

UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS 法结合特征裂解途径分析玄参水提物中化学成分

陈向阳, 翟 硕, 徐露露, 蒋丽娟, 姜艳艳, 刘 斌*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要:目的 采用 UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS 法结合不同化学成分群的特征裂解途径对玄参水提物中的化学成分进行快速定性分析。方法 采用 Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 0.2 mL/min, 质谱使用 ESI 离子源, 正离子模式下采集数据。结果 根据对照品质谱数据总结出环烯醚萜类和苯丙素类成分的裂解规律。通过分析玄参水提物的质谱数据及化合物元素组成, 并结合裂解规律和相关文献及 ClogP 值等, 鉴定出 61 个化合物, 包括 28 个环烯醚萜类、27 个苯丙素类以及 6 个其他类。其中 3 个乙酰化安格洛昔 C 和 methoxylscrophuloside B4 为新化合物, stegioside III 为玄参中首次发现。结论 UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS 法能够对玄参水提物中化学成分进行快速、全面地分析, 为玄参的药效物质基础阐明和质量控制提供参考。

关键词: 玄参; UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS; 裂解途径; 环烯醚萜类; 安格洛昔 C; stegioside III

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)12-2822-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.12.012

Identification on chemical constituents of aqueous extract of *Scrophulariae Radix* by UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS combined with cleavage pathways

CHEN Xiang-yang, ZHAI Shuo, XU Lu-lu, JIANG Li-juan, JIANG Yan-yan, LIU Bin

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To rapidly identify the chemical constituents from the aqueous extract of *Scrophulariae Radix* by UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS combined with cleavage pathways of different chemical constituent cluster. **Methods** The analysis was performed on an Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm). The mobile phase consisted of methanol and 0.1% formic acid aqueous solution was used for gradient elution, with a flow rate of 0.20 mL/min. ESI ion source was applied for mass spectra under positive mode. **Results** The cleavage pathways of iridoids and phenylpropanoids were summarized based on mass data of standards. The constituents of the aqueous extract of *Scrophulariae Radix* were further analyzed by using the mass data and element compositions analysis, and referring with the cleavage pathways, literatures and ClogP value. A total of 61 constituents were identified, including 28 iridoids, 27 phenylpropanoids, and six others. Among them, three acetylscrophuloside C and methoxylscrophuloside B4 were new compounds, and stegioside III was identified from *Scrophulariae Radix* for the first time. **Conclusion** UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS can rapidly and comprehensively characterize the chemical constituents of the aqueous extract of *Scrophulariae Radix*, which provides a reference for the clarification of efficacy material basis and quality control of *Scrophulariae Radix*.

Key words: *Scrophulariae Radix*; UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS; cleavage pathways; iridoids; acetylscrophuloside C; stegioside III

玄参 *Scrophulariae Radix* 为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根, 具有清热凉血、滋阴降火、解毒散结等功效, 临床常用于骨蒸咳嗽、热入营血、热病伤阴等^[1]。玄参主要含

有环烯醚萜类、苯丙素类、苯乙醇苷类、有机酸类等成分^[2]。目前玄参化学成分研究多集中在其醇提物^[3-5], 而玄参在临床应用中则主要以水煎为主, 且现代药理研究表明玄参水提物能够有效改善心室重

收稿日期: 2018-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774101)

作者简介: 陈向阳 (1990—), 男, 在读博士, 研究方向为中药 (复方) 有效成分 (组分) 发现。E-mail: chenxiangyang92@163.com

*通信作者 刘 斌 (1967—), 男, 教授, 研究方向为中药 (复方) 有效成分 (组分) 发现与新药创制。E-mail: liubinyin67@163.com

构^[6-7]、抑制心肌肥厚^[8]、保护肝损伤^[9]等,因此为了更加真实反映玄参发挥药效的化学成分组成,对玄参水提物中的化学成分进行分析就显得尤为重要。

高分辨质谱(HRMS)技术作为一种具有高灵敏度、高分辨率的定性能力和强大分子结构表征能力的分析技术,能够实现快速、高效地分析复杂化合物,现被广泛应用到药物成分分析、代谢组学、蛋白质组学以及食品安全等研究领域^[10]。线性离子阱-串联静电轨道阱(LTQ-Orbitrap HRMS)高分辨质谱可提供分辨率高达 100 000 的相对分子质量和高质量精度的碎片信息,对于分析具有复杂化学成分体系的中药及其复方具有独特的优势^[11]。本研究拟借助 UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS 技术结合玄参中不同化学成分群的特征裂解途径对玄参水提物中化学成分进行较为系统的分析鉴定,旨在表征玄参水提物的化学成分轮廓,为进一步阐释玄参水提物药效物质和质量控制提供依据。

1 仪器与材料

KQ-100DE 型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); Dionex Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); LTQ-Orbitrap XL 线性离子阱-串联静电轨道阱质谱仪(美国 Thermo 公司),配有电喷雾离子源(ESI),Xcalibur 2.1 工作站; Sartorius BT25S 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司)。

玄参药材(批号 140101,产地浙江)购自安州市万联中药饮片有限公司,经北京中医药大学张媛教授鉴定为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根;甲酸和甲醇均为色谱纯(美国 Fisher 公司);水为超纯水;哈巴昔(批号 151221)和安格洛昔 C(批号 16100905)对照品购于成都普菲德生物技术有限公司,质量分数均大于 98%;哈巴俄昔(MUST-17051504)、毛蕊花糖昔(批号 MUST-17020715)对照品购于成都曼斯特生物科技有限公司,质量分数均大于 98%。

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品溶液制备 分别取哈巴昔、安格洛昔 C、哈巴俄昔、毛蕊花糖昔对照品适量,精密称定后,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇超声溶解,定容至刻度,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液制备 取玄参饮片 20 g,以 10 倍量水回流提取 2 次,每次 2 h;滤过,合并滤液;

减压浓缩至干,残留物干燥,即得玄参水提物。称取玄参水提物粉末 25.0 mg,置 10 mL 量瓶中,加 30% 甲醇超声溶解并稀释至刻度,摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.2 UPLC 条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇(A)-0.1% 甲酸水溶液(B); 梯度洗脱: 0~2 min, 2% A; 2~6 min, 2%~10% A; 6~14 min, 10%~28% A; 14~21 min, 28%~36% A; 21~25 min, 36%~55% A; 25~29 min, 55%~60% A; 29~33 min, 60%~85% A; 33~39 min, 85%~90% A; 39~40 min, 90%~100% A; 40~41 min, 100% A。体积流量 0.2 mL/min; 进样量 3 μL; 柱温 35 °C。

2.3 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),正离子检测模式,毛细管温度为 350 °C;鞘气体积流量为 40.0 μL/min;辅助气体体积流量为 20.0 μL/min;喷雾电压为 4.0 kV;毛细管电压为 25 V;管透镜电压为 110 V。质量扫描范围 m/z 100~1 500,检测分辨率 30 000;二级质谱采用数据依赖性扫描(data dependent scan, DDS),选取上一级丰度最高的 3 个峰进行碰撞诱导解离(collision induced dissociation, CID)碎片扫描, CID 激活 Q 值 0.25,激活时间 30 ms,归一化碰撞能量为 35%。

3 结果与讨论

3.1 玄参中代表性成分特征裂解规律分析

采用 UPLC-MSⁿ 对混合对照品溶液进行分析,正离子模式下采集质谱数据。根据二级质谱中碎片离子信息,总结环烯醚萜类、苯丙素类成分裂解规律。

3.1.1 环烯醚萜类化合物裂解规律 哈巴昔在一级质谱图中加合离子为 m/z 387.125 6 $[M+Na]^+$, 二级质谱图中产生碎片离子 m/z 369、269、225、207、203、189、185,其中特征性碎片离子 m/z 207 和 189 为母离子 m/z 387.125 6 相继失去 1 分子质量数为 180 的葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)和 1 分子 H_2O 产生,同时离子 m/z 387.125 6 发生糖苷键断裂失去母核碎片 $C_9H_{12}O_4$ (m/z 184) 生成离子 m/z 203 $[C_6H_{12}O_6+Na]^+$, m/z 185 则为 $[C_6H_{12}O_6+Na-H_2O]^+$, m/z 387.125 6 失去 1 分子质量数为 162 的脱水葡萄糖($C_6H_{10}O_5$)和 1 分子 H_2O 分别产生碎片离子 m/z 225 $[M+Na-Glc]^+$ 和 m/z 369 $[M+Na-H_2O]^+$; 此外,二级质谱中可见碎片离子 m/z 269,其元素组成分析

显示为 $C_{11}H_{18}O_6Na$, 推测其为离子 m/z 387.125 6 的葡萄糖吡喃环上的键发生断裂失去 $C_4H_6O_4$ (m/z 118) 中性碎片产生。哈巴苷二级质谱图和裂解途径见图 1-A 和图 2。

哈巴俄苷在一级质谱图中加合离子为 m/z

517.165 7 $[M+Na]^+$, 其特征二级碎片离子 m/z 369 和 m/z 351 为离子 m/z 517.165 7 相继失去 1 分子肉桂酸 ($C_9H_8O_2$) 和 1 分子 H_2O 形成, m/z 203 $[C_6H_{12}O_6+Na]^+$ 和 m/z 185 $[C_6H_{12}O_6+Na-H_2O]^+$ 为葡萄糖的特征碎片离子。哈巴俄苷二级质谱图见图 1-B。

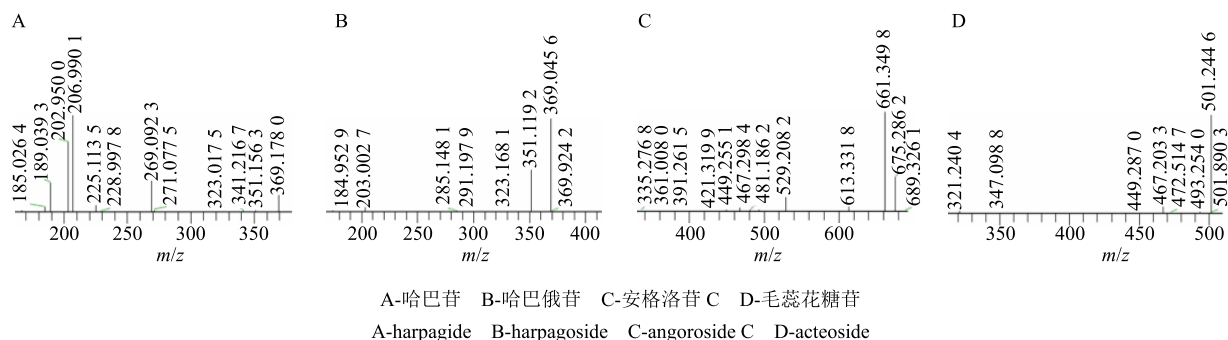


图 1 对照品的 ESI-MS² 图

Fig. 1 ESI-MS² spectrum of standards

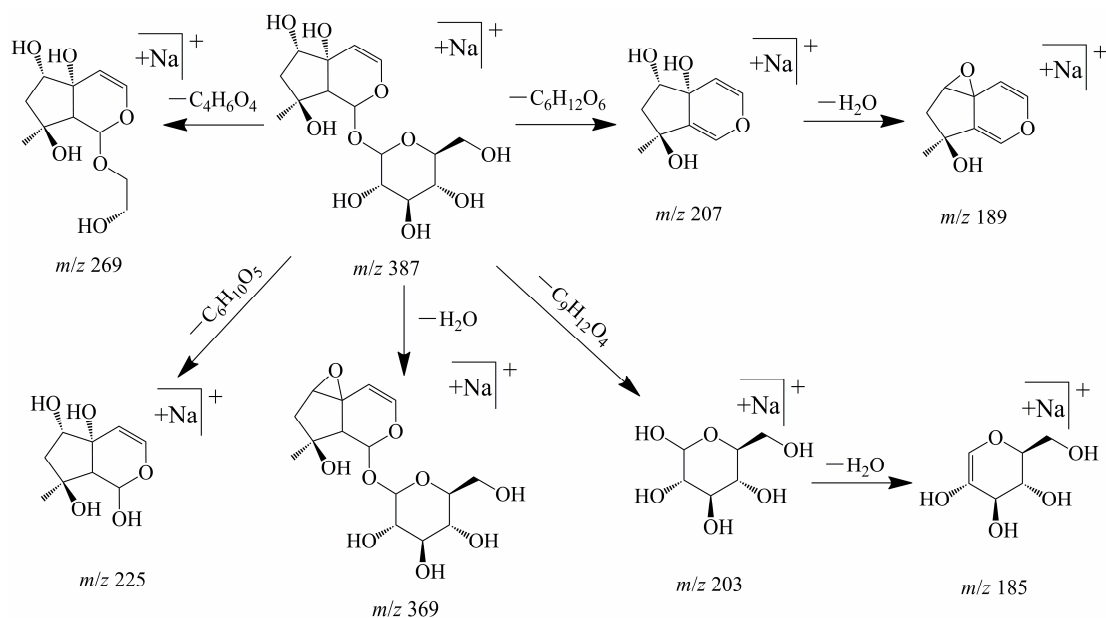


图 2 哈巴苷的裂解途径

Fig. 2 Cleavage pathway of harpagide

玄参中环烯醚萜类化合物多为葡萄糖苷类, 且常见肉桂酰基、对香豆酰基、咖啡酰基、阿魏酰基等苯丙素类取代基。基于上述裂解规律分析, 玄参环烯醚萜苷类化合物在质谱图中主要以加合离子峰 $[M+Na]^+$ 显示, 易丢失 H_2O 、葡萄糖 (m/z 162)、肉桂酸 (m/z 148)、对香豆酸 (m/z 164)、咖啡酸 (m/z 180)、阿魏酸 (m/z 194) 等中性碎片, 且二级质谱图常可见糖的特征性碎片离子 m/z 203 和 m/z 185。

3.1.2 苯丙素类化合物裂解规律 安格洛昔 C 在一

级质谱图中加合离子为 m/z 807.267 0 $[M+Na]^+$, 其二级质谱图中特征碎片离子 m/z 675、661 和 613 分别为离子 m/z 807.267 0 丢失 1 分子阿拉伯糖 (m/z 132)、1 分子鼠李糖 (m/z 146) 和 1 分子阿魏酸产生, 另可见碎片离子 m/z 529 $[M+Na-Rha-Ara]^+$ 、 m/z 481 $[M+Na-Ara-ferulic\ acid]^+$ 、 m/z 467 $[M+Na-Rha-ferulic\ acid]^+$ 、 m/z 335 $[M+Na-Rha-ferulic\ acid-Ara]^+$ 。安格洛昔 C 二级质谱图和裂解途径见图 1-C 和图 3。

毛蕊花糖苷在一级质谱图中加合离子为 m/z 647.193 2 $[M+Na]^+$, 其二级质谱中产生碎片离子 m/z 501 $[M+Na-Rha]^+$ 、 m/z 483 $[M+Na-Rha-H_2O]^+$ 、 m/z 467 $[M+Na-caffeic\ acid]^+$ 、 m/z 321 $[M+Na-caffeic\ acid-Rha]^+$; 此外, m/z 647.193 2 $[M+Na]^+$ 失去二羟基苯乙醇基结构单元碎片 $C_8H_{10}O_3$ (m/z 154) 产生碎片离子 m/z 493 $[M+Na-C_8H_{10}O_3]^+$ 。毛蕊花糖苷二级质谱图见图 1-D。

玄参中苯丙素类成分的基本骨架多由苯丙素类(如肉桂酸、对香豆酸、咖啡酸、阿魏酸等)与葡萄糖、鼠李糖及阿拉伯糖等组成, 且糖结构上常见苯乙醇基类结构取代。通过上述裂解途径分析, 苯丙素类化合物在质谱图中主要以加合离子峰 $[M+Na]^+$ 显示, 易丢失肉桂酸、对香豆酸、咖啡酸、阿魏酸等苯丙素类结构单元碎片、鼠李糖和阿拉伯糖等中性碎片, 且易脱去 H_2O 分子。

3.2 玄参水提物化学成分鉴定

采用 UPLC 条件和质谱条件对玄参水提物样品进行分析, 获取正离子模式下的总离子流图, 见图 4。根据一级质谱中精确相对分子质量信息推测化合物元素组成及分子式, 并结合二级质谱裂解碎片种类和丰度等信息, 通过对照品比对, 参考环烯醚萜类和苯丙素类成分的裂解规律及相关文献, 对玄参水提物中的化学成分进行鉴定。由于玄参化学成分存在同分异构体, 本实验采用 ChemDraw 软件计算化合物的 $ClogP$ 值, 从而对部分同分异构体的保留时间进行指认。玄参水提物化学成分具体鉴定结果见表 1。

3.2.1 环烯醚萜类化合物的结构鉴定 玄参中的环烯醚萜类化合物主要有环戊烷型、环戊烯型和环氧环戊烷型等 3 种类型。对玄参水提物的质谱数据进行分析, 参考环烯醚萜类成分的裂解规律及文献报

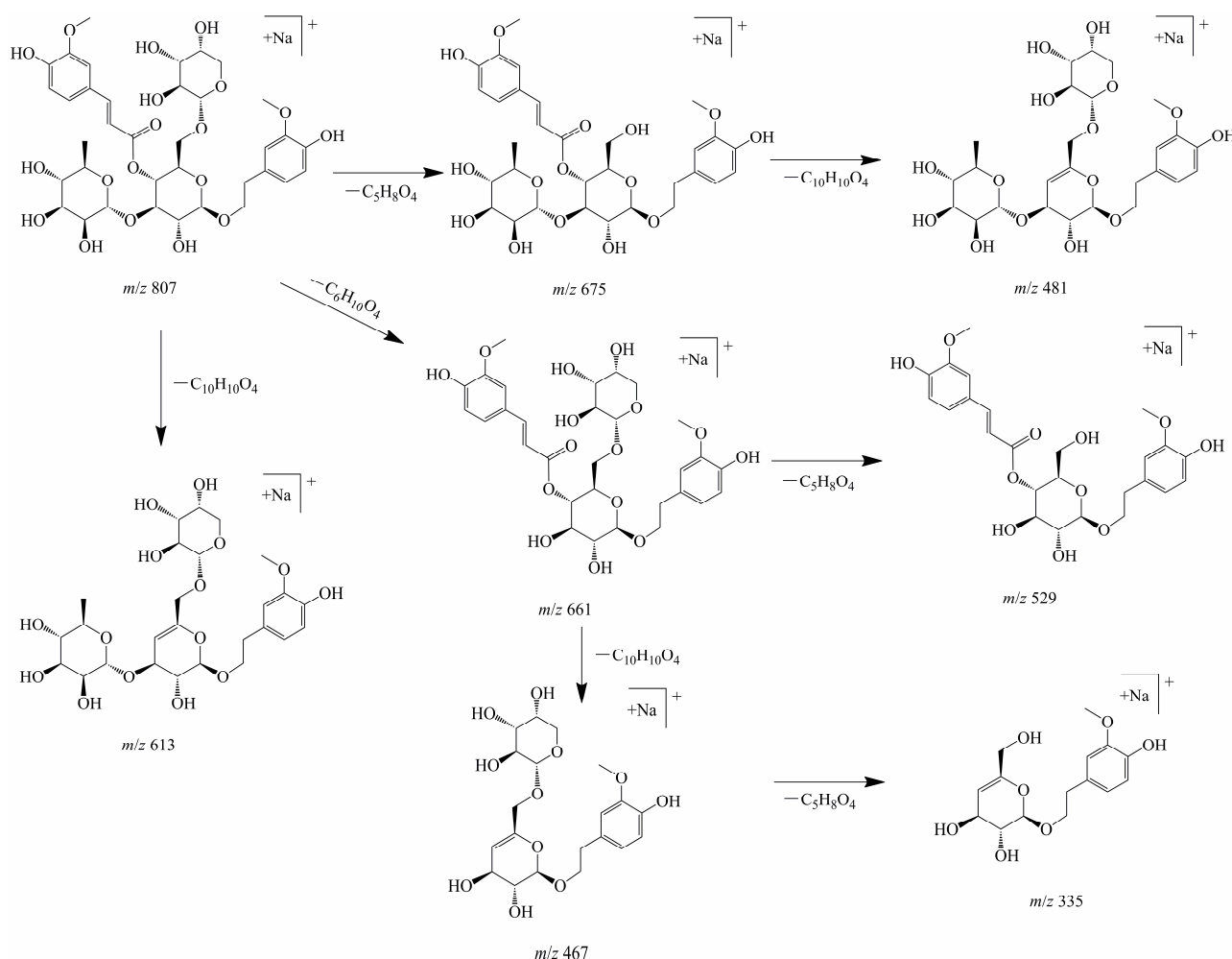


图 3 安格洛苷 C 的裂解途径
Fig. 3 Cleavage pathway of angoroside C

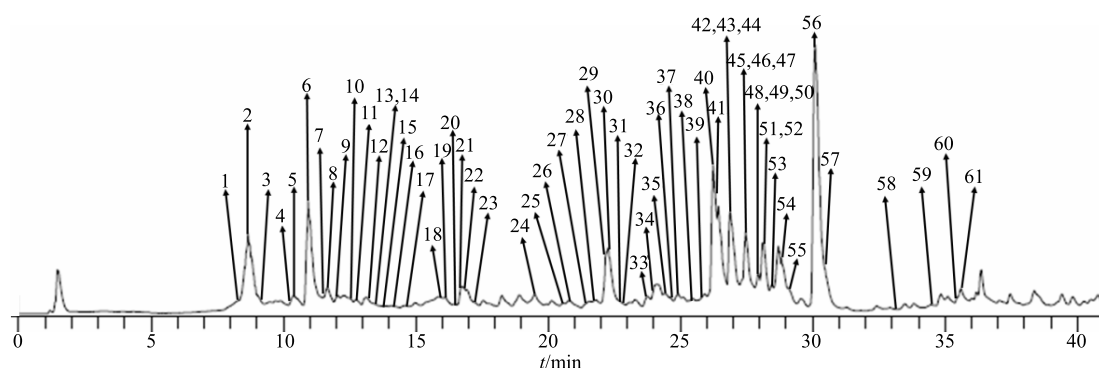


图 4 玄参水提物总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatogram of aqueous extract of *Scrophulariae Radix*

表 1 玄参水提物化学成分的 UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS 鉴定结果

Table 1 Chemical constituents identified from aqueous extract of *Scrophulariae Radix* using UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS

峰号	t_R/min	实测值 (m/z) [M+Na] ⁺	分子式	理论值 (m/z) [M+Na] ⁺	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS (m/z) [#]	化合物
1	8.45	531.166 3	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₄ Na	531.168 4	-3.9	369、351、333、503	6-O-β-葡萄糖杜仲苷 ^b
2	8.67	387.125 2	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀ Na	387.126 2	-2.6	207、203、189、369、225、185	stegioside III ^a
3	9.10	355.135 7	C ₁₅ H ₂₄ O ₈ Na	355.136 3	-1.8	193、337	ningpogside A ^c
4	10.36	399.125 1	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀ Na	399.126 2	-2.8	203、237、381	6-O-甲基梓醇 ^c
5	10.54	549.177 1	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₅ Na	549.179 0	-3.4	365、387、347、531	6'-O-β-葡萄糖哈巴苷 ^a
6	10.94	387.125 3	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀ Na	387.126 2	-2.3	207、203、269、189、369、225、185	哈巴苷 ^a
7	11.57	549.177 3	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₅ Na	549.179 0	-3.2	365、387、369、531、347	6'-O-β-葡萄糖哈巴苷异构体 ^a
8	11.66	399.125 1	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀ Na	399.126 2	-2.6	203、185、237、219	马钱苷酸 ^a
9	12.04	549.177 1	C ₂₁ H ₃₄ O ₁₅ Na	549.179 0	-3.4	365、387、347、531、369	6'-O-β-葡萄糖哈巴苷异构体 ^a
10	12.53	401.141 0	C ₁₆ H ₂₆ O ₁₀ Na	401.141 8	-0.8	221、203、383、239	3,4-二羟甲基梓醇 ^c
11	12.69	369.114 9	C ₁₅ H ₂₂ O ₉ Na	369.115 6	-2.0	351、189、203、185、171	桃叶珊瑚苷 ^b
12	13.24	401.141 1	C ₁₆ H ₂₆ O ₁₀ Na	401.141 8	-0.7	221、203、383、239	lamiol ^a
13	13.41	369.115 2	C ₁₅ H ₂₂ O ₉ Na	369.115 6	-0.4	351、189、203、185、171	7,8-去羟基哈巴苷 ^a
14	13.48	383.130 5	C ₁₆ H ₂₄ O ₉ Na	383.131 3	-1.9	203、221、351、365	6-O-甲基桃叶珊瑚苷 ^b
15	13.88	527.135 9	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₄ Na	527.137 1	-1.2	365、509、347	6-O-咖啡酰基-β-D-呋喃果糖-2-α-D-吡喃葡萄糖苷 ^d
16	14.15	527.136 3	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₄ Na	527.137 1	-1.6	365、509、347	6-O-咖啡酰基-β-D-呋喃果糖-2-α-D-吡喃葡萄糖苷异构体 ^d
17	14.83	511.141 2	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃ Na	511.142 2	-2.0	365、493、349	肉苁蓉苷 F ^d
18	15.94	511.140 7	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃ Na	511.142 2	-3.0	349、185、203、331、493	6-O-p-香豆酰基蔗糖 ^d
19	16.13	499.177 2	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₂ Na	499.178 6	-2.8	353、331、481、319	β-(3-羟基-4-甲氧基苯) 乙基 6-O-α-L-吡喃鼠李糖-(1→3)-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 ^c
20	16.49	425.140 9	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀ Na	425.141 8	-2.7	293、407	苯甲基-6-O-α-L-吡喃阿拉伯糖-β-D-吡喃葡萄糖苷 ^c
21	16.74	631.219 4	C ₂₆ H ₄₀ O ₁₆ Na	631.220 9	-2.4	485、499、353、463、615、467	去阿魏酰基哈巴俄苷 ^c
22	16.87	541.151 1	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄ Na	541.152 8	-3.1	379、361、203、523、185	西伯利亚远志糖 A5 ^d
23	17.23	541.151 6	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄ Na	541.152 8	-2.3	379、203、185、361、523	6'-O-阿魏酰基蔗糖 ^d
24	19.41	439.156 6	C ₁₉ H ₂₈ O ₁₀ Na	439.157 5	-1.9	307、317、421	Phenethyl-β-primeveroside ^e
25	20.58	657.198 9	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₇ Na	657.200 1	-1.8	495、347、477、365、333、639	6-O-肉桂酰基-β-呋喃果糖-(2→1)-O-吡喃葡萄糖-(6→1)-O-吡喃葡萄糖苷 ^d

续表 1

峰号	t_R/min	实测值 (m/z) [M+Na] ⁺	分子式	理论值 (m/z) [M+Na] ⁺	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS (m/z) [#]	化合物
26	20.91	549.156 9	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₃ Na	549.157 9	-1.7	365、531、347、207	6'-O-咖啡酰基哈巴昔 ^a
27	21.42	779.235 8	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉ Na	779.236 9	-1.4	633、647、501、599、453	ehrenoside ^d
28	21.67	375.104 5	C ₁₇ H ₂₀ O ₈ Na	375.105 0	-0.6	315、169、357、229	ningposide C isomer ^d
29	22.26	647.193 6	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅ Na	647.194 6	-1.0	501、467、321、493、483	毛蕊花糖苷 ^{a,d}
30	22.29	495.145 6	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₂ Na	495.147 3	-3.4	333、185、203、315	斩龙剑苷 A ^d
31	22.69	405.115 1	C ₁₈ H ₂₂ O ₉ Na	405.115 6	-1.3	345、169、387、327、217	ningposide B ^d
32	22.73	375.104 7	C ₁₇ H ₂₀ O ₈ Na	375.105 0	-0.9	357、315、169、229	ningposide C ^d
33	23.88	405.114 8	C ₁₈ H ₂₂ O ₉ Na	405.115 6	-0.8	387、345、327、169、217	ningposide A ^d
34	24.02	793.250 9	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉ Na	793.252 6	-2.1	647、661、515、453	scrophuloside B1 ^d
35	24.44	563.171 9	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃ Na	563.173 5	-2.9	379、545、361、207、189	6'-O-阿魏酰基哈巴昔 ^a
36	24.87	647.193 1	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅ Na	647.194 6	-2.5	501、467、321、493、485、483	异毛蕊花糖苷 ^d
37	24.96	793.250 8	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉ Na	793.252 6	-1.8	647、661、515	scrophuloside B1 isomer ^d
38	25.47	793.251 3	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉ Na	793.252 6	-1.3	647、661、515、453	scrophuloside B1 isomer ^d
39	25.86	661.209 7	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅ Na	661.210 3	-1.0	515、499、481、335、493	肉苁蓉苷 C ^d
40	26.13	563.172 1	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃ Na	563.173 5	-2.5	379、545、361、207 (0.38)、189	6'-O-阿魏酰基哈巴昔异构体 ^a
41	26.24	807.266 4	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₉ Na	807.268 2	-2.2	661、675、529、613、467、481、335	安格洛昔 C ^{a,d}
42	26.69	563.172 3	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃ Na	563.173 5	-2.2	369、351、203、185、545、401	8-O-阿魏酰基哈巴昔异构体 ^a
43	26.87	807.266 2	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₉ Na	807.268 2	-2.0	661、675、529、613、467	安格洛昔 C 异构体 ^d
44	27.12	849.277 3	C ₃₈ H ₅₀ O ₂₀ Na	849.278 8	-1.7	703、675、789、661、529、509、335	乙酰安格洛昔 C ^d
45	27.34	679.220 3	C ₃₀ H ₄₀ O ₁₆ Na	679.220 9	-0.6	531、351、513、323、203	6-O- α -D-吡喃半乳糖基哈巴昔 ^a
46	27.41	849.278 3	C ₃₈ H ₅₀ O ₂₀ Na	849.278 8	-0.5	703、675、789、661、529、509、335	乙酰安格洛昔 C ^d
47	27.69	675.225 1	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅ Na	675.225 9	-0.8	529、481、335	地黄苷 ^d
48	27.83	849.277 5	C ₃₈ H ₅₀ O ₂₀ Na	849.278 8	-1.5	703、675、789、529、509、661、335	乙酰安格洛昔 C ^d
49	27.89	675.224 6	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅ Na	675.225 9	-2.0	529、481、335、	肉苁蓉苷 D ^d
50	27.95	533.161 7	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₂ Na	533.162 9	-2.4	369、351、203、185	8-O-香豆酰基哈巴昔 ^a
51	28.13	679.220 2	C ₃₀ H ₄₀ O ₁₆ Na	679.220 9	-0.7	531、513、351、323、203	6'-O- α -D-吡喃半乳糖基哈巴昔或 6'-O- α -D-吡喃葡萄糖基哈巴昔 ^a
52	28.22	563.172 2	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃ Na	563.173 5	-1.3	369、351、203、185、545、401	8-O-阿魏酰基哈巴昔 ^a
53	28.56	389.119 7	C ₁₈ H ₂₂ O ₈ Na	389.120 7	-2.6	371、329、169	ningposide D ^d
54	28.71	517.166 0	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁ Na	517.168 0	-3.9	333、499、315、207、189	6'-O-肉桂酰基哈巴昔 ^a
55	29.11	733.230 4	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₇ Na	733.231 4	-1.4	703、571、553	scrophuloside A5 ^c
56	30.08	517.166 3	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁ Na	517.168 0	-3.3	369、351、203、185	哈巴俄苷 ^a
57	30.54	547.177 2	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂ Na	547.178 6	-2.6	369、351	8-O-甲氧基肉桂酰基哈巴昔 ^a
58	33.15	775.241 3	C ₃₅ H ₄₄ O ₁₈ Na	775.242 0	-0.7	597、537、495、435、385、477	scropolioside A ^c
59	34.64	893.283 6	C ₄₃ H ₅₀ O ₁₉ Na	893.283 9	-0.3	685、495、731、537	methoxylscrophuloside B4 ^c
60	35.46	893.283 0	C ₄₃ H ₅₀ O ₁₉ Na	893.283 9	-0.9	715、495、537、731	scrophuloside A4 ^c
61	35.61	863.271 9	C ₄₂ H ₄₈ O ₁₈ Na	863.273 3	-1.7	685、495、537、701	scrophuloside B4 ^c

*表示通过对照品比对鉴定；[#]碎片离子根据相对丰度由高到低排列；a-环戊烷型环烯醚萜类；b-环戊烯型环烯醚萜类；c-环氧环戊烷型环烯醚萜类；d-苯丙素类；e-其他类

*further confirmation in comparison with authentic standards；[#]fragment ions ranking from high relative abundance to low relative abundance；a-cyclopentane-type iridoids；b-cyclopentene-type iridoids；c-epoxycyclopentane-type iridoids；d-phenylpropanoids；e-others

道，共鉴定推断出 28 个环烯醚萜苷类成分，包括 18 个环戊烷型环烯醚萜苷类、4 个环戊烯型环烯醚萜苷类和 6 个环氧环戊烷型环烯醚萜苷类。其中，哈巴昔和哈巴俄苷通过对照品比对鉴定，其他该类

化合物的鉴定以化合物 **11**（环戊烯型）、**35**（环戊烷型）、**52**（环戊烷型）、**59**（环氧环戊烷型）、**60**（环氧环戊烷型）和 **61**（环氧环戊烷型）为例详述解析过程。

化合物 **11** (t_R 为 12.69 min) 的加合离子峰为 m/z 369.115 6 $[M+Na]^+$, 元素组成分析显示该化合物的分子式为 $C_{15}H_{22}O_9Na$ 。二级质谱产生特征碎片离子 m/z 351、189, 推测为母离子 m/z 369.115 6 相继失去 1 分子 H_2O 和 1 分子葡萄糖 (m/z 180) 形成, 另可见葡萄糖的特征碎片离子 m/z 203 $[C_6H_{12}O_6+Na]^+$ 和 m/z 185 $[C_6H_{12}O_6+Na-H_2O]^+$ 。通过上述裂解途径并结合文献报道^[5,12], 推断化合物 **11** 为桃叶珊瑚苷。

化合物 **35** (t_R 为 24.44 min) 和 **52** (t_R 为 28.22 min) 的加合离子峰分别为 m/z 563.171 9 $[M+Na]^+$ 、 m/z 563.172 2 $[M+Na]^+$, 较哈巴苷的离子 m/z 387.125 6 大 176, 说明可能存在阿魏酰基结构, 元素组成分析显示二者的分子式均为 $C_{25}H_{32}O_{13}Na$ 。化合物 **52** 二级质谱图中基峰 m/z 369 $[M+Na-ferulic\ acid]^+$ 进一步证明该化合物存在阿魏酰基结构单元, 通过分析碎片离子 m/z 351 $[M+Na-ferulic\ acid-H_2O]^+$, m/z 401 $[M+Na-Glc]^+$, m/z 203 和 m/z 185, 结合参考文献^[13-14], 推断化合物 **52** 为 8-*O*-阿魏酰基哈巴苷。化合物 **35** 二级质谱中基峰 m/z 379 则为母离子 m/z 563.172 2 失去 1 分子 $C_9H_{12}O_4$ (m/z 184) 生成, 说明为葡萄糖结构上存在阿魏酰基取代。通过上述裂解途径分析结合参考文献^[4], 推断化合物 **35** 为 6'-*O*-阿魏酰基哈巴苷。

化合物 **61** (t_R 为 25.61 min) 的加合离子峰为 m/z 863.271 9 $[M+Na]^+$, 元素组成分析显示其分子式为 $C_{42}H_{48}O_{18}Na$, 主要碎片离子为 m/z 701 $[M+Na-Glc]^+$ 、 m/z 685 $[M+Na-methoxycinnamic\ acid]^+$ 、 m/z 537 $[M+Na-methoxycinnamic\ acid-cinnamic\ acid]^+$ 、 m/z 495 $[M+Na-methoxycinnamic-cinnamic\ acid-C_2H_2O]^+$, 基于此裂解途径并结合文献报道^[5,15], 推断化合物 **61** 为 scrophuloside B4。化合物 **59** 和 **60** 的加合离子峰分别为 m/z 893.283 6 $[M+Na]^+$ 和 m/z 893.283 0 $[M+Na]^+$, 较离子 m/z 863.271 9 大 30, 元素组成分析显示二者的分子式均为 $C_{43}H_{50}O_{19}Na$ 。化合物 **60** 的特征碎片离子 m/z 715 $[M+Na-methoxycinnamic\ acid]^+$ 和 m/z 537 $[M+Na-2\ methoxycinnamic\ acid]^+$, 表明该化合物存在 2 个甲氧基肉桂酰基结构。经查阅文献报道^[5,15], 推断化合物 **60** 为 scrophuloside A4。对比之下, 化合物 **59** 的特征碎片离子为 m/z 685 $[M+Na-dimethoxycinnamic\ acid]^+$ 和 m/z 537 $[M+Na-dimethoxycinnamic\ acid-cinnamic\ acid]^+$, 表明该化合物存在 1 个二甲氧基肉

桂酰基结构, 推测该化合物为 1 个新化合物, 暂命名为 methoxylscrophuloside B4。

3.2.2 苯丙素类化合物的结构鉴定 对玄参水提物的质谱数据进行分析, 参考苯丙素类成分的裂解规律及文献报道, 共鉴定推断出 27 个苯丙素类化合物, 其中毛蕊花糖苷和安格洛苷 C 通过对照品比对鉴定, 其他该类化合物的鉴定以化合物 **30**、**39**、**44**、**46**、**48** 为例详述解析过程。

化合物 **30** (t_R 为 22.29 min) 的加合离子峰为 m/z 495.145 6 $[M+Na]^+$, 元素组成分析显示其分子式为 $C_{21}H_{28}O_{12}Na$, 特征碎片离子 m/z 333 为母离子 m/z 495.145 6 失去 1 分子质量数 162 的果糖形成, 离子 m/z 333 失去 1 分子 H_2O 和 1 分子肉桂酸分别产生 m/z 315 和 m/z 185。根据上述裂解途径并对比文献报道^[3]分析, 推断化合物 **30** 为斩龙剑苷 A。

化合物 **39** (t_R 为 25.86 min) 的加合离子峰为 m/z 661.209 7 $[M+Na]^+$, 较毛蕊花糖苷加合离子峰 m/z 647.193 2 大 14, 元素组成分析显示其分子式为 $C_{30}H_{38}O_{15}Na$ 。主要碎片离子为 m/z 515 $[M+Na-Rha]^+$ 、 m/z 481 $[M+Na-cafeic\ acid]^+$ 、 m/z 335 $[M+Na-Rha-cafeic\ acid]^+$; 此外, m/z 493 为母离子 m/z 661.209 7 失去 1 分子 $C_9H_{12}O_3$ (m/z 168) 碎片, 说明二羟基苯乙醇基结构单元上的羟基被甲基化。针对上述裂解途径结合文献报道^[5], 推断化合物 **39** 为肉苁蓉苷 C。

化合物 **44** (t_R 为 27.12 min)、**46** (t_R 为 27.41 min) 和 **48** (t_R 为 27.83 min) 的加合离子峰分别为 m/z 849.277 3 $[M+Na]^+$ 、 m/z 849.278 3 $[M+Na]^+$ 和 m/z 849.277 5 $[M+Na]^+$, 较安格洛苷 C 离子峰 m/z 807.267 0 大 42 (C_2H_2O), 且元素组成分析显示三者分子式均为 $C_{38}H_{50}O_{20}Na$ 。三者二级质谱均产生碎片离子 m/z 789、703、675、661、529、509、335, 其中 m/z 789 为离子 m/z 849 失去 1 分子 CH_3COOH 产生, 推测该 3 个化合物可能为乙酰化安格洛苷 C; m/z 703、661 和 509 分别为 $[M+Na-Rha]^+$ 、 $[M+Na-Rha-C_2H_2O]^+$ 和 $[M+Na-Rha-ferulic\ acid]^+$; 特征碎片离子 m/z 675 和 m/z 529 分别为离子 m/z 849 和 m/z 703 失去 1 分子质量数 174 的中性碎片, 结合上述分析推断该碎片为乙酰化阿拉伯糖。因此, 推测化合物 **44**、**46** 和 **48** 为 3 个新的乙酰化安格洛苷 C, 乙酰基连接位置在阿拉伯糖的 2、3 或 4 位羟基。

3.2.3 其他类化合物的结构鉴定 参考环烯醚萜类和苯丙素类成分的裂解途径, 从玄参水提物中又鉴

定出 1 个苯甲醇苷类化合物 **20** (苯甲基-6-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖- β -D-吡喃葡萄糖苷), 3 个苯乙醇苷类化合物 **19** [β -(3-羟基-4-甲氧基苯)-乙基 6-*O*- α -L-吡喃鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷]、**21** (去阿魏酰基哈巴俄苷)、**24** (phenethyl β -primeveroside) 以及化合物 **3** (ningpogoside A) 和 **10** (3,4-二羟甲基梓醇)。

4 结论

本研究首次采用 UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS 技术结合特征裂解途径实现了对玄参水提物中化学成分的快速分析鉴定。为了全面分析玄参水提物中的化学成分, 实验中采用了正、负离子 2 种质谱扫描模式对样品进行分析, 结果表明样品在正离子模式下质谱响应较好; 通过分析哈巴苷、哈巴俄苷、安格洛苷 C、毛蕊花糖苷等成分在正离子模式下的质谱数据, 发现本实验中环烯醚萜类和苯丙素类成分的裂解规律较为明确, 故最终选择对样品在正离子模式下的质谱数据进行分析。

通过高分辨质谱仪提供的精确分子质量信息, 结合元素组成分析及二级质谱碎片离子信息, 参考特征裂解途径以及相关文献, 从玄参水提物中共鉴定推断出 61 个化学成分, 其中包括 4 个新成分和 1 个玄参中首次发现成分, 结果表明玄参水提物中主要为环烯醚萜苷类、苯丙素苷类和苯乙醇苷类成分。

玄参水提物具有改善心室重构、抑制心肌肥厚、保护肝损伤等作用。文献调研发现安格洛苷 C 能够保护压力诱导的心室重构^[16], 桃叶珊瑚苷能够保护心肌梗死后心室重构^[17], 毛蕊花糖苷能够保护卡介菌与脂多糖联合诱导的肝损伤^[18]。然而, 这些研究与玄参水提物发挥药效的药效物质的完全阐明仍相距较远。本实验玄参水提物化学成分的系統研究, 不仅丰富了玄参的化学成分内涵, 而且为玄参水提物物质基础的进一步阐明及质量控制提供科学依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 胡瑛瑛, 黄真. 玄参的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 浙江中医药大学学报, 2008, 32(2): 268-270.
- [3] Wu Q, Yuan Q, Liu E H, *et al.* Fragmentation study of iridoid glycosides and phenylpropanoid glycosides in *Radix Scrophulariae* by rapid resolution liquid chromatography with diode-array detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(8): 808-819.
- [4] Chen Y H, Qi J, Hua J, *et al.* Structural characterization and identification of major constituents in *Radix*

Scrophulariae by HPLC coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(1): 47-54.

- [5] 王静哲, 徐风, 刘震, 等. 玄参化学成分 HPLC-ESI-IT-TOF-MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7): 1257-1268.
- [6] Gu W L, Chen C X, Wu Q, *et al.* Effects of chinese herb medicine *Radix Scrophulariae* on ventricular remodeling [J]. *Pharmazie*, 2010, 65(10): 770-775.
- [7] 顾伟梁, 陈长勋, 王樱, 等. 玄参水提物对心室重大鼠心肌纤维化的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1371-1374.
- [8] 顾伟梁, 陈长勋, 王樱. 玄参和附子抗鼠心肌肥厚作用的对比实验研究 [J]. 中西医结合学报, 2008, 6(4): 376-380.
- [9] 刘冠璋, 董婉茹, 于卉, 等. 玄参水提物对 CCl₄ 所致大鼠急性肝损伤的保护作用研究 [J]. 吉林中医药, 2015, 35(5): 504-507.
- [10] Lin L, Lin H, Zhang M, *et al.* Types, principle, and characteristics of tandem high-resolution mass spectrometry and its applications [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(130): 107623-107636.
- [11] 徐露露, 焦其树, 杨佳颖, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap HRMS 法结合特征裂解途径分析鉴定薄荷水提物中 4 种类群化学成分 [J]. 质谱学报, 2018, 39(4): 424-432.
- [12] 赵新峰, 李平, 孙毓庆. 熟地黄的高效液相色谱/电喷雾电离-质谱分析 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(6): 874-876.
- [13] 王静哲, 刘震, 马立满, 等. 基于 UPLC-Q-TOF MS 分析加工炮制对玄参化学成分的影响 [J]. 质谱学报, 2016, 37(1): 1-9.
- [14] Dinda B, Debnath S, Harigaya Y. Naturally occurring iridoids. [J]. *Chem Pharm Bull*, 2007, 55(2): 159-222.
- [15] Nguyen A T, Fontaine J, Malonne H, *et al.* A sugar ester and an iridoid glycoside from *Scrophularia ningpoensis* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(10): 1186-1191.
- [16] Gu W L, Chen C X, Huang X Y, *et al.* The effect of angoroside C on pressure overload-induced ventricular remodeling in rats [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(7/8): 705-712.
- [17] Yang Z, Wu Q Q, Xiao Y, *et al.* Aucubin protects against myocardial infarction-induced cardiac remodeling via nNOS/NO-regulated oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Long*, 2018, 2018: 1-15.
- [18] Zhao J, Liu T, Ma L, *et al.* Protective effect of acteoside on immunological liver injury induced by *Bacillus Calmette-Guerin* plus lipopolysaccharide [J]. *Planta Med*, 2009, 75(14): 1463-1469.