



复方金钱草颗粒化学成分的UHPLC-Q-TOF/MS分析

张哲, 孙卓然, 潘鹏超, 陈啸飞, 柴逸峰

UHPLC-Q-TOF/MS analysis of chemical constituents in compound Jinqiancao granules

ZHANG Zhe, SUN Zhuoran, PAN Pengchao, CHEN Xiaofei, CHAI Yifeng

在线阅读 View online: <http://yxj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202105117>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

联用超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱技术对扶正化瘀胶囊化学成分快速鉴别

Rapid identification of chemical constituents of Fuzheng Huayu capsules by UHPLC-TOF/MS

药学实践杂志. 2019, 37(5): 406-415 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.005

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

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

药学实践杂志. 2020, 38(2): 138-142, 155 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201907116

基于UHPLC-Q-TOF/MS技术对扶正化瘀胶囊入血成分的快速鉴别

Rapid identification of chemical constituents in serum and plasma of Fuzheng Huayu capsules by UHPLC-TOF/MS

药学实践杂志. 2020, 38(3): 250-254, 267 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.201906027

基于正交试验和响应曲面法优化复方金钱草颗粒提取工艺

Optimization of the compound herba lysimachiae extraction process based on orthogonal experiment and response surface method

药学实践杂志. 2020, 38(1): 27-34 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201910001

百蕊草亲水性化学成分研究

Study on hydrophilic chemical constituents from *Thesium Chinensis* Turcz

药学实践杂志. 2018, 36(3): 270-273 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.03.017

三色片醇提物抗补体活性物质的UPLC-Q-TOF-MS/MS研究

Study on components with anti-complement activity from ethanol extract of Sanshe tablets by UPLC-Q-TOF-MS/MS

药学实践杂志. 2021, 39(4): 322-330 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202101036



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 研究报告 ·

复方金钱草颗粒化学成分的UHPLC-Q-TOF/MS分析

张哲¹, 孙卓然², 潘鹏超³, 陈啸飞², 柴逸峰² (1. 中国人民解放军海军第971医院药剂科, 山东青岛266071; 2. 海军军医大学药学院, 上海200433; 3. 中国人民解放军南部战区海军第一医院, 广东湛江524005)

[摘要] 目的 通过超高效液相-四极杆飞行时间质谱(UHPLC-Q-TOF/MS)联用技术定性分析中成药复方金钱草颗粒中的主要化学成分。方法 色谱分离采用XBridge BEH C₁₈柱(2.1 mm×100 mm, 2.5 μm), 流动相由0.1%甲酸水和0.1%甲酸乙腈组成, 梯度洗脱, 流速为0.4 ml/min; 质谱定性采用四极杆飞行时间质谱, 正离子模式扫描。结果 在优化的液质联用条件下, 鉴定出复方金钱草颗粒中47个成分, 并通过软件计算区分了其中的同分异构体, 且对其药材来源进行了归属。结论 本研究通过UHPLC-Q-TOF/MS联用技术, 为鉴定中成药复方金钱草颗粒中的化学成分建立了一种快速、高效的分析方法。

[关键词] 复方金钱草颗粒; 超高效液相-四极杆飞行时间质谱; 化学成分

[中图分类号] R284

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2022)02-0146-06

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202105117

UHPLC-Q-TOF/MS analysis of chemical constituents in compound Jinqiancao granules

ZHANG Zhe¹, SUN Zhuoran², PAN Pengchao³, CHEN Xiaofei², CHAI Yifeng² (1. Department of Pharmacy, No. 971 Naval Hospital of the PLA, Qingdao 266071, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 3. The First Naval Hospital of Southern Theater Command of the PLA, Zhanjiang 524005, China)

[Abstract] **Objective** To qualitatively analyze the main chemical components in compound Jinqiancao granules by ultra high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF/MS). **Methods** XBridge BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 2.5 μm) was used for chromatographic separation. The mobile phase was composed of 0.1% formic acid water and 0.1% formic acid-acetonitrile, gradient elution, and the flow rate was 0.4 ml/min. Mass spectrometry was characterized by Quadrupole time-of-flight mass spectrometry (Q-TOF/MS) and positive ion mode scanning. **Results** Under the optimized LC/MS condition, 47 components in compound Jinqiancao granules were identified. The isomers were distinguished by software calculation. The source of medicinal materials was assigned. **Conclusion** A rapid and efficient analytical method was established for the identification of chemical components in compound Jinqiancao granules by UHPLC-Q-TOF/MS.

[Key words] compound Jinqiancao granules; UHPLC-Q-TOF/MS; chemical constituents

复方金钱草颗粒由广金钱草、车前草、光石韦以及玉米须四味中药材组成, 现执行标准为《中国药典》(一部)2015年版及国家食品药品监督管理总局药品补充批件(2016B00026)。该药具有清热利湿、通淋排石的作用, 在临床上用于治疗湿热所致的热淋、石淋, 症见尿频、尿急、尿痛、腰痛的患者, 以及泌尿系结石、尿路感染见上述证候者^[1]。现代药理学研究也显示复方金钱草颗粒具有防治

草酸钙结石形成、促进输尿管蠕动和增加尿量、抗炎^[2-5]及增加冠脉血流量、保肝利胆^[3-5]、免疫调节等作用^[5]。复方金钱草颗粒中的化学成分包含黄酮类^[5-8]、甾醇类^[5,7-9]、生物碱类^[5-7]、萜类^[5,7,9]、酚酸类^[5-6,8]、挥发油^[5,7]、多糖类等^[6-7]。由于复方金钱草颗粒成分复杂, 目前尚无全面的化学成分鉴定工作。本研究致力于建立起一种快速有效的系统分析方法, 同时定性地鉴别其多种化合物成分, 为其有效成分研究提供依据。

1 试剂与仪器

1.1 试剂

分析纯无水乙醇(中国医药集团上海化学试剂

[作者简介] 张哲, 主管药师, 研究方向: 中药成分分析、临床药学, Email: nancy0322@163.com

[通信作者] 陈啸飞, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 药物分析, Email: xfchen2010@163.com; 柴逸峰, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药物分析, Email: yfchai@smmu.edu.cn

公司);质谱纯甲酸、质谱纯乙腈、0.22 μm 滤膜(德国 Merck 集团);复方金钱草颗粒(规格:10g,广西万通制药有限公司)

1.2 仪器

BP121S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司); Milli-Q A10 超纯水净化系统(美国 Millipore 公司); KQ-400KDB 超声波清洗器(400W, 40KHz; 昆山市超声仪器有限公司); X1R-230 V 台式离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Agilent 1290 超高效液相色谱仪、Agilent 6538 四极杆飞行时间质谱仪(美国安捷伦公司)。

2 试验方法

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件

采用 Agilent 1290 超高效液相色谱仪(UHPLC), 色谱柱为 XBridge BEH C_{18} 柱(2.1 mm \times 100 mm, 2.5 μm), 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 3 μl , 流动相由 0.1% 甲酸水(A)和 0.1% 甲酸乙腈(B)组成, 梯度洗脱, 洗脱条件见表 1, 分析时间为 19 min, 流速为 0.4 ml/min。

2.1.2 质谱条件

采用 Agilent 6538 四极杆飞行时间质谱仪(Q-TOF/MS), 质谱参数如下:电喷雾离子源(正离子模式);质谱扫描范围:50~1500 m/z ;干燥气温度为 350 $^{\circ}\text{C}$;干燥气流速为 11 L/min;雾化气压力为 45

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间(t/min)	A(%)	B(%)
0	98	2
2	98	2
12	40	60
17	2	98
19	2	98

psig;毛细管电压为 4000 V;碎片电压为 120 V; Skimmer 电压为 60 V;参比离子 m/z 为 121.0509 和 922.0098。

2.2 供试品溶液制备

精密称取 2.0 g 复方金钱草颗粒,置于 50 ml 具塞三角烧瓶中,加入 55% 乙醇提取溶剂 25 ml, 称定质量并记录,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中超声加热回流提取药液 10 min,经室温冷却后,再次称定并用提取溶剂补足损失的质量,15000 r/min 离心 20 min, 取上清液并经 0.22 μm 滤膜过滤,得提取液。

2.3 复方金钱草颗粒中化学成分数据库的建立

复方金钱草颗粒由广金钱草、车前草、光石韦和玉米须等四味中药材组成。通过搜索中国知网、万方数据、PubMed 等网站中关于复方金钱草颗粒及其四味中药材的文献,检索上海有机化学研究所的化学专业数据库、TCMID 来建立复方金钱草颗粒化学成分数据库,其相关信息包括化合物中英文名称、分子式以及相对分子质量。

3 结果与讨论

3.1 四极杆飞行时间质谱成分筛查

复方金钱草颗粒 UHPLC-Q-TOF/MS 总离子流图见图 1。应用 Qualitative Analysis 质谱分析软件计算可能的分子组成(误差 <8 ppm),结合复方金钱草颗粒化学成分数据库,对复方金钱草颗粒提取溶液所得色谱图上色谱峰进行分析,利用精确分子量匹配和碎片离子归属策略,初步尝试鉴定出 51 个化学成分,结果如表 2 所示。

3.2 同位素分布验证

对于以上鉴别分析结果,在数据匹配的基础上,我们还利用峰物质特征的同位素分布进行验证。以 4 号峰广金钱草内酯和 11 号峰芸香苷为例,采用 Qualitative Analysis 软件的“显示预测的同位素分布”功能分别对这两种化合物的同位素峰进行

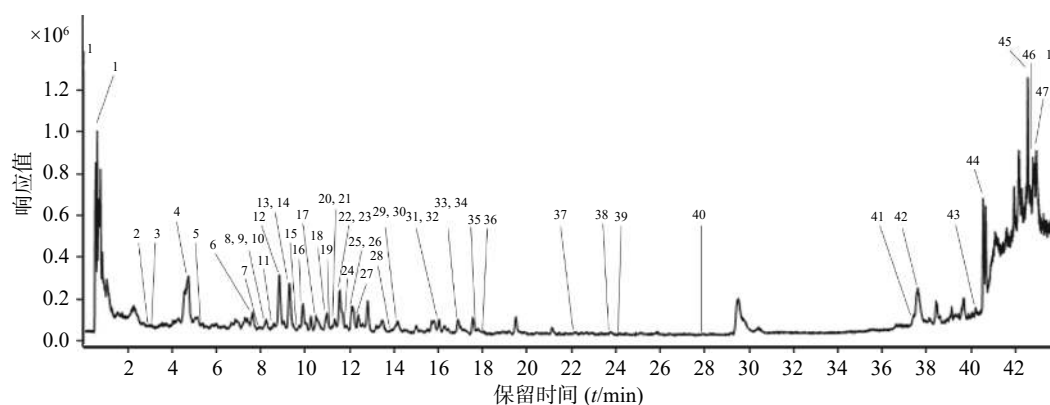


图 1 复方金钱草颗粒 UHPLC-Q-TOF/MS 总离子流图

表2 复方金钱草颗粒化学成分鉴别分析结果

序号	名称	分子式	M+X	m/z	质量	误差(ppm)
1 b	水苏糖	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	(M+H) ⁺	667.231 2	666.224 4	3.86
2 b	桂皮酸	C ₉ H ₈ O ₂	(M+H) ⁺	149.059 4	148.052	-3.2
3 abd	原儿茶酸 /龙胆酸	C ₇ H ₆ O ₄	(M+H) ⁺	155.033 5	154.026 1	-3.44
4 a	广金钱草内酯	C ₈ H ₁₃ N O ₃	(M+H) ⁺	172.096 8	171.089 4	-0.75
5 bd	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	(M+H) ⁺	181.049 3	180.042 1	-0.79
6 abcd	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	(M+H) ⁺	355.102 8	354.095 5	1.1
7 b	丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	(M+H) ⁺	199.060 7	198.053 1	1.24
8 a	香橙素 黄芩素	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	(M+H) ⁺	289.071 6	288.064 1	2.62
9 ab	/染料木素 /芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	(M+H) ⁺	271.060 9	270.053 5	2.66
10 c	(R/S)-eriodictyol-8-C-β-D-glucopyranoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	(M+H) ⁺	473.106 3	450.118	3.88
11 a	芸香苷 槲皮素	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	(M+H) ⁺	611.162 3	610.155 1	2.79
12 ac	/3,5,7,4'-tetrahydroxy-coumaronochromone /6-羟基木犀草素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	(M+H) ⁺	303.050 5	302.043 2	1.78
13 b	大车前苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	(M+H) ⁺	389.145 8	388.138 5	4.04
14 bd	对-香豆酸	C ₉ H ₈ O ₃	(M+H) ⁺	165.054 7	164.047 6	1.45
15 a	homoaonivernite /刺苞菊苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	(M+H) ⁺	581.152	580.144 5	2.96
16 a	维采宁-2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	(M+H) ⁺	595.167 2	594.159 7	2.08
17 b	桃叶珊瑚苷元	C ₉ H ₁₂ O ₄	(M+H) ⁺	185.081 6	184.074 2	3.46
18 a	6-C-glycopyranosyl-8-C-xyloeyl apigenin /6-C-glycopyranosyl-8-C-glycopyranosyl apigenin	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	(M+H) ⁺	549.162 1	548.155 2	4.12
19 ab	阿魏酸 /咖啡酸甲酯	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	(M+H) ⁺	195.065 4	194.058	0.71
20 b	黑麦草内酯	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	(M+H) ⁺	197.117	196.109 7	-1.16
21 b	车前黄酮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	(M+H) ⁺	449.108 9	448.101 6	2.34
22 b	木犀草素-7-O-葡萄糖苷 异槲皮苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	(M+H) ⁺	449.108 9	448.101 6	2.34
23 a	/紫花杜鹃素丁 /6-hydroxyl luteolin 7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	(M+H) ⁺	465.103 3	464.096 5	2.16
24 c	杧果苷 /异杧果苷	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	(M+H) ⁺	423.093 3	422.086 1	2.84
25 a	山柰酚-3-O-芸香糖苷 维采宁-1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	(M+H) ⁺	595.167 2	594.159 7	2.08
26 a	/维采宁-3 /异夏佛塔雪轮苷 /夏佛塔雪轮苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	(M+H) ⁺	565.157 2	564.149 8	3.42
27 abd	对羟基苯甲酸 /水杨酸	C ₇ H ₆ O ₃	(M+H) ⁺	139.039	138.031 7	0.31

(续表 2)

序号	名称	分子式	M+X	m/z	质量	误差(ppm)
28 a	/原儿茶醛 异荛草素 牡荆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	(M+H) ⁺	449.1089	448.1016	2.34
29 a	/异牡荆素 /大波斯菊苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	(M+H) ⁺	433.1137	432.1064	1.65
30 a	/染料木苷 三叶豆苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	(M+H) ⁺	449.1089	448.1016	2.34
31 ab	5, 7-dihydroxy-2', 4'-dimethoxy-isoflavanone-7-O-β-glucopyranoside /[(2R,3S,4S,5R,6R)-6-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy]-4,5-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)oxan-3-yl] (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoate /木通苯乙醇苷A /木通苯乙醇苷B	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	(M+H) ⁺	479.1563	478.149	3.11
32 b	/车前草苷 A /车前草苷 B /3,4-Dihydroxyphenethylalcohol-6-O-caffeoyl-β-D-glucoside /去鼠李糖洋丁香酚苷 车前草苷D	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	(M+H) ⁺	663.19	640.1989	-2.26
33 b	/大车前苷 异洋丁香酚苷 /洋丁香酚苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	(M+H) ⁺	647.195	624.2038	-2.67
34 b	/Beta-D-Glucopyranoside, 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethyl 3-O-(6-deoxy-alpha-L-mannopyranosyl)-, 6-(3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoate), (E)-	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	(M+H) ⁺	647.195	624.2038	-2.67
35 b	黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	(M+H) ⁺	447.0938	446.0864	3.35
36 a	35 b 高车前苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	(M+H) ⁺	463.1239	462.117	1.7
37 abcd	5, 7-Dihydroxy-2'-methoxy-3', 4'-methylenedioxy-isoflavanone-7-O-β-glucopyranoside 山柰酚 /木犀草素 /2'-Hydroxygenistein	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	(M+H) ⁺	493.136	492.1282	2.96
38 a	/高山黄芩素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	(M+H) ⁺	287.0558	286.0482	1.45
39 b	5, 7-Dihydroxy-2', 3', 4'-trimethoxy-isoflavanone-7-O-β-glucopyranoside 异角胡麻苷 /角胡麻苷	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₂	(M+H) ⁺	509.1668	508.1596	2.93
40 a	5, 7-Dihydroxy-2'-methoxy-3', 4'-methylenedioxy-isoflavanone	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	(M+Na) ⁺	675.2281	652.2391	3.69
41 a	5, 7-Dihydroxy-2', 3', 4'-trimethoxy-isoflavanone	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	(M+H) ⁺	331.0824	330.0748	2.45
42 a	Homoferreirin	C ₁₈ H ₁₈ O ₇	(M+H) ⁺	347.112	346.105	-0.6
43 a	大豆皂苷 I	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	(M+H) ⁺	317.1034	316.0959	3.82
44 b	桃叶珊瑚苷	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	(M+H) ⁺	965.5112	942.5214	2.75
45 d	亚油酸	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	(M+H) ⁺	347.1352	346.1279	4.44
46 d	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	(M+H) ⁺	303.2303	280.2408	2.2
47 d	Bis[(2R)-2-ethylhexyl] benzene-1, 2-dicarboxylate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	(M+H) ⁺	301.1421	278.1531	4.47
		C ₂₄ H ₃₈ O ₄	(M+H) ⁺	413.2681	390.2798	7.14

注: a. 广金钱草中的成分; b. 车前草中的成分; c. 光石韦中的成分; d. 玉米须中的成分

匹配,其结果见图2和图3。图中结果明显可见,该两种离子理论上的同位素峰强度比、出峰位置(由方框表示)与实际测得的(由竖线峰表示)结果吻合良好,4号化合物广金钱草内酯的吻合分数为99.94,11号化合物芸香苷的吻合分数为95.28。以上结果证明鉴别分析结果准确。

3.3 同分异构体的区分

实验中我们发现复方金钱草颗粒中含有多组同分异构体,本文采用ACD/ChemSketch软件计算化合物的油水分配系数logP值判断出峰顺序。以

16号峰维采宁-2与25号峰山柰酚-3-O-芸香糖苷为例,在UHPLC-Q-TOF/MS总离子流图中,提取 m/z 为595.1672的离子,结果见图4。

维采宁-2和山柰酚-3-O-芸香糖苷的结构式如图5所示。采用ACD/ChemSketch软件计算它们的油水分配系数logP值分别为 $-0.10(\pm 0.94)$ 和 $1.96(\pm 1.45)$,表明山柰酚-3-O-芸香糖苷的疏水性更强,在反相色谱柱中的保留时间则越长,确定这两个化合物的出峰顺序维采宁-2在前,山柰酚-3-O-芸香糖苷在后,从而对异构体的色谱峰进行相应归属。

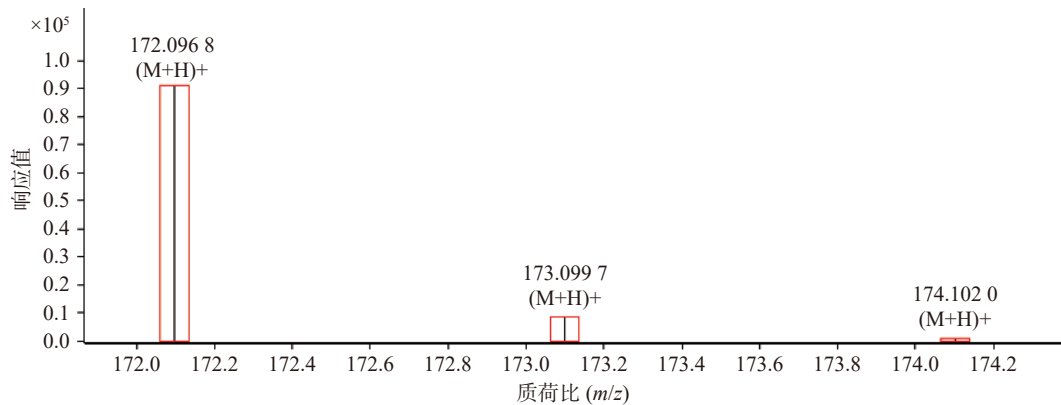


图2 4号化合物离子峰的理论同位素强度与实际同位素强度匹配结果

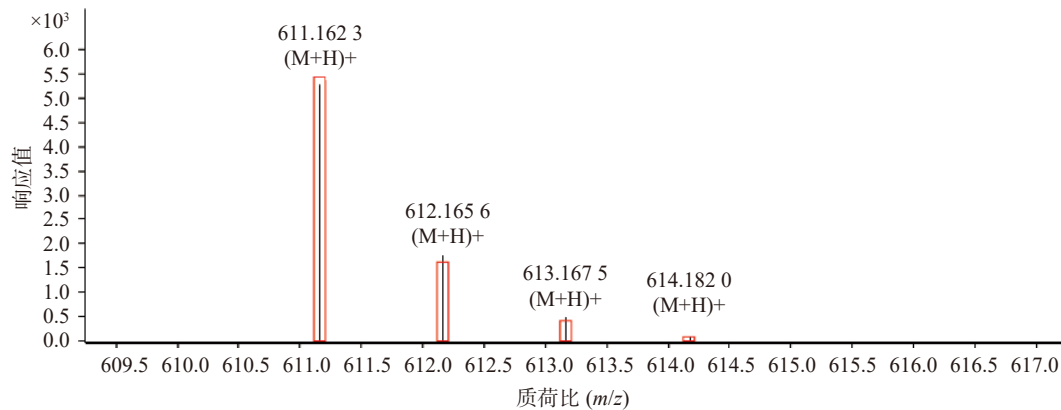


图3 11号化合物离子峰的理论同位素强度与实际同位素强度匹配结果

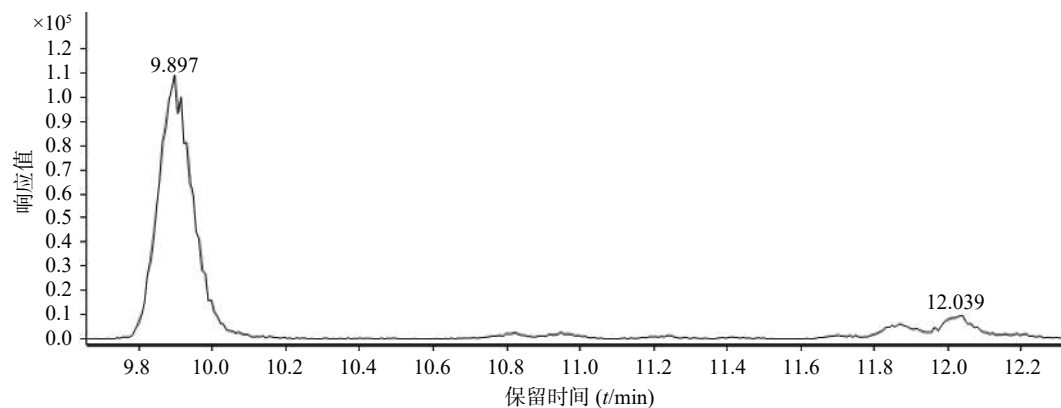


图4 16号峰(维采宁-2)和25号峰(山柰酚-3-O-芸香糖苷)的离子色谱图

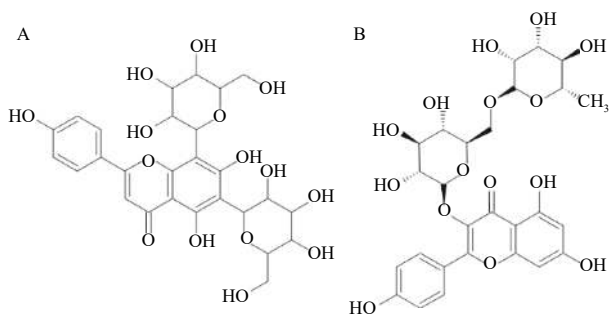


图5 维采宁-2 (A) 和山柰酚-3-O-芸香糖苷 (B) 的结构式

我们还用此方法对同一分子式的一组多个同分异构体进行 logP 值的排序, 以确定这些成分的出峰顺序来进行归属。例如在总离子流图中, 第 21、22、28、30 号峰为一组同分异构体, 分别为车前黄酮苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、异荭草素和三叶豆苷, 其结构式如图 6 所示。在 UHPLC-Q-TOF/MS 总离子流图中, 提取 m/z 为 449.1089 的离子, 结果见图 7。对它们的油水分配系数 logP 值进

行排序, 可知该 4 种同分异构体的出峰顺序, 结果如表 3 所示。

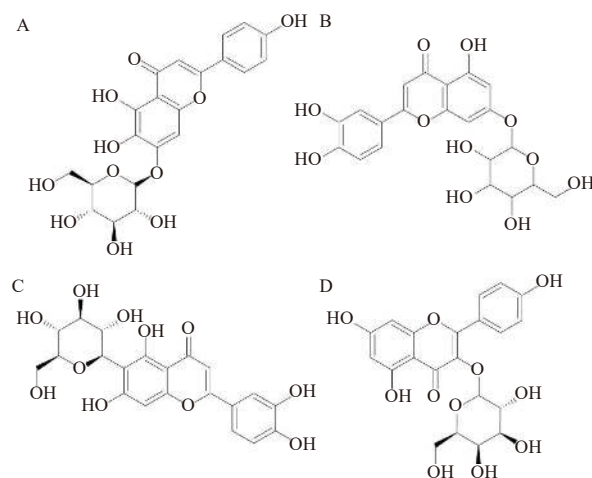


图6 车前黄酮苷 (A)、木犀草素-7-O-葡萄糖苷 (B)、异荭草素 (C) 和三叶豆苷 (D) 的结构式

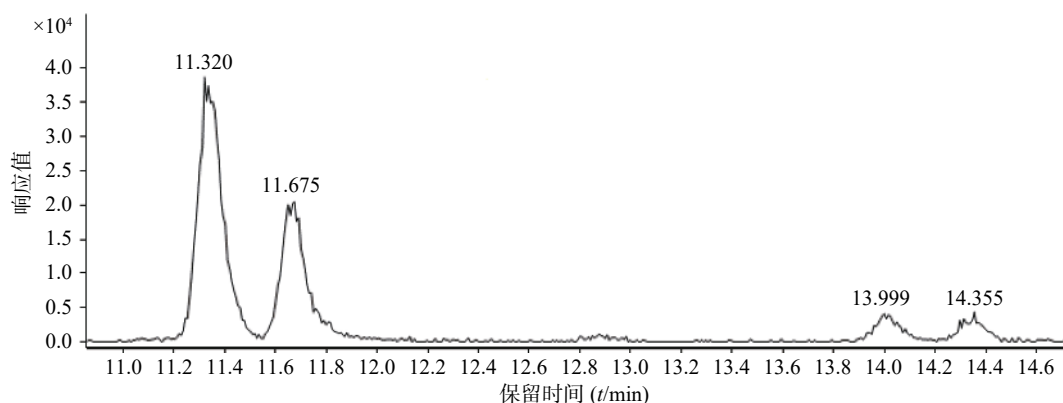


图7 车前黄酮苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、异荭草素和三叶豆苷的离子色谱图

表3 同分异构体 (21、22、28 和 30 号峰) 的归属结果

出峰编号	化合物名称	logP值	保留时间(t/min)
21	车前黄酮苷	-0.30±0.64	11.320
22	木犀草素-7-O-葡萄糖苷	-0.09±0.64	11.675
28	异荭草素	1.58±0.88	13.999
30	三叶豆苷	1.95±1.43	14.355

4 讨论

本研究采用 UHPLC-Q-TOF/MS 技术, 实现了对中成药复方金钱草颗粒中多成分的快速定性分析, 共鉴定出 2 个苯乙醇苷类、1 个低聚糖类、8 个酚酸类、27 个黄酮类、1 个生物碱类、5 个萜类、1 个脂肪酸类、2 个酯类成分 (共 47 个活性成分), 该技术为中药复方多成分分析提供了一种有效、可靠的方法, 也同样适用于其他中药复方复杂体系的化学成分分析。

由于中药复方化学成分较单味药材更多更复

杂, 因而同分异构体的情况非常普遍。使用的四极杆复合飞行时间质谱 (Q-TOF) 在保持了较高的检测灵敏度以及质量准确性的前提下, 可以对样本中所有的成分的质荷比进行全谱采集。这种技术使数据采集效率有了极大的提高, 更加适用于中药重要复杂体系化学成分的鉴定。

虽然本研究基于复方金钱草颗粒化学成分数据库, 利用精确分子量匹配和碎片离子归属策略并辅以软件计算的方法鉴定出了多个化学成分, 但仍有大量的同分异构体无法被有效地区分开来, 因此, 在下一步实验中, 使用标准品对照的方法进行更精确地鉴定。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)2020年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1326.

(下转第 156 页)