

高效液相色谱-电喷雾-飞行时间串联质谱分析泽兰水提取物

黄晶晶¹, 李倩¹, 高小康¹, 赵新锋¹, 王世祥¹, 郑晓晖^{1,2*}

1. 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069

2. 西北大学与深圳清华大学研究院共建“创新中药及天然药物研究”联合实验室, 广东 深圳 518057

摘要: 目的 采用高效液相色谱-电喷雾-飞行时间串联质谱法(HPLC-ESI-TOF-MS/MS)对泽兰水提取物的主要成分进行分析鉴定。方法 超声法制备泽兰水提取物, TC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)反相 HPLC 梯度洗脱法分离各主要成分; 电喷雾电离源正离子模式和负离子模式对色谱流出物进行离子化, 四级杆飞行时间串联质谱法对各主要色谱峰进行归属。结果 通过二级高分辨质谱分析结合对照品数据及相关文献共鉴定 22 个化合物的结构, 其主要结构类型为氨基酸类、酚酸类、萜类、黄酮及黄酮苷类、甾醇类和脂肪酸类。结论 HPLC-ESI-TOF-MS/MS 可从保留时间、紫外吸收光谱、精确相对分子质量、分子式和二级结构碎片等方面对泽兰的主要成分进行定性分析, 为中药药效物质基础研究提供一种快速准确的分析方法。

关键词: 泽兰; 高效液相色谱-电喷雾-飞行时间串联质谱; 二级高分辨质谱; 药效物质基础; 定性分析

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)16-2218-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.16.005

Identification of compounds in aqueous extract from aerial parts of *Lycopus lucidus* by HPLC-ESI-TOF-MS/MS

HUANG Jing-jing¹, LI Qian¹, GAO Xiao-kang¹, ZHAO Xin-feng¹, WANG Shi-xiang¹, ZHENG Xiao-hui^{1,2}

1. College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

2. Joint Laboratory of Innovative Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine of Northwest University & Research Institute of Tsinghua University in Shenzhen, Shenzhen 518057, China

Abstract: Objective To identify the main active compounds in the aqueous extract from the aerial parts of *Lycopus lucidus* by high performance liquid chromatography (HPLC)-electrospray (ESI)-time of flight tandem mass spectrometry (TOF-MS/MS). **Methods** The aqueous extract from the aerial parts of *L. lucidus* was prepared using ultrasonic method; Chromatographic separation of the main active compounds was performed on a TC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) reverse phase column through gradient elution; All the compounds eluted from the column were detected under both positive and negative ionization modes. Each chromatographic peak was analyzed by quadrupole tandem mass spectrometry coupled with TOF. **Results** Twenty two compounds were identified through the analysis of tandem mass spectrum and the information from reference substances, including amino acids, phenolic acids, terpenoids, flavonoids and flavonoid glycosides, sterols, and fatty acid. **Conclusion** HPLC-ESI-TOF-MS/MS is capable of analyzing the main compounds in the aerial parts of *L. lucidus* using retention time, ultraviolet spectrum, current molecular weight, formula, and fragmenting information of daughter ions. It will probably become a reliable alternative for the rapid analyzing substantial foundation of Chinese materia medica.

Key words: aerial parts of *Lycopus lucidus*; HPLC-ESI-TOF-MS/MS; second-order HR-MS; pharmacodynamic substance foundation; qualitative analysis

泽兰为唇形科地笋属植物地瓜儿苗 *Lycopus lucidus* Turcz. 或硬毛地瓜儿苗 *L. lucidus* Turcz. var. *hirtus* Regel 的干燥地上部分, 为中医临床妇科要药之一。该药主要用于治疗月经不调、经闭、痛经、

产后瘀血腹痛和水肿等症^[1]。对泽兰的研究主要集中在其药物价值及种质资源保护和开发方面, 而对其质量控制和化学成分分离鉴定方面的研究较少。杨学猛等^[2]和童欣等^[3]分别采用 HPLC 法测定了泽

收稿日期: 2013-03-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21005060); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20106101110001)

作者简介: 黄晶晶 (1987—), 女, 硕士研究生, 从事色谱分析研究。E-mail: nijingchong@126.com

*通信作者 郑晓晖 (1968—), 男, 教授, 从事中药代谢与分析研究。Tel: (029)88302686 E-mail: zhengxh@nwu.edu.cn

兰中熊果酸、齐墩果酸和迷迭香酸的量;黄月纯等^[4]和陈慕媛等^[5]通过 HPLC 特征图谱和指纹图谱法,研究了泽兰饮片与提取物的相关性,证明特征图谱法和指纹图谱法可用于泽兰的质量控制。上述研究为泽兰及其复方质量控制方法的建立提供了参考,本研究进一步采用 HPLC-ESI-TOF-MS/MS 对泽兰水提物进行分析,鉴定了精氨酸、脯氨酸、原儿茶酸、咖啡酸、迷迭香酸、2 α -羟基熊果酸、熊果酸、齐墩果酸、白桦脂酸、木犀草素-7-葡萄糖苷、木犀草素、芹菜苷、柯伊利素-7-葡萄糖苷、柯伊利素、槲皮素-3-葡萄糖苷、异鼠李素-3-芸香糖苷、芸香苷、槲皮素-7-葡萄糖苷、槲皮素、 β -谷甾醇、胡萝卜苷和硬脂酸共 22 个化合物,旨在为研究泽兰药效物质基础建立快速准确的方法。

1 仪器与材料

KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),1200 Series 型高效液相色谱系统(安捷伦科技公司),6520 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS(安捷伦科技公司)。

泽兰药材购自陕西省中药材公司,由西北大学生命科学学院中药学系房敏峰副教授鉴定为地瓜儿苗 *Lycopus lucidus* Turcz. 的干燥地上部分;咖啡酸(批号 110885-00102)、迷迭香酸(批号 100526)、熊果酸(批号 110742-200517)、齐墩果酸(批号 110709-200505)、芸香苷(批号 080-9303)、木犀草素(批号 111520-200809)和槲皮素(批号 100081-200406)对照品均购自中国药品生物制品检定所;甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);水(超纯水,自制);其他均为分析纯。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别准确称取咖啡酸、迷迭香酸、熊果酸、齐墩果酸、木犀草素、芸香苷

和槲皮素对照品 4.0、2.5、3.0、5.0、3.5、2.0、2.5 mg,用甲醇溶解于 5.0 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,制备质量浓度分别为 0.8、0.5、0.6、1.0、0.7、0.4、0.5 mg/mL 的对照品溶液,4 °C 冷藏备用,进样前用 0.45 μ m 有机系微孔滤膜滤过。

2.1.2 泽兰水提物的制备 取泽兰药材适量,60 °C 下干燥至恒定质量,粉碎,过 40 目筛。精密称定药材粉末 10 g,加 30% 甲醇溶液 150 mL,在 40 kHz 下超声提取 40 min。滤过,重复 2 次,收集滤液,减压浓缩至干,用水定容于 5 mL 量瓶中,4 °C 冷藏备用,进样前用 0.45 μ m 水系微孔滤膜滤过。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 Agilent TC-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱;流动相为乙腈(A)-含 5.0 mmol/L 甲酸胺水溶液(B);梯度洗脱:0~10 min, 10% B; 10~15 min, 10%~20% B; 15~40 min, 20%~50% B; 40~41 min, 50%~85% B; 41~70 min, 85% B。体积流量为 0.8 mL/min;二极管阵列检测器全波长扫描;柱温为 25 °C;进样量为 2.5 μ L;柱后 3:1 分流,1/4 导入质谱进行定性分析。

2.2.2 质谱条件 电喷雾正负离子模式电离;干燥气体积流量 10 L/min;干燥气温度 350 °C;雾化气压力 241.3 Pa;雾化器温度 350 °C;毛细管电压 4.0 kV;质量扫描 m/z 50~1 000。

3 结果与讨论

3.1 对照品溶液分析

在拟定分析条件下,取所有对照品溶液各 5.0 μ L,正离子和负离子模式进行分析,采集色谱图、总离子流图、一级质谱图,获得其保留时间、相对分子质量和分子式等信息,结果见表 1。

3.2 泽兰水提物分析

拟定分析条件下,泽兰水提物在正离子和负离子模式下,全扫描总离子流图见图 1。可见,正离

表 1 对照品正负离子鉴定结果

Table 1 Identification of reference substances under positive and negative ion modes

名称	t / min	相对分子质量	分子式	一级碎片 (+)	一级碎片 (-)
咖啡酸	22.4	180.157 4	C ₉ H ₈ O ₄	181.105 2 [M+H] ⁺	179.157 4 [M-H] ⁻
迷迭香酸	23.2	360.330 5	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	361.330 5 [M+H] ⁺	359.196 5 [M-H] ⁻
木犀草素	24.8	286.231 5	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.231 5 [M+H] ⁺	285.236 4 [M-H] ⁻
熊果酸	26.4	456.700 3	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	457.700 3 [M+H] ⁺	455.682 3 [M-H] ⁻
齐墩果酸	29.2	456.741 2	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.741 2 [M+H] ⁺	455.821 4 [M-H] ⁻
芸香苷	38.4	610.510 4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.612 4 [M+H] ⁺	609.541 6 [M-H] ⁻
槲皮素	47.4	302.032 9	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.102 4 [M+H] ⁺	300.879 6 [M-H] ⁻

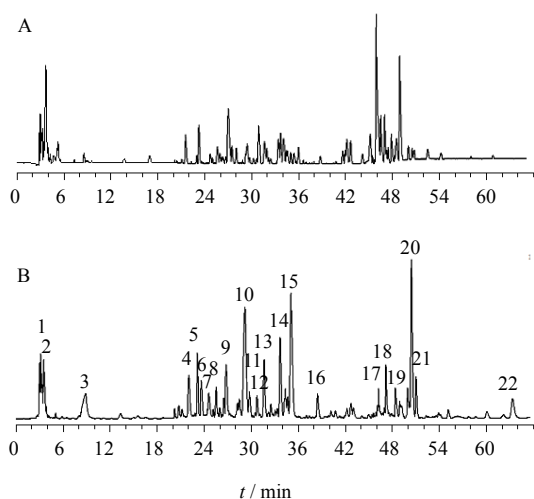


图1 泽兰水提取物正离子 (A) 和负离子 (B) 全扫描总离子流图

Fig. 1 Full-scan TIC of aqueous extract from aerial parts of *L. lucidus* under positive (A) and negative (B) ion modes

子和负离子模式下, 泽兰水提物的总离子流图出峰情况基本一致, 但负离子模式下, 大部分峰的信号较正离子模式强。

选择负离子模式下, 相对丰度大于 5%, 且分离良好的色谱峰为对象, 根据其反相色谱保留行为、光谱图、质谱特征, 结合文献数据进行结构鉴定, 共确定 22 个化学成分 (见表 2), 结构类型可分为 5 类。

3.2.1 氨基酸类化合物 氨基酸是构成蛋白质的基本单位, 也是人体生命活动的重要活性物质, 一般极性较大, 在反相色谱中保留时间很弱。本实验通过对比对照品和待测物的精确相对分子质量、分子式、一级质谱等信息, 共在泽兰中鉴定出精氨酸和脯氨酸 2 种氨基酸类物质。

3.2.2 酚酸类物质 中药中酚酸类物质一般具有抗心肌缺血、改善微循环、消炎和抗氧化等临床疗效。本实验从泽兰水提取物中共鉴定出原儿茶酸、咖啡酸和迷迭香酸 3 种酚酸类物质。该类物质一般极性较

表 2 泽兰水提取物正负离子模式鉴定结果

Table 2 Identification of aqueous extract from aerial parts of *L. lucidus* under positive and negative ion modes

峰号	<i>t</i> / min	$[M+H]^+$ (<i>m/z</i>)	$[M-H]^-$ (<i>m/z</i>)	分子式	相对分子质量	化合物
1	2.7	175.320 1	173.214 3	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.111 7	精氨酸
2	3.8	116.201 7	114.310 3	C ₅ H ₉ NO ₂	115.130 5	脯氨酸
3	8.6	155.016 4	153.120 7	C ₇ H ₆ O ₄	154.120 1	原儿茶酸
4	22.4	181.105 2	179.157 4	C ₉ H ₈ O ₄	180.157 4	咖啡酸
5	23.2	361.330 5	359.196 5	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	360.330 5	迷迭香酸
6	23.8	449.401 2	447.376 9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.376 9	木犀草素-7-葡萄糖苷
7	24.8	287.231 5	285.236 4	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.231 5	木犀草素
8	25.6	473.723 1	471.699 7	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.699 7	2 α -羟基熊果酸
9	26.4	457.700 3	455.682 3	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.700 3	熊果酸
10	29.2	456.741 2	455.821 4	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.741 3	齐墩果酸
11	29.8	433.377 5	431.296 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.377 5	芹菜苷
12	30.8	463.187 5	461.243 1	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	462.403 5	柯伊利素-7-葡萄糖苷
13	32.6	301.312 4	298.904 6	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.262 9	柯伊利素
14	33.8	465.162 7	463.250 1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.095 5	槲皮素-3-葡萄糖苷
15	35.2	625.301 9	623.283 2	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.169 0	异鼠李素-3-芸香糖苷
16	38.4	611.612 4	609.541 6	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.510 4	芸香苷
17	46.2	465.170 2	463.220 7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.376 3	槲皮素-7-葡萄糖苷
18	47.4	303.102 4	300.879 6	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.032 9	槲皮素
19	48.7	457.821 4	455.703 8	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.700 3	白桦脂酸
20	50.6	415.705 3	413.690 6	C ₂₉ H ₅₀ O	414.706 7	β -谷甾醇
21	51.4	577.849 2	575.857 4	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	576.847 3	胡萝卜苷
22	63.6	307.396 2	283.481 6	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.477 2	硬脂酸

大,在反相色谱柱上保留较弱。由于苯环等大共轭体系的存在,酚酸类物质一般具有较强的紫外吸收。经 HPLC 二极管阵列检测器的全波长扫描,结合对照品的紫外吸收特征,确定了 280 nm 为其最大吸收波长,从而对质谱鉴定结果进行了佐证。

3.2.3 萜类化合物 从泽兰中鉴定出 4 种萜类化合物,保留时间分别为 25.6、26.4、29.2、48.7 min。保留时间为 25.6、26.4、29.2 min 的化合物相对分子质量分别为 472.7、456.7、456.7,二级质谱均出现 4 个丰度较大的碎片峰 m/z 248、203、189、133。根据文献报道^[6],推测该类化合物具有 Δ^{12} -齐墩果烯及 Δ^{12} -熊果烯类五环三萜类化合物的典型裂解特征,4 个碎片离子为 C 环 RDA 裂解获得的特征离子。此外,在保留时间为 25.6 min 的化合物二级质谱中还出现 m/z 223 的离子峰,推测其为化合物 A/B 环上羟基取代所致。据此,推测保留时间为 25.6 min 的化合物为 2 α -羟基熊果酸;参考对照品的保留时间,鉴定保留时间为 26.4、29.2 min 的 2 个化合物为熊果酸和齐墩果酸;保留时间为 48.7 min 的化合物相对分子质量为 456.7,二级质谱出现 2 个强峰 m/z 207、189,根据文献报道^[6],符合羽扇豆烷型五环三萜类化合物的典型裂解特征:当 A 环上只有 3-羟基取代时出现 b 系列离子(m/z 207、189)^[6],故推测其为白桦脂酸。

3.2.4 黄酮及黄酮苷类化合物 共从泽兰中鉴定出 10 个黄酮及黄酮苷类化合物:木犀草素-7-葡萄糖苷、木犀草素、芹菜素、柯伊利素-7-葡萄糖苷、柯伊利素、槲皮素-3-葡萄糖苷、异鼠李素-3-芸香糖苷、芸香苷、槲皮素-7-葡萄糖苷和槲皮素。图 1-B 中峰 6 和 7 所示化合物二级质谱出现 m/z 153 的强峰,参考文献报道^[6],把分子离子分为离子 a (m/z 152) 和离子 b (m/z 118) (图 2),两片各来自黄酮的 A 环和 B 环。知其符合简单取代黄酮的典型裂解特征:RDA 重排生成 a+1 离子(即 m/z 153),进一步结合文献研究结果^[7],鉴定其为木犀草素-7-葡萄糖苷和木犀

草素;峰 11 所示化合物二级质谱出现丰度较大的 m/z 270、153、124 的碎片峰,参考文献报道^[6],推测 m/z 270 为化合物失去 1 分子六碳糖基生成芹菜素所致; m/z 153、124 则为芹菜素 RDA 裂解方式生成的 a+1 离子及 a 离子失去 CO 的碎片离子;峰 12 和峰 13 相对分子质量相差为 162,推测峰 13 为峰 12 失去 1 分子葡萄糖糖苷所生成;2 个峰的二级质谱均出现 m/z 153、133 的强峰,推测为黄酮类化合物 RDA 裂解所生成的 a+1 峰和 b-15 峰。参考文献报道^[6],推测峰 12 和峰 13 为柯伊利素-7-葡萄糖苷、柯伊利素;峰 14~18 的二级质谱中出现 m/z 153、137、274、273、245 等共有碎片峰,符合槲皮素的质谱裂解信息,推测其为槲皮素的衍生物。进一步根据对照品的保留时间信息,确定峰 16 为芸香苷,峰 18 为槲皮素。峰 14、17 与峰 18 的相对分子质量差值均为 162,推测其为槲皮素与葡萄糖糖苷结合生成。峰 17 的二级质谱中出现 m/z 286 的碎片离子峰,但峰 14 则无该碎片,故推测峰 14 为 3 位取代,而峰 17 为 7 位取代,从而鉴定 2 个化合物为槲皮素-3-葡萄糖苷和槲皮素-7-葡萄糖苷;峰 15 的二级质谱中,还出现了 2 个丰度较大的碎片峰 m/z 478 [$M-146$]⁻ 和 m/z 462 [$M-162$]⁻,推测其结构中应含有 2 个糖苷,一是葡萄糖苷,一是鼠李糖苷,结合其母体的碎片信息,推测其结构为异鼠李素-3-芸香糖苷。

3.2.5 其他类化合物 利用 HPLC-ESI-TOF-MS 所提供的保留时间、紫外吸收光谱、分子式和质谱碎片信息,参考文献的研究结果^[8],本实验还从泽兰的水提取物中鉴定了 β -谷甾醇、胡萝卜苷和硬脂酸 3 个化合物。

4 讨论

对于高效液相色谱-质谱分析而言,色谱流动相的离子强度是影响质谱检测信号的关键因素。甲酸等有机酸和氢氧化铵等有机碱常被用于调节流动相的离子强度而用于碱性和酸性化合物分离分析。本实验探讨了甲酸和氢氧化铵对泽兰化学成分分离检测的影响,发现总离子流图中丰度较大的峰分别为 12 和 8 个,且各峰分离度差。在此基础上,采用甲酸铵对色谱流动相进行调节,总离子流图中峰数目有所增加,分离度有所改善。通过探讨不同浓度甲酸铵对质谱检测的影响,发现 5.0 mmol/L 甲酸铵为流动相添加剂时,质谱图中化合物数目最大,且各峰分离较好。

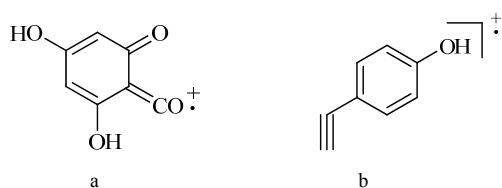


图 2 a 和 b 的具体片段

Fig. 2 Fractoins of a and b

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 杨学猛, 徐风梅. HPLC 法测定泽兰中熊果酸、齐墩果酸的含量 [J]. 中草药, 2003, 34(10): 附 11.
- [3] 童欣, 贺凡珍, 彭维, 等. HPLC 法同时测定泽兰中咖啡酸和迷迭香酸的含量 [J]. 中药材, 2012, 35(2): 246-247.
- [4] 黄月纯, 张子龙, 魏刚, 等. 泽兰及其精制提取物 HPLC 特征图谱的相关性研究 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8): 1506-1510.
- [5] 陈慕媛, 黄月纯, 刘东辉, 等. 泽兰饮片及不同部位 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2010, 32(12): 2029-2032.
- [6] 从浦珠. 质谱在天然有机化学中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [7] 王涛, 李超, 濮社班, 等. 泽兰的化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 83-85.
- [8] 孙连娜, 陈万生, 陶朝阳, 等. 泽兰化学成分的研究 I [J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(9): 1029-1030.