

质谱引导型制备液相色谱用于中药有效成分制备分离

LCMS-021

摘要：本文建立了一种使用岛津质谱引导型高效液相制备色谱用于中药有效成分制备分离的方法。中药成分复杂，有效成分通过制备液相手段可以得到有效纯化。实验采用反相液相色谱，使用 C18 色谱柱与 0.1% TFA 水溶液 - 乙腈条件，以质谱信号触发馏分收集，做到目标组分和杂质的准确分离。

关键词：高效液相色谱 质谱 中药有效成分 制备分离

高效液相色谱是实验室常用的分离分析手段，用于复杂样品中目标组分的分离和定量分析。按照样品分离的目的和规模区分，高效液相色谱分为分析型和制备型。制备型高效液相色谱仪同分析型工作原理相似，通过样品分子、流动相和固定相之间的相互作用使得目标组分得以分离，与分析型液相色谱不同的是其检测器末端通常会连接馏分收集器对目标组分予以收集。

紫外检测器以应用范围广泛成为高效液相色谱仪常用检测器，对于大多数化合物均有良好的响应，也是多数制备型高效液相色谱仪的标准配置。在高效液相色谱制备分离实际操作中，个别样品紫外信号响应弱时使用紫外信号作为触发机制会显著降低样品的回收率；基质复杂的样品里多个色谱峰中目标峰的定性确认需要大量的时间；含量微小的珍贵样品由于量少响应弱，很难从

在线检测的角度同杂质做以区分，可能需要多次富集后才能进行有效制备，以上种种都是紫外检测器对制备分离应用的制约。质谱检测器以进入质谱仪的样品离子为检测目标，不受化合物光谱学特性的影响，并且灵敏度高，为化合物的检测提供一种更为高效可靠的定量定性手段，可以大大提高制备分离的准确程度和效率，节省时间和溶剂消耗。

岛津质谱引导型高效液相制备色谱仪以 LC-20AP 系列液相色谱仪为基础，新一代单四极质谱 LCMS-2020 为质谱检测单元，提供紫外和质谱两种检测模式的多种触发方式，整合 CTC IFC-PAL 自动进样 - 馏分收集器，实现快速高通量进样和收集行为，为研究院所和相关企业提供一种高效、灵敏、方便、可靠的高效液相制备分离手段。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津制备型高效液相色谱质谱联用仪。具体配置为 LC-20AP×2（输液泵，梯度洗脱用），LC-20AD（输液泵，质谱进样补偿用），DGU-20A5（在线脱气机），CTC IFC-PAL（自动进样 - 馏分收集器），SPD-20A（紫外检测器），APV（主动式比例分流阀），LCMS-2020（单四极杆质谱仪），CBM-20A（系统控制器），LabSolutions Ver. 5.3（色谱工作站）。



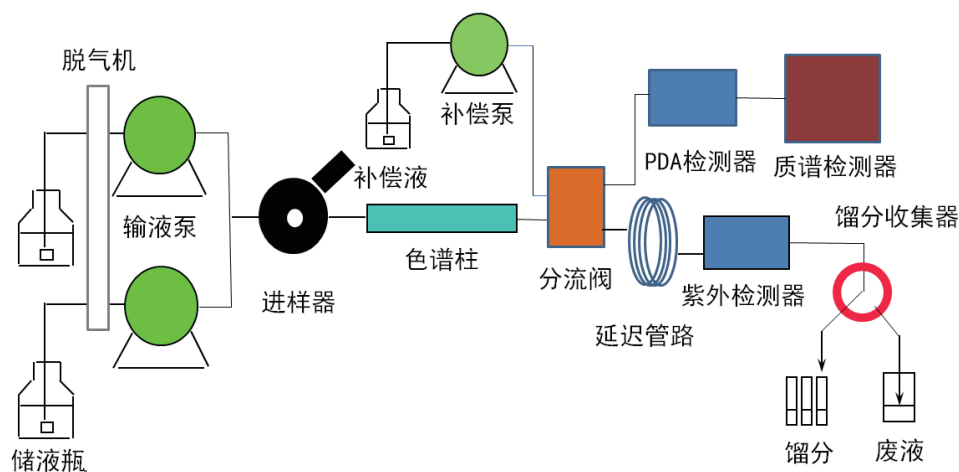


图 1 岛津高通量制备型高效液相质谱联用仪实物图及流路图

1.2 分析条件

液相条件 色谱柱: Shim-pack PRC-ODS(H) 20 mm I.D × 250 mm L, 5 μm

流动相: A相 -0.1% TFA 水溶液

B相 - 乙腈

洗脱方式: 等度洗脱

流速: 10 mL/min

检测波长: 220 nm

进样体积: 500 μL

质谱参数

质谱仪: LCMS-2020

离子源: ESI(+)

扫描方式: SCAN (m/z 100~1000)

加热模块温度: 400°C

脱溶剂管温度: 250°C

雾化气流速: 1.5 L/min

干燥气流速: 15 L/min

离子源接口电压: 4.5 kV

检测器电压: 1.2 kV

质谱监测类型: 质量数色谱图 (MC)

质谱监测离子: m/z 334.0; m/z 336.0

分流参数

分流比: 20000:1

收集参数

触发信号: MS

触发类型: 水平 (Level)

水平阈值: 3000 μV

收集体积: 8000 μL

MS延迟: 2400 μL

1.3 样品分离前准备情况

中药蛇床子的两种有效部位 A 和 B 的甲醇提取液, 浓度约为 30 mg/mL。制备分离前先做样品分析, 分取样品 A 和 B 以甲醇 - 水 (1/1, V/V) 稀释到约 1 mg/mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, LCMS 进样分析。

中药样品 LCMS 分析条件

仪器: LCMS-2020

色谱柱: Shim-pack XR-ODS 2 mm ID × 75 mm L,

2.2 μm

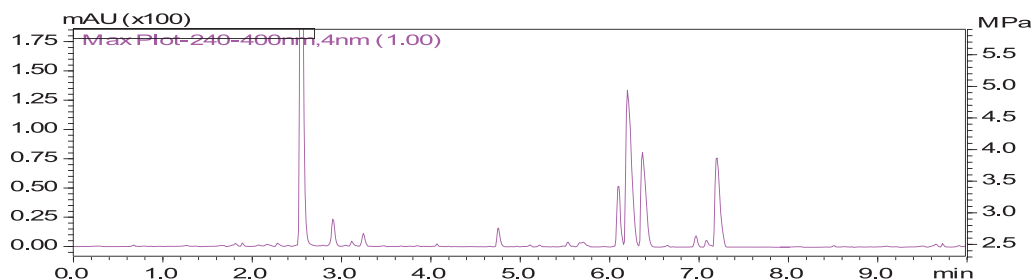
流动相: A相 -0.1% TFA 水溶液

B相 - 乙腈

流速: 0.9 mL/min

洗脱方式: 梯度洗脱

柱温: 40°C



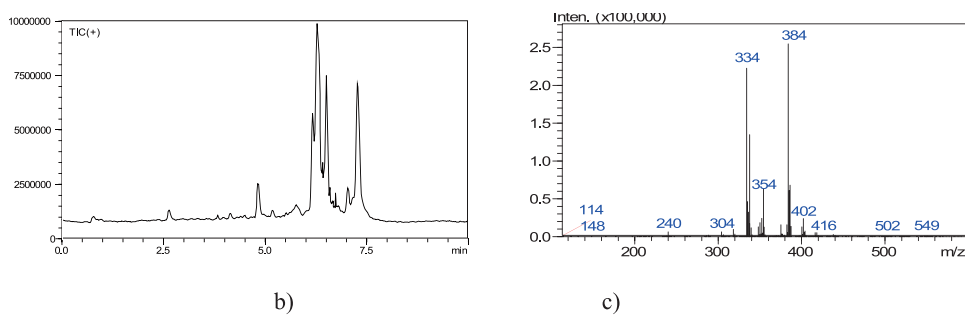


图 2 蛇床子中有效成分 A 的 LCMS 分析情况

a) 紫外色谱图 b) ESI(+)总离子流图 c) 质谱图 (6-6.5 min)

0 min(2%B)-8 min(25%B)-8.1 min(100%B)-9.5 min(100%B)-9.6 min(2%B)-11 min(stop)

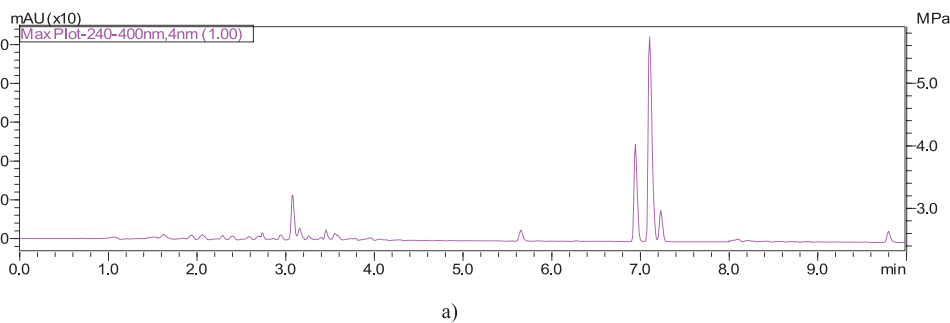


图 3 蛇床子中有效成分 B 的 LCMS 分析情况

a) 紫外色谱图 b) ESI(+)总离子流图 c) 质谱图 (7-7.5 min)

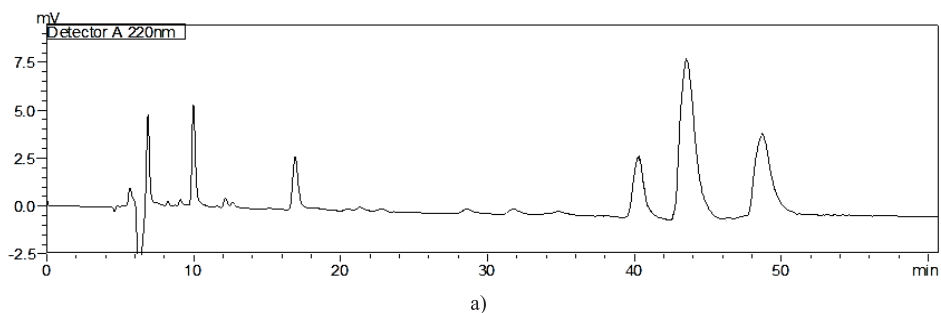
0 min(2%B)-8 min(25%B)-8.1 min(100%B)-9.5 min(100%B)-9.6 min(2%B)-11 min(stop)

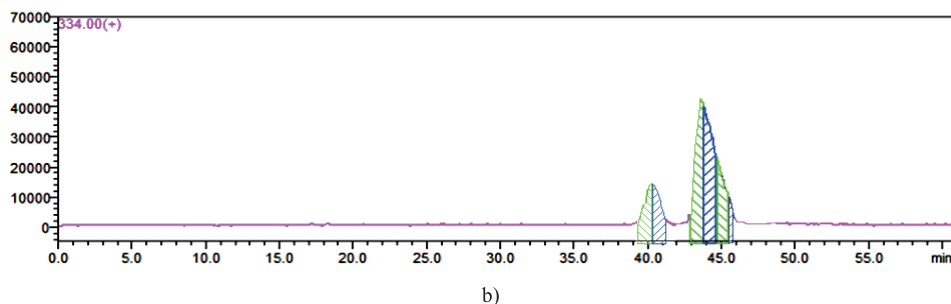
根据上述分析结果，得到待分离化合物的液相色谱保留特点和分子量信息，为制备方法的开发提供帮助。

结果与讨论

2.1 制备分离色谱图

分别将样品溶液经 0.22 μm 滤膜过滤后进入制备液质系统，制备分离色谱图如下所示：

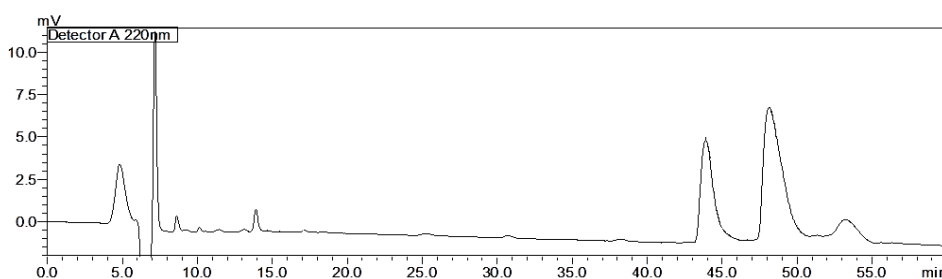




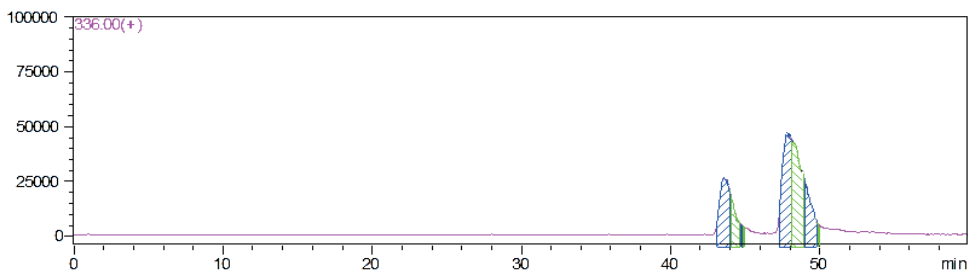
b)

图 4 有效成分 A 的制备分离色谱图

a) 紫外色谱图 b) 离子流图



a)



b)

图 5 有效成分 B 的制备分离色谱图

a) 紫外色谱图 b) 离子流图

结论

在制备分离工作进行前通过对待测样品的 LCMS 分析，确定该化合物的保留特性和分子量信息，对之后制备分离方法的开发提供指导作用。本例中，中药有效成分的成分复杂，LCMS 分析结果表明在目标峰位置有多个色谱峰，经过制备液质系统分离，分别得到两对异构体，并与 m/z 384 的共同杂质基线分离。相对于以紫外检测器引导的制备色谱而言，质谱引导的制备液相色谱在目标峰的辨识上更为精准，收集结果更准确。