

HPLC/ESI-MS 法鉴定半枝莲乙酸乙酯组分中黄酮苷元类化合物

王艳萍¹, 薛兴亚¹, 张秀莉¹, 金郁², 章飞芳², 梁鑫淼^{1,2}

(1. 中国科学院大连化学物理研究所, 分离分析化学重点实验室, 辽宁 大连 116023;
2. 华东理工大学, 上海 200237)

摘要:利用正离子模式电喷雾质谱研究了包括正黄酮、异黄酮、二氢黄酮、异二氢黄酮和黄酮醇在内的 5 个黄酮亚类苷元的质谱断裂碎片, 并得到了能够区别鉴定这 5 类黄酮苷元的特征碎片离子。其中, 2 个 CO 的连续丢失可以看作异黄酮的特征断裂, $[^{0,4}B-H_2O+H]^+$ 是二氢黄酮的特征碎片离子, 黄酮醇和异二氢黄酮则主要发生 0,2 键和 2,3 键的断裂, 分别形成特征性的 $^{0,2}A^+$ 和 $^{2,3}B^+$ 碎片离子。在此基础上, 利用高效液相色谱与电喷雾质谱联用技术对半枝莲乙酸乙酯组分中的化合物进行研究, 确定了异红花素 (isocarthamidin)、印黄芩素 (scutellarin)、木樨草素 (luteolin)、柚皮素 (naringenin)、4'-羟基汉黄芩素 (4'-hydroxy-wogonin) 和芹菜素 (apigenin) 6 个黄酮苷元, 并结合紫外光谱信息和质谱碎片信息, 对另外 6 个黄酮苷元类化合物进行初步的结构推断。

关键词:半枝莲; 黄酮苷元; 高效液相色谱; 电喷雾质谱

中图分类号: O 657. 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2009)03-0129-10

Identification of Flavonoid Aglycones in Ethyl Acetate Multi-Components of *Scutellaria barbata* D. Don by HPLC/ESI-MS

WANG Yan-ping¹, XUE Xing-ya¹, ZHANG Xiu-li¹,
JIN Yu², ZHANG Fei-fang², LIANG Xin-miao^{1,2}

(1. Key Lab of Separation Science for Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China;
2. East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The flavonoid aglycones in ethyl acetate multi-components of *Scutellaria barbata* D. Don were identified by high performance liquid chromatography/positive electrospray ionization mass spectrometry (HPLC/ESI-MS). Because the fragmentation behaviors of the flavonoid aglycones were crucial for the identification of unknown flavonoid aglycones, the characteristic MS fragments of five subclasses of flavonoid aglycones were initially studied using positive ion ESI-MS. The results indicate that the consequential loss of two CO molecules can be regarded as the diagnostic fragmentation pathway of isoflavone. $^{0,2}A^+$ and

收稿日期: 2008-12-24; 修回日期: 2009-03-15

基金项目: 国家杰出青年基金(20825518)和科技部支撑计划中医药领域课题(2006BAI06A01-06)资助

作者简介: 王艳萍(1981~), 女(汉族), 山东潍坊人, 博士研究生, 从事天然药物化学与有机质谱研究。E-mail: wyp@dicp.ac.cn

通信作者: 薛兴亚(1970~), 男(汉族), 陕西韩城人, 博士, 副研究员, 从事复杂样品的分离分析研究。E-mail: xuexy@dicp.ac.cn

$^{2,3}\text{B}^+$ fragments originated from the cleavage of C—C bonds of C-ring at positions 0/2 and 2/3 are the characteristic fragments of flavonol and isoflavanone respectively, and $[\text{O}^4\text{B}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ can be used to identify the flavanones. Based on these characteristic fragments, six flavonoids including isocarthamidin, scutellarin, luteolin, naringenin, 4'-hydroxywogonin and apigenin are identified unambiguously. Then, combined with the chromatographic retention time and UV spectra, another six compounds are identified tentatively.

Key words: *Scutellaria barbata* D. Don; flavonoid aglycones; HPLC; ESI-MS

半枝莲(*Scutellaria babarta* D. Don)别名狭叶韩花草、牙刷草等,为唇形科植物半枝莲的全草,味辛、苦,性寒,归肺、肝肾经,有清热解毒、散瘀止血、利尿消肿等功效,是一种常用中药。其中黄酮类化合物,包括黄酮苷及苷元,是其主要活性成分^[1]。对黄酮类化合物的准确定性能够促进对半枝莲药效物质基础的深入理解,有利于更好的发挥半枝莲的药效作用。

由于标准品种类及价格的限制,目前对半枝莲中黄酮类化合物的研究主要集中在对几种相对含量较高的黄酮类化合物的定性、定量研究上,如黄芩苷、野黄芩苷、黄芩素、野黄芩素和芹菜素等^[2-4],而对其中的微量黄酮类化合物研究则相对较少。随着液质联用仪的广泛应用,尤其是电喷雾(ESI)等软电离技术的快速发展,LC/MS直接用于中药复杂体系中微量化合物的定性分析已逐渐成为中药研究的热点技术^[5-6]。该技术的广泛应用是建立在相同类别的化合物具有相似的质谱断裂行为基础上,通过对同类化合物质谱断裂规律的研究,实现对复杂体系中微量化合物的快速定性分析。

在过去的十几年,黄酮苷元各亚类质谱断裂规律的研究已取得了巨大的进展。电喷雾电离源,大气压化学电离源(APCI)以及快原子轰击(FAB)等软电离技术都在黄酮苷元质谱断裂规律的研究中得到了广泛的应用^[7-10]。然而这些报道多数都是针对某一类或少数几类黄酮苷元的质谱碎片进行研究的,仅能得到个别亚类黄酮苷元在特定电离源及特定电离模式下的特征碎片离子和断裂途径,很难体现所得碎片离子的专属性、特征性,不利于复杂体系中未知化合物的准确定性。

本工作利用正离子模式电喷雾质谱对包括正黄酮、异黄酮、黄酮醇、二氢黄酮和异二氢黄酮在内的 5 个常见亚类黄酮苷元进行质谱表征,系统的总结各亚类黄酮苷元的特征碎片离子,并结合 LC/MS 技术对半枝莲乙酸乙酯组分中的黄酮苷元进行分离和定性研究,对无标准品对照的黄酮苷元进行结构推测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 Series LC/MSD Trap;美国安捷伦公司产品;Hypersil C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm);大连依利特公司产品;所有色谱分析用水均为 Millipore 纯化系统产生的超纯水;乙腈(色谱纯);德国 Merck 公司产品;甲醇(色谱纯);山东禹王公司产品;甲酸(色谱纯);美国 Tedia 公司产品;乙酸乙酯:工业级。

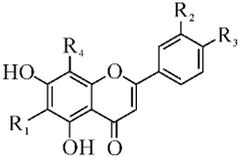
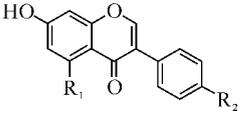
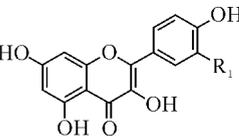
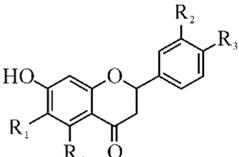
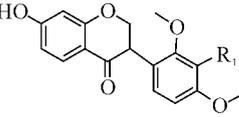
1.2 药材及标准品

半枝莲产于河南确山县,经中国中医研究院中药研究所鉴定。不同亚类黄酮苷元质谱断裂规律研究所涉及标准品均为本实验室前期纯化分离所得,化合物具体信息列于表 1。

1.3 样品制备

准确称取 10 g 半枝莲药材,用 100 mL 水回流提取 2 次,每次 2 h,将 2 次提取液过滤,合并滤液,60 °C 减压回流浓缩至 10 mL,备用。用乙酸乙酯对上述浓缩液进行萃取处理,每次加入 10 mL 乙酸乙酯,重复 3 次,合并萃取液,并在 35 °C 下进行减压回流浓缩。取浓缩后干粉适量,以甲醇溶解,用 0.22 μm 滤膜过滤后得到半枝莲乙酸乙酯组分样品溶液。标准品均用甲醇溶解,用 0.22 μm 滤膜过滤,备用。

表 1 黄酮苷元样品
Table 1 Flavonoid aglycone samples

结构	类别	化合物	相对分子质量	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
	正黄酮 Flavone	黄芩素 Baicalein	270	OH	H	H	H
		芹菜素 Apigenin	270	H	H	OH	H
		4'-羟基汉黄芩素 4'-Hydroxy-wogonin	300	H	H	OH	OCH ₃
		印黄芩素 Scutellarin	286	OH	H	OH	H
		木樨草素 Luteolin	286	H	OH	OH	H
	异黄酮 Isoflavone	大豆苷元 Daidzein	254	H	OH	—	—
		染料木素 Genistein	270	OH	OH	—	—
		刺芒柄花素 Formononetin	268	H	OCH ₃	—	—
	黄酮醇 Flavonol	山柰酚 Kaempfeol	286	H	—	—	—
		槲皮素 Quercetin	302	OH	—	—	—
	二氢黄酮 Flavanone	柚皮素 Naringenin	272	H	H	OH	OH
		橙皮素 Hesperidin	302	H	OH	OCH ₃	OH
		甘草素 Glycyrrhizin	256	H	H	OH	H
		异红花素 Isocarthamidin	288	OH	OH	H	OH
	异二氢黄酮 Isoflavanone	7-羟基-2',4'-二甲氧基 二氢异黄酮 Sativanone	300	H	—	—	—
		7-羟基-2',3',4'-三甲氧基 二氢异黄酮 3'- o-methylviolanonone	330	OCH ₃	—	—	—

1.4 分析条件

1.4.1 半枝莲乙酸乙酯组分色谱分离条件 半枝莲乙酸乙酯组分的分离是在 Agilent 1100 液相色谱仪上经过线性梯度洗脱实现的。色谱柱: Hypersil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm × 5 μm); 柱温: 30 °C; DAD 检测器的检测波长范围: 190 ~ 400 nm, 记录 280 nm 色谱图; 流动相(A): 0.1% 甲酸水溶液, 流动相(B): 乙腈; 梯度条件: 0 ~ 30 min, B 相从 7% 线性增加到 25%, 30 ~ 55 min, B 相从 25% 线性增加到 50%; 流速: 1 mL · min⁻¹。

1.4.2 质谱分析条件 所有质谱分析均采用电喷雾离子源。扫描方式: 黄酮苷元标准品采用正离子模式进行质谱扫描, 半枝莲乙酸乙酯组分采

用正负离子同时扫描; 质量扫描范围: m/z 50 ~ 1 000; 干燥气温度: 325 °C; 干燥气流速: 8 L · min⁻¹; 雾化气压力: 241.15 kPa; 毛细管电压: 3.5 kV; 多级质谱碰撞电压: 1.0 V。

1.5 黄酮苷元质谱裂解术语

为方便讨论黄酮苷元质谱断裂形成的碎片离子, 采用文献[7]中的命名规则, 黄酮苷元中各碳原子的编号及常见 C 环开环断裂方式示于图 1。C 环开环断裂后形成两部分碎片, 包含 A 环部分和 B 环部分, 分别用^{i,j}A⁺和^{i,j}B⁺表示, 左上标代表 C 环断裂的位置。另外, 由 C 环开环断裂后形成的离子继续发生中性丢失后, 形成的质谱碎片用[^{i,j}A[±] - X]和[^{i,j}B[±] - X]表示, X 代表中性丢失的分子。

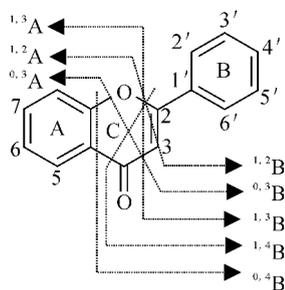


图 1 黄酮苷常见断裂方式

Fig. 1 Nomenclature for principal fragmentations

2 结果与讨论

2.1 正离子模式下黄酮苷元质谱断裂研究

黄酮苷元在正负离子模式下都具有良好的信号响应,但相比而言,负离子模式往往具有更高的灵敏度,而正离子模式下所得的质谱碎片具有更好的规律性,易于对不同亚类的黄酮苷元进行区分鉴定。所以,为了获得明显的特征碎片离子,进而对复杂体系中的未知黄酮苷元进行相对准确的结构推测,对 5 个亚类的黄酮苷元在正离子模式下进行系统的表征,详细研究各亚类黄酮苷元的特征碎片离子。5 类黄酮苷元的主要质谱断裂碎片列于表 2。

不同亚类的黄酮苷元在正离子模式下,都主要形成由中性小分子的丢失或 C 环开环断裂产生的两类碎片离子。中性小分子的丢失主要发生 H_2O , CO , CO_2 等单独或连续丢失,此类碎片离子的种类往往取决于 A, B 环上取代基团的种类、取代位点。当 A, B 两环上存在邻位羟基取代时,容易发生中性 H_2O 分子丢失,甲氧基取代基的存在则容易产生因甲基自由基的丢失而形成的偶电子离子。由表 2 所列的碎片可以看出,各种黄酮苷元的 C 环开环断裂主要发生在 1/3, 0/4, 2/3 等位置 C—C 键的断裂。具体的 C 环开环断裂碎片的种类是由黄酮苷元的种类决定的,不同类别的黄酮苷元具有不同的开环断裂途径,能够形成各自的特征碎片离子。中性小分子丢失和 C 环开环断裂所形成的两类碎片离子的相对强度与 C 环的饱和程度有较大关系。当 C 环的 C2 和 C3 之间为双键连接时, A, B, C 3 个六元环形成稳定的共轭体系, C 环不容易发生开环断裂,从而使中性小分子丢失所形成的碎片具有较大的相对丰度;反之,当 C 环的 C2 和 C3 之

间为单键连接时, 3 个六元环不能形成大共轭体系, C 环的稳定性相对较差, 容易发生开环反应, 形成具有较大相对丰度的开环断裂碎片。

通过对表 2 中所列的 5 类黄酮苷元正离子模式下质谱信息的比较, 发现不同类别的黄酮苷元可以通过相同的断裂途径形成相同的碎片离子。其中, C 环 1/3 两个化学键的 RDA 断裂就是本工作涉及的 5 个亚类黄酮苷元最常见的共有开环断裂方式, 这与文献[7-10]报道的质谱分析结果是完全一致的。说明该特征断裂对黄酮苷元类化合物具有普适性, 通过 1/3 两个化学键的断裂所形成的 $^{1,3}A^+$ 或 $^{1,3}B^+$ 离子, 可视为区别黄酮苷元及非黄酮化合物的特征离子。其次, 在众多的黄酮苷元中二氢黄酮和异二氢黄酮具有更多的相同碎片离子。二者因为 C 环均为饱和环而易发生开环断裂, 表 2 中所列的 $[^{0,4}B-H_2O]^+$ 和 $[^{0,4}B-H_2O-CO]^+$ 都是这两类黄酮苷元通过 C 环开环断裂所形成的共有质谱碎片, 而这两个碎片离子正是能够对二氢黄酮、异二氢黄酮和 C 环不饱和的黄酮亚类进行有效区分的共有诊断碎片。此外, 个别类别的黄酮苷元还能够通过不同的断裂途径形成相同类型的碎片离子。例如异黄酮和黄酮醇, 二者虽然结构差异比较大, 但在电喷雾质谱的正离子模式下却都能够形成 $[M-2CO+H]^+$ 碎片。该离子的存在能够对黄酮醇, 异黄酮进行初步判定。以染料木素和槲皮素为代表的这两类黄酮苷元形成该共有特征离子的可能断裂途径, 分别示于图 2(a), 2(b)。以染料木素为代表的异黄酮, 其 B 环与 C 环的连接点是 C3 位置, 这就使得 C 环上的 O 原子容易与 C2 一起以 CO 的形式发生断裂脱去, 促成了异黄酮分子中 2 个 CO 的连续丢失。而黄酮醇形成 $[M-2CO+H]^+$ 的途径与异黄酮又有所不同(图 2(b))。黄酮醇分子结构中, C3 位羟基的存在使得黄酮醇可以发生 C3 和 C4 位 2 个相邻 CO 的同时断裂, 得到的 $[M-2CO+H]^+$ 碎片中应该保留了原 C 环上的 O 原子。

除了黄酮醇和异黄酮, 二氢黄酮和异二氢黄酮分别共有特征碎片离子, 黄酮醇和异二氢黄酮还具有其各自的诊断碎片, 而这些诊断碎片正是进行黄酮苷元类别区分以及进行同分异构体鉴别的关键。如图 2(b)所示, C3 位羟基的存在使黄酮醇的 C 环容易发生烯醇式和酮式的互变, 当

表 2 正离子模式下,5 个亚类黄酮苷元质谱碎片列表

Table 2 Fragment ions observed for the five sub-classes flavonoid in the PI mode

化合物名称	所属亚类	[M+H] ⁺	1,3A ⁺	1,3B ⁺	1,4A ⁺	0,2A ⁺	2,3B ⁺	[0,4B-H ₂ O-CO] ⁺	[0,4B-H ₂ O] ⁺	[M-B+H] ⁺	[M-B-CO+H] ⁺	[M-CH ₃ +H] ⁺	[M-2CO+H] ⁺	[M-H ₂ O+H] ⁺	[M-CO+H] ⁺	[M-CH ₂ O+H] ⁺	[M-H ₂ O-CO+H] ⁺	
黄芩素	正黄酮	271	169	103	141	—	—	—	—	—	—	—	—	253	—	241	—	
芹菜素		271	153	—	125	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	241	—	
4'-羟基汉黄芩素		301	168 *	—	—	—	—	—	—	—	—	—	286	—	268 *	258 *	—	—
印黄芩素		287	169	119	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	269	—	257	241
木犀草素		287	153	135	—	—	—	—	—	161	179	—	— 269	—	257	—	—	—
大豆苷元	异黄酮	255	137	—	—	—	—	—	—	—	—	—	199	237	227	—	—	
染料木素		271	153	119	—	—	—	—	—	—	—	—	215	253	243	—	—	
刺芒柄花素		269	137	118 *	—	—	—	—	—	—	—	—	254	213	—	241	—	—
鸡豆黄素 A		285	153	—	—	—	—	—	—	—	179	151	270	229	—	257	—	—
山柰酚		黄酮醇	287	153	—	—	165	—	—	—	—	—	—	231	269	—	—	241
槲皮素	303		153	—	—	165	—	—	—	—	—	—	247	285	—	—	257	
柚皮素	二氢黄酮		273	153	—	—	—	—	119	147	179	—	—	—	—	—	—	—
橙皮素			303	153	151	—	—	—	149	177	179	—	—	—	285	—	—	—
甘草素			257	137	—	—	—	—	119	147	163	—	—	—	239	—	—	211
异红花素		289	169	121	—	—	—	119	147	195	—	—	—	271	—	259	—	
7-羟基-2'4'-二甲氧基异二氢黄酮		异二氢黄酮	301	137	165	—	—	151	163	191	163	135	—	—	283	273	—	—
7-羟基-2'3'4'-三甲氧基异二氢黄酮	331		—	—	—	—	181	193	221	163	135	—	—	313	303	—	—	

注: * 表示在丢失甲基自由基的基础上进一步发生开环或中性小分子丢失形成的碎片离子

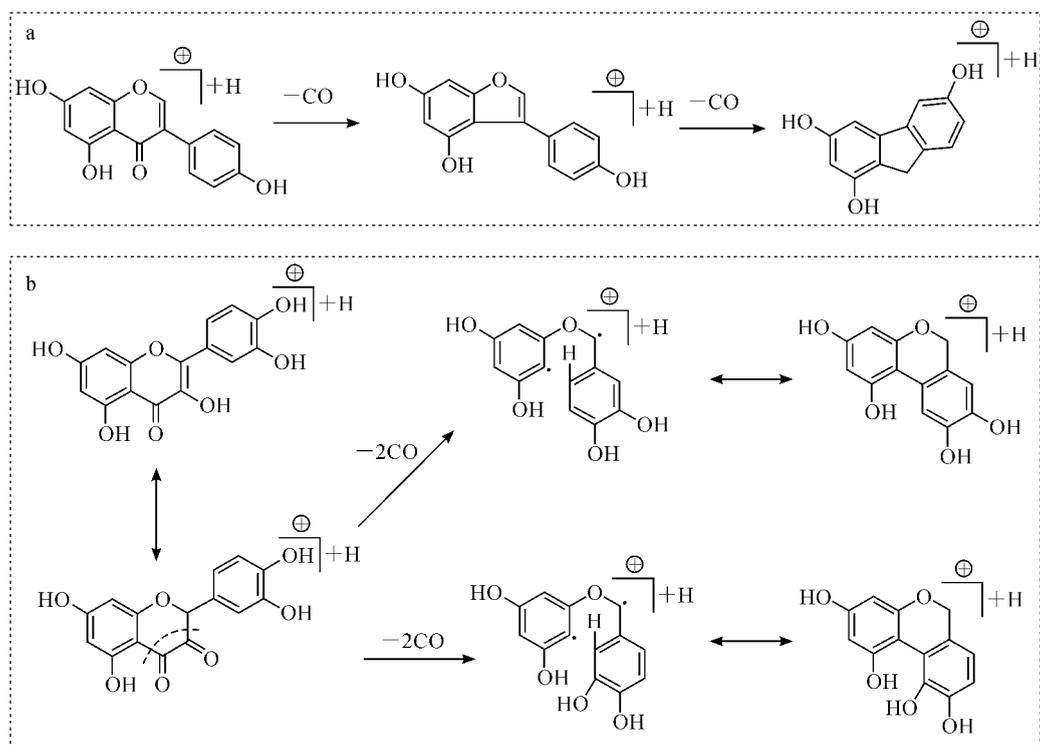


图 2 染料木素(a)和槲皮素(b)分别形成 $[M-2CO+H]^+$ 离子的可能途径

Fig. 2 Mechanisms proposed for the formation of $[M-2CO+H]^+$ ions of genistein (a) and quercetin (b)

C 环的 C3 位转变为酮式时, C 环与整个分子的大共轭体系被破坏, C 环容易发生 0/2 键的断裂形成 $^{0,2}A^+$ 特征碎片离子, 该特征离子与 $[M-2CO+H]^+$ 离子相结合, 能够实现对黄酮、异黄酮和黄酮醇 3 个亚类黄酮苷元中同分异构体进行准确的类别划分。二氢黄酮和异二氢黄酮的 C 环均为饱和环, 二者能够发生许多相同的质谱断裂, 得到大量类别相同的碎片离子。但由于 B 环与 C 环连接位点的不同, 异二氢黄酮还能因为 2/3 键的断裂而形成其特征的 $^{2,3}B^+$ 碎片离子。

综上所述, 在正离子模式电喷雾电离作用下, 本工作涉及的 5 个亚类的黄酮苷元均能够发生 C 环的 1/3 键断裂, 除了正黄酮, 其他 4 类黄酮苷元均有比较典型的专有断裂途径, 能够形成专属性较高的特征碎片离子, 便于对复杂体系中各黄酮苷元进行准确的分类定性。

2.2 复杂体系中黄酮苷元定性流程

根据正离子模式电喷雾质谱得到的 5 个亚类黄酮苷元的特征断裂途径及诊断碎片离子, 设计了黄酮苷元鉴定流程, 示于图 3。该鉴定流程主要解决黄酮苷元的类别归属问题, 至于黄酮苷

元的具体取代基类别、个数和取代位点, 则需要确定类别的基础上, 通过对 C 环开环断裂所形成的碎片离子进行详细的分析来确定。对复杂体系中黄酮苷元化合物的定性应结合紫外吸收光谱、质谱等多种信息同时进行。黄酮类化合物一般都具有较明显的特征紫外吸收光谱, 紫外吸收光谱结合相对分子质量信息可以初步判断哪些化合物可能为黄酮苷元类化合物, 然后再根据质谱数据进行具体的类别归属和取代基团的确定。如图 3 所示, 黄酮苷元类型的判断应该从具有高专属性诊断离子的苷元类型开始, 如黄酮醇。0/2 键的断裂是黄酮醇特有的断裂途径, 如果正离子模式下的质谱图存在 $^{0,2}A^+$ 碎片, 则说明该化合物可能为黄酮醇。反之, 则应进一步根据 $[M-2CO+H]^+$ 或 $^{2,3}B^+$ 的存在与否判断目标化合物是否为异黄酮或异二氢黄酮。在以上 3 种诊断碎片都不存在的情况下, 则应根据 $^{0,4}B^+-H_2O$ 的存在与否判断目标化合物是二氢黄酮还是正黄酮。

2.3 半枝莲乙酸乙酯组分黄酮苷元表征

2.3.1 半枝莲乙酸乙酯组分中黄酮苷元的初步识别

紫外光谱信息是进行化合物类别鉴定的

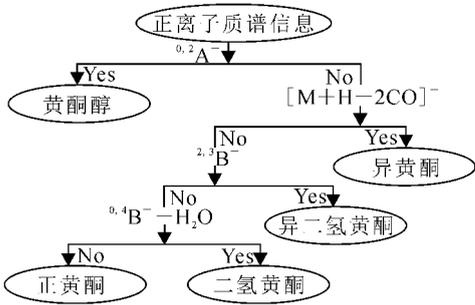


图 3 ESI-MS 正离子模式下黄酮苷元鉴定流程

Fig. 3 Determination of flavonoid aglycones by ESI-MS under positive mode

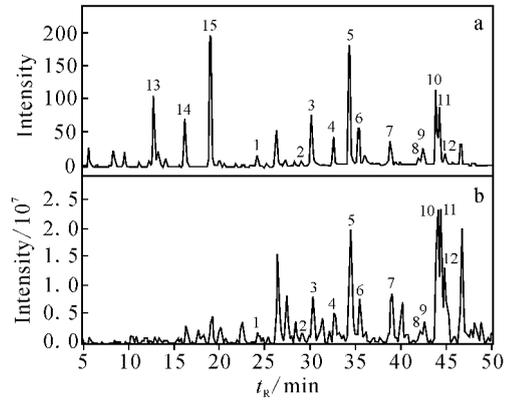


图 4 半枝莲乙酸乙酯组分的液相色谱图(a)和质谱总离子流图(b)

Fig. 4 Liquid chromatography(a) and mass spectrometric total ion chromatogram (TIC) (b) of ethyl acetate multi-components of *Scutellaria barbata* D. Don

重要工具之一,通过液相色谱-紫外检测器(LC-DAD)联用能够快速实现复杂体系中各化合物类别的初步归属。图 4 为半枝莲乙酸乙酯组分液相色谱图(a)和质谱总离子流色谱图(b)。说明在 2.4 的分析条件下,半枝莲乙酸乙酯组分能够得到良好的分离检测。通过对液相色谱图中各个色谱峰紫外吸收光谱的分析(图 5)发现,前 24 min 的色谱峰都不具备黄酮类化合物的特征紫外吸收光谱,初步判断为非黄酮类化合物。在 24~47 min 的色谱峰则大多都在 200~400 nm 范围内存在两个主要的紫外吸收带,一个分布在 220~280 nm,另一个分布在 300~400 nm,这与黄酮类化合物的特征紫外吸收光谱是一致的,推测这一部分可能为黄酮苷或黄酮苷元。结合各色谱峰正负离子一级质谱中得到的准分子离子峰,各色谱峰的准确分子量信息列于表 3,推测图 4 中标注的 12 个色谱峰可能为黄酮苷元。通过对半枝莲乙酸乙酯组分中的目标化合物与表 1 中所列标准品的相对分子质量信息和色谱表征信息的比较,发现 3,5,7,9,10,11 六个色谱峰分别与异红花素、印黄芩素、木樨草素、柚皮素、4'-羟基汉黄芩素和芹菜素 6 个标准品具有相同的相对分子质量、色谱保留时间和紫外吸收光谱,基本可以实现对这 6 个色谱峰的结构确认,但具体结构信息仍需根据多级质谱信息进行验证。此外,半枝莲乙酸乙酯组分中的另外 6 个黄酮苷元化合物可能的结构也需根据多级质谱信息进行推导。

2.3.2 根据质谱碎片进行黄酮苷元结构推断

半枝莲乙酸乙酯组分中黄酮苷元正负离子模式下的准分子离子峰信息以及正离子模式下

的多级质谱信息均列于表 3 中。通过表 3 与表 2 中多级质谱碎片的比较,进一步证实了 2.3.1 中 6 个色谱峰的定性结果。同时,利用 3.1 总结的特征断裂途径和 3.2 中归纳的黄酮苷元定性流程,对表 3 中剩余的 6 个化合物的多级碎片进行了解析,确定了其所属苷元类型和 A, B, C 三环上的取代基种类和数目,得到了基本明确的化合物结构。

如峰 2 和峰 8,二者的二级碎片中均含有 m/z 183, 147 和 121 的离子,其中 m/z 121 和 m/z 147 分别与异红花素的 $^{1,3}B^+$ 和 $[^{0,4}B-H_2O+H]^+$ 离子相同,可推测这两个化合物都与异红花素具有相同的 B 环和 C 环组成,即 B 环有一个羟基,而 C 环的 2,3 位除连接 B 环外无其他取代基团。结合峰 2 和峰 8 的相对分子质量信息,得出这两个化合物可能是比异红花素多 1 个亚甲基的 C 环饱和黄酮苷元,且该亚甲基的连接位点在 A 环,这与 m/z 183 的 $^{1,3}A^+$ 是相符的。同时,由于这两个化合物的二级碎片中都不存在 m/z 107 的 $^{2,3}B^+$ 离子,所以 B 环可能都是连接在 C 环的 C2 位置,基本排除了属于异二氢黄酮的可能性。综合以上分析结果,峰 2 和峰 8 均为 A 环有 2 个羟基和 1 个甲氧基, B 环有 1 个羟基的二氢黄酮。通过相似的解析过程,对 1, 4, 6, 12 四个色谱峰的二级碎片也进行了详细的归属分析,最终得出,1 号峰可能为 A 环有 3 个

羟基, B 环有 2 个羟基的二氢黄酮; 4 号峰可能为 A 环有 3 个羟基, B 环有 1 个羟基的二氢黄酮; 6 号峰可能为 A 环有 3 个羟基, B 环有 1 个羟基的正黄酮; 12 号峰可能为 A 环有 2 个羟基和 1 个甲氧基, B 环有 1 个羟基的正黄酮。此外, 4 号峰和 6 号峰分别与异红花素和印黄芩素

具有相同的相对分子质量和非常相近的多级质谱信息, 而文献[1, 11]报道半枝莲中含有红花素和异红花素, 异黄芩素和印黄芩素两组同分异构体, 因此, 推测 4 号峰和 6 号峰可能分别是红花素和异黄芩素。

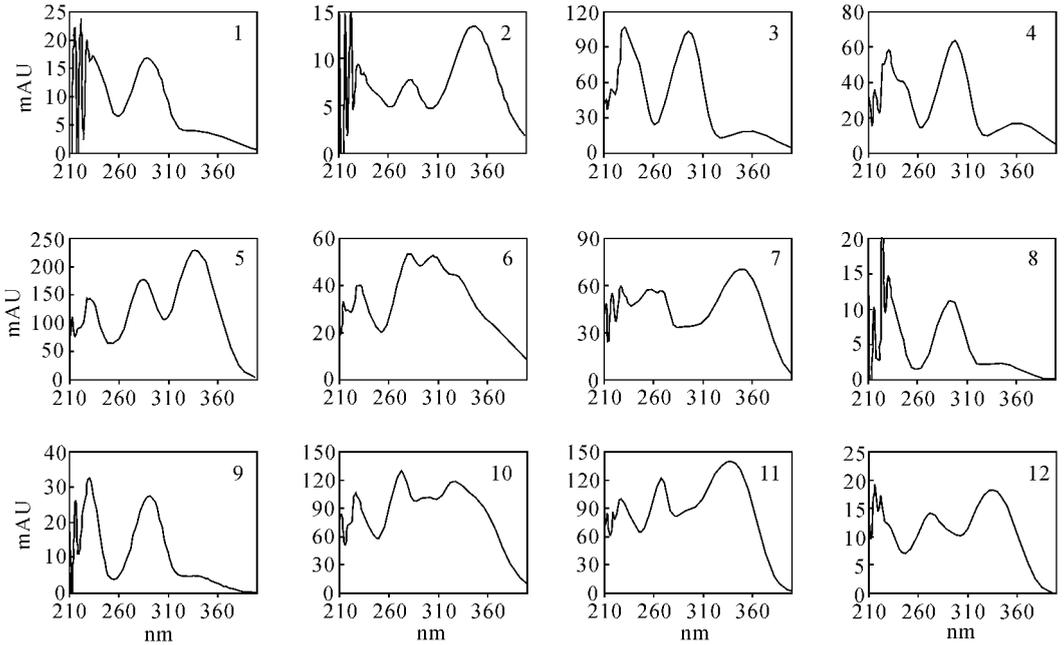


图 5 半枝莲乙酸乙酯组分中部分化合物的紫外光谱图

Fig. 5 UV spectrum of representative compounds of ethyl acetate multi-components of *Scutellaria barbata* D. Don

表 3 半枝莲乙酸乙酯组分中黄酮苷元质谱碎片信息及可能的化合物结构

Table 3 Summary of fragments ions of flavonoid aglycones from ethyl acetate multi-components of *Scutellaria barbata* D. Don

峰号	保留时间/min	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	相对分子质量	MS^2	MS^3	可能的化合物结构
1	24.1	305	303	304	287(50%), 241(10%), 195(15%), 187(10%), 169(65%), 163(100%), 145(20%), 117(5%)		A 环 3 个羟基 B 环 2 个羟基的二氢黄酮
2	29.1	303	301	302	283(25%), 273(70%), 267(30%), 201(35%), 183(100%), 147(10%), 121(15%)		A 环两个羟基 1 个甲氧基 B 环 1 个羟基的二氢黄酮
3	30.1	289	287	288	271(10%), 259(12%), 185(8%), 169(100%)*, 147(80%), 121(30%)	151(50%), 139(100%), 123(55%), 113(45%), 85(25%)	异红花素

续表

峰号	保留时间/min	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	相对分子质量	MS ²	MS ³	可能的化合物结构
4	32.5	289	287	288	271(8%), 259(20%), 185(9%), 169*(100%), 147(50%), 121(45%)	151(70%), 139(100%), 123(20%), 113(22%), 85(50%)	A 环有 3 个羟基 B 环有 1 个羟基的二氢黄酮 可能为红花素
5	34.2	287	285	286	269(35%), 257*(100%), 242(30%), 169(15%)	119(100%)	印黄芩素
6	35.3	287	285	286	269(30%), 257*(100%)	139(50%), 121(10%), 119(100%), 91(15%)	A 环有 3 个羟基 B 环有 1 个羟基的正黄酮 可能为异黄芩素
7	38.8	287	285	286	269(85%), 257(70%), 137(10%), 135(100%)		木樨草素
8	41.9	303	301	302	183*(100%), 168(5%), 147(8%), 121(2%)	168(100%), 137(13%)	A 环 2 个羟基 1 个甲氧基 B 环 1 个羟基的二氢黄酮
9	42.7	273	271	272	171(15%), 153*(100%), 147(90%), 119(7%)	125(100%)	柚皮素
10	43.8	301	299	300	286*(100%)	268(100%), 258(20%), 242(10%), 168(18%)	4'-羟基汉黄芩素
11	44.2	271	269	270	252(95%), 247(100%), 153(10%)		芹菜素
12	44.8	301	299	300	286*(100%)	267(25%), 186(50%), 177(78%), 168(100%), 160(70%), 119(18%)	A 环 2 个羟基 1 个甲氧基, B 环 1 个羟基的正黄酮

注: * 为进行三级质谱分析的母离子

3 小 结

采用正离子模式电喷雾质谱系统地对包括正黄酮、异黄酮、黄酮醇、二氢黄酮和异二氢黄酮在内的 5 个常见亚类 17 种黄酮苷元进行质谱表征, 得到了各亚类黄酮苷元的特征碎片离子, 并总结了复杂体系中黄酮苷元定性的基本流程。在此基础上, 结合 LC/MS 技术对半枝莲乙酸乙酯组分中的黄酮苷元进行了良好的分离定性研究, 准确鉴定了包括异红花素、印黄芩素、木樨草素、柚皮素、4'-羟基汉黄芩素和芹菜素在内的 6

个黄酮苷元, 并对另外 6 个无标准品对照的黄酮苷元进行了苷元类别的归属和取代基种类、数目的鉴定。本工作定性或尝试定性的 12 个化合物均为正黄酮或二氢黄酮, 这与文献报道的半枝莲中所含主要黄酮苷元的种类是一致的。

液质联用技术结合标准品质谱断裂规律研究, 能够快速实现对相同类别化合物的初步定性, 对复杂体系中微量化合物的快速定性具有重大意义。但该方法只能进行大概的结构推断, 不能对具体的取代位点等做出详细描述。准确的

结构鉴定还需要对目标化合物进行分离纯化后,通过核磁等技术进行准确的结构解析,对于微量化合物则可通过在线液相色谱-核磁联用技术等对化合物的结构进行进一步的确认。

参考文献:

- [1] 蒋小岗, 顾振纶. 半枝莲的化学成分和药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(1):3-5.
- [2] 仲浩, 刘宗平, 刘海波, 等. HPLC 法测定半枝莲中黄芩素的含量[J]. 食品与药品, 2008, 10(9):47-48.
- [3] 李洁. HPLC 测定半枝莲不同药用部位野黄芩苷的含量[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(3):427-428.
- [4] 乔春峰, 韩全斌, 宋景政, 等. RP-HPLC 测定半枝莲药材中 4 种主要黄酮类成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(17):1342-1344.
- [5] ZHOU D Y, XU Q, XUE X Y, et al. Identification of O-diglycosyl flavanones in *Fructus aurantii* by liquid chromatography with electrospray ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 42(4):441-448.
- [6] SHI P Y, HE Q, SONG Y, et al. Characterization and identification of isomeric flavonoid O-diglycosides from genus citrus in negative electrospray ionization by ion trap mass spectrometry and

time-of-flight mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 598(1):110-118.

- [7] MA Y L, LI Q M, Van den HEUVEL H, et al. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 1997, 11(12):1357-1364.
- [8] FABRE N, RUSTAN I, de HOFFMANN E, et al. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2001, 12(6):707-715.
- [9] KANG J G, HICK L A, PRICE W E. A fragmentation study of isoflavones in negative electrospray ionization by MSⁿ ion trap mass spectrometry and triple quadrupole mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(6):857-868.
- [10] de RIJKE E, OUT P, NIESSEN W M A, et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids[J]. J Chromatog A, 2006, 1112(1/2):31-63.
- [11] SONODA M, NISHIYAMA T, MATSUKAWA Y, et al. Cytotoxic activities of flavonoids from two *Scutellaria* plants in Chinese medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 91(1):65-68.

《质谱学报》增刊征订通知

中国物理学会质谱分会第八届全国会员代表大会暨第九届全国学术交流会于 2008 年 12 月 11 日在海南省海口市召开。本次会议是展示质谱学基础、应用研究成果,以及质谱技术与仪器最新进展的一次盛会,本届学术大会收录的会议论文以《质谱学报》增刊的形式正式发表,内容涉及有机、无机、同位素、生物质谱学和质谱仪器的基础、方法及新技术研究,以及在生物、医药、天然产物、石油化工、食品安全、环境及表面分析等领域的应用研究与发展动态,充分反映了质谱学技术目前在我国各个领域的应用情况和质谱学在科学技术发展中的重要作用。

此次出版的增刊目次可以在《质谱学报》网站上下载,网址为 <http://www.jcmss.com.cn>,如需订阅可直接与编辑部联系,电话:010-69357734, E-mail:jcmss401@163.com。