基于高分辨质谱法的淫羊藿特征药效黄酮质谱裂解规律及新化合物鉴定研究

秦伟瀚,阳　勇,李　卿,刘　翔*

重庆市中药研究院,重庆 400065

摘　要:结合高分辨质谱法探讨淫羊藿特征药效黄酮的质谱裂解规律,并运用该规律鉴定新化合物的化学结构。Q-TOF 采集样品数据,PeakView 软件对已知成分进行定性分析,借助该软件的 Mass Calculators、Formula Finder、Fragments Pane 等功能对化合物二级质谱裂解规律进行剖析总结。本研究从 54 批 15 个淫羊藿品种中共鉴定出了 27 种该类成分。在含有 ESI 源质谱中特征黄酮会先后由外至内断裂 C-3 位的糖苷键及 C-7 位的糖苷键,其后则是脱去 C-8 位的异戊烯基和 C-4′位的甲氧基,如果糖苷上键合有乙酰基,那么质谱中会先脱掉乙酰基,如果 C-8 位异戊烯基双键被加成还原为了异戊醇基,那么该基团会先脱水再脱掉烃基,如果 C-8 位与 C-7 位基团成环,将不会产生异戊烯基的特征碎片。借由此裂解规律还鉴定出了 2 个新化合物的化学结构。该分析方法简单、实用、可靠,该实验结果有助于进一步明确淫羊藿的药效物质基础和生物合成规律。

关键词:淫羊藿;高分辨质谱;裂解规律;新化合物

中图分类号:R917　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-6880(2021)9-1478-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.9.005

Study on mass spectroscopic fragmentation of flavonoids from Herba Epimedii and identification of new compounds based on HR-MS

QIN Wei-han, YANG Yong, LI Qin, LIU Xiang*

Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: To investigate the fragmentation rule of Herba Epimedii flavonoids by high resolution mass spectrometry (HR-MS), and to identify the chemical structures of the new compounds. Q-TOF was used to collect data, and PeakView software was used to analyze the known components qualitatively. With the help of Mass Calculators, Formula Finder, Fragments Pane and other functions of the software, the fragmentation rules of compounds were analyzed and summarized. A total of 27 compounds were identified from 15 varieties of Herba Epimedii in 54 batches. In the mass spectrometry containing ESI, the characteristic flavonoids will break the glycosidic bond at C-3 position and C-7 position successively from the outside to the inside, and then the isoamyl group at the C-8 position and the methoxy group at the C-4′ position are removed. If the acetyl group is bonded on the glycoside, the acetyl group will be removed first in the mass spectrometry. If the double bond of Isoamyl group at the C-8 position is reduced to isoamyl alcohol group, the group will be dehydrated first and then removed If the C-8 and C-7 groups form a ring, the characteristic fragments of isopentenyl will not be produced. The chemical structures of two new compounds are also identified. This method is simple, practical and reliable. The experimental results will help to further clarify the pharmacodynamic material basis and biosynthesis law of Herba Epimedii.

Key words: Herba Epimedii; high resolution mass spectrometry; pyrolysis law; new compounds

淫羊藿始载于《神农本草经》,为小檗科(Berberidaceae)淫羊藿属(*Epimedium* L.)植物的干燥叶[1]。其性温,味辛、甘,归肝、肾经[2]。具有补肾壮阳、强健筋骨、祛风除湿之功效;临床多用于治疗男性不育、骨质疏松等病症[3-5]。淫羊藿物质基础已经较为明确,主要药效成分是以去甲淫羊藿素为母核的黄酮醇类衍生物,如研究报道较多的淫羊藿苷、朝藿定、淫羊藿次苷等均归为此类[6-8]。笔者通过查

收稿日期:2021-03-24　　接受日期:2021-07-21

基金项目:重庆市科技局项目(cc-cstc-CA-19-2,cstc2019jxjl-jbky10007,cstc2020jxjl10004);重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0464)

*通信作者　E-mail:zysliux@163.com

阅相关文献,发现该类化合物活性基团为 C-3、C-7、C-4′位羟基以及 C-8 位的异戊烯基,通过甲基转移反应、糖基转移反应、氧化还原反应等形成了总共达 54 种结构活性类似的次生代谢产物[9,10]。迄今为止,对黄酮苷的质谱裂解研究已有大量报道,但没有文献将淫羊藿特征成分化学结构与质谱裂解规律相结合进行深入探讨[11-15]。本实验借助高分辨质谱法,将淫羊藿中特征药效黄酮醇归为苷元、单糖苷、二糖苷、三糖苷和四糖苷 5 类进行解析研究。该实验结果有助于此类成分的定性定量分析以及新化合物的结构鉴定,为进一步明确淫羊藿的药效物质基础和生物合成规律提供科学依据。

1　仪器与材料

LC-30A 型超高效液相色谱仪(日本,岛津公司);Triple TOF™ 4600 型四极杆串联飞行时间高分辨质谱仪(美国,AB 公司);JY92-ⅡD 型超声波细胞粉碎机(中国,宁波新艺超声设备有限公司);HK-02A 型高速中药粉碎机(中国,广州赛豪机械有限公司);JM-20D-40 型超声波清洗机(中国,洁盟清洗设备有限公司);AUW220 型万分之一分析天平(日本,岛津公司)。

对照品淫羊藿苷(批号:489-32-7)、淫羊藿次苷 I(批号:56725-99-6)、淫羊藿次苷 II(批号:113558-15-9)、朝藿定 A(批号:110623-72-8)、朝藿定 B(批号:110623-73-9)、朝藿定 C(批号:110642-44-9)、箭叶淫羊藿苷 B(批号:118525-36-3)、2″-鼠李糖淫羊藿次苷 II(批号:135293-13-9)、宝藿苷 II(批号:55395-07-8)、淫羊藿属苷 A(批号:39012-04-9)、去甲淫羊藿素(批号:28610-31-3)、脱水淫羊藿素(批号:116554-17-5)、茂藿苷 A(批号:20872-01-4)、宝藿苷 V(批号:118544-18-6)、粗毛淫羊藿苷(批号:143601-07-4),质量分数均大于 98%,均购于成都埃法生物科技有限公司;乙腈(色谱级,德国 Merck 公司)、甲酸(色谱级,美国 ACS 公司),其余试剂为分析纯;水为娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。不同品种淫羊藿样品均采自于重庆、四川、贵州、湖南等地,经重庆市中药研究院生药研究所刘翔副研究员鉴定为小檗科多年生草本植物淫羊藿的地上部分。54 批样品信息见表 1。

表 1　淫羊藿样品采集信息表

Table 1　Herba Epimedii sample collection information table

学名 Scientific name	样品编号 Sample No.	采集地点 Collection location
E. baojingense Q. L. Chen et B. M. Yang	S1、S2	湖南省
E. mikinorii Stearn	S3、S4	湖北省
E. leptorrhizum Steam	S5、S6	重庆市
*E. sutchuenense*Franch.	S7、S8	重庆市、四川省
E. truncatum H. R. Liang	S9、S10	湖南省
E. hunanense Hand. -Mazz.	S11 ~ S15	湖南省
E. pubescens Maxim.	S16 ~ S22	重庆市、四川省
E. membranaceum K. Meyer	S23、S24	四川省
E. myrianthum Stearn	S25 ~ S41	重庆市
E. dolichostemon Stearn	S42 ~ S44	重庆市
E. borealiguizhouense S. Z. He et Y. K. Ying	S45、S46	贵州省
E. acuminatum Franch.	S47 ~ S49	重庆市
E. jinchengshanense Yan J. Zhang & J. Q. Li	S50	重庆市
E. simplicifolium Ying	S51、S52	重庆市
E. zhushanense K. F. Wu et S. X. Qian	S53、S54	重庆市

2　方法

2.1　色谱条件

色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 柱(100 mm ×2.1 mm,1.8 μm);柱温 30 ℃;流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液,体积流量 0.2 mL/min;梯度洗脱:0 ~ 1.0 min,7% 乙腈;1.0 ~ 7.0 min,7% →55% 乙腈;7.0 ~ 11.5 min,55% →88% 乙腈;11.5 ~ 13.0 min,88% 乙腈;13.0 ~ 13.1 min,88% →7% 乙腈;13.1 ~ 15.0 min,7% 乙腈;进样量 2 μL。

天然产物研究与开发

2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),正离子模式采集数据,喷雾电压(IS):+5 500 V;雾化气压力(GS1):0.40 MPa;气帘气压力(CUR):0.12 MPa;辅助气压力(GS2):0.35 MPa;离子源温度(TEMP):550 ℃;簇裂解电压(DP):50 V;碰撞能量(CE):40 eV;碰撞能量区间(CES):15 eV;检测模式为 IDA(信息关联采集模式),多重质量亏损(MMDF)和动态背景扣除(DBS)为触发二级的条件,满足该条件优先进行二级扫描。

2.3 供试品溶液制备

精密称取淫羊藿样品粉末 0.1 g,置 5 mL EP 管中,精密加入 70% 的甲醇水溶液 2 mL,浸润 1 h 后称定重量,超声波细胞破碎处理(功率:800 W)25 min,放冷,再次称定重量,用 70% 甲醇溶液补足减失重量,混匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过于进样瓶中,即得。

2.4 样品数据分析处理

根据淫羊藿化学相关文献,构建以去甲淫羊藿素为母核的已知化学成分数据库。应用 PeakView 软件提取分析高分辨质谱采集的不同品种批次样品数据,将满足质量误差小于 5 ppm、同位素分布正确且含有二级碎片的离子作为目标化合物,结合软件 Formula Finder、Mass Calculators 等功能、在线数据库(SciFinder、Reaxys、ChemSpider、Metlin、HMDB),进行快速的定性分析。将鉴定结果按照苷元、单糖苷、二糖苷、三糖苷、四糖苷进行归类,探讨总结该类化合物的二级质谱裂解规律,并凭借此规律进行新化合物的结构判定。

3 结果与分析

淫羊藿的特征药效黄酮是一类以去甲淫羊藿素为母核的黄酮醇衍生物,该类化合物母核的 C-3、C-7 位羟基、C-8 位异戊烯基和 C-4′位甲氧基是其活性基团,通过甲基转移反应、糖基转移反应、氧化还原反应等形成了各种活性结构类似的次生代谢产物(见图 1)。据统计该类化合物共有 54 种,本研究采用超高效液相-高分辨质谱法在 54 批 15 个淫羊藿品种中共鉴定出了 27 种该类成分,其中两个被鉴定为淫羊藿的新化合物,鉴定结果见表 2。样品(S6)的总离子流图见图 2。

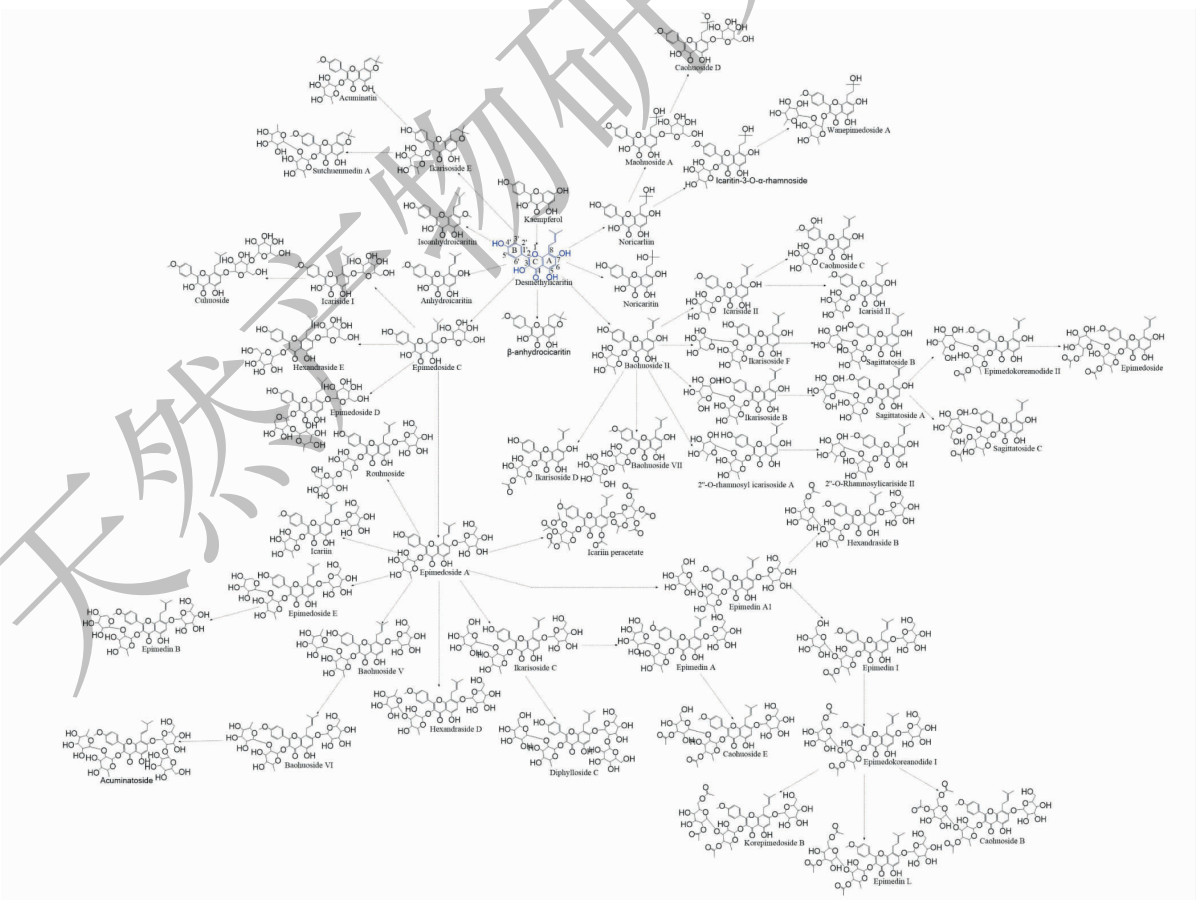


图 1 淫羊藿特征黄酮醇成分次生代谢途径

Fig. 1 Secondary metabolic pathways of alcohol components in characteristic flavonoids of Herba Epimedii

表 2　淫羊藿特征黄酮成分鉴定结果

Table 2　Identification of characteristic flavonoids from Herba Epimedii

化合物类型 Compound type	保留时间 t_R(min)	离子峰归属 Ion mode	理论质量 Theoretical mass(m/z)	测试质量 Test mass(m/z)	相对误差 Relative error(ppm)	化学式 Formula	鉴定结果 Identification result
苷元 Aglycone	8.56	$[M+H]^+$	369.133 27	369.133 90	1.7	$C_{21}H_{20}O_6$	异去氢淫羊藿素
	8.72	$[M+H]^+$	355.117 62	355.118 55	2.6	$C_{20}H_{18}O_6$	去甲淫羊藿素
	9.59	$[M+H]^+$	369.133 27	369.133 14	0.3	$C_{21}H_{20}O_6$	脱水淫羊藿素
	9.70	$[M+H]^+$	369.133 27	369.133 83	1.5	$C_{21}H_{20}O_6$	Anhydrocicaritin
单糖苷 Monoglycoside	7.04	$[M+H]^+$	517.170 44	517.171 80	2.6	$C_{26}H_{28}O_{11}$	淫羊藿属苷 C
	7.59	$[M+H]^+$	549.196 65	549.198 23	2.9	$C_{27}H_{32}O_{12}$	茂藿苷 A
	7.74	$[M+H]^+$	533.201 74	533.202 24	0.9	$C_{27}H_{32}O_{11}$	淫羊藿素-3-*O*-α-鼠李糖苷
	8.09	$[M+H]^+$	501.175 52	501.176 84	2.6	$C_{26}H_{28}O_{10}$	宝藿苷 II
	8.56	$[M+H]^+$	515.191 17	515.191 93	1.5	$C_{27}H_{30}O_{10}$	淫羊藿次苷 II
	8.64	$[M+H]^+$	531.186 09	531.188 11	3.8	$C_{27}H_{30}O_{11}$	淫羊藿次苷 I
	9.10	$[M+H]^+$	513.175 52	513.176 17	1.3	$C_{27}H_{28}O_{10}$	粗毛淫羊藿苷
二糖苷 Diglycoside	6.88	$[M+H]^+$	679.223 26	679.224 62	2.0	$C_{32}H_{38}O_{16}$	Hexandraside E
	7.04	$[M+H]^+$	663.228 35	663.230 32	3.0	$C_{32}H_{38}O_{15}$	淫羊藿属苷 A
	7.33	$[M+H]^+$	693.238 91	693.239 29	0.5	$C_{33}H_{40}O_{16}$	粗藿苷
	7.46	$[M+H]^+$	677.244 00	677.245 58	2.3	$C_{33}H_{40}O_{15}$	淫羊藿苷
	7.87	$[M+H]^+$	633.217 78	633.218 04	0.4	$C_{31}H_{36}O_{14}$	大花淫羊藿苷 F
	7.92	$[M+H]^+$	719.254 56	719.255 55	1.4	$C_{35}H_{42}O_{16}$	M1
	8.24	$[M+H]^+$	661.249 08	661.251 71	4.0	$C_{33}H_{40}O_{14}$	2″-鼠李糖基淫羊藿次苷 II
	8.27	$[M+H]^+$	647.233 43	647.234 63	1.8	$C_{32}H_{38}O_{14}$	箭叶淫羊藿苷 B
三糖苷 Triglycoside	6.81	$[M+H]^+$	825.281 17	825.282 63	1.8	$C_{38}H_{48}O_{20}$	柔藿苷
	6.99	$[M+H]^+$	809.286 26	809.288 89	3.3	$C_{38}H_{48}O_{19}$	宝藿苷 V
	7.26	$[M+H]^+$	823.301 91	823.303 23	1.6	$C_{39}H_{50}O_{19}$	朝藿定 C
	7.28	$[M+H]^+$	839.296 82	839.299 17	2.8	$C_{39}H_{50}O_{20}$	朝藿定 A
	7.32	$[M+H]^+$	809.286 26	809.288 46	2.7	$C_{38}H_{48}O_{19}$	朝藿定 B
	7.38	$[M+H]^+$	881.307 39	881.308 14	0.9	$C_{41}H_{52}O_{21}$	朝藿定 I
四糖苷 Tetraglycoside	7.21	$[M+H]^+$	985.354 73	985.357 67	3.0	$C_{45}H_{60}O_{24}$	粗毛淫羊藿苷
	7.21	$[M+H]^+$	985.354 73	985.351 31	3.4	$C_{45}H_{60}O_{24}$	**M2**

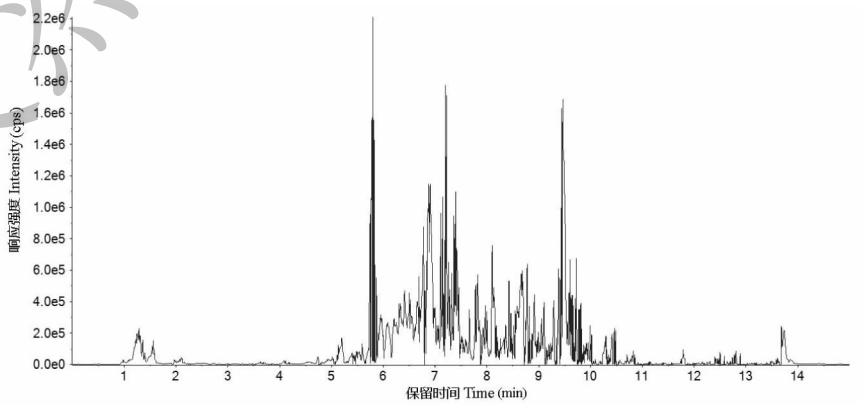


图 2　样品的总离子流图

Fig. 2　Total ion current diagram of the sample

天然产物研究与开发

3.1 质谱裂解规律解析

3.1.1 苷元成分裂解规律解析

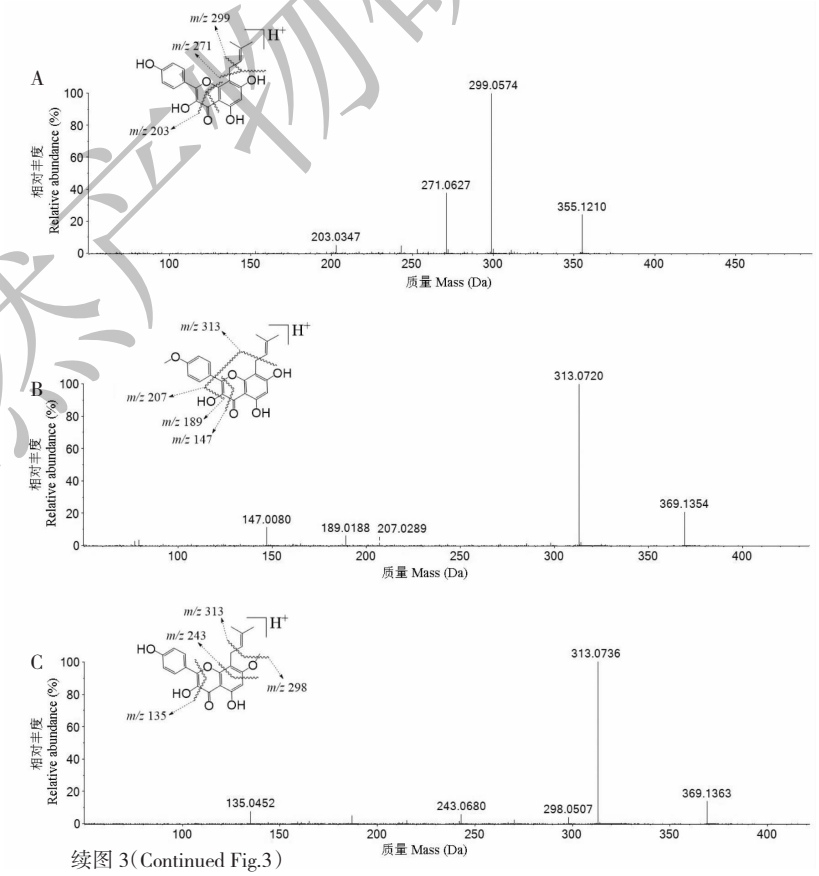
统计淫羊藿化学相关文献资料,该植物中特征黄酮醇的苷元成分共有 5 个,分别为去甲淫羊藿素、去甲淫羊藿苷、去甲淫羊藿黄素、脱水淫羊藿素、异去氢淫羊藿素和 anhydrocicaritin。除了去甲淫羊藿苷、去甲淫羊藿黄素未被检测出以外,其它几个苷元均有质谱响应。由图 2 可知,去甲淫羊藿素、脱水淫羊藿素、异去氢淫羊藿素结构类似,差别仅在于 *O*-甲基化位置不同,通过比较这几个化合物的二级谱图,可以发现 C-8 位异戊烯基最容易断裂,其次是甲氧基和母核 C 环。Anhydrocicaritin 的化学结构与其它几个苷元的差异主要是 C-8 位异戊烯基与 C-7 位羟基成环,由该化合物二级质谱可知(见图 2D),环断裂后可以连续脱去烃基生成 *m/z* 311 和 *m/z* 299 的离子,这种碎裂方式与其它几个苷元完全不同,且其它几个苷元均是先脱异戊烯基再脱甲氧基或甲基,而 anhydrocicaritin 则是先脱甲氧基再断裂环状结构,这种质谱行为差异可能与 C-8、C-7 位基团成环后的化学结构更加稳定有关。

3.1.2 单糖苷成分裂解规律解析

淫羊藿植物中含异戊烯基黄酮醇的单糖苷成分共报道有 12 个,本研究鉴定出了 7 个。由图 3 可知,这 7 个单糖苷化合物含有 C-3 位的鼠李糖苷或 C-7 位的葡萄糖苷,通过比较二级谱图可以发现单糖苷的碎裂规律为 C-3、C-7 位的糖苷键首先断裂,之后即是脱掉 C-8 位异戊烯基和 C-4′位的甲氧基。但茂藿苷 A(见图 3G)、淫羊藿素-3-*O*-α-鼠李糖苷(见图 3F)的 C-8 位异戊烯基双键被水加成还原,形成一个带有羟基的结构,在质谱碎裂中表现为糖苷键断裂后 C-8 位异戊醇基脱水后再脱烃基。粗毛淫羊藿苷(见图 3C)的 C-8、C-7 位成环之后再脱氢形成双键并与母核 A 环的双键共轭,因此该环状结构比异戊烯基更加稳定,所以粗毛淫羊藿苷在 C-3 位鼠李糖苷脱掉后,C-4′位再脱掉一个甲基,且二级质谱中没有发现异戊烯基断裂产生的离子碎片。

3.1.3 二糖苷成分裂解规律解析

淫羊藿植物中含异戊烯基黄酮醇的二糖苷成分共报道有 17 个,本研究鉴定出了 7 个。由图 4 可知,鉴定出的二糖苷化合物均在 C-3 和 C-7 位键合有葡萄糖苷、鼠李糖苷和木糖苷,C-8 位键合有一个异戊烯基,C-4′位或有一个甲氧基。通过比较二糖苷化合物的化学结构,可以发现 C-3 位羟基只与鼠李糖苷直接相连,C-7位羟基只与葡萄糖苷直接相



续图 3(Continued Fig.3)

天然产物研究与开发

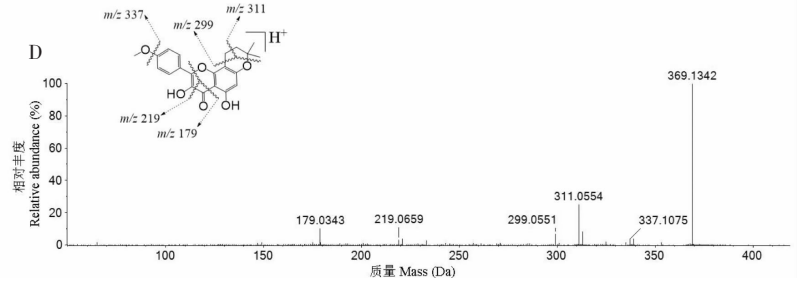
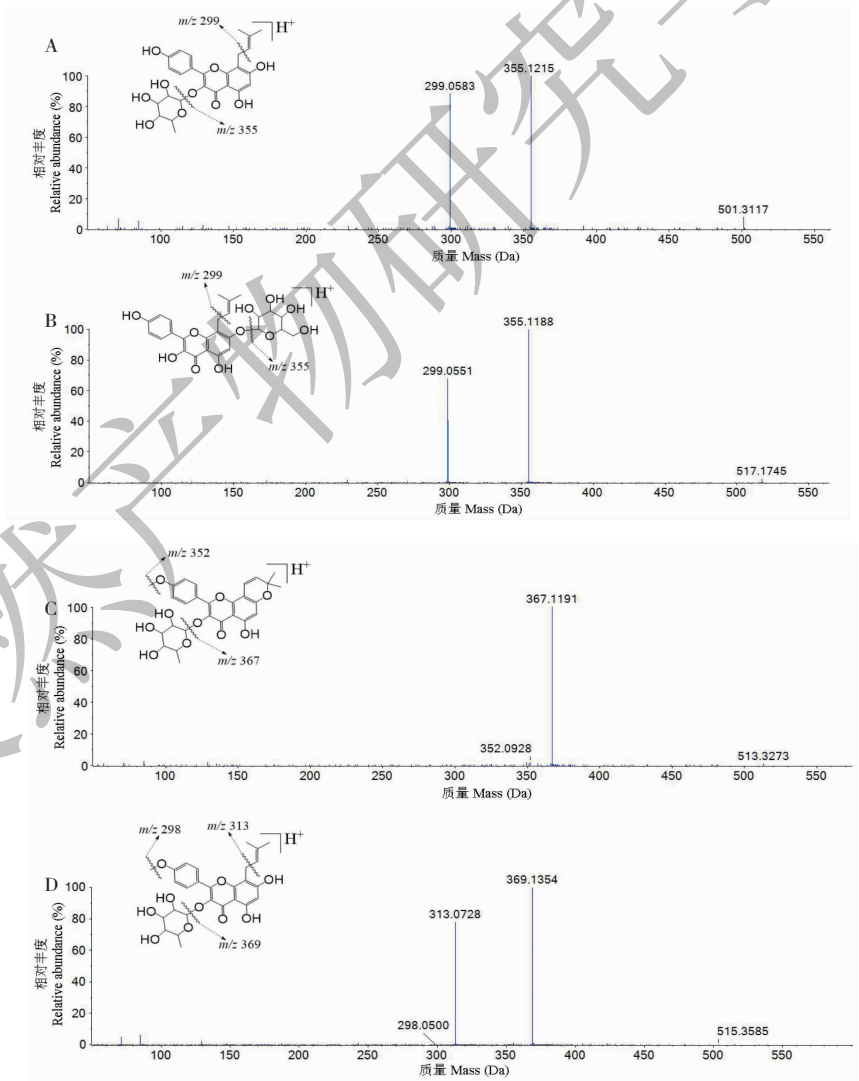


图 3　苷元化合物的质谱裂解规律图

Fig. 3　Fragmentation patterns of aglycones by mass spectrometry

注:A:去甲淫羊藿素;B:脱水淫羊藿素;C:异去氢淫羊藿素;D:Anhydrocicaritin。Note:A:Desmethylicaritin;B:Anhydroicaritin;C:Isoanhydroicaritin;D:Anhydrocicaritin.

连,且 C-3、C-7 位均有同时键合两个糖苷的情况(大花淫羊藿苷 F、粗藿苷、箭叶淫羊藿苷 B、2″-鼠李糖基淫羊藿次苷 II)。通过比较上述化合物的二级质谱,发现二糖苷化合物的裂解规律为 C-3 位的糖苷键首先会由外至内的进行断裂,其次是断掉 C-7 位的糖苷键,之后则是脱掉 C-8 位的异戊烯基和 C-4′位的甲氧基。造成此质谱行为的原因可能与该类化合物的构象及化学键的键能等因素相关。



续图 4(Continued Fig.4)

天然产物研究与开发

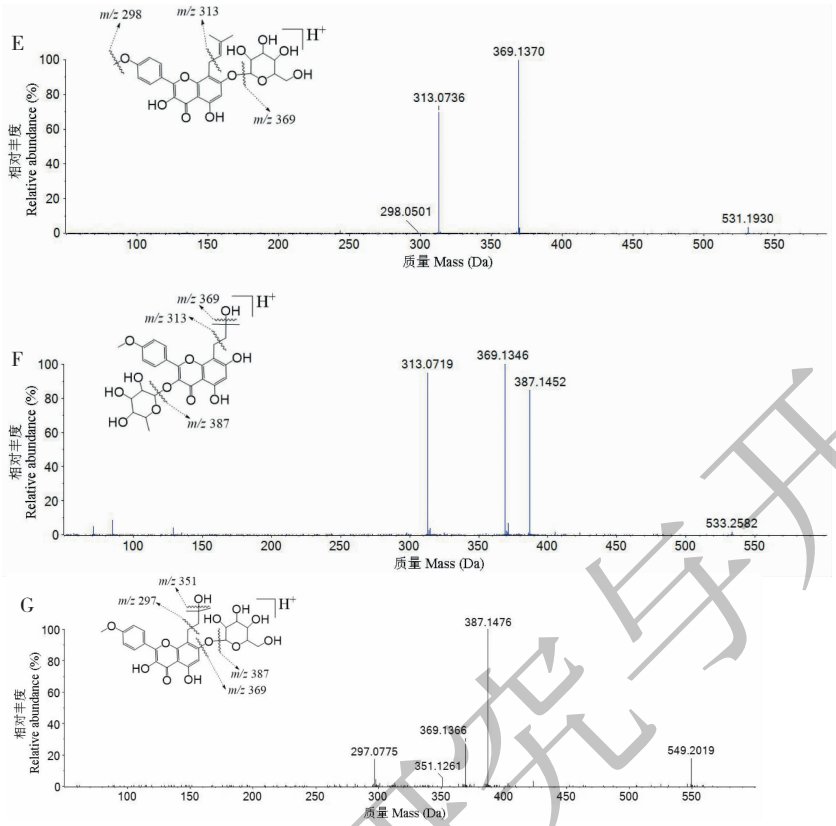


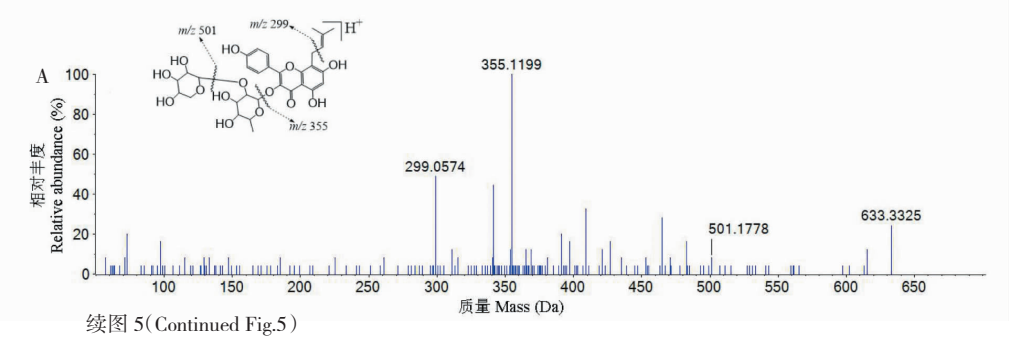
图 4 单糖苷化合物质谱裂解规律图

Fig. 4 Fragmentation patterns of monosaccharide compounds by mass spectrometry

注:A:宝藿苷 II;B:淫羊藿属苷 C;C:粗毛淫羊藿苷;D:淫羊藿次苷 II;E:淫羊藿次苷 I;F:淫羊藿素-3-*O*-α-鼠李糖苷;G:茂藿苷 A。Note: A:Baohuoside II;B:Epimedoside C;C:Acuminatin;D:Icariside II;E:Icariside I;F:Icaritin-3-*O*-α-rhamnoside;G:Maohuoside A.

3.1.4 三糖苷成分裂解规律解析

淫羊藿植物中含异戊烯基黄酮醇的三糖苷成分共报道有 17 个,本研究鉴定出了 6 个。由图 5 可知,鉴定出的三糖苷化合物均在 C-3 和 C-7 位键合有葡萄糖苷、鼠李糖苷和木糖苷,C-8 位键合有一个异戊烯基,C-4′位或有一个甲氧基。通过比较三糖苷化合物的化学结构,可以发现与二糖苷相同的是 C-3 位羟基只与鼠李糖苷直接相连,C-7 位羟基只与葡萄糖苷直接相连,但 C-7 位没有同时键合两个糖苷的情况。对比三糖苷化合物的二级质谱,发现三糖苷化合物的裂解规律与二糖苷一致,均为 C-3 位的糖苷键首先会由外至内的进行断裂,其次是断掉 C-7 位的糖苷键,之后则是脱掉 C-8 位的异戊烯基和 C-4′位的甲氧基。但朝藿定 I 与其它三糖苷化合物结构上略有不同(见图 5F),有一分子的乙酰基连接在了鼠李糖苷上,结合二级质谱分析发现,该化合物在脱掉 C-3 位葡萄糖苷之后会先脱掉乙酰基再脱掉鼠李糖苷。这也提示含有乙酰基的该类成分,在质谱行为中其酯键会先于所连糖苷的糖苷键发生断裂。



续图 5(Continued Fig.5)

天然产物研究与开发

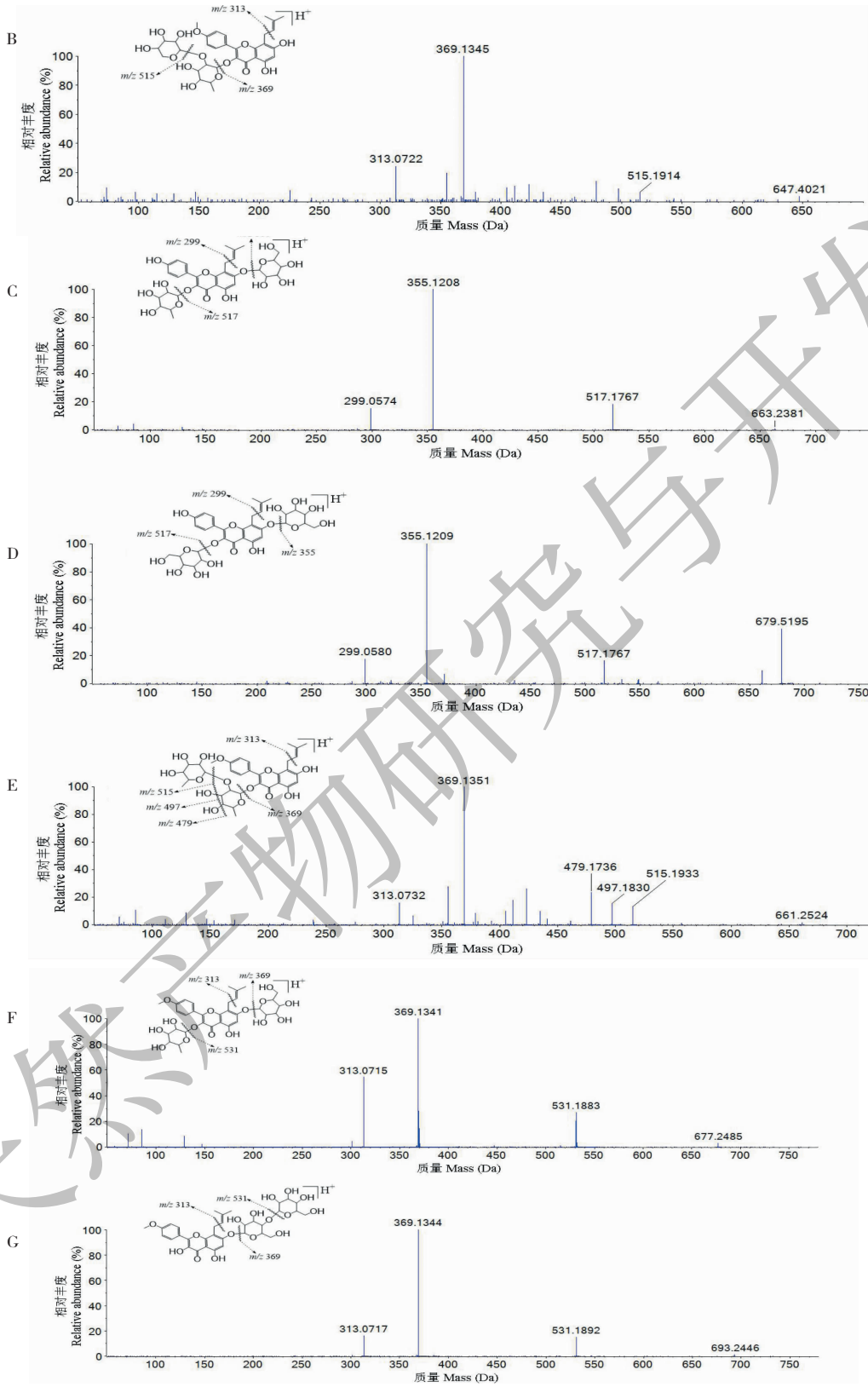


图 5 二糖苷化合物质谱裂解规律图

Fig. 5 Fragmentation patterns of diglycoside compounds by mass spectrometry

注:A:大花淫羊藿苷 F;B:箭叶淫羊藿苷 B;C:淫羊藿属苷 A;D:Hexandraside E;E:2′′-鼠李糖基淫羊藿次苷 II;F:淫羊藿苷;G:粗藿苷。

Note:A:Ikarisoside F;B:Sagittatoside B;C:Epimedoside A;D:Hexandraside E;E:2′′-*O*-Rhamnosylicariside II;F:Icariin;G:Cuhuoside.

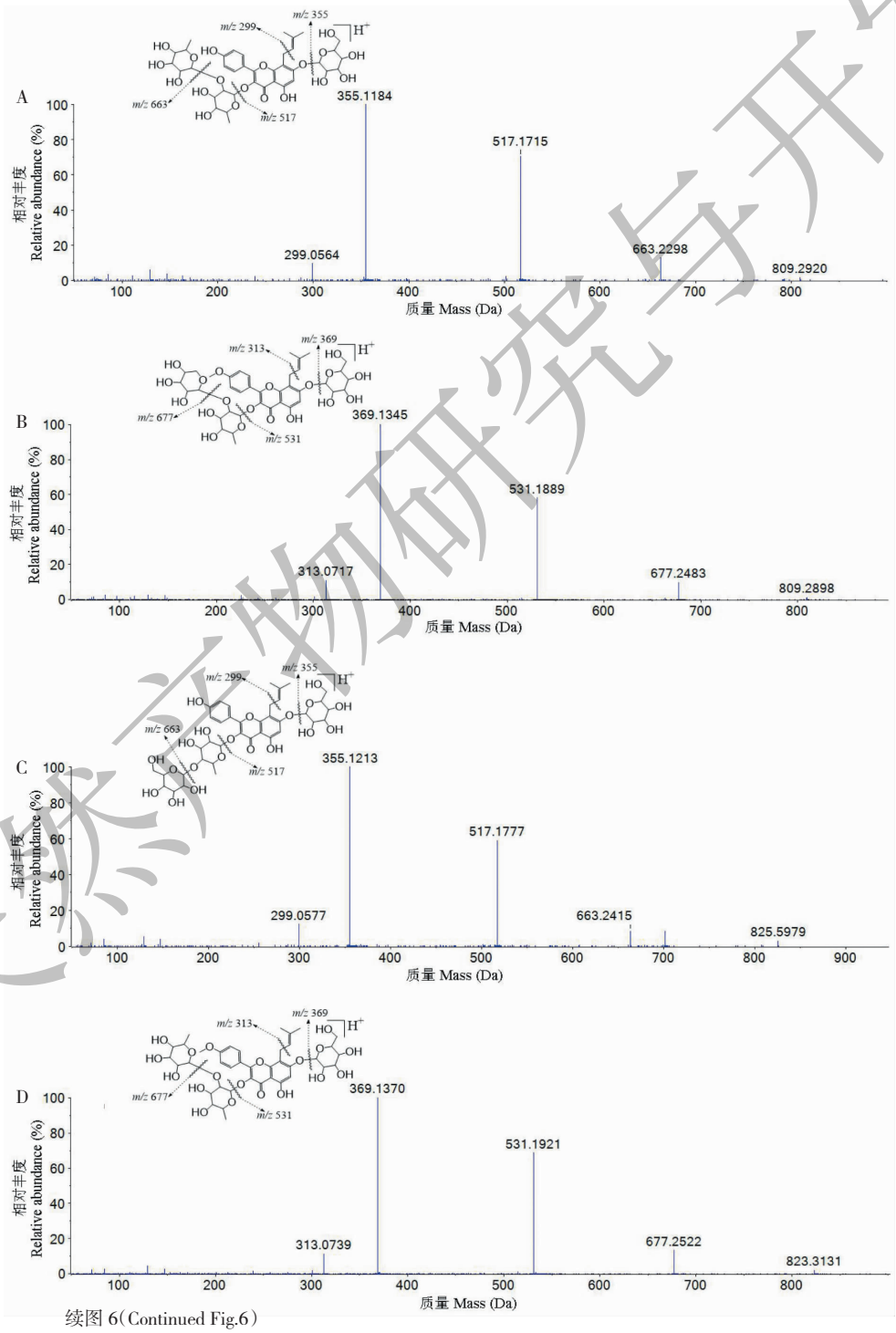
天然产物研究与开发

3.1.5 四糖苷成分裂解规律解析

淫羊藿植物中含异戊烯基黄酮醇的四糖苷成分仅报道 2 个(二叶淫羊藿苷 C、粗毛淫羊藿苷)。本研究鉴定出了粗毛淫羊藿苷,由图 6 可知,粗毛淫羊藿苷的 C-3 位键合了 2 个鼠李糖苷,C-7 位键合了 2 个葡萄糖苷,C-8 位有一个异戊烯基,C-4′位有一个甲氧基。通过分析该化合物的二级质谱,推测四糖苷化合物的裂解规律为 C-3 位的糖苷键首先会由外至内的进行断裂,其次是 C-7 位的糖苷键由外至内的进行断裂,之后则是脱掉 C-8 位的异戊烯基。比较三糖苷与四糖苷化合物的结构可以发现,这两类成分的结构差异主要为 C-7 位多了 1 个糖苷,所以质谱裂解规律相似,至于四糖苷化合物较少的原因可能与该代谢途径的生物合成积累相关。

3.2 基于质谱裂解规律的新化合物可能结构鉴定

3.2.1 新化合物 M1 的可能结构鉴定



续图 6(Continued Fig.6)

天然产物研究与开发

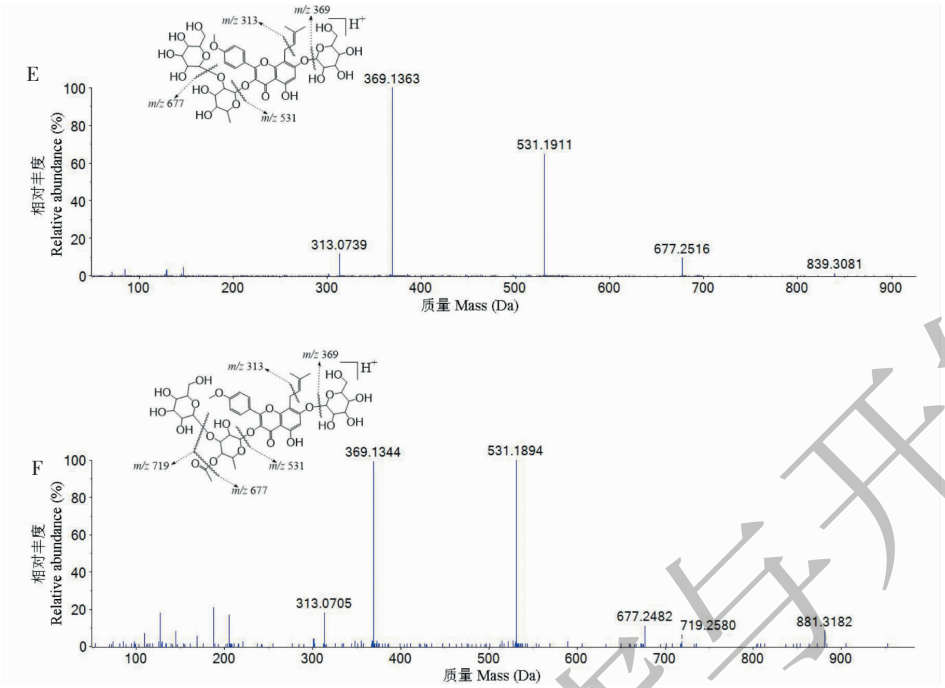


图 6　三糖苷化合物质谱裂解规律图

Fig. 6　Mass spectroscopic fragmentation of triglycoside compounds

注:A:宝藿苷 V;B:朝藿定 B;C:柔藿苷;D:朝藿定 C;E:朝藿定 A;F:朝藿定 I。Note:A:Baohuoside V;B:Epimedin B;C:Rouhuoside;D:Epimedin C;E:Epimedin A;F:Epimedin I.

保留时间为 7.92 min 的化合物 **M1**,分子式为 $C_{35}H_{42}O_{16}$,$[M+H]^+$ 的实际测量值为 719.255 5,理论值为 719.254 5,误差为 1.4 ppm,由质谱二级碎片图(见图 7)可知 *m/z* 为 719.261 6 的母离子连续脱去 188.069 5、162.055 5、56.063 1 Da 生成 *m/z* 531.192 1、*m/z* 369.136 6、*m/z* 313.073 5 的碎片离子。再由 *m/z* 为 189.078 0 的离子连续脱去 18.011 1、42.011 0、18.010 8 Da 生成 *m/z* 171.066 9、*m/z* 129.055 9、*m/z* 111.045 1 的碎片离子。通过 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 $C_8H_{12}O_5$、$C_6H_{10}O_5$、C_4H_8、H_2O、C_2H_2O 的精确质量数分别为 188.067 93、162.052 28、56.062 05、18.010 02、42.010 02 Da,与上述脱去碎片差值均小于 0.01 Da,表明该化合物可能存在鼠李糖苷、乙酰基、葡萄糖苷、异戊烯基、羟基的结构。

参考淫羊藿化学相关文献,化合物 **M1** 仅与朝鲜淫羊藿属苷Ⅱ、箭叶淫羊藿苷 C 为同分异构体。由图 8 可知,此两化合物的葡萄糖苷均键合在 C-3 位的鼠李糖苷上,根据该类化合物质谱裂解规律,C-3 位上的糖苷键会由外向内依次断掉。由此推测朝鲜淫羊藿属苷Ⅱ、箭叶淫羊藿苷 C 会先脱掉葡萄糖苷,即先脱掉 162 的碎片。而 **M1** 则是先脱掉 1 个

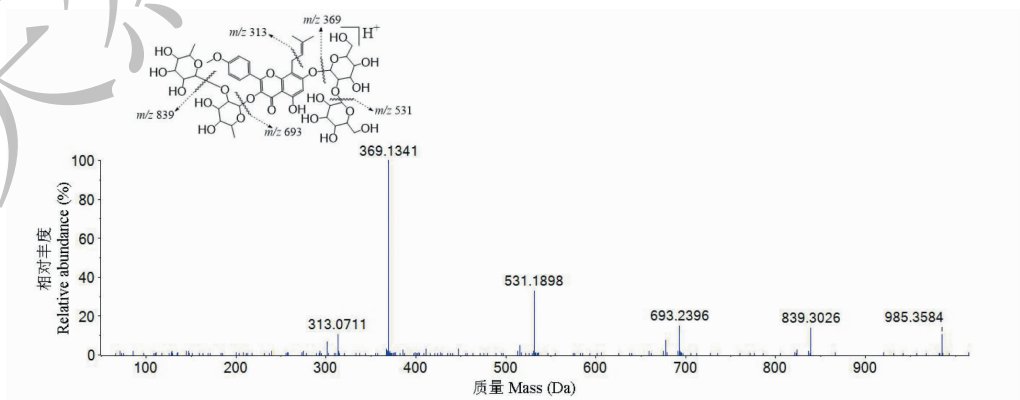


图 7　四糖苷化合物粗毛淫羊藿苷质谱裂解规律图

Fig. 7　Mass spectroscopic analysis of acuminatoside from tetraglycoside

天然产物研究与开发

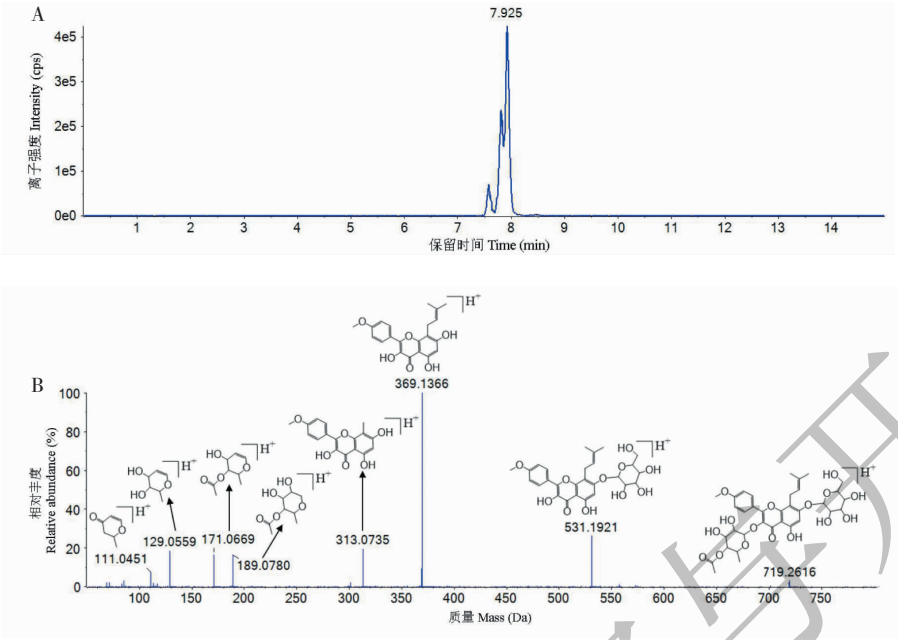


图 8 新化合物 M1 的提取离子图和二级裂解规律图

Fig. 8 Extraction ion diagram and secondary cracking diagram of a new compound **M1**

注:A:提取离子图;B:二级裂解规律图。Note:A:Extracted ion map;B:Secondary cracking pattern.

含乙酰基的鼠李糖苷,再脱掉 1 个葡萄糖苷,表明该化合物的葡萄糖苷没有键合在 C-3 位上,而是键合在 C-7 位的羟基上。由二级谱图(见图 7B)可知 **M1** 含有 *m/z* 189 的离子碎片,经过软件计算,该碎片是由一分子鼠李糖和一分子乙酰基组成,同时也证明乙酰基是连在 C-3 位的鼠李糖苷之上。将该化合物结构信息代入 SciFinder、Reaxys 等在线数据库进行检索,未匹配到与 **M1** 相一致的化学结构,故推测其为淫羊藿的新化合物。

3.2.2 *新化合物* **M2** *的可能结构鉴定*

保留时间为 7.21 min 的化合物 **M2**,分子式为 $C_{45}H_{60}O_{24}$,$[M+H]^+$ 的实际测量值为 985.351 3,理论值为 985.354 7,误差为 3.4 ppm,由质谱二级碎片图(见图 9)可知 *m/z* 为 985.369 8 的母离子连续脱去 162.057 7、146.059 1、146.060 2、162.055 3、56.063 3 Da 生成 *m/z* 823.312 1、*m/z* 677.253 0、*m/z* 531.192 8、*m/z* 369.137 5、*m/z* 313.074 2 的碎片离子。通过 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 $C_6H_{10}O_5$、$C_6H_{10}O_4$、C_4H_8 的精确质量数分别为 162.052 28、146.057 36、56.062 05 Da,与上述脱去碎片差值均小于 0.01 Da,表明该化合物可能存在葡萄糖苷、鼠李糖苷和乙酰基的结构。

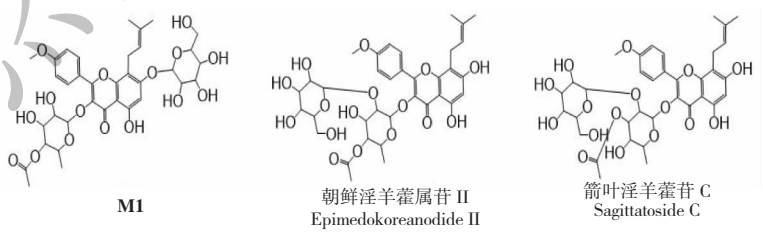


图 9 新化合物 M1 与同分异构体成分的结构比较图

Fig. 9 Structural comparison of new compound **M1** with its isomer

参考淫羊藿化学相关文献,化合物 **M2** 仅与粗毛淫羊藿苷为同分异构体。由图 10 可知,粗毛淫羊藿苷的 C-3 位上键合两个鼠李糖苷,C-7 位上键合两个葡萄糖苷。根据该类化合物质谱裂解规律,C-3 位的糖苷键会由外向内依次断掉,之后即是 C-7 位的糖苷键由外向内依次断掉。由此推测粗毛淫羊藿苷会连续脱掉 146、146、162、162 的离子碎片,这也与该化合物的二级碎片检测结果一致(见图 6),但

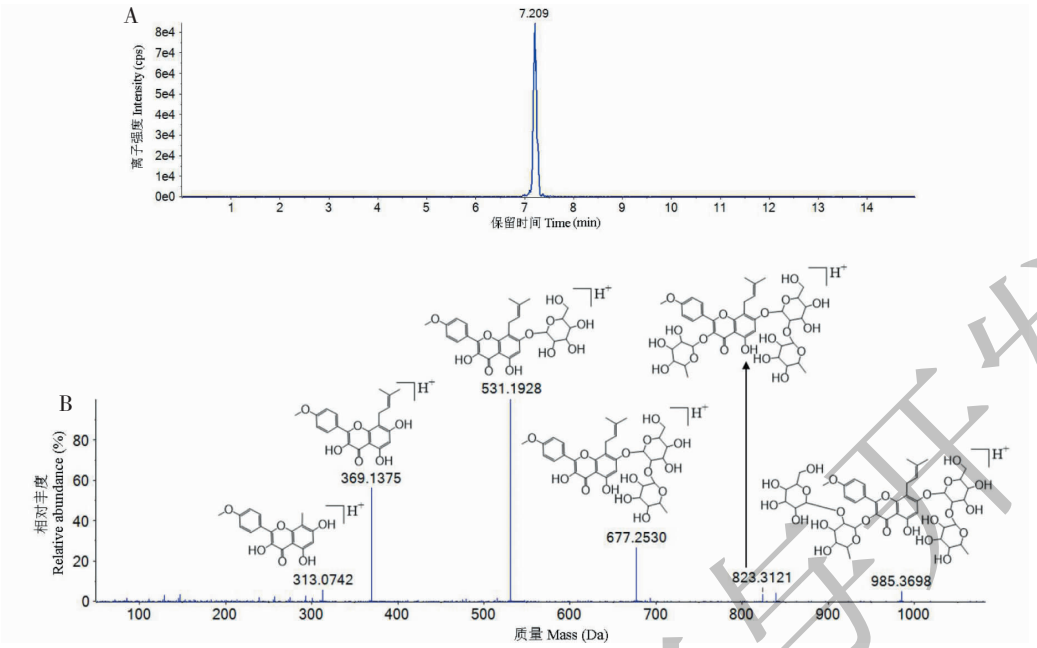


图 10　新化合物 M2 的提取离子图和二级裂解规律图

Fig. 10　Extraction ion diagram and secondary fragmentation diagram of a new compound **M2**

注:A:提取离子图;B:二级裂解规律图。Note:A:Extracted ion map;B:Secondary cracking pattern.

M2 的二级质谱则是连续脱掉 162、146、146、162 的碎片。由该类化合物结构可知,C-3 位和 C-7 位键合的糖苷数目没有超过 2 个,且 C-3 位只与鼠李糖苷直接相连,C-7 位只与葡萄糖苷直接相连(见图 11)。据此推测 **M2** 的结构中 C-3 位和 C-7 位均有一个葡萄糖苷和鼠李糖苷相连。将该化合物结构信息代入 SciFinder、Reaxys 等在线数据库进行检索,未匹配到与 **M2** 相一致的化学结构,故推测其为淫羊藿的新化合物。

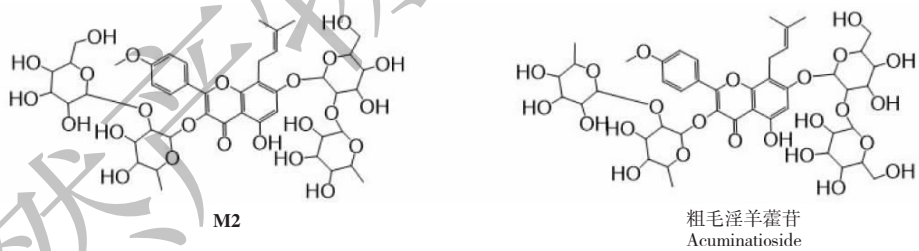


图 11　新化合物 M2 与同分异构体成分结构比较图

Fig. 11　Comparison of composition and structure between new compound **M2** and isomer

4　讨论

淫羊藿是我国常用且重要的补益类中药材,虽然对淫羊藿的药效物质基础报道较多,但迄今没有文献对该类成分的化学结构以及质谱裂解规律进行过分析总结,不利于该类成分的定性定量分析、生物合成规律探讨以及新成分新化合物的鉴定。本研究借助高分辨质谱,通过实验对含有异戊烯基药效黄酮醇的二级质谱解析发现,该类化合物在含有 ESI 源质谱中首先会由外至内的断裂 C-3 位糖苷键及乙酰基,之后则是由外至内的断裂 C-7 位糖苷键及乙酰基,其后则是脱去 C-8 位的异戊烯基和 C-4′位的甲氧基,如果 C-8 位异戊烯基双键被水加成还原为了异戊醇基,那么其质谱碎裂行为会先脱水再脱掉烃基,如果 C-8 位与 C-7 位基团成环,将不会产生异戊烯基的特征碎片。并借由上述裂解规律鉴定出了 2 个新化合物的化学结构,但高分辨质谱对同分异构体的结构鉴定能力存在一定缺陷,新化合物的化学结构还得依靠植化分离后,通过核磁共振波谱进

行最终确定。据文献报道,淫羊藿植物中含异戊烯基黄酮醇成分的 C-3 位羟基是重要活性位点[10],表明 C-3 位羟基糖苷化更易发生反应,与之相应的是在质谱行为中该位点的糖苷键也更容易断裂。糖苷键在质谱碎裂中属于异裂,即断裂时电荷不平均分配,所以该类衍生物中糖苷键的偶极矩大小或许是决定其断裂难易程度的一个重要的因素,这还有待课题组做进一步研究验证。本实验结果为深入阐明淫羊藿的药效物质基础及生物合成规律提供了科学依据。

参考文献

1 Qin WH, Wei YS, Yang Y, et al. Study on the correlation between inflorescence characteristics and flavonoid content of large-fllowered taxa of *Epimedium*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32:633-644.

2 Wang YZ, Jiang DC, Rong LS, et al. Comparative analysis of flavonoids in *Epimedium koreanum* from northeast China[J]. Chin Hosp Pharm J(药物分析杂志),2019,39:2034-2040.

3 Fang DF, Zhang JY. Research progress on the mechanism of Epimedium and its active ingredients in improving cardiovascular disease[J]. Chin Pharm(中国药房),2020,31:1139-1143.

4 Ouyang HZ, He J. Research progress on the quantitative analysis of chemical constituents in *Epimedium* herb and its pharmacokinetics[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med(天津中医药大学学报),2019,38:219-227.

5 Luo L, Yuan ZY, Hunag HY, et al. Advances in the chemical constituents and pharmacological studies of *Epimedium*[J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药),2019,15:190-194.

6 Ma WJ, Yao GZ, Jia Q, et al. Qualitative analysis on chemical constituents from *Epimedium brevicornu* by UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. J Chin Med Mater(中药材),2019,42:1554-1559.

7 Zhang LF, Hong YD, Luo Y, et al. Simultaneous determination of eight ingredients in drug pair of Eucommiae Cortex and Epimedii Folium by HPLC[J]. Chin Hosp Pharm J(药物分析杂志),2019,39:772-779.

8 Wang HZ, Cai YH, Chen YZ, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of *Epimedium*[J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药),2016,12:63-65.

9 Wei GY, Chen JJ, Liao SH, et al. Impact of light intensity on biosynthesis of active ingredients in *Epimedium*[J]. J Plant Sci(植物科学学报),2012,30:415-422.

10 Zhang HF, Yang XH. Bioactive constituents in Herba Epimedii and their developmental strategies[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2010,41:329-332.

11 Li X, Shi H, Ding JX, et al. Analysis of chemical constituents as flavonoids and coumarins in Radix Ardisiae from different sources[J]. Chin Pharm(中国药房),2021,32:443-452.

12 Liu W, Sun JH, Zhang JH, et al. Rapid characterization of chemical profile in daylily flowers and analysis of their fragmentation pathways by UHPLC-LTQ-Orbitrap MS^n[J]. J Chin Inst Food Sci Technol(中国食品学报),2020,20:256-264.

13 Qin WH, Yang Y, Guo YL, et al. Derivation of the biogenic pathway and identification of new compounds of *Epimedium* based on Yinyanghuo as the main metabolite[J]. Acta Pharm Sin(药学学报),2020,55:2176-2181.

14 Sun MJ, Wang HJ, Ding FJ, et al. Qualitative analysis of flavonoids in *Tetrastigma hemsleyanum* based on UPLC-Quadrupole/Exactive Orbitrap mass spectrometry and mass defect filter method[J]. J Chin Mass Spectr Soc(质谱学报),2020,41:359-367.

15 Yin CY, Zhang C, Sun MQ, et al. Mass spectrometric fragmentation pathways of three *Ginkgo biloba* flavonoids using HPLC-Q-TOF MS[J]. J Chin Mass Spectr Soc(质谱学报),2020,41:359-367.

天然产物研究与开发