

UPLC-LTQ-Orbitrap MS 结合分子网络技术鉴别铁线莲属植物中三萜皂苷类成分

袁 恩, 邓敏芝, 周立分, 张普照, 张亚梅*

江西中医药大学, 江西 南昌 330004

摘要: **目的** 构建铁线莲属 6 种植物中皂苷类成分的分子网络与快速分析。**方法** 超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱联用技术 (UHPLC-LTQ Orbitrap MS) 采集质谱信息, 将信息上传至 GNPS 数据平台计算分析, 借助 Cytoscape 软件生成可视化分子网络图, 根据对照品的裂解规律和文献分析鉴定铁线莲植物中皂苷类成分。**结果** 从 6 种植物中鉴别出常春藤和齐墩果酸型皂苷共 25 个, 其中 16 个为常春藤型皂苷、9 个为齐墩果酸型皂苷, 根据代表各成分节点的颜色及比例, 得到各成分在铁线莲属 6 种植物中的分布情况。鉴定的 25 个三萜皂苷中, 20 个为 2 种或 2 种以上铁线莲共有成分, 其中化合物 clematichinenoside A 和 oleanolic acid 3-*O*-ribopyranosyl-(1→3)- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -*L*-arabinopyranoside 为 5 种铁线莲共有成分; 6 个三萜皂苷只在单种铁线莲中存在。**结论** 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 的分子网络技术与传统分析方法比较, 其可快速、可视化的区分 6 种植物中三萜皂苷的差异; 6 种植物中三萜皂苷类成分相似之中又有不同, 为药材替代提供参考依据。

关键词: 铁线莲; 超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱联用技术; 分子网络; 皂苷; 常春藤型皂苷; 齐墩果酸型皂苷
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)24-6157-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.004

Identification on triterpenoid saponins of *Clematis* species by UPLC-LTQ-Orbitrap MS combined with molecular network

YUAN En, DENG Min-zhi, ZHOU Li-fen, ZHANG Pu-zhao, ZHANG Ya-mei

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To construct molecular network and analyze rapidly the saponins of six species of *Clematis* plants. **Methods** The mass spectral data, acquired with UHPLC-LTQ Orbitrap MS, were uploaded to the GNPS analysis platform to build molecular network, visualized by Cytoscape software. On the other hand, the triterpenoid saponins from six plants were identified on the basis of the fragmentation regularity of the standard and the reported literature. **Results** Twenty-five triterpenoid saponins, including 16 hederagenin saponins and nine oleanolic acid-type saponins, were determined from six kinds of plants. The distribution of the triterpenoid saponins in the six kinds of plants were profiled by the pie chart of each node in molecular network. Twenty compounds were found in at least two species of *Clematis*. Clematichinenoside A and oleanolic acid 3-*O*-ribopyranosyl-(1→3)- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -*L*-arabinopyranoside were the common constituents in five species. Six saponins were distributed in in single species of *Clematis*. **Conclusion** Compared with traditional phytochemical methods, the molecular network technology of UPLC-LTQ-Orbitrap MS can quickly and visually distinguish different triterpenoid saponins in six kinds of plants. There are similarities and differentiates among the triterpenoid saponins in the six kinds of plants, which provides the basis for the substitution of medicinal materials.

Key words: clematis; LTQ Orbitrap MS; molecular network; saponin; hederagenin saponins; oleanolic acid-type saponins

毛茛科 (Ranunculaceae) 铁线莲属 *Clematis* L. 植物为多年生木质藤本, 全世界有 350 余种^[1], 我
国毛茛科铁线莲属植物资源丰富, 分布于全国各地, 主要以华中地区、西南地区居多。该属植物在多个

收稿日期: 2020-03-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21562027); 江西省自然科学基金资助项目 (20171BAB205091)

作者简介: 袁 恩 (1992—), 男, 硕士, 研究方向为中药有效成分分析。Tel: 13397917681 E-mail: 1264383988@qq.com

*通信作者 张亚梅 (1982—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药资源开发利用。Tel: 18174012941 E-mail: yameizhang01@126.com

民族中作为药用, 具有祛风除湿、舒筋活血、消肿止痛等功效^[2]。目前从 20 余种本属植物中分离得到皂苷类、黄酮类、木脂素类、挥发油类、生物碱类、甾醇类等成分, 其中皂苷类化合物是该属的主要成分, 有 70 余种^[3], 主要为常春藤型和齐墩果酸型^[4]。随着铁线莲属药材民族用药的增多, 其多基原、多代用品的现象十分普遍。然而大部分铁线莲属药材所含化学成分尚不明确, 无法阐明替代的合理性, 因此急需一种有效的方法来区分铁线莲属不同基原药材的成分差异。传统的植物化学研究过程漫长, 且实验的重复性差, 无法在短时间内系统地分析药材化学成分差异。超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱联用技术 (UHPLC-LTQ Orbitrap MS) 结合数学计算方法, 可以快速完成对复杂化学成分的鉴定, 比较样品间的成分差异, 但这些结果可视化不好, 实验员需要耗费大量时间完成数据追踪和化学成分结构解析。

分子网络 (molecular networking) 是近年发展起来的天然产物可视化鉴定技术^[5], 结构类似的天然产物, 在相同的质谱裂解条件下, 会产生相似的特征碎片离子, 通过计算机计算这些碎片离子的相似度, 按相似度大小, 合成一张可视化的网络图谱, 其中每一个节点表示一个化合物的 MS/MS 质谱图, 结构类似的化合物分子会在一个分子网络中聚集成簇^[6], 目前, 分子网络技术作为研究工具广泛在天然产物领域使用^[7]。

本研究采用分子网络技术, 将 UHPLC-LTQ Orbitrap MS 采集样品和标准化合物的二级质谱数据上传至全球天然产物分子网络集群数据库 (Global Natural Products Social Molecular Networking), 并借助 Cytoscape 软件可视化, 构建长花铁线莲、美花铁线莲、甘川铁线莲、钝萼铁线莲、银叶铁线莲、准噶尔铁线莲 6 种植物中的皂苷

类化合物的分子网络图, 鉴定皂苷类化合物结构, 探讨皂苷类化合物在 6 种植物中的分布规律, 为药材的替代提供依据; 同时本研究结果为质谱分子网络在药材化学成分全面或者某大类成分的比较提供可行性依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LTQ-Orbitrap Elite 线性离子阱-串联静电场轨道阱质谱仪: 配有电喷雾离子源 (ESI)、Xcalibur 2.1 化学工作站, 美国 Thermo Scientific 公司; Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UHPLC Plus Focused 超高效液相色谱系统: 配有二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二级管阵列 (DAD) 检测器, 美国 Thermo Scientific 公司; Chromeleon 7 工作站, 美国 Thermo Scientific 公司; Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统, 美国 Millipore 公司; KQ3200DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; R200D 型电子分析天平 (十万分之一), 德国 Sartorius 公司。

1.2 试剂与材料

5 种化合物对照品葎岩仙皂苷 F、常春藤皂苷 C、虎掌草皂苷 D、葎岩仙皂苷 D、刺五加皂苷 A1 均由本课题组分离纯化得到 (经 HPLC, 质量分数 $\geq 98\%$), 质谱级甲醇、乙腈 (美国 ACS 恩科化学有限公司); 质谱级甲酸 (美国 Fishier Scientific 公司); 其余试剂均为分析纯; 铁线莲药材经江西中医药大学中药资源与民族药研究中心钟国跃研究员鉴定, 样品采集信息见表 1。

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液的配制 精确称取 4 种常春藤型皂苷葎岩仙皂苷 F、葎岩仙皂苷 D、常春藤皂苷 C、虎掌草皂苷 D 及齐墩果酸型皂苷刺五加皂苷 A1 各 1.02 mg, 分别置于 2 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀

表 1 铁线莲属 6 种植物信息表

Table 1 Origin information of six *Clematis* species

植物名称	拉丁名	采集地点	采集号
长花铁线莲	<i>C. rehderiana</i> Craib	四川省甘孜州康定县	20170712
甘川铁线莲	<i>C. akebioides</i> Maxim.	四川省甘孜州炉霍县	20170713
美花铁线莲	<i>C. potaninii</i> Maxim.	四川省甘孜州甘孜县	20170715
钝萼铁线莲	<i>C. petersae</i> Hand	四川省阿坝州壤塘县	20170716
银叶铁线莲	<i>C. delavayi</i> Franch	四川省阿坝州马尔康县	20170717
准噶尔铁线莲	<i>C. songorica</i> Bunge	新疆维吾尔自治区托里县	20170818

释至刻度，5 个对照品溶液摇匀后各取 100 μL 于 2 mL 离心管内，混合均匀，并稀释至澄清，放入高速离心机中 13 000 r/min 离心 10 min，离心后取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，置于 1.5 mL 液相瓶内，即得常春藤型和齐墩果酸型皂苷混合对照品溶液，备用。

2.1.2 供试品溶液的配制 称取 6 种铁线莲干燥样品各 10 g，分别加入 100 mL 75% 甲醇溶液，60 $^{\circ}\text{C}$ 回流提取 90 min，分别取上清液 1 mL 于 2 mL 离心管内，放入高速离心机中 13 000 r/min 离心 10 min，离心后取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，置于 1.5 mL 液相瓶内，即得供试品溶液，备用。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)，流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B)，梯度洗脱：0~15 min, 10%~20% B；15~18 min, 20%~25% B；18~20 min, 25% B；20~55 min, 25%~36% B；55~75 min, 36%~40% B；75~80 min, 40%~95% B；80~82 min, 95% B；82~82.1 min, 95%~10% B；82.1~85 min, 10% B。柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ ，进样量 3 μL ，体积流量 0.3 mL/min。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI)，负离子检测模式，毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$ ，鞘气体积流量 30 L/h，辅助气体流量 10 L/h，喷雾电压 3 kV，毛细管电压 -35 V，管透镜电压 -110 V。样品采用全扫描模式，分辨率 30 000，质量扫描范围 m/z 600~1 500，数据依赖性扫描 DDA- MS^2 ；母离子列表 PIL- MS^2 ；运用 CID 和 HCD 结合的裂解方式获得碎片离子。

2.3 数据处理

利用 Xcalibur 2.1 工作站进行质谱数据处理，构

建常春藤皂苷元和齐墩果酸皂苷元特征碎片模板，总结标准品裂解规律。同时，采用 LC- MS/MS 分子网络技术，依据供试品和对照品二级碎片相似性建立分子网络图，鉴定 6 种铁线莲样品中的化学成分，并结合精确相对分子质量、保留时间及相关文献，推测结构类似化合物。

3 结果与讨论

3.1 常春藤型皂苷和齐墩果酸型皂苷的裂解方式和裂解电压的选择

首先采用常规的依赖型数据采集 DDA- MS^2 和源内 CID 裂解采集方法，以不同裂解电压 (20、30、40 eV) 获得皂苷化合物二级质谱图，以常春藤皂苷 C 为例，裂解电压为 20 eV，获得的碎片离子不全，且未得到母核碎片信息；裂解电压为 40 eV，能量过大，母离子被完全打碎；裂解电压为 30 eV，既能保留母离子信息，也能获得 m/z 1 073、749、731、603、471、469 等特征碎片离子，见图 1。故选择 30 eV 作为最优裂解电压。

在常规 CID 裂解模式下，对一些相对分子质量较大的化合物，无论如何增大裂解电压，都裂解不完全，无法提供准确的母核信息，故选择 PIL- MS^2 和 HCD 高能碰撞采集方法对这类化合物进行结构鉴定。以推测化合物 hederagenin 3- O - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-ribosepyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside 为例：质谱提供的精确准分子离子峰为 m/z 1 205.590 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ，分子式为 $\text{C}_{58}\text{H}_{94}\text{O}_{26}$ (质量偏差为 3.07×10^{-6})。在 CID 源内裂解采集模式下，二级质谱图中出现 m/z 1 161、1 043、881、749、603 等碎片离子，见图 2-a。其中， m/z 1 161

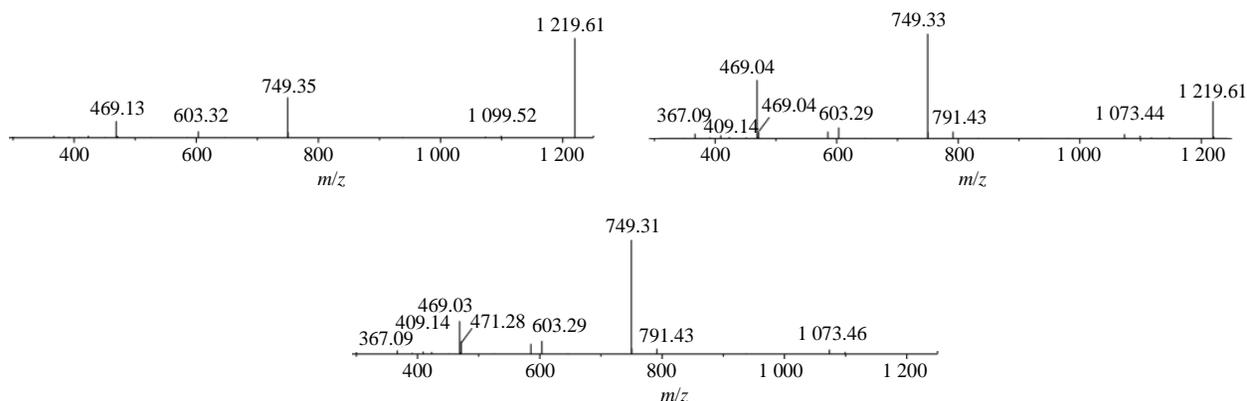


图 1 不同裂解电压下常春藤皂苷 C 的二级质谱图

Fig. 1 MS^2 spectra of hederasaponin C at different collision energies

碎片离子是准分子离子 C₂₈ 位脱羧反应而形成的, 提示化合物 C₂₈ 位未连接糖分子; 碎片离子 *m/z* 1 043 与准分子离子 *m/z* 1 205 质量数相差 162, 提示存在六碳糖, 该碎片离子进一步脱去 1 分子 H₂O, 形成 *m/z* 1 025 碎片离子; 同理, 碎片离子 *m/z* 1 043、881、749、603 质量数分别相差 *m/z* 162、132、146, 提示依次存在六碳糖、五碳糖、鼠李糖。由此推测, 化合物含有 2 分子六碳糖、1 分子五碳糖及 1 分子

鼠李糖, 但由于缺少母核碎片信息, 无法鉴定其为哪种类型的皂苷类成分。在 HCD 采集的二级质谱图中, 不仅获得更多碎片离子, 而且出现明显的 *m/z* 471 常春藤皂苷元诊断离子, 见图 2-b。

3.2 对照品质谱裂解规律

在负离子模式下, 分别对 5 个对照品进行全扫描和 DDA-MS² 裂解分析 (图 3)。在结构上, 对照品都有 1 个相同的三萜母环, 苷元分别为常春藤(葸

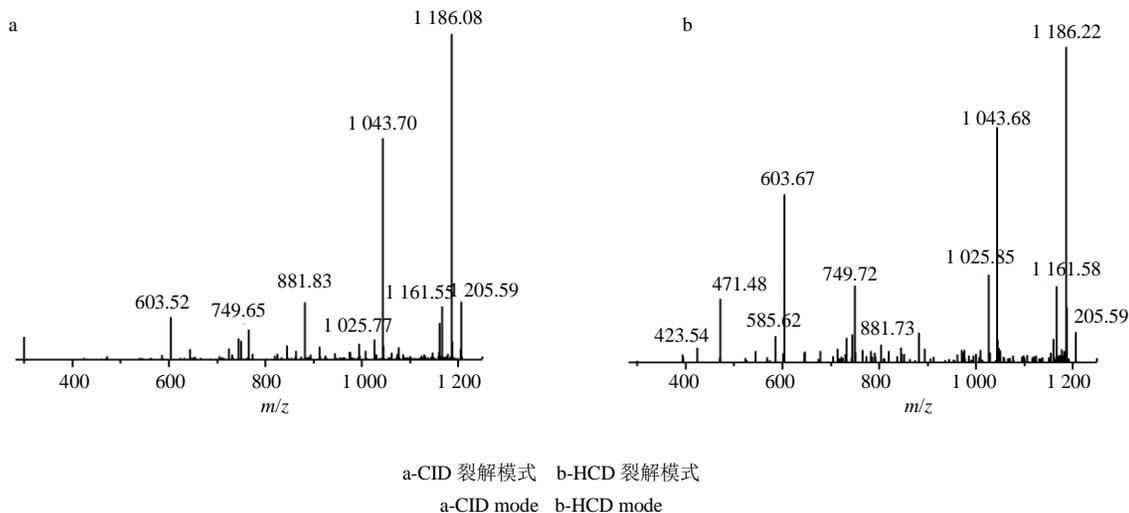


图 2 hederagenin 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-ribosepyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside 的二级质谱图

Fig. 2 MS² spectra of compound hederagenin 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-β-D-ribosepyranosyl-(1→3)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside

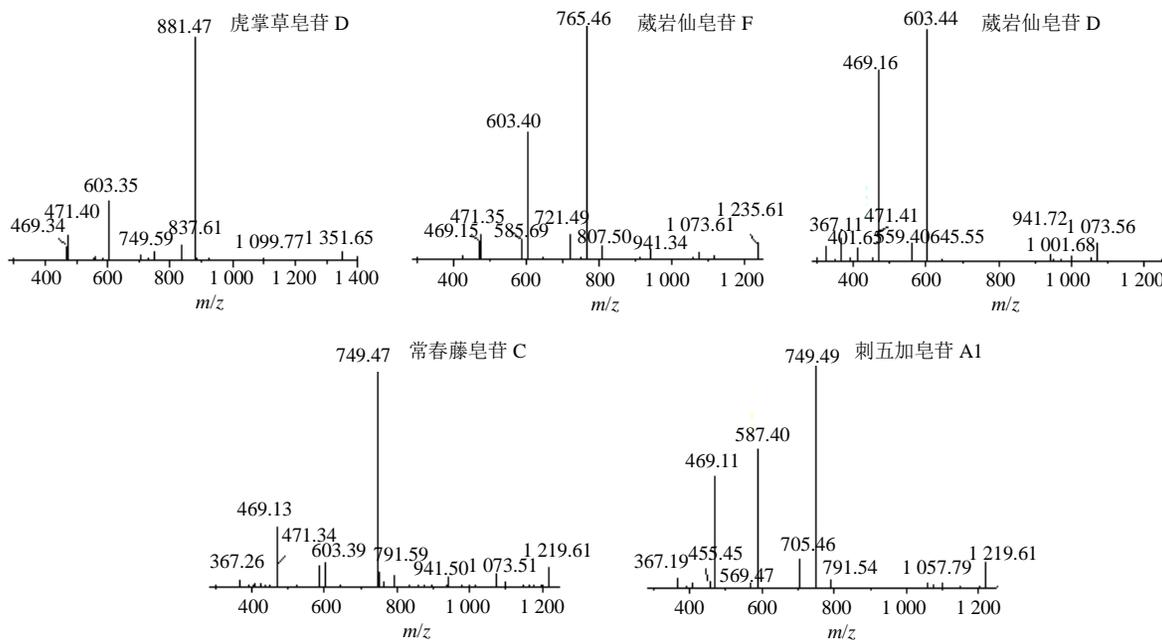


图 3 5 个对照品化合物二级质谱图

Fig. 3 MS² spectra of five standards

岩仙皂苷 F、葳岩仙皂苷 D、常春藤皂苷 C、虎掌草皂苷 D) 和齐墩果酸皂苷元 (刺五加皂苷 A1)。所有对照品 C₃ 位和 C₂₈ 位均有取代的双糖链苷, 连接糖类型为葡萄糖、鼠李糖、核糖和阿拉伯糖, 且 C₂₈ 位糖链均由 α -L-鼠李糖基-(1→4)- β -D-葡萄糖基-(1→6)- β -D-葡萄糖基组成, 葡萄糖基的端基碳与苷元 C₂₈ 位的羧基成酯, C₂₈ 位的酯键易首先发生断裂, 故将 C₂₈ 位的糖链称为 α 链, 而 C₃ 位糖链称为 β 链。由于各标准品在结构上存在共性, 因此在二级裂解质谱中表现出相似的规律性, 以下分别以葳岩仙皂苷 F 和刺五加皂苷 A1 为例, 对常春藤型皂苷和齐墩果酸型皂苷质谱裂解规律进行解析。

以对照品葳岩仙皂苷 F 为例, 其结构属于常春藤型皂苷。质谱给出准分子离子峰为 m/z 1 235.601 4 [M-H]⁻, 在二级质谱图中呈现 m/z 1 073、941、765、721、603、585、471、469 等碎片离子, 其中碎片离子 m/z 1 073 [M-H-Glc]⁻ 和 m/z 941 [M-H-Glc-Ara]⁻ 是准分子离子 m/z 1 235 分别失去 C₃ 位 β 链上的末端葡萄糖基和葡萄糖基-阿拉伯糖基而产生; 碎片离子 m/z 765 比准分子离子 m/z 1 235 质量数减少 470, 是由于准分子离子 C₂₈ 酯键断裂, 失去 α 链上 2 分子葡萄糖及 1 分子的鼠李糖而产生; 碎片离子 m/z 721 比 m/z 765 质量数减少 44, 是由于中性丢失 C₂₈ 上 1 分子 CO₂ 而产生; m/z 765、603、471 碎片离子质量数差异分别为 162 和 132, 表明相继失去 1 分子葡萄糖和 1 分子阿拉伯糖; m/z 603 进一步丢失 1 分子水形成 m/z 585; m/z 469 碎片离子由于 C₂₈ 位失去苷元的 α 链上的 2 分子葡萄糖和 1 分子鼠李糖 (-Glc-Glc-Rha) 带上电荷而产生的, 裂解途径见图 4。

以对照品刺五加皂苷 A1 为例, 其结构属于齐墩果酸型皂苷。质谱给出准分子离子为 m/z 1 219.606 1 [M-H]⁻, 在二级质谱图中呈现 m/z 1 057、749、705、587、569、469、455 等碎片离子, 其中碎片离子 m/z 1 057 [M-H-Glc]⁻ 是准分子离子 m/z 1 219 失去 C₃ 位 β 链上的末端葡萄糖基而产生; 碎片离子 m/z 749 同样是由于准分子离子 C₂₈ 酯键断裂, 失去整个 α 链上 2 分子葡萄糖及 1 分子的鼠李糖而产生; 碎片离子 m/z 705 比 m/z 749 质量数减少 44, 是由于中性丢失 C₂₈ 位上 1 分子 CO₂ 而产生; m/z 749、587、455 碎片离子质量数差异分别为 162、132, 表明相继失去 1 分子葡萄糖和 1 分子阿拉伯糖; m/z 587 进一步丢失 1 分子水形成 m/z 569; m/z 469 碎

片离子由于 C₂₈ 位失去苷元的 α 链上 2 分子葡萄糖和 1 分子鼠李糖(-Glc-Glc-Rha)带上电荷而产生的, 裂解途径与葳岩仙皂苷 F 相似。

3.3 6 种铁线莲属植物分子网络分析

如图 5 所示, 在铁线莲提取物分子网络图中, 每个节点代表 1 种化合物, 节点中红、蓝、绿、橙、黄、灰 6 种不同颜色分别表示不同植物, 不同颜色在节点中所占面积的大小表示该节点化合物在不同来源样品中的相对含量, 节点之间的连线表示 2 种化合物具有相似的碎片离子, 距离越近相似性越高^[7]。结合分子网络分析结果和化合物二级碎片离子图, 可将网络图划分为 2 个区域, 蓝色虚线区域为常春藤型皂苷类成分, 鉴定的所有化合物都含有 m/z 471.348 8 常春藤皂苷元碎片离子, 对照品虎掌草皂苷 D、常春藤皂苷 C、葳岩仙皂苷 F、葳岩仙皂苷 D 出现在该区域; 红色虚线区域为齐墩果酸型皂苷类成分, 鉴定的所有化合物都含有 m/z 455.353 1 齐墩果酸皂苷元碎片离子, 对照品刺五加皂苷 A1 出现在该区域。从图中可以看出 6 种铁线莲植物中常春藤型皂苷数量多于齐墩果酸型皂苷 (表 2)。

此外, 在齐墩果酸型皂苷区域内, 发现准分子离子为 m/z 1 381.66、1 365.67、1 071.53、911.49、895.50 等一系列未知化合物。以准分子离子为 m/z 895.50 的化合物为例, 通过精确相对分子质量和保留时间等信息, 从准噶尔铁线莲醇提液质谱图中提取该化合物的二级碎片信息, 二级质谱图中呈现 m/z 749、733、689、587、569、455 等特征碎片离子, 推测第一条裂解途径为 m/z 895→ m/z 749→ m/z 587→ m/z 455, 质量数依次相差 m/z 146、162、132, 提示该化合物依次脱去 1 分子鼠李糖、1 分子六碳糖和 1 分子五碳糖; 第二条裂解过程 m/z 895→ m/z 733→ m/z 587→ m/z 455, 提示该化合物也可依次脱去 1 分子六碳糖、1 分子鼠李糖和 1 分子五碳糖, 而碎片离子 m/z 689 [M-H-Hex-CO₂]⁻ 提示该化合物脱去 1 分子六碳糖后直接暴露 C₂₈ 位的羧基, 说明 α 链上只连接 1 个六碳糖, 2 条裂解过程都是后丢失 1 分子五碳糖, 说明 C₃ 位 β 链上的五碳糖直接与苷元相连, 鼠李糖连在外侧, 碎片离子 m/z 455 提示苷元为齐墩果酸型。基于以上推测, 该化合物结构可能为 Rha-Ara-Ole-Glc、Rha-Ara-Ole-Gal、Rha-Xyl-Ole-Glc、Rha-Rib-Ole-Glc 等, 由于暂无相关文献报道, 还有待后续研究。

同时也在常春藤型皂苷区域内, 发现准分子离子

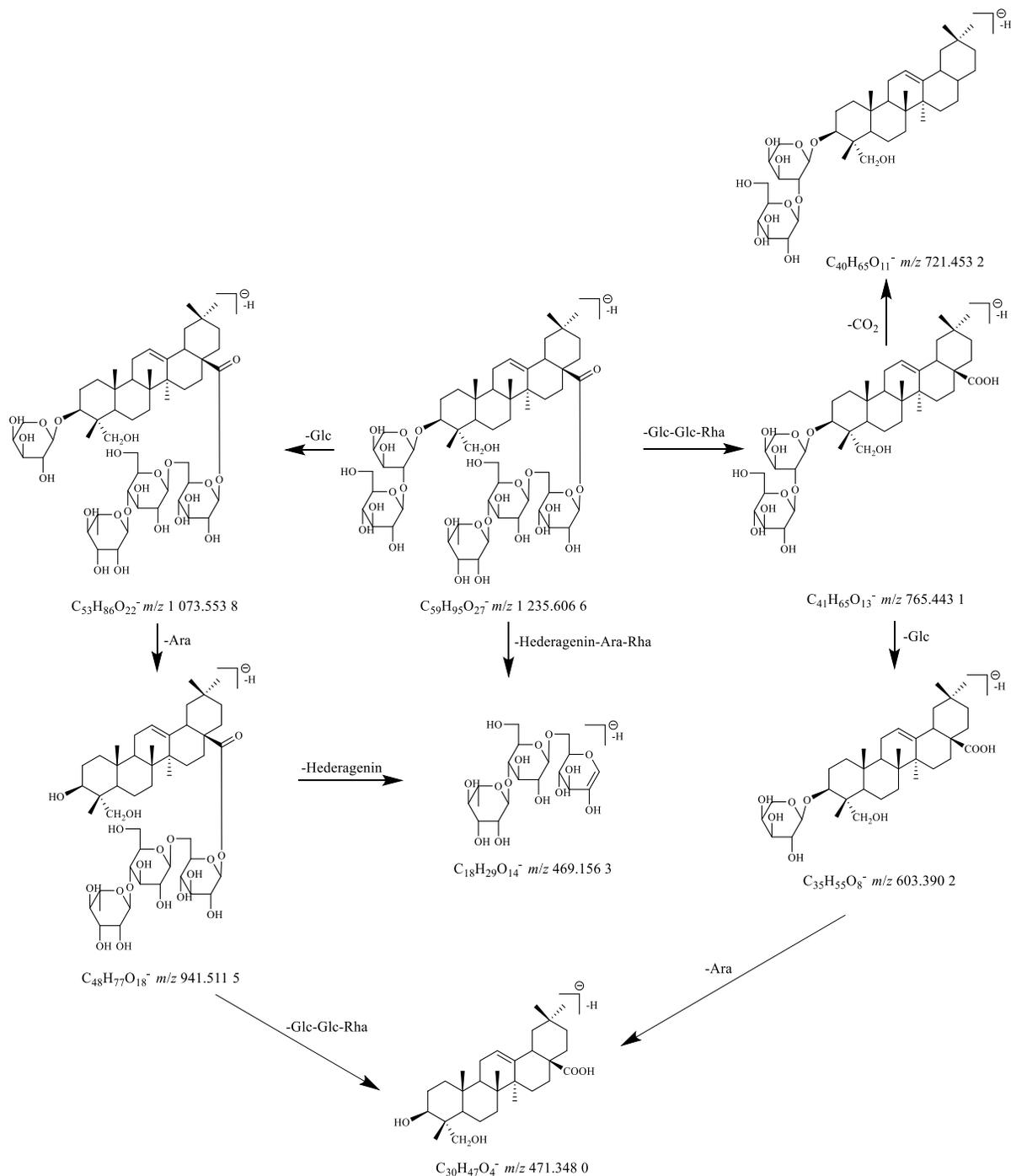


图 4 葎岩仙皂苷 F 裂解途径

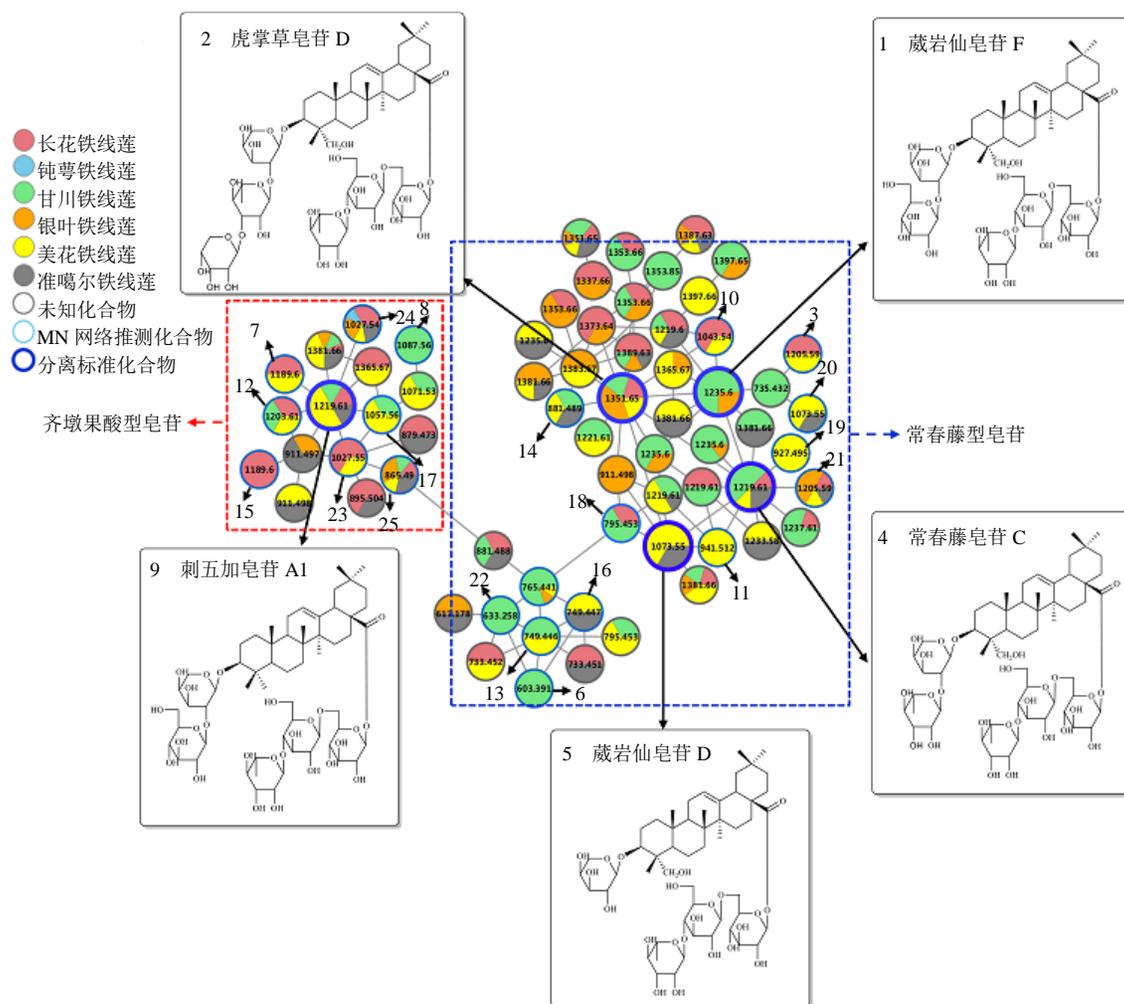
Fig. 4 Fragmentation pathway of cauloside F

子为 m/z 1397.65、1353.66、1221.61、735.43 等一系列未知化合物，由于暂无相关文献报道，糖的类型不明确，也有待后续通过制备分离和核磁鉴定等方法进行研究。

3.4 基于分子网络分析皂苷类化合物在 6 种铁线莲中分布情况

3.4.1 6 种铁线莲植物中三萜皂苷对照品的分布情

况 三萜皂苷对照品在 6 种铁线莲中的分布差异较明显，其中虎掌草皂苷 D、刺五加皂苷 A1、葎岩仙皂苷 D 分布较广，刺五加皂苷 A1、葎岩仙皂苷 D 分布相同，都分布在甘川铁线莲、美花铁线莲、长花铁线莲、准噶尔铁线莲 4 种铁线莲中，虎掌草皂苷 D 主要分布在甘川铁线莲、美花铁线莲、长花铁线莲、银叶铁线莲 4 种铁线莲中；葎岩仙皂苷 F 分布



数字 1~25 分别表示表 2 中鉴定出的化合物对应编号

The numbers 1 to 25 represent the corresponding numbers of the compounds identified in Table 2

图 5 6 种铁线莲中特征三萜皂苷分子网络图

Fig. 5 Molecular network of triterpenoid saponins from six *Clematis* species

表 2 铁线莲中三萜皂苷类成分

Table 2 Triterpenoid saponins from six *Clematis* species

序号	t_R/min	分子式	一级质谱 (m/z)		偏差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片 (m/z)	化合物名称	分布植物
			理论值	实测值				
1	20.76	$C_{59}H_{96}O_{27}$	1235.606 6	1235.601 4	-4.21	765 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻ , 721 [M-H-Glc-Glc-Rha-CO ₂] ⁻ , 603 [M-H-Glc-Glc-Rha-Glc] ⁻ , 585 [M-H-Glc-Glc-Rha-Glc-H ₂ O] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Glc-Rha-Glc-Ara] ⁻ , 469 [M-H-Hederagenin-Glc-Ara] ⁻	葎岩仙皂苷 F ^[8]	GC, YY
2	27.23	$C_{64}H_{104}O_{30}$	1351.654 0	1351.657 3	2.44	881 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻ , 837 [M-H-Glc-Glc-Rha-CO ₂] ⁻ , 749 [M-H-Glc-Glc-Rha-Rib] ⁻ , 603 [M-H-Glc-Glc-Rha-Rib-Rha] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Glc-Rha-Rib-Rha-Ara] ⁻ , 469 [M-H-Hederagenin-Rib-Rha-Ara] ⁻	虎掌草皂苷 D ^[9]	CH, GC, YY, MH

续表 2

序号	t _R /min	分子式	一级质谱 (m/z)		偏差 (×10 ⁻⁶)	二级碎片 (m/z)	化合物名称	分布植物
			理论值	实测值				
3	27.49	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₆	1 205.596 1	1 205.592 7	-2.82	735 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻ , 691 [M-H-Glc-Glc-Rha-CO ₂] ⁻ , 603 [M-H-Glc-Glc-Rha-Rib] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Glc-Rha-Rib-Ara] ⁻ , 469 [M-H-Hederagenin-Rib-Ara] ⁻	vitalboside F ^[10]	CH, MH
4	27.77	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₆	1 219.611 7	1 219.608 3	-2.79	749 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻ , 603 [M-H-Glc-Glc-Rha-Rha] ⁻ , 585 [M-H-Glc-Glc-Rha-Rha-H ₂ O] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Glc-Rha-Rha-Ara] ⁻ , 469 [M-H-Hederagenin-Rha-Ara] ⁻	常春藤皂苷 C ^[11]	CH, GC, MH, ZGE
5	28.79	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₂	1 073.553 8	1 073.552 2	-1.49	603 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻ , 559 [M-H-Glc-Glc-Rha-CO ₂] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Glc-Rha-Ara] ⁻ , 469 [M-H-Hederagenin-Ara] ⁻	葳岩仙皂苷 D ^[12]	MH, ZGE
6	28.82	C ₃₃ H ₅₆ O ₈	603.390 2	603.390 1	-0.17	585 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 559 [M-CO ₂] ⁻ , 471 [M-H-Ara] ⁻	hederagenin 3-O- α -L-arabinopyranoside ^[13]	GC
7	34.05	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₅	1 189.601 1	1 189.598 4	-2.27	1 143 [M-H-CH ₂ O] ⁻ , 1 027 [M-H-Glc] ⁻ , 1 009 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 865 [M-H-Glc-Glc] ⁻ , 847 [M-H-Glc-Glc-H ₂ O] ⁻ , 733 [M-H-Glc-Glc-Rib] ⁻ , 689 [M-H-Glc-Glc-Rib-CO ₂] ⁻ , 587 [M-H-Glc-Glc-Rib-Rha] ⁻ , 455 [M-H-Glc-Glc-Rib-Rha-Ara] ⁻	oleanolic acid 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-ribosepyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside ^[13]	CH, MH
8	34.35	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₂	1 087.569 5	1 087.565 2	-3.95	617 [M-H-Glc-Rha-Glc] ⁻ , 469 [M-H-Oleanolic-Ara] ⁻ , 455 [M-H-Glc-Rha-Glc-Glc] ⁻	clemantoside A ^[14]	GC
9	35.62	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₆	1 219.611 7	1 219.606 1	-4.59	749 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻ , 705 [M-H-Glc-Glc-Rha-CO ₂] ⁻ , 587 [M-H-Glc-Glc-Rha-Glc] ⁻ , 569 [M-H-Glc-Glc-Rha-Glc-H ₂ O] ⁻ , 469 [M-H-Oleanolic-Glc-Ara] ⁻ , 455 [M-H-Glc-Glc-Rha-Glc-Ara] ⁻	刺五加皂苷 A1 ^[15]	CH, GC, MH, ZGE
10	36.99	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₁	1 043.543 2	1 043.540 6	-2.49	881 [M-H-Glc] ⁻ , 837 [M-H-Glc-CO ₂] ⁻ , 749 [M-H-Glc-Rib] ⁻ , 705 [M-H-Glc-Rib-CO ₂] ⁻ , 603 [M-H-Glc-Rib-Rha] ⁻ , 559 [M-H-Glc-Rib-Rha-CO ₂] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Rib-Rha-Ara] ⁻	clemastanoside D ^[11]	CH, MH
11	37.36	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	941.511 5	941.511 7	0.21	469 [M-H-Hederagenin] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻	kalopanaxsaponin G ^[16]	MH
12	39.44	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₅	1 203.616 8	1 203.612 1	-3.90	733 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻ , 587 [M-H-Glc-Glc-Rha-Rha] ⁻ , 469 [M-H-Oleanolic-Rha-Ara] ⁻ , 455 [M-H-Glc-Glc-Rha-Rha-Ara] ⁻	常春藤皂苷 B ^[11]	CH, GC, MH

续表 2

序号	t_R/min	分子式	一级质谱 (m/z)		偏差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片 (m/z)	化合物名称	分布植物
			理论值	实测值				
13	40.02	$C_{41}H_{66}O_{12}$	749.448 2	749.444 6	-4.80	603 [M-H-Rha] ⁻ , 585 [M-H-Rha-H ₂ O] ⁻ , 559 [M-H-Rha-CO ₂] ⁻ , 471 [M-H-Rha-Ara] ⁻	3-O- α -L-arabopyranosyl hederagenin 28-O- α -L-rhamnopyranosyl ester ^[17]	GC, MH
14	41.18	$C_{46}H_{74}O_{16}$	881.490 4	881.488 3	-2.38	837 [M-H-CO ₂] ⁻ , 749 [M-H-Rib] ⁻ , 705 [M-H-Rib-CO ₂] ⁻ , 603 [M-H-Rib-Rha] ⁻ , 585 [M-H-Rib-Rha-H ₂ O] ⁻ , 559 [M-H-Rib-Rha-CO ₂] ⁻ , 471 [M-H-Rib-Rha-Ara] ⁻	hederagenin 3-O- β -D-ribofuranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside ^[18]	GC, MH, ZGE
15	41.32	$C_{58}H_{94}O_{25}$	1 189.601 1	1 189.599 5	-1.34	719 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻ , 675 [M-H-Glc-Glc-Rha-CO ₂] ⁻ , 587 [M-H-Glc-Glc-Rha-Xyl] ⁻ , 469 [M-H-Oleanolic-Xyl-Ara] ⁻ , 455 [M-H-Glc-Glc-Rha-Xyl-Ara] ⁻	4-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopyranosyl oleanolic acid 28-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl ester ^[19]	CH
16	42.61	$C_{41}H_{66}O_{12}$	749.448 2	749.445 9	-3.07	731 [M-H-H ₂ O] ⁻ , 705 [M-H-CO ₂] ⁻ , 603 [M-H-Rha] ⁻ , 585 [M-H-Rha-H ₂ O] ⁻ , 471 [M-H-Rha-Ara] ⁻	α -常春藤皂苷 ^[18]	MH, ZGE
17	43.46	$C_{53}H_{86}O_{21}$	1 057.558 9	1 057.557 3	-1.51	587 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻ , 469 [M-H-Oleanolic-Ara] ⁻ , 455 [M-H-Glc-Glc-Rha-Ara] ⁻	刺五加皂苷 C3 ^[15]	GC, MH
18	52.06	$C_{42}H_{68}O_{14}$	795.453 6	795.450 9	-3.39	749 [M-H-CH ₂ O ₂] ⁻ , 633 [M-H-Glc] ⁻ , 615 [M-H-Glc-H ₂ O] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Glc] ⁻	saponin 4 ^[15]	CH, GC
19	53.33	$C_{47}H_{76}O_{18}$	927.495 9	927.494 8	-1.18	765 [M-H-Glc] ⁻ , 633 [M-H-Glc-Glc] ⁻ , 603 [M-H-Glc-Ara] ⁻ , 589 [M-H-Glc-Glc-CO ₂] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Glc-Ara] ⁻	川续断皂苷 VI ^[17]	MH
20	54.10	$C_{53}H_{86}O_{22}$	1 073.553 8	1 073.552 4	-1.30	603 [M-H-Glc-Glc-Rha] ⁻ , 585 [M-H-Glc-Glc-Rha-H ₂ O] ⁻ , 559 [M-H-Glc-Glc-Rha-CO ₂] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Glc-Rha-Ara] ⁻ , 469 [M-H-Hederagenin-Ara] ⁻	clematibetoside C ^[18]	MH, ZGE
21	55.53	$C_{58}H_{94}O_{26}$	1 205.596 1	1 205.592 4	-3.07	1 161 [M-H-CO ₂] ⁻ , 1 043 [M-H-Glc] ⁻ , 881 [M-H-Glc-Glc] ⁻ , 749 [M-H-Glc-Glc-Rib] ⁻ , 603 [M-H-Glc-Glc-Rib-Rha] ⁻ , 585 [M-H-Glc-Glc-Rib-Rha-H ₂ O] ⁻ , 471 [M-H-Glc-Glc-Rib-Rha-Ara] ⁻	hederagenin 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-ribofuranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside ^[20]	CH, YY, MH, ZGE
22	57.55	$C_{36}H_{58}O_9$	633.400 8	633.400 1	-1.11	589 [M-H-CO ₂] ⁻ , 471 [M-H-Glc] ⁻	vitalboside B ^[15]	GC
23	70.46	$C_{52}H_{84}O_{20}$	1 027.548 3	1 027.545 1	-3.11	865 [M-H-Glc] ⁻ , 821 [M-H-Glc-CO ₂] ⁻ , 733 [M-H-Glc-Rib] ⁻ , 689 [M-H-Glc-Rib-CO ₂] ⁻ , 587 [M-H-Glc-Rib-Rha] ⁻ , 455 [M-H-Glc-Rib-Rha-Xyl] ⁻	clemargenoside H ^[21]	CH, MH

续表 2

序号	t_R/min	分子式	一级质谱 (m/z)		偏差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片 (m/z)	化合物名称	分布植物
			理论值	实测值				
24	78.01	$C_{52}H_{84}O_{20}$	1 027.548 3	1 027.544 3	-3.89	865 [M-H-Glc] ⁻ , 821 [M-H-Glc-CO ₂] ⁻ , 733 [M-H-Glc-Rib] ⁻ , 587 [M-H-Glc-Rib-Rha] ⁻ , 543 [M-H-Glc-Rib-Rha-CO ₂] ⁻ , 455 [M-H-Glc-Rib-Rha-Ara] ⁻	clematichinenoside A ^[20]	CH、GC、YY、MH、ZGE
25	78.59	$C_{46}H_{74}O_{15}$	865.495 5	865.493 6	-2.20	821 [M-H-CO ₂] ⁻ , 733 [M-H-Rib] ⁻ , 715 [M-H-Rib-H ₂ O] ⁻ , 689 [M-H-Rib-CO ₂] ⁻ , 587 [M-H-Rib-Rha] ⁻ , 543 [M-H-Rib-Rha-CO ₂] ⁻ , 455 [M-H-Rib-Rha-Ara] ⁻	oleanolic acid 3-O-ribopyranosyl-(1→3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranoside ^[11]	CH、GC、YY、MH、ZGE

CH-长花铁线莲 DE-钝萼铁线莲 GC-甘川铁线莲 YY-银叶铁线莲 MH-美花铁线莲 ZGE-准噶尔铁线莲
 CH-C. rehderiana Craib DE-C. pterae Hand GC-C. akebioides Maxim YY-C. delavayi Franch MH-C. potaninii Maxim ZGE-C. songorica Bunge

在甘川铁线莲和银叶铁线莲 2 种铁线莲中；常春藤皂苷 C 分布在美花铁线莲、准噶尔铁线莲 2 种铁线莲中；钝萼铁线莲中未检测三萜皂苷类化合物，分布情况见图 6。

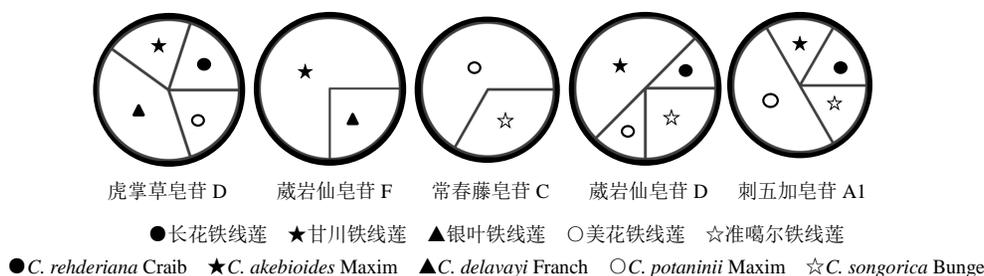


图 6 三萜皂苷对照品在 5 种铁线莲中的分布

Fig. 6 Distribution of triterpenoid saponins in five *Clematis* species

3.4.2 6 种铁线莲植物中三萜皂苷类成分分布情况 6 种铁线莲提取液和三萜皂苷对照品的 MS/MS 数据经分子网络处理，构建可视化分子网络图，共指认出 66 个常春藤型和齐墩果酸型三萜皂苷类化合物，其中 25 个为已鉴定化合物（结合离子碎片和相关文献进行鉴定），41 个为未鉴定化合物。结果见表 2。

在已鉴定三萜皂苷化合物中，16 个为常春藤型皂苷，9 个为齐墩果酸型皂苷。分析发现：美花铁线莲、甘川铁线莲、长花铁线莲和准噶尔铁线莲 4 种铁线莲成分较为相似，共有 18 个化合物是其中至少 2 种铁线莲共有成分；银叶铁线莲中仅检测到 5 个三萜皂苷成分；钝萼铁线莲中未检测到三萜皂苷类化合物。

在未鉴定三萜皂苷化合物中，34 个为常青型皂苷，7 个为齐墩果酸型皂苷。未鉴定三萜皂苷分布规律与已鉴定化合物大体一致，共有 28 个化合物是美花铁线莲、甘川铁线莲、长花铁线莲和准噶尔铁线莲 4 种铁线莲

中至少 2 种铁线莲共有成分，钝萼铁线莲中未发现未鉴定三萜皂苷类化合物。

基于对三萜皂苷化合物在 6 种铁线莲中分布研究得出，长花铁线莲、美花铁线莲、准噶尔铁线莲和甘川铁线莲这 4 种铁线莲相似度较高，可在民族用药中替代入药；银叶铁线莲三萜皂苷类成分较少，需谨慎替代入药；钝萼铁线莲中无三萜皂苷类成分，不可替代入药。

4 讨论

本研究采用 UHPLC-LTQ Orbitrap MS 常规 CID 源内裂解结合 HCD 高能诱导裂解技术获得 6 种铁线莲和标准品质谱信息，并借助 GNPS 数据库平台对 6 种铁线莲中的化学成分进行相似度分析，生成可视化分子网络图。通过分子网络图，可以明显看出各化学成分之间的相关性和差异性，以标准化合物为参照节点，结合节点化合物精确相对分子质量、保留时间、二级碎片信息及相关参考文献，挖掘更

多母核结构相近的化合物。质谱常用的多维统计分析方法主要有主成分分析 (PCA)、层次聚类分析 (HCA)、偏最小二乘法判别分析 (PLS-DA)、正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 等, 主要通过降维技术将多个变量化为少数主成分, 统计出不同组样本变量之间的关系或找到差异成分, 但要求的样本数量多, 得到的数据量庞大且可视化不强, 并需要提前对样本进行分组, 目前主要用于代谢组学分析; 而分子网络技术能够同时对单个或者多个数据集以及不同来源样品质谱数据中的未知化合物进行聚类 and 可视化定性分析, 无需对样本进行分组, 并且有 MassBank、HMDB、ReSpect、NIST、GNPS 等多个第三方数据库线上支持对未知化合物的指认, 不仅能大大缩减了质谱、核磁等数据分析化合物结构的工作量, 有效减少盲目性, 而且能直观快速分析出化合物在不同样品中的分布。

研究 6 种不同基原铁线莲属药材中常春藤和齐墩果酸型三萜皂苷类化学成分及其分布发现, 钝萼铁线莲不含三萜皂苷类成分, 因此在民族用药中, 钝萼铁线莲不能用于替代其他铁线莲属药材; 美花铁线莲、甘川铁线莲、长花铁线莲和准噶尔铁线莲 4 种铁线莲化学成分相似, 可替代用药。同时分子网络发现一些文献尚未报道的三萜皂苷类化合物, 有待进一步研究。

参考文献

[1] 孙 凤, 张 琳, 田景奎, 等. 圆锥铁线莲化学成分的研究 [J]. 中国药学杂志, 2007, 42(2): 102-103.

[2] 王文采, 李良千. 铁线莲属一新分类系统 [J]. 植物分类学报, 2005, 43(5): 431-488.

[3] 李 杨, 张 伟, 赫雪锋, 等. 铁线莲属植物的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中南药学, 2018, 16(3): 355-362.

[4] 张 权, 齐梦蝶, 康 莹, 等. UHPLC-LTQ Orbitrap MS 快速鉴别无患子果皮中部分苷及苷元成分 [J]. 质谱学报, 2018, 39(2): 224-239.

[5] 程桃芳, 金慧子, 刘昌孝, 等. LC-MS/MS 分子网络及其对中药研究的启发 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 265-273.

[6] 谈 英, 韩晓妮, 张跃飞, 等. 基于 UPLC-Q/TOF MS 对不同产地东北铁线莲化学成分的比较 [J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(5): 399-403.

[7] 田梦梦. 基于 LC-MS/MS 的分子网络可视化分析六大类茶样中的黄烷醇类生物碱 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.

[8] Elias R, Lanza A M D, Vidal-Ollivier E, et al. Triterpenoid saponins from the leaves of *Hedera helix* [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54(1): 98-103.

[9] 卫 柯, 孙雨芊, 李 虎, 等. 美花铁线莲地上部分的皂苷类成分研究 [J]. 中南药学, 2017, 15(4): 432-435.

[10] Mel'nikov V N, Kal'yan Y B, Dekanosidze G E, et al. Preliminary investigation of the glycosides of *Clematis orientalis* [J]. *Chem Nat Compd*, 1974, 10(2): 269-269.

[11] Kizu H, Shimana H, Tomimori T. Studies on the constituents of *Clematis* species. VI. ¹⁾ the constituents of *Clematis stans* SIEB. et ZUCC.²⁾ [J]. *Chem Pharm Bull*, 1995, 43(12): 2187-2194.

[12] Lü S W, Dong S Y, Xu D, et al. Spectrum-effect relationships between fingerprints of *Caulophyllum robustum* Maxim and inhabited pro-inflammation cytokine effects [J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1826.

[13] Kizu H, Tomimori T. Studies on the constituents of *Clematis* species. II. on the saponins of the root of *Clematis chinensis* Osbeck. 2. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1980, 28(9): 2827-2830.

[14] Bahuguna R P, Jangwan J S, Kaiya T, et al. Clemontanoside-A, a bisglycoside from *Clematis montana* [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(9): 2511-2513.

[15] Zhong H M, Chen C X, Tian X, et al. Triterpenoid saponins from *Clematis tangutica* [J]. *Planta Med*, 2001, 67(5): 484-488.

[16] Shao C J, Kasai R, Xu J D, et al. Saponins from roots of *Kalopanax septemlobus* (THUNB.) KOIDZ, Ciqui: structures of kalopanax-saponins C, D, E and F [J]. *Chem Pharm Bull*, 1989, 37(2): 311-314.

[17] Du Z Z, Zhu N, Ze-Ren-Wang-Mu N, et al. Two new antifungal saponins from the Tibetan herbal medicine *Clematis tangutica* [J]. *Planta Med*, 2003, 69(6): 547-551.

[18] Kawata Y, Kizu H, Miyaichi Y, et al. Studies on the constituents of *Clematis* species. VIII. triterpenoid saponins from the aerial part of *Clematis tibetana* KUNTZ [J]. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49(5): 635-638.

[19] Whang W K. Aromatic compounds and triterpenoidal saponins from *Clematis koreana* var. *umbrosa* [J]. *Arch Pharm Res*, 1994, 17(1): 5-10.

[20] Shao B P, Qin G W, Xu R S, et al. Triterpenoid saponins from *Clematis chinensis* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 38(6): 1473-1479.

[21] Li S G, Huang X J, Li M M, et al. Triterpenoid saponins from the roots of *Clematis uncinata* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2014, 62(1): 35-44.