

大狼把草的化学成分液质联用快速鉴定分析

王翌臣, 王焕军, 张玲, 周洪雷, 马艳妮*
(山东中医药大学药学院, 实验中心, 济南 250355)

[摘要] 目的:建立大狼把草化学成分的液质联用定性表征方法并总结裂解规律。方法:按照化学成分数据库构建-液质数据采集-数据库检索-质谱数据解析的步骤,采用 HALO C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm); 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~10 min, 5%~25% B; 10~30 min, 25%~45% B; 30~35 min, 45%~70% B; 35~45 min, 70%~90% B; 45~60 min, 90%~100% B; 60~70 min, 100% B)。柱温 25 °C, 流速 0.2 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL; 质谱条件为采用 ESI 离子源, 在正离子模式下进行检测, 对大狼把草中的橙酮、查尔酮、苯丙素等进行分析。结果:从大狼把草的提取液中, 鉴定出黄酮类 22 个, 苯丙素类 5 个, 有机酸 2 个, 碳烯 1 个, 发现在正离子模式下, 绿原酸及其衍生物会有规律的断裂产生 [奎尼酸 + H - H₂O]⁺, [咖啡酰基 + H]⁺, 多羟基酸会脱水裂解。黄酮类化合物, 主要会丢失 CO, H₂O 等碎片, 橙酮类化合物会产生 286, 270, 230 等碎片离子。结论:采用高效液相-飞行时间液质联用法可以快速有效的对中药中已知化学成分进行定性分析, 为大狼把草的物质基础表征提供质谱依据。

[关键词] 大狼把草; 化学成分; 高效液相-飞行时间-串联质谱联用; 裂解规律

[中图分类号] R284.1; R289; R22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0080-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181710

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180614.1355.021.html>

[网络出版时间] 2018-06-14 15:16

Application of Mass Spectrometry in Rapid Analysis of Constituents in *Bidens frondosa*

WANG Yi-chen, WANG Huan-jun, ZHANG Ling, ZHOU Hong-lei, MA Yan-ni*
(College of Pharmaceutical Science, Experimental Center, Shandong University of
Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a characterization method of chemical composition from *Bidens frondosa* by HPLC-TOF-MS. **Method:** In accordance with the procedure of construction of chemical composition database-MS data acquisition-database retrieval-mass spectrometry data analysis, the separation was performed on a HALO column, with C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm) as stationary phase. And the mobile phase was water and 0.1% formic acid (A) -acetonitrile (B) for gradient elution. The method of gradient elution: 0-10 min, 5% - 25% B; 10-30 min, 25% -45% B; 30-35 min, 45% -70% B; 35-45 min, 70% -90% B; 45-60 min, 90% - 100% B; 60-70 min, 100% B. The temperature of column was 25 °C, the flow rate was 0.2 mL · min⁻¹, and the injection volume was 5 μL. The composition of *B. frondosa* was analyzed under positive ion mode. **Result:** The 24 flavonoid constituents, 5 phenylpropanoids, 2 organic acids were identified in extraction of *B. frondosa*. In positive ion mode, chlorogenic acid and its derivatives were ruptured regularly, and produced [quinic acid + H -

[收稿日期] 20171013(017)

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2015HM080); 山东中医药大学“名科工程”青年骨干培养计划; 山东中医药大学大学生 SRT 训练计划(2017041)

[第一作者] 王翌臣, 从事中草药栽培与鉴定研究, E-mail: wyc970410@163.com

[通信作者] * 马艳妮, 硕士, 讲师, 从事传统中药的鉴别研究, E-mail: lxyaner@163.com

$\text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{caffeoyl} + \text{H}]^+$, polyhydroxy acids were dehydrocracked. Flavonoids lost CO , H_2O and other fragment ion, and auronones produced the ions of 286, 270, 230. **Conclusion:** HPLC-TOF-MS method could be used for fast qualitative analysis of the chemical components in traditional Chinese medicine, and provide the material basis for the characterization of *B. frondosa* based on mass spectrometry.

[Key words] *Bidens frondosa*; chemical composition; HPLC-ESI-TOF-MS; fragmentation pattern

大狼把草为菊科鬼针草属植物大狼把草的全草,始载于《本草拾遗》,味苦性平而无毒,功用养阴敛汗、清热解毒,大狼把草主要成分为木犀草素、槲皮素、芹菜素及其苷类,现代多用于治体虚乏力、感冒、扁桃体炎、痢疾、肠炎,外用治皮癣、丹毒等^[1]。鬼针草属植物在我国资源丰富,具有一定的生物活性和临床疗效,研究表明该属植物化学成分通常具有抗癌、抗炎、抗氧化活性^[2]。

课题组前期对鬼针草属植物婆婆针^[3]、金盏银盘^[4]进行了化学成分的分离,发现鬼针草属植物主要成分包括橙酮、查尔酮以及聚炔苷类化合物,在此基础上,采用液质联用的方法鉴定了鬼针草属植物的小花鬼针草的主要成分^[5]。液质联用技术将液相色谱的良好分离性与质谱选择灵敏性好结合起来,有分析范围广,分离能力强等优点^[6-7],采用液质联用的方法根据精确相对分子质量,分子碎片峰,参考文献、对照品色谱保留时间及二级质谱对化学成分进行了快速的识别和鉴定^[8-9],本文针对大狼把草中黄酮类成分进行液质联用分析,对大狼把草中的化学成分进行鉴定,并鉴定出黄酮类 22 个、苯丙素类 5 个、有机酸 2 个、碳烯 1 个,建立了大狼把草化学成分快速准确的分析方法,为大狼把草的物质基础表征提供质谱依据。

1 材料

大狼把草采自山东省济南市长清区,经山东中医药大学徐凌川教授鉴定为菊科鬼针草属植物大狼把草 *Bidens frondosa* 的地上部分,样本保存于本实验室。

1260 系列高效液相色谱仪,6230 TOF 型质谱仪(配有标准电喷雾离子源, MassHunter Data Acquisition 在线工作站和 Qualitative Analysis B. 06.00 离线分析软件)(美国安捷伦公司);CP225D 型 1/10 万电子分析天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);N-1100 型旋转蒸发器(日本东京理化仪器公司);甲酸(色谱纯,美国 Tedia);甲醇(美国 Thermo Fisher);屈臣氏水,其他试剂为分析纯。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 取大狼把草地上部分粉

碎,称取 20 g,以 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,减压回收至无醇味,石油醚(60 ~ 90 °C)萃取除去叶绿素,石油醚层弃去,剩余部分水浴蒸干得浸膏。精密称取药材浸膏 0.1 g,以 80% 甲醇溶解配制质量浓度为 40 mg·L⁻¹ 供试品溶液。

2.2 大狼把草化学成分数据库的建立 根据国内外专业数据库(Pubmed, ChemSpider)相关研究文献,获得鬼针草属植物化学成分 233 个单体信息,采用安捷伦 Formula-Database Generator 软件(含各元素精确质量数),根据各成分碳、氢、氧原子的个数计算精确相对分子质量,建立鬼针草属植物化学成分数据库。

2.3 色谱条件 采用 HALO C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 2.7 μm);流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 25% B; 10 ~ 30 min, 25% ~ 45% B; 30 ~ 35 min, 45% ~ 70% B; 35 ~ 45 min, 70% ~ 90% B; 45 ~ 60 min, 90% ~ 100% B; 60 ~ 70 min, 100% B);柱温 25 °C,流速 0.2 mL·min⁻¹,进样量 5 μL。

2.4 质谱条件 ESI 离子源,正离子模式,毛细管电压 4 000 V;雾化气压力 241.3 kPa;干燥气 N₂,流量 11 L·min⁻¹;干燥气温度 350 °C;碎裂电压 110 V;参比离子 121.050 873 和 922.009 798;质量扫描范围 m/z 100 ~ 1 000。

2.5 质谱分析 根据鬼针草属植物化学成分数据库,对大狼把草样品总离子流图进行分析,以 MassHunter Data Qualitative Analysis 质谱分析软件推测成分的分子式,根据质谱碎裂信息同时参照相关文献报道推测化合物结构。

3 结果和分析

3.1 大狼把草的化学成分鉴定 实验数据的采集和分析采用 MassHunter software version B. 06.00 (Agilent Technologies) 软件,库检索-利用精确质量数及分子式。首先,通过 Agilent Masshunter Qualitative Analysis 软件的 MFE 功能查找化合物;其次,根据查找到的化合物的精确质量数,±5 ppm 范围内,生成可能分子式,对大狼把草的样品总离子流图匹配出的 31 种化合物作出鉴定,并做出质谱解

析,见图 1,表 1。

3.2 绿原酸及衍生物的裂解规律 峰 1 保留时间为 1.22 min,其准离子峰为 m/z 193.063 $[M + H]^+$ 和 m/z 215.053 $[M + Na]^+$,根据 Qualitative Analysis B.06.00 离线分析软件推断其分子式可能是 $C_7H_{12}O_6$,误差为 2.09 ppm,在进一步的质谱裂解过程中,其准离子峰脱掉 1 分子 H_2O 或 1 分子 CO_2 分别形成特征离子峰 175.060 1 为 $[M + H - H_2O]^+$,特征离子峰 m/z 149.022 1 为 $[M + Na - CO_2Na]^+$,此特征与奎尼酸^[8]的裂解规律基本一致,故峰 1 为奎尼酸。

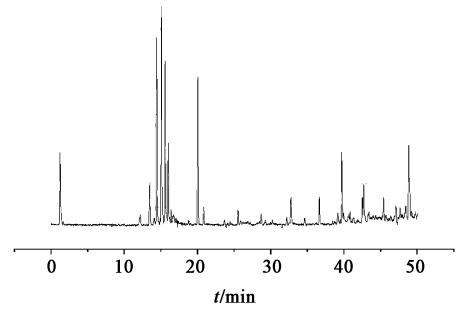


图 1 大狼把草样品溶液液的 HPLC-TOF-MS 总离子流
Fig.1 Total ion chromatogram of *Bidens frondosa* by HPLC-TOF-MS

表 1 大狼把草的化学成分鉴定

Table 1 Identification results of the chemical composition from *Bidens frondosa*

No.	t_R /min	名称	分子式	加合离子	计算值	检测值	误差 /ppm	碎片离子及其荷质比实测值
1	1.22	奎尼酸	$C_7H_{12}O_6$	$[M + H]^+$ $[M + Na]^+$	192.063 4	192.063 0	2.06	149.022 1 $[M + Na - CO_2Na]^+$, 175.060 1 $[M + H - H_2O]^+$
2 ¹⁾	9.21	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M + H]^+$	354.095 1	354.094 2	2.62	337.091 8 $[M + H - H_2O]^+$, 327.265 8 $[M + H - CO]^+$
3	11.44	咖啡酸	$C_9H_8O_4$	$[M + H - H_2O]^+$	180.042 3	180.094 2	3.04	163.038 9 $[M + H - H_2O]^+$, 149.024 7 $[M + H - CH_3O]^+$
4	12.06	$\alpha, 3, 2', 4'$ -四羟基查耳酮-2'- O - β -D-吡喃葡萄糖基	$C_{21}H_{22}O_{10}$	$[M + H_2O]^+$	434.121 3	434.128 0	-0.69	265.164 4 $[M + H_2OC_6H_{10}O_6]^+$, 224.266 $[M + H_2O - C_6H_{10}O_6 - C_2HO]^+$
5	12.81	奥卡宁 4-甲氧基-3'- O - β 葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M + H]^+$	464.095 5	464.094 4	2.32	285.278 8 $[M + H - C_5H_{10}O_6 - CH_3]^+$, 267.267 4 $[M + H - C_5H_{10}O_6 - CH_3 - H_2O]^+$
6	13.75	奥卡宁 5- O - β -D-葡萄糖苷	$C_{21}H_{22}O_{11}$	$[M + H - H_2O]^+$	450.116	450.116	0.43	433.112 9 $[M + H - H_2O]^+$, 267.268 5 $[M + H - C_6H_{10}O_5 - H_2O]^+$
7	14.05	木犀草素 3- O - β -D-吡喃葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M + H]^+$	464.095 5	464.094 4	2.32	447.092 2 $[M + H - H_2O]^+$, 285.279 9 $[M + H - C_6H_{11}O_6]^+$
8	14.12	(Z)-7- O - β -D-吡喃葡萄糖基 6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M + H]^+$	448.100 6	448.100 7	-0.16	285.279 91 $[M + H - C_6H_{11}O_5]^+$, 267.267 4 $[M + H - C_6H_{11}O_5 - H_2O]^+$
9	14.18	紫云英苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M + H]^+$	448.100 6	448.100 7		285.279 91 $[M + H - C_6H_{11}O_5]^+$, 267.267 4 $[M + H - C_6H_{11}O_5 - H_2O]^+$
10	15.18	奥卡宁 4'- O - β -D(4',6'-二乙酰基)吡喃葡萄糖苷	$C_{25}H_{26}O_{13}$	$[M + H - H_2O]^+$	532.137 3	532.137	-0.34	463.123 5 $[M + H - C_2HO - CO]^+$, 267.262 5 $[M + H - C_2HO - CO - H_2O - C_6H_{10}O_6]^+$
11	15.27	3,4-二- O -咖啡酰奎宁酸	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M + H - H_2O]^+$	516.126 8	516.126 3	0.99	335.257 7 $[M + H - C_9H_6O_3]^+$, 173.364 8 $[M + H - C_9H_6O_3 - C_9H_6O_3]^+$
12	15.35	(Z)-6- O - β -D-吡喃葡萄糖基 6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M + H]^+$	448.100 6	448.100 7	-0.16	285.279 91 $[M + H - C_6H_{11}O_5]^+$, 267.267 4 $[M + H - C_6H_{11}O_5 - H_2O]^+$
13	15.40	奥卡宁 7- O - β -D-葡萄糖苷	$C_{21}H_{22}O_{11}$	$[M + H - H_2O]^+$	450.116	450.116	0.43	433.112 9 $[M + H - H_2O]^+$, 267.268 5 $[M + H - C_6H_{10}O_5 - H_2O]^+$
14	15.41	芹菜素 7- O -吡喃葡萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M + H]^+$	432.105 6	432.105 4	0.36	285.0731 $[M - C_6H_{11}O_6]^+$, 166.197 $[M - C_6H_{11}O_6 - C_7H_4O_2]^+$

续表 1

No.	t_R /min	名称	分子式	加合离子	计算值	检测值	误差 /ppm	碎片离子及其荷质比实测值
15	15.60	槲皮素 7- <i>O</i> -鼠李糖苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M + H]^+$	448.100 6	448.100 7	-1.29	302.565 7 $[M + H - C_5H_7O_5]^+$, 166.120 5 $[M + H - C_5H_7O_5 - CO - C_6H_4O_2]^+$
16	15.67	异槲皮素	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M + H - H_2O]^+$	464.095 5	464.095 5	-1.29	302.565 7 $[M + H - C_6H_{11}O_5]^+$, 287.073 4 $[M + H - C_6H_{11}O_5 - CH_3]^+$
17	15.83	3,5-二- <i>O</i> -咖啡酰奎宁酸	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M + H - H_2O]^+$	516.126 8	516.126 3	0.99	335.257 7 $[M + H - C_9H_6O_3]^+$, 173.364 8 $[M + H - C_9H_6O_3 - C_9H_6O_3]^+$
18	16.23	(<i>Z</i>)-6- <i>O</i> -(3'',4'',6''-三乙 酰基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- 6,7,3',4'-四羟基橙酮	$C_{27}H_{26}O_{14}$	$[M + H]^+$	-	572.766 6	-	448.282 6 $[M + H - C_2O - C_2H_2O - C_2H_2O]^+$, 267.123 5 $[M + H - C_2O - C_2H_2O - C_2H_2O - C_6H_{12}O_6]^+$
19	16.70	奥卡宁 4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -(6'- <i>O</i> - 乙酰葡萄糖苷)	$C_{23}H_{24}O_{12}$	$[M + H]^+$	492.126 8	492.128 8	0.99	375.123 5 $[M + H - H_2O]^+$, 267.270 2 $[M + H - C_8H_{12}O_6 - H_2O]^+$
20	17.835	硫黄菊素	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M + H]^+$	270.0528	270.052	-	166.120 9 $[M + H - CO - H_2O - H_2O - C_2O]^+$
21	18.15	山柰酚-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡 萄糖苷	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M + H]^+$	448.1006	448.100 7	-0.16	267.268 5 $[M + H - C_6H_{12}O_6]^+$, 224.125 1 $[M + H - C_6H_{12}O_6 - CO - H_2O]^+$
22	19.02	(<i>Z</i>)-6,7,3',4'-四羟基- 橙酮	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M + H]^+$	286.0477	286.047 2	-1.88	242.126 7 $[M + H - CO - H_2O]^+$, 224.126 7 $[M + H - CO - H_2O - H_2O]^+$
23	19.02	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-二氢槲皮素	$C_{15}H_{12}O_7$	$[M + H]^+$	304.0583	304.057 7	-1.89	287.054 7 $[M + H - H_2O]^+$, 224.122 7 $[M + H - CO - H_2O - H_2O - H_2O]^+$
24 ¹⁾	19.05	木犀草素	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M + H]^+$	286.2307	286.230 1	1.83	224.162 8 $[M + H - COOH - H_2O]^+$, 166.123 0 $[M + H - C_7H_6O_2]^+$
25	20.05	1-[(羧基乙酰基)氧 基]甲基}4,6,8,10-十一 碳烯基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	$C_{22}H_{24}O_{10}$	$[M + K - H_2O]^+$	448.1369	448.137 5	-1.44	415.151 8 $[M + K - H_2O - H_2O - H_2O - H_2O]^+$, 394.223 $[M + K - H_2O - COOH - CH_2 - CO]^+$
26 ¹⁾	21.88	芹菜素	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M + H]^+$	270.0528	270.052	-3.02	252.972 7 $[M + H - H_2O]^+$, 235.342 6 $[M + H - H_2O - H_2O]^+$, 224.123 1 $[M + H - H_2O - CO]^+$
27	21.88	山柰酚	$C_{15}H_{12}O_6$	$[M + H - H_2O]^+$	288.0634	288.062 5	2.95	271.060 1 $[M + H - H_2O]^+$, 243.028 $[M + H - H_2O - CO]^+$, 166.122 7 $[M + H - C_7H_7O_2]^+$
28	22.02	6,7,3',4'-四羟基橙酮	$C_{14}H_9O_6$	$[M + H]^+$	-	273.22	-	230.209 1 $[M + H - COO]^+$, 166.121 4 $[M + H - C_6H_5O_2]^+$
29	41.31	(<i>Z</i>)-6- <i>O</i> -(6-对-香豆酰 基- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)6, 7,3',4'-四羟基橙酮	$C_{30}H_{26}O_{13}$	$[M + H - H_2O]^+$	594.1373	594.137 1	0.29	391.232 4 $[M + H - C_{12}H_{12}O_3]^+$, 301.178 6 $[M + H - C_{12}H_{12}O_3 - C_3H_6O_3]^+$, 225.194 $[M + H - C_{18}H_{13}O_{10}]^+$
30	43.72	反油酸	$C_{18}H_{34}O_2$	$[M + H]^+$	282.2559	282.255 5	1.42	265.252 6 $[M + H - H_2O]^+$, 224.127 1 $[M + H - COOCH_3]^+$
31	49.43	α -亚油酸	$C_{18}H_{30}O_2$	$[M + H]^+$	278.2246	278.226 2	-4.86	261.221 3 $[M + H - H_2O]^+$, 235.168 5 $[M + H - COO]^+$

注: ¹⁾与对照品比对。

峰 2 的保留时间为 9.21 min, 准分子离子峰 m/z 355.101 4 $[M + H]^+$, 推断其分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, 误差为 2.62 ppm, 在进一步的质谱裂解中, 准分子离

子峰脱去 1 个 H_2O 分子, 形成特征离子峰 m/z 337.091 8 为 $[M + H - H_2O]^+$, 失去 1 个 CO 分子形成特征离子峰 m/z 326.265 8 为 $[M + H - CO]^+$, 并

在裂解中出现了 m/z 163.034 3 咖啡酰基, 样品中绿原酸的 $[M + H]^+$ 峰为 m/z 355.101 6, 对照品的 $[M + H]^+$ 峰为 m/z 355.102 6, 且与对照品保留时间、碎片信息及特征峰一致, 故因此推断峰 2 为绿原酸^[10-12]。

峰 3 的保留时间为 11.44 min, 其准离子峰为 m/z 163.038 5 $[M + H]^+$, 可推断其分子式 $C_9H_8O_4$, 误差 3.04 ppm, 在质谱裂解过程中, 该峰是与 H^+ 结合然后丢失 1 分子水形成特征离子碎片 m/z 163.038 5 为 $[M + H - H_2O]^+$, 碎片离子峰 m/z 149.024 7 为

$[M + H - CH_3O]^+$, 此特征与奎尼酸的裂解规律基本一致, 故判断峰 3 为咖啡酸。

峰 11 的保留时间是 15.83 min, 其准离子峰为 m/z 499.122 8 $[M + H - H_2O]^+$, 可推断分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$, 误差为 0.99 ppm, 在质谱裂解过程中, 其母离子丢失 1 分子 $C_9H_6O_3$ 和 2 分子 $C_6H_9O_3$ 形成特征离子峰 m/z 335.257 7 为 $[M + H - C_9H_6O_3]^+$, 特征离子峰 m/z 173.364 8 为 $[M + H - C_9H_6O_3 - C_6H_9O_3]^+$, 和绿原酸衍生物裂解规律^[10] 基本一致, 故判断峰 11 为 3,4-二-*O*-咖啡酰奎宁酸。见图 2。

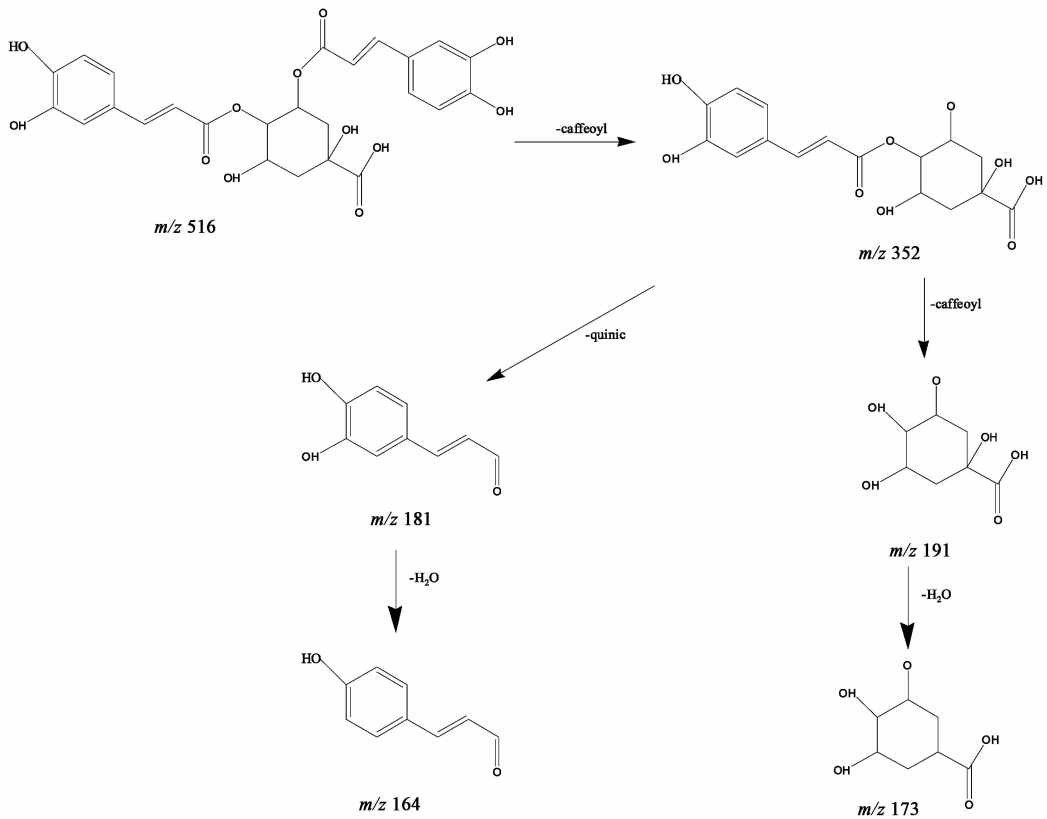


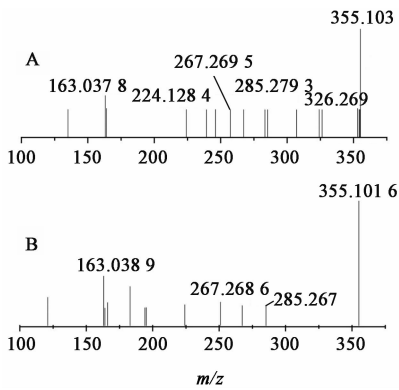
图 2 3,4-二-*O*-咖啡酰奎尼酸可能的裂解方式

Fig. 2 Possible cleavage method of 3,4-di-*O*-caffeoylquinic acid

绿原酸是由咖啡酸和奎尼酸生成的缩酚酸。分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, 相对分子质量为 354.094 2。这类化合物的结构中存在酯键、不饱和双键和多元酚, 在提取过程中, 往往会通过水解和分子内酯基迁移而发生异构化^[10]。酯键断裂产生奎尼酸峰 (m/z 191) 和咖啡酰基峰 (m/z 163)。咖啡酰基在奎尼酸上的不同取代形成了不同的衍生物。在正离子模式下, 绿原酸及其衍生物会有规律的断裂产生 174 [奎尼酸 + $H - H_2O$]⁺, 164 [咖啡酰基 + H]⁺, 多羟基酸会脱水裂解。见图 3。

3.3 黄酮糖苷类化合物的裂解方式 黄酮类化合

物包括黄酮苷和黄酮糖苷, 黄酮醇等, 本实验共鉴定出 5 类, 以其中部分为例进行解析, 以二氢槲皮素为例进行详细解析, 通过分子特征查找和分子式查找两个模块对大狼把草的总离子流图进行化合物特征查找, 然后通过从化合物生成分子式的模块生成分子式, 然后进行在自建的鬼针草属的化学成分数据库中, 进行数据检索, 得到与数据库配对的化合物的的分子质量, 保留时间等信息, 在总离子流图中提取出二氢槲皮素的离子流图和质谱图, 离子峰 287.054 7 $[M + H - H_2O]^+$, 离子峰 224.122 7 $[M + H - CO - H_2O - H_2O - H_2O]^+$, 与二



A. 大狼把草中的绿原酸; B. 绿原酸对照品

图 3 绿原酸对照品与大狼把草中绿原酸的质谱

Fig. 3 Mass spectrum and lysis process of chlorogenic acid in *Bidens frondosa*

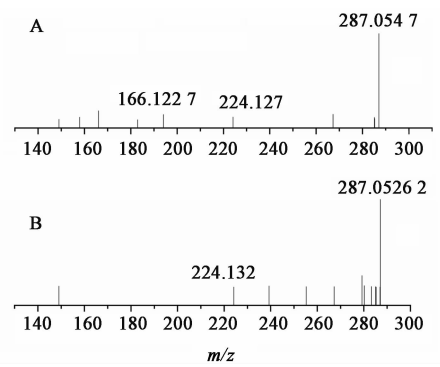
氢槲皮素的裂解规律基本一致,推断出该色谱峰为二氢槲皮素。

3.3.1 黄酮及其苷类 峰 7 的 t_R 为 15.41 min,其准离子峰为 m/z 465.1019 $[M + H]^+$,可推断其分子式为 $C_{21}H_{20}O_{12}$,误差为 2.32 ppm,在进一步的质谱裂解中,其准离子峰丢失 1 分子 $C_6H_{12}O_6$,形成特征离子峰碎片 m/z 285.0731 $[M + H - C_6H_{12}O_6]^+$,进而在失去 1 分子 $C_7H_4O_2$,形成特征离子峰 166.197 为 $[M + H - C_6H_{12}O_6 - C_7H_4O_2]^+$,故判断峰 7 为木犀草素 3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷。

峰 24 的保留时间为 19.05 min,样品中木犀草素 $[M + H]^+$ 峰为 287.0547,对照品的 $[M + H]^+$ 峰为 287.0551,且与对照品保留时间、碎片信息及特征峰一致,具体信息见图 4,和木犀草素衍生物相关报道^[10,13]相符合,故推断峰 24 为木犀草素,木犀草苷在质谱裂解的过程中会先进行糖苷的断裂,然后进行苷元分子内的裂解。通过相同的方法判定峰 10,碎片信息与数据库信息相吻合且与文献中芹菜素^[14]的裂解规律基本一致,故推断峰 10 位芹菜素 7-*O*-吡喃葡萄糖苷。

3.3.2 黄酮醇及其苷类 峰 9 的保留时间是 14.18 min,其准离子峰为 m/z 449.1017 $[M + H]^+$,可推断其化学式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$,在进一步的质谱裂解过程中,其准离子峰丢失 1 分子 $C_6H_{11}O_5$ 形成特征碎片离子峰 285.27991 $[M + H - C_6H_{11}O_5]^+$,进而丢失 1 分子 H_2O 形成特征离子碎片 m/z 267.2674 $[M + H - C_6H_{11}O_5 - H_2O]^+$,与紫云英苷的裂解规律基本一致,故判断峰 9 为紫云英苷。

峰 15 保留时间是 15.61 min,其准离子峰为 m/z 449.1076 $[M + H]^+$,误差为 -1.29 ppm,可推断其



A. 大狼把草中的木犀草素; B. 木犀草素对照品;

图 4 大狼把草中木犀草素、木犀草素对照品的质谱

Fig. 4 Mass spectrum of luteolin, luteolin standard and characteristic peak of *Bidens frondosa*

化学式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$,在进一步的质谱裂解过程中,其准离子峰丢失 1 分子 H_2O 和 1 分子 $C_5H_{10}O_5$ 形成特征碎片离子峰 m/z 302.5657 $[M + H - C_5H_{10}O_5]^+$,在丢失 1 分子 CO 和 $C_6H_5O_2$,形成碎片离子峰 m/z 166.1205 $[M + Na - H_2O - C_5H_{10}O_5 - CO - C_6H_5O_2]^+$,和槲皮素衍生物^[15-16]的裂解规律基本一致,依照此法推断出峰 15 为槲皮素 7-*O*-鼠李糖苷,峰 6 为异槲皮素。

峰 27 保留时间是 21.88 min,其准离子峰为 m/z 271.0625 $[M + H - H_2O]^+$,可推断其分子式为 $C_{15}H_{12}O_6$ 误差为 2.95 ppm,在质谱裂解过程中,其峰丢失 1 分子 H_2O ,形成离子峰 m/z 271.0601 $[M + H - H_2O]^+$,进而在丢失 1 分子 CO 形成特征离子峰 m/z 243.028 $[M + H - H_2O - CO]^+$,其准离子峰直接丢失 1 分子 $C_7H_7O_2$ 形成碎片离子峰 m/z 166.1227 为 $[M + H - C_7H_7O_2]^+$,与文献中山柰酚^[15]裂解规律基本一致,故推断峰 27 为山柰酚。

3.3.3 二氢黄酮醇类 峰 23 保留时间为 19.02 min,其准离子峰为 m/z 305.0577 $[M + H]^+$,推断分子式为 $C_{15}H_{12}O_7$,误差为 -1.89 ppm,在进一步的质谱裂解过程中,其准离子峰丢失 1 分子 H_2O ,形成特征离子峰 m/z 287.0547 $[M + H - H_2O]^+$,进而丢失 1 分子 CO 和 2 分子 H_2O ,形成特征离子峰 m/z 224.1227 为 $[M + H - CO - 3H_2O]^+$,和数据库中二氢槲皮素的信息基本一致,故推断为 (2*R*,3*R*)-二氢槲皮素^[16]。

3.3.4 查耳酮类 峰 13 保留时间为 15.40 min,其准离子峰为 m/z 433.1125 为 $[M + H - H_2O]^+$,可推断其分子式为 $C_{21}H_{22}O_{11}$,误差为 0.43 ppm,在质谱裂解的过程中,其准离子峰丢失 1 分子 $C_6H_{10}O_5$,

形成 m/z 267. 268 5 为 $[M + H - H_2O - C_6H_{10}O_5]^+$, 和查尔酮文献报道相吻合^[15-16], 故推断峰 13 为奥卡宁 7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷。按照此方法类推峰 5 为奥卡宁 4-甲氧基-3'-*O*- β 葡萄糖苷, 峰 6 为奥卡宁 5-*O*- β -*D*-葡萄糖苷, 峰 10 为奥卡宁 4'-*O*- β -*D*(4', 6'-二乙酰基)吡喃葡萄糖苷, 峰 19 为奥卡宁 4'-*O*- β -*D*(6'-*O*-乙酰葡萄糖苷)。

3.3.5 橙酮类 峰 8 的保留时间 14. 12 min, 其准离子峰为 m/z 449. 107 2 $[M + H]^+$, 可推断其分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$, 误差为 0. 16 ppm, 在质谱裂解的过程中丢失 1 分子 $C_6H_{11}O_5$, 形成碎片离子峰 m/z 285. 279 1 为 $[M + H - C_6H_{11}O_5]^+$, 进而在丢失 1 分子 H_2O 碎片离子峰 m/z 267. 267 4 为 $[M + H - C_6H_{11}O_5 - H_2O]^+$, 故推断峰 8 为 (*Z*)-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基 6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮, 峰 22 保留时间为 19. 02 min, 其准离子峰为 m/z 287. 047 2 $[M + H]^+$, 在裂解的过程中丢失了 1 分子 CO 和 1 分子 H_2O , 形成碎片离子峰 242. 126 7 为 $[M + H - CO - H_2O]^+$, 进而在丢失 1 分子 H_2O 碎片离子峰 m/z

224. 126 7 为 $[M + H - CO - H_2O - H_2O]^+$, 故推断该峰为 (*Z*)-6, 7, 3', 4'-四羟基-橙酮。

峰 18 的保留时间为 16. 23 min, 其准离子峰为 m/z 573. 766 6, 推断分子式为 $C_{27}H_{26}O_{14}$, 在质谱裂解的过程中, 碎片离子峰 m/z 448. 282 6 为 $[M + H - C_2O - C_2H_2O - C_2H_2O]^+$ 是脱去 3 个乙酰基之后的离子碎片, 碎片离子峰 m/z 267. 123 5 为 $[M + H - C_2O - C_2H_2O - C_2H_2O - C_6H_{12}O_6]^+$ 为脱去糖苷后的离子碎片, 所以推断该化合物是 (*Z*)-6-*O*(3'', 4'', 6''-三乙酰基- β -*D*-吡喃葡萄糖基)-6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮。峰 28 的保留时间为 22. 02 min, 在质谱裂解的过程中母离子丢失 1 分子 COO 得到 m/z 230. 209 1 $[M + H - COO]^+$, 丢失 2 分子 $C_6H_5O_2$ 得到 166. 121 4 $[M + H - C_6H_5O_2]^+$, 和文献报道一致, 故推断为 6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮^[17]。按照以上方法推断峰 12 为 (*Z*)-6-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基 6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮。峰 20 为硫黄菊素, 峰 29 为 (*Z*)-6-*O*-(6-对-香豆酰基- β -*D*-吡喃葡萄糖基)6, 7, 3, 4'-四羟基橙酮。见图 5, 6。

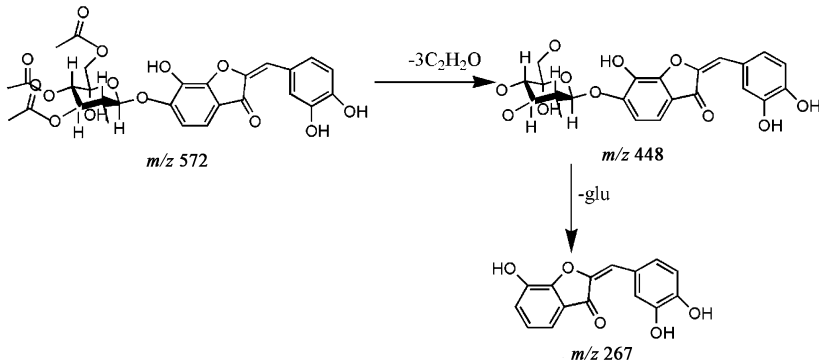


图 5 (*Z*)-6-*O*(3'', 4'', 6''-三乙酰基- β -*D*-吡喃葡萄糖基)-6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮可能裂解的方式

Fig. 5 Possible cleavage of aureone, (*Z*)-6-*O*-(3'', 4'', 6''-triacetyl- β -*D*-glucopyranosyl) 6, 7, 3', 4'-tetrahydroxy

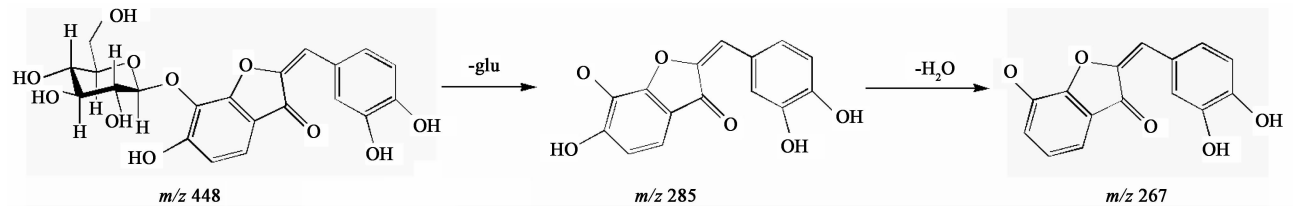


图 6 (*Z*)-7-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基 6, 7, 3', 4'-四羟基橙酮可能的裂解的方式

Fig. 6 Possible cleavage of aureone, (*Z*)-7-*O*- β -*D*-glucopyranosyl 6, 7, 3', 4'-tetrahydroxy

大狼把草中含有大量的黄酮类化合物, 其中大部分与糖结合成糖苷类, 少部分以游离的苷元形式存在, 本次实验在正离子模式下对大狼把草黄酮苷元的裂解和黄酮糖苷的裂解规律进行总结。黄酮苷元在正离子模式下主要丢失 CO , CO_2 , H_2O , C_2H_2O ,

C_2O_3 片段。例如黄酮类中芹菜素及其糖苷丢失 H_2O 产生 253, 235, 225 等碎片; 山柰酚及其糖苷丢失 H_2O 产生 271, 243 等碎片; (*Z*)-6, 7, 3', 4'-四羟基奥哝丢失 H_2O , CO 产生 270, 242, 239, 224, 166 等碎片, 橙酮类化合物会产生 286, 270, 230 等碎片离

子。槲皮素类等黄酮醇会产生 302, 285, 267 等碎片离子。本次检测的黄酮糖苷大多数都为黄酮 O-糖苷, 发现裂解主要以糖苷键的断裂、糖糖键的断裂、糖环的交叉环切除裂解为主, 最终丢失为黄酮苷元^[18]。见图 7。

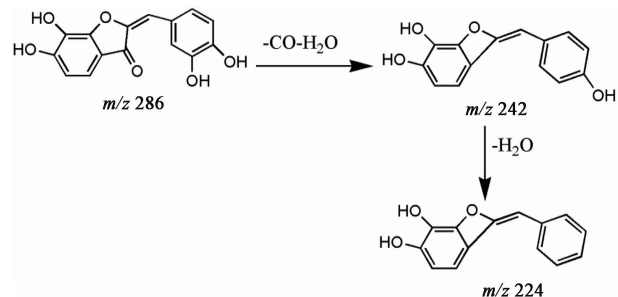


图 7 (Z)-6,7,3',4'-四羟基橙酮可能裂解的方式
Fig. 7 Possible cleavage of (Z)-6,7,3',4'-tetrahydroxyoxyketone

4 结论

大狼把草化学成分的液质联用鉴定较少, 本文采用乙醇作为提取溶剂, 采用 HPLC-TOF-MS 技术快速、全面对大狼把草的化学成分作出鉴定, 最后确定结构的成分有碳烯 1 个, 有机酸 2 个, 苯丙素 5 个, 黄酮 22 个, 黄酮包括黄酮及其苷元类 4 个、黄酮醇及其苷类 5 个、二氢黄酮醇 1 个、查耳酮类 5 个、橙酮类 7 个等。

本次实验虽然色谱峰没有完全的分开, 但是通过数据库比确定总离子流图中的化学成分, 排除外界干扰, 对不同种的化合物进行质谱解析, 并且对芹菜素及糖苷, 槲皮素及其糖苷, 橙酮和查尔酮及其糖苷的质谱裂解进行裂解规律的总结^[19-20]。研究结果表明, HPLC-TOF-MS 技术可以快速系统地鉴定大狼把草的化学成分, 对大狼把草的化学成分进行初步的探索。质谱对大狼把草的成分表征, 以及对查尔酮、橙酮的 ESI-MS 裂解规律的总结, 为大狼把草的药效作用和作用机制奠定了基础。

[参考文献]

[1] 《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 372.
[2] 张瑞娇, 张元元, 崔皓月, 等. 鬼针草提取物解热抗菌抗病毒作用的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(10): 905-911.
[3] 马明, 王建平, 徐凌川. 婆婆针化学成分的研究[J]. 中草药, 2005, 36(1): 7-9.
[4] 陈月红. 金盏银盘化学成分与抗氧化活性的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2008.
[5] 李胜峰, 刘阿娜, 蒋海强, 等. 小花鬼针草化学成分液

质联用分析[J]. 山东中医杂志, 2016, 35(7): 641-644.
[6] 罗美霞, 吴波, 胡坪君, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的砂糖橘皮化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21): 45-51.
[7] 吴茵, 邱志宏, 白万军, 等. 玄麦甘桔颗粒化学成分的分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 70-76.
[8] 冯阳, 陈玉梅, 辛华. 金樱子黄酮类成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 71-76.
[9] 丁嘉华, 冯毅凡, 李卫民, 等. UPLC-Q-TOF-MS 对桑白皮总黄酮提取物的快速分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 78-84.
[10] 罗奇志, 王有志, 罗佳波. 绿原酸水解产物的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(7): 1345-1349.
[11] Bartolome A P, Villaseñor I M, YANG W C. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): botanical properties, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology [J]. ECAM, 2013, 2013(2): 340215.
[12] 张倩, 张加余, 隋丞琳, 等. HPLC-DAD-ESI-MS/MS 研究金银花水提工艺中绿原酸类成分的变化规律[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23): 3564-3568.
[13] 李敬芬. 新型木犀草素衍生物的合成及结构表征[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2009, 26(2): 255-258.
[14] 丁健桦, 王兴祥, 张慧, 等. 芹菜素的电喷雾萃取电离串联质谱[J]. 高等学校化学学报, 2011, 32(8): 1714-1719.
[15] 王清, 刘敬, 陈晓兰, 等. 基于 LC/QTOF-MS/MS 法鉴定兰考泡桐花化学成分[J]. 中医药学报, 2015, 43(5): 70-76.
[16] 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.
[17] 赵安琦, 李博, 张慧荣, 等. 应用电喷雾质谱技术分析鉴定桑叶中黄酮类化合物[J]. 分子科学学报, 2014, 30(4): 293-298.
[18] 郑国帅, 赵鑫, 范国荣. 黄酮醇糖苷及其结构类似物的质谱裂解规律研究[J]. 药学服务与研究, 2015, 15(3): 196-200.
[19] 黄敏珠, 陈海生, 刘建国, 等. 中药鬼针草化学成分的研究[J]. 第二军医大学学报, 2006(8): 888-891.
[20] KANG J G, Hick L A, Price W E. A fragmentation study of isoflavones in negative electrospray ionization by MSⁿ ion trap mass spectrometry and triple quadrupole mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(6): 857-868.

[责任编辑 顾雪竹]