

桂枝茯苓胶囊中三萜类成分 UPLC 指纹图谱研究

林 夏^{1,2,3}, 何艳梅^{2,3}, 李家春^{2,3}, 黄文哲^{2,3}, 萧 伟^{1,2,3}, 丁 岗^{1,2,3*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210046
2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘要: 目的 建立桂枝茯苓胶囊(GFC)三萜类成分 UPLC 指纹图谱方法, 为评价 GFC 的质量提供新方法。方法 采用 Agilent Zorbax Eclipse Plus HD C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%磷酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.2 mL/min, 柱温 30 ℃, 检测波长为 210 nm。采用 Q-TOF/MS 对指纹图谱中共有峰进行指认。结果 得到分离度和重复性良好的 GFC 三萜类成分指纹图谱, 确定了 20 个共有峰, 其中 1~7、10、12、14~17 号峰共 13 个共有峰来自于茯苓, 8、11 号峰来自于桂枝, 9 号峰来自于白芍和牡丹皮, 13 号峰来自于桃仁、白芍、牡丹皮和桂枝。10 批成品指纹图谱相似度在 0.90 以上。UPLC-Q-TOF/MS 共鉴定出 15 个成分, 分别为常春藤皂苷(1)、去氢土莫酸(2)、土莫酸(3)、猪苓酸 C(4)、3-表去氢土莫酸(6)、茯苓酸 D(7)、α-亚麻酸(9)、去氢茯苓酸(10)、齐墩果酸(11)、茯苓酸(12)、亚油酸(13)、棕榈油酸甲酯(15)、棕榈酸(16)、棕榈酸乙酯(17)、胡萝卜苷(18)。结论 建立的 UPLC 指纹图谱有较好的精密性、重复性和稳定性, 适用于 GFC 的质量控制。

关键词: 桂枝茯苓胶囊; UPLC; 指纹图谱; 三萜类成分; UPLC-Q-TOF/MS; 茯苓; 桂枝; 白芍; 牡丹皮; 桃仁; 常春藤皂苷; 去氢土莫酸; 土莫酸; 猪苓酸 C; 3-表去氢土莫酸; 茯苓酸 D; α-亚麻酸; 去氢茯苓酸; 齐墩果酸; 茯苓酸; 亚油酸; 棕榈油酸甲酯; 棕榈酸; 棕榈酸乙酯; 胡萝卜苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)16-2857-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.16.013

UPLC fingerprint of triterpenoids in Guizhi Fuling Capsule

LIN Xia^{1,2,3}, HE Yan-mei^{2,3}, LI Jia-chun^{2,3}, HUANG Wen-zhe^{2,3}, XIAO Wei^{1,2,3}, DING Gang^{1,2,3}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China
2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China
3. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish the UPLC fingerprint of triterpenoids in Guizhi Fuling Capsule (GFC) and give a new method for quality control. **Methods** UPLC was used on an Agilent Zorbax Eclipse Plus HD C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column with the gradient elution solvent system composed of acetonitrile-0.1% H₃PO₄ water solution as mobile phase, the flow rate was 0.2 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the detection wavelength was 210 nm. The common peaks were identified by Q-TOF/MS. **Results** The UPLC fingerprints of triterpenoids in GFC were established. Totally 20 common peaks were selected as the fingerprint peaks of GFC, of which a total of 13 mutual peaks (1—7, 10, 12, and 14—17) from *Poria*, the peaks of number 8 and 11 were from *Cinnamomi Ramulus*, the peak of number 9 was from *Paeoniae Radix Alba* and *Moutan Cortex*, and the peak of number 13 was from *Persicae Semen*, *Paeoniae Radix Alba*, *Moutan Cortex*, and *Cinnamomi Ramulus*. The similarity among the fingerprint of 10 batches of GFC samples were 0.90. Fifteen chemical components were identified by UPLC-Q-TOF/MS, which were 1-hederagenin, 2-dehydrotumulosic acid, 3-tumulosil acid, 4-polyporenic acid C, 6-3-epidehydrotumulosic acid, 7-poricoic acid D, 9-α-linolenic acid, 10-dehydropachymic acid, 11-oleanolic acid, 12-pachymic acid, 13-linolic acid, 15-methylcis-9-hexadecenoate, 16-palmitic acid, 17-palmitic acid ethyl ester, and 18-daucosterol. **Conclusion** The established UPLC fingerprint has desirable precision,

收稿日期: 2015-11-25

基金项目: 科技部重大新药创制项目 (2013ZX09402203)

作者简介: 林 夏, 女, 工程师, 从事新药质量标准研究。Tel: 15105130710 E-mail: linxia297125856@163.com

*通信作者 丁 岗, 男, 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药新剂型的研究与开发。

Tel: (0518)81152337 Fax: (0518)81152327 E-mail: kanionlunwen@163.com

reproducibility, and stability, and could be applied to the quality control of GFC.

Key words: Guizhi Fuling Capsule; UPLC; fingerprint; triterpenoids; UPLC-QTOF/MS; *Poria*; *Cinnamomi Ramulus*; *Paeoniae Radix Alba*; *Moutan Cortex*; *Persicae Semen*; hederagenin; dehydrotumulosic acid; tumulosil acid; polyporenic acid C; 3-epidehydrotumulosic acid; poricoic acid D; α -linolenic acid; dehydropachymic acid; oleanolic acid; pachymic acid; linolic acid; methylcis-9-hexadecenoate; palmitic acid; palmitic acid ethyl ester; daucosterol

桂枝茯苓胶囊(GFC)处方源自于东汉张仲景《金匮要略》中的经典名方桂枝茯苓汤,由桂枝、茯苓、牡丹皮、赤芍和桃仁共5味中药组成,诸药相伍,具有活血化瘀的作用,用于妇人宿有症块或血瘀经闭、行经腹痛、产后恶露不尽。临床上常用于卵巢囊肿、子宫内膜异位症、子宫肌瘤、慢性盆腔炎、痛经等妇科血瘀证的治疗^[1-4]。GFC化学成分复杂^[5-9],目前也有质量控制研究方面的报道^[10],且《中国药典》2015年版^[11]主要采用LC指纹图谱结合定量测定及TLC方法检测制剂中白芍、牡丹皮、桃仁、桂枝,采用显微鉴别方法鉴别茯苓,进而对其质量进行控制和评价,但是没有主要针对GFC中茯苓有效成分的质控方法。而茯苓三萜类成分具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节等作用^[12-13],为了更好地反映GFC的内在质量,首次对GFC中三萜类成分的指纹图谱进行了研究。

1 仪器和材料

Agilent 1290 超高压液相色谱仪, DAD 紫外检测器, 美国 Agilent 公司; Q-TOF (6538) 质谱仪, 电喷雾离子源 (ESI) 及 Agilent Masshunter 数据处理系统, 美国 Agilent 公司; Mettler AE240 电子分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Centrifuge 5415D 高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; Milli-Q Academic 纯水机, 美国 Millipore 公司。GFC, 江苏康缘药业股份有限公司生产, 批号 130501、140301、140401、140701、140801、140901、141001、141002、141101、150701; 茯苓酸, 自制, 质量分数为 99.5% (HPLC 面积归一化法测定); 乙腈, 色谱纯, 美国天地公司; 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus HD C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m); 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液, 梯度洗脱, 线性洗脱程序为 0~12 min, 50%~55%乙腈; 12~16 min, 55%~60%乙腈; 16~20 min, 60%~65%乙腈; 20~24 min, 65%~70%乙腈; 24~28 min, 70%~75%乙腈; 28~32 min, 75%~85%乙腈; 32~34 min, 85%~90%乙腈; 34~

60 min, 90%乙腈; 体积流量 0.2 mL/min; 检测波长 210 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 进样量 1 μ L; 理论板数按茯苓酸峰计算应不低于 100 000。

2.2 对照品溶液的制备

取茯苓酸对照品适量, 精密称定, 加甲醇制得含茯苓酸 100 μ g/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品内容物适量, 混匀, 取约 5 g, 精密称定, 置 150 mL 圆底烧瓶内, 加乙醚 50 mL, 浸泡 30 min 后加热回流 40 min, 滤过, 分取乙醚, 滤渣用少量乙醚润洗, 合并乙醚液, 滤过, 置蒸发皿内, 蒸干, 加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶内, 加甲醇稀释定容至刻度, 摇匀, 过 0.22 μ m 滤膜, 即得。

2.4 精密度试验

取供试品(批号 130501)内容物适量, 取约 5 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次进行测定。采用相似度软件, 剪切去掉前 5 min 色谱峰(本研究对象为该制剂中茯苓三萜类成分, 检测波长为 210 nm; 前 5 min 色谱峰为弱保留、极性较大的成分堆叠一起, 且在 210 nm 响应极高, 指纹图谱中三萜类成分因响应较弱, 无法辨识, 故去掉前 5 min 色谱图), 以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照图谱, 计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度。通过全谱峰匹配, 相似度结果均不小于 0.99, 符合指纹图谱的技术要求。表明该方法精密度良好。

2.5 稳定性试验

取供试品(批号 130501)内容物适量, 取约 5 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 照“2.1”项下色谱条件于 0、2、4、6、8、12 h 分别测定指纹图谱, 采用相似度软件, 剪切去掉前 5 min 色谱峰, 以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照图谱, 计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度。通过全谱峰匹配, 相似度结果均不小于 0.99, 符合指纹图谱的技术要求。表明供试品溶液 12 h 内成分是稳定的。

2.6 重复性试验

取供试品(批号 130501)内容物适量, 取约 5 g, 精密称定, 按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品

溶液，照“2.1”项下色谱条件测定指纹图谱，采用相似度软件，剪切去掉前 5 min 色谱峰，以第 1 次进样所得指纹图谱作为参照图谱，计算后 5 次进样所得指纹图谱的相似度。通过全谱峰匹配，相似度结果均不小于 0.99，符合指纹图谱的技术要求。表明该方法重复较好。

2.7 对照指纹图谱的建立与技术参数

本方法主要针对处方中三萜类成分建立指纹图谱，因此选择保留时间适中、分离较好的茯苓酸作

为参照物。

取 10 批次 GFC 进行检测，根据所得图谱，标定 20 个共有峰，采用国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》2012 年版进行分析，以中位数法对照指纹图谱生成法，生成对照指纹图谱见图 1，以 12 号峰茯苓酸为对照参比峰。10 批样品检测所得色谱图与对照指纹图谱相似度分别为 0.927、0.945、0.989、0.917、0.901、0.911、0.949、0.950、0.921、0.918，见图 2。

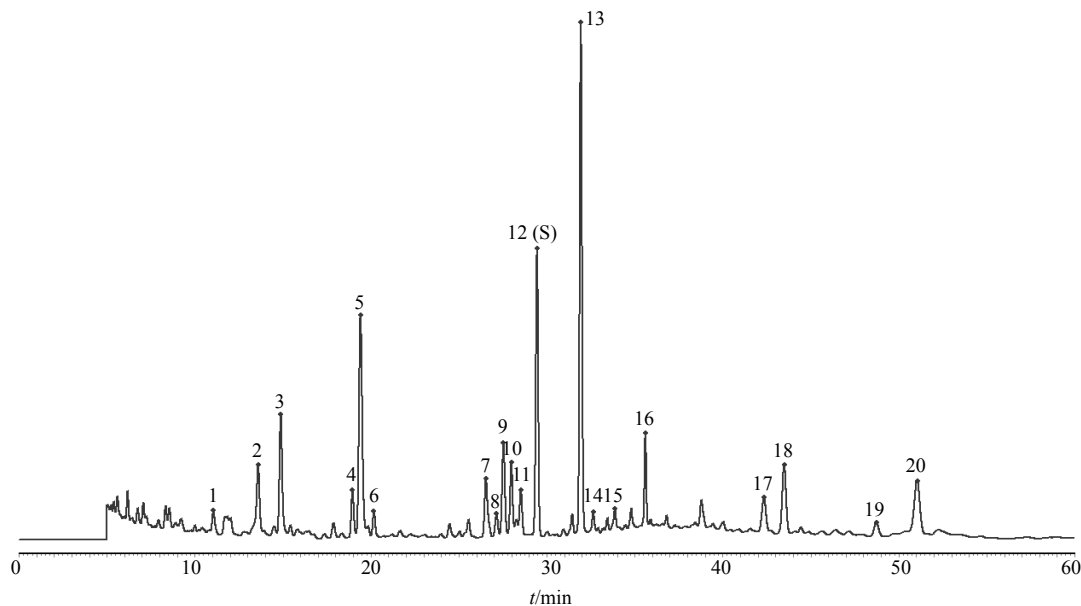


图 1 GFC 对照指纹图谱

Fig. 1 UPLC reference fingerprint of GFC

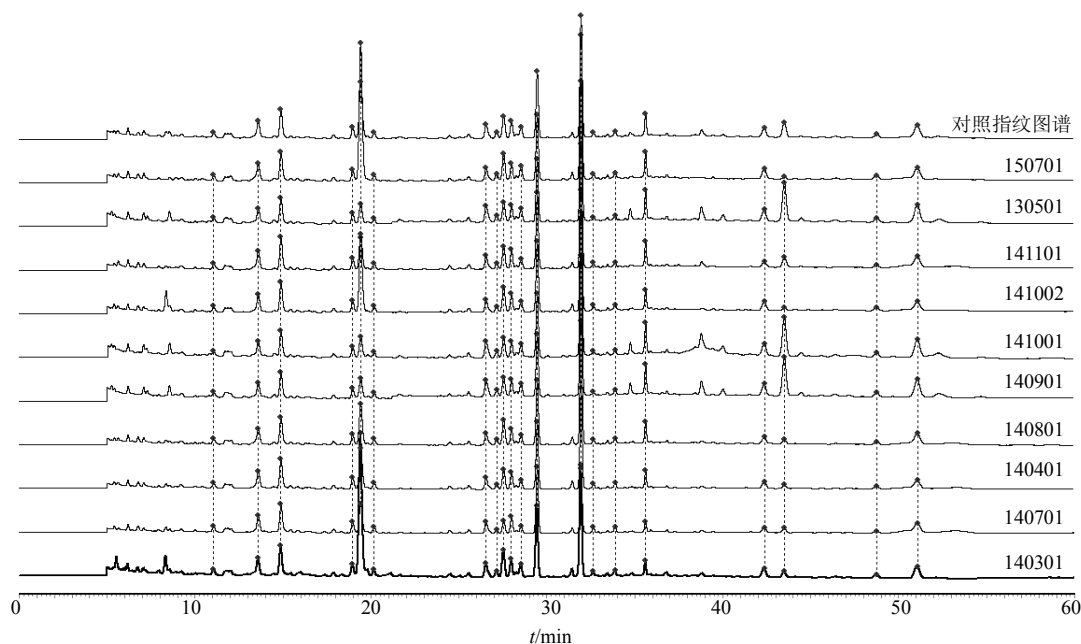


图 2 10 批 GFC 指纹图谱

Fig. 2 UPLC fingerprint for 10 batches of GFC

2.8 指纹图谱中共有峰的归属

取茯苓药材、桃仁药材、白芍药材、牡丹皮药材、桂枝药材各约 0.5 g, 精密称定于圆底烧瓶内, 加乙醚 25 mL 浸润 30 min 后加热回流 40 min, 滤过, 滤渣用少量乙醚润洗, 合并乙醚液于蒸发皿内, 蒸干, 加甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶内, 加甲醇稀释定容至刻度摇匀, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。按“2.1”项下色谱条件进样分析, 通过保留时间和 DAD 扫描分析, 指纹图谱中标定的 20 个共有峰, 其中 1、2、3、4、5、6、7、10、12、14、15、16、17 号峰共 13 个色谱峰来自于茯苓药材, 其中 8 和 11 号峰来自于桂枝, 9 号峰来自于白芍和牡丹皮, 13 号峰来自于白芍、牡丹皮、桂枝和桃仁, 见图 3。

2.9 共有峰指认

2.9.1 色谱条件 除 0.1%磷酸水溶液改为 0.1%甲酸水溶液外其余同“2.1”项下色谱条件。

2.9.2 质谱条件 采用 ESI 源, 正、负离子模式分别扫描, 毛细管电压 (正离子模式: 4 000 V; 负离子模式: 3 500 V), 雾化气压力 310.32 kPa (45 psi), 干燥气体积流量 10 L/min, 加热毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 源内裂解电压 175 V, 锥孔电压 65 V, 质量数扫描范围 m/z 100~2 000。

2.9.3 供试品溶液制备 同“2.3”项下供试品溶液制备方法。

2.9.4 化学成分数据库建立 通过 Agilent 提供的“formula-database-generator”软件建立 GFC 中化学成分的分子式与理论相对分子质量数据库。

2.9.5 GFC 指纹图谱中共有峰鉴别 应用 UPLC-Q-TOF/MS 在上述色谱和质谱条件下对供试品溶液进行定性分析, 正/负离子模式下的总离子流图 (TIC) 见图 4。结合紫外光谱信息、MS 数据和文献数据^[14-16]进行分析, 初步鉴定出 15 个化合物。UPLC-Q-TOF/MS 鉴定结果见表 1。

3 讨论

用 DAD 检测器在 190~400 nm 扫描, 210 nm 检测波长能较全面地反映 GFC 中的三萜类化学成分, 且各色谱峰分离较好, 基线平稳, 故选择 210 nm 作为 GFC 中的三萜类指纹图谱的检测波长。

比较了甲醇-0.1%磷酸水溶液、乙腈-水系统和乙腈-0.1%磷酸水溶液流动相系统对指纹图谱的影响, 结果乙腈-0.1%磷酸水溶液流动相系统所得指纹图谱峰形较好, 基线较平稳; 考察了柱温在 20、25、30 $^{\circ}\text{C}$ 时及体积流量在 0.18、0.20、0.22 mL/min 所得指纹图谱, 结果柱温在 25 $^{\circ}\text{C}$ 、体积流量在 0.20 mL/min 时基线较平稳, 各色谱峰分离度较好; 考察了进样体积分别为 1、2、3 μL 时指纹谱图, 结果进样量增大时无色谱峰增多的现象, 且相似度在 0.98 以上, 故选择进样体积为 1 μL ; 比较了同类型的 3

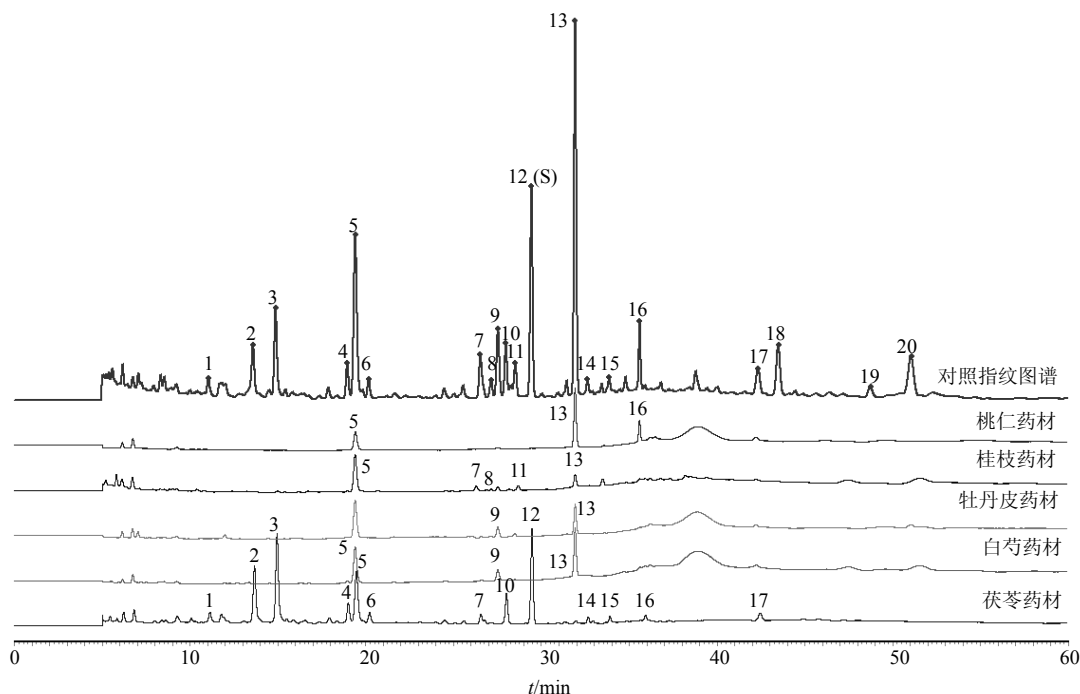


图 3 GFC 指纹图谱中各共有峰归属色谱图

Fig. 3 Fingerprint of each characteristic peak of phenolic compounds in GFC

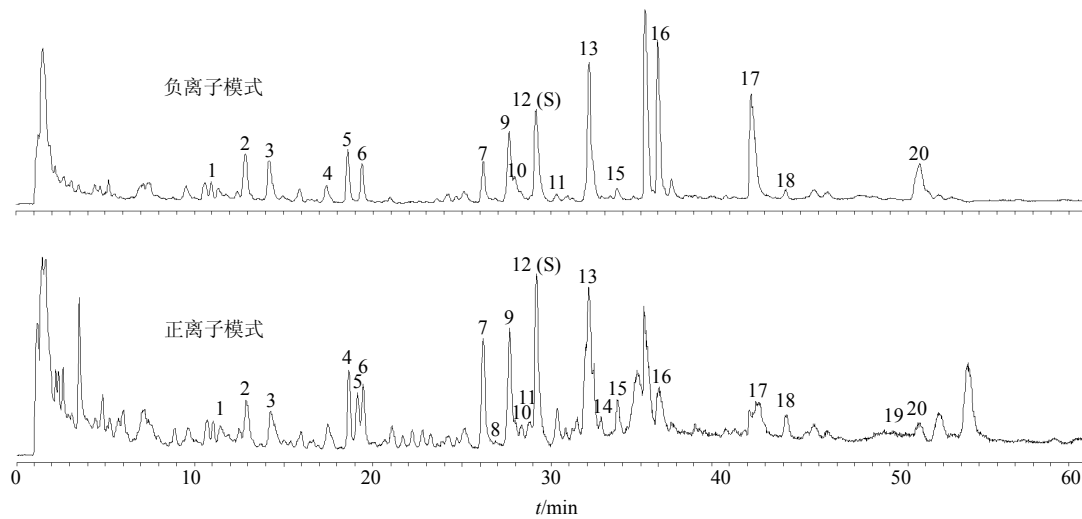


图4 GFC的UPLC-QTOF-MS总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatogram from UPLC-QTOF-MS of GFC

表1 GFC化学成分的UPLC-Q-TOF/MS的质谱分析鉴定结果

Table 1 UPLC-Q-TOF/MS analysis results for chemical constituents in GFC

峰号	t_R /min	一级离子	实际值	理论值	偏差/($\times 10^{-6}$)	分子式	英文名	中文名
1	10.612	$[M-H]^-$	472.355 1	472.355 3	0.38	$C_{30}H_{48}O_4$	hederagenin	常春藤皂苷
		$[M+H]^+$	472.354 9	472.355 3	0.70			
2	13.083	$[M-H]^-$	484.355 0	484.355 3	0.52	$C_{31}H_{48}O_4$	dehydrotumulosic acid	去氢土莫酸
		$[M+H]^+$	484.355 9	484.355 3	-1.25			
3	14.182	$[M-H]^-$	486.726 0	486.726 3	0.40	$C_{31}H_{50}O_4$	tumulosil acid	土莫酸
		$[M+H]^+$	486.347 2	486.726 3	5.24			
4	18.581	$[M-H]^-$	482.339 3	482.694 5	0.63	$C_{31}H_{46}O_4$	polyporenic acid C	猪苓酸 C
6	19.421	$[M-H]^-$	484.354 4	484.355 3	0.78	$C_{31}H_{48}O_4$	3-epidehydrotumulosic acid	3-去表去氢土莫酸
		$[M+H]^+$	484.354 1	484.355 3	-1.60			
7	26.155	$[M-H]^-$	514.365 6	514.329 5	0.42	$C_{31}H_{46}O_6$	poricoic acid D	茯苓酸 D
		$[M+H]^+$	278.218 0	278.429 6	-2.27	$C_{18}H_{30}O_2$	α -linolenic acid	α -亚麻酸
9	27.421	$[M-H]^-$	278.218 0	278.429 6	-2.27	$C_{18}H_{30}O_2$	α -linolenic acid	α -亚麻酸
		$[M+H]^+$	278.231 9	278.429 6	0.35			
10	27.650	$[M-H]^-$	526.365 6	526.365 8	0.47	$C_{33}H_{50}O_6$	dehydropachymic acid	去氢茯苓酸
		$[M+H]^+$	526.366 4	526.365 8	-1.03			
11	27.920	$[M-H]^-$	456.360 4	456.360 3	-0.14	$C_{30}H_{48}O_3$	oleanolic acid	齐墩果酸
		$[M+H]^+$	456.360 4	456.360 3	-0.01			
12	29.157	$[M-H]^-$	528.381 1	528.381 5	0.66	$C_{33}H_{52}O_5$	pachymic acid	茯苓酸
		$[M+H]^+$	528.381 7	528.381 5	-0.48			
13	32.133	$[M-H]^-$	280.233 1	280.445 5	-0.30	$C_{18}H_{32}O_2$	linolic acid	亚油酸
		$[M+H]^+$	280.247 5	280.445 5	0.19			
15	33.715	$[M-H]^-$	268.233 0	268.434 8	1.10	$C_{17}H_{32}O_2$	methylcis-9-hexadecenoate	棕榈油酸甲酯
16	35.497	$[M-H]^-$	256.233 0	256.240 2	1.17	$C_{16}H_{32}O_2$	palmitic acid	棕榈酸
17	41.242	$[M-H]^-$	284.264 3	284.271 5	0.33	$C_{18}H_{36}O_2$	palmitic acid ethyl ester	棕榈酸乙酯
18	43.074	$[M+COOH]^-$	576.389 7	576.439 0	0.29	$C_{35}H_{60}O_6$	daucosterol	胡萝卜苷

根色谱柱, 结果表明, 3 根色谱柱所得指纹图谱相似度在 0.98 以上; 延长测试时间 1 倍进行滞后峰考察, 结果在延长时间内无滞后峰, 因此该色谱条件适合 GFC 三萜类指纹图检测。

比较了分别用乙醚、乙醚与水、二氯甲烷作为提取溶剂在超声和回流 2 种提取方法下所得指纹图谱, 结果以乙醚作为提取溶剂, 回流提取方法所得指纹图谱最佳。

本研究建立的 GFC 中三萜类成分 UPLC 指纹图谱方法, 确定了 20 个共有峰, 并对共有峰进行了归属。茯苓药材中主要的 13 个色谱峰均能在指纹图谱中得以体现。采用 UPLC/Q TOF MS 对共有峰进行快速鉴定, 结果初步鉴定出 15 个成分, 为后续质量标准深入研究提供参考依据。

参考文献

- [1] 张新庄, 萧伟, 徐筱杰, 等. 基于网络药理学的桂枝茯苓胶囊治疗痛经、子宫肌瘤和盆腔炎的分子作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 81-94.
- [2] 林芬. 桂枝茯苓丸在妇产科的临床应用进展 [J]. 实用医技杂志, 2007, 14(14): 1870-1871.
- [3] 王振中, 范麒如, 窦霞, 等. 桂枝茯苓胶囊抑制小鼠离体子宫收缩效应及其物质基础评价 [J]. 中草药, 2009, 40(4): 609-611.
- [4] 张华. 桂枝茯苓胶囊在妇产科临床应用近况 [J]. 中国社区医师: 医学专业, 2010, 22(12): 28-29.
- [5] 王振中, 李成, 李家春, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (I) [J]. 中草药, 2011, 42(5): 856-858.
- [6] 朱克近, 王振中, 李成, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2011, 42(6): 1087-1089.
- [7] 杨鹏飞, 王振中, 王洪庆, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (III) [J]. 中草药, 2012, 43(3): 463-466.
- [8] 王洪庆, 刘超, 方莲花, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (IV) [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1386-1390.
- [9] 王雪晶, 谢雪, 罗鑫, 等. 桂枝茯苓胶囊化学成分研究 (V) [J]. 中草药, 2015, 46(6): 812-816.
- [10] 李家春, 孙兰, 李红娟, 等. 桂枝茯苓胶囊 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1333-1335.
- [11] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [12] 游昕, 熊大国, 郭志斌, 等. 茯苓多种化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(2): 106-109.
- [13] 冯启光. 茯苓有效成分的药理学研究概况探析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(24): 179-180.
- [14] 韩小娟, 罗建光, 陆园园, 等. HPLC-DAD-ESI-MSⁿ 法鉴定茯苓中的三萜成分 [J]. 药学与临床, 2009, 17(4): 290-293.
- [15] 唐安, 郭景瑞, 谢彤, 等. UPLC-LTQ-Qorbitrap 质谱联用技术分析茯苓中的化学成分 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 561-565.
- [16] 杨鹏飞. 桂枝茯苓胶囊及其单味药茯苓化学成分和生物活性研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.