

舒肝解郁胶囊的 UPLC-MS 指纹图谱研究

乔怀耀, 罗 荣, 吴 娟, 朱文漓, 柯尊洪, 郝晓锋, 柯 潇, 郭智刚*
成都康弘药业集团股份有限公司, 四川 成都 610036

摘要: 目的 建立舒肝解郁胶囊的 UPLC-MS 指纹图谱分析方法, 为其质量评价积累数据。方法 以 0.1% 甲酸-乙腈为流动相, 梯度洗脱 60 min, 使用 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) 进行指纹图谱研究, 同时通过高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱分析方法鉴定部分成分。结果 对其中 22 个共有峰进行了成分鉴定, 对 34 批舒肝解郁胶囊进行了指纹图谱检测和相似度评价, 34 批样品的相似度均大于 0.960, 确立了指纹图谱中的 12 个特征吸收峰。结论 所建立的舒肝解郁胶囊的指纹图谱特征性和专属性强, 该方法可用于舒肝解郁胶囊的质量控制。

关键词: 舒肝解郁胶囊; 指纹图谱; UPLC-MS; 相似度; 质量评价; 绿原酸; 紫丁香苷; 咖啡酰奎宁酸; 芦丁; 金丝桃苷; 槲皮素; I13, I18 穗花杉双黄酮

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)02-0208-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.02.011

UPLC-MS fingerprint of Shugan Jieyu Capsules

QIAO Huai-yao, LUO Rong, WU Juan, ZHU Wen-li, KE Zun-hong, HAO Xiao-feng, KE Xiao, WU Zhi-gang
Chengdu Kanghong Pharmaceutical Group Co., Ltd., Chengdu 610036, China

Abstract: Objective To establish a ultra high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS) fingerprint for the quality control of Shugan Jieyu Capsules and to accumulate the data used for their quality evaluation. **Methods** UPLC separation was performed on an Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm) by gradient elution in 60 min with 0.1% formic acid-acetonitrile as mobile phase. The mass spectrometry detection was performed on a trap equipped with an ESI interface and operated in both positive and negative ionization modes to identify components. **Results** Twenty-two characteristic common peaks of chemical constituents were identified and 34 batches of Shugan Jieyu Capsules were analyzed. The quality of samples was assessed by *Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM* (2004 A version). The similarities of 34 batches of Shugan Jieyu Capsules were all over 0.960, and 12 characteristic peaks of UPLC fingerprint for Shugan Jieyu Capsules were established. **Conclusion** The UPLC fingerprint of Shugan Jieyu Capsules is established, the convenient and high specific method could be used to identify and evaluate the quality of Shugan Jieyu Capsules.

Key words: Shugan Jieyu Capsules; fingerprint; UPLC-MS; similarity; quality evaluation; chlorogenic acid; syringoside; caffeoylquinic acid; rutin; hyperoside; quercetin; I13, I18-biapigenin

舒肝解郁胶囊是国内第 1 个用于治疗抑郁的中成药, 由贯叶金丝桃和刺五加 2 味中药组成, 主要的功效为健脾安神。贯叶金丝桃已经有 2 400 年的使用历史, 公元前 5 世纪就被用作一种很好的疗伤药^[1]。《中国药典》2010 年版记载其有“疏肝解郁、清热利湿、消肿通乳”的功效^[2]。贯叶金丝桃醇提取物的主要成分为 6 类: 萘并二萜酮类、间苯三酚

类、黄酮类、双黄酮类、苯丙烯酸类和原花青素。另外, 还含有少量的单宁酸、氧杂蒽酮、挥发油和氨基酸等^[1,3]。刺五加始见于《神农本草经》, 列为上品。《中国药典》2010 年版记载其有“益气健脾、补肾安神”的功效^[2]。文献报道其主要的化学成分有刺五加皂苷、黄酮类、多糖类、三萜皂苷类、木脂素和咖啡酰奎宁酸类等^[4-7]。

收稿日期: 2013-09-09

基金项目: 四川省重大产业技术创新专项“治疗抑郁症中药新药舒肝解郁胶囊产业化工艺研究”(2012CD00082); 四川省科技成果转化项目“治疗抑郁症中药新药舒肝解郁胶囊成果转化”(2012SC0029)

作者简介: 乔怀耀 (1982—), 男, 硕士, 从事中药和生物药质量标准研究工作。Tel: (028)87510520 E-mail: qiaohuaiyao@cnkh.com

*通信作者 郭智刚 Tel: (028)87519380 E-mail: wuzhigang@cnkh.com

中成药具有生物活性和化学成分复杂多样的特点^[8]。作为一种多组分化学成分复杂样品的有效质量控制方法,指纹图谱技术可以综合反映药材中各主要成分及其相对含量^[9]。现根据舒肝解郁胶囊主要成分的特性,应用 UPLC-MS 技术^[10],建立了舒肝解郁胶囊化学成分指纹图谱分析和定性质量评价方法,测定了 34 批样品,利用指纹图谱技术对产品的质量信息进行监控。

1 仪器与材料

1290 超高效液相色谱仪,配有四元泵,UV 检测器,自动进样器等(美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水处理系统(Millipore Bedford, MA, 美国);电喷雾离子阱质谱仪(美国 Thermo Finnigan 公司); Sartorius BS224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器)。

对照品金丝桃苷(批号 111521-2001004, 质量分数 93.9%)、异嗪皮啶(批号 110837-201005, 质量分数 99.9%)、芦丁(批号 100080-200707, 质量分数 90.5%)、紫丁香苷(批号 111574-200502, 质量分数 99.9%)、绿原酸(批号 110753-200413, 质量分数 99.9%)、槲皮素(批号 100081-200406, 质量分数 97.3%)和槲皮苷(批号 111538-200302, 质量分数 99.9%)均购自中国药品生物制品检定所;舒肝解郁胶囊(批号 100601、100603、100701、100702、100703、100704、100705、100801、100802、100901、100902、101001、101002、110412、110511、110601、110705、110803、110902、110904、111003、111004、111111、111113、111122、111203、111204、111205、111206、111207、111208、111209、111211、111212, 分别以 S1~S34 表示)、贯叶金丝桃提取物(制备批号 110808)、刺五加提取物(制备批号 110803)均由成都康弘制药有限公司提供;甲醇、甲酸、乙腈均为质谱纯(美国 Sigma 公司);超纯水经 Milli-Q 自制。

2 方法与结果

2.1 UPLC 条件

色谱柱为 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 2.7 μm),柱温 30 °C,体积流量 0.5 mL/min,检测波长为 265 nm,进样量 5 μL。流动相为 0.1%甲酸-乙腈,梯度洗脱程序:0~3 min, 5% 乙腈;3~10 min, 5%~10% 乙腈;10~20 min, 10%~20% 乙腈;20~30 min, 20%~35% 乙腈;30~40 min, 35%~55% 乙腈;40~45 min, 55%~100% 乙腈;45~50 min, 100% 乙腈;50~51 min, 100%~

5% 乙腈;51~60 min, 5% 乙腈。

2.2 质谱条件

电喷雾电离,正、负 2 种离子模式检测,氮气作为鞘气、辅助气和吹扫气。正离子模式(ESI⁺)下:喷雾电压 3.6 kV,鞘气 2.625 MPa,辅助气 875 kPa,吹扫气 0 Pa;毛细管温度 275 °C,毛细管电压为 10 V,透镜电压为 80 V。负离子模式(ESI⁻)下:喷雾电压 5 kV,鞘气 2.625 MPa,辅助气 875 kPa,吹扫气 0 Pa;毛细管温度 275 °C,毛细管电压为 -10 V,透镜电压为 -100 V。全扫描质量范围: *m/z* 150~1 000。二级质谱数据依赖模式采集,全扫描图谱中响应度强度最高的 3 个峰用于二级质谱分析,高纯氦气用作碰撞气,碰撞能量为 35 eV。

2.3 供试品溶液的制备

取本品胶囊内容物约 0.25 g,精密称定,置于 25 mL 量瓶中,加入 50% 甲醇 20 mL,超声 30 min(电功率 200 W,频率 40 kHz),再加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.4 混合对照品溶液的制备

取少量金丝桃苷、异嗪皮啶、芦丁、紫丁香苷、绿原酸、槲皮素和槲皮苷对照品于同一 EP 管内,加 50% 甲醇 1 mL,超声 10 min,取适量混合对照品溶液,滤过,即得。

2.5 药材提取物溶液制备

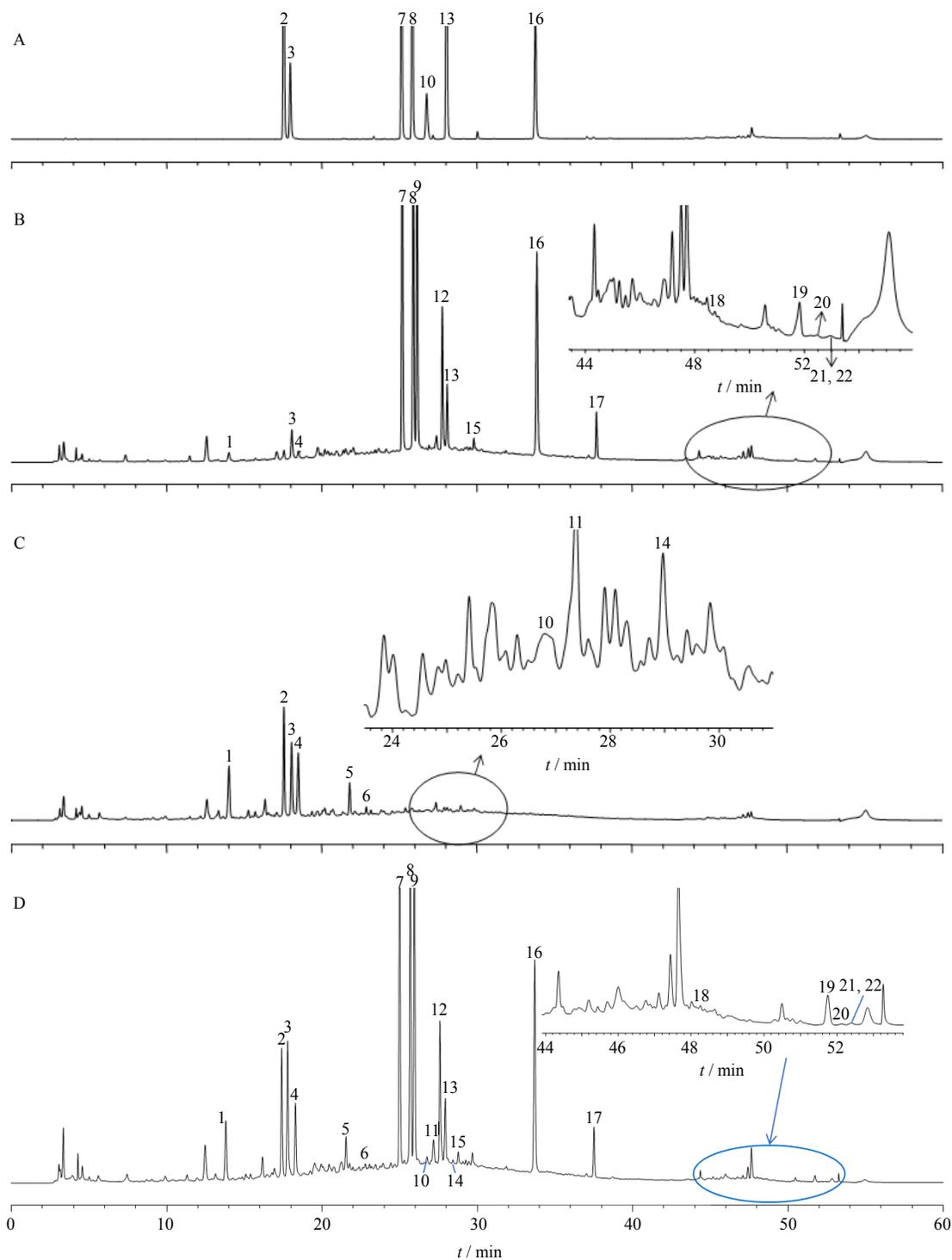
分别取药材提取物(贯叶金丝桃和刺五加) 0.3 g,加 50% 甲醇 25 mL,超声 30 min,取适量溶液,滤过,即得。

2.6 供试品的检测及部分化合物的鉴定

分别取对照品溶液、药材提取物溶液和舒肝解郁胶囊(批号 100601)供试品溶液进样 5 μL,按照“2.1”和“2.2”项下条件进行分析,得到色谱图(图 1)。将对照品峰的保留时间和供试品峰的保留时间以及相应的正负离子二级碎片进行比对,鉴定了供试品中的 7 个对照品成分(表 1)。将供试品中色谱峰所对应化合物的质谱数据与文献报道^[4-5,11-18]进行比较,共鉴别了 22 个色谱峰代表的可能成分(表 1)。根据药材提取物溶液色谱峰和供试品峰保留时间以及质谱数据,可以得出 22 个化合物的药材来源(表 1)以及其在供试品色谱图中对应的色谱峰(图 1-D)。

2.7 舒肝解郁胶囊的指纹图谱分析

2.7.1 精密度试验 取舒肝解郁胶囊(批号 110902)供试品溶液,连续进样 6 次,按样品分析色谱条件



1-新异绿原酸 2-紫丁香苷 3-绿原酸 4-1'-咖啡酰奎宁酸 5-3', 5'-二咖啡酰奎宁酸 6-刺五加苷 E 7-芦丁 8-金丝桃苷 9-异槲皮苷
 10-异嗪吡啶 11-1', 5'-二咖啡酰奎宁酸 12-槲皮素-3-β-D-阿拉伯糖 13-槲皮苷 14-4', 5'-二咖啡酰奎宁酸 15-乙酰氧基金丝桃苷
 16-槲皮素 17-II3, II8 穗花杉双黄酮 18-原伪金丝桃素 19-贯叶金丝桃素 20-加贯叶金丝桃素 21-金丝桃素 22-伪金丝桃素
 1-neochlorogenic acid 2-syringoside 3-chlorogenic acid 4-1'-O-caffeoylquinic acid 5-3', 5'-O-dicaffeoylquinic acid 6-eleutheroside E
 7-rutin 8-hyperoside 9-isoquercitrin 10-isofraxidin 11-1', 5'-O-dicaffeoylquinic acid 12-quercetin-3-β-D-arabinose 13-quercitrin
 14-4', 5'-O-dicaffeoylquinic acid 15-acetyl-hyperoside 16-quercetin 17-II3, II8-biapigenin 18-protopseudohypericin 19-hyperforin
 20-adhyperforin 21-hypericin 22-pseudohypericin

图 1 对照品溶液 (A)、贯叶金丝桃药材 (B)、刺五加药材 (C) 和舒肝解郁胶囊 (批号 100601, D) 的典型 UPLC 色谱图
 Fig. 1 Typical UPLC of reference solutions (A), *Hyperic Perforati Cum Radice Herba* (B), *Acanthopanax Senticosi Radix* (C), and *Shugan Jieyu Capsules* (Batch No. 100601, D)

表 1 舒肝解郁胶囊提取化合物的鉴定
Table 1 Identification of extracted compounds from Shugan Jieyu Capsules

峰号	t / min	相对分子质量		碎片离子 (m/z)		化合物名称	药材来源
				ESI ⁺	ESI ⁻		
1	13.65	354	355, 163		353, 191, 179, 135	新异绿原酸	I、II
2 ^a	17.41	372	395		—	紫丁香苷	I
3 ^a	17.60	354	355, 163		353, 191	绿原酸	I、II
4	18.12	354	355, 163		353, 191, 173, 135	1'-咖啡酰奎宁酸	I、II
5	21.39	516	517, 499, 325, 283, 217, 163		515, 353, 335, 179	3', 5'-二咖啡酰奎宁酸	I
6	22.65	742	760, 579, 419, 401, 245, 235, 217		787, 741, 579, 417	刺五加苷 E	I
7 ^a	24.83	610	611, 465, 303		609, 301	芦丁	II
8 ^a	25.53	464	465, 303		463, 301	金丝桃苷	II
9	25.78	464	465, 303		463, 301	异槲皮苷	II
10 ^a	26.53	222	223, 207, 195, 190, 163, 135, 107		—	异嗪吡啶	I
11	27.05	516	517, 499, 473, 325		515, 353, 335	1', 5'-二咖啡酰奎宁酸	I
12	27.40	434	435, 303		433, 301	槲皮素-3-β-D-阿拉伯糖	II
13 ^a	27.75	448	449, 303		477, 301	槲皮苷	II
14	28.51	516	517, 499		515, 353	4', 5'-二咖啡酰奎宁酸	I
15	28.81	506	507, 303		505, 463, 301	乙酰氧基金丝桃苷	II
16 ^a	33.50	302	303, 285, 274, 257, 247, 229, 165, 137		301, 273, 257, 179, 151	槲皮素	II
17	37.34	538	539, 521, 497, 455, 419, 403, 387, 377, 359, 335, 269		537, 443, 385	II3, II8 穗花杉双黄酮	II
18	48.38	522	—		521, 504, 477	原伪金丝桃素	II
19	51.40	536	—		535, 466, 397, 383, 315	贯叶金丝桃素	II
20	52.06	550	—		549, 480, 411, 397, 329, 313	加贯叶金丝桃素	II
21	52.82	504	—		503, 459	金丝桃素	II
22	52.90	520	—		519, 503, 487, 475	伪金丝桃素	II

“—”表示该化合物在相应的离子模式下没响应，“a”表示化合物通过与对照品比对确定结构，“I”表示刺五加，“II”表示贯叶金丝桃
“—” means compound without response in relative ion mode; “a” means structures of compound determined by matching its reference substance; “I” indicates *Acanthopanax Senticosus Radix*; “II” indicates *Hyperic Perforati Cum Radice Herba*

测定,计算各色谱峰(单峰面积大于 2.0%总峰面积)的相对峰面积与保留时间。结果相对峰面积 RSD 均小于 2.0%,相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%,说明仪器精密度良好。

2.7.2 重复性试验 取同一批舒肝解郁胶囊(批号 110902),按“2.3”项下方法平行制备 6 份,分别进行 UPLC 测定,计算各色谱峰(单峰面积大于 2.0%总峰面积)的相对峰面积与保留时间。结果相对峰面积 RSD 均小于 3.0%,相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%。

2.7.3 稳定性试验 选取同一批(批号 110902)供试品溶液,分别在 0、4、16、24 h 进样,计算各共有峰的相对峰面积与相对保留时间。结果共有峰的相对峰面积 RSD 均小于 3.0%,相对保留时间的 RSD 均小于 0.5%,说明样品在 24 h 内稳定。

2.7.4 指纹图谱的建立及相似度分析 检测了连续 2 年生产的共 34 批舒肝解郁胶囊,建立了指纹图谱(图 2)。对舒肝解郁胶囊指纹图谱(34 批)中保留时间在 12~54 min 内峰面积大于 30 mAU·s 的色谱峰进行自动积分,采用《中药指纹图谱相似度评价系统 2004 A 版》软件来评价各批次指纹图谱的相似度,将色谱图数据导入中药指纹图谱相似度计算软件,通过与系统建立共有模式比较,得到各批次样品的相似度数据,见表 2。

2.8 特征峰与质量控制

通过对 34 批样品指纹图谱的比较,确立了舒肝解郁胶囊标准指纹图谱中 12 个特征吸收峰(表 3),有 11 个单峰面积占总峰面积 2%以上,5 号峰在刺五加提取物色谱图中峰面积超过总峰面积的 5%,因此也将其定为舒肝解郁胶囊指纹图谱的特征峰。

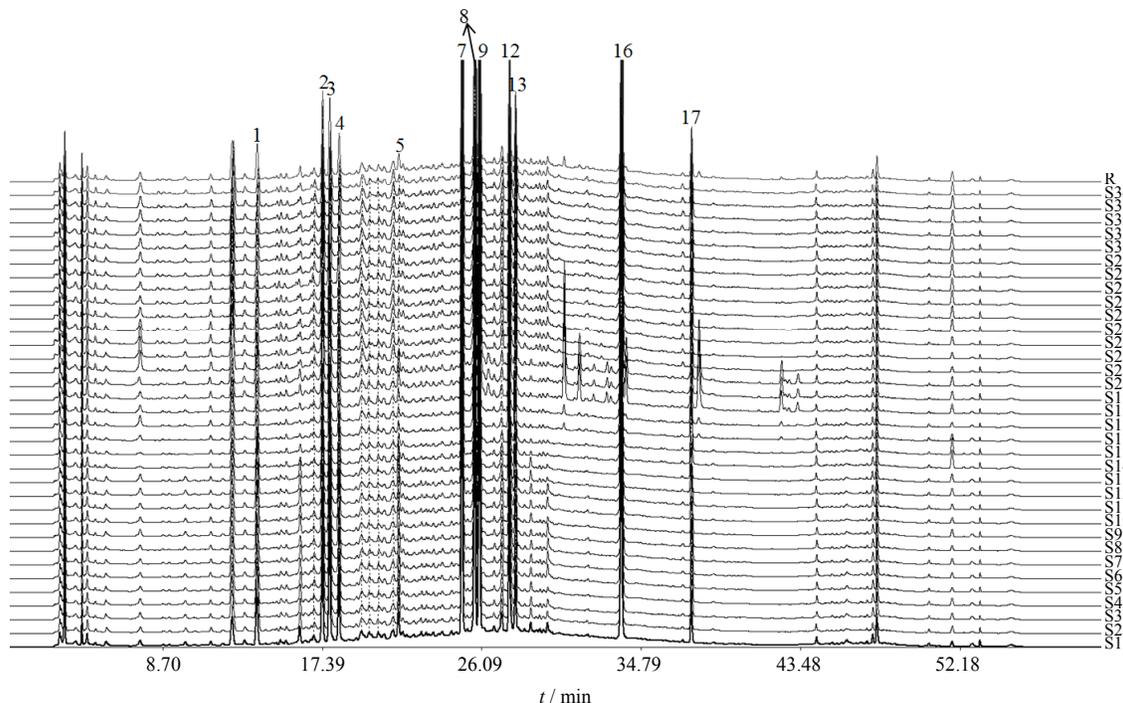


图 2 34 批次舒肝解郁胶囊的 UPLC 指纹图谱

Fig. 2 UPLC fingerprint of 34 batches of Shugan Jieyu Capsules

表 2 舒肝解郁胶囊 UPLC 指纹图谱相似度数据

Table 2 Similarity data of Shugan Jieyu Capsules by UPLC fingerprint

批号	相似度										
100601	0.987	100705	0.991	101002	0.981	110902	0.966	111122	0.993	111208	0.990
100603	0.988	100801	0.996	110412	0.980	110904	0.966	111203	0.988	111209	0.990
100701	0.983	100802	0.986	110511	0.981	111003	0.993	111204	0.990	111211	0.990
100702	0.981	100901	0.995	110601	0.976	111004	0.993	111205	0.989	111212	0.990
100703	0.988	100902	0.992	110705	0.973	111111	0.989	111206	0.992		
100704	0.989	101001	0.983	110803	0.960	111113	0.993	111207	0.990		

表 3 34 批次舒肝解郁胶囊指纹图谱中 12 个特征吸收峰的信息

Table 3 Information of 12 characteristic peaks for 34 batches of Shugan Jieyu Capsules by UPLC fingerprint

峰号	化合物名称	t / min	平均保留时间 RSD / %	峰面积 RSD / %	单峰占总峰面积百分比 / %
1	新异绿原酸	13.85	0.14	32.53	2.98
2	紫丁香苷	17.41	0.09	24.61	5.17
3	绿原酸	17.81	0.09	33.33	6.06
4	1'-咖啡酰奎宁酸	18.32	0.09	35.67	3.17
5	3',5'-二咖啡酰奎宁酸	21.56	0.08	60.09	1.29
7	芦丁	25.02	0.06	12.96	14.87
8	金丝桃苷	25.71	0.05	26.00	13.42
9	异槲皮苷	25.97	0.05	14.04	14.53
12	槲皮素-3-β-D-阿拉伯糖	27.60	0.05	13.11	5.73
13	槲皮苷	27.94	0.05	19.86	2.53
16	槲皮素	33.71	0.04	27.84	10.12
17	II3, II8 穗花杉双黄酮	37.54	0.04	16.60	1.95

芦丁(7号峰)与相邻峰分离良好而且保留时间居中,选作参照峰,通过参照峰芦丁计算34批次供试品12个特征峰的相对保留时间及RSD值,各特征峰的相对保留时间RSD值均小于0.2%(表3)。

3 讨论

比较了不同比例的甲醇-水(甲醇体积分数分别为0、25%、50%、75%、100%)溶剂对样品的提取率,结果显示,50%甲醇-水的提取率略高于其他溶剂。根据质谱研究的相关经验,甲酸对质谱结果的干扰较大,为了获得较好的质谱结果尽量降低甲酸量,以0.1%甲酸作为水相。由于等度洗脱分离效果较差,使用0.1%甲酸-乙腈进行了不同的梯度洗脱优化,结果显示,本实验中使用的梯度洗脱方法在60 min内获得舒肝解郁胶囊化学成分指纹图谱,图谱指纹性强,且各色谱峰大部分都得到了基线分离。采用二极管阵列检测器做全波长扫描,考察不同吸收波长图谱,结果表明,265 nm处各成分具有较好的紫外吸收,色谱信息丰富,基线平稳,而且避免了溶剂末端吸收的影响。分别使用Poroshell 120 SB-C₁₈(Agilent, 150 mm×4.6 mm, 2.7 μm)和Eclipse Plus C₁₈(Agilent, 250 mm×4.6 mm, 5 μm)2种色谱柱进行分离优化,前者在分离度和峰形上更优。

指纹图谱研究时发现5批次样品分离出的4个色谱峰在其他批次样品中不明显,可能与生产该批次胶囊原料药材的自然生长环境差异有关,说明该指纹图谱方法使舒肝解郁胶囊之间的细微质量差异得到了明显区分。利用本方法对34批次的舒肝解郁胶囊进行指纹图谱检测,34批样品的相似度均大于0.960,从指纹图谱共有峰的峰位和峰形看,分离效果好,同时也在一定程度上反映了舒肝解郁胶囊生产工艺稳定、质量可靠。

参考文献

- [1] Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(3): 511-521.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] Nahrstedt A, Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. [J]. *Pharmacopsychiatry*, 1997, 30(Suppl 2): 129-134.
- [4] Feng S L, Hu F D, Zhao J X, et al. Determination of eleutheroside E and eleutheroside B in rat plasma and tissue by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction and photodiode array detection [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 62(3): 315-320.
- [5] Tolonen A, Joutsamo T, Mattila S, et al. Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and ¹H-NMR methods [J]. *Phytochem Anal*, 2002, 13(6): 316-328.
- [6] 龚婧如, 王书芳. 刺五加的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2337-2341.
- [7] 张涛, 朴俊虹, 袁蕾, 等. 刺五加化学成分及自由基清除活性研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(6): 1057-1060.
- [8] 杨秀伟. 中草药化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(7): 961-969.
- [9] 聂磊, 罗国安, 曹进, 等. 中药二维信息指纹图谱模式识别 [J]. *药学报*, 2004, 39(2): 136-139.
- [10] 章弘扬, 杨辉华, 张敏, 等. UPLC-MS结合模式识别用于罗汉果不同部位化学成分的比较分析 [J]. *中草药*, 2013, 44(1): 19-23.
- [11] European Pharmacopoeia 7.0 [S]. 2010.
- [12] Japanese Pharmacopoeia XV [S]. 2006.
- [13] Tatsis E C, Boeren S, Exarchou V, et al. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS [J]. *Photochemistry*, 2007, 68(3): 383-393.
- [14] Silva B A, Ferreres F, Malva J O, et al. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts [J]. *Food Chem*, 2005, 90(1/2): 157-167.
- [15] Boutaleb-Charki S, Sánchez-Moreno M, Díaz J G, et al. Activity and mode of action of flavonoids compounds against intracellular and extracellular forms of *Trypanosoma cruzi* [J]. *Open Nat Prod J*, 2011, 4: 1-7.
- [16] Ganzera M, Zhao J, Khan I A. *Hypericum perforatum*-chemical profiling and quantitative results of St. John's Wort products by an improved high performance liquid chromatography method [J]. *J Pharm Sci*, 2002, 91(3): 623-630.
- [17] Kurkin V A, Zapesochayaya G G, Bandyshev V V. Phenolic compounds of *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Chem Nat Compd*, 1991, 27(6): 755-756.
- [18] Kurkin V A, Evstratova R I, Zapesochayaya G G. Phenolic compounds of the bark of *Eleutherococcus senticosus* [J]. *Chem Nat Compd*, 1992, 28(5): 512-513.