

山楂中化学成分的 UPLC/ESI-TOF/MS 分析

乔晓莉^{1,2}, 吴士杰³, 祁向争⁴, 冯 健¹, 肖学风^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津市南开医院, 天津 300100

3. 石家庄以岭药业股份有限公司, 河北 石家庄 050000

4. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150

摘要: 目的 建立山楂中化学成分的超高压液相/电喷雾-飞行时间/质谱(UPLC/ESI-TOF/MS)的分析方法。方法 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1%甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 50 °C, 检测波长范围 260~360 nm, 进样量 1 μL。ESI 离子源, 飞行时间质谱检测器, 对比对照品进行鉴别。结果 共鉴定出 13 个化合物, 分别为苹果酸(1)、枸橼酸(2)、绿原酸(3)、花青素 B₂(4)、表儿茶素(5)、花青素 B₃(6)、牡荆素葡萄糖苷(7)、芦丁(8)、金丝桃苷(9)、异槲皮苷(10)、槲皮素(11)、熊果酸(12)、熊果醇(13)。结论 建立了一种简单、快速的 UPLC/ESI-TOF/MS 方法对山楂中化学成分进行了鉴定。

关键词: 山楂; 枸橼酸; 槲皮素; 熊果酸; 超高压液相/电喷雾-飞行时间/质谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)02-0120-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.02.003

Identification of chemical constituents in *Crataegus pinnatifida* var. *major* by UPLC/ESI-TOF/MS

QIAO Xiao-li^{1,2}, WU Shi-jie³, QI Xiang-zheng⁴, FENG Jian¹, XIAO Xue-feng¹

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China

3. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd, Shijiazhuang 050000, China

4. Second Affiliated Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China

Abstract: Objective To identify the chemical constituents of *Crataegus pinnatifida* var. *major* N. E. Brown by UPLC/ESI-TOF/MS.

Methods The method of identification was performed on Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile with gradient elution program. The injection volume was 1 μL at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 50 °C, and the detection wavelength was set from 260 to 360 nm. The detector was TOF Mass Spectrometer with an ESI ion source. The data were compared with those of the reference substances. **Results** Thirteen compounds were identified as malic acid (1), citric acid (2), chlorogenic acid (3), anthocyanin B₂ (4), epicatechin (5), anthocyanin B₃ (6), vitexin-glucoside (7), rutin (8), hyperoside (9), isoquercetin (10), quercetin (11), ursolic acid (12), and uvaol (13).

Conclusion The established method for the determination of chemical constituents of *C. pinnatifida* var. *major* using UPLC/ESI-TOF/MS is simple and reliable.

Key words: *Crataegus pinnatifida* var. *major* N. E. Brown; citric acid; quercetin; ursolic acid; UPLC/ESI-TOF/MS

山楂为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* var. *major* N. E. Brown 或山楂 *C. pinnatifida* Bge.的

干燥成熟果实, 味酸、甘, 性微温, 归脾、胃、肝经, 具有消食健胃、行气散瘀的功效^[1]。山楂中主

收稿日期: 2013-10-15

作者简介: 乔晓莉(1982—), 女, 山西大同人, 在读博士, 药师, 主要从事药剂学和药动学研究工作。

Tel: 13512463203 E-mail: 13512463203@163.com

*通信作者 肖学风, 女, 博士, 教授, 硕士生导师。Tel: 13820066504 E-mail: kai1219@126.com

要含有黄酮、三萜和有机酸,还含有维生素 C、胡萝卜素及钙、铁等微量元素和磷脂类成分^[2]。

近年来,山楂的研究工作主要集中在化学成分的测定^[3-4]、分离鉴定^[5-7]及药理作用^[8-9]等研究方面,使用液质联用技术进行山楂化学成分鉴定的报道较少,其中许红蕾等^[10]采用 HPLC-DAD/ESI-MS 技术鉴定出山楂叶中 11 个主要化学成分;岳晓芝等^[11]采用 HPLC/ESI-IT-MS 方法鉴定并得到了山楂中的 12 个成分。本实验采用 UPLC/ESI-TOF/MS 获得山楂化学成分的二级质谱数据,高效、准确地鉴别了 13 个化合物,分别鉴定为苹果酸(1)、枸橼酸(2)、绿原酸(3)、花青素 B₂(4)、表儿茶素(5)、花青素 B₃(6)、牡荆素葡萄糖苷(7)、芦丁(8)、金丝桃苷(9)、异槲皮苷(10)、槲皮素(11)、熊果酸(12)、熊果醇(13)。对丰富山楂中化学成分的研究内容和总结相关化合物的质谱裂解规律具有重要的意义。

1 仪器与材料

Waters UPLC-MS/MS 系统:Acquity Ultra Performance LC 包括 DAD 检测器、自动进样器、二元泵、在线脱气机;Q-TOF Premier 质谱仪包括电喷雾离子源(ESI)和 MassLynx V4.1 工作站(美国 Waters 公司)。Mikro 220R 台式冷冻离心机(德国 Hettich 公司);FW80 粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司);XP6 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

乙腈、甲醇均为色谱纯(美国 Fisher 公司),甲酸、无水乙醇为分析纯(天津江天化工技术有限公司),流动相用水由 Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)制得。

柠檬酸(批号 111679-200401)、绿原酸(批号 110753-200413)、表儿茶素(批号 110878-200102)、芦丁(批号 100080-200306)、金丝桃苷(批号 111521-200303)、槲皮素(批号 100081-200406)、熊果酸(批号 110742-200516)对照品均购自中国食品药品检定研究院;苹果酸(批号 6915-15-7)、花青素 B₂(批号 29106-49-8)、花青素 B₃(批号 23567-23-9)、牡荆素葡萄糖苷(批号 76135-82-5)、异槲皮苷(批号 21637-25-2)、熊果醇(批号 545-46-0)对照品均购自上海纯优生物科技有限公司;山楂药材(批号 120412)购于河北安国药材市场,经天津药物研究院周福军副研究员鉴定为蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* var. *major* N. E. Brown 的干燥成熟果实。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取 6 种对照品各 10 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,配成质量浓度均为 1 mg/mL 的各对照品溶液储备液;取 0.5 mL 储备液置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配成质量浓度均为 50 μg/mL 对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取山楂药材适量,去核和柄后粉碎(过 40 目筛),精密称取细粉 2.5 g,置 100 mL 圆底烧瓶中,精密加入 75%乙醇 50 mL,称定质量,加热回流 1.5 h,放冷,再称定质量,用 75%乙醇补足减失质量,摇匀,滤过,滤液真空浓缩至干,残渣加甲醇溶解,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,即得。

2.3 检测条件

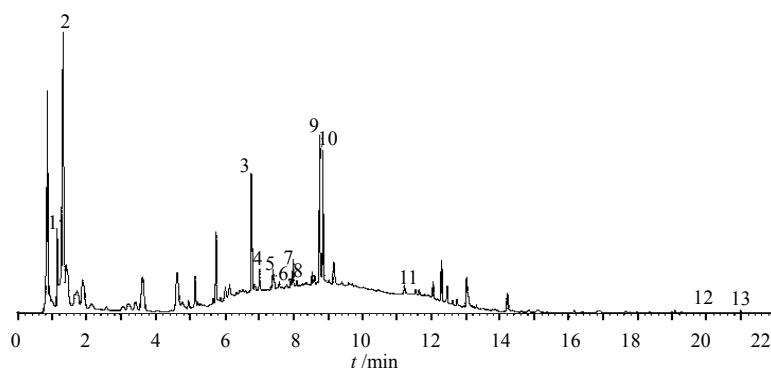
2.3.1 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,0~3 min, 2%B; 3~5 min, 2%~10%B; 5~10 min, 10%~30%B; 10~12 min, 30%~50%B; 12~16 min, 50%~60%B; 16~22 min, 60%~100%B; 体积流量:0.3 mL/min;柱温:50 ℃;检测波长:0~6 min, 260 nm; 6~12 min, 360 nm; 12~22 min, 260 nm; 进样量:1 μL。

2.3.2 质谱条件 电喷雾电离:负离子模式毛细管电压-2.5 kV;正离子模式毛细管电压 3.0 kV;离子源温度:100 ℃;脱溶剂气温度:300 ℃;脱溶剂气流量:600 L/h;锥孔气流量:50 L/h;离子检测方式:正离子和负离子全扫描;离子对扫描范围: m/z 50~1 000。用 2.5 mmol/L 三氟醋酸钠溶液对正负离子模式下 m/z 50~1 000 质量数进行校正。

2.4 成分的鉴定

在上述色谱条件下得到山楂的 UPLC-DAD 色谱图见图 1。总体来说山楂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 13 个主要色谱峰进行鉴别,见图 2。数据分析由 MassLynx V4.1 工作站完成。结合分子式预测软件对质谱碎片作综合分析,得到化合物的分子式及碎片信息,并对比对照品进行鉴别。

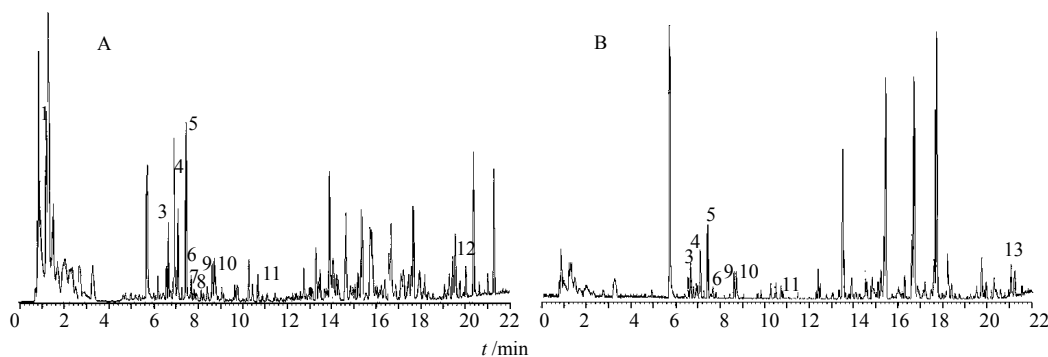
化合物 1 t_R = 1.04 min, Q-TOF/MS m/z : 132.972 0 [M-H]⁻, 二级扫描裂解产生了 m/z 115、73、



1-苹果酸 2-柠檬酸 3-绿原酸 4-花青素 B₂ 5-表儿茶素 6-花青素 B₃ 7-荊素葡萄糖苷
8-芦丁 9-金丝桃苷 10-异槲皮苷 11-槲皮素 12-熊果酸 13-熊果醇
1-malic acid 2-citric acid 3-chlorogenic acid 4-anthocyanin B₂ 5-epicatechin 6-anthocyanin B₃ 7-vitexin-glucoside
8-rutin 9-hyperoside 10-isoquercetin 11-quercetin 12-ursolic acid 13-uvaol

图 1 山楂的 UPLC-DAD 色谱图

Fig. 1 UPLC-DAD chromatogram of *C. pinnatifida* var. *major*



1-苹果酸 2-柠檬酸 3-绿原酸 4-花青素 B₂ 5-表儿茶素 6-花青素 B₃ 7-荊素葡萄糖苷
8-芦丁 9-金丝桃苷 10-异槲皮苷 11-槲皮素 12-熊果酸 13-熊果醇
1-malic acid 2-citric acid 3-chlorogenic acid 4-anthocyanin B₂ 5-epicatechin 6-anthocyanin B₃ 7-vitexin-glucoside
8-rutin 9-hyperoside 10-isoquercetin 11-quercetin 12-ursolic acid 13-uvaol

图 2 在正离子 (A) 和负离子 (B) 检出模式下山楂 UPLC/ESI-TOF/MS 总离子流图

Fig. 2 UPLC/ESI-TOF/MS total ion current of *C. pinnatifida* var. *major* under positive (A) and negative (B) ion detection mode

71. 对照品 $t_R=1.04$ min, 裂解规律为 m/z 133 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 115 $[M-H-H_2O]^-$ 、73 $[M-H-C_2H_4O_2]^-$ 、71 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$, 分子式为 $C_4H_6O_5$, 相对分子质量为 134.088 6, 对比对照品鉴别化合物 1 为苹果酸。

化合物 2 $t_R=1.32$ min, Q-TOF/MS m/z : 190.985 7 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生 m/z 147、111、87. 对照品 $t_R=1.32$ min, 裂解规律为 m/z 191 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 147 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 、111 $[M-H-CO_2-2H_2O]^-$ 、87 $[M-2H-2CO_2-CH_3]^-$, 分子式为 $C_6H_8O_7$, 相对分子质量为

192.125 3, 对比对照品鉴别化合物 2 为柠檬酸。

化合物 3 $t_R=6.64$ min, Q-TOF/MS m/z : 353.072 9 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生 m/z 191, 推测其是奎尼酸 $C_7H_{12}O_6$ (192) 失去一个质子, 而绿原酸是由奎尼酸和咖啡酸 $C_9H_8O_4$ (180) 脱水组成的缩酚酸。对照品 $t_R=6.64$ min, 裂解规律为 m/z 353 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 191 $[M-H-162]^-$, 分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, 相对分子质量为 354.313 5, 对比对照品鉴别化合物 3 为绿原酸。

化合物 4 $t_R=7.09$ min, Q-TOF/MS m/z : 577.147 9 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生 m/z 289, 推

测其是表儿茶素 $C_{15}H_{14}O_6$ (290) 失去一个质子。对照品 $t_R=7.09$ min, 裂解规律为 m/z 577 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 289 $[M-289]^-$, 分子式为 $C_{30}H_{26}O_{12}$, 相对分子质量为 578.529 2, 对比对照品鉴别化合物 **4** 为表儿茶素的二聚体即花青素 B_2 。

化合物 **5** $t_R=7.44$ min, Q-TOF/MS m/z : 289.041 0 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生 m/z 245、205、179。对照品 $t_R=7.44$ min, 裂解规律为 m/z 289 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 245 $[M-H-CO_2]^-$ 、205 $[M-H-2(C_2H_2O)]^-$ 、179 $[M-H-C_6H_6O_2]^-$, 分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$, 相对分子质量为 290.272 6, 对比对照品鉴别化合物 **5** 为表儿茶素。

化合物 **6** $t_R=7.64$ min, Q-TOF/MS m/z : 865.250 2 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生 m/z 577、289, 且同花青素 B_2 一样也存在 m/z 289 碎片信息。对照品 $t_R=7.64$ min, 裂解规律为 m/z 865 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 577 $[M-H-289]^-$ 、287 $[M-H-289-289-2H]^-$, 分子式为 $C_{45}H_{38}O_{18}$, 相对分子质量为 866.785 9, 对比对照品鉴别化合物 **6** 为表儿茶素的三聚体即花青素 B_3 。

化合物 **7** $t_R=8.17$ min, Q-TOF/MS m/z : 611.267 6 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生 m/z 593、431、269、251。对照品 $t_R=8.17$ min, 裂解规律为 m/z 611 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 431 $[M-H-C_6H_{12}O_5-2H_2O]^-$ 、269 $[M-H-2C_6H_{12}O_5-H_2O]^-$ 、251 $[M-H-2C_6H_{14}O_4-2H_2O]^-$, 分子式为 $C_{27}H_{30}O_{15}$, 相对分子质量为 594.526 2, 对比对照品鉴别化合物 **7** 为牡荆素葡萄糖苷。

化合物 **8** $t_R=8.39$ min, Q-TOF/MS m/z : 609.171 3 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 301。对照品 $t_R=8.39$ min, 裂解规律为 m/z 609 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生 m/z 301 $[M-H-C_6H_{12}O_5-C_6H_{10}O_4-2H_2O]^-$, 分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$, 相对分子质量为 610.525 6, 对比对照品鉴别化合物 **8** 为芦丁。

化合物 **9** $t_R=8.60$ min, Q-TOF/MS m/z : 463.070 4 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 301。对照品 $t_R=8.60$ min, 裂解规律为 m/z 463 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生 m/z 301 $[M-H-C_6H_{12}O_5-H_2O]^-$, 分子式为 $C_{21}H_{20}O_{12}$, 相对分子质量为 464.382 6, 对比对照品鉴别化合物 **9** 为槲皮素-3-*O*-半乳糖苷即金丝桃苷。

化合物 **10** $t_R=8.69$ min, Q-TOF/MS m/z : 463.0691 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 301。

对照品 $t_R=8.69$ min, 裂解规律为 m/z 463, 二级扫描裂解产生 m/z 301 $[M-H-C_6H_{12}O_5-H_2O]^-$, 分子式为 $C_{21}H_{20}O_{12}$, 相对分子质量为 464.382 6, 对比对照品鉴别化合物 **10** 为槲皮素-3-*O*-葡萄糖苷即异槲皮苷。

化合物 **11** $t_R=11.13$ min, Q-TOF/MS m/z : 301.002 1 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生 m/z 283、273、257、229。对照品 $t_R=11.13$ min, 裂解规律为 m/z 301 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生了 m/z 283 $[M-H-H_2O]^-$ 、273 $[M-H-CO]^-$ 、257 $[M-H-CO-O]^-$ 、 m/z 229 $[M-H-CO-O-CO]^-$, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$, 相对分子质量为 302.240 2, 对比对照品鉴别化合物 **11** 为槲皮素。

化合物 **12** $t_R=20.13$ min, Q-TOF/MS m/z : 455.333 6 $[M-H]^-$, 二级扫描裂解产生 m/z 437、409、247。对照品 $t_R=20.13$ min, 裂解规律为 m/z 455, 二级扫描裂解产生了 m/z 437 $[M-H-H_2O]^-$ 、409 $[M-H-HCOOH]^-$ 、247 $[M-H-208]^-$, 分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$, 相对分子质量为 456.360 3, 对比对照品鉴别化合物 **12** 为熊果酸。

化合物 **13** $t_R=21.05$ min, Q-TOF/MS m/z : 443.385 4 $[M+H]^+$, 二级扫描裂解产生 m/z 235、217、191。对照品 $t_R=21.05$ min, 裂解规律为 m/z 443, 二级扫描裂解产生了 m/z 425 $[M+H-H_2O]^+$ 、235 $[M+H-208]^+$, 即 C 环进行 RDA 裂解, 失去含 AB 环的离子; 还存在 m/z 217 $[M+H-208-H_2O]^+$ 、191 $[M+H-208-CO_2]^+$, 分子式为 $C_{30}H_{50}O_2$, 相对分子质量为 442.381 1, 对比对照品鉴别化合物 **13** 为熊果醇。

4 讨论

对色谱条件的摸索, 考察了甲醇-水、乙腈-水系统, 发现乙腈的洗脱效果优于甲醇, 且各色谱峰分离效果更好, 加入 0.1% 甲酸可以改善峰拖尾, 并提高质谱响应。故本实验采用 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相, 兼顾了液相色谱和液质联用两者的分离要求。

采用 ESI-MS 定性分析时, 为获得全面信息同时采用正、负离子全扫描, 发现负离子检测模式下目标物质的响应值明显, 正离子检测信息量少, 主要因为山楂中富含多元酚类物质, 属于酸性化合物, 适宜于负离子模式检测; 而有些组分在正离子模式下响应高, 如三萜类, 故本实验采取正负离子全扫描模式。TOF 总离子流图可以看出色谱峰数明显比 DAD 色谱图中多, 说明山楂中某些成分紫外吸收较弱。

UPLC/ESI-TOF 技术结合了高分离度的色谱及

高灵敏度和特异性质谱等优点,通过比较药材中未知化合物与对照品的质谱碎裂特征,定性鉴别多种类型化合物,是中药活性成分研究的有效分析手段。实验结果表明,高分辨质谱在结构解析中起到了关键作用。但依然存在一定的局限性,如裂解碎片的合理解释,同分异构体物质质谱分析,相关参考文献较少等。因此,采用 Q-TOF/MS 进行结构确认还需进一步研究,总结大量不同类型化合物的裂解特征,从而为中药化学成分的解析提供更可靠的依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010: 29.
- [2] 吴士杰,李秋津,肖学风,等. 山楂化学成分及药理作用的研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 316-319.
- [3] 雷成康,郭玲. 山楂中有机酸含量测定方法的改进 [J]. 中药材, 2010, 33(5): 745-747.
- [4] 王阳,吕晓丽,常福厚,等. 紫外分光光度法测定山楂提取物中总黄酮的含量 [J]. 内蒙古医学院学报, 2011, 33(6): 572-574.
- [5] 张文,霍丹群. 微波法提取山楂总黄酮的初步工艺研究 [J]. 中成药, 2006, 28(11): 1667-1669.
- [6] 袁怀波,凌庆枝,马嫻. 大孔树脂分离纯化山楂总三萜酸的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(2): 155-157.
- [7] 王鑫波,高敏,童丽姣. HPLC 法测定山楂叶总黄酮磷脂复合物中牡荆素鼠李糖苷 [J]. 中草药, 2011, 42(7): 1341-1343.
- [8] 宋敏,曹宝鑫. 山楂对高脂血症小鼠模型血脂代谢及降脂酶的影响 [J]. 中国现代药物应用, 2012, 6(20): 119-120.
- [9] 董贺,张太平,李俊,等. 山楂中谷甾醇抑制肿瘤细胞的研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(4): 270-272.
- [10] 许红蕾,周婷婷,范国荣. 山楂叶化学成分的 HPLC-DAD/ESI-MS 分析 [J]. 药学实践研究, 2009, 27(1): 40-42.
- [11] 岳晓芝. 基于 HPLC-MS 技术的山楂多元酚类物质的质量控制 [D]. 天津: 天津大学, 2010.