

· 化学与分析 ·

## 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的砂糖橘皮化学成分分析

罗美霞<sup>1</sup>, 吴波<sup>1</sup>, 胡坪君<sup>1</sup>, 韦敏燕<sup>1</sup>, 杨秀娟<sup>1</sup>, 刘鄂湖<sup>2</sup>, 郑国栋<sup>1\*</sup>

(1. 广州医科大学, 广州 511436; 2. 中国药科大学, 南京 211198)

**[摘要]** **目的:**通过超高效液相色谱串联-四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)联用技术对砂糖橘果皮化学成分进行快速分析和鉴定。**方法:**采用 Agilent Zorbax Extend C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm), 以 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱进行色谱分离, 流速 0.6 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 35 °C, 进样体积 0.5 μL。飞行时间质谱, 采用电喷雾(ESI)离子源, 在正离子模式下采集数据, 质量扫描范围设置为 *m/z* 100 ~ 1 000, 运行时间 24 min, 使用质谱分析软件 Peak view 中的目标化合物筛查法, 结合保留时间、精确相对分子质量和二级质谱裂解碎片鉴定和推测成分。**结果:**在所设定的 LC-MS 条件下, 结合对照品及文献报道的质谱数据对砂糖橘果皮的甲醇提取液分析, 共分离鉴定了 31 个成分, 包括 5 个黄酮碳苷, 6 个黄酮氧苷, 17 个多甲氧基黄酮, 1 个生物碱和 2 个多酚类化合物。**结论:**研究中建立的检测方法简便、准确, 为快速鉴定分析化学成分提供一种有效的分析方法, 并比较全面地阐明了砂糖橘果皮化学组成, 这为砂糖橘果皮成为供开发利用的柑橘资源提供科学依据。

**[关键词]** 砂糖橘; 超高效液相色谱串联-四级杆飞行时间质谱; 化学成分

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0045-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017210045

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1123.016.html>

**[网络出版时间]** 2017-08-09 11:23

### Qualitative Analysis of Chemical Constituents in *Citrus reticulata* 'Shiyue Ju' by UPLC-Q-TOF-MS

LUO Mei-xia<sup>1</sup>, WU Bo<sup>1</sup>, HU Ping-jun<sup>1</sup>, WEI Min-yan<sup>1</sup>, YANG Xiu-juan<sup>1</sup>, LIU E-hu<sup>1</sup>, ZHENG Guo-dong<sup>1\*</sup>

(1. Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze and evaluate the chemical constituents of *Citrus reticulata* 'Shiyue Ju' rapidly by using ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) technique. **Method:** The LC separation was performed on a UPLC Agilent Zorbax Extend C<sub>18</sub> column (4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm), with 0.1% formic acid solution (A) -acetonitrile solution (B) as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.6 mL·min<sup>-1</sup>; column temperature was set at 35 °C; and injection volume was 0.5 μL. Electrospray ion (ESI) source was applied for the TOF-MS analysis under the positive ion mode; the mass scanning range was between *m/z* 100-1 000; and the running time was 24 min. By using target compound screening method in the mass spectrometry analysis software, the structures of monitored

**[收稿日期]** 20170626(010)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(31401613); 2014 年广东省高校优秀青年培养计划项目(粤教师函[2014]145 号); 广州市属高校科研计划项目(2012C210)

**[第一作者]** 罗美霞, 在读硕士, 从事生药学与天然药物化学的研究与开发, Tel: 13798161766, E-mail: luomx\_2016@163.com

**[通讯作者]** \* 郑国栋, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事天然产物活性成分与中药资源研究, Tel: 020-37103256, E-mail: gd200237@126.com

chemical compositions were identified and speculated by retention time, exact relative molecular weight and the secondary mass spectra fragment of MS. **Result:** Under certain chromatographic conditions, thirty-one chemical compounds were separated and identified completely from the methanol extraction of *C. reticulata* ‘Shiyue Ju’ based on reference substances and related references, including five flavone C-glycosides, six flavone O-glycosides, seventeen polymethoxylated flavonoids (PMFs), alkaloid and two polyphenols compounds. **Conclusion:** The established detection method was convenient and accurate, providing an analytical approach for rapidly identifying and analyzing the chemical compounds. The study supplied the scientific basis to become available for the development and utilization of citrus resources.

[**Key words**] *Citrus reticulata* ‘Shiyue Ju’; UPLC-Q-TOF-MS; chemical compound

砂糖橘 (*Citrus reticulata* ‘Shiyue Ju’), 又名十月桔, 为芸香科柑橘属植物, 原产广宁、四会一带, 是当地柑桔主栽品种之一<sup>[1]</sup>, 因其味甜如砂糖故名。我国柑橘种类繁多, 资源丰富, 自古以来有柑橘皮作为陈皮的应用历史, 尤以广陈皮为道地药材, 由于各种原因, 砂糖橘皮几乎没有开发利用。2015 年版《中国药典》收录的作为药用陈皮药材的主要品种有 4 种, 分别为广陈皮 (茶枝柑) *C. reticulata* ‘Chachi’, 川陈皮 (大红袍) *C. reticulata* ‘Dahongpao’, 浙陈皮 (温州蜜柑) *C. reticulata* ‘Unshiu’, 建陈皮 (福橘) *C. reticulata* ‘Tangerina’; 我国广东年产砂糖橘高达 120 万吨, 以食用果肉为主, 其果皮被大量丢弃, 浪费资源且污染环境。黄酮类成分具有抗癌、抗炎、抗氧化以及抗神经炎性反应能力等作用, 已成为研究热点<sup>[2-3]</sup>。目前只有少量关于砂糖橘果皮化学成分研究的报道<sup>[4-5]</sup>, 本文研究表明砂糖橘果皮的 5 种活性黄酮成分含量与道地药材广陈皮接近<sup>[6]</sup>。

超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用 (UPLC-Q-TOF-MS) 是近几年发展起来的一种广受关注的质谱技术。目前有大量研究报道了 UPLC-Q-TOF-MS 作为一种新型技术广泛应用于快速分析鉴定中药材化学成分, 已取得良好的结果<sup>[7-9]</sup>。至今为止尚未发现关于砂糖橘皮化学成分的系统分析报道, 因此, 本文研究将 UPLC-Q-TOF-MS 应用于砂糖橘果皮化学成分的定性, 以期实现高选择、高精度的鉴定, 填补砂糖橘果皮化学成分鉴定的空白, 从而为砂糖橘果皮的深入研究与利用提供数据和技术支撑。

## 1 材料

1290 系列超高效液相系统 (包括二元梯度泵, 自动进样器, 柱温箱, 自动脱气机, 1200 二级管阵列检测器及色谱工作站, 美国安捷伦公司), MS205DU 型 1/10 万分析天平 (瑞士梅特勒-托利多仪器有限

公司), KQ-800KDE 型超声波清洗机 (昆山市超声仪器有限公司)。

砂糖橘果皮样品于 2012 年 10 月采自广东省茂名市化州, 经广州医科大学药学院郑国栋副教授鉴定为芸香科砂糖橘 *C. reticulata* ‘Shiyue Ju’ 的果皮, 样品保存于广州医科大学药学院实验室。

对照品橙皮苷 (批号 MUST-15070211), 芸香柚皮苷 (批号 MUST-14101208), 川陈皮素 (批号 MUST-15110911), 橘皮素 (批号 MUST-14112410), 均购自于成都曼思特生物科技有限公司; 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 (批号 1151123) 购于上海抚生实业有限公司; 各对照品的纯度均 >98%。色谱纯乙腈 (德国 Merck 公司), 超纯水 (美国 Millipore 公司), 甲酸 (纯度 99%, 美国 ROE 公司), 甲醇为分析纯。

## 2 方法

**2.1 对照品溶液制备** 精密称取各个对照品适量, 用甲醇溶解并定容, 配成含橙皮苷 ( $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 芸香柚皮苷 ( $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 川陈皮素 ( $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 橘皮素 ( $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 ( $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的混合对照品溶液, 放置于 4 °C 冰箱备用。临用前, 用甲醇将贮备液稀释到适当浓度即得。

**2.2 供试品溶液制备** 精密称定药材粉末 (过 50 目筛) 0.25 g, 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇 25 mL, 超声处理 (320 W) 30 min, 放冷, 补重, 离心 ( $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 5 min), 取上清液即得供试品溶液。进样前, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液进样。

**2.3 分析条件** 色谱条件: 采用安捷伦 1290 系列超高效液相系统, Agilent Zorbax Extend C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm × 50 mm, 1.8 μm), 柱温 35 °C, 流动相 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 2 min, 16% B; 2 ~ 7 min, 16% ~ 19% B; 7 ~ 15 min, 19% ~ 40% B; 15 ~ 24 min, 40% ~ 55% B), 流速

0.6 mL·min<sup>-1</sup>, 进样体积 0.5 μL, 检测器采用 Agilent 6530 型 Q-TOF-MS 系统, 电喷雾 (ESI) 离子源。质谱条件: 干燥氮气流速 10.0 L·min<sup>-1</sup>, 干燥气体温度 325 °C, 雾化压力 310.3 kPa, 鞘气温度 300 °C, 鞘气流速 11 L·min<sup>-1</sup>, 毛细管电压 3 000 V, skimmer 65 V, OCT 1 RF V<sub>pp</sub> 750 V, 裂解电压 120 V, 正离子模式全程监测, 离子扫描范围设置为 *m/z* 100 ~ 1 000, 碰撞能量 (CE) 设定为 25 V 和 45 V, 数据采集及处理分别采用 Agilent MassHunter Acquisition Software Ver. A. 01.00 及 Agilent MassHunter Workstation Software Version B. 02.00 分析软件。

### 3 结果

在本实验中, 应用 UPLC-Q-TOF-MS 技术, 在正离子模式下, 基于化合物的保留行为、紫外吸收光谱和质谱信息, 将砂糖橘果皮的甲醇提取液按照 2.3 项下条件分析共鉴定了 31 个成分, 包括 5 个黄酮碳苷, 6 个黄酮氧苷, 17 个多甲氧基黄酮, 1 个生物碱和 2 个多酚类化合物。5 个对照品及砂糖橘果皮甲醇提取液的总离子流图见图 1。31 个化合物结合质子分子, 总结了准确的相对分子质量, 保留时间 (*t<sub>R</sub>*), 分子式和质量精度等。具体各类化合物鉴定见表 1。

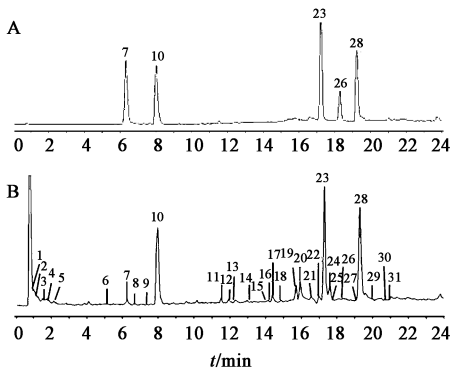


图 1 5 个对照品 (A) 及砂糖橘果皮甲醇提取液 (B) 的总离子流  
Fig. 1 Total ion chromatogram (TIC) of reference compounds (A) and methanolic extract of peels of *Citrus reticulata* 'Shiyue Ju' (B) in positive mode

**3.1 黄酮苷的快速鉴定** 在柑橘属植物中, 多存在黄酮碳苷与黄酮氧苷两种类型。黄酮氧苷多为在黄酮骨架的 7 位连接 β-rutinoside 或 β-neohesperidose, 黄酮氧苷质谱主要裂解特征为从 [M + H]<sup>+</sup> 离子连续丢失糖链, 而形成高强度的黄酮苷元碎片; 黄酮碳苷主要为在 C<sub>6</sub> 或 (和) C<sub>8</sub> 位连接葡萄糖, 形成单糖碳苷或双糖碳苷, 其较难裂解, 在一级质谱中, 保留完整的 [M + H]<sup>+</sup> 分子离子峰, 在二级质谱中, 低碰撞

电压下 (25 V) 可产生糖链裂解的碎片, 如脱水峰 [M + H - nH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 脱醛基峰 [M + H - CH<sub>2</sub>O - 2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 等<sup>[10]</sup>。

色谱峰 7, 通过与对照品保留时间、裂解碎片等信息进行比对, 鉴定为芸香柚皮苷, 芸香柚皮苷的一级和二级质谱裂解见图 2。在一级电压下, 可见到 [M + H]<sup>+</sup> 连续丢失 162 Da (葡萄糖) 和 308 Da (芸香糖) 而生成的碎片离子 *m/z* 419 和 273。二级质谱 (45 V) 中, 不仅能看到高强度的黄酮苷元离子峰 (*m/z* 273), 还可以看到苷元的裂解碎片峰, 如 RDA 裂解碎片产生 *m/z* 153.016 5 碎片离子峰, 苷元离子脱去 1 分子 CO (28 Da) 产生 *m/z* 245.043 0 碎片离子峰等。

色谱峰 10, 通过与对照品的保留时间、裂解碎片等信息进行比对, 鉴定为橙皮苷, 一级和二级质谱裂解见图 2。在一级电压下, 可见到 [M + H]<sup>+</sup> 连续丢失 162 Da (葡萄糖) 和 308 Da (芸香糖) 而生成的碎片离子 *m/z* 449 和 303。二级质谱 (45 V) 中, 不仅能看到高强度的黄酮苷元离子峰 (*m/z* 303), 还可以看到苷元的裂解碎片峰, 如 RDA 裂解碎片产生 *m/z* 153 (C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>O<sub>4</sub>) 碎片离子峰等。

色谱峰 8, 分子离子峰为 *m/z* 579.170 6, 经计算其分子式为 C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>14</sub>, 其碎片离子及裂解途径与化合物 7 相似, 具有高强度的掉芸香糖 (308 Da) 的黄酮苷元离子峰 (*m/z* 271.053 3), 再与文献进行比对, 推断化合物 8 为野漆树苷。相似的, 化合物 9, 11 被推断为柑橘属中常见化合物地奥司明和枸橼苷<sup>[11]</sup>。

色谱峰 2, 3, 4, 5, 6 为一系类黄酮碳苷。正离子模式下, 在低碰撞能量下, 均可产生一系列脱水峰 ([M + H - nH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), 例如, 色谱峰 3, 分子离子峰为 *m/z* 595.166 5, 分子式 C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>15</sub>, 可见二级碎片 *m/z* 577.153 1 ([M + H - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), *m/z* 559.152 7 ([M + H - 2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), *m/z* 541.141 5 ([M + H - 3H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>), *m/z* 523.124 1 ([M + H - 4H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>)。通过与文献中 6, 8-二-C-葡萄糖基芹菜素 (vicenin-2) 的质谱数据比较, 色谱峰 3 可推断为 vicenin-2。该化合物同样在橘子、柠檬、佛手等柑橘属植物中有文献报道。相似的, 鉴定色谱峰 2 为 6, 8-二-C 葡萄糖基木犀草素, 色谱峰 4 为 diosmetin-6, 8-di-C-glucoside, 色谱峰 5 为 chrysoeriol-6, 8-di-C-glucoside, 色谱峰 6 为 diosmetin-6-C-glucoside<sup>[12-13]</sup>。

**3.2 多甲氧基黄酮的快速鉴定** 多甲氧基黄酮 (polymethoxyflavones, PMFs) 为柑橘属植物中最常见

表 1 砂糖橘果皮主要化合物表征

Table 1 Major compounds of *Citrus reticulata* 'Shiyue Ju' peel

峰号	$t_R/\text{min}$	$[M+H]^+$	$\delta$	分子式	碎片离子	化合物(英文)	化合物(中文)
1	0.84	168.1016	1.34	$C_9H_{13}NO_2$	150.0821, 135.0688, 119.0433, 107.0473	synephrine	辛弗林
2	1.18	611.1616	-1.52	$C_{27}H_{30}O_{16}$	575.1686, 557.1332, 473.1035, 395.0693, 341.0635, 310.0490	lucenin-2	6,8-二-C 葡萄糖基木犀草素
3	1.49	595.1665	-1.87	$C_{27}H_{30}O_{15}$	578.1534, 559.1400, 541.1324, 523.1261, 457.1052, 409.0886, 325.0668	vicenin-2	6,8-二-C-葡萄糖基芹素
4	1.59	625.1755	0.73	$C_{28}H_{32}O_{16}$	607.1627, 589.1404, 571.1429, 553.1267, 487.1213, 355.0785	diosmetin-6,8-di-C-glucoside	-
5	1.8	625.1756	1.08	$C_{28}H_{32}O_{16}$	505.1269, 487.1301, 439.1090, 409.1013, 355.0789	chyoeriol-6,8-di-C-glucoside	-
6	5.18	463.1226	1.98	$C_{22}H_{22}O_{11}$	445.1099, 427.0980, 397.1045, 380.0810, 367.0751, 343.0703, 313.0703	diosmetin-6-C-glucoside	-
7	6.25	581.1877	-1.53	$C_{27}H_{32}O_{14}$	480.3886, 433.1085, 273.0743, 195.0236, 153.0165	narirutin <sup>1)</sup>	芸香柚皮苷 <sup>1)</sup>
8	6.39	579.1706	-1.34	$C_{27}H_{30}O_{14}$	433.1074, 315.0899, 271.0558, 195.0234, 153.0132, 127.0351	rhoifolin	野漆树苷
9	7.56	609.1801	1.97	$C_{28}H_{32}O_{15}$	493.1251, 463.1289, 343.0839, 301.0755	diosmin	地奥司明
10	7.91	611.1974	-0.47	$C_{28}H_{34}O_{15}$	449.1541, 369.1046, 303.0921, 263.0589, 195.0322, 153.0209	hesperidin <sup>1)</sup>	橙皮苷 <sup>1)</sup>
11	11.49	595.2010	1.40	$C_{28}H_{34}O_{14}$	463.2334, 379.1144, 287.0910, 263.0568, 153.0190	poncirin	枸橼苷
12	12.29	728.3986	1.34	$C_{36}H_{53}N_7O_9$	700.4005, 587.3215, 474.2415, 259.1492, 138.1301	citrusin III	-
13	12.90	725.2303	-0.49	$C_{33}H_{40}O_{18}$	419.1375, 404.1131, 390.0876, 361.0904	melitidin	-
14	13.29	359.1127	-0.53	$C_{19}H_{18}O_7$	329.0618, 314.0847, 301.0551, 163.0917, 147.0445	monohydroxy-tetramethoxyflavone	-
15	14.04	375.1446	1.92	$C_{20}H_{22}O_7$	211.0570, 196.0386, 150.0294, 120.0533	pentamethoxyflavanone	-
16	14.15	389.1241	-1.77	$C_{20}H_{20}O_8$	374.1083, 359.0762, 341.0672, 298.0344	monohydroxy-pentamethoxyflavone	-
17	14.39	373.1285	-0.60	$C_{20}H_{20}O_7$	358.1057, 343.0833, 315.0898, 287.0968, 181.0135, 153.0200	isosinensetin	异橙黄酮
18	14.84	389.1218	2.47	$C_{20}H_{20}O_8$	374.0980, 359.0776, 344.0501, 330.0987, 313.0696, 193.012	monohydroxy-pentamethoxyflavone	-
19	15.70	373.1281	-0.48	$C_{20}H_{20}O_7$	357.0987, 343.0812, 329.1015, 312.0988, 297.0780, 153.0171	sinensetin	甜橙素
20	15.94	343.1176	0.18	$C_{19}H_{18}O_6$	328.0939, 313.0693, 285.0744, 257.0804, 181.0113, 153.0170	tetramethyl-O-isoscutellarein	-
21	16.53	375.1437	0.30	$C_{20}H_{22}O_7$	253.0857, 211.0615, 196.0410, 181.0153, 168.0397, 150.0287	pentamethoxyflavanone	-
22	16.94	471.2014	-0.04	$C_{26}H_{30}O_8$	425.2089, 397.2043, 265.1281, 201.0896, 161.0624, 105.0683	limonin	柠檬苦素
23	17.21	403.1380	1.91	$C_{21}H_{22}O_8$	388.1114, 373.0885, 355.0781, 327.0831, 211.0208, 183.0269	nobiletin <sup>1)</sup>	川陈皮素 <sup>1)</sup>
24	17.49	343.1173	0.69	$C_{19}H_{18}O_6$	327.0873, 313.0698, 299.0918, 282.0872, 267.0633, 181.0119, 153.0161	tetramethyl-O-scutehellarein	四甲基-O-野黄芩素

续表 1

峰号	$t_R/\text{min}$	$[M+H]^+$	$\delta$	分子式	碎片离子	化合物(英文)	化合物(中文)
25	17.84	403.138 7	0.11	$C_{21}H_{22}O_8$	388.116 0, 373.093 0, 359.067 5, 327.085 8, 183.014 4, 163.071 6	hexamethoxyflavone	六甲氧基黄酮
26	18.25	433.148 7	1.83	$C_{22}H_{24}O_9$	417.118 1, 403.102 0, 388.077 4, 373.066 8, 303.074 2, 217.046 2	3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxyflavone*	3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮
27	19.12	345.133 3	-0.10	$C_{19}H_{20}O_6$	240.052 9, 211.055 5, 196.037 0, 167.029 4, 131.071 4, 119.040 3	tetramethoxyflavanone or tetramethoxychalcone	-
28	19.22	373.128 9	-1.48	$C_{20}H_{20}O_7$	358.104 9, 343.080 9, 328.057 5, 297.075 6, 211.022 9, 183.028 3	tangeretin <sup>1)</sup>	橘皮素 <sup>1)</sup>
29	19.95	375.143 5	0.88	$C_{20}H_{22}O_7$	241.068 5, 226.043 4, 211.020 0, 193.014 5, 183.025 8	pentamethoxyflavanone	五甲氧基黄酮
30	20.74	403.140 3	-2.16	$C_{21}H_{22}O_8$	388.111 4, 373.088 5, 355.078 1, 327.083 1, 183.026 9, 151.071 7	hexamethoxyflavone	-
31	20.98	389.122 5	0.59	$C_{20}H_{20}O_8$	374.098 1, 359.082 0, 341.070 0, 331.080 4, 197.007 3	5-hydroxy-6, 7, 8, 3', 4'-pentamethoxyflavone	5-羟基-6, 7, 8, 3', 4'-五甲氧基黄酮

注: <sup>1)</sup> 与对照品相比进行进一步确认。

的一类具有良好生物活性的特征成分。他们在黄酮的母核上,在不同的位置连接多个甲氧基或羟基。黄酮母核的相对分子质量为 222 Da,因此多甲氧基黄酮的相对分子质量为 (222 + 30a + 16b) Da,其中 a ≥ 1, b ≥ 0,即多甲氧基黄酮的分子量是一系列固定值,这有助于多甲氧基黄酮的鉴定<sup>[14]</sup>,见表 2。

表 2 多甲氧基黄酮分子式和相对分子质量

Table 2 Formula and relative molecular weight of polymethoxylated flavonoids

取代基	-	OH	2OH	3OH	4OH	5OH
2OCH <sub>3</sub>	$C_{17}H_{14}O_4$ (282)	$C_{17}H_{14}O_5$ (298)	$C_{17}H_{14}O_6$ (314)	$C_{17}H_{14}O_7$ (330)	$C_{17}H_{14}O_8$ (346)	$C_{17}H_{14}O_9$ (362)
3OCH <sub>3</sub>	$C_{18}H_{16}O_5$ (312)	$C_{18}H_{16}O_6$ (328)	$C_{18}H_{16}O_7$ (344)	$C_{18}H_{16}O_8$ (360)	$C_{18}H_{16}O_9$ (376)	
4OCH <sub>3</sub>	$C_{19}H_{18}O_6$ (342)	$C_{19}H_{18}O_7$ (358)	$C_{19}H_{18}O_8$ (374)	$C_{19}H_{18}O_9$ (390)		
5OCH <sub>3</sub>	$C_{20}H_{20}O_7$ (372)	$C_{20}H_{20}O_8$ (388)	$C_{20}H_{20}O_9$ (404)			
6OCH <sub>3</sub>	$C_{21}H_{22}O_8$ (402)	$C_{21}H_{22}O_9$ (418)				
7OCH <sub>3</sub>	$C_{22}H_{24}O_9$ (432)					

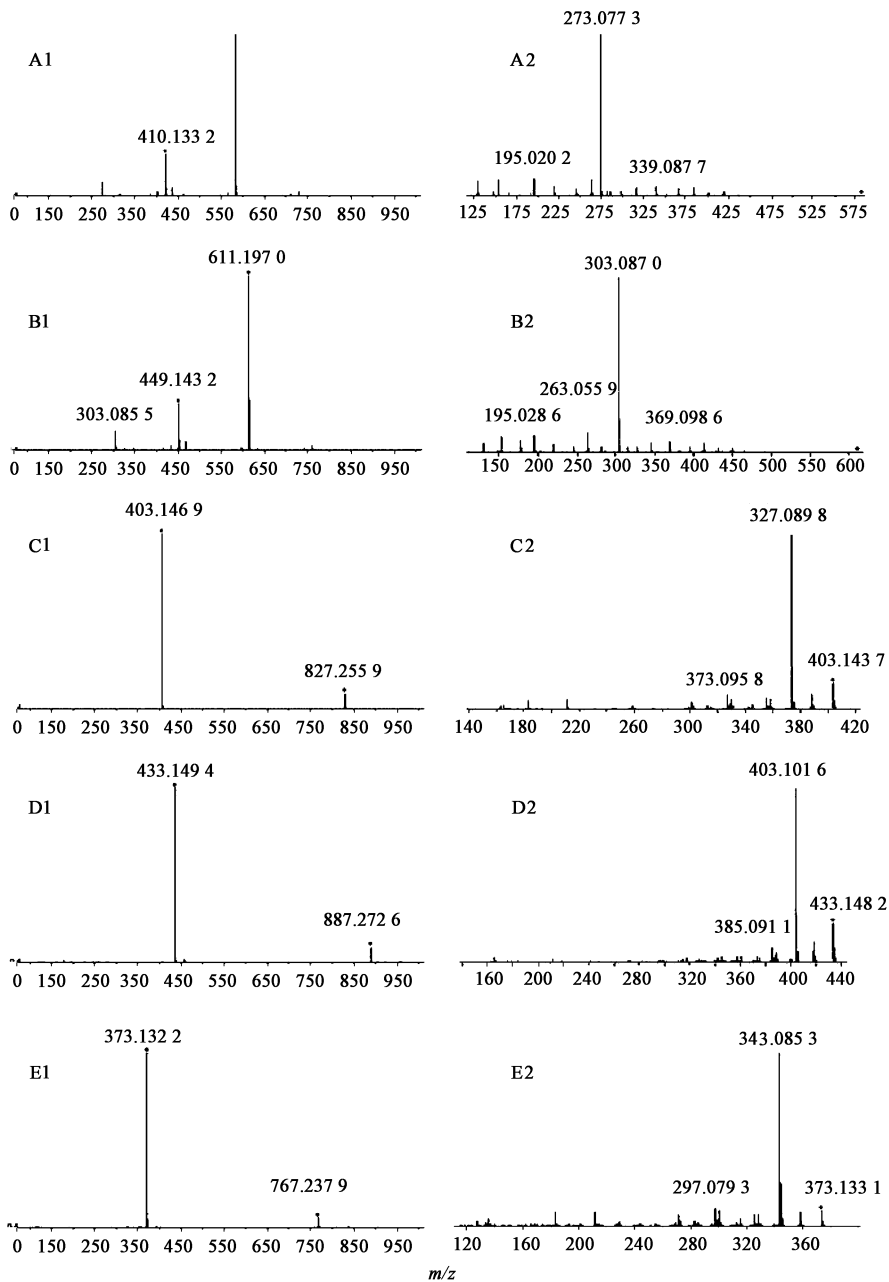
注:括号中表示相对分子质量。

多甲氧基黄酮在二级质谱中易脱 2 个或 2 个甲基,产生特征碎片离子  $[M+H-15]^+$ ,  $[M+H-30]^+$ ,同时也会丢失一系列碎片离子,如 16 Da (-CH<sub>4</sub>), 33 Da (-H<sub>2</sub>O - CH<sub>3</sub>), 48 Da (-2CH<sub>3</sub> - H<sub>2</sub>O), 58 Da (-2CH<sub>3</sub> - CO), 61 Da (-CO - H<sub>2</sub>O - CH<sub>3</sub>), 63 Da (-3CH<sub>3</sub> - H<sub>2</sub>O) 和 73 Da (-3CH<sub>3</sub> - CO)<sup>[15]</sup>。再结合质谱给出的相对分子质量和分子式信息,最终鉴定出 12 个多甲氧基黄酮。

色谱峰 23,通过与对照品的保留时间,裂解碎片等信息进行比对,鉴定为川陈皮素,一级质谱显示分子离子峰  $[M+H]^+$  为  $m/z$  403.138 0,二级质谱显示有碎片离子  $m/z$  388.119 4 ( $[M+H-CH_3]^+$ ), 373.094 5 ( $[M+H-2CH_3]^+$ ), 358.071 0 ( $[M+H-3CH_3]^+$ ), 345.098 3 ( $[M+H-2CH_3-CO]^+$ )。

色谱峰 17, 19, 28 的分子离子峰  $[M+H]^+$  均为  $m/z$  373,分子式经计算为  $C_{20}H_{20}O_7$ 。色谱峰 28,通过与对照品的保留时间、裂解规律进行比对,鉴定其为橘皮素,即 4', 5, 6, 7, 8, -五甲氧基黄酮。二级质谱中可见诊断碎片离子  $[M+H-15]^+$ ,  $[M+H-30]^+$ ,即丢失 1 分子或 2 分子甲基。同时也有系列碎片离子  $m/z$  328.051 2 ( $[M+H-3CH_3]^+$ ), 315.077 3 ( $[M+H-2CH_3-CO]^+$ ), 300.055 5 ( $[M+H-3CH_3-CO]^+$ )。色谱峰 17 和 19 的二级碎片中具有丰度较高的  $[M+H-CH_4]^+$  碎片,说明该类化合物在 B 环有 2 个相邻甲氧基。3', 4', 5, 6, 7, -五甲氧基黄酮和 3', 4', 5, 7, 8, -五甲氧基黄酮是文献中报道的 2 个从柑橘属中分离鉴定出的五甲氧基黄酮<sup>[16]</sup>,再根据文献报道此化合物的裂解碎片,保留时间等信息,初步推断色谱峰 17 为 3', 4', 5, 7, 8, -五甲氧基黄酮,色谱峰 19 为 3', 4', 5, 6, 7, -五甲氧基黄酮。

色谱峰 26 的分子离子峰  $[M+H]^+$  均为  $m/z$  433.148 7,分子式经计算为  $C_{22}H_{24}O_9$ 。通过与对照品的保留时间、裂解规律进行比对,鉴定其为 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-七甲氧基黄酮。二级质谱中可见丢失 16 Da (-CH<sub>4</sub>) 和 30 Da (-2CH<sub>3</sub>) 而形成的碎片离



A. 芸香柚皮苷; B. 橙皮苷; C. 川陈皮素; D. 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮; E. 橘皮素; A1 ~ E1. 一级质谱; A2 ~ E2. 二级质谱

图 2 5 种对照品阳离子质谱

Fig. 2 Positive MS and MS/MS spectra of five reference compounds

子峰  $m/z$  417. 118 1 和  $m/z$  403. 102 0。

#### 4 讨论与总结

课题组前期曾采用快速高分辨液相色谱-电喷雾串联质谱(RRLC-ESI-MS/MS)对陈皮中的化合物进行了快速分析,共鉴定出 41 种化学成分,主要包括 4 个黄酮碳苷,7 个黄酮氧苷,19 个多甲氧基黄酮<sup>[17]</sup>。本文采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对砂糖橘果皮中化学成分进行全面定性分析,根据其保留时间、质谱数据、裂解规律、参考文献等信息,从砂糖橘果皮甲醇提取液中快速鉴定出 31 个化合物,包括 5 个

黄酮碳苷,6 个黄酮氧苷,17 个多甲氧基黄酮,1 个生物碱和 2 个多酚类化合物,以期对砂糖橘果皮的深入研究与开发利用,提供研究数据。

鉴定出的化合物结构中除了黄酮苷类以外,以 PMFs 为主,大量国内外报道了 PMFs 具有抗氧化、抗炎、抗癌、抗菌、抗诱变以及心血管保护等药理活性<sup>[18-21]</sup>。结合笔者的研究<sup>[22]</sup>,进一步证实了砂糖橘果皮不仅多甲氧基黄酮类型丰富,而且含量很高,甚至高于传统道地药材广陈皮含量。这很大程度上对砂糖橘果皮开发成为有临床应用的陈皮提供了

理论指导。

UPLC-Q-TOF-MS 技术具有分析时间短、分辨率高、碎片信息丰富等特点,本实验结合多甲氧基黄酮对照品,根据分子式和裂解碎片等信息判断甲氧基取代个数,或根据文献中保留时间等信息推测其构型,成功表征砂糖橘果皮化学成分结构。

[致谢]新会区人民政府、新会陈皮行业协会等单位在基地建设方面的支持,以及潘艳婷同志在样品采集对本项目工作的大力支持和帮助。

[参考文献]

[1] 梁健钦,杨焕琪,熊万娜,等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取砂糖桔叶挥发油及其 GC-MS 分析[J]. 食品与机械,2010,26(3): 28-34.

[2] 郑国栋,蒋林,杨得坡,等. HPLC 法同时测定不同产地广陈皮中 5 种活性黄酮成分[J]. 中草药,2010,41(4): 652-655.

[3] Ho S C, Kuo C T. Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (Citri Reticulatae Pericarpium) [J]. Food Chem Toxicol, 2014,71:176-182.

[4] 张涵,鲁周民,王锦涛,等. 4 种主要柑橘类香气成分比较[J]. 食品科学,2017,38(4): 192-196.

[5] ZHANG J Y, ZHANG Q, ZHANG H X, et al. Characterization of polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the peels of 'Shatangju' mandarin (Citrus reticulata Blanco) by online high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem,2012,60(36):9023-9034.

[6] 郑国栋. 岭南特色药材广陈皮化学成分及其质量评价研究[D]. 广州:中山大学,2009.

[7] 张定堃,韩雷,李瑞煜,等. UPLC-Q-TOF-MS 分析不同产地泥附子化学成分的差异[J]. 中国中药杂志,2016,41(3):463-469.

[8] 李玲云,王云,刘梦娇,等. 梔子金花丸化学成分的 UPLC-Q/TOF-MS/MS 快速鉴定与分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(14): 1-11.

[9] 杨彬,王媛,田梦,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究法半夏中甘草化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(3): 45-49.

[10] Abad-García B, Garmón-Lobato S, Berrueta L A, et al. New features on the fragmentation and differentiation of C-glycosidic flavones isomers by positive electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22 ( 12 ): 1834-1842.

[11] SHI P, HE Q, SONG Y, et al. Characterization and identification of isomeric flavonoid O-diglycosides from

genus Citrus in negative electrospray ionization by ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2007, 598 ( 1 ): 110-118.

[12] Barreca D, Bellocco E, Caristi C, et al. Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (Citrus limetta Risso) juice [J]. Food Chem, 2001,129: 417-422.

[13] Roowi S, Crozier A. Flavonoids in tropical Citrus species [J]. J Agric Food Chem,2011,59(22): 12217-12225.

[14] ZHANG J Y, LI N, CHEN Y Y, et al. Characterization of seventy polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the leaves of Murraya paniculata by on-line high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed Anal,2011,56(5): 950-961.

[15] ZHOU D Y, ZHANG X L, XU Q, et al. UPLC/Q-TOF-MS/MS as a powerful technique for rapid identification of polymethoxylated flavones in Fructus Aurantii [J]. J Pharmaceut Biomed Anal,2009,50(1): 2-8.

[16] DU Q Z, CHEN H. The methoxyflavones in Citrus reticulata Blanco cv. Ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells [J]. Food Chem, 2010, 119: 567-572.

[17] ZHENG G D, ZHOU P, YANG H, et al. Rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for identification of chemical constituents in Citri Reticulatae Pericarpium [J]. Food Chem,2013,136(2): 604-611.

[18] Anagnostopoulou M A, Kefalas P, Kokkalou E, et al. Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC-diode array detection electrospray ionization mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2005, 19 ( 2 ): 138-148.

[19] Jayaprakasha G K, Negi P S, Sikder S, et al. Antibacterial activity of Citrus reticulata peel extracts. Hoppe-Seyler's Z. Physiol [J]. Chem,2000,55 ( 11/ 12 ): 1030-1034.

[20] WU Y Q, ZHOU C H, TAO J, et al. Antagonistic effects of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, on eosinophilic airway inflammation of asthmatic rats and relevant mechanisms [J]. Life Sci,2006,78 ( 23 ): 2689-2696.

[21] Kawaii S, Tomono Y, Katase E, et al. Effect of citrus flavonoids on HL-60 cell differentiation [J]. Anticancer Res,1999,19 ( 2A ): 1261-1269.

[22] 罗璇捷,杨宜婷,李晓伟,等. 11 个品种来源陈皮中多甲氧基黄酮的测定 [J]. 中成药,2017,39(3): 565-569.

[责任编辑 顾雪竹]