

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李金花^{1,2}, 曾锐², 瞿燕³, 黄林芳^{1*}

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: **目的** 应用超高效液相色谱仪联用四级杆串联飞行时间质谱仪 (UPLC-Q-TOF-MS^E) 结合 UNIFI 天然产物信息平台对黄牡丹 *Paeonia delavayi* var. *lutea* 的化学成分进行快速定性分析。 **方法** 应用时间依赖型 MS^E 方式采集样品质谱数据, 结合自动检出及人工核对方法分析黄牡丹化学成分。 **结果** 通过 UNIFI 数据库自动检出、在线及离线数据库的检索和相关文献的人工核对, 鉴定了 57 个化合物, 包括单萜苷、酚酸、鞣酸、丹皮酚和三萜等类化合物。 **结论** 本方法可以快速全面地定性分析黄牡丹根的化学成分, 为黄牡丹的质量控制和药效物质基础的阐明提供参考。

关键词: 黄牡丹; 高效液相色谱仪联用四级杆串联飞行时间质谱仪; UNIFI; 单萜苷; 酚酸; 鞣酸; 丹皮酚

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)08-1529-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.08.009

Rapid identification on chemical constituents in roots of *Paeonia delavayi* var. *lutea* by UPLC-Q-TOF-MS^E combined with UNIFI informatics platformLI Jin-hua^{1,2}, ZENG Rui², QU Yan³, HUANG Lin-fang¹

1. Institute of Medicinal Plant Development, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China

2. College of Pharmacy, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China

3. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: **Objective** To rapidly identify the chemical constituents of *Paeonia delavayi* var. *lutea* roots by ultra-high performance liquid coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS^E) and UNIFI informatics platform. **Methods** Time-dependent MS^E data-acquisition mode was applied to acquire mass spectrometric data, and then the chemical constituents were identified by automatic identification and artificial identification. **Results** Totally 57 compounds were identified, including monoterpene glycosides, phenolic acids, tannins, paeonols, and triterpenes. **Conclusion** UPLC-Q-TOF-MS^E combined with UNIFI database could be used to rapidly and comprehensively characterize the chemical constituents of *P. delavayi* var. *lutea* roots. This study provides a reference for quality control of *P. delavayi* var. *lutea* roots and clarifying the material basis of its efficacy.

Key words: *Paeonia delavayi* Franch. var. *lutea* (Delavay ex Franch.) Finet et Gagnep.; UPLC-Q-TOF-MS^E; UNIFI; monoterpene glycosides; phenolic acids; tannins; paeonols

黄牡丹为芍药科芍药属牡丹组植物黄牡丹 *Paeonia delavayi* Franch. var. *lutea* (Delavay ex Franch.) Finet et Gagnep. 的干燥根和根皮。云南省常作为中药赤芍和赤丹皮使用, 其味酸、苦, 性微寒, 具有清热凉血、活血化瘀等功效, 临床用于胸

腹肋疼痛、尿血、血痢、痛经等症^[1-2]。黄牡丹是我国特有的珍稀濒危物种, 被列为国家三级保护植物, 特产于我国云南、四川西南部及西藏东南部^[3-4]。芍药属植物的化学成分研究表明, 该属植物主要含单萜苷、酚酸、黄酮、三萜和甾醇等成分, 芍药

收稿日期: 2016-09-06

基金项目: 国家自然科学基金面上项目——西洋参不同产地品质相关“地理特异基因群”的发掘 (81274013); 国家自然科学基金面上项目——地理格局及生态驱动揭示肉苁蓉品质生态型机理 (81473315); 国家自然科学基金重点项目——道地药材形成的生物学实质 (81130069)

作者简介: 李金花, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂分析和中药活性成分研究。Tel: (010)57833197 E-mail: jinhuali108@126.com

***通信作者** 黄林芳, 研究员, 硕士生导师, 主要研究方向为中药资源与质量评价研究。Tel: (010)57833197 E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

苷和丹皮酚是主要的活性化学成分^[5-7]。现代药理研究表明,芍药苷具有抗自由基损伤、降血糖、抗血小板聚集、扩张血管、改善微循环、抗惊厥、神经保护、抑制肿瘤、免疫调节等作用^[8];丹皮酚具有保肝护肾、降血糖、保护心血管、抗心律失常、神经保护、增强免疫力、抗菌消炎、抗肿瘤、神经保护、抗过敏等多种药理作用^[9]。目前,国内外有关黄牡丹的研究较少,对其化学成分缺乏系统的研究^[4,10]。

超高效液相色谱与飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF-MS^E)技术是一种具有高分辨、高灵敏的定性能力和强大的结构表征能力新型的分析技术,可以提供良好的分离效果,能快速、高效地分析复杂化合物,已广泛运用到中药药效物质基础、中药化学成分分析、代谢组学等研究领域^[11]。UNIFI天然产物整体解决方案以UPLC-Q-TOF-MS^E技术为基础,对样品进行MS^E采集,并将中药中已有的化合物信息录入UNIFI数据库,软件自动进行峰提取和分子式确定等数据处理过程并与数据库中化合物结构进行匹配,自动将软件计算的理论碎片与采集的二级离子进行匹配,给出碎片离子的可能结构,最终通过预设的工作流程模版自动显示所鉴定化合物的详细信息^[12]。本实验利用UPLC-Q-TOF-MS^E技术结合UNIFI数据库对黄牡丹的化学成分进行快速、全面地定性分析,鉴定了57个化合物,包括单萜苷、酚酸、鞣酸、丹皮酚和三萜等类化合物,为黄牡丹的质量控制和药效物质基础的阐明提供了参考。

1 仪器与材料

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱系统(Waters Corporation, Milford, MA, 美国);高分辨率飞行时间质谱仪Q-TOF-MS(Waters Corporation, 美国)。乙腈(LC-MS级, Fisher Scientific公司);水为纯净水(杭州娃哈哈集团),其余试剂为分析纯。

实验用黄牡丹于2014年9月采自云南省大理州,经中国医学科学院药用植物研究所黄林芳研究员鉴定为毛茛科芍药属植物黄牡丹 *Paeonia delavayi* Franch. var. *lutea* (Delavay ex Franch.) Finet et Gagnep. 的根。

2 方法

2.1 样品溶液的制备

黄牡丹根粉碎成粗粉,取粗粉500 g,用石油醚浸泡1 d后渗滤提取至提取液颜色变浅,弃去石油醚提取液,残渣挥去石油醚,用3倍量80%乙醇水

回流提取2次,合并提取液,减压回收乙醇至无醇味,浓缩液用等体积醋酸乙酯萃取2次,合并醋酸乙酯萃取液(上层),浓缩至干,得醋酸乙酯萃取物;浓缩醋酸乙酯萃取后的下层溶液至干,得乙醇提取物。分别取黄牡丹根的醋酸乙酯萃取物和乙醇提取物,加甲醇配成质量浓度为5 mg/mL的溶液。进样前用0.22 μm微孔滤膜滤过。

2.2 UPLC 条件

色谱柱为Waters ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),以0.1%甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相,进行梯度洗脱(0~1.5 min, 0~2% B; 1.5~5 min, 2%~65% B; 5~9.5 min, 65%~90% B; 9.5~12 min, 90%~100% B; 12~12.5 min, 100% B)。柱温35℃,体积流量0.3 mL/min,进样体积2 μL。

2.3 MS 检测条件

采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式,雾化气(N₂)体积流量为800 L/h,脱溶剂气温度为450℃,锥孔气流量为50 L/h,离子源温度120℃,毛细管电压3.0 kV,锥孔电压35 V,离子喷雾电压(ESI⁻)2 200 V和(ESI⁺)3 000 V;MS^E扫描模式检测,扫描范围 m/z 100~1 500;亮氨酸脑啡肽为准确质量数校准液。

2.4 数据采集与处理

采用MS^E模式采集数据,并使用UNIFI数据处理系统对黄牡丹根提取物的化学成分进行自动识别。UNIFI数据库条目中包含化合物名称、分子式、结构式、保留时间和碎片离子理论精确质量数。对化合物进行自动识别后,运用MassLynx 4.1软件对负离子模式基峰离子流图进行处理,结合碎片离子理论精确质量数、相对保留时间和分子式匹配软件Elemental composition、化合物结构匹配软件Mass Fragment、离线及在线质谱数据库(PubMed、Mass Bank、Chemspider、METLIN)及相关文献对各主要化合物进行人工识别和确认。

3 结果

利用UNIFI数据处理系统和MassLynx 4.1软件对黄牡丹根的醋酸乙酯部位和乙醇部位进行定性分析,(-)ESI-MS的质谱基峰离子流图(BPI)见图1。在黄牡丹根中共检测到64个化合物,其中对57个化合物进行了归属,保留时间、分子式、分子离子峰、加合离子峰和裂解碎片的信息结果见表1。

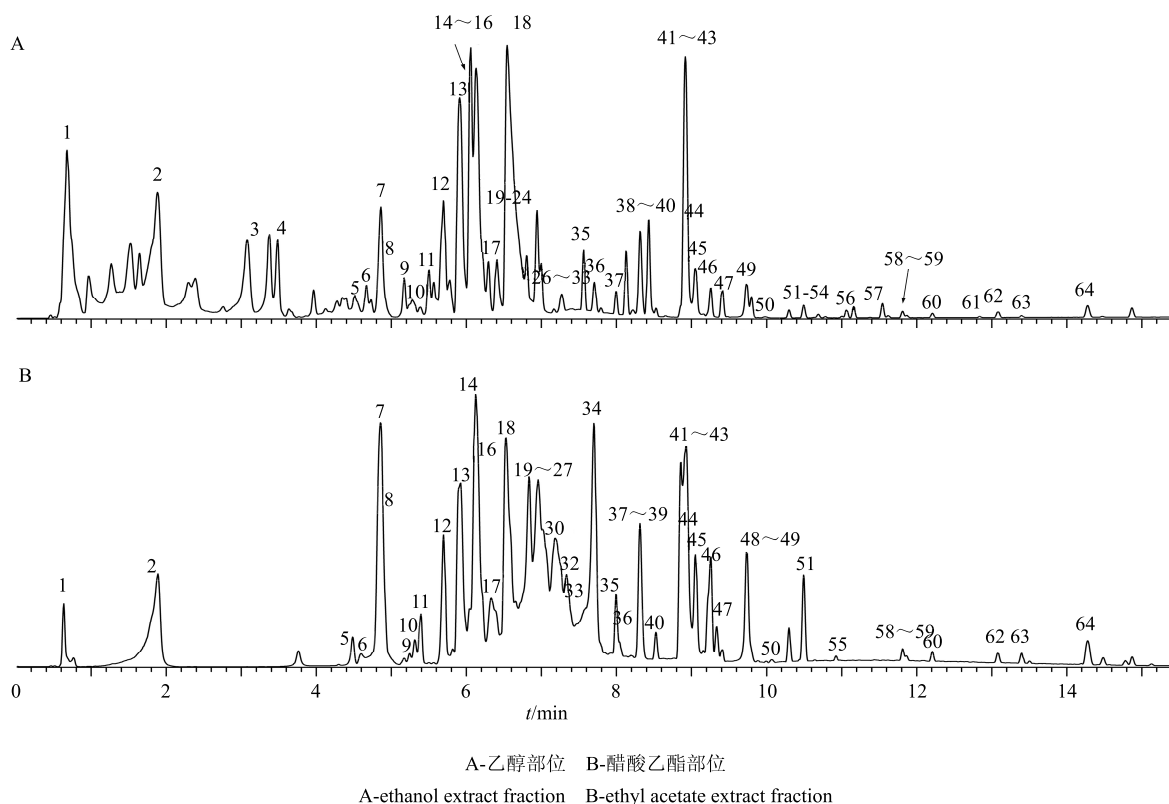


图 1 黄牡丹根提取物 UPLC-Q-TOF-MS^E 负离子模式下的基峰离子流 (BPI) 图

Fig. 1 Base peak ion (BPI) chromatograms of extracts of *P. delavayi* var. *lutea* roots in negative ion mode by UPLC-Q-TOF-MS^E

3.1 单萜苷类的鉴定

单萜类是芍药属植物的主要活性成分。在本研究中 23 个单萜及其苷类成分被鉴定,分别是牡丹酮 (paeonisuffrone)、paeonidanin、paeonisothujone、芍药苷 (paeoniflorin)、氧化芍药苷 (oxypaeoniflorin)、芍药内酯苷 (albiflorin)、没食子酰芍药苷 (galloylpaeoniflorin)、没食子酰芍药苷异构体 (galloylpaeoniflorin isomer)、乙酰芍药苷 (acetoxypaeoniflorin)、双没食子酰芍药苷 (digalloylpaeoniflorin)、4-*O*-乙基芍药苷 (4-*O*-ethylpaeoniflorin)、苯甲酰氧化芍药苷 (benzoyloxypaeoniflorin)、苯甲酰芍药苷 (benzoylpaeoniflorin)、苯甲酰芍药苷异构体 (benzoylpaeoniflorin isomer)、suffruiabioside B 和牡丹皮苷 (mudanpioside) A、B、C、E、F、H、I、J。单萜苷类成分具有萜烷骨架结构和葡萄糖基部分结构,二级质谱碎片 m/z 165 为萜烷骨架碎片,碎片 $[M-H-122]^-$ 和 $[M-H-162]^-$ 分别为单萜苷类丢失苯甲酰基和葡萄糖基后的碎片^[13]。此外,在单萜苷类二级质谱中碎片离子 m/z 121、137、151、169 被检测到,这些碎片为苯甲酸、羟基苯甲酸、

甲氧基苯甲酸和没食子酸基团的碎片。具有代表性单萜苷的 MS 图见图 2。经 MassLynx 软件分析,峰 12、13、27 的分子式均确定为 $C_{23}H_{28}O_{11}$, 其中峰 13 相对丰度最高并有明显的 m/z 449 $[M-H-CH_2O]^-$ 环氧类结构特征碎片峰,结合文献确定峰 12、13、27 分别为芍药内酯苷、芍药苷、牡丹皮苷 I^[14]。峰 19、21 的分子式确定为 $C_{30}H_{32}O_{15}$, 峰 19 相对丰度较高,具有 m/z 613、491、479、449 等特征碎片,确定为没食子酰芍药苷,峰 21 的碎片与峰 19 相似,推测没食子酰芍药苷异构体。峰 33 和 35 表现出了相同的分子式 $C_{30}H_{32}O_{13}$, 根据其碎片及在 C_{18} 反相柱的保留行为,分别鉴定为牡丹皮苷 C 和苯甲酰氧化芍药苷;同理峰 45、47 分别鉴定为牡丹皮苷 J 和牡丹皮苷 B^[15]。峰 43、49 分子式均为 $C_{30}H_{32}O_{12}$, 碎片离子相似,分别鉴定为苯甲酰芍药苷及其异构体,此外,根据 UNIFI 自动识别、文献报道和在线及离线质谱数据库的比对,对其他单萜糖苷类成分分别进行鉴定,结果见表 1。

3.2 没食子酸及其衍生物、鞣酸类的鉴定

据相关文献报道,芍药属植物含有丰富的没食

表 1 黄牡丹根提取物化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS^E 鉴定结果Table 1 Identification of chemical constituents from roots of *P. delavayi* var. *lutea* by UPLC-Q-TOF-MS^E

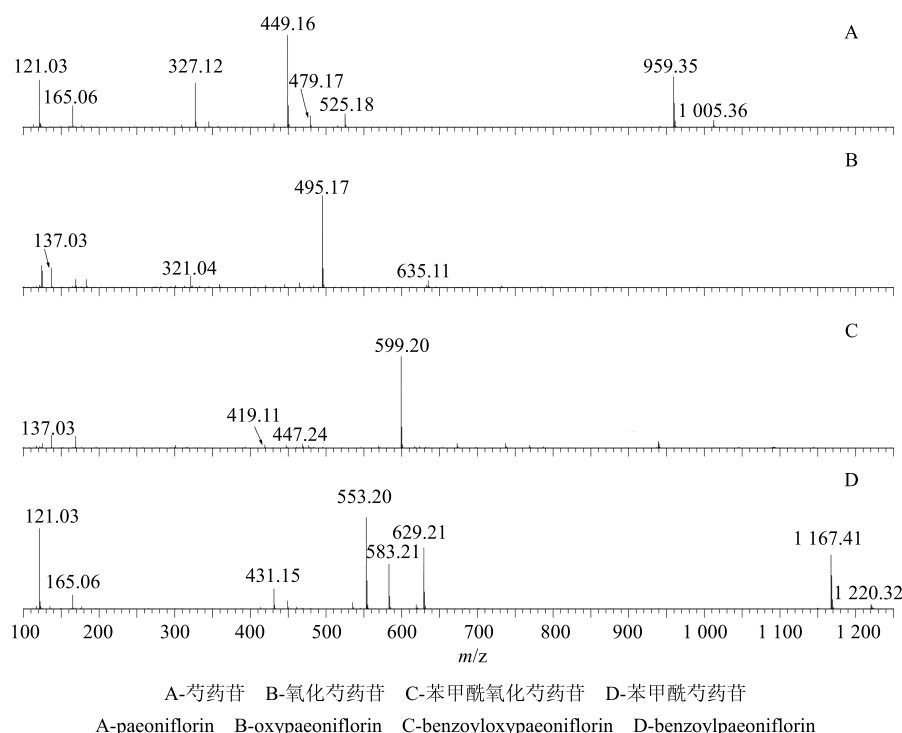
峰号	<i>t_R</i> /min	分子式	准分子离子 峰实测值	准分子离子 峰理论值	分子加合离子峰	碎片离子	化合物	提取部位
1	0.67	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	331.074 3	331.066 5	663.159 4 [2M-H] ⁻	169, 125	1- <i>O</i> -没食子酰-β- <i>D</i> -葡萄糖	E, EA
2	1.88	C ₇ H ₆ O ₅	169.018 7	169.013 7		125	没食子酸	E, EA
3	3.08/3.38	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	493.132 0	493.119 3	987.269 2 [2M-H] ⁻	331, 169, 125	没食子酰蔗糖	E
4	3.57	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₄	463.122 3	463.108 8		373, 343, 169, 125	mudanoid B	E
5	4.51	C ₁₆ H ₂₄ O ₈	343.151 3	343.139 3		181, 151	牡丹皮苷 F	E, EA
6	4.52	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.096 9	483.077 5		331, 169, 125	双没食子酰葡萄糖	E, EA
7	4.86	C ₈ H ₈ O ₅	183.038 9	183.029 3		169, 125	没食子酸甲酯	E, EA
8	4.89	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	495.170 9	495.150 3	541.170 6 [M+HCOO] ⁻ , 991.335 3 [2M-H] ⁻	477, 461, 447, 439, 415, 359, 345, 137	氧化芍药苷	E, EA
9	5.14	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃	525.176 6	525.160 8		463, 461, 415, 359, 121	牡丹皮苷 E	E, EA
10	5.17	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.108 6	635.088 4		169, 125	三没食子酰葡萄糖	E, EA
11	5.50	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	635.108 6	635.088 4		463, 169, 125	三没食子酰葡萄糖异构体	E, EA
12	5.69	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	479.169 1	479.155 3	525.176 6 [M+HCOO] ⁻ , 959.350 7 [2M-H] ⁻ , 1 005.355 9 [2M+ HCOO] ⁻	437, 345, 317, 283, 195, 139, 121	芍药内酯苷	E, EA
13	5.90	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	479.169 1	479.155 3	525.176 6 [M+HCOO] ⁻ , 959.350 9 [2M-H] ⁻ , 1 005.355 9 [2M+ HCOO] ⁻	449, 327, 165, 121	芍药苷	E, EA
14	6.12	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	787.123 0	787.099 4		393, 197, 169, 125	四没食子酰葡萄糖	E, EA
15	6.13	C ₈ H ₈ O ₄	167.049 1	167.034 4		149, 123	3-羟基-4-甲氧基苯甲酸	E
16	6.13	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.053 3	197.045 0		169, 168, 125, 124	没食子酸乙酯	E, EA
17	6.32	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₆	937.120 2	937.094 7		787, 383, 181, 169, 125	dihydroxymethylbenzoyl- tetragalloyl glucose	EA
18	6.55	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	939.140 1	939.110 4		631, 469, 277	五没食子酰葡萄糖	E, EA
19	6.61	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	631.185 4	631.166 3	1 263.382 7 [2M-H] ⁻	479, 525, 449, 327, 169, 125, 124, 121	没食子酰芍药苷	E, EA
20	6.81	C ₄₈ H ₃₆ O ₃₀	1 091.157 7	1 091.121 3		939, 671, 469, 335, 183, 169, 125	六没食子酰葡萄糖	E, EA
21	6.94	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	631.185 4	631.166 3		169, 125, 121	没食子酰芍药苷异构体	E, EA
22	6.95	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₂	521.180 7	521.165 9	567.191 3 [M+HCOO] ⁻	491, 479, 321, 121	乙酰芍药苷	E, EA
23	7.04	C ₃₇ H ₃₆ O ₁₉	783.206 8	783.177 3		631, 567, 435, 325, 121	双没食子酰芍药苷	E, EA
24	7.06	C ₂₆ H ₃₈ O ₁₇	621.209 1	621.203 1		455, 293, 165, 131	suffruticoside E	E, EA
25	7.18	C ₃₅ H ₄₀ O ₃₄	1 243.173 1	1 243.132 3		1 091, 939, 621, 469, 349, 197, 165, 121	七没食子酰葡萄糖	EA
26	7.20	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	197.076 3	197.081 4			牡丹酮	E, EA
27	7.27	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	479.169 1	479.155 3	525.176 6 [M+HCOO] ⁻ , 959.350 9 [2M-H] ⁻	431, 357, 137, 121	牡丹皮苷 I	E, EA
28	7.40	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	459.154 8	459.150 3		293, 165	丹皮酚原苷	E
29	7.43	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	493.190 8	493.171 0			paeonidanin	E
30	7.45	C ₁₅ H ₂₀ O ₈	327.107 5	327.108 0			丹皮酚苷	E, EA

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	准分子离子 峰实测值	准分子离子 峰理论值	分子加合离子峰	碎片离子	化合物	提取部位
31	7.51	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_6$	317.120 2	317.102 5			芍药苷元酮	E
32	7.56	$\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$	507.167 6	507.186 6		461, 121	4-O-乙基芍药苷	E, EA
33	7.73	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$	599.199 2	599.176 5	1 199.382 8 $[\text{2M}-\text{H}]^-$	599, 477, 449, 165, 137, 121	牡丹皮苷 C	E, EA
34	7.86	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_9$	329.095 1	329.087 3	375.096 8 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$		mudanoxide A	EA
35	7.99	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$	599.199 2	599.176 5		551, 461, 431, 327, 137, 121	苯甲酰氧化芍药苷	E, EA
36	8.03	$\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{O}_{17}$	745.262 1	745.234 4	791.270 0 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	673, 623, 447, 165, 121, 117	suffruiabioside B	E, EA
37	8.38	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	615.189 3	615.171 4		585, 477, 447, 439, 281, 137	牡丹皮苷 H	E, EA
38	8.43		553.215 7		599.252 6 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$		未知	E, EA
39	8.44	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	289.077 7	289.071 2		245, 221, 151	儿茶素	E, EA
40	8.47	$\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{O}_{13}$	613.178 0	613.192 1	659.217 6 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	543, 461, 361, 321, 165, 151, 121	牡丹皮苷 A	E, EA
41	8.68	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$	459.152 1	459.150 3		431	丹皮酚新苷	E, EA
42	8.92	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	121.042 6	121.029 0		103	苯甲酸	E, EA
43	8.92	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$	583.206 8	583.181 6	629.211 9 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$, 1 167.410 2 $[\text{2M}-\text{H}]^-$, 1 213.495 4 $[\text{2M} + \text{HCOO}]^-$	553, 535, 461, 431	苯甲酰芍药苷	E, EA
44	9.01	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_5$	213.072 6	213.076 3			牡丹缩酮	E, EA
45	9.05	$\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$	629.211 5	629.187 0		599, 477, 453, 431, 167, 121	牡丹皮苷 J	E, EA
46	9.42		735.221 3		1 471.47 $[\text{2M}-\text{H}]^-$	629, 583, 357	未知	E, EA
47	9.72	$\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$	629.211 9	629.187 0		583, 553, 535, 431, 429, 165, 151, 137, 121	牡丹皮苷 B	E, EA
48	9.79	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	151.047 3	151.039 5		135	resacetophenone	EA
49	9.99	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$	583.206 8	583.181 6	629.211 9 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$, 1 167.410 2 $[\text{2M}-\text{H}]^-$, 1 213.495 4 $[\text{2M} + \text{HCOO}]^-$	461, 345, 327, 121	苯甲酰芍药苷异构体	E, EA
50	10.05	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	611.200 4	611.161 2		445, 343, 431, 301, 121, 117	牡丹苷 A/B/C/D	E, EA
51	10.49	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_4$	357.223 8	357.207 0		325	芍药二酮	E, EA
52	10.61	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	611.200 3	611.161 2		565, 443, 147, 121, 117	牡丹苷 A/B/C/D	E
53	10.69	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_4$	357.223 8	357.207 0		325	芍药二酮异构体	E
54	10.76	$\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_6$	471.333 2	471.274 7	517.339 1 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	419, 329	paeonenoide A	E
55	11.01	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_3$	181.094 3	181.086 5			paeonisoethujone	EA
56	11.16	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	611.200 4	611.161 2		565, 247, 121, 117	牡丹苷 A/B/C/D	E
57	11.55		657.245 4			293, 236	未知	E
58	11.82		487.358 9		533.365 5 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	457, 311, 249	未知	E, EA
59	11.94	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$	165.055 3	165.055 2		147, 133, 123	丹皮酚	E, EA
60	12.21		457.310 9		503.319 3 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	339	未知	E, EA
61	12.84		735.292 4			689, 431, 339	未知	E
62	13.08	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	455.333 0	455.353 0	501.332 2 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	437, 391	齐墩果酸	E, EA
63	13.39		473.345 5		519.347 7 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	339, 277	未知	E, EA
64	14.28	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$	471.361 6	471.347 4	517.368 8 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	393	常春藤皂苷元	E, EA

E-乙醇部位; EA-醋酸乙酯部位

E-ethanol extract fraction; EA-ethyl acetate extract fraction

图 2 4 个具有代表性单萜苷的 MS 图 (ESI⁻)Fig. 2 MS spectra (ESI⁻) of representative monoterpene glycosides

子酸及其衍生物、鞣酸类物质^[5-6,15]。经 MassLynx 软件数据分析, 峰 2、7、16 分别鉴定为没食子酸 (gallic acid)、没食子酸甲酯 (methyl gallate)、没食子酸乙酯 (ethyl gallate)。它们具有共同的碎片 m/z 169 [gallic acid-H]⁻ 和 125 [gallic acid-H-CO₂]⁻。峰 2 鉴定为没食子酰蔗糖 (galloylsucrose); 峰 1、6、10、11、14、18、20、25 属于没食子酰葡萄糖, 由于没食子酰基的个数不同, 分子式也不一样。此外, 没食子酰基的位置不一样, 导致同分异构体的存在。在裂解过程中, 这些没食子酰葡萄糖化合物常表现出没食子酰基和 H₂O 分子的丢失。三没食子酰葡萄糖 (trigalloyl glucose)、四没食子酰葡萄糖 (tetragalloyl glucose)、五没食子酰葡萄糖 (1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-β-*D*-glucose)、六没食子酰葡萄糖 (hexagalloyl glucose)、七没食子酰葡萄糖 (heptagalloyl glucose) 的质谱裂解信息和碎片见图 3。峰 4 的 m/z 463.122 3 [M-H]⁻ 和峰 34 的 m/z 329.095 1 [M-H]⁻, 通过与文献比对^[13], 分别鉴定为 mudanoside B 和 mudanoside A。峰 17 的 m/z 937.120 2 [M-H]⁻, 分子式为 C₄₁H₃₀O₂₆, 碎片与之前文献报道一致^[16], 确定为 dihydroxymethyl-benzoyltetragalloyl glucose。峰 15 分子式为 C₈H₈O₄, 鉴定为 3-羟基-4-甲氧基苯甲酸, 峰 42 具有分子离

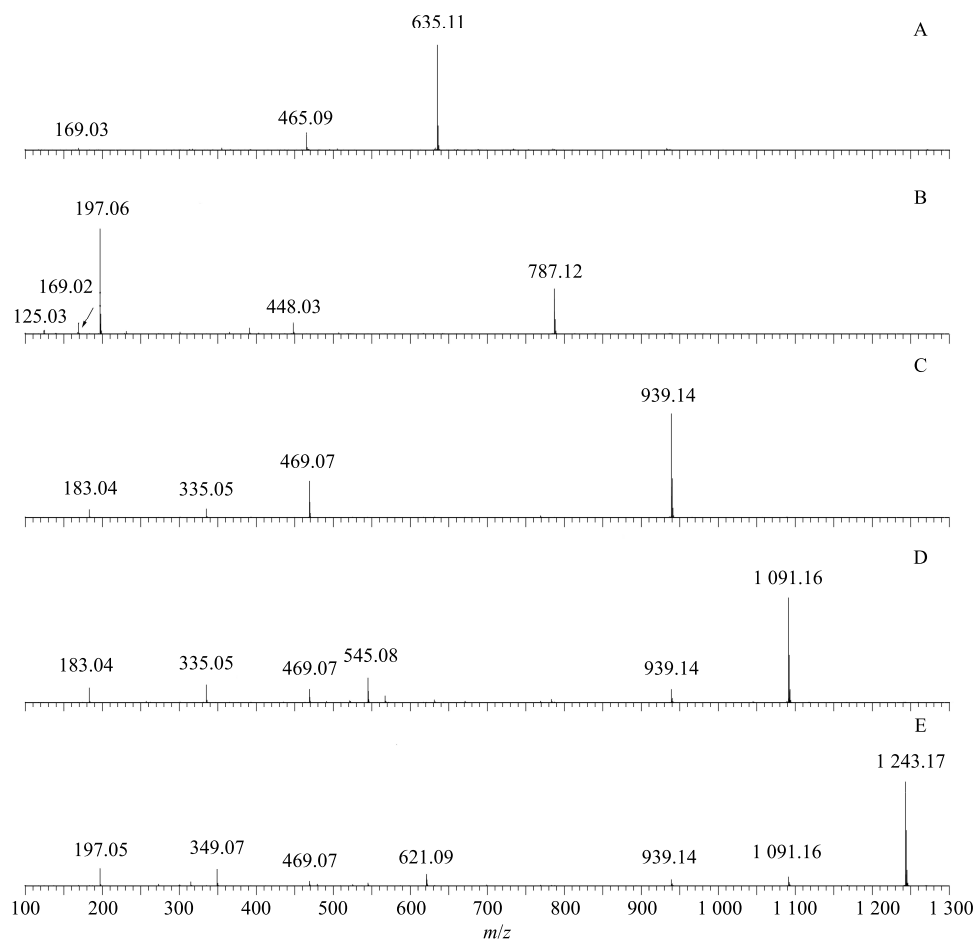
子峰 [M-H]⁻ m/z 121.029 0 和碎片 [M-H-H₂O]⁻ m/z 103, 识别为苯甲酸 (benzoic acid)。

3.3 丹皮酚类的鉴定

在本实验中, 8 个苯乙酮化合物被鉴定, 属于丹皮酚及其衍生物。峰 24 显示 m/z 621.209 1 [M-H]⁻, 分子式为 C₂₆H₃₈O₁₇, 结合与文献比对^[17], 鉴定为 suffruticoside E; 通过自动识别和人工核对, 峰 28 m/z 459.154 8 [M-H]⁻ 和峰 30 m/z 327.107 5 [M-H]⁻ 分别鉴定为丹皮酚原苷和丹皮酚苷; 峰 41 的分子式为 C₂₀H₂₈O₁₂, 鉴定为丹皮酚新苷; 峰 50、52、56 都具有相同的分子式 C₂₇H₃₂O₁₆, 碎片离子峰相近。据文献报道^[13,17], 芍药属植物含有化合物 suffruticoside A、B、C、D, 由于峰 50、52、56 提供的碎片信息有限, 不能归属具体化合物, 推测属于化合物 suffruticoside A、B、C、D。峰 59 分子式为 C₉H₁₀O₃, 显示了碎片 m/z 147、133、123, 鉴定为丹皮酚 (paeonol)。

3.4 其他

本实验通过 UNIFI 识别、在线及离线数据库和相关文献的比对, 儿茶素 [(+)-catechin]、芍药缩酮 (paeonisuffral)、resacetophenone、芍药二酮 (palbinone)、常春藤皂苷元 (hederagenin)、paeonenoide A、齐墩果酸 (oleanolic acid) 被鉴定,



A-三没食子酰葡萄糖 B-四没食子酰葡萄糖 C-五没食子酰葡萄糖 D-六没食子酰葡萄糖 E-七没食子酰葡萄糖
A-trigalloyl glucose B-tetragalloyl glucose C-1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose D-hexagalloyl glucose E-heptagalloyl glucose

图 3 具有代表性的没食子酰葡萄糖的 MS 图 (ESI⁻)

Fig. 3 MS spectra (ESI⁻) of representative galloyl glucoses

这之前文献关于芍药属化学成分的报道一致^[6,18]。此外, 7 个成分通过离线及在线数据库检索, 未能找到匹配的化合物, 暂时未能定性。

4 讨论

在本研究中, 首次运用 UPLC-Q-TOF-MS^E 技术结合 UNIFI 数据分析平台定性分析了黄牡丹根提取物中的化学成分。鉴于芍药属植物含有丰富的酚酸和鞣酸类化学成分, 流动相中加入少量的酸, 能有效改善峰形和离子化效果, 因此采用 0.1% 甲酸水溶液作为水相。另外, 为了较全面推测样品中的化合物, 采用了正、负离子 2 种质谱扫描模式, 结果发现负离子模式下质谱响应较好, 故最终选择在负离子模式下进行数据分析。实验采用的 UPLC-Q-TOF-MS^E 技术拥有 UPLC 良好分离效果和 Q-TOF-MS^E 高灵敏度、高分辨率, 可以提供强大的化合物结构信息。

Q-TOF-MS 的 MS^E 数据采集模式可通过低碰撞能扫描和高碰撞能扫描之间快速切换同时完成 2 种扫描功能的数据采集^[19]。在低碰撞能扫描下得到相关分子离子峰及其加合峰的信息, 在高碰撞能扫描下得到相关碎片峰的信息, 两者再通过保留时间进行关联, 从而为黄牡丹根提取物的定性分析提供了较多的化合物结构信息, 实现一次性对提取物中多个复杂成分快速定性分析。此外, 本研究应用了 UNIFI 数据分析平台, 实现了化学成分自动分析, 简化了数据处理过程。

本实验共定性了 57 个化学成分, 主要为单萜苷和酚酸类化学成分。据有关文献报道^[5-6], 芍药属植物含有丰富的单萜苷、黄酮、三萜、酚酸、丹皮酚和鞣酸等类化合物, 本次实验定性的多数化合物与前期芍药属植物文献报道一致, 但本次实验尚未鉴

定到黄酮类化合物,如槲皮素、山柰酚、异鼠李素、木犀草素等,在正、负离子模式下自动识别和人工识别均未找到,这有可能与药材的品种、药材的部位、提取方法以及液质条件有关。另外,在离子流图中一些响应较好的峰暂时未能定性,黄牡丹的化学成分有待进一步研究。

总之,本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS^E 技术结合 UNIFI 数据分析平台对黄牡丹根化学成分进行了快速定性分析,为中药材化学成分的分析提供了一种快速检测的方法,同时也为黄牡丹根药材的质量控制、药效物质基础的阐明提供了科学依据。

参考文献

- [1] 云南省药品标准 (1996 年版) [S]. 1998.
- [2] Wang D X, Ma H, Zhang Y L, *et al.* *Paeonia* (Paeoniaceae) expressed sequence tag-derived microsatellite markers transferred to *Paeonia delavayi* [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(2): 1278-1282
- [3] 潘开玉. 中国植物志 (第 27 卷) [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [4] 王琳, 周浓, 代亨英. HPLC 法测定黄牡丹不同部位中没食子酸和丹皮酚的含量 [J]. *医药导报*, 2015, 34(2): 228-231.
- [5] He C N, Peng Y, Zhang Y C, *et al.* Phytochemical and biological studies of paeoniaceae [J]. *Chem Biod*, 2010, 7(4): 805-838.
- [6] Wu S H, Wu D G, Chen Y W. Chemical constituents and bioactivities of plants from the genus *Paeonia* [J]. *Chem Biod*, 2010, 7(1): 90-104.
- [7] Ogawa K, Nakamura S, Sugimoto S, *et al.* Constituents of flowers of paeoniaceae plants, *Paeonia suffruticosa* and *Paeonia lactiflora* [J]. *Phytochem Lett*, 2015, 12: 98-104.
- [8] 郑世存, 李晓宇, 欧阳兵, 等. 芍药苷药理作用研究新进展 [J]. *中国药物警戒*, 2012, 2(9): 100-103.
- [9] 胡云飞, 徐国兵. 牡丹皮及其主要成分丹皮酚的药理作用研究进展 [J]. *安徽医药*, 2014, 18(4): 589-592.
- [10] 冯源, 王胤, 周浓, 等. HPLC 测定黄牡丹不同部位中芍药苷的含量 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(9): 139-142.
- [11] 杨林军, 谢彦云, 李志锋, 等. UPLC/Q-TOF-MS/MS 分析中华常春藤中的化学成分 [J]. *中草药*, 2016, 47(4): 566-572.
- [12] Zhang F, Li M, Qiao L, *et al.* Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae Semen* by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Ziziphus* species [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 122: 59-80.
- [13] Xiao C, Wu M, Chen Y, *et al.* Revealing metabolomic variations in *Cortex Moutan* from different root parts using HPLC-MS method [J]. *Phytochem Anal*, 2015, 26(1): 86-93.
- [14] 王镇方, 赵阳, 庞旭, 等. 利用 UPLC-Q-TOF-MSE 快速分析四物汤中的化学成分 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(21): 3702-3708.
- [15] He C, Peng B, Dan Y, *et al.* Chemical taxonomy of tree peony species from China based on root cortex metabolic fingerprinting [J]. *Phytochemistry*, 2014, 107: 69-79.
- [16] Wu M, Gu Z. Screening of bioactive compounds from moutan cortex and their anti-inflammatory activities in rat synoviocytes [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2009, 6(1): 57-63.
- [17] Xiao C, Wu M, Chen Y, *et al.* Metabolomic analysis provides novel chemotaxonomic characteristics for phenotypic cultivars of tree peony [J]. *Anal Methods-UK*, 2014, 6(19): 7854-7864.
- [18] Wu S H, Yang S M, Wu D G, *et al.* Three novel 24,30-dinortriterpenoids, paeonenoides A-C, from *Paeonia veitchii* [J]. *Helv Chim Acta*, 2005, 88(2): 259-265.
- [19] 闫利利, 史家文, 王金芳, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MSE 方法分析半夏泻心汤的化学成分 [J]. *药学报*, 2013, 48(4): 526-531.