

谨以此文庆贺卢佩章院士 80 华诞 !

液质联用分析葛根提取物及中药片剂中异黄酮类化合物

田宏哲, 王 华, 关亚凤

(中国科学院大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要 :采用反相 C_{18} 毛细管液相色谱柱,以乙腈(含 0.1% (体积分数,下同)三氟乙酸)和水(含 0.1% 三氟乙酸)为流动相梯度洗脱,在 26 min 内分离了葛根异黄酮提取物以及愈风宁心片中的主要成分。采用毛细管液相色谱/四极杆飞行时间串联质谱仪对葛根提取物以及片剂中的几种主要异黄酮类化合物做了结构分析,发现葛根素是主成分(提取物中其平均质量分数是 13.32%;片剂中每片含量 19.28 ~ 24.34 mg)。对微量未知化合物,用它们的离子谱图与已知化合物的谱图比较,推测其成分为 3'-甲氧基葛根素和 3'-甲氧基大豆苷。

关键词 :反相毛细管液相色谱;液相色谱-电喷雾离子质谱;葛根异黄酮;葛根素;中药

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)05-0477-05

Separation and Identification of Isoflavonoids in *Pueraria lobata* Extracts and Its Preparations by Reversed-Phase Capillary Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry

TIAN Hongzhe, WANG Hua, GUAN Yafeng

(Dalian Institute of Chemical Physics, The Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract : Isoflavonoids in *Pueraria lobata* extract and its preparations were separated and identified by reversed-phase capillary liquid chromatography (RP-CapLC) coupled with photodiode array (PDA) detector and negative electrospray ionization quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. The separation was performed on a 150 mm \times 0.32 mm i. d., 5 μ m C_{18} capillary column, using mobile phase of 0.1% aqueous trifluoroacetic acid solution and acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid under gradient elution. The product ion spectra of the deprotonated ions allowed for the identification of puerarin, daidzin and daidzein in the sample. Puerarin was found to be the most abundant component in the extract (about 13%, mass fraction) and its preparations (19.28 - 24.34 mg per tablet). The structures of trace amount of unknown isoflavonoids were deduced based on the spectra of known compounds. They were proposed to be 3'-methoxypuerarin and 3'-methoxydaidzin.

Key words : reversed-phase capillary liquid chromatography; liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry; isoflavonoids of *pueraria lobata*; puerarin; traditional Chinese medicine

野葛(*Pueraria lobata* (willd.) Ohwi)为豆科(Leguminosae)葛属植物,是重要的药用植物之一^[1],其根为常用生药(其中黄酮类化合物的质量分数可达 10% ~ 14%),具有降低血管阻力,改善心、脑血液循环,减慢心率,降低心肌耗氧量等药理作用^[2,3],在肌体抗氧化、退热止汗、治呕吐、防治老年

痴呆症等方面也有治疗作用^[4,5]。葛根中主要异黄酮成分为葛根素(puerarin)、大豆苷(daidzin)、大豆苷元(daidzein)等,据报道这几类化合物都具有药理活性^[6,7]。

目前,对葛根异黄酮提取物的测定方法主要有高效液相色谱法、紫外分光光度法、薄层色谱法以及

收稿日期 2005-05-08

作者简介:田宏哲,女,博士研究生。

通讯联系人:关亚凤,男,研究员,博士生导师,Tel (0411)84379590,E-mail:kfguan@mail.dlptt.ln.cn.

基金项目:国家自然科学基金仪器专项基金资助项目(批准号 20227501)、中国科学院大型科学仪器装备支持计划项目和大连化学物理研究所科学创新项目。

毛细管电泳-紫外、荧光或者电化学检测法等^[8-13]。但上述方法无法对提取物中的未知化合物进行定性。液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)已广泛应用于未知化合物的定性分析^[14],尤其近年来发展起来的生物质谱采用软电离和串联质谱技术,可得到很强的分子离子峰以及易于解析的分子碎片峰,从而可确定基团的连接位置,进一步推断化合物的结构。

本文以优化的乙腈-水(含 0.1%(体积分数)三氟乙酸)流动相体系,用梯度洗脱模式分离了葛根提取物以及葛根制剂愈风宁心片中的主成分(葛根素、大豆苷、大豆苷元等);同时采用 LC-MS-MS 对提取物中的异黄酮类化合物进行定性。结果表明,该方法适用于上述活性成分的定性分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

毛细管液相色谱系统:Micro-Tech 毛细管液相色谱仪,四元梯度泵,Linear 200 UV-VIS 检测器,Chrom-Perfect 色谱工作站(Micro-Tech Scientific Inc)。LC-MS 联用系统:Waters 毛细管液相色谱(CapLC)系统,包括自动进样器、三元高压微流量泵系统、二极管阵列检测器(PDA)、电喷雾-四极杆飞行时间串联质谱仪(ESI-Q-TOF)(Waters 公司)和 Masslynx 质谱工作站。

试剂:乙腈,甲醇(色谱纯,Fluka 公司),实验用水为娃哈哈纯净水。乙醇、三氟乙酸、醋酸铵均为分析纯。葛根素、大豆苷元购自中国药品生物制品检定所(含量 $\geq 98\%$)。

1.2 样品的配制

葛根提取物(总异黄酮含量(质量分数) $\geq 40\%$)由西安天诚医药生物工程公司提供。精确称取葛根提取物 10 mg,置于 10 mL 容量瓶中,采用甲醇定容至刻度并摇匀。所有溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

葛根制剂愈风宁心片(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂)供试品溶液的制备:取本品一片(0.28 g/片),除去糖衣,研碎,精密称取 0.223 mg,放入 5 mL 带刻度离心管中,加入 5 mL 30%(体积分数,下同)乙醇,超声处理 30 min 后,冷却,用 30% 乙醇补足减少的体积。摇匀后,静置 1 h,然后离心(3 000 r/min)30 min,取上清液过滤,滤液作为供试品溶液,保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.3 分析条件

1.3.1 液相色谱条件

C_{18} 毛细管液相色谱柱(150 mm \times 0.32 mm i. d. 5 μm , Micro-Tech Scientific Inc)。流动相 A

为含 0.1%(体积分数,下同)三氟乙酸的乙腈溶液,流动相 B 为含 0.1% 三氟乙酸的水溶液,梯度洗脱:0~30 min,流动相 A 的体积分数由 5% 到 40%;在随后的 5 min,流动相 A 的体积分数为 95%。在下次分析前用体积分数为 100% 的流动相 B 平衡 10 min,流速 8.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。检测波长 248 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 320 nL。

1.3.2 液质联用分析条件

C_{18} 色谱柱(100 mm \times 0.32 mm i. d., 5 μm , Waters),流动相 A 为 10 mmol/L 醋酸铵乙腈溶液,流动相 B 为 10 mmol/L 醋酸铵水溶液,梯度洗脱:0~30 min,流动相 A 的体积分数由 5% 到 70%,流速 4.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。PDA 检测波长 210~400 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 200 nL。

质谱分别采用正、负离子检测模式:正离子模式下毛细管电压 3 030 V,锥孔电压 30 V。负离子模式下毛细管电压 -2 250 V,锥孔电压 35 V,扫描范围 m/z 200~800。干燥气为 N_2 ,流量 450 L/h,脱溶剂气温度 200 $^{\circ}\text{C}$,离子源温度 80 $^{\circ}\text{C}$ 。用氩气作碰撞气进行碰撞诱导裂解(CID),碰撞能量 15~35 eV。

2 结果与讨论

2.1 微柱液相色谱分离

葛属植物成分复杂,其中主要活性成分为异黄酮类化合物。目前在葛属植物中已经发现了大约 35 种异黄酮类化合物^[15],而在葛根提取物中主要存在葛根素、大豆苷、大豆苷元和染料木苷等异黄酮。在甲醇-水体系下,葛根提取物中的主成分葛根素与其他成分难以完全分离^[16]。本文采用乙腈-水体系,分离了葛根提取物中的几种异黄酮(见图 1)。葛根提取物中的主成分葛根素(平均质量分数为

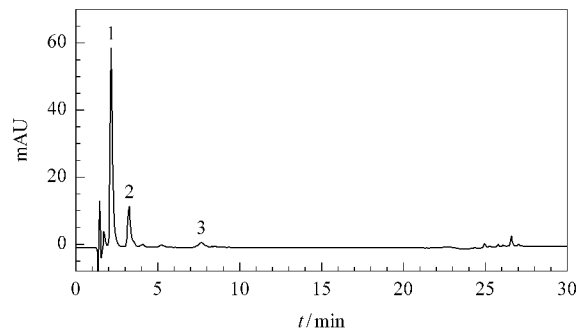


图 1 葛根提取物的液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of *Pueraria lobata* extract
Column: ODS C_{18} (150 mm \times 0.32 mm i. d., 5 μm). Mobile phase: A, acetonitrile containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid; B, 0.1% (v/v) aqueous trifluoroacetic acid solution; gradient: 0~30 min, 5% A \rightarrow 40% A. Flow rate: 8.0 $\mu\text{L}/\text{min}$. Detection wavelength: 248 nm. Injection volume: 320 nL.
Peaks: 1. puerarin; 2. daidzin; 3. daidzein.

13.32%)的保留时间、峰高和峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为1.18%、1.53%、3.18%($n=5$)。

2.2 葛根片剂的分析

采用上述优化条件,对愈风宁心片样品溶液进行测定,结果见图2。在葛根提取物样品中,葛根素的平均($n=5$)保留时间为2.14 min(见图1);而在片剂样品中,葛根素的平均($n=5$)保留时间为2.20 min(见图2)。片剂中葛根素(含量为19.28~24.34 mg/片)的保留时间、峰高和峰面积的RSD($n=5$)分别为1.26%、4.79%、7.17%,说明方法的重现性较好。因此采用该流动相组成和梯度洗脱方法,

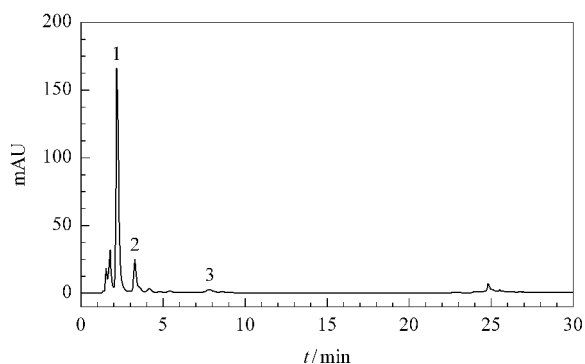


图2 愈风宁心片样品的液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of Yufeng Ningxin Tablet

For experimental conditions and peak identifications, see

Fig.1.

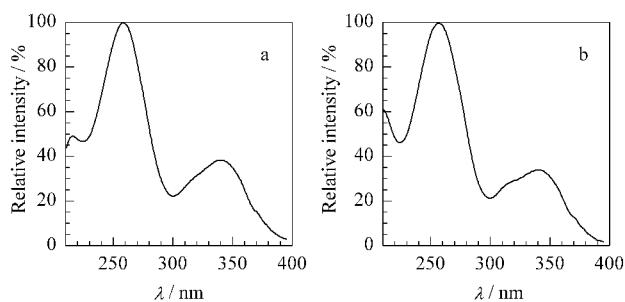


图4 图3中峰1(a)、峰2(b)、峰3(c)和峰4(d)的紫外光谱图

Fig.4 UV spectra of peaks 1(a), 2(b), 3(c), 4(d) in Fig.3

用葛根素和大豆苷元标样分别在正离子模式和负离子模式下直接进样,所得质谱图(未列出)表明,在正离子模式直接进样的情况下,由于加和离子的存在以及溶剂中杂质在该模式下易于离子化而形成干扰,谱图比较复杂,因此无法进行深入的解析。而在负离子模式下直接进样的谱图比较清晰,没有杂质峰干扰。因此,本文采用毛细管液相色谱与质谱联用,在负离子模式下进行分析,其总离子流图见图5。

从总离子流图中几个主要峰对应的质谱图(见图6)可以发现,图5中9.77 min流出峰的质谱特征峰的 m/z (见图6-c)与大豆苷元的质谱特征峰的 m/z 253($[M-H]^-$)相同,因此可以断定该峰为大

可以对中药提取物以及中药制剂中的葛根素进行定性分析。

2.3 葛根提取物的 LC-MS 分析

图3为采用二极管阵列检测器检测的葛根提取物的色谱图,图4为其中1,2,3,4号峰的紫外吸收光谱图。从图4中可看出,1,2,3,4号峰的紫外吸收光谱与异黄酮类化合物的紫外特征吸收峰相似。

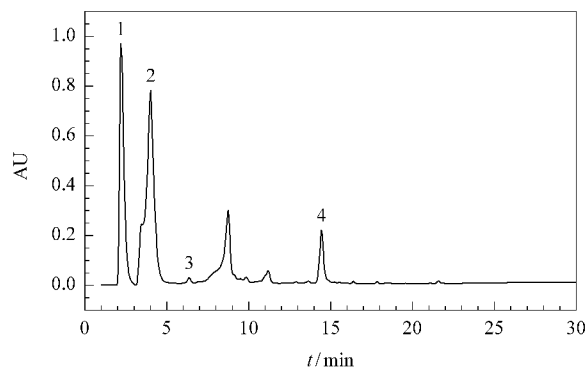


图3 葛根提取物的毛细管液相色谱图

Fig.3 PDA-CapLC chromatogram of *Pueraria lobate* extract

Column: Waters C_{18} (100 mm \times 0.32 mm i. d., 5 μ m).

Mobile phase: A, acetonitrile containing 10 mmol/L NH_4Ac ; B, 10 mmol/L aqueous NH_4Ac solution; gradient: 0–30 min, 5% A \rightarrow 70% A. Flow rate: 4.0 μ L/min. Injection volume: 200 nL.

Peaks: 1. puerarin; 2. daidzin; 3. daidzein; 4. unknown.

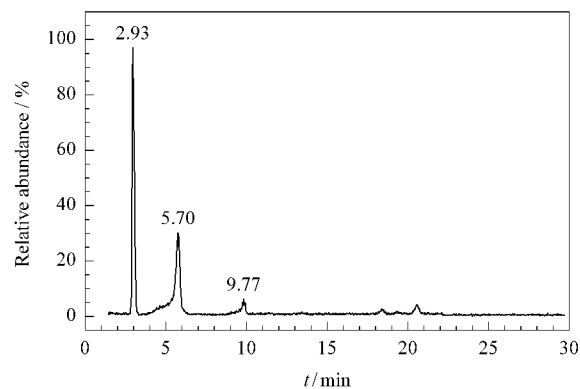


图5 葛根提取物的总离子流色谱图

Fig.5 LC-MS total ion current chromatogram of *Pueraria lobate* extract

豆昔元。图 5 中 5.70 min 流出峰的质谱特征峰(见图 6-b)的 m/z 值与葛根素和大豆昔的相同,但无法确定是这两种异构体中的哪一种化合物,因此采用 LC-MS/MS 对该峰进一步进行碎片分析,谱图见图 7。从文献 [14] 可知,葛根素在 8 位形成糖苷,属于碳苷类异黄酮;而大豆昔在 7 位形成单糖链苷,属于氧苷类异黄酮。氧苷类异黄酮的单糖链与异黄酮通过 C—O 键相连,其稳定性弱于通过 C—C 键相连的碳苷,因此在形成子离子时,主要失去了相对分

子质量(M_r)为 162 的碎片离子,形成糖苷配基——大豆昔元的脱质子峰,其 m/z 为 253。因此可以推断,图 5 中 5.70 min 流出峰为大豆昔。从图 6-a 可以看到,图 5 中 2.93 min 流出峰是多组分。我们分别以 m/z 415, 445, 546 为母离子进行 MS/MS 分析,结果见图 8, 9 和 10。从图 8 可以看出,在碰撞能量仅为 15 eV 时,该化合物即失去了 M_r 为 120 的碎片离子而形成 m/z 297 的子离子,因此可以推断其为碳苷类异黄酮——葛根素。

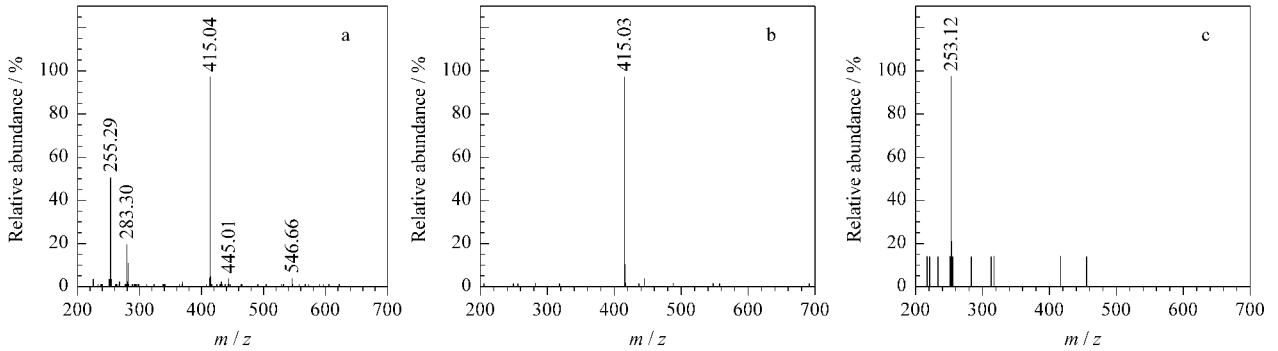


图 6 图 5 中主要峰所对应的质谱图

Fig. 6 MS spectra of the major peaks in Fig. 5

Retention times of peaks in Fig. 5 : a. 2.93 min ; b. 5.70 min ; c. 9.77 min.

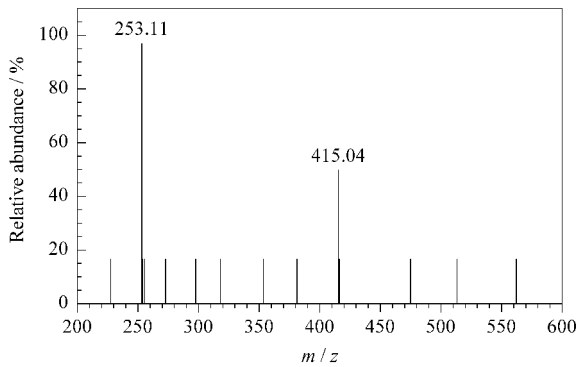


图 7 图 6-b 中质谱特征峰(m/z 为 415)的 LC-MS/MS 谱图

Fig. 7 Product ion spectrum of the ion at m/z 415 in Fig. 6-b

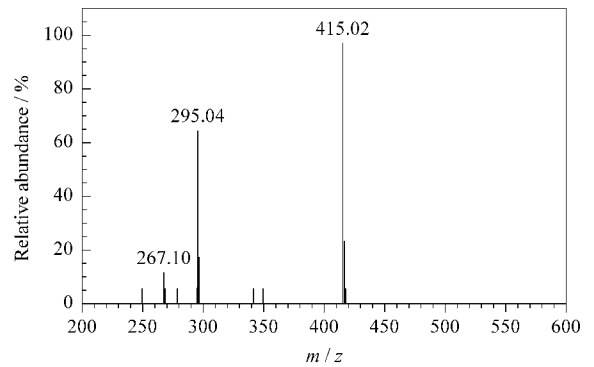


图 8 图 6-a 中以 m/z 415 为母离子的子离子谱图

Fig. 8 Product ion spectrum of the ion at m/z 415 in Fig. 6-a

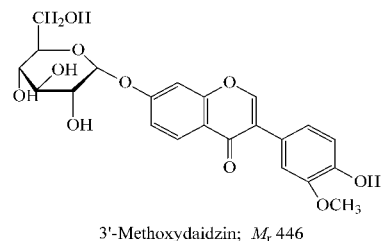
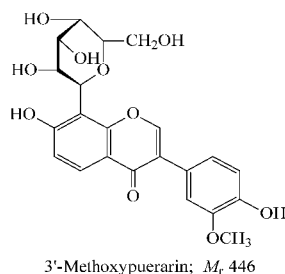
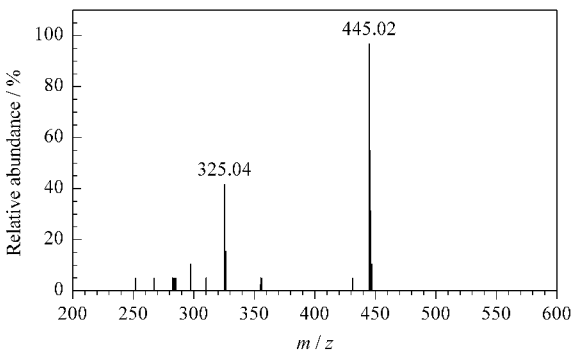


图 9 图 6-a 中以 m/z 445 为母离子的子离子谱图及据此推测的化合物结构

Fig. 9 Product ion spectrum of the ion at m/z 445 in Fig. 6-a and their proposed structures

从图9可以看到,母离子445失去一个 M_r 为120的碎片离子形成325.04的子离子峰,随后的碎裂片断既包含了氧苷也包含了碳苷的碎裂途径^[14],因此推断该化合物可能是3'-甲氧基葛根素和3'-甲氧基大豆苷的混合物。图10为图5中2.93 min流出的峰以 m/z 546为母离子进行分析得到的子离子谱图,该母离子的碎片峰没有给出太多的结构信息,虽然与7-木糖葛根素(见图11)的特征峰 m/z 547($[M-H]^-$)相似,但目前还无法确定该化合物结构。

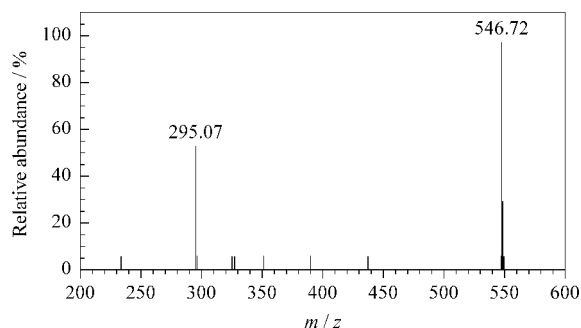


图10 图6-a中以 m/z 546为母离子的子离子谱图
Fig. 10 Product ion spectrum of the ion at m/z 546 in Fig. 6-a

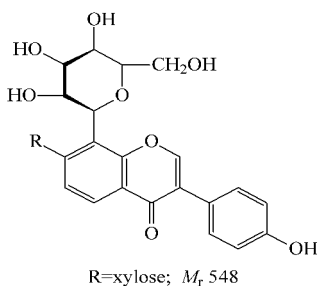


图11 7-木糖葛根素的结构

Fig. 11 Structure of 7-xylosepuerarin

2.4 愈风宁心片样品的LC-MS/MS分析

对该样品进行负离子模式的液质联用分析结果见图12。从其总离子流图中各峰所对应的质谱图

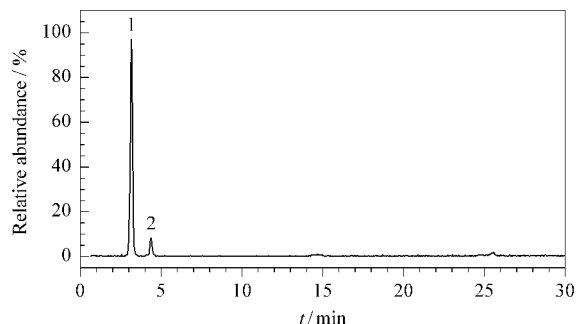


图12 愈风宁心片样品在负离子模式下的总离子流图
Fig. 12 LC-MS total ion current chromatogram of Yufeng Ningxin Tablet

Peaks: 1. puerarin; 2. daidzin.

(图略)可确定图12中3.15 min流出峰主要为葛根素,4.34 min流出峰为大豆苷。由于大豆苷元含量低,因此在联用分析中未被检测到,但在质谱直接进样分析中发现存在微量的大豆苷元以及 m/z 为445/546的化合物。对分子离子峰为 m/z 445的化合物进行串联质谱分析,与葛根提取物中 m/z 为445的化合物碎裂片断相同,可以确定为3'-甲氧基葛根素和3'-甲氧基大豆苷的混合物,而分子离子峰为 m/z 546的化合物目前还无法确定结构。

3 结语

本文以乙腈-水为流动相,在反相色谱中分离了葛根提取物以及中药片剂中的主要成分。采用液质联用方法对提取物及其片剂中的主成分进行了定性,并对其中两种微量成分的结构进行了推测。但另外一种微量成分目前还无法确认,对其结构需要进一步深入地研究。

参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China, Vol 1. Beijing: Chemical Industry Press (中国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社), 2000. 273
- [2] Lai Yanglin, Tang Bing. China Journal of Chinese Materia Medica (赖洋林, 唐冰. 中国中药杂志), 1989, 14(5): 52
- [3] Luo Qizhi, Dai Kaijin, Ma Ande, Luo Jiabo. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (罗奇志, 戴开金, 马安德, 罗佳波. 药物分析杂志), 2004, 24(1): 11
- [4] Keung W M, Vallee B L. Phytochem, 1998, 47(4): 499
- [5] Song Hongjie, Zeng Ming, Hu Jinhong, Wang Daye, Zhang Hanming. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (宋洪杰, 曾明, 胡晋红, 王大业, 张汉明. 药物分析杂志), 2000, 20(4): 223
- [6] Rong H J, Stevens J F, Deizer M L, De Cooman L, De Keukeleire D. Planta Medica, 1998, 64(7): 620
- [7] Zhao Xiaoli, Cui Xiaobing, Di Liuqing. China Journal of Chinese Materia Medica (赵晓莉, 崔小兵, 狄留庆. 中国中药杂志), 2000, 25(7): 413
- [8] Chen G, Zhang J X, Ye J N. J Chromatogr A, 2001, 923: 255
- [9] Cao X L, Tian Y, Zhang T Y, Li X, Ito Y. J Chromatogr A, 1999, 855: 709
- [10] Chen G, Zhang J X, Ye J N. Analyst, 2000, 125: 815
- [11] Wang C C, Prasain J K, Barnes S. J Chromatogr B, 2002, 777: 3
- [12] Jiang R W, Lau K M, Lam H M, Yam W S, Leung L K, Choi K L, Waye M M Y, Mak T C W, Woo K S, Fung K P. J Ethnopharmacol, 2005, 96(1-2): 133
- [13] Benlhabib E, Baker J I, Keyler D E, Singh A K. Biomed Chromatogr, 2004, 18(6): 367
- [14] Prasain J K, Jones K, Kirk M, Wilson L, Smith-Johnson M, Weaver C, Barnes S. J Agric Food Chem, 2003, 51: 4213
- [15] Cao Zhongling, Li Jianbei, Zhang Dongming. Journal of Chinese Medicinal Materials (曹钟灵, 李建北, 张东明. 中药材), 2005, 28(1): 67
- [16] Li Meiqing, Sheng Xuan, Shao Xueguang. Chinese Journal of Analytical Chemistry (李梅青, 盛旋, 邵学广. 分析化学), 2003, 31(2): 178