

· 论著 ·

高效液相-高分辨飞行时间质谱对复方夏枯草消瘤方化学成分的鉴别

戴媛媛¹, 汪晓河¹, 马明华², 计强国¹, 顾小燕¹, 吴铁军¹, 年 华¹ (1. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科, 上海 200437; 2. 上海市杨浦区中心医院药剂科, 上海 200090)

【摘要】 目的 应用高效液相-高分辨飞行时间质谱(HPLC-TOF/MS)技术鉴别夏枯草消瘤方的化学成分。方法 色谱分离采用 ACE(3.0 mm×150 mm) 色谱柱; 流动相为甲醇(A)和0.1%甲酸水(B), 梯度洗脱: 0~5 min: 5%A, 5~10 min: 5%~15%A, 10~30 min: 15%~45%A, 30~40 min: 45%~70%B, 40~50 min: 70%~90%B; 进样量 2 μ l, 流速为 0.4 ml/min; 柱温为 25 $^{\circ}$ C。质谱定性采用飞行时间质谱, 采用 ESI 离子源, 正、负离子模式共同监测, 参比离子 m/z 121.9856, 1033.9881; 扫描范围 m/z 100-1200。**结果** 共鉴别出夏枯草消瘤方中 37 种化学成分, 正离子模式碎片电压 160 V 条件下 8 个; 负离子模式碎片电压 160 V 条件下 28 个, 碎片电压 260 V 条件下 19 个; 正负离子均有响应 4 个, 负离子模式两种碎片电压下均有响应 16 个, 并对成分进行了药材归属。**结论** 建立了一种基于 HPLC-TOF/MS 技术对夏枯草消瘤方的化学成分进行鉴别的有效方法, 为其质量控制及体内的深入研究奠定了基础。

【关键词】 夏枯草消瘤方; 化学成分; 鉴别; 高效液相-高分辨飞行时间质谱

【中图分类号】 R927 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1006-0111(2020)02-0138-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1006-0111.201907116

Identification of chemical constituents of Xiakucao Xiaoliu mixture by HPLC-TOF/MS

DAI Yuanyuan¹, WANG Xiaohu¹, MA Minghua², JI Qiangguo¹, GU Xiaoyan¹, WU Tiejun¹, NIAN Hua¹ (1. Pharmaceutical Center of Yueyang Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200437, China; 2. Pharmaceutical Center of Yangpu District Central Hospital, Shanghai 200090, China)

【Abstract】 Objective To identify the chemical constituents of Xiakucao Xiaoliu mixture by high performance liquid chromatography-high resolution time-of-flight mass spectrometry (HPLC-TOF/MS). **Methods** The chromatographic separation ACE (3.0mm×150 mm) column was used. The mobile phase was methanol (A) and 0.1% formic acid (B). The gradient elution was: 0-5 min, 5% A; 5-10 min, 5%-15% A; 10-30 min, 15%-45%A; 30-40 min, 45%-70%B; 40-50 min, 70%-90%B. The injection volume was 2 μ l. The flow rate was 0.4 ml/min. The column temperature was 25 $^{\circ}$ C. The mass spectrometry was characterized by time-of-flight mass spectrometry, using ESI ion source. The common monitoring was in positive and negative ion mode. The reference ion was m/z 121.9856, 1033.9881. The scanning range was m/z 100-1200. **Results** A total of 37 chemical constituents were identified in the Xiakucao Xiaoliu mixture, 8 in the positive ion mode fragment voltage of 160 V, 28 in the negative ion mode fragment voltage of 160 V, and 19 in the fragment voltage of 260 V. Both positive and negative ions had 4 responses. The negative ion mode has 16 responses under both fragment voltages. And the ingredients were medicinal. **Conclusion** An effective method for the identification of the chemical constituents of *Prunella vulgaris* L. by HPLC-TOF/MS was established, which laid a foundation for its quality control and in-depth study in vivo.

【Key words】 Xiakucao Xiaoliu mixture; chemical composition; identification; high performance liquid-high resolution time-of-flight mass spectrometry

【基金项目】 上海市卫生和计划生育委员会科研项目(201440386); 上海中医药大学高峰高原学科项目(KY111.20.81); 上海市科学技术委员会科研计划项目(16401902100)

【作者简介】 戴媛媛, 硕士研究生, 研究方向: 中药临床药学, Email: shineyy1024@163.com

【通讯作者】 马明华, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 临床药学, Email: njmmh@126.com; 年 华, 博士, 主任药师, 研究方向: 中药临床药学及医院药学, Email: jackynian@126.com

夏枯草消瘤合剂由中药夏枯草、牡蛎、生地、黄、莪术、苍术、白术组成, 是中医肿瘤学专家钱伯文教授的经验方。方中诸药配伍, 以达化痰软坚, 活血化瘀, 补养气血的功效。其临床实验研究已证实, 该药配合一线化疗方案治疗中晚期非小细胞肺癌患者, 有助于提高患者的生存治疗和减少化疗所产生的毒副作用^[1]。由该方制成的合剂在我院临床

使用多年,前期研究对于组方中化学成分的研究仍限于迷迭香酸、咖啡酸的稳定性研究^[2]。尽管方中一些单味药的化学成分已有报道^[3-18],但是整个复方制剂的化学成分未见报道。由于组分的复杂性,复方的成分分析比单味药更具有挑战性,明确夏枯草消瘤方色谱图中各个色谱峰归属对于该复方的质量控制及体内深入研究具有重要意义。

高效液相-高分辨飞行时间质谱(HPLC-TOF/MS)串联技术对于中药复杂体系中化学成分分析和鉴定非常有效。其灵敏度高、操作简便、耗时短,可以在短时间获得化合物准确的相对分子质量,通过与所建立的已知化学成分数据库比对,可以快速的对被测成分进行分析鉴别^[19-20]。因此,本文采用HPLC-TOF/MS技术,首次对夏枯草消瘤方中化学成分进行鉴别,并且对各成分进行药材归属,以进一步阐明夏枯草消瘤方的化学物质基础。

1 材料和方法

1.1 仪器

Agilent 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、柱温箱和二级管阵列检测器;Agilent 6220 高分辨飞行时间质谱仪(美国安捷伦公司),配有标准电子喷雾离子源(ESI);分析软件为 MassHunter 数据采集在线工作站和 Qualitative Analysis 离线分析软件。

1.2 药品与试剂

咖啡酸(批号:110885-200102,纯度>98.5%)、迷迭香酸(批号:111871-201505,纯度>98.5%)对照品,均购自中国食品药品检定研究院,甲醇和甲酸为色谱纯(Fisher, USA),其余试剂均为分析纯,水为纯水。

夏枯草、生地黄、莪术、麸炒苍术、麸炒莪术、牡蛎、煅牡蛎均由上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院中药房提供(见表1)。药材及饮片均经第二军医大学药学院生药学教研室黄宝康教授鉴定。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取咖啡酸、迷迭香酸对照品 3.22、5.68 mg 置 10 ml 量瓶中,加甲醇稀释定容,配成浓度分别为 322、568 $\mu\text{g/ml}$ 的母液,精密吸取母液 1 ml 置于 10 ml 量瓶,加甲醇定容后,即得对照品

表1 药材信息

| 药材名称 | 批号 | 药材来源 |
|------|------------|--------------|
| 夏枯草 | 180207 | 上海康桥药业有限公司 |
| 生地黄 | 180302 | 上海同济堂药业有限公司 |
| 莪术 | 180306 | 上海虹桥中药饮片有限公司 |
| 麸炒白术 | 2018031001 | 上海上药华宇药业有限公司 |
| 麸炒苍术 | 180407 | 上海虹桥中药饮片有限公司 |
| 牡蛎 | 2017102006 | 上海上药华宇药业有限公司 |
| 煅牡蛎 | 180301 | 上海同济堂药业有限公司 |

溶液。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取夏枯草 4.2 g、牡蛎 8.4 g、煅牡蛎 8.4 g、地黄 4.2 g、莪术 4.2 g、白术(麸炒)2.1 g、苍术(麸炒)2.1 g,以上七味,充分润湿,分别加 8 倍量与 4 倍量水煎煮两次,每次煮沸后于 85 $^{\circ}\text{C}$ 保温 20 min,煎液滤过,合并滤液,滤液浓缩至相对密度 1.10 以上(80 $^{\circ}\text{C}$),离心,取上清液;精密吸取夏枯草消瘤方溶液上清液 5 ml,置于 50 ml 容量瓶中,加甲醇定溶,摇匀,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得夏枯草消瘤方样品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱:ACE C₁₈(3.0 mm \times 150 mm),流动相 A 相为甲醇,B 相为水(含 0.1% 甲酸),梯度洗脱:0~5 min: 5%A, 5~10 min: 5%~15%A, 10~30 min: 15%~45%A, 30~40 min: 45%~70%B, 40~50 min: 70%~90%B;进样量 2 μl ,流速为 0.4 ml/min;柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$;运行时间为 50 min。

2.4 质谱条件

采用 ESI 离子源,正、负离子模式均进行检测,雾化器为高纯氮气,具体参数如下:正离子模式:毛细管电压 3500 V,干燥器温度 350 $^{\circ}\text{C}$,干燥器流速 10L/min,雾化器压力 40 psig,碎片电压 160 V;参比离子 m/z 121.9856, 1033.9881;扫描范围 m/z 100-1200。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} 。

2.5 夏枯草消瘤方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,以及国内外相关研究文献,收集了夏枯草消瘤合剂方中六味中药化学成分名称及分子式共 760 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,计算精确相对分子质量、M+H 和 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 结果和讨论

3.1 夏枯草消瘤合剂的相关图谱

夏枯草消瘤方样品溶液的总离子流图见图1。其中图1A为正离子160 V模式,图1B为负离子160 V模式,图1C为负离子260 V模式。

3.2 利用对照品鉴别化合物

实验中利用已有的2个对照品,在负离子模式、碎片电压160 V条件下,无偏差的鉴别出咖啡酸、迷迭香酸,对照品总离子流图见图2。

3.3 利用精确质量数和同位素分布鉴别化合物

正离子模式下以图1中2号峰疣孢酚为例,说

明夏枯草消瘤方色谱峰的鉴别过程。保留时间为24.032 min,色谱图中的准分子离子为267.1591。利用Qualitative Analysis数据分析软件的计算功能计算精确质量数的可能元素组成(5×10^{-6}),并比对数据库中已知化合物的质荷比,初步确定元素组成为 $C_{15}H_{22}O_4$,为疣孢酚的 $(M+H)^+$ 。计算该准分子离子的核素分布情况,从图3A可以看出同位素分布的理论值(方框所示)与实际值(方框内峰所示)吻合良好,确定此峰为疣孢酚。同理可得负离子模式下图1中18号峰,地黄苷D的解析过程(图3B)。

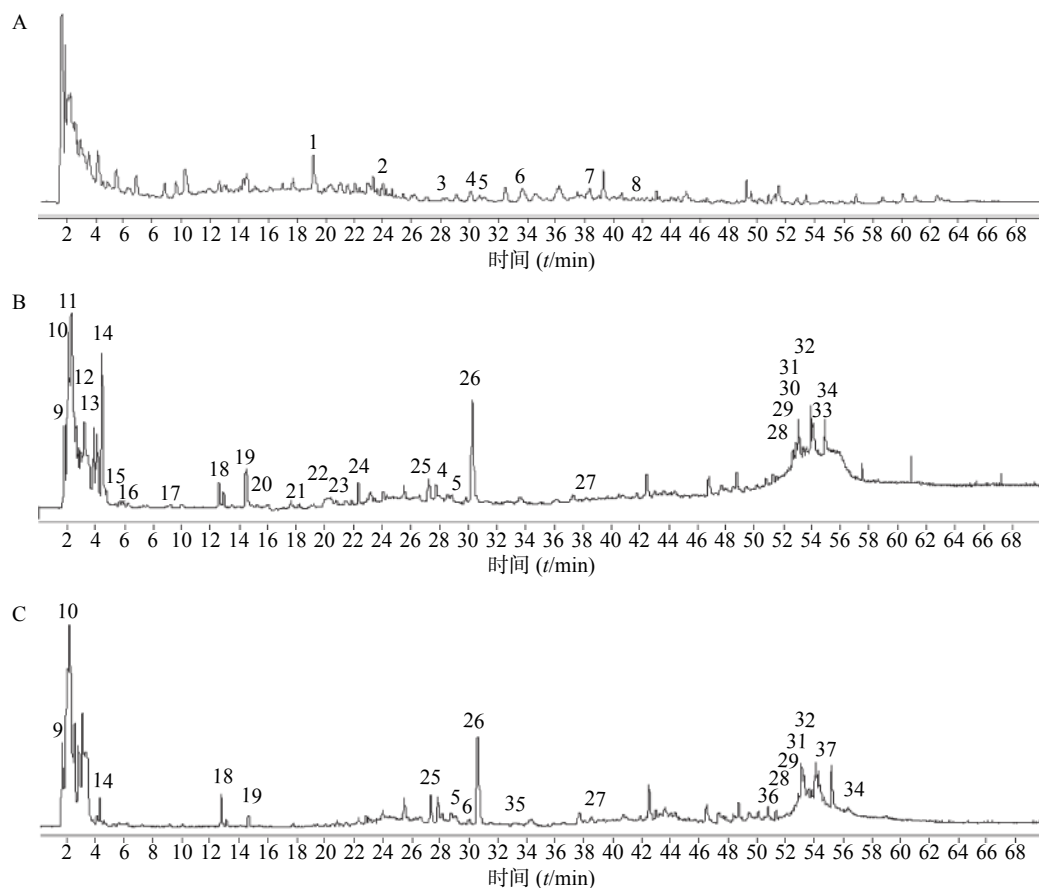


图1 夏枯草消瘤方 TOF/MS 总离子图

A. 正离子模式,碎片电压160 V; B. 负离子模式,碎片电压160 V; C. 负离子模式,碎片电压260 V

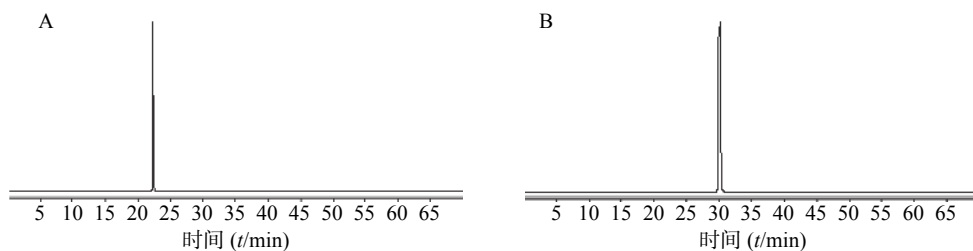


图2 对照品 TOF/MS 总离子流图

A. 咖啡酸; B. 迷迭香酸

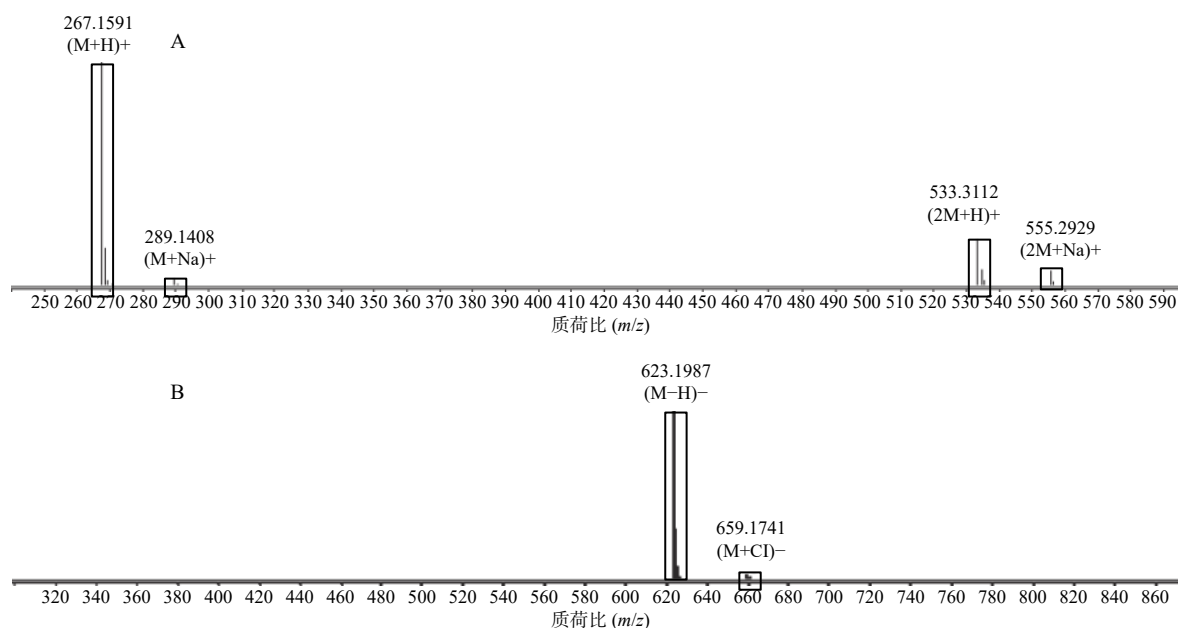


图3 夏枯草消瘤方同位素分布图

A. 莪术(正离子模式); B. 地黄(负离子模式)

3.4 夏枯草消瘤合剂化学成分鉴别结果

根据飞行时间质谱测得精确的相对分子质量, 比对所建立的数据库, 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, 结合上述对照品鉴别结果及相关文献报道, 对夏枯草消瘤合剂中药材在正、负离子模式下所得色谱图中色谱峰进行分析, 初步鉴别出 37 个化学成分, 结果见表 2、表 3。对于部分未见区分的同分异构体, 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。

3.5 讨论

对色谱条件的摸索, 考察了甲醇-水、乙腈-水系统, 发现甲醇的洗脱效果优于乙腈, 且各色谱峰分离效果更好, 加入 0.1% 甲酸可以改善峰型, 并提高质谱响应, 故采用甲醇-0.1% 甲酸水为流动相。

由于本组方含有药材较多, 组方内所含成分比较复杂, 因此选择大梯度洗脱, 以期最大程度地得到其中的化合物保留。质谱检测比较了正、负离子两种扫描模式, 由于组方中所含多种化合物响应模式各有不同, 因此, 选择正、负离子两种扫描模式同时进行监测。对于碎片电压的选择, 本方中大部分化学成分在 160 V 时以准分子离子峰形式稳定存在, 有少量化学成分在负离子模式下 260V 时以准分子离子峰形式稳定存在, 图谱本底较低, 因此选择 160 V、260 V 的碎片电压可以最大限度地对方中的成分进行鉴别。

4 结论

本研究运用 HPLC-TOF/MS 技术快速鉴别夏枯草消瘤合剂中 37 种化学成分, 其中正离子模式

表 2 夏枯草消瘤合剂中化学成分的正离子模式鉴别结果

| 序号 | 相对时间(min) | 化合物 | 分子式 | M+H | 实验值(m/z) | 理论值(m/z) | 误差($\times 10^{-6}$) | 来源 |
|-----------------|-----------|------------------|---|--------------------|-----------|-----------|------------------------|-----|
| 1 | 19.174 | 7-羟基异喹啉 | C ₉ H ₇ NO | [M+H] ⁺ | 146.060 8 | 146.052 8 | -0.72 | 地黄 |
| 2 | 24.032 | Verrucarol | C ₁₅ H ₂₂ O ₄ | [M+H] ⁺ | 267.159 1 | 267.151 8 | 0.06 | 莪术 |
| 3 | 28.388 | 白术内酯 II | C ₁₅ H ₂₀ O ₂ | [M+H] ⁺ | 233.153 3 | 233.146 3 | 1.49 | 白术 |
| 4 ¹⁾ | 30.653 | 芦丁 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | [M+H] ⁺ | 611.160 8 | 611.153 4 | -0.27 | 夏枯草 |
| 5 ¹⁾ | 30.703 | 槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖苷 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | [M+H] ⁺ | 465.102 9 | 465.095 5 | -0.25 | 夏枯草 |
| 6 ¹⁾ | 33.713 | 伞形酮 | C ₉ H ₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 163.038 7 | 163.031 7 | 1.54 | 夏枯草 |
| 7 | 38.337 | 白术内酯 III | C ₁₅ H ₂₀ O ₃ | [M+H] ⁺ | 249.148 2 | 249.141 2 | 2.05 | 白术 |
| 8 ¹⁾ | 41.969 | 十四烷基柠檬酸 | C ₂₀ H ₃₆ O ₇ | [M+H] ⁺ | 389.252 9 | 389.246 1 | 1.31 | 白术 |

注: 1)表示正负模式下测得

表3 夏枯草消瘤合剂中化学成分的负离子模式鉴别结果

| 序号 | 相对时间(min) | 化合物 | 分子式 | M+H | 实验值(m/z) | 理论值(m/z) | 误差($\times 10^{-6}$) | 来源 |
|------------------|-----------|------------------------------------|---|------------------------------------|-----------|-----------|------------------------|-----|
| 9 ¹⁾ | 1.999 | 精氨酸 | C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ | (M-H) ⁻ | 173.104 3 | 173.111 7 | 0.56 | 地黄 |
| 10 ¹⁾ | 2.109 | 葡萄糖酸 | C ₆ H ₁₂ O ₇ | (M-H) ⁻ | 195.051 1 | 195.058 3 | -0.23 | 夏枯草 |
| 11 | 2.789 | 苹果酸 | C ₄ H ₆ O ₅ | (M-H) ⁻ | 133.014 3 | 133.021 5 | -0.61 | 夏枯草 |
| 12 | 2.842 | 柠檬酸 | C ₇ H ₁₂ O ₆ | (M-H) ⁻ | 191.019 5 | 191.027 0 | 1.04 | 夏枯草 |
| 13 | 3.305 | 二氢梓醇 | C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀ | (M+CHO ₂) ⁻ | 409.134 8 | 409.136 9 | 0.88 | 地黄 |
| 14 ¹⁾ | 4.441 | 梓醇 | C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀ | (M+CHO ₂) ⁻ | 407.118 8 | 407.121 2 | 2.01 | 地黄 |
| 15 | 4.724 | 尿嘧啶核苷 | C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆ | (M-H) ⁻ | 243.062 2 | 243.069 5 | 0.43 | 地黄 |
| 16 | 5.869 | 络氨酸 | C ₉ H ₁₁ NO ₃ | (M-H) ⁻ | 180.066 4 | 180.073 9 | 1.28 | 地黄 |
| 17 | 9.186 | 鸟苷 | C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅ | (M-H) ⁻ | 282.084 1 | 282.091 7 | 1.12 | 地黄 |
| 18 ¹⁾ | 12.586 | 地黄苷D | C ₂₇ H ₄₂ O ₂₀ | (M+CHO ₂) ⁻ | 731.225 6 | 731.226 9 | -0.57 | 地黄 |
| 19 ¹⁾ | 14.46 | 丁香酸 | C ₉ H ₁₀ O ₅ | (M-H) ⁻ | 197.045 3 | 197.052 8 | 1.48 | 地黄 |
| 20 | 14.562 | 益母草苷 | C ₁₅ H ₂₄ O ₉ | (M+Cl) ⁻ | 383.111 1 | 383.642 | 0.88 | 地黄 |
| 21 | 18.189 | 原儿茶酸 | C ₇ H ₆ O ₃ | (M-H) ⁻ | 137.024 5 | 137.031 7 | -0.75 | 夏枯草 |
| 22 | 19.253 | 2,3-二氢-7-甲氧基-4-甲基-1H-1,5-苯并二氮卓-2-酮 | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ | (M-H) ⁻ | 203.082 5 | 203.089 9 | 0.52 | 苍术 |
| 23 | 21.839 | 地黄苦苷 | C ₁₆ H ₂₆ O ₈ | (M-H) ⁻ | 345.155 3 | 345.162 8 | 0.41 | 地黄 |
| 24 | 22.327 | 咖啡酸 | C ₉ H ₈ O ₄ | (M-H) ⁻ | 179.035 1 | 180.049 5 | -0.9 | 白术 |
| 25 ¹⁾ | 27.255 | 异迷迭香酸苷 | C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃ | (M-H) ⁻ | 521.130 8 | 521.137 3 | -1.42 | 夏枯草 |
| 4 ²⁾ | 28.487 | 芦丁 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | (M-H) ⁻ | 609.146 1 | 609.153 4 | 0.08 | 夏枯草 |
| 5 ²⁾ | 28.61 | 槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖苷 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | (M-H) ⁻ | 463.088 1 | 463.095 5 | 0.26 | 夏枯草 |
| 26 ¹⁾ | 30.296 | 迷迭香酸 | C ₁₈ H ₁₆ O ₈ | (M-H) ⁻ | 359.077 2 | 359.084 5 | 0.18 | 夏枯草 |
| 27 ¹⁾ | 38.237 | 异地黄苷 | C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅ | (M-H) ⁻ | 651.229 1 | 651.236 7 | 0.59 | 地黄 |
| 28 ¹⁾ | 52.394 | 表莪术酮 | C ₁₅ H ₂₈ O ₂ | (M-H) ⁻ | 239.201 4 | 239.208 9 | 1.07 | 莪术 |
| 29 ¹⁾ | 52.687 | 肉豆蔻酸 | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | (M-H) ⁻ | 227.201 7 | 227.208 9 | -0.12 | 夏枯草 |
| 30 ¹⁾ | 52.748 | 熊果酸 | C ₃₀ H ₄₈ O ₃ | (M-H) ⁻ | 455.353 | 455.306 3 | 0.17 | 夏枯草 |
| 31 ¹⁾ | 53.606 | 亚油酸 | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | (M-H) ⁻ | 279.232 8 | 279.240 2 | 0.55 | 夏枯草 |
| 32 ¹⁾ | 53.911 | 软脂酸 | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | (M-H) ⁻ | 255.233 4 | 255.240 2 | -1.71 | 夏枯草 |
| 33 | 54.095 | 油酸 | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | (M-H) ⁻ | 281.249 0 | 281.255 9 | -1.43 | 夏枯草 |
| 34 ¹⁾ | 54.92 | 硬脂酸 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | (M-H) ⁻ | 283.264 5 | 283.271 5 | -0.93 | 苍术 |
| 35 | 33.114 | 6-O-E阿魏酰基筋骨草醇 | C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂ | (M-H) ⁻ | 523.181 7 | 523.189 4 | 0.73 | 地黄 |
| 36 | 51.355 | 麝香草酚 | C ₁₀ H ₁₄ O | (M-H) ⁻ | 149.097 1 | 149.104 5 | 0.28 | 夏枯草 |
| 37 | 54.305 | 11-十八烯酸- | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | (M-H) ⁻ | 281.248 6 | 282.225 9 | 0.09 | 夏枯草 |

注: 1)表示负模式下碎片电压160V和260V测得; 2)表示正负模式下测得。

碎片电压 160 V 条件下 8 个; 负离子模式碎片电压 160 V 条件下 28 个, 碎片电压 260 V 条件下 19 个; 正负离子均有响应 4 个, 负离子模式两种碎片电压下均有响应 16 个, 并对成分进行了药材归属。该方法在传统的植物化学分离提取基础上对色谱峰进一步明确化, 为夏枯草消瘤方的质量控制、体内的深入研究及临床应用奠定了良好的基础。

【参考文献】

- [1] 贺天临, 谢国群, 陈洁, 等. 夏枯草消瘤合剂联合化疗治疗中晚期非小细胞肺癌30例[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(5): 29-32.
- [2] 朱全刚, 程亮, 顾小燕, 等. HPLC法同时测定夏枯草消瘤合剂中迷迭香酸和咖啡酸的含量[J]. 中医药导报, 2015, 21(20): 21-23.

(下转第 155 页)