

基于 UPLC-Triple-TOF/MS 方法的三叶青化学成分分析

曾美玲, 沈耐涛, 吴赛伟, 厉 群*

浙江大学医学院附属第四医院, 浙江 义乌 322000

摘要: 目的 建立超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱法 (UPLC-Triple-TOF/MS) 快速分析三叶青 *Tetrastigma hemsleyanum* 的化学成分。方法 采用 Agilent Eclipse Plus-C₁₈ 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈 (0.1% 甲酸)-水 (0.1% 甲酸), 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 ℃。采用电喷雾离子源负离子模式, 全扫描模式采集样品数据, 根据高分辨数据并结合二级质谱信息快速鉴定三叶青的化学成分。结果 推测了三叶青中 51 种化学成分, 主要包括黄酮类、酚酸类、磷脂、糖酯类和苯磺酸类等, 并对磷脂、糖酯和苯磺酸类化合物的裂解规律进行总结。结论 通过 UPLC-Triple-TOF/MS 联用技术, 为定性分析三叶青的化学成分提供了一种快速、高效的定性分析方法。

关键词: 三叶青; 超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱; 黄酮; 磷脂; 酚酸; 原花青素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)05-0874-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.006

Analysis on chemical constituents in *Tetrastigma hemsleyanum* by UPLC-Triple-TOF/MS

ZENG Mei-ling, SHEN Nai-tao, WU Sai-wei, LI-Qun

The Fourth Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Yiwu 322000, China

Abstract: Objective To establish a quick method of ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Triple-TOF/MS) for the analysis of compounds in *Tetrastigma hemsleyanum*. **Methods** The separation was performed on the chromatographic column of Agilent Eclipse Plus-C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 1.8 μm), and the mobile phase was methanol (0.1% formic acid)-0.1% formic acid solution, with a gradient elution at a flow rate of 1 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and negative ion mode was used for TOF-MS. **Results** Fifty-one compounds were identified or tentatively characterized based on the retention time and MS spectra. They are flavonoids, phenolic acids, phospholipids, glycolipids, benzenesulfoic acid, etc. And the preliminary fragmentation rules of phospholipid, glycolipids, and benzenesulfoic acid were summarized. **Conclusion** The results demonstrate that UPLC-Triple-TOF/MS method is novel, quick, and efficient for the identification of the compounds in *T. hemsleyanum*.

Key words: *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg; UPLC-Triple-TOF/MS; flavonoids; phenolic acids; phospholipid; glycolipids; benzenesulfoic acid

三叶青为葡萄科崖爬藤属植物三叶崖爬藤 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg, 全草均可入药, 以地下块根的药用效果最好。其根入药, 具有清热解毒、祛风化痰、活血止痛的功能, 是福建、浙江地区传统习用三叶青鲜草, 习称“一粒珠”。大量药理研究表明三叶青具有抗炎、镇痛及解热、抗肿瘤、抗病毒、调节免疫等作用^[1-3], 因此研究其化学物质基础显得非常有意义。近年来, HPLC-Triple-TOF/MS 技术广泛运用于中药及复方多成分的鉴定

上, 通过高效液相色谱分离, 利用串联高分辨飞行时间质谱的精确相对分子质量定性优势, 全面而快速对中药多成分进行准确鉴定^[4-6]。目前关于三叶青块根药材定性分析已有报道, 主要集中在黄酮类化合物, 但其总量在 0.1%~0.3%^[7-10], 因此三叶青化学物质基础有待进一步研究。本实验采用 UPLC-Triple-TOF/MS 技术对三叶青化学成分进行全面定性分析, 推测了其中 51 种化学成分, 主要包括黄酮类、酚酸类、磷脂、糖酯类和苯磺酸类等,

收稿日期: 2016-07-04

作者简介: 曾美玲 (1988—), 女, 主要研究方向为中药学、药物分析。E-mail: 15868814908@163.com

*通信作者 厉 群 (1987—), 女, 主要研究方向为药物分析、药物制剂。E-mail: 20719022@zju.edu.cn

并对磷脂、糖酯和苯磺酸类化合物的裂解规律进行总结,为三叶青的化学物质基础研究提供新的科学依据。

1 仪器与试剂

UPLC-Triple-TOF/MS 系统:AcquityTM ultra 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Triple TOF 5600⁺型飞行时间质谱,配有电喷雾离子源(美国 AB SCIEX 公司);Eppendorf minispn 离心机(德国 Eppendorf 公司);METTLER TOLEDO XS105 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);三叶青药材购自浙江中医药大学饮片厂(批号 141113),由浙江大学生命科学学院姜维梅副教授鉴定为三叶崖爬藤 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 的干燥块根。乙腈和甲酸为色谱纯(Merck 公司),水为 Milli-Q 超纯水,其余试剂均为分析纯。紫云英苷、儿茶素、山柰酚、槲皮素和槲皮苷对照品购于上海一飞生物科技有限公司;异鼠李素和异槲皮苷对照品购于上海融禾医药科技发展有限公司;对照品质量分数均大于 98%。

2 方法

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为安捷伦 Eclipse Plus-C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 1.8 μm);以 0.1%甲酸溶液为流动相 A,以 0.1%甲酸乙腈为流动相 B,线性梯度洗脱,0~10 min, 5%~10% B; 10~13 min, 10%~12% B; 13~18 min, 12% B; 18~25 min, 12%~20% B; 25~30 min, 20%~40% B; 30~50 min, 40%~90% B, 体积流量为 1.0 mL/min;柱温为 30 °C;检测波长为 254 nm;进样量 10 μL。

2.1.2 质谱条件 UPLC-Triple-TOF 5600⁺飞行时间液质联用仪;负离子扫描模式;扫描范围: *m/z* 100~1 500;雾化气(GS₁): 344.75 kPa;雾化气

(GS₂): 344.75 kPa;气帘气(CUR): 241.325 kPa;离子源温度(TEM): 550 °C(负);离子源电压(IS): -4 500 V(负);一级扫描:去簇电压(DP): 100 V;聚焦电压(CE): 10 V;二级扫描:使用 TOF MS~Product Ion~IDA 模式采集质谱数据, CID 能量为 30、50 和 70 eV,进样前,用 CDS 泵做质量轴校正,使质量轴误差小于 2×10⁻⁶。

2.2 供试品溶液制备

三叶青药材粉碎过 80 目筛,干燥(50 °C)至恒定质量,取 2.0 g 至 100 mL 烧瓶,80 mL 甲醇水浴回流提取 1 h,滤过,取 70 mL 续滤液,减压浓缩至干,甲醇复溶并转移到 5 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过。

2.3 化合物结构分析

查阅国内外三叶青及其同科属植物化学成分研究相关文献报道,同时借助 Scifinder 和 Reaxys 数据库,收集整理了三叶青中各类化学成分。利用液质联用仪采集数据后,提取各色谱峰的质谱图,根据准分子离子([M+H]⁺、[M-H]⁻)和加荷离子([M+NH₄]⁺、[M+Na]⁺、[M+Cl]⁻、[M+HCOO]⁻等)信息判断并得到的一级质谱精确相对分子质量,通过 peakview 1.2 软件在 5×10⁻⁶ 的质量偏差范围内拟合分子式,与文献数据库进行比对,对各色谱峰进行初步推测。筛选信噪比较好的二级质谱图以获取色谱峰的二级质谱信息,并获得化合物相应的碎片离子,根据离子的裂解情况并结合对照品及文献数据进一步比对推测化学成分。

3 结果

三叶青样品在“2.1”项色谱及质谱条件下分析得三叶青 UPLC-Triple-TOF/MS 总离子流图,见图 1。根据“2.3”的数据分析方法,共得到 52 种成分,推测了其中 51 种,结果见表 1。

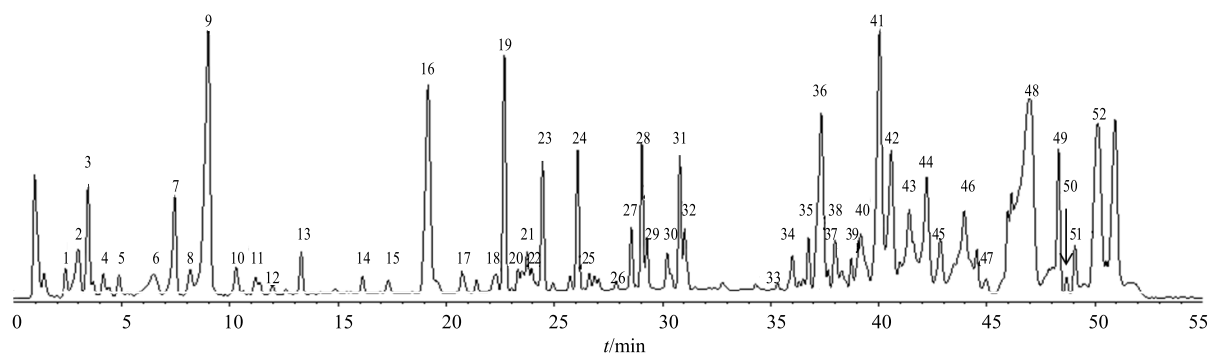


图 1 三叶青样品 UPLC-Triple-TOF/MS 的负离子基峰离子色谱图

Fig. 1 UPLC-Triple-TOF-MS base peak chromatogram of *T. hemsleyanum* in negative ion mode

表 1 三叶青化学成分分析

Table 1 Identification analysis of each chemical constituent in *T. hemsleyanum*

峰号	t_R/min	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	分子式	误差/ ($\times 10^{-6}$)	二级质谱 (m/z)	化合物
1	2.39	353.144 8	353.145 3	$\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$	-1.5	71.016 4 (14), 101.024 5 (36), 161.043 3 (25), 207.086 8 (100), 353.147 1 (17)	乙基芸香糖苷
2	2.97	315.072 4	315.072 2	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_9$	0.8	108.023 4 (100), 109.030 6 (18), 152.012 1 (72), 153.018 2 (12), 315.072 3 (14)	原儿茶酸葡萄糖苷
3	3.43	315.072 3	315.072 2	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_9$	0.5	108.022 9 (100), 109.030 4 (19), 152.011 4 (67), 153.018 6 (13)	原儿茶酸葡萄糖苷
4	4.14	461.130 2	461.130 1	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	0.3	108.022 2 (15), 123.045 7 (11), 152.011 0 (61), 167.034 3 (100), 461.131 0 (13)	香草酸-1- <i>O</i> -呋喃芹糖基葡萄糖酯
5	4.87	447.114 4	447.114 4	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$	0.0	108.023 6 (15), 152.011 7 (100), 447.115 4 (47)	原儿茶酸-1- <i>O</i> -呋喃芹糖基葡萄糖酯
6	6.46	577.135 5	577.135 2	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	0.6	125.024 3 (40), 151.039 4 (22), 161.023 7 (25), 203.069 7 (18), 205.049 7 (18), 245.042 9 (16), 245.081 6 (27), 256.037 2 (22), 281.039 7 (18), 289.072 0 (100), 339.068 2 (18), 407.078 7 (74)	原花青素二聚体
7	7.43	577.135 6	577.135 2	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	0.8	125.025 5 (46), 137.024 7 (16), 151.040 1 (14), 161.024 4 (24), 175.040 1 (12), 203.071 9 (16), 205.050 3 (13), 245.082 3 (27), 256.036 9 (13), 289.072 2 (90), 339.088 7 (11), 407.079 4 (100), 425.089 4 (13), 451.103 3 (12)	原花青素二聚体
8	8.17	577.135 7	577.135 2	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	1.0	125.025 0 (53), 137.023 2 (19), 151.039 3 (21), 161.024 0 (26), 175.038 9 (21), 205.049 7 (21), 245.081 2 (28), 255.029 7 (18), 287.067 7 (18), 289.072 5 (97), 407.079 9 (100)	原花青素二聚体
9	8.97	289.071 9	289.071 8	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	0.5	97.030 4 (23), 109.030 3 (88), 121.029 2 (26), 122.037 9 (17), 123.045 5 (100), 125.024 8 (42), 137.024 9 (45), 149.024 1 (23), 150.030 8 (19), 151.039 3 (47), 159.044 1 (40), 161.060 1 (28), 164.011 2 (21), 187.039 3 (39), 188.047 6 (17), 203.070 6 (40), 205.051 3 (19), 221.080 5 (21), 245.082 4 (19)	儿茶素

续表 1

峰号	t_R/min	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	分子式	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级质谱 (m/z)	化合物
10	10.29	865.201 4	865.198 5	$\text{C}_{45}\text{H}_{38}\text{O}_{18}$	3.3	125.024 7 (67), 161.024 1 (29), 243.028 7 (34), 245.044 1 (34), 261.038 3 (25), 287.055 4 (71), 289.071 2 (72), 407.077 0 (100), 413.088 9 (25), 425.088 3 (37), 449.088 8 (20), 451.103 9 (31), 543.094 6 (25), 575.122 3 (26), 577.138 3 (52), 695.145 6 (42), 713.157 4 (24), 739.172 2 (18), 865.208 6 (83)	原花青素三聚体
11	11.19	417.140 2	417.140 2	$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$	-0.1	59.016 9 (33), 71.016 9 (45), 89.026 5 (85), 108.021 8 (61), 123.044 3 (33), 125.023 0 (67), 233.064 6 (100), 293.086 4 (67)	甲氧基苯酚-1- <i>O</i> -呋喃芹糖 基- <i>O</i> -葡萄糖苷
12	11.97	431.155 8	431.155 9	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	-0.2	135.044 3 (24), 136.053 2 (18), 151.034 0 (10), 195.066 2 (100), 270.008 4 (10), 431.156 8 (42)	2-甲氧基-4-甲基苯-1- <i>O</i> -呋喃 芹糖基葡萄糖苷
13	13.29	415.161 0	415.161 0	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$	0.1	71.019 3 (21), 101.024 7 (26), 113.024 0 (18), 161.044 4 (68), 269.102 1 (100), 415.160 8 (53)	苯乙醇芸香糖苷
14	16.13	741.191 2	741.188 4	$\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{20}$	3.8	271.025 0 (9), 299.020 5 (68), 300.027 4 (32), 301.035 5 (14), 446.087 6 (88), 595.134 3 (42), 741.197 7 (100)	槲皮素-3- <i>O</i> -木糖基葡萄糖- 7- <i>O</i> -鼠李糖苷
15	17.32	577.136 2	577.135 2	$\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	1.8	122.979 9 (15), 125.025 4 (60), 161.023 0 (35), 175.016 0 (20), 187.045 8 (15), 203.075 6 (30), 205.153 4 (15), 245.085 0 (30), 254.964 7 (15), 287.038 2 (20), 289.071 7 (100), 407.076 9 (65)	原花青素二聚体
16	19.16	725.195 8	725.193 5	$\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{O}_{19}$	3.2	255.030 0 (8), 283.025 5 (22), 284.033 3 (90), 285.040 6 (22), 430.091 9 (17), 579.139 9 (100), 725.202 0 (16)	山柰酚-3- <i>O</i> -呋喃芹糖-7- <i>O</i> - 鼠李糖基葡萄糖苷
17	20.75	755.207 1	755.204 0	$\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{20}$	4.1	299.017 9 (4), 313.035 9 (7), 314.044 3 (28), 315.053 2 (10), 460.103 3 (8), 609.153 1 (100), 755.211 8 (23)	异鼠李素-3-吡喃阿拉伯糖- 7-葡萄糖基鼠李糖苷
18	22.32	595.131 1	595.130 5	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{16}$	1.1	255.029 5 (13), 271.024 7 (29), 300.028 3 (100), 301.035 3 (7), 595.135 0 (42)	槲皮素-3- <i>O</i> -木糖基葡萄糖苷

续表 1

峰号	t_R/min	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	分子式	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级质谱 (m/z)	化合物
19	22.69	593.151 2	593.151 2	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	0.0	255.030 3 (19), 283.025 3 (100), 285.040 8 (89), 430.092 4 (44), 431.100 9 (29), 447.095 6 (25), 593.155 8 (22)	山柰酚-7- <i>O</i> -鼠李糖-3- <i>O</i> -葡萄糖苷
20	23.33	623.162 9	623.161 8	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	1.8	270.015 6 (13), 300.025 9 (13), 313.034 9 (100), 314.042 6 (13), 315.050 8 (95), 445.078 5 (10), 460.103 4 (49), 461.111 3 (53), 477.106 9 (43), 623.167 9 (30)	异鼠李素-7- <i>O</i> -鼠李糖-3- <i>O</i> -葡萄糖苷
21	23.60	499.181 7	499.182 1	$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$	-0.8	161.097 2 (34), 205.087 1 (100)	异戊烯基苯甲酸-4- <i>O</i> -木糖基葡萄糖苷
22	23.75	463.088 5	463.088 2	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	0.6	151.003 6 (8), 243.029 7 (15), 255.030 1 (31), 271.025 6 (71), 300.028 5 (100), 301.035 9 (55), 463.090 7 (9)	异槲皮苷
23	24.46	579.136 4	579.135 5	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$	1.5	227.035 0 (16), 255.030 3 (36), 284.033 5 (100), 285.041 6 (19), 579.140 7 (24)	山柰酚芸香糖苷
24	26.08	447.093 9	447.093 3	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	1.4	227.035 3 (73), 255.030 6 (100), 284.033 6 (66), 285.041 2 (25), 447.096 3 (17)	紫云英苷
25	26.62	507.114 9	507.114 4	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$	1.0	241.013 6 (16), 242.020 5 (24), 258.016 7 (20), 270.016 2 (10), 273.040 8 (40), 286.010 7 (16), 301.035 7 (28), 316.059 4 (15), 329.030 5 (23), 344.054 9 (100), 345.062 5 (12), 507.118 2 (48)	丁香亭-3- <i>O</i> -葡萄糖苷
26	27.88	447.093 7	447.093 3	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	0.9	151.003 0 (52), 300.027 5 (60), 301.035 6 (100), 447.094 5 (20)	槲皮苷
27	28.56	535.256 7	535.254 9	$\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_{10}$	3.4	129.103 8 (37), 171.080 9 (12), 189.066 3 (100), 205.097 3 (11), 318.151 2 (11), 318.181 7 (17), 361.155 7 (27), 405.146 2 (22), 491.268 5 (29), 535.259 1 (57)	未知
28	29.05	431.098 4	431.098 4	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	0.1	151.004 0 (37), 257.045 7 (23), 284.033 2 (39), 285.040 8 (100), 431.100 0 (14)	山柰酚-3- <i>O</i> -鼠李糖苷
29	29.28	301.035 8	301.035 4	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	1.4	62.993 0 (40), 65.007 0 (94), 93.035 5 (54), 107.014 4 (67), 121.030 1 (100), 149.022 5 (34), 151.003 8 (381), 161.016 5 (33), 162.998 7 (33), 178.997 6 (60), 245.303 2 (60), 301.034 8 (73)	槲皮素

续表 1

峰号	t_R/min	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	分子式	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级质谱 (m/z)	化合物
30	30.22	357.061 9	357.061 6	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_8$	0.9	77.043 2 (45), 112.989 1 (11), 121.030 2 (100), 135.044 9 (5), 163.039 6 (28)	岩衣酸
31	30.80	285.041 5	285.040 5	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	3.6	143.050 2 (10), 145.029 6 (10), 159.045 0 (10), 183.044 5 (10), 185.060 3 (11), 187.039 1 (14), 211.038 2 (9), 227.034 6 (11), 239.034 8 (10), 285.041 0 (100)	山柰酚
32	31.03	315.051 0	315.051 0	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	-0.1	63.026 5 (12), 151.002 7 (31), 163.002 1 (12), 164.011 1 (20), 227.031 2 (12), 243.027 3 (12), 255.028 8 (12), 271.024 6 (20), 283.025 2 (11), 300.028 5 (100), 315.051 9 (23)	异鼠李素
33	35.32	721.367 3	721.365 2	$\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_{14}$	2.9	89.024 9 (10), 161.044 8 (10), 235.082 6 (13), 277.217 7 (100), 397.136 6 (88), 415.145 9 (40), 675.368 2 (15)	姜糖脂 A 或其异构体
34	35.83	721.367 5	721.365 2	$\text{C}_{33}\text{H}_{56}\text{O}_{14}$	2.4	89.025 2 (9), 119.035 8 (8), 161.015 0 (7), 235.081 6 (11), 277.218 2 (100), 397.137 9 (82), 415.148 0 (34), 675.369 0 (12)	姜糖脂 A 或其异构体
35	36.67	677.376 6	677.375 4	$\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{O}_{14}$	1.8	89.026 1 (5), 119.034 9 (4), 125.024 3 (4), 161.045 3 (5), 179.055 7 (5), 235.082 2 (9), 279.233 8 (100), 397.136 5 (67), 415.147 3 (31), 677.382 2 (11)	姜糖脂 B
36	37.34	265.148 2	265.147 9	$\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{S}$	1.1	79.960 2 (13), 96.962 1 (100), 265.148 2 (15)	月桂基硫酸氢
37	37.67	476.278 4	476.278 3	$\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{NO}_7\text{P}$	0.3	78.959 9 (4), 140.011 1 (4), 196.037 6 (12), 214.047 3 (2), 279.232 7 (100), 476.279 7 (4)	1-linoleylglycero-2-phospho-ethanolamine
38	37.99	431.220 3	431.220 4	$\text{C}_{21}\text{H}_{37}\text{O}_7\text{P}$	-0.3	78.961 8 (25), 152.995 7 (100)	1-linolenoyl-2-lysosn-glycero-3-phosphate
39	38.73	452.278 1	452.278 3	$\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{NO}_7\text{P}$	-0.4	78.961 2 (4), 140.011 2 (3), 196.037 8 (9), 255.233 4 (100)	1-棕榈-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺
40	39.17	311.169 0	311.168 6	$\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{S}$	1.2	79.959 2 (6), 119.051 1 (12), 170.002 7 (4), 183.012 0 (100), 197.027 4 (3), 311.169 5 (41)	4-(1-methyl-decyl)-benzene-sulfonic acid
41	40.04	433.235 9	433.236 1	$\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{P}$	-0.4	78.962 8 (18), 152.995 9 (100)	亚油酰基溶血磷脂酸
42	40.58	433.235 9	433.236 1	$\text{C}_{21}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{P}$	-0.4	78.962 8 (18), 152.996 2 (100)	亚油酰基溶血磷脂酸异构体
43	41.43	325.184 2	325.184 3	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{S}$	-0.3	119.051 0 (9), 170.004 4 (4), 183.012 1 (100), 325.185 6 (39)	4-(2-dodecyl)-benzene-sulfonate

续表 1

峰号	t_R/min	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	分子式	误差 ($\times 10^{-6}$)	二级质谱 (m/z)	化合物
44	42.22	409.235 7	409.236 1	$\text{C}_{19}\text{H}_{39}\text{O}_7\text{P}$	-0.9	78.962 9 (29), 152.996 5 (100), 255.232 9 (7)	1-palmitoyl-lysophosphatidic acid
45	42.85	435.251 6	435.251 7	$\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{O}_7\text{P}$	-0.3	78.962 3 (25), 96.971 2 (4), 150.979 9 (4), 152.996 0 (100), 171.005 3 (4), 281.248 7 (3)	溶血磷脂酸
46	43.96	339.200 0	339.199 9	$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{S}$	0.2	79.959 5 (2), 119.051 2 (9), 170.003 9 (4), 183.012 2 (100), 197.027 5 (2), 225.058 3 (2), 239.073 8 (3), 339.201 4 (46)	4-(1-methyl-dodecyl)-benzene-sulfonic acid
47	44.97	339.200 2	339.199 9	$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_3\text{S}$	0.8	79.959 5 (2), 119.049 3 (7), 183.012 1 (100), 184.019 1 (18), 339.199 8 (60)	4-(1-methyl-dodecyl)-benzene-sulfonic acid 异构体
48	46.91	981.581 7	981.579 2	$\text{C}_{51}\text{H}_{84}\text{O}_{15}$	2.5	89.026 9 (1), 161.045 5 (2), 179.056 0 (2), 277.217 2 (100), 379.125 3 (14), 397.135 9 (39), 415.146 6 (9), 657.353 5 (14), 675.364 7 (9), 935.584 2 (10)	1,2-二亚麻酰-3- <i>O</i> -(半乳糖基半乳糖)甘油
49	48.32	497.347 4	497.348 4	$\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}_7$	-2.0	85.030 9 (14), 99.010 5 (17), 111.009 1 (20), 129.019 2 (100), 141.017 3 (12), 349.310 5 (23), 497.348 3 (49)	passifloricin C 衍生物
50	48.69	279.233 0	279.233 0	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	0.2		亚麻酸
51	49.08	499.363 5	499.364 0	$\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{O}_7$	-1.1	75.022 7 (14), 99.010 9 (10), 129.019 8 (22), 363.326 5 (10), 499.366 0 (100)	passifloricin C
52	50.13	758.543 9	758.542 4	$\text{C}_{40}\text{H}_{75}\text{NO}_9$	2.0	89.027 0 (11), 119.036 6 (13), 179.055 6 (8), 225.221 8 (12), 271.227 8 (9), 278.248 7 (9), 296.259 5 (10), 532.475 6 (64), 550.486 8 (32), 712.543 0 (100)	大豆脑苷 I

3.1 黄酮类

根据文献报道^[1]三叶青的提取物中含有槲皮素、山柰酚等黄酮类成分,在一级质谱中,化合物的准分子离子峰丰度较高,氯和甲酸加荷离子峰丰度较低,在二级高分辨质谱中,可以观测到 $[\text{M}-\text{Glc}-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{Rha}-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{Glc}-\text{Xyl}-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{Rha}-\text{Glc}-\text{H}]^-$ 等碎片离子,其中 m/z 285.040 5、 m/z 301.035 6 和 m/z 315.051 0 分别为山柰酚、槲皮素和异鼠李素的准分子离子峰。通过比对对照品,峰 22、24、26、29、31 和 32 鉴定为异槲皮苷、紫云英苷、槲皮苷、槲皮素、山柰酚和异鼠李素。峰

14、16、17、18、19、20、21、23、25 和 28 通过分析其碎片和母核离子,确定为黄酮类成分,经文献比对^[7-10],推测其结构。

峰 6、7、8 和 15 TOF/MS 均给出分子离子峰 577.135 4,质谱软件计算出精确分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$,与文献报道的原花青素二聚体类分子式一致,再根据 TOF-MS 二级碎片离子 m/z 407.079 9、289.072 5、245.081 2、125.025 0 等,与文献报道原花青素二聚体二级质谱相一致^[11],推测为原花青素二聚体,峰 10 给出分子离子峰 865.201 4,质谱软件计算出精确分子式为 $\text{C}_{45}\text{H}_{38}\text{O}_{18}$,再根据 TOF-MS

二级碎片离子 m/z 739.172 2, 577.138 3, 407.079 9, 289.072 5, 245.081 2, 125.025 0, 推测为原花青素三聚体。峰 9 经对照品比对, 推断峰 9 为儿茶素。

3.2 酚酸类

峰 2、3、4 和 5 TOF/MS 给出分子离子峰, 质谱软件计算出精确分子式, 在二级质谱中, 均观测到 m/z 152.011 0 ($C_7H_4O_4$) 和 108.022 9 ($C_6H_4O_2$) 离子, 根据质谱软件计算, m/z 108.022 9 可能为二苯酚类结构, 而 m/z 152.011 0 脱羧后变成 m/z 108.022 9 离子, 此类结构的母核可能为原儿茶酸, 根据文献检索和裂解途径研究^[12-13], 推测峰 2 和 3 为原儿茶酸葡萄糖苷, 葡萄糖取代未知无法确认。峰 4 和 5 分别推测为香草酸-1-*O*-呋喃芹糖基葡萄糖酯和原儿茶酸-1-*O*-呋喃芹糖基葡萄糖酯。根据 TOF/MS 结果, 峰 11 与峰 12 差 1 个亚甲基, 根据峰 11 二级碎片信息, 推测峰 11 的母核离子为二苯酚结构, 根据 Reaxys 数据库检索, 推测峰 11 和峰 12 分别推测为甲氧基苯酚-1-*O*-呋喃芹糖基-*O*-葡萄糖苷和 2-甲氧基-4-甲基苯-1-*O*-呋喃芹糖基葡萄糖苷。

3.3 酯类

负离子模式下观测到一些饱和度较高的化学成分, 可能存在长链不饱和脂肪酸结构单元, 该类成分出峰晚于黄酮苷元, 紫外吸收较差, 容易被忽视。对高分辨质谱数据解析后, 发现三叶青块根中存在磷脂和糖酯 2 类成分。

3.3.1 磷脂类 峰 37、38、39、41、42、44 和 45, 一级质谱负离子模式响应较好, 质谱软件计算出精确分子式, 发现化合物中含有磷元素且饱和度较高, 检索数据库后, 初步推测此类化合物为磷脂, 在二级质谱中观测到 m/z 78.962 9 (PO_3) 典型磷脂碎片峰, 根据 Reaxys 数据库和裂解途径分析 (图 2), 推测均为磷脂类成分。

3.3.2 糖酯类 峰 33、34、35 和 48 在一级质谱中, 化合物的氯和甲酸加荷离子丰度较高, 几乎观测不到准分子离子峰, 二级质谱中, 观测到 m/z 161.045 5、277.217 2、415.146 6 和 675.365 7 等碎片离子, 根据文献检索^[14-15]和裂解途径分析 (图 3), 推测均为糖酯类成分。

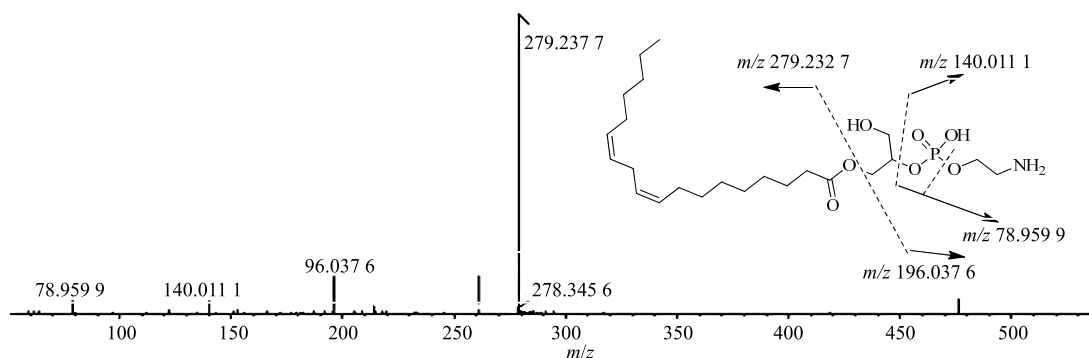


图 2 1-Linoleylglycero-2-phosphoethanolamin 质谱裂解过程

Fig. 2 Detail fragmentation pathway of 1-linoleylglycero-2-phosphoethanolamin

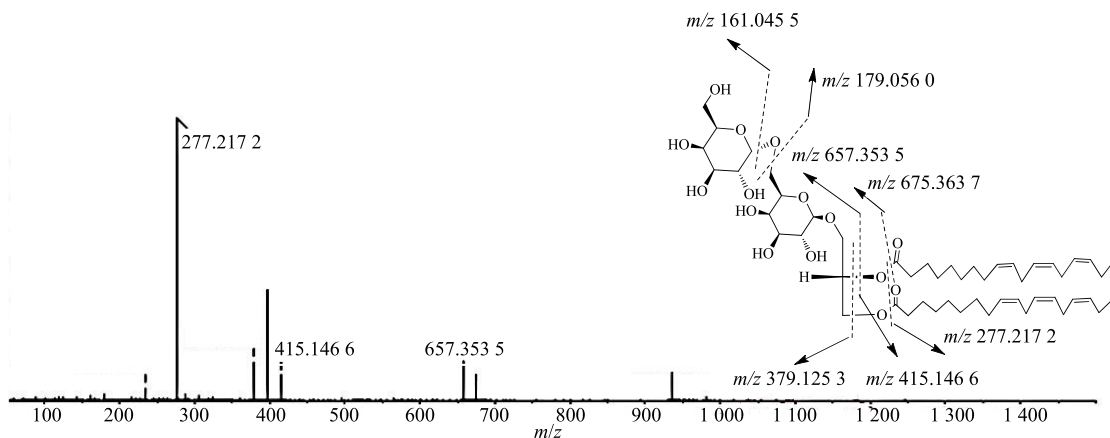


图 3 1,2-二亚麻酰-3-*O*-(半乳糖基半乳糖) 甘油质谱裂解过程

Fig. 3 Detail fragmentation pathway of 1,2-di-linolenoyl-3-*O*-(galactopyranosyl-*O*-galactopyranosyl) glycerol

3.4 烷基磺酸类

峰 36、40、43、46 和 47，一级质谱负离子模式响应较好，质谱软件计算出精确分子式，发现化合物中含有硫元素，检索数据库后，初步推测此类

化合物为烷基磺酸类，在二级质谱中观测到 m/z 79.958 9 (SO_3) 和 m/z 183.011 7 ($\text{C}_8\text{H}_8\text{SO}_3$) 2 个典型磺酸根和苯磺酸根碎片峰，根据数据库和裂解途径分析 (图 4)，推测均为烷基磺酸类成分。

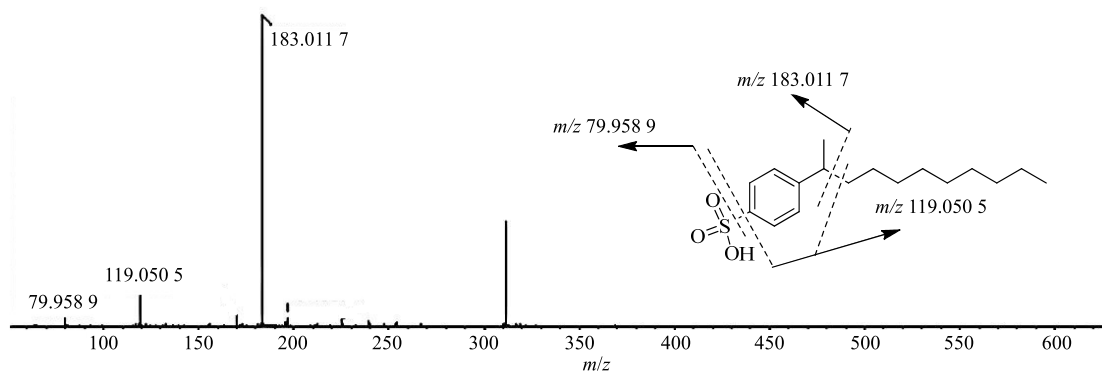


图 4 4-(1-Methyl-decyl)-benzenesulfonic acid 质谱裂解过程

Fig. 4 Detail fragmentation pathway of 4-(1-methyl-decyl)-benzenesulfonic acid

3.5 其他类

峰 1 在一级质谱中显示 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子为 m/z 353.144 8，质谱软件计算出精确分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$ ，在 MS^2 图谱中均可见 m/z 207.086 8 和 m/z 161.043 3，推测为 $[\text{M}-\text{H}-\text{Rha}]^-$ 和 $[\text{Glu}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ ，峰 1 推测为乙基芸香糖苷；峰 13 在一级质谱中显示 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子为 m/z 415.161 0，质谱软件计算出精确分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{10}$ ，在 MS^2 图谱中均可见 m/z 269.102 1 和 m/z 161.044 4，推测为 $[\text{M}-\text{H}-\text{Rha}]^-$ 和 $[\text{Glu}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ ，峰 13 推测为苯乙醇芸香糖苷^[16]；同理，其余色谱峰均得到推测。

4 讨论

4.1 检测条件的优化

比较了正负离子检测模式，发现负离子模式质谱响应明显优于正离子模式，因此本实验在负离子模式下定性分析样品。通过色谱条件优化，比较了乙腈水和甲醇水，结果表明，使用乙腈水系统的分离效果优于甲醇水。当水相中添加 0.1% 甲酸时，峰形更优，质谱响应更佳。色谱柱比较了普通 C_{18} 柱和快速分离柱 (填料粒径 1.8 μm)，快速分离柱不但提高了峰容量，而且磷脂和糖酯类成分峰形得到明显改善。

4.2 质谱解析

UPLC-Triple-TOF/MS 提供了一级高分辨数据，根据元素组成，计算出分子式，寻找植物中首次发现的已知化合物提供了搜库的可能。二级碎片离子也是高分辨数据，为分析碎片离子和断裂方式提供

更加准确而丰富的信息。

4.3 小结

本实验利用 UPLC-Triple-TOF/MS 联用技术，建立了三叶青定性分析方法，共分析了三叶青 52 个化合物，为三叶青成分定性提供了一种快速、高效的分析方法。磷脂、糖酯和烷基磺酸类成分在三叶青块根中首次发现，扩展了三叶青化学成分类别，但其药理活性有待进一步研究。本研究结果可以为三叶青的药效物质基础研究及质量控制提供新的依据。

参考文献

- [1] 陈丽芸, 郭素华. 三叶青的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2012(12): 1368-1370.
- [2] Peng X, Zhuang D D, Guo Q S. Induction of S phase arrest and apoptosis by ethyl acetate extract from *Tetrastigma Hemsleyanum* in human hepatoma hepg (2) cells [J]. *Tumor Biol*, 2015, 36(4): 2541-2550.
- [3] Ye C L, Liu X G. Extraction of flavonoids from *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg and their antioxidant activity [J]. *J Food Processing Preservation*, 2015, 39(6): 2197-2205.
- [4] Peng Y, Zhao L L, Lin D J, et al. Determination of the chemical constituents of the different processed products of *Anemarrhena Asphodeloides Rhizomes* by high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(4): 508-519.
- [5] Ling Y, Fu Z W, Zhang Q, et al. Identification and structural elucidation of steroidal saponins from the root of *Paris Polyphylla* by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS [J].

- Nat Prod Res*, 2015, 29(19): 1798-1803.
- [6] Zhang F, Qi P, Xue R, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in *Acorus tatarinowii* Schott by HPLC/ESI-QTOF-MS/MS [J]. *Biomed Chromatogra*, 2015, 29(6): 890-901.
- [7] 许文, 傅志勤, 林婧, 等. HPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC-QqQ-MS 的三叶青主要成分定性定量研究 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 30(22): 4365-4372.
- [8] 许文, 傅志勤, 林婧, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定三叶青中 10 种黄酮类成分 [J]. *药学学报*, 2014, 49(12): 1711-1717.
- [9] Sun Y, Li H Y, Hu J N, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of phenolics in *Tetragastium Hemsleyanum* and their antioxidant and antiproliferative activities [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(44): 10507-10515.
- [10] Sun Y, Qin Y, Li H Y, *et al.* Rapid characterization of chemical constituents in *Radix Tetragastium*, a functional herbal mixture, before and after metabolism and their antioxidant/antiproliferative activities [J]. *J Functional Foods*, 2015, 18: 300-318.
- [11] 刘国强, 董静, 王弘, 等. EgC/Gc 和 egcg/Gcg 的 esi-It-ToF 质谱裂解规律研究 [J]. *质谱学报*, 2009, 30(5): 287-294.
- [12] Zeng X, Wang H, Gong Z, *et al.* Antimicrobial and cytotoxic phenolics and phenolic glycosides from *Sargentodoxa Cuneata* [J]. *Fitoterapia*, 2015, 101: 153-161.
- [13] 陈丽芸. 三叶青化学成分及抗肿瘤活性研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2014.
- [14] Yoshikawa M, Yamaguchi S, Kunimi K, *et al.* Stomachic principles in Ginger. Iii. An anti-ulcer principle, 6-gingesulfonic acid, and three monoacyl-digalactosylglycerols, gingerglycolipids A, B, and C, from *Zingiberis Rhizoma* originating in Taiwan [J]. *Chem Pharm Bull*, 1994, 42(6): 1226-1230.
- [15] Gao Z, Ali Z, Khan I A. Glycerogalactolipids from the fruit of *Lycium Barbarum* [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(16): 2856-2861.
- [16] 郭晓江. 两种药用植物的化学成分及生物活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2013.