

基于准确相对分子质量和多级质谱技术的 LC-MS 方法鉴定麦冬醇提液中高异黄酮类成分

郭 哲^{1,2}, 陈 丽^{1,2}, 梁琼麟², 王义明², 罗国安^{2*}

1. 江西中医学院, 江西 南昌 330004

2. 清华大学 化学系, 北京 100084

摘要: **目的** 建立一种基于准确相对分子质量和多级质谱技术相结合的 LC-MS 方法, 对麦冬醇提液中的高异黄酮类成分进行鉴定。 **方法** 色谱分离采用 Alltima C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), Alltech 保护柱, 流动相组成为 1 mmol/L 乙酸铵水溶液-0.01% 乙酸乙腈, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 298 nm; 质谱定性采用飞行时间质谱 (TOF/MS) 结合离子阱多级质谱 (Trap/MSⁿ), 负离子模式扫描。 **结果** 在麦冬醇提液中, 采用 TOF/MS 筛查出 11 种成分的分子式, 采用 Trap/MSⁿ 共鉴定出 11 种成分, 并对各峰进行归属。 **结论** 两种质谱联用能快速鉴定药材成分, 为中药复方复杂体系分析提供了一种有效、可靠的分析模式。

关键词: 麦冬; 高异黄酮; 飞行时间质谱; 离子阱多级质谱; 中药复方

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)05-0844-04

Identification of homoisoflavonoids in *Ophiopogon japonicus* alcohol extract by an LC-MS based on precise mass and tandem mass spectrometer

GUO Zhe^{1,2}, CHEN Li^{1,2}, LIANG Qiong-lin², WANG Yi-ming², LUO Guo-an²

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Analysis Center, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: Objective To develop an LC/MS approach based on precise mass and tandem mass spectrometer to identify homoisoflavonoids from *Ophiopogon japonicus* alcohol extract. **Methods** Separation was performed on an Alltima C₁₈ reverse-phase column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and an Alltech pre-column. The mobile phase consisted of water containing 1 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile containing 0.01% acetic acid was used as gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min. The detection wavelength was 298 nm. A combination of time-of-flight mass spectrometer (TOF/MS) and ion trap tandem mass spectrometer (Trap/MSⁿ) was applied for qualitative analysis under negative ion mode. **Results** From the alcohol extract of *O. japonicus*, the molecular formulae of 11 components were screened by TOF/MS and 11 chemical components were identified by Trap/MSⁿ. All of the peaks were attributed. **Conclusion** This method can be used to identify medicinal ingredients quickly and provide an effective and reliable analytical model, as well as other complex system of traditional Chinese medicine compound.

Key words: *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl.; homoisoflavonoids; time-of-flight mass spectrometer (TOF/MS); ion trap tandem mass spectrometer (Trap/MSⁿ); traditional Chinese medicine compound

麦冬为百合科沿阶草属植物 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl. 的干燥块根, 是一味常用滋阴中药, 始载于《神农本草经》, 具有养阴生津、润肺清心的功效, 可用于热病伤津、心烦口渴等症。麦冬中主要含有甾体皂苷^[1]、高异黄酮、多糖、氨基酸等成分。其中麦冬高异黄酮具有良好的抗炎、

抗应激、抗组胺以及心血管保护功能和磷酸化抑制剂的作用^[2]。

目前对麦冬高异黄酮类成分的研究主要是通过多种分离技术从中分离出单一化学成分, 再通过核磁共振 (NMR) 等技术鉴定。文献报道^[3-7], 从麦冬中已分离得到的 30 多种黄酮类成分。然而传统

收稿日期: 2010-11-10

作者简介: 郭 哲 (1983—), 女, 硕士, 专业中药学。Tel: (010)62772265 E-mail: guozhe2003110145@sina.com

*通讯作者 罗国安 Tel: (010)62781688 E-mail: luoga@mail.tsinghua.edu.cn

的提取分离过程复杂, 时间较长, 不能整体表征中药复杂性, 无法实现工业中快速对药材的质量控制。Min 等^[8]利用 HPLC-UV-ESI-MSⁿ 对三氯甲烷-甲醇萃取麦冬粉末中的黄酮类成分进行了鉴定, 但三氯甲烷-甲醇毒性大, 不适合工业化生产。本实验针对高异黄酮在 298 nm 下有最大吸收, 主要利用 HPLC-TOF/MS 和 HPLC-Trap/MS 相结合, 对麦冬醇提取液中的多种高异黄酮成分进行鉴定, 为麦冬药材的质量控制提供可信的参考, 同时弥补了因缺乏对照品而无法快速鉴定成分的现状。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1100 series HPLC 高效液相色谱仪 [包括: G1312A 低压二元梯度泵、G13158 二极管阵列检测器 (UV)、柱温箱、Chemstation 化学工作站], Agilent 1100 series LC/MSD Trap 质谱仪, Agilent 1100 series LC/MSD TOF 质谱仪, Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统, SPZ05 型电子天平 (瑞士梅特勒利多公司)。

1.2 药材与试剂

麦冬药材 (河北神威药业有限公司提供)。乙腈 (Fisher 公司, 色谱纯), 乙酸铵 (北京化工厂, 分析纯), 乙酸 (北京化工厂, 分析纯), 水为 Milli-Q 超纯水。

2 方法与结果

2.1 样品制备

取麦冬药材 30 g, 90%乙醇回流提取, 合并提取液。提取液过 0.45 μm 微孔滤膜, 得待测样品。进样量为 20 μL 。

2.2 仪器条件

2.2.1 液相色谱条件 色谱柱为 Alltima C₁₈ 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), Alltech 保护柱; 流动相为 1 mmol/L 乙酸铵水溶液 (A) -0.01% 乙酸乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~10 min, 20%~29%B; 10~25 min, 29%~36%B; 25~60 min, 36%~66%B; 60~70min, 66%~90%B。体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 298 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 20 μL 。

2.2.2 质谱条件 TOF/MS: 采用分流设置, 分流比为 1:3; ESI 离子源, 负离子检测模式; 干燥气流量: 9 L/min; 雾化压力: 2.41×10^5 Pa; 干燥气温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 毛细管电压: 3 500 V (负模式); 实验数据采用 Analyst QS1.1 软件分析。

Trap/MSⁿ: 设定同上, 自动三级碎片分析。数

据采用 Agilent 化学工作站 Rev.A.09.01 软件进行处理。

2.3 实验结果

离子阱多级质谱条件分别比较了正、负两种离子扫描模式, 且对上述各参数进行优化, 最终确定在上述条件下, 负离子模式的峰容量更大、分离度较好。故确定 TOF/MS 及 Trap/MS 质谱条件均在负离子模式下进行, 结果见图 1。

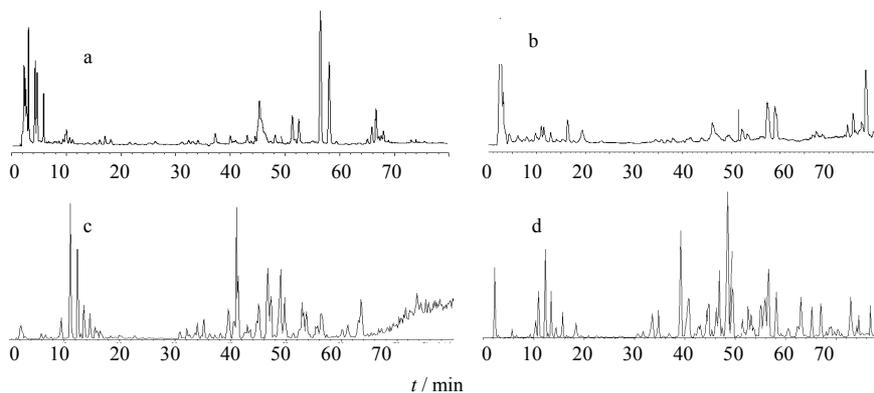
2.3.1 TOF/MS 未知成分筛查 麦冬醇提液的 HPLC-UV 图 (298 nm) 及 HPLC-TOF/MS 总离子流图 (负离子扫描模式) 见图 1。对照 HPLC-UV (298 nm) 色谱图下的色谱峰, 对 TOF/MS 中所标示的高异黄酮类成分进行鉴定。对图上标注的 10 个色谱峰中的物质进行精确相对分子质量定性分析, 设定筛查相对分子质量的误差为 5, 匹配可能分子式, 个别物质质谱响应较弱, 需在 $\delta 10$ 左右得到相应的分子式, 因此扩大误差至 $\delta 20$ 内, 匹配可能的分子式。同时查看其特征的同位素分布。以 7、8 号峰物质为例, 采用 Analyst QS 软件的“同位素匹配功能”分别对这两种化合物离子峰的同位素峰进行匹配 (结果见图 2)。从图中看出, 这两种离子计算的同位素峰强度比、出峰位置与实际测得的结果吻合良好, 说明推测的分子式准确可信。并结合离子阱上各峰裂解的碎片, 鉴定化合物。结果见表 1。

从表 1 中看出, 峰 2 为一个混合峰, 存在两种化合物, 两种化合物保留时间接近, 在 HPLC-TOF/MS 色谱图中未能较好分离, 在 TOF/MS 质谱图上能够分离。

2.3.2 Trap/MSⁿ 碎片结构分析 麦冬醇提液的 HPLC-UV 图谱 (298 nm) 和 HPLC-Trap/MS 总离子流图 (负离子扫描模式) 见图 1。根据 MS 测定的 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 值, 及 MSⁿ 裂解碎片三级自动裂解, 并结合 TOF/MS 匹配出的可能分子式进行鉴定, 最终鉴定出了麦冬醇提液中的 11 种成分相对应的碎片, 见表 1。其中峰 2 为 2 个成分的混合峰。

从表 1 中看出, 与 TOF/MS 的鉴定结果一致, 峰 2 为一个混合峰, 由两种化合物组成。另外结合 TOF/MS, 峰 4、9、10 分别只有一个分子式相匹配, 且 Trap/MSⁿ 中的裂解也是唯一的, 通过文献检索化合物, 3 个峰存在同分异构体, 因此不能完全确定具体的成分。

现以 7 号和 8 号化合物为例, 对它们的分子式和裂解方式进行分析来鉴定成分, 具体分析如下:



a-HPLC-UV 色谱图 b-HPLC-TOF/MS 总离子流图 (负离子扫描模式) c-HPLC-Trap/MS 总离子流图 (正离子扫描模式)
d-HPLC-Trap/MS 总离子流图 (负离子扫描模式)
a-HPLC-UV chromatogram b-HPLC-TOF/MS total ion chromatogram (negative ion scan mode) c-HPLC-Trap/MSⁿ total ion chromatogram
(positive ion scan mode) d-HPLC-Trap/MS total ion chromatogram (negative ion scan mode)

图 1 麦冬醇提液的 HPLC-UV-MS 色谱图

Fig. 1 HPLC-UV-MS chromatogram of *O. japonicus* alcohol extract

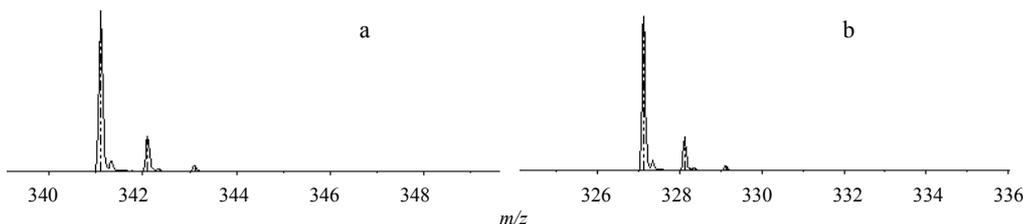


图 2 7 号 (a) 和 8 号 (b) 化合物离子峰的理论同位素峰强度与实际同位素强度匹配结果

Fig. 2 Results of theoretical isotopes compared with calculated ones of ion peaks 7 (a) and 8 (b)

表 1 麦冬醇提液 LC-TOF/MS 相对分子质量匹配结果及 LC-Trap/MSⁿ 解析推测结果

Table 1 LC-TOF/MS matching results of molecular weight and LC-Trap/MSⁿ analyzing of *O. japonicus* alcohol extract

峰号	t_R /min	化合物名称	TOF/[M-H] ⁻			Trap/[M-H] ⁻	
			分子式	测得(m/z)	环加双键数	MS(m/z)	MS2、MS3(m/z)
1	37.95	麦冬黄烷酮 F	C ₂₀ H ₂₁ O ₇	373.122 2	10.5	372.9	183, 168
	46.12	麦冬黄烷酮 E	C ₁₉ H ₁₉ O ₇	359.108 3	10.5	358.9	169, 154
2	46.59	2 α -羟基甲基麦冬二氢高异黄酮 A	C ₁₉ H ₁₇ O ₇	357.092 3	11.5	356.8	153
		2 β -羟基甲基麦冬二氢高异黄酮 A					
3	49.10	5-hydroxy-7-methoxy-3',4'-methylene-dioxy-6,8-dimethyl homoisoflavonone	C ₂₀ H ₁₉ O ₆	355.112	11.5	354.9	205, 177
4	51.33	麦冬黄酮 A	C ₁₈ H ₁₃ O ₆	325.066	12.5	324.8	297, 203
		异麦冬黄酮 A					
5	52.17	麦冬黄烷酮 A	C ₁₈ H ₁₅ O ₆	327.082 1	11.5	326.8	191, 163
6	53.26	麦冬黄烷酮 B	C ₁₈ H ₁₇ O ₅	313.103 1	10.5	312.7	—
7	57.39	甲基麦冬黄烷酮 A	C ₁₉ H ₁₇ O ₆	341.098 5	11.5	340.9	205, 177
8	58.97	甲基麦冬黄烷酮 B	C ₁₉ H ₁₉ O ₅	327.118	10.5	326.9	205, 177
9	66.7	6-醛基异麦冬黄酮 A	C ₁₉ H ₁₃ O ₇	353.060 7	13.5	352.9	325, 297
		麦冬黄酮 C					
10	67.4	6-醛基异麦冬黄烷酮 A 麦冬黄烷酮 C	C ₁₉ H ₁₅ O ₇	355.075 3	12.5	354.8	327, 191

在负离子模式下, 7 号化合物(甲基麦冬黄烷酮 A)的准分子离子峰为 $340.9[M-H]^-$, 二级裂解成 $[M-H-C_8H_8O_2]^-$, 三级质谱是脱掉一个 CO 形成 $[M-H-C_8H_8O_2-CO]^-$ 碎片, 结合其分子式匹配结果 ($C_{19}H_{17}O_6$), 鉴定该化合物为甲基麦冬黄烷酮 A。

8 号化合物(甲基麦冬黄烷酮 B)的准分子离子峰为 $326.9[M-H]^-$, 二级裂解成 $[M-H-C_8H_{10}O]^-$, 三级质谱是脱掉一个 CO 形成 $[M-H-C_8H_{10}O-CO]^-$ 碎片离子峰, 结合其分子式匹配结果 ($C_{19}H_{19}O_5$), 鉴定该化合物为甲基麦冬黄烷酮 B。7 和 8 号化合物的裂解过程见图 3。

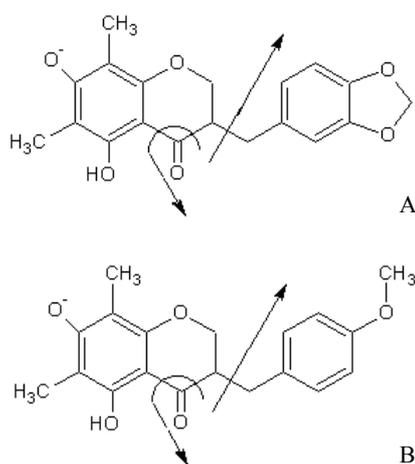


图 3 甲基麦冬黄烷酮 A (A) 和甲基麦冬黄烷酮 B (B) 裂解过程

Fig. 3 Fragmentations of methylophiopogonanone A (A) and methylophiopogonanone B (B)

3 讨论

利用 HPLC-TOF/MS 鉴定出 10 个峰的 11 种成分的精准相对分子质量, 利用 HPLC-Trap/MSⁿ 鉴定出麦冬醇提液中高异黄酮类 11 个成分的相应碎片离子, 其中峰 2 为 2 个成分的混合峰, 峰 4、9、10 均存在同分异构体(表 1)。综合两种质谱结果, 共确定麦冬醇提液中高异黄酮的 10 个色谱峰的化学

成分。

用串联质谱能将分离、结构解析同步完成, 直接分析混合物组分, 有高度的选择性和可靠性, 其检测水平可以达到 pg 级等特点^[9], 因此得到广泛应用。本实验通过 TOF/MS 与 Trap/MSⁿ 结合的技术, 快速完成了对麦冬醇提液中高异黄酮类成分的定性, 共确定 11 个成分, 并准确对各成分进行峰归属。该方法充分发挥了 TOF/MS 精确相对分子质量测定和 Trap/MSⁿ 多级碎片分析的优势, 快速对该药材成分进行定性分析, 弥补了无对照品情况下对化合物的准确、快速鉴定。同时, 此方法也同样适用于中药复方多成分复杂体系的分析, 为中药复方复杂体系分析提供了一种有效、可靠的分析模式。

参考文献

- [1] 余伯阳, 徐国钧, 平井康熙, 等. HPLC 法测定川、浙麦冬中麦冬皂苷 B, D 的含量 [J]. 中草药, 1991, 22(8): 345-346.
- [2] 谢明华, 蔡鑫君, 陈稀烦, 等. 超声提取麦冬总黄酮的工艺研究 [J]. 海峡药学, 2008, 20(1): 15-17.
- [3] 黄晓刚, 邹萍, 胡晓斌, 等. 绵麦冬的化学成分研究 [J]. 华西药学杂志, 2006, 21(6): 529-531.
- [4] 朱永新, 严克东, 涂国土. 麦冬中高异黄酮的分离与鉴定 [J]. 药学学报, 1987, 22(9): 679-684.
- [5] Chang J M, Shen C C, Huang Y L, et al. Five new homoisoflavonoids from the tuber of *Ophiopogon japonicus* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65(11): 1731-1733.
- [6] Nguyen T H, Tran V S, Andrea P, et al. Homoisoflavonoids from *Ophiopogon japonicus* Ker-Gawler [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 1153-1158.
- [7] 朱大元, 黎豫杭, 许正宇, 等. 参麦注射液的化学成分制备及其在治疗心脑血管疾病中的应用 [P]. 中国专利: CN101172971A, 2008-05-07.
- [8] Min Y, Dean G, Guan Y, et al. Analysis of homoisoflavonoids in *Ophiopogon japonicus* by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, 16(2): 234-243.
- [9] 李卫中, 马燕. 液质联用技术在医药领域的发展与应用 [J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(6): 66-69.