

秦艽花液质联用的指纹图谱研究

胡一晨^{1,2}, 吉琅¹, 廖晴¹, 曹纪亮¹, 万丽^{1*}

- (1. 成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137;
2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 建立秦艽花的液质联用指纹图谱检测方法, 为最终实现秦艽花真伪品的鉴别提供参考。方法: 以 Agilent ZORBAX ECLIPSE XDB-C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) 为分析用色谱柱, 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 在正离子模式下, 分析 11 批秦艽花药材, 并利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行了相似度计算。结果: 建立了秦艽花液质联用指纹图谱的共有模式, 标定了指纹图谱中的 23 个共有峰, 11 批药材的相似度均 > 0.90, 并用 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 技术对 7 个共有峰进行了指认。结论: 方法精密性、稳定性和重复性良好, 为提高秦艽花的质量标准提供了依据。

[关键词] 秦艽花; 指纹图谱; 液质联用; 龙胆苦苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0067-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121107.1339.007.html>

[网络出版时间] 2012-11-7 13:39

Liquid Chromatography-Mass Spectrography Fingerprinting Analysis of Flos Gentianae Stramienae

[收稿日期] 20120808(002)

[第一作者] 胡一晨, 在读硕士, 从事中药有效成分分析研究, Tel: 18810801157, E-mail: huyichen0323@126.com

[通讯作者] * 万丽, 教授, 博士生导师, 从事药物分析研究, Tel: 028-66174295, E-mail: wanli8801@163.com

液系统分离效果好。

3.3 检测波长的选择 对葛根芩连微丸中的待测成分葛根素、甘草苷、黄芩苷、盐酸小檗碱进行了全波长扫描, 结果各成分在 275 nm 处均有较大的吸收, 且该波长处待测成分无干扰。因此选用 275 nm 作为检测波长。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 1146.
[2] 潘竞锵, 韩超, 刘惠纯, 等. 葛根芩连汤降血糖作用的实验研究[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(3): 167.
[3] 王芬, 何华亮. 张发荣运用葛根芩连汤治疗糖尿病经验[J]. 中医杂志, 2005, 46(2): 103.
[4] 夏宏. 葛根芩连微丸中葛根素的含量测定[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(1): 681.
[5] 吴昭晖, 谭晓梅, 罗佳波. 高效液相色谱法测定葛根芩连微丸中葛根素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 1999, 5(6): 10.
[6] 崔向微, 张贵君, 李慧. 葛根芩连汤中 7 种药效成分

分析[J]. 天津中医药, 2008, 25(5): 417.

- [7] 章军, 刘宇政, 王跃生, 等. HPLC 同时测定葛根芩连微丸中 12 个有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 58.
[8] 陈月凤, 龙晓英, 江涛, 等. HPLC 法同时测定大鼠灌胃给予葛根芩连微丸血浆中 3 种有效成分的含量[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(3): 246.
[9] 罗奇志, 戴开金, 马安德, 等. 葛根芩连汤及微丸中葛根素、大豆苷元的 HPCE 分析药物分析杂志[J]. 2004, 24(1): 11.
[10] 朱斌. 葛根芩连微丸中小檗碱、巴马汀的含量测定[J]. 中药材, 2000, 23(10): 641.
[11] 王立, 赵瑛. 煎煮方式对葛根芩连汤中黄芩苷和小檗碱家犬体内药动学影响[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1326.
[12] 陈丽红, 王强. 葛根芩连汤中不同配伍对黄芩苷、小檗碱含量的影响[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(4): 147.

[责任编辑 顾雪竹]

HU Yi-chen^{1,2}, JI Lang¹, LIAO Qing¹, CAO Ji-liang¹, WAN Li^{1*}

(1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China;
2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the fingerprint chromatograms of Flos Gentianae Stramineae by the means of liquid chromatography-mass spectrography (LC-MS). **Method:** The analysis was performed on Agilent ZORBAX ECLIPSE XDB-C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) with the mobile phase consisting of 0.1% formic acid-water-acetonitrile in a gradient mode. The chromatograms were recorded by using ESI-MS in positive ion model. Totally, 11 batches of samples were analyzed and their similarities were calculated using fingerprint similarity evaluation software. **Result:** The LC-MS fingerprint common mode of Flos Gentianae Stramineae was obtained. A total of 23 characteristic peaks were selected as the common fingerprint peaks. The similarities of 11 samples were greater than 0.90 as compared to the common mode and seven peaks were identified by using HPLC-ESI-Q-TOF-MS. **Conclusion:** The reported method is precise, reproducible and reliable. The establishment of LC-MS fingerprint chromatograms can be helpful for the quality control of Flos Gentianae Stramineae.

[Key words] Flos Gentianae Stramineae; fingerprint; LC-MS; gentiopicroside

秦艽花为龙胆科龙胆属植物麻花秦艽的干燥花^[1],具有显著的清热解毒功效,临床上常用于治疗胃肠炎、肝炎、胆囊炎等。麻花秦艽在藏族地区是一种常用上品藏草药,藏文译名吉解嘎保,属于吉解类药物。《晶珠本草》中记载:“吉解嘎保可止血,消肿,清腑热、胆热、脉热,治麻风和毒热,炮制物敷患部可消肿,撒布腐疮清脉热。”国内学者曾对秦艽花的成分进行了研究,发现其中含有环烯醚萜类、黄酮类、三萜类、甾醇类化合物等多种成分^[2-5],发挥清热解毒作用的活性成分为环烯醚萜类,包括龙胆苦苷(gentiopicroside)、獐牙菜苦苷(swertiamarin)、獐牙菜苷(sweroside)等。

目前在市面流通的秦艽花药材,其含龙胆苦苷的量存在较大差异。本课题组前期曾建立了秦艽花药材的质量控制标准^[1]。为能够较为全面地评价秦艽花药材质量,本文将运用液质联用技术对 11 批秦艽花药材进行分析,建立秦艽花药材的指纹图谱。同时,采用 Q-TOF-MS 高分辨串联质谱对复杂体系中 7 个共有峰进行了明确的成分指认,为秦艽花药材的质量评价及质量控制提供了科学依据。

1 材料

Agilent 1260 型高效液相色谱仪, BRUKER micrOTOF-Q II 型液质联用型高分辨串联质谱仪,采用电喷雾电离(ESI); Agilent ZORBAX ECLIPSE XDB-C(18) 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm),甲

醇、乙腈为色谱纯(Fisher Scientific Co.),水为超纯水。

龙胆苦苷对照品由中国生物制品检定所提供(批号 110770-200712,含量测定用);秦艽花药材共 11 批,收集自不同产地(采收地点见表 1),经成都中医药大学严铸云教授鉴定均为麻花秦艽 *Gentiana straminea* Maxim. 的干燥花。所有药材经粉碎、过筛(四号筛)混匀,置干燥器中,备用。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 取秦艽花粉末(过四号筛)约 0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声处理(功率 150 W,频率 40 kHz)20 min,取出,放冷,再称定质量,用 70% 甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取龙胆苦苷对照品适量,加甲醇制成每 1 mL 含 0.3 mg 的溶液,即得。

2.3 色谱条件 Agilent ZORBAX ECLIPSE XDB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm),梯度洗脱,流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液;柱温 30 °C,进样体积 10 μL,流速 0.4 mL·min⁻¹。秦艽花 70% 甲醇提取物洗脱条件:0 ~ 5.0 min, 95% A, 5.0 ~ 15.0 min, 95% A ~ 85% A, 15.0 ~ 50.0 min, 85% ~ 20% A。

表1 样品信息

样品批号	采收地点
01	四川省阿坝藏族羌族自治州若尔盖县包座牧场
02	青海省海南州贵德县拉鸡山
03	青海省西宁市亚郎藏药行
04	青海省西宁市俄吾蒙藏药行
05	西藏雄巴拉曲藏药厂
06	西藏自治区藏药厂
07	西藏山南金珠雅砻藏药厂
08	青海省西宁市宝库乡
09	四川省甘孜藏族自治州道孚县八美镇
10	四川省若尔盖藏医院
11	四川省甘孜州藏医院

2.4 质谱条件 LC-MS 系统使用 ESI 离子源,在正离子模式下采集数据。数据采集范围 m/z 50 ~ 1 000。离子源参数: Capillary 4 500 V, End Plate Offset - 500 V, Nebulizer (N_2) 1.0 Bar, Dry Heater 180 $^{\circ}C$, Dry Gas 6.0 L \cdot min $^{-1}$ 。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密性 取样品批号为 01 的供试品溶液,按 2.3,2.4 项下的色谱质谱条件连续进样 5 次,记录色谱图。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版(国家药典委员会)对所得的色谱图进行分析处理。结果显示,所得色谱图的相似度值不 < 0.998,以龙胆苦苷峰(指纹图谱中为 4 号峰)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间的 RSD < 1.0%,相对峰面积的 RSD < 3.0%,表明仪器精密性良好。

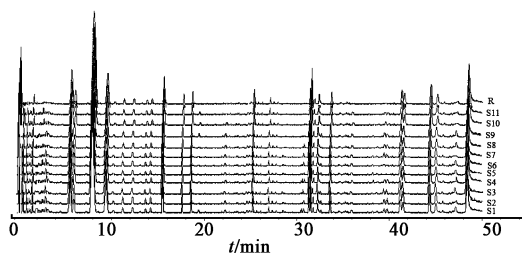
2.5.2 重复性 取样品批号为 01 的药材 5 份,分别精密称定,按 2.1 项下供试品溶液的制备方法平行制备供试液,再按 2.3,2.4 项下的色谱质谱条件检测,记录色谱图。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版(国家药典委员会)对所得的色谱图进行分析处理。结果显示,所得色谱图的相似度值不 < 0.998,以龙胆苦苷峰(指纹图谱中为 4 号峰)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间的 RSD < 1.0%,相对峰面积的 RSD < 3.0%,表明实验方法的重复性良好。

2.5.3 稳定性 取样品批号为 01 的供试品溶液,分别在 0,2,4,10,24 h 按 2.3,2.4 项下的色谱质谱条件检测,记录色谱图。采用中药色谱指纹图谱相

似度评价系统 2004 年 A 版(国家药典委员会)对所得的色谱图进行分析处理。结果显示,所得色谱图的相似度值不 < 0.998,以龙胆苦苷峰(指纹图谱中为 4 号峰)为参照峰,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果表明,各共有峰相对保留时间的 RSD < 1.0%,相对峰面积的 RSD < 3.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 秦艽花药材指纹图谱的建立

2.6.1 秦艽花指纹图谱的绘制 分别精密吸取对照品溶液及 11 批供试品溶液各 10 μ L,按 2.3,2.4 项下的色谱质谱条件检测,记录色谱图。采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004 年 A 版(国家药典委员会)对 11 批秦艽花药材的色谱图进行分析处理,设定 S1 为参照图谱,中位数法,时间窗口宽度 0.3,将其他样品的色谱图与参照图谱进行自动匹配,建立共有模式(图 1)。计算 11 批秦艽花药材的相似度,结果见表 2,11 批药材的相似度均 < 0.900,表明样品相似性良好,此方法可以作为控制秦艽花药材质量的依据。



S1 ~ S11. 依次为 01 ~ 11 号样品;R. 共有模式

图1 11批秦艽花药材的 LC/MS 指纹图谱及其共有模式

表2 11批秦艽花药材的相似度

样品批号	相似度	样品批号	相似度
01	0.907	07	0.916
02	0.913	08	0.930
03	0.915	09	0.952
04	0.948	10	0.941
05	0.932	11	0.957
06	0.945		

2.6.2 共有峰的确定 比较 11 批秦艽花药材的色谱图,以图谱中峰面积较大,峰型较好,保留时间为 8.1 min 的龙胆苦苷色谱峰(4 号峰)为参照峰(龙胆苦苷对照品色谱图见图 2),用相对保留时间来标定共有指纹峰。结果表明,1 ~ 23 号峰在 11 批样品中均出现,而且相对保留时间较为稳定,RSD < 4%。因此,标定此 23 个色谱峰为共有指纹峰。利用中位数法得到了秦艽花 LC-MS 指纹图谱的共有模式,见图 3。

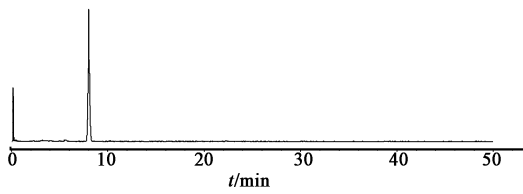


图 2 龙胆苦苷对照品的色谱

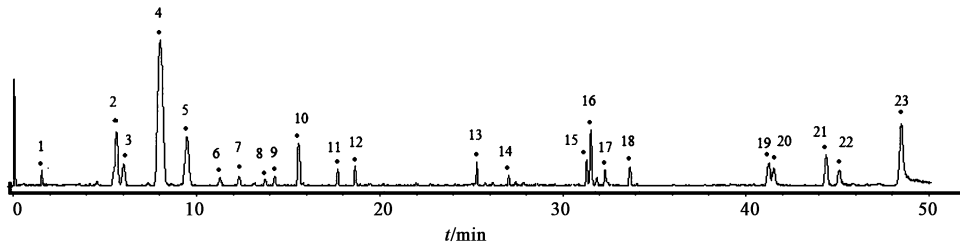


图 3 秦艽花药材的 LC/MS 指纹图谱共有模式

表 3 秦艽花共有峰中化学成分的信息

峰号	t_R /min	选择离子	测定值 (m/z)	分子式	理论值 (m/z)	相对分子 质量误差	二级质谱主要碎片 (m/z)	化合物
1	1.7	[M + H]	176.0701	$C_{10}H_{10}NO_2$	176.0706	4.6	125.0597	gentianine
2	5.7	[M + Na]	397.1093	$C_{16}H_{22}O_{10}Na$	397.1105	3.0	179.9005, 161.0053	swertiamarin
3	6.1	[M + Na]	541.1521	$C_{22}H_{30}O_{14}Na$	541.1528	1.3	357.1180, 195.0652	6'-O- β -D-glucosylgentiopicroside
4	8.1	[M + H]	357.1166	$C_{16}H_{21}O_9$	357.1180	4.0	217.0495, 179.0328	gentiopicroside
		[M + Na]	379.0981	$C_{16}H_{20}O_9Na$	379.0999	5.0		
5	9.6	[M + H]	359.1307	$C_{16}H_{23}O_9$	359.1336	6.8	219.0651	sweroside
		[M + Na]	381.1150	$C_{16}H_{22}O_9Na$	381.1156	3.5		
10	15.6	[M + H]	449.1055	$C_{21}H_{21}O_{11}$	449.1078	5.3	287.0550, 179.0338	isoorientin
		[M + Na]	471.0872	$C_{21}H_{20}O_{11}Na$	471.0897	5.6		
11	17.8	[M + H]	433.1097	$C_{21}H_{21}O_{10}$	433.1129	3.0	271.0601, 180.0417	isovitexin
		[M + Na]	455.0936	$C_{21}H_{20}O_{10}Na$	455.0949	5.5		

3 结论与讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择 在秦艽花供试品溶液制备方法的建立中,以龙胆苦苷提取率为指标,前期分别考察了提取方法(超声提取、加热回流提取),提取溶剂(水、乙醇、不同比例的甲醇-水),提取时间。因秦艽花中含有大量的色素,干扰 LC-MS 的测定,提取溶剂中适当增加水的比例,降低醇浓度能有效避免提取出大量干扰物质。因此,确定了供试品溶液制备以 70% 甲醇超声处理 20 min,即可达到满意的提取效率。

3.2 共有成分的指认 对秦艽花药材 LC-MS 指纹图谱中的 7 个共有峰进行了初步的推断,这些共有峰的二级离子碎片信息并未能完全和文献一一对应,这可能是与仪器型号,质谱条件的差异有关,要进行准确的判断还需要进一步实验。此外,尚有 16 个共有峰未能进行确认,有待于后期的深入研究。

[参考文献]

[1] 胡一晨,万丽,张艺,等. 秦艽花的质量标准规范化研

2.6.3 共有峰的指认 根据一级和二级质谱信息以及文献报道^[6-7],对秦艽花指纹图谱的 23 个共有峰进行了分析,在正离子模式下的色谱图中成功识别到 4 个环烯醚萜类化合物、2 个黄酮类化合物和 1 个生物碱类化合物,准分子离子峰、二级质谱特征离子碎片信息以及鉴定出可能的化合物名称见表 3。

究. 中药与临床[J]. 2011, 2(2):16.

[2] 张雅惠. 藏药秦艽花的化学成分研究及中国药典中麻花秦艽品种单列的研究[D]. 西安:西北大学, 2009:9.

[3] 郑姜彬. 麻花秦艽的化学成分研究[D]. 西安:西北大学, 2010:6.

[4] 武云霞. 麻花秦艽化学成分的研究[D]. 北京:北京化工大学, 2008:2.

[5] 危士虎. 麻花秦艽化学成分、生物活性及质量控制的研究[D]. 北京:北京化工大学, 2010:7.

[6] Li H L, Peng X J, He J C, et al. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of swertiamarin in rat plasma and its application in pharmacokinetics [J]. J Chromatogr B, 2011, 879:1653.

[7] Aberham A, Schwaiger S, Stuppner H, et al. Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthenes and xanthone glycosides in *Gentiana lutea* L. roots by RP-HPLC and LC-MS [J]. J Pharmaceut Biomed, 2007, 45: 437.

[责任编辑 顾雪竹]