

基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术鉴定藤梨根的化学成分^Δ

陈方超^{1,2*},高守红³,王志鹏³,杨宏³,顺庆生²,宋新华⁴,徐一新^{2#}(1.上海中医药大学研究生院,上海201213;2.上海健康医学院药学院,上海201318;3.海军军医大学附属长征医院药学部,上海200003;4.宜春学院化学与生物工程学院,江西宜春336000)

中图分类号 R282;R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)14-1725-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.14.12

摘要 目的:快速鉴定藤梨根的化学成分,为该药材后续的物质基础和质量控制等研究提供参考。方法:运用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱技术(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)进行藤梨根的化学成分检测。色谱柱为Waters XSelect HSS T3,流动相为0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液(梯度洗脱),柱温为40℃,流速为0.3 mL/min,进样量为3 μL;采用电喷雾离子源,以负离子模式采集数据,扫描范围为 m/z 50~1 500,干燥气温度为350℃,雾化气压力为45 psi,毛细管电压为3 500 V,鞘气温度为350℃。根据准分子离子和二级碎片离子信息,结合相关文献以及对照品的保留时间和质谱裂解规律对检出的化学成分进行结构鉴定。结果与结论:共鉴定出58个化学成分,包括16个五环三萜类化合物(如羟基积雪草酸、积雪草酸、山楂酸、科罗索酸、齐墩果酸、熊果酸等)、12个黄酮类化合物(如芦丁、槲皮苷、木犀草苷、紫云英苷等)、17个有机酸类化合物(如隐绿原酸、绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸C等)等,有9个化合物(如原花青素B₁、B₂、木犀草素等)为首次从藤梨根中鉴定出来。UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术可快速鉴定藤梨根中的化学成分。

关键词 藤梨根;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱技术;化学成分;鉴定

Identification of Chemical Components in *Actinidia chinensis* Root by UHPLC-Q-TOF-MS/MS

CHEN Fangchao^{1,2}, GAO Shouhong³, WANG Zhipeng³, YANG Hong³, SHUN Qingsheng², SONG Xinhua⁴, XU Yixin²(1. Graduate School, Shanghai University of TCM, Shanghai 201213, China; 2. School of Pharmacy, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China; 3. Dept. of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200003, China; 4. College of Chemistry and Bio-engineering, Yichun University, Jiangxi Yichun 336000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To identify chemical components of *Actinidia chinensis* root rapidly, and to provide reference for further material basis and quality control study of the crude medicine. METHODS: UHPLC-Q-TOF-MS/MS technique was used to detect chemical components of *A. chinensis* root. The separation was performed on Waters XSelect HSS T3 column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid acetonitrile solution-0.1% formic acid water solution (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 40 °C, and sample size was 3 μL. Electrospray ion source was adopted, the data was collected under negative ion mode; the scanning range was m/z 50-1 500; the drying gas temperature was 350 °C, the atomizing air pressure was 45 psi, the capillary voltage was 3 500 V, and sheath gas temperature was 350 °C. According to the information of excimer ion and secondary fragment ion, the chemical components were identified by combining with the relevant literature, the

2006, 116 (4):984-995.

[19] SUN BW, ZOU XQ, CHEN YL, et al. Preconditioning of carbon monoxide releasing molecule-derived CO attenuates LPS-induced activation of HUVEC[J]. *Int J Biol Sci*, 2008, 4 (5):270-278.

[20] LILLJEBJORN LV, CSIZMADIA E, HEDBLUM A, et al.

Δ 基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目(No.1741-1972400)

* 硕士研究生。研究方向:中药分析。电话:021-51322403。E-mail: jiankonglingyuan@163.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:天然活性成分。电话:021-65886698。E-mail: xuyx@sumhs.edu.cn

A role of the heme degradation pathway in shaping prostatic inflammatory responses and lipid metabolism[J]. *Am J Pathol*, 2020. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.12.008.

[21] YAO Q, HUANG ZW, ZHAI YY, et al. Localized controlled release of bilirubin from β-cyclodextrin-conjugated ε-polylysine to attenuate oxidative stress and inflammation in transplanted islets[J]. *ACS Appl Mater Interface*, 2020, 12 (5):5462-5475.

[22] 李佩儒,周春阳,张译,等.洋葱醇提取物总多酚含量及其抗氧化活性研究[J]. *中国药业*, 2019, 28(9):21-24.

(收稿日期:2019-12-13 修回日期:2020-05-13)

(编辑:罗 瑞)

retention time of the reference substance and the law of mass spectrometry cracking. RESULTS & CONCLUSIONS: Totally 58 chemical components was identified, which included 16 pentacyclic triterpenes (such as hydroxyasiatic acid, asiatic acid, maslinic acid, corosolic acid, oleanic acid, ursolic acid, etc.), 12 flavonoids (such as rutin, quercitrin, cynaroside, astragalol, etc.), 17 organic acids (such as cryptochlorogenic acid, chlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid C, etc.). There were 9 components (such as procyanidin B₁, B₂ and luteolin, etc.) identified for the first time in *A. chinensis* root. UHPLC-Q-TOF-MS/MS technique can be used for the rapid identification of chemical components in *A. chinensis* root.

KEYWORDS *Actinidia chinensis* root; UHPLC-Q-TOF-MS/MS; Chemical component; Identification

藤梨根为猕猴桃科猕猴桃属植物中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* Planch.)的干燥根,又名阳桃根,其味苦、涩,性凉,具有清热解毒、活血散结、祛风利湿等功效^[1-2]。藤梨根是浙江等地区常用的抗肿瘤中药,临床上多用于治疗胃癌、肝癌、食管癌、结肠癌等消化系统肿瘤,还用于治疗风湿痹痛、黄疸、痢疾、淋浊带下、瘰疬、水肿等症^[3]。现代化学成分研究表明,其化学成分主要为五环三萜类、黄酮类、萜醌类、苯丙素类、甾体类、生物碱类、有机酸类等,其主要活性成分为五环三萜类成分^[4-7]。现代药理学研究表明,藤梨根具有明显的抗肿瘤、抗菌、抗氧化、保肝、降血脂、抗病毒、免疫调节等作用^[8-11]。

目前对藤梨根的研究主要集中在化学成分的分离以及药理作用的研究等方面,但藤梨根的化学成分复杂、分析方法单一,尤其是在质量控制方面的研究鲜有报道,缺乏有效的质量控制标准。近年来,液质联用技术发展迅速,以其分析时间短、分离度高、灵敏度高和准确度高等特点在中药成分分析鉴定中具有独特优势^[12]。基于此,本研究采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱技术(UHPLC-Q-TOF-MS/MS)对藤梨根的化学成分进行快速鉴别,为进一步研究其物质基础以及质量控制提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器

1290型UHPLC仪(配备在线脱气机、二元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器)、6530型高分辨飞行时间质谱仪[配备Dual AJS电喷雾离子源(ESI)、MassHunter Data Acquisition 7.1工作站、Qualitative Analysis B 10.0定性分析软件和PCDL Manager 8.0数据库软件]均购自美国Agilent公司;CPA 225D型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);VortexKB3型涡旋混匀器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);Mini Spin个人型高速离心机、移液器(德国Eppendorf公司);SK7200H型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

熊果酸等45种对照品信息详见表1;甲醇、乙腈(质谱纯,德国Merck公司);甲酸(色谱纯,上海麦克林生物

化学有限公司);无水乙醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);纯净水(广州屈臣氏有限公司)。

表1 对照品信息

Tab 1 Reference substance information

名称	批号	来源	纯度
熊果酸	MB6981	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
齐墩果酸	MB6817-S	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
科罗素酸	MB6728	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
山楂酸	MB5828	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
积雪草酸	MB6704	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
羟基积雪草酸	MB6826	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
L-天门冬氨酸	140624-201506	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
L-精氨酸	MB2140-S	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
奎宁酸	MB6731	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
柠檬酸	MB8820-S	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
腺苷	MB1003-S	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
肌醇	MB5209-S	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
D-无水葡萄糖	B21882	上海源叶生物科技有限公司	≥98%
琥珀酸	MB5295	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
L-亮氨酸	140624-201506	中国食品药品检定研究院	≥98%
原儿茶醛	MB7049	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
原儿茶酸	DY0081	成都德思特生物技术有限公司	≥98%
儿茶素	MB6626	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
苯甲酸	MB5469	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
对羟基苯甲酸	MB4174	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
秦皮乙素	MB5821-S	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
咖啡酸	MB1719-S	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
香草酸	MB5110-S	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
表儿茶素	MB6535	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
瑞香素	MB6878	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
4-香豆酸	16142	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	≥99%
柚皮素	E1419017	上海阿拉丁生化科技股份有限公司	≥98%
芦丁	MB758	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
7-羟基香豆素	MB4828	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
木犀草苷	MB6798	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
紫云英苷	MB7087	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
槲皮苷	MB6680	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
芦荟大黄素	110795-201308	中国食品药品检定研究院	≥98%
开环异落叶松树脂酚	B20666	上海源叶生物科技有限公司	≥98%
绿原酸	MB6178-S	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
隐绿原酸	MB7041	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
异绿原酸A	MB7020	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
异绿原酸C	MB7022	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
木犀草素	MB6799	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
槲皮素	1501616	上海同田生物技术有限公司	≥98%
芹菜素	MB6830	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
肉桂酸	1343-110101	中药固体制剂制造技术国家工程研究中心	≥98%
阿魏酸	12050335	上海同田生物技术有限公司	≥98%
棕榈酸	MB7088	大连美仑生物技术有限公司	≥98%
硬脂酸	MB6805	大连美仑生物技术有限公司	≥98%

12批藤梨根药材均于2018年10月采自于大别山区(编号:1801-1812),经海军军医大学药学院黄宝康教授鉴定为猕猴桃科猕猴桃属植物中华猕猴桃(*A. chinensis* Planch.)的干燥根。标本存放于上海中医药大学科创中心中药资源与生物技术中心实验室。

2 方法

2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取45种对照品各10.0 mg,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成质量浓度均为1.0 mg/mL的单一对照品贮备液,于-20 °C条件下保存,备用。临用前,取各对照品贮备液100 μL,置于同一10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,制成各成分质量浓度均为10 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

取藤梨根药材适量,粉碎,过40目筛后,精密称取粉末1.0 g,置于100 mL具塞锥形瓶中,加入80%甲醇30 mL,超声(功率:400 W,频率:40 kHz)提取60 min,摇匀,滤纸滤过后再经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱:Waters XSelect HSS T3(100 mm×2.1 mm, 2.5 μm);流动相:0.1%甲酸乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0 min,5% A;3 min,15% A;13 min,41% A;23 min,70% A;25~30 min,95% A);流速:0.3 mL/min;柱温:40 °C;进样量:3 μL。

2.4 质谱条件

采用ESI离子源,在负离子模式(MSI⁻)条件下采集数据,扫描范围为 m/z 50~1 500。具体质谱参数:干燥气温度为350 °C;干燥气流速为10 L/min;雾化气压力为45 psi;毛细管电压为3 500 V;鞘气温度为350 °C;鞘气流速为11 L/min;碎裂电压为140 V;锥孔电压为65 V;八极杆电压为750 V;参比离子分别为 m/z 112.985 1、1 033.988 1;二级能量(CE)分别10、20、40 V。

2.5 藤梨根化学成分数据库和二级质谱数据库的建立

2.5.1 化学成分数据库 根据国内外专业数据库PubMed、SciFinder、ChemSpider、中科院化学专业数据库、Sci-Hub、中国知网等平台中的国内外相关文献研究,收集了藤梨根中目前已经报道的166个化合物。同时,根据Qualitative Analysis B 10.0定性分析软件中的“Formular-database-generator”工具(含各元素精确质量数),结合所测得的各成分所含碳、氢、氧等元素的数量,计算出相应的精确分子量,并建立了包括化合物名称(含英文名称)、分子式、CAS号在内的化学成分数据库。

2.5.2 二级质谱数据库 通过MassHunter Data Acquisition 7.1工作站采集45种对照品的二级质谱数据[包含分子离子、碎片离子 m/z 信息和保留时间(t_R)等],导入PCDL Manager 8.0数据库软件中,建立二级质谱数据库。

2.6 藤梨根化学成分分析

采用Qualitative Analysis B 10.0定性分析软件进行数据处理。首先,将所采集的藤梨根化学成分一级质谱数据与“2.5.1”项下建立的化学成分数据库进行比对,根据其匹配得分(>90)、精确分子量的误差(±5 ppm以内)以及同位素分布,初步对藤梨根药材中的成分进行定性筛查。然后,根据各成分的保留时间和精确分子量,与已有对照品进行对比后推测出待测成分结构;若无相应对照品,则通过二级质谱数据对待测成分的碎片离子进行解析,再结合相关文献推测出该成分结构。最后,在MassHunter Data Acquisition 7.1工作站的“Target MS/MS”采集模式下采集样品和对照品的二级质谱数据,对其主要碎片离子进行比对分析,推测其裂解方式,进一步确定化学成分结构。

3 结果

3.1 化学成分的鉴定分析

藤梨根供试品溶液的总离子流图见图1。通过与“2.5.1”“2.5.2”项下建立的数据库进行对比,结合相关文献信息以及质谱裂解规律进行分析,鉴定出58个化学成分,其中包括16个五环三萜类化合物、12个黄酮类化合物、17个有机酸类化合物等;有9个化合物为首次从藤梨根中鉴定出来,详见表2。

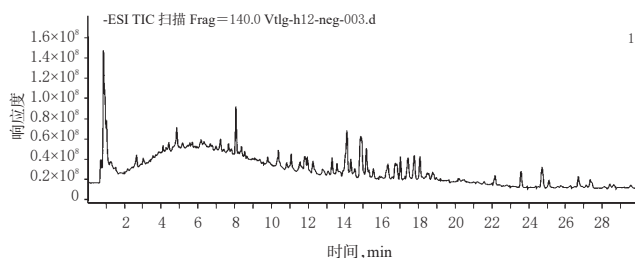


图1 藤梨根供试品溶液的总离子流图(MSI⁻模式)

Fig 1 Total ion chromatogram of test solution of *A. chinensis* root(MSI⁻ mode)

表2 藤梨根化学成分的UHPLC-Q-TOF/MS鉴定结果
Tab 2 Identification results of chemical components in *A. chinensis* root by UHPLC-Q-TOF-MS/MS

序号	t_R , min	离子模式	m/z		碎片离子	分子式	化合物
			实测值	理论值			
1*	0.610	[M-H] ⁻	173.104 3	173.104 4	131	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	L-精氨酸
2*	0.834	[M-H] ⁻	132.029 9	132.030 2	115, 71	C ₆ H ₇ NO ₄	L-天门冬氨酸
3*	0.834	[M-H] ⁻	179.056 0	179.056 1	137, 112	C ₆ H ₁₇ O ₆	肌醇
4*	0.877	[M-H] ⁻	179.055 8	179.056 1	161, 109	C ₆ H ₁₂ O ₆	D-无水葡萄糖
5*	0.927	[M-H] ⁻	191.055 8	191.055 7	111	C ₇ H ₁₂ O ₆	奎宁酸
6*	1.010	[M-H] ⁻	191.056 0	191.055 7	147, 111	C ₆ H ₈ O ₇	柠檬酸
7*	1.383	[M-H] ⁻	130.086 6	130.087 3	115	C ₆ H ₁₃ NO ₂	L-亮氨酸
8*	1.394	[M+HCOO] ⁻	312.093 8	312.095 0	134	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₄	腺苷
9*	1.495	[M-H] ⁻	117.019 3	117.019 5	73	C ₆ H ₄ O ₄	琥珀酸
10*	2.670	[M-H] ⁻	121.029 1	121.029 5	77	C ₇ H ₆ O ₂	苯甲酸
11*	3.064	[M-H] ⁻	153.019 6	153.019 3	109	C ₇ H ₈ O ₄	原儿茶酸
12*	3.895	[M-H] ⁻	577.134 8	577.135 1	451, 425, 407, 289, 125	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₂	原花青素B ₁ ^[13-14]
13*	4.017	[M-H] ⁻	137.024 4	137.024 2	108	C ₇ H ₆ O ₃	原儿茶醛
14*	4.036	[M-H] ⁻	137.024 5	137.024 2	108, 92	C ₇ H ₆ O ₃	对羟基苯甲酸

续表2

Continued tab 2

序号	t_R , min	离子模式	m/z		碎片离子	分子式	化合物
			实测值	理论值			
15*	4.106	[M-H] ⁻	353.085 9	353.087 8	191, 113	C ₁₆ H ₁₆ O ₅	隐绿原酸
16*	4.184	[M-H] ⁻	289.071 8	289.071 8	245, 205, 203, 179, 125	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素
17*	4.231	[M-H] ⁻	353.087 3	353.087 8	191	C ₁₆ H ₁₆ O ₅	绿原酸
18*	4.618	[M-H] ⁻	577.133 9	577.135 1	451, 425, 407, 289, 125	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₂	原花青素 B ₂ ^[13-14]
19*	4.652	[M-H] ⁻	167.034 9	167.035 0	152, 123, 108	C ₆ H ₆ O ₄	香草酸
20*	4.782	[M-H] ⁻	177.019 2	177.019 3	149, 133, 105	C ₆ H ₆ O ₄	秦皮乙素
21*	5.011	[M-H] ⁻	289.071 5	289.071 7	245, 205, 203, 125, 109	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	表儿茶素
22*	5.049	[M-H] ⁻	179.034 6	179.034 7	135	C ₆ H ₆ O ₄	咖啡酸
23*	5.306	[M-H] ⁻	177.018 6	177.018 9	149, 133, 121	C ₆ H ₆ O ₄	瑞香素
24*	5.862	[M-H] ⁻	163.039 7	163.040 1	119, 93	C ₆ H ₆ O ₃	4-香豆酸
25*	6.554	[M-H] ⁻	609.146 4	609.146 3	301, 300, 271, 243, 151	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁
26*	6.600	[M-H] ⁻	193.050 7	193.050 6	104	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸
27*	6.632	[M-H] ⁻	161.024 3	161.024 4	133, 117, 105	C ₆ H ₆ O ₃	7-羟基香豆素
28*	7.462	[M-H] ⁻	147.044 6	147.045 2	103	C ₆ H ₆ O ₂	肉桂酸
29*	7.476	[M-H] ⁻	515.118 7	515.119 5	353, 191, 179, 135	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 A
30*	7.694	[M-H] ⁻	447.092 8	447.093 3	301, 300, 271, 255, 151	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	槲皮苷
31*	7.742	[M-H] ⁻	447.092 5	447.093 3	285, 284, 327, 255, 151	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	紫云英苷
32**	7.797	[M-H] ⁻	447.092 9	447.093 3	301, 300, 271, 151	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草苷
33*	8.045	[M-H] ⁻	515.119 2	515.119 5	353, 191, 179, 173	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 C
34*	8.499	[M-H] ⁻	361.165 3	361.165 7	165	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	开环异落叶松树脂酯
35	9.294	[M+HCOO] ⁻ , [M-H] ⁻	711.395 6 665.388 4	711.396 1 665.390 6	503	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₁	四羟基三萜酸苷
36**	10.347	[M-H] ⁻	285.040 3	285.040 4	133	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	木犀草素
37*	10.441	[M-H] ⁻	301.035 1	301.035 6	285, 215, 179, 151	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	槲皮素
38**	11.745	[M-H] ⁻	271.062 9	271.062 9	253, 151, 119	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素
39**	12.007	[M-H] ⁻	269.045 4	269.045 3	151, 117	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	芹菜素
40	12.878	[M-H] ⁻	519.334 4	519.332 7	501	C ₂₆ H ₂₆ O ₇	五羟基三萜酸
41	14.190	[M-H] ⁻	503.336 9	503.337 8	485	C ₂₆ H ₂₆ O ₆	四羟基三萜酸
42	14.358	[M-H] ⁻	503.336 9	503.337 8	485, 457	C ₂₆ H ₂₆ O ₆	四羟基三萜酸
43*	14.872	[M-H] ⁻	503.337 4	503.337 8	503, 485, 457	C ₂₆ H ₂₆ O ₆	羟基积雪草酸
44*	15.428	[M-H] ⁻	249.112 3	249.112 5	155, 113	C ₁₄ H ₁₆ O ₄	邻苯二甲酸二异丙酯
45	16.204	[M-H] ⁻	503.336 9	503.337 8	503	C ₂₆ H ₂₆ O ₆	四羟基三萜酸
46*	16.738	[M-H] ⁻	487.342 5	487.342 9	487	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	积雪草酸
47	16.941	[M-H] ⁻	487.342 5	487.342 9	487	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	三羟基三萜酸
48*	17.991	[M-H] ⁻	269.045 2	269.045 5	241, 225, 197	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	芦荟大黄素
49*	19.330	[M-H] ⁻	631.363 4	631.363 6	467, 145	C ₃₀ H ₃₂ O ₇	蜡果杨梅酸 A ^[15]
50*	19.970	[M-H] ⁻	633.378 6	633.379 7	469, 145	C ₃₀ H ₃₂ O ₇	3β-香豆素酰基-2α, 24(23)-二羟基乌苏酸 ^[16]
51*	20.693	[M-H] ⁻	471.347 1	471.347 6	471	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	山楂酸
52*	20.883	[M-H] ⁻	471.347 5	471.347 6	471	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	科罗素酸
53	22.909	[M-H] ⁻	617.383 2	617.384 8	497, 145	C ₂₈ H ₃₀ O ₆	高加蓝花甙三萜酸 ^[17]
54	23.111	[M-H] ⁻	617.383 2	617.384 8	497, 145	C ₂₈ H ₃₀ O ₆	高加蓝花甙三萜酸 ^[17]
55*	24.178	[M-H] ⁻	455.352 8	455.352 9	455	C ₁₈ H ₁₈ O ₃	齐墩果酸
56*	24.449	[M-H] ⁻	455.351 9	455.353 1	455	C ₁₈ H ₁₈ O ₃	熊果酸
57*	25.663	[M-H] ⁻	255.232 8	255.232 1	255	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	棕榈酸
58*	27.273	[M-H] ⁻	283.263 2	283.263 5	283	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	硬脂酸

注：“*”表示与对照品对比；“#”表示首次从藤梨根中鉴定出来的化合物

Note: “*” means compared with substance control; “#” means compound identified from *A. chinensis* root for the first time

3.2 化合物裂解规律解析

3.2.1 黄酮类化合物 本研究在藤梨根中共鉴定出12个黄酮类成分,主要是黄酮类和黄酮苷类化合物。以部分化合物为例进行分析,结果发现黄酮单糖苷类化合物在裂解电压下,多失去1分子糖,二级质谱中碎片离子峰多为[M-H-Rha(146)]⁻、[M-H-Glu(162)]⁻,其 m/z 分别为301、285。解析示例如下。

化合物12、18:准分子离子峰均为 m/z 577[M-H]⁻,根据Qualitative Analysis B 10.0定性分析软件(下同)推测其分子式为C₃₀H₂₆O₁₂;二级质谱中出现明显的碎片离子峰 m/z 289[M-H-C₁₅H₁₂O₆]⁻,再通过与文献报道^[13-14]比对,最终鉴定化合物12、18分别为原花青素B₁、B₂。

化合物16、21:准分子离子峰均为 m/z 289[M-H]⁻,二级质谱中出现明显的碎片离子峰 m/z 245[M-H-CO₂]⁻、205[M-H-C₄H₄O₂]⁻,且化合物21图谱上还有碎片离子179[M-H-C₆H₆O₂]⁻,推测其分子式为C₁₅H₁₄O₆;再通过与儿茶素和表儿茶素对照品进行比对,并结合其保留时间,最终鉴定化合物16、21分别为儿茶素和表儿茶素。

化合物25:准分子离子峰为 m/z 609[M-H]⁻,二级质谱中出现明显的碎片离子峰 m/z 301[M-H-Rha(146)-Glu(162)]⁻、300[M-2H-Rha(146)-Glu(162)]⁻,推测其分子式为C₂₇H₃₀O₁₆;再通过与芦丁对照品进行比对,最终鉴定化合物25为芦丁。

化合物30、31、32:准分子离子峰均为 m/z 447 [M-H]⁻,其中化合物30、32的二级质谱中出现明显的碎片离子峰 m/z 301[M-H-Rha(146)]⁻,推测其分子式为C₂₁H₂₀O₁₁;再通过与槲皮苷和木犀草苷对照品进行对比,最终鉴定化合物30、32分别为槲皮苷和木犀草苷。化合物31的二级质谱中出现明显的碎片离子峰 m/z 285[M-H-Glu(162)]⁻、284[M-2H-Glu(162)]⁻,推测其分子式为C₂₁H₂₀O₁₁,再通过与紫云英苷对照品进行比对,最终鉴定化合物31为紫云英苷。

黄酮类成分二级质谱图和裂解途径解析见图2、图3(以槲皮苷、紫云英苷为例)。

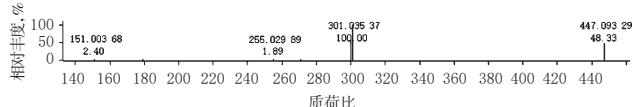
3.2.2 五环三萜类化合物 本研究在藤梨根中共鉴定出16个五环三萜类成分,该类成分主要分为两大类,即熊果酸类和齐墩果酸类;根据其羟基数目的不同,可分为一羟基、二羟基、三羟基、四羟基、五羟基等五环三萜酸类;在不同裂解电压下,其结构均较稳定,产生的碎片离子峰多为 m/z 455、471、487、503、519等。以部分化合物为例,解析如下。

化合物35:准分子离子峰为 m/z 665[M-H]⁻、711[M+HCOO]⁻,二级质谱中出现明显的碎片离子峰 m/z 503[M-H-Glu(162)]⁻,即失去了1分子葡萄糖,故鉴

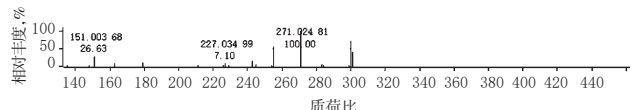
定化合物 35 是一个四羟基三萜酸苷类成分,分子式为



-ESI MS² QTOF FV=180 CE=20(M-H)⁻

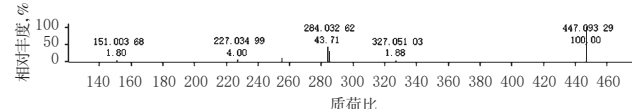


-ESI MS² QTOF FV=220 CE=40(M-H)⁻



A. 槲皮苷

-ESI MS² QTOF FV=180 CE=20(M-H)⁻



B. 紫云英苷

-ESI MS² QTOF FV=220 CE=40(M-H)⁻

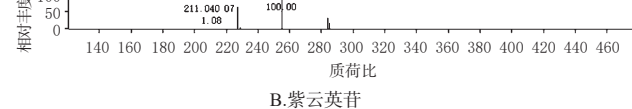


图 2 黄酮类成分二级质谱图示例

Fig 2 Examples for secondary mass spectra of flavonoids

化合物 40: 准分子离子峰为 m/z 519[M-H]⁻, 二级质谱中出现碎片离子峰 m/z 501[M-H-H₂O]⁻, 即失去了 1 分子水, 故鉴定化合物 40 是一个五羟基三萜酸成分, 其分子式为 C₃₀H₄₈O₇。

化合物 41: 准分子离子峰为 m/z 503[M-H]⁻, 二级质谱中出现碎片离子峰 m/z 485[M-H-H₂O]⁻, 即失去了 1 分子水, 故鉴定化合物 41 是一个四羟基三萜酸成分, 其分子式为 C₃₀H₄₈O₆。

化合物 42: 准分子离子峰为 m/z 503[M-H]⁻, 二级质谱中出现碎片离子峰 m/z 485[M-H-H₂O]⁻、457[M-H-H₂O-CO]⁻, 故鉴定化合物 42 是一个四羟基三萜酸成分, 其分子式为 C₃₀H₄₈O₆。

化合物 45、47: 准分子离子峰分别为 m/z 503[M-H]⁻、487[M-H]⁻, 二级质谱中出现碎片离子峰 m/z 503[M-H]⁻、487[M-H]⁻, 故鉴定化合物 45、47 分别为一个四羟基三萜酸成分和一个三羟基三萜酸成分, 其分子式分别为 C₃₀H₄₈O₆、C₃₀H₄₈O₅。

化合物 43: 准分子离子峰为 m/z 503[M-H]⁻, 二级质谱中出现明显的碎片离子峰 m/z 487[M-H]⁻、485[M-H-H₂O]⁻、457[M-H-H₂O-CO]⁻, 推测其分子式为 C₃₀H₄₈O₆; 再通过与羟基积雪草酸对照品进行比对, 最终鉴定化合物 43 为羟基积雪草酸。

化合物 46: 准分子离子峰为 m/z 487[M-H]⁻, 二级质谱中出现碎片离子峰 m/z 487[M-H]⁻, 推测其分子式为 C₃₀H₄₈O₅; 再通过与积雪草酸对照品进行比对, 最终鉴

定化合物 46 为积雪草酸。

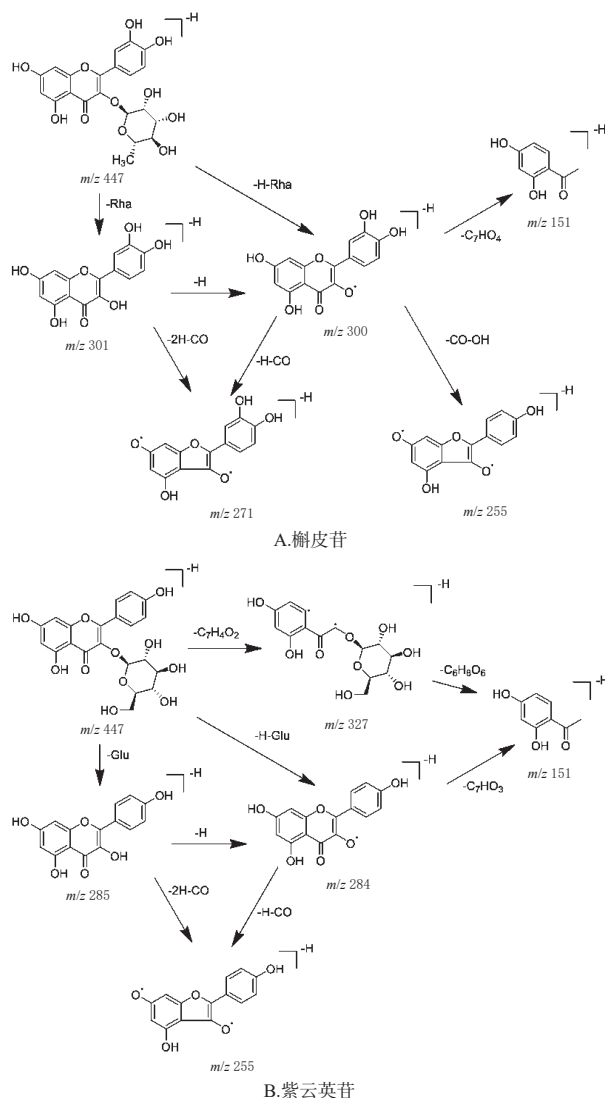


图 3 黄酮类成分的裂解途径示例

Fig 3 Examples for fragmentation pathway of flavonoids

化合物 51、52: 准分子离子峰均为 m/z 471[M-H]⁻, 二级质谱中均出现碎片离子峰 m/z 471[M-H]⁻, 推测其分子式为 C₃₀H₄₈O₃; 再通过与山楂酸和科罗素酸对照品进行比对, 最终鉴定化合物 51、52 分别为山楂酸和科罗素酸。

化合物 55、56: 准分子离子峰均为 m/z 455[M-H]⁻, 二级质谱中均出现碎片离子峰 m/z 455[M-H]⁻, 推测其分子式为 C₃₀H₄₈O₃; 再通过与齐墩果酸和熊果酸对照品进行比对, 最终鉴定化合物 55、56 分别为齐墩果酸和熊果酸。

三萜类成分二级质谱图和裂解途径解析见图 4、图 5 (以积雪草酸、羟基积雪草酸为例)。

3.2.3 有机酸类化合物 本研究在藤梨根中共鉴定出 17 个有机酸类成分, 以部分化合物为例, 解析如下。

化合物 15、17: 准分子离子峰均为 m/z 353[M-H]⁻,

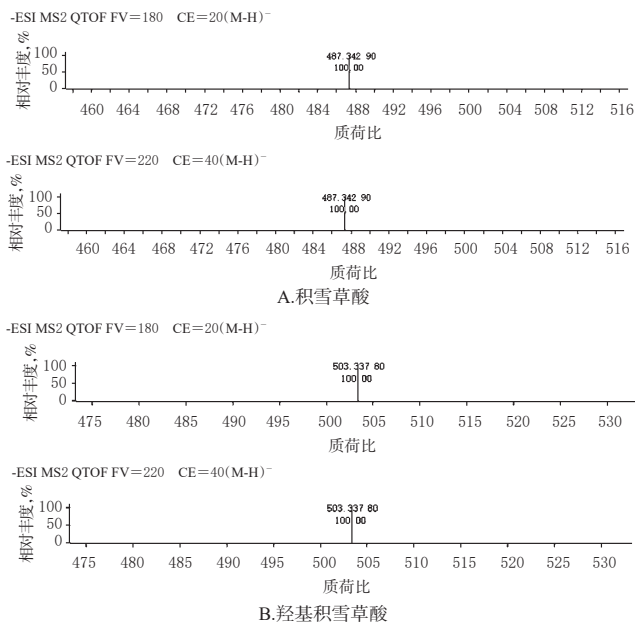


图4 三萜类成分的二级质谱图示例

Fig 4 Examples for secondary mass spectra of pentacyclic triterpenes

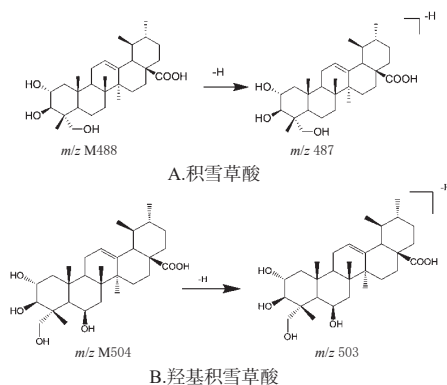


图5 三萜类成分的裂解途径示例

Fig 5 Examples for fragmentation pathway of pentacyclic triterpenes

二级质谱中均出现明显的碎片离子峰 m/z 191 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$, 推测其分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$; 再通过与隐绿原酸、绿原酸对照品进行比对, 最终鉴定化合物 15、17 分别为隐绿原酸和绿原酸。

化合物 29、33: 准分子离子峰均为 m/z 515 $[M-H]^-$, 二级质谱中出现明显的碎片离子峰 m/z 353 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ 、191 $[M-H-2(C_9H_6O_3)]^-$ 、179 $[M-H-C_{16}H_{16}O_8]^-$ 等, 推测其分子式为 $C_{25}H_{24}O_{12}$; 再通过与异绿原酸 A、异绿原酸 C 对照品进行比对, 最终鉴定化合物 29、33 分别为异绿原酸 A 和异绿原酸 C。

有机酸类成分二级质谱图和裂解途径见图 6、图 7 (以异绿原酸 A、异绿原酸 C 为例)。

4 讨论

现有研究表明, 藤梨根中的主要成分为五环三萜类化合物, 且多互为同分异构体, 采用常规的定性分析手

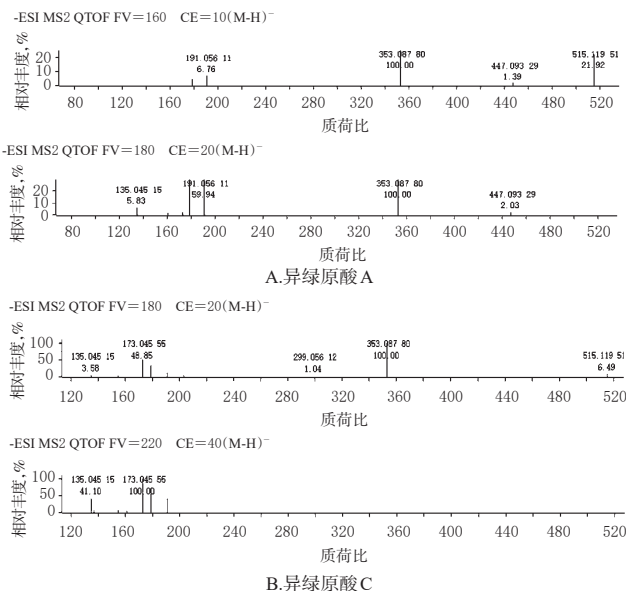


图6 有机酸类成分的二级质谱图示例

Fig 6 Examples for secondary mass spectra of organic acids

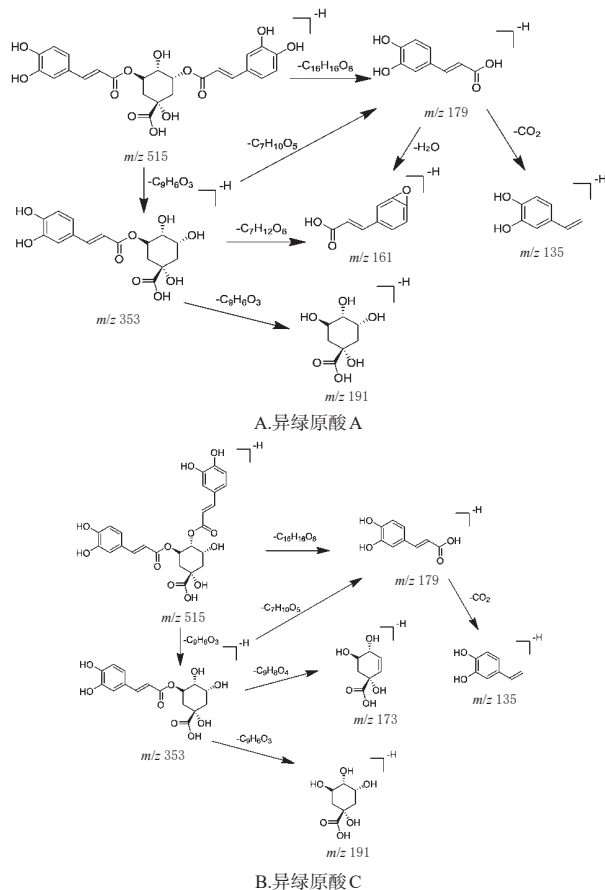


图7 有机酸类成分的裂解途径示例

Fig 7 Examples for fragmentation pathway of organic acids

段难以进行分离。本研究采用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 该技术具有高分辨率、高灵敏度的分离特点^[12], 可实现对藤梨根药材化学成分的快速鉴定; 此外, 对其中

的同分异构体化合物,该技术可通过比对对照品信息及保留时间差异实现有效的定性鉴定。

由于药材中成分较为复杂,故本研究对实验条件进行了综合考察,对提取方法(回流、超声)、提取溶剂(水、20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇、无水乙醇)、提取时间(30、60、90 min)等进行了筛选。根据总离子流的响应度,最终确定提取方法为:以80%乙醇为提取溶剂、超声提取60 min。此外,本课题组还对色谱条件中的流动相体系(乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液、0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液)进行考察,根据不同流动相条件所得图谱的总离子流的响应度及色谱峰的峰分离效果,最终确定以0.1%甲酸乙腈溶液-0.1%甲酸水溶液为流动相。

综上所述,本研究共从藤梨根中鉴定出58个化学成分,其中包括16个五环三萜类化合物(如羟基积雪草酸、积雪草酸、山楂酸、科罗素酸、齐墩果酸、熊果酸等)、12个黄酮类化合物(如芦丁、槲皮苷、木犀草苷、紫云英苷等)、17个有机酸类化合物(如隐绿原酸、绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸C等)等;有9个化合物(如原花青素B₁、B₂、木犀草素等)为首次从藤梨根中鉴定出来。UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术可快速鉴定藤梨根中的化学成分。

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42卷:第2分册[M].北京:科学出版社,1984:260-261.

[2] 全国中草药汇编编写组.全国中草药汇编:上册[M].2版.北京:人民卫生出版社,1996:820-821.

[3] 章红燕,芦柏震,侯桂兰.我院4年间抗肿瘤中草药用药的调查分析[J].中国药业,2002,11(6):63.

[4] CHANG J, CASE R. Cytotoxic phenolic constituents from the root of *Actinidia chinensis*[J]. *Planta Med*, 2005, 71(10):955-959.

[5] XU YX, XIANG ZB, JIN YS, et al. Constituents from the roots of *Actinidia chinensis* and their cytochrome P₄₅₀ enzyme inhibitory activities[J]. *Chem Biodivers*, 2016, 13(11):1454-1459.

[6] 何国浓,王邦才,王辉,等.藤梨根化学成分的研究:II[J].

中华中医药杂志,2016,31(6):2353-2355.

[7] 赫军,马秉智,赵铁,等.藤梨根的化学成分研究[J].中国药学杂志,2014,49(3):184-186.

[8] 关英,阿选德.藤梨根乙酸乙酯提取物对肺癌A549细胞凋亡的诱导作用[J].中国药房,2015,26(25):3499-3501.

[9] 吴淑莲,荣福.藤梨根含药血清对肺腺癌A549细胞的抑制作用[J].广东医学,2017,38(16):2432-2435.

[10] CHENG QL, LI HL, HUANG ZQ, et al. 2 β , 3 β , 23-trihydroxy-urs-12-ene-28-olic acid (TUA) isolated from *Actinidia chinensis* Radix inhibits NCI-H460 cell proliferation by decreasing NF- κ B expression[J]. *Chem Biol Interact*, 2015. DOI:10.1016/j.cbi.2015.06.038.

[11] KU CY, WANG YR, LIN HY, et al. Corosolic acid inhibits hepatocellular carcinoma cell migration by targeting the VEGFR2/Src/FAK pathway[J]. *PLoS One*, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0126725

[12] WAN M, ZHANG Y, YANG Y, et al. Analysis of the chemical composition of *Angelicae pubescentis* Radix by ultra-performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *J Chin Pharm Sci*, 2019, 28(3):145-159.

[13] SKEHAN P, STORENG R, SCUDIERO D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82(13):1107-1112.

[14] WAN SB, CHAN TH. Enantioselective synthesis of afzelechin and epiafzelechin[J]. *Tetrahedron*, 2004, 60(37):8207-8211.

[15] SAKURAWI K, YASUDA F, TOZYO T, et al. Endothelin receptor antagonist triterpenoid, myriceric acid A, isolated from *Myrica cerifera*, and structure activity relationships of its derivatives[J]. *Chem Pharm Bull*, 1996, 44(2):343-351.

[16] 袁珂,朱建鑫,张耀,等.猫人参化学成分研究[J].中草药,2008,39(4):505-507.

[17] 甘秀海,周欣,陈华国,等.黑骨藤中极性部位化学成分研究[J].中国中药杂志,2009,34(24):3225-3228.

(收稿日期:2020-02-01 修回日期:2020-05-31)

(编辑:段思怡)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊,欢迎投稿、订阅