

葛根枳椇软胶囊中黄酮类化合物的 UPLC/Q-TOF-MS 快速分析

孙冬梅¹, 董玉娟², 胥爱丽¹, 罗文汇¹, 江洁怡¹

1. 广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州 510095

2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

摘要: 目的 采用 UPLC/Q-TOF-MS 技术对葛根枳椇软胶囊中的黄酮类成分进行定性分析。方法 采用 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm), 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相梯度洗脱, 体积流量 0.4 mL/min; 质谱定性采用飞行时间质谱, 电喷雾离子源, 负离子模式下采集数据; 质谱的相关参数: 干燥气温度 300 °C, 干燥气体积流量 10 L/min, 雾化气压力 276 kPa, 鞘流气温度 350 °C, 鞘流气流量 11 L/min, 毛细管电压 3 500 V, 碎片电压 175 V。结果 结合质谱数据及文献数据分析, 鉴定出 20 个黄酮类化合物, 相对分子质量集中于 250~650。结论 借助 UPLC 的快速分离和 Q-TOF-MS 测定的精确相对分子质量, 可以有效地对葛根枳椇软胶囊中黄酮类成分进行分析鉴定。该方法准确、快速、灵敏, 为其质量控制提供了实用可靠的技术手段。

关键词: UPLC/Q-TOF-MS; 葛根枳椇软胶囊; 野葛; 枳椇; 黄酮类化合物

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)07-0970-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.07.007

Rapid analysis on flavonoids in Gegen Zhiju Soft Capsule by UPLC/Q-TOF-MS

SUN Dong-mei¹, DONG Yu-juan², XU Ai-li¹, LUO Wen-hui¹, JIANG Jie-yi¹

1. Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510095, China

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

Abstract: Objective To identify the flavonoids in Gegen Zhiju Soft Capsule (a soft capsule prepared with *Puerariae Radix* and *Hoveniae Dulcis Fructus* seu *Semen* and so on) using ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS). **Methods** The analysis was performed on Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 2.7 μm) gradient elution with a mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile. The flow rate was at 0.4 mL/min. TOFMS was applied for qualitative analysis, and the data were collected by the negative ion mode using ESI ion source. The parameters of ion source were as follows: drying gas temperature, 300 °C; drying gas flow rate, 10 L/min; nebulizer gas pressure, 276 kPa, sheath gas temperature, 350 °C; sheath gas flow rate, 11 L/min; capillary voltage, 3 500 V; fragmentor voltage, 175 V. **Results** Twenty flavonoid compounds were identified by TOF-MS and literature data. Relative molecular weight was concentrated within 250—650. **Conclusion** The rapid separation with UPLC and Q-TOF-MS determination of the precise molecular weight information could effectively analyze and identify the flavonoid compounds in Gegen Zhiju Soft Capsule. The method is accurate, rapid, and sensitive, and could provide a reliable and effective technique for the quality control.

Key words: ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass; Gegen Zhiju Soft Capsule; *Puerariae Radix*; *Hoveniae Dulcis Fructus* seu *Semen*; flavonoids

葛根为豆科 (Leguminosae) 植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 是《中国药典》2010 年版收录的常用中药之一, 其性凉, 味甘、辛, 归脾、胃、肺经, 具有解肌退热、生津止渴、透疹、升阳止泻、通经活络、解酒毒之功效。临床上多用于外感发热头痛、项背强痛、口渴、消渴、麻疹不

透、热痢、泄泻、眩晕头痛、中风偏瘫、胸痹心痛、酒毒伤中等症^[1]。枳椇子为鼠李科 (Rhamnaceae) 拐枣属 *Hovenia* Thunb. 植物枳椇 *Hovenia acerba* Lindl. 的干燥成熟种子, 属养阴、生津、润燥、止渴、凉血类药物。其主要为清热利尿、止渴除烦、解酒毒, 用于热病烦渴、呃逆、小便不利^[2]。葛根

收稿日期: 2014-09-28

基金项目: 广州市科技计划项目 (201300000062)

作者简介: 孙冬梅 (1969—), 硕士, 主任中药师, 主要从事中药质量评价研究。Tel: (020)83482683 E-mail: dyjhua@163.com

枳椇软胶囊是以葛根提取物与枳椇子提取物为主要原料,经国家食品药品监督管理局批准的保健食品,对化学性肝损伤有辅助保护功能。目前,采用HPLC-MS方法对葛根成分的定性与定量的相关研究已有不少报道^[3-5],耗时多为1 h以上;枳椇子成分的相关研究^[6-7]较少,未见对葛根枳椇软胶囊制剂的相关报道。以天然植物为原料开发的保健食品,每一味中药都是一个复杂体系,包含着丰富的化学成分。而这类保健食品以测定总黄酮、粗多糖、总皂苷等或只测定1~2个化学成分的量作为质量控制指标^[8],针对性不强,测定结果不稳定。

本实验拟采用UPLC/Q-TOF-MS技术建立同时测定葛根枳椇软胶囊中多种黄酮类功效成分的快速分析方法,为阐明其功效物质基础及质量控制提供一定的研究思路和方法。

1 仪器和试剂

Agilent 1290型液相色谱仪(在线脱气机,二元泵,高性能自动进样器和DAD检测器);Agilent Technologies 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF LC/MS质谱仪(MassHunter workstation Data Acquisition工作站和MassHunter Qualitative Analysis software质谱分析软件);KQ5200DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Mettler XS205DU电子天平(瑞士梅特勒托利多公司);MilliPore Advantage A10自动纯水机(美国默克密理博公司)。

芦丁(批号0080-9504)、葛根素(批号110752-200912)、大豆苷(批号111738-201302)、染料木苷(批号111709-200501)、大豆苷元(批号100502-200402)、鹰嘴豆芽素A(批号111708-200501)、槲皮素(批号10081-200907)、异鼠李素(批号110860-200406)对照品均购于中国食品药品检定研究院;芒柄花苷(批号486-62-4,质量分数≥98%,购于成都瑞芬思生物科技有限公司);3'-甲氧基葛根素(批号117047-07-1,质量分数≥98%,购于上海纯优生物);鸢尾黄素-7-O-木糖葡萄糖苷(批号117047-1205,质量分数≥98%,购于上海古朵生物科技有限公司);甲醇、乙腈为色谱纯试剂(默克),水为超纯水;葛根枳椇软胶囊(总黄酮5.10 mg/g;批号14010201)购于威海紫光生物科技开发有限公司。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱为Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(100

mm×2.1 mm, 2.7 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~2 min, 10%~15% A;2~3 min, 15%~17% A;3~5 min, 17%~27% A;5~6 min, 27%~35% A;6~8 min, 35% A。柱温25℃;体积流量0.4 mL/min;进样体积1 μL;紫外检测波长254 nm。

2.2 质谱条件

电喷雾负离子模式;质量扫描范围 m/z 50~1 000;离子源参数:干燥气温度300℃,干燥气流量10 L/min,雾化气压力276 kPa,鞘流气温度350℃,鞘流气流量11 L/min,毛细管电压3 500 V,碎片电压175 V,碰撞电压15~40 V,离子能量1 eV,每0.2秒采集1次图谱;选择参比校准液甲酸盐加合物(商品名HP0921,相对分子质量966, C₁₉H₁₉O₈N₃P₃F₂₄)作实时质量数校正。

2.3 供试品溶液制备

取10粒软胶囊的内容物,搅拌均匀,取内容物0.5 g,加25 mL甲醇,超声30 min,冷却,冰箱保持冷却2 h,待油脂类物质析出后,定性滤纸趁冷滤过,滤液再过微孔滤膜(0.22 μm),作为供试品溶液。

2.4 对照品溶液制备

取芦丁、葛根素、大豆苷、染料木苷、芒柄花苷、大豆苷元、鹰嘴豆芽素A、槲皮素、异鼠李素、3'-甲氧基葛根素、鸢尾黄素-7-O-木糖葡萄糖苷对照品适量,精密称定,加甲醇分别制成含芦丁51.0 μg/mL、葛根素48.6 μg/mL、大豆苷40.4 μg/mL、染料木苷41.2 μg/mL、芒柄花苷51.3 μg/mL、大豆苷元10.4 μg/mL、鹰嘴豆芽素A36.4 μg/mL、槲皮素30.1 μg/mL、异鼠李素20.4 μg/mL、3'-甲氧基葛根素45.2 μg/mL、鸢尾黄素-7-O-木糖葡萄糖苷39.7 μg/mL的溶液,过0.22 μm微孔滤膜,即得,备用。

3 结果与分析

3.1 葛根枳椇软胶囊中黄酮类化合物的鉴别

葛根枳椇软胶囊中的黄酮类化合物极性较大且热不稳定,分子中的羟基容易形成稳定的氧负离子,使用ESI离子源,负离子模式检测所得总离子流图(图1)有较好的信噪比,且与254 nm波长下紫外检测色谱图基本吻合。通过对色谱峰进行二级质谱研究,20个化合物的准确相对分子质量和离子碎片信息数据见表1。

对总离子流图中主要的20个色谱峰进行鉴别。首先,根据TOF-MS上所得到的精确化合物相对分子质量信息,通过MassHunter Qualitative Analysis

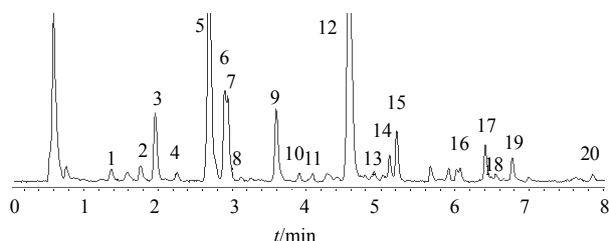


图1 葛根枳椇软胶囊提取液的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of extract from Gegen Zhiju Soft Capsule

表1 葛根枳椇软胶囊提取物中黄酮类化合物的 UPLC-PDA-TOF/MS 分析

Table 1 Analysis on flavonoids in extract from Gegen Zhiju Soft Capsule by UPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	t_R/min	化合物名称	分子式	负离子模式 (m/z)			MS/MS 碎片离子信息
				测量值	理论值	偏差	
1	1.371	葛根素-4'-O- β -D-葡萄糖苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	577.156 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$	577.155 2	-1.77	457
2	1.761	大豆素-4',7-O-葡萄糖苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	623.161 8 $[\text{M}+\text{HCOO}-\text{H}]^-$	623.160 7	-1.83	415
3	1.935	3'-氢化葛根素	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	431.098 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$	431.097 3	-3.78	283, 311
4	2.251	3'-氢化葛根素木糖苷	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	563.140 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$	563.139 5	-1.90	283, 311
5	2.683	葛根素	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	415.103 5 $[\text{M}-\text{H}]^-$	415.102 4	-2.76	267, 295
6	2.890	3'-甲氧基葛根素	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	445.115 1 $[\text{M}-\text{H}]^-$	445.112 9	-4.90	325, 310, 297, 282
7	2.940	葛根素-7-木糖苷	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	547.146 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$	547.144 6	-4.00	295, 267
8	3.114	3'-甲氧基葛根素木糖苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	577.155 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$	577.155 2	-1.07	325, 310, 297, 282
9	3.584	大豆苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	461.109 1 $[\text{M}+\text{HCOO}-\text{H}]^-$	461.107 8	-2.74	415, 253
10	3.895	3'-甲氧基大豆苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	491.119 4 $[\text{M}+\text{HCOO}-\text{H}]^-$	491.118 4	-2.04	445, 283
11	4.069	染料木素-8-C-芹菜葡萄糖苷	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_1$	563.140 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$	563.139 5	-1.19	283, 311
12	4.567	芦丁	$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{16}$	609.148 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$	609.145 0	-4.91	301, 300
13	4.907	染料木苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	477.103 6 $[\text{M}+\text{HCOO}-\text{H}]^-$	477.102 8	-1.78	431, 269
14	5.115	鸢尾黄素-7-O-木糖葡萄糖苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	593.152 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$	593.150 1	-3.21	284
15	5.204	6-羟基鹰嘴豆芽素 A-6,7-二葡萄糖苷	$\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	623.163 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$	623.160 7	-4.08	315, 314
16	6.061	芒柄花苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9$	475.124 8 $[\text{M}+\text{HCOO}-\text{H}]^-$	475.123 5	-2.77	267
17	6.402	大豆苷元	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	253.050 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$	253.049 5	-5.02	223, 208, 195, 133, 132
18	6.543	鹰嘴豆芽素 A	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	283.061 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$	283.060 1	-4.96	268
19	6.579	槲皮素	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_7$	301.034 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$	301.034 3	-1.66	178, 151, 121, 107
20	7.846	异鼠李素	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	315.050 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$	315.049 9	-2.22	300, 151, 107

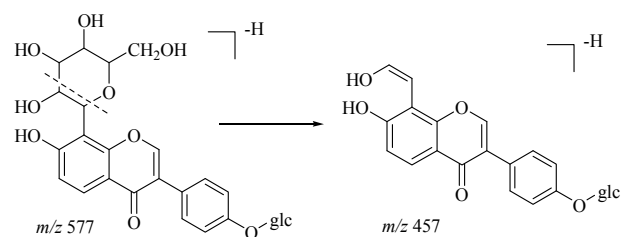
对分子质量理论值为 577.155 2, 实测值为 577.156 2, 可推断其分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$, 以 m/z 577.156 2 为母离子, 进行二级质谱分析, 所得二级质谱图中有明显的 457 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4]^-$ 碎片离子信息, 是其母分子离子失去 $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$ (M_v 120) 分子产生的, 推测其裂解途径见图 2。

峰 2: 大豆素-4',7-O-葡萄糖苷。质谱给出分子离子峰 m/z 623.161 8 $[\text{M}+\text{HCOO}-\text{H}]^-$, 推断其分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$, 以 m/z 623.161 8 为母离子进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 415 $[\text{M}-\text{H}-$

Software 质谱分析软件在质量偏差为 5 的范围内计算其可能的元素组成, 将可能的元素组成与高分辨相对分子质量输入 Agilent MassHunter Molecular Structure Correlator 数据库中查找有关的化学成分结构, 与文献报道^[9-15]的化学成分进行比对, 结合保留时间及裂解碎片信息进行综合分析, 初步推断葛根枳椇软胶囊提取液中的黄酮类成分的结构。

3.2 葛根枳椇软胶囊中黄酮类化合物的结构解析

峰 1: 葛根素-4'-O- β -D-葡萄糖苷。通过该峰的相

图2 葛根素-4'-O- β -D-葡萄糖苷可能的裂解途径Fig. 2 Possible fragmentation mechanism of puerarin-4'-O- β -D-glucoside

Glc⁻ 碎片离子信息,推测是其母分子离子失去葡萄糖分子 (M_v 162) 产生的。

峰 3: 3'-氢化葛根素。质谱给出分子离子峰 m/z 431.098 9 [M-H]⁻, 推断其分子式为 $C_{21}H_{20}O_{10}$, 以 m/z 431.098 9 作为母离子进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 311、283 碎片离子信息, 311 [M-H-120]⁻ 为糖环的交叉环切除裂解, 丢失 $C_4H_8O_4$ (M_v 120) 分子形成的碎片离子, 283 [M-H-120-28]⁻ 是继而丢失 1 个 CO 分子形成的碎片离子。

峰 4: 3'-氢化葛根素木糖苷。质谱给出分子离子峰 m/z 563.140 6 [M-H]⁻, 推断其分子式为 $C_{26}H_{28}O_{14}$, 以 m/z 563.140 6 作为母离子进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 311、283 碎片离子信息, 311 [M-H-Xyl-120]⁻ 为其母分子离子失去木糖分子 (M_v 132), 再丢失 $C_4H_8O_4$ (M_v 120) 分子形成的碎片离子, 283 [M-H-Xyl-120-28]⁻ 是继而丢失 1 个 CO 分子形成的碎片离子。

峰 5: 葛根素。质谱给出分子离子峰 415.103 5 [M-H]⁻, 推断其分子式为 $C_{21}H_{20}O_9$, 以 m/z 415.103 5 为母离子进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 295、267 碎片离子信息, 295 [M-H-120]⁻ 为糖环的交叉环切除裂解, 丢失 $C_4H_8O_4$ (M_v 120) 分子形成的碎片离子, 267 [M-H-120-28]⁻ 是继而丢失 1 个 CO 分子形成的碎片离子, 裂解途径同峰 3。

峰 6: 3'-甲氧基葛根素。质谱给出分子离子峰 m/z 445.115 1 [M-H]⁻, 推断其分子式为 $C_{22}H_{22}O_{10}$, 以 m/z 445.115 1 作为母离子进行二级质谱分析, 所得二级质谱图中有明显的 325、310、297、282 碎片离子信息。325 [M-H-120]⁻ 为糖环的交叉环切除裂解, 丢失 $C_4H_8O_4$ (M_v 120) 分子形成的碎片离子, 310 [M-H-120-15]⁻ 是继而丢失 1 个 CH_3 分子形成的碎片离子, 297 [M-H-120-28]⁻ 是继 325 碎片丢失 1 个 CO 分子形成的碎片离子, 282 [M-H-163]⁻ 是其母分子离子失去葡萄糖分子产生的碎片离子。推测其裂解途径见图 3。

峰 7: 葛根素-7-木糖苷。质谱给出分子离子峰 547.146 8 [M-H]⁻, 可推断其元素组成为 $C_{26}H_{28}O_{13}$, 以 m/z 547.146 8 为母离子, 进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 295、267 碎片离子信息。295 [M-H-Xyl-120]⁻ 为其母分子离子失去木糖分子 (M_v 132), 再丢失 $C_4H_8O_4$ (M_v 120) 分子形成的碎片离子, 267 [M-H-Xyl-120-28]⁻ 是其继而丢失 1 个 CO 分子形成的碎片离子。

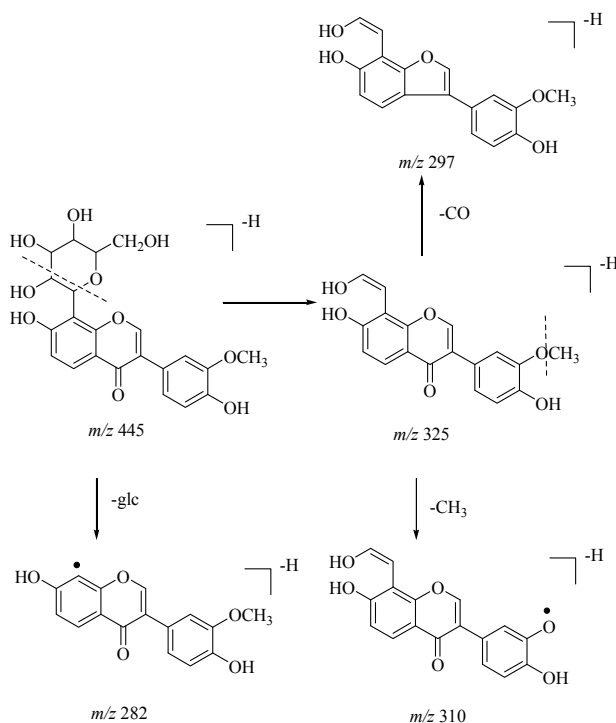


图 3 3'-甲氧基葛根素可能的裂解途径

Fig. 3 Possible fragmentation mechanism of 3'-methoxy-puerarin

峰 8: 3'-甲氧基葛根素木糖苷。质谱给出分子离子峰 m/z 577.155 8 [M-H]⁻, 推断其分子式为 $C_{27}H_{30}O_{14}$, 以 m/z 577.155 8 作为母离子进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 325、310、297、282 碎片离子信息。325 [M-H-Xyl-120]⁻ 为其母分子离子失去木糖分子 (M_v 132), 继而丢失 $C_4H_8O_4$ (M_v 120) 分子形成的碎片离子, 310 [M-H-Xyl-120-15]⁻ 是继而丢失 1 个 CH_3 分子形成的碎片离子, 297 [M-H-Xyl-120-28]⁻ 是继 325 碎片丢失 1 个 CO 分子形成的碎片离子, 282 [M-H-Xyl-Glc]⁻ 是其母分子离子失去木糖和葡萄糖分子产生的碎片离子。

峰 9: 大豆苷。质谱给出分子离子峰 461.109 1 [M+HCOO-H]⁻, 推断其分子式为 $C_{21}H_{20}O_9$, 以 m/z 461.109 1 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得二级质谱图中有明显的 253 [M-H-Glc]⁻ 碎片离子信息, 是其母分子离子失去葡萄糖分子 (M_v 162) 产生的。

峰 10: 3'-甲氧基大豆苷。质谱给出分子离子峰 491.119 4 [M+HCOO-H]⁻, 推断其分子式为 $C_{22}H_{22}O_{10}$, 以 m/z 491.119 4 为母离子, 进行二级质

谱分析,所得谱图中有明显的 283 $[M-H-Glc]^-$ 碎片离子信息,是其母分子离子失去葡萄糖分子 (Mv 162) 产生的。

峰 11: 染料木素-8-*C*-芹菜葡萄糖苷。质谱给出分子离子峰 563.140 2 $[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{26}H_{28}O_{14}$, 以 m/z 563.140 2 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 311、283 碎片离子信息。311 $[M-H-Api-120]^-$ 为其母分子离子失去芹糖分子 (Mv 132) 分子, 接而丢失 $C_4H_8O_4$ (Mv 120) 分子形成的碎片离子, 283 $[M-H-Api-120-28]^-$ 是其继而丢失 1 个 CO 分子形成的碎片离子。

峰 12: 芦丁。质谱给出分子离子峰 609.148 0 $[M-H]^-$, 可推断其分子式为 $C_{27}H_{28}O_{16}$, 以 m/z 609.148 0 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 300、301 $[M-H-Rha-Glc]^-$ 碎片离子信息, 是其母分子离子依次失去鼠李糖 (Mv 146) 和葡萄糖分子 (Mv 162) 分子产生的。

峰 13: 染料木苷。质谱给出分子离子峰 477.103 6 $[M+HCOO-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{21}H_{20}O_{10}$, 以 m/z 477.103 6 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 269 $[M-H-Glc]^-$ 碎片离子信息, 是其母分子离子失去葡萄糖分子 (Mv 162) 分子产生的。

峰 14: 鸢尾黄素-7-*O*-木糖葡萄糖苷。质谱给出分子离子峰 593.152 0 $[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{27}H_{30}O_{15}$, 以 m/z 593.152 0 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 284 $[M-H-Xyl-Glc-15]^-$ 碎片离子信息, 是其母分子离子失去木糖分子 (Mv 132) 和葡萄糖分子 (Mv 162) 后继而丢失 1 个 CH_3 分子形成的碎片离子。

峰 15: 6-羟基鹰嘴豆芽素 A-6,7-二葡萄糖苷。质谱中给出分子离子峰 623.163 2 $[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{28}H_{30}O_{16}$, 以 m/z 623.163 2 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得二级质谱图中有明显的 314、315 碎片离子信息, 315 $[M-H-120-120-C_3O_2]^-$ 为糖环的交叉环切除裂解和丢失 1 个 C_3O_2 分子形成的碎片离子。推测其裂解途径见图 4。

峰 16: 芒柄花苷。质谱给出分子离子峰 475.124 8 $[M+HCOO-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{22}H_{22}O_9$, 以 m/z 475.124 8 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 267 $[M-H-Glc]^-$ 碎片离子信息, 是其母分子离子失去葡萄糖分子 (Mv 162) 产生的。

峰 17: 大豆苷元。质谱给出分子离子峰 253.050 8

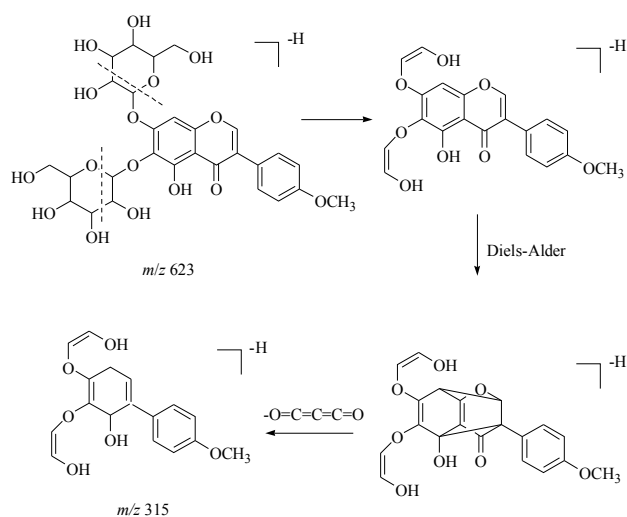


图 4 6-羟基鹰嘴豆芽素 A-6,7-二葡萄糖苷可能的裂解途径
Fig. 4 Possible fragmentation mechanism of 6-hydroxybiochanin A-6,7-di-O-glucoside

$[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{15}H_{10}O_4$, 以 m/z 253.050 8 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 224、223、209、208、196、195、133、132 碎片离子信息, 224 $[M-H-29]^-$ 是其丢失 1 个 CHO 分子形成的碎片离子, 196 $[M-H-29-28]^-$ 是继而丢失 1 个 CO 分子形成的碎片离子。209 $[M-H-44]^-$ 是母离子丢失 1 个 CO_2 分子形成的碎片离子, 133 是母离子 C 环上发生 RDA 裂解形成的 $^{0,3}B$ 碎片离子。推测其裂解途径见图 5。

峰 18: 鹰嘴豆芽素 A。质谱给出分子离子峰 283.061 7 $[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$, 以 m/z 283.061 7 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 268 $[M-H-15]^-$ 碎片离子信息, 是其丢失 1 个 CH_3 分子产生的。

峰 19: 槲皮素。质谱给出分子离子峰 301.034 7 $[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{15}H_8O_7$, 以 m/z 301.034 7 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 179、151、121、107 碎片离子信息。C 环 1/2 位上 C-C 键断裂, 得碎片 $^{1,2}A^-(m/z$ 179) 和 $^{1,2}B^-(m/z$ 121), m/z 151 和 m/z 107 特征离子产生的断裂途径为 RDA 反应, 裂解途径见图 6。

峰 20: 异鼠李素。质谱给出分子离子峰 m/z 315.051 0 $[M-H]^-$, 推断其分子式为 $C_{16}H_{12}O_7$, 以 m/z 315.051 0 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 所得谱图中有明显的 300、151、107 碎片离子信息。 m/z 300 $[M-H]^-$ 为丢失 1 个 CH_3 分子产生的, m/z 151 和 m/z 107 特征离子产生的断裂途径为 RDA 反应。

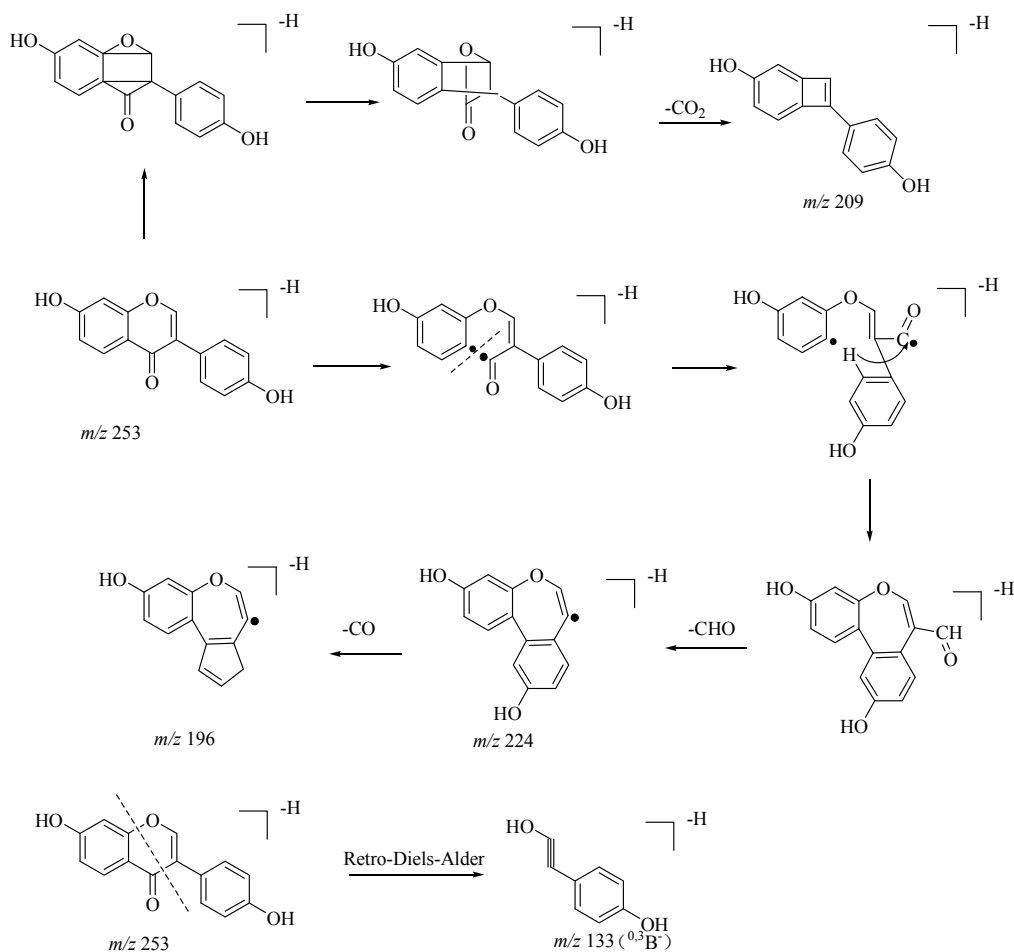


图 5 大豆苷元可能的裂解途径

Fig. 5 Possible fragmentation mechanism of daidzein

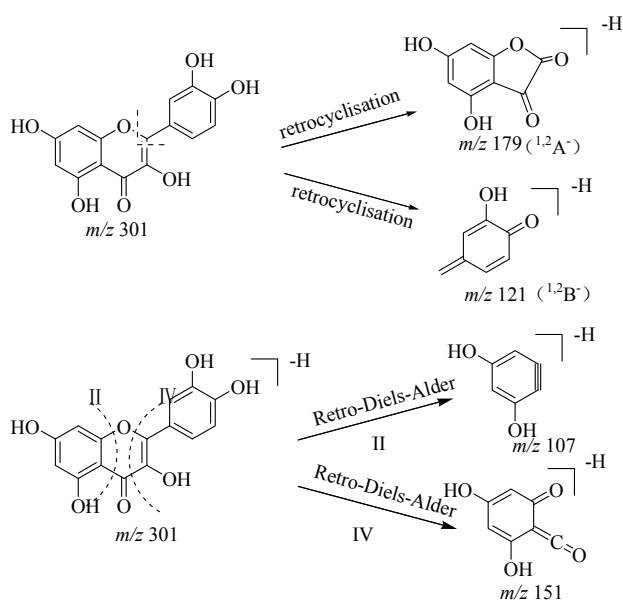


图 6 槲皮素可能的裂解途径

Fig. 6 Possible fragmentation mechanism of quercetin

4 讨论

4.1 测定方法的选择

UPLC/Q-TOF-MS 分析具有高分离度、高速度、高灵敏度、可测定精确相对分子质量等特点^[16-18], 尤其适用于中药多组分、复杂成分的分离和定性鉴别。本实验运用 UPLC-MS 技术可以在 8 min 内完成化合物的分离, 将其用于成分鉴定和指认, 避免了采用对照品核对成分峰的局限性, 体现了 Q-TOF 在化合物鉴定工作中的优势, 为葛根枳椇胶囊的化学物质基础研究提供了更为快速有效的手段。

4.2 色谱和质谱条件的选择

乙腈洗脱能力较甲醇强, 且溶剂黏度较低, 故选择乙腈作为有机溶剂, 达到了快速分离色谱峰的目的。考察了乙腈与水及不同种类的挥发性缓冲液(甲酸溶液、乙酸铵溶液)组成的流动相体系对化合物的色谱行为及离子化程度的影响。结果表明, 以乙腈-甲酸作为流动相可获得最优的色谱峰形、分离效果和质谱信号响应。黄酮易于失去 1 个质子, 以

[M-H]⁻的准分子离子峰形式存在, 故选择负离子模式采集数据。

4.3 样品前处理方法的选择

由于样品辅料中含有大豆油、明胶、甘油等, 待有机溶剂提取完后, 样品放置于保持低温(4℃)的进样器中容易析出油脂, 如果直接进样易对色谱柱有一定的损坏, 故样品提取完后, 先置于冰箱待油脂析出后, 趁冷过滤备用, 进而减少杂质对仪器和色谱柱的影响。

本实验运用 UPLC-Q-TOF-MS 法对葛根枳椇软胶囊中的黄酮类成分进行了分离及结构鉴定。根据各个色谱峰在质谱中的精确相对分子质量、质谱碎片结构信息和色谱保留规律, 参考相关文献, 成功鉴定了葛根枳椇软胶囊中 20 个化合物, 其中 17 个化合物为异黄酮, 3 个化合物为黄酮, 并总结了黄酮化合物质谱裂解的途径。其中芦丁、葛根素、大豆苷、染料木苷、大豆苷元、鹰嘴豆芽素 A、槲皮素、异鼠李素、芒柄花苷、3'-甲氧基葛根素、鸢尾黄素-7-O-木糖葡萄糖苷与对照品对照后进行确认, 其他成分则通过二级质谱扫描 MS², 并根据特征碎片离子峰加以确认。本实验建立的快速筛查方法, 为其质量控制提供了新的方法和途径。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 彭玲, 李坤平, 高英积, 等. 枳椇子中黄酮类化合物的 HPLC-ESI-MS 分析 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 4(20): 341-343.
- [3] Yan Y, Chai C Z, Wang D W, *et al.* HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS analysis and HPLC quantitation of chemical constituents in traditional Chinese medicinal formula Ge-Gen Decoction [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 80: 192-202.
- [4] Chang Q, Sun L, Zhao R H, *et al.* Simultaneous determination of ten active components in traditional Chinese medicinal products containing both Gegen (*Pueraria lobata*) and Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) by high-performance liquid chromatography [J]. *Phytochem Anal*, 2008, 19(4): 368-375.
- [5] Chen L, Tang Y P, Chen M J, *et al.* Chemical correlation between Gegen Qinlian dispensing granule and its four raw herbs by LC fingerprint [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(2): 100-107.
- [6] 丁林生, 梁侨丽, 腾艳芬. 枳子黄酮类成分研究 [J]. 药学报, 1997, 32(8): 600-602.
- [7] Hyun T K, Eom S H, Yu C Y, *et al.* *Hovenia dulcis*-an asian traditional herb [J]. *Planta Med*, 2010, 76(10): 943-949.
- [8] 王竹天, 杨大进. 保健食品功效成分测定方法现状及发展趋势 [J]. 中国食品卫生杂志, 2000, 12(6): 13-15.
- [9] Lu J, Xie Y Y, Tan Y, *et al.* Simultaneous determination of isoflavones, saponins and flavones in *Flos Puerariae* by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Chem Pharm Bull*, 2013, 61(9): 941-951.
- [10] Zhang C L, Ding X P, Hu Z F, *et al.* Comparative study of *Puerariae lobatae* and *Puerariae thomsonii* by HPLC-diode array detection-flow injection chemiluminescence coupled with HPLC-electrospray ionization-MS [J]. *Chem Pharm Bull*, 2011, 59(5): 541-545.
- [11] Zhou Q L, Wang Y F, Yang D H, *et al.* Identification of the absorptive constituents and their metabolites *in vivo* of *Puerariae Lobatae Radix* decoction orally administered in WZS-miniature pigs by HPLC-ESI-Q-TOFMS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(9): 1208-1218.
- [12] Chen L, Tang Y P, Chen M J, *et al.* Chemical correlation between Gegen Qinlian dispensing granule and its four raw herbs by LC fingerprint [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(2): 100-107.
- [13] Zhang Y, Xu Q, Zhang X Z, *et al.* High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for identification of isoflavones and description of the biotransformation of kudzu root [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 383(1): 787-796.
- [14] Du G, Zhao H Y, Zhang Q W, *et al.* A rapid method for simultaneous determination of 14 phenolic compounds in *Radix Puerariae* using microwave-assisted extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(5): 705-714.
- [15] 周永刚, 吴思, 毛飞. 葛根中黄酮类化学成分的分析 [J]. 药学实践杂志, 2013, 31(2): 116-119.
- [16] Wu H X, Yang C Y, Wang Z H, *et al.* Metabolism profile of quincetone in swine by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 37(2): 141-154.
- [17] Aznar M, Rodriguez-Lafuente A, Alfaro P, *et al.* UPLC-Q-TOF-MS analysis of non-volatile migrants from new active packaging materials [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 404(6/7): 1945-1957.
- [18] Wong M C Y, Lee W T K, Wong J S Y, *et al.* An approach towards method development for untargeted urinary metabolite profiling in metabonomic research using UPLC/Q TOF MS [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 871(2): 341-348.