

- RAW264.7 细胞炎性因子产生及细胞形态变化的影响[J]. 中药材, 2020, 43(1): 206-210.
- [11] 裴少萌. 岩白菜素的提取、衍生化与生物活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2019.
- [12] Zhang X M, Zhang F, Yao F F, et al. Bergenin has neuroprotective effects in mice with ischemic stroke through antioxidative stress and anti-inflammation via regulating Sirt1/FOXO3a/NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Neuroreport*, 2022, 33(13): 549-560.
- [13] Gao X J, Guo M Y, Zhang Z C, et al. Bergenin plays an anti-inflammatory role via the modulation of MAPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways in a mouse model of LPS-induced mastitis [J]. *Inflammation*, 2015, 38(3): 1142-1150.
- [14] 张琪, 苏兰, 何龙希, 等. 白藜芦醇的药理作用及其临床应用的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2022, 37(2): 214-217.
- [15] 孔涛, 马彦博, 杨自军, 等. 白藜芦醇的生物学功能及作用机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(6): 592-596.
- [16] 王鹤樵, 张婷, 任金妹, 等. 白藜芦醇局部应用制剂研究进展[J]. 中南药学, 2021, 19(6): 1238-1242.
- [17] Meng T T, Xiao D F, Muhammed A, et al. Anti-inflammatory action and mechanisms of resveratrol[J]. *Molecules*, 2021, 26(1): 229.
- [18] Galiniak S, Aebisher D, Bartusik-Aebisher D. Health benefits of resveratrol administration[J]. *Acta Biochim Pol*, 2019, 66(1): 13-21.
- [19] Singh A K, Vinayak, M. Resveratrol alleviates inflammatory hyperalgesia by modulation of reactive oxygen species (ROS), antioxidant enzymes and ERK activation [J]. *Inflamm Res*, 2017, 66(10): 911-921.

## UHPLC-ESI-Orbitrap-MS 法分析龙胆叶化学成分

蔡梦婷, 杨亚玲, 李锡涛, 吴妙梨, 黄宇虹, 黎锦城\*  
(广东药科大学中药学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 目的 建立超高效液相色谱串联质谱 (UHPLC-ESI-Orbitrap-MS) 法分析龙胆叶 *Sauropus spatulifolius* Beille 化学成分。方法 该植物甲醇提取物的分析采用 YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱 (150 mm×2.0 mm, 3  $\mu$ m); 流动相 0.1% 甲酸-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 35 °C; 电喷雾负离子模式。根据各成分高分辨数据结合对照品对所得成分进行结构鉴定, 并对 11 批样品进行小分子化合物分布表征。结果 从中鉴定了 35 个化合物, 包括有机酸 15 个, 苷类 11 个, 酯类 7 个, 其他 2 个, 其特征性成分为咖啡酰葡萄糖酸、12-氧代亚油酸、14, 16-二羟基-12-氧代油酸、阿魏酰葡萄糖酸。结论 该方法合理可行, 可为龙胆叶质量评价提供依据。

**关键词:** 龙胆叶; 化学成分; 超高效液相色谱串联质谱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2023)06-1906-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.027

## Identification on chemical constituents in *Sauropus spatulifolius* by UHPLC-ESI-Orbitrap-MS

CAI Meng-ting, YANG Ya-ling, LI Xi-tao, WU Miao-li, HUANG Yu-hong, LI Jin-cheng\*  
(School of Traditional Chinese Materia Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish a ultra high performance liquid chromatography-electron spray ionization-orbitrap-mass spectrometer (UHPLC-ESI-Orbitrap-MS) method for the identification of the chemical constituents in *Sauropus spatulifolius* Beille. **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on 35 °C

收稿日期: 2021-12-02

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (20201190)

作者简介: 蔡梦婷 (1997—), 女, 硕士生, 从事中药质量分析与评价研究。E-mail: 758143363@qq.com

\* 通信作者: 黎锦城 (1967—), 男, 副主任药师, 从事临床中药研究。E-mail: ljc@gdpu.edu.cn

网络出版日期: 2022-06-27

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220627.0947.002.html>

thermostatic YMC-Pack ODS-AQ column (150 mm×2.0 mm, 3  $\mu$ m), with the mobile phase comprising of 0.1% formic acid-acetonitrile flowing at 0.2 mL/min in a gradient elution manner; using an electrospray (ESI) ion source in negative ion mode. According to the high-resolution data of each component and the reference substance, the identifications of the structures of the obtained components, and the distribution features of small molecule compounds of eleven batches of samples were achieved. **RESULTS** Among the identified thirty-five compounds, including fifteen organic acids, eleven glycosides, seven esters and two others; the characteristic components were caffeoyl gluconic acid, 12-oxo-linoleic acid, 14, 16-dihydroxy-12-oxo-oleic acid and ferulic gluconic acid. **CONCLUSION** This reasonable and feasible method provides a basis for the quality evaluation of *S. spatulifolius*.

**KEY WORDS:** *Sauropus spatulifolius* Beille; chemical constituents; UHPLC-ESI-Orbitrap-MS

龙胆叶为大戟科植物龙胆叶 *Sauropus spatulifolius* Beille 的干燥叶, 分布在我国广西、广东和海南地区, 是岭南地区重要民族药材和传统食疗药材, 收录于 2020 年版《中国药典》<sup>[1]</sup>, 其性甘、平, 味淡, 归肺、胃经, 可清肺止痰, 治疗内伤肺痨失音、喉痛等, 将其和猪肉煎汤可治疗痰火咳嗽<sup>[2]</sup>, 主要成分为鞣质、生物碱、有机酸、黄酮等, 具有抗炎、镇痛、抑菌、抗过敏等作用<sup>[3-5]</sup>。在 2020 年版《中国药典》中, 山柰酚-3-O-龙胆二糖昔是龙胆叶唯一质控指标, 但该成分分布广泛, 在冬青科、豆科、木犀草科中均有报道<sup>[6-7]</sup>, 专属性较差, 而且与植物传统功效的关联性不强, 难以真实反映其质量, 因此, 有必要基于龙胆叶化学成分群选择专属性更强的指标, 以提升其质量评价的客观性。

高分辨液质联用技术 (HPLC-HRMS) 可充分揭示中药材小分子化学成分群, 而小分子化合物在电喷雾串联质谱 (ESI-MS/MS) 的裂解行为与其化学结构紧密相关, 是结构鉴定的重要依据<sup>[8]</sup>。因此, 本实验采集不同产地龙胆叶, 基于超高效液相色谱串联质谱 (UHPLC-ESI-Orbitrap MS) 法分析其化学成分, 并筛选专属性较强者作为特征指标, 以期为该植物质量标准的进一步提升提供依据。

## 1 材料

1.1 药物 龙胆叶购于广州市清平东市场、广州白云山中药饮片有限公司, 采自广东药科大学药圃, 经广东药科大学中药学院葛跃伟教授鉴定为正品, 具体信息见表 1。

1.2 试剂与药物 芦丁 (纯度  $\geq 98\%$ , 批号 CHB190110)、槲皮素 (纯度  $\geq 98\%$ , 批号 CHB190110)、柠檬酸 (纯度  $\geq 98\%$ , 批号 CHB180127)、阿魏酸 (纯度  $\geq 98\%$ , 批号

表 1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

编号	类型	产地	来源
LLY-1	商品	肇庆	清平东市场 B014 档
LLY-2	商品	广西	清平东市场 B032 档
LLY-3	商品	番禺	清平东市场裕顺药行
LLY-4	商品	湛江	正田市场 118 档
LLY-5	商品	不明	清平东市场先锋中药材商行
LLY-6	商品	肇庆	清平东市场奋发药材行
LLY-7	商品	不明	广州白云山中药饮片有限公司
LLY-8	商品	清远	清平路 87 号
LLY-9	商品	肇庆	清平东市场 B041 档
LLY-10	商品	不明	清平东市场 B020 档
LLY-11	栽培	广州	广东药科大学药圃

CHB180206) 对照品均购于成都克洛玛生物科技有限公司。乙腈、甲酸、甲醇为色谱纯, 购于上海麦克林生化科技有限公司。

1.3 仪器 UHPLC-Q Exactive 液质联用仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ME204 型天平 [万分之一, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; KQ-300DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 溶液制备

2.1.1 供试品溶液 龙胆叶粉碎后过 3 号筛, 精密称取 1.00 g 粉末, 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 按料液比 1:15 精密量取 15 mL 50% 甲醇, 置于锥形瓶中, 室温超声提取 (40 kHz、300 W) 2 次, 每次 30 min, 提取液过滤后减压浓缩、冻干, 置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中避光保存。称取 0.05 g 冻干粉末, 加入适量 50% 甲醇复溶, 充分溶解后 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取各对照品适量, 甲醇超声溶解定容至质量浓度为 0.5 mg/mL, 即得, 置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱中避光保存。

## 2.2 UHPLC-ESI-Orbitrap MS 条件

2.2.1 色谱 YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱 (150 mm×2.0 mm, 3  $\mu$ m); 流动相 0.1% 甲酸 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~3 min, 5% B; 3~50 min, 5%~95% B; 50~55 min, 95% B; 55~56 min, 95%~5% B; 56~65 min, 5% B); 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 3  $\mu$ L。

2.2.2 质谱 电喷雾负离子模式, MS 扫描范围  $m/z$  150~2 200,  $MS^2$  扫描范围  $m/z$  150~2 200; 离子源温度 320 °C; 离子喷雾电压 3 500 V/-3 000 V; 辅助气体压力 15 psi (1 psi=6.895 kPa); 鞘气压 35 psi; MS 碰撞能 30 eV,  $MS^2$  碰撞能 30 eV。

2.3 数据分析 采用 Xcalibur 3.0 软件对负离子模式下的质谱数据进行处理, 经实时校正后, 根据高分辨质量数据计算分子式 (误差 $<5\times10^{-6}$ ), 通过数据依赖型采集模式采集二级碎片信息, 结合 SciFinder、ChemSpider 数据库对分子式、结构片段进行分析, 推测其结构式。再通过对照品比对进行质谱裂解规律探讨, 并应用于类似化合物结构鉴定中。

采用聚类分析热图法进行离子丰度可视化分析<sup>[9-10]</sup>, 从全扫描质谱数据中采集目标化合物前体离子的高分辨质量值, 通过 TraceFinder 软件计算峰面积, R 分析将峰面积值载入“gplots”软件包中, 生成热图, 以欧氏距离法进行聚类分析。

## 3 结果

3.1 化学成分鉴定 正负离子模式下化合物种类表征差异较小, 但负离子模式下离子化效率和化合物响应较高, 见图 1。

基于对照品质谱裂解规律 (图 2)、多级质谱解析, 并结合相关文献报道, 共鉴定出 35 个化合物, 见表 2, 包括有机酸 15 个, 苷类 11 个, 酯类 7 个, 其他类 2 个, 基本涵盖了龙胆叶主要成分。

3.1.1 苷类 共鉴定出 11 个 (3、5、7~9、12、14~15、17~18、21), 其中黄酮苷裂解方式经碰撞诱导解离, 主要发生糖苷键断裂, 丢失 1 个或多个葡萄糖残基 (162 Da) 或鼠李糖残基 (146 Da), 产生不同类型黄酮苷元离子, 苷元自由基离子为特征碎片离子, 如槲皮素类黄酮苷元  $m/z$  300.0, 山柰酚类黄酮苷元  $m/z$  285.0; 黄酮易在苷元 C 环发生 RDA 裂解, 产生特征碎片 $^{1,3}A^-$ 、 $^{1,3}B^-$ 。化合物 15、17 的准分子离子峰为  $m/z$  609.145 4 [ $M-H^-$ ]、463.089 5 [ $M-H^-$ ], 其黄酮苷元碎片分别为  $m/z$  285.0、300.0, 均产生碎片

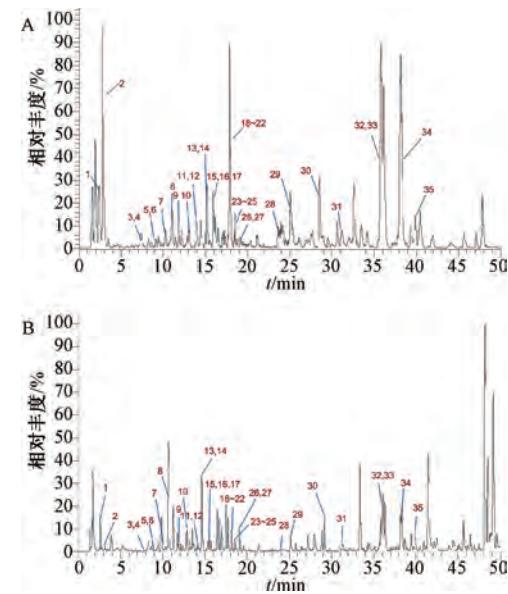


图 1 负离子模式 (A)、正离子模式 (B) 下基峰离子色谱图

Fig. 1 Base peak ion current chromatograms in negative ion mode (A) and positive ion mode (B)

$m/z$  151.0 的 $^{1,3}A^-$  特征碎片, 并且在化合物 17 二级质谱图中还可见 $^{1,3}B^-$  碎片为  $m/z$  149.1, 推测两者分子式为  $C_{27}H_{30}O_6$ 、 $C_{21}H_{20}O_{12}$ 。结合文献 [14-15] 报道, 推测化合物 15 为山柰酚-3-O-龙胆二糖苷, 17 为金丝桃苷, 其黄酮苷元裂解途径见图 3C。

其他苷类均通过糖苷键断裂, 中性丢失葡萄糖残基、葡糖酸 (193.0 Da) 或葡糖二酸 (209.0 Da), 产生不同的苷元碎片。化合物 3、9 的  $MS/MS$  碎片均显示咖啡酸特征碎片  $m/z$  179.0, 化合物 5 显示没食子酸特征碎片  $m/z$  169.0, 化合物 8 显示阿魏酸特征碎片  $m/z$  193.1。此外, 在其二级质谱中还观察到常见中性丢失, 如  $H_2O$  (18 Da)、 $CO$  (28 Da)、 $CO_2$  (44 Da)、 $\cdot OCH_3$  (31 Da) 等。结合文献 [11-12] 报道, 推测化合物 3 为咖啡酰葡萄糖酸, 5 为没食子酸葡萄糖苷, 8 为阿魏酰葡萄糖酸, 9 为咖啡酸葡萄糖苷, 化合物 3、8 的质谱裂解途径见图 3A~3B。

3.1.2 酯类 共鉴定出 7 个 (13、16、20、23~24、29~30), 主要通过酯基的断裂生成不同的有机酸小分子碎片离子, 如化合物 20 的准分子离子峰为  $m/z$  287.150 5 [ $M-H^-$ ], 其二级质谱图中主要的离子碎片有  $m/z$  129.1、159.0, 推测为由于前体离子的酯键断裂产生的己二酸基团碎片 ( $m/z$  129.1)、羟甲基-庚酸基团 ( $m/z$  159.0)<sup>[18]</sup>; 常见

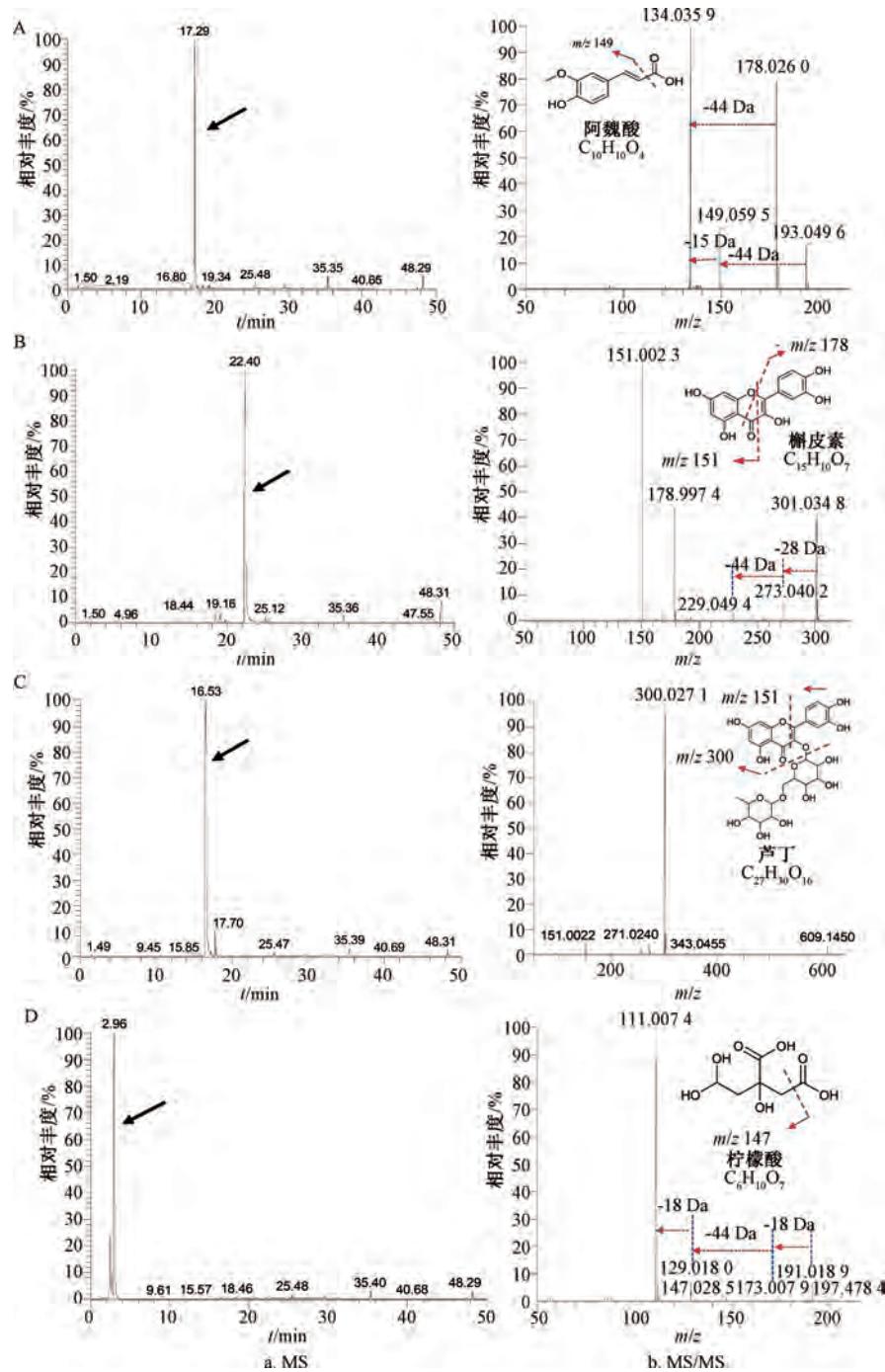


图2 阿魏酸(A)、槲皮素(B)、芦丁(C)、柠檬酸(D)对照品质谱图

Fig. 2 Mass spectra of ferulic acid (A), quercetin (B), rutin (C) and citric acid (D) reference substances

中性丢失  $\text{H}_2\text{O}$  (18 Da)、 $\text{CO}_2$  (44 Da) 等, 如化合物 **20** 中性丢失一分子  $\text{CO}_2$  (44 Da)、二分子  $\text{CO}_2$  (88 Da), 分别得到  $m/z$  243.1、199.1; 分子中带有甲氧基基团时会发生甲氧基 ( $\cdot \text{OCH}_3$ , 31 Da) 和甲基的自由基 ( $\cdot \text{CH}_3$ , 15 Da) 丢失, 如化合物 **16** 二级质谱图中可见碎片  $m/z$  197.2 [ $\text{M}-\text{H}-\text{OCH}_3-\text{CH}_3$ ]<sup>-</sup>、181.1 [ $\text{M}-\text{H}-2\text{OCH}_3$ ]<sup>-</sup>。结合文献 [15] 报道, 推测化合物 **16** 为丙二酸酯, **20** 为

1-(5-羧基-2-乙基戊基)己二酸酯。

3.1.3 有机酸 共鉴定出 15 个 (1~2、4、6、10~11、19、25~28、32~35), 主要通过中性丢失水 (18 Da)、 $\text{CO}_2$  (44 Da) 产生一系列二级离子碎片, 如化合物 **10** 的准分子离子峰为  $m/z$  179.034 5 [ $\text{M}-\text{H}$ ]<sup>-</sup>, 其  $\text{MS}^2$  图谱中主要可见基峰  $m/z$  135.0, 推测是前体离子丢失一分子  $\text{CO}_2$  (44 Da) 产生的碎片; 化合物 **19** 的准分子离子峰为

表2 龙胆叶化学成分  
Tab.2 Chemical constituents in *S. spatuifolius*

序号	$t_R/\text{min}$	分子式	分子离子峰 [ $\text{M} \cdot \text{H}^+$ ] <sup>-</sup>		MS/MS 碎片离子	鉴定	类别	文献
			理论值	实测值				
1	2.14	$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_6$	165.040 5	165.039 9	129.02, 101.02	戊糖酸	a	—
2*	3.15	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	191.019 7	191.019 3	173.01, 129.02, 111.01	柠檬酸	a	—
3	7.22	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_{11}$	371.062 0	371.062 5	209.03, 191.02, 179.04, 135.04	咖啡酰葡萄糖酸	b	[11]
4	7.70	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	335.098 4	335.097 8	161.05, 101.02	8,10-二氧代-4,7,11,14-四氧庚二酸	a	—
5	9.10	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_{10}$	331.067 1	331.066 9	169.01, 125.02	没食子酸葡萄糖苷	b	[12]
6	9.27	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_8$	209.030 3	209.030 0	191.02, 173.01, 129.02, 111.01	葡萄糖酸	a	[11]
7	10.43	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_8$	303.108 5	303.109 0	171.07, 143.07, 187.06	2-烯丙基-4,6-二乙酸吡喃葡萄糖苷	b	—
8	11.05	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	385.077 5	385.078 2	209.03, 191.02, 149.03, 193.05	阿魏酰葡萄糖酸	b	—
9	12.03	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_9$	341.087 8	341.086 9	135.04, 267.12, 179.03	咖啡酸葡萄糖苷	b	—
10	12.96	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	179.035 0	179.034 5	135.04	咖啡酸	a	[12]
11	14.05	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_6$	259.118 7	259.119 1	241.11, 197.12, 125.10	3-乙基-1,3,5-戊三羧酸	a	—
12	14.08	$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	451.124 6	451.125 3	137.02, 109.03, 165.05	羟基根皮苷	b	[13]
13	15.33	$\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_4$	241.144 5	241.144 7	197.15, 139.11	甲基环己烷-琥珀酸甲酯	c	—
14	15.35	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	371.098 4	371.097 9	121.03, 249.06, 267.52	2-(3-苯甲酰基)羟丙基葡萄糖酸	b	[14-15]
15	15.74	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_6$	609.146 1	609.145 4	285.04, 300.02, 151.00, 164.07, 123.04	山柰-3-O-龙胆二糖苷	b	—
16	16.00	$\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_4$	243.160 2	243.160 2	197.15, 181.12, 124.04	丙二酸酯	c	—
17	16.37	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	463.088 2	463.089 5	300.03, 146.06, 151.00, 123.04, 149.06	金丝桃苷	b	[15]
18	17.03	$\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$	535.182 1	535.181 1	369.15, 329.14, 298.12	2-(3-对苯酚乙稀基-5-甲氧基苯基)-6-O-呋喃酰基-吡喃葡萄糖苷	b	—
19*	17.21	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	193.050 6	193.050 3	178.03, 149.10, 134.04	阿魏酸	a	—
20	17.53	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{O}_6$	287.150 0	287.150 5	243.12, 129.09, 158.98, 225.11, 199.13	1-(5-羧基-2-乙基戊基)己二酸酯	c	—
21	17.57	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	593.151 2	593.153 9	284.03, 162.06, 146.05, 151.00,	3-葡萄糖-7-鼠李糖-山柰酚苷	b	—
22	17.81	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_5$	269.139 4	269.140 2	209.12, 251.13, 225.11	1-(半胱氨酸)-3-[2-(2-羟基乙氧基-乙氧基)-2-丙醇	d	[16]
23	18.14	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_5$	241.108 1	241.108 2	195.14, 195.14, 137.10, 197.12	羥基环己烷丙二酸酯	c	[16]
24	18.48	$\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_5$	243.123 8	243.124 1	207.10, 183.10, 158.06	庚烯酸丙基酯	c	[16]
25	18.58	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$	187.097 6	187.097 1	125.10, 143.11, 169.09	壬二酸	a	[12]
26	19.36	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_6$	343.212 6	343.213 3	325.20, 307.19, 289.18, 171.10, 201.11	10,11-二羟基-9,12-二氧代十八酸	a	—
27	19.89	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4$	199.097 6	199.097 3	155.11, 137.10	环己二乙酸	a	—
28	24.03	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_5$	327.217 7	327.218 2	309.21, 291.20, 211.13, 183.14, 171.10	14,16-二羟基-12-氧代油酸	a	[17]
29	25.12	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_5$	329.233 3	329.233 8	311.22, 171.10, 293.21, 229.14	3-羟基-1-(糠甲基)己基癸酸酯	c	—
30	28.66	$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_4$	307.191 5	307.192 0	121.07, 137.10, 185.12	4-甲基戊基-4-(2-乙氧基苯基癸酸)丁酸	c	—
31	32.10	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_4$	309.207 1	309.207 9	209.16, 137.10, 251.17, 291.20	二甲氨基苯基癸酸	d	—
32	35.80	$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_2$	275.201 7	275.202 0	257.19, 231.21, 204.18	12-苯基十二羧酸	a	—
33	35.99	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$	293.212 2	293.212 8	183.14, 275.20, 235.17, 211.13, 171.10	12-氧代亚油酸	a	[14,17]
34	38.32	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_3$	295.227 9	295.228 3	277.22, 171.10, 196.14, 259.21	羟基亚油酸	a	[14,17]
35	40.35	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_3$	297.243 5	297.244 1	279.23, 261.22, 171.10	羥基油酸	a	[17]

注: \* 为经对照品对比确定的成分, a 表示酚类, b 表示有机酸, c 表示酯类, d 表示芳香烷烃。

$m/z$  193.050 3 [M-H]<sup>-</sup>，可见离子碎片  $m/z$  149.1 [M-H-44]<sup>-</sup>，进一步中性丢失 1 个甲基 (15 Da) 得到碎片  $m/z$  134.0；化合物 28、33 的准分子离子峰分别为  $m/z$  327.212 8 [M-H]<sup>-</sup>、293.212 8 [M-H]<sup>-</sup>，在其  $MS^2$  图谱中均可见丢失水分子的离子碎片信息，分别为  $m/z$  309.2 [M-H-18]<sup>-</sup>、275.2

[M-H-18]<sup>-</sup>；由于受羰基的电负性影响，化合物 33 邻位 C-C 键容易断裂，产生离子碎片  $m/z$  183.1、211.1。根据与对照品比对结合文献 [19] 报道，推测化合物 10、19、28、33 分别为咖啡酸、阿魏酸、14, 16-二羟基-12-氧代油酸、12-氧代亚油酸，化合物 33 的裂解途径见图 4D。

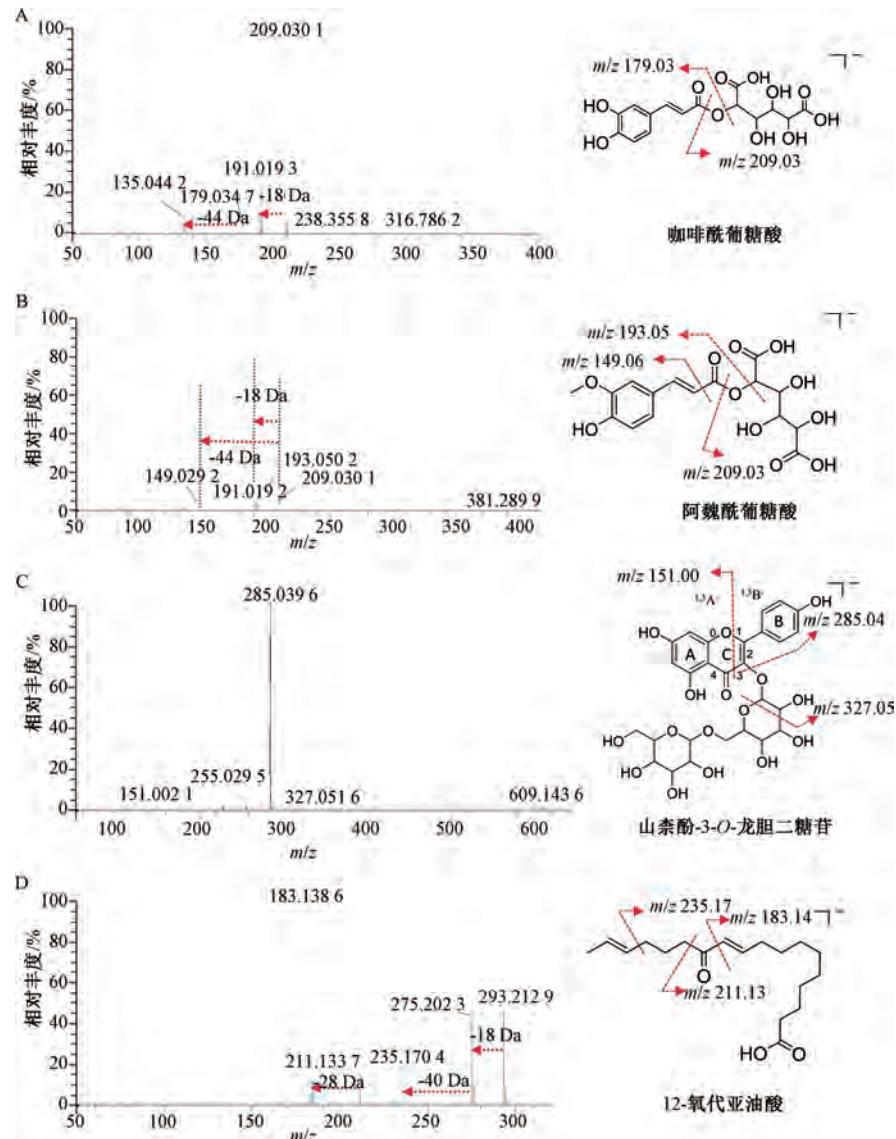


图 3 化合物 3 (A)、8 (B)、15 (C)、33 (D) 的二级质谱图和质谱裂解途径

Fig. 3  $MS^2$  mass spectra and fragmentation pathways of compounds 3 (A), 8 (B), 15 (C) and 33 (D)

3.1.4 其他 共鉴定了 2 个芳香烷烃 (22、31)，化合物 22 准分子离子峰为  $m/z$  269.140 2 [M-H]<sup>-</sup>，在二级质谱中可见碎片离子  $m/z$  225.1 [M-H-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O]<sup>-</sup>、209.1 [M-H-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>]<sup>-</sup>、251.1 [M-H-H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>，结合高分辨质谱数据给出的分子式为 C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>，推测为 1- (苄氧基) -3- [2- (2-羟基乙氧基) 乙氧基] -2-丙醇。

3.2 小分子化合物分布表征 对 11 批样品进行

LC-HRMS 的平行分析，采用 TraceFinder 软件对 35 个化合物在不同样品中的峰面积进行积分统计，再进行小分子质谱离子强度可视化热图分析，结果见图 4。由此可知，I (1, 8, 14, 18)、IV (20, 28, 30, 34)、V (3, 33) 组中咖啡酰葡萄糖酸 (3)、12-氧代亚油酸 (33)、戊糖酸 (1) 和阿魏酰葡萄糖酸 (8) 相对丰度较高，并且 14, 16-二羟基-12 氧代油酸，1- (5-羧基-2-乙基戊基) 己二酸

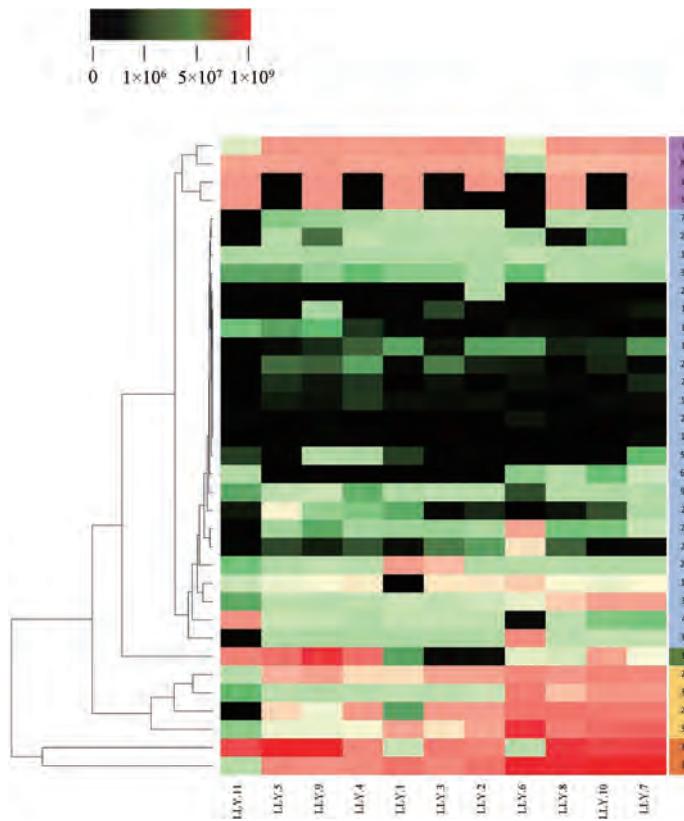


图4 小分子化合物分布热图

Fig. 4 Distribution heat map of small molecule compounds

酯, 4-甲基戊基-4-(2-乙氧基苯氧基)丁酸, 及羟基亚油酸等有机酸(酯)类分布也较广。

文献[20]报道, 有机酸是龙胆叶中含量较高的小分子化合物, 该类成分(尤其是油酸和亚油酸)一方面对维持人体健康有着重要的生理功能, 是人体不能合成的必需脂肪酸之一, 也是 $\gamma$ -亚麻酸和花生四烯酸的合成前体物质, 另一方面也具有较好的药效活性。此外, 咖啡酰葡萄糖酸(3)、阿魏酰葡萄糖酸(8)均属于酚酸类成分, 具有较强的抗氧化能力及自由基清除活性<sup>[21]</sup>, 与龙胆叶抗氧化活性密切相关; 咖啡酰葡萄糖酸(3)、咖啡酸葡萄糖苷(9)均为咖啡酰类衍生物, 具有一定抗炎作用, 可能为龙胆叶抗炎药效物质。

综上所述, 咖啡酰葡萄糖酸、14, 16-二羟基-12-氧代油酸、12-氧代亚油酸、阿魏酰葡萄糖酸在不同批次样品中相对丰度较高, 分布较稳定, 而且二者药理活性与龙胆叶传统功效相关, 相较于2020年版《中国药典》规定的山柰酚-3-O-龙胆二糖苷, 在分布及活性评价上更为契合, 可作为质量评价的候选化合物。

#### 4 结论

本实验基于UHPLC-ESI-Orbitrap MS法鉴定了

龙胆叶中35个主要小分子化合物, 包括有机酸15个, 苷类11个, 酯类7个, 其他类2个, 结合其药理活性报道筛选出咖啡酰葡萄糖酸、12-氧代亚油酸、14, 16-二羟基-12-氧代油酸、戊糖酸、阿魏酰葡萄糖酸作为目标成分。但由于戊糖酸在其他科属植物中分布广泛, 不具有专属性, 而且酚酸、不饱和脂肪酸与龙胆叶传统药理活性密切相关, 故选择咖啡酰葡萄糖酸、12-氧代亚油酸、14, 16-二羟基-12-氧代油酸、阿魏酰葡萄糖酸作为质量评价指标成分, 从而提升该植物质量评价标准的专属性与客观性。

#### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 100.
- [2] 萧步丹. 岭南采药录 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1932.
- [3] 丁 聰, 贺 勤, 柳贤福. 龙胆叶水提物的止咳祛痰作用研究 [J]. 华西药学杂志, 2015, 30(1): 49-50.
- [4] 丘 琴, 鄢汉深, 王 莹, 等. 龙胆叶根急性毒性和抗炎作用的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 286-288.

- [ 5 ] 甄汉深, 刘 蓉, 丘 琴, 等. 龙利叶抗炎镇痛作用研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 270-273.
- [ 6 ] 冯华芬. 毛冬青叶化学成分研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2012.
- [ 7 ] Grafakou M E, Barda C, Tomou E M, et al. The genus *Genista* L.: a rich source of bioactive flavonoids [J]. *Phytochemistry*, 2021, 181: 112574.
- [ 8 ] 夏 兵, 马风伟, 丁立生, 等. 天然产物的质谱智能解析研究 [J]. 中国科学: 化学, 2017, 47(12): 1458-1466.
- [ 9 ] Ge Y W, Zhu S, Yoshimatsu K, et al. MS/MS similarity networking accelerated target profiling of triterpene saponins in *Eleutherococcus senticosus* leaves [J]. *Food Chem*, 2017, 227: 444-452.
- [ 10 ] Ge Y W, Zhu S, Kazuma K, et al. Molecular ion index assisted comprehensive profiling of B-type oligomeric proanthocyanidins in rhubarb by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(13): 3555-3570.
- [ 11 ] Garran T A, Ji R F, Chen J L, et al. Elucidation of metabolite isomers of *Leonurus japonicus* and *Leonurus cardiaca* using discriminating metabolite isomerism strategy based on ultra-high performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1598: 141-153.
- [ 12 ] 庚丽峰, 丘 琴, 甄丹丹, 等. HPLC 同时测定龙利叶抗炎活性部位中的原儿茶酸和咖啡酸 [J]. 华西药学杂志, 2020, 35(6): 640-643.
- [ 13 ] Wei W W, Wu P, You X Y, et al. Dihydrochalcones from the leaves of *Lithocarpus litseifolius* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2021, 23(9): 819-824.
- [ 14 ] 李 蒙, 黄晓雷, 王 璞, 等. 龙胆叶化学成分研究 [J]. 中药材, 2019, 42(7): 1541-1545.
- [ 15 ] Fernández-Poyatos M D P, Ruiz-Medina A, Zengin G, et al. Phenolic characterization, antioxidant activity, and enzyme inhibitory properties of *Berberis thunbergii* DC. leaves: a valuable source of phenolic acids [J]. *Molecules*, 2019, 24(22): 4171.
- [ 16 ] 何显科, 宁 丽, 韦锦斌, 等. 龙胆叶乙酸乙酯萃取物液相色谱—质谱联用分析及体外抗菌活性的实验研究 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(4): 542-546.
- [ 17 ] 龚 雪, 周长凤, 肖培根, 等. 茜草鼠尾草的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2019, 40(4): 165-172.
- [ 18 ] Nehring A, Bury D, Kling H W, et al. Determination of human urinary metabolites of the plasticizer di (2-ethylhexyl) adipate (DEHA) by online-SPE-HPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1124: 239-246.
- [ 19 ] Hu T, Lin M, Zhang D, et al. A UPLC/MS/MS method for comprehensive profiling and quantification of fatty acid esters of hydroxy fatty acids in white adipose tissue [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(28): 7415-7428.
- [ 20 ] 柳小春, 叶芳敏, 吕伟旗. 龙胆叶中山奈酚-3-O-龙胆二糖苷含量测定与相关性分析 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2021, 31(11): 1066-1069.
- [ 21 ] 陆秋娜, 李兆叠, 郑鸿娟, 等. 龙胆叶提取物的抗氧化活性研究 [J]. 湖北农业科学, 2017, 56(1): 89-90; 94.