

UPLC-TOF-MS 法鉴定胀果甘草药渣中黄酮类成分

张娟¹, 刘芬², 李宁^{2*}, 卿德刚¹, 孙宇¹, 贾晓光¹, 倪慧^{1*}

1. 新疆维吾尔自治区中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

2. 沈阳药科大学 中药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 建立胀果甘草药渣中黄酮类成分的超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱(UPLC-TOF-MS)定性分析方法。**方法** Agilent SB-C₁₈柱(100 mm×4.6 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 254 nm。ESI 离子源, 飞行时间质谱检测器。对比自制对照品进行鉴别。**结果** 共鉴定出 8 个黄酮类成分, 分别为 2',4,4'-三羟基查耳酮、甘草查耳酮 D、甘草查耳酮甲、4'-羟基-2",2"-二甲吡喃[5",6",6",7"]黄酮、甘草黄酮 C、光甘草酮、甘草黄酮 B 和 kanzonol E。**结论** 建立了一种简单、可靠的 UPLC-TOF-MS 方法对胀果甘草药渣中黄酮类成分进行了鉴定, 对胀果甘草药渣综合利用有一定参考价值。

关键词: 胀果甘草药渣; 黄酮; 2',4,4'-三羟基查耳酮; 甘草查耳酮 D; 甘草查耳酮甲; 超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱(UPLC-TOF-MS)

中图分类号: R284.21

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2012)06-0558-04

Identification of flavonoids gruffs of *Glycyrrhiza inflata* waste by UPLC-TOF-MS

ZHANG Juan¹, LIU Fen², LI Ning², QING De-gang¹, SUN Yu¹, JIA Xiao-guang¹, NI Hui¹

1. Xinjiang Institute of Chinese Materia Medica and Ethical Materia Medica, Urumqi 830002, China

2. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To establish the identification method for flavonoids in gruffs of flavonoids in *G. inflata* by UPLC-TOF-MS.

Methods The method of identification was performed on Agilent SB-C₁₈ column (100 mm×4.6 mm, 1.8 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution with gradient elution program. The flow rate was 0.40 mL/min, the column temperature was 25 °C, and the wavelength was set at 254 nm. The detector was TOF Mass Spectrometer with an ESI ion source. The data were compared with those of the reference substances. **Results** Eight flavonoids were identified from the gruffs in *G. inflata* and were identified as 2',4,4'-trihydroxychalcone, licochalcone D, licochalcone A, 4'-hydroxy-2",2"-dimethylpyrano [5",6",6",7] flavone, licoflavone C, glabrone, licoflavone B, and kanzonol E. **Conclusion** The established method for the determination of flavonoids in the gruffs of *G. inflata* using UPLC-TOF-MS is simple, reliable, and could provide the reference on comprehensive utilization.

Key words: gruffs of *Glycyrrhiza inflata* Batal.; flavonoids; 2',4,4'-trihydroxychalcone; licochalcone D; licochalcone A; UPLC-TOF-MS

胀果甘草药渣为豆科植物胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Batal. 工业化生产甘草酸过程中排出的废弃物, 传统水提法虽制得了甘草酸, 但却浪费了胀果甘草中大量的低极性黄酮类成分。研究表明胀果甘草药渣中富含的黄酮类成分具有抗真菌、抗艾滋病、抗肿瘤、抗溃疡、抗氧化、保肝及降血糖等多种生物活性^[1-4]。本课题组的前期工作也表明胀果甘草药

渣中的总黄酮具有较好的抗肿瘤、抗炎活性。由于水提取甘草酸不会对胀果甘草药渣造成污染, 因此胀果甘草药渣仍可进一步应用于食品、药品、化妆品的生产。

甘草经提取后一些含量较低的低极性黄酮类成分在药渣中相对含量提高。目前, 已有相关专利和文献报道了甘草药渣或甘草药渣总黄酮作为活性提

收稿日期: 2012-10-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81001371); 新疆维吾尔自治区高技术研究发展项目(200915122); 乌鲁木齐市科技计划项目(P09111003, Y101120002)

作者简介: 张娟(1983—), 女, 甘肃人, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 天然药物的分析与制剂。Tel: (0991) 8855334 E-mail: ezhanguane76@sina.com

*通讯作者 李宁(1979—), 女, 河北保定人, 副教授, 主要从事天然药物化学研究。Tel: (024)23986475 E-mail: liningsypharm@163.com

倪慧(1964—), 女, 研究员, 硕士研究生导师, 主要从事天然药物的分析及制剂。Tel: (0991)8855334 E-mail: xjnihui@163.net

取物应用的实例,但都未对其主要指标性成分进行指认。为了更好地为甘草药渣综合利用提供化学成分和活性物质基础信息,为指导和衡量甘草提取、纯化工艺的合理性提供一个方法,本实验在对胀果甘草药渣化学成分进行充分研究的基础上应用超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱(UPLC-TOF-MS)技术建立了胀果甘草药渣中黄酮类成分定性分析方法,利用从胀果甘草药渣中分离得到的单体化合物^[5-6]对 8 个特征峰进行了鉴定。该法操作简便、可靠,对丰富胀果甘草药渣化学成分研究内容、药理作用研究及质量控制均有一定的参考价值。

1 仪器与材料

Agilent 6520 Q-TOF 质谱仪; Hitachi Model D-2000 HPLC 色谱仪。

2',4,4'-三羟基查耳酮、甘草查耳酮 D、甘草查耳酮甲、4'-羟基-2'',2''-二甲基吡喃[5'',6'',6,7]黄酮、甘草黄酮 C、光甘草酮、甘草黄酮 B、kanzonol E 对照品(自制,经 UV、IR、NMR 和 MS 鉴定结构,质量分数均大于 95%)。乙腈为色谱纯,甲酸为分析纯。胀果甘草药渣来自新疆新农甘草有限责任公司,经水提取后残留药渣干质量大约为原质量的 60%。

2 方法与结果

2.1 对照溶液的制备

取各对照品约 1.0 mg,分别精密称定,置 5 mL

量瓶,各加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 供试溶液的制备

取胀果甘草药渣适量,10、8、8 倍量 95%乙醇回流提取 3 次,每次 2、1.5、1.5 h,提取液减压浓缩得提取物。取提取物 10 mg,置 10 mL 量瓶,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

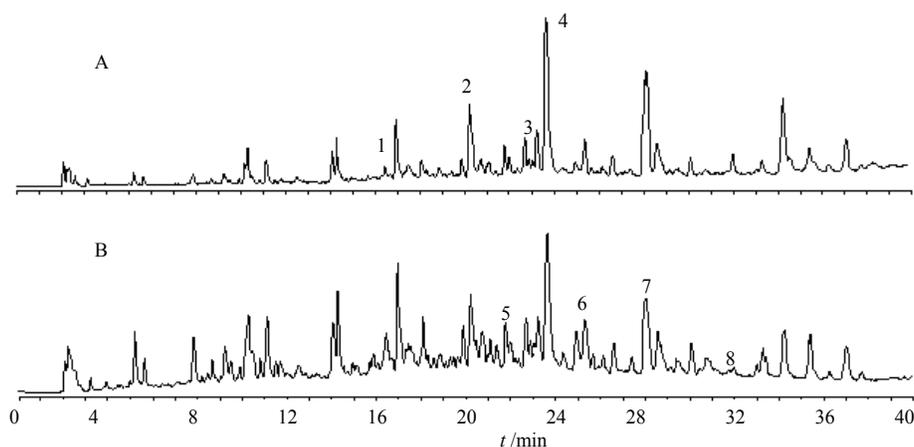
2.3 检测条件

TOF/MS 质谱条件:ESI 离子源,飞行时间质谱检测器, Gas Temp 350 °C, Dring Gas 5 mL/min, VCap 4 000 V, Fragmentor 150 V, Skimmer 65 V。

色谱条件:Agilent SB-C₁₈ 柱(100 mm×4.6 mm, 1.8 μm);流动相乙腈-0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱,0~40 min 乙腈 5%→100%,甲酸水溶液 95%→0%;体积流量 0.4 mL/min;柱温 25 °C;检测波长 254 nm。

2.4 成分的鉴别

在优化的色谱条件下以质谱正、负离子 2 种检出模式进行扫描,得到胀果甘草药渣提取物的 UPLC-TOF-MS 典型总离子流图(图 1),并获得相应的紫外色谱图(图 2)。可见质谱总离子流图和紫外色谱图基本对应,而且质谱图的响应峰比紫外色谱图好。总体来说胀果甘草药渣中的化学成分在负离子模式下的质谱响应要比正离子模式的质谱响应好,但也有个别成分在正离子模式下有更好响应,所以实验分别在 2 种模式下对有较好响应的 8 个主要色谱峰进行鉴别,见图 3。



1-2',4,4'-三羟基查耳酮 2-甘草查耳酮 D 3-甘草查耳酮甲 4-4'-羟基-2'',2''-二甲基吡喃[5'',6'',6,7]黄酮 5-甘草黄酮 C 6-光甘草酮 7-甘草黄酮 B 8-kanzonol E
1-2',4,4'-trihydroxychalcone 2-licochalcone D 3-licochalcone A 4-4'-hydroxy-2'',2''-dimethylpyrano [5'',6'',6,7] flavone 5-licoflavone C 6-glabrone 7-licoflavone B 8-kanzonol E

图 1 在正(A)、负(B)离子检出模式下胀果甘草药渣提取物 UPLC-TOF-MS 总离子流图

Fig. 1 UPLC-TOF-MS total ion current of extract in gruffs of *G. inflata* under positive (A) and negative (B) ion model

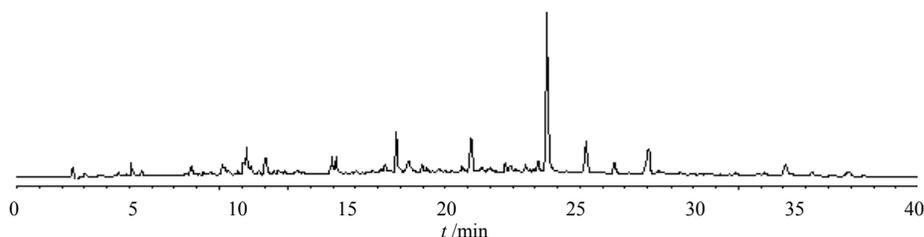
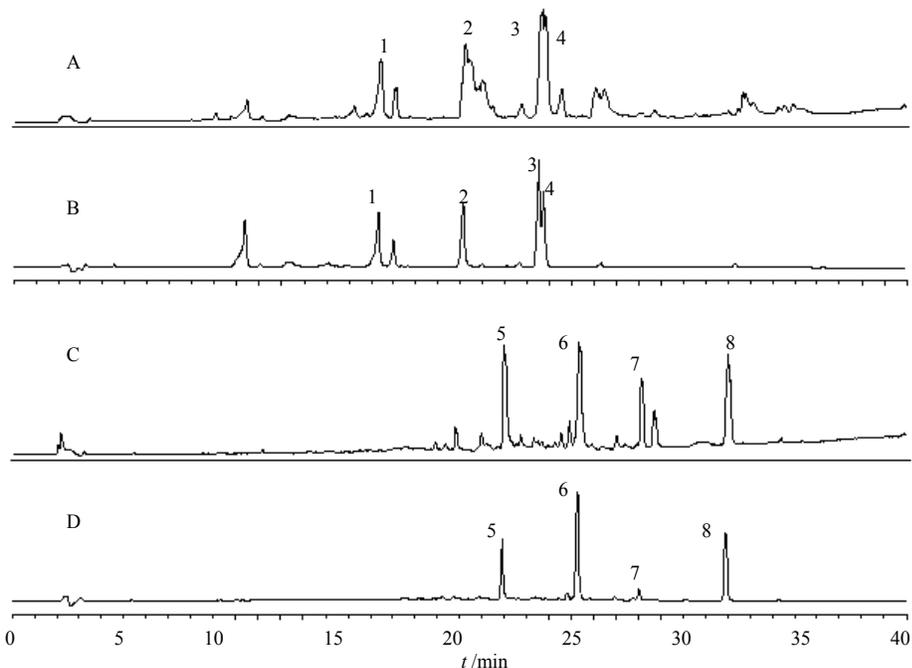


图 2 胀果甘草药渣提取物 UPLC 图谱

Fig. 2 UPLC chromatogram of extract in gruffs of *G. inflata*



1-2',4,4'-三羟基查耳酮 2-甘草查耳酮 D 3-甘草查耳酮甲 4-4'-羟基-2",2"-二甲基吡喃[5",6",6,7]黄酮 5-甘草黄酮 C 6-光甘草酮 7-甘草黄酮 B 8-kanzonol E
 1-2',4,4'-trihydroxychalcone 2-licochalcone D 3-licochalcone A 4-4'-hydroxy-2",2"-dimethylpyrano [5",6",6,7] flavone 5-licoflavone C 6-glabrone 7-licoflavone B 8-kanzonol E

图 3 混和对照品的 HPLC-TOF-MS 总离子流图 (A、C) 和 UPLC 图 (B、D)

Fig. 3 UPLC-TOF-MS total ion current (A and C) and UPLC chromatograms (B and D) of mixed reference substances

采用提取离子色谱 (EIC), 根据测得样品成分和对照品的保留时间、质谱信息结合化学成分研究基础对药渣中的 8 个主要色谱峰进行了指认和相对分子质量的归属, 见表 1。

3 讨论

胀果甘草药渣所含成分复杂, 极性差别大, 使用 HPLC 法分析时间较长, 故实验采用 UPLC 梯度洗脱法分析。比较了不同酸度 (0.5%冰醋酸溶液、0.1%甲酸溶液、0.5%甲酸溶液)、不同流动相组成 (甲醇-水、甲醇-乙腈-水) 和不同比例, 以及不同梯度方法的液相系统。结果表明, 以乙腈-0.1%甲酸溶液进行梯度洗脱时, 出峰数目较多, 分离

表 1 色谱峰的鉴定和相对分子质量的归属

Table 1 Identification of peaks and assignment of molecular weight

峰号	t_R/min	离子	M_r	测定 m/z
1	16.452	$[M+H]^+$	256	257
2	20.164	$[M+H]^+$	354	355
3	23.744	$[M+H]^+$	338	339
4	23.976	$[M+H]^+$	320	321
5	22.025	$[M-H]^-$	338	337
6	25.506	$[M-H]^-$	336	335
7	28.108	$[M-H]^-$	390	389
8	32.036	$[M-H]^-$	388	387

度好。

本实验采用 UPLC-TOF-MS 技术建立了胀果甘草药渣乙醇提取物中黄酮类成分定性鉴别方法, 对比自制对照品的保留时间及质谱图, 鉴定了包括甘草查耳酮甲在内的 8 个黄酮类成分, 能更加客观地反映胀果甘草药渣的内在质量, 为进一步利用胀果甘草药渣生产黄酮类产品提供重要依据。

该方法快速、灵敏、准确度高, 可作为胀果甘草药渣质量控制方法之一, 有助于评价不同产地、不同生产过程产生的胀果甘草药渣中黄酮类成分的差异, 为胀果甘草药渣的药理学研究和综合利用提供了化学物质基础信息。

参考文献

- [1] 贾国惠, 贾世山. 甘草中黄酮的药理作用研究进展 [J]. 中国药学杂志, 1998, 33(9): 513-516.
- [2] 田庆来, 官月平, 张波, 等. 甘草有效成分的药理作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(2): 343-347.
- [3] 王立, 李家恒. 中国甘草属植物研究进展 [J]. 草业科学, 1999, 16(4): 28-31.
- [4] 刘芬, 李宁, 倪慧, 等. 甘草药渣的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2011, 13(2): 6-9.
- [5] 李宁, 刘芬, 倪慧, 等. 新疆胀果甘草化学成分分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(5): 368-371.
- [6] 刘芬, 倪慧, 卿德刚, 等. 甘草药渣化学成分分离与鉴定 [J]. 中国药物化学杂志, 2011, 21(4): 312-314.