

# UPLC-QTOF-MS 分析乌敛莓成分及多组分定量研究

许倩倩<sup>1</sup>, 包贝华<sup>1</sup>, 张丽<sup>1</sup>, 赵学龙<sup>2</sup>, 谈瑄忠<sup>2</sup>, 李文<sup>2</sup>

(1.南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023; 2.南京中医药大学附属南京中医院, 江苏 南京 210001)

**摘要:**目的 定性分析乌敛莓化学成分并对其主要成分建立定量分析方法。方法 采用高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-QTOF-MS)技术, 选用 ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub> 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.4 mL/min, 质谱采用电喷雾(ESI)离子源, 在正、负离子模式下采集数据。运用 PeakView 软件对结果进行分析, 根据化合物的相对保留时间、准分子离子峰和碎片离子峰等信息, 并结合对照品和相关文献进行成分鉴定。采用 UPLC 法对 4 个主要成分(木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素、芹菜素)建立含量测定方法。结果 从乌敛莓中共推断并鉴定出 31 个化学成分, 包括黄酮及其苷类 6 个, 香豆素类 3 个, 萜类及三萜类 7 个, 脂肪酸酯类 7 个, 其他类 8 个。3 批乌敛莓中木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素、芹菜素含量范围分别为 0.061%~0.15%、0.077%~0.14%、0.011%~0.028%、0.020%~0.062%。结论 该分析方法可以快速、准确地分析乌敛莓中的化学成分, 建立的定量方法为乌敛莓质量控制及制剂开发奠定了基础。

**关键词:** 乌敛莓; 化学成分分析; UPLC-QTOF-MS; 黄酮类; 定量分析方法

**中图分类号:** R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2020)04-0517-08

**DOI:** 10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0517

**引文格式:** 许倩倩, 包贝华, 张丽, 等. UPLC-QTOF-MS 分析乌敛莓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.

## UPLC-QTOF-MS Analysis and Multicomponent Quantitative Analysis of *Cayratia Japonica*

XU Qian-qian<sup>1</sup>, BAO Bei-hua<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, ZHAO Xue-long<sup>2</sup>, TAN Xuan-zhong<sup>2</sup>, LI Wen<sup>2</sup>

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China; 2. Nanjing Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210001, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To qualitative analysis of the chemical constituents of *Cayratia japonica* and establish a quantitative analysis method for the main components. **METHODS** ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub> chromatographic columns (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) were selected, acetonitrile (B)-0.1% formic acid aqueous solution (A) was used as mobile phase for gradient elution, a flow rate of 0.4 mL/min, mass spectrometry using electrospray (ESI) ion source to collect data in positive and negative ion mode. The results were analyzed by PeakView software. Then according to the relative retention time, excimer ion peak and fragment ion peak of the compound, the chemical composition was analyzed according to the reference material and related literature. The quantitative analysis of four main components (luteolin-7-O-glucoside, apigenin-7-O-glucoside, luteolin, apigenin) were established. **RESULTS** A total of 31 chemical constituents were identified in *Cayratia japonica*, including 7 flavonoids and their glycosides, 3 coumarins, 7 terpenoids and triterpenoids, 7 fatty acid esters and 8 other classes. The contents of luteolin-7-O-glucoside, apigenin-7-O-glucoside, luteolin and apigenin in three batches of *Cayratia japonica* were 0.061%~0.15%, 0.077%~0.14%, 0.011%~0.028% and 0.020%~0.062%, respectively. **CONCLUSION** This method can analyze quickly and accurately the constituents of *Cayratia japonica* and the quantitative analysis method could be used for quality control of *Cayratia japonica*.

**KEYWORDS:** *Cayratia japonica*; chemical composition analysis; UPLC-QTOF-MS; flavonoids; quantitative analysis method

乌敛莓为葡萄科乌敛莓属植物乌敛莓 *Cayratia japonica* (Thunb.) Gagnep. 的全草, 具有清热利湿, 解毒消肿之功效, 主治热毒痈肿、疔疮、丹毒、

风湿痹痛、黄疸等<sup>[1]</sup>。乌敛莓膏是南京市中医院著名制剂, 已应用于临床 30 余年, 临床表明其对肛周脓肿、乳痈、腮腺炎、痛风性关节炎、风湿性关节炎和

收稿日期: 2020-04-17

基金项目: 南京市第五批老中医药专家学术经验继承项目; 南京市医学科技发展资金(YKK16294); 南京市中医药转化医学基地项目(ZHCX201806)

第一作者: 许倩倩, 女, 硕士研究生, E-mail: xuqianqian0617@163.com

通信作者: 张丽, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制与质量控制研究, E-mail: zhangli@njucm.edu.cn;

赵学龙, 男, 主管中药师, 主要从事医院药事管理、医院制剂研发及中药临床药学工作, E-mail: zhaoxuelong301@163.com

腰痛等症均有良好的疗效。苏莉等<sup>[2]</sup>采用乌莓膏对火毒蕴结型肛痈患者进行治疗,结果发现乌莓膏组在自行溃透比率、缩短脓肿消退时间、减轻疼痛、降低切开排脓比率等方面效果明显。此外临床研究还表明乌莓膏结合负压辅助愈合系统(VAC)对高位复杂性肛瘘术后创面的愈合效果良好<sup>[3]</sup>。但目前对乌莓研究主要集中在临床效果上,而对其有效成分研究较少,缺乏主要成分定量分析方法,亦缺乏完善的质量标准。

本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析技术对乌莓所含化学成分进行分析,以期较为全面地获得乌莓的化学成分信息,并根据分析结果对含量较高的成分建立定量方法,不仅为建立完善的乌莓膏质量标准奠定基础,亦为进一步研究其效应物质基础及作用机制提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

I-Class 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Shimadzu 快速液相系统(配备有 LC-20AD XR 泵,SIL-20A XR 自动进样器,CTO-20AC 柱温箱,日本岛津公司);Triple TOF 5 600 质谱仪(配备有 DuoSpray 离子源,美国 AB Sciex 公司);BP211D 型电子天平( $d=0.01$  mg,赛多利斯科学仪器有限公司);HANGPING FA1104N 型分析天平( $d=0.1$  mg,上海精密科学仪器有限公司);台式高速离心机(TG16A-WS 型,南京以马内利仪器设备有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9023A 型,上海精宏实验设备有限公司);高速中药粉碎机(XFB-200 型,吉首市中诚制药机械厂);数控超声波清洗器(KH-500DB 型,昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

乙腈、甲醇色谱纯(德国 Merck 公司);甲酸色谱级(罗恩试剂);超纯水(Milli-Q 超纯水系统制备);其余试剂为分析纯。对照品木犀草素-7-O-葡萄糖苷(上海源叶生物科技有限公司,批号:Y26A9H59973),纯度 $\geq 98\%$ ;芦丁(上海源叶生物科技有限公司,批号:T27F10Z81699),纯度 $\geq 98\%$ ;木犀草素(中国食品药品检定研究院,批号:111520-201605,纯度:99.6%);芹菜素(上海融禾医药科技有限公司,批号:080531,纯度 $> 98\%$ );芹菜素-7-O-葡萄糖苷(批号:16080705,纯度 $\geq 98\%$ )。

### 1.3 饮片

乌莓饮片产地为安徽亳州市涡阳县(批号:

20181201,生产日期:2018 年 12 月 3 日,鉴定编号:ZYHXL3-CJ-S1),安徽亳州市蒙城县(批号:20190428,生产日期:2019 年 4 月 28 日,鉴定编号:ZYHXL3-CJ-S2)和河南周口市太康县(批号:20190425,生产日期:2019 年 4 月 25 日,鉴定编号:ZYHXL3-CJ-S3)。经南京中医药大学严辉副教授鉴定为葡萄科植物乌莓 *Cayratia japonica* (Thunb.) Gagnep.的全草。

## 2 方法与结果

### 2.1 成分鉴定

2.1.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub> 色谱柱(2.1 mm $\times$ 50 mm,1.8  $\mu$ m);流速:0.4 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:2  $\mu$ L;流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~12 min,1%~6%B;12~15 min,6%~10%B;15~22 min,10%~15%B;22~30 min,15%~20%B;30~40 min,20%~60%B;40~45 min,60%~90%B。

2.1.2 质谱条件 采用 TOF MS-IDA-MS/MS 模式,电喷雾离子源(ESI),采用正负离子模式扫描,质量扫描范围  $m/z$  50~1 500。

正离子检测方式:气帘气(CUR)276 kPa,雾化气(GS1)279 kPa,辅助气(GS2)279 kPa,电喷雾电压(ISVF)5 500 eV,离子源温度(TEM)550 $^{\circ}$ C,去簇电压(DP)100 eV;TOF-MS 模式下设置碰撞电压 10 eV,IDA-MS/MS 条件下设置碰撞电压 40 eV,碰撞电压差 20 eV。

负离子检测方式:气帘气(CUR)276 kPa,雾化气(GS1)279 kPa,辅助气(GS2)279 kPa,电喷雾电压(ISVF)4 500 eV,离子源温度(TEM)550 $^{\circ}$ C,去簇电压(DP)-100 eV;TOF-MS 模式下设置碰撞电压-10 eV,IDA-MS/MS 条件下设置碰撞电压-40 eV,碰撞电压差 20 eV。

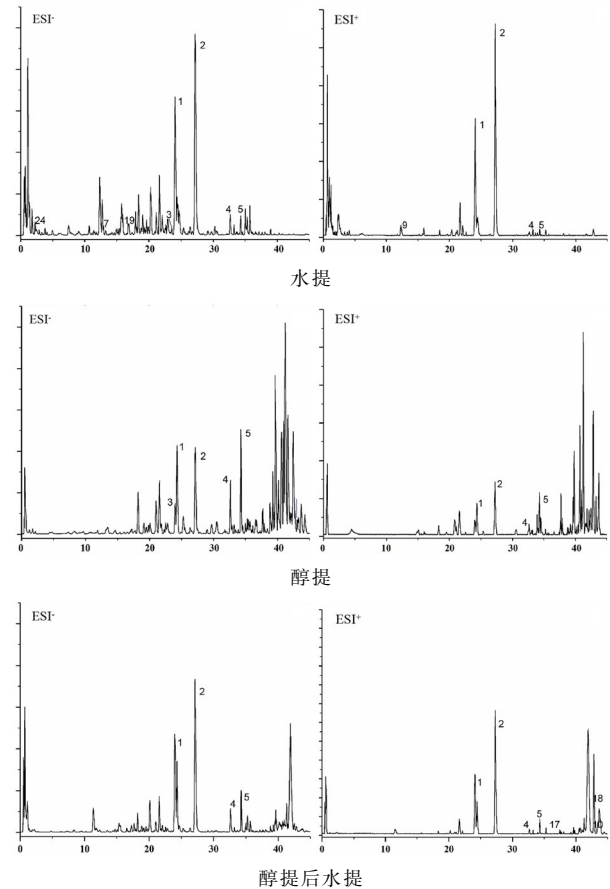
2.1.3 供试品溶液制备 水提:乌莓饮片最粗粉适量,加 10 倍量水回流提取 2 次,每次 2 h,合并滤液,减压干燥得干浸膏。精密称取干浸膏约 0.2 g 至 10 mL 量瓶,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,上清液经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

醇提:乌莓饮片最粗粉适量,加 10 倍量乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并滤液,减压干燥得干浸膏。精密称取干浸膏约 0.2 g 至 10 mL 量瓶,加乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,上清液经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

醇提后水提:取乌莓醇提后残渣加 10 倍量水

进行提取,合并滤液后减压干燥得干浸膏。精密称取干浸膏约 0.2 g 至 10 mL 量瓶,加乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀,上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 乌菰莓化学成分鉴定 通过查阅国内外相关文献<sup>[4-6]</sup>,并借助 TCMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、SciFinder (<https://scifinder.cas.org>)、ChemSpider (<http://www.chemspider.com>) 等网络数据库建立乌菰莓的化学成分库。在相同分析条件下,分别对乌菰莓饮片各供试品溶液进行质谱数据采集。数据处理采用 AB 公司 PeakView 软件(version 1.2),将包含化合物名称和分子式信息的化学成分库导入软件内置的 XIC Manager 表单,从原始质谱数据中筛选目标化合物,获取各化合物的保留时间、精确分子质量等信息,选取精确分子质量误差在±5 范围内的目标质谱峰,提取二级碎片离子信息,通过对照品比对、参考相关文献、推测裂解途径进行化合物确认<sup>[7]</sup>。离子流图见图 1。



注:1.木犀草素-7-O-葡萄糖苷;2.芹菜素-7-O-葡萄糖苷;3.芦丁;  
4.木犀草素;5.芹菜素;7.秦皮甲素;9.秦皮苷;10.羽扇豆醇;  
17.棕榈酸;18.硬脂酸;19.反式咖啡酸乙酯;24.没食子酸

图1 乌菰莓不同提取方式总离子流图

在正负离子模式下,共鉴别或推断出乌菰莓中 31 个化学成分。其中黄酮及其苷类化合物 6 个,见图 2;香豆素类化合物 3 个,见图 3;萜类及三萜类化合物 7 个,见图 4;脂肪酸酯类化合物 7 个,见图 5;其他类 8 个,见图 6。鉴定出的各化学成分的基本信息见表 1。

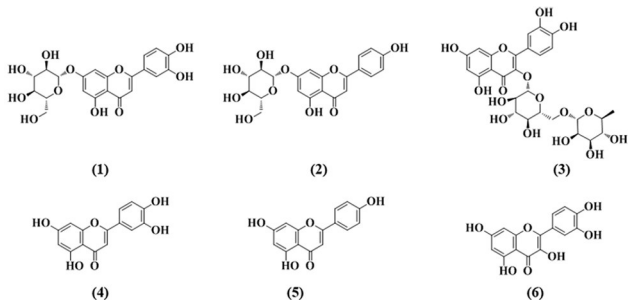


图2 黄酮及其苷类化合物结构式

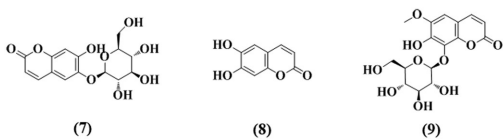


图3 香豆素类化合物结构式

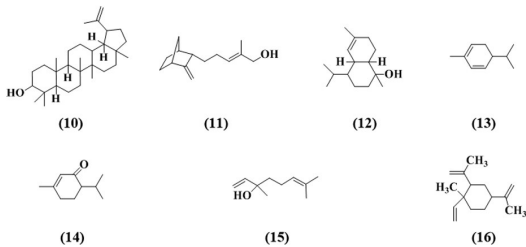


图4 萜类化合物结构式

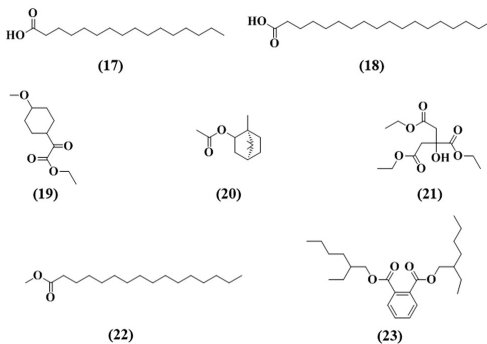


图5 脂肪酸酯类化合物结构式

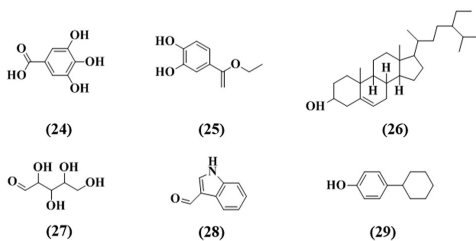


图6 其他类化合物结构式

表 1 乌菰莓化学成分 UPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定结果

| No. | t <sub>R</sub> /min | 化合物                                  | 分子式                                             | <i>m/z</i> | 误差/<br>ppm | 负离子            | 正离子                          | MS/MS                                   | 来源             | 参考文献 |
|-----|---------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------------|------------|------------|----------------|------------------------------|-----------------------------------------|----------------|------|
| 1   | 24.051              | 木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷*              | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> | 448.100 5  | −0.30      | H <sup>−</sup> |                              | 447,285                                 | 均有             | [8]  |
| 2   | 27.186              | 芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷*               | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> | 432.105 6  | 1.0        | H <sup>−</sup> |                              | 431,341,323,311,265,283,269,163,161,117 | 均有             | [9]  |
| 3   | 23.996              | 芦丁*                                  | C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub> | 610.153 3  | −3.3       | H <sup>−</sup> |                              | 609,285                                 | 醇提             | [10] |
| 4   | 32.647              | 木犀草素*                                | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>  | 286.047 7  | −1.0       | H <sup>−</sup> |                              | 285,199,175,151,133,107                 | 均有             | [10] |
| 5   | 34.289              | 芹菜素*                                 | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>  | 270.052 8  | −0.90      | H <sup>−</sup> |                              | 151,117,65                              | 均有             | [10] |
| 6   | 31.626              | 槲皮素                                  | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>  | 302.235 7  | 0.60       | H <sup>−</sup> |                              | 301,151                                 | 均有             | [10] |
| 7   | 13.468              | 秦皮甲素                                 | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>  | 340.079 4  | 0.30       | H <sup>−</sup> |                              | 339,205,177,149,133,105                 | 均有             | [11] |
| 8   | 14.242              | 秦皮乙素                                 | C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>    | 178.026 6  | 1.1        | H <sup>−</sup> |                              | 177,149,133,121,105,93,93,81            | 均有             | [12] |
| 9   | 11.462              | 秦皮苷                                  | C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub> | 370.089 9  | 2.0        |                | H <sup>+</sup>               | 163,119                                 | 醇提             | [13] |
| 10  | 44.022              | 羽扇豆醇                                 | C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O               | 426.386 1  | −3.6       |                | Na <sup>+</sup>              | 237,203,149                             | 水提             | [14] |
| 11  | 41.286              | 檀香醇                                  | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O               | 220.350 5  | −3         | H <sup>−</sup> |                              | 93,55                                   | 水提             |      |
| 12  | 38.579              | T-Muurolol                           | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O               | 222.366 3  | 0.60       |                | COOH <sup>+</sup>            | 55,67,95,149,189                        | 醇提             | [15] |
| 13  | 34.67               | (−)-水芹烯                              | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>                 | 136.125 2  | −0.90      |                | COOH <sup>+</sup>            | 23,121,121,109,107,53,81,93             | 水提             |      |
| 14  | 25.015              | (−)-胡椒酮                              | C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O               | 152.233 4  | −2.3       |                | H <sup>+</sup>               | 81,71,69,67,55,53                       | 均有             | [16] |
| 15  | 37.516              | 芳樟醇                                  | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O               | 154.249 3  | −2.7       |                | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | 72,57                                   | 醇提             |      |
| 16  | 37.624              | β-榄香烯                                | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                 | 204.351 1  | −1.3       |                | COOH <sup>+</sup>            | 175,161,147,121,107,81,67,55            | 醇提             | [17] |
| 17  | 37.423              | 棕榈酸                                  | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>  | 256.240 2  | −0.20      |                | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> | 71,73,0215                              | 醇提             | [14] |
| 18  | 43.686              | 硬脂酸                                  | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>  | 284.271 5  | 0.20       |                | COOH <sup>+</sup>            | 271,237,197,55                          | 醇提             | [18] |
| 19  | 16.818              | 反式咖啡酸乙酯                              | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>  | 208.210 6  | 0.50       | H <sup>−</sup> |                              | 163                                     | 均有             | [19] |
| 20  | 36.20               | <i>L</i> -乙酸冰片酯                      | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>  | 196.146 3  | −1.0       | H <sup>−</sup> |                              | 195                                     | 均有             |      |
| 21  | 10.97               | 柠檬酸三乙酯                               | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>  | 276.120 9  | −2.9       | H <sup>−</sup> |                              | 127,145,257,275                         | 水提             | [18] |
| 22  | 1.15                | 棕榈酸甲酯                                | C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>  | 270.255 9  | 0.00       |                | H <sup>+</sup>               | 271,71                                  | 醇提后水提<br>水提    | [18] |
| 23  | 43.11               | 邻苯二甲酸二乙基己酯                           | C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>  | 390.277 0  | −2.0       | H <sup>−</sup> |                              | 149                                     | 醇提后水提<br>醇提后水提 | [20] |
| 24  | 2.242               | 没食子酸                                 | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>    | 170.021 5  | 2.5        | H <sup>−</sup> |                              | 169,125,107,97,69                       | 均有             | [9]  |
| 25  | 23.43               | 3,4-二羟基苯甲酸乙酯                         | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>   | 182.057 9  | 0.60       | H <sup>−</sup> |                              | 181,153,123,109,91                      | 醇提             | [21] |
| 26  | 41.44               | β-谷甾醇                                | C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O               | 414.386 2  | −4.3       |                | Na <sup>+</sup>              | 403,385,367,357,191                     | 醇提后水提<br>醇提    | [22] |
| 27  | 2.01                | 阿拉伯糖                                 | C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>   | 150.129 9  | 2.0        | H <sup>−</sup> |                              | 161,143,115,101,99,73,59,57             | 水提             | [23] |
| 28  | 19.5                | 吡啶-3-甲醛                              | C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NO                | 145.052 8  | −0.70      | H <sup>−</sup> |                              | 144,116,114,65                          | 醇提后水提<br>均有    | [5]  |
| 29  | 35.72               | 4-环己基苯酚                              | C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O               | 176.120 1  | −3.1       |                | H <sup>+</sup>               | 159,133,107,105,93,55                   | 水提             | [5]  |
| 30  | 16.8                | 5-羟基-3,4-二甲基-5-戊基-2(5 <i>H</i> )-呋喃酮 | C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>  | 197.118 3  | 0.50       |                | COOH <sup>+</sup>            | 185,181,167,151,145,53,55               | 醇提             | [5]  |
| 31  | 42.51               | 6,10,14-三甲基-2-十五烷酮                   | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O               | 268.477 8  | −0.70      |                | COOH <sup>+</sup>            | 71,57,57                                | 醇提后水提<br>醇提    | [5]  |

注：\* 表示与对照品比对鉴定的化合物。

2.1.5 黄酮及其苷类化合物解析 黄酮及其苷类化合物是乌菰莓主要化学成分类型,该类化合物在ESI-MS 裂解过程中容易发生脱糖基、脱水、环的逆

狄尔斯-阿德尔反应(RDA)裂解以及 CO、CO<sub>2</sub>、CHO 等中性分子丢失<sup>[13]</sup>;在负离子模式下,异戊烯基取代的黄酮类成分易失去糖基产生基峰离子,而

苷元离子较难进一步裂解,因此可将苷元离子作为鉴别该类化合物的特征离子。以化合物1为例,该化合物为黄酮苷类化合物,在一级质谱图中出现  $m/z$  447.092 6  $[M-H]^-$  的分子离子峰,并在  $m/z$  285 处有一个碎片峰,这是由于所连葡萄糖基团丢失所得的苷元离子。其在  $m/z$  447.092 6 处用  $[M-H]^-$  离子洗脱,在  $MS^2$  分析中断裂,在  $m/z$  285 处生成主要离子,且二级图谱中 3 个峰匹配度  $>90\%$ 。并通过与标准品进行比较,确定该化合物为木犀草素-7-O-葡萄糖苷,其可能裂解途径见图 7。

化合物 4 的一级质谱图出现  $m/z$  285.039 4  $[M-H]^-$  的分子离子峰,二级图谱中在  $m/z$  199  $[(M-H)-86]^-$  处有一个碎片峰,推断这是由于 2-苯基色原酮中 B 环中  $C_4H_6O_2$  的丢失;A 环中 7-OH 与 B 环结构的裂解成碎片  $m/z$  175。其在  $m/z$  285.039 4 处用  $[M-H]^-$  离子洗脱,在  $MS^2$  分析中断裂,在  $m/z$  199、175、151 处生成主要离子,并通过与标准品进行比较,确定该化合物为木犀草素,且为化合物 1 的苷元分子,故具体裂解途径见图 7 虚线框内。用相同方法鉴定黄酮类化合物。

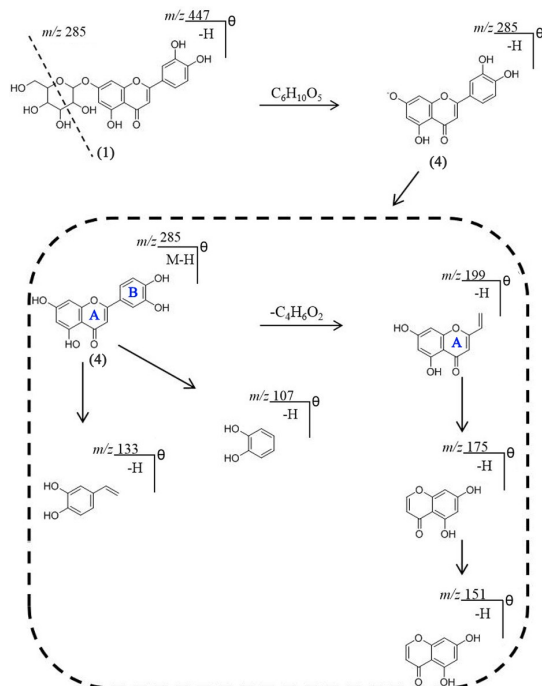


图 7 木犀草素-7-O-葡萄糖苷的裂解途径

2.1.6 香豆素类化合物解析 香豆素类化合物在 ESI-MS 中大多具有强的分子离子峰,简单香豆素和呋喃香豆素类的分子离子峰经常是基峰。由于香豆素类分子一般具有多个和芳环连接的氧原子、羟基、甲氧基,故其质谱经常出现一系列失去  $CO$ ,  $OH$  或

$H_2O$ , 甲基或甲氧基的碎片离子峰。以化合物 7 为例,该化合物为香豆素类化合物,在  $m/z$  177 处有一个碎片,这是由于所连糖基丢失所得的苷元离子。在  $m/z$  133 处有一个碎片,由于其脱了一个  $CO_2$  所得。化合物 8 是它的苷元化合物,二级图谱中同样包含有以上特征碎片峰,且相对丰度较高。结合文献研究鉴定化合物 7 为秦皮甲素,化合物 8 为秦皮乙素。其可能裂解途径见图 8。用相同方法鉴定香豆素类化合物。

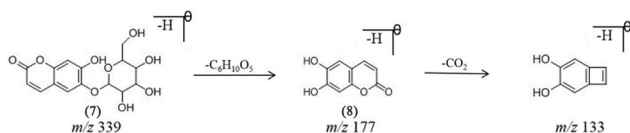


图 8 秦皮甲素的裂解途径

2.1.7 脂肪酸酯类化合物解析 化合物 17 在间隔 14 个质量单位( $CH_2$ 群)的范围内由一系列相应的烃类团簇组成,其 MS 谱主要由于烃侧链的逐渐断裂,特征片段是  $m/z$  71 处的  $[CH_3(CH_2)_4]^-$  和  $m/z$  73 的  $[(CH_2)_2COOH]^-$  的碎片。其可能裂解途径见图 9。用相同方法鉴定该类其他化合物。

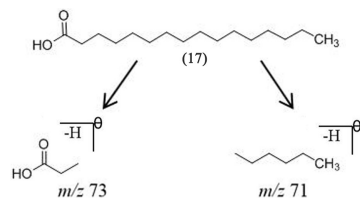


图 9 棕榈酸的裂解途径

2.1.8 其他化合物解析 化合物 24 的一级质谱给出准分子离子峰  $m/z$  169  $[M-H]^-$ , 二级质谱  $m/z$  125.0  $[(M-H)-44]^-$  为失去 1 个  $CO_2$  的碎片离子峰,且是它的特征碎片峰。根据文献比对<sup>[9]</sup>,鉴定该化合物为没食子酸。用相同方法鉴定其他各类化合物。

## 2.2 多成分含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS  $T_3$  色谱柱 (2.1 mm  $\times$  50 mm, 1.8  $\mu m$ ); 流动相: 甲醇 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B); 梯度洗脱: 0 ~ 8 min, 37% ~ 37% A; 8 ~ 15 min, 37% ~ 75% A; 15 ~ 17 min, 75% ~ 90% A; 检测波长 254 nm; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30  $^{\circ}C$ ; 进样量 2  $\mu L$ 。

2.2.2 对照品溶液的制备 取木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素和芹菜素对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,配制成质量浓度分别为 0.56、0.50、0.072、0.10 mg/mL 的混合对照品溶

液。

2.2.2.3 供试品溶液的制备 取乌菟莓饮片粉末约 1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 20 mL,称定质量,超声处理 45 min (500 W, 40 kHz),放冷,再称定质量,用甲醇补足失质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.2.4 方法学考察

表 2 回归方程及相关系数

| 成分                     | 回归方程                  | <i>r</i> | 线性范围/(μg·mL <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|-----------------------|----------|-----------------------------|
| 木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 | $Y=9\,965X-56\,401$   | 0.999 7  | 17.58~281.3                 |
| 芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷  | $Y=8\,140.8X-40\,188$ | 0.999 6  | 15.79~252.6                 |
| 木犀草素                   | $Y=17\,042X-14\,355$  | 0.999 7  | 2.362~37.21                 |
| 芹菜素                    | $Y=13\,162X-17\,996$  | 0.999 7  | 3.136~50.18                 |

2.2.2.4.2 精密度试验 取同一混合对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷、木犀草素、芹菜素峰面积的 *RSD* 分别为 0.39%、0.39%、0.39%、1.1%,表明仪器精密度良好。

2.2.2.4.3 稳定性试验 取乌菟莓粉末(批号:20181201)按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后(条件同“2.2.1”)进样分析,并记录其峰面积。结果木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷,芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷,木犀草素和芹菜素峰面积的 *RSD* 分别为 2.7%、2.3%、2.2%、1.8%,表明该供试品溶液样品在 24 h 内稳定性良好。

2.2.2.4.4 重复性试验 取乌菟莓粉末(批号:20181201)精密称定 6 份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,进样分析(方法和条件同“2.2.1”),并记录其峰面积。结果木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、芹菜素-7-

2.2.4.1 线性关系考察 将“2.2.2”项下配制好的混合对照品溶液作为 1 号,分别稀释 2、4、8、16 倍,制得 2~5 号混合对照品溶液。分别精密吸取 1~5 号混合对照品溶液,注入超高效液相色谱仪,按色谱条件进样测定。以浓度 *X* 为横坐标,各对照品峰面积 *Y* 为纵坐标绘制标准曲线,结果见表 2。各待测成分 *r* 在 0.999 6~0.999 7 之间,表明其线性关系良好。

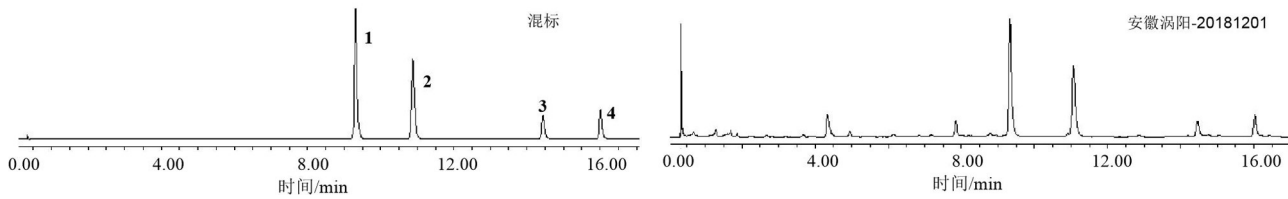
*O*-葡萄糖苷、木犀草素和芹菜素含量的 *RSD* 分别为 1.4%、2.2%、1.1%、2.8%,表明该方法的重复性良好。

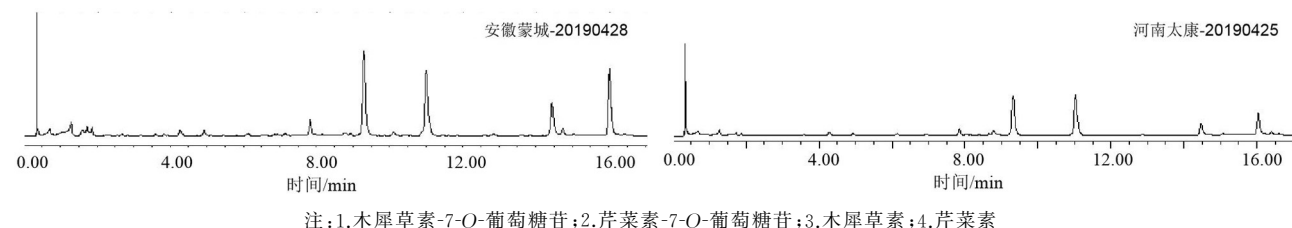
2.2.4.5 加样回收率试验 取乌菟莓粉末(批号:20181201)0.5 g,精密称定,置锥形瓶中,分别精密加入与已知成分含量相同的各对照品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,结果木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷、木犀草素和芹菜素加样回收率的平均值依次为 101.2%、98.39%、102.1%、96.56%,*RSD* 值依次为 0.42%、1.3%、1.5%、1.8%,表明该方法回收率良好。

2.2.5 样品测定 3 个不同批次乌菟莓饮片粉末各取 3 份,精密称定,进样分析,色谱图见图 10。测定峰面积,通过各成分的线性方程计算各成分含量,结果见表 3。

表 3 3 批乌菟莓饮片含量测定结果(*n*=3)

| 产地   | 批号       | 木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷/% | 芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷/% | 木犀草素/% | 芹菜素/% |
|------|----------|--------------------------|-------------------------|--------|-------|
| 安徽涡阳 | 20181201 | 0.150                    | 0.140                   | 0.015  | 0.020 |
| 安徽蒙城 | 20190428 | 0.120                    | 0.130                   | 0.028  | 0.062 |
| 河南太康 | 20190425 | 0.061                    | 0.077                   | 0.011  | 0.022 |





注:1.木犀草素-7-O-葡萄糖苷;2.芹菜素-7-O-葡萄糖苷;3.木犀草素;4.芹菜素

图 10 3 批乌荭莓饮片含量测定液相色谱图

### 3 讨论

乌荭莓具有清热利湿、解毒消肿的功效,医院制剂乌荭莓膏长期用于临床且疗效确切,但乌荭莓未被药典收录,其所含化学成分及质量标准亦不甚明确且研究较少,乌荭莓膏也无完善的质量控制标准。本文通过 UPLC 法分别对水提、醇提、醇提后水提所含化学成分进行了数据采集,并运用 peakview 软件将数据采集结果与自建的乌荭莓化学成分库进行比对,采用对照品比对及文献比对,根据裂解规律分析发现共有 31 个化合物有不同程度的响应。根据质谱结果可以发现,醇提法分离获得的化学成分数目较多,保留时间多靠后,多为苷元类化合物。水提法中分离获得的成分则以极性较大成分为主,这些为后续探讨乌荭莓活性部位的物质差异奠定初步基础。分析结果发现黄酮类成分木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素、芹菜素 4 个成分含量较高,故对不同提取物中这 4 种成分的含量进行测定。提取方式不同,其浸膏得率和各成分含量不同,水提、醇提和醇提后水提 3 种提取方式的得率分别为 23.9%、13.8% 和 28.7%。关于各成分含量,在醇提后水提法中木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷的含量最高,分别为 5.340 mg/g 和 6.078 mg/g,在醇提法中含量最低,分别为 2.911 mg/g 和 3.010 mg/g。木犀草素和芹菜素的含量则是在醇提法中最高,分别为 0.372 mg/g 和 0.769 mg/g,在水提法中含量最低,分别为 0.0913 mg/g 和 0.0923 mg/g。文献研究表明黄酮类化合物具有广泛的药理作用和生物活性,如抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗氧化和增强细胞免疫等作用。周霄楠等<sup>[24]</sup>发现木犀草素可极显著地抑制脂多糖(LPS)诱导小鼠 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达,从而发挥抗炎作用。芹菜素可诱导细胞凋亡,发挥其抗肿瘤作用,抑制肿瘤生长<sup>[25]</sup>。此外有研究表明木犀草素-7-O-葡萄糖苷等黄酮类成分具有良好的抗氧化活性<sup>[26]</sup>。梁生林等<sup>[27]</sup>采用 2 种急性炎症模型即二甲苯致小鼠耳廓肿胀和蛋清致大鼠足跖肿胀以及大鼠棉球肉芽肿

慢性炎症模型,对乌荭莓的抗炎镇痛部位进行筛选,结果发现乌荭莓的抗炎作用部位主要为水部位,镇痛部位主要为石油醚部位。课题组后续实验将对上述成分展开深入研究,探究其在痛风性关节炎和肛周脓肿术后愈合方面的作用机理。

相对于 HPLC 法,UPLC 法分离效率及灵敏度更高,更适用于组分复杂,分离困难的中药样品分析,并且木犀草素-7-O-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、木犀草素、芹菜素 4 个成分含量高于万分之一,符合《中国药典》含量测定指标限度要求,可作为标准质控指标,故采用 UPLC 法建立其含量测定方法,实验对供试品溶液制备的料液比和超声时间进行了考察,料液比分别考察了 1:10、1:15、1:20,结果发现料液比为 1:20 时各成分含量最高,超声时间分别考察了 30、45、60 min,结果发现,随着超声时间的增加而含量增加,但 60 min 与 45 min 的差异较小,最终确定提取时间为 45 min。故最终以料液比 1:20,超声时间 45 min 作为供试品溶液的制备方法。含量测定结果发现不同批次、不同产地乌荭莓中各成分含量存在差异,河南周口市太康县产乌荭莓各成分含量明显低于安徽亳州市蒙城县和涡阳县产地的乌荭莓,后续还需继续收集不同产地批次的乌荭莓进行测定分析,建立其限量标准。

本实验采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对乌荭莓的化学成分进行分析,鉴定并推断出 31 个化学成分,且获得了较为全面的化学成分信息。同时从样品总离子流图中我们也发现,部分色谱峰响应较好却未能在已建数据库中找到匹配成分,这表明乌荭莓化学成分的研究需要进一步完善。本实验对乌荭莓主要黄酮类成分建立了 UPLC 定量分析方法,初步为其质量评价提供依据,为后续乌荭莓膏的工艺优化与质量标准制定提供依据,亦为保障乌荭莓膏临床疗效稳定及作用机制研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志:第 48 卷第 2 分册[M].北京:科学出版社,1998:78.
- [2] 苏莉,郑雪平.乌荭莓膏治疗火毒蕴结型肛痈临床观察[J].中华

- 中医药杂志, 2017, 32(8): 3822-3824.
- [3] 苏莉, 郑雪平. 乌菰莓膏结合负压辅助愈合系统在高位复杂性肛瘘术后的应用研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(2): 368-371.
- [4] 赵学龙, 谈瑄忠, 李文, 等. 乌菰莓药学与临床研究现状及分析[J]. 中医药导报, 2018, 24(2): 110-113.
- [5] 邓胜国, 蒋雅茜, 汪亚楠, 等. 乌菰莓根部化学成分初步研究[J]. 山东化工, 2018, 47(22): 78-79.
- [6] 张娟, 唐雪妹, 王鹏, 等. 乌菰莓中黄酮类化合物的质谱鉴定[C]//中国化学会第二届全国质谱分析学术报告会会议摘要集. 北京: 中国化学会, 2015: 248.
- [7] LI H, YAO WF, LIU QN, et al. Application of UHPLC-ESI-Q-TOF-MS to identify multiple constituents in processed products of the herbal medicine *Ligustri lucidi fructus* [J]. Molecules, 2017, 22(5): 689.
- [8] 马文娟, 姚广哲, 贾琪, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法定性分析淫羊藿中的化学成分[J]. 中药材, 2019, 42(7): 1554-1559.
- [9] AKDEMIR ZS, TATLI II, BEDIR E, et al. Antioxidant flavonoids from *Verbascum salviifolium boiss* [J]. Fabad J Pharm Sci, 2004, 28(2): 71-75.
- [10] 梁颖, 许文佳, 符策奕, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定牛耳枫中的 8 种成分[J]. 中药材, 2018, 41(22): 2615-2618.
- [11] 苏日娜, 罗维早, 魏荣锐, 等. 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术的特色藏族药高原荨麻化学成分快速识别研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(8): 1607-1614.
- [12] 冯美玲, 王书芳, 张兴贤. 枸杞子的化学成分研究[J]. 中草药, 2013, 44(3): 265-268.
- [13] LI X, ZHANG YF, ZENG X, et al. Chemical profiling of bioactive constituents in *Sarcandra glabra* and its preparations using ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry[J]. Rapid Comm Mass Spectrom, 2011, 25(17): 2439-2447.
- [14] FARID AB, BOTROS RM, GALAL TM, et al. Immunomodulatory triterpenoids from the oleogum resin of *Boswellia cart-erii* birdwood[J]. Z Naturforsch C J Biosci, 2003, 58(7/8): 505-516.
- [15] LING D, ROLAND P, STEPHAN R, et al. T-murolol sesquiterpenes from the marine *Streptomyces* sp. M491 and revision of the configuration of previously reported amorphanes[J]. J Nat Prod, 2009, 72(1): 99-101.
- [16] YAGUCHI A, YOCHINARI T, TSUYUKI R, et al. Isolation and identification of precocenes and piperitone from essential oils as specific inhibitors of trichothecene production by *Fusarium graminearum* [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(3): 846-851.
- [17] FARALDOS JA, WU SQ, CHAPPELL J, et al. Conformational analysis of (+)-Germacrene A by variable temperature NMR and NOE spectroscopy[J]. Tetrahedron, 2007, 63(32): 7733-7742.
- [18] YANG WC, ADAMEC J, REGNIER FE. Enhancement of the LC/MS analysis of fatty acids through derivatization and stable isotope coding[J]. Anal Chem, 2007, 79(14): 5150-5157.
- [19] KOJI U, YUU O, TAKUMA I, et al. Inhibitory effect of the alkyl side chain of caffeic acid analogues on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages[J]. Bioorgan Med Chem, 2008, 16: 7795-7803.
- [20] CHEN HM, WANG C, WANG X, et al. Determination of phthalate esters in cosmetics by gas chromatography with flame ionization detection and mass spectrometric detection[J]. Int J Cosmetic Sci, 2005, 27: 205-210.
- [21] HUANG CH, GHAVTADZE N, CHATTOPADHYAY B, et al. Synthesis of catechols from phenols via Pd-catalyzed silanol-directed C-H oxygenation[J]. J Am Chem Soc, 2011, 133(44): 17630-17633.
- [22] 邹瑾, 周金彩, 龙红萍, 等. UPLC-ESI-Q-TOF-MS 法分析究州卷柏化学成分[J]. 中成药, 2018, 40(10): 2334-2337.
- [23] PELTIER-PAIN P, TIMMONS SC, GRANDEMANGE A, et al. Warfarin glycosylation invokes a switch from anticoagulant to anticancer activity[J]. ChemMedChem, 2011, 6(8): 1347-1350.
- [24] 周霄楠, 韩超, 宋鹏琰, 等. 木犀草素和槲皮素体外抗炎作用研究[J]. 动物医学进展, 2017, 38(10): 56-61.
- [25] 李静, 吕志超, 陆庆革, 等. 芩连翘皮方加减对肛周脓肿大鼠模型影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2019, 21(6): 50-54.
- [26] PENG A, LIN LZ, ZHAO MM, et al. Classification of edible chrysanthemums based on phenolic profiles and mechanisms underlying the protective effects of characteristic phenolics on oxidatively damaged erythrocyte[J]. Food Res Int, 2019, 123: 64-74.
- [27] 梁生林, 黄芳辉, 钟兴华, 等. 乌菰莓抗炎镇痛有效部位的筛选[J]. 中草药, 2016, 47(4): 634-639.

(编辑: 杨巍敏)