



白芍中芍药苷及其衍生物的 UPLC-MS/MS 分析

郑敏霞, 陈喆*, 刘培, 葛宇清, 代群

(浙江中医药大学 附属第一医院 国家中医临床研究基地, 浙江 杭州 310006)

[摘要] 目的: 采用超高效液相色谱与四级杆-线性离子阱串联质谱联用技术(UPLC-Q-Trap MS-MS)对白芍中单萜糖苷类成分进行分析和鉴别。方法: 用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液(A) 乙腈(B) 为流动相梯度洗脱, 使用 ESI 离子源, 在负离子模式下采集数据, 数据采集范围 m/z 100~1200, 雾化气 124.11 kPa, 脱溶剂气 103.43 kPa, 气帘气 206.85 kPa; 离子源温度为 450 °C; 离子喷雾电压为 -4.5 kV; 结果: 白芍中化学成分获得了较好的分离和检测, 共推测出 6 个糖苷类化合物的化学结构; 结论: 该方法灵敏度高, 分离度好, 适用于白芍中单萜糖苷类成分的快速分析与结构鉴定。

[关键词] 白芍; 单萜糖苷; 超高效液相色谱质谱联用法

白芍 *Paeonia lactiflora* Pall 为毛茛科植物 Ranunculaceae 芍药 *P. lactiflora* 的干燥根, 性微苦, 味苦酸, 有养血柔肝, 缓中止痛, 敛阴收汗的功能^[1]。我国白芍主产区为浙江、安徽、四川等地。白芍化学成分主要为挥发油类、单萜类、三萜类及黄酮类化合物等^[2], 其药材的质量控制一般以其主要成分芍药苷(paeoniflorin, 一种单萜糖苷类成分) 为指示成分。目前, 对芍药的质量控制方法主要有薄层鉴别、高效液相色谱(HPLC) 和薄层扫描等几种方法^[3]。白芍中单萜糖苷类化合物结构相似, 常规的 HPLC 方法分离时间长且难以达到分析要求。UPLC 是较先进的液相色谱技术, 具有超高压、超高灵敏度、超高分离度等特点, Q-Trap 串联质谱灵敏度高、选择性强, 得到的质谱图数据完整且品质高。本研究应用 UPLC-MS-MS 对白芍中单萜糖苷类成分进行快速分析, 并探讨了该类化合物电喷雾质谱的裂解特点, 为中药白芍的质量评价及研究提供有价值的参考。

1 仪器与试剂

Waters 超高效液相色谱仪(Acquity UPLC, Waters, USA) 包括在线真空脱气系统, 四元超高压泵系统, 自动进样器, 柱温箱; Q-Trap 4000 四级杆-线性离子阱串联质谱(Q4000, 美国 Applied Biosystems 公司, 电喷雾电离源); Analyst 1.5.1 分析软件。SB2200 超声清洗机(SHANGHAI BRANSON);

AE200 电子分析天平(METTLER)。

白芍药材购于安徽亳州, 经浙江中医药大学资源与鉴定教研室来平凡教授鉴定为白芍 *P. lactiflora* 的干燥根。乙腈、甲酸为色谱纯(Fisher Scientific); 水为 Millipore 纯净水; 其他试剂为分析纯(杭州华东医药有限公司)。氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷为本实验室制备(经 HPLC 分析纯度大于 98%); 对照品芍药苷(110736-200732) 购自中国药品生物制品检定所。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 取白芍药材粉碎过 24 目筛, 称取 1 g 粗粉并加入甲醇 20 mL, 加热回流提取 30 min, 放置室温过滤, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.2 对照品溶液的制备 分别称取芍药苷、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷对照品适量于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解、定容, 进行液质联用分析。

2.3 色谱分析条件 超高效液相色谱流动相为 0.1% 甲酸溶液(A) 和乙腈(B), 柱温 25 °C, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 2 μL, 梯度洗脱条件, 见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件 %

t/min	乙腈	0.1% 甲酸溶液
0	5	95
2	15	85
6	65	35
7	90	10
8	5	95
9	5	95

2.4 质谱分析条件 UPLC-MS 系统使用电喷雾离

[稿件编号] 20110105001

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30600280)

[通信作者] * 陈喆, 副研究员, Tel: (0571) 86620280, E-mail: chenzhe_zjtcn@yahoo.cn

子源(ESI)在负离子模式下采集数据,数据采集范围 m/z 100 ~ 1 200。离子源参数 ESI: 雾化气 124.11 kPa, 脱溶剂气 103.43 kPa, 气帘气 206.85 kPa; 离子源温度为 450 ℃; 离子喷雾电压为 -4.5 kV。

3 结果与讨论

白芍中单萜糖苷类化合物结构相似,极性相近,等度洗脱难以实现良好分离。本研究对甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水溶液 3 种流动相进行比较分析,发现加入一定量甲酸有利于改善分离度。由于糖苷类化合物极性相对较大,因此使用 ESI 离子源;在负离子模式下其质谱信号信噪比较低,故选择在负离子模式下进行检测。质谱电压与温度条件通过以 $10 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速针泵注射 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 芍药苷标液优化。然后选定母离子进行二级碎裂扫描,通过优化碰撞能量及流动注射分析(FIA)优化气压条件,得到最佳雾化器为 103.43 kPa,辅助气为 124.11 kPa,气帘气为 206.85 kPa。

按照上述色谱条件,分别取白芍样品溶液和标样进行分析,其选择离子流图,见图 1。ESI 负离子模式下 6 个主要化合物产生的准分子离子峰有多种,为 $[M-H]^-$, $[M+Cl-H]^-$, $[M+HAc-H]^-$, 这对确定未知化合物的相对分子质量具有重要的意义。由一级和二级特征碎片离子并结合文献,对分离出的 6 个主要峰进行分析,并推测出其可能的结构,结果见表 2。

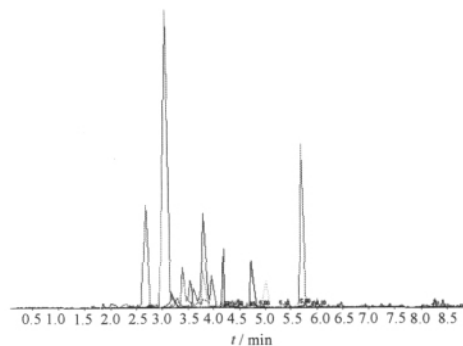


图 1 白芍样品的提取离子流图

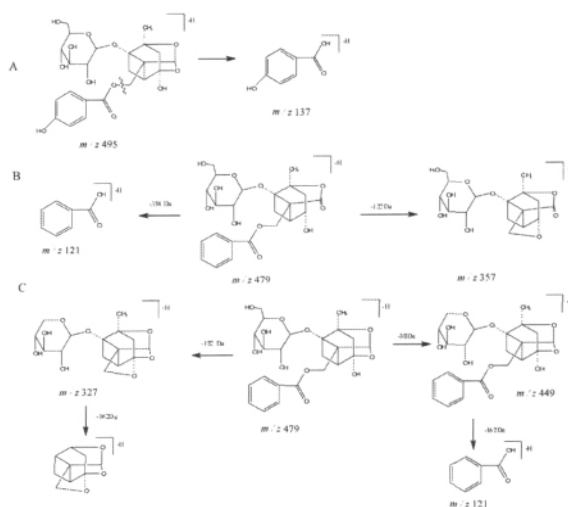


图 2 部分糖苷化合物的可能裂解途径

表 2 芍药苷及其衍生物的 UPLC-MS/MS 分析

No.	t_R $[M-H]^-$	$[M+Cl-H]^-$	$[M+HAc-H]^-$	MS/MS	碎片离子	化合物
1	2.09	495	—	—	137	氧化芍药苷
2	2.69	479	515	525	357, 121	白芍苷
3	3.05	479	515	525	449, 327, 165, 121	芍药苷
4	3.61	631	—	—	509, 465, 313, 169	没食子酰基芍药苷
5	3.85	939	—	—	769, 617, 447, 169	pentagalloyl glucose
6	5.70	583	—	629	553, 461, 231, 121	苯甲酰芍药苷

化合物 1 准分子离子峰为 m/z 495 $[M-H]^-$, MS/MS 碎片的离子峰为 m/z 137, 其可能的裂解途径,发生了酯键的断裂,结合文献推测为氧化芍药苷^[4],且与对照品数据一致,见图 3。

化合物 2 准分子离子峰为 m/z 479 $[M-H]^-$, 515 $[M+Cl-H]^-$, 525 $[M+HAc-H]^-$, 同样由酯键断裂产生的 MS/MS 碎片的离子峰为 m/z

357, 121, 如图 4 所示,其可能的裂解途径,如图 3 所示,结合文献推测为白芍苷^[5]。

化合物 3 白芍苷的同分异构体,具有相同的准分子离子峰为 m/z 479 $[M-H]^-$, 515 $[M+Cl-H]^-$, 525 $[M+HAc-H]^-$, 但 MS/MS 碎片离子峰不同,分别为 m/z 449, 327, 165, 121, 推测其裂解途径与白芍苷不同,由酯键断裂和糖苷键的断裂共同

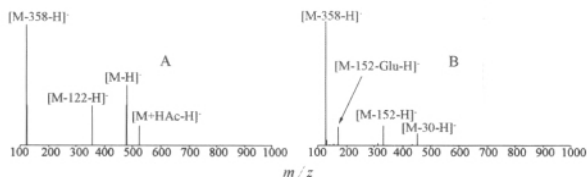


图3 白芍苷(A)和芍药苷(B)的二级质谱

产生,结合文献推测为芍药苷^[6],且与对照品数据一致,见图3 4。

化合物4 准分子离子峰为 m/z 631 $[M-H]^-$, MS/MS 碎片的离子峰为 m/z 509, 465, 313, 169, 其裂解方式与上述化合物类似,结合文献推测为没食子酰基芍药苷^[7]。

化合物5 准分子离子峰为 m/z 939 $[M-H]^-$, MS/MS 碎片的离子峰为 m/z 769, 617, 447, 169, 结合文献推测为 Pentagalloyl glucose^[8]。

化合物6 准分子离子峰为 m/z 583 $[M-H]^-$, 629 $[M+HAc-H]^-$, MS/MS 碎片的离子峰为 m/z 553, 461, 231, 121, 其裂解方式与上述单萜糖苷类化合物类似,结合文献推测为苯甲酰芍药苷^[9],且与对照品数据一致。

本实验经过超高效液相色谱的分离,借助 Q-Trap MS 测定的相对分子质量及碎片离子信息,对白芍中的主要单萜糖苷类化合物进行了定性鉴定,

发现白芍中的单萜糖苷类化合物在质谱中主要会发生酯键和糖苷键的断裂,从而建立了快速、灵敏的白芍药材的化学成分定性分析方法,为白芍药材的成分鉴定提供了一种准确有效的方法。

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005: 96.
- [2] 高小荣,田庚元. 白芍化学成分研究进展[D]. 上海: 中国科学院上海冶金研究所, 2000.
- [3] 谷满仓,钱亚芳,吕圭源. 白芍的化学成分及质量控制方法研究进展[J]. 科技通报, 2006, 22(3): 337.
- [4] Murakami N, Saka M, Shimada H. New bioactive monoterpene glycoside from *Paeonia Radix* [J]. Chem Pharm Bul, 1996, 44(6): 1279.
- [5] Shimizu M, Kiyashi T, Morita N. A new monoterpene from paeony roots [J]. Tetrahedron Lett, 1981, 22: 3069.
- [6] Lang H, Li S, McCabe T. A new monoterpene glycoside of *Paeonia lactiflora* [J]. Planta Med, 1984, 50(6): 501.
- [7] Jin Y, John E, Magdy I. Monoterpene glucoside from paeony root [J]. Phytochemistry, 1990, 29(12): 3859.
- [8] Dong H, Liu Z, Song F, et al. Structural analysis of monoterpene glycosides extracted from *Paeonia lactiflora* Pall. Using electrospray ionization FTICR MS [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21: 3193.
- [9] Hayashi T, Shinbo T, Shimizu M, et al. New monoterpene glycosides from paeony root [J]. Tetrahedron Lett, 1985, 26: 3699.

Analysis and identification of glycosides in *Paeonia lactiflora* by UPLC-MS/MS

ZHENG Minxia, CHEN Zhe*, LIU Pei, GE Yuqing, DAI Qun
(National Clinical Research Base of Traditional Chinese Medicine,
Zhejiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the monoterpene glycosides in *Paeonia lactiflora* by UPLC-MS/MS. **Method:** An Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm × 50 mm) with 1.7 μm particle size was used. The mobile phase was composed of acetonitrile and 0.1% formic acid in gradient mode. The flow rate was 0.4 mL · min and the chromatographic run time was 9 min for one run. The mass spectrometer equipped with an electrospray ion source in negative ion mode. **Results:** Totally six glycosides were analyzed and identified by the established UPLC-MS/MS method. **Conclusion:** The method was rapid, sensitive, and extremely useful for rapid identification of glycosides in *P. lactiflora*.

[Key words] *Paeonia lactiflora*; monoterpene glycoside; UPLC-MS/MS

doi: 10.4268/cjcm20111222

[责任编辑 丁广治]

• 1643 •