

高效液相色谱/电喷雾-离子阱/飞行时间质谱分析鉴定中药虎杖中的成分

No.LCMS-IT-TOF-007

摘要：建立快速、准确鉴别中药虎杖化学成分的液相色谱质谱法。采用高效液相色谱电喷雾离子阱飞行时间串联质谱（HPLC/ESI-QIT/TOFMS）对蒽醌类以及羟基二苯乙烯类对照品，包括大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、大黄酸、芦荟大黄素和虎杖苷进行分析，总结其多级裂解规律。研究结果表明在中药化学成分研究工作中采用电喷雾离子阱飞行时间质谱，可提高中药化学成分分析的效率并有利于新化合物的发现和鉴别。

关键词：虎杖 成分鉴定 电喷雾电离 离子阱 飞行时间质谱 LCMS-IT-TOF

虎杖为蓼科植物虎杖（*Polygonum cuspidatum* Sieb et Zucc）的根茎。性微苦、微寒，具有祛风、利湿、破瘀、通经的功效。中医临床用于治疗湿热黄疸、肺热咳嗽、疮痈肿毒、关节麻痹、经闭经痛、水火烫伤、跌打损伤等。

虎杖主要含有二苯乙烯类、蒽醌类、萘醌类和黄酮类等成分。现代研究表明，蒽醌类物质具有较强的抗菌、消炎、抗肿瘤、免疫调节及致泻作用。二苯乙烯类化合物具有降血压、降血脂、抗氧化、抗自由基、改善微循环、保护肝脏等多种功能。

近年来虎杖的研究工作主要集中在化学成分的分离鉴定、含量测定及药理作用研究等方面，使用液相质谱联用技术进行虎杖化学成分分析的报道较少，且多为液质联用（LC-MS）或液质/质联用（LC-MS/MS）的分析结果。例如，Yi等采用HPLC-MS方法鉴别了虎杖中的9个成分。本文采用高效液相色谱/电喷雾离子阱/飞行时间质谱（HPLC/ESI-QIT/TOFMS），获得虎杖化学成分的高精度多级质谱（ $MS^1 \sim MS^6$ ）数据，高效、准确地鉴别相关组分。这一工作对丰富虎杖化学成分的研究内容、总结相关化合物质谱裂解规律、虎杖药材品质评价和开发利用均有重要的意义。

■ 实验部分

1、仪器与材料

Prominence液相色谱系统（日本岛津公司）：2个LC-20AD输液泵，SIL-20AC可控温自动进样器，CTO-20A柱温箱，SPD-M20A二极管阵列检测器。电喷雾-离子阱/飞行时间质谱LCMS-IT-TOF（日本岛津公司）。电喷雾-离子阱/飞行时间质谱综合离子阱与飞行时间质谱的特点，可提供高分辨、高精度的多级（ MS^n ，最多10级）质谱数据。

乙腈、甲醇均为色谱纯（美国Fisher公司），甲酸为优级纯（日本和光纯药公司），流动相用水由Milli-Q纯水系统（美国Millipore公司）制得。

大黄素（Emodin，纯度大于97%）、大黄酚（Chrysophanol，纯度大于97.5%）、大黄素甲醚（Physcion，纯度大于98%）、大黄酸（Rhein，纯度大于98%）、芦荟大黄素（Aloe-emodin，纯度大于97%）及虎杖苷（Polydatin，纯度大于98%）对照品由中国药品生物制品检定所购得。

虎杖药材购于河北安国药材市场，经北京大学药学院王弘副教授鉴定为蓼科植物虎杖的干燥块根。

2、样品制备

对照品供试液制备

称取对照品10 mg，用甲醇定容至10 mL，配成浓度为1 mg/mL的储备液。取25 μ L浓度为1 mg/mL的储备液，用甲醇定容至25 mL，配制成浓度1 mg/L的供试溶液。

虎杖药材供试液制备

取虎杖药材粉末1.0 g（过60目筛），置具塞三角瓶中，加入50 mL甲醇，称重。置超声振荡器中提取30 min后，取出，放置至室温，称重。补充甲醇至原重量，混匀，过0.22 μ m微孔滤膜，即得。

3、实验条件

色谱条件

Diamonsil（钻石）C₁₈色谱柱（250 \times 4.6 mm i.d.; 5 μ m），流动相A相为0.1%甲酸水溶液，B相为乙腈。梯度洗脱程序：0.00~30.00 min，20%B~35%B；30.00~50.00 min，35%B~65%B；50.00~70.00 min，65%B~85%B；流速：1.0 mL/min；柱温：35 $^{\circ}$ C；检测波长范围：190~800 nm；进样量：1 μ L；分流比：1:4，即0.2 mL/min进质谱。

质谱条件

电喷雾电离（ESI）：正离子模式喷雾电压4.5 kV，负离子模式喷雾电压-3.5 kV；加热模块（HB）温度：200 $^{\circ}$ C；曲线脱溶剂管（CDL）温度：200 $^{\circ}$ C。

碰撞诱导解离（CID）参数：（1）碰撞能量：MS¹~MS³: 50%；MS⁴: 40%；MS⁵: 35%；MS⁶: 22%；（2）碰撞气比例：MS¹~MS³: 50%；MS⁴~MS⁶: 70%；（3）碰撞时间：MS¹~MS⁶: 30 msec。雾化气采用氮气（纯度 \geq 99.5%），流速1.5 L/min，检测器电压1.70 kV。高纯氩气（纯度 \geq 99.99%）作为CID碰撞气及冷却气。使用三氟醋酸钠（2.5 mmol/L）溶液对正、负离子模式m/z 100~1000的范围进行质量数校正。

使用自动采集模式，每一级自动选择基峰离子作为下一级的母离子进行碎裂。

数据分析由LCMSsolution 3.41工作站完成。结合分子式预测软件对多级质谱碎片作出综合分析，得到化合物的分子式及碎片信息。

结果与讨论

1、对照品多级质谱裂解规律研究

1) 蒽醌类化合物裂解规律

分别对大黄素、大黄酚、大黄素甲醚、大黄酸以及芦荟大黄素等5个常见蒽醌对照品进行研究。蒽醌类化合物在ESI负离子模式下均有良好的信号，生成较强的[M-H]⁻分子离子，适于进行多级质谱研究；而正离子模式下蒽醌化合物的[M+H]⁺分子离子峰较弱，特别是大黄酸在正离子模式下无法产生相应的[M+H]⁺分子离子峰。因此，本实验选择ESI负离子模式进行蒽醌化合物裂解规律的研究。

研究表明，除芦荟大黄素外，其它蒽醌化合物的裂解规律主要为逐级失去CO中性碎片，并出现CO₂的中性丢失。

大黄素与大黄酚的化学结构式相差1个羟基取代基，其多级质谱碎片具有较大的相似性，如图1所示。分别以MS²碎片离子m/z 225为母离子，大黄素与大黄酚得到一致的MS³~MS⁵碎片。而大黄素的MS²碎片中具有明显的m/z 241离子，大黄酚中则无此离子。因此，m/z 241碎片离子可作为除分子离子峰之外，鉴别大黄素和大黄酚的特征离子。

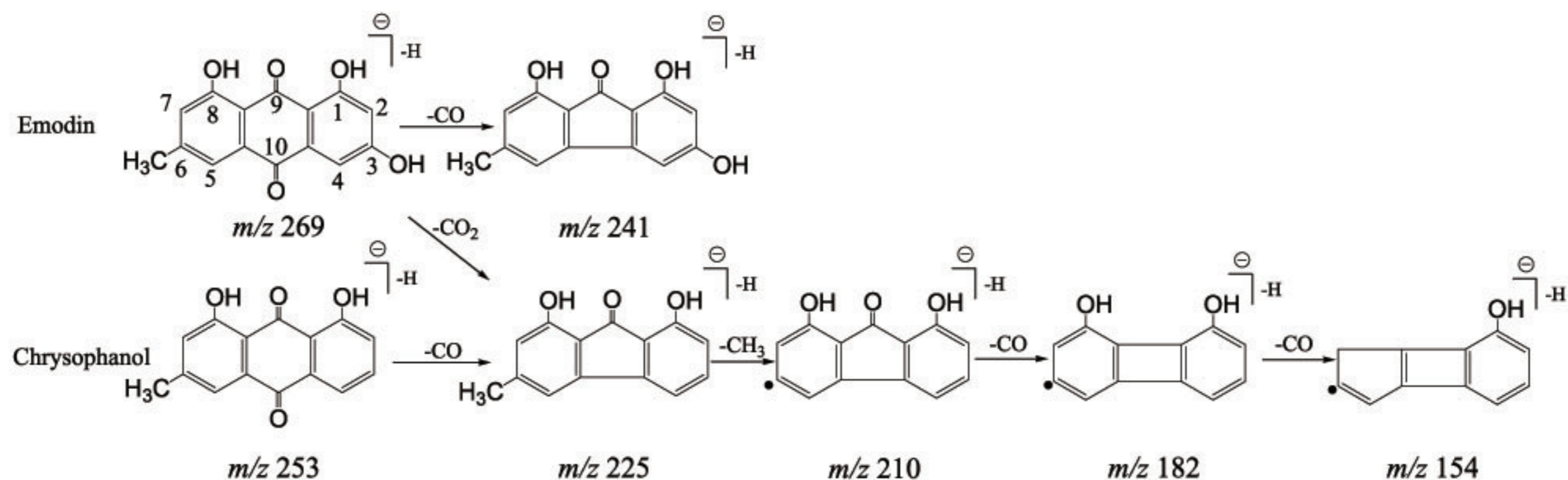


图1 大黄素和大黄酚的裂解途径示意图

大黄酸 (Rhein) 与芦荟大黄素 (Aloe-emodin), 结构相似, 仅在3-位的取代基有所不同: 大黄酸为羧基, 芦荟大黄素为羟甲基。大黄酸的裂解过程中出现连续的CO丢失, 体现一般蒽醌化合物的典型特征。芦荟大黄素与 大黄酸等其它蒽醌化合物相比, 其裂解途径具有较大的差别。在芦荟大黄素的裂解过程中连续出现质量数为29Da的 CHO中性丢失 (如图2所示), CHO为芦荟大黄素特有的中性碎片, 可作为其鉴别特征。

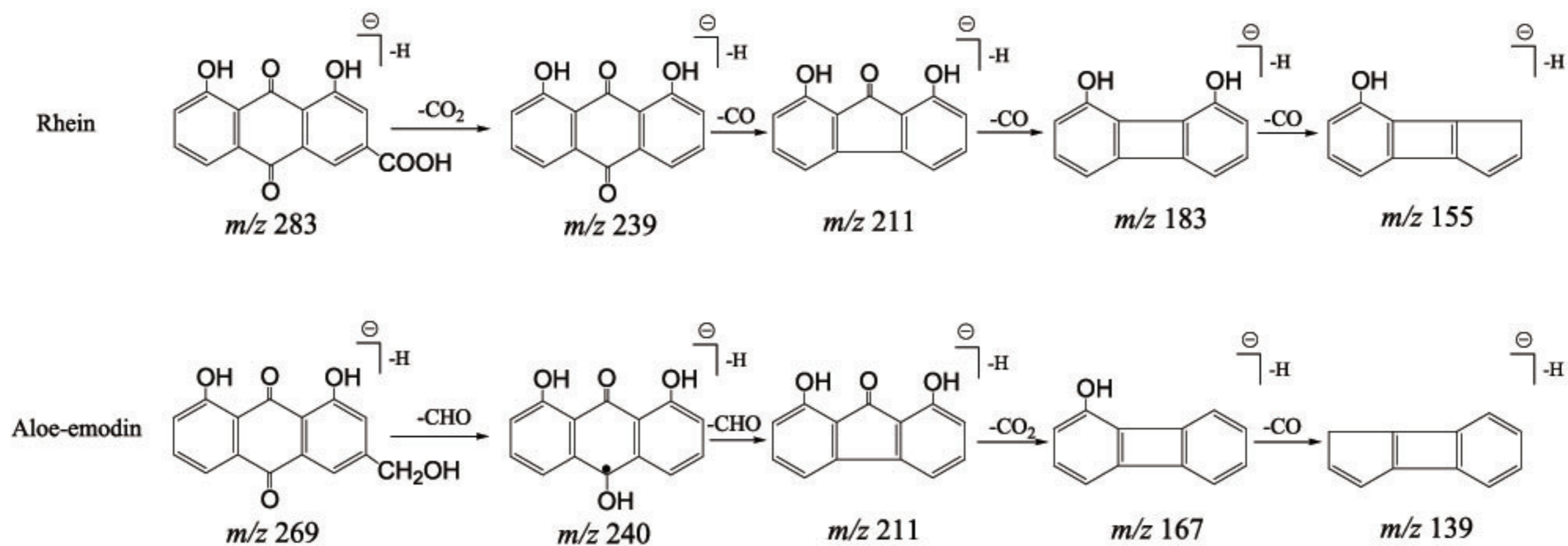


图2 大黄酸和芦荟大黄素的裂解途径示意图

大黄素甲醚 (Physcion) 也显示了独特的裂解特征, 如图3所示。由于甲氧基取代基的存在, 使得大黄素甲醚的MSⁿ碎片除分子离子峰外全部为偶数质量数的碎片离子。

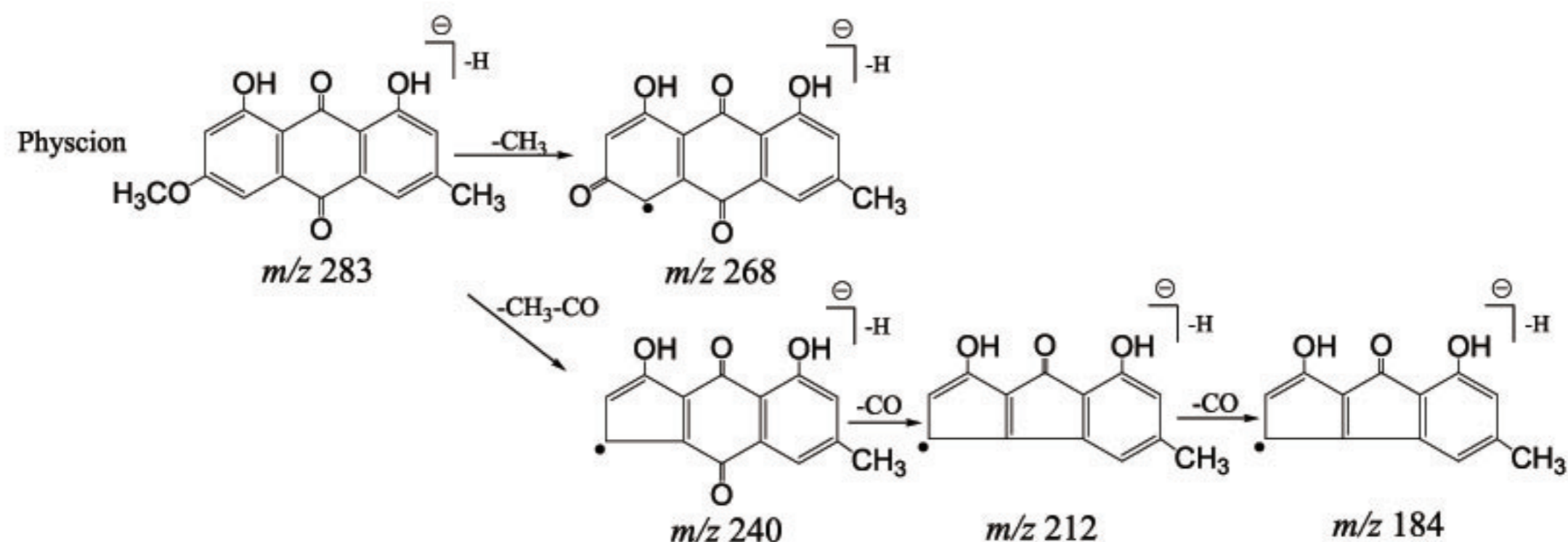


图3 大黄素甲醚的裂解途径示意图

5个蒽醌类化合物由于具有不同的取代基而出现不同特征的碎片离子, 根据其特征的碎片离子对虎杖药材中的蒽醌类化合物进行鉴定。

2) 二苯乙烯类化合物裂解规律

二苯乙烯类成分的裂解规律具有完全不同的特征, 主要为失去取代糖基生成苷元, 苷元继续碎裂产生质量数为42Da的C₂H₂O中性丢失。虎杖苷是虎杖中最主要的二苯乙烯类成分, 图4显示了其裂解规律。

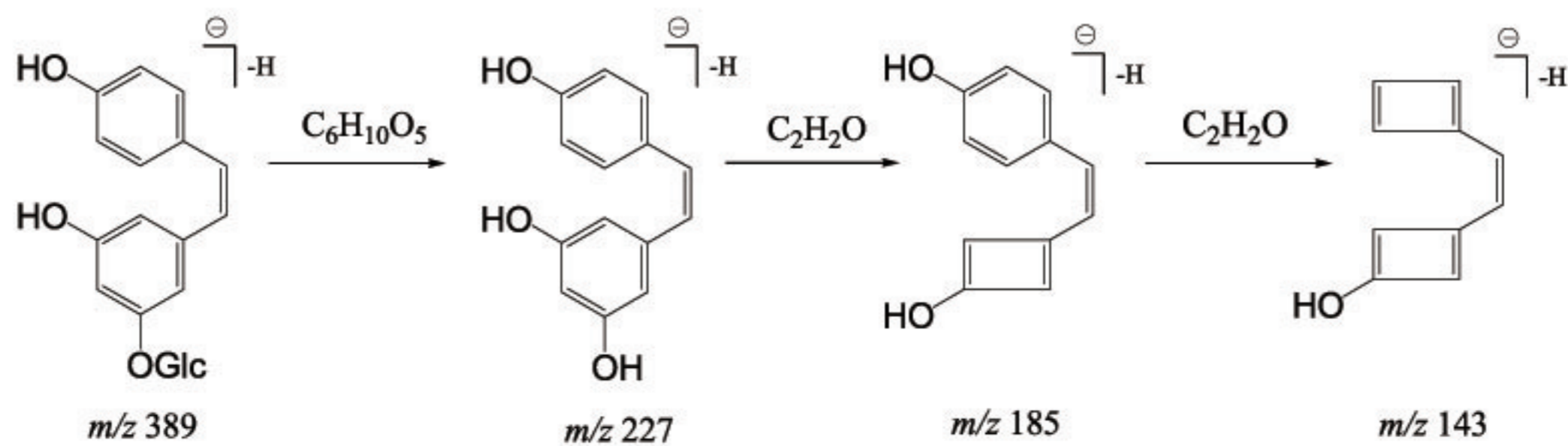


图4 虎杖苷裂解途径示意图

表1总结了6个对照品的通用名称、分子式、准确质量数及多级质谱数据，并列出了相应离子的相对丰度。通过对不同类型对照品的系统分析，建立了虎杖相关化学成分鉴别的质谱数据基础。

2、虎杖化学成分研究

对虎杖药材进行正、负离子模式分析。由于蒽醌苷元在负离子模式下具有较好的质谱响应，因此，着重分析负离子模式结果，将正离子模式结果作为成分鉴别的辅助依据。图5为负离子模式下得到的总离子流图（TIC）。对每个谱峰的多级碎片进行解析，对比对照品的裂解规律，综合紫外(UV)数据、保留时间及参考文献，共鉴别了10个化学成分。

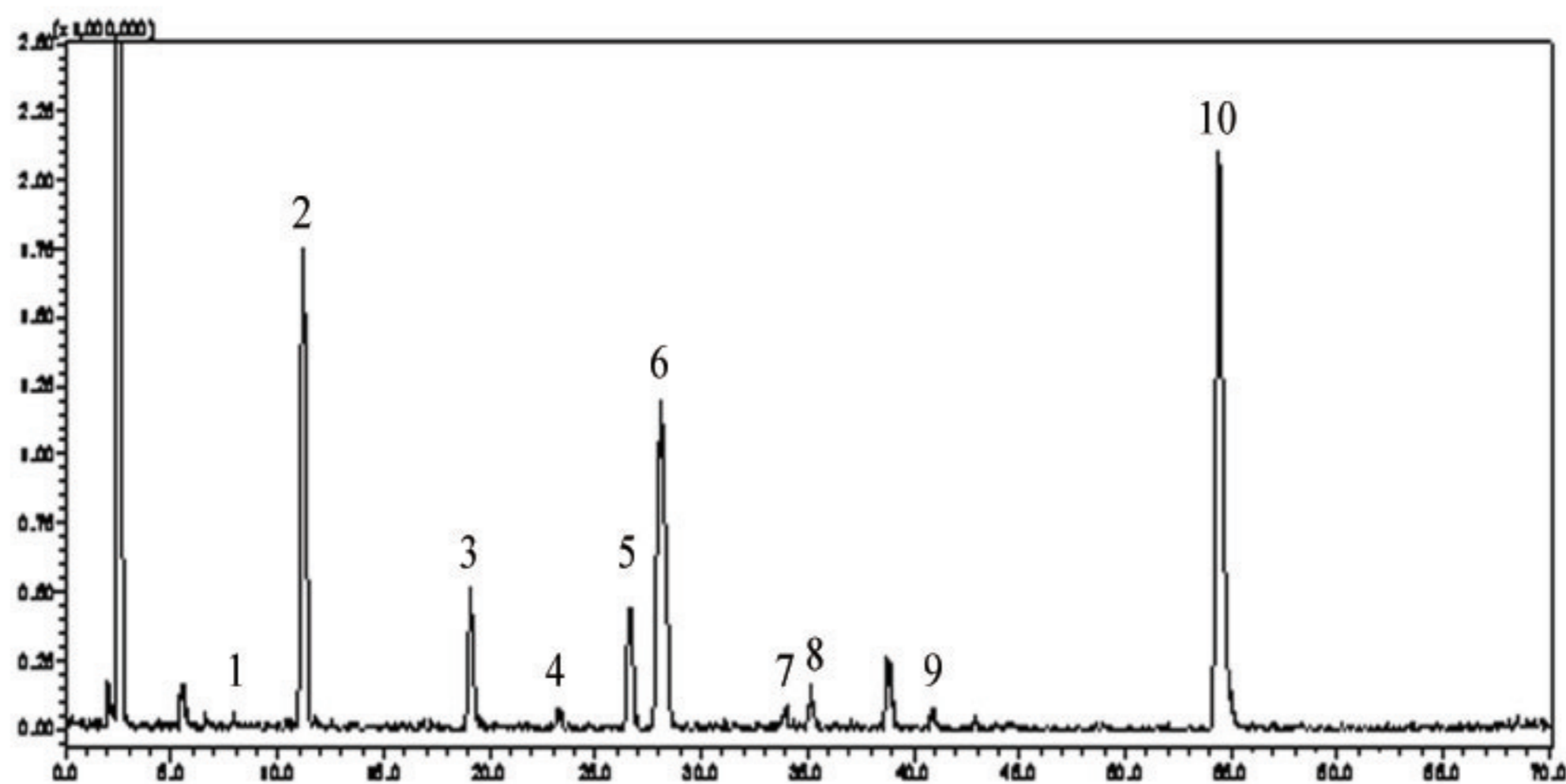


图5 虎杖甲醇提取物总离子流图

Separation method: diamonsil C₁₈ column(250 × 4.6 mm i.d., 5 μm), mobile phase A: water with 0.1% formic acid, mobile phase B: acetonitrile; gradient elution program: 0.00~30.00 min, 20%B~35%B; 30.00~50.00 min, 35%B~65%B; 50.00~70.00min, 65%B~85%B; flow rate: 1.0 mL/min; oven temperature: 35°C; wavelength range: 190–800 nm; inject volume: 1 μL

Peak identifications: 1. resveratrolsoid; 2. polydatin; 3. emodin-8-O-glucoside; 4. resveratrol; 5. torachryson-8-O-glucoside; 6. emodin-1-O-glucoside; 7. torachryson-8-O-(6'-acetyl)glucoside; 8. physcion-8-O-glucoside; 9. physcion-8-O-(6'-acetyl)glucoside; 10. emodin

1) 虎杖中蒽醌类成分的鉴定

在虎杖药材的多级质谱中，共有5个色谱峰的质谱裂解方式符合蒽醌类化合物的碎裂特征。色谱峰3的准分子离子峰为 m/z 431， MS^1 至 MS^2 的碎裂过程中出现六碳糖中性丢失， MS^2 ~ MS^5 级碎片为大黄素的典型碎片。虎杖中糖苷类成分所含糖基一般为葡萄糖，且多在8位取代，因此判断峰3为大黄素-8-O-葡萄糖苷。

峰6与峰3主要碎裂途径一致，为大黄素葡萄糖苷。峰6与峰3保留时间的差异显示峰6极性较小。当葡萄糖在1位取代时，葡萄糖上的羟基可与大黄素9位羰基以及3位羟基形成分子内氢键，降低化合物极性，延长保留时间。Shan等在研究虎杖活性成分的过程中，鉴别得到大黄素-1-O-葡萄糖苷。因此，鉴定峰6为大黄素-1-O-葡萄糖苷。

峰8在 MS^1 至 MS^2 的碎裂过程中出现六碳糖中性丢失， MS^2 ~ MS^5 级碎片为大黄素甲醚的特征碎片，则峰8为大黄素甲醚-8-O-葡萄糖苷。

峰9MS²~MS⁵碎片与峰8一致，MS¹至MS²产生204Da的乙酰葡萄糖中性丢失，一般，葡萄糖乙酰化多发生在葡萄糖6位，则推测峰9为大黄素甲醚-8-O-(6'-乙酰基)葡萄糖苷，为首次在虎杖中鉴别的化合物。

峰10的裂解过程与大黄素对照品相同且保留时间一致，故鉴定为大黄素。图6显示已鉴别的蒽醌类成分的结构。

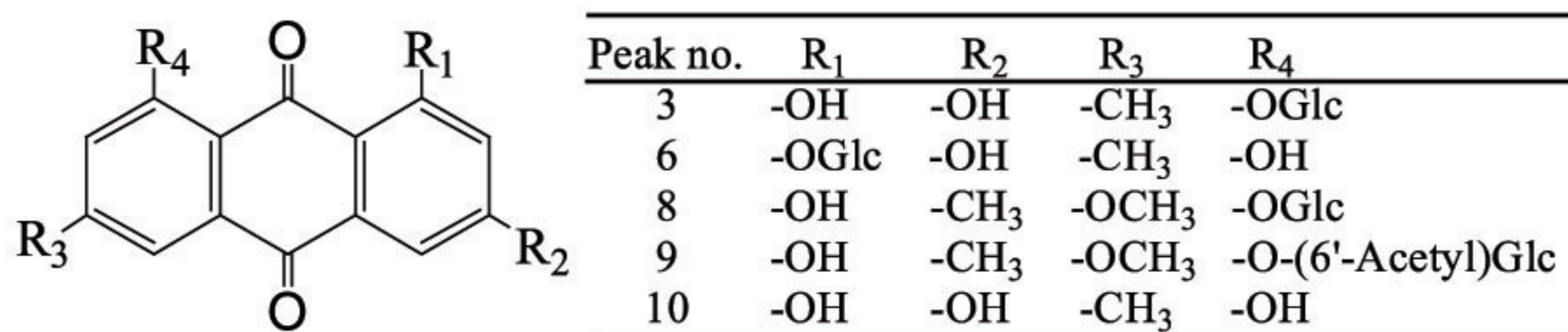


图6 峰3、6、8、9、10的化学结构式

Peak 3: emodin-8-O-glucoside; Peak 6: emodin-1-O-glucoside; Peak 8: physcion-8-O-glucoside; Peak 9: physcion-8-O-(6'-acetyl) glucoside; Peak 10: emodin

2) 虎杖中二苯乙烯类成分的鉴定

在虎杖药材的总离子流图中有3个峰（峰1、峰2和峰4）的多级碎片符合二苯乙烯类化合物的质谱裂解规律。峰1与峰2的MS²至MS⁵的碎片与虎杖苷对照品一致，其MS¹的准分子离子峰m/z435经分析为虎杖苷[M-H]⁻离子在ESI负离子模式下与流动相中甲酸分子（46Da）形成的加合物。峰2与虎杖苷对照品具有相同的保留时间，可确定峰2为虎杖苷。参考文献报道，峰1保留时间较短，且含量明显低于虎杖苷，则峰1鉴别为白藜芦醇-4'-O-葡萄糖苷。峰4的多级碎片与虎杖苷MS²~MS⁴的碎片一致，故鉴定为白藜芦醇。图7为峰1、峰2和峰4的化学结构式。

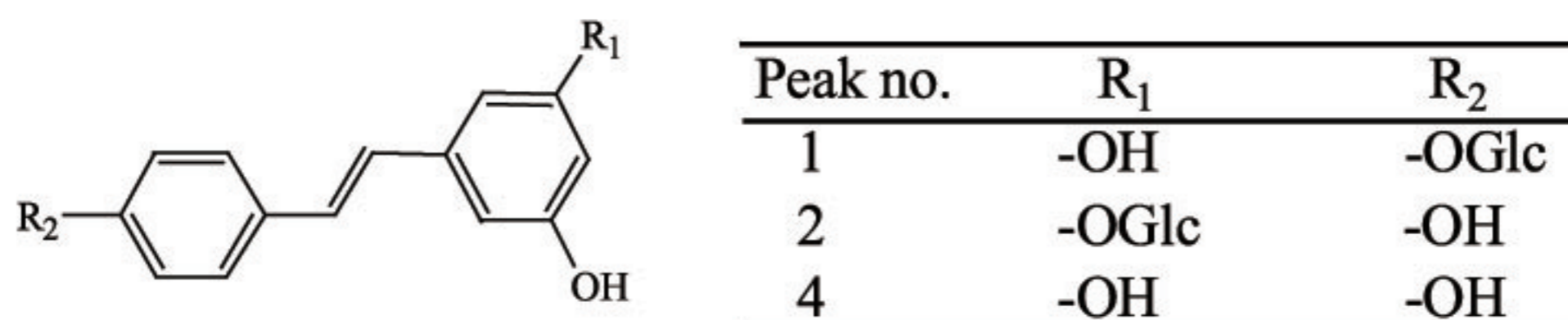


图7 峰1、2和4的化学结构式

Peak 1: resveratrolside; Peak 2: polydatin; Peak 4: resveratrol

3) 决明子类成分的质谱特征及虎杖中决明子类成分的鉴定

本研究根据参考文献鉴别了2个决明子类化合物，分别为峰5和峰7。决明子类化合物是虎杖的酚性成分，目前对此类化合物活性的研究还较少。根据峰5的准分子离子峰、UV数据，并综合文献报道，推测峰5为决明松-8-O-葡萄糖苷（Torachryson-8-O-glucoside），具有如图8所示的裂解过程。

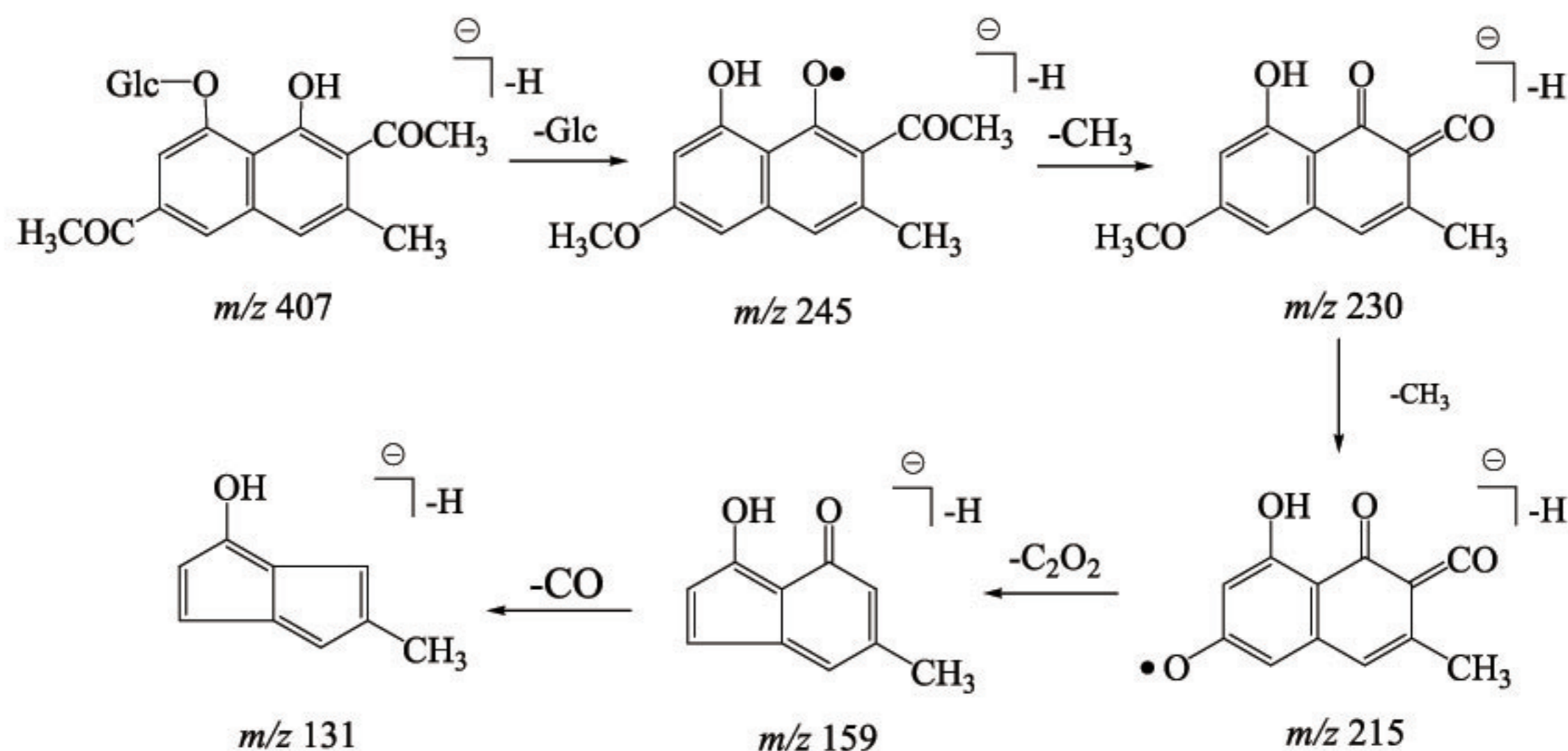


图8 决明子类化合物的裂解规律示意图

峰7的MS²至MS⁶级质谱图与峰5的MS²至MS⁶的谱图一致，因此二者具有相同的母核。但峰7的MS¹级谱图的母离子为m/z 449.1390，与MS²级子离子相差204Da，显示失去了乙酰化葡萄糖的中性碎片。一般，葡萄糖乙酰化多发生在葡萄糖6位，因此推测峰7为决明子-8-O-(6'-乙酰葡萄糖)苷，是首次在虎杖中鉴别的化合物。图9为2个决明子类化合物的结构式。

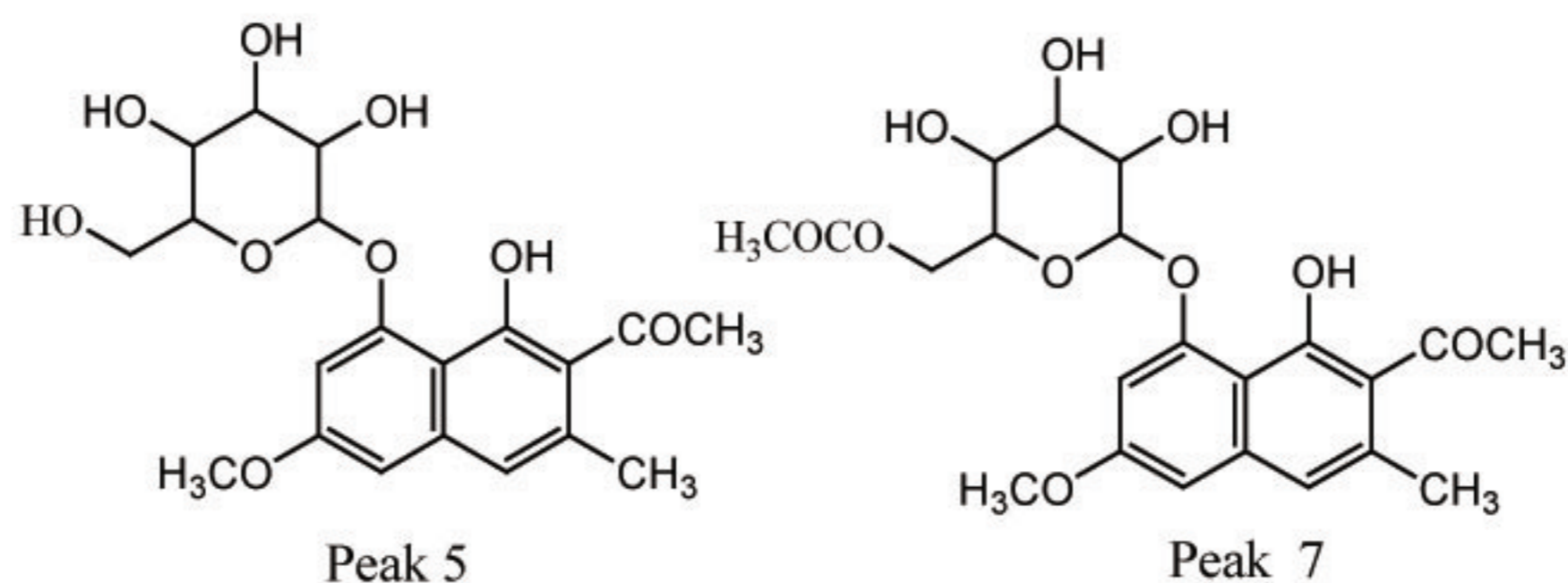


图9 决明子类化合物的推测结构

Peak 5: torachryson-8-O-glucoside; Peak 7: torachryson-8-O-(6'-acetyl)-glucoside

表2详细总结了以上10个化合物的保留时间、紫外数据、多级质谱数据及相应的鉴别结果。

结论

HPLC/ESI-QIT/TOFMS系统应用于中药化学成分研究领域，通过比较药材中未知化合物与对照品的多级质谱碎裂特征，可定性鉴别多种类型化合物。与传统液质联用技术相比，由HPLC/ESI-QIT/TOFMS系统获得的高精度多级质谱数据，可提供更多的化学结构信息，提高了结构解析的准确性。但多级质谱技术在结构鉴定方面，依然存在一定局限性，例如对取代基以及糖基结合位点的确认，裂解碎片的合理解释，相关参考文献较少等。因此，采用多级质谱数据进行结构确认的工作还需要进行深入的研究，总结大量不同类型化合物的裂解特征，从而为中药化学成分解析提供更可靠的依据。