

### 3个辽东槲木三萜皂苷同分异构体的电喷雾质谱区分

夏永刚, 宫凤秋, 郭信东, 宋艳, 梁军, 匡海学\*

(黑龙江中医药大学 教育部北药基础与应用研究重点实验室, 黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 该研究采用超高效液相色谱串联三重飞行时间质谱(UPLC-Triple-TOF-MS)对3个辽东槲木三萜皂苷同分异构体(VI, VII和B)进行质谱区分。通过分析槲木皂苷VI(1)和槲木皂苷VII(2)的 $[M + Na]^+$ 的二级质谱(CE = 90 eV),二者在 $m/z$  981.502 5 $[Y_{0\alpha} + Na]^+$ , 819.443 3 $[Y_{0\alpha} - Glc + Na]^+$ , 527.157 2 $[C_{3\beta} + Na]^+$ , 509.150 4 $[B_{3\beta} + Na]^+$ 和365.106 5 $[C_{3\beta} - Glc + Na]^+$ 处产生了相同的碎片离子峰,而槲木皂苷B(3)的 $[M + Na]^+$ 二级质谱在 $m/z$  671.198 2和689.208 7处产生了2个明显不同的碎裂离子峰,其分别归属于 $[B_{4\beta} + Na]^+$ 和 $[C_{4\beta} + Na]^+$ 。因此, $[B_{4\beta} + Na]^+$ 和 $[C_{4\beta} + Na]^+$ 可作为化合物3区分其他两个异构体(1和2)的特征性的诊断离子。进一步分析槲木皂苷VI(1)和槲木皂苷VII(2)的 $[M + NH_4]^+$ 或 $[M + H]^+$ 的二级谱图(CE = 40 eV),二者在 $m/z$  455.350 7和437.341 2处产生相同的苷元脱水碎片离子峰,其分别归属于 $[苷元 - H_2O + H]^+$ 和 $[苷元 - 2H_2O + H]^+$ 。槲木皂苷VI(1)的苷元类型是刺囊酸,其 $[苷元 - 2H_2O + H]^+$ 和 $[苷元 - H_2O + H]^+$ 的离子强度比值 $< 1$ ,而槲木皂苷VII(2)的苷元类型是常春藤,其 $[苷元 - 2H_2O + H]^+$ 和 $[苷元 - H_2O + H]^+$ 的离子强度比值 $> 1$ ,基于此可以有效区分槲木皂苷VI(1)和槲木皂苷VII(2)。以上研究表明,利用电喷雾二级质谱法可以快速、简便、准确地区分3种槲木皂苷(VI, VII和B)异构体。

**[关键词]** 超高效液相色谱; 质谱区分; 三萜皂苷; 异构体; 槲木皂苷VII; 槲木皂苷VI; 槲木皂苷B

**[中图分类号]** R284.1; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0042-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181813

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180629.1107.010.html>

**[网络出版时间]** 2018-07-02 8:32

### Differentiation of Three Isomers of *Aralia elata* Triterpene Saponins Using Electrospray Mass Spectrometry

XIA Yong-gang, GONG Feng-qiu, GUO Xin-dong, SONG Yan, LIANG Jun, KUANG Hai-xue\*

(Key Laboratory of Chinese Materia Medica, Ministry of Education, Heilongjiang Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Natural Medicine Pharmacodynamic Material Bases, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**[Abstract]** In this study, ultra performance liquid chromatography tandem three four quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Triple-TOF-MS) was used to discriminate three isomers (congmunosides VI, VII and B) in *Aralia elata*. Through the analysis of MS<sup>2</sup> spectra of  $[M + Na]^+$  (CE = 90 eV) on congmunosides VI and VII (1 and 2), both produced the same fragmentation ion peaks at  $m/z$  981.498 2  $[Y_{0\alpha} + Na]^+$ , 819.439 1  $[Y_{0\alpha} - Glc + Na]^+$ , 527.161 4  $[C_{3\beta} + Na]^+$ , 509.150 4  $[B_{3\beta} + Na]^+$  and 365.105 7  $[C_{3\beta} - Glc + Na]^+$ , while the MS<sup>2</sup> spectrum of congmunoside B (3) of  $[M + Na]^+$  (CE = 90 eV) produced two different characteristic

**[收稿日期]** 20180318(001)

**[基金项目]** 黑龙江省杰出青年科学基金项目(JC2016020);黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSCT-2016209);黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z15209)

**[第一作者]** 夏永刚,教授,从事中药及复方药效物质基础研究, Tel:0451-82193052, E-mail: yonggangxia@163.com

**[通信作者]** \*匡海学,教授,博士生导师,从事中药及复方药效物质基础、中药性味理论研究, Tel:0451-82193052, E-mail: hxkuang@hotmail.com

fragmentation ion peaks of  $m/z$  671.198 2 and 689.208 7, corresponding to the  $[B_{4\beta} + Na]^+$  and  $[C_{4\beta} + Na]^+$ . Thus, the structure of congmunoside B (**3**) could be effectively distinguished with other two isomers of saponins (**1** and **2**) via  $[B_{4\beta} + Na]^+$  and  $[C_{4\beta} + Na]^+$  ions. Through the further analysis  $MS^2$  spectrum of  $[M + NH_4]^+$  and  $[M + H]^+$  (CE = 40 eV) for congmunosides VI and VII (**1** and **2**) yielded same ions at  $m/z$  455.350 7 and 437.341 2, belonging to the  $[A - H_2O + H]^+$  and  $[A - 2H_2O + H]^+$ . The aglycone of congmunoside VI (**1**) was echinocystic acid with the ion intensity ratio of  $[A + H - 2H_2O]^+$  ( $m/z$  437.34) to  $[A + H - H_2O]^+$  ( $m/z$  455.35) ascribed to < 1. The aglycone of congmunoside VII (**2**) was hederagenin with the ion intensity ratio of  $[A + H - 2H_2O]^+$  ( $m/z$  437.34) to  $[A + H - H_2O]^+$  ( $m/z$  455.35) ascribed to > 1. Based on the above fragmentations of  $[M + NH_4]^+$  and  $[M + H]^+$  ions, congmunosides VI and VII (**1** and **2**) could be further distinguished. The study results demonstrated that three isomers from *A. elata* could be distinguished rapidly, easily and accurately by electrospray ionization tandem mass spectrometry.

**[Key words]** UPLC; mass spectrometry discrimination; isomers; triterpene saponins; congmunoside VII; congmunoside VI; congmunoside B

辽东槲木 (*Aralia elata*), 是五加科槲木属植物, 东北俗称刺老芽。辽东槲木广泛应用于民间且历史悠久, 有着极高的药用价值, 主要为补气安神、活血解毒、祛风、除湿止痛等功能<sup>[1]</sup>。自上世纪以来, 诸多学者对槲木的化学成分进行了研究, 发现了大量的三萜皂苷类化合物<sup>[2-4]</sup>。三萜皂苷作为槲木中主要的活性成分, 具有抗炎<sup>[5]</sup>、抗肿瘤<sup>[6]</sup>、降血糖<sup>[7]</sup>、改善肝功能等作用。本课题组前期工作表明辽东槲木叶总皂苷 (ETS) 能够抑制突变型 p53 基因的表达, 可导致 PCNA 基因表达的下调, 从而抑制肿瘤细胞增殖<sup>[8]</sup>。另外, 本课题组以槲木皂苷 TTP 和槲木皂苷 V 两种皂苷为指标性成分, 采用高效液相色谱蒸发光检测法 (HPLC-ELSD) 对不同产地和不同采收期的辽东槲木分别进行了含量测定研究<sup>[4]</sup>。

液相色谱-质谱联用技术作为一种新型的分析技术, 以高分辨、高灵敏的定性能力和强大的结构表征的特点而被广泛运用到中药药效物质基础、中药化学成分分析等研究领域。马慧等<sup>[9]</sup>以槲木皂苷 II, IV, V, X 和槲木叶皂苷 II 为指标性成分, 采用超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 方法, 对辽东槲木不同部位中 5 种三萜皂苷进行了含量测定。虽然文献报道了 HPLC-ELSD 和 UPLC-MS/MS 等多种方法对辽东槲木中三萜皂苷进行研究, 但由于槲木三萜皂苷存在多种异构体, 不同的异构体可能具有不同的药理作用<sup>[10]</sup>, 以上方法均未对槲木中三萜皂苷的异构体进行区分。

因此, 本文采用超高效液相色谱串联三重飞行时间质谱 (UPLC-Triple-TOF-MS), 对 3 个槲木皂苷异构体 VI (**1**), VII (**2**) 和 B (**3**) 进行了电喷雾质谱区分, 通过分析化合物 **1** ~ **3** 的  $[M + NH_4]^+$ ,  $[M +$

$H]^+$  和  $[M + Na]^+$  的碎片离子峰, 有效实现对 3 个槲木皂苷异构体的电喷雾质谱区分, 该研究成果将有助于相关三萜皂苷类化合物的质谱结构解析。

### 1 材料

3 个槲木皂苷异构体, 槲木皂苷 VI (**1**), 槲木皂苷 VII (**2**) 和槲木皂苷 B (**3**), 经 HPLC-UV 检测纯度均 > 95%, 具有相同的相对分子质量和分子式, 其结构见图 1A, 其裂解方式命名<sup>[11]</sup>见图 1B。色谱甲醇和乙腈为美国 Thermo Fisher 公司, 其他试剂均为分析纯 (北京化工厂)。

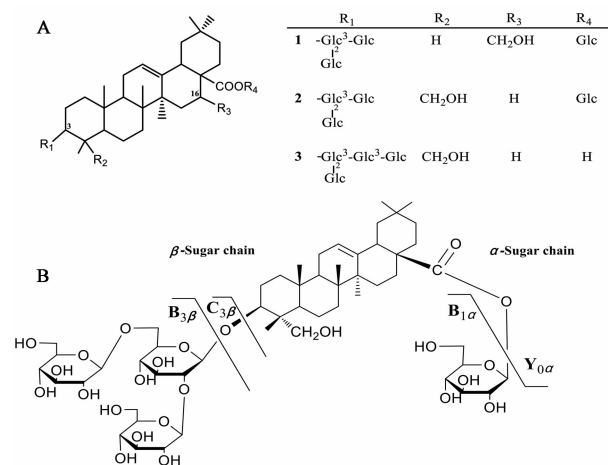


图 1 3 个槲木皂苷异构体化学结构 (A) 及三萜皂苷质谱裂解命名 (B)

Fig. 1 Chemical structures of three reference standards (A) and nomenclature used for triterpene saponin in this context (B)

H-Class 型超高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司, 在线脱气机、自动进样器、四元泵), Triple-TOF-5600<sup>+</sup> 型质谱系统 (美国 AB 公司, ESI 离子源), 纯净水采用美国 Milli-Q 纯化水器制备, ML104/02 型

1/10 万电子分析天平(瑞士梅特勒托利多公司)。

## 2 方法

**2.1 对照品溶液的制备** 精密称定化合物 **1**~**3** 适量,加甲醇制备质量浓度分别为  $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的储备液,用甲醇稀释到  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的混合溶液,  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,备用。

**2.2 色谱条件** 选用 Waters T3 色谱柱 ( $2.1 \text{ mm}\times 150 \text{ mm}, 1.8 \mu\text{m}$ ); 流动相 A 为  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  甲酸铵和 0.1% 甲酸水溶液, B 相 0.1% 甲酸的乙腈溶液, 梯度洗脱 (0~2 min, 80%~78% A; 2~6 min, 78%~77% A; 6~10 min, 77%~63% A; 10~13 min, 63%~61% A; 13~17 min, 61%~58% A; 17~18 min, 58%~57% A; 18~20 min, 57%~50% A; 20~27 min, 50%~40% A; 27~30 min, 40%~10% A); 流速  $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 进样量  $2 \mu\text{L}$ , 样品室温度设定  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ , 柱温  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

**2.3 液相色谱质谱条件** UPLC-Triple-TOF 5600<sup>+</sup> 液相色谱质谱联用仪, 电喷雾离子源, 正离子全扫描模式, 扫描范围  $m/z$  400~1 250, 碰撞气体为氮气, 碰撞能为 5 eV。二级 MS/MS 分析采用 IDA 扫描模式, 碰撞能分别采用 40, 90 eV。

## 3 结果与分析

3 个槲木皂苷 VI, VII 和 B (**1**~**3**) 经 UPLC-Triple-TOF 分离, 其总离子流图见图 2。化合物 **1** 保留时间为 6.85 min, 在正离子全扫描模式下 ( $\text{CE} = 5 \text{ eV}$ ), 化合物 **1** 在  $m/z$  1 138.602 5 (理论值 1 138.600 9,  $\delta$  1.4),  $m/z$  1 121.575 7 (理论值 1 121.574 4,  $\delta$  -1.2) 和  $m/z$  1 143.551 3 (理论值 1 143.556 3,  $\delta$  -4.4) 处产生  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ ,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  和  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  分子离子峰, 因此确定其分子式为  $\text{C}_{54}\text{H}_{88}\text{O}_{24}$ 。二级质谱 MS/MS 分析见图 3A,  $m/z$  1 138.602 5 处的  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  母离子 ( $\text{CE} = 40 \text{ eV}$ ), 在  $m/z$  455.353 1 (68%) 和 437.343 7 (30%) 处产生了高强度的苷元脱水碎片离子, 其分别归属于  $[\text{苷元} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  和  $[\text{苷元} - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  碎片离子。二级质谱 MS/MS 分析  $m/z$  1 143.551 3 处的  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  母离子 ( $\text{CE} = 90 \text{ eV}$ ), 见图 3B, 能够在  $m/z$  981.498 2 (100%), 819.439 1 (20%), 527.161 4 (35%), 509.160 4 (10%) 和 365.105 7 (20%) 处产生了系列的加钠碎片离子, 其分别归属于  $[\text{Y}_{0\alpha} + \text{Na}]^+$ ,  $[\text{Y}_{0\alpha} - \text{Glc} + \text{Na}]^+$ ,  $[\text{C}_{3\beta} + \text{Na}]^+$ ,  $[\text{B}_{3\beta} + \text{Na}]^+$  和  $[\text{C}_{3\beta} - \text{Glc} + \text{Na}]^+$ 。由于化合物 **1** 是双糖链皂苷, 且其 C-28 位的酯苷键较 C-3 位的醇苷键容易

断裂, 因此化合物 **1** 首先失去 C-28 位的葡萄糖基 (162 Da), 在  $m/z$  981.498 2 处产生  $[\text{Y}_{0\alpha} + \text{Na}]^+$  的碎片离子峰, 且  $[\text{Y}_{0\alpha} + \text{Na}]^+$  ( $m/z$  981.498 2) 在 MS/MS 谱图上表现为基峰。  $[\text{Y}_{0\alpha} + \text{Na}]^+$  进一步产生两条裂解途径: 其中一条途径可以解释为首先失去 C-3 位的末端葡萄糖基 (162 Da), 在  $m/z$  819.439 1 处产生  $[\text{Y}_{0\alpha} - \text{Glc} + \text{Na}]^+$  的离子峰; 另一条途径可被解释为其首先失去  $[\text{苷元} - \text{H}_2\text{O}]^+$  离子 (454 Da), 在  $m/z$  527.161 4 处产生  $[\text{C}_{3\beta} + \text{Na}]^+$  的 C-3 糖链碎片离子峰,  $[\text{C}_{3\beta} + \text{Na}]^+$  可进一步再失去 1 分子葡萄糖基 (162 Da), 在  $m/z$  365.105 7 处产生  $[\text{C}_{3\beta} - \text{Glc} + \text{Na}]^+$  的离子峰。综上所述, 裂解化合物 **1** 的  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  母离子, 可以归纳得出两条特征性的裂解途径  $m/z$  1 143.551 3 ~ 981.498 2 ~ 819.439 1 ( $\Delta m = 162$  和 162 Da) 和  $m/z$  1 143.551 3 ~ 981.498 2 ~ 527.161 4 ~ 365.105 7 ( $\Delta m = 162, 454$  和 162 Da), 其详细裂解途径见图 3C。

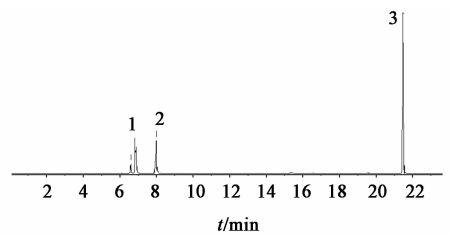
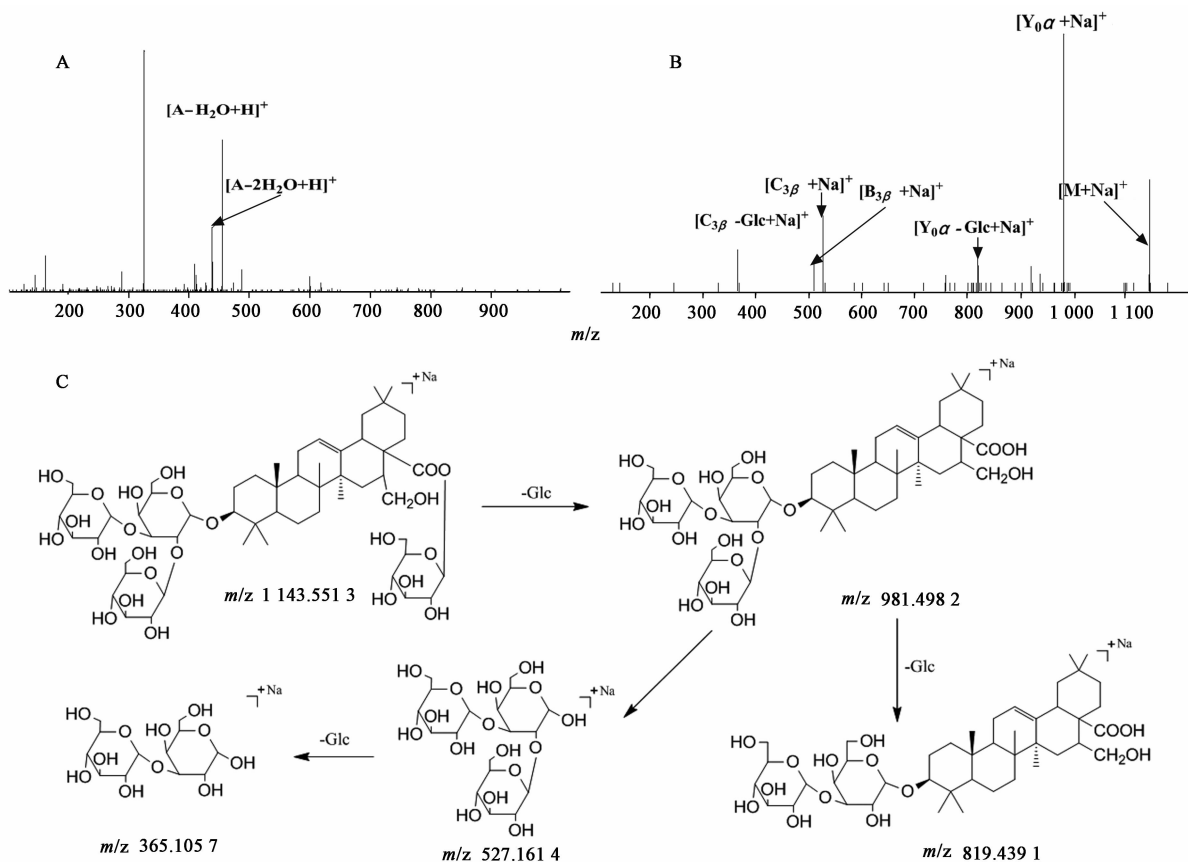


图2 3 个化合物的总离子流

Fig. 2 Total ions of three compounds

化合物 **2** 保留时间为 7.98 min, 在正离子全扫描模式下 ( $\text{CE} = 5 \text{ eV}$ ), 化合物 **2** 在  $m/z$  1 138.603 4 (理论值 1 138.600 9,  $\delta$  2.2), 1 121.575 4 (理论值 1 121.574 4,  $\delta$  -0.3) 和 1 143.554 7 (理论值 1 143.556 3,  $\delta$  -1.5) 处产生  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ ,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  和  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  分子离子峰, 因此确定其分子式为  $\text{C}_{54}\text{H}_{88}\text{O}_{24}$ 。二级质谱 MS/MS (图 4A) 分析  $m/z$  1 138.603 4 处的  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$  母离子 ( $\text{CE} = 40 \text{ eV}$ ), 产生相同的苷元碎片离子  $m/z$  455.350 6 (70%) 和 437.334 2 (100%) 处产生了高强度的苷元碎片离子, 其可分别被归属于  $[\text{苷元} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  和  $[\text{苷元} - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$  碎片离子。二级 MS/MS 分析  $m/z$  1 143.554 7 处的  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  母离子 ( $\text{CE} = 90 \text{ eV}$ ), 见图 4B, 能够在  $m/z$  981.500 9 (100%), 819.446 0 (18%), 527.158 1 (24%) 和 365.106 9 (20%) 处产生了系列的加钠碎片离子, 其归属于  $[\text{Y}_{0\alpha} + \text{Na}]^+$ ,  $[\text{Y}_{0\alpha} - \text{Glc} + \text{Na}]^+$ ,  $[\text{C}_{3\beta} + \text{Na}]^+$  和  $[\text{C}_{3\beta} - \text{Glc} +$



A. CE = 40; B. CE = 90; C.  $[M + Na]^+$  裂解途径

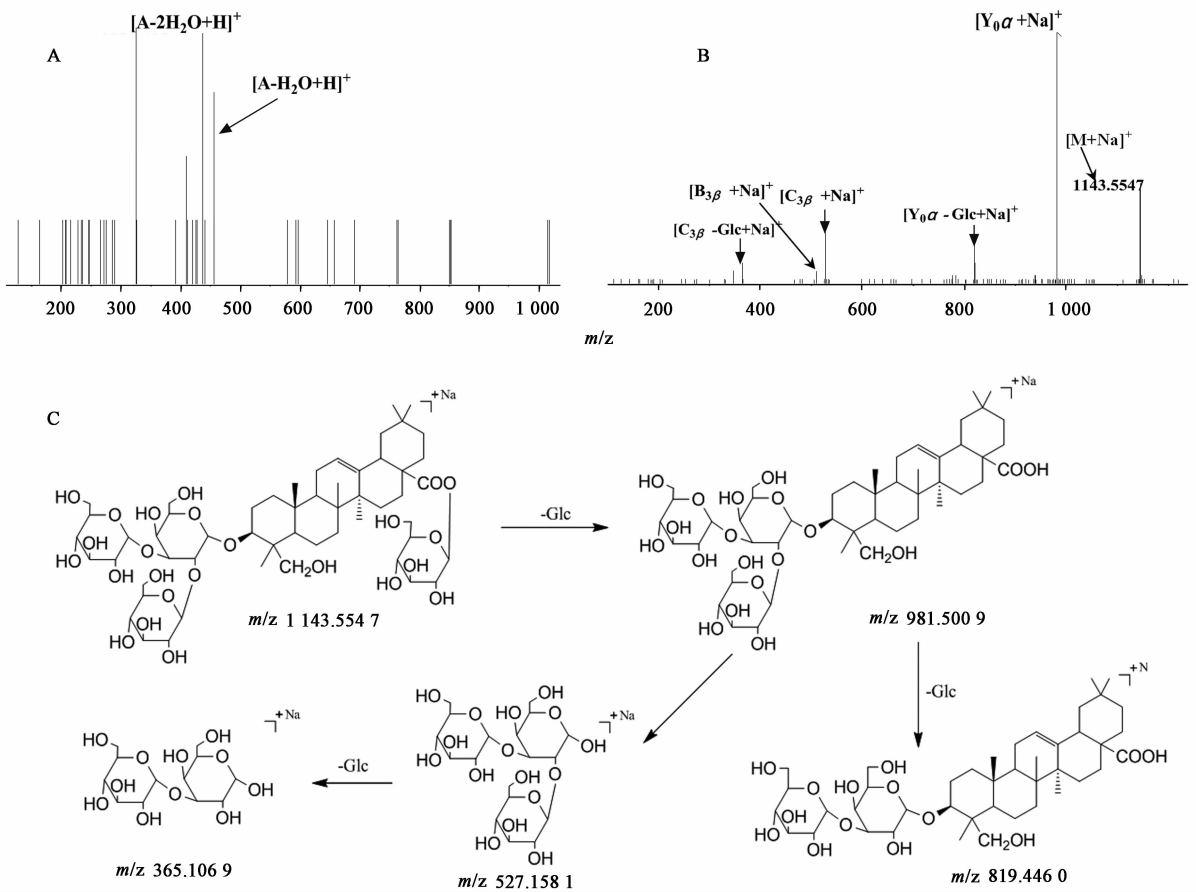
图 3 化合物 1 的正离子质谱及  $[M + Na]^+$  离子的裂解途径

Fig. 3 Mass spectra of peak 1 and summarization of fragmentation approaches of  $[M + Na]^+$

$Na]^+$ 。由于化合物 2 亦是双糖链皂苷,其 C-28 位的酯苷键同样较 C-3 位的醇苷键容易断裂,因此化合物 2 首先失去 C-28 位的葡萄糖基(162 Da),在  $m/z$  981.5009 处产生  $[Y_{0\alpha} + Na]^+$  的碎片离子峰,且  $[Y_{0\alpha} + Na]^+$  在 MS/MS 谱上亦表现为基峰。如图 4C 所示,  $[Y_{0\alpha} + Na]^+$  进一步产生两条裂解途径:其中一条途径可以解释为首先失去 C-3 位的末端葡萄糖基(162 Da),在  $m/z$  819.4460 处产生  $[Y_{0\alpha} - Glc + Na]^+$  的离子峰;另一条途径可被解释为首先失去  $[昔元 - H_2O]^+$  离子(454 Da),在  $m/z$  527.1581 处产生  $[C_{3\beta} + Na]^+$  的 C-3 糖链碎片离子峰,  $[C_{3\beta} + Na]^+$  进一步再失去 1 分子葡萄糖基(162 Da),在  $m/z$  365.1069 处产生  $[C_{3\beta} - Glc + Na]^+$  的离子峰。综上所述,裂解化合物 2 的  $[M + Na]^+$  离子,可以归纳得出两条特征性的裂解途径,  $m/z$  1 143.5547 ~ 981.5009 ~ 819.4460 ( $\Delta m = 162$  和 162 Da) 和  $m/z$  1 143.5547 ~ 981.5009 ~ 527.1581 ~ 365.1069 ( $\Delta m = 162, 454$  和 162 Da,其详细裂解途径见图 4C)。与化合物 1 相比,具有相

同的碎裂途径,但在  $m/z$  437.3342 ( $[昔元 - 2H_2O + H]^+$ ) 和 455.3506 ( $[昔元 - H_2O + H]^+$ ) 处的相对离子强度比不同。

化合物 3 保留时间为 21.46 min,在正离子全扫描模式下 (CE = 5 eV),化合物 3 在  $m/z$  1 138.6040 (理论值 1 138.6009,  $\delta$  2.7), 1 121.5756 (理论值 1 121.5744,  $\delta$  - 0.1) 和 1 143.5569 (理论值 1 143.5563,  $\delta$  0.5) 处产生  $[M + NH_4]^+$  和  $[M + H]^+$  和  $[M + Na]^+$  分子离子峰,因此确定其分子式为  $C_{54}H_{88}O_{24}$ 。二级 MS/MS,见图 5A;分析  $m/z$  1 138.6040 处的  $[M + NH_4]^+$  母离子 (CE = 40 eV),在  $m/z$  455.3525 (30%) 和 437.3415 (35%) 处产生了特征性的昔元脱水碎片离子,其可分别被归属于  $[昔元 - H_2O + H]^+$  和  $[昔元 - 2H_2O + H]^+$ 。二级 MS/MS 分析  $m/z$  1 143.5569 处的  $[M + Na]^+$  母离子 (CE = 90 eV),见图 5B;能够在  $m/z$  981.4974 (18%), 819.4427 (20%), 689.2094 (20%), 671.1982 (10%), 527.1560 (15%) 和 365.1062 (10%) 处产生了系列的加钠碎片离子,其分别归属



A. CE = 40; B. CE = 90; C.  $[M + Na]^+$  裂解途径

图 4 化合物 2 的正离子质谱及  $[M + Na]^+$  离子的裂解途径

Fig. 4 Mass spectra of peak 2 and summarization of fragmentation approaches of  $[M + Na]^+$

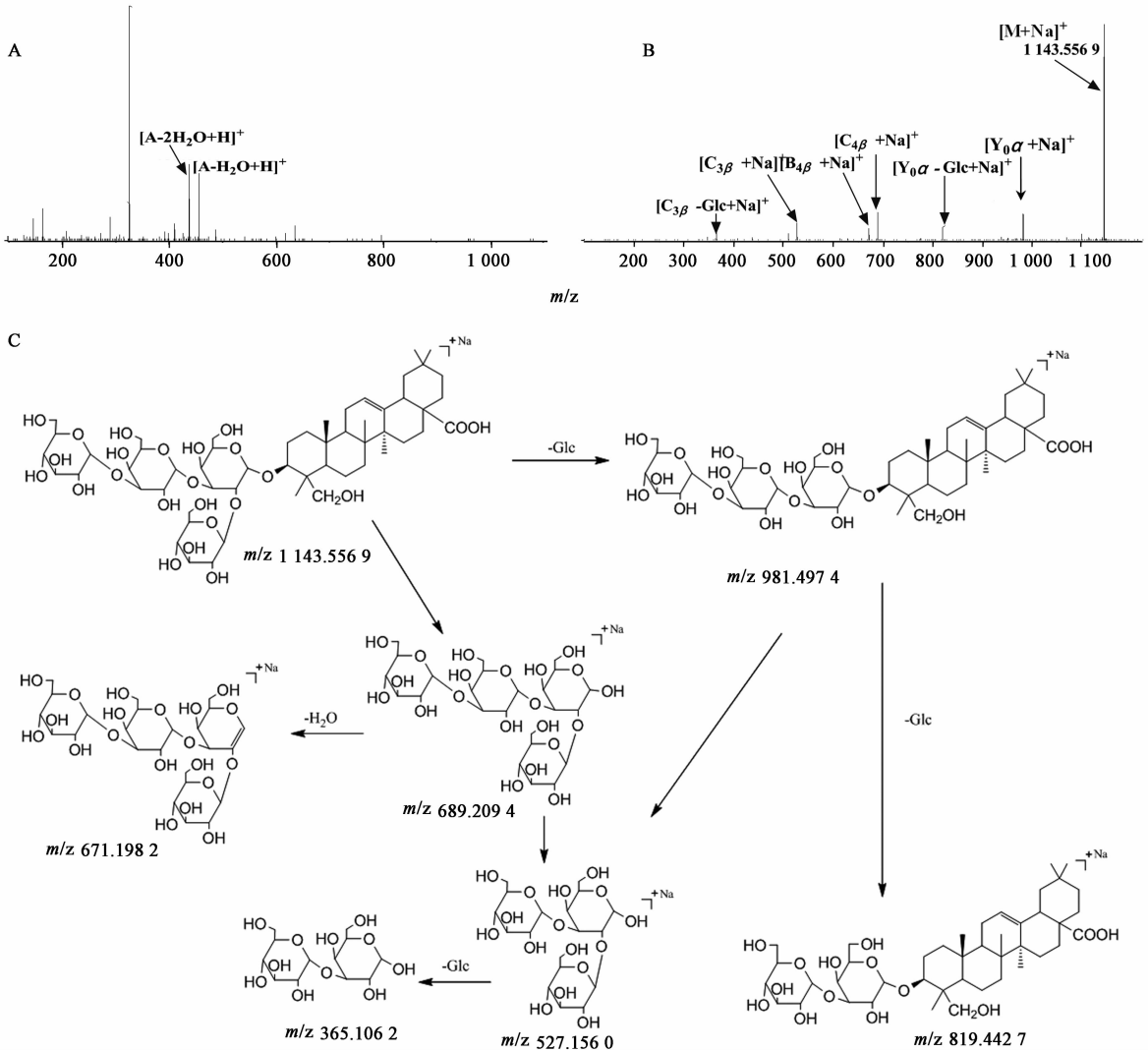
于  $[Y_{0\alpha} + Na]^+$ ,  $[Y_{0\alpha} - Glc + Na]^+$ ,  $[C_{4\beta} + Na]^+$ ,  $[B_{4\beta} + Na]^+$ ,  $[C_{3\beta} + Na]^+$  和  $[C_{3\beta} - Glc + Na]^+$ 。由于化合物 3 是单糖链皂苷,其 C-28 位的是 1 个游离的羧基,因此化合物 3 产生三条主要的裂解途径,归纳见图 5C。(1)  $[M + Na]^+$  首先失去 C-3 糖链外端的 1 分子葡萄糖基(162 Da),在  $m/z$  981.497 4 处产生  $[Y_{0\alpha} + Na]^+$  的碎片离子峰,且其在 MS/MS 谱图上表现为母离子  $[M + Na]^+$  强度的 25%,  $[Y_{0\alpha} + Na]^+$  离子可进一步失去 C-3 糖链外端 1 分子葡萄糖基(162 Da),在  $m/z$  819.442 7 处产生  $[Y_{0\alpha} - Glc + Na]^+$  的离子峰;(2) 与裂解途径(1)相比,首先在  $m/z$  981.497 4 处产生了相同的  $[Y_{0\alpha} + Na]^+$  的离子峰,其进一步失去苷元脱水离子(454 Da),在  $m/z$  527.156 0 处产生  $[C_{3\beta} + Na]^+$  的离子峰,  $[C_{3\beta} + Na]^+$  再进一步失去 1 分子葡萄糖基(162 Da),在  $m/z$  365.106 2 处产生  $[C_{3\beta} - Glc + Na]^+$  离子峰;(3) 与裂解途径(1)和(2)明显不同,  $[M + Na]^+$  离子首先失去苷元脱水离子(454 Da),在  $m/z$  689.209 4

处产生了明显的  $[C_{4\beta} + Na]^+$  的离子峰,其可归属为 C-3 糖链的完整 4 个糖基,  $[C_{4\beta} + Na]^+$  离子可进一步再失去 1 分子外端葡萄糖基(162 Da),在  $m/z$  527.156 0 处产生  $[C_{3\beta} + Na]^+$  的离子峰,  $[C_{3\beta} + Na]^+$  再进一步失去 1 分子葡萄糖基(162 Da),在  $m/z$  365.106 2 处产生  $[C_{3\beta} - Glc + Na]^+$  的离子峰。此外,  $[C_{4\beta} + Na]^+$  可失去 1 分子  $H_2O$ (18 Da),在  $m/z$  671.198 2 处产生  $[B_{4\beta} + Na]^+$  的离子峰。综上所述,碎裂  $[M + Na]^+$  母离子,可以归纳得出 3 条特征性的裂解途径,  $m/z$  1 143.556 9 ~ 981.497 4 ~ 819.442 7 ( $\Delta m = 162$  和 162 Da),  $m/z$  1 143.556 9 ~ 981.497 4 ~ 527.156 0 ~ 365.106 2 ( $\Delta m = 162, 454$  和 162 Da) 和  $m/z$  1 143.556 9 ~ 981.497 4 ~ 689.209 4 ~ 527.156 0 ~ 365.106 2 ( $\Delta m = 162, 454, 162$  和 162 Da),其详细裂解途径见图 5C。

槲木中含有大量的三萜皂苷,化合物 1~3 是同分异构体,其具有相同的分子式  $C_{54}H_{88}O_{24}$ 。3 个皂苷的苷元均为齐墩果烷骨架,糖基连接在 C-3 和/或 C-28 位,其中化合物 1 是双糖链皂苷,苷元为刺囊酸,

其 C-3 位连接 3 个糖基片段, C-28 位连接 1 个糖基片段 (Glc); 化合物 **2** 与化合物 **1** 相比, 亦是双糖链皂苷, 具有相同的 C-3 和 C-28 糖链, 但苷元为常春藤;

化合物 **3** 与化合物 **2** 相比, 具有相同的常春藤苷元, 区别在于糖链不同, 化合物 **3** 为 1 个单糖链皂苷, C-3 位连接 4 个糖基, C-28 位是 1 个游离的羧基。



A. CE = 40; B. CE = 90; C.  $[M + Na]^+$  裂解途径

图 5 化合物 **2** 的正离子质谱及  $[M + Na]^+$  离子的裂解途径

Fig. 5 Mass spectra of peak **2** and summarization of fragmentation approaches of  $[M + Na]^+$

在正离子模式下, 化合物 **1** ~ **3** 的二级质谱在  $m/z$  981.498 2 (100%), 819.439 1 (12%), 527.161 4 (30%) 和 365.106 5 (16%) 处产生了一系列特征性的共有离子峰, 其分别归属于  $[Y_{0\alpha} + Na]^+$ ,  $[Y_{0\alpha} - Glc + Na]^+$ ,  $[C_{3\beta} + Na]^+$  和  $[C_{3\beta} - Glc + Na]^+$  见图 4; 但化合物 **3** 在  $m/z$  671.198 2 和 689.209 4 处产生了不同的碎片离子峰, 其分别归属于  $[B_{4\beta} + Na]^+$  和  $[C_{4\beta} + Na]^+$ 。因此,  $[B_{4\beta} + Na]^+$  和  $[C_{4\beta} + Na]^+$  可作为化合物 **3** 区分其他 2 个异构体特征性的诊断离子。同理, 分析化合物 **1** 和 **2** 的  $[M + NH_4]^+$  或  $[M + H]^+$  的二级谱图时 (CE = 40),

在  $m/z$  455.352 5 和 437.341 5 处产生了共同的苷元碎片离子峰在, 其分别归属于  $[苷元 - H_2O + H]^+$  和  $[苷元 - 2H_2O + H]^+$ 。然而, 可以通过苷元脱水碎片离子的离子强度比值区分化合物 **1** 和 **2**, 化合物 **1** 的苷元类型为刺囊酸, 其相对离子强度比值  $< 1$ ; 而化合物 **2** 的苷元类型为常春藤, 其相对离子强度比值  $> 1$ , 这与以前的文献报道一致<sup>[12]</sup>。化合物 **1** ~ **3** 三个同分异构体的二级质谱分别与其结构特征相吻合, 产生的相应诊断离子, 可以区分化合物 **1** ~ **3**。

#### 4 讨论与结论

本研究以 UPLC-Triple-TOF-MS 作为研究方法,对 3 个辽东椴木三萜皂苷异构体进行了结构区分研究。通过分析化合物 **1**~**3** 的  $[M + Na]^+$  的碎片离子峰,化合物 **3** 的二级谱图在  $m/z$  671. 198 2  $[B_{4\beta} + Na]^+$  和 689. 208 7  $[C_{4\beta} + Na]^+$  处产生 2 个与化合物 **1** 和 **2** 明显不同的特征碎片离子峰,通过  $[B_{4\beta} + Na]^+$  和  $[C_{4\beta} + Na]^+$  处的诊断离子能够有效区分化合物 **3** 与化合物 **1** 和 **2**。化合物 **1** 和 **2** 的  $[M + NH_4]^+$  或  $[M + H]^+$  的二级质谱在  $m/z$  437. 341 2  $[\text{苷元} - 2H_2O + H]^+$  和 455. 350 7  $[\text{苷元} - H_2O + H]^+$  处产生 2 个特征的苷元脱水碎片离子峰,化合物 **1** 的  $[\text{苷元} - 2H_2O + H]^+$  和  $[\text{苷元} - H_2O + H]^+$  相对离子强度比值  $< 1$ , 而化合物 **2** 的  $[\text{苷元} - 2H_2O + H]^+$  和  $[\text{苷元} - H_2O + H]^+$  相对离子强度比值  $> 1$ 。利用电喷雾二级质谱法可以快速、简便、准确地区分 3 种椴木皂苷异构体。化合物 **1**~**3** 的保留时间分别为 6. 85, 7. 98, 21. 46 min, 其中化合物 **3** 的保留时间与化合物 **1** 和 **2** 的保留时间差距较大,这与文献报道一致<sup>[12-13]</sup>。这一现象可能被解释为化合物 **1** 和 **2** 是双糖链皂苷,而化合物 **3** 是单糖链皂苷,且化合物 **3** 具有游离的羧基,因此推测双糖链三萜皂苷(**1** 和 **2**)的极性远大于相应 C-3 单糖链三萜皂苷(**3**)。

#### [参考文献]

[1] 邹淑君,许树军,李靖,等. 辽东椴木叶皂苷成分及其药理学研究进展[J]. 中医药学报, 2017, 45(4): 111-114.

[2] 张秀萍,孙达辰,肖洪彬. 辽东椴木叶总皂苷抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(11): 232-234.

[3] 孙桂波,李锐,周莉玲,等. 龙牙椴木化学成分与药理

作用的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2003, 14(2): 139-141.

[4] 李百美,孙宜春,王秋红,等. 不同产地和不同采收期辽东椴木叶中两种皂苷的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 59-62.

[5] 刘纪成,吕志强,蒙雪婵,等. 龙牙椴木总皂苷含量测定及其抗炎镇痛活性评价[J]. 氨基酸和生物资源, 2017, 39(2): 130-134.

[6] 邹淑君,李靖,许树军,等. 辽东椴木叶总皂苷的 HPLC 及抗肿瘤作用谱效关系分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21): 13-17.

[7] 宋少江,徐绥绪,曹颖林. 辽东椴木总皂苷降血糖作用研究[J]. 中药研究与信息, 2005, 7(5): 7-9.

[8] 尹丽颖,边晓燕,肖洪彬,等. 辽东椴木叶总皂苷对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠 p53 及 PCNA 蛋白表达的影响[J]. 中医药学报, 2010, 38(1): 18-20.

[9] 马慧,宋少江,刘菲菲,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定辽东椴木不同部位中 5 种皂苷类成分的含量[J]. 色谱, 2014, 32(7): 762-766.

[10] 李凤金,肖洪彬. 辽东椴木化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国中医药科技, 2015, 22(3): 353-355.

[11] Domon B, Costello C E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates[J]. Glycoconj J, 1988, 5(4): 397-409.

[12] XIA Y G, LIANG J, LI G Y, et al. Energy-resolved technique for discovery and identification of malonyl-triterpene saponins in *Caulophyllum robustum* by UHPLC-electrospray fourier transform mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2016, 51(10): 947-958.

[13] XIA Y G, LI G Y, LIANG J, et al. A strategy for characterization of triterpene saponins in *Caulophyllum robustum* hairy roots by liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 100(21): 109-122.

[责任编辑 顾雪竹]