

# 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和 HPLC 的广东产广地龙鲜、干品主要化学成分分析

胡小勤<sup>1,4†</sup>, 蒙丹<sup>2†</sup>, 曾学文<sup>1\*</sup>, 廖承谱<sup>3\*</sup>, 赵威<sup>4</sup>, 丁雪菲<sup>4</sup>

<sup>1</sup>金华高等研究院, 金华 321013; <sup>2</sup>广西生态工程职业技术学院, 柳州 545004;

<sup>3</sup>浙江大学金华研究院, 金华 321299; <sup>4</sup>广西中医药大学, 南宁 530200

**摘要:**比较广东产的鲜、干广地龙化学成分差异,测定广地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的含量,建立广地龙质量评价标准。采用超高效液相色谱-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术分析鲜、干广地龙中主要化学成分,高效液相色谱法(HPLC)测定鲜、干广地龙次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的含量。结果表明,通过文献及实验室建立的数据库比对,干广地龙解析得56个化合物,其中11种游离氨基酸类,16种有机酸类,核苷类9种,9种二肽类及环二肽类,11种含氮类及其他类;鲜广地龙解析得到48个化合物,其中11种游离氨基酸类,17种有机酸类,10种核苷类,8种二肽类及环二肽类,2种含氮类及其他类。次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶分离效果较好,标准曲线在线性范围线性良好( $r=0.9999$ ),平均加样回收率在98.36%~99.82%,相对标准偏差在0.25%~3.1%。本实验采用的UPLC-Q-TOF-MS/MS技术为鉴定鲜、干广地龙化学成分提供快速、高效的定性分析方法,HPLC法建立简单且快速、准确地测定次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶定量方法。该研究为鲜、干广地龙的化学成分研究以及质量控制提供科学依据。

**关键词:**广地龙;超高效液相串联质谱法;高效液相色谱法;鲜品;干品;成分分析

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)12-2051-13

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.12.007

## Analysis of the main chemical components in fresh and dried *Pheretima aspergillum* from Guangdong by UPLC-Q-TOF-MS/MS and HPLC

HU Xiao-qin<sup>1,4†</sup>, MENG Dan<sup>2†</sup>,

ZENG Xue-wen<sup>1\*</sup>, LIAO Cheng-pu<sup>3\*</sup>, ZHAO Wei<sup>4</sup>, DING Xue-fei<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Jinhua Advanced Research Institute, Jinhua 321013, China; <sup>2</sup>Guangxi Ecological Engineering Vocational and Technical College, Liuzhou 545004, China; <sup>3</sup>Jinhua Institute of Zhejiang University, Jinhua 321299, China;

<sup>4</sup>Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China

**Abstract:** This study aims to compare the chemical composition differences between fresh and dried *Pheretima aspergillum* produced in Guangdong and to establish quality evaluation standards by determining the contents of hypoxanthine, xanthine, and uracil. Ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) was used to analyze the primary chemical components in both fresh and dried samples, while high-performance liquid chromatography (HPLC) was employed to quantify the levels of hypoxanthine, xanthine, and uracil. The results indicated that, based on comparisons with databases established from literature and laboratory work, 56 compounds were identified in the dried samples, including 11 free amino acids, 16 organic acids, 9 nucleosides, 9 dipeptides and cyclic dipeptides, and 11 nitrogen-containing and miscellaneous compounds. In the fresh samples, 48 compounds were identified, including 11 free amino acids, 17 organic acids, 10 nucleosides, 8 dipeptides and cyclic dipeptides, and 2 nitrogen-containing and miscellaneous compounds. The separation of hypoxanthine, xanthine, and uracil was achieved with satisfactory results, exhibiting good linearity within the calibration range ( $r=0.9999$ ). The average recovery rates ranging were between 98.36% and 99.82%, and

收稿日期:2024-03-29

接受日期:2024-11-19

基金项目:首届建生药业鲜药创研基金(JSJC-20190105-047);广西中医药大学2019年广西一流学科建设开放课题(2019XK071)

† 共同第一作者

\* 通信作者 E-mail:15907813718@163.com, liaochengpu@zju-jhi.com

the relative standard deviations were between 0.25% and 3.1%. The UPLC-Q-TOF-MS/MS technique used in this study provided a rapid and efficient qualitative analysis method for identifying the chemical components in both fresh and dried *Pheretima aspergillum* samples. The HPLC method developed is simple, fast, and accurate for quantifying hypoxanthine, xanthine, and uracil. This research provides a scientific basis for studying the chemical composition and quality control of fresh and dried *Pheretima aspergillum*.

**Key words:** *Pheretima aspergillum*; UPLC-Q-TOF-MS/MS; HPLC; fresh products; dry products; component analysis

鲜药是传统中医临床上的特色用药之一,在其传统应用方法中,鲜用为主的中草药高达486种<sup>[1]</sup>。鲜药可以最大程度地保存其中的有效成分,以发挥其独到功效,拥有干药材无可比拟的疗效。化学研究发现鲜药材中生物活性成分含量往往高于其干品,如鲜地黄中梓醇、还原糖和多糖的量均高于其干品<sup>[2]</sup>;鲜鱼腥草中有6个酚类成分含量明显高于干品<sup>[3]</sup>,以上研究表明:鲜药与干药在化学成分方面存在一定差异。

地龙属于常用动物类中药,为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *Pheretima guillelmi* (Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *Pheretima pectinifera* Michaelsen 的干燥体。前一种习称“广地龙”,后三种习称“沪地龙”。而广地龙主产于广东、广西。地龙性咸寒,归肝、脾、膀胱经,具有清热定惊,通络平喘,利尿的功效。常用于高热、肢体麻木、惊痛抽搐、关节痹痛、半身不遂、肺热喘咳、尿少水肿、高血压等症。研究表明,广地龙主要化学成分有蛋白质、核苷类、氨基酸、多肽等。其中核苷类成分具有一定的特异性和稳定性,可作为评价广地龙真伪的依据之一。以核苷类为代的表化合物有次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶等。现代药理学证明,次黄嘌呤具有很好平喘、降压作用<sup>[4]</sup>。黄嘌呤可扩张支气管,临床用于治疗哮喘<sup>[5]</sup>;尿嘧啶可抑制5-氟尿嘧啶的分解<sup>[6]</sup>,临床上用于肿瘤的联合治疗。

目前对广地龙药材研究主要集中在干广地龙领域,对鲜广地龙的研究很少。为研究鲜广地龙与干广地龙的化学成分差异,该研究采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对广东产的鲜、干广地龙主要化学成分进行分析,用HPLC测定鲜、干广地龙中次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的含量,为科学评价鲜、干广地龙的质量差异提供科学依据。

## 1 材料与试剂

### 1.1 仪器与设备

Agilent 6530 Q-TOF 四级杆-飞行时间液质联用仪(美国安捷伦科技有限公司);Waters 2695 高效液

相色谱仪(美国 Waters 公司);TGL-16 高速离心机(四川蜀科仪器有限公司);EYELA 冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);JAC-2010P 超声机(韩国 KODO 公司);XS205D 电子分析天平(上海梅特勒托利多科技有限公司)。

### 1.2 实验试剂

甲醇(色谱级,批号 302Y1906HB,美国 Fisher chemical 公司);乙腈(色谱级,批号 200-835-2,德国 Merck 公司);屈臣氏饮用水(广州屈臣氏食品饮料有限公司);甲酸(色谱级,批号 73C1812PR,上海阿拉丁试剂有限公司);26 种核苷类混合对照品(纯度  $\geq 98.0\%$ ,批号 UL290479,美国 Waters 公司);24 种氨基酸混合对照品(纯度  $\geq 98.0\%$ ,批号 UL780923,美国 Waters 公司);次黄嘌呤(纯度  $\geq 98.0\%$ ,批号 TM0313XC13,上海融禾医药有限公司);黄嘌呤(纯度  $\geq 99.0\%$ ,批号 200107,上海融禾医药有限公司);尿嘧啶(纯度  $\geq 98.0\%$ ,批号 T14A8X33880,上海源叶生物公司)。

### 1.3 实验材料

鲜地龙于 2019 年采购于广东,经广西中医药大学中药鉴定教研室滕建北教授鉴定为钜蚓科动物参环毛蚓 (*Pheretima aspergillum*)。

广东广地龙,剖腹,洗净,切段。取切段广东产广地龙晾干,粉碎,过筛,制成干广地龙药材粉末,4℃保存备用。取鲜广地龙放置研钵,加入适量液氮,迅速冷冻,边研磨边加液氮,直至成细末,过筛,后转移至冻干瓶,冷冻干燥 24 h,制成鲜广地龙冻干粉,4℃保存备用。

## 2 方法与结果

### 2.1 对照品溶液的制备

取次黄嘌呤对照品、黄嘌呤对照品、尿嘧啶对照品适量,精密称定,分别加水制成每 1 mL 各含 1 mg 的溶液,作为储备液。取次黄嘌呤储备液 2 mL、黄嘌呤储备液 1 mL、尿嘧啶储备液 0.5 mL 分别加入 10 mL 容量瓶中,制成每 1 mL 各含 200  $\mu\text{g}$  次黄嘌呤、100  $\mu\text{g}$  黄嘌呤、50  $\mu\text{g}$  尿嘧啶的溶液,作为对照品溶液。另取次黄嘌呤储备液 0.5 mL、黄嘌呤储备

液 0.5 mL、尿嘧啶储备液 0.5 mL 至 50 mL 容量瓶中,加水制成每 1 mL 各含 10  $\mu\text{g}$  的溶液,作为对照品混合液,备用。

## 2.2 供试品溶液的制备

取鲜、干地龙约 2.0 g,精确称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,称定重量,超声 40 min,放冷至室温,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,搅拌均匀,离心,滤过,取续滤液,即得。

## 2.3 色谱、质谱条件

### 2.3.1 色谱条件

色谱柱:Agilent poroshell 120 SB-Aq  $C_{18}$  (2.7  $\mu\text{m}$ , 3.0 mm  $\times$  150 mm),流动相 A:0.1% 甲酸,流动相 B:0.1% 甲酸-乙腈;柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积:5  $\mu\text{L}$ ;流速 0.3 mL/min;波长 205 nm;洗脱梯度,0 ~ 18 min,95%  $\rightarrow$  80% A;18 ~ 30 min,80%  $\rightarrow$  50% A;30 ~ 39 min,50%  $\rightarrow$  50% A;39 ~ 42 min,50%  $\rightarrow$  30% A;42 ~ 18 60min,30%  $\rightarrow$  0% A;60 ~ 62 min,0%  $\rightarrow$  0% A;62 ~ 64 min,0%  $\rightarrow$  95% A,上述条件用于定性分析。

色谱柱:Luna Omega Polar  $C_{18}$  (250 mm  $\times$  4.6

mm,5  $\mu\text{m}$ ),柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ,流动相 A:甲醇,流动相 B:0.1% 磷酸二氢钾,波长 254 nm,梯度洗脱,流速:0.8 mL/min,该条件用于含量测定。

### 2.3.2 质谱条件

电喷雾离子源,正负离子模式扫描,雾化气压:38 Psi;鞘气温度:350  $^{\circ}\text{C}$ ;鞘气流速:11 L/min;毛细管电压: +4 000 V;喷雾电压: +1 000 V;片段电压: +120 V;碰撞能量:10、20、40 V;数据采集模式:Auto MS/MS;一级质谱扫描范围( $m/z$ ):100 ~ 1 000;二级质谱扫描范围( $m/z$ ):50 ~ 1 000;每循环最大母离子个数:5;同位素模型(isotope model):有机小分子。

## 2.4 方法学考察

### 2.4.1 线性关系考察

取 200  $\mu\text{g/mL}$  次黄嘌呤、100  $\mu\text{g/mL}$  黄嘌呤、50  $\mu\text{g/mL}$  尿嘧啶对照品溶液依次进样 1、5、8、10、15、18、20  $\mu\text{L}$ ,在“2.3.1”项下色谱条件进行测定,记录次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的峰面积。试验结果表明次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶在线性范围内线性良好(见表 1)。

表 1 各成分线性关系

Table 1 Linear relationship of various constituents

成分 Component	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient ( $R$ )	线性范围 Linear Range ( $\mu\text{g/mL}$ )
次黄嘌呤 Hypoxanthine	$Y = 1 \times 10^6 X + 540\ 813$	0.999 9	0.20 ~ 4.09
黄嘌呤 Xanthine	$Y = 266\ 032 X - 144\ 405$	0.999 9	0.10 ~ 2.03
尿嘧啶 Uracil	$Y = 739\ 955 X - 336\ 178$	0.999 9	0.15 ~ 3.02

### 2.4.2 精密度试验

精密吸取“2.1”项下质量浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  的混合对照品溶液 10  $\mu\text{L}$ ,重复进 6 次,在“2.3.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积。实验结果表明次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的峰面积相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 0.35% ~ 0.80%,精密度良好。

### 2.4.3 重复性试验

取干广地龙药材约 2.0 g,精密称定,在“2.2”项下制备 6 份供试品溶液,以“2.3.1”项下色谱条件进行测定,记录 6 份供试品次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的峰面积,计算含量,计算其 RSD 值。结果表明 RSD 在 0.28% ~ 0.36%,表明实验方法重复性好。

### 2.4.4 稳定性试验

取“1.3”项下干地龙药材约 2.0 g,精密称定,按照“2.3.1”项下色谱条件分别在 0、4、6、10、12、18 h 进行测定,记录次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的峰面积,计算 RSD 值。试验结果表明次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶峰面积 RSD 分别为 1.8%、3.0%、0.61%,表明 18 h 内样品稳定性好。

### 2.4.5 加样回收率试验

取“1.3”项下已知量的干地龙药材粉末约 1.0 g,精密称定,共 6 份,精密加入对照品次黄嘌呤 0.111 0 mg、黄嘌呤 0.081 2 mg、尿嘧啶 0.040 0 mg,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.3.1”项下色谱条件进行测定,记录次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的峰面积。试验结果表明平均加样回收率在

98.36% ~ 99.82% 之间, RSD 在 0.25% ~ 3.1% 之间, 表明方法较准确(见表 2)。

## 2.5 鲜、干广地龙化学成分鉴定

### 2.5.1 化合物鉴定结果

采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术, 在“2.3”项下条件对供试品溶液以及混合对照品溶液进行检测, 得到正离子模式总离子流色谱图(见图 1)和负离子模式总离子流色谱图(见图 2), 通过实验室对照品建立的数据库进行比对鉴定, 查阅相关 Zhang 等<sup>[7]</sup>文献, 收集广地龙报道的化合物信息, 建立成分的一级质谱数据库。将采集的数据导入 Peakview 1.2 软件

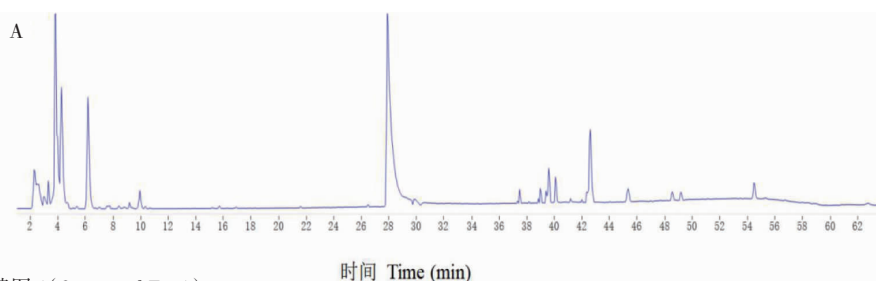
中, 进行无目标筛查, 对筛查出的化合物进行碎片离子比对, 结合色谱保留时间、精确分子质量、特征碎片离子、MS/MS 裂解规律, 鉴定鲜广地龙和干广地龙的化学成分。

实验结果显示: 鲜广地龙中解析得到 48 个化合物, 其中游离氨基酸类 11 种、有机酸类 17 种、核苷类 10 种、二肽类及环二肽类 8 种; 干广地龙中解析得到 56 个化合物, 其中游离氨基酸类 11 种、有机酸类 16 种、核苷类 9 种、二肽类及环二肽类 9 种、含氮类及其他类 11 种。各化合物的保留时间、分子式、离子碎片等信息见表 3。

表 2 加样回收率

Table 2 Sample recovery rate

成分 Component	取样量 Sample weight (mg)	加标量 Added amount (mg)	测得量 Found amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	平均回收率 Average recovery rate (%)	RSD (%)
次黄嘌呤 Hypoxanthine	0.110 3	0.111 0	0.219 8	98.92	98.36	0.38
	0.110 0		0.219 2	98.64		
	0.109 8		0.219 3	98.91		
	0.109 6		0.217 9	97.83		
	0.109 9		0.218 2	97.83		
	0.109 5		0.218 0	98.01		
黄嘌呤 Xanthine	0.089 8	0.081 2	0.171 1	100.12	99.82	0.25
	0.089 5		0.170 6	99.88		
	0.089 5		0.170 9	100.24		
	0.089 7		0.170 8	99.88		
	0.089 4		0.170 0	99.26		
	0.089 6		0.170 4	99.51		
尿嘧啶 Uracil	0.039 5	0.040 0	0.078 7	98.00	98.67	3.1
	0.040 0		0.080 7	101.75		
	0.040 3		0.080 9	101.50		
	0.040 5		0.081 6	102.75		
	0.039 0		0.076 8	94.50		
	0.039 3		0.076 7	93.50		



续图 1 (Continued Fig.1)

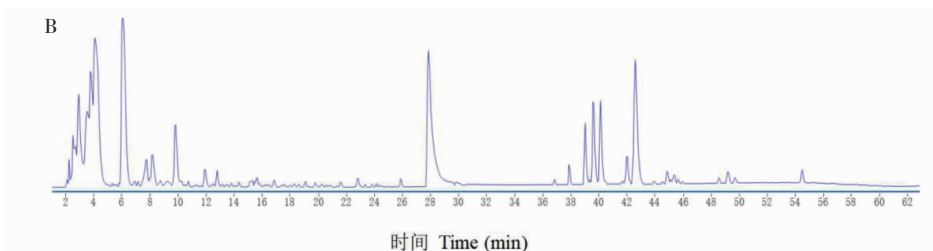


图 1 鲜广地龙 (A) 和干广地龙 (B) 正离子模式下总离子流色谱图

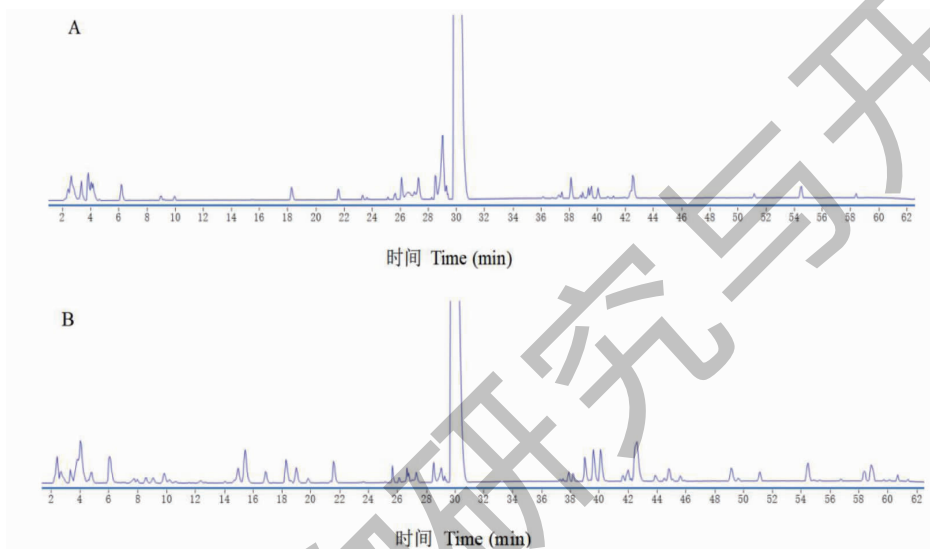
Fig. 1 Total ion chromatograms of fresh *P. aspergillum* (A) and dried *P. aspergillum* (B) in positive ion mode

图 2 鲜广地龙 (A) 和干广地龙 (B) 负离子模式下总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion chromatograms of fresh *P. aspergillum* (A) and dried *P. aspergillum* (B) in negative ion mode

表 3 鲜广地龙和干广地龙化学成分结构鉴定结果

Table 3 Identification results of chemical constituents of fresh *P. aspergillum* and dried *P. aspergillum*

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	离子模式 Ion mode	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	测定值 Measured value	误差 Error ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ion (MS/MS)	DPA	FPA
1	2.165	$[M+H]^+$	赖氨酸 Lysine	$C_6H_{14}N_2O_2$	147.116 1	-0.31	130.090 6, 84.080 9, 56.050 2	✓	✓
2	2.302	$[M+H]^+$	精氨酸 Arginine	$C_6H_{14}N_4O_2$	175.117 4	-2.10	70.065 3, 116.202 8, 158.093 5, 60.057 9	✓	✓
3	2.508	$[M+H]^+$	缬氨酸 Valine	$C_5H_{11}NO_2$	118.079 1	1.12	55.055 1, 72.081 8, 118.086 8	✓	✓
4	2.439	$[M+H]^+$	脯氨酸 Proline	$C_5H_9NO_2$	116.063 5	-2.95	70.065 9, 55.055 0, 57.056 9, 68.050 2	✓	✓
5	2.371	$[M+H]^+$	谷氨酸 Glutamic acid	$C_5H_9NO_4$	148.053 2	-1.92	84.044 9, 102.054 7, 56.049 7, 130.050 0	✓	✓
6	3.299	$[M+H]^+$	烟酸 Nicotinic acid	$C_6H_5NO_2$	124.037 7	1.01	124.037 7, 80.050 1, 78.034 1, 52.022 7	✓	✓
7	3.809	$[M+H]^+$	腺苷 Adenosine	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	268.105 9	1.02	268.105 9, 136.062 5, 119.035 8,	✓	✓
8	3.292	$[M+H]^+$	甲硫氨酸 Methionine	$C_5H_{11}O_2NS$	150.052 1	-1.01	133.032 4, 104.053 6, 61.011 4, 87.026 6	✓	✓

续表 3 (Continued Tab. 3)

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	离子模式 Ion mode	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	测定值 Measured value	误差 Error ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ion (MS/MS)	DPA	FPA
9	3.333	[M + H] <sup>+</sup>	腺嘌呤 Adenine	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	136.062 2	1.00	136.062 2, 119.035 6, 94.042 6, 109.050 7, 165.054 2, 136.075 3,	✓	✓
10	3.665	[M + H] <sup>+</sup>	酪氨酸 Tyrosine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	182.074 9	-0.40	123.043 4, 119.048 9, 91.054 4, 77.038 1	✓	✓
11	3.388	[M + H] <sup>+</sup>	鸟嘌呤 Guanine	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O	152.045 5	1.01	152.045 5, 135.033 0, 110.033 7, 82.038 9	✓	✓
12	4.015	[M + H] <sup>+</sup>	鸟苷 Guanosine	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	284.102 1	1.12	284.102 1, 152.059 5, 135.032 4, 110.037 2	-	✓
13	4.152	[M + H] <sup>+</sup>	肌苷 Inosine	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	269.091 0	0.92	269.091 0, 137.046 8, 110.035 1	✓	✓
14	4.141	[M + H] <sup>+</sup>	次黄嘌呤 Hypoxanthine	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O	137.046 5	0.95	137.046 5, 119.035 8, 110.035 5, 94.040 4, 82.040 5	✓	✓
15	4.014	[M-H] <sup>-</sup>	琥珀酸 Succinic acid	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	117.116 0	-0.91	117.116 0, 99.006 7, 73.027 4	✓	✓
17	3.751	[M + H] <sup>+</sup>	亮氨酸 Leucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	132.093 6	-1.40	86.096 5, 69.070 1	✓	✓
18	4.230	[M + H] <sup>+</sup>	异亮氨酸 Isoleucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	132.093 6	-1.40	86.096 5, 69.070 1	✓	✓
19	5.864	[M + H] <sup>+</sup>	果糖苯丙氨酸 Fructose phenylalanine	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>7</sub>	328.141 3	0.51	328.141 3, 310.122 7, 292.113 5, 265.121 5, 120.080 6	-	✓
20	5.796	[M + H] <sup>+</sup>	2-哌啶酮 2-Piperidone	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO	100.076 2	0.91	100.076 2, 82.065 4, 72.043 7, 56.505 0, 55.054 3	✓	-
21	6.354	[M + H] <sup>+</sup>	苯丙氨酸 L-Phenylalanine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	166.086 7	1.51	166.086 7, 120.080 7, 103.054 6, 77.039 0, 93.070 0	✓	✓
22	7.272	[M + H] <sup>+</sup>	腺苷酸琥珀酸核苷 Adenosine succinyl nucleotide	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	384.113 1	0.89	384.113 1, 252.078 9, 206.061 6, 192.046 8, 136.067 7	-	✓
23	9.769	[M + H] <sup>+</sup>	色氨酸 Tryptophan	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	205.078 9	0.51	188.071 4, 146.061 1, 118.066 2, 91.055 5	✓	✓
24	9.780	[M + H] <sup>+</sup>	丙氨酰苯丙氨酸 Alanylphenylalanine	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	237.124 8	0.53	237.124 8, 166.088 3, 120.081 1, 103.054 6, 77.038 6	✓	✓
25	6.676	[M + H] <sup>+</sup>	谷氨酰苯丙氨酸 Glutamylphenylalanine	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	295.121 6	0.34	120.081 6, 103.057 0, 84.043 7	✓	✓
26	10.490	[M + H] <sup>+</sup>	谷氨酰苯丙氨酸异构体 Glutamylphenylalanine isomer	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	295.121 6	1.02	295.129 0, 166.084 5, 120.081 8, 84.045 8	✓	✓
27	16.125	[M + H] <sup>+</sup>	亮氨酰苯丙氨酸 Leucylphenylalanine	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	279.170 5	1.02	279.170 8, 120.080 9, 103.052 2, 77.040 3	✓	✓
28	17.370	[M + H] <sup>+</sup>	异亮/亮氨酰苯丙氨酸异构体 Isoleucyl/Leucylphenylalanine isomer	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	279.170 5	0.54	166.079 6, 120.079 5, 86.097 9, 69.069 6	✓	✓
29	18.612	[M + H] <sup>+</sup>	异亮/亮氨酰苯丙氨酸异构体 Isoleucyl/Leucylphenylalanine isomer	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	279.170 5	0.54	120.080 4, 103.053 8, 77.040 1, 166.084 9	✓	✓
30	19.090	[M + H] <sup>+</sup>	异亮/亮氨酰苯丙氨酸异构体 Isoleucyl/Leucylphenylalanine isomer	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	279.170 5	0.54	279.170 5, 166.079 5, 120.081 4, 86.096 7	✓	✓
31	19.770	[M + H] <sup>+</sup>	N-乙酰基苯甲酸乙酯 N-Acetyl ethyl benzoate	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	208.097 0	1.72	208.097 0, 120.082 4, 103.054 5	✓	-
32	21.350	[M + H] <sup>+</sup>	组氨酰天冬酰胺 Histaminylasparagine	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	238.109 4	1.01	238.109 4, 192.103 7, 120.080 5, 103.057 0, 77.038 5	✓	-
33	21.350	[M + H] <sup>+</sup>	N-(甲氧羰基)-L-苯丙氨酸 N-(Methoxycarbonyl)-L-phenylalanine	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>4</sub>	238.109 4	1.00	238.109 4, 192.103 7, 120.080 5, 103.057 0, 77.038 5	✓	-
34	23.680	[M + H] <sup>+</sup>	7,8-二甲基苯并蝶啶-2,4-二酮 7,8-Dimethylbenzopterin-2,4-dione	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	244.084 4	2.00	244.084 4, 198.056 0, 172.082 8, 165.053 5	-	✓
35	27.580	[M + H] <sup>+</sup>	二氢辣椒素 Dihydrocapsaicin	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	308.214 7	-0.22	290.206 5, 262.214 4, 192.134 2, 179.132 9	✓	-

续表 3 (Continued Tab. 3)

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	离子模式 Ion mode	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	测定值 Measured value	误差 Error ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ion (MS/MS)	DPA	FPA
36	49.890	[M+H] <sup>+</sup>	5,8,11,14-十碳四烯酰胺 5,8,11,14-Eicosatetraenamide	C <sub>20</sub> H <sub>33</sub> NO	304.264 5	1.01	304.264 5,287.231 9, 245.222 3,203.176 7	√	-
37	51.150	[M-H] <sup>-</sup>	二十碳五烯酸 Eicosapentaenoic acid	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	301.203 8	1.82	301.203 8,257.226 7, 203.178 7	√	√
38	51.712	[M-H] <sup>-</sup>	亚麻酸 $\alpha$ -Linolenic acid	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	277.205 3	-1.02	277.205 3,233.219 0, 192.983 7	√	√
39	55.710	[M-H] <sup>-</sup>	十五烷酸 Pentadecanoic acid	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	241.217 6	-0.92	241.217 6,223.062 3, 97.265 2	√	√
40	53.450	[M-H] <sup>-</sup>	4,7,10,13,16,19-二十二碳六 烯酸	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	327.232 4	-1.01	327.232 4,283.284 8, 177.154 8,229.197 5	√	√
41	53.861	[M-H] <sup>-</sup>	棕榈烯酸 Palmitenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	253.218 3	-0.84	253.218 3,217.851 1, 181.107 1	-	√
42	54.472	[M-H] <sup>-</sup>	花生四烯酸 Arachidonic acid	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	303.226 4	-0.99	303.226 4,259.236 2, 05.118 5	√	√
43	55.161	[M-H] <sup>-</sup>	二十二碳五烯酸 Docosapentaenoic acid	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	329.240 2	-1.00	329.240 2,285.248 9	√	√
44	55.310	[M-H] <sup>-</sup>	亚油酸 Linoleic acid	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	279.232 4	0.86	279.232 4,280.230 8	√	√
45	58.370	[M-H] <sup>-</sup>	棕榈酸 Palmitic acid	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	255.226 9	0.45	255.226 9	√	√
46	56.720	[M-H] <sup>-</sup>	8,11,14-二十碳三烯酸 8,11,14-Eicosatrienoic acid	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	305.240 0	0.67	305.240 0	√	√
47	62.700	[M-H] <sup>-</sup>	硬脂酸 Stearic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	283.258 6	0.88	283.258 6,265.235 8	-	√
48	58.850	[M-H] <sup>-</sup>	油酸 Oleic acid	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	281.242 6	-1.45	281.242 6	√	√
49	60.080	[M-H] <sup>-</sup>	十七酸 Heptadecanoic acid	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	269.243 5	-0.98	269.243 5,270.256 1	√	√
50	2.544	[M+H] <sup>+</sup>	腺苷 5'-单磷酸 Adenosine 5'-monophosphate	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	348.072 8	1.56	348.072 8,136.062 5	√	√
51	3.161	[M+H] <sup>+</sup>	5'-二磷酸腺苷 Adenosine-5'-diphosphate	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> P <sub>2</sub>	428.042 7	1.77	428.042 7,348.075 1, 136.063 5	√	√
52	3.983	[M+H] <sup>+</sup>	虫草素 3'-Deoxyadenosine	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	252.112 5	-0.55	252.112 5,136.064 6	√	√
53	7.659	[M+H] <sup>+</sup>	6-乙酰氧基正己酸甲酯 Methyl 6-acetoxy-hexanoate	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	189.124 3	0.67	189.124 3,143.119 5, 132.102 2,86.097 9	√	√
54	8.207	[M+H] <sup>+</sup>	三羟甲基氨基甲烷 Tris(hydroxymethyl) aminomethane	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	122.135 2	1.45	105.071 6,77.039 3, 51.023 6	√	√
55	12.715	[M+H] <sup>+</sup>	环缙二亮氨酸 Cyclic dileucine	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	227.183 3	2.03	114.055 2,86.061 5, 72.045 0,68.049 5	√	-
56	22.854	[M+H] <sup>+</sup>	9-乙基腺嘌呤 9-Ethyladenine	C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub>	164.106 5	-0.41	164.106 5,105.069 3, 77.039 0	√	-
57	25.868	[M+H] <sup>+</sup>	N-羟甲基邻苯二甲酰亚胺 N-Hydroxymethylphthalimide	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	178.041 6	0.76	178.041 6,105.070 5, 77.038 1	√	-
58	27.855	[M+H] <sup>+</sup>	2-酮-L-古洛糖酸 2-Keto-L-gullic acid	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	195.186 2	1.08	195.186 2,83.061 5	√	√
59	45.393	[M+H] <sup>+</sup>	9,12,15-十八碳三烯酸 9,12,15-Octacatrienoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	279.429 6	1.21	149.023 9,121.028 4, 121.029 1,93.034 8, 55.039 9	√	√
60	54.505	[M+H] <sup>+</sup>	4,4'-二叔丁基二苯胺 4,4'-Di-tert-butylidiphenylamine	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N	282.280 6	-1.11	265.255 4,247.243 4, 135.115 9,93.070 9, 100.077 1	√	√
61	14.897	[M-H] <sup>-</sup>	3-[(2-羟乙基)氨基]丙酰胺 3-[(2-Hydroxyethyl) amino] propionamide	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	131.065 9	1.01	131.065 9,85.064 4, 69.034 2	√	-
62	16.853	[M-H] <sup>-</sup>	N-乙酰-L-亮氨酸 N-Acetyl-L-leucine	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	172.091 3	0.88	172.091 3,130.084 2, 86.968 2	√	√

续表3 (Continued Tab. 3)

序号 No.	保留时间 $t_R$ (min)	离子模式 Ion mode	化合物 Compound	分子式 Molecular formula	测定值 Measured value	误差 Error ( $\times 10^{-6}$ )	碎片离子 Fragment ion (MS/MS)	DPA	FPA
63	21.567	[M-H] <sup>-</sup>	二乙基(叔丁氧羰基-氨基)乙酯 Diethyl (tert-butoxycarbonyl-amino)ethyl ester	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>6</sub>	274.107 7	1.42	274.107 7, 256.097 6, 230.081 8, 79.956 8	√	√
64	19.810	[M-H] <sup>-</sup>	N-乙酰-D-苯丙氨酸 N-Acetyl-D-phenylalanine	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	206.079 1	2.43	206.079 1, 164.068 8, 147.046 5, 58.028 9	√	-
65	37.831	[M+H] <sup>+</sup>	(S)-叔丁基 4-(2-(6-苄基-8-氧代-5,6,7,8-四氢吡唑并[4,3-e][1,4]二氮卓平-2(4H)-基)乙基)哌啶-1-羧酸盐 (S)-Tert-butyl 4-(2-(6-benzyl-8-oxo-5,6,7,8-tetrahydropyrazolo[4,3-e][1,4] diazepin-2(4H)-yl)ethyl) piperidine-1-carboxylate	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	454.330 8	-0.65	454.330 8, 184.073 7, 125.000 0, 104.108 1, 86.097 6	√	√

注:“-”此样品没有检测到此物质;“√”表示此样品检测到物质;FPA:鲜广地龙;DPA:干广地龙。

Note:“-”:This substance is not detected in this sample;√:The substance is detected in this sample;FPA:Fresh *P. aspergillum*;DPA:Dried *P. aspergillum*.

## 2.5.2 鲜、干广地龙化学成分解析

### 2.5.2.1 氨基酸类化合物

氨基酸类化合物因含有氨基和羧基而易丢失NH<sub>3</sub>、HCOOH、CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O等中性分子产生一系列特征碎片。根据文献推断解析得到色氨酸、亮氨酸、赖氨酸、精氨酸、苯丙氨酸、等游离氨基酸<sup>[8-12]</sup>。化合物**1**在正离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  147.116 1 [M+H]<sup>+</sup>, 分子式为C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 丢失1分子NH<sub>3</sub>得到碎片离子  $m/z$  130.090 6, 丢失1分子COOH-NH<sub>3</sub>得到碎片离子  $m/z$  84.080 9, 丢失1分子COOH-NH<sub>3</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>得到碎片离子  $m/z$  56.050 2, 根据文献<sup>[8,9]</sup>信息可知与赖氨酸的裂解碎片信息相同,

所以确定化合物**1**赖氨酸。化合物**2**在正离子模式下准分子离子峰为  $m/z$  175.117 4 [M+H]<sup>+</sup>, 分子式为C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 丢失1分子NH<sub>3</sub>得到碎片离子  $m/z$  158.093 5, 丢失1分子CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub>得到碎片离子  $m/z$  116.202 8, 丢失1分子CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CH<sub>5</sub>N<sub>3</sub>得到碎片离子  $m/z$  70.065 3, 丢失1分子NH<sub>3</sub>-COOH-C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>得到碎片离子  $m/z$  60.056 5, 根据参考文献<sup>[8-12]</sup>, 化合物**2**裂解碎片信息与精氨酸的相同, 所以确定化合物**2**为精氨酸。以赖氨酸与精氨酸为例子, 对氨基酸类化合物的裂解方式分析, 赖氨酸的裂解途径见图3, 精氨酸的裂解途径见图4。

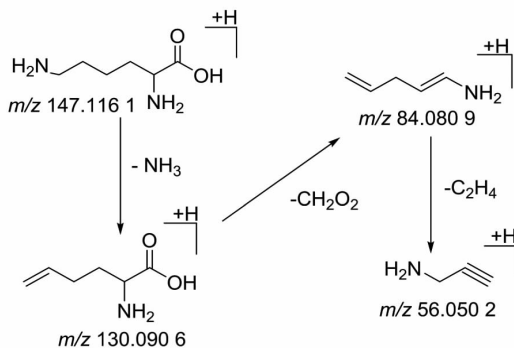
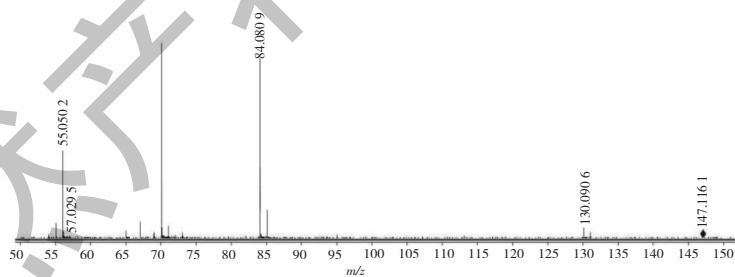


图3 赖氨酸的裂解途径

Fig. 3 The cleavage pathway of lysine



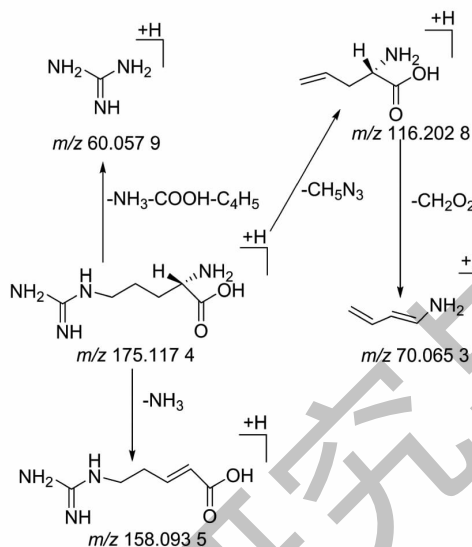
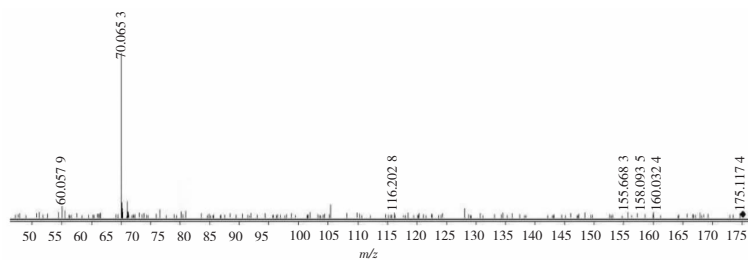


图4 精氨酸的裂解途径

Fig. 4 The cleavage pathway of arginine

化合物 **3, 4, 5, 8, 10, 17, 18, 21** 为氨基酸类化合物,在正负离子模式下,得到准分子离子峰  $m/z$  依次为 118.079 1  $[M + H]^+$ 、116.063 5  $[M + H]^+$ 、148.053 2  $[M + H]^+$ 、182.074 9  $[M + H]^+$ 、132.093 6  $[M + H]^+$ 、132.093 6  $[M + H]^+$ 、166.086 7  $[M + H]^+$ ,氨基酸类化合物多数容易失去 COOH、 $NH_3$ 、OH 等基团,根据文献报道<sup>[7]</sup>,故化合物 **3, 4, 5, 8, 10, 17, 18, 21** 依次为缬氨酸、脯氨酸、谷氨酸、蛋氨酸(甲硫氨酸)、酪氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸。化合物 **23** 准分子离子峰为  $m/z$  205.078 9  $[M + H]^+$ ,二级质谱扫描下产生碎片离子峰  $m/z$  188.071 4  $[M + H - NH_2]^+$ 、146.061 1  $[M + H - COOH - CH_2]^+$ 、118.066 2  $[M + H - C_5H_7O_2N]^+$ 、91.055 5  $[M + H - C_8H_4N]^+$ ,根据参考文献信息<sup>[7,12]</sup>,推测化合物 **23** 为色氨酸。

#### 2.5.2.2 核苷类化合物

在正负离子模式下,根据文献推断解析到鸟苷、肌苷、尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤等化学物质<sup>[12-14]</sup>,核苷类成分容易失去 1 分子的  $C_5H_7O_4$  与高能裂解下失去 1 分子的  $NH_3$ ,化合物 **9** 准分子离

子峰为  $m/z$  136.062 2  $[M + H]^+$ ,化学结构式为  $C_5H_5N_5$ ,根据二级质谱裂解分析,失去 1 分子的  $NH_3$  得到碎片离子  $m/z$  119.035 6,失去 1 分子的  $HCN_2$  产生碎片离子  $m/z$  94.042 6,失去 CN 产生碎片离子  $m/z$  109.050 7,依据文献<sup>[7,12]</sup>信息,推测该化合物 **9** 为腺嘌呤。化合物 **11** 准分子离子峰为  $m/z$  152.045 5  $[M + H]^+$ ,化学结构式为  $C_5H_5N_5O$ ,根据二级质谱裂解分析,失去 1 分子的  $NH_3$  产生碎片离子  $m/z$  135.033 0,失去 1 分子的  $NH_2 - CN$  产生碎片离子  $m/z$  110.037 7,失去  $CO - H_2CN_2$  产生碎片离子  $m/z$  82.038 9,推测该化合物 **11** 为鸟嘌呤,查阅文献<sup>[13-15]</sup>,化合物 **11** 的特征峰与鸟嘌呤的特征峰的一致,故化合物 **11** 为鸟嘌呤,裂解途径见图 5。

化合物 **12, 13, 14, 22, 50, 51, 52** 为核苷类化合物,在正离子、负离子模式扫描下,得到准分子离子峰  $m/z$  依次为 284.102 1  $[M + H]^+$ 、269.091 0  $[M + H]^+$ 、137.046 5  $[M + H]^+$ 、384.113 1  $[M + H]^+$ 、348.072 8  $[M + H]^+$ 、428.042 7  $[M + H]^+$ 、252.112 5  $[M + H]^+$ ,化合物 **12** 二级质谱扫描下得到碎片离子峰  $m/z$  152.059 5  $[M + H - C_5H_8O_4]^+$ ,

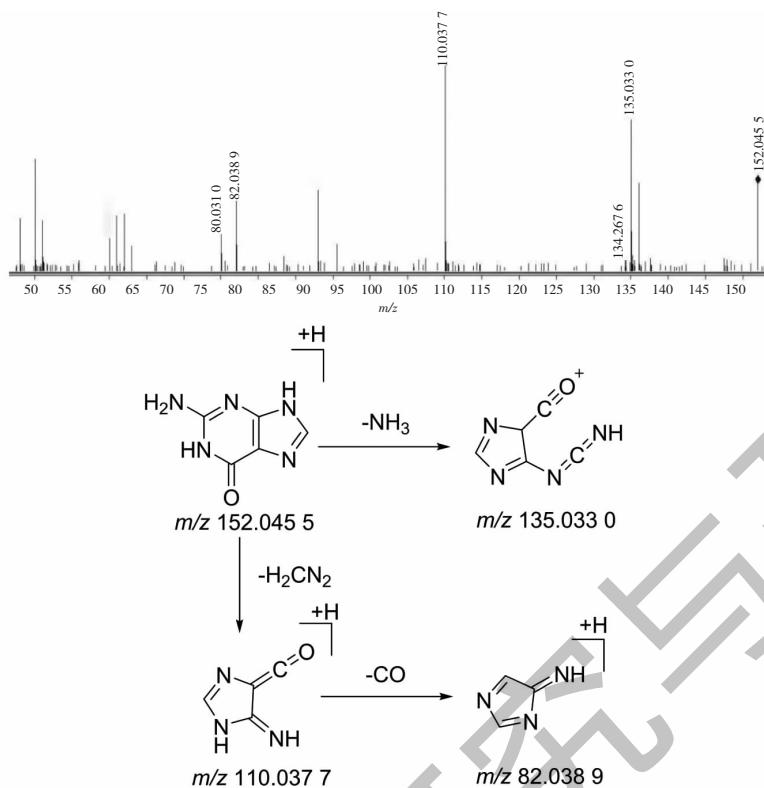


图5 嘌呤的裂解途径

Fig. 5 The cleavage pathway of guanine

$m/z$  110.037 2  $[M + H - C_6H_9O_4N_2]^+$ , 化合物 **13** 二级质谱扫描下得到碎片离子峰  $m/z$  137.046 8  $[M + H - C_5H_6O_4]^+$ 、 $m/z$  110.035 1  $[M + H - C_6H_9O_4N]^+$ , 化合物 **14** 二级质谱扫描得到碎片离子峰  $m/z$  119.035 8  $[M + H - H_2O]^+$ 、 $m/z$  110.035 5  $[M + H - HCN]^+$ 、 $m/z$  94.040 4  $[M + H - CH_3N_2]^+$ , 化合物 **22** 二级质谱扫描得到碎片离子峰  $m/z$  252.078 9  $[M + H - C_5H_8O_4]^+$ 、 $m/z$  206.061 6  $[M + H - C_6H_{10}O_6]^+$ 、 $m/z$  192.046 8  $[M + H - C_7H_{12}O_6]^+$ 、 $m/z$  136.067 7  $[M + H - C_9H_{12}O_8]^+$ , 化合物 **50** 二级扫描得到碎片离子峰  $m/z$  136.062 5  $[M + H - C_5H_9O_7P]^+$ , 化合物 **51** 二级扫描得到碎片离子峰  $m/z$  136.063 5  $[M + H - C_5H_{10}O_{10}P_2]^+$ , 化合物 **52** 二级扫描得到碎片离子峰  $m/z$  136.064 6  $[M + H - C_5H_8O_3]^+$ , 根据文献<sup>[7]</sup>报道, 推测化合物 **12**、**13**、**14**、**22**、**50**、**51**、**52** 依次为鸟苷、肌苷、次黄嘌呤、腺苷酸琥珀酸核苷、腺苷 5'-单磷酸、5'-二磷酸腺苷、虫草素。

### 2.5.2.3 有机酸类

根据文献推断解析出琥珀酸、烟酸、油酸、棕榈烯酸、亚麻酸、硬脂酸、等有机酸<sup>[16-19]</sup>, 化合物 **15** 在

负离子模式下的准分子离子峰为  $m/z$  117.116 0  $[M - H]^-$ ; 化合物 **38** 在负离子模式下的准分子离子峰  $m/z$  277.205 3  $[M - H]^-$ ; 化合物 **41** 在负离子模式下的准分子离子峰  $m/z$  253.218 3  $[M - H]^-$ 。化合物 **15** 分别失去 1 分子  $H_2O$  与 1 分子  $CO_2$ , 得到离子碎片峰 99.006 7  $[M - H - H_2O]^-$ 、73.027 4  $[M - H - CO_2]^-$ , 与文献结果一致<sup>[7]</sup>, 故化合物 **15** 为琥珀酸。化合物 **38** 产生  $m/z$  233.219 0、 $m/z$  192.983 7 离子碎片, 分别是丢失 1 分子  $COOH$  与 1 分子  $COOH - C_3H_4$ , 结合文献资料<sup>[7]</sup>, 故化合物 **38** 为亚麻酸。化合物 **41** 二级碎片离子有  $m/z$  217.851 1、 $m/z$  181.107 1, 分别是丢失 2 分子  $H_2O$  与 1 分子  $C_4H_8O$ , 文献<sup>[7,15]</sup>信息与棕榈烯酸的特征峰一致, 故化合物 **41** 为棕榈烯酸。

化合物 **6** 在正离子模式下的准分子离子峰  $m/z$  124.037 7  $[M + H]^+$ , 失去 1 分子的  $CO_2$  得到离子碎片峰  $m/z$  80.050 1  $[M + H - CO_2]^+$ , 失去 1 分子的  $CH_2O_2$  得到离子碎片峰  $m/z$  78.034 1, 失去 1 分子的  $COOH - C_2H_3$  离子碎片峰  $m/z$  52.022 7  $[M + H - COOH - C_2H_3]^+$ , 根据文献<sup>[7]</sup>信息, 可推测化合物 **6** 为烟酸, 其裂解途径见图 6。

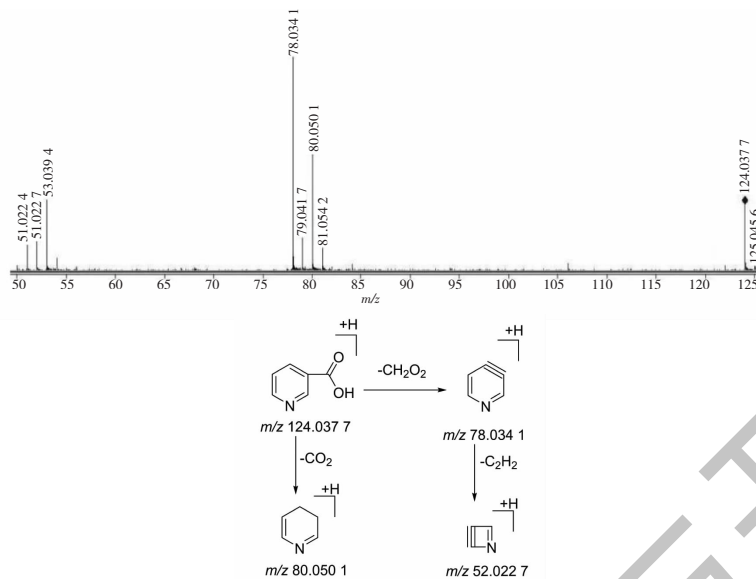


图6 烟酸的裂解途径

Fig. 6 The cleavage pathway of nicotinic acid

#### 2.5.2.4 二肽与环二肽类

化合物 **24**、**25**、**27**、**32**, 在正离子模式下的准分子离子峰分别是  $m/z$  237.1248  $[M + H]^+$ 、 $m/z$  295.1216  $[M + H]^+$ 、 $m/z$  279.1705  $[M + H]^+$ 、 $m/z$  238.1094  $[M + H]^+$ , 在二级质谱扫描下, 化合物 **24** 得到特征碎片离子峰  $m/z$  166.0883  $[M + H - C_3H_5NO]^+$ 、 $m/z$  120.0811  $[M + H - COOH - C_3H_6NO]^+$ 、 $m/z$  103.0546  $[M + H - NH_3 - CONH - COOH - C_2H_5]^+$ 、 $m/z$  77.0386  $[M + H - NH_3 - CONH - COOH - C_4H_7]^+$ , 化合物 **25** 得到特征碎片离子峰  $m/z$  120.0816  $[M + H - C_6H_9NO_5]^+$ 、 $m/z$  103.0570  $[M + H - C_6H_{12}N_2O_5]^+$ 、 $m/z$  84.0437  $[M - C_8H_7N_2O_5]^+$ , 化合物 **27** 得到特征碎片离子峰  $m/z$  120.0809  $[M + H - NH_3 - COOH - C_6H_9O]^+$ 、 $m/z$  103.0522  $[M + H - NH_3 - COOH - C_6H_{12}NO]^+$ 、 $m/z$  77.0403  $[M + H - NH_3 - COOH - C_8H_{14}NO]^+$ , 化合物 **32** 得到特征碎片离子峰  $m/z$  192.1037  $[M - CO -$

$NH_3]^+$ 、 $m/z$  120.0805  $[M + H - CONH - C_3H_9NO]^+$ 、 $m/z$  103.0570  $[M + H - CONH - C_5H_4N_2]^+$ 、 $m/z$  77.0385  $[M + H - CO - NH_3 - CONH - C_3H_9N_2]^+$ , 根据文献<sup>[7]</sup>报道, 二肽类与环二肽类化合物容易丢失  $NH_3$ 、 $COOH$  与  $CONH$ , 化合物 **24**、**25**、**27**、**32** 的离子特征峰分别与丙氨酰苯丙氨酸、谷氨酰苯丙氨酸、亮氨酰苯丙氨酸、组氨酰天冬酰胺的特征离子峰相同, 因此化合物 **24**、**25**、**27**、**32** 分别是丙氨酰苯丙氨酸、谷氨酰苯丙氨酸、亮氨酰苯丙氨酸、组氨酰天冬酰胺。

#### 2.6 鲜、干广地龙中黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的含量测定

取鲜、干广地龙约 2.0 g, 精密称定, 按照“2.2”项下方法分别制备鲜、干广地龙供试品溶液, 在“2.3.1”项下色谱条件进行测定, 计算次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的含量。计算次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的含量, 结果见表 4、图 7。

表4 鲜、干广地龙样品含量测定结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 4 Determination results of fresh *P. aspergillum* and dried *P. aspergillum* ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

样品 Sample	取样量 Sampling quantity (g)	次黄嘌呤含量 Content of hypoxanthine (mg/g)	黄嘌呤含量 Content of xanthine (mg/g)	尿嘧啶含量 Content of uracil (mg/g)
鲜广地龙 Fresh <i>P. aspergillum</i>	2.014	0.18 ± 2.36	0.14 ± 0.30	0.06 ± 0.82
干广地龙 Dried <i>P. aspergillum</i>	2.016	0.19 ± 0.59	0.26 ± 0.53	0.10 ± 0.26

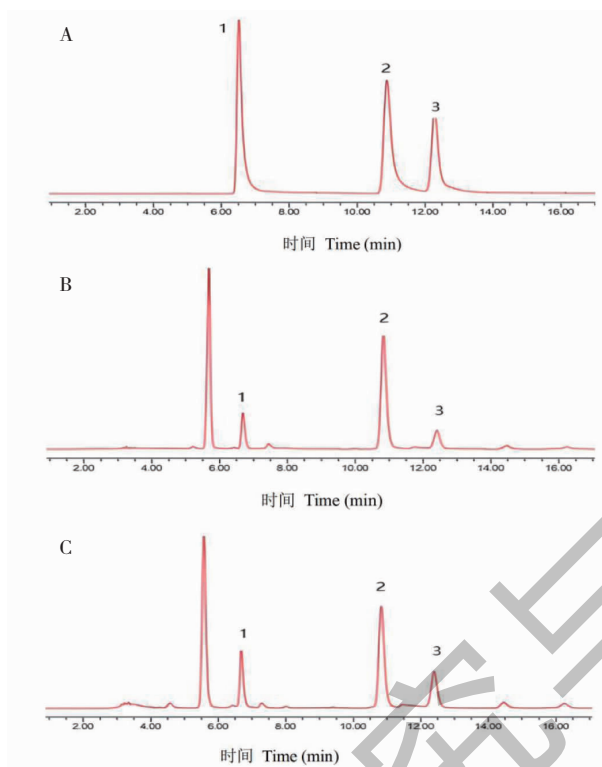


图7 混合对照品溶液(A)、鲜广地龙(B)以及干广地龙(C)的HPLC色谱图

Fig. 7 HPLC chromatogram of mixed standard solution (A) and fresh *P. aspergillum* (B) and dried *P. aspergillum* (C)

注:1:尿嘧啶;2:次黄嘌呤;3:黄嘌呤。Note:1:Uracil;2:Hypoxanthine;3:Xanthine.

### 3 讨论与结论

近几年来,鲜地龙广泛应用于临床中。研究发现鲜地龙的可溶性蛋白含量及纤溶酶活性明显高于干地龙,而且鲜地龙的蛋白组分明显多于干地龙,鲜地龙液外敷能够抑制兔耳瘢痕组织增生及鲜地龙液外敷具有很好的抗炎作用,可对鲜地龙在外用制剂的应用与发展提供实验研究基础<sup>[20,21]</sup>。地龙具有广泛的药理作用,如抗凝血、抗肿瘤及免疫调节、降压、平喘等,也有研究表明:地龙还能够抑制心肌肥大,起到预防心衰的作用<sup>[22]</sup>。本实验采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术对广东产的鲜、干广地龙进行化学成分差异性分析。其主要化学成分为氨基酸、核苷类化合物、有机酸类化合物、二肽与环二肽类化合物、含氮及其他类化合物。结果显示:广东产的干广地龙解析出56个化合物;广东产的鲜广地龙解析出48个化合物。广东产的干广地龙较鲜广地龙多了13种成分:2-哌啶酮、*N*-乙酰基苯甲酸乙酯、组氨酰天冬酰胺、*N*-(甲氧羰基)-*L*-苯丙氨酸、二氢辣椒素、5,8,11,14-二十碳四烯酰胺、棕榈烯酸、硬脂酸、环缩二亮氨酸、9-乙基腺嘌呤、*N*-羟甲基邻苯二甲酰亚胺、3-[(2-羟乙基)氨基]丙酰胺、*N*-乙酰-*D*-苯丙氨

酸;少了6种成分:鸟苷、果糖苯丙氨酸、腺苷酸琥珀酸核苷、7,8-二甲基苯并蝶啶-2,4-二酮、亚麻酸,上述研究结果表明:广东产的鲜、干广地龙的化学成分有较大差异。液相结果显示,干广地龙中尿嘧啶的含量高于鲜广地龙中尿嘧啶的含量;鲜广地龙中次黄嘌呤的含量与干广地龙中黄嘌呤的含量差异不明显;干广地龙中黄嘌呤的含量高于鲜广地龙中黄嘌呤的含量。次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶作为广地龙的主要核苷类成分之一,测定广地龙次黄嘌呤、黄嘌呤、尿嘧啶的含量,建立广地龙质量标准评价真伪广地龙提供参考依据。

本实验用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术分析广东产的鲜、干广地龙的化学成分,为后续鲜、干广地龙的药效物质基础研究及中成药二次开发和质量控制提供参考,另外鲜广地龙的研究也为后续研究其它鲜药提供一定的化学研究基础,该方法不仅方法简单,且灵敏度高。

#### 参考文献

- 1 Tan F, Peng Y. Review the research on chemical constituents and classification analysis of fresh plant medicines [J]. Mod

- Chin Med(中国现代中药),2013,15:14-17.
- 2 Li JP, Ma H, Wang YS, et al. Comparison of contents of catalpol and sugars in fresh and dried *Rehmannia glutinosa* [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志),2001,36:300-302.
  - 3 Meng J, Dong XP, Zhao ZZ. Quantitative analysis of phenols bioactive components in the fresh and dry *Houttuynia cordata* by HPLC[J]. World J Integr Tradit West Med(世界中西医结合杂志),2008,3:145-147.
  - 4 Wang BX. Pharmacology of modern Chinese medicines[M]. Tianjin:Tianjin Science and Technology Press(现代中药药理学),1997:1104-1105.
  - 5 Hong GJ. Discussion on the efficacy and safety of xanthines in the treatment of bronchial asthma[J]. Contemp Med(当代医学),2015,21:114-115.
  - 6 Ikenaka K, Shirasaka T, Kitano S, et al. Effect of uracil on metabolism of 5-fluorouracil *in vitro*[J]. Gan,1979,70:353-359.
  - 7 Zhang Y, Dong WT, Huo JH, et al. Analysis on chemical constituents of *Pheretima aspergillum* by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2017,48:252-262.
  - 8 Wei D, Fan WL, Xu Y. Identification of water-soluble peptides in distilled spent grains by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Food Ferment Ind(食品与发酵工业),2019,45:203-207.
  - 9 Qin WH, Yang Y, Li Q, et al. Analysis of chemical compositions from nepal cordyceps by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志),2019,28:1574-1581.
  - 10 Calderón-Santiago M, Priego-Capote F, Jurado-Gómez B, et al. Optimization study for metabolomics analysis of human sweat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in high resolution mode[J]. J Chromatogr A,2014,1333:70-78.
  - 11 Zhu B, Cao H, Sun L, et al, Zhang Q. Metabolomics-based mechanisms exploration of Huang-Lian Jie-Du decoction on cerebral ischemia via UPLC-Q-TOF/MS analysis on rat serum[J]. J Ethnopharmacol,2018,216:147-156.
  - 12 Gao T, Yang LJ, Sheng XK, et al. Analysis of chemical constituents of Xiangdan Injection by HPLC-Q-TOF/MS and GC/MS[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2019,41:345-352.
  - 13 Wang YH, Feng JL, Pan ZQ, et al. The analysis of 18 free amino acids by liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry[J]. Chin J Health Lab Technol(中国卫生检验杂志),2006,16:161-163.
  - 14 Cao YY. Application of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of nucleosides in *Hericium erinaceus* [J]. J Minxi Vocat Tech Coll(闽西职业技术学院学报),2018,20:113-117.
  - 15 Lu Z, Wang Q, Wang M, et al. Using UHPLC Q-Trap/MS as a complementary technique to in-depth mine UPLC Q-TOF/MS data for identifying modified nucleosides in urine[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2017,1051:108-117.
  - 16 Lu Z, Wang Q, Wang M, et al. Using UHPLC Q-Trap/MS as a complementary technique to in-depth mine UPLC Q-TOF/MS data for identifying modified nucleosides in urine[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2017,1051:108-117.
  - 17 Liu AH, Guo H, Ye M, et al. Detection, characterization and identification of phenolic acids in Danshen using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry[J]. J Chromatogr A,2007,1161:170-82.
  - 18 Persson XM, Blachnio-Zabielska AU, Jensen MD. Rapid measurement of plasma free fatty acid concentration and isotopic enrichment using LC/MS[J]. J Lipid Res,2010,51:2761-2765.
  - 19 Xiao JP, Zhang WY, Yang X, et al. Analysis on the fatty acids composition of earthworm[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2010,21:2760-2762.
  - 20 Huang JW, An LF, Wu JR. Research the Inhibition effect mechanism of *Lumbricus* on hypertrophic scar in rabbit ears [J]. Chin J Aesthet Med(中国美容医学),2013,22:642-644.
  - 21 Chen LY, Zhang Y, Qi F, et al. Compared with the dissolubility proteins and activity of fibrinolytic enzyme between fresh earthworm and dry earthworm [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2012,18:89-92.
  - 22 Zhang SY, Liang TM, Fang L, et al. Study on the protective effect of earthworm extracts on pathological cardiac hypertrophy in rats through Akt/mTOR/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2023,35:183-190.