

荭草素和异荭草素、牡荆素和异牡荆素 2 对 碳苷化合物的快速检测与鉴定^{*}

冯广卫 李翠兵 廖尚高 张丽娟 李勇军 龙庆德 王永林^{**}

(贵阳医学院 贵阳 550004)

摘要 目的: 建立利用超高效液相色谱-电喷雾电离质谱(UPLC-ESI/MS)快速检测和鉴定荭草素(orientin)和异荭草素(isoorientin)、牡荆素(vitexin)和异牡荆素(isovitexin) 2 对碳苷化合物的方法,并将其应用于荭草中上述 2 对碳苷化合物的分析鉴定。方法:采用 BEH C₁₈(2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm)色谱柱,柱温 45 ℃,以甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱,流速 0.3 mL · min⁻¹;通过电喷雾电离源(ESI),考察了以正离子多反应监测(MRM)与不同能量下碰撞诱导解离(CID)对标准对照品中这 2 对碳苷化合物的检测和鉴定的可行性,利用所建立的方法筛选并鉴定了荭草粗提物中的这 2 对异构体。结果:建立了 MRM 筛选分析和 CID 快速鉴定荭草素和异荭草素、牡荆素和异牡荆素 2 对碳苷化合物的方法。应用这一方法,完成了荭草中这 2 对碳苷异构体的快速分析鉴定。结论:该方法简便、快速、可靠,可以用于荭草等含荭草素和异荭草素、牡荆素和异牡荆素 2 对异构体的药材及其相关产品中这些化合物的快速分析鉴定。

关键词: 红蓼; 荭草; 碳苷异构体; 碰撞诱导解离; 多反应监测; 红草素; 异红草素; 牡荆素; 异牡荆素; 快速分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)07-1263-06

Rapid detection and identification of two isomeric C-glycosides, orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin^{*}

FENG Guang-wei, LI Cui-bing, LIAO Shang-gao, ZHANG Li-juan,
LI Yong-jun, WANG Yong-lin^{**}

(Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

Abstract Objective: To develop a rapid method for the detection and identification of two isomeric C-glycosides, orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin, by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (UPLC-ESI/MS) and to evaluate its application in the analysis of the four glycosides in *Polygonum orientale*. **Methods:** The samples were separated on a BEH C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm) at 45 ℃ with gradient mobile phase of methanol (A) and 0.1% formic acid in water (B) at the flow rate of 0.3 mL · min⁻¹; Multi-reaction monitoring (MRM) and collision-induced dissociation (CID) at different collision energy in the positive electrospray ionization (ESI) mode was evaluated respectively for the rapid detection and identification of the two isomeric C-glycosides in the standards and crude extracts. **Results:** A method of MRM and CID in the positive ESI was developed for the rapid detection and identification of the two isomeric C-glycosides. Orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin were rapidly detected and identified in *P. orientale*. **Conclusion:** The method is simple, rapid and reliable and can be used in the rapid detection and identification of the two isomeric C-glycosides in their enriched plants and products.

Key words: *Polygonum orientale*; isomeric C-glycosides; collision-induced dissociation (CID); multi-reaction monitoring (MRM); orientin; isoorientin; vitexin; isovitexin; rapid detection

^{*} “重大新药创制”国家科技重大专项(2008ZX09101-021); 国家自然科学基金(30860366); 贵州省科技重大专项(黔科合重大专项字[2007]6010号)

^{**} 通讯作者 Tel: (0851) 6908899; E-mail: gywyl@gmc.edu.cn

黄酮碳苷广泛存在于多种药用植物中,是多种中草药质量控制的重要指标。在这些碳苷中,有很多是同分异构体,结构差异不大,即使是在同一药材中,具有相同相对分子质量的化合物也往往很多,鉴定这些化合物的结构困难不小。荭草素和异荭草素、牡荆素和异牡荆素是2对黄酮碳苷异构体^[1~3],是多种药材的主要有效成分。但是,由于结构差异小,化合物间具有相似的紫外吸收和一级质谱碎片,仅凭二极管阵列检测器和单级质谱仪等常规检测仪器与液相色谱仪串联难以在复杂的中草药粗提物中检测到这些异构体的存在并有效鉴定它们的结构。因此,开发一种快速检测和鉴定这些化合物的有效方法显得非常重要。Ferreres等^[4]利用离子阱的多级质谱功能鉴定了大量的黄酮氧苷和碳苷,建立了不同苷化位置异构体的鉴别方法;Pereira等^[5]利用源内CID高分辨质谱技术有效地检测并鉴别了4个药材中荭草素和异荭草素、牡荆素和异牡荆素2对黄酮碳苷异构体。但是,由于一级质谱的灵敏度不高,源内CID较难重现,这一方法的应用受到很大限制。

荭草为蓼科植物红蓼 *Polygonum orientale* L. 的干燥全草,为贵州少数民族用药,收载于《贵州省中药材质量标准》1988年版,荭草具有清热解毒、祛风除湿、活血消肿之功效,临床用于风湿性关节炎、冠心病、心胃气痛等^[6]。根据文献^[7]报道及李勇军等^[8]对荭草化学成分的研究结果,荭草主要含荭草素、异荭草素、荭草苷A和B、牡荆素、异牡荆素、槲皮素等黄酮类化合物和酚酸类物质原儿茶酸、没食子酸等。在荭草药材^[9]及黄勇等^[10]以荭草提取物研制的几个品种中,荭草素/异荭草素、牡荆素/异牡荆素这2对碳苷化合物是其主要的药效物质基础,因此对这2对异构体的快速检测鉴定意义重大。

液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)是20世纪90年代成熟起来的一项新技术,具有灵敏度高、选择性强、分离和结构确证一次完成等特点^[11,12]。考虑到多反应监测(MRM)在质谱检测中的高灵敏度和二级质谱在位置异构体结构鉴别中较强的能力^[13],在本实验中,作者研究并开发了一种应用三重四极杆质谱的正离子多反应监测(MRM)与碰撞诱导解离(CID)分别快速检测和鉴定荭草素/异荭草素、牡荆素/异牡荆素这2对黄酮碳苷的有效方法,并应用该方法实现了荭草中这2对碳苷化合物的快速检测和鉴定,为荭草药

材及其相关产品的进一步开发应用提供了实验基础。

1 仪器与试剂

Waters ACQUITY UPLC(美国Waters公司); Waters ACQUITY TQD型质谱仪(美国Waters公司); MasslynX工作站。

荭草素、异荭草素、牡荆素、异牡荆素的对照品从荭草中分离得到,且均通过与文献中各化合物相应的MS、IR、¹H-和¹³C-NMR、比旋光数据对比确定结构,经UPLC在多个波长下测定纯度都大于95%;荭草药材,采自贵州省惠水县,经贵阳医学院药学院生药学教研室龙庆德老师鉴定。甲醇、甲酸为色谱纯(美国TEDIA公司),盐酸、乙醚、正丁醇等试剂为分析纯,水为屈臣氏蒸馏水。

2 溶液制备

2.1 对照品溶液 称取荭草素、异荭草素、牡荆素、异牡荆素各对照品适量,用甲醇超声溶解,制备各化合物浓度均为0.1 mg·mL⁻¹的混合对照品溶液,用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2 供试品溶液 取荭草药材粉末(过80目筛)0.5 g,加水50 mL,水浴回流2 h,趁热滤过,取续滤液25 mL于分液漏斗中,用稀盐酸调pH至2,用乙醚提取3次,每次15 mL,弃乙醚液,水层用水饱和的正丁醇提取3次,每次15 mL,合并正丁醇液,再用正丁醇饱和的水洗涤2次,每次15 mL,弃水洗涤液,正丁醇液蒸干,残渣加甲醇适量溶解,转入5 mL量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

3 色谱-质谱条件

3.1 UPLC色谱分离条件 采用BEH C₁₈(2.1 mm×150 mm,1.7 μm)色谱柱,柱温45℃,流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱[0 min,A-B(15:85);6 min,A-B(25:75);10 min,A-B(40:60);20 min,A-B(100:0);21 min,A-B(15:85)]流速0.3 mL·min⁻¹,进样量2 μL。

3.2 ESI/MS分析条件 离子源为电喷雾电离源(ESI),正离子方式检测。采集参数如下:碰撞气为氦气;雾化和干燥气为氮气;离子源温度120℃;去溶剂气温度350℃;去溶剂气流量650 L·h⁻¹;锥孔气流速50 L·h⁻¹;碰撞气流量0.18 mL·min⁻¹;RF棱镜0.50 V;质量扫描范围(*m/z*)50~1000。全扫描一级质谱(full scan):毛细管电压3 kV,锥孔电压50 V;二级质谱:毛细管电压3 kV,锥孔电

压 50 V,碰撞能量(CE) 20/30 eV;多反应监测(MRM):毛细管电压 3 kV,锥孔电压 50 V,碰撞能量(CE) 30 V, m/z 449 > 329 与 m/z 433 > 313 分别为荭草素/异荭草素和牡荆素/异牡荆素的检测离子通道。

4 荭草素/异荭草素、牡荆素/异牡荆素质谱检测方法的建立

荭草素/异荭草素($C_{21}H_{20}O_{11}$, 相对分子质量: 448)、牡荆素/异牡荆素($C_{21}H_{20}O_{10}$, 相对分子质量: 432)为 2 对同分异构体。荭草素和牡荆素是在 8 位连接有 1 个葡萄糖基的黄酮 C-苷类化合物,而异荭草素和异牡荆素是在 6 位连接有 1 个葡萄糖基的黄酮 C-苷类化合物。通过对这 2 对化合物的质谱研究发现,正离子模式比负离子模式更灵敏。在一级质谱(锥孔电压 50 V)中,荭草素与异荭草素在正

离子模式下有 m/z 相同的 $[M+H]^+$ 加合离子 m/z 449。牡荆素与异牡荆素在正离子模式下有 m/z 相同的 $[M+H]^+$ 加合离子 m/z 433。由于相对分子质量一样的化合物比较多,应用一级质谱不能准确检测出荭草素与异荭草素、牡荆素与异牡荆素这 2 对异构体。在 $[M+H]^+$ 加合离子的二级质谱中(图 1),荭草素与异荭草素、牡荆素与异牡荆素各异构体具有基本相同的碎片离子(如在碰撞能量为 30 eV 下,荭草素与异荭草素均有 m/z 353, 339, 329, 299 等离子;牡荆素与异牡荆素均有 m/z 337, 323, 313, 283 等离子)。鉴于 MRM 的高选择性和高灵敏度,本实验在对质谱条件进行优化后,在碰撞能量为 30 eV 下,将采用 MRM 的扫描方式,分别以荭草素/异荭草素、牡荆素/异牡荆素的离子对 m/z 449 > 329、 m/z 433 > 313 作为检测离子通道,对这 2 对异构体进行检测。

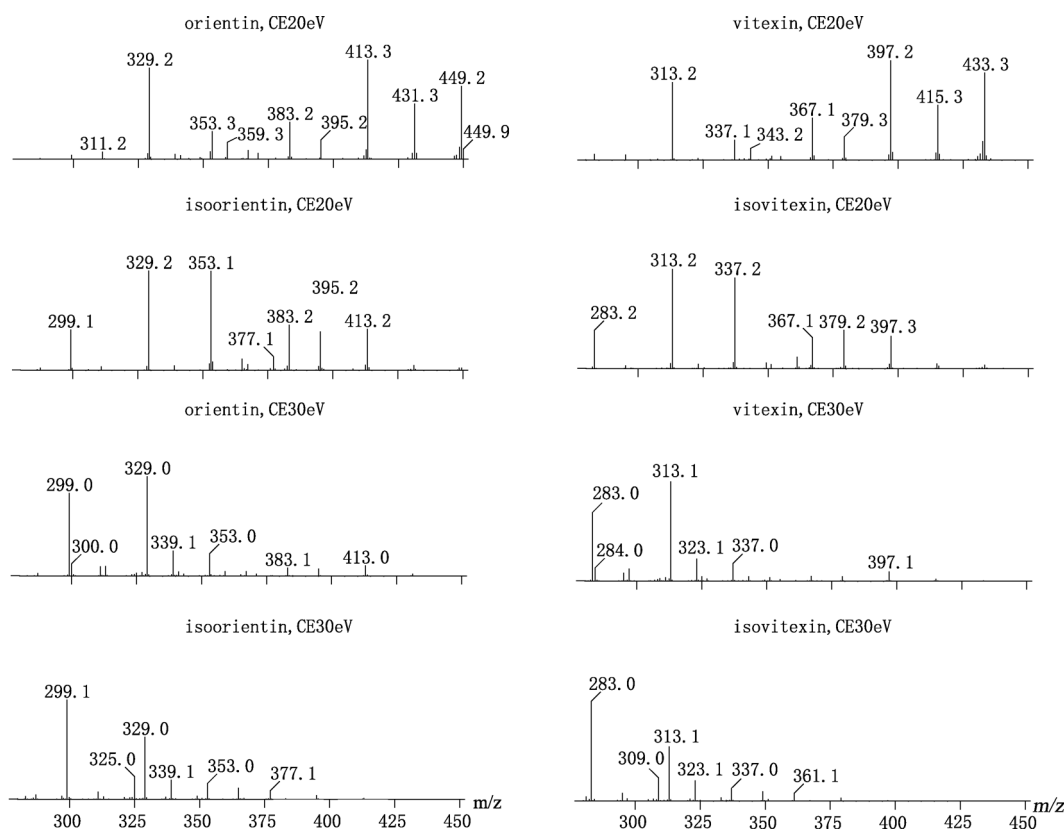


图 1 荭草素/异荭草素和牡荆素/异牡荆素在不同碰撞能量(CE: 20/30 eV)下的二级质谱图

Fig 1 MS² spectra of orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin at different collision energy(CE: 20/30 eV)

5 荭草素/异荭草素、牡荆素/异牡荆素质谱鉴定方法的建立

虽然利用上述 MRM 方法能够快速检测出荭草素/异荭草素和牡荆素/异牡荆素 2 对碳苷化合物,但由于母、子离子质荷比相同,该方法尚不

能对各异构体进行有效的鉴定。考虑到 CID 对化合物结构鉴定的有效性,考察了利用不同碰撞能量的二级质谱对 2 对异构体进行鉴定的可行性。

按照 Domon 和 Costello 的表示方法^[14],在不同

碰撞能量下,对照品荭草素和异荭草素、牡荆素和异牡荆素的加合离子 $[M+H]^+$ 的二级质谱及其裂解途径图分别见图 1 和图 2。 m/z 449 为荭草素和异荭草素的加合离子 $[M+H]^+$; m/z 为 431 $[M+H-H_2O]^+$ 、413 $[M+H-2H_2O]^+$ 、395 $[M+H-3H_2O]^+$ 的离子分别为母离子 $[M+H]^+$ 连续丢失水分子而产生的碎片离子; m/z 329 为 $[M+H]^+$ 失去 1 个质量数为 120 的中性碎片后生成 $[M+H-120]^+$ 得到的碎片离子,是在葡萄糖基上 O 位和 2 位断裂所得到的 $^{0,2}X^+$ 离子; m/z 299 为 $[M+H]^+$ 失去 1 个质量数为 150 的中性碎片后生成 $[M+H-150]^+$ 得到的碎片离子,是在葡萄糖基上 O 位和 1 位断裂所得到的 $^{0,1}X^+$ 离子。牡荆素和异牡荆素的裂解规律与荭草素和异荭草素的基本一致。 m/z 433 为母离子 $[M+H]^+$; m/z 为 415 $[M+H-H_2O]^+$ 、397 $[M+H-2H_2O]^+$ 、379 $[M+H-3H_2O]^+$ 的离子分别为母离子 $[M+H]^+$ 连续丢失水分子而产生的碎片离子; m/z 313 为 $[M+H]^+$ 失去 1 个质量数为 120 的中性

碎片后生成 $[M+H-120]^+$ 得到的碎片离子,是在葡萄糖基上 O 位和 2 位断裂所得到的 $^{0,2}X^+$ 离子; m/z 283 为 $[M+H]^+$ 失去 1 个质量数为 150 的中性碎片后生成 $[M+H-150]^+$ 得到的碎片离子,是在葡萄糖基上 O 位和 1 位断裂所得到的 $^{0,1}X^+$ 离子。从荭草素和异荭草素的二级质谱图可以看出,利用子离子在相对丰度上的差异可以有效而快速地区分这 2 对异构体。在碰撞能量为 20 eV 下(图 1) 这 2 对异构体的主要区别在于加合离子 $[M+H]^+$ (m/z 449 或 433) 和碎片离子 $^{0,1}X^+$ (m/z 299 或 283, $[M+H-150]^+$) 峰的丰度。8-碳苷类化合物(荭草素和牡荆素)的准分子离子 $[M+H]^+$ 峰的相对丰度约为 70%~80%,而碎片离子峰 $^{0,1}X^+$ 的相对丰度小于 5%;相反,6-碳苷类化合物(异荭草素和异牡荆素)的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 的相对丰度小于 5%,而相应碎片离子峰 $^{0,1}X^+$ 的相对丰度约为 35%~40%。

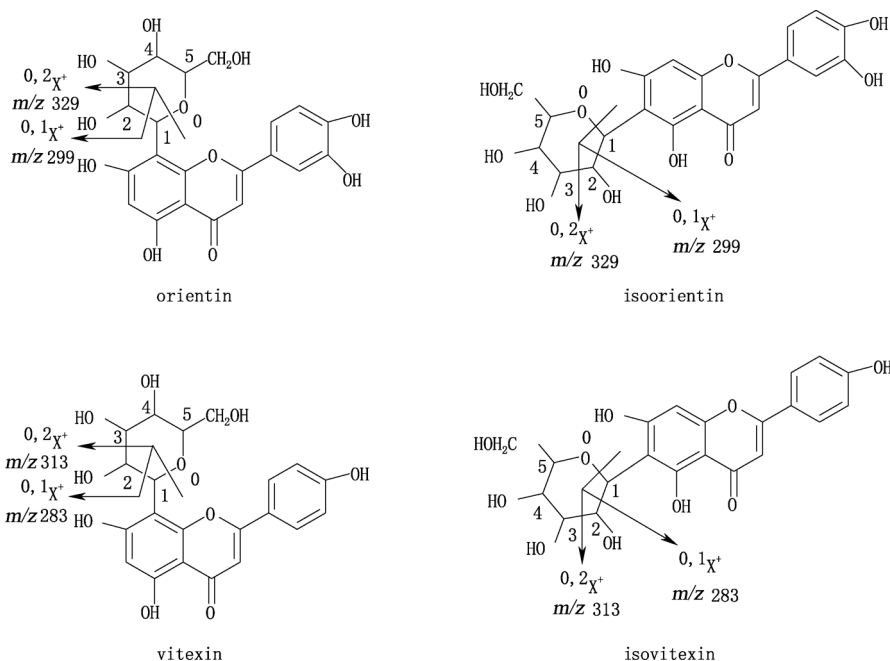


图 2 荭草素/异荭草素和牡荆素/异牡荆素的结构及其主要裂解途径(化合物的裂解参照 Domon 和 Costello (1988) 的方法加以命名和标注)

Fig 2 Structures and the main fragmentation pathways of orientin/isorientin and vitexin/isovitexin annotated according to the nomenclature adopted by Domon and Costello (1988).

上标表示参与裂解的键(The superscripts indicate bonds that have been broken)

6 荭草中荭草素/异荭草素、牡荆素/异牡荆素的快速检测与鉴定

利用所建立的 MRM 筛选方法,对荭草提取物进行了研究,检测并鉴定出了荭草素/异荭草素(图

3-b)、牡荆素/异牡荆素(图 3-c) 这 2 对黄酮碳苷化合物。结合对照品的色谱保留时间和二级质谱特征,这 2 对异构体的结构分别得到了鉴定(图 3-d)。

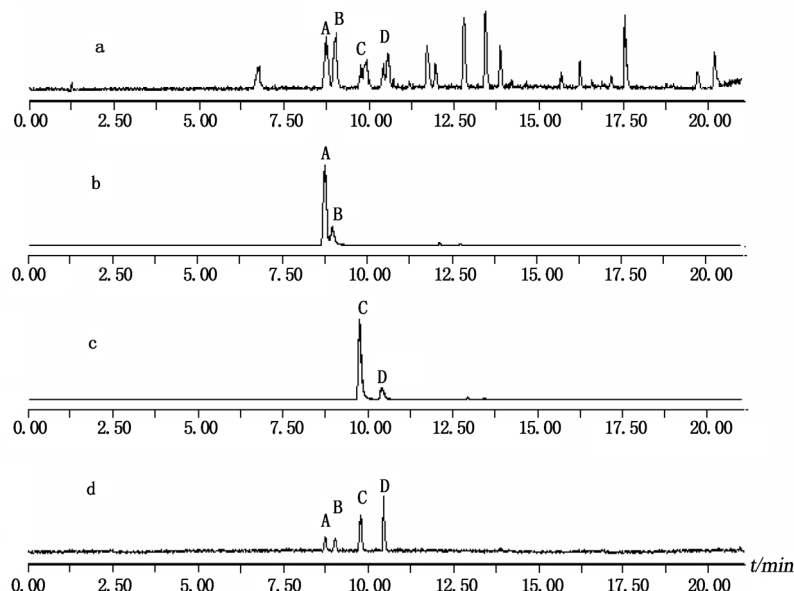


图3 荭草提取物中荭草素、异荭草素、牡荆素、异牡荆素的MRM检测与鉴定

Fig 3 MRM screening and identification of orientin, isoorientin, vitexin, and isovitexin in the crude extract of *Polygonum orientale*

a. UPLC-(+)-ESI-MS图[UPLC-(+)-ESI-MS] b. UPLC-MRM(离子通道449>329)筛选[UPLC-MRM profiling of the transition 449>329] c. UPLC-MRM(离子通道433>313)筛选[UPLC-MRM profiling of the transition 433>313] d. 对照品荭草素(A)、异荭草素(B)、牡荆素(C)和异牡荆素(D)混合样的UPLC-(+)-ESI-MS图[UPLC-(+)-ESI-MS of the mixture of standards orientin(A), isoorientin(B), vitexin(C), and isovitexin(D)]

7 讨论

7.1 在流动相的选择中,比较了甲醇-0.1%甲酸和乙腈-0.1%甲酸2种溶剂系统。发现以乙腈-0.1%甲酸作为流动相得到的质谱图,各色谱峰的响应不高,可能是由于乙腈引起的离子抑制的原因。最后,选择了甲醇-0.1%甲酸作为本次实验的流动相。

7.2 MRM技术于20世纪80年代中期开始走向成熟,本实验采用MS的MRM扫描方式分别检测液相色谱流出的荭草素/异荭草素、牡荆素/异牡荆素2对异构体,选择性大大优于紫外检测器;三重四极杆MRM检测荭草素/异荭草素、牡荆素/异牡荆素的原理是:样品经液相色谱分离、富集后在离子源被离子化,然后进入第1个四极杆,调整质量扫描参数,只允许 m/z 449(荭草素和异荭草素对)或 m/z 433(牡荆素和异牡荆素对)进入碰撞区,以去除其他质荷比的离子; m/z 449、 m/z 433的离子在碰撞区(第2个四极杆)被碰撞活化解离(CID)产生子离子;在第3个四极杆中,只允许选定的特征碎片离子 m/z 329(荭草素和异荭草素对)、 m/z 313(牡荆素和异牡荆素对)通过并进入质量分析器,大大提高了质谱检测的选择性。

7.3 碰撞诱导解离(CID)技术在二级质谱中能给出

出稳定而丰富的碎片信息,可以用于化合物定性分析。本实验应用三重四级杆质谱不同能量CID技术,根据荭草素/异荭草素、牡荆素/异牡荆素二级质谱中的丰富碎片信息及其相对丰度,结合对照品的色谱保留时间,实现了这2对异构体的快速鉴定。

7.4 虽然异构体的化学式及相对分子质量完全一致,但是由于其化学结构存在差异,导致其质谱裂解行为有所不同,所以采用MRM高灵敏度的检测技术结合CID下的二级特征质谱,可以对各种类型的异构体进行快速有效的筛选和鉴定。同时,本实验建立的方法,能够快速检测和鉴定出荭草药材中荭草素/异荭草素、牡荆素/异牡荆素这2对异构体,该方法科学合理,检测鉴定速度快,必将在荭草及其相关产品以及其他富含这些异构体的中草药的研究开发中发挥积极作用。

参考文献

- PENG Jin-yong(彭金咏), FAN Guo-rong(范国荣), WU Yu-tian(吴玉田). Studies on chemical constituents of *Patrinia villosa* (白花败酱草化学成分研究). *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2006, 31(2): 128
- ZHAI Yan-jun(翟延君), ZHANG Shu-rong(张淑荣), HAO Ning(郝宁), et al. Research situation on seeds of *Polygonum orientale* L. (水红花子研究概况). *J Liaoning Coll Tradit Chin Med*

- (辽宁中医学院学报) 2005 7(3) : 226
- 3 WU Hong - xin(吴洪新) , WEI Xiao - yi(魏孝义) , FENG Shi - xiu(冯世秀) *et al.* A study on the flavonoids of *Lespedeza hedysaroides*(尖叶胡枝子黄酮类化学成分的研究) . *Acta Bot Boreal - Occident Sin*(西北植物学报) 2009 29(9) : 1904
 - 4 Ferreres F , Gil - Izquierdo A , Andrade PB , *et al.* Characterization of C - glycosyl flavones O - glycosylated by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* , 2007 , 1161 (1 - 2) : 214
 - 5 Pereira CAM , Yariwake JH , McCullagh M. Distinction of the C - glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC - MS exact mass measurement and in - source CID. *Phytochem Anal* 2005 , 16: 295
 - 6 Drug Administration of Guizhou Province(贵州省药品监督管理局) . Quality Standards for Chinese Herbal Medicines of Guizhou Province(贵州省中药材、民族药材质量标准) . Guiyang(贵阳) : Guizhou Science and Technology Publishing House(贵州科技出版社) 2003. 267
 - 7 ZHENG Shang - zhen(郑尚珍) , WANG Ding - yong(王定勇) , LIU Wu - xia(刘武霞) , *et al.* The flavonoids of *Polygonum orientale* L. (荭草中的黄酮类化合物) . *Northwest Norm Univ (Nat Sci)* (西北师范大学学报 自然科学版) , 1999 35(4) : 37
 - 8 LI Yong - jun(李勇军) , HE Xun(何迅) , LIU Li - na(刘丽娜) *et al.* Studies on chemical constituents in herb of *Polygonum orientale* (荭草化学成分的研究) . *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2005 30(6) : 444
 - 9 WANG Ai - min(王爱民) , WANG Yong - lin(王永林) , LIU Li - na(刘丽娜) , *et al.* Study on quality for Herba Polygoni Orientalis (荭草药材的质量研究) . *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志) 2006 31(13) : 1047
 - 10 HUANG Yong(黄勇) , ZHENG Lin(郑林) , WANG Ai - min(王爱民) , *et al.* Comparative study on antimyocardial ischemia of chemical constituents with different medicinal parts of *Polygonum orientale* (荭草不同药用部位抗心肌缺血作用及化学成分比较研究) . *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药) , 2010 , 21 (10) : 2520
 - 11 TIAN Wei(田薇) , ZHANG Da - hua(张大华) , CHENG Xing - guo(程型国) *et al.* Analysis of five glycosides in *Swertia franchetiana* H. Smith extracts by high performance liquid chromatography and atmospheric pressure chemical ionization - mass spectrometry (高效液相色谱 / 质谱分析抱茎獐牙菜提取物中的苷性成分) . *Chin J Anal Chem*(分析化学) 2005 36(9) : 1265
 - 12 MA Xiao - qiong(马小琼) , XIAO Hong - bin(肖红斌) , LIANG Xin - miao(梁鑫淼) . Differentiation of ginsenoside Rf and pseudo - ginsenoside F_{II} by in - source collision - induced dissociation high performance liquid chromatography - atmospheric pressure chemical ionization - mass spectrometry(源内裂解液相色谱 - 质谱鉴别人参皂甙 Rf 和拟人参皂甙 F_{II}) . *Chin J Anal Chem*(分析化学) , 2006 34(9) : 1273
 - 13 Xing J , Xie C , Lou H. Recent applications of liquid chromatography - mass spectrometry in natural products bioanalysis. *J Pharm Biomed Anal* , 2007 , 44: 368
 - 14 Domon B , Costello CE. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FAB MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J* , 1988 5(4) : 397

(本文于 2010 年 7 月 11 日收到)