

基于UHPLC-Q-Exactive-MS技术的猪牙皂化学成分分析

韩君 (北京康仁堂药业有限公司, 中药配方颗粒关键技术国家地方联合工程研究中心, 北京 101301)

摘要 [目的]定性分析猪牙皂的化学成分组成。[方法]采用UHPLC-Q-Exactive-MS技术,对比相关文献,通过Xcalibur软件分析鉴定猪牙皂中化学成分。[结果]鉴定了猪牙皂中17个化合物,包括3个酚类成分、7个黄酮类成分、7个皂苷类成分。[结论]该方法专属性好、结果可靠,为猪牙皂质量控制及药效物质基础提供参考。

关键词 猪牙皂;化学成分;UHPLC-Q-Exactive-MS;皂苷类

中图分类号 R284.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)24-0201-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.24.057



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Chemical Composition Analysis of Gleditsiae Fructus Abnormalis Based on UHPLC-Q-Exactive-MS Technology

HAN Jun (National and Local Joint Engineering Research Center for Key Technology of Chineses Medicinal Composition Granules, Beijing Temages Pharmaceutical Co., Ltd., Beijing 101301)

Abstract [Objective] Qualitatively analyzed the chemical compositions of gleditsiae fructus abnormalis. [Method] The chemical compositions of gleditsiae fructus abnormalis were analyzed and authenticated by using the UHPLC-Q-Exactive-MS technology and comparing relevant documents through the Xcalibur software. [Result] The 17 chemicals were authenticated in gleditsiae fructus abnormalis, including 3 phenolic compounds, 7 flavonoids and 7 saponins. [Conclusion] The good exclusiveness and reliable result of this method provided reference to the quality control and efficacious material basis of gleditsiae fructus abnormalis.

Key words Gleditsiae fructus abnormalis; Chemical composition; UHPLC-Q-Exactive-MS; Saponins

猪牙皂为豆科植物皂荚(*Gleditsia sinensis* Lam.)的干燥不育果实^[1],被《中华人民共和国药典》2020年版记载为常用中药之一,但未见控制其药材的指标性成分,文献中对其化学成分分析主要以总皂苷以及三萜皂苷的苷元齐墩果酸和刺囊酸为主^[2-5],全面化学成分分析鲜见报道。目前,对猪牙皂研究主要为三萜皂苷、黄酮和木脂素^[6-8]的提取分离与结构鉴定。该研究用UHPLC-Q-Exactive-MS技术对猪牙皂化学成分进行鉴定,以期为质量控制指标成分的选择和药效物质基础提供参考。

1 材料与与方法

1.1 仪器与材料 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪串联Ultimate 3000型超高效液相色谱系统(美国赛默飞世尔科技公司);BT25S型电子天平(Sartorius公司);KQ-300DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。甲醇(国药集团化学试剂有限公司,批号为20190910);色谱级乙腈(默克股份两合公司,批号为JB097430);猪牙皂对照药材(上海源叶生物有限公司,批号为Y19N10H103559)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件。ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.8 μm);柱温为30℃;流动相为乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~15 min,10%~40%A;15~25 min,40%~80%A;25~30 min,80%A;30~40 min,80%~10%A);流速为0.2 mL/min;进样量为1 μL。

1.2.2 质谱条件。采用电喷雾离子源(ESI),毛细管电压3 200 V,毛细管温度300℃,离子源温度350℃,质谱一级采集范围m/z 146~2 200,二级采集范围m/z 50~3 000,S-Lens

RF Level 50。

1.2.3 供试品溶液的制备。取猪牙皂对照药材约22.55 mg,置50 mL三角瓶中,加25%甲醇10 mL,超声处理30 min,滤过,即得。

2 结果与分析

2.1 UHPLC-Q-Exactive-MS分析 取“1.2.3”项下供试品溶液,按“1.2.1”和“1.2.2”色谱质谱条件进行分析,分别得到负离子模式下猪牙皂的总离子流见图1。

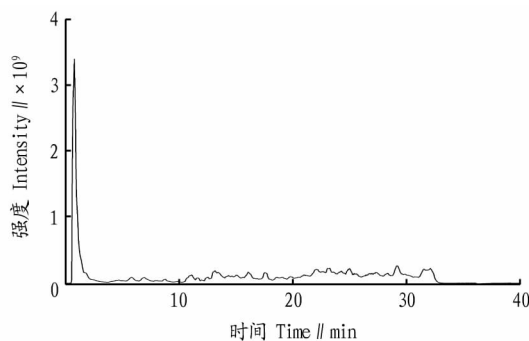


图1 负离子模式下的猪牙皂总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram of gleditsiae fructus abnormalis in negative ion mode

2.2 结构鉴定 理论值通过质量计算器获得,根据测定值与理论值二者偏差小于0.005%,氮律等原则,结合Xcalibur软件的相对分子质量数,质谱一级、二级碎片信息,相关参考文献,共鉴定出17种化合物,包括3个酚类成分、7个黄酮类成分、7个皂苷类成分。被鉴定的化学成分的分子式、二级碎片离子、结构类型等信息见表1。

2.3 化合物的质谱裂解特征分析

2.3.1 黄酮类成分的鉴定。该研究共分析鉴定了7个黄酮类化合物。以化合物5为例,ESI⁻模式下准分子离子为m/z

作者简介 韩君(1988—),男,辽宁开原人,硕士,从事计算药物分析及中药分析、天然活性成分研究与利用工作。

收稿日期 2020-08-10; **修回日期** 2020-08-28

609.185 1 [M-H]⁻, 经过碰撞脱去一分子鼠李糖形成碎片离子 m/z 463.966 0 [M-H-C₆H₁₀O₄]⁻, 再脱去一分子葡萄糖形成碎片离子 m/z 301.071 9 [M-H-C₆H₁₀O₅-C₆H₁₀O₄]⁻, 丢失

B环和C环并发生重排后形成碎片离子 m/z 151.002 7。根据文献[13]报道和裂解碎片特征判断, 该化合物可能为新橙皮苷, 该化合物的 MS/MS 图见图 2, 可能的裂解方式见图 3。

表 1 猪牙皂中的成分结构鉴定结果

Table 1 The authentication results of the constituent structure in gleditsiae fructus abnormalis

编号 No.	保留时间 RT min	提取离子 Extracted ions	测定值 Measured value	理论值 Theoretical value	误差 Error 10 ⁻⁶	分子式 Molecular formula	主要二级碎片离子 (MS/MS) Main secondary fragment ion (MS/MS)	鉴定结果 Identification result	类型 Type	文献 Literature
1	2.07	[M-H] ⁻	367.104 4	367.103 5	2.5	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	302.016 8, 281.846 3, 237.276 6, 193.050 0, 134.036 3, 117.033 5	3-O-阿魏酰奎尼酸	酚类	[9]
2	2.07	[M-H] ⁻	367.104 4	367.103 5	2.5	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	302.016 8, 281.846 3, 237.276 6, 209.968 9, 193.050 0, 173.044 8	3-咖啡酰奎尼酸甲酯	酚类	[10]
3	6.65	[M-H] ⁻	431.098 5	431.098 4	0.2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	425.613 5, 395.317 3, 342.066 5, 323.056 6, 311.056 4, 283.061 3	异牡荆素	黄酮苷	[11]
4	8.32	[M-H] ⁻	477.103 8	477.103 8	0.0	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	398.943 3, 315.042 9, 300.026 8, 285.040 5, 271.025 0, 243.029 8	柞柳素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	黄酮苷	[12]
5	8.48	[M-H] ⁻	609.185 1	609.182 5	4.3	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	433.966 0, 301.071 9, 276.764 1, 238.192 2, 151.002 7, 134.036 3	新橙皮苷	黄酮苷	[13]
6	8.60	[M-H] ⁻	607.166 6	607.166 8	-0.3	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	515.226 3, 343.118 4, 313.073 0, 299.056 4, 284.032 6, 255.030 0	金圣草素-7-O-新橙皮糖苷	黄酮苷	[14]
7	10.77	[M-H] ⁻	1 483.695 8	1 483.696 2	-0.3	C ₆₉ H ₁₁₂ O ₃₄	1 364.194 8, 1217.600 5, 1 004.094 7, 897.483 6, 879.473 8, 765.438 2	gleditsia saponins E'	皂苷	[15]
8	10.95	[M-H] ⁻	287.056 2	287.056 1	0.3	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	215.277 0, 169.012 7, 151.002 8, 135.044 1, 125.023 4, 107.012 7	黄颜木素	黄酮	[16]
9	11.11	[M-H] ⁻	417.155 0	417.155 5	-1.2	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	387.109 2, 281.081 8, 181.049 7, 166.026 2, 151.002 8, 137.023 1	表丁香脂素	酚类	[17]
10	11.41	[M-H] ⁻	285.040 6	285.040 5	0.4	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	267.030 0, 241.050 3, 217.050 1, 199.039 2, 175.039 2, 151.002 7	木犀草素	黄酮	[18]
11	11.68	[M-H] ⁻	1 631.731 0	1 631.733 4	-1.5	C ₇₄ H ₁₂₀ O ₃₉	1 499.685 2, 1276.728 0, 897.485 3, 631.210 1, 499.167 4, 337.114 4	皂荚皂苷 J	皂苷	[19]
12	13.10	[M-H] ⁻	1 599.745 1	1 599.743 6	0.9	C ₇₄ H ₁₂₀ O ₃₇	1 467.701 2, 1 333.640 5	皂荚皂苷 H	皂苷	[15]
13	13.48	[M-H] ⁻	1 615.739 3	1 615.738 5	0.5	C ₇₄ H ₁₂₀ O ₃₈	1 483.675 7, 1320.395 1, 881.484 7, 749.449 9, 631.207 5, 455.353 1	gleditsia saponins C'	皂苷	[14]
14	14.35	[M-H] ⁻	1 453.687 4	1 453.685 7	1.2	C ₆₈ H ₁₁₀ O ₃₃	1 321.639 9	皂荚皂苷 I	皂苷	[14]
15	16.20	[M-H] ⁻	1 635.778 7	1 635.780 0	-0.8	C ₇₈ H ₁₂₄ O ₃₆	1 617.770 3, 1 453.686 2, 1 435.673 5, 749.449 5, 617.409 0, 455.353 8	皂荚皂苷 B	皂苷	[5]
16	17.56	[M-H] ⁻	1 619.787 8	1 619.785 0	1.7	C ₇₈ H ₁₂₄ O ₃₅	1 435.677 1, 1 333.657 1, 881.490 6, 749.448 2, 617.406 1, 455.353 5	皂荚皂苷 A	皂苷	[5]
17	18.72	[M-H] ⁻	177.019 1	177.019 3	-1.1	C ₉ H ₆ O ₄	149.059 4, 135.044 2, 121.028 0, 114.739 8, 106.040 2, 96.968 1	5,7-二羟基色原酮	黄酮	[20]

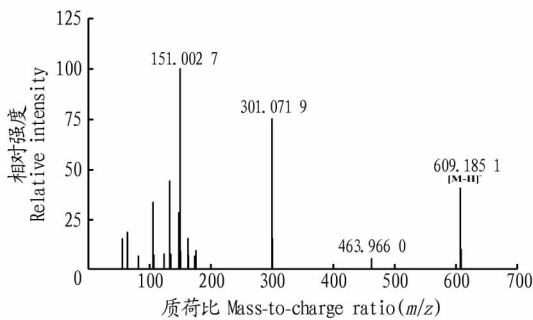


图 2 新橙皮苷的 MS/MS 图

Fig.2 The MS/MS spectrometry of neohesperidin

2.3.2 皂苷类成分的鉴定。皂苷类化合物是猪牙皂中的特征性成分, 该研究共分析鉴别了 7 个皂苷类化合物。以化合物 16 为例, ESI⁻ 模式下准分子离子为 m/z 1 635.778 7 [M-H]⁻, 脱去一分子 H₂O 形成碎片离子 m/z 1 617.770 3 [M-H-H₂O]⁻, 再脱去 C₁₀H₁₆O₃ 形成碎片离子 m/z 1 453.686 2 [M-H-C₁₀H₁₆O₃-H₂O]⁻, 再脱去一分子 H₂O 形成碎片 m/z 1 435.673 5 [M-H-2H₂O-C₁₀H₁₆O₃]⁻, 再脱去 C₂₂H₃₅O₁₆ 形成碎片离子 m/z 881.490 6 [M-H-C₂₂H₃₅O₁₆-2H₂O-C₁₀H₁₆O₃]⁻, 再脱去 C₁₆H₂₇O₁₃ 形成碎片离子 m/z 455.353 8 [M-H-C₁₆H₂₇O₁₃-C₂₂H₃₅O₁₆-2H₂O-C₁₀H₁₆O₃]⁻。

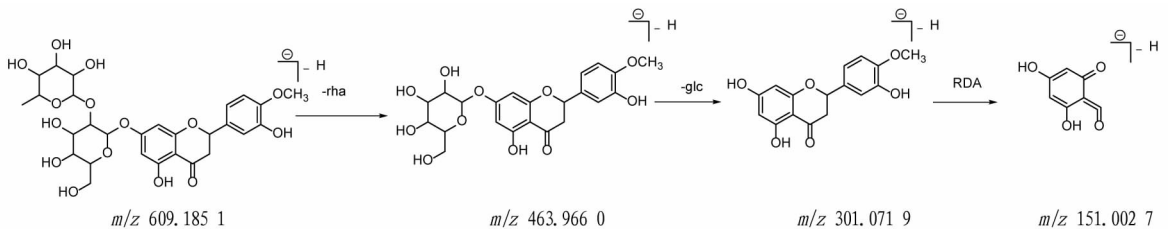


图 3 新橙皮苷可能的裂解途径

Fig.3 The possible fragmentation pathways of neohesperidin

根据文献[5]报道和裂解碎片特征,判断该化合物可能为皂荚苷 B,该化合物的 MS/MS 图见图 4,可能的裂解方式见图 5。

3 结论

采用 UHPLC-Q-Exactive-MS 技术,利用质谱的高分辨、高灵敏度等特点,对猪牙皂中化学成分进行研究,鉴定出 17 个化合物,明确了猪牙皂中黄酮类以及皂苷类成分的质谱裂解规律,为其药效物质基础及质量控制指标成分的选择提供了数据支撑。

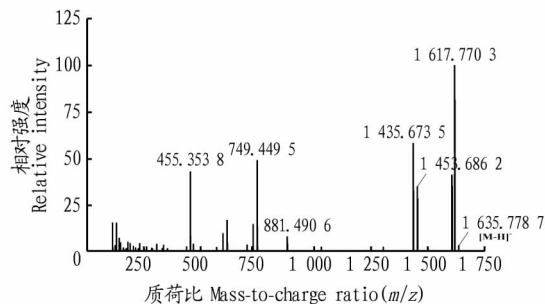


图 4 皂荚苷 B 的 MS/MS 图

Fig.4 The MS/MS spectrometry of gleditsiasaponin B

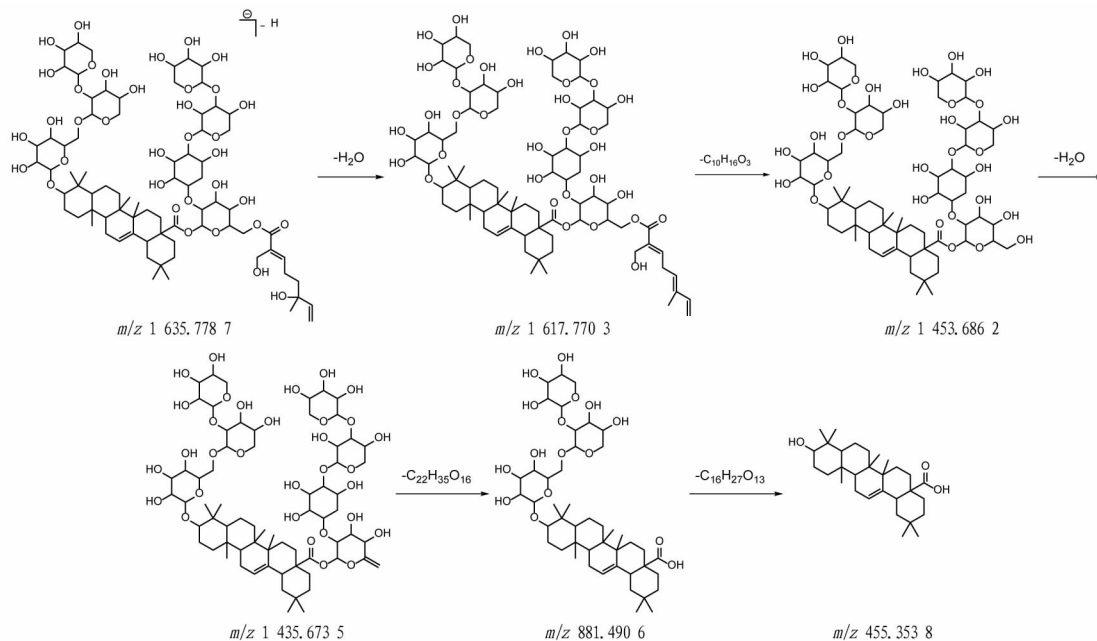


图 5 皂荚苷 B 可能的裂解途径

Fig.5 The possible fragmentation pathways of gleditsiasaponin B

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:2020 年版一部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:339.

[2] 邓显仪,陈晓兰,唐红艳,等.猪牙皂中刺囊酸和齐墩果酸的含量测定[J].贵州科学,2017,35(6):25-29.

[3] 李建军,马静潇,尚星晨,等.大皂角与猪牙皂的形态结构及成分分析[J].河南农业科学,2018,47(7):67-70.

[4] XIA Y F,GAO Z Z,DAI Y,et al.Analysis of bioactive saponins in fructus *Gleditsiae abnormalis* and fructus *Gleditsiae sinensis* by LC-ELSD[J].Chromatographia,2009,70(9):1361-1366.

[5] WANG S,WANG Q,QIAO X,et al.Separation and characterization of triterpenoid saponins in *Gleditsia sinensis* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J].Planta medica,2016,82(18):1558-1567.

[6] 马林,张荣飞,余舒乐,等.猪牙皂的化学成分[J].中国药科大学学报,2015,46(2):188-193.

[7] 韩秀文.猪牙皂皂苷类成份的提取分离与鉴定[J].内蒙古中医药,2011,30(16):55-56.

[8] 殷志琦,张荣飞,张健,等.猪牙皂药材的质量评价方法[J].中国药科大学学报,2011,42(5):428-430.

[9] PAREJO I,JAUREGUI O,SÁNCHEZ-RABANEDA F,et al.Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry[J].Journal of agricultural and food chemistry,2004,52(12):3679-3687.

[10] SILVA D B,OKANO L T,LOPES N P,et al.Flavanone glycosides from

Bidens gardneri Bak. (Asteraceae)[J].Phytochemistry,2013,96:418-422.

[11] LIN L C,CHOU C L.Meroterpenes and C-glycosylflavonoids from the aerial parts of *Plumbago zeylanica*[J].The Chinese pharmaceutical journal,2003,55(1):77-81.

[12] LIU G,WANG H,WU T,et al.Chemical constituents from *Ainsliaea fragrans*[J].Chinese journal of natural medicines,2007,5(4):266-268.

[13] ROOWI S,CROZIER A.Flavonoids in tropical citrus species[J].Journal of agricultural and food chemistry,2011,59(22):12217-12225.

[14] ZHANG Z Z,KOIKE K,JIA Z H,et al.Triterpenoidal saponins acylated with two monoterpene acids from *Gleditsia sinensis*[J].Chemical & pharmaceutical bulletin,1999,47(3):388-393.

[15] ZHANG Z Z,KOIKE K,JIA Z H,et al.Triterpenoidal saponins from *Gleditsia sinensis*[J].Phytochemistry,1999,52(4):715-722.

[16] PARK K Y,JUNG G O,LEE K T,et al.Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*[J].Journal of ethnopharmacology,2004,90(1):73-79.

[17] CASABUONO A C,POMILLO A B.Lignans and a stilbene from *Festuca argentina*[J].Phytochemistry,1994,35(2):479-483.

[18] MIYAZAWA M,HISAMA M.Antimutagenic activity of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium*[J].Bioscience,biotechnology, and biochemistry,2003,67(10):2091-2099.

[19] LU D,XIA Y F,TONG B,et al.*In vitro* anti-angiogenesis effects and active constituents of the saponin fraction from *Gleditsia sinensis*[J].Integrative cancer therapies,2014,13(5):446-457.

[20] CHEN H J,CHUNG C P,CHIANG W C,et al.Anti-inflammatory effects and chemical study of a flavonoid-enriched fraction from adlay bran[J].Food chemistry,2011,126(4):1741-1748.