

利用全碰撞能二级质谱区分 4 个三萜酸同分异构体

吴丽娟^{1,2}, 南瑞茹², 王倩^{1,2}, 陈欣², 刘文静³, 宋月林¹

(1. 北京中医药大学, 北京中医药研究院, 中药现代研究中心, 北京 102401; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102401;

3. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 本研究采用全碰撞能二级质谱(FCER-MS²)区分 4 个三萜酸同分异构体, 利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱(UPLC-QE-Qorbitrap-MS)采集熊果酸、齐墩果酸、 α -乳香酸和 β -乳香酸的高分辨质谱数据, 归属各碎片离子。利用在线能量分辨质谱(online ER-MS)法进一步采集主要碎片离子在不同碰撞能下的丰度变化, 通过“S”曲线或高斯曲线拟合, 归一化后构建 FCER-MS² 图谱; 计算[M+H]⁺的半数响应碰撞能(CE₅₀)、碎片离子的最佳碰撞能(OCE)、最大相对离子丰度(RII_{max})等参数, 并将其应用于同分异构体的区分。通过高分辨数据中特征性碎片离子可将 4 个化合物初步分为 I(熊果酸和齐墩果酸)和 II(α -乳香酸和 β -乳香酸)2 组同分异构体。FCER-MS² 图谱表明, I 组化合物碎片离子 m/z 411 的 OCE 和 m/z 439 的 RII_{max} 均有显著差异; II 组化合物碎片离子 m/z 163 和 121 的 OCE, m/z 439、219 和 205 的 RII_{max} 均有显著差异。FCER-MS² 图谱还包含了 m/z 、CE₅₀、OCE 和 RII_{max} 等信息, 全面呈现了[M+H]⁺的质谱裂解行为, 可为区分细微结构差异的三萜酸同分异构体提供有效的分析工具。

关键词: 在线能量分辨质谱(online ER-MS); 裂解曲线; 三萜酸; 同分异构体

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2025)01-0003-08

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0031

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0031

Isomeric Differentiation of Four Triterpene Acids Using Full Collision Energy Ramp-MS² Analysis

WU Li-juan^{1,2}, NAN Rui-ru², WANG Qian^{1,2}, CHEN Xin², LIU Wen-jing³, SONG Yue-lin¹

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing Research Institute of Chinese Medicine, Beijing

University of Chinese Medicine, Beijing 102401, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of

Chinese Medicine, Beijing 102401, China; 3. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine,

Zhengzhou 450046, China)

Abstract: Triterpene acids, a subclass of acidic triterpenoids existing in their free state, are widely distributed throughout traditional Chinese medicine (TCM). These compounds, characterized by their ring system structures, can be further categorized into several subtypes, primarily tetracyclic and pentacyclic triterpenoid acids. The structural variability is attributed to varying conjugation types and sites, resulting in numerous isomeric forms, thereby posing significant challenges to the precise identification of triterpene acids. Various methods have been employed to differentiate triterpene acid isomers, including liquid chromatography, mass spectrometry, and chemical derivatization coupled

with mass spectrometry. However, these techniques often rely on reference standards or necessitate intricate sample preparation procedures, rendering them less suitable for the analysis of TCMs due to the complexity of their matrices. Therefore, there is an urgent need to find a new method to distinguish triterpene acid isomers. Herein, four triterpene acid isomers were successfully differentiated using full collision energy ramp-MS² (FCER-MS²) analysis. Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole exactive-Orbitrap mass spectrometry (UPLC-QE-Qorbitrap-MS) was deployed to acquire high-resolution m/z values for four triterpene acid isomers, namely ursolic acid, oleanolic acid, α -boswellic acid and β -boswellic acid. Their mass fragmentation pathways were proposed by carefully assigning ion signals. The abundances of precursor and product ions at step-wise collision energy values were recorded using online energy-resolved mass spectrometry (online ER-MS). FCER-MS² spectra were configured by assembling sigmoid- and Gaussian-shaped breakdown graphs of those primary MS² spectral signals after appropriate data normalization. The parameters, such as collision energy at the half survival rate (CE₅₀) of precursor ions, the optimal collision energy (OCE) of primary fragment ion species and the maximal relative ion intensity (RII_{max}) were calculated from those regressive equations, and subsequently were applied for isomers differentiation. The four isomers were firstly divided into two groups, designated as group I (ursolic acid and oleanolic acid) and group II (α -boswellic acid and β -boswellic acid) through the existences of the so-called diagnostic fragment ions. Moreover, the two isomers belonging to group I show different OCE and RII_{max} values for m/z 411 and 439, respectively. When concerning the two isomers in group II, significant differences occur on OCE values for m/z 163 and 121, and RII_{max} values for m/z 439, 219 and 205, particularly the RII_{max} ranking positions of m/z 439 and 219. FCER-MS² spectra also include m/z , CE₅₀, OCE and RII_{max} features, which can comprehensively cover the mass fragmentation behaviors of precursor ions, and they are therefore an eligible tool to advance structural identification confidence of triterpene acids.

Key words: online energy-resolved mass spectrometry (online ER-MS); breakdown graph; triterpene acids; isomers

三萜酸是一类以游离态存在的酸性三萜类化合物,根据环系结构可分为四环三萜酸和五环三萜酸,因取代基种类和连接方式的多样性导致其同分异构体众多,为三萜酸类成分的准确鉴定带来了极大挑战^[1]。以熊果酸和齐墩果酸为例,两者为1组同分异构体,仅在E环甲基取代位置有差异,但在临床应用和药理活性方面存在显著差异^[2-3]。有研究采用液相色谱^[4]、质谱^[5]和样品衍生化^[6]等方法实现了熊果酸和齐墩果酸的区分,但这些方法或依赖于标准品,或需要复杂的样品前处理,并不完全适用于分析中药等复杂基质,故亟需寻找新的方法以实现熊果酸和齐墩果酸及其他三萜酸类同分异构体的区分。

能量分辨质谱(ER-MS)法可用于研究前体离子在不同碰撞能(collision energy, CE)下裂解生成碎片离子的丰度变化,进而研究离子分解反

应机理,已被用于区分同分异构体^[7]。本课题组在ER-MS基础上创建了在线能量分辨质谱(online ER-MS)法,可获得前体离子的半数响应碰撞能(CE₅₀)、碎片离子的最佳碰撞能(OCE)等质谱信息,实现不依赖于对照品的化合物同分异构体的精准区分^[8]。为了全面呈现前体离子的所有质谱裂解行为,提出了全碰撞能二级质谱(FCER-MS²)概念,其由前体离子和主要碎片离子的裂解曲线组成,包含 m/z 、前体离子的CE₅₀、以及主要碎片离子的OCE和最大相对离子丰度(RII_{max})等信息,可以进一步助力同分异构体的准确鉴定^[9-10]。

本研究以熊果酸、齐墩果酸、 α -乳香酸和 β -乳香酸4个同分异构体为例,利用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱(UPLC-QE-Qorbitrap-MS)采集化合物的高分辨MS¹和MS²

等数据,分析其质谱裂解行为。通过在线 ER-MS 法获得前体离子和所有碎片离子在不同 CE 下的质谱响应值,并构建 FCER-MS² 图谱,深入全面分析三萜酸类化合物质谱裂解行为的差异,以期实现三萜酸类同分异构体的有效区分。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

LC-20AD_{XR} 型分析型高效液相色谱仪:日本 Shimadzu 公司产品,配有 LC-20AD_{XR} 二元高压泵、DGU-20A 真空脱气机、SIL-20AD 自动进样器、CTO-20AC 柱温箱和 PDA 检测器;Q-ExactiveTM Orbitrap 质谱仪:美国 Thermo-Fisher 公司产品,配有电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur 2.2.0 数据处理系统;SCIEX Qtrap 5500 质谱仪:美国 SCIEX 公司产品,配有 ESI 源及 Analyst 1.6.3 数据处理系统;XS105 型电子分析天平:瑞士 Mettler-Toledo 公司产品;Milli-Q 超纯水系统:美国 Millipore 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

对照品:熊果酸(批号: B21403)、齐墩果酸(批号: B20954)为上海源叶生物科技有限公司产品; α -乳香酸(批号: PS010980)为成都普思生物科技股份有限公司产品; β -乳香酸(批号: DSTDR005701)为成都德思特生物技术有限公司产品;各化合物经高效液相色谱(HPLC)法检测,纯度均大于 98%。甲醇、甲酸、乙腈:均为质谱级,美国 Thermo-Fisher 公司产品;二甲基亚砜(DMSO):美国 Sigma 公司产品;超纯水(18.2 M Ω ·cm):由 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.3 样品制备

精密称取适量的各对照品,用 DMSO 溶解,配制成 1.0 g/L 对照品储备液。吸取适量的各对照品储备液,用 50%甲醇稀释,得到 100 mg/L 对照品溶液。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 型色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm $\times$ 1.8 μ m);流动相: A 相为 0.1%甲酸水溶液, B 相为 0.1%甲酸乙腈溶液;以 95%B 等度洗脱 6 min;流速 0.25 mL/min;柱温 40 $^{\circ}$ C;进样量 2 μ L。

1.4.2 QE-Qbitrap-MS 条件 正离子模式;喷雾电压 3.6 kV;离子源温度 350 $^{\circ}$ C;鞘气流速 10.5 L/min;

辅助气流速 3 L/min;碰撞能量(CE)35 eV;碰撞能量扩展值(CES)15 eV;MS¹ 全扫描范围 m/z 100~550,分辨率 70 000 FWHM,自动增益控制目标离子数 1×10^6 ;MS² 谱图为数据依赖式采集(DDA)模式,质量扫描范围 m/z 50~550,分辨率 17 500 FWHM,自动增益控制目标离子数 1×10^5 。

1.4.3 Qtrap-MS 条件 正离子多反应监测(MRM)模式,离子喷雾电压(IS)5 500 V,离子化温度(TEM)500 $^{\circ}$ C,气帘气(CUR)压强 2.07×10^5 Pa,雾化气(GS1)压强 1.65×10^6 Pa,辅助气(GS2)压强 1.65×10^6 Pa,脱离子簇(DP)电压 60 V,第一四极杆(Q1)和第三四极杆(Q3)均为单位分辨率(0.6~0.8 u)。

1.5 构建全碰撞能二级质谱图

熊果酸、齐墩果酸、 α -乳香酸、 β -乳香酸的化学结构示于图 1。熊果酸和齐墩果酸的羧基取代在 C-28 位,结构差异在于 E 环甲基取代位置; α -乳香酸和 β -乳香酸的羧基取代在 C-4 位,结构差异同样在于 E 环甲基取代位置。基于检测到的高分辨质谱数据,对熊果酸和齐墩果酸构建 20 个离子对,分别为 m/z 457.3>457.3、457.3>439.3、457.3>411.3、457.3>393.3、457.3>249.3、457.3>231.3、457.3>217.3、457.3>203.3、457.3>191.3、457.3>189.3、457.3>177.3、457.3>175.3、457.3>163.3、457.3>149.3、457.3>135.3、457.3>133.3、457.3>121.3、457.3>109.3、457.3>107.3、457.3>95.3;对 α -乳香酸和 β -乳香酸构建 20 个离子对,分别为 m/z 457.3>457.3、457.3>439.3、457.3>373.3、457.3>361.3、457.3>239.3、457.3>237.3、457.3>221.3、457.3>219.3、457.3>205.3、457.3>191.3、457.3>175.3、457.3>163.3、457.3>161.3、457.3>149.3、457.3>147.3、457.3>135.3、457.3>123.3、457.3>121.3、457.3>109.3、457.3>95.3。每个离子对衍生出一系列拟离子对(PITs)。以离子对 m/z 457.3>457.3 为例,其拟离子对分别为 m/z 457.300>457.300、457.300>457.301……457.300>457.350,每个 PIT 采集时间(dwelling time)为 5 ms,对应碰撞能 5、7、9、11……105 eV;利用 UPLC-Qtrap-MS 采集各离子对在不同 CE 下的质谱响应值,使用 Analyst 1.6.3 软件对色谱峰积分,分别定义前体离子对 m/z 457.3>457.3 和碎片离子对中最大响应值为 1,计算各离子对的相对响应值;将碰撞能和相对响应值导入 GraphPad

Prism 9.0 软件(美国 San Diego, CA), 前体离子对和碎片离子对的裂解曲线分别通过“S”曲线和高斯曲线拟合, 构建 FCER-MS² 图谱, 前体离子

对半数相对响应值和碎片离子对最大相对响应值所对应的 CE 分别为 CE₅₀、OCE, 基于 FCER-MS² 图谱获得各离子对的 CE₅₀、OCE 和 RII_{max} 等参数。

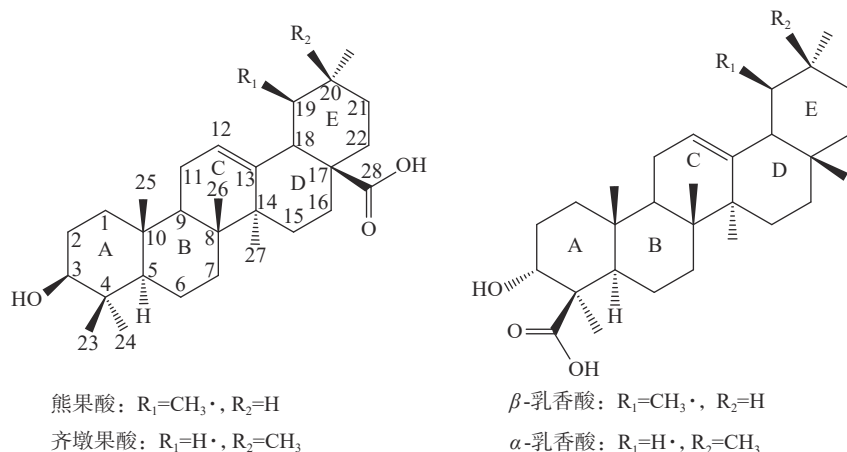


图1 熊果酸、齐墩果酸、 α -乳香酸、 β -乳香酸的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of ursolic acid, oleanolic acid, α -boswellic acid and β -boswellic acid

2 结果与讨论

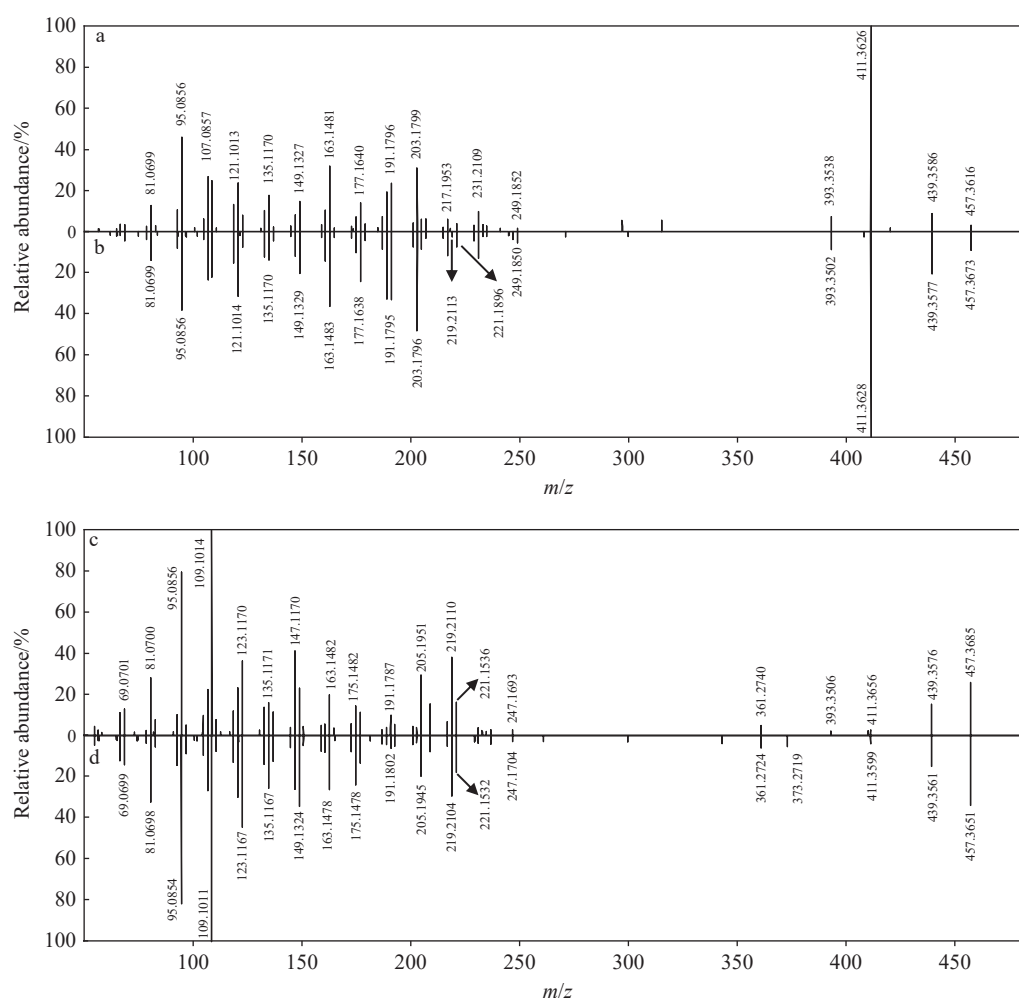
2.1 高分辨多级质谱行为分析

高分辨质谱数据表明, 熊果酸、齐墩果酸、 α -乳香酸和 β -乳香酸在负离子模式下的碎片离子信息较少, 仅发生 H_2O (18 u) 和 CO (28 u) 的中性丢失, 且相对强度较低。而在正离子模式下具有更丰富的 MS² 碎片信息, 同时能观察到 C 环的逆狄尔斯-阿德尔裂解反应 (Retro-Diels-Alder, RDA), 因此选取正离子模式用于后续分析。根据 MS² 图谱的相似程度将 4 个化合物分为 I 组 (熊果酸和齐墩果酸) 和 II 组 (α -乳香酸和 β -乳香酸)。

I 组中, 熊果酸和齐墩果酸的准分子离子峰分别为 m/z 457.361 6、457.367 3, 示于图 2a、2b, 主要碎片离子有 m/z 439 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 411 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 m/z 393 $[M+H-2H_2O-CO]^+$ 。 m/z 249、191 为 C 环 RDA 裂解的特征碎片, 随后 m/z 249 丢失 $HCOOH$ (46 u) 和 CH_2 (14 u) 生成 m/z 203、189 碎片离子, m/z 191 连续丢失 CH_2 生成 m/z 177、163、149、135 和 121 等系列碎片离子; m/z 231、217 为 D 环环裂后连续丢失 CH_2 得到的碎片离子。II 组 α -乳香酸和 β -乳香酸的准分子离子峰分别为 m/z 457.368 5、457.365 1, 示于图 2c、2d, 主要碎片离子有 m/z 439 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 411 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 、 m/z 361 $[M+H-C_7H_{12}]^+$ 。 m/z 221、219 为 C 环 RDA 裂解的特征碎片离子, 随后 m/z 221

发生 $HCOOH$ (46 u) 和连续的 CH_2 (14 u) 丢失, 生成 m/z 175、161、147、133 和 119 等碎片离子; m/z 219 连续丢失 CH_2 , 生成 m/z 205、191、177、163、149、135 和 121 等系列碎片离子。分析 2 组同分异构体的 MS² 数据发现, 它们都产生了许多相差 2 u 的簇离子峰, 这种现象在灵芝三萜酸中也有报道^[11]。

结合 MS² 碎片离子信息和文献数据^[12-13], 推测 2 组同分异构体可能的质谱裂解途径示于图 3。本研究通过分析羧基取代位置的差异, 探讨了利用保留羧基的 MS² 碎片离子确定羧基取代位置的可行性。当 C 环发生 RDA 裂解时, 熊果酸和齐墩果酸产生的 MS² 碎片离子为 m/z 249、191, 而 α -乳香酸和 β -乳香酸产生的碎片离子为 m/z 221、219。但是, 分析 MS² 图谱可以发现, 它们均产生了 m/z 221、219、191 碎片离子, 而 m/z 249 仅在熊果酸和齐墩果酸中被检测到, 但丰度较低, 有时甚至无法检测到。因此, 无法通过 C 环 RDA 裂解后保留羧基的 MS² 碎片离子来确定羧基取代位置。进一步比较 MS² 谱图发现, m/z 361 $[M+H-C_7H_{12}]^+$ 是 α -乳香酸和 β -乳香酸 E 环裂解产生的特征碎片离子, 在熊果酸和齐墩果酸中均未被检测到。因此, 可以根据 E 环裂解后保留羧基的 m/z 361 特征碎片离子确定羧基的具体取代位置。此外, 碎片离子 m/z 411、393 在熊果酸和

图2 熊果酸(a)、齐墩果酸(b)、 α -乳香酸(c)、 β -乳香酸(d)的 MS² 谱图Fig. 2 MS² spectra of ursolic acid (a), oleanolic acid (b), α -boswellic acid (c) and β -boswellic acid (d)

齐墩果酸中丰度较高,而在 α -乳香酸和 β -乳香酸中丰度极低甚至消失,也可以作为区分2组同分异构体的辅助手段。综上,可通过诊断是否存在碎片离子 m/z 361, 以及 m/z 411、393 丰度差异来判断羧基取代位点,并将4个同分异构体区分为I组(熊果酸和齐墩果酸)和II组(α -乳香酸和 β -乳香酸)。对于组内同分异构体,只存在甲基取代位点的微小差异,导致 MS² 谱图高度相似,因此,仅依赖常规的高分辨质谱数据无法实现区分。

2.2 全碰撞能二级质谱图分析

碎片离子丰度取决于其生成速率和后续的分解速率,理论上,碎片离子在不同 CE 条件下的丰度动态变化能够揭示其更细微的结构信息^[14-15]。FCER-MS² 谱图由前体离子和主要碎片离子在不同 CE 下的裂解曲线组成,包含的 m/z 、CE₅₀、

OCE 和 RII_{max} 信息分别与化合物元素组成、化学键解离能(BDE)和碎片离子焓值紧密相关,可以作为结构描述符用于同分异构体的准确区分^[9]。根据本课题组前期研究^[8],CE₅₀ 和 OCE 与色谱柱、流动相、梯度洗脱程序和仪器参数等无关,是化合物固有的理化参数。此外,前期实验数据显示,化合物的 OCE 误差值为 ± 0.3 eV, RII_{max} 误差值为 $\pm 10\%$ ^[9],表明 FCER-MS² 谱图的准确度高,足以用于同分异构体的准确区分。为了确保数据的准确性和可靠性,本研究选择 RII_{max} 大于 10%,拟合度 R^2 大于 95% 的离子对来绘制 FCER-MS² 谱图。

2.2.1 熊果酸和齐墩果酸的 FCER-MS² 谱图比较 基于高分辨质谱数据信息构建了 20 个候选离子对,经过初步筛选有 7 个离子对(m/z 457.3 > 457.3、457.3 > 439.3、457.3 > 411.3、457.3 > 203.3、

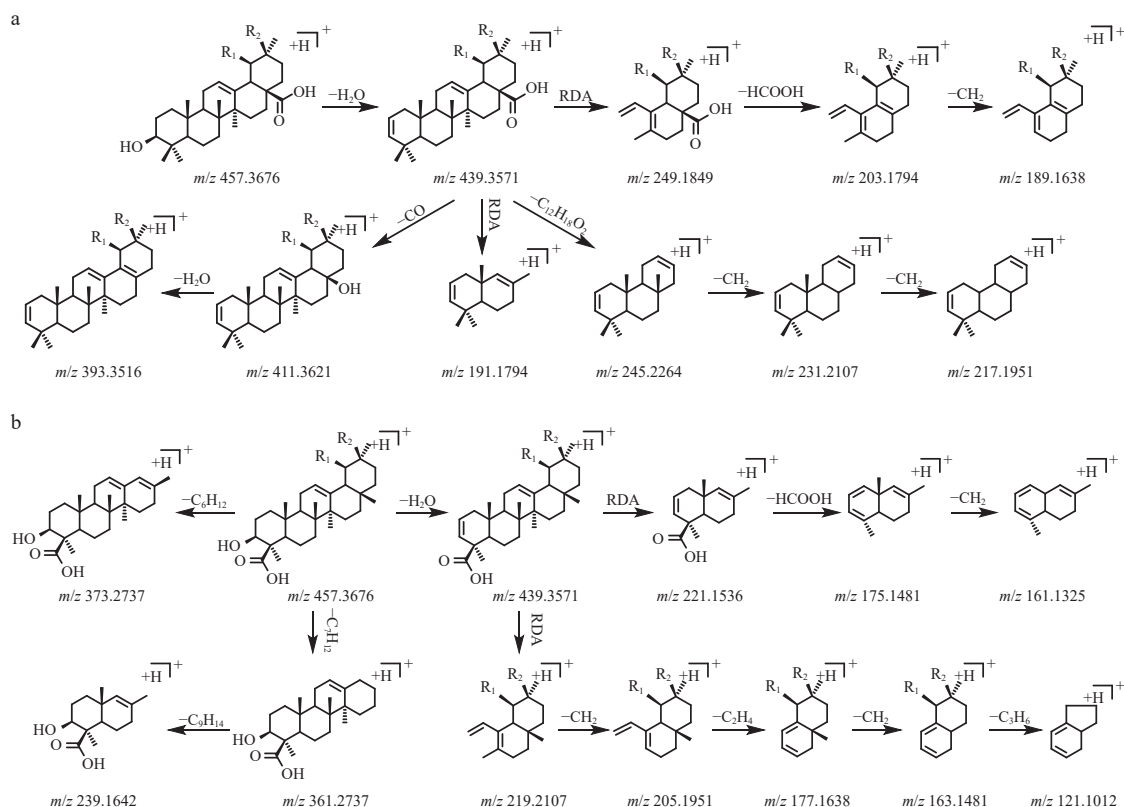


图3 熊果酸和齐墩果酸(a)、 α -乳香酸和 β -乳香酸(b)可能的质谱裂解途径

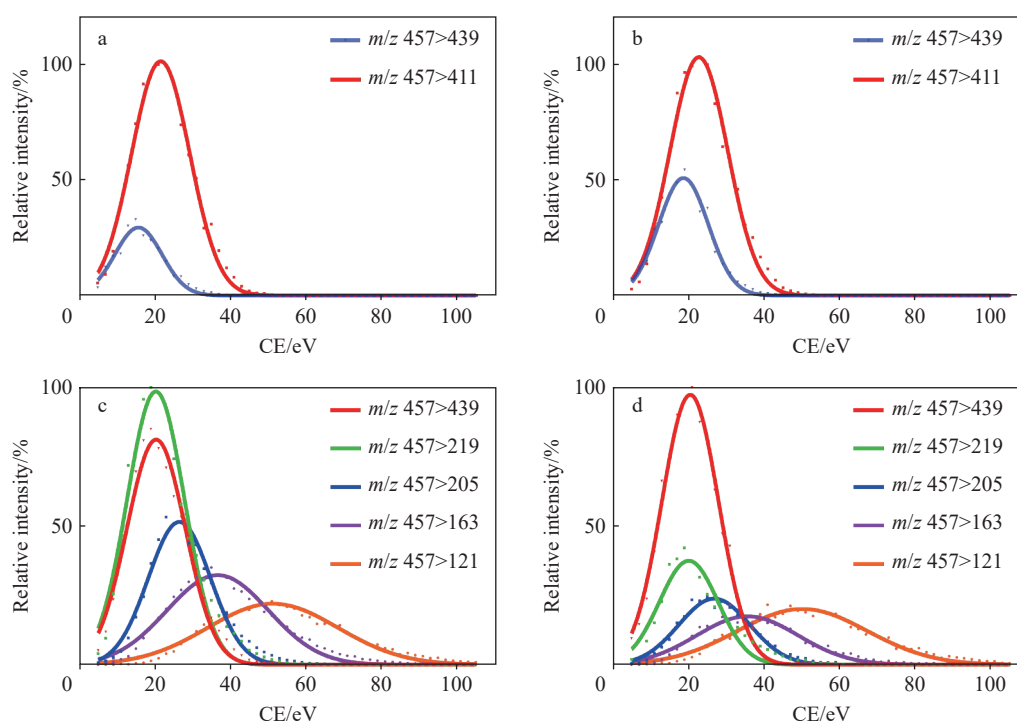
Fig. 3 Proposed fragmentation pathways of ursolic acid and oleanolic acid (a), α -boswellic acid and β -boswellic acid (b)

457.3>191.3、457.3>189.3、457.3>163.3)可用于构建 FCER-MS² 谱图。其中, 碎片离子对 m/z 457.3>439.3、457.3>411.3 的裂解曲线存在差异, 示于图 4a、4b, 碎片离子 m/z 411 的 ΔOCE 为 1.49 eV, m/z 439 的 $\Delta RII_{\max}$ 为 23.92%, 列于表 1。其中, 齐墩果酸丢失 CO(m/z 411, $OCE=23.87$ eV) 发生键断裂所需的能量大于熊果酸(m/z 411, $OCE=22.38$ eV), 推测是由于齐墩果酸 C-20 位偕二甲基的供电子效应使 C-28 位羧基电子云密度升高, 键能增大引起的。因此, 通过比较熊果酸和齐墩果酸碎片离子 m/z 411 的 OCE 及 m/z 439 的 $RII_{\max}$, 可以实现两者的准确区分。

2.2.2 α -乳香酸和 β -乳香酸的 FCER-MS² 谱图比较 前期构建了 20 个候选离子对, 最终选取 10 个离子对 (m/z 457.3>457.3、457.3>439.3、457.3>221.3、457.3>219.3、457.3>205.3、457.3>191.3、457.3>175.3、457.3>163.3、457.3>149.3、457.3>121.3) 绘制 FCER-MS² 谱图。其中, 碎片离子对 m/z 457>439、457>219、457>205、457>163、457>121 的裂解曲线有差异, 示于图 4c、

4d。碎片离子 m/z 163、121 的 ΔOCE 分别为 1.01、1.10 eV, 有较明显的区分; m/z 439、219、205 的 $RII_{\max}$ 存在显著差异, 且 m/z 439、219 的 $RII_{\max}$ 相对关系有所不同, α -乳香酸的 $RII_{\max m/z 439} < RII_{\max m/z 219}$, β -乳香酸的 $RII_{\max m/z 439} > RII_{\max m/z 219}$, 且 m/z 219 的 $\Delta RII_{\max}$ 为 62.47%, 是区分 α -乳香酸和 β -乳香酸的最有力证据, 结果列于表 1。推测碎片离子 m/z 163 的 OCE 差异可能是由于甲基取代位置不同造成的, α -乳香酸 C-20 位偕二甲基的供电子效应使 C-28 位甲基电子云密度升高、键能增大, 导致 α -乳香酸的 $OCE(36.67$ eV) 显著大于 β -乳香酸 (35.66 eV)。因此, 通过比较 α -乳香酸和 β -乳香酸碎片离子 m/z 163、121 的 OCE , m/z 439、219、205 的 $RII_{\max}$, 可以实现两者的准确鉴定。

即使 I 组和 II 组同分异构体组内差异仅表现为甲基取代位置的微小变化, 但对周围化学环境和化学键性质仍产生影响, 使得同一离子对的 OCE 和 $RII_{\max}$ 表现出显著差异。熊果酸和齐墩果酸的碎片离子 m/z 411 的 ΔOCE 为 1.49 eV, m/z 439 的 $\Delta RII_{\max}$ 为 23.92%; α -乳香酸和 β -乳香

图4 熊果酸(a)、齐墩果酸(b)、 α -乳香酸(c)、 β -乳香酸(d)差异碎片离子的裂解曲线Fig. 4 Breakdown graphs of distinguishing product ions for ursolic acid (a), oleanolic acid (b), α -boswellic acid (c) and β -boswellic acid (d)表1 熊果酸、齐墩果酸、 α -乳香酸和 β -乳香酸各离子对的最佳碰撞能和相对离子丰度Table 1 CE_{50} of the precursor ions and OCE and RII_{max} of fragmentation ions for ursolic acid, oleanolic acid, α -boswellic acid and β -boswellic acid

分子描述符 Molecular descriptor	化合物 Compound	碎片离子 Fragmentation ion (m/z)												
		457	439	411	221	219	205	203	191	189	175	163	149	121
$CE_{50}/OCE/eV$	熊果酸	17.55	17.18	22.38	N/A	N/A	N/A	34.88	31.70	42.11	N/A	40.26	N/A	N/A
	齐墩果酸	17.03	17.94	23.87	N/A	N/A	N/A	35.35	30.86	43.04	N/A	39.95	N/A	N/A
	α -乳香酸	19.43	20.35	N/A	26.26	20.27	26.52	N/A	31.87	N/A	42.38	36.67	37.78	51.27
	β -乳香酸	19.82	20.52	N/A	26.72	20.13	26.90	N/A	31.93	N/A	43.30	35.66	37.23	50.17
$RII_{max}/\%$	熊果酸	—	41.02	100.00	N/A	N/A	N/A	16.20	14.37	10.95	N/A	14.90	N/A	N/A
	齐墩果酸	—	64.94	100.00	N/A	N/A	N/A	21.30	16.00	14.52	N/A	13.64	N/A	N/A
	α -乳香酸	—	81.21	N/A	18.42	100.00	51.52	N/A	18.66	N/A	21.19	32.37	26.06	22.08
	β -乳香酸	—	100.00	N/A	10.29	37.53	23.88	N/A	10.69	N/A	14.35	17.50	19.13	20.16

注: N/A表示未采集该离子对的数据; —表示不适用; 加粗数值可用于区分组内同分异构体

酸的碎片离子 m/z 163、121 的 ΔOCE 分别为 1.01、1.10 eV, m/z 205 的 ΔRII_{max} 为 27.64%, m/z 439、219 的 RII_{max} 相对关系有所不同, 且 m/z 219 的 ΔRII_{max} 为 62.47%。通过构建以上离子对的裂解曲线, 比较 OCE 和 RII_{max} 信息, 可以实现熊果酸和齐墩果酸、 α -乳香酸和 β -乳香酸同分异构体的有效区分。

3 结论

本研究利用高分辨 MS^2 谱图和 FCER- MS^2 谱图成功区分了熊果酸、齐墩果酸、 α -乳香酸和 β -乳香酸。由于羧基取代位置的差异, α -乳香酸和 β -乳香酸产生的 m/z 361 碎片离子在熊果酸和齐墩果酸中均未被检测到, 因此, 可依据 m/z 361 将 4 个同分异构体分为熊果酸和齐墩果酸

(I组)、 α -乳香酸和 β -乳香酸(II组)。FCER-MS²谱图结果表明,I组碎片离子 m/z 411 的 OCE 显示出较大差异, m/z 439 的 $R_{II_{\max}}$ 呈现显著差异; II组碎片离子 m/z 163、121 的 OCE 明显不同, m/z 439、219、205 的 $R_{II_{\max}}$ 也呈现显著差异,且 m/z 439、219 的 $R_{II_{\max}}$ 相对关系发生了变化,据此可实现4个同分异构体的有效区分。本研究基于 FCER-MS² 谱图对熊果酸、齐墩果酸、 α -乳香酸和 β -乳香酸的多级质谱裂解行为进行深入分析,从多维角度实现了4个同分异构体的区分,为中药等复杂基质中三萜酸类同分异构体的准确鉴定提供了有效方法,也为其他类型同分异构体的区分提供了参考。

参考文献:

- [1] LI Z, ZHU H, CAI X, HE D, HUA J, JU J, LV H, MA L, LI W. Simultaneous determination of five triterpene acids in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in pharmacokinetic study after oral administration of Folium Eriobotryae effective fraction[J]. *Biomedical Chromatography*, 2015, 29(12): 1 791-1 797.
- [2] CAMER D, YU Y, SZABO A, HUANG X F. The molecular mechanisms underpinning the therapeutic properties of oleanolic acid, its isomer and derivatives for type 2 diabetes and associated complications[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014, 58(8): 1 750-1 759.
- [3] 谭仁祥, 罗兰, 蒋勃广, 刘利根, 陈俊华. 一种治疗抑郁症的药物: 中国, ZL 00 1 36513.4[P]. 2001-08-15.
- [4] LI P, LIU A, LI Y, YUAN B, XIAO W, LIU Z, ZHANG S, LIN H. Development and validation of an analytical method based on HPLC-ELSD for the simultaneous determination of rosmarinic acid, carnosol, carnosic acid, oleanolic acid and ursolic acid in rosemary[J]. *Molecules*, 2019, 24(2): 323.
- [5] GRABOWSKA K, ŻMUDZKI P, WRÓBEL-BIEDRAWA D, PODOLAK I. Simultaneous quantification of ursolic and oleanolic acids in glechoma hederacea and glechoma hirsuta by UPLC/MS/MS[J]. *Planta Medica*, 2021, 87(4): 305-313.
- [6] YU Z, CUI M, YAN C, SONG F, LIU Z, LIU S, ZHANG H. Gas phase isomeric differentiation of oleanolic and ursolic acids associated with heptakis-(2,6-di-*O*-methyl)- β -cyclodextrin by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2010, 45(4): 444-450.
- [7] 汪明, 朱育芬. 能量分辨质谱的研究概况[J]. *质谱学报*, 1995, 16(4): 20-30.
- WANG Ming, ZHU Yufen. General situation of energy resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 1995, 16(4): 20-30(in Chinese).
- [8] CAO Y, CHAI C, CHANG A, XU X, SONG Q, LIU W, LI J, SONG Y, TU P. Optimal collision energy is an eligible molecular descriptor to boost structural annotation: an application for chlorogenic acid derivatives-focused chemical profiling[J]. *Journal of Chromatography A*, 2020, 1 609: 460 515.
- [9] GUAN P, LIU W, CAO Y, TANG H, HUO H, WAN J B, QIAO X, TU P, LI J, SONG Y. Full collision energy ramp-MS² spectrum in structural analysis relying on MS/MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(46): 15 381-15 389.
- [10] LIU W, LI W, ZHANG P, GONG X, TU P, TANG L, LI J, SONG Y. Quality structural annotation for the metabolites of chlorogenic acid in rat[J]. *Food Chemistry*, 2022, 379: 132 134.
- [11] WU N, PENG B, LI T, TU P, WANG S, LI B, LIU W, SONG Y. Rapid simultaneous determination of four ganoederic acids in ganoderma (Chinese name: Lingzhi) by direct infusion-multiple reaction monitoring cubed[J]. *Journal of Analysis and Testing*, 2024, 8(1): 52-62.
- [12] CHEN Q, ZHANG Y, ZHANG W, CHEN Z. Identification and quantification of oleanolic acid and ursolic acid in Chinese herbs by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry[J]. *Biomedical Chromatography*, 2011, 25(12): 1 381-1 388.
- [13] HUANG L, CHEN T, YE Z, CHEN G. Use of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-ion trap mass spectrometry for identification of oleanolic acid and ursolic acid in *Anoectochilus roxburghii* (wall.) Lindl[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 42(7): 910-917.
- [14] XIU Y, MA L, ZHAO H, SUN X, LI X, LIU S. Differentiation and identification of ginsenoside structural isomers by two-dimensional mass spectrometry combined with statistical analysis[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2019, 43(3): 368-376.
- [15] HERNANDEZ J, MÜLLER A, JAISWAL R, DAVALOS J Z, KUHNERT N. Energy resolved mass spectrometry of chlorogenic acids and its application to isomer quantification by direct infusion tandem mass spectrometry[J]. *Phytochemical Analysis*, 2018, 29(4): 406-412.

(收稿日期: 2024-03-20; 修回日期: 2024-04-16)