

# SFE-LCMS-QTOF 联用测定补骨脂主要成分

## LCMS-QTOF-019

**摘要：**本文利用岛津超临界流体萃取技术（SFE）提取了中药补骨脂中的主要成分，并利用其中9种物质的标准品，在岛津超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪（LCMS-QTOF）上建立了定量标准曲线和高分辨二级质谱库。标准曲线下限0.2~1 μg/L，上限50~500 μg/L， $R^2 > 0.990$ 。在标准质谱库的基础上，推断了主要二级碎片离子的裂解路径。根据标准曲线，测定补骨脂样品中相关物质的含量为0.27~38.52 mg/g。样品中相关物质的二级质谱与标准谱库匹配良好，库搜索匹配度 >90%。

**关键词：**四极杆飞行时间质谱（QTOF） 离线超临界萃取（Offline-SFE） 补骨脂 高分辨质谱库

补骨脂是豆科植物补骨脂的干燥成熟果实，性味辛、苦、温，归肾、脾经。补骨脂具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻等功效，外用可消风祛斑，主要用于治疗肾阳不足所致阳痿遗精、腰膝冷痛、肾虚作喘、外用也可治疗白瘫风、斑秃。主要化学成分为香豆素类、单萜酚类、黄酮类，具有雌激素样作用以及抗炎、抗菌、抗真菌、抗氧化、抗肿瘤和免疫调节的活性，用于预防和治疗骨质疏松、细菌感染、哮喘和骨关节炎等。然而长期或大量服用补骨脂具有引发肝损伤的潜在危险，并有光毒性、肾毒性和生殖毒性，限制了其在临床中的应用。因此，充分了解补骨脂的化学成

分谱，对全面掌握补骨脂致毒机制至关重要。

传统分析方法需利用甲醇等有机溶剂对补骨脂样品进行萃取，费时费力且污染较大。本文采用岛津公司超临界流体萃取（SFE）技术，利用超临界态二氧化碳对补骨脂的主要成分进行了快速提取。在LCMS-9030超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪上建立了9种主要成分的标准曲线及高分辨标准二级质谱库，解析了二级质谱裂解规律。在此基础上，通过精确质量数及二级质谱对SFE提取样品中相应物质进行了确证，并定量分析了相应浓度。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 Nexera-UC Offline-SFE 超临界萃取系统，具体配置：SFE-30A 超临界流体萃取单元，LC-30AD<sub>SF</sub> 二氧化碳输液泵，LC-20AD<sub>Xr</sub> 输液泵（含 LPGE 低压梯度比例阀），SFC-30A×2 背压调节单元，CBM-20A 系统控制器，LabSolutions V 5.91 工作站软件。

岛津 LCMS-9030 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱联用仪，具体配置：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5R</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-9030 四极杆飞行时间质谱仪，LabSolutions V 5.97 工作站软件，质谱解析软件 LabSolutions Insight Explore LCMS。

### 1.2 分析条件

#### SFE 萃取条件

萃取剂：A：超临界态二氧化碳；B：乙醇

萃取流速：5 mL/min

萃取剂比例：10% B

静态萃取：3 min

#### 液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GISS, 2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.9 μm

流动相：A：水；B：甲醇

进样体积：1 μL

洗脱方式：梯度洗脱（表1）

动态萃取：8 min

萃取温度：45°C

萃取背压：20 MPa

萃取次数：3 次循环萃取

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

表 1 液相梯度时间程序

Time(min)	%B
0.00	50
1.00	50
5.00	95
8.00	95
8.10	50
10.00	STOP

## 质谱条件

离子源: ESI (+)、ESI (-)

离子源接口电压: 4.0 kV (+)、-3.0 kV (-)

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10 L/min

加热气: 空气 10 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

接口温度: 300°C

 采集模式: MS<sup>1</sup> (m/z 50 -400)

MS/MS (m/z 50 - 350)

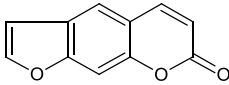
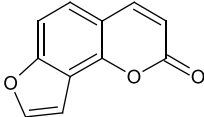
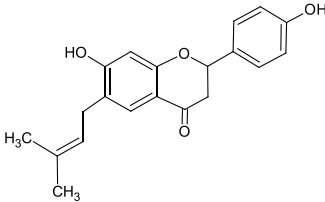
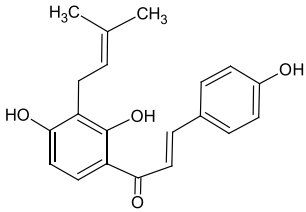
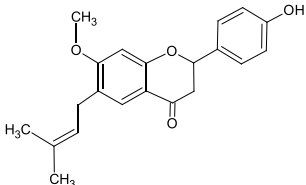
碰撞能量 (CE): (35±17) V

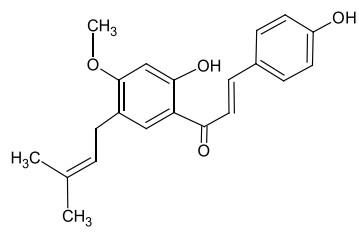
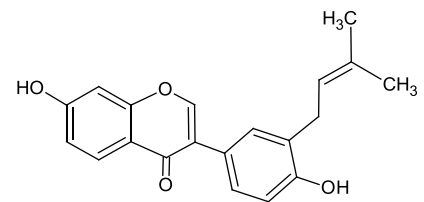
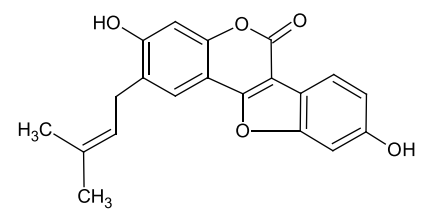
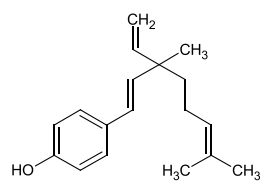
ID: ON

## 1.3 目标物信息

本次实验 9 种目标物质基本信息如表 2 所示。

表 2 目标物质基本信息

编号	物质	化学式	分子量	结构式	分析模式
1	补骨脂素	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	186.17		+
2	异补骨脂素	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	186.17		+
3	补骨脂甲素	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	324.37		-
4	补骨脂乙素	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	324.37		-
5	补骨脂二氢黄酮甲醚	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	338.40		-

6	4'-O-甲基补骨脂查尔酮 B	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	338.40		-
7	新补骨脂异黄酮	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	322.35		-
8	补骨脂定	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	336.34		-
9	补骨脂酚	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O	256.37		-

## ■ 样品前处理

用 24 目中草药粉碎机将盐炙补骨脂磨成粉末，准确称取 2 g 左右补骨脂粉末样品，放置于 5 mL SFE 萃取罐中，由超临界流体萃取，萃取条件见 1.2 SFE 萃取条件，萃取出液用乙醇吸收，并最终定容至 20 mL。

## ■ 结果与讨论

### 3.1 标准曲线绘制

将 9 种目标物标准品配制成混标溶液上机分析，根据 MS<sup>1</sup> 精确 m/z 提取色谱图定量分析（图 1、2），绘制标准曲线（图 3），线性范围及相关系数见表 3。

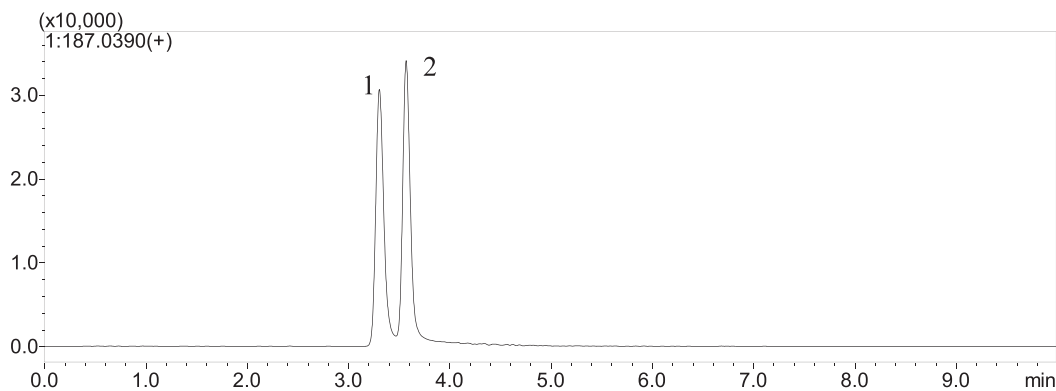


图 1 ESI (+) 模式 100 μg/L 混标提取离子流图（编号对应物质参见表 2）

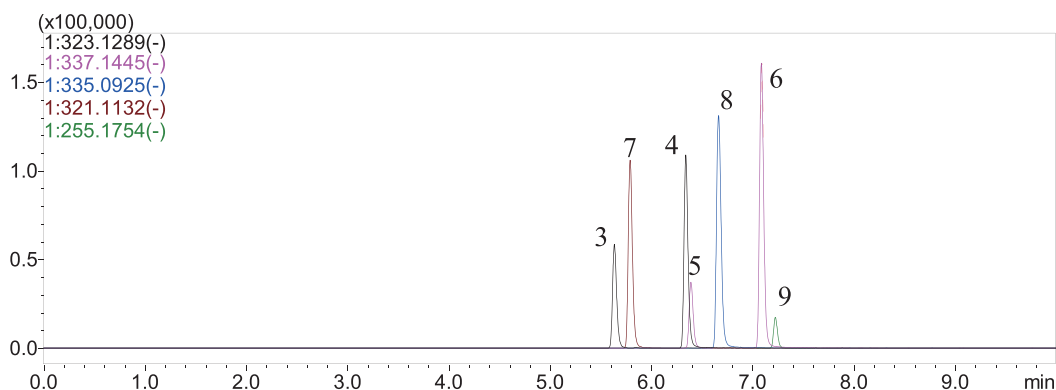


图 2 ESI (-) 模式 100 µg/L 混标提取离子流图 (编号对应物质参见表 2)

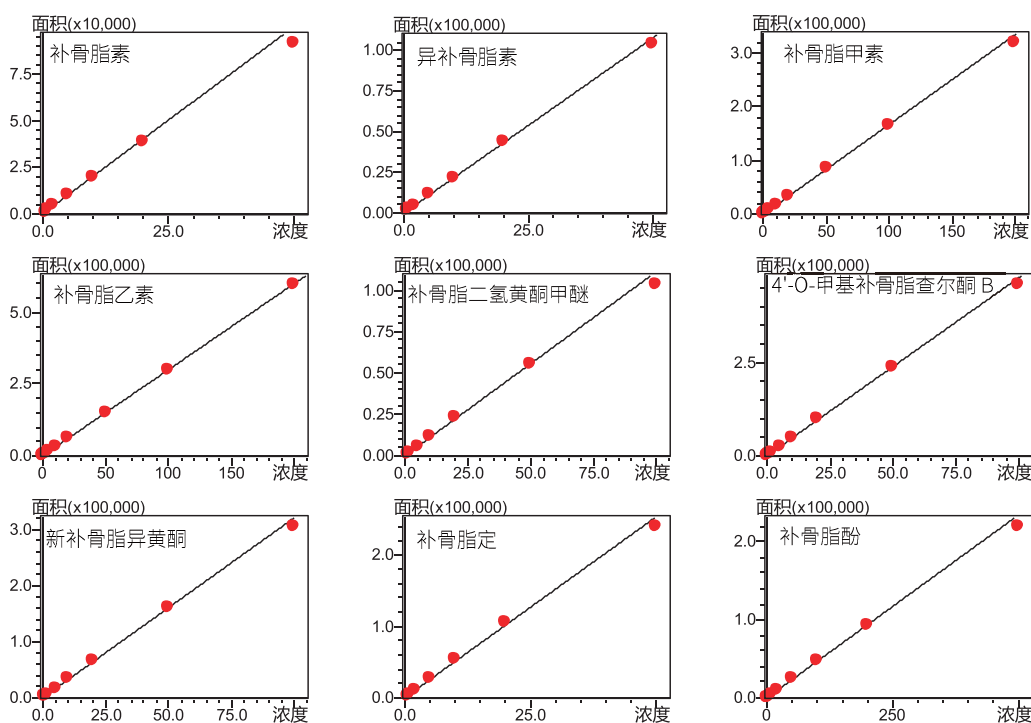


图 3 目标物质标准曲线

表 3 标准曲线方程及线性范围

编号	物质	保留时间 (min)	校准曲线	相关系数	线性范围 (µg/L)
1	补骨脂素	3.337	Y=2007.36X+164.720	r <sup>2</sup> =0.990	0.5-50
2	异补骨脂素	3.543	Y=2143.19X+287.446	r <sup>2</sup> =0.999	0.5-50
3	补骨脂甲素	5.663	Y=1699.27X-236.984	r <sup>2</sup> =0.999	0.5-200
4	补骨脂乙素	6.359	Y=3003.99X-335.959	r <sup>2</sup> =0.998	0.2-200
5	补骨脂二氢黄酮甲醚	6.412	Y=1113.00X-77.1179	r <sup>2</sup> =0.998	1-100
6	4'-O-甲基补骨脂查尔酮 B	7.108	Y=4773.52X-95.5994	r <sup>2</sup> =0.999	0.2-100
7	新补骨脂异黄酮	5.799	Y=3208.57X-174.052	r <sup>2</sup> =0.997	0.5-100
8	补骨脂定	6.688	Y=5080.87X+80.8283	r <sup>2</sup> =0.998	0.5-50
9	补骨脂酚	7.249	Y=469.491X-194.737	r <sup>2</sup> =0.999	1-500

### 3.2 标准质谱库建立及二级质谱解析

连接两通直接进样 1 pg 标准品单标（补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂酚 10 pg）获取目标物的标准一级和二级质谱图，建立标准质谱库，并推断主要碎片离子的裂解路径。图 4 至图 6 及表 4 展示了补骨脂素的相应结果，9 种物质的完整结果见附件。

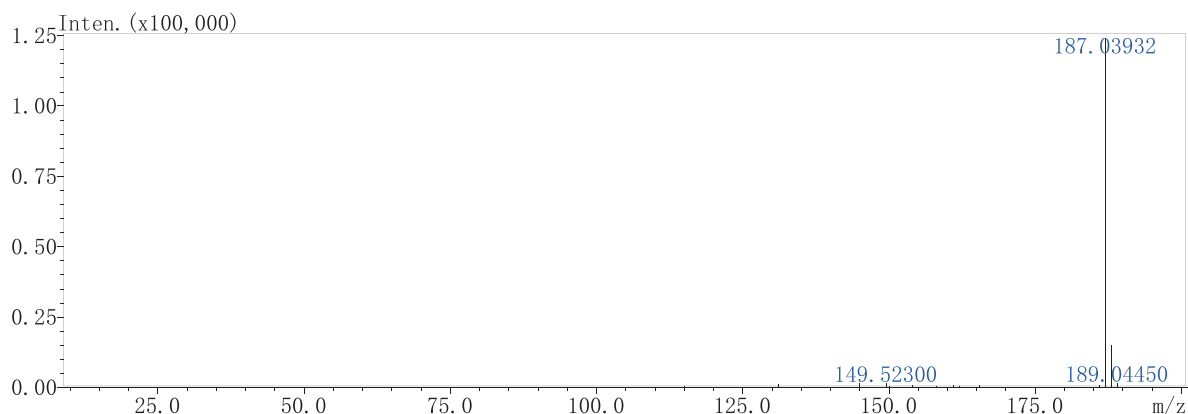


图 4 补骨脂素一级质谱图

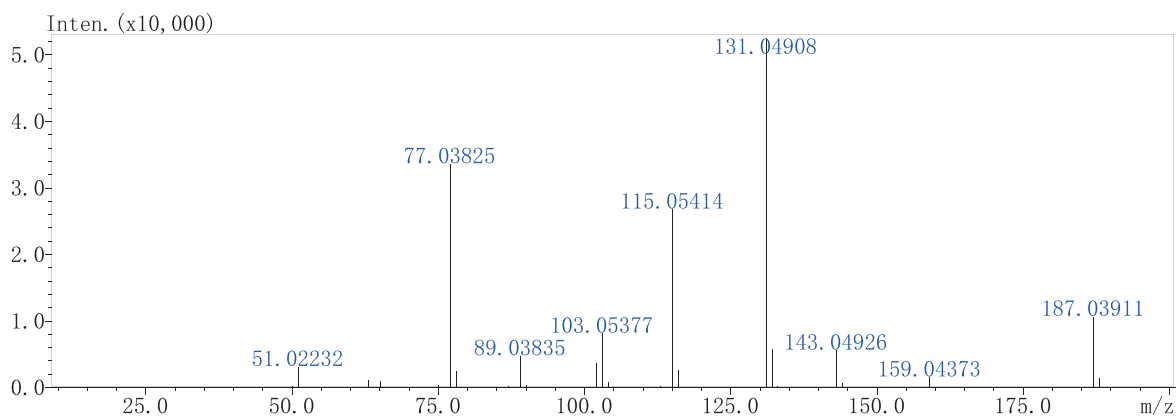


图 5 补骨脂素二级质谱图

表 4 补骨脂素 MS<sup>1</sup> 及主要 MS<sup>2</sup> 离子信息

离子类型	理论 m/z	实测 m/z	分子式预测 (M)	偏差 (ppm)	同位素得分
[M+H] <sup>+</sup>	187.03897	187.03932	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	1.85	99.5
[M+H] <sup>+</sup>	159.04406	159.04373	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-2.07	0.0
[M+H] <sup>+</sup>	143.04914	143.04926	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> O	0.82	98.5
[M+H] <sup>+</sup>	131.04914	131.04908	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O	-0.45	99.9
[M+H] <sup>+</sup>	115.05423	115.05414	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O	-0.72	100.0
[M+H] <sup>+</sup>	103.05423	103.05377	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub>	-4.46	97.4
[M] <sup>+</sup>	102.04640	102.04612	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub>	-2.76	52.0
[M+H] <sup>+</sup>	89.03858	89.03835	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub>	-0.22 mDa	96.5
[M+H] <sup>+</sup>	77.03858	77.03825	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	-0.32 mDa	99.3
[M+H] <sup>+</sup>	51.02293	51.02232	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	-0.61 mDa	0.0

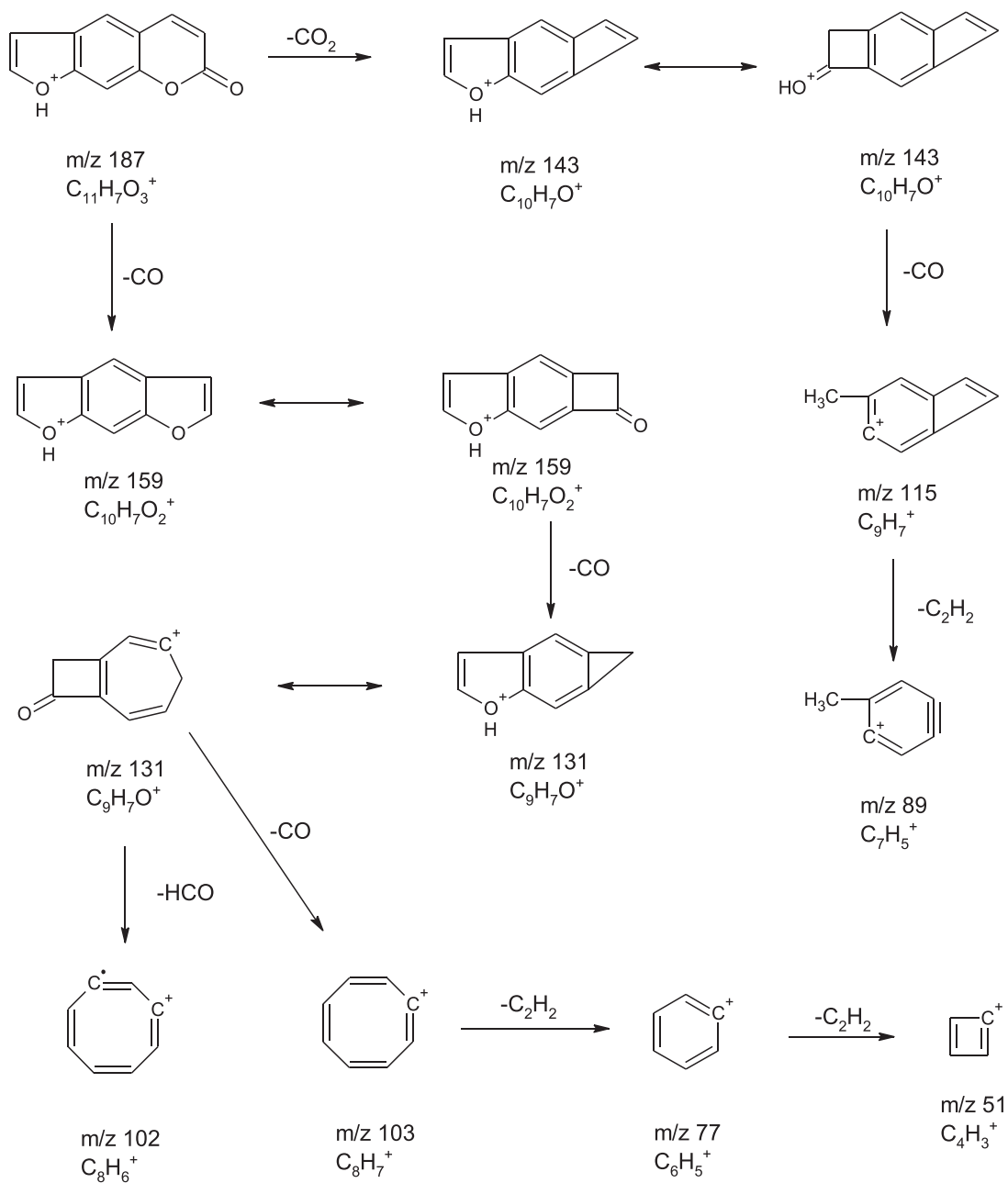


图6 补骨脂素可能的二级质谱裂解规律

### 3.3 实际样品分析

将补骨脂粉末萃取液稀释一定倍数后上机分析，色谱图如图7、8所示。根据3.1建立的标准曲线计算上机样品中目标物浓度，再结合稀释倍数、萃取液体积和所萃取的补骨脂粉末重量计算出粉末中的浓度（表5）。将实际样品中目标物的二级质谱图在3.2中建立的标准谱库中进行搜索，匹配度均>90%（表5），且能够很好地区分补骨脂素和异补骨脂素这一对同分异构体（图9）。

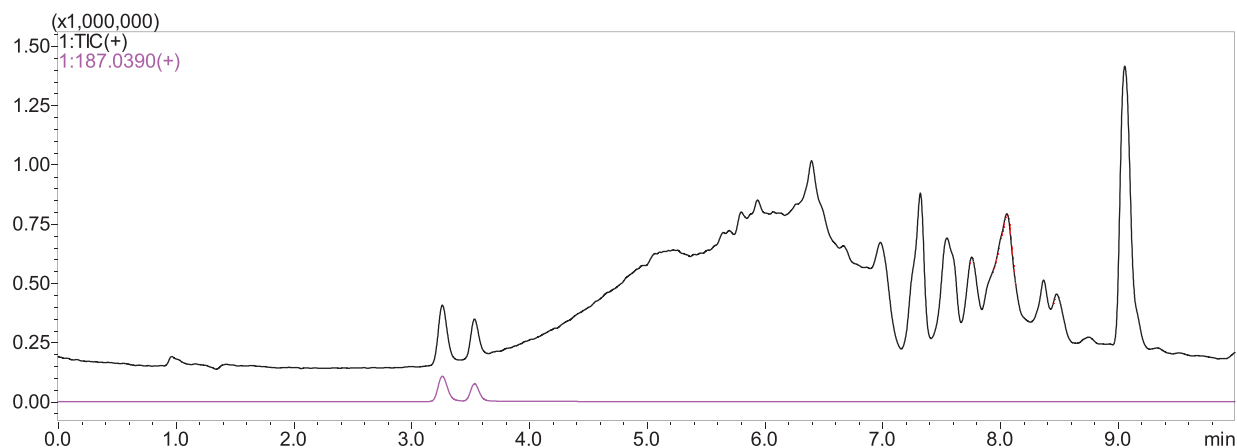


图 7 1000 倍稀释后正模式下实际样品 TIC 图和提取离子流图

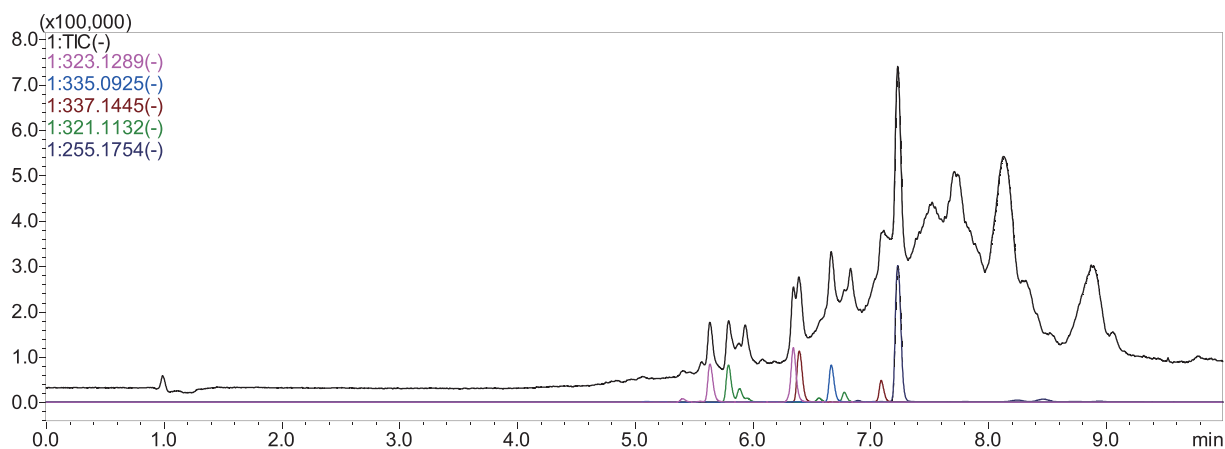
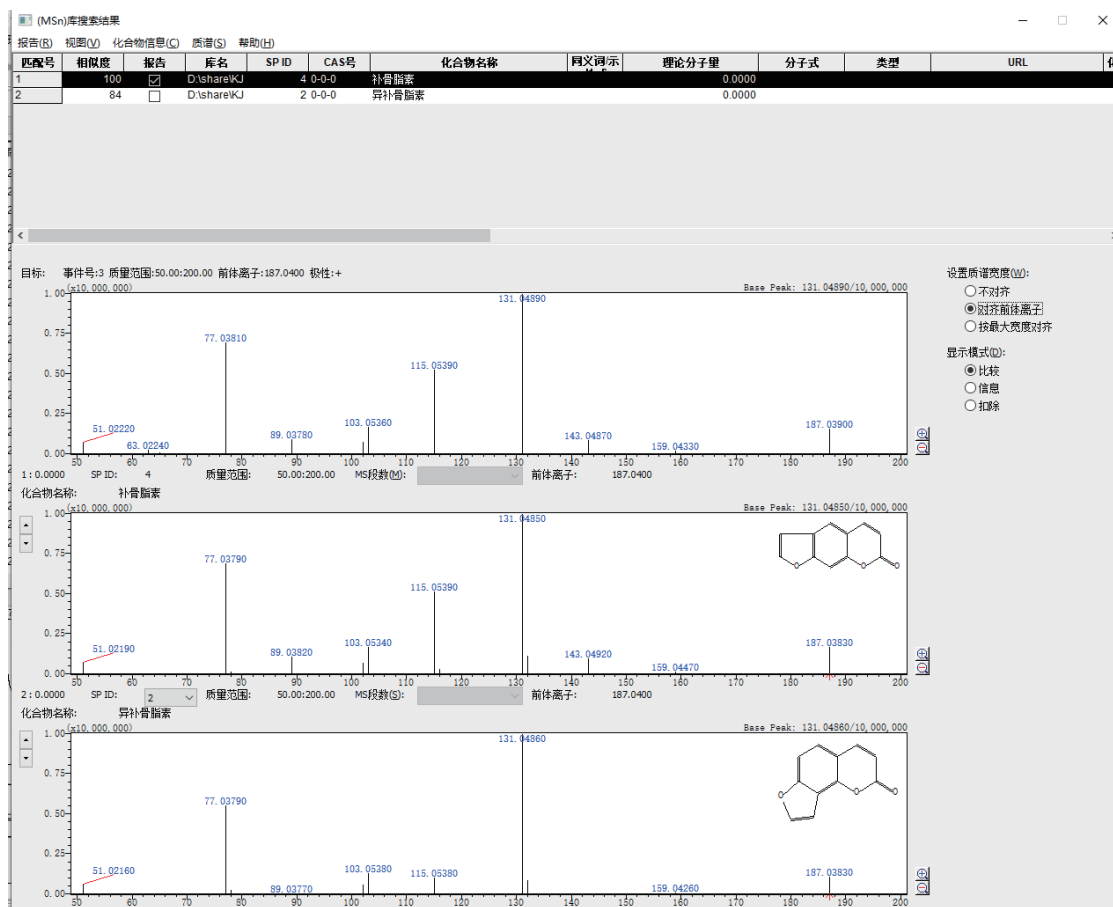


图 8 1000 倍稀释后负模式下实际样品 TIC 图和提取离子流图

表 5 补骨脂粉末样品目标物浓度

编号	物质	溶液浓度 (µg/L)	稀释倍数	粉末浓度 (mg/g)	库搜索得分
1	补骨脂素	37.992	10000	3.74	100
2	异补骨脂素	26.726	10000	2.63	100
3	补骨脂甲素	158.143	1000	1.56	99
4	补骨脂乙素	125.340	1000	1.23	99
5	补骨脂二氢黄酮甲醚	47.791	10000	4.70	100
6	4'-O- 甲基补骨脂查尔酮 B	27.913	1000	0.27	100
7	新补骨脂异黄酮	77.004	1000	0.76	94
8	补骨脂定	49.573	1000	0.49	98
9	补骨脂酚	391.573	10000	38.52	97



## ■ 结论

本文利用 LCMS-9030 建立了补骨脂中 9 种物质的标准曲线, 标准曲线下限 0.2~1 μg/L, 上限 50~500 μg/L, 线性范围 100-1000 倍,  $R^2 > 0.990$ ;  $MS^1$  误差  $< 2$  ppm, 同位素得分  $> 97$ ,  $MS^2$  误差  $< 5$  ppm。实际样品二级质谱与标准谱库匹配得分  $> 90\%$ , 相应物质浓度 0.27~38.52 mg/g。

岛津应用云

