



UPLC-MS 分析侧柏叶中黄酮类化合物

单鸣秋, 钱雯, 高静, 池玉梅, 张丽, 丁安伟*

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的:采用超高效液相色谱-质谱仪联用技术(UPLC-MS)对侧柏叶中黄酮类成分进行分析和鉴别。方法:用 Waters BEH C₁₈柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。流动相为0.2%甲酸水溶液-甲醇梯度洗脱,使用ESI离子源,在负离子模式下采集数据。结果:推断出侧柏叶中11个黄酮类化合物,并探讨了黄酮类化合物的电喷雾/串联质谱(ESI-MS-MS)的裂解方式。结论:经过超高效液相色谱的分离,利用质谱测定提供的准确质量数,结合紫外光谱的信息可以鉴定侧柏叶中主要的黄酮类成分。探讨了黄酮类化合物的电喷雾/串联质谱(ESI-MS/MS)的裂解方式,为其成分鉴定提供了准确有效的方法。

[关键词] 超高效液相色谱-质谱联用;侧柏叶;黄酮

侧柏叶为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥枝梢及叶,其性味苦涩、性寒,具有凉血止血的功效^[1]。近年来,高效液相色谱法已成为分析侧柏叶黄酮类化合物的主要方法^[1-3]。但有关采用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-MS)对侧柏叶的研究目前还未见报道。本实验利用 UPLC-MS 技术分析、推测了侧柏叶中的11种黄酮类化合物。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Waters Acquity 超高效液相色谱仪,配有二极管阵列(DAD)检测器;Q-TOF micro 质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI);Masslynx 4.1 工作站。

槲皮苷(中国药品生物制品检定所,批号111538-200403),槲皮素(中国药品生物制品检定所,批号100081-200406),芹菜素(上海融禾医药科技有限公司,批号080531),异槲皮苷、穗花杉双黄酮(上海顺勃生物工程技术有限公司),杨梅素(南京泽朗医药科技有限公司)。甲醇(色谱纯),水(高纯水)。其它试剂为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 色 谱 条 件

Waters BEH C₁₈柱(2.1 mm×50

mm, 1.7 μm)。流动相为0.2%甲酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(表1)。流速0.208 mL·min⁻¹;柱温30℃;DAD记录205~400 nm 紫外光谱。

表1 流动相梯度

t/min	0.2% 甲酸水溶液/%	甲醇/%
0.00	95.00	5.00
1.80	70.00	30.00
15.80	55.00	45.00
17.80	50.00	50.00
25.80	15.00	85.00
27.80	5.00	95.00
29.80	95.00	5.00
30.00	95.00	5.00

1.2.2 质 谱 条 件 电喷雾负离子模式检测;扫描范围 m/z 100~1 000;毛细管电压2.8 kV;样品孔电压20 V;MCP检测电压2.1 kV;喷雾气流量50 L·h⁻¹,脱溶剂气流量350 L·h⁻¹;脱溶剂温度300℃;离子源温度100℃;碰撞能量25 V。

1.2.3 样 品 制 备 取侧柏叶粉末1 g,精密称定,置于50 mL锥形瓶中,加25 mL甲醇,密塞,超声处理1 h(工作频率40 kHz,功率250 W),冷却后过滤,将滤渣用少量甲醇洗涤,洗涤液与滤液合并,转移至50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜过滤,即得。

2 结 果

2.1 色 谱 特 征

经 UPLC-MS/MS 分析,在360 nm提取的紫外色谱图与质谱检测的选择离子色谱图基本吻合(图

[稿件编号] 20101012012

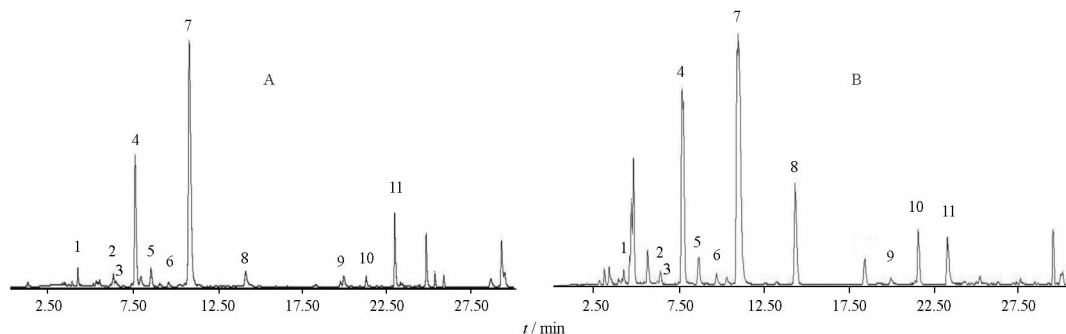
[基金项目] 国家“十一五”科技攻关项目(2006BAI09B06-02)

[通信作者] * 丁安伟,教授,博士生导师, Tel: (025) 85811523, E-mail: awding105@163.com

[作者简介] 单鸣秋,讲师,博士研究生, Tel: (025) 85811519, E-mail: shanmingqiu@163.com

1)。因黄酮类化合物有较多的羟基,可形成稳定的氧负离子,故采用负离子模式检测,使总离子流色谱

图有较低的背景值,并且负离子模式形成的母离子通常为 $[M-H]^-$,比较单一,易于辨认。



A. UPLC 色谱图(360 nm) B. 总选择离子流图。

图 1 侧柏叶 UPLC-MS 图

2.2 光谱特征

紫外光谱显示,UPLC 分离的化合物均有 2 个强度相近的吸收带。其中带 I 的最大吸收波长(λ_{max})主要分布在 330 ~ 360 nm,带 II 的 λ_{max} 主要

分布在 250 ~ 270 nm。各色谱峰对应的紫外 λ_{max} (表 2)。吸收带位置和形状显示符合黄酮类化合物的紫外吸收特征。

2.3 质谱特征

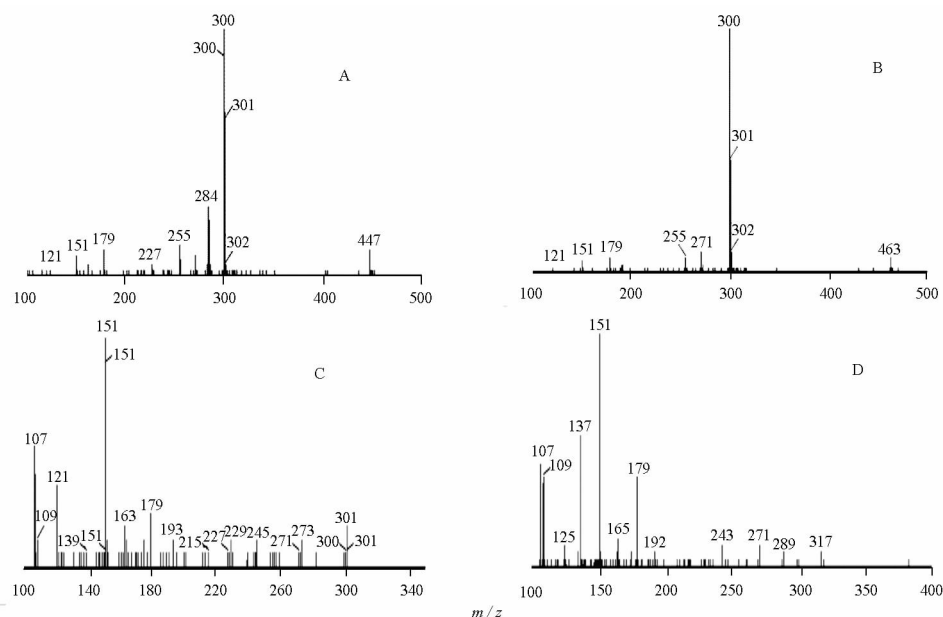
表 2 UPLC 分离化合物的质谱及紫外光谱数据

化合物	t_R /min	精确相对分子质量	分子式	碎片离子质荷比(m/z)	吸收带 I	吸收带 II
1	4.24	609.133 9	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609, 463, 447, 301, 179	347	268
2	6.37	625.125 2	$C_{27}H_{30}O_{17}$	625, 479, 463, 317	354	270
3	6.48	479.081 8	$C_{21}H_{20}O_{13}$	479, 317, 179, 151	335	270
4	7.65	463.038 4	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463, 317, 179, 151, 137	351	261
5	8.59	463.059 4	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463, 301, 179, 151, 121	353	255
6	9.68	463.069 9	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463, 301	340	270
7	10.84	447.041 6	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447, 301, 179, 151, 121	349	256
8	14.16	431.062 8	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431, 285, 179, 151	342	264
9	19.76	269.026 3	$C_{15}H_{10}O_5$	269, 151, 117	343	267
10	21.32	537.075 0	$C_{30}H_{18}O_{10}$	537, 417, 375, 331, 309	338	269
11	23.04	537.052 6	$C_{30}H_{18}O_{10}$	537, 417, 375, 331, 257	330	272

二级质谱分析结果显示,黄酮苷的 ESI/Q-TOFMS/MS 的裂解在糖基和苷元之间(表 2),主要化合物的二级质谱图(图 2)。根据丢失碎片的质量数和裂解规律,推测 UPLC 分离的化合物为单糖苷,主要为六碳糖苷(162)和五碳糖苷(146)。苷元碎片的质荷比分别为 m/z 317, 301, 285。利用 Masslynx4.1 软件,检索母离子 $[M-H]^-$ 的元素组成,结合考虑 UV 光谱图与不饱和度的合理性,检索所得的分子式、检索结果及二级质谱数据(表 2)。

3 讨论

在二级质谱中,发现有碎片 m/z 301, 317, 推测可能为槲皮素和杨梅素的糖苷脱糖后裂解形成的碎片峰,对二者的对照品在相同条件下进行质谱解析。通过检索槲皮素和杨梅素的二级质谱,碎片 m/z 179, 151, 137, 121 的元素组成依次为 $C_8H_3O_5$, $C_7H_3O_4$, $C_7H_5O_3$, $C_7H_5O_2$ 。分析两者的碎片情况,结合考虑结构特征,推测黄酮醇的裂解在 C 环 2 位于 1 位和 3 位之间, m/z 137, 121 分别为杨梅素和槲皮素 B 环连 2 位碳碎片, m/z 179 为



A. 檞皮苷; B. 异檞斗皮苷; C. 檞皮素; D. 杨梅素。

图 2 侧柏叶主要化合物的二级质谱图

A 环与 C 环部分, m/z 151 是 m/z 179 失去 CO 的产物。其裂解情况与样品中 m/z 301 和 317 相同, 因此认为檞皮素和杨梅素为侧柏叶中多数黄酮苷的苷元。

UPLC 对侧柏叶中多个色谱峰进行了分离, 采用对照品在相同条件下分析, 结果表明, 5, 7, 9, 10

号峰, 分别依次与异檞皮苷、檞皮苷、芹菜素和穗花杉双黄酮的保留时间、光谱特征和质谱特征一致。利用 Q-TOF 的碎片离子的精确质量数, 检索碎片离子元素组成, 分析裂解方式, 结合保留时间和紫外光谱特征, 推测该 11 个化合物的结构 (图 3)。

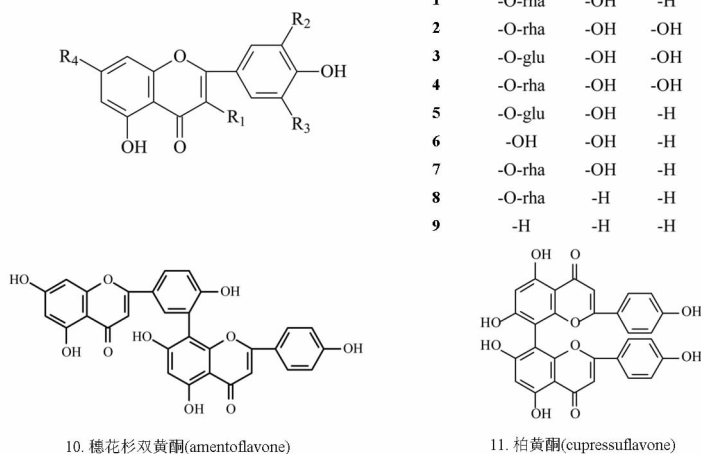


图 3 UPLC-MS 分离推测侧柏叶中 11 个化合物的结构

通过超高效液相色谱与电喷雾质谱联用, 通过

质谱和紫外光谱特征, 可以分析侧柏叶中的黄酮类



化合物,并为其中黄酮类化合物的鉴定提供了快速准确的方法。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2005:149.
[2] 郑冰珊,陈晓城,林崇良. HPLC测定侧柏叶颗粒中槲皮苷含

量[J]. 江西中医药,2007,(2):50.

[3] Lu Y H, Liu Zh Y, Wang Zh T, et al. Quality evaluation of *Platycladus orientalis* (L.) Franco through simultaneous determination of four bioactive flavonoids by high-performance liquid chromatography[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41(4):1186.

Analysis of flavonoids in Platycladi Cacumen by UPLC-MS

SHAN Mingqiu, QIAN Wen, GAO Jing, CHI Yumei, ZHANG Li, DING Anwei*

(Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the flavonoids in Platycladi Cacumen. **Method:** The constituents in Platycladi Cacumen were determined by UPLC-MS. A Waters BEH C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm) was used with a gradient elution of methanol-water containing 0.2% formic acid. The mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector and operated in data was collected under the negative ion modes. **Result:** Eleven constituents were identified. **Conclusion:** In this study, the main flavonoids in Platycladi Cacumen were separated by UPLC, and identified through the information of mass number and UV spectra. With the information of MS/MS from flavonoids, the modes of breaking up flavonoids were discussed. It is an accurate and effective method which can be applied for the constituent identification of Platycladi Cacumen.

[Key words] UPLC-MS; Platycladi Cacumen; flavonoids

doi:10.4268/cjcm20111218

[责任编辑 丁广治]