

无尾果黄酮类化学成分的 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析[※]

● 朱继孝* 文乐 魏春华 慕泽泾 钟国跃 曾金祥[▲]

摘要 目的:通过 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对无尾果中的化学成分进行定性分析。方法:采用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS, YMC-ULtraHT Pro C18 色谱柱(100 mm×3 mm, 2 μ m)以甲醇-0.5% 甲酸水溶液为流动相梯度洗脱;质谱采用电喷雾(ESI)离子源,在负离子模式下采集数据,通过保留时间、精确分子离子峰和二级质谱裂解碎片,对无尾果进行成分鉴定。结果:初步鉴定了无尾果中 10 个黄酮类成分。结论:UHPLC-Q-TOF-MS/MS 方法能快速鉴别无尾果中的黄酮类化学成分,该方法简单、快速,结果准确,为无尾果的药效物质研究奠定基础。

关键词 无尾果 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 化学成分 裂解规律 黄酮

无尾果(*Coluria longifolia* Maxim),藏药名为热衮巴,是蔷薇科无尾果属的植物,分布于中国大陆的甘肃、云南、西藏、四川、青海等地,全草入药,有止血止痛、清热作用。藏药志记载,热衮巴能治疗高血压引起的发烧、神经性发烧、疝痛等,具有清热解毒功效^[1]。无尾果在藏区使用广泛。目前国内外对于无尾果化学成分的研究并不多见。本课题组前期对无尾果的抗炎、镇痛、解热作用进行了研究。前期研究结果表明,无尾果具有显著的抗炎、镇痛、解热作用,其抗炎作用与提高抗氧化能力、抑制脂质过氧化、抑制炎症因子 TNF- α 、PGE₂ 的释放有关。但其药效物质基础仍不清楚,限制了无尾果的进一步开发与应用。因此,建立一种有效、准确的方法对无尾果进行化学成分研究具有重要意义。近年来,液质联用在中药领域应用广泛,已成为分离鉴定各种化合物

的重要手段之一^[2-3]。液质联用技术弥补了传统检测器的不足,它集 LC 的高分离能力和 MS 的高灵敏度、高选择性于一体^[4]。因此,本实验以无尾果为研究对象,应用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对无尾果甲醇提取物的化学成分进行研究,根据其准分子离子以及二级碎片离子、文献数据等鉴定无尾果的化学成分,并总结其质谱裂解规律,为无尾果活性成分的鉴定和研究提供科学依据,同时为藏药化学成分的研究奠定了基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器 岛津 LC-30A 超高效液相色谱仪, PDA 紫外检测器; Triple-TOF 5600⁺ 高分辨质谱仪,配备 ESI 离子源及 Analyst 1.6 数据处理软件、PeakView 数据处理软件(A 美国 B SCIEX 公司); KQ-5200DB 型超声清洗机(昆山市超声波仪器公司); AL204 型电子分析天平(Mettler Toledo 仪器(上海)有限公司); Millipore-Simplicity 超纯水处理系统(德国默克密理博公司)。

1.2 药物与试剂 异槲皮苷对照品(纯度 \geq 98%,批号: MUST-16051010)、金丝桃苷对照品(纯度 \geq 98%,批号: MUST-16032113)、木犀草素对照品(纯度 \geq 98%,批号: MUST-16011015)均购自成都曼思特生物科技有限公司; 甲醇(HPLC 级,美国天有

※基金项目 江西民族药现代科技与产业发展协同创新中心开放基金项目(No. JXXT201402021)

*** 作者简介** 朱继孝,男,副教授,硕士研究生导师。研究方向:中药与民族药有效成分与作用机理。

▲通讯作者 曾金祥,男,副教授,硕士研究生导师。研究方向:中药与民族药物质基础与质量标准。Email: zjinxiang@163.com

• 作者单位 江西中医药大学中药资源与民族药研究中心(330004)

限公司),甲酸(HPLC级,山西西亚化工有限公司),水为Milli-Q系统纯化水(美国Millipore公司)。

无尾果由课题组采自云南怒江贡山县,经江西中医药大学钟国跃研究员鉴定为蔷薇科无尾果属植物无尾果(*C. longigolia* Maxim)的干燥全草。

2 方法

2.1 供试品溶液制备 无尾果粉碎,称取约2.0g置于50mL锥形瓶,加入25mL 75% 甲醇超声提取45min,抽滤、旋干、定容至5mL容量瓶中,取定容后药液过0.22 μ m微孔滤膜过滤,供UHPLC-Q-TOF-MS/MS分析。

2.2 标准品溶液的制备 分别精密称取2mg对照品(金丝桃苷、异槲皮苷、木犀草素)于5mL容量瓶中,用75%甲醇溶解稀释至刻度,过0.22 μ m微孔滤膜,待分析。

2.3 LC-MS条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱:YMC-ULtraHT Pro C18色谱柱(100 mm \times 3 mm,2 μ m);流动相:0.5% 甲酸水溶液(A),甲醇(B),梯度洗脱:0~30min,8%~60% B;30~40min,60%~95% B;40~42min,95%~8% B;42~47min,8%~8% B;流速:0.4mL/min;

柱温:32 $^{\circ}$ C;进样量:4 μ L。

2.3.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源(ESI),负离子模式;质量扫描范围 m/z 100~1000;喷雾电压:-4500V,雾化气温度:500 $^{\circ}$ C,气帘气:140.745kPa,辅助气:344.74 kPa;去簇电压(DP):-100V;采用AB analyst TF软件采集数据,TOF/MS一级预扫描和触发的二级扫描TOF/MS/MS离子累积时间分别为200、100 ms,碰撞能量CE为40eV,CES碰撞能量叠加为(40 \pm 10)eV。

2.4 数据处理 采用AB Sciex公司Peak View 1.6软件,对UHPLC-Q-TOF-MS/MS采集的数据进行处理。

3 结果

3.1 无尾果化学成分分析 采用UHPLC-Q-TOF-MS/MS对75%甲醇提取无尾果药材成分进行定性分析,(-)ESI-MS的质谱总离子流图(TIC)见图1。应用Peak View 1.6软件分析75%甲醇提取无尾果中各化学成分的保留时间及其质谱信息,并结合分子离子峰与对照品、相关文献报道数据进行对比,对其中的化学成分进行确认,初步鉴定出无尾果提取物中黄酮类化合物10个,见表1。

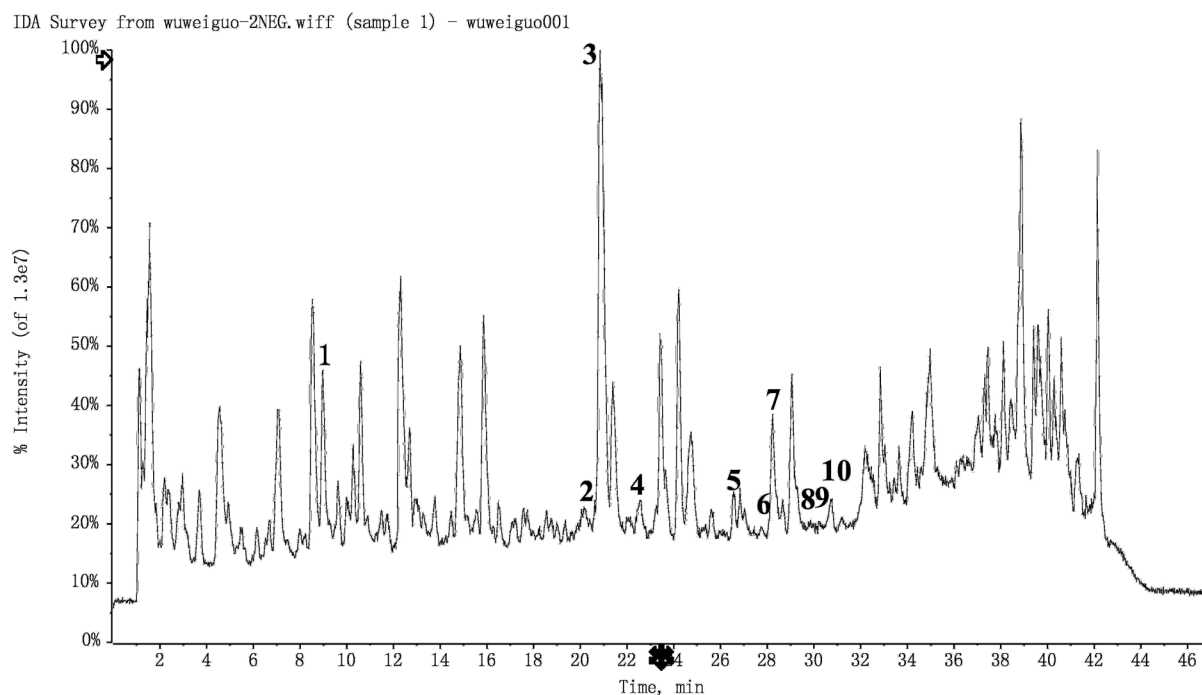


图1 无尾果提取物在负离子模式下总离子流图

表1 无尾果提取物的化学成分鉴定结果

Peak no	Compound identity	Formula	Rt (min)	Error (ppm)	Found at Mass (Da)	Fragment ions <i>m/z</i>
1	Catechin hydrate	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	8.97	4.4	289.0712	245.0826, 203.0715, 187.0398, 161.0603
2	Hyperoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	20.75	1	463.0681	301.0351, 272.0322, 255.0299, 243.0294, 178.9990, 151.0046
3	Miquelianin	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	20.86	0.5	477.0678	301.0362, 151.0052, 178.9993
4	Apigenin7 - glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	22.47	0.6	431.0966	311.0581, 269.0454, 225.0572, 200.0450,
5	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	26.57	3.1	301.0363	273.0393, 178.9981, 151.0043
6	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	27.75	2	285.0410	257.0450, 229.0501, 151.0046
7	Tiliroside	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	28.23	0.6	593.1304	447.0940, 327.0516, 307.0829, 285.0415, 284.0332, 255.0304, 227.0351, 163.0401
8	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	29.82	1.6	285.0399	257.0562, 257.0453, 229.0311, 211.0405, 187.0420
9	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	30.31	2.1	269.0461	241.0467, 225.0548, 201.0541, 197.0445, 159.0459
10	Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	30.61	2.8	315.0519	300.0275, 283.0245, 151.0048

3.2 化合物的质谱裂解特征 化合物 1_{t_R} 为 8.97min, 负离子模式下, 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 *m/z* 289.0712 [M-H]⁻, 其分子式为 C₁₅H₁₄O₆, 分子离子峰失去 CO₂ 得到碎片离子 *m/z* 245.0826, 碎片离子 *m/z* 245.0826 分别失去 C₂H₂O、C₃H₆O 得到碎片离子 *m/z* 203.0715、187.0398。碎片离子 *m/z* 203.0715 失去 C₂H₂O 得到碎片离子 *m/z* 161.0603, 裂解规律与文献一致。因此, 可以推测为儿茶素^[5]。

化合物 2_{t_R} 为 20.75min, 负离子模式下, 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 *m/z* 463.0681 [M-H]⁻, 其分子式为 C₂₁H₂₀O₁₂, 二级图谱与标准品一致, 二级图谱碎片离子峰为 *m/z* 301.0351、300.0278、271.0246、255.0299、243.0294、178.9990、151.0046。根据二级碎片离子 *m/z* 301.0351、300.0278、272.0322、255.0290、243.0294、178.9990、151.0046 推测为槲皮素母核, 分子离子峰, *m/z* 463.0681 失去一分子葡萄糖得到 *m/z* 301.0351, 而 *m/z* 301.0351 强度高于 *m/z* 300.0278 和碎片离子 *m/z* 271.0254、255.0299, 可以推测糖连接在 3 位, 见图 2a。因此, 推测此化合物为金丝桃苷^[6]。

化合物 3_{t_R} 为 20.86min, 负离子模式下, 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 *m/z* 477.0747 [M-H]⁻, 其分子式为 C₂₁H₁₈O₁₃, 分子离子峰失去一分子葡萄糖醛酸得到碎片离子 *m/z* 301.0362, 根据碎片离子 *m/z* 179.0344、151.0052、150.9874 推测 *m/z* 301.0362 为槲皮素母核。因此, 推测化合物 3 为槲皮素-3-O-葡萄糖醛酸, 裂解规律与文献一致^[6]。

化合物 4_{t_R} 为 22.47 min, 负离子模式下, 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 *m/z* 431.0970 [M-H]⁻,

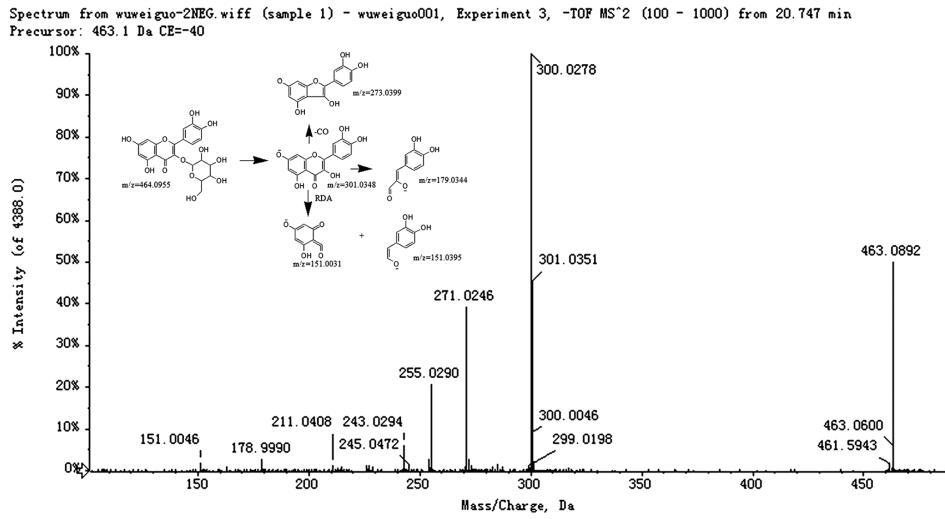
其分子式为 C₂₁H₂₀O₁₀, 分子离子峰失去 C₄H₈O₅ 得到碎片离子 *m/z* 311.0581, 失去一分子葡萄糖得到碎片离子 *m/z* 269.0454。碎片离子 *m/z* 269.0454 分别失去 CO₂ 和 C₃O₂ 得到碎片离子 *m/z* 225.0572、200.0450, 推测化合物 4 为芹菜素 7-O-葡萄糖苷, 裂解规律与文献一致^[7]。

化合物 5_{t_R} 为 26.57 min, 负离子模式下, 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 *m/z* 301.0363 [M-H]⁻, 其分子式为 C₁₅H₁₀O₇, 分子离子峰 *m/z* 301.0363 分别失去 CO、C₇H₆O₂ 得到碎片离子 *m/z* 273.0405、178.9982, 碎片离子 *m/z* 178.9982 失去 CO 得到碎片离子 *m/z* 151.0042, 推测此化合物为槲皮素, 裂解规律与文献一致^[8]。

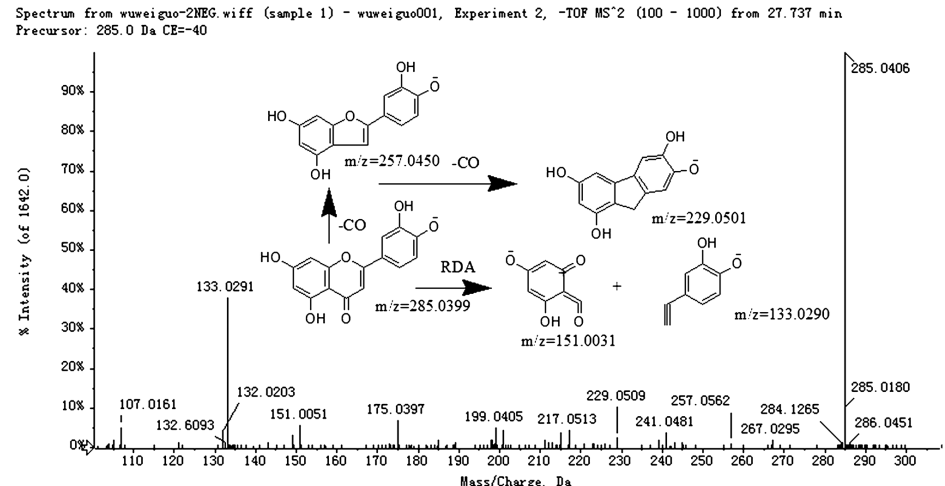
化合物 6_{t_R} 为 27.75 min, 负离子模式下, 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 *m/z* 285.0399 [M-H]⁻, 其分子式为 C₁₅H₁₀O₆, 二级图谱与对照品一致, 分子离子峰失去 CO 得到碎片离子 *m/z* 257.0562, 碎片离子 *m/z* 257.0450 失去 CO 得到碎片离子 *m/z* 229.0509。碎片离子 *m/z* 285.0399 发生 RDA 裂解得到碎片离子 *m/z* 151.0051、133.0291, 推测此化合物为木犀草素, 见图 2b, 裂解规律与文献一致^[9]。

化合物 7_{t_R} 为 28.23min, 负离子模式下, 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 *m/z* 593.1304 [M-H]⁻, 其分子式为 C₃₀H₂₆O₁₃, 碎片离子峰为 *m/z* 447.0940、327.0516、307.0829、285.0415、284.0332、255.0304、227.0351、145.0296, 分子离子失去 C₉H₆O₂ 得到碎片离子 447.0940, 碎片离子 *m/z* 447.0940 进一步失去 C₆H₁₀O₅ 产生碎片离子 *m/z* 285.0415, 推测中性丢失为葡萄糖基。由碎片离子 *m/z* 285.0415、284.0332、255.0304、227.0351 可以推断为

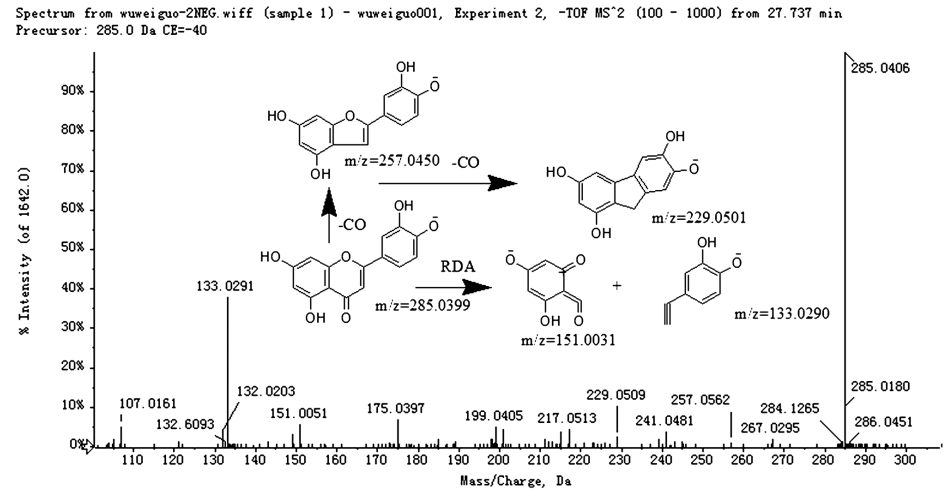
山奈酚母核。因此,推测此化合物为银锻苷^[9]。



a 金丝桃苷



b 木犀草素



c 芹菜素

图2 金丝桃苷、木犀草素和芹菜素的质谱图谱及裂解过程

化合物 8_{t_R} 为 29.82min, 负离子模式下, 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 m/z 285.0399 [M-H]⁻, 其分子式为 C₁₅H₁₀O₆, 分子离子峰 m/z 285.0399 分别失去 CO、C₄H₄O₃ 得到碎片离子 m/z 257.0450、187.0395, 碎片离子 m/z 257.0450 分别失去 CO 和 HCOOH 得到碎片离子 m/z 229.0501、211.0395, 推测化合物 8 为山奈酚, 裂解规律与文献一致^[10]。

化合物 9_{t_R} 为 30.31min, 负离子模式下, 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 m/z 269.0405 [M-H]⁻, 其分子式为 C₁₅H₁₀O₅, 分子离子峰 m/z 269.0405 分别失去 CO、CO₂、C₃O₂、C₂O₃ 得到碎片离子 m/z 241.0467、225.0548、201.0541、197.0445, 碎片离子 m/z 201.0541 失去 C₂H₂O 得到碎片离子 m/z 159.0459, 见图 2c, 推测化合物 9 为芹菜素, 裂解规律与文献一致^[11]。

化合物 10_{t_R} 为 30.61min, 负离子模式下, 高分辨 ESI-MS 准分子离子峰为 m/z 315.2549 [M-H]⁻, 其分子式为 C₁₆H₁₂O₇, 分子离子峰 m/z 315.2549 失去 CH₃ 得到 m/z 300.0275, 碎片离子 m/z 300.0275 失去 H₂O 得到碎片离子 m/z 283.0246, 先失去 C₇H₆O 再失去 CO 得到碎片离子 m/z 151.0048, 推测化合物 10 为异鼠李素, 裂解规律与文献一致^[12]。

4 讨论

藏药具有疗效明显、毒副作用小、资源丰富易得等优点, 属我国较有影响、较为完整的民族药之一。而无尾果化学成分相关的报道仍属空白。

UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术为化合物的鉴定提供了一种全新方法, 与传统化学成分分离鉴别方法相比操作简便、快速、准确, 已成为中药药效成分发现与鉴别的有力工具。本实验分析了无尾果甲醇提取物成分的质谱行为, 鉴别了 10 种黄酮类化合物。并进一步发现以槲皮素为母核的化合物如槲皮素-3-O 葡萄糖醛酸、金丝桃苷, 其特征碎片离子为 m/z 301; 芹菜素, 其特征碎片离子为 m/z 269; 木犀草素, 其特征碎片离子为 m/z 285, 为后续黄酮类化合物的鉴别提供了参考依据。

黄酮类化合物具有抗炎、镇痛、抗氧化、保肝、抗病毒等活性^[13], 如金丝桃苷具有抗炎镇痛的作用且通过抑制 NF-κB 的活化产生抗炎作用^[14]; 木犀草

素具有抗炎镇痛保护神经的作用, 其能降低炎症因子转录调节因子的活性, 减少促炎细胞因子和炎症介质的产生^[15]。这表明本实验推断出的黄酮类化合物, 在一定程度上阐明了无尾果的抗炎镇痛药效成分, 为无尾果的药理活性乃至质量控制提供了初步物质依据。从总离子流图可以看出, 仍有大量成分尚待进一步解析, 说明无尾果可能还存在其它抗炎镇痛药效成分, 相关工作正在进行之中。

参考文献

- [1] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 1991:350-351.
- [2] Li S L, Song J Z, Qiao C F, et al. A novel strategy to rapidly explore potential chemical markers for the discrimination between raw and processed Radix Rehmanniae by UHPLC-TOFMS with multivariate statistical analysis. [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2010, 51(4): 812-23.
- [3] Li Z, Song X, Fu Z, et al. Identification of the Major Constituents in Zhimu - Huangqi Herb - Pair Extract and Their Metabolites in Rats by LC-ESI-MS n[J]. Chromatographia, 2013, 76(13):767-780.
- [4] 刘祥东, 梁琼麟, 罗国安, 等. 液质联用技术在医药领域中的应用[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1):110-116.
- [5] 刘国强, 董静, 王弘, 等. 4 种儿茶素类化合物电喷雾质谱裂解规律的研究[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(8):1566-1570.
- [6] 张语迟, 刘春明, 刘志强, 等. 罗布白麻与罗布红麻的液相色谱-质谱联用分析[J]. 分析测试学报, 2009, 28(10):1148-1154.
- [7] 张维冰, 王智聪, 张凌怡. 超高效液相色谱-二极管阵列检测-串联质谱法测定菊花中的 10 种咖啡酰基奎宁酸和 22 种黄酮类化合物[J]. 分析化学, 2013, 41(12):1851-1861.
- [8] 李宇航, 戴海学, 汪明明, 等. 槲皮素的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 质谱学报, 2009, 30(6):374-378.
- [9] 李军茂, 何明珍, 欧阳辉, 等. 超高效液相色谱与飞行时间质谱联用快速鉴别木芙蓉叶的化学成分[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(14):1162-1168.
- [10] 梁艳, 于世锋, 陈卫军, 等. 山奈酚的电喷雾质谱裂解途径[J]. 应用化学, 2009, 26(10):1250-1252.
- [11] 丁健桦, 王兴祥, 张慧, 等. 芹菜素的电喷雾萃取电离串联质谱[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(8):1714-1719.
- [12] 李想. 黄酮醇类化合物 ESI-ITMS-n 质谱裂解规律的量子化学研究[D]. 佳木斯大学, 2015.
- [13] 阿布拉江·克依木. 黄酮苷类天然产物的质谱分析方法研究[D]. 中国协和医科大学, 2006.
- [14] 李锦松, 陈剑鸿, 孟民杰. 金丝桃苷药理作用及其作用机制的研究进展[J]. 广东药学院学报, 2015, 31(2):269-272.
- [15] 王继双, 何焱, 张文静, 等. 木犀草素的药理作用研究进展[J]. 生命科学, 2013, 25(6):560-565.