

· 化学与分析 ·

UPLC-Q-TOF-MS^E 结合相对保留时间在线快速鉴定 麦冬中甾体皂苷类成分

晏仁义¹, 马凤霞^{2,3}, 余河水², 康利平², 张洁¹,
赵阳², 孙欣光², 贾德贤¹, 马百平^{2*}

(1. 新奥集团 新绎健康科技有限公司, 河北 廊坊 065001;

2. 军事医学科学院 放射与辐射医学研究所, 北京 100850; 3. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的: 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS^E)表征并快速在线鉴定麦冬中甾体皂苷类成分; 结合呋甾皂苷在反向色谱上的保留规律, 鉴别同分异构体。方法: 运用 2 种反相色谱柱(Acquity UPLC HSS T3 和 Agela Venusil XBP C₁₈-2), 在 2 种溶剂系统(0.1% 甲酸/水-0.1% 甲酸/乙腈, 丙酮-水)和 3 个洗脱条件下对系列呋甾皂苷的色谱保留规律进行总结。利用 UPLC-Q-TOF-MS^E 对麦冬成分进行分析, 获得质谱数据。结果: 3 种色谱条件下呋甾皂苷的相对保留时间一致, 呈现如下保留规律: 甾体皂苷中糖链结构相同, 苷元上羟基的数目越多保留时间越短; 仅羟基位置不同时, 保留时间为 1 位羟基 < 17 位羟基 < 14 位羟基; 仅 C-26 位糖链糖基连接位置不同时, 葡萄糖-(1→6)-葡萄糖 < 葡萄糖-(1→2)-葡萄糖; 从麦冬表征的图谱中共鉴定了 21 个色谱峰, 其中 14 个呋甾皂苷, 7 个为螺甾皂苷。结论: 色谱保留时间能为呋甾皂苷同分异构体的液质联用在线鉴定提供有益的数据支持。

[关键词] 麦冬; 超高效液相色谱-飞行时间质谱; 相对保留时间; 呋甾皂苷; 螺甾皂苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)24-0043-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016240043

Identification of Steroidal Saponins in *Ophiopogonis Radix* by UPLC-Q-TOF-MS^E Combined with Relative Retention Time

YAN Ren-yi¹, MA Feng-xia^{2,3}, YU He-shui², KANG Li-ping², ZHANG Jie¹,
ZHAO Yang², SUN Xin-guang², JIA De-xian¹, MA Bai-ping^{2*}

(1. Ovation Health Science and Technology Co. Ltd., ENN Group, Langfang 065001, China;

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China;

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the steroidal saponins in the tubers of *Ophiopogonis Radix* by ultra-performance liquid chromatography tandem with time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS^E) combined with the relative retention time (RRT) of furostanol saponins in reverse chromatography. **Method:** The retention time of several furostanol saponins was tested on two kinds of reversed-phase column, Acquity UPLC HSS T3 and Agelavenusil XBP C₁₈-2, using water (0.1% formic acid)-acetonitrile (0.1% formic acid) and acetone-water, respectively. The mass spectrometric data of *Ophiopogonis Radix* were obtained by UPLC-Q-TOF-MS^E. **Result:** The RRT of furostanol saponins was consistently in three chromatographic conditions. When the sugar parts were

[收稿日期] 20160714(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373938);北京市自然科学基金项目(7152114)

[第一作者] 晏仁义, 博士, 副研究员, 从事中药化学研究工作, Tel: 0316-2595033, E-mail: 58557686@qq.com

[通讯作者] * 马百平, 博士, 研究员, 从事中药化学研究工作, Tel: 010-66930265, E-mail: mabaiping@sina.com

identical, the RRT was shorter alone with the increase number of hydroxyl; location of hydroxyl affected the RRT, the orders were asfollow: 1-hydroxyl < 17-hydroxyl < 14 -hydroxyl. When only the sugar chain at C-26was different, the RRT was as follow: glucosyl- (1→6) -glucosyl < glucosyl- (1→2) -glucosyl. UPLC-Q-TOF-MS^E combined with RRT, a total of 21 compounds were identifiedincluding 14 furostanolsaponins and 7 spirostanolsaponins.

Conclusion: The RRT of furostanolsaponins provide supportive data for rapidly identify isomers of steroidalsaponins from *Ophiopogonis Radix* by UPLC-Q-TOF-MS^E.

[**Key words**] tubers of *Ophiopogonis Radix*; UPLC-Q-TOF-MS^E; relative retention time; furostanolsaponins; spirostanolsaponins

UPLC 具有高分离速度和高灵敏度,和常规的 HPLC 比较峰容量、灵敏度、分析效率有了很大的提高;Q-TOF 可提供准确相对分子质量,利用母离子和碎片离子的精确质量信息,给出色谱峰的分子式和结构信息。UPLC-Q-TOF-MS^E 结合二者的优点,为复杂体系中化合物的分离分析提供了良好的平台,被广泛用于中药化学成分的在线快速表征和结构分析。UPLC-Q-TOF-MS^E 在线结构表征的一般程序为先测试已知结构的化合物,根据质谱数据推测结构裂解方式,根据推定的裂解规律结合文献报导的化合物质谱数据和数据库检索来表征相关结构类群的其他化合物的结构。运用此方法笔者对重楼、胡芦巴和知母中的甾体皂苷进行了快速表征,根据质谱数据准确鉴定甾体皂苷同分异构体有较大困难;而反相色谱保留时间的差异有助于鉴定同分异构体,如螺甾皂苷 25R 和 25S 异构体的鉴别^[1-3]。

前期笔者对麦冬甾体皂苷类成分进行了研究,分离得到系列呋甾皂苷同分异构体,结构差异主要是羟基取代位置不同和 C26 位糖链内糖基连接位点不同^[4-6]。利用质谱数据确定甾体皂苷元上羟基取代位置和糖链内糖基连接位点较困难。本文对呋甾皂苷在反相色谱上保留时间的规律进行总结,并把总结的规律运用到 UPLC-Q-TOF-MS^E 在线结构表征中,能准确鉴定麦冬中的呋甾皂苷同分异构体。

1 材料

ACQUITYTM UPLC 超高效液相色谱系统, Synapt MS 质谱系统, Acquity UPLC HSS T3 超高效液相柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 高效液相色谱系统 (包括 2695 Separations Module 四元泵, Empower 色谱工作站, Alltech 2000 型蒸发光散射检测器, 美国 Waters 公司); KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), SPE C₁₈ 萃取柱 (1 000 mg/6 mL, 博纳艾杰尔科技), SP825 型非极性大孔吸附树脂 (日本三菱化学公司), 乙腈和甲酸为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 超纯水自制 (Millipore 纯

水器制备)。

麦冬采自四川绵阳, 原植物经天津中医药大学张丽娟老师鉴定为麦冬 *Ophiopogon japonicus* 的干燥块根。对照品包括呋甾皂苷 ophiofurospisides A, C, G, H, I, L 和 ophiopogonins H, I, J, P, Q; 螺甾皂苷 ophiopogonins D, D', R, ophiopogonin C 和 Tb 均为本实验室从麦冬中制备并鉴定结构, 采用 HPLC-ELSD 峰面积归一化法检测, 纯度均 >95%。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱, 柱温 45 °C, 流动相 0.1% 甲酸/水 (A)-0.1% 甲酸/乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 0.5 min, 5.0% B; 0.5 ~ 1.0 min, 5.0% ~ 16.0% B; 1.0 ~ 5.0 min, 16.0% ~ 19.0% B; 5.0 ~ 13.0 min, 19.0% ~ 24.0% B; 13.0 ~ 21.0 min, 24.0% ~ 33.0% B; 21.0 ~ 26.0 min, 33.0% ~ 38.0% B; 26.0 ~ 31.0 min, 38.0% ~ 42.0% B; 31.0 ~ 37.0 min, 42.0% ~ 52.0% B; 37.0 ~ 42.0 min, 52.0% ~ 60.0% B; 42.0 ~ 42.1 min, 60.0% ~ 100% B; 42.1 ~ 45.0 min, 100% B), 流速 0.60 mL·min⁻¹。

2.2 质谱条件 ESI 离子源, 电离方式 ESI⁻ 和 ESI⁺, 毛细管电压 3.0 kV, 锥孔电压 30 V, 离子源温度 100 °C, 除溶剂气温度 450 °C, 除溶剂气体气流量 800 L·h⁻¹, 碰撞气体氩气。碰撞能量为低能量扫描时, transfer 电压为 4 eV, trap 电压为 6 eV。高能量扫描时, 负离子模式下 transfer 电压为 10 eV, trap 电压为 60 ~ 75 eV; 正离子模式下 transfer 电压为 10 eV, trap 电压为 75 ~ 90 eV。质量扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 500。选取 400 μg·L⁻¹ 亮氨酸-脑啡肽作为校正液, 流速 5 μL·min⁻¹。

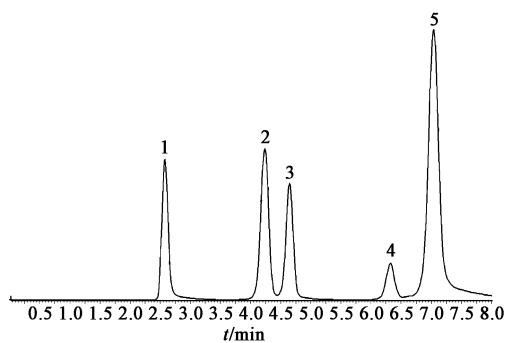
2.3 对照品溶液制备 分别称取各对照品约 0.5 mg, 分别用 30% 乙腈 (呋甾皂苷) 或者甲醇 (螺甾皂苷) 1 mL 溶解, 再分别取 20 μL 用 50% 甲醇稀释到 2 mL。0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得, 进样体积 3 μL。

2.4 供试品溶液制备 干燥麦冬块根粉碎(过四号筛),精密称取粉末样品 3 g 于锥形瓶中,加入 60% 乙醇溶液 100 mL,超声提取 15 min(功率 100 W,频率 40 kHz),提取 2 次,滤过;合并 2 次提取液,浓缩至无醇味;过平衡好的 SP825 大孔吸附树脂(20 mL),4 倍柱体积 10% 乙醇洗脱除杂;收集 3 倍柱体积的 80% 乙醇洗脱部分,浓缩至无醇味,过 SPE C₁₈ 萃取柱,收集 90% 甲醇洗脱部分(120 mL),浓缩干燥。取干燥样品 4 mg 以 60% 乙醇溶液 2 mL 超声溶解,并定容至刻度,摇匀。0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得,进样量 5 μL。

2.5 呋甾皂苷类反相色谱保留规律的探讨 本实验室从麦冬中分离鉴定了一系列结构多样的呋甾皂苷类化合物,其结构存在如下特征:①分子中含有双糖链,分别连接在 C-3 和 C-26 位。C-3 位糖链结构有 3 种类型,分别是木糖-(1→4)-[鼠李糖-(1→2)]-葡萄糖,木糖-(1→4)-葡萄糖和鼠李糖-(1→2)-葡萄糖;C-26 位糖链结构也有 3 种类型,分别是葡萄糖-(1→2)-葡萄糖,葡萄糖-(1→6)-葡萄糖和葡萄糖;②除 22 位羟基外还含有羟基 0~3 个。如果含有 1 个羟基,连接位置可能在 1 位,14 位或 17 位;2 个羟基主要连在 14 位和 17 位上;3 个羟基主要连在 12 位,14 位和 17 位上;③同分异构体较多,主要差异为羟基取代位置不同或者 C-26 糖链糖基连接位点不同。

分析这些结构在反相 C₁₈ 色谱上的保留时间,发现如下规律:①甾体皂苷中糖链相同,苷元上羟基的数目不同或连接位置不同保留时间差异较大。羟基越多保留时间越短;当相对分子质量相同,仅羟基位置不同,在反相 C₁₈ 上的保留时间分别为 1 位羟基 < 17 位羟基 < 14 位羟基;②相对分子质量、苷元和 3 位糖链都相同时,仅 26 位糖链连接位置不同时,反相 C₁₈ 上保留时间顺序为葡萄糖-(1→6)-葡萄糖 < 葡萄糖-(1→2)-葡萄糖,见图 1,2。

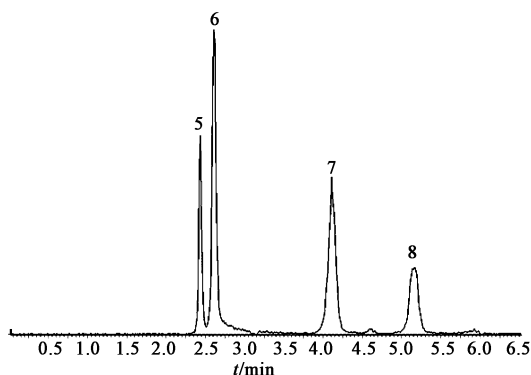
呋甾皂苷类化合物在反相色谱上的保留时间规律在 2 种反相色谱柱和 3 种洗脱条件上都予以证实,说明该规律有一定的耐用性。反相色谱柱包括 ACQUITY UPLC HSS T3 超高效液相柱上(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)和 Agela Venusil XBP C₁₈-2 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)。在超高效液相柱上流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B),分别用 2 个不同的梯度洗脱,图 1,2 的洗脱条件为洗脱梯度(0~0.5 min, 5% B; 0.5~1.0 min, 5%~20% B; 1.0~7.5 min, 20% B; 7.5~8.0 min,



1. ophiopuroside L; 2. ophiopuroside A; 3. ophiopogonin I; 4. ophiopuroside G; 5. ophiopuroside H

图 1 相同相对分子质量对照品(MW = 1 050)的 UPLC-Q-TOF-MS^E 总离子流

Fig. 1 Total ion chromatogram of references possessing same molecular weight (MW = 1 050) by UPLC-Q-TOF-MS^E



5. ophiopogonin P; 6. ophiopogonin Q; 7. ophiopuroside C; 8. ophiopogonin J

图 2 相同相对分子质量对照品(MW = 1 258)的 UPLC-Q-TOF-MS^E 总离子流

Fig. 2 Total ion chromatogram of references possessing same molecular weight (MW = 1 258) by UPLC-Q-TOF-MS^E

20%~45% B; 8.0~8.5 min, 45%~95% B), 流速 0.60 mL·min⁻¹。图 3 的梯度洗脱条件见 2.1 项。在常规反相色谱柱上流动相水(A)-丙酮(B)梯度洗脱(0~25 min, 24%~35% B; 25~25.1 min, 35%~24% B; 25.1~35 min, 24% B)。

2.6 UPLC-Q-TOF-MS^E 在线鉴定麦冬中甾体皂苷

2.6.1 对照品的质谱分析 ophiopuroside L(3)的低能量负离子给出 m/z 1 095.526 5 [$M + HCOO$]⁻和 1 049.523 8 [$M - H$]⁻,判断化合物 3 的分子式为 C₅₀H₈₂O₂₃。高能量负离子给出 m/z 917.482 2 [$M - H - Xyl$]⁻, 771.410 3 [$M - H - Xyl - Rha$]⁻, 753.325 8 [$M - H - Xyl - Rha - H_2O$]⁻和 591.318 9 [$M - H - Xyl - Rha - H_2O - Glc$]⁻, 429.293 1 [$M - H - Xyl - Rha - H_2O - Glc - Glc$]⁻,表明化合物 3 是含有 2 个游离羟基的呋甾

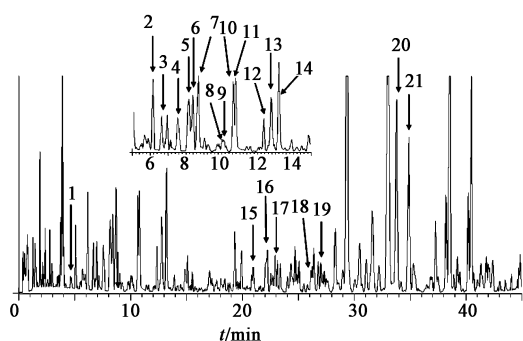


图 3 麦冬 UPLC-Q-TOF-MS^E 的总离子流
Fig. 3 Total ion chromatogram of tubers of *Ophiopogonis Radix* by UPLC-Q-TOF-MS^E

皂苷,并含有 2 个葡萄糖,1 个鼠李糖和 1 个木糖。低能量正离子给出 m/z 1 073.522 4 $[M + Na]^+$ 和 1 033.527 9 $[M + H - H_2O]^+$,这也是判断呋甾皂苷相对分子质量的特征信号。系列碎片信号 431.309 3 $[M + H - Xyl - Rha - H_2O - Glc - Glc]^+$, 413.293 9 $[M + H - Xyl - Rha - H_2O - Glc - Glc - H_2O]^+$ 和 395.268 3 $[M + H - Xyl - Rha - H_2O - Glc - Glc - H_2O - H_2O]^+$ 是判断呋甾皂苷羟基取代个数的重要依据。

ophiopogonin Q (1) 的低能量负离子给出 m/z 1 257.590 8 $[M + HCOO]^-$ 和 1 211.557 6 $[M - H]^-$,低能量正离子给出 m/z 1 235.576 9 $[M + Na]^+$ 和 1 195.587 2 $[M + H - H_2O]^+$,判断化合物 1 的分子式为 $C_{56}H_{92}O_{28}$ 。高能量正离子给出 m/z 431.142 6 $[M + H - Xyl - Rha - H_2O - Glc - Glc - Glc]^+$,表明化合物 1 的苷元结构和化合物 3 一致,仅比化合物 3 多了 1 分子葡萄糖。

ophiopogonin H (2) 的低能量负离子给出 m/z 1 273.582 5 $[M + HCOO]^-$ 和 1 227.623 2 $[M - H]^-$,低能量正离子给出 m/z 1 251.571 3 $[M + Na]^+$,判断 2 的分子式为 $C_{56}H_{92}O_{29}$ 。高能量正离子给出 m/z 447.194 2 $[M + H - Xyl - Rha - H_2O - Glc - Glc - Glc]^+$,以及连续脱去三分子 H_2O 的离子碎片 429.226 6,411.285 3 和 393.277 4,表明化合物 2 的苷元中比化合物 1 和 3 多 1 个羟基取代,糖链的结构和化合物 1 一致。

ophiofurospiside C (4) 和 ophiopogonin J (7) 的分子离子峰 m/z 1 211.5 $[M - H]^-$ 提示二者分子式均为 $C_{56}H_{92}O_{28}$,同化合物 1 的分子式一致,提示 3 个化合物为同分异构体。3 个化合物的离子碎片信息基本一致,仅根据质谱信息较难准确归属结构。化合物 1 和 4 之间的差异为羟基取代位置不同,分别

在 1 位和 17 位;化合物 4 和 7 之间保留时间差异较大,为羟基取代基位置不同和 26 位糖链内糖基连接位点不同 2 个影响因素叠加作用的结果。与化合物 4 比较,化合物 7 的 14 位羟基取代和 26 位的葡萄糖-(1→2)-葡萄糖结构都使保留时间增大;以上 3 个呋甾皂苷根据保留时间能准确的归属结构。

ophiofurospiside A (8) 和 ophiopogonin I (10) 的低能量负离子给出 m/z 1 095.5 $[M + HCOO]^-$ 和 1 049.5 $[M - H]^-$,低能量正离子给出 m/z 1 073.5 $[M + Na]^+$ 和 1 055.5 $[M + H]^+$,判断分子式为 $C_{50}H_{82}O_{23}$ 。413.3 $[M + H - Xyl - Rha - Glc - Glc - H_2O - H_2O]^+$ 提示分子中含有 2 个游离羟基。根据保留时间的差异能准确归属化合物 8 和 10 的结构,羟基取代位置分别为 14 位和 17 位。

ophiopogonin R (15) 低能量负离子给出 m/z 815.410 2 $[M + HCOO]^-$ 和 769.418 3 $[M - H]^-$,低能量正离子给出 m/z 793.401 7 $[M + Na]^+$ 和 775.383 9 $[M + Na - H_2O]^+$,判断分子式为 $C_{39}H_{62}O_{15}$ 。高能量负离子给出 m/z 623.349 4 和 461.287 0 分别是 769.418 3 $[M - H]^-$ 依次脱去 1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖形成的碎片。 m/z 461.287 0 离子信号提示分子为螺甾皂苷含有 3 个羟基。

ophiopogonin C (16) 低能量负离子给出 m/z 931.459 2 $[M + HCOO]^-$ 和 885.453 7 $[M - H]^-$,低能量正离子给出 m/z 909.450 5 $[M + Na]^+$ 和 869.463 1 $[M + H - H_2O]^+$,判断分子式为 $C_{44}H_{70}O_{18}$ 。高能量正离子给出 m/z 737.418 6, 591.371 4 和 429.298 7 分别是 m/z 869.463 1 $[M - H]^-$ 依次脱去 1 分子木糖,1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖形成的碎片。提示分子为螺甾皂苷并含有 2 个羟基。

Tb (19) 的低能量负离子给出 m/z 783.422 2 $[M + HCOO]^-$ 和 737.414 4 $[M - H]^-$,低能量正离子给出 m/z 761.410 9 $[M + Na]^+$, 739.430 8 $[M + H]^+$ 和 721.417 9 $[M + H - H_2O]^+$,判断分子式为 $C_{39}H_{62}O_{13}$ 。高能量正离子给出 m/z 575.386 4 和 413.301 8 分别是 m/z 721.417 9 $[M + H - H_2O]^+$ 依次脱去 1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖形成的碎片。同时提示分子中有 1 个羟基。

ophiopogonin D (20) 的低能量负离子给出 m/z 899.468 3 $[M + HCOO]^-$ 和 853.461 8 $[M - H]^-$,低能量正离子给出 m/z 877.462 6 $[M + Na]^+$ 和 855.481 1 $[M + H]^+$ 判断分子式为 $C_{44}H_{70}O_{16}$ 。高能

量正离子给出 m/z 709.397 1, 577.380 1, 559.367 6 和 413.308 4 分别是 m/z 855.481 1 $[M + H]^+$ 依次脱去 1 分子鼠李糖, 1 分子木糖, 1 分子水和 1 分子呋喃糖形成的碎片。同时提示分子中有 1 个羟基。

ophiopogonin D' (**21**) 的低能量负离子给出 m/z 899.471 0 $[M + HCOO]^-$ 和 853.463 6 $[M - H]^-$, 低能量正离子给出 m/z 877.461 7 $[M + Na]^+$ 和 855.479 4 $[M + H]^+$ 判断分子式为 $C_{44}H_{70}O_{16}$, 和化合物 **20** 相同。但是高能量正离子给出 m/z 723.436 5, 577.377 6 和 415.325 4 分别是 m/z 855.481 1 $[M + H]^+$ 依次脱去 1 分子木糖, 1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖形成的碎片, 和化合物 **20** 比较有差异。同时提示分子中不含羟基。

2.6.2 其他色谱峰的质谱分析 化合物 **5** 的低能量负离子给出 m/z 1 211.578 4 $[M - H]^-$, 低能量正离子给出 m/z 1 235.571 7 $[M + Na]^+$, 1 195.559 6 $[M + H - H_2O]^+$, 判断分子式为 $C_{56}H_{92}O_{28}$, 同化合物 **4** 和 **7** 一致。同时高能量正离子给出 m/z 395.294 3 $[M + H - Xyl - Rha - 3 \times Glc - 3 \times H_2O]^+$, 提示化合物 **5** 与 **4** 和 **7** 之间的差异仅在羟基取代基位置和糖基之间的连接不同。保留时间处在化合物 **4** 和 **7** 之间, 检索麦冬中分离得到的化合物, 推测结构为 ophiopogonin N (**5**), 与化合物 **4** 比较仅羟基取代基位置不同, 符合色谱保留规律 17 位羟基(化合物 **4**) < 14 位羟基(化合物 **5**); 与化合物 **7** 的差异仅在 26 位葡萄糖基之间的连接不同, 符合色谱保留规律葡萄糖-(1→6)-葡萄糖(化合物 **5**) < 葡萄糖-(1→2)-葡萄糖结构(化合物 **7**)。

化合物 **11** 的低能量负离子给出 m/z 963.488 3 $[M + HCOO]^-$ 和 917.481 1 $[M - H]^-$; 低能量正离子给出 m/z 941.470 1 $[M + Na]^+$ 和 901.483 4 $[M + H - H_2O]^+$, 判断分子式为 $C_{45}H_{74}O_{19}$, 高能量正离子给出 m/z 883.467 0, 721.383 4, 575.372 1 和 413.297 8 分别为 m/z 901.483 4 $[M + H - H_2O]^+$ 连续脱去 1 分子 H_2O , 1 分子葡萄糖, 1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖的信号。通过检索麦冬中分离得到的成分, 推测结构为 ophiopogonin B^[7]。

化合物 **9** 的低能量负离子和低能量正离子给出离子峰与化合物 **11** 一致, 同时还可以见到 575.374 5 和 413.315 5 等与化合物 **11** 一致的丢失糖基和水后生成的碎片离子信息, 说明二者为同分异构体, 但是化合物 **9** 的保留时间比 **11** 少 0.7 min, 推测化合物 **9** 的羟基取代在 17 位。通过文献检索, 该化合物为麦冬中含有的 (20S, 25R)-26-O-

β -D-吡喃葡萄糖-呋甾-5-烯-3 β , 17 α , 22 α , 26-四羟基-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1→2)- β -D-吡喃葡萄糖苷^[7]。

化合物 **12** 和 **13** 的低能量负离子给出 m/z 1 195.6 $[M - H]^-$, 低能量正离子给出 m/z 1 219.5 $[M + Na]^+$, 判断分子式均为 $C_{56}H_{92}O_{27}$ 。高能量负离子给出 m/z 1 033.5, 901.4, 755.424 4, 737.4, 575.3, 413.3 分别为从 m/z 1 195.6 $[M - H]^-$ 脱去 1 个葡萄糖, 1 个木糖, 1 个鼠李糖, 1 分子 H_2O , 1 个葡萄糖和 1 个葡萄糖的离子碎片信号。高能量正离子模式中可见 m/z 415.3 提示分子中只有 1 个游离羟基, 通过文献检索, 麦冬中分离得到的化合物 ophiopogonin G 和 F 符合该质谱裂解特征, 差异仅在 26 位糖链中葡萄糖连接位置不一样, 根据保留时间差异归属化合物 **12** 的结构为 ophiopogonin G [葡萄糖-(1→6)-葡萄糖], 化合物 **13** 的结构为 ophiopogonin F [葡萄糖-(1→2)-葡萄糖]^[4]。

化合物 **14** 的低能量负离子给出 m/z 1 109.551 4 $[M + HCOO]^-$ 和 1 063.544 6 $[M - H]^-$, 判断分子式均为 $C_{51}H_{84}O_{23}$ 。和 ophiopogonin G (**12**) 相比少了 1 个木糖。高能量负离子给出离子信号 m/z 901.485 4, 755.426 0, 737.413 7, 575.362 1 和 413.289 6 分别为从 m/z 1 063.544 6 $[M - H]^-$ 脱去 1 个葡萄糖, 1 个鼠李糖, 1 个木糖, 1 分子 H_2O , 1 个葡萄糖和 1 个葡萄糖的离子碎片信号。检阅文献发现麦冬中分离得到的化合物 ophiopogonin K 符合该质谱特征^[8]。

25R- Δ 5(6)-烯-螺甾-3 β , 14 α , 17 α -三羟基-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1→2)- β -D-吡喃葡萄糖苷 (**17**) 的低能量负离子给出 m/z 799.417 9 $[M + HCOO]^-$ 和 753.408 1 $[M - H]^-$, 结合低能量正离子给出的 m/z 777.408 8 $[M + Na]^+$ 和 737.416 7 $[M + H - H_2O]^+$, 判断分子式为 $C_{39}H_{62}O_{14}$ 。高能量正离子给出 m/z 719.404 2, 提示分子中有 2 个羟基; m/z 573.344 5, 411.291 5 分别是 m/z 719.404 2 $[M + H - H_2O - H_2O]^+$ 依次脱去 1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖形成的碎片^[9]。

25R- Δ 5(6)-烯-螺甾-3 β , 17 β -二羟基-3-O- α -L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-[β -D-吡喃木糖基-(1→4)]- β -D-吡喃葡萄糖苷 (**18**) 的低能量负离子给出 m/z 915.465 3 $[M + HCOO]^-$ 和 869.457 9 $[M - H]^-$, 结合低能量正离子给出 m/z 893.454 1 $[M + Na]^+$, 871.473 1 $[M + H]^+$ 和 853.470 1 $[M + H - H_2O]^+$, 判断分子式为 $C_{44}H_{70}O_{17}$ 。高能量正离子给出 m/z

721.428 5, 575.343 5 和 413.308 4 分别是 m/z 853.470 1 $[M + H - H_2O]^+$ 依次脱去 1 分子木糖、1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖形成的碎片。同时提示分子中有 1 个羟基^[10]。

3 讨论

呋甾皂苷反相色谱保留规律的试验中,笔者在超高效液相色谱柱 Acquity UPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 以 0.1% 甲酸/水 (A)-0.1% 甲酸/乙腈 (B) 为流动相体系, 分别用 2 个不同的梯度洗脱; 以及在在常规高效液相色谱柱 Agela Venusil XBP C₁₈-2 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 用水 (A)-丙酮 (B) 为流动相梯度洗脱; 结果表明保留时间和结构之间的关系在 3 个试验中都一致, 说明发现的规律有一定的耐用性。

UPLC-Q-TOF-MS^E 技术可以同时提供良好的分离效果及提供精确的和丰富的质谱信息, 广泛运用到中药复杂成分的在线快速鉴别研究中。本试验中

发现在 (-) ESI-MS 条件下, 甾体皂苷类化合物多出现准分子离子 $[M - H]^-$ 和加合离子 $[M + HCOO]^-$; 在 (+) ESI-MS 模式下, 出现加合离子 $[M + Na]^+$, 以及 $[M + H - H_2O]^+$ 和 $[M + Na - H_2O]^+$ 等碎片离子。甾体皂苷类化合物裂解丢失糖基后碎片离子较为明显, 有利于判断化合物糖链部分连接的糖基种类。麦冬中分离报道的甾体皂苷糖基种类主要是葡萄糖、鼠李糖和木糖, 以及少量化合物含有呋喃糖^[4,6,8]。苷元离子可以快速鉴别苷元中游离羟基个数, 如 m/z 431, 413, 395 系列表明麦冬中呋甾皂苷含有 2 个游离羟基, 依此类推 m/z 429, 411, 393 表明含有 1 个游离羟基。

本试验利用 UPLC-Q-TOF-MS^E 技术从麦冬中共鉴定 21 个甾体皂苷成分, 包括 14 个呋甾皂苷和 7 个螺甾皂苷, 见图 4, 表 1。利用质谱信息鉴定同分异构的化学结构有较大的难度, 甾体皂苷结构复杂, 存在较多的同分异构体, 包括羟基取代位置不同和

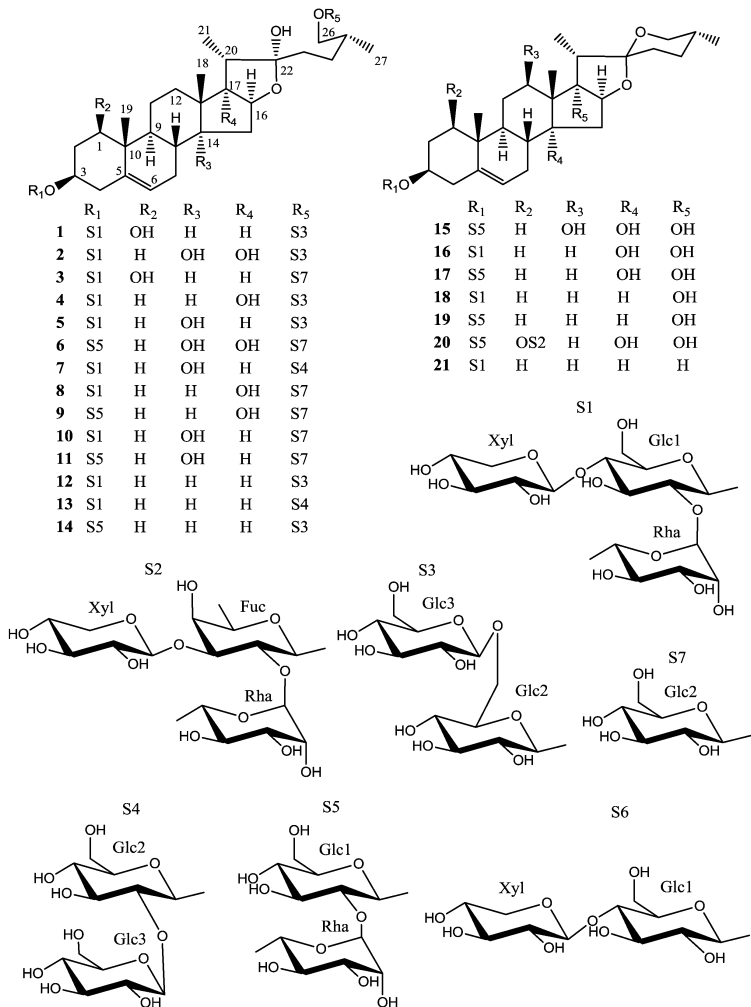


图 4 麦冬液质在线鉴定的甾体皂苷结构

Fig. 4 Steroidal saponins identified by UPLC-Q-TOF-MS^E from tubers of *Ophiopogonis Radix*

表 1 正离子模式和负离子模式下麦冬的化学成分鉴定

Table 1 Identification of chemical constituents from tubers of *Ophiopogonis Radix* by UPLC-Q-TOF-MS^E in both positive and negative modes

峰号	化合物	t_R /min	分子式	正离子模式	负离子模式
1	ophiopogonin Q	4.62	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₈	1 235.576 9, 1 217.587 2, 1 195.587 2, 1 063.536 5, 431.142 6, 287.165 4, 269.167 6, 251.173 9	1 257.590 8, 1 211.557 6, 1 193.530 9, 1 079.535 4, 917.481 3
2	ophiopogonin H	6.21	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₉	1 251.571 3, 1 233.549 4, 1 119.524 8, 1 101.504 0, 969.379 5, 447.194 2, 429.226 6, 411.285 3, 393.277 4, 267.164 3, 249.169 1	1 273.582 5, 1 227.623 2, 1 209.523 9, 1 141.541 3, 1 095.532 2, 1 077.517 6, 1 059.502 7, 915.464 4, 769.347 4, 463.226 7, 431.277 3
3	ophiofurospiside L	6.70	C ₅₀ H ₈₂ O ₂₃	1 073.521 9, 1 055.511 1, 1 033.530 9, 909.452, 871.472 5, 777.407 9, 727.352 2, 593.383 9, 431.315 9, 413.293 9, 395.268 1, 287.202 6, 269.194 2, 251.179 7	1 095.527 7, 1 049.522 3, 917.475 5, 903.471 4, 899.473 6, 771.408 8, 753.325 3, 591.317 7, 447.287 4, 429.292 9
4	ophiofurospiside C	7.53	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₈	1 235.571 3, 1 217.566 5, 1 103.532 2, 1 085.513 4, 431.214 9, 413.309 9, 395.295 0, 377.280 3, 269.184 8, 251.190 8	1 257.587 6, 1 211.583 4, 1 193.568 6, 1 079.536 4, 1 061.520 0, 917.480 3, 899.474 0, 753.350 8
5	ophiopogonin N	8.20	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₈	1 235.571 7, 1 217.563 2, 1 195.559 6, 1 103.524 4, 1 085.515 7, 395.294 3, 251.178 5	1 211.578 4, 1 079.541 1, 1 049.531 9, 917.480 7, 771.422 6, 591.355 0, 447.223 2
6	ophiofurospiside F	8.42	C ₄₅ H ₇₄ O ₂₀	957.472 4, 939.466 7, 917.482 1, 899.470 5, 737.420 5, 447.201 4, 429.209 3, 411.281 2, 393.265 5, 267.175 0, 249.171 1	979.481 6, 933.480 2, 915.459 5
7	ophiopogonin J	8.73	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₇	1 235.575 3, 1 217.564 3, 1 195.596 0, 1 103.534 9, 1 085.521 5, 1 063.538 0, 941.399 8, 413.302 5, 395.299 7, 251.179 0	1 211.596 1, 1 079.531 7, 1 049.527 3, 917.477 8, 771.422 1, 753.406 1, 591.360 5, 429.285 6
8	ophiofurospiside A	10.06	C ₅₀ H ₈₂ O ₂₃	1 073.522 1, 1 055.512 5, 1 033.529 8, 941.470 0, 923.470 7, 901.68 8, 759.459 8, 575.374 5, 413.315 3, 395.292 9, 251.183 0	1 095.531 5, 1 049.528 8, 1 031.483 3, 963.484 9, 917.482 2, 447.311 0
9	(20 <i>S</i> , 25 <i>R</i>)-26- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖-呋甾-5-烯-3 β ,17 α ,22 α ,26-,四羟基-3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -吡喃鼠李糖基-(1 \rightarrow 2)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	10.15	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₉	941.471 0, 923.470 7, 901.688 1, 575.374 5, 413.315 3, 395.292 9, 251.183 0	963.485 5, 917.479 3, 771.430 1, 755.429 8, 609.370 7, 447.309 2
10	ophiopogonin I	10.63	C ₅₀ H ₈₂ O ₂₃	1 073.523 4, 1 055.506 6, 1 033.530 9, 755.427 3, 593.260 7, 575.368 9, 431.288 0, 413.303 5, 395.295 1, 269.182 6, 251.166 1	1 095.533 1, 1 049.501 1, 917.483 9, 771.420 5, 755.430 1, 609.368 5, 591.250 6, 447.317 6, 429.298 5
11	ophiopogonin B	10.85	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₉	941.470 1, 923.465 4, 901.483 4, 883.467 0, 739.420 1, 721.383 4, 575.372 1, 413.297 8, 395.285 5, 269.181 2, 251.166 9	963.488 3, 917.481 1, 771.422 7, 755.428 5, 609.365 4, 447.313 3
12	ophiopogonin G	12.36	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₇	1 219.578 6, 1 201.566 0, 1 087.457 4, 1 073.493 8, 941.481 4, 415.301 2, 271.206 6, 253.193 1	1 241.598 1, 1 195.634 2, 1 063.539 9, 1 049.513 7, 1 033.537 0, 901.482 5, 755.424 4, 737.409 7, 575.367 8, 413.321 6
13	ophiopogonin F	12.81	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₇	1 219.583 9, 1 201.567 6, 1 087.540 8, 415.318 8, 397.307 7, 271.210 6, 253.201 7	1 195.595 5, 1 063.545 0, 1 033.533 9, 901.465, 871.462 3, 755.424 2, 737.414 2, 575.360 4, 413.295 6

续表 1

峰号	化合物	t_R /min	分子式	正离子模式	负离子模式
14	ophiofurospiside K	13.20	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₃	1 087.537 0, 1 069.520 9, 1 047.537 1, 885.482 5, 723.434 8, 577.373 4, 433.214 0, 415.298 0, 397.251 4, 379.211 2, 271.191 3, 253.191 3	1 109.551 4, 1 063.544 6, 901.485 4, 755.426 0, 737.413 7, 575.362 1, 413.289 6
15	ophiopogonin R	20.81	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₅	793.401 7, 775.383 9	815.410 2, 769.418 3, 623.349 4, 461.287 0, 443.267 8
16	ophiopogonin C	22.54	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₈	909.450 5, 869.463 1, 851.443 5, 737.418 6, 591.371 4, 429.298 7, 411.292 0, 393.284 2	931.459 2, 885.453 7, 753.401 1, 445.273 0
17	25R-Δ5(6)-烯-螺甾-3β,14α,17α-三羟基-3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷	22.94	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₄	777.408 8, 737.416 7, 719.404 2, 701.391 6, 631.304 4, 573.344 5, 411.291 5, 393.261 7	799.417 9, 753.408 1
18	25R-Δ5(6)-烯-螺甾-3β,17β-二羟基-3-O-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-[β-D-吡喃木糖基-(1→4)]-β-D-吡喃葡萄糖苷	26.12	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₇	893.454 1, 871.473 1, 853.470 1, 747.385 2, 721.428 5, 575.343 5, 413.308 4, 395.295 7	915.465 3, 869.457 0, 737.406 8
19	Tb	27.06	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₃	761.410 9, 739.430 8, 721.417 9, 575.386 4, 413.301 8, 251.172 2	783.422 2, 737.414 4, 719.207 6
20	ophiopogonin D	33.83	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆	877.462 6, 855.481 1, 731.402 4, 709.397 1, 577.380 1, 559.367 6, 413.308 4, 395.290 4	899.468 3, 853.461 8, 721.418 8, 575.364 1
21	ophiopogonin D'	34.88	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆	877.461 7, 855.479 4, 745.425 4, 723.436 5, 577.377 6, 415.325 4	899.471 0, 853.463 6, 721.422 2, 575.380 6

糖链连接位点的差别等情况,文献报道中多没有准确归属,仅以异构体表示。本实验中结合色谱保留规律对其中 3 组同分异构体呋甾皂苷的结构进行了准确归属(4,5,7,9,11,12,13)。本实验发现的色谱保留规律对将来麦冬中甾体皂苷同分异构体的表征及在线鉴定具有参考意义。保留时间 30~40 min 未鉴定的峰根据精确相对分子质量推测为麦冬中所含的高异黄酮类成分,由于本实验中所用的质谱条件适合于甾体皂苷,对高异黄酮类成分提供的碎片信息有限,所以未作进一步鉴定。

【参考文献】

[1] Kang L P, Yu K, Zhao Y, et al. Characterization of steroidal glycosides from the extract of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* by UPLC/Q-TOF-MS^E [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62(6): 235-249.

[2] Kang L P, Yu K, Pang X, et al. Characterization and identification of steroidal saponins from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* by ultra high-performance liquid chromatography and hybrid time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 74: 257-267.

[3] Zhao Y, Kang L P, Yu H S, et al. Structure characterization and identification of steroidal saponins

from the rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* by ultra performance liquid chromatography and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2013, S341/342(5): 7-17.

[4] Zhang T, Zou P, Kang L P, et al. Two novel furostanolsaponins from *Ophiopogon japonicus* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(9): 824-831.

[5] Zhang T, Kang L P, Yu H S, et al. Steroidal saponins from the tuber of *Ophiopogon japonicus* [J]. *Steroids*, 2012, 77(12): 1298-1305.

[6] Liu Y, Meng L Z, Xie S X, et al. Studies on chemical constituents of *Ophiopogon japonicus* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(10): 982-990.

[7] 孟玲芝. 麦冬化学成分研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2013.

[8] 刘奕训. 川麦冬中甾体皂苷类成分的研究[M]. 衡阳: 南华大学, 2013.

[9] Li N, Zhang L, Zeng K W, et al. Cytotoxic steroidal saponins from *Ophiopogon japonicus* [J]. *Steroids*, 2013, 78(1): 1-7.

[10] Wang J Z, Ming L, Chen X B, et al. A new C27-steroidal glycoside from *Ophiopogon japonicus* [J]. *Chin Chem Lett*, 2008, 19(1): 82-84.

【责任编辑 顾雪竹】