

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合特征分子网络技术的畲药树参成分分析及其抗炎活性评价

张乐怡¹, 范欣荣^{1,2#}, 王慧玉¹, 薛畅², 杨慧珍⁴, 秦宇雯³, 袁宙新¹, 朱寅荻^{3*}, 姜程曦^{2*}

1. 浙江中医药大学附属丽水中医院 药剂科, 浙江 丽水 323000

2. 温州医科大学药学院, 浙江 温州 325035

3. 温州医科大学中医药学院, 浙江 温州 325035

4. 北京中医药大学中医药学院, 北京 100029

摘要: 目的 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱 (ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS) 结合特征分子网络 (feature-based molecular networking, FBMN) 技术, 对畲药树参 *Dendropanax dentiger* 醇提物化学成分进行快速鉴定, 并对其抗炎活性进行初步评价。方法 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 以 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B) 为流动相梯度洗脱, 在正、负离子模式下采集质谱数据, 并在全球天然产物社会分子网络 (global natural products social molecular networking, GNPS) 网站 (<http://gnps.ucsd.edu>) 上构建 FBMN。基于 SIRIUS 6.2.2 软件及 GNPS 数据库匹配结果, 结合对照品比对、保留时间、特征碎片、文献及 PubChem、MassBank 数据库信息, 并结合 FBMN 的结构聚类特性, 快速鉴定树参醇提物的化学成分并总结其裂解规律; 采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型, 结合 CCK-8、Western blotting 及免疫荧光实验, 评价其抗炎效果。结果 共鉴定出树参中 59 种化学成分, 包括酚酸类 18 个、木脂素类 11 个、黄酮及其苷类 8 个、香豆素 6 个、环肽 4 个、苯乙醇苷 3 个、脂肪酸及其衍生物 4 个、环烯醚萜 2 个、糖苷 2 个及生物碱 1 个。其中, 19 个潜在未报道化合物首次从树参中分析得到。基于 FBMN, 成功识别异绿原酸 A、B、C 等同分异构体, 并进一步推测出其甲基化衍生物。细胞实验结果表明, 树参醇提物可显著抑制 LPS 诱导的炎症反应, 降低白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β) 和肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 的表达, 促进白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 分泌, 并抑制核因子-κB 亚基 p65 (nuclear factor-kappa-B p65, NF-κB p65) 的核转位。结论 FBMN 弥补了传统分子网络在鉴定同分异构体方面的不足, UPLC-Q-TOF-MS/MS 联合 FBMN 技术可实现树参复杂成分的快速、高效鉴定, 并首次发现 19 个潜在未报道化合物。树参提取物具有良好抗炎活性, 为其后续药效物质研究和开发应用提供实验依据。

关键词: 树参; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱; 特征分子网络; 异绿原酸 A; 异绿原酸 B; 异绿原酸 C; 抗炎活性
中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)06-2029-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.06.004

Component analysis and anti-inflammatory activity evaluation of *Dendropanax dentiger* from a She ethnic medicine based on UPLC-Q-TOF-MS/MS combined with characteristic molecular network technology

ZHANG Leyi¹, FAN Xinrong^{1,2}, WANG Huiyu², XUE Chang², YANG Huizhen⁴, QIN Yuwen³, YUAN Zhouxin¹, ZHU Yindi³, JIANG Chengxi²

1. Pharmacy Department, Lishui Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Lishui 323000, China

收稿日期: 2025-10-26

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目 (2024ZR205); 浙江省中医药管理局共建科技计划项目 (GZY-ZJ-KJ-23098); 丽水市公益性技术应用研究项目 (2024GYX36); 丽水市自筹类公益性技术应用研究项目 (2022SJCZ037)

作者简介: 张乐怡 (1995—), 女, 主管中药师, 研究方向为中药学和民族药学 (畲药)。E-mail: lsleyizhang@163.com

#共同第一作者: 范欣荣 (1996—), 男, 中药师, 研究方向为中药学和民族药学 (畲药)。E-mail: lsyhfxr@163.com

*通信作者: 姜程曦 (1971—), 男, 研究员, 研究方向为中药学和民族药学 (畲药)。E-mail: jiangchengxi@126.com

朱寅荻 (1986—), 男, 副教授, 研究方向为中药活性成分。E-mail: ydzh@wmu.edu.cn

2. School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China
3. School of Traditional Chinese Medicine, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China
4. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To rapidly identify the chemical constituents of the ethanol extract of *Dendropanax dentiger*, a She ethnic medicine, using ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) and feature-based molecular networking(FBMN), and preliminarily evaluate its anti-inflammatory activity. **Methods** Chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) using a gradient elution with 0.1% formic acid in water (A) and acetonitrile (B) as the mobile phases. MS data were acquired in both positive and negative ion modes, and FBMN was constructed on the global natural products social molecular networking (GNPS) platform (<http://gnps.ucsd.edu>). Based on the matching results of the SIRIUS 6.2.2 software and the GNPS database, combined with the reference standards, retention time, feature fragments, literature, and information from the PubChem and MassBank databases, and in combination with the structural clustering characteristics of FBMN, the chemical composition of the alcohol extract of *D. dentiger* was rapidly identified and its lysis rules were summarized. *In vitro* anti-inflammatory effects were evaluated using a lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophage inflammation model, with CCK-8, Western blotting, and immunofluorescence analyses. **Results** A total of 59 compounds were identified, including 18 phenolic acids, 11 lignans, eight flavonoids and flavonoid glycosides, six coumarins, four cyclic peptides, three phenylethanoid glycosides, four fatty acids and derivatives, two iridoids, two glycosides, and one alkaloid. Among them, 19 potentially unreported compounds were identified from *D. dentiger* for the first time. Three positional isomers—isochlorogenic acid A, B, and C were successfully identified via FBMN, and a methylated derivative was further proposed. The results of cell experiments demonstrated that the ethanol extract of *D. dentiger* significantly suppressed LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells by downregulating interleukin-1 beta (IL-1β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) expression, upregulating IL-10 secretion, and inhibiting nuclear translocation of nuclear factor-kappa-B p65 (NF-κB p65). **Conclusion** FBMN effectively overcomes the limitations of traditional molecular networking in isomer identification. The integration of UPLC-Q-TOF-MS/MS with FBMN enables rapid and efficient identification of the complex components in *D. dentiger*, leading to the first identification of 19 potentially unreported compounds. The ethanol extract of *D. dentiger* exhibits promising anti-inflammatory activity, providing an experimental basis for further research and development application of its active substances.

Key words: *Dendropanax dentiger* (Harms) Merr.; UPLC-Q-TOF-MS/MS; feature-based molecular networking; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid C; anti-inflammatory activity

畚药树参为五加科植物树参 *Dendropanax dentiger* (Harms) Merr.的根或茎,别名枫荷梨、半边枫、鸭脚木、阴阳风等,是江浙地区最常用的30种畚药之一^[1]。其药用历史悠久,在《中华本草》《中药大辞典》《全国中草药汇编》《中国畚族医药学》等医学典籍中均有记载,具有祛风除湿、活血消肿之功效,在江浙畚族地区常用于风湿病、关节炎、半身不遂等疾病治疗,以其茎作为主药的医院制剂“枫荷梨”也曾被广泛应用于临床,疗效显著,充分体现了其独特的民族医药价值及地方应用特色。然而,因药效物质基础不清、饮片质量标准缺失等问题,其临床应用受到一定制约,原有院内制剂亦已停产^[2-4]。现代研究表明,树参中主要含有酚酸类、黄酮类和脂肪烃类等化学成分,具有抗炎、抗氧化、增强免疫力等多种药理活性^[5-6]。目前,树参研究主要集中于化合物的分离鉴定以及总提物或特定部位的药效学研究,随着药理研究的不断深入,全面、

快速地解析其化学成分,明确其药效物质基础,已成为亟待解决的关键科学问题。

中药化学成分的系统表征与鉴定是阐明其作用机制的前提和基础,目前,国内外学者已对树参的化学成分开展了相关研究,刘敏等^[2]采用液相色谱-质谱联用(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)、核磁共振氢谱、碳谱技术从树参茎中共分离鉴定出10个化合物。周健等^[7]通过硅胶柱色谱、制备型液相色谱等方法,分离鉴定出树参中的9个成分。Yang等^[5]从树参醇提物中鉴定出81个化学成分。然而,以往研究多集中于树参根部,对于树参茎醇提物中化学成分尚缺乏系统全面的成分表征方法,深入挖掘树参中的活性成分仍具重要研究意义。

超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS)

因其选择性强、灵敏度高、分辨率高等优势,广泛应用于中药体系的化学成分分析。然而,由于中药成分复杂、异构体众多,仅依靠传统 LC-MS 鉴定策略往往难以实现对化合物结构的精确解析^[8]。针对这一难题,近年多种前沿技术在同分异构体区分方面展现出显著优势。例如,基于机器学习的保留时间与碰撞截面预测模型,可构建涵盖四维结构信息的多维数据库,从而实现复杂天然产物体系的高精度表征^[9]。Song 团队基于在线能量分辨质谱技术构建了多级三维质谱策略^[8,10],实现同类化合物间结构差异的深度解析,为中药成分组学研究提供了新的技术支撑。全球天然产物社会分子网络(global natural products social molecular networking, GNPS)是一种基于 LC-MS 数据构建的可视化分子网络技术^[11]。该方法通过比对化合物的 MS/MS 碎片谱图,根据谱图相似性构建网络节点,并利用改进的余弦相似度算法评估化合物之间的结构相关性,最终实现成分之间的关系可视化,不仅可在未知样品成分组成的情况下直观获得各成分之间的关系,还有助于发现已知化合物的类似物和潜在新化合物^[12-13]。特征分子网络(feature-based molecular networking, FBMN)作为其拓展形式,能够区分传统分子网络中难以解析的同分异构体及立体异构体,显著提升了同类化合物的识别能力^[14]。目前,FBMN 技术已广泛用于天然产物和中药成分的定性分析,但是将 LC-MS/MS 与 FBMN 技术结合用于中药快速成分解析的研究仍相对有限。

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 联合 FBMN 技术,对畚药树参化学成分进行全面快速表征,共分析鉴定出 59 个化合物,包括酚酸类、木脂素类等,并总结其裂解规律。此外,在此基础上,利用 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞炎症模型评价树参提取物对白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)和核因子- κ B 亚基 p65(nuclear factor-kappa-B p65, NF- κ B p65)蛋白表达的影响,结果发现树参具有良好的抗炎效果,其机制可能与抑制 NF- κ B 通路活化有关,为后续树参活性成分的分离、纯化及药理机制研究奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

AB SCIEX TripleTOF[®] 5600+型超高效液相色谱

串联四级杆飞行时间质谱,含 ESI 接口(美国 AB SCIEX 公司); AG105 型十万分之一电子天平(上海恒平天平科学仪器有限公司); AE124J 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); HTY-200g 型切药机(永康市红太阳机电有限公司); HWS-26 型电热恒温水浴锅[沙鹰科学仪器(上海)有限公司]; 低温高速离心机(中国 LiChen 公司),多功能酶标仪(德国 Eppendorf 公司),倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司), Smart2Pure Pro UV/UF 型超纯水仪、CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),电泳仪、ChemiDoc[™] XRS+ 化学发光成像系统(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 试剂与试药

树参药材(标本编号 S20)于 2023 年 6 月野外采自浙江丽水遂昌县阴岱,经温州医科大学姜程曦教授鉴定为五加科树参属植物树参 *D. dentiger* (Harms) Merr. 的干燥茎。

对照品原儿茶酸(批号 110809-202207,质量分数 97.5%),绿原酸(批号 110753-202119,质量分数 96.3%)均购自中国食品药品检定研究院;紫丁香苷(批号 AFBG1364),隐绿原酸(批号 AFCE3004),异绿原酸 A(批号 AZ22042903),异绿原酸 C(批号 AFCEB0705)均购自成都埃法生物科技有限公司,质量分数均 \geq 98%。乙腈为色谱纯,购自德国 Merck 公司;甲酸、甲醇为分析纯,购自西陇科学股份有限公司;水为超纯水(美国赛默飞 Smart2 Pure Pro UV/UF 型超纯水仪自制)。D-101 大孔树脂购自安徽三星树脂有限公司。

RAW264.7 巨噬细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;胎牛血清(批号 10099-141)购自美国 Invitrogen 公司;细胞培养级二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 货号 BL165B)、增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒(货号 BL520B)、PBS 溶液(货号 BL302A)购自安徽白鲨生物科技有限公司;TNF- α 抗体(货号 17590-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号 3700)、p-NF- κ B p65 抗体(货号 3033)购自美国 CST 公司;NF- κ B p65 抗体(货号 ab16502)、IL-1 β 抗体(货号 ab254360)、IL-10 抗体(货号 ab9969)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG(货号 ab6721)购自英国 Abcam 公司;CCK-8 试剂盒购自北京兰博利德有限公司;LPS(货号 L2654)购自美国

Sigma-Aldrich 公司, DMEM 高糖培养基 (批号 6124334) 购自美国 Gibco 公司; 放射免疫沉淀法 (radioimmuno-precipitation assay, RIPA) 裂解液、二辛可宁酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白试剂盒、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶配制试剂盒、青霉素-链霉素 (批号 01408/28223、P0009、Z918240807、C0222) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司。

2 方法

2.1 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

2.1.1 溶液的制备

(1) 树参提取物制备: 称取树参药材切片约 500 g, 置圆底烧瓶中, 加入 70%乙醇没过药材, 加热回流提取 3 次, 每次 2 h, 滤过合并提取液, 减压浓缩至无醇味后, 用预处理好的 D-101 大孔树脂吸附分离, 并用 70%乙醇洗脱。洗脱液减压浓缩并置 60 °C 下真空干燥, 得树参醇提物。参照课题组前期确定的高效液相色谱测定方法^[1], 测得树参提取物中紫丁香苷、绿原酸、异绿原酸 A 的质量分数分别为 0.392、4.279、2.834 mg/g。

(2) 对照品溶液制备: 精密称取原儿茶酸、紫丁香苷、绿原酸、异绿原酸 A 以及异绿原酸 C 对照品适量, 用 70%甲醇配制成 10 μg/mL 的混合对照品溶液, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

(3) 供试品溶液制备: 精密称取树参醇提物 120 mg 置于锥形瓶中, 加入 70%甲醇 35 mL, 超声处理 30 min。将提取液以 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.1.2 液相色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 以 0.1%甲酸水 (A)-乙腈 (B) 为流动相, 柱温为 30 °C; 体积流量 0.4 mL/min; 检测波长 254 nm; 进样量 4 μL。梯度洗脱: 0~1 min, 0~8% B; 1~30 min, 8%~28% B; 30~31 min, 28%~8% B; 31~35 min, 8% B。

2.1.3 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI): 检测方式为正、负离子模式检测, 喷雾电压: 5 500 V/-4 500 V, 氮气作为雾化气 379 kPa、辅助气 379 kPa 及气帘气 240 kPa, 并设定源温为 550 °C, 碰撞气 55 kPa; 去簇电压 (DP): 80 V/-80 V, 碰撞能 (CE): 35 eV/-35 eV, 碰撞能量扩展 (CES): 15 eV/-15 eV。通过信息依赖性采集 (IDA) 方法进行质谱分析。一级全扫描质量范围为 m/z 50~1 500; 二级质谱扫

描范围 m/z 50~1 500。

2.2 FBMN 分子特征网络解析及 SIRIUS 注释

MSConvert 用于将原始 LC-MS/MS 质谱数据 wiff2 文件转换为 mzML 文件, 分别构建正负电离模式 FBMN, 使用 MZmine 3.0 处理 mzML 文件。采用 WinSCP 软件将 MZmine 软件处理得到的 TSV 文件和 mgf 格式文件上传到 GNPS 数据库 (<https://gnps.ucsd.edu>), 在 Feature Networking 模块建立 FBMN。并设置余弦分数阈值为 0.7 且超过 6 个匹配峰, topK 为 10, 母离子之间的最大质量偏差为 0.02。后缀为 graphml 的结果导出后使用 Cytoscape 3.8.0 软件进行可视化分析查看与 GNPS 数据库匹配的成分, 初步鉴定化合物; 再根据已鉴定化合物与其相邻节点的相似度, 结合质谱数据和相对分子质量差异, 推测其他节点的可能结构。同时将 mzML 文件导入 SIRIUS 6.2.2, 所有化合物均使用 SIRIUS、CSI: FingerID 和 CANOPUS 模块计算。MS2MassDev 参数设置为 1×10^{-5} , 并排除同位素。选择 SIRIUS 6.2.2 中可用的所有数据库进行分子预测。手动注释后实现化合物的初步分类, 用 Cytoscape 3.8.0 软件进行可视化分析。

2.3 化合物鉴定结果验证

通过检索 PubMed 和中国知网, 建立 1 个包括各个化合物的名称、准分子离子峰 (m/z)、分子式、一级质谱碎片和二级质谱碎片等信息的树参化学成分的自建库。然后对于有对照品的化合物, 可以结合树参提取物, 混合对照品溶液和各个生物样品在相同的色谱和质谱条件下的谱图信息, 对目标物的保留时间与质谱二级碎片信息进行分析鉴定。对于没有对照品的化合物, 通过查阅文献和结合相关的在线网站 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、MassBank (<https://massbank.eu/MassBank/>)、HMDB (<https://hmdb.ca/>), 寻找二级碎片信息。使用 PeakView 软件中的 XIC Manager 和 IDA 功能对样品进行化合物的鉴定分析, 用 ChemDraw 软件绘图。

2.4 树参提取物体外抗炎活性评价

2.4.1 样品溶液的制备 树参提取物用 DMSO 溶解, 配制成 100 mg/mL 储备液, 4 °C 保存, 使用时用 DMEM 细胞培养液稀释成工作质量浓度 (依次为 50、100、200、400 μg/mL)。

2.4.2 细胞培养与处理 RAW264.7 细胞置于含 10%胎牛血清 (FBS) 及 1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱

内培养,隔天换液。待细胞生长融合度达到80%~90%时,胰酶消化传代。

2.4.3 CCK-8 法测定细胞毒性 取对数生长期的 RAW264.7 细胞悬液,调整细胞密度为 2×10^5 个/mL,以每孔 100 μ L 接种至 96 孔板中,放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。设空白组、对照组、树参给药组(50、100、200、400 μ g/mL),每组设 3 个复孔。给药组加入相应质量浓度的树参提取物,对照组使用不含药物的相同培养基进行处理。除空白组不加细胞外,其他组待细胞培养贴壁后,以换液的方式进行给药。培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,使用酶标仪在 450 nm 下检测各孔吸光度(A)值,按公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4.4 Western blotting 检测树参对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 NF- κ B、p-NF- κ B 蛋白的表达 取对数生长期的细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,于培养箱中培养。设对照组、模型组和树参给药(50、100、200 μ g/mL)组,每组设 3 个复孔。给药组分别加入相应质量浓度的树参提取物预处理 2 h,除对照组外,其余各组加入 LPS (1 μ g/mL) 刺激 24 h。收集细胞,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,计算蛋白上样量。加入蛋白上样缓冲液后,95 $^{\circ}$ C 水浴 10 min 使蛋白变性,10% SDS-PAGE 电泳(90

V、90 min),转至 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别加入一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 溶液洗涤后,加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1h,使用 ECL 试剂盒显影,凝胶成像系统进行成像,以 β -actin 作为内参蛋白,采用 Image J 软件对各条带测定灰度值。

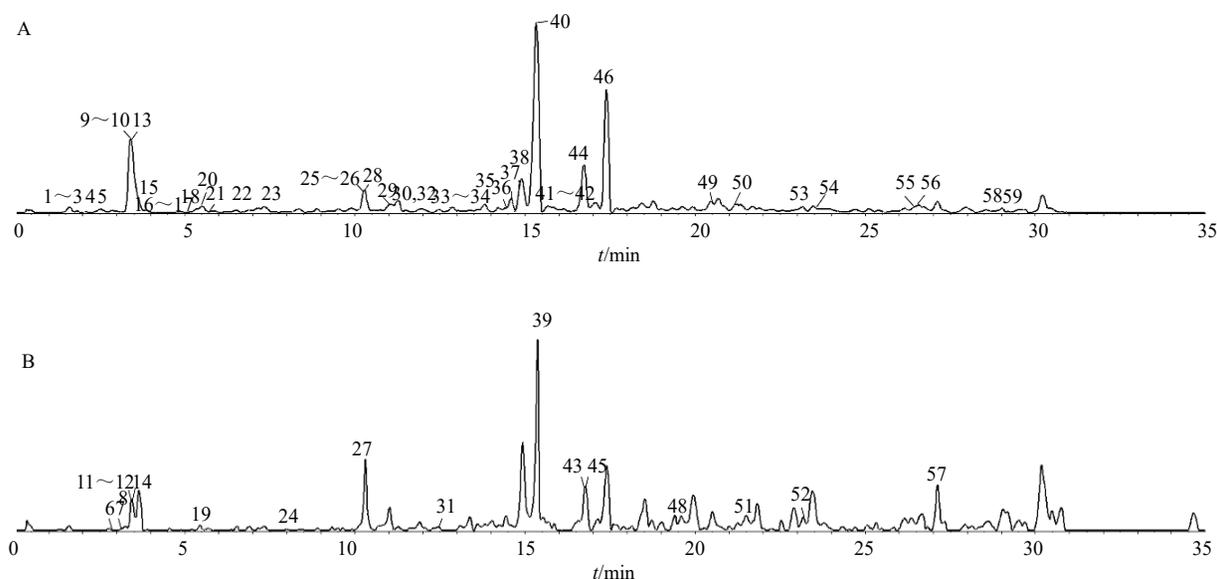
2.4.5 免疫荧光观察细胞 NF- κ B p65 核转位情况 将 RAW264.7 细胞以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 24 孔板,按“2.4.4”项下方法分组处理后,弃去培养基,PBS 洗涤 3 次,用 4% 多聚甲醛室温固定 15 min,0.2% Triton X-100 溶液通透样品 10 min。PBS 洗涤 3 次,10% 山羊血清封闭 1 h 后,加入兔抗 NF- κ B p65 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日加入二抗室温避光孵育 1 h,DAPI 染核封片,荧光显微镜下观察并采集图像,Image J 软件分析核/质荧光强度比值。

2.4.6 统计学处理 采用 Graphpad Prism 8.3 软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 One-way ANOVA 方法进行单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 树参醇提物化学成分分析

通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 高分辨质谱在正、负离子模式下分别采集树参醇提物的质谱数据,总离子流图见图 1。构建的 FBMN 见图 2,正离子模式下构建的 FBMN 包括 290 个节点,其中节点 ≥ 2 的团簇 62 个,负离子模式下构建的 FBMN 包括 793



A-负离子模式; B-正离子模式。

A-negative ion mode; B-positive ion mode.

图 1 树参醇提物基峰总离子流图

Fig. 1 Base peak total ion chromatogram of alcohol extract from *D. dentiger*

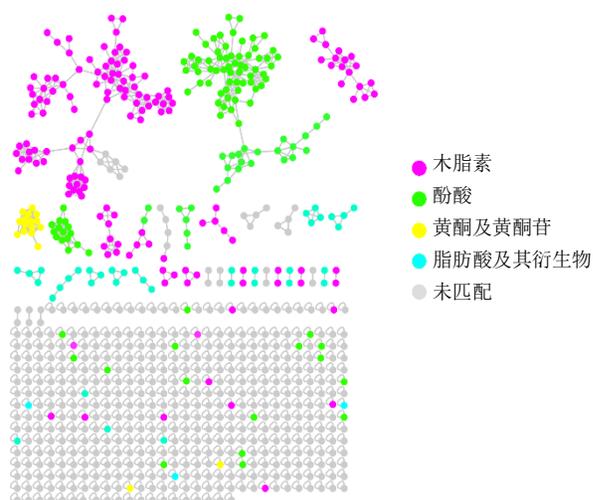


图2 树参醇提物 FBMN 图
Fig. 2 FBMN of alcohol extract from *D. dentiger*

表1 树参在正、负离子模式下化学成分分析

Table 1 Chemical composition analysis of *D. dentiger* in positive and negative ion modes

序号	t_R /min	离子类型	理论值 (m/z)	测定值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	碎片信息 (m/z)	化合物名称	分类
1	1.584	$[M-H]^-$	197.045 5	197.045 6	0.3	$C_9H_{10}O_5$	123.009 6	没食子酸乙酯	酚酸类
2 ^a	1.608	$[M-H]^-$	153.019 3	153.019 3	-1.3	$C_7H_6O_4$	153.017 8, 109.028 9, 91.018 7	原儿茶酸	酚酸类
3 ^c	1.646	$[M-H]^-$	359.098 3	359.098 9	0.7	$C_{15}H_{20}O_{10}$	197.045 6, 182.023 0	(3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl) 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate ^[18]	酚酸类
4	2.128	$[M-H]^-$	359.098 8	359.099 3	-0.7	$C_{15}H_{20}O_{10}$	197.045 5, 166.998 1, 153.055 7, 137.024 8	丁香酸葡萄糖苷 ^[19-20]	酚酸类
5 ^c	2.668	$[M-H]^-$	515.140 6	515.141 1	3.2	$C_{22}H_{28}O_{14}$	353.108 7, 323.076 7, 191.056 3, 161.024 4	7-[4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-6-methoxychromen-2-one ^[18]	香豆素
6	2.803	$[M+NH_4]^+$	480.207 5	480.207 6	3.9	$C_{20}H_{30}O_{12}$	317.114 6, 155.070 9, 85.029 4	连翘脂苷 ^[21]	苯乙醇苷类
7 ^a	3.191	$[M+Na]^+$	395.131 2	395.132 9	2.0	$C_{17}H_{24}O_9$	364.112 2, 232.071 9, 185.042 6	紫丁香苷 ^[22]	苯乙醇苷类
8	3.223	$[M+H]^+$	133.064 8	133.065 8	1.0	C_9H_8O	105.070 7, 89.039 8, 77.038 3, 64.032 9	<i>trans</i> -cinnamaldehyde	酚酸类
9	3.315	$[M-H]^-$	341.088 5	341.094 8	0.4	$C_{15}H_{18}O_9$	179.034 4, 161.023 9, 135.045 3	咖啡酸 3- β -D-葡萄糖苷	酚酸类
10	3.393	$[M-H]^-$	191.056 1	191.055 8	0.6	$C_7H_{12}O_6$	127.042 2, 85.029 2	奎宁酸	酚酸类
11	3.415	$[M+H]^+$	193.049 5	193.050 7	0.7	$C_{10}H_8O_4$	178.026 4, 137.060 4, 133.029 2	东莨菪素 ^[23]	香豆素
12	3.442	$[M+Na]^+$	377.084 3	377.086 8	0.9	$C_{16}H_{18}O_9$	359.076 3, 331.078 5, 215.051 7	东莨菪苷 ^[24]	香豆素
13 ^a	3.452	$[M-H]^-$	353.087 8	353.087 6	-0.5	$C_{16}H_{18}O_9$	707.180 0, 417.138 1, 353.086 6, 191.055 5	绿原酸	酚酸类
14 ^c	3.489	$[M+H]^+$	163.039 0	163.040 1	3.5	$C_9H_6O_3$	145.030 1, 135.045 8, 117.034 5, 89.039 6	7-羟基香豆素	香豆素

个节点, 其中节点 ≥ 2 的团簇 326 个。利用 SIRIUS 软件中的 CSI: FingerID 结构匹配模块和 CANOPUS 模块计算对化合物进行手动注释后导入 Cytoscape 3.8.0 软件进行可视化分析, 图 2 中不同颜色的节点代表不同的化合物类别, 主要包括酚酸类、木脂素类、黄酮及黄酮苷类等, 另外香豆素类、环肽及苯乙醇苷类化合物仅出现在正离子模式下构建的 FBMN 中, 说明此 3 类化合物在正离子模式下响应较好。通过与对照品比对、检索相关文献及自建数据库对其进行化学成分表征, 鉴定出 52 个化合物, 根据 FBMN 结果推测出 7 个化合物, 共鉴定出 59 个化合物, 结果见表 1。各类化学成分种类占比见图 3。

3.2 树参醇提物各类化学成分的鉴定及裂解规律

3.2.1 酚酸类化合物的裂解规律分析

酚酸类化合物通常由苯环羟基结构和羧酸(或酯)基团构成,

表 1 (续)

序号	t_R /min	离子类型	理论值 (m/z)	测定值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	碎片信息 (m/z)	化合物名称	分类
15 ^a	3.882	[M-H] ⁻	353.087 1	353.087 5	-0.5	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.056 3, 179.034 9, 173.045 7, 135.045 5	隐绿原酸	酚酸类
16	3.652	[M-H] ⁻	477.161 3	4 771 609	-0.9	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₃	293.087 8, 183.056 7, 168.042 8, 89.024 5	kelampayoside A	糖苷
17 ^c	4.072	[M-H] ⁻	401.145 3	401.145 0	-0.7	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀	269.103 1, 161.046 7	淫羊藿次苷 F2	黄酮苷类
18 ^c	5.402	[M-H] ⁻	177.019 3	177.019 2	-0.5	C ₉ H ₆ O ₄	121.028 5, 105.034 8, 93.033 3, 77.038 2	瑞香素	香豆素
19	5.405	[M+Na] ⁺	393.115 6	393.117 7	4.2	C ₁₇ H ₂₂ O ₉	231.069 0, 185.045 4	芥子醛葡萄糖苷	酚酸类
20	5.480	[M-H] ⁻	207.066 2	207.066 2	-0.2	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	192.042 5, 177.019 8, 149.023 1 93.034 2	3,4-二甲氧基肉桂酸	酚酸类
21 ^c	5.866	[M-H] ⁻	561.182 5	561.181 5	-1.0	C ₂₄ H ₃₄ O ₁₅	207.066 4, 192.042 9, 177.019 5	球腺糖苷 A	糖苷
22	6.866	[M-H] ⁻	503.177 0	503.176 8	-0.8	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₃	341.122 5, 221.067 2, 161.046 2	tinoscorside D	环烯醚萜类
23 ^{b,c}	7.625	[M-H] ⁻	537.161 9	537.161 9	-1.9	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₃	323.077 6, 179.035 8, 161.024 7	MEGxp0_769	环烯醚萜类
24	8.031	[M+H] ⁺	193.049 5	193.050 2	3.4	C ₁₀ H ₈ O ₄	178.027 3, 133.029 9, 122.036 4	异东茛菪亭	香豆素
25	10.219	[M-H] ⁻	417.155 5	417.155 8	0.9	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	387.108 1, 345.134 9, 197.035 1, 181.050 6, 166.026 9, 61.988 2	右旋丁香树脂酚	木脂素
26	10.255	[M-H] ⁻	741.261 1	741.261 7	0.8	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈	579.207 2, 417.155 0, 181.050 5	鹅掌楸苷/丁香脂素二葡萄糖苷 ^[25-26]	木脂素
27 ^b	10.322	[M+H] ⁺	419.172 3	419.171 9	4.5	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	383.146 3, 217.087 7, 205.088 0, 173.062 2, 167.071 0, 145.066 8	表丁香脂素	木脂素
28	10.332	[M-H] ⁻	579.208 3	579.208 0	-2.4	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃	417.155 1, 402.132 7, 181.050 5	无梗刺五加苷 B	木脂素
29 ^c	11.090	[M-H] ⁻	521.202 8	521.202 6	-0.4	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	359.149 4, 341.139 1, 329.138 7, 323.130 6, 187.076 6, 161.068 7	淫羊藿次苷 E5	黄酮苷类
30 ^{b,c}	12.418	[M-H] ⁻	261.134 1	261.137 3	-0.8	C ₁₂ H ₂₂ O ₆	187.097 0, 169.085 7, 125.097 1, 97.065 6	9-(2,3-dihydroxypropoxy)-9-oxononanoic acid	脂肪酸及其衍生物
31	12.460	[M+H] ⁺	303.049 9	303.051 9	5.9	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	257.044 9, 165.009 1, 153.021 2, 137.023 0	槲皮素 ^[24]	黄酮
32	12.484	[M-H] ⁻	609.146 1	609.145 8	-0.5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	300.027 7, 271.022 7, 255.030 8, 151.003 9	芦丁 ^[27]	黄酮
33	13.152	[M-H] ⁻	187.097 6	187.097 8	-2.0	C ₉ H ₁₆ O ₄	169.088 2, 125.097 0, 123.081 6	壬二酸	脂肪酸及其衍生物
34	13.301	[M-H] ⁻	523.217 9	523.215 3	-1.7	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₁	361.167 2, 346.143 5, 165.055 9	secoisolaricresinol glucopyranoside ^[28]	木脂素
35	14.039	[M-H] ⁻	177.055 6	177.055 7	-0.8	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	162.031 6, 134.036 6	松柏醛	酚酸类
36 ^c	14.410	[M-H] ⁻	519.187 2	519.187 6	0.8	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	357.132 8, 327.122 7, 206.057 3, 176.047 7	罗汉松树脂酚苷 ^[20]	木脂素
37	14.640	[M-H] ⁻	515.118 1	515.117 9	-2.7	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.086 8, 335.076 7, 191.055 7, 179.034 5, 173.045 0, 161.024 1	异绿原酸 B	酚酸类
38 ^c	14.879	[M-H] ⁻	579.208 3	579.205 5	-2.4	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃	417.154 3, 402.131 1, 387.107 4, 181.050 3, 166.026 9, 151.003 1	tortoside A	木脂素

表 1 (续)

序号	t_R/min	离子类型	理论值 (m/z)	测定值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	碎片信息 (m/z)	化合物名称	分类
39 ^c	15.314	[M+H] ⁺	499.123 5	499.123 5	0.6	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₁	319.082 1, 163.039 5	dicafeoyl quinolactone	酚酸类
40 ^a	15.406	[M-H] ⁻	515.116 3	515.117 2	-2.4	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.086 1, 191.055 5	异绿原酸 A	酚酸类
41 ^{b,c}	16.221	[M-H] ⁻	623.160 1	623.160 2	-1.2	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	315.049 8, 314.043 0, 300.027 7, 300.041 1	CCG-208 435	黄酮苷类
42 ^c	16.516	[M-H] ⁻	361.164 1	361.164 8	-0.6	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	346.141 2, 179.071 5, 165.054 6, 147.045 2, 121.029 3	开环异落叶松树脂酚 ^[20]	木脂素
43 ^{b,c}	16.739	[M+H] ⁺	479.156 8	479.156 3	3.1	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	163.039 8, 145.030 0, 135.046 0	木通苯乙醇苷 B	苯乙醇苷类
44 ^c	16.769	[M-H] ⁻	639.193 1	639.190 7	-3.7	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	455.117 8, 179.034 0, 161.023 6	大车前昔 (同分异构体)	黄酮苷类
45	16.847	[M+H] ⁺	679.511 7	679.518 3	2.0	C ₃₆ H ₆₆ N ₆ O ₆	661.502 4, 548.417 1, 322.250 9	cyclo hexaleucyl (or isoleucyl) ^[5]	环肽
46 ^a	17.472	[M-H] ⁻	515.116 3	515.117 9	-2.4	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	353.086 1, 191.055 5	异绿原酸 C	酚酸类
47	18.514	[M+H] ⁺	415.138 7	415.138 6	3.5	C ₂₂ H ₂₂ O ₈	387.145 6, 233.081 8, 201.056 3, 181.050 7, 167.071 4	鬼臼毒素	生物碱类
48	19.414	[M+H] ⁺	792.595 7	792.597 8	2.0	C ₄₂ H ₇₇ N ₇ O ₇	774.584 7	cyclo hetaleucyl (or isoleucyl) ^[5]	环肽
49 ^c	20.482	[M-H] ⁻	531.150 8	531.147 9	-2.3	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	339.086 3, 191.055 3, 173.044 8, 161.023 7	sesaminol monoglucoside	木脂素
50	21.368	[M-H] ⁻	529.133 9	529.132 7	-2.4	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	367.103 1, 193.049 7, 179.045 1, 173.045 1, 161.023 8, 135.044 7	3,5-二咖啡酰奎尼酸甲酯 ^[17]	酚酸类
51	21.514	[M+H] ⁺	905.679 8	905.682 1	1.1	C ₄₈ H ₈₈ N ₈ O ₈	887.663 3	cyclo octaleucyl (or isoleucyl) ^[5]	环肽
52	23.313	[M+H] ⁺	1 018.763 8	1 017.763 6	1.7	C ₅₄ H ₉₉ N ₉ O ₉	1 000.755 2	cyclo nonaleucyl (or isoleucyl) ^[5]	环肽
53 ^c	23.433	[M-H] ⁻	337.108 1	337.106 0	-2.6	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	322.083 2, 307.059 7, 291.064 8	7-hydroxy-3-[4-hydroxy-3-[3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-2,3-dihydrochromen-4-one ^[18]	黄酮
54	23.694	[M-H] ⁻	529.135 1	529.132 7	-2.5	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₂	355.117 5, 337.106 4, 191.055 6	4-feruloyl-5-caffeoylquinic acid	酚酸类
55 ^{b,c}	26.498	[M-H] ⁻	677.148 3	677.148 6	-2.7	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅	515.117 6, 353.086 4, 191.055 1, 179.034 5, 173.044 8, 161.023 0	3,4,5-三咖啡酰奎宁酸	酚酸类
56 ^c	26.593	[M-H] ⁻	619.203 2	619.201 3	-3.4	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₄	455.118 8, 353.086 9, 161.023 9	matsutakeside I	黄酮
57 ^c	27.142	[M+H] ⁺	355.118 3	355.110 0	1.2	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	337.111 5, 327.125 2, 323.094 1, 267.103 8, 252.079 9, 224.085 6, 181.067 0, 121.029 1	芝麻素 ^[19]	木脂素
58 ^{b,c}	28.750	[M-H] ⁻	327.216 0	327.217 2	-2.0	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	291.196 1, 229.144 1, 211.132 9, 171.102 8,	9,12,13-trihydroxyoctadeca -10,15-dienoic acid	脂肪酸及其衍生物
59	28.835	[M-H] ⁻	327.216 0	327.217 6	-2.0	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	309.204 0, 291.195 5, 239.123 0, 229.143 1, 211.133 2, 171.102 0	顺丁烯二酸 ^[19]	脂肪酸及其衍生物

^a为已与对照品比对的化合物, ^b为根据 FBMN 推测出的化合物, ^c为树参中潜在的新化合物。

^acomponents confirmed by comparison with the reference standards, ^bcompounds predicted by FBMN, ^cpotentially undescribed compounds from *D. dentiger*.

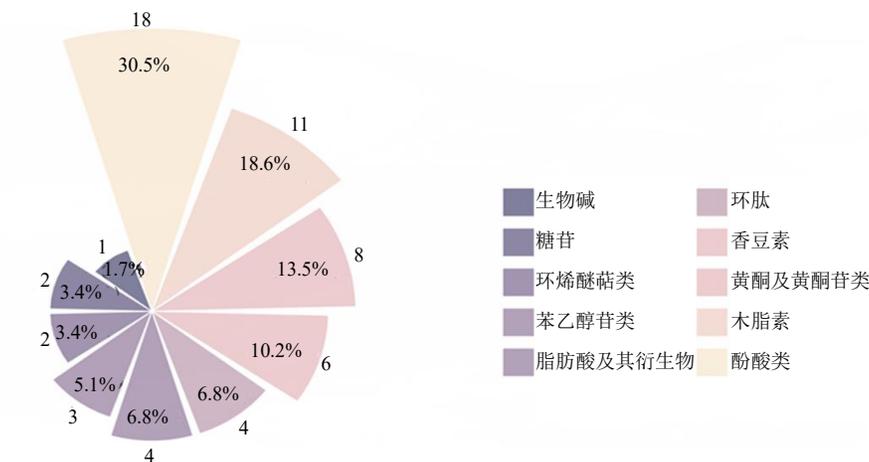


图3 树参各类化学成分种类占比图

Fig. 3 Category proportion chart of all kinds of chemical composition in *D. dentiger*

酚酸类化合物容易在裂解过程中形成咖啡酸以及奎宁酸特征离子碎片 m/z 191^[15], 在负离子模式下响应良好, 常以 $[M-H]^-$ 离子形式出现。酚酸类化合物是树参中的主要活性成分, 多为奎宁酸及其衍生物类, 将二级质谱数据与酚酸类化合物裂解规律进行比对, 形成酚酸类化合物特征分子网络簇 (图4)。

FBMN 结果显示化合物 13 与 15 在同 1 个分子簇中。其准分子离子峰为 m/z 分别为 353.087 8 和 353.087 1, 二者互为同分异构体, 分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, 保留时间为 3.452、3.882 min。二级质谱中均有均含

有奎宁酸特征碎 m/z 191 $[M-H-caffeoyl]^-$ 及咖啡酸特征碎片 m/z 179 $[caffeic\ acid-H]^-$, 故推测其为单咖啡酰奎宁酸类化合物。研究表明, 咖啡酰基在奎宁酸上的取代位置不同, 其碎片离子稍有差异, 且丰度差异显著, 奎宁酸 4 位有咖啡酰基取代时, m/z 173 的碎片离子丰度较高于碎片离子 m/z 161、179、191; 3 位取代时, 基本只有 m/z 191 的离子碎片; 5 位取代时, m/z 179、191 的离子碎片丰度均较高^[6]。碎片离子 m/z 173 $[M-H-caffeoyl-H_2O]^-$ 由 m/z 191 $[M-H-caffeoyl]^-$ 再失去 1 分子 H_2O 得到,

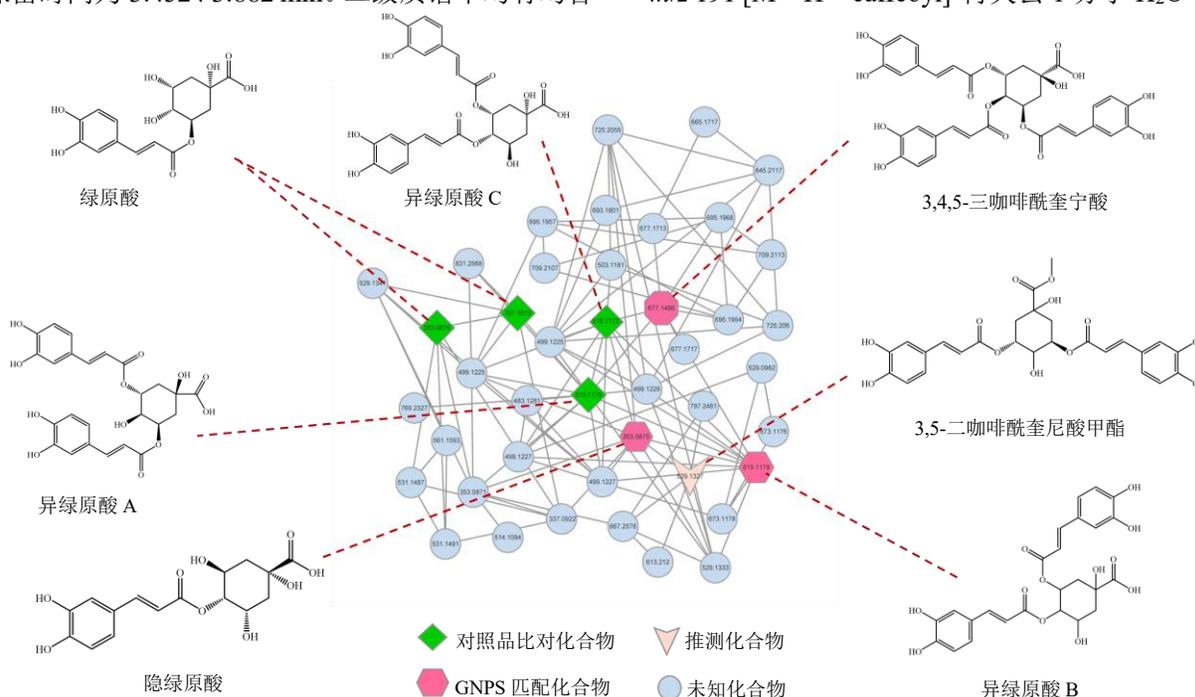


图4 负离子模式下酚酸类化合物的分子簇及其化学结构

Fig. 4 Molecular cluster of phenolic acids and their chemical structures in negative ion mode

特征离子 m/z 179 [caffeic acid-H]⁻失去 1 分子 CO₂ 得到碎片离子 m/z 135 [caffeic acid-H-CO₂]⁻。根据 GNPS 匹配结果, 化合物 **13**、**15** 分别为绿原酸、隐绿原酸, 与对照品进行比对, 证实了化合物 **13**、**15** 分别为绿原酸、隐绿原酸。

分子簇中找到准分子离子峰为 515.117 9 (**27**、**29**)、515.117 2 (**33**) 的化合物, 三者互为同分异构体, 分子式为 C₂₅H₂₄O₁₂, 保留时间为 14.640、15.406、17.472 min。这 3 种化合物与同簇中的 m/z 353.087 8 (绿原酸) 及 353.087 1 (隐绿原酸) 在网络中高度聚集, 二者质量差为 162, 为 1 个咖啡酰基(caffeoyl) 的相对分子质量, 结合 MS/MS 裂解谱图中均观察到 m/z 353 [M-H-caffeoyl]⁻、191 [M-H-2caffeoyl]⁻、179 [caffeic acid-H]⁻ 等特征碎片, 推测这 3 种化合物为二咖啡酰奎宁酸类异构体。因此, 结合分子网络聚类关系与碎片质量差异, 推测其为二咖啡酰奎宁酸类化合物。进一步分析其网络位置可见, 化合物 **37** 节点位于绿原酸 (m/z 353.087 8) 附近, 与之拓扑关系更为紧密, 而化合物 **40** 则靠近隐绿原酸 (m/z 353.087 1)。已知绿原酸为奎宁酸第 3 位被咖啡酰基取代、隐绿原酸为 5 位取代, 因此推测网络中与隐绿原酸相近的化合物 **40** 更可能为异绿原酸 A (3,5-diCQA), 而与绿原酸相邻的化合物 **37** 更可能为异绿原酸 B (3,4-diCQA)。研究表明, 在 4 位取代时可生成特征离子 m/z 173 [M-H-2caffeoyl-H₂O]⁻, 且丰度高于 m/z 179 [caffeic acid-H]⁻ 和 191 [M-H-2caffeoyl]⁻。结合二级质谱碎片特征来看, 化合物 **37** 中 m/z 173 [M-H-2caffeoyl-H₂O]⁻ 离子丰度显著高于 m/z 179 [caffeic acid-H]⁻、191 [M-H-2caffeoyl]⁻, 符合 4 位取代规律; 化合物 **40** 中 m/z 179 [caffeic acid-H]⁻、191 [M-H-2caffeoyl]⁻ 丰度均高, 为 5 位取代特征。化合物 **46** 的节点位于 37~40, 结合其保留时间、MS/MS 谱图中各特征离子以及网络连接度分布特征, 进一步支持其为异绿原酸 C (4,5-diCQA)。经对照品比对得以确证, 化合物 **40** 为异绿原酸 A、**37** 为异绿原酸 B、**46** 为异绿原酸 C。

在同一分子簇中, 还观测到一节点 m/z 529.132 7, 与已确证的异绿原酸 A (3,5-diCQA) 呈显著相关性, 推测其为结构上高度相似的衍生物。该化合物的相对分子质量相较于异绿原酸 A 增加约 14, 进一步分析其 MS/MS 谱图, 可见其与异绿原酸 A 裂解规律相似包括碎片离子 m/z 367.103 0 [M-H-

caffeoyl-CH₃]⁻、179.045 1 [caffeic acid-H]⁻、同时出现 m/z 193.049 7 [M-H-caffeoyl-CO₂]⁻、 m/z 135.044 7 等酚酸裂解特征离子, 说明其主链骨架未发生显著变化, 仅发生了小分子取代修饰。保留时间也较其母体化合物略有延后, 符合甲基化后疏水性增强的特征。综上, 结合文献进行数据分析^[17], 推测 m/z 529.132 7 为甲基化的 3,5-diCQA, 即 3,5-二咖啡酰奎尼酸甲酯。

分子簇中 m/z 677.148 6 (**55**) 的准分子离子峰, 其裂解途径 m/z 677.148 6 → m/z 515.117 6 [M-H-caffeoyl]⁻ → m/z 353.086 4 [M-H-2caffeoyl]⁻ → m/z 191.055 1 [M-H-3caffeoyl]⁻ 为分子离子峰连续脱 3 个咖啡酸的离子碎片, 说明其为 3 咖啡酰基奎宁酸的化合物。 m/z 191.055 1 [M-H-3caffeoyl]⁻ → m/z 173.044 8 [M-H-3caffeoyl-H₂O]⁻、179.034 5 [caffeic acid-H]⁻ → 161.023 0 [caffeic acid-H-OH]⁻。结合文献进行数据分析^[16], 推断化合物 **55** 为 3,4,5-三咖啡酰奎宁酸 (图 5)。

3.2.2 木脂素类化合物的裂解规律分析 在树参分离出的化合物中, 木脂素类成分是树参种除了酚酸类外的另一大类重要化学成分。木脂素类成分是由 2 个苯丙素单元生成 8-8、8-5、8-O-4 位连接的木脂素二聚体。生成二聚体后, 末端的 O-4 位继续与其他苯丙素的 8 位连接生成三聚体^[29]、四聚体氧化, 具有抗癌、抗氧化、抗菌、抗炎及免疫抑制活性^[30]。其二级质谱裂解以 β-β' 连接键断裂生成苄基型碎片, 结合环系开环 (如四氢呋喃、内酯环)、官能团丢失 (脱水、脱 CO、脱甲基) 及苯环特征离子为特征^[31]。从树参醇提物中鉴定出 11 个木脂素类化合物。以化合物 **26** 为例, 简述该类成分的解析过程。化合物 **26**, 负离子模式下, 准分子离子峰 m/z 741.261 7 [M-H]⁻, 分子式为 C₃₄H₄₆O₁₈, 母离子连续中性失去 162 后生成 m/z 579.207 2 和 m/z 417.155 1, 推测此化合物连接 2 个葡萄糖基分子离子连续丢失糖基后得到碎片 m/z 579.207 2 [M-H-Glc]⁻、 m/z 417.155 1 [M-H-2Glc]⁻, 继而连续丢失 1 分子 CH₃ 后得到碎片 m/z 402.132 7 [M-H-2Glc-CH₃]⁻、 m/z 387.109 3 [M-H-2Glc-2CH₃]⁻, 碎片离子 m/z 181.050 5 [M-H-2Glc-2CH₃-C₁₁H₁₀O₄]⁻ 失去 15 (CH₃) 后生成 m/z 166.026 7 [M-H-2Glc-2CH₃-C₁₁H₁₀O₄-CH₃]⁻。其裂解的二级碎片与文献报道相似^[32], 因此, 化合物 **26** 鉴定为鹅掌楸苷。化合物 **26** 裂解规律见图 6。

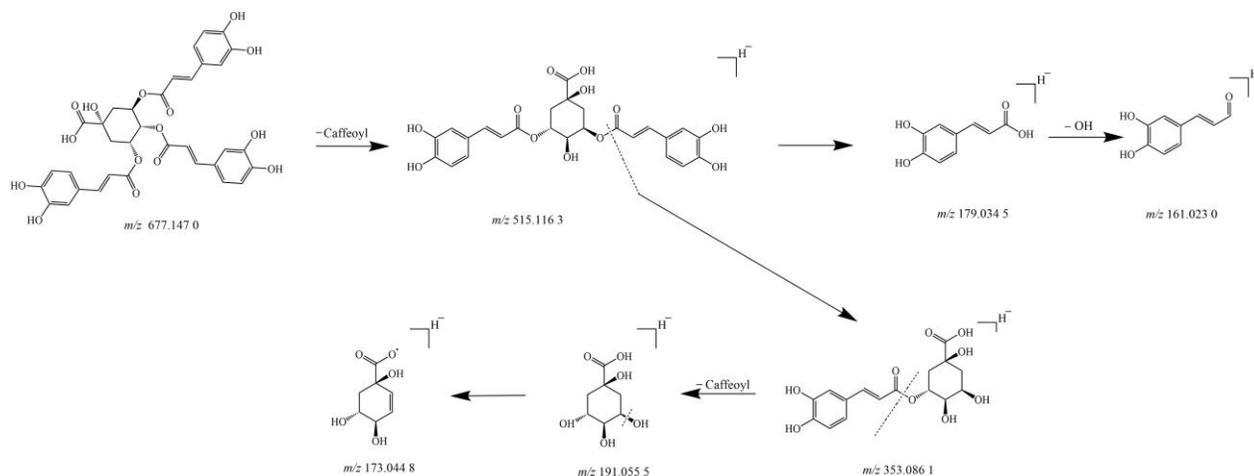


图5 酚酸类化合物3,4,5-三咖啡酸奎宁酸(55)的质谱裂解过程

Fig. 5 Mass spectrometry fragmentation pathway of phenolic acid compound 3,4,5-tricaffeoylquinic acid (55)

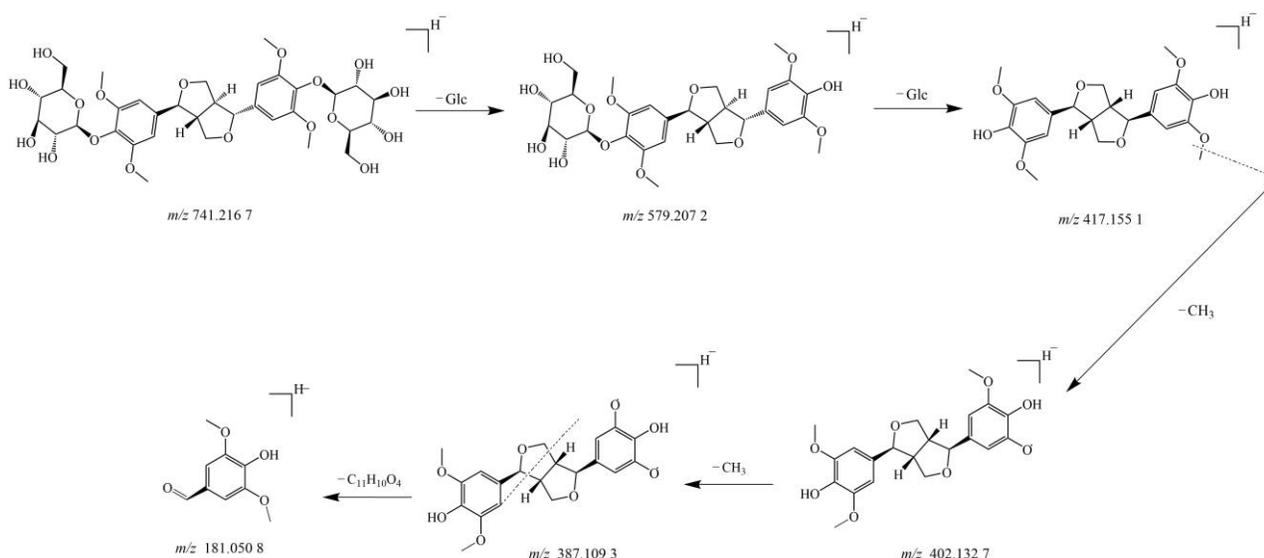


图6 木脂素类化合物鹅掌楸苷(26)的质谱裂解过程

Fig. 6 Mass spectrometry fragmentation pathway of lignan compound liriodendrin (26)

3.2.3 黄酮类化合物的裂解规律分析 黄酮类化合物的基本骨架为C₆-C₃-C₆，结构多样，常与糖结合形成糖苷、碳糖基^[33]。黄酮类化合物的鉴定主要通过C环的RDA裂解、CO、CO₂、H₂O等中性丢失^[34-35]，最常得到的碎片就是通过丢失糖基而产生的特征性碎片，这也是鉴定黄酮类化合物的重要步骤。从树参醇提物中鉴定出8个黄酮类及黄酮苷类化合物。以化合物**32**为例，简述该类成分的解析过程。化合物**32**，负离子模式下，准分子离子峰 m/z 609.1458 [M-H]⁻，分子式为C₂₇H₃₀O₁₆，化合物丢失1分子鼠李唐基(C₆H₁₀O₄)，再丢失1分子葡萄糖基(C₆H₁₁O₅)得到碎片 m/z 300.0277 [M-H-Rha-Glc]⁻，脱去1分子H₂O和CO得到碎片 m/z

255.0308 [M-H-Rha-Glc-H₂O-CO]⁻， m/z 300.0277 [M-H-Rha-Glc]⁻碎片离子丢失1分子CHO得到碎片离子 m/z 271.0227 [M-H-Rha-Glc-CHO]⁻， m/z 300.0277 [M-H-Rha-Glc]⁻槲皮素碎片经RDA裂解生成 m/z 151.0039碎片离子。其裂解的二级碎片与文献报道比对后^[27]，化合物**32**鉴定为芦丁。化合物**32**裂解规律见图7。

3.2.4 香豆素类化合物的裂解规律分析 香豆素是一类具有苯骈α-吡喃酮结构的天然化合物，该类化合物容易在裂解过程中，丢失CH₃、H₂O、CO、CH₃OH等中性基团^[23]。从树参醇提物中鉴定出6个香豆素类化合物。以化合物**11**为例，简述该类成分解析过程。其正离子模式分子离子峰为 m/z 193.0507

[M+H]⁺,经裂解后失去1分子甲基取代基形成 m/z 178.026 4 [M+H-CH₃]⁺,失去1分子CO得到 m/z 165.054 6 [M+H-CO]⁺,再分别失去1分子CH₃OH及1分子CO得到 m/z 133.029 2 [M+H-CO-CH₃OH]⁺、 m/z 137.060 4 [M+H-2CO]⁺碎片离子,其裂解的二级碎片与文献报道相似^[23],因此,化合物 11 鉴定为东莨菪素。化合物 11 裂解规

律见图 8。

3.2.5 其他类 除上述化学成分类型外,还从树参醇提物中鉴定出环肽 4 个、苯乙醇苷类 3 个、脂肪酸及其衍生物 4 个、环烯醚萜类 2 个、糖苷 2 个、生物碱 1 个。各类化合物裂解方式各有不同,如多苯乙醇苷类表现为连续的中性丢失 18 (H₂O) 的碎片离子,苯丙素部分的基团也极易丢失^[36];环烯醚

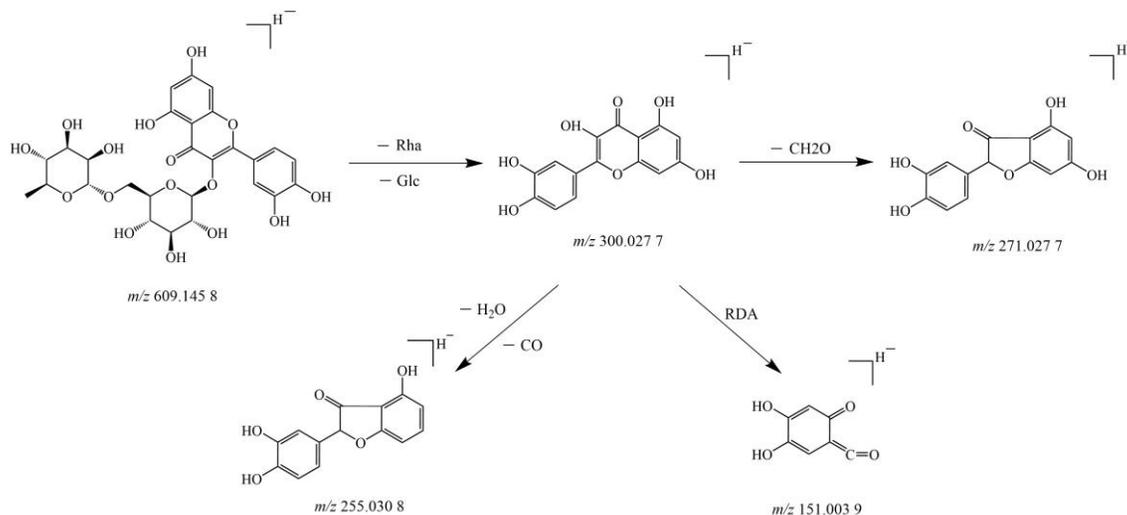


图 7 黄酮类化合物芦丁 (32) 的质谱裂解过程

Fig. 7 Mass spectrometry fragmentation pathway of flavonoid compound rutin (32)

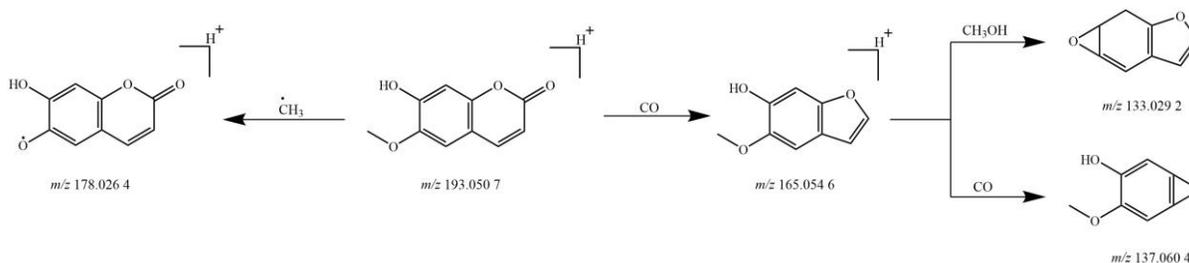


图 8 香豆素类化合物东莨菪素 (11) 的质谱裂解过程

Fig. 8 Mass spectrometry fragmentation pathway of coumarin compound scopoletin (11)

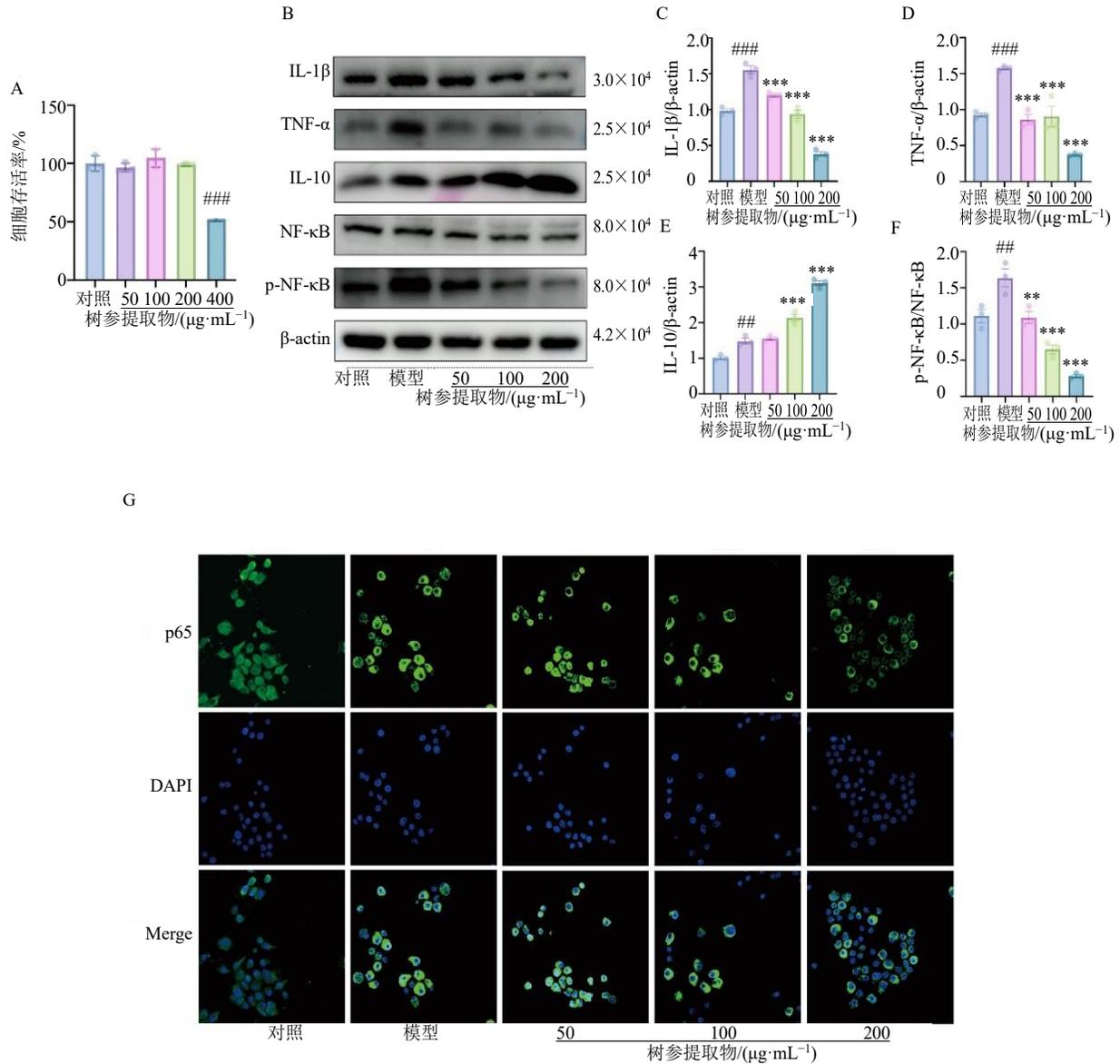
萜类化合物通常是丢失中性分子 H₂O、CO₂,葡萄糖基 (Glc) 等以及二氢吡喃环的断裂^[37];糖苷类成分主要以糖苷键断裂为主,苷元继续裂解。

3.3 抗炎活性结果

采用 CCK-8 法测定不同浓度树参提取物对 RAW 264.7 细胞活力的影响,结果如图 9-A 所示,与对照组相比,50、100、200 μg/mL 的树参提取物对细胞活力无显著影响 ($P > 0.05$),而 400 μg/mL 时 RAW264.7 细胞活力显著降低 ($P < 0.001$)。故选用质量浓度为 50、100、200 μg/mL 的树参提取物用于后续实验。

如图 9-B~F 所示,与对照组相比,模型组细胞

IL-1β、IL-10、TNF-α 和 p-NF-κB/NF-κB 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$ 、0.001);与模型组相比,各剂量树参干预后 IL-1β、TNF-α、p-NF-κB/NF-κB 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001),中、高剂量组抗炎因子 IL-10 蛋白表达显著增加 ($P < 0.001$)。免疫荧光结果显示 (图 9-G),与对照组比较,模型组细胞中 NF-κB p65 核表达明显增加,经树参提取物干预后显著降低了 NF-κB p65 核表达,且随剂量增大抑制 NF-κB 核表达效果更明显。结果表明,安全剂量的树参提取物能够抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞炎症反应,并可能通过抑制 NF-κB 通路激活降低炎症反应。



A-CCK-8 检测树参提取物对细胞活力的影响; B-Western blotting 检测炎症相关蛋白表达; C~F-各蛋白条带灰度值统计分析; G-免疫荧光 (绿色: p65, 蓝色: DAPI, $\times 40$); 与对照组比较: $^{###}P < 0.01$ $^{####}P < 0.001$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ 。

A-CCK-8 assay assessing the effects of the *D. dentiger* extract on cell viability; B-Western blotting analysis assessing inflammation-related protein expression; C~F-quantitative analysis of gray values of each protein band; G-immunofluorescence staining (green: p65, blue: DAPI, $\times 40$). $^{###}P < 0.01$ $^{####}P < 0.001$ vs control group; $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group.

图9 树参提取物对 LPS 诱导 RAW264.7 细胞炎症反应的调控作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Regulatory effects of *D. dentiger* extract on LPS-induced inflammatory responses in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本研究采用正、负离子 2 种模式采集质谱数据, 对于不同类别化学成分的解析鉴定具有一定互补性。与传统分子网络相比, FBMN 在同分异构体的区分及结构解析方面具有显著优势。在本研究中, 根据对照品信息以及 GNPS 数据库匹配, 利用 FBMN 结合保留时间与特征碎片离子, 首先在分子簇中确定了化合物绿原酸 (3-*O*-咖啡酰奎宁酸) 与

隐绿原酸 (4-*O*-咖啡酰奎宁酸) 的节点位置; 进一步通过保留时间、质谱裂解特征与网络拓扑关系, 识别出 3 种二咖啡酰奎宁酸类异构体, 并成功确认为异绿原酸 B (3,4-diCQA)、异绿原酸 C (4,5-diCQA) 与异绿原酸 A (3,5-diCQA)。在此基础上, 根据分子质量差 (+14)、FBMN 聚类关系及裂解特征推断出 1 个新化合物为甲基化 3,5-diCQA (50), 为该类结构的修饰型衍生物之一。因此, 将 UPLC-

Q-TOF-MS/MS 与 FBMN 技术联用, 实现了对畚药树参茎醇提取物中化学成分的快速、系统、精准鉴定。依据成分特征碎片离子及不同类型化合物裂解规律, 本研究从树参茎中共鉴定出畚药树参中 59 种成分, 包括酚酸类 18 个、木脂素类 11 个、黄酮及黄酮苷类 8 个、香豆素 6 个、环肽 4 个、苯乙醇苷类 3 个、脂肪酸及其衍生物 4 个、环烯醚萜类 2 个、糖苷类 2 个、生物碱类 1 个。体外细胞活性实验结果表明, 树参提取物具有显著抗炎作用, 其机制可能与抑制 NF- κ B 通路活化有关。

目前, 对于树参的化学成分研究多集中于树参根部, 而课题组前期调研发现, 畚族民间用药多以树参茎为主要药用部位。因此, 本研究从实际用药情况出发, 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 结合 FBMN 技术系统分析树参茎部位的化学成分, 共鉴定出 59 种成分, 其中 19 个为潜在未报道的新化合物, 为畚药树参的药效物质基础研究提供了重要线索, 也为中药复杂同分异构体的快速鉴定提供了思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 范欣荣, 张乐怡, 罗莎, 等. 基于指纹图谱-网络药理学-多指标定量分析预测树参中的差异活性成分 [J]. 中草药, 2025, 56(6): 2122-2134.
- [2] 刘敏, 张晓芹, 黄绳武, 等. 畚药树参茎化学成分分析及抗炎活性部位高效液相指纹图谱的建立 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(19): 2505-2510.
- [3] 王秀梅, 杨丽, 何军伟, 等. 树参属化学成分与生物活性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24): 229-234.
- [4] 陈张金, 余乐, 刘敏, 等. 基于抗炎有效成分畚药树参茎质量标准的研究 [J]. 中医药导报, 2023, 29(6): 70-75.
- [5] Yang L, Liu R H, Fan A G, *et al.* *Dendropanax dentiger* (Harms) Merr. root and its major constituents exert therapeutic effect on adjuvant-induced arthritis in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113631.
- [6] 杨丽. 树参抗类风湿性关节炎的物质基础及作用机制研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- [7] 周健, 黎玉华, 周颖, 等. 变叶树参化学成分的分离与鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(23): 128-132.
- [8] Zhang K, Jia J R, Li T, *et al.* Triple three-dimensional MS/MS spectrum facilitates quantitative ginsenosides-targeted sub-metabolome characterization in notoginseng [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(9): 4045-4058.
- [9] Wang H D, Zhang L, Li X H, *et al.* Machine learning prediction for constructing a universal multidimensional information library of *Panax* saponins (ginsenosides) [J]. *Food Chem*, 2024, 439: 138106.
- [10] Xu X, Li W, Li T, *et al.* Direct infusion-three-dimensional-mass spectrometry enables rapid chemome comparison among herbal medicines [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(11): 7646-7656.
- [11] 冯小龙, 蔡媛, 李鹏辉, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和分子网络技术快速分析玉叶解毒颗粒醇提取物的化学成分 [J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(10): 1581-1592.
- [12] Wang M X, Carver J J, Phelan V V, *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(8): 828-837.
- [13] Schmid R, Petras D, Nothias L F, *et al.* Ion identity molecular networking for mass spectrometry-based metabolomics in the GNPS environment [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3832.
- [14] Han M R, Xia H, Xia G Y, *et al.* Feature-based molecular networking (FBMN): An efficient booster for discovering novel natural products or metabolites [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2025, 15(4): 2283-2286.
- [15] 胡振宇, 卜俊文, 吴宇, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术分析醋润蜜麸炒柴胡炮制过程中成分差异 [J]. 中草药, 2025, 56(9): 3109-3120.
- [16] 兰晓燕, 朱龙波, 黄显章, 等. 艾叶中主要化学成分的鉴定及其含量测定研究 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7630-7637.
- [17] 吴娟娟, 王子璇, 连运河, 等. 基于 UPLC-QTOF MS/MS 技术研究甜叶菊绿原酸类成分的降解机制 [J]. 质谱学报, 2025, 46(1): 65-77.
- [18] Tsugawa H, Nakabayashi R, Mori T, *et al.* A cheminformatics approach to characterize metabolomes in stable-isotope-labeled organisms [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(4): 295-298.
- [19] Zhuo Y, Fu X M, Jiang Q Y, *et al.* Systems pharmacology-based mechanism exploration of *Acanthopanax senticosus* for Alzheimer's disease using UPLC-Q-TOF-MS, network analysis, and experimental validation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 954: 175895.
- [20] Hu J P, Wu D, Sun Y P, *et al.* Comprehensive analysis of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.) Maxim. leaves based on UPLC-MS/MS: Separation and rapid qualitative and quantitative analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 865586.
- [21] 牟越, 刘博, 张璇, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的连翘不同部位成分分析及其抗炎活性评价 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(4): 968-980.

- [22] 范惠霞, 邓志鹏, 仲浩, 等. LC-MS/MS 法同时测定刺五加制剂中紫丁香苷、刺五加苷 E 和异嗪皮啶的含量 [J]. 食品与药品, 2014, 16(2): 95-99.
- [23] 余文怡, 伍慧敏, 郭秀洁, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱的刺五加注射液化学成分分析 [J]. 色谱, 2023, 41(3): 207-223.
- [24] 陈宏昌, 魏文峰, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析刺五加叶的化学成分 [J]. 中药材, 2016, 39(7): 1536-1540.
- [25] 李莉莉, 马宁宁, 范姗姗, 等. 杜仲不同提取物对帕金森病小鼠的治疗作用及谱效关系研究 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1400-1406.
- [26] 严颖, 赵慧, 邹立思, 等. 杜仲化学成分的 LC-Triple TOF MS/MS 分析 [J]. 质谱学报, 2017(1): 146-156.
- [27] 李自红, 魏悦, 范毅, 等. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析 [J]. 分析试验室, 2015, 34(2): 186-189.
- [28] Han Y, Zhang A H, Sun H, *et al.* High-throughput ultra high performance liquid chromatography combined with mass spectrometry approach for the rapid analysis and characterization of multiple constituents of the fruit of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms [J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(10): 2178-2187.
- [29] Morreel K, Dima O, Kim H, *et al.* Mass spectrometry-based sequencing of lignin oligomers [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(4): 1464-1478.
- [30] Saleem M, Kim H J, Ali M S, *et al.* An update on bioactive plant lignans [J]. *Nat Prod Rep*, 2005, 22(6): 696-716.
- [31] 徐翔, 姜奇瑶, 陈云波, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析刺五加提取物化学成分及入血成分 [J/OL]. 中华中医药学刊, (2025-07-11)[2026-03-03]. <https://link.cnki.net/urlid/21.1546.r.20250711.1121.029>.
- [32] 景秀村, 李军茂, 冯育林, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 分析猪牙皂中化学成分 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(23): 3225-3235.
- [33] 汪嘉俊, 王泽萍, 王雪莲, 等. 山茱萸化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(3): 1088-1103.
- [34] Alara O R, Abdurahman N H, Obanijesu E O, *et al.* Extract-rich in flavonoids from *Hibiscus sabdariffa* calyces: Optimizing microwave-assisted extraction method and characterization through LC-Q-TOF-MS analysis [J]. *J Food Process Eng*, 2020, 43(2): e13339.
- [35] Du L Y, Qian D W, Shang E X, *et al.* UPLC-Q-TOF/MS-based screening and identification of the main flavonoids and their metabolites in rat bile, urine and feces after oral administration of *Scutellaria baicalensis* extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169: 156-162.
- [36] 耿昭, 高必兴, 钟恋, 等. 基于 UHPLC-LTQ-orbitrap-MS 方法分析藏药洪连 (短管兔耳草) 中黄酮与苯乙醇苷类成分 [J]. 药学学报, 2022, 57(9): 2821-2838.
- [37] 李存满, 骆亚薇, 田宝勇. 环烯醚萜类化合物的质谱裂解规律研究进展 [J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2015, 39(6): 522-526.

[责任编辑 王文倩]