

离子阱飞行时间串联质谱定性 检测山茱萸提取物中有效成分

No.LCMS-IT-TOF-014

摘要： 本文使用离子阱飞行时间串联质谱（LCMS-IT-TOF）定性检测了山茱萸生品水提取物中的有效成分。首先使用LCMS-IT-TOF对标准品莫诺昔、没食子酸、5-羟甲基糠醛、熊果酸、山茱萸新苷、齐敦果酸、马钱素等进行了裂解规律的研究，并进行了液质联用分析。其次对山茱萸生品水提取物进行了液质联用自动三级质谱分析，共鉴定出有效成分50个化合物（38个分子式）。并且根据标样裂解规律和样品多级质谱裂解规律，定性检测出了7-O-没食子酰景天庚酮糖苷（ $C_{14}H_{18}O_{11}$ ）和马钱酸（ $C_{16}H_{24}O_{10}$ ），并分别给出了3级质谱裂解规律。

关键词： 山茱萸 离子阱飞行时间串联质谱 LCMS-IT-TOF

中药是我国传统药学宝库，它的含义包含中药材、药材饮片及中成药。目前，世界各个国家和地区均投入了大量的人力和财力，大力开展对天然药物的研究。我国拥有丰富的天然药物资源，数千年的临床中医药理论。但是，中药无论在研究方面或生产方面与西方先进药业比较还有相当大的差距，中药品很难进入世界医药主流市场。现大多数中药产品存在着治疗疾病的作用机制不清、相关作用物质不明确等问题。中药的有效成分是药物发挥药效作用的物质基础，是中药现代化的关键所在。对单味中药化学成分研究是中药研究中的一种方向。目前已经有几十种中药单体和有效部位达到较高临床治疗水平。

山茱萸是中医临床常用的名贵传统抗衰老药物之一。关于本品药用的最早记载见于《神农本草经》，列为中品。俄罗斯医学家通过电子计算机分析了中国、日本和朝鲜3国500多个处方、230种植物药使用情况，按3个国家的使用总数评出25种植物药，山茱萸为其中之一。我国中医药临床研究证明，山茱萸是治疗糖尿病、冠心病和高血压的主要药材。首方六味地黄丸和金匱肾气丸中都用作配伍。山茱萸自然分布在北温带、亚热带的高山地区。在我国多分布在长江南北海拔600-1400米的山岭地区。

液质联用技术是中药研究中最常用的分离分析手段。离子阱飞行时间串联质谱由于既具备多级质谱功能（最多到10级），又具备高分辨率和高质量数准确度，因此特别适合于同时对多种微量成分进行准确的定性和定量分析。本文使用离子阱飞行时间串联质谱（LCMS-IT-TOF）定性检测了山茱萸生品水提取物中的有效成分。

■ 实验部分

1、试剂与仪器

试剂：乙腈，HPLC级；纯水，Milli-Q超纯水仪制备得到；甲酸，LCMS级；所有试剂和样品需用0.45 μ m以下滤膜过滤。仪器：岛津超快速液相色谱仪（UFLC）和离子阱飞行时间串联质谱仪（LCMS-IT-TOF）。具体配置为：输液泵LC-20AD \times 2，在线脱气机DGU-20A₃，自动进样器SIL-20A_{CHT}，柱温箱CTO-20AC，二极管阵列检测器SPD-M20A，控制器CBM-20A，离子阱飞行时间串联质谱仪LCMS-IT-TOF，工作站LCMSsolution V3.50。

2、样品前处理方法

准确称取2.0g粉碎好的山茱萸生品于50mL离心管中，加入20mL水混匀，浸泡半小时后，超声波提取20min，6000rpm离心10min，取上清液，用水稀释1倍后，过0.45 μ m滤膜后供LC-MS分析。

色谱条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II 2.0 mm × 100 mm, 2.2 μm；流动相：A相 - 0.1%的甲酸水溶液，B相 - 乙腈；流速：0.3mL/min；柱温：30℃；进样量：1 μL和4 μL；梯度洗脱程序：0到2.52分钟维持2%B，2.52分钟到3.78分钟线性增加到5%B，3.78分钟到11.30分钟线性增加到15%B，11.30分钟到13.90分钟线性增加到25%B，13.90分钟到17.60分钟线性增加到90%B，17.60分钟到20.20分钟维持90%B，20.20分钟到20.30分钟线性递减到2%B，24.00分钟结束。

质谱条件

离子源：ESI，正负离子同时扫描；扫描范围：m/z100-1000；加热模块温度：200℃；CDL温度：200℃；雾化气流速：1.5L/min；干燥气流速：10L/min；离子源电压：正离子模式+4.5kV，负离子模式-3.5kV；检测器电压：1.70kV；离子累积时间：50ms；CID参数：碰撞能量50%，碰撞气50%；质量数校准方法：AutomaticMS³参数：MS¹, MS², MS³100-1000，最小重复次数3次，动态时间10s；校准方法：自动调谐优化电压，外标法校准质量数。

结果与讨论

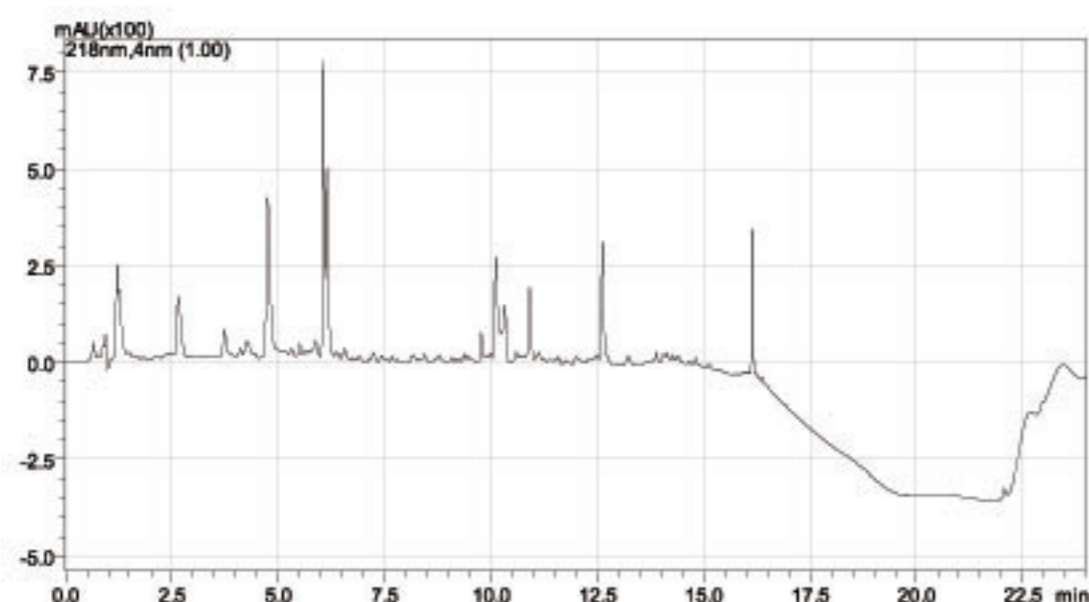
1、标样清单及分析结果

对标样分别进行液质联用分析，结果列表如下：

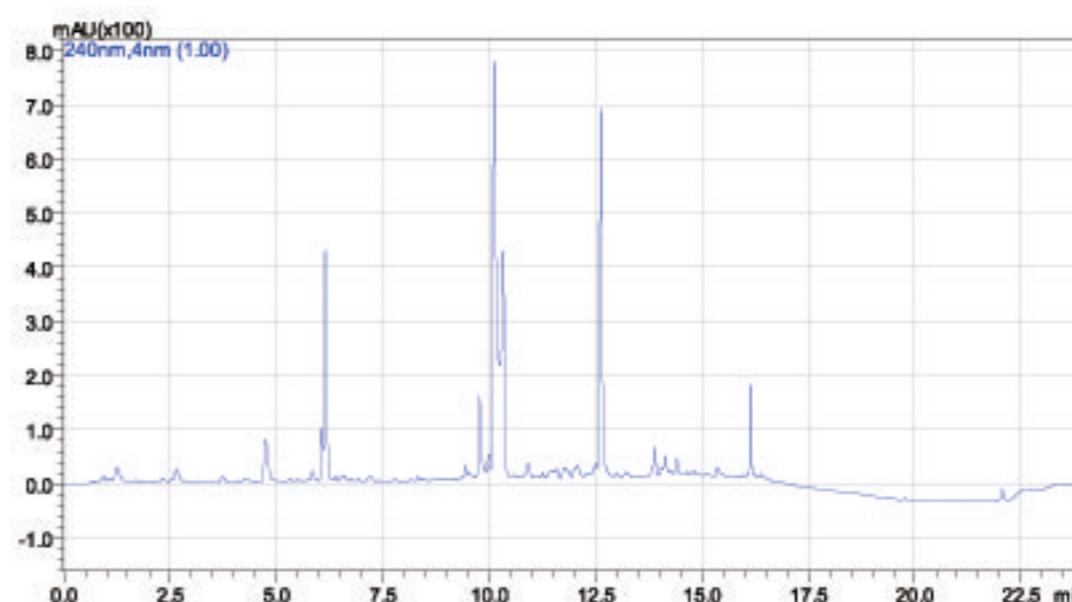
ID	Name	Formula	PDA RT(min)	MS RT(min)	Ion	Meas.m/z	Pred. m/z	Diff(ppm)
1	莫诺昔	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	10.116	10.162	[M+Na] ⁺	429.1382	429.1367	3.50
					[M-H] ⁻	405.1382	405.1402	-4.94
					[M+HCl-H] ⁻	441.1149	441.1169	-4.53
					[M+CF ₃ COOH-H] ⁻	519.1303	519.1331	-5.39
2	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅	4.796	4.823	[M-H] ⁻	169.0148	169.0142	3.55
					[M+HCl-H] ⁻	204.9899	204.9909	-4.88
					[M+CF ₃ COOH-H] ⁻	283.0075	283.0071	1.41
3	5-羟甲基糠醛	C ₆ H ₆ O ₃	6.142	/	/	/	/	/
4	熊果酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	/	21.612	[M-H] ⁻	455.3515	455.3531	-3.51
5	山茶萸新苷	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₄	16.097	16.148	[M-H] ⁻	541.1557	541.1563	-1.11
					[M+CF ₃ COOH-H] ⁻	655.1471	655.1491	-3.05
6	齐敦果酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	/	21.506	[M-H] ⁻	455.3520	455.3531	-2.42
7	马钱素	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	12.589	12.632	[M+Na] ⁺	413.1434	413.1418	3.87
					[M+K] ⁺	429.1160	429.1158	0.47
					[M+HCl-H] ⁻	425.1226	425.1220	1.41
					[M+HCOOH-H] ⁻	435.1501	435.1508	-1.61
					[M+CF ₃ COOH-H] ⁻	503.1365	503.1382	-3.38

2、样品分析结果

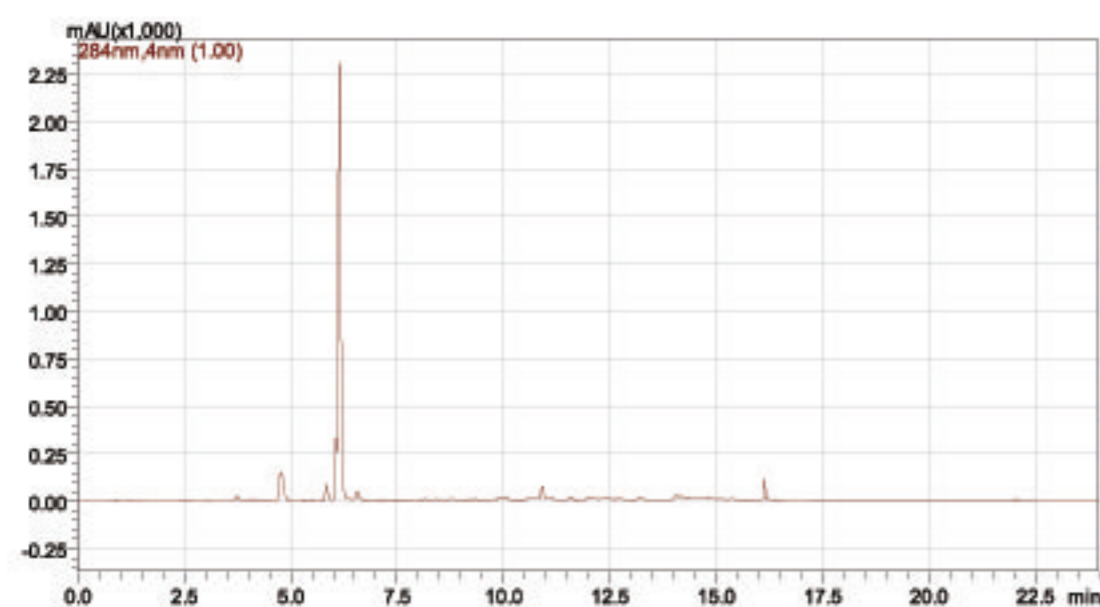
1) 4 μL进样一级质谱正负离子同时扫描分析结果



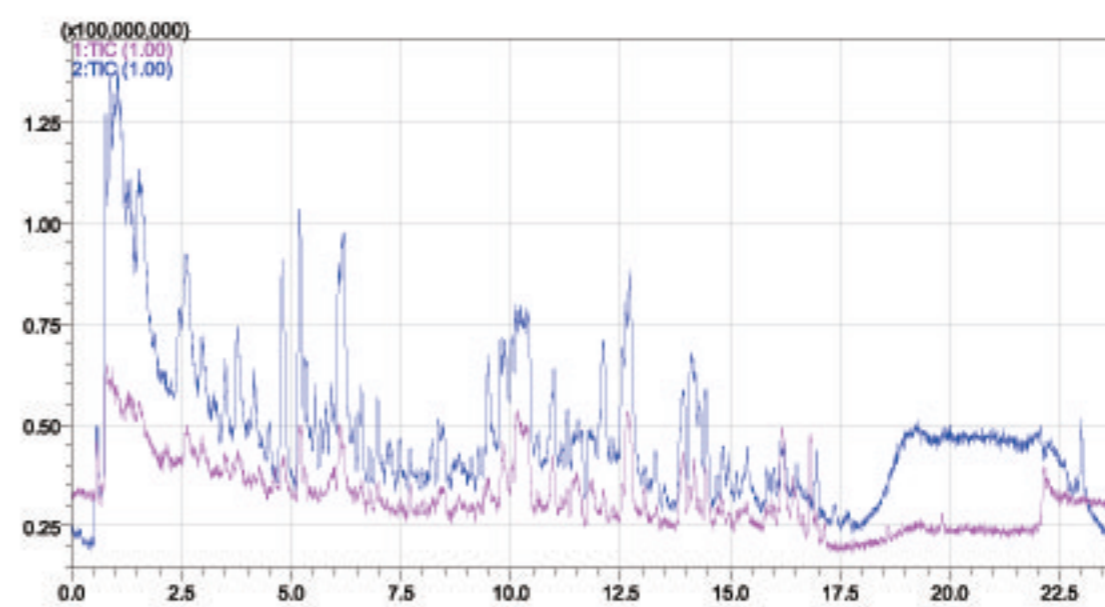
218 nm 色谱图



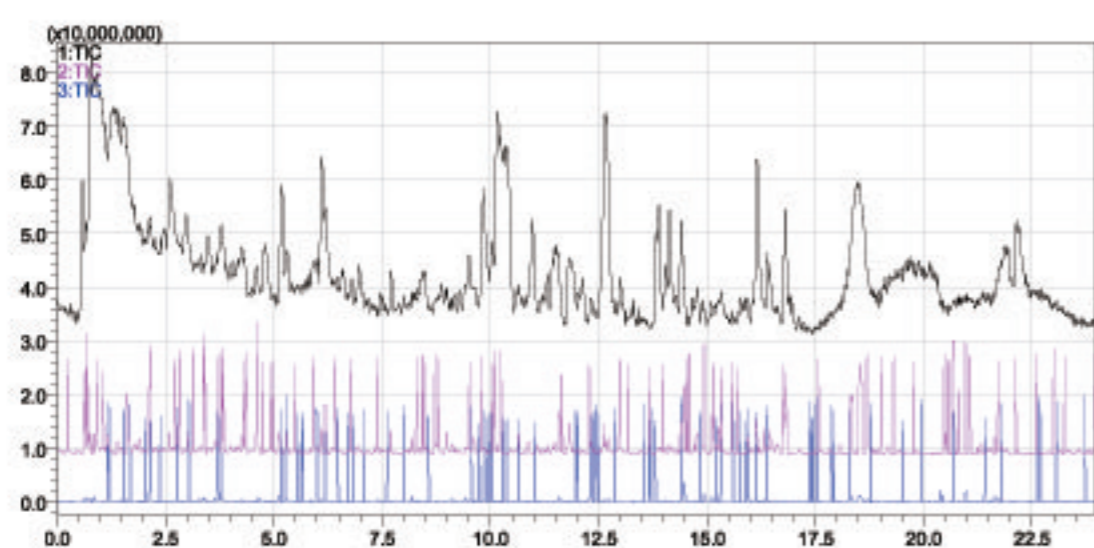
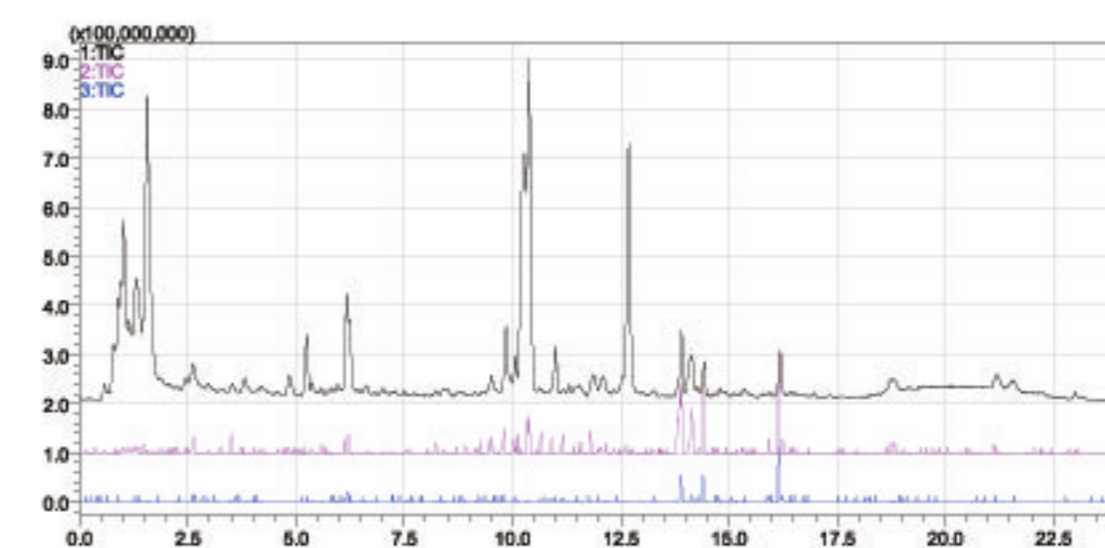
240 nm 色谱图



284 nm 色谱图



TIC图 (1: TIC, SCAN+; 2: TIC, SCAN-)

2) 1 μ L 进样自动三级质谱分析结果ESI (+) , (1: TIC, MS¹; 2: TIC, MS²; 3: TIC, MS³)ESI (-) , (1: TIC, MS¹; 2: TIC, MS²; 3: TIC, MS³)

3) 色谱峰定性结果

由于4 μ L进样条件下离子响应较强, 因此用该数据文件来推断TIC图上所有峰的分子式。并结合1 μ L进样条件正、负离子模式自动三级数据来预测分子式。根据文献报道和山茱萸中化合物性质, 元素组成设为C、H、O, 再用自动三级的结果来推测部分化合物的结构。

No.	Name	Formula	RT(min)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Diff(mDa)	Intensity ($\times 10^6$)
1		$C_7H_{12}O_6$	0.996	$[M+H]^+$	193.0699	193.0707	-0.8	25
				$[M-H]^-$	191.0578	191.0561	1.7	20
2		$C_{16}H_{30}O_{16}$	1.331	$[M+CF_3COOH-H]^-$	591.1413	591.1390	2.3	20
3		$C_{11}H_{16}O_{10}$	2.444	$[M-H]^-$	307.0693	307.0671	2.2	5
				$[M+HCOOH-H]^-$	353.0742	353.0725	1.7	10
4		$C_{16}H_{26}O_{15}$	2.623	$[M-H]^-$	457.1217	457.1199	1.8	16
5		$C_{15}H_{24}O_3$	3.501	$[M+HCOOH-H]^-$	457.1216	457.1199	1.7	18
6		$C_{14}H_{18}O_{11}$	3.794	$[M-H]^-$	361.0792	361.0776	1.6	14
7		$C_{14}H_{18}O_{11}$	4.165	$[M-H]^-$	361.0792	361.0776	1.6	15
8		$C_{14}H_{16}O_{10}$	4.505	$[M+H]^+$	345.0808	345.0816	-0.8	0.7
				$[M-H]^-$	343.0687	343.0671	1.6	8
9	没食子酸	$C_7H_6O_5$	4.798	$[M-H]^-$	169.0163	169.0142	2.1	26
10		$C_{12}H_{20}O_8$	5.200	$[M+HCOOH-H]^-$	337.1135	337.1140	-0.5	34
11		$C_{16}H_{26}O_{11}$	5.339	$[M-H]^-$	393.1418	393.1402	1.6	9
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	507.1357	507.1331	2.6	0.5
12		$C_{13}H_{16}O_{10}$	5.540	$[M-H]^-$	331.0693	331.0671	2.2	13
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	445.0617	445.0599	1.8	0.8
13		$C_{12}H_{18}O_8$	5.695	$[M+HCOOH-H]^-$	335.0990	335.0984	0.6	11
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	403.0882	403.0858	2.4	6

14		$C_{13}H_{18}O_8$	5.788	$[M+HCOOH-H]^-$	347.1003	347.0984	1.9	14
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	415.0879	415.0858	2.1	2.5
15		$C_{14}H_{18}O_{11}$	5.896	$[M-H]^-$	361.0787	361.0776	1.1	13
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	475.0709	475.0705	0.4	3
16	7-O-没食子酰景 天庚酮糖苷	$C_{14}H_{18}O_{11}$	6.174	$[M-H]^-$	361.0781	361.0776	0.5	33
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	475.0725	475.0705	2.0	3
17		$C_{14}H_{16}O_{10}$	6.507	$[M-H]^-$	343.0695	343.0671	2.4	21
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	457.0624	457.0599	2.5	6
18		$C_{16}H_{24}O_{12}$	6.792	$[M+H]^+$	409.1355	409.1341	1.4	0.5
				$[M-H]^-$	407.1210	407.1195	1.5	3.5
19		$C_{15}H_{22}O_{10}$	6.962	$[M-H]^-$	361.1154	361.1140	1.4	12
				$[M+HCOOH-H]^-$	407.1220	407.1195	2.5	8
20		$C_{14}H_{16}O_{10}$	7.179	$[M-H]^-$	343.0694	343.0671	2.3	11
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	457.0623	457.0599	2.4	2
21		$C_{13}H_{16}O_{10}$	7.256	$[M-H]^-$	331.0686	331.0671	1.5	9
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	445.0621	445.0599	2.2	2
22		$C_{15}H_{20}O_8$	7.713	$[M-H]^-$	327.1088	327.1085	0.3	2.5
				$[M+HCOOH-H]^-$	373.1153	373.1140	1.3	2.5
23		$C_{21}H_{22}O_{15}$	8.215	$[M-H]^-$	513.0906	513.0886	2.0	12
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	627.0817	627.0815	0.2	0.4
24		$C_{15}H_{28}O_{17}$	8.459	$[M-H]^-$	479.1247	479.1254	0.7	12.5
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	593.1186	593.1182	0.4	0.7
25		$C_{21}H_{22}O_{15}$	9.108	$[M-H]^-$	513.0908	513.0886	2.2	5
26		$C_{23}H_{26}O_{13}$	9.276	$[M-H]^-$	509.1321	509.1301	2.0	9
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	623.1236	623.1229	0.7	0.8
27		$C_{17}H_{26}O_{11}$	9.498	$[M-H]^-$	405.1419	405.1402	1.7	4
				$[M+HCOOH-H]^-$	451.1476	451.1457	1.9	27
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	519.1339	519.1331	0.8	5
28	马钱酸	$C_{16}H_{24}O_{10}$	9.778	$[M-H]^-$	375.1315	375.1297	1.8	32
				$[M+HCOOH-H]^-$	421.1371	421.1352	1.9	4
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	489.1243	489.1225	1.8	2
29		$C_{17}H_{26}O_{10}$	10.006	$[M+HCOOH-H]^-$	435.1525	435.1508	1.7	32
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	503.1402	503.1382	2.0	3
30	莫诺昔	$C_{17}H_{26}O_{11}$	10.166	$[M+HCOOH-H]^-$	451.1468	451.1457	1.1	33
31		$C_{16}H_{22}O_{11}$	10.997	$[M-H]^-$	389.1105	389.1089	1.6	19
32		$C_{20}H_{28}O_{14}$	11.298	$[M-H]^-$	491.1421	491.1406	1.5	23
33		$C_{21}H_{30}O_{15}$	11.527	$[M-H]^-$	521.1528	521.1512	1.6	17
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	635.1477	635.1441	3.6	1
34		$C_{17}H_{26}O_9$	12.320	$[M-H]^-$	373.1531	373.1504	2.7	3
				$[M+HCOOH-H]^-$	419.1587	419.1559	2.8	2.5
35		$C_{17}H_{24}O_{10}$	12.547	$[M+HCOOH-H]^-$	433.1379	433.1352	2.7	30
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	501.1245	501.1225	2.0	5
36	马钱素	$C_{17}H_{26}O_{10}$	12.615	$[M+HCOOH-H]^-$	435.1525	435.1508	1.7	34
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	503.1382	503.1398	1.6	4
37		$C_{16}H_{22}O_9$	12.716	$[M+HCOOH-H]^-$	403.1265	403.1246	1.9	18
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	471.1144	471.1120	2.4	1.5

38		$C_{24}H_{36}O_{15}$	13.036	$[M+HCOOH-H]^-$	609.2054	609.2036	1.8	5
39		$C_{14}H_{12}O_8$	13.303	$[M-H]^-$	307.0478	307.0459	1.9	9
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	421.0406	421.0388	1.8	2
40		$C_{21}H_{30}O_{14}$	13.924	$[M+H]^+$	507.1720	507.1708	2.2	0.5
				$[M-H]^-$	505.1591	505.1563	2.8	34
41		$C_{17}H_{24}O_{11}$	14.063	$[M-H]^-$	403.1260	403.1246	1.6	13
				$[M+HCOOH-H]^-$	449.1346	449.1301	2.5	1
42		$C_{21}H_{30}O_{14}$	14.201	$[M-H]^-$	505.1583	505.1563	2.0	25
43		$C_{21}H_{30}O_{14}$	14.452	$[M-H]^-$	505.1583	505.1563	2.0	32
44		$C_{20}H_{26}O_{13}$	14.842	$[M+H]^+$	475.1362	475.1446	1.6	1.5
				$[M-H]^-$	473.1322	473.1301	2.1	5
45		$C_{16}H_{28}O_7$	14.963	$[M+HCOOH-H]^-$	377.1836	377.1817	1.9	7.5
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	445.1710	445.1691	1.9	0.4
46		$C_{19}H_{28}O_{11}$	15.833	$[M+HCOOH-H]^-$	477.1635	477.1614	2.1	9
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	545.1508	545.1487	2.1	0.8
47		$C_{21}H_{18}O_{13}$	15.997	$[M+H]^+$	479.0838	479.0820	1.8	1
				$[M-H]^-$	477.0687	477.0675	1.2	8
48		$C_{19}H_{38}O_{16}$	16.086	$[M-H]^-$	521.2070	521.2087	-1.7	1
				$[M+HCOOH-H]^-$	567.2123	567.2142	-1.9	7
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	635.1984	635.2016	3.2	1
49	山茱萸新苷	$C_{24}H_{30}O_{14}$	16.193	$[M-H]^-$	541.1592	541.1563	2.9	30
				$[M+HCl-H]^-$	577.1304	577.1330	-2.6	1.4
				$[M+CF_3COOH-H]^-$	655.1501	655.1491	1.0	2
50		$C_{19}H_{34}O_{10}$	16.517	$[M-H]^-$	421.2095	421.2079	1.6	1
				$[M+HCOOH-H]^-$	467.2154	467.2134	2.0	10

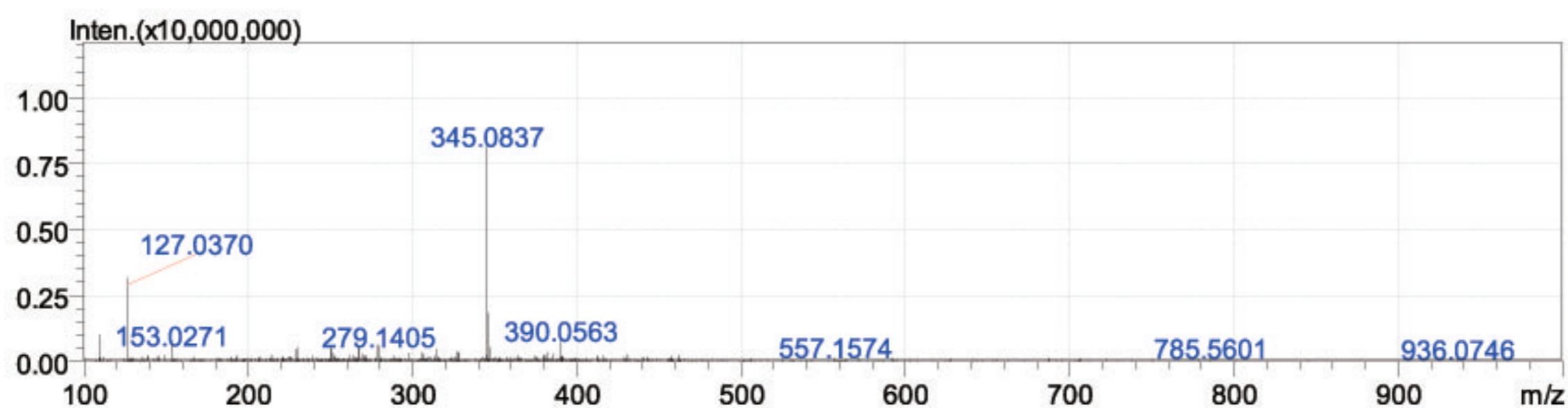
4) 未知化合物定性过程

定性检测出7-O-没食子酰景天庚酮糖苷和马钱酸两种组分。

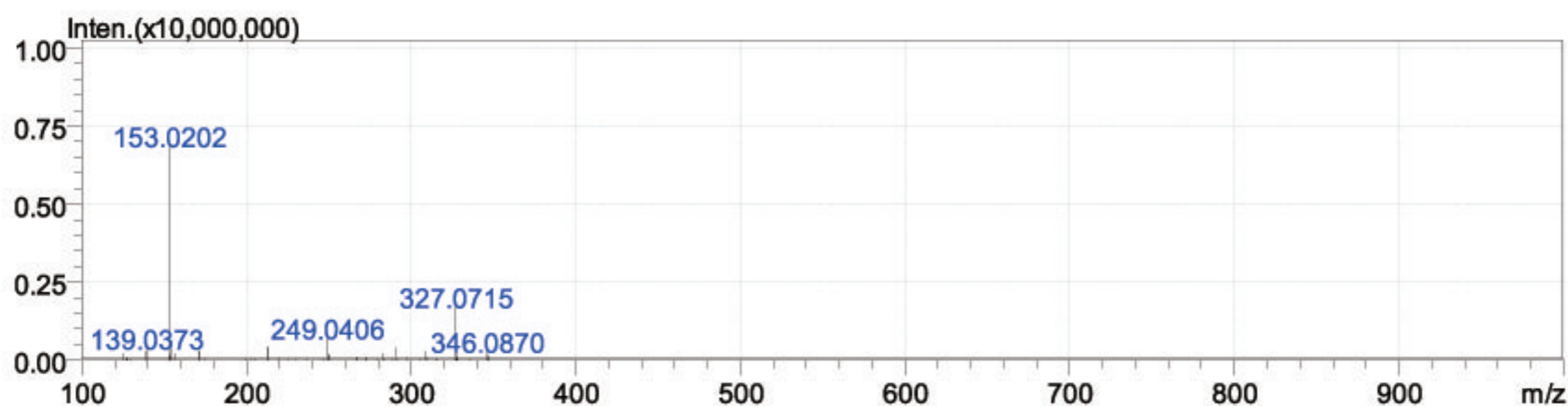
7-O-没食子酰景天庚酮糖苷(7-O-galloyl-D-sedoheptulose)定性过程如下。

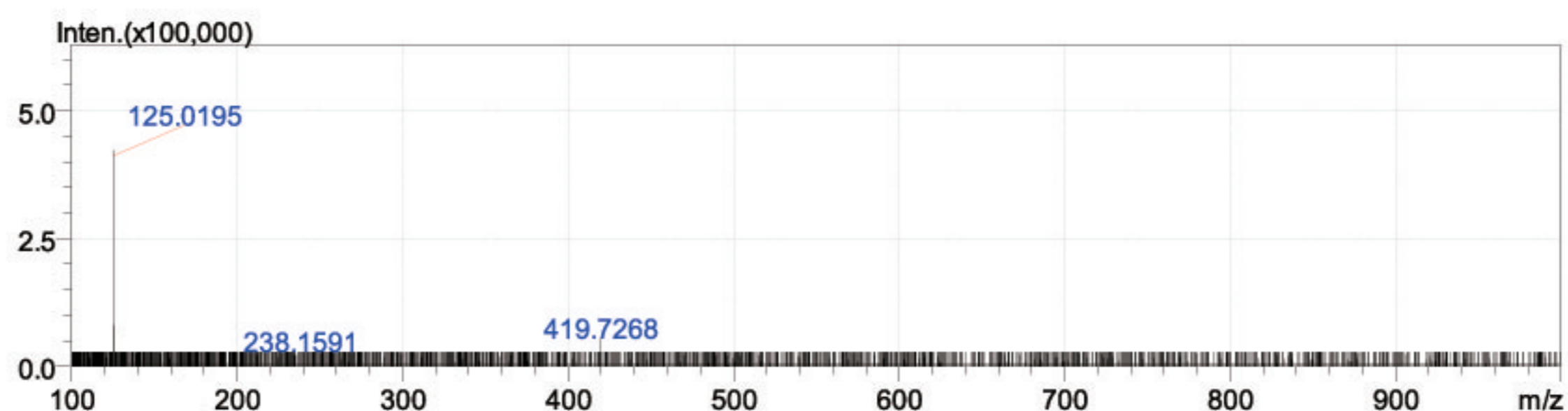
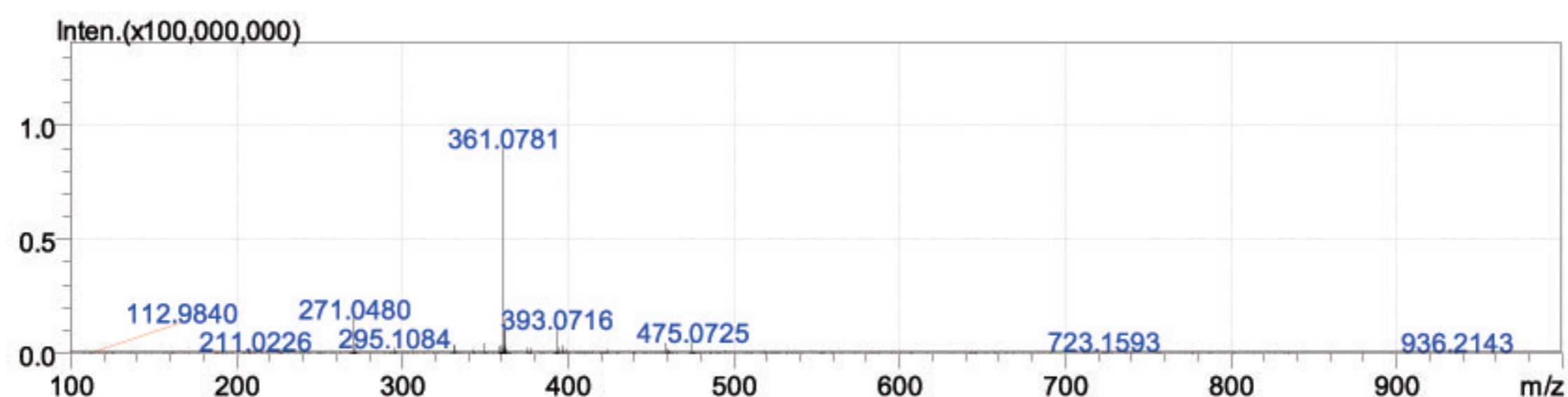
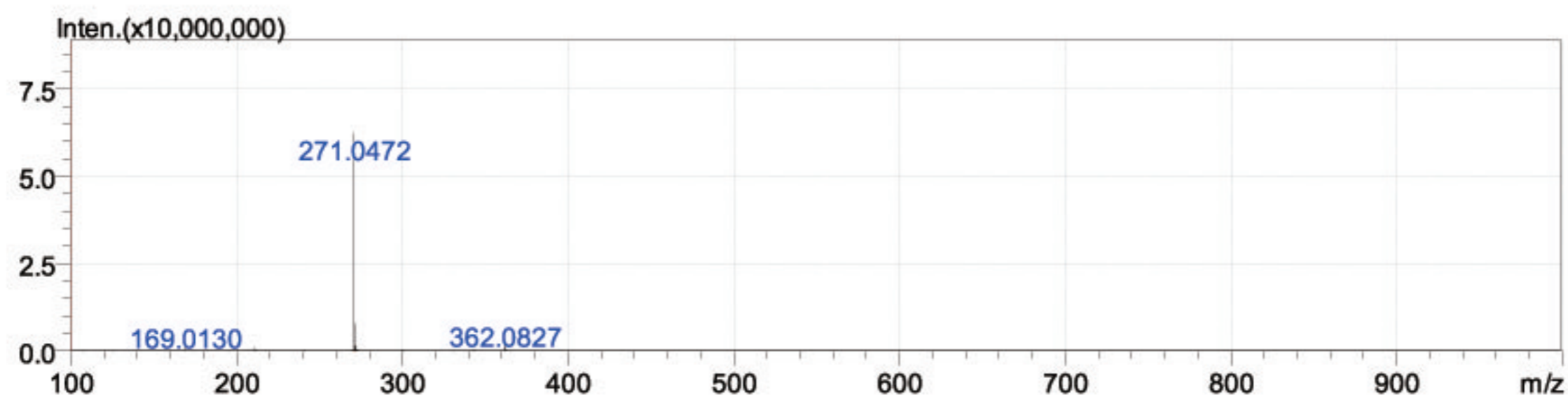
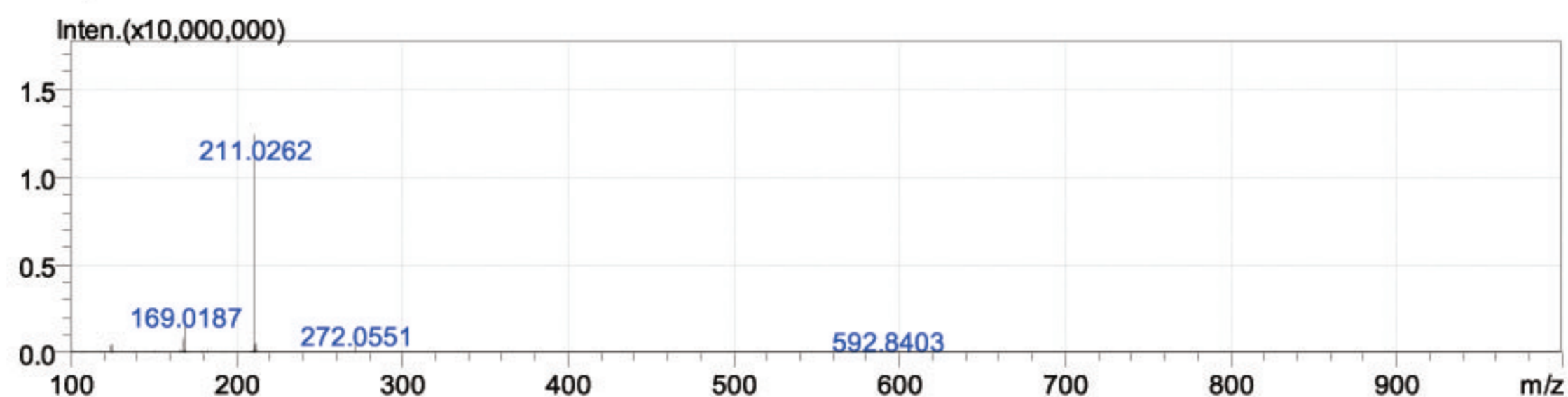
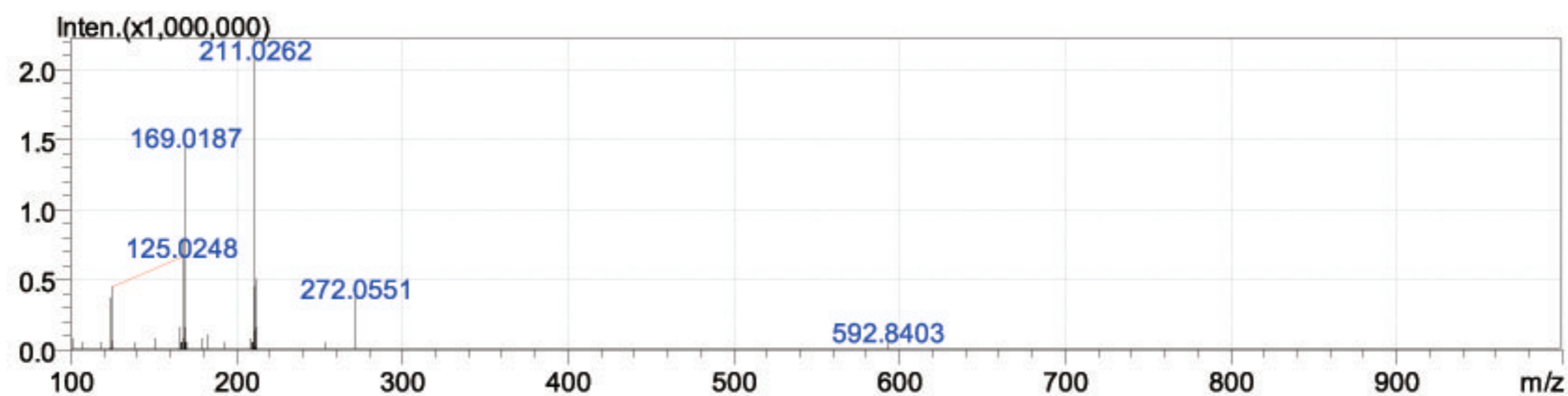
RT 6.174 min的峰的MS³质谱图如下:

ESI (+), MS¹

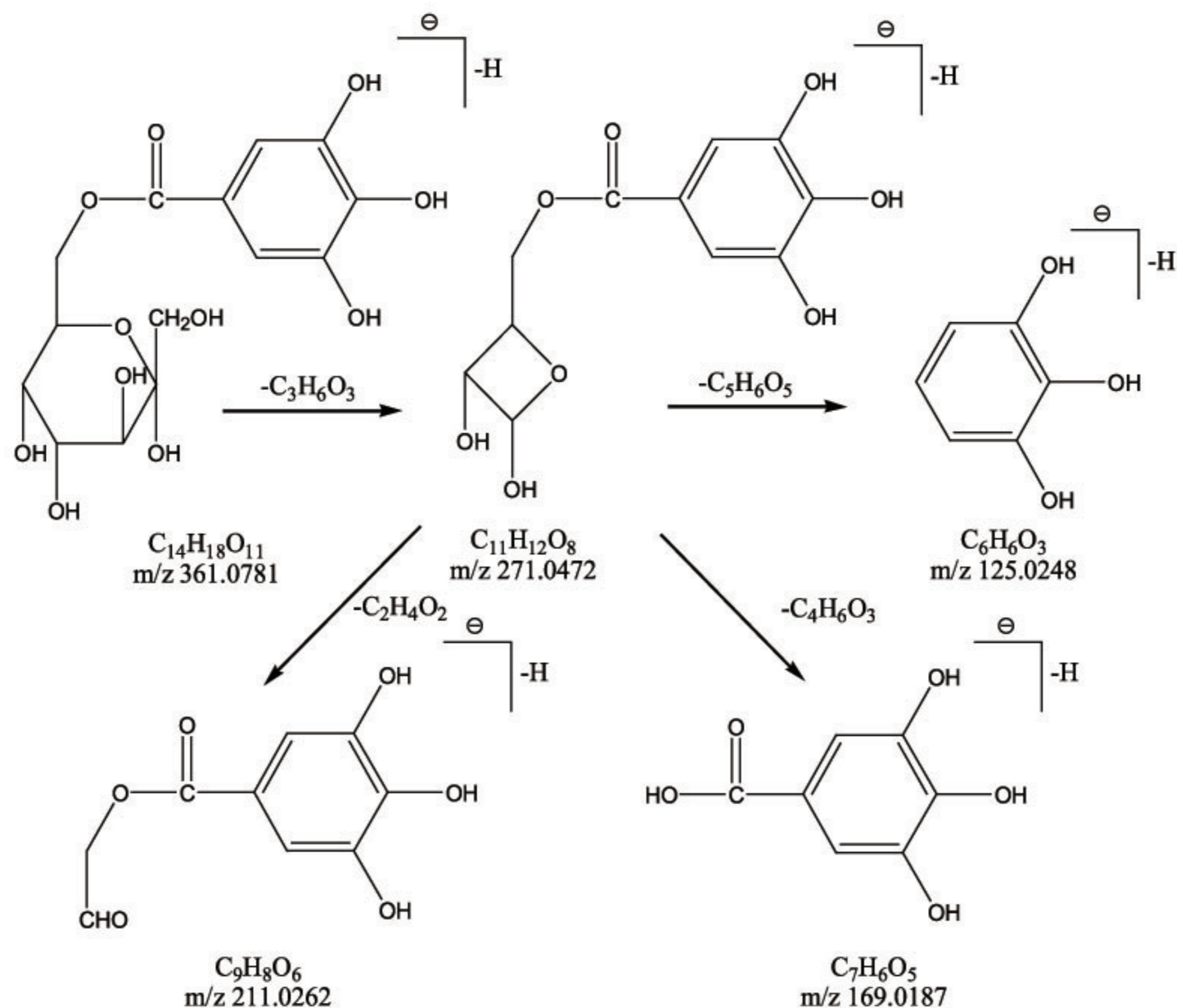
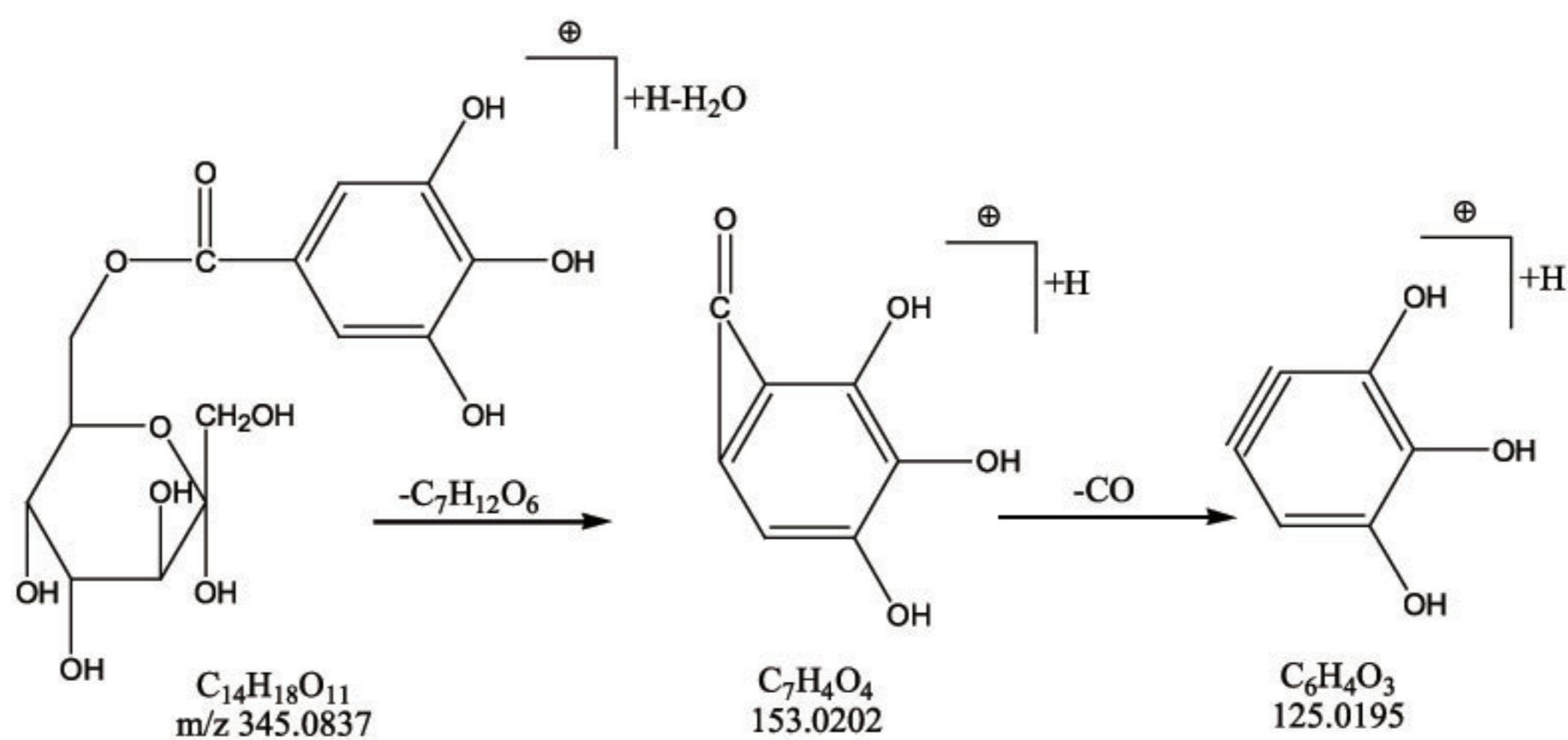


ESI (+), MS², precursor 345.0837



ESI (+), MS³, precursor 153.0202ESI (-), MS¹ESI (-), MS², precursor 361.0781ESI (-), MS³, precursor 271.0472ESI (-), MS³, precursor 271.0472, 放大质谱图

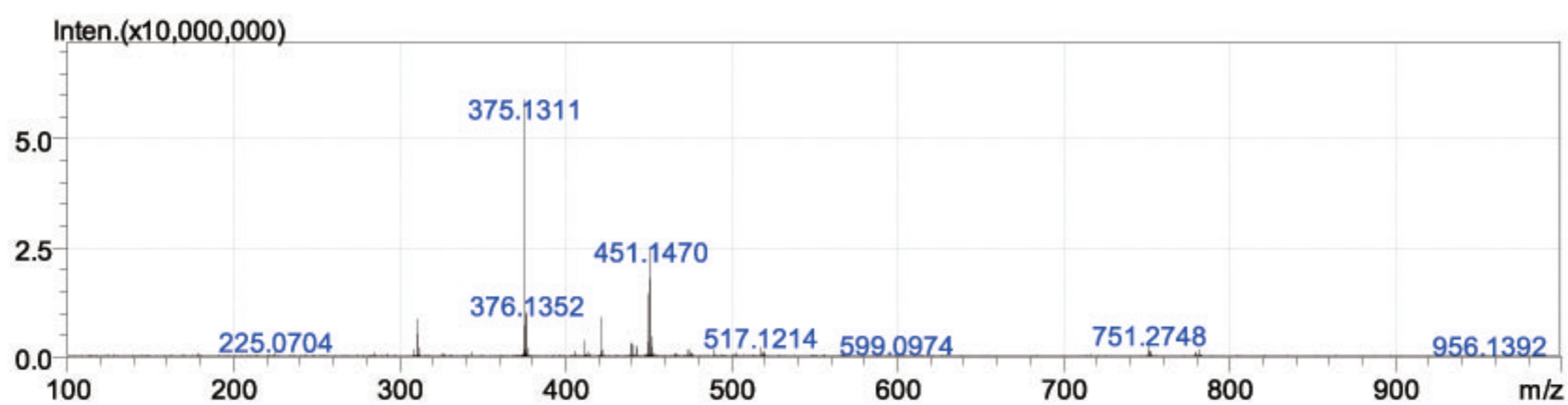
根据负离子质谱图上361.0781和475.0725, 用分子式预测软件可以推测出化合物分子式为C₁₄H₁₈O₁₁, 这两个离子分别为[M-H]⁻和[M+CF₃COOH-H]⁻。在正离子模式一级质谱图上发现脱水离子345.0837, 为[M-H₂O+H]⁺。在负离子模式MS²质谱图上发现169.01离子, 在负离子模式MS³质谱图上发现125.02离子, 均为没食子酸的特征离子, 在前面的标样裂解规律研究中可以找到。说明该化合物极可能是由一分子没食子酰基(C₇H₆O₅)和一分子景天庚酮糖(C₇H₁₂O₆)结合而形成。推导裂解规律如下:

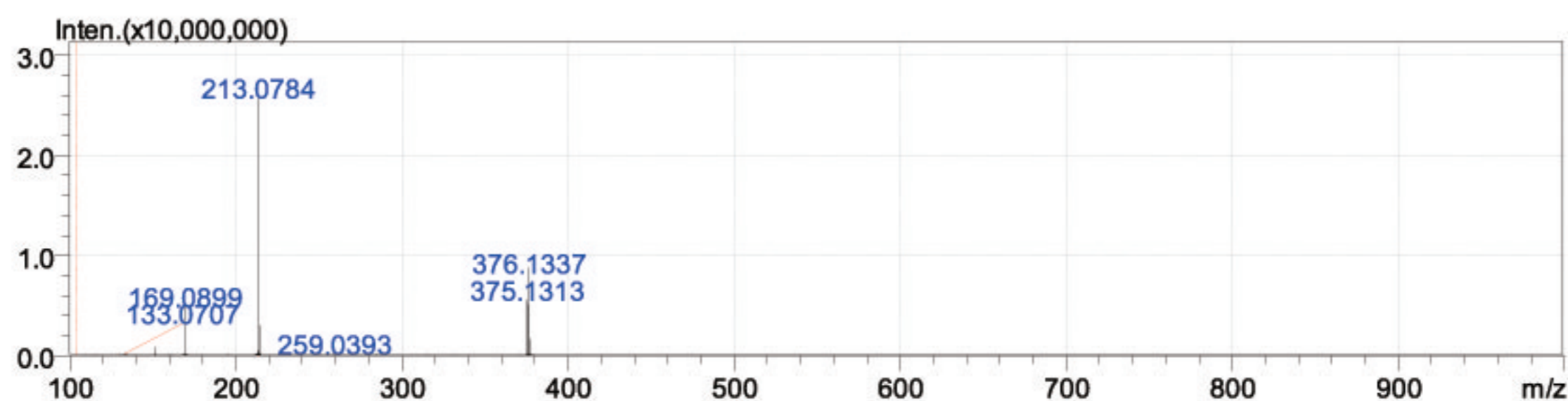
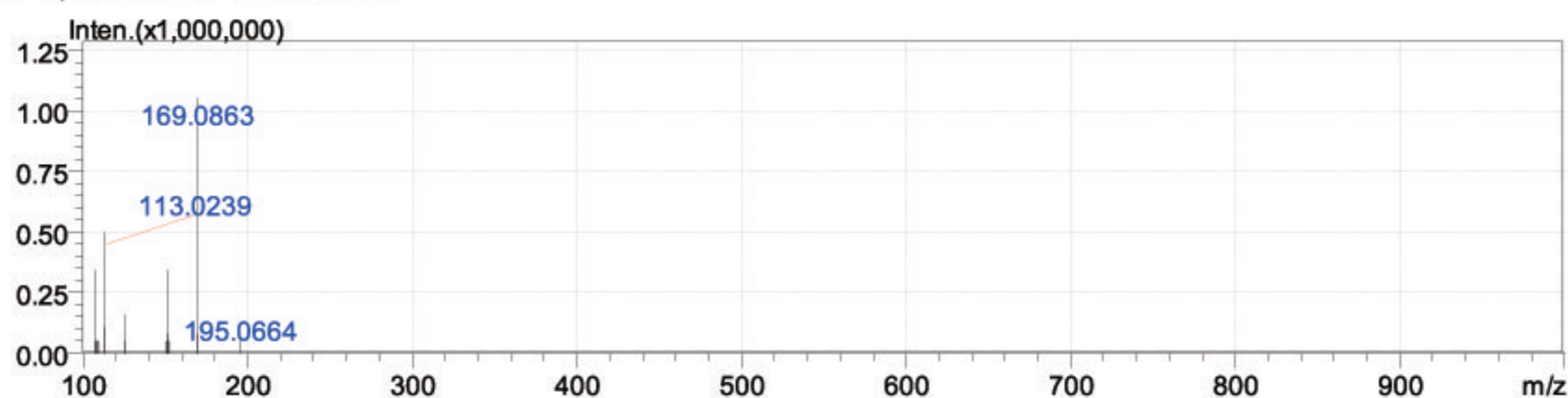
7-O-没食子酰景天庚酮糖苷负离子模式MS³裂解规律7-O-没食子酰景天庚酮糖苷正离子模式MS³裂解规律

马钱酸(loganic acid)定性过程如下。

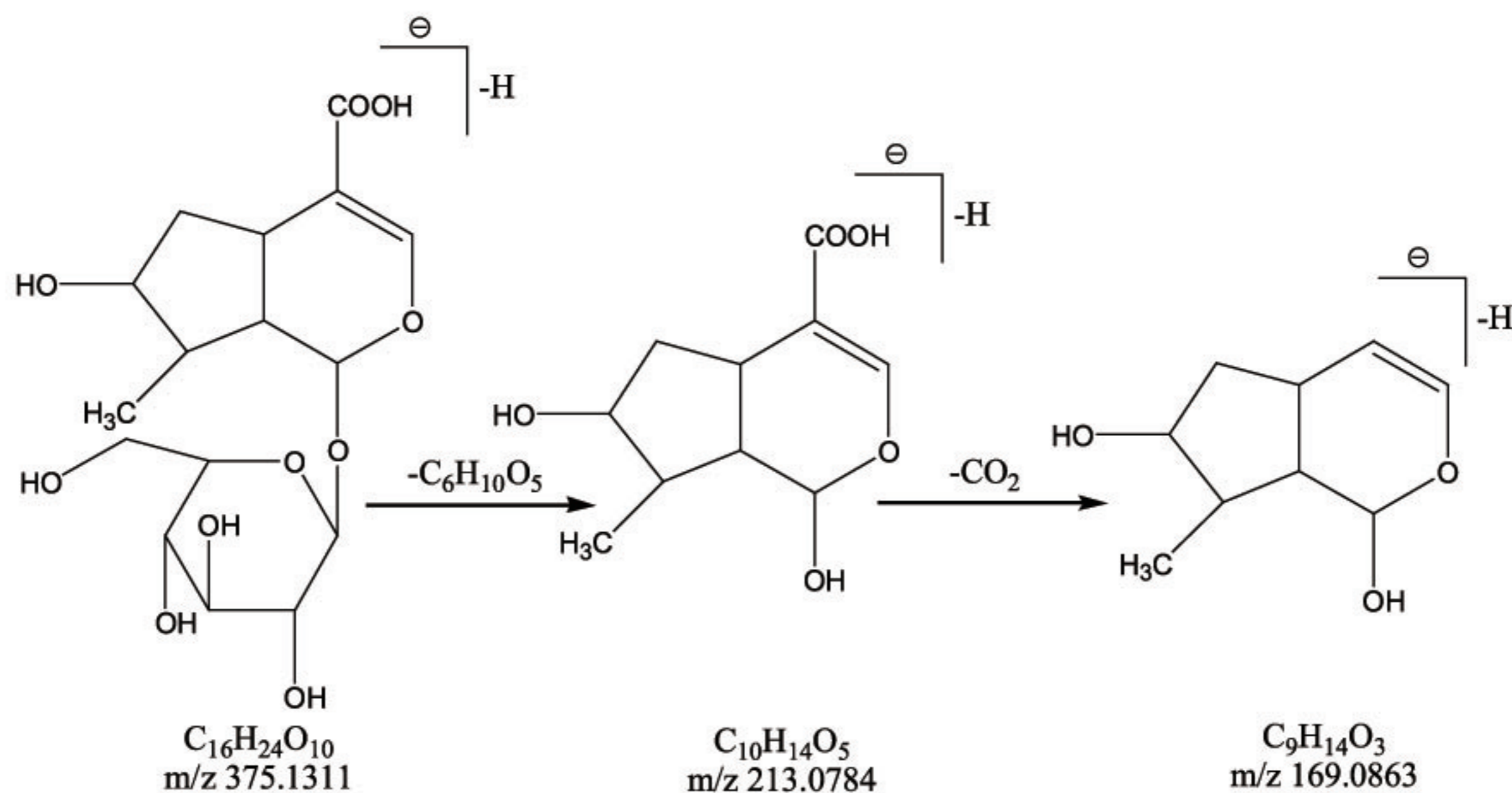
RT 9.788 min峰 的负离子模式MS³质谱图如下：

ESI (-), MS¹



ESI (-), MS², precursor 375.1311ESI (-), MS³, precursor 213.0784

首先根据加合离子和三级质谱预测出分子式为 $C_{16}H_{24}O_{10}$ 。根据 MS^1 375.1311和 MS^2 213.0784的丢失部分162.0527, 可以得出丢失部分的分子式为 $C_6H_{10}O_5$, 与马钱素的正离子模式下413.1434到251.0920的丢失部分162.0514一致, 说明该化合物结构很可能和马钱素 $C_{17}H_{26}O_{10}$ 一致, 只是少了 CH_2 。根据213.0784离子丢失 CO_2 可以判断出, 该化合物有一个羧基, 说明很可能是马钱酸。推导裂解规律如下:

马钱酸负离子模式 MS^3 裂解规律

根据文献报道, 在山茱萸提取物中存在7-O-没食子酰景天庚酮糖苷和马钱酸。

结论

使用岛津LCMS-IT-TOF质谱仪定性分析了山茱萸生品水提样品。对正负离子同时扫描得到的TIC中的所有色谱峰进行了定性判断。根据加合离子和自动三级质谱预测出了所有色谱峰的分子式, 共鉴定出50个化合物(38个分子式)。对标准品莫诺苷、没食子酸、5-羟甲基糠醛、熊果酸、山茱萸新苷、齐敦果酸、马钱素等进行了注射进样裂解规律的研究和液质联用分析。根据标样裂解规律和样品多级质谱裂解规律, 对其中的两个色谱峰进行了定性判断, 推测出为7-O-没食子酰景天庚酮糖苷($C_{14}H_{18}O_{11}$)和马钱酸($C_{16}H_{24}O_{10}$), 并分别给出了3级质谱裂解规律。岛津LCMS-IT-TOF质谱仪是中药有效成分鉴定的强有力工具。