

基于 UPLC-Q-TOF/MS 法野马追化学成分分析鉴定

潘宏春¹, 秦伟瀚², 李晓明², 李卿^{2*}, 雷中惠^{3*}

1. 重庆中药饮片厂有限公司, 重庆 408000

2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

3. 重庆市长寿区人民医院 药学部, 重庆 401220

摘要: 目的 应用超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF/MS)对野马追药材的主要化学成分进行定性研究。方法 采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B) 溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.2 mL/min, 柱温为 35 ℃; 质谱分析采用信息关联模式(IDA) 正、负离子分别采集。结果 应用 PeakView 软件的 Formula Finder 等功能、在线数据库及各色谱峰的二级碎片裂解规律, 从野马追醇提样品中共鉴定出 26 个化合物, 其中 11 个成分为野马追中首次报道; 其主要成分类别包括黄酮、核苷、生物碱、苯丙素、倍半萜、香豆素、多元醇等。结论 该方法精确、可靠、高效, 适用于野马追化学成分的快速鉴定, 为阐明野马追的药效物质基础提供科学依据。

关键词: 野马追; 高效液相色谱-电喷雾电离高分辨飞行时间质谱; 裂解规律; 黄酮; 核苷; 生物碱; 苯丙素; 倍半萜

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)12-3147-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.005

Analysis of chemical constituents in *Eupatorium lindleyanum* by UPLC-Q-TOF/MS

PAN Hong-chun¹, QIN Wei-han², LI Xiao-ming², LI Qing², LEI Zhong-hui³

1. Chongqing Traditional Herbal Pieces of Decoction Factory Co., Ltd., Chongqing 408000, China

2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

3. Department of Pharmacy, Chongqing Changshou District People's Hospital, Chongqing 401220, China

Abstract: **Objective** To analyze and identify the chemical constituents from *Lindley eupatorium* by using UPLC-Q-TOF/MS. **Methods** The separation was performed on Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column with gradient elution of 0.1% formic acid (A)-acetonitrile (B), the flow rate was 0.2 mL/min. The column temperature was set at 35 ℃. The MS analysis was based on information associated mode (IDA), and positive and negative ions were collected respectively. **Results** A total of 26 compounds in *L. eupatorium* were identified by PeakView, combined with the mass spectrometry data of each chromatographic peak in the database, and the cleavage law of secondary fragment of each peak of which 11 compounds were first reported for *L. eupatorium*. The main chemical constituents included flavonoids, nucleosides, alkaloids, phenylpropanoid, sesquiterpenoids, coumarins, polyols, etc. **Conclusion** The method is accurate, reliable and efficient, which is suitable for rapid identification of ingredients in *L. eupatorium*, which provides a reference for clarify its efficacy and material basis.

Key words: *Eupatorium lindleyanum* DC.; UPLC-Q-TOF/MS; cleavage law; flavonoids; nucleosides; alkaloids; phenylpropanoid, sesquiterpenoids

野马追为菊科泽兰属植物轮叶泽兰 *Eupatorium lindleyanum* DC. 的干燥地上部分, 性平、味苦, 有止咳、化痰、平喘之功效, 常用于治疗痰多、咳嗽、

气喘等病症^[1-2]。野马追作为江苏省的道地中药材, 曾被录入《中国药典》1977 年版、1989 年版《江苏省地方药材标准》, 现收载于《中国药典》2015 年版。

收稿日期: 2019-12-04

基金项目: 重点产业共性关键技术创新专项(创新中药研究与开发项目 cstc2016zdcy-ztzz10004)

作者简介: 潘宏春, 从事中药炮制与质量控制研究。E-mail: phc6976@163.com

*通信作者 李卿 E-mail: qingl666@sina.com

雷中惠 E-mail: 1404976072@qq.com

随着对野马追药材研究的不断深入,相关药理报道还指出其具有调血脂、抗动脉粥样硬化等功能^[3-6]。本课题组通过前期研究野马追药材提取物发现,其有效部位的调血脂效果与辛伐他汀相当,部分药理检测指标优于辛伐他汀。鉴于野马追有效部位良好的药理、药效学实验结果,为了进一步研究和阐明其药效物质基础,本研究采用超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF/MS)对野马追主要化学成分进行定性鉴别^[7],为野马追的深入开发利用提供科学依据。

1 材料

LC-30A 型超高效液相色谱仪(二元高压泵、自动进样器、柱温箱,日本岛津公司);Triple TOFTM 4600 型四级杆串联飞行时间高分辨质谱仪(美国 AB 公司);Analyst 1.6 工作站、PeakView 1.2.0.3 数据处理软件;JY92-IIID 型超声波细胞粉碎机(宁波新艺超声设备有限公司);CPA225D 型十万分之一分析天平(德国赛多利斯公司)。

对照品金丝桃苷、咖啡酸、绿原酸、芦丁、腺苷、甘露醇均购于中国食品药品检定研究院,批号分别为 1521-200303、885-200102、0753-9708、100080-200306、110879-200202、110736-200933,供含量测定用;刺凌德草碱、宁德洛非碱均购于美国 SC 公司,批号分别为 10761-201711、10632-201703,所有对照品质量分数均 $\geq 98.0\%$ 。乙腈、甲醇、水为色谱级(德国 Merck 公司);甲酸为色谱级(美国 ACS 公司)。

野马追药材于 2018 年采集于江苏淮安野马追药材种植基地,经重庆市中药研究院肖铭玉副研究员鉴定为菊科泽兰属植物轮叶泽兰 *Eupatorium lindleyanum* DC. 的干燥地上部分。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),洗脱梯度:0~1.0 min, 2% B; 1.0~2.5 min, 2%~10% B; 2.5~3.0 min, 10%~30% B; 3.0~6.5 min, 30%~40% B; 6.5~9.0 min, 40%~60% B; 9.0~12.0 min, 60%~75% B; 12.0~12.1 min, 75%~2% B; 12.1~15.0 min, 2% B; 体积流量 0.2 mL/min,柱温 35 $^{\circ}$ C,进样量 2 μ L。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式,喷雾

电压(IS)为+5 500 V、-4 500 V;雾化气压力(GS1)为 0.35 kPa;气帘气压力(CUR)为 0.15 kPa;辅助气压力(GS2)为 0.30 kPa;离子源温度(TEMP)为 550 $^{\circ}$ C;簇裂解电压(DP)为 65 V;碰撞能量(CE)为 45 V;碰撞能量滚动区间(CES)为 15 V;检测模式为 IDA(信息关联采集模式),多重质量亏损(MMDF)和动态背景扣除(DBS)为触发二级的条件,满足该条件优先进行二级扫描。

2.3 溶液的制备

2.3.1 供试品溶液的制备 取野马追药材适量,粉碎后过 100 目筛,精密称取 0.5 g,置 25 mL 试管中,加入 80%甲醇 20 mL,称定质量,于超声波细胞破碎仪中超声处理 30 min(功率 600 W),取出,放冷,用 80%甲醇定容至刻度,摇匀,0.22 μ m 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3.2 对照品溶液的制备 称取适量金丝桃苷、咖啡酸、绿原酸、芦丁、腺苷、甘露醇、刺凌德草碱、宁德洛非碱对照品于 10 mL 量瓶中,加入色谱甲醇溶解定容至刻度,制成质量浓度为 1.00 mg/mL 的混合对照品溶液,备用。

3 结果

3.1 野马追化学成分分析

在上述色谱、质谱条件下获得的正、负离子模式全扫描总离子流图(TIC)见图 1。将该数据导入 PeakView 软件,获得满足质量误差小于 5×10^{-6} 、同位素分布正确且含有二级碎片的目标化合物,结合 PeakView 软件 Formula Finder 等功能、在线数据库(Human Metabolome Database、Pub Chem、Chemical Book 等)及二级碎片裂解规律,从野马追供试品溶液中找到 8 类共 26 个化合物(表 1),其中有 11 个成分为野马追药材中首次报道。

3.1.1 黄酮类 据野马追化学成分相关文献,黄酮

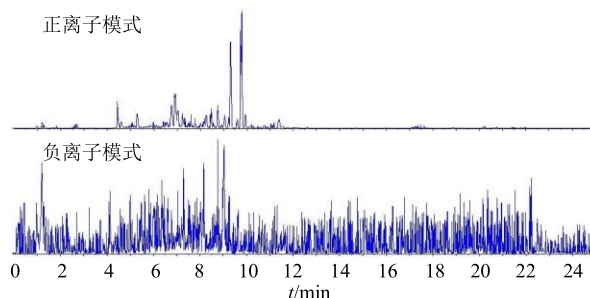


图 1 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram

表 1 定性鉴定结果
Table 1 Qualitative identification results

峰号	t_R/min	分子 离子峰	m/z			偏差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	鉴定结果
			实测值	理论值	二级碎片离子			
1*	1.09	$[\text{M}-\text{H}]^-$	181.071 55	181.071 76	163.063 3, 101.026 3, 59.017 1	1.1	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	甘露醇 [*]
2*	2.21	$[\text{M}+\text{H}]^+$	268.103 92	268.104 03	136.060 6, 119.034 1	0.4	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	腺苷
3*	3.55	$[\text{M}+\text{H}]^+$	355.102 86	355.102 36	163.038 9, 145.028 1	1.4	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	绿原酸
4*	3.94	$[\text{M}+\text{H}]^+$	300.180 32	300.180 55	156.102 0, 138.091 1, 120.080 3	0.8	$\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_5$	刺凌德草碱 [*]
5*	4.02	$[\text{M}+\text{H}]^+$	611.160 43	611.160 66	449.107 5, 287.055 1	0.4	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	芦丁
6	4.32	$[\text{M}-\text{H}]^-$	167.035 18	167.034 98	149.023 6, 121.029 6	1.2	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$	3,4-dihydroxymandelaldehyde [*]
7*	4.36	$[\text{M}-\text{H}]^-$	179.034 73	179.034 98	135.044 4	1.4	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	咖啡酸
8*	4.20	$[\text{M}+\text{H}]^+$	465.103 21	465.102 75	303.049 7	1.0	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	金丝桃苷
9*	4.42	$[\text{M}+\text{H}]^+$	286.201 04	286.201 29	242.174 5, 142.122 4, 124.111 8	0.8	$\text{C}_{15}\text{H}_{27}\text{NO}_4$	宁德洛非碱 [*]
10	6.28	$[\text{M}-\text{H}]^-$	361.162 79	361.162 98	293.176 3, 236.106 0, 221.154 0	0.5	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_4$	thyrotropin releasing hormone [*]
11	6.42	$[\text{M}-\text{H}]^-$	121.029 43	121.029 50	92.027 5	0.6	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	对羟基苯甲醛
12	6.50	$[\text{M}+\text{H}]^+$	303.049 64	303.049 93	285.035 4, 257.041 7, 229.049 3	1.0	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	槲皮素
13	6.84	$[\text{M}+\text{H}]^+$	449.108 29	449.107 84	287.055 2	1.0	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	三叶豆苷
14	6.99	$[\text{M}+\text{H}]^+$	463.196 26	463.196 29	227.108 3, 209.097 8, 199.112 7	0.1	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_9$	野马追内酯 A
15	7.08	$[\text{M}-\text{H}]^-$	377.160 33	377.160 58	261.111 9, 243.111 3, 217.122 5	0.6	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_7$	野马追内酯 M
16	7.62	$[\text{M}+\text{H}]^+$	593.187 09	593.186 48	447.129 3, 285.075 1	1.0	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	蒙花苷
17	7.93	$[\text{M}+\text{H}]^+$	207.065 01	207.065 19	191.031 5, 163.037 5	0.8	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_4$	6,7-二甲氧基香豆素
18	8.14	$[\text{M}-\text{H}]^-$	315.051 17	315.051 03	300.026 7	0.4	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	桉柳素 [*]
19	8.21	$[\text{M}+\text{H}]^+$	421.186 02	421.185 69	245.116 0, 227.105 4, 181.099 6	0.8	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_8$	野马追内酯 F
20	8.90	$[\text{M}+\text{H}]^+$	301.070 55	301.070 66	286.047 3, 258.050 5	0.4	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	鼠李柠檬素 [*]
21	9.04	$[\text{M}-\text{H}]^-$	329.066 64	329.066 68	314.042 5, 299.019 4	0.1	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	五桠果素 [*]
22	9.08	$[\text{M}+\text{H}]^+$	331.081 51	331.081 23	316.058 3, 301.034 2, 298.047 8	0.9	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	棕矢车菊素
23	9.14	$[\text{M}-\text{H}]^-$	179.071 12	179.071 37	135.081 3, 120.057 8	1.4	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$	3-methoxybenzenepropanoic acid [*]
24	9.88	$[\text{M}+\text{H}]^+$	315.086 17	315.086 31	300.059 8, 282.053 1, 254.055 7	0.5	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	鼠曲草黄素 [*]
25	10.07	$[\text{M}+\text{H}]^+$	345.097 06	345.096 88	330.073 1, 312.064 3, 284.066 4	0.5	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$	泽兰黄素
26	11.80	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	165.053 94	165.053 77	150.030 5, 122.033 9, 107.010 9	1.0	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_3$	mesifurane [*]

*野马追未报道的化学成分；*通过对对照品对比确认

*Unreported chemical composition of *E. lindleyanum*; *Identified by comparing with reference standard

类成分报道较多。表 1 结果表明，在正离子模式下，保留时间为 4.02 min，获得 m/z 611.160 43 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的质谱信号(图 2)，二级质谱出现 449.107 5、287.055 1 质谱峰，根据数据库匹配出分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ ，推测该化合物为芦丁，二级碎片离子为 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ 、 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ ，二级质谱及裂解规律分见图 3、4；保留时间为 4.20 min，获得 m/z 465.103 21 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的质谱信号(图 5)，二级质谱出现 303.049 7 质谱峰，根据数据库匹配出分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ ，推测该化合物为金丝桃苷，二级碎片离子为 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ ，二级质谱及裂

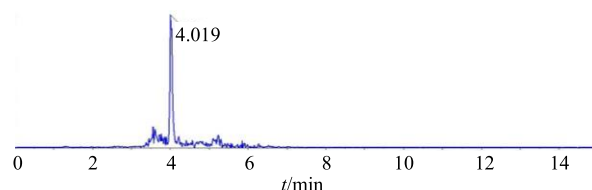


图 2 芦丁提取离子图

Fig. 2 Rutin extraction ion map

解规律分别见图 6、7；保留时间为 6.50 min，获得 m/z 303.049 64 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的质谱信号，二级质谱出现 285.035 4、257.041 7、229.049 3 质谱峰，根据数据库匹配出分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$ ，推测该化合物为槲皮

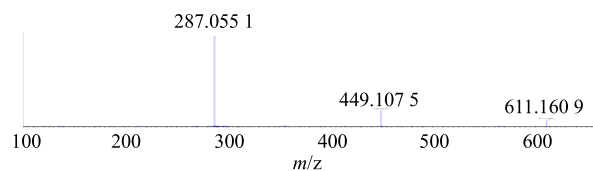


图 3 芦丁二级质谱图

Fig. 3 Secondary mass spectrogram of rutin

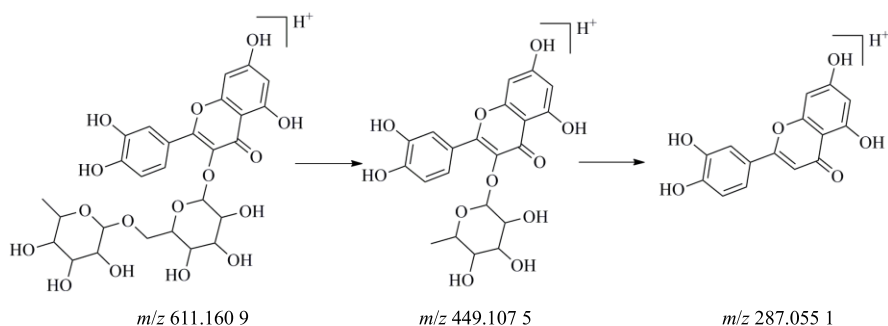


图 4 芦丁裂解规律图

Fig. 4 Mass spectrometric fragmentation pattern of rutin

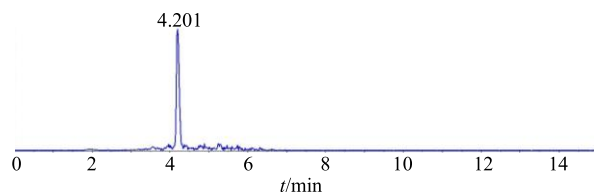


图 5 金丝桃苷提取离子图

Fig. 5 Hyperoside extraction ion map

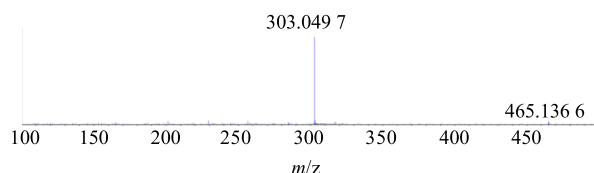


图 6 金丝桃苷二级质谱图

Fig. 6 Secondary mass spectrogram of hyperoside

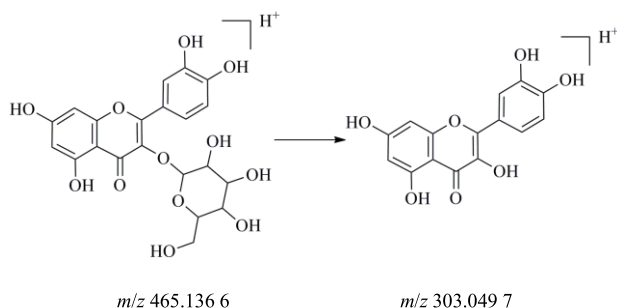


图 7 金丝桃苷裂解规律图

Fig. 7 Mass spectrometric fragmentation pattern of hyperoside

素, 二级碎片离子为 $[M+H-H_2O]^+$ 、 $[M+H-CH_2O]^+$ 、 $[M+H-CH_2O-CO]^+$; 保留时间为 6.84 min, 获得 m/z 449.108 29 $[M+H]^+$ 的质谱信号, 二级质谱出现 287.055 2 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$, 推测该化合物为三叶豆苷, 二级碎片离子为 $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$; 保留时间为 7.62 min, 获得 m/z 593.187 09 $[M+H]^+$ 的质谱信号,

二级质谱出现 447.129 3、285.075 1 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{28}H_{32}O_{14}$, 推测该化合物为蒙花苷, 二级碎片离子为 $[M+H-C_6H_{10}O_4]^+$ 、 $[M+H-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5]^+$; 保留时间为 8.90 min, 获得 m/z 301.070 55 $[M+H]^+$ 的质谱信号, 二级质谱出现 286.047 3、258.050 5 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{16}H_{12}O_6$, 推测该化合物为鼠李柠檬素, 二级碎片离子为 $[M+H-CH_3]^+$ 、 $[M+H-CH_3-CO]^+$; 保留时间为 9.04 min, 获得 m/z 329.066 64 $[M+H]^+$ 的质谱信号, 二级质谱出现 314.042 5, 299.019 4 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{17}H_{14}O_7$, 推测该化合物为五桠果素, 二级碎片离子为 $[M+H-CH_3]^+$ 、 $[M+H-2CH_3]^+$; 保留时间为 9.08 min, 获得 m/z 331.081 51 $[M+H]^+$ 的质谱信号, 二级质谱出现 316.058 3、301.034 2、298.047 8 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{17}H_{14}O_7$, 推测该化合物为棕矢车菊素, 二级碎片离子为 $[M+H-CH_3]^+$ 、 $[M+H-2CH_3]^+$ 、 $[M+H-CH_3-H_2O]^+$; 保留时间为 9.88 min, 获得 m/z 315.086 17 $[M+H]^+$ 的质谱信号, 二级质谱出现 300.059 8、282.053 1、254.055 7 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{17}H_{14}O_6$, 推测该化合物为鼠草苘黄素, 二级碎片离子为 $[M+H-CH_3]^+$ 、 $[M+H-CH_3-H_2O]^+$ 、 $[M+H-CH_3-H_2O-CO]^+$; 保留时间为 10.07 min, 获得 m/z 345.097 06 $[M+H]^+$ 的质谱信号, 二级质谱

出现 330.073 1、312.064 3、284.066 4 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{18}H_{16}O_7$, 推测该化合物为泽兰黄素, 二级碎片离子为 $[M+H-CH_3]^+$ 、 $[M+H-CH_3-H_2O]^+$ 、 $[M+H-CH_3-H_2O-CO]^+$ 。

由表 1 可知, 在负离子模式下共找到 1 种黄酮类物质, 保留时间为 8.14 min, 获得 m/z 315.051 1 7 $[M-H]^-$ 的质谱信号, 二级质谱出现 300.026 7 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{16}H_{12}O_7$, 推测该化合物为柞柳素, 二级碎片离子为 $[M-H-CH_3]^-$ 。

3.1.2 核苷类 本实验仅得到 1 种核苷类成分, 保留时间为 2.21 min, m/z 268.103 9 2 $[M+H]^+$ 的质谱信号 (图 8), 二级质谱出现 136.060 6、119.034 1 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O_4$, 推测该化合物为腺苷, 二级碎片离子为 $[M+H-C_5H_7O_4]^+$ 、 $[M+H-C_5H_7O_4-NH_3]^+$, 二级质谱及裂解规律分见图 9、10。

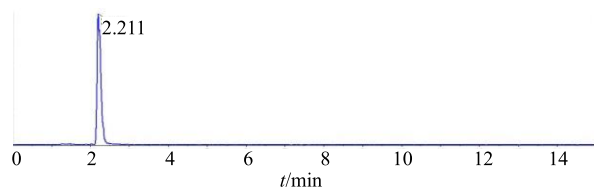


图 8 腺苷提取离子图

Fig. 8 Adenosine extraction ion map

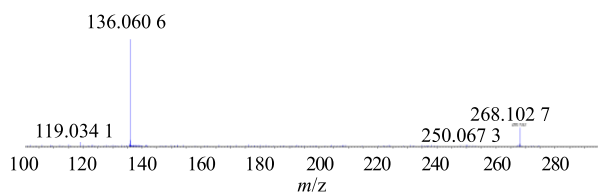


图 9 腺苷二级质谱图

Fig. 9 Secondary mass spectrum of adenosine

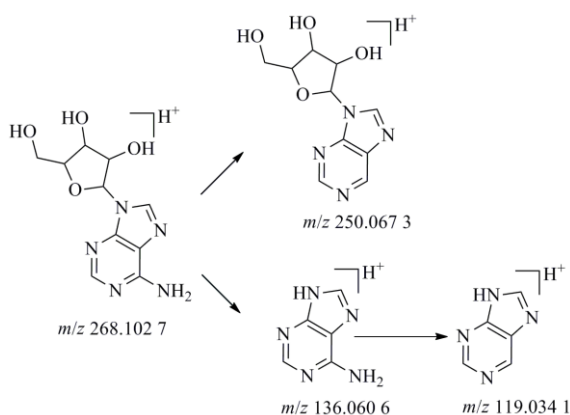


图 10 腺苷裂解规律图

Fig. 10 Mass spectrometric fragmentation pattern of adenosine

3.1.3 苯丙素类 在正离子模式下, 得到 1 种苯丙素类化合物, 保留时间为 3.55 min, m/z 355.102 86 $[M+H]^+$ 的质谱信号 (图 11), 二级质谱出现 163.038 9、145.028 1 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, 推测该化合物为绿原酸, 二级碎片离子为 $[M+H-C_7H_{12}O_6]^+$ 、 $[M+H-C_7H_{10}O_5-H_2O]^+$, 二级质谱及裂解规律分见图 12、13。

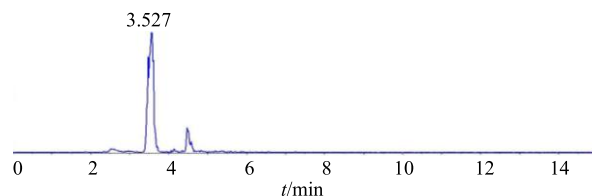


图 11 绿原酸提取离子图

Fig. 11 Chlorogenic acid extraction ion map

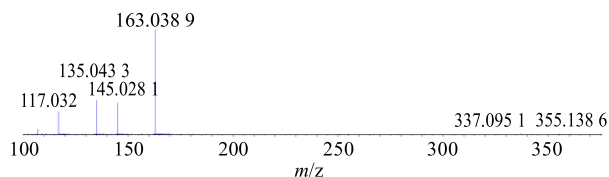


图 12 绿原酸二级质谱图

Fig. 12 Secondary mass spectrum of chlorogenic acid

在负离子模式下得到 2 种苯丙素类物质, 保留时间为 4.36 min 获得 m/z 179.034 73 $[M-H]^-$ 的质谱信号 (图 14), 二级质谱出现 135.044 4 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_9H_8O_4$, 推测该化合物为咖啡酸, 二级碎片离子为 $[M-H-CO_2]^-$, 二级质谱及裂解规律分见图 15、16; 保留时间为 9.14 min 获得 m/z 179.071 12 $[M-H]^-$ 的质谱信号, 二级质谱出现 135.081 3、120.057 8 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{10}H_{12}O_3$, 推测该化合物为 3-methoxybenzenepropanoic acid, 二级碎片离子为 $[M-H-CO_2]^-$ 、 $[M-H-CO_2-CH_3]^-$ 。

3.1.4 倍半萜类 据文献报道, 已鉴定出的野马追倍半萜类化合物达 36 个^[14]。本实验在正离子模式下找到 1 种愈创木烷型倍半萜, 保留时间为 8.21 min, 获得 m/z 421.186 02 $[M+H]^+$ 的质谱信号, 二级质谱出现 245.116 0、227.105 4、181.099 6 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{22}H_{28}O_8$, 推测该化合物为野马追内酯 F, 二级碎片离子为 $[M+H-C_7H_{11}O_5]^+$ 、 $[M+H-C_7H_{11}O_5-H_2O]^+$ 、 $[M+H-C_7H_{11}O_5-H_2O-CH_2O_2]^+$ 。在正离子模式下找到一

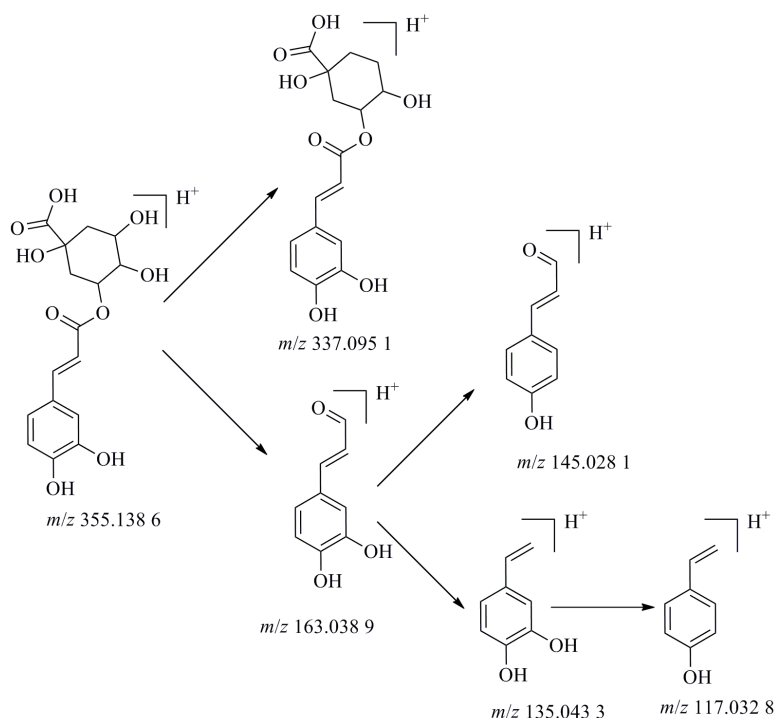


图 13 绿原酸裂解规律图

Fig. 13 Mass spectrometric fragmentation pattern of chlorogenic acid

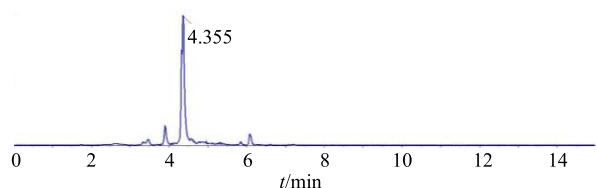


图 14 咖啡酸提取离子图

Fig. 14 Caffeic acid extraction ion map

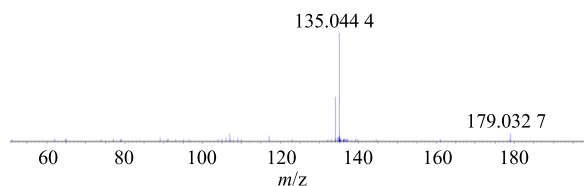


图 15 咖啡酸二级质谱图

Fig. 15 Secondary mass spectrogram of caffeic acid

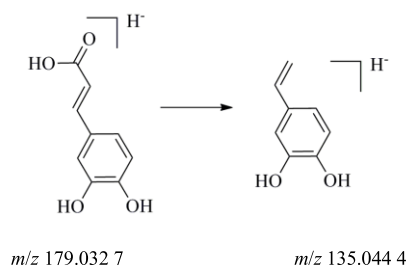


图 16 咖啡酸裂解规律图

Fig. 16 Mass spectrometric fragmentation pattern of caffeic acid

种吉马烷型倍半萜, 保留时间为 6.99 min, 获得 m/z 463.1987 $[M+H]^+$ 的质谱信号 (图 17), 二级质谱出现 227.1083、209.0978、199.1127 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{24}H_{30}O_9$, 推测该化合物为野马追内酯 A, 二级碎片离子为 $[M+H-C_{12}H_{12}O_5]^+$ 、 $[M+H-C_{13}H_{18}O_5]^+$ 、 $[M+H-C_{14}H_{16}O_5]^+$, 二级质谱及裂解规律分见图 18、19。

在负离子模式下找到 1 种杜松烷型倍半萜, 保

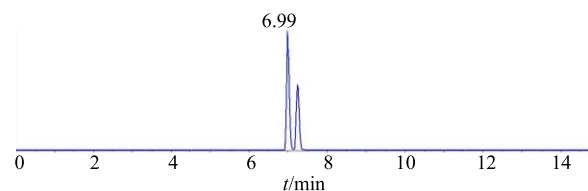


图 17 野马追内酯 A 提取离子图

Fig. 17 Eupalinilide A extraction ion map

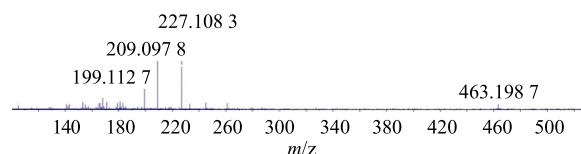


图 18 野马追内酯 A 二级质谱图

Fig. 18 Secondary mass spectrogram of eupalinilide A

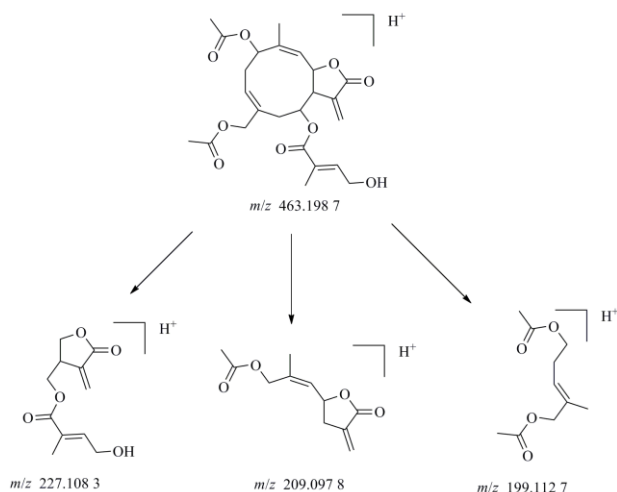


图 19 野马追内酯 A 裂解规律图

Fig. 19 Mass spectrometric fragmentation pattern of eupalinilide A

留时间为 7.08 min 获得 m/z 377.160 33 $[M-H]^-$ 的质谱信号, 二级质谱出现 261.111 9、243.111 3、217.122 5 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{20}H_{26}O_7$, 推测该化合物为野马追内酯 M, 二级碎片离子为 $[M-H-C_5H_8O_3]^-$ 、 $[M-H-C_5H_8O_3-H_2O]^-$ 、 $[M-H-C_5H_8O_3-CO_2]^-$ 。

3.1.5 香豆素类 由表 1 可见, 野马追药材供试品溶液中仅找到 1 种香豆素类化合物。在正离子模式下, 保留时间为 7.93 min, 获得 m/z 207.065 01 $[M+H]^+$ 的质谱信号, 二级质谱出现 191.031 5、163.037 5 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{11}H_{10}O_4$, 推测该化合物为 6,7-二甲氧基香豆素, 二级碎片离子为 $[M+H-CH_4]^+$ 、 $[M+H-CH_4-CO]^+$ 。

3.1.6 生物碱类 在正离子模式下共找到 2 种生物碱(刺凌德草碱、宁德洛非碱), 在负离子模式下找到 1 种生物碱(thyrotropin releasing hormone)。以上 3 种生物碱在野马追相关文献中均为首次报道。

(1) 刺凌德草碱裂解规律分析: 保留时间为 4.56 min, 获得 m/z 300.180 32 $[M+H]^+$ 的质谱信号, 理论值为 300.180 55, 二级质谱出现 156.102 0、138.091 1、120.080 3 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{15}H_{25}NO_5$, 推测该化合物为刺凌德草碱, 二级碎片离子为 $[M+H-C_7H_{12}O_3]^+$ 、 $[M+H-C_7H_{12}O_3-H_2O]^+$ 、 $[M+H-C_7H_{12}O_3-2H_2O]^+$, 刺凌德草碱提取离子、二级碎片及裂解规律见图 20、21。

(2) 宁德洛非碱裂解规律分析: 保留时间为 5.03 min, 获得 m/z 286.201 04 $[M+H]^+$ 的质谱信

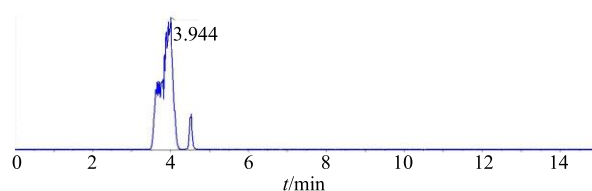


图 20 刺凌德草碱提取离子图

Fig. 20 Extraction ionogram of echinatine

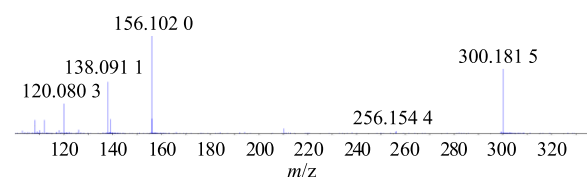


图 21 刺凌德草碱二级质谱及裂解规律图

Fig. 21 Secondary mass spectrometry and fragmentation pattern of echinatine

号, 理论值为 286.201 29, 二级质谱出现 242.174 5、142.122 4、124.111 8 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{15}H_{27}NO_4$, 推测该化合物为宁德洛非碱, 二级碎片离子为 $[M+H-C_2H_4O]^+$ 、 $[M+H-C_2H_4O-C_5H_8O_2]^+$ 、 $[M+H-C_2H_4O-C_5H_8O_2-H_2O]^+$, 宁德洛非碱提取离子、二级碎片及裂解规律见图 22、23。

(3) Thyrotropin releasing hormone 裂解规律分析: 在负离子模式下找到 1 种生物碱类物质, 保留时间为 10.79 min 获得 m/z 361.162 79 $[M-H]^-$ 的质谱信号, 理论值为 361.162 98, 二级质谱出现 293.176 3、236.106 0、221.154 0 质谱峰, 根据数据库匹配出分子式为 $C_{16}H_{22}N_6O_4$, 推测该化合物为 Thyrotropin releasing hormone, 二级碎片离子为 $[M-H-C_3H_3N_2]^-$ 、 $[M-H-C_3H_7N_3O]^-$ 、 $[M-H-C_6H_8N_2O_2]^-$; 该化合物的提取离子、二级图谱及裂解规律见图 24、25。

3.1.7 醇类 本研究仅找到 1 种多元醇。在负离子模式下, 保留时间为 1.02 min, 获得 m/z 181.071 55

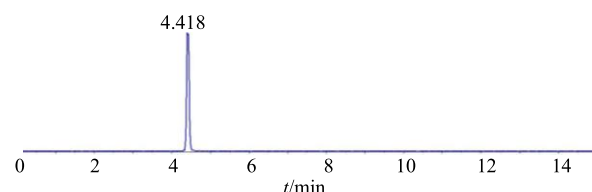


图 22 宁德洛非碱提取离子图

Fig. 22 Extraction ionogram of lindelofine

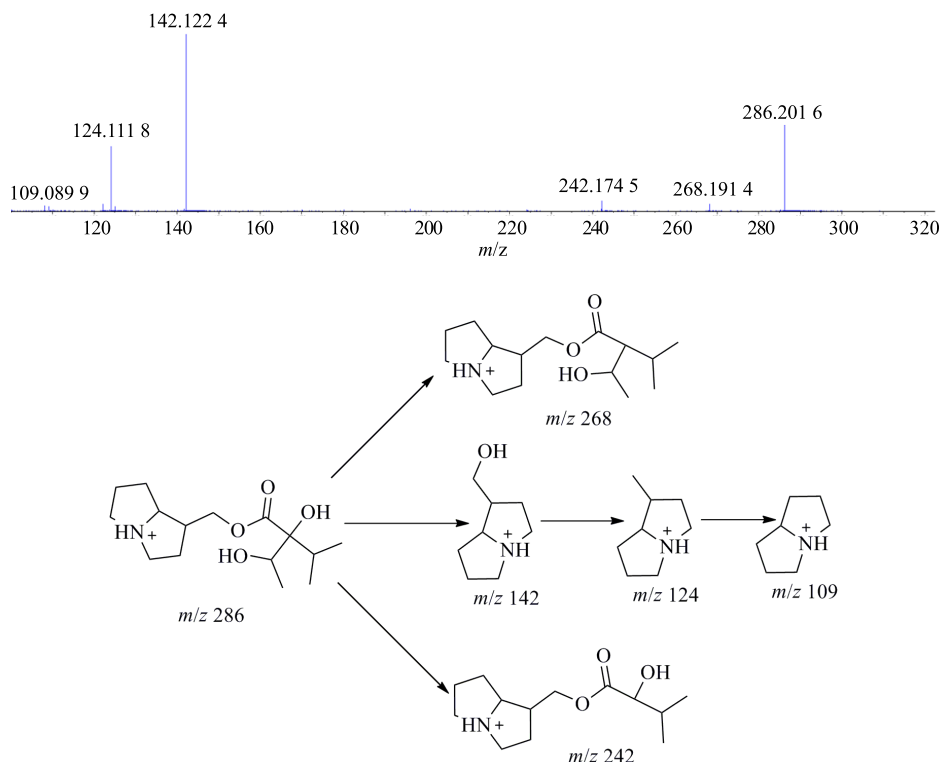


图 23 宁德洛非碱二级质谱及裂解规律图

Fig. 23 Secondary mass spectrometry and fragmentation pattern of lindelofine

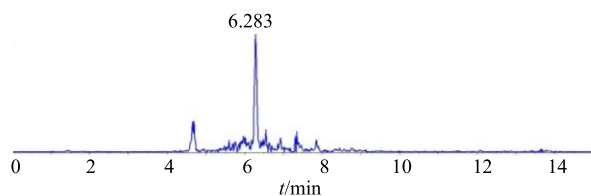


图 24 Thyrotropin releasing hormone 提取离子图

Fig. 24 Extraction ionogram of thyrotropin releasing hormone

[M-H]⁻ 的质谱信号, 理论值为 181.071 76, 二级质谱出现 163.063 3、101.026 3、59.017 1 质谱峰, 由二级碎片图可知 m/z 为 181.074 5 [M-H]⁻ 的母离子分别脱去 18.011 2、92.047 9、110.058 0、122.057 4 生成 163.063 3、89.026 6、71.016 5、59.017 1 的碎片离子; 再由 163.063 3 离子分别脱去 14.016 3、32.026 7、44.026 3、50.037 3、62.039 5 生成 149.047 0、131.036 6、119.037 0、113.026 0、101.023 8 的碎片离子; 应用 PeakView 软件的 Mass Calculators 功能计算出 H₂O、C₃H₈O₃、C₃H₁₀O₄、C₄H₁₀O₄、CH₂、CH₄O、C₂H₄O、CH₆O₂、C₂H₆O₂ 的相对分子质量分别为 18.010 02、92.046 8、110.057 36、122.057 36、14.015 10、32.025 67、44.025 67、50.036 23、62.036 23, 与上述脱去碎片差值均小于 0.01。通过谱库检索仅

发现甘露醇具有可以脱掉上述碎片结构的可能性, 据此推测该化合物为甘露醇, 其提取离子、二级碎片及裂解规律见图 26、27。

3.1.8 其他类 结合数据库、相关文献及二级碎片, 本研究从野马追醇提物中推测可能还含有对羟基苯甲醛、3,4-dihydroxymandelaldehyde、mesifurane。

4 讨论

本实验考察了野马追药材供试品的制备方法, 在参考相关文献报道基础上^[8-11], 结合质谱总离子流图的峰数及峰强度, 系统考察了供试品溶液选用不同提取溶剂 (甲醇、乙醇、醋酸乙酯、水); 不同提取方法 (冷浸、超声、回流、细胞破碎); 不同溶剂比例 (70%、75%、80%、90%) 及不同提取时间 (10 min、20 min、30 min、40 min), 最终确定以 80% 的甲醇细胞破碎 30 min 为最佳的提取方案。

通过采用超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱法 (UPLC-Q-TOF-MS) 对野马追提取物主要化学成分进行定性鉴别分析, 该实验结果显示共检测到 6 类成分 (黄酮、生物碱、脂肪酸酯、香豆素、多元醇等), 共 26 个化合物, 其中 11 个成分为野马追相关文献首次报道, 为后续野马追有效部位的开发利用和物质基础研究提供了理论依据。

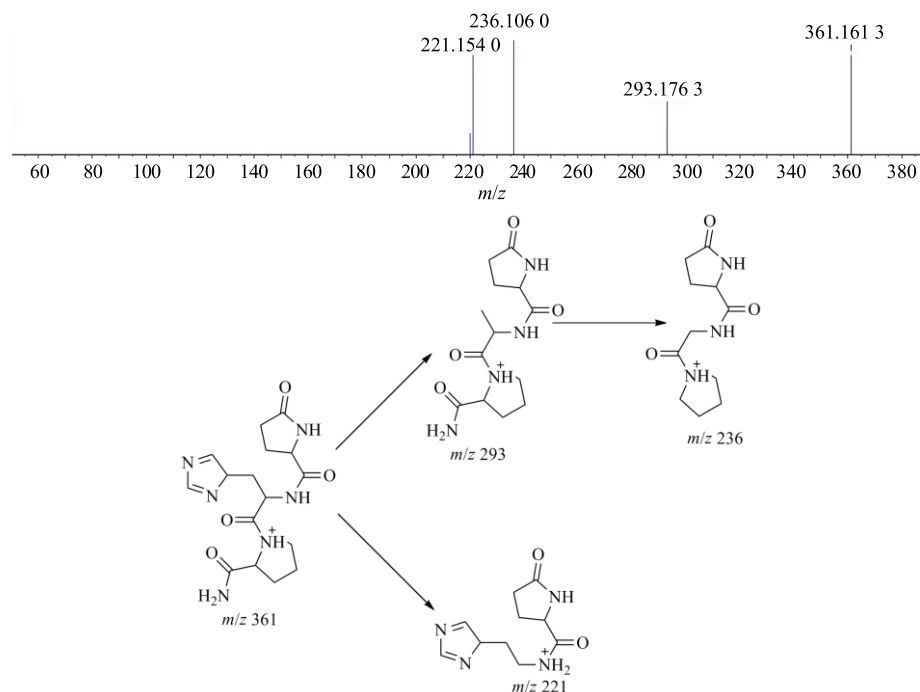


图 25 Thyrotropin releasing hormone 二级质谱及裂解规律图

Fig. 25 Secondary mass spectrometry and fragmentation pattern of thyrotropin releasing hormone

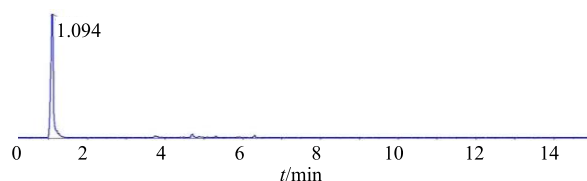


图 26 甘露醇提取离子图

Fig. 26 Extraction ionogram of mannitol

本研究结果共找到了 15 个在野马追药材中已经报道的化学成分,但某些已知成分如:木犀草素、山柰素、野马追内酯 B、东莨菪素等^[12-16]在此次分析中未曾检测到相关碎片,这可能与该化合物在 ESI 源中的离子化效率相关;野马追药材在全国多个省份、地区均有分布及栽种,作为江苏省的特色中药材,其具有不可替代的优势和作用,通过此次

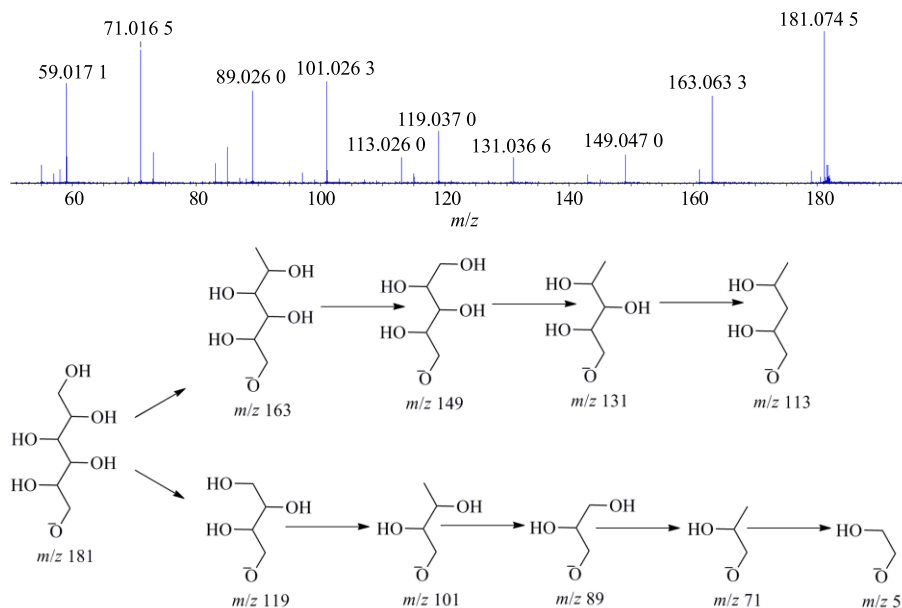


图 27 甘露醇二级质谱及裂解规律图

Fig. 27 Secondary mass spectrometry and fragmentation pattern of mannitol

分析检测,提示今后在野马追药材深入开发利用过程中,应慎重选择药材基原,以保证研究的可持续性和药效的稳定性。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李显伦, 褚纯隽, 韦孝晨, 等. 野马追各化学部位对小鼠急性肺损伤的保护作用 [J]. 西部中医药, 2017, 30(9): 9-15.
- [3] 陈万一, 秦 剑, 何海霞. 野马追总黄酮对实验性高脂血症大鼠脂代谢的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(16): 1589-1591.
- [4] 王柯静, 程 渝, 周远大. 野马追提取液对动脉粥样硬化家兔炎症反应的防治作用 [J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(18): 1853-1856.
- [5] 王柯静, 秦 剑, 陈万一. 野马追改善高脂血症大鼠血液流变性及抗氧化作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(2): 80-82.
- [6] Yan G, Ji L, Luo Y, *et al.* Antioxidant activities of extracts and fractions from *Eupatorium lindleyanum* DC [J]. *Molecules*, 2011, doi: 10.3390/molecules16075998.
- [7] 赵 慧, 严 颖, 邹立思, 等. 基于超高效液相色谱-三重四极杆飞行时间串联质谱技术分析厚朴花中化学成分 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12): 5621-5624.
- [8] 秦伟瀚, 刘 飞, 刘 翔. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析江西虫草化学成分 [J]. 中药材, 2017, 40(6): 1339-1344.
- [9] 张定堃, 韩 雪, 李瑞煜. UPLC-Q-TOF-MS 分析不同产地泥附子化学成分的差异 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(3): 463-469.
- [10] 任晓蕾, 霍金海, 孙国东. 短瓣金莲花化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3475-3481.
- [11] 胡云飞, 裴月梅, 吴 虹. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术研究不同产地牡丹皮药材化学成分的差异 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 2984-2992.
- [12] 仲欢欢, 方诗琦, 陈亚军. 野马追化学成分及其抗炎活性 [J]. 中成药, 2017, 39(2): 329-333.
- [13] 杨念云, 田丽娟, 钱士辉. 野马追地上部分的化学成分研究(II) [J]. 中国天然药物, 2005, 3(4): 224-228.
- [14] 褚纯隽, 任慧玲, 吴天威. 野马追的化学成分及其解热作用研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(5): 816-821.
- [15] Huo J, Yang S P, Ding J, *et al.* Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Eupatorium lindleyanum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2004, 9(4): 339-345.
- [16] 杨念云, 钱士辉, 段金廛, 等. 野马追地上部分的化学成分研究(I) [J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(3): 220-221.