

UPLC-ESI-Q-TOF-MS 在分析山茱萸化学成分中的应用

刘颖坤, 喻卫武*, 白岩(浙江农林大学林业与生物技术学院, 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱电喷雾四级杆飞行时间串联质谱(UPLC-ESI-Q-TOF-MS)对山茱萸中水溶性成分以及醇溶性成分进行分析和鉴别。**方法** 用 ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 以 0.2% 甲酸水溶液-0.2% 甲酸甲醇溶液为流动相梯度洗脱; 使用 ESI 离子源, 分别在正离子和负离子模式下采集数据。**结果** 推断出山茱萸水溶性成分 5 种: 没食子酸, 莫罗忍冬苷, 马钱素, 山茱萸新苷 I, 当药苷; 醇溶性成分 5 种: 7-脱氢马钱素, 山茱萸新苷 II, 槲皮素, 齐墩果酸, 熊果酸。**结论** 经过超高效液相色谱的分离, 借助 Q-TOF-MS 测定得到的精确分子质量及正负离子信息可以鉴定山茱萸中水溶性成分和醇溶性成分, 为其成分鉴定提供了一种准确有效的方法。

关键词: 山茱萸; 水溶性成分; 醇溶性成分; 超高效液相色谱电喷雾四极杆飞行时间串联质谱; 碰撞诱导解离

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2011)03-0226-05

Application of UPLC-ESI-Q-TOF-MS on Chemical Constituents of *Cornus officinalis*

LIU Yingkun, YU Weiwu*, BAI Yan(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Forestry and Biotechnology College, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze and identify water-soluble composition and alcohol-soluble composition in *Cornus officinalis*. **METHODS** These constituents were determined by UPLC-ESI-Q-TOF-MS. The chromatographic separation was performed on ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) with a gradient elution of water containing 0.2% formic acid-methanol containing 0.2% formic acid. The mass spectrometer equipped with electrospray ionization source was used as a detector. And data was collected under the positive and negative ion modes. **RESULTS** Five water-soluble constituents were identified as gallic acid, morroniside, loganin, cornuside I, sweroside. And five alcohol-soluble constituents were identified as 7-dehydrologanin, cornuside II, quercetin, oleanolic acid, ursolic acid. **CONCLUSION** In this study, water-soluble and alcohol-soluble constituents in *Cornus officinalis* were separated by UPLC, and identified through the information of positive ion and negative ion and accurate MW(molecular weight) which were determined by UPLC-ESI-Q-TOF-MS. It is an accurate and effective method which can be applied for the constituent identification of *Cornus officinalis*.

KEY WORDS: *Cornus officinalis*; water-soluble constituents; alcohol-soluble constituents; UPLC-ESI-Q-TOF-MS; CID

山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果实, 其性微温, 味酸、涩, 归肝肾经, 具有补益肝肾、涩精固脱之功效^[1], 是中医临床常用的名贵传统药材之一。国内外学者对其成分进行了研究, 山茱萸中主要含有有机酸类、环烯醚萜类、鞣质类、糖类

以及挥发性成分等^[2]。

近年来, 高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术(HPLC-ESI-MS)在中药领域的广泛应用^[3-5], 使分析、鉴定中药复杂体系中的化学成分更加简便、快速。然而对这些复杂体系中的化合物的指认却一直是质谱分析的关键和难点, 迫切需要发展相

基金项目: 浙江省森林培育重中之重学科开放基金(200511); 浙江农林大学预研项目(2009FK44)

作者简介: 刘颖坤, 男, 硕士, 助理实验师 Tel: (0571)63743865 E-mail: liuyingkun1@163.com *通信作者: 喻卫武, 男, 硕士, 高级实验师 Tel: (0571)63743865 E-mail: yww888@zafu.edu.cn

关方法对化合物进行快速筛查。Q-TOF-MS 是高分辨串联质谱,其显著特点是能够测得化合物的精确分子质量而不降低灵敏度,通过精确分子质量可以获得化合物的分子式,是天然产物研究的强有力工具^[6]。目前,有关山茱萸水溶性成分及醇溶性成分方面的研究还未见文献报道,本试验针对山茱萸的水溶性成分和醇溶性成分差异比较大的特点,使用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 对山茱萸中水溶性成分及醇溶性成分进行快速分析并鉴别,为中药的质量评价及研究提供参考。

1 仪器与试剂

ACQUITYTM Ultra Performance LC 超高效液相色谱系统(美国 Waters 公司);Micromass Q-ToF microTM 串联质谱检测器,采用电喷雾电离(ESI);Masslynx 4.1 工作站(美国 Waters 公司);ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);梅特勒-托利多 AL204 电子分析天平(瑞士);Milli-Q 超纯水装置;KQ 3200 B 型超声发生器(昆山市超声仪器有限公司)。

马钱素、熊果酸、齐墩果酸对照品(上海君创生物科技有限公司,批号分别为 TL6742101、TH0110107 和 TL1665501,纯度均为 98%);甲醇(色谱纯,美国 TEDIA 公司);水为超纯水;山茱萸样品于 2009 年 10 月采自浙江省临安市山茱萸集中分布区。经浙江农林大学林业与生物技术学院森林培育学科高级实验师喻卫武老师鉴定为山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的鲜果。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取马钱素、齐墩果酸、熊果酸对照品各 2.0 mg,马钱素用水定容至 10 mL,齐墩果酸和熊果酸分别用甲醇定容至 10 mL,得浓度为 0.2 mg·mL⁻¹ 溶液作为对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取山茱萸新鲜果实,去核,置烘箱内 60℃ 烘干 48 h,冷却后粉碎过筛(60 目),分别精密称量 1.0 g 粉末 2 份,置 2 个锥形瓶中,分别加入甲醇、水 10 mL,超声振荡 20 min,抽滤,重复 3 次,用适量的提取剂清洗残渣,合并滤液,经旋转蒸发仪真空浓缩至干,用相应提取剂定容至 25 mL,过 0.22 μm 微孔滤膜后作为供试品溶液。

2.2 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),梯度洗脱,流动相 A 为 0.2% 甲酸水溶液;流动相 B 为 0.2% 甲酸甲醇溶液;柱温:30℃;进样体积:10 μL。

山茱萸醇提物洗脱条件:流速:0.2 mL·min⁻¹, 0~8.0 min, 90% A→70% A, 8.0~13.0 min, 70% A→10% A, 13.0~20.0 min 持续为 10% A, 20.0~23.0 min, 10% A→90% A。

山茱萸水提物洗脱条件:流速:0.3 mL·min⁻¹, 0~9.0 min, 90% A→80% A, 9.0~17.0 min, 80% A→25% A, 17.0~20.0 min, 25% A→90% A。

2.3 质谱条件

LC-MS 系统使用 ESI 离子源,在正离子模式与负离子模式下分别采集数据。数据采集范围 *m/z* 100~1 000。离子源参数 ESI:毛细管电压:2 600 V,样品锥电压 30 V,脱溶剂室温度 250℃,离子源温度 120℃雾化气(N₂)体积流量 50 L·h⁻¹,脱溶剂气(N₂)体积流量 400 L·h⁻¹。

Lock Mass 参照溶液为:亮氨酸脑啡肽, [M+H]⁺ 556.277 1, [M-H]⁻ 554.261 5。

3 结果

本试验以不同比例甲酸甲醇以及甲酸水溶液作为流动相进行选择,结果发现,以纯甲醇作为有机相时,得到的色谱峰形不是很好,在加入 0.2% 的甲酸后峰形有很大改善,故选择 0.2% 的甲酸甲醇和 0.2% 的甲酸水溶液作为流动相;色谱柱方面,在 BEH C₁₈ 柱和 HSS T3 C₁₈ 柱之间进行选择,结果发现两者的分离效果都很好,但 BEH C₁₈ 柱基线漂移比较严重。因此选择 HSS T3 C₁₈ 柱对山茱萸的提取物中多种化学成分进行分离。试验中发现,山茱萸水提取液的色谱图与甲醇提取液的色谱图有很大差异,说明山茱萸水提物和醇提物差异很大,因此本试验对山茱萸的水溶性成分和醇溶性成分做了对比分析,结果见图 1。

山茱萸中主要化学成分环烯醚萜苷类和有机酸类化合物极性相对较大,因此采用 ESI 离子源;且成分分子中多含酚羟基,易形成稳定的氧负离子,故用负离子模式检测所得总离子流图(TIC)有较好的信噪比。对于水溶性成分,正、负离子模式的 TIC 图与 230 nm 下紫外色谱图基本吻合;醇溶性成分的则与其 210 nm 下的紫外色谱图基本吻合,但 TIC 图的基线噪声较大。随后又对紫外图中出现的色谱峰分别进行正负离子的二级质谱的研究。

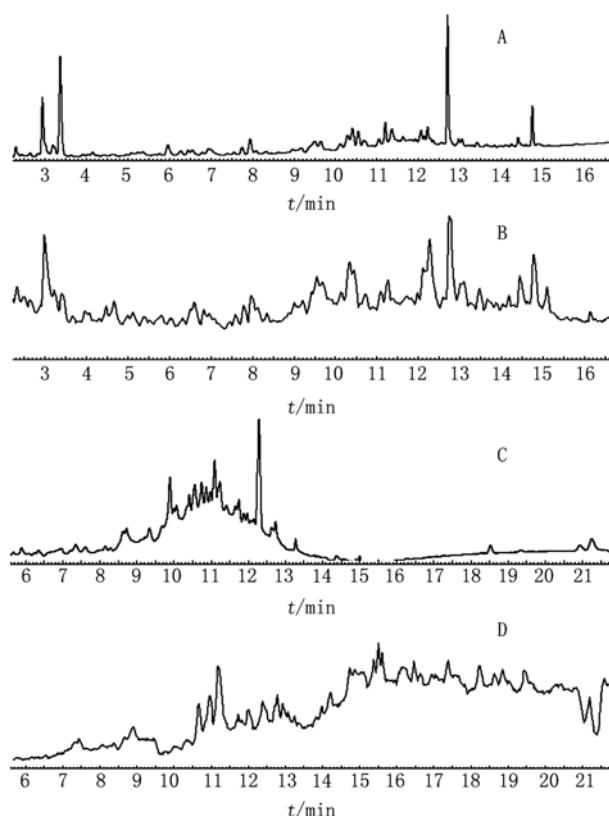


图 1 液相色谱图和质谱总离子流图
A-山茱萸水提液液相色谱图; B-山茱萸水提液总离子流图(ESI⁺); C-山茱萸醇提液液相色谱图; D-山茱萸醇提液总离子流图(ESI⁺);
Fig 1 Liquid chromatogram and mass spectrometric total ion chromatogram (TIC)
A-liquid chromatogram of extract of *Cornus officinalis* extracted by water; B-TIC of extract of *Cornus officinalis* extracted by water; C-liquid chromatogram of extract of *Cornus officinalis* extracted by methanol; D-TIC of extract of *Cornus officinalis* extracted by methanol

根据正、负离子模式的一级质谱的分子离子峰得到化合物的准确相对分子质量, 计算出其元素组成, 结果见表 1 和表 2。再由正、负离子的二级质谱中碎片信息, 结合文献[3-4], 对山茱萸用 UPLC 分离出的 10 个主要峰进行分析, 推断出其可能的结构, 结果见表 3 和表 4。

表 1 山茱萸中水溶性成分的准确相对分子质量
Tab 1 The accurate MW (molecular weight) of water-soluble constituents of *Cornus officinalis*

成分	<i>t_R</i> /min	测定值(<i>m/z</i>)	分子式	理论值(<i>m/z</i>)
1	2.99	169.013 7	C ₇ H ₆ O ₅	169.013 7
2	9.55	405.135 8	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	405.139 7
3	12.27	389.140 4	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	389.144 7
4	12.73	541.152 2	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₄	541.155 7
5	10.92	359.135 7	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	359.134 2

注: 离子模式: [M-H]⁻
Note: negative ion mode

表 2 山茱萸中醇溶性成分的准确相对分子质量

Tab 2 The accurate MW of alcohol-soluble constituents of *Cornus officinalis*

成分	<i>t_R</i> /min	测定值(<i>m/z</i>)	分子式	理论值(<i>m/z</i>)
6	8.85	389.146 9	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	398.144 7
7	11.97	779.271 0	C ₃₄ H ₅₀ O ₂₀	779.267 4
8	13.27	303.051 6	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	303.050 5
9	20.94	457.365 1	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	457.368 2
10	21.26	457.372 1	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	457.368 2

注: 离子模式: [M+H]⁺
Note: positive ion mode

4 讨论

4.1 分子式的确定

Q-TOF-MS 是高分辨串联质谱, 一级质谱是四极杆, 主要起选择离子的作用, 二级质谱为飞行时间质谱, 是该仪器的主要质量分析器, 可以测得经 UPLC 快速分离之后得化合物准确相对分子质量。正、负离子流图上均有和紫外色谱图对应的尖锐的峰出现, 由一级质谱的分子离子峰得到的精确相对分子质量算出其元素组成, 得到化合物的分子式。

4.2 化合物的确定

利用 Q-TOF-MS 确定精确相对分子质量以及可能分子式与结构式之后, 为进一步验证这些色谱峰对应化合物的结构, 在相同条件下做了质谱的源内碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)实验, Q-TOF-MS 相对其他质谱的优势: 在一级四极杆质谱和二级飞行时间质谱之间有一碰撞活化室, 待测物鉴定时可通过 MS/MS 状态下, 一级质谱选取单一离子送入碰撞活化室, 与惰性气体(氦气)发生 CID 后, 到达飞行时间质谱的加速器中, 在排斥极的作用下, 进行质量分离, 从而实现母离子和碎片离子的精确相对分子质量测定^[7]。

根据碎片的精确相对分子质量和参考文献[3, 4, 8]的信息, 可得到 1~10 号峰对应化合物的结构信息。质谱结果分析表明在负离子模式下, 几种环烯醚萜苷类化合物如莫罗忍冬苷、马钱素、当药苷等的质谱行为存在共性, 产生的准分子离子峰多为[M+45]⁻, 这一点在确定未知化合物的种类和相对分子质量时有重要意义中。[M+45]⁻离子初步判定为分子离子峰的甲酸根离子加合物; CID 谱中多有较强的[M-H-162]⁻, 表明结构中都含有位于端基的六碳糖; 部分有二聚体甚至三聚体离子峰。结合这些裂解规律并与对照品比较, 最终

推定化合物结构,可以得到以下结果,分子结构式见图 2。

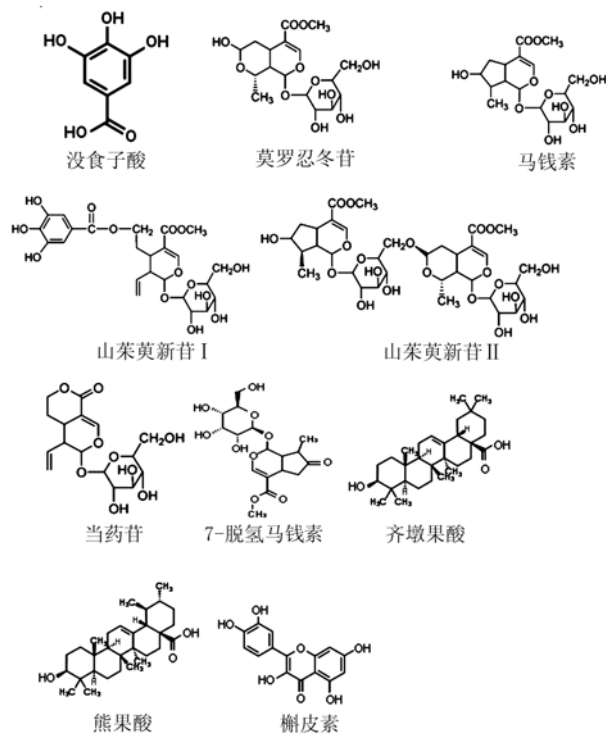


图 2 山茱萸中检出化合物结构式
Fig 2 Chemical structures identified of *Cornus officinalis*

1 号峰的结构分析: Q-TOF-MS 给出准分子离子峰 m/z 169.0137 $[M-H]^-$, 125.028 2 为失去 1 个羧基的没食子酸碎片的离子峰 $[(M-H)-44]^-$, 结合文献推断为没食子酸(gallic acid)^[3]。

2, 3, 4, 5, 6, 7 号峰的结构分析: 由表 1、

表 3 山茱萸中水溶性成分的 UPLC-ESI-MS 数据和鉴别结果

Tab 3 UPLC-ESI-MS identification results of water-soluble constituents of *Cornus officinalis*

成分	正离子模式		负离子模式		化合物
	$[M+H]^+$	加合物或二级碎片	$[M-H]^-$	加合物或二级碎片	
1	—	—	169.013 7	271.066 3, 125.028 2	没食子酸
2	—	—	405.135 8	567.194 7, 243.093 1, 179.054 0, 161.040 5	莫罗忍冬苷
3	391.190 0	408.214 6, 229.102 9	389.140 4	825.322 8, 435.145 2, 227.095 5	马钱素
4	543.399 5	560.212 8, 651.114 5, 385.139 5, 211.107 3	541.152 2	379.132 4, 309.073 5, 169.013 7	山茱萸新苷 I
5	359.144 3	717.272 7, 197.084 0	357.111 2	551.192 6, 240.878 2	当药苷

本试验分析、鉴别的 5 种山茱萸水溶性成分和 5 种醇溶性成分主要是有机酸或环烯醚萜类化合物。山茱萸中的环烯醚萜类成分的质谱行为有很显著的特点: 都有显著的 $[M+45]^-$ -峰; CID 谱中都有较强的 $[M-H-162]^-$ (或 $[M+H-162]^+$)-

表 2 可知, 这 7 个峰的精确相对分子质量的测定值与所对应 7 种物质相对分子质量的理论值基本一致, 且都存在失去一个葡萄糖基的碎片 $[(M-H)-162]^-$ 或 $[(M+H)-162]^+$, 多数峰存在分子离子峰的甲酸根离子加合物 $[(M-H)+46]^-$, 一些出现二聚体, 如 5 号峰出现离子峰 m/z 717.272 7 $[2M-H]^-$; 3 号峰出现 m/z 825.322 8 $[2M-H+46]^-$ 。根据此三点, 综合文献[4]内容, 以及 3 号峰的出峰保留时间、光谱行为及质谱行为与马钱素标准品的是一致的, 推测 2, 3, 4, 5, 6, 7 号峰分别为: 莫罗忍冬苷(morroniside)、马钱素(loganin)、山茱萸新苷 I (cornuside I)、当药苷(sweroside)、7-脱氢马钱素(7-dehydrologanin)、山茱萸新苷 II (cornuside II)。

8 号峰的结构分析: Q-TOF-MS 给出准分子离子峰 m/z 301.005 2 $[M-H]^-$ 、303.051 6 $[M+H]^+$ 。与槲皮素精确分子理论值基本一致, 综合文献[8]内容, 推断 8 号峰为槲皮素(querccetin)。

9, 10 号峰的结构分析: UPLC-MS 给出的 TIC 图中此二峰为倒峰(正负离子模式下皆如此), 推测可能是这两种成分不适合于 ESI 离子源, 但质谱上还是可以得到两成分的准分子离子峰, 如表 4 所示, 并且 10, 11 号峰的出峰保留时间、光谱特征及质谱特征分别与齐墩果酸、熊果酸标准品的一致, 据此推断 9, 10 号峰分别为齐墩果酸(oleanolic acid)、熊果酸(ursolic acid)。

峰, 大部分有二聚体甚至三聚体离子峰及其相应加合甲酸峰, 一部分出现 $[M-H+162]^-$ 或 $[M+H+162]^+$ 。这一点在确定该类化合物以及确定该类未知化合物的相对分子质量时都具有重要意义。究其原因, 环烯醚萜苷分子都有端位六碳糖基。

并且其分子中 3, 4 位的双键由于邻位氧原子的影响, 性质比较活泼, 容易进一步发生加成、氧化、聚合反应。齐墩果酸、熊果酸也有显著的

[M+45]⁻-峰, 也应该是加合甲酸峰; 二者是同分异构体, 齐墩果酸有显著的[M-17]⁻, 推测是失去 1 个羟基的碎片。

表 4 山茱萸中醇溶性成分的 UPLC-ESI-MS 数据和鉴别结果

Tab 4 UPLC-ESI-MS identification results of alcohol-soluble constituents of *Cornus officinalis*

成分	正离子模式		负离子模式		化合物
	[M+H] ⁺	加合物或二级碎片	[M-H] ⁻	加合物或二级碎片	
6	389.146 9	227.094 2, 551.213 6, 586.244 6	—	—	7-脱氢马钱素
7	779.271 0	—	777.299 5	823.299 5, 559.155 3, 509.206 1, 474.069 5	山茱萸新苷 II
8	303.051 6	—	301.005 2	—	槲皮素
9	457.365 1	—	455.340 1	501.371 4, 439.372 1	齐墩果酸
10	457.372 1	—	455.342 3	501.300 0	熊果酸

本试验鉴于山茱萸的水溶性成分和醇溶性成分差异比较大的特点: 如齐墩果酸、熊果酸等极性较小的成分用水无法提取出来, 在醇里面有较好的溶解性, 利用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析速度快, 可提供丰富的质谱信息的优点, 测得山茱萸水溶性成分、醇溶性成分的质谱图, 探讨该类化合物分子在电喷雾正、负离子检测模式下的裂解特点, 以确定该类化合物的相对分子质量、糖连接情况, 对该类化合物进行定性分析。采用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析山茱萸环烯醚萜苷类化合物时, 通过色谱保留时间色谱、质谱特征两方面信息能够提供更加准确可靠的定性结果。

REFERENCES

[1] LI Z J, QIAN L F, LI Z M, et al. Value of medicine and nutrition and utilization of *Cornus officinalis* [J]. J Zhejiang Forestry Coll(浙江林学院学报), 1992, 9(3): 364-370.
[2] YANG J F, LU F P, GAO W Y, et al. Research and development of chemical compositions and pharmacology of *Cornus officinalis* [J]. Prog Mod Biomed(现代生物医学进展),

2006, 6(12): 127-130.
[3] ZHAO X F, SUN Y Q. Analysis of chemical constituents of *Cornus officinalis* by HPLC-ESI-MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2008, 39(2): 180-182.
[4] ZHOU L L, LIU Z Q, WU G G, et al. Analysis on Iridoid Glycosides in crude and processed extracts from *Cornus officinalis* by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. Acta Chim Sin(化学学报), 2008, 66(24): 2712-2716.
[5] HUANG H Q, FENG Y F, RUI W, et al. Analysis of flavonoids in *Rhodoendron mariae* by UPLC/Q-TOF-MS [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34(7): 875-878.
[6] CHI Y M, ZHU H Y, JU L, et al. Analysis of flavonols compounds in Flos Abelmoschus Manihot by high performance liquid chromatography-electrospray ionization/quadrupole-time of flight-mass/mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2009, 27(2): 227-231.
[7] VAN BOCXLAER J F, VANDE CASTEELE S R, VAN POUCKE C J, et al. Confirmation of the identity of residues using time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2005, 529(1/2): 65-73.
[8] ZHANG Y E, LIU E H, LI H J, et al. Chemical constituents from the fruit of *Cornus officinalis* [J]. Chin J Nat Med(中国天然药物), 2009, 7(5): 365-367.