

超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法快速 鉴定水飞蓟中的活性成分

王奎武^{1*}, 胡新玲², 张虹¹, 杜琪珍¹

(1. 浙江工商大学 食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310035;

2. 山东省新泰市第一人民医院 药剂科, 山东 新泰 271200)

[摘要] 目的: 对水飞蓟中七种黄酮木脂体类活性成分在电喷雾串联质谱碎裂机制进行了探讨。方法: 利用超高效液相色谱-离子阱电喷雾串联质谱(UPLC-ESI-MS/MS) 与诱导碰撞解离技术(CID) 在负离子模式下选择合适碰撞能量对水飞蓟中七种黄酮木脂体类活性成分进行了分析, 并对其二级质谱碎裂机制进行了探讨。超高效液相色谱条件 ACQUITY UPLC C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 流动相水-甲醇(0.1% 甲酸) 70:30; 流速 0.25 mL·min⁻¹; 进样 5 μL。结果: 超高效液相色谱可以很好地对此 7 种化合物进行分离, 在二级质谱中异构体产生其特征碎片离子, 呈现出一定的裂解规律, 据此可以快速灵敏地区分此异构体。结论: 本文为黄酮木脂体类化合物的快速检测提供了一种有效的方法。

[关键词] 水飞蓟素; 超高效液相色谱-串联质谱; 裂解机制

水飞蓟素(silymarin) 是菊科水飞蓟属的药用植物水飞蓟 *Silybum maritimum* L. Gaert. 种子的提取物^[1-2]。水飞蓟原产南欧、北非, 1972 年作为一种观赏植物由德国引入我国, 现江苏、陕西、北京等地有栽培, 后来作为保肝药用植物推广种植。水飞蓟素为黄酮木脂素类(flavonolignans) 化合物的混合物, 主要有效成分为水飞蓟亭 A 和 B (silychristin A, B)、水飞蓟宁(silychristin)、水飞蓟宾 A 和 B (silybin A, B)、异水飞蓟宾 A 和 B (isosilybin A, B), 见图 1。

水飞蓟素具有清除活性氧、对抗脂质过氧化、抗肝中毒、保护肝细胞膜、促进肝细胞修复、再生、免疫调节、抗肝纤维化、抗谷胱甘肽(GSH) 排空作用、抗肿瘤、降血脂等多种药理学活性, 临床用于治疗肝炎、胆囊炎等^[3-5]。在欧洲, 用乳蓟治疗肝病已有数千年的历史, 而在我国, 水飞蓟素被广泛用于治疗急性慢性肝炎、早期肝硬化、脂肪肝及中毒性肝损害等, 是一种常用临床制剂, 已经开发出了许多药品, 如益肝灵、利肝隆、肝泰胶囊和水飞蓟宾葡甲胺片等。

水飞蓟素中的主要有效成分均为同分异构体,

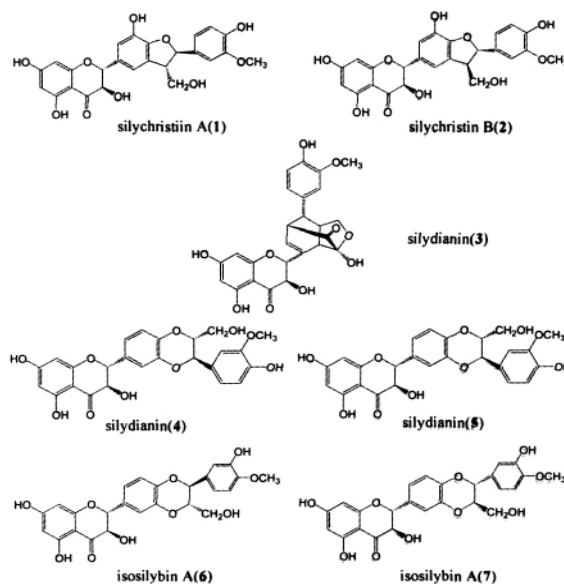


图1 化合物 1~7 的化学结构图

且其中还存在空间立体异构体, 使得该类化合物的分析和分离纯化较为困难。目前报道较多的是用 HPLC、毛细管电泳等方法^[6-14] 对水飞蓟素中有效成分进行分析。但这些方法往往不能对水飞蓟亭 B 和水飞蓟宁实现有效分离。因此, 建立一种简便、快速的类化合物分离和结构鉴定方法, 对其药理活性、体内代谢产物以及其他作用的研究具有重要意义。

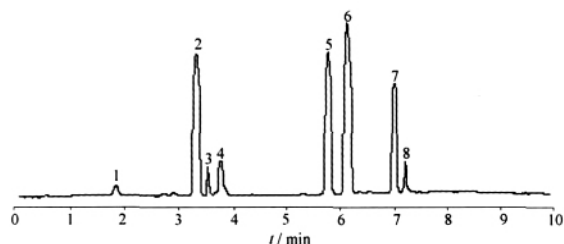
超高效液相色谱(ultra-performance liquid chro-

[稿件编号] 20101229012

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973624); 浙江省自然科学基金项目(Y4090121)

[通信作者] * 王奎武, 博士, 副教授, E-mail: wkw220@yahoo.com.cn

matography, UPLC) 由于其分析时间短、分离效果好等因素受到越来越多的重视。本文成功的运用 UPLC 对 7 种活性进行了完全的分离,在此基础上,使用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 对其二级质谱裂解规律进行了系统的研究,见图 2。与高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 相比,不仅可以获得高分析速度和高分离度,而且显著地提高了质谱检测的灵敏度。



2. 水飞蓟亭 A; 3. 水飞蓟宁; 4. 水飞蓟亭 B; 5. 水飞蓟宾 A;
6. 水飞蓟宾 B; 7. 异水飞蓟宾 A; 8. 异水飞蓟宾 B。

图2 水飞蓟素的 HPLC 谱

1 材料

液-质联用仪 Waters UPLC 超高压液相色谱仪 (二极管阵列检测器); THERMO LCQ FLEET 型质谱仪。色谱纯甲醇、色谱纯甲酸(均为 Merk 公司,德国) 水为双蒸水并经 0.45 μm 滤膜过滤。

2 方法

2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC C_{18} 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μm)。流动相水-甲醇 (0.1% 甲酸) 70:30。流速 0.25 mL $\cdot$ min $^{-1}$, 进样 5 μL 。

2.2 质谱条件

ESI 离子源, 离子源温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 毛细管电压 -4.5 kV, 负离子检出模式, 氮气流速 30 L $\cdot$ min $^{-1}$ 。扫描范围 m/z 100 ~ 1 000。

2.3 样品处理

将 5 kg 干燥水飞蓟种皮干粉, 用石油醚 (沸程 60 ~ 90 $^{\circ}\text{C}$) 脱脂 8 h, 过滤, 滤渣再用石油醚脱脂 4 h, 得滤渣。将经过脱脂处理后的滤渣, 分 3 次在超声波辅助下用乙酸乙酯浸提, 每次加入乙酸乙酯 10 L, 每次浸提 8 h。将 3 次得到的浸提液混合, 在 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩, 得到黄色粉末, 即水飞蓟素。取此样品 1 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 以 0.22 μm 滤膜过滤, 取 5 μL 注入 UPLC-MS 进行分析。

3 结果与讨论

3.1 液相色谱条件优化

水飞蓟素中的 7 种主要有效成分都是属于黄酮木脂素类的结构类似物, 因此该类化合物的分析和分离纯化较为困难。此类化合物带有酚羟基, 在水中会部分解离, 而未解离的羟基与固定相作用较强, 从而常导致拖尾。因此, 黄酮类化合物的 RP-HPLC 中需要加入酸如乙酸、甲酸、磷酸或高氯酸等调节 pH, 抑制解离, 克服拖尾现象^[10-12, 15-16]。考虑到要进行液质联用分析, 故本实验中采用在甲醇和水的体系中加入 0.1% 甲酸来提高各峰之间的分离度, 使各峰达到比较理想的分离效果。

3.2 质谱分析

3.2.1 质谱条件的优化

黄酮木脂素类化合物的 LC-MS/MS 分析方法中离子化模式有 APCI, ESI(-), ESI(+)。选定 ESI(-) 模式, 分别对电离电压、锥孔电压、离子源温度、去溶剂气温度、碰撞能量等条件进行优化。通过全扫描方式观察总离子流图, 得到母离子峰, 通过碰撞反应进行子离子扫描, 确定各物质分别的定量和辅助定性离子, 然后进行 CID 测定。反复调整仪器参数, 直至仪器检测达到最佳状态。

3.2.2 电喷雾串联质谱研究

在负离子模式下, 用电喷雾质谱对 7 种活性成分进行了研究。结果表明, 他们的一级质谱有着相同的准分子离子峰 m/z 481 $[\text{M} - \text{H}]^{-}$ 出现, 可知, 这 7 种成分的相对分子质量均为 482, 为同分异构体。为进一步确证这些化合物的结构, 采用串联质谱技术进行了 CID-MS/MS 分析研究, 实验结果见图 3, 二级质谱的主要碎片离子峰见表 1。

3.2.2.1 水飞蓟亭 A (silychristin A) 和水飞蓟亭 B (silychristin B) 的二级质谱裂解

水飞蓟亭 A 和水飞蓟亭 B 在负离子模式下的二级质谱图, 见图 3, 水飞蓟亭 A 和 B 主要产生 m/z 为 463 ($[\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^{-}$), 453 ($[\text{M} - \text{H} - \text{CO}]^{-}$), 451 ($[\text{M} - \text{H} - \text{HCHO}]^{-}$), 433 ($[\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{HCHO}]^{-}$), 419 ($[\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}_2]^{-}$), 355 ($[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3]^{-}$), 337 ($[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3 - \text{H}_2\text{O}]^{-}$), 325 ($[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3 - \text{HCHO}]^{-}$) 的碎片离子, 其具体裂解方式见图 4。

表1 化合物1~7的二级质谱的主要碎片峰

化合物	准分子离子峰(m/z)	二级质谱碎片峰[MS ²](m/z)		
		P-ion	Loss(u)	L-R
水飞蓟亭 A (silychristin A) 和水飞蓟亭 B (silychristin B)	481	463	18	H ₂ O
		451	30	HCHO
		433	48	H ₂ O + HCHO
		419	62	H ₂ O + CO ₂
		355	126	C ₆ H ₆ O ₃
		337	144	C ₆ H ₆ O ₃ + H ₂ O
水飞蓟宁 (silydianin)	481	325	156	C ₆ H ₆ O ₃ + HCHO
		463	18	H ₂ O
		453	28	CO
		391	90	CO + H ₂ O + CO ₂
		301	180	C ₉ H ₈ O ₄
		179	302	
水飞蓟宾 A (silybin A) 和水飞蓟宾 B (silybin B)	481	169	312	
		151	330	
		463	18	H ₂ O
		453	28	CO
		437	44	CO ₂
		435	46	H ₂ O + CO
异水飞蓟宾 A (isosilybin A) 和异水飞蓟宾 B (isosilybin B)	481	433	48	H ₂ O + HCHO
		355	126	C ₆ H ₆ O ₃
		301	180	C ₉ H ₈ O ₄
		283	198	C ₉ H ₈ O ₄ + H ₂ O
		257	224	C ₁₀ H ₈ O ₆
		463	18	H ₂ O
		453	28	CO
		437	44	CO ₂
		435	46	H ₂ O + CO
		433	48	H ₂ O + HCHO
		301	180	C ₉ H ₈ O ₄
		283	198	C ₉ H ₈ O ₄ + H ₂ O
		257	224	C ₁₀ H ₈ O ₆

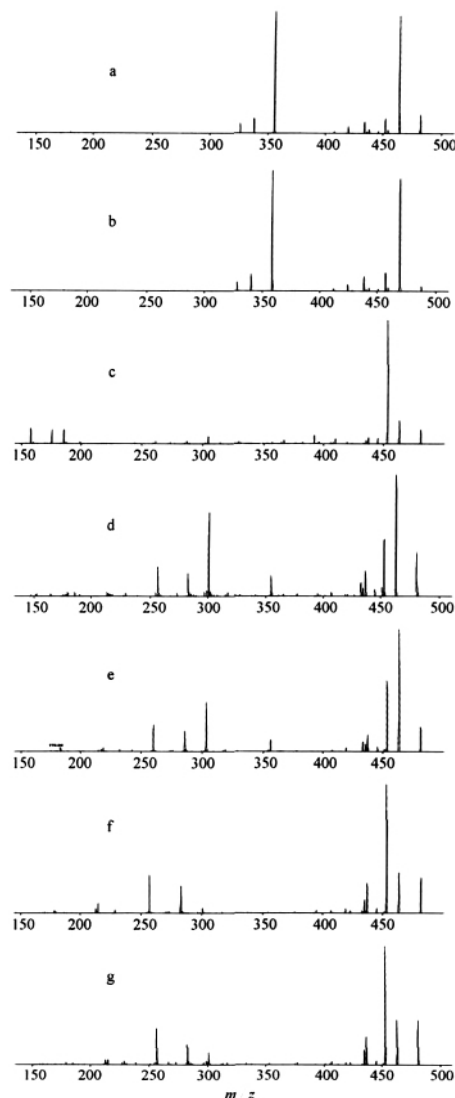


图3 水飞蓟亭 A(a)、水飞蓟亭 B(b)、水飞蓟宁(c)、水飞蓟宾 A(d)、水飞蓟宾 B(e)、异水飞蓟宾 A(f)、异水飞蓟宾 B(g) 的 ESI-MS/MS 负离子质谱图

3.2.2.2 水飞蓟宁 (silychristin) 的二级质谱裂解

水飞蓟宁在负离子模式下的二级质谱图,见图3,水飞蓟宁主要产生 m/z 为 463 ($[M-H-H_2O]^-$), 453 ($[M-H-CO]^-$), 391 ($[M-H-CO-H_2O-CO_2]^-$), 301 ($[M-H-C_9H_8O_4]^-$), 179, 169, 151 的碎片离子,其具体裂解方式见图5。

3.2.2.3 水飞蓟宾 A (silybin A) 和水飞蓟宾 B (silybin B) 的二级质谱裂解

水飞蓟宾 A、水飞蓟

宾 B 在负离子模式下的二级质谱图,见图3,结果表明,它们的二级质谱有着几乎相同的碎片离子峰。主要产生 m/z 为 463 ($[M-H-H_2O]^-$), 453 ($[M-H-CO]^-$), 437 ($[M-H-CO_2]^-$), 435 ($[M-H-H_2O-CO]^-$), 433 ($[M-H-H_2O-HCHO]^-$), 355 ($[M-H-C_6H_6O_3]^-$), 301 ($[M-H-C_9H_8O_4]^-$), 283 ($[M-H-C_9H_8O_4-HCHO]^-$), 257 ($[M-H-C_{10}H_8O_6]^-$) 的碎片离子,其具体裂解方式见图6。

3.2.2.4 异水飞蓟宾 A (isosilybin A) 和异水飞蓟宾 B (isosilybin B) 的二级质谱裂解

异水飞蓟宾 A

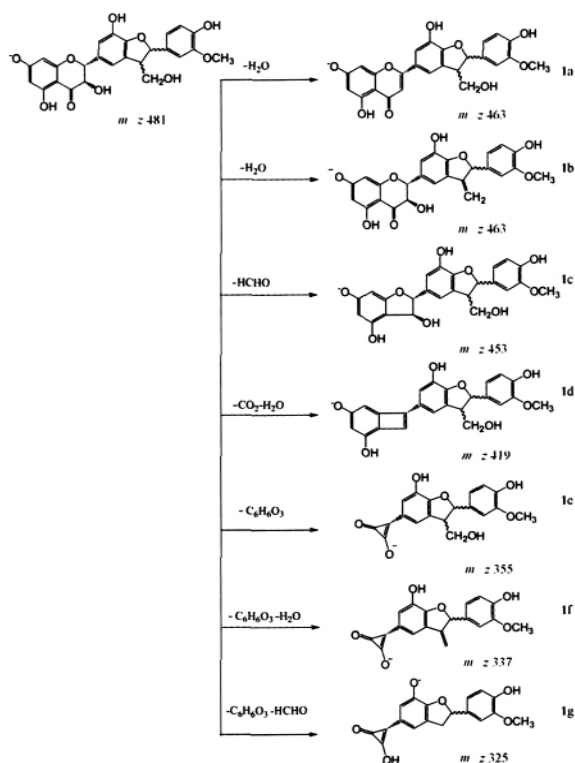


图4 水飞蓟亭 A 和 B 的二级质谱裂解途径

和异水飞蓟宾 B 在负离子模式下的二级质谱图, 见图 3, 结果表明, 它们的二级质谱的碎片离子峰几乎相同。主要产生 m/z 为 463 ($[M - H - H_2O]^-$) 453 ($[M - H - CO]^-$) 437 ($[M - H - CO_2]^-$) 435 ($[M - H - H_2O - CO]^-$) 433 ($[M - H - H_2O - HCHO]^-$) 301 ($[M - H - C_9H_8O_4]^-$) 283 ($[M - H - HCHO - C_9H_8O_4]^-$) 257 ($[M - H - C_{10}H_8O_6]^-$) 的碎片离子, 其具体裂解方式见图 7 所示。

4 结论

使用 UPLC 成功的对水飞蓟提取物中的 7 种活性成分进行了完全的分离。ESI-CID-MS/MS 技术是快速区分和鉴定黄酮木脂体类化合物同分异构体的有效方法。在负离子模式下可以提供更多的有效信息, 通过谱图中的 $[M - H]^-$ 准分子离子峰很容易得到此类化合物的分子量, 通过 CID-MS/MS 技术可获得各化合物一系列的碎片信息, 从 7 种活性物质的二级质谱可以看出, 它们均可以通过中性失去 H_2O 或 CO 分子得到 m/z 为 463 453 的碎片离子, 但由于其结构的不同, 其二级质谱还是有非常明显的不同。在水飞蓟亭 A 和 B 的二级质谱图中, m/z 为 355 的碎片离子丰度最大, 同时此碎片离子可再

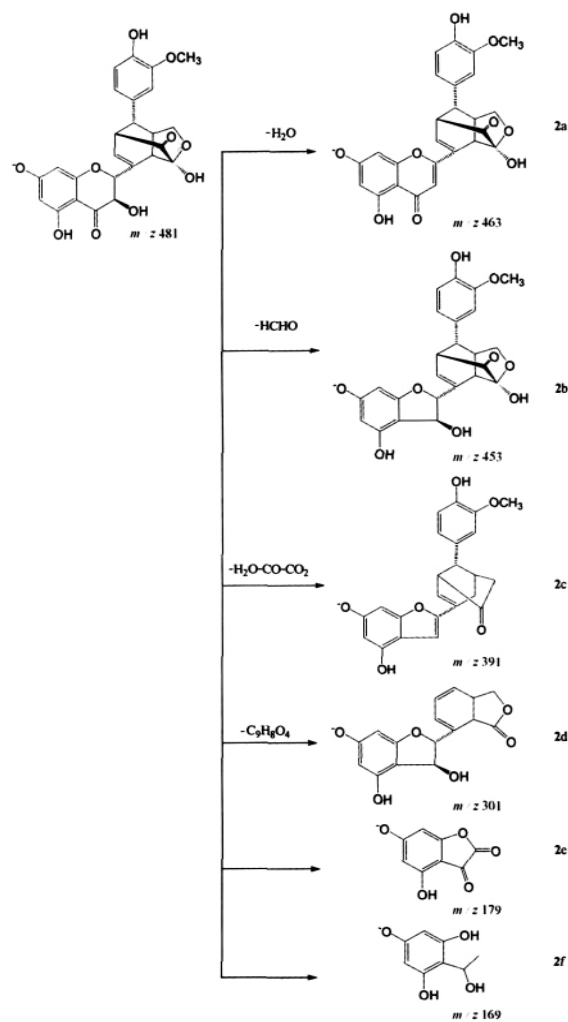


图5 水飞蓟宁的二级质谱裂解途径

失去 1 分子 H_2O 或 1 分子 $HCHO$ 进一步产生 m/z 为 337 和 325 的碎片离子; 在水飞蓟宁的二级质谱图中, 没有出现 m/z 为 355 337 325 的碎片离子, 取而代之的是 m/z 为 301 179 169 的碎片离子, m/z 为 453 的碎片峰丰度最大; 而在差象异构体水飞蓟宾 A、水飞蓟宾 B、异水飞蓟宾 A 和异水飞蓟宾 B 的二级质谱图中, 也有明显的不同, 水飞蓟宾 A、水飞蓟宾 B 的二级质谱出现了 m/z 为 355 的碎片离子, 同时丰度最大的碎片离子的 m/z 为 463。而异水飞蓟宾 A 和异水飞蓟宾 B 的二级质谱图中, m/z 为 355 的碎片离子消失, 丰度最大的碎片离子的 m/z 为 453。这些信息为区分这些同分异构体提供了有用的信息。

建立了超高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用测定水飞蓟素中 7 种主要有效成分方法。该法具

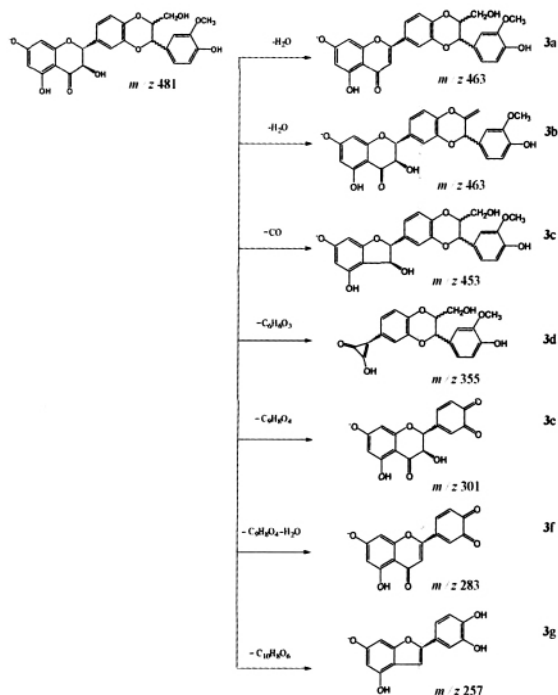


图6 水飞蓟宾A和水飞蓟宾B的
二级质谱裂解途径

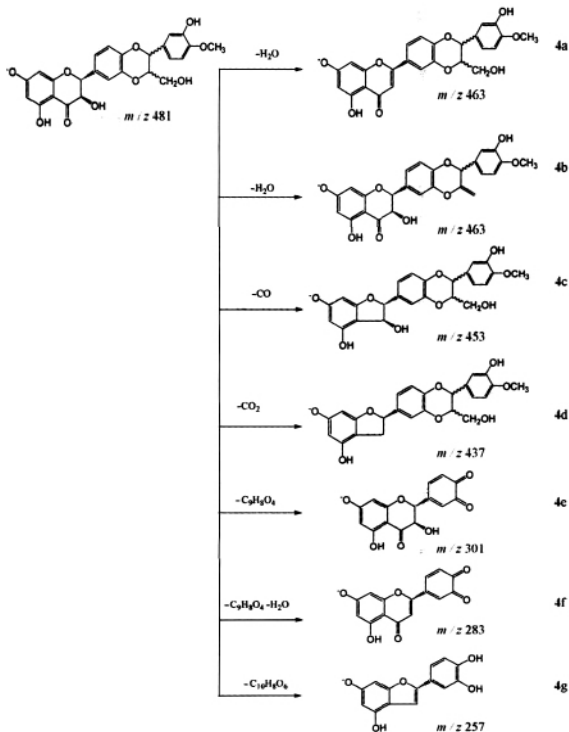


图7 异水飞蓟宾A和异水飞蓟宾B的二级
质谱裂解途径

且明显提高了检测效率,为进一步对其药理活性、体内代谢产物以及其他作用的研究提供了一种快捷、方便的方法。

[参考文献]

- [1] 李晓玉. 保肝药水飞蓟素的药理[J]. 国外医学参考资料: 药学分册, 1975, (6): 243.
- [2] 余传隆, 黄泰康, 丁志遵, 等. 中药辞海(第1卷) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993: 963.
- [3] 李琰, 杜勇, 张小茜. 水飞蓟质量标准的研 究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(2): 165.
- [4] 闫玉峰, 于健东. 水飞蓟的化学成分及药理研究进展 [J]. 中国药事, 2000, 14(5): 335.
- [5] 朱铨, 郑哲洙, 崔京浩. 水飞蓟素及其制剂的研究进展 [J]. 中国野生植物资源, 2002, 20(3): 47.
- [6] 定天明, 田颂龙, 张正行, 等. 胶束电泳毛细管色谱法测定水飞蓟素及其制剂中有效成分含量 [J]. 药学学报, 2000, 35(10): 778.
- [7] 王伟, 黄伟静, 曾韶辉. 水飞蓟宾非对映异构体的 HPLC 分离测定 [J]. 药品评价, 2005, 2(4): 280.
- [8] 定天明, 田颂龙, 张正行, 等. 水飞蓟素制剂中有效成分 HPLC 分离测定 [J]. 药物分析杂志, 1999, 19(3): 304.
- [9] F Kvasnicka, B Biba, R Sevcik, et al. Analysis of the active components of silymarin [J]. J Chromatogr A, 2003, 990: 239.
- [10] Martinelli E M, Morazzoni P, Livio S, et al. Liquid chromatographic assay of silybin in human plasma and urine [J]. J Liq Chrom, 1991, 14(7): 1285.
- [11] Mascher H, Kikuta C, Weyhenmeyer R. Diastereoisomeric separation of free and conjugated silybin in plasma by reversed phase HPLC after specific extraction [J]. J Liq Chrom, 1993, 16(13): 2777.
- [12] Richlmg B, Hans B, Kramarczyk R, et al. Two high-performance liquid chromatographic assays for the determination of free and total silybin diastereomers in plasma using column switching with electrochemical detection and reversed-phase chromatography with ultraviolet detection [J]. J Chromatogr B, 1995, 13(670): 267.
- [13] James I Lee, Mahesh Narayan, Jeffrey S Barrett, et al. Analysis and comparison of active constituents in commercial standardized silymarin extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2007, 845: 95.
- [14] Wei Li, Jiangping Han, Zhiwen Li, et al. Preparative chromatographic purification of diastereomers of silybin and their quantification in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2008, 862: 51.
- [15] 姚水宝, 杨水新, 施红敏. 梯度高效液相色谱法分离测定利加隆片中水飞蓟宾的含量 [J]. 药品检测, 2001, 10(8): 13.
- [16] 王萍, 丛润滋, 王俊德, 等. 水飞蓟素中活性黄酮的测定 [J]. 色谱, 1998, 16(6): 510.

有操作简单、有机试剂消耗少、测定周期短等优点,

Determination of active components in silymarin by UPLC-ESIMS

WANG Kuiwu^{1*}, HU Xinling², ZHANG Hong¹, DU Qizhen¹

(1. School of Food Science and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China;
2. Department of Pharmacy, Xintai First People's hospital, Xintai 271200, China)

[Abstract] A UPLC-ESIMS method was developed for simultaneous analysis of seven major bioactive flavonolignans in silymarin including silychristins A (1) and B (2), silydianin (3), silybins A (4) and B (5), and isosilybins A (6) and B (7). In this study, the seven major active flavonolignans including the diastereomers 1/2, 4/5, and 6/7 were completely separated using UPLC with an ACQUITY UPLC C₁₈ column and MeOH-water (formic acid) mobile phase system. The collision-induced dissociation (CID) MS/MS spectra of these flavonolignans were studied systematically using ESI-MS. The results with the present methodology showed that UPLC-MS/MS can be used for general screening of active natural products from plant extracts and for the specific quality control of silymarin.

[Key words] silymarin; UPLC-MS/MS; fragmentation mechanism

doi: 10.4268/cjcm20111713

[责任编辑 丁广治]

书 讯

由张铁军、杨秀伟教授主编的《中药质量控制-方法、技术与示范》于2011年4月在科学出版社出版发行。本书是一部关于中药质量评价思路、方法和实验研究的专著,是作者承担的国家科技支撑计划项目“中药质量控制技术研究”研究成果的总结。该书介绍了药材的品种及产地的确定,研究样品的野外及田间取样,有效部位药效筛选及药效物质基础研究质量,有效成分体内过程研究,质量评价及质量控制指标的确定,样品处理方法,分析测试方法,数据处理方法,质量评价方法等质量分析的全过程,构建符合中药复杂体系特点的、科学、规范、适合推广应用的中药质理研究技术方法和系统的评价体系,并将构建的技术方法应用于7种中药材、2种饮片、6种配方颗粒、5种复方中药质量的示范性研究。本书既是研究工作的具体总结,又为中药质量评价和质量控制提供新的思路和方法,适合从事中药研究、教学、生产的人员,以及临床药员研究工作者使用。

定价148元。各地新华书店及医学书店有售;邮购电话:010-64034601,6401516;地址:北京市东黄城根北街16号科学出版社医学中心(100717);联系人温晓萍;请在汇款附言注明所购图书的书名、册数、联系电话、是否要发票等。