

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

李 伟¹, 冯育林¹, 黎田儿¹, 吴 欢¹, 李 艳¹,
钟国跃¹, 吴 蓓², 何明珍¹

(1. 江西中医药大学中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006;

2. 江西省南昌市食品药品检验所, 江西 南昌 330029)

摘要:建立了超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术结合诊断离子法快速分析连钱草中黄酮类化合物。采用信息依赖型的扫描(IDA)模式,在电喷雾负离子模式下分析黄酮标准化合物的裂解规律及特征碎片离子信息,并以标准物质的特征碎片离子作为诊断离子,全面鉴别连钱草中的黄酮类成分。在连钱草中共鉴别出 35 个黄酮类化合物,其中有 25 个化合物为在该植物中首次发现;除白杨素、芹菜素、毛蕊异黄酮、木犀草素、山奈酚、槲皮素外,其他化合物均以黄酮苷的形式存在。该方法可为连钱草的质量控制及药效学研究提供技术支持。

关键词:超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS);诊断离子;连钱草;黄酮

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2016)06-0504-13

doi:10.7538/zpxb.youxian.2016.0028

Rapid Analysis on Flavonoids in *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr by UPLC-Q-TOF/MS Couple with Diagnostic Ions

LI Wei¹, FENG Yu-lin¹, LI Tian-er¹, WU Huan¹, LI Yan¹,
ZHONG Guo-yue¹, WU Bei², HE Ming-zhen¹

(1. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine,
Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

2. Nanchang Food and Drug Inspection Institute, Nanchang 330029, China)

Abstract: With the modernization of Chinese medicine, the development of effective quality control method for Chinese herbs is one of the key scientific problems in the future. A method of high performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) couple with diagnostic ions under negative mode of ESI was developed for analyzing flavonoids in *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. An informa-

收稿日期:2015-12-22;修回日期:2016-03-18

基金项目:江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新中心开放基金项目资助

作者简介:李 伟(1989—),男(汉族),江西上饶人,硕士研究生,药物化学专业。E-mail: liwei6308402@163.com

通信作者:何明珍(1977—),女(瑶族),广西恭城人,讲师,从事天然药物活性成分及体内代谢研究。E-mail: hzm07@163.com

吴 蓓(1976—),女(汉族),江西南昌人,副主任药师,从事药学研究。E-mail: wubei8@163.com

网络出版时间:2016-07-05;网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20160705.1349.020.html>

tion dependent acquisition (IDA) mode was used to acquire high-precision mass spectrometric data for comprehensive profiling of constituents from *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. Both precursor ions and corresponding fragment ions (mass deviation are less than 5×10^{-6}) were simultaneously generated in negative mode. The precursor ions showing chemical formula could provide candidate compounds by querying the relevant database. Some database, such as Massbank, SciFinder, Chemspider, were used to quickly screen the possible compounds in *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. The characteristic groups and structure information were obtained by analyzing fragment ions, and that was very important to select out target ingredients form candidate compounds. The results show that a total of 35 flavonoids are identified, and 25 of which flavonoids are identified for the first time from *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr. In addition to chrysin, apigenin, isoflavone, luteolin, kaempferol and quercetin, all the other compounds are flavonoid glycosides. The method can provide the technical support and material basis for pharmacodynamics research and quality control of *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr.

Key words: high performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS); diagnostic ions; *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr; flavonoids

连钱草又名活血丹、透骨消,为唇形科多年生草本植物活血丹(*Glechoma longituba* (Nakai) Kupr.)的干燥地上部分^[1],是贵州、云南等地苗族习用药材^[2],除西北地区外,在全国各地均有分布^[3]。现代药理学研究表明,连钱草对金黄色葡萄球菌极度敏感,对痢疾杆菌、绿脓杆菌和伤寒杆菌中度敏感,具有抗炎、抑菌、降血糖、降胆固醇等药理活性^[4-6]。连钱草中含有挥发油^[7]、有机酸类^[8]、萜类^[9-10]和黄酮类^[11-12]化学成分,目前已报道了大波斯菊苷、芦丁、槲皮素、芹菜素、木犀草素、木犀草苷等黄酮类化合物,但仍有许多未知的黄酮类成分未见报道。为了明确连钱草的药效活性物质基础和作用机制,有必要全面分析连钱草的化学成分。

确定中药材中未知化学成分常用的方法是对药材进行提取分离纯化,得到化合物单体成分后,进行核磁共振波谱解析,进而得到化合物准确的结构信息。虽然该方法的准确性高,但试剂消耗量大、过程繁琐、耗时较长,且不能满足痕量分析的要求。近年来,超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术结合了超高效液相色谱的分离能力和高分辨质谱的高灵敏度和高精确度,能够实现复杂体系中化学成分的高通量分析^[13-17],在中药复杂成分定性分析方面得到广

泛应用^[18-19]。UPLC-Q-TOF/MS 技术结合数据依赖性扫描模式(IDA)能够得到化合物高质量精度的一级质谱和二级质谱信息。根据化合物的一级质谱信息确定化合物的分子式,从 Chemspider 等数据库中筛选出候选化合物^[20];根据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目标化合物。由于具有相同结构的化合物在质谱中有相似的裂解规律和特征碎片,因此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。

本实验将采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术,以具有代表性的黄酮标准化合物裂解规律和特征碎片离子为诊断信息,结合 SciFinder、Chemspider、Massbank 数据库的在线检索功能,全面解析连钱草中的黄酮类化合物,希望为连钱草的质量控制提供技术支持,同时为其药效学研究奠定物质基础。

1 实验部分

1.1 仪器

TripleTOF® 5600 高分辨质谱仪:美国 AB Sciex 公司产品,配有 Analyst TF1.6 和 Peak-view1.2 数据处理系统;LC-30AD 超高效液相

色谱仪:日本岛津公司产品;KQ250DB 型数控超声波清洗器:巩义市予华仪器有限责任公司产品。

1.2 材料及试剂

连钱草药材:购于贵州,经江西省南昌市食品药品检验所主管药师吴蓓鉴定为唇形科活血丹(*Glechoma longituba* (Nakai) Kupr.) 干燥地上部分;木犀草素(批号:111520-200504)、木犀草苷(批号:111720-201408)、山奈酚(批号:110861-200808)、紫云英苷(批号:110080-201307)、槲皮素(批号:111538-201105)、芦丁(批号:100080-201409)对照品:购自中国食品药品检验所;甲醇、乙腈(色谱纯):美国 Fisher 公司产品;甲酸(色谱纯):美国 Sigma-Aldrich 公司产品;蒸馏水:屈臣氏集团产品;其余试剂均为分析纯。

1.3 供试品溶液的制备

取 1 g 连钱草药材粉末(过 3 号药筛),加入 50 mL 60% 甲醇,超声 30 min,用 0.45 μm 滤膜过滤,滤液稀释 100 倍,过 0.22 μm 微孔滤膜,待测;用甲醇稀释对照品溶液,配制成浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液。

1.4 实验方法

1.4.1 色谱条件 Acquity UPLC BEH C18 柱(100 mm $\times$ 2.1mm $\times$ 1.7 μm);柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,

体积流量 0.4 mL/min;进样量 2 μL ;流动相:1%甲酸水溶液(A 相)-乙腈(B 相);B 相比比例随时间变化为 0~30 min、10%~20%B,30~70 min、20%~50%B,70~90 min、保持 50%B 相不变。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),负离子扫描模式,喷雾电压-4 500 V,温度 600 $^{\circ}\text{C}$,气帘气压力 1.72×10^5 Pa,雾化气(GS1)和辅助气(GS2)压力均为 3.45×10^5 Pa,质量扫描范围 m/z 50~1 200,数据采集时间 90 min,母离子触发的子离子扫描方式(TOF/MS-IDA-MS²),去簇电压-100 V,碰撞能量-40 eV,碰撞能量叠加 10 eV。

2 结果与讨论

2.1 黄酮类标准物质的质谱裂解规律研究

按 1.4.2 节条件分别将 6 个黄酮类对照品溶液经进样针注入质谱仪中,采集数据并得到二级碎片离子后,总结黄酮类标准物质的裂解规律和特征碎片离子信息。6 个黄酮类标准物质的结构式示于图 1,二级质谱图示于图 2。

2.1.1 黄酮苷元裂解规律及特征碎片离子

木犀草素,分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$,母离子为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 285.041 2。在二级质谱中,可以生成一系列的碎片离子,其中 m/z 241.049 9

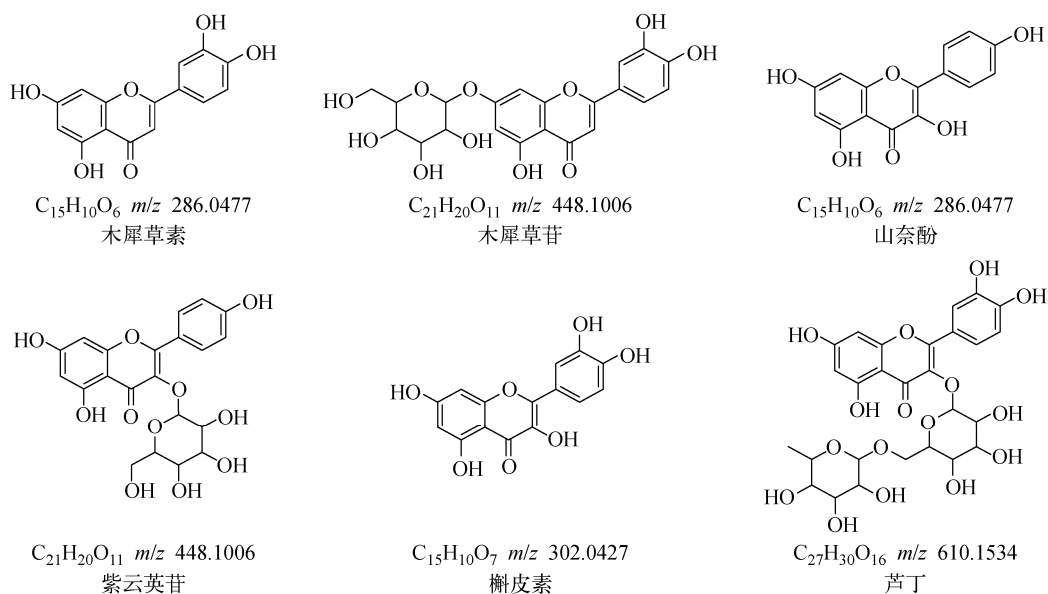
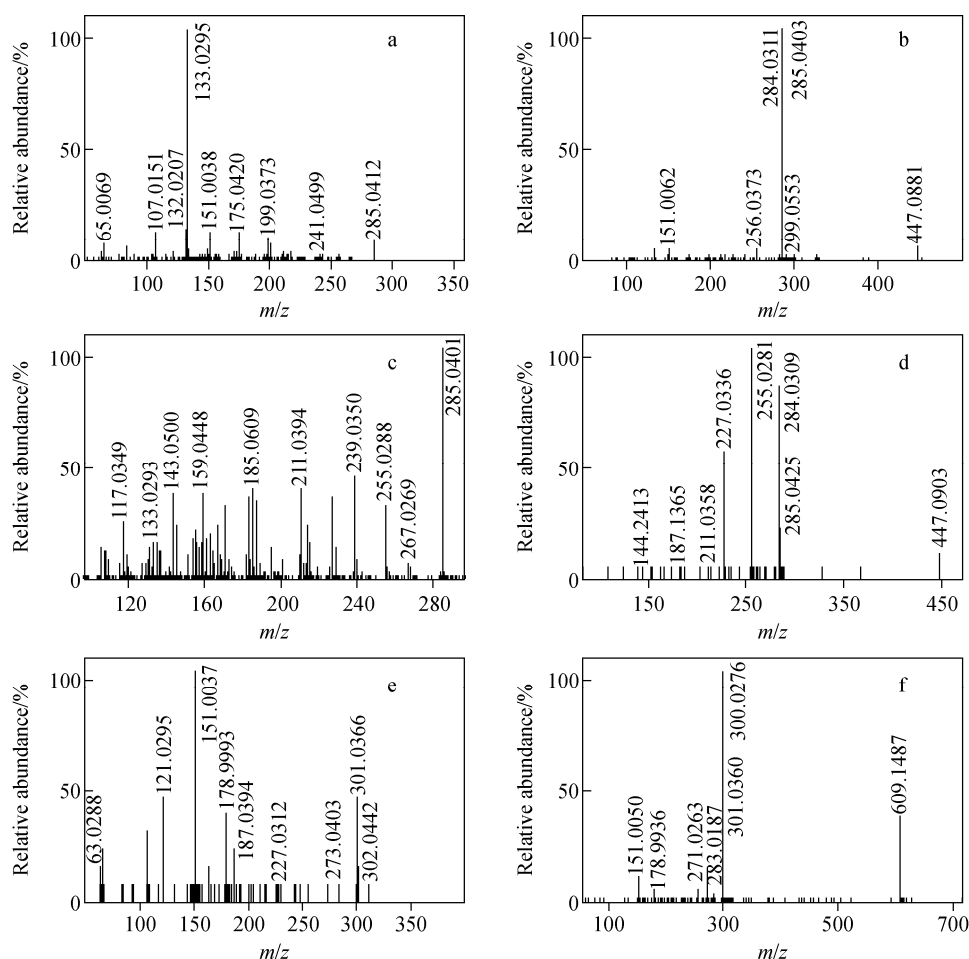


图 1 6 个黄酮类化合物的结构式

Fig. 1 Chemical structures of six flavonoid compounds



注: a. 木犀草素; b. 木犀草苷; c. 山奈酚; d. 紫云英苷; e. 槲皮素; f. 芦丁

图 2 在负离子模式下, 黄酮类标准化化合物的二级质谱图

Fig. 2 MS² spectrums of standard flavonoids in negative mode

($C_{14}H_9O_4^-$) 比母离子少 44 u, 为木犀草素母核 C 环失去羰基后再失去氧原子的碎片离子; 木犀草素母核发生 RDA 裂解, 分别生成 m/z 151.003 8 ($C_7H_3O_4^-$) 和 m/z 133.029 5 ($C_8H_5O_2^-$) 碎片离子, 其中 m/z 133.029 5 由 B 环和 C 环上的残基组成, 其丰度远大于 m/z 151.003 8。

山奈酚, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_6$, 具有黄酮醇结构, 为木犀草素的同分异构体, 母离子 $[M-H]^-$ m/z 285.040 1, 其特征碎片离子与木犀草素有明显的差异。其中, m/z 255.028 8 ($C_{14}H_7O_5^-$) 为山奈酚 C 环脱掉 CO 后形成的碎片离子, 该离子继续脱 O 生成 m/z 239.035 0 ($C_{14}H_7O_4^-$) 碎片离子, 再失去 CO 生成 m/z 211.039 4 ($C_{13}H_7O_3^-$) 碎片离子。在山奈酚的二级碎片离子中, 可发现 RDA 裂解后的碎片离子 m/z 133.029 3, 但相对丰度很低。

槲皮素, 分子式为 $C_{15}H_{10}O_7$, 母离子 $[M-H]^-$ m/z 301.036 6。二级碎片离子 m/z 273.040 3 ($C_{14}H_9O_6^-$) 为 C 环上脱 CO 生成; m/z 178.999 3 ($C_8H_3O_5^-$) 为槲皮素失去 B 环后再失去 CH 的碎片离子; m/z 151.003 7 为槲皮素 RDA 裂解形成的碎片离子。

综上所述, 黄酮类化合物在质谱中容易失去 C 环中的羰基 (−28 u) 和氧原子 (−16 u), 且易发生 RDA 裂解生成 m/z 151.003 8 碎片离子。其中, 在具有黄酮醇结构的化合物中, m/z 301.036 6、178.999 3 可视为槲皮素母核的诊断离子, m/z 285.040 1、255.028 8 可视为山奈酚母核的诊断离子。

2.1.2 黄酮苷裂解规律及特征碎片离子

木犀草苷, 分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$, 母离子 $[M-H]^-$ m/z 447.088 1, 葡萄糖基在 A 环的

7 位羟基上,二级碎片离子中,出现了明显的苷元母核离子 m/z 285.040 3($C_{15}H_9O_6^-$)和 m/z 284.031 1($C_{15}H_8O_6^{\cdot-}$)。根据有机化合物质谱裂解规律和氮规则可知,当化合物不含或含偶数个氮原子时,化合物的相对分子质量为偶数,其[M—H]⁻峰的质荷比一般为奇数,但在质谱中均裂形成的奇电子离子质荷比却为偶数。 m/z 284.031 1($C_{15}H_8O_6^{\cdot-}$)为葡萄糖均裂方式形成的碎片离子,其丰度小于异裂方式脱去葡萄糖后的碎片离子 m/z 285.040 3; m/z 284.031 1($C_{15}H_8O_6^{\cdot-}$)可继续脱去 C 环羰基生成 m/z 256.037 3($C_{14}H_8O_5^{\cdot-}$);此外,还发现了黄酮母核 RDA 裂解碎片 m/z 151.006 2。

紫云英苷,分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$,母离子 [M—H]⁻ m/z 447.090 3,为山奈酚 C 环 3 位羟基与葡萄糖结合形成的苷,是木犀草苷的同分异构体,但其二级质谱中的碎片离子与木犀草苷有较大的差别。其中,苷元碎片离子 m/z 285.042 5($C_{15}H_9O_6^-$)的丰度明显小于 m/z 284.030 9($C_{15}H_8O_6^{\cdot-}$),说明脱糖基方式以均裂为主;苷元碎片失去一分子 CO 后生成 m/z 255.028 1($C_{14}H_7O_5^-$),继续失去一分子 CO 生成 m/z 227.033 6($C_{13}H_7O_4^-$)碎片离子,最后脱掉氧原子得到 m/z 211.035 8($C_{13}H_7^{\cdot-}$)碎片离子。

芦丁,分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$,母离子 [M—H]⁻ m/z 609.148 7,为槲皮素 C 环 3 位羟基与芸香糖结合形成的双糖苷。 m/z 463.088 7($C_{21}H_{19}O_{12}^-$)为芦丁脱去鼠李糖形成的碎片离子,主要以异裂方式形成,该离子继续脱去葡萄糖得到苷元碎片 m/z 301.036 0($C_{15}H_9O_7^-$)和 m/z 300.027 6($C_{15}H_8O_7^{\cdot-}$)。其中 m/z 300.027 6 的

丰度明显大于 m/z 301.036 0,说明 C 环 3 位的糖苷键主要以均裂方式断裂。除此之外,还发现了明显的槲皮素苷元裂解生成的 m/z 178.993 6($C_8H_3O_5^-$)碎片离子。

综上所述,在与黄酮苷元相同的碰撞能量下,黄酮苷中的基峰常为脱掉糖基后的苷元碎片。在黄酮醇类化合物的糖基中,中性碎片的丢失方式与苷键的位置有关^[21-22];若与苷键连接的糖为单糖,苷键位于 A 环酚羟基时,脱糖基常以异裂方式为主,生成质荷比为奇数的奇电子离子峰;当苷键位于 C 环醇羟基时,脱糖基常以均裂方式为主,生成质荷比为偶数的偶电子离子峰。苷元碎片离子的丰度大小可以作为判断苷元结构及糖基位置的重要诊断依据^[23],但当与苷键连接的糖为双糖或多糖时,情况比较复杂^[24]。常见的黄酮类化合物的诊断离子信息情况列于表 1。

2.2 连钱草中黄酮类化合物的确认

按 1.4 节条件进样,采集连钱草样品数据,使用 Peakview1.2 软件分析,共鉴别出 35 个黄酮类化合物,其中有 25 个化合物为在该植物中首次发现,连钱草样品的总离子流图示于图 3,鉴别结果列于表 2。由于黄酮类化合物具有相同的母核,在质谱中具有相似的裂解规律,本实验选取具有代表性的化合物 2、6、18、28、29、33、34,阐述其详细的解析过程。

化合物 2:保留时间 43.59 min,根据母离子 [M—H]⁻ m/z 269.046 1,可得到化合物的分子式为 $C_{15}H_{10}O_5$ 。该化合物的母离子质荷比比木犀草素小 16 u,且丰度最强的碎片离子 m/z 117.035 2($C_8H_5O^-$)也比木犀草素基峰碎片离子 m/z 133.029 5($C_8H_5O_2^-$)小 16 u,由

表 1 常见黄酮类化合物的诊断离子
Table 1 Diagnostic ions of common flavonoids

母核结构	共有离子 (m/z)	母核诊断信息 (m/z)	苷键连接位置的诊断信息
木犀草素		285.0405,241.0506,133.0295	m/z 285.0405 丰度大于 m/z 284.0326,苷键一般位于 A 环 7 位羟基上,且常出现 m/z 256.0377 碎片离子
山奈酚	151.0037	285.0405,255.0299,239.0350	m/z 284.0326 丰度大于 m/z 285.0405,表明苷键位于 C 环 3 位羟基上,且有较明显的 m/z 255.0299 碎片离子
槲皮素		301.0354,271.0249,255.0299	m/z 301.0354 丰度大于 m/z 300.0276,苷键一般位于 A 环 7 位羟基上,反之苷键位于 C 环 3 位羟基上

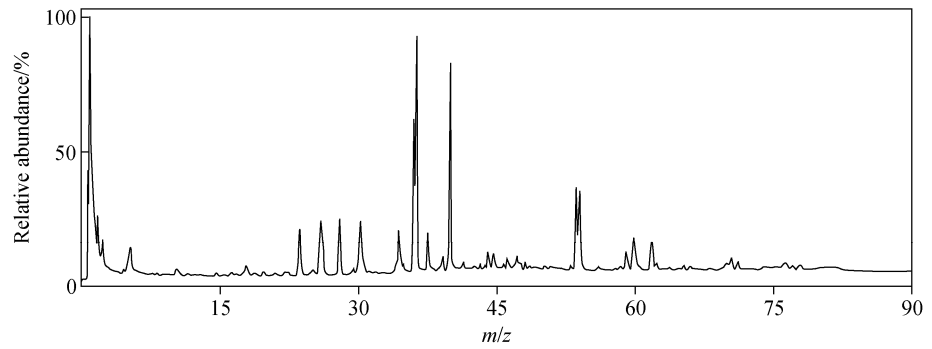


图 3 UPLC/Q-TOF-MS 分析连钱草的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of *Glechoma longituba* (Nakai) kupr by UPLC/Q-TOF-MS

表 2 连钱草中黄酮类化合物的鉴别结果

Table 2 Identification results of flavonoids compounds from *Glechoma longituba* (Nakai) kupr

序号	t_R/min	分子式	母离子 (m/z)	误差/ $\times 10^{-6}$	二级碎片离子(m/z)	推断结果
1	17.82	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	431.0984	0.8	268.0381,240.0474, 211.0433,151.0049	大波斯菊苷
2	43.53	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	269.0453	-0.9	227.0346,183.0445, 149.0245,117.0356, 107.0144	芹菜素
3	25.02	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.0932	-0.2	285.0403,256.0373, 151.0062	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷
4	18.55	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	609.1486	4.1	301.0365,300.0280, 271.0253,255.0305	芦丁
5	37.67	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	301.0357	1.3	151.0027,121.0299, 107.0126	槲皮素
6*	40.25	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	593.1541	4.9	533.1225,503.1189, 473.1070,383.0800, 353.1070	夏佛托苷
7*	12.84	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	563.1442	2.6	473.1089,443.1047, 383.0806,353.0662	异夏佛托苷
8	25.02	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.0932	-0.2	285.0403,227.0390, 151.0062	木犀草苷
9*	44.57	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	285.0406	0.5	255.0288,239.0350, 227.0339,211.0344, 185.0609,171.0446	山柰酚
10*	1.14	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	253.0500	-2.5	209.0666,143.0502, 119.0480	白杨素
11	19.42	$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{17}$	621.1114	2.7	351.0581,269.0455, 193.0361	海常素
12*	30.16	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	445.0779	0.6	269.0455,225.0552	黄芩苷
13*	10.29	$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{18}$	637.1088	4.5	351.0586,285.0417, 193.0365,175.0252, 113.0241	木犀草素-3',7-二- <i>O</i> -葡萄糖醛酸
14*	10.29	$\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{O}_{18}$	637.1088	3.7	461.0764,285.0415, 257.0439	木犀草素-3',7-二- <i>O</i> -葡萄糖苷酸
15*	32.45	$\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_{14}$	533.0959	4.2	489.1066,447.0965, 327.0512,285.0410	木犀草素-7- <i>O</i> -6"-丙二酰基葡萄糖苷
16	27.92	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	461.0725	4	285.0418,284.0328, 255.0288,239.0350, 227.0339	山柰酚-3-葡萄糖醛酸甙

续表 2

序号	t_{R}/min	分子式	母离子 (m/z)	误差/ $\times 10^{-6}$	二级碎片离子(m/z)	推断结果
17	56.07	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	283.0613	0.4	268.0385, 239.0357, 211.0400, 171.0450, 151.0039, 117.0354	毛蕊异黄酮
18*	10.29	$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{18}$	639.1255	-2.9	477.0760, 463.0909, 301.0361, 300.0285, 271.0267	槲皮素-3- O - β -葡萄糖-7- O - β - 葡萄糖醛酸
19*	31.34	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	475.0896	2.9	299.0564, 284.0328	Takakin-8-glucuronide
20*	15.46	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{16}$	595.1327	3.8	463.0916, 433.1259, 300.0280, 271.0264, 255.0305	槲皮素-3-阿拉伯糖葡萄糖
21*	9.10	$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{17}$	623.1193	4.4	503.0860, 447.0950, 285.0401, 179.0358	2-[4-(β - L -Glucopyranosyloxy)-3- hydroxyphenyl]-5-hydroxy-4-oxo- 4H-chromen-7-yl D - Galactopyranosiduronic acid
22*	9.10	$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{17}$	623.1268	2.3	447.0915, 337.0794, 285.0400, 151.0046	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-5- hydroxy-4-oxo-4H-chromen-7-yl 2- O -hexopyra-nuronosylhexopyr- anoside
23*	0.85	$\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$	651.2331	3.1	475.1866, 329.1301, 193.0506, 175.0412, 160.0170	地黄苷
24*	1.61	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	607.1718	4.2	455.1768, 299.0586, 284.0340	香叶木苷
25*	25.02	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.0944	2.5	301.1361, 300.0277, 284.0329, 271.0246, 255.0296, 227.0355, 211.0384, 163.0032, 151.0045	槲皮苷
26*	25.02	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	431.0994	2.4	341.0679, 323.0568, 311.0561, 283.0622, 269.0468	异牡荆素
27*	19.73	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	463.0895	2.8	301.0358, 300.0269, 271.0249, 255.0285, 243.0310, 151.0038	槲皮素-3- O -葡萄糖苷
28*	22.02	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	577.1583	3.5	431.1000, 430.0925, 285.0410, 283.0255, 255.0310	山奈苷
29 Δ	40.25	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	593.1325	4.8	593.1342, 447.0946, 285.0401, 284.0328, 151.0037	银锻苷
30*	40.25	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	593.1512	4.1	477.0965, 301.0367	Horridin
31*	25.06	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	449.1109	4.4	342.0559, 287.0381, 269.0463, 259.0620, 243.0672, 225.0571, 178.9979, 151.0035, 125.0251	Hovetrichoside C
32*	25.02	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.0933	-0.2	284.0309, 255.0281, 227.0336, 211.0358	紫云英苷
33*	18.55	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	609.1511	3.2	463.0921, 317.0317, 287.0212, 271.0212, 259.0248, 243.0309, 193.0140, 178.9994, 163.0053, 151.0021	杨梅素-3,7- O -二鼠李糖苷

续表 2

序号	<i>t_R</i> /min	分子式	母离子(<i>m/z</i>)	误差/ ×10 ⁻⁶	二级碎片离子(<i>m/z</i>)	推断结果
34 *	12.37	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625.1458	4.6	479.0835, 478.0783, 463.0920, 317.0301, 316.0240, 287.0215, 271.0198	杨梅素-3- <i>O</i> -鼠李糖苷-7- <i>O</i> -鼠李糖苷
35 *	23.60	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479.0831	3.2	479.0821, 316.0234, 287.2010, 271.0271, 242.0278, 151.0030	5,7-Dihydroxy-4-oxo-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-chromen-3-yl β- <i>D</i> -allopyranoside

注：* 表示连钱草中首次检出的化合物

此推测该化合物比木犀草素少 1 个羟基;在其二级碎片离子中,发现了黄酮 RDA 裂解碎片 *m/z* 151.003 0(C₇H₃O₄⁻),经数据库检索,推测该化合物为芹菜素,其二级质谱图及裂解途径示于图 4。

化合物 6:保留时间 40.25 min,根据母离子[M-H]⁻ *m/z* 593.151 2,可得到化合物的分子式为 C₂₇H₃₀O₁₅。在该化合物的二级质谱图中,可以发现比母离子小 60 u(*m/z* 533.122 5、C₂₅H₂₅O₁₃⁻),90 u(*m/z* 503.118 9,C₂₄H₂₃O₁₂⁻),120 u(*m/z* 473.128 9,C₂₃H₂₁O₁₁⁻)等一系列的特征碎片离子。*m/z* 473.107 0 继续失去 90 u、120 u,分别得到 *m/z* 383.080 0(C₂₀H₁₅O₈⁻)和 *m/z* 353.107 0(C₁₉H₁₃O₇⁻)碎片离子,这与碳苷的裂解规律非常相似^[25],故推测该化合物可能为碳苷,且有两分子的葡萄糖(中性丢失 162.052 8 u)与苷元相连。该化合物苷元的相对分子质量为 269.048 5(C₁₅H₁₉O₅⁻),推测其可能为芹菜素的双糖碳苷。根据这些信息,经检索数据库,推断该化合物为夏佛托苷,其二级质谱图及裂解途径示于图 5。

化合物 18:保留时间 10.29 min,根据母离子[M-H]⁻ *m/z* 639.125 5,可得到化合物的分子式为 C₂₇H₂₈O₁₈。该化合物的二级质谱图中出现了明显的 *m/z* 301.036 1(C₁₅H₉O₇⁻)、*m/z* 300.028 5(C₁₅H₈O₇⁻)和 *m/z* 178.998 8(C₈H₃O₅⁻)碎片离子,由此推测该化合物可能有槲皮素母核。化合物中性丢失一分子葡萄糖醛酸(176.034 6 u)生成碎片离子 *m/z* 463.090 9(C₂₁H₁₉O₁₂⁻),再丢失一分子葡萄糖生成碎片离子 *m/z* 301.036 1 或 *m/z* 300.028 5。在该化合物的二级质谱中还发现了丰度较弱的碎片离子 *m/z* 477.076 0(C₂₁H₁₇O₁₃⁻),为母核脱去葡萄糖后生成的,推测其有 2 个糖基接在苷元的不同位置,且葡萄糖可能位于 C 环 3 位羟基上。经数据库检索,推测该化合物为槲皮素 3-*O*-β-葡萄糖苷-7-*O*-β-葡萄糖苷酸,其二级质谱图及裂解途径示于图 6。

化合物 28:保留时间 22.02 min,根据母离子[M-H]⁻ *m/z* 577.164 2,可得到化合物的分子式为 C₂₇H₃₀O₁₄。该化合物的特征碎片离子 *m/z* 431.100 0(C₂₁H₁₉O₁₀⁻) 和 *m/z* 285.041 0

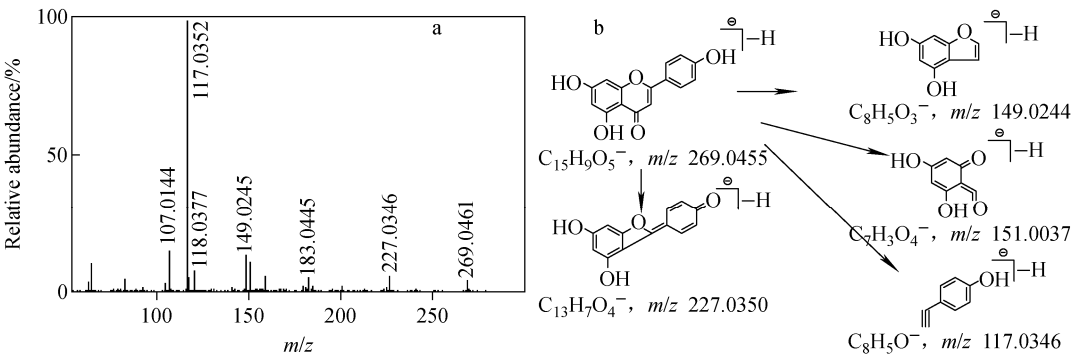


图 4 芹菜素的二级质谱图(a)及其裂解途径(b)
Fig. 4 MS² spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of apigenin

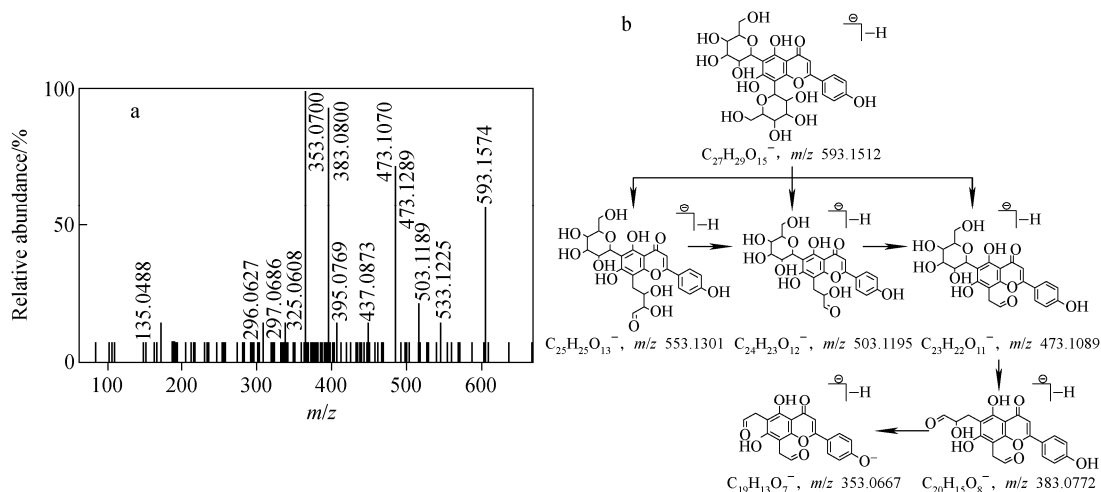


图5 夏佛托苷的二级质谱图(a)及其裂解途径(b)

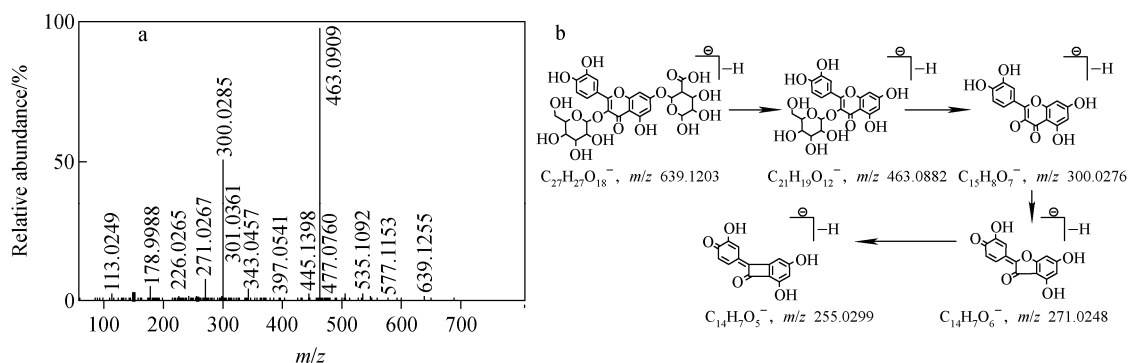
Fig. 5 MS² spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of schaftoside

图6 槲皮素 3-O-β-葡萄糖苷-7-O-β-葡萄糖苷酸的二级质谱图(a)及其裂解途径(b)

Fig. 6 MS² spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of quercetin 3-O-β-glucoside-7-O-β-glucuronide

($C_{15}H_9O_6^-$)分别为母离子依次脱去鼠李糖(中性丢失 146.057 9 u)生成的碎片; m/z 431.100 0 丰度小于 m/z 430.092 5($C_{21}H_{18}O_{10}^-$),表现出明显的黄酮醇苷结构特征,由此推测其有一分子的鼠李糖连接在 C 环羟基上; m/z 285.041 0 和 m/z 255.031 0($C_{14}H_7O_5^-$)也显示苷元母核为黄酮醇结构,推测其苷元为山奈酚。根据以上信息,经数据库检索,推测该化合物为山奈苷,其二级质谱图及裂解途径示于图 7。

化合物 29:保留时间 40.25 min,根据母离子 $[M-H]^-$ m/z 593.134 2,可得到化合物的分子式为 $C_{30}H_{26}O_{13}$ 。该化合物的特征碎片 m/z 447.094 6($C_{21}H_{19}O_{11}^-$)比母离子小 146 u (精确分子质量 146.039 6,非鼠李糖结构),继续脱去一分子葡萄糖得到 m/z 285.040 1

($C_{15}H_9O_6^-$)碎片离子;该碎片离子和 m/z 255.028 6($C_{14}H_7O_5^-$)共同显示其化合物为山奈酚母核结构,因此,该化合物结构中具有山奈酚母核和葡萄糖;根据 m/z 285.040 1 丰度高于 m/z 284.032 8,可知山奈酚 C 环 3 位羟基上不存在单糖结构,由此推测中性丢失 146.039 6 u 的基团连接在葡萄糖上。经数据库检索,推测该化合物为银锻苷,其二级质谱图及裂解途径示于图 8。

化合物 33:保留时间 18.55 min,根据母离子 $[M-H]^-$ m/z 609.152 2,可得到化合物的分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$ 。在特征碎片离子中, m/z 463.092 1($C_{21}H_{19}O_{12}^-$)为母离子脱去一分子鼠李糖后的碎片,继续脱去鼠李糖得到 m/z 317.031 7($C_{15}H_9O_8^-$)碎片离子;由于该化合物的 2 个糖基相同,无法确定糖的连接方式,但

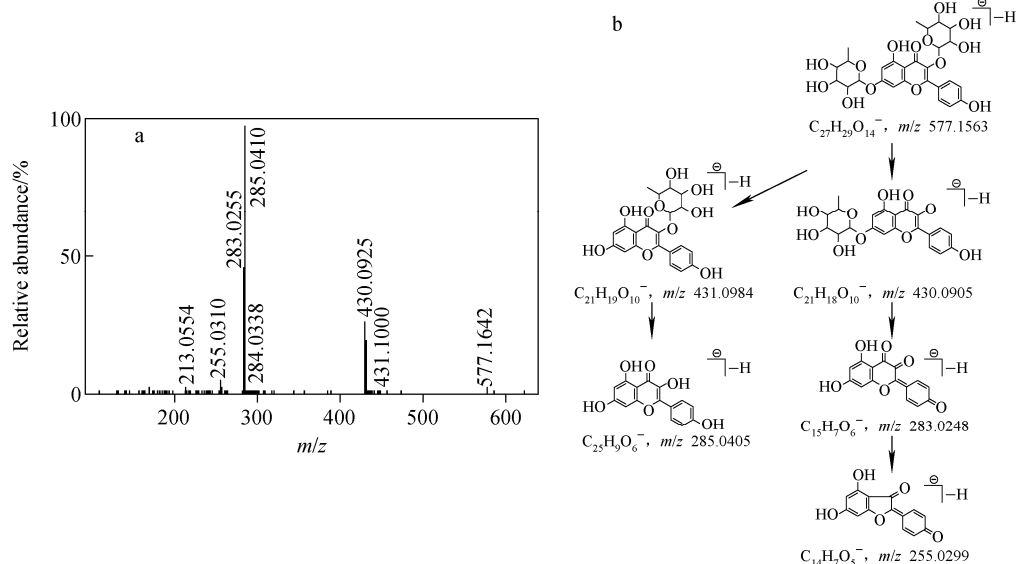


图 7 山奈苷的二级质谱图 (a) 及其裂解途径 (b)

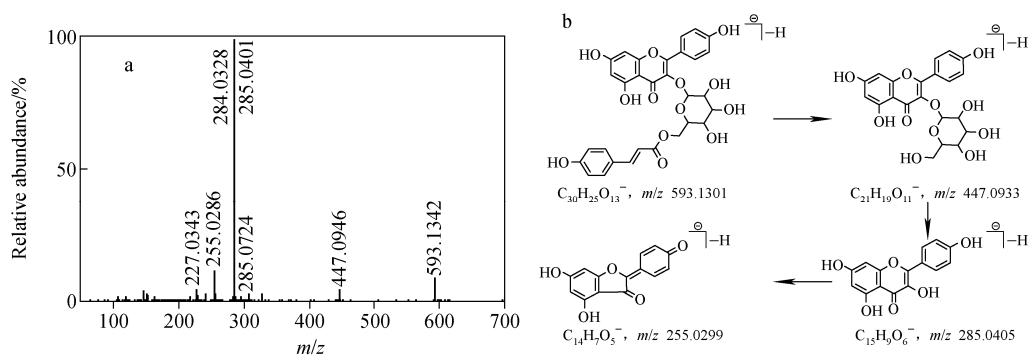
Fig. 7 MS² spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of kaempferitrin

图 8 银锻苷的二级质谱图 (a) 及其裂解途径 (b)

Fig. 8 MS² spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of tiliroside

因 m/z 463.092 1 的丰度较强,可推测 2 个鼠李糖连接在苷元的不同位置; m/z 316.023 7 ($C_{15}H_8O_8^-$) 的丰度较 m/z 317.031 7 强,且出现了 m/z 271.025 2 ($C_{14}H_7O_6^-$) 和 m/z 178.999 4 碎片离子,表明该化合物具有槲皮素母核结构; m/z 317.031 7 较槲皮素母离子 $[M-H]^-$ m/z 301.036 6 ($C_{15}H_9O_7^-$) 多 16 u,说明该化合物的苷元结构比槲皮素多 1 个羟基;根据 A 环与 B 环残基形成的一系列碎片离子 m/z 178.999 4 ($C_8H_3O_5^-$)、 m/z 163.005 3 ($C_8H_3O_4^-$) 和 m/z 151.002 7 ($C_7H_{33}^-$),推测该羟基可能位于 B 环上。经数据库检索,推测该化合物为杨梅素-3,7-O-二鼠李糖苷,其二级质谱图及裂解途径示于图 9。

化合物 34:保留时间 12.37 min,根据母离子 $[M-H]^-$ m/z 625.153 2,可得到化合物的分子式为 $C_{27}H_{30}O_{17}$ 。在特征碎片离子中, m/z 479.083 5 ($C_{21}H_{19}O_{13}^-$) 为母离子脱去一分子鼠李糖后的碎片, m/z 463.092 1 ($C_{21}H_{19}O_{12}^-$) 为母离子脱去一分子葡萄糖后的碎片,由此可见,葡萄糖和鼠李糖在苷元上的位置不同;由苷元的碎片离子 m/z 317.030 1 ($C_{15}H_9O_8^-$)、 m/z 316.024 0 ($C_{15}H_8O_8^-$) 和 m/z 271.019 8 ($C_{14}H_7O_6^-$),推测该化合物的母核与化合物 33 相同,不同之处在于 A 环 7 位羟基上为葡萄糖。经数据库检索,推测该化合物为杨梅素-3-O-鼠李糖苷-7-O-葡萄糖苷,其二级质谱图及裂解途径示于图 10。

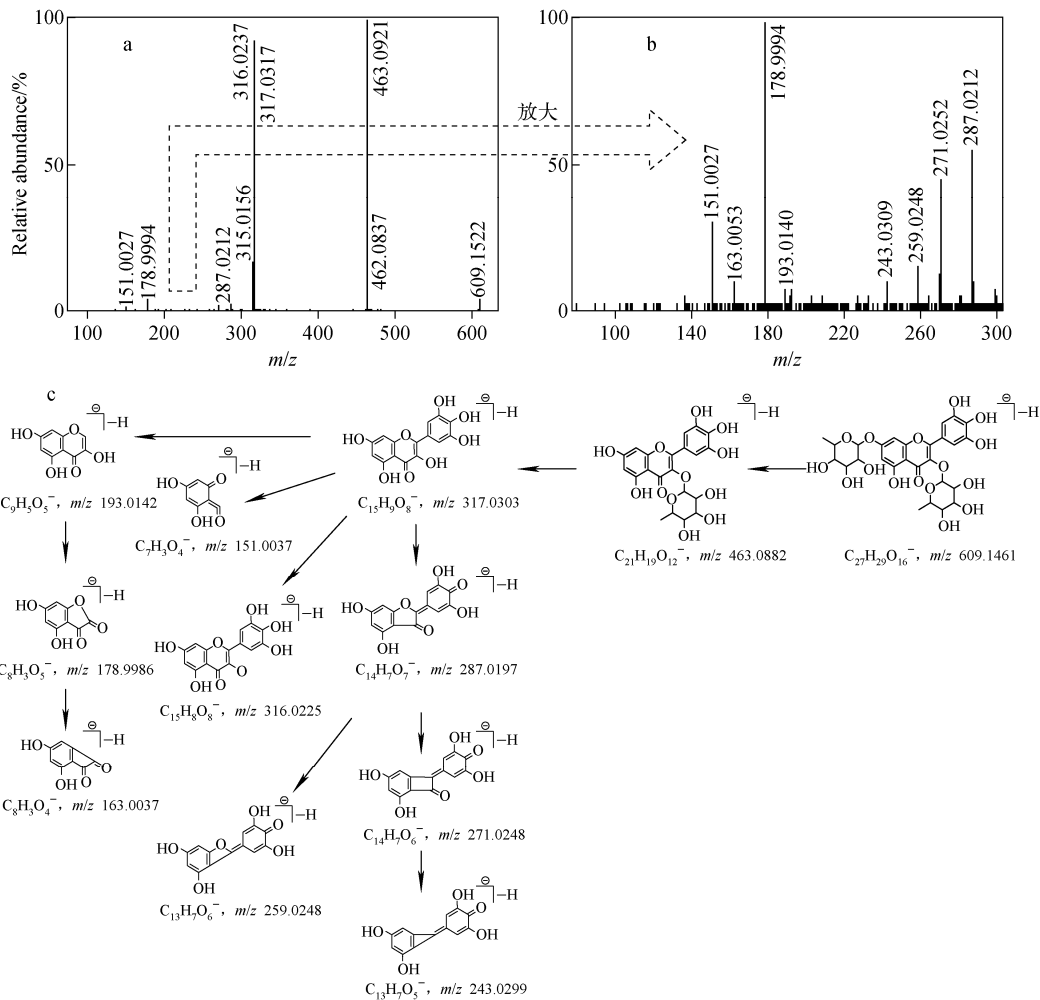


图 9 杨梅素-3,7-*O*-二鼠李糖苷的二级质谱图(a)、局部放大图(b)及其裂解途径(c)

Fig. 9 MS² spectrum (a), partial enlarged drawing (b) and fragmentation pathway (c) of myricetin-3,7-*O*-dirhamnoside

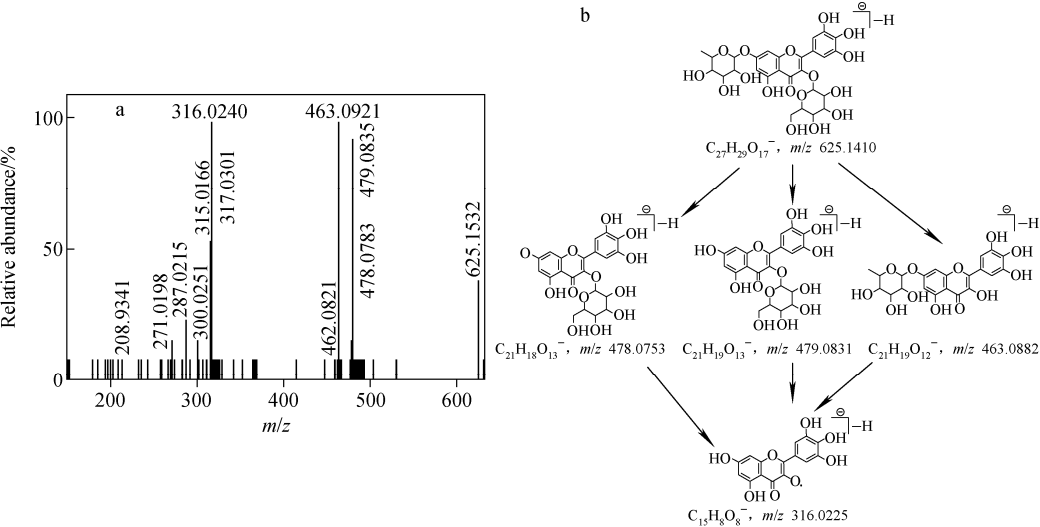


图 10 杨梅素-3-*O*-鼠李糖苷-7-*O*-葡萄糖苷的二级质谱图(a)及其裂解途径(b)

Fig. 10 MS² spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of myricetin-3-*O*-rhamnoside-7-*O*-glucoside

3 讨论

本研究采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术分析连钱草中黄酮类化合物。由于具有相同结构的黄酮类化合物在质谱中表现出相同的裂解途径及特征碎片离子,故在采集连钱草样品前,分析了典型的黄酮标准物质的碎片裂解途径,以标准物质的特征碎片离子作为诊断信息,有利于同源未知化合物的解析。本实验共鉴别了连钱草中 35 个黄酮类化合物,其中有 25 个化合物为在该植物中首次发现。除白杨素、芹菜素、毛蕊异黄酮、木犀草素、山奈酚、槲皮素外,其他化合物均以黄酮苷的形式存在。该结果可为连钱草质量控制及药效研究奠定物质基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:275.
- [2] 张前军,杨小生,朱海燕,等. 连钱草中三萜类化学成分[J]. 中草药,2006,37(12):1 780-1 781.
ZHANG Qianjun, YANG Xiaosheng, ZHU Haiyan, et al. Triterpenoid of *Glechoma longituba* [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2006, 37(12): 1 780-1 781(in Chinese).
- [3] Editorial Board of Chinese Heral. State administration of traditional Chinese medicine, China. China Herbal[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999.
- [4] 陶勇,石米扬. 连钱草的抑菌活性研究[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(10):284-285.
TAO Yong, SHI Miyang. Antimicrobial activity of the *Glechoma longituba*[J]. Chin Hosp Pharm, 2011, 31(10): 284-285(in Chinese).
- [5] 袁春玲,王佩琪,郭伟英. 连钱草的降血糖作用及其机制研究[J]. 中药药理与临床,2008,24(3):57-58.
YUAN Chunlin, WANG Peiqi, GUO Weiyang. Study on effect and mechanism of *Glechoma longituba* on hypoglycemic action[J]. Chin Med Pharmacol Clin, 2008, 24(3): 57-58(in Chinese).
- [6] 葛少祥,彭代银,刘金旗,等. 连钱草治疗胆固醇结石的实验研究[J]. 中药材,2007,30(7):842-845.
GE Shaoxiang, PENG Daiyin, LIU Jinqi, et al. Study on treatment of cholesterol gallstones by *Glechoma longituba* [J]. Chin Med Mat, 2007, 30(7): 842-845(in Chinese).
- [7] 樊钰虎,周刚,张璐,等. 连钱草挥发油化学成分的气相色谱-质谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):41-44.
FAN Yuhu, ZHOU Gang, ZHANG Lu, et al. Analysis on chemical components of volatile oils from *Glechoma longituba* by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Chin Exp Tradit Med Form, 2010, 16(13): 41-44(in Chinese).
- [8] 张前军,杨小生,朱海燕,等. 连钱草中有机酸成分研究[J]. 天然产物研究与开发,2006,18(增刊):55-56.
ZHANG Qianjun, YANG Xiaosheng, ZHU Haiyan, et al. Organic acids of *Glechoma longituba* [J]. Nat Prod Res Dev, 2006, 18(Suppl): 55-56(in Chinese).
- [9] ZHANG Q J, YANG X S, ZHU H Y, et al. A novel sesquiterpenoid from *Glechoma longituba* [J]. Chin Chem Lett, 2006, 17(3): 355-357.
- [10] ZHU Y D, ZOU J, ZHAO W M. Two new monoterpenoid glycosides from *Glechoma longituba* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10(2): 199-204.
- [11] 杨念云,段金殿,李萍,等. 连钱草中的黄酮类化学成分[J]. 中国药科大学学报,2005,36(3):210-212.
YANG Nianyun, DUAN Jin'ao, LI Ping, et al. Flavonoids from *Glechoma longituba* (Nakai) Kupr[J]. J China Pharm U, 2005, 36(3): 210-212(in Chinese).
- [12] 杨念云,段金殿. 连钱草的化学成分研究[J]. 药学报,2006,41(5):431-434.
YANG Nianyun, DUAN Jin'ao. Chemical constituents of *Glechoma longituba* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2006, 41(5): 431-434(in Chinese).
- [13] 钟艳梅,冯毅凡,郭姣. 基于 UPLC/Q-TOFMS 技术的白术药材化学成分快速识别研究[J]. 质谱学报,2015,36(1):72-77.
ZHONG Yanmei, FENG Yifan, GUO Jiao. Rapid identification of components from *Atractylodes macrocephalae* Rhizoma Based on UPLC/Q-TOF MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2015, 36(1): 72-77(in Chinese).

- [14] AZNAR M, RODRIGUEZ-LAFUENTE A, AL-FARO P, et al. UPLC-Q-TOF-MS analysis of non-volatile migrants from new active packaging materials[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 404(6/7): 1 945-1 957.
- [15] WONG M C Y, LEE W T K, WONG J S Y, et al. An approach towards method development for untargeted urinary metabolite profiling in metabonomic research using UPLC/Q TOF MS [J]. J Chromatogr B, 2008, 871(2): 341-348.
- [16] SHI F, GUO C, GONG L, et al. Application of a high resolution benchtop quadrupole-Orbitrap mass spectrometry for the rapid screening, confirmation and quantification of illegal adulterated phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal medicines and dietary supplements[J]. J Chromatogr A, 2014, 1 344(6): 91-98.
- [17] LI W, XING W, WANG S, et al. An online coupled peritoneal macrophage/cell membrane chromatography and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry method to screen for anti-inflammatory components from the Chinese traditional medicine *Chloranthus multistachys* Pei[J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(11): 1 580-1 586.
- [18] LI L, LUO G A, LIANG Q L, et al. Rapid qualitative and quantitative analyses of Asian ginseng in adulterated American ginseng preparations by UPLC/Q-TOF-MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(1): 66-72.
- [19] MA Z C, ZHOU S S, LIANG Q D, et al. UPLC-TOF/MS based chemical profiling approach to evaluate toxicity-attenuated chemical composition in combination of ginseng and Radix Aconiti Praeparata[J]. Acta Pharm Sin, 2011, 46(12): 1 488-1 492.
- [20] WU H X, YANG C Y, WANG Z H, et al. Metabolism profile of quinocetone in swine by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2012, 37(2): 141-154.
- [21] ABLAJAN K, ABLIZ Z, SHANG X Y, et al. Structural characterization of flavonol 3,7-*di-O*-glycosides and determination of the glycosylation position by using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2006, 41(3): 352-360.
- [22] MARCH R E, LEWARS E G, STADEY C J, et al. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry[J]. Int J Mass Spectrum, 2006, 248(1/2): 61-85.
- [23] CUYCKENS F, CLAEYS M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids[J]. J Mass Spectrom, 2004, 39(1): 1-15.
- [24] HVATTUM E, EKEBERG D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2003, 38(1): 43-49.
- [25] 刘建群,舒积成,张锐,等. 新西兰牡荆苷等4种碳苷黄酮的电喷雾质谱裂解规律研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8): 72-76.
- LIU Jianqun, SHU Jicheng, ZHANG Rui, et al. Study on the four flavone-C-glycosides by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chin Exp Tradit Med Form, 2013, 19(8): 72-76(in Chinese).