

实时直接分析质谱法分析中药有效成分的特征气相离子反应机理

刘鑫¹, 侯玉珠¹, 杨彤彤¹, 李娜¹, 刘淑莹¹, 张哲¹, 苏蕊²

(1. 长春中医药大学, 吉林 长春 130117; 2. 吉林大学无机合成与制备化学国家重点实验室, 吉林 长春 130012)

摘要:本研究采用实时直接分析离子源耦合线性离子阱质谱(DART-LTQ MS)法分析中药有效成分, 并优化 DART-LTQ MS 的质谱参数、离子化温度和工作气体种类等条件。在最优条件下, 以 N₂ 和 He 作为 DART 离子源工作气体, 发现不同结构的中药有效成分在 N₂/He-DART MS 中产生了一系列有规律的特征离子, 并总结其气相离子特征反应规律。如, 采用 N₂-DART MS 分析中等极性的低沸点化合物时, 原位发生了有规律的特征离子反应, 主要包括氧化反应([M+nO+H]⁺ 或 [M+nO-H]⁻ (n=1, 2, 3, 4, 5)) 和脱氢反应(损失了 2 个 H, [M-2H±H][±]); 采用 He-DART MS 分析具有强极性、高沸点的苷类化合物时, 在四甲基氢氧化铵(TMAH)辅助下, 迅速发生了甲基化反应([M+nCH₂+H]⁺、[M+nCH₂+(CH₃)₃NH]⁺ 或 [M+nCH₂-H]⁻ (n=1, 2, 3, 4, 5))。另外, 根据特征离子推断可能的反应机理, 并对相关反应产生的特征母离子进行串联质谱实验, 验证所推测机理的准确性。该方法可为中药有效成分的快速分析提供技术支持。

关键词:实时直接分析(DART); 线性离子阱质谱(LTQ); 中药有效成分; 氧化反应; 脱氢反应; 甲基化反应

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-2997(2023)05-0589-13

doi: 10.7538/zpxb.2022.0171

Analysis of Characteristic Ion Reactions and Mechanism Exploration of Active Ingredients in Traditional Chinese Medicine by Direct Analysis in Real-Time Mass Spectrometry

LIU Xin¹, HOU Yu-zhu¹, YANG Tong-tong¹, LI Na¹,

LIU Shu-ying¹, ZHANG Zhe¹, SU Rui²

(1. Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. State Key Laboratory of Inorganic Synthesis and Preparative Chemistry, Jilin University, Changchun 130012, China)

Abstract: Direct analysis in real-time (DART) ionization source coupled with mass spectrometer can directly and rapidly analyze raw samples in their native environment with high specificity and minimal or no sample preparation. In this study, DART combined with linear ion trap mass spectrometry (DART-LTQ MS) was used to analyze the active components of 33 traditional Chinese medicines and explore the generated gas-

phase ion reaction mechanism. The parameters of MS and ion source were optimized, such as ionization gas and temperature. Under the optimized conditions, a series of regular characteristic ions were generated in DART-MS when using N_2 and He as the ion source working gas. It was found that when N_2 -DART MS was used to analyze active compounds of low boiling points, regular characteristic ion reactions occurred *in situ*, mainly including oxidation reaction ($[M+nO+H]^+$ or $[M+nO-H]^-$ ($n=1, 2, 3, 4, 5$)) and dehydrogenation reaction (two hydrogens lost, $[M-2H\pm H]^+$). The methylation reaction ($[M+nCH_2+H]^+$, $[M+nCH_2+(CH_3)_3NH]^+$ or $[M+nCH_2-H]^-$ ($n=1, 2, 3, 4, 5$)) occurred when detection of glycosides compound with highly polar and high-boiling by He-DART MS. Furthermore, the characteristic gas ion reaction mechanism of the active components in traditional Chinese medicine was intensively studied, and the exactly related reactions were discussed. The oxidation mechanisms of furanocoumarins and the dehydrogenation mechanisms of dihydroflavonoids were deduced according to the tandem mass spectrometry of the characteristic ion products and the proposed fragmentation pathways. The methylation reaction of glycosides and the action site were verified. And the reaction mechanisms were proposed and further confirmed by tandem mass spectrometry. The rapid analysis of the active ingredients in traditional Chinese medicine by N_2 -DART under high temperature and high pressure provides unique and primary characteristics that is difficult to be formed by other methods, which also provides a theoretical reference for future research on the mechanism of DART-MS. This method is rapid, effective, which is suitable for qualitative determination of the active ingredients in traditional Chinese medicine.

Key words: direct analysis in real time (DART); linear ion trap mass spectrometer (LTQ); active components of traditional Chinese medicine; oxidation; dehydrogenation; methylation

敞开式离子化质谱(ambient ionization mass spectrometry, AIMS)是21世纪初出现的一种新兴质谱分析技术,待测样品在敞开环境(大气压)下不需前处理或仅需简单处理即可进行质谱测定^[1],具有快速、实时、高通量、原位、环境友好等特点。根据 AIMS 技术的特点,可将其分为电喷雾和电晕放电2类,其中最具有代表性和广泛应用的是解吸电喷雾电离质谱(DESI-MS)和实时直接分析质谱(DART-MS)^[2-3]。最早实现商品化的直接电离源是 DART 离子源,其工作气体可以采用氦气、氮气^[4]或氙气^[5],通过 DART 栅网电极辉光放电被激发至激发态,形成具有能量的电离气流^[6]将样品快速电离并解吸,使待测化合物离子化,通过质谱或串联质谱得到实时直接分析数据^[6-8]。将 DART 离子源与各种质量分析器联用能够有效电离分子质量低于1 500 u的化合物^[9]。相

较于传统的色谱-质谱技术,DART-MS具有无需或仅需简单的样品前处理过程^[6]、仪器设置及优化参数少、实验步骤简单、分析时间短、可应用于开放环境、无需特定溶剂等优点,已成为法医^[10-11]、农业^[12]、环境^[13-14]、医药^[15]、天然产品表征^[16]、植物质量控制^[17-18]、中药材可视化质控^[18-19]等领域的新兴检测手段。

DART-MS适用于分析分子质量介于生物大分子与有机小分子之间、中等极性、低沸点的分子。在前期工作中,本课题组通过改进 DART-MS 技术成功分析了人参皂苷、寡糖等难挥发的高沸点分子^[20]。此外,在中药材分析鉴定中发现,DART 离子源存在一些技术难题:采用加热解吸对样品进行热脱附极大限制了其在中药快速检测领域中的应用;一些植物中重要的生物活性成分(如皂苷、寡糖等)属于不易挥发的高沸点化合物,通过热解吸很难将其全部脱

附后测定。因此,使用 DART-MS 很难获得强度高和重复性好的质谱信号,限制了其在中药材等复杂基质样品中痕量化合物分析中的应用。

本研究将采用实时直接分析离子源耦合在线性离子阱质谱(DART-LTQ MS)法快速分析中药中具有显著生理活性和药理作用的 33 种化学成分,包括生物碱类、苯丙素类、醌类、黄酮类和萜类等,并优化工作气体种类、电压、电离温度等实验条件。此外,根据不同工作气体情况下 DART-MS 产生的特征离子情况,研究不同结构特性化合物的特征离子反应机理。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

线性离子阱质谱仪:美国 Thermo Fisher 科技有限公司产品;DART 实时分析离子源:美国 Ion Sense 公司产品;Sartorius BT25S 分析天平:北京赛多利斯科学仪器有限公司产品。

甲醇:色谱纯,美国 Fisher 公司产品;丙酮:分析纯,上海恒斐生物科技有限公司产品;四甲基氢氧化铵(TMAH):分析纯,25%甲醇溶液,上海阿拉丁试剂有限公司产品;高纯氦气、氩气、氮气:纯度>99.999%,长春巨洋氧气厂产品;大黄素甲醚、五味子甲素、甘草次酸、苦参碱、苍术素、杜鹃素、柴胡皂苷 A、丹皮酚、黄芩素、细辛脂素、欧前胡素、白花前胡甲素、白花前胡乙素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、天麻素、黄芪甲苷、柴胡皂苷 D、柴胡皂苷 B2、黄芩苷、斯皮诺素、细叶远志皂苷、橙皮苷、哈巴苷、哈巴俄苷、马钱苷、淫羊藿苷、人参皂苷 Rg1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、薯蓣皂苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1 等 33 种天然产物标准物质:上海源叶生物科技有限公司产品。

1.2 DART-LTQ MS 分析

LTQ 质谱仪配有接口,可与外置的第 4 代 DART 离子源耦合。质谱接口的陶瓷管与 DART 离子源陶瓷帽处于一条直线上,陶瓷帽与离子传输管的距离为 7 mm。用一端封闭的熔点管(封闭端)蘸取待测样品溶液,将其置于 DART 离子源陶瓷帽和陶瓷离子传输管中间的热气流中,停留 30 s,高温下待测物迅速解脱附并离子化,经陶瓷离子传输管引入质谱仪。使用 Xcalibur 2.2 系统软件(Thermo Fisher

Scientific, San Jose, CA)处理数据。

1.2.1 DART 离子源条件 筛网栅极电压 +350 V(正离子模式)和 -300 V(负离子模式);工作气体分别为 He、N₂ 和 Ar,其中 N₂ 用于待机模式;通过优化离子源温度,最终确定萜类和萜类化合物检测温度 400 ℃,生物碱类和醌类化合物检测温度 350 ℃,苯丙素类和炔烃类化合物检测温度 300 ℃;载气流速 2 L/min。

1.2.2 质谱条件 毛细管电压 +42 V(正离子模式)和 -32 V(负离子模式);根据待测样品熔点的不同,将毛细管温度设为 250~320 ℃;透镜电压 +240 V(正离子模式)和 -100 V(负离子模式);分辨率 1 000;串联质谱碎裂模式为碰撞诱导解离(CID);母离子筛选窗口 m/z 1.0;碰撞能量 10~50 eV。

1.3 样品制备

取适量大黄素甲醚,用丙酮配制成 0.67 g/L 溶液;取适量五味子甲素、甘草次酸、苦参碱、苍术素、杜鹃素、柴胡皂苷 A、丹皮酚、黄芩素、细辛脂素、欧前胡素、白花前胡甲素、白花前胡乙素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、天麻素、黄芪甲苷、柴胡皂苷 D、柴胡皂苷 B2、黄芩苷、斯皮诺素、细叶远志皂苷、橙皮苷、哈巴苷、哈巴俄苷、马钱苷、淫羊藿苷、人参皂苷 Rg1、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C、薯蓣皂苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1 的标准品,分别用甲醇配制成 2.00 g/L 溶液。

2 结果与讨论

2.1 DART 离子源温度的优化

DART 离子源工作气体的种类和温度是影响样品离子化的重要因素^[21]。本实验考察了以 Ar、N₂ 和 He 作为工作气体时,离子源温度(200~550 ℃)对被测组分信号响应的影响,每个样品重复测定 3 次。当 DART 离子源温度低于 300 ℃时,样品的信号强度较低;当离子源温度升至 500 ℃时,会导致样品发生热分解,使部分化合物的离子信号强度降低。为了获得强度较高且稳定的化合物离子响应信号,综合分析 Ar、N₂ 和 He 作为 DART 离子源工作气体的检测效果。对于中等极性、低沸点化合物,在 Ar、N₂ 和 He 中,中苦参碱的最佳离子化温度为 350 ℃,大黄素甲醚为 350 ℃,五味子甲素为 300 ℃,甘草次酸分别为 400、550、400 ℃,苍

术素为 300 °C, 杜鹃素为 300 °C。当检测难挥发、高沸点的柴胡皂苷 A 时, 在 Ar、N₂ 中均未检测到其特征离子信号, 在 He 中的最佳离子化温度为 400 °C。

2.2 DART 离子源工作气体的选择

已有报道^[21-22]采用 He、Ar 和 N₂ 作为 DART 离子源的工作气体, 其中 He 是 DART-MS 的主要工作气体。He、Ar 和 N₂ 对应的离子化能分别为 19.8、11.5 和 8.5~15.5 eV^[23], 其中 He 的能量最高、离子化强度最强, 但检测成本较昂贵。本实验考察了丹皮酚、黄芩素和甘草次酸在 He、Ar、N₂ 不同工作气体下的响应强度, 其 DART-LTQ MS 谱图示于图 1。可知, 3 种工作气体主要获得 [M+H]⁺ / [M-H]⁻ 准分子离子峰, 虽然 N₂-DART MS 谱图较复杂,

但通过进一步探索 N₂-DART 机理, 所得谱图的特征离子信号辨识度较高, 采用 N₂ 作为工作气体不仅能够降低检测成本, 且具有一定的应用价值。因此, 本文将重点探讨 N₂-DART 中的离子化机理。

2.3 N₂-DART 机理研究

2.3.1 氧化反应 早在 1989 年, Stemmler 等^[24]发现在化学电离源中会发生氧化反应产生负离子, 当离子源温度升高至 300 °C 时, 醛类、酮类和酸酐等化合物与氧气发生表面催化反应^[24-25], 在 O₂ 和 N₂ 存在的情况下会产生一系列高丰度的负离子, 特征离子峰为 [M+nO-H]⁻ (n=1, 2, 3, …)。2019 年, Su 等^[21]发现, 采用 N₂-DART MS 检测有机磷农药、氨基酸等化合物时, 会原位产生活性氧。本实验采用 N₂-DART-LTQ MS

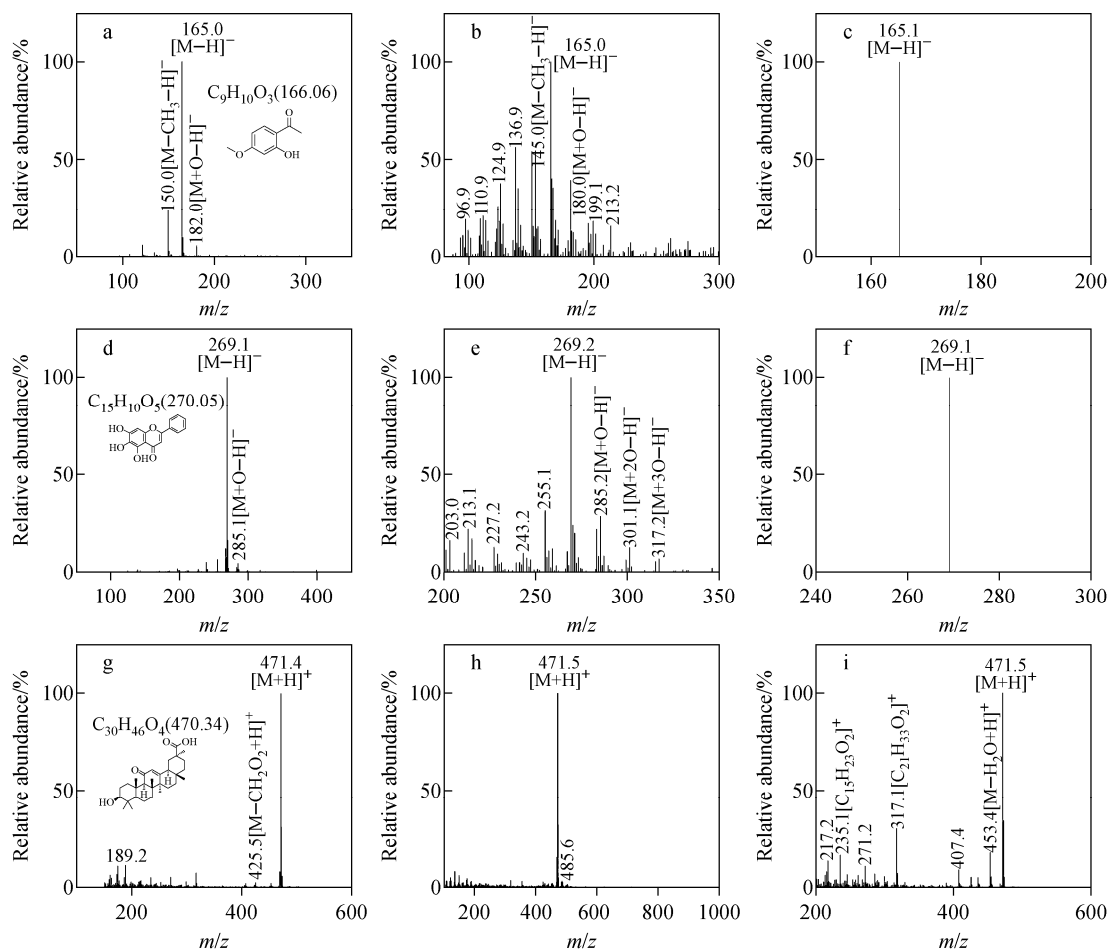


图 1 丹皮酚(a,b,c)、黄芩素(d,e,f)、甘草次酸(g,h,i)在 Ar (a,d,g)、N₂ (b,e,h)和 He (c,f,i)作为 DART 工作气体时的质谱图

Fig. 1 Mass spectra of paeonol (a, b, c), baicalein (d, e, f), glycyrrhetic acid (g, h, i) using Ar (a, d, g), N₂ (b, e, h) and He (c, f, i) as DART working gas

分析多种中药的有效成分,发现去甲异波尔定、大黄素甲醚、大黄素、丹参酮 II A、隐丹参酮、丹参酮 I、甘草次酸、乌药醚内酯、甘草酸、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 B2、薯蓣皂苷、天麻素、甘草苷、5-O-甲基维斯阿米醇苷、鲁斯可皂苷元、杜鹃素、欧前胡素、白花前胡甲素、白花前胡乙素、绿原酸、菊苣酸、细辛脂素、丹皮酚及阿魏酸等 25 种化合物的谱图中出现了氧化产物离子。芸香科和伞形科中药中含有丰富的香豆素类有效成分,具有抗真菌、抗氧化、抗肿瘤及抗高血压等多种生物活性^[26-27],本研究以香豆素类化合物为例探究氧化机理。在负离子模式下,欧前胡素、白花前胡甲素及白花前胡乙素的 N₂-DART-LTQ MS 谱图示于图 2。可知,采用 N₂

作为工作气体会产生活性氧,并获得一系列 [M+nO-H]⁻ (n=1,2,3…) 特征离子峰。

进一步对主要离子进行串联质谱 (MS²) 分析,探索化合物的氧化位置和机理。以白花前胡甲素为例,其氧化产物的串联质谱图和可能的裂解途径示于图 3。白花前胡甲素失去侧链 -C₂H₄O₂ 并脱掉 C=O 后,生成碎片离子 m/z 313.3 [C₁₈H₁₇O₅]⁻。此外,谱图中出现 m/z 297.3 离子,推断发生了氧化反应, m/z 313.3 为氧化产物离子。通过 MS² 实验进一步确定了氧化反应发生的位点,由图 3 的反应式 (1)~(4) 可知,氧化位点没有发生在 C-4 位上。白花前胡甲素属于香豆素类化合物,在质谱中多形成吡喃酮和呋喃香豆素,其中 m/z

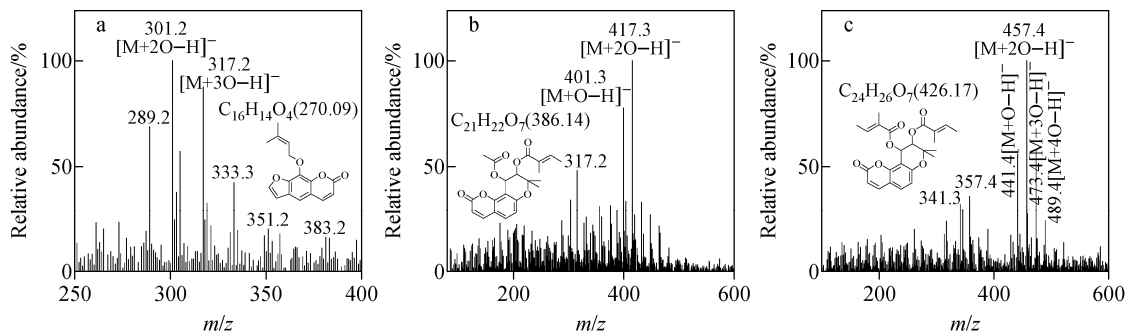


图 2 在负离子模式下,欧前胡素 (a)、白花前胡甲素 (b) 及白花前胡乙素 (c) 的 N₂-DART-LTQ MS 谱图

Fig. 2 N₂-DART-LTQ MS spectra of imperatorin (a), praeprutorin A (b) and praeprutorin B (c) in negative ion mode

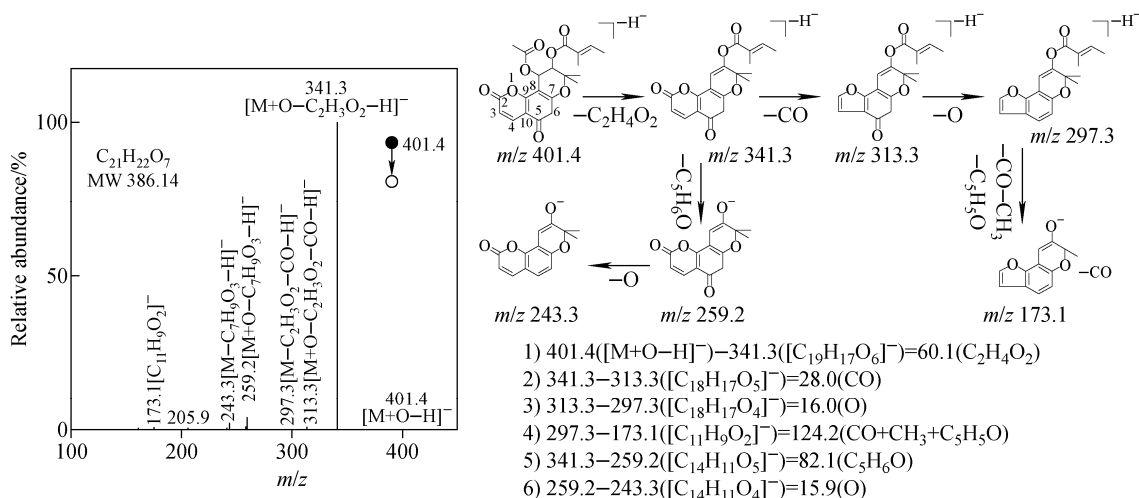


图 3 白花前胡甲素氧化产物的 N₂-DART-LTQ MS 串联质谱图及裂解途径

Fig. 3 Tandem mass spectrum and proposed fragmentation pathways of oxidized products of praeprutorin A using N₂-DART-LTQ MS

401.4、341.3、259.2 和 243.3 属于 α -吡喃酮类香豆素, m/z 313.3、297.3 和 173.1 离子具有呋喃环结构。在氧化反应中, 推测活性氧作用于 C-5 位上, 产生不饱和羰基, 这与香豆素类化合物在 N_2 -DART MS 中产生的氧化产物特征离子一致。通过氧化产物的二级质谱碎片离子推测碎裂规律, 并证明 C-5 位为氧化位点。

在 N_2 -DART MS 中生成 $[M+O-H]^-$ 的氧化反应机理示于图 4。可见, 载气 N_2 受高电极电压的激发形成 N_2^* ; $O_2(^3P_2)$ 的电离能(IE)为 12.2 eV, 因此, $N_2^*(4S_{3/2}, IE=15.58 \text{ eV})$ 可以激活 O_2 , 活性氧(O^*)源于 O_2^* [21]。在香豆素类化合物的苯骈 α -吡喃酮母核上, O^* 可作用于 C 和 H 上, 形成激发态的四元环过渡态。 N_2 的 $N\equiv N$ 伸缩振动不断保持活性, 可以淬灭激发态的能量, 产生稳定产物。因此, 苯骈 α -吡喃酮母核结构中的苯环被氧化为不饱和环酮结构。

2.3.2 脱氢反应 细辛脂素和杜鹃素分别为细辛与满山红质量检测中的重要标准物质, 其

中细辛脂素具有抗病毒和抗结核杆菌的作用 [28]; 杜鹃素具有抗癌作用, 可通过线粒体介导的途径抑制喉鳞癌细胞的迁移、侵袭、诱导癌细胞凋亡 [29]。Song 等 [30] 于 2018 年深入研究了正离子模式下 N_2 -DART MS 中发生的反应机理。本实验利用 N_2 -DART-LTQ MS 快速分析中药中酚类、苯丙素类、生物碱类等有效成分, 细辛脂素、杜鹃素、对羟基苯甲醇、去甲异波尔定等化合物在谱图中出现了脱氢离子。细辛脂素、杜鹃素在正离子模式下产生了 $[M-2H+H]^+$ 特征离子, 其 N_2 -DART-LTQ MS 谱图示于图 5。

以杜鹃素为例进行 MS^2 实验, 结果示于图 6。 m/z 283.1 和 281.0 分别为特征离子 $[M+H-H_2O]^+$ 和 $[M+H-2H-H_2O]^+$, m/z 208.9 和 207.0 分别为 m/z 283.1 和 281.0 离子失去 $-C_6H_4$ 产生的特征离子。由 m/z 208.9、207.0、283.1 和 281.0 可知, 脱氢反应的位置发生在含氧原子的结构单元上。推测 m/z 211.1 为母离子 $[M-2H+H]^+$ 先后失去羰基

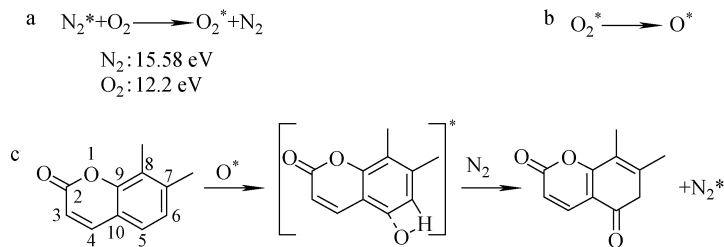


图 4 N_2 -DART MS 中香豆素类化合物的氧化机理

Fig. 4 Oxidation mechanism of coumarin compounds in N_2 -DART MS

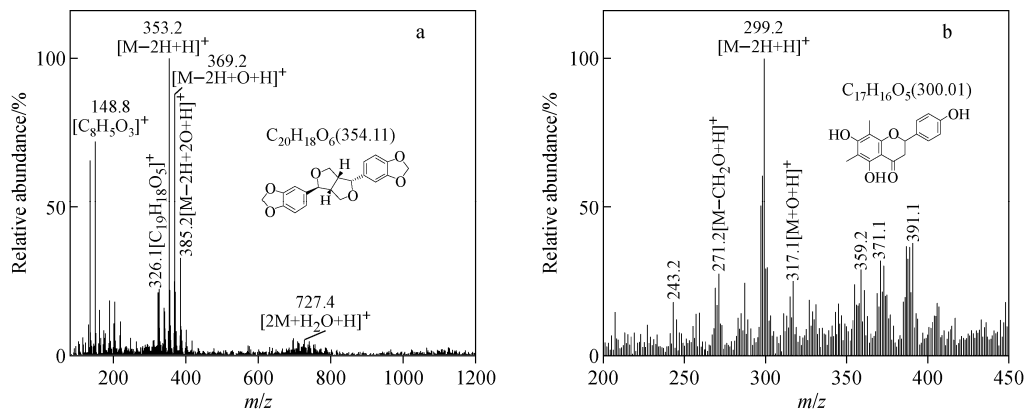


图 5 细辛脂素 (a) 和杜鹃素 (b) 的 N_2 -DART-LTQ MS 谱图

Fig. 5 N_2 -DART-LTQ MS spectra of asarinin (a) and farrerol (b)

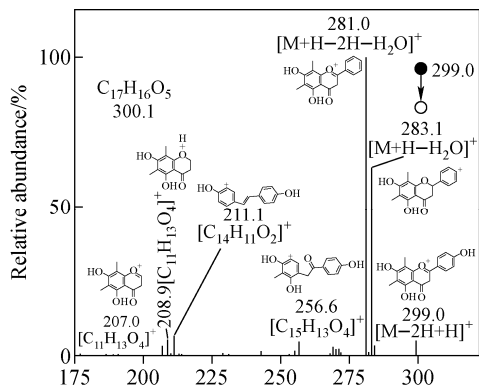
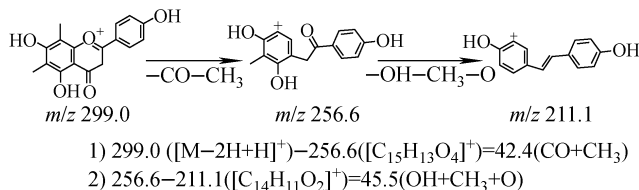


图 6 杜鹃素脱氢产物的 N₂-DART-LTQ MS 串联质谱图及裂解途径

Fig. 6 Tandem mass spectrum and fragmentation pathways of hyfraction extraction products of farrerol using N₂-DART-LTQ MS



(CO)、甲基(与 C-8 位相连的甲基(-CH₃))、酚羟基(Ph-OH)、甲基(与 C-6 位相连的甲基)以及氧(O)所形成的特征离子,根据碎裂结构以及离子产物断裂后的双键位置判断,脱氢反应发生在苯骈环氧结构中的 C、O 处,产生 -C=O-,与苯环形成稳定的共轭结构。此外,根据谱图中的特征离子情况,结合烷烃和芳烃在 DART-MS 中产生的脱氢反应^[30-31],阐述了正离子模式下二氢黄酮类化合物在 N₂-DART-LTQ MS 中发生的脱氢反应机理。当 N₂ 作为 DART 离子源工作气体检测样品时,亚稳态氮物质可将能量转移到 NO,形成 NO⁺,其可能是由中性氮电离产生的,示于图 7a。NO⁺的高活性对分子、离子反应中的电荷交换、脱氢等非常重要,其可与苯骈环氧结构反应,夺走环氧结构中 O 相连的 C 上的 H,形成 [-C=O]⁺ 结构,完成脱氢反应,示于图 7b。

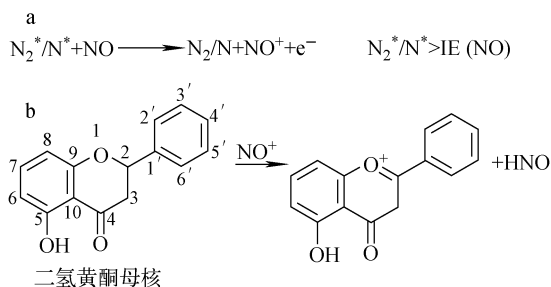


图 7 N₂-DART MS 中二氢黄酮的脱氢反应机理

Fig. 7 Proposed mechanism of dehydrogenation reaction of dihydroflavonoids in N₂-DART MS

2.4 He-DART 甲基化反应

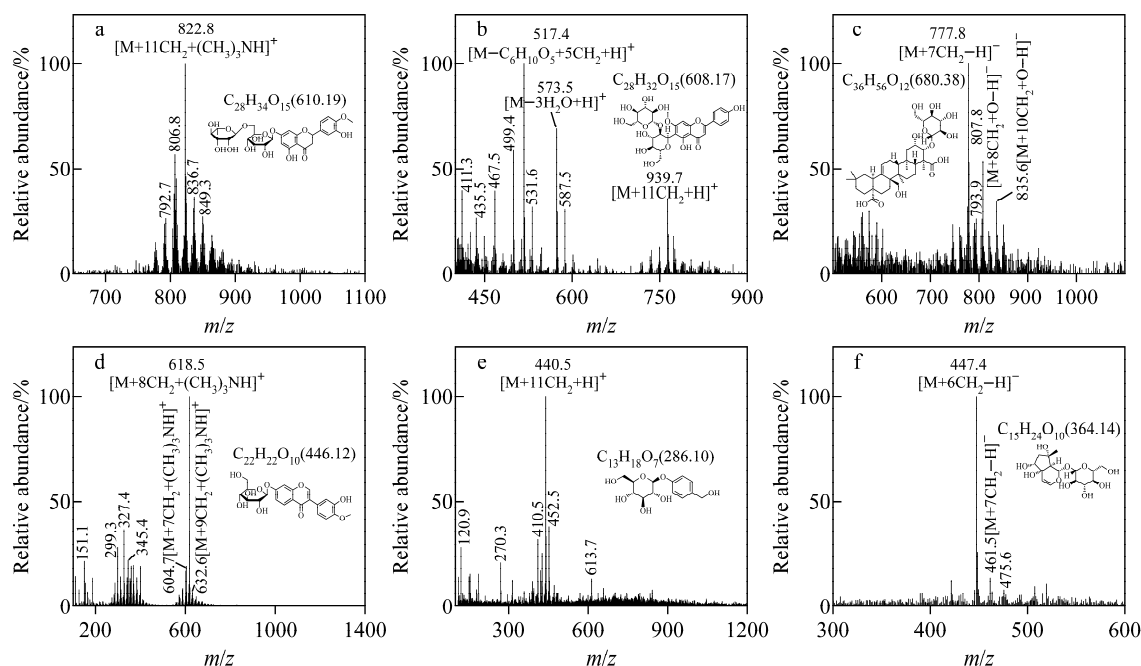
苷是糖或糖的衍生物与另一非糖物质(包括苯丙素类、黄酮类和萜类等)通过糖的端基碳原子连接而成的一类化合物。苷类化合物中存在多羟基结构,具有较强的极性和较高的沸点^[32],挥发性较差和质子亲和势较低,DART-MS 对此类化合物的热解吸和电离能力较弱。因此,可以用原位衍生化试剂辅助此类化合物的离子化^[33-35]。四甲基氢氧化铵(TMAH)为 GC-MS 分析中常用的一种甲基化试剂,高温下可与样品中羟基、羧基等极性基团发生瞬时反应生成甲基化衍生物^[19-20]。DART 离子源加热管温度高达 550 °C,可满足 TMAH 衍生化所需的高温环境。

通过条件优化,得到苷类化合物实时检测的最优温度为 400 °C,部分苷类化合物的 He-DART-LTQ MS 谱图示于图 8。以 He 作为 DART 离子源的工作气体,将 TMAH 辅助样品滴加至待测样品表面,在高温情况下,溶剂迅速气化,TMAH 与待测化合物发生衍生化反应,被测样品在正离子模式下产生 [M+nCH₂+H]⁺ / [M+nCH₂+(CH₃)₃NH]⁺ (n=0,1,2...) 系列的特征离子峰,在负离子模式下产生 [M+nCH₂-H]⁻ (n=0,1,2...) 系列的特征离子峰,获得甲基化产物。

于擎等^[20]从凝聚相和气相两方面阐述甲基化机理。本研究结合 21 种苷类化合物的 He-DART-LTQ MS 实验数据,进一步总结中药材中难以检测的苷类化合物的甲基化现象。

在凝聚相中,由于 TMAH 具有强碱性,可快速被电离为四甲铵阳离子 $((\text{CH}_3)_4\text{N}^+)$ 和氢氧根离子,大量 OH^- 可夺取糖或苷元羟基中的氢,使其产生氧负离子。氧负离子具有强亲核性,可破坏 $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ 中的 N—C 键,夺取甲基,使自身产生甲基化离子(图 8b 中的 m/z 517.4 和图 8c 中的 m/z 777.8 离子等),与苷类化合物反应生成甲基化产物,所生成的甲基化产物挥发性较强,能够快速进入气相发生离子化反应,获得质谱信号。同时,进入气相中的 TMAH 在高温下分解生成三甲胺,在激发态 He 的作用下 N—C 键发生均裂,形成 $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 和 $\text{CH}_3\cdot$, $\text{CH}_3\cdot$ 与 $-\text{OCH}_3$ 快速结合形成乙氧基,生成乙基化产物离子,进而与 $(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+$ 相结合,生

成图 8a 中的 m/z 822.8 和图 8b 中的 m/z 939.7 等特征离子。橙皮苷过甲基化离子(m/z 822.8)的 MS^2 谱图示于图 9, m/z 634.8 为单糖断裂产生的产物离子,计算后发现鼠李糖上的羟基发生了甲基化反应;结合碎片离子 m/z 428.3,推测在 C-3' 处的羟基发生了乙基化,同时发生乙基化反应的苯环结构在与 C-2 相连处发生断裂,并失去 $(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+$ 离子及鼠李糖。添加甲基化试剂后,皂苷类化合物易产生挥发性强的甲基化、乙基化产物离子,根据产物离子的结构特征和空间位阻推测乙基化作用位点。21 种苷类化合物的 He-DART-LTQ MS 衍生化离子数据列于表 1。



注: a. 橙皮苷; b. 斯皮诺素; c. 细叶远志皂苷; d. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; e. 天麻素; f. 哈巴苷

图 8 TMAH 试剂辅助下 6 种被测样品的 He-DART-LTQ MS 谱图

Fig. 8 He-DART-LTQ MS spectra of six samples with the assistance of TMAH reagent

3 结论

本研究建立了 DART-LTQ MS 法探究中药有效成分的特征气相离子反应机理,并优化了 DART 离子源的操作参数、离子化温度及工作气体种类等实验条件。通过分析待测样品的 DART-LTQ MS 特征碎片离子发现, N_2 -DART 离子源中存在氧化反应和脱氢反

应, He-DART 离子源中存在甲基化反应等特征离子反应。根据串联质谱获得的特征碎片离子和提出的裂解途径,推导并验证了 DART-LTQ MS 中发生的反应机理,可为中药有效成分的快速检测及 DART-MS 的机制研究提供理论参考。

表 1 He-DART-LTQ MS 中 21 种苷类化合物的离子信息推导
Table 1 Derivated ion information of 21 glycosides using He-DART-LTQ MS

序号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	相对分子质量 Relative molecular mass	操作模式 MS mode	母离子 Precursor ion (<i>m/z</i>)	碎片离子 Fragment ion (<i>m/z</i>)	碰撞电压 Collision energy/eV
1	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446.12	+	618.5[M+3CH ₂ CH ₂ +2CH ₂ +(CH ₃) ₃ NH] ⁺	604.3, 586.1, 575.3	40
2	天麻素	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	286.11	+	440.5[M+11CH ₂ +H] ⁺	426.4, 412.6, 395.2, 269.2	25
3	黄芪甲苷	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	784.46	-	896.7[M+8CH ₂ -H] ⁻		
4	柴胡皂苷 A	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780.47	+	931.9[M+11CH ₂ +H] ⁺		
5	柴胡皂苷 D	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780.47	+	964.9[M+13CH ₂ +H] ⁺	932.9, 770.0, 571.1, 431.3	18
6	柴胡皂苷 B2	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	780.47	+	808.1[M+2CH ₂ -H] ⁻		
7	黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	446.08	+	283.4[M-C ₆ H ₆ O ₆ +CH ₂ +H] ⁺		
8	斯皮诺素	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	608.17	+	517.4[M-C ₆ H ₁₀ O ₅ +5CH ₂ +H] ⁺	499.5, 467.3, 355.2	20
9	细叶远志皂苷	C ₃₆ H ₃₆ O ₁₂	680.38	+	719.7[M+8CH ₂ -H] ⁻	704.6, 485.4, 469.3	31
10	橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.19	+	831.8[M+3CH ₂ +3O+(CH ₃) ₃ NH] ⁺	817.0, 758.9, 716.6, 588.6, 316.2	27
11	哈巴苷	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀	364.14	-	777.8[M+7CH ₂ -H] ⁻	759.7, 745.8, 717.8	24
				+	822.8[M+11CH ₂ +(CH ₃) ₃ NH] ⁺	634.8, 428.3, 413.5, 383.2	19
				-	447.4[M+6CH ₂ -H] ⁻	432.5, 415.4, 385.4	20

续表 1

序号 No.	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	相对分子质量 Relative molecular mass	操作模式 MS mode	母离子 Precursor ion (<i>m/z</i>)	碎片离子 Fragment ion (<i>m/z</i>)	碰撞电压 Collision energy/eV
12	哈巴俄苷	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	494.18	—	447.5[M-C ₉ H ₆ O+6CH ₂ -H] ⁻	432.1, 415.4, 355.3	19
13	马钱苷	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	390.15	—	461.4[M+4CH ₂ +O-H] ⁻		
14	淫羊藿苷	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	676.24	+	397.5[M-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₄ H ₁₀ O ₄ +2CH ₂ +H] ⁺	382.3, 341.3	25
15	人参皂苷 Rg1	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	800.49	+	764.6[M-C ₆ H ₁₁ O ₆ +16CH ₂ +(CH ₃) ₃ NH] ⁺		
16	朝藿定 A	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	838.29	+	397.3[M-2C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₄ +2CH ₂ +H] ⁺ 827.6[M-C ₆ H ₁₁ O ₆ +12CH ₂ +H] ⁺	382.4, 367.2, 341.3, 314.3	35
17	朝藿定 B	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	808.28	+	773.8[M-C ₆ H ₁₀ O ₅ +7CH ₂ -H] ⁻ 397.3[M-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₅ H ₈ O ₄ +2CH ₂ +H] ⁺		
18	朝藿定 C	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	822.29	+	397.3[M-C ₆ H ₁₀ O ₅ -2C ₆ H ₁₀ O ₄ +2CH ₂ +H] ⁺ 797.5[M-C ₆ H ₁₁ O ₆ +11CH ₂ +H] ⁺	382.4, 367.2, 341.3, 314.3	25
19	薯蓣皂苷	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	868.48	+	1039.0[M+8CH ₂ +(CH ₃) ₃ NH] ⁺	993.9, 894.7, 850.6, 454.5	20
20	人参皂苷 Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	946.55	+	1011.9[M+9CH ₂ +H ₂ O-H] ⁻ 937.0[M-C ₆ H ₁₁ O ₆ +8CH ₂ +(CH ₃) ₃ NH] ⁺	905.0, 494.7, 449.8	25
21	人参皂苷 Rb1	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1108.60	+	937.0[M-C ₆ H ₁₁ O ₆ -C ₆ H ₁₁ O ₆ +8CH ₂ +N(CH ₃) ₃ NH] ⁺ 1378.8[M+15CH ₂ +(CH ₃) ₃ NH] ⁺		

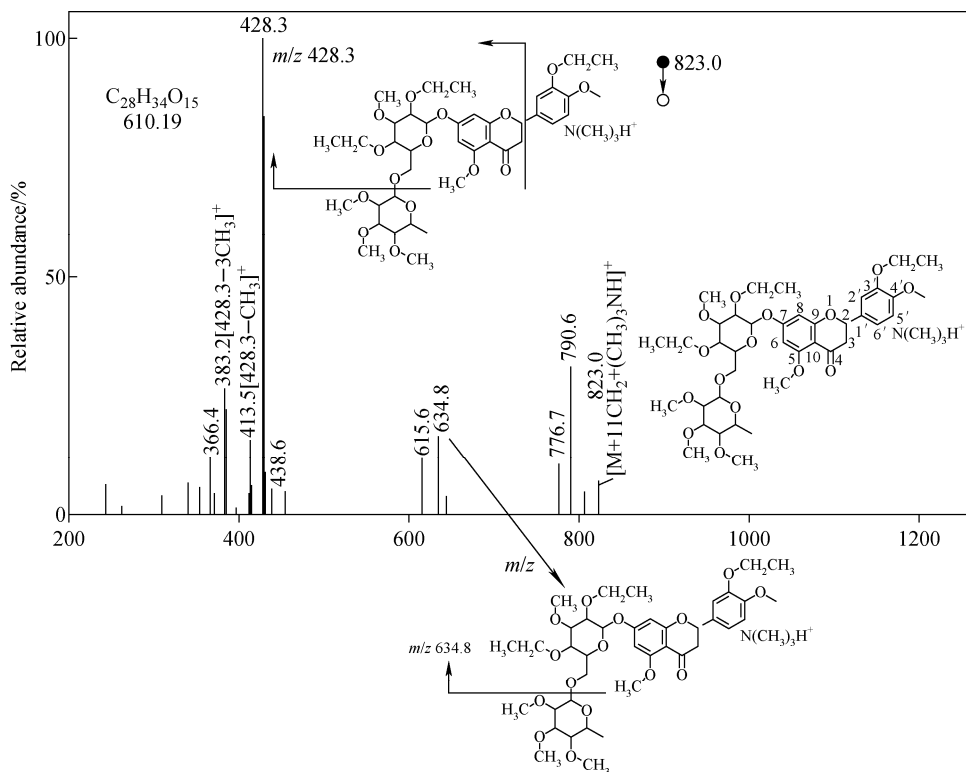


图 9 He-DART-LTQ MS 法检测橙皮苷甲基化产物的串联质谱图

Fig. 9 MS² spectrum of hesperidin methylation using He-DART-LTQ MS

参考文献:

- [1] COOKS R G, OUYANG Z, TAKATS Z, WISEMAN J M. Detection technologies. Ambient mass spectrometry[J]. Science, 2006, 311(5767): 1566-1570.
- [2] HUANG M Z, YUAN C H, CHENG S C, CHO Y T, SHIEO J. Ambient ionization mass spectrometry[J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2010, 3: 43-65.
- [3] CODY R B, LARAMEE J A, DURST H D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(8): 2297-2302.
- [4] SONG L G, CHUAH W C, QUICK J D, REMSEN E, BARTMESS J E. Nitrogen direct analysis in real time time-of-flight mass spectrometry (N₂ DART-TOF/MS) for rapid screening of forensic drugs[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2020, 34(1): e8558.
- [5] DANE A J, CODY R B. Selective ionization of melamine in powdered milk by using argon direct analysis in real time (DART) mass spectrometry[J]. Analyst, 2010, 135(4): 696-699.
- [6] WANG L, CHEN T, ZENG S, QU H. Quality by design study of the direct analysis in real time mass spectrometry response[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2014, 25(2): 278-285.
- [7] MATOUSEK T, KRATZER J, STURGEON R E, MESTER Z, MUSIL S. A mass spectrometric study of hydride generated arsenic species identified by direct analysis in real time (DART) following cryotrapping[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(13): 3443-3453.
- [8] FORMAS T P, KRAUSS S T. Confined DART-MS for rapid chemical analysis of electronic cigarette aerosols and spiked drugs[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2021, 32(8): 2274-2280.
- [9] GROSS J H. High-mass cluster ions of ionic liquids in positive-ion and negative-ion DART-MS and their application for wide-range mass calibrations[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(1): 63-80.
- [10] DRURY N, RAMOTOWSKI R, MOINI M. A

- comparison between DART-MS and DSA-MS in the forensic analysis of writing inks[J]. *Forensic Science International*, 2018, 289: 27-32.
- [11] MARIC M, MARANO M, CODY R B, BRIDGE C. DART-MS: a new analytical technique for forensic paint analysis[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(11): 6 877-6 884.
- [12] WANG J Q, DU Q, YOU X R, LV Y Q, BI W T, LI H L, CHEN D D Y. Solvent-free high-throughput analysis of herbicides in environmental water[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1 071: 8-16.
- [13] CODY R, MALEKNIA S D. Coated glass capillaries as SPME devices for DART mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2020, 34(23): e8946.
- [14] GENG X, ZHAO Z Y, LI H L, CHEN D D Y. Tee-shaped sample introduction device coupled with direct analysis in real-time mass spectrometry for gaseous analytes[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(50): 16 813-16 820.
- [15] GUO Y L, CHI H Y, LIU X K, SUN X L, WANG Y, LIU S Y. Rapid characterization of Schisandra species by using direct analysis in real time mass spectrometry[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2018, 53(3): 240-246.
- [16] YE W J Y. Natural product discovery by direct analysis in real time mass spectrometry[J]. *Mass Spectrometry*, 2019, 8(2): S0081.
- [17] CHEN Z Y, YANG Y Y, TAO H X, LIAO L P, LI Y, ZHANG Z J. Direct analysis in real-time mass spectrometry for rapid identification of traditional Chinese medicines with coumarins as primary characteristics[J]. *Phytochemical Analysis*, 2017, 28(3): 137-143.
- [18] WANG J Q, ZHOU Y Y, WANG M, BI W T, LI H L, CHEN D D Y. High-throughput analysis for artemisinin with deep eutectic solvents mechanochemical extraction and direct analysis in real time mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(5): 3 109-3 117.
- [19] WANG Y, LI C M, HUANG L, LIU L, GUO Y L, MA L. Rapid identification of traditional chinese herbal medicine by direct analysis in real time (DART) mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 845: 70-76.
- [20] 于擎,于彬彬,越皓,焦丽丽,刘淑莹. 甲基化辅助实时直接分析电离的机理研究[J]. *化学学报*, 2012,70(15):1 650-1 654.
- YU Qing, YU Binbin, YUE Hao, JIAO Lili, LIU Shuying. Study of mechanism of ionization assisted by methylation in direct analysis in real time ion source[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2012, 70(15): 1 650-1 654(in Chinese).
- [21] WANG L, ZENG S S, QU H B. Effects of ion source operating parameters on direct analysis in real time of 18 active components from traditional chinese medicine[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 121: 30-38.
- [22] SU R, YU W J, SUN K J, YANG J, CHEN C B, LIAN W H, LIU S Y, YANG H M. The ion source of nitrogen direct analysis in real-time mass spectrometry as a highly efficient reactor; generation of reactive oxygen species[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2019, 30(4): 581-587.
- [23] YANG H M, WAN D B, SONG F R, LIU Z Q, LIU S Y. Argon direct analysis in real time mass spectrometry in conjunction with makeup solvents: a method for analysis of labile compounds [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(3): 1 305-1 309.
- [24] STEMLER E A, BUCHANAN M V. Negative ions generated by reactions with oxygen in the chemical ionization source[J]. *Organic Mass Spectrometry*, 1989, 24: 94-104.
- [25] STEMLER E A, BUCHANAN M V. Differentiation of methyl substituted fluorenes, anthracenes and benz[α]anthracenes using surface-catalyzed oxidation reactions and negative ion chemical ionization mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1988, 2(9): 184-188.
- [26] BHATTARAI N, KUMBHAR A A, POKHAREL Y R, YADAV P N. Anticancer potential of coumarin and its derivatives[J]. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2021, 21(19): 2 996-3 029.
- [27] YU C L, YU Y L, YANG S F, HSU C E, LIN C L, HSIEH Y H, CHIOU H L. Praeruptorin A reduces metastasis of human hepatocellular carcinoma cells by targeting ERK/MMP1 signaling pathway[J]. *Environmental Toxicology*, 2021, 36(4): 540-549.

- [28] NEWMAN D J, CRAGG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79: 629-661.
- [29] ZHANG T T, LIU H, LIU M, WANG C H. Farrerol suppresses the progression of laryngeal squamous cell carcinoma via the mitochondria-mediated pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2021, 913: 174-183.
- [30] SONG L G, CHUAH W C, LU X Y, REMSEN E, BARTMESS J E. Ionization mechanism of positive-ion nitrogen direct analysis in real time[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2018, 29(4): 640-650.
- [31] SONG L G, GIBSON S C, BHANDARI D, COOK K D, BARTMESS J E. Ionization mechanism of positive-ion direct analysis in real time: a transient microenvironment concept[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(24): 10 080-10 088.
- [32] MORLOCK G E, RISTIVOJEVIC P, CHERNETSOVA E S. Combined multivariate data analysis of high-performance thin-layer chromatography fingerprints and direct analysis in real time mass spectra for profiling of natural products like propolis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1 328: 104-112.
- [33] KIM H J, PARK S R, JANG Y P. Extraction-free in situ derivatization of timosaponin all using direct analysis in real time TOF MS[J]. *Phytochemical Analysis*, 2014, 25(4): 373-377.
- [34] NAGY T, KUKI A, NAGY L, ZSUGA M, KEKI S. Lipid qualitative analysis of 2 flavonoids, rutin and silybin, in medical pills by direct analysis in real-time mass spectrometry (DART-MS) combined with in situ derivatization[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2018, 53(3): 240-246.
- [35] 闫福源,许宁,王任晶,崔长升,齐滨,刘淑莹,王洋,刘莉. 基于 DART-MS 技术的人参皂苷结构分析[J]. *长春中医药大学学报*, 2018, 34(6): 1 058-1 062.
- YAN Fuyuan, XU Ning, WANG Renjing, CUI Changsheng, QI Bin, LIU Shuying, WANG Yang, LIU Li. Structural analysis of ginsenoside based on DART-MS technology[J]. *Journal of Changchun University of Chinese Medicine*, 2018, 34(6): 1 058-1 062(in Chinese).
- (收稿日期:2022-10-13;修回日期:2023-01-11)