

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240927001

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间全信息串联质谱技术分析黄芪中黄酮类及皂苷类化合物质谱裂解规律

聂紫璇^{1,2}, 常 源¹, 缪翼翔¹, 史 辑^{1*}, 刘蓬蓬^{1*}

(1. 辽宁中医药大学药学院, 国家中医药管理局中药炮制工艺原理重点研究室, 辽宁省中药炮制专业技术创新中心, 大连 116600; 2. 丹东市中医院, 丹东 118000)

摘 要: 目的 应用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间全信息串联质谱(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS^E)技术分析黄芪中 10 个黄酮化合物、5 个皂苷化合物的质谱裂解规律。**方法** 在电喷雾离子源正、负离子模式下, 分别对黄芪中 10 个黄酮化合物、5 个皂苷化合物的主要特征碎片进行检测, 依据获得的特征碎片分析裂解途径, 归纳裂解规律。**结果** 在正离子模式下, 黄芪中的 15 种化合物均取得了较好的质谱信息。黄酮类化合物主要裂解规律为先脱去 C₆H₁₀O₅ 生成相应的苷元, 其次是失去·CH₃、CO、H₂O、CH₄O、C₂H₄O 等官能团。同时, 黄酮类化合物经逆-狄尔斯-阿尔德反应裂解(retro Diels-Alder reaction, RDA)后形成相应的片段离子。黄芪皂苷I、黄芪皂苷II、黄芪皂苷III、黄芪甲苷和环黄芪醇在正离子模式下产生相同的裂解碎片 m/z 473、455、437、419、143、125。**结论** 该研究获得了黄芪中黄酮类、皂苷类化合物的质谱裂解特征, 可为挖掘黄芪作为药食同源药材, 其功能成分对机体的保健作用机制研究提供参考依据, 为保障黄芪动物性食品安全提供技术支撑。

关键词: 黄芪; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间全信息串联质谱法; 裂解规律; 黄酮; 皂苷

Fragmentation pattern of flavonoids and saponins in *Astragali Radix* by mass spectrum based on ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry

NIE Zi-Xuan^{1,2}, CHANG Yuan¹, MIAO Yi-Xiang¹, SHI Ji^{1*}, LIU Peng-Peng^{1*}

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine Processing Principle Key Research Office, Liaoning Province Traditional Chinese Medicine Processing Technology Innovation Center, Dalian 116600, China; 2. Dandong Traditional Chinese Medicine Hospital, Dandong 118000, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(82003945)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (82003945)

*通信作者: 史 辑, 教授, 主要研究方向为中药炮制化学研究。E-mail: lnshiji@163.com

刘蓬蓬, 副教授, 主要研究方向为中药炮制研究。E-mail: liupengpeng0411@163.com

*Corresponding author: SHI Ji, Professor, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, No.77, Shengming One Road, Jinzhou District, Dalian 116600, China. E-mail: lnshiji@163.com

LIU Peng-Peng, Associate Professor, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, No.77, Shengming One Road, Jinzhou District, Dalian 116600, China. E-mail: liupengpeng0411@163.com

ABSTRACT: Objective To analyse the mass spectrometry fragmentation pattern of 10 kinds of flavonoids, 5 kinds of saponins in *Astragali Radix* by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS^E). **Methods** In the positive and negative ion modes of the electrospray ion source, the main characteristic fragments of 10 kinds of flavonoids, 5 kinds of saponins were detected respectively, and the cracking process was inferred according to the characteristic fragments, and the cracking rules were summarized. **Results** Good mass spectrum information was obtained for all 15 kinds of components in positive ion mode. The main fragmentation pattern of flavonoids was to remove C₆H₁₀O₅ to generate the corresponding aglycones firstly, followed by the loss of ·CH₃, CO, H₂O, CH₄O, C₂H₄O and other functional groups. At the same time, flavonoids were cleaved by retro Diels-Alder reaction (RDA) to form corresponding fragment ions. In addition, the same fragmentation *m/z* 473, 455, 437, 419, 143, 125 were produced by astragaloside I, astragaloside II, astragaloside III, astragaloside IV and cycloastragenol in positive ion mode. **Conclusion** In this study, the mass spectrum cracking characteristics of flavonoids and saponins in *Astragali Radix* are obtained, which can provide reference for exploring *Astragali Radix* as a homologous medicinal material and the study on the mechanism of its functional components' health care on the organism, and provide technical support for ensuring the safety of *Astragali Radix* animal food. **KEY WORDS:** *Astragali Radix*; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry; fragmentation pattern; flavonoids; saponins

0 引言

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 或膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.] 的干燥根, 味甘, 性微温, 归肺、脾经, 具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血、行滞通痹、托毒排脓、敛疮生肌之功。黄芪药用历史悠久, 素有“十药九芪”之美誉^[1]。“药食同源”在我国历史悠久, 其理论贯穿于中医药和饮食文化中, 中国现存最早的本草著作《神农本草经》中记载了黄芪作为药食两用药材^[2]。黄芪因其有着保护心血管、调节免疫、抗肿瘤、抗氧化应激、改善代谢等诸多功能, 一直是药食同源食品的研究热点^[3-8]。目前黄芪已在 2021 版《药食同源目录大全》中被收载, 在保健品领域黄芪提取物可用于改善免疫性疾病、血液疾病等; 在食品工业领域黄芪多糖可用作功能性食品的添加剂, 增强其营养价值和健康功效^[9-10]。黄芪中主要以黄芪皂苷 I、II、III、IV 和环黄芪醇等皂苷类成分, 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、染料木苷、黄芪异黄酮苷、黄芪紫檀烷苷等黄酮苷和少量对应的苷元成分及多糖类成分分为有效成分^[11-14]。食品的黄酮类和苷类成分经口服进入体内后, 在肠道内将主要由存在的微生物进行代谢转化, 从而生成更易被小肠黏膜吸收的营养成分, 进入血液循环发挥保健作用。此外, 食材经相关的加工处理后, 可引起营养成分发生转化, 产生新的营养物质基础^[15-19]。

液相色谱-质谱联用技术可高效、准确地分析中药饮片及炮制所引起的药效物质基础变化情况, 而电喷雾全信息质谱(electrospray ionization-mass spectrometry, ESI-MS^E)

技术由于操作简便, 既可测定化合物的相对分子质量, 又能获得较为丰富的结构信息, 在生物及天然产物分析中亦有着广泛的应用^[20-24]。电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)是一种软电离方式, MS^E技术可以同时获得所有化合物的一级母离子和二级碎片离子的高分辨、高质量精确数据信息, 已成为推测药物活性成分的相对分子质量、分子式、裂解规律及阐明化学结构的重要手段^[25-30]。并且四极杆技术也具有高分辨率、高质量精度、质量范围宽等特点^[31]。故本研究将对黄芪的 10 个黄酮类化合物、5 个皂苷类化合物的质谱裂解过程进行检测, 分析各化合物的特征碎片离子, 并进行结构归属, 为黄芪药食两用资源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

Waters AcquityTMI-Class 超高效液相色谱仪(在线脱气机, 低压二元梯度泵, 全自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器)、Waters Xevo G2-XS 四极杆-飞行时间质谱仪(Waters Masslynx V4.1 数据处理软件)、ACQUITY UPLC HSS T₃ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、ACQUITY UPLC HSS T₃ 保护柱(2.1 mm×5 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); AE 240 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler 公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 材料与试剂

黄芪皂苷 I(批号: MUST-16012906)、黄芪皂苷 II(批号:

MUST-16031010)、黄芪皂苷III(批号: MUST-16090204)、黄芪甲苷(批号: MUST-16022804)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号: MUST-16031205)、毛蕊异黄酮(批号: MUST-16120911)、芒柄花苷(批号: MUST-16031111)、芒柄花素对照品(批号: MUST-16031005)(纯度 $\geq 98\%$, 成都曼斯特生物科技有限公司); 2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮葡萄糖苷(黄芪异黄酮苷)(批号: 160217)、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮(黄芪异黄酮)对照品(批号: 160816)(纯度 $\geq 98\%$, 成都普菲德生物技术有限公司); 9,10-二甲氧基紫檀烷葡萄糖苷(黄芪紫檀烷苷)对照品(批号: 16112732, 纯度 $\geq 98\%$, 上海普誉科贸有限公司); 3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷(黄芪紫檀素)对照品(批号: Y29D7H27839, 纯度 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 甲酸(色谱纯, 德国 Merck 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Sigma 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 生、炙黄芪的制备

生黄芪: 取黄芪药材, 除去杂质, 大小分档, 洗净, 润透, 切厚片, 干燥。

炙黄芪: 取净黄芪片, 加入黄芪片重量 25% 的炼蜜(用适量沸水稀释), 拌匀, 闷润 12 h, 待药汤尽, 置 130~150 °C 下炒制 6 min, 取出, 晾凉, 备用。

1.3.2 对照品溶液的制备

分别精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、染料木苷、染料木素、黄芪异黄酮苷、黄芪异黄酮、黄芪紫檀烷苷、黄芪紫檀素对照品各 5 mg, 黄芪皂苷I、黄芪皂苷II、黄芪皂苷III、黄芪甲苷、环黄芪醇对照品各 3 mg, 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 4 °C 储存备用。

1.3.3 供试品溶液的制备

取生、炙黄芪粉末, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 40 mL 甲醇, 摇匀, 密塞, 称重, 超声提取 1 h (300 W, 40 kHz), 取出, 静置冷却, 用甲醇补足失重, 摇匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

1.3.4 液相色谱-质谱条件

ACQUITY UPLC HSS T₃ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm), 预柱为 ACQUITY UPLC HSS T₃ 保护柱(2.1 mm $\times$ 5 mm, 1.8 μm); 流动相: A 为含 0.1% 甲酸水, B 为含 0.1% 甲酸乙腈, 按下列条件进行梯度洗脱: 0~5 min 18%~26% B, 5~8 min 26%~32% B, 8~10 min 32%~36% B, 10~12 min 36%~40% B, 12~13 min 40%~48% B, 13~15 min 48%~70% B, 15~16 min 70%~90% B, 16~17 min 90%~100% B, 17~19 min 100% B, 19~20 min 100%~18% B, 20~27 min 18%~18% B; 检测波长: 260 nm; 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 2 μL 。

采用 ESI, 在正、负离子模式下进行扫描监测。质

量数扫描范围: m/z 50~1500, 毛细管电压: 2000 V, 离子源温度: 100 °C, 脱溶剂温度: 400 °C, 雾化气(N_2)流速: 40 L/h, 脱溶剂气(N_2)流速: 800 L/h, 碰撞能量: 20~30 V, 数据采集速率: 0.5 s/scan。采用质量锁定技术以亮氨酸-脑啡肽(ESI^+ : m/z 556.2771, ESI^- : m/z 554.2615) 调谐液作为时时校正溶液, 确保质量数的准确, 流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 切换频率为 20 s/次。

1.4 数据处理

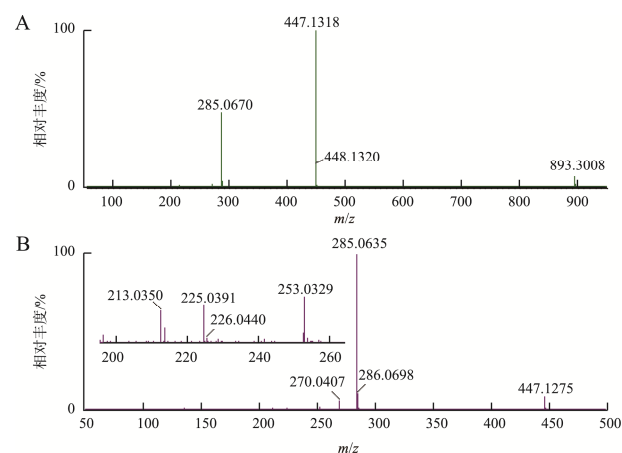
使用 Waters Masslynx V4.1 软件进行 UPLC-Q-TOF-MS^E 数据的采集和处理, 使用 ChemDraw 20.0 软件进行裂解规律的绘制。

2 结果与分析

2.1 黄芪中黄酮类成分在正离子模式下的裂解规律

2.1.1 毛蕊异黄酮葡萄糖苷及毛蕊异黄酮的裂解规律

毛蕊异黄酮葡萄糖苷分子产生质子化的准分子离子峰 m/z 447.1318 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 和 2 倍分子质子化的准分子离子峰 m/z 893.3008 ($[2\text{M}+\text{H}]^+$)。一级质谱图中, m/z 447.1318 $\rightarrow m/z$ 285.0670 (两个质荷比相邻的两个离子的质荷比差异 $\Delta m=162$) 指示了毛蕊异黄酮葡萄糖苷结构中葡萄糖取代基的裂解过程, 得到的产物离子 m/z 285.0670 信号明显, 见图 1A。二级质谱图中, 碎片离子 m/z 285.0635 丢失甲基自由基($\cdot\text{CH}_3$)可得到产物离子 m/z 270.0407, 丢失 1 分子 CH_4O 可产生离子 m/z 253.0329, 丢失 1 分子甲基自由基($\cdot\text{CH}_3$)和 1 分子 $\cdot\text{CHO}$ 可产生离子 m/z 213.0350。产物离子 m/z 253.0329 丢失 CO 中性分子可得到产物离子 m/z 225.0391, 见图 1B。毛蕊异黄酮葡萄糖苷具体裂解途径见图 2。



注: A. 一级谱图; B. 二级谱图, 图 3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29 同。

图 1 毛蕊异黄酮葡萄糖苷正离子模式质谱图

Fig.1 Mass spectra of calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside (ESI^+)

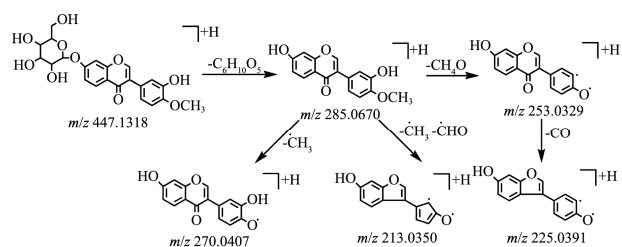


图 2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷正离子模式裂解途径

Fig.2 Cleavage pathways of calycosin-7-O- β -D-glucopyranoside (ESI^+)

毛蕊异黄酮分子产生质子化的准分子离子峰 m/z 285.0635 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。二级质谱图中, 毛蕊异黄酮的裂解途径与毛蕊异黄酮葡萄糖苷一致, 但由准分子离子经过逆-狄尔斯-阿尔德反应裂解(retro Diels-Alder reaction, RDA)^[22] 生的离子 m/z 137.0042 信号明显, 见图 3。毛蕊异黄酮在正离子模式下的裂解途径见图 4。

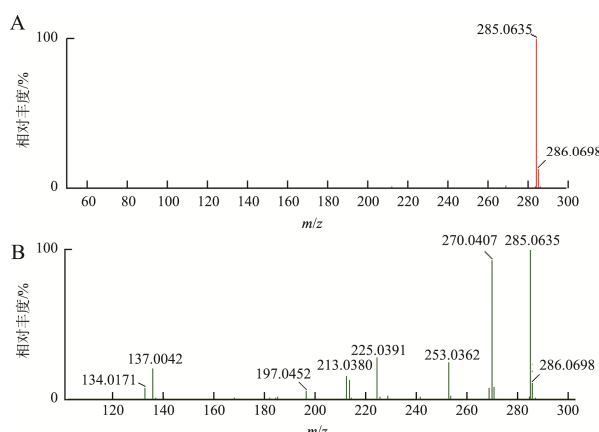


图 3 毛蕊异黄酮正离子模式质谱图

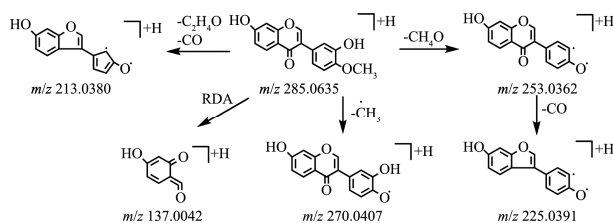
Fig.3 Mass spectrums of calycosin (ESI^+)

图 4 毛蕊异黄酮正离子模式裂解途径

Fig.4 Cleavage pathways of calycosin (ESI^+)

2.1.2 芒柄花苷及芒柄花素的裂解规律

芒柄花苷分子产生质子化的准分子离子峰 m/z 431.1334 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。一级质谱图中, m/z 431.1334 $\rightarrow$ m/z 269.0664 ($\Delta m=162$) 指示了芒柄花苷结构中葡萄糖取代基的裂解过程, 得到的产物离子 m/z 269.0664 信号明显, 见图 5A。二级质谱图中, 碎片离子 m/z 269.0664 丢失甲基自由基($\cdot\text{CH}_3$)得到的产物离子 m/z 254.0430, 此外 m/z 253.0395 是由 m/z 269.0664 丢失 1 分子 CH_4 得到的; 而 m/z 226.0471 和 m/z 225.0391 分别是由离子 m/z 254.0430 和 m/z

253.0395 丢失 CO 中性分子得到的, 并且 m/z 225.0391 丢失 1 分子 CO 产生离子 m/z 197.0452。此外, 离子 m/z 269.0664 连续丢失 2 分子 CO 产生 m/z 213.0769, 见图 5B。芒柄花苷在正离子模式下的裂解途径见图 6。

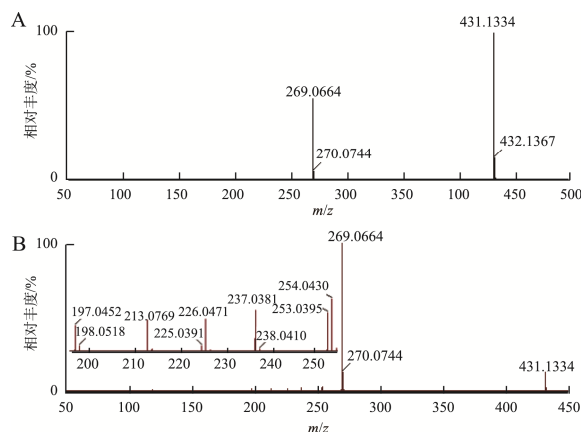


图 5 芒柄花苷正离子模式质谱图

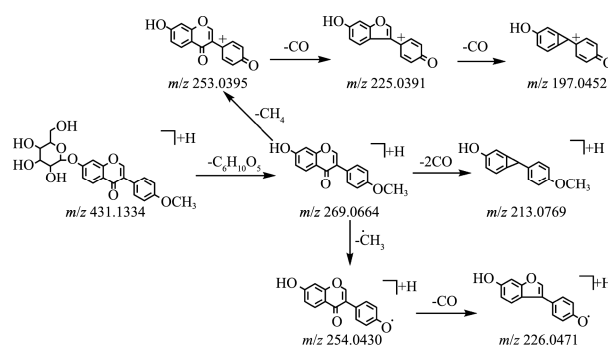
Fig.5 Mass spectrums of ononin (ESI^+)

图 6 芒柄花苷正离子模式裂解途径

Fig.6 Cleavage pathways of ononin (ESI^+)

芒柄花素分子产生质子化的准分子离子峰 m/z 269.0698 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。二级质谱图中, 芒柄花素的裂解途径与芒柄花苷一致, 见图 7。芒柄花素在正离子模式下的裂解途径见图 8。

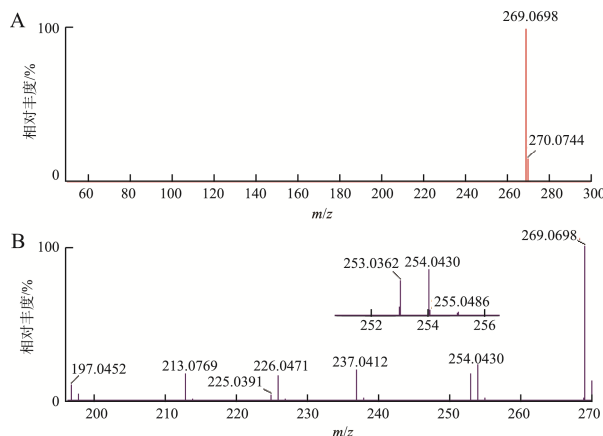


图 7 芒柄花素正离子模式质谱图

Fig.7 Mass spectrums of formononetin (ESI^+)

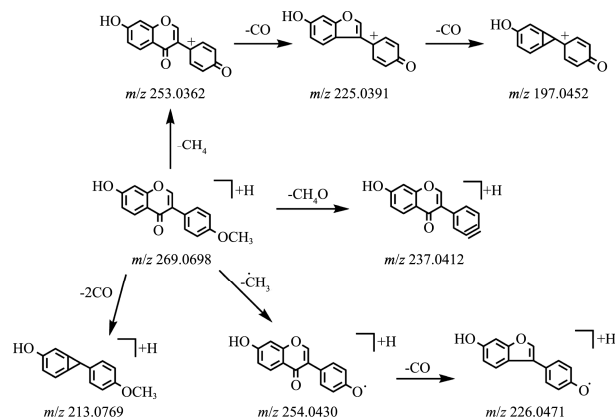


图 8 芒柄花素正离子模式裂解途径
Fig.8 Cleavage pathways of formononetin (ESI^+)

2.1.3 染料木苷及染料木素的裂解规律

染料木苷分子产生 2 倍分子质子化的准分子离子 m/z 865.2675 ($[2\text{M}+\text{H}]^+$)和质子化的准分子离子峰 m/z 433.1071 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。一级质谱图中, m/z 433.1071 $\rightarrow$ m/z 271.0437 ($\Delta m=162$)指示了染料木苷结构中葡萄糖取代基的裂解过程,得到的产物离子 m/z 271.0437,见图 9A。二级质谱图中,离子 m/z 271.0437 经过 RDA 裂解产生离子 m/z 153.0000,此外离子 m/z 271.0437 丢失 1 分子 H_2O 产生离子 m/z 253.0329。离子 m/z 243.0491 和 m/z 215.0529 分别是由离子 m/z 271.0437 连续丢失 CO 中性分子得到的。之后 m/z 215.0529 依次丢失 1 分子 H_2O 和 1 分子 CO 得到产物离子 m/z 197.0452 和 m/z 169.0477,见图 9B。染料木苷在正离子模式下的裂解途径见图 10。

染料木素分子产生质子化的准分子离子峰 m/z 271.0471 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。二级质谱图中,染料木素的裂解途径与染料木苷一致,见图 11。染料木素在正离子模式下的裂解途径见图 12。

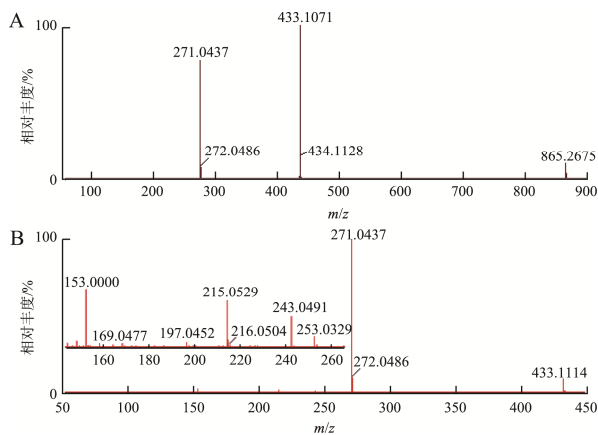


图 9 染料木苷正离子模式质谱图
Fig.9 Mass spectrums of genistin (ESI^+)

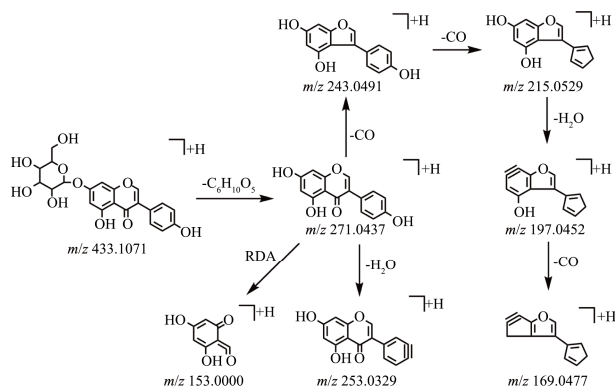


图 10 染料木苷正离子模式裂解途径
Fig.10 Cleavage pathways of genistin (ESI^+)

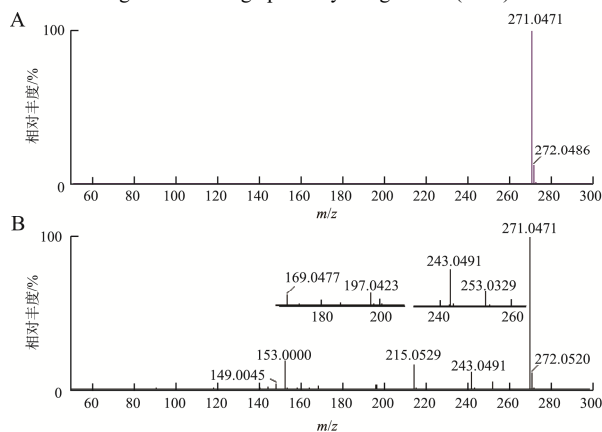


图 11 染料木素正离子模式质谱图
Fig.11 Mass spectrums of genistein (ESI^+)

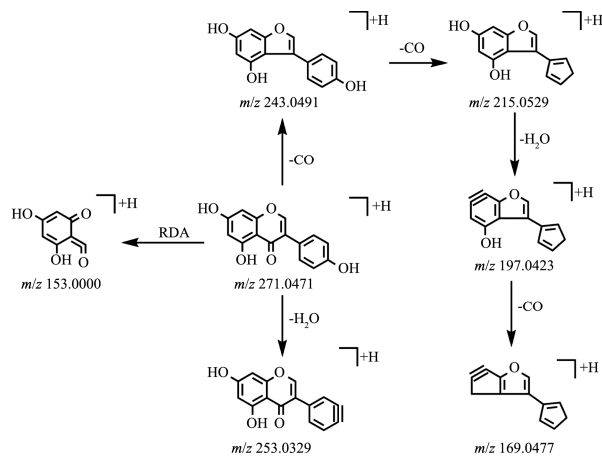


图 12 染料木素正离子模式裂解途径
Fig.12 Cleavage pathways of genistein (ESI^+)

2.1.4 黄芪异黄酮苷及黄芪异黄酮的裂解规律

黄芪异黄酮苷产生质子化的准分子离子峰 m/z 465.1811 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。一级质谱图中, m/z 465.1811 $\rightarrow$ m/z 303.1129 ($\Delta m=162$)指示了染料木苷结构中葡萄糖取代基的裂解过程,得到的产物离子 m/z 303.1129,见图 13A。二级质谱图中,离子 m/z 303.1129 经过 RDA 裂解产生 m/z 193.0669、181.0672 和 167.0529,此外 m/z 303.1129 经过 RDA 裂解和丢失甲基自

由基($\cdot\text{CH}_3$)得到产物 m/z 123.0259, 见图 13B。同时离子 m/z 167.0529 和 m/z 123.0259 在一级质谱图中信号明显。黄芪异黄烷苷在正离子模式下的裂解途径见图 14。

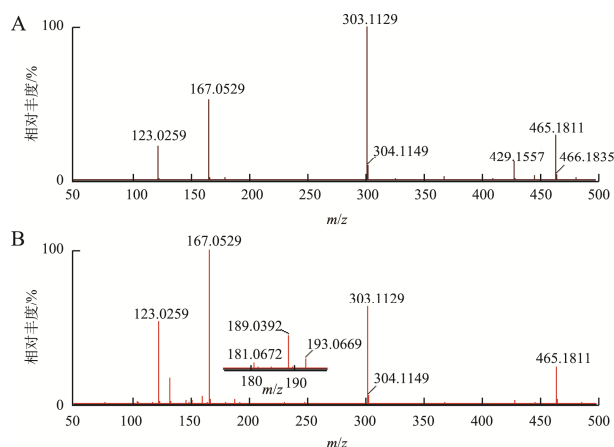


图 13 黄芪异黄烷苷正离子模式质谱图

Fig.13 Mass spectrums of 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavan-7-O-β-D-glucoside (ESI^+)

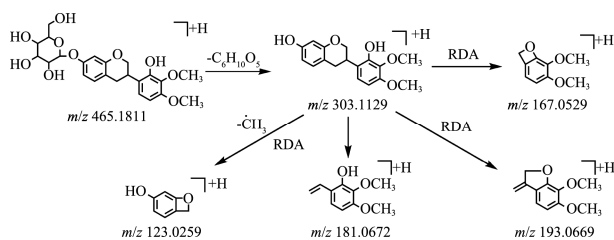


图 14 黄芪异黄烷苷正离子模式裂解途径

Fig.14 Cleavage pathways of 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavan-7-O-β-D-glucoside (ESI^+)

黄芪异黄烷分子产生准分子离子峰 m/z 303.1129 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。二级质谱图中, 黄芪异黄烷的裂解途径与黄芪异黄烷苷一致, 此外离子 m/z 167.0529 失去甲基自由基($\cdot\text{CH}_3$)所得到的产物离子 m/z 152.0296 信号明显, 见图 15。黄芪异黄烷在正离子模式下的裂解途径见图 16。

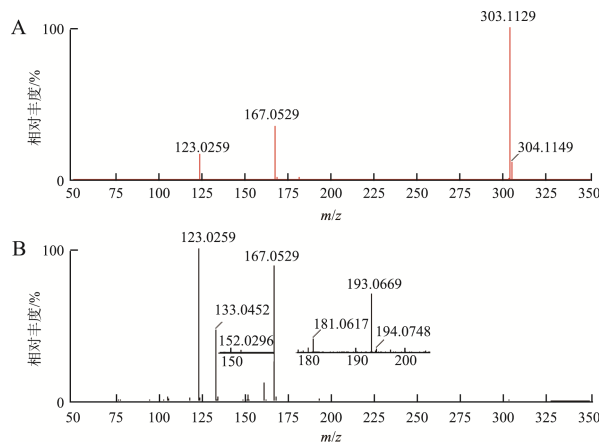


图 15 黄芪异黄烷正离子模式质谱图

Fig.15 Mass spectrums of 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavan (ESI^+)

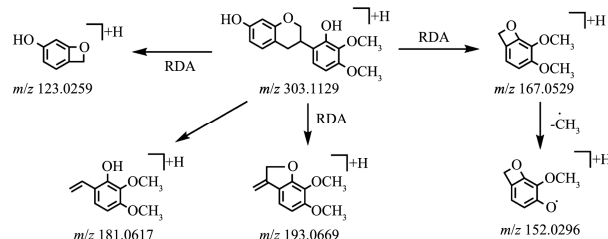


图 16 黄芪异黄烷正离子模式裂解途径

Fig.16 Cleavage pathways of 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavan (ESI^+)

2.1.5 黄芪紫檀烷苷及黄芪紫檀素的裂解规律

黄芪紫檀烷苷分子产生质子化的准分子离子峰 m/z 463.1619 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。一级质谱图中, m/z 463.1619 $\rightarrow$ m/z 301.0963 ($\Delta m=162$) 指示了黄芪紫檀烷苷结构中葡萄糖取代基的裂解过程, 得到的产物离子 m/z 301.0963, 见图 17A。二级质谱图中, 离子 m/z 301.0963 丢失甲基自由基($\cdot\text{CH}_3$)得到的产物离子 m/z 286.0629, 或者 m/z 301.0963 经过 RDA 裂解以及丢失甲基自由基($\cdot\text{CH}_3$)分别得到离子 m/z 167.0529 和 m/z 152.0296。此外, 离子 m/z 301.0963 丢失 1 分子 CH_4O 、1 分子 CO 和 1 分子甲基自由基($\cdot\text{CH}_3$)分别得到 m/z 269.0664、 m/z 241.0688、 m/z 226.0471, 见图 17B。离子 m/z 167.0529 在一级质谱图中同样信号明显。黄芪紫檀烷苷在正离子模式下的裂解途径见图 18。

黄芪紫檀素分子产生准分子离子峰 m/z 301.0963 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。二级质谱图中, 黄芪紫檀素的裂解途径与黄芪紫檀烷苷一致, 见图 19。黄芪紫檀素在正离子模式下的裂解途径见图 20。

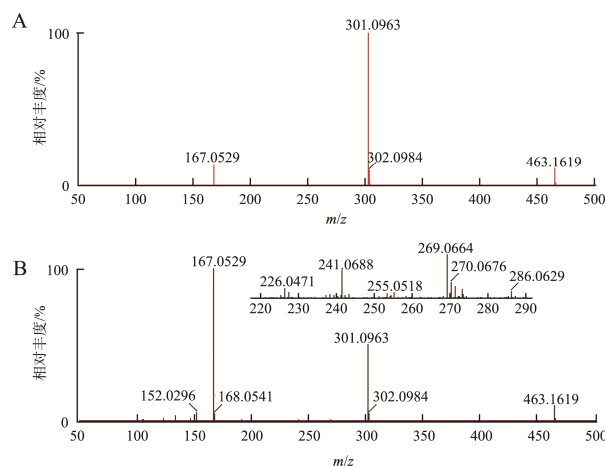


图 17 黄芪紫檀烷苷正离子模式质谱图

Fig.17 Mass spectrums of 9,10-dimethoxy-pterocarpan-3-O-β-D-glucoside (ESI^+)

2.2 黄芪中皂苷类成分在正离子模式下的裂解规律

2.2.1 黄芪皂苷I的裂解规律

黄芪皂苷I分子产生质子化的准分子离子峰 m/z 869.5405 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)。在一级质谱图中, 由准分子离子丢失

葡萄糖取代基($\Delta m=162$)和 1 分子 $C_9H_{12}O_6$ 后再依次丢失 H_2O 中性分子所得的产物离子 m/z 689.4568、 m/z 671.4363 和 m/z 653.4244 信号明显, 离子 m/z 653.4244 再依次脱去 1 分子 $C_9H_8O_4$ 和一系列 H_2O 中性分子后生成离子 m/z 473.3596、 m/z 455.3517、 m/z 437.3420 和 m/z 419.3269, 见

图 21A。二级质谱图中, 准分子离子丢失葡萄糖取代基($\Delta m=162$)、1 分子 $C_9H_{12}O_6$ 、1 分子 H_2O 和 1 分子 $C_{22}H_{34}O_2$ 得到产物 m/z 143.0870, 之后再丢失 H_2O 中性分子得到 m/z 125.0748, 见图 21B。黄芪皂苷I在正离子模式下的裂解途径见图 22。

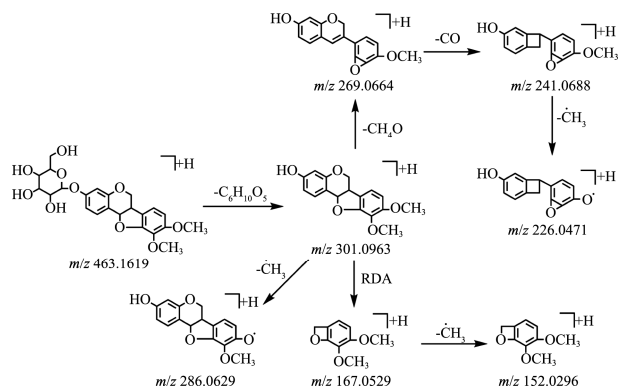


图 18 黄芪紫檀烷苷正离子模式裂解途径

Fig.18 Cleavage pathways of 9,10-dimethoxy-ptercarpan-3-O- β -D-glucoside (ESI^+)

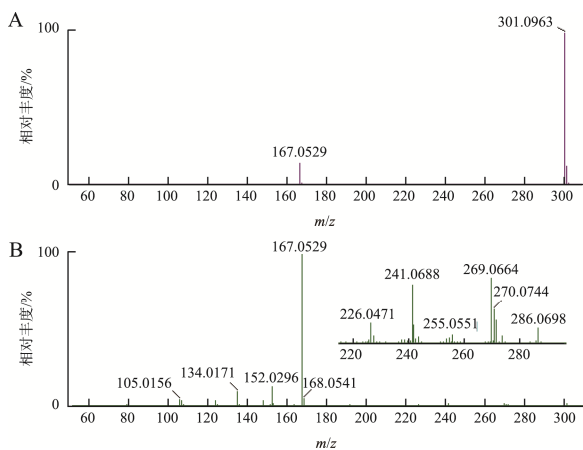


图 19 黄芪紫檀烷正离子模式质谱图

Fig.19 Mass spectra of 3-hydroxy-9,10-dimethoxy-ptercarpan (ESI^+)

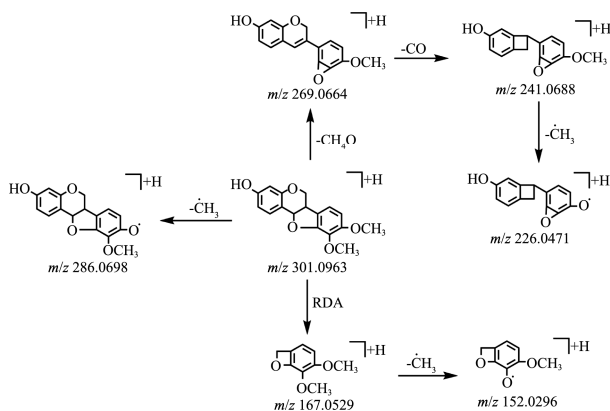
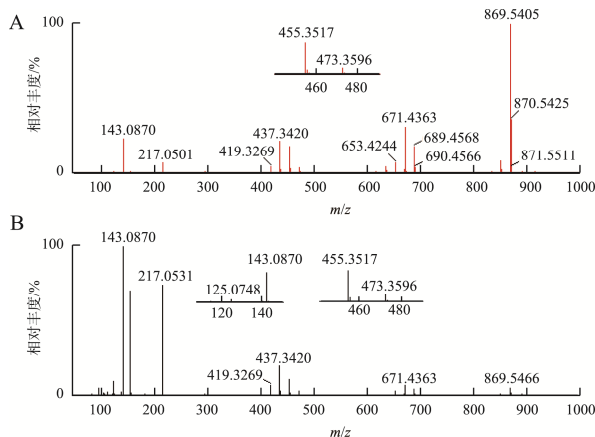


图 20 黄芪紫檀烷正离子模式裂解途径

Fig.20 Cleavage pathways of 3-hydroxy-9,10-dimethoxy-ptercarpan (ESI^+)



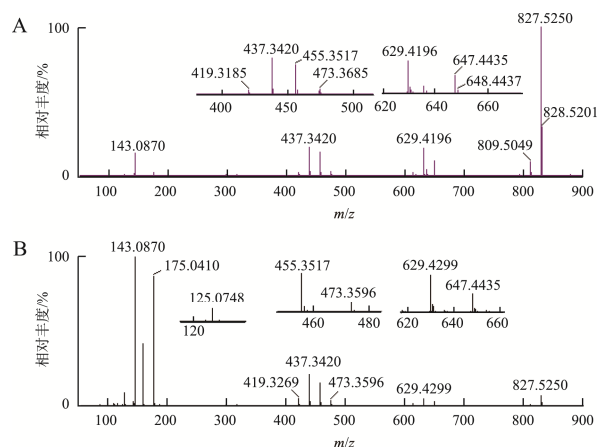


图 23 黄芪皂苷II正离子模式质谱图
Fig.23 Mass spectrums of astagaloside II (ESI⁺)

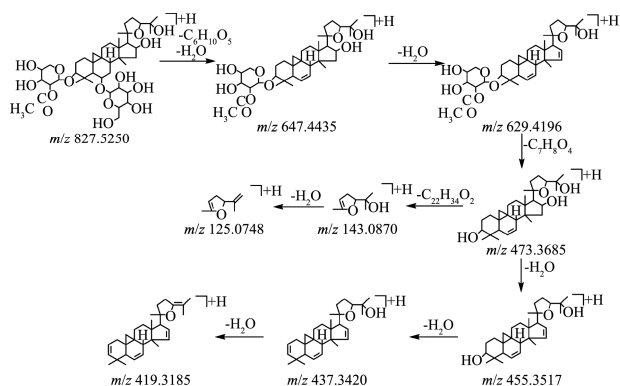


图 24 黄芪皂苷II正离子模式裂解途径
Fig.24 Cleavage pathways of astagaloside II (ESI⁺)

2.2.3 黄芪皂苷III的裂解规律

黄芪皂苷III分子产生质子化的准分子离子峰 m/z 785.5058 ($[M+H]^+$)。一级质谱图中, 由准分子离子丢失 1 分子 H_2O 产生离子 m/z 767.4926, 由准分子离子丢失葡萄糖取代基($\Delta m=162$)和木糖取代基($\Delta m=150$)得到产物离子 m/z 473.3685, 见图 25A。二级质谱图中, 由准分子离子丢失葡萄糖取代基($\Delta m=162$)产生离子 m/z 623.4376, 产物离子 m/z 605.4310 和产物离子 m/z 587.4107 是离子 m/z 623.4376 失去 H_2O 中性分子的结果, 信号明显。离子 m/z 587.4107 丢失 $C_5H_8O_3$ 中性分子产生 m/z 455.3517, 之后 m/z 455.3517 再连续丢失 H_2O 中性分子产生 m/z 437.3420 和 m/z 419.3269, 离子 m/z 473.3685 再连续丢失 1 分子 $C_{22}H_{34}O_2$ 和 1 分子 H_2O 得到产物离子 m/z 143.0870 和 m/z 125.0748, 见图 25B。黄芪皂苷III在正离子模式下的裂解途径见图 26。

2.2.4 黄芪甲苷的裂解规律

黄芪甲苷分子产生质子化的准分子离子峰 m/z 785.5058 ($[M+H]^+$)。一级质谱图中, 由准分子离子丢失 1 分子 H_2O 产生离子 m/z 767.4926, 之后再脱去木糖取代基($\Delta m=150$)得到产物离子 m/z 635.4303; 由准分子离子丢失

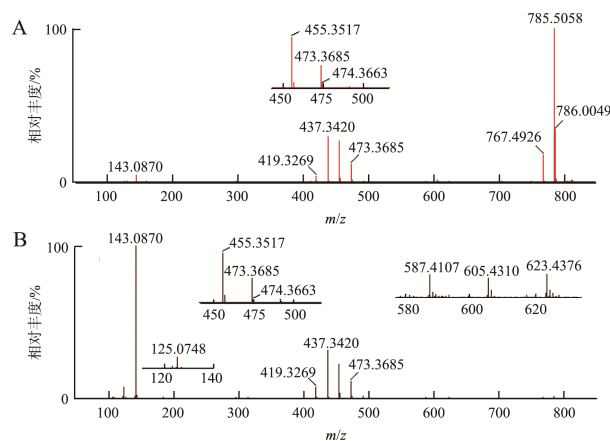


图 25 黄芪皂苷III正离子模式质谱图
Fig.25 Mass spectrums of astagaloside III (ESI⁺)

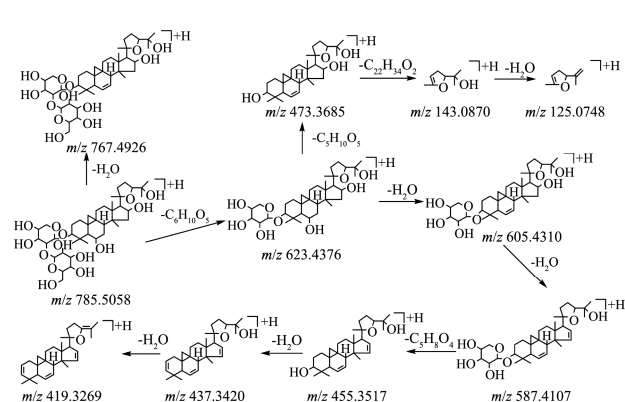


图 26 黄芪皂苷III正离子模式裂解途径
Fig.26 Cleavage pathways of astagaloside III (ESI⁺)

葡萄糖取代基($\Delta m=162$)和 1 分子 H_2O 得到产物离子 m/z 605.4210, 离子 m/z 605.4210 分别丢失 H_2O 中性分子和 $C_5H_8O_3$ 中性分子所得到的产物离子信号明显(m/z 587.4107、 m/z 473.3685 和 m/z 455.3517)。离子 m/z 455.3517 连续丢失 H_2O 中性分子分别得到离子 m/z 437.3420 和 m/z 419.3269。此外, 准分子离子丢失葡萄糖取代基($\Delta m=162$)和木糖取代基($\Delta m=150$)得到产物离子 m/z 473.3685, 见图 27A。二级质谱图中, 离子 m/z 473.3685 再连续丢失 1 分子 $C_{22}H_{34}O_2$ 和 1 分子 H_2O 得到产物离子 m/z 143.0870 和 m/z 125.0748, 见图 27B。黄芪甲苷在正离子模式下的裂解途径见图 28。

2.2.5 环黄芪醇的裂解规律

环黄芪醇分子产生中性分子结合钠离子形成的准分子离子 m/z 513.3676 ($[M+Na]^+$)、质子化的准分子离子 m/z 491.3810 ($[M+H]^+$)和 2 倍分子质子化的准分子离子 m/z 981.8130 ($[2M+H]^+$)。在一级质谱和二级质谱中, 准分子离子连续丢失 H_2O 中性分子分别产生离子 m/z 473.3685、 m/z 455.3560、 m/z 437.3420 和 m/z 419.3311。此外, 离子 m/z 473.3685 丢失 1 分子 $C_{22}H_{34}O_2$ 得到产物 m/z 143.0870, 之

后再丢失 H_2O 中性分子得到 m/z 125.0771, 见图 29。环黄芪醇在正离子模式下的裂解途径见图 30。

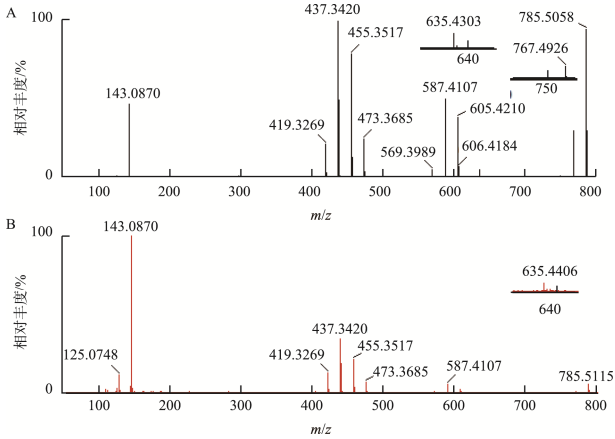


图 27 黄芩甲苷正离子模式质谱图
Fig.27 Mass spectrums of astragaloside IV (ESI⁺)

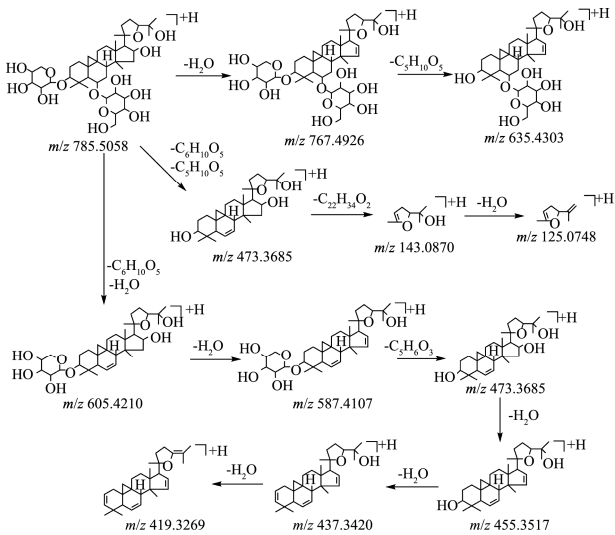


图 28 黄芩甲苷正离子模式裂解途径
Fig.28 Cleavage pathways of astragaloside IV (ESI⁺)

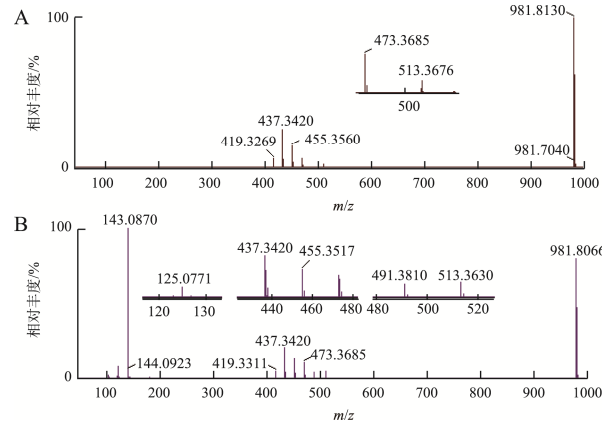


图 29 环黄芪醇正离子模式质谱图
Fig.29 Mass spectrums of cycloastragenol (ESI⁺)

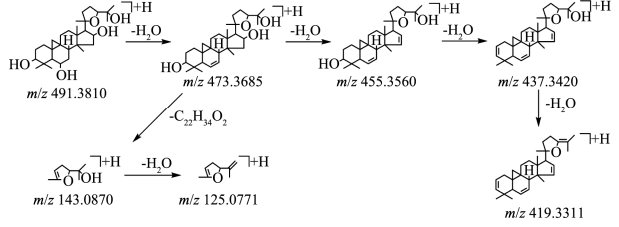


图 30 环黄芪醇正离子模式裂解途径
Fig.30 Cleavage pathway of cycloastragenol (ESI⁺)

2.3 黄酮类成分在正离子模式下的裂解规律总结

黄芩中 10 种黄酮类化合物的裂解途径分析发现, 黄酮类化合物先脱去 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ 生成相应的苷元, 其次是失去 $\cdot\text{CH}_3$ 、 CO 、 H_2O 、 CH_4O 、 $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ 等官能团。同时, 黄酮类化合物经 RDA 裂解后形成相应的碎片离子。

2.4 皂苷类成分在正离子模式下的裂解规律总结

黄芩中 5 种皂苷类化合物的裂解途径分析发现, 黄芩皂苷I、黄芩皂苷II、黄芩皂苷III、黄芩甲苷和环黄芪醇由于结构相似(结构见图 31 和表 1), 在 ESI 正离子模式下, 通过相同的裂解方式产生了 m/z 473、455、437、419、143、125 等相同的碎片离子结构。(1)黄芩皂苷I、黄芩皂苷II、黄芩皂苷III和黄芩甲苷通过丢失 R_1 离子片断以及 OR_2 离子片断产生离子 m/z 473, 之后 5 种皂苷类成分连续丢失 H_2O 中性分子产生 m/z 455、 m/z 437、 m/z 419 的碎片离子。(2)黄芩皂苷I、黄芩皂苷II、黄芩皂苷III、黄芩甲苷和环黄芪醇通过在 E 环上发生裂解脱去 ^5E 离子片断生成 m/z 143, 之后再丢失 H_2O 产生 m/z 125(裂解途径见图 32)。

表 1 黄芩中 5 种皂苷类成分的 R_1 和 R_2 结构
Table 1 R_1 and R_2 structures of 5 kinds of saponins in *Astragali Radix*

化合物名称	R_1	R_2
黄芩皂苷I	木糖(2',3'-二-O-乙酰基)	葡萄糖
黄芩皂苷II	木糖(2'-O-乙酰基)	葡萄糖
黄芩皂苷 III	木糖(2'-O-葡萄糖)	氢原子
黄芩甲苷	木糖	葡萄糖
环黄芪醇	氢原子	氢原子

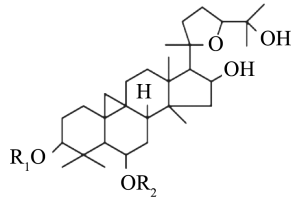


图 31 黄芩中 5 种皂苷类成分的化学结构
Fig.31 Chemical structures of 5 kinds of saponins in *Astragali Radix*

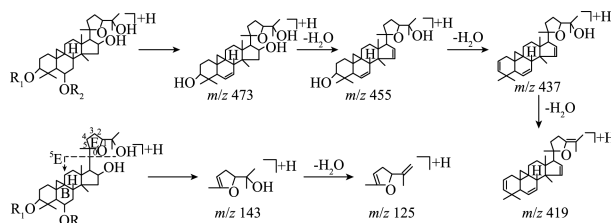


图 32 正离子模式下黄芪中 5 种皂苷类成分的裂解规律
Fig.32 Common cleavage pathway of 5 kinds of saponins at positive mode

3 结 论

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS^E 技术对黄芪中 10 个黄酮单体及 5 个皂苷单体在 ESI 正、负离子模式下进行了质谱裂解碎片的采集和裂解途径的分析, 推测了其裂解方式和碎片离子的可能结构, 总结了相关单体活性成分的裂解规律。在 ESI 正离子模式下, 黄芪的 10 个黄酮类化合物和 5 个皂苷类化合物, 产生较好的裂解碎片, 而在负离子模式下产生的碎片离子较少。故只对 15 种成分在正离子模式下的裂解情况进行研究。黄芪中黄酮类化合物主要裂解规律为先脱去 C₆H₁₀O₅ 生成相应的苷元, 其次是失去·CH₃、CO、H₂O、CH₄、CH₄O、C₂H₄O 等官能团。同时, 黄酮类化合物经 RDA 后形成相应的片段离子。黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 III、黄芪甲苷和环黄芪醇在正离子模式下产生相同的裂解碎片 *m/z* 473、455、437、419、143、125。综上所述, 黄芪作为药食同源药材, 在保健方面应用颇为广泛, 其市场需求较为广阔, 有良好的发展前景。本研究可为挖掘黄芪作为药食同源药材, 其功能成分对机体的保健作用机制研究提供参考依据, 为保障黄芪动物性食品安全提供技术支撑。

参考文献

- [1] 胡燕梨, 谭丽盈, 胡国辉. UPLC-MS/MS 法同时测定黄芪水提液中 3 种成分的含量[J]. 海峡药学, 2022, 34(2): 66–69.
HU YL, TAN LY, HU GH. Simultaneous determination of three components in astragalus membranaceus aqueous extract solution by UPLC-MS/MS method [J]. Strait Pharm J, 2022, 34(2): 66–69.
- [2] 奚佳玉, 苏圆锦, 赵鲲鹏, 等. 黄芪药食同源的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2023, 38(6): 718–724.
XI JY, SU YJ, ZHAO KP, *et al.* Research progress in medicinal and food homologous of *Astragali Radix* [J]. West China J Pharm Sci, 2023, 38(6): 718–724.
- [3] CHU C, LIAN WQ, EHU L, *et al.* *Radix Astragali (Astragalus)*: Latest advancements and trends in chemistry, analysis, pharmacology and pharmacokinetics [J]. Cur Org Chem, 2010, 14(16): 1792–1807.
- [4] 张颖, 王淳, 于丹, 等. 黄芪多糖抑制肺腺癌 A549/DDP 细胞移植瘤裸鼠 EMT 改善顺铂耐药的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6): 79–85.
ZHANG Y, WANG C, YU D, *et al.* Astragalus polysaccharides improve

cisplatin resistance by inhibiting EMT of lung adenocarcinoma A549/DDP cells transplanted into nude mice [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2022, 28(6): 79–85.

- [5] ZHANG W, ZHANG M, CHENG A, *et al.* Immunomodulatory and antioxidant effects of *Astragalus* polysaccharide liposome in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Fish Shellfish Immun, 2020, 100: 126–136.
- [6] 陈蔚, 陈雯洁, 夏燕萍, 等. 黄芪多糖改善糖尿病大鼠心肌糖脂代谢[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2009, 25(4): 440–442.
CHEN W, CHEN WJ, XIA YP, *et al.* *Astragalus* polysaccharides improves glycolipid metabolism in myocardium of diabetic hamsters [J]. Chin J Endocr Metab, 2009, 25(4): 440–442.
- [7] 李明泽, 秦飞, 李国峰, 等. 黄芪保健功能研究及产品发现现状[J]. 农产品加工, 2023(20): 78–82.
LI MZ, QIN F, LI GF, *et al.* Current status of astragalus health function research and product development [J]. Farm Prod Process, 2023(20): 78–82.
- [8] HE Y, AMER HM, XU Z, *et al.* Exploration of the underlying mechanism of *Astragaloside* III in attenuating immunosuppression via network pharmacology and *vitro/vivo* pharmacological validation [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 330: 118235.
- [9] 马传贵, 张志秀, 王如良, 等. 黄芪多糖的提取、结构及生物活性研究[J]. 特种经济动植物, 2024, 27(10): 124–128.
MA CG, ZHANG ZX, WANG RL, *et al.* Study on extraction, structure and biological activity of *Astragalus* polysaccharides [J]. Spec Econ Anim Plant, 2024, 27(10): 124–128.
- [10] 宋沁洁, 李国峰, 李威慰, 等. 黄芪药食同源现状分析[J]. 沈阳药科大学学报, 2023, 40(4): 509–517.
SONG QJ, LI GF, LI XW, *et al.* Analysis of the current situation of *Astragalus* medicine food homologous [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2023, 40(4): 509–517.
- [11] 杨希文, 祁效林, 戴衍朋, 等. 黄芪中有效成分的提取、生物活性功能及其在动物生产中的应用[J]. 饲料研究, 2024, 47(3): 149–153.
YANG XW, QI XL, DAI YP, *et al.* Extraction of active ingredients from *Astragalus membranaceus*, biological activities, and their applications in animal production [J]. Feed Res, 2024, 47(3): 149–153.
- [12] 何嘉郡, 秦晨, 贺廉清, 等. 黄芪黄酮类成分及其药理作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(1): 112–119.
HE JJ, QIN C, HE LQ, *et al.* Research on flavonoids of *Huangqi (Astragali Radix)* and their pharmacological action [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2024, 26(1): 112–119.
- [13] 吴娇, 全芳超. 黄芪的化学成分、药理作用及临床应用[J]. 滨州医学院学报, 2024, 47(1): 68–75.
WU J, TONG FC. Chemical composition, pharmacological action and therapeutic application of *Astragalus* [J]. J Binzhou Med Univ, 2024, 47(1): 68–75.
- [14] 叶迎, 王瑞海, 苗青, 等. 甘肃产 1~2 年生红芪和黄芪皂苷、多糖、黄酮类成分含量差异研究[J]. 中草药, 2023, 54(14): 4649–4661.
YE Y, WANG RH, MIAO Q, *et al.* Comparative study on statistical differences of saponins, polysaccharides and flavonoids contents of Gansu 1-2 years old *Hedysari Radix* and *Astragali Radix* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(14): 4649–4661.
- [15] 谢果珍, 黄莉莉, 张水寒, 等. 肠道微生物代谢苷类化合物的研究

- 进展[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(7): 1261–1271.
- XIE GZ, HUANG LL, ZHANG SH, *et al.* Advances in metabolism of glycosides by gut microbiota [J]. Nat Prod Res Dev, 2022, 34(7): 1261–1271.
- [16] 韩冰, 李静娜, 吕西雨, 等. 肠道菌群代谢转化中药皂苷类成分研究进展[J]. 中草药, 2023, 54(20): 6922–6932.
- HAN B, LI JN, LV XY, *et al.* Research progress on metabolic transformation of traditional Chinese medicine saponins by intestinal flora [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(20): 6922–6932.
- [17] 刘雪艳, 查代君. 黄酮类活性成分的代谢研究进展[J]. 福建医科大学学报, 2021, 55(4): 358–366.
- LIU XY, ZHA DJ. Research advances on metabolism of flavonoids [J]. J Fujian Med Univ, 2021, 55(4): 358–366.
- [18] 金杜欣, 曹维, 赵秀丽, 等. 肠道菌群对黄酮类化合物的代谢作用及生物学活性影响研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(7): 324–330.
- JIN DX, CAO W, ZHAO XL, *et al.* Research progress on the metabolic action and biological effects of flavonoids mediated by intestinal flora [J]. Food Ferment Ind, 2024, 50(7): 324–330.
- [19] LOGAN IE, SHULZHENKO N, SHARPTON TJ, *et al.* Xanthohumol requires the intestinal microbiota to improve glucose metabolism in diet-induced obese mice [J]. Mol Nutr Food Res, 2021, 65(21): e2100389.
- [20] 李金花, 曾锐, 瞿燕, 等. UPLC-Q-TOF-MS-E 技术结合 UNIFI 数据库快速定性分析黄牡丹化学成分[J]. 中草药, 2017, 48(8): 1529–1536.
- LI JH, ZENG R, QU Y, *et al.* Rapid identification on chemical constituents in roots of *Paeonia delavayi* var. *lutea* by UPLC-Q-TOF-MSE combined with UNIFI informatics platform [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(8): 1529–1536.
- [21] ZHANG C, HE Y, LI T, *et al.* Analysis of chemical components in herbal formula Qi Bai Granule by UPLC-ESI-Q-TOF-MS [J]. Nat Prod Res, 2019, 33(15): 2271–2275.
- [22] 陈文君, 刘平, 范赛, 等. 5 种丁香酚类化合物的电喷雾质谱裂解规律研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(9): 3491–3498.
- CHEN WJ, LIU P, FAN S, *et al.* Fragmentation pattern of 5 kinds of eugenol compounds by electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(9): 3491–3498.
- [23] 王晓雪, 赫军, 崔刚, 等. 碳青霉烯类抗生素的电喷雾质谱裂解规律分析[J]. 中国药房, 2014, 25(45): 4294–4296.
- WANG XX, HE J, CUI G, *et al.* Analysis of electrospray mass spectrum fragmentation regularity of carbapenem antibiotics [J]. Chin Pharm, 2014, 25(45): 4294–4296.
- [24] 王春国, 刘勇, 石晋丽, 等. 5 种缬草素类成分电喷雾质谱裂解规律研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 578–584.
- WANG CG, LIU Y, SHI JL, *et al.* Mass spectrum characterization of five valepotriates by electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chin Mater Med, 2013, 38(4): 578–584.
- [25] TILLER PR, YU S, CASTRO-PEREZ J, *et al.* High-throughput, accurate mass liquid chromatography/tandem mass spectrometry on a quadrupole time-of-flight system as a ‘first-line’ approach for metabolite identification studies [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008, 22(7): 1053–1061.
- [26] 黄浩洲, 仇敏, 唐进法, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS-E 技术的三勒浆口服液上清液及沉淀部分化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 143–151.
- HUANG HZ, QIU M, TANG JF, *et al.* Analysis of chemical components in supernatant and precipitate of sanajon oral liquid based on UPLC-Q-TOF-MSE technology [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2020, 26(14): 143–151.
- [27] 吴吉洋, 高方圆, 叶晓岚, 等. 创新药物川阿格雷及其拼合分子阿魏酸和川芎嗪的质谱裂解规律[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(7): 755–758.
- WU JY, GAO FY, YE XL, *et al.* Chuan’agelei and its flatten structure ferulic acid and ligustrazine: Mass fragmentation pathway [J]. Acad J Nav Med Univ, 2012, 33(7): 755–758.
- [28] 方高, 张鹏, 叶晓岚, 等. 淡豆豉异黄酮及其苷元的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(10): 1108–1115.
- FANG G, ZHANG P, YE XL, *et al.* Electron spray ion trap mass spectrometry of isoflavones and isoflavone aglycones of *Semen sojae praeparatum* [J]. Acad J Naval Med Univ, 2013, 34(10): 1108–1115.
- [29] 李自红, 魏悦, 范毅, 等. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 分析试验室, 2015, 34(2): 186–189.
- LI ZH, WEI Y, FAN Y, *et al.* Analysis of rutin by electrospray iontrap mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2015, 34(2): 186–189.
- [30] 史俊, 王汝斌. 一种聚酰胺-胺型树枝状分子的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 分析试验室, 2016, 35(4): 455–458.
- SHI J, WANG RB. Analysis of one kind of polyamide-amine dendrimers by electrospray ion trap mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2016, 35(4): 455–458.
- [31] 王艺霏, 陈晶, 马启凤, 等. 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱法测定米炒人参炮制前后皂苷成分及其裂解规律的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(8): 235–245.
- WANG YF, CHEN J, MA QF, *et al.* Determination of saponin components and their cleavage laws in rice-fried ginseng before and after concoction by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap-mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2024, 15(8): 235–245.

(责任编辑: 安香玉 于梦娇)

作者简介



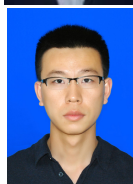
聂紫璇, 硕士, 主要研究方向为中药炮制学。

E-mail: niezixuan97@126.com



史辑, 教授, 主要研究方向为中药炮制化学研究。

E-mail: lnshiji@163.com



刘蓬蓬, 副教授, 主要研究方向为中药炮制研究。

E-mail: liupengpeng0411@163.com