

分析与测试

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的灰茅根化学成分分析

于亚娟¹,周轲²,刘东升²,朱旭江²,郭朝晖^{*2},袁松³,石晶¹

(1.甘肃中医药大学药学院,甘肃兰州 730000;

2.甘肃省药品检验研究院 国家药品监督管理局中药材饮片质量控制重点实验室,甘肃兰州 730000;

3.中国食品药品检定研究院,北京 100004)

摘要:采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术对灰茅根中化学成分进行定性分析。采用 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱,以 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相设置梯度洗脱,流速为 0.3 mL/min。质谱检测后得到多个不同的化合物,比较提取物中分子量和碎片分子量,并借助数据库搜索。共鉴定出 41 个化合物,其中萜类 10 个,苯丙素类 9 个,黄酮类 5 个,醌类 2 个,有机酸 4 个,生物碱 2 个和其他类 7 个。利用此法能有效、快速地检测出灰茅根中的化学成分,为中药材来源的先导化合物的开发提供理论指导。

关键词: UPLC-Q-TOF-MS/MS; 灰茅根; 化学成分; 萜类化合物; 苯丙素类化合物

中图分类号: R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2024)10-0063-09

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0066

Analysis of Chemical Constituents in Root *Pennisetum* by High Resolution UPLC-Q-TOF-MS/MS YU Ya-juan¹, ZHOU Ke², LIU Dong-sheng², ZHU Xu-jiang², GUO Zhao-hui^{*2}, YUAN Song³, SHI Jing¹ (1. College of Pharmacy, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Quality Control of Chinese Herbal Medicine Slices, State Drug Administration, Gansu Institute of Drug Inspection, Lanzhou 730000, China; 3. China National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100004, China)

Abstract: UPLC-Q-TOF-MS/MS was used to qualitatively analyze the chemical components of root *Pennisetum*. The chromatographic column was Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈, with a gradient elution of 0.1% formic acid water-acetonitrile as the mobile phase and the flow rate was 0.3 mL/min. Several compounds were identified using mass spectrometry, and the molecular weights of the extracts and fragments were compared by searching against a database. A total of 41 chemical compounds were identified, including 10 terpenes, 9 phenylpropanoids, 5 flavonoids, 2 quinones, 4 organic acids, 2 alkaloids and 7 others. This method can effectively and quickly detect the chemical constituents in roots of *Pennisetum*, and provide theoretical guidance for the development of lead compounds from Chinese medicinal materials.

Key words: UPLC-Q-TOF-MS/MS; root *pennisetum*; chemical composition; terpenoids; phenylpropanoids

灰茅根 *Pennisetum longissimum* S.L.Chen et Y. X.Jin var. *intermedium* S.L.Chen et Y.X.Jin 为禾本科植物变异狼尾草的干燥根茎,现收载于《甘肃省中药材标准》,主要分布于甘肃省陇南市徽县等地。灰茅根味甘,性凉,具有清热,止咳,止痛等药理作用,主要用于鼻塞,流涕,咽喉疼痛,牙痛,血瘀等症^[1]。灰茅根药用价值显著,目前未有对其化学成分进行较为系统且全面的分析鉴定研究报告,研究潜力较大。

历年本草中皆有关于“茅根”的记载,大多为禾本科植物^[2]。《本草蒙筌》中“下淋利小便,通闭逐瘀血”;《本草易读》中“止吐衄诸血,除淋漓客热。黄胆水肿皆疗,嘔呕喘急悉医。利小便而

止消渴处处有之”;《本草择要纲目》中“劳伤虚羸,补中益气,除瘀血血闭寒热,利小便,下五淋”等。狼尾草最早载于《本草拾遗》,甘肃陇南

收稿日期:2024-01-29;网络首发日期:2024-07-20

基金项目:兰州市科技计划项目(2019-1-127);甘肃省药品科研项目(2018GSFDA004,SSCJG-YP-A202201,2022GSMPA0026,2022GSMPA0032)。

作者简介:于亚娟(1997-),女,河北保定人,硕士生,主要研究方向为中药物质基础与质量控制研究。

通讯作者:郭朝晖(1968-),E-mail:1282664933@qq.com。

引用本文:于亚娟,周轲,刘东升,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的灰茅根化学成分分析[J].化学试剂,2024,46(10):63-71。

徽县的一种民间药用的狼尾草与历史记载的茅根相似,经专家鉴定为禾本科中型狼尾草的干燥根茎。

UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术集超高效液相色谱的高效分离能力和飞行时间质谱的高分辨特性为一体,实现了对中药材复杂成分的快速分离和鉴定,目前被广泛应用于中药及复方的化学成分分析鉴定^[3]。本研究首次采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对灰茅根的化学成分进行系统地分析,为进一步研究灰茅根的药效物质基础及质量控制研究提供科学依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器及试剂

Agilent 1290 型超高效液相色谱串联 6546Q-TOF 高分辨质谱仪(美国 Agilent 公司);METTLER TOLEDO ME204 型、METTLER TOLEDO MS205DU 型分析天平(瑞士梅特勒公司);KQ-500DE 超声波清洗器(上海超声波仪器厂)。

灰茅根药材由甘肃省陇南市徽县中医院提供,由兰州大学生命科学学院植物分类学专家蒲训教授鉴定灰茅根 *Pennisetum longissimum* S. L. Chen et Y. X. Jin var. *intermedium* S. L. Chen et Y. X. Jin 为禾本科植物变异狼尾草的干燥根茎。

甲醇、乙腈(质谱级,德国默克医药生物有限公司);甲酸(质谱级,北京迪马科技有限公司);屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 供试品溶液的制备

灰茅根药材经粉碎后过五号筛,精密称取两份约 4 g 粉末,置于锥形瓶中,按照料液比 1:10 分别加入 20 mL 甲醇和水,超声提取 30 min,冷却至室温,补足质量。将两份样置于同一锥形瓶,混匀。混合后的样品用 15 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

1.2.2 色谱条件

采用 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱,以 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~1.5 min, 0~5% B; 1.5~10 min, 5%~20% B; 10~15 min, 20%~40% B; 15~20 min, 40%~60% B; 20~25 min, 60%~80% B; 25~30 min, 80%~95% B; 30~35 min, 95% B; 35~40 min, 95%~5%; 40~45

min, 5%)。流速为 0.3 mL/min,柱温 40 °C,进样量 3 μL。

1.2.3 质谱条件

采用电喷雾离子源,正、负离子模式扫描 auto MS/MS,质量扫描范围 50~1 200 m/z;气体温度 325 °C,干燥气流 12 L/min,雾化器压力 45 psi,鞘气温度 325 °C,鞘气流速 11 L/min,毛细管电压 3.5 kV,fragmentor 电压 120 V;碰撞能量 0 V 和 15 V,数据采集 45 min。

1.2.4 样品的采集

按照 1.2.1 方法进行样品的制备,按 1.2.2 和 1.2.3 的检测条件进行测定。采用 MSMS 模式进行数据采集。

1.2.5 数据的分析

通过 Agilent MassHunter 和 Qualitative Analysis 软件进行数据和处理,如保留时间校准、峰识别和峰提取等,经人工筛选出最终结果。将测得化合物通过碎片离子质谱图及其裂解途径、比对相关文献进一步确证。

2 结果与讨论

根据质谱得到的化学成分信息,运用 Agilent 相关软件筛选出目标化合物。根据保留时间、准分子离子峰、二级碎片等信息,结合 Chemical Book (<https://www.chemicalbook.com/>)、ChemSpider (<https://www.chemspider.com/>) 和化源网 (<https://www.chemsrc.com/>) 等数据库及参考文献鉴定相关化学成分。结果在灰茅根中共鉴定出

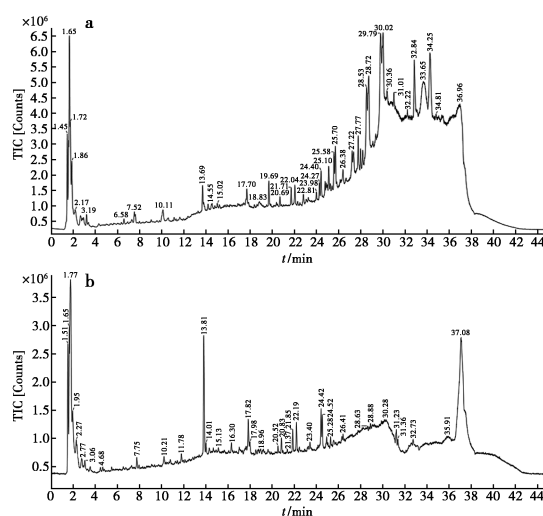


图 1 灰茅根正(a)、负(b)离子模式下的总离子流图
Fig.1 BPI chromatograms of the root *Pennisetum* in positive (a) and negative (b) mode

41 个化合物,其中萜类 12 个,苯丙素类 9 个,黄酮类 5 个,有机酸 4 个,醌类 2 个,生物碱 2 个和其他类 7 个。灰茅根中正、负离子模式的总离子流图,见图 1,各分析结果见表 1。

表 1 灰茅根中鉴定出的 41 个化合物^注

Tab.1 41 compounds identified in the root *Pennisetum*

<i>t</i> R/ min	离子 模式	理论值 (<i>m/z</i>)	实测值 (<i>m/z</i>)	误差	分子式	碎片离子 (<i>m/z</i>)	化合物名称	来源	
1g	1.21	POS	118.068 05 [M+H] ⁺	118.068 13	-0.56	C ₅ H ₁₁ NO ₂	55.116 47,71.078 41、 85.029 51,101.023 78	缬氨酸(valine)	[4,5]
2c	1.21	NEG	609.182 47 [M-H] ⁻	609.185 44	-4.88	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	301.072 35,343.113 78、 465.124 15,489.140 31	新橙皮苷(neohesperidin)	[4,6,7]
3g	1.65	NEG	134.047 18 [M-H] ⁻	134.047 30	-0.9	C ₅ H ₅ N ₅	78.959 42,92.024 91、 107.035 60	腺嘌呤(adenine)	[5,6]
4g	5.14	NEG	203.082 55 [M-H] ⁻	203.082 66	0.029	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	74.025 30,116.049 74、 142.064 98,159.090 98	L-色氨酸(L-tryptophan)	[5,8,9]
5a	6.42	NEG	495.150 78 [M-H] ⁻	495.150 29	0.982	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	465.135 10,165.054 21、 137.023 15	氧化芍药苷(oxypaeoniiflora)	[10,11]
6a	6.99	POS	541.152 80 [M+Na] ⁺	541.151 79	1.867	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄	89.064 45,177.064 18、 191.011 99	6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷(6'- O-β-D-Glucosyl gentiopicroside)	[12]
7f	7.38	NEG	169.014 28 [M-H] ⁻	169.014 25	0.18	C ₇ H ₆ O ₅	125.023 74,151.005 42	没食子酸(gallic acid)	[10]
8g	9.298	NEG	163.040 17 [M-H] ⁻	163.040 07	0.63	C ₉ H ₈ O ₃	93.034 59,117.033 55、 119.049 51,163.038 77	邻羟基肉桂酸(<i>o</i> -hydroxycinnamic acid)	[9]
9a	9.404	NEG	325.092 87 [M-H] ⁻	325.092 94	-0.216	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	131.099 10,195.110 71、 239.131 66,257.098 54	白果内酯(bilobalide)	[13]
10c	10.58	NEG	389.124 17 [M-H] ⁻	389.124 23	-0.16	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	143.049 11,185.059 41、 227.053 60,340.010 79	虎杖苷(polydatin)	[6]
11b	10.74	NEG	535.182 08 [M-H] ⁻	535.182 59	-0.96	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₂	161.030 25,178.061 42、 315.124 54,329.135 81、	去甲络石苷(Nortracheloside)	[14]
12b	10.97	NEG	221.045 52 [M-H] ⁻	221.045 55	-0.12	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	162.987 31,190.997 14、 206.021 36	异嗪皮啉(isofraxidin)	[15]
13a	11.07	NEG	521.203 01 [M-H] ⁻	521.202 86	0.28	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	247.113 46,443.175 91、 475.205 86	双氢鸦胆子苦醇(dihydrobrusatol)	[16]
14b	11.11	NEG	147.045 24 [M-H] ⁻	147.045 15	0.6	C ₉ H ₈ O ₂	87.019 50,129.035 06	二氢香豆素(dihydrocoumarin)	[17,18]
15b	11.3	NEG	521.202 81 [M-H] ⁻	521.202 82	-0.015	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	107.060 84,285.144 86、 313.143 24,328.168 53	二氢去氢二愈创木基醇-4'-O-β-D- 葡萄糖苷(Urolignoside)	[19,20]
16a	12.99	NEG	187.097 65 [M-H] ⁻	187.097 59	0.3	C ₉ H ₁₆ O ₄	101.037 23,128.051 07、 171.099 20	杜仲醇(eucommiol)	[21,22]
17c	13.28	NEG	355.118 69 [M-H] ⁻	355.118 76	-0.202	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	151.040 07,160.017 36、 190.060 86,193.051 02	勒奇黄烷酮 G(leachianone G)	[23]
18c	13.57	POS	415.188 00 [M+Na] ⁺	415.186 16	4.443	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	89.048 18,177.075 40、 233.107 78	光甘草酚(glabrol)	[24]
19b	13.57	NEG	227.071 30 [M-H] ⁻	227.071 36	-0.25	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	119.048 83,135.043 34、 148.051 54,175.085 82	川白芷素(angenomalin)	[25]
20d	13.96	POS	403.162 80 [M+Na] ⁺	403.162 50	0.744	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₄	259.107 33,299.118 84、 351.132 05	番木鳖次碱(vomicine)	[24]
21b	14.15	POS	433.214 80 [M+H] ⁺	433.213 23	3.637	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	151.092 35,177.110 88、 348.176 30,415.224 08	五味子醇甲(wuweizi alcohol A)	[9]

续表

<i>t</i> R/ min	离子 模式	理论值 (<i>m/z</i>)	实测值 (<i>m/z</i>)	误差	分子式	碎片离子 (<i>m/z</i>)	化合物名称	来源	
22d	14.24	POS	411.176 31 [M+H] ⁺	411.176 95	-1.56	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	327.116 09、349.100 68、 379.145 70、394.134 09	伪马钱子碱(pseudobrucine)	[24]
23a	15.53	NEG	371.113 60 [M-H] ⁻	371.113 28	0.87	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	151.039 82、267.071 69、 372.114 82	黄藤内酯(fibraurin)	[23]
24e	16.06	NEG	329.066 65 [M-H] ⁻	329.066 09	1.71	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	135.046 92、299.053 03、 315.050 10、	橙黄决明素(aurantio-obtusin)	[7]
25c	16.6	NEG	269.045 46 [M-H] ⁻	269.045 57	-0.41	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	136.547 40、244.146 65、 262.159 37	5-去羟山柰酚(resokaempferol)	[26]
26f	17.13	POS	353.229 80 [M+Na] ⁺	353.229 72	0.226	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	67.057 71、81.073 85、 95.090 22、107.091 53、 121.107 01、133.108 49	三棱酸(sanleng acid)	[16,18]
27a	20.04	POS	335.214 41 [M+H] ⁺	335.213 23	3.514	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	299.204 57、317.223 74	14-去氧穿心莲内酯 (14-deoxyandrographolide)	[27]
28b	20.53	POS	439.172 70 [M+Na] ⁺	439.172 33	0.842	C ₂₃ H ₂₈ O ₇	134.036 33、167.069 87、 221.118 07	木兰脂素(magnolin)	[4]
29g	20.7	NEG	367.118 69 [M-H] ⁻	367.118 02	1.821	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	134.036 52、149.060 54、 160.015 33、175.038 92	姜黄素(curcumin)	[28]
30g	20.7	NEG	367.117 89 [M-H] ⁻	367.118 53	-1.73	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	149.042 97、163.060 42、 230.087 06、246.084 64	环姜黄素(cyclocurcumin)	[28]
31e	21.13	NEG	269.045 52 [M-H] ⁻	269.045 58	-0.21	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	225.054 23、237.107 83、 241.047 99	芦荟大黄素(aloe emodin)	[7]
32g	21.35	NEG	313.238 42 [M-H] ⁻	313.238 48	-0.19	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	141.085 66、155.102 69、 226.124 51、268.172 26	癸二酸二丁酯(dibutyl sebacate)	[29]
33a	21.453	NEG	191.071 40 [M-H] ⁻	191.071 18	1.151	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	145.030 05、149.032 09、 163.039 33	细辛醚(asaricin)	[8]
34b	22.74	NEG	265.123 40 [M-H] ⁻	265.123 00	1.509	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	223.076 26、247.095 47	厚朴酚(magnolol)	[4]
35a	26.95	NEG	455.353 10 [M-H] ⁻	455.352 34	1.669	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	265.247 33、277.215 30、 314.226 28、375.284 97	齐墩果酸(oleanolic acid)	[30]
36f	27.38	NEG	277.217 28 [M-H] ⁻	277.217 21	0.253	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	157.143 08、255.228 98	α-亚麻酸(linolenic acid)	[31]
37f	28.8	NEG	279.233 00 [M-H] ⁻	279.233 01	-0.036	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	221.151 31、279.229 73、 280.233 66	亚油酸(linolic acid)	[9]
38b	29.73	NEG	413.124 07 [M-H] ⁻	413.124 24	-0.41	C ₂₂ H ₂₂ O ₈	398.101 67、413.122 17、 414.314 57	苦鬼臼毒素(podophyllotoxin)	[9]
39a	29.73	NEG	577.374 57 [M-H] ⁻	577.374 25	-8.4	C ₃₃ H ₅₄ O ₈	149.062 44、193.106 83、 381.235 55、408.329 22	知母皂苷 A1(timosaponin A-1)	[22]
40a	33.99	NEG	619.421 52 [M-H] ⁻	619.421 49	0.047	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	91.021 21、413.338 87、 457.324 27	人参皂苷 RH4(ginsenoside RH4)	[31]
41a	34.83	POS	487.508 21 [M+H] ⁺	487.508 37	-0.325	C ₃₁ H ₅₀ O ₄	295.226 67、349.277 31、 451.359 82、469.322 31	土莫酸(tumulolic acid)	[20,24]

注:a.萜类;b.苯丙素类;c.黄酮类;d.生物碱类;e.醌类;f.有机酸类;g.其他。

2.1 萜类化合物的鉴定分析

萜类化合物是灰茅根中主要的化合物,具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等药理作用^[32]。结合对照品和相关文献,在灰茅根中共解析出 10 个萜类化

合物,主要为单萜、三萜类和少量的二萜类化合物。单萜类以化合物 5 为例,在负离子模式下,保留时间为 6.42 min,准分子离子峰为 *m/z* 495.150 29 [M-H]⁻,通过软件计算推测其化学

式为 $C_{23}H_{28}O_{12}$, 裂解时准分子离子峰丢失 1 个 $-CH_2O$ 形成碎片离子 m/z 465.135 10 $[M-H-CH_2O]^-$, 接着 Glucose (葡萄糖)、 $C_7H_6O_3$ 、 H_2O 和 CH_2O 、 C_2H_4 等中性分子再次丢失, 形成 m/z 165.054 21 (蒽烷) 和 m/z 137.023 15 (对羟基苯甲酸) 的碎片离子, 查阅文献 [9, 11] 可知蒽烷和对羟基苯甲酸碎片离子为氧化芍药苷的特征碎片离子, 以此推测该化合物为氧化芍药苷, 见图 2。

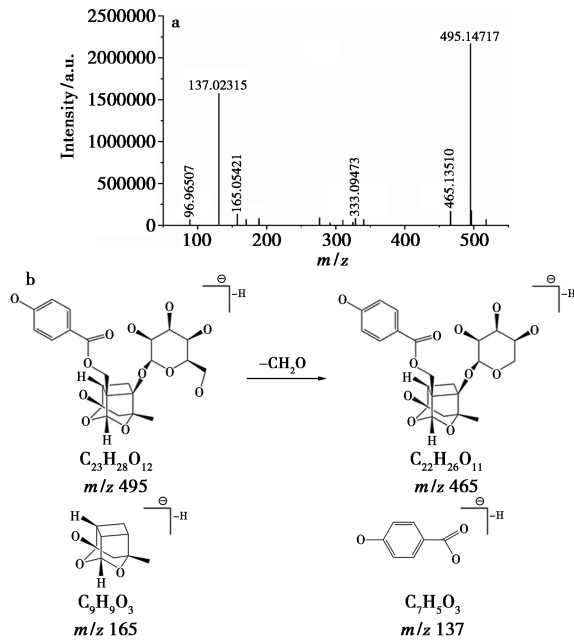


图 2 氧化芍药苷的二级质谱图(a)和可能裂解图(b)

Fig.2 Secondary mass spectrum (a) and possible fragmentation mechanism (b) of oxypaeoniflora

三萜类化合物在植物体内多与糖结合成苷或酯, 在裂解过程中, 环上 $-OH$ 易丢失形成 H_2O , 且糖苷键易断裂 [33]。以化合物 41 为例, 在正离子模式下, 保留时间为 34.83 min, 准分子离子峰为 m/z 487.508 37 $[M+H]^+$, 推测化学式为 $C_{31}H_{50}O_4$, 裂解时依次脱去 2 分子 H_2O 形成 m/z 469.322 31 $[M+H-2H_2O]^+$ 、 m/z 451.359 82 $[M+H-2H_2O]^+$ 的碎片离子, 继续丢失 1 个糖苷键, 形成 m/z 295.226 67 $[M+H-C_9H_{16}O_2-2H_2O]^+$ 碎片离子, 查阅文献推测出该化合物为土莫酸 [20, 24]。

二萜类化合物多以丢失中性分子 H_2O 为主, 以化合物 27 为例, 在正离子模式下, 保留时间为 20.04 min, 准分子离子峰 m/z 335.213 23 $[M+H]^+$, 推测化学式为 $C_{20}H_{30}O_4$, 二级碎片离子为 m/z 317.223 74 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 299.204 57 $[M+H-2H_2O]^+$, 结合对照品和文献 [27] 比对, 推测出该化合物为 14-去氧穿心莲内酯, 见图 3。

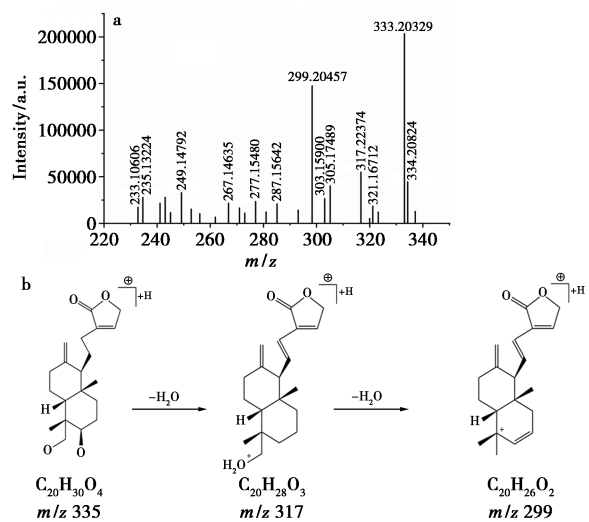


图 3 14-去氧穿心莲内酯的二级质谱图(a)和可能裂解图(b)

Fig.3 Secondary mass spectrum (a) and possible fragmentation mechanism (b) of 14-deoxyandrographolide

2.2 苯丙素类化合物的鉴定分析

从灰茅根中共鉴别出苯丙素类化合物 9 个, 其中包括 7 个香豆素类: 二氢香豆素、异嗪皮啉、去甲络石苷、二氢去氢二愈创木基醇-4'-O-β-D-葡萄糖苷、五味子醇甲、川白芷素和苦鬼白毒素; 2 个木脂素类: 木兰脂素和厚朴酚。香豆素类在裂解过程中, 先是丢失一些特有的取代基, 接着吡喃环上的 CO 丢失, 若取代基中有羟基, 则多失去 1 分子 CO, 直至丢失全部的 O [34]。

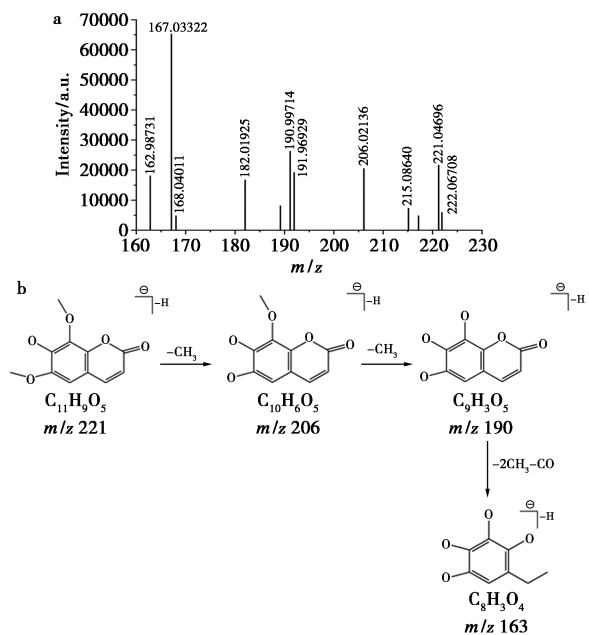


图 4 异嗪皮啉的二级质谱图(a)和可能裂解图(b)

Fig.4 Secondary mass spectrum (a) and possible fragmentation mechanism (b) of 7-hydroxycoumarin

香豆素类以化合物 12 为例,化合物 12 在负离子模式下,保留时间为 10.97 min,准分子离子峰为 m/z 221.045 55 $[M-H]^-$,推测化学式为 $C_{11}H_{10}O_3$,裂解时依次脱去 2 分子 $-CH_3$,产生 m/z 206.021 36 $[M-H-CH_3]^-$ 、190.997 14 $[M-H-2CH_3]^-$ 的碎片离子,接着丢失 1 分子 CO ,形成 m/z 162.987 31 $[M-H-2CH_3-CO]^-$ 的碎片离子,结合文献[15]推测其为异嗪皮啉,见图 4。

木质素类以化合物 34 为例,在负离子模式下,保留时间为 22.74 min,准分子离子峰为 m/z 265.123 00,推测其化学式为 $C_{18}H_{18}O_2$,二级碎片有 m/z 223.076 26 $[M-H-C_3H_6]^+$ 、 m/z 247.095 47 $[M-H-H_2O]^+$,结合对照品和文献[4]比对,推测出其为厚朴酚,见图 5。

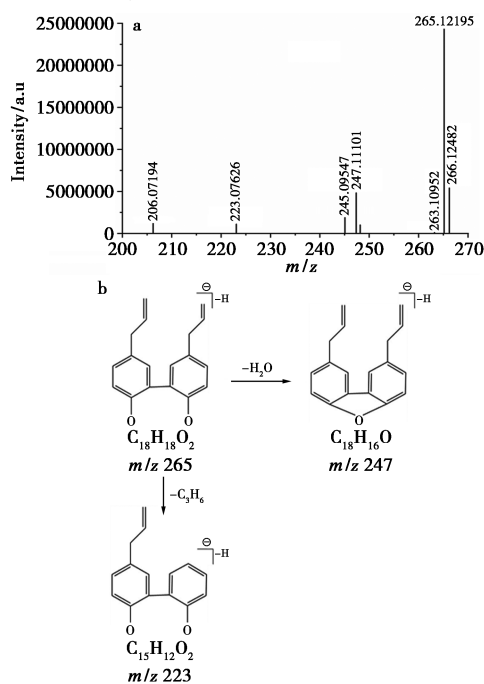


图 5 厚朴酚的二级质谱图 (a) 和可能裂解图 (b)
Fig.5 Secondary mass spectrogram (a) and possible fragmentation mechanism (b) of magnolol

2.3 黄酮类化合物的鉴定分析

黄酮类主要包括黄酮、二氢黄酮及其苷类,基本母核为 2-苯基色原酮,C 环相比于 A 环和 B 环易断裂。黄酮苷类的裂解规律通常是以 RDA 裂解、糖苷键的断裂和中性分子的丢失^[35]为主。在灰茅根中共鉴定出 5 个黄酮类化合物,以化合物 2 为例,在负离子模式下,保留时间为 1.21 min,准分子离子峰为 m/z 609.185 44 $[M-H]^-$,推测其分子式为 $C_{28}H_{34}O_{15}$,准分子离子的糖苷键断裂,丢失 1 分子葡萄糖和 1 分子鼠李糖得到 m/z

301.072 35 $[M-H-Rha-Glc]^-$;丢失 $-C_{10}H_{18}O_8$ 和 $-C_4H_8O_4$ 分别得到 m/z 343.113 78 $[M-H-C_{10}H_{18}O_8]^-$ 和 m/z 489.140 31 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$ 的碎片离子,根据以上数据推测其为新橙皮苷^[4,6,7]。化合物 10 在负离子模式下,保留时间为 10.58 min,准分子离子峰为 m/z 389.124 23 $[M-H]^-$,推测其分子式为 $C_{20}H_{22}O_8$,准分子离子

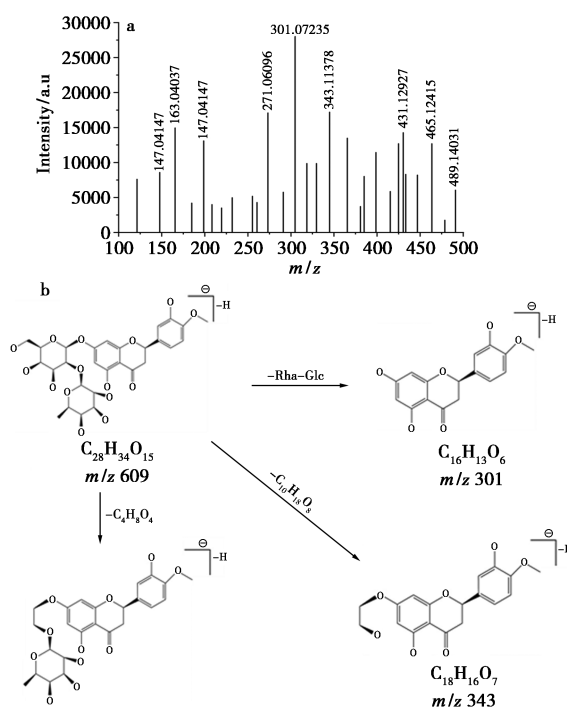


图 6 新橙皮苷的二级质谱图 (a) 和可能裂解图 (b)
Fig.6 Secondary mass spectrogram (a) and possible fragmentation mechanism (b) of neohesperidin

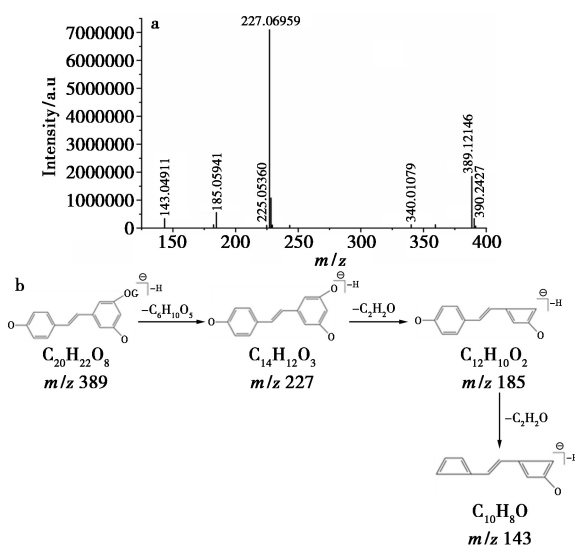


图 7 虎杖苷的二级质谱图 (a) 和可能裂解图 (b)
Fig.7 Secondary mass spectrogram (a) and possible fragmentation mechanism (b) of polysweed

丢失糖苷得到 m/z 227.053 60 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 的碎片离子;接着连续丢失 2 分子 $-C_2H_2O$,在 A、B 环间发生 RDA 裂解,形成碎片离子 m/z 185.059 41 $[M-H-C_2H_2O]^-$ 和 m/z 143.049 11 $[M-H-2C_2H_2O]^-$,推测其可能为虎杖苷^[6],二者见图 6、7。

2.4 醌类化合物的鉴定分析

醌类化合物主要分为蒽醌、萘醌、菲醌和苯醌 4 种类型,在灰茅根中蒽醌类化合物有 2 个,分别为芦荟大黄素和橙黄决明素。研究表明蒽醌类化合物具有抗炎、抗血栓和利尿等药理作用^[36],在裂解过程中,多为苯环上的取代基断裂。

以化合物 31 为例,化合物 31 在负离子模式下,保留时间为 21.13 min,准分子离子峰为 m/z 269.045 58 $[M-H]^-$,推测化学式为 $C_{15}H_{10}O_5$,裂解时先是失去苯环上的 $-CH_2O$ 取代基,得到 m/z 241.047 99 $[M-H-CH_2O]^-$ 碎片离子,接着在保留了共轭结构的基础上,继续失去一个 O,得到 m/z 225.054 23 $[M-H-CH_2O-O]^-$ 碎片,通过查阅文献^[7]推测出化合物 31 为芦荟大黄素,见图 8。

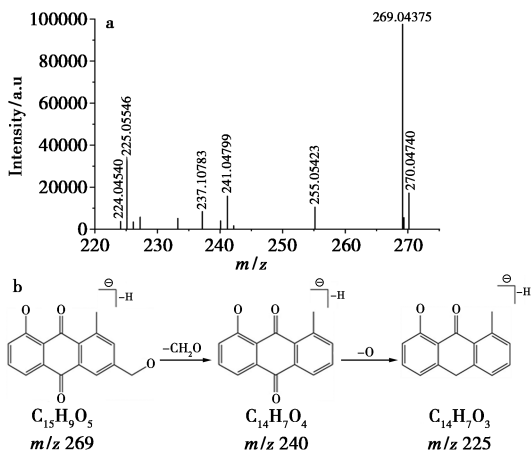


图 8 芦荟大黄素的二级质谱图(a)和可能裂解图(b)

Fig.8 Secondary mass spectrogram (a) and possible fragmentation mechanism (b) of alooe-emodin

2.5 有机酸类化合物的鉴定分析

研究表明有机酸是植物体中的共有成分,具有抗炎、抗氧化、抗血小板聚集等生物活性^[37],从灰茅根中初步推测出可能含有没食子酸、三棱酸、 α -亚麻酸和亚油酸。有机酸在负离子模式下响度较好,根据特征碎片 $-COOH$ 连接的基团不同分为脂肪酸和芳香酸,两者在裂解过程中多丢失 H_2O 和 CO_2 等中性分子^[38]。以化合物 7 为

例,保留时间为 7.38 min,准分子离子峰为 m/z 169.014 25 $[M-H]^-$,推测化学式为 $C_7H_6O_5$,裂解时准分子离子峰丢失 H_2O 、 CO_2 分别得到 m/z 151.005 42 $[M-H-H_2O]^-$ 和 m/z 125.023 74 $[M-CO_2]^-$ 的碎片离子,结合文献^[10]推测此化合物为没食子酸,见图 9。

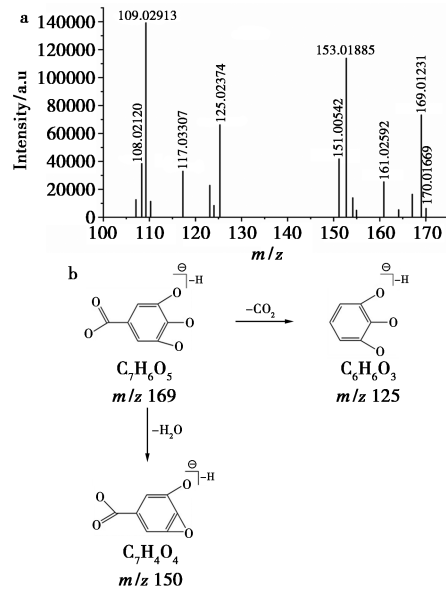


图 9 没食子酸的二级质谱图(a)和可能裂解图(b)

Fig.9 Secondary mass spectrogram (a) and possible fragmentation mechanism (b) of gallic acid

2.6 生物碱类化合物的鉴定分析

生物碱是一类具有碱性的有机化合物,具有复杂的环状结构,在环内大多含有 N,有抗炎、抗病毒和抗肥胖的生物活性^[39]。根据已有的数据库进行对比,推测出灰茅根中可能含有 2 个生物碱,分别为伪马钱子碱和番木鳖次碱。化合物 22 在正离子模式下,保留时间为 14.24 min,准分子离子峰为 m/z 411.176 95 $[M+H]^+$,推测分子式为 $C_{23}H_{26}N_2O_5$,裂解时失去 1 分子 H_2O ,形成 m/z 394.134 09 $[M+H-H_2O]^+$ 的碎片,接着失去 1 分子中性离子碎片得到 m/z 379.145 70 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$ 的碎片离子。结合文献^[24]对比,推测其为伪马钱子碱。

2.7 其他类化合物的鉴定分析

从灰茅根中共推测鉴别出 7 个其他类化合物,包括两个氨基酸类:L-色氨酸、缬氨酸等。氨基酸类是一类既含有氨基又有羧基的化合物,在裂解过程中通常会丢失 H_2O 、 CO 和 $COOH_2$ 等小分子,有时也会丢失 $-NH_3$ ^[25]。以化合物 1 为例,在正离子模式下,保留时间为 1.21 min,准分

子离子峰为 m/z 118.068 13 $[M+H]^+$, 推测化学式为 $C_5H_{11}NO_2$, 裂解时准分子离子峰陆续断裂— $COOH^-$ 和— NH_3^+ 得到 m/z 71.078 41 $[M+H-COOH]^+$ 、 m/z 55.116 47 $[M+H-COOH-NH_3]^+$ 的碎片离子, 结合对照品和文献[4,5]推测其为缬氨酸。

3 结论

在实验的前期, 本课题组对灰茅根供试品的提取和液质条件进行了优化, 包括灰茅根的提取溶剂(水、50% 甲醇、甲醇)、超声时间(30、60 min)、洗脱梯度等。结合实验结果、环境和经济的需求, 最终确定纯甲醇超声提取 30 min, 以 0.1% 甲酸-乙腈为流动相进行梯度洗脱。由于灰茅根化学成分较复杂, 且不同成分在不同条件下响应强度不同, 因此采用正负模式全扫描的形式进行分析。

本研究首次基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对灰茅根中化学成分进行了分析, 共鉴定了 41 种化学成分, 其中萜类 12 个, 醌类 2 个, 有机酸 4 个, 苯丙素类 9 个, 黄酮 5 个, 生物碱 2 个以及其他 7 个。通过结果分析发现灰茅根中萜类、香豆素和黄酮类成分种类较多, 以此推测这 3 类成分可能是灰茅根发挥药效的主要成分。而针对灰茅根中未知化合物, 后续应经修饰转变为具有一定生物活性和药效作用的先导化合物。

本研究通过灵敏、快速的 UPLC-Q-TOF-MS 技术对灰茅根进行分析, 首次系统性预测化学成分, 为今后的药效物质基础与质量控制研究奠定了坚实的物质基础, 也为其质量评价标准提供了科学理论支撑。

参考文献:

- [1] 甘肃省药品监督管理局. 甘肃省中药材标准[S]. 兰州: 兰州大学出版社, 2020.
- [2] 国家中医药管理局《中药材》编委. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 351.
- [3] 佟薇, 江芝婷, 胡坪, 等. LC-MS 方法分析皮肤表面鞘脂的组成[J]. 化学试剂, 2022, **44**(9): 1 368-1 375.
- [4] 罗思妮, 彭致铖, 范倩, 等. 经典名方小承气汤中化学成分的 UPLC-Q-Orbitrap-MS 分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, **27**(23): 1-10.
- [5] 陈剑, 吴昊, 刘润花, 等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术分析乌灵胶囊的化学成分[J]. 中药材, 2022, **45**(3): 639-646.
- [6] SUNSONG R, DU T, ETIM I, et al. Development of a novel UPLC-MS/MS method for the simultaneously quantification of polydatin and resveratrol in plasma: Application to a pharmacokinetic study in rats [J]. *J. Chromatogr.*, 2021, **1** **185**: 123 000.
- [7] 梁红宝, 孙建之, 姜宇珺, 等. 基于 GC-MS 和 UPLC-Q-Exactive MS 技术的首荟通便胶囊质量标志物研究[J]. 中草药, 2022, **53**(21): 6 674-6 685.
- [8] 董萍萍, 张加余, 王红, 等. UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 分析五味消毒饮中化学成分[J]. 中成药, 2022, **44**(11): 3 531-3 540.
- [9] 黄海英, 康俊丽, 余亚辉, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap MS 法分析补肺益肾方的化学成分[J]. 分析测试学报, 2019, **38**(1): 1-13.
- [10] 续艳丽, 李晨曦, 杨飞霞, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术分析经典名方芍药甘草汤的化学成分[J]. 南京中医药大学学报, 2021, **37**(6): 938-948.
- [11] LI Y, MIAO L, GUO R, et al. To explore the regulatory effect of Buyang Huanwu Decoction on cerebral infarction based on quantitative proteomics[J]. *J. Proteomics.*, 2023, **277**: 104 850.
- [12] 陈俊可, 曾锐. 基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 的代谢组学技术对粗茎秦艽不同部位化学成分研究[J]. 中草药, 2018, **49**(10): 2 328-2 335.
- [13] YIN C Y, LIAN Y P, XU J D, et al. Study on network pharmacology of Ginkgo biloba extract against ischaemic stroke mechanism and establishment of UPLC-MS/MS methods for simultaneous determination of 19 main active components [J]. *Phytochem. Anal.*, 2024, **35**(2): 254-270.
- [14] LIANG P, MA Y, YANG L, et al. Uncovering the mechanisms of active components from toad venom against hepatocellular carcinoma using untargeted metabolomics [J]. *Molecules*, 2022, **27**(22): 7 758.
- [15] 马强, 白桦, 王超, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速筛查化妆品中 18 种香豆素类化合物[J]. 分析测试学报, 2014, **33**(3): 248-255.
- [16] 郝庆秀, 康利平, 朱寿东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS^E 技术的彝药满山香的化学成分鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2017, **42**(21): 4 234-4 245.
- [17] LIU H, YANG L, WAN C, et al. Exploring potential mechanism of ciwujia tablets for insomnia by UPLC-Q-TOF-MS/MS, network pharmacology, and experimental validation [J]. *Front. Pharmacol.*, 2022, **13**: 990 996.
- [18] LU X N, ZHENG Y, WEN F, et al. Study of the active ingredients and mechanism of Sparganii rhizoma in gastric cancer based on HPLC-Q-TOF-MS/MS and network

- pharmacology[J].*Sci. Rep.*, 2021, **11**(1): 1 905.
- [19] 王凤云, 韩亮, 宋雨鸿. UPLC/Q-TOF-MS 技术快速鉴定瑶药别旁茶提取物的化学成分[J]. 广东药学院学报, 2016, **32**(1): 55-60.
- [20] 黄琪, 刘琼, 张逢雨, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱结合网络药理学探讨杜仲治疗糖尿病肾病的有效成分[J]. 中国新药与临床杂志, 2021, **40**(6): 460-469.
- [21] 吴瑶, 罗强, 孙翠玲, 等. 小槐花的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2012, **37**(12): 1 788-1 792.
- [22] LV C, LI Q, ZHANG Y, et al. A UFLC-MS/MS method with a switching ionization mode for simultaneous quantitation of polygalaxanthone III, four ginsenosides and tumulosic acid in rat plasma: Application to a comparative pharmacokinetic study in normal and Alzheimer's disease rats[J]. *J. Mass. Spectrom.*, 2013, **48**(8): 904-913.
- [23] 刘建庭, 仇瑜, 卜睿臻, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的痹祺胶囊化学物质组及入血成分的研究[J]. 中草药, 2021, **52**(18): 5 496-5 513.
- [24] 王晓婷, 于颖琦, 高慧. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 探究知母皂苷类成分质谱裂解规律[J]. 中华中医药杂志, 2022, **37**(5): 2 593-2 597.
- [25] 孟祎, 赵伊君, 薛志鹏, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的柳叶鼠李化学成分分析[J]. 中南药学, 2024, **22**(1): 78-85.
- [26] 韩柳, 王翠竹, 董庆海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS^E 技术的银花泌炎灵片提取液全成分分析[J]. 吉林医药学院学报, 2022, **43**(2): 81-84.
- [27] 李景华, 许笑笑, 赵炎葱, 等. 穿心莲二萜内酯有效部位化学成分的液质联用法鉴定及其初步药效学研究[J]. 中国中药杂志, 2014, **39**(23): 4 642-4 646.
- [28] 李金花, 杨贤英, 张翔, 等. 姜黄抑制神经氨酸酶活性及活性部位化学成分研究[J]. 中药材, 2017, **40**(12): 2 859-2 863.
- [29] 吴福林, 王翠竹, 董庆海, 等. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合 UNIFI 数据库快速分析止痛化癥胶囊的化学成分[J]. 中国药房, 2019, **30**(17): 2 336-2 342.
- [30] LIU M, LIU Z, DONG Z, et al. Identification of sanguinarine Metabolites in rats using UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *Molecules*, 2023, **28**: 22.
- [31] 郭晓敏, 程捷恺, 张明, 等. UHPLC/MSⁿ 质谱树技术与 Q/TOF 联用在利舒康胶囊成分鉴定中的应用[J]. 中草药, 2017, **48**(10): 1 944-1 956.
- [32] 陆玉婷, 李济顺, 卓燊, 等. 泡桐叶化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物预测分析[J]. 中成药, 2023, **45**(9): 2 997-3 008.
- [33] 许如玲, 范君婷, 董惠敏, 等. 经典名方黄芪桂枝五物汤标准煎液化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析[J]. 中国中药杂志, 2020, **45**(23): 5 614-5 630.
- [34] 顿珠次仁, 邓敏芝, 朱根华, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术快速分析裂叶独活中香豆素类成分[J]. 中药新药与临床药理, 2022, **33**(1): 105-114.
- [35] 陈美庆, 朱卫丰, 管咏梅, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析葛根配方颗粒的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, **29**(19): 176-186.
- [36] JIANG X, ZHOU L, ZUO L, et al. Pharmacokinetics and metabolism research of shenkang injection in rats based on UHPLC-MS/MS and UHPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. *Drug Des. Devel. Ther.*, 2020, **14**: 1 837-1 850.
- [37] SHI M, HUANG F F, DENG C P, et al. Bioactivities, biosynthesis and biotechnological production of phenolic acids in salvia miltiorrhiza[J]. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2019, **59**(6): 953.
- [38] 朱赞斐, 谭善忠, 王洪兰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的益气健脾颗粒化学成分分析[J]. 中草药, 2022, **53**(12): 3 601-3 613.
- [39] GAO K, ZHENG C, WANG T, et al. 1-Deoxyojirimycin: Occurrence, extraction, chemistry, oral pharmacokinetics, biological activities and in silico target fishing[J]. *Molecules*, 2016, **21**(11): 1 600.