

基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析乌蕨中的化学成分*

黄斌 胡燕珍 李雪 吴先昊 王亚敏 陈乐#

(江西省中医药研究院 南昌 330046)

摘要:目的:快速识别乌蕨中的化学成分。方法:利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术对乌蕨药材化学成分进行分析,色谱条件为 Waters C₁₈ 色谱柱(2.1 mm× 100 mm,1.7 μm),流动相为乙腈-0.2%甲酸溶液,流速为 0.25 ml/min,柱温 40℃;采用正、负离子模式进行检测;利用 PeakView 1.2 软件对所得的成分进行分析,整理其母离子及二级碎片,通过与对照品、相关文献比对,分析其裂解途径,推断其化合物结构。结果:共推断出乌蕨中 32 种化合物,包括 15 个黄酮类化合物,15 个有机酸类化合物,2 个香豆素类成分,其中原儿茶酸葡萄糖苷、咖啡酰葡萄糖苷为首次从乌蕨中发现。结论:从液质结果及相关文献表明,乌蕨中化学成分以有机酸、黄酮及其苷类成分为主。本研究可为乌蕨的药效物质基础研究提供参考依据。

关键词:乌蕨;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术;化学成分

Analysis of Chemical Constituents in Odontosoria chinensis based on UPLC-Q-TOF-MS*

HUANG Bin, HU Yan-zhen, LI Xue, WU Xian-hao, WANG Ya-min, CHEN Le#

(Jiangxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330046)

Abstract: Objective: To identify the chemical constituents of Odontosoria chinensis rapidly. Methods: Used ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry to analyze the chemical constituents of Odontosoria chinensis, the chromatographic conditions were waters C₁₈ column(2.1 mm× 100 mm, 1.7 μm), mobile phase was acetonitrile-0.2% formic acid solution, flow rate was 0.25 ml/min, column temperature was 40℃; positive and negative ion modes were used for detection. Analyzed the components by peakview 1.2 software, and the parent ions and secondary fragments were sorted out. By comparing with the reference substance and related literature, the cleavage pathway was analyzed, and the structure of the compounds was deduced. Results: A total of 32 compounds were deduced, including 15 flavonoid compounds, 15 organic acid compounds, and 2 coumarin compounds. Procatechuic acid glucoside and caffeoyl glucoside found for the first time in Odontosoria chinensis. Conclusion: According to the results of liquid chromatography and related literatures, organic acids, flavonoids and their glycosides were the main chemical constituents in Odontosoria chinensis. This study can provide a reference for the study of pharmacodynamic material basis of Odontosoria chinensis.

Keywords: Odontosoria chinensis; Ultra performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry; Chemical constituents

中图分类号:R284.1

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2021.09.077

乌蕨(*Odontosoria chinensis*)又称乌韭、苦黄连、大叶金花草等,为陵齿蕨科,属多年生草本植物^[1],乌蕨在我国的蕴藏量极大,主要分布于长江流域附近的江西、安徽、湖南、四川、云南、广西等省。乌蕨具有保肝、清热解毒、抗炎、抗肿瘤等作用^[2-3],《江西草药》《中药大辞典》《贵州中草药名录》《广西中药志》等都记载了乌蕨可用来治疗痢疾、烫伤、支气管炎、肝炎、黄疸等疾病^[4]。乌蕨尚无明确的质量标准规范,段萍等研究乌蕨地上部分质量控制方法,对多批次乌蕨药材的原儿茶酸、原儿茶醛、荭草苷含量进行了测定^[5]。本课题组前期对乌蕨的化学成分及药理作用进行了总结^[6],同时对乌蕨抗炎活性部位进行了研究^[7]。目前,超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术^[8-12]已被广泛应用于化学成分的快速识别中,本实验利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速识别乌蕨中化学成分,建立其化学成分分析方法,为乌蕨物质基础的进一步研究提供参考依据。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 材料 AB-Sciex 5600 系列 LC/MS Trap 型质谱仪, Waters C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm× 100 mm, 1.7 μm), PeakView 1.2 软件; 对照品: 原儿茶酸 (批号: 110809-201906)、原儿茶醛 (批号: 110810-201608)、秦皮乙素 (批号: 741-200105)、香草酸 (批号: 776-9001)、咖啡酸 (批号: 885-200102)、牡荆苷 (批号: 111687-201704)、木犀草苷 (批号: 111720-201106)、槲皮苷 (批号: 111538-200302)、木犀草素 (批号: 110861-201611)、芹菜素 (批号: 111901-201102), 以上对照品均购自中国食品药品检定研究院,纯度均≥95%。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 Waters C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm× 100 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-0.2%甲酸溶液,柱温为 40℃,进样量为 2 μl,流速为 0.25 ml/min。梯度洗脱条件见表 1,质谱条件见表 2。

* 基金项目:江西省中医药管理局科技计划项目(编号:2019A228);

江西省中医药中青年骨干人才(第一批)培养计划[编号:赣中医药科教字(2020)2号]

通信作者:陈乐, E-mail: 76349830@qq.com

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A: 乙腈 (%)	B: 0.2%甲酸溶液 (%)
0	5	95
8	15	85
35	30	70
50	100	0
52	100	0
52	5	95
55	stop	

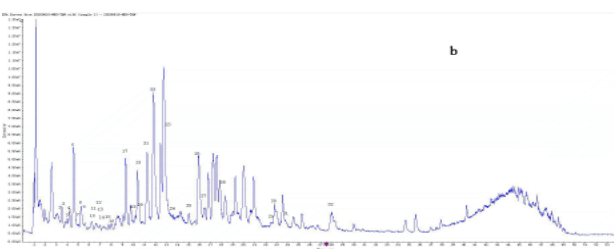
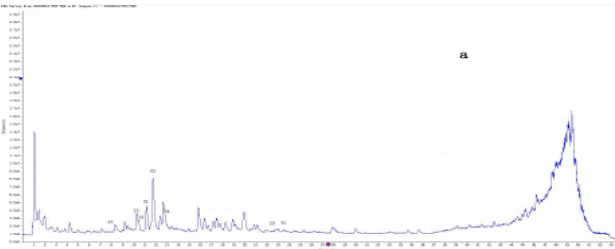
表 2 质谱条件

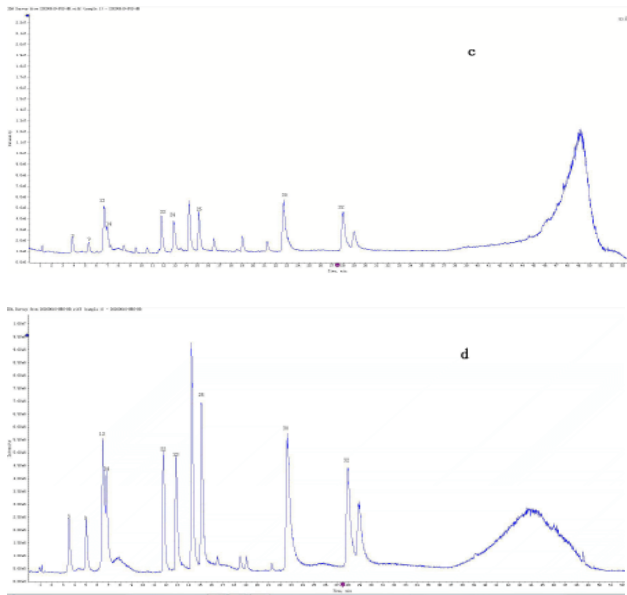
离子源	ESI
扫描模式	正 / 负离子
扫描范围	100~1 500 Da
喷雾电压	5 500 V/-4 500 V
雾化气温度	500℃
气帘气	40.00 Psi
雾化气	50.00 Psi
辅助加热气	50.00 Psi
去簇电压	100 V/-100 V
碰撞能量	40 V/-40 V
碰撞能量叠加	10 V

表 3 乌蕨醇提取物化学成分

峰号	RT	MS ¹	MS ²	分子式	ppm	化合物
1	3.412	329.0881[M-H] ⁻	167,152,123,108	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	0.9	香草酸葡萄糖苷
2	3.508	315.0726[M-H] ⁻	195,153,109,108	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	1.4	原儿茶酸葡萄糖苷 ^[8]
3	3.417	153.0212[M-H] ⁻	109,108	C ₇ H ₈ O ₄	2.1	原儿茶酸 ^[9]
4	4.179	197.0466[M-H] ⁻	182,167,123	C ₉ H ₁₀ O ₅	0.8	丁香酸 ^[6]
5	4.211	359.0982[M-H] ⁻	197,182,167,153,138,123	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	-0.5	丁香酸葡萄糖苷
6	4.631	299.0782[M-H] ⁻	137,136,109,108	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	2.5	原儿茶醛葡萄糖苷
7	5.016	339.0722[M-H] ⁻	177,133,105	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	0.2	秦皮甲素 ^[10]
8	5.164	461.1299[M-H] ⁻	299,137,136,109,108	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₃	-0.4	原儿茶醛二葡萄糖苷
9	5.292	137.0270[M-H] ⁻	119,109,108	C ₇ H ₈ O ₃	1.0	原儿茶酸 ^[11]
10	6.110	353.0878[M-H] ⁻	191	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	2.2	绿原酸 ^[12]
11	6.423	341.0878[M-H] ⁻	179,135	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	1.7	咖啡酰葡萄糖苷 ^[12]
12	6.655	177.0206[M-H] ⁻	149,133,105	C ₈ H ₈ O ₄	1.2	秦皮乙素 ^[10]
13	6.756	167.0367[M-H] ⁻	152,108	C ₈ H ₈ O ₄	0.3	香草酸 [*]
14	6.974	179.0367[M-H] ⁻	135,134	C ₈ H ₈ O ₄	0.6	咖啡酸 ^[9]
15	7.673	355.1042[M-H] ⁻	193,178,149,134	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	2.1	阿魏酰葡萄糖苷 ^[12]
16	8.017	593.1518[M-H] ⁻	473,431,413,311,293	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	1.0	牡荆素葡萄糖苷 ^[6]
		595.1657[M+H] ⁺	433,415,397,379,367,337,313,295,283	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-0.1	
17	9.284	451.0882[M-H] ⁻	297,153,109	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₂	0.4	2-O-β-D-(6-O- 龙胆酰吡喃葡萄糖) 龙胆酸 ^[6]
18	10.065	609.1470[M-H] ⁻	489,429,357,327,309	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-1.6	荭草素 -2'' -O-β-D- 吡喃葡萄糖苷 ^[6]
		611.1607[M+H] ⁺	491,449,431,413,395,383,353,329,311,299,287	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	-0.3	
19	10.442	447.0937[M-H] ⁻	357,327,299,297	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	0.9	荭草苷 ^[13]
		449.1078[M+H] ⁺	431,413,395,383,367,359,353,339,329,313,311,300,299	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	0.4	荭草苷 ^[14]
20	10.458	465.1039[M-H] ⁻	297,167,153,152,109,108	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	0.5	4-O-β-D-(6-O- 龙胆酰吡喃葡萄糖) 香草酸 ^[6]
21	11.110	593.1518[M-H] ⁻	473,413,311,293	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	1.0	牡荆素葡萄糖苷 ^[6]
		595.1657[M+H] ⁺	433,415,397,379,367,337,313,295,283	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-0.1	
22	11.763	431.0991[M-H] ⁻	341,323,311,293,283	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1.7	牡荆苷 ^[13]
		433.1129[M+H] ⁺	415,397,379,367,351,343,337,323,313,297,295,284,283	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1.1	牡荆苷 ^[14]
23	12.973	447.0931[M-H] ⁻	285,284	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	0.9	木犀草苷 [*]
24	13.343	577.1564[M-H] ⁻	457,413,311,293	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	1.8	牡荆素 -2''-O- 鼠李糖苷 ^[6]
		579.1708[M+H] ⁺	433,415,397,379,367,337,313,295,283	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	-0.2	
25	15.078	447.0937[M-H] ⁻	301,300,285,271,255,243,151	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	0.9	槲皮苷 ^[12]
26	15.875	431.0987[M-H] ⁻	269,268	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	0.8	芹菜素 -7-O- 葡萄糖苷 ^[6]
27	16.294	577.1563[M-H] ⁻	487,431,413,269,268	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	3.5	异野漆树苷
28	18.168	431.0992[M-H] ⁻	269,268	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1.9	芹菜素葡萄糖苷
29	22.472	755.1861[M-H] ⁻	593,575,473,413,341,311,293	C ₂₉ H ₄₀ O ₂₃	-3.5	牡荆素 -O- 二葡萄糖苷或其异构体
		757.1974[M+H] ⁺	595,577,475,433,415,397,379,337, 313,271,163	C ₂₉ H ₄₀ O ₂₃	-0.7	
30	22.604	285.0415[M-H] ⁻	199,151,133	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	1.6	木犀草素 ^[10]
31	23.796	739.1910[M-H] ⁻	577,575,559,457,413,341,311,293,281	C ₂₉ H ₄₀ O ₂₂	-3.9	牡荆素 -O- 鼠李糖 -O- 葡萄糖苷或其异构体
		741.2025[M+H] ⁺	595,577,459,433,415,313,295,163	C ₃₀ H ₃₆ O ₁₇	2.5	
32	28.017	269.0470[M-H] ⁻	151,149,117	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	1.5	芹菜素 ^[10]

注: * 表示已有对照品。

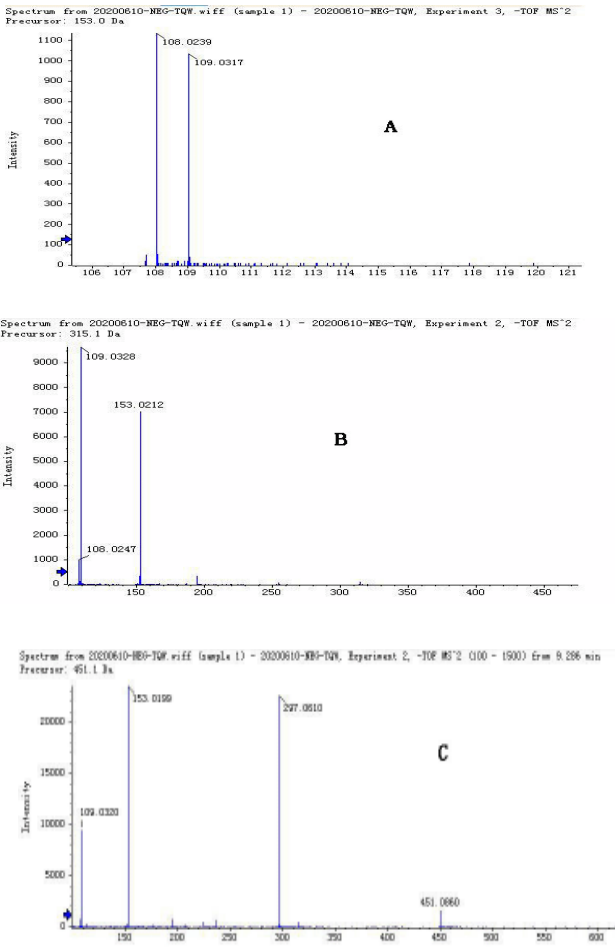




注:a,b 分别为供试品正、负离子 TIC 图,c,d 为对照品正、负离子 TIC 图。

图 1 正、负离子模式 TIC 图

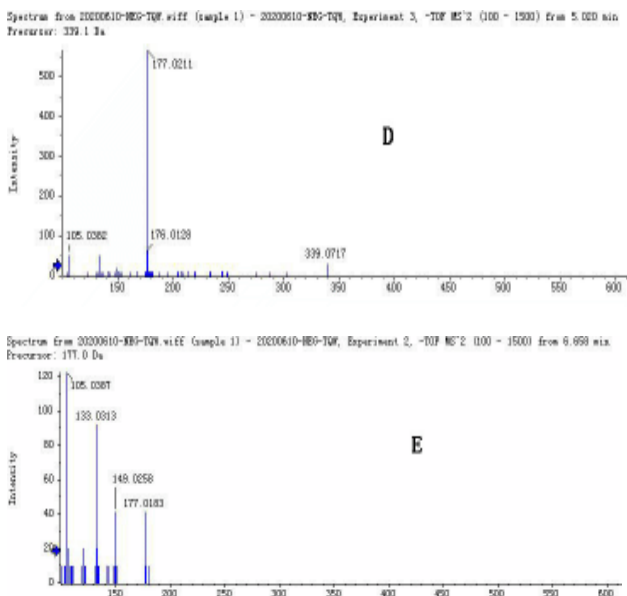
$[M-H-C_7H_6O_4-C_6H_8O_4-CO_2]^-$ 的碎片离子。鉴定为 2-O-β-D-(6-O- 龙胆酰吡喃葡萄糖) 龙胆酸。见图 2。



注:A、B、C 分别为原儿茶酸、原儿茶酸葡萄糖苷、2-O-β-D-(6-O- 龙胆酰葡萄糖) 龙胆酸 MS² 图。标有 * 的为有对照品比对。

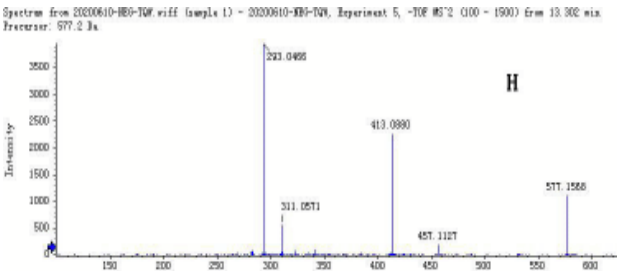
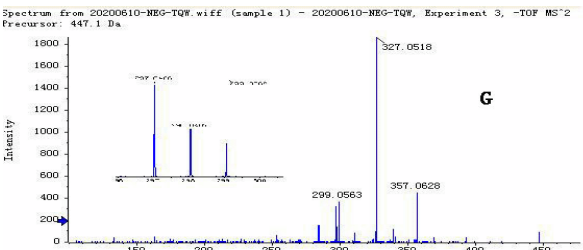
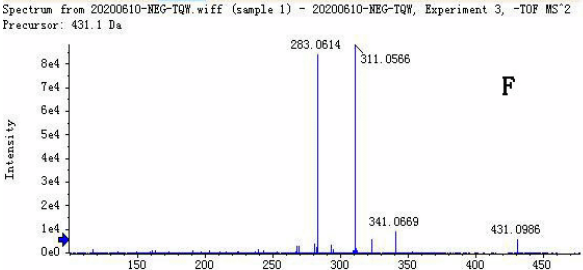
图 2 原儿茶酸、原儿茶酸葡萄糖苷、2-O-β-D-(6-O- 龙胆酰葡萄糖) 龙胆酸 MS² 图

2.2.2 香豆素类 该类化合物负离子模式下主要以 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰形式存在,发生裂解时出现连续脱去 CO 、 CO_2 的碎片离子峰,如果是香豆素苷类成分,则首先脱去糖基部分。秦皮乙素 t_R 为 6.655 min, 在负离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 177 $[M-H]^-$, 根据元素组成分析, 分子式为 $C_9H_6O_4$, 二级图谱中脱去一分子 CO 、 CO_2 生成 m/z 149 $[M-H-CO]^-$, m/z 133 $[M-H-CO_2]^-$ 碎片离子, 再脱去一分子 CO 生成 m/z 105 $[M-H-CO_2-CO]^-$ 碎片离子。与对照品及文献 10 比对鉴定为秦皮乙素。秦皮甲素 t_R 为 5.016 min, 在负离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 339 $[M-H]^-$, 根据元素组成分析, 分子式为 $C_{15}H_{16}O_9$, 二级图谱中脱去糖基部分, 生成秦皮乙素苷元离子, m/z 177 $[M-H-glc]^-$ 。与文献 10 比对鉴定为秦皮甲素。见图 3。



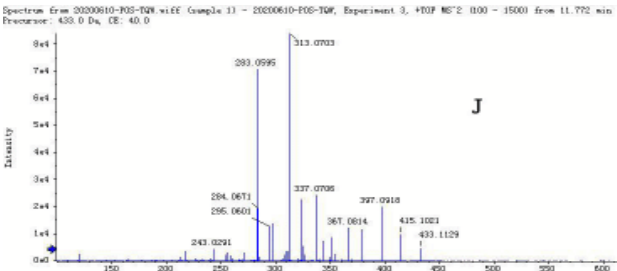
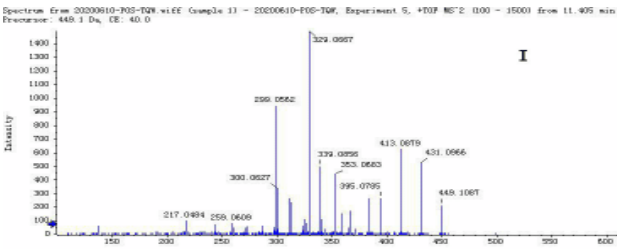
注:D、E 分别为秦皮乙素、秦皮甲素 MS² 图。
图 3 秦皮乙素、秦皮甲素 MS² 图

m/z 577 [M-H]⁻, 根据元素组成分析, 分子式为 C₂₇H₃₀O₁₄, 发生糖环裂解, 产生 m/z 457[M-H-120]⁻ 碎片离子, 脱去鼠李糖基, 产生 m/z 311[M-H-120-rha]⁻ 碎片离子; 在正离子模式下, 其准分子离子峰为 m/z 579[M+H]⁺, 二级图谱中脱去鼠李糖, 生成 m/z 433[M+H-rha]⁺ 碎片离子, 其后面裂解过程同牡荆苷。与文献 8 比对, 鉴定为牡荆素鼠李糖苷。见图 4~ 图 5。

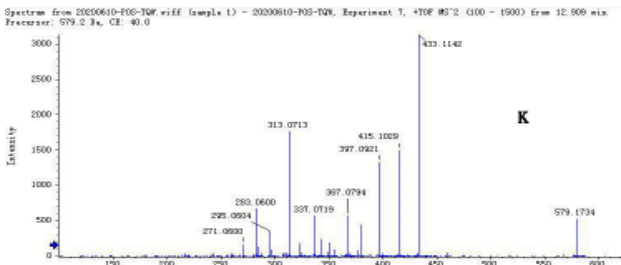


注:F、G、H 分别为牡荆苷、荭草苷、牡荆素鼠李糖苷在负离子模式下的 MS² 图。

图 4 牡荆苷、荭草苷、牡荆素鼠李糖苷在负离子模式下的 MS² 图



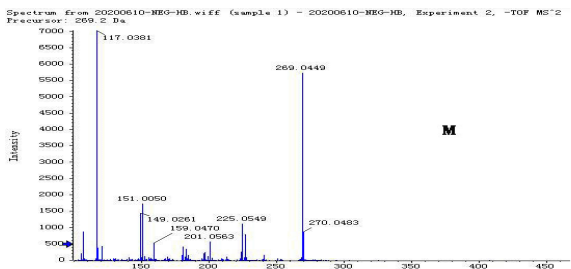
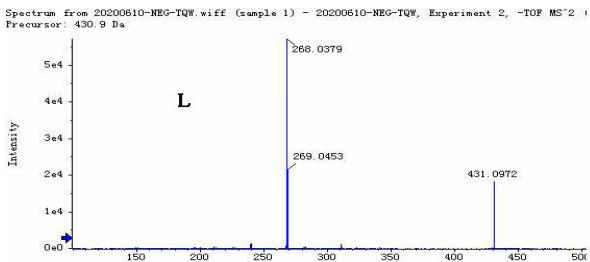
2.2.3 黄酮碳苷 黄酮碳苷在负离子模式下, 不首先出现脱糖的离子碎片, 而是发生糖环裂解, 产生丢失 90 u、120 u、150 u 的离子碎片; 在正离子模式下, 会产生连续脱去水分子的碎片离子, 文献 6 表明乌蕨中含有牡荆苷、荭草苷、牡荆素鼠李糖苷等黄酮碳苷类化合物。牡荆苷 t_R 为 11.763 min, 在负离子模式下, 其准分子离子峰为 m/z 431[M-H]⁻, 根据元素组成分析, 分子式为 C₂₁H₂₀O₁₀, 发生糖环裂解, 产生 m/z 341[M-H-90]⁻, m/z 311[M-H-120]⁻ 的特征碎片离子, 脱去 CO 产生 m/z 283[M-H-120-CO]⁻ 的碎片离子; 在正离子模式下, 其准分子离子峰为 m/z 433[M+H]⁺, 二级图谱中连续脱去 3 个水分子生成 m/z 415 [M+H-H₂O]⁺, m/z 397 [M+H-2H₂O]⁺, m/z 379 [M+H-3H₂O]⁺ 的碎片离子; 发生糖环裂解, 生成 m/z 313[M+H-120]⁺, m/z 283[M+H-150]⁺ 的碎片离子。与对照品及文献 13、14 比对, 鉴定为牡荆苷。荭草苷 t_R 为 11.443 min, 在负离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 447 [M-H]⁻, 根据元素组成分析, 分子式为 C₂₁H₂₀O₁₁, 发生糖环裂解, 产生 m/z 357[M-H-90]⁻, m/z 327[M-H-120]⁻, m/z 297[M-H-150]⁻ 的碎片离子峰; 在正离子模式下, 其准分子离子峰为 m/z 449[M+H]⁺, 连续脱去 3 个水分子后生成 m/z 431 [M+H-H₂O]⁺, m/z 413 [M+H-2H₂O]⁺, m/z 395 [M+H-3H₂O]⁺ 的碎片离子; 发生糖环裂解, 生成 m/z 329[M+H-120]⁺, m/z 299[M+H-150]⁺ 的碎片离子。与文献 13、14 比对, 鉴定为荭草苷。牡荆素鼠李糖苷 t_R 为 13.343 min, 在负离子模式下, 准分子离子峰为



注:I、J、K 分别为牡荆苷、荭草苷、牡荆素鼠李糖苷在正离子模式下的 MS² 图。

图 5 牡荆苷、荭草苷、牡荆素鼠李糖苷在正离子模式下的 MS² 图

2.2.4 黄酮氧苷 该类化合物负离子模式下主要以 [M-H]⁻ 的准分子离子峰形式存在,发生裂解时主要脱去其糖基部分,生成其苷元离子,然后发生脱羧基或发生 RDA 裂解,文献 6 表明乌蕨中含有芹菜素、山萘酚、芹菜素-7-O-葡萄糖苷等黄酮类化合物。芹菜素-7-O-葡萄糖苷 t_R 为 15.875 min,在负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 431[M-H]⁻,根据元素组成分析,分子式为 C₂₁H₂₀O₁₀,脱去葡萄糖,产生 m/z 269[M-H-gluc]⁻ 碎片离子,与文献 12 比对鉴定为芹菜素-7-O-葡萄糖苷。芹菜素 t_R 为 28.017 min,在负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 269[M-H]⁻,根据元素组成分析,分子式为 C₁₅H₁₀O₅,发生 RDA 裂解,产生 m/z 117, m/z 151 碎片离子,与对照品及文献 12 比对鉴定为芹菜素。



注:L、M 分别为芹菜素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素的 MS² 图。

图 7 芹菜素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素的 MS² 图

3 讨论

本研究通过对乌蕨甲醇提取物进行

UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析共推断出 32 种化合物,其中有 15 个有机酸类、2 个香豆素类、15 个黄酮类物质(包括 2 个黄酮苷元、7 个黄酮碳苷、6 个黄酮氧苷),原儿茶酸葡萄糖苷、咖啡酰葡萄糖苷为首次从乌蕨中发现。

目前文献报道乌蕨含有的黄酮碳苷为单糖碳苷、二糖碳苷,二糖碳苷的碎裂规律鲜有文献报道,其与双糖碳苷的裂解规律差异也尚不明确^[13-14],其主要问题在于糖是与苷元连接还是与糖基连接,本文中的二糖碳苷及三糖碳苷有待进一步深入研究。文献^[15-16]也表明有机酸、黄酮碳苷类成分与其抗炎、保肝等功效有关,因此有机酸、黄酮及其苷类成分是乌蕨的有效成分群,而乌蕨的药效物质基础研究有待进一步深入挖掘。

参考文献

[1]秦仁昌.中国植物志(第 2 卷)[M].北京:科学出版社,1959.275-279.
[2]国家中医药管理局.中华本草(第 2 卷)[M].上海:上海科学技术出版社,1999.110-112.
[3]全国中草药汇编编写组.全国中草药汇编(上册)[M].第 2 版.北京:人民卫生出版社,1996.45.
[4]周洁.壮药大叶金花草质量评价研究[D].南宁:广西中医药大学,2016.
[5]段萍,徐作刚,万红才,等.乌蕨的质量标准研究[J].华西药学杂志,2018,33(5):519-522.
[6]胡燕珍,张媛媛,田莹莹,等.乌蕨的研究进展[J].现代中药研究与实践,2020,34(2):79-86.
[7]陈乐,胡燕珍,吴先昊,等.乌蕨的不同提取组分治疗大鼠急性咽喉炎模型初步研究[J].实用中西医结合临床,2019,19(12):175-176,182.
[8]孙崇鲁,吴浩,楼天灵,等.UPLC-Q-TOF-MS 法分析三叶青地上部分化学成分[J].中成药,2018,40(6):1424-1429.
[9]汪丹,蔡甜,吴志军,等.银黄清肺胶囊化学成分的 LC-ESI-MS/MS 分析[J].中国测试,2016,42(3):36-40.
[10]许倩倩,包贝华,张丽,等.UPLC-QTOF-MS 分析乌蕨成分及多组分定量研究[J].南京中医药大学学报,2020,36(4):517-524.
[11]林秀莲,宋粉云,潘玄玄,等.UPLC-Q-TOF-MS 分析补肾强身片中化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(19):61-67.
[12]赵晓梅,程宇欣,梁彩霞,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的吴茱萸化学成分分析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(6):113-126
[13]吴新安,都模勤.黄酮碳苷类化合物 ESIMS-MS 裂解规律初探[J].天然产物研究与开发,2011,23(6):1085-1087.
[14]冯广卫,李翠兵,廖尚高,等.荭草素和异荭草素、牡荆素和异牡荆素 2 对碳苷化合物的快速检测与鉴定[J].药物分析杂志,2011,31(7):1263-1268.
[15]吴新安,赵毅民.天然黄酮碳苷及其活性研究进展[J].解放军药学报,2005,2121(2):135-138.
[16]张晓燕,许海森,王笃军,等.原儿茶酸与原儿茶醛对小鼠肝脏细胞色素 P450 表达的影响[J].中国野生植物资源,2017,36(1):18-21,25.

(收稿日期: 2021-01-24)