

# 连翘酯苷 A 和连翘苷 LTQ Orbitrap MS 裂解途径

任卫琼<sup>1</sup>, 许海玉<sup>2\*</sup>, 王松松<sup>3</sup>, 欧阳荣<sup>1</sup>, 杨洪军<sup>2</sup>, 王志琪<sup>4</sup>

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;  
3. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 4. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

**[摘要]** **目的:**对连翘酯苷 A 和连翘苷的电喷雾质谱裂解途径进行研究。**方法:**使用 LTQ-Orbitrap 高分辨质谱仪,采用蠕动注射泵直接进样的方法,在正离子扫描模式下,分析连翘酯苷 A 和连翘苷的一级和多级质谱图。**结果:**连翘酯苷 A 的  $[M + Na]^+$  准分子离子峰容易失去碎片  $C_6H_{10}O_4$  (鼠李糖)或  $C_9H_8O_4$  (咖啡酸),并在  $MS^3$  谱中发现同时有两种不同来源的  $m/z$  321 的离子,推断是由  $m/z$  501 与  $m/z$  467 离子分别丢失咖啡酸或鼠李糖的裂解而来。连翘苷的  $[M + Na]^+$  准分子离子峰容易失去碎片  $C_6H_{10}O_5$  (葡萄糖);同时在多级碎裂时,容易失去  $H_2O$ ,推断与分子结构中的酯键和糖苷键以及羟基有关。**结论:**本文首次使用 LTQ-Orbitrap 高分辨质谱仪报道连翘酯苷 A 和连翘苷的质谱裂解途径,根据高分辨特征碎片离子可对其进行快速在线鉴别,同时也为进一步研究连翘酯苷 A 和连翘苷的体内代谢过程与结构修饰提供数据支撑。

**[关键词]** LTQ Orbitrap; 连翘酯苷 A; 连翘苷; 高分辨质谱; 裂解途径

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)12-0065-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015120065

**LTQ Orbitrap MS on Fragmentation Pathways of Forsythoside A and Forsythin** REN Wei-qiong<sup>1</sup>, XU Hai-yu<sup>2\*</sup>, WANG Song-song<sup>3</sup>, OUYANG Rong<sup>1</sup>, YANG Hong-jun<sup>2</sup>, WANG Zhi-qi<sup>4</sup> (1. *The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007*; 2. *Institute of Chinese Materia Medica China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*; 3. *School of Traditional Chinese Medicine of Capital Medical University Beijing 100069, China*; 4. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China*)

**[Abstract]** **Objective:** To study the fragmentation pathways of forsythoside A and forsythine by electrospray ionization mass spectrometry. **Method:** A syringe pump was used for the direct injection of reference compounds. Forsythoside A and forsythine were analyzed using LTQ orbitrap MS in positive ion mode. The first and multi-stage mass spectrum diagrams of forsythoside A and forsythine were obtained. **Result:** These were the fragmentation characteristics in the positive LTQ orbitrap MS. Forsythoside A was easy to lose  $C_6H_{10}O_4$  (rhamnose) or  $C_9H_8O_4$  (caffeic acid), in the  $MS^3$  spectra there were two kinds of different sources of  $m/z$  321 ion at the same time, We inferred that fragment ions were from  $m/z$  501 or  $m/z$  467 ion respectively losing caffeic acid or rhamnose. Forsythine was easy to lose  $C_6H_{10}O_5$  (glucose), in multi-stage fracture it was easy to lose  $H_2O$ . We inferred that ester and glycosidic bond and hydroxyl may contribute to it in the molecular structure. **Conclusion:** It first reported the fragmentation pathways of forsythoside A and forsythine by LTQ Orbitrap-high resolution mass spectrometer in positive ion mode. The characteristic fragment ions were can be recognized as a rapid identification features of these compounds. Meanwhile, the study can provide accurate data support for further research of metabolites and modifying structure of these compounds.

**[Key words]** LTQ Orbitrap; forsythoside A; forsythine; high resolution mass spectrometry; fragmentation pathways

连翘具有清热解毒、散结消肿的功效,其主要成分有连翘酯苷 A、连翘酯苷 B 等苯乙醇苷类,连翘

**[收稿日期]** 20141111(006)

**[第一作者]** 任卫琼, 硕士, 副主任药师, 从事从事中药制剂与质量控制研究, Tel:13037311165, E-mail:renweiqiong1@126.com

**[通讯作者]** \* 许海玉, 博士, 副研究员, 从事中药新药设计与技术研究, Tel:13701004691, E-mail:hy\_xu627@163.com

苷、连翘脂素等木脂素类,芦丁、槲皮素等黄酮类等成分<sup>[1-2]</sup>,现代药理学研究表明,连翘酯苷 A 具有抗菌、抗感染、解热、抗病毒和抗氧化功能的作用<sup>[3-6]</sup>,还对·OH 引发的 DNA 损伤具有保护作用<sup>[7]</sup>;连翘苷具有抗炎<sup>[8]</sup>、抗氧化<sup>[9-10]</sup>和降血脂<sup>[10]</sup>的作用;且连翘酯苷 A、连翘苷为 2010 年版《中国药典》连翘药材的指标性成分。

虽然连翘酯苷 A 和连翘苷的质量评价方法已有不少报道<sup>[12-14]</sup>,但是利用质谱去研究其裂解途径鲜有报道,并且未提供高分辨、低偏差的数据支撑。LTQ Orbitrap 高分辨质谱仪作为近年发展起来的一种质谱检测系统,具有离子阱和高分辨质谱平行检测能力,可同时实现多级质谱碎裂和母离子的高分辨采集,在化合物的分析中有着极为重要的作用<sup>[11]</sup>。本文首次采用 LTQ orbitrap MS 对连翘酯苷 A 和连翘苷进行质谱裂解分析,探讨了连翘酯苷 A 和连翘苷裂解规律,为其快速、在线鉴别及体内代谢过程与结构修饰研究奠定数据基础。

### 1 材料

超高压液相色谱-电喷雾-线性离子阱傅立叶变换串联质谱仪(UPLC-ESI-LTQ-Orbitrap, Thermo Fisher Scientific, 配有电喷雾离子源(ESI)和 Xcalibur 2.0 工作站);PB110S 型 1/10 万的电子分析天平(瑞士 Mettler 公司)。连翘为木犀科植物连翘 Forsythia suspense 的干燥果实,经湖南中医药大学第一附属医药药检室周新蓓副主任医师鉴定为正品。

对照品连翘酯苷 A (批号 79916-77-1)、连翘苷

(批号 487-41-2)均购自山东省中药化学对照品工程技术研究中心,供含量测定用;甲醇(色谱纯, Fisher Scientific 公司),实验用水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司),其他试剂均为分析纯。

### 2 方法

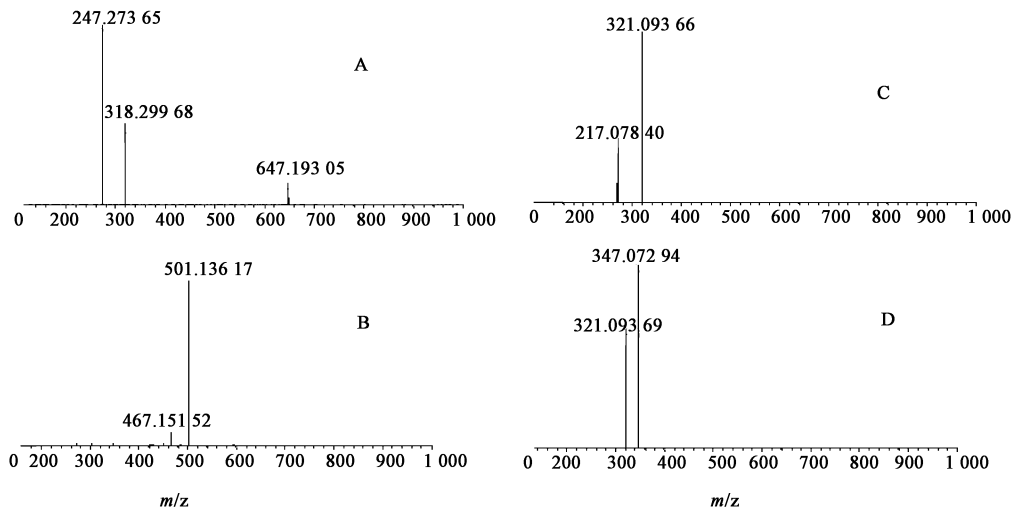
**2.1 对照品溶液的配制** 分别精确称取连翘酯苷 A、连翘苷对照品各 2 mg 于 25 mL 量瓶中,甲醇溶解,超声 30 s,制成含连翘酯苷 A、连翘苷 0.08 mg·L<sup>-1</sup>的对照品溶液,密封,于 4 °C 冰箱保存。

**2.2 质谱条件** 离子化模式 ESI 源,正离子模式,鞘气流量 35 arb,辅助气流量率(arb)0,扫气流量(arb)0,喷雾电压 5 kV,毛细管温度 350 °C, s-透镜射频水平 67.7%。

**2.3 测定** 实验前,使用对应的校正液进行正离子模式下的校正。使用进样针分别吸取对照品溶液约 200 μL,在正离子的模式下,用注射泵以 10 μL·min<sup>-1</sup>流速注入质谱仪。

**2.4 测定结果** 从结果可以得出,两者在正离子的模式下响应较好。连翘酯苷 A 的扫描范围为 *m/z* 125 ~ 1 000,连翘苷的扫描范围为 *m/z* 105 ~ 1 000,全扫描及 MS<sup>n</sup> 扫描分辨率为 30 000;MS<sup>n</sup> 碎裂方式为文献使用的碰撞诱导解离(CID),能量为 35%。

**2.5 连翘酯苷 A 裂解规律探析** 连翘酯苷 A 在正离子模式下的多级质谱图见图 1。连翘酯苷 A 在全扫描后,发现连翘酯苷 A 准分子离子 *m/z* 647.193 05 可能因为不稳定而不很明显,该离子可能为连翘酯苷 A 分子离子增加 Na<sup>+</sup> 所得;选择碰撞诱导解离(CID)分析,选择 *m/z* 647.193 05 进行二级裂解,分



A. 连翘酯苷 A 加 Na<sup>+</sup> 的准分子离子峰; B. ESI-MS<sup>2</sup> 质谱; C. ESI-MS<sup>3</sup> 质谱 *m/z* 467; D. ESI-MS<sup>3</sup> 质谱 *m/z* 501

图 1 连翘酯苷 A 在正离子模式下的多级质谱

Fig. 1 MS and MS<sup>n</sup> of forsythoside A in positive ion mode

别得到碎片离子  $m/z$  501.136 08 ( -1.123 ppm), 467.151 49 ( -1.847 ppm),  $m/z$  501.136 08 可能由  $m/z$  647.193 05 失去末端鼠李糖基的裂解反应而得, 467.151 49 可能由  $m/z$  647.193 05 失去中性碎片  $C_9H_8O_4$  而得; 选择  $m/z$  501.136 08, 467.151 49 进行三级裂解, 发现得到较多的碎片离子, 主要有  $m/z$  347.072 94 ( -2.214 ppm), 321.093 66 ( -2.816 ppm) 和  $m/z$  321.093 66 ( -2.816 ppm), 271.078 40 ( -2.161 ppm),  $m/z$  347.072 94 可能由  $m/z$  501.136 08 失去中性苷元部分 (154 Da) 得到,  $m/z$  271.078 40 可能由  $m/z$  467.151 49 失去中性碎片  $C_{10}H_{12}O_4$  得到,  $m/z$  321.093 66 可能由  $m/z$  501.136 08, 467.151 49 别失去中性碎片  $C_9H_8O_4$ ,  $C_6H_{10}O_4$  后产生。

**2.6 连翘苷裂解规律探析** 连翘苷在正离子模式下的多级质谱见图 2。连翘苷在全扫描后, 发现准分子离子峰  $m/z$  557.198 24 丰度很强, 该离子可能为连翘苷分子离子增加  $Na^+$  所得; 选择碰撞诱导解离 (CID) 分析, 将  $m/z$  557.198 24 进行二级裂解, 分别得到碎片离子  $m/z$  395.145 17 ( -3.390 ppm), 309.093 54 ( -3.022 ppm), 这些碎片离子可能由  $m/z$  557.198 24 分别失去中性碎片  $C_6H_{10}O_5$ ,  $C_{14}H_{16}O_4$  得到; 将  $m/z$  395.145 17, 309.093 54 进行三级裂解, 发现得到较多的碎片离子, 主要有  $m/z$  271.093 35 ( -2.103 ppm) 和 219.062 26 ( -2.831 ppm), 291.083 34 ( -2.265 ppm),  $m/z$  271.093 35 可能由  $m/z$  395.145 17 失去中性碎片  $C_7H_8O_2$  得到,  $m/z$  219.062 26, 291.083 34 可能由  $m/z$  309.093 54 分别失去中性碎片  $C_3H_6O_3$ ,  $H_2O$  后产生。

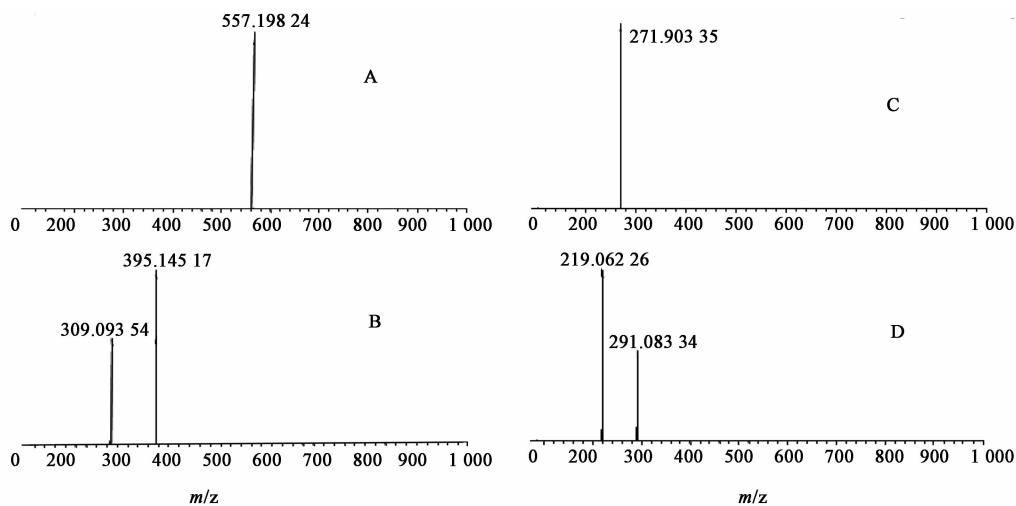
基于以上分析, 现将连翘酯苷 A 和连翘苷的裂解碎片离子归纳见表 1。

### 3 结论

通过对连翘酯苷 A、连翘苷可能的裂解规律分析, 发现连翘酯苷 A 在正离子模式下有较好的响应。连翘酯苷 A 是咖啡酸的衍生物, 是含有咖啡酰基的苯乙醇双糖苷类化合物, 由于咖啡酰基和末端鼠李糖基均处于外侧, 结合上述的裂解分析认为,  $m/z$  501 与 467 离子可能是由  $m/z$  647 离子分别丢失鼠李糖或咖啡酸共同贡献的结果,  $m/z$  347 离子可能由  $m/z$  501 离子丢失苷元而得, 与文献<sup>[15]</sup>报道的在正离子模式下, 咖啡酰基苯乙醇苷类化合物主要发生中性丢失苷元部分 (154 Da) 以及末端糖基的裂解反应一致。从  $MS^3$  谱中发现同时有两个不同来源的  $m/z$  321 的离子, 结果表明  $m/z$  647 离子优先发生咖啡酰基的裂解产生  $m/z$  467 离子的同时,  $m/z$  647 离子也丢失鼠李糖产生  $m/z$  501, 其离子结构中保留咖啡酰基, 因此  $m/z$  321 的离子是从这两种来源的  $m/z$  501 与 467 离子分别丢失咖啡酸或鼠李糖的裂解反应而来的。

连翘苷在正负离子模式下都有响应, 但在正离子模式下响应较负离子模式下好, 且在负离子模式下, 其分子离子峰为其质量数。对于连翘苷, 分子结构中具有酯键和糖苷键, 由于糖苷键的断裂检测到了葡萄糖的丢失, 同时, 对其进行多级碎裂时,  $H_2O$  的丢失较为明显, 与其结构中的羟基有关。

本研究首次使用 LTQ Orbitrap 高分辨质谱仪对连翘酯苷 A、连翘苷进行多级质谱裂解扫描, 得



A. 连翘苷加  $Na^+$  的准分子离子峰; B. ESI- $MS^2$  质谱; C. ESI- $MS^3$  质谱  $m/z$  395; D. ESI- $MS^3$  质谱  $m/z$  309

图 2 连翘苷在正离子模式下的多级质谱

Fig. 2 MS and  $MS^n$  of forsythin in positive ion mode

到高分辨的质谱裂解碎片,导入软件推导得到碎片离子的分子式,偏差均小于 5 ppm(表 1)。利用此高分辨的碎片离子信息为其结构鉴定、定量分

析及代谢研究奠定精确的数据基础,以便从复杂体系中快速、灵敏、可靠地鉴别其化合物及其衍生物。

表 1 连翘酯苷 A 和连翘苷的分子离子和质谱裂解碎片

Table 1 Molecular ion and mass spectrometry pyrolysis fragments of Forsythoside A and Forsythin

名称	准分子离子峰 [M + Na] <sup>+</sup>	偏差 ppm	M <sub>s</sub> <sup>2</sup>	偏差 ppm	M <sub>s</sub> <sup>3</sup>	偏差 ppm	
连翘酯苷 A	647.193 05	-0.491	501.136 08 [M - C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub> + Na] <sup>+</sup>	-1.123	347.072 94 [M - C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> + Na] <sup>+</sup>	-2.214	
						321.093 66 [M - C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> + Na] <sup>+</sup>	-2.816
			467.151 49 [M - C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub> + Na] <sup>+</sup>	-1.847	321.093 66 [M - C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> + Na] <sup>+</sup>	-2.816	
					271.078 40 [M - C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub> + Na] <sup>+</sup>	-2.161	
连翘苷	557.198 24	-1.283	395.145 17 [M - C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> + Na] <sup>+</sup>	-3.390	271.093 35 [M - C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> + Na] <sup>+</sup>	-2.103	
						291.083 34 [M - C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub> + Na] <sup>+</sup>	-2.265
			309.093 54 [M - C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> + Na] <sup>+</sup>	-3.022	219.062 26 [M - C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> + Na] <sup>+</sup>	-2.831	

[参考文献]

[1] 吴艳芳,王新胜,袁永亮,等.连翘化学成分研究[J].中草药,2013,44(15):2052-2054.

[2] 曾建勋,马奕斌,李瑞明,等.高效液相色谱飞行时间质谱分析连翘水煎液的有效成分[J].中药材,2013,36(4):581-583.

[3] 冯淑怡,李先荣,孙建宁.连翘酯苷 A 抗感染、解热作用研究[J].现代生物医学进展,2006,6(10):73-75.

[4] 李仲兴,王秀华,赵建宏,等.连翘对金黄色葡萄球菌及表皮葡萄球菌的体外抗菌活性研究[J].天津中医药,2007,24(4):328-333.

[5] Qu H, Zhang Y, Wang Y, et al. Antioxidant and antibacterial activity of two compounds (forsythoside and forsythin) isolated from *Forythia suspense* [J]. J Pham Pharmacol, 2008, 60(2):261-266.

[6] 胡克杰,徐凯建,王跃红,等.连翘酯苷体外抗病毒作用的实验研究[J].中国中医药科技,2001,8(2):89.

[7] 刘金,张立伟.连翘酯苷对·OH 引发的 DNA 损伤的防护作用[J].山西中医学院学报,2006,7(1):23-24.

[8] Diaz Lanza A M, Abad Marthinez M J, Fernandez Matcllano L, et al. Lignan and Phenylpropanoid glycosides from *Phillyrealatifolia* and their in vitro anti-inflammatory activity [J]. Planta Med, 2001, 67(3):

219-223.

[9] Zhao Y C, LI F R, Yan J X, et al. Effect of phillyrin on the anti-obesity in nutritive obesity mice [J]. J Chin Med Matc, 2005, 28(2):123-124.

[10] 赵咏梅,李发荣,杨建雄,等.连翘苷降血脂及抗氧化作用的实验研究[J].天然产物研究与开发,2005,17(2):157-159.

[11] 李晓雯,沈保华,江峥,等. HPLC-LTQ orbitrap MS 对血液、尿液中精神药品的筛选及确证 [J]. 法医学杂志, 2012, 28(1):44-48.

[12] 支旭然,苑霖,生宁,等. HPLC-MS/MS 法测定不同采收期连翘叶中 9 种成分 [J]. 中草药, 2013, 44(22):3231-3235.

[13] 姬雪礼,李文烈,郑晓杰,等. 高效液相色谱法同时测定连翘叶中连翘酯苷 A 和连翘苷的含量 [J]. 中国药业, 2014, 23(7):33-34.

[14] 魏悦,李晓,李自红,等. HPLC 同时测定连翘药材及提取物中芦丁、连翘酯苷 A 和连翘苷的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9):108-111.

[15] 刘影. 苯乙醇苷类化合物及其混合物组分群的质谱分析方法以及 LC-MS/NMR 相关谱分析方法研究 [D]. 北京:中国协和医科大学, 2009.

[责任编辑 顾雪竹]