

基于 UHPLC-Q-TOF MS/MS 的 胆南星中胆汁酸类成分的质谱裂解规律研究

单国顺¹, 赵启苗², 潘 多¹, 陶 鑫¹, 高 慧¹, 许 枬¹, 贾天柱¹

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁中医药大学杏林学院, 辽宁 沈阳 110167)

摘要:采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UHPLC-Q-TOF MS/MS)法研究胆南星中 4 种类型 25 种胆汁酸类成分在电喷雾离子源正、负离子模式下的质谱裂解规律。结果表明,一级质谱中, 25 种胆汁酸类成分均可得到加氢(脱氢)的准分子离子峰 $[M+H]^+$ ($[M-H]^-$);二级质谱中,不同类型胆汁酸类成分(包含多种同分异构体)的裂解途径大多是脱去母核上的取代基产生 H_2O 及 CO_2 的中性碎片丢失。尤其是甾体母核 C17 位的功能基团更易裂解,产生一系列特征性碎片离子。游离胆汁酸在正离子模式下可发生 A 环和 C 环开裂,产生 m/z 175.112 3、161.096 6、147.081 4 离子;在负离子模式下可发生中性丢失,形成 $[M-H-CO_2]^-$ 、 $[M-H-H_2CO_2]^-$ 、 $[M-H-H_2O-H_2CO_2]^-$ 离子。此外,在正离子模式下,牛磺酸型胆汁酸可形成牛磺酸基裂解碎片离子 m/z 126.022 6,甘氨酸型胆汁酸可形成甘氨酸基裂解碎片离子 m/z 158.081 8;在负离子模式下,牛磺酸型胆汁酸侧链断裂可产生丰度较强的磺酸基 m/z 79.956 8、牛磺酸基 m/z 124.007 3 和牛磺酸脱氨 m/z 106.980 3 碎片离子,甘氨酸型胆汁酸侧链断裂可产生丰度较强的 m/z 74.042 6 碎片离子。在负离子模式下,单酮基胆汁酸母核裂解还可形成带有酮基的特征离子 m/z 402.301 3,而胆汁酸酯则难以形成稳定的负离子,在正离子模式下则可产生甘氨酸甲酯离子 m/z 90.055 7。这些质谱裂解规律有助于对胆南星中其它胆汁酸类化合物的结构进行解析与推断,也可为快速分析和鉴定含有胆汁酸类成分的样品提供依据。

关键词:超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UHPLC-Q-TOF MS/MS);胆南星;胆汁酸;裂解规律

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2020)04-0340-11

doi:10.7538/zpzb.2019.0050

Study on the Fragmentation Behavior of Bile Acids in Bile Arisaema by UHPLC-Q-TOF MS/MS

SHAN Guo-shun¹, ZHAO Qi-miao², PAN Duo¹,
TAO Xin¹, GAO Hui¹, XU Nan¹, JIA Tian-zhu¹

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. School of Xinglin, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110167, China)

收稿日期:2019-04-16;修回日期:2019-05-21

基金项目:国家发改委行业专项课题(201507004-03);科技部中药标准化项目(ZYBZH-Y-ZY-45)资助

作者简介:单国顺(1984—),男(汉族),辽宁营口人,副教授,从事中药炮制工艺与质量标准研究。E-mail: shanguoshun@126.com

通信作者:许 枬(1968—),女(汉族),辽宁丹东人,教授,从事天然产物研究与开发。E-mail: xudanbs@163.com

贾天柱(1951—),男(汉族),辽宁朝阳人,教授,从事中药炮制化学与化学炮制学研究。E-mail: jiatzh@126.com

网络出版时间:2020-01-21;网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20200121.1032.006.html>

Abstract: The fragmentation pathways of 4 types and 25 species bile acids in Bile Arisaema were investigated using ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometer (UHPLC-Q-TOF MS/MS) by electrospray ionization at positive and negative ion mode. The protonated $[M+H]^+$ or deprotonated $[M-H]^-$ were observed by ESI-MS, from which the molecular weights were deduced. The MS/MS data of $[M+H]^+$ or $[M-H]^-$ ions provided fragmentation information of the compounds. The main and typical fragmentation pathways of different bile acids were neutral losses of H_2O and CO_2 units in the substituent on the mother nucleus. In particular, the functional groups in the C17 position of steroid mother nucleus were broken and provided characteristic fragmentation information. Meanwhile, the cleavages of A and C ring were also observed at the positive ion mode of the free bile acids. The common fragment ions of m/z 175, 161 and 147 were characteristic ions. The ions of neutral loss were also observed at the negative ion mode of the free bile acids, generating ions of $[M-H-CO_2]^-$, $[M-H-H_2CO_2]^-$ and $[M-H-H_2O-H_2CO_2]^-$. Taurine type bile acid could be broken and provided taurine group fragment ion m/z 126.022 6 at the positive ion mode. Glycine type of bile acid could also be broken and provided glycine group fragment ion m/z 158.081 8 at the positive ion mode. Taurine type bile acid could be broken and provided high abundance of $[SO_3]^-$ fragment ion m/z 79.956 8, $[NH_2-CH_2-CH_2-SO_3]^-$ fragment ion m/z 124.007 3 and $[CH_2=CH_2-SO_3]^-$ fragment ion m/z 106.980 3 at the negative ion mode. Glycine type of bile acid could also be broken and provided high abundance of $[NH_2-CH_2-COO]^-$ fragment ion m/z 74.042 6 at the negative ion mode. In addition, the characteristic ion of m/z 402.301 3 with ketone group would be formed by the cleavage of single ketone group bile acid at the negative ion mode. It was difficult to form stable ions for bile acid esters at the negative ion mode. It could be broken and provided $[NH_2-CH_2-COOCH_3]^+$ fragment ion m/z 90.055 7. The fragmentation behavior of bile acids was reasonable and could provide the basis for the structures elucidation and identification in the Bile Arisaema. It will provide the basis for rapid analysis and identification of samples which contain bile acids.

Key words: ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometer (UHPLC-Q-TOF MS/MS); Bile Arisaema; bile acids; fragmentation behavior

胆南星是一味具有悠久历史的传统发酵制剂,由制天南星的细粉与牛、羊或猪胆汁经加工制成,或由生天南星细粉与牛、羊或猪胆汁经发酵加工而成,其味苦、辛、性凉,归肺、肝、脾经,具有清热化痰、息风定惊之功效,在临床上多用于痰热咳嗽、咯痰黄稠、中风痰迷、癫狂惊痫等症的治疗^[1-2]。目前,胆南星在生产上主要采用发酵法,并按照天南星-胆汁 100:40 的质量比投料。动物胆汁中含有大量的胆酸类成分,而该类成分又具有与胆南星相同的解热、祛痰作用^[3-4],因此

胆南星中胆汁酸类可能是其重要的活性成分。

胆汁酸(BAs)是一类具有胆甾烷母核的复杂物质,由肝脏分泌,广泛存在于人和动物体内,对脂类物质的吸收和代谢具有重要作用。实际上,作为重要的信号物质,胆汁酸因能表征机体的代谢障碍而成为生理、病理和代谢检测的重要指标。同时,某些动物胆汁酸及其产物具有良好的药用价值,常用于治疗发热、咳嗽等症^[3-4]。前期已有实验证实了胆南星中的胆汁酸类成分是发挥退热、抗炎作用的主要活性物质^[5-6],并以此

为基础,建立了相关的质量控制方法^[7-8]。但是,由于胆汁酸类成分结构特征的原因,在常规的紫外检测器下其灵敏度较低,这使得质谱成为定性定量检测此类物质的重要方法^[9-14]。尤其是多级质谱,可以给出胆汁酸类成分多种结构碎片信息,在定性鉴定和定量分析方面具有明显的优势^[15-16]。此外,由于胆汁酸类物质中同分异构体及差向异构体较多,加之有些胆汁酸成分获取困难,仅根据质谱裂解规律来鉴定胆汁酸类成分仍然面临很多挑战。

液相色谱-质谱联用技术兼具了色谱的高效分离能力以及质谱的定性功能,是天然药物分离和鉴定的有效方法^[17]。尤其是超高效液相色谱系统与电喷雾-四极杆-飞行时间质谱(ESI-Q-TOF MS)等高分辨质谱的联用,可在对化合物进行快速分离的同时获得其分子离子信息,还可在碰撞碎裂后获得丰富的碎片离子信息,从而有助于在复杂体系中进行化合物的结构推断。本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UHPLC-Q-TOF MS/MS)技术,在正、负两种离子模式下对胆南星中4种类型共25种单体成分的质谱裂解行为进行研究,以期为胆南星中其他同类化合物的结构鉴定提供依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Waters AcuityTM I-class 超高效液相色谱仪(在线脱气机,低压二元梯度泵,全自动进样器,柱温箱,二极管阵列检测器),Waters Xevo G2-XS 四极杆-飞行时间质谱仪,Waters Masslynx V4.1 数据处理软件;均为美国 Waters 公司产品;Mili-Q 超纯水系统;美国 Millipore 公司产品;AE240 型天平;瑞士 Mettler 公司产品;FA1004B 电子天平;上海精密科学仪器有限公司产品;KQ-250DB 型数控超声波清洗器;昆山市超声仪器有限公司产品。

1.2 主要材料与试剂

胆南星:实验室自制,按照2015版《中国药典》方法,采用东北天南星 *Arisaema amurense Maxim.* 细粉与猪胆汁混合(质量比100:40)发酵30天;甲醇、乙腈、甲酸:均为质谱级,德国 Merck 公司产品;实验用水:由 Millipore 纯水机制备;牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA)、牛磺猪去氧胆

酸(THDCA)、胆酸(CA)、鹅去氧胆酸(CDCA)、猪去氧胆酸(HDCA)、去氧胆酸(DCA):均购自中国食品药品检定研究院;猪胆酸(HCA)、6-酮-甘氨酸猪去氧胆酸(6-O-GHDCA)、7-酮-甘氨酸猪去氧胆酸(7-O-GCDCA)、6-酮-甘氨酸猪去氧胆酸乙酯(6-O-GHDCAE)、6-酮-甘氨酸猪去氧胆酸甲酯(6-O-GHDCAm)、7-酮-甘氨酸猪去氧胆酸甲酯(7-O-GCDCAm)、甘氨酸猪去氧胆酸甲酯(GCDCAm)、甘氨酸猪胆酸甲酯(GHCAM)、甘氨酸熊去氧胆酸甲酯(GUDCAm)、甘氨酸猪去氧胆酸甲酯(GHDCAm)、鹅去氧胆酸甲酯(CDCAM)、猪胆酸甲酯(HCAM)、猪去氧胆酸甲酯(HDCAM)、甘氨酸胆酸(GCA)、甘氨酸猪去氧胆酸(GCDCA)、甘氨酸猪去氧胆酸(GHDCA)、甘氨酸猪胆酸(GHCA)、牛磺胆酸(TCA)、牛磺猪胆酸(THCA):纯度均大于98%,由本实验室从胆南星中分离得到。25种对照品的结构式示于图1。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 Acquity UPLCTM BEH C18 色谱柱(2.1 mm×50 mm×1.7 μm);流动相: A 为乙腈, B 为含 0.1% 甲酸的水溶液;流速 0.45 mL/min;梯度洗脱程序:0~3 min(10%~25% A),3~7 min(25%~30% A),7~11 min(30%~50% A),11~12 min(50%~70% A),12~17 min(70%~100% A),17~18 min(100% A),18.01~22 min(10% A);柱温 35 °C;进样量 2 μL。

1.3.2 质谱条件 ESI 电喷雾离子源正、负离子模式,毛细管电压 2.5 kV,锥孔电压 40 V,离子源补偿电压 80 V,离子源温度 100 °C,脱溶剂气温度 400 °C,锥孔气流速 100 L/h,脱溶剂气流速 800 L/h,质量扫描范围 m/z 50~1 200,信号采集频率 0.5 s⁻¹。

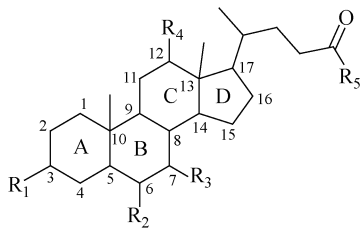
1.4 供试品溶液的制备

分别称取各约 2.0 mg 上述 25 种对照品,精密称定,置于 5 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制成储备液。临用时以甲醇稀释 100 倍,并过 0.22 μm 滤膜。

2 结果与讨论

2.1 正负离子模式下的 LC-MS 分析

胆汁酸类成分由于其结构特点存在较多同分异构体。本研究涉及的4种类型25种胆汁酸



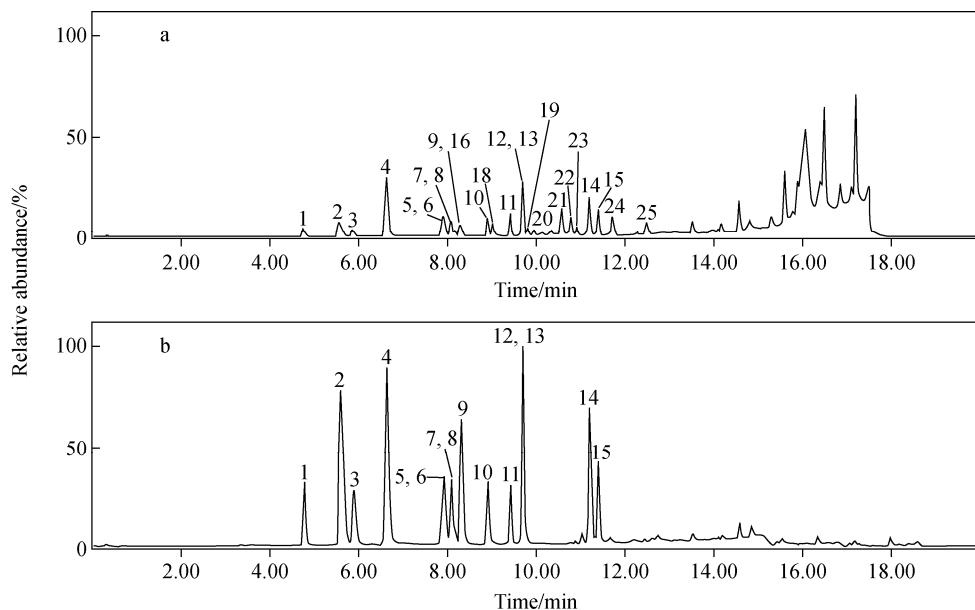
序号 No.	化合物 Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	THCA	OH	OH	OH	H	NH(CH ₂) ₂ SO ₃
2	THDCA	OH	H	OH	H	NH(CH ₂) ₂ SO ₃
3	TCA	OH	H	OH	OH	NH(CH ₂) ₂ SO ₃
4	GHCA	OH	OH	OH	H	NHCH ₂ COOH
5	GCA	OH	H	OH	OH	NHCH ₂ COOH
6	6-O-GHDCA	OH	CO	H	H	NHCH ₂ COOH
7	GHDCA	OH	OH	H	H	NHCH ₂ COOH
8	7-O-GCDCA	OH	H	CO	H	NHCH ₂ COOH
9	TCDCA	OH	H	OH	H	NH(CH ₂) ₂ SO ₃
10	HCA	OH	OH	OH	H	OH
11	CA	OH	H	OH	OH	OH
12	GCDCA	OH	H	OH	H	NHCH ₂ COOH
13	HDCA	OH	OH	H	H	OH
14	DCA	OH	H	H	OH	OH
15	CDCA	OH	H	OH	H	OH
16	GHCAM	OH	OH	OH	H	NHCH ₂ COOCH ₃
17	GHDCAM	OH	OH	H	H	NHCH ₂ COOCH ₃
18	6-O-GHDCAM	OH	CO	H	H	NHCH ₂ COOCH ₃
19	7-O-GCDCAM	OH	H	CO	H	NHCH ₂ COOCH ₃
20	GUDCAM	OH	H	OH	H	NHCH ₂ COOCH ₃
21	GCDCAM	OH	H	OH	H	NHCH ₂ COOCH ₃
22	HCAM	OH	OH	OH	H	OCH ₃
23	HDCAM	OH	OH	H	H	OCH ₃
24	CDCAM	OH	H	OH	H	OCH ₃
25	6-O-GHDCAE	OH	CO	H	H	NHCH ₂ COOCH ₂ CH ₃

图 1 25 种对照品的结构式

Fig. 1 Chemical structures of 25 compounds

类成分包括 9 组同分异构体,即 DCA,HDCA 与 CDCA; THDCA 与 TCDCA; GHDCA 与 GCDCA;CA 与 HCA; TCA 与 THCA; GCA 与 GHCA; 6-O-GHDCA 与 7-O-GCDCA; 6-O-GHDCAM 与 7-O-GCDCAM; GHDCAM 与 CDCAM。然而,互为同分异构体的化合物由于质量数相同,仅通过质谱无法对其进行鉴别。超高效液相色谱-串联高分辨质谱技术兼顾了

液相色谱的分离能力和质谱的分辨能力,利用各组同分异构体之间结构不同所导致的色谱行为差异进行分离,再分别进行质谱碎片分析,能够有效地分离和鉴定胆汁酸中同分异构体化合物。因此,本研究采用 UHPLC-Q-TOF MS/MS 技术分析胆南星中 25 种胆汁酸类成分,在正、负离子模式下,25 种化合物均得到良好分离,其总离子流图示于图 2。



注: 1. THCA; 2. THDCA; 3. TCA; 4. GHCA; 5. GCA; 6. 6-O-GHDCA; 7. GHDCA; 8. 7-O-GCDCA;
9. TCDCA; 10. HCA; 11. CA; 12. GCDCA; 13. HDCA; 14. DCA; 15. CDCA; 16. GHCA; 17. GHDCA; 18. 6-O-GHDCA; 19. 7-O-GCDCA; 20. GUDCA; 21. GCDCA; 22. HCAM; 23. HDCAM; 24. CDCAM; 25. 6-O-GHDCAE

图2 正(a)、负(b)离子模式下, 25种胆汁酸类化合物的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of 25 bile acids at positive (a) and negative (b) ion modes

2.2 质谱裂解规律分析

2.2.1 游离型胆汁酸的裂解规律分析 正离子模式下, 游离型胆汁酸的一级质谱可以形成较稳定的准分子离子 $[M+H]^+$ 。在二级质谱中可以产生一定数目的脱水离子 $[M+H-nH_2O]^+$, 该脱水离子除由失去羟基产生外, 也可由失去羧基产生, 故脱水的数目为羟基数加1。侧链断裂也是游离型胆汁酸类化合物常见的断裂方式, 从而得到甾体母核结构的碎片离子。此外, 在正离子模式下还可产生丰度较小的A环和C环开裂的碎片离子, 这也是负离子模式下较少发生的情况。甾体母核裂解代表性碎片离子包括 m/z 175.112 3、161.096 6、147.081 4等。5种游离型胆汁酸在正离子模式下的一级、二级质谱数据列于附表1(文章中的附表请登录《质谱学报》网站下载, 以下同)。

负离子模式下, 游离型胆汁酸的一级质谱可以产生稳定的准分子离子 $[M-H]^-$ 。二级质谱中可以产生丰度较大的脱水离子 $[M-H-nH_2O]^-$, 脱水数目一般与分子中羟基数一致。此外, 准分子离子还容易丢失 m/z 44、46、64 离子, 生成 $[M-H-CO_2]^-$ 、 $[M-H-$

$H_2CO_2]^-$ 、 $[M-H-H_2O-H_2CO_2]^-$ 。侧链断裂是游离型胆汁酸类化合物常见的断裂方式, 生成的离子一般丰度较大, 故在胆酸、猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸及去氧胆酸的二级质谱中可分别观察到 m/z 289.216 6、273.221 9 碎片离子, 这对于鉴定甾体母核部分的结构非常有价值。需要注意的是, 丢失侧链后的碎片离子往往伴随丢失2个H的碎片离子, 这也是游离型胆汁酸二级质谱的一个特征^[14]。5种游离型胆汁酸在负离子模式下的一级、二级质谱数据列于附表1。以猪胆酸为例, 正、负离子模式下的二级质谱图示于图3。

猪胆酸在正离子模式下的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 409.295 4, 主要碎片为失去一系列 H_2O 分子形成的碎片离子 m/z 391.284 8、373.274 3、355.263 7、337.253 1。其中, 脱水离子除由羟基产生外, 羧基也可脱水形成碎片离子 m/z 337.253 1, 该碎片还可通过侧链断裂形成碎片离子 m/z 253.195 6。该碎片离子还可进一步发生A环、C环开裂产生丰度较小的碎片离子 m/z 173.096 6、159.081 0、147.081 4。正离子模式下, 猪胆酸可能的裂解途径示于图4。

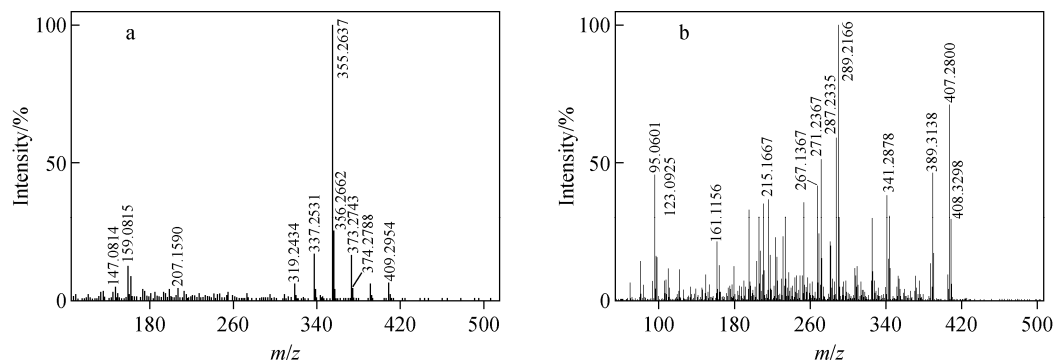


图3 正(a)、负(b)离子模式下,猪胆酸的 MS/MS 谱图

Fig. 3 MS/MS spectra of hyocholic acid at positive (a) and negative (b) ion modes

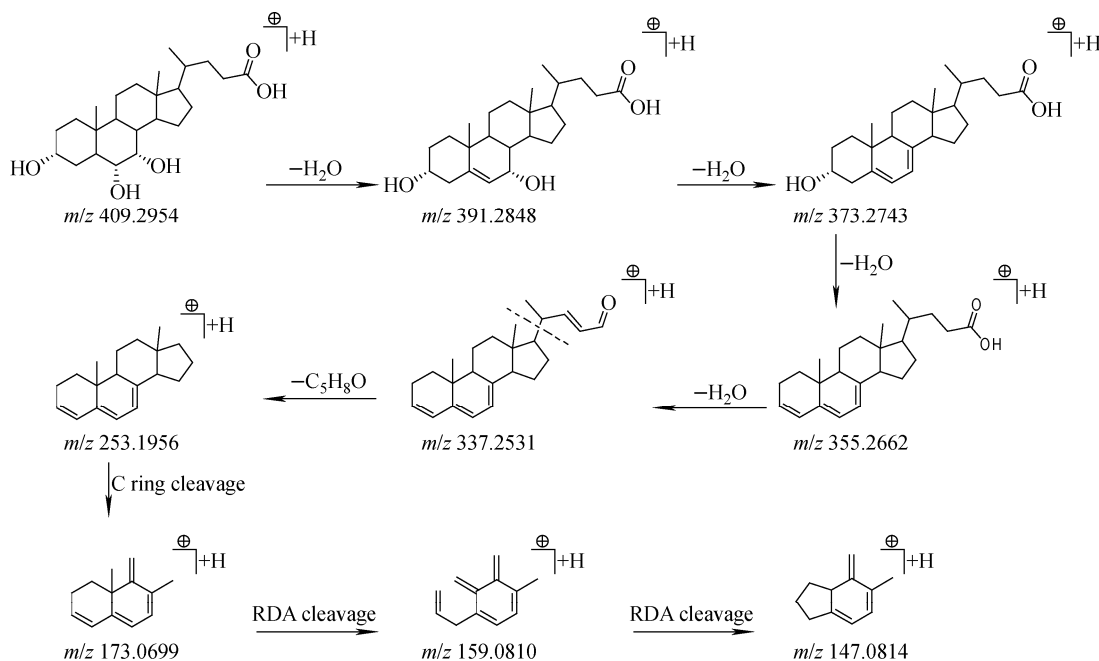


图4 正离子模式下,猪胆酸可能的裂解途径

Fig. 4 Proposed fragmentation pathway of hyocholic acid at positive ion mode

猪胆酸在负离子模式下的分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 407.280 0, 主要碎片包括失去 1 分子 H_2O 形成的 m/z 389.313 8、失去 1 分子 H_2CO 和 H_2O 形成的 m/z 341.267 8; 其中, 碎片 m/z 389.313 8 可通过侧链断裂形成 m/z 289.216 6 $[M-H-H_2O-C_5H_8O_2]^-$ 基峰, 该碎片还可脱去 1 分子 H_2O 形成碎片离子 m/z 271.236 7, 以及通过丢失 2 个 H 形成独特的碎片离子 m/z 287.201 1。负离子模式下, 猪胆酸可能的裂解途径示于图 5。

2.2.2 结合型胆汁酸的裂解规律分析 结合型胆汁酸主要分为牛磺酸型和甘氨酸型。正离

子模式下, 结合型胆汁酸的一级质谱可以形成较稳定的准分子离子 $[M+H]^+$ 。二级质谱可以产生丰度较大的脱水离子 $[M+H-nH_2O]^+$, 脱水数目一般与分子中羟基数一致。此外, 结合型胆汁酸的侧链更容易断裂, 牛磺酸型胆汁酸可形成特征性的牛磺酸基裂解碎片离子 m/z 126.022 6, 甘氨酸型胆汁酸可形成特征性的甘氨酸基裂解碎片离子 m/z 158.081 8, 而部分 A、C 环裂解碎片与游离胆汁酸基本一致。

负离子模式下, 结合型胆汁酸的一级质谱可以形成稳定的 $[M-H]^-$ 离子。二级质谱除可产生脱水离子外, 牛磺酸型胆汁酸侧链断裂

还可产生丰度较强的磺酸基[SO₃]⁻碎片 m/z 79.956 8、牛磺酸基[NH₂—CH₂—CH₂—SO₃]⁻碎片 m/z 124.007 3 及牛磺酸脱氨离子 m/z 106.980 3 [CH₂=CH₂—SO₃]⁻，其中 m/z 79.956 8[SO₃]⁻ 多为基峰；甘氨酸型胆汁酸侧链断裂可产生丰度较强的碎片离子[NH₂—CH₂—COO]⁻ m/z 74.042 6(常为基峰)，依据

这些碎片离子可确认被分析成分为何种结合型胆汁酸。与游离型胆汁酸相似，结合型胆汁酸的准分子离子容易丢失 m/z 44、46，即产生[M—H—CO₂]⁻、[M—H—H₂CO₂]⁻等离子。10种结合型胆汁酸正、负离子模式下的一级、二级质谱数据列于附表2。以牛磺猪胆酸和甘氨酸猪胆酸为例，其二级质谱图示于图6。

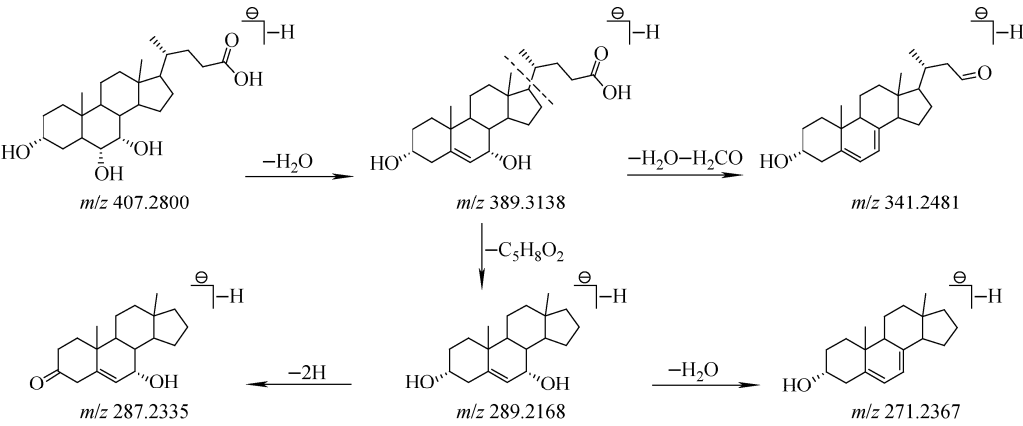


图5 负离子模式下,猪胆酸可能的裂解途径

Fig. 5 Proposed fragmentation pathway of hyocholic acid at negative ion mode

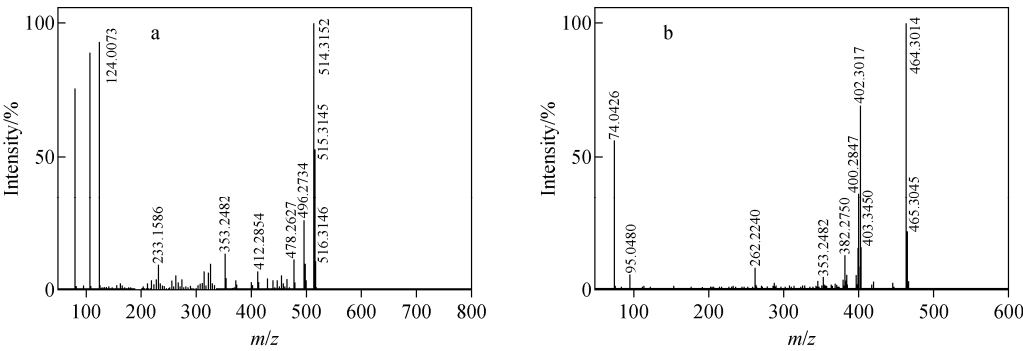


图6 负离子模式下,牛磺猪胆酸(a)及甘氨酸猪胆酸(b)的MS/MS图谱

Fig. 6 MS/MS spectra of taurohyocholic acid (a) and glycohyocholic acid (b) at negative ion mode

牛磺猪胆酸在负离子模式下的分子离子峰[M—H]⁻为 m/z 514.315 2,碎片离子包括失去一系列H₂O分子形成 m/z 496.273 4、478.262 7,以及侧链断裂所形成的牛磺酸基碎片[NH₂—CH₂—CH₂—SO₃]⁻ m/z 124.007 3、牛磺酸脱氨碎片[CH₂=CH₂—SO₃]⁻ m/z 106.980 3、磺酸基碎片[SO₃]⁻ m/z 79.956 8。负离子模式下,牛磺猪胆酸可能的裂解途径示于图7。

甘氨酸猪胆酸在负离子模式下的分子离子峰

[M—H]⁻为 m/z 464.301 4,可脱去1分子水形成离子[M—H—H₂O]⁻ m/z 446.290 6,该离子还可发生侧链断裂形成甘氨酸型胆汁酸的特征性碎片离子[NH₂—CH₂—COO]⁻ m/z 74.042 6以及碎片离子 m/z 371.258 6;此外,脱水峰[M—H—H₂O]⁻ m/z 446.290 6可进一步裂解形成碎片离子[M—H—CO₂]⁻ m/z 402.301 7、[M—H—H₂CO₂]⁻ m/z 400.284 7。负离子模式下,甘氨酸猪胆酸可能的裂解途径示于图8。

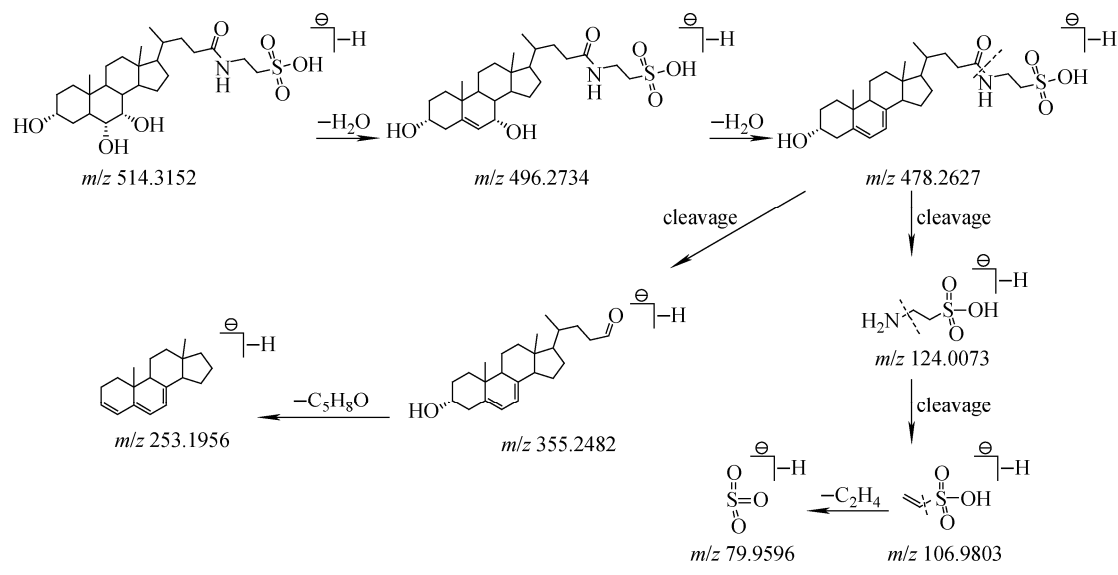


图 7 负离子模式下,牛磺猪胆酸可能的裂解途径

Fig. 7 Proposed fragmentation pathway of taurohyocholic acid at negative ion mode

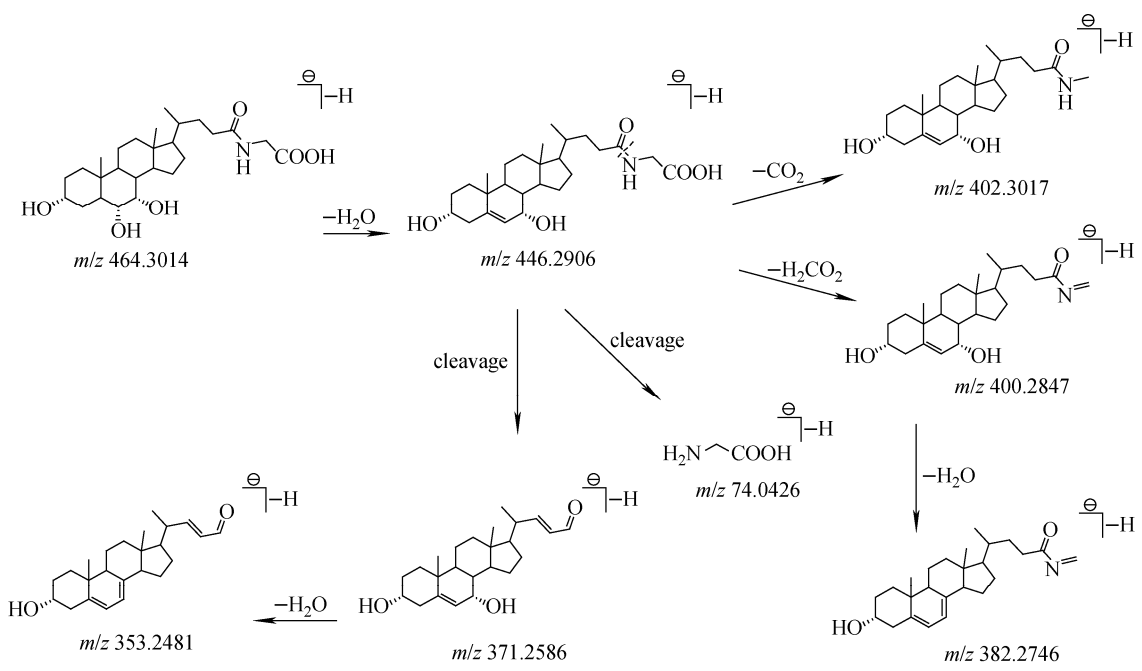


图 8 负离子模式下,甘氨酸猪胆酸可能的裂解途径

Fig. 8 Proposed fragmentation pathway of glycohyocholic acid at negative ion mode

2.2.3 单酮基胆汁酸的裂解规律分析 胆南星中分离得到的单酮基胆汁酸主要是 C-6 位或 C-7 位酮基的甘氨酸型结合胆汁酸。正、负离子模式下,单酮基胆汁酸的质谱裂解规律与甘氨酸型结合胆汁酸的裂解规律基本一致,但在母核裂解中形成带有酮基的离子 m/z 402.3013 是这类化合物的特征。

2 种单酮基胆汁酸在正、负离子模式下的一级、二级质谱数据列于附表 2,其二级质谱图示于图 9。

7-O-甘氨酸鹅去氧胆酸在负离子模式下的分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 446.2913,失去 1 分子 CO_2 形成带有酮基的碎片离子 m/z 402.3013,脱去 1 分子 H_2O 形成 m/z 384.2904;

分子离子峰发生侧链断裂还可形成侧链碎片离子
牛磺酸基 $[NH_2-CH_2-COOH]^-$ m/z 74.024 3

(基峰)。负离子模式下,牛磺猪胆酸可能的裂解途径示于图 10。

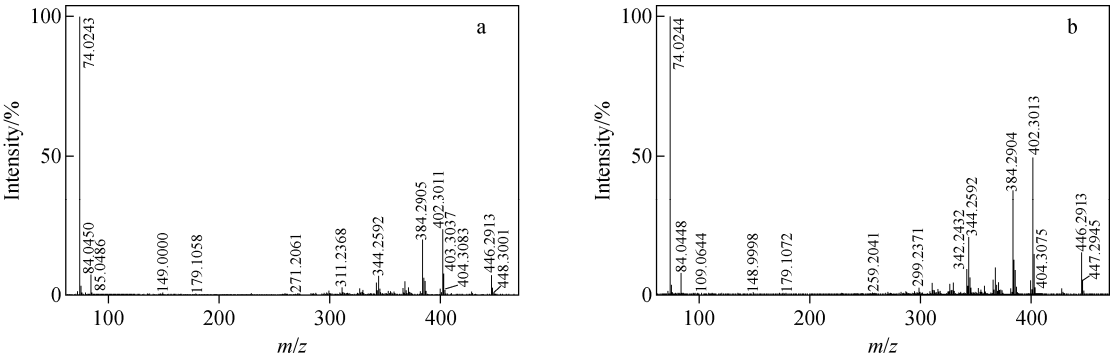


图 9 负离子模式下,6-*O*-甘氨酸猪去氧胆酸(a)及 7-*O*-甘氨酸鹅去氧胆酸(b)的 MS/MS 图谱

Fig. 9 MS/MS spectra of 6-*O*-glycohyodeoxycholic acid (a) and 7-*O*-glycochenodeoxycholic acid (b) at negative ion mode

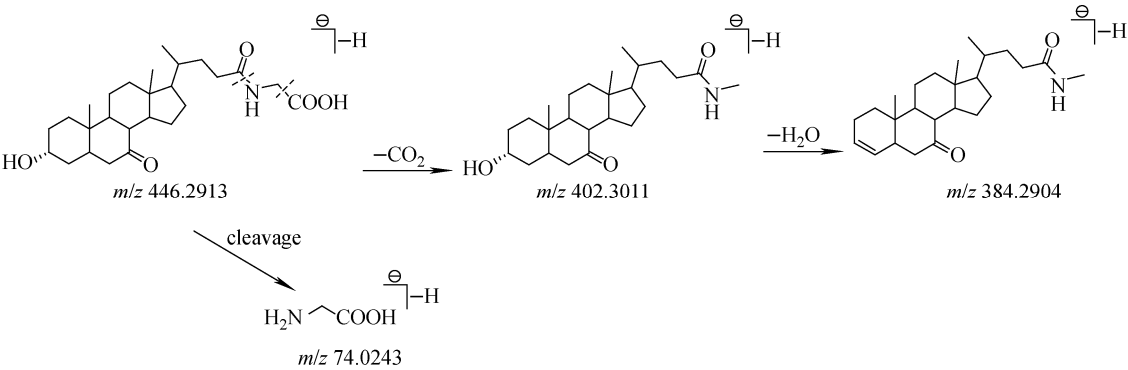


图 10 负离子模式下,7-*O*-甘氨酸鹅去氧胆酸可能的裂解途径

Fig. 10 Proposed fragmentation pathway of 7-*O*-glycochenodeoxycholic acid at negative ion mode

2.2.4 胆汁酸酯的裂解规律分析 胆南星中胆汁酸的酯化物以甲酯化的甘氨酸结合型胆汁酸类化合物居多,该类化合物在负离子模式下难以形成稳定的离子,仅可在正离子模式下进行分析。正离子模式下,胆汁酸酯的一级质谱可以形成稳定的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 。二级质谱可以产生甘氨酸甲酯离子 $[NH_2-CH_2-COOCH_3]^+$ m/z 90.055 7 及羟基脱水峰,还可产生母核的 A 和 C 环裂解碎片,对母核结构的鉴定十分有利,其二级质谱图示于图 11。此类成分的质谱裂解规律性较强,具体数据列于附表 3。

甘氨酸鹅去氧胆酸甲酯在正离子模式下的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 464.337 5,碎片离子为失去一系列 H_2O 分子形成的离子 $[M+$

$H-nH_2O]^+$ m/z 446.327 5、428.317 0;其中 m/z 428.317 0 脱水峰还可发生侧链断裂形成

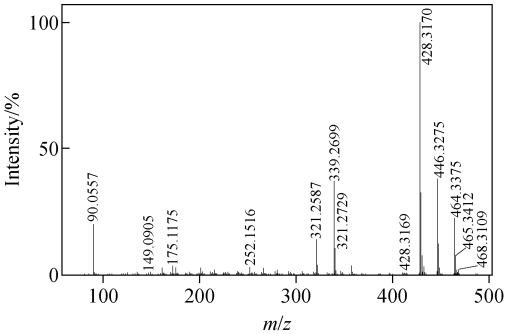


图 11 正离子模式下,甘氨酸鹅去氧胆酸甲酯的 MS/MS 图谱
Fig. 11 MS/MS spectrum of glycochenodeoxycholic acid methyl ester at positive ion mode

甘氨酸甲酯碎片离子 $[\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{COOCH}_3]^+$
 m/z 90.055 7 以及母核离子 m/z 339.269 9。

正离子模式下,甘氨酸去氧胆酸甲酯可能的裂解途径示于图 12。

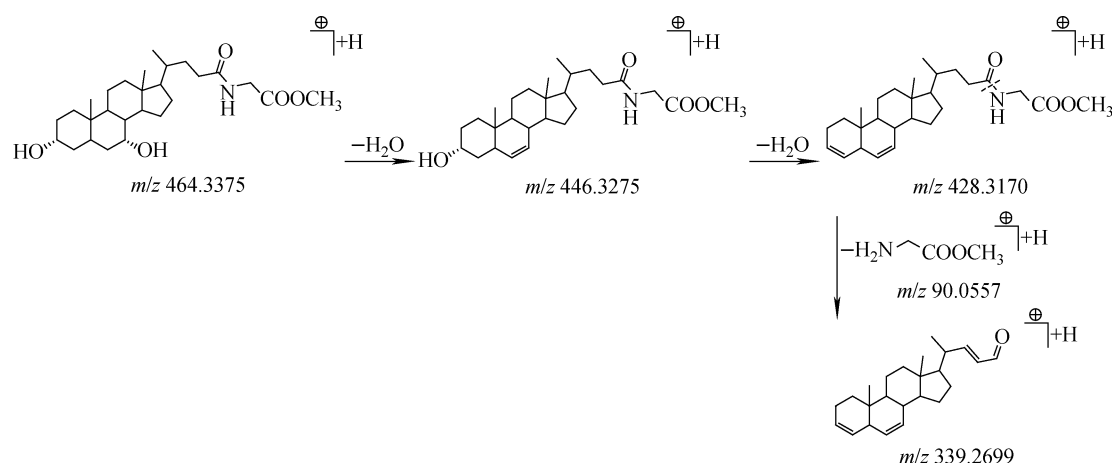


图 12 正离子模式下,甘氨酸去氧胆酸甲酯可能的裂解途径

Fig. 12 Proposed fragmentation pathway of glycochenodeoxycholic acid methyl ester in positive ion mode

3 结论

本工作采用 UHPLC-Q-TOF MS/MS 法研究了胆南星中含有的 4 种类型(游离胆汁酸、结合型胆汁酸、单酮基胆汁酸和胆汁酸酯) 25 种胆汁酸类成分在电喷雾离子源正、负离子模式下的质谱裂解行为,发现不同类型胆汁酸类的裂解行为多以羟基脱水 and C_{17} 位侧链断裂为主。另外,游离胆汁酸在正离子模式下还可产生丰度较小的 A 环和 C 环开裂的碎片离子,产生代表性碎片 m/z 175.112 3、161.096 6、147.081 4,负离子模式下还可通过中性丢失形成 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{CO}_2]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{CO}_2]^-$;结合型胆汁酸在正离子模式下,牛磺酸型胆汁酸可形成牛磺酸基裂解碎片离子 m/z 126.022 6,甘氨酸型胆汁酸可形成甘氨酸基裂解碎片离子 m/z 158.081 8,负离子模式下,牛磺酸型胆汁酸侧链断裂可产生丰度较强的磺酸基碎片 m/z 79.956 8、牛磺酸基碎片 m/z 124.007 3 及牛磺酸脱氨离子 m/z 106.980 3,甘氨酸型胆汁酸侧链断裂可以产生丰度较强的碎片离子 m/z 74.042 6;单酮基胆汁酸的质谱裂解规律与甘氨酸型结合胆汁酸的裂解过程基本一致,但在母核裂解中形成带有酮基的特征离子 m/z 402.301 3;胆汁酸酯在负离子模式下难以形成稳定的离子,正离子

模式下可以产生甘氨酸甲酯 m/z 90.055 7 特征离子,这些质谱裂解行为可为胆汁酸类成分的分析 and 鉴定提供理论和数据支撑。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2015 年版(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015;245.
- [2] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 上海:上海科技出版社, 2008;282.
- [3] WANG D Q H, CAREY M C. Therapeutic uses of animal biles in traditional Chinese medicine: an ethnopharmacological, biophysical chemical and medicinal review[J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(29): 9 952-9 975.
- [4] HOFMANN A F, HAGEY L R. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2008, 65(16): 2 461-2 683.
- [5] 陈江宁,单国顺,刘晓娟,高慧. 胆南星辅料成分分析及其清热作用[J]. 中国现代中药, 2016, 18(7): 837-840.
CHEN Jiangning, SHAN Guoshun, LIU Xiaoyu, GAO Hui. Composition analysis and compare of clearing heat effects among Arisaema cum bile processing[J]. Modern Chinese Medical, 2016, 18(7): 837-840(in Chinese).
- [6] 陈江宁,单国顺,赵启苗,贾天柱,高慧. 不同胆

- 汁制胆南星中胆酸类成分及其解热作用比较[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(4): 567-571.
- CHEN Jiangning, SHAN Guoshuan, ZHAO Qimiao, JIA Tianzhu, GAO Hui. Comparison of the components of bile acids and the antipyretic effect of bile[J]. *Drugs & Clinic*, 2017, 32(4): 567-571(in Chinese).
- [7] 赵启苗, 单国顺, 陈江宁, 高慧, 贾天柱. 胆南星质量评价方法初探[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 28-31.
- ZHAO Qimiao, SHAN Guoshun, CHEN Jiangning, GAO Hui, JIA Tianzhu. Preliminary study on quality evaluation of Bile Arisaema[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2017, 23(6): 28-31(in Chinese).
- [8] 刘晓峰, 崔亚晨, 单国顺, 许枬, 高慧. 胆南星中胆酸类成分含量测定及发酵前后含量比较[J]. 中国现代中药, 2019, 21(3): 375-379.
- LIU Xiaofeng, CUI Yachen, SHAN Guoshun, XU Nan, GAO Hui. Study on contents change of bile acids before and after fermentation of Arisaema cum Bile[J]. *Modern Chinese Medical*, 2019, 21(3): 375-379(in Chinese).
- [9] PAIVA M J N, MENEZES H C, SILVA J C C, RESENDE R R, LOURDES CARDEAL Z. New method for the determination of bile acids in human plasma by liquid-phase microextraction using liquid chromatograph-ion-trap-time-of-flight mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1 388(1): 102-109.
- [10] FENG C, LI X, ZHANG C, HE G Z, XU Y J, LI W, YU Z Q, CAI H J, LIU D. Development of a rapid and simple LC-MS/MS method for identification and quality control of natural Calculus Bovis and Calculus Bovis Sativus[J]. *Analytical Methods*, 2015, 7(1): 7 606-7 617.
- [11] ZHANG J, CHEN X Y, GONG Y J, WAN L S, GAO F, GAN S R, WEI F, MA S C, CHEN J C, NIE J. Rapid identification of bile acids in snake bile using ultra high-performance liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, (1 036/1 037): 157-169.
- [12] ZHANG J, FAN Y Q, GONG Y J, CHEN X Y, WAN L S, ZHOU C G, ZHOU J W, MA S C, WEI F, CHEN J C, NIE J. Simultaneous determination of nine kinds of dominating bile acids in various snake bile by ultra high-performance liquid chromatography with triple quadrupole linear iontrap mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2017, (1 068/1 069): 245-252.
- [13] 雷凯, 刘雅楠, 张程亮, 向东, 李喜平, 任秀华, 刘东. HPLC-MS/MS法测定体外培育牛黄与天然牛黄中26种胆汁酸成分[J]. 中草药, 2018, 49(10): 2 447-2 453.
- LEI Kai, LIU Ya'nan, ZHANG Chengliang, XIANG Dong, LI Xiping, REN Xiuhua, LIU Dong. Simultaneous quantification of 26 bile acids in Calculus Bovis Sativus and Calculus Bovis by HPLC-MS/MS[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(10): 2 447-2 453(in Chinese).
- [14] 石岩, 熊婧, 魏锋, 马双成. 常用胆汁类动物药中特征离子的探索研究及应用[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(4): 651-658.
- SHI Yan, XIONG Jing, WEI Feng, MA Shuangcheng. Study of characteristic ions in frequently-used traditional Chinese medicinal materials derived from animal bile and its application[J]. *China Journal of Chinese material medica*, 2018, 43(4): 651-658(in Chinese).
- [15] CHEN D X, LIN S, XU W, HUANG M Q, CHU J F, XIAO F, LIN J M, PENG J. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Shexiang Tongxin dropping pill by HPLC-Q-TOF-MS/MS and UPLC-QqQ-MS/MS[J]. *Molecules*, 2015, 20(10): 18 597-18 619.
- [16] QIAO X, YE M, LIU C F, YANG W Z, MIAO W J, DONG J, GUO D A. A tandem mass spectrometric study of bile acids: interpretation of fragmentation pathways and differentiation of steroid isomers[J]. *Steroids*, 2012, 77(3): 204-211.
- [17] WU H, GUO J, CHEN S, LIU X, ZHOU Y, ZHANG X, XU X. Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 72(2): 267-291.

附表 1 5 种游离胆汁酸正、负离子模式的质谱数据

Attached table 1 Mass spectrometry data of five free bile acids in positive and negative ion modes								
离子模式 Ion mode	化合物 Compounds	分子式 Formula	理论分子量 Predicted mass(<i>m/z</i>)	测定分子量 Measured mass(<i>m/z</i>)	误差 Error/ppm	二级质谱碎片 (MS ²)		
						脱水离子 Lose H ₂ O fragments	侧链裂解碎片离子 Side chain eliminated fragments	A/C 环裂解碎片离子 A/C ring cleaved fragment
正离子	CA	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	409.2954	409.2954[M+H] ⁺	0.0	[409]:373.2743, 355.2637*	319.2434,309.2588,253.1956	207.1590,159.0815,147.0814
	HCA	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	409.2954	409.2954[M+H] ⁺	0.0	[409]:391.2848, 373.2743,355.2637*	319.2434,309.2588,253.1956	175.1123,159.0820,147.0814
	CDCA	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	393.3005	393.3009[M+H] ⁺	+1.0	[393*]:357.2790	311.2744,253.1956	199.14789,161.0961
	HDCA	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	393.3005	393.3009[M+H] ⁺	+1.0	[393]:357.2790*	321.2854,311.2744	175.1124,161.0969
	DCA	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	393.3005	393.3009[M+H] ⁺	+1.0	[393]:357.2790	347.2951*,321.2595,253.1956	161.0966,147.0814
负离子	CA	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	407.2797	407.2800[M-H] ⁻	+1.2	[407]:389.3138, 371.2588,353.2483	369.2433,345.2800,343.2635, 341.2481,325.2537,	289.2166*,287.2011, 271.2367,253.1960
	HCA	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	407.2797	407.2800[M-H] ⁻	+1.2	[407]:389.3138, 371.2588,353.2483	345.2800,343.2635,341.2481, 327.2693,323.2379,309.2588	289.2166*,287.2011, 271.2367,253.1960
	CDCA	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	391.2848	391.2853[M-H] ⁻	+1.3	[391*]:373.2744, 355.2637	343.2635,327.2693,325.2533, 299.2366	273.2219,271.2367, 255.2115
	HDCA	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	391.2848	391.2853[M-H] ⁻	+1.3	[391*]:373.2744, 355.2637	343.2635,329.2839, 325.2533,299.2366	287.2011,273.2219, 255.2115
	DCA	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	391.2848	391.2853[M-H] ⁻	+1.3	[391*]:373.2744*, 355.2637	343.2635,329.2839, 325.2533,299.2366	299.2366,273.2219, 255.2115

注：* 表示基峰

附表 2 10 种结合型胆汁酸的正、负离子模式质谱数据

Attached table 2 Mass spectrometry data of ten conjugated bile acids in positive and negative ion modes

离子模式 Ion mode	化合物 Compounds	分子式 Formula	理论分子量 Predicted mass		测定分子量 Measured mass		误差 Error/ppm	二级质谱碎片 (MS ²)			
			Predicted mass (<i>m/z</i>)	Measured mass (<i>m/z</i>)	Error/ppm	Lose H ₂ O fragments	侧链/甾环裂解碎片离子 Side chain/steroid-ring cleavage fragments	牛磺酸基/甘氨酸基碎片离子 Taurine/Glycine fragments			
正离子	TCA	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	516.2995	516.2998[M+H] ⁺	+0.6	[516 ⁺]:480.2788, 462.2684 [*]	355.2641,337.2861,319.2429	126.0226			
	THCA	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	516.2995	516.2998[M+H] ⁺	+0.6	[516 ⁺]:480.2788, 462.2684	355.2641,337.2861,319.2429	126.0226			
	TCDCA	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	500.3219	500.3046[M+H] ⁺	+0.6	[498 ⁺]:482.2942, 464.2837 [*]	357.2802,339.2690, 321.2588,175.1129	280.0646,126.0026			
	THDCA	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	500.3219	500.3046[M+H] ⁺	+0.6	[500 ⁺]:482.2942, 464.2837 [*]	357.2802,339.2690, 321.2588,161.0968	280.0646,126.0026			
GCA	GCA	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	466.3169	466.3170[M+H] ⁺	+2.4	[500]:448.3069, 430.2964,412.2858	355.2641,337.2861, 319.2429,173.0966	158.0818			
	GHCA	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	466.3169	466.3170[M+H] ⁺	+2.4	[466]:448.3069, 430.2964,412.2858 [*]	355.2641,337.2861, 319.2429,173.0966	158.0818			
	GCDCA	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	450.3219	450.3221[M+H] ⁺	+0.4	[450]:430.2964	432.3117,414.3009,339.2697, 321.2588,243.1758,201.1285, 161.0974	158.0818			
	GHDCA	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	450.3219	450.3221[M+H] ⁺	+0.4	[450]:430.2964	432.3117,414.3009,339.2697, 321.2588,243.1758,201.1285, 161.0974	158.0818			
6-O-GHDCA	6-O-GHDCA	C ₂₆ H ₄₁ NO ₅	448.3063	448.3066[M+H] ⁺	+0.7	[446]:430.2964, 412.2857 [*]	355.2648,337.2537, 319.2433,199.1949	158.0818			
	7-O-GCDCA	C ₂₆ H ₄₁ NO ₅	448.3063	446.3066[M+H] ⁺	+0.7	[446]:430.2964, 412.2857 [*]	355.2648,337.2537, 319.2433,199.1949	158.0818			

离子模式 Ion mode	化合物 Compounds	分子式 Formula	理论分子量 Predicted mass (<i>m/z</i>)	测定分子量 Measured mass (<i>m/z</i>)	误差 Error/ppm	二级质谱碎片(MS ²)			
						脱水离子 Lose H ₂ O fragments	侧链/甾环裂解碎片离子 Side chain, steroid-ring cleavage fragments	牛磺酸基/甘氨酸基碎片离子 Taurine/Glycine fragments	
负离子	TCA	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	514. 2838	514. 3152[M-H] ⁻	+2. 6	[514 ⁺]:496. 2734, 478. 2626	448. 3066,430. 2963,412. 2855, 402. 3017,400. 2856,382. 2746, 371. 2586	79. 9568,106. 9803, 124. 0073	
	THCA	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	514. 2838	514. 3152[M-H] ⁻	+2. 6	[514 ⁺]:496. 2734, 478. 2626	448. 3066,430. 2963,412. 2855, 402. 3017,382. 2746,371. 2586	79. 9568,106. 9803, 124. 0073 [*]	
	TCDCa	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	498. 2889	498. 2891[M-H] ⁻	+0. 6	[498 ⁺]:480. 2788, 462. 2680	432. 3118,414. 3010,386. 3061, 373. 2748,368. 259,355. 2640	79. 9568,106. 9803, 124. 0073	
	THDCA	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	498. 2889	498. 2891[M-H] ⁻	+0. 6	[498 ⁺]:480. 2788, 462. 2680	432. 3118,414. 3010,386. 3061, 373. 2748,368. 259,355. 2640	79. 968,106. 9803, 124. 0073	
	GCA	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	464. 3012	464. 3014[M-H] ⁻	+0. 9	[464 ⁺]:446. 2906 462. 2680	418. 2961,402. 3017,371. 2586, 369. 2430,354. 2612,323. 2377	74. 0246 [*] 74. 0246	
	GHCA	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	464. 3012	464. 3014[M-H] ⁻	+0. 9	[464 ⁺]:446. 2906	418. 2961,402. 3017,400. 2847, 371. 2586,369. 2430,354. 2612, 323. 2377	74. 0246	
	GCDCA	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	448. 3063	448. 3068[M-H] ⁻	+1. 1	[448 ⁺]:430. 2962	404. 3168,402. 3017,386. 3061, 368. 2958	74. 0246 [*]	
	GHDCa	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	448. 3063	448. 3068[M-H] ⁻	+1. 1	[448 ⁺]:430. 2962	404. 3168,386. 3061,368. 2958	74. 0246 [*]	
	6-O-GHDCa	C ₂₆ H ₄₁ NO ₅	446. 2906	446. 2913[M-H] ⁻	+1. 6	[446 ⁺]:428. 2803	402. 3011,384. 2905,368. 2954, 325. 2536,299. 2371	74. 0246 [*]	
	7-O-GCDCA	C ₂₆ H ₄₁ NO ₅	446. 2906	446. 2913[M-H] ⁻	+1. 6	[446 ⁺]:428. 2803	402. 3011,384. 2905,368. 2954, 325. 2536,311. 2368	74. 0246 [*]	

注：* 表示基峰

附表 3 10 种胆汁酸酯的正离子模式质谱数据

Attached table 3 Mass spectrometry data of ten ester of bile acids in positive ion mode

化合物 Compounds	分子式 Formula	理论分子量 Predicted mass (<i>m/z</i>)	测定分子量 Measured mass (<i>m/z</i>)	误差 Error/ppm	二级质谱碎片(MS ²)		
					脱水离子 Lose H ₂ O Fragments	侧链裂解碎片离子 Side chain eliminated Fragments	A/C 环裂解碎片离子 A/C ring cleaved Fragment
CDCAM	C ₂₅ H ₄₃ O ₄	407. 3166	407. 3166[M+H] ⁺	0. 0	[407]:389, 3063	357. 2800 [*] , 339. 2699, 321. 2588	243. 1756, 215. 1439, 161. 0972
HCAM	C ₂₅ H ₄₃ O ₅	423. 3110	423. 3110[M+H] ⁺	0. 0	[423]:387, 2893, 369. 2790 [*]	355. 2640, 339. 2699, 319. 2427	275. 2019, 195. 1180, 161. 0972
HDCAM	C ₂₅ H ₄₃ O ₄	407. 3166	407. 3166[M+H] ⁺	0. 0	[407]:389, 3063	357. 2800 [*] , 339. 2699, 321. 2588	275. 2019, 215. 1439, 161. 0972
6-O-GHDCAE	C ₂₈ H ₄₇ NO ₅	476. 3376	476. 3376[M+H] ⁺	0. 0	[476]:458, 3274	355. 2639, 319. 2429, 104. 0714 [*]	189. 1275, 175. 1121, 161. 0972
6-O-GHDCAM	C ₂₇ H ₄₃ NO ₅	462. 3219	462. 3224[M+H] ⁺	+0. 4	[462]:444, 3115	373. 2737, 355. 2643 [*] , 90. 0557	189. 1275, 175. 1121, 161. 0972
7-O-GCDCAM	C ₂₇ H ₄₃ NO ₅	462. 3219	462. 3221[M+H] ⁺	+0. 4	[462]:444, 3115	373. 2737, 355. 2642 [*] , 90. 0557	189. 1275, 175. 1121, 161. 0972
GHCAM	C ₂₇ H ₄₅ NO ₆	480. 3325	480. 3328[M+H] ⁺	+0. 1	[480]:462, 3216, 444. 3117 [*]	355. 2644, 337. 2535, 90. 0557	161. 0972
GCCCAM	C ₂₇ H ₄₅ NO ₅	464. 3376	486. 3195[M+Na] ⁺ , 464. 3375[M+H] ⁺	+0. 4 -0. 2	[464]:446, 3275 [*] , 428. 3170	357. 2797, 339. 2699, 90. 0557	189. 1275, 175. 1121, 161. 0972
GHDCAM	C ₂₇ H ₄₅ NO ₅	446. 3376	486. 3195[M+Na] ⁺ , 464. 3375[M+H] ⁺	+0. 4 -0. 2	[464]:446, 3275 [*] , 428. 3170	357. 2797, 339. 2699, 90. 0557	189. 1275, 175. 1121, 161. 0972
GUDCAM	C ₂₇ H ₄₅ NO ₅	464. 3376	464. 3375[M+H] ⁺	-0. 2	[464]:446, 3275, 428. 3170 [*]	357. 2797, 339. 2699, 321. 2582, 257. 1971, 90. 0557	189. 1275, 175. 1121, 161. 0972

注：* 表示基峰