

UPLC-Orbitrap-MS/MS 研究葶苈子化学成分及其质谱裂解规律

田晓^{1,2}, 窦旻^{1,3}, 罗群^{1,3}, 张燕燕¹, 李书沐^{1,4}, 汪福意^{1,2,3,4}

(1. 中国科学院化学研究所, 北京 100190; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355;

3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 北京国家质谱中心, 北京 100190)

摘要: 本研究建立了超高效液相色谱-静电场轨道离子阱-串联质谱(UPLC-Orbitrap-MS/MS)法鉴定葶苈子化学成分。将葶苈子的甲醇-水溶液(70:30, *V/V*)提取液经 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm×1.7 μm)分离后, 导入 Orbitrap 高分辨质谱仪, 在电喷雾正、负离子模式下, 采用全扫描-数据依赖型(data dependent)二级质谱扫描(Full MS/dd-MS²)模式采集数据, 并使用 Compound Discoverer(CD)软件对数据进行色谱峰对齐和提取。随后, 将母离子和碎片离子的精确质量数导入 CD 软件与各数据库进行匹配, 归纳各类化合物的质谱裂解规律。结果表明, 在南葶苈子 1(DS1)提取液中鉴定到 39 种化合物, 包括生物碱类、黄酮类、强心甘类、酰胺类、有机酸类、氨基酸类等。采用该方法进一步鉴定南葶苈子 2(DS2)和北葶苈子(LA), DS2 中鉴定到 37 种化合物, 其中 10 种为 DS1 中未鉴定到的; LA 中鉴定到 42 种化合物, 其中 7 种在 DS1 和 DS2 中均未鉴定到。本研究可为探讨不同来源葶苈子的药理学作用机制和葶苈子的临床应用提供数据支持。

关键词: 超高效液相色谱-静电场轨道离子阱-串联质谱(UPLC-Orbitrap-MS/MS); 葶苈子; 化学成分; 裂解规律

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)06-0773-12

DOI: 10.7538/zpxb.2024.0162

CSTR: 32365.14.zpxb.2024.0162

Study of Chemical Components and Fragmentation Pathways of *Semen Lepidii* by UPLC-Orbitrap-MS/MS

TIAN Xiao^{1,2}, DOU Yang^{1,3}, LUO Qun^{1,3}, ZHANG Yan-yan¹, LI Shu-mu^{1,4}, WANG Fu-yi^{1,2,3,4}

(1. Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; 2. Shandong University of Traditional

Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

4. National Centre for Mass Spectrometry in Beijing, Beijing 100190, China)

Abstract: *Semen Lepidii* is the dried and mature seeds of the cruciferous plant of *Descurainia Sophia* or *Lepidium Apetalum*, being a widely-used traditional Chinese medicine for various pharmacological effects, such as antibacterial, antitumor, diuretic and improving immune function. However, the chemical components of *Semen Lepidii* from different regions have not been clear, limiting the further application of this herb medicine in clinic. Therefore, in this study, a method of ultra-performance liquid chromatography-electrostatic Orbital ion trap tandem mass spectrometry (UPLC-Orbitrap-MS/MS) was developed to identify the chemical components of the three *Semen Lepidii*, namely *Descurainia Sophia* 1 (DS1), *Descurainia Sophia* 2 (DS2) and *Lepidium Apetalum* (LA) from

different regions, and to study the fragmentation pathways of the identified components. The methanol-water (70:30, *V/V*) extract of the three mashed powder samples was separated on an ACQUITY UPLC BEH C18 column (100 mm×2.1 mm×1.7 μm), and infused into high mass resolution Orbitrap mass spectrometer for analyzing under positive and negative ion modes. MS/MS data were acquired with a Full MS/dd-MS² mode, and the chromatographic peaks were aligned and extracted by using Compound Discoverer (CD) software. Then, the accurate mass informations of the precursor and fragment ions were matched to the databases in the CD platform for identification of components in the samples, and studied the fragmentation pathways of identified compounds. A total of 39 compounds are identified in DS1, including alkaloids, flavonoids, cardiac glycosides, amides, organic acids, amino acids, and others. This method was used to analyze methanol-water extract of DS2 and LA, 37 compounds are identified in DS2, including 10 compounds which are not identified in DS1, and 42 compounds are identified in LA, including 7 compounds which are not identified in both DS1 and DS2. The results indicated that the chemical components of *Semen Lepidii* originated from different regions are remarkably different and may act as medicine in various ways. This study provides a fundamental for further studying the molecular mechanism of pharmacological effects of *Semen Lepidii*, which can promote its clinical application.

Key words: ultra-performance liquid chromatography-electrostatic Orbitrap ion trap tandem mass spectrometry (UPLC-Orbitrap-MS/MS); *Semen Lepidii*; chemical component; fragmentation pathway

葶苈子为十字花科植物播娘蒿(习称“南葶苈子”或“甜葶苈”)或独行菜(习称“北葶苈子”或“苦葶苈”)的干燥成熟种子。《中华人民共和国药典》(2020版)将播娘蒿和独行菜均作为葶苈子正品入药。葶苈子具有泻肺平喘,行水消肿之功效^[1]。现代药理学研究表明,葶苈子有着多种药理作用,如强心、调血脂、抗菌、抗肿瘤、镇咳、利尿、改善免疫功能等,具有成本低、毒性小、多靶点协同作用的优势^[2-3]。根据产地不同,可将葶苈子分为南葶苈子和北葶苈子,其中,南葶苈子主产于山东、河南、江苏、安徽、浙江等地,北葶苈子主产于河北、辽宁、内蒙古,目前市场上主要以南葶苈子为主^[4]。南葶苈子和北葶苈子的形状相似,但南葶苈子种子呈扁圆形,粒小,黄棕色至红棕色,味微辛苦,略有粘性;而北葶苈子种子呈扁卵圆形,粒较大,味微辛辣,粘性较强。目前普遍认为北葶苈子的药效强,南葶苈子的作用相对缓和^[5]。虽然葶苈子具有较好的药效,但其活性成分复杂,药效成分在体内分布和吸收代谢途径不清楚,缺少大规模的试验支持,限制了葶苈子在临床治疗上的深入开发和应用^[6]。

静电场轨道离子阱(Orbitrap)质谱具有高效、广谱和准确的分析特性,可以对复杂样品中的化合物进行多级质谱分析^[7],广泛应用于中药

活性成分分析中^[8-10]。本研究将基于超高效液相色谱-静电场轨道离子阱-串联质谱(UPLC-Orbitrap-MS/MS)技术,在正、负离子模式下分析鉴定不同产地的葶苈子化学成分。采用Compound Discoverer(CD)软件对数据进行色谱峰对齐和提取,并将一级质谱的精确质量数和二级质谱的碎片信息与CD软件中各个数据库匹配,准确分析和鉴定南葶苈子1(DS1)、南葶苈子2(DS2)和北葶苈子(LA)中的化学成分,并研究代表性化合物的质谱裂解规律,希望为葶苈子的药理研究和临床应用提供理论依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Orbitrap Fusion Lumos 质谱仪、ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm×1.7 μm)、Orbitrap 质谱上样瓶及瓶盖:赛默飞世尔科技(中国)有限公司产品;SB-4 200 DTD 超声波清洗机:宁波新芝生物科技有限公司产品;微孔滤膜(0.22 μm):天津市津腾实验设备有限公司产品;分析天平:北京天林恒泰科技有限公司产品;37 ℃ 恒温箱:上海精宏实验设备有限公司产品;Sigma 3-18K 高速冷冻离心机:美国 Sigma-Aldrich 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

南葶苈子 1、北葶苈子: 购自安徽信远堂中药店; 南葶苈子 2: 购自山东新中鲁中医院; 均由山东中医药大学邵林主任药师鉴定为十字花科植物播娘蒿或独行菜的种子。甲醇(质谱级)、乙腈(ACN)、水: 美国 Fisher Chemical 公司产品; 甲酸(FA): 美国 Honeywell 公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 样品通过 Thermo U3000 LC 系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品)和自动采样器加载。流动相: A 相为含 0.1%FA 的水溶液, B 相为含 0.1%FA 的 ACN 溶液; 梯度洗脱程序: 0~3 min(5%~7%B), 3~5 min(7%~13%B), 5~14 min(13%~95%B), 14~16 min(95%B), 16~17 min(95%~5%B), 17~20 min(5%B); 流速 0.2 mL/min; 柱温 40 °C; 进样体积 3 μ L。

1.3.2 质谱条件 将 Orbitrap Fusion Lumos 配备的电喷雾电离(ESI)源连接到 UPLC 系统用于 MS 和 MS² 分析, 采用数据依赖采集(DDA)模式, 质量分析器均为 Orbitrap, 质量扫描范围 m/z 100~1 000, 离子转移管温度 325 °C, 雾化器温度 350 °C, 喷雾电压 3 500 V(正离子检测模式)和 2 500 V(负离子检测模式), 采用碰撞能量为(35 \pm 15)%的高能碰撞解离(HCD)获取 MS² 数据。

1.4 样品制备

将南北葶苈子磨成粉末后过 60 目筛, 取 400 mg 放入 15 mL 离心管中, 加入 5 mL 甲醇-水溶液(7:3, V/V), 37 °C 恒温箱中浸泡 24 h, 室温下超声处理 1.5 h, 以 4 500 r/min 离心 20 min 后, 用 0.22 μ m 膜过滤萃取液, 得到供试样品, 待超高效液相色谱-电喷雾电离-串联质谱(UPLC-ESI-MS/MS)分析。

1.5 数据处理

CD v3.3 为赛默飞世尔科技有限公司开发的小分子质谱分析数据处理软件, 主要针对复杂天然产物以及生物样品成分和代谢物的统计和鉴定分析。CD 拥有一套全面的数据库和统计分析工具, 以及基于节点的可定制化工作流程, 能够充分利用 Orbitrap 质谱仪产生的高分辨率精确质量(high-resolution accurate-mass, HRAM)数据实现对小分子化合物的结构鉴定。

葶苈子化学成分的数据处理步骤如下: 选择

“Natural Product Unknown ID w Stats Online and Local Database Searches”工作流程, 导入原始数据文件, 选取样本类型(样品组和对照组)的研究变量对样本分组, 增添样品组和对照组的比值进行比较。使用默认工作流程进行分析, 将导入 CD 软件的一级和二级质谱信息进行色谱峰保留时间对齐和离子的提取、整合以及分子式预测, 并将这些信息在线链接到 Chem Spider、mzCloud、Mass Lists 数据库查找比对, 可获得所有鉴定化合物的预测分子式、准分子离子峰、色谱峰面积 Area(Max.)、质量精度 Δ Mass、保留时间等信息。此外, mzCloud 数据库还可鉴定与原型组分碎片离子匹配度较高的化合物, 并得到打分值, 以 mzCloud Best Match 表示。

经搜库鉴定, 将方差分析(Anova) P 值小于 0.000 1、色谱峰面积大于 10^6 、得分值大于 85 的化合物作为受试葶苈子的主要化学成分。最后, 结合 Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 HMDB 数据库(<https://hmdb.ca/>)进一步筛选鉴定到的化合物, 确认南北葶苈子甲醇-水提取液的化学成分。

1.6 样品配制

取 5 份 40 μ L DS1 提取液样品, 每份分别加入预先配制的等体积、等浓度毒毛旋花子苷元、葶苈苷和槲皮素标准储备液, 使 5 份样品中标准物的终浓度分别为 200、100、50、10、0 μ mol/L, 待 UPLC-ESI-MS/MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 正、负离子模式分析结果比较

DS1 提取液的总离子流色谱图示于图 1a、1b。可以看出, 正离子模式下的 DS1 提取液成分较负离子模式丰富。此外, CD 数据库搜索结果表明, 在负离子模式下, DS1 提取液中丰度较高的成分大多为有机酸类, 并非通常认为的中药活性成分。因此, 后续实验将仅对正离子模式下检测到的成分进行精确分析。

根据正离子模式下采集到的离子色谱峰保留时间、一级质谱精确质量数等信息, 当 mzCloud Best Match > 85, Area(Max.) > 10^6 , $|\Delta$ Mass| < 5×10^{-6} 时, 结合采集的二级质谱数据, 在 CD 数据库中鉴定到 DS1 中 39 种化学成分, 包括 4 种生物碱类、7 种黄酮类、2 种强心苷类、6 种酰胺类、

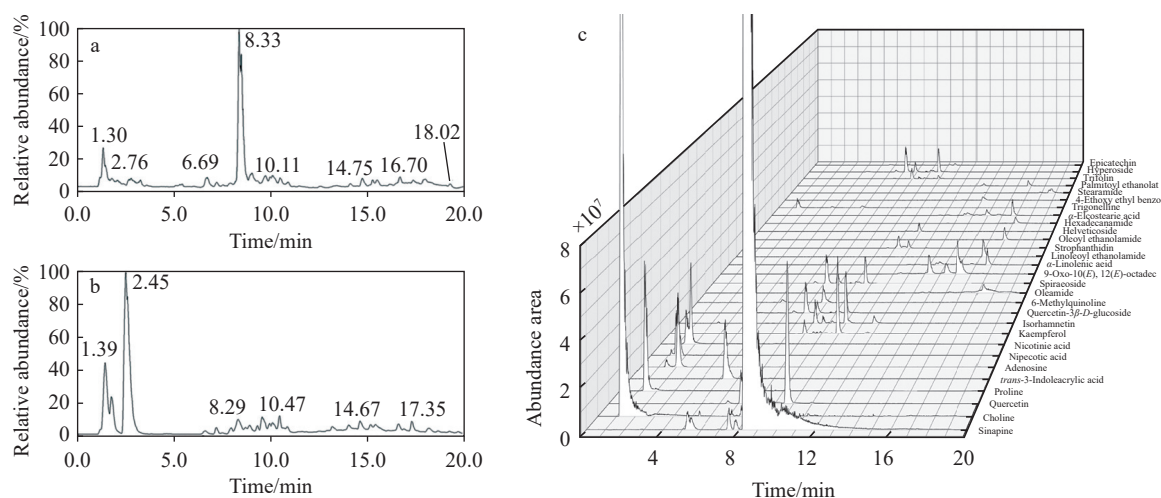


图1 DS1 甲醇-水提取液在正(a)、负(b)离子模式下的总离子流色谱图,以及正离子模式下的提取离子流色谱图(c)
 Fig. 1 Total ion current chromatograms of methanol-H₂O extract of DS1 under positive (a) and negative (b) ion modes, and extracted ion current chromatograms (c) of methanol-H₂O extract of DS1 under positive ion mode

表1 DS1 化学成分

Table 1 Chemical components of DS1

序号 No.	化合物名称 Compound name	保留时间 Retention time/min	分子式 Formula	理论分子质量 Theoretical molecular weight	实测 质荷比 Measured m/z	质量精度 $ \Delta_{\text{Mass}} /\times 10^{-6}$	参照离子 Reference ion	类别 Category
1	L-组氨酸 L-Histidine	1.181	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155.06940	156.07668	0.47	[M+H] ⁺	氨基酸
2	胆碱 Choline	1.278	C ₅ H ₁₃ NO	103.09966	104.10694	0.48	[M+H] ⁺	生物碱
3	天冬酰胺 Asparagine	1.299	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132.05348	133.06073	0.11	[M+H] ⁺	氨基酸
4	L-天冬氨酸 L-Aspartic acid	1.302	C ₄ H ₇ NO ₄	133.03748	134.04475	0.23	[M+H] ⁺	氨基酸
5	L-谷氨酸 L-Glutamic acid	1.321	C ₅ H ₉ NO ₄	147.05323	148.06049	0.48	[M+H] ⁺	氨基酸
6	葫芦巴碱 Trigonelline	1.325	C ₇ H ₇ NO ₂	137.04769	138.05497	0.10	[M+H] ⁺	生物碱
7	腺嘌呤 Adenine	1.377	C ₅ H ₅ N ₅	135.05442	136.06169	0.57	[M+H] ⁺	其他
8	脯氨酸 Proline	1.379	C ₅ H ₉ NO ₂	115.06327	116.07055	0.49	[M+H] ⁺	氨基酸
9	鸟嘌呤 Guanine	1.406	C ₅ H ₅ N ₅ O	151.04946	152.05671	0.31	[M+H] ⁺	其他
10	吡啶酸 Nipicotic acid	1.458	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129.07906	130.08633	0.61	[M+H] ⁺	有机酸
11	烟酸 Nicotinic acid	1.516	C ₆ H ₅ NO ₂	123.03218	124.03946	1.25	[M+H] ⁺	其他
12	L-焦谷氨酸 L-Pyroglutamic acid	1.917	C ₅ H ₇ NO ₃	129.04277	130.05005	1.40	[M+H] ⁺	其他
13	腺苷 Adenosine	2.083	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	267.09703	268.10431	1.04	[M+H] ⁺	氨基酸
14	异亮氨酸 Isoleucine	2.352	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.09465	132.10193	0.18	[M+H] ⁺	氨基酸

续表

序号 No.	化合物名称 Compound name	保留时间 Retention time/min	分子式 Formula	理论分子质量 Theoretical molecular weight	实测 质荷比 Measured m/z	质量精度 $ \Delta_{\text{Mass}} /\times 10^{-6}$	参照离子 Reference ion	类别 Category
15	<i>L</i> -苯丙氨酸 <i>L</i> -Phenylalanine	3.227	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.07889	166.08617	0.53	[M+H] ⁺	有机酸
16	<i>trans</i> -3-吲哚丙烯酸 <i>trans</i> -3-Indoleacrylic acid	5.301	C ₁₁ H ₉ NO ₂	187.06327	188.07054	0.31	[M+H] ⁺	氨基酸
17	<i>D</i> (+)-色氨酸 <i>D</i> (+)-Tryptophan	5.303	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.08983	205.09711	0.23	[M+H] ⁺	其他
18	表儿茶素 Epicatechin	5.663	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.07919	291.08646	0.51	[M+H] ⁺	黄酮
19	绣线菊苷 Spiraeoside	7.145	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09538	465.10266	0.20	[M+H] ⁺	生物碱
20	6-甲基喹啉 6-Methylquinoline	7.801	C ₁₀ H ₉ N	143.07355	144.08083	0.35	[M+H] ⁺	生物碱
21	芥子碱 Sinapine	8.326	C ₁₆ H ₂₃ NO ₅	309.15740	310.16467	0.72	[M+H] ⁺	黄酮
22	金丝桃苷 Hyperoside	9.026	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09462	465.10190	1.84	[M+H] ⁺	黄酮
23	槲皮素-3β- <i>D</i> -糖苷 Quercetin-3β- <i>D</i> -glucoside	9.599	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464.09546	465.10272	0.04	[M+H] ⁺	黄酮
24	槲皮素 Quercetin	9.657	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.04222	303.04950	1.42	[M+H] ⁺	黄酮
25	三叶草素 Trifolin	9.911	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.10027	449.10757	0.65	[M+H] ⁺	黄酮
26	山奈酚 Kaempferol	9.917	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.04735	287.05463	1.36	[M+H] ⁺	黄酮
27	异鼠李素 Isorhamnetin	10.002	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.05812	317.06540	0.57	[M+H] ⁺	强心苷
28	毒毛旋花子苷元 Strophanthidin	10.255	C ₂₃ H ₃₂ O ₆	404.21994	405.22723	0.13	[M+H] ⁺	强心苷
29	葶苈苷 Helveticoside	10.916	C ₂₉ H ₄₂ O ₉	534.29020	535.29034	0.26	[M+H] ⁺	其他
30	4-苯甲酸乙酯 4-Ethoxy ethylbenzoate	14.059	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	194.09427	195.10155	0.12	[M+H] ⁺	有机酸
31	α-桐酸 α-Eleostearic acid	14.920	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.22411	279.23138	1.70	[M+H] ⁺	有机酸
32	9-Oxo-10(<i>E</i>),12(<i>E</i>)-十八碳二烯酸 9-Oxo-10(<i>E</i>),12(<i>E</i>)-octadecadienoic acid	15.426	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.21958	277.21625	0.28	[M+H-H ₂ O] ⁺	有机酸
33	亚麻酰乙醇酰胺 Linoleoyl ethanolamide	16.170	C ₂₀ H ₃₇ NO ₂	323.28208	324.28932	1.07	[M+H] ⁺	酰胺
34	α-亚麻酸 α-Linolenic acid	16.725	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278.22446	279.23175	0.42	[M+H] ⁺	有机酸
35	棕榈酰乙醇酰胺 Palmitoyl ethanolamide	16.768	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	299.28252	300.28979	0.32	[M+H] ⁺	酰胺
36	油酰乙醇酰胺 Oleoyl ethanolamide	16.992	C ₂₀ H ₃₉ NO ₂	325.29770	326.30496	1.18	[M+H] ⁺	酰胺
37	十六酰胺 Hexadecanamide	17.181	C ₁₆ H ₃₃ NO	255.25600	256.26328	0.85	[M+H] ⁺	酰胺
38	油酰胺 Oleamide	17.366	C ₁₈ H ₃₅ NO	281.27175	282.27902	0.42	[M+H] ⁺	酰胺
39	硬脂酰胺 Stearamide	18.685	C ₁₈ H ₃₇ NO	283.28703	284.29431	1.69	[M+H] ⁺	酰胺

5种有机酸类、9种氨基酸类以及6种其他类化合物,详细情况列于表1。从提取离子流色谱图可以看出,芥子碱(sinapine)为DS1中丰度最高的化学成分,示于图1c。

2.2 DS1 化学成分鉴定

2.2.1 生物碱类 生物碱是一类含碱性官能团的有机化合物,具有复杂的氮杂环结构,是中药材重要的有效成分之一。在DS1中,共鉴定到4种生物碱类化合物,包括芥子碱、胆碱、葫芦巴碱和6-甲基喹啉。以芥子碱为例,在正离子模式下可见该化合物的准分子离子峰 m/z 310.164 64[M+H]⁺, 分子式为 C₁₆H₂₃NO₅, 保留时间为 8.326 min。二级质谱产生 m/z 251.091 06[M-C₃H₉N]⁺、236.067 69[M-C₃H₉N-CH₃]⁺、207.065 19[M-C₃H₉N-CH₃-CHO]⁺特征碎片离子,与数据库中芥子碱的二级质谱图吻合,其二级质谱图和裂解途径示于图2。

2.2.2 黄酮类 在DS1甲醇-水提取液中共鉴定到7种黄酮类化合物,包括槲皮素、山奈酚、异鼠李素、槲皮素 3-*D*-葡萄糖苷、槲皮素 4'-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、三叶草素和金丝桃苷。槲皮素是一种天然类黄酮,广泛存在于水果、草药和蔬菜中,具有广泛的有益作用和生物活性,如抗炎、抗氧化、抗肿瘤以及神经保护^[11-13]。在正离子模式下,可见该化合物的准分子离子峰 m/z 303.049 62[M+H]⁺, 分子式为 C₁₅H₁₀O₇, 保留时间为 9.657 min。二级质谱产生 m/z 285.039 18[M+H-H₂O]⁺、257.044 28[M+H-2H₂O]⁺、153.018 23[M+

H-2H₂O-C₇H₄O]⁺、121.028 53[M+H-2H₂O-C₇H₄O-O₂]⁺特征碎片离子,与数据库中槲皮素的二级质谱图吻合,其二级质谱图和裂解途径示于图3。

2.2.3 强心苷类 强心苷类化合物广泛用于治疗心力衰竭和心律失常^[14]。普遍认为,强心苷抑制 Na⁺/K⁺-ATP 酶, Na⁺/K⁺-ATP 酶通过 Na⁺-Ca²⁺交换剂提高细胞内 Ca²⁺, 进而增强心肌细胞的收缩力^[15]。然而,有许多研究^[16-17]报道了强心苷对癌症的治疗效果,例如乳腺癌、非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、前列腺癌和白血病。在DS1中共鉴定到毒毛旋花子苷元和葶苈苷2种强心苷类化合物。对于毒毛旋花子苷元,在正离子模式下可见其准分子离子峰 m/z 405.170 78[M+H]⁺, 分子式为 C₂₃H₃₂O₆, 保留时间为 10.255 min。二级质谱产生 m/z 369.205 72[M+H-2H₂O]⁺、351.195 34[M+H-3H₂O]⁺、305.189 39[M+H-3H₂O-CH₂O₂]⁺、125.059 77[M+H-3H₂O-CH₂O₂-C₁₅H₁₆]⁺、79.054 45[M+H-3H₂O-CH₂O₂-C₁₅H₁₆-CH₂O₂]⁺特征碎片离子,与数据库中毒毛旋花子苷元的二级质谱图吻合,其二级质谱图和裂解途径示于图4。

对于葶苈苷,正离子模式下可见其准分子离子峰 m/z 535.146 85[M+H]⁺, 保留时间为 10.916 min, 分子式为 C₂₉H₄₂O₉。二级质谱产生 m/z 369.206 42[M+H-C₆H₁₂O₄-H₂O]⁺、323.200 31[M+H-C₆H₁₀O₃-C₄H₂O₂]⁺、153.054 18[M+H-C₆H₁₀O₃-C₄H₂O₂-C₉H₁₄O₃]⁺特征碎片离子,其二级质谱图和裂解途径示于图5。

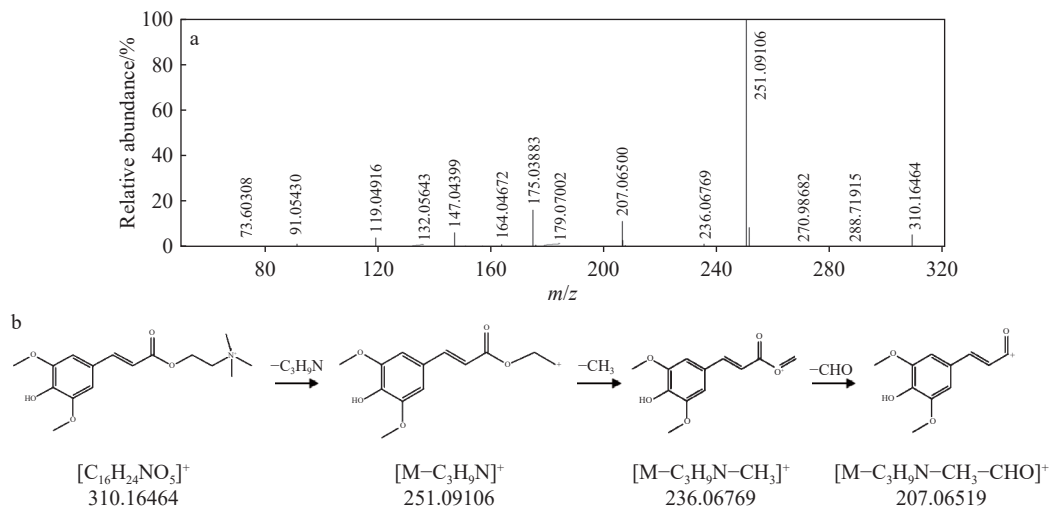


图2 芥子碱的二级质谱图(a)和裂解途径(b)

Fig. 2 MS/MS spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of sinapine

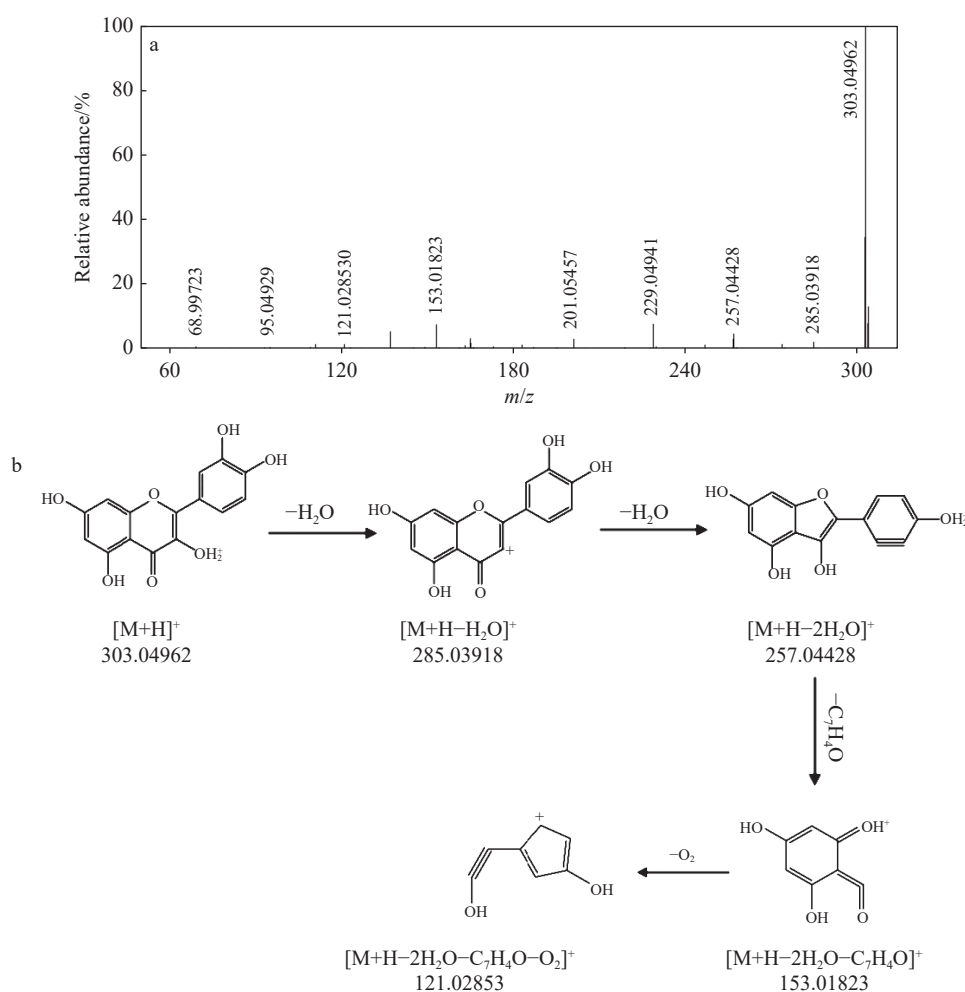


图3 槲皮素的二级质谱图(a)和碎裂途径(b)

Fig. 3 MS/MS spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of quercetin

2.2.4 酰胺类 在DS1中共鉴定到6种酰胺类化合物,包括油酰胺、油酰乙醇酰胺、亚油酰乙醇酰胺、十六酰胺、十八酰胺和棕榈酰乙醇酰胺。以棕榈酰乙醇酰胺为例,在正离子模式下可见该化合物的准分子离子峰 m/z 300.289 55 $[M+H]^+$,分子式为 $C_{18}H_{37}NO_2$, 色谱保留时间为 16.768 min。二级质谱产生 m/z 282.279 17 $[M+H-H_2O]^+$ 、239.236 18 $[M+H-H_2O-C_2H_5N]^+$ 特征碎片离子,与数据库中棕榈酰乙醇酰胺的二级质谱图吻合,其二级质谱图和裂解途径示于附图1(请登录《质谱学报》网站 <https://zpxb.xml-journal.net> 下载,下同)。

2.2.5 有机酸类 在DS1中共鉴定到5种有机酸类化合物,包括亚麻酸、3-吡啶丙烯酸、哌啶-3-羧酸、9-氧代-10(E),12(E)-十八碳二烯酸和 α -榄尖酸。以3-吡啶丙烯酸为例,在正离子模式下可见该化合物的准分子离子峰 m/z 188.070 54 $[M+H]^+$,

分子式为 $C_{11}H_9NO_2$, 保留时间为 5.301 min。二级质谱产生 m/z 170.059 92 $[M+H-H_2O]^+$ 、142.065 12 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 特征碎片离子,与数据库中3-吡啶丙烯酸的二级质谱图吻合,其二级质谱图和裂解途径示于附图2。

2.2.6 氨基酸类 在DS1中共鉴定到9种氨基酸类化合物,包括苯丙氨酸、脯氨酸、L-焦谷氨酸、异亮氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、D-色氨酸、天冬氨酸和组氨酸。以脯氨酸为例,在正离子模式下可见其准分子离子峰 m/z 116.070 74 $[M+H]^+$,分子式为 $C_5H_9NO_2$, 色谱保留时间为 1.379 min。二级质谱产生 m/z 70.065 28 $[M+H-HCOOH]^+$ 特征碎片离子,与数据库中脯氨酸的二级质谱图吻合,其二级质谱图和裂解途径示于附图3。

2.2.7 其他类 除上述主要化学成分外,在DS1中还鉴定到6种其他类型化合物,包括烟酸、腺

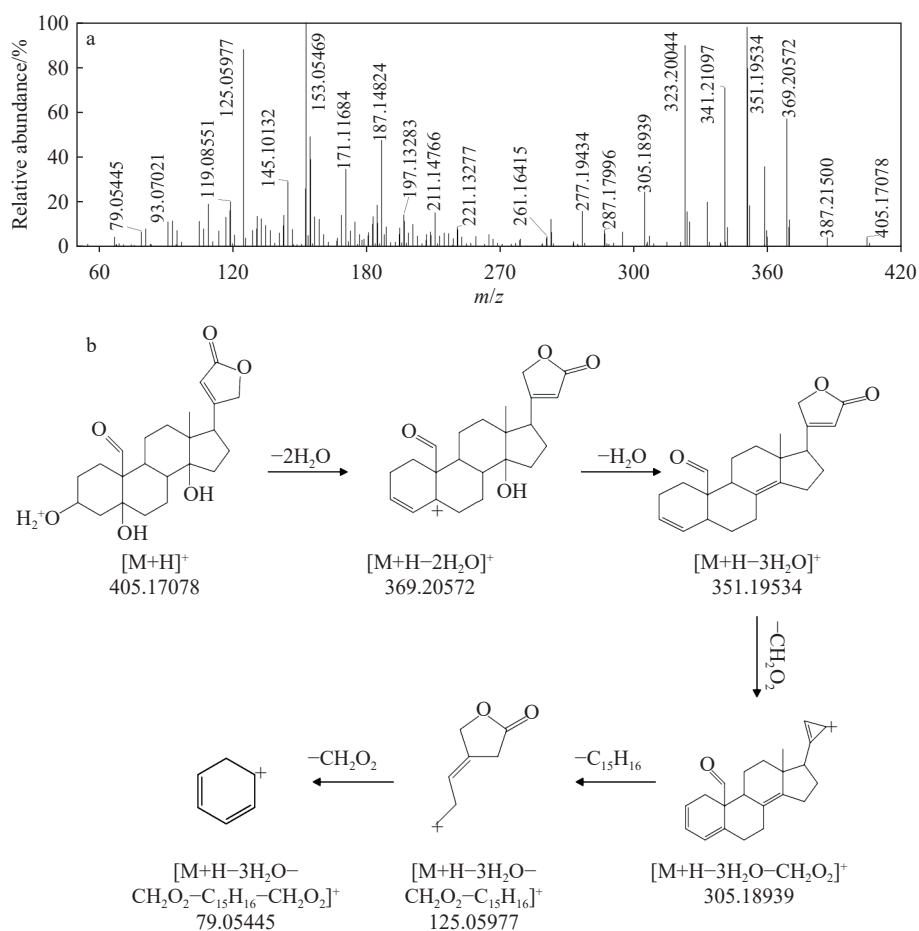


图4 毒毛旋花子苷元的二级质谱图(a)和裂解途径(b)

Fig. 4 MS/MS spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of strophanthidin

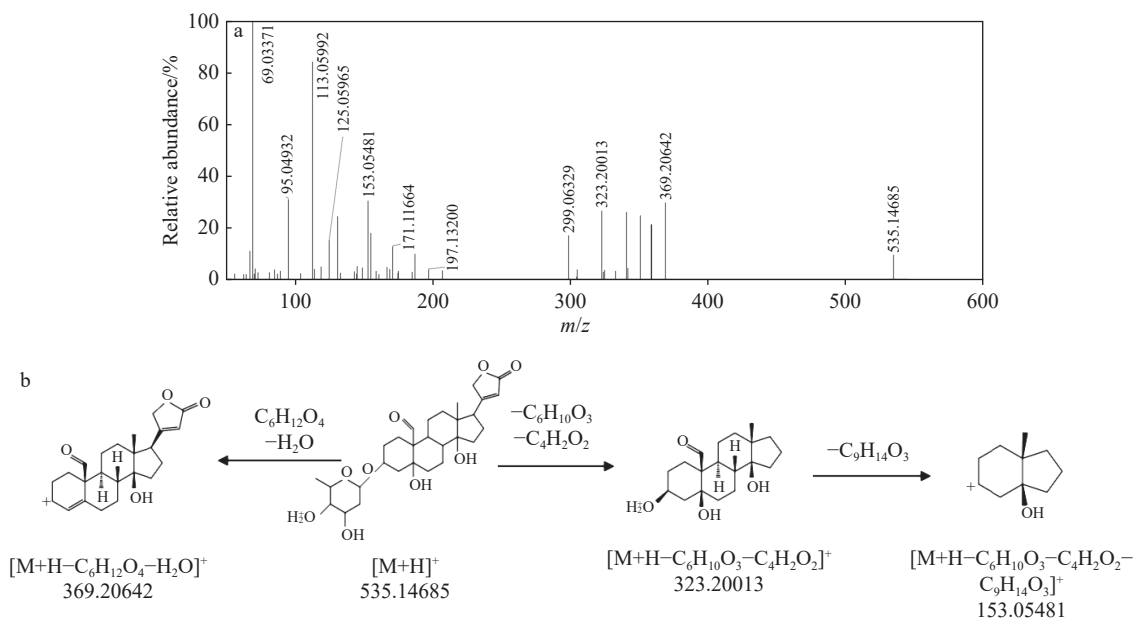


图5 葶苈苷的二级质谱图(a)和碎裂途径(b)

Fig. 5 MS/MS spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of helvetioside

苷、腺嘌呤、鸟嘌呤、4-乙氧基苯甲酸乙酯和表儿茶素。以表儿茶素为例,在正离子模式下可见其准分子离子峰 m/z 291.086 91 $[M+H]^+$,分子式为 $C_{15}H_{14}O_6$,保留时间为 5.663 min。二级质谱产生 m/z 147.043 75 $[M+H-C_6H_8O_4]^+$ 、139.038 99 $[M+H-C_8H_8O_3]^+$ 、123.044 19 $[M+H-C_8H_8O_4]^+$ 特征碎片离子,与数据库中表儿茶素的二级质谱图吻合,其二级质谱图和裂解途径示于图 6。

2.3 DS2 和 LA 化学成分鉴定

采用该方法鉴定 DS2 和 LA 中的化学成分。在 DS2 中鉴定出 37 种化合物,其中 10 种在 DS1 中未鉴定到,包括螺旋藻苷、苯并噻唑、邻苯二甲酸氢辛酯、香草醛、9-氧代-10*E*,12*Z*-十八碳二烯酸、N₆,N₆,N₆-三甲基-*L*-赖氨酸、吡啶-4-甲醛、8-羟基喹啉、根皮素和牛蒡素,详细情况列于附表 1。以香草醛为例,在正离子模式下可见其准分子离子峰 m/z 153.054 66 $[M+H]^+$,分子式为 $C_8H_8O_3$,保留时间为 9.233 min。二级质谱产生 m/z 125.959 74 $[M+H-CO]^+$ 、111.044 07 $[M+H-CO-CH_2]^+$ 、93.033 55 $[M+H-CO-CH_2-H_2O]^+$ 、65.038 67 $[M+H-2CO-CH_2-H_2O]^+$ 特征碎片离子,与数据库

中香草醛的二级质谱图吻合,其二级质谱图和裂解途径示于图 7。

以根皮素为例,在正离子模式下可见其准分子离子峰 m/z 275.092 32 $[M+H]^+$,分子式为 $C_{15}H_{14}O_5$,保留时间为 9.604 min。二级质谱产生 m/z 169.049 44 $[M+H-C_7H_6O]^+$ 、107.049 20 $[M+H-C_8H_8O_4]^+$ 特征碎片离子,与数据库中根皮素的二级质谱图吻合,其二级质谱图和裂解途径示于附图 4。

在 LA 中鉴定到 42 种化合物,其中 7 种在 DS1 和 DS2 中均未鉴定到,包括 *L*-缬氨酸、邻苯三酚、喹啉、12-氧代植物二烯酸、单亚油酸甘油酯、5,7-二羟基黄酮和川陈皮素,详细信息列于附表 2。以邻苯三酚为例,在正离子模式下可见其准分子离子峰 m/z 127.039 05 $[M+H]^+$,分子式为 $C_6H_6O_3$,保留时间为 2.644 min。二级质谱产生 m/z 109.028 49 $[M+H-H_2O]^+$ 、81.033 59 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 特征碎片离子,与数据库中邻苯三酚的二级质谱图吻合,其二级质谱图和裂解途径示于附图 5。

以单亚油酸甘油酯为例,在正离子模式下可见其准分子离子峰 m/z 355.282 14 $[M+H]^+$,分子

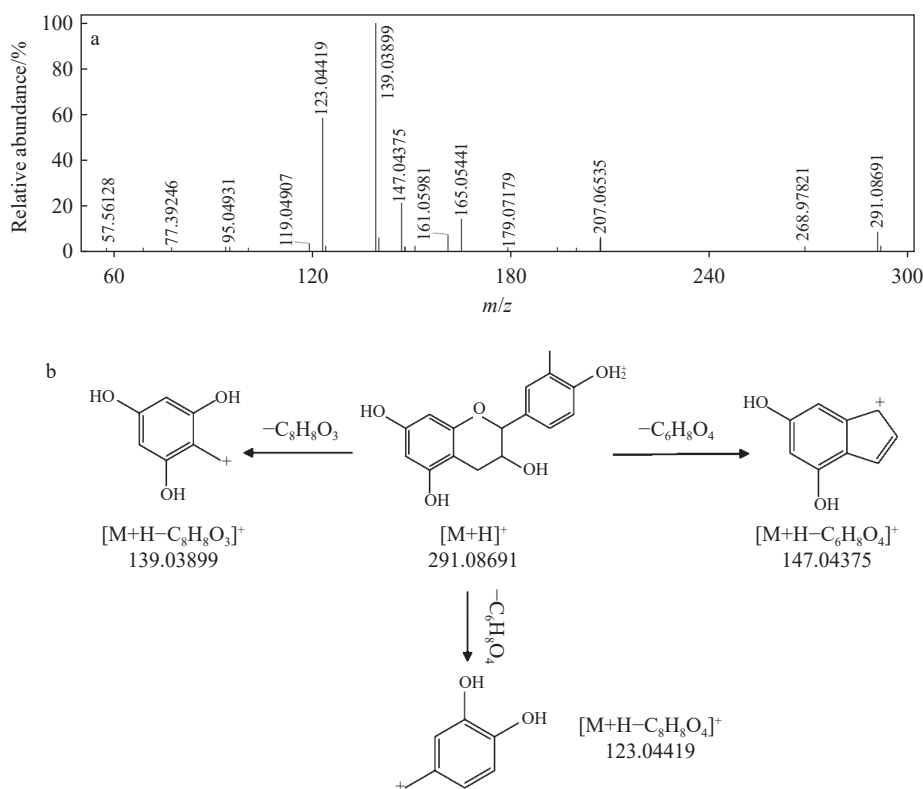


图 6 表儿茶素的二级质谱图(a)和碎裂途径(b)

Fig. 6 MS/MS spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of epicatechin

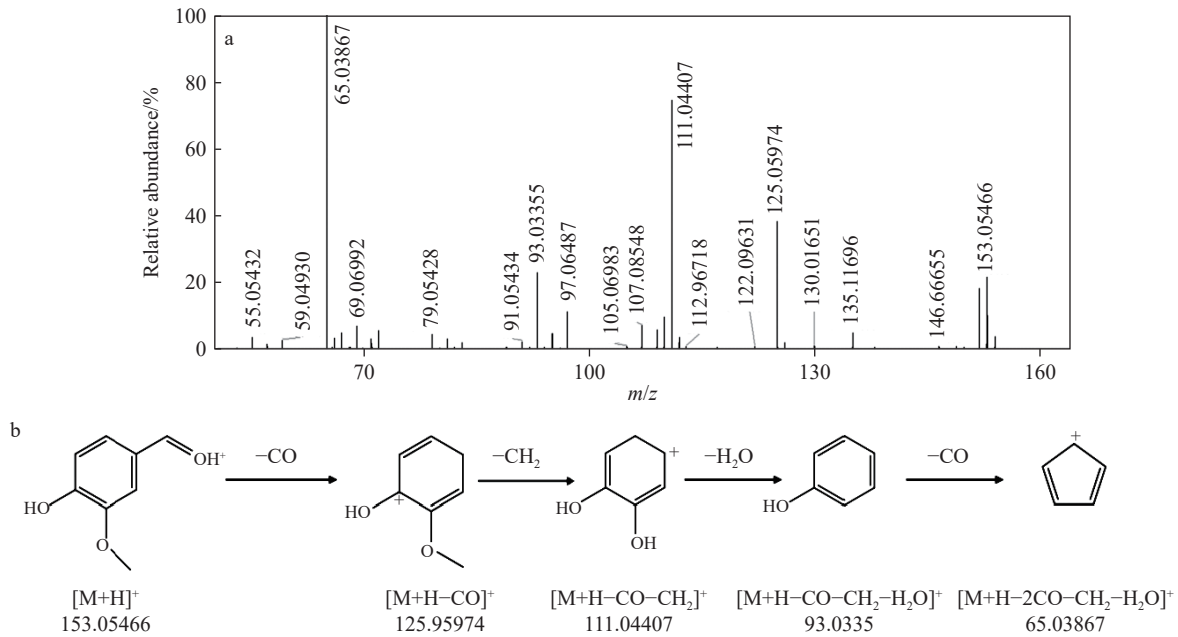


图7 香草醛的二级质谱图(a)和碎裂途径(b)

Fig. 7 MS/MS spectrum (a) and fragmentation pathway (b) of vanillin

式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{O}_4$, 保留时间为 16.861 min。二级质谱产生 m/z 337.272 89 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 、109.101 20 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_3]^+$ 、95.085 72 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_3-\text{CH}_2]^+$ 、81.070 06 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_3-2\text{CH}_2]^+$ 、67.054 44 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_3-3\text{CH}_2]^+$ 特征碎片离子, 与数据库中单亚油酸甘油酯的二级质谱图吻合, 其二级质谱图和裂解途径示于附图6。

2.4 标准加入法测定结果

在定性分析鉴定的南北葶苈子 40 余种化合物中, 毒毛旋花子苷元、葶苈苷和槲皮素具有较好的抗肿瘤和抗氧化活性, 研究它们在葶苈子药物中的含量, 对于后续提取活性成分、研究药物

机理有着重要作用。为降低不同因素对定量分析的影响, 本实验选择标准加入法测定南葶苈子粉末中 3 种活性成分的含量。在标准加入法中, 加标曲线反向延长线对应的浓度即为待测样品中毒毛旋花子苷元、葶苈苷和槲皮素的浓度。选取不同加标浓度下峰面积不变的 α -亚麻酸作为内标, 计算提取离子流色谱图中 3 种组分的相对峰面积。以各组分加标浓度为横坐标, 相对峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线, 示于图 8, 所得的斜率 k 、截距 b 和线性相关系数 R^2 列于表 2。根据表 2, 可计算出南葶苈子粉末中毒毛旋花子苷元、葶苈苷和槲皮素含量分别为 39、80、3 $\mu\text{g/g}$ 。

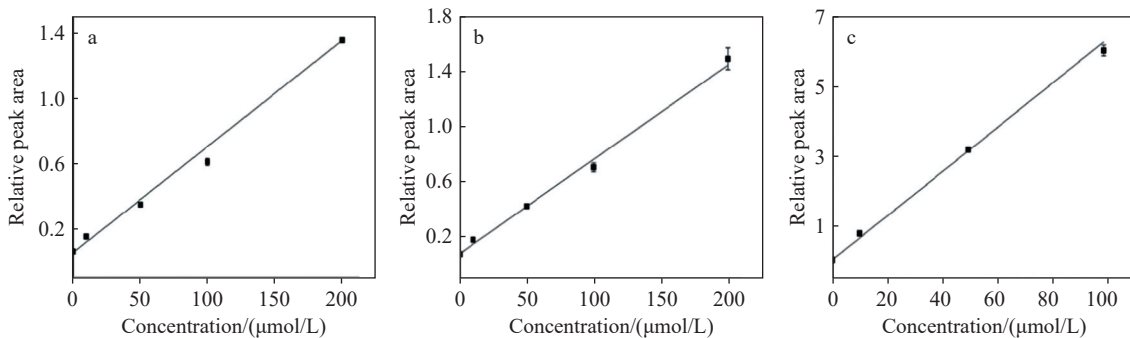


图8 毒毛旋花子苷元(a)、葶苈苷(b)和槲皮素(c)标准加入工作曲线图

Fig. 8 Work curves of standard addition method for strophanthidin (a), helveticoside (b) and quercetin (c)

表2 毒毛旋花子苷元、葶苈苷和槲皮素标准加入法定量信息

Table 2 Quantitative parameters of standard addition method for strophanthidin, helveticoside and quercetin

化合物名称 Compound name	斜率 Slop (<i>k</i>)	截距 Intercept (<i>b</i>)	相关系数 Correlation coefficient (R^2)
毒毛旋花子苷元	0.00656	0.05043	0.99918
葶苈苷	0.00687	0.08239	0.98329
槲皮素	0.06258	0.05199	0.99618

3 结论

本研究采用 UPLC-Orbitrap-MS/MS 技术在正离子模式下分析鉴定南葶苈子 DS1 的化学成分。通过精确质量数、同位素峰分布及二级质谱碎片等信息,利用 CD 软件进行搜库,共鉴定到南葶苈子中 39 种化学成分,包括生物碱类、黄酮类、强心苷类、酰胺类、有机酸类、氨基酸类等。其中,生物碱类化合物芥子碱是南葶苈子中丰度最高的化学成分,黄酮类化合物槲皮素次之。此外,利用该方法鉴定到南葶苈子 DS2 中 37 种化合物,其中 10 种化合物在 DS1 中未鉴定到;在北葶苈子 LA 中鉴定到 42 种化合物,其中有 7 种化合物在 DS1 和 DS2 均未鉴定到。在此基础上,应用标准加入法定量分析南葶苈子 DS1 中具有特殊药效的毒毛旋花子苷元、葶苈苷、槲皮素 3 种化合物,其中强心苷类成分葶苈苷含量最高,毒毛旋花子苷元次之。本工作可为进一步研究葶苈子强心、抗肿瘤、抗氧化等药理学作用提供实验和理论依据。

参考文献:

- [1] 徐明,张静,邱建平,陈荟旭. 葶苈子的炮制历史沿革及其药理作用研究进展[J]. 中医药导报, 2021, 27(10): 132-137.
XU Ming, ZHANG Jing, QIU Jianping, CHEN Huixu. Research progress on processing methods and pharmacological effects of Tinglizi (*Descurainiae semen lepidii semen*)[J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2021, 27(10): 132-137(in Chinese).
- [2] 林雪竹,李蔚群,关永霞,张贵民. 葶苈子化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国现代中药, 2022, 24(3): 550-558.
LIN Xuezhu, LI Weiqun, GUAN Yongxia, ZHANG Guimin. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Descurainiae semen lepidii semen*[J]. Modern Chinese Medicine, 2022, 24(3): 550-558 (in Chinese).
- [3] 孟祥凤. 葶苈子化学成分及药理作用的研究进展[J]. 黑龙江科技信息, 2013(34): 71.
MENG Xiangfeng. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Descurainiae semen lepidii semen*[J]. Heilongjiang Science and Technology Information, 2013(34): 71(in Chinese).
- [4] 吕娇娇,高国香,王艳. 葶苈子药材生态适宜性区划研究[J]. 中兽医医药杂志, 2021, 40(1): 12-17.
LV Jiaojiao, GAO Guoxiang, WANG Yan. Study on the regionalization of ecological suitability of *Lepidii Semen*[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2021, 40(1): 12-17(in Chinese).
- [5] 周喜丹,唐力英,周国洪,寇真真,王婷,王祝举. 南北葶苈子的最新研究进展[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(24): 4 699-4 708.
ZHOU Xidan, TANG Liying, ZHOU Guohong, KOU Zhenzhen, WANG Ting, WANG Zhuju. Advances on *Lepidii semen* and *Descurainiae semen*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2014, 39(24): 4 699-4 708(in Chinese).
- [6] 张培,邵蒙苏,赵林华. 葶苈子的临床应用及其用量探究[J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38(8): 843-846.
ZHANG Pei, SHAO Mengsu, ZHAO Linhua. Exploration of the clinical dosage of pepperweed seed[J]. Journal of Changchun University of Chinese Medicine, 2022, 38(8): 843-846(in Chinese).
- [7] ZUBAREV R A, MAKAROV A. Orbitrap mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(11): 5 288-5 296.
- [8] 张榆,胡少伟,杨佳颖,张金华,王路,蒋丽娟,姜艳艳,刘斌. 基于 UPLC-LTQ Orbitrap MS 的益气降脂颗粒化学组成分析[J]. 质谱学报, 2020, 41(5): 411-426.
ZHANG Yu, HU Shaowei, YANG Jiaying, ZHANG Jinhua, WANG Lu, JIANG Lijuan, JIANG Yanyan, LIU Bin. Chemical composition analysis of Yiqi Jiangzhi Granules based on UPLC-LTQ Orbitrap MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2020, 41(5): 411-426(in Chinese).
- [9] 孔佳琦,孟宪双,尚宇瀚,董益阳,马强. 青胶蒲公英化

- 学成分鉴定及质谱裂解规律研究[J]. *质谱学报*, 2022, 43(3): 278-286.
- KONG Jiaqi, MENG Xianshuang, SHANG Yuhan, DONG Yiyang, MA Qiang. Identification of chemical components in *Taraxacum kok-saghyz* Rodin and investigation of mass spectrometric fragmentation pathways[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2022, 43(3): 278-286(in Chinese).
- [10] 马聪玉, 生宁, 李元元, 王喆, 张金兰. 中药成分质谱分析新技术和新策略进展[J]. *质谱学报*, 2021, 42(5): 709-717.
- MA Congyu, SHENG Ning, LI Yuanyuan, WANG Zhe, ZHANG Jinlan. Advances in mass spectrometric-based technologies and strategies for the analysis of traditional Chinese medicine[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2021, 42(5): 709-717(in Chinese).
- [11] SHEN P, LIN W, DENG X, BA X, HAN L, CHEN Z, QIN K, HUANG Y, TU S. Potential implications of quercetin in autoimmune diseases[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 689 044.
- [12] REYES-FARIAS M, CARRASCO-POZO C. The anti-cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(13): 3 177.
- [13] YANG H, XU S, TANG L, GONG J, FANG H, WEI J, SU D. Targeting of non-apoptotic cancer cell death mechanisms by quercetin: implications in cancer therapy [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 1 043 056.
- [14] KELLY R A. Cardiac glycosides and congestive heart failure[J]. *The American Journal of Cardiology*, 1990, 65(10): 10E-16E.
- [15] REUTER H, HENDERSON S A, HAN T, ROSS R S, GOLDHABER J I, PHILIPSON K D. The Na⁺-Ca²⁺ exchanger is essential for the action of cardiac glycosides[J]. *Circulation Research*, 2002, 90(3): 305-308.
- [16] SHIRATORI O. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: *in vitro* and *in vivo* studies[J]. *Gan*, 1967, 58(6): 521-528.
- [17] PRASSAS I, DIAMANDIS E P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, 7(11): 926-935.

(收稿日期: 2024-09-06; 修回日期: 2024-10-18)