

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术比较板蓝根和大青叶的化学成分

严曾豪^{1,2}, 李雯珊², 梁冰宜^{1,2}, 吴 灏¹, 彭 维¹, 李楚源², 王德勤², 苏薇薇^{1*}

1. 中山大学生命科学学院 广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心, 广东 广州 510275

2. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广东 广州 510515

摘 要: **目的** 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱联用 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 技术比较板蓝根 *Isatidis Radix* 和大青叶 *Isatidis Folium* 的化学成分。 **方法** 采用 Accliam 120 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm; Thermo Fisher), 以 0.1% 甲酸的乙腈溶液-0.1% 甲酸的水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 0.3 mL/min, 柱温为 40 ℃, 采用电喷雾离子源 (ESI), 在正、负离子模式下进行数据采集, 以 PeakView 1.2 质谱分析软件分析数据。 **结果** 通过化合物的保留时间、精确质荷比、二级质谱裂解碎片等信息, 结合对照品、参考文献和 Massbank 等数据库共鉴定或指出板蓝根和大青叶的 71 个共有成分, 主要包括生物碱、黄酮、木脂素、含硫化合物、有机酸等类化合物; 板蓝根特有成分 6 个, 主要包括含硫化合物类等; 大青叶特有成分 2 个, 均为生物碱类。 **结论** 该方法能够系统、快速地比较分析板蓝根和大青叶的化学成分, 为其质量控制和药效物质基础研究提供了重要依据。

关键词: 板蓝根; 大青叶; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 吲哚-3-甲醛; 直铁线莲宁 B; 异牡荆素

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)12-3956-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.004

Comparison of chemical constituents of *Isatidis Radix* and *Isatidis Folium* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS

YAN Zenghao^{1,2}, LI Wenshan², LIANG Bingyi^{1,2}, WU Hao¹, PENG Wei¹, LI Chuyuan², WANG Deqin², SU Weiwei¹

1. Guangdong Engineering and Technology Research Center for Quality and Efficacy Reevaluation of Post marketed TCM, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

2. Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To compare the chemical constituents of Banlangen (*Isatidis Radix*) and Daqingye (*Isatidis Folium*) by UPLC-Q-TOF-MS/MS technology. **Methods** The liquid phase separation was performed on Accliam 120 C₁₈ (Thermo Fisher, 250 mm×4.6 mm, 5 μm) column, the mobile phases were 0.1% formic acid acetonitrile and 0.1% formic acid solution with gradient elution, flow rate was 0.3 mL/min, column temperature was 40 ℃. Mass spectrometry was performed using electrospray ion (ESI) source under positive and negative ion mode. Retention time, precise mass charge ratio, secondary mass spectrometry and other mass spectrometry data were analyzed using PeakView® 1.2 software (AB Sciex, Foster City, CA, USA) based on reference materials, literature data and Massbank database. **Results** A total of 71 compounds were identified and speculated in *Isatidis Radix* and *Isatidis Folium*, including alkaloids, flavonoids, lignans, sulfur compounds and organic acids. Six compounds were identified and speculated only in *Isatidis Radix*, including sulfur compounds, and two compounds were identified and speculated only in *Isatidis Folium* which both belongs to alkaloids. **Conclusion** The established method can systematically and quickly compare the chemical constituents of *Isatidis Radix* and *Isatidis Folium*, which could provide an important basis for the research of quality control and pharmacodynamic material basis.

Key words: *Isatidis Radix*; *Isatidis Folium*; UPLC-Q-TOF-MS/MS; indole-3-carboxaldehyde; clemastanin B; isovitexin

收稿日期: 2023-10-24

基金项目: 中国博士后科学基金资助项目 (2021M700913); 广州市科学技术协会青年科技人才托举工程项目 (QT20230101122)

作者简介: 严曾豪 (1993—), 男, 博士, 研究方向为中药二次开发。E-mail: yanzengh@yeah.net

*通信作者: 苏薇薇, 博士生导师, 教授, 主要从事创新药物研制、中药上市后再评价及中药国际化。E-mail: lsssw@126.com

板蓝根和大青叶均为用药历史悠久的清热解毒类中药,两者植物来源相同,分别为十字花科菘蓝属植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fortune. 的干燥根和干燥叶^[1]。在中医临床应用中,板蓝根和大青叶均性味苦寒,归心、胃经,具有清热解毒、凉血的功效,两者常作单独和配伍使用^[1]。清·张秉成《本草便读》记载:“板蓝根即靛青根,其功用行为与靛青叶同,能入肝胃血分,不过清热,解毒,辟疫,杀虫四者而已。但叶主散,根主降,此又同中之异耳”。现代药理学研究也表明,板蓝根及大青叶的不同提取部位均表现出抗金黄色葡萄球菌等细菌^[2]、抗流感病毒等病毒^[3-5]、抗脂多糖等所致炎症^[6-8]的药理活性,两者及其有关组方广泛用于各类感冒的防治,在甲型 H1N1 流感、新冠肺炎疫情的防治中发挥了重要作用^[9-10]。

近几十年,国内外学者对板蓝根的化学成分进行了较为深入的研究,主要分离或鉴定了生物碱、木脂素、含硫化合物等种类丰富的化学成分^[11-12]。针对大青叶的化学成分研究相对较少,其化学成分主要包括生物碱、黄酮等类,部分化学组成与板蓝根相同^[13-14]。板蓝根和大青叶中的多种单体化学成分被证实具有抗病毒、抗炎等药理活性。例如,板蓝根源木脂素类成分落叶松脂醇-4-O- β -D-葡萄糖苷具有抗流感病毒、抑制流感病毒介导炎症的作用^[15];落叶松脂醇还具有体外抑制白色念珠菌、金黄色葡萄球菌等生长的抗菌、真菌作用^[16-17];大青叶的黄酮类成分异牡荆素、异荭草素等则具有较好的抗炎活性^[18-19]。这些活性化学成分共同构成了板蓝根和大青叶的重要药效物质基础,化学组成的差异也能够一定程度上反映板蓝根和大青叶在药效特色上的区别^[14]。然而,板蓝根和大青叶在物质基础方面的异同仍缺乏直接研究。因此,本研究采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术,对板蓝根和大青叶的化学成分进行研究,定性比较分析两者物质基础的差异性,以期为嗣后质量控制和药效物质基础的进一步研究开发提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UFLC-Q-TOF-MS/MS 液质联用系统(UFLC XR 超高效液相色谱, Shimadzu Corp., Kyoto, 日本);配置 Triple TOF™ 5600+和 Analyst® 1.7.1 工作站(AB Sciex, Forster City, 美国)。Milli-Q 超纯

水净化系统(Millipore 公司, Billerica, 美国), MS105DU 十万分之一电子分析天平(Metler Toledo, Zurich, 瑞士),超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

1.2 材料

板蓝根药材(批号 1912003, 产地甘肃张掖)和大青叶药材(批号 2003002, 产地甘肃张掖)均购自广州采芝林药业有限公司,经中山大学生命科学学院彭维主任药师鉴定分别为十字花科植物菘蓝 *I. indigotica* Fort. 的干燥根和干燥叶;对照品直铁线莲宁 B(质量分数 $\geq 98\%$, CFS202102)购自武汉天植生物技术有限公司(ChemFaces);尿苷(质量分数 99.6%, 批号 110887-202104)、鸟苷(质量分数 93.6%, 批号 111977-201501)、腺苷(质量分数 99.7%, 批号 110879-201703)、(R,S)-告依春(质量分数 100.0%, 批号 111753-202007)购自中国食品药品检定研究院;落叶松脂醇(质量分数 $\geq 95\%$, D16GB171471)购自上海源叶生物科技有限公司。质谱级甲醇和乙腈购自 Thermo Fisher Scientific Inc. (Fair Lawn, 美国);色谱级甲酸购自 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, 美国)。超纯水由 Milli-Q 超纯水净化系统(Millipore Co., Billerica, 美国)净化并于使用前使用孔径为 0.22 μm 的滤膜滤过。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

分别取板蓝根和大青叶粉末(过三号筛)1 g, 精密称定,置于 25 mL 具塞锥形瓶中,精密加入 60% 甲醇水 10 mL, 密塞,称定质量,40 kHz 超声提取 30 min, 放置至室温后,用 60% 甲醇水补足损失的质量,0.22 μm 的滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取尿苷、鸟苷、腺苷各 5 mg, 加 5% 甲醇水配制成质量浓度约为 0.02 mg/mL 的混合对照品溶液;精密称取直铁线莲宁 B、落叶松脂醇、(R,S)-告依春各 5 mg 加甲醇配制成质量浓度为 0.01 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件和质谱条件

2.3.1 液相色谱条件 Accliam 120 C₁₈ 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm ; Thermo Fisher),流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 5% B; 5~35 min, 5%~95% B; 35~40 min, 95% B; 40~41 min, 95%~5% B; 41~45 min, 5% B);体积流量为 0.3 mL/min;柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$,

进样量为 5 μ L。

2.3.2 质谱条件 质谱采用电喷雾电离离子源 (electrospray ionization source, ESI), 分别以正、负离子模式检测, 离子源载气 1 气压为 378.95 kPa (55 psi), 离子源载气 2 气压为 378.95 kPa (55 psi), 气帘气气压为 241.15 kPa (35 psi), 离子源温度为 550 $^{\circ}$ C, 离子喷雾电压 (ion spray voltage) 在正离子模式下为 5 500 V, 在负离子模式下为 -4 500 V, 碰撞能 (collision energy) 为 40 V, 浮动碰撞能 (collision energy spread) 为 20 V, 去簇电压 (declustering potential) 为 80 V, 雾化气和辅助气均为氮气, 检测质荷比 (m/z) 为 50~1 500, 在信息依赖采集模式 (information-dependent acquisition, IDA) 下使用 Analyst[®] 1.7.1 软件采集数据, 使用 PeakView[®] 1.2 软件 (AB Sciex, Foster City, CA, 美国) 分析数据。

2.4 数据分析

查阅国内外板蓝根、大青叶及菰蓝属植物化学成分研究相关文献报道, 收集整理得到板蓝根、大青叶的已知化学成分数据库。采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术采集数据后, 使用 PeakView[®] 1.2 软件的 XIC Manager 功能提取各色谱峰的质谱信息, 根据一级质谱精确相对分子质量、二级质谱碎裂方式、同位素分布等

信息, 并与对照品、自建数据库、本地天然产物数据库 (AB sciex, Forster City, 美国) 以及 Massbank (www.massbank.jp)、Chemspider (www.chemspider.com) 等在线数据库对照, 鉴定或指认化学成分。

3 结果

3.1 板蓝根和大青叶中化学成分的鉴定

采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对板蓝根和大青叶的化学成分进行定性分析, 分别得到板蓝根和大青叶甲醇提取物在 ESI (-) 和 ESI (+) 模式下的质谱总离子流色谱图, 结果见图 1 和 2。根据“2.4”项的数据分析方法, 鉴定出板蓝根和大青叶共有成分共 71 个, 包括 5 个氨基酸类、3 个核苷类、7 个含硫化合物类、12 个黄酮类、10 个木脂素类、22 个生物碱类、8 个有机酸类以及 4 个其他类; 板蓝根特有检出成分共 6 种, 包括 1 个木脂素类、2 个生物碱类、3 个含硫化合物类; 大青叶特有检出成分共 2 个, 均为生物碱类, 具体结果见表 1。

3.2 化合物的裂解规律分析

3.2.1 生物碱类化合物 生物碱是广泛存在于中药中的一类含氮的碱性有机化合物, 大多数具有含氮杂环结构, 该类化合物的主要裂解途径为易丢失 H_2O 、 CO_2 或者支链等, 且易发生环状结构的断裂重排。生物碱类是板蓝根和大青叶的特征性成分之

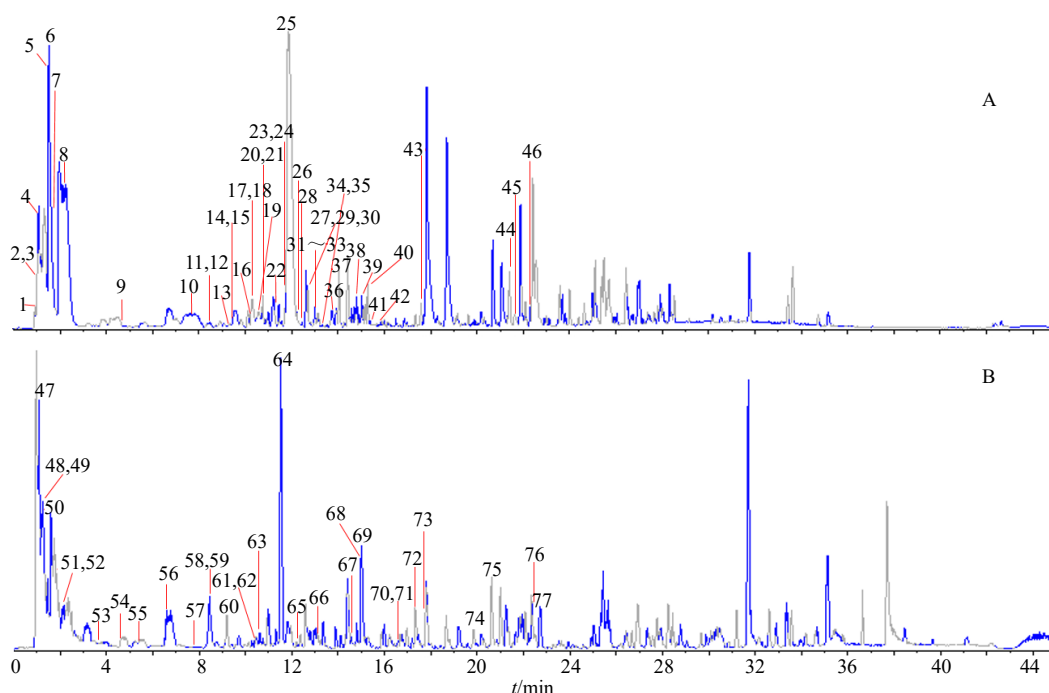


图 1 负 (A)、正 (B) 离子模式下板蓝根的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 基峰色谱图

Fig. 1 Base peak chromatograms of *Isatidis Radix* in negative (A) and positive (B) modes

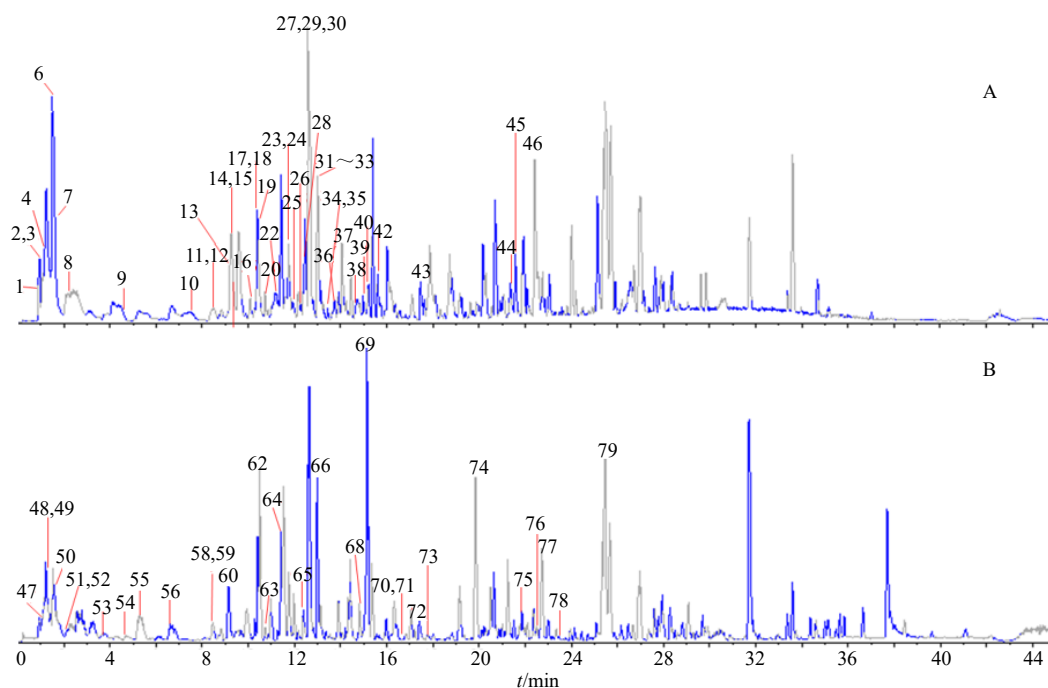


图 2 负 (A)、正 (B) 离子模式下大青叶的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 基峰色谱图

Fig. 2 Base peak chromatograms of *Isatidis Folium* in negative (A) and positive (B) modes

表 1 板蓝根和大青叶化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定结果

Table 1 Identification of chemical constituents of *Isatidis Radix* and *Isatidis Folium* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	t_R/min	分子式	离子模式	准分子离子峰 (m/z)		偏差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子	鉴定	归属
				理论值	实测值				
1	0.98	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	173.104 40	173.104 62	1.3	131.082 2	精氨酸	A、B
2	1.05	$\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	118.050 97	118.050 95	-0.2	\	苏氨酸	A、B
3*	1.08	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	266.089 48	266.089 39	-0.3	\	腺苷	A、B
4	1.23	$\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	115.003 68	115.003 68	0	71.012 3	马来酸	A、B
5	1.53	$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_{10}\text{S}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	388.037 76	388.038 31	1.4	259.013 9, 195.034 1, 96.960 4, 74.991 2	表原告依春/原告依春	A
6*	1.57	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	243.062 26	243.062 50	1.0	200.057 6, 152.039 6, 110.025 8, 82.029 4, 66.035 3	尿苷	A、B
7*	1.75	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	282.084 39	282.084 66	1.0	150.041 6, 133.015 2, 108.020 2	鸟苷	A、B
8	2.12	$\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_9\text{S}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	372.042 85	372.043 41	1.5	259.013 5, 195.033 8, 96.960 2, 74.991 1	葡萄糖芸薹芥素	A、B
9	4.69	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	463.048 66	463.049 29	1.4	96.959 6	4-羟基-芸薹葡萄糖硫苷	A、B
10	7.66	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	447.053 75	447.054 47	1.6	96.959 6	芸薹葡萄糖硫苷	A、B
11	8.41	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_6$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	294.098 31	294.099 63	4.5	131.037 7	靛苷	A、B
12	8.46	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	333.109 21	333.110 44	3.7	144.046 2	老鼠瓜苷 A	A、B
13	9.29	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	121.029 50	121.029 59	0.7	92.025 9	苯甲酸	A、B
14	9.43	$\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	525.161 37	525.162 75	2.6	363.105 7, 195.067 8, 167.035 3, 150.031 5	菰蓝氧代新木脂素苷 A	A、B
15	9.47	$\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}\text{S}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	488.123 21	488.124 27	2.2	326.067 0, 163.009 8	虾脊兰苷	A、B
16	10.24	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	197.045 55	197.046 40	4.3	182.021 2, 166.997 6, 123.008 6, 95.013 2	丁香酸	A、B
17	10.40	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	593.151 19	593.153 00	3.0	503.119 3, 473.108 0, 311.056 3, 282.053 7	染料木素-C, O-二葡萄糖苷	A、B
18	10.42	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{S}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	477.064 31	477.064 58	0.6	96.959 2	5-甲氧基-葡萄糖芸苔素	A、B
19	10.53	$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	181.014 25	181.014 56	1.8	93.034 6, 65.040 0	2-羟基对苯二甲酸	A、B
20	10.73	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	609.146 11	609.148 41	3.8	411.073 8, 357.061 7, 327.053 3, 299.054 9	木犀草素-6-C-葡萄糖苷-7-O-葡萄糖苷	A、B
21*	10.75	$\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	683.255 66	683.258 11	3.6	521.206 6, 359.149 9, 329.140 6	直线线莲宁 B	A

表 1 (续)

峰号	<i>t_R</i> /min	分子式	离子模式	准分子离子峰 (<i>m/z</i>)		偏差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子	鉴定	归属
				理论值	实测值				
22	11.42	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.151 19	593.153 49	3.9	341.068 0, 311.057 0, 283.062 8	皂草苷	A、B
23	11.75	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	623.161 76	623.163 73	3.2	371.078 5, 341.067 3, 298.049 4	异金雀花素-2"-β-D-葡萄糖苷	A、B
24	11.76	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.093 29	447.094 19	2.0	429.082 8, 357.061 7, 327.051 4, 297.040 1	异荛草苷	A、B
25	11.95	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₁₀ S ₂	[M-H] ⁻	477.064 31	477.064 79	1.0	446.047 4, 96.960 2	4-甲氧基-葡萄糖芸苔素	A、B
26	12.20	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₁	[M-H] ⁻	523.218 49	523.218 64	0.3	361.166 5, 347.078 9	开环异落叶松脂素-β-D-葡萄糖苷	A、B
27	12.70	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	521.202 84	521.205 33	4.8	359.140 2, 329.140 2	落叶松脂醇-4-O-β-D-葡萄糖苷	A、B
28	12.44	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 63	193.050 67	0.2	178.027 5, 149.060 2, 134.037 3	阿魏酸	A、B
29	12.63	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.098 37	431.100 45	4.8	341.067 1, 311.056 5, 283.062 1	异牡荆素	A、B
30	12.65	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	223.061 2	223.062 17	4.4	208.038 7, 193.014 2, 164.048 1, 149.023 9, 121.029 0, 93.034 3	芥子酸	A、B
31	12.84	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	581.223 97	581.226 13	3.7	389.162 5	5,5'-二甲氧基落叶松脂素-4-O-葡萄糖苷	A、B
32	12.96	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₄	[M-H] ⁻	597.218 88	597.219 53	1.1	551.214 4, 389.161 4, 359.151 5	菰蓝氧化新木脂素苷 E	A、B
33	13.00	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	461.108 94	461.110 23	2.8	371.078 5, 341.067 1, 298.049 1	异金雀花素	A、B
34	13.44	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	[M-H] ⁻	359.150 01	359.150 26	0.7	344.125 6, 130.089 7	异落叶松脂醇	A、B
35	13.48	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	519.187 19	519.188 50	2.5	357.131 9, 151.039 2	松脂素-β-D-吡喃葡萄糖苷	A、B
36	13.74	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.024 42	137.024 81	2.9	93.034 1, 65.039 5	水杨酸	A、B
37	14.05	C ₉ H ₁₆ O ₄	[M-H] ⁻	187.097 58	187.098 73	6.1	169.087 1, 125.097 1, 97.065 5	壬二酸	A、B
38	14.62	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	[M-H] ⁻	361.165 66	361.165 87	0.6	346.145 0, 179.072 5, 165.055 6	开环异落叶松脂素	A、B
39 ^a	15.03	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	[M-H] ⁻	359.150 01	359.151 27	3.5	329.141 7, 192.079 5, 178.065 5, 175.076 9, 160.053 7, 147.042 1	落叶松脂醇	A、B
40	15.17	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	591.171 93	591.172 40	0.8	367.105 3, 223.062 1, 205.052 2	蒙花苷	A、B
41	15.50	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ S ₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	561.085 44	561.086 56	2.0	160.043 1, 96.960 5	表菰蓝碱苷	A
42	15.72	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	[M-H] ⁻	371.113 63	371.114 62	2.7	353.106 7, 341.103 4, 338.079 9, 323.057 8, 279.070 2, 267.067 9	甜橙黄酮	A、B
43	17.54	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 55	269.046 61	3.9	151.003 4, 117.033 7	染料木素	A、B
44	21.41	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M-H] ⁻	255.066 28	255.067 31	4.0	213.055 6, 185.061 0, 171.045 3, 151.003 1, 145.066 2, 107.012 4, 83.012 5, 65.002 6	乔松素	A、B
45	21.64	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 55	269.046 55	3.7	\	大黄素	A、B
46	22.30	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.061 20	283.061 99	2.8	268.039 3, 239.036 6, 211.041 3, 167.050 5	毛蕊异黄酮	A、B
47	1.21	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	118.086 26	118.085 84	-3.5	58.065 0	缬氨酸	A、B
48	1.48	C ₅ H ₄ N ₄ O	[M+H] ⁺	137.045 79	137.045 12	-4.8	119.035 4, 110.034 4	次黄嘌呤	A、B
49	1.53	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	113.034 55	113.034 17	-3.4	96.006 2, 70.027 1	尿嘧啶	A、B
50	1.74	C ₅ H ₅ N ₅ O	[M+H] ⁺	152.056 69	152.056 35	-2.2	135.029 6, 110.033 9	鸟嘌呤	A、B
51	2.07	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	[M+H] ⁺	180.101 91	180.101 19	-4.0	162.089 1, 133.050 9	N-甲基苯丙氨酸	A、B
52	2.17	C ₉ H ₇ NO	[M+H] ⁺	146.060 04	146.059 80	-1.7	118.064 0, 91.053 9, 65.038 4	2-羟基喹啉	A、B
53	3.68	C ₈ H ₇ NO ₂	[M+H] ⁺	150.054 96	150.054 70	-1.7	132.043 5, 122.059 7, 95.048 5, 77.038 4	2,5-二羟基喹啉	A、B
54 ^a	4.54	C ₅ H ₇ NOS	[M+H] ⁺	130.032 11	130.031 65	-3.6	60.973 6	(R,S)-告依春	A、B
55	5.28	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	205.097 15	205.097 06	-0.5	188.071 1, 146.060 1, 118.064 8, 91.054 1	色氨酸	A、B
56	6.59	C ₁₀ H ₈ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	189.065 85	189.065 71	-0.8	161.070 3, 149.046 9, 116.049 1, 92.049 1, 65.037 7	2,3-二氢-4-羟基-2-氧代喹啉-3-乙腈	A、B
57	7.66	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	191.081 50	191.081 33	-0.9	146.059 9, 132.044 0, 128.049 1	(R)-2-氧代-1,2,3,4-四氢喹啉-4-羧酰胺	A
58	8.45	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ O ₄	[M+H] ⁺	327.133 93	327.134 23	0.9	201.102 0, 173.071 1, 145.075 3	依啶蓝酮	A、B
59	8.52	C ₈ H ₆ N ₂ O	[M+H] ⁺	147.055 29	147.055 18	-0.8	130.029 8, 92.049 4 65.038 4	4(3H)-喹唑酮	A、B
60	9.28	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	235.107 72	235.107 54	-0.8	70.064 6	菰蓝灵碱 C	A、B
61	10.46	C ₈ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	154.086 26	154.085 93	-2.1	136.076 4, 108.043 2, 80.049 1, 68.049 3, 53.038 2	3-乙酰胺基喹啉	A

表 1 (续)

峰号	t_R/min	分子式	离子模式	准分子离子峰 (m/z)		偏差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子	鉴定	归属
				理论值	实测值				
62	10.52	$\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	258.076 08	258.076 01	-0.3	240.066 4, 212.071 1, 184.076 2, 154.065 3, 129.069 6	6-羟基-4-(5-羟基甲基 咪唑-2-基) 喹啉- 2(1 <i>H</i>)-酮	A、B
63	10.7	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	219.076 42	219.076 32	-0.5	201.066 4, 173.071 4	鸭嘴花酮碱	A、B
64	11.53	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	187.086 59	187.086 67	0.4	\	脱氧鸭嘴花酮碱	A、B
65	12.16	$\text{C}_8\text{H}_5\text{NO}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	148.039 30	148.039 08	-1.5	120.044 7, 92.049 3, 77.038 4, 65.038 2	靛红	A、B
66	13.12	$\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	146.060 04	146.059 79	-1.7	118.064 7, 117.056 7, 91.054 0, 65.038 3	吲哚-3-甲醛	A、B
67	14.7	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	381.111 48	381.111 71	0.6	219.059 5, 186.079 2, 179.039 7, 171.056 1, 164.017 0	吲哚-3-乙腈-4-甲氧基- 2- $\text{C}-\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖硫苷	A
68	14.99	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	176.070 61	176.070 58	-0.2	160.039 2, 133.051 5, 104.049 0	4-甲氧基-3-吲哚甲醛	A、B
69	15.15	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	239.081 50	239.081 70	0.8	211.086 6, 147.054 7, 132.043 7, 120.043 5, 92.048 7	3-羟苯基喹唑酮	A、B
70	16.68	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	323.102 63	323.102 81	0.5	305.093 0, 291.101 5, 186.053 1, 158.058 9, 130.064 3	甲基-2-(4-氧代-1,4-二 氢喹啉-3-羧酰胺基)- 苯酯	A、B
71	16.86	$\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_9$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	539.227 56	539.227 13	-0.8	521.213 9, 367.151 9, 137.059 3	菝葜倍半木脂素 A	A、B
72	17.34	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	176.070 61	176.070 64	0.2	161.047 4, 144.044 4, 133.051 8, 117.057 1, 104.049 1, 89.038 0	1-甲氧基-3-吲哚甲醛	A、B
73	17.67	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	263.081 50	263.081 75	0.9	144.044 1, 120.043 0	异靛蓝	A、B
74	19.85	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	249.065 85	249.066 08	0.9	221.071 2, 130.028 7	色胺酮	A、B
75	21.78	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	263.081 50	263.081 74	0.9	235.086 1, 219.091 3, 206.083 8	靛蓝	A、B
76	22.51	$\text{C}_{32}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	523.140 08	523.140 02	-0.1	505.127 9, 289.059 5, 235.085 2	双靛蓝	A、B
77	22.72	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	263.081 50	263.081 86	1.4	245.071 7, 235.087 1, 219.092 3, 190.065 9, 165.070 1, 132.044 2	靛玉红	A、B
78	23.48	$\text{C}_2\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	364.144 44	364.144 53	0.2	245.107 0	三聚二氢吲哚	B
79	25.67	$\text{C}_{23}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	364.108 05	364.108 24	0.5	336.112 4, 166.066 4	青黛酮	B

A-板蓝根; B-大青叶; *表示该化学成分通过对照品比对指认。

A-*Isatis Radix*; B-*Isatis Folium*; *confirmed by reference substance.

一, 本研究从板蓝根和大青叶中共鉴定出 26 个生物碱类成分, 主要包括吲哚类生物碱和喹唑啉酮类生物碱。以峰 66 吲哚-3-甲醛为例, 在 ESI 正离子模式下, 准分子离子 m/z 146.059 79 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 分别以均裂和异裂的方式在羰基处发生断裂形成碎片离子 m/z 117.056 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{CHO}]^+$ 和 118.064 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$, 接着发生含氮五元杂环的断裂, 形成该类取代芳香环特征性的基峰碎片卓鎬离子 m/z 91.054 0 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$, 并进一步裂解形成碎片离子 m/z 65.038 3 $[\text{C}_5\text{H}_5]^+$, 通过与数据库对比可以确定该化合物为吲哚类生物碱吲哚-3-甲醛, 其可能的碎片裂解途径见图 3-A。以峰 594 (3*H*)-喹唑酮为例, 在 ESI 正离子模式下, 准分子离子 m/z 147.055 18 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 失去 1 氢得到碎片离子 m/z 130.029 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$, 六元含氮杂环发生断裂形成特征性碎片苯胺离子 m/z 92.049 4 $[\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}]^+$, 芳香环断裂形成特征性碎片离子 m/z 65.038 4 $[\text{C}_5\text{H}_5]^+$, 通过与数据库对比可以确定该化合物为喹唑啉酮类生物碱 4(3*H*)-喹唑酮, 其可能的碎片裂解途径见图 3-B。

3.2.2 含硫化合物类 含硫化合物是广泛存在于菝葜中的一类次级代谢产物, 本研究从板蓝根和大青叶中共鉴定出 10 个含硫化合物, 该类化合物常具有硫代葡萄糖基团和磺酰基团的结构。以峰 8 葡萄糖芜菁素为例, 在 ESI 负离子模式下, 准分子离子峰 m/z 372.043 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 失去 1 个磺酰基得到碎片离子 m/z 259.013 5 $[\text{M}-\text{H}-\text{HSO}_4-\text{NH}_2]^-$, 进一步在硫苷键处断裂形成葡萄糖硫苷碎片离子 m/z 195.033 8 $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5\text{S}]^-$, 葡萄糖硫苷碎片离子继续碎裂形成碎片离子 m/z 74.991 1 $[\text{C}_2\text{H}_3\text{OS}]^-$ 。此外, 该类成分还易形成特征性的磺酰基峰碎片离子 m/z 96.960 2 $[\text{HSO}_4]^-$, 通过与数据库对比可以确定该化合物为硫代葡萄糖苷类化合物葡萄糖芜菁素, 其可能的碎片裂解途径见图 4。

3.2.3 木脂素类 木脂素类是板蓝根中的一类重要活性化学成分, 本研究从板蓝根和大青叶中共鉴定出 11 个木脂素类成分, 主要包括四氢呋喃类等。以峰 21 直铁线莲宁 B 为例, 在 ESI 负离子模式下, 准分子离子峰 m/z 683.258 11 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 可分别在 2 个

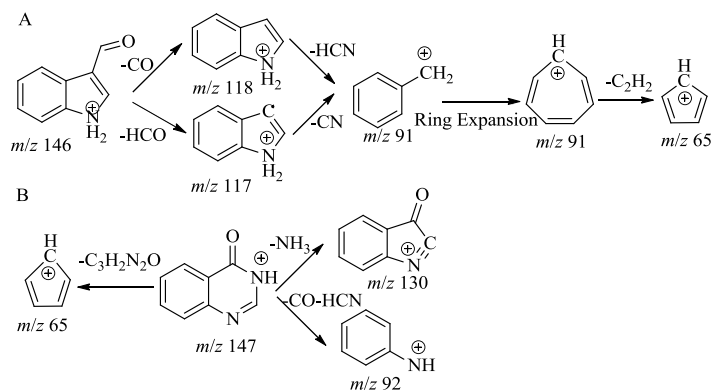


图 3 吲哚-3-甲醛 (A) 和 4(3H)-喹唑酮 (B) 可能的碎片裂解途径

Fig. 3 Proposed fragmentation pathways of indole-3-carboxaldehyde (A) and 4(3H)-quinazoline (B)

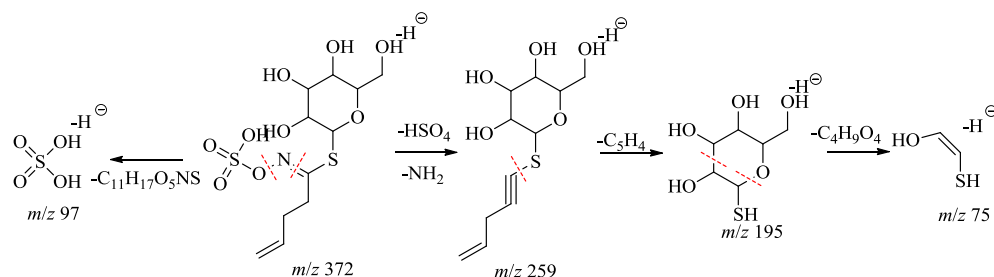


图 4 葡萄糖茺芥素可能的碎片裂解途径

Fig. 4 Proposed fragmentation pathway of gluconapin

位置脱去 1 个葡萄糖基和 2 个葡萄糖基形成碎片离子 m/z 521.206 6 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 和 359.149 9 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5]^-$, 接着再分别脱去芳香环上取代的 1 个甲氧基形成碎片离子 m/z 329.140 6 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5-OCH_3]^-$, 通过与数据库对比和对照品对照可以确定该化合物为四氢呋喃类木脂素直铁线莲宁 B, 其可能的碎片裂解途径见图 5。

3.2.4 黄酮类 本研究还从板蓝根和大青叶中共

鉴定出 12 个黄酮类化合物, 多为黄酮苷元与糖结合形成的碳苷或氧苷。以峰 9 异牡荆素为例, 在 ESI 负离子模式下, 准分子离子峰 m/z 431.100 45 $[M-H]^-$ 以不同方式发生糖基六元环结构的断裂形成一系列规律性碎片离子 m/z 341.067 1 $[M-H-C_3H_6O_3]^-$ 、311.056 5 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$ 和 283.062 1 $[M-H-C_5H_{10}O_5]^-$, 通过与数据库对比和对照品对照确定该化合物为黄酮碳苷异牡荆素, 其可能的碎片裂解途径见图 6。

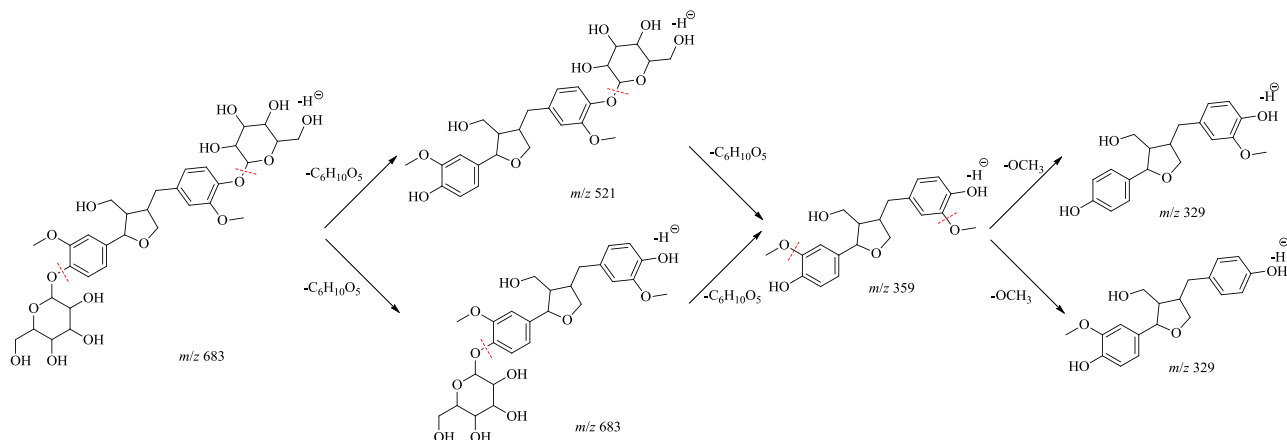


图 5 直铁线莲宁 B 可能的碎片裂解途径

Fig. 5 Proposed fragmentation pathway of clemastanin B

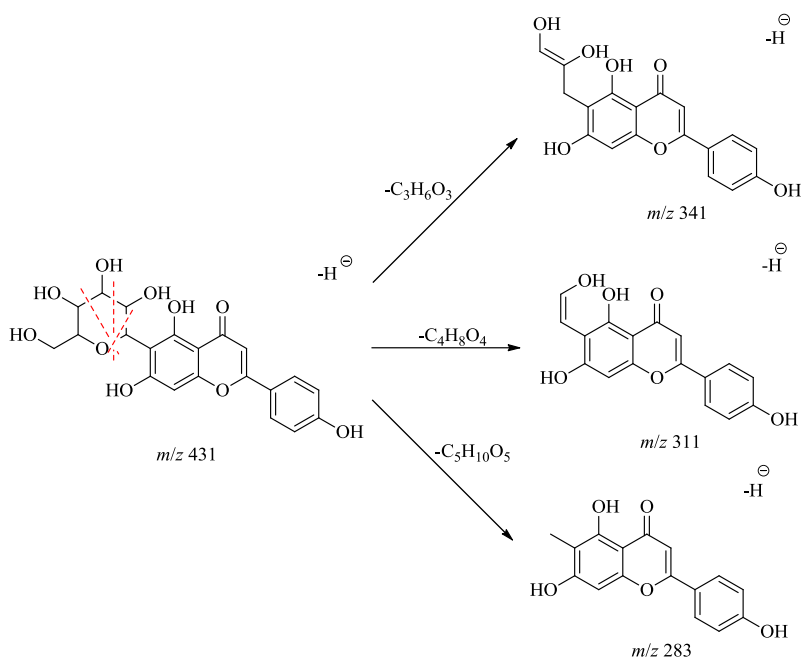


图 6 异牡荆素可能的碎片裂解途径
Fig. 6 Proposed fragmentation pathway of isovitexin

3.2.5 有机酸类 有机酸类化合物亦是植物中常见的一类天然产物，该类化合物的主要裂解途径为易丢失 CH_3 、 CO 等支链基团，且易在羧基处断裂形成碎片离子。以峰 28 阿魏酸为例，在 ESI 负离子模式下，准分子离子峰 m/z 193.050 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 容易在芳香环取代甲氧基处脱去 1 个甲基形成碎片离子 m/z 178.027 5 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$ ，且容易在羧基处脱去 1 个甲氧基形成碎片离子 m/z 149.060 2 $[\text{M}-\text{H}-\text{COO}]^-$ ，此外准分子离子峰还可同时脱去 1 个甲氧基和 1 个甲基形成碎片离子 m/z 134.037 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{COO}]^-$ ，通过与数据库对比和对照品对照可以确定该化合物为有机酸类化合物阿魏酸，其可能的碎片裂解途径见图 7。

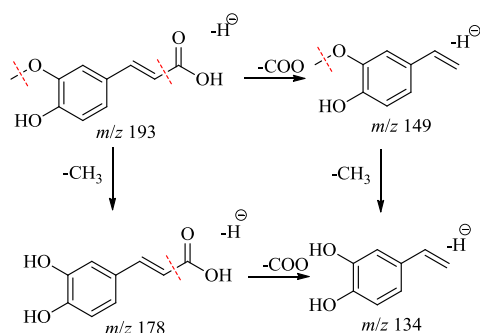


图 7 阿魏酸可能的碎片裂解途径
Fig. 7 Proposed fragmentation pathway of ferulic acid

4 讨论

中药化学成分复杂，常通过多成分以不同机制发挥药效作用。因此采用传统植物化学分离手段研究中药药效物质基础较为困难，运用液相-质谱联用技术能快速地筛选、鉴定中药成分，对中药物质基础、质量控制等研究具有重要意义。本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对十字花科菘蓝属植物菘蓝来源的中药板蓝根和大青叶的化学成分进行了定性分析，鉴定出板蓝根和大青叶共有成分共 71 个，板蓝根特有检出成分共 6 个，大青叶特有检出成分共 2 个。这些化学成分信息为板蓝根、大青叶及其组方的质量控制、药效物质基础和作用机制、药物代谢等研究提供了科学依据。

定性比较结果表明，包括有机酸、含硫化合物、黄酮、木脂素、生物碱等类大部分化学成分在板蓝根和大青叶中均有检出，其中不乏具有显著抗病毒、抗炎或抗菌等生物活性的共有化学成分。例如，有文献观察到含硫生物碱类成分 (*R,S*)-告依春能通过线粒体融合蛋白 2-线粒体抗病毒信号蛋白 (Mfn2-MAVS) 信号通路发挥抗病毒作用，改善拘束应激引起的流感易感性^[20]；喹唑啉酮类生物碱色胺酮在体外被观察到具有抗人冠状病毒 NL63 的作用^[21]；吲哚类生物碱能够通过下调 TOLL 样受体 7 (TLR7) 信号通路抑制呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial

virus, RSV) 感染诱导的炎症反应^[22]; 木脂素类成分落叶松脂醇-4-*O*- β -*D*-葡萄糖苷具有抗流感病毒、抑制流感病毒介导炎症的作用^[15], 落叶松脂醇还具有体外抑制白色念珠菌、金黄色葡萄球菌等生长的抗细菌、真菌作用^[16-17]; 黄酮类成分异牡荆素、异荭草素等则具有较好的抗炎活性^[18-19]。结合板蓝根和大青叶的现代药理学研究和临床应用情况, 以上结果初步解释了板蓝根和大青叶均具有“清热解毒”功效和相关药效作用的物质基础。此外, 板蓝根和大青叶各有少量特有检出成分, 两者的液-质联用色谱图也有一定差别, 说明板蓝根和大青叶虽来源于同一种植物, 但在化学成分的种类或含量上仍有一定差异。本实验中, 在大青叶中难以检出的板蓝根成分直线铁连宁 B 在体内、体外被证实具有抗甲型和乙型流感病毒作用^[23]; 而大青叶特有检出成分三聚二氢吲哚 (trisindoline) 被发现具有抗肿瘤、抗氧化等活性^[24]。化学成分的差异表明板蓝根和大青叶可能也具有各自的药效特色, 有待进一步药理学对比研究。

本研究仍有一些不足之处, 板蓝根和大青叶的物质基础差异可能还反映在化学成分含量以及多糖等大分子成分、挥发性成分的差异上, 本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术仅定性对比了其部分化学成分组成情况, 有必要在此基础上进一步综合运用 HPLC、GC-MS 等技术进一步开展更全面的化学成分定量、半定量分析研究。

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: 22, 214-215.
- [2] 郑剑玲, 王美惠, 杨秀珍, 等. 大青叶和板蓝根提取物的抑菌作用研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2003, 15(1): 18-19.
- [3] 杨子峰, 王玉涛, 秦笙, 等. 板蓝根水提物 S-03 体外抑制甲、乙型流感病毒感染的实验研究 [J]. 病毒学报, 2011, 27(3): 218-223.
- [4] 刘盛, 陈万生, 乔传卓, 等. 不同种质板蓝根和大青叶的抗甲型流感病毒作用 [J]. 第二军医大学学报, 2000, 21(3): 204-206.
- [5] Deng Y P, Liu Y Y, Liu Z, *et al.* Antiviral activity of *Folium isatidis* derived extracts *in vitro* and *in vivo* [J]. *Am J Chin Med*, 2013, 41(4): 957-969.
- [6] 赵泽军, 王志旺, 郭玫, 等. 甘肃产不同生态型板蓝根对小鼠抗炎、免疫调节作用的比较 [J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(1): 57-60.
- [7] Wu B B, Wang L Y, Jiang L L, *et al.* N-butanol extract from *Folium isatidis* inhibits the lipopolysaccharide- induced downregulation of CXCR1 and CXCR2 on human neutrophils [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 179-185.
- [8] Fan Z Y, Cai L L, Wang Y G, *et al.* The acidic fraction of *isatidis Radix* regulates inflammatory response in LPS-stimulated RAW_{264.7} macrophages through MAPKs and NF- κ B pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 8879862.
- [9] 陈纯静, 赵澄, 张香港, 等. 基于 JAK2-STAT3 通路研究流感相关脑病的发病机制与麻杏石甘汤的干预作用 [J]. 中草药, 2022, 53(12): 3694-3703.
- [10] 疾病预防控制中心. 关于印发新型冠状病毒肺炎防控方案(第九版)的通知 [EB/OL]. [2022-07-04]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3577/202206/de224e7784fe4007b7189c1f1c9d5e85.shtml>
- [11] 杨立国, 王琪, 苏都那布其, 等. 菰蓝属植物化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(16): 2039-2048.
- [12] 聂黎行, 王馨平, 黄烈岩, 等. 板蓝根化学成分信息库的构建 [J]. 中国药理学杂志, 2022, 57(6): 428-452.
- [13] 闫峻. 复方板蓝根颗粒化学成分的分离分析及活性评价 [D]. 长春: 吉林大学, 2008.
- [14] Chen J, Zhu Z P, Gao T H, *et al.* *Isatidis Radix* and *Isatidis Folium*: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 283: 114648.
- [15] Li J, Zhou B X, Li C F, *et al.* Lariciresinol-4-*O*- β -*D*-glucopyranoside from the root of *Isatis indigotica* inhibits influenza A virus-induced pro-inflammatory response [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174: 379-386.
- [16] Hwang B, Cho J, Hwang I S, *et al.* Antifungal activity of lariciresinol derived from *Sambucus williamsii* and their membrane-active mechanisms in *Candida albicans* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(3): 489-493.
- [17] Bajpai V K, Shukla S, Paek W K, *et al.* Efficacy of (+)-lariciresinol to control bacterial growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 804.
- [18] He M, Min J W, Kong W L, *et al.* A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin [J]. *Fitoterapia*, 2016, 115: 74-85.
- [19] Ziqubu K, Dlodla P V, Joubert E, *et al.* Isoorientin: A dietary flavone with the potential to ameliorate diverse metabolic complications [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104867.
- [20] Luo Z, Liu L F, Wang X H, *et al.* Epigoitrin, an alkaloid

- from *Isatis indigotica*, reduces H1N1 infection in stress-induced susceptible model *in vivo* and *in vitro* [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 78.
- [21] Tsai Y C, Lee C L, Yen H R, *et al.* Antiviral action of tryptanthrin isolated from *Strobilanthes cusia* leaf against human coronavirus NL63 [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(3): 366.
- [22] Hou X B, Zhang X Y, Bi J T, *et al.* Indole-3-carboxaldehyde regulates RSV-induced inflammatory response in RAW_{264.7} cells by moderate inhibition of the TLR7 signaling pathway [J]. *J Nat Med*, 2021, 75(3): 602-611.
- [23] Yang Z F, Wang Y T, Zheng Z G, *et al.* Antiviral activity of *Isatis indigotica* root-derived clemastanin B against human and avian influenza A and B viruses *in vitro* [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(4): 867-873.
- [24] Wati F A, Santoso M, Moussa Z, *et al.* Chemistry of trisindolines: natural occurrence, synthesis and bioactivity [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(41): 25381-25421.

[责任编辑 王文倩]