

LC-MSⁿ 柱后衍生化及在线活性检测联用技术对祁菊抗氧化活性成分的快速分离鉴定

LCMS-IT-TOF-025

摘要：建立一种 LC-MSⁿ、柱后衍生化及在线活性检测联用技术，对祁菊中的抗氧化活性成分进行快速分离鉴定。对祁菊乙醇提取物的不同极性的萃取物进行 DPPH 离线活性检测，确定正丁醇萃取物具有较高抗氧化活性。采用 HPLC-PDA-ESI-MSⁿ 和柱后衍生方法对正丁醇部分的化合物进行快速的分离和鉴定；与 HPLC-PDA-DPPH 在线活性检测方法联用确定祁菊的抗氧化活性物质基础。将此方法应用于祁菊抗氧化活性成分分析，在线分离并鉴定了 21 个化合物，其中 17 个化合物为首次从祁菊中鉴定，14 个化合物具有抗氧化活性，初步阐述了祁菊的抗氧化活性物质基础。本文建立了一种快速而简便的抗氧化活性成分的快速分离、鉴定和活性检测方法，此方法对于中药的多成分活性物质分析和检测具有重要意义。

关键词：祁菊，柱后衍生，在线抗氧化活性检测方法，抗氧化活性成分，HPLC-PDA-ESI-MSⁿ

序言

菊花为菊科菊属植物菊 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 的干燥头状花序^[1]。菊花除了用于观赏外，做为药用和食用已有 2000 多年的历史。《神农本草经》中记载菊花有“久服利血气，轻身耐志延年”的作用^[2]。现代药效活性研究表明菊花具有抗氧化^[3]、抗衰老、抗菌、抗病毒等作用。其中抗氧化作用与高血脂、高血压、冠心病、动脉硬化等疾病的发病机制有密切的关系。而菊花对上述心血管疾病也具有较好的药理活性^[4]，被认为与菊花的抗氧化活性有关。尽管前人对菊花的抗氧化活性进行了较多的研究，但菊花中的抗氧化成分尚未见报道。

《中国药典》根据菊花产地和加工方法的不同，划分成亳菊、滁菊、杭菊和贡菊 4 个品种^[1]，此外祁菊、怀菊、济菊、川菊等也是药用品种。祁菊主产于河北省安国地区，是中国八大药用菊花品种之一。然而，祁菊的化学成分报道很少，仅从中分离得到金合欢素、木犀草素和芹菜素^[5]。有关祁菊的药理活性及其相关物质基础的研究尚未见报道。为阐明祁菊中的抗氧化活性成分，本文建立了一套 HPLC-PDA-ESI-MSⁿ、柱后衍生技术，并与 HPLC-PDA-DPPH 在线活性检测方法联用的快速活性检测系统，对祁菊活性部位进行快速的分离和鉴定，现将结果报道如下。

材料和方法

2.1. 植物材料、实验仪器和样品制备

2.1.1 植物材料

祁菊购自河北省安国市，经北京大学药学院植物研究室王弘副教授鉴定为菊科植物菊花 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) 的祁菊品种。凭证标本存放在北京大学药学院植物标本馆。

2.1.2 实验仪器

岛津 LC-20AD_{XR} 液相色谱系统：LC-20AD_{XR} 高压泵，SPD-20AV 紫外检测器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，SIL-20AC 自动进样器，DGU-20A₅ 自动脱气机，LCsolution 工作站。

岛津 LC-ESI-IT-TOF 系统：LC-20AD_{XR} 高压泵，SPD-20AV 紫外检测器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，SIL-20AC 自动进样器，DGU-20A₅ 自动脱气机，LCMS-IT-TOF 离子阱 - 飞行时间质谱仪，LCMSsolution 3.3 工作站。

紫外分光光度计：UV7500 紫外可见光分光光度计，上海天美科学仪器有限公司。

KQ2200DB 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司生产。

2.1.2 样品制备

取祁菊药材，粉碎，过 20 目筛，取 20 g 药材粉末，加 95% 乙醇 100 mL 超声提取三次 (40KHz, 250W)，滤过，滤液置旋转蒸发仪中减压回收乙醇，浸膏经冷冻干燥得 3.17 g 棕黄色浸膏粉，用 100 mL 去离子水混悬，分别用石油醚、正丁醇 20 mL 萃取 3 次。每个提取部分减压回收溶剂至干，冷冻干燥，分别得石油醚萃取 0.87 g，正丁醇萃取物 0.76 g，水萃取物 1.67 g。萃取物分别进行 DPPH 抗氧化方法检测，选取具有抗氧化活性的萃取物采用 HPLC-PDA-ESI-IT-TOF 仪、HPLC 柱后衍生技术进行成分分离和结构鉴定，并与 HPLC-PDA-DPPH 在线活性检测方法联用对活性提取部位进行快速活性检测。

DPPH 抗氧化活性检测供试溶液：将三种不同极性的萃取物和芦丁 (阳性对照) 配制成浓度为 640 mg/L, 320 mg/L, 160 mg/L, 80 mg/L, 40 mg/L, 20 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L 的甲醇溶液，做为活性检测的供试溶液。

HPLC 分析用样品溶液：取具有抗氧化活性萃取物 50 mg，置 10 mL 容量瓶中，加甲醇溶解，定容，分析前用 0.22 μm 的滤膜滤过，精密吸取 10 μL 进样。

2.2 祁菊提取物的抗氧化活性

DPPH 测定采用文献方法^[6-7] 并进行改进，将样品配制一系列浓度 (见 2.1 项)，取 0.15 mL 样品溶液，加入 2.85 mL DPPH 溶液 (甲醇, 0.12 mmol·L⁻¹)，37 °C 育温 30 min，用 UV7500 紫外可见光分光光度计测定 515 nm 处吸光度。每份样品平行操作 3 次，取算术平均值，计算不同浓度的样品溶液对 DPPH 的清除率，计算公式为：

$$[(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100\%$$

$A_{control}$ 空白对照的吸光度值， A_{sample} 指加入 DPPH 溶液后样品溶液的吸光度值。清除 50% DPPH 自由基所需浸膏的质量浓度 (mg·L⁻¹)，即半数消除率，用 IC₅₀ 表示。HPLC-PDA-DPPH 在线抗氧化活性检测出的化合物活性强弱以自由基清除贡献率 (RSP, Radical Scavenger Profile) 衡量，计算公式如下：

$$RSP = [A(x)/Area(total)] \times 100\%$$

$A(x)$ 是具有活性的化合物在 515 nm 的峰面积， $Area(total)$ 指贡菊提取物中所有活性化合物在 515 nm 的峰面积之和。

2.3. HPLC-PDA-ESI-IT-TOF 和 HPLC-PDA-DPPH/UV shift reagents 在线活性检测方法及其柱后衍生化参数

色谱柱采用 YMCTM C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm i.d.; 5 μm) 与 DiamonsilTM C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm i.d.; 5 μm) 色谱柱串联。洗脱方法：二元梯度洗脱；柱温：40 °C；检测波长：335 nm；流速：1.0 mL·min⁻¹；洗脱条件见 Table 1。

Table1 Gradient conditions of HPLC mobile phase
表 1 HPLC 流动相洗脱条件

Time(min)	Solution A (%)	Solution B (%)
0.00	12	88
15.00	20	80
60.00	25	75
100.00	40	60
110.00	60	40
120.00	100	0

Solution A: Acetonitrile, containing 0.08% formic acid (% , v/v)

Solution B: Water, containing 0.08% formic acid (% , v/v)

HPLC-PDA-IT-TOF 质谱仪质谱条件为：自动调谐毛细管温度 200 °C，正离子模式下的喷雾电压 4.5 kV，端盖加速电压 -3.0 V；负离子模式下的喷雾电压 -3.5 kV，端盖加速电压 3.0 V；碰撞能 50%；氮气流速 1.5 L·min⁻¹，检测器电压 1.70 kV，流动相流速 5 μL·min⁻¹。CID 所使用的碰撞气为高纯氦气。使用三氟醋酸钠 (2.5 mmol·L⁻¹) 进行质量数校正，校正范围为 50-1000 Da。

HPLC-PDA- 柱后衍生方法是采用文献报道^[8-10]，加入诊断试剂可以准确的判断黄酮类化合物的类型、取代基的数目和位置，用于弥补质谱分析数据在结构鉴定上的不足；加入 DPPH 溶液可以在线检测指纹图谱中具有抗氧化活性的化学成分。仪器示意图见 Fig.1，柱后衍生条件见 Table2。

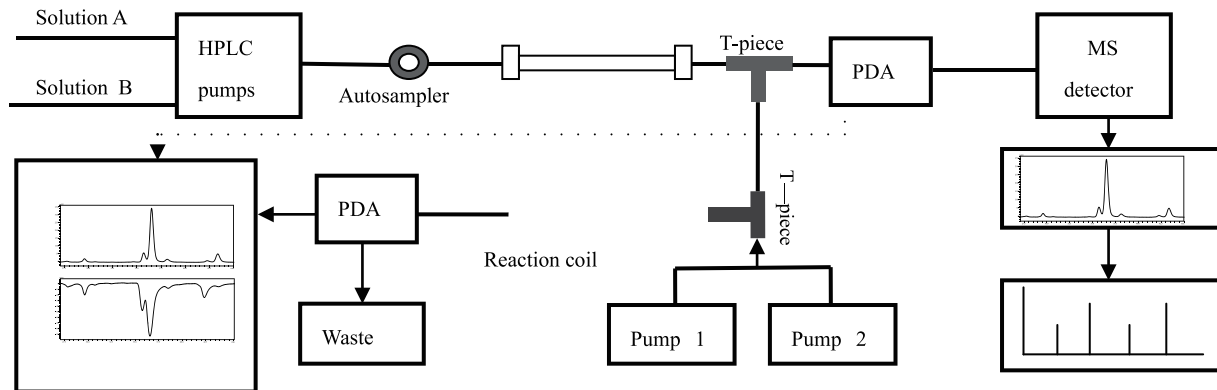


图 1 用于祁菊中化学成分鉴定和在线活性检测的 HPLC 柱后衍生仪器示意图。样品溶液为祁菊的正丁醇萃取部分 (甲醇溶解)，3- 通的分流比为 1:1，反应线圈为 10 米长的 PEEK 管 (内径 0.25 mm)。

表 2 柱后反应条件以及所加入的紫外位移试剂和 DPPH 溶液。

Shift reagent	Pump 1	Flow 1 (mL·min ⁻¹)	Pump 2	Flow 2 (mL·min ⁻¹)	pH	Temperature (°C)
AlCl ₃	NaOH ^a	1.0	AlCl ₃ ^c	0.3	8.0	90
AlCl ₃ / HCl	NaOH ^a	0	AlCl ₃ ^c / HCl	0.3	3.5	90
NaOAc	NaOH ^a	0.9	NaOAc ^d	0.5	8.0	90
NaOAc/H ₃ BO ₃	NaOH ^a	0.5	NaOAc ^e / H ₃ BO ₃ ^e	0.6	5.0	90
DPPH	DPPH ^b	0.2	--	--	--	40

a, 0.02mol·L⁻¹NaOH aqueous solution; b, 0.06mmol·L⁻¹DPPH methanol solution; c, 0.3mol·L⁻¹AlCl₃ aqueous solution; d, 0.5mol·L⁻¹NaOAc aqueous solution; e, 0.1mol·L⁻¹NaOAc-0.7 mol·L⁻¹H₃BO₃=1:1(v/v)

结果和讨论

3.1 DPPH 抗氧化活性检测法分析祁菊不同极性萃取物的抗氧化活性

按照 2.2 项方法测定贡菊不同极性萃取部位的抗氧化活性，清除 DPPH 自由基趋势图见 Fig 2。

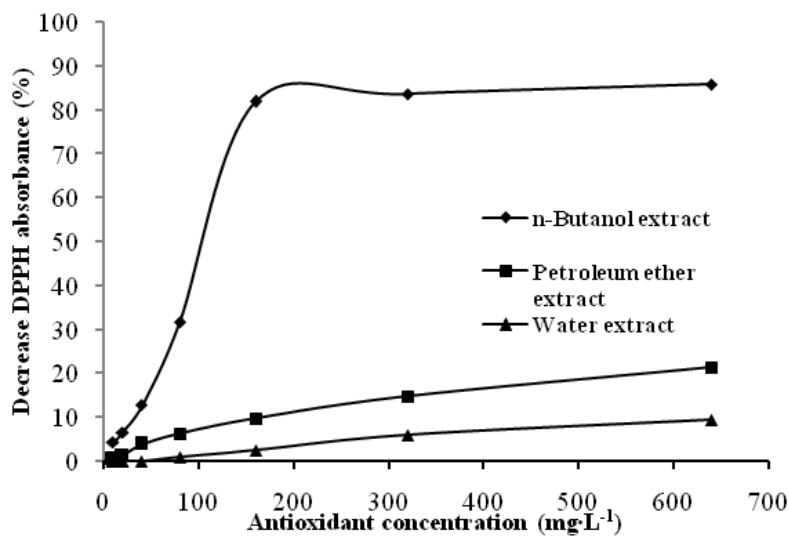


图 2 祁菊不同萃取部位清除 DPPH 自由基能力的趋势图。

由 Fig. 2 可以看出，祁菊的石油醚萃取物、正丁醇萃取物、水萃取物均有清除 DPPH 自由基的作用，但正丁醇萃取物清除 DPPH 自由基的能力最强 (IC₅₀ 为 115.46 mg·L⁻¹)，其次是石油醚提取物 (IC₅₀ 为 1728.47 mg·L⁻¹)，而水提取物清除自由基的能力很弱 (IC₅₀ 为 3608.28 mg·L⁻¹)。基于上述实验结果，本研究选用正丁醇部分进行在线抗氧化活性检测，以确定祁菊中的抗氧化活性成分。

3.2 祁菊化学成分的 LC-MSⁿ 数据及柱后衍生化分析

按 2.3 项所述方法，所得 335 nm 下贡菊正丁醇萃取物的 HPLC 指纹图谱 (Fig.3)；正离子模式下 ESI-MSⁿ 总离子流图如 Fig. 4。根据 ESI-MSⁿ(Table 3) 数据，结合 HPLC-PDA- 柱后衍生数据 (Table 4)，从祁菊正丁醇萃取物中共鉴定 21 个化合物，其中咖啡酰奎宁酸类成分 4 个，黄酮类成分 12 个，二氢黄酮类成分 5 个。

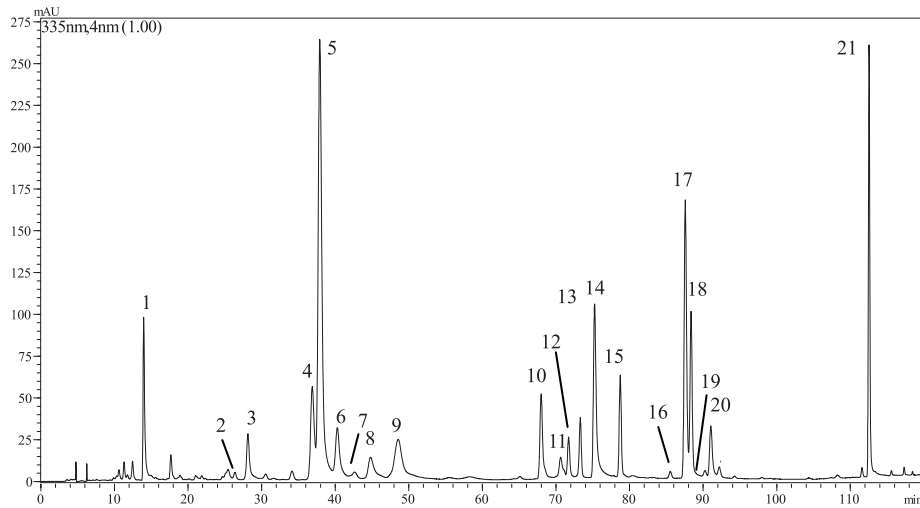


图 3 祁菊正丁醇萃取部分的 HPLC-PDA 指纹图谱

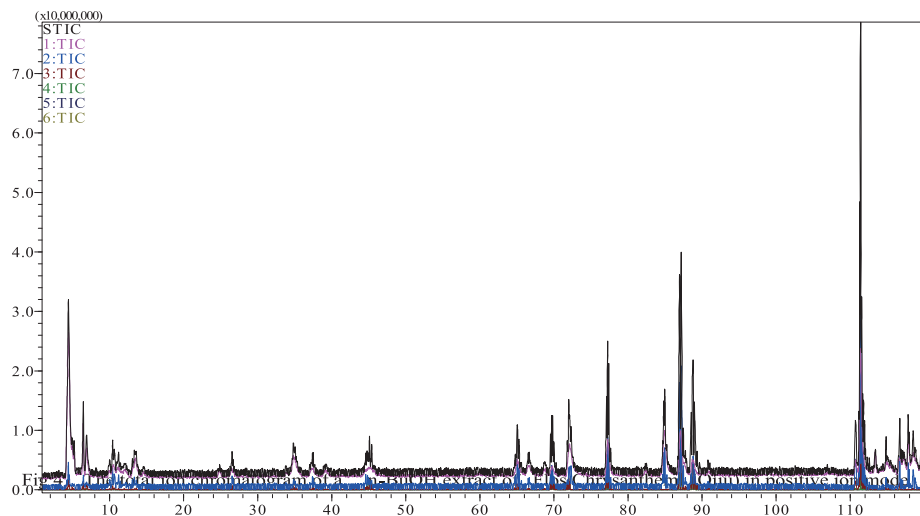


图 4 正离子模式下祁菊正丁醇萃取部分的总离子流图

表 3 正、负离子模式下已鉴定化合物的 ESI-MSⁿ 数据

No.	t _R (min)	(+)ESI-MS ⁿ	(-)ESI-MS ⁿ	Compound identified
1	14.144	355.1 → 163.0 → 145.0 → 117.0	353.1 → 191.1 → 85.0	5-CQA
2	26.357	451.1 → 289.1 → 163.0	449.1 → 287.1 → 151.0 → 107.0	5,3',4'-trihydroxyl flavonone-7-O-glucoside
3	27.956	449.1 → 287.1 → 153.0(135.0) → 97.0	447.1 → 285.0 → 199.0(175.0) → 171.0	luteolin-7-O-glucoside
4	36.925	517.1 → 499.1 → 319.1 → 163.0	515.1 → 353.1 → 191.1 → 85.0	1,5-CQA
5	38.135	517.1 → 499.1 → 319.1 → 163.0 → 145.0 → 117.0	515.1 → 353.1 → 191.1 → 85.0	3,5-DCQA
6	39.894	433.1 → 271.1 → 153.0(119.1)	431.1 → 269.0 → 225.1	apigenin-7-O-glucoside
7	40.888	537.1 → 289.1 → 153.0(179.0)	535.1 → 491.1 → 287.1 → 151.0	5,3',4'-trihydroxyl flavonone-7-O-(malonyl)glucoside
8	46.905	517.1 → 499.1 → 319.1 → 163.0 → 145.0 → 117.0	515.1 → 353.1(203.0) → 173.0 → 93.0	4,5-DCQA
9	49.168	463.1 → 301.1 → 286.0 → 258.1 → 229.0(153.0)	—	diosmetin-7-O-glucoside
10	67.977	519.1 → 271.1(433.1) → 153.0(119.1) → 67.0	—	apigenin-7-O-(malonyl)glucoside
11	70.486	289.1 → 163.0(153.0) → 145.0 → 117.0 → 89.0	287.1 → 151.0 → 107.0	5,7,3',4'-tetrahydroxyl flavonone
12	71.736	549.1 → 301.1(463.1) → 286.0 → 258.1 → 229.1(153.0)	547.1 → 503.1 → 299.1 → 284.0	diosmetin-7-O-(malonyl)glucoside
13	72.909	593.2 → 447.1 → 285.1 → 270.1(153.0) → 242.1	—	linarin
14	74.909	287.1 → 153.0(135.0)	285.0 → 175.0(217.0)	luteolin
15	78.303	447.1 → 285.1 → 242.1(270.1) → 153.0 → 67.0	—	acacetin-7-O-glucoside
16	85.273	273.1 → 153.0(119.1)	271.1 → 151.0 → 107.0	naringenin
17	87.162	271.1 → 153.0 → 81.0	269.0 → 225.1(151.0) → 181.1	apigenin
18	88.263	533.1 → 285.1(447.1) → 242.1(270.1) → 153.0	—	acacetin-7-O-(malonyl)glucoside
19	89.905	303.1 → 177.1(153.0) → 145.0	301.1 → 242.1(286.0) → 227.0	hesperetin
20	90.546	301.1 → 286.1 → 258.1 → 229.1(153.0) → 187.0 → 121.0	299.1 → 284.0 → 256.0	diosmetin
21	112.302	285.1 → 242.1(270.1) → 153.0 → 81.0	283.1 → 268.0 → 240.0 → 211.0 → 167.1	acacetin

表 4 已鉴定化合物的紫外吸收数据及加入柱后紫外诊断试剂后的紫外吸收数据

Compound	UV spectrum(nm)		Shifted UV spectrum (nm)							
			NaOAc		NaOAc/H ₃ BO ₃		AlCl ₃		AlCl ₃ /HCl	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	325	241	327	241	326	241	325	241	326	241
2	324	283	324	283	324	283	—	303	—	303
3	348	254, 266 (sh)	345	254, 266(sh)	362	258	406	270	383	270
4	326	241	325	241	326	241	325	241	326	241
5	328	267	325	252	330	245	333	248	326	248
6	336	267	339	266	339	266	331, 374	273, 294	337, 374	273, 295
7	324	283	324	283	324	283	—	301	—	301
8	328	242	326	249	334	242	329	246	326	245
9	344	252, 267	341	252, 267	347	267	350, 380	272	350, 382	270
10	336	267	338	266	337	266	337, 373	273, 294	337, 374	273, 295
11	324	283	—	324	—	324	—	303	—	303
12	347	253, 267	349	265	348	266	349, 381	270	349, 381	273
13	332	267	335	267	336	266	336, 376	274, 296	337, 375	273, 296
14	348	254, 266 (sh)	359	271	363	258	405	269	353, 384	270
15	332	267	335	266	335	266	336, 374	274, 295	337, 374	274, 296
16	—	288	—	324	—	287	—	304	—	305
17	336	267	356	273	339	266	336, 376	273, 294	338, 374	273, 295
18	332	267	335	267	335	267	336, 377	274, 296	337, 375	274, 296
19	—	287	—	324	—	285	—	303	—	302
20	347	252, 267	356	272	348	266	352, 380	272	350, 381	271
21	330	268	349	273	336	267	337, 374	275, 297	337, 376	275, 298

I: Band I; II: Band II; sh: shoulder peak

3.2.1 绿原酸类化合物

表 5 祁菊中已鉴定的绿原酸类化合物结构



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
5-CQA	H	H	H	H	R
3,5-DCQA	R	H	R	H	H
1,5-DCQA	R	H	H	H	R
4,5-DCQA	H	H	H	R	R

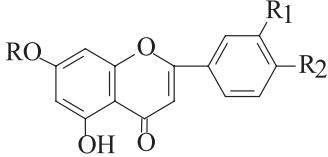
在柱后衍生化实验中，加入各种衍生化试剂后，化合物 1, 4, 5, 8 紫外光谱中的最大吸收均无改变，故这四种化合物非黄酮类化合物。

化合物 1 的紫外光谱的最大吸收为 241nm 和 326 nm。在负离子模式下，其分子离子峰 [M-H]⁻ 为 m/z 353.0846 (校正值为 m/z 353.0873)，确定其分子式为 C₁₆H₁₈O₉，根据文献报道的紫外及质谱数据^[11-12]，推测其为单咖啡先奎宁酸类化合物。MS² 中基峰为 m/z 191.0575 (校正值为 m/z 191.0556, C₇H₁₁O₆⁻)，无 m/z 179 的碎片；MS³ 中基峰为 m/z 85.0318，这些特征与文献报道^[12] 的 5-CQA 相符。进一步验证，化合物 1 的保留时间、LC-MSⁿ 数据及色谱行为与 5-CQA 对照品一致，因此判断化合物 1 为 5-CQA。

化合物 4、5、8 的紫外光谱均在 242 nm 和 328 nm 有最大吸收。在负离子模式下，三者分子离子峰 [M-H]⁻ 均为 m/z 515.1，结合文献^[11-14] 推测为二咖啡酰奎尼酸 (DCQA)，分子式为 C₂₅H₂₄O₁₂。其中化合物 8 的 MS² 基峰为 m/z 353.0894；MS³ 基峰为 m/z 173.0468，并观察到碎片离子 m/z 299 (相对丰度 9.05%) 和 m/z 203 (相对丰度 11.32%)；MS⁴ 基峰为 m/z 93.0380，MS² 中无 m/z 335 离子碎片，因此确定其为 4,5-DCQA^[13]。化合物 4、5 的 MS³ 基峰均为 m/z 191.0556，MS⁴ 基峰为 m/z 85.0290，推测二者可能为 1,3-DCQA，1,5-DCQA 或 3,5-DCQA。由于化合物 5 的 MS³ 中 m/z 179.0351 相对丰度为 51.23%，与对照品进行对照，确定其为 3,5-DCQA。而化合物 4 的 MS³ 中未观察到 m/z 179 碎片，因此判断其为 1,5-DCQA^[7-9]。

3.2.2 黄酮类化合物

表 6 祁菊中已鉴定的黄酮类化合物结构



Compound	R	R ₁	R ₂
apigenin	H	H	OH
apigenin-7- O-glucoside	O-Glucose	H	OH
apigenin-7- O-(malonyl)glucoside	O-(malonyl)glucoside	H	OH
luteolin	H	OH	OH
luteolin-7- O-glucoside	O-Glucose	OH	OH
acacetin	H	H	OCH ₃
acacetin-7- O-glucoside	O-Glucose	H	OCH ₃
linarin	O-Rutinoside	H	OCH ₃
acacetin-7- O-(malonyl)glucoside	O-(malonyl)glucoside	H	OCH ₃
diosmetin	H	OH	OCH ₃
diosmetin-7- O-glucoside	O-Glucose	OH	OCH ₃
diosmetin-7- O-(malonyl)glucoside	O-(malonyl)glucoside	OH	OCH ₃

本研究从祁菊中分离鉴定的黄酮类化合物包括木犀草素、芹菜素、香叶木素和金合欢素及其苷，其结构特点为：在 A 环上均含有 5,7- 二羟基结构，在 B 环上则含有羟基和甲氧基，在 LC-MSⁿ 质谱裂解规律和柱后衍生分析中均具有以下特点：

在质谱裂解中，黄酮类化合物容易发生 RDA 裂解，产生 ^{1,3}A⁺ 和 ^{1,3}B⁺ 碎片，根据高分辨质谱的 ^{1,3}A⁺ 碎片的质量可以精确的推算出 A 环取代基的类型和数目，而 ^{1,3}B⁺ 碎片的质量或分子离子峰减去 ^{1,3}A⁺ 碎片的质量可以精确的推算出 B 环取代基的类型和数目。裂解规律见图。

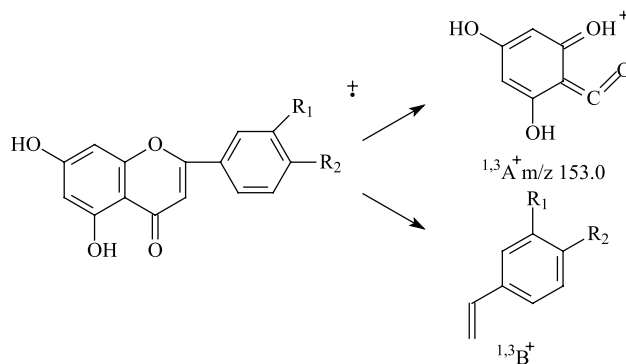


图 55.7- 二羟基取代黄酮化合物的 RDA 裂解规律

柱后衍生分析中,根据加入衍生试剂后造成的紫外吸收峰的移动值,可以推测取代基的类型和取代位置。如黄酮化合物加入 AlCl_3/HCl 诊断试剂后,带 I 红移 35-55 nm,表明黄酮化合物结构中含有 5- 游离羟基;加入醋酸钠诊断试剂,带 II 红移 5-20 nm,表明黄酮化合物结构中含 7- 游离羟基;加入 AlCl_3 诊断试剂,带 I 比 AlCl_3/HCl 谱红移 18 nm,或加入 $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ 后,带 I 红移 16 nm,说明 B 环有邻二羟基等等。二氢黄酮也具有类似的质谱裂解规律和柱后衍生规律。

3.2.2.1 芹菜素类成分

UV 光谱中,化合物 17, 6, 10 的带 II 在 267 nm 有吸收,带 I 在 336 nm 有吸收,具有黄酮类成分的特征吸收。

在正离子模式下,化合物 17 的分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 271.0641(校正值 m/z 271.0606),根据高分辨质谱确定其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$,推测其为 3 个羟基取代黄酮; MS^2 中可见 RDA 裂解产生的 $^{13}\text{A}^+$ 碎片 m/z 153.0200(校正值 m/z 153.0188, $\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_4^+$) 和 $^{13}\text{B}^+$ 碎片 m/z 119.0482(校正值 119.0497, $\text{C}_8\text{H}_7\text{O}^+$),说明 A 环有两个羟基, B 环有一个羟基。在负离子模式下,分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 为 m/z 269.0435(校正值 m/z 269.0450), MS^2 中存在 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{O}_2]^-$ 碎片离子 m/z 201.0537(校正值 m/z 201.0552, $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_3^-$)、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{O}_2-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$ 碎片离子 m/z 159.0411(校正值 m/z 159.0446, $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_3^-$),根据文献报道^[15],失去 C_3O_2 后接着裂解 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ 碎片发生在 C 环,且 4' 位存在羟基。在柱后衍生分析中,加入 AlCl_3/HCl 诊断试剂,带 I 红移 38 nm,说明具有 5- 羟基;加入 NaOAc 诊断试剂后,带 II 红移 6 nm,说明有 7- 羟基;综上分析推测峰 17 结构为 5,7,4'- 三羟基黄酮,即芹菜素。经与芹菜素对照品对照,峰 17 的保留时间、紫外吸收、ESI- MS^n 中的离子碎片均与芹菜素对照品一致,故确定化合物 17 为芹菜素。

在正离子模式下,化合物 6 的分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 433.1105(校正值 m/z 433.1135),根据高分辨质谱推测其分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$; MS^2 中碎片离子峰 $[\text{M}+\text{H}-162]^+$ m/z 271.0606 为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 失去一分子葡萄糖或半乳糖基的苷元碎片,半乳糖与苷元脱离后,可以失去一分子 H_2O ,形成 m/z 145 的碎片,而葡萄糖与苷元脱离后不发生裂解^[10],在化合物 6 的质谱图中未见 m/z 145 碎片,故推测其为葡萄糖苷。该化合物苷元在正负离子模式下的裂解行为均与化合物 17 相同,因此推测化合物 6 为芹菜素的葡萄糖苷。

在正离子模式下,化合物 10 的分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 519.1082(校正值 m/z 519.1139),根据高分辨质谱推测其分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{O}_{13}$; MS^2 级质谱中有碎片离子峰 $[\text{M}+\text{H}-248]^+$ m/z 271.0606(基峰) 和 $[\text{M}+\text{H}-86]^+$ m/z 433.1154(校正值 m/z 433.1135, $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{10}^+$, 相对丰度 16.89%) 分别为分子离子峰失去一分子丙二酰葡萄糖基和丢失丙二酰基后所得碎片。 MS^4 的裂解行为与化合物 17 的 MS^2 相同,因此推测化合物 6 为芹菜素的丙二酰葡萄糖苷。

化合物 6,10 的柱后衍生数据与化合物 17 相似,但加入 NaOAc 诊断试剂后带 II 没有红移,因而不具有游离 7- 羟基,说明其在 7 位上形成 O 苷。因此确定化合物 6 为芹菜素 -7-O- 葡萄糖苷,化合物 10 为芹菜素 -7-O- 丙二酰葡萄糖苷。

3.2.2.2 木犀草素类成分

化合物 14, 3 的 UV 谱中带 I 在 253, 266 nm,带 II 在 348 nm 附近有吸收,具有黄酮化合物的特征吸收,且 B 环可能含 3',4'- 二羟基取代。

在正离子模式下,化合物 14 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 287.0538(校正值 m/z 287.0556),故推测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$,为 4 个羟基取代黄酮; MS^2 的 RDA 裂解产生 $^{13}\text{A}^+$ m/z 153.0204 和 $^{13}\text{B}^+$ m/z 135.0478 碎片,说明 A 环和 B 环上各含有两个羟基。在柱后衍生分析中,加入 AlCl_3/HCl 诊断试剂使带 I 红移 34 nm;加入 NaOAc 诊断试剂后带 II 红移 5 nm,说明具有游离 5,7- 二羟基。加入 AlCl_3 后带 I 比 AlCl_3/HCl 谱红移 18 nm,且在加入 $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ 后,比带 I 红移 16 nm,说明 B 环有邻二羟基;结合质谱数据,确定化合物 14 为 5,7,3',4'- 四羟基黄酮,即木犀草素。峰 14 与木犀草素对照品的保留时间、紫外吸收、ESI- MS^n 中的离子碎片及相对丰度均一致,故确定化合物为木犀草素。

化合物 3 的分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为 m/z 449.1109(校正值 m/z 449.1084),根据高分辨质谱数据推测其分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$; MS^2 中 $[\text{M}+\text{H}-162]^+$ m/z 287.0543 为 $[\text{M}+1]^+$ 失去一分子葡萄糖的苷元碎片,且与木犀草素的 $[\text{M}+1]^+$ 质量数

相同；MS³的裂解基本与峰 14 的 MS² 相同，说明峰 3 的苷元部分与峰 14 的结构一致。且柱后衍生数据基本同化合物 14，但在加入 NaOAC 诊断试剂后带 II 未红移，因此不具有游离 7- 羟基，故推测为 7 位上形成 *O*- 苷。确定化合物 5 为木犀草素 -7-*O*- 葡萄糖苷。

3.2.2.3 金合欢素类成分

化合物 21, 13, 15, 18 的 UV 谱中带 II 在 268 nm, 带 I 在 330 nm 有最大吸收, 具有黄酮类成分的特征吸收。

在正离子模式下, 化合物 21 的分子离子峰 [M+H]⁺ 为 m/z 285.0789(校正值), 推测分子式为 C₁₆H₁₂O₅, 为 2 个羟基 1 甲氧基取代黄酮; MS² 中 m/z 270.0538 的 [M+H-15]⁺ 离子, 为 [M+1]⁺ 失去一个自由基 CH₃• 所得; MS³ 的 RDA 裂解产生 m/z 153.0290 的 ¹³A⁺ 离子, 说明 A 环上含 2 个羟基, B 环含 1 个甲氧基。在柱后衍生分析中, 加入 AlCl₃/HCl 诊断试剂使带 I 红移 46 nm; 加入 NaOAC 诊断试剂使带 II 红移 5 nm, 说明具有游离 5,7- 二羟基。故推测为 5,7- 二羟基 -4'- 甲氧基黄酮, 即金合欢素。化合物 21 的保留时间、紫外吸收、ESI-MSⁿ 中的离子碎片均与对照品金合欢素一致, 故确定为金合欢素。

化合物 15 的 [M+H]⁺ 为 m/z 447.1268, 根据高分辨质谱数据推测其分子式为 C₂₂H₂₂O₁₀; MS² 中 m/z 285.0768 的 [M+H-162]⁺ 碎片为 [M+1]⁺ 失去单分子葡萄糖所得苷元碎片。MS³ 的质谱裂解与峰 12 的 MS² 相同, 推测化合物 15 为化合物 21 的葡萄糖苷。峰 18 的 [M+H]⁺ 为 m/z 533.1295, 推测其分子式为 C₂₅H₂₄O₁₃; MS² 中 m/z 285.0763 的 [M+H-248]⁺ 和 m/z 447.1291 的 [M+H-86]⁺ 的碎片分别为 [M+1]⁺ 失去丙二酰葡萄糖基和丢失丙二酰基后所得碎片。MS³ 的质谱裂解与峰 22 的 MS² 相同, 推测为峰 21 的丙二酰葡萄糖苷。峰 13 的 [M+H]⁺ 为 m/z 593.1932, 分子式: C₂₈H₃₂O₁₄; MS² 中 [M+H-146]⁺/ m/z 447.1263 为 [M+1]⁺ 失去单分子鼠李糖后的碎片, [M+H-146-162]⁺/ m/z 285.0720 为 [M+H-146]⁺ 继续丢失单分子葡萄糖形成的苷元碎片, 且 [M+H-146]⁺ 丰度大于 [M+H-146-162]⁺^[14], 故确定其为芦丁糖苷。MS⁴ 质谱裂解与峰 21 的 MS² 相同, 推测峰 13 为峰 22 的芦丁糖苷。

化合物 13, 15, 18 的柱后衍生分析与化合物 21 相似, 只是加入 NaOAC 诊断试剂后带 II 没有红移, 说明不具有游离 7- 羟基。以上数据提示化合物 13, 15, 18 在黄酮的 7 位上形成 *O* 苷。故确定峰 15 为金合欢素 -7-*O*- 葡萄糖苷, 峰 18 为金合欢素 -7-*O*- 丙二酰葡萄糖苷, 峰 13 为金合欢素 -7-*O*- 芦丁糖苷, 即蒙花苷。

3.2.2.4 香叶木素及其苷类成分

化合物 20, 9, 12 的 UV 谱中带 II 在 251, 267 nm(sh), 带 I 在 346 nm, 推测该化合物为黄酮类成分, 且 B 环可能为 3',4'- 二氧取代。

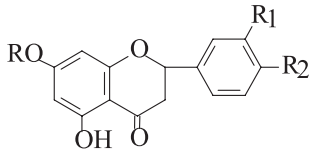
在正离子模式下, 化合物 20 的分子离子峰 [M+H]⁺ 为 m/z 301.0841(校正值 m/z 301.0712), 根据高分辨质谱数据推测其分子式为 C₁₆H₁₂O₆, 为 3 个羟基和 1 个甲氧基黄酮。MS² 质谱中 m/z 286.0541 的 [M+H-15]⁺ 离子为分子离子峰失去一个自由基 CH₃• 所得; MS⁴ 中的 m/z 153.0171 的 ¹³A⁺ 离子说明其 A 环具有两个羟基; 因此 B 环 3',4'- 位为一个羟基和一个甲氧基。在柱后衍生分析中, 加入 AlCl₃/HCl 诊断试剂后带 I 红移 36 nm, 加入 NaOAC 诊断试剂后带 II 红移 5 nm, 说明具有游离 5,7- 二羟基; 综合质谱数据和柱后衍生化数据, 推测该化合物为 5,7,3'- 三羟基 -4'- 甲氧基黄酮, 即香叶木素。

化合物 9 的分子离子峰 [M+H]⁺ 为 m/z 463.1228(校正值 m/z 463.1240), 根据高分辨质谱数据推测其分子式为 C₂₂H₂₂O₁₁; MS² 中 [M+H-162]⁺/ m/z 301.0679 碎片为 [M+1]⁺ 失去一分子葡萄糖或半乳糖基后的苷元碎片, 根据文献 [17], 确定其为葡萄糖苷。MS³ 后的质谱裂解行为与化合物 20 的一致, 因此推测化合物 9 为香叶木素的葡萄糖苷。化合物 12 的分子离子峰 [M+H]⁺ m/z 549.1286(校正值 m/z 549.1244), 根据高分辨质谱数据推测其分子式为 C₂₅H₂₄O₁₄; MS² 级质谱中 m/z 301.0712 的 [M+H-248]⁺ 离子 (基峰) 和 m/z 463.1240 的 [M+H-86]⁺ 碎片 (校正值 m/z 463.1240, C₂₂H₂₃O₁₁⁺) 分别为 [M+1]⁺ 失去一分子丙二酰葡萄糖基和丢失丙二酰基后所得苷元碎片。MS³ 之后的裂解行为与化合物 20 相近, 推测化合物 12 为香叶木素的丙二酰葡萄糖苷。化合物 9, 12 的柱后衍生化数据基本与峰 20 相似, 但加入 NaOAC

诊断试剂后带 没有红移, 说明峰 9, 12 不具有游离 7- 羟基, 表明在 7 位上形成 O 苷。因此确定化合物 9 为香叶木素 -7-O- 葡萄糖苷, 化合物 12 为香叶木素 -7-O- 丙二酰葡萄糖苷。

3.2.2.5 二氢黄酮类化合物

表 7 祁菊中已鉴定的二氢黄酮类化合物结构



Compound	R	R ₁	R ₂
naringenin	H	H	OH
5,7,3',4'-tetrahydroxyl flavonone	H	OH	OH
5,3',4'-trihydroxyl flavonone-7-O-glucoside	O-Glucose	OH	OH
5,3',4'-trihydroxyl flavonone-7-O-(malonyl)glucoside	O-Glucose	OH	OH
hesperetin	H	H	OCH ₃

化合物 16, 11, 19, 2, 7 的 UV 谱中带 II 在 285 nm 附近有吸收, 为主峰, 带 I 弱, 具有二氢黄酮类成分的特征吸收。

在正离子模式下, 化合物 16, 11, 19 的分子离子峰 $[M+H]^+$ 分别为 m/z 273.0756(校正值 m/z 273.0763), m/z 289.0628(校正值 m/z 289.0712) 和 m/z 303.0870(校正值 m/z 303.0869), 根据高分辨质谱数据推测其分子式分别为 $C_{15}H_{12}O_5$, $C_{15}H_{12}O_6$ 和 $C_{16}H_{14}O_6$; 分别为 3 个羟基取代, 4 个羟基取代和 3 个羟基 1 个甲氧基取代二氢黄酮; 3 个化合物的 MS^2 中均发生 RDA 裂解产生 m/z 153.0 的 $^{13}A^+$ 碎片, 证明 3 个化合物的 A 环均含有两个羟基; 化合物 11 的 MS^3 中的 $^{14}B^+$ 碎片离子丢失一分子 H_2O , 形成 m/z 145.0299 碎片, 表明 B 环上为邻二酚羟基^[16]。在柱后衍生分析中, 3 个化合物加入 $AlCl_3/HCl$ 诊断试剂后带 II 红移 15-18 nm, 加入 NaOAc 后带 II 红移 36-41 nm, 说明含有 5,7- 二羟基, 以上质谱及柱后衍生数据结合文献^[17-19] 确定化合物 16 为 5,7,4'- 三羟基二氢黄酮(柚皮素), 化合物 11 为 5,7,3',4'- 四羟基二氢黄酮(圣草酚), 化合物 19 为 5,7,3'- 三羟基 -4'- 甲氧基二氢黄酮(橙皮素)。

在正离子模式下, 化合物 2 的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 451.1318(校正值 m/z 451.1240), 根据高分辨质谱数据推测其分子式为 $C_{21}H_{22}O_{11}$; MS^2 中产生 m/z 289.0712 的 $[M+H-162]^+$ 碎片为 $[M+H]^+$ 失去一分子葡萄糖^[15]。 MS^3 质谱裂解行为与化合物 11 的 MS^2 相同, 推测应为圣草酚的葡萄糖苷。化合物 7 的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 537.1216(校正值 m/z 537.1244), 根据高分辨质谱推测其分子式为 $C_{24}H_{24}O_{14}$; MS^2 质谱中 m/z 289.0704(校正值 m/z 289.0712) 的 $[M+H-248]^+$ 碎片是分子离子峰失去一分子丙二酰葡萄糖得到的。 MS^3 质谱裂解与化合物 11 的 MS^2 相同, 推测为圣草酚的丙二酰葡萄糖苷。在柱后衍生分析中, 化合物 2, 7 与化合物 11 相似, 只是在加入加入 NaOAc 试剂后带 II 未发生位移, 说明不含游离 7- 羟基, 应为 7 位上形成 O 苷。因此确定化合物 2 为圣草酚 -7-O- 葡萄糖苷, 化合物 7 为圣草酚 -7-O- 丙二酰葡萄糖苷。

3.3 祁菊正丁醇提取物 LC-PDA-DPPH 在线抗氧化活性测定
在线 DPPH 活性检测结果见图

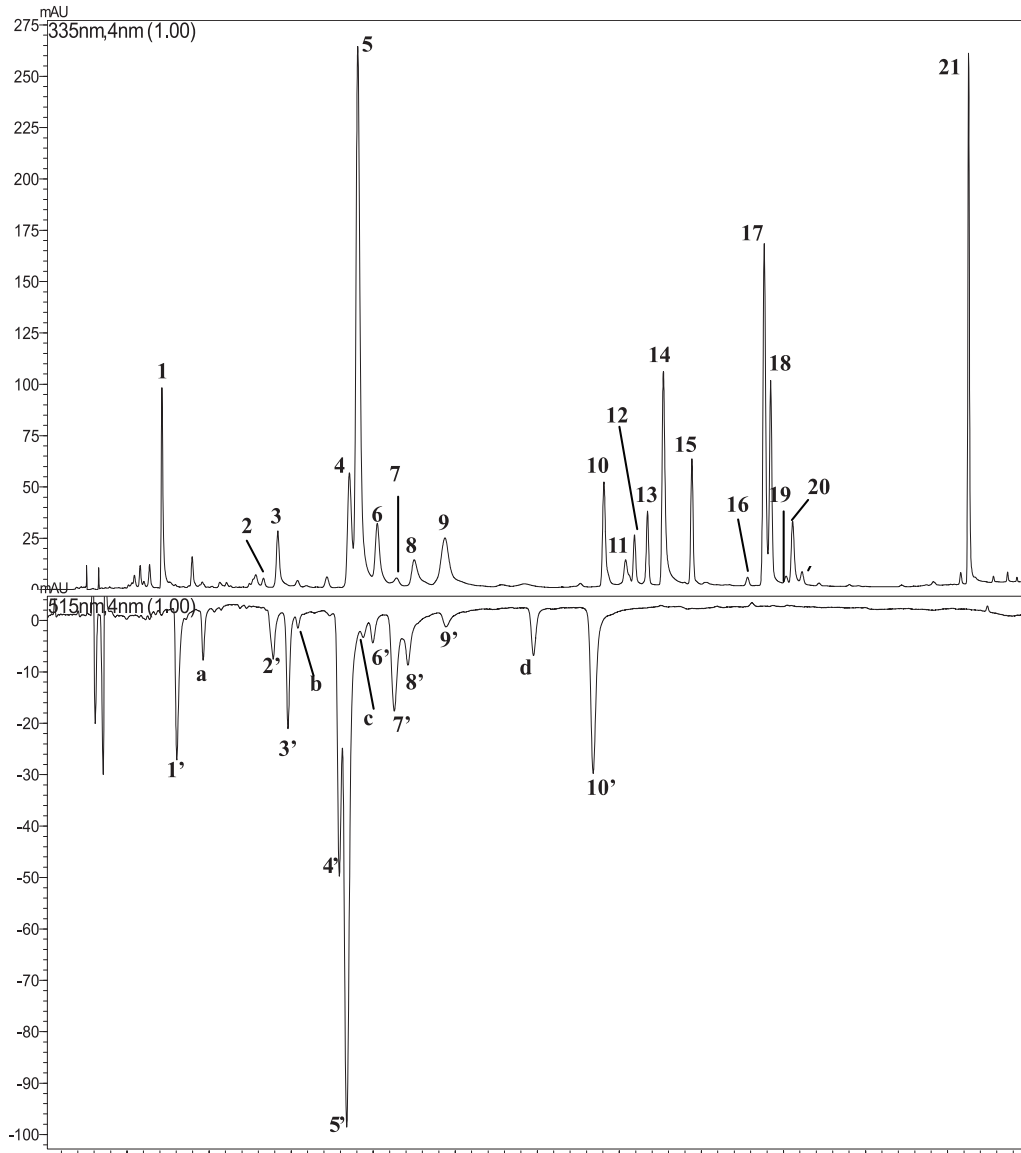


图 5 在线 HPLC-PDA-DPPH 法检测祁菊正丁醇提取物抗氧化活性成分色谱图

HPLC-PDA-DPPH 在线活性检测结果表明，祁菊正丁醇提取物中咖啡酰奎宁酸类化合物、木犀草素类化合物、圣草酚类化合物均具有较强的抗氧化活性作用，而其他黄酮类化合物的抗氧化作用较差。并对上述化合物的抗氧化活性强度进行了测定，结果见图。

表 8 图 5 中具有抗氧化活性的化合物极其活性计算值。

No.	Compound	t _R (min)	Area	RSP (%)	IC ₅₀ (mg•L ⁻¹)
1'	5-CQA	16.065	936,610	10.95	123.13
a	—	19.275	223,487	2.61	—
2'	5,3',4'-trihydroxyl flavonone-7-O-glucoside	27.825	375,827	4.39	259.91
3'	luteolin-7-O-glucoside	29.620	602,973	7.05	175.01
b	—	30.818	55,411	0.65	—
4'	1,5-CQA	35.873	604,123	7.06	76.21
5'	3,5-DCQA	36.768	2,640,197	30.85	56.39
c	—	38.774	36,440	0.43	—
6'	apigenin-7-O-glucoside	39.960	122,151	1.43	—
7'	5,3',4'-trihydroxyl flavonone-7-O-(malonyl)glucoside	42.570	699,397	8.17	—
8'	4,5-DCQA	44.235	18,499	0.22	53.58
9'	diosmetin-7-O-glucoside	48.850	178,016	2.08	—
d	—	59.550	368,945	4.31	—
10'	apigenin-7-O-(malonyl)glucoside rutin	66.805	1,695,207	19.81	— 200.71

Rutin was the antioxidant standard.

其中咖啡酰奎宁酸类化合物抗氧化作用最强、其次为芹菜素类化合物、木犀草素类化合物、圣草酚类化合物，香叶木素和金合欢素类化合物的抗氧化作用很弱，说明在祁菊中咖啡酰类化合物、木犀草素类化合物和圣草酚类化合物为其主要抗氧化活性成分。

结论

采用 LC-PDA-ESI-MSⁿ 技术，结合柱后衍生分析对中国传统药物祁菊的活性部位进行了化学成分的分析鉴定，应用 LC-PDA-ESI-MSⁿ 技术鉴定中药中黄酮类化合物已有很多报道，但是，该技术对于黄酮类化合物中取代基的位置判断较困难，需要借助其他鉴定技术以提高其准确性，柱后衍生技术可以较准确的确定黄酮类化合物的类型和取代位置，与 LC-PDA-ESI-MSⁿ 技术形成很好的互补，有效地提高了化合物结构鉴定的准确性。我们采用 LC-PDA-ESI-MSⁿ 技术，结合柱后衍生分析从祁菊中共鉴定了 21 个成分，包括绿原酸类成分 4 个，黄酮类成分 12 个，二氢黄酮类成分 5 个。其中异绿原酸(4,5-二咖啡酰奎尼酸)、1,5-二咖啡酰奎尼酸、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-丙二酰葡萄糖苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、金合欢素-7-O-葡萄糖苷、蒙花苷、金合欢素-7-O-丙二酰葡萄糖苷、香叶木素、香叶木素-7-O-葡萄糖苷、香叶木素-7-O-丙二酰葡萄糖苷、柚皮素、圣草酚、圣草酚-7-O-葡萄糖苷、圣草酚-7-O-丙二酰葡萄糖苷、橙皮素等 17 个化合物为首次从祁菊中分离鉴定。

本研究采用 LC-PDA-ESI-MSⁿ 与 LC-PDA-DPPH 在线活性检测联用技术可以同时祁菊正丁醇提取物中所含化合物进行分离鉴定和活性测定。测定结果表明，祁菊中绿原酸、异绿原酸(4,5-二咖啡酰奎尼酸)、3,5-二咖啡

酰奎尼酸、1,5-二咖啡酸奎尼酸等咖啡酰奎宁酸类成分具有很强的抗氧化活性，是祁菊中主要抗氧化活性成分；黄酮类化合物中芹菜素、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-丙二酰葡萄糖苷、木犀草素-7-O-葡萄糖苷、金合欢素-7-O-葡萄糖苷、蒙花苷、金合欢素-7-O-丙二酰葡萄糖苷、圣草酚、圣草酚-7-O-葡萄糖苷、圣草酚-7-O-丙二酰葡萄糖苷也有较好的抗氧化活性，从结构分析看，上述黄酮类化合物均含有3',4'-邻二酚羟基结构，这与文献报道^[20-21]一致；而金合欢素和香叶木素类成分因不含3',4'-邻二酚羟基结构，所以其抗氧化活性很弱。

本文采用LC-PDA-ESI-MS[®]技术、柱后衍生化、结合LC-PDA-DPPH在线活性检测技术对祁菊中抗氧化活性部位进行了快速分离、鉴定和活性检测。该技术能够快速、准确地对祁菊中抗氧化活性成分及其类型进行分析鉴定，而无需采用传统的提取、分离、鉴定和活性检测方法，具有快速、准确、省时和费用低廉等特点，该分析系统对中药成分的快速分离、鉴定和活性检测提供了范例，为祁菊的药用和作为保健饮品预防退行性疾病提供了化学成分与活性两方面的支持。