

· 综述 ·

LC-MS 技术在天然产物黄酮类成分分析中的应用[△]牛江涛^{1,2}, 曹瑞^{1,2}, 司昕蕾^{1,2}, 辛二旦^{1,2}, 张育贵^{1,2}, 张淑娟^{1,2}, 李越峰^{1,2*}

1. 甘肃中医药大学 药学院, 甘肃 兰州 730000;

2. 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室, 甘肃 兰州 730000

[摘要] 黄酮类化合物是多数植物中的主要成分, 并具有广泛的药理活性, 因此具有较大的研究价值。目前, 国内外学者对黄酮类化合物已做了大量研究, 其主要结构、分类、裂解规律等均已有多报道, 液质联用(LC-MS)技术近年来已经成为了黄酮类化合物分析的主要技术和方法。概述 LC-MS 技术及其分析方法、黄酮类化合物结构特征及其主要裂解方式, 并综述了 LC-MS 技术在黄酮类成分分析中的最新研究, 旨在为黄酮类成分的分析测定提供参考。

[关键词] 黄酮类化合物; 液质联用技术; 结构特征; 裂解规律; 分析测定

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)09-1576-04

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190916001

Application of LC-MS Technology in Analysis of Flavonoids in Natural Products

NIU Jiang-tao^{1,2}, CAO Rui^{1,2}, SI Xin-lei^{1,2}, XIN Er-dan^{1,2},ZHANG Yu-gui^{1,2}, ZHANG Shu-juan^{1,2}, LI Yue-feng^{1,2*}

1. College of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine(TCM), Lanzhou 730000, China;

2. Key Laboratory of Quality and Standard of TCM of Gansu Province, Lanzhou 730000, China

[Abstract] Flavonoids are the main components in most plants and have a wide range of pharmacological activities, so they have great research value. At present, domestic and foreign scholars have done a lot of research on flavonoids, and the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) technology has become the main technology and method for flavonoid analysis in recent years. This paper summarizes the LC-MS technology and its analytical methods, the structural characteristics of flavonoids and its main methods of cleavage, and reviews the recent research on the analysis of flavonoids by LC-MS technology, to provide a reference for the analytical determination of flavonoids.

[Keywords] flavonoids; LC-MS technique; structural characteristics; cleavage law; analytical determination

黄酮类化合物(flavonoids)是广泛存在于自然界, 基本母核为 2-苯基色原酮(C₆-C₃-C₆)的一系列化合物的总称^[1]。黄酮类成分是多种中药的次生代谢产物, 也是其主要的药效成分^[2-3]。研究表明, 黄酮类化合物具有保护心血管系统^[4-7]、抗氧化^[8]、抗抑郁^[9]、抗炎^[10]、抗肿瘤^[11]、镇静催眠^[12]等作用, 并有类雌激素^[13]作用。黄酮类化合物分布广泛、数量众多且结构复杂, 因此选用一种高效、快速、准确的结构鉴定和含量测定的分析技术具有重要的意义。液质联用(LC-MS)技术是近年来发展起来的集 LC 的高分离能力和 MS 的高灵敏度及强大的结构测定能力于一体的一门综合性分析技术^[14], 近年来

已经越来越广泛地应用于黄酮类成分的分析测定中。本文通过对 LC-MS 技术在黄酮类成分研究中的应用的相关文献进行综述和归纳, 旨在为黄酮类成分的分析测定提供参考。

1 LC-MS 技术概述及化合物分析方法

1.1 LC-MS 简述

液质联用仪主要由高效液相色谱、接口设备及质谱 3 个部分组成, 接口设备将 LC 和 MS 精密地结合, 使得 LC-MS 可以同时复杂成分进行定性和定量分析^[15]。LC-MS 技术的主要原理是样品先经过液相色谱分离后进入接口设备, 使样品气化、电离

[△] **[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81960713); 甘肃省自然科学基金创新基地和人才计划项目(18JR3RA197); 甘肃省中药质量与标准研究重点实验室开放基金(ZYZL18-008)

^{*} **[通信作者]** 李越峰, 教授, 研究方向: 中药及复方加工炮制机理及活性成分研究; E-mail: lyfyxk@126.com

并除去流动相溶剂,最后进入质谱仪做质谱检测。接口技术是LC-MS的关键技术,目前应用最广泛的接口技术主要是大气压离子化接口(API)技术,其主要包括电喷雾离子化(ESI)、大气压化学离子化(APCI)和离子喷雾离子化(ISI)模式^[16]。随着技术的不断更新,LC-MS技术不仅能检测小分子物质还能检测如蛋白质、多肽等大分子物质,同时还可以分析极性大、挥发性差和热不稳定的化合物^[15]。因此,LC-MS技术在药物分析、质量控制、药代动力学、代谢组学、蛋白组学等诸多领域有着广泛的应用^[17]。

1.2 LC-MS 化合物分析方法

样品经前处理后,进入液相色谱,经分离后,洗脱进入质谱离子源,实现样品离子化,然后进入质谱检测器中按照母离子质荷比(m/z)差异进行分离选择,然后进入碰撞室发生碰撞诱导裂解,产生子离子,再经后1个质量分析器按 m/z 分离后检测,从而实现定性定量分析^[18]。例如基于超高效液相色谱联合飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术结合数据依赖型扫描模式,能够获得成分高质量精度的一级质谱和二级质谱信息。依据化合物的一级质谱信息(相对保留时间、准分子峰质荷比以及对应的加合离子)能够确定化合物的分子式,通过检索NIST、Wiley等数据库,可以从中筛选出目标化合物^[19];再结合化合物的二级质谱信息进一步确定化合物的母核结构、特征官能团等,从而快速筛选或推测出目标化合物结构。

2 黄酮类化合物结构特征和裂解规律

2.1 结构特征

黄酮类化合物是由2个苯环(A与B环)通过3个碳原子互相联结而成的一系列化合物。通常根据中间3个碳原子是否成环、环与环的接连位置以及三碳的氧化程度等结构特征,常将黄酮类化合物分成黄酮(flavone)、异黄酮(isoflavone)、黄酮醇(flavonol)、二氢黄酮(flavanone)、二氢异黄酮(isoflavanone)、二氢黄酮醇(flavanonol)、查耳酮(chalcone)、花色素(anthocyanidin)等^[20-21]。黄酮类化合物的基本母核结构见图1。

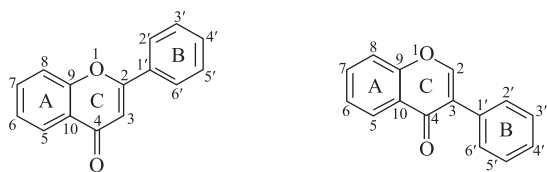


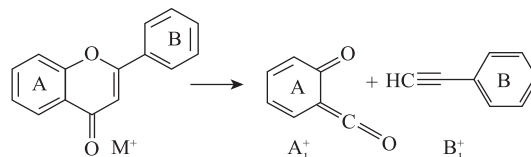
图1 黄酮和异黄酮母核结构

自然界中存在的天然黄酮大多是以上述结构为母核的衍生物,因A、B环上取代基的数目、种类、取代位点的不同而形成各种各样的黄酮类物质,常见的取代基有羟基、甲基、甲氧基及异戊烯基等^[22]。黄酮类化合物主要以2种形式存在于植物体内,其中大部分以与糖基结合成苷的形式存在,而另一部分以游离形式存在。天然黄酮糖苷多以O-糖苷和C-糖苷形式存在。

2.2 裂解规律

近年来,学者们对黄酮类化合物做了大量的质谱研究。研究表明,ESI和APCI模式均适用于黄酮类化合物分析,一般正离子模式下稍好于负离子模式^[23]。电喷雾质谱等软电离质谱技术,不但可以得到游离黄酮类的强分子离子峰,并且可以直接测定黄酮类O-糖苷,而获得很强的分子离子峰或准分子离子峰,同时也能获得有关苷元及糖基部分的重要结构信息^[24]。研究表明,黄酮类化合物均发生系列以C环为中心的断裂、丢失与重排反应,其主要有如图2所示的2种裂解方式。

裂解方式I(RDA裂解):



裂解方式II:

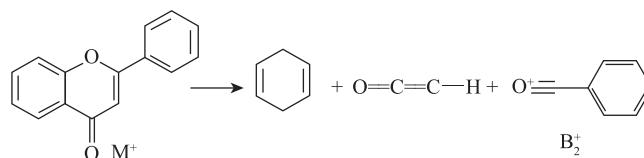


图2 黄酮类化合物主要裂解方式

上述2种裂解方式呈相互竞争、互相制约的关系^[24]。大多数游离黄酮的分子离子峰 $[M]^+$ 为基峰, $[M-H]^+$ 、 $[M-CO]^+$ 以及由裂解方式I产生的碎片 A_1^+ 、 $[A_1-CO]^+$ 和 B_1^+ 峰均为较重要的峰,此类质谱信息可以确定苷元类型及A、B、C环上的取代基类型及取代基数目^[25]。黄酮苷类因与糖基连接的苷键原子为C原子和O原子的不同而分为黄酮C-糖苷和黄酮O-糖苷。黄酮C-糖苷多以糖环的交叉环切除裂解为主,几乎不产生苷元离子;黄酮O-糖苷的裂解以糖苷键的断裂、糖糖键的断裂以及糖环的交叉环切除裂解为主^[23]。研究表明,在质谱分析中结构相同的化合物一般其裂解规律相似并具有相似的特征碎片,因而总结黄酮标准物质的裂解规律,并以其特征碎片离子作为诊断离子,有利于黄酮类

未知化合物的质谱解析^[26]。

3 LC-MS技术在黄酮类成分分析中的应用

3.1 LC-MS技术在黄酮类成分结构分析中的应用

LC-MS技术可以得到样品的紫外图谱、正负模式下的总离子流图以及各组分的一级、二级质谱图,通过与对照品相对保留时间的比对及准分子离子峰、特征碎片离子峰信息的综合分析,可以解析化合物结构信息。党立志等^[27]采用LC-MS技术,以迷迭香为研究药材,建立了一种快速识别其中黄酮苷类化合物的方法,同时解析出了14种黄酮苷及其同系物结构。王翌臣等^[28]基于LC-MS技术从大狼把草的提取液中鉴定出了22个黄酮类成分,并发现其裂解方式主要是丢失CO和H₂O等碎片。王芦笛^[29]采用多离子监测-信息依赖-增强型离子扫描(MIM-IDA-EPI)扫描方式为主,LTQ/Orbitrap mass分析为辅的分析方法对瑞香狼毒水提液进行分析,并鉴定出23种黄酮类化合物。白海玉等^[30]基于前级离子质量准确度、同位素分布模式和碰撞诱导解离(CID)碎裂模式等分析,同时结合二级谱图信息匹配及文献报道,从野菊花中共鉴定出28种黄酮类成分的结构。冯艺飞等^[31]基于LC-MS技术对茵陈黄酮提取物组成进行分析,并从中鉴定出了芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷等成分。Cao等^[32]基于高效液相色谱-电喷雾电离串联离子阱质谱(HPLC-ESI-IT-MSⁿ)技术从紫花地丁中成功鉴定出了35种黄酮苷类成分结构。

3.2 LC-MS技术在黄酮类成分定量分析中的应用

LC-MS技术以其高灵敏性可以测定极少量样品中成分的含量。谢进等^[33]采用LC-MS对黄秋葵荚果中黄芩素、柚皮素、槲皮素、黄芩苷和芦丁5种黄酮类成分的含量进行测定,并发现该方法具有重复性好、灵敏度高、专一性强等优点。杜娟等^[34]采用LC-MS技术,以体积分数为0.1%甲酸乙腈和体积分数为0.1%甲酸水溶液为流动相,在负离子模式下采用多反应监测,测定葛根素、木犀草素、槲皮素和儿茶素含量。其研究结果表明,4种黄酮的平均加样回收率为93.6%~107.5%,RSD为1.62%~2.21%,表明该方法灵敏、准确、稳定,可用于山楂降脂软胶囊的质量控制。魏巍等^[35]采用UPLC-MS/MS同时测定了镇江香醋中10种黄酮类成分含量,结果表明,10种黄酮类化合物在25.0~1 000.0 ng·mL⁻¹线性关系良好(0.999 8≥r≥0.993 4),检出限为1.0~4.0 ng·mL⁻¹。朱雅玲等^[36]基于HPLC-MS/MS

同时测定了喘可治注射液中4种黄酮苷含量,其研究结果显示,4种成分在API3000液质联用系统仪上的定量限均为0.04 ng·mL⁻¹、检测限均为0.05 ng·mL⁻¹。

3.3 LC-MS技术在黄酮类成分药动学研究中的应用

近年来,LC-MS技术越来越多地应用到黄酮类成分的药代动力学研究中。有研究采用HPLC-MS/MS,同时测定了灌胃大蓟提取物后大鼠血浆中7种黄酮类成分的含量,并发现其中除芹菜素外,6种大蓟黄酮类成分在大鼠体内吸收和消除迅速^[37]。常路^[38]采用LC-MS对槐角中槐角苷、染料木苷、染料木素、芦丁、槲皮素和山柰酚6种黄酮类成分做了药代动力学研究,其研究结果显示,灌胃给药槐角提取物后黄酮苷先被吸收,黄酮苷元后被吸收,且黄酮苷元在血液中消除缓慢。另有研究采用LC-MS做了麦冬中黄烷酮E、麦冬黄酮A、麦冬二氢黄烷酮A和麦冬二氢黄烷酮B大鼠血浆中的药物动力学研究,结果表明,麦冬黄酮类成分虽具有相似的化学结构,但血药浓度-时间曲线和药物代谢动力学参数却表现出显著差异^[39]。

4 结语

黄酮类化合物广泛存在于植物体内,具有多种药理活性,是一类具有广泛开发前景的天然药物。因此,总结梳理黄酮类化合物的快速准确的定性定量分析方法,对其进一步开发研究具有重要意义。LC-MS技术集液相色谱高分离能力和质谱的结构解析能力于一体,具有高灵敏度、高分辨率、快速、稳定等特点,是黄酮类等复杂化合物同时定性定量分析的重要技术手段。随着LC-MS技术的不断发展,采用该技术分析黄酮类化合物将会变得更加快速、准确、简单和便捷。

参考文献

- [1] YUAN E, LIU B, NING Z, et al. Preparative separation of flavonoids in *Adinandra nitida* leaves by high-speed counter-current chromatography and their effects on human epidermal carcinoma cancer cells [J]. Food Chem, 2009, 115(3):1158-1163.
- [2] MORIMOTO M, FUKUMOTO H, NOZOE T, et al. Synthesis and insect antifeedant activity of aurones against *Spodoptera litura* larvae [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(3):700-705.
- [3] 杨利军, 田迪英. 11种中草药抗氧化活性与黄酮含量相关性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1):119-120, 123.
- [4] 孙振国. 天然黄酮类化合物对心脑血管的药理分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(80):121-124.
- [5] 高敏. 中草药黄酮类化合物防治动脉粥样硬化的实验研

- 究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(4): 43-44.
- [6] 李冲, 文翔昊, 郭露, 等. 山银花黄酮粗提物对急性心肌梗死氧化损伤大鼠的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(8): 779-783, 835.
- [7] 刘灏, 呼日乐巴特, 熊英, 等. 黄芪总黄酮对病毒性心肌炎小鼠心律失常与内质网应激因子的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(1): 16-18, 22.
- [8] 秦晶晶, 钱慧琴, 魏婧, 等. 菟丝子总黄酮提取工艺及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2019, 40(23): 151-157.
- [9] QIU J, HU S Y, ZHANG C H, et al. The effect of Chaihu-Shugan-San and its components on the expression of ERK5 in the hippocampus of depressed rats[J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152(2): 320-326.
- [10] 宋英, 张咏梅, 徐洁, 等. 杨梅黄酮对炎性痛大鼠的外周镇痛作用[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(8): 1108-1111.
- [11] 梁艳妮, 唐志书, 张晓群, 等. 马齿苋总黄酮的超声波辅助提取工艺优化及其抗氧化、抗肿瘤活性研究[J]. 中国农学通报, 2019, 35(4): 130-135.
- [12] 常征, 王蓉, 李洪潮, 等. 凹叶景天总黄酮镇静催眠作用研究[J]. 保山学院学报, 2017, 36(2): 15-18.
- [13] BOONCHIRD C, MAHAPANICHKUL T, CHERDSHEWASART W. Differential binding with ER α and ER β of the phytoestrogen-rich plant *Pueraria mirifica* [J]. Brazilian J Med Biol Res, 2010, 43(2): 195-200.
- [14] 马亚娟, 王宝春, 殷海霞, 等. 液质联用技术在中药成分研究中的应用[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(56): 11076-11077.
- [15] 张海江. 基于液相色谱-电喷雾质谱联用技术的中药物质基础辨识方法研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004.
- [16] 唐学红, 肖先举. 高效液相色谱-质谱联用技术在药物分析中的应用[J]. 当代化工, 2011, 40(9): 988-990.
- [17] 胡冰莹. LC-MS/MS技术在内源性代谢产物定性和定量中的应用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2017.
- [18] 王国才, 贺玖明. 液相色谱质谱联用技术在临床检测和代谢研究中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(22): 2750-2755.
- [19] WU H, YANG C, WANG Z, et al. Metabolism profile of quinoxaline in swine by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokin, 2012, 37(2): 141-154.
- [20] AHERNE S A, O' BRIEN N M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism [J]. Nutrition, 2002, 18(1): 75-81.
- [21] 朱勃, 贾威阵, 章银军. 黄酮类化合物结构修饰研究进展[J]. 发酵科技通讯, 2016, 45(1): 50-54.
- [22] 刘国柱. 中药中黄酮类化合物全定性分析策略[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2010.
- [23] 唐瑰宝, 陈楠, 潘馨. 液质联用技术在黄酮类化合物研究中的应用[J]. 海峡药学, 2011, 23(12): 7-9.
- [24] 匡海学. 中药化学[M]. 2版. 北京: 中国中医药出版社, 2011: 162.
- [25] MA Y L, LI Q M, VAN D H H, et al. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Sp, 2015, 11(12): 1357-1364.
- [26] 李伟, 冯育林, 黎田儿, 等. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合诊断离子方法快速分析连钱草中黄酮类化合物[J]. 质谱学报, 2016, 37(6): 504-516.
- [27] 党立志, 张翼鹏, 张健, 等. LC-MS 技术快速识别迷迭香中黄酮苷类化合物[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2017, 32(2): 358-365.
- [28] 王翌臣, 王焕军, 张玲, 等. 大狼把草的化学成分液质联用快速鉴定分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 80-87.
- [29] 王芦笛. 基于液质联用技术的瑞香狼毒化学成分及药代动力学研究[D]. 保定: 河北大学, 2017.
- [30] 白海玉, 刘宝忠, 霍金海. 基于液质联用技术的野菊花中黄酮成分分析[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(6): 56-60.
- [31] 冯艺飞, 李文钊, 王兆燃, 等. 响应面法优化茵陈总黄酮提取工艺及成分结构的初步表征[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 192-197, 215.
- [32] CAO J, YIN C, QIN Y, et al. Approach to the study of flavone di-c-glycosides by high performance liquid chromatography-tandem ion trap mass spectrometry and its application to characterization of flavonoid composition in *Viola yedoensis* [J]. J Mass Spectrom, 2014, 49(10): 1010-1024.
- [33] 谢进, 黄艳宁, 徐瑞, 等. 采用液质联用方法检测黄秋葵果实黄酮类物质含量[J]. 广西植物, 2017, 37(12): 1592-1597.
- [34] 杜娟, 左非非, 魏双艳, 等. 山楂降脂软胶囊中 4 种黄酮含量的测定[J]. 郑州大学学报(医学版), 2017, 52(4): 456-459.
- [35] 魏巍, 周琪乐, 纪凤娣, 等. 基于液质联用技术的镇江香醋中十种黄酮类物质含量的同时测定[J]. 中国酿造, 2018, 37(10): 162-166.
- [36] 朱雅玲, 许舜军, 冯怡, 等. 液质联用同时测定喘可治注射液 4 种黄酮苷含量[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(2): 244-248.
- [37] 张智勇. 基于液质联用技术的大蓟药代动力学特征及其 3 种黄酮类成分的体外代谢研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- [38] 常路. 基于液质联用技术的槐角多组分分析与药代动力学研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.
- [39] 吴茵. 基于液质联用技术的麦冬化学成分分析与药代动力学研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.