

## 葛根中黄酮类化学成分的 UHPLC-Q-TOFMS 分析

周永刚<sup>1</sup>, 吴思<sup>2</sup>, 毛飞<sup>3</sup>, 吴婷婷<sup>4</sup>, 吴海棠<sup>2</sup>, 柴逸峰<sup>2</sup> (1. 解放军 81 医院, 江苏 南京 210000; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 3. 北京儿童医院药剂科, 北京 100056; 4. 解放军 263 医院药械科, 北京 101149)

**[摘要]** 目的 通过超高效液相-单重四级杆-飞行时间质谱(UHPLC-Q-TOFMS) 联用技术 对中药葛根的主要化学成分进行有效的鉴定。方法 色谱分离采用 ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 流动相组成分别为 0.1% 甲酸水溶液和乙腈 梯度洗脱 流速为 0.4 ml/min; 质谱定性采用飞行时间质谱 正离子模式扫描。结果 在优化的液质联用条件下 通过单重四级杆-飞行时间质谱鉴定出葛根中 18 个成分。结论 通过 UHPLC-Q-TOFMS 联用技术, 为鉴定葛根中的化学成分建立起了一种快速、高效的分析方法。

**[关键词]** 葛根; 超高效液相-单重四级杆-飞行时间质谱; 化学成分

**[中图分类号]** R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)02-0116-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.02.009

## Analysis on flavonoid constituents of *Pueraria lobata* by UHPLC-Q-TOFMS

ZHOU Yong-gang<sup>1</sup>, WU Si<sup>2</sup>, MAO Fei<sup>3</sup>, WU Ting-ting<sup>4</sup>, WU Hai-tang<sup>2</sup>, CHAI Yi-feng<sup>2</sup> (1. The 81st Hospital of PLA, Nanjing 210002, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433 China; 3. Department of Pharmacy, Beijing Children's Hospital, Beijing 100056, China; 4. Department of Drug and Equipment Section, The 263rd Hospital of PLA, Beijing 101149, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze chemical constituents of *Pueraria lobata* by ultrahigh pressure liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UHPLC-Q-TOFMS). **Methods** A ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) column was used to separate. The mobile phase consisted of water containing 0.1% methane acid and acetonitrile was used as gradient elute. The flow rate was 0.4 ml/min. TOFMS was applied for qualitative analysis under positive ion mode. **Results** Under optimized condition, 19 major constituents in *Gardenia jasminoides Ellis* were identified by quadrupole-time of flight mass spectrometry and structure-relevant fragment ions. **Conclusion** A simple and reliable method using UHPLC-Q-TOFMS was established to identify the chemical constituents of *Pueraria lobata*.

**[Key words]** *Pueraria lobata*; UHPLC-Q-TOFMS; chemical constituents

葛根始载于《神农本草经》,为常用中药之一。葛根又名甜葛、粉葛等,是豆科葛属植物野葛 *pueraria lobata*(willd) ohwi 的根,在我国主产于河南、湖南、浙江、四川等地<sup>[1]</sup>。其性凉,味甘、辛,归脾胃经,具有升阳解肌、透疹止泻、除烦止渴之功效,为中医临床中治疗表证发热、头疼项强、斑疹不透、脾虚泄泻及消渴的要药<sup>[2]</sup>。

中外学者分别对葛属植物进行了大量的研究,得到了黄酮类、三萜类、香豆素类等多种类型化合物<sup>[3]</sup>。现代药理实验表明,葛根中的黄酮类成分有明显的扩张冠状动脉、减慢心率、降低心肌耗氧量、改善心脑血管循环等作用,对突发性耳聋、中老年骨质疏松症和妇女更年期综合征等也有特殊功效<sup>[5]</sup>。

目前对葛根中主要化学成分的分离提取主要采用传统的化学方法<sup>[5]</sup>。部分研究采用高效液相色谱法对葛根的化学成分进行分析<sup>[6,7]</sup>,这些分析方法耗时较长,且仅针对其中某几种或某一类物质进行分析,而缺乏从整体上对葛根化学结构的阐述。

本研究采用 UHPLC-Q-TOFMS 技术对葛根中多成分进行鉴别,该法操作简便、快速、准确,为葛根的药效物质基础研究及质量控制提供参考。

### 1 仪器和试剂

安捷伦 1290 型液相色谱仪,包括在线脱气机,二元泵,高性能自动进样器;安捷伦 G6220A 飞行时间质谱仪,配有标准电喷雾离子源(ESI),MassHunter 色谱工作站和 Qualitative Analysis 质谱分析软件。

HPLC 级乙腈(Merck, Germany); HPLC 级甲酸(Tedia, USA); 无水乙醇为分析醇(中国医药集团上海化学试剂公司);水为娃哈哈纯净水。

**[作者简介]** 周永刚(1964-) 男,主任药师。Tel: (025) 84544832, E-mail: zyg1124@yahoo. cn.

**[通讯作者]** 柴逸峰。E-mail: yfchai@smmu. edu. cn.

## 2 试验

### 2.1 色谱及质谱条件

**2.1.1 色谱条件** 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 流动相: A 0.1% 甲酸水溶液, B 乙腈; 梯度洗脱: 0 ~ 1 min (5% B), 1 ~ 6 min (5% B ~ 13% B), 6 ~ 10 min (13% B ~ 25% B), 10 ~ 13 min (25% B ~ 55% B), 13 ~ 15 min (55% B ~ 80% B), 15 ~ 16 min (80% B ~ 95% B); 柱温 40 °C, 进样体积 4 μl, 流速 0.4 ml/min。

**2.1.2 质谱条件** 电喷雾正离子模式; 质量扫描范围  $m/z$  100 ~ 1100; 毛细管电压 4 000 V; 雾化气压力 50 psi; 干燥气流速 11 L/min; 干燥气温度 350 °C; 碎片电压 120 V。选择参比校准液做实时质量数校正。实验数据采用 Qualitative Analysis 软件处理。测定样品之前, 使用调谐液校准质量轴。

**2.2 供试品溶液制备** 取葛根药材适量, 粉碎后过 40 目筛, 称取葛根药材 0.5 g, 置 100 ml 量瓶中, 加 70% 乙醇 50 ml, 称重, 超声 30 min (超声功率为 500 W, 频率 40 kHz), 冷却后补足失重。取 5 ml 醇提液, 10 800 r/min 离心 5 min, 取上清, 再用微孔滤膜过滤 (0.45 μm) 过滤, 作为供试品溶液。在“2.1”项下色谱条件下进样分析。

**2.3 葛根化学成分数据库的建立** 根据葛根药材的化学成分研究报道, 收集了葛根药材化学成分 63 个, 包括黄酮类、三萜类和香豆素类化学成分, 并通过安捷伦“formula-database-generator”软件建立葛根各组方药材中已知化学成分数据库。

## 3 结果与讨论

**3.1 提取溶剂的选择** 分别采用水和 70% 乙醇作为提取溶剂制备供试品, 经测试比较, 以 70% 乙醇作提取溶剂可得到较多的峰, 并且以水作提取溶剂较难滤过, 故最终采用 70% 乙醇作为提取溶剂制备供试液, 对葛根中的主要黄酮类成分进行了提取。

**3.2 实验条件优化** 首先考察了甲醇-水和乙腈-水两种体系, 结果显示在甲醇-水体系下葛根提取物中的主成分葛根素与其他成分难以完全分离; 而乙腈-水体系能有效分离葛根中的异黄酮成分, 故选择乙腈作为有机相。在流动相体系中加入甲酸可增加质谱响应, 实验考察了甲酸的添加量对分离的影响, 结果发现甲酸浓度在 0.1% 时大多数成分有较好的质谱响应。因此, 最终采用 0.1% 甲酸水溶液作为水相。

质谱检测分别比较了正、负离子两种扫描模式,

结果发现正离子模式下峰容量更大、质谱响应更强, 故实验最终选择在正离子模式下进行。

**3.3 葛根中主要化学成分的鉴别** 在优化的色谱质谱条件下, 葛根提取液的 UHPLC-Q-TOFMS 典型总离子流图见图 1。笔者对其中主要的 18 个峰进行了鉴别, 其中包括 1 对同分异构体。化合物按照以下方法鉴别: 首先, 根据 TOFMS 上所得到的精确化合物分子量信息, 通过 MassHunter 软件在 5 ppm 的质量偏差范围内计算其可能的元素组成, 并将其与所建的数据库相匹配, 对葛根化学成分进行初步鉴别, 结果见表 1。随后对其中一对同分异构体进行鉴别, 选择合适的分子离子峰或基峰进行碰撞诱导解离 (CID), 通过二级质谱的裂解方式, 获得化合物结构相关的碎片离子, 根据离子的裂解情况并结合数据库中各化合物的化学结构, 区分各同分异构体, 结果见表 2。

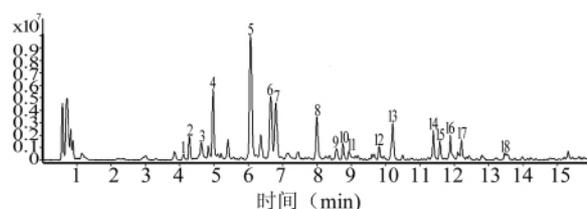


图 1 葛根提取物 UHPLC-Q-TOFMS 总离子

以分子离子峰  $m/z$  579 为例, 来说明鉴别过程。首先通过该峰的精确分子量 579.171 1, 可推断其元素组成为  $C_{27}H_{30}O_{14}$ , 通过与数据库匹配, 初步可判定其为 puerarin-4'-O-β-D-glucopyranoside; 再以  $m/z$  579.171 1 作为母离子, 对其进行二级质谱分析, 碰撞能量为 15 eV。所得二级质谱图中有明显的 459.126 5 [ $M + H - C_4H_8O_4$ ]<sup>-</sup>, 297.076 3 [ $M + H - C_4H_8O_4 - glc$ ]<sup>-</sup> 等碎片离子信息, 是其母分子离子依次失去  $C_4H_8O_4$  (120 Da) 分子, 然后再失去葡萄糖分子 (162 Da) 产生的。结合保留时间等信息, 最终将该峰鉴定为葛根素-4'-O-D-葡萄糖苷 (puerarin-4'-O-β-D-glucopyranoside)。采用类似的方法, 对其他活性成分也进行相应的鉴别。

以分子离子峰 417 为例, 来说明同分异构体的鉴别过程。通过与数据库匹配, 峰 5 和峰 8 的元素组成均为  $C_{21}H_{20}O_9$ , 为一对同分异构体, 葛根素 (puerarin) 和大豆苷 (daidzin)。为进一步区分这对同分异构体, 对其母离子进行二级质谱分析, 碰撞能量为 15 eV, 得到在此能量下的二级质谱图。葛根素结构中含有碳苷键, 而大豆苷结构中含有的是氧苷键。在质谱图中, 碳苷和氧苷比较容易区分。在质谱图

表 1 葛根化学成分鉴别结果

序号	时间 (min)	鉴别结果	分子式	[M + H] <sup>+</sup>			[M + Na] <sup>+</sup>	MS/MS 碎片离子信息
				测量值	理论值	偏差 (ppm)		
1	4.096	tectorigenin-7-O-β-D-xylosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	595.166 0	595.166 3	-0.50	617.147 9	301.27 [M + H-xy1-glc] <sup>+</sup> 285.12 [M + H-xy1-glc-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
2	4.286	puerarin-4-O-β-D-glucopyranoside	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	579.171 1	579.171 4	-0.52	601.151 9	459.13 [M + H-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup> 297.12 [M + H-C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> -glc] <sup>+</sup>
3	4.624	kakkalide	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	609.181 2	609.181 9	-1.15	631.163 2	315.21 [M + H-xy1-glc] <sup>+</sup> 300.34 [M + H-xy1-glc-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 285.08 [M + H-xy1-glc-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
4	4.976	3'-hydroxypuerarin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	433.113 2	433.113 5	-0.69	455.095 5	415.10 [M + H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 397.10 [M + H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
5	6.063	puerarin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	417.118 2	417.118 6	-0.96	439.100 1	399.10 [M-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 381.09 [M-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 363.08 [M-3H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 351.08 [M-2H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 321.07 [M-2H <sub>2</sub> O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> 297.07 [M-H <sub>2</sub> O-C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 279.06 [M-2H <sub>2</sub> O-C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
6	6.658	3'-methoxydaidzin	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	447.128 9	447.129 1	-0.45	—	285.12 [M + H-glc] <sup>+</sup> 270.08 [M + H-glc-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
7	6.809	puerarinxyloside	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	549.160 5	549.160 8	-0.55	571.142 4	417.11 [M + H-C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
8	7.980	daidzin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	417.118 7	417.118 6	0.24	439.100 5	255.06 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>
9	8.529	3'-methoxydaidzein	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	285.076 8	285.076 3	1.75	307.058 7	270.05 [M + H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
10	8.762	tectoridin	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	463.124 2	463.124 0	0.43	485.106 0	301.16 [M + H-glc] <sup>+</sup> 286.12 [M + H-glc-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
11	8.937	tectorigenin	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	301.070 9	301.071 2	-0.99	—	286.14 [M + H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
12	9.808	3'-hydroxydaidzein	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	271.060 1	271.060 6	-1.84	293.042 1	271.06 [M + H] <sup>+</sup>
13	10.217	6''-O-malonyldaizidin	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	503.119 3	503.119 0	0.60	525.101 2	255.13 [M + H-C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> ] <sup>+</sup>
14	11.389	pueroside D	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	475.159 9	475.160 4	-1.05	497.141 8	313.10 [M + H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup> 107.05 [M + H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
15	11.583	ononin	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	431.134 6	431.134 2	0.93	453.116 7	269.08 [M + H-glc] <sup>+</sup> 254.12 [M + H-glc-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
16	11.881	daidzein	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	255.065 6	255.065 7	-0.39	277.047 3	255.06 [M + H] <sup>+</sup>
17	12.212	irisolidone	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	315.086 6	315.086 9	-0.95	337.068 5	300.07 [M + H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 285.06 [M + H-2CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
18	13.464	formononetin	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	269.081 0	269.081 4	-1.48	291.062 8	254.05 [M + H-CH <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>

表 2 葛根中同分异构体葛根素和大豆苷的鉴别结果

序号	时间 (min)	鉴别结果	分子式	[M + H] <sup>+</sup> m/z	结构相关的碎片离子信息
5	6.063	puerarin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	417.118 2	399.1073 [M + H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 381.0968 [M + H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 363.0860 [M + H-3H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 351.0860 [M + H-2H <sub>2</sub> O-CH <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> 321.0754 [M + H-2H <sub>2</sub> O-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> 297.0757 [M + H-H <sub>2</sub> O-C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> 279.0647 [M + H-2H <sub>2</sub> O-C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
8	7.980	daidzin	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	417.118 7	255.065 6 [M + H-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> ] <sup>+</sup>

中峰 5 的质谱图上有明显的 255.065 6 [M + H-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup> 碎片离子信息,推断出裂解途径见图 2(a) 所示,即大豆苷的糖苷键断裂,脱掉 1 个葡萄糖基,得到基峰碎片离子 m/z 255 [M + H-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>,与大豆苷元的准分子离子峰 m/z 255 [M + H]<sup>+</sup> 一致,而其准分子离子峰 m/z 417 [M + H]<sup>+</sup> 则相对较弱。峰 8 的质谱图上有明显的 399.107 3 [M

+ H-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 381.096 8 [M + H-2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 363.086 0 [M + H-3H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 351.086 0 [M + H-2H<sub>2</sub>O-CH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, 321.075 4 [M + H-2H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 297.075 7 [M + H-H<sub>2</sub>O-C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, 279.064 7 [M + H-2H<sub>2</sub>O-C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup> 等碎片离子信息,推断出裂解途径见图 2(b) 所示。结合以上信息,能够鉴定峰 5 为葛根素,峰 8 为大豆苷。

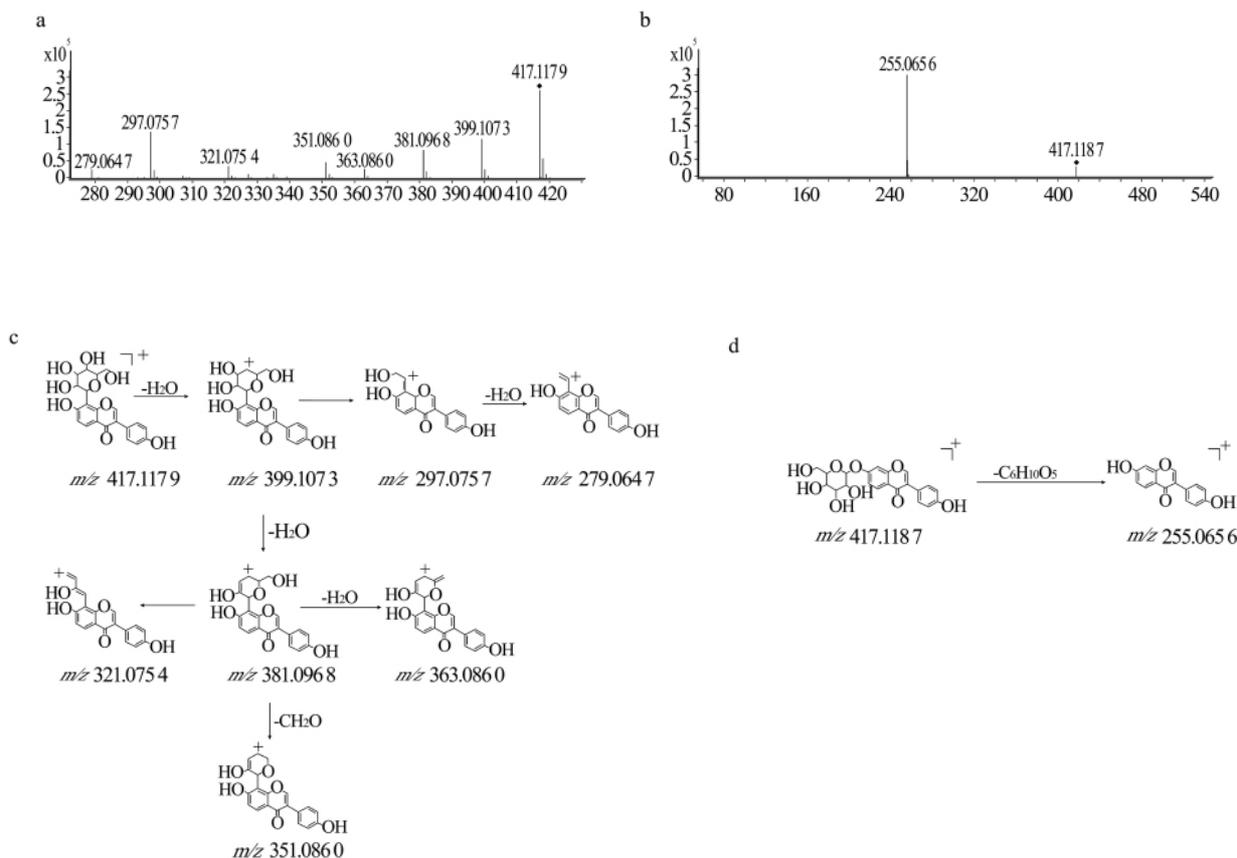


图2 同分异构体葛根素和大豆苷的鉴别过程

a-根素二级质谱图; b-大豆苷二级质谱图; c-葛根素裂解途径; d-大豆苷裂解途径

#### 4 结论

本实验采用UHPLC-Q-TOFMS技术,结合数据库匹配和二级质谱分析,实现了对葛根中主要成分的快速定性分析,共鉴定出18个葛根中的主要黄酮类成分。该方法快速、灵敏、准确度高,可作为葛根质量控制的方法之一,同时为葛根的药理学和临床药学研究提供了化学物质基础信息。

#### 【参考文献】

- [1] 柳航,李占林,郭婕,等.葛根的化学成分[J].沈阳药科大学学报,2009,26:882.
- [2] Du G, Zhao HY, Zhang QW, et al. A rapid method for simultaneous determination of 14 phenolic compounds in Radix Puerariae using microwave-assisted extraction and ultra high performance

liquid chromatography coupled with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2010, 1217: 705.

- [3] 石立秋.葛根的化学成分及药理活性[J].中华临床医学研究杂志,2003,70:11678.
- [4] 董英,徐斌,林琳,等.葛根的化学成分研究[J].食品与机械,2005,21(6):85.
- [5] 杨东晖,陈浪,曾志,等.葛根化学成分的研究[J].华南师范大学学报,2002,94:94.
- [6] 田宏哲,王华,关亚风.液质联用分析葛根提取物及中药片剂中异黄酮类化合物[J].色谱,2005,23(5):477.
- [7] Lin CC, Wu CI, Shen SJ. Determination of 12 pueraria components by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2005, 28: 1785.

[收稿日期]2012-08-15

[修回日期]2012-10-29

欢迎 订 阅                      欢 迎 投 稿  
本刊网址: www.yxsjzz.cn; yxsj.smmu.edu.cn