

基于 UPLC-QE Plus-MS/MS 技术的广东紫珠 化学成分分析及其神经保护活性

刘永林^{1,2}, 许熙¹, 汤圆¹,
曾聪¹, 胡培², 陈杰^{1*}, 李谄光^{1,2*}

¹江西中医药大学药学院, 南昌 330004; ²江中药业股份有限公司, 南昌 330096

摘要: 分析广东紫珠 (*Callicarpa kwangtungensis*, CK) 的化学成分并探讨其对神经细胞的保护作用。本研究采用超高效液相色谱串联四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-QE Plus-MS/MS) 对 CK 的化学成分进行鉴定。通过建立体外神经炎症模型, 检测一氧化氮 (nitric oxide, NO)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 炎症因子含量, 结合细胞流式术检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 并使用免疫荧光观察细胞形态变化, 以评估 CK 的神经保护作用。在 CK 中共鉴定出 108 个化学成分, 包括 34 个苯乙醇苷类、10 个苯丙素类、25 个黄酮类、23 个萜类、10 个有机酸类、2 个有机醛类和 4 个其他类化合物, 其中 21 个成分为首次鉴定。体外实验结果表明, CK 能够抑制脂多糖诱导的 BV2 细胞 NO、IL-1 β 、IL-6 和 ROS 的表达水平, 并能够逆转 BV2 细胞的活化状态。本研究通过 UPLC-QE Plus-MS/MS 实现对 CK 化学成分进行快速分析, 并探讨了其神经保护活性, 为后续的药物基础研究和新药开发提供了重要的理论依据。

关键词: 广东紫珠; 化学成分; UHPLC-QE Plus-MS/MS; 神经炎症; 神经保护

中图分类号: R284.1; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)10-1639-21

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.10.001

Chemical composition analysis of *Callicarpa kwangtungensis* by UPLC-QE Plus-MS/MS and its neuroprotective activity

LIU Yong-lin^{1,2}, XU Xi¹, TANG Yuan¹,
ZENG Cong¹, HU Pei², CHEN Jie^{1*}, LI Yi-guang^{1,2*}

¹School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

²Jiangzhong Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330096, China

Abstract: This study aims to analyze the chemical constituents of *Callicarpa kwangtungensis* (CK) and investigate its neuroprotective activity. The chemical constituents of CK were identified by UPLC-QE Plus-MS/MS. By establishing an *in vitro* neuroinflammation model, the levels of nitric oxide (NO), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) inflammatory factors were detected, and the levels of reactive oxygen species (ROS) were measured in combination with flow cytometry, and changes in cell morphology were observed using immunofluorescence to assess the neuroprotective effects of CK. A total of 108 compounds were identified in CK, including 34 phenylethanoid glycosides, 10 phenylpropanoids, 25 flavonoids, 23 terpenoids, 10 organic acids, 2 organic aldehydes, and 4 others, of which 21 components were identified for the first time. The results of *in vitro* experiments showed that CK was able to inhibit lipopolysaccharide-induced expression levels of NO, IL-1 β , IL-6, and ROS in BV2 cells and reverse the activation state of BV2 cells. In this study, the rapid analysis of the chemical components of CK was achieved by UPLC-QE Plus-MS/MS, and its neuroprotective activity was investigated, which provided an important theoretical basis for subsequent basic research on pharmacophore substances and the development of new drugs.

Key words: *Callicarpa kwangtungensis*; chemical composition; UHPLC-QE Plus-MS/MS; neuroinflammation; neuroprotection

广东紫珠为马鞭草科植物广东紫珠(*Callicarpa kwangtungensis* Chun, CK)的干燥茎枝和叶,始载于《本草拾遗》,被认为具有收敛止血、散瘀、清热解毒等药用特性^[1]。其化学成分复杂,主要包括苯乙醇苷类、黄酮类、萜类等成分,具有抗炎、抗氧化、抗菌等药理活性^[2,3]。近年来,大量研究表明其次生代谢物,如苯乙醇苷、黄酮和萜类成分,具有显著的神经营保护作用。Kong等^[4]研究表明,主要成分连翘酯苷B能够有效抑制神经炎症,改善APP/PS1小鼠的记忆功能障碍。此外,从广东紫珠分离的二萜类化合物也显示出显著的神经保护活性^[5,6]。He等^[7]研究结果显示,木犀草素通过过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor- γ , PPAR γ)依赖性机制改善3×Tg-AD小鼠的认知缺陷,并抑制 β -淀粉样蛋白(amyloid β -protein, A β)诱导的氧化应激、线粒体功能障碍和神经元凋亡。因此,广东紫珠具有潜在的神经保护活性。

目前的研究主要集中在苯乙醇苷类和黄酮等含量较高的成分。Gong等^[8]建立了一种利用HPLC-ESI-IT-TOF-MS/MS鉴定了广东紫珠苯乙醇苷类、黄酮类等化合物。Yang等^[9]通过UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术鉴定了广东紫珠醇提物的正丁醇萃取部位的化学成分。过去的研究主要集中在醇提取物和重要活性成分,尚未报道有关于水提物化学成分和神经保护活性,亟需进一步补充相关的研究。超高效液相色谱串联四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-QE Plus-MS/MS)技术常用于中药成分的快速定性分析,对明确中药物质基础具有重要意义^[10]。为了快速鉴定和分析广东紫珠的化学成分及抗神经炎症活性,本研究中采用UPLC-QE Plus MS对其进行定性分析,并通过脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的BV2细胞建立神经炎症模型,探索其神经保护活性,为后续广东紫珠药效和物质基础的深入研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 药材与试剂

广东紫珠(批号220501,产地:湖南)购买自湖南树智农业有限公司,经江西中医药大学杨安金教授鉴定为马鞭草科植物广东紫珠*Callicarpa kwangtungensis* Chun的干燥茎枝和叶,标本(20221201)保存于江中药谷科研中心中药资源研究标本室。

对照品毛蕊花糖苷(批号:111530-201914)、连翘酯苷B(批号:111811-201603)、金石蚕苷(批号:111812-201303)、木犀草素(批号:111520-202107)、木犀草苷(批号:111720-202111)、熊果酸(批号:110742-201823)(中国食品药品检定研究院),纯度均 $\geq 98\%$;甲酸、乙腈、甲醇(批号:64-18-6、75-05-8、67-56-1,色谱级,德国Merck公司)。

BV2小胶质细胞(批号:CL-0493,武汉普诺赛生命科技有限公司);LPS、地塞米松(dexamethasone, DXMS)(批号:L2880、D-08,美国Sigma公司);磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(批号:P1022、D8371,北京索莱宝科技有限公司);细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、小鼠白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、小鼠白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒(批号:C0040、S0021S、PI301、PI326、S0033S,上海碧云天生物技术有限公司);离子钙结合适配器分子1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1)(批号:10904-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);ActinRed(批号:KGMP0012,江苏凯基生物技术股份有限公司);Alexa Fluor 488(批号:ab150077,美国Abcam公司)。

1.2 仪器

Vanquish超高效液相色谱联用Q Exactive四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪、Thermo Scientific Hypersil GOLD C18色谱柱(美国Thermo Fisher Scientific公司);VICTOR Nivo酶标仪(英国PerkinElmer公司);CytoFLEX流式细胞仪(挪威Beckman公司);DM3000荧光显微镜(德国Leica公司)。

1.3 广东紫珠成分分析

1.3.1 广东紫珠水提物制备

将广东紫珠药材打成粉末后,精密称取1 000 g粉末,加入10倍的超纯水,加热回流2 h,合并滤液,将合并后的滤液浓缩后,经冷冻干燥制成冻干粉。

1.3.2 样品制备

精密称取冻干粉若干,置于具塞锥形瓶中,精密加入25 mL甲醇配置成生药量2.5 g/mL的混悬液,超声30 min后冷却至室温,并用甲醇补足减少的质量,摇匀,使用0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液。分别精密称取毛蕊花糖苷、连翘酯苷B、金石蚕苷、

木犀草素、木犀草苷和熊果酸对照品若干,加入甲醇溶液分别制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液,混合对照品制成质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。

1.3.3 UPLC-QE Plus-MS/MS 分析条件

Thermo Scientific Hypersil GOLD C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μm); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL ; 流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈(B), 梯度洗脱(0~2 min, 5% B; 2~10 min, 5% \rightarrow 25% B; 10~20 min, 25% \rightarrow 45% B; 20~30 min, 45% \rightarrow 65% B; 30~40 min, 65% \rightarrow 85% B; 40~47 min, 85% \rightarrow 95% B; 47~50 min, 95% \rightarrow 5% B)。

采用电喷雾离子源(ESI), 在正负离子模式下分别对样品检测分析, 扫描范围为 m/z 100~1 500。喷雾电压为 ± 3.5 kV; 毛细管温度为 320 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气流量为 35 arb; 辅气流量为 10 arb; 辅气加热器温度为 350 $^{\circ}\text{C}$; 碰撞能量为 20、40、60 eV; 检测方式为 Full MS/dd-MS², 其中 Full MS 分辨率为 70 000, dd-MS² 分辨率为 17 500。

1.3.4 数据分析

经过 Thermo Xcalibur 软件数据采集后, 将图谱数据导入 QualBrowser 和 TraceFinder 软件用于定性数据分析。本实验根据化合物的精确质量数、同位素分布比推测化合物分子式, 并根据二级质谱碎片, 结合对照品、软件数据库匹配和国内外相关文献资料进行比对, 最终实现对广东紫珠化学成分的鉴定。

1.4 细胞实验

1.4.1 细胞给药及分组

精密称取广东紫珠冻干粉若干, 使用 PBS 和不超过 0.5% DMSO 配制成 10 mg/mL 的溶液, 经过 0.22 μm 的无菌滤膜过滤后, 保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。细胞分组: 对照组(control, Con)、模型组(model, Mod)、阳性药地塞米松组(DXMS, 40 $\mu\text{g/mL}$)、不同浓度广东紫珠给药组(CK, 50~400 $\mu\text{g/mL}$)。细胞贴壁后, 除 Con 组外, 其余组均加入 LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ 培养 24 h 形成神经炎症模型。

1.4.2 细胞活力测定

将 BV2 细胞以 9×10^3 个/孔接种于 96 孔板中。细胞贴壁后, 加入 CK 50~800 $\mu\text{g/mL}$ 干预 24 h 后, 加入含 10% CCK-8 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h 后使用酶标仪测定 450 nm 吸光度。

1.4.3 炎症因子含量测定

将 BV2 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 24 孔板中。细胞贴壁后, 按照细胞分组进行干预。干预 24 h 后, 收集细胞培养基上清液, 按照说明书方法检测 NO、IL-1 β 、IL-6 的含量。

1.4.4 ROS 表达水平测定

将 BV2 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中。细胞贴壁后, 按照细胞分组进行干预。干预 24 h 后, 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 孵育 20 min。制成细胞悬液后使用流式细胞仪检测 ROS 的表达水平。

1.4.5 免疫荧光检测

将 BV2 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 12 孔板细胞爬片, 并按照分组进行细胞处理。干预 24 h 后吸去上清液, 用 4% 多聚甲醛在 37 $^{\circ}\text{C}$ 固定 BV2 细胞 30 min 后用 PBS 洗涤细胞 3 次。随后用 0.1% Triton X-100 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下透化 BV2 细胞 20 min 后用 PBS 洗涤细胞 3 次。一抗 Iba1 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育细胞过夜, PBS 洗涤 3 次后使用 ActinRed 室温孵育 30 min。再次用 PBS 洗涤 3 次后, 使用 Alexa Fluor 488 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光下孵育 2 h。使用含抗荧光淬灭剂的 DAPI 室温避光对细胞核染色 10 min, 在荧光显微镜拍摄荧光图像。

1.5 统计学分析

所有数据均用平均值 \pm 标准误(Mean \pm SEM) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件对不同处理之间的差异进行统计分析。统计显著性设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 化学成分分析

通过 UHPLC-QE Plus-MS/MS 正负离子模式下分析了广东紫珠水提物的质谱总离子流图, 如图 1 所示。根据“1.3.4”中数据分析的方法, 结合文献报道^[9,11-15], 数据库和对照品比对, 对广东紫珠水提物进行化学成分的解析。共鉴定出 108 个化合物, 包括 34 个苯乙醇苷类、10 个苯丙素类、25 个黄酮类、23 个萜类、10 个有机酸类、2 个有机醛类和 4 个其他类化合物, 其中 21 个化合物首次从广东紫珠鉴定得到, 详细的结果见表 1。

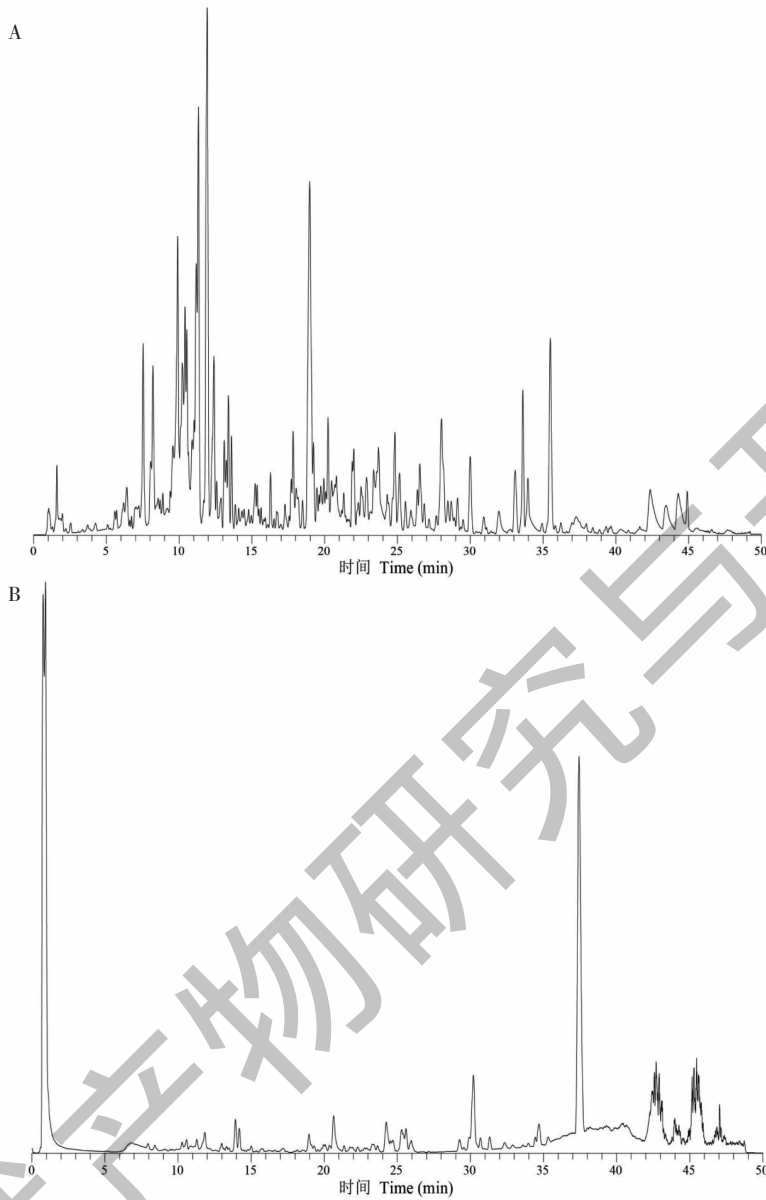


图1 负离子(A)和正离子(B)模式下的广东紫珠水提物的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of aqueous extracts of *C. kwangtungensis* in negative (A) and positive (B) ion modes

表1 广东紫珠化学成分鉴定结果

Table 1 Identification results of the chemical compounds in *C. kwangtungensis*

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	类别 Class	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	计算值 Calculated value (m/z)	测量值 Observed value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	二级碎 片离子 MS ² fragmentation ion
1	0.98	4-羟基苯甲醛 4-Hydroxybenzaldehyde	H	C ₇ H ₆ O ₂	[M+H] ⁺	123.044 0	123.044 6	4.88	123.044 6, 95.049 3
2	1.48	柠檬酸 Citric acid	G	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.019 7	191.018 8	-4.71	191.018 8, 111.007 5
3	3.72	丁香酸 Syringic acid	G	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	199.060 0	199.059 7	-1.51	199.059 7, 181.049 0, 140.046 6, 125.023 0
4	6.54	O-(Methoxycarbonyl) phenylacetic acid	G	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 6	193.049 7	-4.66	193.049 7, 178.026 2, 134.036 1

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	类别 Class	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	计算值 Calculated value (m/z)	测量值 Observed value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	二级碎 片离子 MS ² fragmentation ion
5	6.63	阿魏酸 Ferulic acid	B	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 6	193.049 7	-4.66	193.049 7, 178.026 2, 149.059 6, 134.036 1
6	6.78	草木樨苷 Melilotoside	B	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	[M-H] ⁻	325.092 8	325.093 8	3.08	325.093 8, 163.039 0, 145.028 3
7	7.01	连翘酯苷 E Forsythoside E	A	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	461.166 4	461.166 4	0.00	461.166 4, 315.108 5, 297.097 7, 135.043 9, 153.054 4
8	7.36	4-羟基肉桂酸 4-Hydroxy cinnamic acid	G	C ₉ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	165.054 6	165.054 4	-1.21	165.054 4, 147.043 6, 137.059 4, 119.048 9, 91. 054 4
9	7.41	Peiioside A	A	C ₂₆ H ₃₆ O ₁₇	[M-H] ⁻	619.187 9	619.185 5	-3.88	619.185 5, 457.135 7, 179.033 9, 161.023 5, 135.043 8
10	7.47	Sucrose 1'-benzoate	I	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂	[M-H] ⁻	445.135 1	445.132 9	-4.94	445.132 9, 137.022 9
11	7.74	5-甲基间苯二甲酸甲酯 5-Mmethyl isophthalic acid monomethyl ester	G	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 6	193.049 7	-4.66	193.049 7, 178.026 2, 165.054 0, 149.059 6, 134.036 1
12	7.83	咖啡酰-D-吡喃葡萄糖 Caffeoyl-D-glucopyr- anose ^{#[12]}	B	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	341.087 8	341.086 4	-4.10	341.086 4, 281.066 4, 221.045 0, 179.034 0, 161.023 4, 135.043 9
13	8.52	肉苁蓉苷 F Cistanoside F	A	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	487.145 7	487.144 1	-3.28	487.144 1, 179.034 0, 161.023 4, 135.043 9
14	8.56	香草醛 Vanillin	H	C ₈ H ₈ O ₃	[M+H] ⁺	153.054 6	153.054 1	-3.27	153.054 1, 135.115 6, 125.059 4
15	8.74	β -Hydroxy samioside	A	C ₃₄ H ₄₄ O ₂₀	[M-H] ⁻	771.235 3	771.234 1	-1.56	771.234 1, 753.223 6, 591.190 4
16	8.81	新北美圣草苷 Neoeriocitrin ^{#[13]}	C	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	[M-H] ⁻	595.166 8	595.165 5	-2.18	595.165 5, 475.124 3
17	8.85	咖啡酸 Caffeic acid	B	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.034 9	179.034 1	-4.47	179.034 1, 135.044 0, 117.033 3
					[M+H] ⁺	181.049 5	181.048 9	-3.31	181.048 9, 163.038 5, 145.027 9, 135.043 6, 117.033 3, 89.038 8
18	8.97	Tuberonic acid glucoside	G	C ₁₈ H ₂₈ O ₉	[M-H] ⁻	387.166 0	387.165 5	-1.29	387.165 5, 207.101 1, 163.111 7
19	9.07	去酰基异地黄苷 Deacyl isomartynoside ^{#[12]}	A	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	475.182 0	475.183 5	3.16	475.183 5, 329.123 7, 149.059 6
20	9.19	6-O-香草醛哈巴苷 6-O-Vanillylharpagide ^{#[13]}	D	C ₂₃ H ₃₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	529.156 2	529.155 8	-0.76	529.155 8, 161.023 4, 133.028 3
21	9.41	芹菜素-6, 8-二-碳-葡萄 糖苷 Apigenin-6, 8-di-C- glucoside	C	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.151 1	593.150 1	-1.69	593.150 1, 575.138 4, 503.119 6, 473.108 4, 383.076 7, 353.066 3
22	9.59	Benzyl 6-O-(6-deoxy- α -L- mannopyranosyl)- β -D-glu- copyranoside ^{#[14]}	I	C ₁₉ H ₂₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	415.160 9	415.162 2	3.13	415.162 2, 269.102 8, 161.044 5
23	9.84	木犀草素-双葡萄糖醛酸苷 Luteolin-diglucuronide	C	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₈	[M-H] ⁻	637.104 6	637.103 8	-1.26	637.103 8, 351.056 4, 285.040 1, 193.034 4, 175.023 9
24	9.92	β -羟基连翘酯苷 B β -OH-forsythoside B	A	C ₃₄ H ₄₄ O ₂₀	[M-H] ⁻	771.235 3	771.234 2	-1.43	771.234 2, 753.223 8, 661.199 8, 591.193 1, 179.034 0, 161.023 3, 135.043 9
25	10.11	芥子酸 4-Hydroxy-3,5-di- methoxy cinnamic acid	G	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	223.061 1	223.060 6	-2.24	223.060 6, 208.036 9, 193.013 3, 179.105 8, 165.018 3, 137.023 5

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	类别 Class	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	计算值 Calculated value (m/z)	测量值 Observed value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	二级碎 片离子 MS ² fragmentation ion
26	10.21	β -羟基毛蕊花糖苷 β -OH-acteoside	A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	[M-H] ⁻	639.193 0	639.192 4	-0.94	639.192 4, 621.181 7, 477.162 2, 459.151 1, 179.034 0, 161.023 4, 151.033 9, 135.044 0
27	10.26	7,3-二甲氧基-木犀草素- 4'-O-新橙皮苷 7,3-Dime- thoxy-luteolin-4'-O-neo- hesperidoside	C	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	[M-H] ⁻	621.182 4	621.181 5	-1.45	621.181 5, 475.123 9, 269.081 5
28	10.41	黑麦草内酯 Loliolide	D	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	[M+H] ⁺	197.117 2	197.116 4	-4.06	197.116 4, 179.106 0, 161.095 6, 151.114 2
29	10.57	5-羟基-4',6,7-三甲氧基 黄酮 5-Hydroxy-4',6,7- trimethoxyflavone ^{#[13]}	C	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	[M-H] ⁻	327.087 4	327.087 8	1.22	327.087 8, 135.044 3
30	10.57	大车前苷 Plantamajoside	A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	[M-H] ⁻	639.193 0	639.192 1	-1.41	639.192 1, 621.181 8, 179.034 0, 135.044 0
31	10.76	Campneoside II	A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	[M-H] ⁻	639.193 0	639.192 4	-0.94	639.192 4, 621.181 9, 529.155 1, 459.148 8, 179.034 0, 161.023 3, 135.043 9, 151.038 9
32	11.22	Samioside	A	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	[M-H] ⁻	755.240 4	755.239 1	-1.72	755.239 1, 593.207 3, 447.148 2, 179.033 7, 161.023 3, 153.054 7
33	11.32	连翘酯苷 B Forsythoside B*	A	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	[M-H] ⁻	755.240 4	755.239 2	-1.59	755.239 2, 593.208 4, 461.163 8, 179.033 9, 161.023 4, 153.054 7, 135.044 0
34	11.49	木犀草素-3'-O-葡萄糖苷 Luteolin-3'-O-glucuronide	C	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[M-H] ⁻	461.072 5	461.072 0	-1.08	461.072 0, 285.040 2, 241.050 4, 151.002 6
35	11.50	木犀草素 Luteolin*	C	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.040 4	285.040 1	-1.05	285.040 1, 241.050 2, 151.002 5, 133.028 3
					[M+H] ⁺	287.055 0	287.054 2	-2.79	287.054 2, 269.044 7, 241.048 4, 153.017 7
36	11.61	毛蕊花糖苷 Acteoside*	A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	623.198 1	623.198 1	0.00	623.198 1, 461.168 2, 315.108 3, 179.034 0, 161.023 4, 153.054 7, 135.044 0
37	11.63	木犀草苷 Luteoloside*	C	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.093 2	447.092 7	-1.12	447.092 7, 285.040 0, 267.029 0, 241.049 9, 151.002 5, 133.028 3
					[M+H] ⁺	449.107 8	449.108 3	1.11	449.108 3, 287.053 9, 269.044 0, 241.048 1, 153.017 6
38	11.68	Alboside I	D	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₃	[M-H] ⁻	551.177 0	551.175 2	-3.27	551.175 2, 357.119 6, 195.066 0
39	11.79	异毛蕊花糖苷 Isoacteoside	A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	623.198 1	623.197 4	-1.12	623.197 4, 461.166 2, 315.108 1, 179.034 2, 161.023 3, 153.054 9, 135.043 9
40	11.92	金石蚕苷 Poliumoside*	A	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉	[M-H] ⁻	769.256 0	769.255 1	-1.24	769.255 1, 607.222 7, 461.163 7, 179.034 0, 161.023 4, 153.054 4, 135.043 9
41	12.08	脱羟基连翘酯苷 B Dehydroxy forsythoside B	A	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	739.245 4	739.244 6	-1.08	739.244 6, 577.212 6, 179.034 0, 161.023 4, 153.054 8, 135.044 0

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	类别 Class	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	计算值 Calculated value (m/z)	测量值 Observed value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	二级碎 片离子 MS ² fragmentation ion
42	12.26	松柏醛 Coniferaldehyde	B	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	177.055 7	177.054 9	-4.52	177. 054 9、162. 031 1、 149. 023 2
43	12.27	(+)-异落叶松脂素-9-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(+)- Isolariciresinol-9-O- β -D- glucopyranoside	B	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	521.202 8	521.202 6	-0.38	521. 202 6、341. 139 0、 175. 075 4、160. 051 8、 769. 254 7、593. 208 4、 461. 164 4、447. 146 3、 193. 049 5、175. 039 0、 161. 023 3、153. 054 6、 653. 208 3、621. 180 9、 459. 150 2、179. 033 9、 161. 023 4、151. 039 0、 135. 044 1
44	12.27	Alyssonoside	A	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉	[M-H] ⁻	769.256 0	769.254 7	-1.69	623. 197 5、461. 166 2、 315. 108 4、161. 023 4、 179. 033 9、153. 054 4、 135. 043 9
45	12.28	Isocampneoside I ^{#[9]}	A	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₆	[M-H] ⁻	653.208 7	653.208 3	0.61	681. 203 2、663. 192 0、 501. 163 1、459. 150 3、 179. 034 0、161. 023 3、 151. 039 0、135. 044 0
46	12.34	Parvifloroside B	A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻	623.198 1	623.197 5	-0.96	357. 136 0、342. 109 9、 151. 038 9、136. 015 4、 121. 028 3
47	12.46	2'-Acetyl-campneoside II ^{#[9]}	A	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	681.203 6	681.203 2	-0.59	651. 229 3、175. 038 8
48	12.48	(-)-松脂醇 (-)-Pinoresinol	B	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	[M-H] ⁻	357.134 3	357.136 0	4.76	607. 202 9、461. 168 0、 445. 171 6、179. 034 0、 161. 023 4、145. 028 4
49	12.66	肉苻蓉苷 D Cistanoside D	A	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	651.229 4	651.229 3	-0.15	577. 155 5、413. 087 5、 269. 045 3、117. 033 3
50	12.72	丁香内酯 A 3'- α -L-鼠李 糖苷 Syringalide A 3'- α -L- rhamnopyranoside	A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₄	[M-H] ⁻	607.203 2	607.202 9	-0.49	769. 253 3、461. 166 0、 179. 033 9、161. 023 3
51	12.73	野漆树苷 Rhoifolin	C	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	577.156 2	577.155 5	-1.21	369. 132 8、353. 102 7、 339. 086 9、179. 070 4
52	12.75	Isoalyssonoside	A	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉	[M-H] ⁻	769.256 0	769.253 3	-3.51	431. 098 1、268. 037 5、 240. 042 4、151. 002 6、 107. 012 5
53	12.76	辛夷脂素 Kobusin ^{#[13]}	B	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	[M-H] ⁻	369.134 3	369.132 8	-4.06	433. 111 5、271. 063 0、 153. 014 3
54	12.78	染料木苷 Genistin	C	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	431.098 3	431.098 1	-0.46	797. 249 9、755. 244 0、 593. 208 3、179. 034 4、 161. 023 4、135. 043 9
55	12.82	2'-乙酰连翘酯苷 B 2'-Acetyl forsythoside B	A	C ₃₆ H ₄₆ O ₂₀	[M-H] ⁻	797.250 9	797.249 9	-1.25	783. 270 9、607. 223 9、 461. 165 8、193. 049 8、 175. 039 0、160. 015 5
56	12.87	Longissimoside B	A	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₉	[M-H] ⁻	783.271 7	783.270 9	-1.02	665. 207 6、179. 034 2
57	13.03	管花苷 B Tubuloside B	A	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	[M-H] ⁻	665.208 7	665.207 6	-1.65	461. 108 5、446. 085 0、 298. 047 7、283. 024 4、 255. 029 5
58	13.13	金圣草素-7-O- β -D-吡喃 葡萄糖苷 Chrysoeriol-7-O- β -D-glucopyranoside	C	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	461.108 9	461.108 5	-0.87	

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	类别 Class	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	计算值 Calculated value (m/z)	测量值 Observed value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	二级碎 片离子 MS ² fragmentation ion
59	13.27	独一味昔 A Lamiophlomiside A	A	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₉	[M-H] ⁻	783.271 7	783.273 0	1.66	783. 273 0, 607. 224 6, 461. 163 8, 275. 076 0, 193.050 6, 175.039 2 811. 265 9, 769. 256 3, 649. 234 3, 607. 225 3,
60	13.38	江藤苷 Brandioside	A	C ₃₇ H ₄₈ O ₂₀	[M-H] ⁻	811.266 6	811.265 9	-0.86	461. 166 6, 179. 033 3, 161. 023 4, 153. 055 3, 135.044 0
61	13.38	Eukovoside	A	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	[M-H] ⁻	637.213 7	637.213 1	-0.94	637. 213 1, 193. 049 6, 175.038 5, 160.015 6
62	13.47	开环异落叶松脂醇 Secroisolaricresinol	B	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	[M-H] ⁻	361.165 6	361.165 1	-1.38	361.165 1, 331.155 0
63	13.60	安格洛昔 C Angoroside C	A	C ₃₆ H ₄₈ O ₁₉	[M-H] ⁻	783.271 7	783.270 6	-1.40	783. 270 6, 607. 223 8, 193.049 7, 175.039 1
64	13.63	苯基-4'-羟基-苯基-3'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷 Benzyl- 4'-hydroxy-benzoyl-3'-O- β -D-glucopyranoside	I	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	[M-H] ⁻	405.119 1	405.118 8	-0.74	405.118 8, 243.065 8
65	13.69	管花苷 E Tubuloside E	A	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₅	[M-H] ⁻	649.213 7	649.212 5	-1.85	649.212 5, 337.107 8
66	13.71	金合欢素-双葡萄糖醛酸苷 Acacetin-diglucuronide	C	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	635.125 3	635.127 7	3.78	635. 127 7, 351. 0564 9, 283. 060 9, 193. 034 4, 175.023 7
67	13.84	车前草苷 C Plantainoside C	A	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	[M-H] ⁻	637.213 7	637.213 1	-0.94	637. 213 2, 461. 166 4, 193. 049 8, 175. 039 0, 160.015 5, 153.053 7
68	14.33	2'-乙酰毛蕊花糖苷 2'-Acetylacteoside	A	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₆	[M-H] ⁻	665.208 7	665.207 9	-1.20	665. 207 9, 503. 176 9, 315. 107 8, 179. 034 3, 161. 023 4, 135. 044 0, 153.054 7
69	14.38	5-甲氧基-金粉藤素 5-Methoxy sarotano- side ^{#[13]}	C	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₃	[M-H] ⁻	577.192 6	577.192 2	-0.69	577. 192 2, 179. 033 9, 161.023 4
70	14.58	地黄苷 Martynoside	A	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	651.229 4	651.228 5	-1.38	651. 228 5, 475. 181 2, 329. 124 1, 193. 049 8, 175.039 1, 160.015 6
71	14.82	3,4',5,7-四甲氧基黄酮 3,4',5,7-Tetramethoxyfla- vone	C	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	[M-H] ⁻	341.103 0	341.102 8	-0.59	341. 102 8, 297. 112 8, 282.089 4, 267.066 0
72	14.90	甜叶苷 R1 Suavissimoside R1 ^{#[13]}	F	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₂	[M-H] ⁻	679.369 9	679.369 2	-1.03	679.369 2, 503.338 6
73	14.88	3,3',4',5,7-五甲氧基黄 酮 3,3',4',5,7-Pentame- thoxyflavone	C	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	[M-H] ⁻	371.113 6	371.113 3	-0.81	371. 113 3, 353. 102 9, 341. 102 3, 323. 057 0, 267. 065 8, 191. 034 1, 147.044 0 301. 034 9, 273. 039 6,
74	15.15	槲皮素 Quercetin	C	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.035 3	301.034 9	-1.33	151. 002 6, 121. 028 2, 107.012 4
75	15.30	3,5-二甲氧基-4-甲基苄 醇 3,5-Dimethoxy-4-meth- yl benzyl alcohol	I	C ₁₀ H ₁₄ O ₃	[M+H] ⁺	183.101 5	183.101 7	1.09	183.101 7, 155.070 5, 81. 033 3
76	15.34	5,7,3',4'-四羟基-3-甲氧 基黄酮 5,7,3',4'-Tetra- hydroxy-3-methoxy flava- none	C	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	317.065 5	317.064 5	-3.15	317. 064 5, 302. 040 9, 274. 046 0, 163. 037 2, 135.042 7, 153.017 6
77	15.37	异地黄苷 Isomartynoside	A	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	651.229 4	651.228 9	-0.77	651. 228 9, 475. 181 8, 193. 049 8, 175. 039 1, 160.015 5

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	类别 Class	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	计算值 Calculated value (m/z)	测量值 Observed value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	二级碎 片离子 MS ² fragmentation ion
78	15.55	3,12- <i>O</i> - β -D-二葡萄糖吡喃基 11,16-二羟基松香醇-8,11,13-三烯 3,12- <i>O</i> - β -D-Diglucoopyranosyl 11,16-dihydroxyabieta-8,11,13-triene	E	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	657.312 7	657.312 4	-0.46	657.312 4, 495.259 6, 465.248 4, 303.196 1
79	15.68	6- <i>O</i> -反式-肉桂酰环烯醚萜 B6- <i>O</i> -Transcinnamoylphlorigidoside B	D	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₃	[M-H] ⁻	591.208 3	591.207 3	-1.69	591.207 3, 179.034 1, 161.023 4, 133.028 3
80	15.78	巨大戟醇 Ingenol ^{#[14]}	E	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	[M-H] ⁻	347.186 3	347.185 8	-1.44	347.185 8, 303.196 0
81	16.73	16-nor-15-Oxabieta-8,11,13-trien-18-oic acid	E	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	[M+H] ⁺	301.179 8	301.179 8	0.00	301.179 8, 286.048 2
82	17.16	5,7,4'-三羟基-3'-甲氧基黄酮 5,7,4'-Trihydroxy-3'-methoxy flavanone	C	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	299.056 1	299.055 7	-1.34	299.055 7, 284.032 3, 256.037 3, 151.002 6
					[M+H] ⁺	301.070 6	301.070 8	0.66	301.070 8, 286.046 7, 258.051 6
83	17.73	2 α ,3 β ,19 α ,23-四羟基-12-烯-28-齐墩果酸 2 α ,3 β ,19 α ,23-Tetrahydroxy-12-ene-28-oleanolic acid	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	[M-H] ⁻	503.337 8	503.337 5	-0.60	503.337 5, 401.268 9, 369.279 2, 351.268 7
84	17.79	5-羟基-3',4',7-三甲氧基黄酮 5-Hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone ^{#[13]}	C	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	[M-H] ⁻	327.217 6	327.217 3	-0.92	327.217 3, 229.143 9, 211.133 2
85	18.00	特丁贝罗 Terbufibrol	G	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	[M-H] ⁻	343.155 0	343.154 8	-0.58	343.154 8, 299.164 9
86	18.52	冰岛衣酸 Cetraric acid	G	C ₂₀ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	401.087 8	401.086 7	-2.74	401.086 7, 357.061 4, 313.071 3, 225.054 9, 181.064 8, 121.028 2
87	18.59	2 α ,3 α ,19 α -三羟基-12-烯-28-乌苏酸 2 α ,3 α ,19 α -Trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid ^{#[14]}	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	[M+H] ⁺	489.357 5	489.357 5	0.00	489.357 5, 453.337 9, 435.327 1, 407.329 2, 201.163 0, 189.162 9
88	18.75	(+)-泡桐素 (+)-Paulownin ^{#[13]}	B	C ₂₀ H ₁₈ O ₇	[M-H] ⁻	369.097 9	369.098 1	0.54	369.098 1, 269.045 7
89	19.45	2 α ,3 β ,22 β ,23-四羟基-12-烯-28-齐墩果酸 2 α ,3 β ,22 β ,23-Tetrahydroxyursolic-12-en-28-oic acid	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	[M-H] ⁻	503.337 8	503.337 7	-0.20	503.337 7, 485.328 6, 457.333 0, 441.337 4
90	19.55	穿心莲内酯 Andrographolide ^{#[14]}	E	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	[M-H] ⁻	349.202 0	349.201 7	-0.86	349.201 7, 285.186 5
					[M+H] ⁺	351.216 6	351.217 0	1.14	351.217 0
91	20.12	鼠李毒素 Rhamnazin	C	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M-H] ⁻	329.066 6	329.066 3	-0.91	329.066 3, 314.042 8, 299.019 3, 271.024 5, 243.029 3, 199.039 3, 151.002 6
92	20.45	阿江榄仁酸 Arjunolic acid ^{#[13]}	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	[M-H] ⁻	487.342 8	487.342 8	0.00	487.342 8, 469.331 9, 423.326 8
93	20.91	19-Hydroxykivalic acid/isomer ^{#[14]}	G	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	353.232 2	353.233 1	2.55	353.233 1

续表 1 (Continued Tab. 1)

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	类别 Class	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	计算值 Calculated value (m/z)	测量值 Observed value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	二级碎 片离子 MS ² fragmentation ion
94	21.00	金合欢素 Acacetin	C	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	283.061 1	283.060 8	-1.06	283.060 8, 268.037 4, 240.042 1, 151.002 7, 107.012 5
95	21.17	阿江榄仁素葡萄糖苷 II Arjunglucoside II	F	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	649.395 7	649.396 0	0.46	649.396 0, 487.340 1
96	21.17	野蔷薇苷 Rosamultin	F	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	649.395 7	649.396 0	0.46	695.395 5, 487.340 1
97	21.50	8 α ,9 α ,13 α ,14 α -Diepoxy- abietan-18-oic acid	F	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	[M-H] ⁻	333.207 1	333.206 4	-2.10	333.206 4, 315.196 2, 303.196 0
98	22.32	毡毛美洲茶素 Velutin	C	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	313.071 7	313.071 4	-0.96	313.071 4, 298.047 9, 283.024 5
99	22.45	3'-甲氧基-柳穿鱼黄素 3'-Methoxy-pectolarigenin	C	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	[M-H] ⁻	343.082 3	343.081 8	-1.46	343.081 8, 328.058 5, 313.035 0, 285.040 1, 257.045 0, 241.050 4, 226.026 6
100	23.02	烯-28-齐墩果酸 2 α ,3 β , 23,29-Tetrahydroxyolean- 12-en-28-oic acid ^{#[13]}	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	[M-H] ⁻	503.337 8	503.339 2	2.78	503.339 2, 337.252 0
101	23.33	蔷薇酸 Euscaphic acid	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	[M-H] ⁻	487.342 8	487.342 8	0.00	487.342 8, 469.332 0, 423.329 5
102	23.81	芹菜素 Apigenin	C	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.045 5	269.045 3	-0.74	269.045 3, 241.050 1, 197.060 4, 151.002 2, 117.033 4
					[M+H] ⁺	271.060 0	271.059 4	-2.21	271.059 4, 225.053 6, 197.059 1
103	25.00	5,4'-二羟基-3,7,3'-三甲 氧基黄酮 5,4'-Dihydroxy- 3,7,3'-trimethoxyflavone	C	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	[M-H] ⁻	343.082 3	343.081 2	-3.21	343.082 0, 328.057 6, 313.034 5, 285.038 6, 257.044 9, 242.021 3
					[M+H] ⁺	345.096 8	345.097 8	2.90	345.097 8, 330.074 2, 137.059 9
104	25.88	Aederagenin	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	[M-H] ⁻	471.347 9	471.349 3	2.97	471.349 3
105	33.11	3-表熊果酸 3-Epiursolic acid	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	[M-H] ⁻	455.353 0	455.352 8	-0.44	455.352 8
106	33.63	熊果酸 Ursolic acid*	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	[M-H] ⁻	455.353 0	455.352 8	-0.44	455.352 8, 407.332 6
					[M+H] ⁺	457.367 6	457.366 7	-1.97	457.367 9, 439.355 8, 393.351 1, 203.178 8, 191.179 3
107	37.86	2 α ,3 α -二羟基-12-烯-28- 乌苏酸 2 α ,3 α -Dihydroxy- urs-12-en-28-oic acid ^{#[14]}	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	[M-H] ⁻	471.347 9	471.347 6	-0.64	471.347 6, 409.347 3, 391.300 5
					[M+H] ⁺	473.362 5	473.362 9	0.85	473.362 9, 455.354 5, 437.340 9, 409.346 5, 391.334 5, 203.178 6, 189.163 0
108	38.44	科罗索酸 Corosolic acid ^{#[12]}	F	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	[M-H] ⁻	471.348 0	471.347 6	-0.85	471.347 6, 393.315 9, 377.284 4

注: #从广东紫珠首次鉴定得到的化合物; *该化合物通过与对照品比对鉴定。A: 苯乙醇苷类; B: 苯丙素类; C: 黄酮类; D: 单萜类; E: 二萜类; F: 三萜类; G: 有机酸类; H: 有机醛类; I: 其他类

Note: #Compounds identified from *C. kwangtungensis* for the first time; * This compound was identified by comparison with the reference substance. A: Phenylethanoid glycosides; B: Phenylpropanoids; C: Flavonoids; D: Monoterpenes; E: Diterpenes; F: Triterpenes; G: Organic acids; H: Organic aldehydes; I: Others.

2.1.1 苯乙醇苷类的鉴定

苯乙醇苷类是广东紫珠的主要成分和重要药效物质基础,其结构主要由苯乙醇及其衍生物,糖和酰基组成。常见的糖基为 *D*-葡萄糖和 *L*-鼠李糖,通过 C1 位置与苯乙醇结构中的 α -OH 连接,与酰基通过 C2/C4/C6 相连接。苯乙醇苷质谱裂解规律一般为 C2/C4/C6 上的酰基容易断裂失去,再逐一脱去结构中的糖基。本研究鉴定出 34 个苯乙醇苷类成分,按照酰基结构分为三类:咖啡酰基型、阿魏酰基型和其他型。咖啡酰基型一般先脱去咖啡酰基片,再进行中性糖单位的连续丢失,掉落的咖啡酸碎片离子进一步脱去 H_2O 和 CO_2 单元形成特征碎片离子。阿魏酰基型与咖啡酰基型相似,裂解规律一般为脱去阿魏酰基,再进行中性糖单位的连续丢失,掉落的阿魏酸碎片离子进一步脱去 H_2O 和 CH_3 单元形成特征碎片离子。 m/z 179 $[M-H]^-$ 、161 $[M-H]^-$ 和 135 $[M-H]^-$ 是咖啡酰基取代型的特征碎片离子, m/z

z 193 $[M-H]^-$ 、175 $[M-H]^-$ 和 160 $[M-H]^-$ 阿魏酰基取代型的特征碎片离子。以化合物 **40**、**45**、**70** 为例研究苯乙醇苷类成分的裂解规律。

化合物 **40** ($t_R = 11.92$ min) 负离子模式下准分子离子峰 m/z 769.255 1 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_{35}H_{46}O_{19}$, 其二级质谱图与推测的质谱裂解途径见图 2。准分子离子峰 m/z 769.255 1 $[M-H]^-$ 脱去 $C_9H_6O_3$ (m/z 162) 得到碎片离子 m/z 607.222 7; 碎片离子 m/z 607.222 7 继续脱去 $C_6H_{10}O_4$ (m/z 146) 得到碎片离子 m/z 461.163 7; 准分子离子峰脱去 $C_{26}H_{38}O_{15}$ (m/z 590) 得到碎片离子 m/z 179.034 0, 碎片离子 m/z 179.034 0 分别脱去 H_2O (m/z 18) 和 CO_2 (m/z 44) 得到碎片离子 m/z 161.023 4 和 135.043 9; 准分子离子峰脱去 $C_{27}H_{36}O_{16}$ (m/z 616) 得到 m/z 153.054 4 的碎片离子。与对照品保留时间和二级质谱碎片离子比对一致,化合物 **40** 确定为金石蚕苷。

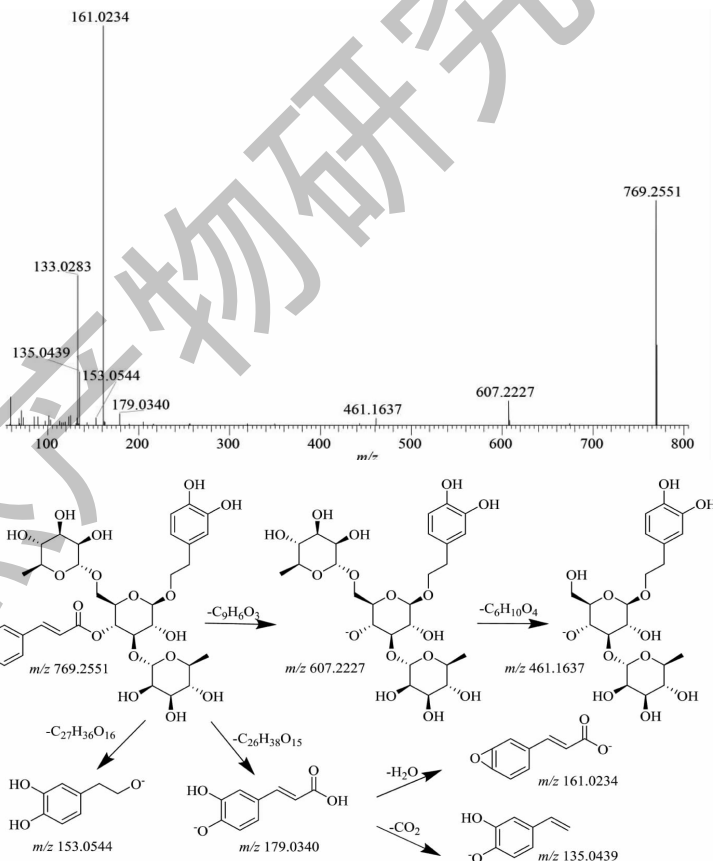


图 2 金石蚕苷可能的质谱裂解途径裂解示意图

Fig. 2 The possible mass spectrometry fragmentation pathways of poliumoside

化合物 **47** ($t_R = 12.46$ min) 负离子模式下准分子离子峰 m/z 681.203 2 $[M-H]^-$, 推测其分子式为

$C_{31}H_{38}O_{17}$, 其二级质谱图与推测的质谱裂解途径见图 3。准分子离子峰 m/z 681.203 2 $[M-H]^-$ 脱去

H_2O (m/z 18) 得到碎片离子 m/z 663.192 0, 随后碎片离子 m/z 663.192 0 脱去 $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$ (m/z 162) 得到碎片离子 m/z 501.163 1, 碎片离子 m/z 501.163 1 再脱去 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ (m/z 42) 得到碎片离子 m/z 459.150 3, 碎片离子 m/z 459.150 3 脱去 $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_9$ (m/z 308)

得到 m/z 151.039 0 的碎片离子。碎片离子 m/z 179.034 0、161.023 3 和 135.044 0 表明其为咖啡酰基型苯乙醇苷类化合物。通过与文献^[9] 比对, 化合物 **47** 鉴定为 2'-acetyl-campneoside II。

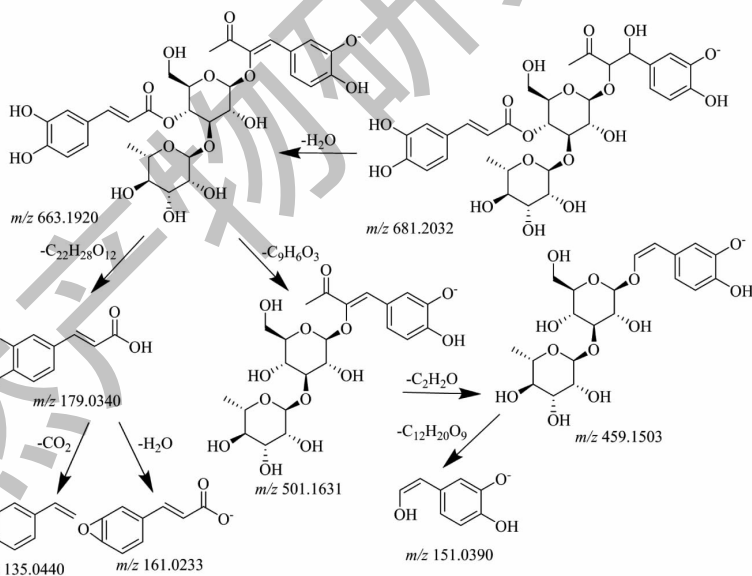
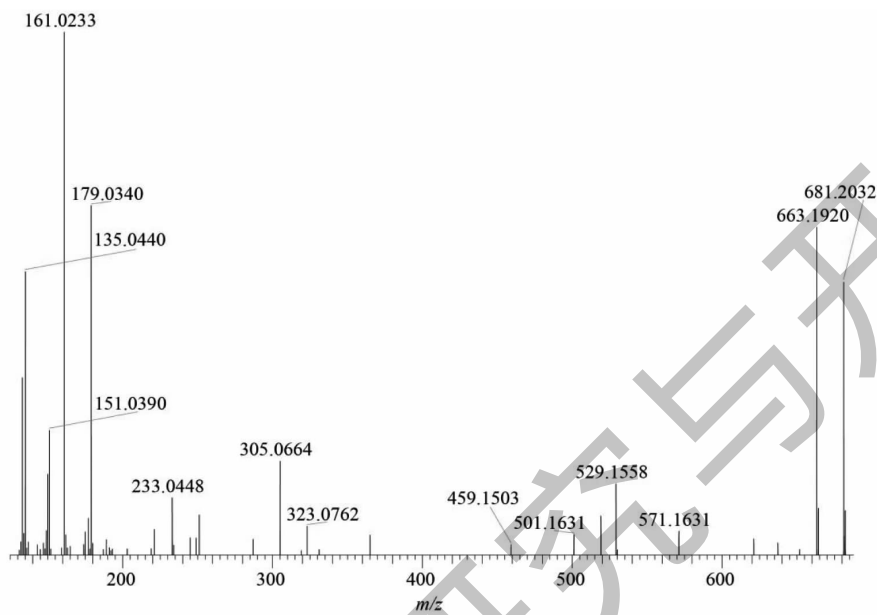


图 3 2'-Acetyl-campneoside II 可能的质谱裂解途径裂解示意图

Fig. 3 The possible mass spectrometry fragmentation pathways of 2'-acetyl-campneoside II

化合物 **70** ($t_R = 14.58$ min) 负离子模式下准分子离子峰 m/z 651.228 9 [$\text{M}-\text{H}$]⁻, 推测其分子式为 $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$ 。准分子离子峰脱去 $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$ (m/z 176) 得到碎片离子 m/z 475.181 8; 准分子离子峰脱去 $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$ (m/z 458) 得到碎片离子 m/z 193.049 8, 碎片离子 m/z 193.049 8 脱去 H_2O (m/z 18) 得到碎

片离子 m/z 175.039 1, 碎片离子 m/z 175.039 1 再脱去 CH_3 (m/z 15) 得到碎片离子 m/z 160.015 5。通过与文献^[12] 比对, 化合物 **70** 鉴定为地黄苷。

根据不同类型苯乙醇苷裂解规律、结合文献质谱数据和对照品比对, 鉴定 **9**、**13**、**15**、**24**、**26**、**30** ~ **33**、**36**、**39** ~ **41**、**45** ~ **47**、**50**、**55**、**57**、**60**、**68** 为咖啡酰

基型苯乙醇苷。化合物 **19**、**44**、**49**、**52**、**56**、**59**、**61**、**63**、**67**、**70**、**77** 为阿魏酰基型苯乙醇苷,化合物 **7** 和 **65** 为其他型苯乙醇苷。

2.1.2 苯丙素类

苯丙素的基本结构为 C_6-C_3 ,一般在 C_3 单元发生丢失 CH_3 、 CH_2 、 H_2O 等中性小分子。从广东紫珠鉴定出 10 种苯丙素,包括化合物 **5**、**6**、**12**、**17**、**42**、**43**、**48**、**53**、**62**、**88**。以化合物 **43** 和 **48** 为例分析苯丙素类成分的裂解规律。

化合物 **43** ($t_R = 12.27$ min) 负离子模式下准分子离子峰 m/z 521.2026 $[M-H]^-$,拟合其分子式为 $C_{26}H_{34}O_{11}$ 。准分子离子峰脱去 $C_6H_{12}O_6$ (m/z 180) 得到碎片离子 m/z 341.1390,碎片离子 m/z 341.1390 脱去 $C_9H_{10}O_3$ (m/z 166) 得到碎片离子

m/z 175.0754,碎片离子 m/z 175.0754 再脱去 CH_3 (m/z 15) 得到 m/z 160.0518。与文献报道^[9]的特征碎片离子比对,化合物 **43** 鉴定为 (+)-异落叶松脂素-9- O - β -D-吡喃葡萄糖苷,其二级质谱图与推测的质谱裂解途径见图 4。

化合物 **48** ($t_R = 12.48$ min) 负离子模式下准分子离子峰 m/z 357.1360 $[M-H]^-$,预测其分子式为 $C_{20}H_{22}O_6$ 。准分子离子峰脱去 CH_3 (m/z 15) 得到碎片离子 m/z 342.1099,碎片离子 m/z 342.1099 脱去 $C_{11}H_{11}O_3$ (m/z 191) 得到碎片离子 m/z 151.0389,碎片离子 m/z 151.0389 分别丢失 CH_3 (m/z 15) 和 C_2H_6 (m/z 30) 得到碎片离子 m/z 136.0154 和 121.0283。结合文献^[9]质谱数据比对,化合物 **48** 鉴定为 (-)-松脂醇。

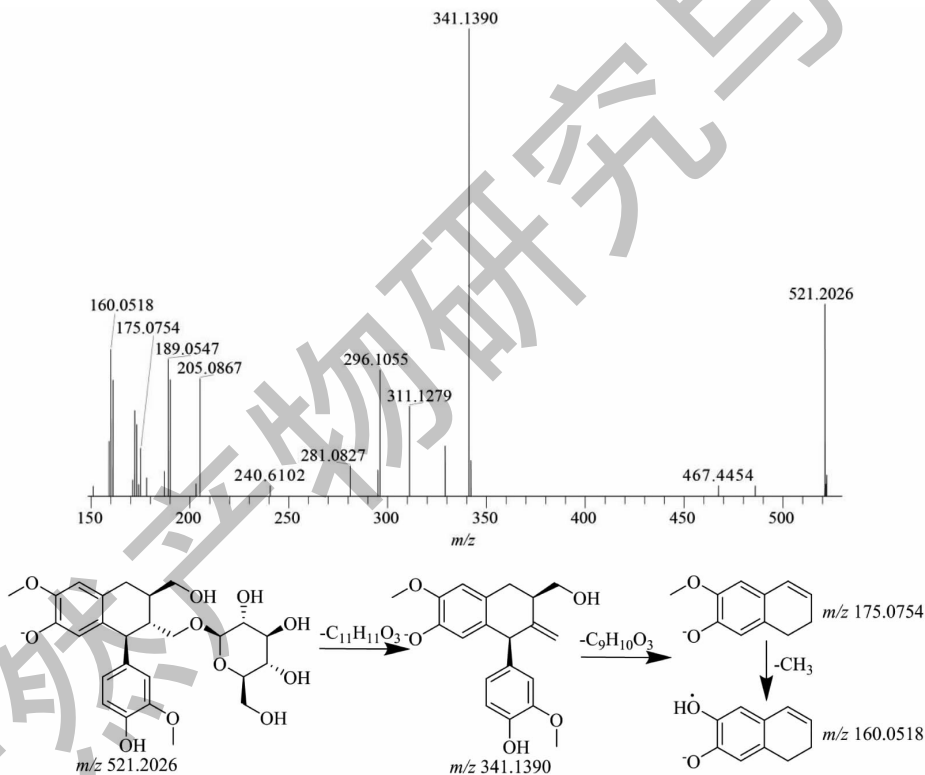


图 4 (+)-异落叶松脂素-9- O - β -D-吡喃葡萄糖苷可能的质谱裂解途径裂解示意图

Fig. 4 The possible mass spectrometry fragmentation pathways of (+)-isolariciresinol-9- O - β -D-glucopyranoside

2.1.3 黄酮类

黄酮类的基本骨架为 $C_6-C_3-C_6$ 化合物,根据结构特点分为简单黄酮类和黄酮苷类。根据文献研究^[16],广东紫珠的黄酮类成分容易丢失 CH_3 、 H_2O 、 CO 、 CO_2 ,且 C 环易发生逆狄尔斯-阿德尔反应 (Diels-Alder, RDA),得到特征碎片离子 m/z 151 $[M-H]^-$ 和 m/z 153 $[M+H]^+$ 。根据这些特征,鉴

定出 25 个黄酮类成分。以化合物 **35** (黄酮苷元) 和 **37** (黄酮苷) 为例分析黄酮类成分的质谱裂解规律。

黄酮苷元类主要为黄酮、黄酮醇,在结构中常被羟基、甲基和甲氧基等基团取代。化合物 **35** ($t_R = 11.50$ min) 负离子模式下准分子离子峰 m/z 285.0401 $[M-H]^-$,推测其分子式为 $C_{15}H_{10}O_6$,准分子离子峰脱去 CO_2 (m/z 44) 得到碎片离子 m/z

241.050 2。随后 C₁-C₃ 化学键发生 RDA 裂解,得到碎片离子 m/z 151.002 5 和 133.028 3。正离子模式下准分子离子峰 m/z 287.054 2 [M + H]⁺, 准分子离子峰脱去 H₂O (m/z 18) 得到碎片离子 m/z 269.044 7, 碎片离子 m/z 269.044 7 再脱去 CO (m/z

28) 获得 m/z 241.048 4 碎片。最后发生 RDA 裂解得到 m/z 153.017 7 的碎片离子。该化合物的保留时间、质谱碎片离子信息与木犀草素一致,故化合物 **35** 鉴定为木犀草素,其二级质谱图与推测的质谱裂解途径见图 5。

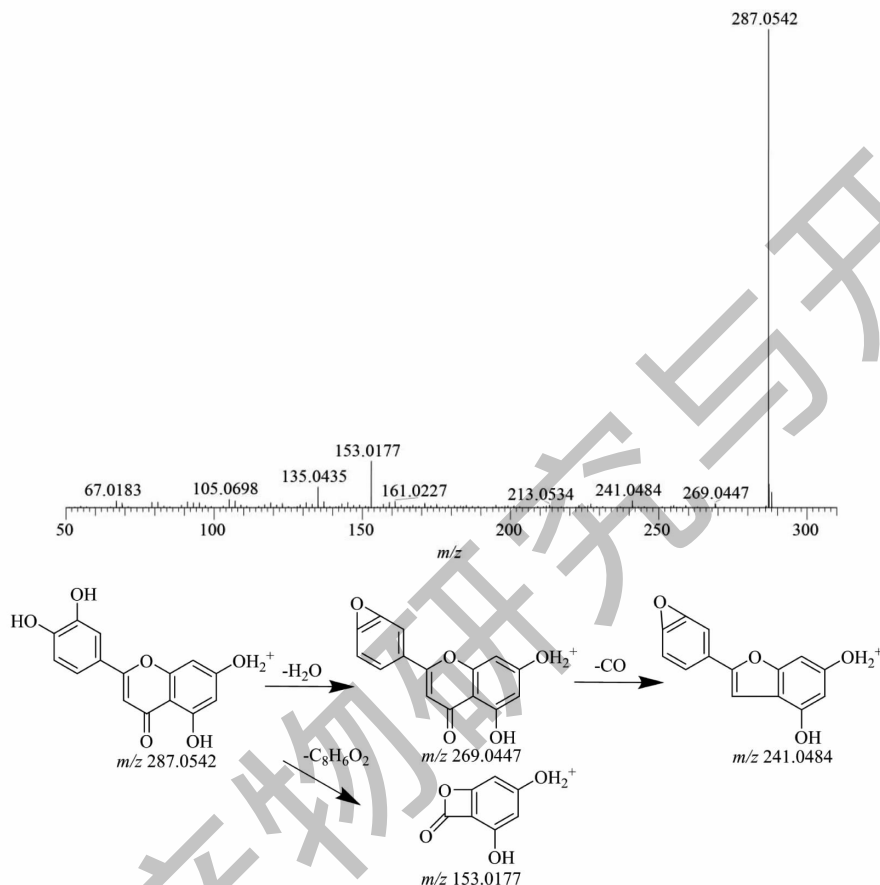


图 5 木犀草素可能的质谱裂解途径裂解示意图

Fig. 5 The possible mass spectrometry fragmentation pathways of luteolin

黄酮苷类多以木犀草素、芹菜素作为母核,结构中的葡萄糖等糖基易先脱去,再进一步脱去 H₂O, CO₂ 等中性小分子,最后在 C 环上发生 RDA 裂解。化合物 **37** ($t_R = 11.63$ min) 负离子模式下准分子离子峰 m/z 447.092 7 [M-H]⁻, 推测其分子式为 C₂₁H₂₀O₁₁, 其二级质谱图与推测的质谱裂解途径见图 6。准分子离子峰脱去 C₆H₁₀O₅ (m/z 162) 得到碎片离子 m/z 285.040 0, 碎片离子 m/z 285.040 0 分别脱去 H₂O (m/z 18) 和 CO₂ (m/z 44) 得到碎片离子 m/z 267.029 0 和 241.049 9, 最后进行 RNA 裂解得到碎片离子 m/z 151.002 5 和 133.028 3。正离子模式下准分子离子峰 m/z 449.108 3 [M + H]⁺, 其碎片离子 m/z 287.053 9、269.044 0、241.048 1 和

153.017 6 与木犀草素有相同的碎片离子峰,通过与对照品保留时间和二级质谱碎片比对,确定化合物 **37** 为木犀草苷。

根据裂解规律、结合文献二级质谱碎片离子和对照品比对,鉴定化合物 **29、35、54、69、71、73、74、76、82、84、91、94、98、99、102、103** 为黄酮苷元类,化合物 **1、21、23、27、34、37、51、58、66** 为黄酮苷类。

2.1.4 萜类化合物

广东紫珠的萜类化合物成分众多,包括单萜、二萜和三萜。从广东紫珠中共鉴定出 23 个萜类成分,包括 4 个单萜,4 个二萜和 15 个三萜。以化合物 **28、78、79、92、106** 为例分析萜类成分可能的裂解途径。

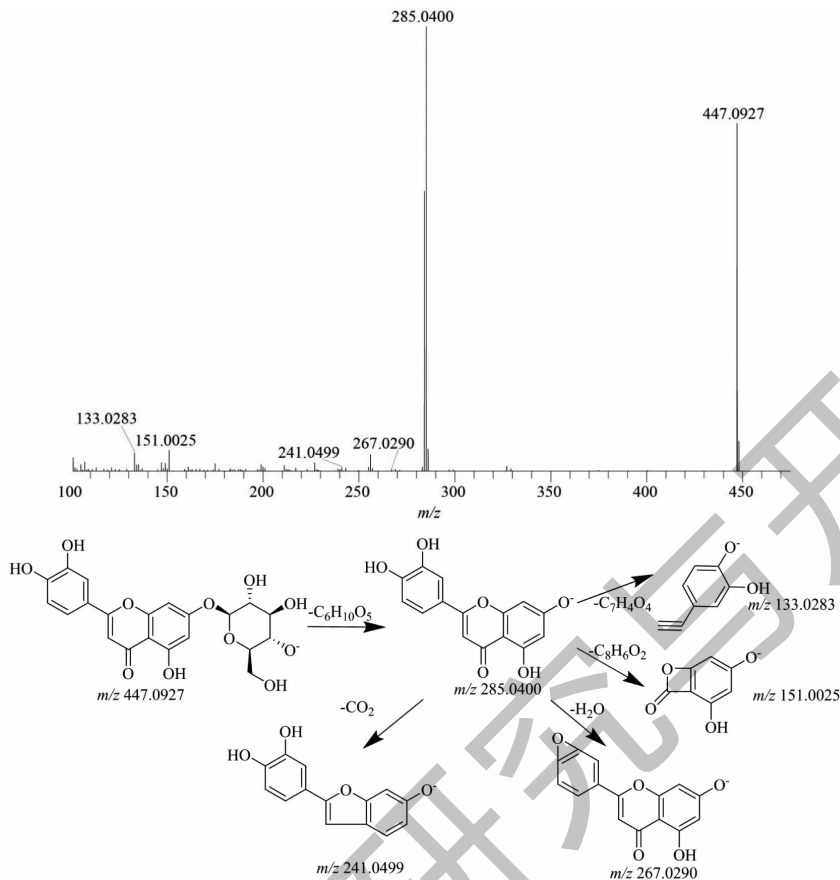


图 6 木犀草苷可能的质谱裂解途径裂解示意图

Fig. 6 The possible mass spectrometry fragmentation pathways of luteoloside

2.1.4.1 单萜

从广东紫珠的单萜类共鉴定出 4 个单萜 (**20**、**28**、**38**、**79**), 其中 3 个为环烯醚萜。广东紫珠的单萜类化合物结构中常含有糖基, 发生裂解时易脱去糖基产生碎片离子, 苷元进一步丢失 H_2O 、 CO 、 CH_2O_2 形成碎片离子, 无糖基结构单萜则易直接脱去 H_2O 、 CO 、 CH_2O_2 形成碎片离子。

化合物 **28** ($t_{\text{R}} = 10.41$ min) 正离子模式下准分子离子峰 m/z 197.1164 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 经拟合推测其化学式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3$, 其二级质谱图与推测的质谱裂解途径见图 7。准分子离子峰脱去 H_2O (m/z 18) 得到碎片离子 m/z 179.1060, 碎片离子 m/z 179.1060 分别脱去 H_2O (m/z 18) 和 CO (m/z 28) 得到碎片离子 m/z 161.0956 和 151.1112。与文献^[9] 二级碎片核对一致, 化合物 **28** 鉴定为黑麦草内酯。

化合物 **79** ($t_{\text{R}} = 15.68$ min) 负离子模式下准分子离子峰 m/z 591.2073 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 经拟合推测其化学式为 $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{13}$ 。准分子离子峰脱去 $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7$ (m/z

m/z 412) 得到碎片离子 m/z 179.0341, 碎片离子 m/z 179.0341 脱去 H_2O (m/z 18) 得到碎片离子 m/z 161.0234, 碎片离子 m/z 161.0234 再脱去 CO (m/z 28) 得到 m/z 133.0283。与文献^[9] 报道的特征碎片离子一致, 鉴定化合物 **79** 为 6-*O*-反式-肉桂酰环烯醚萜 B。

2.1.4.2 二萜

二萜类化合物以松香烷型二萜为主, 根据裂解规律和特征碎片离子信息鉴定出化合物 **78**、**80**、**81**、**90** 为二萜类。二萜类化合物的裂解规律一般为先将结构中的糖基脱去, 失去糖基后的苷元或者不含糖基的化合物易脱去 H_2O 、 CH_3 、 CH_2O 等形成碎片离子。化合物 **78** ($t_{\text{R}} = 15.55$ min) 负离子模式下准分子离子峰为 m/z 657.3124 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 推测其分子式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_{14}$ 。准分子离子峰脱去 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ (m/z 162) 得到碎片离子 m/z 495.2596, 碎片离子 m/z 495.2596 脱去 CH_2O (m/z 30) 得到碎片离子 m/z 465.2484, 碎片离子 m/z 465.2484 再次脱去 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$

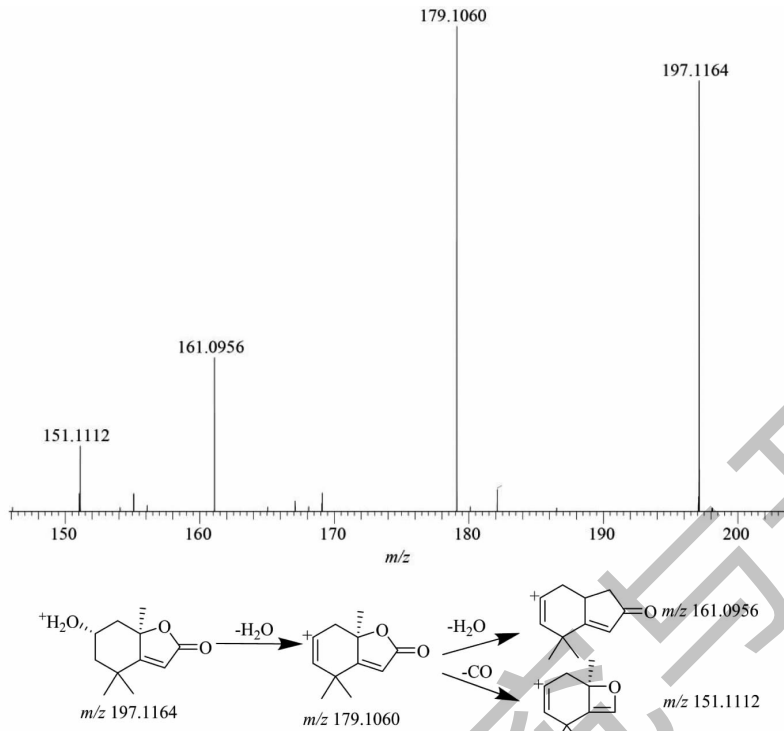
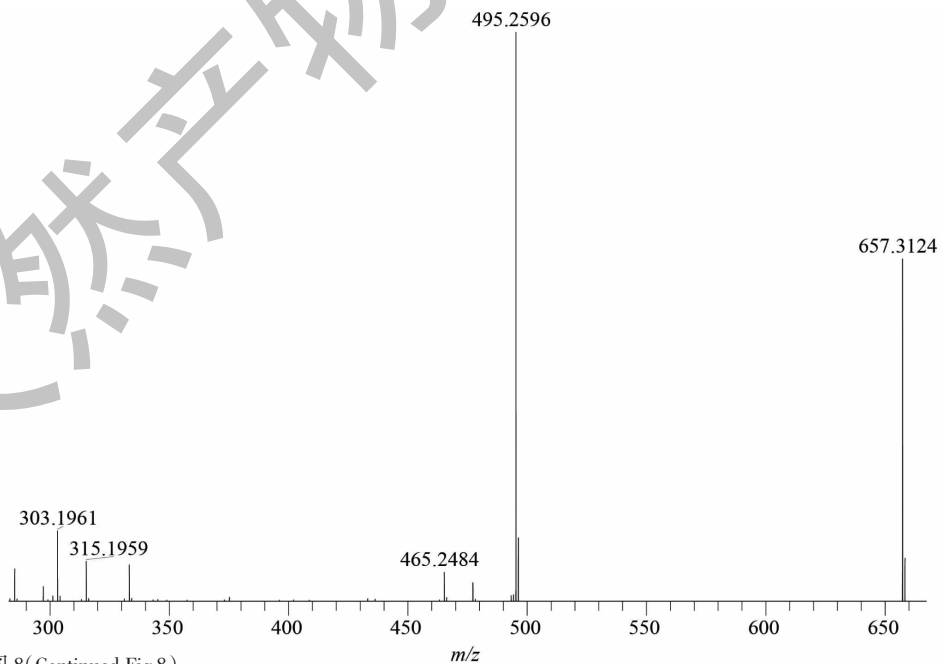


图7 黑麦草内酯可能的质谱裂解途径裂解示意图

Fig. 7 The possible mass spectrometry fragmentation pathways of loliolide

(m/z 162) 得到 m/z 303.1961 的碎片离子。根据裂解规律结合文献^[9] 比对, 化合物 **78** 鉴定为 3,12-*O*- β -D-二葡萄糖吡喃基 11,16-二羟基松香醇-8,11,

13-三烯, 其二级质谱图和推测的质谱裂解途径见图 8。



续图 8(Continued Fig.8)

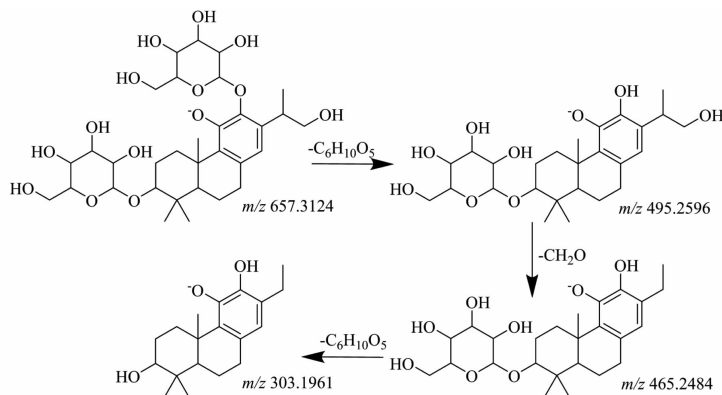


图 8 3,12-*O*- β -D-二葡萄糖吡喃基 11,16-二羟基松香醇-8,11,13-三烯可能的质谱裂解途径裂解示意图

Fig. 8 The possible mass spectrometry fragmentation pathways of 3,12-*O*- β -D-diglucoopyranosyl-11,16-dihydroxyabieta-8,11,13-triene

2.1.4.3 三萜

广东紫珠中的三萜类常以熊果酸和齐墩果酸作为基本骨架,结构主要以五环三萜为主。熊果酸和齐墩果酸仅在 C19/C20 位上的甲基不同,因结构相似而有相似的裂解规律,其母离子常丢失 H_2O 、 CO_2 、 CO_2H 、 CO_2H_2 形成碎片离子。根据质谱裂解规律、结合文献报道数据和对照品比对,鉴定 15 个三萜类化合物(72、83、87、89、92、95~97、100、101、104~108)。以化合物 92 和 106 为例分析三萜类成

分可能的裂解途径。

化合物 92 ($t_R = 20.45$ min) 在负离子模式下准分子离子峰 m/z 487.3428 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_{30}H_{48}O_5$ 。准分子离子峰丢失 H_2O (m/z 18) 得到碎片离子 m/z 469.3319, 碎片离子 m/z 469.3319 丢失 CO_2H_2 (m/z 46) 得到碎片离子 m/z 423.3268。与文献^[13]报道的特征碎片一致,鉴定化合物 92 为阿江榄仁酸,其二级质谱图和推测的质谱裂解途径见图 9。

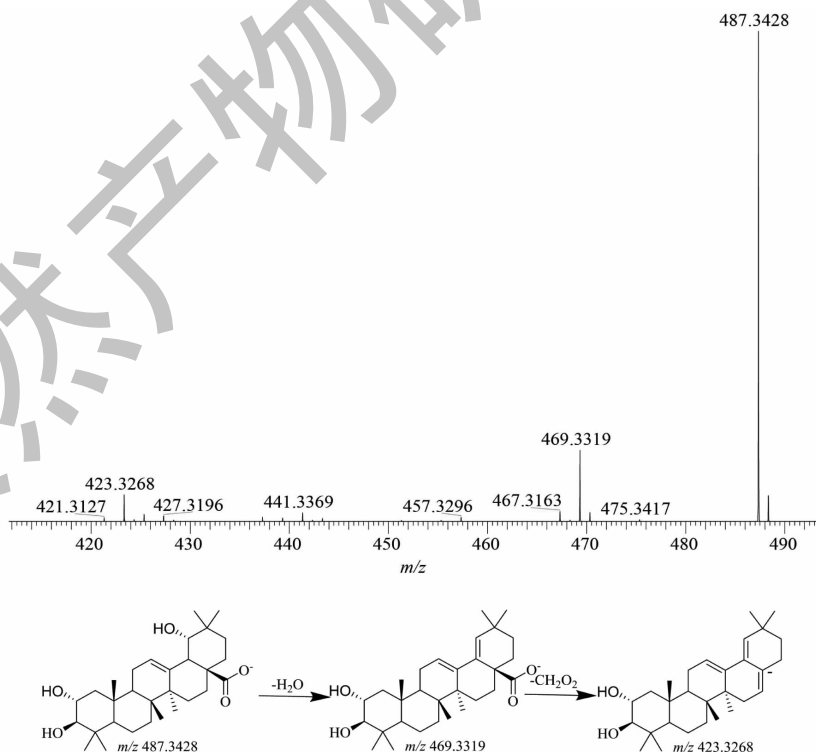


图 9 阿江榄仁酸可能的质谱裂解途径裂解示意图

Fig. 9 The possible mass spectrometry fragmentation pathways of arjunolic acid

化合物 **106** ($t_R = 33.63$ min) 负离子模式下准分子离子峰 m/z 455.352 8 $[M-H]^-$, 推测其分子式为 $C_{30}H_{48}O_3$ 。准分子离子峰脱去 C_2H_8O (m/z 48) 得到碎片离子 m/z 407.332 6。正离子模式下准分子离子峰 m/z 457.367 9 $[M+H]^+$, 准分子离子峰脱去 H_2O (m/z 18) 得到碎片离子 m/z 439.355 8, 碎片离子 m/z 439.355 8 脱去 CO_2H_2 (m/z 46) 得到 m/z 393.351 1。此外, 环结构还易断裂形成碎片离子 m/z 203.178 8 和 191.179 3。通过与对照品比对, 确定化合物 **106** 为熊果酸。

2.1.5 有机酸和有机醛

广东紫珠的有机酸和有机醛类成分主要为苯甲酸和苯甲醛及其衍生物, 从广东紫珠中共鉴定出 10 个有机酸 (**2~4, 8, 11, 18, 26, 85, 86, 93**) 和 2 个有机醛 (**1, 14**)。通过比较文献发现^[17], 有机酸和有机醛容易丢失 CH_3 、 H_2O 、 CO 、 CO_2 单元。

化合物 **8** ($t_R = 7.36$ min) 正离子模式下准分子离子峰 m/z 165.054 4 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_9H_8O_3$ 。准分子离子峰脱去 CO (m/z 28) 得到碎片离子 m/z 137.059 4; 准分子离子峰脱去 H_2O (m/z 18) 得到碎片离子 m/z 147.043 6, 碎片离子 m/z 147.043 6 脱去 CO 得到碎片离子 m/z 119.048 9, 碎片离子 m/z 119.048 9 再脱去 CO 得到碎片离子 m/z 91.054 4, 与文献^[9]的特征碎片相匹配, 鉴定化合物 **8** 为 4-羟基肉桂酸。

化合物 **14** ($t_R = 8.56$ min) 正离子模式下准分子离子峰 m/z 153.054 1 $[M+H]^+$, 推测其分子式为 $C_8H_8O_3$ 。准分子离子峰脱去 H_2O (m/z 18) 得到碎片离子 m/z 135.115 6; 准分子离子峰脱去 CO (m/z 28) 得到碎片离子 m/z 125.059 4, 与文献^[9]报道的香草醛特征碎片一致, 鉴定化合物 **14** 为香草醛。

2.1.6 其他

除了上述的几类化合物外, 根据文献^[8, 11, 12] 质谱裂解规律和碎片离子信息, 鉴定出了 4 个成分, 分别为 sucrose 1'-benzoate (**10**)、苄基 6-*O*-(6-脱氧- α -*L*-甘露糖基)- β -*D*-吡喃葡萄糖糖苷 (**22**)、苄基-4'-羟基-苄基-3'-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖糖苷 (**64**)、3,5-二甲氧基-4-甲基苄醇 (**75**)。

2.2 细胞活性研究

2.2.1 广东紫珠对 BV2 细胞活力的影响

本研究通过 CCK8 法检测处理后 BV2 细胞活力的变化, 观察 CK 对 BV2 细胞活力的影响。将分别向 BV2 细胞加入不同浓度的 CK。与 Con 组相

比, 当 CK 浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率降至 79.87%, 一定程度上影响了细胞存活率。而在 50~400 $\mu\text{g/mL}$ CK 给药组对 BV2 细胞活力无显著影响 ($P > 0.05$) (见图 10)。后续实验选择了无明显毒性作用的浓度范围 50~400 $\mu\text{g/mL}$ 进行体外活性研究。

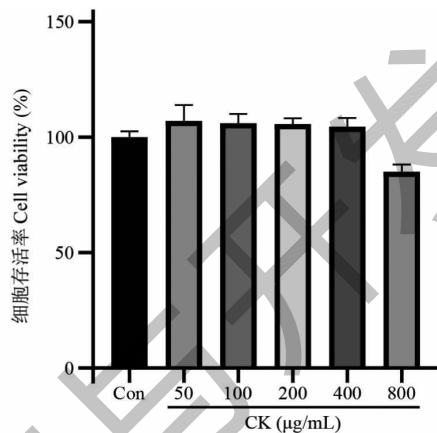


图 10 CK 对 LPS 诱导的 BV2

细胞活力影响 (Mean \pm SEM, $n = 5$)

Fig. 10 Effects of different concentrations of CK treatment on cell viability of BV2 cells (Mean \pm SEM, $n = 5$)

2.2.2 广东紫珠对 LPS 诱导的 BV2 细胞中 NO 含量的影响

使用 Griess 试剂测量了释放到培养基中的亚硝酸盐, 研究 CK 对 LPS 诱导的 BV2 细胞 NO 水平的影响。如图 11 所示, 与 Con 组相比, Mod 组的 NO

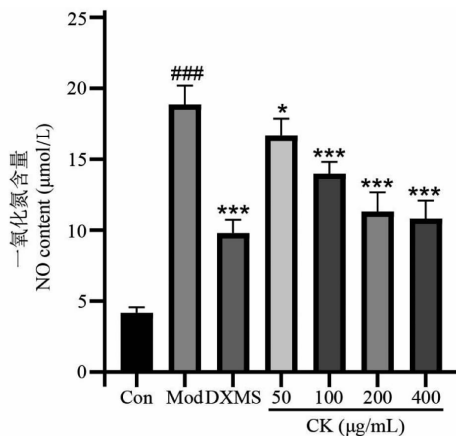


图 11 CK 对 LPS 诱导的 BV2 细胞中

NO 水平的影响 (Mean \pm SEM, $n = 3$)

Fig. 11 Effects of different concentrations of CK on the levels of NO LPS-induced BV2 cells (Mean \pm SEM, $n = 3$)

注: 与 Con 组相比, $### P < 0.001$; 与 Mod 组相比, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$, 下同。Note: Compared with Con, $### P < 0.001$; Compared with Mod, $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$, the same below.

含量显著升高($P < 0.05$),增加了 $12.97 \mu\text{mol/L}$ 。不同浓度 CK 给药组呈剂量依赖显著抑制了 NO 的释放($P < 0.05$)。结果表明,广东紫珠抑制 LPS 诱导的 BV2 释放 NO。

2.2.3 广东紫珠对 LPS 诱导 BV2 细胞 IL-1 β 和 IL-6 含量的影响

采用 ELISA 检测 CK 对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症因子的影响。如图 12 所示,与 Con 相比,Mod 组 IL-1 β 和 IL-6 含量显著升高($P < 0.05$)。100 ~ 400 $\mu\text{g/mL}$ CK 预处理后,显著降低了 IL-1 β 和 IL-6 的含量($P < 0.05$)。结果表明,广东紫珠降低 LPS

诱导的 BV2 炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 的水平。

2.2.4 广东紫珠对 LPS 诱导 BV2 细胞 ROS 水平的影响

ROS 的产生被认为是神经炎症疾病的一个重要因素,通过 ROS 试剂盒测定了细胞内 ROS 的水平(见图 13)。与 Con 组相比,Mod 组的 ROS 信号峰向右移动,表达水平显著升高($P < 0.05$)。200、400 $\mu\text{g/mL}$ CK 给药组细胞的 ROS 信号峰向左移动,表达水平显著降低($P < 0.01$)。结果表明,广东紫珠降低 LPS 诱导的 BV2 细胞中 ROS 的水平。

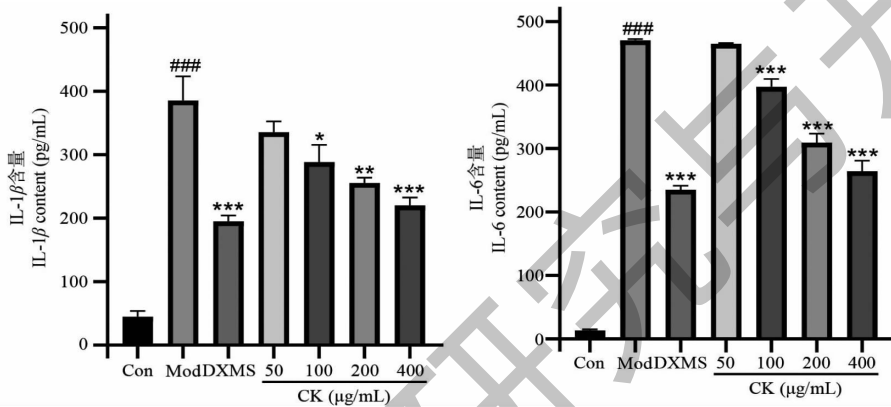


图 12 CK 对 LPS 诱导 BV2 细胞 IL-1 β 和 IL-6 含量的影响 (Mean \pm SEM, $n = 3$)

Fig. 12 Effect of CK on the content of IL-1 β and IL-6 in LPS-induced BV2 cells (Mean \pm SEM, $n = 3$)

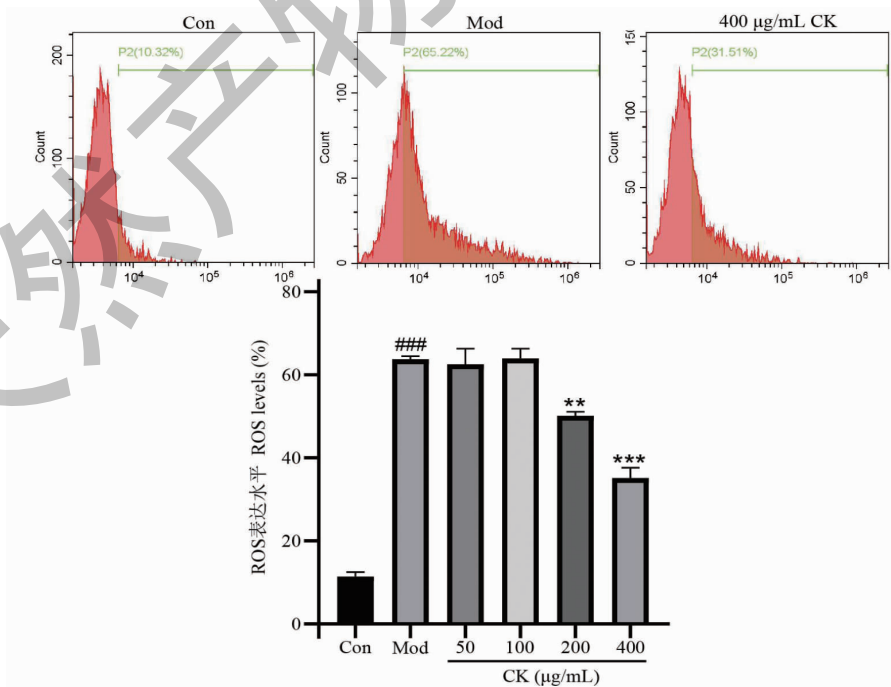


图 13 CK 对 LPS 诱导的 BV2 细胞中 ROS 水平的影响 (Mean \pm SEM, $n = 3$)

Fig. 13 Effects of different concentrations of CK on ROS levels in LPS-induced BV2 cells (Mean \pm SEM, $n = 3$)

2.2.5 广东紫珠对 LPS 诱导 BV2 细胞形态的影响

通过免疫荧光观察 CK 对 BV2 细胞形态的影响。如图 14 所示,与 Con 组相比,Mod 组细胞显示出较大的胞体,细胞突触变粗变短,呈现显著的“阿米巴状”特点,其特征为“活化”状态。200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CK 预处理后,一定程度逆转了其形态学变化。结果表明,广东紫珠抑制 LPS 诱导 BV2 细胞的激活。

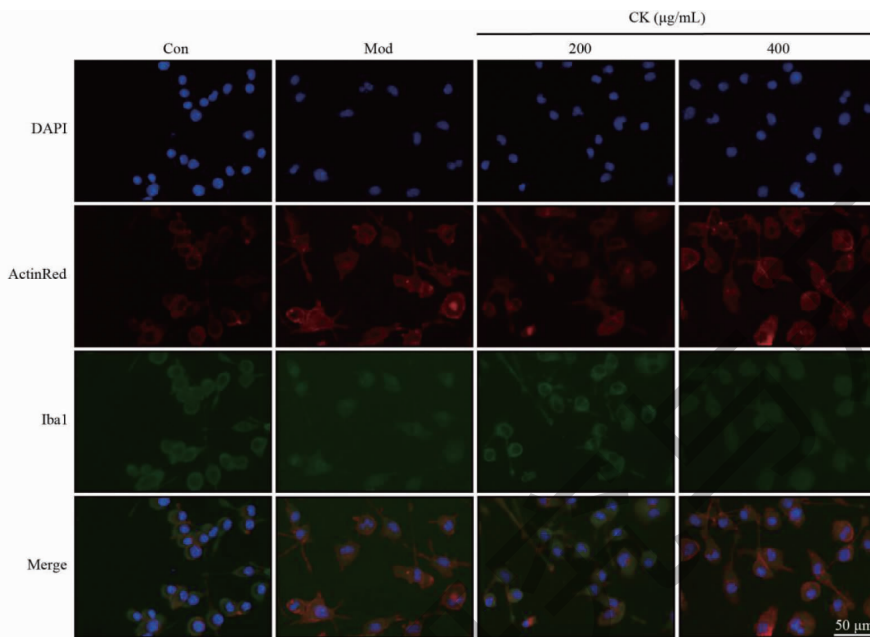


图 14 CK 对 LPS 诱导 BV2 细胞形态的影响

Fig. 14 Effect of CK on the morphology of LPS-induced BV2 cells

3 讨论与结论

本研究通过对广东紫珠提取工艺中提取时间(1、2 h)和提取次数(2 次、3 次)进行考察,确定提取方法。最终选择了提取条件为料液比 1:10、提取时间 2 h、提取温度 90 $^{\circ}\text{C}$ 、提取次数 3 次。在制备样品过程中时,考察生药量浓度 0.5 ~ 2.5 g/mL ,发现 2.5 g/mL 生药量浓度所得到的谱图信息更加丰富。此外,还考察了水-乙腈、水-甲醇和不同浓度的甲酸水-甲醇等不同流动相、Hypersil GOLD 和 Accucore C_{18} 色谱柱对谱图峰分离度的影响。发现所用条件色谱图中能够分离出更多的色谱峰,因此选择了上述条件完成对广东紫珠水提物的检测。

神经炎症作为阿尔兹海默病等神经退行性疾病的主要特征之一,对其进行靶向治疗是一项重要的策略^[18,19]。大脑中持续的免疫反应和稳态失衡产生的慢性炎症可能引发神经元细胞损伤,过度的炎症反应最终加剧神经退行性疾病的发展^[20]。在神经炎症的病理过程中,NO 的产生会导致不同程度的神经元损伤,同时细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 ROS 直接参与了病理过程,促使神经元细胞发生凋亡^[21]。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁中的有毒物质,常被用

来诱导小胶质细胞的激活,从而构建研究神经炎症的模型^[22]。因此,在本研究中利用 LPS 的 BV2 细胞模型评价广东紫珠的神经保护活性。

来诱导小胶质细胞的激活,从而构建研究神经炎症的模型^[22]。因此,在本研究中利用 LPS 的 BV2 细胞模型评价广东紫珠的神经保护活性。

目前,对广东紫珠的化学成分和生物活性研究仍不完善。为深入挖掘广东紫珠的药效物质基础,本研究在现有研究基础上,通过优化提取条件、调整流动相和质谱条件,首次运用 UPLC-QE Plus-MS/MS 分析技术对广东紫珠水提物的化学成分进行了全面解析。参考之前研究中预测的质量标志物,如金石蚕苷、连翘酯苷 B 等,进行参数优化,获得信息丰富、分离度高的谱图。从广东紫珠表征出 108 个成分,包括 34 个苯乙醇苷类、10 个苯丙素类、25 个黄酮类、23 个萜类、10 个有机酸类、2 个有机醛类和 4 个其他类化合物,其中 21 个化合物首次在该植物中被鉴定得到,并分析了代表性成分的裂解规律。体外药效研究结果显示,广东紫珠展现出显著的神经保护作用,有效抑制了 LPS 诱导的神经细胞炎症和氧化应激。本研究利用 UPLC-QE Plus-MS/MS 技术系统性分析广东紫珠的物质基础,并通过构建神经炎症模型深入探索其神经保护活性,弥补了现阶段研究的空白,为未来药效物质基础研究和新药开

发提供了重要参考和依据。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 44.
- 2 Liu YL, Yang GD, Ma Y, et al. *Callicarpa kwangtungensis* Chun of Chemical components, pharmacological activity research progress and prediction analysis of Q-Marker [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2024, 42: 238-250.
- 3 Huang YM, Yuan H JJ, Chen P, et al. Terpenoids from *Callicarpa kwangtungensis* and their anti-inflammatory activity [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34: 50-56.
- 4 Kong FG, Jiang X, Wang RC, et al. Forsythoside B attenuates memory impairment and neuroinflammation via inhibition on NF- κ B signaling in Alzheimer's disease [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17: 305.
- 5 Li S, Sun XC, Li Y, et al. Natural NO inhibitors from the leaves of *Callicarpa kwangtungensis*: structures, activities, and interactions with iNOS [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27: 670-674.
- 6 Xu J, Li S, Sun XC, et al. Diterpenoids from *Callicarpa kwangtungensis* and their NO inhibitory effects [J]. Fitoterapia, 2016, 113: 151-157.
- 7 He ZJ, Li XQ, Wang Z, et al. Protective effects of luteolin against amyloid beta-induced oxidative stress and mitochondrial impairments through peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanism in Alzheimer's disease [J]. Redox Biol, 2023, 66: 102848.
- 8 Gong J, Miao H, Sun XM, et al. Simultaneous qualitative and quantitative determination of phenylethanoid glycosides and flavanoid compounds in *Callicarpa kwangtungensis* Chun by HPLC-ESI-IT-TOF-MS/MS coupled with HPLC-DAD [J]. Anal Methods, 2016, 8: 6323-6336.
- 9 Yang LP, Zhai YY, Chen XY, et al. Rapid identification of chemical compositions in *Callicarpa kwangtungensis* Chun by ultra-high-performance liquid chromatography with Q Exactive hybrid quadrupole orbitrap high-resolution accurate mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2020, 43: 2487-2494.
- 10 Yang Y, Shao JJ, Xu JK, et al. Study on the active components and mechanism of *Callicarpa nudiflora* against H1N1 based on UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS, network pharmacology and experimental validation [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2024, 36: 279-292.
- 11 Shi YT, Wu CY, Chen YH, et al. Comparative analysis of three *Callicarpa* herbs using high performance liquid chromatography with diode array detector and electrospray ionization-trap mass spectrometry method [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 75: 239-247.
- 12 Wu YS, Shi L, Liu XG, et al. Chemical profiling of *Callicarpa nudiflora* and its effective compounds identification by compound-target network analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 182: 113110.
- 13 Feng SX, Wang LL, Deng L, et al. Systematic characterisation of the effective components of five *Callicarpa* species with UPLC-Q-TOF-MS and evaluation of their anti-hyperuricaemic activity [J]. Nat Prod Res, 2022, 37: 1662-1667.
- 14 Jia QQ, Zhang HY, Hu P, et al. Chemical profiling and quality evaluation of *Callicarpa nudiflora* from different regions in China by UPLC-QTOF-MS fingerprint [J]. Chem Biodivers, 2022, 19: e202200444.
- 15 Chen ML, Chang WQ, Zhou JL, et al. Comparison of three officinal species of *Callicarpa* based on a biochemome profiling strategy with UHPLC-IT-MS and chemometrics analysis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 145: 666-674.
- 16 Li S. Studies on the Chemical Constituents of *Callicarpa kwangtungensis* Chun [D]. Tianjin: Nankai University (南开大学), 2016.
- 17 Sun XM, Liao QF, Liu GH, et al. Simultaneous determination of three phenylethanoid glycosides from *Callicarpae Caulis* et *Folium* in rat plasma by LC-MS/MS and its application to PK study [J]. Bioanalysis, 2013, 5: 1883-1895.
- 18 Heneka M T, Carson M J, El Khoury J, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. Lancet Neurol, 2015, 14: 388-405.
- 19 Newcombe E A, Camats-Perna J, Silva M L, et al. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease [J]. J Neuroinflamm, 2018, 15: 276.
- 20 Thakur S, Dhapola R, Sarma P, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current progress in molecular signaling and therapeutics [J]. Inflammation, 2022, 46: 1-17.
- 21 Calsolaro V, Edison P. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: current evidence and future directions [J]. Alzheimer's Dement, 2016, 12: 719-732.
- 22 Zhuang XY, Xiang XY, Grizzle W, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain [J]. Mol Ther, 2011, 19: 1769-1779.