

甘地胶囊化学成分的HPLC-ESI-TOF/MS分析^Δ

张健^{1,2*}, 唐跃年², 陈婷², 刘艳², 柴逸峰^{1#}(1.第二军医大学药学院, 上海 200433; 2.上海交通大学医学院附属新华医院药学部, 上海 200092)

中图分类号 R283.65; R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2921-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.15

摘要 目的:对甘地胶囊的化学成分进行快速分离与鉴别。方法:采用高效液相色谱-电喷雾-高分辨飞行时间质谱(HPLC-ESI-TOF/MS)联用技术。色谱柱为Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(100 mm×3 mm, 2.7 μm),流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为0.4 ml/min,检测波长为254 nm,柱温为25 ℃,进样量为10 μl;使用ESI离子源,在负离子模式下采集数据,N₂流速为10 L/min,载气温度为350 ℃,毛细管电压为4 000 V,轰击电压为165 V,扫描质量范围(*m/z*)为100~1 100 amu。结果:推断出甘地胶囊内容物中主要成分有18种,分别为8-表马钱子苷酸、莫诺苷、马钱素、当药苷、芦丁、异毛蕊花苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖苷、山茱萸新苷、黄芩苷、山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷、2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、汉黄芩苷、黄芪甲苷、黄芩素、汉黄芩素、黄芩新素Ⅱ、异黄芪皂苷Ⅰ、乙酰黄芪皂苷Ⅰ。结论:该方法快速、微量、高效,可为甘地胶囊的药效物质基础和质量控制研究奠定基础。

关键词 甘地胶囊;化学成分;高效液相色谱-电喷雾-飞行时间质谱联用技术

Analysis of Chemical Constituents of Gandi Capsule by HPLC-ESI-TOF/MS

ZHANG Jian^{1,2}, TANG Yue-nian², CHEN Ting², LIU Yan², CHAI Yi-feng¹(1.School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2.Dept. of Pharmacy, Xinhua Hospital Affiliated to Medical School, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To separate and identify the chemical constituents of Gandi capsule. METHODS: HPLC-ESI-TOF/MS was adopted. The determination was performed on Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(100 mm×3 mm, 2.7 μm) column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.4 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 10 μl. ESI and negative ion mode were adopted, and the flow rate and temperature of carrier gas (N₂) were 10 L/min and 350 ℃, respectively. The capillary voltage was 4 000 V, the bombardment voltage was 165 V, and scanning proton range were 100-1 100 amu. RESULTS: A total of 18 chemical constituents were identified in Gandi capsule, including 8-epiloganic acid, morroniside, loganin, sweroside, rutin, isoverbascoside, kaempferol 3-rutinoside, cornuside, baicalin, kaempferol-3-glucoside, 2'-Hydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavane-7-*O*-β-*D*-glucoside, wogonoside, astragaloside, baicalein, wogonin, skullcapflavon II, isoastragaloside I and acetyastragaloside I. CONCLUSIONS: The method is rapid, trace and highly active, and can lay foundation for pharmacodynamic material basis and quality control of Gandi capsule.

KEYWORDS Gandi capsule; Chemical constituents; HPLC-ESI-TOF/MS

甘地胶囊(Gandi capsule, GDC)为上海交通大学医学院附属新华医院院内制剂,委托上海蔡同德堂中药制药厂生产。本制剂主要用于治疗糖尿病引起的血管病变,临床疗效满意^[1-3]。方中一些指标成分测定已有少量文献报道^[4-5],但整个复方制剂的化学组分繁多且复杂,缺乏系统研究,其所含主要化学成分未见报道。

高分辨飞行时间质谱(TOF/MS)是一种新兴且发展迅速的MS技术,具有检测灵敏度高、测定化合物物质荷比精确、离子扫描范围宽等优点,现已越来越广泛地用于中药分析中^[6-9]。本试验采用高效液相色谱(HPLC)-电喷雾(ESI)-TOF/MS联用

技术,对GDC中多成分进行了鉴别。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪,配有在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱和二极阵列检测器(美国安捷伦公司);6220型TOF/MS仪,配有标准ESI离子源,分析软件为Mass Hunter在线工作站和Qualitative Analysis离线分析软件(美国安捷伦公司);Labofuge 400R型高速离心机[力新仪器(上海)有限公司];XW-80型旋涡混合器(上海医科大学仪器厂);电热恒温鼓风干燥箱(上海跃进医疗器械厂);AS3120B型超声波清洗器(上海医用分析仪器厂)。

1.2 药品与试剂

GDC(上海蔡同德堂中药制药厂,批号:111201);黄芪甲苷对照品(批号:0781-200311)、黄芩素对照品(批号:111595-200604)、芦丁对照品(批号:100080-200707)、黄芩素对照品(批号:111595-200905)和汉黄芩素对照品(批号:

^Δ基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81202598);上海市科委科研项目课题(No.11DZ1972500)

*主任药师,硕士研究生导师,博士研究生。研究方向:药学。电话:021-25077150。E-mail:zj_xhpharm@126.com

#通信作者:教授,博士研究生导师,博士。研究方向:药物分析。电话:021-81871201。E-mail:yfchai@smmu.edu.cn

111514-200403)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈和甲酸为色谱纯(美国Fisher公司),水为双蒸馏水,其余试剂均为分析纯。全部溶剂均采用0.22 μm微孔滤膜滤过。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取5种对照品各适量,置25 ml量瓶中,加甲醇约20 ml,超声处理(功率:500 W,频率:40 kHz)20 min溶解,加甲醇稀释至刻度,经0.22 μm微孔滤膜滤过,得质量浓度为50.00 mg/ml的标准储备液,-20℃保存,备用。使用时,再稀释至所需浓度。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取GDC内容物0.1 g,置25 ml量瓶中,加水20 ml,超声处理(功率:500 W,频率:40 kHz)40 min,放至室温后补水至刻度,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 HPLC条件

色谱柱:Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(100 mm×3 mm,2.7 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~10 min,10%→35% B;>10~20 min,35%→60% B;>20~30 min,60%→90% B;>30~40 min,90% B);柱温:25℃;流速:0.4 ml/min;检测波长:254 nm;进样量:10 μl。

2.4 MS条件

采用ESI离子源,在负离子模式下进行监测,具体参数如下:毛细管电压4 000 V;雾化气压力40 psi;干燥气为N₂,体积流量10 L/min;载气温度350℃;轰片电压165 V;参比离子为m/z 112.985 5和1 033.988 1;扫描质量范围(m/z)100~1 100 amu。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<1×10⁻⁶。

2.5 GDC化学成分数据库的建立

根据国内外专业数据库(Pubmed、ChemSpider、中科院化学专业数据库等)及相关研究文献,GDC中8味药材的化学成分超过240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、氧原子的个数,计算精确的相对分子质量,建立了包括化合物名称、分子式、精确相对分子质量、M+H、M-H等准分子离子峰、相对分子质量的相应化学成分数据库。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度试验 精密吸取“2.2”项下供试品溶液10 μl,按“2.3”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果表明,18个主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积没有明显变化,其RSD分别为0.25%~0.87%(n=6)和0.47%~0.96%(n=6),说明仪器的精密度良好。

3.1.2 稳定性试验 取按“2.2”项下方法制备的同一供试品溶液适量,按“2.3”项下色谱条件分别在0、4、8、12、24 h测定,考察各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的稳定性。结果表明,18个主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积没有

明显变化,其RSD分别为0.17%~0.26%(n=5)和0.55%~2.37%(n=5),说明供试品溶液在24 h内稳定。

3.1.3 重复性试验 取GDC内容物适量,共6份,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样测定,考察各主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积的重复性。结果表明,18个主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积没有明显变化,其RSD分别为0.13%~0.52%(n=6)和0.51%~1.68%(n=6),说明本方法的重复性良好。

3.2 成分筛查

通过HPLC-ESI-TOF/MS分析并应用Qualitative Analysis分析软件计算可能的分子组成(误差<3 ppm),结合GDC化学成分数据库,对GDC供试品溶液所得总离子流图(图1)上的色谱峰进行分析,初步推测了18个成分的分子组成,其中峰5、9、14、15、16通过与对照品比对,分别确认为芦丁、黄芩苷、黄芪甲苷、黄芩素、汉黄芩素,详见表1。对表1中的精确相对分子质量与计算所得的理论值进行比较可知,试验测得的相对分子质量准确可信(误差均<3 ppm)。在数据匹配的基础上,本试验还利用峰物质特征的同位素分布进行了验证。在负离子模式下,采用Qualitative Analysis软件的“同位素匹配功能”对异毛蕊花苷(6号峰)离子的同位素峰进行匹配,匹配结果见图2。从图2可以看出,离子理论上计算的同位素峰强度比、出峰位置(由方框表示)与实际测得的结果(由框内的峰表示)吻合良好,进一步说明推导结果的准确可信。同理可得其他峰的解析结果。

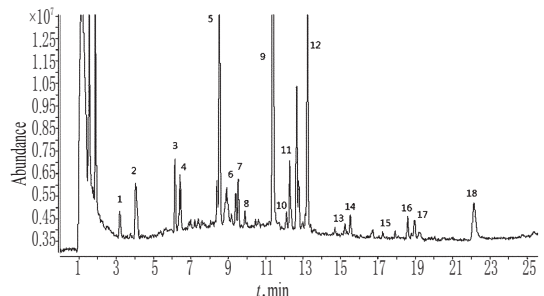


图1 GDC的HPLC-TOF/MS总离子流图

Fig 1 HPLC-TOF/MS TIC of Gandi capsule

3.3 鉴定成分归属

本试验采用HPLC-ESI-TOF/MS联用技术,从GDC中鉴定出了18个化合物成分,分别归属于地黄2个、黄芪4个、山茱萸4个、黄芩5个、槐花1个、余甘子3个、益母草2个,详见表1。其中,部分化合物可存在于多种药材中,如芦丁可在槐花与益母草中共存。该鉴定结果与GDC的复方配伍成分基本吻合。

4 讨论

4.1 试验条件的优化

在流动相体系中加入甲酸可有效抑制黄酮类化合物的拖尾现象。本试验考察了甲酸添加量对分离度的影响,结果发现甲酸体积分数在0.1%时已经足够抑制黄酮类物质的拖尾情况,并且GDC中大多数成分有不错的MS响应。因此,最终采用0.1%甲酸水溶液作为水相。MS检测分别比较了正、负离子

表1 GDC中化学成分的负离子模式鉴别结果

Tab 1 Analysis of chemical constituents in Gandi capsule in negative mode

峰号	保留时间,min	化合物名称	分子式	加合离子	精确相对分子质量	试验相对分子质量	误差,ppm	归属
1	3.195	8-表马钱子苷酸	C ₁₆ H ₂₅ O ₁₀	[M-H] ⁻	376.138 8	376.136 9	1.65	地黄
2	4.026	莫诺苷	C ₁₇ H ₂₅ O ₁₁	[M+HCOO] ⁻	406.150 2	406.147 5	2.68	山茱萸
3	6.137	马钱素	C ₁₇ H ₂₅ O ₁₀	[M+HCOO] ⁻	390.152 1	390.152 6	1.85	山茱萸
4	6.344	当药苷	C ₁₆ H ₂₅ O ₉	[M+HCOO] ⁻	358.126 6	358.126 4	1.29	山茱萸
5	8.555	芦丁	C ₂₇ H ₃₅ O ₁₆	[M-H] ⁻	610.154 9	610.153 4	2.51	槐花、益母草
6	8.890	异毛蕊花苷	C ₂₉ H ₃₉ O ₁₃	[M-H] ⁻	624.206 6	624.205 4	1.85	地黄
7	9.398	山茱萸-3-O-芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₅ O ₁₃	[M-H] ⁻	594.161 9	594.158 5	1.79	余甘子
8	9.893	山茱萸新苷	C ₂₄ H ₃₁ O ₁₄	[M-H] ⁻	542.165 7	542.163 6	2.94	山茱萸
9	11.363	黄芩苷	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁	[M-H] ⁻	446.085 6	446.084 9	1.52	黄芩
10	12.100	山茱萸-3-O-葡萄糖苷	C ₂₇ H ₃₅ O ₁₁	[M-H] ⁻	448.101 7	448.100 6	2.48	余甘子
11	12.515	2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷	C ₂₅ H ₂₉ O ₁₀	[M-H] ⁻	464.169 1	464.168 2	1.86	黄芪
12	13.271	汉黄芩苷	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	[M-H] ⁻	460.101 5	460.100 6	2.01	黄芩
13	15.345	黄芪甲苷	C ₄₁ H ₆₉ O ₁₄	[M-H] ⁻	784.460 7	784.460 9	-0.27	黄芪
14	15.585	黄芩素	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	[M-H] ⁻	270.054 0	270.052 8	2.18	黄芩
15	17.590	汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	284.069 1	284.068 5	2.09	黄芩、余甘子、益母草
16	18.798	黄芩新素II	C ₁₉ H ₁₉ O ₆	[M-H] ⁻	374.100 9	374.100 2	2.05	黄芩
17	19.277	异黄芪皂苷I	C ₄₆ H ₇₇ O ₁₆	[M-H] ⁻	868.482 0	868.482 0	-0.10	黄芪
18	22.274	乙酰黄芪皂苷I	C ₄₇ H ₇₉ O ₁₇	[M-H] ⁻	910.490 7	910.492 6	-2.08	黄芪

两种扫描模式,结果发现负模式下峰容量更大、MS响应更强,故最终选择在负模式下进行。

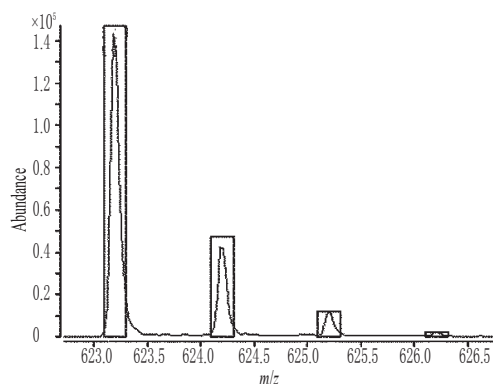


图2 6号化合物离子峰的理论同位素峰强度与实际同位素峰密度匹配结果

Fig 2 Correspondence of theoretical and measured isotopic peak density for compound 6

4.2 色谱峰的选择

图谱分析可得到更多信息,本试验先易后难,先查出18个主要色谱峰的化合物结构,作为判断GDC药效学的主要物质。从组方可知,黄芪、地黄、山茱萸为本处方君药,本次测定中所得黄芪甲苷、异黄芪皂苷I、乙酰黄芪皂苷I、2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-O-β-D-葡萄糖苷4个化合物为黄芪中有效组分;8-表马钱子苷酸、异毛蕊花苷为地黄中有效组分;莫诺苷、马钱素、当药苷、山茱萸新苷4个化合物为山茱萸中的有效组分。此外,本试验还对槐花、黄芩、余甘子、益母草中的有效组分进行了测定。相比用HPLC-UV法,本法测定中药复方组分中化学成分的灵敏度和准确度可大大提高,同时检测化

物的数量也明显增加。本法灵敏度高,可以在短时间获得化合物准确的相对分子质量,通过与建立的已知化学成分数据库比对,可对被测成分进行快速分析和鉴别,用于中药复方组分的化学成分分析和鉴定非常有效。相比传统的HPLC-UV分离方法,本法具有显著的优越性,对进一步阐明GDC中药药理学的主要物质基础及其质量控制,具有重要的临床意义。

参考文献

- [1] 朱伟嵘,杨永华,郑岚,等.甘地胶囊对糖尿病血瘀证治疗作用的临床观察[J].中华现代中西医杂志,2005,3(13):1153.
- [2] 晁愚,张昕.甘地胶囊质量标准研究[J].中成药,2007,29(3):附1-2.
- [3] 曹含弘.前列地尔联合甘地胶囊治疗早期糖尿病肾病疗效观察[J].山东医药,2013,53(24):80.
- [4] 唐跃年,凌启迪,肖敏,等.HPLC法测定甘地胶囊中指标成分的含量[J].中国临床药学杂志,2011,20(5):296.
- [5] 唐跃年,凌启迪,肖敏,等.甘地胶囊指纹图谱分析及指标成分含量测定[J].中国临床药学杂志,2013,22(5):299.
- [6] 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,2013,29(4):20.
- [7] 赵亮,田文君,吕磊,等.UPLC-TOF/MS对中药复方扶正平消胶囊化学成分的鉴别[J].第二军医大学学报,2012,33(7):770.
- [8] 赵白云,朱臻宇,王彬,等.UPLC-DAD-TOF/MS法测定小柴胡汤中柴胡皂苷a,黄芩苷和甘草酸的含量[J].第二军医大学学报,2007,28(5):527.

(收稿日期:2013-10-25 修回日期:2014-03-21)