取步骤

Betz 和 Anderson^[1]以及 Burney^[2]曾报导了室温条件下从白毛茛中萃取生物碱的方法。按照此方法进行萃取，然后采用 HPLC 对生物碱提取物进行精确定量分析。纯白毛茛根粉末的最优化室温萃取条件总结如下：

1. 称取约 0.5 g 白毛茛根粉末
2. 加入 100 mL 乙腈:水:H₃PO₄ (70:30:0.1, v/v/v)，混匀
3. 超声处理 5 分钟，振摇（手腕抖动）10 分钟，离心 5 分钟

4. 5 倍稀释萃取物

5. 稀释后的萃取物直接进行 HPLC 分析

HPLC 分析

白毛茛中生物碱的 HPLC 分析，要求能够分离主要的生物碱。此外，还需要能够分离巴马亭，因为它存在于其它含有小檗碱的植物中。我们开发了一种能够分离所有这些组分的 HPLC 方法。采用 Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱、醋酸铵缓冲液和乙腈混合流动相，可得到最佳的分离度和峰形。图 2 显示了分离结果，并列出了所采用的全部优化分离条件。为获得一致的保留时间，温度控制在 30°C^[3]。

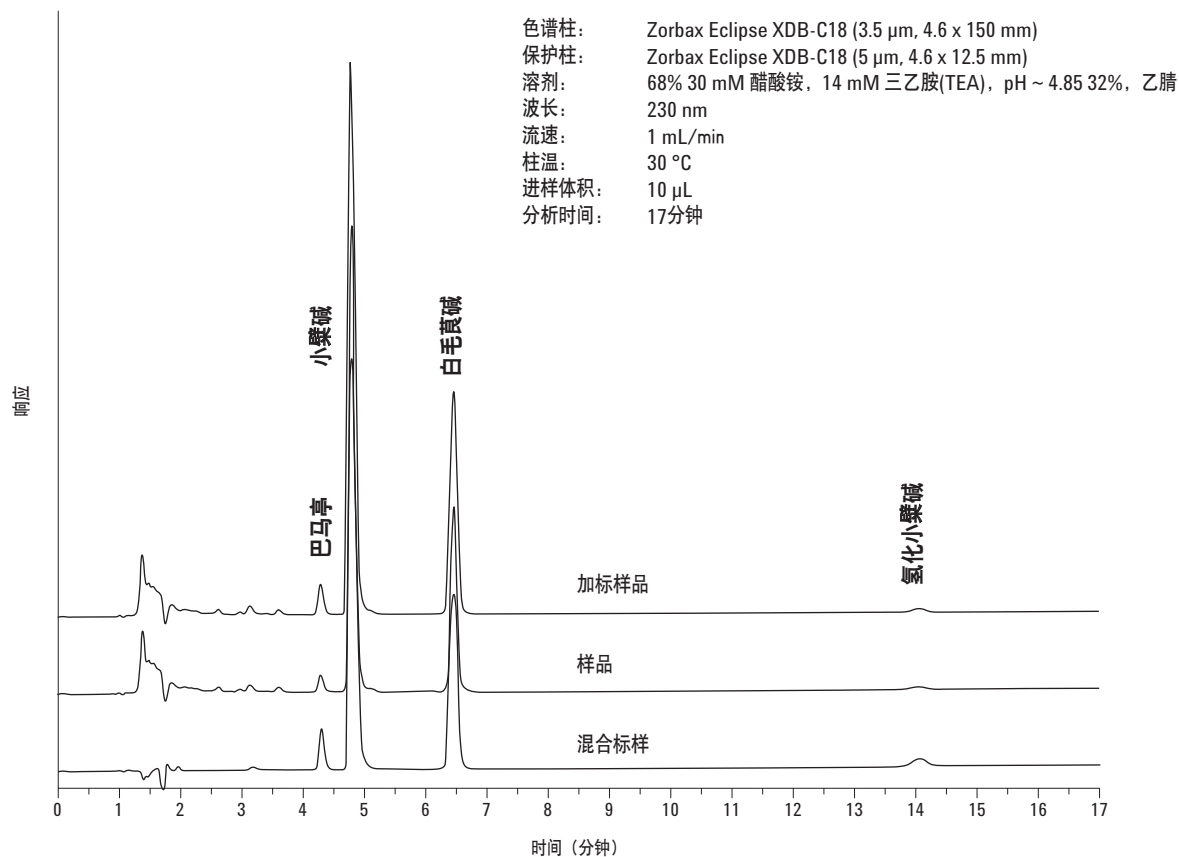


图 2. 白毛茛萃取物在 Eclipse XDB-C18 柱上的 HPLC 分离结果

方法验证

采用本 HPLC 方法可对室温萃取方法进行验证。本方法研究了线性、精度和生物碱的回收率。表 1 列出了这些结果。方法的精度良好,不同生物碱的回收率范围在 92%-102%,完全适用于定量分析。线性很好(图 3),灵敏度良好。通过标样数据计算出的小檗碱的检测限(LOD)为 0.50 mg/mL,定量限(LOQ)为 1.65 mg/mL。因此可以对低水平含量的小檗碱进行精确定量,适用于检测不同来源白毛茛产品的质量。

表 1
室温萃取方法的验证结果

	巴马亭	小檗碱	白毛茛碱	氢化小檗碱
精度 (n = 10)	0.18 ± 0.002(s)%	3.06 ± 0.05(s)%	2.04 ± 0.01(s)%	0.08 ± 0.001(s)%
生物碱回收率 (~ 0.3–2 g of GS) (~ 0.6–1 mg/mL) (n = 12)	0.18 ± 0.003(s)%	3.10 ± 0.06(s)%	2.05 ± 0.02(s)%	0.08 ± 0.001(s)%
加标量和回收率 (n = 3)	加标量 = ~ 0.15% 92.2 ± 5.5(s)%	加标量 = ~ 2.0% 101.5 ± 0.2(s)%	加标量 = ~ 2.0% 101.9 ± 0.2(s)%	加标量 = ~ 0.10% 101.9 ± 7.9(s)%

(s) = 标准偏差

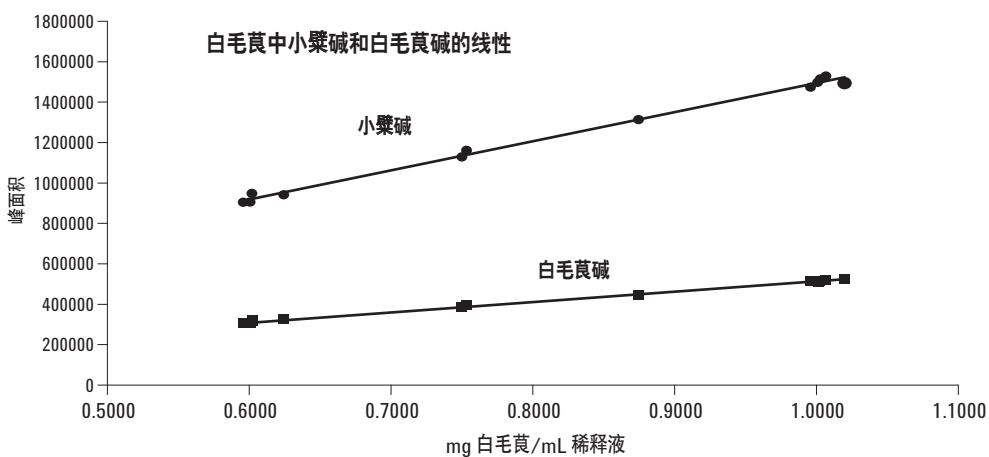
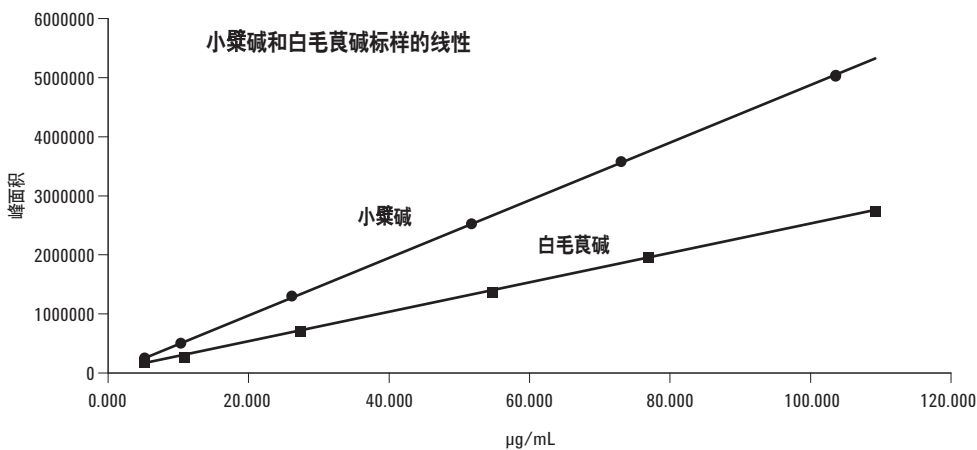


图 3
小檗碱和白毛茛碱标样以及白毛茛提取物中小檗碱和白毛茛碱的线性

结果

白毛茛的测定

采用室温萃取方法和 HPLC 分析方法测定来自 3 个不同供货商的 6 批白毛茛根粉末样品中生物碱的含量, 结果列于表 2。这些结果说明来自不同供货商的样品的质量是不同的, 也说明了需要一个很好的 HPLC 定量分析方法的原因。

表 2
用室温萃取法和 HPLC 分析来自不同供货商的多批白毛茛根粉末的测试结果

供货商	批次	% 巴马亭	% 小檗碱	% 白毛茛碱	% 氢化小檗碱	已知生物碱的总含量%
1	A	nd	3.27	2.36	0.09	5.94
	B	nd	3.29	2.40	0.07	5.98
2	C	0.19	3.01	1.99	0.09	5.53
	D	0.18	3.06	2.04	0.08	5.36
3	E	nd	4.60	4.06	0.12	8.99
	F	nd	3.93	2.67	0.20	6.93

结论

白毛茛室温萃取法简便而可靠, 萃取物采用 Zorbax Eclipse XDB-C18 快速分离色谱柱进行等度 HPLC 分析, 在 15 分钟内获得了 6 种生物碱的分离结果, 分离度高, 峰形好。该分析方法提供了包括小檗碱和白毛茛碱在内的白毛茛生物碱含量的可靠定量结果。该方法已通过分析来自 3 个不同供货商的白毛茛得到了验证, 预期也可用于其它含小檗碱植物的分析。

参考文献

1. J. M. Betz, S. M. Musser, and G. M. Larkine, "Differentiation between Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) and Possible Adulterants by LC/MS," presented at the 39th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, Orlando, FL, July 19–23, 1998.
2. M. L. Anderson and D. P. Burney, *J. AOAC Intern.*, 81:1005–1110 (1998).
3. H. A. Weber, et. al., *J. Liq. Chrom. and Rel. Tech.* 24(1) 87–95 (2001).

致谢

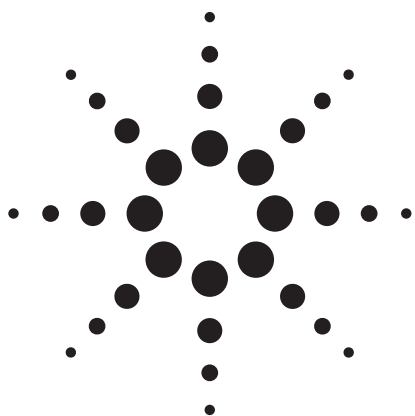
本应用由下列人员完成: 美国中西部研究所的 Holly A. Weber、Matthew K. Zart、Andrew E. Hodges、Kellie D. White、Roger K. Harris 和 Alice P. Clark, 通讯地址: Midwest Research Institute, 425 Volker Blvd, Kansas City, MO 64110。

国家毒物学项目组的 Diane Overstreet 和 Cynthia Smith, 通讯地址: 111 Alexander Drive, Research Triangle Park, NC 27709。

本研究由国家环境卫生科学研究所 (National Institute of Environmental Health Sciences) 资助, 合同号 N01-ES-55385 和 N01-ES-05457。

更多信息

如需了解更多关于我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。



使用长的 1.8 μm 快速分离高通量色谱柱对甘草提取物进行高分离度反相 HPLC 分析 应用报告

食品添加剂、天然产物和药物

作者

Bernard Permar 和 Ronald E. Majors
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

对甘草、甘草水解产物和市售甘草样品进行高分离度反相 HPLC 分析, 结果表明使用 ZORBAX 1.8 μm 色谱柱获得的分离度和通量远远高于常规 5.0 μm 色谱柱。

前言

药用甘草取自生长在欧洲、中东和西亚的高约 4、5 英尺的灌木植物光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra*) 的根部。已知该植物的根含有约 4% 的甘草甜素, 即甘草酸的钾盐或钙盐。甘草酸为带两分子葡萄糖醛酸的五环三萜羧酸 (18- β -甘草次酸) 的糖苷 (图 1)。

甘草甜素比蔗糖甜 50 倍, 但已知大剂量时有毒。水解后糖苷失去甜味, 转化为甘草次酸苷元和两分子葡萄糖醛酸。

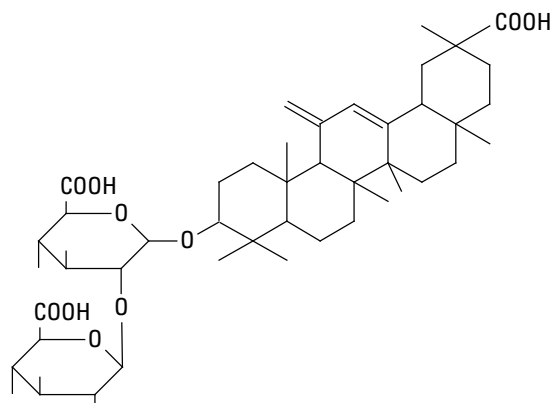


图 1
甘草酸的结构

任何品种甘草的萃取物都包含 100 多种化合物。其中的几种被用作糖果中的甜味剂、止咳糖浆中的调味剂, 以及在药物中用来掩盖苦味, 而中草药 (TCM) 主要利用其治疗效用。甘草的治疗效用早在几个世纪前就被中国、印度、埃及、希腊和罗马所知。其用途包括止咳剂、泻药, 还可用于治疗胃溃疡、阿狄森氏病和肝病。近来, 已证明甘草甜素有对抗 DNA 和 RNA 病毒 (流感病毒 A 和 B、HIV、VZV 和 B 型和 C 型肝炎病毒) 的抗病毒活性^[1]。甘草也用于外用化妆品。

甘草种类不同、采收时间不同、提取方法不同都会使目标化合物的丰度发生很大变化。因此，需要能够检测甘草中活性成分的分析方法。已有研究表明，梯度洗脱反相 HPLC 法可以作为分离甘草中某些重要化合物的有效方法^[2]。本应用报告对经典 HPLC 方法和使用新的快速分离高通量(RRHT)色谱柱的 HPLC 方法进行了比较。我们用这些 HPLC 技术研究了两种市售甘草根提取物的差异。

实验

本研究中所用的两种反相 (RP) 柱:

- 常规的 ZORBAX StableBond (SB)-C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 μ m
- ZORBAX SB-C18 RRHT, 4.6 mm x 150 mm, 1.8 μ m

RRHT 柱填料粒径较小，因此用较短的柱子即可得到与常规长柱相同的分离度，而且可以加快分离速度。

结果

HPLC 条件

仪器: Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统
检测器: 多波长检测器 (MWD), 254 nm/100 BW, 450 nm 参比波长
流动相: A = 1% 醋酸水溶液
B = 1% 醋酸乙腈溶液

ZORBAX SB-C18 柱的梯度条件:

常规: 4.6 mm x 250 mm, 5 μ m
5% 到 100% B 50 分钟
RRHT: 4.6 mm x 150 mm, 1.8 μ m
5% 到 100% B 30 分钟
流速: 1.0 mL/min
温度: 室温

标准样品: 购自 Sigma Aldrich

- (G) 0.1 mg 甘草酸铵盐, 纯度~75%, 溶于 0.5 mL 流动相 B, 并加 0.5 mL 流动相 A 至 1.0 mL
- (GA) 0.1 mg 18- β -甘草次酸, 纯度 97%, 溶于 0.5 mL 流动相 B, 并加 0.5 mL 流动相 A 至 1.0 mL

样品:

- 甘草提取物 A (HERB FARM)
- 甘草提取物 B (纽瓦克天然食品)

两种提取物都经涡旋混合，并于进样前过滤 (0.2 微米)。

进样量: 5 μ L 提取物

一般甘草提取物中最重要的化合物是 G，其次是其水解产物 GA。这些物质都有商品出售。虽然甘草中也有其它组分被鉴定出来，并有商品出售，但都相当昂贵。因为我们的主要目的是说明使用高分离度 HPLC 短柱的优越性，所以在开始建立方法时我们只用了两种标准品 (G 和 GA)。图 2a 为 G 和 GA 在常规柱 (ZORBAX SB-C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 μ m) 上梯度分离的结果。待检测的甘草提取物成分非常复杂，所以用等度条件并不能分离所有组分。因带糖基的 G 极性更大，先被洗脱，而 GA 远在其后被洗脱。采用该梯度，GA 在 42 分钟出峰。切换到较短的 ZORBAX SB-C18 RRHT 柱 (4.6 x 150 mm, 1.8 μ m) 上后，分离效果相同，如图 2b 所示，但分离时间仅为 25 分钟，节省了 40% 左右的时间。

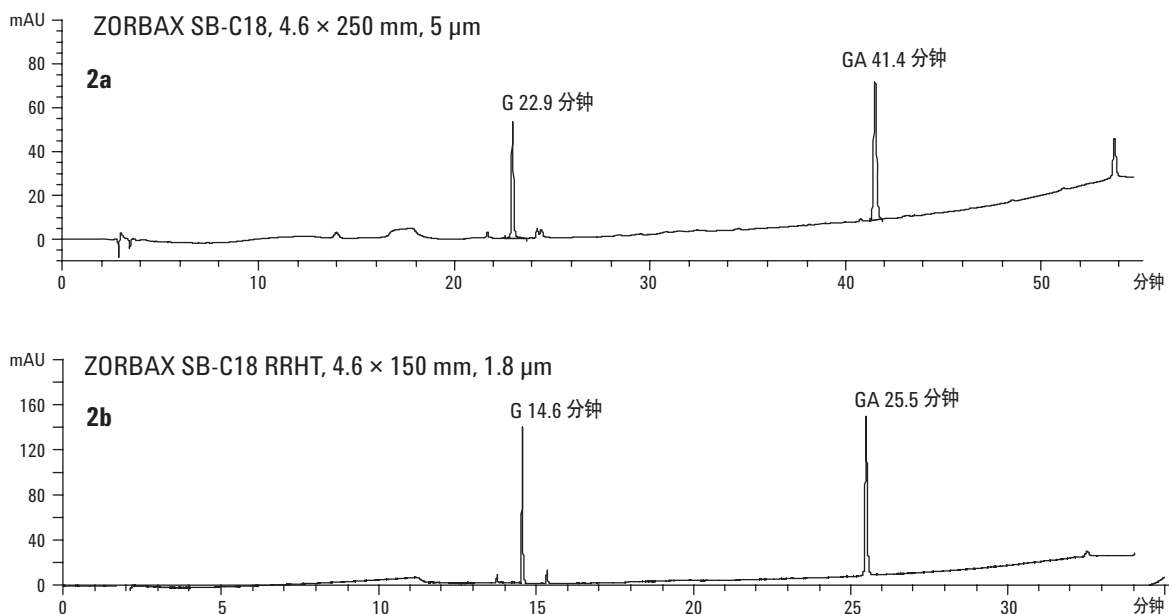


图 2
G 和 GA 在 5.0 和 1.8 μm 柱上的梯度反相分离结果

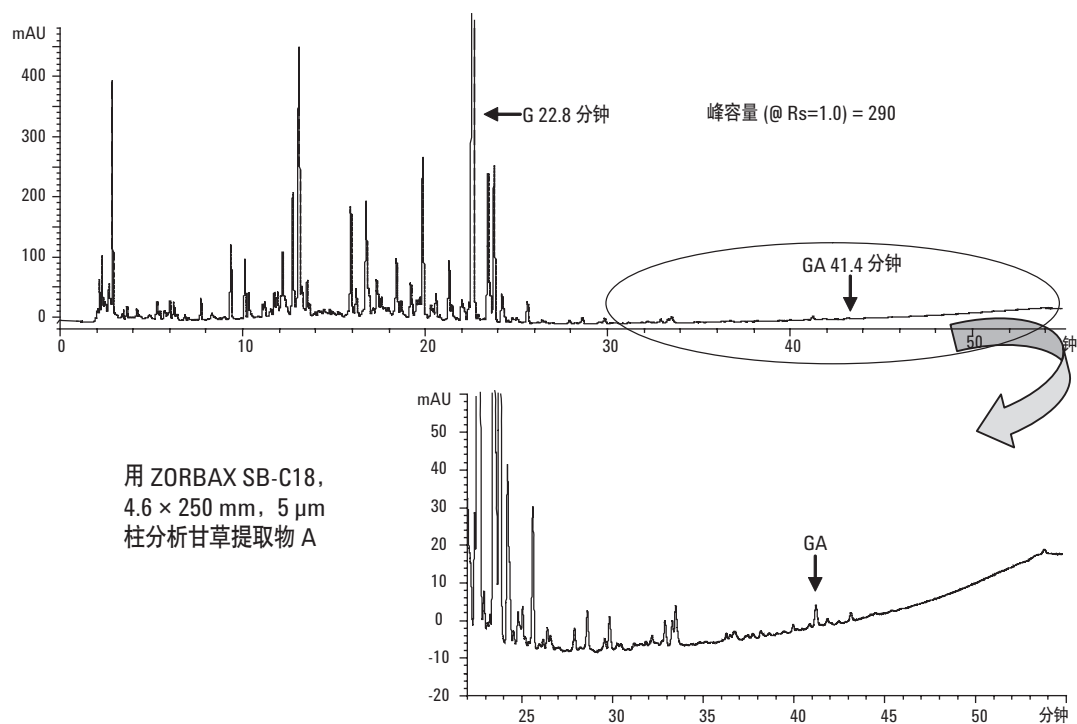
图 3 和图 4 显示了这两种色谱柱对实际甘草提取物的分离情况。按实验部分所述，对过滤后的提取物进样，得到复杂的色谱图。图 3a 显示用粒径 5 μm、长 250 mm 的色谱柱得到的复杂色谱图。截图显示提取物中有少量 GA 存在。GA 是 G 的水解产物，因此其在甘草提取物中的浓度应低得多，除非为了增加水解产物的浓度将提取物进行处理。从峰面积计算可知，提取物 A 中 GA 浓度不到 G 的 0.5%。

虽然实际的峰数没有计算，但 5 μm 柱的计算峰容量 (3) 应为 290 (分离度=1.0)。用粒径 1.8 μm、长 150 mm 的色谱柱分离同样的提取物 A，可以看到色谱图分得更好 (即分离度更高)

(图 3b)。这一高柱效色谱柱的计算峰容量为 442，比用 5 μm 长的色谱柱高 50%。因此，在快速分离短柱上，更容易测定微小组分。计算得到 1.8 μm 柱单位时间的峰数 (分离度=1.0) 为 17.7 个峰/分钟，而 5 μm 柱仅为 7.1 个峰/分钟。

图 4a 和 4b 显示用提取物 B 进行的类似分离。该提取物比提取物 A 更为复杂，将图 3b 的高分离度色谱图与 4b 进行对比。同样，计算的 1.8 μm 每分钟峰数值远远高于 5 μm 柱 (分别为 17 和 7.5)。根据峰面积计算可知，提取物 B 中 GA 约为 G 的 1%。

(A)



(B)

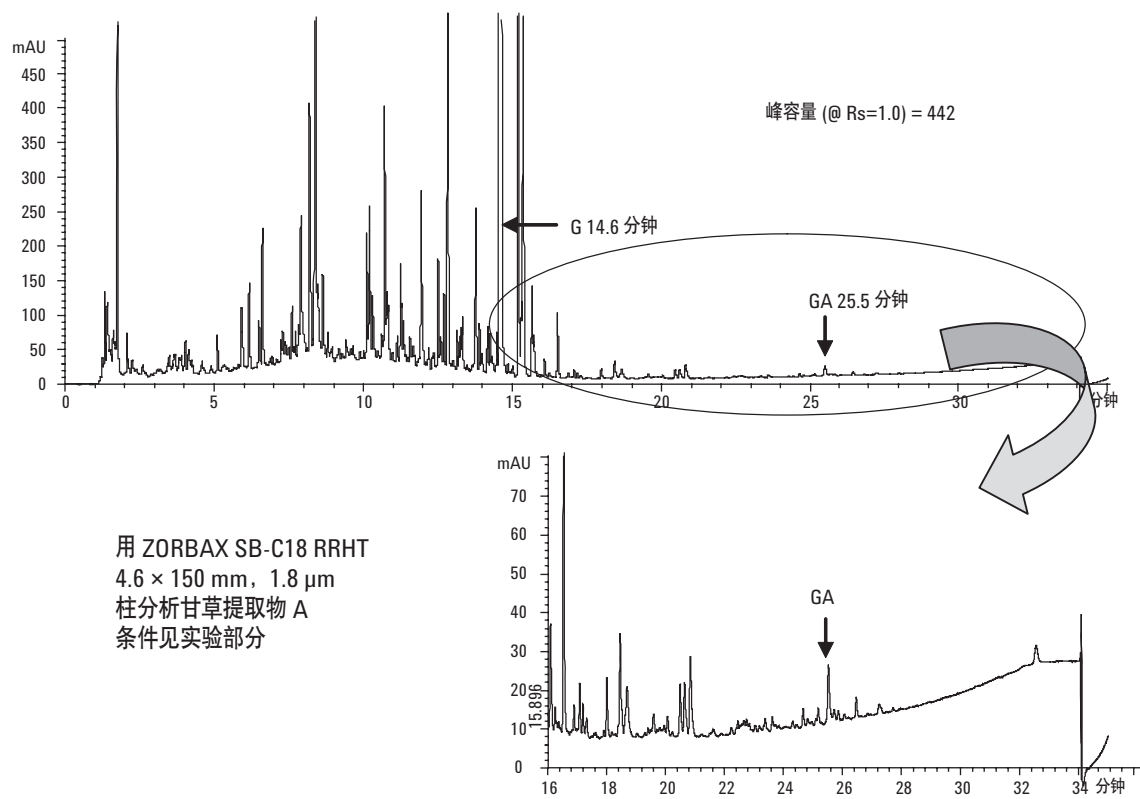
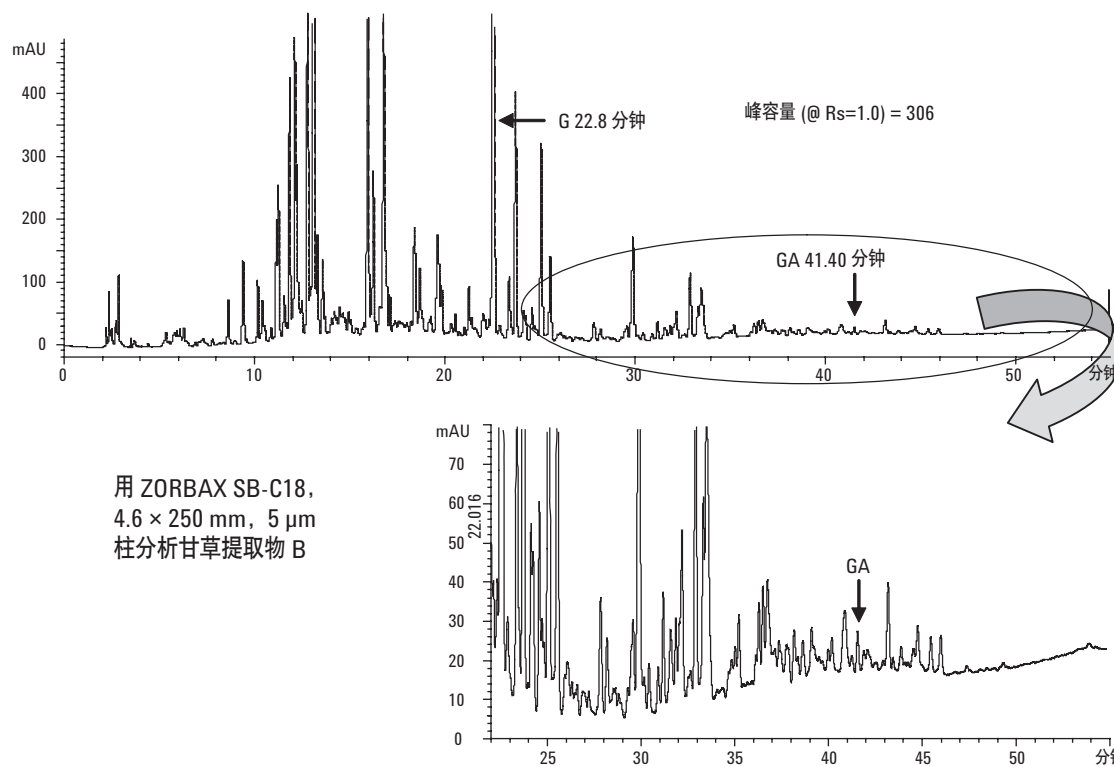


图 3a 和 3b
用 5.0 μm 柱 (A) 和 1.8 μm 柱 (B) 对甘草提取物 A 进行梯度反相分离

(A)



(B)

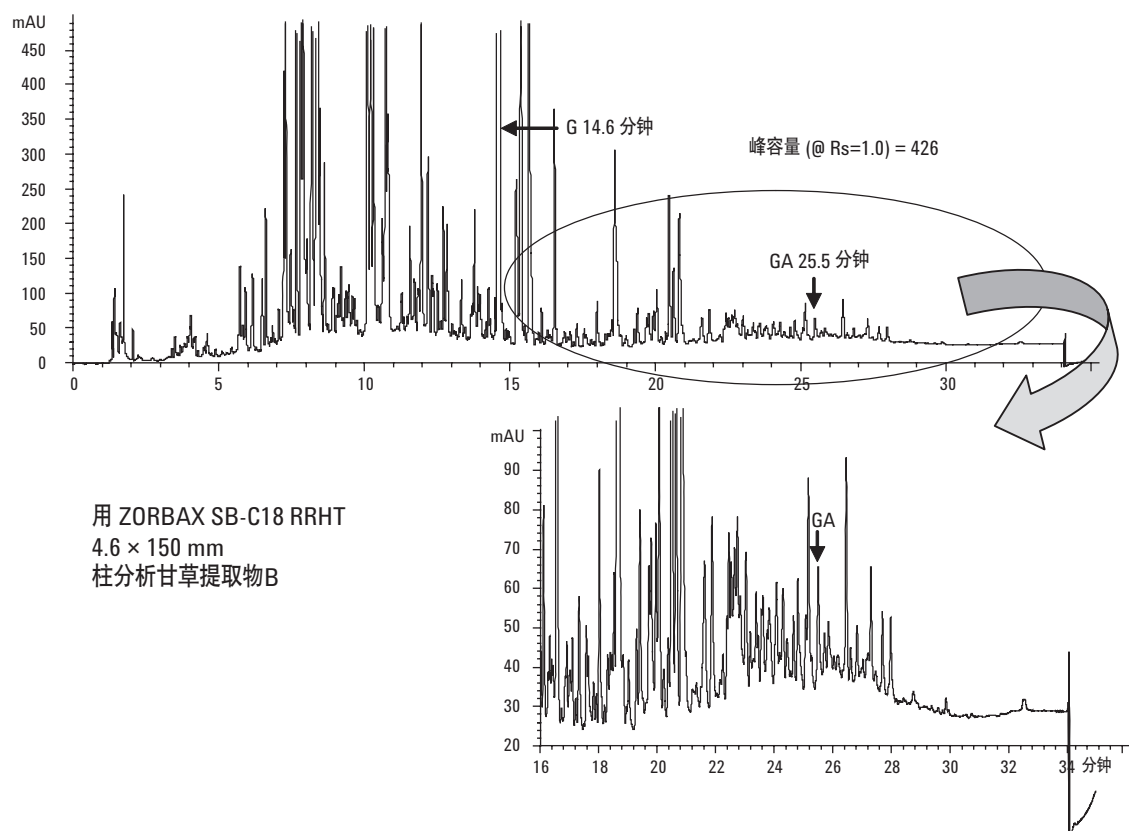


图 4a 和 4b
用 5.0 μ m 柱 (A) 和 1.8 μ m 柱 (B) 对甘草提取物 B 进行梯度反相分离

结论

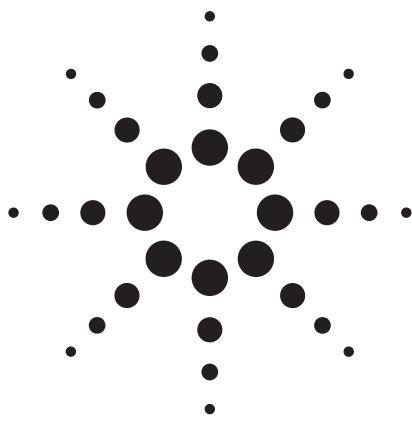
尚未对甘草提取物中的组分进行定量分析。从我们的研究中可知, 1.8 μm 柱的分离度和通量远远超过了 5.0 μm 常规柱。当遇到天然产物的更复杂样品时, 分析人员需要更精细的组分分析, 高分离度、小粒径色谱柱的使用将会越来越多。研究甘草、其它天然产物和中草药时, 都需要进行梯度分离和高灵敏度检测。

参考文献

1. S. Fanali, Z. Aturki, G. D'Orazio, M. A. Raggi, M. G. Quaglia, C. Sabbioni, and A. Rocco, (2005) *J. Sep. Sci.*, **28**, 982–986.
2. I. Kitagawa, (2002) *Pure Appl. Chem.* **74** (7), 1189–1198.

更多信息

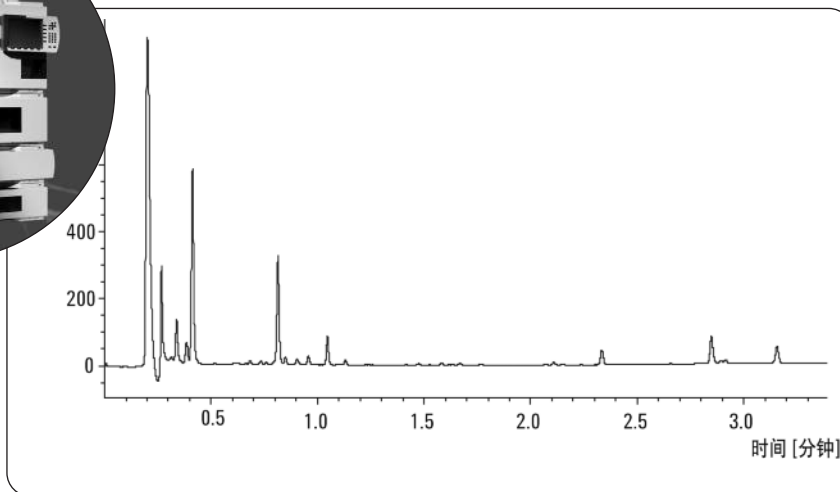
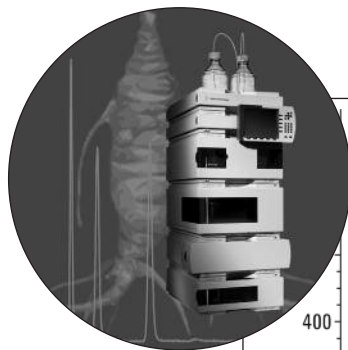
如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。



用高分离度快速液相色谱对三七进行快速、高分离度分析

应用报告

徐智秀



摘要

本应用报告内容:

- 建立了三七分析的高分离度快速液相色谱(RRLC)方法
- 从常规 HPLC 到 RRLC 的方法转换结果
- RRLC 方法的使用缩短了分析时间, 同时保持了复杂组分的良好分离度, 从而提高了样品通量, 降低了成本
- 采用优化的方法得到了三七植物不同部位的色谱图, 结果显示其峰形和特定皂甙的浓度各不相同

安捷伦仪器:

1200 系列高分离度快速液相色谱系统
ZORBAX XDB C18 RRHT 柱

应用领域:

中药

前言

中药 (TCM) 在中国已有很长的历史, 其疗效被中国、韩国、日本等亚洲国家广泛认可。西方国家也越来越普遍地将中药作为食品添加剂或营养品。随着时间的推移, 已有 11000 多种中药曾被使用。中药的研究和质量控制十分依赖于仪器分离, 并要求很高的分离性能。

在本研究中, 我们建立了一种分析三七的高分离度快速液相色谱 (RRLC) 方法。用安捷伦的方法转换器可以将常规 HPLC 方法轻松转移至 RRLC。用不同的提取方法制备三七植物不同部位的样品。将这些样品用优化的方法进行分离, 得到的色谱图显示其具有不同的色谱峰形。本应用报告还显示了定量结果。质量控制部门可以利用本研究开发更快、更好的方法, 缩短分析时间、提高样品通量。使用该方法还降低了溶剂成本, 改善了整个分析流程。

三七, 在中国也称田七, 是一种重要而昂贵的中药。已栽培了约 400 年, 85% 以上的三七产自中国的云南省。三七的疗效主要有活血化痰、消肿止痛。最新

的药理学研究表明, 三七 (Panax notoginseng) 具有抗癌和保肝作用, 对心脑血管系统也有保护作用^[1]。三七的皂甙图谱与著名的人参 (Panax ginseng) 和西洋参 (Panax quinquefolium) 非常相似, 因为它们属于同一种属。三七主要用于中国南方, 有多种不同的中药剂型。著名的中药制剂云南白药和片仔癀都含有三七。

中药基质的复杂一直是质量控制和研究的最大挑战。中国药典 2005 版列出了药材三七和中国专利药物三七伤药片, 必须对制剂中的三七皂甙 R1 成分进行分析。三七皂甙的一般分析时间为 60 分钟以上。随着对中药的研究越来越深入, 科学家们认为仅控制一两种组分还不足以确定中药的质量, 需要开发分离更多组分的质量控制方法。分离像中药这样的复杂样品比分离合成药物需要更多的时间。当样品通量也纳入考量范围的时候, 理想的解决方案就是用更短的时间得到相似或更好的性能。采用 RRLC 可以开发分析时间更短、性能更好的方法。RRLC 方法还有节省时间和溶剂的优势。对生产质量控制来说, 使用 RRLC 意味着新批次的产品可以比用常规 HPLC 方法更快出厂。

实验部分

仪器

用配置以下组件的 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统开发 RRLC 方法:

Agilent 1200 系列 RRLC 系统包括:

- 带真空脱气机的 Agilent 1200 系列 SL 型二元泵
- Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器
- Agilent 1200 系列 SL 型柱温箱
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器, 配备微量流通池 (2 μ L 体积, 3 mm 光程)
- Agilent 化学工作站 B.02.01 SR1, 用于数据采集和处理
- Agilent ZORBAX XDB C18 RRHT 色谱柱, 4.6 x 50 mm, 1.8 μ m 粒径

用包含以下组件的标准配置 Agilent 1100 系列液相色谱仪进行常规 HPLC 对比实验:

- 带脱气机的 Agilent 1100 系列二元泵
- Agilent 1100 系列自动进样器
- Agilent 1100 系列柱温箱
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器
- Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱, 4.6 x 50 mm, 5 μ m 粒径

样品和样品制备

- 三七皂甙 R1、人参皂甙 Rg1 和人参皂甙 Rb1 标准品购自中国药品生物制品检定所(NICPBP)。人参皂甙 Re 和人参皂甙 Rc 标准品购自美国 Sigma-Aldrich 公司
- 三七茎和叶提取物 (NCLE)由用户实验室友情赠送。茎和叶用 60%乙醇萃取，溶剂蒸干后，用正丁醇溶解残渣，再将溶剂蒸干，残留黄色粉末用甲醇溶解，进样
- 三七根提取物 (NRE)由用户实验室友情赠送。原始组分水提取，经大孔滤膜过滤后，蒸干。残留白色粉末用甲醇溶解，进样
- 三七购自当地药材商店。品牌为同仁堂。原料用水/甲醇 (30/70, v/v)提取，超声处理 30 分钟，用 0.22 μm 滤膜过滤，用澄明滤液进样
- 水、乙腈和甲醇均购自美国 Fisher 公司

方法转换

使用 5 μm 粒径填料色谱柱的常规 HPLC 方法需要转换为使用 1.8 μm 粒径填料色谱柱的 RRLC 方法。安捷伦的方法转换器(在 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统的光盘上，出版号 5989-5130EN)可用于这一目的，转换过程简便、快速(图 1)。根据不同情况，转换后的方法可能需要按方法转换器上列出的不同参数做进一步调整。如何将常规 HPLC 方法手动转换成 RRLC 方法，可查阅安捷伦的其它应用报告^[2,3,4]。

结果与讨论

色谱图

药理研究表明，由于组分不同，三七植物的不同部位有不同疗效。为了获得更多有效的成分，我们采用了各种特

殊提取方法。三七样品用常规 HPLC 方法和 RRLC 方法分析得到了不同的峰形图。图 2 显示了用常规 HPLC 方法分析的三七茎和叶提取物 (NCLE) 的色谱图。通常此类分离需要 60 分钟以上^[5]。如实验部分所述，分析三七样品的 RRLC 方法是

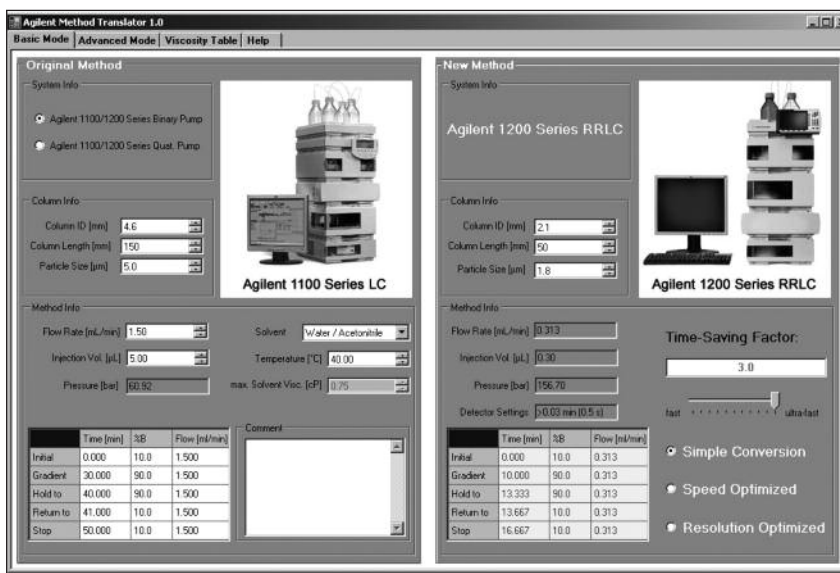


图 1 安捷伦方法转换器将标准 HPLC 方法转换成 RRLC 方法

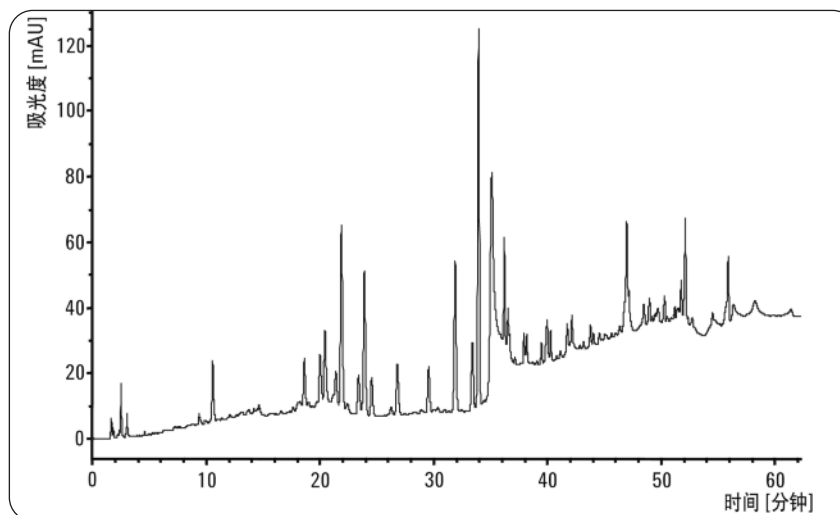


图 2 在 Agilent 1100 系列 LC 系统上用常规 HPLC 方法分析 NCLE 的色谱图。色谱条件见表 1

根据常规 HPLC 方法开发的。同样的 NCLE 样品分别采用常规 HPLC 方法和 RRLC 方法 1。色谱图见图 2 和图 3。图 3 的色谱峰比图 2 的峰窄，这说明提高了复杂样品的峰容量。RRLC 分析的分离度或分离性能比常规 HPLC 更好。同时分析时间从 60 分钟缩短到 20 分钟。另一个应当关注的因素是常规 HPLC 和 RRLC 的色谱柱选择性应保持一致。如果新 RRLC 柱具有和常规 HPLC 柱完全不同的选择性，转换方法将失去意义。本研究中的峰形和洗脱顺序都相同，因而没有必要再确认新色谱图中的色谱峰。另外，二极管阵列检测器的 UV 光谱图也有助于进一步确证。

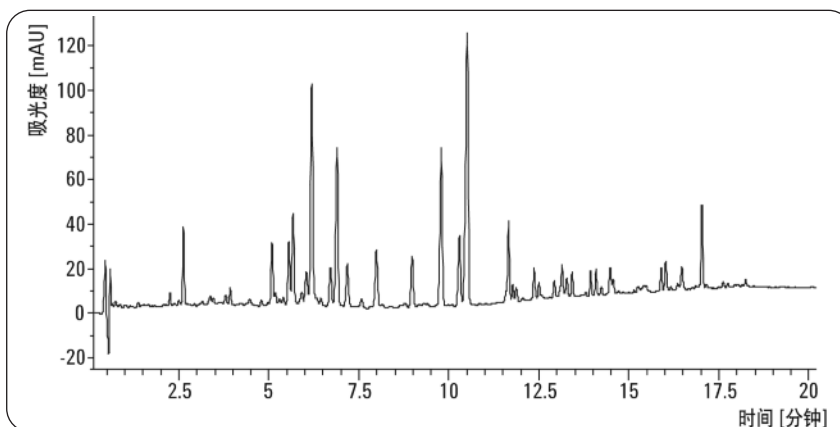


图 3
在 Agilent 1200 系列 RRLC 系统上采用 RRLC 方法 1 分析 NCLE 的色谱图。色谱条件见表 1

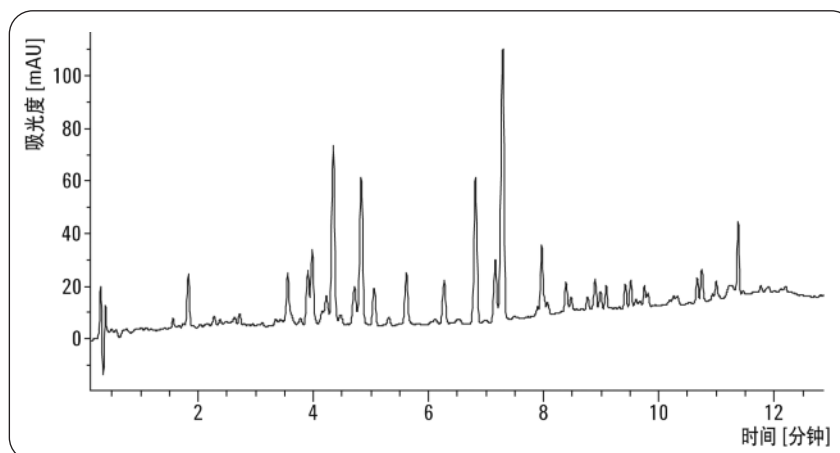


图 4
在 Agilent 1200 系列 RRLC 系统上采用 RRLC 方法 2 分析 NCLE 的色谱图。色谱条件见表 1

使用 Agilent 1100 系列液相色谱仪常规方法的色谱条件:	RRLC 方法 1 的色谱条件:	RRLC 方法 2 的色谱条件:	RRLC 方法 3 的色谱条件:
色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18, 4.6 x 250 mm, 5 μm 粒径	色谱柱: Agilent ZORBAX XDB C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 μm 粒径	色谱柱: Agilent ZORBAX XDB C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 μm 粒径	色谱柱: Agilent ZORBAX XDB C18, 4.6 x 50 mm, 1.8 μm 粒径
流动相: A: 水; B: 乙腈	流动相: A: 水; B: 乙腈	流动相: A: 水; B: 乙腈	流动相: A: 水; B: 乙腈
梯度: 0 分钟, 20 %B; 10 分钟, 30 %B; 20 分钟, 35 %B; 30 分钟, 40 %B; 40 分钟, 60 %B; 50 分钟, 100 %B	梯度: 0 分钟, 20 %B; 3 分钟, 30 %B; 7 分钟, 35 %B; 10 分钟, 40 %B; 13 分钟, 60 %B; 17 分钟, 100 %B	梯度: 0 分钟, 20 %B; 1.5 分钟, 30 %B; 5 分钟, 35 %B; 7 分钟, 40 %B; 10 分钟, 60 %B; 12 分钟, 100 %B	梯度: 0 分钟, 30 %B; 2.5 分钟, 60 %B; 5 分钟, 100 %B
流速: 1.0 mL/min	流速: 1.0 mL/min	流速: 1.5 mL/min	流速: 2.5 mL/min
进样体积: 5 μL	进样体积: 5 μL	进样体积: 5 μL	进样体积: 5 μL
二极管阵列检测	二极管阵列检测	二极管阵列检测	二极管阵列检测
列检测: 203 nm ± 8 nm, 参比 360 nm ± 100 nm	列检测: 203 nm ± 8 nm, 参比 360 nm ± 100 nm	列检测: 203 nm ± 8 nm, 参比 360 nm ± 100 nm	列检测: 203 nm ± 8 nm, 参比 360 nm ± 100 nm

表 1
色谱条件

图 4 显示了用 RRLC 方法 2 分析 NCLE 样品所得的色谱图。流速提高到 1.5 mL/min，缩短了分析时间。同时还保持了与图 3 结果相同或相当的性能。对于复杂样品，缩短分析时间意味着损失峰容量。因此，用户应权衡峰容量和分析时间做出选择。

如实验部分所述，三种样品取自不同部位。图 5 为用 RRLC 方法 1 分析三七根提取物（NRE）样品的色谱图。该样品采用不同的步骤从三七根中提取的。色谱峰形显示 NRE 和 RCLE 含有不同种类的皂甙和其它成分。为了检验我们建立的 RRLC 方法能否用于其它三七样品的分析，我们在当地中药店购买了三七，品牌为同仁堂，药店已经把这种三七制成了粉末。对该三七样品分析的色谱图见图 6 和图 7。图 6 中的色谱图为采用 RRLC 方法 1 所得，图 7 采用的是 RRLC 方法 3。与需要 60 分钟以上分析时间的常规 HPLC 方法相比，图 7 中的色谱图显示 4 分钟即可完成分析。三七茎和叶提取物比所分析的其它样品更复杂，使用 RRLC 方法 1 或 2 在保证分离度的同时节省了分析时间。对于像同仁堂三七提取物这样不太复杂的样品，可以用更快速方法在较短的时间内完成分析，如图 7 所示。

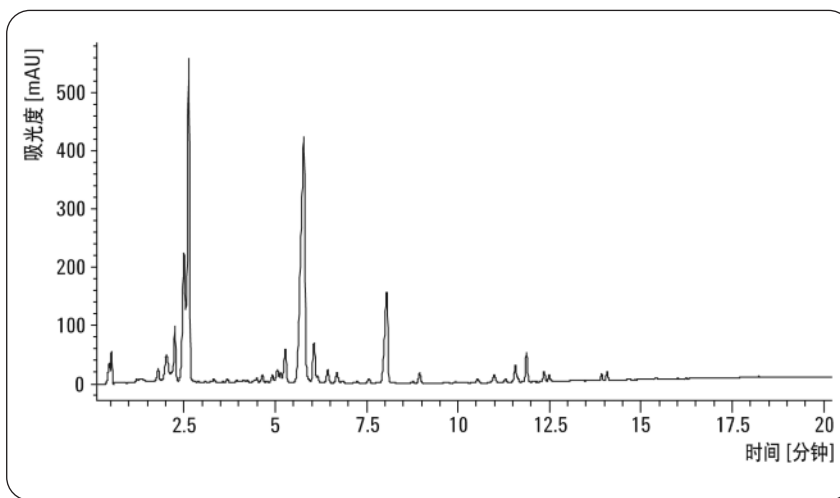


图 5 在 Agilent 1200 系列 RRLC 系统上用 RRLC 方法 1 分析 NRE 的色谱图。色谱条件见表 1

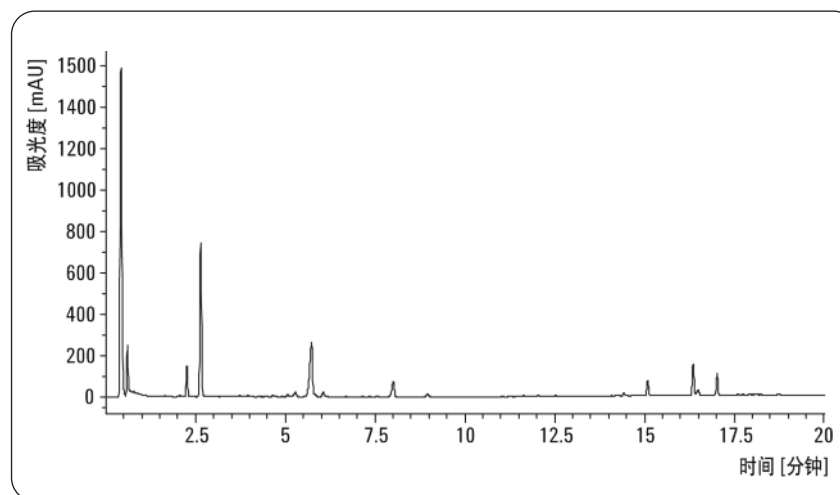


图 6 在 Agilent 1200 系列 RRLC 系统上用 RRLC 方法 1 分析同仁堂三七的色谱图。色谱条件见表 1

定量结果

用 RRLC 方法 2 分析了实验部分列出的标准品。采用不同浓度的标准品建立校正曲线, 测定三个样品的浓度。定量结果见表 2。NCLE 含有许多种类的皂甙, 但不含 Rc 或 Re。NRE 含皂甙的种类较少, 但却包含了本研究所分析的 5 种标准品。同仁堂三七提取物不含多种皂甙, 也不含 Rc 或 Re。R1、Rb1 和 Rg1 的含量高于 NCLE 和 NRE。所有样品中三七 R1 的浓度为 0.029 到 0.89 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。本研究中的定量方法可用于对不同方法提取的三七进行质量控制。

结论

中药是复杂的天然产物, 用常规 HPLC 方法分析需要高性能的系统和较长的分析时间。本研究所建立的 RRLC 方法显示了如何在保持复杂组分良好分离度的同时缩短分析时间。色谱图显示不同三七提取物样品有不同的色谱峰形。如果将应用需求考虑在内, 还可以采用更快流速的 RRLC 获得更快速的分析方法。本研究中所建立的定量方法可轻松用于三七产品的质量的控制。采用 RRLC 方法保持或提高了性能, 同时大大缩短了分析时间, 从而增加了样品通量、降低了成本。

参考文献

1. Wei J.X., Du Y.C., "Modern science research and application of panax notoginseng", *Yunnan Science and Technology Press, Kunming, China, 1996*.

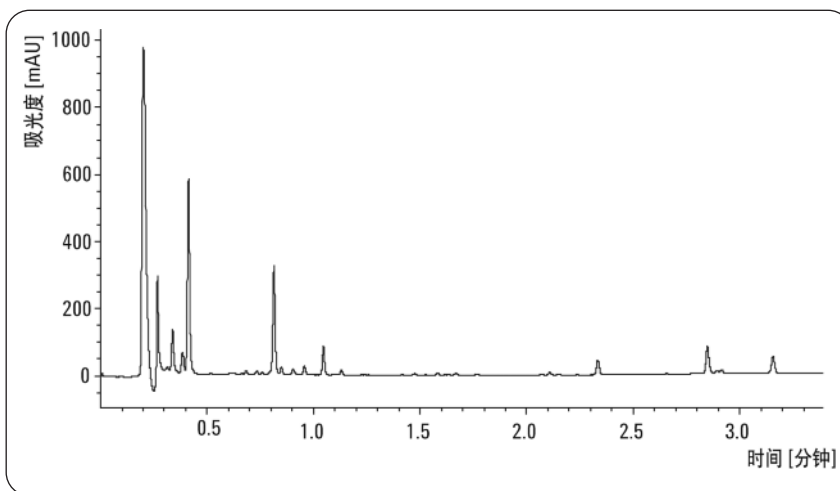


图 7 在 Agilent 1200 系列 RRLC 系统上用 RRLC 方法 3 分析同仁堂三七的色谱图。色谱条件见表 1

标准品	公式 Y: 峰面积 x: 含量(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	校正	NCLE 中的浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	NRE 中的浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	同仁堂三七粉中的浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
R1	$Y = 54.03850x + 0.395722$	0.99995	0.029	0.48	0.89
Rb1	$Y = 71.64751x - 0.159297$	1.0000	0.18	4.64	2.136
Re	$Y = 93.85331x + 3.83488$	0.99982	N/A	1.28	N/A
Rg1	$Y = 151.66579x + 0.501417$	1.0000	0.07	1.52	1.54
Rc	$Y = 11.12002x + 0.128832$	0.99980	N/A	0.025	N/A

表 2 皂甙标准品的定量结果

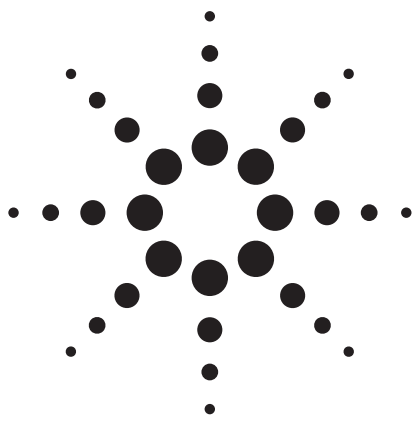
2. Angelika Gratzfeld-Huesgen, "使用亚二微米粒径的色谱柱, 用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱 (RRLC) 系统进行快速和超快速分析, 并与常规 Agilent 1100 系列液相色谱系统进行比较", *安捷伦应用报告, 出版号 5989-5672CHCN, 2006*。

3. Michael Woodman, "提高快速高效分离方法转换的效率", *安捷伦应用报告, 出版号 5989-5177CHCN, 2006*。

4. Michael Frank, "Saving analysis time and gaining resolution by simple means", *Agilent Application Note, Publication Number 5989-6819EN, 2007*。

5. Lau A.J., Woo S.O., Koh H.L., "Analysis of saponins in raw and steamed Panax notoginseng using high-performance liquid chromatography with diode array detection", *J. Chromatogr. A, 1011, 77-87, 2003*。

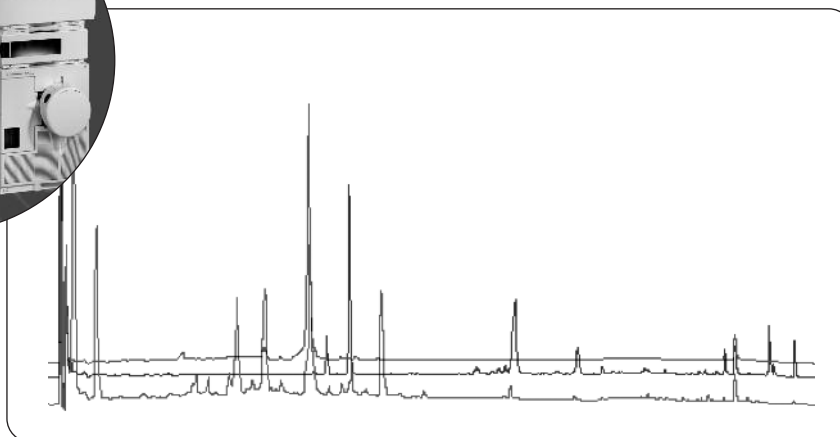
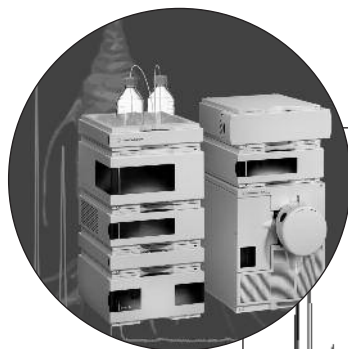
徐智秀是安捷伦科技公司中国上海的应用化学家。



使用带 UV 和 MS 检测的高分离度快速液相色谱仪建立中药制剂的可靠质控方法

应用报告

徐智秀



摘要

安捷伦仪器:

1200 系列高分离度快速液相色谱系统
6140 四极杆质谱系统

应用领域:

中药

本应用报告报导了采用带紫外-可见和四极杆质谱检测器的高分离度快速液相色谱仪，建立分析各种中药(TCM)及中药制剂的可靠质控方法。比较了不同中药的 UV 和 MS 检测的色谱图，并通过结合 UV 与 MS 图谱鉴定目标化合物。

前言

中国有着长期使用中药和中药制剂的历史，对其疗效有着丰富的经验。然而，一直以来质量控制却只是基于中草药的外观。随着新技术的发展，人们发现中药中含有成百上千种化合物，其浓度范围差异很大。而且，不同生长地域、不同采收时节，以及不同炮制和加工工艺，都会影响中草药的组分。因此，控制中药中化合物的质量极具挑战。由于特定组分的中药制剂常常包含多种中药，所以，现在只检测中药制剂中 1 种或 2 种成分的方法已不足以控制其质量。例如，芪参益气滴丸，一种用于治疗冠心病的专利中药，就包含以下四种中药成分：

- 黄芪(Astragali)
- 丹参(Salviae miltiorrhizae)
- 三七(Notoginseng)
- 降香(Lignum dalbergine orodoriferae)

本研究以芪参益气滴丸为样品，用带紫外-可见和质谱检测的高分离度快速液相色谱 (RRLC)，建立了一种对中药进行质量控制的新方法。本研究主要目的是建立一种可靠的方法，检测在加热或混合过程中不发生改变的潜在目标化合物。

实验部分

仪器

- Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统，包含带真空脱气机的 SL 型二元泵、SL 型柱温箱和配置微量流通池 (2 μ L 体积, 3 mm 光程) 的 SL 型二极管阵列检测器

- 配置 ESI 源的 Agilent 6140 四极杆质谱系统
- 安捷伦化学工作站 B.02.01 SR1，用于数据采集和处理
- Agilent ZORBAX SB-C18 RRHT 色谱柱，3.0 x 50 mm, 1.8 μ m 粒径
- 流速：1.0 mL/min (被动分流器将进入 MS 的流速降低至 0.4 mL/min)
- 柱温：45 $^{\circ}$ C
- 检测波长：203 nm
- 峰宽：0.5 s
- 狭缝宽度：4 nm
- 光谱：190-400 nm，步进 2 nm

标准品

丹酚酸 B、丹参酮 I、丹参酮 IIA、隐丹参酮、丹参素、三七皂甙 R1 和黄芪甲苷均购自中国药品生物制品检定所 (NICPBP)。人参皂甙 Rg1、人参皂甙 Rb1、3,4-二羟基苯甲醛、3,4-二羟基苯甲酸、人参皂甙 Re 和人参皂甙 Rc 购自美国 Sigma-Aldrich 公司

溶剂

乙腈购自美国 Fisher 公司，水经 Milli-Q 纯水系统制备。

样品和样品制备

芪参益气滴丸、黄芪、丹参、三七中间体提取物和降香挥发油由中国 TASLY 制药公司友情赠送。中药材购自当地中药店。

将滴丸、中药提取物和中药材溶解在 70% 甲醇/水溶液中，超声处理 30 分钟，用 0.22 μ m 滤膜过滤。

RRLC 方法

- 流动相：
 - A: 0.1% 甲酸的水溶液
 - B: 0.1% 甲酸的乙腈溶液
- 梯度：0 分钟，10% B；8 分钟，38% B；12 分钟，100% B；保持 3 分钟，然后至 10% B

MS 方法

- 扫描：80-1400 (正/负)
- 碎裂电压：70 (正/负)
- 干燥气：12 L/min
- 雾化器压力：50 psi
- 干燥气温度：50 $^{\circ}$ C
- 毛细管电压：3200 V (正/负)

结果与讨论

用安捷伦方法转换工具 (可提供光盘，出版号 5989-5130EN) 将传统液相色谱方法转为高分离度快速方法。

丹参、三七、黄芪和降香提取物的比较

图 1 显示，在 203 nm 下得到的丹参和三七的色谱图与混合提取物完全不同。混合和加热后，某些色谱峰消失，并出现了一些新色谱峰。

这说明，在质控过程中对目标化合物进行筛查是重要的一步，以确定该化合物在生产过程中没有改变。大多数研究人员采用 203 nm 进行检测，因为主要活性成分是在 203 nm 有弱吸收的皂甙。但在 203 nm 下出现的几个大峰可能都与质量控制无关，而小峰则可能对活性成分的研究更为重要。因此，需要用灵敏度更高的检测器进行补充检测，以提供组分的更多信息。

不同检测器和条件的比较

图2显示了UV和MS检测结果的差异。质谱总离子流色谱图(TIC)中出现的峰更多,因为某些组分没有UV吸收或吸收很弱。采用MS检测增加了另一方面的信息,并且提供了不同化合物的更多结构信息。负极性模式给出了更完整的色谱峰信息,可以对目标化合物进行质谱鉴定。

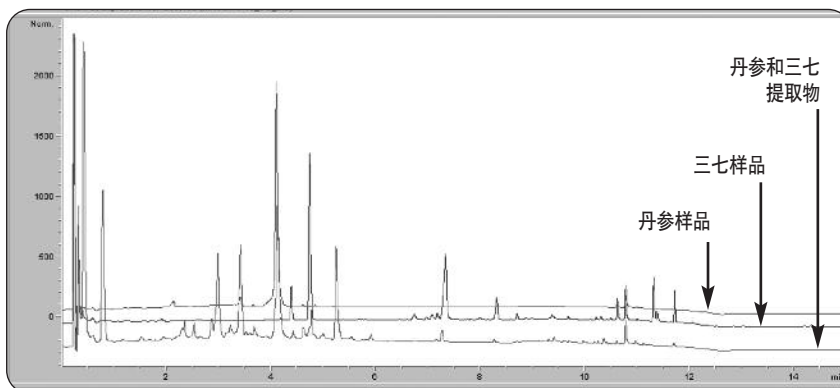


图1 丹参和三七及混合提取物的色谱图

芪参益气滴丸和不同提取物的比较

图3显示了从三种提取物和其它添加剂中制备的丹参、三七、黄芪和降香提取物,以及芪参益气滴丸的色谱图。标号的色谱峰为该中药制剂质量控制扫描的目标化合物。根据UV和MS数据,研究了不同色谱峰,以确定这些化合物是否发生了改变。表1列出了鉴定结果。

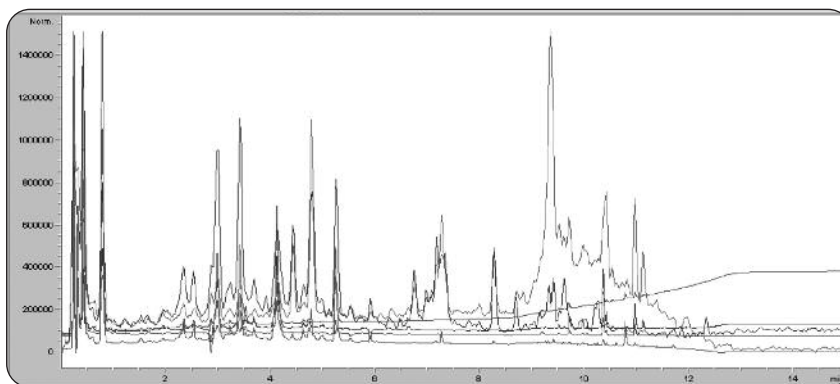


图2 丹参三七混合提取物的色谱图,显示了UV和MS检测得到不同结果

结论

本应用报告报导了采用UV和MS检测的RRLC方法,比目前药典的质量控制方法更加可靠,因为该方法可以根据UV和MS检测器提供的信息追踪中药中几种成分的质量。由于在生产和制备过程中这些组分可能发生改变,所以追踪这些组分非常重要。用于质谱检测的Agilent 6140四极杆质谱使用简便,并能与Agilent 1200系列RRLC系统和安捷伦化学工作站软件完全集成。

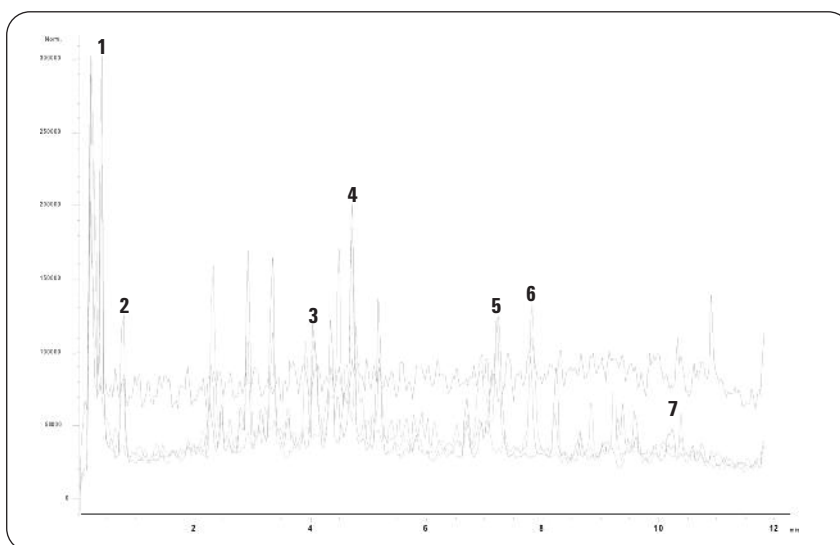


图3 三种中药组合和滴丸样品的负极性总离子流图比较

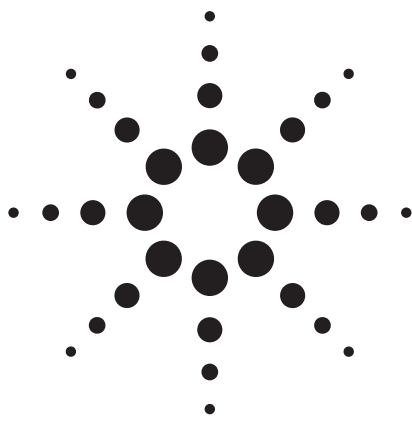
参考文献

1. Ai-hua Liu, et.al., *Journal of Chromatography B*, 846, 32-41, **2007**.
2. Jin-huai Liu, et.al., *Journal of Chinese Pharmaceutical Science*, 13 (4), **2004**.
3. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 1676-1680, **2005**.
4. 安捷伦应用报告, 出版号 5989-4506EN、5989-5493EN、5989-6757EN。

色谱峰	化合物	MS	UV λ_{\max} (nm)
1	丹参素	197 [M-H] ⁻ , 395 [2M-H] ⁻	280
2	原儿茶醛	137 [M-H] ⁻ , 275 [2M-H] ⁻	225, 280, 310
3	丹酚酸 B	717 [M-H] ⁻	260, 280
4	人参皂甙 Rg1	845 [M+HCOO] ⁻	210
5	人参皂甙 Rb1	11071[M-H] ⁻	210
6	黄芪甲苷 IV	829 [M+HCOO] ⁻	210
7	丹参酮 I	295137 [M+H ₂ O] ⁻	230

表 1
目标化合物结构式及检测信息 (数字代表图 3 中的色谱峰)

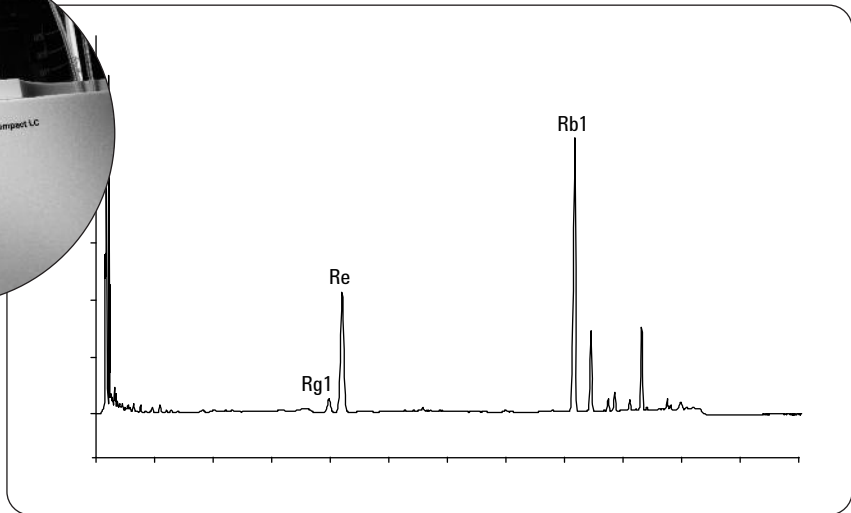
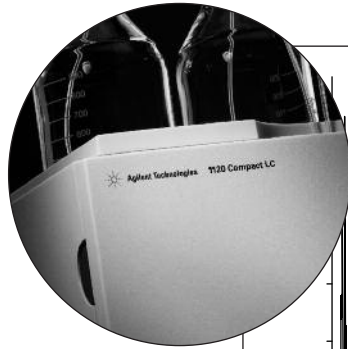
徐智秀是安捷伦科技公司中国上海的应用化学家。



使用 Agilent 1120 一体式液相色谱仪分析 人参和西洋参

应用报告

徐智秀



摘要

安捷伦仪器:

1120 一体式液相色谱仪
EZChrom Elite Compact 软件
HC-C18(2)色谱柱

应用领域:

中药

Agilent 1120 一体式液相色谱仪是进行常规、分析型液相色谱的明智选择。它是一款以使用简便、性能强大和可靠性优良为特点的一体式液相色谱仪。因而能获得高精度的保留时间和峰面积，以及对待测化合物的低检测限，尤其适用于传统中药的常规分析。本应用报告采用优化的方法对最著名的中药人参和西洋参进行分析，得到色谱图，结果显示两者具有不同的色谱峰形，特定皂甙的含量也各不相同。

前言

在中国及其它国家，中药（TCM）有着长期使用的历史，其疗效也已广为人知。人参，可以说是最著名的中药，长期以来被用作滋补、抗疲劳、镇静和治疗胃溃疡的药物。在多种中药制剂中也广泛使用。另一种著名的中药是西洋参，具有与人参类似的疗效，但由于所含皂甙不同，两者也有一些区别。

按照中华人民共和国药典方法，人参必须要用 HPLC 测定人参皂甙 Rg1、Re 和 Rb1，对西洋参也有类似的要求，也要测定上述皂甙。这些要求使测定人参和西洋参中人参皂甙 Rg1、Re 和 Rb1 对中药材和最终制剂的质量控制非常重要。

本研究中，我们用 Agilent 1120 一体式液相色谱仪建立了测定人参和西洋参中人参皂甙的 HPLC 方法。

实验

仪器

- Agilent 1120 一体式液相色谱仪，包括带集成式脱气机的梯度泵、带样品瓶盘的自动进样器、柱温箱和可变波长检测器，见图 1
- Agilent HC-C18(2)，高碳载量，150 x 4.6 mm，5 μ m 粒径色谱柱
- Agilent EZChrom Elite Compact 软件

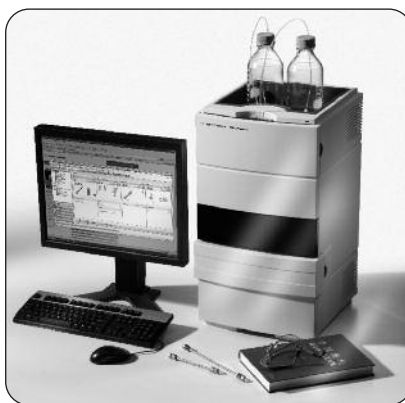


图 1
Agilent 1120 一体式液相色谱仪

样品和样品制备

人参和西洋参均购自当地中药店，样品处理方法如下：称取 1 g 粉末，溶解在正丁醇饱和的 50 mL 水中。该溶液用超声处理 30 分钟，300 rpm 离心 5 分钟。蒸干溶剂，残留物用 5 mL 甲醇溶解。最终溶液进样前经 0.20 μ m 滤膜过滤。

色谱条件

- 流动相：
A：水，B：乙腈
- 梯度：0 分钟，19% B；35 分钟，19% B；55 分钟，29% B；70 分钟，29% B；100 分钟，40% B
- 流速：1.0 mL/min
- 进样量：10 μ L
- 柱温：40 $^{\circ}$ C
- 检测波长：203 nm

结果与讨论

人参分离色谱图见图 2。获得这张色谱图所用的方法与中华人民共和国药典中规定的方法相同。色谱图显示所有目标化合物都得到了良好分离。人参皂甙 Rg1 和 Re 完全分开，表明 Agilent 1120 一体式液相色谱仪非常适用于这一分析。

西洋参分离色谱图见图 3。色谱图显示目标人参皂甙均得到良好分离。

从人参和西洋参的色谱图可以看出，两种样品的色谱图形及人参皂甙的浓度各不相同。对于像人参和西洋参这样的复杂中药样品，Agilent 1120 一体式液相色谱仪是在常规分析工作中获得良好结果的可靠工具。

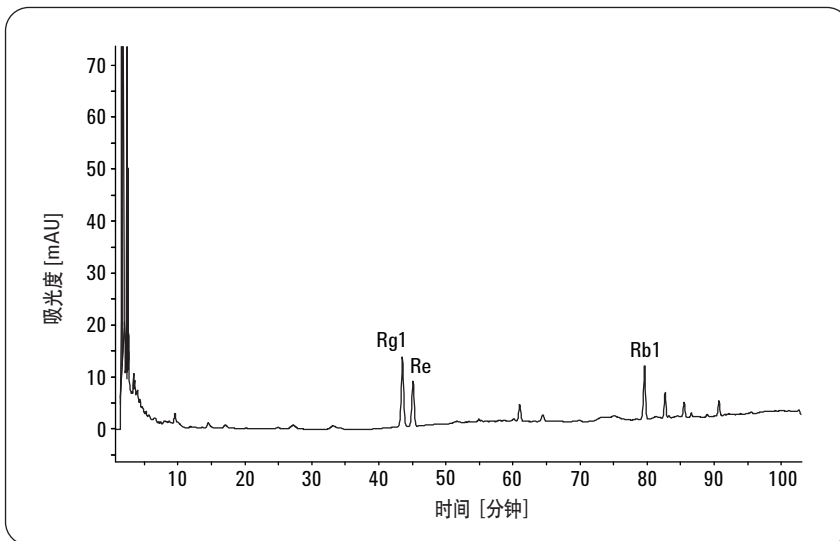


图 2
在 Agilent 1120 一体式液相色谱系统上用 CHP 方法分析人参的色谱图

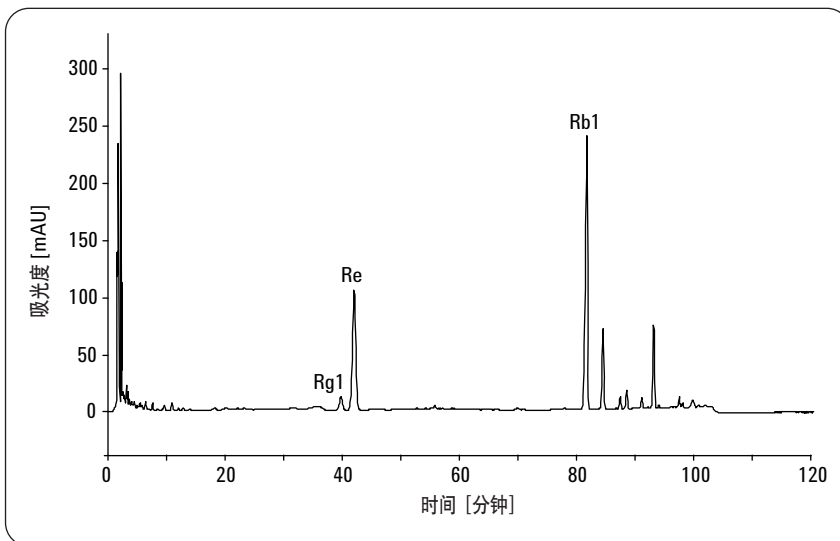


图 3
在 Agilent 1120 一体式液相色谱系统上分析西洋参的色谱图

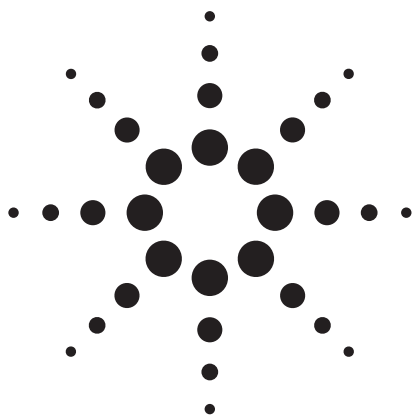
结论

虽然中药是复杂的天然产物，但本研究证明，Agilent 1120 一体式液相色谱仪能够分析其活性组分，并获得了良好的分离性能。结果表明，Agilent 1120 一体式液相色谱仪适用于复杂中药样品的常规质量控制检测。

参考文献

1. 中华人民共和国药典，第一卷，2005

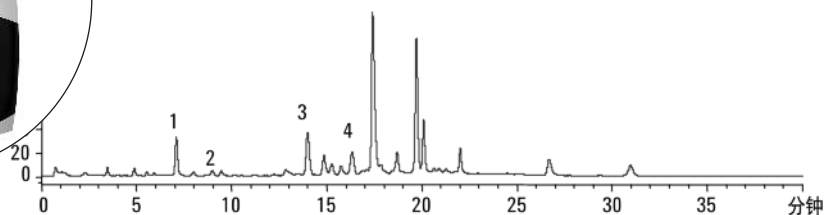
徐智秀是安捷伦科技公司中国上海的应用化学家。



采用 Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器 分析传统中药

应用报告

徐智秀



安捷伦仪器:

- Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统
- Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器

应用领域:

- 中药 (TCM)

摘要

中药里经常有一些成分必须用 HPLC 检测，但缺乏生色团，在紫外检测下没有信号。Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器 (ELSD) 可以检测比流动相挥发性低的所有溶质，因此是一种极好的替代手段。在《中国药典 2005 版》中，有几种需要使用 ELSD 检测的中药成分，本应用报告列举了两个例子——银杏 (*Ginkgo biloba* L) 中的黄酮，以及黄芪中的黄芪甲苷。

前言

蒸发光散射检测器作为 HPLC 系统中对无 UV 吸收分析物的准通用型检测器，正得到越来越广泛的应用。特别是在草药中，越来越多无 UV 吸收的化合物需要以非衍生化状态进行检测。Agilent 1200 系列 HPLC 产品线中的一个新成员——蒸发光散射检测器——将为这类应用提供帮助。

Agilent 1200 系列 ELSD 可以检测比流动相挥发性低的所有溶质。只有样品形成的非挥发性颗粒才能产生信号。如果某些化合物没有生色团，其挥发性又比液相色谱溶剂低，ELSD 就可作为使用简便、灵敏度高的优良检测器。梯度流动相也不干扰检测。如果流动相在特定 UV 波长下产生强吸收，则 ELSD 将是另一种替代手段，可以保持基线的稳定，并产生强信号。

ELSD 的工作原理包括三个主要的连续步骤：

- 用氮气或空气使色谱洗脱液雾化
- 在相对低的温度下让流动相蒸发
- 残留颗粒（包括分析物分子）产生光散射

图 1 显示了检测的各个阶段。

中药的某些组分没有生色团，因此需要一种通用的检测器进行检测。Agilent 1200 系列 ELSD 与其它通用检测器相比有明显优势。质谱 (MS) 较昂贵，而且需要经过良好培训、具备相关知识的操作者。质量控制部门的常规分析工作一般不用质谱。示差折光检测器能进行通用的检测，但只能用于等度分析，不适

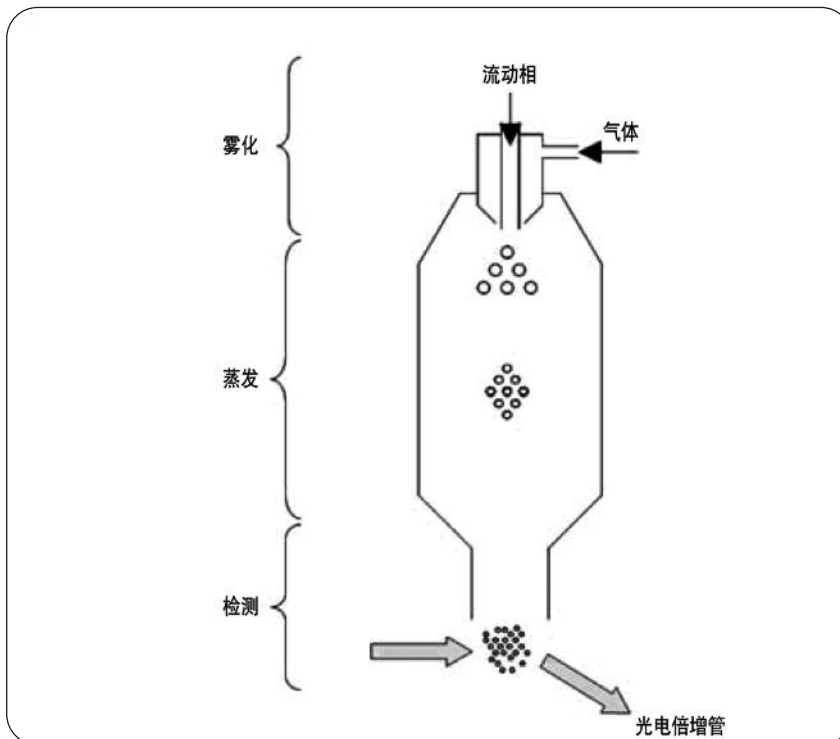


图 1
Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器的截面图

合分离复杂混合物。如果配置 UV 检测器的系统串联一台 ELSD，将能同时检测各类结构的多种化合物（带生色团或不带生色团）。

中国药典 2005 版中，有几种中药成分需要用 ELSD 检测。例如，银杏中的黄酮和黄芪中的黄芪甲苷。

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 及其提取物不仅在中国非常有名，而且也在世界各地被广泛用于治疗心脑血管疾病。它的疗效主要来源于与黄酮一起存在的银杏内酯和白果内酯。质量控制方法必须能够测定银杏及其制品中黄酮的含量。

黄芪 (*Radix Astragali*)，是一种在中国广泛使用的中药。药理实验和临床研究已证明，黄芪具有多种生物活性，被用于治疗肾炎、糖尿病、高血压等疾病。其有效成分之一，黄芪甲苷，不含生色团，需要一种通用检测器来测定其含量。

本应用报告中，我们探讨了银杏黄酮和黄芪甲苷的分离和定量分析。本报告还提供了使用 Agilent 1200 系列 ELSD 的一些建议。

实验部分

仪器

开发高分离度快速液相色谱 (RRLC) 方法, 使用配置如下的 Agilent 1200 系列 RRLC 系统:

- 带脱气机的 Agilent 1200 系列 SL 型二元泵
- Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器
- Agilent 1200 系列 SL 型柱温箱
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器, 配置微量流通池 (2 μL 体积, 3 mm 光程)
- Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器, 带标准喷雾器
- Agilent 化学工作站 B.03.02, 用于数据采集和处理
- Agilent ZORBAX XDB-C18 快速分离高通量 (RRHT) 色谱柱, 3.0 x 50 mm, 1.8 μm 粒径

系统设置

HPLC 组件按一般方式连接, 如图 2 所示。Agilent 1200 系列 ELSD 通过 RS-232 电缆与计算机相连。遥控电缆将 Agilent 1200 系列 ELSD 与 HPLC 其它组件连接。

系统测试

实验开始之前, 应对 Agilent 1200 系列 ELSD 进行测试, 以确保其处于良好状态, 且性能合格。

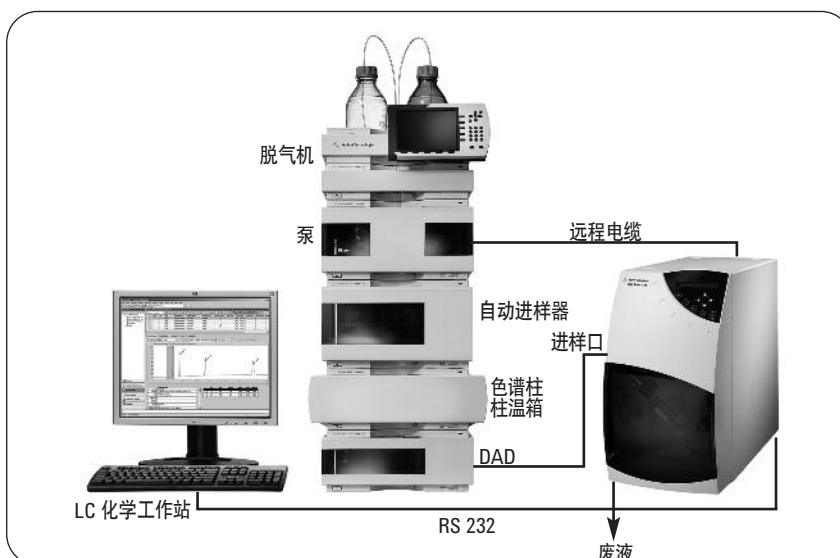


图 2
配置蒸发光散射检测器的 Agilent 1200 系列 RRLC 系统

测试条件:

- 样品: 咖啡因, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (或相似浓度)
- 溶剂: 等度, 80% 水, 20% 乙腈
- 流速: 1 mL/min
- 进样量: 20 μL
- 色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 x 150 mm, 5 μm (或其它相当规格的色谱柱)
- 柱温箱 (TCC) 温度: 40 $^{\circ}\text{C}$
- ELSD 温度: 40 $^{\circ}\text{C}$
- ELSD 压力: 3.5 bar (51 psi)
- ELSD 增益: 7
- ELSD 过滤器: 1 秒
- 一般系统: Agilent 1200 系列标准液相色谱系统 (请注意, 需要进行常规 HPLC 分析时, 也可以使用 Agilent

1200 系列 RRLC 系统)

方法运行后, 若仪器安装后处于良好状态, 应记录检测器响应值。以后每次需要的时候都应该用同样的方法进行性能检查。

ELSD 不能使用不挥发的缓冲液。如果不挥发的盐进入 ELSD, 检测器将无法区分这些不挥发颗粒是来自样品还是缓冲液。因而使基线明显抬高, 样品的信噪比降低。

由于 ELSD 只能检测挥发性比流动相差的化合物, 所以在开发新方法时, 应当用另一种检测器来确定所有化合物都可以从色谱柱中洗脱。

标准品和样品制备

本实验使用下列标准品、样品和溶剂：

- 标准品购自 NICBP (中国药品与生物制品检定所)
- 溶剂 (甲醇、乙腈、四氢呋喃) 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司
- 水经 Millipore 纯水系统制备
- 黄芪样品购自中药店
- 银杏提取物由用户馈赠

样品制备过程如下，称取 1 克样品，溶于 5 mL 甲醇，超声混合 30 分钟，过滤，取澄清溶液进样。

银杏分析方法

- 流动相： A = 水, B = 四氢呋喃/甲醇, 体积比 10/25
- 流速： 0.7 mL/min
- 梯度： 0 分钟, 12% B;
10 分钟, 16% B;
15 分钟, 22% B;
20 分钟, 30% B
- ELSD： 温度 = 40 °C,
压力 = 50 psi,
增益 = 7,
过滤器 = 3 秒

黄芪分析方法

- 流动相： A = 水, B = 乙腈
- 流速： 0.7 mL/min
- 梯度： 0 分钟, 20% B;
1 分钟, 30% B;
5 分钟, 35% B;
30 分钟, 100% B
- ELSD： 温度 = 40 °C,
压力 = 50 psi,
增益 = 5,
过滤器 = 3 秒

结果与讨论

银杏的分析

银杏及其制品的成分非常复杂，需要用 HPLC 进行良好分离。过去由于仪器的限制，常常采用等度方法。等度方法的缺点是分析时间长，分离度较差。本应用报告采用梯度方法，在较短的时间内获得较好分离。

图 3 显示的是银杏黄酮标准品的色谱图，ELSD 和 UV 两个通道信号的对比。黄酮在 210 nm 波长下有很低的响应，254 nm 没有响应。对 UV 和 ELSD 的灵敏度进行比较说明了测定银杏中黄酮时采用 ELSD

是必要的。本方法还能通过查看 UV 补充信号辨别这些色谱峰中是否包含纯的黄酮。

图 4 中的色谱图显示 ELSD 能够检测出银杏样品中的许多峰。该样品成分非常复杂，ELSD 信息有助于找出更多组分，包括缺乏生色团的成分。4 个黄酮峰彼此完全分离，并与其它组分分开。

运行 ELSD 方法时，即使 ELSD 信号中已经没有色谱峰出现，还是要监测 UV 通道，以确定所有组分都已从系统中洗脱出来，避免污染色谱柱和系统。

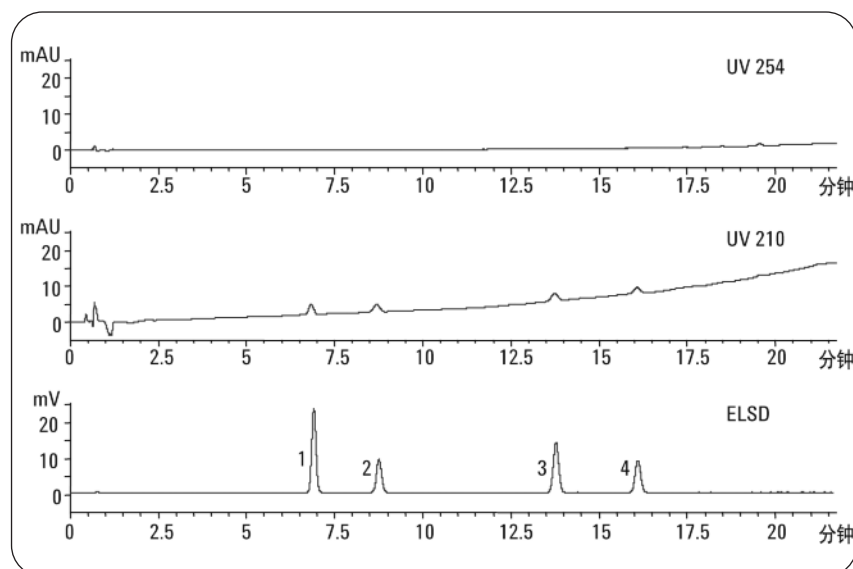


图 3
银杏黄酮 ELSD 和 UV 不同通道的色谱图比较

黄芪的分析

开发黄芪中黄芪甲苷的 HPLC 分析条件时，必须将所有标准品与真实中药样品中其它成分进行分离。为了缩短分离时间，可以采用梯度分析。在分离时间不太长，峰容量足够时可以用等度分析。图 5 上图显示了黄芪样品的梯度分析色谱图，下图是黄芪甲苷标准品的色谱图。上图显示黄芪甲苷与其它样品组分实现了良好的分离。

定量分析

ELSD 并不总是线性检测器。对某些化合物，浓度和峰面积只在一定范围内呈线性关系。在有些情况下，必须用非线性方程计算。

在本应用中，表 1 的结果表明是线性方程，因为所测样品在线性范围内呈良好的响应。

检测限与 ELSD 使用的方法条件有很大关系。例如，增益和过滤器等 ELSD 参数都影响检测限。

用本方法得到的检测限于表 2。表 2 中显示的数字表示用当前方法所能检测到的每个标准品的检测限。

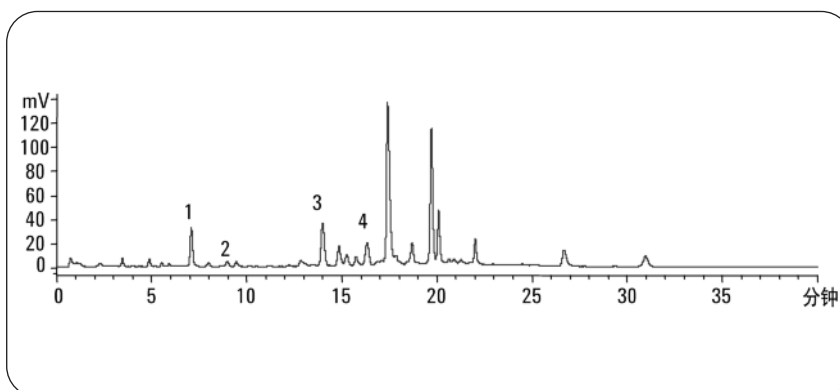


图 4
银杏样品的 ELSD 色谱图，标号的为黄酮峰

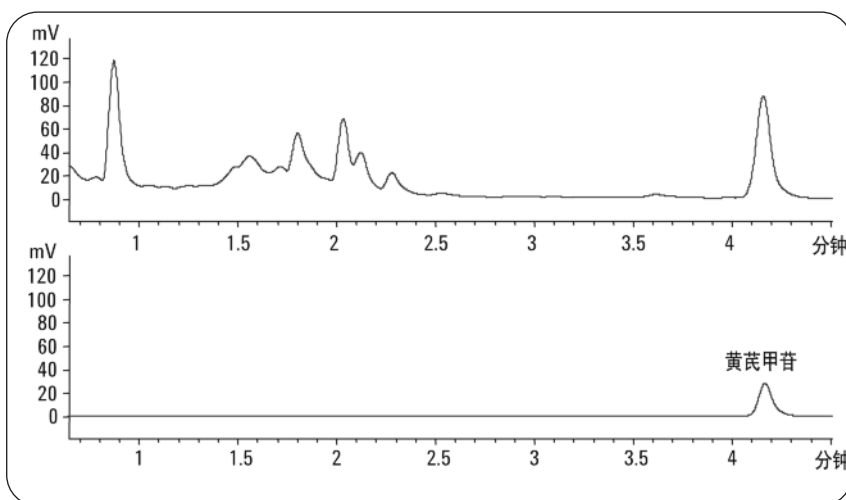


图 5
黄芪样品（上图）和黄芪甲苷标准品（下图）的 ELSD 色谱图

结论

本研究用 Agilent 1200 系列 RRLC 和 Agilent 1200 系列 ELSD 开发了两种方法。用这些方法对标准品和中药组分进行了良好分离。中药标准品的检测限也说明该系统可以检测低浓度的组分。本研究所进行的定量分析给出了满足中国药典要求的完全解决方案。该方法可用于含相关组分中药的质量控制。

参考文献

1. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, **2005**.
2. L.-W. Qi et al., "Quality evaluation of *Radix Astragali* through a simultaneous determination of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors", *J. Chromatogr. A*, **1134**, 162-169, **2006**.
3. Wang Qiao'e et al. "Progresses on Evaporative Light-scattering Detection" *J. of Instrumental analysis (Chinese)*, Vol. 25, No.6, 126-132, **2006**.
4. Roger Trones et. al "Modified laser light-scattering detector for use in high temperature micro liquid chromatography" *J. of Chrom A*, **814**, 55-61, **1998**.
5. B.T. Mathews et al. "Improving Quantitative measurements for the Evaporative Light Scattering Detector" *Chromatographia*, **60**, 625-633, **2004**.
6. E.Oppenheimer et. al "Examination of the concentration response Evaporative Light Scattering Mass Detector" *J. Chrom 323*, 297-304, **1985**.
7. M, Dreux et al. "The Evaporative Light Scattering Detector- a Universal Instrument for Non- Volatile Solutes in LC and SFC" *LC-GC Int, March* **1996**.
8. Su Hong et al. "Determination of Jujubaside A in Ziziphi Spinosae Mixture by HPLC-ELSD" *J. of Modern Food and Pharmaceuticals (Chinese)*, Vol. 17 No 6, 35-37, **2007**.

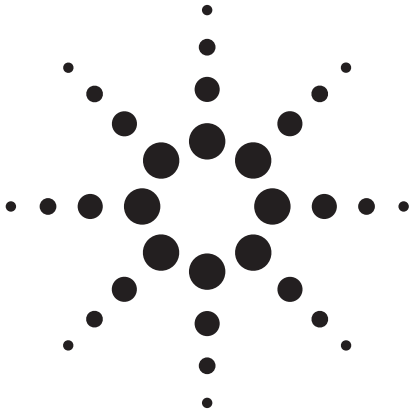
化合物名称	方程	线性范围 (µg/mL)	相关系数
银杏内酯 A	$y = 31.45689x - 4.18609$	20 - 2000	0.99791
银杏内酯 B	$y = 49.66089x - 2.95274$	260 - 2600	0.99932
银杏内酯 C	$y = 75.64218 + 17.60311$	20 - 2000	0.99468
白果内酯	$y = 89.66172x - 13.33119$	15 - 1500	0.99955
黄芪甲苷	$y = 15.8618x - 8.0644$	11 - 1100	0.9933

表 1
定量结果

化合物名称	检测限 (ng)
银杏内酯 A	12.5
银杏内酯 B	19.5
银杏内酯 C	30
白果内酯	15
黄芪甲苷	22

表 2
标准品的检测限

徐智秀是安捷伦科技公司中国上海的应用化学家。



采用 Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器分析中药

应用报告

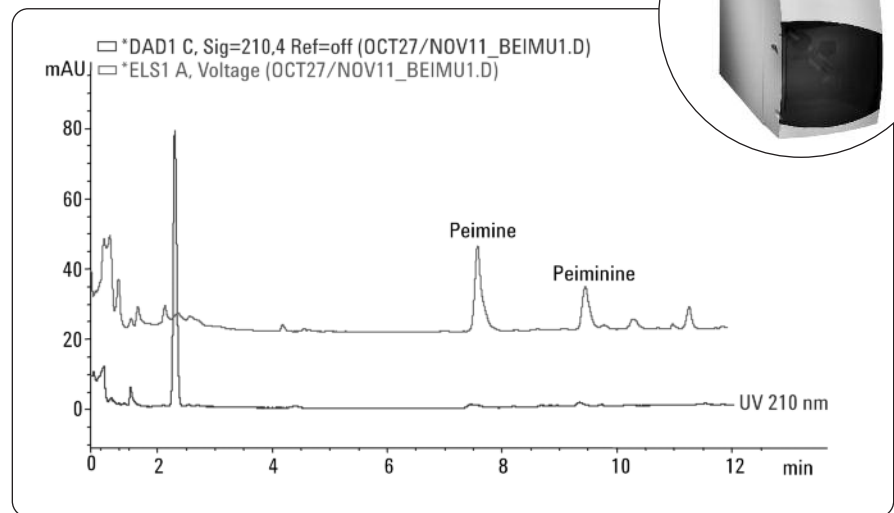
生产 QA/QC

作者

徐智秀

安捷伦科技公司

中国，上海



摘要

本应用报告报导了 5 种中药的 HPLC 分离方法，这些中药是浙贝母、知母、三金片、地肤子和路路通。对 HPLC 方法进行了分离优化，以得到最多的组分。还报导了样品制备方法，以便使读者能够遵循完整的方案。

前言

2005 版中国药典颁布了采用蒸发光散射检测器 (ELSD) 分析中药的几种重要方法 [1]。因为这些中药所含的化合物没有生色团或紫外吸收非常弱, 需要用一种像 ELSD 这样的通用检测器对中药中的这些化合物进行定量测定。另一篇应用报告报导了银杏叶和黄芪的 ELSD 分析 [2], 这是药典要求检测的两种中药。浙贝母、知母、三金片、地肤子和路路通是中国药典 2005 版要求用 ELSD 分析特定活性成分的其它中药。

分析方法的起始过程和定量部分已经在前面两篇应用报告中介绍过 [2,3], 按照药典要求进行定量分析非常简单, 只需要两个数据点, 用这两点的对数得到校正曲线, 即可定量。因此, 在本应用报告中将不再涉及定量分析。本文将介绍分离结果, 以及梯度和仪器参数。

由于中药相当复杂, 二极管阵列检测器 (DAD) 和 ELSD 都不能独立检测出所有成分。在本研究中, 将 DAD 和 ELSD 串联, 以最大限度地获得样品信息, 并监测系统洗脱的所有色谱峰。使最大数量的色谱峰得到良好分离, 还有助于用指纹图谱对其未知组分进行分析。

分离采用的是 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱 (RRLC) 系统。在这个系统上, 可以针对中药样品的不同分析需求, 轻松

地选择使用亚二微米 RRLC 色谱柱或常规 HPLC 柱。如果使用窄内径色谱柱, 因为峰宽变窄, 需要 RRLC 喷雾器 (安捷伦部件号 G4218-20004)。本应用报告中报导的实例, 兼顾了分离和样品通量两个因素。针对需要加快分离速度或提高峰容量的不同需要, 也可以使用同样填料但内径和长度不同的其它色谱柱。

实验

标准品和材料

路路通酸、地肤子皂苷 Ic、羟基积雪草苷、知母皂甙元、贝母甲素和贝母乙素均购于国家药品和生物制品检定所 (中国北京)。中药样品购自上海的中药店。

仪器

使用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统进行常规和 RRLC 方法开发。该系统包含以下组件:

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵, 配置真空脱气机
- Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器
- Agilent 1200 系列 SL 型柱温箱
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器, 配置微量流通池 (2 μ L 体积, 3 mm 光程)
- Agilent 1200 系列蒸发光散射检测器, 配置标准喷雾器
- 安捷伦化学工作站 B.03.02, 用于数据采集和处理

样品制备

路路通:

精确称取 0.6 g 粉末置于样品瓶中, 加入 20 mL 脱水乙醇, 称量混合物, 并超声 15 分钟。冷却后, 再精确称量。加脱水乙醇补充损失的溶剂, 充分混合并过滤。精确量取 10 mL 滤液, 蒸干。用脱水乙醇溶解残渣, 定容至 2 mL。溶液用 0.22 μ m 尼龙滤膜过滤后, 直接进样。

地肤子:

精确称取 0.5 g 粉末置于样品瓶中, 准确加入 10 mL 甲醇。精确称量混合物, 放置过夜, 并超声 30 分钟, 冷却后再称量。加甲醇补充损失的溶剂至最初重量, 充分混合。溶液用 0.22 μ m 尼龙滤膜过滤后, 直接进样。

三金片:

取 2 片研磨, 去除糖衣, 研至细粉。精确称取 0.5 g 粉末置于样品瓶中, 准确加入 10 mL 甲醇。溶液超声 30 分钟, 冷却, 充分混合并过滤。然后准确量取 5 mL 溶液, 该溶液用氨水定量冲洗 2 次 (每次 0.5 mL)。蒸干提取物, 用甲醇溶解残渣, 充分混合, 配制成分析溶液。溶液用 0.22 μ m 尼龙滤膜过滤后, 直接进样。

知母:

精确称取样品粉末 0.5 g 置具塞样品瓶中, 准确加入 10 mL 乙醇, 称重, 并浸泡过夜。样品超声处理 40 分钟, 冷却, 再称重。用乙醇补充缺失重量, 并充分混合。然后, 加入 10 mL 水和 1 mL 盐酸, 回流加热

2 小时。样品冷却后，边振摇边滴加 40% 氢氧化钠溶液，至溶液颜色由橘黄色骤变为橘红色。样品用氯仿萃取 2 次（每次 5 mL）。合并提取液，蒸干。用甲醇溶解残渣，并用甲醇稀释至最终体积 5 mL，充分混合。溶液用 0.22 μm 尼龙滤膜过滤后，直接进样。

浙贝母:

精确称取样品粉末 2 g 置具塞样品瓶中，加入 4 mL 浓氨水，浸泡 1 小时。准确加入 20 mL 氯仿和甲醇混合物 (4:1)。样品称重，在 80 °C 水浴上回流加热 2 小时。样品冷却后，再称重，用上述混合物补充减失的溶剂。过滤样品，准确量取 5 mL 滤液，在蒸发皿中蒸干。用甲醇溶解残渣，转移到样品瓶中，用甲醇稀释至最终体积 10 mL，充分混合。溶液用 0.22 μm 尼龙滤膜过滤后，直接进样。

方法

路路通:

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse C18, 4.6 x 150 mm, 1.8 μm
溶剂: A = 水 (0.1 % 醋酸), B = 甲醇
流速: 0.8 mL/min
梯度: 0 分钟, 80 %B; 10 分钟, 85 %B; 30 分钟, 100 %B
UV 检测器: 210 nm, 254 nm
ELSD 温度: 40 °C

ELSD 压力: 50 psi
ELSD 增益: 9
ELSD 过滤器: 3 s

地肤子:

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse C18, 4.6 x 100 mm, 3.5 μm
溶剂: A = 水 (0.1 % 醋酸), B = 甲醇, 等梯度, 90 %B
流速: 0.8 mL/min
UV 检测器: 210 nm, 254 nm
ELSD 温度: 40 °C
ELSD 压力: 50 psi
ELSD 增益: 9
ELSD 过滤器: 3 s

三金片:

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse C18, 4.6 x 100 mm, 3.5 μm
溶剂: A = 水 (0.1 % 醋酸), B = 甲醇
流速: 0.6 mL/min
梯度: 0 分钟, 45 %B; 10 分钟, 55 %B; 20 分钟, 100 %B
UV 检测器: 210 nm, 254 nm
ELSD 温度: 40 °C
ELSD 压力: 50 psi
ELSD 增益: 9
ELSD 过滤器: 3 s

知母:

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse C18, 3 x 50 mm, 1.8 μm
溶剂: A = 水 (0.1 % 醋酸), B = 甲醇
流速: 0.6 mL/min
梯度: 0 分钟, 45 %B; 5 分钟, 45 %B; 10 分钟, 80 %B; 15 分钟, 100 %B
UV 检测器: 210 nm, 254 nm
ELSD 温度: 45 °C
ELSD 压力: 50 psi
ELSD 增益: 9
ELSD 过滤器: 3 s

浙贝母:

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse C18, 3 x 50 mm, 1.8 μm
溶剂: A = 水 (0.03 % 氨水, pH 9), B = 乙腈
流速: 0.6 mL/min
梯度: 0 分钟, 45 %B; 5 分钟, 45 %B; 10 分钟, 70 %B
UV 检测器: 210 nm, 254 nm
ELSD 温度: 45 °C
ELSD 压力: 50 psi
ELSD 增益: 9
ELSD 过滤器: 3 s

结果和讨论

路路通

图 1 显示了 Fructus Liquidambaris (中文名: 路路通) UV-254 nm 通道和 ELSD 通道的色谱图。图 1 标出了路路通酸。比较两个通道的结果, 可以看出其中的区别。路路通酸在 UV-254 nm 通道中没有响应, 而对 ELSD 有良好响应。分析之初洗脱出的其它组分在 ELSD 上没有响应, 但 254 nm 紫外检测有响应。这里没有显示 210 nm 通道的图谱, 因为只有几个色谱峰, 而且吸收值很低。

有 2 对色谱峰, 分别标记为 1 和 2。我们对这 2 对色谱峰的分离进行了优化, 因为它们对 ELSD 比 UV 210 nm 的响应更强, 将来有可能成为要用 ELSD 进行定量分析的潜在化合物, 尽管我们还不知道它们的确切结构。

地肤子

图 2 显示了用 ELSD 和 UV 210 nm 两个通道对地肤子分离组分的检测结果。图中标示为地肤子皂苷 Ic, 其在 210 nm 有非常弱的紫外吸收。用 ELSD 比 UV 检测器检测到了更多的色谱峰, 说明地肤子中的某些组分没有生色团, 需要两个检测器串接, 在一次分析中得到两个通道的信息。一些较早洗脱的组分没有生色团, 只在 ELSD 通道中有响应。

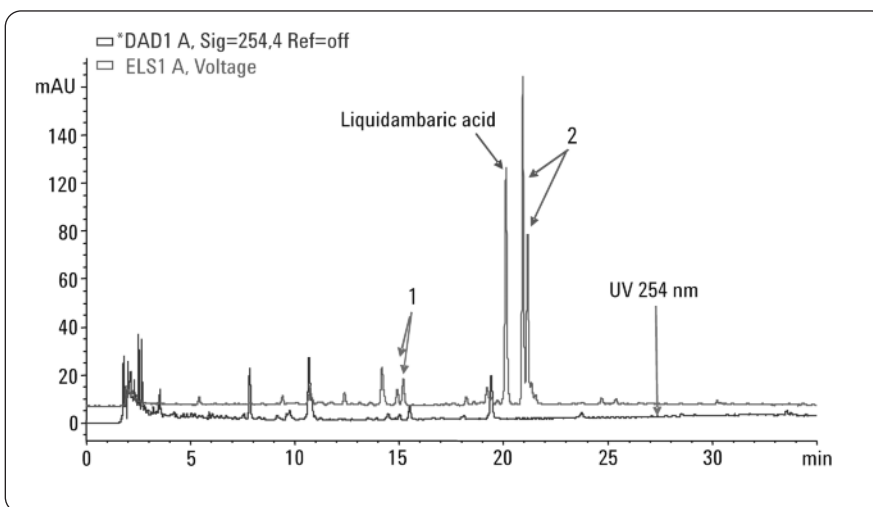


图 1
路路通的 ELSD 检测 (红色) 色谱图和 UV 通道 (蓝色) 色谱图的叠加

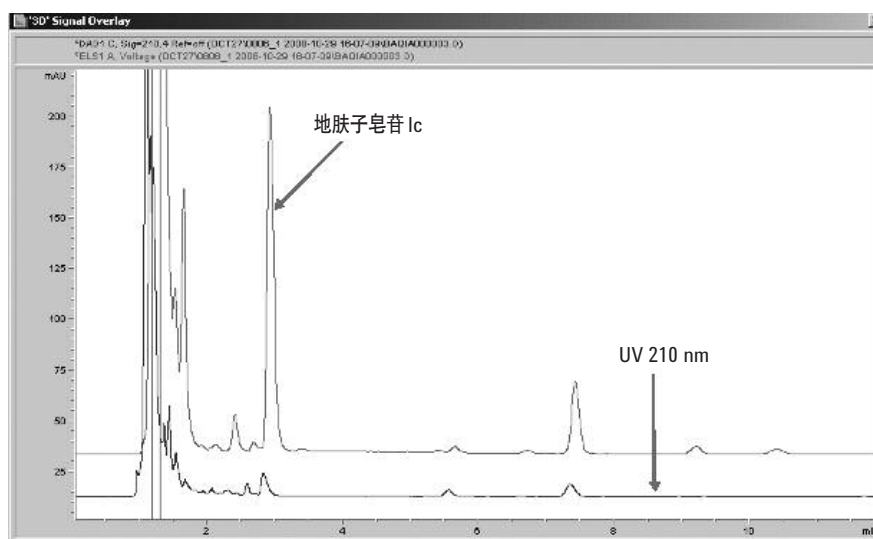


图 2
地肤子 ELSD 通道 (红色) 和 UV 210 nm 通道 (蓝色) 的色谱图

三金片

图 3 显示了三金片 ELSD 和 UV 210 nm 通道分析的色谱图。标出了其活性成分，羟基积雪草苷。210 nm 的紫外吸收信号显示色谱峰比 ELSD 通道少，因为注入色谱柱的大多数组分都没有生色团。另外，210 nm 的 UV 信号基线不平坦，因为用于分离的溶剂的吸收在梯度变化过程中有所改变。如果没有 ELSD，将不会得到三金片色谱峰的更多信息，也无法达到质量控制指纹图谱。

知母

ELSD 通道的色谱图显示，从中药店购得的知母质量不太好，因为知母皂甙元的峰很小。知母皂甙元在 210 nm 紫外检测波长下没有响应。对于知母的其他组分，ELSD 通道检测到的比紫外 210 nm 通道的色谱峰更多，而且两张色谱图有差异。要得到知母中有生色团和没有生色团组分的更多信息，需要使用这两种互补的检测器。

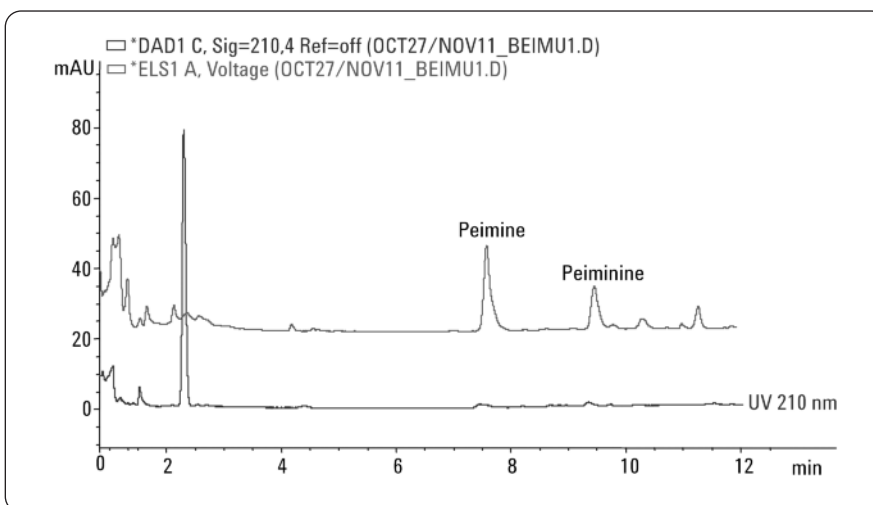


图 3
三金片 ELSD 通道（红色）和 UV 210 nm 通道（蓝色）的色谱图

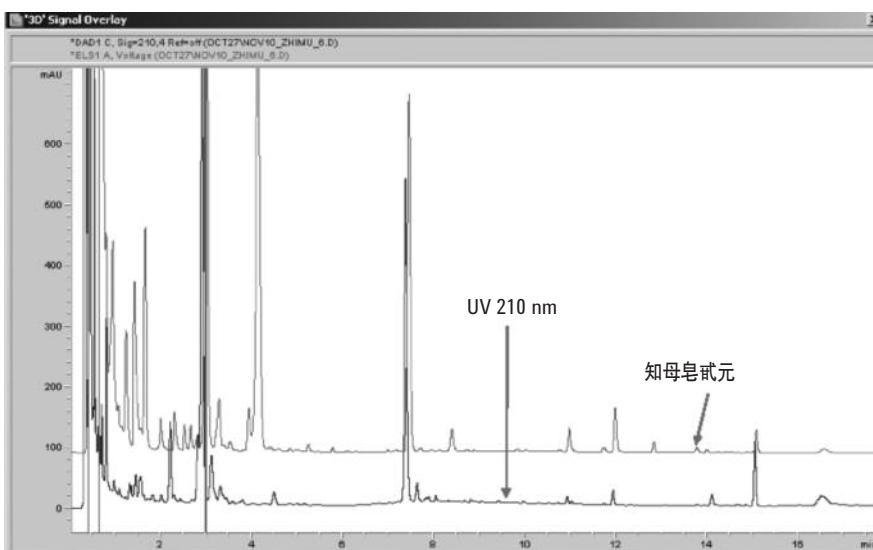


图 4
知母 ELSD 通道（红色）和 UV 210 nm 通道（蓝色）的色谱图

浙贝母

贝母甲素和贝母乙素是浙贝母中两种最重要的成分。210 nm 紫外检测只有很少的几个色谱峰。ELSD 检测结果显示，两种活性组分得到了良好分离，用亚二微米色谱柱在 Agilent 1200 系列 RRLC 系统上，只用 12 分钟即可完成分离。用现在的方法，这两种组分可以完全分离。如果峰容量不是问题，可以用 Agilent 1200 系列 RRLC 系统加快分析速度，得到更高的样品通量。

结论

在本应用报告和以前的应用报告 2 中，我们建立了中国药典 2005 版要求用 ELSD 检测中药的分析方法。探讨了各种样品的制备方法和仪器参数。

ELSD 是分析不含生色团化合物的最佳选择。当化合物在紫外区没有良好紫外吸收的官能团时，ELSD 可以提供更好的信号。当流动相采用有 UV 吸收的溶剂时，ELSD 还可以保持基线平稳。

将 UV 和 ELSD 串接进行检测非常必要，可以获得两个通道的信号，因为任何一种检测器单独使用都不能检测到所有的色谱峰。本应用报告所报导的方法可以用于质量控制部门，因为这里提供了详细信息。

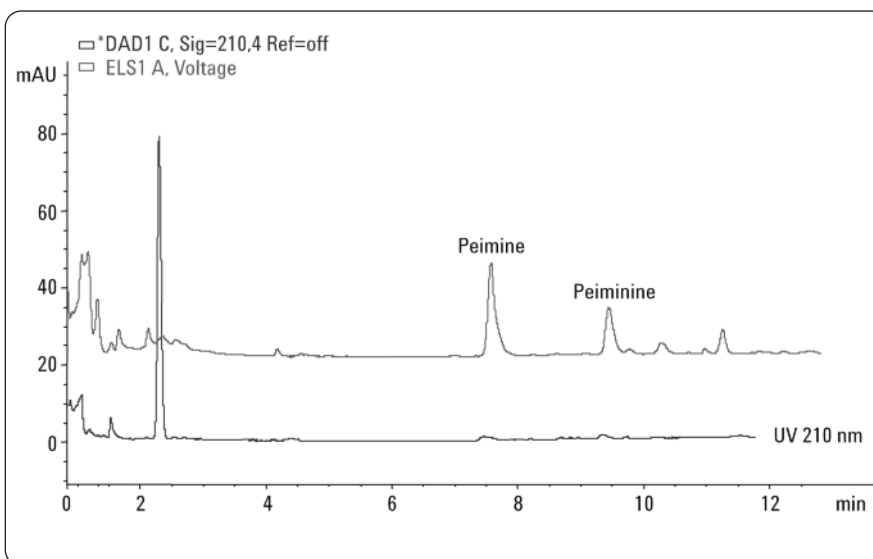
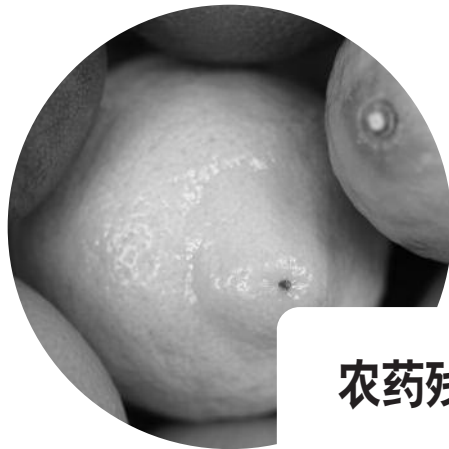


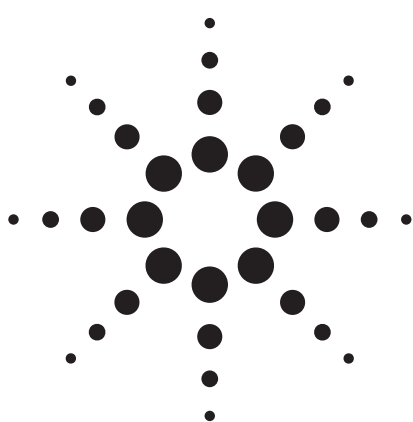
图 5
浙贝母 ELSD 通道 (红色) 和 UV 210 nm 通道 (蓝色) 的色谱图

参考文献

1. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*, volume 1, China Pharmacopoeia Commission, *People's Medical Publishing House*, **2005**.
2. Z. Xu, "Analysis of traditional Chinese medicines with the Agilent 1200 Series evaporative light scattering detector," *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-8922EN, **2008**.
3. Z. Xu, H. Huang, X. Zhang, "Analysis of Radix Bupleuri (Chaihu) using Agilent 1200 Series LC Systems with Evaporative Light Scattering Detector," *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5989-9834EN, **2008**.



农药残留的检测



使用 GC/MS 筛选中药中 430 种残留杀虫剂：从样品制备到报告生成仅需一小时

应用报告

中药

作者

栾伟和徐智秀
安捷伦科技（上海）有限公司
上海市浦东外高桥保税区英伦路 412
200131
中国

摘要

本文阐述了中药杀虫剂残留筛选的总体解决方案，包括样品制备方法、仪器采集参数、先进的质谱数据处理，以及自动的定性、定量报告生成。该筛选方法中应用了以下技术：**QuEChERS** 样品处理方法，可以缩短样品预处理时间，降低预处理成本，减小环境污染；微板流路控制技术，是 **Agilent 7890A** 的一个重要革新，可以通过反吹除去基质中脏东西引起的化学噪声并缩短运行周期；安捷伦解卷积报告软件（**DRS**），应用了 **AMDIS** 解卷积算法，能够在 2~3 分钟内用新的日本肯定列表 **RTL** 数据库对 430 种适用于气相色谱分析的杀虫剂进行筛选。总之，这种筛选方法从制备样品到生成报告可在 1 小时内完成。

前言

中药在中国的应用已有数千年历史，在中国和其它国家显示了非常好的治疗效果。与以往相比，越来越多的中药材在农场中进行大规模的栽培。农场使用的杀虫剂应得到监测，以确保其残留量在安全范围内。中药的基质非常复杂，并且常用的杀虫剂有好几百种，但是其残留量却非常小。由于这些因素的存在，在短时间内完成残留杀虫剂的筛选成为一项非常困难的任务。

这一问题的解决涉及以下几个步骤，包括样品预处理、仪器采集、数据处理和报告生成。使用气相色谱/质谱联用仪（GC/MS）的基本要求如下：

1. 有效而且简单的样品制备方法
2. 重复性好而且可重现的保留时间
3. 包含保留时间和质谱信息的数据库

QuEChERS 是由 Dr. Steven J. Lehotay 和他的同事们开发的一种食品中杀虫剂分析方法，由 Quick（快速）、Easy（简便）、Cheap（经济）、Effective（高效）、Rugged（稳定）和 Safe（安全）的首字母缩写而命名^[1-5]。这里之所以选择 QuEChERS，是因为和传统方法相比，它具有很多优点，例如对于极性和挥发性不同的杀虫剂有高回收率，样品通量大，有机溶剂用量小，不使用氯化物作溶剂^[1-5]。QuEChERS 满足上述第 1 条基本要求。

保留时间锁定 (RTL) [6]指在不同的 Agilent 6890/7890 GC 系统中使用相同牌号色谱柱, 仍然获得非常接近的色谱保留时间的能力。Agilent 7890 GC 的保留时间重复性尤其出色, 偏差小于 0.01 分钟。RTL 能够使不同仪器的保留时间精确地匹配, 满足上述第 2 条基本要求。

2005 年 11 月 29 日, 日本厚生省 (MHLW) 颁布了一套有关杀虫剂、饲料添加剂和兽药管理的“肯定列表 (Positive List)”制度。该制度是世界上有关杀虫剂最为严厉的法规。按照该法规, 安捷伦开发了一种新型数据库, 名为“日本肯定列表保留时间锁定数据库 (the Japanese Positive List RTL Database)”, 其中包括了日本肯定列表中所有适用于气相色谱分析的杀虫剂, 以及日本检疫机构监测的其它杀虫剂。该数据库中包含各种杀虫剂的保留时间和光谱信息, 因此满足上述第 3 条基本要求[7]。

另外, 筛选方法还应满足以最低的假阳性和假阴性率对杀虫剂进行快速确认的要求。

安捷伦解卷积报告软件 (DRS) [7]设计用于从基质中对质谱进行自动解卷积, 从而生成定性和定量报告。DRS 整合来自三个方面的信息: MSD ChemStation、自动质谱解卷积和鉴定系统 (AMDIS), 以及美国标准与技术研究院 (NIST) 质谱数据库检索。DRS 增强了从复杂基质中获得结果的信心, 一般的数据处理时间只需 2~3 分钟, 很好地满足了以上所提的更高要求。

本文阐述了如何应用以上技术手段来开发中药基质中杀虫剂筛选的一整套方法。研究的目标包括中药的不同药用部位, 如金银花的花、黄芪的根和茎、银杏叶的叶、人参的根和枸杞的果实。通过约 20 分钟的 QuEChERS 预处理, 所得提取物注入 Agilent 7890A/5975C。运行日本肯定列表测试方法, 并采用反吹技术, 运行时间约 37 分钟。最后, 利用日本肯定列表 RTL 数据库, 经过 2~3 分钟的 DRS 处理, 自动生成一份定性定量报告。

实验部分

中药材购自当地药店, 包括金银花、黄芪、银杏叶、人参和枸杞。所有样品均研成细粉。

样品制备

- 称取中药材细粉 1 g, 置 50 mL 聚四氟乙烯试管中, 加入蒸馏水 6 mL, 使样品完全润湿, 并于室温中存放 2 小时
- 加入 0.1% 的冰醋酸乙腈溶液 4 mL, 用手剧烈振荡 1 分钟, 然后加入硫酸镁 1.2 g、氯化钠 4 g, 继续用手剧烈振荡 1 分钟后, 以 4000 rpm 转速离心 3 分钟
- 取 PSA (部件号 5188-5364) 500 mg、C18 (部件号 189-1302) 250 mg、硫酸镁 250 mg, 置 5 mL 离心管中, 接着移取上述提取液的上清液 1.5 mL 至离心管中, 以 3000 rpm 转速离心 1 分钟。如果离心后溶液呈黑色, 可加入石墨化碳黑以吸附其中的色素 (如叶绿素)
- 移取提取液 1.0 mL 至 GC 样品瓶中

如果在筛选后还需要进行专属的定量分析, 可在最终溶液中加入分析保护剂和内标物质。

GC/MS

日本肯定列表方法由日本厚生省发布, 用于所有日本生产和进口的农产品中杀虫剂的检测。本文中, 对该方法进行改进, 加上反吹过程, 用以处理复杂的中药基质。方法参数详见表 1。

系统的软件要求

Agilent MSD ChemStation (部件号 G1701EA, Ver. E.02.00)、安捷伦解卷积报告软件 (部件号 G1716AA, Ver. A.04.00)、NIST05b 质谱数据库 (部件号 G1033A), 包括 NIST MS Search (Ver. 2.0d) 和 AMDIS (Ver. 2.65), 以及安捷伦日本肯定列表杀虫剂 RTL 数据库 (部件号 G1675AA)。

结果与讨论

用于多种中药基质的 QuEChERS 方法优化

在中药制剂中，可以选择中药材不同的可食用部位入药。另外，中药基质的化学成分复杂，含有皂苷、多糖、黄酮、酚酸以及脂肪酸等。因此，测定如此复杂的中药基质中的残留杀虫剂是一项艰巨的任务。

本次研究中，首先对金银花进行了考察，随后，为了在化学成分方面更具代表性，将不同的中药混合在一起。选择了5种中药材进行混合，分别是金银花、黄芪（根和茎）、银杏叶、人参（根）和枸杞子。

QuEChERS 方法中，吸附剂（如 PSA 和 C18）的用量对于杀虫剂的回收率有很大的影响。已经证明，PSA 在处理中药提取物的酸性成分方面更为有效。通过对 PSA 不同剂量的筛选发现，500 g 的用量已经足够。经 QuEChERS 处理的混合中药样品典型色谱图见图 1。

微板流路控制技术产生的反吹作用在复杂的中药基质分析研究中的应用

反吹作用通过改变色谱柱中载气流的方向，将高沸点物从色谱柱入口端冲出。经证明，这种反吹作用能够有效地消除一次次运行产生的化学噪声。通常，高沸点物留在色谱柱的前端，只有将柱温升至足够高，才能把它们赶出色谱柱。众所周知，长时间高温烘烤色谱柱易使色谱柱填料严重流失，导致色谱柱寿命缩短。有些复杂基质，即使长时间烘烤仍然无法完全除去高沸点物，则可能在下一次进样时发生保留时间漂移。反吹是避免高温烘烤和保留时间漂移的最高解决方案。反吹能最大程度地减小对检测器的污染，这对于质谱检测器尤为重要，因为它可以减少离子源的清洗次数。反吹的另一个积极贡献在于它能缩短运行周期，从而提高实验室的效率。有关反吹作用的详情，包括方法开发步骤，可参见安捷伦相应的应用报告^[8]。

表 1. 气相色谱仪和质谱仪参数

气相色谱仪	Agilent 7890A 或 6890N			前进行器	
前进行口	分流/不分流			样品清洗	0
进样类型	不分流			样品泵	6
进样口温度	280 °C			进样量	2 µL
进样口衬管	去活双细径锥衬管 (部件号 5188-5398)			注射器大小	10 µL
压力	17.446 psi			溶剂 A 进样前	0
吹扫气流速	50 mL/min			溶剂 B 进样前	0
吹扫时间	0.75 min			溶剂 A 进样后	6
总流速	54.51 mL/min			溶剂 B 进样后	6
载气节省功能	开			延迟时间	1 秒
节省流速	20.0 mL/min			进样速度	快速
节省时间	1.00 min			进样前延迟时间	0 min
载气类型	氦气			氦气	0 min
柱温箱				MSD	带三轴检测器的 Agilent 5975C
程序升温	°C/min	目标温度 °C	保持时间 (min)	采集模式	全扫描
初始时间		50	1	溶剂延迟	3.30 min
升温速率	25	125	0	最低质量	35
升温速率	10	300	10	最高质量	450
运行结束后		300	5	阈值	100 (或根据噪声水平设定)
总运行时间	36.5 min			采样次数	2
平衡时间	0.5 min			四极杆温度	150 °C
色谱柱	J&W DB-5ms 超高惰性 (部件号 122-5532UI)			离子源温度	230 °C
柱长	30 m			传输管线温度	280 °C
直径	0.25 mm			调谐文件	Atune.u
液膜厚度	0.25 µm			增益因子	10
模式	恒流			痕量离子检测	开
压力	17.446 psi (运行结束后 2 psi)			RTL	系统的保留时间锁定为甲基毒死蜱在 13.443 min 洗脱
标称初始流速	1.51 mL/min (运行结束后 4.05 mL/min)			反吹	
进样口	前进行口			装置	三通分流器 (部件号 G3183B)
出口	PCM (部件号 G1530-63309)			限流管尺寸	0.706 m × 0.18 mm 内径
出口压力	2 psi (运行结束后 60 psi)				

本实验中，使用带尾吹气的三通分流器来实现反吹作用。该装置有特别的尾吹气补充管路和四个接口，一个接色谱柱，另三个可与三个不同检测器的限流管相连。由于本次研究中仅用到一个质谱检测器，尾吹气前两个接口被封上，第三个接口连接色谱柱，最后一个接口连接限流管。这样设置的主要目的是避免由于死体积的增大而引起色谱峰展宽。限流管的长度和内径分别为 0.706 m 和 0.18 mm。该装置和 GC/MS 系统设置示意图见图 2。

中药基质中目标杀虫剂的 DRS 鉴定

杀虫剂分析的另一个挑战，是在复杂的基质中对痕量的目标化合物进行鉴定时，通常受到很高的化学噪音的干扰，得到的谱图库匹配因子很低。为改善匹配因子，以前常用的方法是背景扣除，然而，这种方法同时受到基质情况和检测人员水平的影响，有时会给出不一致的结果。

安捷伦于 2004 年投入应用的解卷积报告软件 (DRS) 是一个软件包，将三个不同数据处理软件信息整合成易于阅读的报告。DRS 的最主要优点是大大缩短了从复杂的基质分析中解

读结果所需的时间。然而，一个合适的数据库对于成功运用 DRS 非常重要。日本肯定列表 RTL 数据库是用于杀虫剂分析的新型 DRS 数据库，包含 430 种适用气相色谱分析的杀虫剂的保留时间和质谱信息。数据库的详细信息参见安捷伦的应用报告^[7]。

中药基质中残留杀虫剂分析的数据处理和报告生成，优先推荐使用 DRS 与日本肯定列表 RTL 数据库。图 3 是加标混合中药样品的典型 DRS 报告的一部分。

图 4 显示了分析中药基质残留杀虫剂时使用 DRS 的优势。在混合中药样品中加入 10 ppb 浓度水平的甲基嘧啶磷。该化合物被 MSD ChemStation 漏过了，却由 DRS 成功检出。上方窗口是总离子流色谱图 (TIC)，中间窗口是第 2199 次扫描 (13.981 分钟) 时有干扰的原始光谱，下方窗口是解卷积光谱 (白色曲线) 和日本肯定列表 RTL 数据库中甲基嘧啶磷光谱 (黑色曲线) 的对比。经过解卷积，第 2199 次扫描的光谱图变“干净”了，从而能从混合中药样品中轻松鉴定出甲基嘧啶磷。

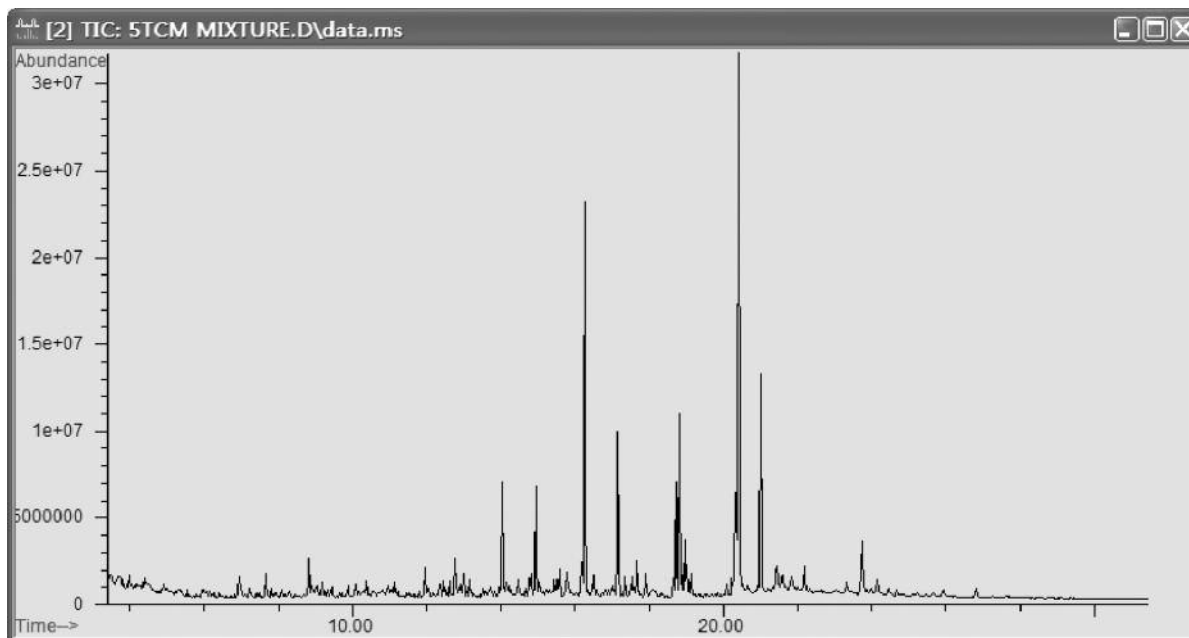


图 1. 混合中药样品 (金银花、黄芪、银杏叶、人参和枸杞) 经 QuEChERS 处理后的典型总离子流色谱图

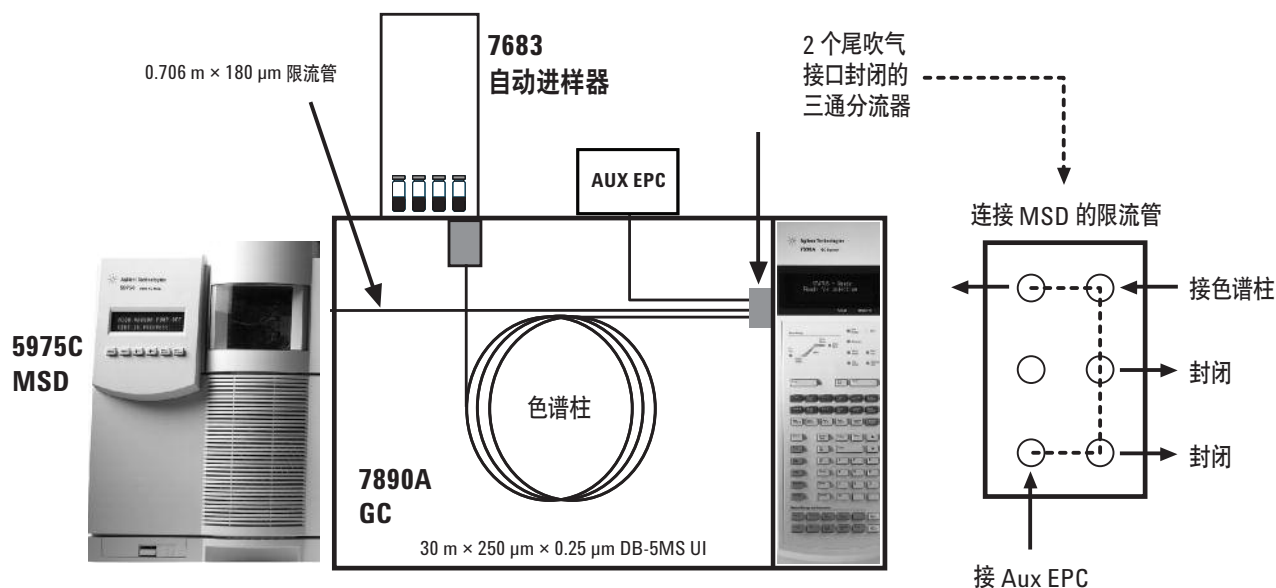


图 2. GC/MS 系统设置和三通分流器管路连接示意图

结论

痕量水平杀虫剂分析最主要的干扰就是复杂中药基质中的化学噪声。本文采用了几种新技术以消除这些干扰。成熟的样品制备方法是尽可能地去除化学噪声的主要途径。应用 QuEChERS 方法使样品制备步骤得到了简化，提高了实验室的效率，整个处理过程仅需 20 分钟左右即可完成。然而，即使应用了有如 QuEChERS 这样的前处理方法，仍然不能完全除去化学噪声。反吹是另一种可以消除一次次运行中化学噪声的方法。尽管反吹不是一个新的概念，但是应用微板流路控制技术能够比以往更有效地实现反吹作用。本研究中，一种带尾吹气的三通分流器用于实施反吹作用，带反吹的数据采集时间约为 37 分钟。在数据处理过程中与化学噪声有关的最后一步利用了一种解卷积的算法。安捷伦的解卷积报告软件能够将数据处理时间缩短至 2~3 分钟，同时应用了日本肯定列表 RTL 数据库，对于中药基质中杀虫剂的分析十分有效。从样品预处理到生成筛选报告，整个中药基质中 430 种残留杀虫剂的筛选仅需 1 小时即可完成。

参考文献

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, and F. J. Schenck, "Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and 'Dispersive Solid-Phase Extraction' for the Determination of Pesticide Residues in Produce," *J. AOAC Int.*, 2003; 86(2): 412
2. S. J. Lehotay, K. Mastovska, and S. J. Yun, "Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue

Analysis in Fatty Food Matrixes," *J. AOAC Int.*, 2005; 88(2): 630

3. S. J. Lehotay, K. Mastovska, and A. R. Lightfield, "Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables," *J. AOAC Int.*, 2005; 88(2): 615
4. S. J. Lehotay, A. de Kok, M. Hiemstra, and P. van Bodegraven, "Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of 229 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection," *J. AOAC Int.*, 2005; 88(2): 595
5. M. Anastassiades, K. Mastovska, S. J. Lehotay, "Evaluation of Analyte Protectants to Improve Gas Chromatographic Analysis of Pesticides," *J. Chromatogr. A*, 2003; 1015(1-2): 163
6. V. Giarocco, B. Quimby, and M. Klee, "Retention Time Locking: Concepts and Applications," Agilent Technologies publication 5966-2496E
7. Philip L. Wylie, "Screening for Pesticides in Food Using the Japanese Positive List Pesticide Method: Benefits of Using GC/MS with Deconvolution Reporting Software and a Retention Time Locked Mass Spectral Database," Agilent Technologies publication 5989-7436EN
8. Chin K. Meng, "Improving Productivity and Extending Column Life with Backflush," Agilent Technologies publication 5989-6018EN

MSD 解卷积报告

样品名称: Op02spiked stds-1

数据文件: D:\Wei\Pest@TCM\DATA\080625~1
 \200806~2.D

日期/时间: 07:11 PM Thursday, Jul 17 2008

相邻色谱峰背影扣除 = 1

分辨率 = 中

灵敏度 = 高

峰形要求 = 中

在 AMDIS 目标谱图库中检出的成分用 NIST 谱图库继续检索。

R.T.	Cas #	化合物名称	含量 (ng)		AMDIS		NIST	
			Chem station	AMDIS	匹配	R.T. Diff sec.	反向匹配	匹配数
6.6795	62737	敌敌畏	0.05	0.04	70	5.1	70	1
9.4430	2675776	地茂散			51	1.5	52	77
11.326	6923224	久效磷	0.04					
11.6951	118741	六氯苯			50	0.7		
11.6951	7364207	苯甲酸四乙基甲酯					72	1
12.108	319857	β -BHC		0.05	58	0.7	61	5
12.4776	333415	二嗪农		0.03	63	0.2	45	1
12.8566	319868	δ -BHC		0.05	59	0.2	52	5
13.436	5598130	甲基毒死蜱		0.05	79	-0.4	65	1
13.503	50471448	免克宁			56	-0.5	56	1
13.5616	298000	甲基对硫磷		0.06	54	-0.5	60	2
13.984	29232937	甲基嘧啶磷		0.05	81	-0.9	64	1

图 3. 典型 DRS 报告的一部分

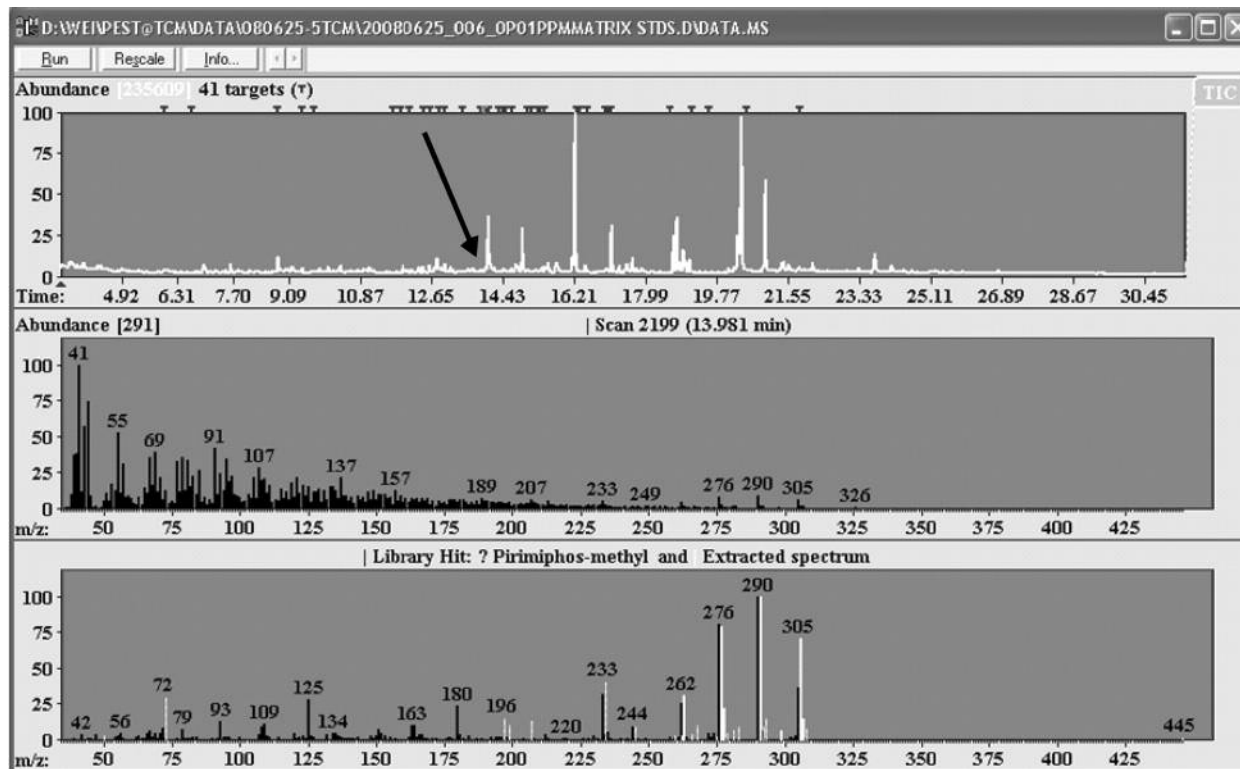
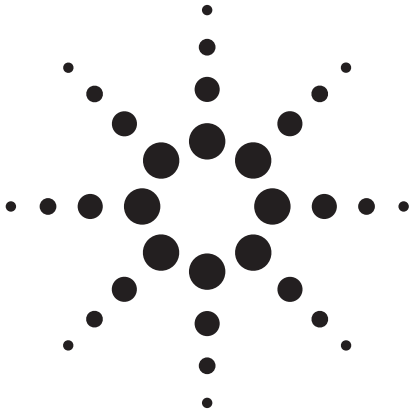


图 4. AMDIS 结果显示, 其中, 上方窗口为中药混合样品的总离子流色谱图, 中间窗口为甲基嘧啶磷洗脱物光谱图, 下方窗口同时给出解卷积光谱图 (白色) 与谱图库中甲基嘧啶磷光谱图 (黑色)



安捷伦 7000A GC/MS/MS 在中药基质 ppb 级杀虫剂筛查中的应用

Wei Luan, Melissa Churley, and Mike Szelewski

应用报告

提高农残监测水平受到越来越普遍的关注。一些国际组织和国家制定了不同产品中农药最高残余量限制标准 (MRLs)。农残检测实验室的首要任务是发展分析方法,能够在有限时间内进行大量的分析,筛查出痕量的农药。GC/MS 已经成为这种分析的标准仪器。日本和欧盟都制定了很低的农残 MRLs。最近又挑战性地规定了复杂基质中数百种农药残留达到 ppb 级浓度以下,这就要求有更高的农药筛查的灵敏度和效率。三重四极杆质谱运用多反应监测 (MRM) 模式可以显著除去基质干扰,有效地提高信噪比 (S/N)。本文描述运用色谱与三重四极杆联用 (GC/MS/MS) 从中药 (TCM) 中筛查浓度低至 1ppb 的农药。农药目标物和各自的 MRM 条件列于表 1。

要点

- 在宽的线性范围内离子比率有良好的 consistency, 在基质中样品浓度极低时峰面积有良好的重现性, 这些性能使农药筛查变得更为可靠
- 安捷伦的碰撞池在 5 ms 的驻留时间下, 2 ppb 的浓度也可以达到极好的重现性。在单一的时间段中, 可以通过设置更多的 MRM transition 来提高工作效率
- 使用 MRM 模式可以减小基质干扰, 使农药筛查达到更低检测限

表 1. 农残目标物及其 MRM 条件

分组时间	化合物名称	保留时间	定量	碰撞能量	Qual 1	碰撞能量	Qual 2	碰撞能量
1	敌敌畏	6.00	185 → 93	15	185 → 109	15	109 → 79	5
1	甲胺磷	6.10	141 → 95	5	95 → 80	5		
1	乙酰甲胺磷	7.82	136 → 94	10	142 → 96	5		
1	乐果	8.53	125 → 79	5	125 → 93	15		
1	氧化乐果	9.53	156 → 110	5	156 → 79	20		
2	落长灵	11.12	118 → 90	5	118 → 73	5		
2	杀螟腈	11.41	243 → 109	10	243 → 116	5		
3	八甲磷-E	12.41	264 → 127	15	127 → 109	10		
3	甲基对硫磷	12.58	263 → 109	10				
3	八甲磷-Z	13.13	264 → 127	15	127 → 109	10		
3	灭藻醌	13.23	207 → 172	15	207 → 179	12	172 → 128	10
3	毒死蜱	13.52	314 → 258	15	314 → 286	5	197 → 169	15
3	氟草津	13.52	225 → 189	15	240 → 225	5	198 → 91	10
3	对硫磷	13.54	291 → 109	10	291 → 81	10		
3	1-2-噻唑磷	13.85	195 → 103	5	195 → 139	5		
4	氟虫腈	14.33	367 → 225	25	367 → 224	20		
4	嗉硫磷	14.36	146 → 118	10	157 → 129	15		
4	硫丹 α -体	14.83	241 → 206	15	229 → 194	10	195 → 159	10
4	虫螨腈	15.77	247 → 227	15	247 → 197	20	408 → 59	10
4	硫丹 β -体	15.90	241 → 206	15	229 → 194	10	195 → 159	10
5	三唑磷	16.38	161 → 134	5	161 → 106	10	257 → 162	5
5	溴螨酯	17.64	341 → 183	20	341 → 185	20		
5	谷硫磷	18.31	160 → 77	20	160 → 132	5	132 → 77	15
6	唑草胺	19.92	100 → 72	5	188 → 119	25	188 → 82	20
6	1-4-氟氯菊酯	20.03	163 → 127	5	163 → 91	15	206 → 151	25
7	氟氰戊菊酯 1	20.46	199 → 157	5	199 → 107	30	157 → 107	15
7	氟氰戊菊酯 2	20.64	199 → 157	5	199 → 107	30	157 → 107	15
8	氰戊菊酯 1	21.14	167 → 125	10	225 → 119	15		
8	氰戊菊酯 2	21.33	167 → 125	10	225 → 119	15		
8	恶醚唑 1	21.53	323 → 265	15	265 → 202	20		
8	恶醚唑 2	21.60	323 → 265	15	265 → 202	20		
8	溴氟菊酯	21.85	181 → 152	30	253 → 172	5	253 → 93	20

实验

痕量级别化合物的定量难度很高，原因是基质复杂、限定离子比例超出范围或者目标离子隐藏在复杂背景中。单四极杆质谱中，选择离子监测（SIM）往往用来改善检测限和定量重现性。在 SIM 模式，谱检测器只监测在一段保留时间范围内出现的目标化合物的对应几个离子。通过监测少数特定离子，信噪比（S/N）显著改善。当基质复杂时，SIM 可能与全扫描一样，无法在基质干扰下正常检测痕量水平的农药。三重四极杆质谱，通过在

六极杆中选择性地对母离子碰撞碎裂产生子离子，可大幅度减少或消除基体干扰。这个过程中，通过多反应监测（MRM）模式，基于高选择性的母离子与子离子的反应通道，而不会对基质中的干扰化合物进行碎裂。母离子的选择类似于 SIM，但是最终的子离子是由所选择的母离子唯一产生的，而不是由干扰物离子产生。

它的主要优点是即使在最复杂的基质中，在超低水平浓度的检测范围内改善目标化合物的信噪比同时获得一致的离子比例。图 1 显示安捷伦气相色谱/质谱/质谱工作站定量界面。红色框内的数字为浓度范围从 0.1 ppb 至 1000 ppb 杀螟脲在中药基质中限定离子比率，图中显示标准曲线及低浓度端放大图。在绿色框显示的数字为校准曲线的精度。表 2 是中药中 1 ppb 杀虫剂 6 次进样峰面积的重现性。

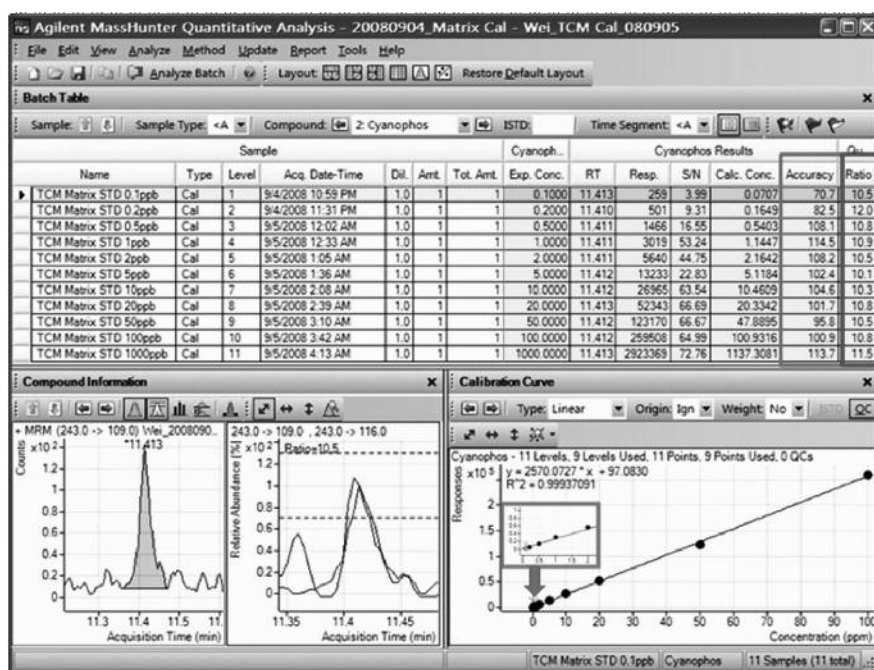


图 1. 中药基质中杀螟脲校正曲线与离子比例

表 2. 中药基质中 1 ppb 杀虫剂峰面积

	峰面积标准偏差 RSD (%) (n = 6)
杀螟脲	4.83
溴螨酯	5.12

线性加速度设计的安捷伦六极杆碰撞室经过优化，适合于高速度运行并且排除鬼峰和交叉污染，最高 500 MRM/秒的 MRM 能力允许每个时间段中离子驻留时间最少，transitions 的数目达到最大，因此每次运行可以筛选多个化合物。驻留时间的试验描述在表 3 中，是采用中医基质 2 ppb 溴螨酯所测。驻留时间减少至 5 毫秒，重复运行峰面积的相对标准偏差 < 5.0%。至 2 毫秒时精度较低，但在复杂基质中 2 ppb 的分析结果是可以接受的。

表 3. 驻留时间实验结果：中药基质中 2 ppb 溴螨酯

	100 ms	50 ms	10 ms	5 ms	2 ms
面积 1	5849	5910	6265	6704	6747
面积 2	5712	6167	6189	6728	6279
面积 3	5895	5941	5966	6131	6523
面积 4	5921	6471	6551	6243	6397
面积 5	5999	6299	6119	6504	4831
面积 6	5999	6524	6415	6796	4737
加和	35375	37312	37505	39106	35514
平均	5895.83333	6218.667	6250.833	6517.667	5919
Std	107.618617	260.1528	209.5638	276.2496	893.2359
RSD	1.83	4.18	3.35	4.24	15.1

图 2 为中药萃取液在 GC/MS/MS MRM 1 微升进样时的总离子流色谱图。11 种 ppb 级杀虫剂鉴定列于表 4。

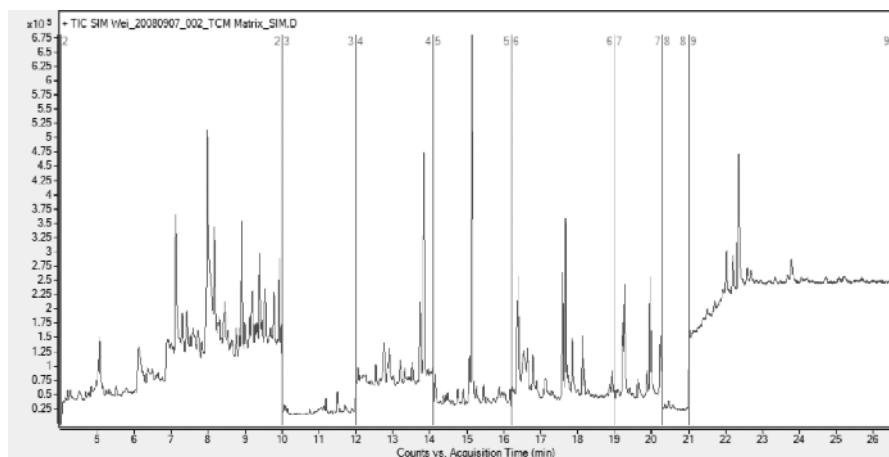


图 2. 中药萃取液在 GC/MS/MS MRM 的总离子流色谱图

表 4. 中药基质空白 GC/MS/MS 筛查结果

RT	名称	定量 transition	基质面积 (未加标)	校正结果
5.995	敌敌畏	185.0 → 93.0	68	—
6.100	甲胺磷	141.0 → 95.0	0	—
7.760	乙酰甲胺磷	136.0 → 94.0	0	—
8.526	乐果	125.0 → 79.0	0	—
9.478	氧化乐果	156.0 → 110.0	0	—
11.100	落长灵	118.0 → 90.0	0	—
11.414	杀螟腈	243.0 → 109.0	0	—
12.390	八甲磷-E	264.0 → 127.0	0	—
12.560	甲基对硫磷	263.0 → 109.0	1227	6.21*
13.200	灭藻醌	207.0 → 172.0	38	—
13.500	氟草津	225.0 → 189.0	16	—
13.510	毒死蜱	314.0 → 258.0	1224	1.99*
13.520	对硫磷	291.0 → 109.0	3950	5.62*
13.840	噻唑磷	195.0 → 103.0	0	—
14.320	氟虫腈	367.0 → 255.0	0	—
14.340	噻硫磷	146.0 → 118.0	3970	1.11*
14.820	硫丹 α -体	241.0 → 206.0	156	1.89*
15.750	虫螨腈	247.0 → 227.0	0	—
15.880	硫丹 β -体	241.0 → 206.0	208	1.61*
16.360	三唑磷	161.0 → 134.0	531	1.63*
17.620	溴螨酯	341.0 → 183.0	63	—
18.290	谷硫磷	160.0 → 77.0	0	—
19.900	唑草胺	100.0 → 72.0	1260	3.37*
20.026	氟氯氟菊酯;	163.0 → 127.0	0	—
20.439	氟氰戊菊酯-1	199.0 → 157.0	0	—
20.624	氟氰戊菊酯-2	199.0 → 157.0	0	—
21.122	氰戊菊酯-1	167.0 → 125.0	4188	1.79*
21.326	氰戊菊酯-2	167.0 → 125.0	13070	1.79*
21.520	恶醚唑-1	323.0 → 265.0	0	—
21.574	恶醚唑-2	323.0 → 265.0	0	—
21.840	溴氟菊酯	181.0 → 152.0	2078	3.53*

* 可能为阳性样品

结论

农药残留监测需要在一个非常有限的时间和超低浓度筛选数百个目标化合物。气相色谱与三重串联四极杆质谱可以执行非常有选择性的 MRM，可以大大消除来自基质的化学噪音干扰并改进信噪比，降低检测限。此应用开发的方法筛查中药中 ppb 级浓度水平的农药残留。气相色谱/质谱/质谱能够真正有助于提高筛查超低水平的农药残留。

参考文献

1. Wei Luan, and Zhixiu Xu, "Screening for 430 Pesticide Residues in Traditional Chinese Medicine Using GC/MS: From Sample Preparation to Report Generation in One Hour," Agilent Technologies publication 5989-9341EN

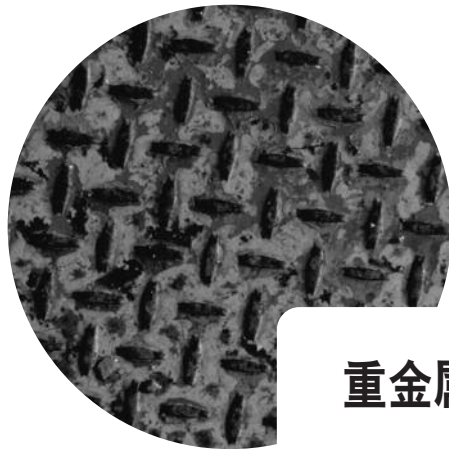
栾伟是安捷伦科技上海有限公司应用化学家；Melissa Churley 是安捷伦安捷伦科技的应用化学家，美国加州 Santa Clara；Mike Szelewski 是安捷伦科技公司的应用化学家，美国特拉华州 Wilmington。

如需了解更多信息

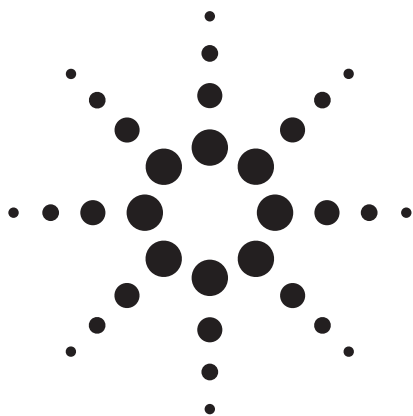
有关我们产品及服务的更多信息，

敬请登录我们的网站

www.agilent.com/chem/cn。



重金属含量的测定



用电感耦合等离子体质谱测定中药中的毒性元素

应用报告

Hua Zhang
Yan-zhi Shi
Yu-hong Chen
Ying-feng Wang



摘要

本应用报告报导了采用电感耦合等离子体质谱分析中药中 Be、Cr、Mn、Ni、Cu、Zn、As、Ag、Cd、Ba、Hg、Tl 和 Pb 的方法。样品用微波消解法溶解。为验证方法的有效性，还消解并测定了两种有证标准物质。所有目标元素的方法检测限为 $0.1\text{-}7.2\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

前言

中药 (TCM) 及相关制品在中国已被广泛使用了几个世纪。现在中国政府和科学家们都比以往更关注中药的临床安全问题。解决这一问题使中药符合国际标准并为世界所接受的关键。随着科技的进步,人们越来越关注某些中药中重金属(如汞(Hg)、砷(As)、铅(Pb)、镉(Cd))的危害。这些元素进入人体后将发生蓄积,最终影响健康。因此分析毒性重金属是中药质量控制的关键,有些法规已对其含量实施限制^[1]。由于这些严格的法规约束,中药出口面临巨大压力,中药中重金属的高含量已引起国际社会的强烈反响。

在目前的卫生法规中,还有限制铍(Be)、铬(Cr)、镍(Ni)、银(Ag)、钡(Ba)和铊(Tl)等其它毒性有害元素。但是,随着生活水平和健康意识的提高,人们会对这些元素的优缺点更加关注。因此,需要严格控制中药中这些元素的含量。

另外,锰(Mn)对人体内分泌、神经和酶系统都有好处,是许多酶以及正常心肌

代谢所需的重要元素。锌有利于免疫系统,缺锌(Zn)将损害正常系统代谢,而缺铜(Cu)是冠心病的起因之一^[2]。但如果这些元素的水平过高,将可能危害人体健康。

天然中药非常复杂,含有不同浓度水平的许多元素。过去用 ASS、AFS 和 AES 技术相结合进行分析,方法费时,花费昂贵^[3]。ICP-MS 正迅速成为广泛样品中元素检测的首选测定技术。另外,对金属元素它具有最宽的线性范围(九个数量级,从 1 ng·mL⁻¹ 到 1000 µg·mL⁻¹)、最高的灵敏度和最低的检测限,可以快速、准确地同时测定多种元素。现在最新版的中华人民共和国药典(中国药典 2005)已将 ICP-MS 作为草药中重金属测定的标准方法之一^[4]。

本研究中,我们用微波消解法制备样品。高温及密闭的系统确保快速、完全消解,避免了某些易蒸发元素的损失,如砷和汞。用微波消解 ICP-MS 方法分析了 13 个毒性元素,包括 Be、Cr、Mn、Ni、Cu、Zn、As、Ag、Cd、Ba、Hg、Tl 和 Pb。用两个有证标准物质——灌木树叶和茶叶对

方法进行了验证,所得结果与标准值一致。该方法用加标回收实验进行了评价,回收率为 90.3 -109.7 %。

实验部分

仪器

本研究使用 Agilent 7500c 系列 ICP-MS (仪器的具体信息见表 1)。样品用 CEM MARS5 微波消解系统(美国 CEM 公司)进行消解制备,该系统包括微波炉、PTFE-TFE 高压釜和固定的样品盘。全程使用去离子水(Milli-Q 超纯水系统)。

试剂

硝酸(HNO₃),痕量金属级(Merck);过氧化氢(H₂O₂),MOS 级;标准储备液:10 µg·mL⁻¹混合标准溶液,包括 Be、Cr、Mn、Ni、Cu、Zn、As、Ag、Cd、Ba、Hg、Tl 和 Pb。将储备液用 5% HNO₃ 稀释配制校正标准溶液;Hg 储备溶液:1000 µg·mL⁻¹(中国国家钢铁分析中心)。将储备液用 5% HNO₃ 稀释配制校准溶液;内标溶液:1.0 µg/mL。10 µg·mL⁻¹ Li、Sc、Ge、Y、Tb 和 Bi 混合标准溶液(安捷伦部件号

雾化器	Babington 雾化器
雾化室	石英 scott 型,帕尔贴温控至 2 ± 0.1 °C
炬管	石英,2.5 mm 内径
接口	镍锥

表 1
Agilent 7500c ICP-MS 仪器信息^[7]

5183-4680) 用稀释 5% HNO₃ 配制。调谐溶液: 10 ng·mL⁻¹ ⁷Li、⁵⁹Co、⁸⁹Y、¹⁴⁰Ce 和 ²⁰⁵Tl 混合标准溶液 (2% HNO₃) (安捷伦部件号 5184-3566); 所有标准溶液和样品配制使用的去离子水 (18.2 M_Ω) 由 Milli-Q[®] 超纯水纯化系统 (Millipore 公司) 制备。有证标准物质: GBW07602 (灌木树叶) 和 GBW08513 (茶叶)。

样品预处理

精密称取 0.5000 g 样品, 置于 PTFE 管中; 加入 6 μL HNO₃ 和 1 μL H₂O₂。由于中药含有大量有机物, 且样品量大, 建议进行预消解。为了避免由于消解过程产生气体和压力引发爆炸使样品损失, 将样品在溶液中溶解, 并置于微波炉中。首先, 将温度升高到 120°C 约 5 分钟, 然后让样品完全冷却, 使压力降至正常。接着, 按

阶段	功率		升温时间/分钟	温度/°C	保持时间/分钟
	最大功率/W	%			
1	1200	100	5:00	120	5:00
2	1200	100	6:00	180	20:00

表 2
微波消解程序

元素	Be	Cr	Mn	Ni	Cu	Zn	As	Ag	Cd	Ba	Hg	Tl	Pb
同位素	9	52	55	60	63	66	75	107	114	137	202	205	208

表 3
目标元素的同位素

表 2 中消解程序进行。消解后, 样品管冷却至室温, 将内容物倾入 50 mL PET 瓶中。样品管和盖用少量蒸馏水冲洗数次, 混合液加至 PET 瓶中。加水至精确重量为 50 g。不含样品的试剂空白按与测试样品相同的步骤操作。

ICP-MS 参数和目标元素同位素

在优化条件下分析样品溶液。目标元素同位素列于表 3; 选择 ⁷²Ge 作为分析 Be、Cr、Mn、Ni、Cu、Zn 和 As 的内标元素, ¹¹⁵In 作为分析 Ag、Cd 和 Ba 的内标元素, ²⁰⁹Bi 作为分析 Hg、Tl 和 Pb 的内标元素。ICP-MS 参数由仪器自动进行优化。包括灵敏度、背景、氧化物、双电荷、稳定性等所有指标均符合安装需求。各参数列于表 4。

校正曲线

混合储备溶液和 Hg 储备溶液用 5% HNO₃ 分别稀释为 0.1、0.5、2、10 ng·mL⁻¹。空白溶液是 5% HNO₃。在优化条件下测定空白和校正溶液。仪器自动绘制校正曲线。所有校正曲线的线性相关系数 (r) 均好于 0.9999。

参数	设定值
功率	1350 W
等离子体气流速	15.0 L · min ⁻¹
辅助气流速	1.0 L · min ⁻¹
载气流速	1.12 L · min ⁻¹
采样速率	0.4 mL · min ⁻¹
采样深度	7 mm
采样锥孔	1.0 mm
截取锥孔	0.4 mm
数据采集模式	定量分析
积分时间	0.3 s / 同位素
氧化铈/铈	<0.5%
双电荷	<2%

表 4
ICP-MS 的工作参数

结果与讨论

方法检测限

在优化条件下对空白样品分析 11 次，计算每个元素的方法检测限（表 5）。

元素	MDL
Be	0.1
Cr	7.2
Mn	1.1
Ni	1.9
Cu	2.5
Zn	3.4
As	3.5
Ag	0.6
Cd	0.8
Ba	2.4
Hg	1.1
Tl	0.1
Pb	0.9

表 5
方法的检测限(MDL) (单位: $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$)

标准物质的测定

通过测定两种有证标准物质: GBW07602 (灌木树叶) 和 GBW08513 (茶叶), 评价了微波-ICP-MS 方法的可靠性和准确度。结果与标定值完全一致, 对比见表 6。

回收率

用标准加入法测定了每个元素的百分回收率, 以评价方法的可靠性和准确度。所有元素的回收率均在 90.3%-109.7%之间。结果令人满意 (表 7)。

样品分析

本研究分析了 7 种市售中药中的 13 种毒性元素。每个样品分析 8 次, 准确度 (RSD%) 在 0.3% - 6.8%之间 (表 8)。从表 8 中的结果可以看出, 并非所有中药都

符合法规要求。某些元素的浓度远远超出许可限。无论如何, 在大多数中药中, 所有毒性元素的量都是比较低的。

结论

证据表明, 当前的中药市场比较混乱, 要确保不超出毒性元素的最大规定许可限度, 需要进行严格管理和质量控制。

国家和地方药品管理机构也需要制定管

理和控制中药生产和销售的规范。本研究采用微波消解制备样品, 用 Agilent 7500c 系列 ICP-MS, 以优化的工作参数, 对不同药物中所有元素同时进行了分析。采用已知标准品的加标回收实验, 用有证标准物质对本方法进行了验证。本方法在精度、准确度、简便性、速度、检测限和多元素测定等方面均优于其它技术。

元素	GBW07602 (灌木树叶)		GBW08513 (茶叶)	
	标准值 $\text{ug}\cdot\text{g}^{-1}$	测定值 $\text{ug}\cdot\text{g}^{-1}$	标准值 $\text{ug}\cdot\text{g}^{-1}$	测定值 $\text{ug}\cdot\text{g}^{-1}$
Be	0.056 ± 0.014	0.046	/	0.088
Cr	2.3 ± 0.3	2.0	/	2.2
Mn	58 ± 6	54	2170 ± 110	2074
Ni	1.7 ± 0.4	1.7	5.09 ± 0.76	4.94
Cu	5.2 ± 0.5	4.6	8.96 ± 0.59	8.23
Zn	20.6 ± 2.2	19.8	22.6 ± 1.5	22.4
As	0.95 ± 0.12	0.79	0.180 ± 0.049	0.134
Ag	0.027 ± 0.006	0.024	/	0.022
Cd	0.14 ± 0.06	0.18	0.023 ± 0.004	0.022
Ba	19 ± 3	17	120 ± 10	112
Hg	/	42.5	0.017	0.018
Tl	/	0.015	/	0.016
Pb	7.1 ± 1.1	6.1	1.00 ± 0.05	0.91

表 6
测定值与标准值的比较

元素	加标值 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测定值 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	百分回收率 (%)
Be	10	9.37	93.7
Cr	10	10.63	106.3
Mn	10	10.97	109.7
Ni	10	10.24	102.4
Cu	10	10.68	106.8
Zn	10	10.36	103.6
As	10	10.89	108.9
Ag	10	9.20	92.0
Cd	10	9.25	92.5
Ba	10	9.16	91.6
Hg	5	4.87	97.3
Tl	10	9.58	95.8
Pb	10	9.03	90.3

表 7
回收率实验结果

样品名称		葛根汤	止咳散	桂附地黄丸	黄连上清丸	金嗓散结丸	脑得生丸	舒肝丸
元素								
Be	测定值	0.020	0.009	0.032	0.034	0.060	0.037	0.013
	RSD%	5.2	2.6	1.0	5.1	2.0	1.4	5.2
Cr	测定值	0.34	0.46	1.40	1.58	4.89	1.74	4.76
	RSD%	2.0	2.0	1.9	2.6	2.3	2.5	0.8
Mn	测定值	34.77	17.80	54.78	30.37	87.23	23.96	124.4
	RSD%	0.7	2.4	1.1	2.20	1.21	2.62	3.10
Ni	测定值	1.09	1.17	1.24	1.64	3.09	1.50	3.15
	RSD%	0.6	0.9	1.4	0.8	2.2	1.8	1.8
Cu	测定值	1.49	1.68	4.08	8.85	15.23	3.56	5.38
	RSD%	0.6	0.6	0.6	2.5	2.3	2.38	0.46
Zn	测定值	5.66	4.82	21.27	18.57	37.07	15.33	22.59
	RSD%	0.6	1.1	2.4	1.3	1.5	1.7	1.7
As	测定值	N.D.	0.26	0.46	0.79	0.89	0.56	29.14
	RSD%	1.6	1.4	3.9	3.5	5.7	3.3	1.5
Ag	测定值	0.0009	0.0008	0.005	0.007	0.079	0.006	0.007
	RSD%	5.3	6.3	2.1	5.8	3.5	5.6	4.3
Cd	测定值	0.022	0.042	0.10	0.11	0.15	0.077	0.082
	RSD%	5.5	1.5	1.2	2.7	1.9	3.6	2.0
Ba	测定值	5.86	8.94	15.32	44.76	167.8	136.7	12.98
	RSD%	1.1	1.7	1.4	2.1	2.8	0.3	0.9
Hg	测定值	0.003	0.002	0.85	0.088	0.027	0.076	5.05
	RSD%	6.8	5.8	3.3	5.5	5.0	3.5	0.6
Tl	测定值	0.008	0.027	0.025	0.020	0.033	0.036	0.014
	RSD%	1.3	2.4	2.7	3.6	3.2	1.1	4.1
Pb	测定值	0.15	0.16	0.93	1.54	2.14	0.68	1.69
	RSD%	0.7	1.1	2.6	2.1	1.7	1.5	1.3

表 8
中药分析结果(n = 8)。单位: $\mu\text{g g}^{-1}$

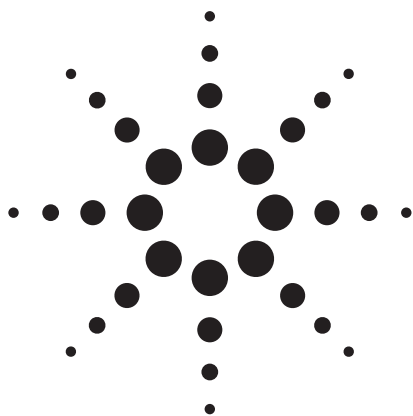
参考文献

1.
Wang Xiao-ru, "Application of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry." *Chemical Industry Press. Bei Jing.*, 102, **2005**.
2.
Dong Hong-bo, Han Li-qing, Dong Shun-fu, "Instrumentation & Analysis Monitoring"
(3): 29~30, **2002**.
3.
Yu Zi-li, Guang Lei, "Analytical Technique of Metal Ion". *Chemical Industry Press. Bei Jing*, 225~226, **2004**.
4.
Determination of Lead (Pb), Cadmium (Cd), Arsenic (As), Mercury (Hg) and Copper (Cu), Ch. P 2005 (English version), Appendix IX B, p. 54-56

Hua Zhang 是首都师范大学化学系研究生, Yan-zhi Shi 和 Ying-feng Wang 是中国北京首都师范大学分析中心的教授。Yuhong Chen 是安捷伦科技中国公司的应用工程师。



残留溶剂的质量控制

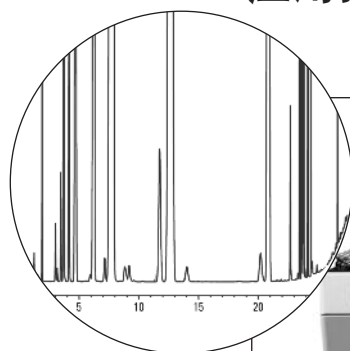


以更好的精度、更高的灵敏度和更大的样品通量进行药物中残留溶剂的分析

在药物质量控制中使用配置 G1888 顶空进样器的 Agilent 7890A GC 系统

应用报告

Albert E. Gudat
Roger L. Firor
Ute Bober



摘要

使用顶空气相色谱进行药物杂质分析的实验室面临着以下与仪器相关的问题：

- 顶空分析的面积精度受气压变化的影响
- 某些低浓度分析物的灵敏度较差
- 高沸点杂质的存在明显延长了每个样品的分析时间，还可能损坏分析柱

残留溶剂测定是药物质量控制中最常见的顶空气相色谱应用。在本应用报告中，我们未做任何大的改动，将已有的 Agilent 6890 GC 分析残留溶剂的方法转移到新的 Agilent 7890A GC 上。对两个系统上所得的结果进行了比较。总体上讲，Agilent 7890A GC 系统提供了与 Agilent 6890N GC 系统至少相同或更好的性能。结果还显示，Agilent 7890A GC 中所运用的新技术可以显著改善峰面积和保留时间的重现性和灵敏度，还能明显缩短整个分析时间，从而提高样品通量和效率。

安捷伦仪器：
7890A GC 系统
G1888 顶空进样器

应用报告：
药物质量控制
杂质分析

前言

由于许多溶剂对人类健康构成威胁，所以国家和国际法规机构，如美国食品和药品管理局 (U.S. FDA)、美国药典 (USP)、欧洲药典 (EP)，以及国际协调会议 (ICH)，都要求对药物、赋形剂和最终产品中的残留溶剂进行分析。根据其可能的危害将溶剂分为三类。1 类溶剂应避免，2 类溶剂应限制，3 类溶剂被认为低毒。目前的趋势是从安全角度出发要降低污染物水平，需要更灵敏而准确的分析方法。针对残留溶剂的 USP <467>新规范于 2007 年 7 月开始实施。其目的是最终实现与 ICH Q3C(R3)相一致，后者也被 EP 所采用。

对药品中残留溶剂以及对药品包装材料可提取或渗透溶剂的分析，通常采用带火焰离子化检测器 (FID) 的顶空 (HS) GC，或用质谱检测 (MSD) 进行鉴别和确证。详见参考文献 1-3。残留溶剂分析是药物质量控制中顶空 GC 的最常见应用。目前使用顶空 GC 的实验室可能遇到下列仪器方面的问题：

- 由于大气压变化影响了顶空气体采样阀 (GSV) 注射样品的量，顶空分析的面积精度可能受到影响

- 对于某些低浓度分析物，如苯，分析灵敏度较低
- 受到后洗脱杂质和高沸点溶剂/稀释剂如沸点 225 °C 的 1, 3 二甲基-2 咪唑啉酮 (DMI) 的影响，样品分析周期过长

另外，随着对新分析仪器需求的增长，首要问题是已建立并经过验证的方法是否能不用再进行方法开发，不用再进行验证或只需稍加验证，即可轻松转移到新一代仪器上。本研究的目的至少是要证明在都不调节顶空气体采样阀定量管压力的条件下，HS/7890A GC/FID 与 HS/6890N GC/FID 系统相当。但更重要的是，还要说明 7890A GC 中所采用的微板流路控制新技术、第 5 代气路系统，以及出色的电子系统，如何有效地解决上述问题，明显提高峰面积和保留时间的精度和灵敏度，并通过增加残留溶剂分析的样品通量来提高效率。

注：本文中所有的缩写和名词概述、图表、实验描述及计算公式列于附录中。

实验部分

6890N 和 7890A GC 均配置安捷伦顶空进样器、挥发性物质接口 (VI) 和火焰离子检测器 (FID)。表 1 列出了 HS/VI/6890N/FID 和 HS/VI/7890A/FID 系统的实验条件。7890A 系统在顶空进样定量管上带反压调节和不带反压调节的条件下操作，而 6890N 则无反压调节。为了计算每个分析物峰面积和保留时间的重现性 (用 %RSD 表示) 及统计的方法检测限 (MDL)，制备了 20 份相同样品。用 Eppendorf 管吸取 Restek 1 类和 2 类标准品，先用 100 mL 容量瓶配制标准水溶液，然后取 5 mL 标准溶液，迅速转移到含 3 g 硫酸钠的 10 mL 顶空样品瓶中，并立刻加盖特氟龙密封盖。然后每管涡旋混合半分钟。其中 10 份样品用 6890N 系统，10 份样品用 7890A 系统分析，两个系统的顶空进样定量管上均无压力控制。顶空平衡后，通过辅助电子流量控制 (AUX EPC) 模块对顶空样品瓶加压至 14.000 psi，并进样到 6890N GC 或 7890A GC 系统。为消除色谱柱质量批间差异的影响，两个气相色谱系统均使用同一根 DB 624 色谱柱进行分离。用前述方法制备的另外 20 份样品也用 7890A 系统

分析, 但顶空定量管上不带反压调节。图 1、2、3 显示了采用顶空进样定量管压力调节、顶空样品瓶加压和反吹的 7890A 系统示意图。顶空平衡后, AUX EPC 通道为顶空样品瓶加压至 20.000 psi, 用流量控制模块 (PCM) 的反压调节通道在 5.000 psi 调节定量管管。

6890N 或 7890A GC		G1888A 顶空进样器	
进样口	挥发性物质接口	定量管规格	1 mL
温度	160 °C	样品瓶压力	14.0 psig
分流比	2:1	顶空炉温	85 °C
载气	氮气	定量管温度	100 °C
载气流量	9 mL/min	传输管线温度	120 °C
GC 柱箱升温程序		平衡时间	30 分钟, 轻振摇
初始温度	35 °C	GC 周期时间	50 分钟
初始时间	20 分钟	加压	0.15 分钟
速率	25 °C/分钟	放空 (定量管充满)	0.5 分钟
最终温度	250 °C	进样	0.5 分钟
最终时间	15 分钟		
色谱柱:	30 m x 0.45 mm x 2.55 μm DB624 安捷伦部件号 124-1334		

标准品	
ICH 1 类和 2 类	Restek #36228 (1 类) #36229 (2A 类) #36230 (2B 类)

表 1
残留溶剂分析的仪器条件

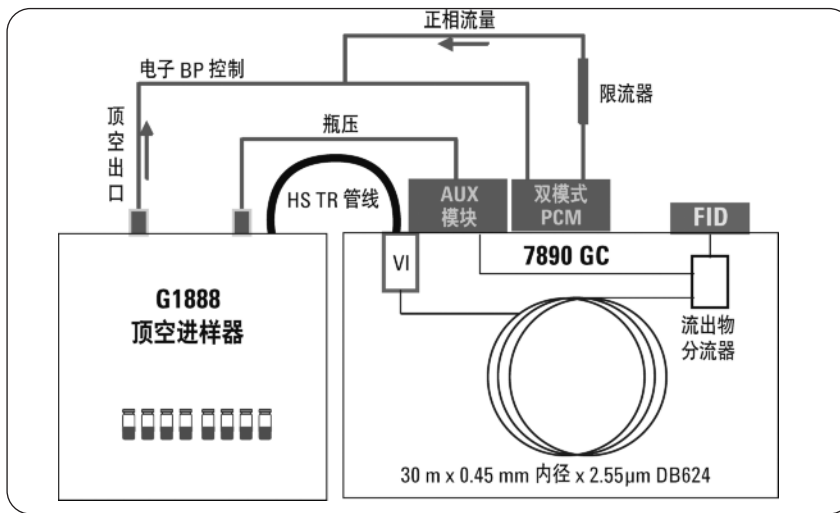


图 1
反吹实验中所用带反吹功能的 7890A GC 配置结构图

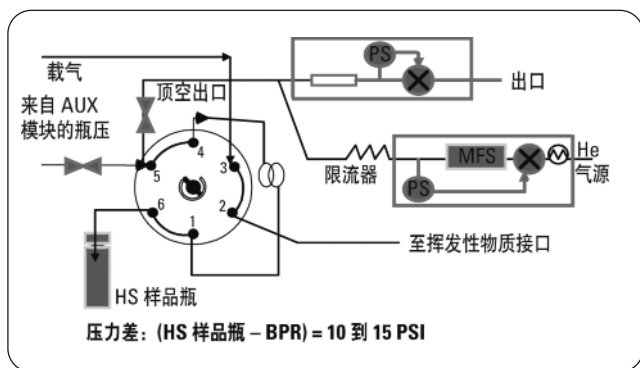


图 2
带反压调节 (BPR) 的顶空 (HS) 进样系统

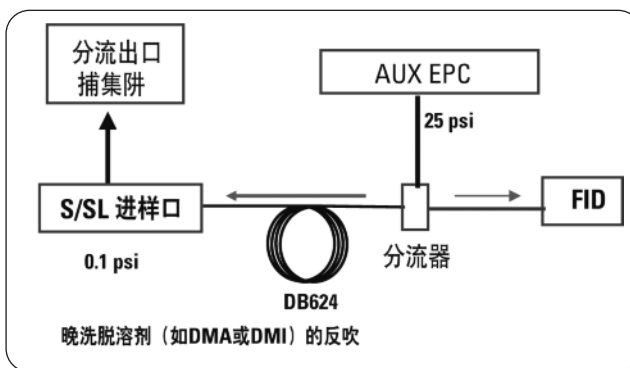


图 3
采用反相气流对晚洗脱溶剂反吹的流程

残留溶剂	ICH 类别	赋形剂 限制浓度 [ppm]	7890A GC 带 BPR*		赋形剂 MDL# [ppm]	7890A GC 大气压下 (无 BPR)		赋形剂 MDL# [ppm]	6890N GC 大气压下 (顶空)		赋形剂 MDL# [ppm]
			重现性 [%RSD] N=8			重现性 [%RSD] N=8			重现性 [%RSD] N=8		
			t _R	面积	t _R	面积	t _R	面积	t _R	面积	
苯	1	2	0.014	2.43	0.1	0.012	5.62	0.2	0.010	9.52	0.2
1,2-二氯乙烷	1	5	0.005	4.47	0.7	0.02	8.03	0.5	0.016	8.63	0.5
1,1-二氯乙烯	1	8	0.013	3.24	0.8	0.011	16.63	3.3	0.022	9.82	1.1
氯仿	2	600	0.009	2.85	54.9	0.016	7.15	61.4	0.018	8.20	62.7
己烷	2	290	0.014	4.18	23.1	0.027	7.15	33.2	0.020	10.61	39.1
环己烷	2	3880	0.042	3.59	341.0	0.012	4.29	299.9	0.018	9.79	501.1
三氯乙烯	2	80	0.012	2.69	5.8	0.016	5.29	7.9	0.013	7.91	7.9
甲苯	2	890	0.025	2.11	46.3	0.024	5.41	85.9	0.031	7.90	90.3
乙苯	2	369	0.002	2.27	24.4	0.002	4.90	35.3	0.003	7.40	35.5
邻二甲苯	2	195	0.001	1.86	9.8	0.001	5.12	19.0	0.002	7.00	18.4
29 种溶剂的平均值			0.013	2.83		0.017	8.77		0.021	9.34	

* 反压调节 (调节顶空出口压力)

方法检测限

表 2

7890A 和 6890N HS/VI/GC/FID 系统分析残留溶剂的保留时间和峰面积重现性及 MDL 计算值

上述实验的结果总结于表 2。从 1 类和 2 类溶剂中选取有代表性的 29 种溶剂, 将其结果列于此表。另外, 显示了所有 29 种溶剂的平均值。还进行的一系列实验表明顶空定量管加压使灵敏度提高。但此时, 不是用 HS 管中含 3 g 硫酸钠的 5 mL 标准溶液, 而是用 Restek 2B 类标准溶液。用毛细管虹吸使标准溶液充满 5 μ L 毛细管, 用薄纸小心擦拭毛细管外壁, 快速转移至一个空的顶空样品瓶中, 并立即加盖。该步骤消除了制备相同样品的用户误差, 确保了精确而重复的样品制备。这些系列实验的结果如图 7 所示。图中的误差线代表了 95% 的置信区间 (± 2 倍标准偏差或 sigma)。

最后, 对系统重新配置进行柱反吹, 快速去除晚洗脱杂质或高沸点溶剂或稀释剂。该配置如图 3 所示。用分流/不分流 (S/SL) 进样口代替挥发性物质进样口 (VI), 连接到顶空传输管线。VI 配置的 0.45 mm 内径柱可能会限制反吹流速, 而 S/SL 进样口则没有这种局限。VI 配置未进行反吹检测。

结果与讨论

残留溶剂的典型色谱图如图 4 所示, 早洗脱和晚洗脱峰的峰面积和保留时间重现性如图 5 所示。以本实例中的 1,1-二氯乙烯为例, 面积精度提高了 3 倍。但

对于某些溶剂如邻二甲苯, 精度提高了 4 倍。总之, 7890A 系统的性能优于 6890N 系统, 某些代表性 1 类和 2 类分析物的性能参数列于表 2。

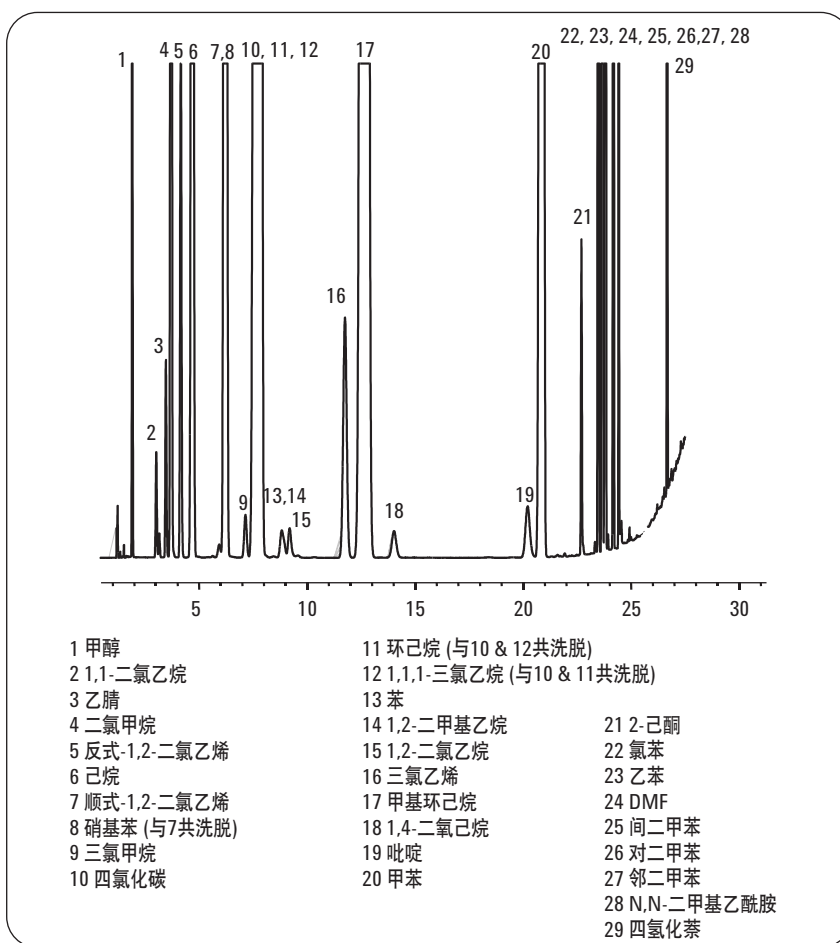


图 4
1 类和 2 类残留溶剂的气相色谱图

提高峰面积精度

从表 2 和图 6 的结果中可得出以下结论：

- 总体来说，无顶空进样定量管反压调节时，7890A 和 6890N 的面积重现性相同。同样条件下的结果无显著性差异。29 种残留溶剂（如表 2 最后一栏所示）的平均面积精度 [%RSD] 为 9%
- 带顶空进样定量管反压调节的 7890A GC，峰面积重现性至少比无顶空进样定量管反压调节的 7890A GC (或 6890N GC) 好 3 倍。个别分析物提高了 4 倍，如图 5 中的邻二甲苯
- 当气压波动较大时，观察到的差异更加明显。这是在进行了一系列测定后得出的结论。图 6 中所列的数据就是在这样的雷雨天得到的。在极端气象条件下，如果不加反压调节，平均峰面积重现性可能增大到 16%。但使用了优化反压调节方法后，大气压波动的影响被完全消除了，所测的平均重现性又回到以前气象条件稳定时测定的 3%。原因是随大气压变化加载气体进样阀产生变化。这种现象在不同地理位置或不同海拔下运行同一方法时可能出现，或者出现在本文中大气压剧烈变化的雷雨天。有了反压调节，气体进样阀可以在恒定条件下工作，从而提高了精度和灵敏度

提高保留时间精度

与峰面积精度所得结果相似，我们也看到了对保留时间重现性的有益影响：

- 与 6890N GC 相比，7890A GC 上所有 29 种溶剂的平均保留时间重现性都更高，不管加不加反压调节
- 7890A GC 带顶空进样定量管反压调节的平均保留时间重现性最好。与没有任何压力调节的 6890N GC 相比，提高了 2 倍

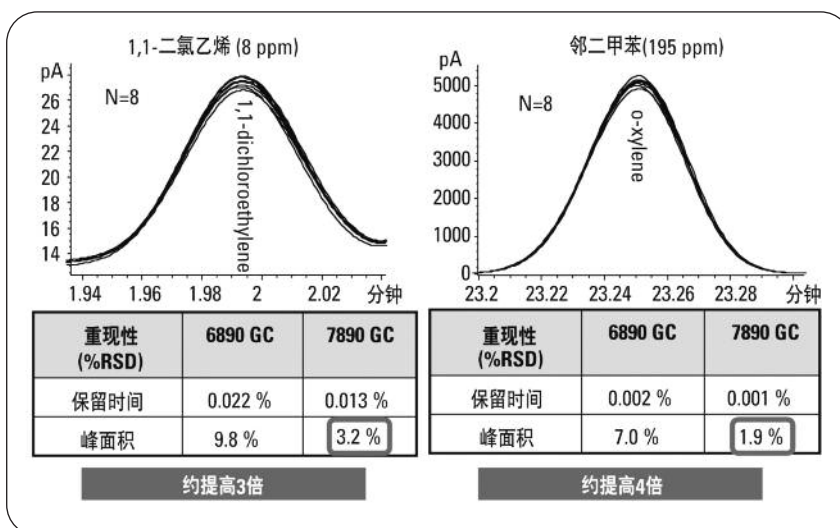


图 5 通过反压调节改善峰面积和保留时间精度的实例 (反压调节: 5.000 PSI, 顶空瓶压: 20.000 PSI)



图 6 反压调节——在出口减少大气压波动的影响。随大气压变化，加载气体进样阀会产生波动

用反压调节优化灵敏度

与 6890N 或不带反压调节的 7890A GC 相比，加上反压调节后总灵敏度提高了 2 倍。图 7 显示了顶空样品瓶加压和顶空进样定量管加压后 1,4-二氧己烷峰面积的变化。我们在样品瓶上加的压力越大，顶空样品的稀释倍数就越多。这在 x 轴为零时（未使用反压调节，定量管暴露在大气压下）非常

明显。顶空瓶加压至 14、35 和 60 psi 时，14 psi 的峰面积重现性最好。当用 BPR 调节定量管的压力时，我们看到面积值增至最大，然后下降到完全为零。一旦达到曲线顶端，过大的高压通过顶空定量管减压使顶空瓶减压（放空循环），流经定量管的样品流消失，甚至逆向。达到曲线顶端后，我们不再将样品留在定量管中。为了收集并进样顶空样品，压力差 ($P_{HS} - P_{Vial} - BPR$) 应为 10 到 15 psi。

采用反吹提高效率

7890A GC 的反吹功能可以通过逆向流动去除晚洗脱的化合物。其优点如下：

- 缩短分析时间
- 延长毛细管柱寿命

因为系统有 EPC，一旦最后的目标分析物从色谱柱中洗脱出来，AUX 组件的压力程序就可以变为较高压力（本例中为 25 psi），同时分流/不分流进样口变为较低压力（本例中为 0.1 psi）。此时柱中的气流为逆向，通过进样口的分流出口将剩余的洗脱物反吹出去。功能示意图见图 3。用仅含 1 类残留溶剂的样品进行反吹实验，样品用两种高沸点稀释剂 DMSO 和 DMI 配制(图 8)。这种样品的典型色谱图如图 8A 所示，历时 30 多分钟。所有 1 类溶剂已在 35 °C 等温条件下 10 分钟内洗脱，所以从 10 到 16 分钟进行反吹，并将柱温升至 250 °C。结果是每次运行节省了 14 分钟的时间（图 8B）。从空白分析的色谱图中可以看出，高沸点化合物已被成功去除（图 8C）。在这个离子中，反吹使样品通量倍增，提高了效率。7890A GC 的快速冷却功能也进一步节省了时间。

线性相当

为了测定线性，制备了从十分之一到两倍极限浓度的 5 份稀释溶液。按照 USP <467>方法，100 mg 赋形剂/药片溶解在含 3 克硫酸钠的 5 mL 水中，用下列公式将 5 mL 水中浓度换算成 100 mg 赋形剂中残留溶剂的浓度： $c_e \text{ [ppm]} = 50 \cdot c_v$ 。在后文中此浓度表述为赋形剂相当浓度 c_e ，在这里 c_v 是样品瓶溶液浓度。

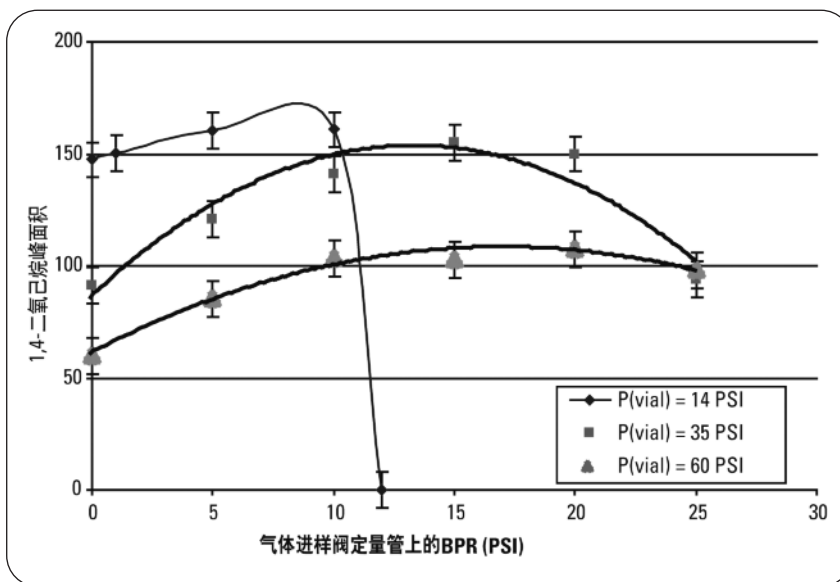


图 7 采用 7890 GC 提高灵敏度——峰面积随顶空瓶和进样定量管压力的改变而变化

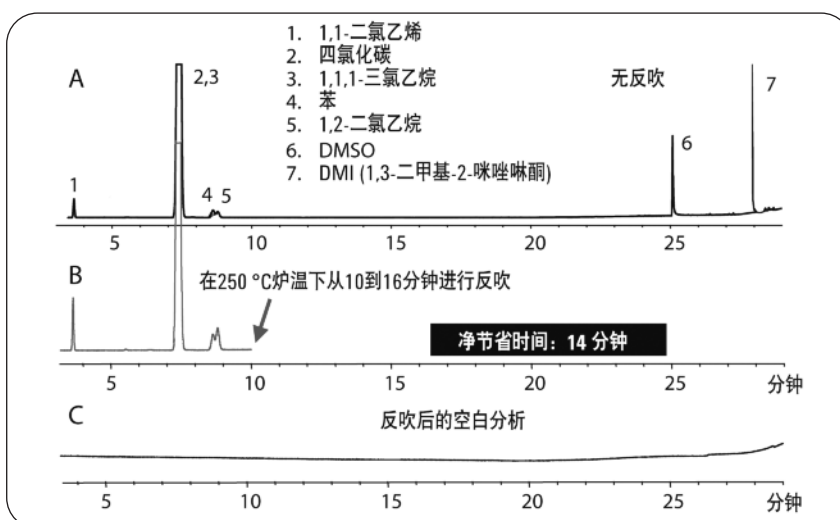


图 8 反吹如何缩短分析时间，提高工作效率的实例（含所有 ICH 1 类残留溶剂样品的色谱图）：A. 初始情况（无反吹）B. 用反吹缩短了分析时间 C. 反吹后的空白分析

用 7890A GC 测定某些代表性残留溶剂的线性结果，与 6890N GC^[1] 系统上进行的类似实验对比，分别见图 9 和 10。总体来看，7890A 和 6890N GC 系统非常一致。所有校正曲线都在十分之一到 2 倍

检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 均表明，两个系统性能相近 (表 3a 和 3b 只显示了 7890A 的数据)。MDL 计算结果 (见表 2 和附录中的 MDL 方程) 和在限定浓度上计算出的 S/N 比值都说明，7890A GC 系统的灵敏度比 6890N GC 系统高 2 倍。

结论

实验表明, 7890A GC 的结果比 6890 GC 更好, 总结如下:

- 可以将现有方法从 6890 直接转移到 7890A GC 上, 无需任何方法开发或性能改变
- 不带反压调节的 7890A GC 表现出相同或更好的性能
- 7890A GC 的反压调节消除了大气压变化的影响
- 7890A GC 顶空进样定量管优化反压调节后, 峰面积精度 [%RSD] 可提高 3 到 5 倍
- 同样条件下, 保留时间稳定性提高到 ± 0.001 分钟
- 对 7890A GC 顶空进样定量管加压后灵敏度提高 1 倍
- 7890A GC 的反吹功能显著缩短了总分析时间 (例如缩短 50%)
- 从线性数据评估, 两个系统性能相当
- 本应用报告中建立的实验方法适用于残留溶剂的常规分析。但当有未知物存在时, 尚不能提供更多信息。解决方案是将 GC 与 Agilent 5975B 系列 MSD 联用, 对目标化合物定量和未知化合物鉴定都能提供良好结果

	二氯甲烷	苯	1,4-二氧己烷	氯仿	三氯乙烯
线性	0.99945	0.99859	0.99606	0.99362	0.99967
斜率	6.0935	50.2950	0.4214	2.7160	14.3362
截距	228.3704	4.6045	11.4008	5.2606	106.9926
LOD	10.2	0.02	2.5	0.25	0.07
LOQ	10.4	0.06	8.4	0.82	0.23

表 3a

用 7890A 顶空 GC/FID 系统所得的线性、LOD 和 LOQ 结果

	二氯甲烷	苯	1,4-二氧己烷	氯仿	三氯乙烯
线性	0.9988	0.9995	0.9996	0.9991	0.9991
斜率	252.82	2106.2	15.268	192.41	535.39
截距	19.987	0.0015	0.3239	0.1851	3.7229

表 3b

用 6890N 顶空 GC/FID 系统所得的线性、LOD 和 LOQ 结果

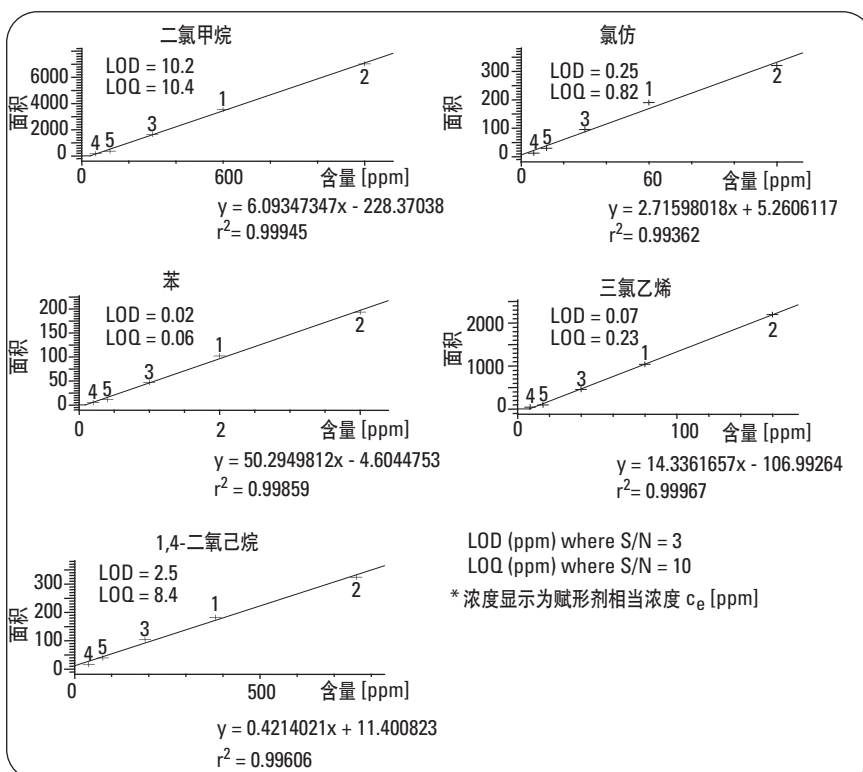


图 9 用 7890A 顶空 GC/FID 系统测定的某些残留溶剂线性曲线*

参考文献

1.

Roger L. Firor, “使用 Agilent G1888 网络化顶空进样器检测药品中的残留溶剂,” 安捷伦应用报告, 出版号 5989-1263CHCN, 2004.

2.

Roger L. Firor and Albert E. Gudat, “用 Agilent G1888 顶空进样器/6890N 气相色谱/5975 inert MSD 检测系统测定药品中的残留溶剂,” 安捷伦应用报告, 出版号 5989-3196CHCN, 2005.

3.

Albert E. Gudat and Roger L. Firor, “The Determination of Extractables and Leachables in Pharmaceutical Packaging Materials using Headspace/GC/MS,” *Agilent Application Note, Publication Number 5989-5494EN, 2006.*

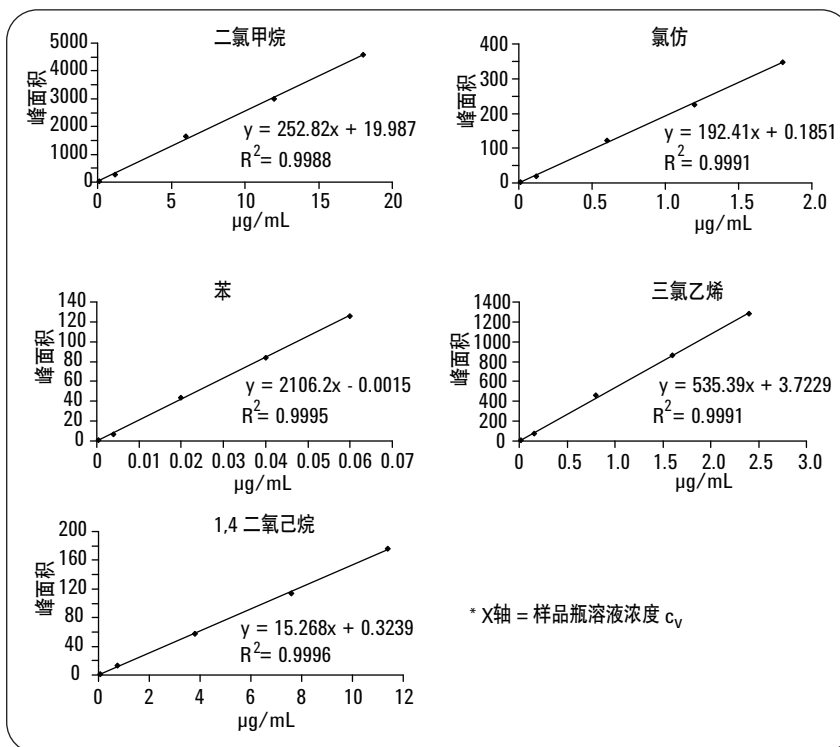


图 10
6890N 顶空 GC/FID 系统所测某些残留溶剂的线性曲线

附录

缩写列表

%RSD – 百分相对标准偏差	LOD – 检测限 (S/N = 3)
[limit] – 浓度限度	LOQ – 定量限 (S/N = 10)
Atm P – 大气压	MDL – 方法检测限 (统计)
AUX – 辅助	MFS – 质量流传感器
BP – 反压	min – 分钟
BPR – 反压调节	MSD – 质量选择检测器
C _v – 样品瓶溶液浓度	P(Vial) – 顶空样品瓶压力
C _e – 赋形剂相当浓度	PCM – 流量控制组件
Cal – 校正	PS – 压力传感器
DMA – 二甲基酰胺	PSI – 每平方英寸磅
DMI – 1,2-二甲基-2-咪唑啉酮	RT – 保留时间
DMSO – 二甲基亚砷	S/N – 信噪比
EP – 欧洲药典	S/SL – 毛细管分流/不分流进样口
EPC – 电子流量控制	TR – 传输
FID – 火焰离子化检测器	U.S. FDA – 美国食品和药品管理局
GC – 气相色谱	USP – 美国药典
GSV – 气体进样阀	VI – 挥发物进样口
HS – 顶空	X – 比例阀
ICH – 国际协调会议	

统计的方法检测限 (MDL)

$$MDL = s \cdot t_{(n-1, 1-\alpha=99)} = s \cdot 3.143$$

其中

$t_{(n-1, 1-\alpha)}$ = 置信度为 99%, 自由度为 n-1 的学生 t 检验值

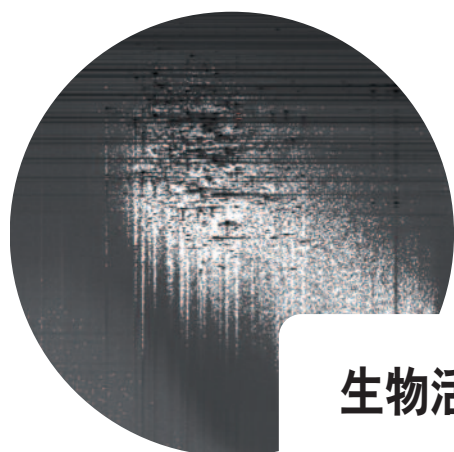
n = 试验次数

s = 7 次试验的标准偏差

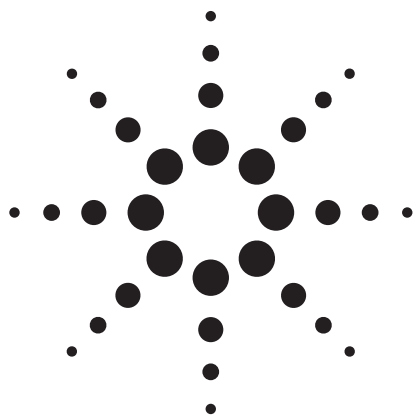
USEPA Method 524.2 (1992 年 8 月第 4 版)

Roger L. Firor 和 Albert E. Gudat 是美国安捷伦科技公司的应用化学家。

Ute Bober 是安捷伦科技公司德国 Waldbronn 的项目经理。



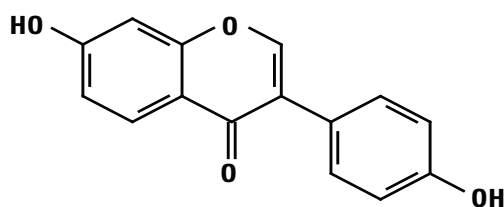
生物活性化合物的纯化和轮廓图分析



用 Agilent 1100 系列纯化系统分离红三叶草中的芒柄花黄素和其它植物雌激素

应用报告

Edgar Nägele
Udo Huber



摘要

制药行业为了寻找新药经常要从植物中分离活性天然产物。在本应用报告中，我们报导了如何用 Agilent 1100 系列 AS (分析型) 和 PS (制备型) 纯化系统完成这项工作^[1]。以分离红三叶草中的芒柄花黄素及其它植物雌激素为例，说明分析级和制备级流量的安捷伦纯化解决方案具有卓越的性能。

前言

雌激素用于治疗更年期紊乱和骨质疏松，因为这些病变是激素水平低下引起的。不幸的是，使用甾体化合物出现副作用的几率很高，如血栓形成。对亚洲和西方人群的对比研究显示，这类疾病在亚洲人当中并不普遍。这可以用亚洲的大豆膳食来解释，这种膳食中植物雌激素含量很高。目前对植物雌激素^[2]的研究很受重视，因为其在激素替代疗法和肿瘤预防中非常重要，而且没有副作用。

另一篇应用报告报导了用荧光^[3]和 UV-可见检测，鉴定红三叶草 (*Trifolium pratense*, L., Leguminosae) 提取物中带异黄酮结构的植物雌激素^[4]。在本篇应用报告中，我们将介绍用 Agilent 1100 系列 AS 型和 PS 型纯化系统从红三叶草中分离芒柄花黄素和其它植物雌激素。

仪器

实验用下列系统进行：
分析型系统：

- Agilent 1100 系列真空脱气机
- Agilent 1100 系列四元泵
- Agilent 1100 系列多孔板自动进样器
- Agilent 1100 系列柱温箱
- Agilent 1100 系列二极管阵列检测器
- Agilent 1100 系列 AS 型馏分收集器

制备型系统：

- 两个 Agilent 1100 系列制备泵
 - Agilent 1100 系列制备型自动进样器
 - Agilent 1100 系列色谱柱箱
 - Agilent 1100 系列二极管阵列检测器
 - Agilent 1100 系列制备型馏分收集器
- 该系统用安捷伦化学工作站 (A.09.01 版) 和纯化/高通量软件 (A.01.01 版) 控制。

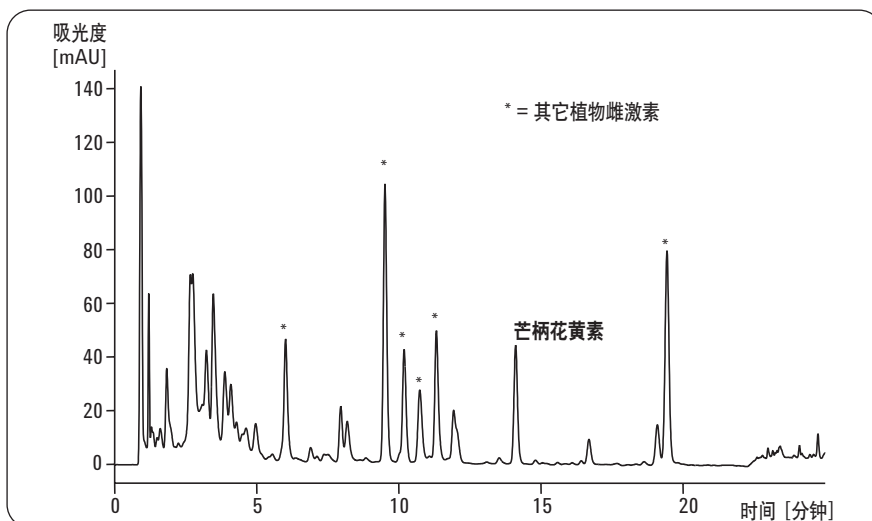


图 1
红三叶草粗提物的色谱图

色谱柱：	ZORBAX SB-C18, 3 x 150 mm, 5 μ m
流动相：	0.1% 醋酸水溶液, 0.1% 醋酸乙腈溶液
梯度：	20% B 至 45% B 20 分钟, 45% B 到 100% B 1 分钟 100% B 持续 4.5 分钟, 100% B 到 20% B 0.5 分钟
停止时间：	25 分钟
后运行时间：	5 分钟
流速：	0.7 mL/min
进样量：	5 μ L
柱温：	35 $^{\circ}$ C
UV 检测器：	DAD 260 nm/16 (参比 800 nm/100) 标准流通池 (10 mm 光程)

结果与讨论

提取

25 g 干燥的红三叶草用含 25 mL 0.1 M H_2SO_4 的 250 mL 甲醇萃取 3 小时。从超声水浴中取出混合物，搅拌过夜。过滤后于 40 °C 将溶液蒸至 30 mL，并再次过滤。

分析方法开发

在以前报导方法^[4]的基础上用醋酸代替磷酸，开发分析方法。图 1 显示了所得到的色谱图。色谱图中标记了芒柄花黄素和其它几种植物雌激素^[4]。

体积超载实验

由于提取物的浓度是一定的，不可能进行浓度超载进样，所以必须采用体积超载分离这些化合物。进样高达 50 μL 粗提物样品仍能使分析型纯化达到足够的分离(图 2)。

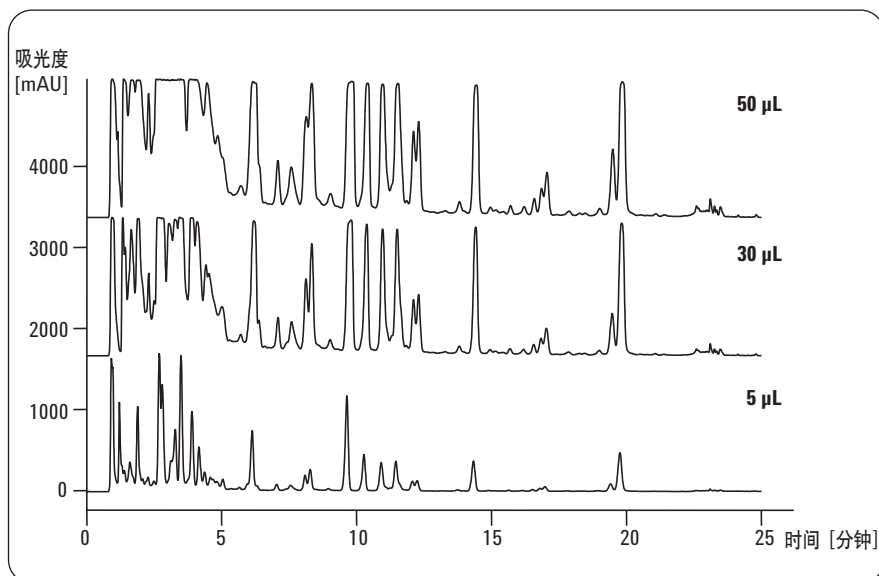


图 2
体积超载实验

植物雌激素的分析型分离

从复杂天然提取物中分离化合物的常用方法是按时间段分离馏分。由于在超载实验中获得了良好分离，所以我们按色谱峰分离红三叶草提取物的馏分。色谱图如图 3 所示——垂直线代表收集的馏分。分析方法见图 1，进样量为 50 μL 。在 6 到 20 分钟之间仅根据阈值（500 mAU）收集馏分。

更大量的分离

为了得到更多植物雌激素，我们将几次运行得到馏分汇集在一起。这意味着要对同一样品瓶中的样品重复进样，并将得到的馏分收集在同一个馏分瓶中。汇集功能在用户指南中有详细介绍^[5]。450 μL 样品分 9 次进样，每次进样 50 μL ，所得馏分自动汇集。对该馏分重新分析显示了良好结果，表明仪器和软件具有良好性能（图 4）。

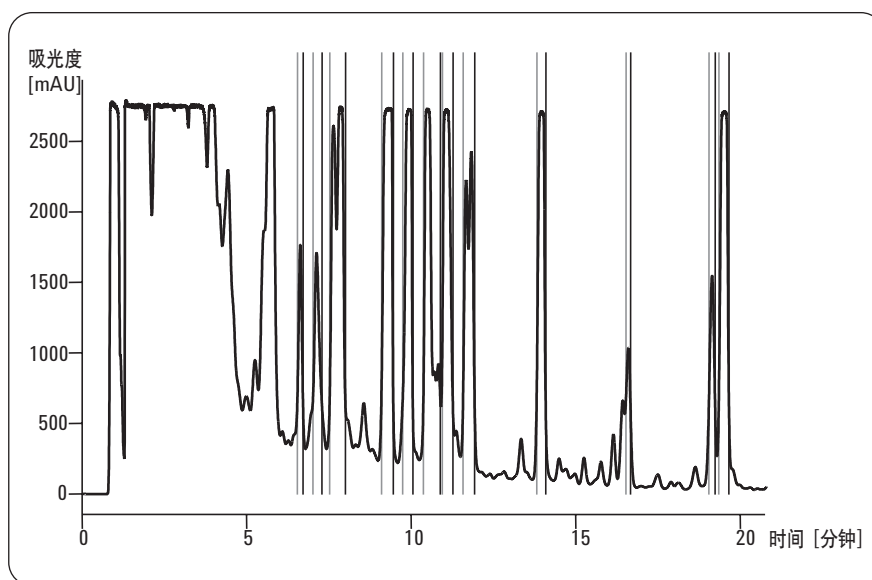


图 3
红三叶草提取物的分析型分离

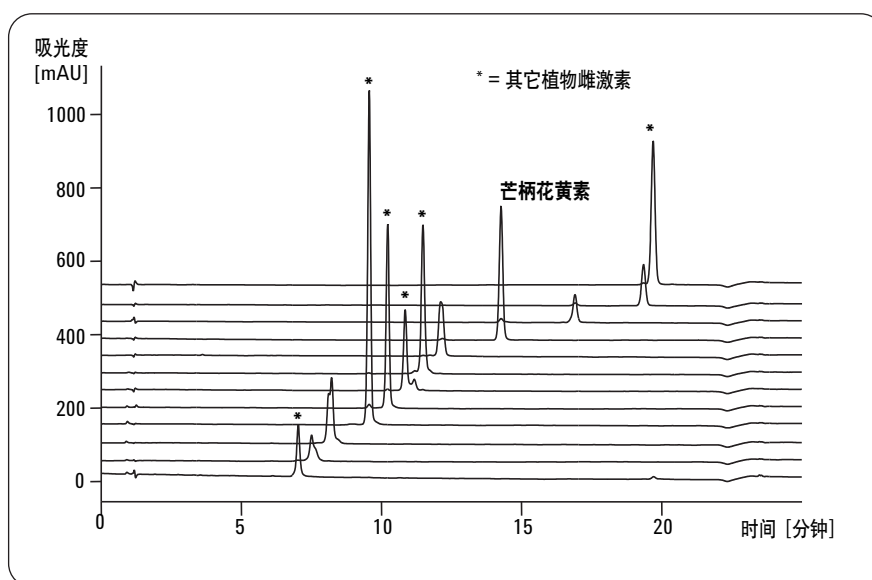


图 4
汇集馏分的再分析

纯化更大量物质的另一种方式是在更大的色谱柱上进行。根据分析型色谱柱的超载实验结果（图 2），进行了单次进样 450 μL 的放大计算。此工作在 9.4 x 150 mm 柱上进行，流速 7 mL/min。因为 Agilent 1100 系列多孔板 AS 型自动进样器只能允许 5 mL/min 的最大流速，所以将纯化转移到 PS 型纯化系统上进行。所得色谱图如图 5 所示。较短光程的制备型流通池（3 mm）与标准流通池（10 mm）相比，得到的峰高和峰面积较小。馏分的再分析显示纯度与汇集实验相当。汇集实验和采用 9.4 mm 内径柱的进样量相同（450 μL ）。所用的溶剂量也相当（约 200 mL）。但在 9.4 mm 内径柱上纯化的主要优点是节省了获得等量纯化物质所需要的时间。

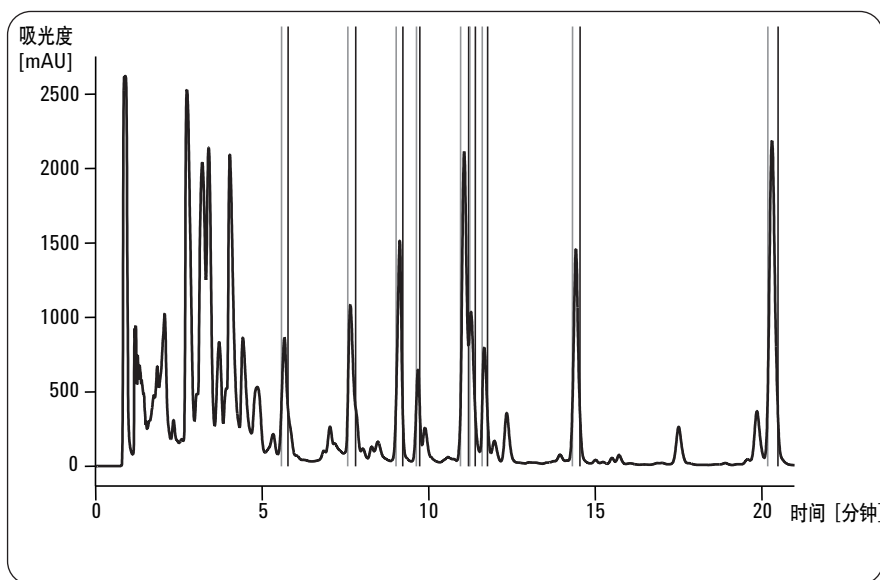


图 5. 红三叶草提取物的制备型分离

以制备规模分离植物雌激素

要纯化更大量的样品，方法进一步扩展到 21.2 x 150 mm 柱上。这种规模可一次性进样 2300 μL 。色谱图和方法如图 6 所示。馏分再分析表明，从馏分纯度上看，放大无任何性能损失。

色谱柱:	ZORBAX SB-C18, 9.4 x 150 mm, 5 μm
流动相:	0.1% 醋酸水溶液, 0.1% 醋酸乙腈溶液
梯度:	20% B 到 45% B 20 分钟, 45% B 到 100% B 1 分钟 4.5 分钟 100% B, 100% B 到 20% B 0.5 分钟
停止时间:	25 分钟
后运行时间:	5 分钟
流速:	7 mL/min
进样:	450 μL
柱温:	室温
UV 检测器:	DAD 260 nm/16 (参比 800 nm/100) 制备型流通池(3 mm 光程)
馏分收集:	5.5 到 21 分钟之间, 仅基于阈值 (100 mAU)

结论

在本应用报告中，我们报导了用 Agilent 1100 系列制备系统 AS 开发了分离含芒果柄花黄素和其它几种植物雌激素的红三叶草复杂粗提物的分析型方法。基于该方法，进行了基于色谱峰收集馏分的分析规模制备性分离。为了得到更多植物雌激素，使用了 Agilent 1100 系列纯化系统 AS 的汇集功能。对馏分再分析，测定了所得化合物的纯度。在分析型结果的基础上，对方法进行了放大。在 Agilent 1100 系列纯化系统 PS 上用两根不同色谱柱重复纯化，一次性运行得到更大量的目标化合物。制备规模的纯度结果与分析型系统一致。

参考文献

1. “New perspectives in purification with HPLC and HPLC/MS” 安捷伦科技产品手册，出版号 5988-3673EN, 2001.
2. Julia Barrett, “Phytoestrogen: Friends or Foes”, *Environmental Health Perspectives*, (104), 478, 1996.
3. “Sensitive and Reliable Fluorescence Detection for HPLC”, 安捷伦科技产品手册，出版号 5968-9105E, 1990.

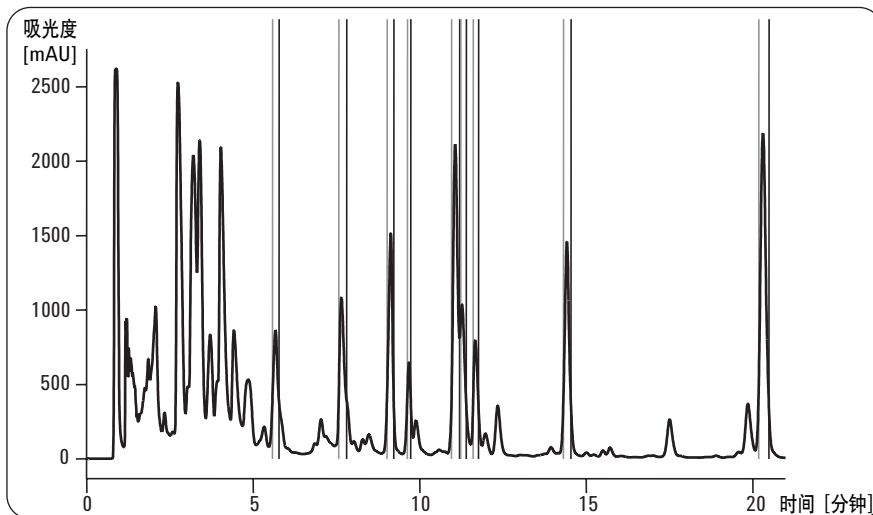
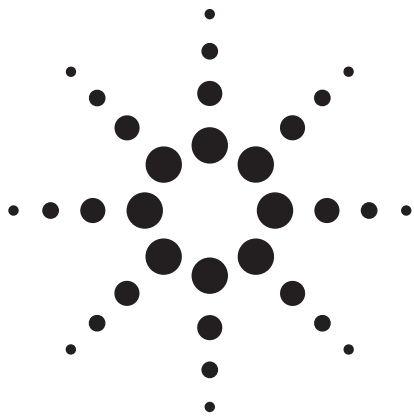


图 6
21.2 mm 制备柱上的馏分分离

色谱柱:	ZORBAX SB-C18, 21.2 x 150 mm, 5 μm
流动相:	0.1% 醋酸水溶液, 0.1% 醋酸乙腈溶液
梯度:	20% B 到 45% B 20 分钟, 45% B 到 100% B 1 分钟 4.5 分钟 100% B, 100% B 到 20% B 0.5 分钟
停止时间:	25 分钟
后运行时间:	5 分钟
流速:	35 mL/min
进样:	2300 μL
柱温:	室温
UV 检测器:	DAD 260 nm/16 (参比 800 nm/100) 制备型流通池(3 mm)
馏分收集:	5.5 到 21 分钟之间, 仅基于阈值 (100 mAU)

4. “用反相 HPLC 和紫外-可见与荧光检测器分离红色三叶草中的植物雌激素”, 安捷伦科技应用报告, 出版号 5988-2399CHCN, 2001.
5. “Agilent 1100 Series Purification System”, 安捷伦科技用户指南, 部件号 G2262-90001, 2001.

Edgar Nägele 和 Udo Huber 是安捷伦科技公司德国 Waldbronn 的应用化学家。



人参中复杂天然产物提取物的分析——第 I 部分：采用带精确质量检测的高分离度快速 LC-ESI TOF 解析人参皂甙的结构

应用报告

Edgar Nägele

摘要

有历史记载以前，人们就已经开始用草药提取物治疗疾病。通过多少代人的临床经验和教训逐渐发现了其在人体中的活性和作用。中药（TCM）就是一个很好的例子。天然来源的西方药物由于其潜在价值，也越来越受到重视，但是要建立西药的质量控制标准，需要对天然产物的药用成分进行深入了解。

本应用报告将介绍，采用配置快速分离高通量（RRHT）色谱柱的高分离度快速液相色谱系统，对复杂的人参提取物成分进行分离，并用 ESI 垂直加速式飞行时间质谱（oaTOF）测定精确质量，解析结构。在本工作的第二部分，将讨论采用高分离度快速液相色谱系统结合离子阱质谱进行结构解析^[8]。

前言

有历史记载以前, 世界各地的所有古老文明都曾经用植物和动物源性粗提物治疗疾病。几百年的临床经验和教训使人类逐渐发现了其治疗不同疾病的活性以及对人体的其它作用, 这些宝贵的经验世代相传。中药 (TCM) 是这一经验不断积累、优化过程的最好例证。由于这类药物通常是含有成百上千种不同化学成分的复杂混合物, 而各成分之间又存在疗效的拮抗或协同作用, 要进行质量控制和质量保障非常困难。色谱指纹图谱是使用广泛并被美国食品药品监督管理局 (FDA) 和世界卫生组织 (WHO) 承认的方法^[1,2]。

色谱指纹图谱能够以定性的方式鉴别和区分种属相近的草药, 除此之外, 对药用植物提取物的定量分析也越来越重要。通过定量分析确定药物成分以及潜在毒性天然成分的绝对量, 对控制传统药物的质量非常重要^[3]。这对天然来源的西药也越来越重要。但是要建立西药的质量控制标准, 需要对天然产物的药用成分进行深入了解。由于传统草药常含有几百种物质, 其中只有几种是有生物活性的化合物, 所以有必要建立一种新策略, 从植物提取物中筛选对动物或细胞模型, 以及受体和酶

学实验有生物活性及药理作用的化合物^[4]。人参 (*Panax species*) 是一种使用了 5000 多年的著名亚洲草药。已有报导的人参药理作用包括, 对中枢神经系统 (CNS) 的刺激和抑制作用、抗高血压、抗高血糖、抗肿瘤和免疫调节等作用^[5]。其主要活性化合物人参皂甙是三萜皂甙, 过去几年中, 已分离和鉴定出了 80 多种。过去 30 年来, 在建立分析人参提取物和制剂的分析方法方面, 人们已经做了大量工作。分析人参等复杂天然提取物的首选方法, 是高效液相色谱法 (HPLC)^[6]。现在也采用 LC/MS 仪器测定复杂的和结构相似的人参皂甙, 如用 LC/ESI oaTOF 进行精确质量测定, 用液相色谱/离子阱或液相色谱/三重串联四极杆质谱仪, 通过 MS/MS 和 MSⁿ 进行结构解析^[7]。本应用报告将介绍使用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统, 配置 RRHT 色谱柱, 对复杂的人参提取物中的成分进行分离, 并用 ESI oaTOF MS 进行精确质量测定。采用 CID 裂解解析结构, 并根据测得的精确质量计算碎片离子的经验式。高分离度液相色谱系统与离子阱 MS 联用, 通过 MSⁿ 解析结构的应用, 将在本工作的第 2 部分讨论^[8]。

实验部分

仪器

- 带脱气机的 Agilent 1200 系列 SL 型二元泵。该泵的最大压力限是 600 bar, 能够用 1.8 μm 粒径 RRHT 柱进行高分离度 HPLC 分析, 以获得最佳分离性能
- 带温度控制的 Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器。该自动进样器是为与 1200 系列 SL 型二元泵一起工作而特别设计的, 具有最低的延迟体积
- Agilent 1200 系列柱温箱 (TCC)。该 TCC 与高压二元泵一起使用, 在优化的延迟体积条件下可选择分离式热交换器和柱后冷却, 并可选择 2 位/10 通阀进行交替色谱柱再生
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器 (DAD)。该 DAD 能以高达 80 Hz 的采样速率采集数据, 并具有内置数据存储功能
- Agilent 6200 系列 MSD TOF。垂直加速型飞行时间质谱仪, 带双喷雾器接口进行质量校正, 以最高的准确性获得分子质量数。该飞行时间质谱仪能以 40 Hz 速率采集数据, 还能进行正/负切换
- Picard TOF 软件 A02.00, 用于 TOF LC/MS 系统数据采集的软件

- 分析软件: 用于 TOF 和 UV 数据分析的软件
- 色谱柱: ZORBAX SB-C18, 2.1 x 150 mm, 1.8 μm

样品

粉碎的冻干人参 (1g)(Panax ginseng), 加 10 mL 甲醇, 超声处理 30 分钟, 过滤后直接进样。

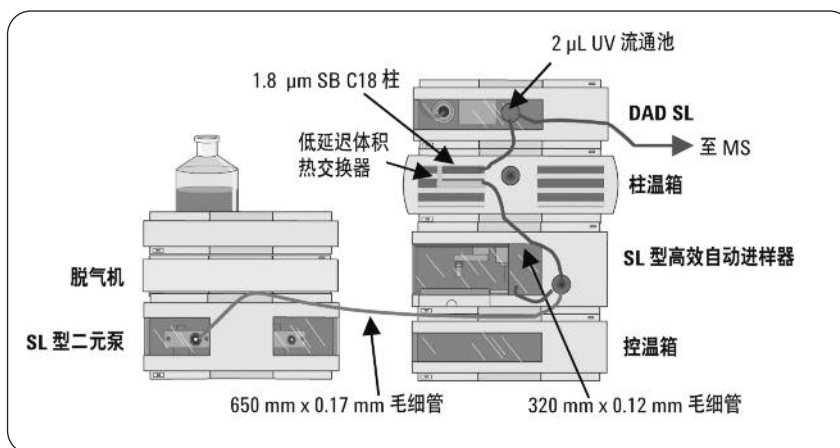


图 1 与 MS 联用的 Agilent 1200 系列二元泵 LC 系统, 采用低延迟体积配置

Agilent 6200 系列 MSD TOF 系统的设置如图 1 所示。在该设置中, Agilent 1200 系列 SL 型二元泵通过一根 0.17 mm 内径不锈钢毛细管与 Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器连接。为减少延迟体积, Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器的针座毛细管采用 0.12 mm 内径, 用同样规格的毛细管在 Agilent 1200 系列柱温箱中连接低延迟体积(1.4 μL)热交换器和色谱柱。将 2 μL 流通池置于 Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器中用于 UV 检测。出口毛细管直接连在飞行时间质谱仪的电喷雾离子源的喷雾器上, 该质谱仪能以 40 Hz 采集质谱图。从人参 (Panax ginseng) 复杂天然产物提取物的 UV 分析可以看出, 对仪器设置进行了优化以获得最高分离度 (见下图)。高分离度配置的 Agilent 1200 系列二元泵系统的全部性能在另一篇应用报告中介绍^[9]。只要稍加改动, 这一系统也可以用于高通量分析^[10]。

方法:

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵的操作条件如下:

溶剂 A: 水 + 0.1% TFA
 溶剂 B: 乙腈 + 0.1% TFA
 流速: 0.5 mL/min
 梯度: 0 分钟 5% B,
 1 分钟 5% B,
 60 分钟 85% B,
 61 分钟 95% B,
 70 分钟 95% B

停止时间: 70 分钟
 后运行时间: 15 分钟

- 用 Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器进样 10 μL 样品, 并将样品冷却到 10 °C。1 分钟后将样品定量管切换到旁路, 以降低延迟体积
- Agilent 1200 系列柱温箱, 配备 1.4 μL 低延迟体积热交换器, 设置为 50 °C

- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器, 用 80 Hz 采集数据, 检测波长设置为 220 nm/4, 参比 360/100, 采用 2 μL 流通池, 30 mm 光程
- Agilent 6200 系列 MSD TOF 按下列条件操作:

离子源:	ESI, 正离子模式, 带双喷雾器, 参考质量
干燥气体:	12 L/min
干燥温度:	200 °C
雾化器:	35 psi
扫描:	200-1300
碎裂电压:	150 V 或 CID 300 V
锥孔电压:	60 V
毛细管电压:	3000 V

两个实验的条件:

泵

溶剂 A: 水 + 0.1% TFA

溶剂 B: 乙腈 + 0.1% TFA

梯度: 10% 到 95% 乙腈 40 分钟,
持续 1 分钟

流速: 0.4 mL/min

自动进样器

进样量: 3 μ L

柱温箱

温度: 50 $^{\circ}$ C

检测器

DAD 2 μ L 流通池, 20 Hz, 220 nm

结果与讨论

为了对 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统和 Agilent 1100 系列标准液相色谱系统进行分离性能的对比, 我们在最大压力为 400 bar 的 Agilent 1100 系列系统上安装 5 μ m 粒径柱, 在最大压力为 600 bar 的 Agilent 1200 系列系统上安装 1.8 μ m 粒径 RRHT 柱, 分析一种复杂天然产物。使用 2.1 x 150 mm, 1.8 μ m 柱的系统反压约为 520 bar, 在 220 nm 波长下收集的 UV 色谱图表明, Agilent 1200 系列系统的色谱峰分离度更高(图 2)。UV 色谱图中基线分离的色谱峰最大峰宽 (FWHM) 小于 0.1 分钟。Agilent 1200 系列泵结合 RRHT 柱所能获得的卓越分离度有助于得到更多用于化合物鉴定的质谱信息。

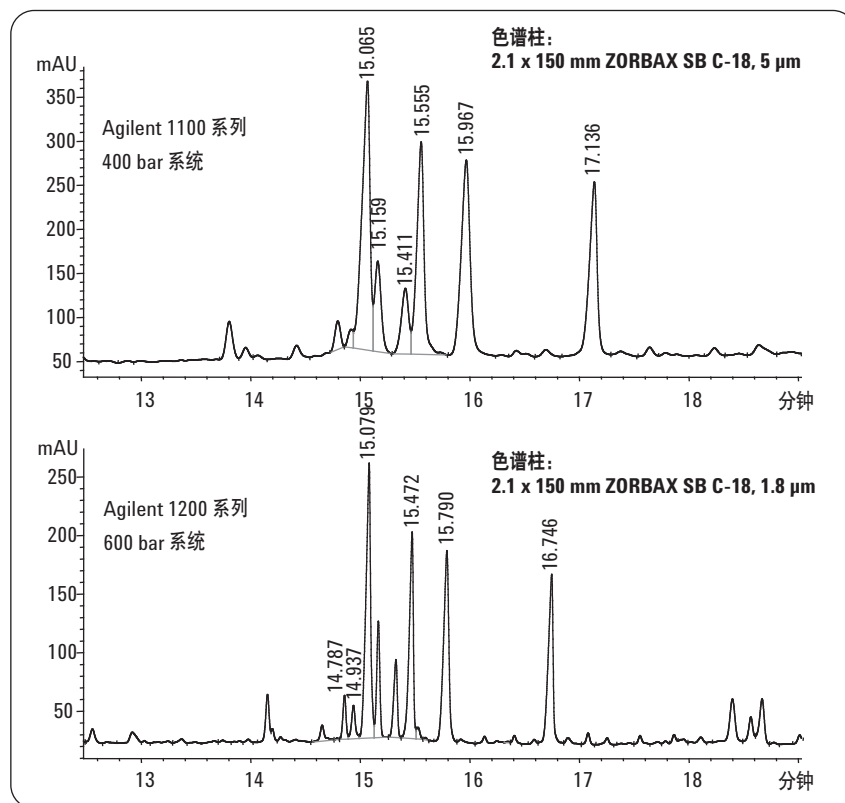


图 2
在 400 bar 系统上用 5 μ m 粒径柱和在 600 bar 系统上用 1.8 μ m 粒径柱分析人参提取物

人参粗提物中各组分用 1.8 μ m 粒径 RRHT 柱进行高分离度快速 HPLC 分离后, 用 ESI oaTOF 进行精确质量测定。主成分在 20 和 33 分钟洗脱, 在色谱图中标为人参皂甙 Re、Rf、F₁₁、Rb₁、Rc、Rb₂ 和 Rd (图 3)。详细分析人参皂甙 Rb₁、Rc 和 Re 的 ESI oaTOF 数据进行结构解析, 而在另一篇应用报告中已对种属相关的人参皂甙 Rf 和 F₁₁ 进行了讨论^[11]。

27.7 分钟洗脱的人参皂甙 Rb₁ 是通过 m/z 1109.6129 的质子化分子离子鉴定的, 其相应经验分子式的质量精度为 -1.90 ppm 或 2.10 mDa。丢失一个水分子得到 m/z 1091.6012 离子, 质量精度 -0.91 ppm。提高锥孔电压进行 CID 实验结构解析, 为 TOF 图谱提供更多信息 (图 4)。丢失一个葡萄糖链得到 m/z 785.5047 和 m/z 325.1136 离子, 质量精

度分别为 0.53 ppm 和 -0.39 ppm。高质量精度还鉴定出了从 m/z 785.5047 离子上连续丢失水得到的一系列离子。接着，分子上丢失第二个葡萄糖链得到 m/z 425.3784 离子，质量精度为 -0.14 ppm。这个离子来自三萜核结构，是所有人参皂甙中常见的离子。丢失一分子水得到 m/z 407.3679 离子，质量精度 0.10 mDa 或 -0.30 ppm。通过一系列 CID 碎片，以及分子离子和一系列计算出的经验式，确证了人参皂甙 Rb_1 的结构。裂解形式如图 4 所示，质量精度和经验式列于表 1。

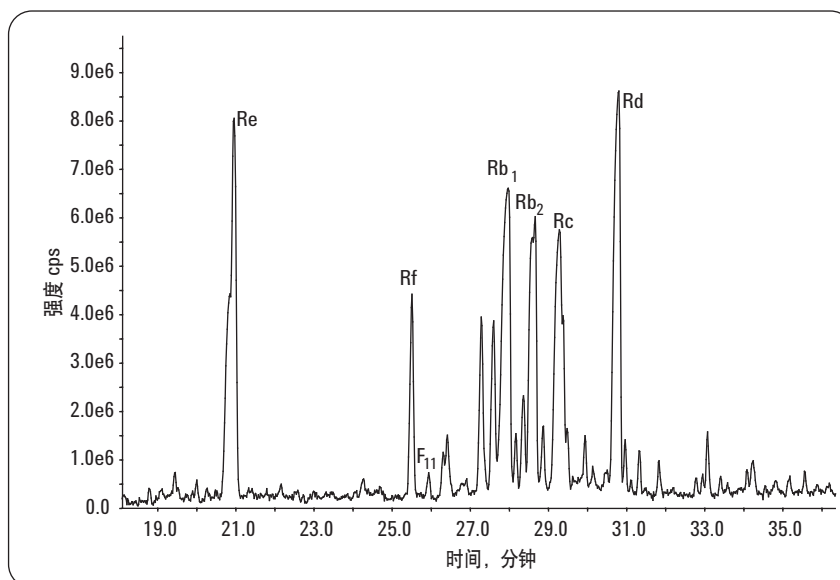


图 3
包含人参提取物主成分峰面积的 RR-LC-TOF 基峰色谱图

测定的质量	计算的质量	分子式	质量精度 [mDa]	质量精度 [ppm]
1109.6129	1109.6108	$C_{54}H_{93}O_{23}$	2.10	-1.90
1091.6012	1091.6002	$C_{54}H_{91}O_{22}$	1.00	-0.91
785.5047	785.5051	$C_{42}H_{73}O_{13}$	-0.40	0.53
767.4950	767.4946	$C_{42}H_{71}O_{12}$	0.40	-0.58
749.4854	749.4840	$C_{42}H_{69}O_{11}$	-1.40	1.88
425.3784	425.3783	$C_{30}H_{49}O$	0.10	-0.14
407.3679	407.3678	$C_{30}H_{47}$	0.10	-0.30
343.1248	343.1240	$C_{12}H_{23}O_{11}$	0.80	2.23
325.1136	325.1135	$C_{12}H_{21}O_{10}$	0.10	-0.39

表 1
用 ESI oaTOF 解析人参皂甙 Rb_1 时的经验分子式和所得质量精度

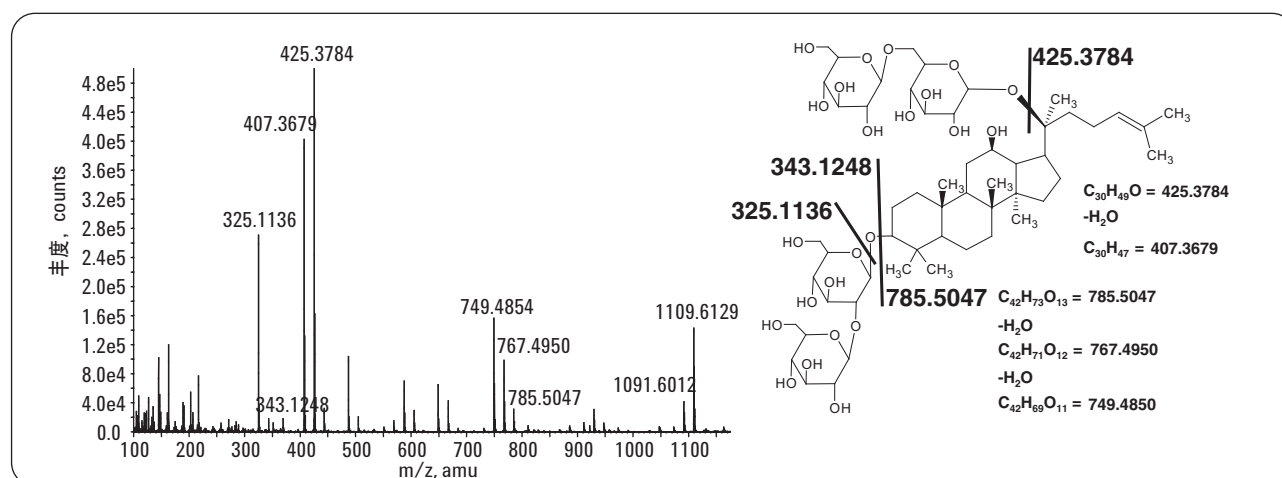


图 4
用 ESI oaTOF 测定的人参皂甙 Rb_1 及其 CID 碎片的精确质量

保留时间 29.3 分钟人参皂甙 Rc 的鉴定, 是通过 m/z 1079.5991 处的分子离子和丢失一分子水 m/z 1061.5888 处的产物 (质量精度分别为 1.02 ppm 和 0.78 ppm), 计算出经验式而鉴定的。在较高锥孔电压下的裂解首先丢失阿拉伯糖和葡萄糖糖基, 然后从剩下的分子碎片上丢失一分子水 (图 5)。开始时糖的裂解产生 m/z 785.5060 和 m/z 755.4936 两个离子, 质量精度分别为 -1.12 ppm 和 1.26 ppm。待所有糖完全丢失后, 检测到 m/z 425.3785 三萜核结构, 计算所得经验分子式的高质量精度为 -0.37 ppm。在 m/z 325.1124 处检测到裂解的糖链, 质量精度 0.22 ppm。裂解形式如图 5 所示, 所有碎片的质量精度列于表 2。保留时间 28.7 分钟的人参皂甙 Rc 和 Rb₂, 是经验式和分子质量相同的结构异构体。在人参皂甙 Rc 中阿拉伯糖是呋喃糖形式, 而在人参皂甙 Rb₂ 中, 阿拉伯糖是吡喃糖形式。

所测人参提取物中最后一个主成分定为人参皂甙 Re。该化合物在 20.8 分钟洗脱, 根据经验分子式 m/z 947.5585 处的质量鉴定, 质量精度高达 0.60 mDa 或 -0.59 ppm (图 6)。CID 裂解为其鉴定提供了

进一步的证据。糖基断裂剩下两个主要碎片。 m/z 767.4957 处 (质量精度 -1.50 ppm) 是丢失葡萄糖分子得到的碎片。连续丢失水产生 m/z 749.4855 离子。进一步丢失葡萄糖二糖后, 在 m/z 441.3739

测定的质量	计算的质量	分子式	质量精度 [mDa]	质量精度 [ppm]
1079.5991	1079.6002	C ₅₃ H ₉₁ O ₂₂	-1.10	-1.02
1061.5888	1061.5896	C ₅₃ H ₈₉ O ₂₁	-0.88	0.78
785.5060	785.5051	C ₄₂ H ₇₃ O ₁₃	0.90	-1.12
767.4939	767.4946	C ₄₂ H ₇₁ O ₁₂	-0.70	0.85
749.4846	749.4840	C ₄₂ H ₆₉ O ₁₁	0.60	-0.81
755.4936	755.4946	C ₄₁ H ₇₁ O ₁₂	-1.00	1.26
737.4830	737.4840	C ₄₁ H ₆₉ O ₁₁	-1.00	1.34
719.4723	719.4734	C ₄₁ H ₆₇ O ₁₀	-1.10	1.56
425.3785	425.3783	C ₃₀ H ₄₉ O	0.20	-0.37
407.3679	407.3678	C ₃₀ H ₄₇	0.10	-0.30
325.1134	325.1135	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₀	-0.10	0.22

表 2
用 ESI oaTOF 解析人参皂甙 Rc 时的经验式和所得质量精度

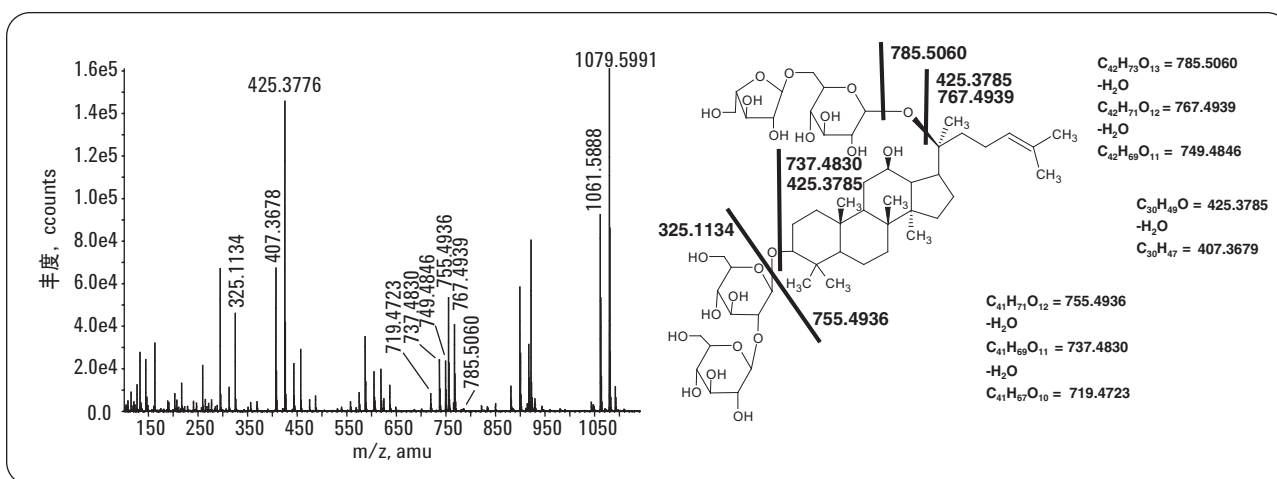


图 5
用 ESI oaTOF 测定人参皂甙 Rc 及其 CID 碎片的精确质量

处产生三萜皂甙母核结构的碎片 (质量精度 0.35 ppm)。继续进一步丢失水以后, 该碎片在 m/z 423.3625 和 m/z 405.3519 处产生离子, 质量精度分别为 0.45 ppm 和 0.55 ppm。所测碎片的计算经验式和质量精度列于表 3。

测定的质量	计算的质量	分子式	质量精度 [mDa]	质量精度 [ppm]
947.5585	947.5579	$C_{48}H_{83}O_{18}$	0.60	-0.59
767.4957	767.4946	$C_{42}H_{71}O_{12}$	1.10	-1.50
749.4855	749.4840	$C_{42}H_{49}O_{11}$	1.50	-2.01
441.3731	441.3733	$C_{30}H_{49}O_2$	-0.20	0.35
423.3625	423.3627	$C_{30}H_{47}O$	-0.20	0.45
405.3519	405.3521	$C_{30}H_{45}$	-0.20	0.55

表 3
用 ESI oaTOF 解析人参皂甙 Re 时的经验式和所得质量精度

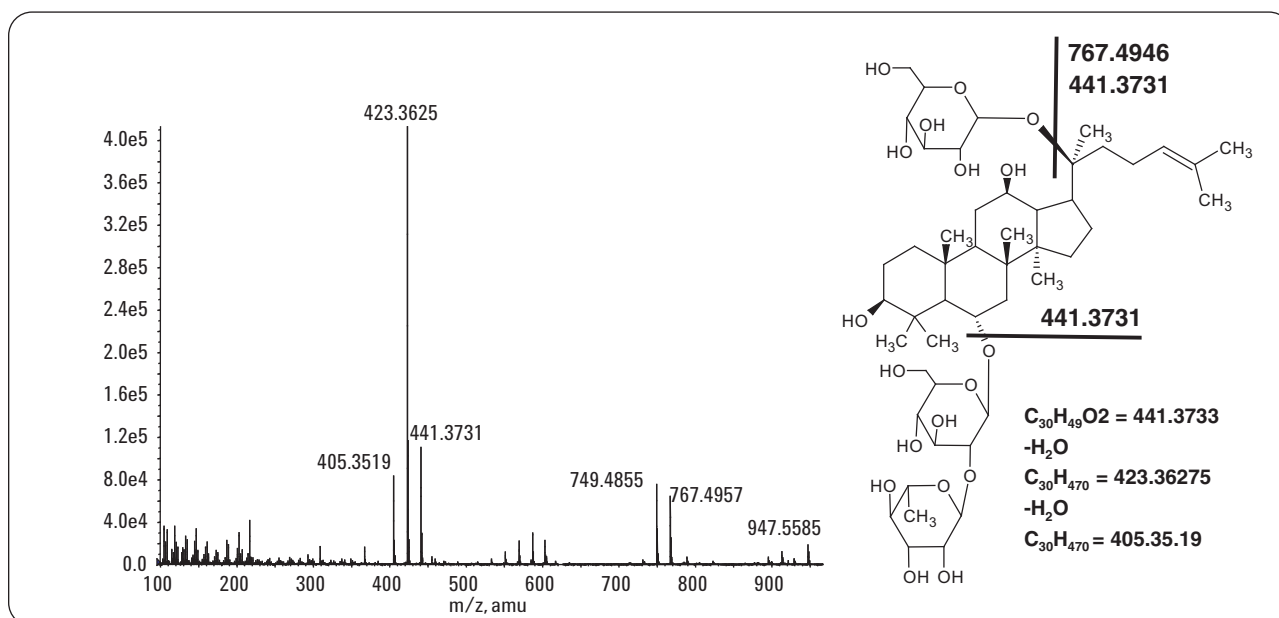


图 6
用 ESI oaTOF 测定人参皂甙 Re 及其 CID 碎片的精确质量

结论

使用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统结合 Agilent 6200 系列 MSD TOF 的特色应用, 证明了其在植物源性高度复杂提取物中天然产物的结构解析中的用途。在本应用报告中, 我们用 Agilent 1200 高分离度快速液相色谱/TOF 系统分析了高度复杂的人参提取物。

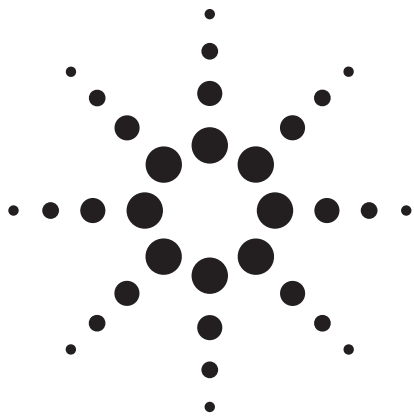
对比原来的 Agilent 1100 系列系统, 进一步表明采用配置 1.8 μm 粒径色谱柱的新系统获得了更高的分离度。提取物中的主要化合物, 三种复杂结构的人参皂甙, 可以通过解析得到的 TOF 图谱进行鉴定。可能的结构通过对分子离子及 CID 分子碎片的经验式计算进行了确证。所有测定的质量都非常精确, 因此确定的结构具有最高的可信度。有了这些天然植物

提取物成分的相关知识, 就可以在生产药物制剂之前用高分辨 LC/TOF 技术监测提取物的含量。这些分析可以实现完全的自动化, 并以最高的质量精度和经验式确认进行质量测定, 从而对化合物进行准确的确认。

参考文献

1. U.S. Food and Drug Administration, "Guidance for Industry botanical Drug Products", **2000**.
2. World Health Organization, "General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine", **2000**.
3. Drasar P., Moravcova J. "Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines.", *J. Chrom. B 1-2*, 812, 3–21,
4. Huang X., Kong L., Li X., Chen X., Guo M., Zou H. „Strategy for analysis and screening of bioactive compounds in traditional Chinese medicines.”, *J. Chrom. B 1-2*, 812, 71-84, **2004**.
5. Attele A.S., Wu J.A., Yuan C.S. *Biochem. Pharmacol.* 58, 1685-1693, **1999**.
6. Fuzzati N. "Analysis methods of ginsenosides.", *J. Chrom B1-2*, 812, 114-133, **2004**.
7. Wang X., Sakuma T., Asafu-Adjaye E., Shiu G. K. „Determination of ginsenosides in plant extracts from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* L. by LC/MS/MS.”, *Anal. Chem.* 71, 1579-1584, **1999**.
8. Naegele, E., "Examination of a complex natural product extract from ginseng - Part II: Structure elucidation of ginsenosides by high resolution LC-ion trap by MSⁿ" *Agilent Application Note, publication number 5989-4705EN*, **2006**.
9. "Performance of Agilent 1200 SL LC system for highest resolution." *Agilent Application Note, publication number 5989-4489EN*, **2006**.
10. "Performance of the Agilent 1200 SL HPLC System for Ultra-Fast LC Applications with 2.1-mm i.d. columns." *Agilent Application Note, publication number 5989-4502EN*, **2006**.
11. Naegele, E., "Examination of a complex natural product extract from ginseng - Part III: Species differentiation of ginseng and authentication of ginseng products by LC/MS", *Agilent Application Note, publication number 5989-4706EN*, **2006**.

Edgar Nägele 是安捷伦科技公司德国 Waldbronn 的应用化学家。



人参中复杂天然产物提取物的分析——第 II 部分：用高分辨离子阱 LC/MS 对人参皂甙进行结构解析

应用报告

Edgar Nägele

摘要

有历史记载以前，人们就已经开始用草药提取物治疗疾病。通过多少代人的临床经验和教训逐渐发现了其在人体中的活性和作用。中药（TCM）就是一个很好的例子。天然来源的西方药物由于其潜在价值，也越来越受到重视，但是要建立西药的质量控制标准，需要对天然产物的药用成分进行深入了解。本应用报告报导了用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统结合快速分离高通量（RRHT）柱分离复杂的人参提取物中各组分的方法。用离子阱 MSⁿ 和 MRM 获得的信息确定各组分的结构，并用于质量控制。

前言

有历史记载以前，世界各地的所有古老文明都曾经用植物和动物源性粗提取物治疗疾病。几百年的临床经验和教训使人类逐渐发现了其治疗不同疾病的活性以及对人体的其它作用，这些宝贵的经验世代相传。中药（TCM）是这一经验不断积累、优化过程的最好例证。人参（*Panax species*）是一种使用了5000多年的著名亚洲草药。已有报导的人参药理作用包括，对中枢神经系统（CNS）的刺激和抑制作用、抗高血压、抗高血糖、抗癌和免疫调节等作用⁵。其主要活性化合物人参皂甙属于三萜皂甙，目前已分离和鉴定出了80多种。过去30年来，在建立分析人参提取物和制剂的分析方法方面，人们已经做了大量工作。分析人参等复杂天然产物提取物的首选方法，是高效液相色谱法（HPLC）^[1]。现在也采用LC/MS仪器测定复杂的和结构相似的人参皂甙，如用LC/ESI oaTOF进行精确质量测定，用LC/离子阱或LC/三重串联四极杆质谱仪，通过MS/MS和MSⁿ进行结构解析^[2]。特别是可以用离子阱MSⁿ碎片轮廓谱确证药用人参产品的可信性及其活性成分之间的差异^[3]。

本应用报告将报导，用Agilent 1200系列高分离度快速液相色谱系统与1.8 μm色谱柱分离复杂人参提取物中的各组分。用离子阱MSⁿ和MRM得到的信息测定各组分结构并用于质量控制。在本系列应用报告的第I部分已经报导了高分离LC系统与ESI oaTOF精确质量测量的应用^[4]。

实验部分

仪器

- 带脱气机的Agilent 1200系列SL型二元泵。该泵能够用于1.8 μm粒径RRHT色谱柱的高分离度HPLC分析，并获得最佳性能
- 带温度控制的Agilent 1200系列SL高效自动进样器。该自动进样器是为Agilent 1200系列SL型二元泵确保最低延迟体积而特别设计的
- Agilent 1200系列柱温箱（TCC）。该TCC将与Agilent 1200系列SL型二元泵和可选件分离式热交换器，以及柱后冷却一起使用，在优化的延迟体积条件下，用可选件2位/10通阀进行交替色谱柱再生

- Agilent 1200系列SL型二极管阵列检测器（DAD）。该DAD能以高达80 Hz的采样速率收集数据。万一网络出现问题，仪器将启动内置的数据存储功能
- Agilent 6330离子阱LC/MS。该离子阱配置标准ESI源，能以26000 m/z/秒的速度扫描。可以数据依赖地全自动获取MSⁿ图谱
- 仪器控制所用的软件是化学工作站B01.03，离子阱软件5.3，用离子阱数据分析软件3.3分析数据
- 色谱柱：ZORBAX SB-C18，2.1 x 150 mm，1.8 μm

样品

粉碎的冻干人参（1g）（*Panax ginseng*）加入10 mL甲醇，超声处理30分钟，过滤后直接分析。

Agilent 6330离子阱LC/MS系统的设置如图1所示。Agilent 1200系列SL型二元泵用0.17 mm内径不锈钢毛细管与Agilent 1200系列SL型高效自动进样器（ALS SL）相连。为减少延迟体积，ALS SL的针座毛细管内径为0.12 mm。同样类型的毛细管连接Agilent 1200系列柱温箱中的低延迟体积（1.6 μL）热交换器，柱温箱

连接色谱柱。Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器中内置 2 μL 流通池进行 UV 检测。出口毛细管直接连接到 6330 离子阱 LC/MS 电喷雾源的雾化器上, 该仪器能以 26000 m/z /秒的速度进行扫描。优化仪器设置以获得最大分离度, 对人参 (*Panax ginseng*) 复杂天然产物提取物进行的 UV 分析证明了这一点。为了验证其性能, 对 Agilent 1100 系列 LC 系统 (5 μm 粒径柱) 和 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统 (1.8 μm 粒径柱) 的分析进行了比较^[4]。在 220 nm 波长下获得的 UV 色谱图清楚地表明, Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统的色谱峰分离度更高。UV 色谱图中大多数基线分离峰的峰宽 (FWHM) 小于 0.1 分钟。高分辨配置的 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统的全部性能在另一篇应用报告中报导^[5]。该系统稍加改动也可以用于高通量分析, 这在另一篇应用报告中有详细报导^[6]。

方法

• Agilent 1200 系列 SL 型二元泵的操作条件如下:

溶剂 A: 水 + 0.1% TFA
 溶剂 B: 乙腈 + 0.1% TFA
 流速: 0.5 mL/min
 梯度: 0 分钟 5% B,
 1 分钟 5% B,
 60 分钟 85% B,
 61 分钟 95% B,
 70 分钟 95% B

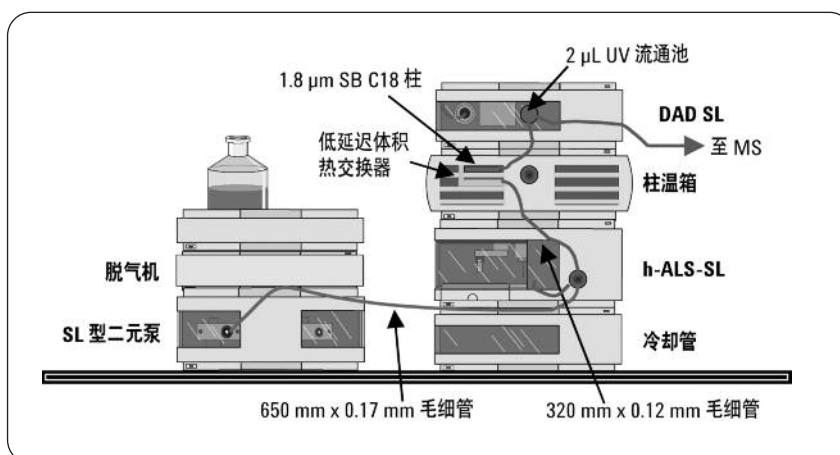


图 1
Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统与 MS 联用, 采用低延迟体积配置

停止时间: 70 分钟

后运行时间: 15 分钟

• 用 Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器进样 10 μL 样品, 样品冷却至 10 $^{\circ}\text{C}$ 。1 分钟后样品定量管切换到旁路, 以缩小延迟体积

• Agilent 1200 系列 SL 型柱温箱调节到 50 $^{\circ}\text{C}$, 配置低延迟体积热交换器

• 用 Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器以 80 Hz 在 220 nm/4 nm 波长 (参比 360/100) 下采集数据, 配置 2 μL 流通池, 30 mm 光程

• 6330 离子阱 LC/MS 在下列条件下操作:

离子源: ESI 正离子模式

干燥气: 5.0 L/min

干燥温度: 300 $^{\circ}\text{C}$

雾化器: 15 psi

靶标: 125000

最长累加时间: 100 ms

扫描: 200-1300

平均: 2

MSⁿ: 自动化 MS/MS 和 MS³

结果与讨论

在高分离度 HPLC 上用 1.8 μm 粒径色谱柱对人参粗提物中各组分进行分离后, 再使其碎裂进行 MSⁿ 分析。主要成分在 20 到 33 分钟之间洗脱, 在基峰色谱图中标为人参皂甙 Re、Rf、F₁₁、Rb₁、Rb₂、Rc、Rd (图 2)。所用色谱柱的高分离度使人参提取物中大量微量化合物得到了分离, 由于扫描速度高达 26000 m/z /秒, 足够采集离子阱 MS/MS 和 MSⁿ 数据, 因此这些小峰也可以被分析。本应用深入研究了人参皂甙 Re、Rb₁ 和 Rc 的离子阱 MS/MS 和 MS³ 数据, 用于结构解析, 而品种依赖的 Rf 和 F₁₁ 人参皂甙分析在另一部分中讨论^[7]。

简单 MS 扫描得到质子化和加合形式的分子离子质量 (图 3)。质子化和加合离子的比值取决于电喷雾离子源的温度, 因为加合复合物在高温下比质子化离子更稳定, 后者将发生裂解, 丢失一个水和其它碎片。人参皂甙 Re 质谱扫描产生的离子有 m/z 928.9 $[M+H-H_2O]^+$ 、946.9 $[M+H]^+$ 、969.1 $[M+Na]^+$; 人参皂甙 Rb₁ 产生的离子是 m/z 1090.1 $[M+H-H_2O]^+$ 、1108.5 $[M+H]^+$ 、1131.1 $[M+Na]^+$; 人参皂甙 Rc 则得到离子 m/z 1059.71 $[M+H-H_2O]^+$ 、1077.75 $[M+H]^+$ 、1101.1 $[M+Na]^+$ 。选择 6330 离子阱质谱 LC/MS, MS/MS 和 MS³ 条件产生加合离子。与质子化离子相比, 这些离子的裂解能得到更清晰、更多的结构信息, 其碎片与本研究第 I 部分讨论的 CID 碎片相似^[4]。在 m/z 789.9 处, 人参皂甙 Re 从加合分子离子中丢失 1 分子葡萄糖, 因

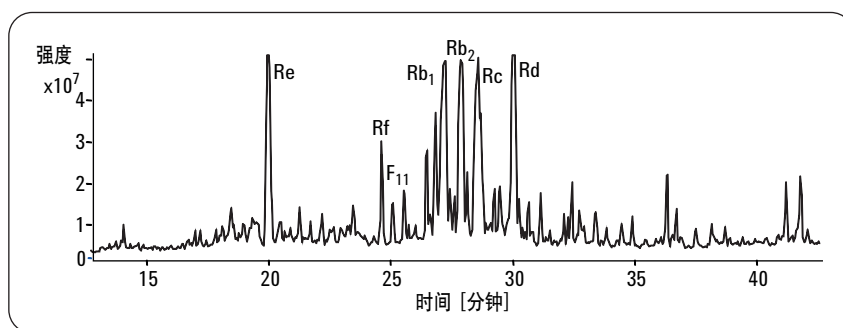


图 2
用高分离 LC 离子阱在 1.8 μ m 粒径色谱柱上得到的人参提取物基峰色谱图

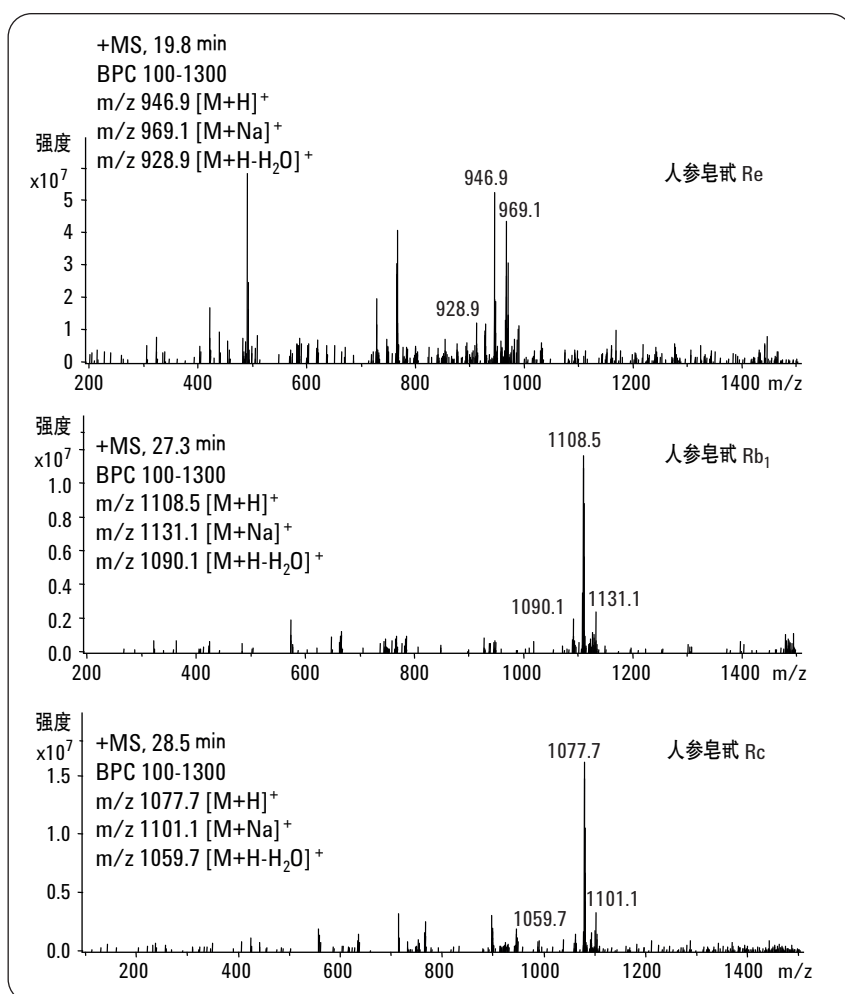


图 3
人参皂甙 Re、Rc 和 Rb₁ 的质谱图

而在 MS/MS 中只产生一个碎片 (图 4)。在 MS³ 中, 这种加合碎片裂解成两部分, 可以检测到来自二糖断裂后的离子 m/z 349.2。与之相比, 人参皂甙 Rc 的 MS/MS 产生了两个碎片。一个也是 m/z 789.5 的离子, 另一个在 m/z 335.1 处断裂的是阿拉伯糖 (图 5)。在 MS³ 中, m/z 365.1 处的二糖是从 m/z 789.5 处的离子上断裂。人参皂甙 Rb₁ 有另一种不同的裂解方式, 在 MS/MS 中, 其分子离子在 m/z 789.5 和 m/z 365.1 处丢失一个葡萄糖链裂解为离子。在 MS³ 中, 在 m/z 789.5 处的碎片也在 m/z 356.1 处丢失相同的二糖 (图 6)。

根据 MS/MS 和 MS³ 碎片轮廓谱可以区分人参提取物中所含的不同人参皂甙, 因为连接在三萜皂甙核结构上的糖分子将以不同的方式并且是特征的方式断裂。如果已知各种人参皂甙在 MS/MS 和 MS³ 模式下的特征裂解轮廓谱, 将有助于用离子阱 MRM 以一种非常独特的方式检测特定化合物的存在。人参皂甙 Re、Rb₁ 和

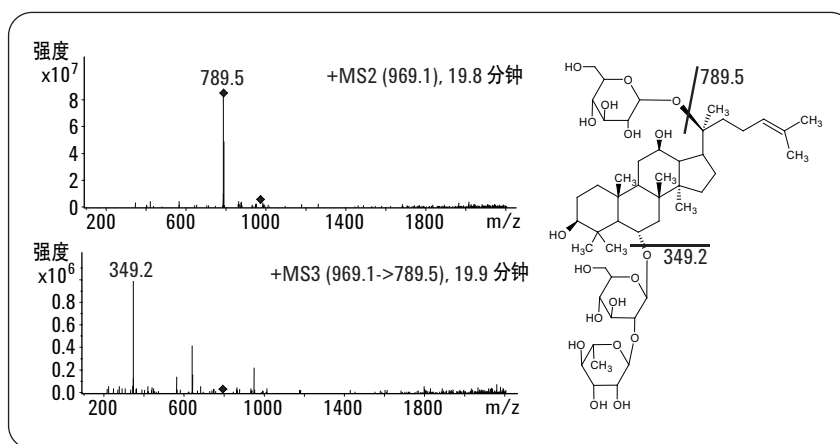


图 4 用离子阱 LC/MS 的 MS/MS 和 MS³ 裂解解析人参皂甙 Re 的结构

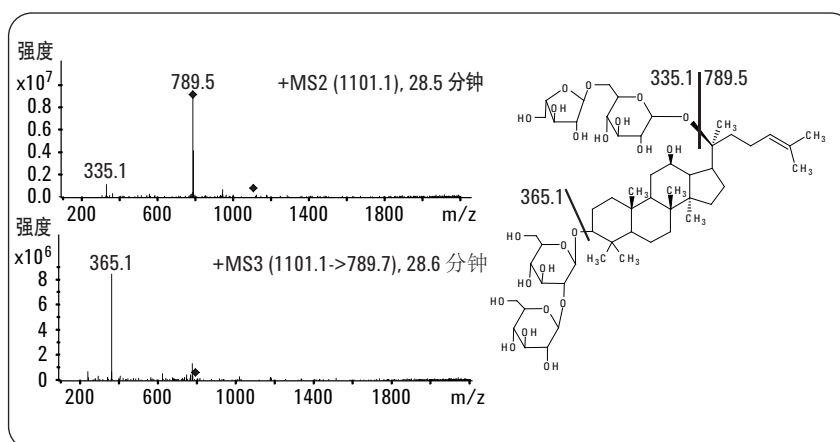


图 5 用离子阱 LC/MS 的 MS/MS 和 MS³ 裂解解析人参皂甙 Rc 的结构

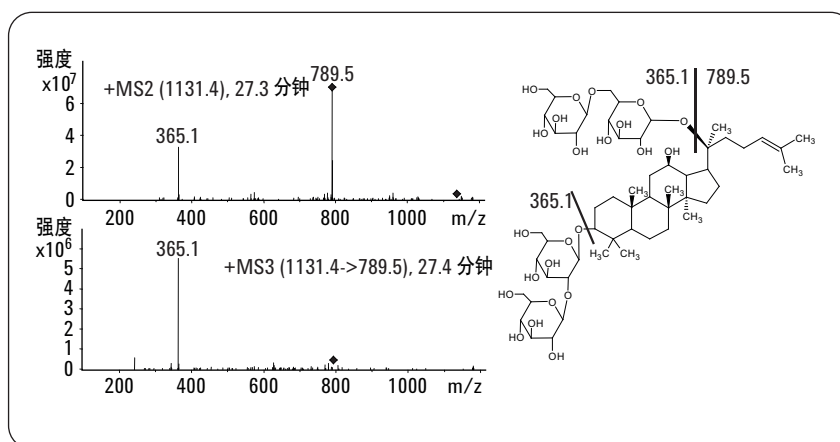


图 6 用离子阱 LC/MS 的 MS/MS 和 MS³ 裂解解析人参皂甙 Rb₁ 的结构

Rc 加合分子离子 MS/MS-MRM 清楚地显示, 其存在于人参粗提取物中 (图 7)。所得的 MS/MS 图谱与上述实验中得到的图谱一致 (图 4-6)。另外, 还检测到了人参皂甙 Rb₂ 和 Rd 异构体。

结论

结果表明, Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统与 Agilent 6330 离子阱 LC/MS 联用, 能够用于植物源性高度复杂天然提取物的结构解析。在本研究中, 用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统和 Agilent 6330 离子阱 LC/MS 系统分析了高度复杂的人参提取物。通过对所得的 MS/MS 和 MS³ 数据进行解析, 可以发现提取物中主要化合物为三种结构复杂的人参皂甙。当离子阱 MRM 用于特殊组分时, 可以用不同碎片数据的更多信息对天然提取物或制药产品进行质量控制。

参考文献

1. Fuzzati N. "Analysis methods of ginsenosides.", *J. Chrom B1-2*, 812, 114-133, **2004**.

2. Wang X., Sakuma T., Asafu-Adjaye E., Shiu G. K. „Determination of ginsenosides in plant extracts from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* L. by LC/MS/MS.", *Anal. Chem.* 71, 1579-1584, **1999**.

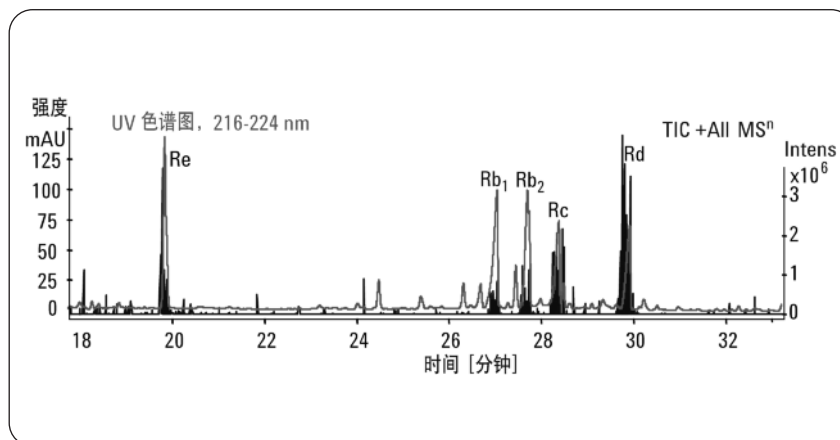


图 7 人参皂甙 Re、Rb₁ 和 Rc 的钠加合分子离子 MS/MS-MRM, 及人参粗提取物的 UV 色谱图

3.

Chan T.W.D., But P.P.H., Cheng S.W., Kwok I.M.Y., Lau F.W., Xu H.X. "Differentiation and authentication of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and ginseng products by using HPLC/MS." *Anal. Chem.* 72, 1281-1287, **2000**.

4.

"Examination of a complex natural product extract from Ginseng – Part I: Structure elucidation of Ginsenosides by high resolution LC – ESI oaTOF with accurate mass measurement", *Agilent Application Note, Publication number 5989-4506EN*, **2006**.

5.

"Performance of the Agilent 1200 SL HPLC System for Ultra-Fast LC Applications with 2.1-mm i.d. columns." *Agilent Application Note, publication number 5989-4502EN*, **2006**.

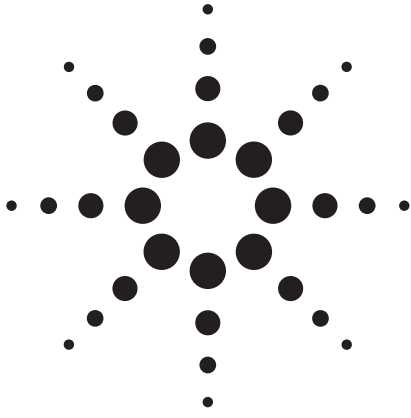
6.

"Performance of Agilent 1200 SL LC system for highest resolution." *Agilent Application Note, publication number 5989-4489EN*, **2006**.

7.

"Examination of a complex natural product extract from Ginseng - Part III: Species differentiation ginseng and authentication of ginseng products by LC/MS", *Agilent Application Note, Publication Number 5989-4706EN*, **2006**.

Edgar Nägele 是安捷伦科技公司德国 Waldbronn 的应用化学家。



人参中复杂天然产物提取物的分析——第 III 部分：采用 LC/MS 鉴别人参制品及人 参植物的种属差异

应用报告

Edgar Nägele

摘要

有历史记载以前，人们就已经开始用草药提取物治疗疾病。同种植物常常因地域、气候、生长条件或亚种不同，具有不同形式的活性成分。中药（TCM）中使用的一些植物就是极好的例子。人参作为其中的代表，其亚种广泛分布在亚洲和美洲大陆。本应用报告报导了用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统，配置快速分离高通量（RRHT）柱，对复杂人参提取物中的组分进行分离的方法。用 LC/ESI 八极加速飞行时间（oaTOF）和 LC/离子阱质谱检测并鉴别了地域或生物源性不同的人参所含化合物的差别。基于已知的组分结构信息，通过测定组分谱图可为人参制品的鉴定提供证据。

前言

不同地域和文化的传统天然疗法，经常使用同样的植物制成草药提取物和酊剂治疗疾病。所用植物生长在不同条件下，表现为不同的亚种，其活性组分便有不同。这种现象的典型例子就是人参 (*Panax spec.*)，在中药(TCM)中已经使用了几千年。在整个亚洲和美洲大陆，这种草药有多种亚种分布^[1]。人参这类复杂天然提取物的首选分析方法，是高效液相色谱(HPLC)^[2]。其主要活性化合物为三萜皂甙，称为人参皂甙，已分离并鉴定出了 80 多种。目前采用 LC/ESI oaTOF 精确质量测定和 LC/离子阱或 LC/三重四极杆仪，通过 MS/MS 和 MSⁿ 进行结构解析，鉴别人参皂甙复杂而相似的结构^[3]，可以区分人参的不同产地或亚种，并通过药物活性成分串联质谱分析所得到的碎片验证药用人参的质量^[4]。本应用报告报导了用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统，配置快速分离高通量(RRHT)柱，分离人参(*Panax ginseng*)和西洋参(*Panax quinquefolius*)复杂提取物成分的方法。用 LC/ESI oaTOF 精确质量测定和 LC/离子阱 MSⁿ 质谱进行检测和鉴定，区分地域或生物源性的差异。根据已知的组分结构信息，测定组分轮廓图可以为人参制品鉴定提供证据。用 ESI oaTOF 进行精确质量

测量解析人参皂甙结构，包括 CID 裂解和离子阱 MSⁿ 分析已在本研究的第 I 和第 II 部分中详细介绍^[5,6]。

实验部分

仪器

- 带脱气机的 Agilent 1200 系列 SL 型二元泵。该泵能够用 1.8 μm 粒径 RRHT 柱进行高分离 HPLC 分析，以获得最佳分离性能
- 带温度控制的 Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器(h-ALS SL)。该自动进样器为配合 1200 系列 SL 型二元泵使用而特别设计，具有最低的延迟体积
- Agilent 1200 系列柱温箱(TCC)。该 TCC 与 SL 型二元泵一起使用，在优化的延迟体积条件下可选择分离式热交换器和柱后冷却，并可选择 2 位/10 通阀进行交替柱再生
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器(DAD)。该 DAD 能以高达 80 Hz 的采样速率采集数据，并具有内置数据存储功能
- Agilent 6210 MSD TOF。八极加速飞行时间质谱仪，带双喷雾器接口以进行质量校正，能以最高的准确性获取分子质量数。该飞行时间质谱仪能以 40 Hz 速率采集数据，还能进行正/负切换
- Agilent 6330 离子阱，用于 MSⁿ 串联质

谱实验的离子阱质谱仪，扫描速度高达每秒 26000 m/z，具有自动数据自适应 MSⁿ 功能

- LC/离子阱仪器控制软件为化学工作站 B01.03，离子阱软件 5.3，用离子阱数据分析软件 3.3 进行数据分析
- LC/TOF 仪器控制采用 Mass Hunter 工作站进行数据采集，AnalystQS 进行数据分析
- 色谱柱：ZORBAX SB-C18，2.1 x150 mm，1.8 μm

样品

1. 粉碎的冻干人参 (1 g) (*Panax ginseng*) 和粉碎的冻干西洋参 (1 g) (*Panax quinquefolius*) 分别加入 10 mL 甲醇，超声处理 30 分钟，过滤后直接分析
2. 糖浆——如韩国人参提取物药用制品 (ILHWA Co., LTD, Korea) (1 g) 溶解于 100 mL 水/甲醇 (1/1, v/v) 中，过滤后直接分析

系统设置

LC/MS 系统的设置如图 1 所示。Agilent 1200 系列 SL 型二元泵通过一根 0.17 mm 内径不锈钢毛细管与 Agilent 1200 系列 h-ALS SL 连接。为减少延迟体积，h-ALS SL 的针座毛细管采用 0.12 mm 内径，用同样规格的毛细管在柱温箱中连接低延

迟体积(1.6 μ L)热交换器,柱温箱链接色谱柱。将 2 μ L 流通池置于 SL 型 DAD 中用于 UV 检测。出口毛细管直接连在 ESI oaTOF 或离子阱质谱仪的电喷雾源喷雾器上。从人参 (*Panax ginseng*) 复杂天然产物提取物的 UV 分析可以看出,对仪器设置进行了优化以获得最高分离度^[5]。使用 2.1 x 150 mm, 1.8 μ m 色谱柱,系统反压一般在 560 bar 左右。UV 色谱图中基线分离的色谱峰最大峰宽 (FWHM) 小于 0.1 分钟。高分离配置的 Agilent 1200 系列二元泵系统的全部性能在另一篇应用报告中介绍^[7]。只要稍加改动,这一系统也可以用于高通量分析^[8]。

方法

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵的操作条件如下:

溶剂 A: 水 + 0.1% TFA
 溶剂 B: 乙腈 + 0.1% TFA
 流速: 0.5 mL/min
 梯度: 0 分钟 5% B
 1 分钟 5% B
 60 分钟 85% B
 61 分钟 95% B
 70 分钟 95% B
 停止时间: 70 分钟
 后运行时间: 15 分钟

- 用 Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器进样 10 μ L 样品,并将样品冷却到

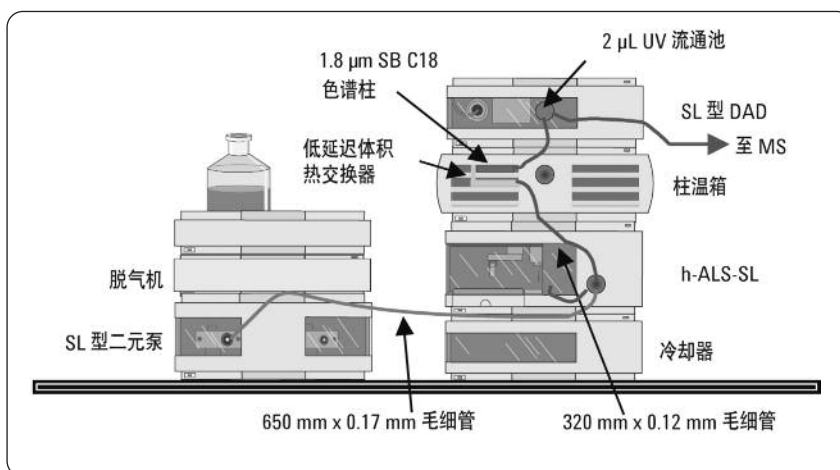


图 1 Agilent 1200 系列高分离快速液相色谱系统与 MS 联用,采用低延迟体积配置

10 $^{\circ}$ C。1 分钟后将样品定量环切换到旁路,以降低延迟体积

- Agilent 1200 系列柱温箱, 配备 1.6 μ L 低延迟体积热交换器, 设置为 50 $^{\circ}$ C
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器, 用 80 Hz 采集数据, 检测波长设置为 220 nm/4 nm, 参比 360/100, 采用 2 μ L 流通池, 30 mm 光程

- TOF 质谱仪操作条件如下:

离子源: ESI, 正离子模式, 带双喷雾器, 参考质量
 干燥气体: 12 L/min
 干燥温度: 200 $^{\circ}$ C
 雾化器: 35 psi
 扫描: 200-1300
 碎裂电压: 150 V 或 CID 300 V
 锥孔电压: 60 V
 毛细管电压: 3000 V

- 离子阱质谱仪的操作条件如下:

离子源: ESI 正离子模式
 干燥气体: 5.0 L/min
 干燥温度: 300 $^{\circ}$ C
 雾化器: 15 psi
 靶标: 150000
 最大累加时间: 100 ms
 扫描: 200-1300
 平均: 2
 MSⁿ: 自动化 MS/MS 和 MS³

结果与讨论

采用高分离度 HPLC 1.8 μ m 粒径色谱柱分离了人参 (*Panax ginseng*) 和西洋参 (*Panax quinquefolius*) 样品中的各化合物, 揭示了不同人参亚种粗提物中各成分的差异。很明显, 差异不仅在于人参皂甙的浓度不同, 还在于各种属中存在不同的化

合物。实验证明, 在离子阱 MS 基峰色谱图 (图 2 和图 3) 中, 20 到 40 分钟之间洗脱的主要组分为常见的人参皂甙 Re、Rg₁、Rb₁、Rb₂、Rc 和 Rd, 以及特殊的人参皂甙 Rf 和 F₁₁。1.8 μm 粒径色谱柱除了具有良好的分离度以外, 其分离度还可以随温度改善。例如, 在 50 °C 柱温下, 所有人参样品中都含有的人参皂甙 Re m/z 946.5 [M+H]⁺ 和人参皂甙 Rg₁ m/z 823.5 [M+Na]⁺ 分不开 (图 2), 但在 80 °C 时却能完全分离 (图 3)。要用 LC/MS 区分人参和西洋参, 异构体人参皂甙 Rf 和伪人参皂甙 F₁₁ 非常有用。对人参的分析显示, 质子化和加合形式的人参皂甙 Rf 分别在 m/z 801.5 和 m/z 823.5 处。在 m/z 801.5 处的异构体伪人参皂甙 F₁₁ 只能作为痕量化合物检测 (图 3)。相反, 西洋参中却含有大量伪人参皂甙 F₁₁, 而不含人参皂甙 Rf。两种异构体都有相同的经验式 (C₄₂H₇₂O₁₄)。这两种化合物是构造异构体, 只在结构式上有区别。要区分这些种属特异性化合物的异构体形式, 需要进行 MS/MS 实验。西洋参样品的离子阱 MS/MS 实验表明, 保留时间 28.5 分钟的伪人参皂甙 F₁₁ 在 m/z 309.1 处断裂为葡萄糖-鼠李糖二糖部分后, 丢失 5 个水分子, 依次在 m/z 475.4、457.4、439.3、421.3 和 403.3 处产生离子 (图 4)。最后在 m/z 143.1 处产生特殊的呋喃环碎片。为了验证所提出的碎片结构, 我们用高分辨

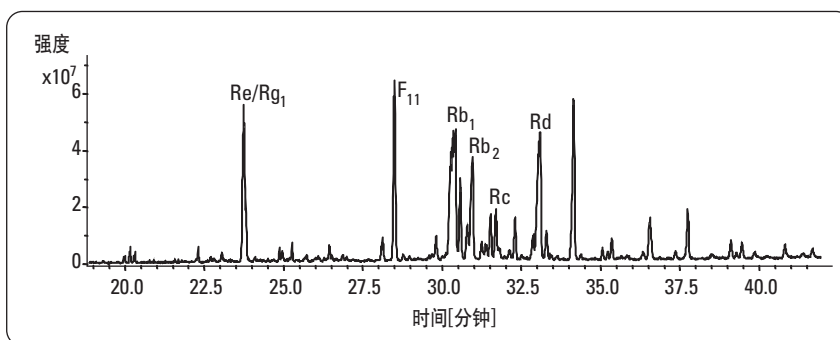


图 2 用 RRHT 色谱柱在 50 °C 下分离西洋参 (*Panax quinquefolius*) 粗提取物中化合物的基峰色谱图

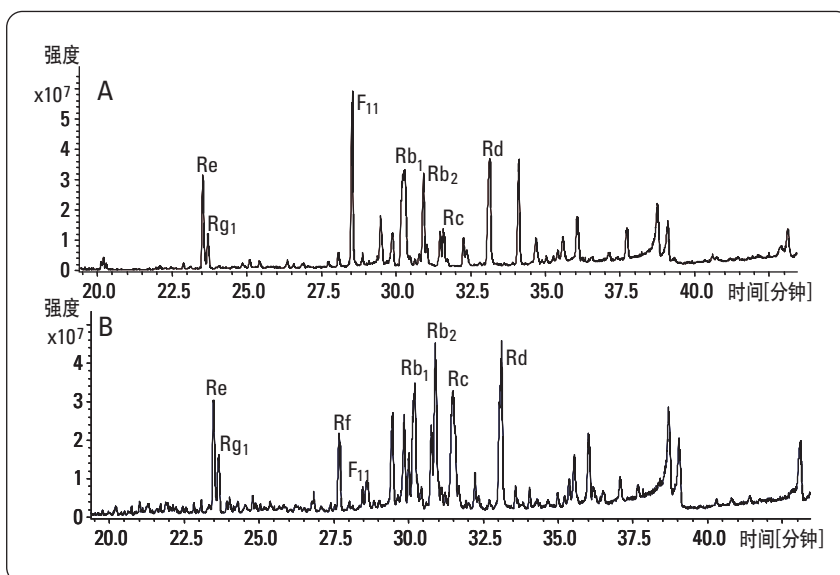


图 3 用 RRHT 色谱柱在 80 °C 下分离 A 西洋参 (*Panax quinquefolius*) 和 B 人参 (*Panax ginseng*) 亚种粗提取物中化合物的基峰色谱图

LC/MS oaTOF 高质量精度测量和经验式 439.3569 和 421.3464 碎片的四个经验式。确证对该实验进行了重复 (图 5)。用 3.10 ppm 质量精度确证了 m/z 0.41 ppm 质量精度测量 m/z 801.4997 309.1176 处断裂的二糖碎片, 及 m/z 的精确质量, 确证了分子离子。以不到 143.1065 处小的呋喃环碎片 (质量精度 2 ppm 的质量精度确证了连续丢失 5 个 4.90 ppm)。图 5 中的表格列出了伪人参水分子产生的 m/z 475.3782、457.3676、皂甙所有碎片的测量质量、计算精度。

与之相比,保留时间 27.7 分钟的化合物是人参的特征组分, 人参皂甙 Rf。LC/MS 分析显示, 该化合物也含有质子化的分子离子 m/z 801.5。这是该分子的典型碎片, 可用于区分人参皂甙 F_{11} 。MS/MS 分析中, 二糖链 m/z 325.0 裂解后, 连续丢失 4 个水分子 (图 6)。得到的碎片离子质量为 m/z 459.4、441.4、423.4 和 405.4, 不同于 F_{11} 分子产物。没有见到 m/z 143.1 碎片。为确证鉴定结果进行了 LC/MS oaTOF 分析。TOF 图谱显示分子离子 m/z 801.4999, 质量精度为 0.16 ppm (图 7)。以 0.9 到 1.6 ppm 的质量精度确证了丢失水后得到的 m/z 459.3834、441.3726、423.3620 和 405.3515 碎片。断裂的葡萄糖二糖的质量在 m/z 325.1134 处以 0.22 ppm 质量精度测定。图 6 中的表格列出了人参皂

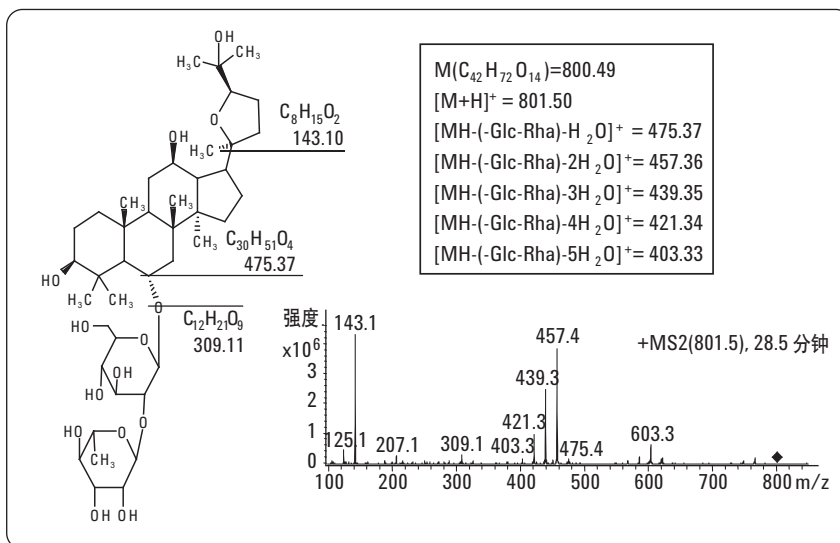


图 4 西洋参 (*Panax quinquefolius*) 中典型的 24(R) 伪人参皂甙 F_{11} 的 MS/MS

甙 Rf 所有碎片的测量质量和计算精度。对 的人参皂甙 Rf 和 F_{11} , 可以用于确定人参其它人参皂甙也进行了离子阱 MS/MS 植物的种属, 以及药用人参制剂的来源。测, 及/或 ESI oaTOF 经验式计算, 见图 我们对购自韩国厂商的一种经药用纯化 3。LC/MS 离子阱或 ESI oaTOF 检测典型 的黑色、浆状人参提取物进行了分析。分

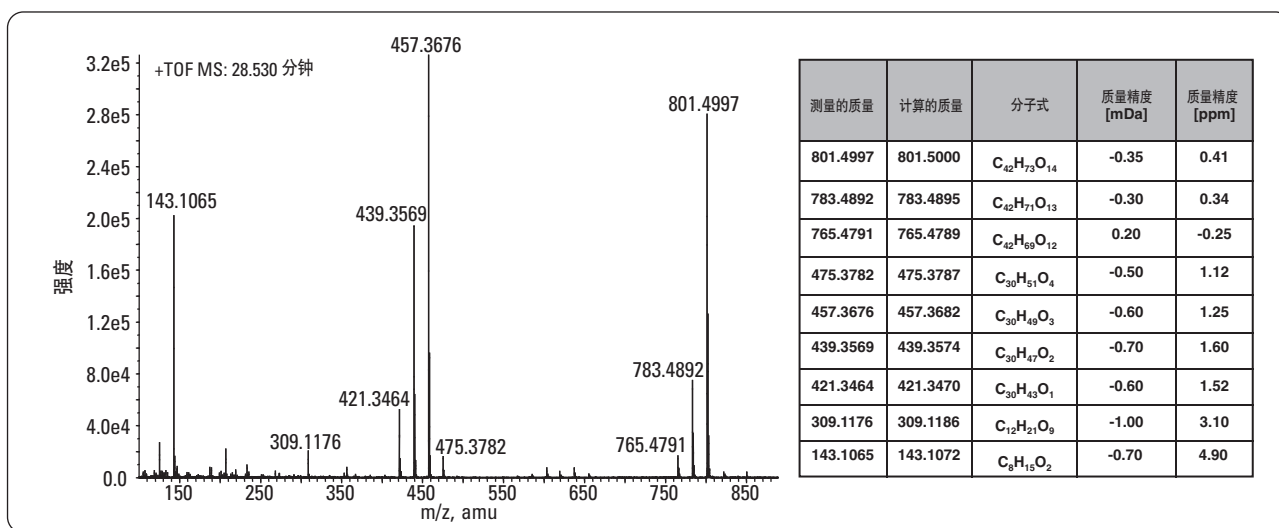


图 5 西洋参 (*Panax quinquefolius*) 提取物 24(R) 伪人参皂甙 F_{11} 的 HR-LC ESI oaTOF

析结果表明, 其人参皂甙 Rb₁、Rb₂、Rc 和 Rd 为典型的亚洲人参亚种 (图 8)。用 RRHT 色谱柱完全分离了人参皂甙 Re 和 Rg₁ 峰。最后特征人参皂甙 Rf 的存在为亚洲人参种属提供了证据。可以用典型人参皂甙离子阱 MRM 的一个或多个特殊质量, 只查找样品中的特征人参皂甙^[6]。

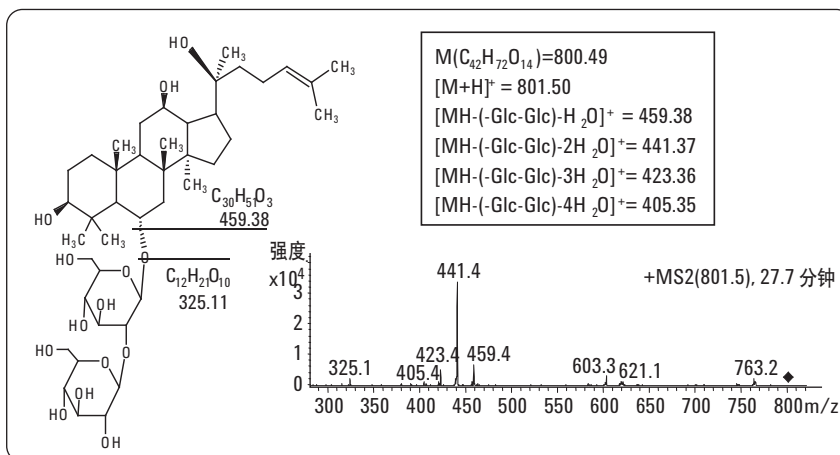


图 6 人参 (*Panax ginseng*) 提取物人参皂甙 Rf 的 MS/MS

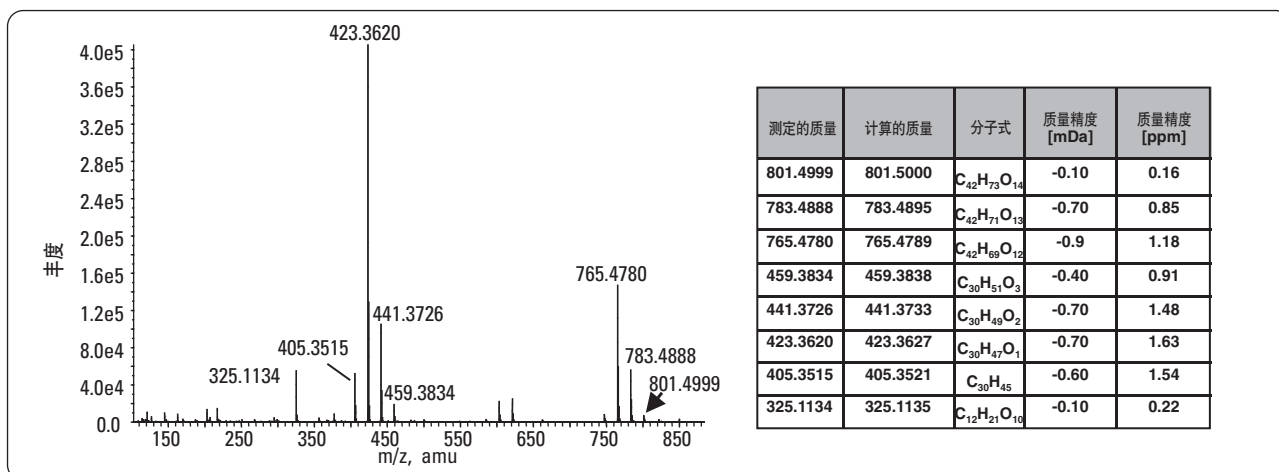


图 7 人参 (*Panax ginseng*) 提取物人参皂甙 Rf 的 HR-LC ESI TOF

结论

Agilent 1200 系统高分离度 LC 系统与 Agilent 6330 离子阱和 Agilent 6210 TOF 联用, 是检测天然产物提取物及纯化的药用制品中结构复杂化合物强大分析工具。在本应用报告中, 用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱/离子阱系统和 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱

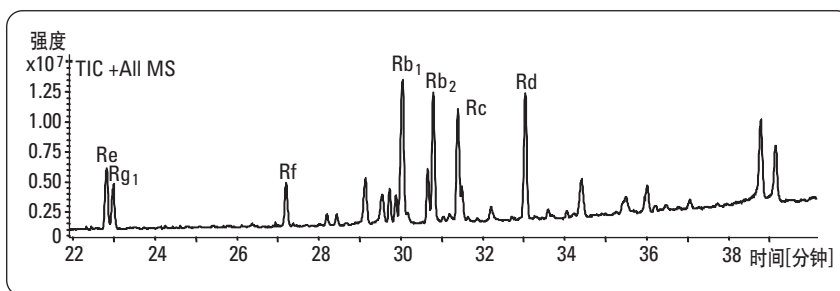


图 8 韩国人参 (*Panax ginseng*) 纯化药用参提取物的离子阱 MS 分析

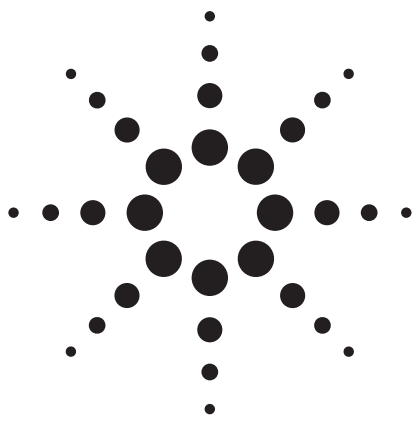
谱/TOF 系统，分析了不同种类人参中高度复杂的提取物。对提取物中的化合物进行了高分离度分离，可以鉴定与人参产地种属相关的特征化合物，以及人参提取物和药品中常见人参皂甙的不同组成。通过解释 MS/MS 离子阱数据可以解析两类种属特异人参皂甙的复杂结构，并用 ESI-MS/MS 精确质量测量进行确证。用不同裂解产物的详细信息确定药用人参提取物的地区来源。

参考文献

1. Chuang W.-C., Wu H.-K., Sheu S., Chiou S.-H., Chang H.-C., Chen Y.-P., *Planta Med.* 61, 459pp., **1995**.
2. Fuzzati N. "Analysis methods of ginsenosides.", *J. Chrom B1-2*, 812, 114-133, **2004**.
3. Wang X., Sakuma T., Asafu-Adjaye E., Shiu G. K. „Determination of ginsenosides in plant extracts from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* L. by LC/MS/MS.", *Anal. Chem.* 71, 1579-1584, **1999**.
4. Chan T.W.D., But P.P.H., Cheng S.W., Kwok I.M.Y., Lau F.W., Xu H.X. "Differentiation and authentication of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and ginseng products by using HPLC/MS." *Anal. Chem.* 72, 1281-1287, **2000**.
5. "Analysis of a complex natural product extract from Ginseng - Part I: Structure elucidation of Ginsenosides by rapid resolution LC – ESI TOF with accurate mass measurement", Agilent Application Note, *Publication number 5989-4506EN*, **2005**.

6. "Analysis of a complex natural product extract from Ginseng - Part II: Structure elucidation of ginsenosides by high resolution ion trap LC/MS" Agilent Application Note, *Publication Number 5989-4705EN*, **2006**.
7. "Performance of Agilent 1200 SL LC system for highest resolution." Agilent Application Note *Publication number 5989-4489EN*, **2005**.
8. "Performance of the Agilent 1200 SL HPLC System for ultra-fast LC applications with 2.1-mm i.d. columns." Agilent Application Note, *Publication Number 5989-4502EN*, **2005**.

Edgar Nägele 是安捷伦科技公司德国 Waldbronn 的应用化学家。

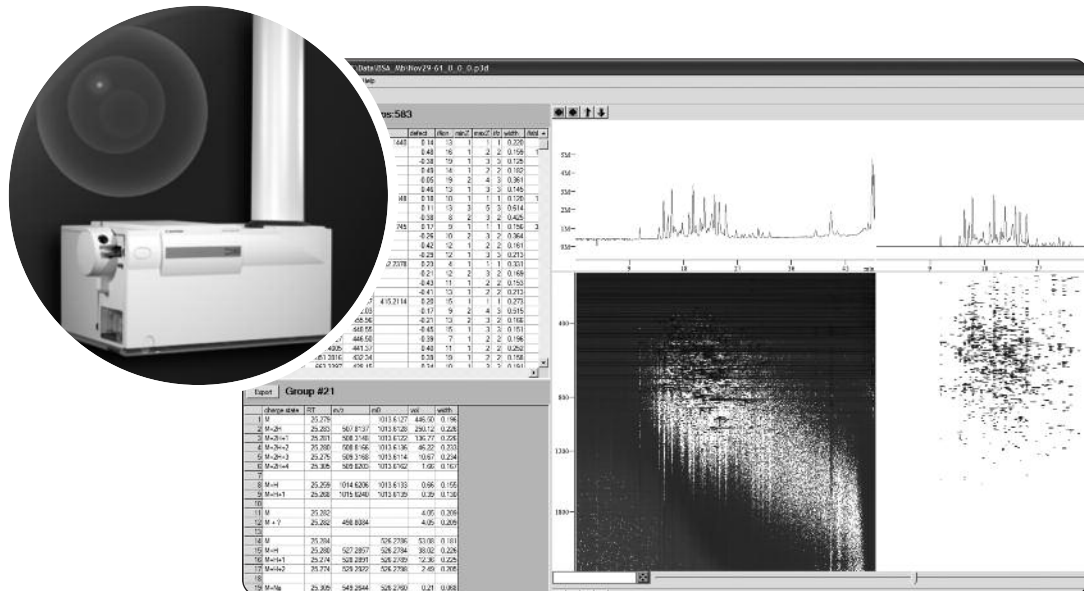


Agilent MassHunter——复杂天然产物提取物 LC/ESI-TOF 数据的快速计算机辅助分析

第 1 部分：用 MassHunter 工作站软件分子特征提取器分析 Agilent 6210 TOF 数据

应用报告

Edgar Naegele



摘要

本应用报告报导了：

- 用 LC/ESI-TOF 精确质量检测确定复杂的天然化合物结构
- 快速计算机辅助鉴定和解析新天然产物化合物的化学结构
- 用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱 (RRLC) 系统，结合快速分离高通量 (RRHT) 柱，分离复杂人参提取物中的成分，用 Agilent 6210 ESI-TOF 质谱仪进行精确分子质量测量
- 用 MassHunter 工作站软件中的分子特征提取器处理 TOF 数据，得到分子特征，即结合保留时间和质量鉴定的特征分子

安捷伦仪器：
1200 系列高分离度快速液相色谱系统
6210 飞行时间 MS
MassHunter 工作站软件

应用报告：
药物开发中的天然产物分析

前言

有历史记载以前，人们就已经开始用草药提取物治疗疾病。经过多少代人的临床经验和教训逐渐发现了其在人体中的活性和作用。中药（TCM）就是一个很好的例子。天然来源的西方药物由于其潜在价值，也越来越受到重视，但是要建立西药的质量控制标准，需要对天然产物的药用成分进行深入了解。人参（*Panax species*）是一种使用了 5000 多年的著名亚洲草药。已有报导的人参药理作用包括，对中枢神经系统（CNS）的刺激和抑制作用、抗高血压、抗高血糖、抗肿瘤和免疫调节等作用^[1]。其主要活性化合物人参皂甙属于三萜皂甙，目前已分离和鉴定出了 80 多种。

过去 30 年来，在建立分析人参提取物和制剂的分析方法方面，人们已经做了大量工作。分析人参等复杂天然产物提取物的首选方法，是高效液相色谱法（HPLC）^[2]。现在也采用 LC/MS 仪器测定复杂和结构相似的人参皂甙，如用 LC/ESI oaTOF 进行精确质量测定，用液相色谱/离子阱或液相色谱/三重串联四极杆质谱仪，通过 MS/MS 和 MSⁿ 进行结构解析^[3]。但是处理采集到的质谱数据，以鉴定并解析新天然产物化合物的化学结构仍然是耗费时间的瓶颈问题。本应用报告使用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱（RRLC）系统和快速分离

高通量（RRHT）柱，对复杂人参提取物中的成分进行分离，并与 Agilent 6210 ESI TOF 质谱联用，对分子质量进行精确测量。所得的 TOF 数据用 MassHunter 工作站软件的分子特征提取软件（MFE）进行处理，得到分子特征，结合保留时间和质量对分子进行鉴定。从简化的质谱数据中鉴定天然产物化合物。通过软件辅助的数据对比^[4]，也揭示了人参亚种之间的成分差异，并给出了一个用自动化方法分析复杂天然提取物的实例^[5]。

实验部分

仪器

- 带脱气机的 Agilent 1200 系列 SL 型二元泵。该泵能够用 1.8 μm 粒径 RRHT 色谱柱进行高分离度 HPLC 分析，以获得最佳分离性能
- 带温度控制的 Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器（h-ALS SL）。该自动进样器为配合 1200 系列 SL 型二元泵工作而特别设计的，具有最低的延迟体积
- Agilent 1200 系列柱温箱（TCC）。该 TCC 与 SL 型二元泵一起使用，在优化的延迟体积条件下可选择分离式热交换器和柱后冷却，并可选择 2 位/10 通阀进行交替色谱柱再生
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器（DAD SL）。该 DAD 能以高达 80 Hz 的采样速率采集数据，并具有内置数据存储功能

- Agilent 6210 MSD TOF。八极加速飞行时间质谱仪，带双喷雾器接口进行质量校正，以最高的准确性获取分子质量数。该飞行时间质谱仪能以 40 Hz 速率采集数据，还能进行正/负切换
- 色谱柱：ZORBAX SB-C18, 2.1 x 150 mm, 1.8 μm 粒径
- 软件：TOF 仪器控制软件 MassHunter 工作站 A02.00 用于数据采集，Analyst 软件用于数据浏览，分子特征提取（MFE）软件用于数据处理

在 LC/TOF 仪器设置中，低延迟体积配置的 SL 型二元泵通过一根 0.12 mm 内径不锈钢毛细管与 h-ALS SL 连接。为减少延迟体积，h-ALS SL 的针座毛细管采用 0.12 mm 内径，用同样规格的毛细管在柱温箱中连接低延迟体积（1.6 μL）热交换器，柱温箱连接色谱柱。将 2 μL 流通池置于 SL 型 DAD 中用于 UV 检测。出口毛细管直接连在 ESI oaTOF 或离子阱质谱仪的电喷雾源喷雾器上。对仪器设置进行了优化以获得最高的分离度。

样品制备

粉碎的冻干人参和西洋参（1g）（*Panax ginseng* 和 *Panax quinquefolius*）中加入 10 mL 甲醇，超声处理 30 分钟，过滤后直接分析。

方法

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵在以下条件下操作:

溶剂 A: 水 + 0.1% TFA

溶剂 B: 乙腈 + 0.1% TFA

流速: 0.5 mL/min

梯度: 0 分钟 5% B,
1 分钟 5% B, 60 分钟
85% B, 61 分钟 95% B,
70 分钟 95% B

停止时间: 70 分钟

后运行时间: 15 分钟

- 用 Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器进样 10 μ L 样品, 并将样品冷却到 10 $^{\circ}$ C。1 分钟后将样品定量环切换到旁路, 以降低延迟体积
- Agilent 1200 系列柱温箱, 配备 1.6 μ L 低延迟体积热交换器, 设置为 50 $^{\circ}$ C
- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器, 用 80 Hz 采集数据, 检测波长设置为 220 nm/4 nm, 参比 360/100, 采用 2 μ L 流通池, 30 mm 光程
- 6210 TOF 质谱仪操作条件如下:

离子源: ESI 正离子模式, 双喷雾器带参考标样校正

干燥气体: 12 L/min

干燥温度: 200 $^{\circ}$ C

雾化器: 35 psi

扫描: 200-1300

碎裂电压: 150 V 或 CID 300 V

锥孔电压: 60 V

毛细管电压: 3000 V

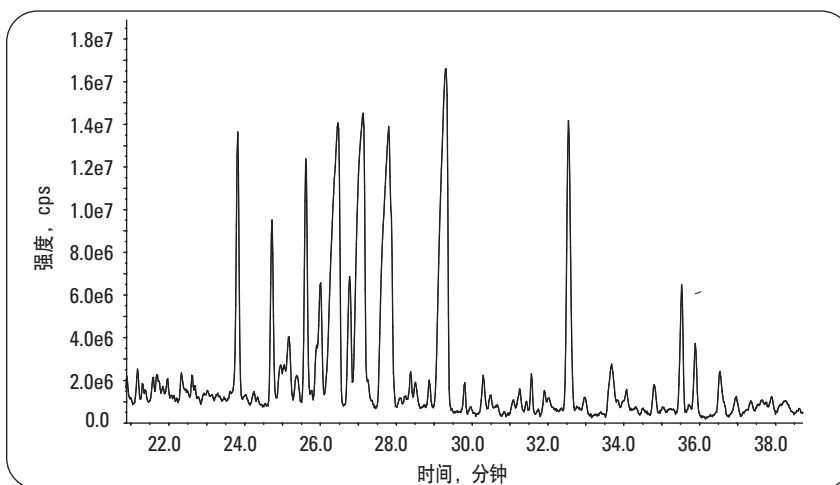


图 1 在 1.8 μ m 粒径色谱柱的高分离度液相色谱上采用 ESI-TOF 质谱分析人参 (*Panax ginseng*) 提取物的色谱图

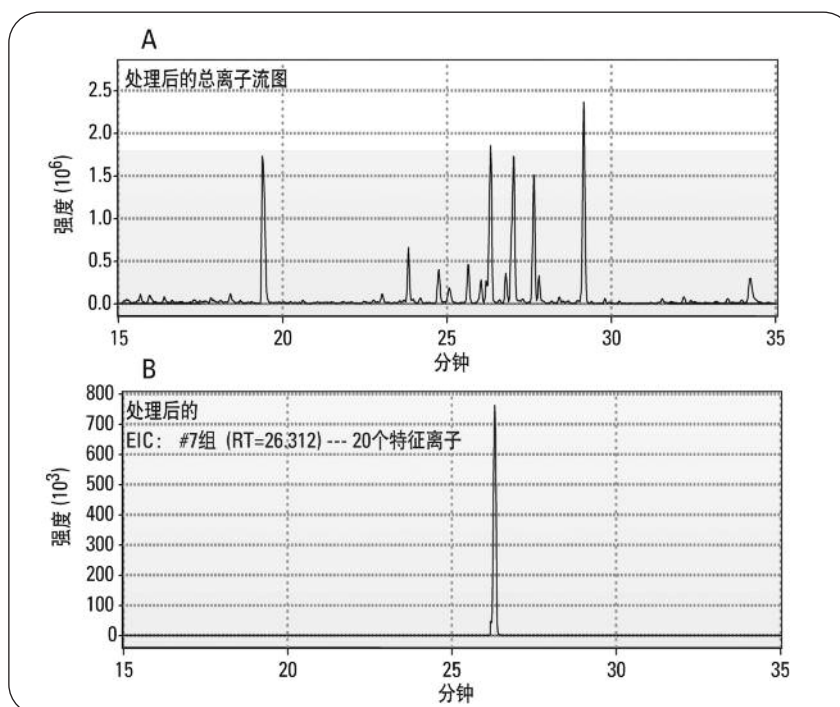


图 2
A) 软件处理后的人参提取物总离子流图和分组的分子特征离子
B) 保留时间 26.3 分钟的特征离子 #7 组包含 20 个分子特征离子

结果与讨论

用 Agilent 1200 系列 RRLC 系统 RRHT 色谱柱 (1.8 μ m 粒径), 与 ESI TOF 质谱 (Agilent 6210 TOF) 联用, 对人参 (*Panax*

ginseng) 提取物中的成分进行了分离。高分离度 LC 为天然产物提取物的主要成分和微量成分提供了良好分离 (图 1)。所采集的 TOF 数据经 MFE 软件提取, 将化

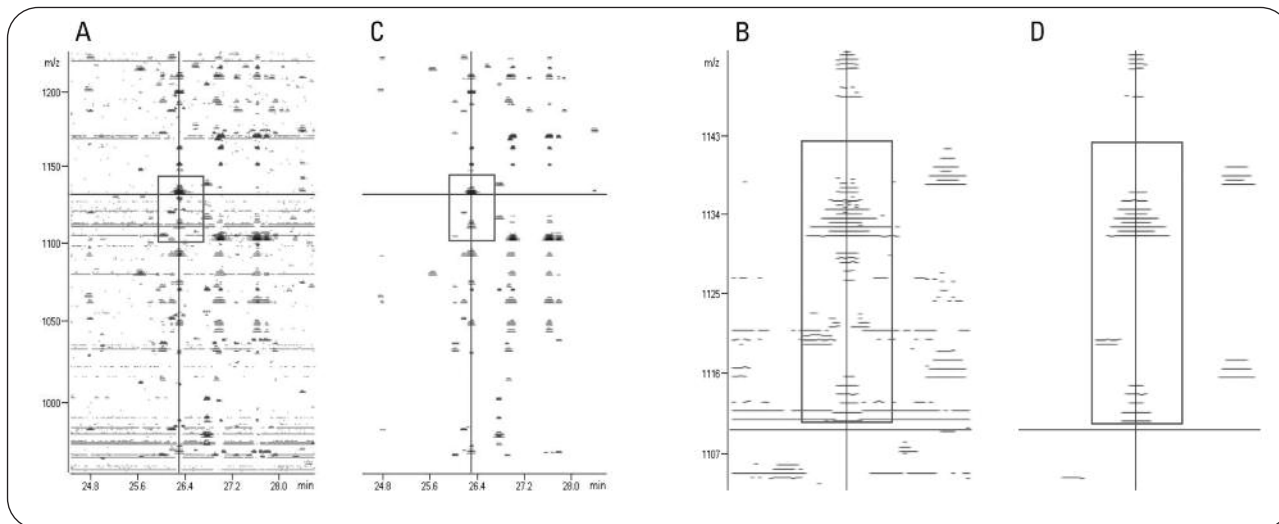


图3 人参提取物 TOF 图谱的 2D 图，保留时间 vs. 质量。A) 未处理的 2D 图谱，保留时间 24.8- 28.0 分钟，质量范围 900-1250；B) 未处理的人参皂甙 Rb_1 离子放大的 2D 图谱；C) 和 D) 相同质量和保留时间范围处理后的 2D 图谱

合物所含的分子离子和未确定的背景离子分开 (图 2)。在这一过程中，将包括同位素化合物和加合物在内的分子特征离子分成组。从处理的数据中，仔细分析了保留时间 26.3 分钟的 7 号特征组，鉴定了人参提取物中的这些化合物。在这个保留时间的特征组中，有 20 个不同的特征碎片，包含分子离子及其不同的加合物和同位素。保留时间为 26.3 分钟的 7 号特征碎片组处理后的 EIC 如图 2B 所示。从 2D 等值线图中可以看出提取离子组中的特征分子的能力，该图显示了保留时间和离子质量 (图 3)。从人参皂甙 Rb_1 的在 m/z 1109.6 处的质子化离子和 m/z 1131.4 处加合离子的未处理色谱图可以看出，有许多非特异性的化学干扰离子 (图 3A 和 3C)。由于这些非特异性离子没有清晰的同位素分布，不能将其归入特征分子组，在数据处理过程中将被清除。在同一保留时间窗内剩下的离子将被归入分

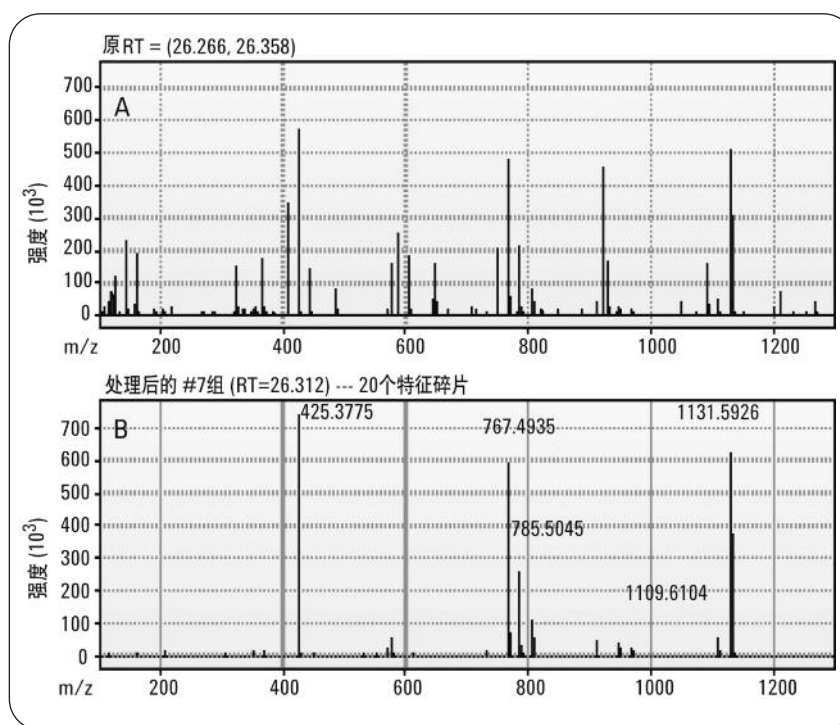


图4 A) 26.3 分钟未处理的质谱图；B) 26.3 分钟处理后的质谱图显示出属于同一组的分子特征

子特征组，包括基本离子的加合物和同位素峰 (图 3B 和 3D)。放大的窗口 (图 3C 和 3D) 清楚地显示了数据的简化。将处理

后的质谱图 (图 4B) 与人参皂甙 Rb_1 的原质谱图 (图 4A) 相比，也可以看出数据的改善。质谱图的显著简化得到了分子

特征离子，并消除了化学噪音，使解析更加容易，尤其适用于对碰撞诱导解离 (CID) 产生的分子离子进行结构解析 (图 4B)。这些来自同一保留时间的洗脱物碎片，与分子离子一起被归入同一个分子特征组中。用于人参皂甙 Rb₁ 结构解析的质谱解释见图 5。质子化的分子离子为 m/z 1109.6104，钠加合离子为 m/z 1131.5926。丢失一个葡萄糖产生碎片 m/z 785.5045，再丢失 1 分子水，在 m/z 767.4935 处产生碎片。三萜皂甙核结构在 m/z 425.3775 处丢失第二个葡萄糖产生离子。鉴定出的人参皂甙 Rb₁ 分子特征离子及其 CID 碎片列于表 1。质子化的、钠加合和钾加合离子分别以 -0.14、-0.41 和 0.32 ppm 高质量精度测得。分子的计算质量精度为 -0.41 ppm。另外，还计算了 CID 碎片及其加合物的质量精度 (表 1)。从而进一步验证了经验式和提取的分子结构。天然产物提取物的成分常取决于亚种、生长区域和生长条件。要确定天然植物提取物中是否含有适当浓度的活性成分，需要与标准提取物进行比较。对人参来说，不同亚种含有普通人参皂甙，也有特异性人参皂甙。一个典型的例子是人参 (*Panax ginseng*) (图 2) 与西洋参 (*Panax quinquefolius*) 的对比。简化图谱得到的分子特征离子揭示了这种差异 (图 6)。特别是典型的西洋参亚种在 24.5 分钟洗脱的人参皂甙 F₁₁ 含量很高，但却没有人参皂甙 Rf (图 2 中于 24 分钟洗脱) [5]。

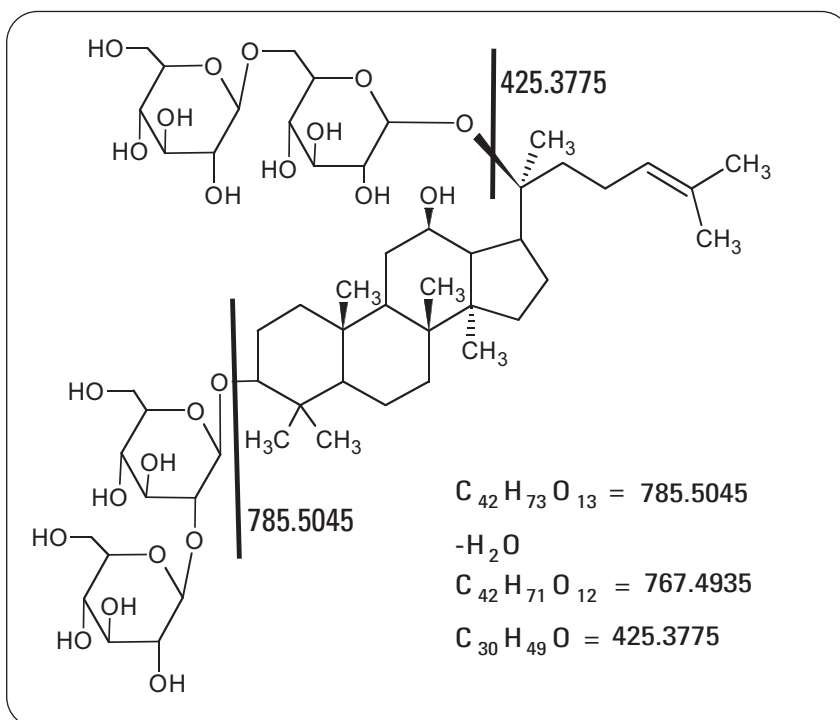


图 5 解析处理后质谱图 (包含分子特征) 得到的人参皂甙 Rb₁ 结构

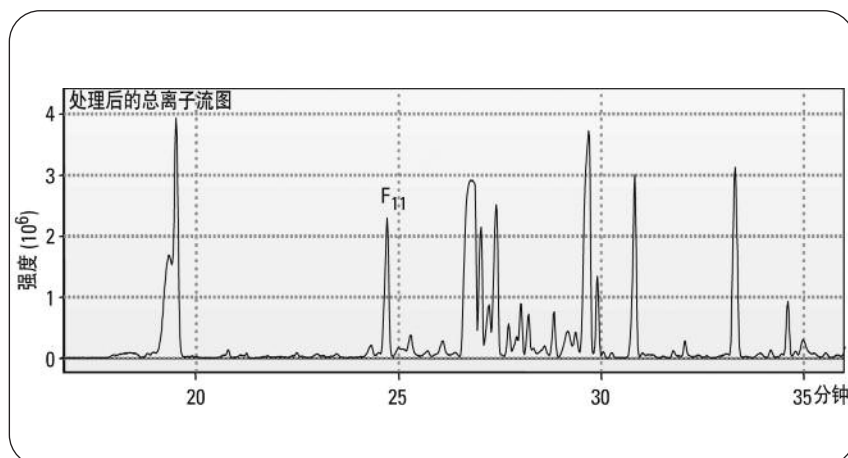


图 6 软件处理过的西洋参提取物总离子流图和分组的分子特征

种类	RT	m/z	质量	精度	RT	m/z	质量	精度	RT	m/z	质量	种类	RT	m/z	质量	精度
M+H	26.31	1109.6104	1108.6031 - 0.14 ppm		26.31	785.5045	784.4972	0.10 ppm	26.31	767.4935	766.4862	0.68ppm	26.31	425.3775	424.3702	0.75 ppm
M+H+1	26.31	1110.6152			26.31	786.5081			26.31	768.4976			26.31	426.3813		
M+H+2	26.31	1111.6176			26.31	787.5108			26.31	769.5004			26.31	427.3850		
M+H+3	26.31	1112.6219			26.31	788.5134			26.31	770.5027			26.31	428.3882		
M+H+4	-----	-----			-----	-----			26.31	771.4965			-----	-----		
M+Na	26.31	1131.5926	1108.6034 - 0.41 ppm		26.31	807.4486	784.4976	0.39 ppm	26.31	789.4756	766.4864	0.42 ppm	-----	-----	-----	-----
M+Na+1	26.31	1132.5964			26.31	808.4902			26.31	790.4809			-----	-----		
M+Na+2	26.31	1133.599			26.31	809.4950			26.30	791.4883			-----	-----		
M+Na+3	26.31	1134.6021			26.30	810.4938			-----	-----			-----	-----		
M+Na+4	26.31	1135.5998			-----	-----			-----	-----			-----	-----		
M+K	26.30	1147.5664	1108.6033 - 0.32 ppm	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
M	26.31		1108.6034 - 0.41ppm		26.31		784.4972	+ 0.10ppm	26.31		766.4862	+ 0.7ppm	26.31		424.3702	+ 0.75ppm

表 1
鉴定的分子特征离子和经验式确证的计算质量精度。(人参皂甙 Rb1, C₅₄H₉₂O₂₃, M 1108.6029; 碎片 C₄₂H₇₃O₁₃, M 784.4973; 碎片 C₄₂H₇₁O₁₂, M 766.4867; 碎片 C₃₀H₄₉O, M 424.3705)

结论

用 Agilent 1200 系列 RRLC 系统和 1.8 μm 粒径色谱柱，可以精确分离高度复杂的天然产物样品中的成分。与 ESI-TOF MS 联用，可以得到大量精确质量数据用于经验式确定和结构分析。用 MassHunter 工作站软件中的分子特征提取器处理这些数据，得到了分子特征离子，包括分子离子、其同位素和加合离子，大大减少了数据量，有助于数据解释。高精度测量分子特征中包括的不同分子种类的分子离子和 CID 碎片质量，可用于经验式计算和结构解析。

参考文献

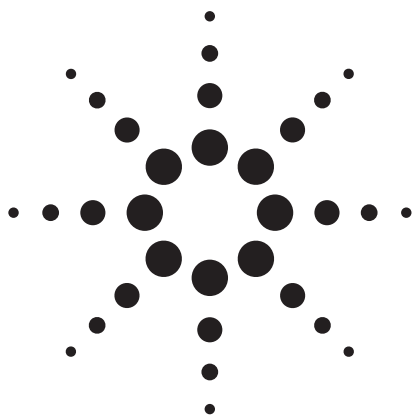
- Attele A.S., Wu J.A., Yuan C.S., *Biochem. Pharmacol.* 58, 1685-1693, 1999.
- Fuzzati N., "Analysis methods of ginsenosides." *J. Chrom. B1-2*, 812, 114-133, 2004.
- Wang X., Sakuma T., Asafu-Adjaye E., Shiu G. K., "Determination of ginsenosides in plant extracts from Panax ginseng and Panax quinquefolius L. by LC/MS/MS." *Anal. Chem.* 71, 1579-1584, 1999.
- Edgar Naegele: "Agilent Mass- Hunter – Fast computer-aided analysis of

LC/ESI-TOF data from complex natural product extracts

Part 2: Comparison of Agilent 6210 TOF data from different biological origin with Mass Profiler in MassHunter Workstation software", *Agilent Application Note, Publication number 5989-6076EN, 2007.*

5. Edgar Naegele: "Agilent Mass- Hunter –Fast computer aided analysis of LC/ESI-TOF data from complex natural product extracts Part 3: Automated analysis of Agilent 6210 TOF data from complex natural product extracts", *Agilent Application Note, Publication number 5989-6077EN, 2007.*

Edgar Naegele 是德国 Waldbronn 的安捷伦应用化学家。

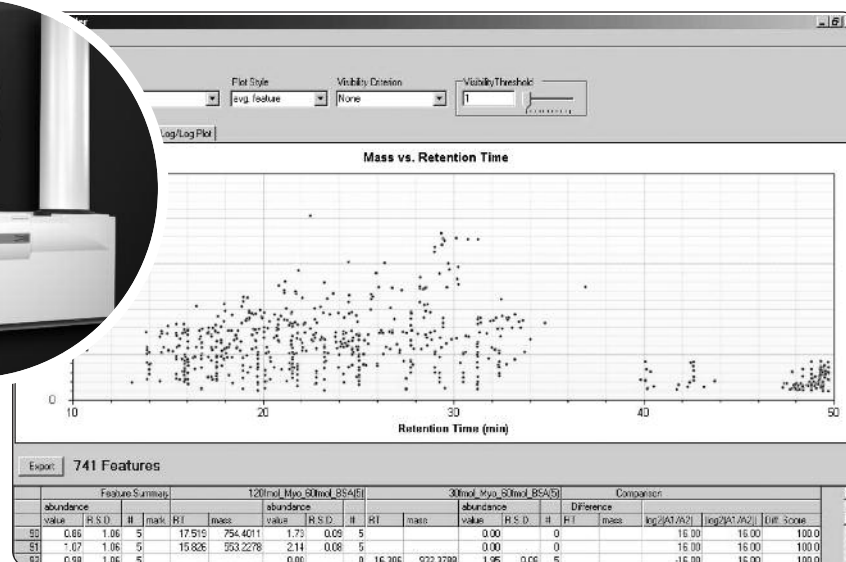
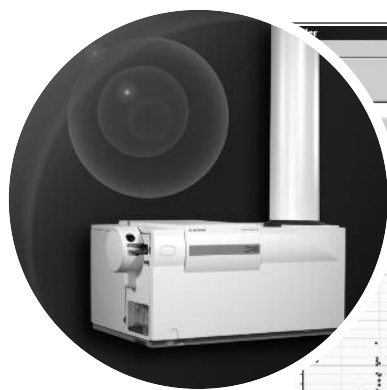


Agilent MassHunter ——复杂天然产物 提取物 LC/ESI-TOF 数据的快速计算机辅助 分析

第 2 部分：用 MassHunter 软件的 Mass Profiler 比较
不同生物来源的 Agilent 6210 TOF 数据

应用报告

Edgar Naegele



摘要

本应用报告报导了：

- 新天然产物化合物化学结构的快速计算机辅助鉴定和解析
- 用 LC/ESI-TOF 精确质量检测确定复杂的天然化合物结构
- 用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱 (RRLC) 系统，结合快速分离高通量 (RRHT) 柱，分离复杂人参提取物中的成分，用 Agilent 6210 ESI-TOF 质谱仪进行精确分子质量测量
- 用 MassHunter 工作站软件中的 Mass Profiler 处理 TOF 数据，鉴定两种不同人参亚种样品之间的统计学差异
- 通过基于高精度质量测量的经验式计算鉴定不同化合物

安捷伦仪器：

1200 系列高分离度快速液相色谱系统
6210 飞行时间 MS
MassHunter 工作站软件

应用领域：

药物开发中复杂天然提取物的分析

前言

有历史记载以前，人们就已经开始用草药提取物治疗疾病。通过多少代人的临床经验和教训逐渐发现了其在人体中的活性和作用。中药（TCM）就是一个很好的例子。天然来源的西方药物由于其潜在价值，也越来越受到重视，但是要建立西药的质量控制标准，需要对天然产物的药用成分进行深入了解。人参（*Panax species*）是一种使用了 5000 多年的著名亚洲草药。

除亚洲人参外，还使用其它人参品种，例如西洋参（*Panax quinquefolius*）。每个亚种的药用活性化合物都有不同的种类和浓度^[1]。因此，了解不同生物源性植物提取物的组成非常重要，以便在使用前预测其治疗活性。主要活性化合物人参皂甙属于三萜皂甙，目前已分离和鉴定出了 80 多种。

过去 30 年来，在建立分析人参提取物和制剂的分析方法方面，人们已经做了大量工作。分析人参等复杂天然提取物的首选方法，是高效液相色谱法（HPLC）^[2]。现在也采用 LC/MS 仪器测定复杂和结构相似的人参皂甙，如用 LC/ESI oaTOF 进行精确质量测定，用 LC/离子阱或 LC/三重串联四极杆仪，通过 MS/MS 和 MSⁿ 进行结构解析^[3]。但是处理采集到的质谱数据仍是耗费时间的瓶颈。

本应用报告报导了采用安捷伦 MassHunter 工作站软件中的 Mass Profiler 分析 TOF 数据，快速而轻松地鉴别不同亚种人参提取物的方法。本文还报导了使用 Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱（RRLC）系统和快速分离高通量（RRHT）柱，对复杂人参提取物中的成分进行分离，并与 Agilent 6210 ESI TOF 质谱联用，对分子质量进行精确测量的方法。

在本研究的第 1 部分中报导了用 MassHunter 工作站软件的分子特征提取软件（MFE）处理 TOF 数据，鉴定天然产物化合物^[4]，在本研究的第 3 部分还给出了一个用自动化方法分析复杂天然提取物的实例^[5]。

实验部分

仪器

- 带脱气机的 Agilent 1200 系列 SL 型二元泵。该泵能够用 1.8 μm 粒径 RRHT 柱进行高分离度 HPLC 分析，以获得最佳分离性能
- 带温度控制的 Agilent 1200 系列 SL 高效自动进样器（h-ALS SL）。该自动进样器为配合 1200 系列 SL 二元泵工作而特别设计，具有最低的延迟体积
- Agilent 1200 系列柱温箱（TCC）。该 TCC 与 SL 二元泵一起使用，在优化的延迟

体积条件下可选择分离式热交换器和柱后冷却，并可选择 2 位/10 通阀进行交替色谱柱再生

- Agilent 1200 系列 SL 二极管阵列检测器（DAD）。该 DAD 能以高达 80 Hz 的采样速率采集数据，并具有内置数据存储功能
- Agilent 6210 MSD TOF。垂直加速飞行时间质谱仪，带双喷雾器接口进行质量校正，以最高的准确性获取分子质量数。该飞行时间质谱仪能以 40 Hz 速率采集数据，还能进行正/负切换
- 色谱柱：ZORBAX SB-C18, 2.1 x 150 mm, 1.8 μm 粒径
- 软件：TOF 仪器控制软件安捷伦 MassHunter 工作站 A02.00 版本用于数据采集，安捷伦 Analyst 软件用于数据浏览，安捷伦 Mass Profiler 软件用于数据处理

在 LC/TOF 系统设置中，低延迟体积配置的 SL 型二元泵通过一根 0.17 mm 内径不锈钢毛细管与 SL 型高效自动进样器连接。为减少延迟体积，SL 型高效自动进样器采用 0.12 mm 内径的针座毛细管，用同样规格的毛细管在柱温箱中连接低延迟体积（1.6 μL）热交换器，柱温箱色谱柱。将 2 μL 流通池置于 SL 型 DAD 中用于 UV 检测。出口毛细管直接连在质谱仪的电喷雾源喷雾器上。对仪器设置进行了优化以获得最高分离度。

样品制备

粉碎的冻干人参和西洋参 (1g) (Panax ginseng 和 Panax quinquefolius) 中加入 10 mL 甲醇, 超声处理 30 分钟, 过滤后直接分析。

方法

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵在以下条件下操作:

溶剂 A: 水 + 0.1% TFA

溶剂 B: 乙腈 + 0.1% TFA

流速: 0.5 mL/min

梯度: 0 分钟 5% B,

1 分钟 5% B,

60 分钟 85% B,

61 分钟 95% B,

70 分钟 95% B

停止时间: 70 分钟

后运行时间: 15 分钟

- 用 Agilent 1200 系列 SL 型高效自动进样器进样 10 μ L 样品, 并将样品冷却到 10 $^{\circ}$ C。1 分钟后将样品定量管切换到旁路, 以降低延迟体积

- Agilent 1200 系列柱温箱, 配备 1.6 μ L 低延迟体积热交换器, 设置为 50 $^{\circ}$ C

- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检测器, 用 80 Hz 采集数据, 检测波长设置为 220 nm/4 nm, 参比 360/100, 采用 2 μ L 流通池, 30 mm 光程

- 6210 TOF 质谱仪操作条件如下:

离子源: ESI 正离子模式,

带双喷雾器用于

参考标样校正

干燥气体: 12 L/min

干燥温度: 200 $^{\circ}$ C

雾化器: 35 psi

扫描: 200-1300

碎裂电压: 150 V 或 CID 300 V

锥孔电压: 60 V

毛细管电压: 3000 V

结果与讨论

用 Agilent 1200 系列 RRLC 系统 RRHT 色谱柱 (1.8 μ m 粒径), 与 ESI-TOF 质谱 (Agilent 6210 TOF) 联用, 对人参 (Panax ginseng) 提取物中的成分进行了分离。高分离度 LC 为天然产物提取物的主要成分和微量成分提供了良好分离 (图 1)。每个样品重复进样 5 次, 用实验部分所

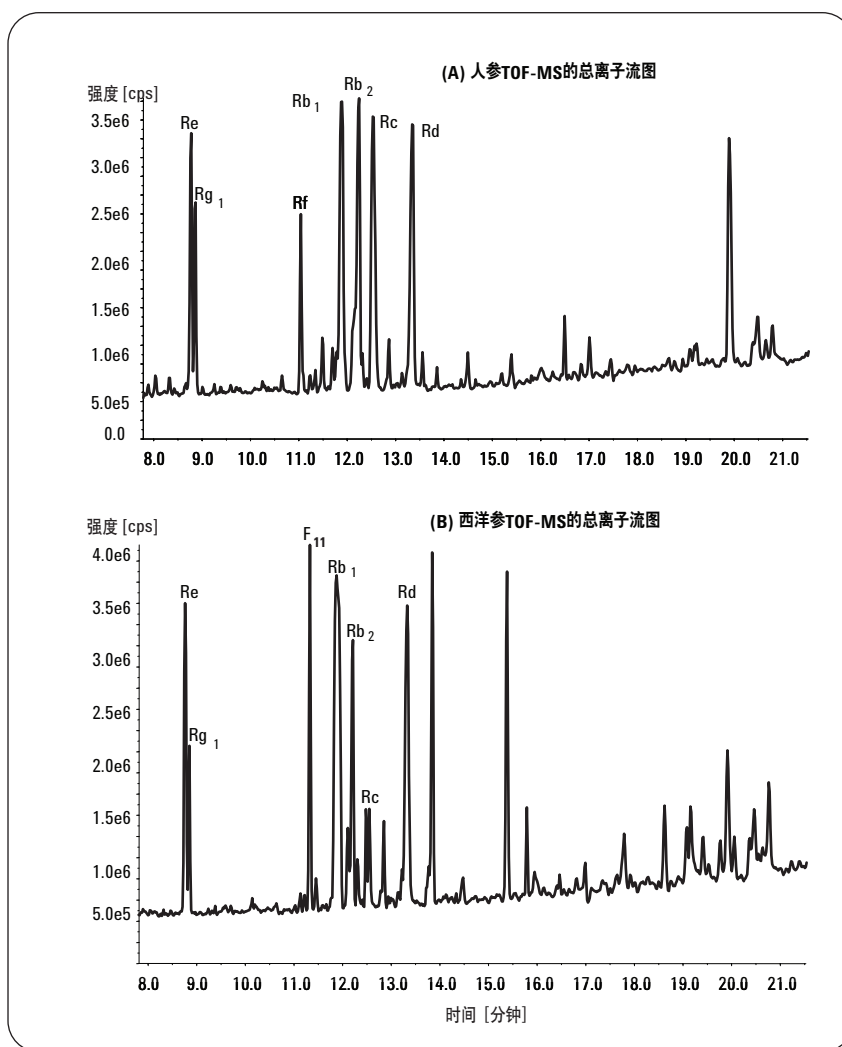


图 1 人参 (A) 和西洋参 (B) 提取物 8 到 21 分钟的 TOF-MS 总离子流图显示了主要的人参皂甙

述 LC/MS TOF 方法进行测定，用 Mass Profiler 分析数据。采集的 TOF 数据用分子特征提取 (MFE) 软件提取^[4]。在这一过程中，鉴定的离子按分子特征分组，包含同位素和加合离子。根据所测提取物样品的生物源性将所得文件分成人参和西洋

参两组，并载入 Mass Profiler 软件。在 Mass Profiler 软件中对所有 671 种鉴定出的分子特征离子以质量对保留时间作图，检查数据质量 (图 2)。已知人参皂甙 Rb₁ (C₅₄H₉₂O₂₃ M = 1108.6029 和 RT = 11.90) 的分子特征被放大。每组保留时

间和质量的标准偏差、丰度的标准偏差，以及该化合物 1.38 ppm 的高质量精度都证明了数据的高质量。每组的特征离子以对数曲线(log₂)显示了人参和西洋参的丰度比值，以进行两组间差异分析 (图 3)。曲线中有 5 条线以显示两组样品在选定

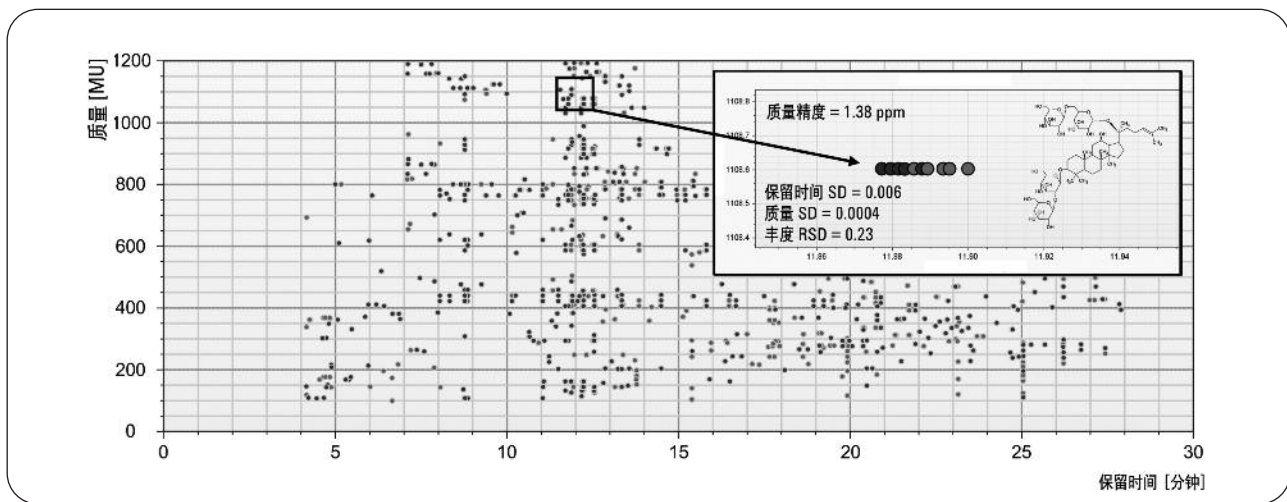


图 2 质量对保留时间作图显示了在人参 (红色) 和西洋参 (蓝色) 提取物中所有 671 个分子特征离子，和人参皂甙 Rb₁ (C₅₄H₉₂O₂₃ M = 1108.6029 和 RT = 11.90) 的分子特征

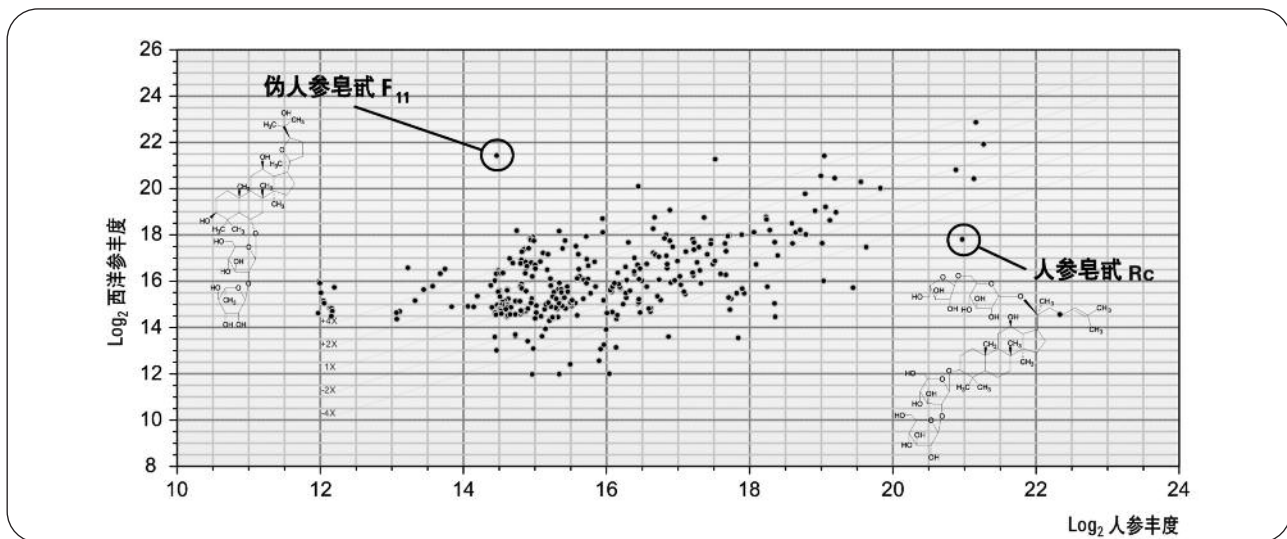


图 3 人参和西洋参的差异分析，显示伪人参皂甙 F₁₁ 只在西洋参中存在，而人参中人参皂甙 Rc 的浓度更高

丰度水平上的差异。位于中部线 (1x) 的分子特征离子表示丰度相同，位于 2x 线内的分子特征离子表示丰度相差 2 倍，在 4x 线内的相差高达 4 倍。除这些丰度差别外，有的特征离子非常特殊，在某一组中可能完全不存在。例如，在人参样品组中含量较高的人参皂甙 Rc (图 1 和 3)。对两组中每个样品的丰度比较清楚地显示，人参中的人参皂甙 Rc 丰度高 8 倍 (表 1)。计算的相对质量误差在 1 位数 ppm 范围内。人参样品组的平均值为 1.71 ppm，西洋参样品组的平均值为 0.90 ppm。只在西洋参样品中存在的一个很容易确定的特征化合物分子，是伪人参皂甙 F₁₁ (图 3)。在西洋参提取物中这个化合物的丰度高 100 倍 (表 2)，人参样品中该化合物的平均相对质量精度为

编号	名称	RT	质量	丰度	质量误差 [mDa]	相对质量误差 [ppm]	平均质量误差 [ppm]
1	西洋参_1	12.550	1078.5909	143,961	-1.50	1.36	0.99
2	西洋参_2	12.505	1078.5912	243,837	-1.20	1.09	
3	西洋参_3	12.557	1078.5921	240,121	-0.30	0.25	
4	西洋参_4	12.491	1078.5919	266,422	-0.50	0.44	
5	西洋参_5	12.493	1078.5904	252,872	-2.00	1.83	
6	人参_1	12.538	1078.5905	2,092,954	-1.90	1.73	1.71
7	人参_2	12.534	1078.5912	2,023,553	-1.20	1.09	
8	人参_3	12.545	1078.5898	2,058,617	-2.60	2.38	
9	人参_4	12.545	1078.5906	2,052,396	-1.80	1.64	
10	人参_5	12.534	1078.5905	2,042,638	-1.90	1.73	

表 1
人参和西洋参皂甙 Rc (C53H91O22 M = 1078.5924) 的保留时间、丰度和质量准确度

编号	名称	RT	质量	丰度	质量误差 [mDa]	相对质量误差 [ppm]	平均质量误差 [ppm]
1	西洋参_1	11.328	800.4900	2,835,414	-2.20	2.70	1.53
2	西洋参_2	11.347	800.4910	2,836,847	-1.20	1.50	
3	西洋参_3	11.337	800.4924	2,815,218	0.20	-0.24	
4	西洋参_4	11.333	800.4909	2,797,743	-1.30	1.60	
5	西洋参_5	11.335	800.4900	2,864,285	-2.20	1.60	
6	人参_1	11.337	800.4914	23,132	-0.80	1.00	1.26
7	人参_2	11.337	800.4930	22,875	0.80	-1.00	
8	人参_3	11.344	800.4927	20,865	0.50	-0.60	
9	人参_4	11.346	800.4942	23,578	2.00	-2.48	
10	人参_5	11.342	800.4912	22,556	-1.00	1.25	

表 2
只有西洋参样品中存在的伪人参皂甙 F11 (C42H72O14 M = 800.4922) 的保留时间、丰度和质量准确度

1.71 ppm，西洋参样品中平均为 1.26 ppm。

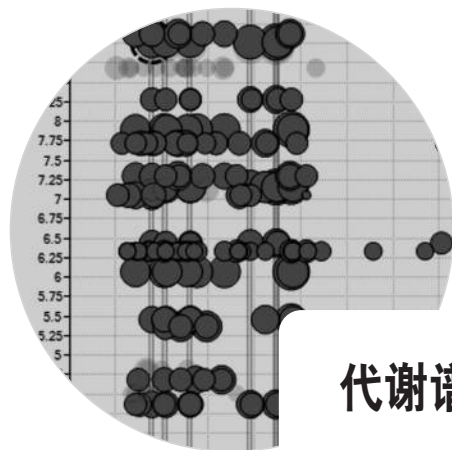
结论

用 Agilent 1200 系列 RRLC 系统和 1.8 μm 粒径色谱柱可以以极低的保留时间标准偏差对高度复杂的天然产物中的各组分进行分离。与 Agilent 6210 ESI-TOF MS 联用可采集高精度、可重现的质量数据。有了这些必要的系统条件后，用 Mass Profiler 软件进行统计处理可评估不同样品组之间分子特征碎片的丰度差异。将有助于鉴别极复杂样品（如天然产物提取物）中单一化合物的浓度和丰度差异。

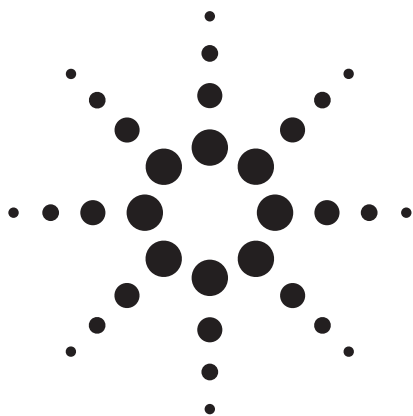
参考文献

1. Chuang W.-C., Wu H.-K., Sheu S., Chiou S.-H., Chang H.-C., Chen Y.-P., *Planta Med.* **61**, 459 pp, **1995**.
2. Fuzzati N., "Analysis methods of ginsenosides." *J. Chrom. B1-2*, **812**, 114-133, **2004**.
3. Wang X., Sakuma T., Asafu-Adjaye E., Shiu G. K., "Determination of ginsenosides in plant extracts from Panax ginseng and Panax quinquefolius L. by LC/MS/MS." *Anal. Chem.* **71**, 1579-1584, **1999**.
4. Edgar Naegele: "Agilent Mass- Hunter – Fast computer-aided analysis of LC/ESI-TOF data from complex natural product extracts – Part 1: Analysis of Agilent 6210 TOF data with the Molecular Feature Extractor in MassHunter Workstation software", *Agilent Application Note, Publication number 5989-5928EN*, **2007**.
5. Edgar Naegele: "Agilent Mass- Hunter – Fast computer aided analysis of LC/ESI-TOF data from complex natural product extracts – Part 3: Automated analysis of Agilent 6210 TOF data from complex natural product extracts", *Agilent Application Note, Publication number 5989-6077EN*, **2007**.

Edgar Naegele 是安捷伦科技公司德国 Waldbronn 的应用化学家。



代谢谱分析

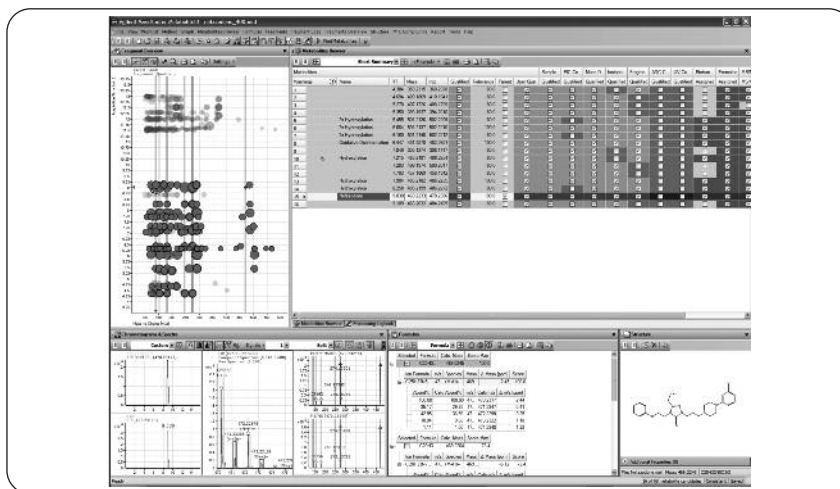


一种用于药物代谢物计算机辅助鉴定的多算法方法

用安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件从精确 QTOF-MS 和 MS/MS 数据中快速鉴定药物代谢物

应用报告

Edgar Nägele, Frank Wolf,
Uwe Nassal, Rainer Jäger,
Horst Lehmann, Frank Kuhlmann,
Karina Subramanian



摘要

本应用报告为 2007 年 6 月 4 日在美国印第安纳州印第安纳波利斯举行的 ASMS 质谱会议上的学术海报 MOP 253 的内容。本报告报导了：

- 用多算法方法对药物代谢物进行快速的计算机辅助鉴定
- 对体外实验产生的药物代谢物进行高分离度色谱分离
- 用 QTOF MS 和 MS/MS 对药物代谢物进行高质量精度测定

安捷伦仪器：

1200 系列高分离度快速液相色谱系统
6510 四极杆飞行时间 LC/MS
ZORBAX RRLC 色谱柱
MassHunter 代谢物鉴定软件

应用领域：

药物研发中的代谢物鉴定

前言

现代药物研发中，鉴定新化合物所有可能的代谢物非常重要，因为需要研究对人体可能的毒性作用来评估其作为新药物的可能性。目前，采用高分辨和高质量精度 QTOF MS 和 MS/MS 获取体内和体外代谢实验的数据¹，在药物研发不同阶段对代谢物进行鉴定。要重复利用这些数据中所包含的所有信息，需要使用不同的但互补的计算机算法来进行数据分析。每种运算都能根据其特殊功能和所分析数据的特定部分给出独立的结果。计算机辅助数据分析的真正优势在于，可以将这些算法整合在一起，提高整个结果的可信度。要做到这一点，就要将各个算法得到的分值进行综合，并用用户预先设定的因子进行加权。本应用报告报导了一个实例，采用安捷伦 MassHunter 代谢物鉴定软件（采用已报导的方法）分析来自代谢物鉴定实验的 QTOF 数据。

实验部分

仪器

- Agilent 1200 系列高分离度快速液相色谱系统，包含脱气机、SL 型二元泵、带温控的 SL 型高效自动进样器、柱温箱和 SL 型二极管阵列检测器
- Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱，2.1 x 150 mm，1.8 μm 粒径
- Agilent 6510 四极杆飞行时间 LC/MS 系统

样品制备

- 储备溶液：
20 mg/mL S9 肝匀浆 0.1 mg/mL 萘法唑酮水溶液 1.6 mg NADP 溶于 1.6 mL 0.1 M 磷酸缓冲液中 (pH 7.4) 50 mM 异柠檬酸盐/MgCl₂ (203 mg MgCl₂·6H₂O

+ 258.1 mg 异柠檬酸盐，溶于 20 mL 水)
异柠檬酸脱氢酶 0.33 U/mL

- NADPH 再生系统：
1.6 mL NADP 溶液 + 1.6 mL 异柠檬酸盐溶液 + 100 μL 异柠檬酸脱氢酶溶液
- 加热混合物：
3.85 μL 物质 + 200 μL NADPH 再生系统 + 746.15 μL 磷酸缓冲液 + 50 μL S9 肝匀浆

于 37 °C 下加热 60 分钟，在 0 和 60 分钟时各取 100 μL 等份液体。通过加入 6 μL 高氯酸和 100 μL 乙腈到等份溶液中终止反应，并于 14,000 g 离心 15 分钟。用 SpeedVac 浓缩仪将上清挥干，用 0.1% 甲酸 (FA) 复溶，按下述条件进行 LC/MS 分析。在 0 分钟终止加热作为对照。

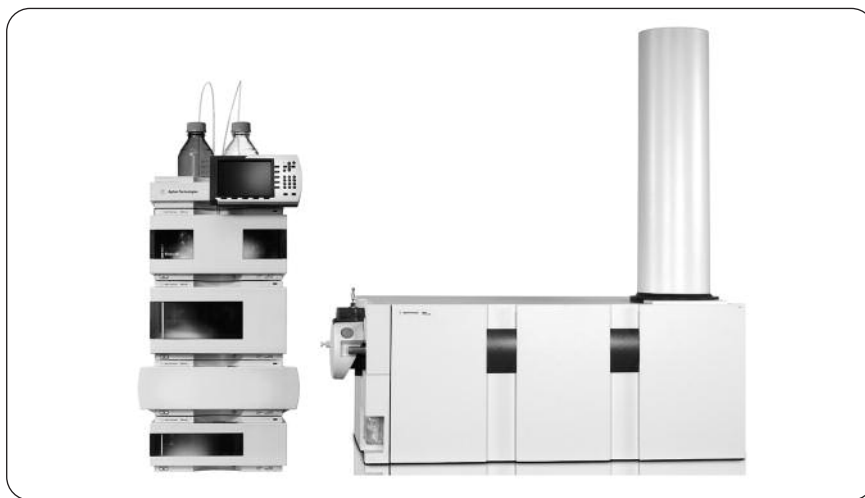


图 1
代谢物鉴定实验的系统配置，包括配备 1.8 μm 粒径色谱柱的 Agilent 1200 系列快速高分离度 LC 和 Agilent 6510 QTOF LC/MS

高分离度 LC/MS 方法

- Agilent 1200 系列 SL 型二元泵

溶剂 A: 水 + 0.1% FA

溶剂 B: 乙腈 + 0.1% FA

流速: 0.5 mL/min

梯度: 0 分钟, 5%B;
15 分钟, 75 %B;
15.1 分钟, 95 %B;
16 分钟, 95 %B

停止时间: 16 分钟

后运行时间: 10 分钟

- Agilent 1200 系列 SL 型自动进样器进
样量:

1-10 μ L 包括针头冲洗

样品温度: 4 $^{\circ}$ C

自动化延迟体积减小

- Agilent 1200 系列 SL 型二极管阵列检
测器检测波长:

210 nm, (\pm 4 nm)

参比波长:

360 nm (\pm 16 nm)

流通池: 2 μ L 体积

3 mm 光程

- Agilent 1200 系列柱温箱

柱温: 60 $^{\circ}$ C

QTOF MS 和 MS/MS 方法

- Agilent 6510 QTOF LC/MS 系统

离子源: ESI, 正离子模式,
带双喷雾器用于
参考标样校正

干燥气体: 12.0 L/min
(m/z 121.005 和
m/z 922.00)

干燥温度: 300 $^{\circ}$ C

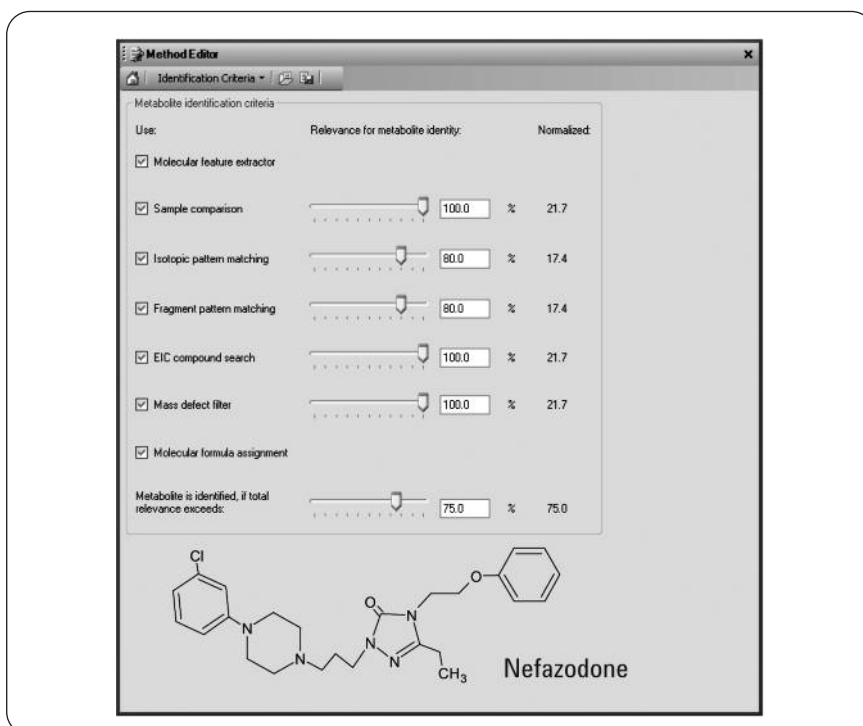


图 2
为每种算法设置代谢物关联分值的权重和总体鉴定关联分数阈值

雾化器压力: 60 psi

质量范围: 100-1000

碎裂电压: 200 V

锥孔电压: 60 V

毛细管电压: 4000 V

碰撞能量: 35 V

数据依赖的 MS/MS: 2 个化合物, 2
张 MS/MS 图谱, 排除 0.03 分钟

数据分析

分析数据的第一步, 包括提出化合物结构
式和计算分子量, 然后对包含代谢物 (样
品, 加热时间 $t > 0$) 的数据文件与仅含母
体药物 (对照, 加热时间 $t = 0$) 的数据文
件进行比较。在比较中, 用分子特征提取

器 (MFE) 算法从 MS 数据中提取出所有
检测到的质量信号。把相关化合物的同位
素质量和加合离子质量归为一组, 作为不
同的分子特征离子, 并去除化学噪音。然
后将代谢样品和对照的化合物列表进行对
比。所有新化合物或在代谢样品中增多的
化合物都被认为是潜在目标代谢物, 进一
步采用由用户指定的不同算法进行分析
(图 2)。这些算法可以对新代谢物进行鉴
定和定量, 或对其它方法发现的代谢物进
行定量。所有代谢物鉴定算法的结果将加
权汇总为最终的鉴定关联分值。最后分值
高于定义的关联阈值时, 即对代谢物进行
定量。所有运算结果列于结果总表中, 便
于浏览查看。

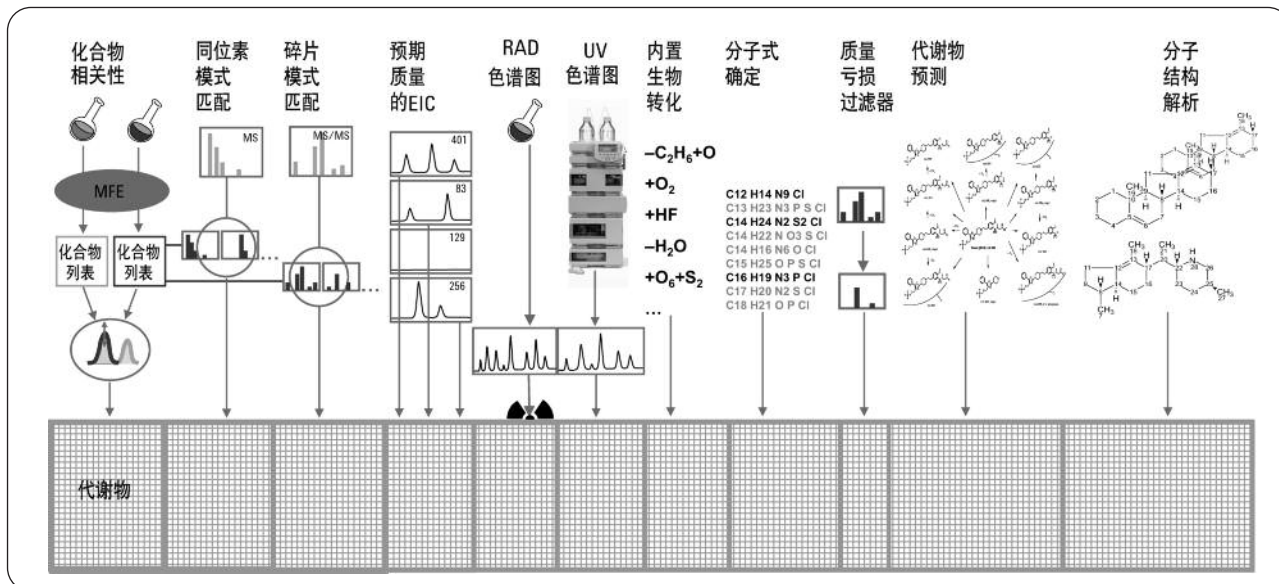


图3 代谢物鉴定软件工作流程，以不同数据分析算法为特色。每发现一个新候选代谢物，即在表中增加新的一列。表中各列为采用不同算法验证已有候选代谢物，显示各种算法的结果

结果与讨论

采用综合多算法的代谢物鉴定流程（图3）产生了一个包含潜在代谢物的结果列表。每发现一个新候选代谢物，即在表中增加新的一列。表中各列为采用不同算法验证已有候选代谢物，显示各种算法的结果。下列几点介绍了各种算法及其在形成最终结果表中的相互影响。

1. 样品-对照的比较 (图4)——在样品比较表中，将化合物与质量数和保留时间进行匹配。对代谢物样品（时间>0，检测母体药物及预期的代谢产物)和对照组的未代谢样品（时间=0）进行比较

Control				Metabolite			
Cpd	Vol.	Mass	RT	Cpd	Vol.	Mass	RT
				22	12372377	501.2137	6.084
				23	8829556	501.2140	6.160
				24	333526	451.2578	6.147
				25	540594	250.1779	6.552
6	818180	272.1599	6.552				
7	182866	451.2586	6.805				
				26	152763	287.1267	7.049
				27	1725493	305.1374	7.049
				28	99662	343.0843	7.049
				29	281726	327.1192	7.050
				30	218708	313.1390	7.114
				31	1198567	291.1575	7.122

图4 对照样品和代谢物样品之间的对比，如质量分别为451.2578和501.2140的二羟基化和脱氯代谢物

2. 同位素谱匹配 (图 5) —— 来自预期生物转化代谢物的同位素谱, 与生物转化的母体药物的理论谱进行对比, 并且比较预期外代谢物的同位素谱与母体药物的理论同位素谱
3. 碎片离子谱匹配或 MS/MS 相关性 (图 6) —— 这一步是使每个潜在代谢物的 MS/MS 质谱图与母体药物的 MS/MS 质谱图相互关联。检测并显示出由生物转化引起的碎片离子的质量漂移

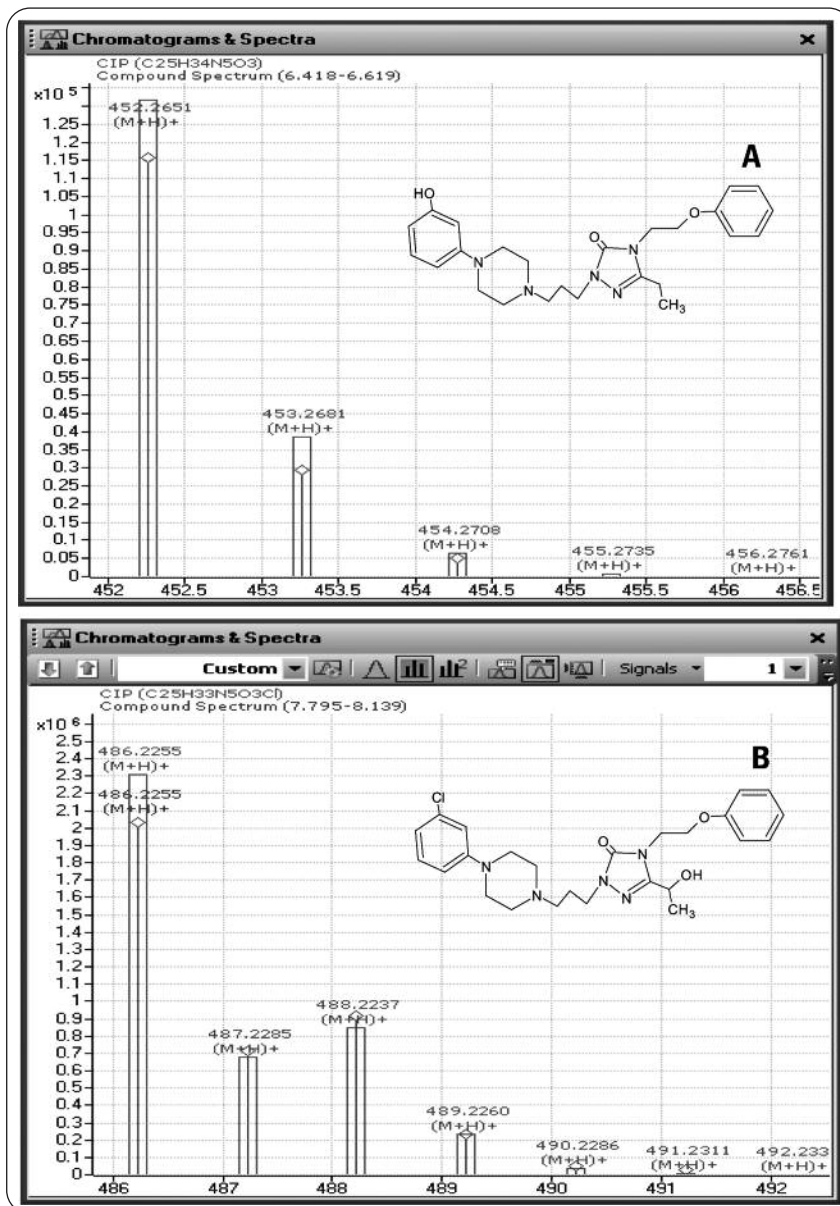


图 5
 A) 通过与母体药物生物转化计算的同位素谱 (CIP) 相比较, 进行脱氯代谢物的同位素谱匹配
 B) 通过与含氯母体药物的计算同位素谱进行比较, 进行含氯羟基化代谢物的同位素谱匹配

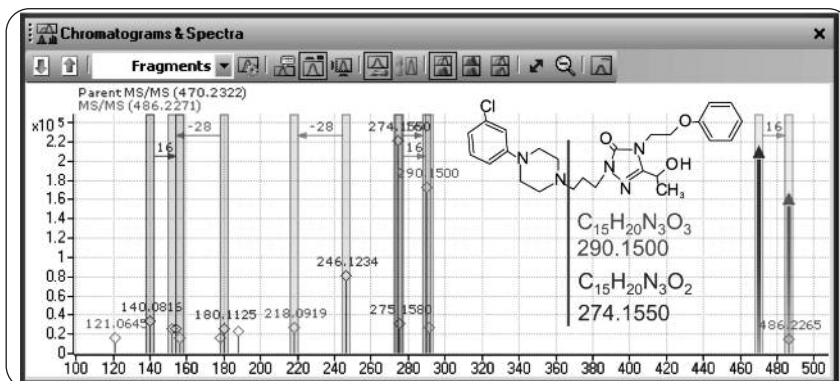


图 6
 通过指定生物转化质量漂移, 对质子化母体药物 (m/z 470.2323) 和质子化羟基化代谢物 (m/z 486.2265) 之间进行 MS/MS 碎片模式匹配。m/z 274.1550 的 MS/MS 碎片来自母体药物, m/z 290.1500 为与羟基化代谢反应相关的 15.9999 的质量漂移

4. 色谱图的提取 (图 7)——包括直接从数据中得到提取离子色谱图 (TIC), 从提取的分子特征中得到提取化合物色谱图 (ECC)
5. 在 RAD (放射性活性检测) 色谱图中进行化合物检索 (这里未显示)
6. 在 UV (紫外) 色谱图或其它检测方法 (这里未显示) 中进行化合物检索
7. 生物转化标记 (图 6 和 10)——通过对母体离子质量的漂移确定预期代谢物, 在结果表中列出已知的生物转化, 并标记这些化合物的生物转化反应名称 (表 10)
8. 分子式指定 (图 8 和 9) ——分子式的指定仅根据所测产物精确质量相符合的元素组成, 根据同样元素组成必须能解释 MS/MS 图谱中产物的碎片质量和中性丢失
9. 质量亏损过滤器——过滤掉在母体药物设定质量亏损窗口之外的潜在代谢物

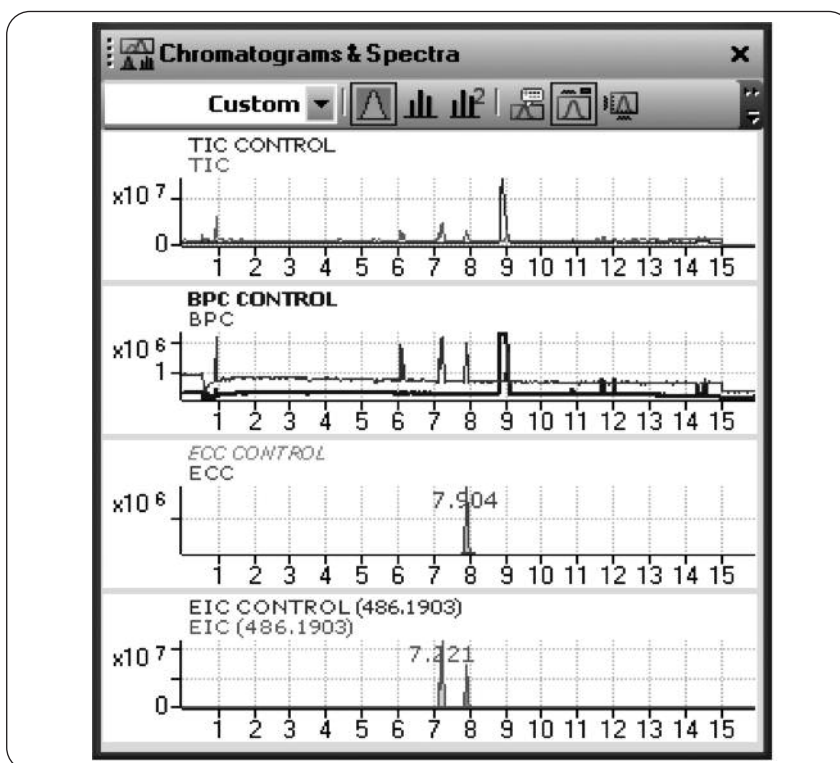


图 7 直接从对照和代谢物样品的测定数据中获得提取离子色谱图 (EIC), 从提取的分子特征中获得提取化合物色谱图 (ECC) ——这里显示了两个不同的羟基代谢物, RT 7.2 和 7.9 分钟, m/z 486.1903。这些代谢物在对照样品中不存在

The figure shows a software window titled 'Formulas'. It contains a table with the following data:

Selected	Formula	Calc. Mass	Score Max
<input checked="" type="checkbox"/>	C ₂₅ H ₃₂ N ₅ O ₃ Cl	485.2194	100.0

Ion Formula	m/z	Species	Mass	Δ Mass [ppm]	Score
C ₂₅ H ₃₃ N ₅ O ₃ Cl	486.2255	(M+H) ⁺	485.2182	2.42	100.0

Abund%	Calc Abund%	m/z	Calc m/z	Δ m/z [ppm]
100.00	100.00	486.2255	486.2266	2.42
34.27	29.36	487.2293	487.2296	0.64
44.24	36.77	488.2246	488.2248	0.50
10.25	9.95	489.2266	489.2272	1.13
1.20	1.58	490.2289	490.2297	1.59
0.14	0.18	491.2321	491.2323	0.33

图 8 最高分值的羟基代谢物计算得的分子式和同位素丰度分布。计算的相对质量误差为 2.42 ppm

10. 代谢物预测——根据手动或计算机辅助代谢物预测得到的结构，对应结果表中的已鉴定化合物

11. 分子结构解析——合并所有数据，进行结构解析和结构式认定

12. 最终代谢物结果表的填写 (图 10):
将已鉴定的代谢物汇总在结果表中，包括这些化合物的主要信息，以及来自各算法的定量结果及其它信息。可以生成更为详尽的结果报表

m/z	Formula	Calc Mass	Δ Mass [ppm]	Loss Formula	Loss Mass
152.0816	C7H9N3O	151.0746	1.78	C18H23N2O2Cl	334.1448
156.0762	C6H9N3O2	155.0695	3.27	C19H23N2OCl	330.1499
178.0972	C9H11N3O	177.0902	1.76	C16H21N2O2Cl	308.1292
188.1065	C12H13NO	187.0997	2.68	C13H19N4O2Cl	298.1197
218.0919	C11H11N3O2	217.0851	2.11	C14H21N2OCl	268.1342
290.1500	C15H19N3O3	289.1426	-0.20	C10H13N2Cl	196.0767

图 9
在 m/z 486.2255 处，质子化羟基代谢物测定的 MS/MS 碎片离子质量和计算出的碎片离子的分子式。显示了丢失的质量数以及丢失的碎片离子的计算分子式。计算出 m/z 290.1500 碎片离子的相对质量误差为 -0.20 ppm

结论

采用几种交互算法对萘法唑酮的代谢 QTOF MS 和 MS/MS 数据进行计算机辅助研究。采用分子特征提取 (MFE) 对对照和代谢样品进行比较后，提取出代谢物。以个位数的相对质量误差获得了高质量精

度的 MS 和 MS/MS 数据，用于代谢物的分子式生成 (MFG)。在最终结果一览表中，生成了已鉴定代谢物的总相关性分值，由各算法的相关分值加权计算产生。

Metabolites										Sample Co...	EIC Co...	Mass D...	Isotopic...	Fragmen...	Biotran...	Formulas	MS/MS...
Name	RT	Mass	m/z	Qualified	Relevance	Qualified	Qualified	Qualified	Qualified	Assigned	Assigned	Assigned	Assigned				
1 Oxidative Dechlorination	6.447	451.2578	452.2651	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
2 Methylene to Ketone	9.109	483.2032	484.2105	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
3 Hydroxylation and Ketone Formation	7.284	499.1974	500.2047	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
4 Hydroxylation	7.215	485.2181	486.2254	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
5 Hydroxylation	7.904	485.2182	486.2255	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
6 3x Hydroxylation	4.369	517.2082	518.2155	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
7 2x Hydroxylation	5.455	501.2136	502.2209	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				
8 2x Hydroxylation	6.084	501.2137	502.2210	✓	100.0	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓				

图 10
全部鉴定代谢物的最终结果表，与已知的生化代谢反应相关。产生结果的算法“样品对比较”、“同位素谱匹配”、“碎片谱匹配”、“质量亏损过滤器”均标为绿色。其它信息，如“指定的生物转化 2”、“计算分子式”和“可用的 MS/MS”标为蓝色。结构可以手动指定。用同样的算法处理数据，也可以提取出与已知生物转化无关的代谢物

参考文献

1.

Hopfgartner G., Chernushevich I. V., Covey T., Plomley J. B., Bonner R., "Exact mass measurement of product ions for the structural elucidation of drug metabolites with a tandem quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 10, 1305-1314, **1999**.

2.

Peterman S. M., Duczak J. N., Kalgutkar A. S., Lame M. E., Soglia J. R., "Application of a linear ion trap/orbitrap mass spectrometer in metabolite characterization studies: Examination of the human liver microsomal metabolism of the non-tricyclic anti-depressant nefazodone using data-dependent accurate mass measurement", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 17, 363-375, **2006**.

应用化学家 Edgar Nägele、软件研发科学家 Frank Wolf、Uwe Nassal、Rainer Jäger 和 Karina Subramanian、产品经理 Horst Lehmann 和 Frank Kuhlmann，均在安捷伦科技公司德国 Waldbronn 工作。

了解更多

www.agilent.com/chem/tcm

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus:cn

安捷伦客户服务中心:

免费专线: 800-820-3278

400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

customer-cn@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/quote:cn

安捷伦科技大学:

<http://www.lasca-china.com.cn/university>

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊:

www.agilent.com/chem/accessagilent:cn

www.agilent.com/chem/tcm

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2010

2010年4月1日, 中国印刷

5989-9912CHCN



Agilent Technologies