

DGLC-31 在线全二维液相色谱串联质谱分析刺五加提取物成分

关键词：提取物，刺五加，在线全二维，液质联用

DGLC-31 Determination of constituents in Radix Acanthopanax Senticosi extracts by online 2D-HPLC method using LC-MS

Key words: extracts, Radix Acanthopanax Senticosi, online 2D-HPLC, LC-MS

引言

高效液相色谱技术已成为中药复杂体系研究的强有力的分析技术支撑，在中药质量控制方面占据重要的地位。当前，随着新型色谱固定相和填料技术的不断发展，为中药各类成分的分析提供多种选择。然而很多中药复方中通常涵盖强极性、中等极性和弱极性等化学成分，这种性质决定了其很难用单一的分离模式进行分离，复杂性超出了单一色谱分离系统的分离能力。在这种情况下，结合多种分离方式的多维色谱分离模式，可以增加色谱系统的分离能力，扩大分离空间，增加色谱峰容量，减少色谱峰重叠。多维液相色谱分离技术已成为液相色谱发展的一个重要方向。

刺五加是五加科五加属的一种落叶灌木，主要的药用部分是它的根及根皮，药材名又称五加参，是中药五加皮的一种。我国民间很早就将其作为药材使用，以达到扶正固本，益智安神，补肾健脾的功效。其系统的化学研究已比较深入，主要含有甾体类、香豆素类、木质素类、酚类、糖类、三萜类及有机酸、微量元素等。本文拟采用全二维液相色谱分离技术结合质谱对刺五加水提取物进行系统的物质基础分析。

测试条件

仪器：Ultimate DGP 3600 系列，包括带有在线脱气单元的双三元梯度泵；柱温箱（配置一个六通阀和一个十通阀）；DAD 检测器。仪器条件及连接图见表 1，一维和二维分离梯度程序见图 1。

表 1 仪器条件及连接图

一维分析柱	Hypersil GOLD PFP, 5 μ m 4.6 \times 150mm (P/N: 25405-154630)
二维分析柱	Acclaim Polar Advantage II C ₁₈ , 120° 3 μ m 4.6 \times 50mm (S/N 001160 P/N: 063189)
柱温	40℃
流动相 A	一维分析泵：甲醇； 二维分析泵：乙腈
流动相 B	0.1% 甲酸
流速	0.5mL/min for 一维分析泵；2.4 mL/min for 二维泵
检测	UV@218, 230, 275nm
进样量	5 μ L

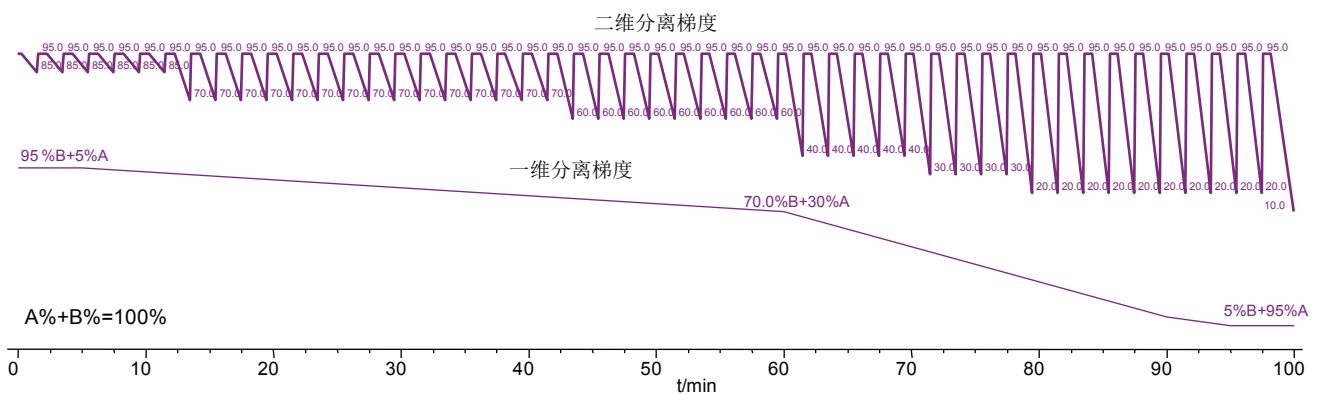
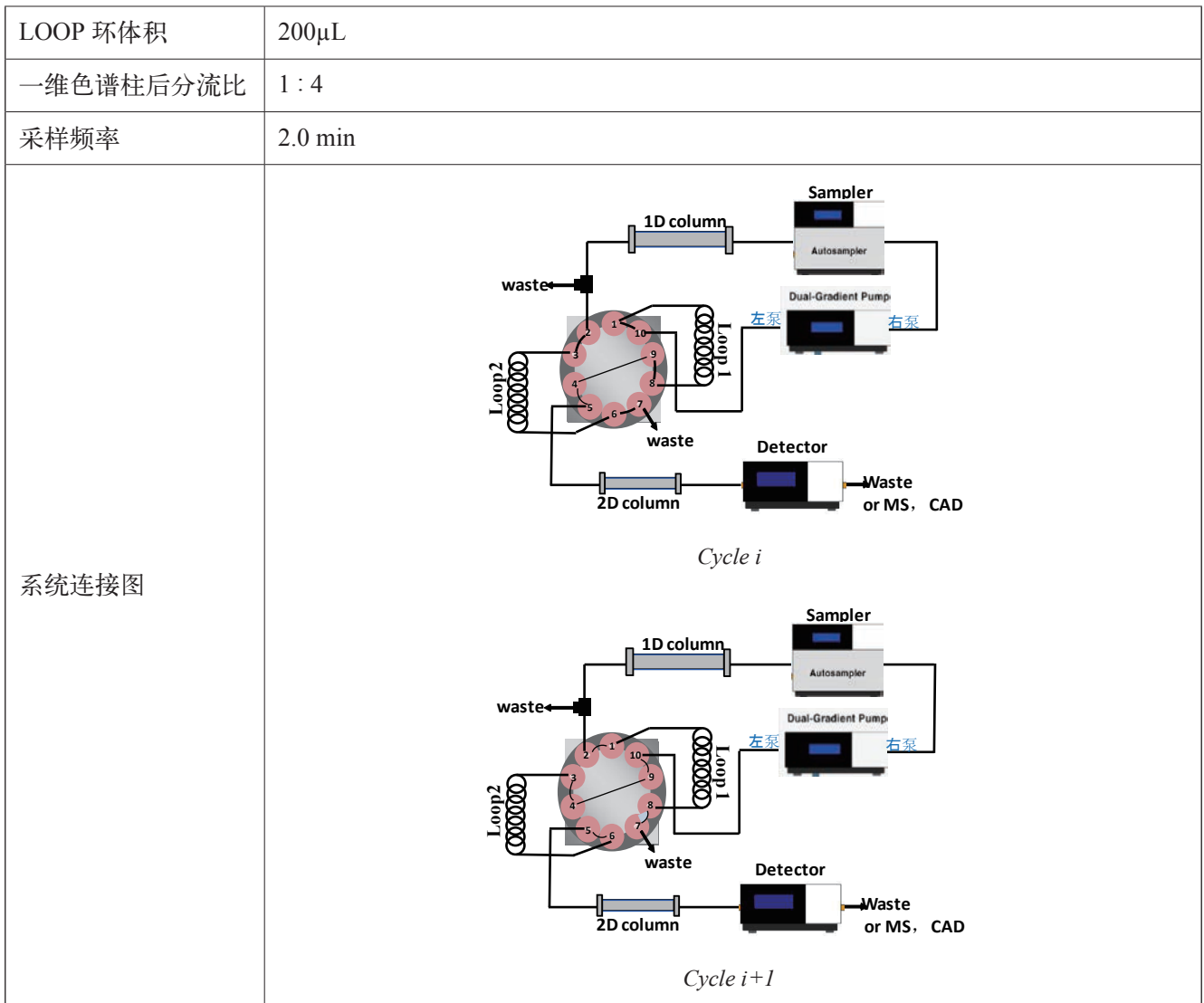


图 1 一维和二维分离梯度程序

样品前处理方法

刺五加浸膏：取刺五加药材 100g，粉碎成粗粉，加水煎煮 2 两次，每次 3 小时，合并提取液，浓缩成浸膏即得。取浸膏适量，加 20% 甲醇 - 水溶解，滤过进样。

对照品溶液制备：取紫丁香苷、绿原酸、异嗪皮啶、刺五加苷 D 和 E 适量，加甲醇溶解，制成混合对照品溶液。

结果和讨论

标准品谱图

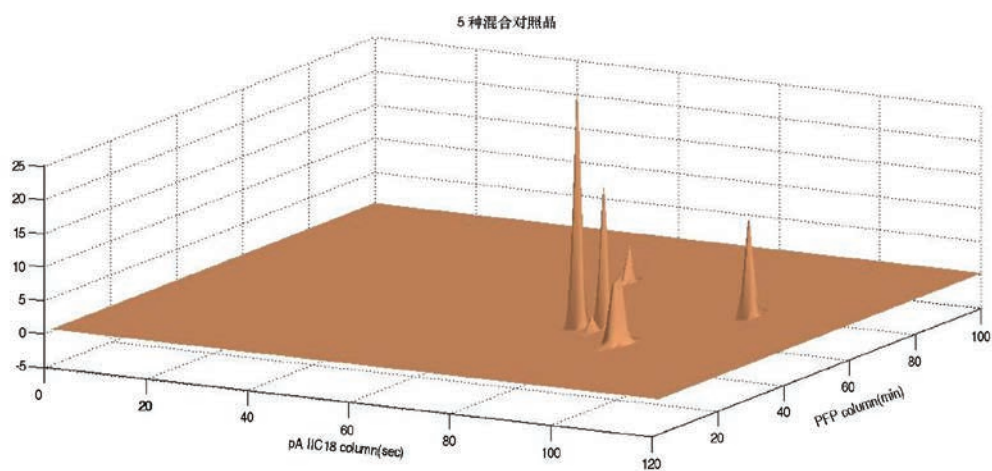


图2 刺五加药材中5种已知混合对照品3D谱图

样品分析谱图

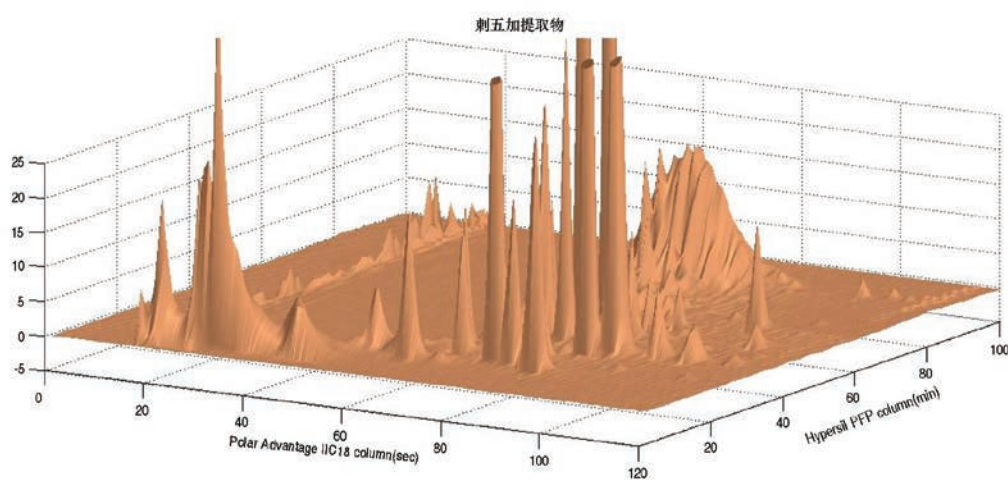


图3 刺五加提取物3D谱图

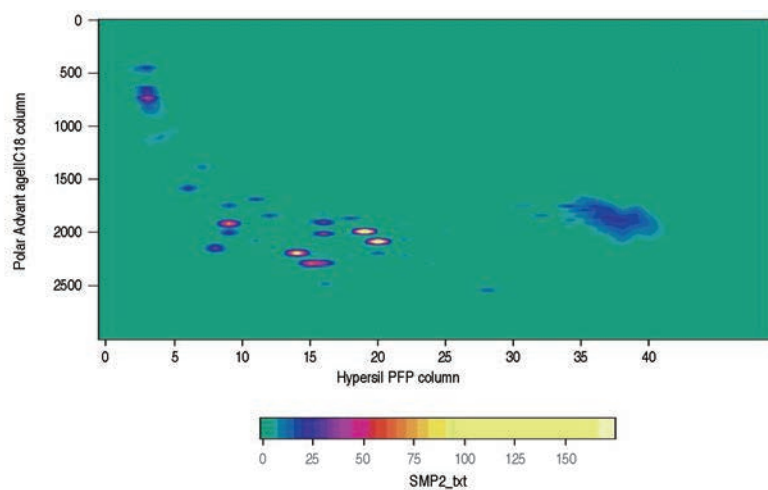
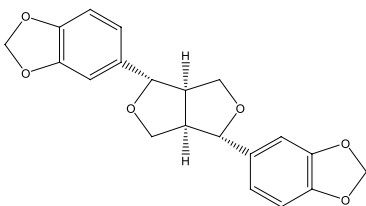
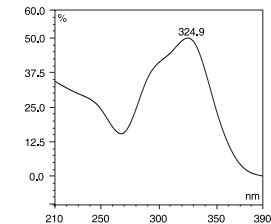
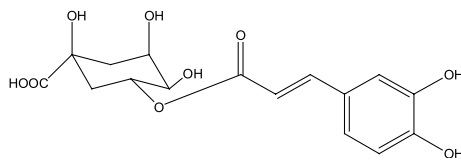
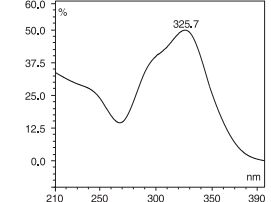
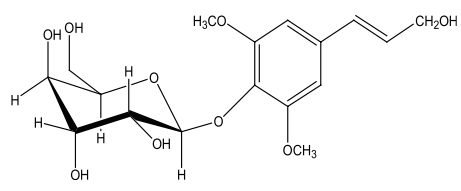
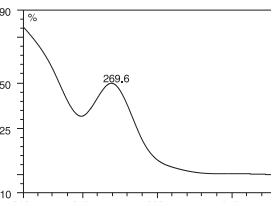
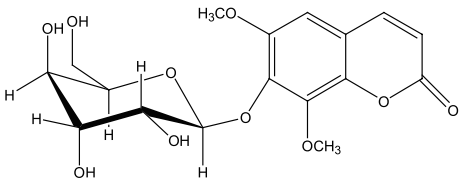
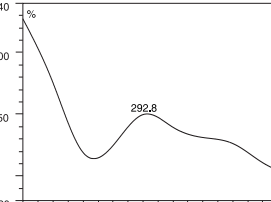
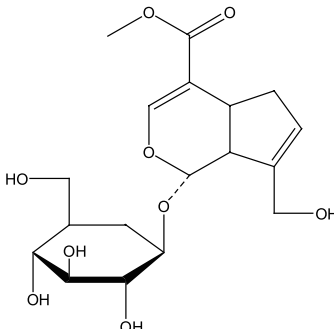
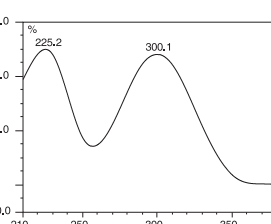
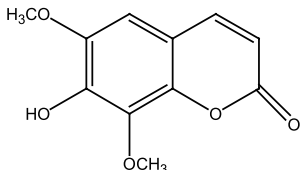
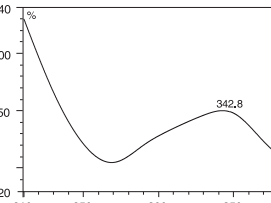


图4 刺五加提取物2D等高图

MS 结果

本实验在确立了色谱条件后，在二维色谱柱后采用柱后分离方式串联了 TSQ，对其中的主要成分进行结构确认工作，见表 2、3。

表 2 刺五加提取物中初步鉴别出的 7 个成分和分子量

序号	Compound	Structure	Molecular weight	UV spectrum
1	L-sesmen (L- 芝麻素)		354	
2	chlorogenic acid 绿原酸		354	
3	Syringin 紫丁香苷		372	
4	Isofraxidin-7-O-β-Dglucoside 异嗪皮啶-7-O-葡萄糖苷		384	
5	Geniposide 京尼平苷		386	
6	Isofraxidin 异嗪皮啶		222	

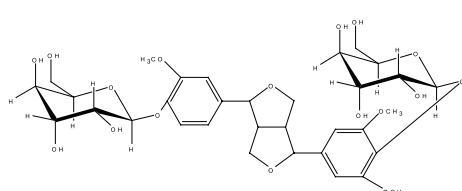
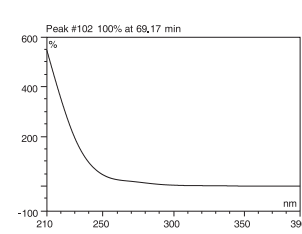
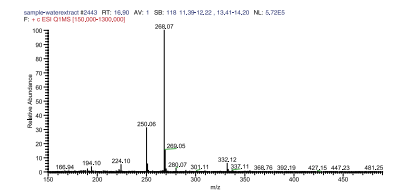
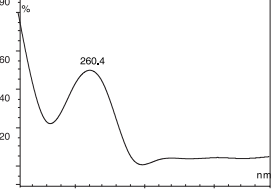
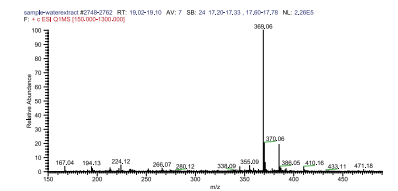
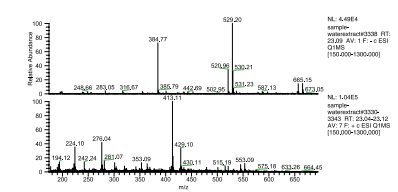
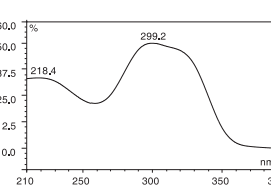
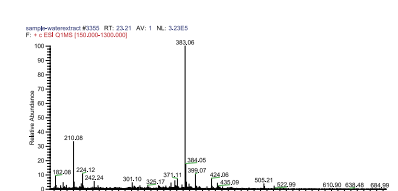
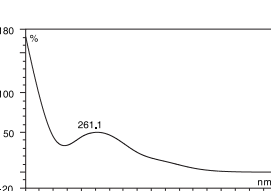
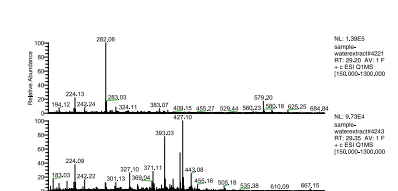
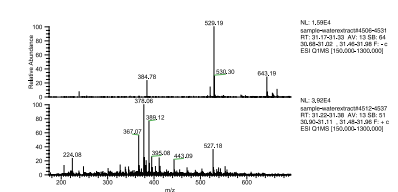
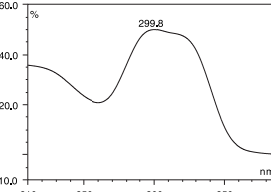
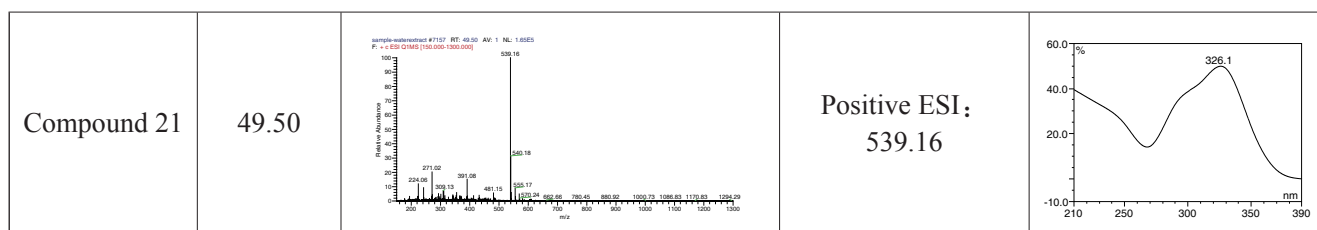
7	ELEUTHEROSIDE E 刺五加苷 E		742	
---	---------------------------	---	-----	---

表 3 其他未知化合物

Name	RT (min)	Ms spectrum	主要离子峰 m/z	UV spectrum
Compound 8	16.91		250 268	
Compound 9	19.06		369.06 387.05	
Compound 10	23.09		Negative ESI: 529.20 384.77 Positive ESI: 413.11 429.10	
Compound 11	23.21		Positive ESI: 383.06	
Compound 12	29.35		Negative ESI: 282.06 Positive ESI 不明显	无 UV 吸收
Compound 13	31.25		Negative ESI: 529.19 643.19 384.78 Positive ESI 峰较乱	

Compound 14	33.21	<p>sample: waterextract #4738-4639R T: 33.19-33.24 AV: 4 SB: 64 30.68-31.02, 31.46-31.96 NL: 9 3054 F: + ESI Q1MS (150.000-1300.000)</p>	<p>Positive ESI: 557.17 442.18</p>	
Compound 15	33.26	<p>NL: 6 1564 sample: waterextract#4604 #473 37 33.23-33.28 AV: 5 F: + ESI Q1MS (150.000-1300.000) NL: 6 4664 sample: waterextract#4820 RT: 33.26 AV: F: + ESI Q1MS (150.000-1300.000)</p>	<p>Negative ESI: 529.20 384.83 643.20 (与化合物13类似)</p>	
Compound 15	33.35	<p>sample: waterextract #4821R T: 33.35 AV: 1N L: 7 4665 F: + ESI Q1MS (150.000-1300.000)</p>	<p>Positive ESI: 365.05</p>	
Compound 16	35.4	<p>sample: waterextract #5120-5132R T: 35.43-35.49 AV: 6 SB: 33 34.96-35.15, 35.64-35.90N L: 1 1965 F: + ESI Q1MS (150.000-1300.000)</p>	<p>Positive ESI: 266.10 207.04 397.07</p>	<p>无紫外吸收</p>
Compound 17	37.24	<p>sample: waterextract #4381R T: 37.22 AV: 1N L: 2 1465 F: + ESI Q1MS (150.000-1300.000)</p>	<p>Positive ESI: 557.17 573.14</p>	
Compound 18	37.26	<p>sample: waterextract #5269-5408R T: 37.34-37.40 AV: 5 SB: 24 37.04-37.21, 37.56-37.70 NL: 1 1265 F: + ESI Q1MS (150.000-1300.000)</p>	<p>Positive ESI: 397.08 497.16 ?</p>	
Compound 19	43.37	<p>sample: waterextract #4261-6274R T: 43.30-43.33 AV: 7N L: 3 5065 F: + ESI Q1MS (150.000-1300.000)</p>	<p>Positive ESI: 407.05 223.01</p>	<p>无明显紫外吸收</p>
Compound 20	43.29	<p>sample: waterextract #4261R T: 43.30 AV: 1 SB: 31 43.08-43.21, 43.37-43.65 NL: 1 4065 F: + ESI Q1MS (150.000-1300.000)</p>	<p>Positive ESI: 539.12 555.13 223.02</p>	<p>无明显紫外吸收</p>



结论

二维色谱柱选择

本文根据刺五加药材中所含有化合物的种类和理化性质，筛选了部分分离机理差异较大的色谱柱，包括氰基柱、全氟苯基柱、极性嵌合 C_{18} 柱和 C_{18} 等，根据色谱柱的主要作用机制，基于雷达图的表达方式，对常用的几种色谱柱进行了筛选，从图 5 可以看出，二者分离机理差异较大，因此确定了全氟苯基柱 + 极性嵌合 C_{18} 柱的组合。

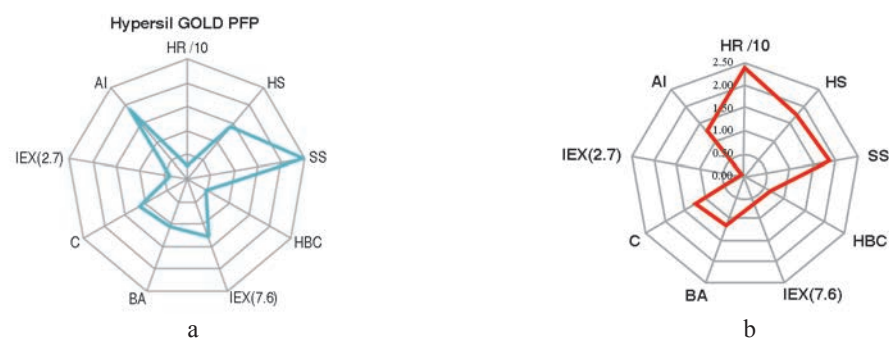


图 5 色谱柱的化学键合相性质 (a 为 PFP 柱; b 为 PA2 C_{18} 柱)

全二维体系的分离能力分析

与传统一维分离比较，在 100min 内分离得到至少 60 个组分，结合 MS 数据和已知文献对 7 个成分进行定性结构鉴别，另外化合物 8~21 在 UV 或在 MS 中响应较高，需进一步采用二级质谱进行结构推断。实验结果初步显示出全二维液相色谱串联质谱分离分析体系的高峰容量、高灵敏度和自动化等特点，为中药复杂体系的分离分析提供了一种可靠的方法。