

高效液相色谱多级质谱联用法同时鉴定苦参中的两大类活性成分

赵琴琴, 张玉峰, 范晓辉*

(浙江大学中药科学与工程学系, 浙江 杭州 310058)

[摘要] 目的: 同时定性分析苦参中两大类理化性质差异巨大的活性成分(生物碱和异戊烯黄酮)。方法: 采用高效液相色谱-多级质谱联用技术, 根据正、负离子模式下的准分子离子峰及其多级碎片信息, 与文献数据或部分对照品对照。结果: 同时鉴定了42个化合物, 包含16个生物碱和26个黄酮, 并对苦参中金雀花碱型和无叶豆碱型生物碱的质谱裂解规律进行了总结和归纳。结论: 此结果为苦参活性成分的快速鉴定奠定了基础。

[关键词] 苦参; 生物碱; 黄酮; 高效液相色谱多级质谱联用(HPLC-MSⁿ); 结构鉴定

快速鉴定同一药材或方剂中理化性质差异较大的活性成分是当前中药物质基础研究的难点问题之一。现有研究大多针对不同类别的成分分别建立提取和分析方法, 进行分析鉴定^[1]。这一研究模式耗时费力, 且不利于所建方法的推广应用, 亟待改善。

苦参是豆科槐属植物苦参 *Sophora Flavescens* Ait. 的干燥根, 具有清热燥湿、杀虫、利尿功效^[2], 其活性成分主要为生物碱和异戊烯黄酮^[3]。由于叔胺基团的存在, 生物碱类化合物高度亲水并成碱性; 相反, 黄酮类化合物由于存在异戊烯基团, 高度亲脂并成酸性。如此巨大的理化性质差异, 使得目前关于苦参物质基础研究均只限于某一类化合物^[4,5]。本研究采用 HPLC-MSⁿ法建立了同时鉴定苦参中的两大类活性成分的分析方法, 并总结了其中两种类型生物碱的质谱裂解规律。

1 材料

Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国安捷伦公司), 二极管阵列检测器, 质谱为 Finnigan LCQ Deca XP^{plus} 离子阱, 配有电喷雾离子源(ESI)(美国 Finnigan 质谱公司)。

乙腈、甲醇为色谱纯(德国默克公司), 二乙胺也为色谱纯(美国 Sigma 公司), 高纯水来自 Milli-Q

超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

苦参药材购自广西省药店, 经浙江大学中药科学与工程学系吴斌讲师鉴定。氧化苦参碱(6)和氧化槐果碱(7)购自中国药品生物制品检定所(中国北京); 臭豆碱(19)和金雀花碱购自芜湖贰尔塔医药科技有限公司(中国安徽), 其他标准品: 2'-甲氧基苦参酮(12); 槐定碱(18); 苦参碱(20); 槐果碱(21); 黄腐醇(28); 槐属黄烷酮 B(31); 苦醇 I(34); 苦醇 L(35); 苦参酮(36); 降苦参酮(38); 苦参啶(39); 去甲苦参啶(40)和异苦参酮(41)为本实验室提取得到。标准品纯度经 HPLC 分析均达到 98% 以上。

2 方法

2.1 色谱条件 Zorbax Extend C₁₈ 色谱柱(4.6 × 250 mm, 5.0 μm)。流动相: A 为 0.025% 二乙胺水溶液, B 为乙腈。梯度洗脱: 0 min, 7.3% B; 23 min, 7.6% B; 28 min, 15% B; 40 min, 22% B; 50 min, 24.5% B; 70 min, 26% B, 平衡时间为 13 min。流速 0.7 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。二极管阵列检测器(DAD)记录 190~400 nm 紫外光谱, 检测波长为 225, 280 和 335 nm。

2.2 串联质谱条件 正、负离子同时检测, 高纯氦为撞击气体。离子喷雾电压分别为 + 4.5 kV(+), - 4.5 kV(-); 毛细管温度: 350 °C; 毛细管电压: + 19 V(+), - 15 V(-); 管透镜补偿电压: + 25 V(+), - 25 V(-); N₂气作为鞘气和辅助气, 鞘气流速 60 L · min⁻¹; 辅气流速 20 L · min⁻¹。全扫描范围 *m/z* 120~1 200。

[稿件编号] 20100928005

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09304-002 & 2009ZX09311-002); 浙江省杰出青年团队项目(R2080693)

[通信作者] * 范晓辉, 主要从事多组分药物体内过程及药物系统毒理学等研究, Tel: (0571) 88208596, E-mail: fanxh@zju.edu.cn

2.3 直接进样质谱条件 正离子模式,离子喷雾电压4.5 kV,毛细管温度275 °C;毛细管电压12 V;套管透镜补偿电压30 V;鞘气流速5 L·min⁻¹;辅气流速0。对照品溶液以10 μL·min⁻¹的流速注入离子源,碰撞能量范围为20%~50%。

2.4 供试品溶液的制备 称取苦参药材粉末(40目)0.1 g,用50%甲醇水定容于5 mL量瓶中,称重室温超声提取30 min。静置冷却,用50%甲醇水补足损失的重量。溶液离心后取上清液作为苦参供试品溶液进行高效液相色谱多级质谱分析。另外,2种类型的苦参生物碱(金雀花碱型:金雀花碱;无叶豆碱型:臭豆碱)的对照品配制成0.2 g·L⁻¹的甲醇溶液,用注射泵直接进样,进行电喷雾质谱分析。

3 结果与讨论

从苦参供试品的正负总离子流图见图1可以看出,所有的生物碱只在正离子模式下被检测到,而黄酮多数在负离子模式下离子化,少数也可在正离子下解离。在正离子模式下,除了准分子离子峰[M+H]⁺外,大多数化合物显示出丰度很高的[M+H+73]⁺离子,可能为准分子离子与流动相中二乙胺(DEA)结合,生成[M+H+DEA]⁺离子的结果。正、负离子扫描下的准分子离子峰进一步进行了二级质谱及三级质谱的分析。根据对照品及文献信息,共鉴定了42个化合物,相关的光谱和质谱数据见表1。

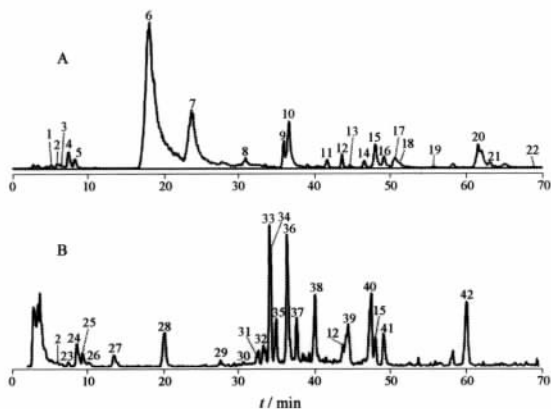


图1 苦参提取物的正(A)、负(B)总离子流图

3.1 生物碱类化合物的鉴定 苦参中的生物碱主要为喹诺西啶类生物碱,且主要包括4类,分别为苦参碱型、金雀花碱型、无叶豆碱型和羽扇豆碱型生物

碱。本研究根据苦参生物碱在正离子模式下的裂解特征,共鉴定12个苦参碱型,1个金雀花碱型和3个无叶豆碱型生物碱。

苦参生物碱类化合物的最大紫外吸收在206 nm左右,而苦参黄酮类化合物除了在210 nm左右有紫外吸收外,320 nm或386 nm左右也存在不同程度的吸收。由此判断化合物**3~11, 13, 17~22**为生物碱类化合物。其中化合物**6, 7, 18, 19, 20, 21**根据标准品对照确定为氧化苦参碱(**6**),氧化槐果碱(**7**),槐定碱(**18**),臭豆碱(**19**),苦参碱(**20**),槐果碱(**21**)。根据对上述几个对照品和文献中苦参生物碱类化合物裂解碎片的总结^[4,6],可以发现苦参碱型生物碱的二级碎片同时具有不同丰度的 m/z 150, 148离子以及[M+H-H₂O]⁺离子,其中苦参碱型生物碱的氮氧化物的一级质谱具有丰度很高的二聚体加合离子[2M+H]⁺,并且其准分子离子峰的二级碎片具有高丰度的特征离子[M+H-H₂O]⁺和[M+H-17]⁺,羟基氧化物的[2M+H]⁺离子丰度相对较低,但具有丰度很高的脱水峰。根据上述总结,推断化合物**3~8, 11, 17, 18, 20, 21, 22**为苦参碱型生物碱,其中化合物**4~7**为苦参碱型生物碱的氮氧化物。

化合物**5**的一级质谱具有高丰度的[2M+H]⁺离子,二级质谱具有基峰 m/z 247 [M+H-H₂O]⁺和强峰 m/z 248 [M+H-17]⁺,同时还有 m/z 150, 148离子,为苦参碱型的氮氧化物,再根据文献^[7]推断其为氧化槐定碱(**5**);化合物**4**一级质谱也具有很强的[2M+H]⁺离子,二级质谱具有脱水峰 m/z 263 [M+H-H₂O]⁺,在脱水峰的基础上,还具有 m/z 246 [M+H-H₂O-17]⁺和 m/z 245 [M+H-H₂O-H₂O]⁺离子,故推测其为苦参碱型的氮氧化物,同时含有羟基,进一步推测其为氧化槐醇(**4**)^[8]。

化合物**17, 22**准分子离子峰的二级质谱都具有 m/z 150, 148和[M+H-H₂O]⁺离子,且其在反相柱上比氮氧化物和羟基氧化物保留(6~30 min)更强,与化合物**18, 20, 21**等非氧化物的保留时间较为接近(50~63 min),故推断它们是苦参碱型中的非氧化物。结合文献信息,推断它们分别为槐胺碱(**17**)^[9]和莱曼碱(**22**)^[10]。

化合物**3, 8, 11**保留时间靠前,并且一级质谱[2M+H]⁺离子丰度相对较低,二级质谱具有丰度

表 1 经鉴定的苦参提取物中的化合物

No.	t_R	紫外 /nm	准分子离子峰	多级质谱 (% 基峰)	化合物名称
正离子模式					
1	5.11	214,322	285	MS ² [285]: 270(100), 253(62), 229(7), 225(18), 137(7)	毛蕊异黄酮 ^[16]
2	5.85	210,328,376	371	MS ² [371]: 315(38), 297(13), 235(100), 179(4)	2'-hydroxyl-isoxanthohumol ^[13]
3	6.32	214	281	MS ² [281]: 264(74), 263(100), 246(9), 245(6), 222(20), 221(44), 218(20), 193(21), 150(14), 148(26), 137(8), 136(17)	5 α ,9 α -二羟基苦参碱 ^[4]
4	7.31	204	281	MS ² [281]: 263(100), 246(6), 245(15), 180(12), 150(3), 148(3)	氧化槐醇 ^[8]
5	8.23	204	265	MS ² [265]: 248(73), 247(100), 220(7), 205(29), 150(3), 148(2), 137(4)	氧化槐定碱 ^[7]
6	17.99	206	265	MS ² [265]: 248(83), 247(100), 233(4), 220(13), 219(4), 206(16), 205(53), 177(5), 176(7), 150(9), 148(49), 137(12), 136(15), 98(5)	氧化苦参碱 ¹⁾
7	23.53	206	263	MS ² [263]: 245(100), 227(4), 203(6), 195(7), 150(25), 148(2), 138(12), 137(4), 136(5)	氧化槐果碱 ¹⁾
8	30.78	206	263	MS ² [263]: 246(88), 245(89), 166(6), 164(100), 150(16), 148(20), 146(9)	9 α -羟基槐果碱 ^[4]
9	35.86	208	261	MS ² [261]: 243(90), 164(24), 146(30), 114(100), 96(33)	脞靛叶碱 ^[4]
10	36.56	208	205	MS ² [205]: 162(20), 146(100), 108(80), 97(15), 58(11)	N-甲基金雀花碱 ^[4]
11	41.61	206	265	MS ² [265]: 247(49), 205(7), 168(8), 150(11), 148(17), 98(2)	槐醇 ^[4]
12	43.56	206,332	453	MS ² [453]: 329(100), 303(61), 197(4), 179(17), 177(20)	2'-甲氧基苦参酮 ¹⁾
13	44.64	206	303	MS ² [303]: 243(100), 206(1), 179(1), 148(1), 122(1), 94(1)	乙酰脞靛叶碱 ^[4,11]
14	46.51	206	577	MS ² [577]: 445(100), 283(60); MS3 [577→283]: 265(2), 255(3), 253(100), 227(4), 225(37)	7-hydroxy-3-methyl-4'-methoxy-flavone-7-primeveroside ^[20]
15	47.95	206,250,308	563	MS ² [563]: 489(6), 431(100), 269(60); MS3 [563→269]: 254(100), 241(30), 237(63), 213(18), 137(27), 107(10)	苦醇 O / 7-hydroxy-3'-methoxy-isoflavone-7-primeveroside ^[5]
16	49.09	206,248,328	563	MS ² [563]: 431(100), 269(50); MS3 [563→269]: 254(87), 241(21), 237(59), 213(100), 181(35), 137(38), 118(16), 107(9)	同化合物 15
17	50.29	206	245	MS ² [245]: 227(100), 174(22), 162(9), 150(15), 148(17), 134(7),	槐胺碱 ^[9]
18	50.50	206	249	MS ² [249]: 247(80), 231(99), 218(30), 150(100), 148(44), 134(32), 112(46)	槐定碱 ¹⁾
19	55.56	204	245	MS ² [245]: 148(22), 98(100)	臭豆碱 ¹⁾
20	61.49	206	249	MS ² [249]: 247(45), 231(100), 150(31), 148(94), 136(22), 114(26)	苦参碱 ¹⁾
21	63.06	204	247	MS ² [247]: 245(100), 229(20), 227(9), 179(32), 150(65), 148(51), 138(12)	槐果碱 ¹⁾
22	68.91	204	247	MS ² [247]: 246(2), 245(2), 229(2), 176(4), 150(4), 148(100)	莱曼碱 ^[10]
负离子模式					
2	5.93	210,324,386	369	MS ² [369]: 351(3), 341(2), 207(12), 161(100)	2'-hydroxyl-isoxanthohumol ^[13]
23	7.41	210,320,386	579	MS ² [579]: 327(2), 285(100), 257(3), 213(2); MS ³ [579→285]: 257(100), 241(27), 213(20), 153(5), 135(15)	苦醇 J ^[15]
24	8.51	210,326,386	369	MS ² [369]: 341(100), 337(3), 325(28), 262(4), 207(5), 161(2)	5-methoxy-3, 7, 2'-trihydroxy-8-[3, 3-dimethylallyl]-flavanone / 7-methoxy-3, 5, 2'-trihydroxy-8-[3, 3-dimethylallyl]-flavanone
25	9.28	210,288,386	565	MS ² [565]: 271(100), 243(3); MS3 [565→271]: 256(5), 243(100), 227(21), 212(7), 199(17), 135(12)	[12 β , 7, 4'-trihydroxyflavanone-7-primeveroside / 3, 7, 4'-trihydroxyflavanone-4'-primeveroside ^[14]

续表 1 经鉴定的苦参提取物中的化合物

No.	t_R	紫外 /nm	准分子离子峰	多级质谱(%基峰)	化合物名称
26	10.11	228,270,386	565	MS ² [565]: 271(100), 243(5); MS3 [565→271]: 256(4), 243(100), 227(25), 212(12), 199(22), 135(11)	同化合物 25
27	13.45	210,324,386	369	MS ² [369]: 341(100), 337(3), 325(28), 263(2), 262(3), 207(4), 161(1)	同化合物 24
28	20.03	210,324,386	353	MS ² [353]: 251(5), 247(4), 233(100), 119(11)	黄腐醇 ¹⁾
29	27.47	210,268,368	577	MS ² [577]: 504(2), 283(100), 268(3); MS3 [577→283]: 268(100), 255(9), 251(46), 223(22)	calycosin-7-primeveroside ^[18] 3'-methoxydaidzein-7-primeveroside
30	30.49	210,310,368	577	MS ² [577]: 293(5), 283(100), 268(5); MS3 [577→283]: 268(100), 255(7), 251(39), 223(15)	同化合物 29
31	32.28	210,324,386	339	MS ² [339]: 245(15), 237(6), 219(100), 193(5)	槐属黄酮 B ¹⁾
32	33.12	210,322,386	267	MS ² [267]: 252(100), 234(5)	芒柄花黄素 ^[17]
33	33.93	210,330	437	MS ² [437]: 419(10), 409(100), 393(45), 368(52), 365(35), 314(52), 313(50), 287(82), 261(70), 149(5)	苦醇 C ^[5,12]
34	34.08	210,332	453	MS ² [453]: 425(13), 421(21), 303(4), 275(22), 177(100), 149(15)	苦醇 I ¹⁾
35	34.83	210,330	439	MS ² [439]: 421(24), 411(59), 395(10), 261(100), 217(5), 177(18)	苦醇 L ¹⁾
36	36.30	212,328	437	MS ² [437]: 419(3), 275(18), 161(100)	苦参酮 ¹⁾
37	37.51	210,312,386	283	MS ² [283]: 268(10), 265(1), 255(100), 254(30), 239(7)	高丽槐素 ^[5,19]
38	39.93	210,330	423	MS ² [423]: 405(1), 395(1), 313(1), 261(100), 161(18)	降苦参酮 ¹⁾
12	43.61	212,328	451	MS ² [451]: 419(9), 319(13), 301(100), 175(5)	2'-甲氧基苦参酮 ¹⁾
39	44.30	212,316,388	437	MS ² [437]: 419(4), 275(22), 161(100)	苦参啉 ¹⁾
40	47.29	212,330,386	423	MS ² [423]: 261(100), 161(14)	去甲苦参啉 ¹⁾
15	47.9	212,260,304	561	MS ² [561]: 267(100); MS3 [561→267]: 252(100)	苦醇 O /7-hydroxy-3'-methoxy-isoflavone-7-primeveroside ^[5]
41	48.98	212,328,386	437	MS ² [437]: 405(12), 313(80), 287(100), 261(15)	异苦参酮 ¹⁾
16	49.01	212,260,304	561	MS ² [561]: 267(100); MS3 [561→267]: 252(100)	同化合物 15
42	59.91	210,310,386	445	MS ² [445]: 283(100); MS3 [283]: 268(10), 255(100), 254(35), 239(4), 211(4), 145(4), 137(4)	三叶豆紫檀苷 ^[5,19]

注: 1) 经对照品对照鉴定。

很高的脱水峰,可判断其为苦参碱型生物碱的羟基氧化物,再结合文献[4]可推测它们为 5 α ,9 α -二羟基苦参碱(3),9 α -羟基槐果碱(8)和槐醇(11)。

化合物 10 准分子离子峰 m/z 205 的二级碎片具有基峰 m/z 146 离子,与文献报道^[4]一致,碎片 m/z 146 可能是 C7-C13 和 C9-C11 断裂产生,由此推断其为 N-甲基雀花碱(10),属于雀花碱型生物碱。

化合物 9 的准分子离子峰为 m/z 261,其二级质谱具有基峰 m/z 243 $[M + H - H_2O]^+$; 化合物 13 的准分子离子峰为 m/z 303,其二级质谱同样产生了基峰 m/z 243 $[M + H - C_2H_4O_2]^+$,故推测两者在分别脱水和脱乙酰基后产生了相同的母核。进一步与臭豆碱(19)的裂解碎片对比,最终推断它们为脞啶叶碱(9)^[4]、乙酰脞啶叶碱(13)^[4,11]。化合物

9,13,19 属于无叶豆碱型生物碱。

3.2 黄酮类化合物的鉴定 本研究共鉴定出 26 个黄酮类化合物,包括 6 个二氢黄酮,3 个查耳酮,7 个二氢黄酮醇,1 个黄酮醇,6 个异黄酮,2 个紫檀素类黄酮和 1 个双苯吡酮。其中有 8 个双糖苷和 1 个单糖苷,双糖苷为含有二糖 primeveroside 基团(β -D-葡萄糖 + β -D-木糖)的化合物,表现在质谱上的特征碎片为产生丰度很高的 $[M - H - 294]^-$ 离子,单糖苷为葡萄糖苷,能产生高丰度的 $[M - H - 162]^-$ 离子。黄酮类化合物的鉴定是根据正、负离子模式下的裂解来推测的。

根据紫外吸收光谱,黄酮类化合物在 210, 320 或 386 nm 左右存在不同程度的吸收,故推断化合物 1~2, 12, 14~16, 23~42 为黄酮类化合物。

根据文献[12],二氢黄酮和其相应的查耳酮会

产生一定的构型转化,故质谱特征一致。主要表现为C环容易裂解,产生丰度极高的A环或B环碎片离子。在正离子模式下,当B环上的2'位是H或OCH₃时,二级质谱中S⁺离子(准分子离子峰失去异戊烯基)的丰度将高于^{1,3}A⁺离子;反之,当B环上的2'位是OH时,二级质谱中^{1,3}A⁺离子的丰度高于S⁺离子。在负离子模式下,当B环上的2'位是OH时,二级质谱主要产生^{1,4}A⁻或^{1,4}B⁻离子,在此基础上,若A环5位连接的也是OH时,^{1,4}A⁻离子丰度高于^{1,4}B⁻离子,若A环5位没有连接OH,则^{1,4}B⁻离子丰度高于^{1,4}A⁻离子;当B环上的2'位连接的是H或OCH₃时,二级质谱主要产生^{1,3}A⁻离子,而其相应的^{1,3}B⁻离子丰度很低。根据上述信息,推测化合物**2**, **12**, **28**, **31**, **36**, **38**, **39**, **40**, **41**为二氢黄酮和查耳酮。其中化合物**12**, **31**, **36**, **38**, **41**通过标准品对照确定为2'-甲氧基苦参酮(**12**)、槐属黄烷酮B(**31**)、苦参酮(**36**)、降苦参酮(**38**)和异苦参酮(**41**),均为二氢黄酮,其UV的最高吸收峰在280 nm左右。化合物**28**, **39**, **40**经过标准品对照确定为黄腐醇(**28**)、苦参啶(**39**)和去甲苦参啶(**40**),为查耳酮,UV最高吸收峰在360~390 nm。化合物**2**的推导如下,在正离子模式下,基峰为 m/z 235 ^{1,3}A⁺离子,而 m/z 315 S⁺离子丰度其次,推测B环上的2'位是OH;在负离子模式下,基峰为 m/z 161 ^{1,4}B⁻离子, m/z 207 ^{1,4}A⁻离子丰度其次,故B环上的2'位是OH的同时,A环5位连接的是H或者OCH₃,进一步根据文献可推测其为二氢黄酮2'-hydroxyl-isoxanthohumol (**2**)^[13]。

二氢黄酮醇和黄酮醇在负离子模式下的二级碎片,除了产生相应的^{1,3}A⁻, ^{1,4}A⁻, ^{1,4}B⁻离子外,还具有特征的[M-H-28]⁻和[M-H-44]⁻离子,分别为准分子离子峰丢失C环上的CO和CO₂所得,故此推断化合物**23**~**27**,**33**~**35**为二氢黄酮醇和黄酮醇。化合物**34**, **35**经标准品对照确定为二氢黄酮醇苦醇I(**34**),苦醇L(**35**)。化合物**24**和**27**一级质谱和二级质谱一致,推断它们为同分异构体。二级质谱中具有高丰度的典型的[M-H-294-28]⁻和[M-H-44]⁻离子,再根据分子量可推测二氢黄酮醇的母环上连有一个异戊烯基、两个羟基和一个甲氧基。A环的8位C上连接异戊烯基,并且5位和7位C上连接一个甲氧基或一个羟基,同时B环上的2'位C上连接一个羟基,才有可能产生

m/z 207 ^{1,4}A⁻和 m/z 161 ^{1,4}B⁻离子,故可推知它们为5-methoxy-3,7,2'-trihydroxy-8-[3,3-dimethylallyl]-flavanone(**24/27**)或7-methoxy-3,5,2'-trihydroxy-8-[3,3-dimethylallyl]-flavanone(**27/24**)^[12]。

化合物**25**,**26**具有典型的基峰离子[M-H-294]⁻,应为二糖 primeveroside 苷。苷元进行三级质谱分析,得到典型的[M-H-294-28]⁻和[M-H-294-44]⁻离子,为二氢黄酮醇或黄酮醇。再根据分子量信息,应为连有2个羟基的二氢黄酮醇,只有2个羟基分别在A环和B环上,才有可能产生 m/z 135 ^{1,3}A⁻离子,并且B环上的羟基不能在2'位C上出现,故推测它们为3,7,4'-trihydroxyflavanone-7-primeveroside或者3,7,4'-trihydroxyflavanone-4'-primeveroside(**25/26**)^[14],属于二氢黄酮醇。

化合物**23**同化合物**25**,**26**相似,二级质谱具有典型的基峰离子[M-H-294]⁻,含有二糖 primeveroside 基团,苷元的三级质谱具有典型的[M-H-294-28]⁻和[M-H-294-44]⁻离子。二氢黄酮醇的母核在A环连有羟基,在B环连有甲氧基,才有可能产生 m/z 135 ^{1,3}A⁻离子,再结合文献推测其为二氢黄酮醇 kushenol J(**23**)^[15]。化合物**33**二级质谱具有典型的[M-H-28]⁻和[M-H-44]⁻离子,根据分子量信息,应该为黄酮醇的母核上连有4个羟基,当5,7,2',4'位分别连接一个羟基时,符合具有 m/z 261 ^{1,4}A⁻离子和 m/z 149 ^{1,4}B⁻离子,且^{1,4}A⁻离子丰度大于^{1,4}B⁻离子,故推测其为黄酮醇苦醇C(**33**)^[5,12]。

异黄酮跟上述几种黄酮在质谱行为上存在显著的差别,表现为在负离子模式下,C环很难裂解,而正离子模式下,C环相对与负离子模式下容易裂解。在本实验鉴定的含有甲氧基取代基团的异黄酮中,在负离子模式下具有典型的[M-H-15]⁻和[M-H-33]⁻离子,分别为丢失甲基和甲氧基的产物。在正离子模式下,除了典型的[M+H-15]⁺和[M+H-32]⁺离子外,还存在C环裂解产生的碎片离子,比如^{1,3}A⁺离子。据此,判断化合物**1**,**15**,**16**,**29**,**30**,**32**为异黄酮。化合物**1**在正离子模式下具有高丰度的 m/z 270 [M+H-15]⁺和 m/z 253 [M+H-32]⁺碎片离子,并具有低丰度的 m/z 137 ^{1,3}A⁺离子,与文献报道一致^[16],推断为毛蕊异黄酮(**1**)。化合物**32**在负离子模式下,只有[M-H-15]⁻和[M-H-33]⁻离子,表现出典型的异黄酮

特征,再结合文献推测为芒柄花黄素(32)^[17]。化合物 15,16 在正、负离子模式下的一、二、三级质谱表现一致,判断它们为同分异构体,在正、负离子模式下都表现出了高丰度的丢失 294 碎片离子,表明含有 1 个二糖 primeveroside 基团。对苷元做三级质谱分析,发现正离子模式具有高丰度的 $[M + H - 294 - 15]^+$ 、 $[M + H - 294 - 32]^+$ 离子和低丰度的 m/z 137 ^{1,3}A⁺ 离子,负离子模式下只有基峰 $[M - H - 294 - 15]^-$,为典型的异黄酮,结合文献可推知为苦醇 O 及其异构体 7-hydroxy-3'-methoxyisoflavone-7'-primeveroside (15/16)^[5],异构位置可能为苦醇 O 的 4' 位的甲氧基异构至 3' 位。化合物 29,30 在负离子模式下具有典型的 $[M - H - 294 - 294]^-$ 离子,含有 primeveroside 基团,苷元的三级质谱具有高丰度的 $[M - H - 294 - 15]^-$ 和 $[M - H - 294 - 33]^-$ 离子,为异黄酮的二糖苷,苷元进一步可推断为毛蕊异黄酮及其异构体,异构位置可能是 3' 位的羟基和 4' 位的甲氧基互换。故化合物 29 和 30 推测为 calycosin-7'-primeveroside (29/30)^[18] 或 3'-methoxydaidzein-7'-primeveroside(29/30)。

化合物 42 的准分子离子峰为 m/z 445,二级质谱生成 m/z 283 $[M - H - 162]^-$,为准分子离子失去 1 分子葡萄糖的产物,此碎片 m/z 283 也是化合物 37 的准分子离子峰,进一步对比 m/z 283,发现两者裂解碎片一致,故推测两者母核一致。对母核进行分析, m/z 268 为 m/z 283 脱氧后加氢所致, m/z 255 为 A 环破裂产生, m/z 239 是在 m/z 255 基础上脱氧所得。再根据文献^[5,19] 故推测化合物 37 为高丽槐素(37),它的葡萄糖苷,即化合物 42 为三叶豆紫檀苷(42),属于紫檀素类黄酮。

化合物 14 在正离子模式下也具有典型的 $[M + H - 294]^+$ 离子,含有 primeveroside 基团,对苷元对三级质谱分析,具有脱水碎片 m/z 265 离子,脱甲氧基碎片 m/z 253 离子以及 m/z 253 脱羰基碎片 m/z 225 离子,再根据文献推测苷元为 7-hydroxy-3-methyl-4'-methoxy-flavone^[20],故推测为 7-hydroxy-3-methyl-4'-methoxy-flavone-7'-primeveroside(14),属于双苯吡酮类黄酮。此类化合物与异黄酮相似,由于 C 环上 2 位和 3 位碳的双键的存在,使得 C 环较难裂解,故产生的碎片多为母核脱去一个或几个基团的离子。

3.3 金雀花碱型和无叶豆碱型生物碱的质谱裂解

规律分析 苦参中的黄酮类成分的质谱裂解规律已有详细的归纳及总结,但生物碱类成分的质谱裂解规律总结还不够完善,且多限于苦参碱型生物碱^[6]。故本研究对苦参碱型以外的金雀花型和无叶豆碱型生物碱正离子下的裂解规律进行了归纳总结,为完善苦参生物碱的质谱裂解规律分析提供参考。

为了探讨金雀花型生物碱的裂解,用标准品金雀花碱进行直接进样电喷雾质谱分析,同时对 N-甲基金雀花碱(10) 碎片裂解进行了推导,见图 2。两者裂解一致,C7-C13 和 C9-C11 都容易发生断裂,金雀花碱的二级质谱只有 AB 环碎片离子 m/z 148,而 N-甲基金雀花碱(10) 二级质谱除了 AB 环碎片离子 m/z 146 外,还有 A 环碎片离子 m/z 108 等。两者产生的 AB 环碎片到底是 m/z 146 还是 m/z 148 离子,可能与 12 位的取代基有关。对金雀花碱的 m/z 148 离子做三级质谱,产生 m/z 120 脱羰基离子。

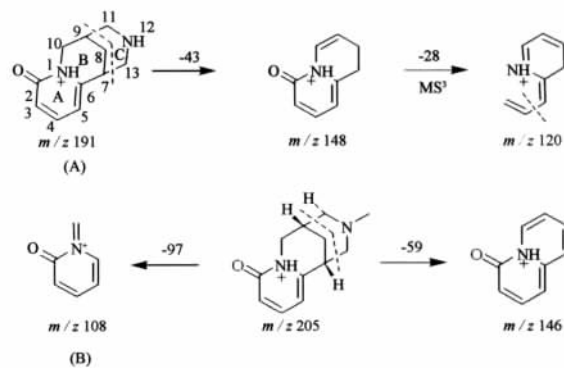


图 2 金雀花碱(A)和 N-甲基金雀花碱(B) 质谱裂解推导

无叶豆碱型和金雀花碱型生物碱的结构相似,故裂解规律基本一致,C7-C13 和 C9-C11 的断裂是它们典型的裂解特征,见图 3。与金雀花碱型生物碱裂解不同的是,无叶豆碱型生物碱由于 D 环的存在,还能形成 D 环系列碎片离子,如脞醍叶碱(9) 的 m/z 114 离子,臭豆碱(19) 的 m/z 98 离子。当然由于取代基的影响,各个化合物间的裂解会存在一定的差异,比如由于羟基的影响,脞醍叶碱(9) 具有丰度很高的脱水峰 m/z 243 $[M + H - H_2O]^+$ 离子,该碎片发生 C 环裂解则产生 D 环碎片离子 m/z 96。对臭豆碱(19) 的 D 环碎片离子进一步做三级

质谱分析,可发现典型的 RDA 裂解,产生 m/z 70 离子。

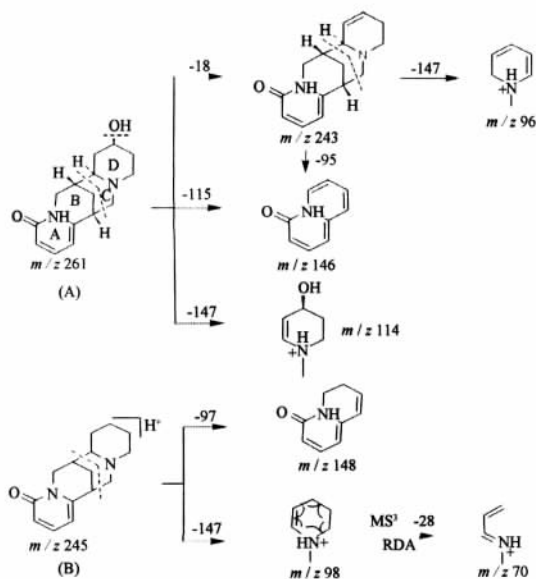


图 3 胍甾叶碱(A)和臭豆碱(B)质谱裂解推导

金雀花型和无叶豆碱型生物碱的 C7-C13 和 C9-C11 的断裂是其典型的裂解特征,特征的碎片有 m/z 148 或 146 等 AB 环碎片离子,无叶豆碱型生物碱还具有其特征的 D 环裂解碎片,12 位碳上的取代基会对两类具体化合物的裂解产生一定的影响。

[参考文献]

[1] 张蕾,吴迪,陈晓辉,等. 建立评价苦参质量的 RP-HPLC 指纹图谱分析方法[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(9): 1261.
 [2] 中国药典. 一部[S]. 2005: 141.
 [3] 王宇. 苦参化学、工艺、制剂及质量研究近况[J]. 中成药, 1997, 19(4): 39.
 [4] 刘倩,张宏桂,刘永刚,等. HPLC-MSⁿ法分析复方苦参注射液的化学成分[J]. 中成药, 2006, 28(10): 1488.
 [5] Zhang L, Xu L, Xiao S S, et al. Characterization of flavonoids in the extract of *Sophora flavescens* Ait. by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector and electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Pharmaceut Biomed Anal, 2007, 44(5): 1019.

[6] 陈怀侠,韩凤梅,杜鹏,等. 苦参生物碱电喷雾质谱分析[J]. 分析化学, 2006, 34(2): 205.
 [7] 张文,莫日根,许慧珍,等. 内蒙古苦豆子 *Sophora alopecuroides* 生物碱成分及分离研究[J]. 内蒙古大学学报, 1994, 25(6): 661.
 [8] Shigeru O, Hirota O, Haginiwa J, et al. The alkaloid constituents of *Euchresta japonica* and the stereochemical assignment of two isomeric sophoridine N-oxides [J]. Chem Pharm Bull, 1980, 28(2): 546.
 [9] 刘斌,石任兵. 苦豆子种子中生物碱的分离及 lehmamine 的结构确定[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(7): 557.
 [10] 刘斌,李金亮,元英进. 苦参汤中生物碱部位的化学成分[J]. 中草药, 2001, 32(4): 293.
 [11] Saito K, Takamatsu S, Murakoshi I. Isolation of a new alkaloid (\rightarrow -*o*-acetylbaptifoline and the absolute stereochemical relationships of lupine alkaloids in *Thermopsis chinensis* [J]. J Nat Prod, 1989, 52(5): 1032.
 [12] Zhang Y F, Zhang P, Cheng Y Y. Structural characterization of isoprenylated flavonoids from Kushen by electrospray ionization multistage tandem mass spectrometry [J]. J Mass Spectrom, 2008, 43(10): 1421.
 [13] 李巍,梁鸿,尹婷,等. 中药苦参主要黄酮类成分的研究[J]. 药学报, 2008, 43(8): 833.
 [14] Mario G, Lldomar A, Acacio D. 5-Deoxyflavonoids and lignan isolated from the wood of *Schizolobium parahyba* (Veil.) S. F. Blake [J]. Quimica Nova, 2008, 31(6): 1349.
 [15] Wu L J, Miyase T, Ueno A, et al. Studies on the constituents of *Sophora flavescens* Ait. IV [J]. Yakugaku Zasshi, 1985, 105(11): 1034.
 [16] Liu E H, Qi L W, Peng Y B, et al. Rapid separation and identification of 54 major constituents in Buyang Huanwu decoction by ultra-fast HPLC system coupled with DAD-TOF/MS [J]. Biomed Chromatogr, 2009, 23(8): 828.
 [17] 李慧,万乐人,王弘,等. 异黄酮同分异构体的 ESI-IT-TOF 质谱特征及区别[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(12): 2284.
 [18] Shi H, Zhao H. Sofflavones and isoflavone glycosides as antidiabetics: Japan, 11116487 [P]. 1999-04-27
 [19] 陈青,朱海燕,杨小生,等. 黔产白刺花化学成分研究[J]. 中成药, 2009, 31(2): 269.
 [20] Srimannarayana G, Rao N V S. Synthesis of 3-alkyl flavones by modified Baker-Venkataraman transformation [J]. Indian J Chem, 1986, 6(12): 696.

Simultaneous characterization of two types of major active components in Kushen by high performance liquid chromatography coupled to multi-stage mass spectrometry

ZHAO Qinqin, ZHANG Yufeng, FAN Xiaohui*

(Department of Chinese Medicine Science & Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] In this study, a high performance liquid chromatography coupled with multi-stage mass spectrometry method was developed for simultaneous characterization of alkaloids and flavonoids, the main active components, in Kushen with diverse physical and chemical properties. Forty-two major constituents, including sixteen Kushen alkaloids and twenty-six Kushen flavonoids were tentatively identified. Additionally, useful and characteristic fragmentation pathways of two types of Kushen alkaloids, namely cytosine-type and sparteine-type, in positive ions mode were proposed and summarized, which would lay a foundation for the rapid identification of the active ingredients in traditional Chinese medicine Kushen.

[Key words] Kushen; alkaloids; flavonoids; high performance liquid chromatography coupled with multi-stage mass spectrometry; Structural identification

doi: 10.4268/cjcm20110625

[责任编辑 丁广治]

封面图片简介

侧金盏花

【来源】 毛茛科侧金盏花 *Adonis amurensis* Regel et Radde 的带根全草。

【别名】 福寿草

【俗名】 冰凉花、冰里花、冰郎花、顶冰花、雪莲花

【原植物】 多年生草本，茎高达30 cm。根状茎粗短，簇生黑色须根；茎少分枝，绿色或带紫堇色，近基部有数个淡褐色或白色的膜质鞘。叶在花后伸展，茎下部叶柄长达7~10 cm，叶片正三角形，长达7.5 cm，宽9 cm，3回近羽状细裂，最终裂片呈披针形，宽约1~1.5 mm，近无毛。花单生茎顶，径约3 cm；萼片约为9，长圆形或倒卵状长圆形，黄色，略带紫色，与花瓣等长或稍长；花瓣约为10，长圆形，黄色，长1.4~2 cm，宽0.5~1 cm，矩圆形或倒卵状矩圆形；雄蕊多数，长约3 mm，心皮多数，子房有柔毛，具短花柱，柱头小，球形。瘦果倒卵状球形，长约4 mm，有短柔毛，果喙弯曲成钩状。花期3~4月；果期4~5月。

【生境】 生于海拔200~1300 m的山坡、草甸及林下较肥沃处。

【分布】 东北；朝鲜、日本、俄罗斯(远东地区)、欧洲。本地区的各市县。

【采制】 早春连根挖取全草，除去泥土，洗净，晒干。

【化学成分】 全草含索马林、拿大麻苷、拿大麻醇苷、黄麻苷、铃兰毒苷等多种强心甙[1]。

【药理作用】 本品浸剂可使冷血动物的心脏停止于收缩期，用于温血动物离体心脏及衰竭之心肺证明有强心苷的作用。总苷有轻度的蓄积作用，能抑制小鼠的自发活动。

【性味功能】 味苦，辛，性平，有小毒。有强心利尿的功能。

【主治用法】 用于心悸、心脏性水肿、癫痫^[2]。

【用量】 口服细粉25 mg，1日1~3次；或水浸或酒浸，2.5 g 1日2次。本品毒性较大，用时需遵医嘱。

【附注】 本区同属植物尚有1种：辽吉侧金盏花 *A. ramosa* Franch.，茎无毛或顶部有短毛，茎生叶4，无柄；花径2.5~4 cm，萼片4~5，灰紫色，广卵形或广菱形，比花瓣短；瘦果无毛。生于海拔300~900 m的向阳山坡上。分布于东北；朝鲜、日本、俄罗斯(远东地区)。本地区的集安、通化、辉南等市县。其他同侧金盏花。