

UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱分析中华苦苣菜与苣荬菜中主要化学成分

刘海霞¹, 裴香萍^{1*}, 杜晨晖¹, 裴妙荣¹, 闫艳², 李慧峰¹

1. 山西中医学院中药学院, 山西 太原 030600

2. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

摘要: 目的 通过 UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱技术分析中华苦苣菜与苣荬菜中主要化学成分的异同。方法 采用 Agilent Poroshell 120 色谱柱 (100 mm×3 mm, 2.7 μm), 并以甲醇-0.5%冰醋酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 体积流量为 0.3 mL/min, 质谱使用 ESI 离子源, 正、负离子模式扫描采集数据。结果 通过正、负离子质谱信息及元素组成分析, 并结合相关文献和对照品数据对照, 鉴定出中华苦苣菜中 9 种化学成分、苣荬菜中 10 种化学成分; 中华苦苣菜与苣荬菜中共有化学成分有 9 种, 其中 7 种有机酸类和 2 种黄酮类成分。结论 利用 UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱技术, 分析中华苦苣菜与苣荬菜中主要化学成分, 为控制中华苦苣菜与苣荬菜药材质量及临床应用提供科学依据。

关键词: 中华苦苣菜; 苣荬菜; 超高效液相色谱-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱; 菊苣酸; 有机酸类; 黄酮类

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)07-1543-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.07.009

Identification of major chemical constituents in *Ixeris chinensis* and *Sonchus brachyotus* by UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS

LIU Hai-xia¹, PEI Xiang-ping¹, DU Chen-hui¹, PEI Miao-rong¹, YAN Yan², LI Hui-feng¹

1. College of Chinese Materia Medicine, Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030600, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** To identify the similarities and differences of the main chemical constituents between *Ixeris chinensis* and *Sonchus brachyotus* by UHPLC-Q exactive orbitrap-HRMS. **Methods** The analysis was performed on an Agilent Poroshell 120 reverse phase column (100 mm × 3 mm, 2.7 μm). The mobile phase consisted of methanol and 0.5% acetic acid, which was used for gradient elution, and the flow rate was 0.3 mL/min. Q exactive orbitrap-HRMS spectrometry was applied for the qualitative analysis under positive and negative ion modes, and ESI ion source was used for mass spectra. **Results** The results indicated that nine compounds from the ethanol extract of *I. chinensis* and ten compounds from the ethanol extract of *S. brachyotus* had been identified by direct comparison in both positive and negative ion mass data, the element compositions analysis, and the data of the literature. Among them, there were nine compounds are the same, which were seven organic acids and two flavonoids compounds. **Conclusion** The efficient separation ability of UHPLC and high sensitive detection of MS were used in this study, which will provide the evidences for evaluating the quality of *I. chinensis* and *S. brachyotus* and stabilizing the curative effect in clinic.

Key words: *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai; *Sonchus arvensis* DC.; UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS; cichoric acid; organic acids; flavonoids

中华苦苣菜 *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai 为菊科苦苣菜属 *Ixeris* Cass. 植物, 又名苦菜、小苦苣、山苦苣等, 主要分布在北部、南部及东部省区, 以全草入药, 具有清热解毒、凉血消肿等功效^[1]。苣荬菜 *Sonchus brachyotus* DC. 为菊科苦苣属一年或

多年生草本植物, 又名苦菜、苦苣菜, 主要分布于中国华北、西北、华南等地, 具有清湿热、消肿排脓等功效^[2-3], 二者在民间常作为野菜使用。我国地方药材标准中二者多作为北败酱药材收录, 《北京市中药材标准》1998 年版^[4]、《甘肃省中药材标准》1995

收稿日期: 2017-10-27

基金项目: 山西省科技厅项目 (2013072002); 山西省食品药品监督管理局项目 (2011023A)

作者简介: 刘海霞 (1989—), 女, 硕士, 研究方向为中药质量标准及中药药效物质基础研究。E-mail: liuhaixin.169@163.com

*通信作者 裴香萍 (1969—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中药质量标准及中药药效物质基础研究。E-mail: peixp69@163.com

年版^[5]、《湖南省中药材标准》2009 年版^[6]将苣荬菜收录在北败酱项下；《山东省中药材标准》2002 年版^[7]、《吉林省中药材标准》1977 年版将中华苦苣菜收录在北败酱项下；2012 年《山西省中药材标准》修订品种北败酱项下，药材来源为中华苦苣菜与苣荬菜的干燥全草。二者化学成分与药理作用具有相似性，多含有黄酮类及有机酸类成分，同具有抗炎保肝的药理作用，为进一步研究二者质量控制方法，本实验采用 UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱技术（UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS）对主要化学成分进行鉴定分析，为其临床应用提供依据。

1 仪器与试剂

Thermo Fisher U3000 超高效液相色谱仪，配置在线脱气、四元梯度泵、柱温箱、自动进样器，Thermo Fisher Q Exactive 质谱联用仪（美国 Thermo 公司）；梅特勒 AB135-S 电子分析天平（上海志荣电子科技有限公司精密密度为十万分之一）；乙醇（分析纯，天津市进丰化工有限公司）；甲醇（色谱纯，瑞典 Oceanpak 公司）；冰乙酸（分析纯，天津科密欧化学试剂有限公司）；娃哈哈纯净水等。

对照品绿原酸（批号 110753-201314）、菊苣酸（批号 111752-200902）、木犀草苷（111968-201301），购于中国食品药品检定研究院；对照品异绿原酸 C（批号 14111414）购于成都曼斯特生物科技有限公司，所有对照品质量分数均大于 98%。中华苦苣菜、苣荬菜药材采于山西介休，经山西中医学院鉴定教研室裴香萍副教授鉴定为菊科植物中华苦苣菜 *Ixeris chinensis* (Thunb.) Nakai 和苣荬菜 *Sonchus brachyotus* DC. 的干燥全草。

2 方法

2.1 UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS 分析

2.1.1 液相色谱条件 Agilent Poroshell 120 色谱柱（100 mm×3 mm，2.7 μm），流动相为甲醇（A）-0.5% 冰醋酸水（B）。梯度洗脱：0~3 min，10%~18% A；3~5 min，18%~20% A；5~7 min，20%~25% A；7~14 min，25%~35% A；14~18 min，35%~40% A；18~26 min，40%~45% A。体积流量 0.3 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 1 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源（ESI）；正、负离子扫描模式（ESI⁺、ESI⁻）；DAD 扫描范围 190~400 nm，检测波长 254、300、330 nm。喷雾电压：3.5 Kv，鞘气体积流量：35 arbitrary units，辅助气体体积流量：

10 arbitrary units，毛细管温度 350 ℃，透镜电压 55 V，扫描范围 m/z 100~1 500，质量分辨率 70 000。

2.2 对照品溶液制备

取绿原酸对照品 4.12 mg、菊苣酸对照品 11.20 mg、木犀草苷对照品 4.01 mg、异绿原酸 C 对照品 1.20 mg，精密称定，置于 10 mL 量瓶中，加 70% 乙醇定容，制成混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备

分别取干燥的中华苦苣菜与苣荬菜全草粉末（过 40 目筛）约 1 g，精密称定，置圆底烧瓶中，精密加入 70%乙醇 50 mL，称定质量，加热回流提取 1 h，放至室温，补足减失质量，10 000 r/min 离心 10 min，取上清液 0.45 μm 微孔滤膜滤过，备用。

3 结果与分析

采用 UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS 对中华苦苣菜和苣荬菜醇提物化学成分进行分析，（-）ESI-MS 和（+）ESI-MS 的质谱总离子流图（TIC），见图 1。

3.1 中华苦苣菜中主要化学成分的鉴定

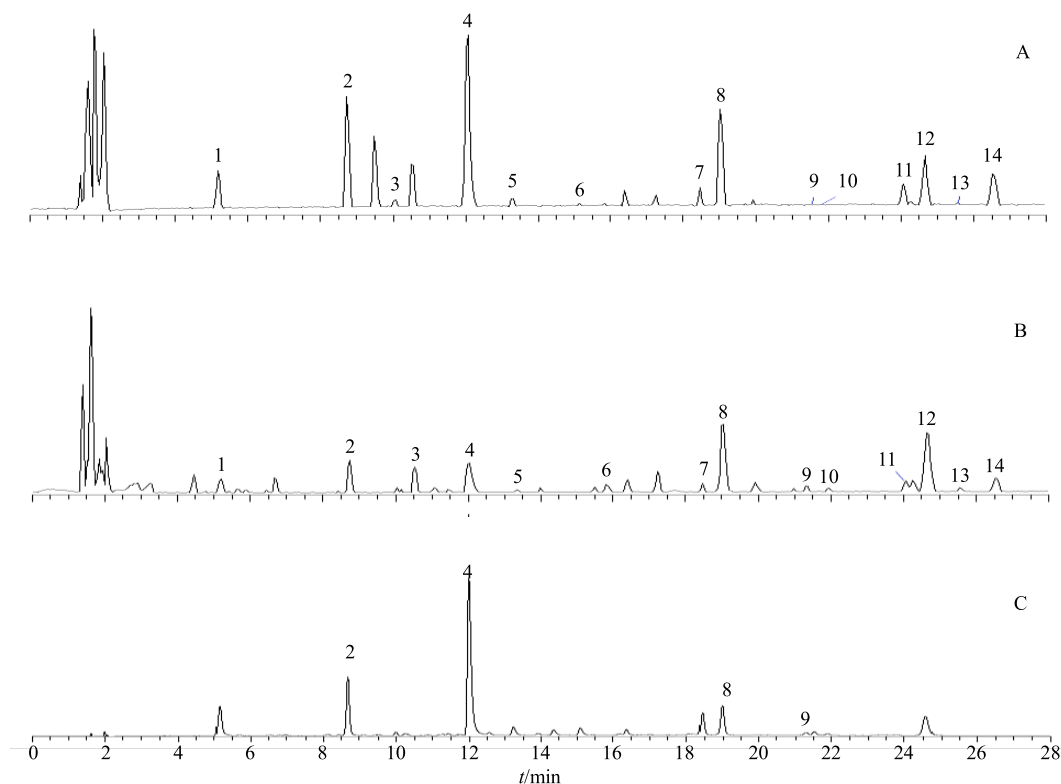
采用 Q Exactive Orbitrap-HRMS，误差以小于 5×10^{-6} 为准，共分析中华苦苣菜中 14 种成分，见图 1 及表 1。其中绿原酸与木犀草苷为已知成分（化合物 2、8），其余化学成分根据各自裂解特征以及结合文献报道推测^[8-9]，并标定了其中 7 种化合物（化合物 1、4~7、9、10）。

峰 1 对应分子离子峰为 $[M-H]^-$ ， m/z 311.040 10，分子式 $C_{13}H_{12}O_9$ ，二级碎片 m/z 149 $[TA-H]^-$ 为酒石酸根（tartaric acid）， m/z 179 $[CA-H]^-$ 为咖啡酸根（caffeic acid）， m/z 135 $[CA-H-CO_2]^-$ ，推测其为咖啡酰酒石酸（caffeoyltartaric acid，CTA）^[10]。

峰 2 对应分子离子峰为 $[M-H]^-$ ， m/z 353.086 03，分子式 $C_{16}H_{18}O_9$ ，二级碎片 m/z 191 $[QA-H]^-$ ， m/z 173 为奎宁酸脱掉 1 分子水形成 $[QA-H_2O-H]^-$ ，与对照品比对，确定化合物 2 为 5-咖啡酰奎宁酸（5-caffeoylquinic acid，绿原酸）。

峰 4 对应分子离子峰为 $[M-H]^-$ ， m/z 473.070 01，分子式 $C_{22}H_{18}O_{12}$ ，二级碎片 m/z 149 $[TA-H]^-$ ， m/z 179 $[CA-H]^-$ ， m/z 311 为 $[M-H]^-$ 脱去咖啡酰基 m/z 162 生成 $[CTA-H]^-$ ，与对照品比对，确定化合物 4 为菊苣酸。

峰 5 产生离子碎片与色谱峰 4 基本相同，推测与化合物 4 为同分异构体，根据文献报道^[11]推测化合物 5 为内消旋菊苣酸。



A-负离子模式 B-正离子模式 C-LC-UV 图
A-negative ion mode B-positive ion mode C-LC-UV

图 1 中华苦蕒菜提取物 UHPLC-Q Excactive Orbitrap-HRMS

Fig. 1 UHPLC-Q Excactive Orbitrap-HRMS chromatograms of extract for *I. chinensis*

表 1 UHPLC-Q Excactive 轨道阱高分辨质谱鉴定中华苦蕒菜中的化学成分

Table 1 Characterization of chemical constituents in *I. chinensis* by UHPLC-Q Excactive Orbitrap-HRMS

峰号	保留时间/min	模式	<i>m/z</i>	分子式	误差($\times 10^{-6}$)	MS/MS	化合物
1	5.18	[M-H] ⁻	311.040 10	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	1.098	179, 149, 135	咖啡酰酒石酸
2*	8.71	[M-H] ⁻	353.086 03	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-1.922	191, 173	5-咖啡酰奎宁酸 (绿原酸)
3	10.50	[M-H] ⁻	485.200 81	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₁	-1.913	425, 343, 310, 263	—
4*	12.22	[M-H] ⁻	473.070 01	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	-3.049	311, 293, 272, 219, 191, 179, 149, 135, 112	菊苣酸
5	13.16	[M-H] ⁻	473.069 76	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	-3.577	311, 293, 219, 191, 179, 149, 135, 112	菊苣酸异构体
6	15.21	[M-H] ⁻	487.085 82	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	-2.633	325, 293, 193, 179, 149, 135	咖啡酰阿魏酰酒石酸
7	18.55	[M-H] ⁻	515.116 88	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	-2.956	353, 191, 179, 161, 135	3,5-二咖啡酰奎宁酸 (异绿原酸 A)
8*	18.97	[M-H] ⁻	447.091 16	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-2.299	285	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 (木犀草苷)
9*	21.61	[M-H] ⁻	515.116 88	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	-2.956	353, 191, 179, 173, 155, 135	4,5-二咖啡酰基奎宁酸 (异绿原酸 C)
10	21.98	[M+H] ⁺	433.110 96	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-4.533	271, 164, 153	芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷
11	24.13	[M-H] ⁻	557.199 83	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₁	-3.425	488, 395, 217, 199, 184, 151, 133	—
12	24.71	[M-H] ⁻	533.091 00	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₄	-2.854	489, 447, 297, 285, 277, 199, 151	—
13	25.62	[M-H] ⁻	523.215 76	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₁	-3.112	495, 423, 358, 199, 149, 117	—
14	26.48	[M-H] ⁻	557.199 95	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₁	-3.209	423, 395, 199, 179, 151, 133	—

*与对照品比对, 下同

*indicates comparison with reference substance, same as below

峰6对应分子离子峰为 $[M-H]^-$, m/z 487.085 82, 分子式 $C_{23}H_{20}O_{12}$, 二级碎片 m/z 193 $[FA-H]^-$ 为阿魏酸根 (ferulic acid), m/z 325 为分子离子脱去咖啡酰基 m/z 162 生成阿魏酰酒石酸结构 $[FTA-H]^-$, m/z 179, 135, 均为咖啡酸结构特征离子碎片, m/z 149 为酒石酸结构特征离子 $[TA-H]^-$, 推测化合物6为阿魏酸、咖啡酸、酒石酸缩合而成, 判断化合物6为咖啡酰阿魏酰酒石酸^[10]。

峰7与色谱峰9分子离子峰 $[M-H]^-$, 均为 m/z 515.116 88, 分子式均为 $C_{25}H_{24}O_{12}$ 二级质谱中均含有碎片 m/z 179 $[CA-H]^-$, m/z 173 $[QA-H_2O-H]^-$, m/z 161 $[CA-H_2O-H]^-$, 推测化合物中含有咖啡酸、奎宁酸等结构; m/z 353 $[CQA-H]^-$ 推测化合物中含有咖啡酰奎宁酸结构。化合物7与化合物9为异构体, 根据文献报道^[9]推测化合物7为3,5-二咖啡酰奎宁酸, 与对照品比对, 化合物9为4,5-二咖啡酰奎宁酸。

峰8分子离子峰 $[M-H]^-$, m/z 447.091 16, 分子式 $C_{21}H_{20}O_{11}$, 二级质谱 m/z 285 为分子离子脱去1分子葡萄糖 (相对分子质量 162) 形成, 与对照品比对, 确定化合物8为木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷。

峰10正离子扫描分子离子峰 $[M+H]^+$, m/z 433.110 96, 分子式 $C_{21}H_{20}O_{10}$, 二级质谱中 m/z 271 为分子离子脱去一分子葡萄糖 (相对分子质量 162) 形成的芹菜素苷元, 通过与对照品比对, 确定化合物10为芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷。

3.2 苣荬菜中主要化学成分的鉴定

采用UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS, 共分析苣荬菜中15种成分, 见图2及表2。其中绿原酸为已知成分 (化合物2), 根据各自裂解特征, 结合文献数据^[9], 对10种化合物进行推断。

色谱峰1、2、3、4、7、9、13均为酚酸类化合物, 裂解规律及归属同中华苦苣菜中化合物1、2、4~7、9 UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS 分析结果。色谱峰10、15为黄酮类化合物。裂解规律及归属同中华苦苣菜中化合物8、10的Q Exactive Orbitrap-HRMS 分析结果。色谱峰8分子离子峰 $[M-H]^-$, m/z 461.070 47, 分子式 $C_{21}H_{18}O_{12}$, 二级质谱 m/z 285 为分子离子失去一分子葡萄糖醛酸残基 (相对分子质量 176) 形成, 产生的三级碎片离子 m/z 257 为山奈酚苷元掉落形成 $[山奈酚-H]^-$, 结合文献报道^[12]推断化合物8为山奈酚-3- β -葡萄糖醛酸。

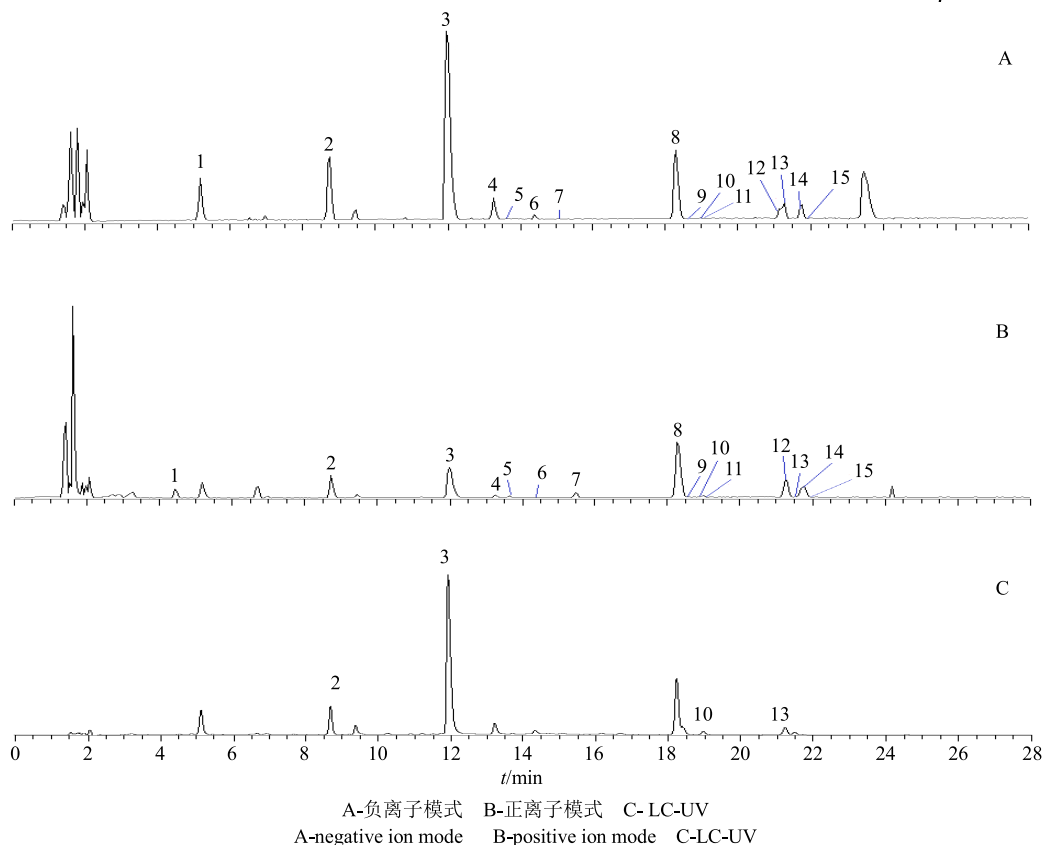


图2 苣荬菜提取物 UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS 谱图

Fig. 2 UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS chromatograms of extract for *S. brachyotus*

表 2 UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱鉴定苣荬菜中的化学成分

Table 2 Characterization of chemical constituents in *S. brachyotus* by UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS

峰号	保留时间/min	模式	m/z	分子式	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS	化合物
1	5.18	[M-H] ⁻	311.039 43	C ₁₃ H ₁₂ O ₉	-1.152	179, 149, 135	咖啡酰酒石酸
2*	8.71	[M-H] ⁻	353.086 03	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-1.922	191, 173	5-咖啡酰奎宁酸 (绿原酸)
3*	12.22	[M-H] ⁻	473.070 01	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	-3.049	311, 293, 272, 219, 191, 179, 149, 135, 112	菊苣酸
4	13.16	[M-H] ⁻	473.069 76	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	-3.577	311, 293, 219, 191, 179, 149, 135, 112	菊苣酸异构体
5	13.57	[M-H] ⁻	485.200 74	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₁	-2.057	425, 263, 179, 161, 119	—
6	14.43	[M-H] ⁻	457.074 40	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	-4.677	311, 295, 277, 179, 163, 135, 113	—
7	15.09	[M-H] ⁻	487.085 82	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	-1.442	325, 293, 299, 219, 193, 179, 149, 135	咖啡酰阿魏酰酒石酸
8	18.25	[M-H] ⁻	461.070 47	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	-2.130	285; MS ³ [285]: 257	山柰酚-3-β-葡萄糖醛酸
9	18.52	[M-H] ⁻	515.116 88	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	-2.956	353, 191, 179, 161, 135	3,5-二咖啡酰奎宁酸 (异绿原酸 A)
10*	18.95	[M-H] ⁻	447.091 16	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-2.299	285	木犀草素-7-O-葡萄糖苷 (木犀草苷)
11	19.05	[M-H] ⁻	593.148 74	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-2.287	523, 285, 256, 175, 151	—
12	21.28	[M-H] ⁻	445.075 59	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	-2.129	269, 175	—
13*	21.55	[M-H] ⁻	515.116 88	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	-2.956	353, 335, 191, 179, 173, 155, 135	4,5-二咖啡酰奎宁酸 (异绿原酸 C)
14	21.71	[M-H] ⁻	559.215 88	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₁	-2.661	486, 407, 196, 151, 121, 107	—
15	21.98	[M+H] ⁺	433.110 96	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-4.533	271; MS ³ [271]: 164, 153	芹菜素-7-O-葡萄糖苷

4 讨论

本实验运用 UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS 联用的技术,对中华苦苣菜与苣荬菜醇提物进行了化学成分定性分析,并找出其醇提物中可能含有的化学成分。实验在正、负离子模式检测到的化学成分,根据各个色谱峰在质谱中的精确相对分子质量、碎片信息、质谱裂解规律和色谱保留规律,并结合标准品的质谱信息和参考文献,综合中华苦苣菜与苣荬菜 UHPLC-Q Exactive 分析结果,二者含有 9 种共同化学成分,为 7 种有机酸类化合物及 2 种黄酮类化合物,7 种有机酸类化合物分别为咖啡酰酒石酸、5-咖啡酰奎宁酸、菊苣酸、菊苣酸异构体,咖啡酰阿魏酰酒石酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸。2 种黄酮类化合物分别为木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷。此外,中华苦苣菜和苣荬菜中分别有 5 种未知成分待分析确定,经查阅相关文献报道,推测中华苦苣菜中化合物 3、12、13 和苣荬菜中化合物 5、11、12 可能为黄酮苷类成分;中华苦苣菜中化合物 11、14 和苣荬菜中化合物 6、14 可能为有机酸类成分。实验将继续对二者醇提物中有机酸类和黄酮类成分进行研究。

高分辨质谱准确、快速,具有在高灵敏度的前提下保证高分辨率 (高精度) 的优点,这一技术的出现解决了中药化学成分复杂性与多样性对其物质基础研究带来的困难。本实验建立了 UHPLC-Q Exactive Orbitrap-HRMS 分析中华苦苣菜与苣荬菜主要化学成分的方法,并对结果进行分析,确立了二者主要成分的异同,为二者药理作用的发挥提供了

理论依据,并为中华苦苣菜与苣荬菜质量控制方法的制定奠定基础。

参考文献

- [1] 周宏雷,袁久荣. 中华苦苣菜化学成分的研究 [J]. 中草药, 1996, 27(5): 267-268.
- [2] 刘贤铭. 败酱草及其混淆品的鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(3): 396-397.
- [3] 谢 华. 败酱草及其混淆品鉴别 [J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(4): 995-996.
- [4] 北京市药品监督管理局编. 北京市中药材标准 [M]. 北京: 首都师大出版社, 1988.
- [5] 甘肃省食品药品监督管理局编. 甘肃省中药材标准 [M]. 兰州: 甘肃文化出版社, 2009.
- [6] 湖南省食品药品监督管理局编. 湖南省中药材标准 [M]. 长沙: 湖南科技出版社, 2009.
- [7] 山东省药品监督管理局编. 山东省中药材标准 [M]. 济南: 山东友谊出版社, 2002.
- [8] 王 放. 基于 LC-HR-MSn 的苦碟子及血栓通注射剂化学成分研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [9] 张维冰,王智聪,张凌怡. 超高效液相色谱-二极管阵列检测-串联质谱法测定菊花中的 10 种咖啡酰基奎宁酸和 22 种黄酮类化合物 [J]. 分析化学, 2013, 41(12): 1851-1861.
- [10] 王 放,张加余,王 青,等. HPLC-HR-MSn 法鉴定苦碟子注射液中的酚酸类成分 [J]. 中南药学, 2013, 11(8): 561-565.
- [11] 谢继国,陈 波,郭建伟,等. L-菊苣酸在不同溶剂中的光致差向异构化 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 22: 630-633.
- [12] 叶晓珂,秦 沛,李 伟,等. 液相色谱-串联质谱分离鉴定树莓叶中黄酮类化合物 [J]. 质谱学报, 2011, 32(5): 272-277.