

直接注射-多级质谱全扫描法 快速分析枸杞子化学成分组

贾金茹¹, 彭 博², 李 婷¹, 刘文静¹, 李 菡¹, 李 波², 赵云芳¹, 宋月林¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 中药现代研究中心, 北京 100029; 2. 安利(中国)植物研发中心, 江苏 无锡 214145)

摘要: 由于色谱分离需要耗费大量的时间, 导致传统 LC-MS 研究中药成分的分析通量较低, 而多级质谱全扫描 (MS/MS^{ALL}) 采用了气态分段技术 (GPF), 可以在直接注射 (DI) 模式下, 采集每个表观质量数 MS¹ 信号的 MS² 图谱, 实现 MS¹-MS² 数据列表的高通量构建。为快速表征枸杞子化学成分组, 本研究采用 DI-MS/MS^{ALL} 全面采集枸杞子提取物中各化学成分的多级质谱数据, 根据高分辨 MS¹ 和 MS² 碎片离子信息推导质谱裂解途径, 结合数据库检索以及相关文献, 从枸杞子中初步鉴定了 38 个化学成分, 包括 1 个氨基酸类、19 个有机酸类、2 个糖脂类、6 个苯丙素类、1 个黄酮类、6 个生物碱类以及 3 个酰胺类化合物。DI-MS/MS^{ALL} 可作为中药等复杂体系快速全面定性分析的有力工具。

关键词: 直接注射-多级质谱全扫描 (DI-MS/MS^{ALL}); 枸杞子; 化学成分组; 裂解途径; MS¹-MS² 数据列表
中图分类号: O657. 63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2022)03-0300-12

doi: 10. 7538/zpxb. 2021. 0088

Rapid Analysis of Chemome Characterization of Lycii Fructus Using DI-MS/MS^{ALL}

JIA Jin-ru¹, PENG Bo², LI Ting¹, LIU Wen-jing¹, LI Han¹,
LI Bo², ZHAO Yun-fang¹, SONG Yue-lin¹

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine,
School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
2. Amway (China) Botanical Research Center, Wuxi 214145, China)

Abstract: Traditional Chinese medicines (TCMs) have played a key role to maintain health for Chinese people for thousands of years, and the chemical compositions should be responsible for the pronounced therapeutical benefits. It is thereby of great importance to analyze the chemical compositions of TCMs. Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry is widely used for the chemical profiling of TCMs. However, chromatographic separations have been complained as a time-consuming course, thus dampening high-throughput measurement. Fortunately, attributing to the assistance of gas phase fractionation technique, MS/MS^{ALL} owns a unique ability namely mass spectrometric separation *via* enabling MS¹ ion cohort sequentially entering the

collision cell and acquiring MS^2 spectrum for each 1 u mass bin. Lycii Fructus is one of the most famous edible herbal medicines and featured with the tonic benefits towards liver, kidney, and eye as well. It is necessary to pursue a rapid method to characterize the chemical profiles. Herein, Lycii Fructus was employed as a representative case to illustrate and validate the applicability of direct injection coupled tandem mass spectrometry full scan (DI-MS/ MS^{ALL}) towards rapid chemome characterization of TCM. First, Lycii Fructus extract was directly imported into electrospray ionization source of quadrupole time-of-flight mass spectrometer with an infusion pump at a flow rate of 10 μ L/min. Then, MS/MS^{ALL} was programmed for multi-stage spectral measurements under positive and negative ionization modes. MS^1 spectrum was recorded in the range of m/z 50-1 000, and MS^2 spectrum was acquired for each mass window with 1 u width from m/z 50 to m/z 1 000. After assigning each MS^2 spectra to its precursor ion, the MS^1 - MS^2 dataset was constructed, and extensive attention was subsequently paid onto MS/MS spectral interpretation. Following database retrieval and reference data, a total of 38 components were tentatively identified from Lycii Fructus extract, including one amino acid, nineteen organic acids, two glycolipids, six phenylpropanoids, one flavonoid, six alkaloids as well as three amides. Above all, DI-MS/ MS^{ALL} is an eligible analytical tool for rapid and in-depth chemome characterization of traditional Chinese medicine as well as some other complicated matrices.

Key words: direct injection coupled tandem mass spectrometry full scan (DI-MS/ MS^{ALL}); Lycii Fructus; chemome characterization; fragmentation pathway; MS^1 - MS^2 data list

枸杞子始载于《神农本草经》,被列为上品,其甘平而润、性滋补,《本草纲目》称其为“平补之药”。《中国药典(2020 版)》规定,枸杞子为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实,具有滋补肝肾、益精明目的功效,用于虚劳精亏、腰膝酸痛、眩晕耳鸣、阳痿遗精、内热消渴等病症^[1]。现代药理研究表明,枸杞子具有抗肿瘤^[2]、抗氧化^[3]、抗衰老^[4]、保护神经^[5]、降血糖^[6]等多种药理活性。枸杞子不仅是我国常用的滋补类中药,而且在许多国家和地区也作为功能性食品使用。由于巨大的市场需求,在我国的宁夏、甘肃、青海等地大规模栽培宁夏枸杞,年产量 20 万吨以上^[7],这给枸杞子样品的检测分析带来了极大挑战。

液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术已成为分析中药等复杂体系化学成分组成的主要工具^[8]。近年来,色谱技术快速发展,特别是超高效液相色谱(UPLC)^[9-10]和亚微米级色谱填料^[11-12]的出现,使液相分析通量显著提高,单次分析所需时间可降到 30 min 以内,甚至 10 min

以内,但依然难以满足大规模样品分析的要求,且不稳定化学成分在与色谱填料接触的过程中可能发生降解。

数据依赖性采集(DDA)和数据非依赖性采集(DIA)是用于获取多级质谱信息(一般为 MS^2 谱图)最常用的 2 种模式^[13]。DDA 能够明确地归属 MS^2 质谱信号,但在色谱共流出情况下,难以全面采集所有化学成分的 MS^2 图谱。DIA 与 DDA 相反,其优点在于能够全面采集 MS^2 图谱,但难以归属碎片离子。在理想的色谱分离情况下,DDA 和 DIA 均能实现 MS^2 图谱的全面采集和母离子的归属;而在无色谱分离情况下,气态分段技术(GPF)^[14-15]的出现为通过直接注射(DI)建立复杂样品 MS^1 - MS^2 数据列表提供了可能。作为最常用的 GPF 技术,SWATH^[16]和多级质谱全扫描(MS/MS^{ALL})^[17]方法能将整个母离子流分割成宽度为 25 u 或者 1 u 的连续质谱窗。对于每个质谱窗,均采用 DIA 模式全面采集碎片离子信息,大大降低了碎片离子归属的难度。特别是

MS/MS^{ALL}技术,首先快速采集样品的 MS¹ 谱图,然后将整个离子队列分成一系列连续单位质量(1 u)窗口,依次进入碰撞池,实现每个表观质量数的 MS² 谱图采集。理论上,只要不是同分异构体,或者具有相同表观质量数的化合物,均可以实现良好的分离。采用无色谱分离的 DI 进样模式,可以根据采集 MS² 图谱所需的时间设定进样时间,为所有二级图谱的采集提供了时间保障。

基于此,为快速、全面阐明枸杞子的化学成分,本研究拟利用 DI-MS/MS^{ALL} 技术对枸杞子的提取物进行分析。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

TripleTOF 5600⁺ 质谱仪:美国 Sciex 公司产品,配有电喷雾离子源(ESI)及 PeakviewTM 1.2 数据处理系统;冷冻干燥机:德国 Christ 公司产品;XS105 型电子分析天平:瑞士 Mettler Toledo 公司产品;超声波清洗器:南京垒君达公司产品;离心机:德国 Eppendorf 公司产品;旋转蒸发仪:上海亚荣公司产品;Milli-Q 超纯水系统:美国 Millipore 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

枸杞子:采自宁夏中卫,经北京大学屠鹏飞教授鉴定为药材茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实;甲醇:质谱纯,美国 Thermo Fisher 公司产品;乙酸乙酯:分析纯,北京化工公司产品;超纯水:由实验室 Milli-Q 超纯水系统制备。

1.3 样品制备

取适量枸杞子,置于液氮中冷冻 1 min,捣碎,真空冷冻干燥机干燥后粉碎,过 2 号筛。精密称取约 1.0 g 粉末,置于具塞三角瓶中,以 50 mL 70% 甲醇-水溶液超声提取 40 min,静置放冷,用 70% 甲醇-水溶液补充失重。室温条件下以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,减压回收溶剂至近干,向其中加入 25 mL 水,待完全溶解后倒入分液漏斗中,加入等量的乙酸乙酯溶液,振摇 3 min,静置分层,取乙酸乙酯层。重复上述操作 3 次,合并乙酸乙酯层溶液,减压回收溶剂至近干,加入 40 mL 甲醇溶液使其完全溶解,过 0.22 μm 滤膜,取续滤液,即得

待测样品。

1.4 质谱条件

蠕动泵以 10 μL/min 将枸杞子提取液注入离子源,持续 5 min,随后以 100 μL/min 向管路中注入甲醇溶液,冲洗管路 2 min。

电喷雾离子源(ESI),正、负离子扫描模式;一级质谱扫描范围 m/z 50~1 000,二级质谱扫描范围 m/z 50~1 000;离子喷雾电压 5 500/-4 500 kV;喷雾气(GS1)压力 30 MPa;辅助加热气(GS2)压力 30 MPa;气帘气(CUR)压力 25 MPa;离子化温度(TEM)200 °C;碰撞能量 35/-35 eV,碰撞能量扩展(CES)15 eV;去簇电压(DP)40/-40 V。

2 结果与讨论

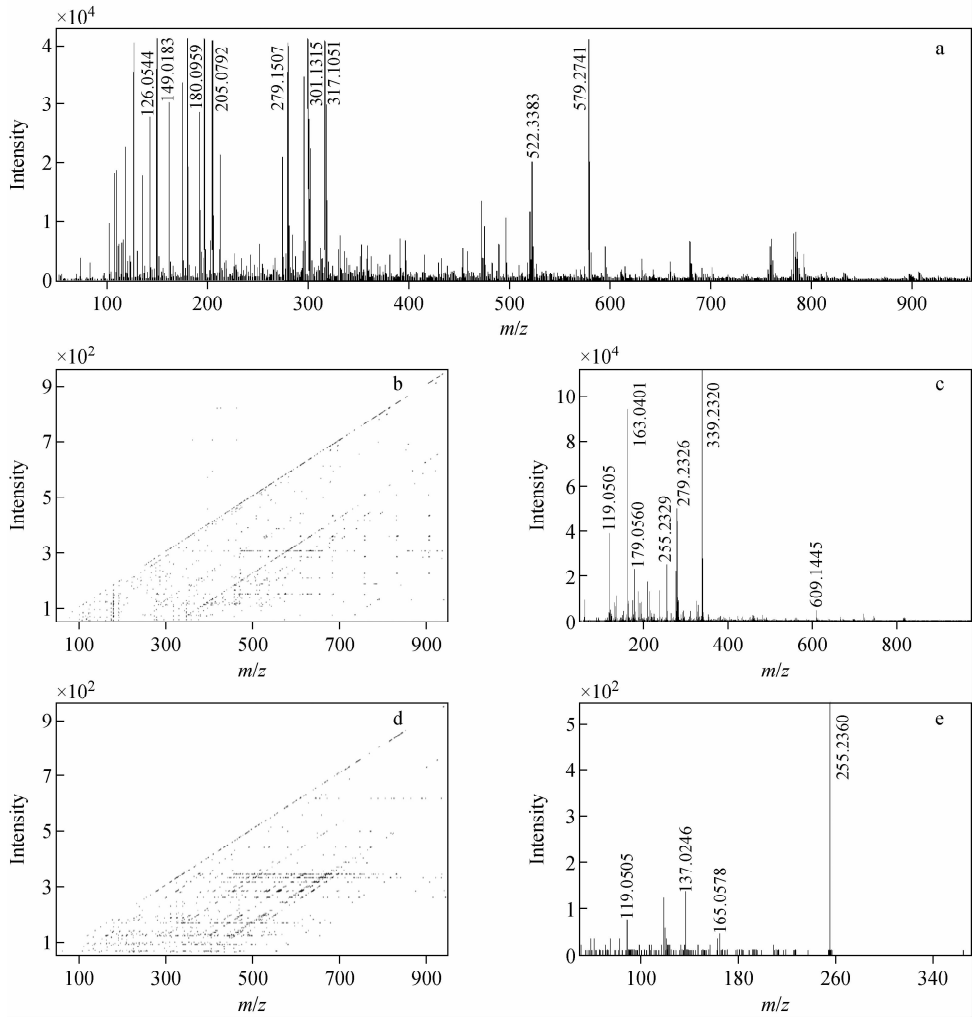
采用 DI-MS/MS^{ALL} 技术分析枸杞子提取物,得到正、负离子模式下的 MS¹ 谱图,分别示于图 1a、1c。正离子模式下,主要的 MS¹ 信号有 m/z 126.054 4、149.018 3、180.095 9、205.079 2、279.150 7、301.131 5、317.105 1、579.274 1 等;负离子模式下,主要的 MS¹ 信号有 m/z 119.050 5、137.024 4、163.041 0、179.056 0、210.077 0、255.232 9、279.232 6、339.232 0、609.144 5 等。采用 PeakviewTM 软件对数据进行可视化处理,以相对丰度 0.1% 进行碎片过滤,得到正、负离子模式下 MS² 碎片离子热图信息,示于图 1b、1d。

以负离子模式下 m/z 255~256 质量窗口为例,该窗口产生的碎片离子主要包括 m/z 165.057 8、137.024 6 和 119.050 5 等,示于图 1e。结合 MS¹ 谱图可知,该窗口出现唯一的母离子 m/z 255.232 9,因此将上述碎片离子归属为其子离子,进而实现 MS¹-MS² 数据列表的构建。

根据得到的 MS¹ 和 MS² 信息,并结合 MassBank、HMDB、Metlin、PubChem 等数据库和相关文献报道的各类化合物的质谱裂解规律,从枸杞子中初步鉴定出 38 个化合物,包括 1 个氨基酸类、19 个有机酸类、2 个糖脂类、6 个苯丙素类、1 个黄酮类、6 个生物碱类以及 3 个酰胺类化合物,结果列于表 1。

2.1 苯丙素类化合物的结构鉴定

从枸杞子中鉴定出 6 个苯丙素类化合物,包括 2 个香豆素类化合物(3 和 8)和 4 个简单



注:a,c, MS¹ 谱图;b,d, MS² 碎片离子热图;e, m/z 255~256 质量窗口的 MS² 质谱图

图1 正(a,b)、负(c,d)离子模式下,枸杞子提取物 DI-MS/MS^{ALL} 的多级质谱图

Fig. 1 Tandem mass spectra of Lycii Fructus extract collected

by DI-MS/MS^{ALL} under positive (a, b) and negative (c, d) ion modes

苯丙素类化合物(9、10、22 和 29)。根据多级质谱数据以及相关文献^[18-19],对 2 类苯丙素类化合物的质谱裂解途径进行推导,并对 MS¹、MS² 信号进行归属。

2.1.1 香豆素类化合物 香豆素类化合物是以苯骈 α -吡喃酮为结构母核,且在 α -吡喃酮环上具有羟基、甲氧基、糖基等含氧官能团的取代。负离子模式下,该类化合物的准分子离子通常以 $[M-H]^-$ 形式存在,碎片离子主要通过发生 CO(28 u)、CO₂(44 u)、葡萄糖残基(C₆H₁₀O₅, 162 u)和鼠李糖残基(C₆H₁₀O₄, 146 u)等基团的中性丢失形成。由于在 α -吡喃酮环上常见甲氧基取代,因此,还会进一步丢失甲基自由基(CH₃•, 15 u)。

以化合物 8 为例,负离子模式下的 MS¹ 谱图显示准分子离子为 m/z 191.034 8 $[M-H]^-$,预测其分子式为 C₁₀H₈O₄(误差为 -1×10^{-6}),主要的碎片离子为 m/z 176.012 2、148.017 3、120.021 6 和 104.027 1,其 MS² 谱图示于图 2a。根据预测的元素组成和相关文献^[20],并结合上述质谱裂解规律,对碎片离子的产生途径进行归属,其中丰度最高的碎片离子 m/z 176.012 2 $[M-H-CH_3\cdot]^-$ 是由母离子脱去甲基自由基(CH₃•, 15 u)产生的。该碎片离子进一步连续丢失 CO(28 u),产生碎片离子 m/z 148.017 3 $[M-H-CH_3\cdot-CO]^-$ 和 m/z 120.021 6 $[M-H-CH_3\cdot-2CO]^-$ 。此外,碎片离子 m/z 104.027 1 $[M-H-CH_3\cdot-CO_2-CO]^-$ 。

表 1 枸杞子中化学成分 的 DI-MS/MS^{ALL} 数据及定性分析结果

Table 1 Tandem mass spectral information and qualitative analysis of chemical constituents in Lycii Fructus using DI-MS/MS^{ALL}

序号 No.	实测值 Measured MS ⁱ (<i>m/z</i>)		分子式 Formula	误差 Error/ ×10 ⁻⁶		碎片离子 MS ² fragment ion (<i>m/z</i>)	化合物名称 Compound	
1	163.0401[M-H] ⁻		C ₉ H ₈ O	0.2		119.0505, 93.0346	羟基肉桂酸	
2	175.0611[M-H] ⁻		C ₇ H ₁₂ O ₅	-0.6		115.0399, 85.0653, 59.0144	羟基丁二酸	
3	177.0191[M-H] ⁻		C ₉ H ₆ O ₄	-1.3		133.0292, 117.0355, 105.0364, 89.0402	七叶内酯	
4	179.0351[M-H] ⁻		C ₉ H ₈ O ₄	0.7		135.0446, 117.0331, 107.0526, 89.0396, 71.0120	咖啡酸	
5	181.0506[M-H] ⁻		C ₉ H ₁₀ O ₄	-0.2		163.0405, 135.0446, 109.0324, 59.0127	黎芦酸	
6	187.0976[M-H] ⁻		C ₉ H ₁₆ O ₄	0.1		169.0897, 143.1064, 125.0971, 97.0654	壬二酸	
7	191.0198[M-H] ⁻		C ₈ H ₈ O ₇	0.4		111.0088, 87.0085, 85.0297	柠檬酸	
8	191.0348[M-H] ⁻		C ₁₀ H ₈ O ₄	-1		176.0122, 148.0173, 120.0216, 120.0216	东莨菪素或异东莨菪素	
9	193.0506[M-H] ⁻		C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-0.2		178.0272, 134.0368, 103.0538	阿魏酸	
10	195.0662[M-H] ⁻		C ₁₀ H ₁₂ O ₄	-0.4		180.0420, 151.0398, 136.0521, 121.0292, 108.0217	二氢阿魏酸	
11	210.0770[M-H] ⁻		C ₁₀ H ₁₃ NO ₄	-0.9		124.0400, 94.0298, 66.0346	4-[2-甲酰基-5-(羟甲基)-1H-吡咯-1-基]-丁酸	
12	224.0924[M-H] ⁻		C ₁₁ H ₁₅ NO ₄	-1.9		180.1086, 150.0946, 94.0296, 66.0344	4-[2-甲酰基-5-(羟甲基)-1H-吡咯-1-基]-丁酸甲酯/(2S)-[2-甲酰基-5-(羟甲基)-1H-吡咯-1-基]-3-甲基-丁酸/2-[2-甲酰基-5-(甲氧基甲基)-1H-吡咯-1-基]-丙酸甲酯	
13	225.0612[M-H] ⁻		C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂	-25.6		59.0138, 165.0201, 113.0247, 89.0243, 113.0247	1-甲氧基羰基-β-咔啉/3-甲氧基羰基-β-咔啉	
14	238.1084[M-H] ⁻		C ₁₂ H ₁₇ NO	-0.3		164.1080, 94.0299, 66.0351	4-[2-甲酰基-5-(甲氧基甲基)1H-吡咯-1-基]-丁酸甲酯	
15	255.2329[M-H] ⁻		C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-0.2		211.1330, 165.0545, 137.0235	棕榈酸	
16	277.2169[M-H] ⁻		C ₁₈ H ₃₀ O ₂	-1.5		233.1555, 125.0997	亚麻酸	
17	279.2326[M-H] ⁻		C ₁₈ H ₃₂ O ₂	-1.3		205.1256, 59.0134	亚油酸	
18	281.2480[M-H] ⁻		C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-2.1		235.0682, 221.0079, 176.0123, 163.0402, 71.0498	油酸	

续表 1

序号 No.	实测值 Measured MS ⁱ (<i>m/z</i>)	分子式 Formula	误差 Error/ ×10 ⁻⁶	碎片离子 MS ² fragment ion (<i>m/z</i>)	化合物名称 Compound
19	283. 2632[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-3. 7	—	硬脂酸
20	295. 2271[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	-2. 6	277. 2114, 163. 0417	双吗啡酸
21	297. 2429[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₃	-2. 1	183. 0109	羟基十八碳烯酸
22	325. 0923[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	-1. 8	279. 2329, 163. 0392, 145. 0303, 119. 0499	对香豆素-O-葡萄糖苷
23	329. 2325[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	-2. 6	229. 1427, 201. 1129, 171. 1025, 165. 0554, 119. 0510	9,12,13-三羟基-10-十八碳烯酸
24	337. 0769[M-H] ⁻	C ₁₂ H ₁₈ O ₁₁	-2. 2	277. 0549, 157. 0125, 119. 0497	枸杞酸
25	339. 2320[M+HCOO] ⁻	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	-2. 5	183. 0125, 163. 1131, 175. 0965, 147. 0809	9-羟基-10,12,15-十八碳三烯酸
26	353. 0861[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-4. 8	191. 0565, 163. 1118, 111. 0086	绿原酸
27	459. 2939[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₄₄ O ₈	-5. 3	423. 3339, 279. 2320, 179. 0359, 163. 0402, 119. 0499 89. 0239, 71. 0141, 59. 0145	山梨糖醇棕榈酸酯
28	461. 3100[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₄₆ O ₈	-4. 3	281. 2492, 279. 2316, 181. 0503, 179. 0551, 119. 0509, 89. 0243	果糖硬脂酸酯或葡萄糖硬脂酸酯
29	487. 1443[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	-2. 9	325. 1816, 163. 1129, 279. 2317	对香豆素-2-O-β-D-葡萄糖-α-D-葡萄糖苷
30	609. 1445[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-2. 6	301. 0357, 191. 0565	芦丁
31	116. 0701[M+H] ⁺	C ₅ H ₉ NO ₂	-4. 2	70. 0628	脯氨酸
32	118. 0857[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₁ NO	-5. 2	59. 0712	甜菜碱
33	126. 0544[M+H] ⁺	C ₆ H ₇ NO ₂	-4. 5	108. 0408, 80. 0468, 55. 0159	2-甲基-5-羟甲基-吡咯
34	136. 0612[M+NH ₄] ⁺	C ₄ H ₆ O ₄	5. 5	119. 0310, 55. 0270	琥珀酸
35	175. 0961[M+H] ⁺	C ₈ H ₁₄ O ₄	-2. 3	143. 0644, 115. 0713, 111. 0405	辛二酸
36	314. 1384[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₉ NO	-0. 8	177. 0484, 162. 0845, 121. 0605	N-反式阿魏酰酯胺
37	472. 2438[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₆	-0. 8	310. 2017, 293. 1760, 220. 0894, 163. 0329	N ¹ -咖啡酰-N ³ -二氢咖啡酰亚精胺
38	474. 2586[M+H] ⁺	C ₂₅ H ₃₅ N ₃ O ₆	-2. 8	457. 2173, 222. 1050, 165. 0486, 123. 0397	N ¹ -N ¹⁰ -二氢咖啡酰亚精胺

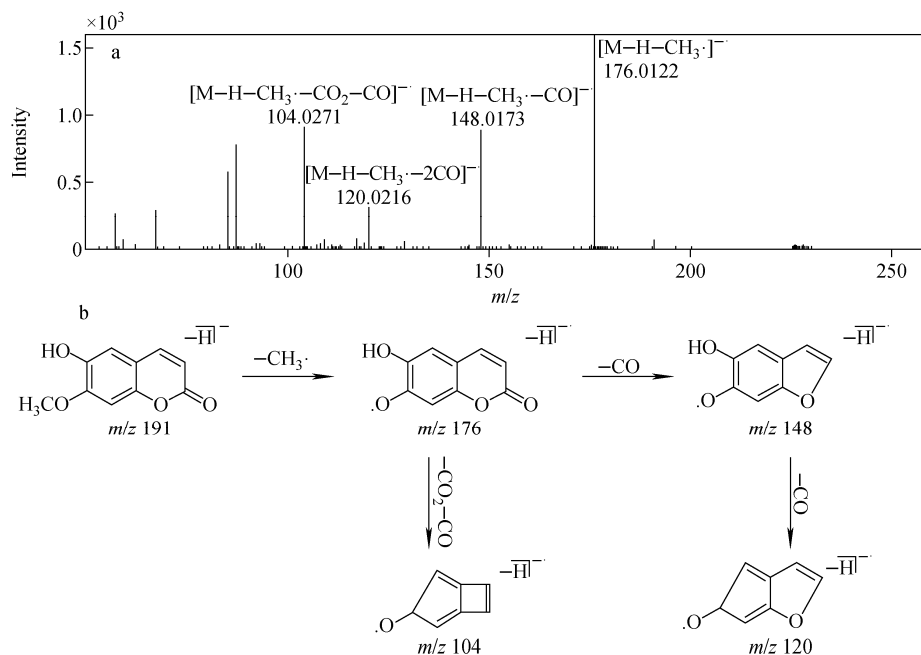


图2 东莨菪素的二级质谱图(a)及其质谱裂解途径(b)

Fig. 2 MS² spectrum (a) and proposed fragmentation pathways (b) of scopoletin

是由 m/z 176.012 2 丢失 1 分子 CO_2 (44 u) 和 1 分子 CO (28 u) 生成。根据上述信息, 将 $[M-H]^-$ m/z 191.034 8 的化合物初步鉴定为东莨菪素 (scopoletin) 或异东莨菪素 (isoscopoletin)。由于枸杞子中存在这对同分异构体, 故化合物 8 的信号是由这对同分异构体同时产生的。以东莨菪素为例, 推测的质谱裂解途径示于图 2b。

2.1.2 简单苯丙素类化合物 简单苯丙素类化合物是以 C6~C3 为基本骨架, 一般具有苯酚结构。负离子模式下, 该类化合物的准分子离子通常以 $[M-H]^-$ 形式存在。在二级质谱图中, 母离子通常会发生 H_2O (18 u)、 CO (28 u) 和 CO_2 (44 u) 等中性丢失产生碎片离子。此外, 由于该类化合物具有酚羟基、羧基等含氧官能团, 与糖上的羟基脱水缩合形成苷类化合物, 因此, 常见糖残基的中性丢失, 例如葡萄糖残基 ($C_6H_{10}O_5$, 162 u) 和木糖残基 ($C_5H_8O_4$, 132 u) 等。

以化合物 22 为例, 负离子模式下的 MS¹ 谱图显示准分子离子为 m/z 325.092 3 $[M-H]^-$, 预测其分子式为 $C_{15}H_{18}O_8$ (误差为 -1.8×10^{-6}), 主要的碎片离子有 m/z 163.039 2、145.030 3 和 119.049 9, 其 MS² 谱图示于图 3a。根据预测的元素组成和相关文献^[20], 并结合上

述质谱裂解规律, 对碎片离子的产生途径进行归属。其母离子 m/z 325.092 3 $[M-H]^-$ 首先中性丢失 1 分子葡萄糖残基 ($C_6H_{10}O_5$, 162 u) 产生碎片离子 m/z 163.039 2 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 该碎片离子进一步中性丢失 1 分子 H_2O (18 u) 产生碎片离子 m/z 145.030 3 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$, 或中性丢失 1 分子 CO_2 (44 u) 产生碎片离子 m/z 119.049 9 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO_2]^-$ 。因此, 根据上述信息初步推测 $[M-H]^-$ m/z 325.092 3 的化合物为对香豆素-O-葡萄糖苷, 其可能的质谱裂解途径示于图 3b。

2.2 生物碱类化合物的结构鉴定

据文献^[20]报道, 目前已从枸杞子中分离得到 72 个生物碱类化合物, 主要包括莨菪烷类、咪唑类、哌啶类和吡咯类等。本研究从枸杞子中初步鉴定出 6 个生物碱类化合物, 其中包括 4 个吡咯类生物碱 (11~14)、甜菜碱 (32) 及 1 个其他类生物碱 (33)。通过多级质谱数据推测吡咯类生物碱的质谱裂解途径, 并对 MS¹、MS² 信号进行归属。

枸杞子中吡咯类生物碱的基本结构为五元含氮杂环, 其吡咯环 1 位氮原子上存在丁酸、丁酸甲酯等基团取代, 且在吡咯环的 2 位和 5 位通常具有羟甲基、甲氧基甲基、醛基等基团取代。

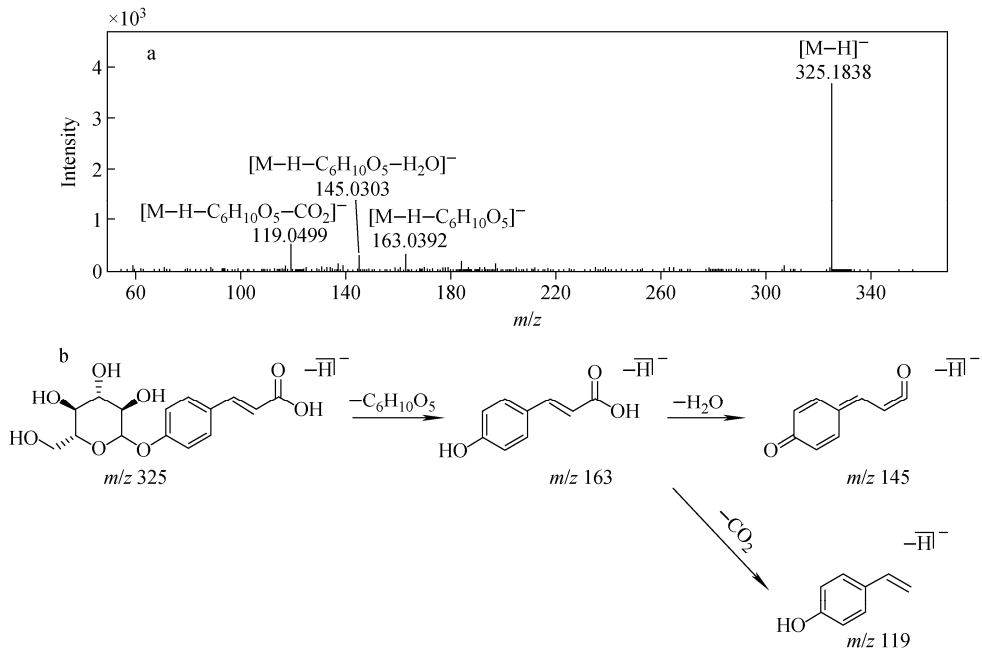


图3 对香豆素-O-葡萄糖苷的二级质谱图(a)及其质谱裂解途径(b)

Fig. 3 MS² spectrum (a) and proposed fragmentation pathways (b) of *p*-coumaric acid-O-glycosides

该类化合物在负离子模式下的准分子离子峰通常以 $[M-H]^-$ 形式存在,碎片离子主要是由吡咯环1位氮原子处支链的中性丢失产生,例如丁酸基团($C_4H_6O_2$, 86 u)、丁酸甲酯基团($C_5H_9O_2$, 100 u)等。此外,由于吡咯环上的2位和5位通常有羟甲基、醛基等基团取代,因此会进一步中性丢失 CH_2O (30 u)、 CO (28 u)等产生相应的碎片离子。

以化合物13为例,负离子模式下的准分子离子为 m/z 210.077 0 $[M-H]^-$,预测其分子式为 $C_{10}H_{13}NO_4$ (误差为 -0.9×10^{-6}),主要的碎片离子有 m/z 124.040 0、94.029 8和66.034 6,其MS²谱图示于图4a。结合预测的元素组成和上述质谱裂解规律,对碎片离子的产生途径进行归属,碎片离子 m/z 124.040 0 $[M-H-C_4H_6O_2]^-$ 是由母离子在吡咯环上N原子处发生断裂丢失 $C_4H_6O_2$ (86 u)形成的,该碎片离子继而丢失 CH_2O (30 u)、 CO (28 u),分别得到碎片离子 m/z 94.029 8 $[M-H-C_4H_6O_2-CH_2O]^-$ 和 m/z 66.034 6 $[M-H-C_4H_6O_2-CH_2O-CO]^-$ 。此外,其母离子还可脱去1分子甲酸(46 u)产生碎片离子 m/z 164.040 8 $[M-H-HCOOH]^-$ 。因此,参考相关文献^[20]以及数据库检索,初步推测 $[M-H]^-$ m/z 210.077 0为4-[2-甲酰基-

5-(羟甲基)-1H-吡咯-1-基]-丁酸,其可能的质谱裂解途径示于图4b。

2.3 酰胺类化合物的结构鉴定

本研究基于DI-MS/MS^{ALL}技术从枸杞子中鉴定出3个酰胺类化合物,包括1个非多胺型酚酰胺类化合物(36)和2个亚精胺型酚酰胺类化合物(37和38)。根据该类化合物的多级质谱数据以及相关文献^[21]推测其质谱裂解途径,并对各MS¹、MS²信号进行归属。

2.3.1 非多胺型酚酰胺类化合物 非多胺型酚酰胺大多具有酪胺结构,正离子模式下的裂解首先主要发生在酰胺键处,中性丢失酪胺分子($C_8H_{11}NO$, 137 u)产生正离子信号,如咖啡酰基(m/z 163)、二氢咖啡酰基(m/z 165)等。由于其结构上存在羟基、甲氧基等取代基团,因此经酰胺键断裂产生的正离子信号会进一步发生 CO (28 u)、 H_2O (18 u)、 $CH_3 \cdot$ (15 u)、 CH_3OH (32 u)等基团丢失。

以化合物36为例,正离子模式下的MS¹谱图显示准分子离子峰为 m/z 314.138 4 $[M+H]^+$,预测其分子式为 $C_{18}H_{19}NO_4$ (误差为 -0.8×10^{-6}),主要的碎片离子有 m/z 177.048 4、162.084 5和121.060 5等,其MS²谱图示于图5a。根据预测的元素组成并结合上述质谱裂解规

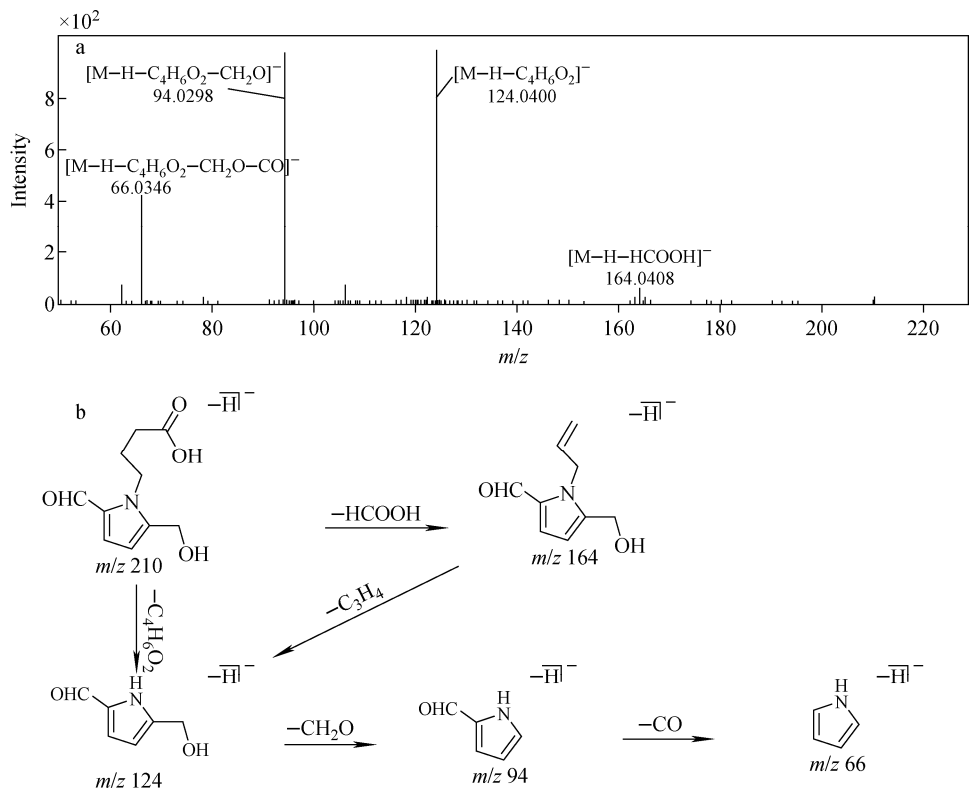


图 4 4-[2-甲酰基-5-(羟甲基)-1H-吡咯-1-基]-丁酸的二级质谱图(a)及其质谱裂解途径(b)

Fig. 4 MS² spectrum (a) and proposed fragmentation pathways (b) of 4-[2-formyl-5-(hydroxymethyl)-1H-pyrrol-1-yl]-butanoic acid

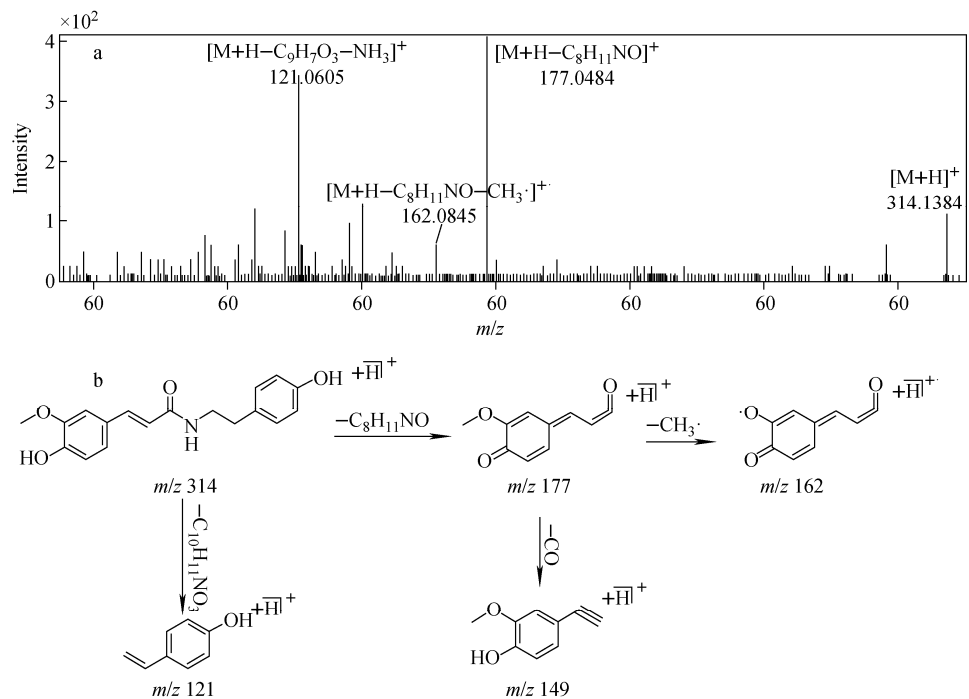


图 5 N-反式阿魏酰酪胺的二级质谱图(a)及其质谱裂解途径(b)

Fig. 5 MS² spectrum (a) and proposed fragmentation pathways (b) of N-trans-feruloyl tyramine

律,对碎片离子的产生途径进行推测。由于该类化合物结构中大多具有酰胺结构,容易在酰胺键处断裂脱去1分子酰胺($\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}$, 137 u)产生 m/z 177.048 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}]^+$ 碎片离子,该碎片离子进一步脱去1分子 CO (28 u) 和甲基自由基($\text{CH}_3\cdot$, 15 u),分别产生碎片离子 m/z 149.054 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}-\text{CO}]^+$ 和 162.084 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}-\text{CH}_3\cdot]^+$ 。此外,酰胺侧 C-N 键断裂产生碎片离子 m/z 121.060 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3]^+$ 。根据上述信息推测 $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 314.138 4 为 *N*-反式阿魏酰酪胺,其可能的质谱裂解途径示于图 5b。

2.3.2 亚精胺型酚酰胺类化合物 亚精胺型酚酰胺是以亚精胺为结构骨架,含有 2 个氨基和 1 个亚氨基,且多具有咖啡酰基(m/z 163)、二氢咖啡酰基(m/z 165)等基团。与非多胺型酚酰胺一致,亚精胺型酚酰胺首先在酰胺键处发生断裂得到酰基正离子,进一步发生 CO (28 u) 中性丢失。氨基侧正离子则在氨基处发生一

系列中性丢失,如 NH_3 (17 u)、 $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}$ (71 u)、 CO (28 u)、 C_3H_6 (42 u)、 CH_3N (29 u) 等^[21]。

以化合物 37 为例,正离子模式下的准分子离子为 m/z 472.243 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$,预测化合物的分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_6$ (误差为 -0.8×10^{-6}),主要的碎片离子有 m/z 310.201 7、293.176 0、220.089 4、163.032 9 等,其 MS^2 谱图示于图 6a。由于该类化合物的结构骨架为亚精胺,其中含有 2 个氨基和 1 个亚氨基,可在酰胺键处断裂产生 m/z 163.032 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3]^+$ 和 m/z 310.201 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]^+$ 碎片离子。碎片离子 m/z 310.201 7 进而在氨基处发生断裂,中性丢失 NH_3 (17 u) 形成碎片离子 m/z 293.176 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3-\text{NH}_3]^+$;而碎片离子 m/z 220.089 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3]^+$ 则是由母离子在亚氨基侧 C-C 键断裂形成。因此,根据上述信息推测 $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 472.243 8 为 *N*¹-咖啡酰-*N*³-二氧咖啡酰亚精胺,其可能的质谱裂解途径示于图 6b。

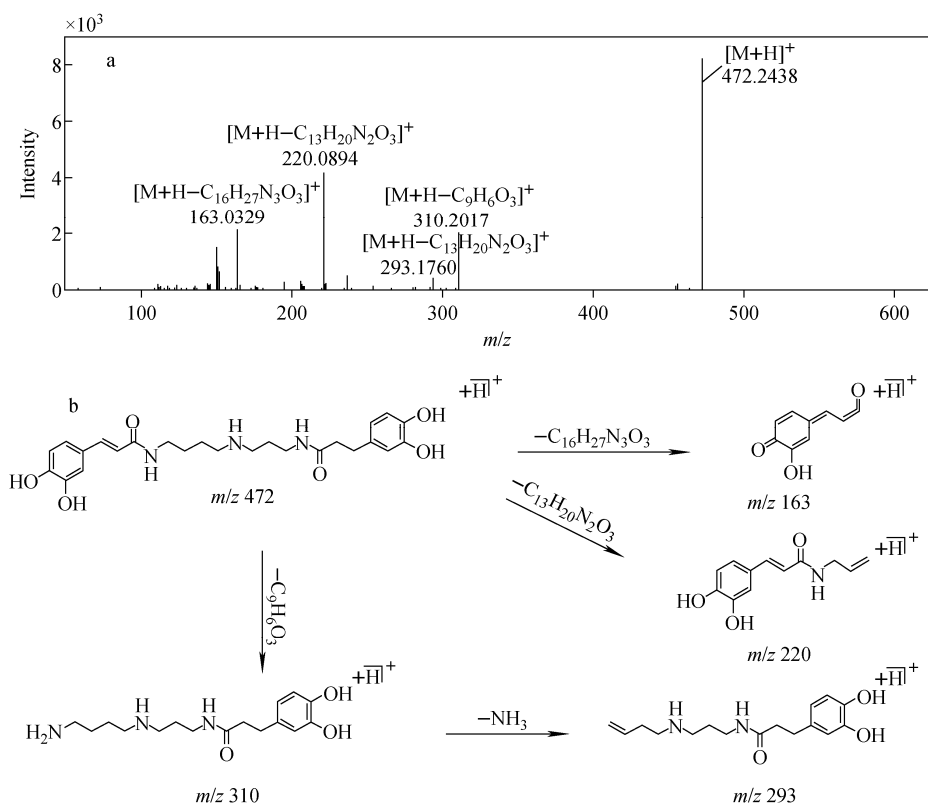


图 6 *N*¹-咖啡酰-*N*³-二氧咖啡酰亚精胺的二级质谱图(a)及其质谱裂解途径(b)

Fig. 6 MS^2 spectrum (a) and proposed fragmentation pathways (b)

of *N*¹-caffeoyl-*N*³-dihydrocaffeoyl spermidine

3 结论

本研究采用 DI-MS/MS^{ALL} 技术表征枸杞子化学成分组,共鉴定出 38 个化合物,可为枸杞子药材的进一步开发和利用提供参考。该技术将直接注射质谱高通量优势与 Q-TOF MS 高灵敏度、高分辨率、强特异性的优势结合,实现中药复杂体系化学成分的快速分析,为中药定性分析和质量评价提供有效的分析工具。但 DI-MS/MS^{ALL} 技术也存在一定的局限性,当设定的检测窗口中存在同分异构体时,无法对其子离子进行归属,难以区分中药中广泛存在的同分异构体类化合物。将该方法与常用的同分异构体区分方法联用,如在线能量分辨质谱等^[22],可提高中药化学成分轮廓分析的准确性。

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,2020:260.
- [2] 杨青. 枸杞多糖通过诱导巨噬细胞极化抗胰腺癌的实验研究[D]. 锦州:锦州医科大学,2016.
- [3] DONNO D, BECCARO G L, MELLANO M G, CERUTTI A K, BOUNOUS G. Goji berry fruit (*Lycium spp.*): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 1 070-1 085.
- [4] 陈立格. 枸杞子的药理作用和临床应用价值分析[J]. 世界最新医学信息文摘,2015,15(59):92.
CHEN Lige. Analysis of pharmacological effects and clinical application value of Lycii Fructus[J]. World Latest Medicine Information, 2015, 15 (59): 92(in Chinese).
- [5] YU M S, WONG A, SO K F, FANG J N, YUEN W H, CHANG C C. New polysaccharide from *Nerium indicum* protects neurons via stress kinase signaling pathway[J]. Brain Research, 2007, 1 153(11): 221-230.
- [6] YE Z, HUANG Q, NI H X, WANG D. Cortex Lycii Radicis extracts improve insulin resistance and lipid metabolism in obese-diabetic rats[J]. Phytotherapy Research, 2008, 22(12): 1 665-1 670.
- [7] 徐常青,刘赛,徐荣,陈君,乔海莉,金红宇,林晨,郭昆,程慧珍. 我国枸杞主产区生产现状调研及建议[J]. 中国中药杂志,2014,39(11):1 979-

1 984.

- XU Changqing, LIU Sai, XU Rong, CHEN Jun, QIAO Haili, JIN Hongyu, LIN Chen, GUO Kun, CHENG Huizhen. Investigation of production status in major wolfberry producing areas of China and some suggestions[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39 (11): 1 979-1 984(in Chinese).
- [8] 张加余,乔延江,张倩,高晓燕,卢建秋. 液质联用技术在天然产物结构鉴定中的应用进展[J]. 药物分析杂志,2013,33(2):349-354.
ZHANG Jiayu, QIAO Yanjiang, ZHANG Qian, GAO Xiaoyan, LU Jianqiu. Progress on application of LC-MS technology in structural identification of the natural products[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2013, 33(2): 349-354(in Chinese).
 - [9] 刘洁,肖红斌. 基于色谱技术的中药药效物质研究进展[J]. 药学学报,2019,54(1):73-81.
LIU Jie, XIAO Hongbin. Research progress on pharmacodynamic substances of Chinese Medicine based on chromatographic techniques[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2019, 54(1): 73-81 (in Chinese).
 - [10] JIN H L, LIU Y F, GUO Z M, WANG J X, ZHANG X L, WANG C R, LIANG X M. Recent development in liquid chromatography stationary phases for separation of traditional Chinese medicine components[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 130: 336-346.
 - [11] LUCIE N, PETR C, PETR S. Ultra-fast separation of estrogen steroids using subcritical fluid chromatography on sub-2-micron particles[J]. Talanta, 2014, 121: 178-186.
 - [12] TAO D Y, ZHANG L H, SHAN Y C, LIANG Z, ZHANG Y K. Recent advances in micro-scale and nano-scale high-performance liquid-phase chromatography for proteome research[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011, 399 (1): 229-241.
 - [13] GUO J, HUAN T. Comparison of full-scan, data-dependent, and data-independent acquisition modes in liquid chromatography-mass spectrometry based untargeted metabolomics[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(12): 8 072-8 080.
 - [14] CALDERÓN S M, PRIEGO C F, MARIA D L.

- Enhanced detection and identification in metabolomics by use of LC-MS/MS untargeted analysis in combination with gas-phase fractionation[J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(15): 7 558-7 565.
- [15] YAN Z X, YAN R. Improved data-dependent acquisition for untargeted metabolomics using gas-phase fractionation with staggered mass range[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(5): 2 861-2 868.
- [16] RON B, GÉRARD H. SWATH data independent acquisition mass spectrometry for metabolomics[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2019, 120: 115 278.
- [17] SIMONS B, KAUKHANEN D, SYLVÄNNE T, DUCHOSLAV E, EKROOS K. Shotgun lipidomics by sequential precursor ion fragmentation on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer[J]. Metabolites, 2012, 2(1): 195-213.
- [18] 胡静,杨媛媛,任慧,崔小敏,刘小妹,罗佳怡,陈志永. 光叶丁公藤中化学成分的 UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS 鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(18): 124-132.
- HU Jing, YANG Yuanyuan, REN Hui, CUI Xiaomin, LIU Xiaomei, LUO Jiayi, CHEN Zhiyong. Identification of chemical constituents in caulis of *Erycibe schmidtii* by UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(18): 124-132(in Chinese).
- [19] SUN C H, WANG Y Z, SUN S Y, CHEN X, SHI X L, FANG H Z, ZHANG Y, FANG Z. Fragmentation pathways of protonated coumarin by ESI-QE-Orbitrap-MS/MS coupled with DFT calculations[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2020, 55(5): e4496.
- [20] 周正群. 枸杞子抗阿尔茨海默病活性成分研究[D]. 广州:暨南大学, 2016.
- [21] 陈晓鹤,苏磊,蒋丽娟,张薇,姜艳艳,刘斌. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱的地骨皮化学成分分析[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20): 4 486-4 494.
- CHEN Xiaohe, SU Lei, JIANG Lijuan, ZHANG Wei, JIANG Yanyan, LIU Bin. Identification of compounds in Lycii Cortex by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(20): 4 486-4 494(in Chinese).
- [22] ZHANG K, LIU W J, SONG Q Q, WAN J B, YU J, GONG X C, CAO L B, SI D D, TU P F, LI J, SONG Y L. Integrated strategy drives direct infusion-tandem mass spectrometry as an eligible tool for shotgun pseudo-targeted metabolomics of medicinal plants[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(4): 2 541-2 550.
- (收稿日期:2021-06-02;修回日期:2021-08-08)