

坤泰胶囊化学成分的 LC-ESI-MS/MS 分析

李定祥¹, 王珍², 罗建光², 张杰^{3*}

(1. 上海海天医药科技开发有限公司, 上海 200023; 2. 中国药科大学, 南京 210009; 3. 上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] **目的:**建立坤泰胶囊中化学成分的高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术(HPLC-ESI-MS/MS)并对其化学成分进行初步鉴定。**方法:**采用 LC-ESI-MS/MS 对坤泰胶囊进行成分分析与鉴定,选用 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30 °C。质谱使用电喷雾(ESI)离子源,正离子模式采集数据。质量扫描范围为 *m/z* 50 ~ 1 500。对各色谱峰质谱图进行分析,根据准分子离子峰判断相对分子质量,进一步根据各主要碎片离子、紫外光谱、保留时间等信息,与文献数据进行比较推测化合物的结构。**结果:**从坤泰胶囊中鉴定了 21 个化合物,主要为黄酮类化合物和生物碱类化合物,并对化合物的药材来源进行了归属。其中,主要有来自黄芩的黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素等,来自黄连的巴马汀、小檗碱、黄连碱、药根碱、非洲防己碱、木兰花碱等,来自白芍的芍药苷等。**结论:**采用 LC-ESI-MS/MS 能够对坤泰胶囊中主要成分进行快速分析与鉴定,为坤泰胶囊进一步开展指纹图谱、质量控制、药物代谢研究和谱效关系研究奠定了基础。

[关键词] 坤泰胶囊; 化学成分; 生物碱; 黄酮; 高效液相色谱-电喷雾质谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0090-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190090

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170629.0912.022.html>

[网络出版时间] 2017-06-29 9:12

Constituents Determination of Kuntai Capsule by LC-ESI-MS/MS

LI Ding-xiang¹, WANG Zhen², LUO Jian-guang², ZHANG Jie³

(1. Shanghai Haitian Medical Technology and Development Limited Company, Shanghai 200023, China;
2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;
3. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the chemical constituents of Kuntai capsule by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). **Method:** The chemical components were analyzed and identified by using LC-ESI-MS/MS. The liquid chromatography separation was carried out on C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.1% formic acid solution as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and column temperature was 30 °C. The mass spectra were obtained in positive ion mode with electrospray ionization. The mass range recorder was set between *m/z* 50-1 500. The molecular weight was determined according to the molecular ion peaks. The compound structures were elucidated by comparing the data with literature data, including main ion peaks, UV spectrum and HPLC retention time information. **Result:** The 21 compounds were identified from Kuntai capsule, mainly including flavones and alkaloids. The flavones, such as baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin, were identified from *Scutellaria baicalensis*. The alkaloids, such as palmatine, berberine, coptisine, jatrorrhizine,

[收稿日期] 20170321(015)

[基金项目] 贵州省科技计划项目(黔科合[2016]支撑 2821)

[第一作者] 李定祥,博士,从事中药新药的研究与开发, Tel:021-64755608-8063, E-mail:dingxiang_li@126.com

[通讯作者] *张杰,博士,副研究员,从事中药研究与开发, Tel:021-64222293, E-mail:guide.zhang@163.com

columbarine and magnoflorine, were identified from *Coptis chinensis*; paeoniflorin came from *Paeonia lactiflora*.

Conclusion: The method is simple and rapid for identifying the main constituents of Kuntai capsule. This paper has laid a foundation for further studying and testing the quality of Kuntai capsule.

[**Key words**] Kuntai capsule; chemical constituent; alkaloid; flavonoid; HPLC-ESI-MS

坤泰胶囊来源于医圣张仲景《伤寒论》收录经方“黄连阿胶汤”。黄连阿胶汤临床上广泛应用于治疗肾阴虚、心火旺,心肾不交之内、妇科疾病。坤泰胶囊是在此方基础上去鸡子黄,重用熟地黄,加茯苓,减少黄连用量,经近百名科研人员、专家共同研制而成的用于卵巢功能衰退围绝经期前后诸证的现代中药复方制剂。其组成药材有熟地黄、黄连、白芍、黄芩、阿胶和茯苓,具有滋阴清热、安神除烦等功效。临床上广泛应用于围绝经期综合征、卵巢早衰与原发性卵巢功能不全、月经不调和不孕症等^[1]。目前关于坤泰胶囊中的化学成分尚无系统的研究报告,仅有文献报道了用 HPLC 测定其中芍药苷、黄芩苷、盐酸小檗碱、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素 6 种成分的含量^[2-3]。目前坤泰胶囊质量标准中,以黄芩苷和盐酸小檗碱为指标性成分进行含量测定。但是单一成分不足以全面地反应复方中药的质量,而中药指纹图谱具有整体性、宏观性和模糊性,能够综合、全面地反映出中药产品的内在质量,可有效地对中药及其制剂进行整体质量控制。为了对坤泰胶囊指纹图谱进行研究,有必要对坤泰胶囊中主要成分进行定性分析,对其主要色谱峰进行归属。LC-MS 联用技术能有效地对中药复方成分进行分离,并对特定色谱峰进行定性鉴别,被广泛地应用于中药化学成分分析、中药质量控制研究和中药药代动力学研究等领域。本文创新性地应用 LC-ESI-MS/MS 对坤泰胶囊中主要色谱峰进行了定性鉴别,为坤泰胶囊质量标准的建立与完善和谱效关系的研究提供理论依据。

1 材料

1260 系列高效液相色谱仪(配多波长二极管阵列 DAD 检测器,美国 Agilent 公司),AmaZon SL 型离子阱电喷雾质谱仪(德国 Bruker 公司),KH-250DB 型超声仪(昆山禾创超声仪器有限公司),R210 型旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司)。

坤泰胶囊(批号 160710,贵阳新天药业股份有限公司生产),乙腈为色谱纯,甲醇、甲酸为分析纯,水为自制重蒸水。

2 方法与结果

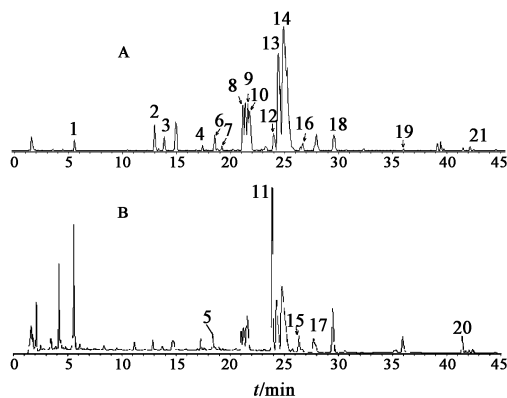
2.1 样品溶液的制备 取 10 粒坤泰胶囊(0.5 g/

粒),将内容物倒出,精密称定,置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入甲醇 20 mL。将锥形瓶置于超声仪中超声提取 60 min(25 ℃,220 W,70 kHz)。滤纸过滤得提取液,提取 3 次,合并 3 次的滤液,减压回收溶剂(50 ℃)得到流浸膏 3.5 g。用 70% 甲醇溶液溶解浸膏,定量转移到 250 mL 量瓶中,摇匀,定容,取上清液经微孔滤膜(0.45 μm)滤过后即得。

2.2 分析条件 色谱条件:Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,3.5 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 3 min,10% ~ 15% B;3 ~ 10 min,15% ~ 25% B;10 ~ 20 min,25% B;20 ~ 25 min,25% ~ 45% B;25 ~ 30 min,45% B;30 ~ 40 min,45% ~ 60% B;40 ~ 45 min,60% B),流速设定 1.0 mL · min⁻¹,柱温 30 ℃,进样量 10 μL。

质谱条件:电喷雾离子源,正负离子扫描模式。N₂ 流速 9 L · min⁻¹,雾化器 0.11 mPa,毛细管电压 4 000 V,扫描质量范围 *m/z* 50 ~ 1 500。

2.3 样品测定 本次研究中,在正负电喷雾电离模式下分别测定了坤泰胶囊样品的 HPLC-MS,经比对,正离子模式下可鉴定更多的成分,且负离子模式下检测的成分在正离子模式下均能被检出,因此选择正离子模式进行分析,易于鉴别。在本次试验过程中,液相色谱图中的各主要色谱峰,基本能在总离子流图(图 1)中观察到,两者图谱非常吻合,说明各主要成分在此分析条件下,能得到较好的检测与鉴定。



A. 正离子模式总离子流;B. HPLC 色谱(280 nm)

图 1 坤泰胶囊 LC-MS 总离子流和 HPLC

Fig. 1 Total ion chromatogram by LC-MS and HPLC spectrum of Kuntai capsule

在正离子模式下,准分子离子峰主要是 $[M + H]^+$,可初步推测出化合物的相对分子质量,根据坤泰胶囊组方中各中药文献报道化学成分信息,可进一步推测可能的化合物。在本次试验中,对准分子离子峰进一步进行了二级、三级质谱分析,获取各主要碎片离子信息,对主要碎片离子进行解析,并与

文献数据比较^[4-8],可进一步验证和推断出化合物的结构。此外,负离子模式下的质谱信息和各色谱峰紫外光谱信息也会在定性鉴别中辅助使用。结合所有信息,本次共鉴定和推测了坤泰胶囊中的 21 个化合物(表 1),其中 10 个来自黄芩,9 个来自黄连,1 个来自地黄,1 个来源于白芍。

表 1 坤泰胶囊中化合物 1~21 的质谱信息

Table 1 Mass information of compounds 1-21 in Kuntai capsule

No.	t_R / min	准分子离子 峰 $[M + H]^+$	碎片离子峰	分子式	鉴定化合物	来源
1	5.6	377.97	198.67, 152.68	$C_{16}H_{24}O_{10}$	8-表番木鳖酸 ^[4]	地黄
2	12.9	341.97	296.80, 264.70	$C_{20}H_{24}NO_4$	木兰花碱 ^[5,8]	黄连
3	13.9	480.97	196.7	$C_{23}H_{28}O_{11}$	芍药苷 ^[6]	白芍
4	17.4	548.97	512.92, 410.91, 392.88	$C_{26}H_{28}O_{13}$	白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷 ^[7]	黄芩
5	18.5	321.91	306.83	$C_{19}H_{16}NO_4^+$	格兰地新 ^[5]	黄连
6	18.5	548.97	530.97	$C_{26}H_{28}O_{13}$	白杨素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷 ^[7]	黄芩
7	19.3	351.93	336.89, 307.84	$C_{20}H_{18}NO_5^+$	8-氧化表小檗碱 ^[8]	黄连
8	21.3	337.94	322.89, 293.84	$C_{20}H_{20}NO_4^+$	药根碱 ^[5]	黄连
9	21.8	337.94	322.89	$C_{20}H_{20}NO_4^+$	非洲防己碱 ^[5]	黄连
10	21.9	319.86	291.83	$C_{19}H_{14}NO_4^+$	黄连碱 ^[5]	黄连
11	24.1	446.89	270.74	$C_{21}H_{18}O_{11}$	黄芩苷 ^[7]	黄芩
12	24.1	333.92	305.87	$C_{20}H_{16}NO_4^+$	甲基黄连碱 ^[5]	黄连
13	24.6	351.95	336.95, 307.91	$C_{21}H_{22}NO_4^+$	巴马汀 ^[5]	黄连
14	25.5	335.93	320.88, 291.88	$C_{20}H_{18}NO_4^+$	小檗碱 ^[5]	黄连
15	26.6	446.90	430.82, 270.76	$C_{21}H_{18}O_{11}$	norwogonin-7-O-glucuronide ^[7]	黄芩
16	26.8	446.89	270.74	$C_{21}H_{18}O_{11}$	5, 6, 7-三羟基-8-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷 ^[7]	黄芩
17	27.9	460.91	284.79	$C_{22}H_{20}O_{11}$	千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷 ^[7]	黄芩
18	29.7	460.90	284.79	$C_{22}H_{20}O_{11}$	汉黄芩苷 ^[7]	黄芩
19	36.1	270.78	252.76	$C_{15}H_{10}O_5$	黄芩素 ^[7]	黄芩
20	41.6	284.79	269.77	$C_{16}H_{12}O_5$	汉黄芩素 ^[7]	黄芩
21	42.2	374.92	359.88, 344.85	$C_{19}H_{18}O_8$	黄芩黄酮 II (skullcapflavone II) ^[7]	黄芩

3 分析与讨论

文献报道黄芩中主要成分是黄酮类化合物^[6]。黄酮类化合物的裂解规律已有较多文献报道,较为成熟,通常情况下为化合物脱去葡萄糖基(163),葡萄糖醛酸基(177),水(18)和甲基(15)而形成各主要碎片离子。本次试验中,化合物 4, 6, 11, 15~21 均显示出较强的 $[M + H]^+$ 准分子离子峰。化合物 4 和 6 在负离子模式下,也显示出较强的准分子离子峰 $547[M - H]^-$,从而推测化合物 4 和 6 相对分子质量为 548。在正离子模式下,化合物 4 和 6 主要碎片离子峰均为 m/z 531,为准分子离子 m/z 549 $[M + H]^+$ 脱去 1 分子水(18)而形成,结合参考文献信息,分别鉴定为白杨素-6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖

苷和白杨素-6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷。化合物 11, 15~18 为黄酮苷类化合物,其主要碎片离子峰均为脱去 177(葡萄糖醛酸基)而形成的碎片。以化合物 11 为例,其主要碎片离子 m/z 270,为准分子离子 m/z 447 $[M + H]^+$ 脱去葡萄糖醛酸基(177)而形成。化合物 11, 15 和 16 为同分异构体,根据参考文献出峰顺序分别鉴定为黄芩苷, norwogonin-7-O-glucuronide 和 5, 6, 7-三羟基-8-甲氧基黄酮-7-O-葡萄糖醛酸苷^[7]。黄酮类化合物如有甲氧基取代,则容易脱去甲基片段而得到 $[M - CH_3]^+$ 离子,如化合物 20 和 21,化合物 20 主要碎片离子 m/z 270,为准分子离子 m/z 285 $[M + H]^+$ 脱去甲基(15)而形成,而化合物 21 主要碎片离子 m/z 360 和 m/z 344,为

准分子离子 m/z 375 $[M + H]^+$ 分别脱去甲基(15)和甲氧基(31)而得到,因此化合物 **20** 和 **21** 分别被鉴定为汉黄芩素和黄芩黄酮 II。

生物碱类化合物在正离子模式下更容易被检出,而且因含单数个氮的生物碱其相对分子质量为奇数,更容易被识别。坤泰胶囊组方药材中,只有黄连中主要成分为生物碱类化合物,且均为异喹啉类生物碱,主要为苜基异喹啉类,包括原小檗碱类和阿朴菲类等。原小檗碱类生物碱在正离子模式下均产生 $[M]^+$ 母离子,若 C-9, C-10 位有甲氧基取代,均可先丢失甲基得到 $[M - CH_3]^+$ 离子,继而脱去与 N 上相连的氢,进一步脱去 C-9 或 C-10 位的 CO 而形成 $[M - CH_3 - H - CO]^+$ 碎片离子。如化合物 **7**, **8**, **13** 和 **14** 在质谱图中均有很强的母离子峰,二级、三级质谱均存在 $[M - CH_3]^+$ 和 $[M - CH_3 - H - CO]^+$ 碎片离子。以化合物 **7** 为例,其主要碎片离子 m/z 337 和 m/z 308,为准分子离子 m/z 352 $[M]^+$ 分别脱去甲基(15) $[M - CH_3]^+$ 和在脱去甲基基础上继而脱去 N 上相连的氢,并进一步脱去 CO 而形成 $[M - CH_3 - H - CO]^+$ 碎片离子。而化合物 **5** 和 **9** 也观察到很强的母离子和 $[M - CH_3]^+$ 碎片离子。化合物 **10** 和 **12** 则可能为黄连碱类化合物,因无甲氧基存在,则可直接脱去 CO 而产生 $[M - CO]^+$ 碎片离子。化合物 **10** 中,其主要碎片离子 m/z 292,为准分子离子 m/z 320 $[M]^+$ 丢失 CO(28)而产生 $[M - CO]^+$ 的碎片离子。总体来说,根据检测到的生物碱碎片离子信息,并结合文献数据,分别鉴定各生物碱类化合物主要为小檗碱、巴马汀、药根碱、黄连碱、甲基黄连碱等,具体见表 1。本次试验中共鉴定了 9 个生物碱类成分,均来自于黄连。

化合物 **1** 的准分子离子峰为 m/z 377 $[M + H]^+$,推测其相对分子质量为 376,与文献报道的 8-表番木鳖酸相符。化合物 **1** 的二级质谱主要碎片离子为 m/z 152,为准分子离子 m/z 377 $[M + H]^+$ 丢失葡萄糖片段(180)和羧基(45)片段后而形成。另外查看化合物 **1** 的紫外光谱图,与 8-表番木鳖酸基本符合,因此化合物 **1** 鉴定为 8-表番木鳖酸,是熟地黄中的成分。

化合物 **3** 的准分子离子峰为 m/z 481 $[M + H]^+$,其质谱图中同时存在 m/z 498 $[M + NH_4]^+$,推测其相对分子质量为 480。查询文献得知与白芍中主要化学成分芍药苷相符。化合物 **3** 的主要碎片离子为 m/z 196,为芍药苷准分子离子 m/z 481 脱去葡萄糖片段(180)和苯甲酰基(105)而形成。结合

文献信息,鉴定化合物 **3** 为芍药苷,来自于白芍。

坤泰胶囊的主要组成是熟地黄、黄芩、黄连、白芍、茯苓和阿胶。其中,熟地黄用料最大,但是因地黄中主要成分是环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类化合物,化学性质不太稳定,含量较低,因此鉴定出的化合物中较少来源于熟地黄。黄芩中黄酮类和黄连中生物碱类成分因含量较高,易被检测,因此本次鉴定的化合物主要来自于黄芩和黄连。

总体来说,本文通过 LC-ESI-MS/MS 方法对坤泰胶囊中化学成分进行了定性分析,主要运用正离子模式,通过对各色谱峰相对分子质量、碎片离子信息、质谱裂解规律和色谱相对保留时间规律等鉴定了坤泰胶囊中 21 个化合物,主要为黄酮或黄酮苷类和生物碱类化合物。其中黄酮类化合物来自于黄芩,生物碱类化合物来自于黄连。本文研究结果为坤泰胶囊进行指纹图谱研究和质量标准研究奠定了基础,也为坤泰胶囊进行体内代谢分析奠定了基础,为进一步研究坤泰胶囊的药效物质基础提供了有力证据。该方法快速、准确、有效,为其他中成药的研究提供了方法和思路。

[参考文献]

- [1] 陈继明,高丽虹,高红艳,等.坤泰胶囊在妇产科临床中的应用[J].实用妇科内分泌杂志,2016,3(4):12-15.
- [2] 胡安青.RP-HPLC 法测定坤泰胶囊中黄芩苷的含量[J].齐鲁药事,2010,29(1):14-15.
- [3] 李浩飞.RP-HPLC 波长切换法同时测定坤泰胶囊中 6 个成分的含量[J].中国当代医药,2015,22(26):7-11.
- [4] 张波泳.UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分[J].中成药,2016,38(5):1104-1108.
- [5] JIANG X, HUANG L F, WU L B, et al. UPLC-QTOF/MS analysis of alkaloids in traditional processed *Coptis chinensis* Franch[J]. EBC Altern Med, 2011, 37(4): 277-293.
- [6] 母会丹,朱靖博,丁燕,等.白芍化学成分的 UPLC/Q-TOF-MS 分析[J].分析实验室,2013,32(7):113-117.
- [7] 刘大伟,闫广利,方圆,等.UPLC-ESI-TOF/MS 应用于黄芩化学成分的快速分析[J].中医药信息,2012,29(4):20-24.
- [8] 朱云祥,陈璐琳,龚婧如,等.LC-Q-TOF-MS 及 LC-IT-MS 分析酸枣仁汤的化学成分[J].中国中药杂志,2014,39(3):457-465.

[责任编辑 顾雪竹]