

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00292

HPLC-TOFMS 法对白花蛇舌草药材及其注射剂中化学成分的快速分离与鉴别

陈伟成¹, 顾大伟², 张 海², 朱臻宇², 张国庆², 柴逸峰^{3*}

1. 上海市南汇区中心医院药剂科, 上海 201300
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438
3. 第二军医大学药学院, 上海 200433

[摘要] **目的** 采用 HPLC-TOFMS 对白花蛇舌草药材及其注射剂中化学成分进行快速分离鉴别。**方法** 色谱柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以 0.3% 醋酸(A)-甲醇(B)为流动相, 梯度洗脱, 0~30 min, 体积分数 30%~90%B, 进样量 10 μl, 流速 1.0 ml/min, 柱温为 30℃, 飞行时间质谱配有 ESI 离子源, 质量数扫描范围 m/z 100~1 000。**结果** 采用 HPLC-TOFMS 方法对白花蛇舌草药材及其注射液制剂进行了在线化学成分分离与质谱表征, 一次性在一张图谱上共鉴别出白花蛇舌草中 11 个化学成分, 市售注射剂中 6 个成分, 自制注射剂中 2 个成分。**结论** 这可为中药白花蛇舌草及其注射剂的药效物质基础和质量控制研究奠定基础。

[关键词] 白花蛇舌草; 注射剂; HPLC-TOFMS; 鉴别

[中图分类号] R 927.13 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0292-05

HPLC-TOFMS in rapid separation and identification of chemical components in *Oldenlandia diffusa* and its injection preparations

CHEN Wei-cheng¹, GU Da-wei², ZHANG Hai², ZHU Zhen-yu², ZHANG Guo-qing², CHAI Yi-feng^{3*}

1. Department of Pharmacy, Nanhui Central Hospital of Shanghai, Shanghai 201300, China
2. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
3. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To rapidly separate and identify the chemical components in traditional Chinese herbal medicine of *Oldenlandia diffusa* and its injection preparations by high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry (HPLC-TOFMS). **Methods** An Agilent Zorbax XDB-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used for separation and identification of chemical components in *Oldenlandia diffusa*, with a mobile phase of 0.3% acetic acid (A) and methanol (B) in gradient elution, 0-30 min, 30%-90%B. The flow rate was set at 1.0 ml/min and the injection volume was 10 μl. The time-of-flight mass spectrometer was equipped with an EIS ion source. The scanning mass range was between m/z 100-1 000. **Results**

The traditional Chinese medicine of *Oldenlandia diffusa* and its injection preparation were on-line separated and characterized by HPLC-TOFMS, and 11 chemical compounds were identified in *Oldenlandia diffusa*, 6 compounds in market injection preparation, and 2 compounds in the injection prepared by ourselves. **Conclusion** Chromatographic demonstration of chemical compounds in *Oldenlandia diffusa* in one run provides a foundation for the further studying the metabolism and mechanism of *Oldenlandia diffusa* and its injection preparations.

[Key words] *Oldenlandia diffusa*; injection; HPLC-TOFMS; identification

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3):292-296]

白花蛇舌草 *Oldenlandia diffusa* (willd) Roxb. 系茜草科耳草属植物, 广泛分布于亚热带地区, 在我国广东、福建、江西、江苏、安徽等地均有栽培。本品性味微苦、甘寒, 具有清热解毒、利尿消肿、活血止痛等功效。用于肠痛(阑尾炎)、疮疖肿毒、湿热黄疸、小便不利等症; 外用治疮疖痈肿、毒蛇咬伤。

白花蛇舌草中所含的化学成分复杂, 目前发现的主要有萜醌类、苷类、有机酸类、黄酮类等^[1], 具有抗肝炎、抗肿瘤、抗病毒、抗炎抑菌、降血脂及降血糖等多种药理活性。

国内外对白花蛇舌草中化学成分研究的报道较多, 主要包括采用聚酰胺、Sephadex LH-20、硅胶和

[收稿日期] 2009-10-09 **[接受日期]** 2009-11-15

[作者简介] 陈伟成, 硕士. E-mail: wisechn@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81871201, E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

LC-MS 指纹图谱或 HPLC 等多种色谱方法进行化学成分的提取、分离及鉴定^[3-12]。

中药化学成分的多多样性与复杂性不仅是发挥其疗效的物质基础,同时也是质量评价的重点与难点。现代分析技术的发展,特别是液质联用分析技术为中药化学成分的分析鉴别提供了简便、准确可靠的方法。高分辨飞行时间质谱(TOFMS)是一种新兴且发展比较迅速的质谱技术,具有检测灵敏度高、测定化合物离子范围宽的优点,通过对化合物的分析检测,能够获得化合物离子的精确质荷比,且增大扫描范围不损失检测灵敏度,现已广泛用于中药及生物样品的分离分析。

本研究采用 HPLC-TOFMS 联用技术,对白花蛇舌草中各化学成分进行了快速分析鉴别,共鉴别出白花蛇舌草药材中 11 个化学成分,为进一步进行化学成分的代谢和作用机制研究奠定基础。

1 仪器和试剂

安捷伦 1200 系列高效液相色谱仪,美国安捷伦公司,包括在线脱气机、二元泵、高性能自动进样器和二极管阵列检测器;安捷伦 6220 高分辨飞行时间质谱仪,美国安捷伦公司,配有标准电喷雾离子源(ESI)、Masshunter 工作站及 Agilent Qualitative analysis 质谱分析软件;DL700 超高压等静压机(上海大隆机器厂);KUDOS SK2200H 型超声器,上海科导超声仪器公司;METTLER AE240 型电子天平,瑞士梅特勒-托利多公司。

白花蛇舌草药材(购于吉林)。由第二军医大学药学院生药学教研室孙连娜副教授鉴定为茜草科耳草属植物 *Hedyoti diffusae*。市售白花蛇舌草注射液(吉林龙泰制药股份有限公司,批号:080606)。甲醇(美国 Fisher 公司)和醋酸(美国 Tedia 公司)均为色谱纯,实验用水为娃哈哈纯净水。甲酸为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。其他的试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)。以 0.3% 醋酸(A)-甲醇(B)为流动相,梯度洗脱,0~30 min,体积分数 30%~90%B,柱平衡时间:15 min;进样量:10 μl;流速 1.0 ml/min;柱温 30℃。

2.2 HPLC-TOFMS 质谱条件 采用 ESI 源,正离子模式下;毛细管电压 4 000 V,雾化气压力 50 psi (1 psi=6.89 kPa),干燥气流速 10 L/min,干燥气

温度 350℃,碎片电压 180 V;参比离子 m/z 121.050 873 和 922.009 798。质量数扫描范围 m/z 100~1 000,分流比 2:1。

2.3 样品溶液的制备 白花蛇舌草药材样品溶液的制备:取白花蛇舌草药材粉末 2 g,精密称定,加 25 ml 75% 甲醇至 50 ml 锥形瓶中,超声 20 min,经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后取续滤液即得。

市售白花蛇舌草注射液样品溶液的制备:取市售注射液 1 ml 加 75% 甲醇定容至 10 ml,摇匀即得。

自制白花蛇舌草注射液样品溶液的制备:取白花蛇舌草药材,在常温下按照固(g)液(ml)比 1:100 加入 50% 乙醇水溶液,密封混匀,浸泡一定时间,置于超高压容器内,升压至 200 MPa。在超高压下,溶剂的渗透、有效成分的溶解平衡和扩散在短时间内即可完成,因此实验选择保压时间 5 min,迅速卸压,料液过滤,离心取上清液为待测样。

2.4 白花蛇舌草药材化学成分数据库的建立 根据白花蛇舌草药材的已有化学成分研究文献,收集了白花蛇舌草化学成分信息,建立相应的化学成分数据库。分别是以 A、B、C、D 为母核的有机酸类、蒽醌类、黄酮类、苷类(图 1),和一些其他物质(见表 1~4 及图 2)。

2.5 白花蛇舌草中化学成分的 HPLC-TOFMS 分析 将白花蛇舌草样品进样,采集 HPLC-TOFMS 总离子流图如图 3 所示。在白花蛇舌草的 TOF-MS 图谱上可看出至少有 11 个色谱峰被检测出来,其中有 11 个色谱峰通过对比分子式与精确相对分子质量数据库鉴定出来。所有目标化合物分子离子的精确质量数误差都在 5 ppm 以内。白花蛇舌草中化学成分的精确定相对分子质量计算结果如表 5 所示。

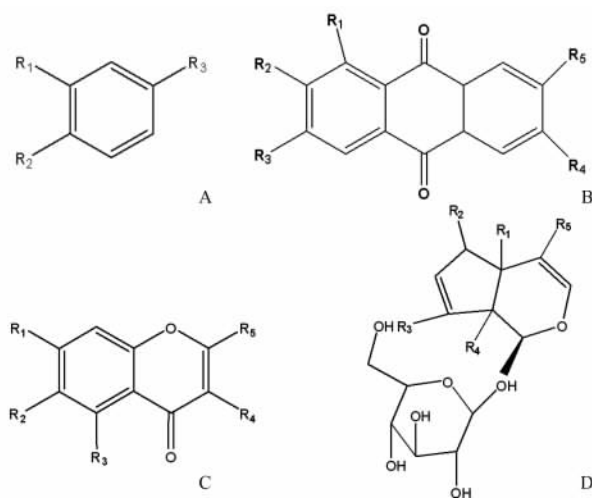


图 1 化学结构母核

Fig 1 The nucleus of chemical structures

A: Organic acids; B: Anthraquinone; C: Flavonoids; D: Glycosides

表 1 以 A 为母核的化学成分

Tab 1 Chemical components based on A nucleus

No.	Relative molecular mass	Compound	Molecular formula	Submission pattern		
				R ₁	R ₂	R ₃
1	154.026 6	3, 4-Dihydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₄	OH	OH	COOH
2	164.047 3	p-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	H	OH	C ₂ H ₄ COOH
3	180.042 3	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	OH	OH	C ₂ H ₄ COOH
4	178.063 0	p-Methoxytranscinnamic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	H	OCH ₃	C ₂ H ₄ COOH
5	194.057 9	Methyl-p-coumarate	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	H	H	COOH
6	194.057 9	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	OCH ₃	OH	CH ₂ COOH

表 2 以 B 为母核的化学成分

Tab 2 Chemical components based on B nucleus

No.	Relative molecular mass	Compound	Molecular formula	Submission pattern				
				R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	238.063 0	2-Hydroxyl-3-methyl anthraquinone	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	H	OH	CH ₃	H	H
2	254.058 0	1,3-Dihydroxy-2-methyl anthraquinone	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	OH	CH ₃	OH	H	H
3	284.068 5	1,7-Dihydroxy-6-methoxy-2-methyl anthraquinone	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	OH	CH ₃	H	OCH ₃	OH
4	284.068 5	2,6-Dihydroxy-1-methoxy-3-methyl anthraquinone	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	OCH ₃	OH	CH ₃	OH	H
5	268.073 5	2-Hydroxyl-3-methyl-1-methoxy anthraquinone	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	OCH ₃	OH	CH ₃	H	H
6	268.073 5	2-Hydroxy-7-methyl-3-methoxy anthraquinone	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	H	OH	OCH ₃	H	CH ₃
7	252.078 6	2-Methyl-3-methoxy anthraquinone	C ₁₆ H ₁₂ O ₃	H	CH ₃	OCH ₃	H	H

表 3 以 C 为母核的化学成分

Tab 3 Chemical components based on C nucleus




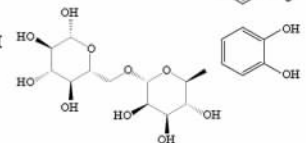
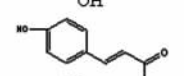
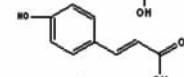
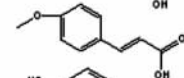
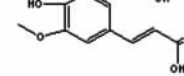
No.	Relative molecular mass	Compound	Molecular formula	Submission pattern				
				R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	302.042 6	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	OH	H	OH	OH	
2	286.047 7	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	OH	H	OH	OH	
3	358.105 3	5-Hydroxy-6, 7, 3', 4'-tetramethoxy lavone	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	
4	610.153 4	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	OH	H	OH	H	

表 4 以 D 为母核的化学成分

Tab 4 Chemical components based on D nucleus

No.	Relative molecular mass	Compound	Molecular formula	Submission pattern				
				R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	390.116 2	Dacetylasperulosidic acid	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	H	OH	CH ₂ OH	H	COOH
2	374.121 3	Gnipsidic acid	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	OH	H	CH ₂ OH	OH	COOH
3	404.131 8	Sandoside methyl ether	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	H	OH	CH ₂ OH	H	COOCH ₃
4	432.126 8	Asperuloside	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₂	H	OH	CH ₃ COOCH ₂	H	COOCH ₃
5	550.168 6	E-6-O-p-coumaroyl scandoside methyl ester	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	H		CH ₂ OH	H	COOCH ₃
6	550.168 6	6-O-p-hydroxycinnamoyl scandoside	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	H		CH ₂ OH	H	COOCH ₃
7	564.184 3	6-O-methoxycinnamoyl scandoside	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₃	H		CH ₂ OH	H	COOCH ₃
8	580.179 2	5-O-feruloyl scandoside methyl ester	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	H		CH ₂ OH	H	COOCH ₃

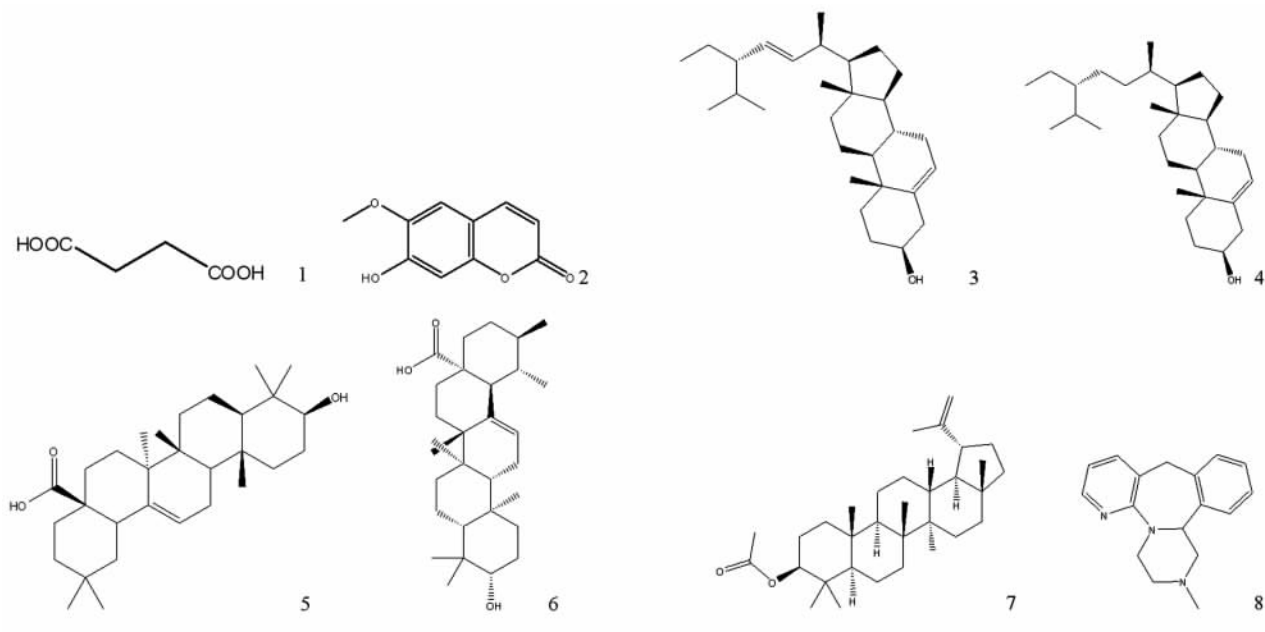


图2 其他化学成分的结构式

Fig 2 Other chemical components

1: Succinic acid; 2: Scopoletin; 3: Stigmasterol; 4: β -sitosterol; 5: Oleanolic acid; 6: Ursolic acid; 7: Acetyl lupeol acetate; 8: Daucosterol

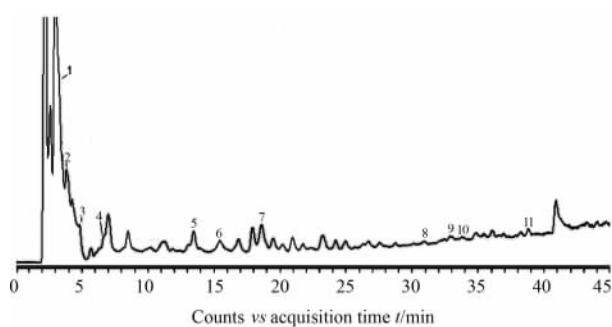


图3 白花蛇舌草中成分(1~11)的 HPLC-TOFMS 总离子流图谱

Fig 3 TIC chromatogram of components(1-11) in *Oldenlandia diffusa* by HPLC-TOFMS

从质谱总离子流图中搜索出 11 个色谱峰的相对分子质量与已知化合物的数据库相符,大部分化合物在正离子模式下的质谱图显示 $[M+H]^+$,少数如去乙酰基车叶草苷酸甲酯在正离子模式下显示 $[M+Na]^+$ 。

2.6 白花蛇舌草注射液中化学成分的 HPLC-TOFMS 分析 采用相同的方法将自制白花蛇舌草注射液样品和市售注射液样品进样分析,采集 HPLC-TOFMS 总离子流图,结果共鉴别出自制白花蛇舌草注射液中 6 个成分,市售白花蛇舌草注射液中 2 个成分,结果如表 6 所示。

表5 白花蛇舌草中各化学成分的 TOFMS 分析结果

Tab 5 Analytical results of components in *Oldenlandia diffusa* by HPLC-TOFMS

No.	Compound	Measured ion	M+X	Expected m/z	Experimental TOF-MS	Error (ppm)
1	p-Coumaric acid	$[C_9H_8O_3]^-$	$[M+H]^+$	165.055 1	165.054 7	-2.423 4
2	7-Hydroxy-6-methoxycoumarin	$[C_{10}H_8O_4]^-$	$[M+H]^+$	193.050 1	193.049 4	-3.626 0
3	Deacetyl asperulosidic acid methyl ester	$[C_{17}H_{24}O_{11}]^-$	$[M+Na]^+$	427.121 6	427.120 8	-1.873 0
4	Methyl-p-coumarate or ferulic acid	$[C_{10}H_{10}O_4]^-$	$[M+H]^+$	195.065 7	195.065 5	-1.025 3
5	Quercetin	$[C_{15}H_{10}O_7]^-$	$[M+H]^+$	303.050 5	303.050 2	-0.989 9
6	Kaempferol	$[C_{15}H_{10}O_6]^-$	$[M+H]^+$	287.055 5	287.055 4	-0.348 3
7	Rutin	$[C_{27}H_{30}O_{16}]^-$	$[M+H]^+$	611.161 2	611.160 3	-1.472 6
8	2-Hydroxyl-3-methyl anthraquinone	$[C_{15}H_{10}O_3]^-$	$[M+H]^+$	239.070 8	239.071	0.836 5
9	1,3-Hydroxyl-2-methyl anthraquinone	$[C_{15}H_{10}O_4]^-$	$[M+H]^+$	255.065 7	255.064 8	-3.528 5
10	1,7-Hydroxyl-6-methoxy-2-methyl anthraquinone	$[C_{16}H_{12}O_5]^-$	$[M+H]^+$	285.076 3	285.076 7	1.403 1
11	2-Hydroxy-3-methyl-1-methoxy anthraquinone or 2-hydroxy-7-methyl-3-methoxy anthraquinone	$[C_{16}H_{12}O_4]^-$	$[M+H]^+$	269.081 4	269.081 0	-1.486 5

表 6 市售和自制白花蛇舌草注射液中各化学成分的分析结果

Tab 6 Analytical results of components in *Oldenlandia diffusa* injection of market and preparation by HPLC-TOFMS

No.	Compound	Measured ion	M+X	Expected m/z	Experimental TOF-MS	Error(ppm)	
Marketed	1	7-Hydroxy-6-methoxyl coumarin	[C ₁₀ H ₈ O ₄] ⁻	[M+H] ⁺	193.050 1	193.049 4	-3.626
	2	Deacetyl asperulosidic acid methyl ester	[C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁] ⁻	[M+Na] ⁺	427.121 6	427.121 7	0.234 1
	3	Methyl-p-coumarate or ferulic acid	[C ₁₀ H ₁₀ O ₄] ⁻	[M+H] ⁺	195.065 7	195.065 5	-1.025 3
	4	Quercetin	[C ₁₅ H ₁₀ O ₇] ⁻	[M+H] ⁺	303.050 5	303.048 9	-5.279 6
	5	Kaempferol	[C ₁₅ H ₁₀ O ₆] ⁻	[M+H] ⁺	287.055 5	287.056 0	1.741 8
	6	Rutin	[C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆] ⁻	[M+H] ⁺	611.161 2	611.160 4	-1.309 0
Self-prepared	7-Hydroxy-6-methoxyl coumarin	[C ₁₀ H ₈ O ₄] ⁻	[M+H] ⁺	193.050 1	193.048 8	-6.734	
	Methyl-p-coumarate or ferulic acid	[C ₁₀ H ₁₀ O ₄] ⁻	[M+H] ⁺	195.065 7	195.066 3	3.075 9	

3 讨论

3.1 提取方法的选择 实验过程中分别选用甲醇、75%甲醇、50%甲醇和水超声提取进行溶剂选择,结果表明以75%的甲醇提取较好;综合考察冷浸、超声、回流等提取方法,结果发现超声20 min效果最好,且操作方便,故最终采用75%的甲醇超声提取,制得样品溶液。

3.2 液相条件的选择 流动相的选择:比较了甲醇-水和乙腈-水系统,由于乙腈-水体系中,基线不稳定,干扰较大,故选择甲醇-水体系。加入适量醋酸调节pH,抑制组分的离解,增强保留时间。使溶剂调节到最佳的分配系数,使白花蛇舌草各成分有效的分离。结合各因素确定适宜的流动相组成为甲醇-0.3%醋酸。

检测波长的选择:在190~400 nm波长范围内检测供试品的出峰情况,结果在254 nm出峰最多,故选择254 nm作为检测波长。温度和流速的选择:实验中分别比较了不同温度和流速对色谱峰的影响,结果表明,在30℃和1 ml/min的条件下,各化学成分既能保证分离度又能良好控制分析时间。

3.3 鉴别结果 根据飞行时间质谱测得的精确相对分子质量,应用Qualitative Analysis质谱分析软件计算可能的分子组成(误差<5 ppm),并结合自建的白花蛇舌草化学成分数据库,将理论值与实测值进行对比,对白花蛇舌草HPLC分离的30余个主要色谱峰进行分析,确定了11个成分的分子组成。同时有3对同分异构体,如对香豆酸甲酯与阿魏酸、1,7-二羟基-6-甲氧基-2-甲基蒽醌与2,6-二羟基-1-甲氧基-3-甲基蒽醌、2-羟基-3-甲基-1-甲氧基蒽醌与2-羟基-7-甲基-3-甲氧基蒽醌,在现有的质谱条件下无法区分。

对比白花蛇舌草药材总离子流图,对市售白花蛇舌草注射液进行鉴别,鉴别出白花蛇舌草注射中6个化学成分,另有很多色谱峰所代表化学成分因未在数据库中而不能有效鉴别,还有待于进一步研究。

采用相同的方法对自制白花蛇舌草注射液中化

学成分进行鉴别,仅鉴别出2种化学成分,这表明虽然超高压技术具有提取温度低、不破坏成分、提取时间短、能耗低等优点,但目前尚并不能有效提取出白花蛇舌草中化学成分,因而有待于进一步研究。

本课题采用HPLC-TOFMS技术对白花蛇舌草药材中化学成分进行了快速分离鉴别,共鉴别出白花蛇舌草中11个化学成分,市售白花蛇舌草注射液中6个化学成分。通过对白花蛇舌草药材及其注射剂中化学成分色谱峰的明确化归属,可为白花蛇舌草药材及其注射剂中有效成分筛选与质量控制研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] 陈文霞,谈献和,李伟,张瑜,崔小兵,徐向彩. 白花蛇舌草HPLC指纹图谱的研究[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20: 38-40.
- [2] 王臣芳. 白花蛇舌草及其常见伪品的鉴别[J]. 药物分析杂志, 2007, 27: 1785-1789.
- [3] 杨婷,杨宜华,杨菊云,陈本美,陈玉祥,余木宜,等. 白花蛇舌草LC-MS指纹图谱的研究[J]. 中国医药导报, 2007, 4: 21-23.
- [4] 周应军,吴孔松,曾光尧,谭健兵,徐康平,李福双,等. 白花蛇舌草化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32: 590-593.
- [5] 张永勇,罗佳波. 白花蛇舌草化学成分的研究[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28: 127-128.
- [6] 黄卫华,李友宾,蒋建勤. 白花蛇舌草化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33: 524-525.
- [7] 刘晶芝,王莉. 白花蛇舌草化学成分研究[J]. 河北医科大学学报, 2007, 28: 188-190.
- [8] 康兴东,李锐,毛羽,赵春超,李宁,孟大利. 白花蛇舌草的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24: 479-481.
- [9] 郭云珍,宝炉丹,潘永玉,郭兴杰. HPLC法同时测定白花蛇舌草注射液中2种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27: 1158-1160.
- [10] 李存满,徐青,薛兴亚,章飞芳,梁鑫森,陈德良. 白花蛇舌草中环烯醚萜苷类化合物的稳定性研究[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2007, 9: 51-55, 66.
- [11] 斯建勇,陈迪华,潘瑞乐,赵晓宏. 白花蛇舌草的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 942-944.
- [12] Li C, Xue X, Zhou D, Zhang F, Xu Q, Ren L, et al. Analysis of iridoid glucosides in *Hedyotis diffusa* by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48: 205-211.