

【 质量控制研究 】

注射用益气复脉（冻干）化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析

周焱焱¹, 焦燕婷¹, 王彦帅¹, 侯媛媛^{1*}, 李德坤², 周大铮², 鞠爱春², 白 钢¹

1. 南开大学药学院, 天津 300353

2. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300402

摘要: **目的** 研究注射用益气复脉(冻干)的化学成分。**方法** 采用超高效液相色谱仪-质谱(UPLC-Q-TOF/MS)方法对注射用益气复脉(冻干)成分进行分析,通过色谱峰的质谱数据与 Waters UNIFI 数据库匹配,并结合二级碎片的裂解规律和文献报道进行解析。**结果** 从注射用益气复脉(冻干)中共鉴定出 145 个化合物,其中有 26 个药效成分为首次检出,包括 17 个黄酮类化合物,4 个麦冬皂苷类化合物以及 5 个木脂素类化合物。**结论** UPLC-Q-TOF/MS 法可以快速、有效的鉴别注射用益气复脉(冻干)的相关成分,为中药质量控制提供依据。

关键词: 注射用益气复脉; UPLC-Q-TOF/MS; 化学成分分析; 质量控制; 黄酮

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2018)03-0446-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.03.016

Chemical compositions analysis for Yiqi Fumai Lyophilized Injection by UPLC-Q-TOF/MS

ZHOU Yaoyao¹, JIAO Yanting¹, WANG Yanshuai¹, HOU Yuanyuan¹, LI Dekun², ZHOU Dazheng², JU Aichun², BAI Gang¹

1. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300353, China

2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co. Ltd., Tianjin 300402, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of Yiqi Fumai Lyophilized Injection. **Methods** The constituents of Yiqi Fumai Lyophilized Injection were analyzed by UPLC-Q-TOF/MS. The mass spectra of each peak were matched with the Waters UNIFI database, and the cracking rules of the second-level fragments and related literatures were used for identification. **Result** A total of 145 compounds were identified. Therein 26 active ingredients were first reported from Yiqi Fumai Lyophilized Injection, including 17 flavonoids, 4 ophiopogon japonicosides and 5 lignans. **Conclusion** UPLC-Q-TOF/MS can be used to identify the active ingredients of Yiqi Fumai Lyophilized Injection rapidly and efficiently, and the result can be provided a basis for TCM quality control.

Key words: Yiqi Fumai Lyophilized Injection; UPLC-Q-TOF/MS; chemical composition profiling; quality control; flavones

注射用益气复脉(冻干)其处方来源于古方《生脉散》^[1],是天津天士力之骄药业有限公司采用现代技术,从红参、麦冬、五味子中提取多种有效成分而制成的现代中药复方冻干粉针剂。临床上用于治疗冠心病、劳累性心绞痛、气阴两虚症的治疗^[2-5]。目前已报道了利用 HPLC/MS 液质技术研究益气复脉中的人参皂苷和木脂素^[6-7],以及采用 UPLC-IT-TOF/MS 对其全成分进行解析^[8]。本实验

利用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对益气复脉的微量化学成分进行了再次分析,共鉴定出 145 个化合物,其中 26 个有效成分为首次发现,特别是其中的 17 个黄酮类成分,为进一步完善益气复脉的化学物质奠定了基础。

1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪串联四极杆/飞行时间质谱 (ACQUITY™ UPLC I-class/M-class SYNAPT G2-

收稿日期: 2018-01-04

*通信作者: 侯媛媛,女,博士,副教授,主要从事复方药物与系统生物学研究。Tel: (022) 23506930 E-mail: houyy@nankai.edu.cn

Si, Waters), Waters UNIFI、Masslynx 4.1 工作站 (Waters, USA); 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); Velocity 14R 高速冷冻离心机 (Dynamic, Australia); AB54 分析天平 (METTLER TOLEDO, Switzerland); Milli-Q 超纯水仪 (MILLIPORE, USA)。

注射用益气复脉(冻干)制剂样品, 由天士力之骄药业有限公司提供。色谱纯乙腈、甲醇 (Fisher, USA); 色谱纯甲酸 (Acros, Belgium); 亮氨酸-脑啡肽醋酸盐 (Sigma-Aldrich, USA); 超纯水由 Milli-Q 制备。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

取益气复脉制剂样品约 0.1 mg, 精密称定, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入甲醇 1 mL, 室温超声提取 30 min, 在 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 100 μL 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇稀释至 0.1 mg/mL, 并转移至进样瓶备用。

2.2 色谱条件

柱温 30° C, 体积流量 0.4 mL/min, 进样量 6.0 μL, 流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B); 二元梯度洗脱: 0~3 min, 5%~30% B; 3~23 min, 30%~60% B; 23~30 min, 60%~100% B; 30~33 min, 100%~5%B; 33~35 min, 5% B。

2.3 质谱条件

采用正、负两种模式扫描测定, 仪器参数如下: 电喷雾离子源 (ESI); V 模式; 毛细管电压 3.0 kV (正模式), 2.4 kV (负模式); 锥孔电压 30 V; 离子源温度 100°C; 脱溶剂气温度 350°C; 脱溶剂氮气流量 800 L/h; 锥孔气流量 30 L/h; 采样频率 0.1 s; 间隔 0.02 s; 质量数扫描范围 100~2 000 Da; 内参校正液 Lockmass 采用亮氨酸脑啡肽盐 LEA ($[M+H]^+ = 555.293$ 1; $[M-H]^- = 553.277$ 5)。数据采集工作站为 MassLynx 4.1。

2.4 化学成分的鉴定

采用上述色谱质谱条件, 对注射用益气复脉(冻干)样品进行正、负离子模式采集, 全扫描总离子流的 BPI 图见图 1。将所得结果导入 Waters UNIFI 软件, 利用 Waters UNIFI 中的以中药数据库为基础的 UNIFI[®]天然产物解决方案分析功能及二级碎片裂解规律, 结合相关文献, 从注射用益气复脉(冻干)中共鉴定出 145 个化合物。其中有 20 个黄酮类物质, 24 个木脂素类物质, 27 个皂苷类物质, 15 个糖类化合物, 38 种有机酸以及 22 个甾醇、多肽和酯类等其他物质。

2.5 药效成分解析

通过对照文献^[8], 发现有 26 个药效成分未曾报道, 其保留时间和裂解规律等具体信息见表 1。其中包括 17 个黄酮类化合物, 4 个麦冬皂苷类化合物, 以及 5 个木脂素类化合物, 具体结构式见图 2。

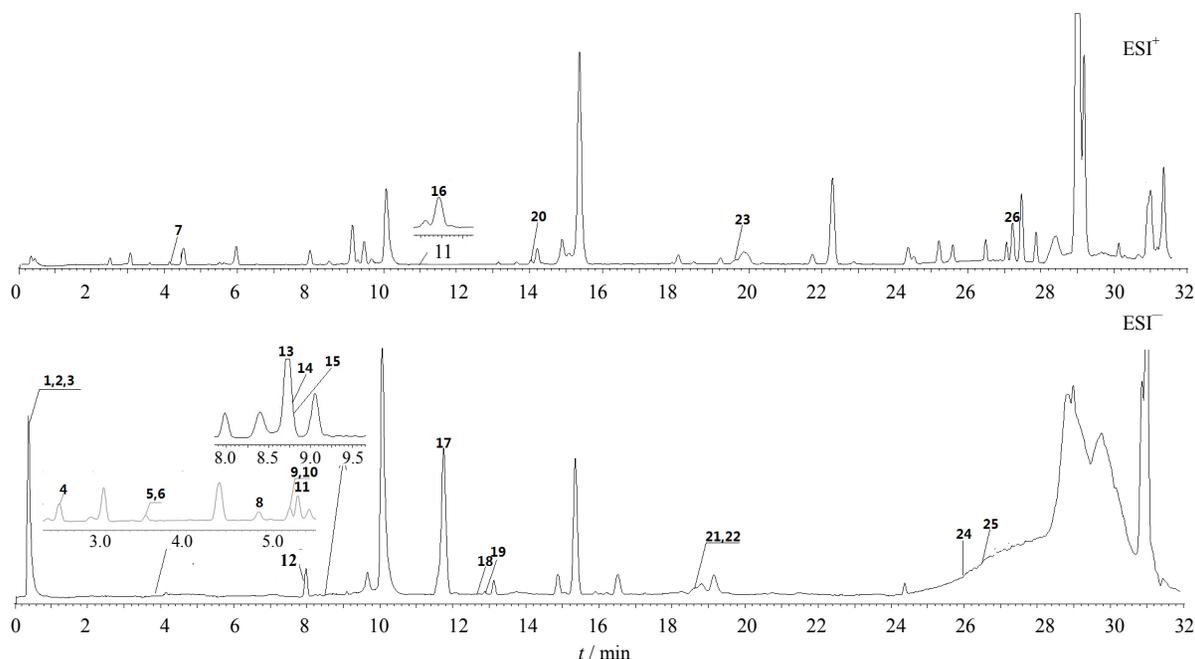


图1 注射用益气复脉(冻干)的 UPLC-Q-TOF/MS 分析

Fig.1 UPLC-Q-TOF/MS Analysis for Yiqi Fumai Lyophilized Injection

表 1 注射用益气复脉(冻干)中主要化学成分的鉴别分析

Table 1 Qualitative analysis of chemical constituents in of Yiqi Fumai Lyophilized Injection

峰号	化合物名称	R_f/min	化学式	精确分子量	m/z		离子碎片
					$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	
1	6-醛基异麦冬黄烷酮 A	0.38	$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_7$	354.07		353.30	216, 179, 247
2	麦冬黄烷酮 E	0.39	$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{O}_7$	354.07		359.11	253, 309
3	麦冬黄酮 A	0.40	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_6$	326.07		325.07	141, 164, 203
4	麦冬皂苷 E	2.55	$\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{O}_{13}$	724.40		723.88	253, 309, 315
5	当归戈米辛 O	3.59	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_8$	498.22		497.21	229, 458
6	5,6,7-三羟基-3-(4'-羟基苄基)色原酮	3.60	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	300.06		299.07	126, 132, 145
7	5,7-二羟基-6-甲基-3-(4'-羟基苄基)-4-色满酮	4.10	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$	300.09	301.07		98, 166
8	5,7-二羟基-6,8-二甲基-3-(2'-羟基-3', 4'-亚甲二氧基-苄基)色原酮	5.07	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_7$	356.08		355.08	106, 132, 255
9	去甲基异麦冬黄烷酮 B	5.43	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$	298.08		329.11	50, 175
10	5,7-二羟基-6-甲基-3-(4'-羟基苄基)色原酮	5.44	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_5$	298.08		297.07	109, 274, 282
11	5,7-二羟基-6,8-二甲基-3-(3', 4'-二羟基苄基)-4-色满酮	5.50	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$	300.09		299.10	133, 177
12	戈米辛 L1	7.90	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6$	388.18		385.18	105, 184
13	14-羟基麦冬皂苷 C	8.76	$\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{17}$	870.46		869.45	109, 274, 282
14	戈米辛 O	8.80	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$	416.18		415.17	209, 299, 330
15	表戈米辛 O	8.84	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_7$	416.18		415.17	209, 299
16	麦冬二氢高异黄酮 B	11.05	$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_5$	314.11	315.12		98, 191, 109
17	甲基麦冬高黄酮 A	11.90	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{O}_6$	340.09		325.10	149
18	甲基麦冬黄酮 B	12.40	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_5$	326.11		325.10	281
19	麦冬黄酮 B	12.90	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5$	312.09		311.10	191, 249
20	戈米辛 F	14.10	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_9$	514.22	515.21		98, 340
21	2'-羟基异麦冬黄烷酮 A	18.73	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_7$	342.07		341.06	279
22	麦冬皂苷 A	18.73	$\text{C}_{40}\text{H}_{62}\text{O}_{14}$	766.41		765.42	109, 327
23	甲基麦冬黄烷酮 B	19.64	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_5$	326.11	329.12	445.30	89, 133, 291
24	(-)-戈米辛 K1	25.58	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_6$	402.20		401.19	313, 353
25	麦冬苷元	26.40	$\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{O}_5$	446.30		445	215, 383
26	戈米辛 J	27.27	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6$	388.18	389.19		116, 216, 341

3 讨论

目前针对于注射益气复脉的药效成分研究主要集中于人参皂苷和木脂素两个方面。其中关于人参皂苷的研究较多,主要采用高效液相色谱法和近红外光谱法进行鉴别和含量测定^[9-15]。另外有采用液

相色谱-质谱联用技术对微量人参皂苷类成分进行鉴别,到目前为止共鉴定出种 36 种人参皂苷类成分^[8]。在木脂素研究方面,主要采用高效液相色谱法和液质联用技术对木脂素成分进行解析和定量^[9,12-13,16-18]。Liu 等^[8]采用超高速液相色谱-离子阱

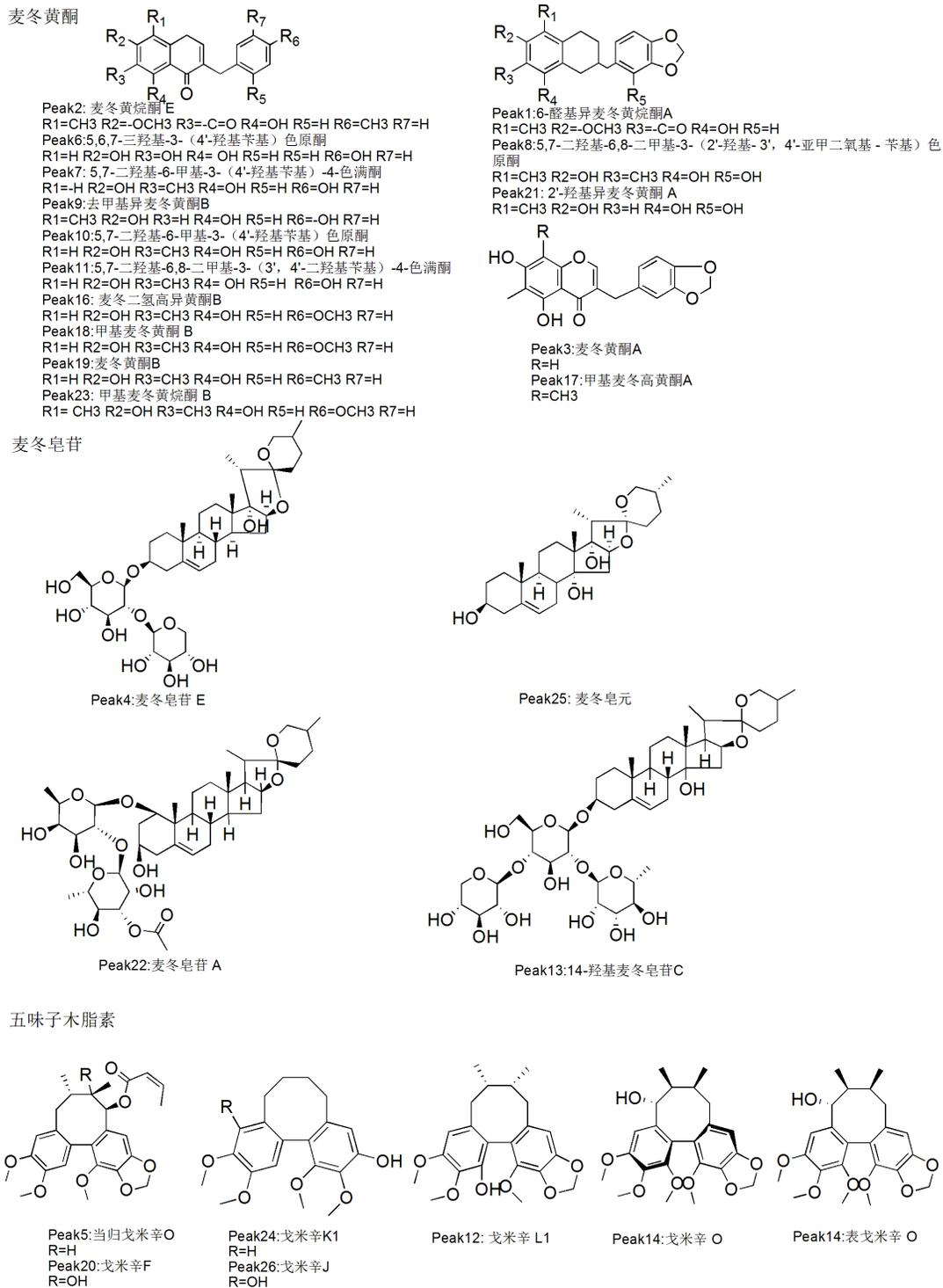


图2 注射用益气复脉中新发现的化合物结构

Fig. 2 The structure of active compounds from Yiqifumai Injection

飞行时间质谱法 (UFLC-IT-TOF/MS) 鉴定出注射用益气复脉 65 个化合物, 其中包括了 36 个人参皂苷, 16 个木脂素, 以及 7 个黄酮类化合物。此外关于其他成分的研究还包括, 采用高效凝胶色谱法和高效液相色谱法对益气复脉中糖苷类大分子物质和

钠离子进行测定^[19-21]。

本研究采用 UPLC-Q-TOF/MS 对注射用益气复脉 (冻干) 的化学成分进行进一步解析, 共鉴定出 145 个化合物。其中有 26 个药效成分为首次检出, 包括 17 个黄酮类化合物, 4 个麦冬皂苷类化合物以

及5个木脂素类化合物。以及15个糖类化合物,38种有机酸以及22个甾醇、多肽和酯类等其他物质,丰富了注射用益气复脉(冻干)的化学成分。

中药注射剂的有效性和安全性取决于生物活性成分和批次间的关系一致性。因此建立合适的分析方法并确定中药的生物活性成分以及相关成分具有重要的意义^[22]。而采用UPLC-Q-TOF/MS方法可以快速、有效的鉴别中药材以及制剂中的相关成分,为中药质量控制研究和基于药效物质的机制研究提供了有效手段。

参考文献

- [1] 冷方南. 中国基本中成药(大系统内科用药) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988.
- [2] 刘晓光, 胡金芳, 宋美珍, 等. 注射用益气复脉(冻干)对环磷酰胺诱导小鼠免疫低下的改善作用 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 962-965.
- [3] 孙静, 王凤, 刘影哲, 等. 注射用益气复脉(冻干)治疗冠心病心绞痛136例 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(9): 1034-1035.
- [4] 杨颖, 姜涛, 王凤, 等. 注射用益气复脉(冻干)治疗冠心病心力衰竭(气阴两虚证)60例临床研究 [J]. 中医药学报, 2012, 40(4): 115-117.
- [5] 王海平, 何志高. 地高辛片联合益气复脉治疗慢性心力衰竭的疗效观察 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5): 532-535.
- [6] Yu K, Ma Y H, Shao Q, et al. Simultaneously determination of five ginsenosides in rabbit plasma using solid-phase extraction and HPLC/MS technique after intravenous administration of 'SHENMAI' injection [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44(2): 532-539.
- [7] Ji H Y, Lee H W, Kim H K, et al. Simultaneous determination of ginsenoside Rb1 and Rg1 in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Pharm Biomed Anal, 2004, 35(1): 207-212.
- [8] Liu C H, Ju A C, Zhou D Z, et al. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of multiple chemical constituents in YiQiFuMai Injection by ultra-fast liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass spectrometry [J]. Molecules, 2016, 21: 640-654.
- [9] 乔晓莉, 肖学凤, 周大铮, 等. UPLC-MS/MS法同时测定注射用益气复脉(冻干)中13种成分 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3402-3407.
- [10] 韩晓萍, 李德坤, 周大铮, 等. 近红外光谱法快速测定注射用益气复脉(冻干)中人参总皂苷的含量 [J]. 光实验室, 2011, 28(04): 1888-1891.
- [11] 韩晓萍, 李德坤, 周大铮, 等. 近红外光谱法测定注射用益气复脉(冻干)中的10种人参皂苷 [J]. 2011, 36(12): 1603-1605.
- [12] 周丹丹, 王蕴华, 李凡, 等. 注射用益气复脉(冻干)的HPLC指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(11): 1900-1904.
- [13] 何珊珊, 岳洪水, 宋丽丽, 等. 注射用益气复脉(冻干)HPLC指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(04): 390-393.
- [14] Shen Z B, Zhu J F, Li B. Determination of ginsenoside Rg1, Re and Rb1 in Yiqifumai oral solution by HPLC [J]. Guangdong College of Pharmacy, 2006, 22 (3): 259-260.
- [15] Han X, Li D, Zhou D, et al. Determination of total content of ten ginsenosides in Yiqifumai lyophilized injection by near infrared spectroscopy [J]. Chin J Chin Mat Med, 2011, 36(12): 1603-1605.
- [16] 张奇, 叶正良, 王薇丹, 等. HPLC-峰面积归一法测定注射用益气复脉(冻干)中总木脂素的含量 [J]. 辽宁中医杂志 2011, 38(11): 2239-2241.
- [17] 褚延斌, 苏小琴, 李德坤, 等. 基于一测多评法对注射用益气复脉(冻干)中9种成分的质量控制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3537-3544.
- [18] Li F T, Chen Y S, Yan H L, et al. Identification of schisandrin as a vascular endothelium protective component in YiQiFuMai Powder Injection using HUVECs binding and HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS analysis [J]. Pharmacol Sci, 2015, 129(1): 1-8.
- [19] 韩晓萍, 叶正良, 王薇丹, 等. HPGPC法检测注射用益气复脉(冻干)中的糖苷类大分子物质 [J]. 中成药, 2011, 33(05): 814-817.
- [20] 彭菲, 叶正良, 李德坤, 等. HPGPC-ELSD法检测注射用益气复脉(冻干)中糖苷类大分子物质 [J]. 中成药, 2014, 36(05): 1098-1100.
- [21] 习斌斌, 徐敏, 李德坤, 等. HPLC-ELSD测定注射用益气复脉(冻干)中钠离子含量 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(08): 1503-1507.
- [22] 张冰, 吴嘉瑞. 关于中药注射剂安全性问题的思考 [J]. 临床药物治疗杂志, 2006, 4(6): 14-18.