

HPLC/TOF-MS 和 HPLC/IT-MSⁿ 联合用于补骨脂药材的化学成分分析

罗娟敏¹, 肖雪², 洪流¹, 田耀伟¹, 郭磊¹, 苏加坤¹, 蔡继宝^{1*}, 罗国安^{3*}

1. 江西中烟工业有限责任公司 技术研发中心, 江西 南昌 330096

2. 广东药学院药科学院, 广东 广州 510006

3. 清华大学 分析中心, 北京 100084

摘要: 目的 建立一种结合高效液相色谱飞行时间质谱(HPLC/TOF-MS)及高效液相色谱离子阱多级质谱(HPLC/IT-MSⁿ)对补骨脂药材进行化学成分定性分析的方法。方法 HPLC 色谱分离采用 Phenomenex luna C₁₈ (5 μm) 反相色谱柱为分析柱, 0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 检测波长为 254 nm; 质谱定性采用飞行时间质谱结合离子阱多级质谱, 正负离子模式扫描。结果 在优化的液质联用条件下, 飞行时间质谱筛查出 13 种成分的分子式, 采用离子阱多级质谱鉴定分析此 13 种成分。结论 HPLC/TOF-MS 和 HPLC/IT-MSⁿ 联合的分析方法, 为中药的多成分分析提供了一种有效、可靠的新模式, 此模式也同样适用于其他复杂体系的分析。

关键词: 补骨脂药材; 高效液相色谱; 飞行时间质谱; 离子阱多级质谱; 多成分分析; 补骨脂素; 异补骨脂素

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)07-0924-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.07.006

Analysis on chemical constituents in *Psoraleae Fructus* by combination of HPLC/TOF-MS and HPLC/IT-MSⁿ

LUO Juan-min¹, XIAO Xue², HONG Liu¹, TIAN Yao-wei¹, GUO Lei¹, SU Jia-kun¹, CAI Ji-bao¹, LUO Guo-an³

1. Technology Center of China Tobacco Jiangxi Industrial Co., Ltd., Nanchang 330096, China

2. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

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

Abstract: Objective To establish a combinative HPLC/TOF-MS and HPLC/IT-MSⁿ method for quantitative analysis on chemical constituents in *Psoraleae Fructus*. **Methods** Separation was performed on a Phenomenex Luna C₁₈ (5 μm) reverse-phase column. The mobile phase consisted of water containing 0.1% formic acid and acetonitrile was used as gradient elute. The flow rate was 1 mL/min. A combination of time-of-flight mass spectrometer (TOF-MS) and ion trap tandem mass spectrometer (IT-MSⁿ) was applied for qualitative analysis under positive and negative ion mode. **Results** Under optimized LC/MS condition, the molecular formulae of 13 components were screened by TOF-MS and all of them were then identified by IT-MSⁿ. **Conclusion** The established combinative HPLC/MS method could thus be considered as an effective and credible pattern for the analysis on the multi-components of Chinese materia medica and it also could be used for as the analysis on other complex systems.

Key words: *Psoraleae Fructus*; HPLC; TOF-MS; IT-MSⁿ; multi-component analysis; psoralen; isopsoralen

补骨脂 *Psoraleae Fructus* 为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 始载于《雷公炮炙论》。《本草纲目》^[1]认为补骨脂“治肾泄, 通命门, 暖丹田, 敛精神”。其性味苦、温, 有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的作用, 用于肾阳不足、阳痿遗精、遗尿尿频、腰膝冷痛、肾虚作喘、五更

泄泻, 外用治白癜风、斑秃^[2]。补骨脂果实、种子含香豆素类、黄酮类、单萜酚类以及挥发油、皂苷、多糖、类脂等多种成分^[3]。

中药现代化研究的基本目标就是要在中医理论指导下, 依靠现代科学技术, 基本阐明中药的药效物质基础和作用机制, 建立科学合理的中药有效性

收稿日期: 2013-10-12

作者简介: 罗娟敏(1986—)女, 江西宜春人, 硕士研究生, 研究方向为中药方剂现代化研究。E-mail: greenteal106@163.com

*通信作者 罗国安, 男, 教授, 博士生导师。Tel: (010)62781688 E-mail: luoga@mail.tsinghua.edu.cn

蔡继宝, 男, 副教授, 高级工程师。Tel: (0791)88289325 E-mail: jbcail@ustc.edu.cn

和安全性评价体系以及中药现代质控体系。色谱/质谱联用技术综合了色谱的高分辨分离和质谱的高灵敏高、选择性检测等优势,是目前复杂体系多组分分析最有力的工具,在中药现代化研究中得到日益广泛的应用^[4]。本实验采用 HPLC/TOF-MS 得到分析物的精确相对分子质量和分子式,然后采用 HPLC/IT-MSⁿ 获得丰富的结构信息对补骨脂进行定性分析,共鉴定出补骨脂化学成分 13 个。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 series HPLC 高效液相色谱仪(包括 G13158 DAD 二极管阵列检测器、G1312A 低压二元泵、柱温箱、Chemstation 化学工作站等), Agilent 1100 series MSD/TOF 质谱仪, Agilent 1100 series LC/MSD Trap 质谱仪, Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统。

乙腈(Merck 公司,色谱纯),甲酸(北京现代东方精细化工有限公司,分析纯),Milli Q 超纯水(自制);补骨脂药材提取液由江西中烟工业有限责任公司提供。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

精密吸取补骨脂药材提取液 100 μL,加 50% 甲醇-水溶解,定容至 2 mL 量瓶中,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜即得。

2.2 色谱与质谱条件

色谱条件: Phenomenex luna 5 μm C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B); 梯度洗脱: 0~48 min, 10%~34% B; 48~65 min, 34%~82% B; 65~80 min, 82%~100% B; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 254 nm。

飞行时间质谱检测条件: LC/MS 系统使用 ESI 离子源,分流比约为 1:3,在正离子模式与负离子模式下分别采集数据。质量扫描范围 m/z : 50~1 200; 毛细管电压: 3 500 V(负模式)、4 000 V(正模式); 干燥气体积流量: 9 L/min; 干燥气温度: 350 °C; 雾化气压: 241.36 kPa; 碎裂电压 190 V。Skimmer 电压 60 V, 八级杆 DC1 电压-38.0 V, 八级杆射频电压 250 V。选择内标校准液做实时质量数校正。实验数据采用 Analyst QS 软件处理。测定样品之前,使用校正液校准质量轴,以保证质量精度误差小于 2。元素组成计算参数设定如下: C≤50, H≤100, O≤30; 环加双键数: 0~30; 电子状态:

偶数; 带电个数: +1; 容许质量范围: 5。

离子阱质谱检测条件: LC/MS 系统使用 ESI 离子源,分流比约为 1:3,在正离子模式与负离子模式下分别采集数据,自动三级碎片分析,扫描质量范围 m/z : 50~1 200; 毛细管电压: 3 500 V(负模式)、4 000 V(正模式); 干燥气体积流量: 9 L/min; 干燥气温度: 350 °C; 雾化气压: 241.36 kPa; 化合物稳定性: 100%。

2.3 样品测定

质谱检测分别比较了正、负离子 2 种扫描模式,结果发现正模式下峰容量更大、质谱响应更强,但 1、2 号峰的负模式响应高于正模式,故实验最终选择在正负模式同时进行。代表性的补骨脂提取液 HPLC-UV 色谱图和 HPLC/TOF-MS、HPLC/IT-MSⁿ 总离子流图见图 1、2。

通过 HPLC/TOF-MS 结合 HPLC/IT-MSⁿ 分析,共鉴定出补骨脂提取液中 13 种成分,结果见表 1。

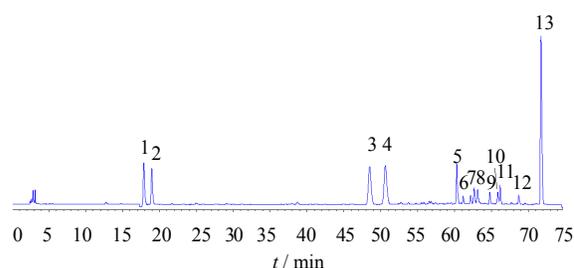


图 1 补骨脂提取液 HPLC-UV 色谱图

Fig. 1 HPLC-UV of extract solution of *Psoraleae Fructus*

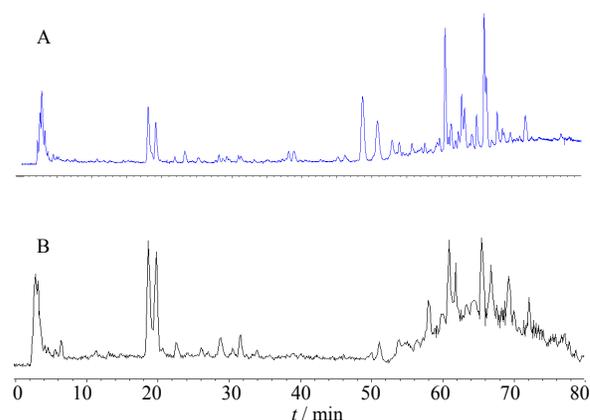


图 2 补骨脂提取液 HPLC/TOF MS 正离子模式 (A) 和 HPLC/IT MSⁿ 负离子模式 (B) 总离子流图
Fig. 2 Total ion chromatograms of HPLC/TOF MS by positive mode (A) and HPLC/IT MSⁿ by negative mode (B) for extract solution of *Psoraleae Fructus*

表1 补骨脂中化学成分质谱解析结果

Table 1 Analytical results of chemical constituents in *Psoraleae Fructus*

峰号	t_R / min	化合物	TOF			IT	
			分子式	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	MS	MS^2 、 MS^3
1	18.107	psoralenoside	$C_{17}H_{17}O_9$		365.089 2	365.0 $[M-H]^-$	202.7 $[M-H-glc]^-$ 158.8 $[M-H-glc-CO_2]^-$
2	19.193	isopsoralenoside	$C_{17}H_{17}O_9$		365.089 2	365.0 $[M-H]^-$	202.7 $[M-H-glc]^-$ 158.8 $[M-H-glc-CO_2]^-$
3	48.634	补骨脂素	$C_{11}H_7O_3$	187.046 3		187.0 $[M+H]^+$	143.0 $[M+H-CO_2]^+$
4	50.704	异补骨脂素	$C_{11}H_7O_3$	187.046 2		187.0 $[M+H]^+$	143.0 $[M+H-CO_2]^+$
5	60.191	新补骨脂异黄酮	$C_{20}H_{19}O_4$	323.128 0		323.2 $[M+H]^+$	267.0 $[M-C_4H_7]^+$ 239.0 $[M-C_4H_7-CO]^+$
6	61.029	补骨脂二氢黄酮	$C_{20}H_{21}O_4$	325.133 5		325.3 $[M+H]^+$	269.0 $[M-C_4H_7]^+$
7	62.449	补骨脂宁	$C_{20}H_{17}O_4$	321.113 0		321.2 $[M+H]^+$	303.0 $[M+H-H_2O]^+$
8	63.017	补骨脂定	$C_{20}H_{17}O_5$	337.107 2		337.2 $[M+H]^+$	281.1 $[M-C_4H_7]^+$
9	64.594	异补骨脂查耳酮	$C_{20}H_{21}O_4$	325.143 3		325.3 $[M+H]^+$	269.0 $[M-C_4H_7]^+$
10	65.617	补骨脂二氢黄酮甲醚	$C_{21}H_{23}O_4$	339.174 4		339.3 $[M+H]^+$	283.1 $[M-C_4H_7]^+$
11	65.972	corylifols A	$C_{25}H_{27}O_4$	391.184 8		391.4 $[M+H]^+$	267.1 $[M+H-C_9H_{16}]^+$ 239.0 $[M+H-C_9H_{16}-CO]^+$
12	68.403	补骨脂查耳酮	$C_{21}H_{23}O_4$	339.158 5		339.3 $[M+H]^+$	283.1 $[M-C_4H_7]^+$
13	71.388	补骨脂酚	$C_{18}H_{25}O$	257.192 0		255.0 $[M-H]^-$	171.9 $[M-C_6H_{11}]^+$

3 分析与讨论

3.1 质谱解析

对部分典型峰的质谱数据进行解析。峰1和2的HPLC/TOF-MS分析： $[M-H]^-$ 均为365.089 2，经元素组成计算得到最匹配的化学式为 $C_{17}H_{17}O_9$ ，可能为psoralenoside、isopsoralenoside。

峰1和2的HPLC/IT-MSⁿ分析：一级质谱图显示365.0峰为 $[M-H]^-$ 准分子离子峰，且易生成二聚体 $[2M-H]^-$ 离子，而其二级质谱图上显示较强的202.7峰为 $[M-H-glc]^-$ 碎片离子峰，三级质谱图上显示较强的158.8峰为 $[M-H-glc-CO_2]^-$ 碎片离子峰。psoralenoside和isopsoralenoside互为同分异构体，碎片离子一样，根据质谱无法判断，参考文献报道的紫外吸收和出峰顺序的不同^[5]，推断出1号峰为psoralenoside、2号峰为isopsoralenoside，结构见图1。

峰3和4的HPLC/TOF-MS分析： $[M+H]^+$ 为187.046 2，经元素组成计算得到最匹配的化学式为 $C_{11}H_7O_3$ ，可能为补骨脂素、异补骨脂素。

峰3和4的HPLC/IT-MSⁿ分析：在一级质谱图上呈现高丰度的 m/z 187离子峰；二级质谱图上显示较强的143.0的峰为 $[M+H-CO_2]^+$ 碎片峰，通过

对照品验证，3号峰为补骨脂素，4号峰为异补骨脂素，结构见图2。

峰5的HPLC/TOF-MS分析： $[M+H]^+$ 为323.128 0经元素组成计算得到最匹配的化学式为 $C_{20}H_{19}O_4$ ，可能为新补骨脂异黄酮、异新补骨脂异黄酮^[6]。

峰5的HPLC/IT-MSⁿ分析：一级质谱图显示

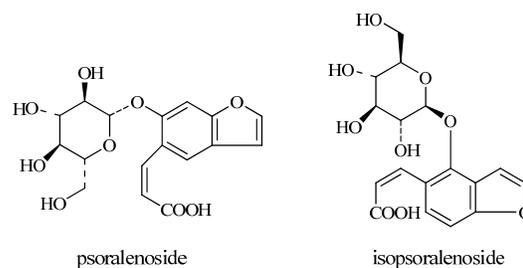
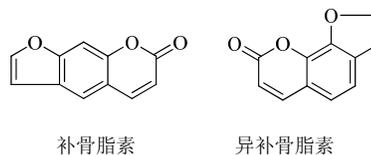


图1 Psoralenoside和isopsoralenoside的结构

Fig. 1 Structures of psoralenoside and isopsoralenoside



补骨脂素 异补骨脂素

图2 补骨脂素和异补骨脂素的结构

Fig. 2 Structures of psoralen and isopsoralen

323.2 峰为 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 二级质谱图上显示较强的 267.1 峰为 $[M-C_4H_7]^+$ 碎片峰, 三级质谱图上显示较强的 239.0 峰为 $[M-C_4H_7-CO]^+$ 碎片离子峰, 新补骨脂异黄酮结构中均有异丁基, 故推断 5 号峰为新补骨脂异黄酮, 结构见图 3。

峰 6 和 9 的 HPLC/TOF-MS 分析: $[M+H]^+$ 为 325.133 5, 经元素组成计算得到最匹配的化学式为 $C_{20}H_{21}O_4$, 可能为补骨脂二氢黄酮^[7]、异补骨脂查

耳酮^[6]。

峰 6 和 9 的 HPLC/IT-MSⁿ 分析: 一级质谱图显示 325.2 峰为 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 二级质谱图上显示较强的 269.1 峰为 $[M+H-C_4H_7]^+$ 碎片峰。补骨脂二氢黄酮、异补骨脂查耳酮结构中均有异丁基, 根据文献报道的出峰顺序^[8], 推断出 6 号峰为补骨脂二氢黄酮、9 号峰为异补骨脂查耳酮, 结构见图 3。



图 3 新补骨脂异黄酮、补骨脂二氢黄酮和异补骨脂查耳酮的结构

Fig. 3 Structures of neobavaisoflavone, bavachin, and isobavachalcone

峰 8 的 HPLC/TOF-MS 分析: $[M+H]^+$ 为 337.107 2, 经元素组成计算得到最匹配的化学式为 $C_{20}H_{17}O_5$, 可能为补骨脂定^[9]。

峰 8 的 HPLC/IT-MSⁿ 分析: 一级质谱图显示 337.2 峰为 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 二级质谱图上显示较强的 281.1 峰为 $[M+H-C_4H_7]^+$ 碎片峰。故推断 8 号峰为补骨脂定, 结构见图 4。

峰 10 和 12 的 HPLC/TOF-MS 分析: $[M+H]^+$ 为 339.158 5, 经元素组成计算得到最匹配的化学式为

$C_{21}H_{23}O_4$, 可能为补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂查耳酮^[10]。

峰 10 和 12 的 HPLC/IT-MSⁿ 分析: 一级质谱图显示 339.3 峰为 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 二级质谱图上显示较强的 283.1 峰为 $[M+H-C_4H_7]^+$ 碎片峰, 补骨脂二氢黄酮甲醚、补骨脂查耳酮结构中均有异丁基, 根据文献报道的出峰顺序^[10], 推断出 10 号峰为补骨脂二氢黄酮甲醚、12 号峰为补骨脂查耳酮, 结构见图 4。

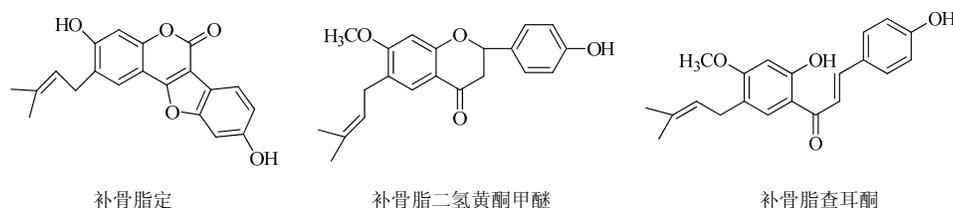


图 4 补骨脂定、补骨脂二氢黄酮甲醚和补骨脂查耳酮的结构

Fig. 4 Structures of psoralidin, bavachinin, and bavachalcone

3.2 讨论

新型的 TOF 系统具有快速、高灵敏度和高分辨率的特点^[11], TOF 质量分析器总是在最大分辨率的条件下工作, 且不需要通过降低分辨率来提高灵敏度。TOF 质谱具有准确质量测定功能, 用一个锁定质量及简单的校正公式就可以纠正很长范围的质量漂移。TOF 可以精确测定目标化合物的质量数, 因而被广泛地应用于定性分析。TOF 还具有扫描速率快, 质谱数据信息大的优点, 同时能提供高分辨和高精度数据。

离子阱质谱仪是一种低-中分辨的质谱仪, 研究级离子阱可以得到超高分辨率的质谱图^[12], 阱内捕获离子产生的空间电荷效应以及其他电场效应会导致被测离子频率的偏移, 所以离子阱很难完成准确质量测定。离子阱产生的子离子质谱图通常只有几个主要碎片, 需要使用多级质谱才能获得完整的子离子质谱。由于离子阱质谱具有成本低, 相对较高的灵敏度以及 MSⁿ 能力, 它比较适合用作目标化合物的筛选和定性分析, 可以用于化合物的鉴定。

本实验采用了结合 2 种 LC/MS 的分析方法,

充分发挥了 TOF-MS 精确质量数测定和 IT-MSⁿ 多级碎片分析的优势, 实现了对补骨脂中多成分的快速定性分析。总共鉴定出 13 种成分, 该方法为中药多成分分析提供了一种有效、可靠的新模式, 也同样适用于其他复杂体系的分析, 同时为有效组分的深入研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 吴疆, 魏巍, 袁永兵. 补骨脂的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(3): 217-219.
- [4] 罗国安, 梁琼麟. 色谱/质谱联用新技术及在中药现代化中的应用 [A] // 中国化学会第十五次全国色谱学术报告会文集 (上册) [C]. 郑州: 第十五次全国色谱学术报告会, 2005.
- [5] Qiao C F, Han Q B, Song J Z, *et al.* Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Fructus Psoraleae* by high-performance liquid chromatography [J]. *Sep Sci*, 2007, 30(6): 813-818.
- [6] 于丽丽. 补骨脂等三种植物药化学成分研究 [D]. 昆明: 云南师范大学, 2004.
- [7] Tsai W J, Hsin W C, Chen C C. Ailtoplatelet flavonoids from seeds of *Psoralea corylifolia* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59: 671-672.
- [8] Zhao L H, Huang C Y, Shan Z, *et al.* Fingerprint analysis of *Psoralea corylifolia* L. by HPLC and LC-MS [J]. *J Chromatogr B*, 2005(821): 67-74.
- [9] Yang Y M, Hyun J W, Sung M S, *et al.* The cytotoxicity of psoralidin from *Psoralea corylifolia* [J]. *Planta Med*, 1996, 62: 353-354.
- [10] Sheng Y, Cheng Q F, Ying W, *et al.* Antibacterial prenylflavone derivatives from *Psoralea corylifolia*, and their structure-activity relationship study [J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(16): 4387-4392.
- [11] Chemushevich I V, Ens W, Standing K G. *Electrospray Ionization Time of Flight Mass Spectrometry. Electrospray Ionization Mass Spectrometry* [M]. New York: Wiley-Interscience, 1997.
- [12] Londry F A, Wells G J, March R E. Enhanced mass resolution in a quadrupole ion trap [J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 1993, 7: 43-45.