

UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析粗茎秦艽化学成分

王长生¹, 董红娇¹, 包雅婷¹, 陈晓虎², 海 洋¹, 曾 锐^{1*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

2. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121

摘 要: **目的** 利用 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术, 对粗茎秦艽块根中的化学成分快速识别和鉴定。**方法** 以 100% 甲醇作为提取液制备供试液, 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 分离, 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 质谱采用正负离子监测模式、全扫描及自动触发二级质谱扫描的功能, 快速识别和鉴定粗茎秦艽中的化学成分。**结果** 通过高分辨数据共鉴定 34 个化学成分, 包括环烯醚萜类 13 个、黄酮类 5 个、酯类 5 个、三萜类 3 个、有机酸类 2 个、苯丙素类 1 个、其他类 5 个, 其中 12 个成分经与对照品比对而准确鉴定, 15 个化学成分为首次从该植物中分得。**结论** UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术可以快速鉴定粗茎秦艽中的化学成分, 为粗茎秦艽化学成分的提取分离及其药效物质基础提供科学依据。

关键词: 粗茎秦艽; UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 环烯醚萜类; 黄酮类; 三萜类

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)18-3175-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.006

Rapid analysis on chemical constituents from roots of *Gentiana crasicaulis* by ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry

WANG Chang-sheng¹, DONG Hong-jiao¹, BAO Ya-ting¹, CHEN Xiao-hu², HAI Yang¹, ZENG Rui¹

1. School of Pharmacy, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China

Abstract: **Objective** An ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry (UPLC- hybrid quadrupole-orbitrap MS) method was developed to rapidly analyze and identify the chemical constituents from the roots of *Gentiana crasicaulis*. **Methods** The 100% methanol extract was separated on an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm ×, 2.1 mm, 1.7 μm), and eluted with a gradient of methanol-water containing 0.1% formic acid. Constituents in the roots of *G. crasicaulis* were identified by HRMS in the positive and negative ion modes using both full scan and two-stage threshold-triggered mass modes. **Results** A total of 34 compounds, including 13 iridoids, 5 flavonoids, 5 esters, 3 triterpenoids, 2 organic acids, 1 phenylpropanoid, and 5 others compounds were identified. Among them, 12 compounds were unambiguously identified by comparing with reference standards. Fifteen compositions were reported for the first time in the roots of *G. crasicaulis*. **Conclusion** Chemical constituents in the roots of *G. crasicaulis* were identified fast with UPLC-Q-Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer technology to provide the scientific basis for the study on the material basis of the separation and crasicaulis chemical constituents.

Key words: roots of *Gentiana crasicaulis*; UPLC-hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry; iridoids; flavonoids; triterpenoids

粗茎秦艽为龙胆科 (Gentianaceae) 植物 *Gentiana crasicaulis* Duthie ex Burk. 的干燥根, 秦艽是中国重要的传统中药之一, 始载于《神农本草经》, 列为中品, “秦艽主寒热邪气, 寒湿风痹, 肢节痛、下水、

收稿日期: 2016-03-01

基金项目: 国家留学基金委青年骨干教师出国研修项目 (CSC201500850007); 四川省科技支撑计划 (2014SZ0131); 四川省科技厅基础研究项目 (2015JY0009); 西南民族大学研究生创新型科研项目 (CX2015SZ033); 西南民族大学大学生创新训练项目 (X201610656298)

作者简介: 王长生 (1992—), 硕士研究生。Tel: (028)85522099 E-mail: changsheng028@126.com

***通信作者** 曾 锐, 副教授, 主要从事药物制剂及民族药研究。Tel: (028)85522099 E-mail: mackzeng@gmail.com

利小便”。其具有祛风湿、清湿热、止痹痛和退虚热功效^[1]，主要用于治疗风湿痹痛、中风半身不遂、筋脉拘挛、骨节酸痛、湿热黄疸、骨蒸潮热、小儿疳积发热。现代药理研究表明其具有保肝、抗炎、抗菌和镇痛效果^[2]，在心血管系统、内分泌系统具有明显的药理作用^[2-3]。秦艽中主要含环烯醚萜苷类、黄酮类和三萜类等化合物^[4-5]。曾锐等^[6]用 HPLC 法同时测定秦艽中 5 个活性成分，建立了对 17 批次秦艽样品聚类分析快速鉴别的方法；吴靳荣等^[7]用 HPLC 法对秦艽和习用品中 5 种环烯醚萜类成分进行定量测定的方法研究；李雨蔚等^[7]分别对藏药秦艽花的化学成分进行系统研究；李荣娇等^[8]采用 HPLC 法对西藏秦艽花与川西秦艽花中 7 种主要化学成分的量进行测定。但使用高通量分辨质谱联用技术对秦艽中粗茎秦艽的多组分化合物的快速识别研究较少。本实验采用 UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术快速识别和鉴定了粗茎秦艽中 34 个化合物，包括环烯醚萜类 13 个、黄酮类 5 个、酯类 5 个、三萜类 3 个、有机酸类 2 个、苯丙素类 1 个、其他类 5 个，其中 15 个化合物为首次从该植物中分得，为粗茎秦艽的进一步研究提供物质基础。

UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱具有高选择性四极杆的离子过滤与 Orbitrap 高分辨准确质量数 (HR/AM) 测量技术，采用全扫描和正负离子切换模式进行测定，通过提取一级质谱的精确质量数进行定性和定量，自动触发二级全扫描质谱进一步提高定性的准确性，进行高通量的目标物或非目标物筛选^[9]。为进一步研究粗茎秦艽的化学成分及活性筛选奠定基础。

1 仪器与材料

UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技公司,美国); Ultimate 3000 超高效液相色谱系统(戴安公司,美国); ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 沃特世科技有限公司,美国); HX-200 型高速中药粉碎机(浙江省永康市溪岸五金药具厂); 三号筛(355±13 μm, 50 目); ESJ200-4 万分之一电子天平(沈阳龙腾电子有限公司); BT25S 十万分之一电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司); KQ5200E 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

色谱纯甲醇(默克公司,美国)、色谱纯甲酸(西格玛奥德里奇,美国)均为 LC-MS 级,水为纯净水(Milli-Q SP Regent Water system,美国),分析

纯甲醇(质量分数≥99.5%)。龙胆苦苷(批号 110902)、槲皮素(批号 110627)、阿魏酸(批号 111020)购于四川省维克奇生物科技有限公司;马钱苷酸(批号 121220)、獐牙菜苷(批号 130401)、獐牙菜苦苷(批号 130402)、山梔苷甲酯(批号 120906)、异牡荆黄素(批号 151117)、异荭草苷(批号 111974 -201401)、山柰酚(批号 120718)购于成都普菲德生物技术有限公司;蔗糖(批号 110833-200904)、柠檬酸(批号 111679-200401)购于中国食品药品检定研究院,12 种对照品质量分数均≥98%。

粗茎秦艽于 2015 年 9 月采自四川省阿坝州黑水县。经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所黄林芳教授鉴定为粗茎秦艽 *Gentiana crasicaulis* Duthie ex Burk. 的根。

2 方法

2.1 供试品的制备

称取粉碎的粗茎秦艽粉末(过 3 号筛)0.5 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,称定质量,超声处理(功率 500 W,频率 40 kHz)30 min,放冷,用甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,进样前用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苷、獐牙菜苦苷、山梔苷甲酯、异牡荆黄素、异荭草苷、槲皮素、阿魏酸、山柰酚、柠檬酸和蔗糖对照品适量,加甲醇超声溶解、定容至 5 mL,分别制成浓度为 8.6、7.0、8.6、9.0、6.8、6.1、6.2、6.9、6.9、6.9、7.1 和 10.1 μg/mL 的对照品溶液。置于 4 ℃冰箱中避光保存备用,进样前用 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.3 色谱条件和质谱条件

色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B),洗脱梯度:(0~2 min, 5% A; 2~20 min, 5%~12% A; 20~35 min, 12%~40% A; 35~38 min, 40% A; 38~48 min, 40%~80% A; 48~50 min, 80% A; 50~51 min, 80%~5% A; 51~55 min, 5% A);体积流量 0.3 mL/min,进样室温度 10 ℃,柱温 35 ℃;进样量 2 μL。

质谱条件:离子源为 HESI 源,正负离子检测模式,鞘气压力 206.84 kPa;辅助气体积流量 8 L/min;喷雾电压 2.00 kV;离子传输管温度 320 ℃;辅助气温度 350 ℃;扫描模式:Full MS/dd-MS²,

Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500, 扫描范围 m/z 100~1 200。MS/MS 模式时,碰撞能为40 eV。

3 化合物质谱分析

使用 Xcalibur 3.0 软件(赛默飞科技有限公司,美国)对粗茎秦艽块根的甲醇溶液进行质谱数据分析,通过高分辨率质谱信息推导其可能的分子式,质谱偏差范围 $\delta \leq 3 \times 10^{-6}$ 。

通过龙胆属植物 Xcms 数据库、化学专业数据

库和相关文献检索和中药的潜在目标数据库(<http://tcm.zju.edu.cn>)对目标化合物进行鉴定和确证。结合化合物的一级、二级质谱及裂解规律进行分析和鉴别。粗茎秦艽(-) ESI-MS 和 (+) ESI-MS 的质谱基峰离子流图见图 1,已鉴定的各化学成分的保留时间、质谱信息以及相关文献数据见表 1。

3.1 环烯醚萜苷类化合物的鉴定

吴靳荣等^[5]利用 HPLC 法同时测定秦艽及习用

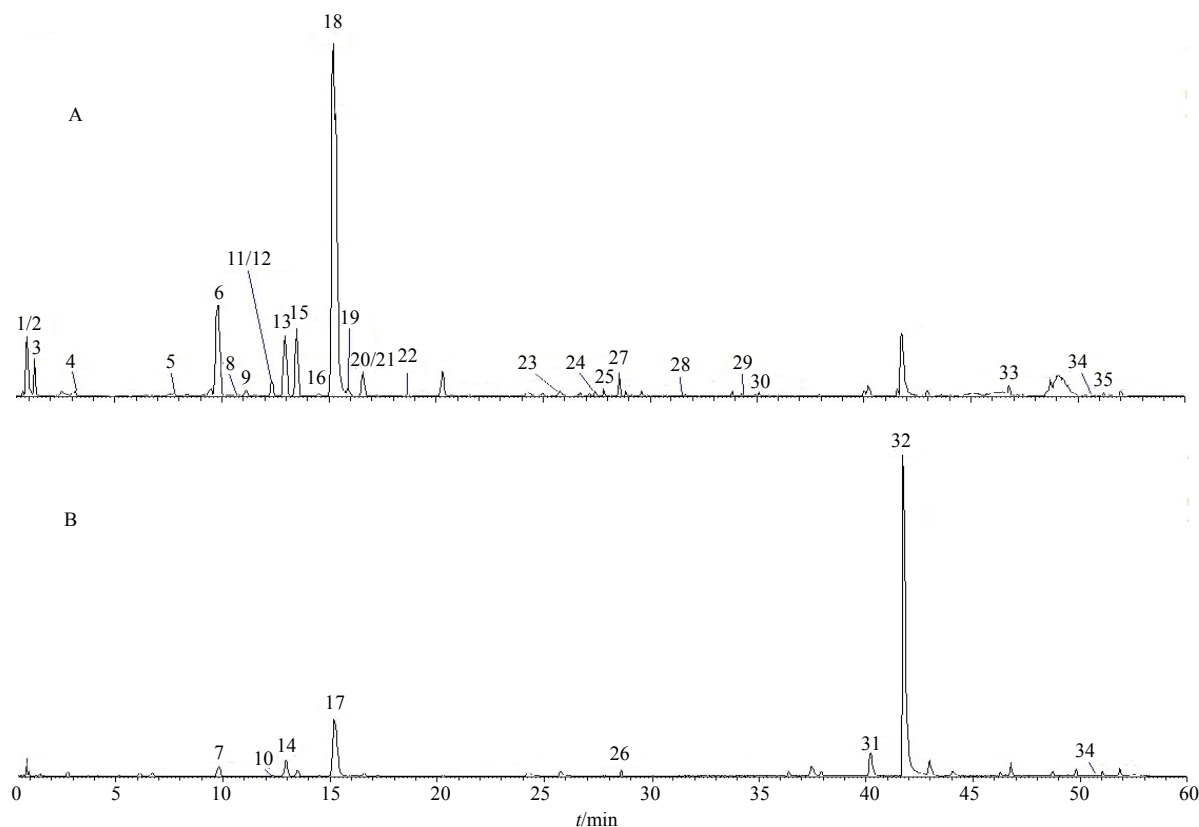


图 1 粗茎秦艽 UPLC-Q-Exactive MS 的负离子 (A) 和正离子 (B) 质谱基峰离子流图

Fig. 1 Negative (A) and positive (B) UPLC-Q-Exactive MS base peak ion flow chart roots of *G. crasicaulis*

表 1 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱对粗茎秦艽中化学成分的鉴定分析

Table 1 Characterization of chemical constituents in roots of *G. crasicaulis* by UPLC- hybrid quadrupole-orbitrap MS

峰号	离子模式	t_R /min		相对分子质量		分子式	偏差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片 (m/z)	化合物
		样品	对照品	实测值	理论值				
1 [*]	-	0.89	0.89	342.116 0	342.115 6	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	1.812	179.055 1, 161.044 4, 149.044 1, 131.033 8, 119.033 2, 113.022 3, 71.012 4	蔗糖 ^[7]
2 [#]	-	0.89		388.122 6	388.136 0	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	-0.398	341.109 6, 179.055 9, 161.044 2, 119.033 3, 89.022 1, 59.012 6	swertiajaposide A ^[4]
3 [#]	-	1.28	1.30	192.026 1	192.026 5	C ₆ H ₈ O ₇	0.201	173.008 3, 154.997 7, 147.028 2, 129.018 1, 87.007 3, 67.017 2, 59.012 3	柠檬酸
4 [#]	-	3.71		170.093 9	170.093 5	C ₉ H ₁₄ O ₃	0.089	151.074 9, 123.080 8, 95.048 0, 81.033 1, 57.032 1	isoboonein ^[4]
5 [*]	-	7.76	7.75	406.147 1	406.381 4	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	1.139	195.325 0, 179.055 1, 119.033 8, 113.022 3, 89.022 1, 71.012 4, 59.012 7	山梔苷甲酯 ^[6]
6 [*]	-	9.80	9.80	376.136 5	376.136 0	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	1.097	213.076 4, 169.086 0, 161.044 3, 151.075 6, 133.064 7, 89.022 2, 59.012 6	马钱苷酸 ^[10]

续表 1

峰号	离子 模式	t _R /min		相对分子质量		分子式	偏差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片 (<i>m/z</i>)		化合物
		样品	对照品	实测值	理论值					
7 [#]	+	9.86		398.118 5	398.157 3	C ₁₉ H ₂₆ O ₉	-1.619	381.112 5, 277.360 9, 237.073 4, 203.052 4, 179.016 5, 149.943 0, 59.142 7		大叶苷 C ^[4]
8 [#]	-	10.46		406.147 4	406.146 6	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	1.242	343.832 3, 195.325 0, 179.055 1, 161.044 1, 149.044 3, 89.022 1, 59.012 7		莫诺昔 ^[3]
9 [#]	-	10.82		538.190 3	538.189 2	C ₂₂ H ₃₄ O ₁₅	2.213	375.131 3, 357.119 9, 213.076 1, 169.086 1, 113.023 3, 101.022 7, 59.012 5		loganic acid 11- <i>O</i> - β -glucopyranosyl ester ^[11]
10	+	12.31		192.042 2	192.041 1	C ₁₀ H ₈ O ₄	2.703	178.077 0, 175.038 6, 165.054 9, 161.059 4, 151.038 7, 133.064 7, 91.054 1		东莨菪素 ^[12]
11 [#]	-	12.32		390.114 2	390.115 6	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	1.442	345.118 3, 283.259 5, 209.044 2, 183.065 2, 165.054 0, 121.064 5, 59.012 7		secologanoside ^[4]
12 [#]	-	12.32		346.126 1	346.125 3	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	1.221	311.473 2, 195.801 9, 165.054 1, 121.064 6, 113.022 0, 89.023 7, 59.012 5		swertiajaposide B ^[4]
13 [*]	-	12.93	12.97	374.121 0	374.120 5	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	1.397	194.299 5, 165.054 4, 149.059 4, 141.018 6, 119.033 3, 113.023 9, 59.012 6		獐牙菜苦昔 ^[13]
14	+	12.95		176.047 6	176.046 0	C ₁₀ H ₈ O ₃	-0.131	147.043 3, 131.049 4, 121.064 0, 119.049 0, 103.054 2, 91.054 5, 79.054 0		红白金花内酯 ^[4,10]
15	-	13.52		518.163 5	518.163 1	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄	0.068	221.066 9, 193.049 3, 179.055 1, 161.044 9, 131.033 3, 119.033 3, 89.022 0		6'- <i>O</i> - β -D-葡萄糖基龙胆苦昔 ^[4]
16 [#]	-	14.54		520.179 3	520.178 6	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₄	1.718	365.810 5, 221.066 1, 179.054 6, 151.075 39, 113.022 7, 89.022 5, 59.012 7		紫药苦昔 ^[4]
17 [*]	+	15.18	15.19	194.057 5	194.057 6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-0.255	177.054 7, 149.069 5, 131.049 5, 121.064 3, 93.070 0, 79.054 9, 71.013 4		阿魏酸 ^[4,12]
18 [*]	-	15.20	15.20	356.111 1	356.110 8	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	1.371	177.054 9, 149.059 5, 145.064 1, 121.064 6, 113.023 3, 93.033 3, 89.022 3		龙胆苦昔 ^[12-13]
19 [#]	-	15.88		492.164 5	492.162 1	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₁	2.285	455.171 8, 221.066 0, 179.055 2, 161.044 6, 131.033 1, 119.033 5, 59.012 7		大叶苷 A ^[4]
20 [#]	-	16.58		404.132 3	404.131 1	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	1.392	339.003 8, 195.065 9, 125.023 5, 119.033 2, 101.022 7, 81.033 7, 59.012 4		gentiascabraseide A ^[3]
21 [*]	-	16.59	16.54	358.126 9	358.125 3	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	0.011	282.830 2, 197.080 2, 179.070 4, 167.070 9, 151.075 3, 127.038 2, 105.070 7		獐牙菜昔 ^[7,12]
22	-	18.59		594.158	594.157 2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	0.724	557.132 1, 473.109 0, 431.097 2, 341.066 9, 311.056 5, 282.053 8, 117.032 1		皂草黄昔 ^[7]
23 [*]	-	25.95	25.90	432.105 4	432.105	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1.387	341.067 5, 311.056 0, 283.061 9, 269.045 6, 239.071 4, 163.039 5, 117.033 1		异牡荆黄素 ^[7]
24	-	27.30		520.195 1	520.193 1	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	1.842	357.134 2, 342.111 2, 257.391 7, 151.038 1, 113.023 6, 85.027 3, 71.012 3		6'- <i>O</i> - β -D-葡萄糖基獐牙菜昔 ^[13]
25 [*]	-	27.78	27.78	448.100 5	448.100 1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1.382	285.070 4, 257.046 1, 241.051 9, 193.013 3, 177.018 7, 151.002 0, 133.028 1		异荛草昔 ^[4]
26	+	28.53		234.088 4	234.088 6	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	-0.365	217.085 7, 189.090 4, 174.067 3, 159.080 4, 145.064 3, 129.069 2, 91.054 9		2-methoxyanofinic acid ^[12]
27	-	28.55		558.195 3	558.194 1	C ₂₅ H ₃₄ O ₁₄	1.388	233.081 3, 189.081 5, 161.096 8, 119.033 4, 101.022 4, 89.022 7, 59.012 7		大叶苷 D ^[4]
28 [#]	-	31.85	31.83	302.043 9	302.042	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	2.431	151.002 1, 193.013 3, 176.953 6, 149.023 5, 92.043 0, 80.023 8		槲皮素 ^[11]
29 [#]	-	34.02	34.02	286.047 4	286.047 9	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	1.196	257.045 5, 229.050 8, 169.014 3, 159.007 4, 151.002 1, 108.020 7, 83.012 3		山柰酚 ^[12]
30	-	35.25		532.156 1	532.157 3	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	-0.773	460.345 2, 315.073 2, 297.057 6, 189.090 6, 153.018 1, 109.028 8, 85.156 9		gentimacroside ^[10]
31	+	40.19		335.222 3	335.221 9	C ₂₀ H ₃₁ O ₄	-0.201	244.974 1, 184.073 0, 173.059 8, 143.010 0, 124.999 2, 104.107 0, 71.073 9		未知

续表 1

峰号	离子 模式	t_R/min		相对分子质量		分子式	偏差 ($\times 10^{-6}$)	二级碎片 (m/z)	化合物
		样品	对照品	实测值	理论值				
32	+	41.75		336.230 6	336.229 1	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_4$	-0.036	294.184 3, 262.078 6, 184.073 7, 143.010 7, 124.999 4, 104.107 2, 71.073 4	未知
33 [#]	-	46.88		471.348 9	471.347 3	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$	1.504	471.348 9, 439.761 9, 393.787 8, 242.494 8, 125.787 9, 101.986 6, 79.846 0	科罗素酸 ^[14]
34	+	50.65		412.368 1	412.369 7	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$	-1.603	395.367 8, 339.170 3, 255.211 5, 213.164 4, 173.132 0, 159.116 8, 81.070 8	豆甾醇 ^[4]
35	-	50.81		455.353 1	456.359 0	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	1.638	455.353 1, 140.958 8, 97.887 5, 92.050 6, 81.064 2	熊果酸 ^[10]
36 [#]	-	51.21		455.353 5	456.359 0	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	1.578	455.353 5, 173.987 8, 152.259 8, 92.044 0	齐墩果酸 ^[15]

*通过对对照品对比确认; #首次从粗茎秦艽中报道

* Identified by comparing with the reference standards; # compositions reported for the first time from roots of *G. crasicaulis*

品中龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苷、獐牙菜苦苷和 6'-*O*- β -*D*-葡萄糖基龙胆苦苷 5 个环烯醚萜苷类成分的量。峰 6 母核离子 m/z 375.130 77 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 其二级特征碎片有 m/z 213.076 34 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5]^-$ 、179.054 93 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ 和 169.086 00 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5-\text{CHO}_2]^-$, 对照品 t_R 为 9.80 min, 与马钱苷酸对照品质谱比对, 鉴定峰 6 为马钱苷酸。峰 13 母核离子 m/z 373.114 04 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 其二级特征碎片有 m/z 163.074 34 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4]^-$ 、141.018 16 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{C}_2\text{H}_3-\text{CO}]^-$, 对照品 t_R 为 12.97 min, 与獐牙菜苦苷对照品质谱比对, 鉴定峰 13 为獐牙菜苦苷。峰 18 母核离子 m/z 355.103 73 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 其二级特征碎片有 m/z 177.054 79 和 149.059 65, 对照品 t_R 为 15.19 min, 与龙胆苦苷对照品质谱比对, 鉴定峰 18 为龙胆苦苷。峰 21 母核离子 m/z 375.130 77 $[\text{M}-\text{H}+46]^-$, 其二级特征碎片有 m/z 179.070 04 $[\text{M}-\text{H}+46-\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6]^-$, 对照品 t_R 为 16.54 min, 与獐牙菜苷对照品质谱比对, 鉴定峰 21 为獐牙菜苷。峰 15 化合物 $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$ 的 t_R 为 13.52 min, 母核离子 m/z 517.156 31 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 另外有 m/z 193.049 93、161.044 49、134.036 03 碎片, 分别对应 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{OGlc}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{O}-\text{OGlc}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{OGlc}-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_3]^-$ 碎片, 通过裂解规律推测峰 15 为 6'-*O*- β -*D*-葡萄糖基龙胆苦苷。

母核离子 m/z 519 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 化合物中有 2 个 t_R , 14.54 min 和 27.30 min。利用 Xcalibur 3.0 软件中 Formula finder 功能, 峰 16 分子式 $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$, 峰 24 分子式 $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$, 相对分子质量偏差均小于 3×10^{-6} 。峰 24 二级有 m/z 357.134 12 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ 、342.111 42 $[\text{M}-\text{H}-\text{OGlc}]^-$ 特征碎片, 通过化合物

精确相对分子质量、二级质谱碎片信息及裂解规律推测峰 16 为紫药苦苷, 峰 24 为 6'-*O*- β -*D*-葡萄糖基獐牙菜苷。

3.2 黄酮类化合物的鉴定

李雨蔚等^[7]利用 IR、ESI-MS、 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR 分析鉴定西藏秦艽花中皂草黄苷、异牡荆黄素、异荭草苷黄酮类成分。峰 22 母核离子 m/z 593.150 82 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 其二级有 m/z 473.109 50、311.056 55, 分别为 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5\text{O}]^-$ 和 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-\text{Glc}]^-$ 特征碎片离子, 根据文献报道^[7], 鉴定峰 22 为皂草黄苷; 峰 23 母核离子 m/z 431.099 67 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 其二级有 m/z 341.067 05、283.061 49、311.056 70, 分别为 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_5\text{O}-\text{CO}_2]^-$ 特征碎片离子, 对照品 t_R 为 25.90 min, 与异牡荆黄素对照品质谱比对, 鉴定为异牡荆黄素; 峰 25 母核离子 m/z 477.104 58 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 其二级有 m/z 285.070 74、151.002 30、133.028 31, 分别为 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{C}_7\text{H}_3\text{O}_4]^-$ 特征碎片离子, 对照品 t_R 为 27.78 min, 与异荭草苷对照品质谱比对, 鉴定为异荭草苷。

3.3 三萜类化合物的鉴定

熊果酸和齐墩果酸均为三萜类化合物, 母核为 m/z 456, 样品中化合物 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ 的 t_R 为 50.81、51.21 min, 在负离子模式下响应较好, 齐墩果酸对照品 t_R 为 51.21 min, 根据对照品 t_R 、同位素分布和二级碎片信息, 鉴定峰 35 为熊果酸, 峰 36 为齐墩果酸。

3.4 有机酸类化合物的鉴定

阿魏酸为有机酸类化合物, 母核相对分子质量 m/z 195 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 相关文献报道该属植物中含有该

化合物^[12]。峰 17 在正离子模式下响应较好,阿魏酸对照品 t_R 为 15.18 min, 二级碎片有 m/z 177.054 47、149.069 65, 分别对应 $[M+H-OH]^+$ 、 $[M+H-OH-CO]^+$ 。根据正离子模式二级质谱碎片信息和对照品质谱, 及与文献报道^[16]比较, 鉴定 17 号峰为阿魏酸。

3.5 其他类化合物的鉴定

据相关文献报道^[7], 秦艽中含有蔗糖。峰 1 在负离子下响应较好, 对照品 t_R 为 0.89 min, 与蔗糖对照品质谱比对, 鉴定为蔗糖。在正离子模式下, 峰 34 母核相对分子质量 m/z 413 $[M+H]^+$ 只有 1 个 t_R 值, 其二级碎片有 m/z 255.211 35、213.164 14, 分别为 $[M+H-C_6H_{13}-CH_4-C_3H_6]^+$ 、 $[M+H-C_6H_{13}-CH_4-C_3H_6-CH_3-C_2H_3]^+$ 特征离子碎片。根据正离子模式下精确相对分子质量和二级质谱碎片信息及与文献报道^[17]比较, 鉴定 34 号峰为豆甾醇。

4 讨论

4.1 液质联用条件的优化

本研究针对流动相考察了甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水和乙腈-0.1%甲酸水, 流动相中加入少量酸, 能有效改善峰形及离子化效果。甲醇和乙腈的比较研究发现, 用乙腈-0.1%甲酸水样品各个峰之间分离度较好, 因此选用乙腈-0.1%甲酸水为流动相。

4.2 Q-Exactive 质谱联用技术优势

UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱采用全扫描直接进样分析, 正负离子切换模式扫描, 自动触发二级质谱, 通过软件 Xcalibur 3.0 得到的特征碎片与实际测定碎片质量偏差均小于 3×10^{-6} , 完全保证筛查结果的准确性。对于未知化合物的鉴定, 正负离子切换扫描模式, 在一次进样的同时采集不同离子化极性下的数据, 以兼顾各种不同化合物, 进一步提高定性的准确性。相比传统的三重四级杆质谱, Q-Exactive 具有更高分辨率、高质量精度、高灵敏度等特点。这些性能特点可以实现高灵敏度准确性, 适用于大规模化合物的筛查、识别和鉴定。

本实验建立粗茎秦艽 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术, 基于化合物相关数据库、参考文献和精确相对分子质量, 鉴定了粗茎秦艽中 34 个化合物, 其中有 15 个成分首次从该品种中分得, 该方法使用少量对照品即可快速分析鉴定出多个化学成分, 表明了 UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱在快速鉴别药物植物多种次生代谢产物领域具有的强大能力。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 唐 栩, 许东晖, 梅雪婷, 等. 26 种黄酮类天然活性成分的药理研究进展 [J]. 中药材, 2003, 26(1): 46-54.
- [3] 穆祯强, 于 洋, 高 昊, 等. 龙胆属秦艽组植物的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(16): 2012-2017.
- [4] Pan Y, Zhao Y L, Zhang J, *et al.* Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Gentiana* (Gentianaceae) [J]. *Chem Biodiv*, 2016, 13(2): 107-150.
- [5] 吴新荣, 吴立宏, 赵志礼, 等. 中药秦艽和习用品中 5 种环烯醚萜类成分的 HPLC 含量测定 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4): 715-720.
- [6] Zeng R, Hu H, Ren G, *et al.* Chemical Profiling Assisted quality assessment of *Gentiana macrophylla* by high-performance liquid chromatography using a fused-core column [J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(8): 1274-1279.
- [7] 李雨蔚, 李荣娇, 袁绿益, 等. 西藏秦艽花的化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2052-2056.
- [8] 李荣娇, 杨凤仙, 袁绿益, 等. HPLC 法测定西藏秦艽花与川西秦艽花中 7 种成分的量 [J]. 中草药, 2015, 46(8): 1227-1230.
- [9] 王勇为. 确证定量分析新工具——Thermo Scientific Q Exactive 台式四极杆-轨道阱高分辨质谱仪 [J]. 现代科学仪器, 2011(5): 138-140.
- [10] Jiang Z B, Liu H L, Liu X Q, *et al.* Chemical constituents of *Gentiana macrophylla* Pall [J]. *Nat Prod Res*, 2010, 24(14): 1365-1369.
- [11] Xu M, Wang D, Zhang Y J, *et al.* Iridoid glucosides from *Gentiana rhodantha* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(5/6): 491-498.
- [12] 段朝辉, 石宝俊, 吴立宏, 等. 长梗秦艽的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(6): 417-420.
- [13] Wei S, Zhang P, Feng X, *et al.* Qualitative and quantitative determination of ten iridoids and secoiridoids in *Gentiana straminea* Maxim. by LC-UV-ESI-MS [J]. *J Nat Med*, 2012, 66(1): 102-108.
- [14] Li W, Li L Y, Zhou W, *et al.* Triterpenoids isolated from the rhizomes and roots of *Gentiana scabra* and their inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(12): 2124-2130.
- [15] 刘明韬, 韩志超, 章 漳, 等. 龙胆的化学成分研究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2005(2): 103-104.
- [16] Wei W L, Huang L F. Simultaneous determination of ferulic acid and phthalides of *Angelica sinensis* based on UPLC-Q-TOF/MS [J]. *Molecules*, 2015, 20(3): 4681-4694.
- [17] 侯彩婷, 王瑞华, 邹昀员, 等. UPLC-MS/MS 法测定多裂翅果菊中植物甾醇的含量 [J]. 食品科学, 2013, 34(14): 301-305.