

# LC-TOF 联用对中药成分分析、提纯和验证

朱辉, 黄保

(广州禾信仪器股份有限公司, 广东 广州 510530)

**摘要:** LC-TOF 联用对中药成分分析、提纯和验证, 结果表明: 混标溶液在 LC-UV 上能得到分离, 但是中药材原液在 LC-UV 上部分组分得不到分离, 使用 LC-TOF 连用, 能分好的分离中药原液, 并能得到一些 UV 上分离不到分峰。

**关键词:** 中药; 质谱

利用中药中已知成分的标品配制成混标(没食子酸、蒽薹苷、槲皮苷、槲皮素、乔松苷、PGHG 和 Thonningianin A), 通过混标对色谱条件和质谱条件进行优化, 使 UV 和 TOF 的分离度和灵敏度都能达到最优条件。

利用优化好的色谱条件和质谱条件, 对前处理过中药样品进行成分分析。

通过 VICI 八通切换阀对中药样品中的 PGHG 和 Thonningianin A 成分进行收集, 并通过再次过色谱柱验证分析。

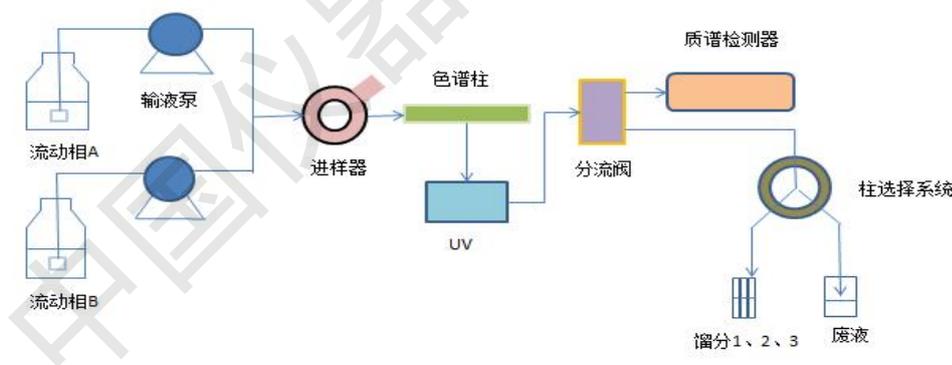


图 1 液相色谱与 TOF 联用纯化系统结构图

## 1 测试条件

### 1.1 实验样品

采用的暨南大学药学院提供的混标和样品, 测试物信息如下所示: 混标: 由没食子酸、蒽薹苷、槲皮苷、槲皮素、乔松苷、PGHG 和 Thonningianin A 七种标物用 80% 甲醇水溶解混合而成, 各自浓度都为 30ug/mL。

样品: 云南 GHC, 经过加热处理, 用 60% 甲醇水溶解。

表 1 标品内含测试物信息

序号	样品	分子式	分子量	检测离子(±)	特征峰(m/z)
1	没食子酸	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	170.0215	[M-H] <sup>-</sup> 、[M+HCOO] <sup>-</sup>	169.0137、215.0192
2	篇蓄苷	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>1</sub> 1	434.0849	[M-H] <sup>-</sup> 、[M+HCOO] <sup>-</sup>	433.0770、479.0825
3	槲皮苷	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>1</sub> 1	448.1005	[M-H] <sup>-</sup> 、[M+HCOO] <sup>-</sup>	447.0927、493.0982
4	槲皮素	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	302.0426	[M-H] <sup>-</sup> 、 [M+HCOO] <sup>-</sup> 、 [M+HCOOH+HCOO] <sup>-</sup>	301.0348、347.0403、 393.0457
5	乔松苷	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	418.1263	[M-H] <sup>-</sup> 、[M+HCOO] <sup>-</sup>	417.1185、463.1240
6	PGHG	C <sub>42</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> 1	872.1435	[M-H] <sup>-</sup>	871.1357
7	Thonningiani n A	C <sub>42</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub> 1	874.1592	[M-H] <sup>-</sup>	873.1513

备注：详细标品质谱信息见附录 1

## 1.2 实验仪器

ESI-TOF-9(L); 伍丰高效液相色谱仪 s-HPLC (EX1700);

经济型柱后分流器; 长沙 TDC 采集卡; 微量注射泵 (HARVARD Pump 11 Elite); VICI 切换阀

## 1.3 实验条件

### 1) 色谱条件

流动相: 乙腈 (A); 1%甲酸水 (B); 流速为: 2mL/min

梯度洗脱: (0—16min, 10—30%A; 16—30min, 30—90%A; 30—31min, 90—10%A; 31—35min, 10%A)

柱温: 常温; 检测波长: 260nm; 进样量: 20ul

色谱柱: Purospher®STARLP RP-18 endcapped(5um), Hibar® 250-4.6

### 2) 质谱条件

ESI: -3600V; 进样口温度: 240°C; 辅助气温度: 380°C

雾化气气压: 0.25MPa; 加热辅助气: 0.05MPa

分流阀分流比: 9:1

## 2 实验方法

### 2.1 混标和样品配制

30ug/mL 混标: 从单标没食子酸、蒽薹苷、槲皮苷、槲皮素、乔松苷、PGHG 和 Thonningianin A (浓度各为 0.4mg/mL) 各取 750ul 到 10mL 的容量瓶中, 用甲醇定容到刻度线即可。

### 2.2 具体操作方法

依次用 100uL 的平头进样针取 60uL 以上的混标 (30ug/mL) 和中药样品原液, 以手动进样阀 (定量环为 20ul) 进行进样, 流动相流速为 2mL/min 进行梯度洗脱, 通过色谱柱对各目标物和未知成分进行分离, 通过紫外检测器和 TOF 检测器进行检测分析, 并记录相关实验结果。

用 100uL 平头进样针取 60uL 以上的中药样品, 根据 TOF 中检测到的 PGHG 和 Thonningianin A 提供的保留时间, 利用两者之间保留时间的差异通过 VICI 切换阀对这两个成分进行收集, 对收集成分再次通过过柱验证。

## 3 实验结果

### 3.1 30ug/mL 混标溶液在紫外检测器和 TOF 上的实验数据

20ul 的混标原液通过色谱柱分离后直接进紫外检测器进行检测, 其结果见图 2。结合同步通过 TOF 检测的各目标离子 MIC 色谱图结果, 见图 3, 可以确定混标中 7 个目标峰 (没食子酸、蒽薹苷、槲皮苷、槲皮素、乔松苷、PGHG 和 Thonningianin A), 在 UV 和 TOF 中的保留时间以及特征离子峰, 见表二。根据色谱柱分离度  $R=2(TR_2-TR_1)/(W_1+W_2)$  公式 (其中  $TR_1$  和  $TR_2$  分别为相邻两峰中前后色谱峰的保留时间,  $W_1$  和  $W_2$  分别为相邻两峰的峰高 10% 处的峰底宽), PGHG 和 Thonningianin A 目标峰在 TOF 上的分离度  $R$  为 1.18 ( $TR_2-TR_1=42.6s$ ;  $W_1+W_2=36s$ ), 已超过分离度  $R=1$  时两峰分开达 98% 的情况。

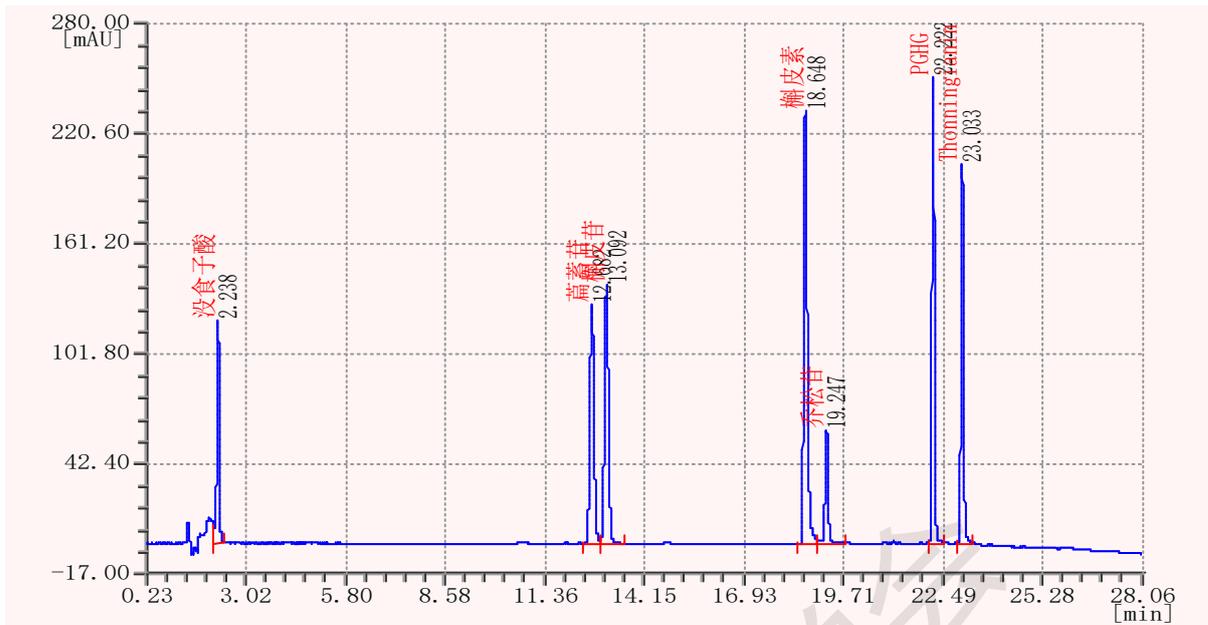


图2 混标原液在 UV 上色谱图

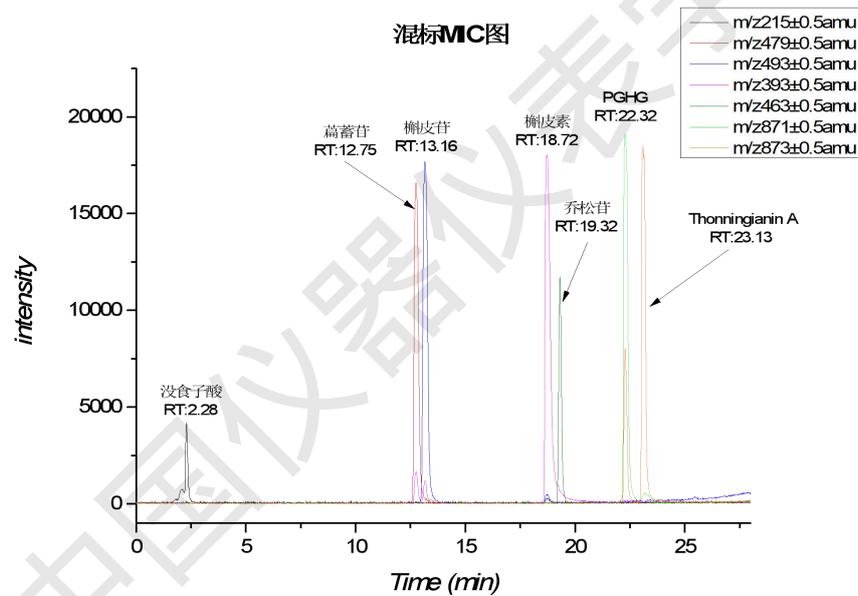


图3 混标原液提取离子色谱图

表2 各目标物负离子模式下特征离子峰以及 TOF 和 UV 保留时间

序号	目标物	TOF 特征离子	保留时间 (min)	
			TOF	UV
1	没食子酸	[M-H] <sup>-</sup> : 169; [M+HCOO] <sup>-</sup> : 215	2.28	2.24
2	芍药苷	[M-H] <sup>-</sup> : 433; [M+HCOO] <sup>-</sup> : 479; 碎片: 300、393	12.75	12.68
3	槲皮苷	[M-H] <sup>-</sup> : 447; [M+HCOO] <sup>-</sup> : 493; 碎片: 300、	13.16	13.09

4	槲皮素	[M-H] <sup>-</sup> : 301; [M+HCOO] <sup>-</sup> : 347; [M+2HCOOH-H] <sup>-</sup> : 393; 碎片: 169、179	18.72	18.65
5	乔松苷	[M+HCOO] <sup>-</sup> : 463; 碎片: 393、301、255	19.32	19.25
6	PGHG	[M-H] <sup>-</sup> : 871; 络合物: 939	22.32	22.22
7	Thoningianin A	[M-H] <sup>-</sup> : 873; [M+HCOO] <sup>-</sup> : 919; 络合物: 941	23.13	23.03

备注 主要特征离子峰为[M-H]<sup>-</sup>和与流动相中甲酸络合形成的[M+HCOO]<sup>-</sup>或[M+2HCOOH-H]<sup>-</sup>，还有一些碎片峰和未知络合物

### 3.2 中药样品在紫外检测器和 TOF 上的实验数据

20ul 的中药样品原液通过色谱柱分离后直接进紫外检测器进行检测,其结果见图 4 以及 TOF 检测的各目标离子 MIC 色谱图结果见图 5。根据 UV 和 TOF 结果可以得出中药样品中同时检出没食子酸、篇蓄苷、槲皮苷、PGHG 和 Thoningianin A 色谱峰已知成分,同时也有 10 个未知组分。除此之外在 TOF 上还有部分 UV 上未检测到的组分,见表三。中药样品中 PGHG 和 Thoningianin A 两个收集目标峰的分度度 R 为 1.26 (TR2-TR1=52s; W1+W2=41s),也已超过分度度 R=1 时两峰分开达 98%的情况,满足目标峰收集要求。

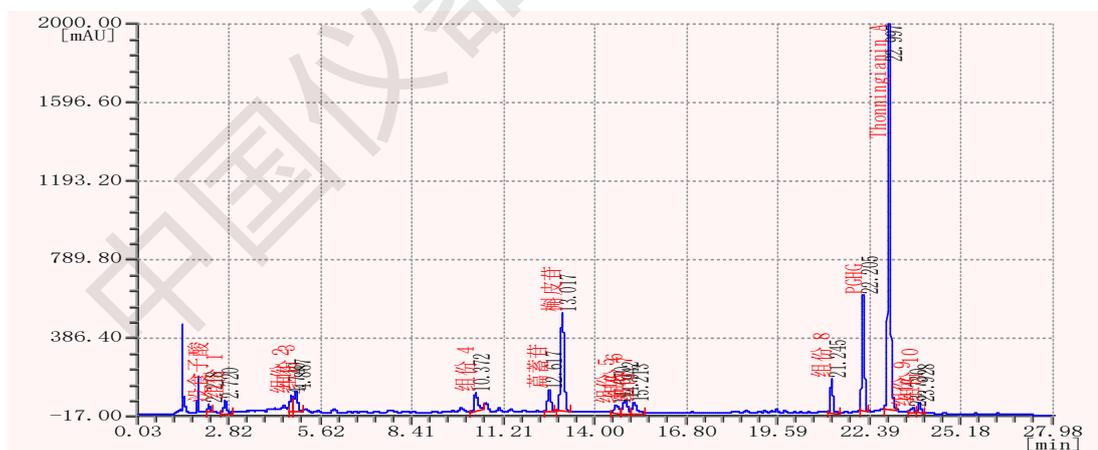


图 4 中药样品原液在 UV 上色谱图

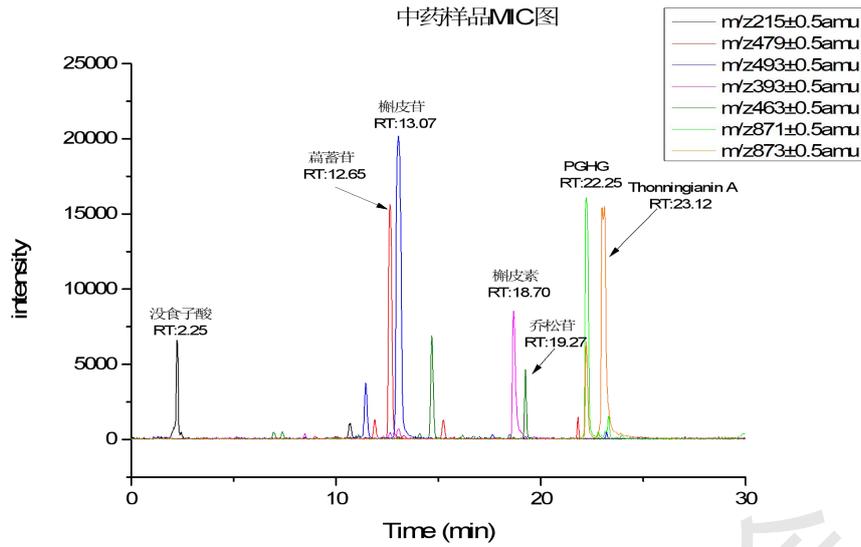


图 5 中药样品原液各目标物提取离子色谱图

表 3 样品组分 1 到组分 10 在 TOF 中的特征离子

序号	目标物	TOF 特征离子	保留时间 (min)	
			TOF	UV
1	组分 1	337.0743、669.1449、737.2038	2.78	2.72
2	组分 2	633.1776、651.1434、697.1620	4.78	4.74
3	组分 3	633.1230、651.1934、679.1416	4.90	4.89
4	组分 4	301.0476	10.40	10.37
5	组分 5	463.1712、481.2108、603.2072、881.3293、927.3265	14.70	14.67
6	组分 6	631.1534、677.2155、745.2162	15.02	14.94
7	组分 7	477.1534、603.2120	15.28	15.21
8	组分 8	571.2456、719.1717、765.2640	21.30	21.25
9	组分 9	311.1500、357.1428、861.3121、885.2706	23.83	23.73
10	组分 10	311.1194、357.1393、867.3367、887.2850	23.97	23.93
11	TOF 组分 1	289.1205、335.1325、607.1914、651.1876	5.20	/
12	TOF 组分 2	655.2598、683.1832、751.2232	6.07	/
13	TOF 组分 3	215.0488、335.1274、441.1645、487.1321、555.1707	10.73	/
14	TOF 组分 4	619.2124、665.2206	18.27	/

15	TOF 组分 5	257.1189、465.2218、691.2757、737.2371	19.60	/
16	TOF 组分 6	569.2354、615.2447、691.2682、737.2668	19.85	/
17	TOF 组分 7	465.2212、721.2878、767.2910	21.02	/

备注 黄色部分可能为未知峰的准分子离子【M-H】<sup>-</sup>，蓝色部分为其对应的络合物【M+HCOO】<sup>-</sup>。

### 3.3 中药样品中 PGHG 和 Thonningianin A 的收集和验证实验数据

根据中药样品中 PGHG 和 Thonningianin A 在 TOF 中保留时间设置 VICI 切换阀的时间，通过阀通道 6 收集 PGHG 组分和通道 7 收集 Thonningianin A，见图 6。PGHG 组分收集 24s，Thonningianin A 组分收集 30s。质谱软件开始采集时，同时手动点击启动阀“Start”按钮，保证两者的同步性。收集组分分别取 20uL 过色谱柱进行验证。PGHG 组分 TOF 结果见图 7，因样品中 Thonningianin A 浓度偏高，容易在手动进样系统或管路中残留（通过进甲醇验证），导致 PGHG 组分的 MIC 图中有 Thonningianin A 存在；Thonningianin A 组分 TOF 结果见图 8，收集组分中只有 Thonningianin A。从两者 TOF 结果和其 UV 检测结果（见图 9）证明 VICI 阀根据 TOF 保留时间设置时间程序已成功收集相应的目标组分，且目标组分没有其他组分干扰。



图 6 VICI 阀收集时间设置程序

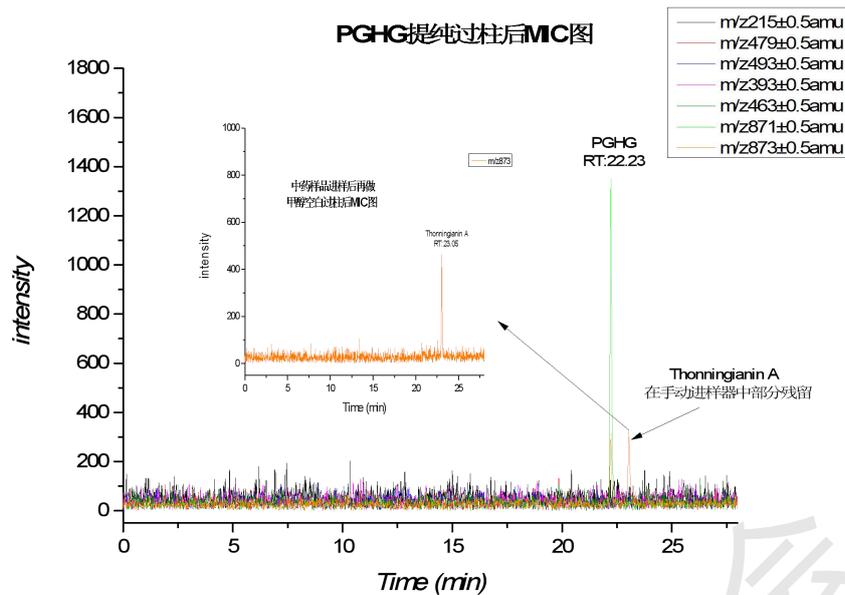


图7 PGHG 提纯过色谱柱的 MIC 图

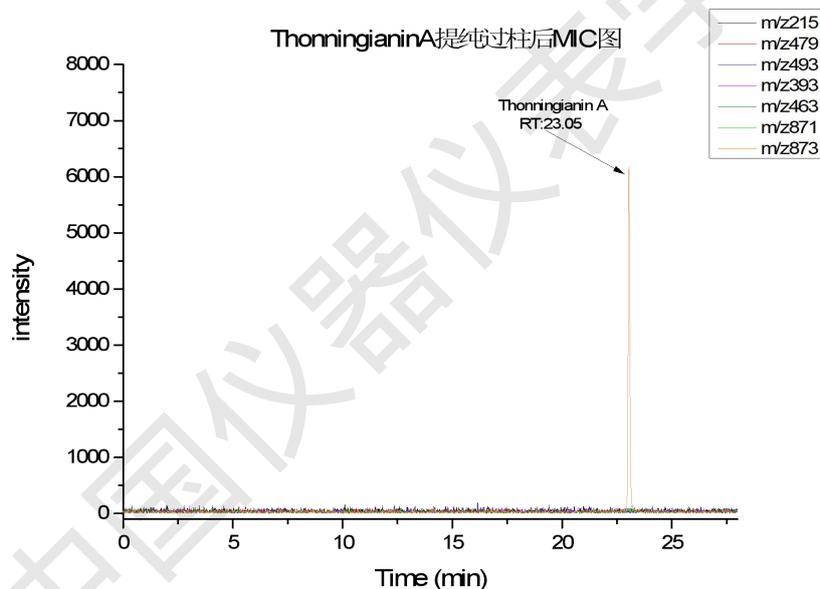


图8 Thonningianin A 提纯过色谱柱的 MIC 图

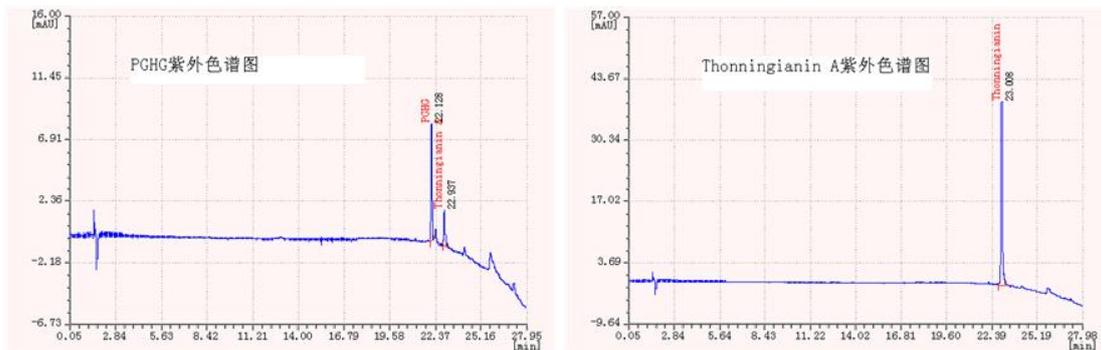


图9 PGHG 和 Thonningianin A 紫外色谱图

## 4 测试结论

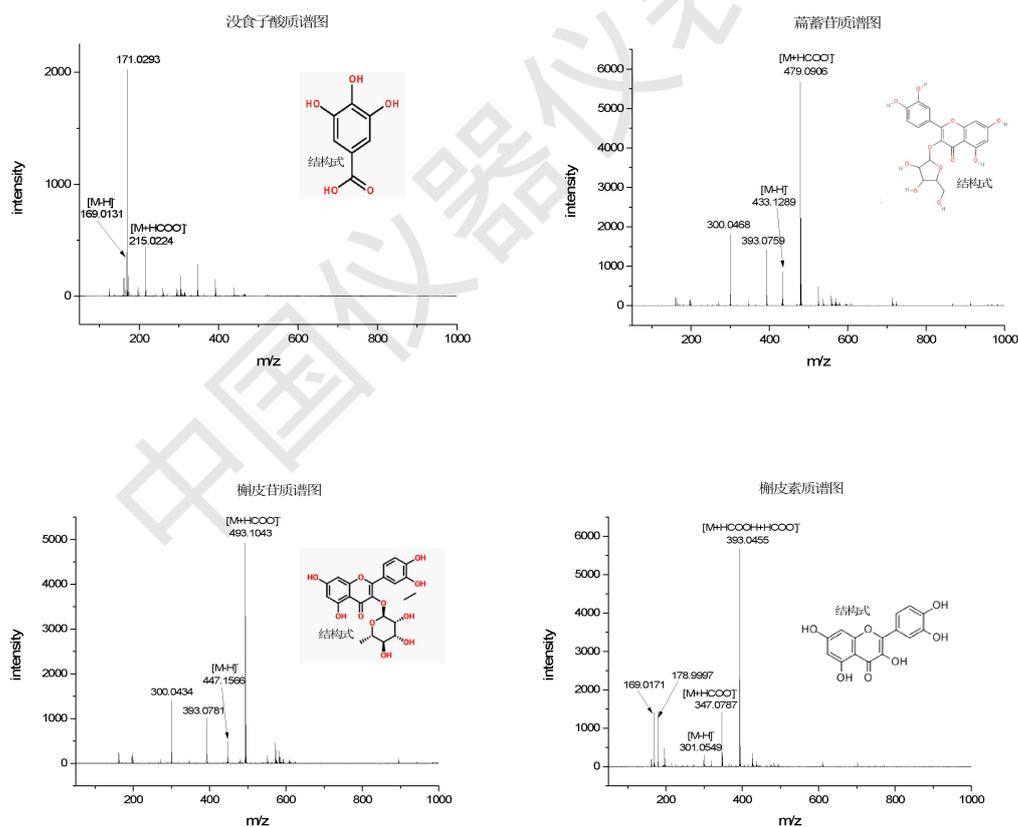
通过混标原液对色谱条件和质谱条件进行优化后，各混标中目标物在 UV 和 TOF 上都能完全检出，且待收集组分 PGHG 和 Thonningianin A 分离度 R 已超过 R=1 时两峰分开达 98% 的情况，满足中药样品中收集要求。

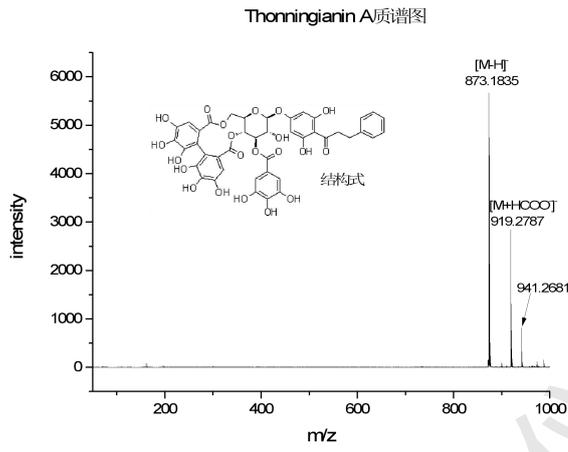
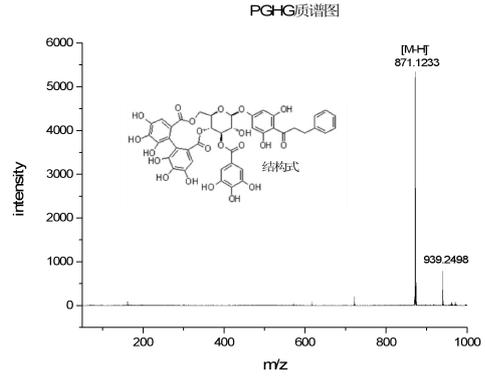
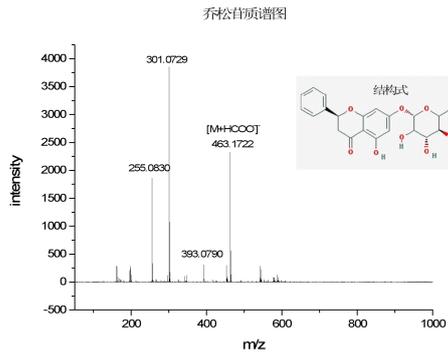
对中药样品进行过色谱柱进行分离分析，因样品中杂质成分干扰较大，个别目标峰（槲皮素和乔松苷）在 UV 上不能检出，但在 TOF 上则有明显的 MIC 目标峰。除此之外，在 TOF 上检测到一些 UV 上未检测到的物质。

根据 PGHG 和 Thonningianin A 组分收集过色谱柱检测结果可以证明目前 VICI 切换阀通过时间程序设置已成功收集相应的目标组分。

## 附录

### 1. 各目标物的质谱图





中国仪器仪表表学会