

半支莲主要化学成分的 HPLC-TOF/MS 分析

纪松岗¹, 刘悦², 毛飞³, 李祥², 柴逸峰² (1. 解放军第401医院药剂科, 山东青岛266071; 2. 第二军医大学药学院, 上海200433; 3. 北京儿童医院药剂科, 北京100056)

[摘要] 目的 通过高效液相-飞行时间质谱(HPLC-TOF/MS)联用技术,对中药半支莲的主要化学成分进行有效的鉴定。方法 色谱分离采用SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈柱(100 mm×3.0 mm, 3 μm),流动相分别为0.1%甲酸水溶液和乙腈梯度洗脱,流速为0.6 ml/min;质谱定性采用飞行时间质谱,正离子模式扫描。结果 在优化的液质联用条件下,通过飞行时间质谱鉴定出半支莲中15个成分。结论 通过HPLC-TOF/MS联用技术,为鉴定半支莲中的化学成分建立起了一种快速、高效的分析方法。

[关键词] 半支莲; 高效液相-飞行时间质谱; 化学成分

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)06-0437-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.06.011

Analysis on chemical constituents of *Scutellaria barbata* by HPLC-TOF/MS

Ji Song-gang¹, Liu Yue², Mao Fei³, Li Xiang², Chai Yi-feng² (1. Department of Pharmacy, the 401st Hospital of PLA, Qingdao 266071, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy, Beijing children's hospital, Beijing 100056, China)

[Abstract] **Objective** To analyze chemical constituents of *Scutellaria barbata* D. Don by high pressure liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS). **Methods** A SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ (100 mm×3.0 mm, 3 μm) was used to separate. The mobile phase consisted of water containing 0.1% methane acid and acetonitrile was used as gradient elute. The flow rate was 0.6 ml/min. TOF/MS was applied for qualitative analysis under positive ion mode. **Results** Under optimized condition, 15 major constituents in *Scutellaria barbata* D. Don were identified by time of flight mass spectrometry and structure-relevant fragment ions. **Conclusion** A simple and reliable method using HPLC-TOF/MS was established to identify the chemical constituents of *Scutellaria barbata* D. Don.

[Key words] *Scutellaria barbata* D. Don; HPLC-TOF/MS; chemical constituents

半支莲为唇形科黄芩属植物半支莲 *Scutellaria barbata* D. Don 的干燥全草,是我国传统的中药,其名最早见于《外科正宗》,主要产于浙江、江苏、安徽、河南、四川、广东、福建、陕西等省^[1]。其味辛、苦,性寒,具有清热解毒、化痰利尿、活血祛瘀、消肿止痛之功效,用于治疗疮痈肿毒、蛇虫咬伤、痢疾、肝炎及肝硬化等症。现代药理研究表明,半支莲的水提取物与醇提取物均有明显的抗肿瘤活性^[2,3],常用于肝癌、肺癌及胃癌等癌症的防治^[4]。

中外学者研究发现半支莲的主要化学成分为生物碱、黄酮类、多糖、有机酸、甾醇等^[5]。目前对半支莲中化学成分分析主要是采用传统的植物化学的方法进行分离提取^[6,7],部分研究采用高效液相色谱法进行分析^[8],这些方法一般分析时间较长,而

且仅针对其中某几种或某一类物质进行分析,而缺乏从整体上系统地阐述半支莲的复杂化学成分。

本研究采用 HPLC-TOF/MS 技术对半支莲中多成分进行了鉴别,该法操作简便、快速、准确,对阐明半支莲药效物质基础、质量控制、开发现代中药新药等具有重要意义。

1 仪器和试剂

1.1 仪器 Agilent 1200 系列快速液相色谱仪,配有在线脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器; Agilent 6220 高分辨飞行时间质谱仪,配有标准电喷雾离子源(ESI),分析软件为 MassHunter 在线工作站和 Qualitative Analysis 离线分析软件 DJ-04 药材粉碎机(上海淀久公司); Mettler AE240 型十万分之一电子天平; Kudos-SK2200H 超声发生器(上海科导超声仪器公司)。

1.2 试剂 半支莲草药材由第二军医大学药学院生药学教研室孙连娜副教授鉴定为唇形科黄芩属植

[作者简介] 纪松岗(1964-),男,主任药师。Tel: E-mail: jisonggang@126.com.

[通讯作者] 柴逸峰。E-mail: yfchai@smmu.edu.cn.

物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don。HPLC 级乙腈 (Merck, Germany); HPLC 级甲酸 (Tedia, USA); 无水乙醇为分析醇 (中国医药集团上海化学试剂公司); 水为娃哈哈纯净水。

2 试验

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ (100 mm × 3.0 mm, 3 μm), 流动相 A 相为乙腈, B 相为水 (含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱, A 相比比例随时间的变化: 25% (1~5 min); 25%~55% (5~12 min); 进样量: 3 μl; 流速: 0.6 ml/min; 柱温 25 °C; 运行时间 30 min; 柱后分流比为 3:1。

2.1.2 质谱条件 采用 ESI 源, 正离子模式, 雾化气为高纯氮气。具体质谱参数: 毛细管电压 4 000 V, 干燥气温度 350 °C, 干燥气流速 9 L/min, 雾化气压力 35 psi (1 psi = 6 894.8 Pa), 碎片电压 180 V; 参比离子 m/z 121.050 8 和 m/z 922.009 7; 质量数扫描范围 m/z 100~1 000 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 1×10^{-6} 。

2.2 供试品溶液制备 取半枝莲药材适量, 粉碎后过 40 目筛, 称取半支莲药材 1.0 g, 置 100 ml 量瓶中, 加 70% 乙醇 20 ml, 称重, 超声 30 min (超声功率为 500 W, 频率 40 kHz), 冷却后补足失重。取 5 ml 醇提液, 10 800 r/min 离心 5 min, 取上清, 再用微孔滤膜过滤 (0.45 μm) 过滤, 作为供试品溶液。在“2.1”项色谱条件下进样分析。

2.3 半枝莲化学成分数据库的建立 根据国外专业数据库 Pubmed Chem Spider、中国科学院化学专业数据库等及国内外相关研究文献, 收集了半枝莲各种化学成分名称及分子式共 87 个, 采用安捷伦 formula-database generator 软件 (含各元素精确质量数), 计算精确相对分子质量, 建立了包括化合物名称、分子式、精确相对分子质量 $M+H$ 准分子离子峰相对分子质量的相应的化学成分数据库。

3 结果与讨论

3.1 提取溶剂的选择 首先考察了提取方法, 本试验选择了较为简便的溶剂超声法。对于提取溶剂, 由于半枝莲主要成分为黄酮类, 根据其成分特点, 考察了甲醇以及 70% 乙醇, 发现采用 70% 的乙醇提取获得的峰容量最大, 故采用 70% 乙醇超声为提取方法。

3.2 实验条件优化 考察了甲醇-水、乙腈-水系统, 发现乙腈的洗脱效果优于甲醇, 且各色谱峰分离效果更好, 加入 0.1% 甲酸可以改善峰拖尾, 并提高

质谱响应, 故采用乙腈-水 (0.1% 甲酸) 为流动相。质谱检测比较了正、负离子两种扫描模式, 结果发现正模式下峰容量大, 质谱响应更好, 故实验最终选择在正模式下进行。

3.3 半枝莲中主要化学成分的鉴别 在优化的色谱质谱条件下, 半枝莲提取液的 HPLC-TOF/MS 典型总离子流图见图 1。我们对其中主要的 15 个峰进行了鉴别, 其中包括 4 对同分异构体。其中, 峰 2 和 4 这一对同分异构体, 两者质谱裂解所得碎片离子相同, 故通过对比标准物质的保留时间和质谱图, 判定峰 2 为红花素葡萄糖醛酸苷, 峰 4 为异红花素葡萄糖醛酸苷。其它化合物按照以下方法鉴别: 首先根据 TOF-MS 上所得到的精确化合物分子量信息, 通过 Mass Hunter 软件在 5 ppm 的质量偏差范围内计算其可能的元素组成, 并将其与所建的数据库相匹配, 对半枝莲化学成分的初步鉴别, 结果见表 1。然后对同分异构体进行鉴别, 调节碎片电压至 360 V, 获得化合物结构相关的碎片离子, 根据离子的裂解情况, 结合数据库中各化合物的化学结构, 区分各同分异构体, 结果见表 2。最终确证了其中的 15 个峰, 结果见表 1。

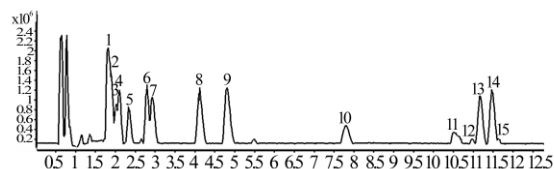


图 1 半枝莲提取物 TOF/MS 总离子流图

以分子离子峰 287 为例, 来说明鉴别过程。在碎片电压 160 V 条件下, 峰 9 和峰 10 的分子离子峰均为 287。首先确定峰 9 和峰 10 精确的分子离子峰分别为 287.055 8 与 287.056 0, 可推断峰 9 和峰 10 的元素组成均为 C₁₅H₁₀O₆。通过与数据库匹配, 初步可判定其为一对同分异构体, Scutellarein 和 Luteolin。为进一步区分这对同分异构体, 调节碎片电压至 360 V, 得到此电压条件下的质谱图。峰 9 的质谱图上有明显的 169.013 7 [M+H-C₈H₆O]⁺, 123.008 2 [M+H-C₈H₆O-CO-H₂O]⁺, 119.049 7 [M+H-C₇H₄O₅]⁺ 等碎片离子信息, 推断出裂解途径见图 2(a) 所示。峰 10 的质谱图上有明显的 153.018 8 [M+H-C₈H₆O₂]⁺, 135.044 6 [M+H-C₇H₄O₄]⁺, 161.023 9 [M+H-C₆H₆O₃]⁺ 等碎片信息, 推断出裂解途径见图 2(b) 所示。结合以上信息, 我们能够鉴定峰 9 为 Scutellarein, 峰 10 为 Luteolin。采用类似的方法, 能够对其他峰也进行相应的鉴别。

表 1 半枝莲化学成分鉴别结果

峰号	保留时间 (min)	鉴别结果	分子式	[M + H] ⁺		
				检测值	理论值	偏差 (ppm)
1	1.818	apigenin-7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.113 3	433.113 5	-0.40
2	1.898	Carthamidin-7-O-glucuronide	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.103 1	465.103 3	-0.43
3	2.010	luteolin-β-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.108 2	449.108 4	-0.42
4	2.106	Isocarthamidin-7-O-glucuronide	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.103 0	465.103 3	-0.65
5	2.347	Luteolin-7-O-glucuronide	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	463.087 5	463.087 7	-0.33
6	2.795	Apigenin-7-O-glucuronide	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	447.092 3	447.092 7	-0.98
7	2.923	4'-Hydroxy-wogonin-7-O-glucuronide	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	477.103 7	477.103 3	0.84
8	4.125	Scutellarin	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	463.087 4	463.087 7	-0.54
9	4.798	Scutellarein	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.055 8	287.055 6	0.83
10	7.794	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.056 0	287.055 6	1.52
11	10.534	5,7,8-Trihydroxy-8-methoxyflavanone	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	303.087 1	303.086 9	0.78
12	10.999	Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.076 5	273.076 3	0.74
13	11.175	4'-Hydroxy-wogonin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.071 6	301.071 2	1.28
14	11.479	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.060 9	271.060 6	0.93
15	11.640	Scutevulin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.071 5	301.071 2	0.95

表 2 半枝莲成分中的同分异构体鉴别结果

组号	峰号	保留时间 (min)	鉴别结果	分子式	[M + H] ⁺ m/z	高碎片电压下的碎片离子
I	5	2.347	Luteolin-7-O-glucuronide	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	463.087 5	287.055 6 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ 169.013 7 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆ - C ₈ H ₆ O] ⁺ 123.008 2 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆ - C ₈ H ₆ O - CO - H ₂ O] ⁺
	8	4.125	Scutellarin	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	463.087 4	287.055 6 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ 153.018 8 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆ - C ₈ H ₆ O ₂] ⁺ 135.008 2 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆ - C ₈ H ₆ O ₂ - H ₂ O] ⁺
II	2	1.898	Carthamidin-7-O-glucuronide	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.103 1	289.071 2 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ 169.013 7 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆ - C ₈ H ₈ O] ⁺ 147.044 6 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆ - C ₆ H ₆ O ₄] ⁺
	4	2.106	Isocarthamidin-7-O-glucuronide	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	465.103	289.071 2 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆] ⁺ 169.013 7 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆ - C ₈ H ₈ O] ⁺ 147.044 6 [M + H - C ₆ H ₈ O ₆ - C ₆ H ₆ O ₄] ⁺
III	9	4.798	Scutellarein	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.055 8	169.013 7 [M + H - C ₈ H ₆ O] ⁺ 123.008 2 [M + H - C ₈ H ₆ O - CO - H ₂ O] ⁺ 119.049 7 [M + H - C ₇ H ₄ O ₅] ⁺
	10	7.794	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.056 0	153.018 8 [M + H - C ₈ H ₆ O ₂] ⁺ 135.044 6 [M + H - C ₇ H ₄ O ₄] ⁺ 161.023 9 [M + H - C ₆ H ₆ O ₃] ⁺
IV	13	11.175	4'-Hydroxy-wogonin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.071 6	286.047 7 [M + H - CH ₃] ⁺ 168.005 9 [M + H - CH ₃ - C ₈ H ₆ O] ⁺ 183.029 3 [M + H - C ₈ H ₆ O] ⁺
	15	11.64	Scutevulin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.071 5	286.047 7 [M + H - CH ₃] ⁺ 168.005 9 [M + H - CH ₃ - C ₈ H ₆ O] ⁺

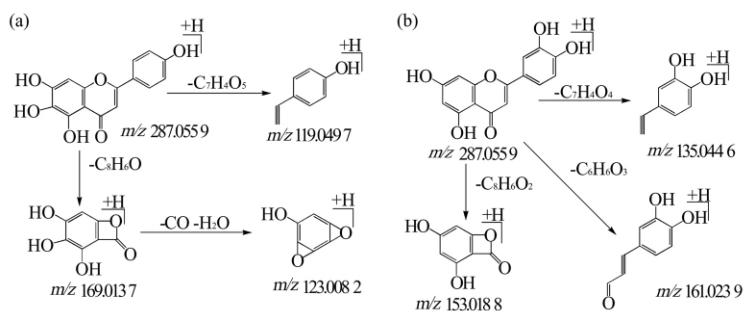


图 2 Scutellarein 和 Luteolin ESI + MS 裂解途径

3 分析与讨论

临床上有以单纯性血糖高而引起的癫痫样症状,多以部分运动性发作为主,主要表现为一侧面部或肢体远端的阵挛和强直,一般血糖逐渐下降,癫痫发作次数逐渐减少,发作时,单独用抗癫痫药物效果不佳,应用胰岛素纠正高血糖及代谢紊乱后,癫痫发作终止^[7-9]。我院收治该患者血酮体阴性、电解质、渗透压基本正常,且无癫痫病史和脑外伤病史,头颅MRI影像学检查无确切的致痫灶发现,虽然首次发作时血糖比较高,但该例患者单独使用抗癫痫药物效果好,且后来癫痫发作时血糖并不高,血糖高时癫痫也没发生,因此基本可以排除癫痫发生是由高血糖引起。治疗患者过程中有多种药物联合使用情况,但癫痫发作时间大多在第2次甲硝唑滴注后,在停用甲硝唑而其他药物继续使用后,未继续使用抗癫痫药物的情况下,患者未再次发作,提示癫痫发作由甲硝唑注射液引起可能性很大,文献资料也证实甲硝唑有致癫痫发作的可能性^[1-6]。

表1中数据可以看出,发生癫痫样症状的10例患者中有9例甲硝唑使用量基本在500 mg/次,文献报道高剂量时可引起癫痫发作和周围神经病变^[10]。甲硝唑容易穿透血脑屏障,其浓度可达血液的50%,因此,高浓度剂量容易导致脑部药物浓度增加。本案例中患者抽搐多次出现在下午甲硝唑滴注过程中或滴注后,可能与该时间段血药浓度较高有关。临床实际用药间隔比较短(该患者甲硝唑用药时间间隔为5~6 h),而甲硝唑 $t_{1/2}$ 为7~8 h,根据药代动力学,理论上可导致下午甲硝唑滴注过程中或滴注后出现浓度过高。

另外,表1中可以看到平均发病年龄在50岁左右,我院的该案例是位老年患者,由于老年人身体组成与各器官功能的改变,即是肝肾功能正常,其药效

学与药动学也会发生一定的变化。与青年人甲硝唑药代动力学特征对比显示,老年组的血药浓度一直高于青年组,AUC大约为青年人的2倍,因而老年病人用药时,甲硝唑剂量应减少30%~40%^[11]。

综合上述原因,该例患者的癫痫症状是由甲硝唑注射液所引起,临床医师在使用甲硝唑时应注意患者的年龄、肝肾功能及用药间隔,同时注意用药剂量,确保药物的安全使用;临床药师在查房时也应及时关注病情进展,准确分析,及时提出用药建议,为患者安全用药提供保障。

【参考文献】

- [1] 李良学. 甲硝唑致癫痫大发作一例[J]. 临床内科杂志, 2006, 23(12): 811.
- [2] 刘树刚, 王汝琴, 马风洁. 口服甲硝唑后癫痫样发作1例[J]. 药物流行病学杂志, 1994, 3(4): 227.
- [3] 宋泽辉. 口服甲硝唑致癫痫大发作1例[J]. 黑龙江护理杂志, 1999, 5(4): 47.
- [4] 赵秀玲, 李凤兰. 应用甲硝唑诱发癫痫发作1例[J]. 菏泽医学专学报, 2003, 15(3): 96.
- [5] 刘文东, 赵兵, 陈金良, 等. 氯胺酮辅助麻醉时应用甲硝唑致癫痫样发作三例报告[J]. 临床麻醉学杂志, 1996, 12(5): 260.
- [6] 马长华, 张爱群, 周爱琳. 术后应用甲硝唑致癫痫样发作三例[J]. 中华外科杂志, 1995, 33(2): 111.
- [7] Tiamkao S, Pratipanawatr T, Tiamkao S, et al. Seizures in non-ketotic hy(perglycaemia [J]. Seizure, 2003, 12(6): 409.
- [8] 刁丽梅, 黄立武, 黄选华. 非酮症非糖尿病高渗性高血糖患者癫痫发作11例临床分析[J]. 中国老年学杂志, 2010, 8(30): 2345.
- [9] 陆爱霞, 赵俊武. 非酮症高血糖并癫痫发作临床分析[J]. 中国医药导报, 2009, 6(22): 200.
- [10] 国家药典委员会. 临床用药须知[M]. 2005: 570.
- [11] 黄慧娥. 甲硝唑在不同病理生理条件下的合理应用[J]. 齐鲁医学杂志, 1999, 14(3): 234.

[收稿日期]2012-03-19

[修回日期]2012-06-11

(上接第439页)

综上所述,本实验采用HPLC-TOF/MS技术,结合数据库匹配,实现了对半支莲中主要成分的快速定性分析,共鉴定出15个半支莲中的主要糖苷类和黄酮类成分。该方法快速、灵敏、准确度高,可作为半支莲质量控制的方法之一,同时为半支莲的药理学和临床药学研究提供了化学物质基础信息。

【参考文献】

- [1] 王桂玲, 房建强, 赵雪梅, 等. 半支莲中总生物碱的提取和纯化条件研究[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(5): 399.
- [2] Lee TK, Kim DI, Song YL, et al. Differential inhibition of *Scutellaria barbata* D. Don (Lamiaceae) on HCG-promoted proliferation of cultured uterine leiomyoma and myometrial smooth

muscle cells [J]. Immunopharmacology and immunotoxicology, 2004, 26(3): 329.

- [3] 陶伟. 中药半支莲的药理及临床应用研究进展[J]. 海军医学杂志, 2008, 29(2): 181.
- [4] 邹蕾蕾, 吴启南. 半支莲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2005, 16(2): 149.
- [5] 仲浩, 薛晓霞, 姚庆强. 半支莲化学成分的研究[J]. 中草药, 2008, 39(1): 21.
- [6] 李萍, 左甜甜, 王晓秋, 等. 半支莲的化学成分研究(II) [J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(5): 374.
- [7] 何枢衡, 祎张, 葛丹丹, 等. 中药半支莲黄酮类成分的分离与结构鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(3): 182.
- [8] 涂琪顺, 蔡光明, 何群, 等. HPLC法测定半支莲中二萜类生物碱 scutebarbatine B [J]. 中草药, 2008, 39(2): 280.

[收稿日期]2012-09-05

[修回日期]2012-09-27