

基于UPLC-Q-TOF/MS技术快速鉴定当归中苯酞类和有机酸类成分^Δ

张清清^{1,2*},冯媛^{1,3},李春花¹,李国川¹,刘兴超¹,李颖玥¹,王红芳¹,周莉¹,张一昕^{1#}(1.河北中医学院药学院,石家庄 050200;2.河北省中药组方制剂技术创新中心,石家庄 050091;3.河北省中药炮制技术创新中心,石家庄 050091)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)05-0579-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.12



摘要 目的 建立全面、快速分析当归中苯酞类和有机酸类等化学成分的方法,为当归的质量评价和药效物质研究提供科学依据。**方法** 以当归70%乙醇提取液为分析样品,采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱联用技术进行分析。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH-C₁₈,流动相为0.1%甲酸溶液-乙腈溶液(梯度洗脱),流速为0.3 mL/min,柱温为30℃,进样量为2 μL。离子源为电喷雾离子源,采用正离子扫描模式,质量扫描范围为 m/z 50~1 000;毛细管电压为4 000 V;雾化器压力为35 psi;裂解电压为135 V,锥孔电压为65 V;干燥气温度为320℃;干燥气流量为10 L/min,鞘流气流量为11 L/min;碰撞能量为20、40 V。使用Qualitative Analysis 10.0软件获取化合物的保留时间、准分子离子峰的精确质量数及二级碎片等信息,通过与对照品质谱图比对,并结合相关文献报道、质谱裂解规律及Chemspider、MassBank、PubChem等数据库信息对化合物进行分析。**结果** 从当归提取物中共鉴定或推断出72个化合物,包括苯酞类化合物55个、有机酸类化合物13个、其他类化合物4个。**结论** 成功建立了能快速、准确识别与鉴定当归中有机酸类和苯酞类等化学成分的方法,为其化学成分的全面表征提供了一种高效、快速的分析手段。

关键词 当归;有机酸类;苯酞类;化学成分;超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱联用技术

Rapid identification of phthalides and organic acids in *Angelica sinensis* based on UPLC-Q-TOF/MS

ZHANG Qingqing^{1,2}, FENG Yuan^{1,3}, LI Chunhua¹, LI Guochuan¹, LIU Xingchao¹, LI Haoyue¹, WANG Hongfang¹, ZHOU Li¹, ZHANG Yixin¹ (1. College of Pharmacy, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. Hebei TCM Formula Preparation Technology Innovation Center, Shijiazhuang 050091, China; 3. Hebei Traditional Chinese Medicine Processing Technology Innovation Center, Shijiazhuang 050091, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish a comprehensive and rapid method for the analysis of chemical constituents as phthalides and organic acids in *Angelica sinensis*, and to provide scientific reference for the quality evaluation and pharmacodynamic substance research of *A. sinensis*. **METHODS** The 70% ethanol extract of *A. sinensis* was analyzed by ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS). The determination was performed on ACQUITY UPLC BEH-C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 30℃, and sample size was 2 μL. The ion source was an electrospray ion source, using positive ion scanning mode, and the mass scanning range was m/z 50-1 000. Capillary voltage was 4 000 V; atomizer pressure was 35 psi; cracking voltage was 135 V and the taper hole voltage was 65 V; the temperature of dry gas was 320℃; the flow of dry gas was 10 L/min and the flow of sheath gas was 11 L/min; collision energy were 20 and 40 V. Qualitative Analysis 10.0 software was used to obtain the retention time of compounds, the accurate mass number of excimer ion peaks and secondary fragments. The compounds were analyzed by comparing with the mass spectra of the reference substance, combined with relevant literature, mass spectrometry cleavage law and database such as Chemspider, MassBank, PubChem. **RESULTS** A total of 72 compounds were identified or deduced from *A. sinensis*, including 55 phthalides, 13 organic acids and 4 other constituents. **CONCLUSIONS** The established method is rapid and accurate for the identification of chemical constituents from *A. sinensis*, such

^Δ 基金项目:河北省自然科学基金资助项目(No.H2019423103);河北中医学院优秀青年教师基础研究计划项目(No.YQ2018008)

* 副教授,博士。研究方向:中药/复方质量控制及药效物质。电话:0311-89926414。E-mail:janezh1987@sina.com

通信作者:教授,博士。研究方向:代谢性疾病的中医药防治和机制。电话:0311-89926308。E-mail:hbzyx123@163.com

as organic acids and phthalides, which provides an efficient and rapid analytical method for the comprehensive characterization of its chemical constituents.

KEYWORDS *Angelica sinensis*; organic acids; phthalides; chemical constituents; UPLC-Q-TOF/MS

随着液质联用技术的发展,超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱联用(UPLC-Q-TOF/MS)技术在中药成分分析中的应用越来越多,该技术可提供化合物准分子离子峰的精确质量数及丰富的碎片信息,能更可靠地表征未知化合物的结构。因此,该技术常常作为中药成分定性或相对定量分析的首选技术,从而实现对中药化学成分的快速识别和鉴定^[1]。前期,本课题组分别采用不同体积分数的甲醇和乙醇作为提取溶剂,以色谱峰的数量、响应值和峰形为评价指标,对当归的提取工艺进行了优化,最终确定以70%乙醇为溶剂进行供试品溶液的制备。本研究拟在前期研究基础上,进一步采用UPLC-Q-TOF/MS技术对当归70%乙醇提取液中的苯醌类等化合物进行研究,并结合文献和有关资料,通过对苯醌类和有机酸类等化合物的分析和总结,为这些化合物的定性分析提供一种快速、有效的方法,同时也为当归药材的质量控制提供可靠依据。

1 材料

1.1 主要仪器

1290 Infinity型UPLC仪、6545型四极杆串联质谱仪均购自美国Agilent公司;BSA224S-CW型电子分析天平购自德国Sartorius公司;KQ-300VDE型双频数控超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司;Eppendorf Centrifuge 5418型离心机购自德国Eppendorf AG公司;Synergy UV型超纯水制备系统购自美国Millipore公司。

1.2 主要药品与试剂

当归饮片购自国药乐仁堂河北药业有限公司(批号20041701,产地为甘肃),经河北中医学院药学院张丹教授鉴定为伞形科植物当归*A. sinensis*(Oliv.)Diels的干燥根。Z-藁本内酯对照品(批号MUST-18051010,纯度99.55%)购自成都曼思特生物科技有限公司;正丁基苯醌对照品(批号6066-49-5,纯度98%)、洋川芎内酯H对照品(批号94596-27-7,纯度98%)、洋川芎内酯I对照品(批号94596-28-8,纯度98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;洋川芎内酯A对照品(批号63038-10-6,纯度98%)、欧当归内酯A对照品(批号88182-33-6,纯度98%)均购自成都普瑞法科技开发有限公司;甲酸、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用ACQUITY UPLC BEH-C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),以0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B)溶液为流动相进行梯度洗脱(0~10 min,0% B→50% B;10~16 min,50% B→60% B;16~20 min,60% B→85% B;20~22 min,85% B;22~25 min,85% B→95% B;25~26 min,95% B→100% B;26~36 min,100% B);柱温为30℃;流速为0.3 mL/min;进样量为2 μL。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(ESI),采用正离子扫描模式,

质量扫描范围为 m/z 50~1 000;毛细管电压为4 000 V;雾化器压力为35 psi;裂解电压为135 V,锥孔电压为65 V;干燥气温度为320℃;干燥气流量为10 L/min,鞘气流流量为11 L/min;碰撞能量为20、40 V。

2.3 供试品溶液的制备

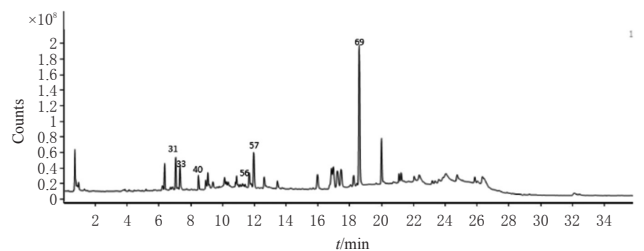
取当归饮片适量,粉碎,过40目筛。精密称取粉末2.0 g,加入20 mL 70%乙醇溶液,超声(功率360 W,频率40 kHz)提取30 min,以10 000 r/min离心5 min,吸取2 mL上清液于10 mL容量瓶中,用70%甲醇溶液定容,即得。

2.4 混合对照品溶液的制备

精密称取洋川芎内酯I、洋川芎内酯H、正丁基苯醌、洋川芎内酯A、Z-藁本内酯和欧当归内酯A对照品各1 mg,分别置于10 mL容量瓶中,用70%甲醇溶液定容,得各单一对照品母液。分别取上述单一对照品母液0.5 mL,置于同一10 mL容量瓶中,用70%甲醇溶液定容,制成各成分质量浓度均为0.005 mg/mL的混合对照品溶液,混匀后备用。

2.5 当归化学成分分析

取“2.3”项下供试品溶液和“2.4”项下混合对照品溶液适量,分别按“2.1”“2.2”项下色谱、质谱条件进样测定,利用Qualitative Analysis 10.0软件获取化合物的保留时间、准分子离子峰的精确质量数及二级碎片等信息,通过与对照品质谱图比对,并结合相关文献报道、质谱裂解规律及ChempSpider、MassBank、PubChem等数据库信息对化合物进行分析。结果,从当归中鉴定或推断出72个化合物,包括55个苯醌类化合物、13个有机酸类化合物、4个其他类化合物。混合对照品溶液的总离子流图见图1,当归化学成分的总离子流图见图2,当归化学成分的鉴定结果及数据见表1。



31: 洋川芎内酯I; 33: 洋川芎内酯H; 40: 正丁基苯醌; 56: 洋川芎内酯A; 57: Z-藁本内酯; 69: 欧当归内酯A

图1 混合对照品溶液的总离子流图

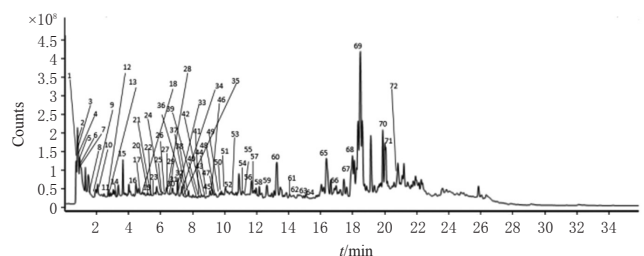


图2 当归化学成分的总离子流图

表1 当归化学成分鉴定结果及相关信息

| 序号 | 名称 | 保留时间/min | 分子式 | 准分子离子峰 | 精确质量数(<i>m/z</i>) | 二级碎片 | 成分类型 | 误差/ppm | 参考文献 |
|----|------------------|----------|---|--------------------|---------------------|---|------|--------|------|
| 1 | 精氨酸 | 0.790 | C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₂ | [M+H] ⁺ | 175.119 0 | 116.070 4[M+H-NHC(NH ₂) ₂] ⁺ | 有机酸类 | -0.52 | [2] |
| 2 | 胆碱 | 0.824 | C ₈ H ₁₇ NO | [M+H] ⁺ | 104.107 1 | 87.079 7[M+H-NH ₃] ⁺ | 其他类 | 1.28 | [3] |
| 3 | 缬氨酸 | 0.857 | C ₆ H ₁₁ NO ₂ | [M+H] ⁺ | 118.086 4 | 72.080 8[M+H-CO-H ₂ O] ⁺ | 有机酸类 | 1.41 | [2] |
| 4 | 脯氨酸 | 0.890 | C ₅ H ₉ NO ₂ | [M+H] ⁺ | 116.070 6 | 70.065 2[M+H-CO-H ₂ O] ⁺ | 有机酸类 | 0.37 | [4] |
| 5 | 腺苷 | 0.940 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₄ | [M+H] ⁺ | 268.104 0 | 136.061 6[M+H-C ₅ H ₁₀ O ₃] ⁺ | 其他类 | 1.76 | [5] |
| 6 | 蔗糖 | 1.007 | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | [M+H] ⁺ | 365.105 4 | 203.113 5[M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ | 其他类 | -0.33 | [3] |
| 7 | 5-羟甲基-2-咪唑甲醛 | 1.040 | C ₆ H ₈ O ₃ | [M+H] ⁺ | 127.039 1 | 109.028 5[M+H-H ₂ O] ⁺ | 其他类 | 0.67 | [3] |
| 8 | 焦谷氨酸 | 1.606 | C ₈ H ₇ NO ₃ | [M+H] ⁺ | 130.049 9 | 102.127 8[M+H-CO] ⁺ 84.044 3[M+H-CO-H ₂ O] ⁺ | 有机酸类 | 0.23 | [5] |
| 9 | 酪氨酸 | 1.889 | C ₉ H ₉ NO ₃ | [M+H] ⁺ | 182.081 2 | 165.054 5[M+H-NH ₃] ⁺ | 有机酸类 | 0.65 | [5] |
| 10 | 9-氨基-1,3,9-壬烷二羧酸 | 2.122 | C ₁₆ H ₂₁ NO ₆ | [M+H] ⁺ | 276.144 5 | 132.101 7[M+H-2COOH-C ₆ H ₅] ⁺ | 有机酸类 | 1.61 | [3] |
| 11 | 洋川芎内酯I/H异构体1 | 2.555 | C ₁₂ H ₁₆ O ₄ | [M+H] ⁺ | 225.112 4 | 179.070 1[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ | 苯酚类 | 0.99 | |
| 12 | 苯丙氨酸 | 2.722 | C ₉ H ₉ NO ₂ | [M+H] ⁺ | 166.086 3 | 149.059 8[M+H-NH ₃] ⁺ 120.080 7[M+H-COOH] ⁺ 103.054 1[M+H-COOH-NH ₃] ⁺ | 有机酸类 | 0.30 | [3] |
| 13 | 精氨酸异构体 | 2.855 | C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₂ | [M+H] ⁺ | 175.118 8 | 116.070 4[M+H-NHC(NH ₂) ₂] ⁺ | 有机酸类 | -0.94 | |
| 14 | 阿魏酸 | 3.272 | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | [M+H] ⁺ | 195.065 3 | 177.054 4[M+H-H ₂ O] ⁺ 149.059 7[M+H-HCOOH] ⁺ 137.059 2[M+H-CO ₂ -CH ₃] ⁺ | 有机酸类 | -0.01 | [2] |
| 15 | 二羟基丁基苯酚异构体1 | 3.555 | C ₁₂ H ₁₄ O ₄ | [M+H] ⁺ | 223.096 7 | 205.085 8[M+H-H ₂ O] ⁺ 181.085 7[M+H-C ₃ H ₅] ⁺ 167.114 4[M+H-C ₄ H ₇] ⁺ | 苯酚类 | 0.72 | |
| 16 | 洋川芎内酯K/G异构体1 | 4.570 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.117 0 | 191.106 3[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.074 7[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 149.023 0[M+H-H ₂ O-C ₃ H ₅] ⁺ 135.116 5[M+H-H ₂ O-C ₄ H ₇] ⁺ | 苯酚类 | -1.07 | |
| 17 | 4,7-二羟基-3-丁基苯酚 | 4.670 | C ₁₂ H ₁₆ O ₄ | [M+H] ⁺ | 223.096 9 | 209.116 8[M+H-CH ₃] ⁺ 205.087 8[M+H-H ₂ O] ⁺ 195.101 0[M+H-C ₃ H ₅] ⁺ 181.085 5[M+H-C ₄ H ₇] ⁺ 167.106 6[M+H-C ₄ H ₇] ⁺ | 苯酚类 | 1.67 | [6] |
| 18 | 洋川芎内酯F异构体1 | 4.820 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 207.101 6 | 179.069 7[M+H-CO] ⁺ 161.059 3[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 123.116 7[M+H-CO-C ₄ H ₇] ⁺ | 苯酚类 | -0.08 | |
| 19 | 洋川芎内酯K/G异构体2 | 5.220 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.117 1 | 191.106 2[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.111 4[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 149.095 0[M+H-H ₂ O-C ₃ H ₅] ⁺ 145.101 1[M+H-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺ 135.116 3[M+H-H ₂ O-C ₄ H ₇] ⁺ | 苯酚类 | -0.53 | |
| 20 | 洋川芎内酯K/G异构体3 | 5.486 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.117 1 | 191.106 3[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.111 7[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 149.095 5[M+H-H ₂ O-C ₃ H ₅] ⁺ 135.117 0[M+H-H ₂ O-C ₄ H ₇] ⁺ | 苯酚类 | -0.25 | |
| 21 | 异阿魏酸 | 5.607 | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | [M+H] ⁺ | 195.065 1 | 151.075 1[M+H-CO ₂] ⁺ | 有机酸类 | -0.60 | [5] |
| 22 | 洋川芎内酯I同分异构体 | 5.670 | C ₁₂ H ₁₆ O ₄ | [M+H] ⁺ | 225.112 7 | 207.101 3[M+H-H ₂ O] ⁺ 179.069 7[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 165.090 7[M+H-C ₃ H ₅ -CO-2H] ⁺ | 苯酚类 | 2.31 | |
| 23 | 丁烯基苯酚异构体1 | 5.753 | C ₁₂ H ₁₂ O ₂ | [M+H] ⁺ | 189.090 9 | 171.080 2[M+H-H ₂ O] ⁺ 153.127 0[M+H-2H ₂ O] ⁺ 144.981 7[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 113.963 7[M+H-C ₆ H ₅ -H ₂ O-2H] ⁺ | 苯酚类 | -0.84 | |
| 24 | 二羟基丁基苯酚异构体2 | 6.053 | C ₁₂ H ₁₄ O ₄ | [M+H] ⁺ | 223.096 7 | 209.116 5[M+H-CH ₃] ⁺ 205.085 8[M+H-H ₂ O] ⁺ 195.064 9[M+H-C ₃ H ₅] ⁺ 167.106 3[M+H-C ₄ H ₇] ⁺ | 苯酚类 | 1.03 | |
| 25 | 洋川芎内酯K/G异构体4 | 6.152 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.117 0 | 191.106 3[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.038 9[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 135.043 8[M+H-H ₂ O-C ₄ H ₇] ⁺ | 苯酚类 | -1.35 | |
| 26 | 洋川芎内酯K/G异构体5 | 6.352 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.117 5 | 191.106 3[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.038 9[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 135.043 8[M+H-H ₂ O-C ₄ H ₇] ⁺ | 苯酚类 | 1.59 | |
| 27 | 洋川芎内酯F异构体2 | 6.386 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 207.101 5 | 189.090 6[M+H-H ₂ O] ⁺ 161.096 1[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ | 苯酚类 | 0.05 | |

续表 1

| 序号 | 名称 | 保留时间/min | 分子式 | 准分子离子峰 | 精确质量数(<i>m/z</i>) | 二级碎片 | 成分类型 | 误差/ppm | 参考文献 |
|----|---------------|----------|---|--------------------|---------------------|---|------|--------|------|
| 28 | 异绿原酸 | 6.402 | C ₁₅ H ₁₆ O ₁₂ | [M+H] ⁺ | 517.134 7 | 191.106 3[M+H-2(C ₆ H ₅ O ₂)] ⁺ | 有机酸类 | 1.46 | [5] |
| 29 | 丁烯基苯酚异构体2 | 6.735 | C ₁₂ H ₁₆ O ₂ | [M+H] ⁺ | 189.091 0 | 171.080 2[M+H-H ₂ O] ⁺ 153.069 3[M+H-2H ₂ O] ⁺ 144.137 9[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 130.966 2[M+H-C ₆ H ₅ -2H] ⁺ 119.048 8[M+H-C ₆ H ₅] ⁺ 113.963 5[M+H-C ₆ H ₅ -H ₂ O-2H] ⁺ | 苯酚类 | 0.03 | |
| 30 | 二羟基丁基苯酚异构体3 | 6.752 | C ₁₂ H ₁₆ O ₄ | [M+H] ⁺ | 223.096 7 | 209.116 8[M+H-CH ₃] ⁺ 205.085 8[M+H-H ₂ O] ⁺ 177.054 4[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ | 苯酚类 | 1.01 | |
| 31 | 洋川芎内酯I | 7.052 | C ₁₂ H ₁₆ O ₄ | [M+H] ⁺ | 225.112 3 | 207.101 6[M+H-H ₂ O] ⁺ 189.090 7[M+H-H ₂ O-H ₂ O] ⁺ | 苯酚类 | 0.88 | [6] |
| 32 | 二羟基丁基苯酚异构体4 | 7.252 | C ₁₂ H ₁₆ O ₄ | [M+H] ⁺ | 223.096 8 | 209.201 1[M+H-CH ₃] ⁺ 205.085 7[M+H-H ₂ O] ⁺ 181.049 5[M+H-C ₆ H ₅] ⁺ 177.090 6[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ | 苯酚类 | 1.23 | |
| 33 | 洋川芎内酯H | 7.335 | C ₁₂ H ₁₆ O ₄ | [M+H] ⁺ | 225.112 5 | 207.101 6[M+H-H ₂ O] ⁺ 189.090 9[M+H-H ₂ O-H ₂ O] ⁺ 179.071 4[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ | 苯酚类 | 1.52 | [6] |
| 34 | 洋川芎内酯K/G异构体6 | 7.501 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.117 1 | 191.106 1[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.132 5[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 135.116 6[M+H-H ₂ O-C ₆ H ₅] ⁺ 91.504 7[M+H-H ₂ O-C ₆ H ₅ -CO ₂] ⁺ | 苯酚类 | -0.71 | |
| 35 | 洋川芎内酯K/G异构体7 | 7.818 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.117 2 | 191.105 6[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.132 3[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ | 苯酚类 | 0.00 | |
| 36 | 丁烯基苯酚异构体3 | 7.918 | C ₁₂ H ₁₆ O ₂ | [M+H] ⁺ | 189.090 9 | 171.149 2[M+H-H ₂ O] ⁺ 144.981 6[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 130.966 0[M+H-C ₆ H ₅ -2H] ⁺ 115.963 6[M+H-C ₆ H ₅ -H ₂ O] ⁺ | 苯酚类 | -0.23 | |
| 37 | 洋川芎内酯K/G异构体8 | 8.051 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.117 2 | 191.106 4[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.132 6[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 149.060 0[M+H-H ₂ O-C ₆ H ₅] ⁺ | 苯酚类 | -0.10 | |
| 38 | 二羟基丁基苯酚异构体4 | 8.084 | C ₁₂ H ₁₆ O ₄ | [M+H] ⁺ | 223.096 9 | 209.116 9[M+H-CH ₃] ⁺ 205.086 0[M+H-H ₂ O] ⁺ 195.121 4[M+H-C ₆ H ₅] ⁺ 177.054 7[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 167.069 9[M+H-C ₆ H ₅] ⁺ | 苯酚类 | 1.95 | |
| 39 | 洋川芎内酯F | 8.367 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 207.101 7 | 189.090 9[M+H-H ₂ O] ⁺ 179.069 9[M+H-CO] ⁺ 123.055 1[M+H-CO-C ₆ H ₅] ⁺ | 苯酚类 | 0.90 | [6] |
| 40 | 正丁基苯酚 | 8.467 | C ₁₂ H ₁₆ O ₂ | [M+H] ⁺ | 191.106 6 | 173.096 0[M+H-H ₂ O] ⁺ 145.100 9[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ | 苯酚类 | -0.08 | [6] |
| 41 | 丁烯基苯酚异构体4 | 8.534 | C ₁₂ H ₁₆ O ₂ | [M+H] ⁺ | 189.091 2 | 171.149 0[M+H-H ₂ O] ⁺ 105.033 6[M+H-C ₆ H ₅ -CO] ⁺ | 苯酚类 | 1.56 | |
| 42 | 洋川芎内酯K | 8.548 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.117 2 | 191.106 1[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.038 9[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 145.101 1[M+H-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺ | 苯酚类 | -0.16 | [7] |
| 43 | 洋川芎内酯K/G异构体9 | 8.934 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.117 1 | 191.106 4[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.131 8[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ 149.0598[M+H-H ₂ O-C ₆ H ₅] ⁺ | 苯酚类 | -0.63 | |
| 44 | 洋川芎内酯F异构体3 | 8.984 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 207.101 5 | 189.090 7[M+H-H ₂ O] ⁺ 179.069 5[M+H-CO] ⁺ | 苯酚类 | 0.05 | |
| 45 | 二羟基丁基苯酚异构体5 | 9.117 | C ₁₂ H ₁₆ O ₄ | [M+H] ⁺ | 223.096 8 | 209.117 2[M+H-CH ₃] ⁺ 205.143 2[M+H-H ₂ O] ⁺ 195.137 5[M+H-C ₆ H ₅] ⁺ 177.054 3[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ | 苯酚类 | 1.24 | |
| 46 | 10,12-十八烷二酸 | 9.233 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | [M+H] ⁺ | 277.216 2 | 259.204 6[M+H-H ₂ O] ⁺ | 有机酸类 | 0.44 | [7] |
| 47 | 洋川芎内酯F异构体4 | 9.633 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 207.101 7 | 189.090 8[M+H-H ₂ O] ⁺ 161.095 8[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ | 苯酚类 | 0.76 | |
| 48 | 洋川芎内酯K/G异构体10 | 9.666 | C ₁₂ H ₁₆ O ₃ | [M+H] ⁺ | 209.116 7 | 191.105 6[M+H-H ₂ O] ⁺ 163.075 2[M+H-H ₂ O-CO] ⁺ | 苯酚类 | -2.25 | |
| 49 | 丁烯基苯酚异构体5 | 9.783 | C ₁₂ H ₁₆ O ₂ | [M+H] ⁺ | 189.091 0 | 171.080 3[M+H-H ₂ O] ⁺ 147.044 0[M+H-C ₆ H ₅] ⁺ | 苯酚类 | 0.01 | |

续表 1

| 序号 | 名称 | 保留时间/min | 分子式 | 准分子离子峰 | 精确质量数(m/z) | 二级碎片 | 成分类型 | 误差/ppm | 参考文献 |
|----|----------------|----------|-------------------|-----------|----------------|--|------|--------|------|
| 50 | 洋川芎内酯D | 9.849 | $C_{12}H_{16}O_4$ | $[M+H]^+$ | 223.096 6 | 209.116 5 $[M+H-C_2H_5]^+$ 205.086 0 $[M+H-H_2O]^+$ 181.121 8 $[M+H-C_3H_5]^+$ 177.054 1 $[M+H-H_2O-CO]^+$ | 苯酞类 | 1.54 | [7] |
| 51 | 洋川芎内酯G | 9.883 | $C_{12}H_{16}O_3$ | $[M+H]^+$ | 209.117 1 | 191.106 4 $[M+H-H_2O]^+$ 163.075 0 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 149.059 7 $[M+H-H_2O-C_3H_5]^+$ 135.044 0 $[M+H-H_2O-C_4H_9]^+$ | 苯酞类 | -0.26 | [7] |
| 52 | 洋川芎内酯K/G异构体11 | 10.266 | $C_{12}H_{16}O_3$ | $[M+H]^+$ | 209.117 2 | 191.106 4 $[M+H-H_2O]^+$ 163.147 5 $[M+H-H_2O-CO]^+$ | 苯酞类 | -0.20 | |
| 53 | 洋川芎内酯A异构体1 | 10.432 | $C_{12}H_{16}O_2$ | $[M+H]^+$ | 193.122 2 | 147.044 1 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 137.059 5 $[M+H-C_4H_9]^+$ | 苯酞类 | -5.91 | |
| 54 | 二羟基丁基苯酞异构体6 | 11.099 | $C_{12}H_{16}O_4$ | $[M+H]^+$ | 223.096 6 | 205.086 0 $[M+H-H_2O]^+$ 177.054 3 $[M+H-H_2O-CO]^+$ | 苯酞类 | 0.71 | |
| 55 | 洋川芎内酯A异构体2 | 11.265 | $C_{12}H_{16}O_2$ | $[M+H]^+$ | 193.122 3 | 175.111 7 $[M+H-H_2O]^+$ 147.116 6 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 137.059 4 $[M+H-C_4H_9]^+$ | 苯酞类 | -0.67 | |
| 56 | 洋川芎内酯A | 11.665 | $C_{12}H_{16}O_2$ | $[M+H]^+$ | 193.122 5 | 175.111 5 $[M+H-H_2O]^+$ 147.116 8 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 137.059 7 $[M+H-C_4H_9]^+$ | 苯酞类 | 1.02 | [6] |
| 57 | Z-藜本内酯 | 11.964 | $C_{12}H_{16}O_2$ | $[M+H]^+$ | 191.106 6 | 173.095 9 $[M+H-H_2O]^+$ 163.105 7 $[M+H-CO]^+$ 145.101 2 $[M+H-CO-H_2O]^+$ | 苯酞类 | 1.25 | [6] |
| 58 | 川芎内酯 | 12.314 | $C_{12}H_{12}O_2$ | $[M+H]^+$ | 189.091 2 | 171.080 3 $[M+H-H_2O]^+$ 161.095 5 $[M+H-C_3H_5]^+$ 147.044 1 $[M+H-C_3H_5]^+$ 131.048 8 $[M+H-C_4H_9-2H]^+$ | 苯酞类 | 0.75 | [6] |
| 59 | Z-藜本内酯同分异构体 | 12.631 | $C_{12}H_{16}O_2$ | $[M+H]^+$ | 191.106 7 | 173.096 3 $[M+H-H_2O]^+$ 145.101 2 $[M+H-H_2O-CO]^+$ | 苯酞类 | 1.00 | |
| 60 | E-丁烯基苯酞 | 13.480 | $C_{12}H_{12}O_2$ | $[M+H]^+$ | 189.091 2 | 171.080 3 $[M+H-H_2O]^+$ 153.069 5 $[M+H-2H_2O]^+$ 105.033 4 $[M+H-C_4H_9-CO]^+$ | 苯酞类 | 0.69 | [7] |
| 61 | 洋川芎内酯K/G异构体12 | 14.179 | $C_{12}H_{16}O_3$ | $[M+H]^+$ | 209.117 0 | 191.106 4 $[M+H-H_2O]^+$ 163.132 4 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 149.020 3 $[M+H-H_2O-C_3H_5]^+$ | 苯酞类 | -1.11 | |
| 62 | 洋川芎内酯A异构体3 | 14.562 | $C_{12}H_{16}O_2$ | $[M+H]^+$ | 193.122 5 | 175.075 3 $[M+H-H_2O]^+$ 147.116 4 $[M+H-H_2O-CO]^+$ | 苯酞类 | -2.89 | |
| 63 | Z-丁烯基苯酞 | 15.079 | $C_{12}H_{12}O_2$ | $[M+H]^+$ | 189.091 1 | 161.095 9 $[M+H-C_3H_5]^+$ 128.9505 $[M+H-H_2O-CO-CH_3]^+$ | 苯酞类 | 1.42 | [7] |
| 64 | 藜本内酯异构体1 | 15.395 | $C_{12}H_{16}O_2$ | $[M+H]^+$ | 191.106 5 | 173.095 7 $[M+H-H_2O]^+$ 163.111 2 $[M+H-CO]^+$ 135.116 7 $[M+H-C_4H_9]^+$ | 苯酞类 | 0.18 | |
| 65 | 洋川芎内酯P | 16.344 | $C_{12}H_{20}O_4$ | $[M+H]^+$ | 381.206 8 | 279.231 8 $[M+H-H_2O-CO-C_4H_9]^+$ 191.106 7 $[M+H-C_{12}H_{16}O_3]^+$ | 苯酞类 | 2.20 | [8] |
| 66 | 洋川芎内酯P同分异构体 | 16.994 | $C_{12}H_{20}O_4$ | $[M+H]^+$ | 381.206 1 | 279.236 1 $[M+H-H_2O-CO-C_4H_9]^+$ 191.106 5 $[M+H-C_{12}H_{16}O_3]^+$ | 苯酞类 | -0.54 | |
| 67 | 新当归内酯 | 17.926 | $C_{12}H_{20}O_4$ | $[M+H]^+$ | 381.206 6 | 335.200 5 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 191.106 6 $[M+H-C_{12}H_{16}O_3]^+$ | 苯酞类 | 2.37 | [8] |
| 68 | 新当归内酯同分异构体 | 18.093 | $C_{12}H_{20}O_4$ | $[M+H]^+$ | 381.206 6 | 363.195 4 $[M+H-H_2O]^+$ 335.200 5 $[M+H-H_2O-CO]^+$ 279.159 0 $[M+H-H_2O-CO-C_4H_9]^+$ 191.106 4 $[M+H-C_{12}H_{16}O_3]^+$ 149.023 0 $[M+H-C_{12}H_{16}O_2-C_3H_5]^+$ | 苯酞类 | 1.98 | |
| 69 | 欧当归内酯A | 18.592 | $C_{12}H_{20}O_4$ | $[M+H]^+$ | 381.207 1 | 191.106 5 $[M+H-C_{12}H_{16}O_3]^+$ 173.095 9 $[M+H-C_{12}H_{16}O_2-H_2O]^+$ 149.022 6 $[M+H-C_{12}H_{16}O_2-C_3H_5]^+$ 135.115 8 $[M+H-C_{12}H_{16}O_2-C_4H_9]^+$ | 苯酞类 | 2.71 | [9] |
| 70 | 藜本内酯二聚体1 | 19.875 | $C_{24}H_{32}O_4$ | $[M+H]^+$ | 381.206 5 | 191.106 5 $[M+H-C_{12}H_{16}O_3]^+$ | 苯酞类 | 1.14 | |
| 71 | 藜本内酯二聚体2 | 20.008 | $C_{24}H_{32}O_4$ | $[M+H]^+$ | 381.206 6 | 191.106 4 $[M+H-C_{12}H_{16}O_3]^+$ | 苯酞类 | 1.41 | |
| 72 | 8,11,14-二十碳三烯酸 | 20.808 | $C_{20}H_{32}O_2$ | $[M+H]^+$ | 307.263 3 | 289.251 5 $[M+H-H_2O]^+$ | 有机酸类 | 0.58 | [10] |

2.6 几类主要化合物的裂解特征分析

2.6.1 有机酸类化合物 有机酸类化合物是一种广泛存在于自然界植物中的酸性有机化合物,具有很强的抗氧化和抗菌、消炎等药理作用,其在质谱中容易丢失CO、CO₂、-COOH、H₂O等而产生碎片离子峰^[1]。本研究共鉴定出13种有机酸类化合物,包括精氨酸、缬氨酸、阿魏酸和异阿魏酸等。

本研究以化合物14为例进行裂解规律分析。该化合物的准分子离子峰[M+H]⁺为195.0653,根据准分子离子峰的精确质量数,判断该化合物的分子式为C₁₀H₁₀O₄。其二级质谱的碎片离子包括m/z 177.0544、149.0597、137.0592。其中,碎片离子m/z 177.0544、m/z 149.0597分别为准分子离子峰丢失1分子H₂O、HCOOH产生,m/z 137.0592为准分子离子峰同时丢失1个CH₂自由基和1分子CO₂产生。根据参考文献[2],推断该化合物为阿魏酸,其可能的质谱裂解途径见图3。

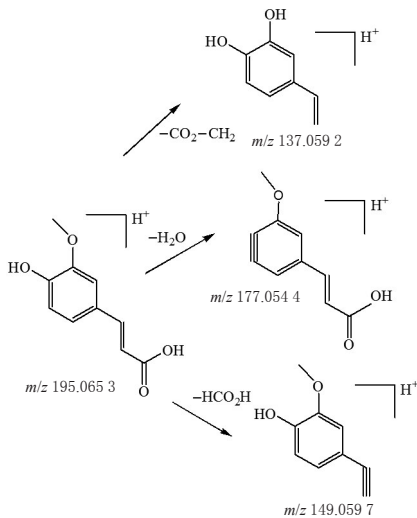


图3 化合物14可能的质谱裂解途径

2.6.2 苯酞类化合物 苯酞类化合物包括简单苯酞(即苯酞单体)和苯酞二聚体两大类,是当归的主要有效成分^[12]。苯酞单体类化合物在质谱裂解中容易丢失H₂O、CO、烷基自由基(CH₃、C₂H₅、C₃H₇、C₄H₉等)及CO₂等产生特征碎片;苯酞二聚体类化合物会先裂解为苯酞单体,常产生m/z 191的特征离子,在此基础上产生与上述单体相同的特征裂解碎片。简单苯酞类化合物是以一个苯酞类结构单元为母核,没有含氧取代的一类成分,主要有Z-藁本内酯、丁烯基苯酞等;苯酞二聚体类化合物是一类由2个苯酞单体聚合物形成的化合物,主要有当归双藁本内酯A、欧当归内酯A等。苯酞类化合物在二级质谱中易丢失H₂O、CO、C₂H₄、C₃H₆、C₄H₈等分子而产生碎片离子^[13]。本研究共鉴定或推断出苯酞类化合物55个,并对代表性苯酞类化合物(化合物56、化合物57和化合物69)的裂解途径进行举例分析。

化合物56:准分子离子峰为[M+H]⁺ 193.1225,根据准分子离子峰的精确质量数,判断该化合物的分子式为C₁₂H₁₆O₂。其二级质谱的碎片离子包括m/z 175.1115、147.1168、137.0597。其中,碎片离子m/z 175.1115为准分子离子峰丢失1分子H₂O产生,在此基础上再丢失1分子CO产生m/z 147.1168的特征碎片;m/z 137.0597为准分子离子峰丢失1个C₄H₈自由基后产生。结合参考文献[6],并与对照品图谱比对,鉴定该化合物为洋川芎内酯A。化合物56可能的质谱裂解途径见图4,洋川芎内酯A对照品的质谱图见图5。

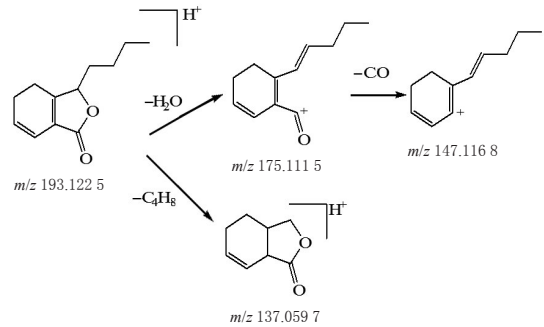


图4 化合物56可能的质谱裂解途径

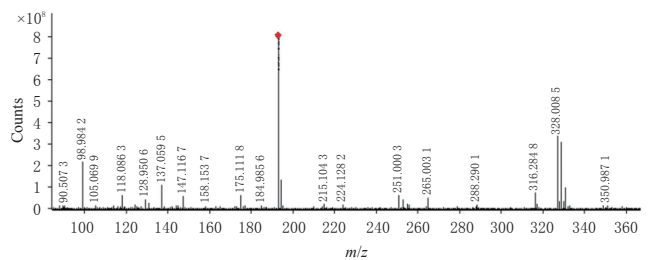


图5 洋川芎内酯A对照品的质谱图

化合物57:准分子离子峰为[M+H]⁺ 191.1066,根据准分子离子峰的精确质量数,判断该化合物的分子式为C₁₂H₁₄O₂。其二级质谱的主要碎片离子包括m/z 173.0959、163.1057、145.1012等。碎片离子m/z 173.0959为准分子离子峰丢失1分子H₂O产生;m/z 163.1057为准分子离子峰丢失1分子CO产生,并在此基础上继续丢失1分子H₂O产生m/z 145.1012的碎片离子。结合参考文献[6],并与对照品图谱比对,鉴定该化合物为Z-藁本内酯。化合物57可能的质谱裂解途径见图6,Z-藁本内酯对照品的质谱图见图7。

化合物69:准分子离子峰为[M+H]⁺ 381.2071,根据准分子离子峰的精确质量数,判断该化合物的分子式为C₂₄H₂₈O₄。其二级质谱的主要碎片离子包括m/z 191.1065、173.0959、149.0226、135.1158。其中,碎片离子m/z 191.1065是苯酞二聚体裂解为苯酞单体后产生;碎片离子m/z 173.0959是裂解后的单体丢失1分子

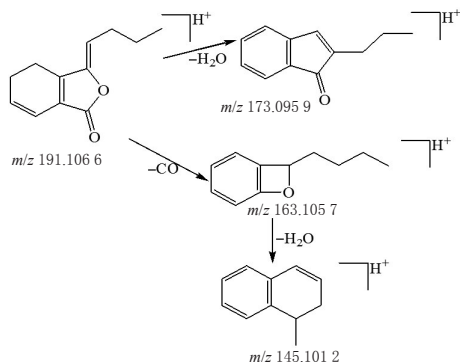


图6 化合物57可能的质谱裂解途径

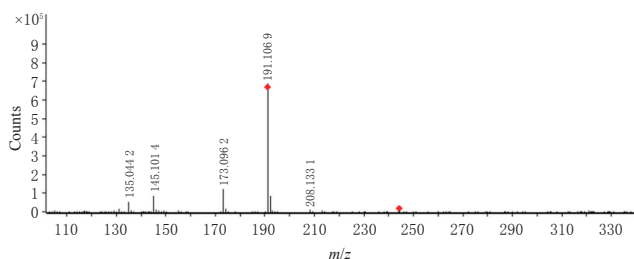


图7 Z-萜本内酯对照品的质谱图

H₂O产生,碎片离子 m/z 149.022 6、135.115 8为裂解后的单体分别丢失1个C₃H₆或C₄H₈自由基后产生。结合参考文献[9],并与对照品图谱比对,鉴定该化合物为欧当归内酯A。化合物69可能的质谱裂解途径见图8,欧当归内酯A对照品的质谱图见图9。

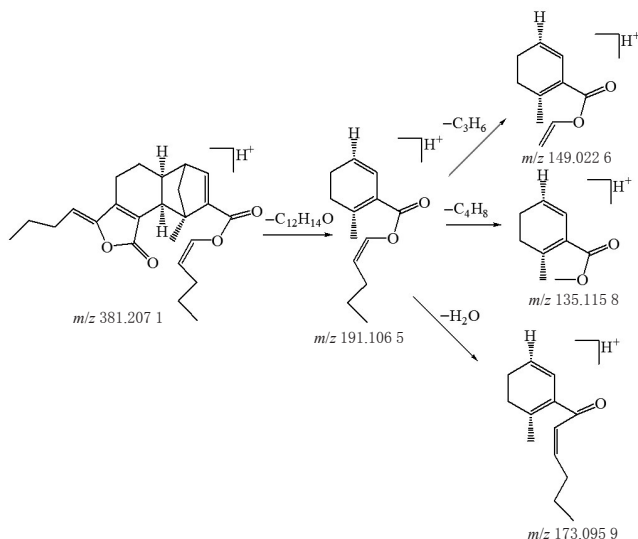


图8 化合物69可能的质谱裂解途径

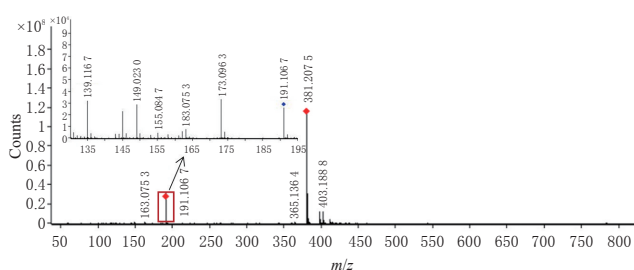


图9 欧当归内酯A对照品的质谱图

3 讨论

UPLC-Q-TOF/MS技术可快速、全面地对中药化学成分进行定性研究,现已被广泛应用于中药或复杂未知物的鉴定分析。为了更快速、可靠地鉴定中药当归中的化学成分,本课题组选用该技术对当归提取物进行分析。在制备当归供试品时,笔者分别采用了30%、50%、70%、90%甲醇和70%乙醇作为提取溶剂,以色谱峰的响应值、峰形、峰个数为评价指标,最终选取70%乙醇为提取溶剂进行样品提取。

本研究根据化合物准分子离子峰的精确质量数、保留时间、分子式并结合对照品图谱比较、质谱裂解规律分析及数据库信息比对等方式从当归中鉴定或推断出72个化合物,包括苯醌类化合物55个、有机酸类化合物13个、其他类化合物4个。苯醌类成分作为当归挥发油的重要组成部分,也是当归的重要药效成分,具有平喘、抗肿瘤、抗血小板聚集等作用^[14-15]。如Z-萜本内酯可抑制HT-29结肠癌细胞的生长,对L1210和K562肿瘤细胞的增殖也有显著的抑制作用^[16]。有机酸类化学成分具有清除氧自由基和抗脂质过氧化等活性^[17],如阿魏酸能减轻超氧自由基和过氧化氢引起的膜脂质过氧化反应,减少丙二醛的生成,能明显降低羟自由基及丙二醛的溶血作用^[18]。

本研究成功建立了快速鉴定当归中有机酸类和苯醌类等化学成分的UPLC-Q-TOF/MS法,为当归化学成分的全面表征提供了一种高效、快速的分析手段,也为该药的质量控制研究、药效物质基础的阐释及资源的开发利用奠定了理论基础。此外,本研究中所有的质谱数据均为正离子模式下采集,导致实验结果具有一定的局限性,还需对其进行进一步的扩展和更深层次的研究。

参考文献

- [1] 宋祯彦,何攀,李富周,等.高效液相色谱串联质谱法测定当归芍药散提取物和含药血清中3种活性成分含量[J].中国中医药信息杂志,2021,28(1):92-99.
- [2] 陈方超,高守红,王志鹏,等.基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术鉴定藤梨根的化学成分[J].中国药房,2020,31(14):1725-1731.
- [3] 牛研,王书芳.LC-Q-TOF-MS和LC-IT-MSⁿ分析当归芍药散中化学成分[J].中草药,2014,45(8):1056-1062.
- [4] 刘腾,许晋芳,卢晓林,等.基于LC-MS代谢组学研究黄芪注射液对白细胞减少症模型小鼠的干预作用[J].中国药房,2020,31(21):2627-2633.
- [5] 李蓉蓉,游蓉丽,秦雪梅,等.基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术快速识别芪蛭通络胶囊化学成分[J].中国中药杂志,2020,45(20):4918-4928.
- [6] 张纪红,吴卫东,刘建庭,等.基于UPLC-Q-TOF/MS技术活血止痛胶囊化学成分的快速分析[J].中草药,2020,51(12):3139-3146.

(下转第591页)