

基于 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 的黄芩中黄酮碳苷的结构表征及同分异构体的区分

谢彤¹, 徐建亚¹, 沈存思¹, 狄留庆², 汪受传¹, 单进军^{1,2*}

1. 南京中医药大学中医儿科学研究所, 江苏省儿童呼吸疾病(中医药)重点实验室, 江苏 南京 210023

2. 南京中医药大学药学院, 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏, 南京 210023

摘要: 目的 建立黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 分析测定方法, 研究黄芩中黄酮碳苷类成分, 并区分其中的同分异构体。方法 采集 Orbitrap 全扫描的质谱图, 并触发动态数据依赖分析模式采集二级、三级和四级的碎片信息, 通过图谱解析确定黄酮碳苷的结果, 通过比对碎片信息区分同分异构体。结果 在黄芩中共鉴定表征了 19 个黄酮碳苷类成分, 并对其中的同分异构体进行区分。结论 该方法能够准确地筛选黄芩中的黄酮碳苷类成分, 并对同分异构体进行区分, 为其他中药的成分分析提供参考。

关键词: 黄芩; 黄酮碳苷; UPLC/LTQ-Orbitrap-MS; 同分异构体; 结构表征

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)22-3318-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.22.006

Structural characterization of C-glycosyl flavonoids in *Scutellaria baicalensis* and differentiation of isomers by UPLC/LTQ-Orbitrap-MS

XIE Tong¹, XU Jian-ya¹, SHEN Cun-si¹, DI Liu-qing², WANG Shou-chuan¹, SHAN Jin-jun^{1,2}

1. Jiangsu Key Laboratory of Pediatric Respiratory Disease, Institute of Pediatrics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Provincial TCM Engineering Technology Research Center of High Efficient Drug Delivery System, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective An UPLC-LTQ-Orbitrap-MS spectrometry method has been developed for the efficient separation and detection of C-glycosyl flavonoids in the extract of *Scutellaria baicalensis* differentiation of isomers. **Methods** Data were acquired by Orbitrap. MS², MS³, and MS⁴ data were triggered by data-dependent acquisition mode. Isomers of C-glycosyl flavonoids were distinguished by a comparison study of mass distribution. **Results** A total of 19 compounds were identified as C-glycosyl flavonoids, and several isomers were successfully discriminated. **Conclusion** This method is proved to be powerful for the identification of C-glycosyl flavonoids and provides the important complementary information for other flavonoid analysis.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; C-glycosyl flavonoids; UPLC/LTQ-Orbitrap-MS; isomers; structural characterization

黄酮碳苷(C-glycosyl flavonoids)是指糖基以 C-C 键直接连接在黄酮母体上的一类化合物。目前发现的黄酮碳苷类结构中,糖基主要连接在 A 环的 C-6 和/或 C-8 位。近来也有文献报道了一些糖基连接在 C 环 C-3 位和 B 环 C-4'位的碳苷结构。根据结构的不同,黄酮碳苷主要分为 2 种类型:单糖碳苷黄酮和双糖碳苷黄酮,此外还存在着 O-糖基-C-糖

基黄酮(O-glycosyl-C-glycosyl flavonoids)以及 O-乙酰化-C-糖基黄酮(O-acylated-C-glycosyl flavonoids)的结构类型^[1]。黄酮碳苷中苷元部分主要有黄酮、黄烷酮、黄酮醇、二氢查耳酮和双黄酮等。黄酮碳苷与黄酮氧苷不同,不易发生水解,具有广泛的药理活性,主要表现为抗氧化、抗炎、抑制血糖增高、抗溃疡、中枢神经保护等功效。因此,近来黄酮碳

收稿日期: 2015-05-17

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81303295); 国家自然科学基金面上项目(81373688); 江苏省高校自然科学研究面上项目(13KJB360005)

作者简介: 谢彤(1985—),女,博士,研究方向为中药多组分分析。Tel: (025)85811330 E-mail: sunnyxyl1021@163.com

*通信作者 单进军,男,副研究员,主要从事代谢组学研究。Tel: (025)85811330 E-mail: dfsjj@163.com

苷受到越来越广泛的关注^[2-4]。

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 是临床上常用的一种清热燥湿、泻火解毒的传统中药，酚类化合物是其发挥药效的主要活性成分。现代质谱分析方法的快速发展使得能够广泛地表征黄芩多种组分的可能结构。Liu 等^[4]利用离子阱质谱鉴定了黄芩中 32 个黄酮类结构；Wang 等^[5]通过高丰度成分剔除的方法筛选出黄芩中 117 个低丰度的黄酮结构。这些基于质谱的广谱分析取得了很大的成果，从黄芩中筛选出了一部分具有明显效应的黄酮成分，却忽视了黄芩中碳苷黄酮的筛选和结构鉴别。本实验采用 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 高分辨率质谱仪，表征黄芩中的黄酮碳苷类成分，并通过比较 MS²、MS³ 和 MS⁴ 的碎片离子丰度对其中的同分异构体进行区分。该研究为其他中药成分中的碳苷结构解析提供参考依据。

1 仪器与材料

超高效液相 U3000 (美国戴安公司)-质谱联用仪 LTQ-Orbitrap XL 质谱仪 (美国 Thermo 公司)；实验室超纯水机 (Millipore Direct-Q3, 美国 Merck Millipore 化工技术有限公司)；Eppendorf Centrifuge 5417R 离心机 (德国 Eppendorf 公司)；EYELA OSB2100 真空旋转蒸发仪 (东京理化器械株式会社)；BT25S 电子天平 (赛多利斯科学仪器有限公司)。乙腈 (色谱纯, Merck 公司)；水为自制纯净水 (Millipore Direct-Q3 制备)；甲酸 (色谱纯, DIKMA 公司, 美国) 其他试剂均为分析纯。

黄芩药材购自铜陵禾田中药饮片股份有限公司 (批号 20130916)，经南京中医药大学药学院中药鉴定教研室刘圣金博士鉴定为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Thermo BDS Hypersil C₁₈ 反相色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 2.3 μm)；流动相由 A (0.1% 甲酸水溶液) 和 B (0.1% 甲酸乙腈溶液) 组成；梯度洗脱程序：0~3 min, 10% B；3~40 min, 10%~50% B；40~44 min, 50%~80% B；44~46 min, 10% B。柱温 35 ℃；进样体积 5 μL；体积流量 0.25 mL/min。

2.2 质谱条件

喷雾电压为 3.5 kV；加热毛细管温度为 300 ℃；雾化温度为 350 ℃；鞘气为 275 kPa；辅助气为 104 kPa。进样前利用标准溶液对 Orbitrap 质量分析器的质量数进行校准。样品首先通过 Orbitrap 分析器进

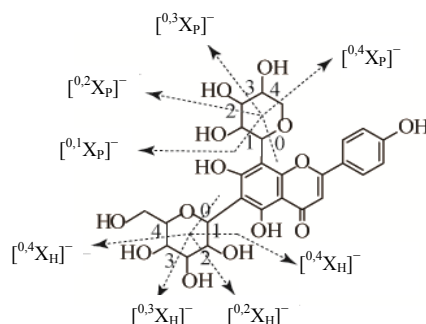
行全扫描分析，质量范围设定为 m/z 200~800，分辨率设为 30 000；MS²、MS³ 和 MS⁴ 质谱的触发方式为动态数据依赖分析模式 (data-dependent acquisition mode)，选取上一级最高峰进行碰撞诱导碎裂解离 (collision induced dissociation, CID) 碎片扫描，碰撞能量设定为 30%，以离子阱打拿极检测。

2.3 药材提取及测定

取黄芩约 10.0 g，精密称定，加 70% 乙醇 100 mL，加热回流 3 h，放冷，滤过，滤液置烧杯中，用少量 70% 乙醇分次洗涤容器和残渣，洗液滤置同烧杯中。滤液置于真空旋转蒸发仪中浓缩，浓缩液置 10 mL 量瓶中，用少量水分次洗涤容器和残渣，洗液置同一量瓶中，加水至刻度，摇匀。吸取供试样品 200 μL，20 000 r/min 离心 10 min，转移上清溶液至进样瓶中，取 5 μL 注入 UPLC/LTQ-Orbitrap 仪器，测定。

3 结果与分析

为了能够更全面地筛选出黄芩中的黄酮碳苷类成分，本实验在正、负离子模式 2 种检测条件下进行化合物筛选和结构表征。文献报道^[6-8]，黄酮碳苷与黄酮氧苷不同，在 CID 条件下，糖残基内部发生裂解 (图 1)，连续丢失 2 或 3 个水分子形成特征性 $[M\pm H-18]^{+/-}$ 、 $[M\pm H-36]^{+/-}$ 和 $[M\pm H-54]^{+/-}$ 等碎片。这些特征碎片离子可以作为诊断离子与黄酮氧苷进行区别。通过诊断离子扫描 (图 2)，本实验在黄芩中共检测到 19 个黄酮碳苷，其中有 2 个单糖碳苷、11 个双糖碳苷、1 个氧苷-碳苷黄酮、4 个黄烷酮碳苷 (C-glycosyl flavanones)、1 个二氢查耳酮碳苷。相应的碎片信息见表 1。



下标 P 表示戊糖基碎裂，G 表示葡萄糖基碎裂，H 表示己糖基碎裂，D 表示脱氧己糖碎裂，下同
subscript of P stand for pentosyl, G for glycosyl, H for hexosyl, and D for deoxy-hexosyl, same as below

图 1 芹菜素 6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷的碎裂途径
Fig. 1 Fragmentation pattern of apigenin-6-C-glucosyl-8-C-arabinoside

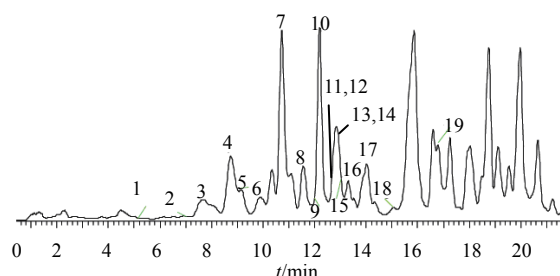


图2 黄芩中的黄酮碳苷类成分的总离子流图

Fig. 2 TIC of C-glycosyl flavonoids from *S. baicalensis*

3.1 单糖黄酮碳苷的结构鉴定和同分异构体的区分

16 和 19 号峰在正离子扫描模式下均产生 m/z 417.118 4 ($C_{21}H_{21}O_9$) 的加质子峰。MS² 谱图中产生较高丰度的碎片离子 m/z 321.2 ($[^{0.4}X_G-H_2O]^+$)、297.3 ($[^{0.2}X_G]^+$)、279.3 ($[^{0.2}X_G-H_2O]^+$) 和 267.2 ($[^{0.1}X_G]^+$)，由己糖碎裂产生。由此推断苷元结构可能与葡萄糖相连，根据质荷比所推测的分子式，其苷元部分为白杨素。化合物 16 和 19 的结构可能为白杨素葡萄糖碳苷。文献报道^[8-9]，通过比对同分异

表1 UPLC/LTQ-Orbitrap 检测黄芩中碳苷黄酮的碎片信息

Table 1 Fragmentation information of C-glycosyl flavonoids in extract by UPLC/LTQ-Orbitrap

峰号	t_R/min	碎片离子	m/z	MS ²	MS ³	MS ⁴
1	5.55	$[M+H]^+$	597.1811	417.2, 459.2, 477.2, 525.2, 543.2, 561.2, 579.1*	393.0, 441.2, 543.0, 561.1	
		$[M-H]^-$	595.1638	209.1, 239.1, 269.1, 311.3, 329.2, 355.3, 385.3, 415.3, 449.2, 457.2, 475.1*, 487.2, 505.2, 559.4, 577.3	209.0, 239.0, 329.2, 355.2*, 439.3, 457.4	144.7, 181.0, 191.0, 209.0, 234.8
2	7.12	$[M+H]^+$	565.1529	355.4, 379.3, 391.3, 409.4, 427.3, 445.2, 457.4, 475.4, 481.2, 499.2, 511.3, 529.2*, 547.1	307.1, 325.2, 391.3, 409.2, 427.1, 445.1, 481.2, 493.2, 511.2*	307.2, 349.2, 373.3, 379.2, 391.3, 409.2, 427.1, 433.3, 445.4, 463.2, 475.2, 493.3
		$[M-H]^-$	563.1370	353.2, 383.3, 425.2, 413.2, 425.3, 443.2, 455.3, 473.2*, 485.3, 503.3, 527.4, 545.4	259.1, 297.2, 311.2, 325.3, 353.2*, 383.3, 395.1, 413.2, 437.2, 425.2	163.2, 191.0, 233.1, 253.1, 297.2, 307.2, 325.2, 335.3
3	7.77	$[M+H]^+$	565.1512	307.2, 325.3, 355.4, 379.3, 397.4, 409.4, 427.3, 445.2, 457.3, 469.4, 481.4, 499.4, 511.3, 529.2, 547.4*	379.2, 397.3, 409.3, 427.3, 451.2, 457.3, 469.3, 481.2, 493.2, 499.1, 511.2, 529.2*	337.3, 349.2, 391.3, 397.1, 409.3, 427.3, 439.3, 451.3, 481.2, 493.3, 499.3, 511.2
		$[M-H]^-$	563.1397	353.2, 383.2, 413.2, 425.2, 443.3*, 473.2, 485.2, 503.2, 515.3, 545.3	311.2, 323.2, 335.2, 353.2*, 365.2, 383.1, 395.2, 407.2, 413.2, 425.3	163.1, 191.1, 233.0, 265.1, 297.2, 307.1, 325.2
4	8.82	$[M+H]^+$	567.1675	283.3, 322.5, 387.1, 411.1, 429.0, 435.7, 441.1, 447.2, 459.2, 483.3, 495.2, 501.4, 513.3, 531.2, 549.3*	321.3, 363.4, 393.1, 411.2, 465.1, 495.2, 513.2, 531.2*	393.2, 411.3, 441.2, 453.3, 465.4, 495.3, 513.3
		$[M-H]^-$	565.1530	209.2, 239.1, 269.1, 299.1, 329.3, 355.1, 385.2*, 415.2, 445.2, 475.1, 487.2, 505.3, 547.3	150.9, 167.1, 239.2*, 367.2	81.1, 100.8, 122.9, 137.1, 153.0, 167.0, 179.0, 209.1, 221.2
5	9.12	$[M+H]^+$	579.1666	339.3, 393.3, 423.3, 441.3, 459.2, 483.3, 495.2, 507.3, 513.3, 525.3, 543.1, 561.1*	363.3, 405.2, 423.2, 441.2*, 465.3, 483.2, 495.2, 513.2, 525.3, 543.2	291.3, 309.3, 363.2, 393.3, 405.3, 423.3
		$[M-H]^-$	577.1524	337.2, 415.1, 439.2, 457.3*, 487.2, 559.4	267.2, 295.1, 319.2, 337.2*, 367.4, 429.2	163.1, 190.9, 281.1, 309.1
6	9.91	$[M+H]^+$	567.1675	411.2, 429.2, 441.2, 447.0, 453.2, 459.1, 465.2, 495.2, 513.2, 531.2, 549.2*	393.2, 411.2, 429.3, 465.2, 495.1, 513.1, 531.2*	393.2, 411.3, 441.2, 453.3, 465.4, 483.2, 495.3, 513.3
		$[M-H]^-$	565.1531	209.1, 239.1, 269.2, 299.1, 329.1, 355.2, 385.2*, 415.3, 419.2, 427.3, 445.3, 475.2, 547.3	167.1, 178.9, 209.0, 221.0, 239.0*, 265.1, 313.3, 357.2, 367.1	106.7, 122.6, 153.1, 167.0, 179.2, 195.1, 209.1, 221.0
7	10.72	$[M+H]^+$	549.1584	291.3, 309.3, 363.5, 393.2, 411.1*, 429.2, 459.4, 465.2, 483.2, 495.2, 513.2, 531.2	279.2, 291.1, 309.2, 321.3, 333.2, 363.1, 375.2, 393.2*	279.2, 291.2, 309.2, 321.2, 357.2, 375.2
		$[M-H]^-$	547.1412	337.1, 367.2, 379.2, 409.3, 427.3, 457.2*, 487.2, 499.4, 511.3, 529.4	281.1, 309.2, 337.1*, 367.3, 397.5	281.3, 309.1
8	11.55	$[M+H]^+$	549.1572	363.3, 375.4, 393.4, 411.3*, 429.3, 441.3, 459.3, 465.3, 483.3, 495.3, 513.2, 531.1	279.1, 309.1, 321.2, 333.2, 363.1, 375.2, 393.1*	279.2, 309.1, 321.3, 331.3, 347.2, 357.2, 375.1
		$[M-H]^-$	547.1435	319.2, 337.2, 349.3, 367.2, 409.2, 427.3, 457.2*, 487.3, 499.3, 517.4, 529.3	281.2, 309.0, 337.1*, 367.3, 397.4	281.0, 309.1
9	11.95	$[M+H]^+$	435.1288	279.2, 297.1, 315.1, 321.2, 339.3, 351.2, 363.2, 369.0, 381.1, 391.0, 399.2, 417.2*	219.1, 255.2, 267.1, 279.1, 297.1*, 321.3, 339.2, 351.2, 363.1, 381.2, 399.2	177.0, 194.9, 211.1, 219.1, 226.9, 240.1, 251.1, 268.1, 279.1
		$[M-H]^-$	433.1138	167.0, 197.1, 269.1, 287.1, 313.1*, 343.2, 415.2	123.1, 139.1, 167.0	80.9, 122.9, 125.0

续表 1

峰号	t_R/min	碎片离子	m/z	MS^2	MS^3	MS^4
10	12.19	$[M+H]^+$	549.1586	363.4, 381.3, 399.3, 411.3, 429.2, 441.3, 453.1, 465.3, 483.2, 495.3, 513.2, 531.1*	363.2, 381.3, 393.2, 399.1, 435.1, 441.1, 453.2, 465.2, 477.3, 483.2, 495.1, 513.1*	381.1, 423.3, 435.4, 447.3, 465.2, 477.2, 495.1
		$[M-H]^-$	547.1414	337.2, 367.3, 379.3, 397.3, 427.3*, 439.2, 457.3, 469.3, 487.4, 499.3, 511.3, 529.2	281.2, 309.3, 337.1*, 367.2	281.2, 309.2
11	12.68	$[M+H]^+$	579.1696	399.4, 423.3, 441.2, 459.3, 465.3, 495.2, 513.2, 525.3, 543.4*, 561.1	339.2, 405.3, 423.2, 441.2, 459.2, 495.2, 507.3, 525.2*	321.3, 393.1, 405.1, 441.1, 459.2, 471.3, 477.2, 489.2, 507.2
		$[M-H]^-$	577.1589	267.0, 295.1, 337.2, 367.3, 397.2, 439.2, 457.3, 487.3*, 517.3, 529.4, 541.2, 559.2	339.2, 367.2*, 397.3, 427.2, 469.3	190.9, 235.1, 296.2, 311.2, 324.2, 339.2
12	12.77	$[M+H]^+$	549.1574	363.4, 381.4, 393.4, 411.4, 429.3, 441.3, 453.3, 465.3, 483.3, 495.3, 513.2, 531.2*	363.3, 381.3, 393.2, 417.3, 423.3, 435.3, 441.3, 453.3, 465.2, 477.3, 483.1*, 495.2	351.3, 381.1, 393.2, 399.2, 465.1
		$[M-H]^-$	547.1435	309.1, 319.3, 337.2, 349.1, 367.2, 379.2, 397.3, 427.2*, 439.2, 457.2, 469.2, 487.4, 511.3, 529.3	191.1, 221.0, 245.1, 309.3, 337.2*, 349.3, 367.1, 391.2, 409.3	163.2, 191.0, 281.2, 309.2
13	12.85	$[M+H]^+$	583.1989	283.1, 301.3, 325.3, 337.3, 367.2, 403.2, 421.1*, 445.1, 469.4, 511.2, 529.0, 547.3, 565.4	258.9, 301.2, 325.2, 367.1, 385.3, 403.1	
		$[M-H]^-$	581.1841	299.3, 329.1, 461.2*, 491.2, 563.4, 563.4	167.1, 191.0, 299.1*, 323.1, 341.1, 353.4	124.9, 167.0, 215.2, 229.2, 255.1, 271.2
14	13.00	$[M+H]^+$	579.1697	255.3, 267.2, 297.2, 321.2, 351.0, 363.2, 381.2, 399.3, 417.2*, 459.2, 513.1, 525.2, 543.1, 561.2	267.1, 297.1, 321.1, 351.2, 363.2, 381.1, 399.2*	267.2, 321.2, 351.1, 363.1, 381.1
		$[M+H]^+$	563.1757	339.4, 363.4, 389.4, 407.3, 425.2, 441.3, 459.2, 465.3, 483.3, 509.2, 527.1*, 545.2	321.2, 363.4, 389.3, 407.1, 511.3, 431.3, 443.3, 465.4, 483.3, 491.2, 509.2*	359.3, 371.3, 377.3, 389.3, 411.2, 431.2, 443.3, 455.4, 476.3, 491.2
15	13.04	$[M+H]^+$	563.1757	339.4, 363.4, 389.4, 407.3, 425.2, 441.3, 459.2, 465.3, 483.3, 509.2, 527.1*, 545.2	321.2, 363.4, 389.3, 407.1, 511.3, 431.3, 443.3, 465.4, 483.3, 491.2, 509.2*	359.3, 371.3, 377.3, 389.3, 411.2, 431.2, 443.3, 455.4, 476.3, 491.2
		$[M-H]^-$	561.1626	337.2, 349.2, 367.3, 379.3, 397.3, 441.3, 457.3*, 471.2, 487.3, 499.3, 517.3, 525.4, 543.3	281.3, 295.1, 309.2, 337.2*, 349.3, 367.3	281.1, 309.1
16	13.28	$[M+H]^+$	417.1181	267.2, 279.1, 297.2, 321.3, 351.2, 363.2, 381.2, 399.2*	267.3, 279.1, 297.0, 321.1*, 339.1, 351.1, 363.1, 381.2	219.1, 293.2
		$[M-H]^-$	415.1013	267.3, 295.1*, 307.4, 325.2, 337.3	149.0, 187.1, 227.1, 251.2, 267.1*	165.0, 180.0, 194.9, 199.1, 223.1
17	13.84	$[M+H]^+$	579.1699	411.3, 417.4, 423.4, 429.2, 441.3, 453.4, 459.3, 471.3, 483.3, 495.4, 513.3, 525.3, 543.3, 561.2*	393.4, 411.3, 429.3, 453.3, 465.2, 471.2, 483.2, 495.2, 507.3, 513.1*, 525.2, 543.2	309.2, 339.3, 381.3, 393.2, 411.3, 429.2, 495.2
		$[M-H]^-$	577.1563	367.2, 397.1, 457.2*, 487.2, 559.1	337.1, 367.1*, 379.2, 397.1	279.1, 311.2, 324.1, 339.1
18	15.39	$[M+H]^+$	563.1741	379.2, 411.4, 425.4, 441.2, 449.3, 467.2, 479.2, 497.3, 509.3, 527.2, 545.1*	363.3, 393.3, 423.2, 441.2*, 449.2, 467.2, 479.3, 491.2, 497.2, 509.3, 527.2	309.1, 321.2, 363.2, 393.0, 405.4, 423.2
		$[M-H]^-$	561.1618	337.1, 349.3, 367.2, 379.3, 423.2, 441.3*, 457.2, 471.2, 483.3, 501.3, 513.4, 543.3	281.3, 309.3, 337.2*, 349.3, 367.2, 379.1, 409.4, 423.4	191.2, 281.1, 309.2
19	16.84	$[M+H]^+$	417.1184	267.0, 297.2, 321.2, 351.1, 363.1, 381.1, 399.2*	267.1, 321.1*, 351.1, 363.2, 381.2	265.1, 293.1
		$[M-H]^-$	415.1012	267.3, 295.2*, 325.1, 337.2, 397.2	149.1, 185.1, 223.1, 267.2*, 277.1	120.9, 145.1, 167.1, 181.1, 195.1, 211.1, 223.1, 239.1

*为下一级裂解碎片的母离子

*parent ion for next stage fragmentation

构体的碎片丰度可以区分 C-6 和 C-8 葡萄糖碳苷，如牡荆黄素 (vitexin, apigenin-8-C-glucoside) 和异牡荆黄素 (isovitexin, apigenin-6-C-glucoside) 以及荭草苷 (orientin, lutelin-8-C-glucoside) 和异荭草苷 (isoorientin, lutelin-6-C-glucoside)。表 2 给出了化合物 **16** 和 **19** 在正负离子下产生 MS^2 碎片离子的丰

度。结果表明，化合物 **19** 在负离子模式下产生 m/z 397.4 ($[M-H-H_2O]^-$ ，相对丰度 2.1%) 和 m/z 325.1 ($[^{03}X_G]^-$ ，相对丰度 19.4%)，而 16 号峰没有扫描到 m/z 397.4。这些信息提示化合物 **19** 为白杨素 6-C-葡萄糖苷。相应的，推测化合物 **16** 为白杨素 8-C-葡萄糖苷。这些结果与 Ferreres 等^[6]和 Li 等^[8]的报

表2 6-C-葡萄糖黄酮和8-C-葡萄糖黄酮在MS²中碎片离子的相对丰度Table 2 Relative abundances of fragments obtained from 6-C-glucosyl flavonoid and 8-C-glucosyl flavonoid in MS²

碎片离子	<i>m/z</i>	相对丰度/%	
		16	19
正离子			
[M+H-H ₂ O] ⁺	[M+H-18] ⁺	100.0	100.0
[M+H-2H ₂ O] ⁺	[M+H-36] ⁺	34.2	26.8
[M+H-3H ₂ O] ⁺	[M+H-54] ⁺	9.6	25.1
[^{2,3} X _G -2H ₂ O] ⁺	[M+H-66] ⁺	35.5	73.3
[^{0,4} X _G -2H ₂ O] ⁺	[M+H-96] ⁺	10.6	43.3
[^{0,2} X _G] ⁺	[M+H-120] ⁺	20.8	40.5
[^{0,2} X _G -H ₂ O] ⁺	[M+H-138] ⁺	3.9	—
[^{0,1} X _G] ⁺	[M+H-150] ⁺	2.7	—
负离子			
[M+H-H ₂ O] ⁻	[M-H-18] ⁻	—	2.1
[^{0,4} X _G -H ₂ O] ⁻	[M-H-78] ⁻	—	1.8
[^{0,3} X _G] ⁻	[M-H-90] ⁻	1.6	19.4
[^{0,2} X _G] ⁻	[M-H-120] ⁻	100.0	100.0
[^{0,2} X _G -CO] ⁻	[M-H-148] ⁻	1.6	—

表3 6-C-戊糖-8-C-葡萄糖黄酮和6-C-葡萄糖-8-C-戊糖黄酮在MS²中碎片离子的相对丰度Table 3 Relative abundances of fragments obtained from 6-C-pentosyl-8-C-glucosyl flavonoids and 6-C-glucosyl-8-C-pentosyl flavonoids in MS²

碎片离子	<i>m/z</i>	相对丰度/%							
		2	3	7	8	10	12	11	17
正离子									
[M+H-H ₂ O] ⁺	[M+H-18] ⁺	99.5	100.0	75.0	72.7	100.0	100.0	100.0	100.0
[M+H-2H ₂ O] ⁺	[M+H-36] ⁺	100.0	20.6	86.5	81.1	23.3	27.4	97.0	21.1
[M+H-3H ₂ O] ⁺	[M+H-54] ⁺	75.6	10.2	80.7	78.5	10.9	13.2	65.1	7.5
[^{2,3} X _G / ^{0,4} X _P -2H ₂ O] ⁺	[M+H-66] ⁺	34.0	27.0	24.4	24.9	27.9	32.3	28.2	22.3
[^{2,3} X _G / ^{0,4} X _P -3H ₂ O] ⁺	[M+H-84] ⁺	23.4	9.4	30.8	30.6	12.5	15.3	17.5	7.8
[^{0,3} X _G / ^{0,2} X _P] ⁺	[M+H-90] ⁺	8.4	—	8.3	7.1	—	—	7.2	—
[^{0,4} X _G / ^{0,3} X _P -2H ₂ O] ⁺	[M+H-96] ⁺	—	11.3	—	—	11.8	15.0	—	9.6
[^{0,3} X _G / ^{0,2} X _P -H ₂ O] ⁺	[M+H-108] ⁺	4.1	11.7	4.0	4.4	16.4	19.7	2.5	9.7
[^{0,2} X _G / ^{0,1} X _P] ⁺	[M+H-120] ⁺	8.9	11.1	9.7	9.4	14.0	15.2	5.9	9.1
[^{0,2} X _G / ^{0,1} X _P -H ₂ O] ⁺	[M+H-138] ⁺	87.9	3.2	100.0	100.0	2.3	3.2	75.3	1.7
[^{0,2} X _G / ^{0,1} X _P -2H ₂ O] ⁺	[M+H-156] ⁺	18.5	1.4	18.8	19.6	1.5	2.1	16.6	1.1
负离子									
[M-H-H ₂ O] ⁻	[M-H-18] ⁻	25.7	12.8	25.4	23.4	10.1	6.9	23.0	12.2
[M-H-CH ₂ O] ⁻	[M-H-30] ⁻	3.9	—	4.2	4.2	—	—	2.8	—
[^{0,3} X _P] ⁻	[M-H-60] ⁻	71.1	12.5	75.6	88.4	5.9	7.4	50.9	3.8
[^{0,3} X _G]/[^{0,2} X _P] ⁻	[M-H-90] ⁻	100.0	67.9	100.0	100.0	55.7	68.1	100.0	56.0
[^{0,2} X _G]/[^{0,1} X _P] ⁻	[M-H-120] ⁻	83.7	100.0	45.0	70.9	100.0	100.0	74.5	100.0
[^{0,2} X _G / ^{0,1} X _P -H ₂ O] ⁻	[M-H-138] ⁻	15.2	3.7	10.9	13.5	1.3	2.4	9.6	0.6
[^{0,2} X _G / ^{0,1} X _P -2CH ₂ O] ⁻	[M-H-180] ⁻	62.7	27.9	37.8	56.0	12.3	21.7	34.8	12.4
[^{0,2} X _G / ^{0,1} X _P -3CH ₂ O] ⁻	[M-H-210] ⁻	61.8	37.6	44.1	61.1	21.7	38.0	42.2	0.1

道一致。正离子模式下产生的碎片信息与文献报道存在一些差别。Cuyckens等^[9]报道8-C-葡萄糖苷会产生[M+H-120]⁺的基峰。而在本研究结果中,2个化合物都产生[M+H-18]⁺的基峰。它们区别主要在MS²中产生的*m/z* 363.0 ([M+H-3H₂O]⁺)、351.2 ([^{2,3}X_G-2H₂O]⁺)、321.3 ([^{0,4}X_G-2H₂O]⁺)和297.2 ([^{0,2}X_G]⁺)。这4个碎片离子在6-C-葡萄糖苷中都具有较高的丰度,而在8-C-葡萄糖苷中丰度则相对较低。

3.2 双糖黄酮碳苷的结构鉴定和同分异构体的区分

根据精确质量数所预测的分子式,本研究共推测出11个双糖取代的黄酮碳苷,其中10个为6-C-糖基-8-C-糖基结构,1个为O-糖基-C-糖基结构。

3.2.1 6-C-糖基-8-C-糖基黄酮的结构鉴定 在负离子模式下,2号和3号峰在高分辨质谱中产生相同的去质子峰*m/z* 563.137 0 (C₂₆H₂₇O₁₄)。表3给出了这2个化合物在CID中的MS²碎片离子丰度。结果显示,2号色谱峰产生了*m/z* 473.2 ([M-H-90]⁻)

的基峰,而3号色谱峰产生了 m/z 443.2 ($[M-H-120]^-$) 的基峰。文献报道^[8], CID 更容易使得 C-6 位的糖基碎裂。由此推测2号峰为芹菜素 6-C-阿拉伯糖-8-C-葡萄糖苷,形成的 $[M-H-90]^-$ 来源于 C-6 位阿拉伯糖 0-2 键的断裂 ($[^{0,2}X_P]^-$)。3号色谱峰为芹菜素 6-C-葡萄糖-8-C-阿拉伯糖苷,形成的 $[M-H-120]^-$ 来源于 C-6 位葡萄糖 0-2 键的裂解 ($[^{0,2}X_G]^-$, 如图1所示)。这与文献报道的结果相一致。除此之外,这2个化合物所产生碎片离子 m/z 403.2 ($[M-H-60]^-$) 的相对丰度也存在差异,2号峰的相对丰度为71.1%,3号峰丰度为12.5%^[7]。在正离子模式下,2个化合物的区别主要在 $[M+H-H_2O]^+$ 、 $[M+H-2H_2O]^+$ 、 $[M+H-3H_2O]^+$ 和 $[M+H-138]^+$,2号峰形成的这4个碎片离子丰度均>70%,而3号峰的丰度都<30%。所有这些碎片离子的特征丰度都能够用于区别 6-C-葡萄糖-8-C-戊糖苷和 6-C-戊糖-8-C-葡萄糖苷的黄酮碳苷结构。

根据上述的分析,推测7号和8号峰为白杨素 6-C-戊糖-8-C-葡萄糖苷;10号和12号峰为白杨素 6-C-葡萄糖-8-C-戊糖苷;11号峰为刺槐黄素 6-C-戊糖-8-C-葡萄糖苷,17号峰为刺槐黄素 6-C-葡萄糖-8-C-戊糖苷(表3)。

15和18号峰在高分辨质谱中都产生 m/z 561.161 8 ($C_{27}H_{29}O_{13}$) 去质子峰,比7、8、10和12号峰所对应的结构多1个甲基基团,由此推测15和18号峰的结构中可能存在脱氧己糖。15号峰的 MS^2 谱图中形成 m/z 487.3 ($[M-H-74]^-$, 相对丰度56.8%) 和 m/z 457.3 ($[M-H-104]^-$, 相对丰度100%)。这2个特征性的碎片分别来源于脱氧己糖 0-3 键和 0-2 键的断裂。由此推测,15号峰可能为 6-C-脱氧己糖碳苷。18号峰的 MS^2 中产生 m/z 471.3 ($[M-H-90]^-$, 相对丰度42.0%) 和 m/z 441.3 ($[M-H-120]^-$, 相对丰度100%)。由此推测18号峰为 6-C-葡萄糖碳苷。综合以上信息,15号峰为白杨素 6-C-脱氧己糖-8-C-葡萄糖碳苷,18号峰为白杨素 8-C-脱氧己糖-6-C-葡萄糖碳苷(表4)。

5号色谱峰在高分辨质谱中产生 m/z 577.152 4 ($C_{27}H_{29}O_{14}$) 的去质子峰。所预测的分子式比15和18号峰多1个羟基。 MS^2 和 MS^3 中,去质子峰产生连续的120中性丢失。由此推测,5号峰可能为双葡萄糖碳苷。 MS^2 图中产生的较高丰度的 m/z 337.2 ($[^{0,2}X_G]^-$ $[^{0,2}X_G]^-$) 和 367.1 ($[^{0,2}X_G]^-$ $[^{0,3}X_G]^-$) 提示5号峰为白杨素 6,8-C-二葡萄糖苷。

表4 6-C-脱氧己糖-8-C-葡萄糖苷和 6-C-葡萄糖-8-C-脱氧己糖苷在 MS^2 中碎片离子的相对丰度

Table 4 Relative abundances of fragments obtained from 6-C-glucosyl-8-C-deoxy-hexosyl flavonoid and 6-C-deoxy-hexosyl-8-C-glucosyl flavonoid in MS^2

碎片离子	m/z	相对丰度/%	
		15	18
正离子			
$[M+H-H_2O]^+$	$[M+H-18]^+$	80.1	100.0
$[M+H-2H_2O]^+$	$[M+H-36]^+$	100.0	29.1
$[M+H-3H_2O]^+$	$[M+H-54]^+$	66.0	11.8
$[^{2,3}X_G-2H_2O]^+$	$[M+H-66]^+$	—	26.0
$[^{0,4}X_D-2H_2O]^+$	$[M-H-80]^+$	13.4	—
$[^{2,3}X_G-3H_2O]^+$	$[M+H-84]^+$	—	15.3
$[^{0,4}X_G-2H_2O]^+$	$[M+H-96]^+$	—	10.0
$[^{0,2}X_D]^+$	$[M-H-104]^+$	14.9	—
$[^{0,2}X_G]^+$	$[M+H-120]^+$	2.7	14.3
负离子			
$[M-H-H_2O]^-$	$[M-H-18]^-$	22.1	8.7
$[^{0,4}X_D]^-$	$[M-H-44]^-$	4.4	—
$[^{0,4}X_G]^-$	$[M-H-60]^-$	—	2.8
$[^{0,3}X_D]^-$	$[M-H-74]^-$	56.8	—
$[^{0,3}X_G]^-$	$[M-H-90]^-$	1.6	42.0
$[^{0,2}X_D]^-$	$[M-H-104]^-$	100.0	4.4
$[^{0,2}X_G]^-$	$[M-H-120]^-$	69.0	100.0

3.2.2 O-糖基-C-糖基黄酮的结构鉴定 14号峰在高分辨质谱中产生了 m/z 579.167 9 ($C_{27}H_{30}O_{14}$) 的质子化色谱峰。 MS^2 图中特征性的脱葡萄糖碎片离子 m/z 417.2 ($[M+H-162]^+$) 以及 $[M+H-18]^+$ 、 $[M+H-36]^+$ 、 $[M+H-54]^+$ 、 $[M+H-66]^+$ 、 $[M+H-120]^+$ 和 $[M+H-150]^+$ 提示结构中同时存在 C-葡萄糖和 O-葡萄糖,并且 O-葡萄糖基团连接在苷元的羟基上,而非 C-葡萄糖的羟基上。 MS^3 中产生的碎片离子 $[M+H-162-18]^+$ 、 $[M+H-162-36]^+$ 、 $[M+H-162-54]^+$ 、 $[M+H-162-66]^+$ 、 $[M+H-162-120]^+$ 和 $[M+H-162-150]^+$ 进一步确证了 C-葡萄糖-O-葡萄糖的结构。由于 MS^3 谱图碎片离子丰度与白杨素 6-C-葡萄糖苷一致,因此推测14号峰为白杨素 7-O-葡萄糖-6-C-葡萄糖苷。

3.3 黄烷酮碳苷的结构鉴定及同分异构体的区分

理论上,黄烷酮碳苷的不饱和度比相应的黄酮碳苷大1。通过分析不饱和度,在监测到的19个黄烷酮碳苷中共发现有4个黄烷酮碳苷结构,其中有2

个为双糖黄烷酮碳苷。9号峰产生了 m/z 435.128 8 ($C_{21}H_{23}O_{10}$) 的质子峰, MS^2 图中存在的 $[M+H-18]^+$ 、 $[M+H-36]^+$ 、 $[M+H-54]^+$ 、 $[M+H-66]^+$ 、 $[M+H-120]^+$ 和 $[M+H-138]^+$, 提示该化合物为单糖黄烷酮碳苷。在负离子模式下, MS^2 和 MS^3 都产生了 m/z 167.0。这个碎片离子来源于黄烷酮苷元 C 环中 1-4 键的断裂 (图 3)。因此, 推测 9 号峰为柚皮素 C-葡萄糖苷。产生的 m/z 167.0 则作为特征碎片诊断黄烷酮碳苷。

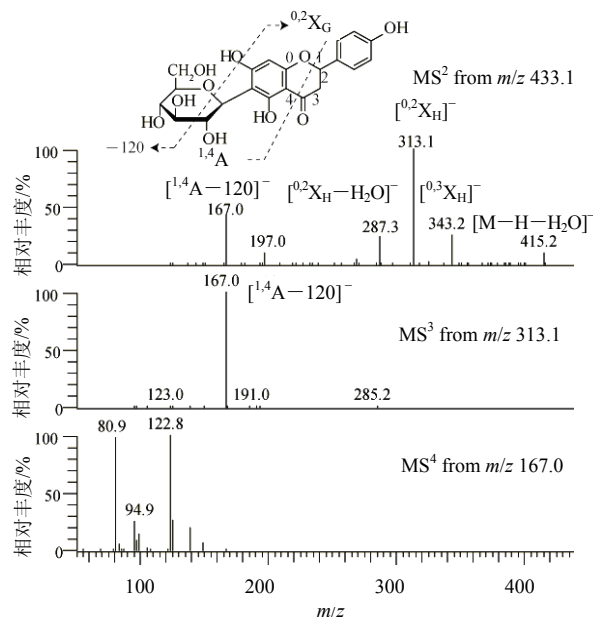


图3 9号峰 MS^2 、 MS^3 和 MS^4 的质谱图

Fig. 3 MS^2 , MS^3 , and MS^4 spectra of peak 9

相类似的, 1号峰产生较高丰度的 $[M-H-120]^-$ ($[^{0,2}X_G]^-$)、 $[M-H-90-120]^-$ ($[^{0,2}X_G]^-$ $[^{0,3}X_G]^-$) 和 $[M-H-120-120]^-$ ($[^{0,2}X_G]^-$ $[^{0,2}X_G]^-$), 提示结构中存在 C-二葡萄糖取代。实验中观察到在 MS^3 中存在 m/z 209.0 ($[^{1,4}A-120-120]^-$)、 m/z 239.1 ($[^{1,4}A-120-90]^-$) 和 m/z 329.2 ($[^{1,4}A-120]^-$), 进一步证实了双葡萄糖碳苷的结构。因此, 1号峰被鉴定为柚皮素-6,8-C-二葡萄糖苷。

4号和6号色谱峰产生了 m/z 565.153 0 ($C_{26}H_{29}O_{14}$) 的去质子峰。 MS^2 中产生高丰度的 m/z $[M-H-90]^-$ ($[^{0,3}X_G]^-$ $[^{0,2}X_P]^-$)、 $[M-H-120]^-$ ($[^{0,2}X_G]^-$ $[^{0,1}X_P]^-$)、 $[M-H-150]^-$ ($[^{0,3}X_G]^-$ $[^{0,3}X_P]^-$) / $[^{0,1}X_G]^-$ 、 $[M-H-90-90]^-$ ($[^{0,3}X_G]^-$ $[^{0,2}X_P]^-$)、 $[M-H-120-90]^-$ ($[^{0,2}X_G]^-$ $[^{0,2}X_P]^-$)、 $[^{1,4}A-90-120]^-$ (m/z 209.1)、 $[^{1,4}A-90-90]^-$ (m/z 239.2) 和 $[^{1,4}A-150]^-$ (m/z 269.2), 提示该化合物可能为葡萄

糖和戊糖取代的双糖黄烷酮碳苷。Viktoria 等^[10]指出 8-C-己糖同分异构体出峰时间比相应的 6-C-己糖同分异构体出峰早。因此, 推测 4号峰为柚皮素 6-C-戊糖-8-C-葡萄糖苷, 6号峰为柚皮素 6-C-葡萄糖-8-C-戊糖苷。

3.4 二氢查耳酮碳苷的结构鉴定

13号峰在高分辨质谱中产生 m/z 581.184 1 ($C_{27}H_{33}O_{14}$) 的去质子峰。根据分子式, 推测其结构中含有双糖取代。根据不饱和度, 推测 26号色谱峰的苷元为二氢查尔酮。 MS^2 中碎片离子 m/z 461.2 ($[^{0,2}X_G]^-$)、 m/z 299.2 ($[^{0,2}X_G-162]^-$) 以及 MS^3 中的 m/z 166.9 ($[A-120-162]^-$) 提示 O-葡萄糖-C-葡萄糖苷。由此, 推测 13号峰为 2',4'-二羟基二氢查耳酮-3'-C-葡萄糖-6'-O-葡萄糖苷 (图 4)。

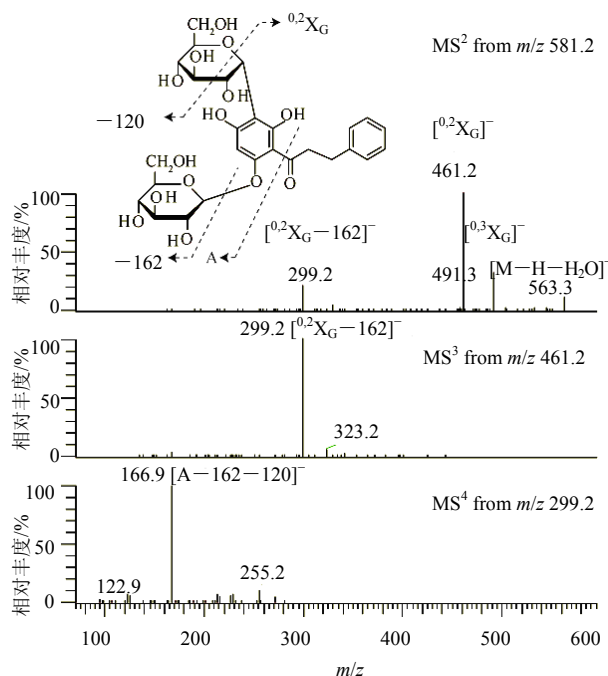


图4 13号峰 MS^2 、 MS^3 和 MS^4 的质谱图

Fig. 4 MS^2 , MS^3 , and MS^4 spectra of peak 13

4 讨论

黄酮碳苷作为黄酮家族的一个类型具有广泛的药理活性, 受到研究者越来越多的关注。黄酮碳苷在质谱中特殊的碎裂规律使得能够将其与氧苷和黄酮苷元区分开。本研究通过建立高通量的 UPLC/LTQ-Orbitrap-MS 的方法, 成功地筛选出黄芩中 19 个黄酮碳苷的结构, 包括 2 个单糖黄酮碳苷、11 个双糖黄酮碳苷、1 个氧苷-碳苷黄酮、4 个黄烷酮碳苷和 1 个二氢查耳酮碳苷。另外, 本研究通过比对 MS^2 、 MS^3 和 MS^4 谱图中碎片离子的丰度对其

中的同分异构体进行区分。本实验的研究结果能够为复杂中药体系中其他黄酮类结构的表征分析提供参考。

参考文献

- [1] Hsieh P W, Chang F R, Lee K H, *et al.* A new anti-HIV alkaloid, drymaritin, and a new C-glycoside flavonoid, diandraflavone, from *Drymaria diandra* [J]. *J Nat Prod*, 2004, 67(7): 1175-1177.
- [2] Talhi O, Silva S A M. Advances in C-glycosyl- flavonoid research [J]. *Curr Org Chem*, 2012, 16(7): 859-896.
- [3] 龚金炎, 吴晓琴, 张 英. 酮碳苷及其活性研究进展 [J]. *解放军药学学报*, 2005, 21(2): 135-138.
- [4] Liu G Z, Ma J Y, Chen Y Z, *et al.* Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria baicalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(23): 4809-4814.
- [5] Wang H L, Cao J, Xu S Q, *et al.* Depletion of high-abundance flavonoids by metal complexation and identification of low-abundance flavonoids in *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1315(8): 107-117.
- [6] Ferreres F, Silva B M, Andrade P B, *et al.* Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*) [J]. *Phytochem Anal*, 2003, 14(6): 352-359.
- [7] Guo X F, Yue Y D, Tang F, *et al.* A comparison of C-glycosidic flavonoid isomers by electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry in negative and positive ion mode [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2013, 333(1): 59-66.
- [8] Li Q M, van den Heuvel H, Delorenzo O, *et al.* Mass spectral characterization of C-glycosidic flavonoids isolated from a medicinal plant (*Passiflora incarnata*) [J]. *J Chromatogr B*, 1991, 562(1/2): 435-446.
- [9] Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids [J]. *J Mass Spectrom*, 2004, 39(1): 1-15.
- [10] Vukics V, Ringer T, Kery A, *et al.* Analysis of heartsease (*Viola tricolor* L.) flavonoid glycosides by micro-liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1206(1): 11-20.