

复方紫灵胶囊化学成分的 UPLC-ESI-QTOF-MS-MS 分析

刁义平*

(中国医学科学院皮肤病研究所, 南京 210042)

[摘要] 目的:采用超高效液相色谱-电喷雾质谱法对复方紫灵胶囊中化学成分进行分析。方法:运用 ACQUITY BEH C₁₈ 超高效液相色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相梯度洗脱;质谱使用 ESI 离子源,正离子与负离子模式下采集数据;运行时间 20 min。结果:通过 QTOF-MS-MS 正、负离子质谱信息及元素组成分析并结合对照品与相关文献数据对照,共鉴定出 30 个化合物。结论:该方法对复方紫灵胶囊的成分鉴定提供了一种快速准确的分析方法。

[关键词] 复方紫灵胶囊;超高效液相色谱-电喷雾质谱法;化学成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)22-0064-05

Chemical Composition of Compound Ziling Capsule by UPLC-ESI-QTOF-MS-MS

DIAO Yi-ping*

(Dermatological Institute of Peking Union Medical University & Chinese Academy
of Medical Sciences, Nanjing 210042, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze and identify the chemical components in compound Ziling capsule by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time of flight/mass spectrometry (UPLC-ESI-QTOF-MS). **Method:** These compounds were analyzed with an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) by gradient elution using acetonitrile and 0.1% formic acid. ESI source was used and data were acquired in positive and negative mode. The running time was 20 min. **Result:** Thirty compounds in compound Ziling capsule were identified by positive and negative QTOF-MS-MS data analysis, the elemental compositions analysis, comparison with the standard substance and the literature values. **Conclusion:** It is a rapid and accurate method for tracing to source of compounds in compound Ziling capsule.

[Key words] compound Ziling capsule; UPLC-ESI-QTOF-MS-MS; chemical composition

复方紫灵胶囊是我院研制的治疗白癜风的口服中药制剂,主要由补骨脂、何首乌、紫草、灵芝等药物组成。该制剂用于治疗白癜风疗效显著,但长期服用也存在一些副作用,如报道突发性药物性肝炎 3 例^[1],这就需要对其加强质量控制,减少不良反应发生率。本研究采用较高峰容量及灵敏度的 UPLC-PDA 和高分辨率的 MS 检测,对复方紫灵胶囊中的主要化学成分进行了鉴定,为追踪工艺过程化学成

分的变化,为寻找复方紫灵胶囊的效应物质基础及质量控制进行探索。

1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC 系统-PDA 检测器(Waters 公司), Synapt™ Q-TOF 质谱仪(Waters 公司,配有 Lock-spray 接口);电喷雾离子源(ESI), Masslynx 4.1 质谱工作站软件(Waters 公司), Massfragment 质谱碎片分析软件(Waters 公司), BT125 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司), EPED 超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司)。

复方紫灵胶囊(0.3 g/粒,中国医学科学院皮肤病医院);补骨脂素、异补骨脂素、甘草苷和甘草次酸

[收稿日期] 20110630(002)

[通讯作者] *刁义平,主管中药师,执业药师, Tel: 025-85878978, E-mail: yiping1998cn@yahoo.com.cn

对照品(中国药品生物制品检定所);甘草素、异甘草苷、甘草酸对照品(上海融禾生物制品有限公司);异甘草素等为本实验室自制,乙腈、甲醇(色谱纯,Merck公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 样品溶液的制备 取复方紫灵胶囊内容物 1 g,精密称定,置 250 mL 具塞锥形瓶中,加 80% 甲醇 100 mL,密塞,称重,超声处理 30 min,补足失重,摇匀,静置,取上清液,用 0.22 μm 滤膜过滤,即得供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备 分别称取对照品适量于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解,定容。

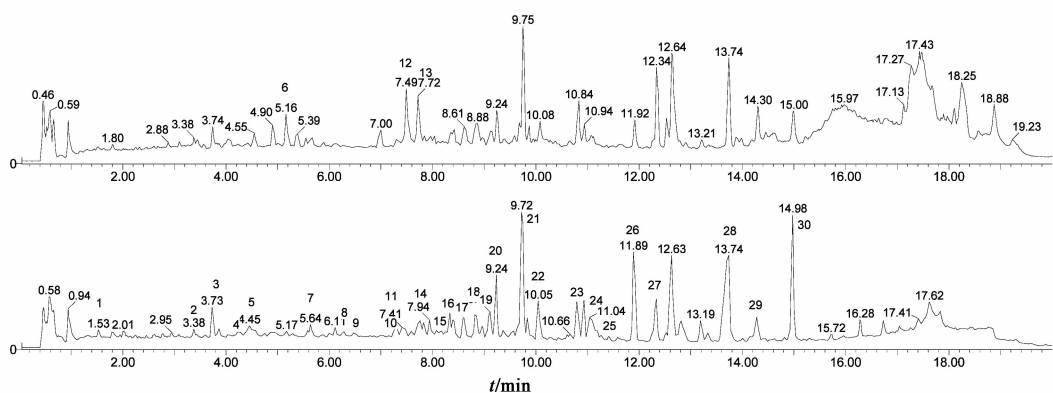
2.3 UPLC 条件 Waters ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~17 min, 5%~

95% A, 17~18 min, 95%~95% A), 18~20 min, 95%~5% A;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$;流速 0.4 mL \cdot min $^{-1}$,进样量 2 μL ,DAD 扫描范围 190~400 nm。

2.4 MS 检测条件 ESI 源,扫描方式为正、负离子检测模式,毛细管电压 3 kV,锥孔电压 30 V,离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气(N_2)温度 350 $^{\circ}\text{C}$,锥孔气(N_2)流量 600 L \cdot h $^{-1}$,碰撞能电压 10~50 V,离子能量 1 V,碰撞气体为氩气(Ar),每 0.5 s 采集 1 次图谱,准确质量测定采用芦丁(rutin, m/z 556.277 1)溶液为锁定质量溶液。扫描范围 m/z 100~1 000。

3 结果与讨论

3.1 UPLC-ESI-MS-MS 成分鉴定 用 UPLC-ESI-MS-MS 对复方紫灵胶囊中化学成分进行定性分析,(+)ESI-MS 和(-)ESI-MS 的质谱总离子流图(TIC)见图 1。



1. 没食子酸;2. 赤芝酮 A;3. 补骨脂苷;4. 甘草苷;5. 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷;6. 麦角甾醇;7. 异甘草苷;8. 甘草素;9. 大黄素-8-O- β -D-葡萄糖苷;10. 灵芝酸 C_2 ;11. 赤芝酮 C;12. 补骨脂素;13. 异补骨脂素;14. 乙酰紫草素;15. 异甘草素;16. 甘草酸;17. 灵芝酮 A;18. 灵芝酮 C;19. 灵芝三醇;20. 灵芝烯酮 D;21. 新补骨脂异黄酮;22. 补骨脂二氢黄酮;23. 补骨脂异黄酮;24. 补骨脂定;25. 大黄素;26. 补骨脂乙素;27. 补骨脂二氢黄酮甲醚;28. 补骨脂查尔酮;29. 甘草次酸;30. 补骨脂酚

图 1 复方紫灵胶囊的 UPLC-ESI-MS 总离子流

3.2 复方紫灵胶囊化学成分分析 通过 UPLC-QTOF 检测得到复方紫灵胶囊中各化学成分的保留时间和质谱信息,并结合提取离子流图及对照品、相关文献数据对比进行化学成分确认,见表 1,2。

3.2.1 与对照品确认的成分 通过对各主要色谱峰按相对保留时间排序,通过供试品和对照品的色谱保留时间(t_R),紫外吸收光谱及(+)ESI-MS 和(-)ESI-MS 数据,确定色谱峰 4,7,8,12,13,15,16,29 分别为甘草苷(4)、异甘草苷(7)、甘草素(8)、补骨脂素(12)、异补骨脂素(13)、异甘草素(15)、甘草酸(16),甘草次酸(29)。

3.2.2 根据质谱裂解特征鉴定的成分 峰 1 的准离子峰为 m/z 169 [M-H] $^{-}$,二级质谱显示主要碎片离子为 125 [M-H-CO_2] $^{-}$,与文献[2]报道的主要碎片离子一致,故推测为没食子酸。

峰 2 的准离子峰为 m/z 401 [M-H] $^{-}$ 片段,二级质谱显示主要碎片离子为 383 [$\text{M-H-H}_2\text{O}$] $^{-}$,373 [M-H-CO] $^{-}$ 与文献[3]报道的主要碎片离子一致,故推测为赤芝酮 A。

峰 3 的准离子峰均为 m/z 365 [M-H] $^{-}$,二级质谱显示主要碎片离子为 203 [$\text{M-H-C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$] $^{-}$,159 [$\text{M-H-C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5\text{-H}_2\text{O-CO}$] $^{-}$,与文献[4-5]报道的碎

表 1 复方紫灵胶囊中各主要成分的保留时间、质谱和紫外光谱数据 (ES⁻)

No	t_R/min	λ/nm	$MS^1(m/z)$	$MS^2(m/z)$	元素组成	化合物
1	1.53	206, 276	169	125	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸
2	3.38	240	401	383, 373	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	赤芝酮 A
3	3.73	245	365	203, 159	C ₁₇ H ₁₈ O ₉	补骨脂苷
4	4.40	239, 275	417	255	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	甘草苷
5	4.45	221, 318	405	243, 225	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷
7	5.58	235, 360	417	255	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	异甘草苷
8	6.29	247, 278	255	135, 119	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	甘草素
9	6.44	280	431	269	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷
10	7.31	256	517	481	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	灵芝酸 C2
11	7.41	245, 287	475	457, 439	C ₂₇ H ₄₀ O ₇	赤芝酸 C
14	7.76	246, 297	329	311	C ₁₈ H ₁₈ O ₆	乙酰紫草素
15	8.09	240, 369	255	135, 119	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	异甘草素
16	8.37	248	821	645, 351	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	甘草酸
17	8.42	252	515	479	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	灵芝酸 A
18	8.82	248	513	495, 477, 449	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	灵芝酸 C
19	9.05	245, 281	455	437	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	灵芝三醇
20	9.24	246	511	475	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	灵芝烯酸 D
21	9.72	248	321	265, 237	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	新补骨脂异黄酮
22	10.05	242, 275	323	203, 119	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	补骨脂二氢黄酮
23	10.79	249	319	291, 263	C ₂₀ H ₁₆ O ₄	补骨脂异黄酮
24	11.04	244, 345	335	280, 251	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	补骨脂定
25	11.19	266, 287	269	241, 225	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	大黄素
26	11.89	246, 367	323	203, 119	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	补骨脂乙素
27	12.34	375	337	322, 119	C ₂₁ H ₂₀ O ₄	补骨脂二氢黄酮甲醚
28	13.74	246, 375	337	322, 119	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	补骨脂查尔酮
29	14.14	249	469	424, 409	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	甘草次酸
30	14.98	194, 261	255	172	C ₁₈ H ₂₄ O	补骨脂酚

表 2 复方紫灵胶囊中各主要成分的保留时间、质谱和紫外光谱数据 (ES⁺)

No	t_R/min	λ/nm	$MS^1(m/z)$	$MS^2(m/z)$	元素组成	化合物
6	5.16	244	397	300	C ₂₈ H ₄₄ O	麦角甾醇
12	7.49	245, 292	187	159, 143	C ₁₁ H ₆ O ₃	补骨脂素
13	7.72	246, 298	187	159, 143	C ₁₁ H ₆ O ₃	异补骨脂素

片离子相比,推测为峰 3 为补骨脂苷。

峰 5 的准离子峰为 m/z 405 [M-H]⁻, 二级质谱显示主要碎片离子为 243 [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻, 225 [M-H-C₆H₁₀O₅-H₂O]⁻, 与文献 [2, 6] 报道的主要碎片离子一致, 故推测为 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-

β-D-葡萄糖苷。

峰 6 的准离子峰为 m/z 397 [M + H]⁺, 二级质谱显示主要碎片离子为 300 [M + H-C₇H₁₃]⁺, 与文献 [3] 报道的主要碎片离子一致, 故推测为麦角甾醇。

峰 9 的准离子峰为 m/z 431 [M-H]⁻ 片段, 二级

质谱显示主要碎片离子为 $269[\text{M-H-C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$, 与文献[2, 6]报道的主要碎片离子一致, 故推测为大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷。

峰 10 的准离子峰为 m/z 517 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $481[\text{M-H-2H}_2\text{O}]^-$ 与文献[7]报道的主要碎片离子一致, 故推测为灵芝酸 C_2 。

峰 11 的准离子峰为 m/z 475 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $457[\text{M-H-H}_2\text{O}]^-$, $439[\text{M-H-2H}_2\text{O}]^-$ 与文献[3]报道的主要碎片离子一致, 故推测为赤芝酸 C。

峰 14 的准离子峰为 m/z 329 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $311[\text{M-H-H}_2\text{O}]^-$, 与文献[8-9]报道的主要碎片离子一致, 故推测为乙酰紫草素。

峰 17 的准离子峰为 m/z 515 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $479[\text{M-H-2H}_2\text{O}]^-$ 与文献[3, 7]报道的主要碎片离子一致, 故推测为灵芝酸 A。

峰 18 的准离子峰为 m/z 513 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $495[\text{M-H-H}_2\text{O}]^-$, $477[\text{M-H-2H}_2\text{O}]^-$ 和 $449[\text{M-H-2H}_2\text{O-CO}]^-$ 与文献[3]报道的主要碎片离子一致, 故推测为灵芝酸 C。

峰 19 的准离子峰为 m/z 455 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $437[\text{M-H-H}_2\text{O}]^-$ 与文献[3]报道的主要碎片离子一致, 故推测为灵芝三醇。

峰 20 的准离子峰为 m/z 511 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $475[\text{M-H-2H}_2\text{O}]^-$ 与文献[7]报道的主要碎片离子一致, 故推测为灵芝烯酸 D。

峰 21 的准离子峰为 m/z 321 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $265[\text{M-H-C}_4\text{H}_8]^-$, $237[\text{M-H-C}_4\text{H}_8\text{-CO}]^-$ 与文献[4]报道的主要碎片离子一致, 故推测为新补骨脂异黄酮。

峰 22 和峰 26 的准离子峰均为 m/z 323 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $203[\text{M-H-(}p\text{-hydroxystyrene)}]^-$, $119[p\text{-hydroxystyrene-H}]^-$, 由质谱信息可知峰 22 和 26 相对分子质量和碎片离子相同, 但保留时间不同, 互为同分异构体, 故根据文献[4-5]报道推测 22 为补骨脂二氢黄酮(补骨脂甲素), 26 为异补骨脂查尔酮(补骨脂乙素)。

峰 23 的准离子峰为 m/z 319 $[\text{M-H}]^-$, 二级质

谱显示主要碎片离子为 $291[\text{M-H-CO}]^-$, $263[\text{M-H-CO-CO}]^-$ 与文献[4]报道的主要碎片离子一致, 故推测为补骨脂异黄酮(补骨脂宁)。

峰 24 的准离子峰为 m/z 335 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $280[\text{M-H-C}_4\text{H}_7]^-$, $251[\text{M-H-CO-CO-CO}]^-$ 与文献[4]报道的主要碎片离子一致, 故推测为补骨脂定。

峰 25 的准离子峰为 m/z 269 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $241[\text{M-H-CO}]^-$, $225[\text{M-H-CO-O}]^-$ 与文献[2, 6]报道的主要碎片离子一致, 故推测为大黄素。

峰 27 和峰 28 的准离子峰均为 m/z 337 $[\text{M-H}]^-$, 二级质谱显示主要碎片离子为 $322[\text{M-CH}_3]^-$, $119[p\text{-hydroxystyrene-H}]^-$, 由质谱信息可知峰 27 和 28 相对分子质量和碎片离子相同, 但保留时间不同, 互为同分异构体, 且比补骨脂二氢黄酮多了一个甲基, 故根据文献[4, 10-11]报道推测峰 27 为补骨脂二氢黄酮甲醚, 峰 28 为补骨脂查尔酮。

峰 30 的准离子峰为 m/z 255 $[\text{M-H}]^-$ 片段, 二级质谱显示主要碎片离子为 $172[\text{M-H-C}_6\text{H}_{11}]^-$, 与文献[4, 12]报道的主要碎片离子一致, 故推测为补骨脂酚。

通过文献对照, 本研究对所鉴定的 30 个化合物进行了来源药味追踪, 其中补骨脂苷(3)、补骨脂素(12)、异补骨脂素(13)、新补骨脂异黄酮(21)、补骨脂二氢黄酮(22)、补骨脂异黄酮(23)、补骨脂定(24)、补骨脂乙素(26)、补骨脂二氢黄酮甲醚(27)、补骨脂查尔酮(28)和补骨脂酚(30)可能来源于组方药材补骨脂; 没食子酸(1)、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(5)、大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(9)和大黄素(25)可能来源于何首乌; 乙酰紫草素(14)可能来源于紫草; 赤芝酮 A(2)、麦角甾醇(6)、灵芝酸 C_2 (10)、赤芝酸 C(11)、灵芝酸 A(17)、灵芝酸 C(18)、灵芝三醇(19)和灵芝烯酸 D(20)可能来源于灵芝; 甘草苷(4)、异甘草苷(7)、甘草素(8)、异甘草素(15)、甘草酸(16)和甘草次酸(24)可能来源于甘草。

[参考文献]

- [1] 中国庆, 龚春燕, 江丽. 复方紫灵胶囊致肝损伤原因分析[J]. 药学与临床研究, 2007, 15(5): 406.
- [2] 李林福. 制首乌化学成分及其质量标准研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2007: 25.

HPLC 同时测定妇炎康片中芍药苷、 丹酚酸 B、小檗碱

黄鸣清¹, 谢友良², 王德杭², 蒋东旭^{2*}, 江滨², 赖小平²

(1. 福建中医药大学 药学院, 福州 350108;

2. 广州中医药大学 新药开发研究中心, 广州 510405)

[摘要] 目的:建立同时测定妇炎康片中芍药苷、丹酚酸 B 及小檗碱的含量测定方法。方法:采用 HPLC, Phenomenex Luna C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾 (含 0.1% 磷酸) 为流动相梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 230, 265, 286 nm。结果:芍药苷的线性范围为 0.077 08 ~ 0.770 8 μg (r = 0.999 7), 平均回收率为 98.87%; 丹酚酸 B 的线性范围为 0.1139 ~ 1.139 μg (r = 0.999 9), 平均回收率为 99.31%; 小檗碱的线性范围为 0.027 8 ~ 0.278 μg (r = 0.999 9), 平均回收率为 100.65%。不同厂家妇炎康片中芍药苷、丹酚酸 B、小檗碱的含量差异较大。结论:该方法简便, 专属性、重复性好, 可作为该制剂中芍药苷、丹酚酸 B 及小檗碱的含量测定方法。

[关键词] 妇炎康片; 芍药苷; 丹酚酸 B; 盐酸小檗碱; 高效液相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2011)22-0068-04

Simultaneous Determination of Paeoniflorin, Salvianolic Acid B and Berberine in Fuyankang Pills by HPLC

HUANG Ming-qing¹, XIE You-liang², WANG De-hang², JIANG Dong-xu^{2*}, JIANG Bin², LAI Xiao-Ping²

(1. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. Institute of Drug Research & Development, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of simultaneous determining effective components in

[收稿日期] 20110414(005)

[第一作者] 黄鸣清, 助理研究员, 博士, 从事中药药效物质基础研究及新药开发, Tel: 15980296606, E-mail: hmq1115@126.com

[通讯作者] * 蒋东旭, 副研究员, 硕士, 从事中药新药研究与开发, Tel: 020-39358103, E-mail: jdx101@gzhtcm.edu.cn

- [3] 刘超. 紫芝和松杉灵芝化学成分研究及灵芝三萜酸的含量测定[D]. 北京:中国协和医科大学中国医学科学院, 2008: 32.
- [4] 刘亚男, 王跃飞, 韩立峰, 等. 高效液相色谱-电喷雾-质谱法分析补骨脂中化学成分[J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (22): 2898.
- [5] Qiao C F, Han Q B, Mo S F, et al. Psoralenoside and isopsoralenoside, two new benzofuran glycosides from *Psoralea corylifolia* [J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54 (5): 714.
- [6] 孙晋苓, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 液相色谱/离子阱质谱法研究何首乌中糖苷类化合物[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21: 806.
- [7] 刘思即, 王艳, 何蓉蓉, 等. 灵芝的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(3): 183.
- [8] 冯文文, 李国玉, 谭勇, 等. 软紫草与硬紫草萜醌类化学成分的研究[J]. 中国现代中药, 2010, 12 (7): 15.
- [9] 刘洁宇, 徐新刚, 刘松艳, 等. 长白山产紫草化学成分研究[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32 (11): 773.
- [10] 寿清耀. 补骨脂治疗骨质疏松的物质基础研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2003: 22.
- [11] 阮博, 孔令义. 补骨脂化学成分的研究[J]. 中药研究与信息, 2005, 7 (4): 7.
- [12] 郭江宁. 补骨脂抗氧化与抗癌活性成分的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2004: 37.

[责任编辑 蔡仲德]