

基于液质联用技术的连翘化学成分分析

张晨曦^{1,3}, 刘素香², 赵艳敏^{1,3}, 张铁军², 刘岱琳^{3*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 中国人民武装警察部队后勤学院, 天津 300309

摘要:目的 应用液质联用技术在正负离子模式下分析连翘 *Forsythiae Fructus* 中的主要化学成分。方法 采用 Agilent 1200 HPLC, Diamonsil II C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.05% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 柱温 35 °C, 进行 200~600 nm 全扫描, 建立连翘指纹图谱, 同时结合 Bruker Daltonics 的 1200 HPLC-Q-TOF 给出的正、负离子质谱信息和元素分析, 与相关文献数据对照, 分析化合物信息。结果 结合 HPLC-Q-TOF-MS 提供的化合物准确相对分子质量, 鉴定连翘中 24 个化合物, 有 12 个苯乙醇苷类成分、7 个木脂素类成分、5 个黄酮类化合物, 其中有 5 个化合物: 3,4-二羟基苯乙醇苷 (1)、2-甲氧基-3,4,5-三羟基苯乙醇苷 (2)、β-羟基化连翘酯苷 H (7)、6-羟基二氢黄酮 (24)、二氢杨梅素 (25) 为首次从连翘中得到鉴定。结论 为连翘药材的质量控制提供技术支持, 为阐明连翘的药效物质基础提供数据参考。

关键词: 连翘; 液质联用技术; 苯乙醇苷类; 木脂素; 黄酮; 3,4-二羟基苯乙醇苷; β-羟基化连翘酯苷 H; 二氢杨梅素

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)12-2053-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.12.006

Analysis on chemical constituents from *Forsythiae Fructus* by HPLC-Q-TOF-MS

ZHANG Chen-xi^{1,3}, LIU Su-xiang², ZHAO Yan-min^{1,3}, ZHANG Tie-jun², LIU Dai-lin³

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Pharmaceutical Research Institute, Tianjin 300193, China

3. College of Logistics, University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

Abstract: Objective To analysis the main chemical ingredients of *Forsythiae Fructus* by LC-MS technology in the positive and negative ions mode. **Methods** The chromatographic fingerprint was obtained with Diamonsil II C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and gradient elution with 0.05% H₂O-formic acid (A)-acetonitrile (B), and the flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was maintained at 35 °C. The detection wavelength was 200–600 nm. Positive and negative ions MS information of Bruker Daltonics 1200 HPLC-Q-TOF was coupled with elemental analysis and compared with literature data to analyze the compounds information. **Results** Combined with the accurately relative molecular mass of compounds provided by HPLC-Q-TOF-MS, 24 compounds were identified from the ethanolic extraction of *Forsythia Fructus*, which include 12 phenylethanoid glycosides, seven lignan ingredients, and five flavonoids. And 3,4-dihydroxyphenylethanoid glycoside (1), 2-methoxy-3,4,5-trihydroxyphenylethanoid glycoside (2), β-hydroxyforsythoside H (7), dihydroquercetagenin (24), and dihydromyricetin (25) were first identified in *Forsythiae fructus*. **Conclusion** The method provides the technical support for the quality control of *Forsythiae Fructus* and contributes the reference data to elucidating the potential basis of *Forsythiae Fructus*.

Key words: *Forsythiae Fructus*; LC-MS technique; phenylethanoid glycosides; lignin; flavonoids; 3,4-dihydroxyphenylethanoid glycoside; β-hydroxyforsythoside H; dihydromyricetin

连翘 *Forsythiae Fructus* 为常用中药,也是疏风解毒胶囊原料药材之一,具有清热解毒、散结消肿的功效,中医临床称之为“疮家圣药”,用于风热感

冒、温病、丹毒、热淋尿闭、痈疽、凛病和肿毒等症的治疗^[1],并对急性肾炎、肺结核、视网膜黄斑区出血、呃逆、便秘等有一定的治疗作用,具有广泛

收稿日期: 2016-02-18

作者简介: 张晨曦 (1991—), 女, 硕士, 研究方向为天然产物活性成分研究。

*通信作者 刘岱琳, 女, 教授, 研究方向为天然产物活性成分研究。Tel: 13821660597 E-mail: dailinlch@163.com

的临床应用基础^[2]。现代研究表明,连翘果实中主要含有木脂素类、苯乙醇苷类、黄酮类、挥发油及萜类、生物碱类和有机酸类等化学成分,其中苯乙醇苷类、木脂素类和黄酮类成分为其主要有效成分^[3]。

目前针对连翘的研究多集中在连翘的化学成分、质量标准 and 药理作用等方面。随着药理作用研究的不断深入,其药效物质基础的快速分析鉴定更是需要关注的方面。液质联用技术在化学成分研究中的应用已显优势,是中药药效物质基础研究的有力手段。曾建勋等^[4]利用 HPLC-TOF-MS 分析连翘水煎液,鉴定了其中 9 个色谱峰,主要是苯乙醇苷类成分和黄酮类成分;刘影等^[5]利用 NMR/LC-MS 平行动态谱学方法技术对连翘提取物中苯乙醇苷类成分进行了同步结构分析研究,鉴定出 7 种成分,其中包括 1 个新的苯乙醇苷和 1 个结构极其罕见的二聚苯乙醇苷生物碱。本实验优化了 HPLC 分析条件,利用 HPLC-Q-TOF 技术分析了连翘提取物的 25 个色谱峰,首次通过色谱和质谱结合一次性识别了 24 个化合物的结构,其中有 5 个化合物:3,4-二羟基苯乙醇苷(1)、2-甲氧基-3,4,5-三羟基苯乙醇苷(2)、 β -羟基化连翘酯苷 H(7)、6-羟基二氢黄酮(24)、二氢杨梅素(25)为首次在连翘中发现,本研究为更有效地确定连翘的药效物质基础,提升质量标准提供了技术支撑。

1 仪器与试药

1200 HPLC-TOF/MS (Bruker Daltonics), 1200 HPLC (Agilent Technology), Milli-Q 超纯水系统(法国 Millipore 公司)。甲醇和乙腈(色谱纯,美国 Merck 公司),对照品连翘酯苷 A (批号 111810-201102) 和连翘苷(批号 110821-200711) 购自中国食品药品检定研究院,槲皮素(批号 6151-25-3) 购自南京泽朗医药科技有限公司,连翘酯苷 I (批号 KMST-L014)、连翘酯苷 H (批号 KMST-L013)、(+)-表松脂素-4- O - β -D-葡萄糖苷(批号 KMST-B021)、(+)-松脂素-4- O - β -D-葡萄糖苷(批号 KMST-S012) 和芦丁(批号 KMST-L020) 购自天津市科曼思特医药科技发展有限公司,质量分数均大于 98%。

药材购自安国药材市场,由天津药物研究院中药研究室张铁军研究员鉴定为连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥果实。

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精确称量连翘酯苷 A、连翘酯苷 I、连翘酯苷 H、

连翘苷、(+)-表松脂素-4- O - β -D-葡萄糖苷、(+)-松脂素-4- O - β -D-葡萄糖苷、芦丁和槲皮素对照品各 2.00 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加入适量 50% 甲醇溶解,并以 50% 甲醇定容,得到质量浓度为 200 μ g/mL 的各单体对照品贮备液。检测前再将对照品贮备液用 50% 甲醇稀释 10 倍,经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

2.2 供试品溶液的制备

取连翘药材粉末 1 g 置于 100 mL 圆底烧瓶中,加入 70% 甲醇 25 mL 称定质量,回流提取 30 min,放冷,称定质量,并用 70% 甲醇补足减失质量,摇匀。经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,取续滤液备用。

2.3 分析条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil II C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为 0.05% 甲酸水溶液-乙腈溶液,梯度洗脱: 0~15 min, 5%~15% B; 15~65 min, 15%~40% B; 65~80 min, 40%~100% B; 80~85 min, 100% B。体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 200~600 nm 全扫描; 进样量为 5 μ L。

2.3.2 质谱条件 采用正、负离子 2 种模式扫描测定,电喷雾离子源 (ESI),扫描质量范围 m/z 50~1 200; 毛细管电压 4.5 kV (正离子), 2.6 kV (负离子), 碎裂电压 200 V; 干燥气温度为 180 $^{\circ}$ C; 干燥气的体积流量为 6 L/min, 雾化气压为 80 kPa; 分流比为 1:4; 内标校正选用甲酸钠溶液。

3 结果

3.1 连翘中化学成分分析

采用 HPLC-Q-TOF-MS 正负离子模式分析连翘 70% 甲醇提取物中的化学成分, (+) ESI-MS、(-) ESI-MS 的质谱总离子流图 (TIC) 见图 1。通过 HPLC-Q-TOF-MS 检测得到了连翘中 25 个化合物的保留时间和质谱数据信息,结合 HPLC 反映化合物的极性、离子流质谱数据和相关文献报道数据对比分析,确定了 12 个苯乙醇苷类成分、7 个木脂素类成分和 5 个黄酮类成分,有 1 个色谱峰未识别。分析结果见表 1。

3.2 化合物的质谱裂解特征分析

3.2.1 苯乙醇苷类化合物的分析鉴定 苯乙醇苷类成分是连翘药材中的特征性成分,本研究中共分析鉴别了 12 个苯乙醇苷类化合物的结构,其结构如图 2 所示,连翘的液质分析图谱中 12 个苯乙醇苷类化合物,表现出了相似的裂解规律,如丢失 rhamnose (M_w 146)、H₂O (M_w 18)、caffeic acyl (M_w 162),

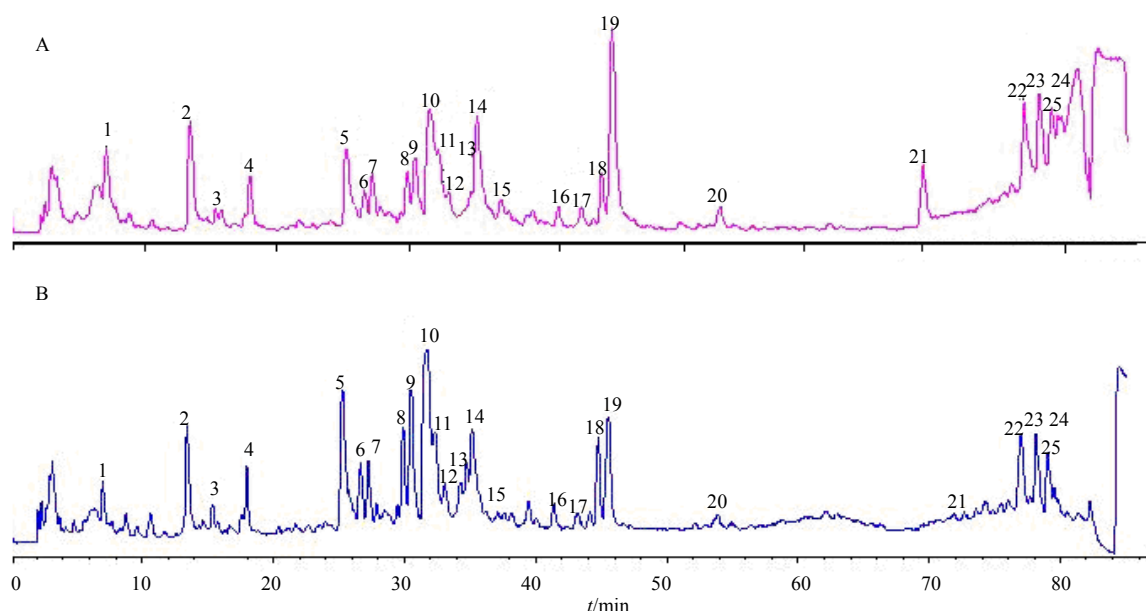


图 1 连翘 70%甲醇提取物正 (A)、负 (B) 离子模式下的 TIC 图

Fig. 1 TIC of extract from *Forsythiae Fructus*

表 1 连翘 70%甲醇提取物中鉴定的苯乙醇苷类、木脂素类、黄酮类和三萜类化合物

Table 1 Phenylethanoid glycosides, lignin, flavonoids, and triterpenoid identified in extracts from *Forsythiae Fructus*

峰号	t_R/min	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	碎片离子 (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	相对分子质量	化合物
1	7.3		339.112 2 $[M+Na]^+$, 137.059 4 $[M+H-Glucose]^+$	315.115 3	316	3,4-二羟基苯乙醇苷
2	13.6	290, 334	399.128 5 $[M+Na]^+$, 215.091 5 $[M+H-Glucose]^+$, 197.080 3 $[M+H-Glucose-H_2O]^+$, 179.069 0 $[M+H-Glucose-H_2O \times 2]^+$	375.139 7	376	2-甲氧基-3,4,5-三羟 基苯乙醇苷
3	15.6	290, 334	485.166 8 $[M+Na]^+$, 317.008 7 $[M+H-Rhamnose]^+$, 155.074 6 $[M+H-Rhamnose-Glucose]^+$	461.176 8	462	连翘酯苷 E
4	18.2	290, 334	489.140 3 $[M+H]^+$, 325.092 9 $[M+H-164]^+$, 163.143 7 $[M+H-164-Glucose]^+$	487.135 7	488	对-香豆素-(6-O-咖啡 酰基)-葡萄糖苷
5	25.5	290, 332	663.207 9 $[M+Na]^+$, 477.128 9 $[M+H-H_2O-Rhamnose]^+$, 325.092 7 $[477-152]^+$, 163.039 3 $[325-Glucose]^+$	639.212 6	640	连翘酯苷 C
6	26.8	290, 332	663.191 4 $[M+Na]^+$, 477.323 5 $[M+H-H_2O-Rhamnose]^+$, 325.091 4 $[477-152]^+$, 163.038 4 $[325-Glucose]^+$	639.210 4	640	β -羟基连翘酯苷 A
7	27.5		663.192 6 $[M+Na]^+$, 477.129 0 $[M+H-H_2O-Rhamnose]^+$, 325.090 7 $[477-152]^+$, 163.038 7 $[325-Glucose]^+$	639.207 4	640	β -羟基连翘酯苷 H
8	30.2	290, 332	633.184 2 $[M+Na]^+$, 479.155 2 $[M+H-Xylose]^+$, 325.091 9 $[479-154]^+$, 163.039 1 $[325-Glucose]^+$	609.190 7	610	连翘酯苷 J
9	30.8	290, 332	647.200 2 $[M+Na]^+$, 479.155 5 $[M+H-Rhamnose]^+$, 325.093 0 $[479-154]^+$, 163.039 4 $[325-Glucose]^+$	623.217 0	624	连翘酯苷 I
10	31.9	290, 332	647.200 3 $[M+Na]^+$, 479.155 6 $[M+H-Rhamnose]^+$, 325.094 4 $[479-154]^+$, 163.040 1 $[325-Glucose]^+$	623.217 1	624	连翘酯苷 A
11	32.6	280, 351	611.153 9 $[M+H]^+$, 465.103 4 $[M+H-Rhamnose]^+$, 303.051 4 $[M+H-Rhamnose-Glucose]^+$	609.164 9	610	芦丁

续表 1

峰号	t_R/min	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	碎片离子 (m/z)	$[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z)	相对分子质量	化合物
12	33.3		647.200 4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 501.137 8 $[\text{M}+\text{Na}-\text{Rhamnose}]^+$, 325.090 8 $[501-176]^+$, 163.038 2 $[325-\text{Glucose}]^+$	623.213 0	624	连翘酯苷 H
13	34.2	276, 340	645.179 1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 479.132 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{Rhamnose}]^+$, 325.090 7 $[479-152]^+$, 163.037 8 $[325-\text{Glucose}]^+$	621.186 2	622	连翘桉木苷 A
14	35.5	276, 340	543.187 7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 359.146 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}]^+$, 341.138 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}-\text{H}_2\text{O}]^+$	519.200 9	520	(+)-表松脂素-4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷
15	37.3	276, 340	543.184 0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 359.203 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}]^+$, 341.135 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}-\text{H}_2\text{O}]^+$	519.195 4	520	(+)-松脂素-4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷
16	41.7	354	543.184 3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 359.147 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}]^+$, 341.137 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}-\text{H}_2\text{O}]^+$	519.198 4	520	(+)-表松脂素-4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷
17	43.5	354	557.200 2 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 355.152 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{Glucose}]^+$	579.220 8*	534	连翘苷异构体
18	45.0	271, 351	523.179 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 343.116 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 219.204 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}-\text{H}_2\text{O}-124]^+$	521.180 5	522	未知
19	45.8	286, 351	557.204 0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 355.155 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}-\text{H}_2\text{O}]^+$	533.213 0	534	连翘苷
20	53.9	266, 366	411.154 8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 389.200 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 371.128 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 353.141 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}\times 2]^+$, 217.081 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}\times 2-136]^+$	387.154 4	388	羟基连翘脂素
21	69.5	276, 340	373.155 8 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 355.153 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 337.142 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}\times 2]^+$, 137.058 3	371.160 9	372	连翘脂素
22	77.2	280, 354	357.038 0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 335.219 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303.230 8 $[\text{M}+\text{H}-32]^+$	333.036 5	334	3',6'-二羟基槲皮素
23	78.3	280, 354	303.048 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$	301.041 7	302	槲皮素
24	78.3	280, 354	343.052 3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 321.240 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303.232 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	319.053 5	320	6-羟基二氢黄酮
25	79.2	280, 354	343.052 3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 321.239 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 303.231 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	319.053 5	320	二氢杨梅素

* $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 的碎片离子* $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ fragment ion

这类化合物都存在很多相似的裂解碎片峰, 如 M_w 479、325、163 等。

10 号色谱峰连翘正负离子模式下的标志性成分, 通过正离子 m/z 647 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 、 m/z 625 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 和负离子 m/z 623 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 分析确定化合物的相对分子质量为 624。如图 3 所示, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子 (m/z 625) 首先发生丢失 m/z 146 的裂解反应, 产生 m/z 479.155 6 离子, 推断为 $[\text{M}+\text{H}-\text{rhamnose}]^+$, 这是由于鼠李糖基位于结构的外侧, 易于脱落; 在此基础上, 结构再次脱落苯乙醇部分片段, 丢失 m/z 152 的碎片, 产生了 m/z 325 的离子碎片; 最后该离子脱去葡萄糖基, 丢失 m/z 162 的碎片, 得到咖啡酰基的片段碎片, 产生 m/z 163 $[325-\text{glucose}]^+$ 的离

子。由此可以判断出该化合物中丢失鼠李糖基片段, 苯乙醇基片段, 葡萄糖基片段之后获得的 m/z 479、325、163 的离子是该类化合物鉴定的特征信号离子。且在相同的质谱条件下与对照品连翘酯苷 A 的裂解规律和出峰时间相一致, 因此判断该化合物为连翘酯苷 A。

质谱中 3 号峰信号通过正离子 m/z 483 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和负离子 m/z 461 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 分析确定化合物的相对分子质量为 462。与 10 号峰相比, 相对分子质量给出未连接咖啡酰基的信息, 质谱裂解碎片中未见到 163 的特征峰, 只观察到脱去 1 分子鼠李糖基片段 m/z 317 和再脱去 1 分子葡萄糖基片段的苯乙醇片段碎片 m/z 155, 结合文献报道的数据和化合物

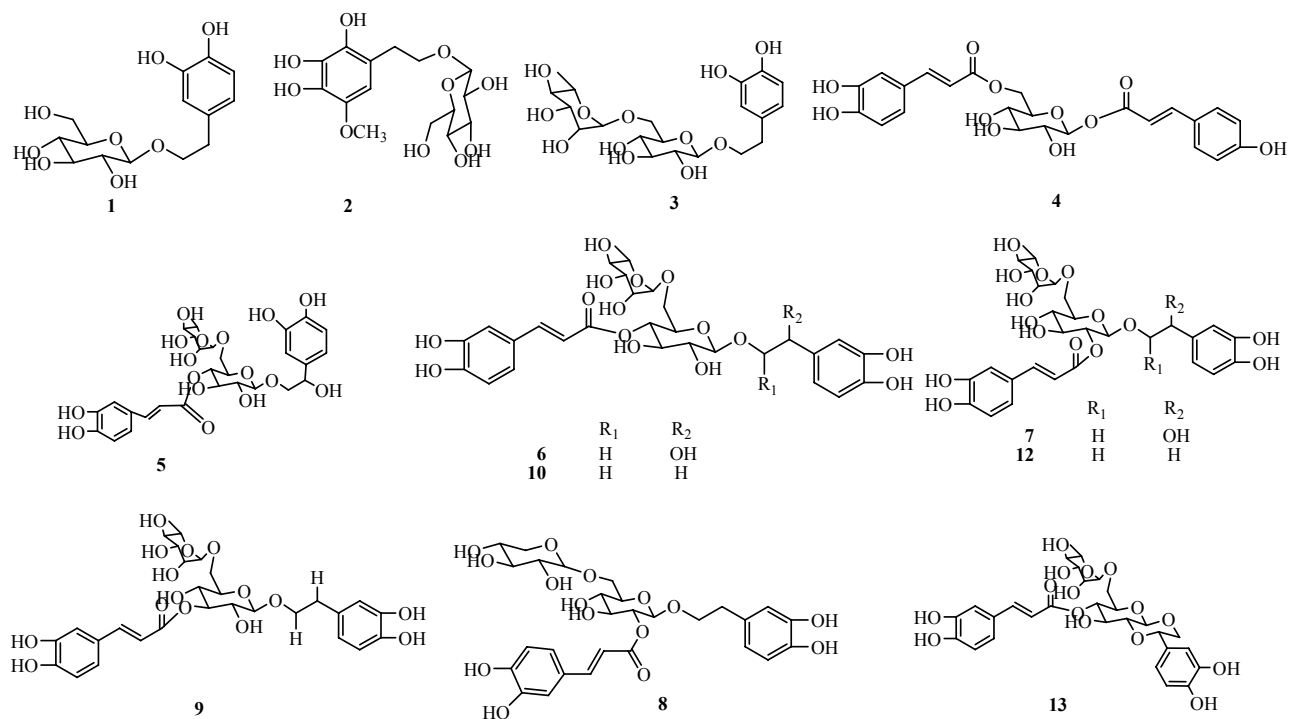


图 2 连翘提取物中苯乙醇苷类化合物的结构

Fig. 2 Structures of phenylethanoid glycosides in extracts from *Forsythiae Fructus*

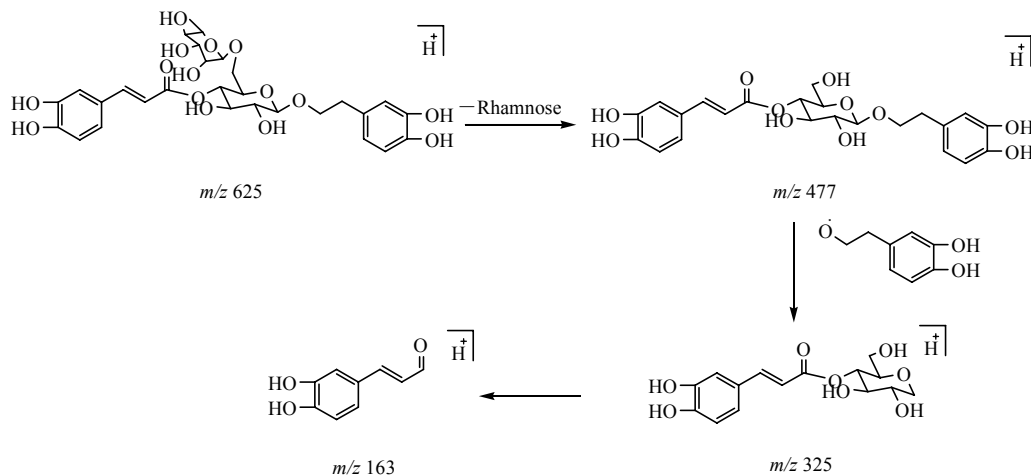
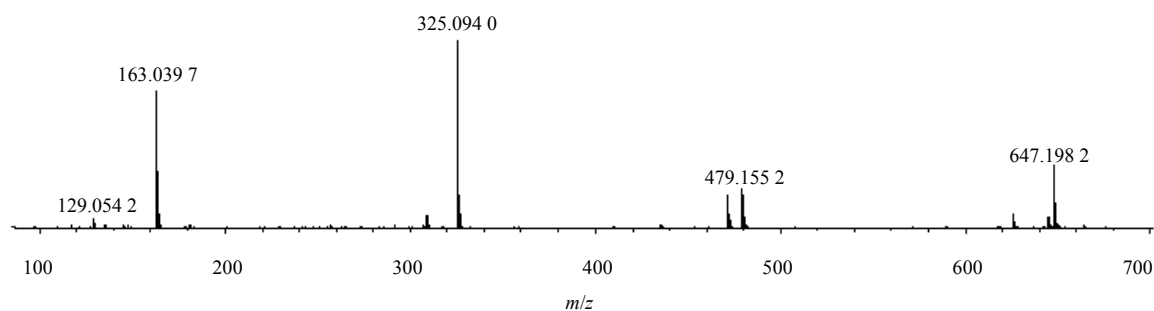


图 3 连翘酯苷 A (10 号峰) 的裂解过程

Fig. 3 Pyrolysis process of forsythoside A (peak 10)

的极性确定3号峰为连翘酯苷E^[6]。

9、12号色谱峰与10号峰的相对分子质量信息以及质谱裂解规律完全相同,仅出峰时间不同,存在一定的极性差异,说明9、12号色谱峰应该为连翘酯苷A的同分异构体,仅是咖啡酰基在葡萄糖基上的连接位置不同而存在微弱的极性差异。通过文献调研连翘中报道连翘酯苷A的同分异构体有连翘酯苷I和连翘酯苷H,在相同的质谱条件下9号色谱峰的质谱信息与对照品连翘酯苷I的裂解规律和出峰时间相一致,12号色谱峰的质谱信息与对照品连翘酯苷H的裂解规律和出峰时间相一致,从而确定9号峰为连翘酯苷I,12号峰为连翘酯苷H。

5、6、7号色谱峰的质谱数据分析,正离子 m/z 663 $[M+Na]^+$ 和负离子 m/z 639 $[M-H]^-$ 分析确定这3个化合物的相对分子质量都是640,也是1组同分异构体。且相对分子质量与10号峰相比多出1个酚羟基。同时3个色谱峰对应的质谱裂解信息中都可以观察到丢失1分子水(m/z 18)的信息,可以确定这3个化合物是连翘酯苷A及其同分异构体的羟基化产物。通过文献比对并参考9、10、12号峰的结构鉴定过程,推测5号峰为连翘酯苷C,6号峰为羟基化连翘酯苷A^[6-7],7号峰为羟基化连翘酯苷H。

8号峰通过正离子 m/z 633 $[M+Na]^+$ 和负离子 m/z 609 $[M-H]^-$ 分析确定化合物的相对分子质量为610。与10号峰相比优先丢失的碎片为xylose m/z 132的碎片,其他裂解规律均与连翘酯苷A相同,检索文献报道^[3]发现连翘中含有连翘酯苷J,其分子式为 $C_{28}H_{34}O_{15}$,相对分子质量理论值为610.189 8,实测值为633.184 2 $[M+Na]^+$,且对比二者极性相当,确定8号峰为连翘酯苷J。

13号峰通过正离子 m/z 645 $[M+Na]^+$ 和负离子 m/z 621 $[M-H]^-$ 分析确定化合物的相对分子质量为622。与10号峰的裂解规律相比其裂解碎片中只有苯乙醇碎片部分出现了差异,说明该部分结构发生了变化,是苯乙醇链部分和糖基部分发生了环合,连翘中报道过的化合物 suspensaside A^[6]。该化合物的分子式为 $C_{29}H_{34}O_5$,相对分子质量理论值为622.189 8,实测值为645.179 1 $[M+Na]^+$ 。其裂解规律和极性都符合,因此推测13号峰为连翘榭木苷A。

4号峰通过正离子 m/z 489 $[M+H]^+$ 和负离子 m/z 487 $[M-H]^-$ 分析确定化合物的相对分子质量为488。其结构与10号峰相比较,缺少了1个鼠李

糖基片段,同结构中没有 m/z 152 的苯乙醇基结构碎片而是出现了1个 m/z 164 的裂解碎片,这是香豆酰基的结构片段。对比文献鉴定其与 *p*-coumaroyl-(6-*O*-caffeoyl)-glucoside 的裂解规律相符合,且该化合物的分子式为 $C_{24}H_{24}O_{11}$,相对分子质量理论值为488.131 9,实测值为489.140 3 $[M+H]^+$,因此推测4号峰为对-香豆素-(6-*O*-咖啡酰基)-葡萄糖苷。

此外1和2号峰为2个小分子苯乙醇苷类化合物。1号峰通过正离子 m/z 339 $[M+Na]^+$ 和负离子 m/z 315 $[M-H]^-$ 分析确定化合物的相对分子质量为316。2号峰通过正离子 m/z 399 $[M+Na]^+$ 和负离子 m/z 375 $[M-H]^-$ 分析确定化合物的相对分子质量为376。1号峰和2号峰的质谱裂解规律中都有脱去1个 m/z 162 的碎片,推测结构中都是直接连接1个葡萄糖基,苯环上取代基有相应的变化,结构比较简单,极性较大,根据文献和质谱数据对比,1号峰的分子式为 $C_{14}H_{20}O_8$,相对分子质量理论值为316.115 8,实测值为339.112 2 $[M+Na]^+$,因此推测1号峰为3,4-二羟基苯乙醇苷。2号峰的分子式为 $C_{16}H_{24}O_{10}$,相对分子质量理论值为376.137 0,实测值为399.128 5 $[M+Na]^+$,推测2号峰为2-甲氧基-3,4,5-三羟基苯乙醇苷。

3.2.2 木脂素类化合物的分析鉴定 木脂素类是连翘药材中的另一类重要功效成分。到目前为止,从连翘属植物中已分离得到34个木脂素类化合物^[8],根据其结构特点,分为双并四氢呋喃类、丁烷衍生物类、四氢呋喃类和芳基四氢萘类4类木脂素。量相对较高的木脂素类成分是连翘苷、(+)-表松脂素-4-*O*- β -*D*-葡萄糖苷和(+)-松脂素-4-*O*- β -*D*-葡萄糖苷成分。本实验利用HPLC-Q-TOF-MS技术共识别了7个木脂素类化合物(图4),且7个都是双并四氢呋喃类木脂素。

19号峰通过正离子 m/z 557 $[M+H]^+$ 和负离子 m/z 533 $[M-H]^-$ 分析确定化合物的相对分子质量为534。质谱中有脱去1个葡萄糖基 m/z 162 的裂解碎片。19号峰是连翘质谱中响应较高的离子流峰信号。其在相同的质谱条件下与对照品连翘苷的裂解规律和出峰时间相一致,从而确定19号峰为连翘苷。17号峰相对分子质量与裂解规律与19号峰完全相同,因此确定其为连翘苷的同分异构体。

而21号峰与19号峰相比较,仅丢失了1分子葡萄糖基碎片,是其苷元连翘脂素的结构,其分子

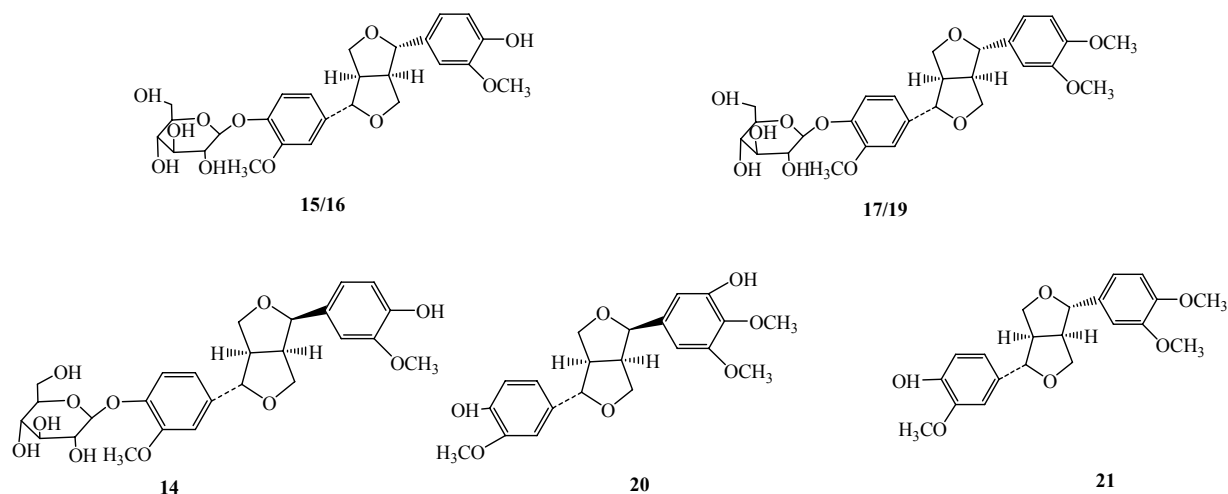


图 4 连翘提取物中木脂素类成分的结构

Fig. 4 Structures of lignins identified in extracts from *Forsythiae Fructus*

式为 $C_{21}H_{24}O_6$ ，相对分子质量理论值为 372.157 3，实测值为 373.155 8 $[M+H]^+$ ，因此 21 号峰为连翘脂素。

14、15 和 16 号峰通过正负离子数据对照，确定相对分子质量 520，且三者的裂解规律完全相同，说明这 3 个峰为 3 个同分异构体的结构，与 19 号峰相比较丢失了 m/z 14，为其羟基化产物。14 号和 15 号峰在相同的质谱条件下分别与对照品 (+)-表松脂素-4- O - β -D-葡萄糖苷、(+)-松脂素-4- O - β -D-葡萄糖苷的裂解规律和出峰时间相一致，确定 14 号和 15 号峰分别为 (+)-表松脂素-4- O - β -D-葡萄糖苷和 (+)-松脂素-4- O - β -D-葡萄糖苷。而化合物 16 是它们的同分异构体，分子式为 $C_{26}H_{32}O_{11}$ ，相对分子质量理论值为 520.194 5，实测值为 543.184 3 $[M+Na]^+$ ，参考文献报道^[6]推测可能为 (+)-表松脂素-4'- O - β -D-葡萄糖苷。

3.2.3 黄酮类化合物的鉴定 本实验中利用 HPLC-Q-TOF-MS 共识别了 5 个黄酮类化合物 (图 5)，涵盖了黄酮醇、黄酮和二氢黄酮的结构母核。

在本液相分析条件下只观察到了 1 个黄酮苷结构，即芦丁，其他 4 个均为黄酮苷元的结构。11 号峰通过正离子 m/z 611 $[M+Na]^+$ 和负离子 m/z 609 $[M-H]^-$ 分析确定化合物的相对分子质量为 610。其质谱裂解过程中可以观察到脱去了 1 分子鼠李糖基 m/z 146 和 1 分子葡萄糖基 m/z 162，苷元碎片 m/z 303。其在相同的质谱条件下与对照品芦丁的裂解规律和出峰时间相一致，从而确定 11 号峰为芦丁。而 23 号峰通过正离子 m/z 303 $[M+H]^+$ 和负离子 m/z 301 $[M-H]^-$ 分析确定化合物的相对分子质量为 302。这与芦丁苷元的碎片裂解规律相一致，在相同的质谱条件下与对照品槲皮素的裂解规律和出峰时间相一致，因此确定 23 号峰为槲皮素。22 号峰极性大于 23 号峰，其正离子 m/z 357 $[M+H]^+$ 和负离子 m/z 333 $[M-H]^-$ 分析确定相对分子质量 334。且质谱裂解规律显示其可以脱去 m/z 32 获得槲皮素的碎片峰，推测 22 号峰是在槲皮素基础上连接 2 个羟基的结构，根据槲皮素结构并通过文献检索^[9]确定 22 号峰为 3',6-二羟基槲皮素。

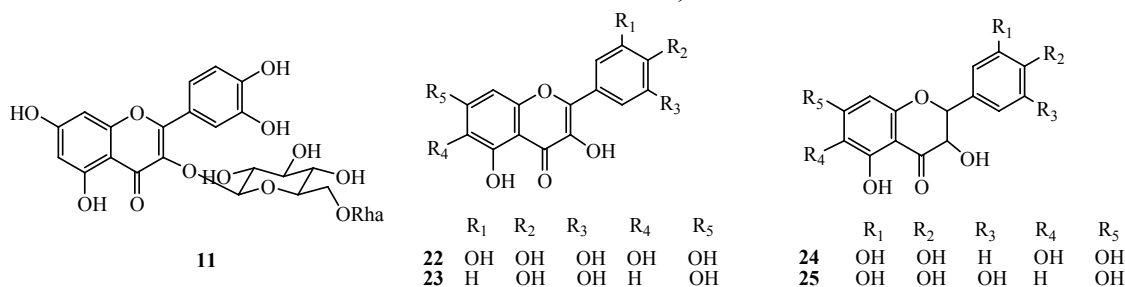


图 5 连翘提取物中黄酮类成分的结构

Fig. 5 Structures of flavonoids identified in extracts from *Forsythiae Fructus*

24 号和 25 号峰通过正离子 m/z 343 $[M+H]^+$ 和负离子 m/z 319 $[M-H]^-$ 分析确定 2 个峰对应的化合物的相对分子质量为 320, 说明 24 号和 25 号峰是互为同分异构体结构。二者的结构与槲皮素相比较相差 m/z 18, 通过文献检索^[10-11], 确定 24 号峰和 25 号峰可能为二氢槲皮素再连接羟基的结构。该化合物分子式为 $C_{15}H_{12}O_8$, 相对分子质量理论值为 320.053 2, 实测值为 343.052 3 $[M+Na]^+$, 因此确定 24 号峰为 6-羟基二氢黄酮, 25 号峰为二氢杨梅素。

4 讨论

本实验采用 HPLC-Q-TOF-MS, 利用质谱的高分辨率特点分析了连翘药材的 70% 甲醇提取物中存在的化学成分, 根据正负离子模式下准分子离子峰, 再结合各个化合物的裂解规律, 并与对照品在相同质谱条件下进行比对, 确定 8 种化合物: 连翘酯苷 I (9)、连翘酯苷 A (10)、芦丁 (11)、连翘酯苷 H (12)、(+)-松脂素-4- O - β -D-葡萄糖苷 (14)、(+)-表松脂素-4- O - β -D-葡萄糖苷 (15)、连翘苷 (19) 和槲皮素 (23); 由准确的相对分子质量及元素组成分析并结合文献报道推测出 16 种化合物, 分别为: 3,4-二羟基苯乙醇苷 (1)、2-甲氧基-3,4,5-三羟基苯乙醇苷 (2)、连翘酯苷 E (3)、对-香豆素-(6- O -咖啡酰基)-葡萄糖苷 (4)、连翘酯苷 C (5)、 β -羟基化连翘酯苷 A (6)、 β -羟基化连翘酯苷 H (7)、连翘酯苷 J (8)、连翘株木苷 A (13)、(+)-表松脂素-4'- O - β -D-葡萄糖苷 (16)、连翘苷异构体 (17)、羟基连翘脂素 (20)、连翘脂素 (21)、3',6-二羟基槲皮素 (22)、6-羟基二氢黄酮 (24)、二氢杨梅素 (25)。其中化合物 1、2、7、24、25 为首次从该植物中报道。从总离子流和正负离子模式下分析, 还有一些量较少的色谱峰。推测可能为有机酸类成分, 但其裂解规律有待进一步研究。

本实验采用 HPLC-Q-TOF-MS 技术对连翘果实

药材提取物中的化学成分进行了分析, 鉴定了 12 个苯乙醇苷类成分、7 个木脂素类成分、5 个黄酮类化合物, 为其饮片的质量控制, 以及后续阐明连翘药材的物质作用基础提供了详实的数据支撑。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 赵建平, 张玲, 王伟. 连翘临床新用简介 [J]. 山西中医, 2004, 20(6): 53.
- [3] 陈玲, 李晓, 李倩, 等. 连翘属植物化学成分的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 441-445.
- [4] 曾建勋, 马龚斌, 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.
- [5] 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.
- [6] 王福男. 中药连翘的化学成分研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [7] Guo H, Liu A H, Li L, *et al.* Simultaneous determination of 12 major constituents in *Forsythia suspense* by high performance liquid chromatography-DAD method [J]. *Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(3): 1000-1006.
- [8] 冯锐. 一种连翘总苷的提取纯化工艺研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2014.
- [9] Estrada E, Quincoces J A, Patlewicz G. Creating molecular diversity from antioxidants in Brazilian propolis. combination of TOPS-MODE QSAR and virtual structure generation [J]. *Mol Divers*, 2004, 8(1): 21-33.
- [10] Piccinelli A L, De Simone F, Passi S, *et al.* Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (Burrito), a folk paraguayan tea [J]. *Agric Food Chem*, 2004, 52(19): 5863-5868.
- [11] Roschek B J, Fink R C, McMichael M D, *et al.* Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection *in vitro* [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(10): 1255-1261.