

UPLC/Q-TOF-MS/MS 鉴定西南银莲花中的皂苷类成分

郭宜城¹, 欧阳辉^{1*}, 何明珍², 梁起栋¹, 宋永贵², 饶小勇², 周欣³, 叶喜德³, 冯育林^{1,2*}, 杨世林^{1,2}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

3. 贵州师范大学 天然药物质量控制研究中心, 贵州 贵阳 550001

摘要: 目的 通过超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC/Q-TOF-MS/MS)联用技术,对西南银莲花 *Anemone davidii* 根茎的皂苷类化学成分进行鉴定。方法 采用 Welch C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相梯度洗脱进行色谱分离;质谱采用电喷雾(ESI)离子源,在负离子模式下采集数据,运行时间 40.25 min,使用质谱分析软件中的目标化合物筛查法,通过保留时间、精确相对分子质量和二级质谱裂解碎片鉴定监测到的化学成分。结果 包括常春藤型皂苷及齐墩果酸型皂苷在内的 52 个三萜皂苷类成分得到良好的分离和鉴定,47 个为该植物中首次发现,其中有 9 对同分异构体。结论 该方法快速、准确,为西南银莲花的化学成分鉴定提供一种新的策略。

关键词: 西南银莲花;超高效液相色谱-飞行时间质谱;三萜皂苷;齐墩果酸;常春藤皂苷元

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)10-1378-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.10.006

Identification of saponins in rhizomes of *Anemone davidii* by UPLC/Q-TOF-MS/MS

GUO Yi-cheng¹, OUYANG Hui¹, HE Ming-zhen², LIANG Qi-dong¹, SONG Yong-gui², RAO Xiao-yong², ZHOU Xin³, YE Xi-de³, FENG Yu-lin^{1,2}, YANG Shi-lin^{1,2}

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. National Pharmaceutical Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

3. Research Center for Quality Control of Natural Medicine, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

Abstract: Objective To identify the saponins in the rhizomes of *Anemone davidii* by ultra performance liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF-MS/MS). **Methods** The separation was performed on UPLC Welch C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), with a mobile phase using 0.1% acetonitrile (A) and water containing 0.1% formic acid (B) for gradient elution. Q-TOF/MS and electrospray ion (ESI) source were applied for the analysis under the negative ion mode, and the running time was 40.25 min. Using target compound screening method, the structures of monitored chemical constituents were identified by retention time, exact relative molecular mass, and cleavage fragments of MS/MS. **Results** Fifty-two triterpenoids were separated and identified from the methanol extract of *A. davidii*, 47 triterpenoids were identified for the first time from *A. davidii* among which nine pairs of structural isomers were included. **Conclusion** UPLC/Q-TOF-MS/MS method can identify the main chemical constituents from *A. davidii* rapidly and accurately, which develops a new strategy for identification of the chemical constituents in *A. davidii*.

Key words: *Anemone davidii* Franch.; ultra performance liquid chromatography couple with time-of-flight mass spectrometry; triterpenoid saponins; oleanic acid; hederagenin

西南银莲花 *Anemone davidii* Franch., 又名铜钱草(湖北)、铜骨七(四川)和钻骨风(贵州),属毛茛科银莲花属植物,生长于海拔 950~3 500 m 的山地中,分布于西南及湖北西部和湖南西北部。其

收稿日期: 2014-01-11

基金项目: 贵州省药物代谢研究平台建设项目(黔科合 ZY[2011]3013 号); 贵州省科技创新人才团队建设项目[黔科合人才团队(2011)4008]

作者简介: 郭宜城,男,江西中医药大学 2011 级硕士研究生,从事中药活性成分研究。E-mail: guoyicheng2013@163.com

*通信作者 冯育林 Tel: (0791)87119632 E-mail: fengyulin2003@126.com

欧阳辉 Tel: (0791)87119652 E-mail: huiouyang@163.com

根状茎具有活血止痛、祛瘀消肿和补肾之功效，可用于治疗跌打损伤、风湿痛、劳伤、阳痿和腰痛^[1]。目前，国内外对银莲花属植物的化学成分研究表明，该属植物富含五环三萜皂苷，尤其以齐墩果烷型皂苷为主，它们是银莲花属植物的特征成分^[2-4]，廖循等^[3]对西南银莲花根状茎和地上部分的化学成分进行研究，分离鉴定了7个三萜皂苷化合物。同时发现其中的2个三萜皂苷具有很强的抗肿瘤活性^[5]。因此，有必要对西南银莲花的皂苷类成分进行深入的研究。超高效液相色谱与飞行时间质谱联用(UPLC/Q-TOF-MS/MS)技术可以提供良好的分离效果及强大的结构表征能力，广泛运用到中药复杂成分的研究中^[6-7]。本实验以西南银莲花根茎为研究对象，采用UPLC/Q-TOF-MS/MS技术，鉴定了西南银莲花根茎提取物中包括常春藤皂苷元及齐墩果酸型皂苷在内的52个三萜皂苷类化合物，其中47个化合物为该植物中首次发现，9对化合物为同分异构体。

1 仪器与材料

超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(AB SCIEX Triple TOF 5600+; Foster City, CA); 岛津超高效液相色谱仪(Nexera UPLC LC—30A, 日本), 含在线真空脱气机, 高压二元梯度泵, 自动进样器, 柱温箱; Welch C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); Sartorius BT25S 型十万分之一电子分析天平(赛多利斯公司, 德国); KQ—500DE 型超声波清

洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

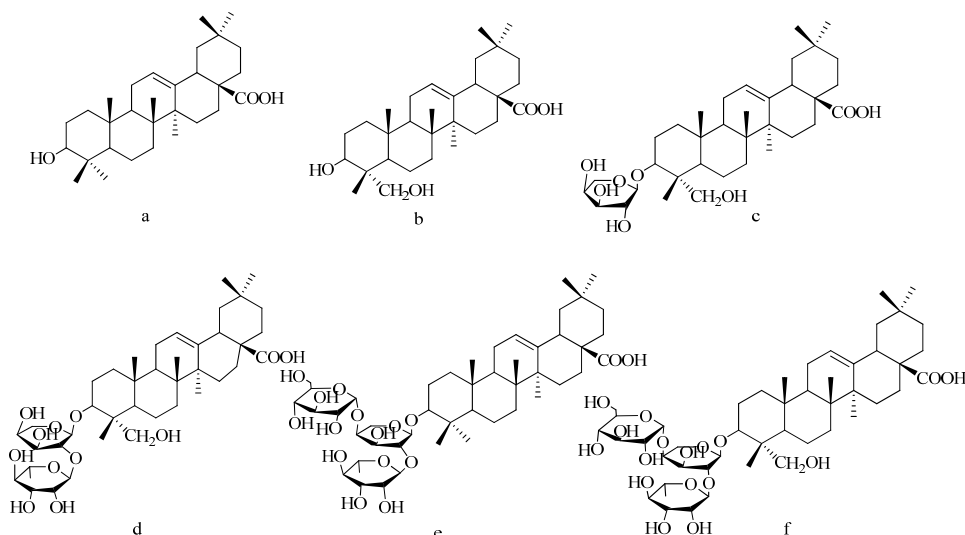
乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 水为 Milli-Q 系统纯化水(美国 Millipore 公司), 其余试剂为分析纯。对照品齐墩果酸($M_w=456.360\ 3$)、常春藤皂苷元($M_w=472.355\ 2$), 3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷($M_w=604.397\ 5$)、 α -常春藤皂苷元($M_w=796.460\ 9$)、3- α -L-吡喃鼠李糖(1→2)[β -D-吡喃葡萄糖-(1→4)]- α -L-吡喃阿拉伯糖 齐墩果酸皂苷(皂苷 X, $M_w=896.513\ 3$)、白头翁皂苷 D($M_w=912.508\ 3$)均为自制, 经 HPLC-ELSD 法测得质量分数均大于 98%, 所有化合物的化学结构见图 1。

西南银莲花干燥根茎由重庆中药研究院提供, 经南昌市食品药品检验所主管药师吴蓓鉴定为西南银莲花 *Anemone davidii* Franch. 的根茎。

2 实验方法

2.1 质谱条件

离子源为电喷雾离子化源(ESI), 负离子模式; 质量扫描范围 m/z 100~1 500; 喷雾电压: -4 500 V, 雾化气温度: 600 °C, 气帘气: 172.36 kPa, 雾化气和辅助气: 344.74 kPa; 去簇电压(DP): -120 V; 采用 TOF-MS-IDA-MS/MS 方法采集数据, TOF/MS 一级预扫描和触发的二级扫描 TOF/MS/MS 离子累积时间分别为 200、100 ms, CE 碰撞能量为 70 eV, CES 碰撞能量叠加为(70±15) eV, 触发二级的方法为 IDA, 多重质量亏损(MMDF)和动态背景扣除



a-齐墩果酸 b-常春藤皂苷元 c-常春藤皂苷元 3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖苷 d- α -常春藤皂苷 e-皂苷 X f-白头翁皂苷 D, 图 2 同
a-oleanic acid b-hederagenin c-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-hederagenin d- α -hederagenin e-saponin X f-pulsatilla saponin D, same as Fig. 2

图 1 6 个对照品的化学结构

Fig. 1 Structures of six reference substances

(DBS) 为触发二级的条件, 满足该条件的优先进行二级扫描。

2.2 液相条件

流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B), 以梯度洗脱, 0.1~2 min, 1% B; 2~5 min, 1%~20% B; 5~25 min, 20%~40% B; 25~33 min, 40%~90% B; 33~37 min, 90% B; 37.1~40.25 min, 10% B。采用 UPLC Welch C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 体积流量 0.25 mL/min, 柱温箱控温 45 °C, 进样量 2.0 μL。

2.3 样品制备及检测

西南银莲花根茎 50 g 粉碎后, 以 10 倍量 95% 乙醇回流提取 3 次, 每次 1 h, 将提取液滤过合并, 减压回收溶剂得到总浸膏, 总浸膏用 50 mL 甲醇超声溶解, 溶液用 2.2 μm 微孔滤膜滤过后进样分析。

3 结果与分析

通过 Scifinder 数据库对该属植物中的化合物进行检索, 得到西南银莲花根茎中潜在的化学成分数据库。采用 Analyst TF1.6 和 Peakview (Version 1.2, AB SCIEX) 软件对根茎提取物的质谱数据进行处。依据测定相对分子质量与理论精确相对分子质量的偏差小于 5×10^{-6} 的原则, 确定各色谱峰对应化确定各色谱峰对应化合物的分子式, 在已建立的银莲花属植物化学成分数据库中检索匹配的化合物。

3.1 对照品质谱行为分析

将 6 个对照品混合溶于甲醇, 在“2.1”项分析条件下进行 MS/MS 分析, 得到总离子流图 (图 2-A)。对应总离子流图中峰 52 为齐墩果酸 ($t_R =$

34.43 min)、峰 45 为常春藤皂苷元 ($t_R = 31.49$ min)、峰 38 为常春藤皂苷元 3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖苷 ($t_R = 29.60$ min)、峰 33 为 α -常春藤皂苷 ($t_R = 29.16$ min)、峰 37 为皂苷 X ($t_R = 29.54$ min)、峰 26 为白头翁皂苷 D ($t_R = 27.7$ min)。根据母核的区别, 将对照品分为 2 种类型, 对照品齐墩果酸和皂苷 X 为齐墩果酸型, 常春藤皂苷元、常春藤皂苷元 3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖苷、 α -常春藤皂苷和白头翁皂苷 D 为常春藤皂苷型。为了进一步的研究齐墩果酸型和常春藤皂苷型三萜皂苷在负离子模式下的裂解行为, 以对照品皂苷 X 和白头翁皂苷 D 为例, 详细的阐述该类化合物的质谱裂解规律。

3.1.1 白头翁皂苷 D 的 MS/MS 分析 如图 2-B 所示, 白头翁皂苷 D 在负离子模式下给出明显的母离子峰 m/z 911.500 0 $[M-H]^-$, 给出 m/z 765.440 0, 749.448 4, 603.390 0, 471.348 3 碎片, 分别对应 $[M-H-Rha]^-$, $[M-H-Glc]^-$, $[M-H-Rha-Glc]^-$ 和 $[M-H-Rha-Glc-Ara]^-$ 。 m/z 585.379 4 比碎片离子 $[M-H-Rha-Glc]^-$ 少 18, 为阿拉伯糖环上羟基与邻位结合脱去 1 分子水产生的碎片离子。 m/z 423.325 0 为碎片离子 m/z 471.379 4 脱去 C-3 羟基位和 C-4 位羟甲基形成双键产生的碎片, 裂解途径分析见图 3-A。通过对白头翁皂苷 D 的 MS/MS 分析, 常春藤皂苷型化合物能给出显著的分子离子峰 $[M-H]^-$, 该类化合物的裂解方式通常为 C-3 位的糖苷键和 C-28 位的糖酯键依次断裂, 最后都能得到稳定的母核碎片离子常春藤皂苷元。碎片离子 m/z 471.348 3 可以作为该类化合物的特征诊断离子。

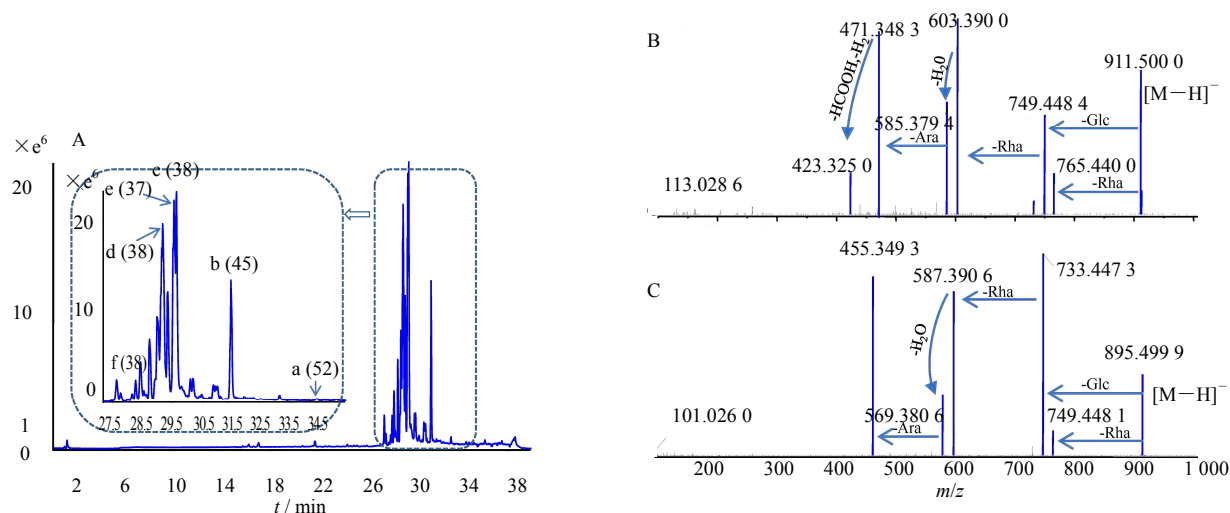


图2 对照品混合液的总离子流图 (A) 及白头翁皂苷 D (B) 和皂苷 X (C) 的 MS/MS 图谱

Fig. 2 Total ion currents for mixed reference substances (A) and MS/MS spectra of *Pulsatilla* saponin D (B) and saponin X (C)

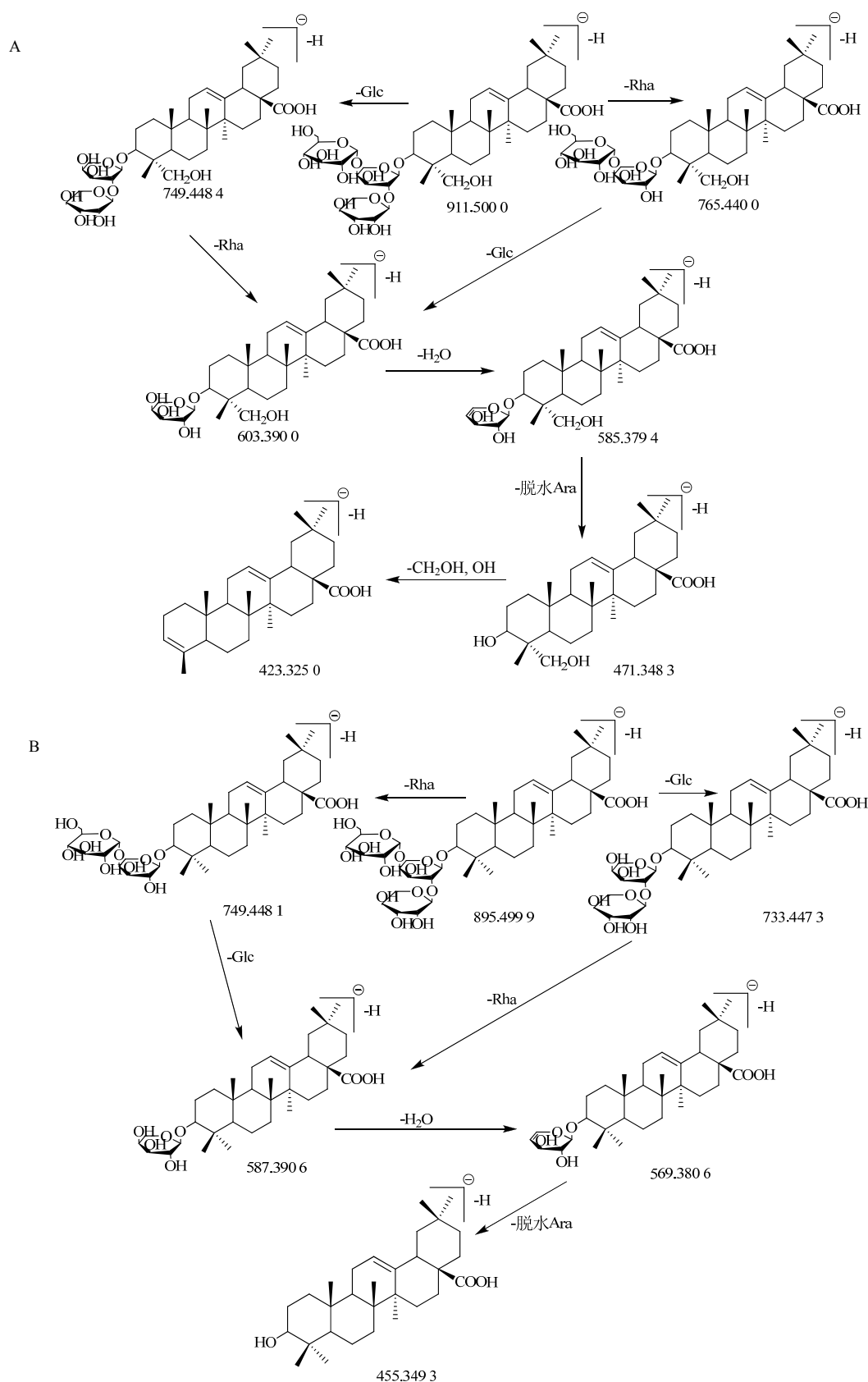


图 3 白头翁皂苷 D (A) 和皂苷 X (B) 的裂解途径

Fig. 3 Fragmentation pathway for *Pulsatilla* saponin D (A) and saponin X (B)

3.1.2 皂苷 X 的 MS/MS 分析 如图 2-C 所示, 皂苷 X 在负离子模式下给出明显的母离子峰 m/z 895.499 9 $[M-H]^-$, 对分子离子峰进行 MS 裂解分析, 给出 m/z 749.448 1, 733.447 3, 587.390 6 的碎片离子, 分别对应为 $[M-H-Rha]^-$, $[M-H-Glc]^-$, $[M-H-Rha-Glc]^-$ 。 m/z 101.026 0 为葡萄糖的裂解碎片^[6], m/z 569.380 6 比碎片离子 $[M-H-Rha-Glc]^-$ 少 18, 根据结构可以判断为阿拉伯糖环上羟基与邻位结合脱去 1 分子水产生的碎片, m/z 455.349 3 比 $[M-H]^-$ 少 440, 为 $[M-H-Glc-Rha-Ara]^-$ 产生的碎片, 即脱去取代基上全部的糖苷, 为齐墩果酸, 裂解途径分析见图 3-B。

通过对皂苷 X 的 MS/MS 分析, 齐墩果酸皂苷化合物容易得到丰度较大的分子离子峰 $[M-H]^-$, 同时在负离子模式下可能给出加成峰 $[M+HCOO]^-$ 。该类化合物的裂解方式通常为 C-3 位上的糖苷键容易首先发生断裂^[6], 继而其他取代位置上的基团裂解, 最后都能得到稳定的苷元碎片离子齐墩果酸。因此碎片离子 m/z 455.349 3 可以作为该类化合物的特征离子。

3.2 西南银莲花化学成分的 MS/MS 分析

在西南银莲花提取物中共鉴定 52 个色谱峰, 负离子模式下的总离子流图见图 4。其中 47 个化合物在该植物中首次发现, 结果见表 1。然后对同分异构体进行鉴别, 通过二级质谱获得化合物的碎片信息, 推测离子的裂解情况, 结合数据库中各化合物的结构, 区分同分异构体 9 对, 结果见表 2。

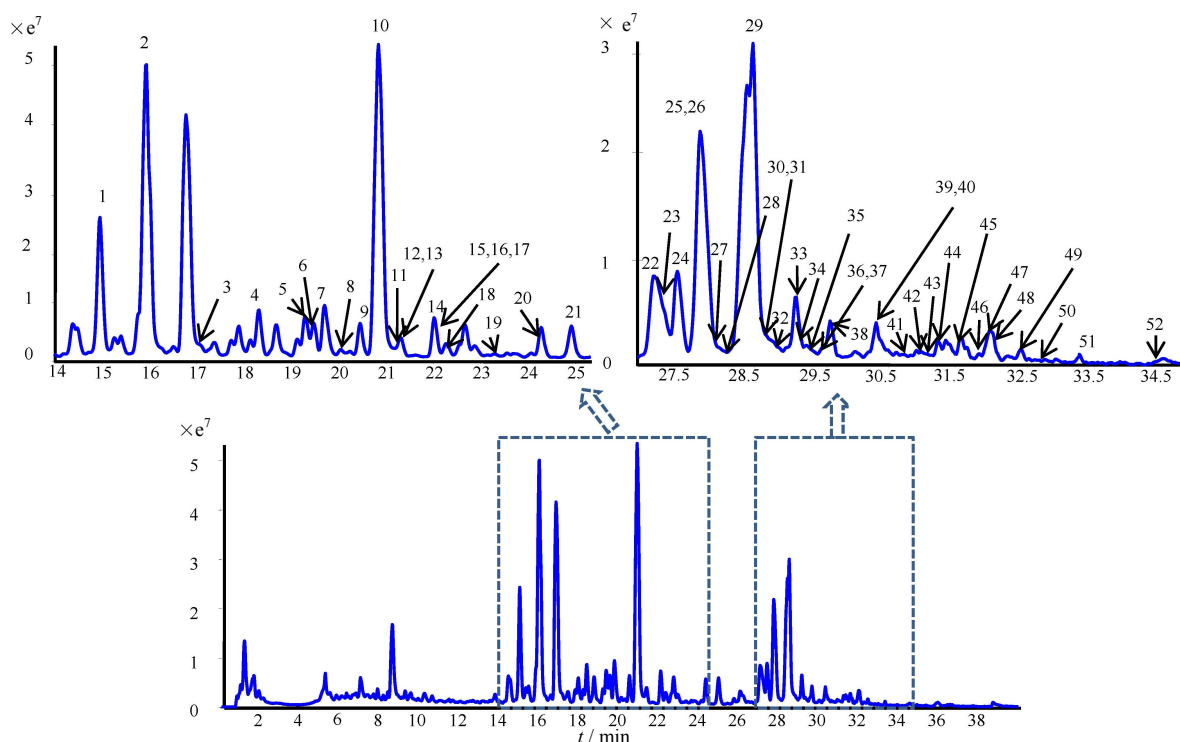


图 4 西南银莲花提取物的 TOF-MS 总离子流图

Fig. 4 TOF-MS total ion chromatogram of extract from *A. davidii*

3.2.1 以齐墩果酸为母核的皂苷化合物 MS/MS 分析 峰 52 为齐墩果酸, 峰 37 为皂苷 X。峰 42 给出了与皂苷 X 相同的分子离子峰, 碎片离子也相同, 参考保留时间, 判断为皂苷 X 的同分异构体, 检索数据库推断峰 42 为竹节香附素 A^[4]。峰 15 给出 m/z 865.495 5 $[M-H]^-$ 和 m/z 911.500 9 $[M+HCOO]^-$ 的离子峰, 确定分子式为 $C_{46}H_{74}O_{15}$, 对其分子离子峰 m/z 865.495 5 $[M-H]^-$ 进行 MS/MS 分析, 得到了 5 个碎片 m/z 733.452 1, 587.393 7, 569.383 3, 455.351 1,

101.024 5, 分别对应 $[M-H-Ara]^-$, $[M-H-Ara-Rha]^-$, $[M-H-Ara-Rha-H_2O]^-$, $[M-H-Ara-Rha-Rib]^-$ 和葡萄糖裂解碎片。参照保留时间和对照品以及在数据库中的检索, 判断峰 15 为 prosapogenin CP4^[8]。同样的方法运用于峰 18, 峰 18 给出 m/z 1 071.545 4 分子离子峰和 m/z 1 117.543 6 的加成峰, 根据 MS/MS 碎片数据, 推断母核上连接了 2 个葡萄糖基、1 个鼠李糖基和 1 个阿拉伯糖基, 推断峰 18 为 rivularinin^[14]。

表1 西南银莲花根茎提取物的化学成分鉴定结果

Table 1 Identification of chemical constituents from rhizomes of *A. davidii*

峰号	t_R / min	检测离子 [M-H] ⁻ /[M-HCOO] ⁻	分子式	二级碎片	鉴别结果	参考文献
1	14.95	1 381.664 5/1 427.670 0	C ₆₅ H ₁₀₆ O ₃₁		卵叶银莲花苷 D ^a	9
2	15.92	1 235.606 6/1 281.612 1	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₇		红毛七皂苷 F ^a	10
3	17.37	1 351.653 9/1 397.659 4	C ₆₄ H ₁₀₄ O ₃₀		huzhangoside D	11
5	19.33	1 498.719 1/—	C ₇₀ H ₁₁₄ O ₃₄		打破碗花花苷 D ^a	12
8	20.07	1 365.669 6/1 411.675 1	C ₆₅ H ₁₀₆ O ₃₀		竹节香附皂苷 R8 ^a	4
9	20.58	899.500 9/945.506 4	C ₄₆ H ₇₆ O ₁₇	737.451 6, 576.402 7, 472.361 3, 101.024 5	常春藤皂苷元 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃核糖-(1→3)-α- <i>L</i> -吡喃葡萄糖基-(1→2)-α- <i>L</i> -吡喃阿拉伯糖苷 ^a	11
11	21.25	—/1 249.622 2	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₅		常春藤皂苷 B	3
12	21.31	1 219.611 7/—	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₆	1 074.558 0, 1 057.546 4, 749.446 2, 587.393 0, 469.154 1, 455.349 7, 101.026 8	刺楸皂苷 B	13
13	21.31	1 265.617 1/1 311.622 6	C ₆₀ H ₉₈ O ₂₈	1 119.561 8, 957.499 2, 795.454 5, 663.805 5, 619.385 4, 487.258 2, 471.994 5	安徽银莲花皂苷 B ^a	2
15	22.03	865.495 5/911.500 9	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₅	733.452 1, 587.393 7, 569.383 3, 455.351 1, 101.024 5	prosapogenin CP4 ^a	8
18	22.30	1 071.545 4/1 117.543 6	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₂	941.421 5, 925.447 2, 765.439 9, 633.402 0, 603.389 8, 471.348 9	rivularinin ^a	14
19	23.45	955.490 8/1 001.496 2	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	763.428 8, 747.432 3, 601.375 1, 471.348 9, 469.332 4, 101.026 3	齐墩果酸 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖醛酸 28- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖-(1→6)-β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 ^a	15
20	24.16	1 103.564 3/1 149.569 8	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₃	957.500 2, 942.524 4, 865.507 3, 733.449 1, 469.154 9, 454.341 1, 323.096 4	齐墩果酸 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖醛酸甲酯 28- <i>O</i> -α- <i>L</i> -吡喃鼠李糖-(1→4)-β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖-(1→6)-β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 ^a	16
21	24.86	941.518 8/987.517 0	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	795.452 1, 633.399 3, 471.346 0	常春藤皂苷元 28- <i>O</i> -α- <i>L</i> -吡喃鼠李糖-(1→4)- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖-(1→6)-β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 ^a	9
23	27.16	1 043.543 2/1 089.548 7	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₁	881.489 0, 765.441 5, 603.387 9, 471.345 5	打破碗花花苷 C ^a	13
25	27.70	957.506 4/1 003.511 9	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉	911.496 5, 765.440 3, 749.443 9, 603.386 2, 585.376 1, 471.344 4, 423.324 9	常春藤皂苷元 2β-羟基-28- <i>O</i> -α- <i>L</i> -吡喃鼠李糖-(1→4)-β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖 ^a	17
27	27.84	897.485 3/943.490 8	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₇	765.444 0, 747.430 6, 603.386 4, 471.347 1, 423.325 5	anemonerivulariside A ^a	18
28	27.98	—/1 087.533 0	C ₅₂ H ₈₂ O ₂₁	763.426 7, 601.372 7, 469.331 5, 471.348 1	卵叶银莲花苷 C ^a	19
30	28.66	633.400 8/679.406 2	C ₃₆ H ₅₈ O ₉	453.407 6, 471.347 5	常春藤皂苷元 28- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 ^a	20
31	28.67	909.485 3/955.490 8	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₇	765.442 0, 747.431 0, 603.388 2, 471.346 0, 423.328 9	narcissiflorinine ^a	21
33	29.16	749.448 15/795.453 63	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	603.387 4, 585.377 8, 471.346 3, 423.325 6	α-常春藤皂苷 ^{a, b}	
34	29.33	—/825.464 2	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	779.452 8, 617.402 9, 599.392 4, 471.344 6, 439.316 2, 101.024 7	齐墩果酸 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃半乳糖基-(1→3)-β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 ^a	22
35	29.35	1 203.616 7/1 249.622 2	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₅	1 057.583 8, 895.494 0, 733.452 0, 587.383 5, 455.355 5, 437.286 6	竹节香附素 D ^a	23

续表 1

峰号	t_R / min	检测离子 [M-H] ⁻ /[M-HCOO] ⁻	分子式	二级碎片	鉴别结果	参考文献
36	29.53	1 057.558 8/1 103.564 3	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₁	895.494 2, 733.452 1, 587.391 6, 569.386 6, 455.353 2	刺五加皂苷 C3 ^a	9
38	29.60	603.390 2/649.395 7	C ₃₅ H ₅₆ O ₈	471.346 8, 101.023 8	常春藤皂苷元 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -吡喃阿拉伯糖苷 ^{a,b}	
39	30.27	795.453 6/841.466 3	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	633.398 8, 471.343 6, 101.024 2	安徽银莲花皂苷 A ^a	24
41	30.74	—/781.474 3	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₁	735.469 5, 573.420 8, 441.336 3, 101.026 6	齐墩果酸 3- <i>O</i> - α - <i>L</i> -吡喃鼠李糖-(1→2)- β - <i>D</i> -吡喃阿拉伯糖苷 ^a	16
43	31.10	601.410 9/647.416 4	C ₃₆ H ₅₈ O ₇	455.423 5	齐墩果酸 3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃鼠李糖苷 ^a	25
44	31.20	927.532 28/973.537 75	C ₄₈ H ₈₀ O ₁₇	765.478 8, 603.426 4, 457.364 9, 101.027 8	齐墩果酸 28- <i>O</i> - α - <i>L</i> -吡喃鼠李糖基-(1→4)- <i>O</i> - β -吡喃葡萄糖基-(1→6)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷 ^a	16
45	31.49	471.347 9/517.353 4	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	423.313 1	常春藤皂苷元 ^{a,b}	
46	31.86	925.516 6/—	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₇		cussonoside B ^a	9
48	32.19	487.342 9/533.348 3	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	471.284 8	2 α , 3 β , 23-三羟基-12-烯-28-齐墩果酸皂苷 ^a	26
51	33.27	485.327 2/531.332 7	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	467.316 1, 423.327 0	青钱柳酸 B ^a	27
52	34.43	455.353 0/501.358 5	C ₃₀ H ₄₈ O ₃		齐墩果酸 ^{a,b}	

a-首次从该植物中发现的化合物 b-对照品化合物, 下表同

a-compounds of firstly discovered in *A. davidii* b-reference substance, same as following table

峰 35 显示的分子离子峰 m/z 1 203.616 7 [M-H]⁻, 可以确定分子式为 C₅₉H₉₆O₂₅, 产生了碎片离子 m/z 1 057.583 8, 895.494 0, 733.452 0, 587.383 5, 455.355 5, 437.286 6, 对应 [M-H-Rha]⁻, [M-H-Rha-Glc]⁻, [M-H-Rha-Glc-Glc]⁻, [M-H-Rha-Glc-Glc-Rha]⁻和 [M-H-Rha-Glc-Glc-Rha-H₂O]⁻。可以看到齐墩果酸型化合物的特征离子 m/z 455.355 5 的存在, 同时 m/z 895.494 0 和对照品皂苷 X 的分子离子峰相近, 结合数据库匹配, 推断峰 35 为竹节香附素 D^[23]。

峰 12、20 的 MS/MS 数据见表 1, 2 个峰分别给出了特征碎片 m/z 455.349 7, 455.341 1, 可以判断为齐墩果酸型化合物, 碎片类型都以糖苷键断裂为主, 脱去包括葡萄糖、鼠李糖和阿拉伯糖。参考对照品皂苷 X 的裂解规律, 和数据库检索推断峰 12、20 分别为刺楸皂苷 B^[13]和齐墩果酸 3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖醛酸甲酯 28-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖-(1→4)- β -*D*-吡喃葡萄糖-(1→6)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷^[16]。

峰 36 的分子离子峰为 m/z 1 057.558 8 [M-H]⁻, 加成峰为 m/z 1 103.564 3 [M+HCOO]⁻, 产生了碎片离子 m/z 895.494 2, 733.452 1, 587.391 6, 569.386 6, 455.353 2, 对应 [M-H-Glc]⁻, [M-H-Glc-Glc]⁻, [M-H-Glc-Glc-Rha]⁻, [M-H-Glc-Glc-Rha-H₂O]⁻和 [M-H-Glc-Glc-Rha-Ara]⁻。推断峰 36 为刺五加皂苷 C3^[9]。峰 41 的分子离子峰 m/z 781.474 37 [M+HCOO]⁻, 同样的

方法推断峰 41 为齐墩果酸 3-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖-(1→2)- β -*D*-吡喃阿拉伯糖苷^[16]。

峰 40 和 47 的分子离子峰分别为 m/z 587.395 3 和 m/z 587.394 6, 化学式为 C₃₅H₅₆O₇, 比齐墩果酸多 162, 推测为齐墩果酸分子上连接了 1 分子葡萄糖, 二级碎片离子有 m/z 455.313 6 [M-H-Glc]⁻和 m/z 455.281 5 [M-H-Xyl]⁻。峰 49、50 具有相同的分子式, 显示的分子离子峰为 m/z 779.458 7 [M+HCOO]⁻和 m/z 779.455 7 [M+HCOO]⁻的加成峰。峰 40、47 和峰 49、50 判断为 2 对同分异构体, 结合保留时间以及与数据库匹配, 推断峰 40 和 47 为 fatsiaside A^[9]或齐墩果酸 3-*O*- β -*D*-吡喃木糖苷^[28], 峰 49 和 50 为五加苷 K^[4]或竹节香附素 B^[29]。峰 43 的分子离子峰为 m/z 601.410 9, 比齐墩果酸多 146, 为齐墩果酸上连接鼠李糖基的化合物, 推断为齐墩果酸 3-*O*- β -*D*-吡喃鼠李糖苷^[25]。

3.2.2 以常春藤皂苷为母核的皂苷化合物 MS/MS 分析 峰 26、33、38、45 分别对应对照品白头翁皂苷 D、 α -常春藤皂苷、常春藤皂苷元 3-*O*- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷、常春藤皂苷元。峰 7 的分子离子峰为 m/z 911.500 9, 与白头翁皂苷 D 相似, 并具有相同的碎片离子, 为白头翁皂苷 D 的同分异构体, 检索数据库, 推断为常春藤皂苷元 3-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖基-(1→3)- α -*L*-吡喃鼠李糖基-(1→2)- α -*L*-吡喃阿拉伯糖苷^[30]。

峰 4 和 14 在负离子模式下离子化后的分子离子峰为 m/z 1 073.553 2 [M-H]⁻和 1 073.553 8 [M-

表 2 西南银莲花根茎提取物中的同分异构体鉴定结果

Table 2 Identification of isomers from extract of rhizomes of *A. davidii*

组别	峰号	t_R / min	检测离子 [M-H] ⁻ /[M-HCOO] ⁻	分子式	二级碎片	鉴定结果	参考文献
ISO 1	4	18.30	1 073.553 2/1 119.558 0	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₂	911.506 0, 749.424 5, 603.387 4, 469.155 8, 451.141 1, 471.345 2, 101.102 6	川续断皂苷乙 ^a 或红毛七皂苷 D ^a	31
	14	22.02	1 073.553 8/1 119.559 2	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₂	911.506 8, 749.425 0, 603.387 6, 469.156 2, 451.140 7, 471.345 6, 101.102 9	川续断皂苷乙 ^a 或红毛七皂苷 D ^a	9
ISO 2	6	19.36	881.497 6/927.495 89	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₆	765.439 1, 603.387 2, 471.346 4, 423.327 1	prosapogenin CP6 或常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃核糖-(1→3)-α-L-吡喃葡萄糖-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 ^a	32
	32	28.79	881.490 4/927.495 89	C ₄₆ H ₇₄ O ₁₆	765.439 6, 603.387 9, 471.346 9, 423.326 2	prosapogenin CP6 或常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃核糖-(1→3)-α-L-吡喃葡萄糖-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 ^a	17
ISO 3	7	19.71	911.500 9/957.506 4	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	765.439 3, 749.447 2, 603.388 0, 585.379 0, 471.345 2, 439.320 5, 423.323 5	常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-(1→3)-α-L-吡喃鼠李糖基-(1→2)-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 ^a	30
	26	27.70	911.500 0/-	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	765.440 0, 749.448 4, 603.390 0, 585.379 4, 471.348 3, 423.325 0	白头翁皂苷 D ^{a,b}	
ISO 4	10	20.84	927.494 7/973.501 37	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	765.442 3, 603.388 3, 499.341 7, 471.345 7, 275.077 7, 101.027 6	木通皂苷 D ^a 或常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖-(1→2) [β-D-吡喃葡萄糖-(1→4)]-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 ^a	33
	22	27.02	927.495 8/973.501 37	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	835.359 5, 765.454 0, 749.429 2, 603.390 1, 557.347 4, 471.346 5, 113.025 2	木通皂苷 D ^a 或常春藤皂苷元 3-O-β-D-吡喃葡萄糖-(1→2) [β-D-吡喃葡萄糖-(1→4)]-α-L-吡喃阿拉伯糖苷 ^a	10
ISO 5	16	22.04	1 335.658 3/1 381.664 53	C ₆₄ H ₁₀₄ O ₂₉		huzhangoside B ^a 或 huzhangoside C ^a	8
	17	22.04	1 335.659 0/1 381.664 53	C ₆₄ H ₁₀₄ O ₂₉		huzhangoside B ^a 或 huzhangoside C ^a	8
ISO 6	24	27.34	765.441 2/811.448 55	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	603.386 2, 471.344 4	牡丹草皂苷 B ^a 或 HN-saponin F ^a	9
	29	28.43	765.443 1/811.448 55	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₃	603.389 2, 471.345 8, 101.025 7	牡丹草皂苷 B ^a 或 HN-saponin F ^a	10
ISO 7	37	29.54	895.499 9/941.511 54	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₆	749.448 1, 733.447 3, 587.390 6, 569.380 6, 455.349 3, 101.026 0	saponin X ^{a,b}	
	42	31.03	895.509 3/941.511 54	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₆	733.453 6, 587.453 6, 455.351 2	竹节香附素 A ^a	4
ISO 8	40	30.27	587.395 3/633.400 81	C ₃₅ H ₅₆ O ₇	455.313 6	齐墩果酸 3-O-β-D-吡喃木糖苷 ^a 或 fatsiaside A ^a	9
	47	31.96	587.394 6/633.400 81	C ₃₅ H ₅₆ O ₇	455.281 5	齐墩果酸 3-O-β-D-吡喃木糖苷 ^a 或 fatsiaside A ^a	28
ISO 9	49	32.40	-/779.458 7	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₁	733.452 3, 571.397 4	五加苷 K 或竹节香附素 B ^a	4
	50	32.74	-/779.455 7	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₁	733.450 6, 571.396 1	五加苷 K 或竹节香附素 B ^a	29

H]⁻, 同时能检测到加成峰 m/z 1 119.558 0 [M+HCOO]⁻ 和 1 119.559 2 [M+HCOO]⁻, 判断其分子式为 C₅₃H₈₆O₂₂, 峰 4 的碎片离子峰有 m/z 911.506 0 [M-H-Glc]⁻, 749.424 5 [M-H-Glc-Glc]⁻, 603.387 4 [M-H-Glc-Glc-Rha]⁻, 471.345 2 [M-

H-Glc-Glc-Rha-Ara]⁻, m/z 469.155 8 为常春藤皂苷元在高碰撞能量条件下环上脱去 2 分子 H 形成双键产生的碎片离子, m/z 451.141 1 为碎片 m/z 469.155 8 脱去 1 分子水的碎片, m/z 101.026 0 为葡萄糖残基的裂解碎片, 同时给出了常春藤皂苷类合

物的特征碎片离子 m/z 471.345 2。峰 14 的二级碎片离子与峰 4 相似。推断峰 4 和 14 为 1 对同分异构,取代基上糖类型一致,取代位置存在差异。根据 MS 和 MS/MS 数据以及与数据库的对照,推断峰 4 和 14 分别为川续断皂苷乙^[31]或红毛七皂苷 D^[9]。

通过与对照品白头翁皂苷 D 的 MS/MS 碎片比较分析,峰 23 的分子离子峰 m/z 1 043.543 2,比白头翁皂苷 D 多 132,给出了 m/z 881.489 0 $[M-H-Glc]^-$ 的峰,其余碎片与白头翁皂苷 D 相同,判断峰 23 化合物为打破碗花花苷 C^[13]。峰 21 的分子离子峰 m/z 941.518 8,产生碎片离子 795.452 1 $[M-H-Rha]^-$, 633.399 3 $[M-H-Rha-Glc]^-$ 和 471.346 0 $[M-H-Rha-Glc-Glc]^-$,推断母核上连接了 2 分子的葡萄糖基和 1 分子鼠李糖基。峰 9、25、27、39 的 MS/MS 数据见表 1,在建立的银莲花属植物化学成分数据库中进行检索,推断峰 9、21、25、27、39 分别为常春藤皂苷元 3-*O*- β -D-吡喃核糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷^[11]、常春藤皂苷元 28-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- β -吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-吡喃葡萄糖苷^[9]、常春藤皂苷元 2 β -羟基-28-*O*- α -L-吡喃鼠李糖基-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-吡喃葡萄糖苷^[17]、anemonerivulariside^[18]、安徽银莲花皂苷 A^[24]。

峰 6、32,峰 10、22 和峰 24、29 为 3 对同分异构体,具有相似的分子离子峰,通过对比保留时间得到分子的极性差异以及与对照品白头翁皂苷 D 和常春藤皂苷元 3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖苷的碎片比较,分析 MS/MS 数据,推断出峰 6 和 32 为 prosapogenin CP6^[32]或常春藤皂苷元 3-*O*- β -D-吡喃核糖基-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-吡喃葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-吡喃阿拉伯糖苷^[17]。峰 10 和 22 为常春藤皂苷元 3-*O*- β -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 2) [β -D-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-吡喃阿拉伯糖苷^[33]或木通皂苷 D^[10]。峰 24 和 29 为牡丹草皂苷 B^[9]或 HN-saponin F^[10]。

峰 30 给出了 m/z 633.400 8 $[M-H]^-$ 分子离子峰和 m/z 679.406 2 $[M+HCOO]^-$ 的加成峰,相对分子质量比 3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷多 30,比常春藤皂苷多 162,同时给出了 C-28 酯键裂解特征碎片 m/z 453.407 6 $[M-H-Glc-H_2O]^-$,推断峰 30 化合物为 28-*O*- β -D-吡喃鼠葡萄糖常春藤皂苷^[20]。

4 讨论

本实验基于化合物的精确相对分子质量,分析不同类型皂苷的质谱行为,总结质谱裂解规律,从

西南银莲花根茎提取物中共确定了 52 个化合物,其中 47 个在该植物中首次发现,包括 9 对同分异构。UPLC/Q-TOF-MS/MS 技术的运用,给西南银莲花根茎的化学成分鉴定提供了一种高效、准确的的分析方法,该方法能够在较短时间内完成化学成分分析的工作,避免了从粗提物纯化才能鉴别的繁琐过程,同时实现西南银莲花药材多组分的良好分离并提供各峰的组成和结构信息,为西南银莲花根茎药效物质基础及其作用机制研究提供了数据支撑。然而与其他的分析方法一样,该方法存在一定的局限性,如无法提供化合物的几何构型,无法准确的判断糖基的连接位置。为了获得化合物的准确结构,需要进一步结合核磁共振技术进行分析。

参考文献

- [1] 张惠源,张志英. 中国中药资源志要 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [2] 曹 沛, 吴凤镔, 丁立生. 银莲花属植物的化学及药理研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(6): 581-584.
- [3] 廖 循, 李伯刚, 高小品, 等. 西南银莲花的活性三萜皂苷 [J]. 中草药, 2001, 32(6): 493-496.
- [4] 匡海学, 田振坤, 张 宁. 两头尖的化学成分研究 (II) [J]. 化学学报, 1984, 42(3): 253-258.
- [5] 彭树林, 廖 循, 王昉彤, 等. 西南银莲花皂苷的抗肿瘤作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(5): 60-62.
- [6] Zhu J B, Guo X J, Fu S P, et al. Characterization of steroidal saponins in crude extracts from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright by ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 462-474.
- [7] Qi L W, Wan H Y, Zhang H, et al. Diagnostic ion filtering to characterize ginseng saponins by rapid liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1230(23): 93-99.
- [8] Liao X, Peng S L, Li B G, et al. A new triterpenoid saponin from *Anemone tomentosa* [J]. *Chin Chem Lett*, 1999, 10(12): 1035-1037.
- [9] Li L M, Liao X, Peng S L, et al. Triterpenoid saponins from *Anemone Begoniifolia* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2004, 6(3): 211-215.
- [10] 廖 循, 李伯刚, 丁立生, 等. 复伞银莲花中的三萜皂甙 [J]. 有机化学, 2001, 21(4): 299-304.
- [11] 廖 循, 李伯刚, 王明奎, 等. 草玉梅中的化学成分 [J]. 高等学校化学学报, 2001, 22(8): 1338-1341.

- [12] Wang M K, Chen Y Z, Wu F E. Triterpenoid saponins from *Anemone hupehensis* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 34(5): 1395-1397.
- [13] 王明奎, 陈耀祖, 吴凤镔. 打破碗花花中三萜皂苷的研究 [J]. 化学学报, 1994, 52(6): 609-612.
- [14] Tiwari K P, Singh R B. Rivularinin, a new saponin from *Anemone rivularis* [J]. *Phytochemistry*, 1978, 17(11): 1991-1994.
- [15] 韩林涛, 黄芳. 鹅掌草根茎三萜皂苷类成分研究 [J]. 中药材, 2009, 32(7): 1059-1061.
- [16] 张兰天, 高石喜久, 张彦文, 等. 地乌中的三萜皂苷类成分 [J]. 中国中药志, 2008, 33(14): 1696-1699.
- [17] Liu J Y, Guan Y L, Zou L B, et al. Saponins with neuroprotective effects from the roots of *Pulsatilla cernua* [J]. *Molecules*, 2012, 17(5): 5520-5531.
- [18] Minh C T A, Nguyen M K, Thuong P T, et al. A new saponin and other constituents from *Anemone rivularis* Buch.-Ham. [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 44: 270-274.
- [19] 廖循, 李伯刚, 丁立生, 等. 卵叶银莲花全草中的新三萜皂苷 [J]. 药学报, 2000, 35(11): 821-825.
- [20] Quang T H, Ngan N T T, Minh C V, et al. Cytotoxic triterpene saponins from the stem bark of *Kalopanax pictus* [J]. *Phytochem Lett*, 2012, 5(1): 177-182.
- [21] Masood M, Minocha P K, Tiwari K P, et al. Narcissiflorine, narcissiflorinine and narcissifloridine, three triterpene saponins from *Anemone narcissiflora* [J]. *Phytochemistry*, 1981, 20(7): 1675-1679.
- [22] Hu H B, Zheng X D, Jian Y F, et al. Constituents of the root of *Anemone tomentosa* [J]. *Arch Pharmacol Res*, 2011, 34(7): 1097-1105.
- [23] 吴凤镔, 朱子清. 中药竹节香附化学成分的研究 (V) [J]. 化学学报, 1985, 43(1): 82-86.
- [24] Ye W C, Zhang Q W, Pan G S, et al. Two unusual oleanane saponins from *Anemone anhuiensis* [J]. *Planta Med*, 2001, 67(6): 590-592.
- [25] Tiwari K P, Masood M, Rathore Y K S. Chemical constituents of *Anemone narcissifloralinn* [J]. *Indian Chem Soc*, 1979, 56(10): 1041-1042.
- [26] 贾远敏, 陈重, 许琼明, 等. 毛酸浆果的化学成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1086-1090.
- [27] 崔保松, 李帅. 青钱柳叶的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2132-2136.
- [28] 王俊儒, 彭树林, 王明奎, 等. 大火草根部的化学成分 [J]. 植物学报, 1999, 41(1): 107-110.
- [29] 吴凤镔, 朱子清. 中药竹节香附化学成分的研究 (III) [J]. 高等学校化学学报, 1985, 6(1): 36-40.
- [30] Chen Y Q, Xu Q M, Liu Y L, et al. Laboratory evaluation of the molluscicidal activity of *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel saponins against the snail *Oncomelania hupensis* [J]. *Biomed Environ Sci*, 2012, 25(2): 224-229.
- [31] 杨运云, 邓洁薇, 吴庆晖, 等. 邓老凉茶颗粒的超高效液相色谱质谱联用指纹图谱研究 [J]. 分析测试学报, 2011, 31(12): 1493-1498.
- [32] Yan L H, Xu L Z, Lin J, et al. Triterpenoid saponins from the stems of *Clematis parviloba* [J]. *Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(4): 332-338.
- [33] 孙辉, 李茜, 叶文才, 等. 兴安白头翁根茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2008, 39(6): 819-822.