

· 化学与分析 ·

液质联用技术快速鉴定白花蛇舌草中黄酮类化学成分

范姣姣¹, 张路¹, 文红梅^{1,2*}, 单晨啸¹, 崔小兵¹, 周红光², 陈海彬²

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210046;
2. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210046)

[摘要] 目的: 采用快速液相色谱仪与四极杆飞行时间串联质谱仪(UFLC-Q-TOF/MS)对白花蛇舌草中黄酮类化学成分进行快速分析和鉴别。方法: 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ Column(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸-乙腈和 0.1% 甲酸-水的流动相进行快速的梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 1 μL。质谱定性采用电喷雾离子源(ESI)的飞行时间质谱, 负离子模式下采集数据, 质量扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 500。结果: 共鉴别出白花蛇舌草中的 13 个黄酮类成分、1 个三萜类成分和 1 个蒽醌类成分。结论: UFLC-Q-TOF/MS 方法能快速鉴别白花蛇舌草中的黄酮类化学成分, 为白花蛇舌草的药效物质研究奠定基础。

[关键词] 白花蛇舌草; 黄酮; 快速液相色谱仪与四极杆飞行时间串联质谱仪; 成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)23-0062-04

[doi] 10.11653/syfy2013230062

Identification of Flavonoids Chemical Constituents in *Hedyotis diffusa* by UFLC-Q-TOF/MS

FAN Jiao-jiao¹, ZHANG Lu¹, WEN Hong-mei^{1,2*}, SHAN Chen-xiao¹,
CUI Xiao-bing¹, ZHOU Hong-guang², CHEN Hai-bin²

(1. Pharmacology College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Supported by the Open Project Program of Traditional Chinese Medicine Department of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To use fast liquid chromatography-triple quadrupole-time of flight mass spectrometry (UFLC-Q-TOF/MS) for analyzing the chemical constituents of flavonoids in traditional Chinese herbal medicine *Hedyotis diffusa*. **Method:** The separation was performed on a ACQUITY UPLC BEH C₁₈ Column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with a mobile phase using 0.1% formic acid ACN (A) and water containing 0.1% formic acid (B) for gradient elution. Time-of-flight mass spectrometer (TOF/MS) and electrospray ion source (ESI) was applied for qualitative analysis under the negative ion mode. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, the temperature of column was 40 °C. and mass scan range was *m/z* 100-1 500. **Result:** Fifteen compounds were identified from flavonoids of *H. diffusa*. **Conclusion:** To use UFLC-Q-TOF/MS method can quickly identify the chemical components of *H. diffusa* which paves a way for further studying the pharmacodynamic material basis of *H. diffusa*.

[Key words] *Hedyotis diffusa*; flavonoids; UFLC-Q-TOF-MS; compounds

[收稿日期] 20130331(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102563); 高校博士学科点专项基金项目(20113237110001); 江苏高校优势学科建设工程项目江苏省中医优势学科开放课题(YS2012ZYX309)

[第一作者] 范姣姣, 硕士, 从事中药化学研究, E-mail: jiao.wa.1988@163.com

[通讯作者] *文红梅, 教授, 博士生导师, 从事中药分析研究, Tel: 025-85811839, E-mail: njwenhm@126.com

白花蛇舌草为茜草科耳草属植物白花蛇舌草的干燥全草,始载于《广西中药志》,具有清热解毒、活血化痰、利湿通淋等作用^[1]。主要含有蒽醌类、萜类、黄酮类、甾醇类、烷烃类、有机酸类和多糖类等成分^[2-3],其中黄酮类成分具有抑制肿瘤生长的作用^[4-5],其主要成分有芦丁、槲皮素-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、山奈酚-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷等^[6-7],因此研究其化学成分具有重要的意义。超快速液相色谱(UFLC)-四极杆飞行时间质谱(Q-TOF-MS)联用技术,集快速有效的分离能力和高分辨、高质量精度的定性能力为一体,已成为中药化学成分研究的有效手段之一^[8]。本研究对白花蛇舌草中黄酮类成分进行UFLC-Q-TOF/MS分析,在线获取样品中各化合物离子的精确质荷比,对比自建化学成分数据库,结合保留时间、二级质谱信息及相关文献,对白花蛇舌草的黄酮部位中的主要化学成分进行快速分析和鉴定。

1 材料

1.1 仪器 LC-20A型快速液相色谱仪,包括在线脱气机、二元泵、高性能自动进样器和二极管阵列检测器(日本岛津公司);高分辨质谱系统:AB SCIEX Triple TOFTM 5600,配有电喷雾离子源(ESI)、Analyst 1.6 色谱工作站和 Peak View 等质谱分析软件(美国 AB 公司)。BUCHI 旋转蒸发器、KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、AY220 型电子分析天平。

1.2 药品与试剂 白花蛇舌草药材购于安徽丰原铜陵中药饮片有限公司,经南京中医药大学中药鉴定教研室王春根教授鉴定为茜草科耳草属植物 *Hedyotis diffusa* Willd(批号 120806,产地江西)。聚酰胺树脂购于浙江省台州市路桥四甲生化塑料厂。槲皮素对照品购自中国药品生物制品检定所(纯度 >99.0%),甲醇、乙腈、甲酸、水(色谱纯)均购自美国默克公司。

2 方法

2.1 总黄酮的提取 称取白花蛇舌草粗粉约 50 g,用 300 mL 80% 的乙醇浸泡后回流提取 3 次,分别为 1,0.5,0.5 h。合并 3 次的提取液,回收乙醇得浸膏后,加水 20 mL 搅拌,离心。收集上清液,用等量的石油醚进行萃取,分别收集水部位和石油醚部位,将水部位溶液加入到已处理的聚酰胺树脂柱中(30 ~ 60 目),调节流速约为 5 mL·min⁻¹,用蒸馏水洗去杂质,至洗出溶液透明无色,再以 80% 的乙醇为流动相解吸附,收集洗脱液,至洗脱液无色透明,合并洗

脱液。将收集到的洗脱液浓缩,回收乙醇至无醇味,并浓缩至稠膏状。

2.2 供试品的制备 称取上述所得浸膏约 10 mg,加入 10 mL 的甲醇,超声溶解,离心,取上清,过 0.22 μ m 微孔滤膜,即得。

2.3 对照品溶液的配制 精密称取槲皮素对照品适量,加入甲醇配成质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 的对照品溶液,离心 5 min(12 000 r·min⁻¹),取上清,即得。

2.4 色谱条件 Waters ACQUITYTM UPLC BEH C₁₈ Column 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.7 μ m),流动相 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 3 min,5% B;3 ~ 5 min,5% ~ 10% B;5 ~ 10 min,10% ~ 20% B;10 ~ 15 min,20% ~ 50% B;15 ~ 20 min,50% ~ 90% B;20 ~ 22 min,90% ~ 95% B;22 ~ 23 min,95% ~ 5% B;23 ~ 25 min,5% B),柱温 40 $^{\circ}$ C,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 1 μ L。

2.5 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),采用动态背景扣除(DBS)和触发信息关联采集模式(IDA)的方法。负离子模式下采集,雾化气(GS1) 55 psi,辅助加热气(GS2) 60 psi,气帘气(Curtain Gas) 40 psi,离子源温度(TEM) 500 $^{\circ}$ C,喷雾电压(IS) -4 500 V,去簇电压(DP) -70 V,碰撞能量(CE) 10 V,质量数扫描范围 m/z 100 ~ 1 500。

2.6 数据采集与分析 采用 Peak View 软件中 XIC Manager 功能进行目标化合物的筛查和确证,利用 Formula finder 根据测得的化合物相对分子质量,同位素分布以及化学逻辑测定化合物的元素组成,结合特征碎片,进行未知化合物的分析与鉴定。

3 结果

3.1 色谱质谱分析 白花蛇舌草的黄酮部位中的化学成分的UFLC-Q-TOF/MS总离子流图的动态扣背景图(BPC)如图1所示。由图可见,黄酮部位化学成分较多,分离效果较好。

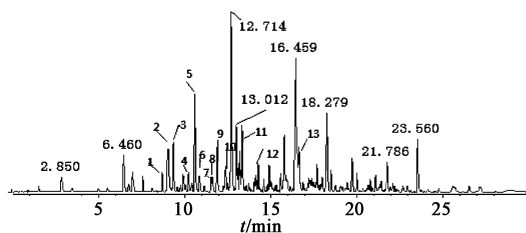


图1 白花蛇舌草黄酮部位负离子模式总离子的动态扣背景(BPC)

3.2 对照品的裂解规律 槲皮素对照品的UFLC-Q-TOF/MS扣除背景的总离子流图(BPC图)见图(2A),其保留时间为 13.9 min;对应的一级质谱图

(2B)可见 m/z 301 为槲皮素的准分子离子峰,二级质谱图(图 2C)可见主要的碎片离子有 m/z 273.067 3 ($[M-H-CO]^-$), m/z 179.016 4, 151.018 9 为 ($C_7H_3O_4^-$) 等,其中 m/z 151.018 9 ($C_7H_3O_4^-$) 为基峰,符合黄酮类的裂解规律^[9]。

3.3 黄酮类化学成分的分析 通过 UFLC-Q-TOF/MS 方法的分析,得到保留时间、一级质谱和二级质谱信息,通过测得的精确质量数,推测该化合物的分子式,利用自建的化学成分数据库,结合相关文献对白花蛇舌草中黄酮类成分进行鉴定,共鉴定出 13 个黄酮类成分、1 个三萜类和 1 个蒽醌类成分。结果如表 1 所示,所有目标化合物准分子离子的精确质

量数误差都在 3×10^{-6} 以内,还存在一些响应很高但没有鉴别出来的化合物。

3.4 化合物的鉴定 以化合物 **6** 为例:说明各色谱峰的鉴别过程。保留时间在 10.887 min 时的一级质谱图(图 3A)给出 m/z 为 463.086 2 的准分子离子峰 $[M-H]^-$,对应的二级谱图(图 3B),可见 m/z 301.035 5 $[M-H-Glc]^-$ 的碎片,利用 Formula finder 软件计算精确质量数的元素组成为 $C_{21}H_{20}O_{12}$, $[M-H]^-$ 的理论值为 463.088 2,实测值为 463.089 3,误差为 -2.4×10^{-6} ,实际同位素峰与理论同位素峰相匹配(图 3C),可判断化合物 **2** 为槲皮素-3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。

表 1 白花蛇舌草黄酮类化学成分的分析结果(负离子)Da:道尔顿

NO	t_R /min	分子式	化合物	M-X	Mass /Da	理论相对 分子质量	实测相对 分子质量	误差 /ppm	主要碎片/Da
1	8.695	$C_{37}H_{38}O_{19}$	山奈酚-3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>Z/E</i> -阿魏酰基)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基]- β - <i>D</i> -吡喃半乳糖苷	M-H	786.200 7	785.193 5	785.200 9	-0.9	785.200 9,285.039 9
2	9.340	$C_{27}H_{30}O_{17}$	槲皮素-3- <i>O</i> -槐糖苷		626.148 3	625.141 0	625.142 3	-2.5	625.142 3,301.035 4
3	9.912	$C_{26}H_{28}O_{16}$	槲皮素-3- <i>O</i> -桑布双糖苷	M-H	596.377 0	595.130 5	595.131 8	-2.2	595.131 8,301.035 4
4	10.416	$C_{27}H_{30}O_{16}$	山奈酚-3- <i>O</i> -(2- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- β - <i>D</i> -吡喃半乳糖苷	M-H	610.153 4	609.146	609.145 3	0.3	609.150 8,285.039 7
5	10.597	$C_{27}H_{30}O_{16}$	芦丁	M-H	610.153 4	609.146	609.145 4	1.3	609.149 1,301.035 0
6	10.887	$C_{21}H_{20}O_{12}$	槲皮素-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	M-H	464.095 5	463.088 2	463.086 2	-2.4	463.089 3,301.035 5
7	11.578	$C_{38}H_{40}O_{21}$	槲皮素-3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>Z/E</i> -芥子酰基)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基]- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	M-H	832.206 2	831.198 9	831.204 9	-2.5	625.143 0,301.035 4
8	11.642	$C_{27}H_{30}O_{15}$	山奈酚-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - α - <i>L</i> -鼠李糖基)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	M-H	594.158 5	593.151 2	593.153 1	-3.0	593.153 1,285.039 2
9	11.901	$C_{37}H_{38}O_{20}$	槲皮素-3- <i>O</i> -[2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - <i>Z/E</i> -阿魏酰基)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基]- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	M-H	802.206 2	801.188 4	801.195 0	-0.8	801.195 0,625.143 7,301.035 4
10	12.301	$C_{21}H_{20}O_{11}$	山奈酚-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	M-H	448.100 6	447.093 3	447.094 3	-0.2	447.094 3,285.040 1
11	13.353	$C_{15}H_{10}O_7$	槲皮素	M-H	302.042 7	301.035 4	301.035 4	0.6	301.035 4,151.003 5
12	14.161	$C_{15}H_{10}O_6$	山奈酚	M-H	286.047 7	285.040 5	285.040 4	0.2	-
13	16.885	$C_{16}H_{12}O_5$	3-甲氧基-5,7-二羟基-黄酮醇	M-H	284.068 5	283.061 2	283.061 2	-0.6	268.036 3,253.013 6
14	2.850		未知				153.023 0		108.021 9,91.019 5
15	6.460		未知				353.086 7		353.086 8,191.055 2
16	12.714	$C_{26}H_{30}O_{13}$	<i>Z/E</i> -6- <i>O</i> -香豆酰桂皮酰鸡尿藤次苷甲酯	M-H	550.168 6	549.161 4	549.161 0	-0.8	549.161 0,369.098 3,223.060 3,163.039 5
17	13.012		未知				853.584 0		853.584 0,790.590 0
18	16.459		未知				329.232 4		329.232 4,311.221 4,293.211 5,229.143 3,211.132 9,171.101 7
19	18.279	$C_{15}H_{10}O_3$	2-甲基-3-羟基蒽醌	M-H	238.063 0	237.055 7	237.054 5	-0.7	237.054 5,209.059 2,195.043 5,179.049 0
20	21.786		未知				597.307 6		597.307 6,417.239 0,315.047 2,281.248 3,241.010 8,152.995 0
21	23.560		未知				271.227 3		271.227 3,253.216 0,225.221 7,197.189 4

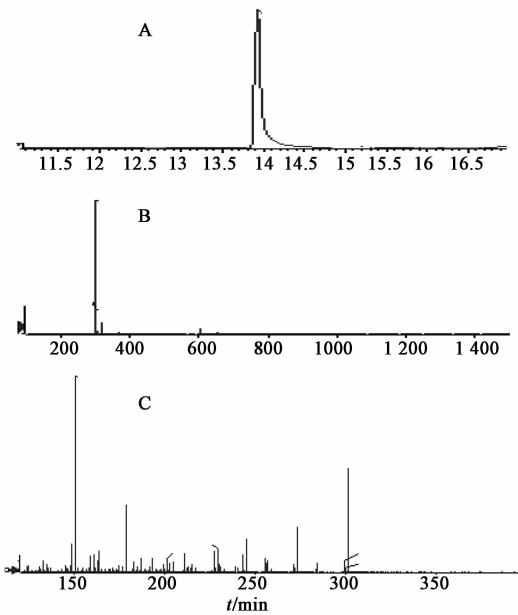


图2 槲皮素对照品的色谱图(A)、一级质谱图(B)和二级质谱图(C)

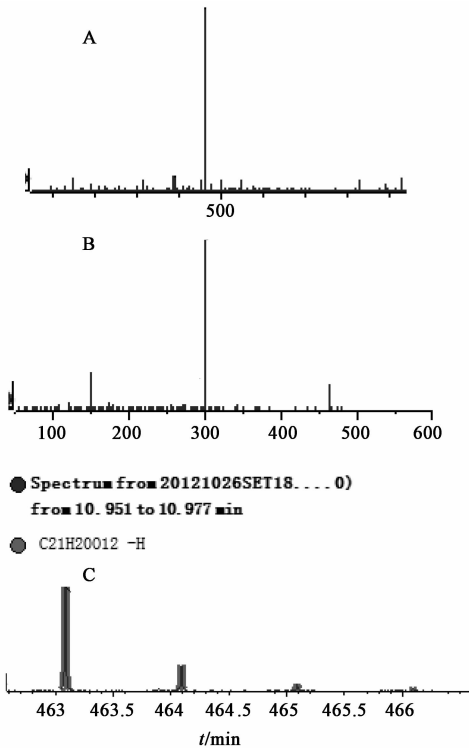


图3 化合物2的一级(A)、二级(B)质谱和同位素匹配(C)

4 讨论

通过比较甲醇-水,乙腈-水,发现乙腈-水可以使白花蛇舌草中黄酮得到较好的分离,加入0.1%的

甲酸以增强离子化效率。最终以0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱。由于黄酮类化合物其分子中的羟基很容易形成稳定的氧负离子,所以在负离子模式检测所得总离子流图有较好的信噪比,故实验最终选择在负离子模式下进行。

对中药化学成分的分析 and 鉴定而言,高分辨质谱具有简单的数据采集流程,但如何在高分辨数据中,快速的发现和鉴定目标结构的化合物,已成为中药成分研究的限速挑战。UFLC-Q-TOF/MS 联用仪的优势在于:一次进样,同时获得高质量的 TOF-MS 和 TOF-MS/MS,通过精确相对分子质量,进行目标化合物的筛查和确证。本文运用 UFLC-Q-TOF/MS 方法快速鉴别出了白花蛇舌草中的13种黄酮类成分,一个三萜类成分和一个蒽醌类成分,并初步了解其质谱裂解规律。但还存在一些响应很高的色谱峰没有鉴别出来,需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] 立敏,周宏霞,刘丹. 白花蛇舌草的药理和临床应用进展[J]. 中医药信息,2001,18(4):14.
- [2] 陈文霞,谈献和,李伟,等. 白花蛇舌草 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 现代中药研究与实践,2006,20:38.
- [3] 陈永康. 白花蛇舌草化学成分研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):290.
- [4] 孙佳,赵冬耕,王明艳,等. 槲皮素对 SMMC-7721 肝癌细胞 PI3K/AKT 信号通路影响的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(18):217.
- [5] 隋在云,王爱洁. 白花蛇舌草和半枝莲微粉配伍对小鼠 H22 肝癌细胞周期及凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(23):161.
- [6] 张海娟,陈业高,黄荣. 白花蛇舌草黄酮成分的研究[J]. 中药材,2005,28(5):385.
- [7] 任风芝,刘刚叁,张丽,等. 白花蛇舌草黄酮类化学成分的研究[J]. 中国药学杂志,2005,40(4):502.
- [8] Shoji Y, Tomoko H, Kazue L, et al Study on the constituents of *Atractylodes lancea*[J]. Chem Pharm Bull, 1989,37(11):2995.
- [9] 尹亮亮,董静,徐英,等. 应用负的 ESI-IT-TOF/MS 方法研究黄酮类化合物的裂解规律[C]. 北京:第9届全国中药和天然药物学术研讨会大会,2007.

[责任编辑 邹晓翠]