

HPLC-TOF/MS 对肝力保胶囊化学成分的快速鉴别

李洋, 王慧, 吕磊, 陈俊, 周瑾, 黄玉凤, 周燕妮, 张国庆*

(上海东方肝胆外科医院, 上海 200438)

[摘要] 目的:运用高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱(HPLC-TOF/MS)联用技术快速鉴别肝力保胶囊中化学成分。方法:色谱分离采用SHISEIDO MG C₁₈色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 3 μm);流动相0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min, 5%~20% B; 10~30 min, 20%~70% B),柱温25℃,流速0.6 mL·min⁻¹,柱后分流比2:1。质谱定性采用飞行时间质谱,电喷雾离子源(ESI),正负离子模式扫描(*m/z* 100~1 000)。结果:一次性鉴别出肝力保胶囊中30种化学成分。结论:该研究比较全面地阐明了肝力保胶囊的化学组成,为该复方的药效学物质基础研究和质量控制奠定了基础。

[关键词] 肝力保胶囊; 化学成分; 鉴别; 飞行时间质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0070-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130070

Rapid Identification of Chemical Composition in Ganlibao Capsules by HPLC-TOF/MS LI Yang, WANG Hui, LYU Lei, CHEN Jun, ZHOU Jin, HUANG Yu-feng, ZHOU Yan-ni, ZHANG Guo-qing* (Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective:** To identify chemical composition in Ganlibao capsules by high-performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS) method. **Method:** The separation was performed on SHISEIDO MG C₁₈ reverse phase column (3.0 mm × 100 mm, 3 μm). The mobile phase consisted of water containing 0.1% formic acid (A) -acetonitrile (B) was used for gradient eluting (0-10 min, 5% -20% B; 10-30 min, 20% -70% B). Temperature of column was 25℃, the flow rate was 0.6 mL·min⁻¹ and post-column split ratio was 2:1. Time-of-flight mass spectrometer (TOF/MS) and electrospray ion source (ESI) were applied for qualitative analysis under positive and negative ion mode, and mass scan range was *m/z* 100-1 000. **Result:** The 30 components of Ganlibao capsules were identified by HPLC-TOF/MS. **Conclusion:** This method is simple and rapid for elucidating the constituents of Ganlibao capsules, which provides the basis for the research of active composition and quality control for this prescription.

[Key words] Ganlibao capsule; chemical composition; identification; TOF/MS

肝力保胶囊由茵陈、虎杖、茯苓、黄芪、苦参提取物精制而成,临床上用于各种急、慢性病毒肝炎的治疗,肝癌所致肝脾肿大、肝硬化腹水、肝昏迷等和经放、化疗所致白细胞减少的辅助治疗。本方兼有上海市传染病医院孟宪益中医治疗重症肝炎之“孟氏系列方”和上海中医药大学附属龙华医院王育群中医治疗肝病之“王氏系列方”的用药经验,结合第二军医大学东方肝胆外科医院临床应用中医药治疗肝病的实践,进行化裁组合,优选有效药物组方,该胶

囊在我院使用十余年,累计治疗病人达5万例,临床效果显著。

肝力保胶囊现有质量标准并不完善,目前仅对其组方中的1个成分进行含量测定,难以体现中药多成分多靶点的作用特点。因此笔者期望通过HPLC-TOF/MS技术对肝力保胶囊进行系统的化学物质基础研究,为其后续质量控制提供依据,同时也为明确其药效学物质基础提供前提条件。HPLC-TOF/MS技术将高效液相色谱和高分辨率的飞行时

[收稿日期] 20140819(002)

[第一作者] 李洋, 硕士, 药师, 从事天然药物化学与质量控制方面的研究, Tel: 021-81875579, E-mail: lml1987bbc@126.com

[通讯作者] * 张国庆, 教授, 主任药师, 从事中药复杂成分分析和系统药理学研究, Tel: 021-81875571, E-mail: guoqing_zhang91@126.com

间质谱结合,对中药复杂体系中化学成分的分析 and 鉴定非常有效^[1]。该技术先通过高效液相色谱对混合物中各化合物进行有效分离,然后通过质谱表征,可在短时间内获得化合物的准确相对分子质量,通过比对已建立的已知化学成分数据库对被测成分进行快速鉴别,与传统中药分离手段相比,具有显著优越性。本实验应用 HPLC-TOF/MS 技术快速鉴别出肝力保胶囊中 30 个化学成分,为肝力保胶囊的质量控制奠定了基础,并为其体内深入研究提供参考。

1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司配有在线脱气机,四元泵,自动进样器,柱温箱和二极管阵列检测器),6220 高分辨飞行时间质谱仪[配有标准电喷雾离子源(ESI),Masshunter Data Acquisition 在线工作站,Qualitative Analysis 离线分析软件,美国安捷伦公司],AE240 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),SB3200-T 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司,50 kHz,120 W)。肝力保胶囊(第二军医大学东方肝胆外科医院制剂室生产,0.3 g/粒,批号 20140301);乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,水为超纯水。

2 方法和结果

2.1 供试品溶液的制备 精密称取肝力保胶囊 3.00 g,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,密塞,称定质量,超声提取 1 h,放冷,再称定,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

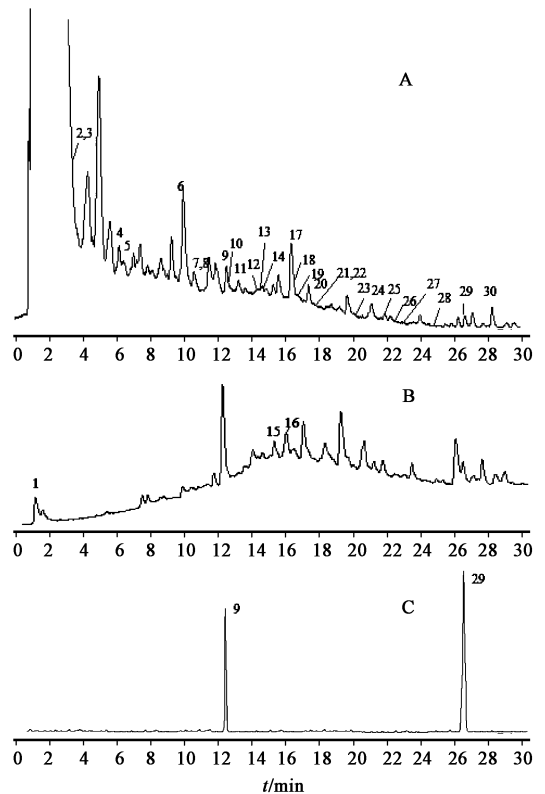
2.2 色谱条件 SHISEIDO MG C₁₈ 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 3 μm),流动相 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 20% B; 10 ~ 30 min, 20% ~ 70% B),进样量 5 μL,流速 0.6 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,柱后分流比 2:1。

2.3 质谱条件 采用 ESI 源,正、负离子模式均进行鉴别,雾化气高纯氮气。具体质谱参数为①正离子模式,毛细管电压 3 500 V,雾化器压力 40 psi,干燥器温度 350 °C,干燥气流速 10 L·min⁻¹,碎片电压 160 V,参比离子 *m/z* 121.050 873, 922.009 798;扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 000;②负离子模式,其他条件同正离子模式,参比离子 *m/z* 112.985 587, 1 033.988 109。测定样品之前,使用调谐液校准质量轴,以保证质量精度误差小于 1 ppm。

2.4 肝力保化学成分数据库的建立 根据国内外专业数据库中 中科院化学专业数据库, Pubmed, ChemSpider 等及其他相关研究文献^[2-8],收集了肝

力保胶囊各种化学成分名称及分子式共 140 个。采用安捷伦“formula-database generator”软件(含各元素精确质量数),根据各成分碳,氢,氧的个数,计算精确相对分子量,建立了包括化合物名称、分子式、相对分子质量、[M + H]⁺, [M + Na]⁺, [M - H]⁻, [M + HCOO]⁻, 准分子离子峰相对分子质量的相应的化学成分数据库。

2.5 肝力保胶囊总离子流图 根据 2.1 项下样品处理方法处理,并根据 2.2 和 2.3 项下色谱质谱条件进样,得肝力保胶囊溶液的总离子流图,见图 1 (批号 20140301)。

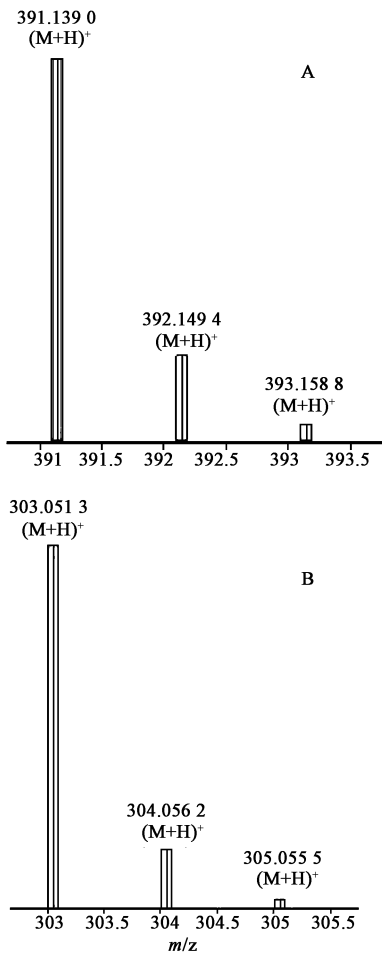


A. 正离子扫描; B. 负离子扫描; C. 对照品; 9. 白藜芦醇; 29. 大黄素
图 1 肝力保胶囊提取物 TOF-MS 总离子流

Fig. 1 Total ion current chromatography of Ganlibao capsules extracts

2.6 化合物鉴别 以 10 号峰 resveratrol-3-*O*-β-*D*-glucoside 为例,说明肝力保胶囊中色谱峰的鉴别过程。保留时间为 12.67 min,色谱图中的准分子离子为 391.139 0。利用 Qualitative Analysis 数据分析软件的计算工具(calculator)计算精确质量数的可能元素组成(误差 < 5 × 10⁻⁶),并比对数据库中已知化合物的质荷比,确定元素组成为 C₂₀H₂₂O₈。计算 C₂₀H₂₂O₈ 的同位素分布情况,与实际情况进行比对,同位素分布的理论值与实际值吻合良好,确定此峰

为 resveratrol-3-*O*- β -D-glucoside, 同理可得 20 号峰 quercetin 的解析过程, 见图 2。



A. resveratrol-3-*O*- β -D-glucoside; B. quercetin

图 2 10 号峰和 20 号峰的准确质量及同位素分布

Fig. 2 Accurate mass and isotopic distribution mass spectrogram of peak 10 and peak 20

2.7 肝力保胶囊中化学成分的鉴别结果 根据飞行时间质谱测得精确的相对分子质量, 比对所建数据库, 应用 Qualitative Analysis 质谱分析软件计算分子组成, 将理论值与实测值进行比对, 对肝力保胶囊正负离子模式下所得色谱图中色谱峰进行分析, 初步鉴别出 30 个化学成分, 其中正离子模式下为 27 个, 负离子模式下为 3 个, 结果见表 1。对于未区分的 3 对同分异构体 (峰 2 和 3, 峰 7 和 8, 峰 21 和 22), 后期可考虑调节碎片电压获得化合物的裂解规律进行区分。

3 讨论

3.1 提取方法的优化 考察了超声提取和水浴回流提取两种方法, 发现超声提取与水浴回流提取效果区别不大, 且前者更简单易操作。同时也优化了

相关参数包括提取溶剂, 提取时间和提取次数, 本实验考察甲醇, 50% 甲醇和 70% 乙醇 3 种溶剂, 最终选择甲醇为提取溶剂, 因其所得色谱图基线平稳, 且有最多峰数。为进一步考察提取时间和次数, 分别用甲醇提取 30 min, 1, 2 h (提取次数分别为 1 次, 2 次), 最终确定超声提取 1 次, 1 h 为最佳提取效果。

3.2 色谱质谱条件优化 对于色谱柱, 本实验考察了 SHISEIDO MG C₁₈ 柱 (3.0 mm × 100 mm, 3 μm), Agilent TC C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), Waters XTerra RP-18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 结果发现 SHISEIDO MG C₁₈ 柱 (3.0 mm × 100 mm, 3 μm) 可以得到最好的分离效果; 本实验还考察了乙腈-水和甲醇-水系统, 发现甲醇-水系统基线不稳定, 干扰较大, 而乙腈-水系统明显更优, 而加入 0.1% 甲酸可以改善色谱峰拖尾现象, 并提高质谱相应, 故最终采用乙腈-水 (含 0.1% 甲酸) 为流动相。由于肝力保胶囊含有多种化合物, 其响应模式各有不同, 因此选择正、负离子两种扫描模式进行考察, 但明显正离子模式下色谱峰容量大, 质谱响应更好。

肝力保胶囊中茵陈为君药, 以苦参、虎杖为臣药, 黄芪为佐, 茯苓为使药, 功效祛邪与扶正兼顾并重, 共奏清热解毒、利水渗湿、疏肝健脾、补肝益肾之功, 鉴别出的 30 个化合物中, 4 个归属于茵陈, 12 个归属于苦参, 3 个归属于虎杖, 8 个归属于黄芪, 3 个归属于茯苓。尽管肝力保胶囊组方各单药量相差不多, 但对于全方的化学贡献却明显不同, 从化合物归属来看, 来源于苦参和黄芪的生物碱和黄酮类成分对复方的贡献较大, 其中生物碱类成分为 8 个, 黄酮类成分为 12 个。茵陈, 虎杖和茯苓出峰相对较少, 虎杖中含量较高的白藜芦醇和大黄素能被很好的鉴别出来, 茵陈特征性化合物绿原酸因为误差较大, 不能够被确定。同时尚有部分化合物因含量较少没有被鉴定。从总离子流图谱上看, 响应较好的几个峰也没有得到鉴别, 推测可能由于复方制剂在特定的工艺条件下, 发生化学反应产生新物质, 有待于进一步研究。

本实验运用 HPLC-TOF/MS 技术快速鉴别出肝力保胶囊中 30 种化学成分, 表征了肝力保胶囊复方制剂的化学物质基础, 为其进一步的质量标准制定及体内的深入研究提供了前提条件, 同时, 肝力保胶囊成分复杂, 作者期待通过明确复方中各药材活性物质基础, 达到精简优化该方的目的。

表1 肝力保胶囊提取物中各化学成分的鉴别分析

Table 1 Qualitative analysis of chemical constituents in Ganlibao capsules

No.	t_R /min	化合物	分子式	M + X	理论相对分子 质量/ m/z	实际相对分子 质量/ m/z	误差	归属 药材
1	1.77	norkurarinol	C ₂₅ H ₃₀ O ₇	M - H	441.191 3	441.191 4	0.23	苦参
2	3.45	matrine	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	M + H	249.196 7	249.195 7	-4.01	苦参
3	3.45	isomatrine	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	M + H	249.196 7	249.195 7	-4.01	苦参
4	6.29	polyporenic acid C methyl ester	C ₃₂ H ₄₈ O ₄	M + H	497.363 1	497.365 3	-4.42	茯苓
5	6.35	9 α -hydroxysophocarpine N-oxide	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	M + H	279.170 9	279.171 7	-2.87	苦参
6	10.09	9 α -hydroxysophoramine	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂	M + H	261.160 3	261.159 5	3.06	苦参
7	10.43	mamanine	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	M + H	263.176 0	263.175 4	0	苦参
8	10.43	9 α -hydroxysophocarpine	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	M + H	263.176 0	263.175 4	0	苦参
9	12.53	revertrol	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	M + H	229.086 5	229.085 8	3.06	虎杖
10	12.67	resveratrol-3-O- β -D-glucoside	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	M + H	391.139 3	391.139 0	-0.77	虎杖
11	12.93	cerevisterol	C ₂₈ H ₄₆ O ₃	M + Na	453.334 5	453.334 9	-0.88	茯苓
12	14.30	7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavane-7-O- β -D-glucoside	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	M + Na	499.121 6	499.120 2	2.80	黄芪
13	14.38	vkushenol L	C ₂₅ H ₂₈ O ₇	M + Na	463.173 3	463.171 9	3.02	苦参
14	14.72	2'-hydroxy-3',4'-dimethoxyisoflavane-7-O- β -D-glucoside	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₂	M + Na	517.132 2	517.130 5	3.29	黄芪
15	15.15	cytisine	C ₁₁ H ₁₄ N ₂ O	M - H	189.102 8	189.101 9	4.76	苦参
16	16.30	vkushenol M	C ₃₀ H ₃₆ O ₇	M - H	507.238 3	507.238 5	0.39	苦参
17	16.60	(6aR,11aR)-3-hydroxy-9,10-dimethoxypterocarpan	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	M + H	301.107 6	301.106 9	2.32	黄芪
18	16.64	6,7-dimethoxycoumarin	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	M + H	207.065 7	207.064 9	3.86	茵陈
19	17.30	calycosin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	M + H	285.076 3	285.077 3	-3.51	黄芪
20	17.67	quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	M + H	303.050 5	303.051 3	-2.64	茵陈
21	17.68	astragaloside V	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₉	M + H	947.521 6	947.519 6	2.11	黄芪
22	17.68	astragaloside VI	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₉	M + H	947.521 6	947.519 6	2.11	黄芪
23	20.09	kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	M + H	287.055 6	287.054 9	2.44	茵陈
24	21.07	formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	M + H	269.081 4	269.080 5	3.34	黄芪
25	21.72	dehydroeburicoic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	M + H	455.352 5	455.353 4	-1.98	茯苓
26	22.65	6-demethoxy-4'-O-methylcapillarisin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	M + H	301.071 2	301.071 2	0	茵陈
27	22.80	daucoesterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	M + Na	599.428 8	599.429 6	-1.33	黄芪
28	24.98	vkushenol N	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	M + H	455.207 0	455.205 0	4.39	苦参
29	26.58	emodin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	M + H	271.060 6	271.058 6	3.69	虎杖
30	28.32	sophoranol N-oxide	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₃	M + H	281.186 5	281.184 8	2.49	苦参

注:误差 = (实际相对分子质量 - 理论相对分子质量) / 理论相对分子质量 $\times 10^6$ 。

【参考文献】

[1] Zhao L, Lou Z Y, Zhu Z Y, et al. Characterization of constituents in *Stellera chamaejasme* L. by rapid-resolution liquid chromatography-diode array detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(1):64-72.

[2] 苗抗立,张建中,董颖,等. 苦参的化学成分及药理的研究进展[J]. 天然产物与开发,2001,13(2):69-73.

[3] 仲兆金,许先栋. 茯苓三萜化学成分及其光谱特征研究进展[J]. 中国药物化学杂志,1997,7(1):71-78.

[4] 杨丹,程忠泉,刘玉清,等. 茯苓皮的化学成分研究[J]. 安徽农学通报,2010,16(19):45-46.

[5] 王志伟,谭晓杰,马婷婷,等. 茵陈化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(10):781-784.

[6] 肖凯,宣利江,徐亚明,等. 虎杖的化学成分研究[J]. 中国药学杂志,2003,38(1):12-14.

[7] 罗舟,苏明智,颜鸣,等. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 中草药,2012,43(3):458-462.

[8] 孙洁,张蕾,张晓拢,等. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 现代药物与临床,2013,28(2):138-143.

【责任编辑 顾雪竹】