

基于 UPLC-QTOF-MS/MS 的卷柏化学成分分析

温静^{1,2*}, 阎新佳^{3,4,5*}¹四川中医药高等专科学校药学院;²绵阳市中药资源开发利用重点实验室, 绵阳 621000;³西南民族大学 青藏高原研究院, 成都 610041;⁴四川省羌彝药用资源保护与利用技术工程实验室;⁵青藏高原民族药用资源保护与利用国家民委重点实验室, 成都 610225

摘要:利用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法(UPLC-QTOF-MS/MS)对中药卷柏的化学成分进行快速分析及鉴定。采用 Agilent Poroshell 120 SB-Aq(2.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.4 mL/min, 进样量为 3 μL ; 选择电喷雾离子源分别在正、负离子模式下扫描分析, 通过保留时间、精确相对分子质量和二级质谱裂解碎片, 对所得成分的主要色谱峰进行鉴定。结果显示从卷柏中共鉴定出 54 个化学成分, 主要包括双黄酮及黄酮类 15 个、炔酚类 12 个、酚酸类 10 个、苯丙素类 5 个、甾体类 2 个、萜类 2 个、氨基酸及肽类 2 个、酯类 2 个和其他类 4 个, 并首次探讨炔酚类成分的裂解规律。该研究建立的 UPLC-QTOF-MS/MS 方法可以快速准确且较全面地分析鉴定卷柏中的化学成分, 可为其质量控制及药效物质基础研究提供科学依据。

关键词: 卷柏; UPLC-QTOF-MS/MS; 双黄酮类; 炔酚类

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)10-1660-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.10.002

Chemical constituents of Selaginellae Herba based on UPLC-QTOF-MS/MS

WEN Jing^{1,2*}, YAN Xin-jia^{3,4,5*}¹School of Pharmacy, Sichuan College of Traditional Chinese Medicine;²Mianyang Key Laboratory of Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Mianyang 621000, China;³Institute of Qinghai-Tibetan Plateau, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;⁴Sichuan Provincial Qiang-Yi Medicinal Resources Protection and Utilization Technology Engineering Laboratory;⁵Tibetan Plateau Ethnic Medicinal Resources Protection and Utilization Key Laboratory of National Ethnic Affairs Commission of the People's Republic of China, Chengdu 610225, China

Abstract: Ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS) was employed to rapidly analyze and identify the chemical constituents of Selaginellae Herba. An Agilent Poroshell 120 SB-Aq (2.7 μm , 2.1 mm \times 100 mm) chromatographic column was used with acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution as the mobile phase in gradient elution, at a flow rate of 0.4 mL/min and an injection volume of 3 μL . The electrospray ion source was selected to scan analyze in both positive and negative ion modes. The main chromatographic peaks of the obtained constituents were identified through retention time, accurate relative molecular mass, and secondary mass spectrometry fragmentation. A total of 54 compounds were identified in Selaginellae Herba, including 15 biflavonoids and flavonoids, 12 selaginellins, ten phenolic acids, five benzenepropanoids, two steroids, two terpenoids, two amino acids and peptides, two esters, and four other categories. The UPLC-QTOF-MS/MS method established in this study can rapidly, accurately, and comprehensively analyze and identify the chemical constituents in Selaginellae Herba, providing a scientific basis for its quality control and pharmacological substance basis research.

Key words: Selaginellae Herba; UPLC-QTOF-MS/MS; biflavonoids; selaginellins

收稿日期: 2024-04-12 接受日期: 2024-09-02

基金项目: 四川省自然科学基金(面上)(2024NSFSC0706); 西南民族大学科研启动基金项目(RQD2022050); 四川中医药高等专科学校高层次人才科研启动经费资助项目(24ZRBS05)

* 通信作者 Tel: 86-28-89165778; E-mail: dachitu@yeah.net, yanxinjia@yeah.net

卷柏(*Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring) 为卷柏科(Selaginellaceae)卷柏属(*Selaginella*)植物,《中华人民共和国药典》2020年版记载卷柏(*Selaginellae Herba*)具有活血通经之功效,用于经闭痛经,癥痕痞块,跌扑损伤^[1]。卷柏化学成分多样,包

括黄酮、炔酚、苯丙素和环肽等^[2-5]。现代药理学研究表明,卷柏具有抗肿瘤、降血糖、抗菌、抗炎、抗真菌和抗氧化等药理作用^[6-9]。近期研究通过高效液相色谱-质谱联用技术对卷柏属植物的化学成分进行了深入分析。Li 等^[10]利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对深绿卷柏中的双黄酮部位进行了化学成分分析,鉴定出 14 个化合物,并通过网络药理学预测和实验验证,探讨了其治疗喉癌的潜在作用机制。Zou 等^[11]采用 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 方法对兖州卷柏进行了化学成分分析,共鉴定出 36 种成分,包括黄酮类、苯丙素和木脂素类等,其中儿茶素、圣草酚-7-*O*-葡萄糖苷等为首次从兖州卷柏中发现。卷柏药效物质主要包括 2 大类:双黄酮类和炔酚类化学成分^[1,8]。但炔酚类化学成分通过 MS 确认的研究未见文献报道。本研究在前期对卷柏化学成分研究的基础上^[2-7],建立了标准品库。因此,采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法(UPLC-QTOF-MS/MS)对卷柏的化学成分进行了全面、快速、准确地分析和鉴定具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

卷柏全草药材,采自黑龙江省尚志市,经沈阳药科大学吕重宁副教授鉴定为卷柏科卷柏属卷柏 *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring 的干燥全草。标本(ST-201904)储存于西南民族大学草地资源学院 221 实验室。

乙腈、甲醇(质谱纯,德国 Merck);甲醇(分析纯,美国 Fisher);甲酸(色谱纯,美国 Acros);屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏蒸馏水有限公司);27 个对照品分别为:apigenin-6, 8-di-C- β -D-glucopyranoside、(+)-pinoresinol、落叶松脂醇、moellenoside C、对乙氧基苯甲酸、tamariscin A、3,5,7-trimethoxy-4'-*O*- β -D-glucopyranoside、3,5,7-trimethoxyflavone-4'-*O*-[5'''-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-apiofuranoyl-(1''' \rightarrow 2'')] - β -D-glucopyranoside]、芹菜素、anemarchalconyn、3,5,7-trimethoxy-4'-hydroxyflavonol、穗花杉双黄酮、selaginellin、selaginellin V、selaginellin E、selaginellin A、selariscinin I、selariscinin J、selaginellin M、selaginellin U、diselaginellin A、咖啡酸、绿原酸、芦丁、apigenin-7-*O*- β -D-glucoside、槲皮素和扁柏双黄酮,均为实验室自制^[2-6],经 HPLC 面积归一化法测定其纯度均大于 98%。

1.2 仪器

安捷伦 G6545B UPLC-Q-ToF MS 质谱仪(美国安捷伦科技公司);F-040S 超声波清洗器(深圳市福洋科技集团有限公司);ME204E 电子天平(梅特勒-托利多国际有限公司);Thermo ST8R 离心机(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.3 供试品溶液的制备

称量卷柏药材粉末 0.3 g,放入 10 mL 锥形瓶中,加入 75% 甲醇 10 mL,密闭,摇匀,超声提取 30 min,用 0.22 μ m 滤膜过滤后,取续滤液,即得。

1.4 对照品溶液制备

分别称取标准品各 0.5 mg,加入 10 mL 甲醇溶解,超声摇匀,得到各对照品储备液,过滤,即得。

1.5 色谱条件

色谱柱:Agilent Poroshell 120 SB-Aq (2.7 μ m, 2.1 mm \times 100 mm);流速:0.4 mL/min;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:3 μ L。梯度洗脱条件:流动相由乙腈(A)和含 0.1% 甲酸的水(B)组成,梯度洗脱程序如下:0 ~ 10 min,5% \rightarrow 15% A;10 ~ 20 min,15% \rightarrow 30% A;20 ~ 30 min,30% \rightarrow 70% A;30 ~ 38 min,70% \rightarrow 95% A。

1.6 质谱条件

采用电喷雾离子源(Dual AJS ESI),离子扫描方式是正、负离子全扫描模式,毛细管电压:3500 v;干燥气温度:350 $^{\circ}$ C;干燥气流量:9 L/min;雾化器压力:45 psi;鞘流气温度:250 $^{\circ}$ C;鞘流气流量:11 mL/min;质量数扫描范围: m/z 50 ~ 1 500 Da;数据采集时间 38 min。

1.7 数据处理

通过广泛大量地查阅文献,收集整理文献中报道的关于卷柏属植物化学成分,相关信息进行卷柏数字化数据库的构建。“*Selaginella*”“*Selaginellaceae*”“*Selaginella tamariscina*”、“compound”“component”“卷柏属”“卷柏”“化学成分”等为关键词,搜索包含 Web of Science、SciFinder Scholar、PubMed、CNKI 和万方等各大数据库,统计卷柏属植物中的化学成分。利用 Excel 软件建立卷柏化学成分质谱数据库,该数据库包括化合物名称(name)、分子式(formula)、分子量(molecular weight)、碎片离子(fragment ion)等相关信息,并将其“.csv”文件导入 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 定性分析软件。对卷柏化学成分质谱数据库进行了建立,共总结出卷柏属植物中黄酮、炔酚、苯丙酸、甾体和

有机酸等各类化合物共计 215 个,包括了化合物名称、分子式、分子量和碎片离子等相关信息。在数据收集方面,方法参数设置如下:保留时间范围 0 ~ 38 min;质量范围 50 ~ 1 500 Da,质量误差限 0.05 Da。对质谱数据进行分析,使用 Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis 10.0 定性分析软件中的“identify”鉴定功能载入已选择的数据,利用软件进行数据分析。

2 结果

2.1 化学成分分析

采用 UPLC-QTOF-MS 对卷柏化学成分进行成分分析,对其进行(+) ESI 和(-) ESI 的全扫描,通过 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 软件进行数据处理。根据精确的准分子离子峰的质荷比(m/z)可以初步判断化合物的分子量和分子式。对

于有对照品的化合物,可以通过保留时间的对比及二级质谱相关信息进行结构鉴定;对于没有对照品的化合物,对比建立的卷柏化学成分数据库进行匹配,参考化合物裂解规律由碎片离子做进一步的验证。根据上述解析原则,结合对照品的数据,数据库检索和各级质谱信息对化学成分的结构进行推测。在正离子模式下共鉴定出 38 个化合物(见表 1),负离子模式下共鉴定了 17 个化学成分(见表 2),正、负离子模式下基峰离子流图见图 1。综合两种离子模式,除重合 1 个穗花杉双黄酮,从卷柏中共鉴定出 54 个化合物,包括双黄酮及黄酮类成分 15 个、炔酚类成分 12 个、酚酸类成分 10 个、苯丙素类成分 5 个、甾体类成分 2 个、萜类成分 2 个、氨基酸及肽类成分 2 个、酯类成分 2 个和其他类成分 4 个,化合物结构式见图 2 和图 3。

表 1 UPLC-QTOF-MS/MS 鉴定的卷柏化学成分(正离子模式)

Table 1 Chemical constituents in Selaginellae Herba by UPLC-QTOF-MS/MS in positive mode

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子 MS/MS fragmentation(m/z)
1	1.06	3-Deoxyguanosine	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	[M + H] ⁺	268.104 6	268.104 1	1.36	136.061 9, 73.028 8
2	1.12	Isoleucyl-alanine	$C_9H_{19}N_2O_3$	[M + H] ⁺	203.139 6	203.139 2	0.93	130.050 7, 84.044 4
3	1.83	红景天苷 Rhodiolside	$C_{14}H_{20}O_7$	[M + Na] ⁺	323.110 7	323.111 0	0.93	250.992 2, 215.009 1, 157.108 4
4	1.99	肉桂酸 Cinnamic acid	$C_9H_8O_2$	[M + NH ₄] ⁺	166.086 8	166.085 8	-0.15	103.055 0, 77.038 8
5	2.42	Sinensiol A	$C_{29}H_{32}O_8$	[M + NH ₄] ⁺	526.244 1	526.241 2	4.81	364.186 2, 235.143 3, 147.042 7
6	3.31	4-Methoxy cinnamic acid methyl ester	$C_{11}H_{12}O_3$	[M + H] ⁺	193.086 5	193.086 0	2.58	105.069 6, 133.064 2, 77.039 4
7	5.05	对羟基苯甲醇 <i>p</i> -Hydroxy-benzyl alcohol	$C_7H_8O_2$	[M + Na] ⁺	147.042 2	147.044 0	-1.20	119.049 2, 91.054 2, 56.941 8
8	5.09	丁香酸 Syringic acid	$C_9H_{10}O_5$	[M + H] ⁺	199.060 6	199.059 6	-4.82	140.046 3, 110.036 1, 77.038 2
9	7.17	Apigenin-6, 8-di-C- β -D-glucopyranoside *	$C_{27}H_{30}O_{15}$	[M + H] ⁺	595.166 3	595.167 6	1.73	457.112 5
10	7.76	(+)-Pinoresinol *	$C_{20}H_{22}O_6$	[M + H] ⁺	359.149 5	359.149 2	-0.83	341.136 8, 309.112 8, 278.091 9
11	7.87	落叶松脂醇 Lariciresinol *	$C_{20}H_{24}O_6$	[M + H] ⁺	361.165 1	361.164 2	-2.49	193.085 7, 163.075 8, 279.101 9
12	7.91	Moellenoside C *	$C_{26}H_{36}O_{12}$	[M + H] ⁺	563.210 4	563.209 6	-1.42	401.157 4, 233.080 1
13	10.03	对乙氧基苯甲酸 <i>p</i> -Ethoxybenzoic acid *	$C_9H_{10}O_3$	[M + H] ⁺	167.070 8	167.070 3	-2.99	78.046 4, 122.035 7, 151.038 2
14	10.69	Tamariscin A *	$C_{25}H_{31}N_7O_6$	[M + Na] ⁺	548.223 4	548.223 4	0	423.129 5, 379.174 4, 278.151 7, 141.113 0
15	10.97	Diferuloylspermidine	$C_{27}H_{35}N_3O_6$	[M + H] ⁺	498.260 4	498.260 2	0.7	322.212 7, 234.112 8, 177.054 2

续表 2 (Continued Tab. 1)

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子 MS/MS fragmentation(m/z)
16	12.61	3,5,7-Trimethoxyflavone-4'-O- β -D-glucopyranoside*	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₁	[M+H] ⁺	491.155 3	491.155 3	0	339.102 8,123.115 0
17	13.21	Sinensiol F	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	[M+H] ⁺	375.144 4	375.144 5	1.95	283.097 5,203.073 3、 167.070 3,121.064 8
18	13.63	3,5,7-Trimethoxyflavone-4'-O-[5'''-O-p-coumaroyl- β -D-apiofuranoyl-(1''' \rightarrow 2'')- β -D-glucopyranoside]*	C ₃₈ H ₄₀ O ₁₇	[M+Na] ⁺	791.216 3	791.214 4	-2.40	351.082 6,504.786 2、 463.124 8
19	15.26	3,5,7-Trimethoxy-4'-hydroxyflavone*	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	[M+H] ⁺	329.102 4	329.102 1	-0.91	263.073 2,296.067 8、 131.050 5
20	15.89	Selaginellin U-1	C ₃₄ H ₂₆ O ₆	[M+H] ⁺	531.180 8	531.179 1	-1.03	367.132 2,273.091 5、 121.027 3
21	16.94	Selariscinin E	C ₃₀ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	541.113 5	541.112 3	2.03	161.058 4,421.055 3
22	17.42	穗花杉双黄酮 Amentoflavone*	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	539.097 8	539.095 9	-3.52	521.680 1,403.042 1、 377.061 4,347.057 0 419.128 1,121.028 3、
23	17.99	Selaginellin*	C ₃₄ H ₂₄ O ₅	[M+H] ⁺	513.170 2	513.168 8	-3.10	297.091 7,378.124 1、 199.075 2
24	18.06	Selaginellin V*	C ₃₅ H ₂₆ O ₆	[M+H] ⁺	543.180 8	543.181 0	0.36	151.039 0,419.128 0、 449.137 5
25	18.06	Isoselagintamarlin A	C ₃₃ H ₂₂ O ₅	[M+H] ⁺	499.154 5	499.153 9	0.05	405.112 9,199.076 1
26	20.59	Selaginellin E*	C ₃₆ H ₂₈ O ₆	[M+H] ⁺	557.196 4	557.196 4	0	483.161 0,525.169 2
27	21.02	Selaginellin A*	C ₃₃ H ₂₂ O ₄	[M+H] ⁺	483.159 6	483.159 0	-1.24	389.118 0,271.077 0、 199.075 3
28	21.22	Selariscinin I*	C ₃₆ H ₂₆ O ₆	[M+H] ⁺	555.180 8	555.180 7	-0.18	495.161 6,401.118 2、 121.028 1
29	21.49	Selariscinin J*	C ₃₅ H ₂₄ O ₆	[M+H] ⁺	541.165 1	541.163 3	-3.32	149.024 4,325.084 6、 429.112 9
30	21.78	Selaginellin M*	C ₃₅ H ₂₆ O ₅	[M+H] ⁺	527.185 8	527.185 2	-0.94	135.044 3,347.052 7、 431.657 8
31	22.15	Selaginellin U*	C ₃₄ H ₂₄ O ₄	[M+H] ⁺	497.175 3	497.172 8	5.00	403.130 3,309.088 8、 199.074 0
32	23.29	α -亚麻酸 α -Linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M+NH ₄] ⁺	296.259 0	296.257 5	-5.00	135.117 8,121.100 6、 81.069 4
33	23.43	Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	[M+H] ⁺	279.159 6	279.158 4	2.24	149.022 7,81.070 2、 57.070 6
34	24.04	3 α ,7 β ,12 α ,24-Tetrahydroxy-24-methyl-5 β -cholestan-26-oic acid	C ₂₈ H ₄₈ O ₆	[M+NH ₄] ⁺	498.379 5	498.379 7	2.10	394.306 0,236.149 0
35	25.02	Diselaginellin A*	C ₆₈ H ₄₆ O ₉	[M+H] ⁺	1 007.322 01	1 007.315 5	6.45	518.141 9,431.122 8、 389.175 6
36	25.47	4'-O-Methylamentoflavone	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₀	[M+H] ⁺	553.113 5	553.114 3	1.80	521.078 2,447.052 5、 284.064 1
37	26.36	17 β -Hydroxy-7 α -methylandrosta-4-en-3-one propionate	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	[M+H] ⁺	359.258 6	359.258 5	-0.27	255.210 8,161.132 1、 67.054 3
38	27.82	棕榈酰胺 Hexadecanamide	C ₁₆ H ₃₃ NO	[M+H] ⁺	256.264 0	256.264 3	1.17	57.069 2,69.070 5、 102.090 8,172.168 6

注: * 通过对照品对比鉴定的化合物。

Note: * Compounds identified by comparison with reference.

表 2 UPLC-QTOF-MS/MS 鉴定的卷柏化学成分 (负离子模式)

Table 2 Chemical constituents in Selaginellae Herba by UPLC-QTOF-MS/MS in negative mode

序号 No.	t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	离子模式 Ion mode	理论值 Theoretical value (m/z)	实测值 Measured value (m/z)	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 碎片离子 MS/MS fragmentation (m/z)
1	1.25	麦芽糖 Maltose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	$[M + HCOO]^-$	387.113 9	387.114 9	2.58	341.110 1, 89.023 9
2	1.34	5-Hydroxyferulate	$C_{10}H_{10}O_5$	$[M + HCOO]^-$	255.050 5	255.051 1	1.56	58.006 1, 72.993 1, 165.055 3
3	2.03	Phenylpropionic acid	$C_9H_{10}O_2$	$[M-H]^-$	149.060 3	149.060 3	0	121.028 4
4	2.44	<i>p</i> -Hydroxyphenylacetaldehyde	$C_8H_8O_2$	$[M-H]^-$	135.045 4	135.044 6	-5.90	108.020 7, 63.149 3
5	3.95	咖啡酸 Caffeic acid*	$C_9H_8O_4$	$[M-H]^-$	179.034 4	179.036 1	0.94	135.046 1, 107.051 1, 79.056 3
6	4.41	绿原酸 Chlorogenic acid*	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.087 3	353.087 9	1.69	191.056 1, 149.059 0
7	6.48	芦丁 Rutin*	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M-H]^-$	609.145 6	609.147 8	3.61	489.105 5, 409.238 0, 345.531 3
8	7.27	Kaempferol 3-sophoroside-7-rhamnoside	$C_{33}H_{40}O_{20}$	$[M-H]^-$	755.203 5	755.204 2	0.92	593.150 8, 269.045 7, 431.098 7
9	11.81	Apigenin-7- <i>O</i> - β -D-glucoside*	$C_{21}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	431.097 8	431.099 7	4.40	268.037 5, 245.188 6
10	13.19	槲皮素 Quercetin*	$C_{15}H_{10}O_7$	$[M-H]^-$	301.034 8	301.035 9	3.65	151.003 9, 121.029 3, 178.999 9
11	14.84	芹菜素 Apigenin*	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	269.045 0	269.045 4	1.48	128.143 6, 180.254 3, 213.026 6
12	14.99	Anemarchalconyn*	$C_{15}H_{10}O_3$	$[M-H]^-$	237.055 2	237.055 8	2.53	209.061 8, 167.889 9, 131.442 3
13	17.43	穗花杉双黄酮 Amentoflavone*	$C_{30}H_{18}O_{10}$	$[M-H]^-$	537.082 2	537.083 7	2.79	417.061 7, 375.051 8, 331.061 4
14	21.88	扁柏双黄酮 Hinokiflavone*	$C_{30}H_{18}O_{10}$	$[M-H]^-$	537.082 2	537.083 2	1.86	375.049 1, 417.060 7, 284.034 2
15	24.48	白果素 Bilobetin	$C_{31}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	551.097 8	551.098 5	1.27	465.096 5, 283.022 8, 196.536 2
16	26.38	3 β , 16 β -12-Oleanene-3, 16, 23, 28-tetrol	$C_{30}H_{50}O_4$	$[M + HCOO]^-$	519.368 9	519.369 3	0.77	415.322 7, 371.330 3
17	28.10	齐墩果酸 Oleanolic acid	$C_{30}H_{48}O_3$	$[M-H]^-$	455.352 5	455.353 6	2.41	377.208 8, 345.960 1, 261.878 0

注: * 通过对照品对比鉴定的化合物。

Note: * Compounds identified by comparison with reference.

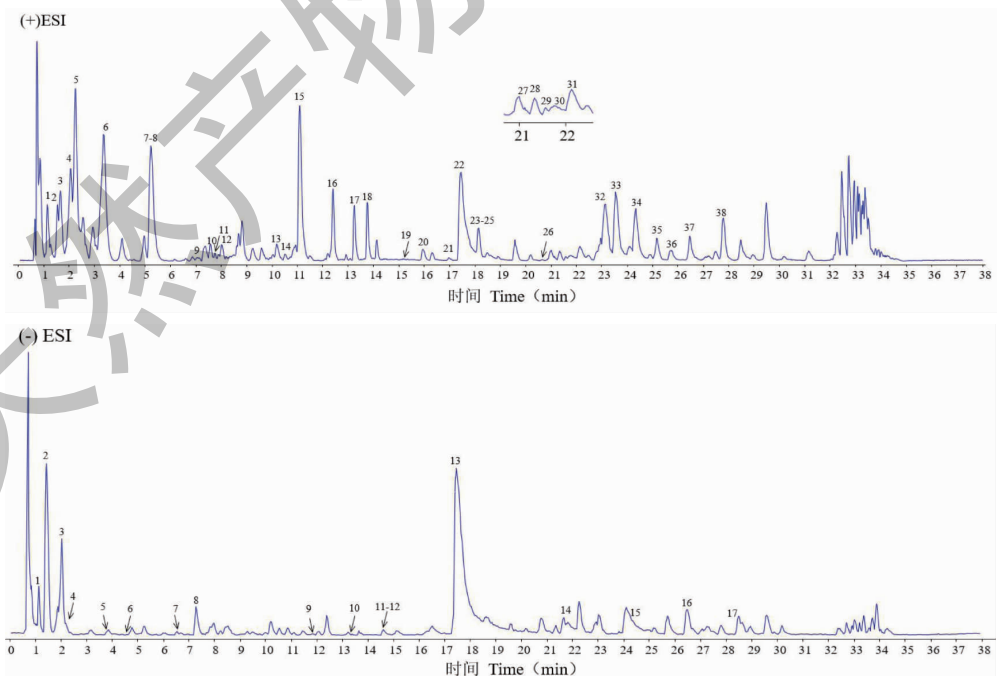


图 1 正、负离子模式下卷柏的基峰离子流色谱图

Fig. 1 The base peak chromatogram of Selaginellae Herba in positive and negative ion mode

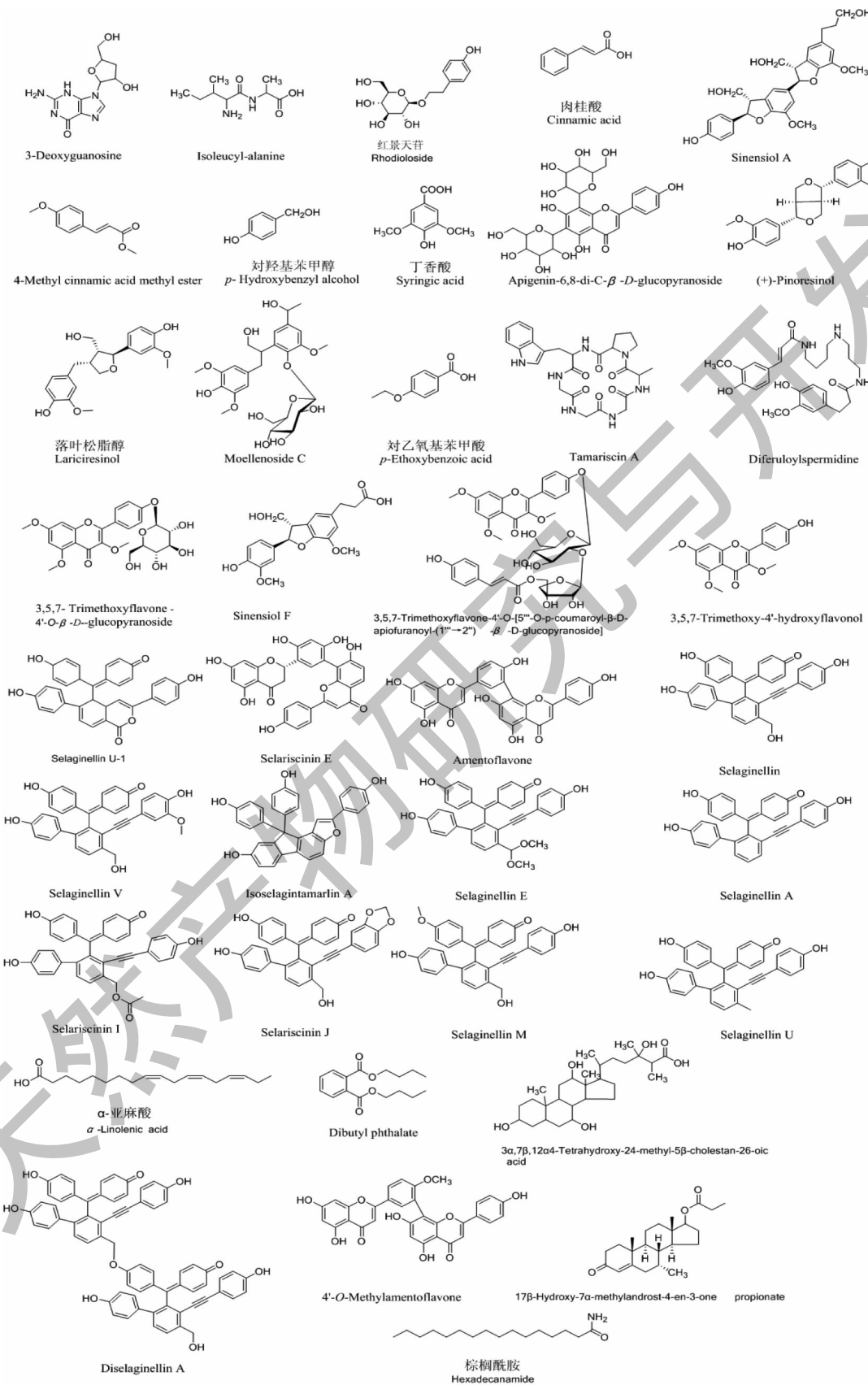


图 2 正离子模式下鉴定卷柏中化学成分的结构式

Fig. 2 Structures of identification of chemical constituents in Selaginellae Herba by UPLC-QTOF-MS/MS in positive mode

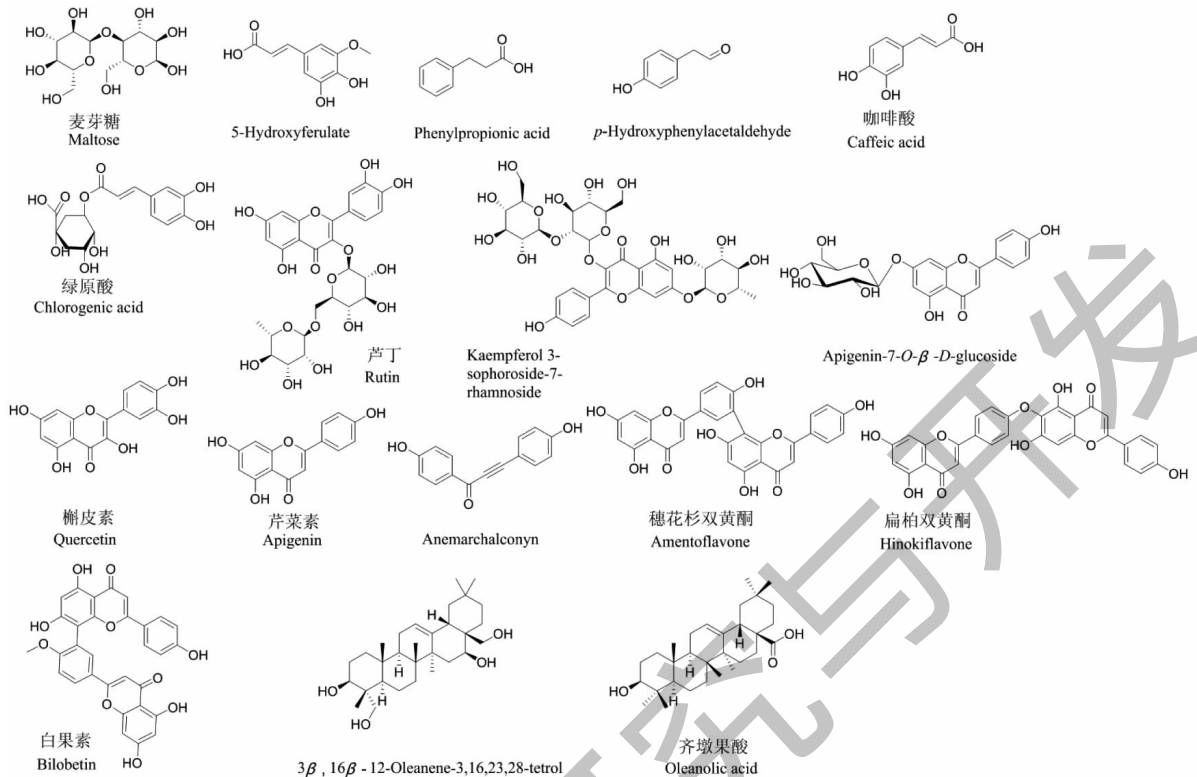


图3 负离子模式下鉴定卷柏中化学成分的结构式

Fig. 3 Structures of identification of chemical constituents in Selaginellae Herba by UPLC-QTOF-MS/MS in negative mode

2.2 双黄酮类化合物的质谱裂解规律分析

卷柏中的双黄酮类主要有两种类型: C-C 键连接(如穗花杉双黄酮); C-O-C 键连接(如扁柏双黄酮)。不同点以 C-C 键不发生断裂, 其中一个黄酮作为取代基; 以 C-O-C 键首先发生断裂, 然后黄酮片段发生 C 环的 I 项裂解和 II 项裂解^[12-14]。

穗花杉双黄酮的主要碎片离子 (m/z) 为: 521.680 1、403.042 1、377.061 4、347.057 0。[M + H]⁺ 离子 m/z 539.095 9 丢失 1 分子 H₂O 产生 m/z 521.680 1, 随后发生 RDA 裂解, 产生 m/z 403.042 1 碎片, 为二级质谱图中的基峰, 它进一步连续脱去 CO 产生 m/z 347.057 0 碎片。[M + H]⁺ 离子 m/z 539.097 8 发生穗花杉双黄酮 II 部分 C 环裂解及 RDA 裂解产生碎片 m/z 377.061 4, 是二级谱图中的次强峰, 然后脱去 C₂H₂O 和 CO 得到 m/z 307.061 2, m/z 153.016 4 碎片为黄酮 C 环裂解碎片, 可能的质谱裂解途径见图 4。

扁柏双黄酮的主要碎片离子 (m/z) 为: 271.056 8、286.045 3、242.051 9、153.015 1。扁柏双黄酮裂解过程与穗花杉双黄酮有很大区别, 与两个双黄酮

结构有关。穗花杉双黄酮是以 C-C 连接两个黄酮单元, 而扁柏双黄酮的两个黄酮单元以 C-O-C 连接, 较易开裂, 所以扁柏双黄酮的二级质谱碎片都是从 C-O 连接处断裂产生的。在扁柏双黄酮的二级图谱中, [M + H]⁺ 离子 m/z 539.093 6 发生 C-O 连接处断裂, 产生 m/z 286.045 3 或者 m/z 271.056 8 碎片, 随后产生奇电子离子 m/z 270.050 4; 再进一步脱去 1 分子 CO 产生奇电子离子 m/z 242.051 9; [M + H]⁺ 离子 m/z 539.093 6 也可发生 RDA 裂解, 产生 m/z 153.015 1 碎片离子, 可能的质谱裂解途径见图 4。由穗花杉双黄酮和扁柏双黄酮的质谱裂解过程可发现, 双黄酮类化合物与黄酮类化合物裂解规律较为相同, 都会发生 C 环的 I 项裂解和 II 项裂解, 然后失去 H₂O、CO 等小分子, 可对卷柏中黄酮类成分进行的结构推测。

2.3 炔酚类化合物的质谱裂解规律分析

卷柏中炔酚类化合物在正离子模式下具有良好的信号响应, 一般以 [M + H]⁺ 为主。主要是脱掉酚羟基 (m/z 93 Da) 得到 [M - C₆H₄OH]⁺ 的片段。如 selaginellin 准分子离子峰为 m/z 513.168 8 [M + H]⁺,

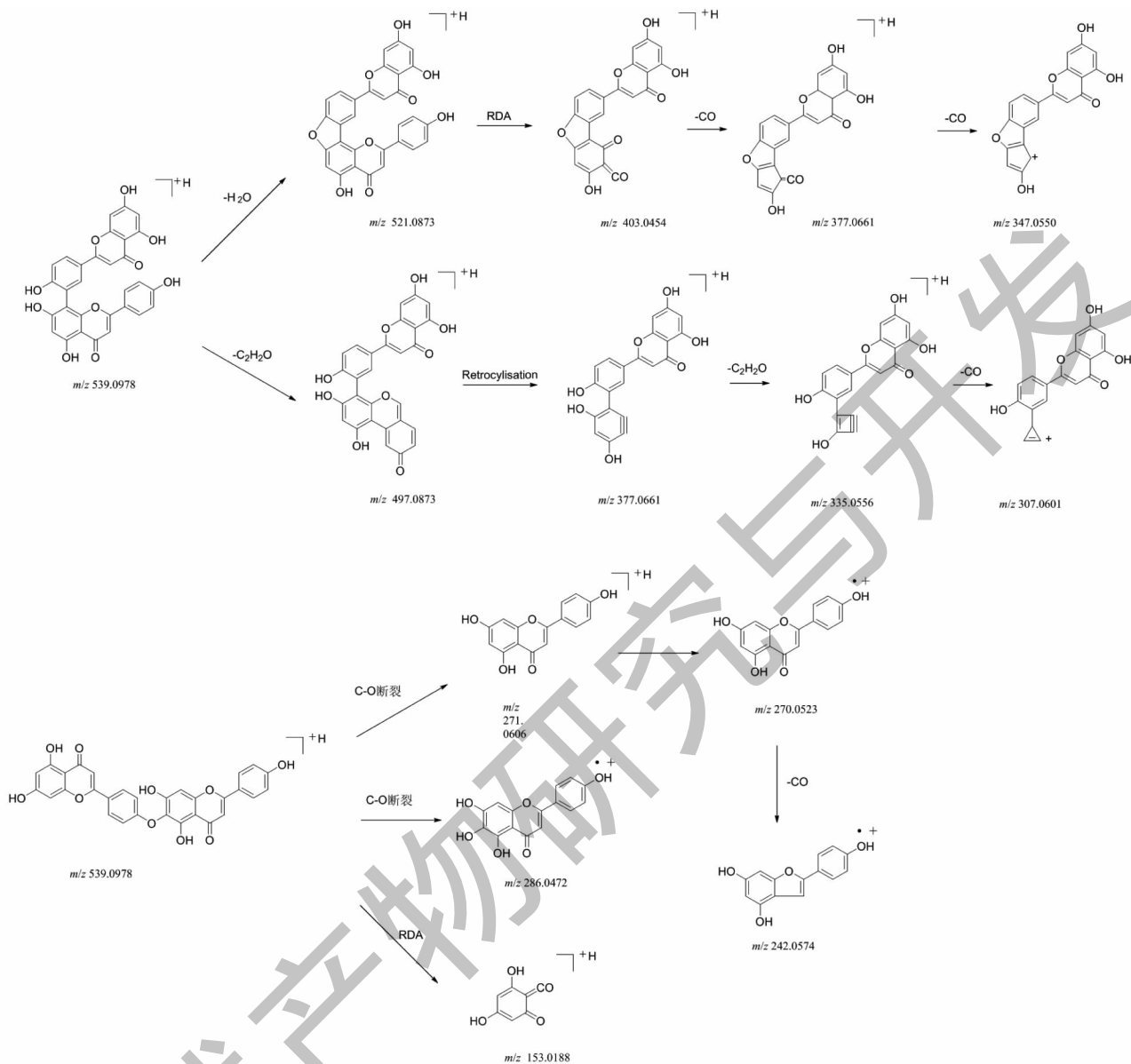


图4 穗花衫双黄酮和扁柏双黄酮的裂解途径

Fig. 4 The cleavage pathways of amentoflavone and hinokiflavone

其丢失 C_6H_4OH 片段产生 m/z 419.1281 $[M-C_6H_4OH]^+$; isoselaginamarlin A 准分子离子峰为 m/z 499.1539 $[M+H]^+$, 其丢失 C_6H_4OH 片段产生 m/z 405.1129 $[M-C_6H_4OH]^+$; selaginellin A 准分子离子峰为 m/z 483.1590 $[M+H]^+$, 其丢失 C_6H_4OH 片段产生 m/z 389.1180 $[M-C_6H_4OH]^+$ 。有的黄酮类化合物会进一步失去 m/z 392 Da 片段, 如 selaginellin、selaginellin V、selaginellin M 和 selariscinin J 等, 其他黄酮类化合物会失去 H_2O 、 CO 、 CH 和 CH_2OH 等小分子片段, 可对卷柏提取物中黄酮类成分进行的结构推测。

selaginellin 在正离子模式下, 准分子离子峰为

m/z 513.1698 $[M+H]^+$, 其首先发生简单裂解失去苯酚片段, 然后环合产生碎片离子 m/z 419.1281, 随后进一步失去苯酚片段, 产生碎片离子 m/z 325.0257, 随后又失去 1 分子 CO 产生碎片离子 m/z 297.0917; 碎片离子 m/z 419.1281 可重排生成 m/z 121.0283 碎片离子片段; 准分子离子峰 m/z 513.1698 $[M+H]^+$ 亦可发生简单裂解, 产生碎片离子 m/z 199.0752, 进一步 α 断裂产生碎片离子 m/z 107.0487; 准分子离子峰 m/z 513.1698 $[M+H]^+$ 失去苯酚乙炔基可产生碎片离子 m/z 378.1241, 因此 selaginellin 可能的裂解途径如图 5 所示。

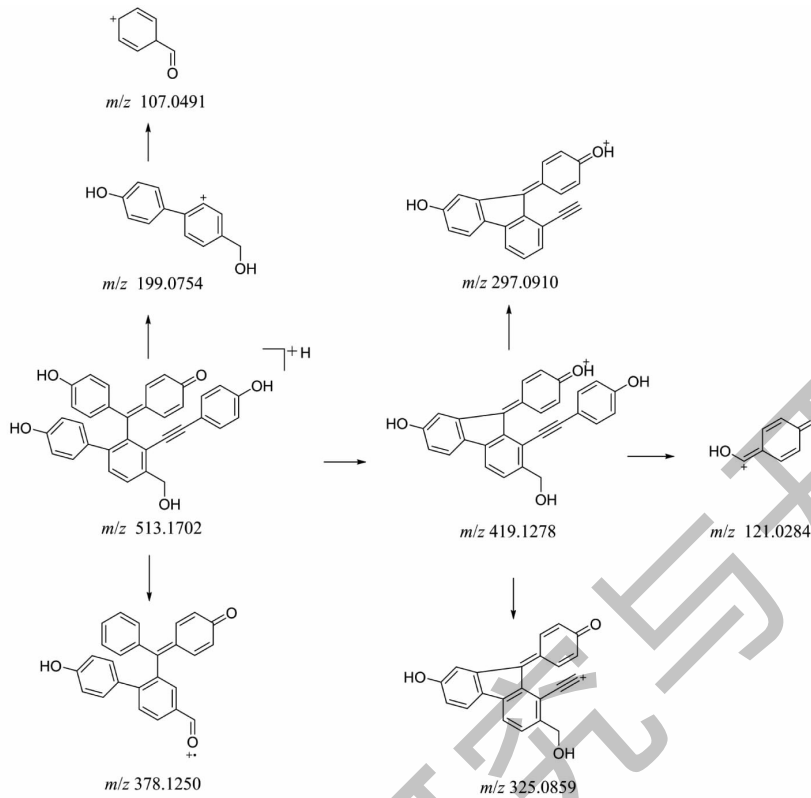


图5 炔酚的裂解途径

Fig. 5 The cleavage pathway of selaginellins

3 讨论与结论

通过查阅文献建立了卷柏化学成分质谱数据库,共总结出卷柏属植物中黄酮、炔酚、苯丙酸、甾体和有机酸等各类化合物共计 215 个,包括了化合物名称、分子式、分子量和碎片离子等相关信息,对比自建 27 个标准品的保留时间、质谱信息,建立了更快速有效的 UPLC-QTOF-MS/MS 方法,共鉴定出 54 个化合物,包括:15 个双黄酮及黄酮类、12 个炔酚类、10 个酚酸类、5 个苯丙素类、2 个甾体类、2 个萜类、2 个氨基酸及肽类、2 个酯类和 4 个其他类。其中,首次报道了 12 个炔酚类成分 UPLC-QTOF-MS/MS 测试方法,归纳总结了双黄酮类和炔酚类成分质谱特征离子、裂解过程和规律。综上所述,该技术具有分离效率高、分析速度快、灵敏度高优点,为卷柏药材的质量控制,以及后续阐明其物质基础提供了详实的数据支撑。

参考文献

1 State 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; 237.

2 Wen J, Sha DM, He XY, et al. A new cyclic peptide from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring [J]. J Asian Nat Prod Res, 2022, 24: 1169-1176.

3 Wen J, Liu Y, Zhang SS, et al. Two new selariscinins from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring [J]. J Asian Nat Prod Res, 2021, 23: 675-680.

4 Yan XJ, Wen J, Song Y, et al. A new cyclotide from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring [J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2022, 47: 4391-4394.

5 Deng B, Hou BQ, Nie CD, et al. Isolation and identification of flavonoids from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring [J]. Chin J Pharm Chem(中国药物化学杂志), 2022, 32: 300-304.

6 Zheng X, Wen J, Li WL, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring [J]. Int J Pharm Res(国际药学研究杂志), 2020, 47: 698-702.

7 Wen J, Sha DM, He XY, et al. Selaginellin derivatives from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring and evaluation for anti-breast cancer activity [J]. Phytochemistry, 2024, 217: 113919.

8 Wei L, Gui HT, Sheng Y, et al. Selaginellins from the genus *Selaginella*: isolation, structure, biological activity, and syn-

- thesis[J]. Nat Prod Rep, 2021, 38, 822-842.
- 9 Cao Y, Yao Y, Liu WD, et al. Synergistic effect of selaginellin *in vitro* on azoles against *Candidasis*[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 1596-1600.
- 10 Li YY, Wang SS, Sefidi F, et al. Mechanism of treating laryngeal cancer by deep green *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring rich in flavonoids; a study based on UPLC-Q-TOF-MS combined with network pharmacology and experimental verification[J]. Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志), 2023, 43: 2248-2259.
- 11 Zou J, Zhou JC, Long HP, et al. Analysis of chemical constituents of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring from Yanzhou by UPLC-ESI-Q-TOF-MS[J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2018, 40: 2334-2337.
- 12 Yin CY, Zhang C, Sun MQ. Mass spectrometric fragmentation pathways of three *Ginkgo biloba* flavonoids using HPLC-Q-TOF MS[J]. J Chin Mass Spectrom (质谱学报), 2020, 41: 57-65.
- 13 Zhang YX. Study on the material basis of Wen-Luo-Fang efficacy based on liquid chromatography-mass spectrometry [D]. Beijing: Peking Union Medical College (北京协和医学院), 2011.
- 14 Wang FQ, Jiang KZ, Li ZG. Purification and identification of genistein in *Ginkgo biloba* leaf extract[J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2007, 25: 509-513.

《天然产物研究与开发》青年编委会

青年编委(以姓氏笔划为序)

Members

王 扣	王红兵	戈惠明	尹文兵	尹 胜	吕兆林
WANG Kou	WANG Hongbing	GE Huiming	YIN Wenbing	YIN Sheng	LYU Zhaolin
刘相国	孙昊鹏	孙桂波	李良成	李国友	邱 莉
LIU Xiangguo	SUN Haopeng	SUN Guibo	LI Liangcheng	LI Guoyou	QIU Li
汪海波	沐万孟	张炳火	张德武	陈益华	林昌俊
WANG Haibo	MU Wammeng	ZHANG Binghuo	ZHANG Dewu	CHEN Yihua	LIN Changjun
欧阳杰	易华西	罗应刚	周 文	胡友财	袁 涛
OUYANG Jie	YI Huaxi	LUO Yinggang	ZHOU Wen	HU Youcai	YUAN Tao
夏永刚	高慧敏	唐金山	黄胜雄	韩秀珍	韩淑燕
XIA Yonggang	GAO Huimin	TANG Jinshan	HUANG Shengxiong	HAN Xiuzhen	HAN Shuyan
曾克武	蓝蔚青	廖晨钟	薛永波		
ZENG Kewu	LAN Weiqing	LIAO Chenzhong	XUE Yongbo		