

高效液相色谱/质谱分析抱茎獐牙菜提取物中的苷性成分

田 薇^{1,2} 张大华³ 程型国³ 李玉林⁴ 陈立仁^{*1} 李永民¹

¹ (中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000) ² (甘肃省药品检验所, 兰州 730030)
³ (中国石油天然气股份有限公司, 兰州 730060) ⁴ (中国科学院西北高原生物研究所, 西宁 810001)

摘 要 采用高效液相色谱/质谱法 (HPLC/MS) 分析抱茎獐牙菜提取物中 5 种苷性成分。在 C_{18} 柱上, 以甲醇 (A: 含 20% 水) 和水 (B: 含 10% 甲醇) 为流动相, 流速 1 mL/min, 线性梯度洗脱 B 从 100% 到 0%, 35 min, 液相色谱/质谱质联用 (LC/MS), 大气压化学电离源 (APCI), 对其中 5 种苷性成分进行定性鉴定。经 HPLC/APC/MS 分析确证, 抱茎獐牙菜提取物中含有獐牙菜苦苷 (swertiamarin)、龙胆苦苷 (gentiopicroside)、獐牙菜苷 (sweroside)、异红草苷 (isoorientin) 和獐牙菜山酮苷 (swertianolin)。采用外标法定量, 回收率分别为 98.3%、106.7%、92.3%、88.2% 和 107.3%, 该方法简便、快速、准确。

关键词 高效液相色谱/质谱, 苷性化合物, 抱茎獐牙菜总苷提取物

1 引 言

龙胆科植物抱茎獐牙菜 (*Swertia franchetiana* H. Smith) 是一种多年生草本植物, 全草入药, 为常用藏药, 藏名“蒂达”, 也泛称“藏因陈”。有清热解毒, 舒肝利胆之功效^[1,2]。文献报道其主要有效成分为酮类、环烯醚萜类、碳键黄酮苷类等几类具有重要药理作用的化学成分^[3~6]。以往对抱茎獐牙菜的研究仅局限在化学成分方面^[7], 通常经过复杂的分离提取过程得到纯品后进行结构表征, 所需时间长且需要样品量较大。液相色谱/质谱联用技术 (LC/MS) 是 20 世纪 90 年代成熟起来的一项新技术, 具有灵敏度高, 选择性强, 分离和结构确证一次完成等特点^[8,9], 使用 LC/APC/MS 分离、鉴定及同时测定抱茎獐牙菜总苷提取物中 5 种苷性成分还未见报道。本文所建立的这种方法对于该提取物标准指纹图谱的建立、提取工艺的控制及产品质量检测具有重要意义。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Micromass ZMD4000 型质谱仪 (美国 Waters 公司); AllianceTM 2690 高液相色谱系统 (美国 Waters 公司); PAD996 二极管阵列检测器; MasslynX 工作站。甲醇为色谱纯 (山东禹王), Millipore 超纯水 (自制); 獐牙菜苦苷 (swertiamarin) (1)、龙胆苦苷 (gentiopicroside) (2) 对照品购于中国药品生物制品检定所; 獐牙菜苷 (sweroside) (3)、异红草苷 (isoorientin) (4)、獐牙菜山酮苷 (swertianolin) (5) 均由中国科学院西北高原生物所藏药现代化研究中心提供; 抱茎獐牙菜总苷提取物由甘肃省药物研究所提供。

2.2 实验条件

2.2.1 色谱条件 C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 柱温 40 $^{\circ}$ C; 流动相: (A) 甲醇 (含 20% H_2O), (B) H_2O (含 10% 甲醇); 溶剂洗脱梯度 (A/B): 0/100 \rightarrow 100/0 (35 min); 进样量: 10 μ L; 流速: 1 mL/min; 紫外检测波长: 240 nm; PAD 检测: 190 ~ 370 nm。

2.2.2 质谱条件 离子源为大气压化学电离源 (APCI), 正离子方式检测 (AP^+): 电离电压 3.8 kV, 负离子方式检测 (AP^-): 电离电压 3.52 kV, 锥孔电压 30 V, 萃取锥孔电压 5 V, 倍增器电压 650 V, 离子源温度为 100 $^{\circ}$ C, APC 加热器温度为 450 $^{\circ}$ C, 吹扫氮气流量为 350 L/h。质量扫描范围 (m/z) 0 ~ 900。

2.2.3 测试样品溶液的配制 准确称取总苷提取物 0.05 g, 加甲醇定容至 50 mL, 过 0.45 μ m 滤膜备用。

2004-08-20 收稿; 2005-02-10 接受

本文系中国科学院“百人计划”资助项目和甘肃省科学技术攻关项目 (No. 2GS035-A43-074)

3 结果与讨论

3.1 液相色谱条件优化

关于以甲醇和水做流动相反相高效液相色谱分离分析极性的 酮苷与黄酮碳苷^[9]、2种环烯醚萜苷^[10]已有报道。本实验研究了不同比例的甲醇和水作为流动相,实现了在 C₁₈色谱柱上对 5种不同的环烯醚萜苷、黄酮碳苷、山酮苷的同时一次分离。另有报道用水-甲醇-异丙醇等度洗脱分离了 4种苷性成分^[11]。由于样品的复杂性,等度洗脱得不到 5种成分比较好的色谱图,于是试用了几种甲醇和水组成的梯度流动相,结果以上所述梯度流动相条件所得色谱图各主要成分分离较好,且保留值适中。

3.2 定性鉴定

在上述色谱条件下,得到獐牙菜提取物及混合标样的 HPLC 色谱图(图 1)。采用 HPLC和 LC-MS复合定性法对其中 5种主要组分的结构进行了鉴定。首先采用保留时间对照法和标准追加法进行初步定性,进而用二极管阵列紫外检测技术采集各色谱峰的紫外光谱图,将所得图谱的形状、吸收带位置及相对强度与标准品图谱比较对照定性,再进一步将 LC-MS联用仪所得质谱图与标准品质谱图对照定性。结果表明图 1中 5个主要色谱峰分别为(1)獐牙菜苦苷;(2)龙胆苦苷;(3)獐牙菜苷;(4)异荛草苷;(5)獐牙菜山酮苷。各紫外光谱、质谱数据参见表 1。代表化合物(1)~(5)质谱和吸收光谱见图 2。

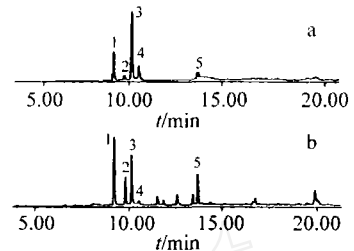


图 1 样品高效液相色谱图

Fig 1 Chromatograms of sample standard sample (a) and the extract sample (b)

1. 獐牙菜苦苷 (swertiamarin); 2. 龙胆苦苷 (gentiopicroside); 3. 獐牙菜苷 (sweroside);
4. 异荛草苷 (isoorientin); 5. 獐牙菜山酮苷 (swertianolin)。

表 1 各色谱峰的化合物归属

Table 1 Identification results of each chromatographic peak

名称 Name (Mr)	保留时间 Retention time (min)	Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) 分子离子 Relative abundance (ion)		紫外光谱 UV spectra (λ_{max})	化学结构 Structure of compound
		正离子	负离子		
獐牙菜苦苷 Swertiamarin (374)	9.17	375 (100) [M + H] ⁺	3 73 (10.5) [M - H] ⁻	194 238	
龙胆苦苷 Gentiopicroside (356)	9.73	357 (100) [M + H] ⁺	n. d.	194 243 251 273	
獐牙菜苷 Sweroside (358)	10.11	359 (100) [M + H] ⁺	357 (0.5) [M - H] ⁻	194 246	
异荛草苷 Isoorientin (448)	10.50	449 (58.0) [M + H] ⁺	447 (70.1) [M - H] ⁻	194 269 352	
獐牙菜山酮苷 Swertianolin (436)	13.68	n. d.	435 (100) [M - H] ⁻	195 252 275 325	

n. d.: 在此工作条件下分子离子峰未检出(not detected by mass spectrometry)

3.3 定量检测

3.3.1 检测波长的确定 样品中存在有环烯醚萜苷、碳黄酮苷、山酮苷类成分,紫外光谱表明其在 240 nm 或 260 nm 左右有吸收峰。分别比较了 5种苷在 240、260 nm 处响应值,除了异荛草苷具有相近的响应外,其余 4种苷在 240 nm 处有更好的响应。故选择 240 nm 为测定波长,同时测定 5种苷的含量。

3.3.2 线性范围及检出限 在本实验条件下,(1)、(2)、(3)、(4)、(5) 5种苷性成分单标浓度分别在 7.4~740、14.7~590、5.25~525、4.25~343、1.07~171 mg/L 范围内,检测器响应值(Y)与浓度(X)呈线性关系。5种对照品的标准溶液稀释到各自的测量下限浓度时,测其峰高响应值及基线噪音强度,以 2倍信噪比计算得到在上述液相色谱条件下进样 10 μ L 时,(1)、(2)、(3)、(4)、(5)的检出限度分别为 0.74、5.90、0.53、0.43、1.70 mg/L。将同一种样品溶液进样 10 μ L,连续进样 5次,测定各峰面积,计算 5种苷的测定精密度。线性关系、精密度结果见表 2。

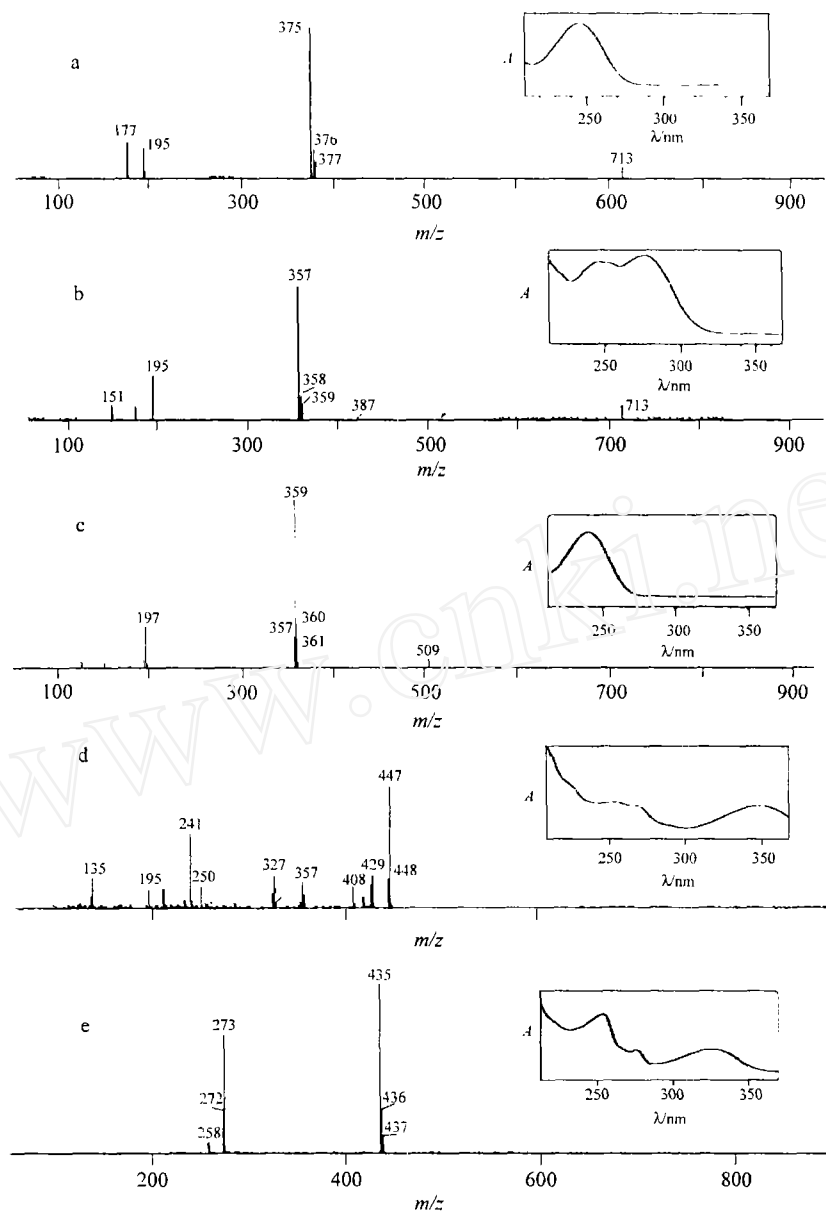


图 2 代表化合物的质谱和光谱图

Fig 2 Mass spectra and ultraviolet (UV) spectra of the compounds

a 獐牙菜苦苷 (swertiamarin); b 龙胆苦苷 (gentiopicoside); c 獐牙菜苷 (sweroside); d 异红草苷 (isoorientin); e 獐牙菜山酮苷 (swertianolin)。

3.3.3 回收率及含量测定 峰面积外标法定量。向已知 5 种苷含量的总苷提取物中加入一定量的混合标准品,按供试品溶液的制备方法制备,分别进样 10 μL,同时取相应浓度的对照品溶液 10 μL,按外标法测定其含量并计算,得到有关数据见表 3。

表 2 线性关系和精密度 (n = 5)

Table 2 Linearity and precision (n = 5)

成分 Component	线性关系 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	RSD (%)
1	$Y = 3 \times 10^7 X + 2.968 \times 10^5$	0.9996	1.29
2	$Y = 4 \times 10^6 X + 6.598 \times 10^4$	0.9981	3.40
3	$Y = 4 \times 10^7 X - 3.818 \times 10^5$	0.9975	1.69
4	$Y = 9 \times 10^7 X - 5.054 \times 10^4$	0.9999	3.51
5	$Y = 2 \times 10^7 X - 2.289 \times 10^5$	0.9979	2.55

成分 1~5 同图 1 (component 1~5 as the same as in Fig 1)

表 3 总苷提取物中 5 种苷性成分的含量及其标准加入回收率

Table 3 Content and recovery test of the five glycosides in the extract

成分 Component	含量 Content (%, n = 5)	原始量 Basic (mg)	加入量 Added (mg)	测得值 Found (mg)	回收率 Recovery (%, n = 3)
1	21.33	2.68	2.96	5.69	98.3
2	2.21	0.28	0.30	0.60	106.7
3	1.78	0.24	0.26	0.48	92.3
4	2.06	0.26	0.17	0.41	88.2
5	14.61	1.84	1.50	3.43	107.3

成分 1~5 同图 1 (component 1~5 as the same as in Fig 1)

References

- 1 Northwest Institute of Plateau Biology. *Chinese Academy of Sciences Tibetan Medicine Glossary (藏药志)*. Xining (西宁): Qinghai People's Publishing House (青海人民出版社), 1991
- 2 Wang Jiannong (王建农), Hou Cuiying (侯翠英). *Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药)*, 1994, 25(8): 401~403
- 3 Ding Jingye (丁经业), Fan Shufen (樊淑芬), Hu Bolin (胡伯林). *Acta Biologica Plateau Sinica (高原生物学集刊)*, 1988, 30(40): 414~419
- 4 Ding Jingye (丁经业), Fan Shufen (樊淑芬), Hu Boli (胡伯林). *Acta Biologica Plateau Sinica (高原生物学集刊)*, 1982, 1: 267~269
- 5 Hostetmann K, Wagner H. *Phytochemistry*, 1977, 16: 481
- 6 Liu Haiqing (刘海青), Liu Yarong (刘亚蓉). *Chinese Traditional and Herbal Drugs (中草药)*, 1996, 27(2): 112
- 7 Wang Yun (王芸), Yang Junshan (杨峻山). *Research and Development of Nature Products (天然产物与开发)*, 1992, 4(1): 99~113
- 8 Lattimer R P, Harris R E. *Mass Spectrometry Reviews*, 1985, 4: 369~390
- 9 Niessen W M N. *J. Chromatogr A*, 1998, 794: 407~435
- 10 Kurthostetmann, Bruno Doman. *J. Chromatogr*, 1984, 283: 137~147
- 11 Miyakawa Tatsuharu (宫川辰治), Osnima Toshiyuki (大岛峻幸). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (药物分析杂志)*, 1997, 17(4): 241~244
- 12 Gao G Y, Li M, Feng Y X. *Acta Pharm. Sinica*, 1994, 29(12): 910~914

Analysis of Five Glycosides in Swertia Franchetiana H. Smith Extracts by High Performance Liquid Chromatography and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry

Tian Wei^{1,2}, Zhang Dahua³, Cheng Xingguo³, Li Yulin⁴, Chen Liren^{*1}, Li Yongmin¹

¹ (Lanzhou Institute of Chemistry Physics Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000)

² (Gansu Institute of Drug Control, Lanzhou 730030)

³ (PetroChina Company Limited Lubricant Company, Lanzhou 730060)

⁴ (Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001)

Abstract A rapid method was first applied to analyze the extract of the *Swertia franchetiana* H. Smith with high performance liquid chromatography-atmospheric pressure (LC-APC/MS) and ultraviolet (UV) spectrometry. Five glycosides were well separated on an ODS column (4.6 mm i.d. × 200 mm, 5 μm) with mixtures of methanol and water as mobile phase. The recoveries of (1) swertiamarin (2) gentiopicroside (3) sweroside (4) isoorientin and (5) swertianolin fortified in the ranges of 7.4~740; 14~590; 5.2~525; 4.2~343; and 1.0~171 mg/L were 98.3%, 106.7%, 92.3%, 88.2% and 107.3%, respectively. It is suitable for the quality control of the extract from *swertia franchetiana* H. Smith.

Keywords Liquid chromatography-mass spectrometry, glycosides, extract of *swertia franchetiana* H. Smith

(Received 20 August 2004; accepted 10 February 2005)