

UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 法鉴定白花蛇舌草注射液中化学成分

苏延旭¹, 覃静华², 陶林¹, 廖作庄¹, 于楠楠¹, 苏志恒², 宋慧², 罗秀^{3*}

1. 广西医科大学第二附属医院, 广西 南宁 530007

2. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021

3. 广西壮族自治区民族医院/广西医科大学附属民族医院, 广西 南宁 530007

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱联用技术(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)辨别分析白花蛇舌草注射液中化学成分。**方法** 采用 Waters Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 以 0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 体积流量 0.30 mL/min, 样品室温度 10 ℃, 进样体积 10 μL。采用电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式下采集数据。通过 NIST 质谱数据库检索, 结合保留时间、分子离子、主要碎片, 并根据文献资料, 推测其化学成分。**结果** 白花蛇舌草注射液中共鉴定出 22 个化合物, 其中包括黄酮类 7 个、有机酸类 7 个、糖类 3 个、萜类 2 个、嘌呤 2 个、丁香脂素和酚苷各 1 个。**结论** 建立的方法能快速、准确、高效鉴定白花蛇舌草注射液中多种化学成分, 为阐明白花蛇舌草的药效物质基础提供参考。

关键词: 白花蛇舌草注射液; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; 化学成分; 黄酮; 有机酸

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)02-0281-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.02.008

Chemical constituents in Baihuasheshecao Injection by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

SU Yan-xu¹, QIN Jing-hua², TAO Lin¹, LIAO Zuo-zhuang¹, YU Nan-nan¹, SU Zhi-heng², SONG Hui², LUO Xiu³

1. The Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China

2. Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

3. Guangxi Zhuang Autonomous Region National Hospital / National Hospital Affiliated of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China

Abstract: **Objective** To analyze chemical constituents in Baihuasheshecao Injection by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS. **Methods** The separation was performed on Waters Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm). The mobile phase was 0.1% formic acid water - acetonitrile for gradient elution. The column temperature was 30 ℃, flow rate was 0.30 mL/min, the sample room temperature was 10 ℃, and the injection volume was 10 μL. Electron spray ionization (ESI) source was adopted with both positive and negative ion modes. The chemical constituents were analyzed based on NIST mass spectrometry library, the retention time, and fragment ion peak of the compounds, as well as comparison with literature data. **Results** 22 Chemical constituents in Baihuasheshecao Injection were identified, including 7 flavonoids, 7 organic acids, 3 sugars, 2 terpenoids, 2 purines, 1 eugenin, and 1 phenolic glycoside. **Conclusion** The established method can quickly, accurately, and efficiently identify various components in Baihuasheshecao Injection, and provided a reference for elucidating the pharmacodynamic material basis of *Hedyotis diffusa*.

Key words: Baihuasheshecao Injection; UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS; chemical constituent; flavonoid; organic acid

白花蛇舌草 *Hedyotis diffusa* Willd 为茜草科耳草属植物全草, 始载于《广西中药志》, 主产于我国江南、两广地区, 入胃、小肠、大肠经, 具有清热解毒、利尿消肿、活血止痛的功效, 是目前最常

用的抗肿瘤中药之一^[1]。白花蛇舌草注射液为白花蛇舌草无菌水溶液, 临床上常用于呼吸道感染、扁桃体炎、肺炎、胆囊炎、阑尾炎、疔疮脓肿、手术后感染以及抗肿瘤治疗。目前关于白花蛇舌草中化

收稿日期: 2021-11-24

基金项目: 广西卫健委自筹经费科研课题(Z20181009); 广西中药局自筹经费科研课题(GZZC2019034)

作者简介: 苏延旭(1987—), 副主任药师, 硕士, 从事中药活性成分研究。E-mail: suyaxu1798@163.com

*通信作者: 罗秀(1985—), 女, 副主任药师, 硕士, 研究方向为临床药学。E-mail: luoxiuc310@163.com

学成分研究的报道较多,但对其临床使用的产品制剂中成分鉴定的研究较少报道。因此,通过对白花蛇舌草注射液中化学成分研究,对白花蛇舌草及其制剂的开发利用具有积极意义。超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)是近几年发展起来的新型液质联用技术,技术结合了超高效液相色谱和高分辨质谱各自的优点,具有分辨率高、质量精度好、定性和定量能力强等特点,能够对复杂的化学组分进行快速分离、检测和结构鉴定,已成为中药化学成分研究的有效手段之一^[2]。本研究对白花蛇舌草注射液进行 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 分析,获取样品中各化合物离子的质荷比,再通过自建化学成分数据库对比,结合保留时间、二级质谱信息和相关文献,对白花蛇舌草注射液中化学成分进行快速分析和辨别。

1 仪器与材料

Q-Exactive Focus 高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),Thermo Fisher UltiMate 3000 超高效液相色谱仪(包括在线脱气机、二元梯度泵、柱温箱、自动进样器)。

甲醇(色谱纯)购自成都市诺尔施科技有限责任公司,批号 2018120901;乙腈(色谱纯)购自 Damas-beta,批号 P1596048。白花蛇舌草注射液由吉林省通化振国药业有限公司提供,规格 2 mL/支,产品批号 201102。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

精密量取白花蛇舌草注射液 1.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加 50%甲醇稀释至刻度,摇匀,0.22 μ m 微孔滤膜滤过,备用。

2.2 色谱条件

Waters Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m),以 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~2 min, 10% B; 2~10 min, 10%~50% B; 10~25 min, 50%~100% B; 25~45 min, 100%~1% B),柱温 30 $^{\circ}$ C,体积流量 0.30 mL/min,样品室温度 10 $^{\circ}$ C,进样体积 10 μ L。

2.3 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),扫描方式采用正、负离子 Full MS 模式,分辨率 7 万 FWHM,喷雾电压 2.80 kV,辅助气体流量 10 arb,辅助气温度

350 $^{\circ}$ C,离子传输管温度 320 $^{\circ}$ C,鞘气体积流量 40 arb;扫描范围 m/z 100~1 200。

2.4 成分鉴定

UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 分析进程结束后,得到白花蛇舌草注射液中各化学成分的保留好时间和质谱信息,正、负离子模式下质谱基峰图见图 1。通过 NIST 质谱数据库检索,结合保留时间、分子离子、主要碎片,以及对比文献资料,共鉴定出 22 个化合物,见表 1。

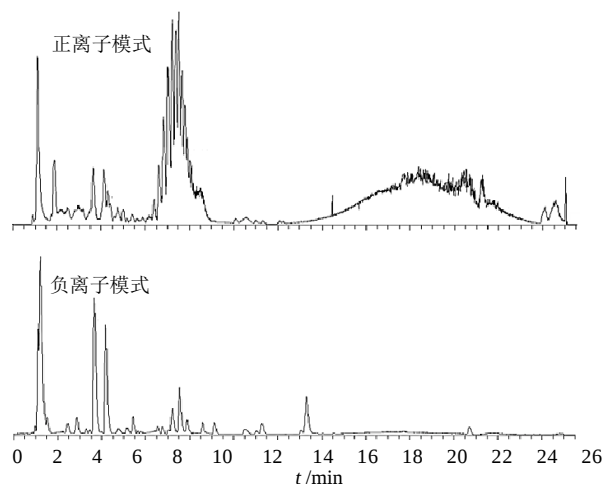


图 1 白花蛇舌草注射液的正、负离子模式基峰离子流图
Fig. 1 Base peak ion chromatograms of Baihuasheshecao Injection in positive and negative models

以松三糖、反式咖啡酸为例,根据文献和质谱裂解特征,鉴定化学成分。保留时间(t_R)为 1.21 min 的峰在 ESI 正离子模式下得到 m/z 527 的离子峰,通过文献报道^[3-4]和网站 Chemical Book (<https://www.chemicalbook.com/ProductIndex.aspx>)可知松三糖相对分子质量为 504,推测 m/z 527 为其准分子离子峰,对 m/z 527 进行 MS² 分析,分别为 m/z 365 [C₁₂H₂₂O₁₁Na⁺]、203 [C₆H₁₂O₆Na⁺]等碎片峰,见图 2。根据元素组成分析,该化合物分子式为 C₁₈H₃₂O₁₆,相对分子质量的理论值为 527.158 3,实测值为 527.157 6,据此推测该化合物为松三糖。

t_R 为 6.55 min 的峰在 ESI 负离子模式下得到 m/z 179 的离子峰,文献报道白花蛇舌草中存在的反式咖啡酸的相对分子质量为 180^[5],推测 m/z 179 为其准分子离子峰,对 m/z 179 进行 MS² 分析,主要有 89 [M-C₈H₇O₂]⁻碎片峰,见图 3。根据元素组成分析,该化合物的分子式为 C₉H₈O₄,相对分子质量的理论值为 179.035 0,实测值为 179.034 1,据此推测该化合物为反式咖啡酸。

表 1 白花蛇舌草注射液中化学成分鉴定结果

Table 1 Identification of chemical constituents in Baihuasheshecao Injection

序号	t_R/min	化合物	分子式	离子类型	测得值	理论值	离子碎片
1	1.21	松三糖	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	527.157 6	527.158 3	527.158 4、365.104 2、203.052 7
2	1.21	麦芽三糖	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	527.157 7	527.158 3	527.158 4、467.126 7、365.104 2、203.051 7
3	1.88	腺嘌呤	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	136.0617	136.0618	119.035 3、92.024 8、65.014 2
4	3.12	黄嘌呤	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	153.040 2	153.0407	55.029 9、81.008 8、110.035 1
5	5.61	反式阿魏酸	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	195.064 6	195.0652	134.036 0、117.033 4、89.039 1
6	6.75	槲皮素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	303.049 0	303.0499	153.018 0、229.049 2
7	7.09	槲皮素-3-鼠李糖苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	449.106 3	449.107 8	287.054 2、85.028 6
8	7.10	山柰酚	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	287.054 9	287.055 0	153.018 0、213.054 4
9	7.52	反式香豆酸	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	165.054 2	165.054 6	119.048 9、118.041 3、105.045 1、91.054 7、75.023 3
10	1.23	帕拉金糖	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	341.108 9	341.108 3	119.033 0、113.022 9、89.022 9、85.027 9、59.012 3
11	4.54	physangulose A	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	475.146 1	475.145 7	221.065 0、161.043 9、151.038 2、143.034 7
12	4.68	龙胆酸 5-O-葡萄糖苷	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	315.071 6	315.072 2	152.010 2、108.020 1
13	4.75	京尼平苷酸	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	373.113 7	373.114 0	59.012 2、123.043 8
14	4.82	羟异梔子苷	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	403.125 2	403.124 6	127.038 5
15	5.31	4-O-D-吡喃葡萄糖基-对香豆酸	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_8$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	371.098 5	371.098 3	163.038 9、119.048 7
16	6.04	奎宁酸衍生物	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.087 4	353.087 8	191.054 7、135.043 8
17	6.55	反式咖啡酸	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	179.034 1	179.035 0	89.038 0、135.044 9
18	6.74	丁香脂素二葡萄糖苷	$\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_{18}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	787.269 1	787.266 6	417.153 4、181.049 4
19	6.76	槲皮素-3,4'-二葡萄糖糖苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	625.139 8	625.141 0	65.140 1、463.083 0、300.025 5
20	7.05	3-阿拉伯糖葡萄糖基槲皮素	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	595.130 6	595.130 5	300.025 4、271.024 8、255.028 8
21	7.11	山柰酚 3-O-槐糖苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	609.146 7	609.146 1	284.032 0、609.147 2
22	8.35	灯盏花甲素	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	445.076 8	445.077 6	269.045 7、85.027 9

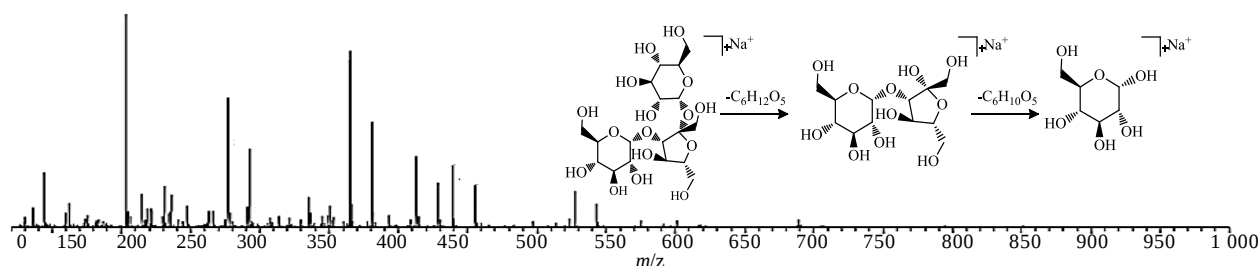
图 2 松三糖的 MS² 图和可能的裂解途径

Fig. 2 Secondary mass spectrum and proposed fragmentation pathway of melezitose

3 讨论

白花蛇舌草中的成分复杂,已报道的化合物多达 171 种,包括萜类、黄酮类化合物、多糖类、萜类、酚类、挥发油等化合物,萜类、多糖类、黄

酮类化合物是其主要的抗肿瘤成分^[6-7]。UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术具有分辨率高、质量精度高、定性和定量能力强等特点,可以在没有对照品的情况下对复杂的中药化学组分进行快速地分离、

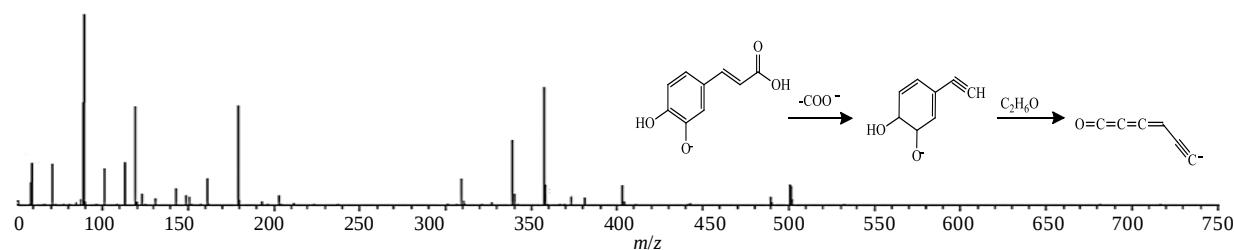
图 3 反式咖啡酸的 MS² 图和裂解规律

Fig. 3 Secondary mass spectrum and proposed fragmentation pathway of trans-caffeic acid

检测和结构鉴定,有效降低了化合物的含量低、提取过程中的成分破坏和丢失对检测的影响^[2]。

为了更大程度地推测和鉴定白花蛇舌草注射液中化合物的种类和数量,本实验采用 UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 在正、负 ESI 电离模式对白花蛇舌草注射液进行全扫描,通过 NIST 标准质谱图进行检索,并结合保留时间、分子离子、主要碎片和文献资料对比,共鉴定出 22 个化合物,包含黄酮、有机酸、糖类、萜类、酚苷等,与文献报道的白花蛇舌草中所含活性成分一致^[8-9]。白花蛇舌草中多酚类、黄酮类和有机酸类成分有改变氧化态烯醇式和酮式官能团互变异构的化学特征,抗氧化活性成分的存在,降低了化疗药物对机体的不良反应,并具有抗肿瘤作用^[10]。白花蛇舌草中的多糖、寡肽和对香豆酸等活性成分可有效抑制肿瘤细胞的生长,并提升免疫机能,而起到抗肿瘤的功效;香豆酸组合物 (TCHDW) 可抑制急性髓系白血病 Kasumi-1 细胞株的生长^[11-12]。本实验通过对白花蛇舌草注射液中化学成分鉴定,有助于了解其中药效物质基础,为进一步研究其药理作用和临床应用开发提供依据。

由于白花蛇舌草中化学成分复杂多样,不同产地药材、不同提取方法、不同制剂工艺和不同检测条件的结果可能存在较大的差异,故本研究结果具有一定的局限性。此外,对于白花蛇舌草中结构非常相近的同分异构体的分辨还存在一定的困难,一些质谱峰在数据库中并没有找到相应的化合物,有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李梓盟, 张佳彦, 李菲, 等. 白花蛇舌草抗肿瘤化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2021, 38(2): 74-79.
- [2] 曾彬, 刘红梅, 刘晓梅, 等. UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术在中药分析中的应用 [J]. 中药材, 2020, 43(9): 2313-2319.
- [3] 曹玲华, 刘育亭, 孙关中. 松三糖衍生物的快原子轰击质谱分析 [J]. 分析化学, 2002(2): 249.
- [4] 木全章, 陆健荣. 云南松叶分泌物的化学成分 [J]. 植物学报, 1984, 26(5): 552-553.
- [5] 李方丽. 白花蛇舌草化学成分及其体外抗肿瘤活性研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.
- [6] Hu C J, He J, Li G Z, et al. Analyzing *Hedyotis diffusa* mechanisms of action from the genomics perspective [J]. *Comput Methods Programs Biomed*, 2019, 174: 1-8.
- [7] 邹香妮, 闫珺. 白花蛇舌草抗肿瘤化学成分及作用机制研究进展 [J]. 化学工程师, 2020, 34(3): 47-49.
- [8] 于亮, 王芳, 郭琪, 等. 白花蛇舌草的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2017, 34(12): 1104-1114.
- [9] Han X, Zhang X, Wang Q, et al. Antitumor potential of *Hedyotis diffusa* Willd: A systematic review of bioactive constituents and underlying molecular mechanisms [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110735.
- [10] 丁小媛. 白花蛇舌草等中药有效成分的分离与分析 [D]. 聊城: 聊城大学, 2015.
- [11] 车宏伟, 杨海宁, 谭晓川, 等. 白花蛇舌草不同提取部位抗肿瘤作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(3): 191-193.
- [12] 陈智, 林圣云, 蒋剑平, 等. 白花蛇舌草对香豆酸组合物对急性髓系白血病细胞 Kasumi-1 生长抑制作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(9): 1089-1094.

[责任编辑 解学星]