

HPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析天葵子乙醇提取物中化学成分

闫秋莹^{1,2}, 程海波¹, 孙东东^{1*}, 谭佳妮¹, 窦志华^{2*}

- (1. 南京中医药大学转化医学研究中心, 国家中医药管理局名医验方评价与转化
重点实验室, 江苏省抗肿瘤验方研究与产业化工程实验室, 南京 210023;
2. 南京中医药大学药学院, 南京 210023)

[摘要] **目的:**采用高效液相色谱与电喷雾四极杆飞行时间质谱仪串联技术(HPLC-ESI-Q-TOF-MS)对天葵子 95%乙醇提取部位中的化学成分进行定性分析。**方法:**采用液质联用色谱方法(LC-MS-MS), C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相梯度洗脱, 质谱使用 ESI 离子源, 正离子模式采集数据。质量扫描范围为 m/z 50 ~ 1 500。**结果:**通过质谱数据分析, 并与相关文献对照, 从天葵子 95%乙醇提取部位共鉴定出 11 种化合物, 分别为 4-(甲氧羰基)-2-氨基丁酸、紫草甙、楼斗菜内酯、蝙蝠葛内酯、蝙蝠葛甙、菲律宾厚壳树苷、天葵甙、橙黄胡椒酰胺、对苯二甲酸二丁酯、胡萝卜苷及邻苯二甲酸-2-乙基-己酯。**结论:**基于 HPLC-ESI-Q-TOF 技术, 通过高效液相色谱分离, 质谱测定相对分子质量、裂解数据, 文献分析检索, 能够快速准确地对天葵子 95%乙醇提取部位的化学成分进行分离鉴定, 为进一步研究天葵子的药效物质基础提供有力证据。

[关键词] 天葵子; 乙醇提取部分; 化学成分; 高效液相色谱串联电喷雾四极杆飞行时间质谱仪

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0042-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016150042

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160628.1133.008.html>

[网络出版时间] 2016-06-28 11:33

Chemical Constituents in Ethanol Extract from *Semiaquilegiae Radix* Based on HPLC-ESI-Q-TOF-MS

YAN Qiu-ying^{1,2}, CHENG Hai-bo¹, SUN Dong-dong^{1*}, TAN Jia-ni¹, DOU Zhi-hua^{2*}

- (1. *Translational Medicine Center, Nanjing University of Chinese Medicine, Key Laboratory of Famous Doctors' Proved Recipe Evaluation and Transformation Under State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Laboratory of Proved Anticarcinoma Recipe Research and Industrialization Engineering, Nanjing 210023, China*; 2. *College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

[Abstract] **Objective:** To analyze the chemical constituents of 95% ethanol extract of *Semiaquilegiae Radix* by using HPLC-ESI-Q-TOF-MS. **Method:** C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was adopted, with acetonitrile-0.1% formic acid as the mobile phase for gradient elution; ESI ion source was used as mass spectra, and the data were collected in the positive mode. The mass scanning range was between m/z 50-1 500. **Result:** Eleven components were identified from 95% ethanol extract of *Semiaquilegiae Radix* by analyzing mass spectra

[收稿日期] 20150730(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373511);国家自然科学基金青年项目(81403079);江苏省自然科学基金项目(BK20141467)

[第一作者] 闫秋莹, 在读硕士, 从事中药成分分析及药效研究, Tel:025-85811145, E-mail: nzyyyq@163.com

[通讯作者] * 孙东东, 博士, 副研究员, 从事中药复方化学成分研究, Tel:025-85811006, E-mail: sun_21373@163.com;

* 窦志华, 博士, 教授, 从事中药药剂及分析研究, Tel:025-85811001, E-mail: zhihuadou@163.com

information, and comparing with data from relevant literatures. **Conclusion:** Based on HPLC-ESI-Q-TOF-MS technology, relative molecular mass and spectrometry pyrolysis data were determined, and chemical components of *Semiaquilegiae Radix* were determined by literature analysis and retrieval. This study provides powerful evidence for further studying the pharmacodynamics material basis of *Semiaquilegiae Radix*.

[**Key words**] *Semiaquilegiae Radix*; ethanol extract; chemical constituent; HPLC-ESI-Q-TOF-MS

天葵子具有清热解毒、消肿散结的功能,主要用于治疗痈肿疔疮、乳痈、瘰疬、虫蛇咬伤^[1]。目前从天葵子中分离鉴定出的化合物主要有生物碱类、酚酸类、内酯类等^[2-6]。液质联用技术(LC-MS-MS)将液相的高效分离能力和质谱的结构鉴别功能有机结合,可以准确地测定保留时间、相对分子质量、裂解规律等,已经被广泛地应用于中药化学成分分析及结构鉴定^[7-8]。目前对于天葵子中化学成分的研究报道较少,液质联用方法对其化学成分的研究更是未见报道,本试验采用 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 技术,获取化合物离子荷质比、保留时间以及其二级质谱信息,通过与相关文献报道信息进行匹配,对天葵子药材 95% 乙醇提取部位中的主要化学成分进行快速分析鉴定,便于进一步研究阐明天葵子的药效物质基础。

1 材料

SCIEX Triple TOF 5600 型质谱仪(包括 Analyst TF1.6 Software,美国 AB 公司),LC-20A 型高效液相色谱仪(配有 DGU-20A3 型在线脱气机,LC-20AD XR 型泵,SIL-20A XR 型自动进样器及 CTO-20AC 柱温箱,日本 Shimadzu 公司),Peak View 质谱分析软件(美国 AB 公司),95% 乙醇工业纯,蒸馏水自制,石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲醇分析纯,乙腈、甲酸色谱纯。HH-ZK4 型水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司),AR2202CN 型千分之一电子天平(奥豪斯仪器上海有限公司),CPA225D 型 1/万电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),KQ500 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),电热鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂),台式冷冻离心机(美国 Thermo 公司),Pall 超纯水系统(美国 Pall 公司)。天葵子药材产于陕西,药材经南京中医药大学陈建伟教授鉴定为毛茛科植物天葵 *Semiaquilegia adoxoides* 的干燥块根。

2 方法

2.1 LC 检测条件 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~10 min,10% B;10~20 min,10%~15% B;20~26 min,15%~20% B;26~36

min,20%~25% B;36~40 min,25%~30% B;40~44 min,30%~40% B;44~52 min,40%~60% B;52~56 min,60%~70% B;56~60 min,70%~95% B;60~64 min,90% B;64~66 min,90%~5% B),柱温 40 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,进样量 5 μL。

2.2 MS 检测条件 电喷雾离子源(ESI)正离子模式,多反应监测(MRM),离子喷雾电压(IS)5 500.00 V,去簇电压(DP)100 V,碰撞电压(CE)50.0 V,雾化气 55.00 psi,辅助加热器 55.00 psi。气帘气(CUR)35.00 psi,去溶剂温度(TEM)500.00 ℃,碰撞活化扫描(CES)为 15.0,TOF MASSES(DA):Min = 50.0000,Max = 1 500.0000。

2.3 供试品溶液的制备 取天葵子药材 15 kg,粉碎后加入 95% 乙醇浸泡,10 倍量 95% 乙醇回流提取 3 次(2,1.5,1 h),过滤,合并 3 次所得滤液,减压回收乙醇得 95% 乙醇提取浸膏;滤渣加入 8 倍量 60% 乙醇回流提取 3 次(2,1.5,1 h),过滤,合并 3 次所得滤液,减压回收乙醇得 60% 乙醇提取浸膏;滤渣加入水提取 2 次,第一次加入 10 倍量水加热提取 2 h,第二次加入 8 倍量水加热提取 1.5 h,趁热过滤,合并 2 次滤液,减压浓缩得水提取浸膏。称取上述所得 95% 乙醇提取物浸膏 0.100 0 g 至 25 mL 量瓶中,加入 70% 甲醇,超声 3 min 使其溶解,定容至刻度,13 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清,即得。

3 结果

3.1 LC-MS 成分鉴定 使用 LC-MS-MS 对天葵子 95% 乙醇提取物中化学成分进行定性分析,ESI 正离子模式下的质谱总离子流(TIC)见图 1。

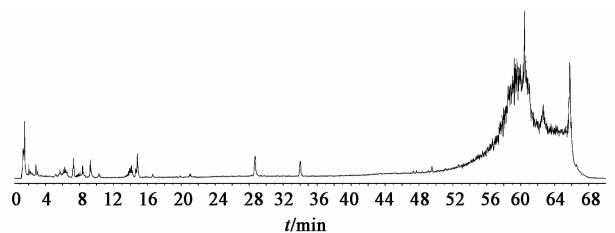


图 1 天葵子 95% 乙醇提取物正离子模式下 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 总离子流

Fig.1 Positive total ion chromatogram of 95% ethanol extract of *Semiaquilegiae Radix* by HPLC-ESI-Q-TOF-MS

3.2 天葵子 95% 醇提部分化学成分分析 通过 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 检测得到天葵子 95% 乙醇提取部位各化学成分的保留时间及质谱裂解信息,通

过总离子流图及相关文献数据对比分析,对天葵子提取物中的化学成分进行确认,分离得到 11 个化合物,见表 1。

表 1 天葵子 95% 乙醇提取物化学成分分析

Table 1 Analysis on chemical composition of 95% ethanol extract of Semiaquilegiae Radix

No.	t_R /min	理论相对分子质量	实测相对分子质量	分子式	化合物
1	1.25	162.068 8	162.075 7	$C_6H_{11}NO_4$	4-(甲氧羰基)-2-氨基丁酸
2	2.86	330.111 0	330.118 4	$C_{14}H_{19}NO_8$	紫草氰苷
3	4.58	153.054 6	153.054 5	$C_8H_8O_3$	稜斗菜内酯
4	4.58	153.054 6	153.054 5	$C_8H_8O_3$	蝙蝠葛内酯
5	5.72	314.123 6	314.124 3	$C_{14}H_{19}NO_7$	蝙蝠葛氰苷
6	6.78	312.107 8	312.107 9	$C_{14}H_{17}NO_7$	菲律宾厚壳树苷
7	7.92	450.137 0	450.137 3	$C_{19}H_{25}NO_{10}$	天葵氰苷
8	51.91	445.212 2	445.212 5	$C_{27}H_{28}N_2O_4$	橙黄胡椒酰胺
9	58.58	279.159 1	279.159 0	$C_{16}H_{22}O_4$	对苯二甲酸二丁酯
10	61.10	615.402 2	615.401 5	$C_{30}H_{60}O_6$	胡萝卜苷
11	63.20	391.284 3	391.281	$C_{24}H_{38}O_4$	邻苯二甲酸-二-2-乙基-己酯

3.3 根据质谱裂解特征鉴定天葵子中的化学成分 t_R 为 1.25 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 162 $[M + H]^+$, 脱去羟基后形成特征碎片 m/z 146 $[M + H - OH]^+$; 脱去甲氧基形成特征碎片 m/z 132 $[M + H - CH_3O]^+$; 脱去 $C_3H_6O_3$ 形成特征碎片 m/z 72 $[M + H - C_3H_6O_3]^+$ 等碎片峰, 见图 2A, 根据元素组成, 该化合物的分子式为 $C_6H_{11}NO_4$, 据文献报道天葵子中存在的 4-(甲氧羰基)-2-氨基丁酸相对分子质量为 161, 据此推测该化合物为 4-(甲氧羰基)-2-氨基丁酸^[2]。

文献报道天葵子中存在的稜斗菜内酯相对分子质量为 152, 据此推测该化合物为稜斗菜内酯^[2]。

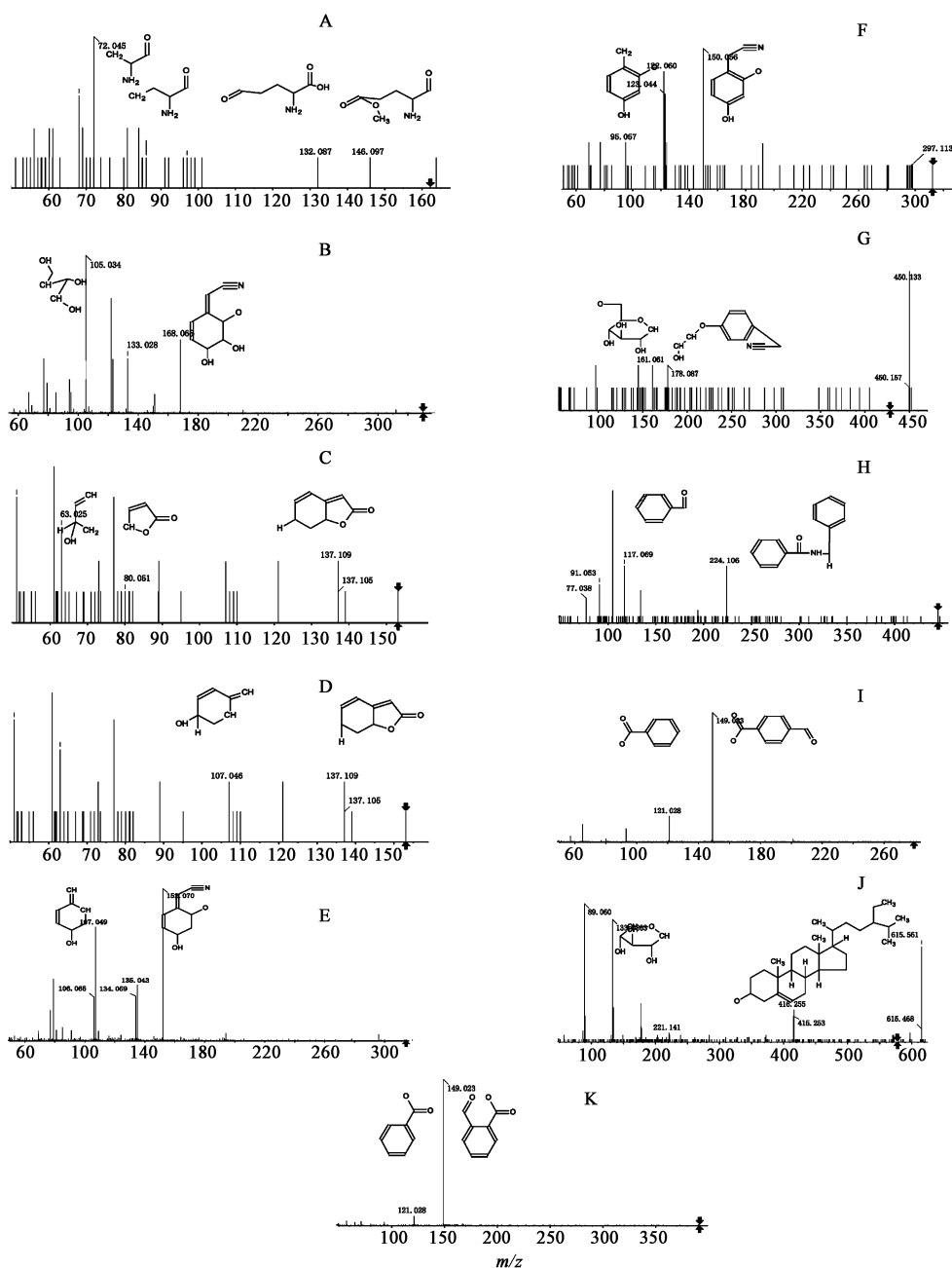
t_R 为 2.86 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 为 330 $[M + H]^+$, 脱去 $C_7H_{12}O_5$ 后形成特征碎片 m/z 168 $[M + H - C_7H_{12}O_5]^+$; 脱去 $C_{10}H_{13}NO_4$ 形成特征碎片 m/z 133 $[M + H - C_{10}H_{13}NO_4]^+$; 脱去 $C_{11}H_{13}NO_5$ 形成特征碎片 m/z 105 $[M + H - C_{11}H_{13}NO_5]^+$ 等碎片峰, 见图 2B, 根据元素组成, 该化合物的分子式为 $C_{14}H_{19}NO_8$, 据文献报道天葵子中存在的紫草氰苷相对分子质量为 329, 据此推测该化合物为紫草氰苷^[4]。

t_R 为 4.58 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 153 $[M + H]^+$, 脱去羟基后形成特征碎片 m/z 137 $[M + H - OH]^+$; 脱去 C_2H_5O 形成特征碎片 m/z 107 $[M + H - C_2H_5O]^+$; 脱去 C_4O_2 形成特征碎片 m/z 73 $[M + H - C_4O_2]^+$ 等碎片峰, 见图 2D, 根据元素组成, 该化合物的分子式为 $C_8H_8O_3$, 据文献报道天葵子中存在的蝙蝠葛内酯相对分子质量为 152, 据此推测该化合物为蝙蝠葛内酯^[2]。

t_R 为 4.58 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 153 $[M + H]^+$, 脱去羟基后形成特征碎片 m/z 137 $[M + H - OH]^+$; 脱去 C_4H_8O 形成特征碎片 m/z 80 $[M + H - C_4H_8O]^+$; 脱去 C_4O_2 形成特征碎片 m/z 73 $[M + H - C_4O_2]^+$ 等碎片峰, 见图 2C, 根据元素组成, 该化合物的分子式为 $C_8H_8O_3$, 据

t_R 为 5.72 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 314 $[M + H]^+$, 脱去 $C_6H_{10}O_5$ 后形成特征碎片 m/z 152 $[M + H - C_6H_{10}O_5]^+$; 脱去 $C_6H_{12}O_6$ 形成特征碎片 m/z 134 $[M + H - C_6H_{12}O_6]^+$; 脱去 $C_7H_{13}NO_6$ 形成特征碎片 m/z 107 $[M + H - C_7H_{13}NO_6]^+$ 等碎片峰, 见图 2E, 根据元素组成, 该化合物的分子式为 $C_{14}H_{19}NO_7$, 据文献报道天葵子中存在的蝙蝠葛氰苷相对分子质量为 313, 据此推测该化合物为蝙蝠葛氰苷^[2]。

t_R 为 6.78 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 312 $[M + H]^+$, 脱去 $C_6H_{10}O_5$ 后形成特征碎片 m/z 150 $[M + H - C_6H_{10}O_5]^+$; 脱去 $C_7H_{11}NO_5$ 形成特征碎片 m/z 123 $[M + H - C_7H_{11}NO_5]^+$; 脱去 $C_8H_{11}NO_6$ 形成特征碎片 m/z 95 $[M + H - C_8H_{11}NO_6]^+$, 见图 2F, 根据元素组成, 该



A ~ K. t_R 分别为 1.25, 2.86, 4.58, 4.58, 5.72, 6.78, 7.92, 51.91, 58.58, 61.10, 63.20 min

图 2 天葵子 95% 乙醇提取部分中各化学成分的 MS^2 (ESI^+)

Fig. 2 MS^2 (ESI^+) of each compounds from 95% ethanol extract of *Semiaquilegiae Radix*

化合物的分子式为 $C_{14}H_{17}NO_7$, 据文献报道天葵子中存在的菲律宾厚壳树苷相对分子质量为 311, 据此推测该化合物为菲律宾厚壳树苷^[2]。

t_R 为 7.92 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 450 [$M + Na$]⁺, 脱去 $C_9H_{13}O_8$ 后形成特征碎片 m/z 178 [$M + Na - C_9H_{13}O_8 - Na$]⁺; 脱去 $C_{13}H_{16}NO_5$ 形成特征碎片 m/z 161 [$M + Na - C_{13}H_{16}NO_5 - Na$]⁺; 脱去 $C_{13}H_{26}NO_6$ 形成特征碎片 m/z 145 [$M + Na - C_{13}H_{26}NO_6 - Na$]⁺ 等碎片峰, 见

图 2G, 根据元素组成, 该化合物的分子式为 $C_{19}H_{25}NO_{10}$, 据文献报道天葵子中存在的天葵氰苷相对分子质量为 449, 据此推测该化合物为天葵氰苷^[4]。

t_R 为 51.91 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 445 [$M + H$]⁺, 脱去 $C_{12}H_{15}NO_3$ 后形成特征碎片 m/z 224 [$M + H - C_{12}H_{15}NO_3$]⁺; 脱去 $C_{18}H_{20}N_2O_4$ 形成特征碎片 m/z 117 [$M + H - C_{18}H_{20}N_2O_4$]⁺; 脱去 $C_7H_{13}NO_5$ 形成特征碎片; m/z

95 $[M + H - C_{19}H_{20}N_2O_4]^+$, 见图 2H, 根据元素组成, 该化合物的分子式为 $C_{27}H_{28}N_2O_4$, 据文献报道天葵子中存在的橙黄胡椒酰胺相对分子质量为 444, 据此推测该化合物为橙黄胡椒酰胺^[5]。

t_R 为 58.58 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 279 $[M + H]^+$, 脱去 $C_8H_{17}O$ 后形成特征碎片 m/z 149 $[M + H - C_8H_{17}O]^+$; 脱去 $C_9H_{17}O_2$ 形成特征碎片 m/z 121 $[M + H - C_9H_{17}O_2]^+$, 见图 2I, 根据元素组成, 该化合物的分子式为 $C_{16}H_{22}O_4$, 据文献报道天葵子中存在的对苯二甲酸二丁酯相对分子质量为 278, 据此推测该化合物为对苯二甲酸二丁酯^[6]。

t_R 为 61.10 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 615 $[M + K]^+$, 脱去糖基后形成特征碎片 m/z 415 $[M + K - C_6H_9O_5 - K]^+$; 脱去 $C_{26}H_{43}$ 形成特征碎片 m/z 221 $[M + K - C_{26}H_{43} - K]^+$; 脱去 $C_{30}H_{51}O_2$ 形成特征碎片 m/z 133 $[M + K - C_{30}H_{51}O_2 - K]^+$ 等碎片峰, 见图 2J, 根据元素组成, 该化合物的分子式为 $C_{35}H_{60}O_6$, 天葵子中存在的胡萝卜苷相对分子质量为 576, 据此推测该化合物为胡萝卜苷^[6]。

t_R 为 63.20 min 的峰在 ESI 正离子模式下准分子离子峰为 m/z 为 391 $[M + H]^+$, 脱去 $C_{16}H_{34}O$ 后形成特征碎片 m/z 149 $[M + H - C_{16}H_{34}O]^+$; 脱去 $C_{17}H_{34}O_2$ 形成特征碎片 m/z 121 $[M + H - C_{17}H_{34}O_2]^+$, 见图 2K, 根据元素组成, 该化合物的分子式为 $C_{24}H_{38}O_4$, 据文献报道天葵子中存在的邻苯二甲酸二-2-乙基-己酯相对分子质量为 390, 据此推测该化合物为邻苯二甲酸二-2-乙基-己酯^[6]。

4 讨论

高效液相与质谱技术的联合使用, 充分发挥了 HPLC 的高效分离特性和质谱的快速、灵敏度高、分辨率高、相对分子质量测定精确、碎片信息丰富的优点。实验通过获得色谱峰的保留时间及准分子离子峰, 并通过与文献数据进行比对, 对天葵子 95% 乙醇提取部位进行了化学成分分析, 发现了多种可能在天葵子 95% 乙醇提取部位中存在的化学成分, 经过进一步对其二级质谱特征裂解碎片进行比对、确认, 在正离子模式检测的化学成分中, 有准确相对分子质量 ($-5 < ppm < 5$) 及元素组成分析确定的化合物为 11 个, 分别为 4-(甲氧羰基)-2-氨基丁酸、紫草

氰苷、嵇斗菜内酯、蝙蝠葛内酯、蝙蝠葛氰苷、菲律宾厚壳树苷、天葵氰苷、橙黄胡椒酰胺、对苯二甲酸二丁酯、胡萝卜苷及邻苯二甲酸二-2-乙基-己酯, 这 11 个化合物在天葵子中已有发现, 但是首次采用高效液相色谱-质谱从天葵子 95% 乙醇提取物中分离鉴定得到。从天葵子 95% 乙醇提取物总离子流图可以看出, 色谱峰分离仍需完善; 同时一些响应较好的色谱峰其相应化合物未能与已知含有的化合物相匹配, 进而完成鉴定, 这提示天葵子中还有未知的化学成分有待于进行进一步的研究。

本试验采用的 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 技术, 能够对复杂化学组分进行较为快速地在在线分离、检测和结构鉴定, 且准确度高、反应灵敏、简单方便、重复性好, 下一步将利用其优势, 进一步追踪分析中药中指标性成分、药效活性成分的变化规律, 发现寻找少量甚至于痕量的化学物质, 进而探索中药复方配伍中的协同组分变化规律。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 11.
- [2] 牛峰. 天葵子的化学成分及质量标准研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [3] Han Q B, Jiang B, Mei S X, et al. Constituents from the roots of *Semiaquilegia adoxoides* [J]. *Fitoterapia*, 2001, 72(1): 86-88.
- [4] Zhang H, Liao Z X, Yue J M. Cyano-and nitro-containing compounds from the roots of *Semiaquilegia adoxoides* [J]. *Chin J Chem*, 2004, 22(10): 1200-1203.
- [5] 邹建华, 杨峻山. 天葵子的化学成分研究[J]. *中国药理学杂志*, 2004, 39(4): 256-257.
- [6] Niu F, Xie G B, Cui Z, et al. Chemical constituents from roots of *Semiaquilegia adoxoides* [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2006, 15(4): 251-254.
- [7] 刘丽萍, 徐晓芳, 孙东东, 等. 淫羊藿水提部位化学成分的 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(19): 112-116.
- [8] 罗芬. 液质联用技术在中药分析中的应用[J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(11): 27-29.

[责任编辑 顾雪竹]