

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析百蕊草醇提物的化学成分

周思倩^{1,2}, 方艳³, 谭金桃³,

田静³, 何苗³, 马丹凤³, 龙红萍^{1,2*}

¹湖南中医药大学, 长沙 410013; ²湖南中医药大学第一附属医院; ³湖南省儿童医院药学部, 长沙 410007

摘要: 为明确百蕊草醇提物中的化学成分, 本研究采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 对百蕊草醇提物的化学成分进行分析鉴定, 在正、负离子模式下采集质谱数据, 采用 Agilent Mass Hunter B.07.00 软件对采集的准分子离子峰信息进行分析, 选择误差在 5×10^{-6} 内的分子式与 TCM 数据库初步比对, 同时参考百蕊草相关文献、结合对照品比对、化合物精确相对分子质量、质谱碎片信息对化合物进一步鉴定。通过液质联用技术共鉴定了百蕊草醇提物 54 个化学成分, 主要包括 16 个黄酮类、10 个生物碱类、5 个二萜类、5 个有机酸类和其他类化合物, 其中首次从百蕊草醇提物中发现氧化苦参碱、4-*O*-阿魏酰基奎宁酸、槲皮素-7-*O*-葡萄糖苷、槲皮素-3-*O*-新橙皮苷等 25 个化学成分, 并进一步探讨了生物碱类、黄酮类和二萜类化合物的质谱裂解规律。通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速对百蕊草醇提物的化学成分进行了较为系统而全面的分析, 为其探究药效物质基础、临床应用及质量控制提供参考。

关键词: 百蕊草; 醇提物; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 裂解规律; 生物碱类; 黄酮类

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

Analysis of chemical components of alcohol extract

Thesium chinense Turcz. based on UPLC-Q-TOF-MS/MS

ZHOU Si-qian^{1,2}, FANG Yan³, TAN Jin-tao³,

TIAN Jing³, HE Miao³, MA Dan-feng³, LONG Hong-ping^{1,2*}

¹Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410013, China; ²The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine;

³Department of Pharmacy, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China

Abstract: To clarify the chemical constituents of alcohol extract from *Thesium chinense* Turcz., ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) was analyzed in this study. The molecular ion peak information was analyzed by Mass Hunter B.07.00 data processing software. The molecular formula with error within 5×10^{-6} was compared with the TCM database to identify the compounds, combined with reference the related literature and control

comparison, combining the precise relative molecular mass and mass spectrometry fragment information. A total of fifty-four chemical compounds in *T. chinense*. The main chemical constituents included 16 flavonoids, 10 alkaloids, 5 diterpenes, 5 organic acids and other compounds. Twenty-five compounds such as oxymatrine, 4-*O*-feruloylquinic acid, quercetin-7-*O*-glucopyranoside, and quercetin-3-*O*-neohesperidoside were identified in this genus for the first time. The mass fragmentation pattern of alkaloids, flavonoids and diterpenes was further explored. Using UPLC-Q-TOF-MS/MS technology can quickly and accurately identify the alcohol extract of chemical constituents from *T. chinense*, which will expand new ideas for further clinical application, and will provide the scientific theory basis for its clinical application and quality control.

Key words: *Thesium chinense* Turcz.; alcohol extract; UPLC-Q-TOF-MS/MS; fragmentation pattern; alkaloids; flavonoids

百蕊草为檀香科 (Santalaceae) 植物百蕊草 (*Thesium chinense* Turcz.) 的干燥全草, 其味微苦、涩、辛, 性寒, 具有清热消炎, 止咳化痰, 退热的功效^[1], 现代药理研究表明百蕊草有镇痛、抗菌、抗炎等作用, 因而被广泛用于治疗肺炎、扁桃体炎、上呼吸道感染等疾病^[2]。百蕊草作为一种民间草药, 1975 年收载于《安徽中草药》一书, 《中国药典》1977 年版首次将百蕊草收录, 现收载于《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003 年版^[3]。

据文献报道百蕊草中主要含有黄酮类、生物碱类和有机酸类等有效成分, Zou 等^[4]对百蕊草乙醇提物通过理化常数测定和光谱分析鉴定, 从百蕊草中分离纯化了 10 个黄酮类化合物, Wang 等^[5]从百蕊草总生物碱部位分离得到 *N*-甲基金雀花碱、白金雀儿碱和槐果碱 3 个生物碱类成分。然而, 尽管在化学成分分析方面的研究已经取得了进展, 但对百蕊草化学成分的了解仍局限于黄酮类和少数生物碱类成分, 尚缺乏对百蕊草中的有效成分进行系统研究。

UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析技术是现在中药成分研究领域中的应用广泛的定性测定方法, 集 UPLC 高效的色谱分离能力和 Q-TOF 高分辨质谱的高灵敏度于一体, 可快速对中草药复杂成分进行定性分析^[6]。因此, 本研究运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对百蕊草醇提物的化学成分进行系统分析, 对于明确百蕊草药效物质基础, 确保临床用药安全有效等具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器

Agilent 1290UPLC-6540 Q-TOF 色谱-质谱联用仪 (美国 Agilent 科技公司); Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (3.0 mm×100 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 超声仪 (上海科导超声仪器有限公司); S-23 高速台式离心机 (湖南湘仪仪器有限公司); AUW120D 电子分析天平 (日

本 SHIMADZU 公司)。

1.2 药物与试剂

色谱甲醇、质谱乙腈(均购于德国 Merck Millipore 公司); 蒸馏水(深圳屈臣氏蒸馏水有限公司); 甲酸铵(质谱级, 美国 Fisher 公司)。

氧化苦参碱(批号 110780-201508); 芸香苷(批号 100080-201811)、山柰酚(批号 110861-202013)均购自中国食品药品检定研究院; 山柰酚-3-*O*-葡萄糖鼠李糖苷(百蕊草素I)对照品(19091201)、槐果碱(18032803)、紫云英苷(百蕊草素II)对照品(19092602), HPLC 分析, 纯度 $\geq 98\%$, 均购于成都普菲德生物技术有限公司。

百蕊草购于湖南中医药大学第一附属医院, 经湖南中医药大学临床中药学教研室陈文明鉴定为檀香科植物百蕊草(*Thesium chinense* Turcz.) 全草, 样品(201903004)保存于湖南中医药大学临床中药学教研室。

1.3 色谱条件

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μ m); 流动相为 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~5 min, 5% \rightarrow 15% B; 5~10 min, 15%~35% B; 10~20 min, 35% \rightarrow 65% B; 20~27 min, 65% \rightarrow 85% B;) 体积流量 0.4 mL/min, 进样量 1 μ L。

1.4 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI), 正、负离子分别检测, 一级、多级模式分别扫描。离子源电压 3.5 kV, 毛细管加热温度为 350 $^{\circ}$ C, 鞘气压力 241.3 kPa, 辅气压力为 68.9 kPa, 离子源温度 350 $^{\circ}$ C, 鞘气、辅助气均为氮气。质谱质量轴校准采用外标法(质量误差为 5×10^{-6}), 校准质量正离子选择 118.086 255、322.048 121、622.028 960、922.009 798、1 221.990 637 和 1 521.971 475, 负离子选择 119.036 9、1 033.988 2。一级全扫质量扫描范围为 m/z 100~1 700, 分辨率 30 000; 二级质谱采用依赖性扫描, 扫描范围为 m/z 50~1 000, 二级 Fragment 电压为 10、20、40 V, 在一级扫描基础上选取前 3 强进行诱导碰撞解离(CID)获取其二级质谱数据。

1.5 百蕊草溶液的配制

1.5.1 供试品溶液的制备

将百蕊草药材粉碎过 40 目筛, 称取 5 g, 精密称定, 加 30 mL 甲醇, 称定重量, 超声提取 30 min (2 次) 后取出, 静置冷却后, 加入甲醇补充到超声前溶液重量, 取上清液, 离心 5 min (8 000 r/min), 经 0.22 μ m 有机微孔滤膜滤过, 即得百蕊草的样品溶液, 作为液质分析样品。

1.5.2 对照品溶液的制备

取山柰酚-3-*O*-葡萄糖鼠李糖苷、氧化苦参碱、芸香苷、山柰酚、槐果碱、紫云英苷 6 个对照品各 4.0 mg，精密称定后置于 10 mL 容量瓶中，加适量甲醇超声溶解，静置后定容到刻度，制成 6 个对照品的贮备液，进样前分别从 6 个对照品贮备液中精确移取 200 μ L 混合均匀，经 0.22 μ m 有机微孔滤膜滤过，进液质系统分析。

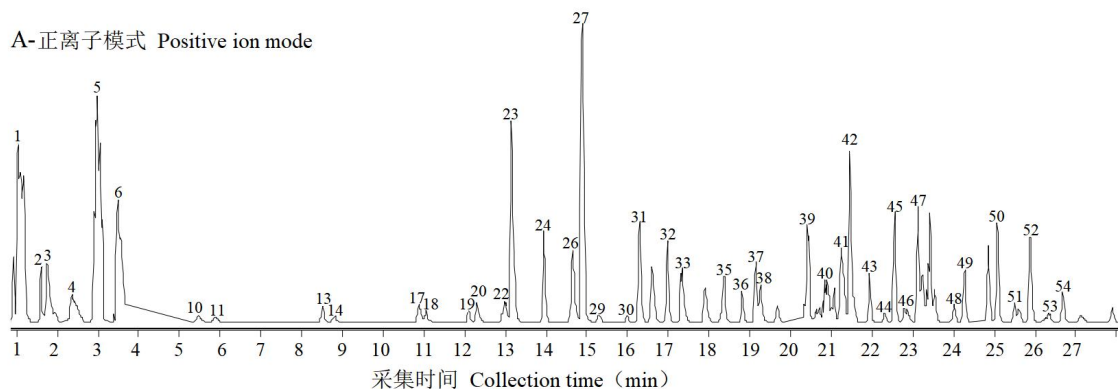
1.6 数据处理

通过查阅百蕊草药材化学成分相关文献，收集百蕊草中的化学成分并建立数据库，采用 Agilent Masshunter Qualitative Analysis 工作站中的分子特征提取 (MFE) 功能和中药成分数据库 (TCM-DATA)，根据质谱扫描提供化合物的一级、二级质谱数据质谱碎片离子信息进行分析，选择误差在 5×10^{-6} 内的分子式与数据库进行初步比对，对化合物进行初步鉴定，其次与自建数据库和对照品进行比对对百蕊草醇提物化学成分进一步确定，同时对百蕊草醇提物中化合物主要类型的裂解规律进行总结。自建数据库化合物信息包括化学成分名称、分子式、相对分子质量、CAS 号等信息。

2 结果与分析

2.1 百蕊草提取物质谱数据分析

采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术，按“1.5”项下条件检测供试品溶液和对照品溶液，对百蕊草提取物中化学成分进行定性分析，得到的正、负离子模式的总离子流图 (TIC) 见图 1。山柰酚-3-*O*-葡萄糖鼠李糖苷、氧化苦参碱、芸香苷、山柰酚、槐果碱、紫云英苷 6 个对照品正离子模式下总离子流图，如图 2 所示。根据质谱生成的化合物信息结合二级碎片离子，同时结合对照品比对及相关参考文献，对百蕊草醇提物的化学成分进行定性分析，共鉴定出 54 个化学成分。其中包含 16 个黄酮类、10 个生物碱类、5 个二萜类、5 个有机酸类和其他类化合物，首次鉴定出 25 个化合物结构式如图 3 所示，化学成分的保留时间、分子式、化合物名称、碎片离子信息等信息数据见表 1。



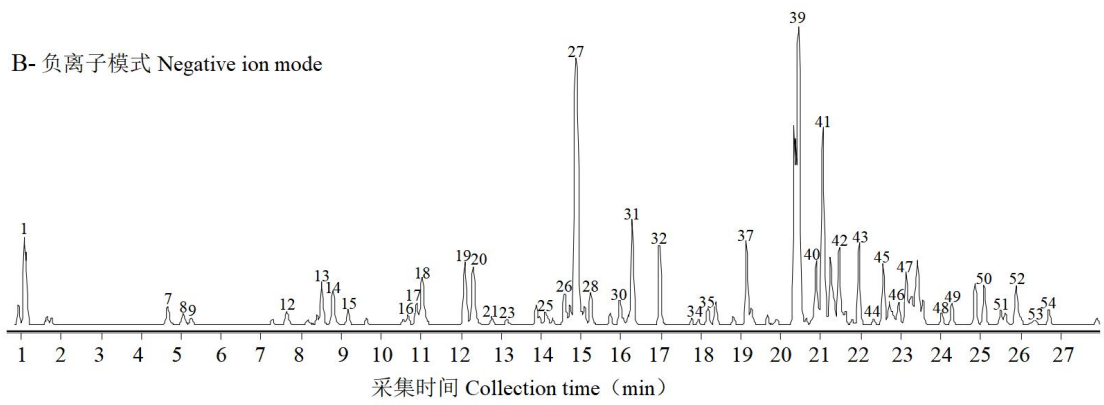


图 1 百蕊草醇提取物 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析的总离子流图

Fig.1 TIC UPLC-Q-TOF-MS/MS of *T. chinense*

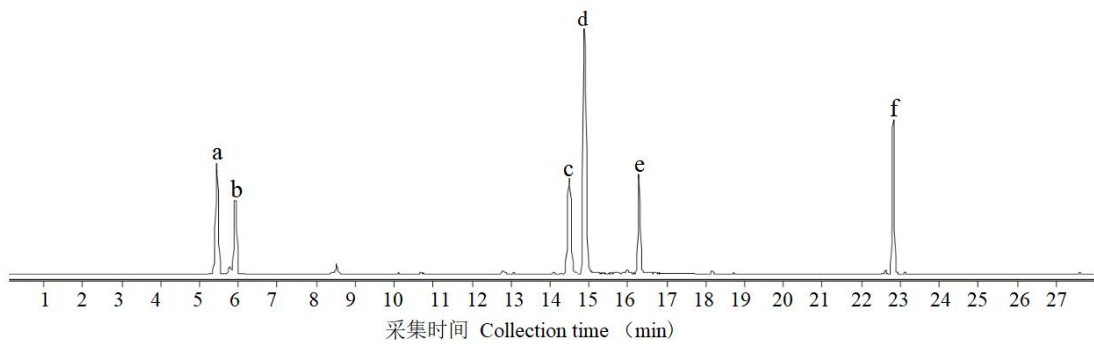


图 2 对照品正离子模式分析的总离子流图

Fig. 2 TIC of reference substances under positive ion mode

注： a.槐果碱； b.氧化苦参碱； c.芸香苷； d.山柰酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷； e.紫云英苷； f.山柰酚。

Note: a. Sophocarpine; b. Oxymatrine; c. Rutin; d. Kaempferol-3-glucorhamnoside; e. Astragalgin; f. Kaempferol.

表 1 百蕊草醇提取物中的成分结构鉴定结果

Table 1 Identification of chemical constituents of alcohol extract of *T. chinense*

峰号 No.	保留时间 t_R (min)	实测值 Measured [M+H] ⁺	实测值 Measured [M-H] ⁻	理论值 Theoretical value (<i>m/z</i>)	分子式 Molecular formula	误差 Error (ppm)	碎片离子 Fragment ion (MS/MS)	化合物 Compound	参考文献 Ref.
1	1.017	205.068 0	181.072 1	181.071 8	C ₆ H ₁₄ O ₆	-1.49	161.046 6、146.048 0、131.045 7、112.985 6	<i>D</i> -甘露醇 <i>D</i> -Mannitol	7
2	1.597	205.132 7	—	205.133 5	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O	4.01	162.092 9、146.064 4、134.057 7、109.043 1	<i>N</i> -甲基金雀花碱 <i>N</i> -methylcytisine	7
3	1.729	136.062 4	—	136.060 4	C ₄ H ₆ O ₄	-4.91	119.024 5、92.067 4、80.043 5、67.022 0	丁二酸 Succinic acid	7
4	2.359	245.163 6	—	245.164 8	C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O	-3.79	216.131 8、176.100 0、148.110 4、98.095 0	槐胺碱 Sophoramine [#]	8
5	2.988	249.185 3	—	249.196 1	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	4.75	218.155 1、176.108 2、148.111 8、110.097 1	白金雀儿碱 Lupanine [*]	7
6	3.485	247.178 0	—	247.178 1	C ₁₃ H ₂₄ N ₂ O	-0.12	227.156 7、179.157 1、150.129 7、136.114 0	红古豆碱 Cuskygrine [#]	9
7	4.676	—	315.109 1	315.108 5	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	-0.86	281.893 7、243.819 2、209.809 3、153.051 6	3,4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷 3,4-Dimethoxyphenyl- β - <i>D</i> -glucoside [#]	10

8	5.041	—	477.161 6	477.161 4	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₃	-0.02	410.787 5、315.115 6、153.058 0、123.046 4	3,4,5-Trimethoxyphenyl- <i>O</i> - β -apiofuranosyl(1"->6')- β -glucopyranoside	11
9	5.239	—	459.151 0	459.150 8	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	4.56	313.093 1、151.039 1、121.030 7、93.034 1	丹皮酚新苷 Paeonolide [#]	12
10	5.546	247.180 2	—	247.180 5	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	1.13	202.156 8、176.103 3、148.109 7、122.095 1	槐果碱 Sophocarpine [*]	7
11	5.887	265.190 4	—	265.191 1	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	3.24	226.1129 1、205.161 1、176.626 2、152.138 4	氧化苦参碱 Oxymatrine [*]	7
12	7.641	—	337.092 9	337.092 9	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	0.11	307.488 2、268.898 4、191.059 6、163.042 0	3-对香豆酰基奎宁酸 3- <i>P</i> -Coumaroylquinic acid [#]	13
13	8.503	757.223 9	755.203 9	757.218 6	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	0.76	611.163 0、449.109 4、287.055 7、129.054 8	Kaempferol-3-sophoroside-7-rhamnoside [#]	14
14	8.801	369.117 4	367.104 1	367.103 5	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	-0.54	280.490 9、193.055 1、149.061 5、134.040 3	4-咖啡酰奎尼酸甲酯 4- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid methyl ester [#]	15
15	9.165	—	621.203 9	621.182 5	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	-1.16	583.695 7、477.163 5、299.018 0、153.054 5	大蓟苷 Pectolarin	7
16	10.672	—	609.143 9	609.146 1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	0.33	551.204 9、447.093 1、327.049 7、283.024 4	山柰酚-3,7-二- <i>O</i> -葡萄糖苷 Kaempferol-3,7-diglucoside	7

17	10.873	489.265 2	487.256 2	489.269 4	C ₂₄ H ₄₀ O ₁₀	0.08	462.297 3、390.211 2、362.216 2、249.128 3	Shionoside C [#]	16
18	11.020	627.154 4	625.143 2	625.141 0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	-2.82	221.068 8、161.049 0	槲皮素-3,4"-二-O-葡萄糖苷 Quercetin-3,4"-diglucoside	7
19	12.097	391.098 7	367.103 9	367.103 5	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	0.18	193.015 1、173.015 0、134.013 1、111.024 2	绿原酸甲酯 3-O-Caffeoylquinic acid methyl ester [#]	15
20	12.296	391.098 4	367.103 8	391.100 0	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	0.29	373.088 3、355.757 4、329.052 6、311.045 5	4-O-阿魏酰基-奎宁酸 4-O-Feruloylquinic acid [#]	13
21	12.743	—	609.146 3	609.146 1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0.24	447.104 2、285.045 7、271.035 2、256.042 9	槲皮素-3-O-新橙皮苷 Quercetin-3-O-neohesperidoside [#]	7
22	12.976	434.213 3	—	434.214 9	C ₂₁ H ₃₃ NO ₇	4.34	288.164 5、201.057 9、147.046 2	毛果天芥菜碱 Lasiocarpine [#]	17
23	13.142	464.227 5	508.219 3	464.227 9	C ₂₄ H ₃₀ O ₈	-3.74	318.154 1、231.054 0、177.046 1、142.116 9	Thesinine-4'-O-D-glucoside	18
24	13.937	464.227 9	—	481.254 4	C ₂₄ H ₃₃ NO ₈	0.29	318.166 0、177.053 4、142.121 2、124.110 9	Spirotetramat-enol-glucoside [#]	19
25	14.127	—	639.177 9	639.156 7	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	-2.26	477.098 8、315.047 4、285.04 2 3、271.025 2	异鼠李素-3,7-O-二葡萄糖苷 Isorhamnetin-3,7-diglucoside	7
26	14.633	611.157 3	609.146 2	609.146 1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0.66	542.116 2、444.126 5、300.024 1、271.105 2	芸香苷 Rutin [*]	7

27	14.898	595.152 2	593.153 0	593.151 2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-1.48	449.122 0、287.064 8、147.069 9、129.058 9	山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖鼠李糖苷 Kaempferol-3- <i>O</i> -glucorhamnoside*	7
28	15.078	—	463.083 6	463.088 2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-0.75	300.032 5、271.029 0、255.033 3、243.032 9	槲皮素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 Quercetin-7- <i>O</i> -glucopyranoside#	7
29	15.228	197.117 9	—	197.117 2	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	0.12	179.103 1、161.092 4、133.099 3、107.083 9	黑麦草内酯 Loliolide	7
30	15.990	681.166 2	679.152 3	679.151 6	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₈	1.76	535.356 4、455.192 1、390.180 2、288.042 9	山柰酚-3- <i>O</i> - (2"- <i>O</i> - α -鼠李糖-(6"-丙酰基) - β - <i>D</i> -葡萄糖苷 Kaempferol-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - α -rhamnosyl-6"- <i>O</i> -mlo nyl)- β - <i>D</i> -glucoside#	20
31	16.289	449.106 2	447.098 3	447.093 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1.38	285.032 9、255.026 9、227.032 3、211.037 8	紫云英苷 Astragalin*	7
32	16.968	637.175 6	635.162 0	635.161 8	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₆	-0.06	471.092 7、284.034 5、255.031 1、227.035 9	山柰酚-3- <i>O</i> - (6"- <i>O</i> -乙酰基) 葡萄糖苷-7- <i>O</i> - 鼠李糖苷 Kaempferol-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -acetyl)glucoside-7- <i>O</i> -r hamnoside	7
33	17.498	758.227 9	—	758.226 4	C ₃₃ H ₄₁ O ₂₀	-2.04	612.181 0、450.125 6、287.049 4、129.056 3	矢车菊素-3- <i>O</i> -葡萄糖芸香糖苷 Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosyl-rutinoside	21

											3R,5R,6S,7E,9R-megastigman-7-en-3,5,6,9-tet
34	17.762	—	537.254 2	537.255 3	C ₂₄ H ₄₂ O ₁₃	2.12	375.197 1、213.147 4、195.133 5、178.605 6	rol-9- <i>O</i> -β- <i>D</i> -apiofuranosyl-(1→2)-β- <i>D</i> -glucopyranoside [#]	22		
35	18.174	491.116 7	489.104 9	489.103 8	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	-0.38	412.249 3、327.04 2 6、285.042 1、255.032 1	山柰酚-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -乙酰基)葡萄糖苷 Kaempferol-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -acetyl)glucoside	23		
36	18.360	489.270 9	—	465.275 9	C ₂₈ H ₃₈ N ₂ O ₄	2.07	390.191 9、362.195 2、249.115 6、195.109 7	吐根酚碱 Isocephaeline [#]	24		
37	19.138	479.115 7	477.104 3	523.109 3	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	0.36	314.042 1、299.019 3、271.093 7、165.020 6	异鼠李素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	7		
38	19.254	523.254 1	—	523.253 7	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₀	2.00	396.189 2、367.162 8、249.121 4、220.117 4	Tanghinin [#]	25		
39	20.419	827.361 2	803.372 0	803.370 7	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	-2.14	641.316 9、479.263 6、317.211 5、161.046 5	甜菊糖苷 Stevioside [#]	26		
40	20.859	959.401 8	935.413 7	935.412 9	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	-1.10	883.363 0、820.363 5、793.315 4、774.339 1	瑞鲍迪苷 F Rebaudioside F [#]	26		
41	21.042	973.418 2	949.428 7	949.428 6	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	-2.20	787.366 6、625.314 2、479.256 4、318.213 6	Rebaudioside C [#]	26		
42	21.240	—	787.376 5	787.375 1	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	-0.74	627.369 9、465.279 6、319.222 8	杜谷糖苷 A Dulcoside A [#]	27		
43	21.930	660.358 6	641.317 8	641.317 9	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	-0.08	519.176 4、427.248 5、319.229 6、301.217 2	甜茶苷 Rubusoside [#]	27		
44	22.317	641.354 9	639.340 0	639.338 6	C ₃₃ H ₅₂ O ₁₂	-2.39	476.277 6、458.229 6、311.161 2、265.151 8	Solanolactoside B [#]	28		
45	22.567	573.326 8	571.375 1	571.312 4	C ₂₉ H ₄₈ O ₁₁	0.43	388.193 3、344.201 6、275.143 2、155.084 4	Gallicaside I [#]	29		

46	22.751	287.054 8	285.048 7	285.040 5	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-0.91	239.039 2、211.044 2、187.043 6、157.068 4	山奈酚 Kaempferol*	7
								Methyl-2,3,6- <i>O</i> -tribenzyl-4- <i>O</i> -(2- <i>O</i> ,3- <i>O</i> -dimet	
47	23.130	759.334 4	757.321 0	757.323 0	C ₄₃ H ₅₀ O ₁₂	-0.90	635.277 0、516.186 2、404.152 5、259.101 7	hyl-6- <i>O</i> -benzyl- α - <i>L</i> -idopyranuronosyl)- α - <i>D</i> -gl	30
								ucopyranoside	
48	24.008	743.339 8	741.325 1	741.324 0	C ₃₇ H ₄₈ N ₂ O ₁₁	0.34	665.302 8、647.289 2、532.192 5、493.177 0	Bearline	31
49	24.273	781.445 0	779.434 4	779.433 6	C ₄₀ H ₆₄ N ₂ O ₁₃	-0.29	664.370 3、538.295 4、432.257 1、313.154 8	Withanamide F	32
50	25.068	587.343 7	585.330 0	585.328 0	C ₃₀ H ₅₀ O ₁₁	-2.00	541.355 8、443.283 7、388.192 7、344.203 5	半乳糖基胆酸 Galactosyl-cholic acid	33
51	25.499	710.343 1	708.325 5	708.323 7	C ₃₅ H ₅₁ NO ₁₄	-1.20	574.306 1、463.178 0、364.131 7、296.140 9	五乙酰乌头碱 Pentaacetylaconine#	34
52	25.800	621.327 2	619.314 6	619.312 4	C ₃₃ H ₄₈ O ₁₁	-2.48	477.238 6、422.165 5、266.114 1、134.058 2	Withalongolide L	35
53	26.321	291.194 7	289.180 5	289.180 9	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	0.66	274.043 7、230.159 5、165.057 5、119.087 3	甲氧基肉桂酸辛酯 Octinoxate#	36
54	26.675	601.359 0	599.345 6	599.343 7	C ₃₁ H ₅₂ O ₁₁	-1.23	457.281 6、388.192 2、344.203 1、275.144 2	Noralpindenoside B	37

注：#首次报道的化学成分；*经对照品比对后的结果；“—”表示无相关信息。

Note: #Compounds identified from *T. chinense* for the first time; *Identification by comparison with the reference; “—” indicates no relevant information.

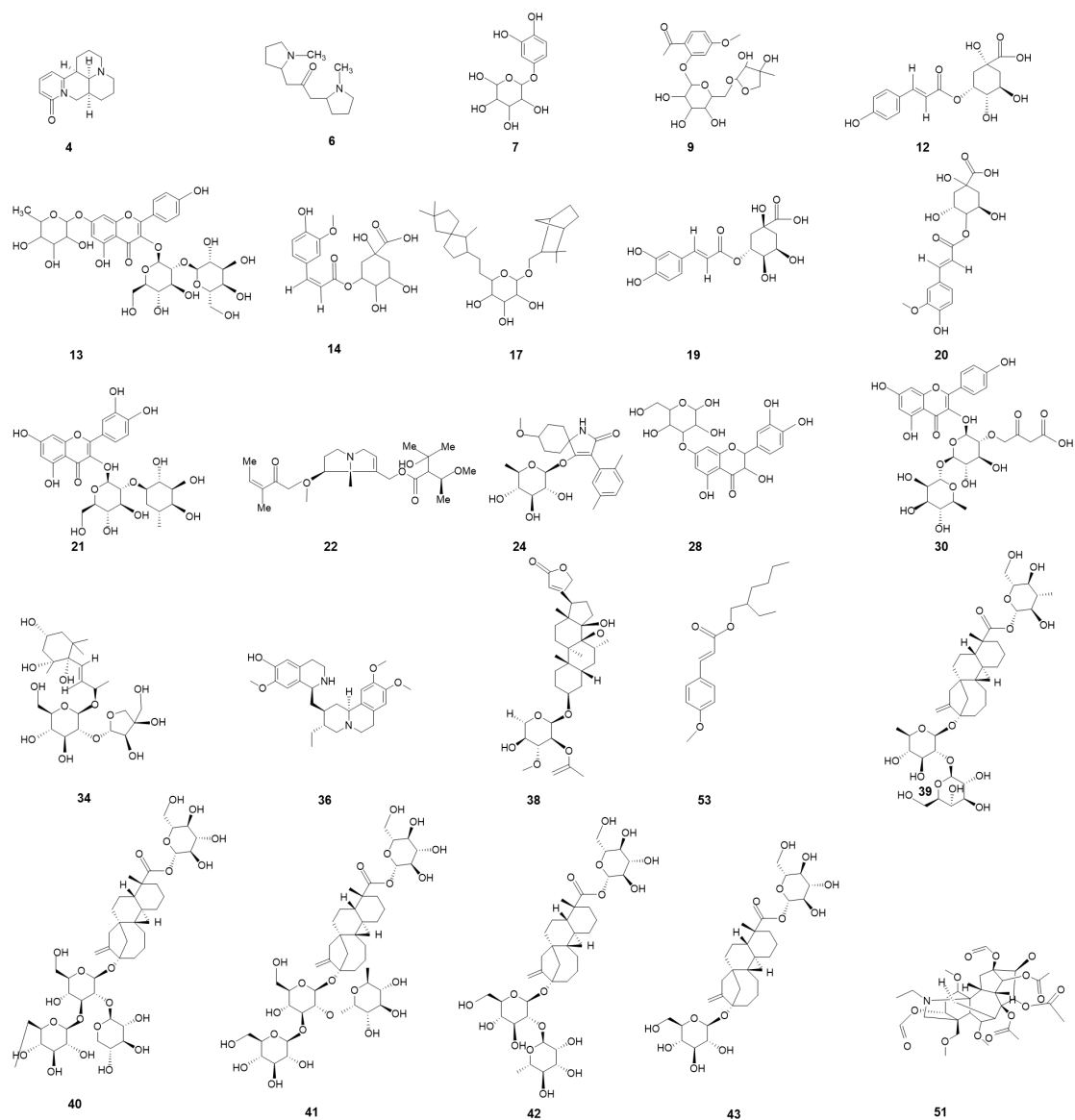


图 3 首次从百蕊草属中鉴定化合物的化学结构

Fig. 3 Structures of 25 compounds identified from *T. chinense* for the first time

2.2 各类化合物结构及裂解特点

2.2.1 生物碱类化合物分析

百蕊草提取物中生物碱类化学成分主要为喹啉里西啶类生物碱, 该生物碱由两个莨菪碱共用一个 *N* 原子稠合而成, 在正离子模式下以 $[M+H]^+$ 的形式存在, 其二级质谱碎片离子多是各环逐渐裂解, 易产生 m/z 150.128 2 的特征碎片离子。本品鉴定出的喹啉里西啶类生物碱化合物有 *N*-甲基金雀花碱 (2)、槐胺碱 (4)、白金雀儿碱 (5)、槐果碱 (10)、氧化苦

参碱 (11) 等, 以槐果碱 (10) 和氧化苦参碱 (11) 的解析为例了解喹啉里西啶类生物碱的质谱裂解规律。

化合物 10: 经对照品比对鉴定为槐果碱 ($C_{15}H_{22}N_2O$), 在正离子模式下得到 m/z 247.171 5[M+H]⁺ 准分子离子峰, 根据二级质谱分析, 准分子离子峰脱去一分子 C_3H_4O 得到 m/z 176.106 8 碎片离子, 同时准分子离子峰经 RDA 重排得到 m/z 为 150.128 2 的特征碎片离子, 紧接着断裂一分子 CH_2 和 C_2H_2 产生 m/z 为 136.584 4 和 110.094 2 的碎片离子, 其碎片离子的可能裂解途径见图 4。

化合物 11: 经对照品对比鉴定为氧化苦参碱 ($C_{15}H_{24}N_2O_2$), 其精确相对分子质量的准分子离子峰为[M+H]⁺ m/z 265.190 8, 准分子离子峰脱去一分子 OH 得到 m/z 249.026 6 的碎片离子, 接着各环逐渐裂解, 分别脱去 C_2H_4 、 C_3H_6 得到 m/z 为 221.878 3、207.046 1 的碎片离子, 其中 m/z 为 207.046 1 的碎片离子继续脱去 C_2H_5 形成 m/z 为 177.099 6 的碎片离子, m/z 为 177.099 6 的碎片离子断裂一分子 C_2H_4 得到 m/z 150.128 2 的特征离子碎片峰, 其碎片离子的可能裂解途径如图 5 所示。

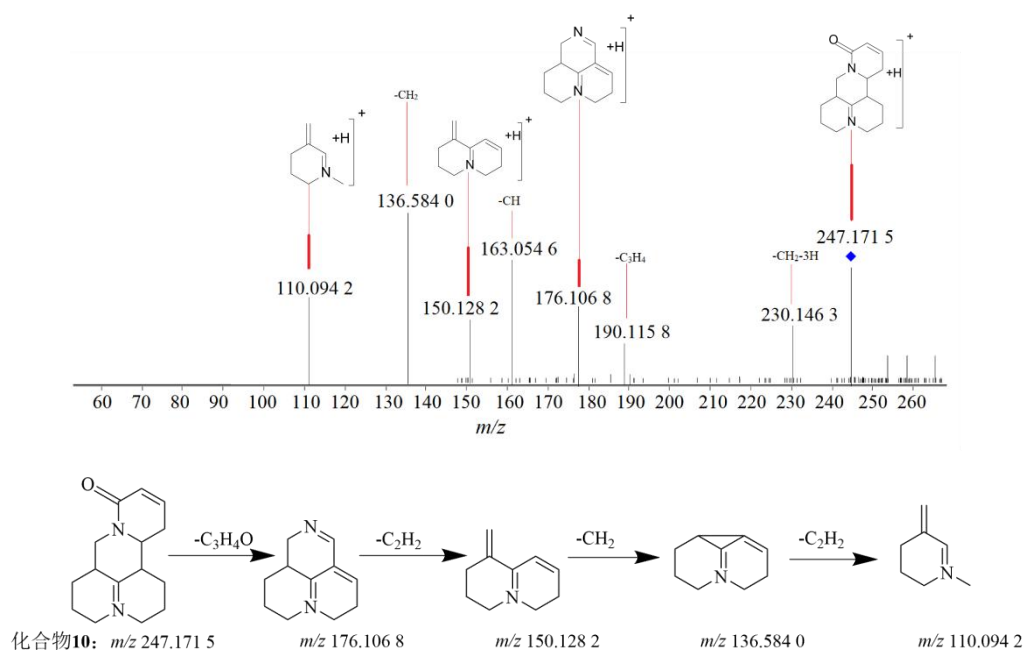


图 4 槐果碱可能裂解途径

Fig. 4 Possible fragmentation pathways of sophocarpine

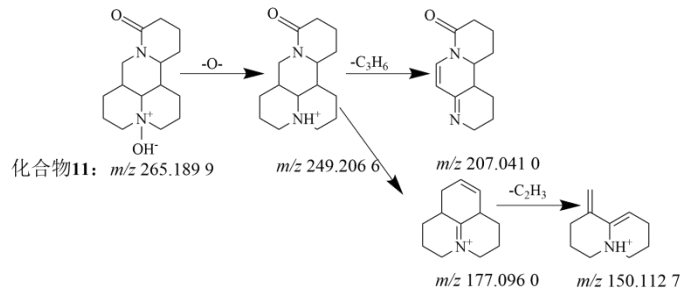
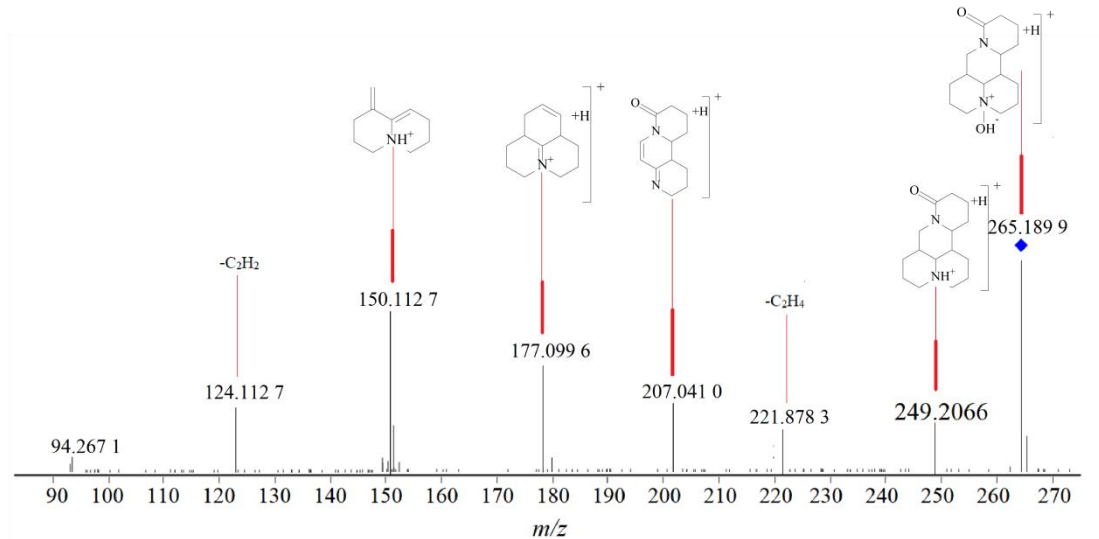


图 5 氧化苦参碱可能裂解途径

Fig.5 Possible fragmentation pathways of oxymatrine

2.2.2 黄酮类化合物分析

黄酮类化合物是百蕊草提取物中主要的化合物类型，是一类基本母核为 2-苯基色原酮的化合物，大部分以游离形式、与糖结合成苷类或以碳糖基的形式存在。黄酮类化合物在正离子模式中主要以 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰形式存在，由于具有较多羟基，在负离子模式中易形成 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰，碎片离子断裂多脱去糖链形成苷元离子和脱去 CO 、 H_2O 为主，C 环上易发生 RDA 裂解反应， m/z 163.0027、151.0320 是黄酮类苷元裂解产生的特征离子峰。结合对照品比对与相关文献，共鉴定出 16 个黄酮类成分，包括 14 个黄酮醇类和 2 个黄烷酮类，分别为山柰酚-3-槐二糖-7-鼠李糖苷（13）、大蓟苷（15）、山柰酚-3, 7-二葡萄糖苷（16）、异鼠李素-3,7-*O*-二葡萄糖苷（25）、芸香苷（26）、山柰酚-3-*O*-葡萄糖鼠李糖苷（27）、槲皮素-7-*O*-葡萄糖苷（28）、紫云英苷（31）、山柰酚-3-*O*-（6''-*O*-乙酰基）葡萄糖苷-7-*O*-鼠李糖苷（32）、山柰酚（46）等。

化合物 46: 经对照品对照鉴定为山柰酚 ($C_{15}H_{10}O_6$)，其精确相对分子质量的准分子离

子峰为[M-H]⁻ m/z 285.048 7, 准分子离子峰脱去一分子 CO 得到 m/z 257.052 5 碎片离子, 接着脱去 CO 得到 m/z 229.043 9 碎片离子, 继续脱去一分子 H₂O 得到 m/z 211.044 2 碎片离子, 黄酮结构中的 A 环易发生 RDA 裂解反应得到 m/z 151.032 0 碎片离子, 其碎片离子的可能裂解途径如图 6 所示。

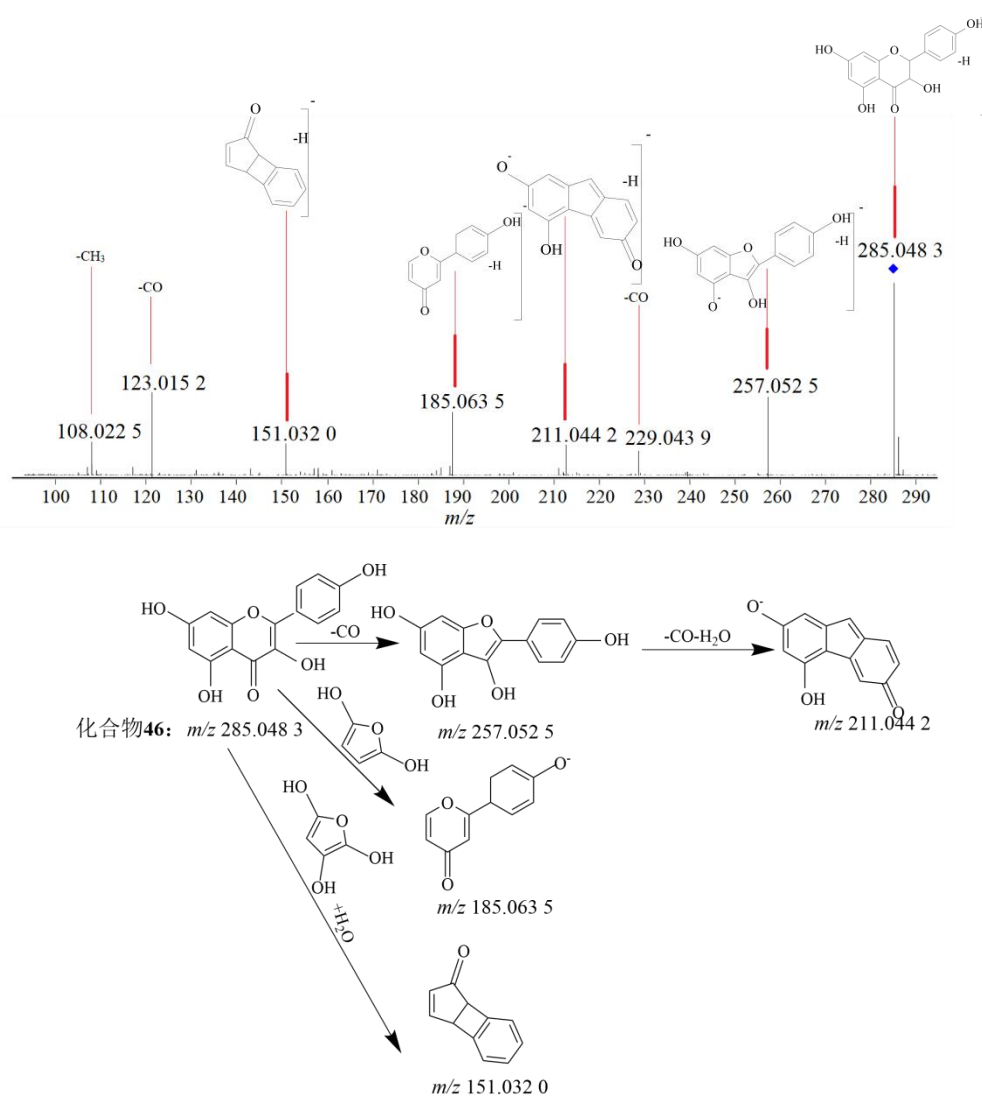


图 6 山柰酚可能裂解途径

Fig. 6 Possible fragmentation pathways of kaempferol

2.2.2.1 黄酮-O-单糖苷类化合物分析

百蕊草提取物中的黄酮类化合物多为黄酮醇类化合物, 且苷元多以山柰酚和槲皮素为主, 黄酮-O-单糖苷类化合物苷元含有多个酚羟基, 在负离子模式下易产生[M-H]⁻离子, 多脱去糖链形成苷元离子, 易产生 C 环开环离子, 如 m/z 255.030 7、227.035 0、211.045 2 碎片离子, 黄酮-O-单糖苷类化合物以槲皮素-7-O-葡萄糖苷 (28) 和紫云英苷 (31) 的解析为例,

了解黄酮 *O*-单糖苷类化合物的质谱裂解规律。

化合物 **28**: 其精确相对分子质量的准分子离子峰[M-H]⁻ m/z 463.121 9, 准分子离子峰脱去一分子葡萄糖基得到 m/z 300.031 2 槲皮素苷元碎片离子, 连续脱去一分子 CO、CO₂、H₂O 得到 m/z 271.029 0、255.030 7、243.032 9 的碎片离子, 接着槲皮素苷元丢失 B 环产生 m/z 193.835 7, A 环发生 RDA 重排产生 m/z 178.999 8 碎片离子, 接着断裂一分子 CO 得到 m/z 151.003 3 的碎片离子, 经参考文献^[38]推测为槲皮素-7-*O*-葡萄糖苷 (C₂₁H₂₀O₁₂), 其碎片离子的可能裂解途径如图 7 所示。

化合物 **31**: 与对照品比对鉴定为紫云英苷 (C₂₁H₂₀O₁₁), 在负离子模式下形成准分子离子峰[M-H]⁻ m/z 447.095 1, 丢失一分子葡萄糖基, 剩下黄酮-*O*-单糖苷类化合物典型的碎片离子 m/z 285.038 9, 相继脱去一分子 OCH₃、CO、CO₂ 得到 m/z 255.030 6、227.035 0、211.045 2 碎片离子峰, 以及苷元离子 m/z 285.038 9 发生 RDA 重排裂解得到 m/z 163.002 7 和 m/z 151.003 3, 其碎片离子的可能裂解途径见图 8。

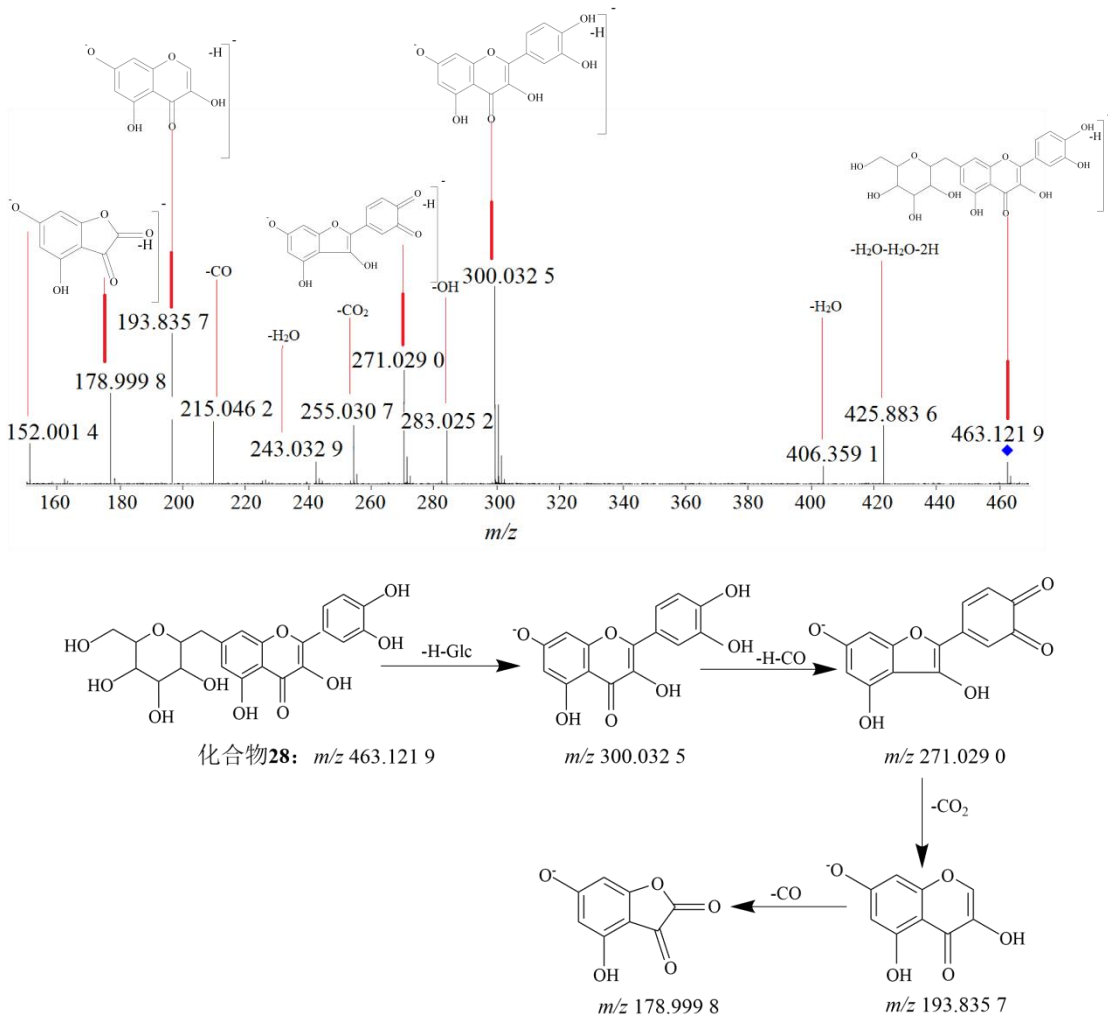


图 7 槲皮素-7-*O*-葡萄糖苷可能裂解途径

Fig.7 Possible Fragmentation pathways of quercetin-7-O-β-D-glucopyranoside

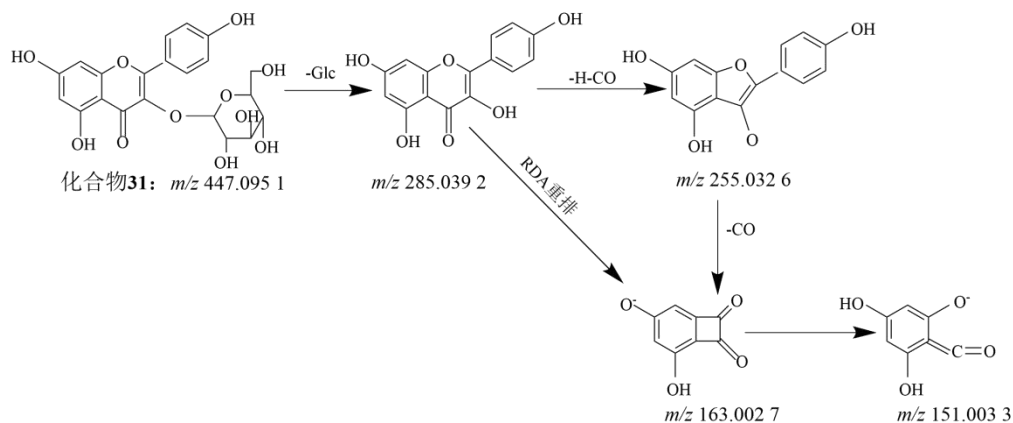
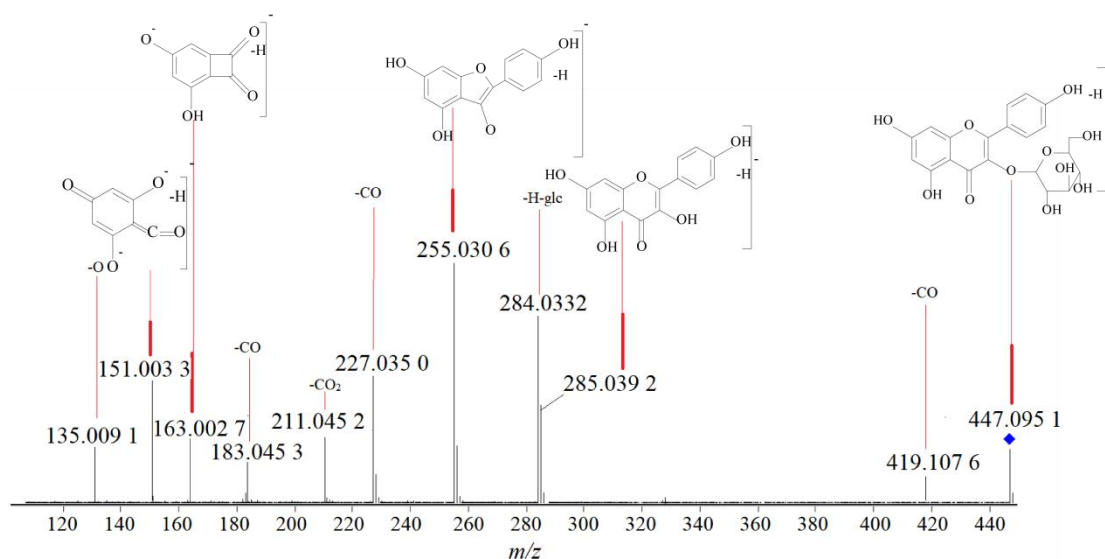


图 8 紫云英苷可能裂解途径

Fig. 8 Possible fragmentation pathways of kaempferol-3-glucoside

2.2.2.2 黄酮 O-双糖苷类化合物分析

黄酮-O-双糖苷类化合物易产生 m/z 255.027 7、 m/z 179.001 6 的特征碎片离子，以芸香苷（**26**）和百蕊草素 I（**27**）为例，了解黄酮 O-双糖苷类化合物裂解规律。

化合物 **26**：与对照品比对鉴定为芸香苷（ $C_{27}H_{30}O_{16}$ ），其精确相对分子质量的准分子离子峰为[M-H] m/z 609.150 4，在峰 23 的基础上加了一分子葡萄糖基，准分子离子峰脱去一分子鼠李糖基得到 m/z 463.652 6 碎片离子，接着脱去一分子葡萄糖基形成 m/z 301.034 9 的碎片离子，脱去一分子 CO_2 得到 m/z 207.002 2，其碎片离子的可能裂解途径如图 9 所示。

化合物 **27**：与对照品比对鉴定为百蕊草素 I（ $C_{27}H_{30}O_{15}$ ），其精确相对分子质量的准分子离子峰[M-H] m/z 593.153 0，准分子离子峰脱去一分子葡萄糖基得到 m/z 430.092 8 碎片离

子，接着脱去一分子五碳糖基得到 m/z 285.038 5 碎片离子，相继脱去一分子 CO 、 $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$ 得到 m/z 227.031 4、179.001 6 的碎片离子，其碎片离子的可能裂解途径如图 10 所示。

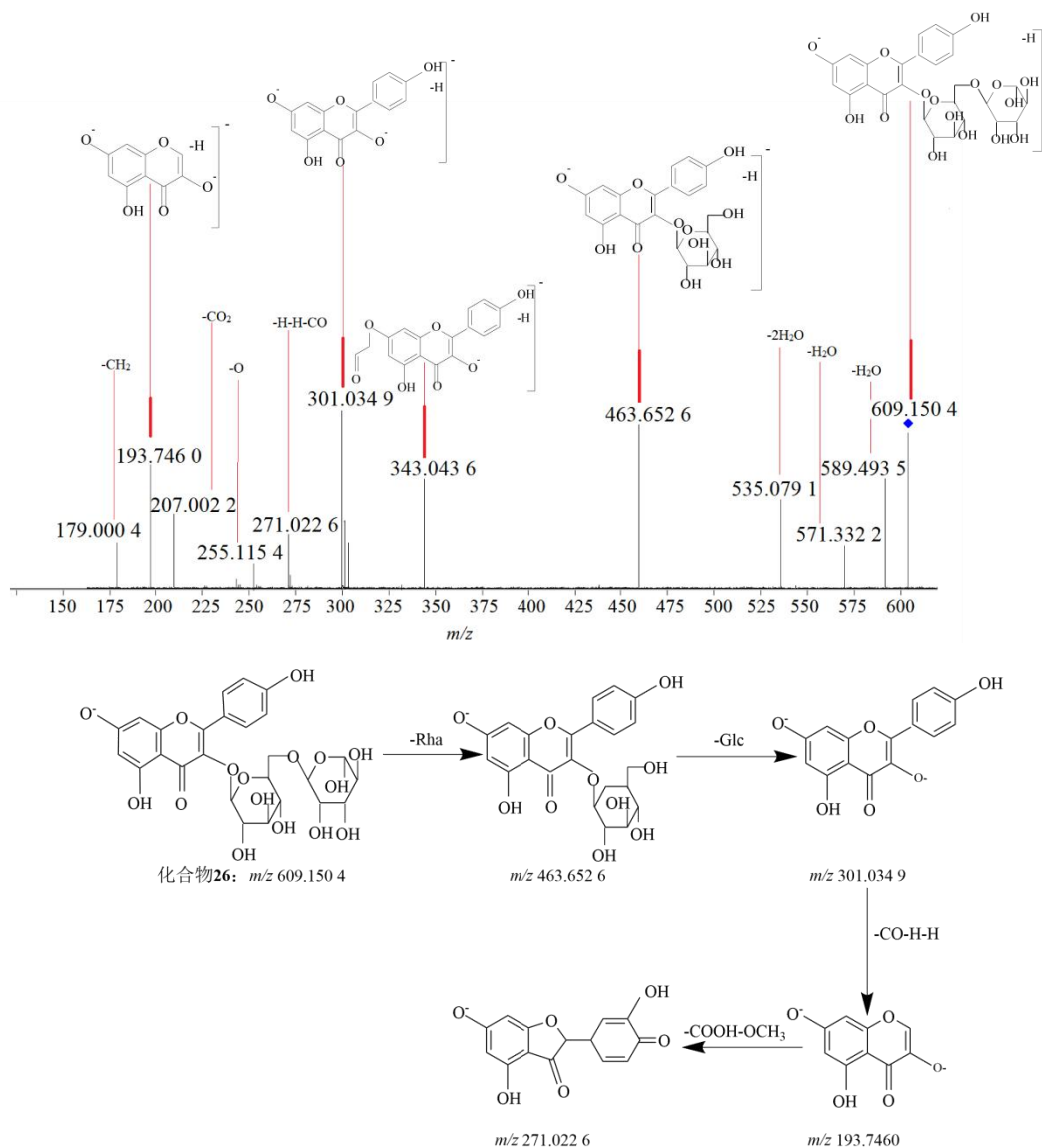


图 9 芸香苷可能裂解途径

Fig. 9 Possible fragmentation pathways of rutin

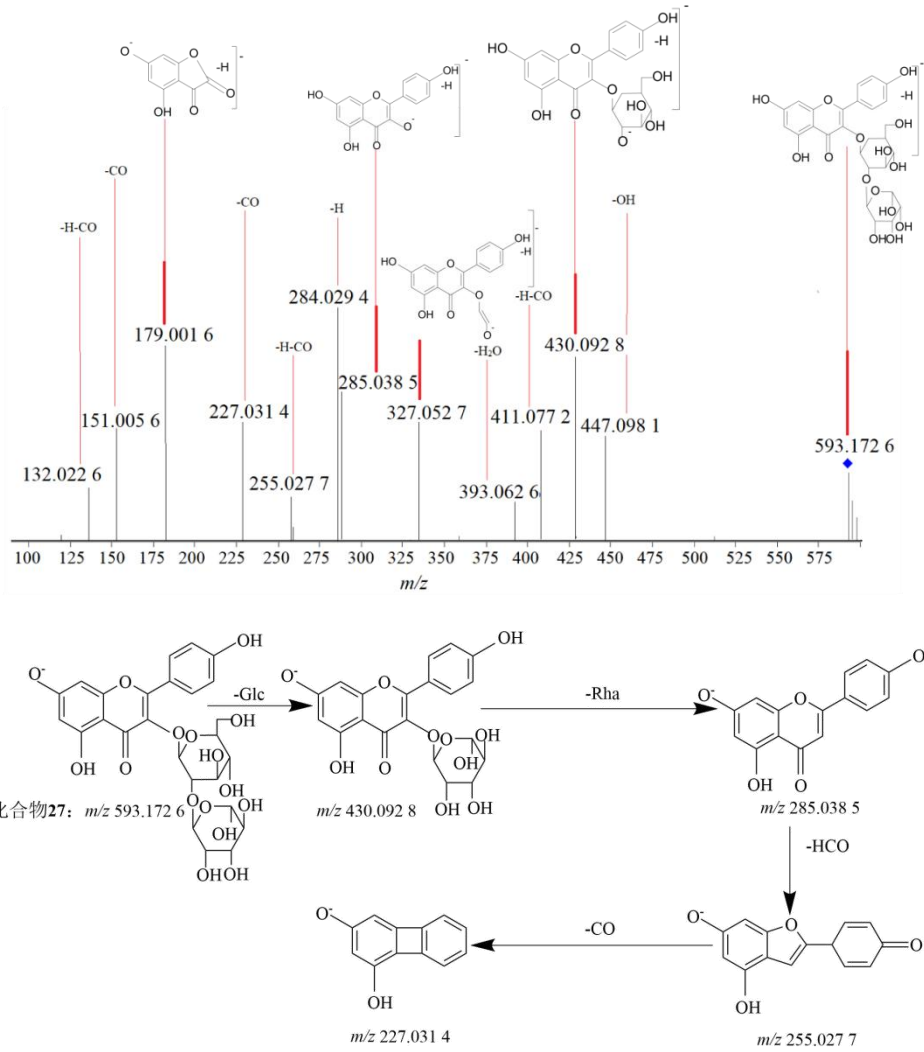


图 10 百蕊草素 I 可能裂解途径

Fig. 10 Possible fragmentation pathways of kaempferol-3-O-glucophamnoside

2.2.3 二萜类

二萜类化合物是百蕊草提取物中另一类化合物，二萜类化合物是由 4 个异戊二烯单位构成，裂解方式主要以糖苷键断裂为主，共鉴定出的二萜类主要包括 rebaudioside F、rebaudioside C、甜菊糖苷、甜茶苷等。以化合物 39 甜菊糖苷为例，在负离子模式下得到 m/z 803.370 7 [M-H]⁻ 准分子离子峰，根据二级质谱分析，准分子离子峰在高压碰撞下连续丢失 2 分子葡萄糖基 (Glc, m/z 162) 产生 m/z 641.317 2 碎片离子和 m/z 479.372 8 碎片离子，根据其碎片及断裂方式以及相关文献报道^[26]，推测其结构式为甜菊糖苷，其碎片离子的可能裂解途径见图 11。

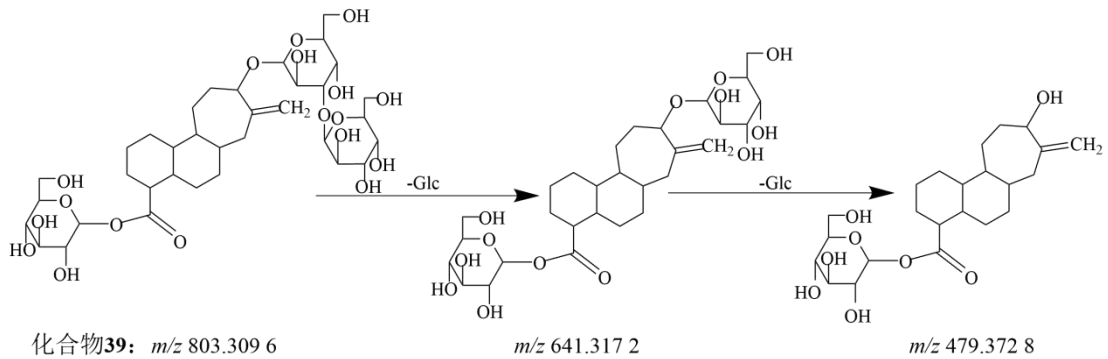
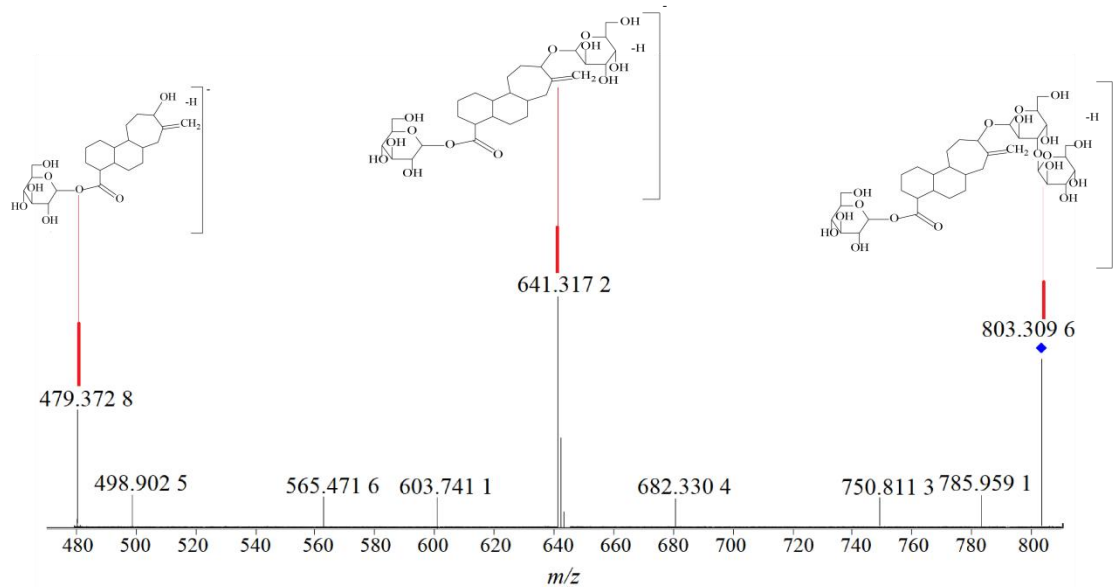


图 11 甜菊糖苷可能裂解途径

Fig. 11 Possible fragmentation pathways of stevioside

2.2.4 其他类化合物

化合物 1、3、7、8、9、12 等分别被鉴定为 *D*-甘露醇、丁二酸、3,4-二羟基苯乙醇葡萄糖苷、3,4,5-Trimethoxyphenyl-*O*- β -apiofuranosyl(1" \rightarrow 6')- β -glucopyranoside、丹皮酚新苷等，相关数据和结构式见图 1 和表 1。

3 讨论与结论

本研究从百蕊草醇提取物中共鉴定出 54 个化学成分，包括紫云英苷等 16 个黄酮类，白金雀儿碱等 10 个生物碱类，甜菊糖苷等 5 个二萜类，丁二酸等 5 个有机酸类和其他类化合物，其中槐果碱、氧化苦参碱等 6 个化合物经对照品比对，其余成分通过二级质谱碎片离子结合相关文献推测鉴定，此研究结果为研究百蕊草药理作用和活性成分作用评价提供了理论依据。

从百蕊草醇提取物中发现，百蕊草醇提取物中的有效成分尤以黄酮类和生物碱类成分为主，其中所鉴定的 14 个化合物归属于黄酮醇类如紫云英苷和芸香苷等，具有许多重要的生物活

性和药理作用,如抗肿瘤、清除自由基、解毒抗炎、提高免疫力等生物活性^[38];5个生物碱类化合物归属于喹啉里西啶类生物碱如苦参碱和氧化苦参碱等,具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗菌和免疫抑制等多种生物活性^[39],这些成分之间相互配合、相互作用共同发挥百蕊草“清热解毒、抗菌消炎”的功效,因而素有“植物抗生素”的美称。此外通过对百蕊草醇提物生物碱类裂解规律解析,发现喹啉里西啶类生物碱化合物在正离子模式下有一个共同的 m/z 150.128 2 的特征裂解碎片;黄酮类化合物在正离子模式中以 $[M+H]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 峰形式存在,在负离子模式中易形成 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰,脱去糖链形成苷元离子和脱去 CO 、 H_2O 是黄酮类化合物裂解的质谱特点, m/z 163.002 7、151.032 0 是黄酮醇类苷元裂解产生的特征碎片离子,二萜类化合物裂解多以连续脱去糖链为主。同时首次从百蕊草醇提物中鉴定出氧化苦参碱、槲皮素-7-*O*-葡萄糖苷、山柰酚-3-*O*-芸香糖-7-*O*-葡萄糖苷等 32 个化学成分,这些化学成分均为在百蕊草醇提物中尚未报道,但后续这些化合物仍需进一步对其鉴定。

本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对百蕊草醇提物进行分析,依据化合物分子式信息和二级碎片离子,结合对照品比对及参考文献,系统地分析了百蕊草醇提物的化学成分,为后续探究百蕊草药效物质基础及作用机制等提供参考。

参考文献

- 1 State Administration of Traditional Chinese Medicine"Chinese Materia Medica"Editorial Board.Chinese Materia Medica(中华本草)[M].Shanghai:Shanghai Science and Technology Press,1999:595.
- 2 Parveen Z,Deng Y,Saeed MK,et al.Anti-inflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz. extracts and its major flavonoids,kaempferol and kaempferol-3-*O*-glucoside[J].Yakugaku Zasshi,2007,127:1275-1279.
- 3 Chen PY,Chen XQ,Wu C,et al.Research on Development and Utilization Of *Thesium chinense* Turcz.[J].Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源),2020,39(6):48-52.
- 4 Zou Y,Hong M,Yang XF.Isolation of chemical components from *Thesium chinense*[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2016,22(7):74-77.
- 5 Wang Z,Li SS.Isolation and identification of alkaloids from *Thesium chinense* Turcz.[J].Chin J Med Chem(中国药物化学),2006,16:306-308.
- 6 Zhang JH,Wu WD,Liu JT,et al.Rapid analysis of chemical constituents of Huoxue Zhitong Capsules based on UPLC-Q-TOF/MS[J].China Tradit Herb Drugs(中草药),2020,51:3139-3146.

- 7 Lombard N, van Wyk BE, le Roux MM. A review of the ethnobotany, contemporary uses, chemistry and pharmacology of the genus *Thesium* (Santalaceae) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 256: 112745.
- 8 Yu YT. Extraction, separation and purification of alkaloids from *Sophra alopecuroides* L. [D]. Xinjiang: Xinjiang Agricultural University (新疆农业大学), 2007.
- 9 El-Shazly A, Wink M. Tropane and pyrrolidine alkaloids from *Convolvulus lanatus* Vahl [J]. *Z Naturforsch C*, 2008, 63: 321-325.
- 10 Zhang JF, Jiao H, Wang JL. Chemical constituents in barks of *Syringa oblata* Lindl. (II) [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 617-619.
- 11 Kanchanapoom T, Kasai R, Yamasaki K. Iridoid and phenolic glycosides from *Morinda coreia* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59: 551-556.
- 12 Zhao MJ, Lin Y, Li PF, et al. Analysis of chemical constituents of Moutan Cortex by HPLC-QTOFMS [J]. *J Pharm Pract* (药学实践杂志), 2014, 32: 261-265.
- 13 Cheiran KP, Raimundo VP, Manfroi V, et al. Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2019, 286: 113-122.
- 14 Chen C, Zhang H, Gu H, et al. Flavonoid glycosides from the berries of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药学杂志), 2007, 22: 367-370.
- 15 Liang QM, Gu AT, Zhang L, et al. Chemical constituents from *Cynodon dactylon* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2020, 42: 657-661.
- 16 Cheng D, Shao Y. Terpenoid glycosides from the roots of *Aster tataricus* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 35(1): 173-176.
- 17 Luo Z, Chen G, Li X, Wang L, et al. Molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction coupled with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for rapid analysis of pyrrolizidine alkaloids in herbal medicine [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42: 3352-3362.
- 18 Martina, Herrmann, et al. Thesinine-4'-O-D-glucoside the first glycosylated plant pyrrolizidine alkaloid from *Borago officinalis* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 60: 399-402.
- 19 Zhang Q, Chen Y, Wang S, et al. Dissipation, residues and risk assessment of spirotetramat and its four metabolites in citrus and soil under field conditions by LC-MS/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(4): 4153.
- 20 Kazuma K, Noda N, Suzuki M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea* [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62: 229-237.

- 21 Cooney D, Jensen D J, Mcghee T K .LC-MS identification of anthocyanins in boysenberry extract and in human urine following dosing[J].J Sci Food Agric,2004,84:237-245.
- 22 Yang XQ, Yang YB, Zhou H, et al. New megastigmane glycoside and alkaloids from *Streptomyces* sp. YIM 63342[J]. Nat Prod Res, 2013, 27: 1191-1196.
- 23 Jeon YH, Seo JE, Kim JH, et al. Quantitative changes of flavonol glycosides from pine needles by cultivar, harvest season, and thermal process[J]. Prev Nutr Food Sci, 2021, 26(1): 100-108.
- 24 Sun L, Hu XR, Liu L, et al. Rapid detection of alkaloids in ipecac by direct analysis in real time tandem mass spectrometry (DART-MS/MS)[J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2012, 37: 1426-1430.
- 25 Carlier J, Guitton J, Bévalot F, et al. The principal toxic glycosidic steroids in *Cerbera manghas* L. seeds: identification of cerberin, neriifolin, tanghinin and deacetyltanghinin by UHPLC-HRMS/MS, quantification by UHPLC-PDA-MS[J]. J Chromatogr B, 2014, 962: 1-8.
- 26 Chaturvedula VSP, Prakash I. Structures of the novel diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*[J]. Carbohydr Res, 2011, 346: 1057-1060.
- 27 Zhang J, Chou GX, Zhang SN, et al. Determination of rubusoside from *Rubus suavissimus* S. Lee leaves by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Spectrosc Lab (光谱实验室), 2011, 28: 2692-2696.
- 28 Shu WH. Studies on Chemical Constituents of *Salanum torvum*[D]. Guangzhou: Jinan University (暨南大学), 2011.
- 29 Asai T, Fujimoto Y. Cyclic fatty acyl glycosides in the glandular trichome exudate of *Silene gallica*[J]. Phytochemistry, 2010, 71: 1410-1417.
- 30 Cao Y, Yamada H. Corrected order in the simultaneous debenzoylation-acetolysis of methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -*D*-glucopyranoside[J]. Carbohydr Res, 2006, 341: 909-911.
- 31 Gardner DR, Pfister JA. HPLC-MS analysis of toxic norditerpenoid alkaloids: refinement of toxicity assessment of low larkspurs (*Delphinium* spp.)[J]. Phytochem Anal, 2009, 20(2): 104-113.
- 32 Fang ST, Liu JK, Li B. A novel 1,10-seco withanolide from *Physalis peruviana*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12: 618-622.
- 33 Nathanson MH, Boyer JL. Mechanism and regulation of bile secretion[J]. Hepatology, 1991, 14: 551-566.
- 34 Cai CQ, Yang CH, Liang JY, et al. Advance in studies on structure-activity relationships of diterpenoid alkaloids in genus *Aconitum*[J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2013, 25(3): 1-5.

- 35 Zhang H,Samadi AK,Gallagher RJ,et al.Cytotoxic withanolide constituents of *Physalis longifolia*[J].J Nat Prod,2011,74:2532-2544.
- 36 Wang CQ,Pan SJ,Zuo GF.GC-MS Analysis of chemical composition and antibacterial activity of volatile oil from flowers of *Elaeagnus lanceolata* Warb.apud Diels[J].Food Sci,2013,34:191-193.
- 37 Wei WW,Ye YS,Xu LX.Study on chemical constituents of non-medicinal parts of *Curcuma longa*[J].J Anhui Agric Sci(安徽农业科学),2016(19):107-108.
- 38 Zhou Q,Wang C,Li YP,et al.Synthesis and antibacterial activity of flavonols[J].Chin J Appl Environ Biol(应用与环境生物学报),2017,23:232-237.
- 39 Li JC,Dai WF,Liu D,et al.Quinolizidine alkaloids from *Sophora alopecuroides* with anti-inflammatory and anti-tumor properties[J].Bioorg Chem,2021,110:104781.

收稿日期: 2022-03-01

接受日期:

基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划项目(202113051694);

*通信作者 Tel: 13487580146; E-mail: longhongping84@163.com