

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术结合多元统计分析比较不同品种牛膝药材化学成分的差异

晏露婷¹, 宋永贵¹, 艾志福¹, 李惠珍¹, 杨明^{1,2}, 朱根华¹, 张琦³, 邵文祥³, 袁恩^{4*}, 苏丹^{1*}

1. 江西中医药大学 抑郁症中医证候动物模型、中药药效（防治精神障碍脑疾病）评价江西省中医药管理局重点实验室，江西 南昌 330004
2. 江西古香今韵大健康产业有限公司，江西 南昌 330004
3. 江西中医药大学中医学院，江西 南昌 330004
4. 江西中医药大学 大型仪器共享服务中心，江西 南昌 330004

摘要：目的 建立超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术（ultra performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS）结合多元统计分析技术的分析方法，比较不同品种牛膝的化学成分差异。方法 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对怀牛膝 *Achyranthes bidentata*、川牛膝 *Cyathula officinalis*、红牛膝 *Cyathula capitata* 和土牛膝 *Achyranthes aspera* 的化学成分进行分析与鉴别，并运用多元统计分析筛选不同品种牛膝的差异性成分。结果 共初步指出 230 种化学成分，其中皂苷类 81 种、生物碱类 26 种、甾酮类 12 种、有机酸类 75 种、木脂素类 19 种和黄酮类 17 种。根据变量重要性投影（variable importance in projection, VIP）值 >1 ， t 检验（ $P < 0.05$ ）从 4 种牛膝中共筛选出 25 个化学标志物。其中，竹节参皂苷、牛膝皂苷在怀牛膝中占比居多；竹节参皂苷 IVa 在红牛膝中的占比最高；甾醇、黄酮醇、有机酸和糖苷类成分在川牛膝中的占比最高；齐墩果烷型皂苷和酰胺类生物碱类成分则在安徽土牛膝中占比最多。结论 该方法快速、全面地对牛膝植物资源的成分进行系统分析，为牛膝的品种分类鉴别和资源开发利用提供了基础。

关键词：UPLC-Q-TOF-MS/MS；怀牛膝；川牛膝；红牛膝；土牛膝；竹节参皂苷；牛膝皂苷；黄酮醇；多元统计分析

中图分类号：R284.1 **文献标志码：**A **文章编号：**0253-2670(2024)07-2160-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.07.004

Comparison of differences in chemical components of different varieties of *Achyranthes bidentata* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology combined with multivariate statistical analysis

YAN Luting¹, SONG Yonggui¹, AI Zhifu¹, LI Huizhen¹, YANG Ming^{1,2}, ZHU Genhua¹, ZHANG Qi³, SHAO Wenxiang³, YUAN En⁴, SU Dan¹

1. Key Laboratory of Depression Animal Model Based on TCM syndrome, Key Laboratory of Evaluation of Traditional Chinese Medicine Efficacy (Prevention and Treatment of Brain Disease with Mental Disorders), Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
2. Jiangxi Guxiang Jinyun Comprehensive Health Industry Co., Ltd., Nanchang 330004, China
3. College of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
4. Large Scale Instrument Sharing Service Center, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To establish an analysis method combining ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) combined with multivariate statistical analysis technology, and compare the chemical composition differences of different varieties of *Achyranthes bidentata*. **Methods** Based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology, the

收稿日期：2023-09-17

基金项目：国家自然科学基金资助项目（82074014）；江西中医药大学首批校级科技创新团队项目（CXTD22008）；江西省杰青需求牵引类项目（20224ACB218008）

作者简介：晏露婷（1997—），女，硕士研究生，研究方向为中医药防治脑疾病作用机制。E-mail: lemon18070491015@163.com

*通信作者：袁恩（1992—），男，硕士研究生，研究方向为中药有效成分分析。E-mail: 1264383988@qq.com

苏丹（1982—），女，博士生导师，教授，从事中医药防治脑疾病作用机制、中药药效物质基础研究。E-mail: sud94@aliyun.com

chemical constituents of *A. bidentata*, *Cyathula officinalis*, *C. capitata* and *A. aspera* were analyzed and identified, and multivariate statistical analysis was used to screen the differential components of different varieties of *A. bidentata*. **Results** A total of 230 chemical components were preliminarily identified, including 81 saponins, 26 alkaloids, 12 sterones, 75 organic acids, 19 lignans and 17 flavonoids. A total of 25 chemical markers were screened from four kinds of varieties according to the VIP value > 1, *t*-test ($P < 0.05$). Among them, chikusetsu saponins, *A. bidentata* saponins were mostly in *A. bidentata*. The content of chikusetsu saponin IVa in *C. capitata* was the highest; the sterols, flavonols, organic acids and glycosides were abundant in *C. officinalis*. The proportion of oleanane saponins and tyramine alkaloids was the highest in *A. aspera* from Anhui. **Conclusion** This method can quickly and comprehensively analyze the components of *A. bidentata* plant resources, which provides a basis for the classification and identification of *A. bidentata* species and the development and utilization of resources.

Key words: UPLC-Q-TOF-MS/MS; *Achyranthes bidentata* Bl.; *Cyathula officinalis* Kuan; *Cyathula capitata* Moq.; *Achyranthes aspera* L.; chikusetsu saponins, *Achyranthes bidentata* saponins; flavonols; multivariate statistical analysis

《中国药典》2020 年版收载的牛膝有怀牛膝和川牛膝 2 种。怀牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根。川牛膝为苋科川牛膝 *Cyathula officinalis* K. C. Kuan 的干燥根^[1]。然而牛膝的来源复杂、品种多样,除以上 2 种药典收载的品种外,尚有红牛膝、土牛膝等混用、误用作牛膝的情况。红牛膝是指苋科头花杯苋 *Cyathula capitata* Moq. 的干燥根^[2]。成方制剂中最新版药典未收载的药材和饮片中规定土牛膝是指苋科植物粗毛牛膝 *Achyranthes aspera* L. 的干燥根及根茎。药典记载怀牛膝逐瘀通经、利尿通淋、补肝肾、强筋骨;川牛膝逐瘀通经、通利关节、利尿通淋^[1]。《中药志》^[3]言怀牛膝更长于补益肝肾,川牛膝更长于祛风利下焦湿。土牛膝则有活血散瘀、清热解毒、利尿的功效,《本草汇笺》^[4]记载其主破血气。红牛膝侧重于祛风湿,逐瘀血^[5]。可见,虽然怀牛膝、川牛膝、红牛膝、土牛膝均为同科植物干燥根,但其在功效及临床应用上差别很大。但是,目前牛膝药材在生产上混种、市场上混售的现象仍普遍存在^[6-7],这不仅给临床用药带来了极大的安全隐患,也严重阻碍了牛膝药用资源的合理利用。

不同品种牛膝的功效差异与其所含化学成分的组成密切相关,明晰常用牛膝品种的化学成分将有助于理解其活性差异并促进各品种资源的有效开发与利用。目前,对这 4 种牛膝的化学成分研究,主要集中在川牛膝和怀牛膝上,有关土牛膝和红牛膝成分分析研究匮乏,虽地方习用,但尚无相关质量控制标准。同时,对这些不同品种间的差异物质与化学成分标志物研究也为空白。故本实验采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术首先对牛膝药材的化学成分进行测定分析,获得包括土牛膝和红牛膝在内的不同牛膝品种的物质

信息。在此基础上,结合多元统计分析方法对怀牛膝、川牛膝、红牛膝、土牛膝进行差异化合物的分析比较。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-30AD 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司); TripleTOF 5600+型高分辨质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); Allegra X-64R 型高速台式冷冻离心机(德国 Beckman 公司); AE240 型十万分之一电子天平(美国 Mettler-Toledo 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂与材料

4 种不同品种牛膝药材各有数批次,其中怀牛膝包括河南武陟、焦作各 5 批;川牛膝包括四川宝兴、天全各 5 批,二者均购自于江西江中中药饮片有限公司。红牛膝包括江西新建、安义各 5 批;土牛膝包括江西新建、江西安义、安徽芜湖和安徽南陵各 5 批,具体信息见表 1。红牛膝、土牛膝由安徽中医药高等专科学校刘学医教授采集。以上 4 种牛膝药材经江西中医药大学吴蜀瑶主管药师分别鉴定为苋科植物牛膝 *A. bidentata* Bl.、川牛膝 *C. officinalis* K. C. Kuan、头花杯苋 *C. capitata* Moq.、粗毛牛膝 *A. aspera* L. 的干燥根及根茎。色谱级甲醇、乙腈(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);质谱级甲酸(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);其余试剂均为分析纯。对照品人参皂苷 R₀(批号 AFCC0151)、槲木皂苷 A(批号 AF21050702)购自于成都埃法生物科技有限公司;齐墩果酸(批号 DST20210602)购自于成都德思特生物技术有限公司;牛膝皂苷 D(批号 HR235W1)购自于宝鸡市辰光生物科技有限公司,各对照品质量分数均大于 98%。

表 1 4 种牛膝药材样品信息
Table 1 Sample information of four kinds of *A. bidentata* medicinal materials

类别	批号	产地	类别	批号	产地
怀牛膝	220120	河南武陟	红牛膝	220603	江西安义
怀牛膝	220122	河南武陟	红牛膝	220604	江西安义
怀牛膝	220314	河南武陟	红牛膝	220627	江西安义
怀牛膝	220501	河南武陟	红牛膝	220728	江西安义
怀牛膝	220724	河南武陟	红牛膝	220729	江西安义
怀牛膝	220129	河南焦作	土牛膝	220914	安徽芜湖
怀牛膝	220328	河南焦作	土牛膝	220916	安徽芜湖
怀牛膝	220427	河南焦作	土牛膝	220918	安徽芜湖
怀牛膝	220625	河南焦作	土牛膝	220920	安徽芜湖
怀牛膝	220825	河南焦作	土牛膝	220922	安徽芜湖
川牛膝	220713	四川宝兴	土牛膝	220923	安徽南陵
川牛膝	220714	四川宝兴	土牛膝	220925	安徽南陵
川牛膝	220801	四川宝兴	土牛膝	221005	安徽南陵
川牛膝	220804	四川宝兴	土牛膝	221006	安徽南陵
川牛膝	220917	四川宝兴	土牛膝	221007	安徽南陵
川牛膝	220720	四川天全	土牛膝	220924	江西新建
川牛膝	220721	四川天全	土牛膝	220926	江西新建
川牛膝	220722	四川天全	土牛膝	220928	江西新建
川牛膝	220902	四川天全	土牛膝	220930	江西新建
川牛膝	220903	四川天全	土牛膝	221002	江西新建
红牛膝	220403	江西新建	土牛膝	221003	江西安义
红牛膝	220405	江西新建	土牛膝	221004	江西安义
红牛膝	220527	江西新建	土牛膝	221005	江西安义
红牛膝	220529	江西新建	土牛膝	221008	江西安义
红牛膝	220626	江西新建	土牛膝	221010	江西安义

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液的配制 精密称取 4 种牛膝干燥样品各 2 g。分别加入 10 倍量 75%乙醇溶液，80 ℃回流提取 2 h，趁热抽滤，将滤液浓缩至约 2 mL 后用 75%乙醇溶液分别将其定容于 5 mL 量瓶中，超声混匀 30 min，最后将每种样品取出适量于 1.5 mL 离心管，放入高速离心机中 15 000 r/min 离心 10 min，分别取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜，置于 1.5 mL 液相瓶内，即得供试品溶液，备用。

2.1.2 对照品溶液的配制 精密称取齐墩果酸、牛膝皂苷 D、楸木皂苷 A、人参皂苷 R₀ 适量，分别用甲醇溶解并配制成 0.2 mg/mL 的溶液，取出适量溶液过 0.22 μm 微孔滤膜，置于 1.5 mL 液相瓶内，即

得对照品溶液，备用。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（150 mm×2.1 mm，1.7 μm），流动相 0.1%甲酸水溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱：0~15 min，5%~40% B；15~63 min，40%~95% B；63~65 min，95% B；65~65.1 min，95%~5% B；65.1~70 min，5% B。柱温 40 ℃，进样量 2 μL，体积流量 0.3 mL/min。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源（ESI），正、负离子扫描模式（用亮氨酸脑啡肽作校正液进行实时校正，以确保试验结果中分子量的精确度和重现性），质量扫描范围 m/z 100~1 500，喷雾电压（ISVE）+5 500/-5 500 V，离子源温度（TEM）500 ℃，去簇电压（DP）100 V，碰撞能量（CE）45 V，碰撞能量叠加（CES）15 V，气帘气压力（CUR）275.8 kPa，雾化气（GS1）和辅助气（GS2）压力均为 344.8 kPa，数据采集时间 70 min，采用 TOF-MS-IDA-MS/MS 方式采集数据。IDA 设置响应值超过 100 cps 的 8 个最高峰进行二级质谱扫描，子离子扫描范围 m/z 50~1 250。满足该条件的优先进行二级扫描，开启动态背景扣除（DBS）。

2.3 数据处理

利用 PeakView 1.2 软件中的 Xic Manager、Formula Finder 等功能进行分析计算，根据主成分裂解规律、对照品、相关文献和各色谱峰二级碎片离子，鉴定各牛膝品种的主要化学成分。

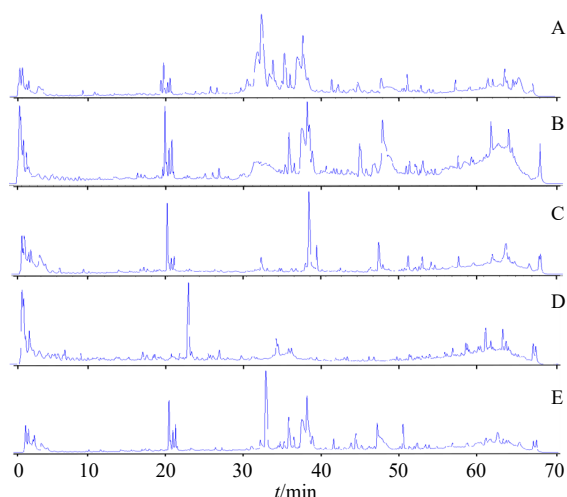
对所得质谱数据经 MarkerView 1.2.1 处理，使用 SIMCA 14.1 进行主成分分析（principal components analysis, PCA）和偏最小二乘法-判别分析（partial least squares-discrimination analysis, PLS-DA），得到变量重要性投影（variable importance in projection, VIP）值>1 的化合物信息，综合筛选不同品种怀牛膝、川牛膝、红牛膝、土牛膝的化学成分差异化合物。

2.4 不同品种牛膝总离子流图比较

如图 1、2 所示，在正、负离子模式下，牛膝各组样品的总离子流图分离度好、响应值较高。研究表明，各组样品的相似度较高、重合度较小，说明不同品种怀牛膝、川牛膝、红牛膝、土牛膝的主要化学成分种类及含量不一致。

2.5 4 种常见牛膝所含成分的系统分析

本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术按照保留时间的先后顺序采集不同品种牛膝的化学成分的



A-安徽土牛膝; B-怀牛膝; C-红牛膝; D-川牛膝; E-江西土牛膝, 图 2 同。

A-*A. aspera* of Anhui; B-*A. bidentata*; C-*C. capitata*; D-*C. officinalis*; E-*A. aspera* of Jiangxi, same as Fig 2.

图 1 UPLC-Q-TOF-MS 正离子模式总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of UPLC-Q-TOF-MS positive ion mode

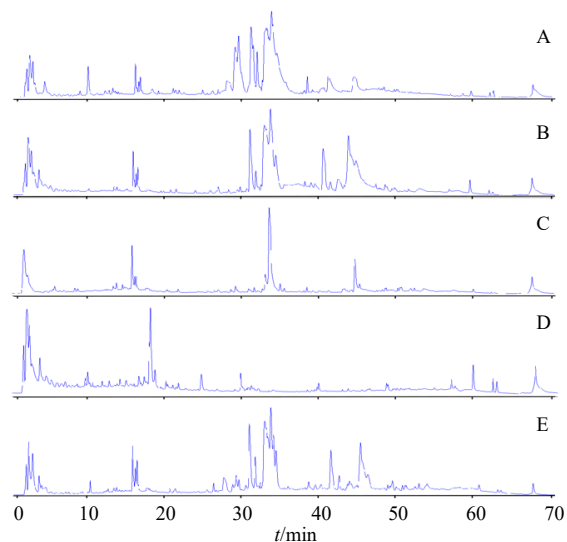


图 2 UPLC-Q-TOF-MS 负离子模式总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of UPLC-Q-TOF-MS negative ion mode

相关质谱数据,对样品溶液进行分析,得到各个样品总离子流图,见图 1、2。利用 Analyst1.6 色谱工作站中得到的精确相对分子质量及化合物二级碎片信息,使用 PeakView1.2 软件与已建立的牛膝主要成分质谱库及对照品和相关文献信息比对,根据各化合物一级质谱、二级质谱信息推测其可能的裂解过程,且质量误差绝对值均小于 5×10^{-6} ,正离子模

式下的加和物为+H、负离子模式下的加和物为-H和+HCOO,在正、负离子扫描模式下寻找牛膝所含的化学成分。最终从该 4 种常见牛膝中共鉴定出 230 种化学成分,包括牛膝皂苷类成分 81 种、甾酮类成分 12 种、生物碱类成分 26 种、有机酸类成分 75 种、木脂素类成分 19 种和黄酮类成分 17 种,具体信息见表 2。

2.5.1 牛膝皂苷类化学成分鉴定 皂苷类化学成分是牛膝中的主要活性物质,具有抗肿瘤、抗炎镇痛及免疫调节的作用。在负离子模式下,已从 4 种常见牛膝中鉴定或初步表征出牛膝皂苷类成分 81 种,这些化合物提供了强烈的去质子化离子 $[M-H]^-$ 和加合离子 $[M+HCOO]^-$ 。牛膝中主要含有齐墩果烷型三萜皂苷,它的裂解模式是皂苷母核的 C₃ 或 C₂₈ 位点糖苷单元的连续丢失,直到形成 $[oleanolic\ acid-H]^-$ 特征碎片离子。糖苷键的丢失一般倾向于优先丢失 C₂₈ 位上的糖基,这可能是由于 C₂₈ 位的酯键比 C₃ 位的醚键更易断裂。当五碳糖和六碳糖同时存在时,五碳糖优先丢失^[8]。从质谱数据中观察到糖基的种类和数量,其中 176、162、146、132 的质量数差异分别表明存在葡萄糖醛酸(GluA)、葡萄糖(Glc)、鼠李糖(Rha)和木糖(Xyl)或阿拉伯糖(Ara)^[9]。现就牛膝皂苷裂解规律,以 achyranthoside D 为例:在负离子采集模式下,二级质谱图出现了齐墩果酸母核的特征碎片离子 m/z 455.352 1,并且在低能量下给出 $[M-H]^-$ 为 m/z 1 117.509 7,其高能量下主要的特征碎片离子为 955.485 6 $[M-C_5H_7O_6-H]^-$ 、793.434 6 $[M-C_5H_7O_6-Glc-H]^-$ 、731.436 2 $[M-C_5H_7O_6-Glc-H_2O-CO_2-H]^-$ 、631.063 5 $[M-C_5H_7O_6-2Glc-H]^-$ 、455.352 1 $[M-GluA-C_5H_7O_6-2Glc-H]^-$ 、161.010 4,通过与对照品及文献报道^[8]比对,推测其为 achyranthoside D,分子式为 C₅₃H₈₂O₂₅,其二级质谱图与具体的裂解方式见图 3,其他对照品齐墩果酸、楤木皂苷 A 及人参皂苷 R₀ 的二级质谱图见图 4。

2.5.2 牛膝甾酮类化学成分鉴定 甾酮类化合物是牛膝中主要的化合物之一,它的主要结构特征是甾体母核的 C₆ 酮基、C₇ 双键、C₁₇ 上连有一个由 8-10 个碳原子所组成的含氧功能基侧链,母核上 A/B 环为顺势稠合, B/C 环为反式、C/D 环大多是反式。在负离子模式下,该类化合物的 MS 谱图有 3 个系列峰^[10]: (1) $[M-nH_2O-H]^-$ 峰; (2) C₁₇-C₂₀ 开裂

表 2 不同品种牛膝中化合物的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定结果

Table 2 UPLC-Q-TOF-MS/MS identification results of compounds in different varieties of *A. bidentata*

编号	t_R/min	化合物名称	分子式	m/z	误差 ($\times 10^{-6}$)	加合离子	二级碎片	归属	化合物 类型
1	30.82	achyranthoside D	$\text{C}_{53}\text{H}_{82}\text{O}_{25}$	1 117.509 7	2.2	M-H	1 117.509 7, 955.485 6, 455.352 1	A、C、D、G	皂苷
2	32.72	achyranthoside B	$\text{C}_{47}\text{H}_{70}\text{O}_{20}$	953.439 5	0.8	M-H	953.439 4, 793.432 6, 455.350 3	A、C、H	皂苷
3	43.44	28-deglucosyl-achyranthoside C	$\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{O}_{15}$	793.401 5	-0.1	M-H	793.401 5, 631.381 5, 455.350 8	A、C、D、G、H	皂苷
4	43.44	betavulgaroside IV	$\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{O}_{15}$	793.401 4	-0.1	M-H	793.401 5, 631.381 5, 455.350 8	A、C、D、G、H	皂苷
5	43.82	achyranthoside IV	$\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{O}_{15}$	791.386 7	1.0	M-H	791.387 3, 631.382 2, 455.351 9	A、C、D、G、H	皂苷
6	43.82	betavulgaroside II	$\text{C}_{41}\text{H}_{60}\text{O}_{15}$	791.386 7	1.0	M-H	791.387 3, 467.352 5, 455.351 9	A、C、D、G、H	皂苷
7	34.01	achyranthoside E	$\text{C}_{46}\text{H}_{70}\text{O}_{19}$	925.444 1	0.3	M-H	925.444 1, 631.381 6, 455.351 2	A、C、D、G、H	皂苷
8	44.74	28-deglucosyl-achyranthoside E	$\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{O}_{14}$	763.390 7	-0.5	M-H	763.390 7, 631.383 1, 455.353 1	A、C、D、G、H	皂苷
9	33.47	竹节参皂苷 IVa	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{14}$	793.437 5	-0.6	M-H	793.437 5, 631.381 7, 455.352 7	A、C、D、G、H	皂苷
10	33.47	姜状三七皂苷 R_1	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{14}$	793.437 5	-0.6	M-H	793.437 5, 631.381 7, 455.352 7	A、C、D、G、H	皂苷
11	30.98	人参皂苷 Ro	$\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$	955.493 9	3.3	M-H	955.493 9, 793.437 7, 455.353 7	A、C、D、G、H	皂苷
12	30.98	3-O-Rha-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GluA-28-O-Glc hederagenin	$\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$	955.490 1	-0.8	M-H	955.491 1, 793.432 3, 471.522 2	A、C、G、H	皂苷
13	28.88	柴胡皂苷 X	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{15}$	809.432 1	-1.0	M-H	809.432 0, 603.390 2, 471.346 8	A、C、D、H	皂苷
14	44.80	28-desglucosylchikusetsusaponin IVa	$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_9$	631.385 6	0.7	M-H	631.385 6, 613.378 6, 455.352 2	A、C、D、G、H	皂苷
15	38.01	achyranthoside C dimethyl ester	$\text{C}_{49}\text{H}_{76}\text{O}_{20}$	983.488 9	3.3	M-H	983.489 6, 793.438 5, 455.352 8	A、C、D、H	皂苷
16	44.10	oleanolic acid 3-O- β -D-glucuronopyranoside	$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_9$	631.385 3	0.1	M-H	631.385 2, 613.373 2, 455.353 0	A、C、D、H	皂苷
17	28.85	28-O- β -D-glucopyranosiduronic acid-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosyl hederagenin	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{15}$	809.433 4	0.6	M-H	809.432 0, 647.377 0, 471.346 8	A、C、D、H	皂苷
18	32.25	屏边三七皂苷 R_1	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{18}$	925.479 9	-0.4	M-H	925.479 9, 763.424 5, 455.351 3	A、C、D、G、H	皂苷
19	32.25	竹节参皂苷 Ib	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{18}$	925.479 9	-0.4	M-H	925.479 9, 763.424 5, 455.351 3	A、C、D、G、H	皂苷
20	32.25	拟人参皂苷 RT_1	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{18}$	925.479 9	-0.4	M-H	925.479 9, 763.424 5, 455.351 3	A、C、D、G、H	皂苷
21	32.25	牛膝皂苷 A	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{18}$	925.479 8	-0.4	M-H	925.479 9, 569.383 6, 455.351 3	A、C、D、G、H	皂苷
22	32.25	榧木皂苷 A	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{18}$	925.479 8	-0.4	M-H	925.479 9, 569.383 6, 455.351 3	A、C、D、G、H	皂苷
23	32.21	3-O- α -L-Ara-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-GluA-28-O- β -D-Glc oleanolic acid	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{18}$	925.480 7	0.5	M-H	925.479 9, 793.440 5, 455.351 3	A、C、D、G、H	皂苷
24	32.21	oleanic-acid-3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopyranosiduronic acid	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{18}$	925.480 7	0.5	M-H	925.480 7, 793.444 4, 455.351 9	A、C、D、G、H	皂苷
25	44.43	拟人参皂苷 Rp_1	$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{13}$	763.426 0	-1.8	M-H	763.425 5, 613.373 8, 455.351 9	A、C、D、G、H	皂苷
26	44.43	28-desglucosylchikusetsusaponin IV	$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{13}$	763.426 0	-1.8	M-H	763.425 5, 631.385 1, 455.351 9	A、C、D、G、H	皂苷
27	44.43	麦冬皂苷 A	$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{13}$	763.426 0	-1.8	M-H	763.425 5, 601.378 8, 455.351 9	A、C、D、G、H	皂苷
28	44.43	地肤子皂苷 IC	$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{13}$	763.426 0	-1.8	M-H	763.425 5, 631.385 1, 455.351 9	A、C、D、G、H	皂苷
29	44.57	洋地黄毒苷	$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{13}$	763.427 7	0.3	M-H	763.427 6, 633.400 4, 455.353 2	A、C、D、G、H	皂苷
30	39.14	3-O-GluA-28-O-Glc gypsogenin	$\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{O}_{15}$	807.419 2	2.4	M-H	807.419 6, 645.365 3, 467.317 5	A、G	皂苷
31	47.31	柴胡皂苷 E	$\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{12}$	809.470 1	2.5	M-H	763.464 0, 455.352 9	H	皂苷
32	42.92	3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucuronopyranosyl]oleanolic acid	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{13}$	777.444 0	1.2	M-H	777.444 2, 631.388 3, 455.352 8	A、C、D、G、H	皂苷
33	32.18	achyranthoside E dimethyl ester	$\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_{19}$	953.475 1	3.2	M-H	953.475 1, 791.362 0, 455.342 5	A、C、D、G	皂苷
34	43.14	柴胡皂苷 C	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{17}$	925.518 7	3.2	M-H	925.518 7, 779.461 9, 455.350 6	H	皂苷
35	57.71	齐墩果酸	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	455.353 1	0.2	M-H	455.353 1, 391.301 3	A、C、D、G、H	皂苷

表 2 (续)

编号	<i>t_R</i> /min	化合物名称	分子式	<i>m/z</i>	误差 ($\times 10^{-6}$)	加合离子	二级碎片	归属	化合物 类型
36	47.60	3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -Glc-(1-2)-[[2-carboxy-1-(carboxymethyl)-2-hydroxy-ethyl]-(1-3)]- β - <i>D</i> -GluA-28- <i>O</i> - β - <i>D</i> -Glc-oleanolic acid	C ₄₇ H ₇₂ O ₁₉	939.460 2	0.8	M-H	939.460 2, 791.459 4, 161.012 2	G, H	皂苷
37	26.76	拟人参皂苷 F ₁₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	799.485 6	2.0	M-H	799.485 6, 653.428 5, 491.374 5	A	皂苷
38	33.01	地肤子皂苷 IIa	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₈	939.495 0	-1.0	M-H	939.495 0, 777.442 8, 455.354 3	A, C, D, G, H	皂苷
39	33.03	3- <i>O</i> -[α - <i>L</i> -Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]- β - <i>D</i> -glucurono-pyranosyl]-28- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosyl oleanolic acid	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₈	939.495 1	-1.7	M-H	939.495 1, 793.431 4, 455.350 8	A, C, D, G, H	皂苷
40	45.50	柴胡次皂苷 D	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	617.400 8	0.3	M-H	617.400 8, 455.353 2	A, C, D, H	皂苷
41	60.61	人参皂苷 Rh ₂	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	621.436 2	-1.6	M-H	621.436 2, 153.001 1	A, C, D	皂苷
42	32.02	人参皂苷 Rg ₂	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.490 2	1.1	M-H	783.490 2, 637.431 9, 475.380 5	H	皂苷
43	32.02	人参皂苷 F ₂	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.490 2	1.1	M-H	783.490 2, 619.418 9, 459.310 1	H	皂苷
44	32.02	人参皂苷 Rg ₃	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	783.490 2	1.1	M-H	783.490 2, 619.418 9, 459.310 1	H	皂苷
45	27.07	叶三七皂苷 B	C ₄₈ H ₈₂ O ₂₀	977.533 5	0.8	M-H	977.533 5, 653.430 2, 491.373 0	H	皂苷
46	27.07	三七皂苷 R ₁	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	931.527 6	1.9	M-H	931.527 6, 799.486 1, 491.373 0	H	皂苷
47	33.61	sulfachyranthoside D	C ₅₃ H ₈₂ O ₂₈ S	1 197.465 1	0.9	M-H	1 197.465 2, 955.492 3, 793.433 3, 613.354 8, 455.356 3	C, H	皂苷
48	41.35	malonyl-SSe	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₅	895.467 9	-0.7	M+ HCOO	895.467 9, 763.425 4	A, C, D	皂苷
49	30.84	牛膝皂苷 B	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₃	1 101.549 5	0.7	M-H	1 101.549 5, 793.432 6, 455.355 6	G	皂苷
50	35.45	常春苷元-28- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	C ₃₆ H ₅₈ O ₉	633.399 3	0.5	M-H	633.399 3, 471.347 6	A	皂苷
51	48.51	越南人参皂苷 R ₃	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₇	929.549 0	1.1	M-H	929.549 0, 605.446 2, 443.371 7	C, D, H	皂苷
52	46.55	柴胡次皂苷 I	C ₃₆ H ₅₆ O ₈	615.390 4	0.2	M-H	615.391 4, 453.345 4, 159.032 8	A, C, D, H	皂苷
53	40.74	achyranthoside C	C ₄₇ H ₇₂ O ₂₀	955.454 0	3.0	M-H	955.454 0, 793.437 9, 455.351 1	G	皂苷
54	40.74	achyranthoside G	C ₄₇ H ₇₂ O ₂₀	955.454 0	3.0	M-H	955.454 0, 793.437 9, 455.351 1	G	皂苷
55	42.48	柴胡皂苷 A	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	779.459 2	0.6	M-H	779.459 2, 617.396 1, 471.677 5	A, D, H	皂苷
56	31.03	竹节参皂苷 III	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	915.533 9	0.9	M-H	915.533 9, 637.428 2, 475.379 0	H	皂苷
57	31.03	三七皂苷 Fe	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	915.533 9	0.9	M-H	915.533 9, 783.493 0, 637.428 2	H	皂苷
58	31.03	人参皂苷 Rd ₂	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	915.533 9	0.9	M-H	915.533 9, 783.493 0, 475.379 0	H	皂苷
59	31.03	人参皂苷 Re ₁	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	961.537 8	0.1	M-H	961.537 8, 637.428 2, 475.379 0	H	皂苷
60	60.23	人参皂苷 Rh ₁	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	637.432 5	0.6	M-H	637.432 5, 255.227 2	A, C, D, G, H	皂苷
61	28.81	vinaginsenoside R ₉	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	961.539 5	1.8	M-H	961.539 5, 780.970 3, 619.423 5	H	皂苷
62	41.93	人参皂苷 Rd	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.542 2	-0.7	M-H	945.542 2, 783.442 8, 459.394 5	H	皂苷
63	25.23	三七皂苷 K	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	945.549 2	1.4	M-H	945.549 2, 799.498 4, 637.441 2	H	皂苷
64	47.24	3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosyl oleanolic acid	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	617.404 9	-1.6	M-H	617.405 3, 441.366 9	H	皂苷
65	28.07	3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -Glc-(β - <i>D</i> -GluA)- β - <i>D</i> -GluA oleanolic acid	C ₄₈ H ₇₄ O ₂₀	1 015.474 0	0.8	M+ HCOO	1 015.474 0, 645.368 1, 437.317 5	A, C, G	皂苷
66	25.68	人参皂苷 Rb ₂	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1 077.585 5	0.6	M-H	1 077.585 5, 945.545 3, 783.522 2	H	皂苷
67	20.71	皂草苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595.165 7	-0.1	M+H	595.165 7, 271.200 9, 85.031 3	H	皂苷
68	38.21	人参皂苷 Rk ₁	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	765.479 5	0	M-H	765.479 4, 619.392 7, 161.048 8	H	皂苷
69	47.26	achyranthoside F	C ₄₈ H ₇₄ O ₂₁	985.476 4	3.3	M-H	985.476 4, 763.457 4, 455.354 8	G, H	皂苷
70	24.15	bornyl 7- <i>O</i> - α - <i>L</i> -ara binofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- β - <i>D</i> -glucopyranoside	C ₂₁ H ₃₆ O ₁₀	447.223 2	-0.9	M-H	447.223 2, 311.075 5, 174.959 6	A	皂苷
71	24.26	人参皂苷 Re ₅	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₅	815.483 1	2.4	M-H	815.483 1, 653.438 0, 491.376 5	H	皂苷
72	27.87	malonyl-acetyl-rotundifolioside B	C ₅₂ H ₈₂ O ₂₁	1 087.533 6	1.5	M+ HCOO	1 087.531 0, 925.489 0, 471.359 7	G	皂苷

表 2 (续)

编号	<i>t_R</i> /min	化合物名称	分子式	<i>m/z</i>	误差 ($\times 10^{-6}$)	加合离子	二级碎片	归属	化合物 类型
73	13.89	ophiopogonin D	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆	899.465 5	2.3	M+	899.466 4, 855.434 8, 146.961 3	C、D	皂苷
						HCOO			
74	24.31	人参皂苷 Rb ₁	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 107.594 8	1.4	M-H	1 107.594 8, 783.507 6, 179.050 9	H	皂苷
75	23.65	chikusetsusaponin IVa methyl ester	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₄	853.458 5	0.6	M+	853.458 5, 691.409 7, 471.360 5	D	皂苷
						HCOO			
76	29.19	achyranthoside D methyl ester	C ₅₄ H ₈₄ O ₂₅	1 131.525 5	2.3	M-H	1 131.523 5, 965.463 5, 469.342 9	G	皂苷
77	15.64	lyoniresinol-3 α -O- β -D-glucopyranoside	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₃	581.224 1	0.3	M-H	581.224 1, 389.158 7, 208.074 4	D、G、H	皂苷
78	57.50	熊果酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.352 9	-0.4	M-H	455.353 1, 409.354 6, 255.238 0	A、C、D、H	皂苷
79	48.60	2 β -羟基熊果酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	473.362 1	-0.9	M+H	473.362 1, 409.342 4, 203.178 1	A、C、D、H	皂苷
80	37.24	甘草酸	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.397 6	1.4	M-H	821.401 0, 499.310 2, 456.972 4	G	皂苷
81	50.97	甘草次酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	469.332 2	-0.2	M-H	469.332 2, 451.321 7, 389.322 0	A、C、D、H	皂苷
82	15.70	牛膝甾酮 A	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	479.300 5	-1.8	M-H	479.300 5, 461.296 4, 443.290 2	A、C、D、G、H	甾酮
83	15.60	水龙骨科甾酮 B	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	495.295 7	-1.3	M-H	495.295 7, 441.263 4, 433.274 9	A、C、D、H	甾酮
84	15.60	achyranthesterone A	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	495.295 7	-1.3	M-H	495.295 7, 477.286 0, 433.274 9	A、C、D、H	甾酮
85	17.81	杯菟甾酮	C ₂₉ H ₄₄ O ₈	519.296 4	0.1	M-H	519.297 3, 319.190 6, 301.181 8	D、G	甾酮
86	18.01	24-hydroxycysterone	C ₂₉ H ₄₄ O ₉	535.291 3	0.2	M-H	535.291 3, 499.268 9, 391.223 8	A、G、H	甾酮
87	18.01	sengosterone	C ₂₉ H ₄₄ O ₉	535.291 3	0.2	M-H	535.291 3, 499.268 9, 391.223 8	A、G、H	甾酮
88	56.36	11-脱氧皮甾醇	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	345.206 0	-3.3	M-H	345.206 0, 277.219 7, 259.212 6	A、C、D、G、H	甾酮
89	19.62	unknown sterone	C ₂₈ H ₄₆ O ₈	509.311 5	-1.0	M-H	509.311 5, 473.254 6	A、C、D、G、H	甾酮
90	19.79	紫菟甾酮 A	C ₂₉ H ₄₈ O ₇	507.333 2	0.9	M-H	507.332 6, 319.196 4, 301.181 1	A、G	甾酮
91	19.79	紫菟甾酮 B	C ₂₉ H ₄₈ O ₇	507.333 2	0.9	M-H	507.332 6, 319.196 4, 301.181 1	A、G	甾酮
92	17.65	makisterone B	C ₂₈ H ₄₆ O ₇	493.317 3	0.5	M-H	493.317 3, 319.191 4, 301.180 5	A、C、D、G、H	甾酮
93	56.51	旌节花甾酮	C ₂₇ H ₄₂ O ₆	461.289 9	-1.9	M-H	461.284 9, 443.252 9, 161.027 0	A、C、D、G、H	甾酮
94	20.73	<i>N</i> -反式-阿魏酰基酪胺	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	312.125 3	3.7	M-H	312.125 3, 297.098 6, 148.054 3	A、C、D、G、H	生物碱
95	52.13	(-)-(A-b)-14 α -benzoyloxy-3 α ,10 β ,13 β ,15 α -tetrahydroxy-1 α ,6 α ,8 β ,16 β ,18-pentamethoxy- <i>N</i> -methylnaconitane	C ₃₂ H ₄₅ NO ₄	508.340 9	-2.4	M-H	508.340 9, 184.075 2, 104.109 9	A、C、D、H	生物碱
96	21.39	<i>N</i> -反式-阿魏酰-3-甲氧基酪胺	C ₁₉ H ₂₁ NO ₅	342.134 7	-0.1	M-H	342.134 7, 327.117 8, 190.051 7	A、C、D、G、H	生物碱
97	10.03	去甲乌药碱	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	272.128 2	0.4	M+H	272.128 2, 237.094 7, 209.098 0	A、G	生物碱
98	6.21	thalifoline	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	208.096 6	-1.0	M+H	208.096 7, 179.067 4, 151.039 0	A、C、D、G、H	生物碱
99	7.48	(+)-酪胺甜菜碱	C ₁₂ H ₁₇ NO ₂	208.133 0	-1.0	M+H	208.133 4, 164.080 0, 115.055 7	A、G	生物碱
100	16.09	<i>N</i> -trans-feruloyl-3-methoxytyramine-4-O- β -D-glucopyranoside	C ₂₅ H ₃₁ NO ₁₀	504.185 8	-3.5	M-H	504.185 7, 342.134 0, 178.053 0	C	生物碱
101	62.86	isomer of 14-O-acetylneoline	C ₂₇ H ₄₃ NO ₃	430.331 3	-0.7	M+H	430.331 2, 120.082 6, 105.070 4	C、G	生物碱
102	27.79	福林德碱	C ₁₄ H ₁₃ NO ₂	228.101 9	-0.1	M+H	228.101 9, 180.080 7, 115.055 9	C、G	生物碱
103	9.95	茵芋碱	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	260.091 7	-0.1	M+H	260.092 4, 243.091 2, 227.057 7	G	生物碱
104	34.04	normuciferidine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	298.143 6	-0.5	M-H	298.143 8, 178.999 2, 103.056 4	A、H	生物碱
105	60.63	贝母辛	C ₂₇ H ₄₁ NO ₃	428.315 8	-0.3	M-H	428.315 8, 120.082 2, 81.071 6	C、G	生物碱
106	16.99	脱氢延胡索碱	C ₂₂ H ₂₄ NO ₄	345.206 7	-2.0	M+H	345.206 4, 330.183 2, 173.095 8	A、C、D	生物碱
107	10.64	<i>p</i> -houmaroylagmatine	C ₁₄ H ₂₀ N ₄ O ₂	277.165 7	-0.7	M+H	277.165 7, 132.048 4, 119.049 2	A、G	生物碱
108	17.09	2,4,10-trimethoxy-dihydro-6 <i>H</i> -isoquinolino[3,2- <i>a</i>]isoquinoline-3,11-diol-glucoside	C ₂₆ H ₃₁ NO ₁₀	518.201 9	-0.3	M+H	518.201 9, 177.056 1, 163.075 6	A、G	生物碱
109	4.88	(+)-4-苯基-2-亚胺基-4-丙醇	C ₉ H ₁₁ NO	150.091 4	0.5	M+H	150.091 4, 134.060 5, 80.052 0	A、H	生物碱
110	39.74	delbruine	C ₂₅ H ₃₉ NO ₇	466.279 6	-0.6	M+H	466.279 6, 223.133 8, 135.080 8	C、H	生物碱

表 2 (续)

编号	<i>t_R</i> /min	化合物名称	分子式	<i>m/z</i>	误差 ($\times 10^{-6}$)	加合离子	二级碎片	归属	化合物 类型
111	8.07	花椒碱	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	230.081 3	0.6	M+H	230.081 3, 200.073 2, 172.071 6	A、D、G、H	生物碱
112	28.39	苜蓿素	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	331.081 4	0.4	M+H	331.081 9, 297.052 7, 136.016 7	G	生物碱
113	11.04	N-甲基福林德碱	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂	242.117 5	-0.1	M+H	242.117 5, 207.096 5, 178.077 6	G	生物碱
114	67.10	3,4-二甲苯苯噁唑烷	C ₁₁ H ₁₃ NO	178.122 7	0.1	M+H	178.122 8, 162.036 0, 91.056 1	A、C、D、G、H	生物碱
115	39.03	gadesine	C ₂₃ H ₃₅ NO ₆	422.253 8	0.1	M+H	422.253 7, 223.131 3, 179.107 1	A、D、G、H	生物碱
116	16.86	B-吡啶-1-丙酸	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂	241.097 1	-0.1	M+H	241.097 1, 181.075 2, 167.060 1	G	生物碱
117	22.05	isomer of 1,7,8-trihydroxy-20-(hydroxymethyl)-16-methoxy-4-(methoxymethyl)aconitan-14-ylacetate	C ₂₄ H ₃₇ NO ₈	468.258 9	-0.6	M+H	468.258 9, 240.107 9, 105.070 8	A、G	生物碱
118	30.37	beiwutinine	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₂	662.316 7	-0.6	M+H	662.316 7, 549.236 1, 188.080 1	C	生物碱
119	47.26	塔拉乌头胺	C ₂₄ H ₃₉ NO ₅	422.289 9	-0.6	M+H	422.290 9, 208.099 4, 124.041 0	C	生物碱
120	59.56	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.234 2	4.5	M-H	279.234 2, 261.225 3	A、C、D、G	有机酸
121	61.93	棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255.234 1	4.4	M-H	255.234 1, 237.234 8, 62.004 9	A、C、D	有机酸
122	62.06	油酸	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	281.248 5	-0.5	M-H	281.248 5, 71.025 5, 61.994 5	A、C、D、G	有机酸
123	51.42	亚麻酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279.232 1	4.2	M+H	277.218 5, 193.116 7, 141.094 4	A、C、D、G、H	有机酸
124	37.98	2β,3β,19α,23-四羟基-12-烯-28-乌苏酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	503.336 6	-2.4	M-H	503.336 0, 485.326 4, 459.347 2	A、C、D、G、H	有机酸
125	42.31	2-氧化坡模醇酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	487.342 0	0.4	M+H	487.342 0, 469.329 8, 425.336 6	A、G、H	有机酸
126	48.16	13-羟基十八碳二烯酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295.228 7	2.9	M-H	295.228 7, 277.219 1	A、C、D、G	有机酸
127	1.82	葡萄糖酸	C ₆ H ₁₂ O ₇	195.051 9	4.5	M-H	195.051 9, 99.009 3, 74.780 6	C、D、G	有机酸
128	2.06	柠檬酸	C ₆ H ₈ O ₇	191.020 7	4.9	M-H	191.020 7, 111.013 1, 87.014 9	C	有机酸
129	61.60	十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255.233 3	1.2	M-H	255.233 3, 97.939 6	A、C、D	有机酸
130	9.13	吡啶-3-丙烯酸	C ₁₁ H ₉ NO ₂	188.070 5	-0.4	M+H	188.070 5, 170.061 6, 144.081 9	A、C、D、G、H	有机酸
131	1.64	精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	175.119 3	1.7	M+H	175.119 3, 130.098 4, 116.073 2	A、C、G、H	有机酸
132	30.72	pinellic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.234 2	2.7	M-H	329.234 2, 293.213 9, 171.103 9	A、C、D、G、H	有机酸
133	1.69	亮氨酸	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.102 1	1.8	M+H	132.102 0, 58.070 9	A、D、G、H	有机酸
134	56.82	2-羟基十六烷酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	271.229 2	4.8	M-H	271.229 2, 195.181 8, 55.024 9	A、C、D、G	有机酸
135	65.23	硬脂酸	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	283.264 0	-0.8	M-H	283.265 0, 265.254 1, 61.992 2	A、C、D、G	有机酸
136	9.65	咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	179.035 7	3.7	M-H	179.036 4, 135.048 2	C、G	有机酸
137	49.57	13-keto-9Z,11E-octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293.213 1	2.9	M-H	293.213 5, 221.154 7, 205.118 6	A、C、D、G	有机酸
138	8.27	色氨酸	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	203.083 5	4.4	M-H	203.083 5, 142.068 3	C、D、G、H	有机酸
139	6.92	原儿茶醛二葡萄糖苷	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₃	461.130 6	1.1	M-H	461.130 6, 298.077 8, 137.062 5	G、H	有机酸
140	58.22	棕榈烯酸	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	253.218 5	4.7	M-H	253.218 6, 116.931 1, 99.936 8	A、C、D	有机酸
141	18.00	菊苣酸	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	473.071 7	-1.8	M-H	473.071 7, 293.038 1, 179.037 3	A、C、H	有机酸
142	12.97	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.051 5	4.2	M-H	193.051 4, 134.036 7	C、D、H	有机酸
143	57.50	白桦脂酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	455.352 9	-0.4	M-H	455.353 1, 301.882 7, 255.238 0	A、C、D、H	有机酸
144	59.72	松苓新酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	453.337 6	0.3	M-H	453.337 5, 407.331 1, 292.824 8	A、C、D、H	有机酸
145	10.41	丹皮酚新苷	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	459.151 3	1.0	M-H	455.353 1, 301.882 7, 255.238 0	A、D、G、H	有机酸
146	50.97	3β,16α-dihydroxy lanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	469.332 2	-0.2	M-H	469.332 2, 451.321 7, 389.322 0	A、C、D、H	有机酸
147	56.64	二十碳五烯酸	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	301.217 3	0.1	M-H	301.217 6, 135.088 8, 83.050 2	H	有机酸
148	9.83	绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.088 2	1.0	M-H	353.088 1, 191.057 8, 173.047 2	H	有机酸
149	9.78	3,4-二羟基肉桂酸	C ₉ H ₈ O ₄	179.035 7	4.1	M-H	179.035 9, 135.046 6, 89.045 0	C、G	有机酸
150	6.72	D-泛酸	C ₉ H ₁₇ NO ₅	218.103 1	-1.3	M-H	218.104 1, 146.081 5, 71.055 6	A、C、D、H	有机酸
151	18.05	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	187.098 3	4.0	M-H	187.098 6, 152.888 7, 123.080 8	C、D	有机酸
152	45.62	茯苓新酸 E	C ₃₀ H ₄₄ O ₆	499.305 1	-2.9	M-H	499.305 3, 455.315 4, 409.309 8	A、G	有机酸
153	3.10	L-酪氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₃	182.081 0	-1.0	M-H	182.081 2, 136.076 8, 123.046 2	A、C、D、G、H	有机酸

表 2 (续)

编号	<i>t_R</i> /min	化合物名称	分子式	<i>m/z</i>	误差 ($\times 10^{-6}$)	加合离子	二级碎片	归属	化合物 类型
154	45.17	皂树皮酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	485.326 1	-2.3	M-H	485.326 1, 441.337 5, 365.288 3	A、G	有机酸
155	13.95	2- <i>O</i> -8- <i>D</i> -(6- <i>O</i> -龙胆酰吡喃葡萄糖)龙胆酸	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₂	451.086 1	-4.6	M-H	451.086 0, 289.031 7, 152.013 3	C、H	有机酸
156	60.40	棕榈油酸	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	255.231 6	-0.9	M+H	255.232 0, 135.119 9, 121.104 7	A、C、G、H	有机酸
157	45.29	美洲茶酸	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	485.326 2	-2.1	M-H	485.326 1, 441.337 5, 365.288 3	A、G	有机酸
158	47.20	马尾柴酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.341 6	-2.6	M-H	487.342 1, 469.327 6, 429.300 9	A、G、H	有机酸
159	44.65	23-羟基白桦酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.347 4	-1.3	M-H	471.347 4, 435.292 0, 391.299 6	A、D	有机酸
160	44.65	科罗素酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.347 3	-1.3	M-H	471.347 4, 409.317 5	A、D	有机酸
161	13.98	香豆素	C ₉ H ₆ O ₂	147.044 1	0	M+H	147.044 1, 91.055 6, 65.043 2	A、C、D、G、H	有机酸
162	6.00	苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164.072 1	2.2	M-H	164.072 2, 103.062 3, 77.048 0	D	有机酸
163	3.09	对香豆酸	C ₉ H ₈ O ₃	165.054 6	-0.4	M+H	165.054 7, 120.058 3, 103.055 0	A、C、D、G	有机酸
164	63.59	十七酸	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	269.249 9	4.8	M-H	269.249 9, 116.929 9	A、C、D、G	有机酸
165	54.40	<i>N</i> -linoleoyl-4-aminobutyric acid	C ₂₂ H ₃₉ NO ₃	364.285 4	-1.0	M-H	364.285 3, 318.276 1, 102.058 9	C、G、H	有机酸
166	1.62	<i>DL</i> -精氨酸	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	173.105 2	4.4	M-H	173.105 2, 131.080 3, 78.962 9	G	有机酸
167	37.85	26-hydroxypricoic acid G	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	501.321 1	-2.2	M-H	501.321 1, 465.297 1, 439.320 1	A、G	有机酸
168	1.67	葡萄糖二酸	C ₆ H ₁₀ O ₈	209.030 8	2.4	M-H	209.030 8, 85.036 5, 71.020 4	A、C、D、G、H	有机酸
169	61.00	hydroxy behenic	C ₂₂ H ₄₄ O ₃	355.322 5	2.0	M-H	355.322 5, 337.304 8, 309.320 0	A、C、D、G、H	有机酸
170	5.66	<i>L</i> -苯丙氨酸	C ₉ H ₁₁ NO ₂	164.072 2	3.0	M-H	164.072 2, 147.896 6, 103.062 3	D	有机酸
171	60.75	8,11,14-二十碳三烯酸	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	305.248 8	0.7	M-H	305.248 8, 71.016 8	G、H	有机酸
172	29.58	香草酸	C ₈ H ₈ O ₄	169.049 6	0.6	M+H	169.050 0, 108.020 2, 81.036 5	A、C、G、H	有机酸
173	65.56	hydroxy-tricosanoic acid	C ₂₃ H ₄₆ O ₃	369.337 2	-0.7	M-H	369.336 5, 323.329 4	A、C、D、G、H	有机酸
174	3.05	苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₂	123.044 2	0.8	M+H	123.044 6, 77.041 7, 51.028 4	G	有机酸
175	8.68	京尼平苷酸	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	373.114 3	0.7	M-H	373.114 3, 211.060 1, 153.022 2	A、D、H	有机酸
176	6.44	原儿茶酸葡萄糖苷	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	315.071 6	-1.8	M-H	315.071 4, 153.017 2, 109.033 0	A、D、H	有机酸
177	59.08	花生四烯酸	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	303.232 8	-0.5	M-H	303.232 7, 109.082 6, 79.963 5	A、G、H	有机酸
178	8.48	丁香酸	C ₉ H ₁₀ O ₅	199.059 5	-3.1	M+H	199.059 5, 152.062 6, 125.024 3	A、D、H	有机酸
179	9.86	奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.057 0	4.7	M-H	191.057 0, 145.899 0, 109.033 4	H	有机酸
180	6.61	香草酸葡萄糖苷	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	329.087 8	0.1	M-H	329.088 7, 167.034 4, 152.013 4	D、H	有机酸
181	48.60	山楂酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	473.362 1	-0.9	M+H	473.361 9, 427.344 2	A、C、D、H	有机酸
182	14.30	反式-2-十二碳烯二酸	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	227.129 9	4.5	M-H	227.129 9, 116.055 6, 59.023 5	A、C、G、H	有机酸
183	45.17	十六碳二酸	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	285.208 4	4.5	M-H	285.208 1, 267.189 1, 223.212 5	G	有机酸
184	9.93	3-羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₃	139.039 3	2.6	M+H	139.039 5, 93.033 6, 65.043 5	A、G	有机酸
185	20.85	酪氨酸	C ₁₄ H ₁₉ NO ₃	280.119 2	0.5	M-H	280.120 3, 192.066 9	D	有机酸
186	13.28	4- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6- <i>O</i> -龙胆酰吡喃葡萄糖)香草酸	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	465.101 9	-4.2	M-H	465.101 9, 289.050 8, 169.018 3	A、D、G	有机酸
187	63.35	花生油酸	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	311.294 4	-0.1	M+H	311.295 1, 149.146 1, 123.118 2	A、C、D、G	有机酸
188	45.51	7-methoxy-β-carboline-1-propionic acid	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃	271.107 6	-0.4	M+H	271.107 6, 206.098 2, 105.071 6	C、G	有机酸
189	60.05	十五烷酸	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	241.217 5	0.8	M-H	241.217 5, 96.963 0	A、C	有机酸
190	45.68	12-phenyldodecanoic acid	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	275.202 7	3.8	M-H	275.202 7, 138.911 6, 115.924 4	A、D、G	有机酸
191	65.32	亚麻酸甘油酯	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	351.253 3	-2.2	M-H	351.253 3, 283.269 8, 55.041 0	C、G	有机酸
192	57.32	肉豆蔻酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	227.201 5	-0.8	M-H	227.201 5, 99.943 3, 61.998 3	A、C、D	有机酸
193	57.32	十四酸	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	227.201 5	-0.8	M-H	227.201 5, 99.943 3, 61.998 3	A、C、D	有机酸
194	61.29	花生三烯酸	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	311.296 3	2.3	M-H	311.296 6, 183.009 7, 116.935 3	A、C、D、G、H	有机酸
195	31.59	4'-demethylides-oxypodophyllotoxin-4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₂	547.181 1	0.1	M+H	547.181 1, 311.092 7, 301.072 0	A、C、H	木脂素
196	40.98	苯并二氢呋喃类木脂素	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	357.133 4	0.4	M+H	357.133 2, 221.059 8, 192.042 8	A、C、H	木脂素
197	21.53	<i>E</i> -3,4-二甲氧基肉桂酸	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	209.080 8	-0.1	M+H	209.080 8, 178.024 8, 165.073 0	A、C、D、G、H	木脂素

表 2 (续)

编号	t_R/min	化合物名称	分子式	m/z	误差 ($\times 10^{-6}$)	加合离子	二级碎片	归属	化合物 类型
198	3.09	4-甲氧基-3H-苯丙咪唑-2-酮	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	165.054 6	-0.4	M+H	165.054 7, 119.052 0, 77.041 9	A、C、D、G	木脂素
199	19.09	表去甲络石苷元	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_7$	419.134 6	2.3	M+ HCOO	419.134 6, 223.063 7, 150.035 2	C、G、H	木脂素
200	34.04	N-(2-(4-羟苯基)-2-甲氧乙基)肉桂酰胺	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	298.143 6	-0.5	M+H	298.143 6, 191.999 8, 103.056 0	A、H	木脂素
201	60.33	4-羟基-3-甲氧基肉桂醛	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$	179.070 4	0.7	M+H	179.070 4, 118.042 6, 89.041 2	A、C、D、G、H	木脂素
202	28.66	五味子酯甲	$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_9$	517.244 4	2.2	M+H	517.244 0, 166.088 5, 120.081 5	C	木脂素
203	24.93	鬼臼毒素	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8$	415.138 4	-0.8	M+H	415.139 8, 309.079 3, 181.049 4	A、H	木脂素
204	25.06	对香豆酰酰胺	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3$	284.127 9	-0.6	M+H	284.127 9, 147.044 9, 121.064 4	A、G、H	木脂素
205	30.74	连翘酯苷 B	$\text{C}_{34}\text{H}_{44}\text{O}_{19}$	757.258 7	5.0	M+H	757.258 7, 611.662 3, 181.049 5	A、H	木脂素
206	28.21	表丁香脂素	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$	419.169 5	-1.4	M+H	419.170 1, 383.147 2, 249.057 9	A、D、G、H	木脂素
207	40.28	epipinoresinol-4-O- β -D-glucopyranoside	$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$	521.200 2	-2.9	M+H	521.200 2, 328.964 9, 150.062 4	C、H	木脂素
208	14.62	dendranthemside B	$\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_8$	389.216 7	-0.7	M+H	389.216 7, 149.096 3, 109.071 8	A、D	木脂素
209	29.33	lanicepside A	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{12}$	539.209 7	-4.8	M+H	539.209 8, 283.041 3, 177.053 3	A、H	木脂素
210	24.02	5-乙酰氧基-6-香叶基-3-戊基-1,4-苯醌	$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$	373.237 4	0.1	M+H	373.237 4, 283.178 3, 178.072 8	A	木脂素
211	39.07	randaiol	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3$	243.101 7	0.5	M+H	243.101 7, 165.071 1, 77.043 3	D、H	木脂素
212	9.47	丁香酚	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$	165.091 1	0.3	M+H	165.091 0, 135.042 5, 119.049 0	H	木脂素
213	11.48	表儿茶素	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	291.086 3	-0.1	M+H	291.086 3, 179.065 7	H	木脂素
214	40.24	5,7,8,4'-四甲氧基黄酮	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$	343.117 8	0.4	M+H	343.117 7, 283.061 5, 219.033 4	A、C、G、H	黄酮
215	16.99	rhamnosyl-glucosyl-apigenin	$\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	575.141 2	0.9	M-H	575.141 5, 267.066 8	A、C、G	黄酮
216	25.81	4'-羟基-5,6,7-三甲氧基黄酮	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_6$	327.087 7	0.9	M-H	327.088 5, 296.076 5, 234.036 4	A、C、D、H	黄酮
217	39.24	番茄红素	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	315.087 1	2.6	M+H	315.087 1, 285.040 2, 253.051 8	A、C、D、G、H	黄酮
218	29.68	山柰素	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	299.057 1	3.2	M-H	299.057 6, 284.033 4, 151.002 3	A、C、D、H	黄酮
219	15.55	7-甲氧基香豆素	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$	177.054 7	0.5	M+H	177.054 8, 134.036 2	A、C、D、G、H	黄酮
220	17.20	野漆树苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	577.156 8	1.0	M-H	577.156 8, 415.099 1, 269.081 6	C、G	黄酮
221	11.27	葛根素	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	415.103 3	-0.3	M-H	415.103 0, 253.049 7	C	黄酮
222	40.21	川陈皮素	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_8$	403.139 6	2.1	M+H	403.140 0, 279.090 6, 217.084 3	C、G、H	黄酮
223	14.67	山柰苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	577.156 5	0.4	M-H	577.156 5, 431.096 8, 285.059 2	G	黄酮
224	9.86	东莨菪苷	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	353.087 1	-2.0	M-H	353.086 7, 191.056 0	H	黄酮
225	17.08	槲皮素-3-O-鼠李糖苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.092 4	-2.1	M-H	447.092 3, 301.034 0, 151.006 1	A、C、D、G、H	黄酮
226	21.98	6-hydroxy-kaempferol-3-methyl ether-7-O-glucoside	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	479.118 0	-0.8	M+H	479.117 6, 317.067 0, 302.043 3	A、C、D、G、H	黄酮
227	28.87	6-prenylquercetin-3-O-glucoside	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$	533.165 4	0.1	M+H	533.165 4, 329.105 7, 255.060 3	A、C、H	黄酮
228	19.06	水仙苷	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	623.161 9	0.2	M-H	623.161 3, 315.053 2, 271.024 0	G、H	黄酮
229	9.20	4-甲氧基-1-甲基-2-喹啉酮	$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}_2$	190.086 1	-1.0	M+H	190.086 1, 175.062 0, 147.067 8	G	黄酮
230	15.05	金丝桃苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	463.088 2	0.0	M-H	463.088 2, 301.029 8	A、H	黄酮

A-安徽土牛膝, C-怀牛膝, D-红牛膝, G-川牛膝, H-江西土牛膝。

A-A. aspera of Anhui, C-A. bidentata, D-C. capitata, G-C. officinalis, H-A. aspera of Jiangxi.

之后的片段峰; (3) C_{20} - C_{22} 断裂后的碎片峰。以 achyranthesterone A 为例, 其在负离子模式下, 产生 495.295 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 依次出现脱去 1 分子 H_2O 后的 477.286 0 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$ 峰和脱去 1 分子 H_2O 和 1 分子 CO_2 后的 433.274 9 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2-\text{H}]^-$ 峰, 并产生 m/z 319.191 1、301.145 1、159.042 3 的特征性二级碎片离子, 结合相关文献报道^[11], 推测其为 achyranthesterone A。

2.5.3 牛膝生物碱类化学成分鉴定 根据文献报道^[12], 苜蓿四氢异喹啉类化合物的分子离子通常会丢失 $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ 或 NH_3 产生 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_7\text{N}]^+$ 或 $[\text{M}-\text{NH}_3+\text{H}]^+$ 的特征子离子。以去甲乌药碱为例, 在正离子模式下, 产生 272.128 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰, 并且出现 237.094 7 $[\text{M}-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ 、209.098 0 $[\text{M}-\text{NH}_3-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}+\text{H}]^+$ 、161.060 4、143.049 7、107.051 1 等特征碎片离子, 结合相关文献报道^[13], 推测其为去甲乌药碱。

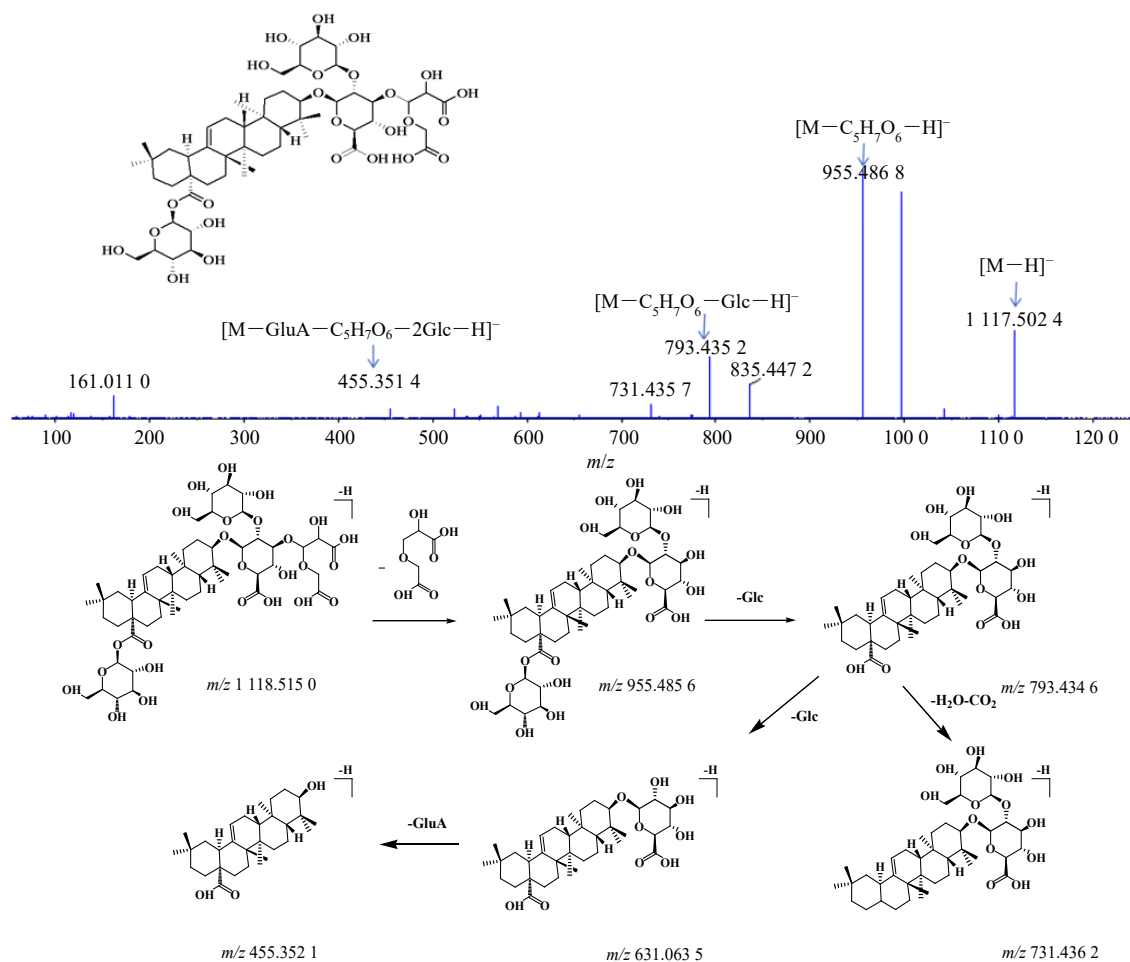


图 3 Achyranthoside D 的二级质谱图及裂解规律图

Fig. 3 MS² spectrum and proposed fragmentation of achyranthoside D

2.5.4 牛膝有机酸类化学成分鉴定 有机酸类化合物是一种广泛存在于自然界中的酸性有机化合物，具有很强的抗氧化和抗菌、消炎等药理作用，其在高能碰撞下通常容易丢失 CO、CO₂、-COOH、H₂O 等而产生碎片离子峰^[14]。本研究采用正、负离子扫描模式，共指出有机酸类成分 75 个，在 MS 扫描过程中以 [M-H]⁻、[M+H]⁺ 的准分子离子形式存在。以亚油酸为例，在负离子模式下，产生 279.2342 [M-H]⁻ 峰，出现 261.2253 [M-H₂O-H]⁻ 等特征碎片离子，结合相关文献报道^[15]，推测其为亚油酸。

2.5.5 牛膝黄酮类化学成分鉴定 在质谱正负离子模式下，黄酮苷类化合物主要的裂解途径表现在糖基部分的裂解和苷元的特征裂解，黄酮苷元的主要 MS 裂解方式是 RDA 裂解途径和小分子或自由基 CH₃、CO、CO₂ 的丢失。对于黄酮苷，糖苷键上的裂解可能以正离子和负离子模式产生，其中 162 (Glc)、146 (Rha)、308 (芸香苷) 是黄酮类-O-糖

苷的特征性中性碎片离子，具有低质荷比的碎片离子与其糖苷配基的碎片离子相同^[16]。山柰素在负离子模式下产生 m/z 为 299.0576 [M-H]⁻ 的准分子离子峰，在 m/z 284.0334 处脱去 1 个甲基产生 [M-CH₃-H]⁻ 的子离子峰，经 RDA 裂解产生 m/z 151.0023 特征碎片。4'-羟基-5,6,7-三甲氧基黄酮，在负离子模式下，依次产生 327.0885 [M-H]⁻、296.0765 [M-OCH₃-H]⁻、265.0521 [M-2OCH₃-H]⁻、234.0364 [M-3OCH₃-H]⁻ 等特征碎片峰，提示脱去 3 个甲氧基，结合相关文献报道^[17]，推测其为 4'-羟基-5,6,7-三甲氧基黄酮。

2.5.6 牛膝木酯素类化学成分鉴定 在 ESI⁺ 模式下鉴定出 19 种木酯素类化合物，且多为双环氧类木酯素。以表丁香脂素为例并结合自建数据库及文献报道阐述牛膝木酯素类化合物的裂解规律和结构鉴定的解析过程。化合物表丁香脂素在正离子模式下，产生 m/z 419.1701 [M+H]⁺ 准分子离子峰，并进一步裂解产生 m/z 383.1472 [M-2H₂O+H]⁺、

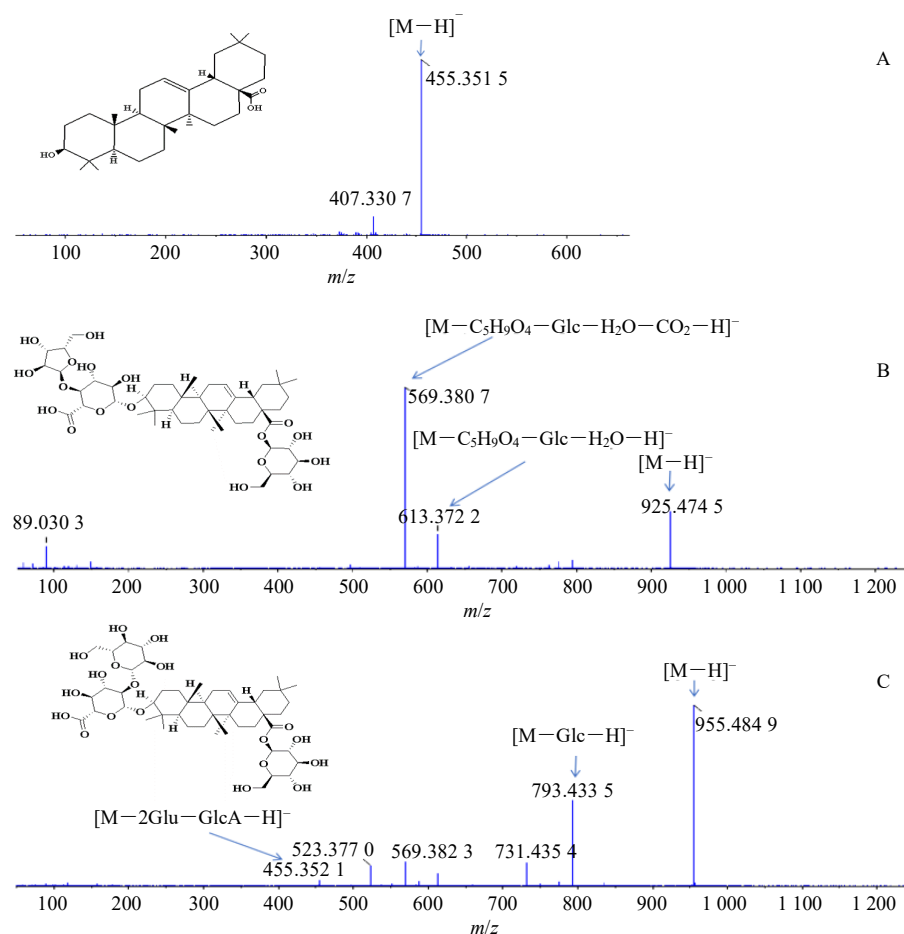


图 4 对照品齐墩果酸 (A)、楸木皂苷 A (B) 和人参皂苷 R₀ (C) 二级质谱图

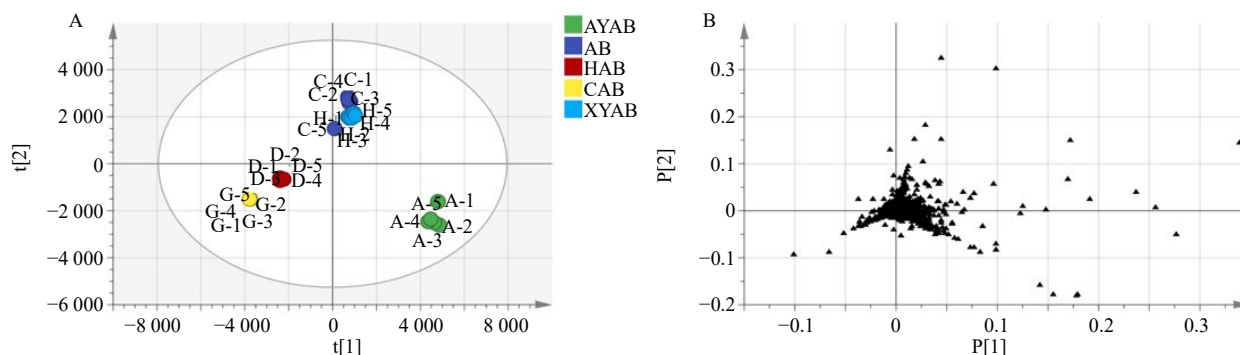
Fig. 4 MS² spectrum of reference substances, including oleanolic acid (A), araloside A (B) and ginsenoside R₀ (C)

265.089 0、249.057 9 等特征碎片离子，经与文献信息^[18]比对，推测其为表丁香脂素。

2.6 UPLC-Q-TOF-MS/MS 数据分析

2.6.1 PCA 图 1、2 初步分析，不同品种怀牛膝、川牛膝、红牛膝、土牛膝的化学成分存在显著差异，为明确其差异性成分，将 MS 原始数据导入 Marker

View 1.2.1 软件进行去除同位素离子峰、峰提取等处理，将所得数据集矩阵导入于 SIMCA 14.1 软件中进行无监督 PCA，得到 PCA 得分图和 Loading 散点图，见图 5。模型验证结果 ($R^2_X=0.819$, $Q^2=0.570$, $P<0.05$)，说明模型拟合能力较好，预测能力良好，具有统计学意义。t[1]轴、t[2]轴将以上 4 种牛膝分子



AYAB-安徽土牛膝；AB-怀牛膝；HAB-红牛膝；CAB-川牛膝；XYAB-江西土牛膝。

AYAB-A. aspera of Anhui; AB-A. bidentata; HAB-C. capitata; CAB-C. officinalis; XYAB-A. aspera of Jiangxi.

图 5 不同产地、不同品种牛膝的 PCA 得分图 (A) 和 Loading 散点图 (B)

Fig. 5 PCA score scatter plot (A) and loading scatter plot (B) of *A. bidentata* from different origins and varieties

3 个象限, 即怀牛膝、江西土牛膝为一类, 川牛膝和红牛膝为一类, 安徽土牛膝为一类, 组间差异明显。我国最早的药学著作《神农本草经》将怀牛膝列为上品, 而目前怀牛膝这种稀有且被广泛开发的药用植物面临着濒危的问题^[19]。加之市场上怀牛膝混售、掺伪现象更为严重, 且其市场价格更高, 故在后续实验中, 以怀牛膝为控制列进行不同品种间的多重比较进而找出差异化合物, 为怀牛膝药材的质控指标提供科学依据。

2.6.2 PLS-DA PLS-DA 模型在为样品组间差异提供最相关变量方面可靠性更强, 能够把与预先设定的和分类无关的信息最大程度从原始矩阵分离, 从而将最相关的因素集中到第一个主成分上, 进而寻找该主成分的正交矫正轴方向, 从而使得组间样

本分离效果更佳, 使组内差异弱化, 组间差异最大化凸显, 且更适用于多组样本间的分离。故本实验在 PCA 分析基础上进行有监督的 PLS-DA 分析, 找出样品组间差异化合物。将 MS 原始数据导入 MarkerView 1.2.1 软件进行 *t* 检验、在 PLS-DA 分析基础上进行 VIP 值 > 1 的筛选, 结合化合物的保留时间、母离子和特征碎片离子等信息, 共鉴定了 25 个差异明显的化合物。这 25 个化合物在 4 种牛膝中的含量存在显著性差异。各化合物在不同组别中的相对离子强度变化趋势见图 6。

3 讨论

怀牛膝、川牛膝、红牛膝和土牛膝为苋科植物的 4 个品种, 它们广泛分布于中国的大部分地区。怀牛膝是药典中的苋科牛膝属植物, 主要分布于河

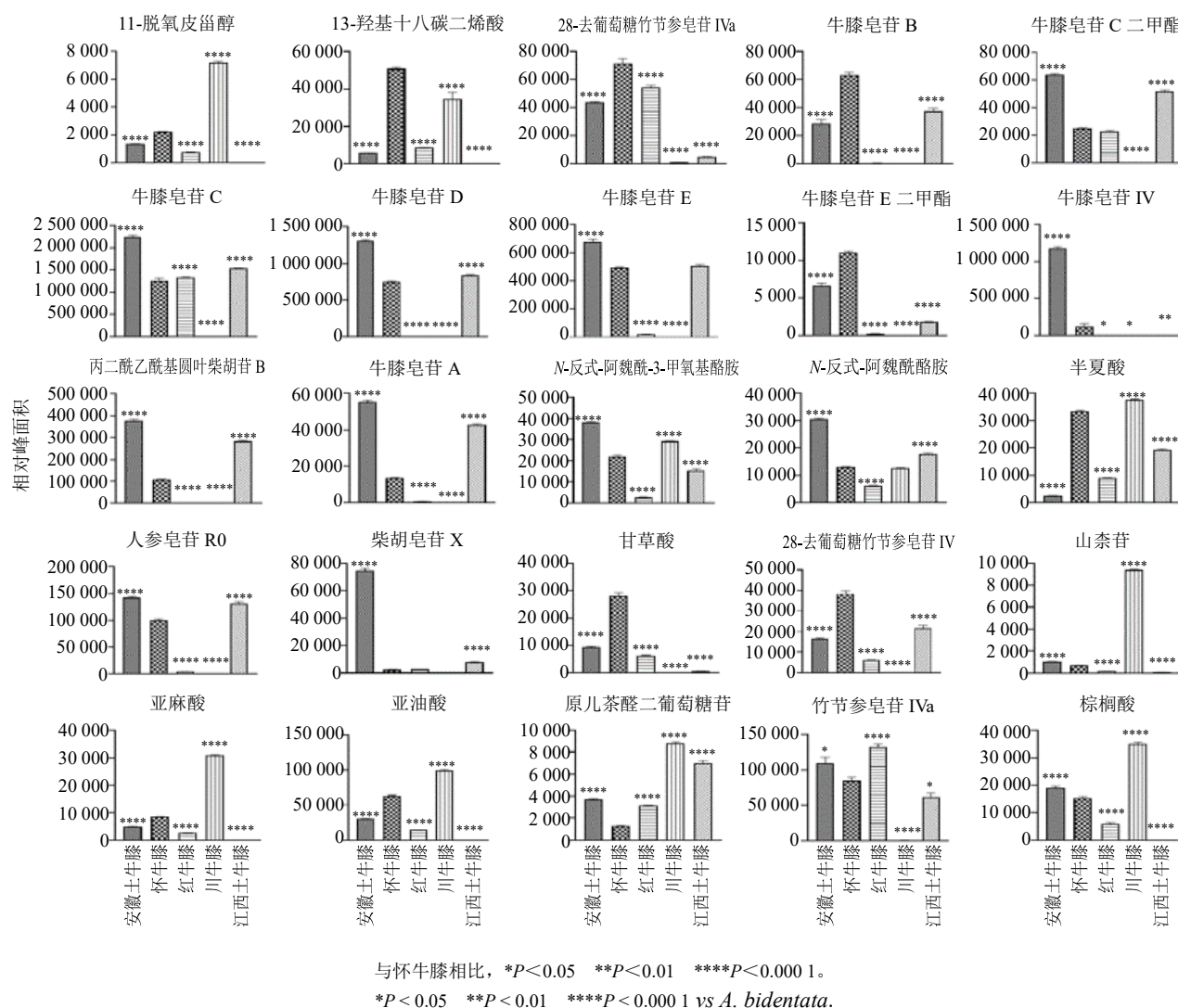


图 6 4 种牛膝样品中差异显著的特征化合物离子强度趋势图 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 6 Trend chart of ionic strength of characteristic compounds with significant differences in four *A. bidentata* samples ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

南省, 广泛用于补肝肾、强筋骨。但怀牛膝常与同科植物土牛膝、川牛膝及红牛膝混淆^[20]。川牛膝是《中国药典》收载的苋科杯苋属植物, 主要在四川省种植并用于逐瘀通经, 它常与红牛膝混淆。此外, 怀牛膝、川牛膝、红牛膝和土牛膝从古至今被习称为“牛膝”。同名中草药的混淆在临床实践和草药市场上普遍存在可能, 这会在安全性和有效性方面造成破坏性后果。另一方面, 牛膝是面临濒危问题的稀有且被广泛开发的药用植物物种之一, 找到具有相同植物成分的定性替代品将有助于减少对此类植物自然栖息地的开发负担, 从而产生相似的成分和药理效益。UPLC-Q-TOF-MS/MS 具有高分辨率、高灵敏度、特异性强、分析速度快等特点, 可实现对中药复杂体系中化学成分的快速分离和鉴定, 故本实验借助超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术结合多元统计分析法对怀牛膝、川牛膝、红牛膝和土牛膝的全成分进行了鉴别分析并找出了相应的差异化合物。

3.1 样品提取条件的考察

为了更全面地获取牛膝药材中所含化合物的信息, 本研究在前期分别比较了不同提取溶剂(甲醇、75%乙醇、5%甲醇、5%乙腈)、不同提取时间(0.5、1、2 h)和不同提取方式(超声提取、回流提取)对样品总离子流图出峰情况的影响。与牛膝药材甲醇提取液相比, 发现 75%乙醇作为供试品溶液的提取溶剂时效果最优, 不仅可以检测到皂苷、有机酸等极性较大的化学成分, 还可以对极性较弱的生物碱有较好的响应。而且, 75%乙醇作为提取溶剂时, 离子峰强度较高且出峰量最多, 所以本实验选取 10 倍量 75%乙醇加热回流提取 2 h 作为样品的提取条件。

3.2 色谱条件的选择

在优化方法的过程中, 本研究分别对流动相种类(0.1%甲酸水-乙腈、0.1%甲酸水-甲醇)、流动相梯度洗脱比例及进样量(2、5 μ L)等色谱条件进行了筛选。最终发现采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m), 流动相 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~15 min, 5%~40% B; 15~63 min, 40%~95% B; 63~65 min, 95% B; 65~65.1 min, 95%~5% B; 65.1~70 min, 5% B; 柱温 40 $^{\circ}$ C, 进样量 2 μ L, 体积流量 0.3 mL/min 等色谱条件时色谱峰峰数较多、分离效果最佳、峰形更好、基线更平滑。

3.3 牛膝药材差异性成分的比较分析

本实验通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对不同

品种牛膝进行了成分分析, 共初步鉴定出 230 种化学成分, 包括牛膝皂苷类成分 81 种、甾酮类成分 12 种、生物碱类成分 26 种、有机酸类成分 75 种、木脂素类成分 19 种和黄酮类成分 17 种。但由于自建数据库的局限性, 尚有部分成分没有鉴定, 有待进一步研究。为了获取牛膝主要成分丰富的离子信息, 本实验采用 ESI 离子源正、负离子扫描模式, 发现牛膝皂苷、甾酮类成分在负离子模式下峰形较好、分离度较高, 而生物碱类成分在正离子模式下分离较好。将所得样品原始质谱数据结合多元统计分析手段, 即主成分分析和偏最小二乘法-判别分析系统分析了 4 种常见牛膝的差异化化合物信息, 一共筛选出 25 种差异标志物可用于以上牛膝的品种判别。

从差异性分析结果来看, 竹节参皂苷、牛膝皂苷在怀牛膝中的占比最高, 现代研究表明, 以上成分具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤及免疫调节等药理活性^[21]。而竹节参皂苷 IVa 在红牛膝中占比居多, 该成分具有很好的抗氧化、抗糖基化活性, 并在体外细胞实验中发现其具有良好的促胰岛素分泌能力, 是潜在的糖尿病治疗药物^[22]。甾醇、黄酮醇、有机酸和糖苷类成分在川牛膝中的占比最高, 以上 4 种成分具有抗炎、抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗血栓形成、预防心血管疾病等多种药理作用^[23-26]。齐墩果烷型皂苷和酪胺类生物碱类成分则在安徽土牛膝中占比最多, 这 2 类成分具有抗炎、抗病毒、抗休克、免疫调节、增加血氧饱和度和保护心血管系统等作用^[27-28]。

综上所述, 牛膝含有皂苷、甾酮、生物碱、有机酸、黄酮和木脂素等多种化学成分, 运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合多元统计分析技术可实现对牛膝药材化学成分的快速鉴定, 比较样品间的成分差异, 既为牛膝的质量控制提供了参考, 也对推动牛膝产业发展、保证牛膝临床用药稳定性提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 39-74.
- [2] 张维方, 梁献葵, 纪亮, 等. 不同品种牛膝 3 个成分含量测定及 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(11): 2665-2669.
- [3] 孙倩. 补益肝肾方治疗老年肝肾阴虚型高血压病(2 级)的临床疗效观察 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2013.
- [4] 顾元交. 本草汇笺 [M]. 上海: 上海中医药大学出版社,

- 1992: 45.
- [5] 何梦竹. 川牛膝形态鉴定与 TSK 基因功能初步研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.
- [6] 童凯, 李昭玲, 闫燊, 等. 基于 HPLC 指纹图谱比较分析川牛膝及其混淆品的化学成分特征 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(10): 2424-2427.
- [7] 廖彭莹, 王东, 杨崇仁, 等. 苋科牛膝资源植物的化学成分研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 2019-2026.
- [8] 傅俊, 吴欢, 吴虹. UPLC-QTOF/MS^E 联合 UNIFI 筛选平台快速分析牛膝中三萜皂苷类成分 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(6): 1054-1061.
- [9] Xu L, Liu Y, Wu H F, *et al.* Rapid identification of chemical profile in Gandou Decoction by UPLC-Q-TOF-MS^E coupled with novel informatics UNIFI platform [J]. *J Pharm Anal*, 2020, 10(1): 35-48.
- [10] 刘明生, 李锐. 植物甾酮类化合物的谱学规律 [J]. 天然产物研究与开发, 1998, 10(4): 5-11.
- [11] 曹艳梅. 川牛膝质控成分分析及活血有效部位研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [12] He J Y, Liu Y, Kang Y, *et al.* Identification of alkaloids in *Stephania hainanensis* by liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 2016, 27(3/4): 206-216.
- [13] Lin Z T, Yang R N, Guan Z, *et al.* Ultra-performance LC separation and quadrupole time-of-flight MS identification of major alkaloids in *Plumula Nelumbinis* [J]. *Phytochem Anal*, 2014, 25(6): 485-494.
- [14] 张清清, 冯媛, 李春花, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术快速鉴定当归中苯酞类和有机酸类成分 [J]. 中国药房, 2022, 33(5): 579-585.
- [15] 马永桦, 王春龙, 王凤霞, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法快速分析石楠叶中化学成分 [J]. 中草药, 2022, 53(20): 6401-6411.
- [16] Wang S F, Chen L L, Leng J, *et al.* Fragment ion diagnostic strategies for the comprehensive identification of chemical profile of Gui-Zhi-Tang by integrating high-resolution MS, multiple-stage MS and UV information [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 98: 22-35.
- [17] 王慧, 黄友荪, 梁燕青, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学技术的枳壳适宜采收期研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(12): 3175-3184.
- [18] 杨欣欣, 刘传鑫, 颜昌钰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/HRMS^E 的活血解毒方化学成分定性分析研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(11): 2207-2216.
- [19] Jaiswal Y, Liang Z T, Ho A, *et al.* Tissue-based metabolite profiling and qualitative comparison of two species of *Achyranthes* roots by use of UHPLC-QTOF MS and laser micro-dissection [J]. *J Pharm Anal*, 2018, 8(1): 10-19.
- [20] Lu K T, Cheng H Y, Lo C F, *et al.* Discriminating between *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix* in Chinese medicine preparations by nested PCR and DNA sequencing methods [J]. *Planta Med*, 2007, 73(12): 1322-1326.
- [21] 罗懿钊, 欧阳文, 唐代凤, 等. 牛膝中皂苷和甾酮类物质基础及药理活性研究进展 [J]. 中国现代中药, 2020, 22(12): 2122-2136.
- [22] 崔佳, 段佳林, 王磊, 等. 竹节参皂苷 IVa 通过 Akt/mTOR 通路保护胰岛 β 细胞损伤 [J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(17): 3224-3229.
- [23] 张嘉怡, 杜冰, 谢蓝华, 等. 绿色新资源食品: 美藤果油 [J]. 中国油脂, 2013, 38(7): 1-4.
- [24] 孙连立. 红花籽油的水酶法提取、乙酯化及纯化研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2013.
- [25] 曾立, 向荣, 尹文清, 等. 瑶药定心藤挥发油的提取工艺及其 GC-MS 分析 [J]. 中成药, 2012, 34(8): 1613-1615.
- [26] 杜萌, 杨婷, 王久利, 等. 唐古特白刺黄酮类物质及其药用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(5): 888-900.
- [27] 周宸, 巩婷, 陈晶晶, 等. 三萜皂苷生物合成相关糖基转移酶研究进展 [J]. 生物工程学报, 2022, 38(3): 1004-1024.
- [28] 王梁凤, 李慧婷, 王堯, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨生脉注射液抗新型冠状病毒肺炎的作用机制 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 2977-2987.

[责任编辑 王文倩]