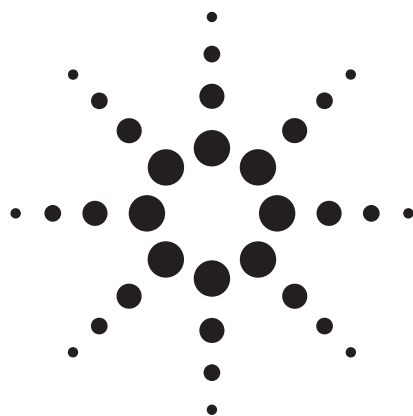
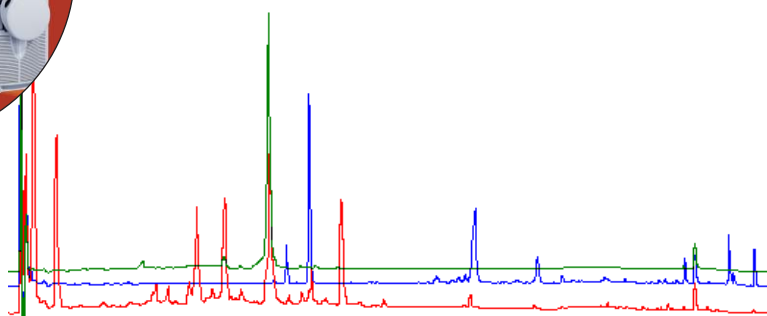
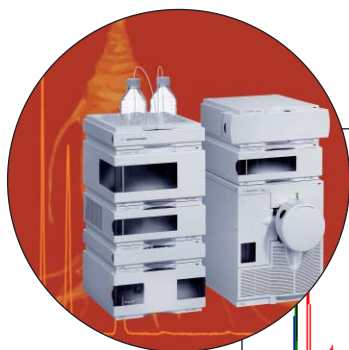




用高分离度快速液相色谱-UV和MS检测 建立可靠的中药制剂质控方法

应用报告

徐智秀



摘要

本应用报告报导了用高分离度快速液相色谱法紫外-可见检测器和四极杆质谱联用，分析各种中药（TCM）及中药制剂，建立可靠的质控方法。对不同中药用UV和MS检测所得到的色谱图进行了比较，将UV和MS图谱结合进行目标化合物的鉴定。

安捷伦仪器:

1200 系列高分离度快速液相色谱系统
6140 四极杆质谱仪

应用领域:

中药



Agilent Technologies

引言

中国长期使用中药和中药制剂，对其治疗作用有丰富的经验。但质量控制仅局限在外观检查是不够的。随着新技术的发展，已经发现某些中药中有几百种化合物，其浓度范围很宽。而且，产地不同和采摘时期不同，以及炮制和加工工艺不同，中草药的成分也不同。因此，对中药化合物的质量控制极具挑战性。现在，只测定中药制剂中一个或两个成分进行质量控制已经不够了，因为特殊配方的中药制剂都是由一种以上中药组成的。例如，芪参益气滴丸，一种用于治疗冠心病的中成药，包含4种中药：

- 黄芪
- 丹参
- 三七
- 降香

本研究以芪参益气滴丸为样品，用高分离度快速液相色谱（RRLC）-紫外-可见检测器和质谱联用，建立中药质量控制的新方法。主要目标是建立一种可靠的方法，能够选定在加热和混合过程中不变的潜在目标化合物。

实验

仪器

- Agilent 1200系列 RRLC系统包括：带真空脱气机的SL型二元泵、SL型高性能自动进样器、配置微量流通池(2 μ L体积，3 mm光程)的SL型柱温箱和二极阵列检测器SL，
- Agilent 6410四极杆质谱仪，配置ESI离子源
- Agilent 化学工作站B.02.01 SR1，用于数据采集和分析
- Agilent ZORBAX XDB C18 RRHT色谱柱，3.0 x 50 mm, 1.8 μ m粒径

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 (NICBP)，人参皂甙Rg1、人参皂甙Rb1、原儿茶醛、原儿茶酸、人参皂甙Re和人参皂甙Rc购自Sigma-Aldrich公司(美国)。

溶剂

乙腈购自Fisher公司(美国)，水由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、三七的中间提取物，及降香精油，由中国TASLY制药公司提供。原药材购自当地中药店。

滴丸、中药提取物和中药原料溶于70 %甲醇/水溶液中，超声提取30分钟，用0.22 μ m滤膜过滤。

RRLC方法

- 流动相：
 - A: 0.1 %甲酸水
 - B: 乙腈，含 0.1 %甲酸
- 梯度：0分钟，10 %B；8分钟，38 %B；12分钟，100 %B；持续3分钟，然后10 %B
- 流速：1.0 mL/min（被动分流器将进入MS的流速降至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，2 nm步进

质谱方法

- 扫描：80-1400（正/负）
- 碰撞诱导解离电压：70（正/负）
- 干燥气体：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

用安捷伦方法转换计算器（光盘发行号5989-5130EN）将常规液相色谱方法转换成高分离度快速液相色谱方法。

丹参三七黄芪和降香提取物的比较

由图1可见,在203 nm检测波长下,丹参和三七的色谱图与混合提取物有很大区别。混合和加热后,某些峰消失了,同时出现了一些新的色谱峰。

目标化合物筛选是质量控制的重要步骤,可以确定加工过程中这些化合物是否发生了变化。大多数研究者都用203 nm进行检测,因为主要活性化合物是皂甙,在203 nm波长下有弱吸收。但203 nm处的大峰可能与质量控制无关,那些小峰可能对研究活性成分更重要。因此,需要另一种灵敏度更高的检测器,提供这些成分的更多信息。

不同检测器和条件之间的比较

图2显示了紫外和MS检测的不同结果。在MS的总离子色谱图中有更多的峰,因为某些成分紫外吸收很弱或者没有吸收。用MS检测增加了另一维数据,并得到了这些不同化合物的结构信息。负离子模式给出了这些峰更完整的信息,可以对质量控制的目标化合物进行鉴定。

芪参益气滴丸和不同提取物之间的比较

图3显示了丹参、黄芪和降香提取物与芪参益气滴丸(由这三种提取物和其它填充剂制成)的色谱图。标记数字的峰就是对这一中药制剂质量控制筛选到的目标化合物。根据UV和MS数据,研究不同的色谱峰,以确定这些化合物是否发生了变化。表1列出了鉴别的结果。

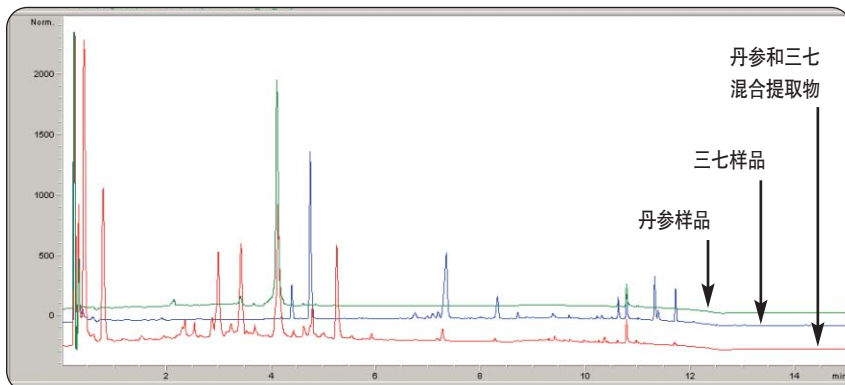


图1
各中药丹参、三七及混合提取物的色谱图

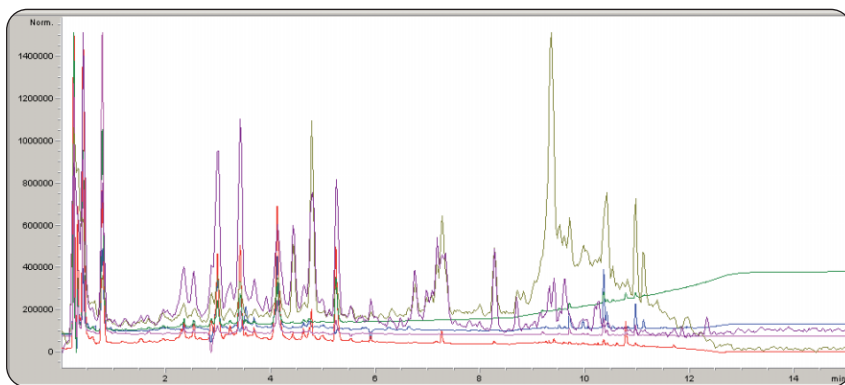


图2
丹参三七组合的色谱图, UV和MS检测得到了不同结果

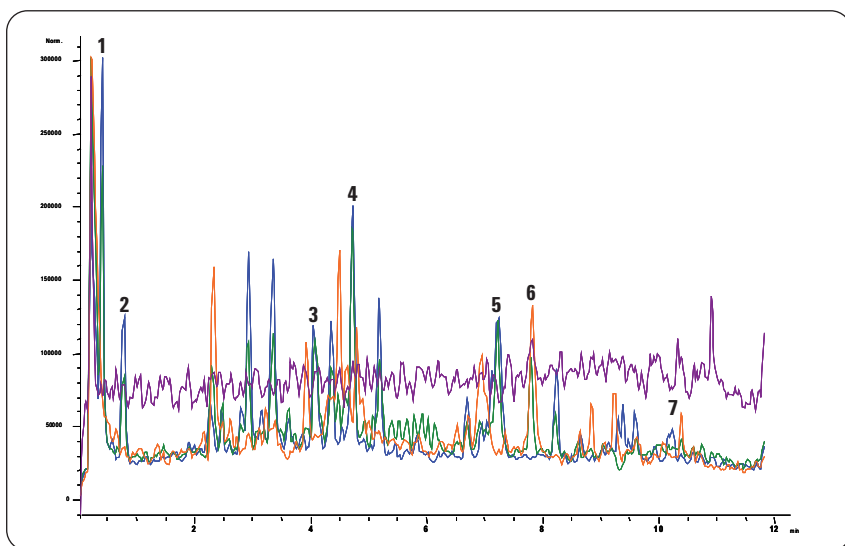


图3
三种中药组合及滴丸样品的负离子TIC比较

结论

本应用报告报导的RRLC-紫外和MS检测方法比目前药典控制单一组分的质量控制方法更可靠，因为能够根据UV和MS检测器提供的信息跟踪中药中几种成分的质量。跟踪这些成分非常重要，因为这些成分可能在炮制和加工过程中发生变化。质谱测定使用的Agilent 6140四极杆质谱仪，与Agilent 1200系列RRLC系统和Agilent化学工作站软件能够完全集成。

参考文献

1.
Ai-hua Liu, et.al., *Journal of Chromatography B*, 846 (2007) 32-41
2.
Jin-huai Liu, et.al., *Journal of Chinese Pharmaceutical Science*, 2004, 13 (4)
3.
Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 1676-1680
4.
Agilent Application Notes, publication numbers 5989-4506EN, 5989-5493EN, 5989-6757EN

色谱峰	化合物	MS	UV $\lambda_{\max}$ (nm)
1	丹参素	197 [M-H] ⁻ , 395 [2M-H] ⁻	280
2	隐丹参酮	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
目标化合物的结构式和检测信息（峰号参见图3）

徐智秀是安捷伦科技上海有限公司的应用化学工程师。

www.agilent.com/chem/tcm

© 2007 安捷伦科技公司

2007年12月1日印刷
发行号 5989-7682CHCN



Agilent Technologies