

杜仲化学成分的 LC-Triple TOF MS/MS 分析

严 颖, 赵 慧, 邹立思, 刘训红, 柴 川, 王胜男, 华愉教

(南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 采用液相色谱-三重四极杆飞行时间串联质谱(LC-Triple TOF MS/MS)法分析杜仲中的化学成分。实验使用反相 C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱; 采用 ESI 离子源的正、负离子扫描方式对样品进行分析。根据高分辨质谱提供的准分子离子和碎片离子的精确分子质量信息, 并结合标准品对照与相关文献数据, 共鉴定出 35 种化学成分, 包括 13 种木脂素类、11 种环烯醚萜类、9 种苯丙素类和 2 种黄酮类成分。该实验可为杜仲的药效物质基础和品质评价等进一步研究提供基础资料。

关键词: 杜仲; 液相色谱-三重四极杆飞行时间串联质谱(LC-Triple TOF MS/MS); 化学成分

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2017)01-0146-11

doi: 10.7538/zpxb.2017.38.01.0146

Chemical Constituents of *Eucommiae Cortex* by LC-Triple TOF MS/MS

YAN Ying, ZHAO Hui, ZOU Li-si, LIU Xun-hong, CHAI Chuan,

WANG Sheng-nan, HUA Yu-jiao

(School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract: *Eucommia ulmoides* Oliv. is the sole species of the genus *Eucommia*, which is an important traditional Chinese herbal medicine with vast clinical consumption because of its positive effects. The leaf, stem, and bark as well as staminate flower of *Eucommia ulmoides* have been traditionally used to cure many diseases. Many studies indicated that monomer compounds and extracts from *Eucommiae Cortex* possess wide-ranging pharmacological actions, especially in treating hypertension, hyperlipemia, diabetes and obesity. In this study, LC-Triple TOF MS/MS was used to analyze the chemical constituents in *Eucommiae Cortex*. The separation and analysis were carried out on a reversed-phase C18 column with gradient elution of 0.1% formic acid (A)-acetonitrile (B). The gradient elution program was set as follow: 5%-10%B at 0-10 min, 10%-15%B at 10-12 min, 15%-20%B at 12-22 min, 20%-30%B at 22-35 min, 30%-60%B at 35-42 min, 60%-85%B at 42-55 min, 85%-5%B at 55-57 min, 5%-5%B at 57-60 min.

收稿日期: 2016-08-11; 修回日期: 2016-11-08

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助项目(YSXK-2014); 江苏高校品牌专业建设工程项目(PPZY2015A070)资助

作者简介: 严 颖 (1993—), 女(汉族), 江苏溧阳人, 硕士研究生, 中药学专业。E-mail: yanying93ly@163.com

通信作者: 刘训红 (1959—), 男(汉族), 江苏滨海人, 教授, 从事中药鉴定与品质评价研究。E-mail: liuxunh1959@sohu.com

The Triple TOF MS/MS system was equipped with an ESI source operating under both positive and negative ionization modes and the spectra were acquired in the range of m/z 50-1 500. According to the accurate mass of molecular and product ions provided by Triple TOF MS/MS, a total of thirty-five compounds in *Eucommiae Cortex* were identified or tentative presumed by compared with reference standards and literature reports, which included thirteen lignans (Olivil-4', 4''-di- $O\beta$ -D-glucopyranoside, 1-Hydroxypinoresinol-4', 4''-di- $O\beta$ -D-glucopyranoside, Olivil- $O\beta$ -D-glucopyranoside, Pinoresinol-di- $O\beta$ -D-glucopyranoside, Eucommin A, Medioresinol-di- $O\beta$ -D-glucopyranoside, Syringaresionl-di- $O\beta$ -D-glucopyranoside, Syringaresionl, 1-Hydroxypinoresinol- $O\beta$ -D-glucopyranoside, Olivil, Pinoresinol, Pinoresinol-4'- $O\beta$ -D-glucopyranoside, and Syringaresionl- $O\beta$ -D-glucopyranoside), eleven iridoids (Eucommioside, Aucubin, Deacetyl asperulosidic acid, Geniposidic acid, Harpagide, Asperulosidic acid, Catalpol, Geniposide, Genipin, Eucomoside B, and Eucommiol), nine phenylpropanoids (Protocatechuic acid 4-glucoside, Vanillic acid, Neochlorogenic acid, Chlorogenic acid, Cryptochlorogenic acid, Caffeic acid, Methyl chlorogenate, Isochlorogenic acid A, and Isochlorogenic acid C), and two flavonoids (Rutin and Isoquercitrin). Twelve of the compounds were identified by comparing their retention times and ESI-MS/MS data with those of reference standards, while other twenty-three compounds were tentatively identified or deduced according to their Triple TOF MS/MS data which afforded sufficient structural information. This study may provide the foundation and support for study on material foundation of efficacy and the overall assessment on quality of *Eucommiae Cortex*.

Key words: *Eucommiae Cortex*; LC-Triple TOF MS/MS; chemical constituents

杜仲来源于杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮,是我国特有的名贵药材,药用历史悠久,始载于《神农本草经》,列为上品,具有补肝肾、强筋骨、安胎之功效,用于肝肾不足、腰膝酸痛、筋骨无力、头晕目眩、妊娠漏血、胎动不安等症状^[1]。现代研究表明,杜仲含有木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类、多糖等多类药效活性成分,具有降血压、降血脂、降血糖、抗肿瘤、抗菌抗病毒、保肝护肾、抗骨质疏松等多方面的药理作用^[2-3]。近年来,杜仲因其显著的生理活性受到广泛关注,国内外学者对其进行了大量研究,主要集中于化学成分分离鉴定、药理作用和品质评价等方面^[4-6],亦有用液相色谱-质谱联用技术分析杜仲化学成分的报道,共定性或鉴定出其中 27 个化学成分^[7-9]。目前杜仲的分析方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、高效毛细管电泳法(HPCE)、核磁共振(NMR)和液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术等^[10-12]。HPLC 法操作简便、灵敏度较高;HPCE 法载样量小、柱效高、分辨率高,但重现

性差、灵敏度较低,以上二者主要用于含量测定。在杜仲化学成分研究方面,主要通过提取、萃取、柱层析或制备型液相色谱等手段分离得到单体化合物后,通过质谱及核磁共振等技术进行分析鉴定,但传统方法的鉴定效率较低,且对于中草药中微量化学成分的检出灵敏度低。液质联用技术具有高效、快速、实验前处理简单、灵敏度高、分辨率高等特点,已广泛应用于中药复杂化学成分的定性定量分析。该技术发展迅速,通过将不同类型的质谱串联组成复合型质谱以提高分辨率、检测灵敏度及质量测定准确度等,或增强其定量能力,实现定性和定量同时分析,以满足不同的分析需求。飞行时间质谱作为目前主流的高分辨质谱仪,其优点是扫描速度快,仪器结构简单,其质量准确度经严格校正后可达 10^{-6} 级,三重四极杆质谱和飞行时间质谱组成串联质谱,可提供母离子和碎片离子的精确质量,与三重四极杆质谱相比,具有更高的分辨率、更高的质量鉴定效率和更好的选择性^[13]。根据化合物的精确分子质量以及

多级质谱给出的化合物裂解碎片,结合相关文献资料,能够快速鉴定化合物的结构。

本实验采用液相色谱-三重四极杆飞行时间串联质谱(LC-Triple TOF MS/MS)技术对杜仲中的化学成分进行分析,根据高分辨质谱获得的化合物精确分子质量、碎片离子峰、色谱保留时间及对照品信息,结合相关文献数据,鉴定杜仲的化学成分,并推测其可能的裂解途径及规律,希望为研究杜仲药材的功效物质基础、质量变化规律及质量调控机制提供基础资料。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Triple TOFTM 5600 System-MS/MS 电喷雾飞行时间高分辨质谱仪;美国 AB Sciex 公司产品,配备 Peakview 1.2 数据处理工作站;SIL-20A XR 超快速液相色谱仪;日本 Shimadzu 公司产品;AnkeTGL-16B 离心机;上海安亭科学仪器厂产品;BSA224S 电子天平;德国赛多利斯公司产品;KQ-500B 型超声波清洗器;昆山市超声仪器有限公司产品;Milli-Q 超纯水制备仪;美国 Millipore 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

松脂醇二葡萄糖苷(批号:111537-200501)、桃叶珊瑚苷(批号:111761-200601)、京尼平苷(批号:110749-200714)、京尼平苷酸(批号:111828-201102)、哈巴苷(批号:111729-201405)、梓醇(批号:110808-200508)、绿原酸(批号:110753-200413)、咖啡酸(批号:110885-200102)、芦丁(批号:100080-200707)等对照品:纯度均大于 99%,由中国食品药品检定研究院提供;新绿原酸(批号:12112712)、隐绿原酸(批号:12112605):纯度均大于 98%,成都普瑞法科技开发有限公司产品;异槲皮苷(批号:BCBB2943):纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma 公司产品;甲醇(批号:143135):色谱纯,江苏汉邦科技有限公司产品;乙腈、甲酸:色谱纯,德国 Merck 公司产品;实验用水:Milli-Q 超纯水。

杜仲样品:于 2015 年 6 月中旬采自贵州省湄潭县洗马镇团结村(北纬 $107^{\circ}27'27.04''$,东经 $27^{\circ}57'15.67''$),剥取杜仲(树龄 15 年)干皮,堆积“发汗”5~7 天至内皮变紫褐色后,晒干。经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定为杜

仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的树皮,留样凭证保存于南京中医药大学中药鉴定实验室。

1.3 溶液制备

1.3.1 对照品溶液 分别取适量各对照品,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇溶解,配制成对照品溶液。分别取 0.2 mL 各对照品溶液,置于 10 mL 量瓶中,用 50% 甲醇配制成混合对照品溶液。

1.3.2 供试品溶液 精密称取 0.6 g 杜仲粉末,加入 30 mL 50% 甲醇,密闭,称其质量后,超声处理(功率 250 W,频率 30 kHz)20 min,放置冷却,再次称其质量,用 50% 甲醇补足质量损失,过滤,滤液以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜,即得供试品溶液。

1.4 实验条件

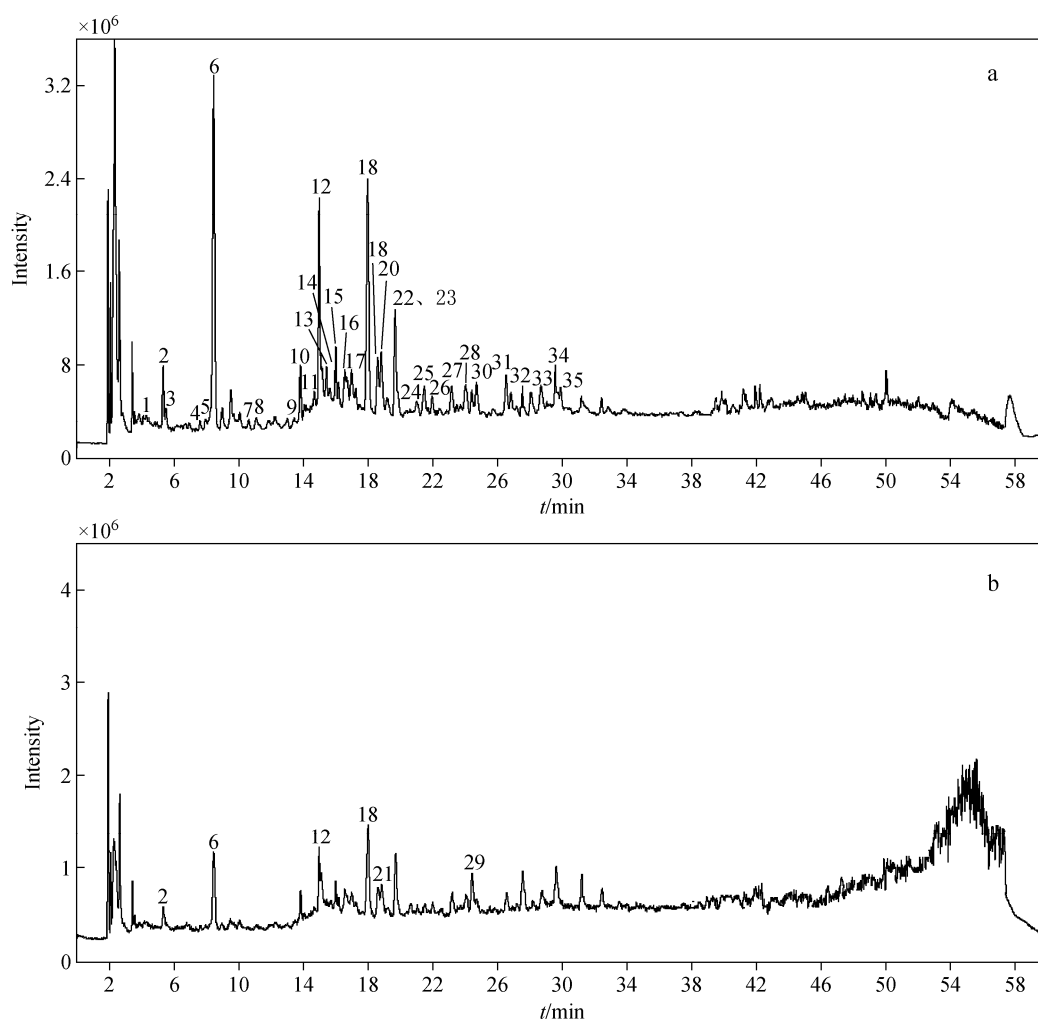
1.4.1 色谱条件 色谱柱:Agilent Zorbax SB-C18 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相:A 为 0.1% 甲酸-水溶液,B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~10 min(5%~10% B),10~12 min(10%~15% B),12~22 min(15%~20% B),22~35 min(20%~30% B),35~42 min(30%~60% B),42~55 min(60%~85% B),55~57 min(85%~5% B),57~60 min(5% B);柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;流速:1.0 mL/min;进样量:10 μL 。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式采集数据;质量扫描范围 m/z 50~1 500;气帘气压力 275.8 kPa;雾化气压力 379.2 kPa;辅助气压力 379.2 kPa;离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$;喷雾电压:正离子模式下 5 500 V,负离子模式下 -4 500 V;解簇电压:正离子模式下 100 V,负离子模式下 -100 V。

2 结果与讨论

2.1 杜仲化学成分色谱峰的鉴定

按照 1.4 节条件对杜仲化学成分进行分离和分析,正、负离子两种模式下的总离子流色谱图示于图 1,可见,本实验从杜仲中共鉴定出 35 个化合物。将供试品的色谱保留时间、质谱准分子离子峰和碎片离子峰信息等与对照品比对,确定了 12 个化学成分峰。汇总与杜仲化学成分相关的文献,根据质谱提供的准确分子质



注:a. 负离子模式扫描;b. 正离子模式扫描

图1 杜仲50%甲醇提取物的总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram (TIC) of 50% methanol extract of *Eucommiae Cortex*

量计算化合物的分子式,再依据碎片离子信息,与相关文献数据比对,并结合 HMDB 数据库检索,共推断出 23 个化学成分峰。杜仲化学成分的保留时间、分子式、化合物名称、高分辨质谱母离子及偏差数据、碎片离子信息等详细信息列于表 1。

2.2 各类化合物的质谱解析

2.2.1 木脂素类 本实验共鉴定了 13 个木脂素类化合物,包括 10 个双环氧木脂素和 3 个单环氧木脂素,分别对应图 1 中的峰 10、15、17、18、19、20、22、23、26、27、29、31 和 32。杜仲中的木脂素类化合物大多为苯丙素二聚体与 1~2 个葡萄糖结合,以单糖苷或二糖苷的形式存在,二级质谱通常失去葡萄糖中性碎片,二糖苷变

为单糖苷碎片的离子峰,单糖苷变为苷元碎片的离子峰。得到的苷元碎片在负离子模式下易失去甲基中性碎片,形成 $[M-H-CH_3]^-$ 碎片离子,苷元碎片在正负离子模式下均可断开呋喃环或四氢呋喃环得到相应碎片离子,如松脂醇碎片离子 m/z 205 和 m/z 151,丁香素碎片离子 m/z 181。

以松脂醇及其糖苷类化合物为例说明其裂解途径。化合物 18 的保留时间为 17.95 min,其准分子离子峰 m/z 681.239 5 $[M-H]^-$ 直接失去 1~2 个葡萄糖中性碎片得到碎片 m/z 519 和 m/z 357,苷元碎片可裂解得到碎片 m/z 151,松脂醇二葡萄糖苷的裂解途径示于图 2。通过与对照品比对,并结合文献数据,推测化合

表 1 LC-Triple TOF MS/MS 分析杜仲中化学成分的鉴定结果

Table 1 Identification of the compounds in *Eucommiae Cortex* by LC-Triple TOF-MS/MS

峰号 No.	t_R / min	MS ¹ m/z	MS ² m/z	分子式 Formula	偏差 Error/ 10^{-6}	化合物 Compound
1	4.35	349.1501[M-H] ⁻	187,169,89,59	C ₁₅ H ₂₆ O ₉	-0.9	杜仲醇苷 Eucommioside ^[14]
2*	5.30	345.1183[M-H] ⁻ 347.1292[M+H] ⁺	183,165,139	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	-2.3	桃叶珊瑚苷 Aucubin ^[7]
3	5.53	389.1094[M-H] ⁻	227,209,183,165,147,121	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	1.2	去乙酰车叶草苷酸 Deacetyl asperulosidic acid ^[15,30]
4	7.98	315.0728[M-H] ⁻	153,108	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	0.9	原儿茶酸-4-葡萄糖苷 Protocatechuic acid-4-glucoside ^[9]
5	8.22	167.0357[M-H] ⁻	152,108	C ₈ H ₈ O ₄	4.2	香草酸 Vanillic acid ^[16,23]
6*	8.36	373.1139[M-H] ⁻ 375.1274[M+H] ⁺	211,193,167,149,121	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	-0.3	京尼平苷酸 Geniposidic acid ^[7,20]
7*	10.46	363.1300[M-H] ⁻	345,201,183,165,89	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀	0.9	哈巴苷 Harpagide ^[24]
8*	11.08	353.0885[M-H] ⁻	191,179,135	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1.9	新绿原酸 Neochlorogenic acid ^[7,17,29]
9	13.77	431.1195[M-H] ⁻	269,251,225,165	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₂	0.0	车叶草苷酸 Asperulosidic acid ^[18,20,30]
10	13.79	699.2530[M-H] ⁻	537,375	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₇	3.5	橄榄素二葡萄糖苷 Olivil-4',4''-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside ^[14]
11*	14.60	361.1139[M-H] ⁻	199,181	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	-0.3	梓醇 Catalpol ^[19-20]
12*	14.97	353.0875[M-H] ⁻ 355.1003[M+H] ⁺	191,179,135	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-0.9	绿原酸 Chlorogenic acid ^[7,17,29]
13*	15.42	353.0887[M-H] ⁻	191,179,135	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	2.5	隐绿原酸 Cryptochlorogenic acid ^[7,17,29]
14*	15.82	387.1293[M-H] ⁻	225,165	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	1.0	京尼平苷 Geniposide ^[8,19]
15	16.13	697.2355[M-H] ⁻	535,373	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₇	0.8	1-羟基松脂素二葡萄糖苷 1-Hydroxypinoresinol-4',4''-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside ^[14]
16*	16.74	179.0358[M-H] ⁻	135	C ₉ H ₈ O ₄	4.9	咖啡酸 Caffeic acid ^[7,25,29]
17	17.23	537.1950[M-H] ⁻	375	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₂	-2.9	橄榄素单葡萄糖苷 Olivil- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside ^[7,14]
18*	17.95	681.2395[M-H] ⁻ 683.2523[M+H] ⁺	519,357,151	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₆	0.8	松脂醇二葡萄糖苷 Pinoresinol-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside ^[7,26-27]

续表 1

峰号 No.	t_R / min	MS ¹ m/z	MS ² m/z	分子式 Formula	偏差 Error/ 10^{-6}	化合物 Compound
19	18.72	549.1957[M-H] ⁻	387,372,357	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₂	-3.7	杜仲脂素 A Eucommin A ^[14,29]
20	18.79	711.2496[M-H] ⁻	549,387	C ₃₃ H ₄₄ O ₁₇	-1.4	中脂素二葡萄糖苷 Medioresinol-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside ^[14]
21	19.33	369.1173[M+H] ⁺	177,145	C ₁₇ H ₂₆ O ₉	-1.9	绿原酸甲酯 Methyl chlorogenate ^[14]
22	19.59	741.2623[M-H] ⁻	579,417	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈	1.6	丁香素二葡萄糖苷 Syringaresionl-di- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside ^[8,24]
23	19.67	417.1543[M-H] ⁻	387,181	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	-2.8	丁香素 Syringaresionl ^[14,28]
24	21.04	225.0776[M-H] ⁻	207,147,123,101,69	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	3.3	京尼平 Genipin ^[8]
25*	21.14	609.1439[M-H] ⁻	301,255	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-3.6	芦丁 Rutin ^[21-22]
26	21.92	535.1814[M-H] ⁻	373	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₂	-1.3	1-羟基松脂素单葡萄糖苷 1-Hydroxypinoresinol- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside ^[7,8,14]
27	23.31	375.1431[M-H] ⁻	360,179	C ₂₀ H ₂₄ O ₇	-4.9	橄榄树脂素 Olivil ^[7,8,25]
28*	24.36	463.0880[M-H] ⁻	301,271,255	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-0.4	异槲皮苷 Isoquercitrin ^[14,22]
29	24.52	359.1476[M+H] ⁺	205,151,137	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	-0.5	松脂醇 Pinoresinol ^[14,26]
30	24.73	520.1811[M-H] ⁻	358,234,190,164	C ₂₅ H ₃₁ NO ₁₁	-2.5	Eucomside B ^[9]
31	26.44	519.1860[M-H] ⁻	357,151	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	-2.3	松脂醇单葡萄糖苷 Pinoresinol-4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside ^[7,29]
32	27.22	579.2079[M-H] ⁻	417	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃	-0.7	丁香素单葡萄糖苷 Syringaresionl- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside ^[14]
33	28.05	515.1171[M-H] ⁻	353,191,179,135	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	-4.6	异绿原酸 A Isochlorogenic acid A ^[17,29,31-32]
34	29.69	187.0971[M-H] ⁻	169,125	C ₉ H ₁₆ O ₄	-2.6	杜仲醇 Eucommiol ^[14]
35	29.90	515.1195[M-H] ⁻	353,191,179,173,135	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	0.0	异绿原酸 C Isochlorogenic acid C ^[17,29,31-32]

注:标“*”的化合物已与对照品比对确定

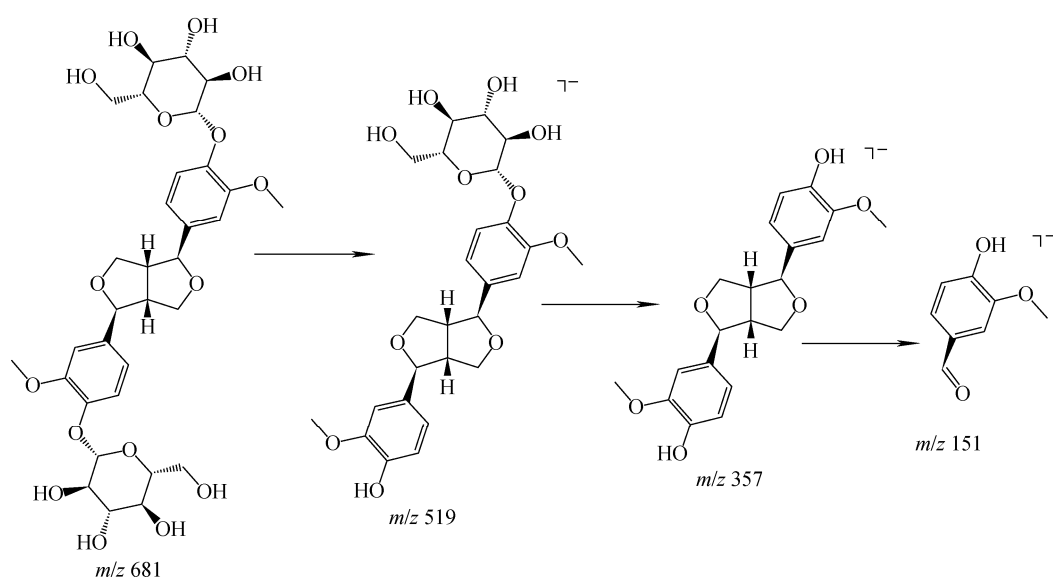


图2 松脂醇二葡萄糖苷的裂解途径

Fig. 2 Fragmentation pathways of pinoresinol-di-O- β -D-glucopyranoside

物18为松脂醇二葡萄糖苷。化合物29的保留时间为24.52 min,其准分子离子峰 m/z 359.147 6 $[M+H]^+$ 的呋喃环断开得到碎片 m/z 205 $[M-ArCHO-H]^+$ 和 m/z 151 $[ArCO]^+$,或 m/z 137 $[ArCH_2]^+$,结合文献数据推测化合物29可能为松脂醇。化合物31的保留时间为26.44 min,其准分子离子峰 m/z 519.186 0 $[M-H]^-$ 失去葡萄糖中性碎片得到苷元碎片 m/z 357,苷元碎片可裂解得到碎片 m/z 151,结合文献数据推测该化合物可能为松脂醇单葡萄糖苷。

2.2.2 环烯醚萜类 本实验共鉴定了11个环烯醚萜类化合物,分别对应图1中的化合物1、2、3、6、7、9、11、14、24、30和34。环烯醚萜类化合物中,大多为环烯醚萜苷类成分,此类成分均易失去葡萄糖中性碎片162,得到苷元碎片离子 $[M-H-Glc]^-$ 。对苷元碎片进行二级质谱分析,大多易失去 H_2O 分子或/和 CO_2 分子得到 $[M-H-Glc-H_2O]^-$ 、 $[M-H-Glc-CO_2]^-$ 、 $[M-H-Glc-CO_2-H_2O]^-$ 等碎片离子。例如,杜仲醇苷碎片离子 m/z 169、桃叶珊瑚苷碎片离子 m/z 165、京尼平苷酸碎片离子 m/z 193、 m/z 167、 m/z 149等。京尼平则易在失去一分子 H_2O 后继续失去中性 CH_3COOH 碎片得到 m/z 147。同时,杜仲中普通环烯醚萜类成分易由母离子在1,4位断开

得到失去中性碎片 $^{1,4}I$ ($C_7H_7O_2$ 或 $C_7H_7O_3$)的碎片离子,也有 $^{1,4}I$ 失去H的碎片离子。如Eucomoside B的碎片离子 m/z 234为苷元碎片 m/z 358作为母离子失去 $^{1,4}I$ 得到;京尼平碎片离子 m/z 123 $[^{1,4}I-H]^-$ 是由 $^{1,4}I$ 失去H得到。

以去乙酰车叶草苷酸为例说明其裂解途径。化合物3的保留时间为5.53 min,其准分子离子峰 m/z 389.109 4 $[M-H]^-$ 失去葡萄糖中性碎片得到苷元碎片 m/z 227,对苷元碎片进行二级质谱分析, m/z 227丢失一分子 H_2O 得到碎片 m/z 209或丢失一分子 CO_2 得到碎片 m/z 183,碎片 m/z 183离子相继失去两分子 H_2O 得到碎片 m/z 165和 m/z 147,结合文献数据,推测化合物3可能为去乙酰车叶草苷酸,其裂解途径示于图3。

2.2.3 苯丙素类 本实验共鉴定了9个苯丙素类化合物,分别对应图1中的化合物4、5、8、12、13、16、21、33和35。其中,绿原酸、绿原酸甲酯、异绿原酸等咖啡酰基奎宁酸类化合物易先失去咖啡酰残基,得到碎片离子 $[M-H-caffeoyl]^-$ 或 $[M+H-caffeoyl]^+$,而后绿原酸和异绿原酸在负离子模式下易失去一分子 H_2O ,绿原酸甲酯在正离子模式下易失去一分子甲氧基,同时咖啡酰基碎片易失去一分子 CO_2 得到 $[caffeoyl-H-CO_2]^-$ 碎片离子。简单酚类或酚酸类化合物的裂解方式有所不同。

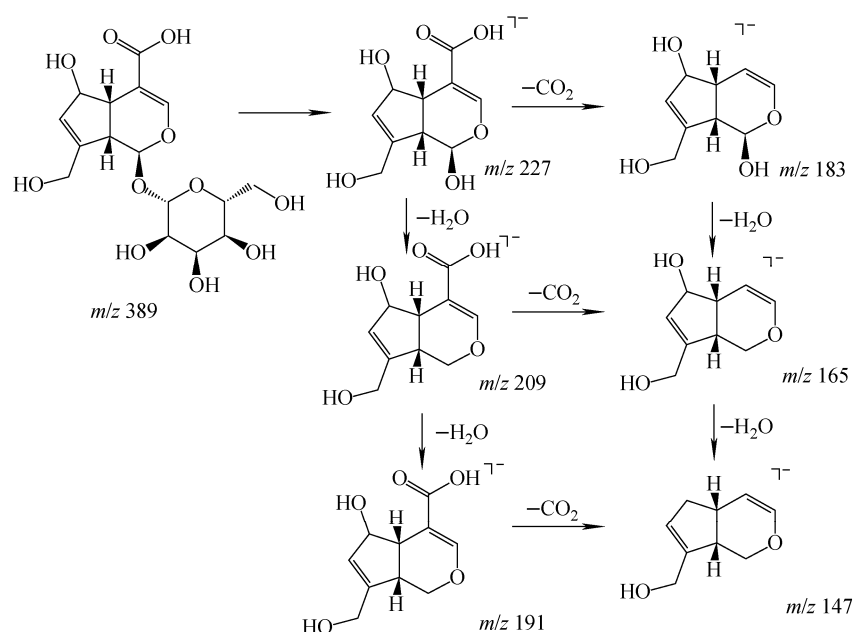


图3 去乙酰车叶草苷酸的裂解途径

Fig. 3 Fragmentation pathways of deacetyl asperulosidic acid

例如在负离子模式下,咖啡酸易失去一分子 CO_2 得到碎片离子 m/z 135;香草酸易失去一分子 CH_3 和一分子 CO_2 得到碎片离子 m/z 152 和 m/z 108;原儿茶酸-4-葡萄糖苷易在失去糖基碎片后失去一分子 CO_2 得到 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ 和 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$ 。

以绿原酸及其同分异构体、异绿原酸 A 和异绿原酸 C 为例说明其裂解途径。化合物 8、12 和 13 的保留时间分别为 11.08、14.97、15.42 min。准分子离子峰为 m/z 353.088 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 碎片离子为 m/z 191、179、135。绿原酸裂解规律示于图 4, 新绿原酸、隐绿原酸的裂解规律与绿原酸相似。由于三者的质谱数据相同, 无法通过质谱分辨, 只能通过与对照品比

对, 并结合文献数据, 推测化合物 8 为新绿原酸, 化合物 12 为绿原酸, 化合物 13 为隐绿原酸。

化合物 33、35 的保留时间分别为 28.05 min 和 29.90 min, 准分子离子峰为 m/z 515.12 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 碎片离子为 m/z 353、191、179、173、135。结合文献数据推测化合物 33 和 35 可能为异绿原酸, 但是用质谱技术无法确定它们是异绿原酸的哪个同分异构体。参考文献^[2-4]报道可知, 杜仲皮中含有异绿原酸 A 和异绿原酸 C, 结合文献^[31-32]中的洗脱顺序、极性差别等特性, 推测化合物 33 可能为异绿原酸 A, 化合物 35 可能为异绿原酸 C。异绿原酸 A 可能的裂解方式示于图 5。

2.2.4 黄酮类 实验中共鉴定了 2 个黄酮类化合物, 分别对应图 1 中的化合物 25 和 28, 二者均是苷元为槲皮素的黄酮苷类成分, 在裂解过程中均易丢失糖基碎片得到苷元碎片离子, 槲皮素苷元碎片还可进一步裂解丢失 H_2O 、 CO 碎片。

以芦丁为例说明其裂解途径。化合物 25 的保留时间为 21.14 min, 其准分子离子峰 m/z 609.143 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 失去鼠李糖和葡萄糖中性碎片得到苷元碎片 m/z 301, 文献表明苷元碎片裂解方式较多, 依据实验得到的质谱数据

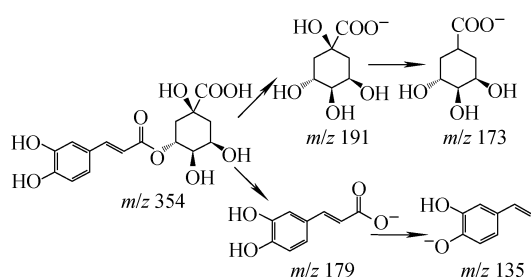


图4 绿原酸的裂解途径

Fig. 4 Fragmentation pathways of chlorogenic acid

中碎片离子 m/z 255, 推测芦丁可能的裂解方式示于图 6。通过与对照品比对, 并结合文献数据, 推测该化合物为芦丁。

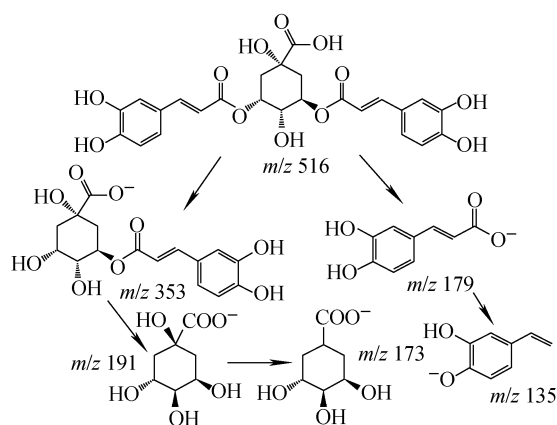


图 5 异绿原酸 A 的裂解途径

Fig. 5 Fragmentation pathways of isochlorogenic acid A

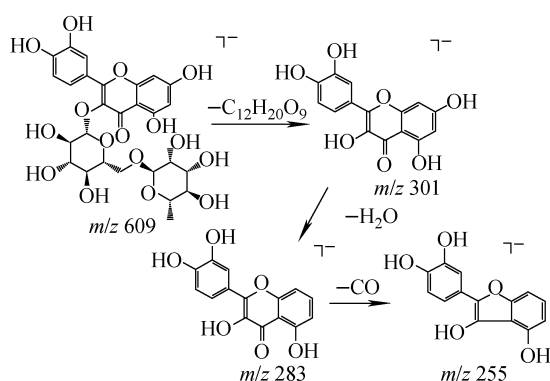


图 6 芦丁的裂解途径

Fig. 6 Fragmentation pathways of rutin

3 结论

本实验采用 LC-Triple TOF MS/MS 技术对杜仲的化学成分进行分析, 通过高分辨质谱获得的化合物精确分子质量、碎片离子峰、色谱保留时间及对照品信息, 结合相关文献数据, 初步鉴定出木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类和黄酮类共 35 种成分, 可为进一步探究杜仲的功效物质基础、质量变化规律及质量调控机制提供基础资料。

LC-Triple TOF MS/MS 技术能够提供高分辨、高精度的多级质谱数据, 适用于化合物的元素组成和裂解途径分析, 在中药复杂组分的

鉴定中具有广阔的应用前景。但该技术仍有其局限性, 比如难以通过质谱数据区分化合物的多种同分异构体, 也无法确认苷类成分中糖基的连接方式, 在裂解规律相关文献数据较少的情况下难以确认化合物的裂解途径等。因此采用质谱数据进行化合物结构鉴定的工作还需要进一步深入研究, 通过总结不同类型化合物的裂解特点, 为中药化学成分的结构解析提供更可靠的依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 164.
- [2] 李欣, 刘严, 朱文学, 等. 杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 378-382.
- LI Xin, LIU Yan, ZHU Wenxue, et al. Study advancement about chemical composition and pharmacological effects of *Eucommia ulmoides* Oliv[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(10): 378-382(in Chinese).
- [3] 冯哈, 周宏灏, 欧阳冬生. 杜仲的化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(6): 713-720.
- FENG Han, ZHOU Honghao, OUYANG Dongsheng. Study advancement about chemical composition and pharmacological effects of *Eucommia ulmoides* Oliv[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2015, 20(6): 713-720(in Chinese).
- [4] HE X, WANG J, LI M, et al. *Eucommia ulmoides* Oliv.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 151(1): 78-92.
- [5] 艾伦强, 李婷婷, 何银生, 等. 杜仲的应用研究进展[J]. 亚太传统医药, 2010, 6(10): 163-165.
- AI Lunqiang, LI Tingting, HE Yinsheng, et al. Progress in research on application of *Eucommiae ulmoides*[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2010, 6(10): 163-165(in Chinese).
- [6] 彭红梅, 李小妹. 杜仲的药理研究现状及应用展望[J]. 中医学报, 2013, 28(1): 72-73.
- PENG Hongmei, LI Xiaoshu. Pharmacological research and application of Duzhong[J]. China Journal of Chinese Medicine, 2013, 28(1): 72-73

- (in Chinese).
- [7] 何峰,王永林,郑林,等. UPLC-PDA-ESI-MS 分析杜仲中化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(3):59-62.
- HE Feng, WANG Yonglin, ZHENG Lin, et al. Identification of compounds in herb of *Eucommia ulmoides* by UPLC-PDA-ESI-MS [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2014, 20(3): 59-62(in Chinese).
- [8] CHAI X, WANG Y, SU Y, et al. A rapid ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the qualitative and quantitative analysis of ten compounds in *Eucommia ulmoides* Oliv[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011, 57(1): 52-61.
- [9] PI J J, WU X, RUI W, et al. Identification and fragmentation mechanisms of two kinds of chemical compositions in *Eucommia ulmoides*, by UPLC-ESI-Q-TOF MS/MS[J]. Chemistry of Natural Compounds, 2016, 52(1): 144-148.
- [10] 狄留庆,刘圣金,赵晓莉,等. 杜仲药材 HPLC 指纹图谱及其共有模式的建立[J]. 中草药, 2007, 38(4):596-599.
- DI Liqing, LIU Shengjin, ZHAO Xiaoli, et al. Establishment of fingerprint of *Eucommiae cortex* and its mutual mode by HPLC[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(4): 596-599(in Chinese).
- [11] 傅兴圣,韩乐,刘训红,等. 高效毛细管电泳测定杜仲中桃叶珊瑚苷等 5 种指标成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2012, 22(9):720-723.
- FU Xingsheng, HAN Le, LIU Xunhong, et al. Simultaneous determination of five index components in *Eucommiae cortex* by HPCE[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2012, 22(9): 720-723(in Chinese).
- [12] 王双燕,丁林芬,吴兴德,等. 杜仲化学成分研究[J]. 中药材, 2014, 37(5):807-811.
- WANG Shuangyan, DING Linfen, WU Xingde, et al. Chemical constituents of *Eucommia ulmoides*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2014, 37(5): 807-811(in Chinese).
- [13] 冯红,潘桂湘. 高分辨质谱在中药化学成分分析中的应用[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(8):40-42.
- FENG Hong, PAN Guixiang. Application of high resolution mass spectrum in the analysis of the chemical constituents in traditional chinese drug[J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2012, 14(8): 40-42(in Chinese).
- [14] 刘才英. 杜仲活性成分与土壤因子相关性及其化学成分 HPLC-Q-TOF-MS 分析的研究[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2013.
- [15] 于莉. 白花蛇舌草抗肿瘤活性成分的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学, 2009.
- [16] QI L W, CHEN C Y, LI P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in *Flos Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, 23(19): 3 227-42.
- [17] 田晨煦,徐小平,廖丽云,等. 高效液相色谱-串联质谱法分离鉴定绿原酸及其相关杂质[J]. 色谱, 2007, 25(4):496-500.
- TIAN Chenxu, XU Xiaoping, LIAO Liyun, et al. Separation and identification of chlorogenic acid and related impurities by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2007, 25(4): 496-500(in Chinese).
- [18] 范姣姣. 基于液质联用技术的消癌解毒方药效物质基础研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2014.
- [19] 卢建秋,孙明谦,张宏桂. 栀子苷和梓醇的电喷雾质谱裂解机制研究[J]. 中草药, 2008, 39(7): 1 011-1 014.
- LU Jianqiu, SUN Mingqian, ZHANG Honggui. Mechanisms of catalpol and jasminoidin by electrospray ionization mass spectrometry[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2008, 39(7): 1 011-1 014(in Chinese).
- [20] 李存满,骆亚薇,田宝勇. 环烯醚萜类化合物的质谱裂解规律研究进展[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2015, (6):522-526.
- LI Cunman, LUO Yawei, TIAN Baoyong. Research progress on mass spectral fragmentation of Iridoids[J]. Journal of Hebei Normal University: Natural Science Edition, 2015, (6): 522-526 (in Chinese).
- [21] 李自红,魏悦,范毅,等. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 分析实验室, 2015, (2):186-189.

- LI Zihong, WEI Yue, FAN Yi, et al. Elucidation of rutin by electron spray ionization mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2015, (2): 186-189(in Chinese).
- [22] 李宇航,戴海学,汪明明,等. 槲皮素的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 质谱学报, 2009, 30(6): 374-378.
- LI Yuhang, DAI Haixue, WANG Mingming, et al. Elucidation of quercetin by electron spray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2009, 30(6): 374-378(in Chinese).
- [23] 李振华,徐金娣,鞠建明,等. 川楝子水提化学成分的 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析[J]. 中草药, 2015, 46(04): 496-501.
- LI Zhenhua, XU Jindi, JU Jianming, et al. Chemical constituents from water extract of *Qoosendan Cructus* by UPLC-ESI-Q-TOF-MS [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2015, 46(04): 496-501(in Chinese).
- [24] COLAS C, GARCIA P, POPOT M, et al. Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of harpagophytum, in equine urine and plasma[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006, 20(22): 3 257-3 266.
- [25] ZHANG X, LI B, ZHOU M, et al. Chemical constituents from *Gymnosporia varialilis* Loes. [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2006, 12: 163-169.
- [26] BRENES M, HIDALGO F J, GARCIA A, et al. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil [J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2000, 77(7): 715-720.
- [27] FENG S, NI S, SUN W. Preparative isolation and purification of the *Lignan Pinoresinol Diglucoside* and *Liriodendrin* from the bark of by high speed countercurrent chromatography [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2007, 30(1): 135-145.
- [28] MONTHONG W, PITCHUANCHOM S, NUNTASAEN N, et al. (+)-Syringaresinol lignan from new species *Magnolia thailandica* [J]. American Journal of Applied Sciences, 2011, 8(12): 1 268-1 271.
- [29] QI L, CHEN Y, LI P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in *Flos Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009, 23(19): 3 227-3 242.
- [30] ÖZGEN, UFUK, KAZAZ C, et al. A novel naphthoquinone glycoside from *Rubia peregrina* L[J]. Turkish Journal of Chemistry, 2009, 33(4): 561-568.
- [31] GUO W, WANG L, GAO Y, et al. Isolation of isochlorogenic acid isomers in flower buds of *Lonicera japonica*, by high-speed counter-current chromatography and preparative high performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2015, (981/982): 27-32.
- [32] PENG B, QIAO C F, ZHAO J, et al. Simultaneous determination of flavonoids, isochlorogenic acids and triterpenoids in *Ilex hainanensis* Using high performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detection[J]. Molecules, 2013, 18(3): 2 934-2 941.