

研究报告

采用核磁共振/液相色谱-质谱异相关谱方法开展 药用植物草棉活性提取物中多组分的 同步结构分析研究

代冬梅^{1,2} 贺玖明² 刘超³ 孙瑞祥³ 张瑞萍²

阿吉艾克拜尔·艾萨⁴ 再帕尔·阿不力孜^{* 2}

¹(浙江大学宁波理工学院,分子设计和营养工程重点实验室,宁波 315100)

²(中国医学科学院/北京协和医学院 药物研究所,中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室,北京 100050)

³(中国科学院计算技术研究所,北京 100080) ⁴(中国科学院新疆理化技术研究所,乌鲁木齐 830011)

摘 要 基于不完全分离分析策略,建立了 NMR/LC-MS 异相关谱(NMR/LC-MS HCS)方法对系列混合物样品的 LC-MS 和 NMR 谱数据的整合分析,发掘混合物图谱中来自同一组分的 LC-MS 和 NMR 谱数据间的内在相关性。以新疆维吾尔民族药用植物草棉(*Gossypium herbaceum* L.)花瓣的乙醇提取物(AB-8-2)为研究对象,以多通道组合闪式色谱技术为分离手段,不完全分离并获取了组分含量呈连续动态变化的系列混合物,运用 NMR/LC-MS HCS 方法对提取物中的黄酮苷类成分进行了同步结构分析研究。由于随组分浓度动态变化的多种谱学信号强度间具有强的正相关性,通过 NMR/LC-MS HCS 图可以获得系列提取物中同一组分的互补性的 LC-MS 和 ¹H NMR 谱数据,包括保留时间(R_t)、质荷比(m/z)和化学位移值(δ)等关键数据。以已解析的关键谱学信号为线索,引入 LC-MS/MS 谱和二维 NMR 谱进行综合分析,成功地从 AB-8-2 中鉴定出 12 个黄酮醇苷类化合物,其中还包括 2 组共流出的同分异构体。结果表明:通过该新型分析方法可以在离线的情况下通过“数学联用的方式”实现与在线 LC-NMR-MS 联用技术相似的分析功能,这种新型谱学分析方法可以简化复杂混合物的分离分析过程,实现结构复杂成分以及多组分无需完全分离的快速同步结构鉴定;尤其对于常规分离条件下难以获得单体的微量成分或极性相近组分群显示出独特的解析能力。

关键词 核磁共振/液相色谱-质谱异相关谱;混合物不完全分离;多组分同步结构鉴定;草棉植物;黄酮苷类

1 引言

质谱和核磁共振谱是鉴定化合物结构必需的两种谱学方法。随着两者联用技术 LC-NMR-MS^[1~3]的出现与发展,显著加快了天然产物及药用植物混合物成分的分离与结构鉴定的进程。它具有先分离后分析的特点。目前,由于 NMR 自身检测灵敏度的限制,导致其与 LC 技术联用时还存在一系列的兼容问题^[4~6],且该仪器较昂贵,使用成本较高。

除了上述联用技术之外,广义二维相关谱技术^[7]的出现为数据的综合分析提供了新思路。利用化学计量学中相关性的原理对混合物体系的同种或不同种谱学数据进行关联分析,从而获得互补性的谱学信息用于分析鉴定。Hua 等^[8]采用二维红外相关谱技术对中药贝母的产地进行区别分析;李钊等^[9]采用基于核磁共振的统计全相关谱(STOCSY)对肾脏中代谢物质系列¹H 高分辨魔角旋转 NMR 谱数据进行归属。Corcoran 等^[10]采用统计异相关谱(SHY),对复杂生物混合物样品的 MS 谱与¹H NMR 谱^[10]、CE 谱数据^[11]进行分析,寻找潜在的生物标志物。广义二维相关谱技术在复杂混合体系的分析中,运用数学分离代替化学分离,具有不分离分析的特点,这对于混合物体系或色谱共流成分的分析鉴

2010-11-21 收稿;2011-01-05 接受

本文系国家自然科学基金(No. 20775091)资助项目

* E-mail: zeper@imm.ac.cn

新疆维吾尔民族药用植物草棉(*Gossypium herbaceum* L.) 为棉属锦葵科(Oleaceae)植物。本研究以其花瓣的乙醇提取物(AB-8-2)为研究对象。药理学研究表明,AB-8-2 组分具有明显的抗老年痴呆活性和一定的抗血栓活性^[14,15]。采用多通道组合闪式色谱技术为分离手段,制备组分浓度呈动态变化的系列混合物流分,运用 NMR/LC-MS HCS 谱方法,并结合 LC-MS/MS 和二维 NMR 谱分析,开展了系列混合物中黄酮苷类化合物的无需完全分离的高效、快速的同步结构分析研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);QTRAP™型四极杆-线性离子阱串联质谱仪(美国 AB 公司)配有电喷雾离子源(ESI)及 Analyst 1.4.2 数据处理系统;INOVA-600 型核磁共振仪(美国 Varian 公司)。

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯,德国 Merck 公司);甲醇(色谱纯,天津永大化学试剂开发中心);氘代二甲基亚砜(含 0.03% (V/V) 四甲基硅烷, Cambridge Isotope Laboratories 公司)。实验用水为饮用纯净水,所有液相分析用溶剂均经抽滤、超声脱气处理(津腾公司滤膜:水相 0.22 μm;有机相 0.22 μm)。

2.2 样品及组分浓度呈连续动态变化系列混合物的制备

草棉活性提取物(编号 AB-8-2)由中国科学院新疆理化技术研究所阿吉艾克拜尔研究员提供。其分离提取的步骤概略如下:将原药材花瓣粉碎,用 70% 乙醇提取、浓缩后混悬于适量水中,用大孔树脂柱富集分离,收集 50%~70% 乙醇洗脱液,减压回收溶剂获得 AB-8-2。

称取 0.6 g 草棉活性提取物 AB-8-2,加适量甲醇溶解,用 2.3 g 反相硅胶拌样且干燥后,采用多通道组合闪式色谱分离系统: sq 16 × (Isco) Combi Flash, RP C₁₈(40~60 μm, Isco 公司) 23 g C₁₈反相闪式色谱柱(Isco patent pending, RediSep™) 梯度分离。流动相为甲醇(A)和水(B),梯度洗脱:0~180 min 5%~30% A, 180~240 min 30%~35% A, 240~340 min 35%~50% A, 340~560 min 50%~80% A。流速为 5 mL/min;检测波长为 370 nm。以每 10 mL 为一管自动收集流分并编号,备用。

2.3 测试条件

色谱条件: YMC-Pack Pro C₁₈ 色谱柱(150 mm × 3.0 mm i. d., 5 μm, 美国 Agilent 公司);以乙腈和 0.1% 甲酸为流动相进行梯度洗脱:0~40 min, 15%~55% 乙腈;流速为 0.3 mL/min;紫外吸收检测波长为 370 nm。

质谱条件: 负离子检测方式。喷雾电压: -4.5 kV; DP 电压: -80 V/-130 V; EP 电压: -9 V/-10 V; 源温度: 350 °C; GS1(雾化气): 4 MPa; GS2(干燥气): 5 MPa。碰撞能量(CE): -10 eV/-35 eV。均选用线性离子阱模式扫描,扫描速度为 1000 Da/s;使用的各种气路均为氮气;数据采集及处理软件采用 Analyst software 1.4.2。

¹H NMR 谱测定条件: 操作温度 298 K;采用 z 梯度三共振探头;操作软件为 Varian Vnmr 6.0 C;¹H NMR 谱测定的谱宽: $-1 \times 10^{-6} \sim 14 \times 10^{-6}$;弛豫延迟: 20 s;采样时间: 3.533 min;采样次数: 32;采样数据点: 64 K。1D TOCSY 谱混合时间为 120 ms;NOESY 实验的预饱和时间为 1.6 s,混合时间为 800 ms。

2.4 LC-MSⁿ 及¹H NMR 谱测定

LC-UV-MS 及 LC-MSⁿ 谱测定: 根据多通道组合闪式色谱分离的结果及溶液颜色的深浅变化,从获得的所有流分中选出 42 个系列提取物(间隔 3~6 个样品),每份提取物取出 0.5 mL 溶液,经微孔滤膜过滤,进行 LC-MSⁿ 谱分析,进样量 10 μL。

¹H NMR 谱测定: 根据上述 LC-UV-MS 谱的测定结果,提取物 AB-8-2 中的组分主要分布在中间一段流分中。从上述 42 个样品中挑选出 25 个样品,经旋转蒸发后,用适量甲醇溶解转移到 5 mm NMR 谱用测试管中,用氮气吹干,然后加入 0.5 mL 氘代二甲基亚砜溶解,进行¹H NMR 谱测定。

2.5 原始数据处理及相关计算

LC-MS 谱数据处理: 采用 Markerview1.1 软件对原始 LC-MS 谱数据(ms. wiff)进行峰对齐、去噪音处理后,转换成文本文件(ms. txt),其中包括质荷比-保留时间(m/z - R_t)和峰强度的信息。将这些文本文件导入 MATLAB 软件,通过编写的程序处理,保存为质谱数据矩阵[MS]。

^1H NMR 谱数据处理: 将原始的 ^1H NMR 谱数据在 MestReC 4.9.9.6 软件中依次进行傅立叶变换、校正、基线校正处理, 并输出为文本文件(ASCII 格式的文件), 其中包括化学位移值和峰强度的信息。然后将这些文本文件导入 MATLAB 软件, 经简化处理后得到的数据保存为 ^1H NMR 谱数据矩阵([NMR])。

相关系数计算: 采用 MATLAB 软件中的 Corrccoef 函数计算相关系数矩阵(C: correlation coefficient matrix)。计算公式为: $C = \text{corrccoef}[\text{MS}][\text{NMR}]$ 。通过设定合理的相关系数截取值(Cutoff), 并用“十”字型标志将 MS 与 ^1H NMR 谱信号强度间的相关系数矩阵可视化, 构成 NMR/LC-MS HCS 图。

3 结果与讨论

3.1 提取物 AB-8-2 的不完全分离结果分析

图 1 为提取物 AB-8-2 的 HPLC-UV 谱, 这 12 个成分依次被洗脱到不同的流分中, 且每个成分的含量在系列流分中呈动态变化。此外, 通过比较峰面积可以看出成分之间的含量差异较大。

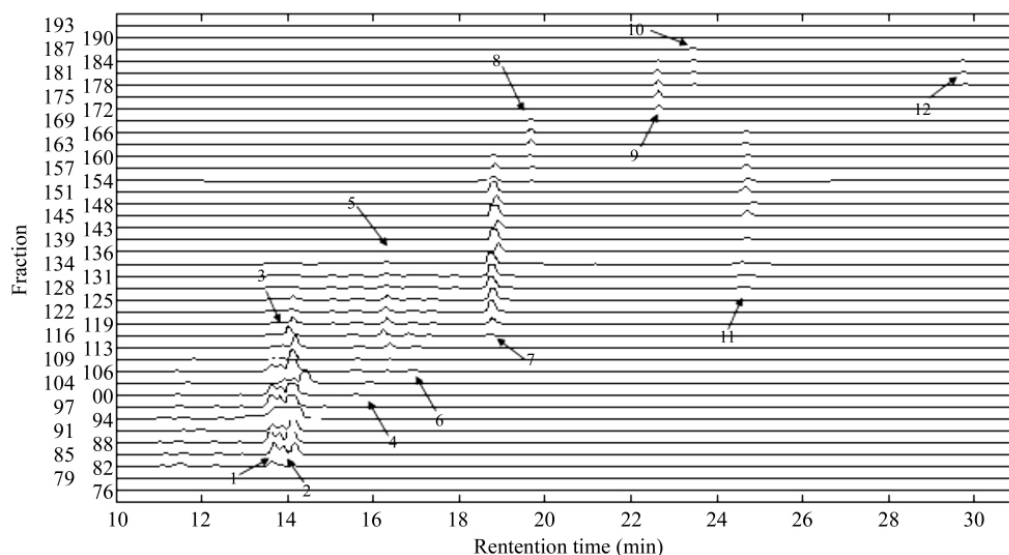


图 1 提取物 AB-8-2 系列流分的 HPLC-UV 谱($\lambda = 370 \text{ nm}$)

Fig.1 HPLC-UV chromatogram of series of fractions of gossypium herbocean extract, AB-8-2, at $\lambda 370 \text{ nm}$

3.2 组分 7 的结构解析

以组分 7 为例, 阐述 NMR/LC-MS HCS 方法在混合物结构鉴定中的作用及分析流程。图 2 为组分 7 的 ^1H NMR /LC-MS HCS 图。横坐标为 ^1H NMR 谱的化学位移值(δ), 纵坐标为某一保留时间(R_t)处的质荷比(m/z), “十”字型标识代表了系列混合物样品中 m/z 与 δ 值信号间的相关关系。其中, 不同类型的重叠“十”字型标识代表了不同峰型的 ^1H NMR 信号, 如单峰、双峰、多重峰等。在保留时间 18.8 min 处的离子与一组 ^1H NMR 谱信号之间的相关标识, 包括 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (m/z 463), 同位素离子 (m/z 464 和 m/z 465) 与 δ 7.96 单峰 δ 7.85 δ 7.97 δ 4.9 和 4.77 的双峰之间存在相关性, 这组相关标识表明这一组 MS 与 ^1H NMR 谱信号是来自混合物中组分 7 的谱学信号。同时, 将这些识别出来的氢谱信号与混合物的 ^1H NMR 谱(图 3)进行比对, 可进一步确定 δ 7.96 处的 ^1H NMR 谱信号为双峰($J = 1.8 \text{ Hz}$),

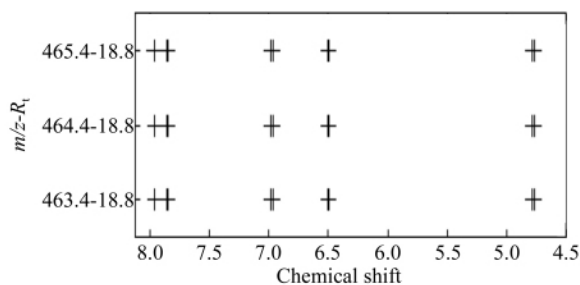


图 2 组分 7 的 ^1H NMR /LC-MS 异相关图(相关系数截取值为 0.6)。其中 δ 6.19 的 ^1H NMR 谱信号因与其它组分的信号相重叠, 而没有出现在相关图中

Fig. 2 ^1H NMR /LC-MS hetero-correlation spectroscopy (HCS) spectrum of constituent 7 with a cutoff of 0.6. The signal at δ 6.19 was overlapped by other signals and was not showed in NMR/LC-MS HCS map

δ 7.85 为双二重峰 ($J=8.4$ Hz, 1.8 Hz)。此外, 根据现有 ^1H NMR 谱信号间的积分比例及偶合裂分关系, 将出现在同一样品范围内 (119 ~ 163 号流分) 的 δ 6.19 的双峰 (分布在 82 ~ 169 号流分, 是一个多组分信号的重叠峰) 也归属为组分 7 的 ^1H NMR 信号。

由图 2 可知, 芳香区域的 ^1H NMR 谱信号构成了黄酮化合物 B 环典型的 ABX 偶合系统和 A 环的 AB 偶合系统, 一个糖的端基质子信号出现在 δ 4.77 处。因此, 可以推断组分 7 为具有槲皮素母核的单糖苷类化合物。由 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z 463) 的 LC-MS/MS 谱 (图 4) 可知, 组分 7 的 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z 463) 裂解丢失 162 Da 基团产生 m/z 301 的子离子, 表明结构中存在一个六碳糖基和槲皮素母核结构。同时, 根据前期研究结果^[16,17], 在碰撞能量 (CE) 35 eV 下, 组分 7 产生了强度很高的 Y_0^- (m/z 301) 和强度非常弱的 $[\text{Y}_0-\text{H}]^-$ (m/z 300), 可以判断组分 7 为槲皮素-3'-O-糖苷类化合物。照射已经归属的糖端基质子信号 (δ 4.77) 获得糖基部分的 1D TOCSY 谱 (图 5), 从而确定糖基为葡萄糖。通过上述综合分析, 组分 7 被鉴定为 Quercetin-3'-O-glucoside。

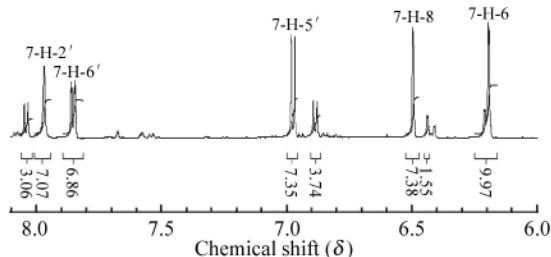


图 3 AB-8-2 的 131 号流分的混合 ^1H NMR 谱。根据 NMR/LC-MS 异相关图的相关性信息从中挖掘出属于组分 7 的信号, 并进行了归属

Fig. 3 Downfield regions of the ^1H NMR spectrum of No. 131 fraction from crude extract AB-8-2. The ^1H NMR signals were correlated and assigned to constituent 7 by using NMR/LC-MS HCS method

3.3 其它成分的结构解析

利用 NMR/LC-MS HCS 谱进行结构鉴定时, 可以遵循从易到难的顺序, 解析时先从色谱分离度较好的组分入手 (如组分 7 ~ 12), 通过 NMR/LC-MS HCS 图依次将每个组分 ^1H NMR 谱信号在混合物的 ^1H NMR 谱中归属。对相邻较复杂的 ^1H NMR 谱信号进行解析。解析时可以剔除那些已归属明确的 ^1H NMR 谱信号, 降低混合物 ^1H NMR 谱的复杂性。具体的结构解析思路总结如下: 首先根据 NMR/LC-MS HCS 谱提供的相关信息, 初步确定化合物的母核结构 (如 m/z 301 提示有槲皮素母核, m/z 285 提示有山奈酚母核), 糖的数目 (端基质子的数目), 特征取代基 (如甲氧基); 再根据 LC-MS/MS 谱提供的裂解信息, 推测糖的种类 (如丢失 162 Da 提示有六碳糖), 取代基种类 (丢失 15 Da 提示有甲氧基), 糖基的取代位置 (黄酮母核的 3 位取代 (如组分 2, 4, 5, 10), 7 位取代 (如组分 1, 6, 9), 3' 位取代 (组分 7)); 通过照射糖基的端基质子信号获得糖基的 1D TOCSY 谱, 确定糖的种类, 如葡萄糖 (组分 1, 3, 5, 6, 7, 8, 10), 半乳糖 (组分 2, 4) 和鼠李糖 (组分 9); 照射已确定归属的质子信号, 获得

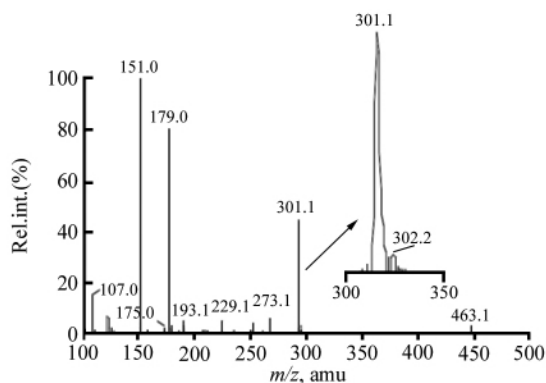


图 4 组分 7 的 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子 (m/z 463) 的 LC-MS/MS 谱。其中苷元离子 (Y_0^- , m/z 301) 的相对强度远远大于自由基苷元离子 ($[\text{Y}_0-\text{H}]^-$, m/z 300) 的相对强度, 因此确定组分 7 为 3' 位糖苷化

Fig. 4 LC-MS/MS spectrum of $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion at m/z 463 of constituent 7. The glycosylation position was determined by comparing the relative abundances of aglycone ion (Y_0^- , m/z 301) and radical aglycone ion ($[\text{Y}_0-\text{H}]^-$, m/z 300)

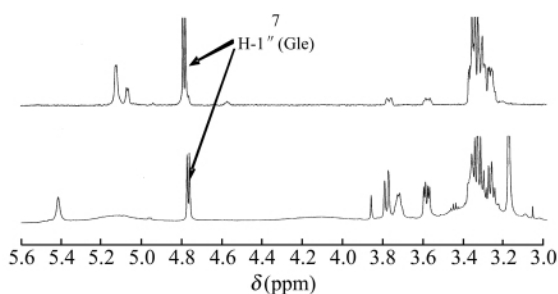


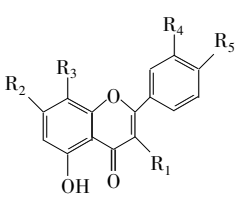
图 5 组分 7 的 1D TOCSY 谱 (a) 和提取物 AB-8-2 的 151 号流分的混合 ^1H NMR 谱 (糖残基部分)

Fig. 5 1D total correlation spectroscopy (TOCSY) spectrum (a) of constituent 7 and ^1H NMR spectrum of sugar moiety of No. 151 fraction from crude extract AB-8-2 (b)

NOESY 谱来确定取代基的连接位置(如组分 8 和 9 中的甲氧基);对于重叠的¹H NMR 谱信号,可以用 NMR/LC-MS PDS 谱进行解析,同时结合黄酮类化合物的结构特点和信号耦合裂分规律,进行拆分归属。本研究利用 NMR/LC-MS HCS 谱,从 AB-8-2 中鉴定了 12 个黄酮醇苷类化合物,其中还包括 2 组共流出的同分异构体(组分 1 2 3 和组分 4 5 6),这些组分的化学结构见表 1。

表 1 AB-8-2 中 12 个组分的结构

Table 1 Structures of 12 constituents in A-8-2

结构 Structure	组分序号 Constituent number	支链 Partial chain	组分序号 Constituent number	支链 Partial chain
	1	$R_1 = R_4 = R_5 = \text{OH}, R_2 = \text{OGlc}, R_3 = \text{H}$	7	$R_1 = R_2 = R_5 = \text{OH}, R_3 = \text{OGlc}$
	2	$R_1 = \text{OGal}, R_2 = R_4 = R_5 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$	8	$R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}, R_4 = \text{OGlc}, R_5 =$
	3	$R_1 = \text{OGlc}, R_2 = R_4 = R_5 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$	9	$\text{OCH}_3, R_5 = \text{OH}, R_2 = \text{ORha}, R_3 = \text{OCH}_3, R_4 =$
	4	$R_1 = \text{OGal}, R_2 = R_5 = \text{OH}, R_3 = R_4 = \text{H}$	10	$\text{H}, R_1 = (6''\text{-p-coumaroyl})-\text{Glc}, R_2 = R_5 = \text{OH},$
	5	$R_1 = \text{OGlc}, R_2 = R_5 = \text{OH}, R_3 = R_4 = \text{H}$	11	$R_3 = R_4 = \text{H}$
	6	$R_1 = R_5 = \text{OH}, R_2 = \text{OGlc}, R_3 = R_4 = \text{H}$	12	$R_1 = R_2 = R_5 = \text{OH}, R_3 = R_4 = \text{H}$

4 结 论

本研究利用 NMR/LC-MS 异相关谱技术,开展了新疆维吾尔民族药用植物草棉活性提取物 AB-8-2 中黄酮醇类成分的同步结构鉴定研究。通过对 NMR/LC-MS HCS 谱中的相关性谱学信息进行综合分析,基于组分浓度动态变化的多个谱学信号间强度协同变化的规律,将系列组分群中属于同一组分的 LC-MS 和¹H NMR 谱数据(通过独立测定得到)通过 NMR/LC-MS HCS 的相关计算和可视化处理关联上,进而获得包括保留时间、质荷比和化学位移值的相关性谱学信息,实现了在不完全分离情况下对活性提取物中多组分的同时结构鉴定。

References

- Hansen S H, Jensen A G, Cornett C, Bjørnsdottir I, Taylor S, Wright B, Wilson I D. *Anal. Chem.*, **1999**, 71(22): 5235 ~ 5241
- Kesting J R, Huang J Q, Sørensen D. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2010**, 51(3): 705 ~ 711
- Tatsis E C, Boeren S, Exarchou V, Trovanis A N, Vervoort J, Gerotheranassis I P. *Phytochem.*, **2007**, 68(3): 383 ~ 393
- Jaroszewski J W. *Planta Med.*, **2005**, 71(8): 691 ~ 700
- Corcoran O, Spraul M. *DDT.*, **2003**, 8(14): 624 ~ 631
- Elipe M V S. *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 497(1-2): 1 ~ 25
- Noda I. *Appl. Spectrosc.*, **1993**, 47(9): 1329 ~ 1336
- Hua R, Sun S Q, Zhou Q, Noda I, Wang B Q. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2003**, 33(2): 199 ~ 209
- LI Zhao, ZHU Hang, CHENG Peng, ZHOU Zhi-Ming, LIU Mai-Li, ZHANG Xu(李钊,朱航,程鹏,周志明,刘买利,张许). *Chin. J. Magn. Reson.*(波谱学杂志), **2007**, 24(4): 510-518
- Crockford D J, Holmes E, Lindon J C, Plumb R S, Zirah S, Bruce S J, Rainville P, Stumpf C L, Nicholson J K. *Anal. Chem.*, **2006**, 78(2): 363 ~ 371
- Garcia-Perez I, Alves A C, Angulo S, Li J V, Utzinger J, Ebbels T E, Legido-Quigley C, Nicholson J K, Holmes E, Barbas C. *Anal. Chem.*, **2010**, 82(1): 203 ~ 210
- Dai D M, He J M, Sun R X, Zhang R P, Aisa H A, Abliz Z. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 632(2): 221 ~ 228
- LIU Ying, HE Jiu-Ming, SUN Rui-Xiang, LIU Chao, ZHANG RUI-Ping, SHI Jian-Gong, ABLIZ Zeper(刘影,贺玖明,孙瑞祥,刘超,张瑞萍,石建功,再帕尔·阿不力孜). *Chinese J. Anal. Chem.*(分析化学), **2011**, 39(3): 323 ~ 329
- Xinjiang Uygur Autonomous Region Health Department(新疆维吾尔自治区卫生厅). *Uygur Medicine Standards*(维吾尔族药材标准). Urumqi(乌鲁木齐): Xinjiang Science and Technology and Health Press(新疆科技卫生出版社): **1993**: 357

- 15 BAI Jie(白杰), Parhat KELIMU(帕尔哈提·克里木), Wuliya YIMING(邬利娅·伊明), YAN Dong(闫冬), Subat TUERDI(苏巴提·吐尔地). *J. Xinjiang Med. Univ.* (新疆医科大学学报), **2005**, 28(3): 209 ~ 212
- 16 Ablajan K, Abliz Z, Shang X Y, He J M, Zhang R P, Shi J G. *J. Mass Spectrom.*, **2006**, 41(3): 352 ~ 360
- 17 Geng P, Zhang R P, Aisa H A, He J M, Qu K, Zhu H B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21(12): 1877 ~ 1888

Simultaneous Structural Identification of Constituents in Active Herbal Extract of *Gossypium Herbaceam* Using Nuclear Magnetic Resonance/Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Hetero-Correlation Spectroscopy

DAI Dong-Mei^{1,2}, HE Jiu-Ming², LIU Chao³, SUN Rui-Xiang³, ZHANG Rui-Ping²,
Haji Akber AISA⁴, Zeper ABLIZ^{*2}

¹(Key Laboratory for Molecular Design and Nutrition Engineering,
Ningbo Institute of Technology, Zhejiang University, Ningbo 315104)

²(Key Laboratory of Bioactive Substances and Resource Utilization of Chinese Herbal Medicine,
Ministry of Education, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking
Union Medical College, Beijing 100050)

³(Institute of Computing Technology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

⁴(Xinjiang Technological Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011)

Abstract To simplify and accelerate the analytical routes for structure identification of constituents in complex mixture, based on an incomplete separation strategy, MS/NMR hetero-correlation spectroscopy (MS/NMR-HCS) was developed as a new analytical method to discover the intrinsic correlation between LC-MS and NMR data of the same constituent from mixture spectra. The ethanol crude extract of the petals of *Gossypium herbaceam* was separated into a series of fractions with the concentration of constituent dynamic variation by flash column chromatography. NMR/LC-MS HCS method was applied to identify the flavonol glycosides in these fractions. The complementary spectral information of the same individual constituent in the crude extract was simultaneously obtained from the spectra of mixtures, including retention time (R_t), mass/charge (m/z) and chemical shift (δ). And combined the LC-MS/MS and 2D NMR analysis, twelve constituents including two groups of co-eluted isomers were identified successfully. The results demonstrated that NMR/LC-MS HCS combined with the incompleted separation strategy could achieve the similar function of on-line LC-MS-NMR in an off-line mode by such a “mathematics hyphenated approach”. The new analytical strategy has the potential advantages for simplifying and accelerating the analytical routes for structure identification of constituents in complex mixture. Especially, this method is suitable for analysis and identification of minimum-quantity constituents and constituents with similar polarity which are hardly obtained in routine experimental conditions.

Keywords Nuclear magnetic resonance/liquid chromatography-mass spectrometry hetero-correlation spectroscopy; Incomplete separation strategy; Simultaneous structural identification in mixture; *Gossypium herbaceam*; Flavonol glycosides

(Received 21 November 2010; accepted 5 January 2011)