

大青叶化学成分及抗氧化活性研究

闫峻¹, 顾娟², 冯硕¹, 姬瑞芳³, 全庆华³, 刘永刚³

(1. 核工业北京地质研究院, 北京 100029; 2. 中日友好医院, 北京 100029; 3. 北京中医药大学, 北京 100029)

摘要:采用高效液相色谱-大气压化学电离质谱法(HPLC-APCI/MS)和直接进样的电喷雾串联质谱法(ESI-MS²)分析大青叶乙酸乙酯、正丁醇和95%乙醇提取物的化学成分。采用Kromasil C18分析柱(4.6 mm×250 mm×5 μm),以0.15%乙酸/水-甲醇为流动相进行线性梯度洗脱,流速0.8 mL/min,柱温25℃;采用全波长扫描紫外检测器,检测波长分别为254 nm和265 nm;采用大气压化学电离源和电喷雾电离源,在正、负两种离子模式下进行检测。结果表明,在大青叶乙酸乙酯、正丁醇和95%乙醇提取物中共鉴别出39种化合物,包括生物碱类、有机酸类、核苷嘌呤类、氨基酸类、黄酮类、糖类、卟啉类以及含硫类成分化合物。采用铁离子还原能力法(FRAP)对大青叶的抗氧化活性进行评价,并用自由基清除能力法验证FRAP法的测试结果。抗氧化活性评价结果表明,大青叶抗氧化活性部位主要集中在极性较低的化学组分中,吡啶类、奎啉酮类和有机酸类化合物是其主要有效成分。该方法快捷、灵敏,适用于中药化学成分分析和抗氧化活性评价。

关键词:大青叶;化学成分;高效液相色谱-大气压化学电离质谱法(HPLC-APCI/MS);电喷雾串联质谱(ESI-MS²);抗氧化活性

中图分类号:O657.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2997(2019)04-0381-10

doi:10.7538/zpxb.2019.0028

Study of Chemical Constituents and Antioxidant Activity of Isatidis Folium

YAN Jun¹, GU Juan², FENG Shuo¹, JI Rui-fang³, QUAN Qing-hua³, LIU Yong-gang³

(1. *Beijing Research Institute of Uranium Geology, Beijing 100029, China;*

2. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China;

3. Beijing University of Uranium Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: High performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry (HPLC-APCI/MS) and electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS²) were applied to analyze the chemical constituents from acetate, *n*-BuOH and 95% ethanol extracts of Isatidis Folium. The separation was performed on a Kromasil C18 column (4.6 mm×250 mm×5 μm) with the gradient of 0.15% acetic acid/water-methanol as mobile phase with a flow rate of 0.8 mL/min at 25℃. The UV

收稿日期:2019-02-25;修回日期:2019-04-12

基金项目:国家自然科学基金项目(81703640)资助

作者简介:闫峻(1982—),男(汉族),吉林通化人,高级工程师,从事中药及天然产物化学成分和质量控制研究。

E-mail: cnncyanjun@163.com

通信作者:刘永刚(1981—),男(汉族),山东临沂人,教授,从事中药药效物质基础研究。E-mail: liuyg0228@163.com

spectra were obtained by a diode array detector (DAD) under the detection wavelength at 254 nm and 265 nm. In order to get exact data of MS and MS² spectra, the atmosphere pressure chemical ionization ion source (APCI) and electrospray ionization ion source (ESI) in both positive and negative mode were utilized. Up to date, thirty-nine different compounds were identified from the crude extracts, including alkaloids, organic acids, nucleosides and purines, amino acids, flavones, carbohydrates, porphyrin and epigotrin. Meanwhile, the antioxidant activity of the extracts from *Radix Isatidis* were successfully estimated by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) and radical scavenging (DPPH) methods. The results of the antioxidant activities indicated that the compositions of antioxidant activity were mainly existed in the small polarity part. Indoles, quinazolinones, organic acids and porphyrins might be the main antioxidative constituents of *Radix Isatidis*. This method is rapid and sensitive that can be used for analyzing the chemical compositions and antioxidant activities of traditional Chinese medicine.

Key words: *Isatidis Folium*; chemical constituents; high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS); electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS²); antioxidant activity

大青叶(*Isatidis Folium*)是十字花科植物菘蓝的干燥叶,为临床常用中药,用于治疗温邪入营、高热神昏、发斑发疹、黄疸热痢、疟腮、喉痹、丹毒和肺肿等症状^[1]。大青叶的化学成分主要包括吲哚类、喹唑酮类、芥子苷类、有机酸类和氨基酸类化合物等^[2],具有抗病原微生物、抗内毒素、抗炎、增强免疫、解热等药理活性^[3],是应用广泛的中成药的原料药之一。

目前,对中药及天然产物化学成分的分析主要采用溶剂分配和柱色谱法将其分离为单一化合物,然后用红外、紫外、核磁等化学方法对其结构进行鉴定,此方法费时,且无法对微量和痕量组分进行分析^[4]。随着色谱、质谱及其联用技术的发展,特别是电喷雾电离(ESI)、大气压化学电离(APCI)等软电离质谱技术的发展,可同时完成成分分离和结构鉴定,是目前研究中药及天然产物化学成分的有效方法^[5]。

现代研究表明^[5],自由基会损伤机体,与许多疾病的发生发展有着密切联系。传统的合成抗氧化剂虽然具有较强的抗氧化能力,但是长期服用会产生一定的毒性,甚至会致畸和致癌^[5]。大青叶具有一定的抗氧化活性,目前对大青叶的研究主要集中在不饱和脂肪酸类和多糖类成分^[6-7],较少涉及抗氧化活性成分的研究。对抗氧化活性组分进行筛选,

继而确定其中抗氧化活性的有效成分,对大青叶的物质基础研究具有重要意义。

本研究拟采用高效液相色谱-大气压化学电离质谱法(HPLC-APCI/MS)、高效液相色谱-电喷雾电离质谱法(HPLC-ESI/MS)和电喷雾多级串联质谱法(ESI-MS²)分别分析大青叶乙酸乙酯、正丁醇和95%乙醇提取物的化学成分,同时,采用铁离子还原能力法(FRAP)对大青叶的抗氧化活性进行评价,并通过自由基清除法(DPPH)验证FRAP法的评价结果,以期为大青叶药效物质基础研究、质量控制标准的制订以及谱效关系的研究提供依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Waters 2695 高效液相色谱仪;美国 Waters 公司产品;Finnigan LCQ 离子阱质谱仪;美国 Finnigan 公司产品;自动酶标仪;奥地利 CliniBio 公司产品。

1.2 主要药材与试剂

大青叶药材:购于北京同仁堂长春药店,经长春中医药大学王淑敏教授鉴定为十字花科植物菘蓝的干燥叶;靛蓝和靛玉红对照品:中国药品生物制品检定所产品;吲哚-3-甲醛对照品:阿拉丁试剂(上海)有限公司产品;胞苷、腺嘌呤

呤、尿苷、鸟苷、腺苷、苯丙氨酸、脯氨酸、精氨酸和苹果酸对照品,以及 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼、2,4,6-三吡啶基三嗪、抗坏血酸,均为美国 Sigma 公司产品;甲醇和乙酸,均为色谱纯,美国 Fisher 公司产品;其他试剂均为分析纯。

1.3 样品制备

称取 10 g 大青叶药材,加水煎煮 2 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,浓缩至适量,加入 3 倍量乙醇,搅匀,静置 24 h,过滤,减压浓缩至稠膏状,得大青叶总提取物。向大青叶总提取物中加水使之溶解,用乙酸乙酯萃取,将乙酸乙酯层减压浓缩并干燥,得大青叶乙酸乙酯提取物;用正丁醇萃取乙酸乙酯萃取后的水相部分,将正丁醇层减压浓缩并干燥,得大青叶正丁醇提取物;将正丁醇萃取后的水相部分干燥,然后加入 95%乙醇溶解,减压抽滤,浓缩并干燥,得大青叶 95%乙醇提取物。各取 0.5 g 大青叶乙酸乙酯、正丁醇和 95%乙醇提取物,分别置于 10 mL 容量瓶中,加 50%甲醇定容至刻度,摇匀,过 0.45 μm 滤膜,取滤液,待测。

1.4 仪器条件

1.4.1 大青叶乙酸乙酯提取物化学成分的色谱和质谱条件 色谱条件:色谱柱为 Kromasil C18 分析柱(4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5 μm);流动相为 0.15%乙酸/水(A)和甲醇(B);梯度洗脱程序:0~45 min(40%~100%B),45~60 min(100%B);流速 0.8 mL/min;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL ;检测波长 254 nm。质谱条件:大气压化学电离源,正、负离子模式检测;质量扫描范围 m/z 50~1 000;气化温度 450 $^{\circ}\text{C}$;毛细管温度 150 $^{\circ}\text{C}$;喷雾电压 4.0 kV;鞘气(N_2)流速 0.9 L/min;辅助气(N_2)流速 1.5 L/min。

1.4.2 大青叶正丁醇提取物化学成分的色谱和质谱条件 色谱条件:色谱柱为 Kromasil C18 分析柱(4.6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5 μm);流动相为 0.15%乙酸/水(A)和甲醇(B);梯度洗脱程序:0~10 min(5%B),10~20 min(5%~20%B),20~30 min(20%~30%B),30~50 min(30%~35%B),50~65 min(35%~55%B);流速 0.8 mL/min;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$;进样量 10 μL ;检测波长 265 nm。质谱条件:电喷雾电离源,正、负离子模式检测;质量扫描范围 m/z 50~1 000;毛细管温度 250 $^{\circ}\text{C}$;喷雾电压 4.5 kV;

鞘气(N_2)流速 0.9 L/min;辅助气(N_2)流速 3.0 L/min。

1.4.3 大青叶 95%乙醇提取物化学成分的质谱条件 电喷雾电离源,正、负离子模式检测;质量扫描范围 m/z 50~1 000;毛细管温度 200 $^{\circ}\text{C}$;喷雾电压 4.5 kV;鞘气(N_2)流速 0.75 L/min;将大青叶 95%乙醇提取物加甲醇稀释后,采用流动注射泵进样,进样流速 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。

1.5 大青叶抗氧化活性研究

1.5.1 铁离子还原能力法 分别用甲醇稀释大青叶乙酸乙酯、正丁醇和 95%乙醇提取物,配制成 0.1 g/L 待测样品溶液,将抗坏血酸(Vc)对照品配制成 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 甲醇溶液作为对照品溶液。将 300 mmol/L 醋酸钠缓冲溶液(pH 3.6),10 mmol/L 2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)溶液(溶解在 40 mmol/L HCl 中)和 20 mmol/L 三氯化铁溶液,以体积比 10:1:1 混合,配制成 FRAP 试剂。取 10 μL Vc 对照品溶液或待测样品溶液,加入 96 孔板中,然后迅速加入 300 μL FRAP 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 下用自动酶标仪分别测定 0 min 和 4 min Vc 对照品溶液和待测样品溶液的吸光度值,平行测定 3 次。FRAP 法的测量结果以相当于 500 μmol Vc 的抗氧化能力计算,其计算公式为:

$$\text{FRAP}(\mu\text{mol}/\text{L}) = (0 \text{ min 吸光度} - 4 \text{ min 吸光度}) / (0 \text{ min Vc 吸光度} - 4 \text{ min Vc 吸光度}) \times 500 \times 2 \quad (1)$$

1.5.2 自由基清除能力法 将大青叶乙酸乙酯、正丁醇和 95%乙醇提取物分别用甲醇稀释,在 0.001~10 g/L 内配制成 10 个不同浓度的待测样品溶液。用甲醇将 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)配制成 65 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 DPPH 溶液。将 20 μL 甲醇和 100 μL DPPH 溶液混合为 A_0 ,20 μL 不同浓度待测样品溶液和 100 μL DPPH 溶液混合为 A_i ,20 μL 不同浓度待测样品溶液和 100 μL 甲醇混合为 A_j 。将以上 3 种混合溶液避光放置 30 min,用自动酶标仪在 515 nm 波长下分别测定其吸光度值,每个样品平行测定 3 次,计算不同浓度样品对 DPPH 自由基的清除率,计算公式为:

$$\text{SA}(\%) = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\% \quad (2)$$

以清除率对各样品的浓度做标准曲线,得线性回归方程 $\text{SA} = aC + b$,依此可以计算出清除率

为 50% 时的样品浓度(C),即为该样品的 IC₅₀ 值。

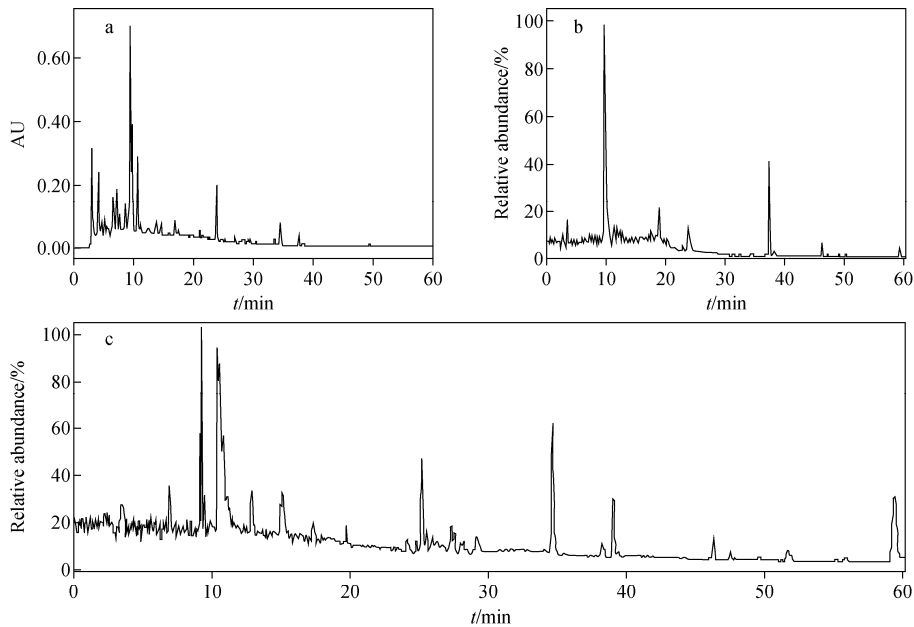
2 结果与讨论

2.1 大青叶各提取物的化学成分分析

大青叶乙酸乙酯提取物、正丁醇提取物的总

离子流图分别示于图 1、图 2。大青叶 95% 乙醇提取物的一级全扫描电喷雾质谱图示于图 3。

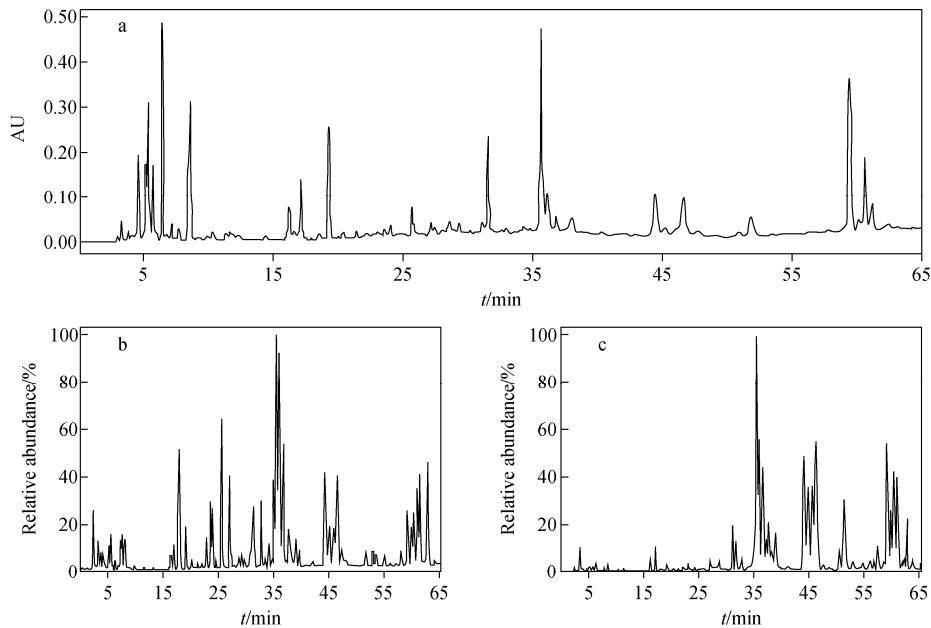
大青叶乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物化学成分的 LC-MS² 数据及其解析、对应的化合物分别列于表 1、表 2。



注：a. 高效液相色谱图；b. 正离子模式；c. 负离子模式

图 1 大青叶乙酸乙酯提取物的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of the acetate extract from Isatidis Folium



注：a. 高效液相色谱图；b. 正离子模式；c. 负离子模式

图 2 大青叶正丁醇提取物的总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of the *n*-BuOH extract from Isatidis Folium

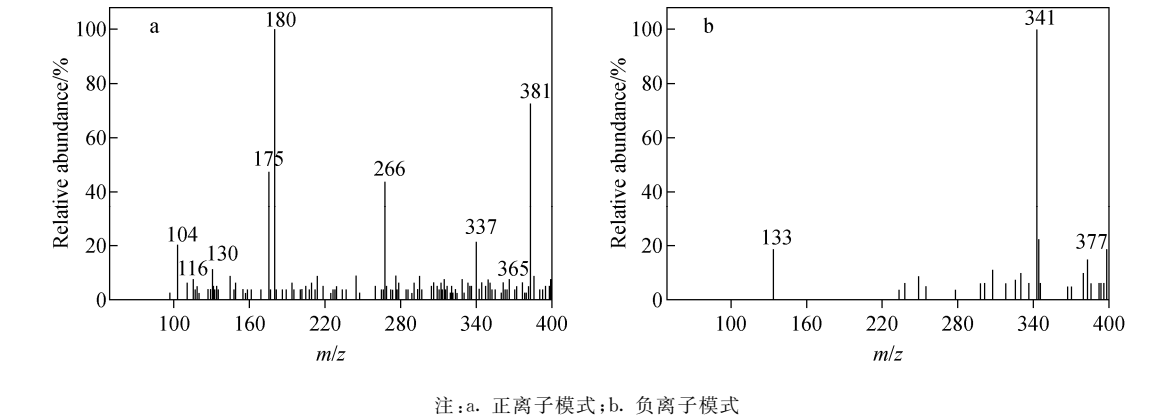


图 3 大青叶 95%乙醇提取物的一级全扫描质谱图

Fig. 3 Mass spectra of the 95% ethanol extract from Isatidis Folium

表 1 大青叶乙酸乙酯提取物的 LC-MS² 数据

Table 1 LC-MS² data of the acetate extract from Isatidis Folium

序号	保留时间	正离子模式	负离子模式	二级质谱数据	化合物
No.	<i>t</i> _R /min	Positive ion mode	Negative ion mode	MS ² data	Compounds
		(<i>m/z</i>)	(<i>m/z</i>)		
1	10.45	166[M+H] ⁺		166;148[M+H-H ₂ O] ⁺ , 120[M+H-HCOOH] ⁺	<i>N</i> -醛基氨基苯甲酸
2	10.98	267[M+H] ⁺		267;249[M+H-H ₂ O] ⁺ , 239[M+H-CO] ⁺ , 146[M+H-C ₆ H ₅ COOH] ⁺	3-羧基苯基喹唑酮
3	12.91		137[M-H] ⁻	137;93[M-H-CO ₂] ⁻	水杨酸
4	13.40	146[M+H] ⁺		146;118[M+H-CO] ⁺	3-醛基吡啶
5	13.84	239[M+H] ⁺		239;221[M+H-H ₂ O] ⁺ , 211[M+H-CO] ⁺	3-羟苯基喹唑酮
6	15.81	327[M+H] ⁺	327;201[M+H-CH ₃ CHC(COOH)COCH ₂] ⁺		依蓝酮
7	23.63	249[M+H] ⁺		249;221[M+H-CO] ⁺	色胺酮
8	28.28	263[M+H] ⁺		263;235[M+H-CO] ⁺ , 219[M-H-CO ₂] ⁺	靛蓝
9	34.25	263[M+H] ⁺		263;235[M+H-CO] ⁺ , 219[M-H-CO ₂] ⁺	靛玉红
10	37.44	279[M+H] ⁺		279;223[M+H-2CO] ⁺ , 205[M+H-2CO-H ₂ O] ⁺	羟基靛玉红
11	46.39		277[M-H] ⁻	277;259[M-H-H ₂ O] ⁻ , 233[M-H-CO ₂] ⁻ , 217[M-H-CH ₃ COOH] ⁻	亚麻酸
12	59.33	535[M+H] ⁺		535;507[M-H-CO] ⁺ , 463[M+H-C ₃ H ₄ O ₂] ⁺ , 435[M+H-C ₃ H ₄ O ₂ -CO] ⁺	焦脱镁叶绿酸 a

表 2 大青叶正丁醇提取物的 LC-MS² 数据

Table 2 LC-MS³ data of the *n*-BuOH extract from *Isatidis Folium*

序号 No.	保留时间 <i>t</i> _R /min	正离子模式 Positive ion mode (<i>m/z</i>)	负离子模式 Negative ion mode (<i>m/z</i>)	二级质谱数据 MS ² data	化合物 Compounds
13	4. 41	244[M+H] ⁺		244; 112[M+H-rib] ⁺	胞苷
14	5. 16	136[M+H] ⁺		—	腺嘌呤
15	5. 49	152[M+H] ⁺		—	鸟嘌呤
16	8. 38	245[M+H] ⁺		245; 113[M+H-rib] ⁺	尿苷
17	16. 64	284[M+H] ⁺		284; 152[M+H-rib] ⁺	鸟苷
18	17. 70		164[M-H] ⁻	164; 147[M-H-NH ₃] ⁻ , 118[M-H-HCOOH] ⁻	苯丙氨酸
19	18. 94	268[M+H] ⁺		268; 136[M+H-rib] ⁺	腺苷
20	35. 05		593[M-H] ⁻	593; 473[M-H-CH ₂ OH(CHOH) ₂ CHO] ⁻ , 431[M-H-glc] ⁻ , 341[M-H-glc-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 311[M-H-glc-CH ₂ OH(CHOH) ₂ CHO] ⁻	皂草苷
21	37. 07		623[M-H] ⁻	623; 503[M-H-CH ₂ OH(CHOH) ₂ CHO] ⁻ , 461[M-H-glc] ⁻ , 371[M-H-glc-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 341[M-H-glc-CH ₂ OH(CHOH) ₂ CHO] ⁻	异金雀花素-7- <i>O</i> - 吡喃葡萄糖苷
22	37. 25	611[M+H] ⁺	609[M-H] ⁻	609; 357[M-H-glc-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 327[M-H-glc-CH ₂ OH(CHOH) ₂ CHO] ⁻	异荛草苷-6''- <i>O</i> - 吡喃葡萄糖苷
23	43. 21		593[M-H] ⁻	593; 341[M-H-glc-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 311[M-H-glc-CH ₂ OH(CHOH) ₂ CHO] ⁻	异牡荆素-6''- <i>O</i> - 吡喃葡萄糖苷
24	45. 25		623[M-H] ⁻	623; 371[M-H-glc-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 341[M-H-glc-CH ₂ OH(CHOH) ₂ CHO] ⁻	异金雀花素-6''- <i>O</i> - 吡喃葡萄糖苷
25	50. 33		447[M-H] ⁻	447; 357[M-H-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 327[M-H-CH ₂ OH(CHOH) ₂ CHO] ⁻	异荛草苷
26	52. 13		609[M-H] ⁻	609; 519[M-H-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 429[M-H-glc-H ₂ O] ⁻ , 339[M-H-glc-H ₂ O-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻	异荛草苷-3''- <i>O</i> - 吡喃葡萄糖苷
27	58. 50		431[M-H] ⁻	431; 341[M-H-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 311[M-H-CH ₂ OH(CHOH) ₂ CHO] ⁻	异牡荆素
28	59. 24		593[M-H] ⁻	593; 503[M-H-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 413[M-H-glc-H ₂ O] ⁻ , 323[M-H-glc-H ₂ O-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻	异牡荆素-3''- <i>O</i> - 吡喃葡萄糖苷
29	59. 75		461[M-H] ⁻	461; 37[M-H-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 341[M-H-CH ₂ OH(CHOH) ₂ CHO] ⁻	异金雀花素
30	60. 37		623[M-H] ⁻	623; 533[M-H-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻ , 443[M-H-glc-H ₂ O] ⁻ , 353[M-H-glc-H ₂ O-CH ₂ OHCHOHCHO] ⁻	异金雀花素-3''- <i>O</i> - 吡喃葡萄糖苷

由图 3 可知,大青叶 95%乙醇提取物在正离子模式下主要有 m/z 104、116、130、175、180、266、337、365 和 381 离子,在负离子模式

下主要有 m/z 133、341 和 377 离子。
大青叶 95%乙醇提取物化学成分 ESI-MS² 数据及其解析、对应的化合物列于表 3。

表 3 大青叶 95%乙醇提取物的 ESI-MS² 数据
Table 3 ESI-MS² data of the 95% ethanol extract from Isatidis Folium

序号 No.	正离子模式 Positive ion mode (m/z)	负离子模式 Negative ion mode (m/z)	二级质谱数据 MS ² data	化合物 Compounds
31	104[M+H] ⁺		104;86[M+H-H ₂ O] ⁺ , 60[M+H-CO ₂] ⁺	γ -氨基丁酸
32	116[M+H] ⁺		116;70[M+H-HCOOH] ⁺	脯氨酸
33	130[M+H] ⁺		130;113[M+H-NH ₃] ⁺ , 84[M+H-SCH ₂] ⁺ , 70[M+H-SC ₂ H ₄] ⁺	表告依春
34	175[M+H] ⁺		175;157[M+H-H ₂ O] ⁺ , 140[M+H-H ₂ O-NH ₃] ⁺ , 112[M+H-HCOOC-NH ₃] ⁺	精氨酸
35	180[M+H] ⁺		180;162[M+H-H ₂ O] ⁺ , 144[M+H-2H ₂ O] ⁺ , 84[M+H-2H ₂ O-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺ , 72[M+H-H ₂ O-C ₃ H ₆ O ₃] ⁺	氨基葡萄糖
36	365[M+Na] ⁺ 381[M+K] ⁺	341[M-H] ⁻	365;203[M+Na-glc] ⁺ , 185[M+Na-glc-H ₂ O] ⁺ 381;219[M+K-glc] ⁺ , 201[M+K-glc-H ₂ O] ⁺ 341;281[M-H-C ₂ H ₄ O ₂] ⁻ , 179[M-H-glc] ⁻ , 161[M-H-H ₂ O] ⁻	蔗糖
37		133[M-H] ⁻	133;115[M-H-H ₂ O] ⁻	苹果酸
38		191[M-H] ⁻	191;173[M-H-H ₂ O] ⁻ , 111[M-H-2H ₂ O-CO ₂] ⁻	柠檬酸
39		195[M-H] ⁻	195;177[M-H-H ₂ O] ⁻ , 159[M-H-2H ₂ O] ⁻ , 129[M-H-2H ₂ O-CH ₂ O] ⁻ , 99[M-H-2H ₂ O-2CH ₂ O] ⁻	葡萄糖醛酸

在正离子模式下, m/z 104 离子的 MS² 谱中有 m/z 86[M+H-H₂O]⁺ 和 m/z 60[M+H-CO₂]⁺ 碎片离子,根据质谱裂解规律,结合文献[13],推断其为 γ -氨基丁酸; m/z 116 离子的 MS² 谱中有 m/z 70[M+H-HCOOH]⁺ 碎

片离子,与脯氨酸对照品具有相同的质谱裂解规律,确定其为脯氨酸; m/z 130 离子的 MS² 谱中有 m/z 113[M+H-NH₃]⁺、 m/z 84[M+H-SCH₂]⁺ 和 m/z 70[M+H-SC₂H₄]⁺ 碎片离子,根据质谱裂解规律,推断其为表告依

春; m/z 175 离子的 MS^2 谱中有 m/z 157 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 140 $[M+H-H_2O-NH_3]^+$ 和 m/z 112 $[M+H-HCOOC-NH_3]^+$ 碎片离子,与精氨酸对照品具有相同的裂解规律,可以确定其为精氨酸; m/z 180 离子的 MS^2 谱中有 m/z 162 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 144 $[M+H-2H_2O]^+$ 、 m/z 84 $[M+H-2H_2O-C_2H_4O_2]^+$ 和 m/z 72 $[M+H-H_2O-C_3H_6O_3]^+$ 碎片离子,根据文献^[13-14]报道,确定其为氨基葡萄糖; m/z 365 和 m/z 381 在一级全扫描质谱中的质荷比相差 16,初步判断其可能分别为蔗糖的 $[M+Na]^+$ 和 $[M+K]^+$ 峰,其中 m/z 365 的 MS^2 谱中有 m/z 203 $[M+Na-glc]^+$ 和 m/z 185 $[M+Na-glc-H_2O]^+$ 碎片离子, m/z 381 的 MS^2 谱中有 m/z 219 $[M+K-glc]^+$ 和 m/z 201 $[M+K-glc-H_2O]^+$ 碎片离子,根据文献报道^[15-16],确定其为蔗糖。

在负离子模式下, m/z 133 的 MS^2 谱中有 m/z 115 $[M-H-H_2O]^-$ 碎片离子,与苹果酸对照品具有相同的质谱裂解规律,同时结合文献^[17]报道,确定其为苹果酸; m/z 341 的 MS^2 谱中有 m/z 281 $[M-H-C_2H_4O_2]^-$ 、 m/z 179 $[M-H-glc]^-$ 和 m/z 161 $[M-H-H_2O]^-$ 碎片离子,与正离子模式下的 m/z 365、381 离子

相对应,为蔗糖的 $[M-H]^-$ 峰^[15-16]; m/z 191 的 MS^2 谱中有 m/z 173 $[M-H-H_2O]^-$ 和 m/z 111 $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$ 碎片离子,与柠檬酸对照品具有相同的质谱裂解规律,可以确定其为柠檬酸; m/z 195 离子在 MS^2 中产生 m/z 177 $[M-H-H_2O]^-$ 、 m/z 159 $[M-H-2H_2O]^-$ 、 m/z 129 $[M-H-2H_2O-CH_2O]^-$ 和 m/z 99 $[M-H-2H_2O-2CH_2O]^-$ 碎片离子,根据文献^[13-14]报道,确定该化合物为葡萄糖醛酸。

2.2 大青叶抗氧化活性的研究

FRAP 值的大小可以反映样品对铁离子还原能力的强弱,FRAP 值越大,说明该样品对铁离子的还原能力越强,即其抗氧化活性越强,反之越弱。样品的 IC_{50} 值可以反映该样品对 DPPH 自由基清除能力的强弱, IC_{50} 值越小,表明该样品对 DPPH 自由基的清除能力越强,即其抗氧化能力越强,反之越弱^[4,18]。大青叶乙酸乙酯、正丁醇、95%乙醇和总提取物的抗氧化活性结果列于表 4。大青叶不同化学组分抗氧化活性强弱依次为:大青叶乙酸乙酯提取物>总提取物>正丁醇提取物>95%乙醇提取物。大青叶乙酸乙酯提取物的抗氧化活性最强,高于总提取物,表明大青叶抗氧化活性的有效成分主要集中在极性较低的化学组分中。

表 4 大青叶提取物的抗氧化活性
Table 4 Antioxidant activity of Isatidis Folium

序号 No.	样品名称 Sample	铁离子还原能力 FRAP/(μ mol/L)	自由基清除能力 DPPH		
			回归方程 Regression equation	相关系数 Related coefficient(<i>r</i>)	半数清除浓度 IC_{50} /(g/L)
1	乙酸乙酯提取物	3134.8	SA=100.8C+18.8	0.9989	0.310
2	正丁醇提取物	2529.3	SA=71.3C+19.4	0.9916	0.430
3	95%乙醇提取物	1318.4	SA=24.0C+16.2	0.9979	1.408
4	总提取物	1953.1	SA=69.1C+14.6	0.9951	0.513

3 结论

本研究采用液相色谱-质谱联用技术分析大青叶乙酸乙酯、正丁醇提取物的化学成分,采用电喷雾多级质谱技术分析大青叶 95%乙醇提取物的化学成分。从大青叶乙酸乙酯、正丁醇和 95%乙醇提取物中共鉴别出 39 种化合物,其中包括 6 种有机酸类化合物,8 种生物碱

类化合物,6 种核苷嘌呤类化合物,4 种氨基酸类化合物,11 种黄酮类化合物,2 种糖类化合物,1 种卟啉类化合物,1 种含硫类化合物。

大青叶抗氧化活性评价结果表明,大青叶抗氧化活性成分主要集中在极性较低的化学组分中,其主要有效成分为吡啶类、唑啉酮类和有机酸类化合物,糖类和氨基酸类化合物的抗氧

化活性较弱。本研究结果可为大青叶药效物质基础研究、质量控制标准的制订和谱效关系的研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:21-22.
- [2] 武彦文,高文远,肖小河. 大青叶的研究进展[J]. 中草药,2006,37(5):793-796.
WU Yanwen, GAO Wenyuan, XIAO Xiaohe. Advances in studies on Folium Isatidis[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2006, 37(5): 793-796(in Chinese).
- [3] 赵震毅,李国斌. 异金雀花素等5种大青叶黄酮的同时检测[J]. 食品工业,2017,38(10):283-286.
ZHAO Zhenyi, LI Guobin. Determination of five flavonoids in different Folium Isatidis extracts by using HPLC[J]. The Food Industry, 2017, 38(10): 283-286(in Chinese).
- [4] 闫峻,赵春芳,李伯平,刘志强,郭冬发,郑重. 板蓝根化学成分及抗氧化活性的研究[J]. 质谱学报,2017,38(2):248-255.
YAN Jun, ZHAO Chunfang, LI Boping, LIU Zhiqiang, GUO Dongfa, ZHENG Zhong. Chemical constituents and antioxidant activity of Radix Isatidis[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 38(2): 248-255(in Chinese).
- [5] 闫峻,刘舒,李伯平,刘志强,郭冬发. 复方板蓝根颗粒 APCI-MS 指纹图谱及化学成分的 LC-APCI-MSⁿ 研究[J]. 质谱学报,2017,38(3):320-327.
YAN Jun, LIU Shu, LI Boping, LIU Zhiqiang, GUO Dongfa. Fingerprint chromatograms and chemical components of compound indigowoad granule by APCI-MS and LC-APCI-MSⁿ[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 38(3): 320-327(in Chinese).
- [6] 孙丽萍,王大仟,张智武. 11种天然植物提取物对 DPPH 自由基的清除作用[J]. 食品科学,2009,30(1):45-47.
SUN Liping, WANG Daqian, ZHANG Zhiwu. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging activities of eleven species of natural plant extracts[J]. Food Science, 2009, 30(1): 45-47(in Chinese).
- [7] 陈瀚,李进,李祥,陈建伟,薛平. 板蓝根不同提取部位的体外抗氧化活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(9):184-186.
CHEN Han, LI Jin, LI Xiang, CHEN Jianwei, XUE Ping. Antioxidation of different extracts from *Isatidis indigotica* in vitro[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2012, 18(9): 184-186(in Chinese).
- [8] MHON T, PLITZKO I, HAMBURGER M. A comprehensive metabolite profiling of *Isatis tinctoria* leaf extracts[J]. Phytochemistry, 2009, 70(7): 924-934.
- [9] XIAO S S, BI K S, SUN Y Q. Identification of chemical constituents in the root of *Isatis Indigotica* Fort. by LC/DAD/ESI/MS/MS[J]. Journal of Liquid Chromatography, 2007, 30(1): 73-85.
- [10] DENG X Y, GAO G H, ZHENG S N, LI F M. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in the leaves of *Isatis indigatica* Fort. by ultra-performance liquid chromatography with PDA and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008, 48(3): 562-567.
- [11] FERRERS F, ANDRADE P B, VALENTAO P, GIL-IZQUIERDO A. Further knowledge on barely (*Hordeum vulgare* L.) leaves O-glycosyl-C-glycosyl flavones by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1182(1): 56-64.
- [12] FERRERS F, GIL-IZQUIERDO A, ANDRADE P B, VALENTAO P, TOMAS-BARBERAN F A. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1161: 214-223.
- [13] 刘舒,闫峻,李慧琳,宋凤瑞,刘忠英,刘志强,刘淑莹. 复方板蓝根颗粒化学成分的质谱研究[J]. 高等学校化学学报,2010,31(6):1143-1147.
LIU Shu, YAN Jun, LI Huilin, SONG Fengrui, LIU Zhongying, LIU Zhiqiang, LIU Shuying. Studies on chemical constituents of compound Indigowoad Root Granule by mass spectrometry[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2010, 31(6): 1143-1147(in Chinese).
- [14] LU W Y, KIMBALL E, RABINOWITZ J D. A high-performance liquid chromatography-tandem

- mass spectrometry method for quantitation of nitrogen-containing intracellular metabolites[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2006, 17(1): 37-50.
- [15] 李锐,付铁军,及元乔,丁立生,彭树林. 膜荚黄芪与蒙古黄芪化学成分的高效液相色谱-质谱研究[J]. 分析化学, 2005, 33(12): 1 676-1 680.
LI Rui, FU Tiejun, JI Yuanqiao, DING Lisheng, PENG Shulin. A study of a *Stragalus Mongholicus* and a *stragalus Menbranaceus* by high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33(12): 1 676-1 680(in Chinese).
- [16] 郭明全,宋凤瑞,陈茂连,白玉,刘志强,刘淑莹. 刺五加寡糖的电喷雾多级串联质谱研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(9): 1 577-1 581.
GUO Mingquan, SONG Fengrui, CHEN Mao-lian, BAI Yu, LIU Zhiqiang, LIU Shuying. Studies on oligosaccharides from *Acanthopanax Senticosus* Harms (AS) by electrospray ionization tandem mass spectrometry (MSⁿ)[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2003, 24(9): 1 577-1 581(in Chinese).
- [17] 刘巍,毛友安,钟科军,卢红兵. 直接电喷雾离子阱质谱法快速表征烟叶[J]. 分析试验室, 2008, 27(2): 65-69.
LIU Wei, MAO You'an, ZHONG Kejun, LU Hongbing. Fast characterization of tobacco leaves by direct electrospray ionization-ion trap mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2008, 27(2): 65-69(in Chinese).
- [18] 闫峻,冯硕,吴韬,LIU R H, TSAO R. 亚麻子发芽前后化学成分及抗氧化活性的研究[J]. 质谱学报, 2018, 39(1): 112-119.
YAN Jun, FENG Shuo, WU Tao, LIU Rong-hua, TSAO Rong. Chemical constituents and antioxidant activity of flaxseed during germination[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2018, 39(1): 112-119(in Chinese).