

# 基于HPLC与LC-MS/MS分析食品组合物桑瓜饮的化学成分

蔡羽, 陈运中\*, 邢琪昌, 刘思敏, 颜春潮

(湖北中医药大学药学院, 湖北省中药保健食品工程技术研究中心, 湖北时珍实验室, 湖北武汉 430065)

**摘要:** 解析具有调节血糖功能的食品组合物桑瓜饮 (Sang-Gua-Yin, SGY) 的成分。使用高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 归属桑叶总生物碱组分、苦瓜总皂苷组分、葛根总黄酮组分的色谱峰, 高效液相色谱-蒸发光散射器 (High Performance Liquid Chromatography-Evaporative light Scattering Detector, HPLC-ELSD) 与液相色谱-串联质谱法 (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 分析组合物桑瓜饮中的化学成分。对食品组合物桑瓜饮的色谱峰进行归属, 标定了 11 个色谱峰, 其中 7 种成分属于葛根总黄酮, 3 种成分属于苦瓜总皂苷, 1 种成分属于桑叶总生物碱; 对 16 个化学成分进行了鉴定, 分别为 1-DNJ、苦瓜苷 A、苦瓜苷 K、葛根素、6''-O-acetyldaidzin、pueroside D、染料木苷、大豆苷、大豆苷元、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、3'-氢化葛根素木糖苷、葛根素-7-木糖苷、葛根素-6''-O-木糖苷、puerarin-7-O-glucoside、葛根素-4'-O-β-D-葡萄糖苷。该研究提示食品组合物桑瓜饮成分选择 1-DNJ、苦瓜苷 A 与葛根素作为评价指标, 为食品组合物桑瓜饮的后续开发利用提供科学依据。

**关键词:** 桑瓜饮; HPLC; LC-MS/MS; 1-DNJ; 苦瓜苷 A; 葛根素

文章编号: 1673-9078(2024)08-158-167

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.1058

## HPLC and LC-MS/MS Analysis of Chemical Constituents of Sang-Gua-Yin: A Food Composition Study

CAI Yu, CHEN Yunzhong\*, XING Qichang, LIU Simin, YAN Chunchao

(Hubei Provincial Research Center for TCM Health Food Engineering, School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Shizhen Laboratory, Wuhan 430065, China)

**Abstract:** Sang-Gua-Yin (SGY) is a food preparation with the ability to regulate blood glucose. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) was used to attribute the chromatographic peaks of the total alkaloids from *Folium Mori*, total saponins from *Fructus Momordicae Charantiae* and total flavonoids from *Radix Puerariae Lobatae*. The chemical components in the composition of SGY were analyzed by High Performance Liquid Chromatography-Evaporative

引文格式:

蔡羽, 陈运中, 邢琪昌, 等. 基于HPLC与LC-MS/MS分析食品组合物桑瓜饮的化学成分[J]. 现代食品科技, 2024, 40(8):158-167.

CAI Yu, CHEN Yunzhong, XING Qichang, et al. HPLC and LC-MS/MS analysis of chemical constituents of Sang-Gua-Yin: a food composition study [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 158-167.

收稿日期: 2022-08-24

基金项目: 湖北省自然科学基金创新发展联合基金 (2024AFD237); 教育部产学研合作协同育人项目 (230804643304437); 湖北省科学技术厅揭榜制科技项目 (2023BEB011)

作者简介: 蔡羽 (1987-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药复方及其物质基础研究, E-mail: yuca2018@hbcum.edu.cn

通讯作者: 陈运中 (1962-), 博士, 二级教授, 研究方向: 中药复方及其物质基础研究, E-mail: chyzhucm@126.com

light Scattering Detector (HPLC-ELSD) and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). The chromatographic peaks of the composition of SGY were attributed to 11 peaks, among which seven components belonged to total flavonoids of *Radix Puerariae lobatae*, three components to total saponins of *Fructus Momordicae charantiae*, and one component to total alkaloids of *Folium mori*. In addition, 16 chemical components were identified as 1-DNJ, momordicoside A, momordicoside K, puerarin, 6''-O-acetyldaidzin, pueroside D, genistein, daidzin, daidzein, 3'-hydroxypuerarin, 3'-methoxy puerarin, 3'-hydrogenated glucosin xyloside, glucosin-7-xyloside, glucosin-6''-O-xyloside, puerarin-7-O-glucoside, and glucosin-4'-O- $\beta$ -D-glucoside. These results indicate that 1-DNJ, momordicoside A, and puerarin could be used as indices with which to evaluate for the ingredients of SGY, providing a scientific basis for the subsequent development and utilization of SGY.

**Key words:** *Sang-Gua-Yin*; HPLC-ELSD; LC-MS/MS; 1-DNJ; momordicoside A; puerarin

2型糖尿病 (Type 2 Diabetes, T2DM) 是一种代谢综合征, 于全世界范围内具有逐年上升的发病率。T2DM 的胰腺中的特征是  $\beta$  细胞功能障碍和目标器官的胰岛素抵抗引起的相对胰岛素缺乏。从 1980 年到 2004 年, 全球肥胖率的上升、久坐不动的生活方式的流行以及人口老龄化的增加使 T2DM 的发病率翻了一番<sup>[1]</sup>。T2DM 对 25 岁以下的患者尤其具有挑战性, 对他们来说, 复杂的症型可能需要几十年的强化治疗, 以减少微血管和大血管并发症的发展和恶化<sup>[2]</sup>。

桑瓜饮由李家庚教授配伍, 将桑叶、苦瓜、葛根和山药按照 4:6:3:3 组方而成, 具有清热润燥、滋阴生津、补肝益肾的功效, 对 II 型糖尿病具有一定的调节作用<sup>[3-7]</sup>。桑瓜饮用单一药物的化学成分研究更深入: 桑叶中的活性成分主要包括黄酮、黄酮苷、多酚、多糖、生物碱、甾醇、挥发油、氨基酸和维生素<sup>[8]</sup>; 苦瓜含有蛋白质、多糖、黄酮、三萜、皂苷、类固醇和生物碱<sup>[9]</sup>; 葛根主要含有黄酮、三萜、皂苷和多糖<sup>[10]</sup>; 山药主要化学成分包括多糖、氨基酸、脂肪酸、山药素类化合物、尿囊素、微量元素、淀粉等<sup>[11]</sup>。现代药理学研究表明, 桑叶生物碱苷酶活性, 桑叶生物碱及其衍生物可以降低血糖<sup>[12]</sup>; 葛根总黄酮可以逆转胰岛  $\beta$  细胞损伤可以改善胰岛素抵抗力, 降低血糖<sup>[13]</sup>; 苦瓜总皂苷通过外周组织促进肝糖原合成, 抑制肝糖原分解 GLUT 增强表达, 增加胰岛素敏感性, 降低血糖<sup>[14]</sup>; 山药多糖的降糖机制可能与它能增加血清中的抗活性氧、增强糖代谢中关键酶的活性、抑制氧化应激、改善免疫功能和调节脂质代谢紊乱有关<sup>[15-17]</sup>。

在本研究中, 食品组合物桑瓜饮干粉由实验室自制, 最终确定组合物桑瓜饮由桑叶总生物碱、葛根总黄酮、苦瓜总皂苷、山药多糖按 1:5:6:6 组方而成。其有效成分基本反映了相应药材的功能主治。在这种情况下, 可以认为实验中的配方接近桑瓜饮方剂, 可以真正还原桑瓜饮方剂的疗效<sup>[18]</sup>。采用

HPLC 对其色谱峰进行归属, 采用 LC-MS/MS 技术对其化学成分进行全面地分析与鉴定, 以期食品组合物桑瓜饮后续开发利用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

1260 系列高效液相色谱仪 (DAD 检测器), 美国 Agilent 公司; 1200 系列高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; HPLC LC-20AT, 日本岛津公司; 2000ES 蒸发光散射检测器, 美国 Alltech 公司; 布鲁克 ultrafleXtreme MALDI TOF/TOF 基质辅助激光解析飞行时间质谱仪, 美国布鲁克·道尔顿公司; Spectra MaxM5 多功能酶标仪、分子仪; xMark 酶标仪, Bio-Rad 伯乐公司。

桑瓜饮干粉由实验室自制 (桑叶总生物碱、葛根总黄酮、苦瓜总皂苷、山药多糖按 1:5:6:6 组方); 中国药品生物制品检验所检测对照品大豆苷 (批号 111738-29603)、大豆苷 (批号 111502-200402); 成都标化纯生物技术有限公司生产对照品葛根素 (批号 3681-99-0)、苦瓜苷 a (批号 170205)、1-DNJ (批号 19130-96-2); 甲醇、乙腈, 色谱纯, Merck 公司; 醋酸铵, 国药化学试剂公司; 超纯水为娃哈哈纯净水。

食品组合物桑瓜饮中桑叶 (批号 160501)、苦瓜 (批号 160901) 均购自湖南自然堂中药饮片有限公司, 葛根 (批号 150401) 和山药 (批号 141101) 购自湖南南国药都中药饮片有限公司经湖北中医药大学药学院胡志刚博士鉴定, 桑叶、葛根和山药符合《中国药典》2020 年版一部相关项下的性状规定, 苦瓜符合《湖南省中药材标准》2009 年版中的要求, 鉴定结果桑叶是桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 苦瓜是葫芦科植物苦瓜 *Momordica charantia* L. 的果实, 葛根是豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 山药是薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea*

*opposita* Thunb. 的干燥根茎。

## 1.2 方法

### 1.2.1 桑叶总生物碱组分的色谱图研究

#### 1.2.1.1 HPLC的色谱条件

Agilent HP 色谱柱 (4.0 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2% 磷酸溶液, 梯度洗脱时间分組为: 0~8 min, 体积分数 25% 乙腈; 8~45 min, 体积分数 25%~50% 乙腈; 46~75 min, 体积分数 50%~25% 乙腈; 检测波长为 263 nm; 流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 理论塔板数按 1-DNJ 的计算不低于 6 000。

#### 1.2.1.2 供试品溶液的制备

分别取三批桑叶总生物碱各 40 mg, 精密称定, 加水定容至 10 mL。

#### 1.2.1.3 对照品溶液的制备

精密称定 1-DNJ 标准品 2.98 mg, 加水定容至 5 mL, 得 0.596 mg/mL 对照品溶液。

#### 1.2.1.4 衍生化

分别精密量取标准品溶液, 样品溶液和超纯水各 100 μL 至 1.5 mL EP 管中, 加入硼酸钾缓冲溶液 (pH 值 8.5) 100 μL, 振摇 10 s, 精密加入 12 mg/mL 茚甲氧羰酰氯 (FMOC-Cl) 的乙腈溶液 200 μL, 振摇 10 s, 30 °C 水浴反应 20 min, 加入 0.1 mol/L 甘氨酸溶液 100 μL 猝灭反应, 再加入 500 μL 体积分数 50% 乙腈溶液, 以 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 待后续测量。

#### 1.2.1.5 桑叶总生物碱制备方法

称取桑叶共 3 kg, 置圆底烧瓶中, 加 10 倍量 φ=60% 乙醇溶液回流提取 2 次, 每次 1 h, 过滤, 合并滤液, 过阳离子交换树脂柱, 充分吸附后, 用 1 BV 纯水洗脱, 溶胀 12 h, 用 4 BV 2% 氨水洗脱, 流速 10 mL/min, 收集洗脱液, 加压回收氨水, 浓缩至 0.5 g/mL, 过阴离子交换树脂, 收集流出液, 并用 2 BV 纯水洗脱, 合并洗脱液, 减压浓缩, 真空干燥, 得总生物碱。

### 1.2.2 葛根总黄酮组分的色谱图研究

#### 1.2.2.1 HPLC的色谱条件

Agilent HP 色谱柱 (4.0 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-甲醇-水, 梯度洗脱时间分組为: 0~15 min, 体积分数 25% 乙腈-甲醇; 15~40 min, 体积分数 25%~40% 乙腈-甲醇; 40~45 min, 体积分数 40%~60% 乙腈-甲醇; 检测波长为 250 nm; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 以葛根素计算的理论塔

板数不低于 4 000。

#### 1.2.2.2 供试品溶液的制备

称取 3 批葛根总黄酮, 每批 10 mg, 精密称定, 加 φ=50% 甲醇定容至 25 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤待测。

#### 1.2.2.3 对照品溶液的制备

称量 1.43 mg 葛根素对照品, 加入体积分数 50% 甲醇定容至 10 mL, 以得质量浓度为 0.143 mg/mL 对照品溶液。

#### 1.2.2.4 葛根总黄酮制备方法

葛根药材打粉过 40 目筛, 称取葛根粉末 3 kg, 置圆底烧瓶中, 加 20 倍 φ=60% 乙醇 80 °C 浸提 2 h, 过滤, 上清液浓缩至 1 g/mL, 过 AB-8 型大孔吸附树脂, 2 BV 水洗除杂, φ=80% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 浓缩至干, 得葛根总黄酮。

### 1.2.3 苦瓜总皂苷组分的色谱图研究

#### 1.2.3.1 HPLC的色谱条件

Tosoh Amide-80 色谱柱 (4.6 mm×250 mm); 流动相为乙腈-水, 梯度洗脱时间分組为: 0~15 min, 体积分数 92.5% 乙腈; 15~22 min, 体积分数 92.5%~80% 乙腈; 22~25 min, 体积分数 80% 乙腈; 25~30 min, 体积分数 80%~75% 乙腈; 0~45 min, 体积分数 75% 乙腈; 柱温为 30 °C; 检测波长为 210 nm; 流量为 1.0 mL/min。

#### 1.2.3.2 供试品溶液的制备

称取三批苦瓜总皂苷粉, 每批 25 mg, 精密称取, 加入 50% 乙腈定容至 25 mL, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤待测。

#### 1.2.3.3 对照品溶液的制备

称取苦瓜苷 A 对照品 1.64 mg, 加体积分数 50% 乙腈稀释至 5 mL, 得到质量浓度为 0.328 mg/mL 的对照品溶液。

#### 1.2.3.4 苦瓜总皂苷制备方法

苦瓜片打粉过 40 目筛, 称取苦瓜粉 4.5 kg, 加 20 倍 φ=70% 乙醇 70 °C 水浴浸提 3 h, 过滤, 减压浓缩至无醇味, 离心除沉淀, 调节 pH 值 8~9, 过 AB-8 大孔树脂, 2 BV 纯水洗脱除杂, 5 BV φ=70% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 回收乙醇, 浓缩至干, 得苦瓜总皂苷。

## 1.2.4 色谱条件优化

### 1.2.4.1 检测器的选择

桑叶总生物碱无紫外吸收, 故选用柱前衍生法衍生后, 对其衍生物进行分析; 苦瓜总皂苷在紫外区为末端吸收, 紫外检测下峰形不佳, 后期再采用蒸发光散射检测器对其进行研究, 发现出峰数较少,

可能跟蒸发光散射检测器检测限较高有关。

#### 1.2.4.2 色谱柱的选择

分别试用 Agilent HP C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.0 mm×250 mm, 5 μm) 和 TSK GEL Amide-80 (4.6 mm×250 mm) 色谱柱, 前者为反向色谱柱, 适用于中小极性化合物分析, 后者是一种高性能的正相/亲水反应色谱柱, 主要用于分析糖类、多肽、核酸、亲水性药物等, 考虑到桑瓜饮中多糖和总生物碱属于强亲水性化合物, 预实验中, 反相柱调整流动相至 95% 水相时, 仍无法跑出较多色谱峰, 最终选择 TSK GEL Amide-80 (4.6 mm×250 mm) 色谱柱进行分析。

#### 1.2.4.3 流动相的选择

参考 Kimura 等<sup>[19]</sup>采用亲水色谱法测定桑叶中 1-DNJ 含量, 再根据其它色谱峰出峰情况调整。山药多糖在高效液相法分析中没有色谱峰出现, 可能是因为多糖在样品处理时, 在 50% 甲醇中没能溶解而被过滤掉, 或者是因为在该色谱条件下不能洗脱, 本文通过绘制山药多糖的 DEAE-Cellulose 52 洗脱曲线, 对其多糖组成进行表征, 为山药多糖组分的质量控制提供参考。

### 1.2.5 山药多糖DEAE-Cellulose52柱层析洗脱曲线绘制

#### 1.2.5.1 山药多糖制备条件

称量约 250 mg 的山药精制水溶性多糖, 于 10 mL 蒸馏水中溶解, 再超声 10 min 后, 再以 4 000 r/min 的转速离心 10 min, 取上清液用滴管缓慢的加入到层析柱 (1.8 cm×30 cm) 中。先用 100 mL 蒸馏水洗脱, 再用不同浓度的氯化钠溶液 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L) 各 100 mL 依次洗脱, 流速控制在 1.0 mL/min, 每管收集体积为 7.5 mL, 收集各管洗脱液后, 以苯酚-浓硫酸法检测吸光度值。为绘制洗脱曲线, 以洗脱液在 490 nm 波长处的吸光度值为纵坐标, 洗脱液管数为横坐标。据报道, 以水洗脱得到的峰为中性多糖, 不同浓度氯化钠溶液洗脱得到的峰为酸性多糖<sup>[20]</sup>。

#### 1.2.5.2 山药多糖制备方法

山药打粉过 40 目筛, 称取山药粉 3 kg, 加 10 倍量水 70 °C 下浸提 3 h, 过滤, 将滤液浓缩至 1 g/mL, 再加体积分数 95% 乙醇至含醇量 70%, 静置过夜, 抽滤, 滤渣真空干燥, 研细得山药总多糖。

### 1.2.6 食品组合桑瓜饮HPLC-ELSD化学成分分析

#### 1.2.6.1 HPLC-ELSD色谱条件

东曹 Amide-80 色谱柱 (250 mm×4.6 mm); 流动相为乙腈-6.5×10 mmol/L 乙酸铵水溶液, 梯

度洗脱: 0~15 min, 体积分数 10% 乙酸铵水溶液; 15~25 min, 体积分数 10%~25% 乙酸铵水溶液; 25~45 min, 体积分数 25% 乙酸铵水溶液; 45~55 min, 体积分数 25%~50% 乙酸铵水溶液; 55~60 min, 体积分数 50%~10% 乙酸铵水溶液; 60~70 min, 体积分数 10% 乙酸铵水溶液; 柱温为 30 °C; 流量为 1.0 mL/min。

ELSD 的条件 Alltech 2000ES 蒸发光散射检测仪; 气体体积流量为 2.7 L/min, 漂移管温度为 95 °C, 进样量为 2 μL。

#### 1.2.6.2 LC-MS/MS色谱条件及质谱条件

色谱条件: 东曹 Amide-80 色谱柱 (250 mm×4.6 mm); 流动相为乙腈-6.5 mmol/L 乙酸铵水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 体积分数 10% 乙酸铵水溶液; 15~25 min, 体积分数 10%~25% 乙酸铵水溶液; 25~45 min, 体积分数 25% 乙酸铵水溶液; 45~55 min, 体积分数 25%~50% 乙酸铵水溶液; 55~60 min, 体积分数 50%~10% 乙酸铵水溶液; 60~70 min, 体积分数 10% 乙酸铵水溶液; 柱温为 30 °C; 流速为 1.0 mL/min; 进质谱检测器前分流三分之一。

质谱条件: 采用电喷雾 (ESI) 离子源; 采集模式为 Auto MS<sup>n</sup> 模式; 校正液为 0.1 mol/L 甲酸钠溶液; 毛细管电压正离子模式为 5 000 V; 毛细管电压负离子模式为 4 500 V; 补偿电压为 -500 V; Rf 值为 150 Vpp; 温度为 180 °C; 气体流量为 5.0 L/min; 气体压力为 0.3 MPa<sup>[21]</sup>。

#### 1.2.6.3 供试品溶液的制备

取 10 mg 食品组合桑瓜饮干粉, 溶解于体积分数 50% 甲醇中, 超声, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 待用。

#### 1.2.6.4 对照品溶液的制备

精密称定标准品大豆苷、大豆苷元、葛根素、苦瓜苷 A 和 1-DNJ 适量, 溶于体积分数 50% 甲醇, 溶解过滤备用。

### 1.2.7 数据分析

采用色谱仪工作站提取色谱数据, 采用 Microsoft Excel 进行数据预处理, 采用 Metabo Analyst 4.0 软件进行聚类分析和主成分分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 桑叶总生物碱色谱图

因桑叶总生物碱无紫外吸收, 选择 FMOC-Cl 衍生后对其检测分析, 如图 1 所示, 3 批总生物碱色谱峰组成与出峰时间基本一致, 界定 11 个色谱峰, 其中 5 号峰为 FMOC-DNJ, 10 号峰为 FMOC-Gly,

11 号峰为 FMOC-Cl。

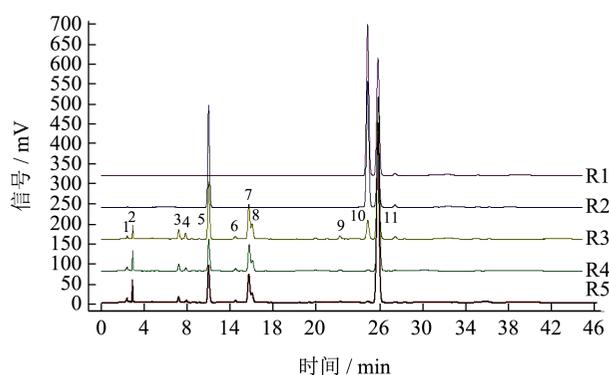


图1 桑叶总生物碱色谱图

Fig.1 The chromatograms of mulberry leaves alkaloid

注: R1 为空白溶液 (只加入 FMOC-Cl 和 Gly), R2 为对照品 1-DNJ, R3~R5 为 3 批总生物碱样品。

### 2.2 葛根总黄酮色谱图

如图 2 所示, 3 批葛根总黄酮色谱峰组成与出峰时间基本一致, 共界定 19 个色谱峰, R1 中仅有 8 号峰, 界定 8 号峰为葛根素。

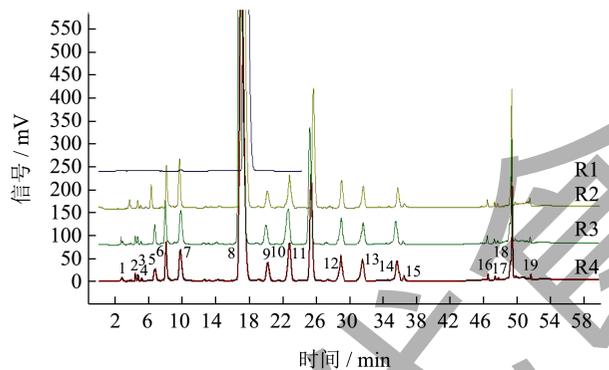


图2 葛根总黄酮色谱图

Fig.2 The chromatograms of pueraria flavonoid

注: R1 为葛根素对照品, R2~R4 为 3 批葛根总黄酮样品。

### 2.3 苦瓜总皂苷色谱图

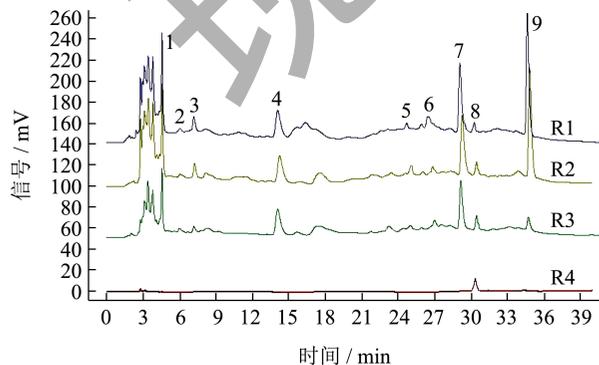


图3 苦瓜总皂苷色谱图

Fig.3 The chromatograms of bitter melon saponin

注: R4 为苦瓜苷 A 对照品, R1~R3 为 3 批苦瓜总皂苷样品。

如图 3 所示, 3 批苦瓜总皂苷色谱峰组成与出峰时间基本一致, 共界定 9 个色谱峰, 其中 8 号峰为苦瓜苷 A。

### 2.4 山药多糖 DEAE-Cellulose52 洗脱曲线

如图 4 所示, 据报道, 以水洗脱得到的峰为中性多糖, 不同浓度氯化钠溶液洗脱得到的峰为酸性多糖<sup>[20]</sup>, 得出山药水溶性多糖主要由 1 个中性多糖和 2 个酸性多糖组成, 第一个峰为以去离子水洗脱的中性多糖, 第二、三峰为以不同浓度氯化钠溶液洗脱的酸性多糖。

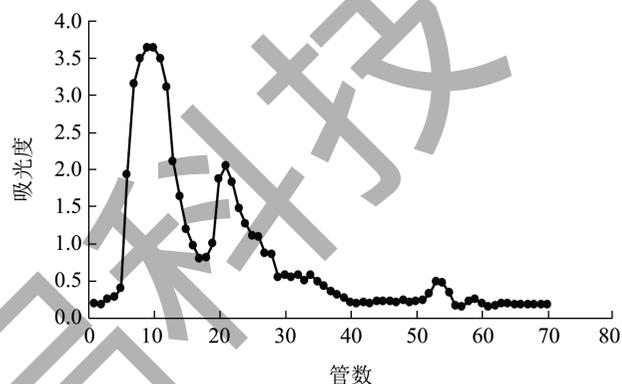


图4 山药多糖 DEAE-Cellulose52 洗脱曲线

Fig.4 Yam polysaccharide elution curve in DEAE-Cellulose52

### 2.5 食品组合物桑瓜饮 HPLC-ELSD 分析

如图 5 所示, 食品组合物桑瓜饮中共标定出 11 个色谱峰, 其中峰 1 与大豆苷元出峰时间一致, 峰 4 与大豆苷出峰时间一致, 峰 5 与葛根素出峰时间一致, 峰 8 与苦瓜苷 A 出峰时间一致, 峰 11 与 1-DNJ 出峰时间一致, 经过与各个组分 ELSD 图谱对比, 可以发现峰 1、4、5、6、7、9、10 来源于葛根总黄酮组分, 峰 2、3、8 来源于苦瓜总皂苷组分, 峰 11 来源于桑叶总生物碱组分。

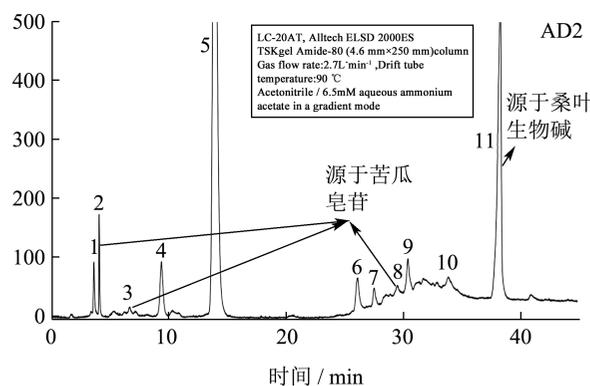


图5 桑瓜饮色谱图

Fig.5 The chromatograms of Sang-Gua-Yin

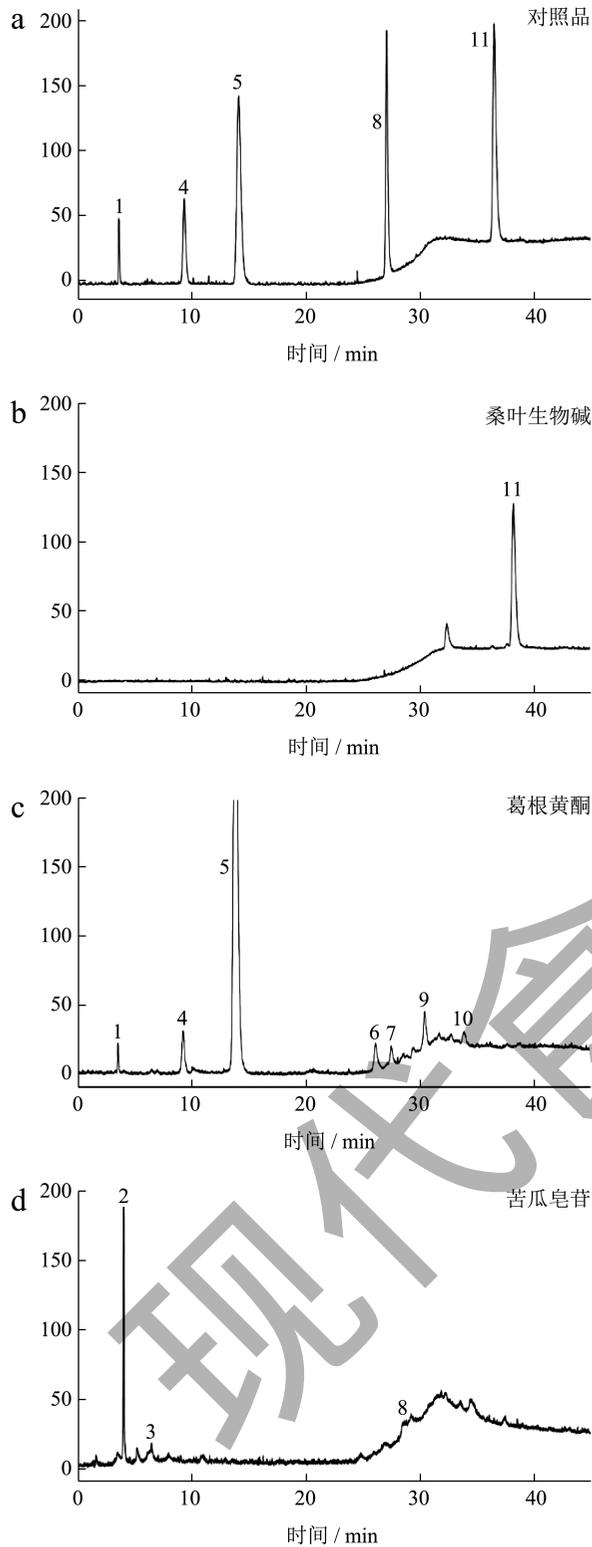


图6 食品组合桑瓜饮化学成分色谱峰归属  
Fig.6 Chromatographic peaks' location

### 2.6 食品组合物桑瓜饮的LC-MS/MS分析

前期首先用高效液相色谱法优化了色谱条件, 以令色谱峰尽可能达到基线分离, 然后稍加调整质谱条件, 获取尽量多的裂解信息, 分别在正负离子

模式下检测, 根据对应色谱峰保留时间推断分子离子峰, 由氮率推测元素组成, 结合参考文献和相应的碎片离子等信息, 共分析鉴定出16个化合物, 将已有标准品分析进行比对, 具体数据结果见表2。标准品及样品总离子流图如图7、8、9所示。

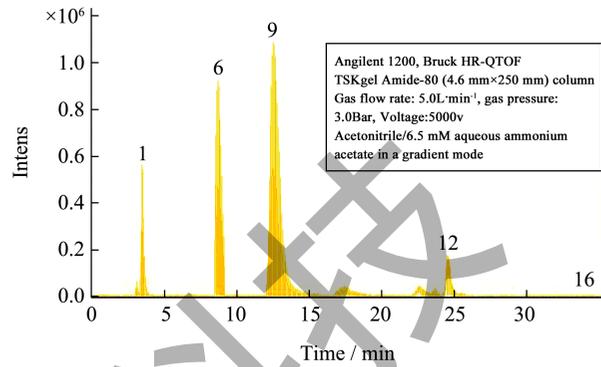


图7 标准品正离子模式总离子流图

Fig.7 HPLC-MS chromatogram of standard substance

注: 1为大豆苷元, 6为大豆苷, 9为葛根素, 12为苦瓜苷A, 16为1-DNJ。

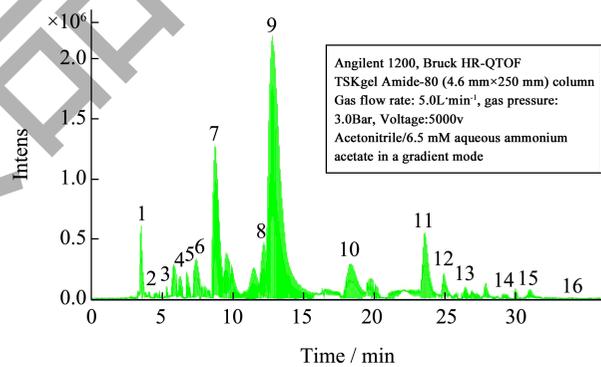


图8 食品组合桑瓜饮样品正离子模式总离子流图

Fig.8 HPLC-MS chromatogram of Sang-Gua-Yin MCCM in positive ion mode

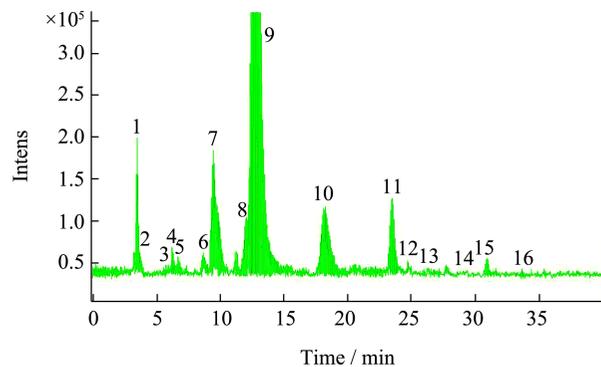


图9 桑瓜饮样品负离子模式总离子流图

Fig.9 HPLC-MS chromatogram of Sang-Gua-Yin MCCM in negative ion mode

表 2 食品组合桑瓜饮化学成分鉴定  
Table 2 Chemical constituents identified in Sang-Gua-Yin

峰号	时间 /min	[M+H] <sup>+</sup>		[M-H] <sup>-</sup>		准分子离子和碎片离子 /ESI <sup>+</sup>	准分子离子和碎片离子 /ESI <sup>-</sup>	化合物推测
		理论值	实测值	理论值	实测值			
1	3.5	255.237	255.4	253.237	253.4	255.4	253.4, 223, 133	大豆苷元
2	4.1	649.866 9	648.8	647.866 9	647.8	671.8, 509.7	647.8	Momordicoside K
3	5.3	459.414 8	459.7	457.414 8	457.5	459.7, 255.3	457.5	6''-O-Acetyldaidzin
4	6.2	475.160 4	475.8	473.160 4	473.2	475.8, 313.4, 107.2	473.2	Pueroside D
5	6.8	433.377 5	433.4	431.377 5	431.4	433.4, 271.3	431.4	染料木苷
6	8.7	417.378 1	417.8	415.378 1	415.5	417.8, 255.3	415.5	大豆苷
7	9.5	433.377 5	433.8	431.377 5	431.4	433.8, 415.2, 313.1	431.4	3'-羟基葛根素
8	12.3	447.404 1	447.7	445.404 1	445.7	447.7, 429.3, 327.1	445.7	3'-甲氧基葛根素
9	12.8	417.378 1	417.6	415.378 1	415.4	417.6, 399.7, 297.3	415.4	葛根素
10	18.4	565.139 5	565.8	563.139 5	563.6	565.8, 433.1, 313.1, 285.1	563.6	3'-氢化葛根素木糖苷
11	23.6	549.144 6	549.2	547.144 6	547.6	549.2, 417.8, 297.9	547.6	葛根素-7-O-木糖苷
12	24.4	818.012 1	818.4	816.012 1	816.3	818.4	816.3, 654, 492	苦瓜苷 A
13	26.4	549.492 7	549.9	547.492 7	547.6	549.9, 297.9, 253.2	547.6	葛根素-6''-O-木糖苷
14	29.2	579.151 2	579.9	577.151 2	577.2	579.9, 417.4, 297.3	577.2	Puerarin-7-O-glucoside
15	31.1	579.151 2	579.9	577.151 2	577.2	579.9	577.2, 457.2	葛根素-4'-O-β-D-葡萄糖苷
16	34.4	164.171 7	164.3	162.171 7	162.1	327, 164.3, 146.2	162.1	1-DNJ

峰 1 正离子模式下给出准分子离子峰为  $m/z$  255.4 [M+H]<sup>+</sup> 且相对丰度为 100%，与大豆苷元的质谱图一致，确认此化合物为大豆苷元，裂解途径如图 10 所示。

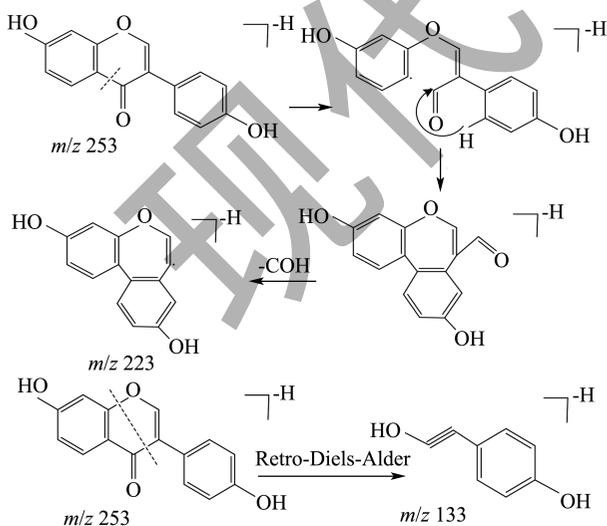


图 10 大豆苷元可能的裂解途径

Fig.10 Possible fragmentation mechanism of daidzein

峰 2 正离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  671.8 [M+Na]<sup>+</sup>，负离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  647.8

[M-H]<sup>-</sup>，推测分子量为 648，元素组成为 C<sub>37</sub>H<sub>60</sub>O<sub>9</sub>，结合碎片离子峰  $m/z$  509.7[M+Na-glc]<sup>+</sup>，推测该化合物为苦瓜苷 K，裂解途径如图 11 所示。

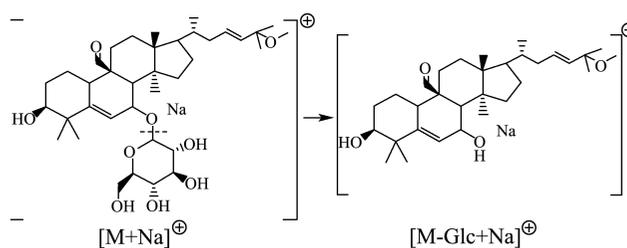


图 11 苦瓜苷 K 可能裂解途径

Fig.11 Possible fragmentation mechanism of momordicoside K

峰 3 正离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  459.7[M+H]<sup>+</sup>，负离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  457.5[M-H]<sup>-</sup>，确定分子量为 458，根据碎片离子峰  $m/z$  255.3，说明存在大豆苷元结构，根据文献报道<sup>[22]</sup>，推测为 6''-O-乙酰基大豆苷 (6''-O-acetyldaidzin)，推测裂解途径如图 12 所示。

峰 4 根据正离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  475.8，负离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  473.2 推测其分子量为 474，正离子模式下其碎片峰  $m/z$  313.4 为 [M+H-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup>， $m/z$  107.2 为 [M+H-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>-

$C_{11}H_9O_3]^+$ ，与文献报道一致，推测为 Pueroside D。

峰 5 正离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  433.4 $[M+H]^+$ ，负离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  431.4 $[M-H]^-$ ，故其分子量为 432，根据碎片离子  $m/z$  271.3，推测为染料木苷 (Genistin)，结构式如图 13 所示，其与峰 7 为同分异构，区别在于峰 5 没有  $m/z$  313 碎片峰。

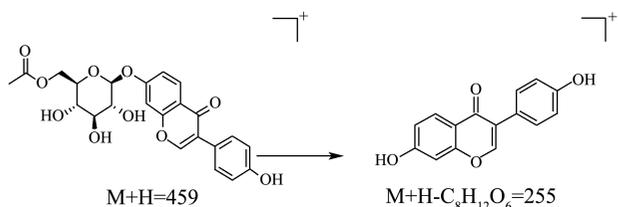


图 12 6''-O-Acetyldaidzin 可能裂解途径

Fig.12 Possible fragmentation mechanism of 6''-O-Acetyldaidzin

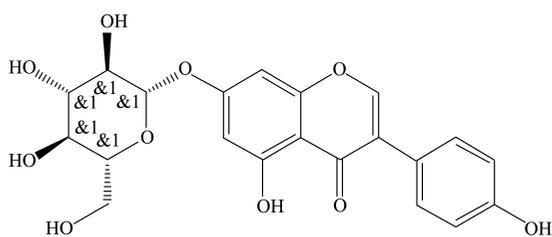


图 13 染料木苷结构式

Fig.13 Genistin structure

峰 6 和峰 9 在正离子模式下，准分子离子峰相近，推测可能是大豆苷和葛根素，根据大豆苷和葛根素的裂解规律，和不同碎片离子峰及其强度推断出峰 9 为葛根素，峰 6 为大豆苷，后经对照品比对验证正确，如图 14、15 所示。

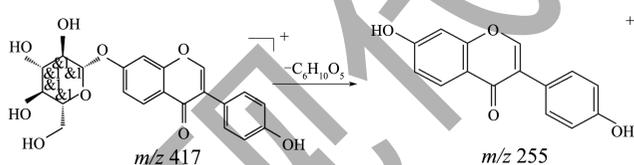


图 14 大豆苷裂解途径

Fig.14 Fragmentation process of daidzin

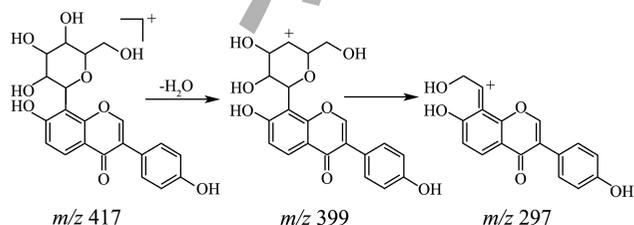


图 15 葛根素裂解途径

Fig.15 Fragmentation process of puerarin

峰 7 正离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  433.8 $[M+H]^+$ ，碎片峰有  $m/z$  415.2、 $m/z$  313.1，其中  $m/z$  313.1

符合  $[M-120+H]^+$  规律。因此，该成分应为碳苷，经过比对已报道的色谱数据，确认此化合物应为 3'-羟基葛根素，结构式如图 16 所示。

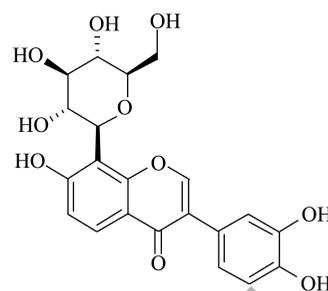


图 16 3'-羟基葛根素结构式

Fig.16 3'-hydroxy puerarin structure

峰 8 正离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  447.7 $[M+H]^+$ ，负离子模式下为  $m/z$  445.7 $[M-H]^-$ ，正离子模式下碎片峰为  $m/z$  429.3 $[M+H-H_2O]^+$ 、 $m/z$  411.1 $[M+H-2(H_2O)]^+$ 、 $m/z$  327.1 $[M+H-120]^+$ 、 $m/z$  284.3 $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$ ，此化合物也为碳苷，比对已报道的质谱数据<sup>[22-25]</sup>，确认此化合物是 3'-甲氧基葛根素 (3'-Methoxypuerarin)。

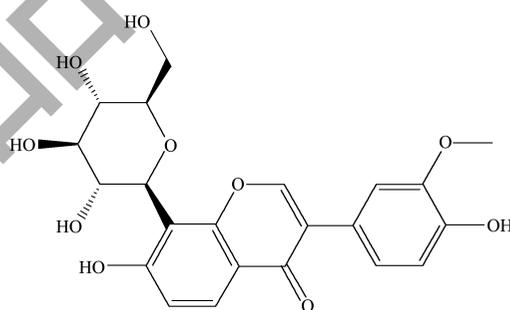


图 17 3'-甲氧基葛根素结构式

Fig.17 3'-Methoxypuerarin structure

峰 10 通过正负离子模式分析可知分子量为 564，正离子模式下有碎片峰  $m/z$  433.1、 $m/z$  313.1、 $m/z$  285.1，参考文献可知<sup>[23-26]</sup>，此化合物的结构为 3'-氢化葛根素木糖苷。

峰 11 正离子模式下有准分子离子峰  $m/z$  549.2 $[M+H]^+$ ，负离子模式下有分子离子峰  $m/z$  547.6 $[M-H]^-$ ，确定分子量为 548，比葛根素分子量大 132，考虑多了一个木糖基，正离子模式下，有碎片离子  $m/z$  417.8 $[M+H-C_5H_8O_4]^+$ ， $m/z$  297.9 $[M+H-C_5H_8O_4-120]^+$ ，推测为葛根素-7-木糖苷。

峰 12 经正负离子模式分析分子量为 817，负离子模式下碎片离子峰为  $m/z$  654 $[M-H-Glc]^-$ 、 $m/z$  492 $[M-H-2Glc]^-$ ，参照对照品可推断为苦瓜苷 A，推测裂解途径如图 18 所示。

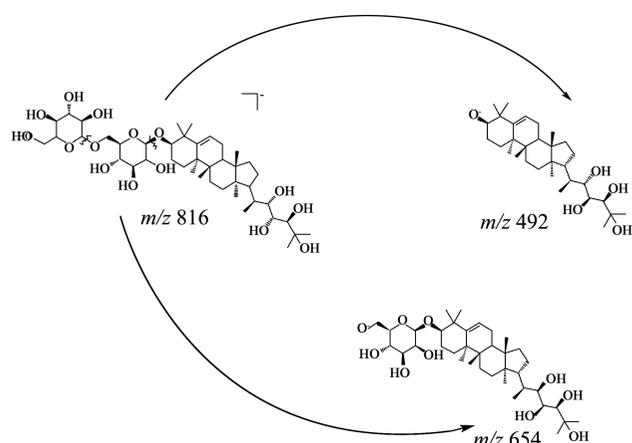


图 18 苦瓜苷 A 可能裂解途径

Fig.18 Possible fragmentation mechanism of momordicoside A

峰 13 分子量同样为 548, 与峰 11 为同分异构体, 不同之处在峰 13 多了  $m/z$  253.2 这个碎片离子,  $m/z$  253.2 碎片离子的出现说明五碳糖是直接与大豆昔元的母核上, 而不是连在大豆昔元的母核上, 因为大豆昔元的 7-O-糖苷键很容易断裂, 碎片离子峰的相对丰度比分子离子峰高; 根据以上分析, 确认此化合物为葛根素 -6"-O-木糖苷。

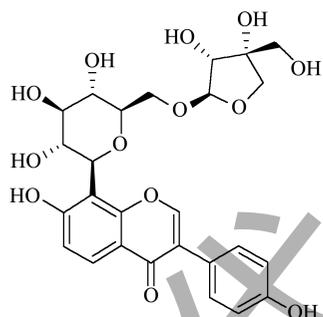


图 19 葛根素 -6"-O-木糖苷结构式

Fig.19 Puerarin-6''-O-xyloside structure

峰 14 正离子模式下有  $m/z$  579.9[M+H]<sup>+</sup>, 负离子模式下有  $m/z$  577.2[M-H]<sup>-</sup>, 确定分子量为 578, 比葛根素分子量大 162, 考虑多了一个葡萄糖基, 正离子模式下, 有碎片离子  $m/z$  417.4[M+H-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup>、 $m/z$  297.3[M+H-C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>-120]<sup>+</sup>, 推测为葛根素 -7-O-葡萄糖苷。

峰 15 正离子模式下有  $m/z$  579.9[M+H]<sup>+</sup>, 负离子模式下有  $m/z$  577.2[M-H]<sup>-</sup>, 确定其分子量为 578, 与峰 14 为同分异构体, 通过查阅文献, 负离子模式下有  $m/z$  457.2[M-H-120]<sup>-</sup>, 推测为葛根素 -4'-O-β-D-葡萄糖苷<sup>[23-26]</sup>, 裂解途径如图 20 所示。

峰 16 正离子模式下有  $m/z$  164.3[M+H]<sup>+</sup>, 相对丰度为 100%, 失去 1 个 H<sub>2</sub>O 后形成碎片离子峰  $m/z$  146.2,

与标准品一致, 鉴定为 1-DNJ, 推测其裂解途径如图 21 所示。

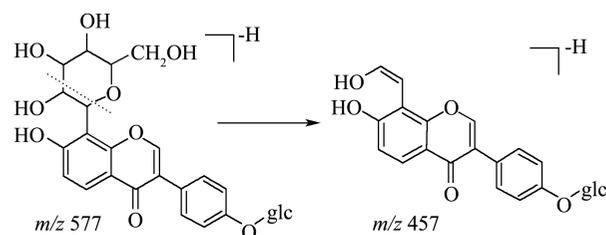


图 20 葛根素 -4'-O-β-D-葡萄糖苷可能裂解途径

Fig.20 Possible fragmentation mechanism of puerarin-4'-O-β-D-glucoside

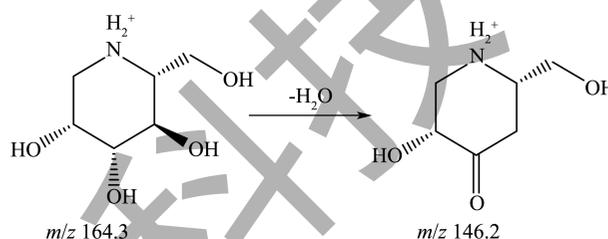


图 21 1-DNJ 可能裂解途径

Fig.21 Possible fragmentation mechanism of 1-Deoxynojirimycin

### 3 结论

根据食品组合物桑瓜饮 HPLC-ELSD 分析结果提示, 11 个色谱峰均找到其相应归属, 其中 7 种成分属于葛根总黄酮, 3 种成分属于苦瓜总皂苷, 1 种成分属于桑叶总生物碱, 表明葛根和苦瓜对化学成分谱色峰的贡献最大。LC-MS/MS 化学成分分析结果表明, 分析鉴定出的 16 个化合物, 其中 13 个来自于葛根总黄酮, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> 为骨架的 2-苯基色原酮是其结构母核, 异黄酮类化合物因取代基的类型和位置不同, 以及与结合的糖链类型、数目、位置不同而异, 存在着许多同分异构体。

本试验通过 HPLC-ELSD 技术所建立的桑瓜饮色谱图研究方法简便可靠, 与 LC-MS/MS 化学成分分析相结合, 可为其指纹图谱的研究与质量控制奠定基础。

### 参考文献

- [1] ZHOU B, LU Y, HAJIFATHALIAN K, et al. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants [J]. Lancet, 2016, 387(10027): 1513-1530.
- [2] CHATTERJEE S, KHUNTI K, DAVIES MJ. Type 2 diabetes [J]. Lancet, 2017, 389(10085): 2239-2251.

- [3] 黄浏姣,陈运中,李家庚.李家庚运用桑瓜饮治疗糖尿病的经验[J].湖北中医杂志,2016,38(1):32-33.
- [4] 汪莹.桑瓜饮降血糖作用的有效部位筛选[D].武汉:湖北中医药大学,2016.
- [5] 汪莹,蔡羽,植飞,等.桑瓜饮降血糖作用的有效部位筛选[J].湖北中医药大学学报,2016,18(3):50-53.
- [6] 邢琪昌,汪莹,植飞,等.桑瓜饮对2型糖尿病大鼠降血糖作用考察及机制初探[J].时珍国医国药,2016,27(9):2101-2103.
- [7] 蔡羽.桑瓜饮干预2型糖尿病大鼠的作用及其PI3K/Akt信号通路机制研究[D].武汉:湖北中医药大学,2018.
- [8] 张倩,张立华.桑叶的化学成分及开发利用进展[J].湖北农业科学,2020,59(15):16-19.
- [9] 周潇恬,罗非君.苦瓜的功能成分和生物活性研究进展[J].现代食品,2020,10:66-71.10
- [10] 李树欣.葛根的化学成分及药理作用的研究进展[J].辽宁化工,2020,49(11):1412-1413.
- [11] 陈梦雨,刘伟,俞桂新,等.山药化学成分与药理活性研究进展[J].中医药学报,2020,48(2):62-66.
- [12] Asano N, Nash R J, Molyneux R J, et al. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, 11 (8):1645-1680.
- [13] 徐灵源,黎荣,梁韬,等总黄酮逆转链脲佐菌素诱导糖尿病小鼠胰腺损伤的研究[J].中国实验方剂学杂志,2013, 19(8):231-234.
- [14] 马春宇,于洪宇,王慧娇,等.苦瓜总皂苷对2型糖尿病大鼠降血糖作用机制的研究[J].天津医药,2014,42(4):321-324.
- [15] 邢文会,侯金丽,韩鸿鹏,等.山药多糖对 I 型糖尿病小鼠血糖和抗氧化能力的影响[J].食品研究与开发,2014, 35(17):107-110.
- [16] 金蕊,程银祥,韩凤梅,等.山药多糖对 I 型糖尿病大鼠血糖血脂及肝肾氧化应激的影响[J].湖北大学学报(自然科学版),2016,38(4):298-302.
- [17] 植飞,邢琪昌,汪莹,等.佛手山药多糖对2型糖尿病大鼠糖脂代谢及氧化应激的影响[J].食品科学,2017,38(5):262-266.
- [18] 叶祖光.中药复方与组分中药[J].中国新药杂志,2011, 20(16):1487-1489.
- [19] TOSHIYUKI KIMURA, KIYOTAKA NAKAGAWA, YUKO SAITO, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2004, 52(6): 1415-1418.
- [20] ZHANG BZ, INNGJERDINGEN KT, ZOU YF, et al. Characterisation and immunomodulating activities of exopolysaccharides from submerged cultivation of *Hypsizigus marmoreus* [J]. *Food Chem*, 2014, 163: 120-128.
- [21] 宋成武.苦丁茶的降血糖活性物质基础与作用机理研究[D].武汉:湖北中医药大学,2014.
- [22] 夏建丽.天然药物葛根、黄芩中黄酮类活性成分的筛选及分离纯化研究[D].长春:长春师范大学,2021.
- [23] 何天雨,王璐,李林,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的经典名方竹茹汤化学成分鉴定及网络药理学研究[J].中国中药杂志,2022,47(19):5235-5245.
- [24] 樊晓莹,付娟,胡军,等.UPLC-Q-TOF-MS/MS快速分析六味地黄苷糖片化学成分[J].中草药,2021,52(21):6473-6484.
- [25] 陈俊,陈聪,彭小芝,等.基于UPLC-Q/TOF-MS/MS的葛根黄芩黄连汤主要成分分析及鉴定[J].中药材,2019,42(9): 2074-2078.
- [26] 孙冬梅,董玉娟,胥爱丽,等.葛根枳椇软胶囊中黄酮类化合物的UPLC/Q-TOF-MS快速分析[J].中草药,2015, 46(7):970-976.