

# UPLC-MS 分析侧柏叶中黄酮类化合物

单鸣秋, 钱雯, 高静, 池玉梅, 张丽, 丁安伟\*

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室 江苏 南京 210046)

**[摘要]** 目的:采用超高效液相色谱-质谱仪联用技术(UPLC-MS)对侧柏叶中黄酮类成分进行分析和鉴别。方法:用 Waters BEH C<sub>18</sub> 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。流动相为 0.2% 甲酸水溶液-甲醇梯度洗脱,使用 ESI 离子源,在负离子模式下采集数据。结果:推断出侧柏叶中 11 个黄酮类化合物,并探讨了黄酮类化合物的电喷雾/串联质谱(ESI-MS-MS)的裂解方式。结论:经过超高效液相色谱的分离,利用质谱测定提供的准确质量数,结合紫外光谱的信息可以鉴定侧柏叶中主要的黄酮类成分。探讨了黄酮类化合物的电喷雾/串联质谱(ESI-MS/MS)的裂解方式,为其成分鉴定提供了准确有效的方法。

**[关键词]** 超高效液相色谱-质谱联用;侧柏叶;黄酮

侧柏叶为柏科植物侧柏 *Platycladus orientalis* (L.) Franco 的干燥枝梢及叶,其性味苦涩、性寒,具有凉血止血的功效<sup>[1]</sup>。近年来,高效液相色谱法已成为分析侧柏叶黄酮类化合物的主要方法<sup>[1-3]</sup>。但有关采用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-MS)对侧柏叶的研究目前还未见报道。本实验利用 UPLC-MS 技术分析、推测了侧柏叶中的 11 种黄酮类化合物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Waters Acquity 超高效液相色谱仪,配有二极管阵列(DAD)检测器;Q-TOF micro 质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI);Masslynx 4.1 工作站。

槲皮苷(中国药品生物制品检定所,批号 111538-200403),槲皮素(中国药品生物制品检定所,批号 100081-200406),芹菜素(上海融禾医药科技有限公司,批号 080531),异槲皮苷、穗花杉双黄酮(上海顺勃生物工程技术有限公司),杨梅素(南京泽朗医药科技有限公司)。甲醇(色谱纯),水(高纯水)。其它试剂为分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 色谱条件

Waters BEH C<sub>18</sub> 柱(2.1 mm×50

mm, 1.7 μm)。流动相为 0.2% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(表 1)。流速 0.208 mL·min<sup>-1</sup>;柱温 30 °C;DAD 记录 205~400 nm 紫外光谱。

表 1 流动相梯度

t/min	0.2% 甲酸水溶液/%	甲醇/%
0.00	95.00	5.00
1.80	70.00	30.00
15.80	55.00	45.00
17.80	50.00	50.00
25.80	15.00	85.00
27.80	5.00	95.00
29.80	95.00	5.00
30.00	95.00	5.00

**1.2.2 质谱条件** 电喷雾负离子模式检测;扫描范围 *m/z* 100~1 000;毛细管电压 2.8 kV;样品孔电压 20 V;MCP 检测电压 2.1 kV;喷雾气流量 50 L·h<sup>-1</sup>,脱溶剂气流量 350 L·h<sup>-1</sup>;脱溶剂温度 300 °C;离子源温度 100 °C;碰撞能量 25 V。

**1.2.3 样品制备** 取侧柏叶粉末 1 g,精密称定,置于 50 mL 锥形瓶中,加 25 mL 甲醇,密塞,超声处理 1 h(工作频率 40 kHz,功率 250 W),冷却后过滤,将滤渣用少量甲醇洗涤,洗涤液与滤液合并,转移至 50 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

## 2 结果

### 2.1 色谱特征

经 UPLC-MS/MS 分析,在 360 nm 提取的紫外光谱图与质谱检测的选择离子色谱图基本吻合(图

[稿件编号] 20101012012

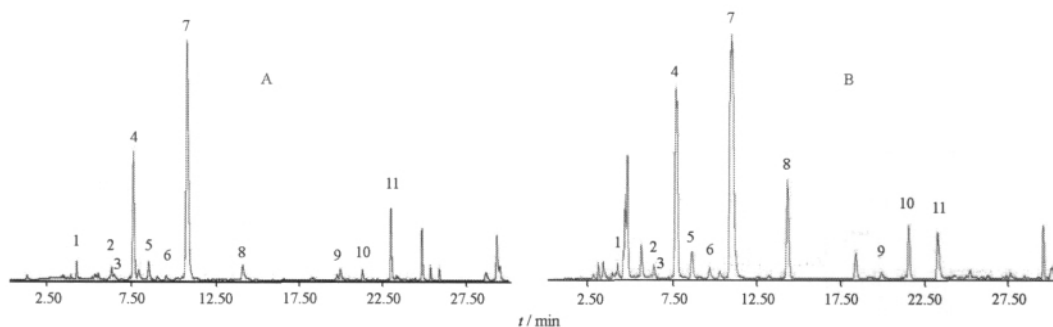
[基金项目] 国家“十一五”科技攻关项目(2006BAI09B06-02)

[通信作者] \* 丁安伟,教授,博士生导师,Tel:(025) 85811523, E-mail: awding105@163.com

[作者简介] 单鸣秋,讲师,博士研究生,Tel:(025) 85811519, E-mail: shanmingqiu@163.com

1)。因黄酮类化合物有较多的羟基,可形成稳定的氧负离子,故采用负离子模式检测,使总离子流色谱

图有较低的背景值,并且负离子模式形成的母离子通常为  $[M-H]^-$ ,比较单一,易于辨认。



A. UPLC 色谱图(360 nm) B. 总选择离子流图。

图 1 侧柏叶 UPLC-MS 图

## 2.2 光谱特征

紫外光谱显示,UPLC 分离的化合物均有 2 个强度相近的吸收带。其中带 I 的最大吸收波长 ( $\lambda_{max}$ ) 主要分布在 330 ~ 360 nm,带 II 的  $\lambda_{max}$  主要

分布在 250 ~ 270 nm。各色谱峰对应的紫外  $\lambda_{max}$  (表 2)。吸收带位置和形状显示符合黄酮类化合物的紫外吸收特征。

## 2.3 质谱特征

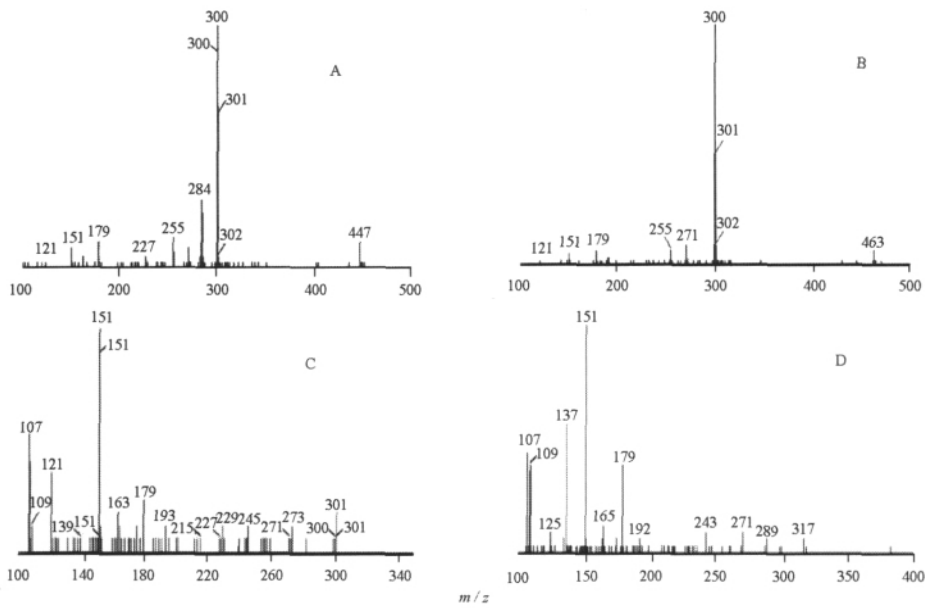
表 2 UPLC 分离化合物的质谱及紫外光谱数据

化合物	$t_R$ / min	精确相对分子质量	分子式	碎片离子质荷比 ( $m/z$ )	吸收带 I	吸收带 II
1	4.24	609.133 9	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609, 463, 447, 301, 179	347	268
2	6.37	625.125 2	$C_{27}H_{30}O_{17}$	625, 479, 463, 317	354	270
3	6.48	479.081 8	$C_{21}H_{20}O_{13}$	479, 317, 179, 151	335	270
4	7.65	463.038 4	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463, 317, 179, 151, 137	351	261
5	8.59	463.059 4	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463, 301, 179, 151, 121	353	255
6	9.68	463.069 9	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463, 301	340	270
7	10.84	447.041 6	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447, 301, 179, 151, 121	349	256
8	14.16	431.062 8	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431, 285, 179, 151	342	264
9	19.76	269.026 3	$C_{15}H_{10}O_5$	269, 151, 117	343	267
10	21.32	537.075 0	$C_{30}H_{18}O_{10}$	537, 417, 375, 331, 309	338	269
11	23.04	537.052 6	$C_{30}H_{18}O_{10}$	537, 417, 375, 331, 257	330	272

二级质谱分析结果显示,黄酮苷的 ESI/Q-TOFMS/MS 的裂解在糖基和苷元之间(表 2),主要化合物的二级质谱图(图 2)。根据丢失碎片的质量数和裂解规律,推测 UPLC 分离的化合物为单糖苷,主要为六碳糖苷(162)和五碳糖苷(146)。苷元碎片的质荷比分别为  $m/z$  317, 301, 285。利用 Masslynx4.1 软件,检索母离子  $[M-H]^-$  的元素组成,结合考虑 UV 光谱图与不饱和度的合理性,检索所得的分子式、检索结果及二级质谱数据(表 2)。

## 3 讨论

在二级质谱中,发现有碎片  $m/z$  301, 317, 推测可能为槲皮素和杨梅素的糖苷脱糖后裂解形成的碎片峰,对二者的对照品在相同条件下进行质谱解析。通过检索槲皮素和杨梅素的二级质谱,碎片  $m/z$  179, 151, 137, 121 的元素组成依次为  $C_8H_3O_5$ ,  $C_7H_3O_4$ ,  $C_7H_5O_3$ ,  $C_7H_5O_2$ 。分析两者的碎片情况,结合考虑结构特征,推测黄酮醇的裂解在 C 环 2 位于 1 位和 3 位之间,  $m/z$  137, 121 分别为杨梅素和槲皮素 B 环连 2 位碳碎片,  $m/z$  179 为



A. 槲皮苷; B. 异槲斗皮苷; C. 槲皮素; D. 杨梅素。

图 2 侧柏叶主要化合物的二级质谱图

A 环与 C 环部分  $m/z$  151 是  $m/z$  179 失去 CO 的产物。其裂解情况与样品中  $m/z$  301 和 317 相同, 因此认为槲皮素和杨梅素为侧柏叶中多数黄酮苷的苷元。

UPLC 对侧柏叶中多个色谱峰进行了分离, 采用对照品在相同条件下分析, 结果表明 5, 7, 9, 10

号峰, 分别依次与异槲皮苷、槲皮苷、芹菜素和穗花杉双黄酮的保留时间、光谱特征和质谱特征一致。利用 Q-TOF 的碎片离子的精确质量数, 检索碎片离子元素组成, 分析裂解方式, 结合保留时间和紫外光谱特征, 推测该 11 个化合物的结构 (图 3)。

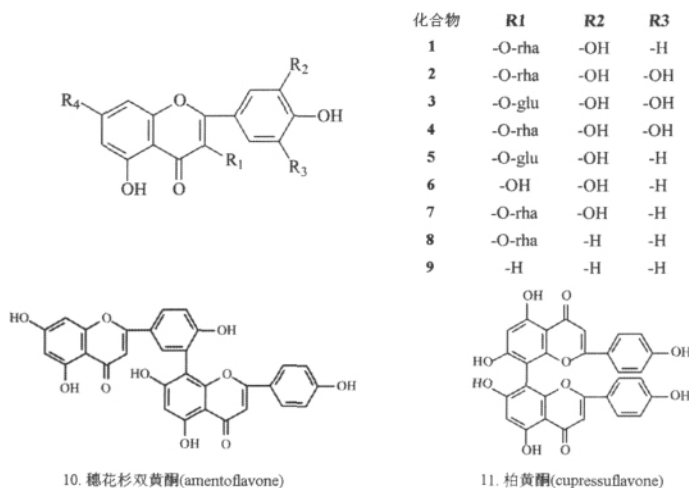


图 3 UPLC-MS 分离推测侧柏叶中 11 个化合物的结构

通过超高效液相色谱与电喷雾质谱联用, 通过 质谱和紫外光谱特征, 可以分析侧柏叶中的黄酮类

化合物,并为其中黄酮类化合物的鉴定提供了快速准确的方法。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2005:149.

[2] 郑冰珊,陈晓城,林崇良. HPLC 测定侧柏叶颗粒中槲皮苷含

量[J]. 江西中医药,2007,(2):50.

[3] Lu Y H ,Liu Zh Y ,Wang Zh T et al. Quality evaluation of *Platycladus orientalis* ( L. ) Franco through simultaneous determination of four bioactive flavonoids by high-performance liquid chromatography[J]. J Pharm Biomed Anal 2006 41( 4) : 1186.

## Analysis of flavonoids in *Platycladi Cacumen* by UPLC-MS

SHAN Mingqiu , QIAN Wen , GAO Jing , CHI Yumei , ZHANG Li , DING Anwei\*  
( *Nanjing University of Chinese Medicine , Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese  
Medicine Formulae Research , Nanjing 210046 , China* )

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the flavonoids in *Platycladi Cacumen*. **Method:** The constituents in *Platycladi Cacumen* were determined by UPLC-MS. A Waters BEH C<sub>18</sub> column ( 2.1 mm × 150 mm , 1.7 μm ) was used with a gradient elution of methanol-water containing 0.2% formic acid. The mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as detector and operated in data was collected under the negative ion modes. **Result:** Eleven constituents were identified. **Conclusion:** In this study , the main flavonoids in *Platycladi Cacumen* were separated by UPLC , and identified through the information of mass number and UV spectra. With the information of MS/MS from flavonoids , the modes of breaking up flavonoids were discussed. It is an accurate and effective method which can be applied for the constituent identification of *Platycladi Cacumen*.

**[Key words]** UPLC-MS; *Platycladi Cacumen*; flavonoids

doi: 10.4268/cjcm20111218

[责任编辑 丁广治]