

赤芍配方颗粒特征组分的鉴定研究

LCMS-QTOF-037

摘要： 本文采用岛津 2DLC+LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪对赤芍配方颗粒特征图谱中 2 号特征峰进行了高分辨质谱定性研究。基于正负离子模式下 MS^1 的准确分子量和同位素丰度比，采用 Labsolutions Insight Explore 软件对分子式进行预测。结合 Chemspider 数据库检索相关结构式信息、 MS^2 质谱图信息以及相关文献信息，推测 2 号特征峰为原花青素类化合物，最后采用标准品进行 1D 与 2D 保留时间及 MS^2 质谱确认，推测 2 号特征峰为原花青素 B1。

关键词： LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱 赤芍配方颗粒 特征组分 鉴定

赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根，其主要化学成分成分有单萜苷类、酚酸类、没食子酰葡萄糖类、挥发油类等。2021 年 4 月 29 日，国家药典委员会公布了《赤芍（芍药）配方颗粒》的国家标准，该标准中展示了赤芍配方颗粒的对照特征图谱并对主要特征峰进行了指认。前期在进行该品种特征图谱分析试验时，发现国家标准中 2 号特征峰与对照品参照物原儿茶醛色谱峰的保留时间及紫外吸收光谱不一致，疑似特征峰指认有误，详见应用报告《赤芍配方颗粒特征图谱分析及结果快速评价》。故本

实验拟对 2 号特征峰进行鉴定研究。

本文以赤芍配方颗粒特征图谱分析中的对照药材为例，采用岛津二维液相色谱 (2DLC) 串联四极杆飞行时间质谱仪 LCMS-9030 建立了赤芍配方颗粒中特征成分的质谱鉴定方法，一维液相条件同国家标准特征图谱项下，二维液相条件为自建方法，通过中心切割的方式将一维待测组分捕集后进入二维高分辨质谱分析，并对待测特征成分进行了详细的定性研究，为中药配方颗粒特征成分研究提供了思路，为赤芍中药配方颗粒特征图谱标准制定提供参考依据。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津二维液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪，具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-20AD × 2	检测器：	SPD-20A (1D)
	LC-20AD XR × 2		SPD-M30A (2D)
柱温箱：	CTO-20AC	质谱仪：	LCMS-9030
自动进样器：	SIL-20AC XR	切换阀：	FCV-12AH ₂
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.99		

1.2 分析条件

1D 液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm P/N: 227-30017-08, SGLC)

流动相：A: 0.05% 磷酸水溶液; B: 乙腈

流速：1 mL/min

柱温：30°C

进样体积：10 μL

检测波长：0-25 min 210 nm; 25-60 min 230 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

2D 液相色谱条件

色 谱 柱 : Shim-pack GIST C18 色谱柱 (100 mm× 2.1 mm I.D., 2 μm
P/N: 227-30001-04, SGLC)

流 动 相 : A: 水; B: 乙腈

流 速 : 0.4 mL/min

柱 温 : 30°C

检 测 波 长 : 210 nm

定量环体积 : 50 μL

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 0%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
18.00	Column	CTO.RVR	0
20.10	Column	CTO.RVR	1
25.00	Pumps	Pump B Conc.	0
25.00	Pumps	Pump B Conc3.	15
25.00	Detector	Wavelength Ch1	230
34.00	Pumps	Pump B Conc3.	18
35.00	Pumps	Pump B Conc3.	20
40.00	Pumps	Pump B Conc.	20
44.00	Pumps	Pump B Conc3.	20
45.00	Pumps	Pump B Conc3.	45
50.00	Pumps	Pump B Conc.	90
55.00	Pumps	Pump B Conc.	90
55.00	Pumps	Pump B Conc3.	47
55.10	Pumps	Pump B Conc.	0
56.00	Pumps	Pump B Conc3.	5
60.00	Controller	Pump B Conc.	

注: “Pump B Conc3.” 表示 1D 有机相浓度, “Pump B Conc.” 表示 2D 有机相浓度, “0” 表示一维流路检测器出口进废液, “1” 表示一维流路检测器出口切换至定量环

LCMS-9030 质谱条件:

离 子 源 : ESI+, ESI-

接 口 电 压 : 4.5 kV, -3.5 kV

雾化气流速 : 3 L/min

加 热 气 流 速 : 10.0 L/min

D L 温 度 : 250°C

加 热 模 块 温 度 : 400°C

接 口 温 度 : 300°C

干 燥 气 流 速 : 10.0 L/min

碰 撞 气 : 氙气

扫 描 模 式 : MS & MS/MS (DDA)

1.3 样品前处理

取赤芍对照药材 0.4 g, 加水 50 mL, 加热回流提取 45 分钟, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加稀乙醇 25 mL, 超声处理 (功率 200 W, 频率 53 kHz) 30 分钟, 取出, 放冷滤过, 取续滤液即得。

■ 结果与讨论

2.1 赤芍配方颗粒特征图谱及待测特征成分二维液相色谱图

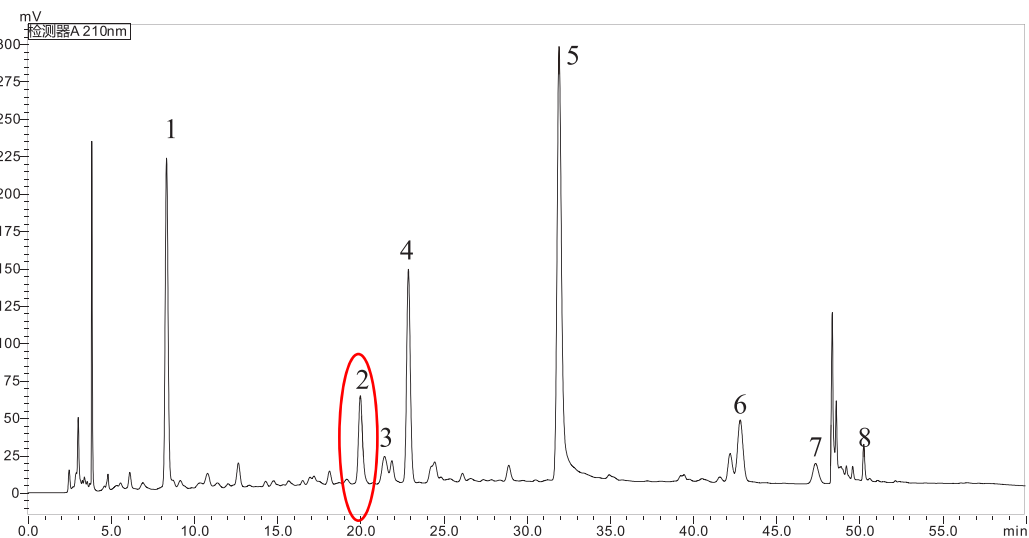


图 1 配方颗粒特征图谱 (1D)

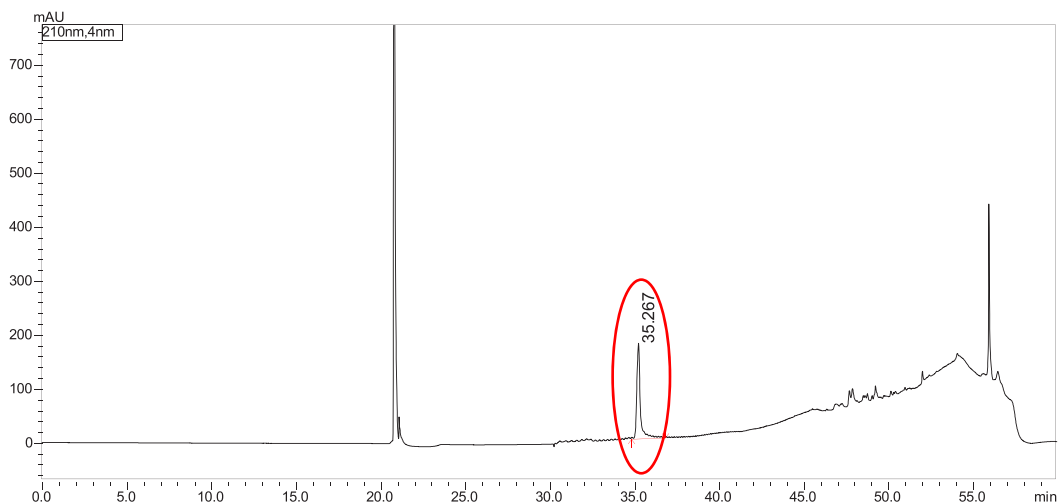


图 2 2号特征峰色谱图 (2D)

一维液相特征图谱中的 2 号特征峰切入至 50 μ L 定量环进行收集, 再由二维流动相进行洗脱, 该组分在二维液相上的保留时间为 35.267 min。

2.2 通过 MS¹ 质谱图确定干扰峰准确分子式

使用 LCMS-9030 对二维液相收集的组分分别进行正、负模式下 MS¹ 采集, 正离子模式下 MS¹ 检测到 m/z 579.14952 的较强信号, 负离子模式下 MS¹ 检测到 m/z 577.13505 的较强信号, 从 MS¹ 质谱图信息推测 2 号特征峰分子量可能为 578。

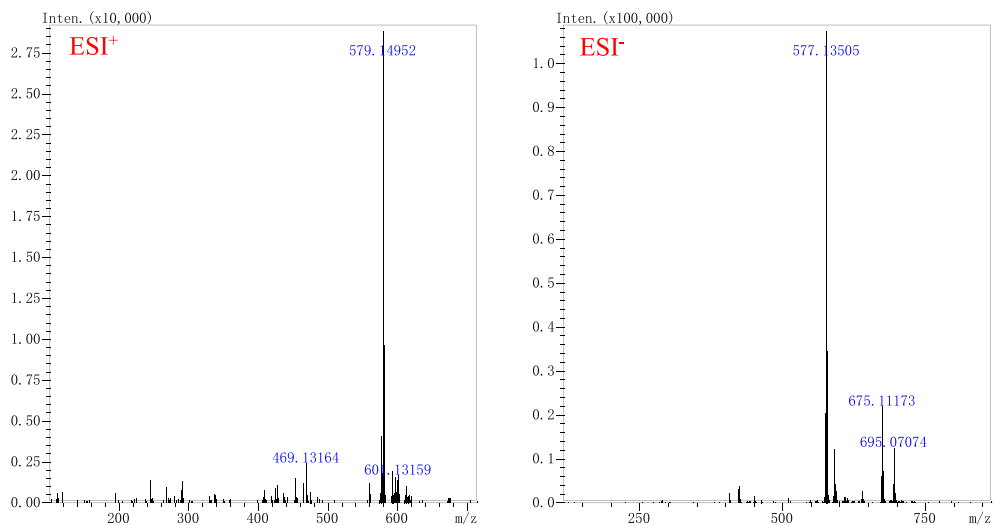
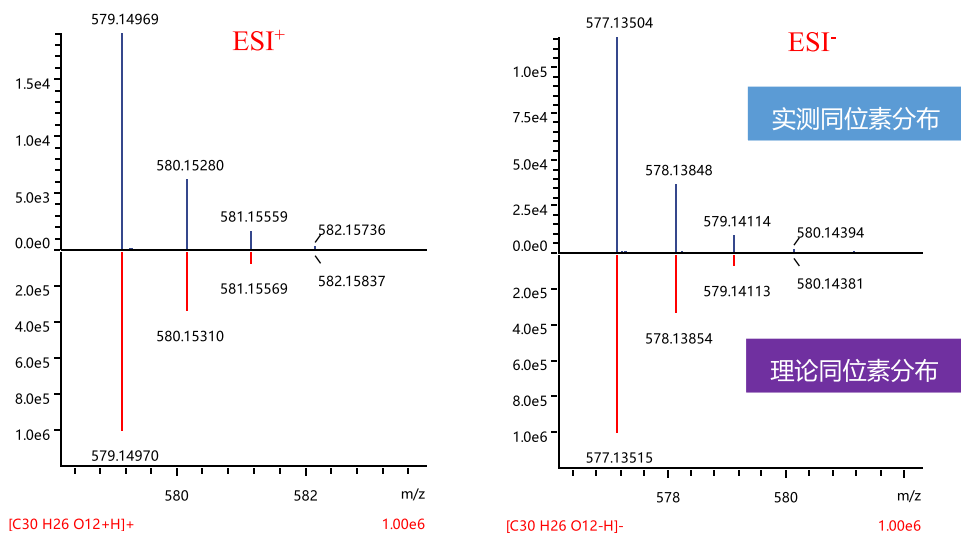


图3 2号特征峰 MS¹ 质谱图

基于准确分子量和同位素丰度比, 2号特征峰的 MS¹ 数据利用 Labsolutions Insight Explore 件中的 Calculate Formula 功能预测其可能的分子式。



#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score	DBE
1	99.74	578.14243	579.14970	579.14969	-0.01	C30 H26 O12	[M+H] ⁺	-0.017	99.72	18.0
2	92.98	556.16075	579.14997	579.14969	-0.28	C30 H20 N8 O4	[M+Na] ⁺	-0.483	92.42	25.0
3	72.90	556.15941	579.14863	579.14969	1.06	C29 H24 N4 O8	[M+Na] ⁺	1.830	70.95	20.0
4	67.15	561.11721	579.15104	579.14969	-1.35	C31 H19 N3 O8	[M+NH4] ⁺	-2.331	64.97	24.0
5	67.15	578.14376	579.15104	579.14969	-1.35	C31 H22 N4 O8	[M+H] ⁺	-2.331	64.97	23.0
6	66.78	578.14108	579.14835	579.14969	1.34	C27 H18 N10 O6	[M+H] ⁺	2.314	64.54	24.0

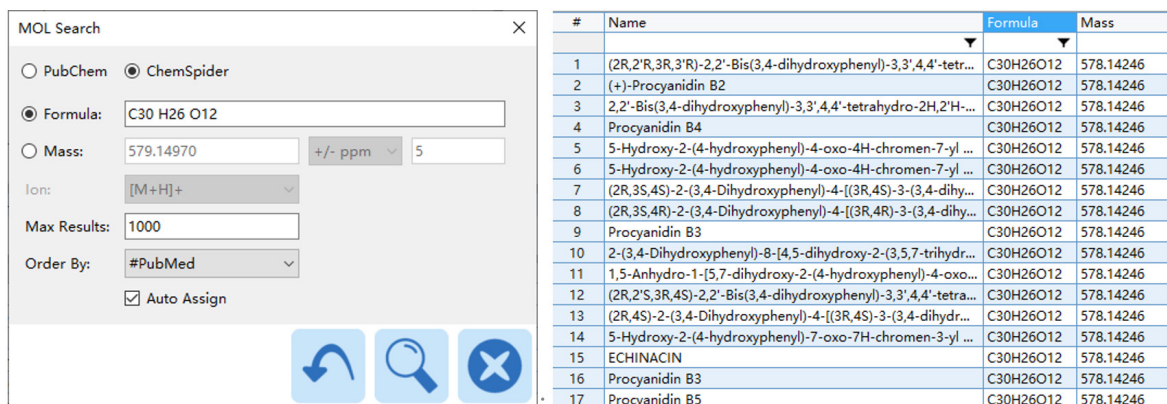
#	Score	Pred. (M)	Pred. m/z	Meas. m/z	Diff. (mDa)	Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	Iso Score	DBE
1	99.94	578.14243	577.13515	577.13504	-0.11	C30 H26 O12	[M-H] ⁻	-0.191	100.00	18.0
2	99.94	532.13695	577.13515	577.13504	-0.11	C29 H24 O10	[M+HCOO] ⁻	-0.191	100.00	18.0
3	99.94	518.12130	577.13515	577.13504	-0.11	C28 H22 O10	[M+CH3COO] ⁻	-0.191	100.00	18.0
4	66.29	578.14108	577.13380	577.13504	1.24	C27 H18 N10 O6	[M-H] ⁻	2.149	63.86	24.0
5	66.29	532.13560	577.13380	577.13504	1.24	C26 H16 N10 O4	[M+HCOO] ⁻	2.149	63.86	24.0
6	66.29	518.11995	577.13380	577.13504	1.24	C25 H14 N10 O4	[M+CH3COO] ⁻	2.149	63.86	24.0

图4 Insight Explore 分子式预测结果

结合正负模式下的预测结果，2号特征峰可能的分子式为 $C_{30}H_{26}O_{10}$ ， $[M+H]^+$ 与 $[M-H]^-$ 同理论质荷比误差分别为 0.01 mDa 和 -0.11 mDa，同位素分布匹配得分分别为 99.72 和 100。

2.3 MS² 结构式确认

Labsolutions Insight Explore 软件分析中的 Assign 功能可直接链接至 Chemspider 或 PubChem 公共数据库进行结构式搜库，勾选 Auto Assign 则可对 MS² 质谱图中碎片离子与可能的结构式进行自动匹配分析，为结构式的进一步确定提供依据。



#	Name	Formula	Mass
1	(2R,2'R,3R,3'R)-2,2'-Bis(3,4-dihydroxyphenyl)-3,3',4,4'-tetr...	C30H26O12	578.14246
2	(+)-Procyanidin B2	C30H26O12	578.14246
3	2,2'-Bis(3,4-dihydroxyphenyl)-3,3',4,4'-tetrahydro-2H,2'H-...	C30H26O12	578.14246
4	Procyanidin B4	C30H26O12	578.14246
5	5-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-7-yl ...	C30H26O12	578.14246
6	5-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-7-yl ...	C30H26O12	578.14246
7	(2R,3S,4S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-4-[(3R,4S)-3-(3,4-dihy...	C30H26O12	578.14246
8	(2R,3S,4R)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-4-[(3R,4R)-3-(3,4-dihy...	C30H26O12	578.14246
9	Procyanidin B3	C30H26O12	578.14246
10	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-8-[4,5-dihydroxy-2-(3,5,7-trihydr...	C30H26O12	578.14246
11	1,5-Anhydro-1-[5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo...	C30H26O12	578.14246
12	(2R,2'S,3R,4S)-2,2'-Bis(3,4-dihydroxyphenyl)-3,3',4,4'-tetra...	C30H26O12	578.14246
13	(2R,4S)-2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-4-[(3R,4S)-3-(3,4-dihydr...	C30H26O12	578.14246
14	5-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-oxo-7H-chromen-3-yl ...	C30H26O12	578.14246
15	ECHINACIN	C30H26O12	578.14246
16	Procyanidin B3	C30H26O12	578.14246
17	Procyanidin B5	C30H26O12	578.14246

图 5 Insight Explore 软件进行结构式搜库 (列举部分结果)

利用 Labsolutions Insight Explore 软件 Assign 功能下的 MOL Search 对分子式 $C_{30}H_{26}O_{10}$ 进行结构式搜索，共有 107 个同分异构体，大多为多酚或黄酮类物质。结合文献及二级质谱信息，推测 2 号峰可能为原花青素类化合物。原花青素属于多酚类物质，广泛存在于植物的皮、壳、籽中。

采用原花青素类标准品对 2 号峰进行进一步确认，推测 2 号峰为原花青素 B1，其一维与二维液相图谱以及 MS² 质谱信息如下所示：

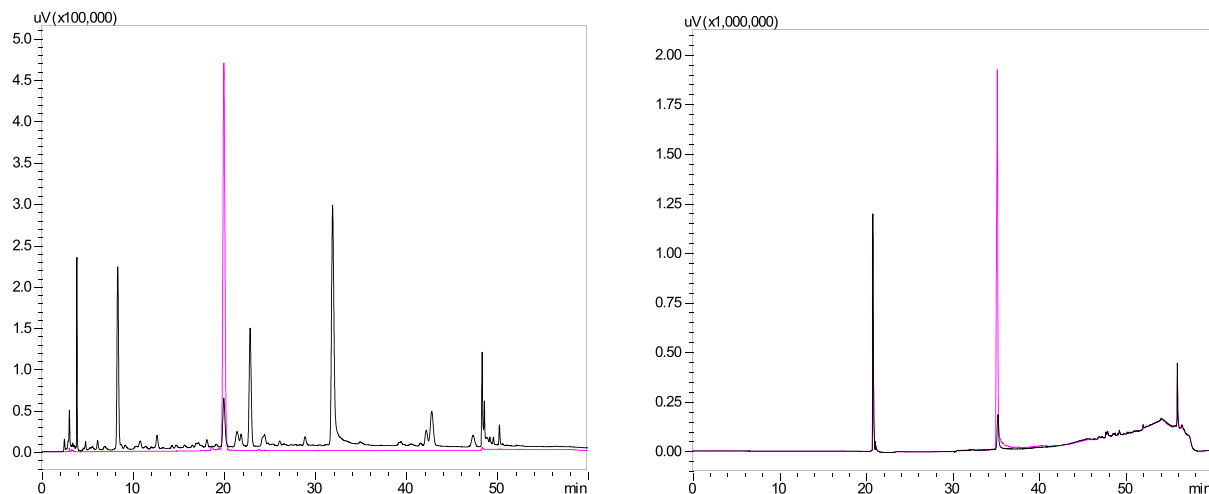


图 6 原花青素 B1 与赤芍对照药材特征图谱 2 号特征峰色谱对比图 (左: 1D, 右: 2D)

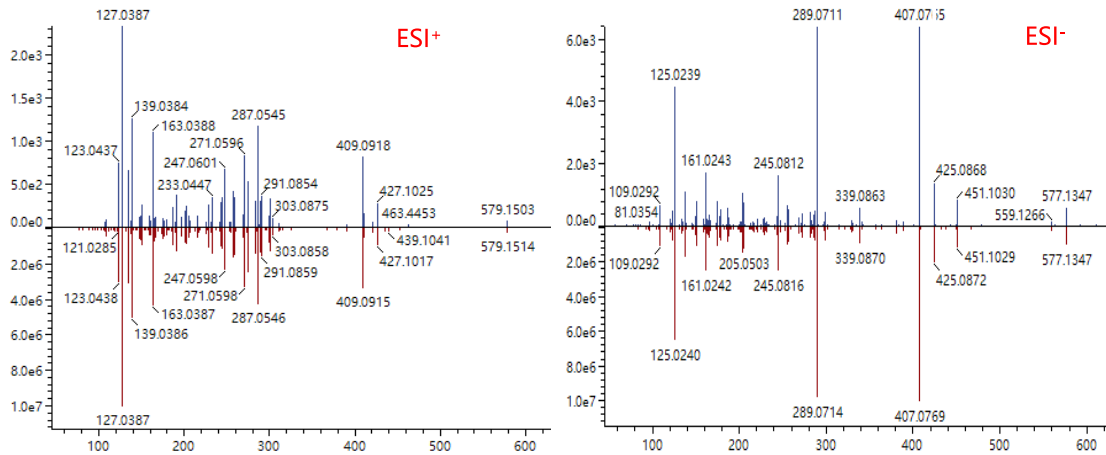


图7 原花青素 B1 与赤芍对照药材特征图谱 2 号特征峰 MS^2 对比图 (上: 实测图, 下: 标准品)

由上图可知, 赤芍对照特征图谱中 2 号特征峰与原花青素 B1 标准品在一维和二维液相上的保留时间一致, 且 MS^2 质谱图基本一致, 说明推测结果合理可靠。

■ 结论

本文采用岛津 2DLC+LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪对赤芍配方颗粒特征图谱中 2 号特征峰进行了高分辨质谱定性研究。经 MS^1 、 MS^2 质谱图信息、相关文献信息以及标准品确认, 最终鉴定 2 号特征峰为原花青素 B1。本研究为中药配方颗粒特征成分研究提供了思路, 为赤芍中药配方颗粒特征图谱标准制定提供参考依据。

岛津应用云

