UPLC-Q-TOF/MS技术结合UNIFI平台快速鉴定鸡骨草化学成分Δ

郭忠会[1]*，郑雪莹[1]，梁　洁[1]，谭　勇[1]，覃春萍[1]，郭家成[1]，李耀华[2]，韦志英[2]，陈奎奎[1]#（1.广西中医药大学药学院，南宁　530200；2.广西中医药大学教学实验实训中心，南宁　530200）

中图分类号　R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）23-2852-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.23.07

摘　要　目的　建立超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱（UPLC-Q-TOF/MS）结合UNIFI平台的分析方法，对鸡骨草的化学成分进行快速鉴定。**方法**　采用ACQUITY PRM HSS T3 FIT色谱柱，以0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱，流速为0.3 mL/min，进样量为2 μL；采用电喷雾离子源，以全信息串联质谱技术在正、负离子模式下分别采集鸡骨草化学成分的质谱数据。建立鸡骨草化学成分数据库，基于UNIFI平台进行靶向和非靶向分析，结合化合物的精确分子质量、二级碎片离子信息及与对照品和文献数据等比对进一步鉴定化学成分。**结果**　共鉴定了鸡骨草的46种化合物，包括黄酮类19种、三萜类8种、生物碱类3种、有机酸类5种、其他类11种；其中11种化合物在鸡骨草中首次报道，9种化合物经对照品比对确证。**结论**　UPLC-Q-TOF/MS结合UNIFI平台的分析方法可快速鉴定鸡骨草的化学成分。鸡骨草中主要以黄酮类、三萜类成分为主。

关键词　鸡骨草；化学成分；鉴定；超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱；UNIFI平台

Rapid identification of chemical constituents in *Abrus cantoniensis* Hance by UPLC-Q-TOF/MS combined with UNIFI platform

GUO Zhonghui[1], ZHENG Xueying[1], LIANG Jie[1], TAN Yong[1], QIN Chunping[1], GUO Jiacheng[1], LI Yaohua[2], WEI Zhiying[2], CHEN Kuikui[1]（1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Teaching Experiment Training Center, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish an analytical method based on ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) combined with UNIFI platform for rapid identification of the chemical constituents in *Abrus cantoniensis* Hance. **METHODS** The chromatographic separation was performed on ACQUITY PRM HSS T3 FIT column for gradient elution with the mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile. The flow rate was 0.3 mL/min, and injection volume was 2 μL. Electrospray ionization was used to collect the mass spectrometry data of the chemical constituents of *A. cantoniensis* Hance with full information tandem mass spectrometry technology in positive and negative ion modes. The chemical constituent database of *A. cantoniensis* Hance was established. Targeted and non-targeted analyses were conducted based on UNIFI platform, and chemical constituents were further identified in combination with accurate molecular mass, secondary fragment ion information and equivalence with reference substances and literature data, etc. **RESULTS** Totally 46 compounds of *A. cantoniensis* Hance were successfully identified, including 19 flavonoids, 8 triterpenoids, 3 alkaloids, 5 organic acids and 11 other components. Among them, 11 compounds were firstly found in *A. cantoniensis* Hance, and 9 compounds were confirmed by reference substance. **CONCLUSIONS** The analytical method based on UPLC-Q-TOF/MS combined with UNIFI platform can quickly identify the chemical constituents of *A. cantoniensis* Hance. Flavonoids and triterpenes are the main components in *A. cantoniensis* Hance.

KEYWORDS　*Abrus cantoniensis* Hance; chemical constituents; identification; UPLC-Q-TOF/MS; UNIFI platform

鸡骨草系豆科植物广州相思子*Abrus cantoniensis* Hance的干燥全株，壮药名“棵骼给”，为广西“桂十味”道地药材之一。其性凉，味甘，具有利湿退黄、清热解毒、疏肝止痛的功效[1]，临床常用于治疗慢性乙型肝炎等肝脏疾病。现代药理研究表明，鸡骨草有降脂保肝、抗菌、抗炎镇痛、增强免疫、抗氧化等多种生物活性[2]。化学成分是中药多靶点、多途径发挥协同作用的物质基础。目前，关于鸡骨草化学成分的研究多集中在鸡骨草全草或提取物的成分分离制备，以及基于高效液相色谱技术的指纹图谱分析和相思子碱、下箴刺桐碱、夏佛塔苷等主成分的含量测定方面[3-4]，而对于鸡骨草化学成分系统分析的研究鲜有报道。

Δ **基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.82160771）；广西科技基地与人才专项（No.桂科AD21238032）；广西中医药大学引进博士科研启动基金项目（No.2020BS015）；广西中医药大学青年基金项目（No.2021QN006）

* **第一作者**　助教，硕士。研究方向：中药药效物质基础。E-mail：997213822@qq.com

通信作者　讲师，博士。研究方向：中药分析及体内过程。E-mail：15299951086@163.com

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱（ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry，UPLC-Q-TOF/MS）技术具有高灵敏度、高分辨率的特点，已广泛用于中药化学成分的分离和结构表征[5]。全信息串联质谱法作为数据依赖型串联质谱法的一种，具有全面、准确、简便、灵活的特点，可为成分解析提供充足、可靠的数据源。此外，UNIFI平台功能强大，具有自动离子流提取、预测分子式、商用/自建数据库检索等功能，可实现化学成分快速、靶向分析，在质谱数据后处理方面展现出了良好的应用前景。基于此，本研究首先建立UPLC-Q-TOF/MS分析方法，基于全信息串联质谱数据采集模式，全面采集鸡骨草质谱数据；然后整理关于鸡骨草化学成分的文献报道，建立鸡骨草化学成分数据库；再利用UNIFI平台，通过靶向与非靶向分析快速解析鸡骨草的化学成分，以期为鸡骨草药效物质的阐释、质量标准的提升奠定基础。

1 材料

1.1 主要仪器

Acquity UPLC Ⅰ-Class型超高效液相色谱系统、Xevo G2-XS Q Tof型四极杆飞行时间质谱仪（配有UNIFI科学信息学系统V1.7和Masslynx 4.1质谱工作站）均购自美国Waters公司；Q-250A3型高速多功能粉碎机购自上海冰都电器有限公司；KQ-500E型超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司。

1.2 主要药品与试剂

鸡骨草药材购自北京本草方源药业有限公司，经广西中医药大学药学院谭勇教授鉴定为豆科植物广州相思子*A. cantoniensis* Hance的干燥地上部分。下箴刺桐碱、牡荆素、异牡荆素、木犀草素4种对照品（批号分别为RFS-X06801909002、RFS-M02302002022、RFS-Y11602-107028、RFS-M00702004028，纯度均大于98%）均购自成都瑞芬思生物科技有限公司；葫芦巴碱、芒柄花素、夏佛塔苷、异夏佛塔苷、维采宁-Ⅱ5种对照品（批号分别为AF21062651、AF20052952、AF21061501、AF21062602、AF20112508，纯度均大于98%）均购自成都埃法生物科技有限公司；质谱级乙腈、甲醇、甲酸均购自美国Fisher公司；亮氨酸-脑啡肽（批号为ST158449，纯度大于98%）购自美国Sigma-Aldrich公司；其他试剂均为分析纯，水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 供试品溶液的制备 取鸡骨草适量，粉碎，过2号筛，精密称取鸡骨草粉末50 mg，加入10 mL 80%甲醇，涡旋2 min，超声（功率150 W，频率50 kHz）溶解30 min，静置放冷，过滤，收集滤液，以12 000 r/min离心15 min，取上清液，备用。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取9个对照品粉末各适量，分别用少量二甲基亚砜助溶，以80%甲醇为溶剂，配制成单个对照品贮备液（1 mg/mL）及混合对照品溶液（10 μg/mL），4 ℃避光保存，备用。

2.2 检测条件

2.2.1 色谱条件 采用ACQUITY PRM HSS T3 FIT色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm），以0.1%甲酸水溶液（A）、乙腈（B）为流动相进行梯度洗脱（0～3 min，5%B；3～10 min，5%B→10%B；10～20 min，10%B→30%B；20～30 min，30%B→65%B；30～35 min，65%B→95%B；35～37 min，95%B→100%B；37～40 min，100%B）；进样体积为2 μL；流速为0.3 mL/min；柱温为40 ℃。

2.2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源，质量扫描范围为质荷比（*m/z*）50～1 500。优化的仪器参数如下：在正、负离子检测模式下，毛细管电压分别为3.0 kV（+）和2.5 kV（－）；锥孔电压为40 V，锥孔气流量为50 L/h，脱溶剂氮气流量为600 L/h，氩气流量为0.15 mL/min，离子源温度为120 ℃，脱溶剂气温度为300 ℃，低能通道中碰撞能量设置为6 V，高能通道中碰撞能量设置为20～35 V。亮氨酸-脑啡肽（100 ng/L）用作Lock Spray实时校正，流速为10 μL/min。

2.3 数据后处理

（1）以“鸡骨草”“*Abrus cantoniensis* Hance”为检索词，通过检索中国知网、PubMed等数据库，收集、整理鸡骨草所含化学成分的信息，建立鸡骨草化学成分数据库。（2）将质谱“原始数据”和“鸡骨草化学成分数据库”导入UNIFI V1.7平台，进行靶向分析。参数设置：高能量强度阈值50.0，低能量强度阈值400.0；精确质量数偏差±5.0 mDa，保留时间容差0.1 min；正离子模式下选择$[M+H]^+$、$[M+Na]^+$为加合离子，负离子模式下选择$[M-H]^-$、$[M+HCOO]^-$为加合离子；正离子校正质量数为556.276 6，负离子校正质量数为554.262 0。对于UNIFI平台靶向匹配的化合物，需通过对照品比较、质谱数据比较、文献比较等方法进一步确证，以排除假阳性结果。（3）采用UNIFI V1.7平台和Masslynx 4.1软件，通过元素匹配、二级碎片分析及特征碎片、质谱数据库信息比较和对照品比较等多种方法，对未匹配的化合物进行非靶向分析。

3 结果与分析

采用UPLC-Q-TOF/MS技术结合UNIFI平台对鸡骨草和混合对照品进行采集和分析，得到正、负离子模式的基峰色谱图（base peak chromatogram，BPC），见图1。结果显示，共鉴定出46种化合物，包括靶向分析的27种化合物和非靶向分析的19种化合物。其中，黄酮类化合物有19种，三萜类化合物有8种，生物碱类化合物有3种，有机酸类化合物有5种，其他类化合物有11种。通过与对照品比对确证了9种化合物。鸡骨草中化学成分的详细分析结果见表1。

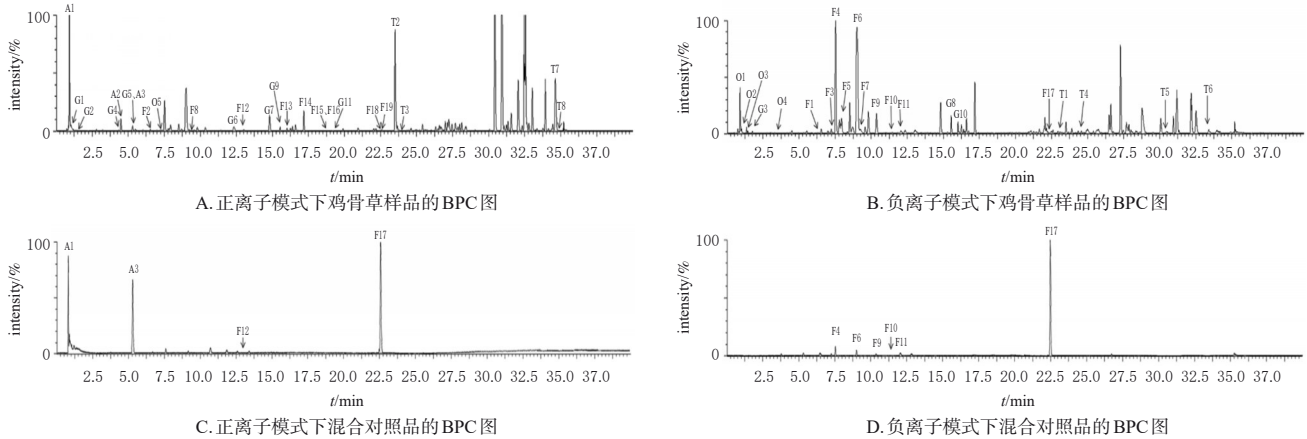


图1　正、负离子模式下鸡骨草样品和混合对照品的BPC图

表1　基于UPLC-Q-TOF/MS的鸡骨草化学成分分析结果

序号	t/min	化学式	准分子离子峰实测值(m/z)	偏差	碎片离子(m/z)	化合物名称
F1[n#]	6.42	$C_{30}H_{26}O_{12}$	577.134 1[M−H]$^-$	−0.9	407.075 5[M−H−$C_6H_{10}O_4$]$^-$、289.073 0[M−H−$C_6H_{10}O_4$−$C_7H_2O_2$]$^-$、245.082 4[M−H−$C_6H_{10}O_4$−$C_7H_2O_2$−CO_2]$^-$、125.025 0[M−H−$C_{24}H_{21}O_9$]$^-$	原花青素B_2
F2[t]	6.42	$C_{15}H_{14}O_6$	291.086 8[M+H]$^+$	−0.3	139.039 3[M+H−$C_8H_8O_3$]$^+$、123.043 3[M+H−$C_8H_8O_4$]$^+$	儿茶素[6]
F3[n#]	7.23	$C_{15}H_{14}O_6$	291.083 6[M+H]$^-$	−3.3	139.083 4[M+H−$C_8H_8O_3$]$^+$、123.040 0[M+H−$C_8H_8O_4$]$^+$	表儿茶素
F4[t*]	7.53	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593.151 9[M−H]$^+$	2.2	575.140 9[M−H−H_2O]$^-$、473.111 8[M−H−$C_4H_8O_4$]$^-$、383.078 9[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_3H_8O_3$]$^-$、353.068 4[M−H−2$C_4H_8O_4$]$^-$、325.071 0[M−H−2$C_4H_8O_4$−CO]$^-$、297.079 5[M−H−2$C_4H_8O_4$−2CO]$^-$	维采宁-Ⅱ
F5[n#]	7.95	$C_{26}H_{28}O_{15}$	579.134 5[M−H]$^-$	−0.9	459.091 8[M−H−$C_4H_8O_4$]$^-$、399.071 7[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_2H_4O_2$]$^-$、369.062 2[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_3H_6O_3$]$^-$	刺芫菊苷[7]
F6[t*]	9.01	$C_{26}H_{26}O_{14}$	563.140 9[M−H]$^-$	0.9	545.129 4[M−H−H_2O]$^-$、473.109 2[M−H−$C_3H_6O_3$]$^-$、443.099 0[M−H−$C_4H_8O_4$]$^-$、383.078 4[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_2H_4O_2$]$^-$、353.068 1[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_3H_6O_3$]$^-$、325.073 0[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_3H_6O_3$−CO]$^-$	夏佛塔苷[8]
F7[t]	9.40	$C_{21}H_{20}O_{11}$	563.394 0[M−H]$^-$	−1.2	473.108 5[M−H−$C_3H_6O_3$]$^-$、443.098 5[M−H−$C_4H_8O_4$]$^-$、383.0780 6[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_2H_4O_2$]$^-$	维采宁-Ⅲ[9]
F8[t]	9.41	$C_{21}H_{20}O_{11}$	449.108 4[M+H]$^+$	0.0	413.085 3[M+H−2H_2O]$^+$、329.066 4[M+H−$C_5H_{10}O_5$]$^+$、287.054 8[M+H−Glu]$^+$	木犀草素-6-*C*-葡萄糖苷
F9[t*]	10.36	$C_{26}H_{26}O_{14}$	563.139 6[M−H]$^-$	−0.9	473.109 4[M−H−$C_3H_6O_3$]$^-$、443.010 2[M−H−$C_4H_8O_4$]$^-$、383.078 2[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_2H_4O_2$]$^-$、353.068 0[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_3H_6O_3$]$^-$、325.072 5[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_3H_6O_3$−CO]$^-$	异夏佛塔苷[9]
F10[n*#]	11.44	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.099 2[M−H]$^-$	3.2	341.068 6[M−H−$C_3H_6O_3$]$^-$、311.057 3[M−H−$C_4H_8O_4$]$^-$、283.061 0[M−H−$C_4H_8O_4$−CO]$^-$	牡荆素[10]
F11[n*#]	12.07	$C_{21}H_{20}O_{10}$	431.098 7[M−H]$^-$	2.1	341.067 3[M−H−$C_3H_6O_3$]$^-$、311.055 0[M−H−$C_4H_8O_4$]$^-$、283.060 5[M−H−$C_4H_8O_4$−CO]$^-$	异牡荆素[10]
F12[t*]	12.99	$C_{15}H_{10}O_6$	287.057 0[M+H]$^+$	4.9	269.049 0[M+H−H_2O]$^+$、231.070 1[M+H−2CO]$^+$、137.023 0[M+H−$C_8H_6O_3$]$^+$	木犀草素
F13[n]	16.02	$C_{15}H_{10}O_5$	271.060 0[M+H]$^+$	−0.4	137.059 5[M+H−$C_7H_2O_3$]$^+$、119.051 7[M+H−$C_7H_4O_2$]$^+$、91.056 2[M+H−$C_7H_4O_2$−CO]$^+$	7,3′,4′-三羟基-黄酮
F14[t]	17.19	$C_{29}H_{36}O_{14}$	609.218 5[M+H]$^+$	0.3	591.204 4[M+H−H_2O]$^+$、563.215 9[M+H−H_2O−CO]$^+$、299.092 6[M+H−$C_5H_9O_4$−Glu]$^+$、165.069 7[M+H−$C_5H_8O_4$−Glu−C_9H_3O]$^+$	8-*O*-methylretusin-7-*O*-*β*-D-apifuranosyl-(1→2)-*β*-D-glucopyranoside
F15[t]	18.59	$C_{16}H_{12}O_5$	285.075 6[M+H]$^+$	−2.5	270.053 1[M+H−CH_3]$^+$、257.051 0[M+H−CO]$^+$、137.023 3[M+H−C_9H_8O]$^+$	7,4′-二羟基-8-甲氧基异黄酮
F16[n#]	20.95	$C_{16}H_{13}O_5$	285.076 3[M+H]$^+$	0	254.048 8[M+H−OCH_3]$^+$、153.053 1[M+H−C_9H_3O]$^+$	金合欢素[11]
F17[n*#]	22.48	$C_{16}H_{12}O_4$	267.066 6[M−H]$^-$	4.5	252.047 0[M−H−CH_3]$^-$、239.172 4[M−H−CO]$^-$、132.022 3[M−H−$C_7H_3O_3$]$^-$	芒柄花素
F18[t]	22.60	$C_{17}H_{14}O_5$	299.093 2[M+H]$^+$	4.3	284.067 0[M+H−CH_3]$^+$、269.045 9[M+H−CH_2O]$^+$、253.046 5[M+H−CO_2]$^+$	8-羟基-7,4′-二甲氧基异黄酮
F19[t]	22.86	$C_{17}H_{14}O_5$	299.092 5[M+H]$^+$	2.0	284.066 0[M+H−CH_3]$^+$	7-羟基-8,4′-二甲氧基异黄酮
T1[n]	23.29	$C_{54}H_{88}O_{22}$	1 087.565 4[M−H]$^-$	−3.2	1 069.005 9[M−H−H_2O]$^-$、909.476 2[M−H−OGlu]$^-$、171.105 0[M−H−OAbr−$C_{14}H_{23}$]$^-$	相思子皂苷Sa1[12]
T2[t]	23.52	$C_{30}H_{48}O_2$	441.371 8[M+H]$^+$	−3.4	423.363 5[M−H−H_2O]$^-$、418.713 6[M−H−H_2O−CH_3]$^-$、175.148 3[M−H−H_2O−CH_3−$C_{16}H_{24}O$]$^-$、106.086 6[M−H−H_2O−CH_3−$C_{16}H_{24}O$−C_7H_9]$^-$	相思子皂醇F[12−14]
T3[t]	23.91	$C_{48}H_{76}O_{17}$	949.517 8[M+Na]$^+$	5.0	599.389 4[M+H−Rha−Glu−H_2O]$^+$、441.372 4[M+H−Rha−Glu−GluA]$^+$、425.377 6[M+H−Glu−Rha−OGluA]$^+$、407.368 9[M+H−Glu−Rha−OGluA−H_2O]$^+$、217.190 5[M+H−Glu−Rha−OGluA−H_2O−$C_{14}H_{22}$]$^+$	槐花皂苷Ⅲ[12−14]
T4[t]	24.34	$C_{48}H_{76}O_{18}$	939.493 8[M−H]$^-$	−1.6	921.507 0[M−H−H_2O]$^-$、595.269 4[M−H−Rha−Glu−2H_2O]$^-$	去氢大豆皂苷Ⅰ[14]
T5[t]	30.47	$C_{30}H_{48}O_3$	455.352 1[M−H]$^-$	−0.9	453.850 6[M−H−2H]$^-$	熊果酸
T6[t]	33.97	$C_{30}H_{48}O_4$	471.347 8[M−H]$^-$	0.8	427.357 9[M−H−CO_2]$^-$、409.346 6[M−H−CO_2−H_2O]$^-$	24-deooxytrogenin
T7[t]	34.72	$C_{30}H_{50}O_2$	465.369 7[M+Na]$^+$	−1.4	215.179 5[M+Na−$C_{14}H_{15}O$−H_2O]$^+$	槐花二醇
T8[t]	34.90	$C_{30}H_{50}O_2$	465.370 3[M+Na]$^+$	0.1	287.235 9[M+Na−$C_{10}H_{21}O$]$^+$、259.205 2[M+Na−$C_{12}H_{23}O$]$^+$、233.192 6[M+Na−$C_{14}H_{25}O$]$^+$、185.132 2[M+Na−$C_{16}H_{33}O_2$]$^+$	相思子皂醇G
A1[n*]	0.92	$C_7H_7NO_2$	138.055 8[M+H]$^+$	2.2	110.060 5[M+H−CO]$^+$、94.062 5[M+H−CO_2]$^+$、79.094 9[M+H−CO_2−CH_3]$^+$	葫芦巴碱

F：黄酮类；T：三萜类；A：生物碱类；O：有机酸类；G：其他类；t：靶向分析；n：非靶向分析；*：与对照品比对的化合物；#：鸡骨草中首次报道的化合物

续表1

序号	t/min	化学式	准分子离子峰实测值(m/z)	偏差	碎片离子(m/z)	化合物名称
A2[t]	4.50	$C_{12}H_{14}N_2O_2$	219.114 0[M+H]$^+$	2.7	188.067 7[M+H−CH_3−NH_2]$^+$、170.060 7[M+H−CH_3−NH_2−H_2O]$^+$、143.074 4[M+H−CH_3−NH_2−CO_2]$^+$、132.079 3[M+H−$C_3H_5NO_2$]$^+$	相思子碱[15]
A3[st]	5.30	$C_{14}H_{18}N_2O_2$	247.144 3[M+H]$^+$	−1.2	188.071 0[M+H−C_5H_9N]$^+$、143.072 9[M+H−C_5H_9N−CO_2]$^+$、118.065 2[M+H−C_5H_9N−CO_2−C_2H_3]$^+$	下箴刺桐碱
O1[ad]	0.90	$C_6H_{12}O_7$	195.051 3[M−H]$^-$	1.2	129.020 8[M−H−CH_6O_3]$^-$、99.008 9[M−H−$C_3H_8O_4$]$^-$、87.010 7[M−H−$C_2H_8O_4$]$^-$	gluconic acid
O2[ad]	1.00	$C_6H_8O_7$	191.020 5[M−H]$^-$	0.3	173.008 7[M−H−H_2O]$^-$、128.038 1[M−H−CO_2−H_2O]$^-$、111.011 3[M−H−CO_2−2H_2O]$^-$	异柠檬酸[16−17]
O3[ad]	1.35	$C_6H_8O_7$	191.020 9[M−H]$^-$	0.5	173.007 2[M−H−H_2O]$^-$、128.063 3[M−H−CO_2−H_2O]$^-$、111.009 8[M−H−CO_2−2H_2O]$^-$	柠檬酸[16−17]
O4[n]	3.76	$C_7H_6O_4$	153.019 5[M−H]$^-$	2.1	109.029 4[M−H−CO_2]$^-$	原儿茶酸[18]
O5[n]	7.24	$C_7H_6O_3$	139.039 0[M+H]$^+$	−3.6	124.056 4[M+H−CH_3]$^+$	邻羟基苯甲酸
G1[t]	1.33	$C_5H_5N_5$	136.062 0[M+H]$^+$	2.6	119.036 0[M+H−NH_3]$^+$	腺嘌呤
G2[t]	1.50	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	268.108 5[M+H]$^+$	5.3	136.061 8[M+H−$C_5H_8O_4$]$^+$	腺嘌呤核苷
G3[ad]	1.76	$C_6H_{10}O_5$	161.045 7[M−H]$^-$	2.3	146.010 1[M−H−CH_3]$^-$、117.017 3[M−H−C_2H_4O]$^-$	重碳酸二乙酯
G4[t]	4.34	$C_{16}H_{18}O_9$	355.103 1[M+H]$^+$	0.6	235.057 9[M+H−$C_6H_8O_4$]$^+$、188.075 7[M+H−Glu−CH_3]$^+$、142.067 6[M+H−Glu−CH_3−2CO]$^+$	isobiflorin[19]
G5[t]	5.30	$C_{16}H_{18}O_9$	355.102 3[M+H]$^+$	−1.7	235.059 2[M+H−$C_6H_8O_4$]$^+$、188.070 5[M+H−Glu−CH_3]$^+$、142.065 0[M+H−Glu−CH_3−2CO]$^+$	biflorin[19]
G6[t]	12.34	$C_{18}H_{17}NO_5$	328.117 6[M+H]$^+$	−2.3	147.043 2[M+H−$C_9H_{11}NO_3$]$^+$、119.049 4[M+H−$C_9H_{11}NO_3$−CO]$^+$、91.054 6[M+H−$C_9H_{11}NO_3$−2CO]$^+$	顺式-*N*-(4-羟基桂皮酰)酪氨酸
G7[n]	14.81	$C_{18}H_{17}NO_5$	328.117 1[M+H]$^+$	−4.3	147.044 3[M+H−$C_9H_{11}NO_3$]$^+$、119.048 8[M+H−$C_9H_{11}NO_3$−CO]$^+$、91.054 7[M+H−$C_9H_{11}NO_3$−2CO]$^+$	反式-*N*-(4-羟基桂皮酰)酪氨酸
G8[n]	15.54	$C_{36}H_{38}N_2O_{10}$	653.212 3[M−H]$^-$	−1.8	472.143 7[M−H−$C_9H_{11}NO_3$]$^-$、364.051 1[M−H−$C_{16}H_{19}NO_4$]$^-$、206.047 2[M−H−2$C_{11}H_{14}NO_4$]$^-$	鸡骨草甲素
G9[n]	15.56	$C_{15}H_{10}O_5$	271.059 9[M+H]$^+$	−0.6	216.034 4[M+H−2CO]$^+$	大黄素
G10[n]	16.01	$C_{36}H_{38}N_2O_{10}$	653.212 2[M−H]$^-$	−2.8	472.139 1[M−H−$C_9H_{11}NO_3$]$^-$、364.052 3[M−H−$C_{16}H_{19}NO_4$]$^-$、206.047 7[M−H−2$C_{11}H_{14}NO_4$]$^-$	鸡骨草乙素
G11[t]	18.89	$C_{16}H_{12}O_5$	285.075 9[M+H]$^+$	0.6	270.051 3[M+H−CH_3]$^+$、253.051 9[M+H−OCH_3]$^+$、225.051 8[M+H−OCH_3−CO]$^+$	大黄素甲醚

3.1 黄酮类成分鉴定

从鸡骨草中鉴定出19种黄酮类化合物，主要包括黄酮碳苷类和黄酮苷元类，其中有7种化合物经对照品比对确证。

3.1.1 黄酮碳苷类 黄酮碳苷类成分的裂解方式常以糖环的交叉环切除反应为主，五碳糖结构常发生$C_3H_6O_3$(90 Da)、$C_2H_4O_2$(60 Da)等中性丢失产生相应的碎片离子，六碳糖结构常发生$C_4H_8O_4$(120 Da)、$C_3H_6O_3$(90 Da)等中性丢失产生相应的碎片离子[9]。本研究以化合物F6为例详细介绍其鉴定过程。化合物F6的准分子离子峰为*m/z* 563.140 9[M−H]$^-$，推测其化学式为$C_{26}H_{28}O_{14}$。碎片离子*m/z* 473.109 2[M−H−$C_3H_6O_3$]$^-$、443.099 0[M−H−$C_4H_8O_4$]$^-$、383.078 4[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_2H_4O_2$]$^-$和353.068 1[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_3H_6O_3$]$^-$可由准分子离子峰发生特征中性丢失$C_3H_6O_3$(90 Da)、$C_4H_8O_4$(120 Da)、$C_6H_{12}O_6$(180 Da)、$C_7H_{14}O_7$(210 Da)产生。此外，碎片离子*m/z* 353.068 1继续丢失1分子CO，获得碎片离子*m/z* 325.073 0[M−H−$C_4H_8O_4$−$C_3H_6O_3$−CO]$^-$；碎片离子*m/z* 545.129 4[M−H−H_2O]$^-$可由准分子离子峰丢失1分子H_2O产生。通过与文献[6—10]和对照品比对鉴定化合物F6为夏佛塔苷，其在负离子模式下的质谱图及可能的质谱裂解途径见图2。

3.1.2 黄酮苷元类 本类黄酮成分常发生C环的逆迪尔斯阿尔德裂解(Retro Diels-Alder reaction，RDA)和CH_3、CO的中性丢失[6]。本研究以化合物F17为例详细介绍该类成分的鉴定过程。化合物F17的准分子离子峰为*m/z* 267.066 6[M−H]$^-$，推测其化学式为$C_{16}H_{12}O_4$。准分子离子峰分别发生1分子CH_3和1分子CO中性丢失，得到碎片离子*m/z* 252.047 0[M−H−CH_3]$^-$和*m/z* 239.172 4[M−H−CO]$^-$；准分子离子峰在C环1，3处发生RDA裂解，得到碎片离子*m/z* 132.022 3[M−H−$C_7H_5O_3$]$^-$。经与数据库和对照品比对，鉴定化合物F17为芒柄花素，其在负离子模式下的质谱图及可能的质谱裂解途径见图3。

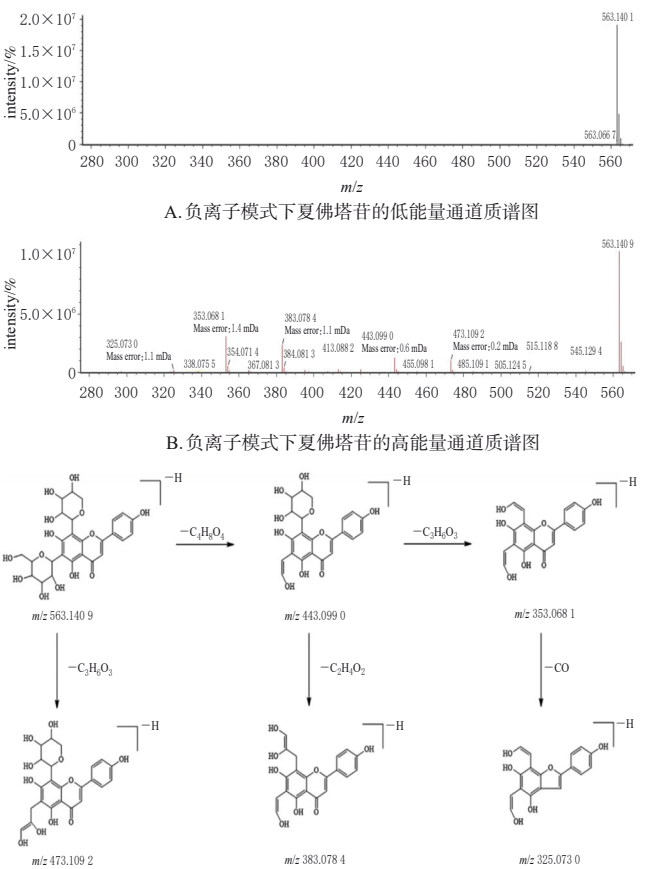
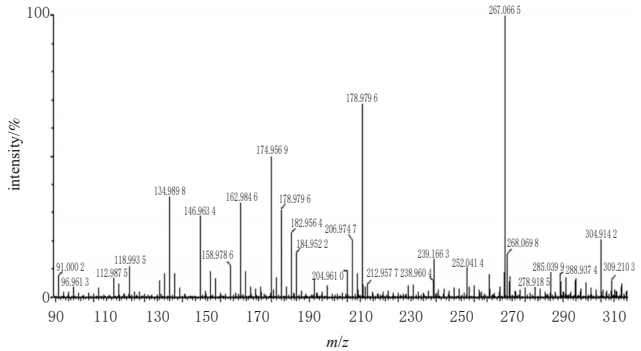
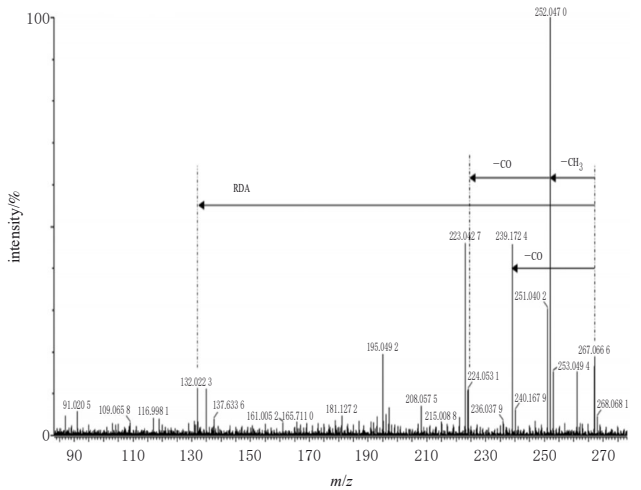


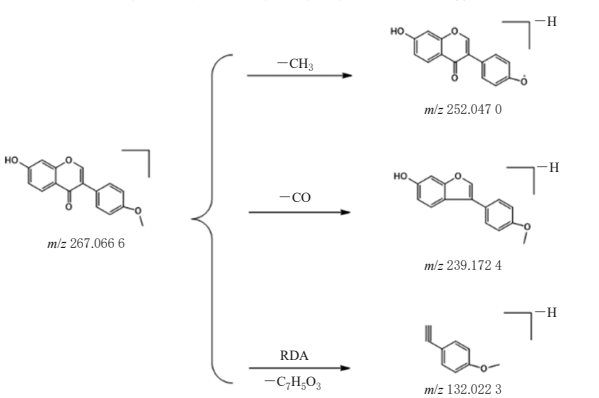
图2 负离子模式下夏佛塔苷的质谱图和可能的质谱裂解途径



A. 负离子模式下芒柄花素的低能量通道质谱图



B. 负离子模式下芒柄花素的高能量通道质谱图

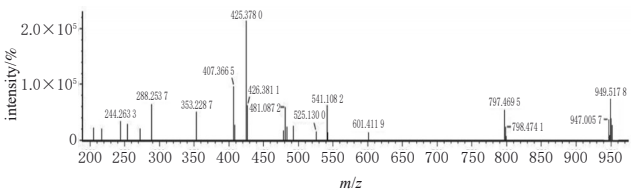


C. 负离子模式下芒柄花素可能的质谱裂解途径

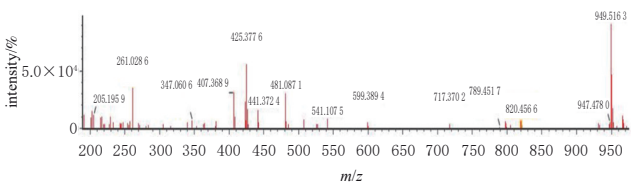
图3　负离子模式下芒柄花素的质谱图和可能的质谱裂解途径

3.2　三萜类

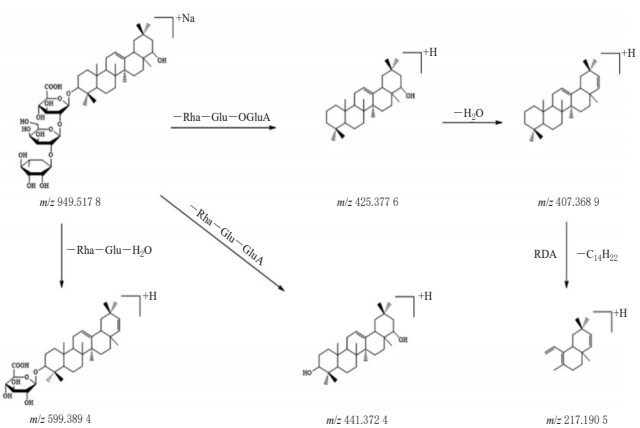
在本研究中，三萜类成分的出峰顺序较靠后，共鉴定出8种三萜类化合物，该类化合物的裂解规律如下：(1)易脱去糖基、H_2O、CO等中性分子；(2)在B、C环发生断裂，产生相应的碎片峰；(3)具有Δ^{12}-齐墩果烯结构的三萜类化合物，C环易发生RDA[11]。本研究以化合物T3为例详细介绍其鉴定过程。低能量通道质谱图显示，化合物T3的加合离子峰为*m/z* 949.517 8$[M+Na]^+$，推测其化学式为$C_{48}H_{78}O_{17}$。高能量通道质谱图显示，碎片离子*m/z* 599.389 4$[M+H-Rha-Glu-H_2O]^+$可由母离子丢失1分子鼠李糖、葡萄糖和H_2O产生；碎片离子*m/z* 441.372 4$[M+H-Rha-Glu-GluA]^+$可由母离子丢失1分子鼠李糖、葡萄糖和葡萄糖醛酸产生；碎片离子*m/z* 425.377 6$[M+H-Glu-Rha-OGluA]^+$可由糖苷结构脱去糖链产生，其继续丢失1分子H_2O可产生碎片离子*m/z* 407.368 9，继续发生RDA产生*m/z* 217.190 5$[M+H-Glu-Rha-OGluA-H_2O-C_{14}H_{22}]^+$的碎片。经与参考文献[11—14]和数据库匹配，鉴定化合物T3为槐花皂苷Ⅲ，其在正离子模式下的质谱图及可能的质谱裂解途径见图4。



A. 正离子模式下槐花皂苷Ⅲ的低能量通道质谱图



B. 正离子模式下槐花皂苷Ⅲ的高能量通道质谱图

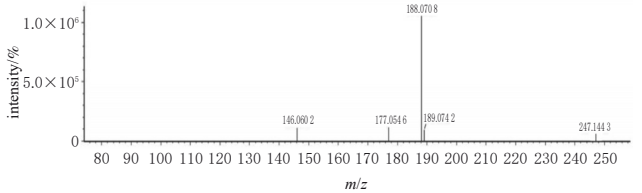


C. 正离子模式下槐花皂苷Ⅲ可能的质谱裂解途径

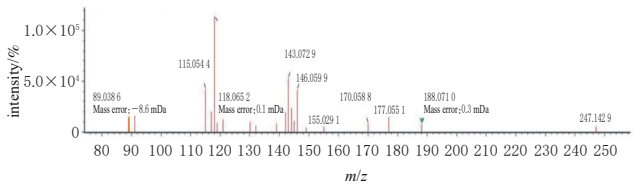
图4　正离子模式下槐花皂苷Ⅲ的质谱图及可能的质谱裂解途径

3.3　生物碱类

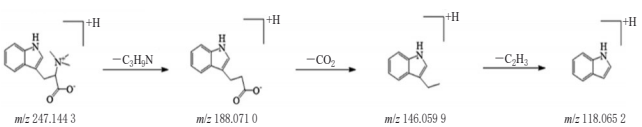
在鸡骨草中共鉴定出3种生物碱类化合物，其中有2种经对照品对比确证。经分析对照品和样品中生物碱的质谱裂解途径，笔者发现该类生物碱支链易发生裂解，母核不易发生裂解。本研究以化合物A3为例详细介绍其鉴定过程。化合物A3的准分子离子峰为*m/z* 247.144 3$[M+H]^+$，推测其化学式为$C_{14}H_{18}N_2O_2$。在正离子模式下，准分子离子峰相继脱去1分子三甲胺、1分子CO_2、1分子亚甲基分别形成碎片离子*m/z* 188.071 0$[M+H-C_3H_9N]^+$、*m/z* 143.072 9$[M+H-C_3H_9N-CO_2]^+$和*m/z* 118.065 2$[M+H-C_3H_9N-CO_2-C_2H_3]^+$。经与数据库和对照品比对，鉴定化合物A3为下箴刺桐碱，其在正离子模式下的质谱图及可能的质谱裂解途径见图5。



A. 正离子模式下下箴刺桐碱的低能量通道质谱图



B. 正离子模式下下箴刺桐碱的高能量通道质谱图



C. 正离子模式下下箴刺桐碱可能的质谱裂解途径

图5　正离子模式下下箴刺桐碱的质谱图及可能的质谱裂解途径

3.4　有机酸类

在鸡骨草中共鉴定出5种有机酸类成分。该类化合物的质谱裂解特点为易发生CO_2、H_2O等中性丢失[5,7]。本研究以化合物O2为例详细介绍其鉴定过程。化合物O2的准分子离子峰为*m/z* 191.020 5$[M-H]^-$，推测其化学式为$C_6H_8O_7$。准分子离子峰连续脱去1分子H_2O、1分子CO_2、1分子H_2O分别形成碎片离子*m/z* 173.008 7$[M-H-H_2O]^-$、*m/z* 128.038 1$[M-H-CO_2-H_2O]^-$和*m/z* 111.011 3$[M-H-CO_2-2H_2O]^-$。此外，化合物O3的准分子离子峰、碎片离子峰与化合物O2相似，推测其互为同分异构体。经与文献[16-17]和数据库比对，鉴定化合物O2为异柠檬酸，化合物O3为柠檬酸（图略）。

3.5　其他类

本研究在鸡骨草中共鉴定出11种其他类成分，主要为蒽醌类、酰胺类化合物。以化合物G2为例介绍其鉴定过程。化合物G2的准分子离子峰为*m/z* 268.108 5$[M+H]^+$，推测其化学式为$C_{10}H_{13}N_5O_4$。准分子离子峰脱去1分子核苷产生碎片离子*m/z* 136.061 8$[M+H-C_5H_8O_4]^+$。经与文献[18]和数据库比对，鉴定化合物G2为腺嘌呤核苷（图略）。

4　讨论

本研究基于UPLC-Q-TOF/MS获得的高分辨前体离子信息和丰富的碎片离子信息可为鸡骨草化学成分解析提供充足的数据支撑。结合UNIFI平台，基于色谱峰提取、数据库靶向筛选和碎片离子注释等功能，可实现对目标化学成分的快速定性分析，大大减少质谱数据后处理的盲目性和耗时性。但本研究也存在一些方法上的不足：（1）难以区分结构相似的同分异构体。如本研究中低能量通道质谱图显示，在保留时间为9.01、9.40、10.36 min的位置均出现了*m/z* 563的色谱峰，其高能量通道质谱图的碎片离子也相似。采用UNIFI平台对3个色谱峰进行分析，UNIFI将3个色谱峰均匹配为夏佛塔苷，出现了假阳性结果。经与文献[8—9，20]和对照品比对，最终将这3个色谱峰依次鉴定为夏佛塔苷、维采宁-Ⅲ、异夏佛塔苷。（2）UNIFI平台的碎片离子注释需进一步验证或修正。如化合物F6的碎片离子*m/z* 383.078 4，UNIFI平台提供的碎片离子注释为母核糖苷键断裂丢失1分子六碳糖和五碳糖上的1分子H_2O，而实际的断裂是由于六碳糖和五碳糖发生糖环的交叉环切反应[9]。当前，UPLC-Q-TOF/MS结合UNIFI平台的分析方法对于结构相似的同分异构体的鉴定还需要通过与对照品、文献数据比较及疏水常数分析等方法进一步验证。碎片离子注释信息对化学成分的解析提供了很大的帮助，但对于复杂的裂解，仍需要结合文献进行分析。

综上所述，本研究建立了UPLC-Q-TOF/MS结合UNIFI平台的分析方法，实现了对鸡骨草化学成分的快速鉴定。从鸡骨草中鉴定出了46种化合物，包括黄酮类化合物19个、三萜类化合物8个、生物碱类化合物3个、有机酸类化合物5个、其他类化合物11，其中11种化合物在鸡骨草中首次报道，9种化合物经过对照品比对确证。本研究初步阐明了壮药鸡骨草的主要化学成分，可为鸡骨草药效物质及作用机制的深入研究、质量标准的提升提供数据支撑，研究方法可为其他中药化学成分的快速分析提供参考。

参考文献

[1] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：203.

[2] 徐柯心，贾子尧，王宝丽，等. 鸡骨草化学成分研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报，2017，19(7)：125-129.

[3] 于苗苗. 鸡骨草化学成分研究[D]. 长沙：湖南师范大学，2019.

[4] 徐柯心，王宝丽，贾子尧，等. UPLC同时测定鸡骨草中2种生物碱和2种黄酮碳苷的含量[J]. 药物分析杂志，2017，37(4)：610-614.

[5] CHEN K K，LIU J，MA Z C，et al. Rapid identification of chemical constituents of *Rhodiola crenulata* using liquid chromatography-mass spectrometry pseudotargeted analysis[J]. J Sep Sci，2021，44(20)：3747-3776.

[6] 李剑豪，杨天歌，张娜，等. UPLC-Q-TOF-MS^{E}技术结合UNIFI筛查平台快速分析刺梨籽中化学成分[J]. 质谱学报，2020，41(1)：76-86.

[7] 丁玉莲. 中药铁皮石斛的化学成分分析[D]. 上海：上海中医药大学，2019.

[8] 周子力. 广金钱草中三种黄酮碳苷的制备与含量测定[D]. 成都：西南交通大学，2013.

（下转第2863页）