

龙胆质谱指纹图谱及化学模式识别方法研究

齐静静^{1,2}, 苑桂鑫¹, 宋凤瑞¹, 刘志强¹, 王琦², 刘淑莹¹

(1. 中国科学院长春应用化学研究所, 吉林 长春 130022;

2. 吉林农业大学, 吉林 长春 130118)

摘要:利用电喷雾质谱(ESI-MS)法建立龙胆质谱指纹图谱,研究其中代表性裂环烯醚萜苷类成分的 ESI-MS 规律。采用甲醇超声法提取龙胆中裂环烯醚萜苷类成分,在正离子方式检测模式下直接进样,应用一级全扫描质谱建立其特征图谱。运用化学模式识别方法对图谱数据进行分析,发现秋季龙胆样品的聚集程度优于春季龙胆样品,根据春季、秋季药材样品的差异,可以对采收期进行区分;裂环烯醚萜苷类成分在二级质谱中易发生脱水、乙酰基、葡萄糖基等。电喷雾质谱法的精密度、稳定性、重现性均符合要求,且具有特征性强、分析速度快、样品用量少等优点。

关键词:龙胆;裂环烯醚萜苷;电喷雾质谱;指纹图谱;化学模式识别

中图分类号:O 657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2009)06-0334-06

Study on Chemical Pattern Recognition and Mass Spectrometry Fingerprints of *Gentiana scabra* Bge.

QI Jing-jing^{1,2}, YUAN Gui-xin¹, SONG Feng-rui¹,

LIU Zhi-qiang¹, WANG Qi¹, LIU Shu-ying¹

(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, Changchun 130022, China;

2. Jilin Agriculture University, Changchun 130118, China)

Abstract: The fingerprint of *Gentiana scabra* Bge. was established by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Main secoiridoid glycosides of *Gentiana scabra* Bge. and their fragment pathway were analyzed by ESI-MS. Secoiridoid glycosides were extracted from *Gentiana scabra* Bge. by methanol supersonics, and extracts were analyzed directly in positive ion mode by ESI-MS. The results of ESI-MS fingerprint were processed by chemical pattern recognition method. The samples from autumn are in good quality. The result also can differentiate samples from different seasons. Secoiridoid glycosides are fragmented through losing H₂O, acetyl and glucosyl in ESI-MS². Electrospray ionization mass spectrometry method is good precision, stability and reproducibility. This method is simple, rapid, and can be used for identification and study of characteristic fingerprint.

收稿日期:2009-03-13;修回日期:2009-07-17

基金项目:吉林省重点科技发展的项目(20060902)资助

作者简介:齐静静(1984~),女,辽宁营口人,硕士研究生,从事天然产物化学与新药研究。E-mail: qijingjingqq@163.com

通信作者:宋凤瑞,女,山东烟台人,研究员,从事药物质谱及中药质量控制技术研究。E-mail: songfr@ciac.jl.cn

Key words: *Gentiana scabra* Bge. ; secoiridoid glycosides; ESI-MS; fingerprint; chemical pattern recognition method

中药龙胆是龙胆科植物条叶龙胆(*Gentiana manshurica* Kitag.), 龙胆(*Gentiana scabra* Bge.), 三花龙胆(*Gentiana triflora* Pall.)或坚龙胆(*Gentiana rigescens* Franch.)的干燥根及根茎^[1]。龙胆性寒、味苦,归肝胆经,具清热燥湿、泻肝胆火之功效,属清热燥湿药。龙胆的主要化学成分为裂环烯醚萜苷类:如龙胆苦苷(gentiopicoside)、当药苷(sweroside)、当药苦苷(swertiamarin)等^[2],此外,还有一些寡糖类化合物。电喷雾质谱(ESI-MS)技术属于“软电离”技术,可以对中药的化学成分进行快速的定性分析^[3-4]。本工作建立龙胆药材的电喷雾质谱指纹图谱的分析方法,运用化学模式识别方法对数据进行分析。结果表明,质谱指纹图谱可对春季、秋季药材样品不同采收期进行区分;利用多级串联质谱技术对代表性裂环烯醚萜苷成分分析,归纳总结此类化合物的裂解规律,为电喷雾质谱技术在中药龙胆的研究奠定基础。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

LCQ 离子阱质谱仪:美国 Finnigan 公司产品,配有电喷雾离子源(ESI);龙胆药材于 2007 年,2008 年 6 月、10 月采自吉林左家种植基地,列于表 1。当药苷(111742-200501)、龙胆苦苷(110770-200510)对照品:购自中国药品生物制品检定所;甲醇(色谱纯):Fisher 公司产品;水为超纯水(18.2 MΩ·cm);其他试剂(分析纯):北京化工厂产品。

表 1 春季、秋季龙胆药材样品

Table 1 *Gentiana scabra* Bge. samples from spring and autumn

春季	海拔/m	秋季	海拔/m
s07-1,s08-1	400	s07-1,s08-1	400
s07-2,s08-2	398	s07-2,s08-2	398
s07-3,s08-3	396	s07-3,s08-3	396
s07-4,s08-4	394	s07-4,s08-4	394
s07-5,s08-5	390	s07-5,s08-5	390

1.2 供试品溶液制备

取龙胆粉末,50℃烘干至恒重,分别精密称取 0.3 g,加入 10 mL 甲醇,称定重量,浸泡 10 min 后,超声提取 30 min。过滤,取 2 mL 滤液,甲醇定容至 5 mL,备用。

1.3 对照品溶液制备

分别精密称取 2 mg 当药苷、龙胆苦苷对照品,定容至 5 mL 容量瓶,得对照品溶液,备用。

1.4 质谱条件

ESI 源,喷雾电压 5 kV,金属加热毛细管温度 220℃,壳气(N₂)流速 60 arb,辅助气(N₂)流速 5 arb,毛细管电压 11 V,质量扫描范围 m/z 50~1 000,分别采集正、负离子谱,MSⁿ 碰撞能量 25%。

2 结果与讨论

2.1 多级串联质谱分析龙胆中主要裂环烯醚萜苷类化合物

春季 s07-1、秋季 s07-1 供试品溶液的正离子电喷雾质谱中,主要存在共有离子 m/z 365、379、381、395、527、543、735、805、821,示于图 1。在 m/z 365、527、543 离子的串联质谱数据中,分别存在脱去 1~2 个六碳糖基的离子,推断 m/z 365 离子是龙胆二糖 $[M+Na]^+$ 、 m/z 527 离子是龙胆三糖 $[M+Na]^+$ 、 m/z 543 离子是龙胆三糖 $[M+K]^+$ 。龙胆药材样品的正离子谱中, m/z 379、381 离子的串联质谱(图 2)与龙胆苦苷(m/z 357)、当药苷(m/z 359)准分子离子的串联质谱碎裂途径相同(图 3),即失去一分子葡萄糖,形成苷元(m/z 195 或 197)再脱水。因此推测, m/z 379、381 离子为龙胆苦苷 $[M+Na]^+$ 和当药苷 $[M+Na]^+$ 。

在龙胆药材样品的一级正离子电喷雾质谱中还存在 $[M+Na]^+$; m/z 805、821 离子,在一级负离子电喷雾质谱中给出了 m/z 781、797 的 $[M-H]^-$ 离子,根据它们的多级串联质谱数据,结合文献^[5-6],鉴定为 trifloroside(三花龙胆苷)、rindoside,其结构示于图 4。对于 trifloroside, m/z 745 是 m/z 805 失去一分子乙酰基和一分子水产生的, m/z 643 是 m/z 745 失去一分子六碳糖产生的, m/z 507 是 m/z 643 失去质量

数为 136 (邻二羟基苯甲酸) 产生的。对于 rindoside, 碎裂途径与 trifloroside 完全相同, 列于表 2。从多级串联质谱数据看出, MS² 主要碎片离子是由于失去连接裂环稀醚萜苷元糖上伯醇位的乙酰基(据糖分子中羟基的活性, 乙酰化反应活性: 半缩醛羟基 > 伯醇位羟基 > 2 号位羟基 > 其他位羟基 [7])、一分子水、一分子六碳

糖基和糖上的另一个乙酰基而形成的。这两个化合物在结构上差异很小, 基本结构单元都是由一分子裂环稀醚萜苷元、葡萄糖(乙酰化或未乙酰化)和邻二羟基苯甲酸结构构成。与龙胆苦苷、当药苷的结构相比, 它们属于结构较复杂的裂环稀醚萜苷类。

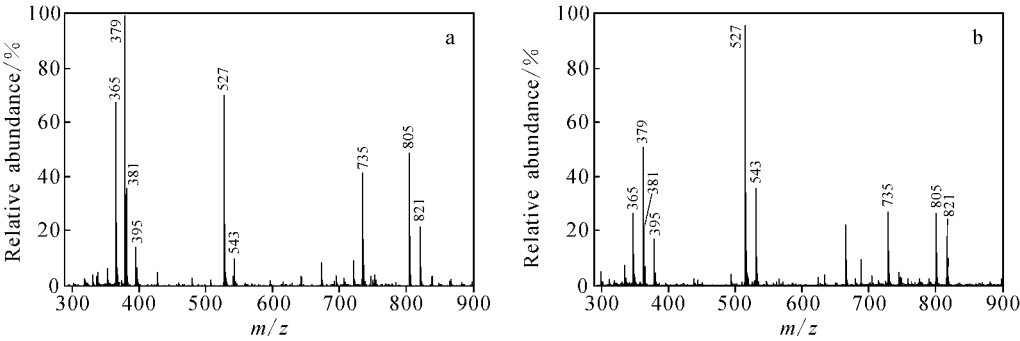


图 1 春季(a)、秋季(b)龙胆药材样品的正离子质谱图
Fig. 1 Mass spectra of *Gentiana scabra* Bge. samples from spring(a) and autumn(b)

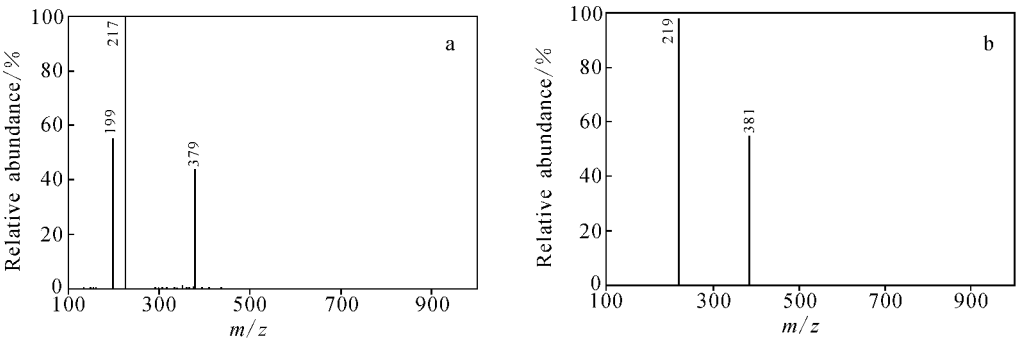


图 2 m/z 379 离子(a)和 m/z 381 离子(b)的正离子 ESI-MS/MS 谱图
Fig. 2 Positive ion ESI-MS/MS spectra of m/z 379 ion(a) and m/z 381 ion(b)

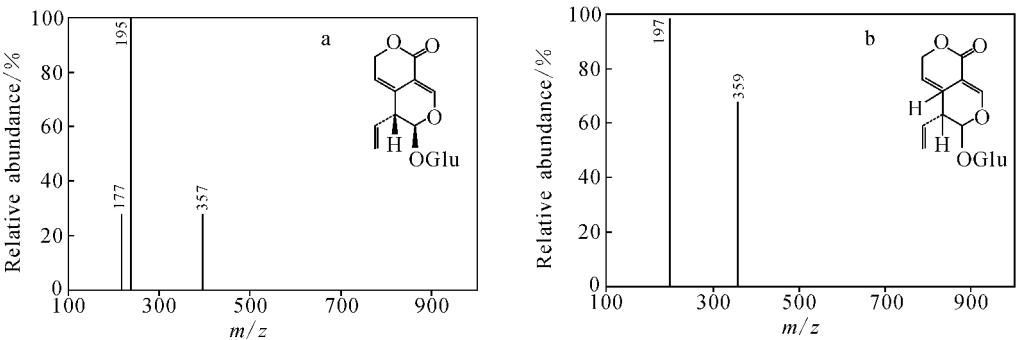


图 3 龙胆苦苷(a)、当药苷(b)的正离子 ESI-MS/MS 谱图
Fig. 3 Positive ion ESI-MS/MS spectra of gentiopicroside(a) and sweroside(b) standard

表 2 龙胆中主要化合物在 ESI-MS/MS 中的特征碎片离子

名称及相对分子质量	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	[2M+Na] ⁺	[M+Na] ⁺ 的主要碎片离子
龙胆二糖(342)	365	—	—	347, 305, 203
龙胆三糖(504)	527	543	—	365, 203
龙胆苦苷(356)	379	395	735	217, 199
当药苷(358)	381	—	—	219
trifloroside(782)	805	—	—	745, 643, 507
rindoside(798)	821	—	—	761, 659, 523

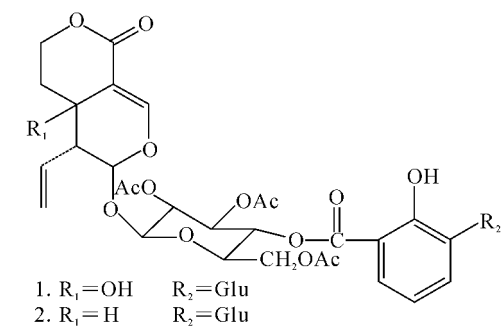


图 4 Trifloroside(1)和 rindoside(2)的结构

Fig. 4 Structures of trifloroside(1) and rindoside(2)

2.2 龙胆药材的质谱指纹图谱分析

2.2.1 方法学考察 1)精密度试验:取龙胆苦苷、当药苷混合标准品溶液,连续进样 5 次,测定质谱指纹图谱。5 次质谱图中,2 个质谱峰相对丰度 RSD 分别为 2.36%、1.98%,TIC 图中离子流强度 RSD 小于 3%,仪器精密度较好。

2)重现性试验:取同一批龙胆按 1.2 方法制备 5 份供试液,进行测定。龙胆苦苷、当药苷质谱峰的相对丰度 RSD 分别为 2.16%、2.62%,TIC 图中离子流强度 RSD 小于 3%,重现性较好。

3)稳定性试验:取同一龙胆样品试液,分别于第 0、4、8、12、16 h 测定,龙胆苦苷、当药苷质谱峰的相对丰度 RSD 分别为 1.69%、2.46%,TIC 图中离子流强度 RSD 小于 3%,说明样品至少在 16 h 内稳定。

2.2.2 龙胆药材的质谱指纹图谱建立 分别精密吸取稀释相同倍数的 20 批供试品溶液,按 1.4 条件进样,记录质谱图,示于图 5。根据以上分析,可对质谱指纹图谱中的主要离子峰进行定性鉴别:龙胆苦苷、当药苷、三花龙胆苷、rindoside

和寡糖类等。龙胆药材的质谱指纹图谱主要可分为 3 个部分:简单环烯醚萜苷类(当药苷、龙胆苦苷)、寡糖(龙胆三糖和龙胆二糖)、复杂环烯醚萜苷(三花龙胆苷和 rindoside)。其中寡糖类成分由于在紫外区没有吸收,所以在色谱指纹图谱中不会显现;而由于质谱是质量分离,可以清楚地看出春季和秋季样品中寡糖类成分的差异。

利用大连化学物理研究所王龙星等人的指纹图谱相似度软件,以上述龙胆药材中主要化合物的相对丰度评价龙胆药材的相似度,以样品 s07-1、s08-1 为参照,秋季样品之间的相似度均大于 0.9,而春季样品之间的相似度一般小于 0.9,但大于 0.8,说明春秋季节的药材存在一定的差异,列于表 3。

2.3 化学模式识别方法分析质谱指纹图谱数据

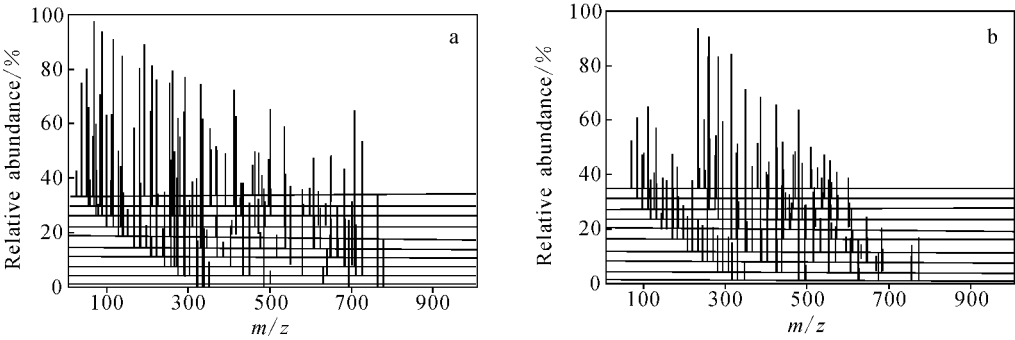
2.3.1 龙胆样品的因子分析、聚类分析 主成分分析就是考虑各指标间的相互关系,利用降维的思想把多个指标转换成较少的几个互不相关的综合指标,从而使研究变成简单的一种统计方法。该方法可以将多维空间的信息在低维(二维或三维空间)表现出来,以消除众多化学信息中相互重叠的部分。它将原始变量进行转换,使少数几个新变量为原变量的线性组合,同时又使这些变量尽可能多的表征原变量的数据特征。根据样品和变量在主成分上的得分或权系数,得分相近的样品视为同类,权系数相近的变量视为相关,对主成分贡献大的变量其影响程度也大。

从质谱指纹图谱可知,龙胆样品春、秋季的差异主要体现在龙胆寡糖上,下面针对 m/z 365(龙胆二糖 $[M+Na]^+$)、 m/z 527(龙胆三糖 $[M+Na]^+$)、 m/z 543(龙胆三糖 $[M+K]^+$) 3 个组成的成分做主成分分析,可得其主成分因子的二、三维投影,示于图 6,图 7。

由图 6,图 7 可以看出,秋季的龙胆样品非

常明显的聚为一类,只针对龙胆寡糖的主成分分析结果聚集程度强于图 6 所示的对所有成分进

行主成分分析结果,可以看出,秋季的龙胆多糖含量高于春季龙胆样品,且含量稳定。



注:从下至上依次为 07-1-5、08-1-5

图 5 春季(a)、秋季(b)龙胆样品的质谱匹配图

Fig. 5 Mass spectrometry fingerprints of *Gentiana scabra* Bge. samples from spring(a) and autumn(b)

表 3 龙胆药材的质谱指纹图谱相似度

Table 3 Similarity of mass spectrometry fingerprint of *Gentiana scabra* Bge.

批次	07-1	07-2	07-3	07-4	07-5	08-1	08-2	08-3	08-4	08-5
春季	1.000	0.913	0.898	0.959	0.867	0.838	0.924	0.878	0.872	0.894
秋季	1.000	0.934	0.904	0.930	0.917	0.906	0.931	0.925	0.913	0.916

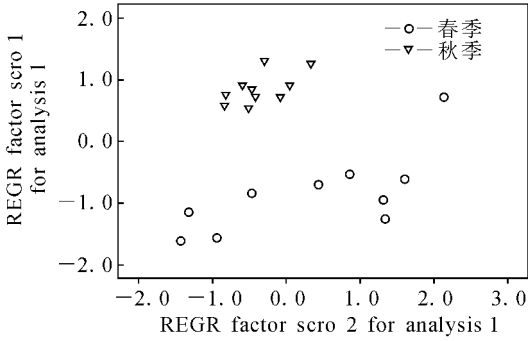


图 6 龙胆寡糖主成分因子的分散点图(二维)

Fig. 6 Dispersal picture of principal constituent factor in polyose of samples (2-dimensional)

2.3.2 聚类分析 K-均值聚类法处理速度快、占用内存少、分类迅速,它通常需要人为地给定分类数目,K-均值聚类法使用的是欧氏距离平方,各变量权数相等^[8]。由于本研究已知包含龙胆的春秋两季数据,所以采用 K-均值聚类法对

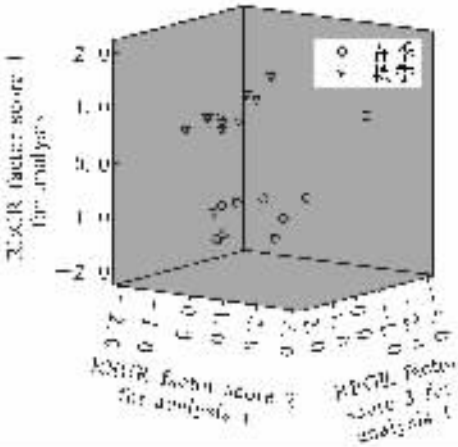


图 7 龙胆寡糖主成分因子的分散点图(三维)

Fig. 7 Dispersal picture of principal constituent factor in polyose of samples (3-dimensional)

样品数据进行聚类分析。
表 4 给出了聚类结果,Cluster 的值为类号,可以看出,春、秋季的 10 个样品各自聚为一类。

表 4 各观测量所属类成员表

Table 4 Member table of each observation factor cluster membership		
Case Number	Cluster	Distance
春季 1	2	1.478
春季 2	2	2.162
春季 3	2	1.830
春季 4	2	2.073
春季 5	2	1.310
春季 6	2	2.790
春季 7	2	1.346
春季 8	2	4.231
春季 9	2	2.088
春季 10	2	1.637
秋季 11	1	3.253
秋季 12	1	2.197
秋季 13	1	2.742
秋季 14	1	2.404
秋季 15	1	2.820
秋季 16	1	4.762
秋季 17	1	2.184
秋季 18	1	2.726
秋季 19	1	2.622
秋季 20	1	3.009

3 结 论

本实验应用电喷雾质谱法建立了龙胆药材的指纹图谱,并对其中代表性裂环烯醚萜苷类成分进行了鉴定和分析,得出龙胆中裂环烯醚萜苷

类成分质谱碎裂规律。运用主成分分析及聚类分析方法对龙胆质谱指纹图谱数据进行了分析,春、秋季的龙胆样品可以各自分为一类,秋季龙胆样品的聚集程度优于春季龙胆样品,即药材质量与气候条件有一定的相关性,也为药材的采收季节提供合理依据。利用质谱建立药材指纹图谱具有样品用量少、特征性强、分析速度快、直接定性等优点,为中药龙胆多维指纹图谱的研究和质量控制奠定了基础。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:化学工业出版社,2005:70.

[2] 杨绍云,王薇薇,李志平. 龙胆化学成分的研究[J]. 中草药,1981,12(6):7.

[3] 崔 勐,刘志强,宋凤瑞,等. 皂苷的电喷雾负离子多级串联质谱研究[J]. 高等学校化学学报,2001,22(8):1323-1325.

[4] 韩凤梅,张 玲,陈怀侠,等. 丹参脂溶性成分的 ESI-MS 行为及其特征图谱研究[J]. 中草药,2006,37(6):122-124.

[5] 刘明韬. 龙胆的化学成分研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2002.

[6] KAKUDA R, IJIMA T, YAOITA Y. et al. Secoiridoid glycosides from *Gentiana scabra* [J]. Nat Prod, 2001, 64(12): 1574-1575.

[7] 姚新生. 天然药物化学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2003:74.

[8] 徐永群,孙素琴,冯学峰,等. 黄芩产区红外指纹图谱和聚类分析法的快速鉴别研究[J]. 光谱学与光谱分析,2003,123(13):502-505.