

· 药学基础 ·

基于UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS的紫苏叶与紫苏梗 化学成分分析

亢倩丽, 李壮壮, 范珊珊, 容蓉, 蒋海强, 姜晓琳, 张继秋, 巩丽丽*
(山东中医药大学 药学院, 实验中心, 济南 250355)

[摘要] 目的:建立液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)对紫苏叶与紫苏梗成分定性分析的方法,探讨紫苏叶与紫苏梗药效差异的物质基础。方法:80%甲醇超声提取紫苏叶与紫苏梗药材,利用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)技术对样品进行定性分析,采用Halo-C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm),流动相0.05%甲酸水溶液-0.05%甲酸乙腈,梯度洗脱,流速0.3 mL·min⁻¹,柱温40 °C,进样量5 μL,采用正、负离子2种监测模式。结果:根据对照品的保留时间,Xcalibur软件的精确相对分子质量、准分子离子峰、碎片离子,相关文献和Mass Frontier 7.0软件对紫苏中的化学成分进行识别和鉴定。共鉴定出4种氨基酸类,7种苯丙素类,10种黄酮类,12种三萜类,7种有机酸类,4种脂肪酸类成分,10个未知成分,其中算盘子酮等6种三萜酸首次在紫苏中鉴定出,共54种化合物,对其中5种不同特征的化合物进行了结构解析。紫苏叶中有45种成分,紫苏梗中有32种成分,二者有23种共有成分。结论:LC-MS技术能够快速有效地对紫苏进行成分鉴定,该研究为紫苏不同部位的质量控制、开发利用提供重要的实验理论依据。

[关键词] 紫苏叶; 紫苏梗; 液相色谱-质谱联用技术; 成分鉴定; 三萜酸

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)13-0156-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201512

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200414.1422.001.html>

[网络出版日期] 2020-4-14 15:05

Qualitative Analysis on *Perilla frutescens* Leaves and Stalks by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

KANG Qian-li, LI Zhuang-zhuang, FAN Shan-shan, RONG Rong, JIANG Hai-qiang, JIANG Xiao-lin,
ZHANG Ji-qiu, GONG Li-li*

(Experience Center, School of Pharmaceutical Science, Shandong University of Traditional Chinese
Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for qualitative analysis of components in *Perilla frutescens* leaves and stalks by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), so as to explore the substance basis of pharmacodynamics differences between *P. frutescens* leaves and stalks. **Method:** *P. frutescens* leaves and stalks were extracted by 80% methanol-water ultrasound. The samples were analyzed by UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS comprehensively. Halo-C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm) was used for gradient elution with 0.05% formic acid aqueous-0.05% acetonitrile formate as mobile phase in positive and negative ion modes. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 5 μL. **Result:** The chemical compound in *P. frutescens* was deduced and identified based on the retention time of chromatography, and the exact molecular weight, excimer ion peaks, fragment ions and

[收稿日期] 20191201(008)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09711001-003-004);山东省重点研发计划项目(2017CXGC1309)

[第一作者] 亢倩丽,在读硕士,从事中药及复方活性成分与质量控制研究,Tel:0531-89628192,E-mail:1391824910@qq.com

[通信作者] *巩丽丽,博士,副教授,从事中药质量控制与仪器分析研究,Tel:0531-89628192,E-mail:gonglily@163.com

reference materials in Xcalibur software. The chemical composition of *P. frutescens* was identified by Mass Frontier 7.0 software. Totally 4 amino acids, 7 phenylpropanoids, 10 flavonoids, 12 triterpenoids, 7 organic acids, 4 fatty acids, 10 unknown compounds and 54 compounds were identified. Among them, 6 triterpene acids, including glochidone, were identified in *P. frutescens* for the first time. The structures of five characteristic compounds were analyzed. There were 45 constituents in *P. frutescens* leaves and 32 constituents in *P. frutescens* stalks. They had 23 common constituents. **Conclusion:** LC-MS can identify the components of *P. frutescens* rapidly and effectively. This study provides an important theoretical basis for the quality control of different parts of *P. frutescens* and the development and utilization of *P. frutescens*.

[Key words] *Perilla frutescens* leaves; *P. frutescens* stalk; liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS); component identification; triterpene acid

紫苏为唇形科紫苏属草本植物,性味辛温,为常用解表药之一,在某些地区也被当做蔬菜、茶饮、调味品。主产于东南亚国家,中国台湾、江西、湖南等中南部地区、喜马拉雅山脉地区,日本、缅甸、朝鲜半岛、印度、尼泊尔也均引进此种。紫苏地上不同部分均可入药,茎叶称紫苏叶,老茎称紫苏梗,果实称紫苏籽。紫苏叶、紫苏梗性味均为辛、温,其中紫苏叶归肺、脾经,功效解表散寒、行气和胃,用于风寒感冒、咳嗽呕恶、妊娠呕吐及鱼蟹中毒等症;紫苏梗归肺、脾经,功效理气宽中、止痛、安胎,用于胸膈痞闷、胃脘疼痛、暖气呕吐、胎动不安等症^[1]。现代药理研究表明,紫苏具有免疫调节、抗菌、抗病毒、镇静、解热、镇痛、抗炎、抗过敏等药理活性^[2]。据报道紫苏中主要化学成分是挥发油、脂肪酸、黄酮、酚酸、萜类^[3],此外还含有少量无机元素和维生素。挥发油的含量较高,具有强烈而独特的香气,主要成分是紫苏酮,紫苏醛, β -石竹烯等^[4];非挥发性成分中的主要成分是酚酸类,黄酮类和三萜酸类化合物,相关研究证明这三类成分对紫苏的药效贡献度较大^[5-7],并展现出与挥发性成分不同的药效。不同入药部位化学成分的差异必然会影响到药理活性与食用价值,因此在大规模地开发利用之前,有必要对紫苏叶与紫苏梗药效差异的物质基础进行充分研究。采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术对紫苏叶和紫苏梗中的挥发油进行表征与对比的研究较多^[4,8-9],对二者非挥发性成分差异鲜有研究,为全面阐释紫苏叶与紫苏梗药效差异物质基础,对比研究紫苏叶与紫苏梗非挥发性成分已成为亟待解决的问题。

近年来,LC-MS技术已在中药及复方的化学成分定性分析中展现出独特优势,为复杂的非挥发性成分的鉴定提供了便捷快速的解决方案。本实验采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨

质谱(UPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS)技术对紫苏叶和紫苏梗的80%甲醇提取物进行快速定性分析,结合一级、二级质谱数据,对照品保留时间信息,相关文献及Mass Frontier 7.0软件,共鉴定出54种化合物,包括氨基酸类、苯丙素类、黄酮类、三萜酸类、有机酸类、脂肪酸类,其中算盘子酮,朦朧木酸,灵芝醇A,白桦酯醇,奈博类固醇D或E,香树脂醇6种三萜酸首次在紫苏植物中发现,拓宽了紫苏的药理作用,为紫苏中的三萜酸类成分的提取分离与研究开发提供理论基础^[10-11]。本研究以紫苏叶、紫苏梗为研究对象,采用LC-MS技术对紫苏叶、紫苏梗提取液进行定性分析,比较二者化学成分的差异,为不同入药部位的紫苏药材的药效差异提供理论研究,为紫苏的质量控制、临床合理用药、不同部位成分的研究与开发提供了科学依据。

1 材料

四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪串联Ultimate 3000型超高效液相色谱系统(美国赛默飞世尔科技公司);CPA225D型1/10万分析天平(德国Sartorius公司);KQ-250DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);5418 Centrifuge型离心机(美国Eppendorf公司);QE-200型中草药粉碎机(浙江屹立工贸有限公司);色谱纯级乙腈、甲醇(美国Thermo Fisher Scientific公司);色谱纯级甲酸(美国Tedia公司);其余试剂均为分析纯(上海国药集团化学试剂有限公司)。

紫苏梗和紫苏叶购自安徽亳州,经山东中医药大学徐凌川教授鉴定为唇形科植物紫苏*Perilla frutescens*的干燥叶(或带嫩枝)和干燥茎。酪氨酸、迷迭香酸、丹参素、原儿茶酸、齐墩果酸、木犀草素、亚油酸、棕榈酸、木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为L-042-170502, M-034-171226, D-036-171216, Y-031-

140801, Q-044-170608, M-029-161121, Y-012-170507, Z-012-170507, M-036-171109, 纯度均 $\geq 98\%$ 。

2 方法

2.1 对照品溶液制备 精密称取酪氨酸 5.373 4 mg, 迷迭香酸 4.892 5 mg, 丹参素 5.356 7 mg, 原儿茶酸 5.765 9 mg, 齐墩果酸 4.884 6 mg, 木犀草素 5.281 4 mg, 亚油酸 4.685 mg, 棕榈酸 5.047 9 mg, 木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷 5.386 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加入 80% 甲醇溶解并定容, 制备单一对照品储备液。

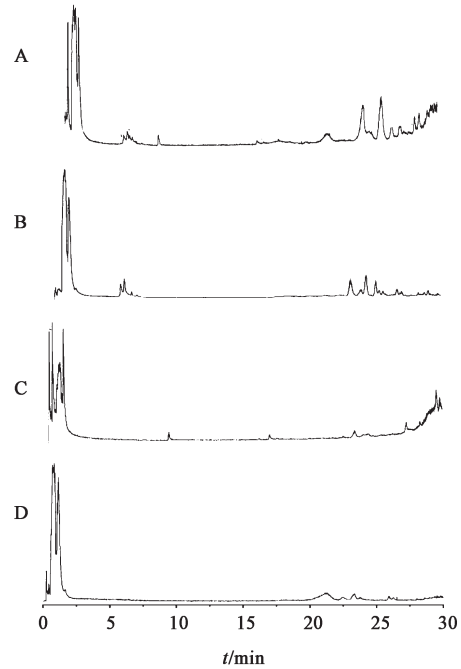
2.2 供试品溶液制备 取紫苏叶和紫苏梗药材适量, 粉碎, 过 2 号, 4 号筛, 分别称取 0.5 g, 置于具塞玻璃瓶中, 加入 80% 甲醇溶液 10 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理(功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 补足减失质量, 提取液离心($13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min, 取上清, 过 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜, 取续滤液, 得供试品溶液。

2.3 液相色谱及质谱条件 液相色谱条件: Halo- C_{18} 色谱柱 ($2.1\ \text{mm}\times 100\ \text{mm}$, $2.7\ \mu\text{m}$), 流动相 0.05% 甲酸水溶液(A)-0.05% 甲酸乙腈溶液(B), 梯度洗脱程序(0~2.5 min, 2%~7%B; 2.5~4 min, 7%~21%B; 4~14 min, 21%~37%B; 14~23 min, 37%~75%B; 23~30 min, 75~100%B); 流速设定 $0.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 $40\ ^\circ\text{C}$, 进样量 $5\ \mu\text{L}$ 。

质谱条件: 正离子模式, 离子源 HESI, 毛细管电压 3 500 V, 毛细管温度 $350\ ^\circ\text{C}$, 离子源温度 $350\ ^\circ\text{C}$, 质谱采集范围 $m/z\ 50\sim 1\ 000$, 分辨率 70 000, S-Lens RF Level 55。负离子模式, 离子源 HESI, 毛细管电压 3 000 V, 毛细管温度 $350\ ^\circ\text{C}$, 离子源温度 $350\ ^\circ\text{C}$, 质谱采集范围 $m/z\ 50\sim 1\ 000$, 分辨率 70 000, S-Lens RF Level 55。阶梯碰撞能量 20, 40, 60 V。

3 结果

取 2.1, 2.2 项下对照品储备液及紫苏叶和紫苏梗供试品溶液, 按 2.3 项下色谱质谱条件进行分析, 分别得到正、负离子模式下紫苏叶和紫苏梗的总离子流见图 1。根据实际测得的相对分子质量与理论相对分子质量二者偏差小于 5 ppm, 同位素丰度比, 氮规则等原则, 结合 Xcalibur 软件的精确相对分子质量数, 一级、二级质谱碎片信息, 对照品的标准图谱, 相关文献, 并结合 Mass Frontier 7.0 软件进行碎裂辅助推断和验证, 共鉴定出 54 种化合物。被鉴定的化学成分的相对保留时间、分子式、一级质谱数据及二级质谱碎片离子等信息见表 1。



A. 紫苏叶正离子; B. 紫苏叶负离子; C. 紫苏梗正离子; D. 紫苏梗负离子

图 1 紫苏叶及紫苏梗正、负离子模式 TIC

Fig. 1 Total ion chromatogram of negative and positive modes of *Perilla frutescens* leaves and stalks

3.1 苯丙素类成分的鉴定 紫苏中苯丙素类化合物较多, 尤其是苯丙酸类^[7]。将迷迭香酸对照品注入系统, 获得其 MS^1 和 MS^2 图谱。 MS^1 显示该化合物的准分子离子峰为 $m/z\ 361.091\ 7\ [\text{M}+\text{H}]^+$, 与其分子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$ 相符; MS^2 图谱中主要的碎片离子为 $m/z\ 181.049\ 9, 163.039\ 9$, 归属各碎片离子分别为结构中 C-O 键断裂、失去 1 个分子水即 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4]^+$, $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4-\text{H}_2\text{O}]^+$ 。咖啡酸 MS^1 显示该化合物的准分子离子峰为 $m/z\ 181.049\ 1\ [\text{M}+\text{H}]^+$, 与其分子式 $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ 相符; MS^2 图谱中主要的碎片离子为 $m/z\ 135.044\ 1$, 归属碎片离子为失去 1 个分子 COOH 即 $[\text{M}+\text{H}-\text{COOH}]^+$ 。

3.2 氨基酸类成分的鉴定 紫苏中氨基酸类成分在正离子模式下响应较好。将酪氨酸对照品注入系统, 获得其 MS^1 和 MS^2 图谱。以酪氨酸为例, 阐述氨基酸类化合物的质谱行为, MS^1 显示该化合物的准分子离子峰为 $m/z\ 182.080\ 9\ [\text{M}+\text{H}]^+$, 与其分子式 $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 相符; MS^2 图谱给出主要的碎片离子为 $m/z\ 136.075\ 5, 165.054\ 3$, 归属各碎片离子分别为 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}_2]^+$, $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$, 通过比对碎片离子可以快速确定几种氨基酸成分。

3.3 黄酮类成分的鉴定 紫苏中黄酮类成分较多,

表1 紫苏成分的鉴定

Table 1 Characterization of constituents of *Perilla frutescens* leave and stalk

No.	t_R /min	准分子离子峰	分子式	δ /ppm	二级碎片	化合物	化合物 类型	分布
1	0.54	241.106 7[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	-1.45	223.096 1, 197.990 5	3,4'-二羟基-3'-甲氧基苯并戊二酸 ^[11]	有机酸	L
2*	0.59	197.045 0[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	-2.77	179.034 3, 152.893 9	丹参素 ^[11]	有机酸	L/S
3	0.61	268.103 5[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	0.00	136.061 5	腺苷 ^[11]	氨基酸	S
4	0.70	191.019 3[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	-2.09	173.008 3, 128.034 1	柠檬酸 ^[11]	有机酸	L/S
5*	0.80	182.080 9[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₃	-1.48	136.075 5, 165.054 3	酪氨酸 ^[11]	氨基酸	S
6	0.81	137.024 2[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₃	-1.46	94.032 3, 75.014 2	原儿茶醛 ^[12]	有机酸	L/S
7	0.83	375.104 2[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	-8.65	163.038 6, 150.077 1	迷迭香酸甲酯 ^[12]	苯丙素类	L
8*	0.87	153.019 0[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₄	-1.96	109.030 5	原儿茶酸 ^[12]	有机酸	L/S
9	1.13	204.086 2[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	0.00	159.036 1, 142.026 2	色氨酸 ^[11]	氨基酸	S
10	1.34	195.064 8[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-1.98	135.013 5, 107.085 5	阿魏酸 ^[13]	苯丙素	L/S
11	1.41	130.049 7[M+H] ⁺	C ₅ H ₇ NO ₃	-1.54	98.512 3, 84.081 2, 87.004 4	焦谷氨酸 ^[14]	氨基酸	L/S
12	1.71	169.048 7[M+H] ⁺	C ₈ H ₈ O ₄	-4.73	146.961 1, 128.950 6	香草酸 ^[12]	有机酸	L
13	2.72	227.127 2[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	-2.58	149.023 0, 209.116 7, 154.989 9	茉莉酸 ^[11]	有机酸	L
14	4.24	193.049 1[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₈ O ₄	-2.07	179.070 2, 161.059 2, 107.960 1	东莨菪内酯 ^[15]	生物碱	L/S
15	4.35	595.164 7[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-1.76	327.200, 209.116 7, 154.989 9	芹菜素-7-O-咖啡酰葡萄糖苷 ^[11]	黄酮苷	L/S
16	4.40	163.038 6[M+H] ⁺	C ₉ H ₆ O ₃	-1.84	145.049 3, 135.043 9, 117.091 0	7-羟基香豆素 ^[15-16]	苯丙素	L
17	4.58	449.107 1[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-1.64	285.038 5	木犀草苷 ^[17]	黄酮苷	L
18*	4.94	287.053 9[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-3.88	153.094 2, 135.116 5	木犀草素 ^[11,18]	黄酮	L
19	4.95	461.072 3[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	-0.43	285.040 9, 175.024 0, 357.063 8	木犀草素-7-O-葡萄糖醛酸苷 ^[17]	黄酮苷	L/S
20	5.03	449.106 8[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-0.45	303.882 7	槲皮苷 ^[17]	黄酮苷	S
21*	5.04	637.104 9[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₈	0.47	351.057 1, 285.040 9, 193.034 7	木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷 ^[19]	黄酮苷	L/S
22	5.11	433.112 0[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-2.13	253.113 4, 313.076, 271.059 1	芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 ^[19]	黄酮苷	L
23*	5.44	361.091 7[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	-0.26	163.039 9, 181.049 9	迷迭香酸 ^[11]	苯丙素	L/S
24	5.57	181.049 1[M+H] ⁺	C ₉ H ₈ O ₄	-2.40	135.044 1	咖啡酸 ^[11]	苯丙素	L/S
25	5.80	271.059 2[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-3.32	119.089 6, 149.023 1, 225.111 6	芹菜素 ^[19]	黄酮	L
26	6.18	303.049 9[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-0.10	274.170 1, 153.127 1, 109.026 6, 137.987 2	槲皮素 ^[19]	黄酮	L
27	6.23	721.174 8[M+H] ⁺	C ₃₆ H ₃₂ O ₁₆	-2.10	361.090 7, 199.987 3	沙利酸 ^[12]	有机酸	L/S
28	8.36	593.186 5[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	0.03	447.091 1, 285.038 7	刺槐黄素-7-O-芸香苷 ^[11]	黄酮苷	L
29	9.03	200.236 8[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₃₀ N	-0.20	128.950 6, 158.960 9, 146.961 0	未知		S
30	16.15	318.299 8[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	-1.48	300.201, 256.174 9, 102.128 0	2-amino-octadecane-1, 3, 4-triol ^[11]	烷醇	L
31	17.28	455.351 1[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	-1.76	409.344 7, 205.159 7, 381.900 9	白桦脂酮酸 ^[20]	三萜酸	L/S
32	18.00	473.362 5[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	0.00	409.345 6, 455.351 0, 437.340 6	臞朧木酸 ^[20]	三萜酸	L/S
33	18.21	473.361 6[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-1.98	200.236 8, 270.314 8	常春藤皂苷元 ^[21]	三萜酸	L
34	22.37	439.357 3[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₂	0.68	393.351 7, 259.169 3, 137.132 6	灵芝醇A ^[20]	三萜酸	L
35*	23.15	457.367 6[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	-0.05	439.359 9, 411.363 3, 249.185 4, 203.170 9, 191.179 1	齐墩果酸 ^[10,20]	三萜酸	L/S
36	24.02	439.356 0[M+H] ⁺	C ₂₈ H ₄₅ ON ₃	0.07	191.178 9, 203.179 0, 249.184 2	未知		L
37	24.12	339.230 0[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₃₀ O ₂	0.27	163.110 5, 324.208 6, 148.087 4	未知		L
38	24.18	423.363 7[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O	3.78	405.352 4, 215.179 9	算盘子酮 ^[20]	三萜酸	L/S

续表 1

No.	t_R /min	准分子离子峰	分子式	δ /ppm	二级碎片	化合物	化合物 类型	分布
39	24.32	342.241 8[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₉ ON ₄	0.12	164.115 0, 195.589 2, 297.244 5	未知		L
40	24.88	369.210 0[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₂₈ O ₄	-0.14	281.249 0, 108.043 9, 160.212 9	未知		L
41 [*]	25.06	279.233 0[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	0.00	261.222 7, 178.879 3	亚油酸 ^[22]	脂肪酸	L/S
42	25.24	443.388 1[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	1.80	425.311 4, 191.179 5, 235.205 9	白桦酯醇 ^[20]	三萜酸	L/S
43	25.99	473.361 9[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	-1.34	295.225 8, 277.215 5	科罗素酸 ^[12]	三萜酸	L/S
44	26.00	471.344 8[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	-4.24	453.344 2, 431.351 3, 319.832 4	坡模酮酸 ^[10,20]	三萜酸	L/S
45	26.13	445.368 0[M+H] ⁺	C ₂₉ H ₄₈ O ₃	0.90	427.357 4, 194.117 1, 409.344 4	奈博类固醇 D 或奈博类固醇 E ^[20]	三萜酸	L/S
46 [*]	26.36	255.232 8[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	-0.78	219.845	棕榈酸 ^[22]	脂肪酸	L/S
47	26.88	281.248 6[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	0.00	243.790 5, 183.362 6	油酸 ^[22]	脂肪酸	L/S
48	26.96	489.356 4[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	-2.15	471.345 9, 250.177 2	委陵菜酸 ^[10,12]	三萜酸	L
49	27.04	565.243 3[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₈ O ₁₅ N ₅	0.07	550.223 4, 503.243 0, 420.230 4	未知		L
50	27.21	310.310 5[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₄₀ ON	0.03	293.284 0, 275.273 3, 117.091 5	未知		S
51	27.66	427.393 3[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₅₀ O	-0.23	409.382 7, 219.210 4, 191.179 1	香树脂醇 ^[20]	三萜酸	L/S
52	28.53	607.289 9[M+H] ⁺	C ₁₉ H ₄₂ O ₁₄ N ₈	0.10	547.268 9, 592.265 4	未知		L
53	29.54	338.341 1[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₄₂ N ₄	2.07	321.314 7, 303.304 3, 97.101 6	未知		S
54	29.80	371.314 3[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₄₁ O ₃ N ₃	0.03	259.190 1, 241.179 5, 147.065, 129.054 6	未知		S

注: *与对照品确证; L. 紫苏叶; S. 紫苏梗。

且响应值较高。将木犀草素, 木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷对照品注入系统, 获得 MS¹ 和 MS² 图谱。木犀草素-7-O-二葡萄糖醛酸苷的 MS¹ 谱图中显示该化合物的准分子离子峰为 m/z 637. 104 9 [M-H]⁻, 与其分子式 C₂₇H₂₆O₁₈, 能够很好地吻合; MS² 图谱显示主要的碎片离子为 m/z 351. 057 1, 285. 040 9, 193. 034 7, 归属各碎片离子分别为 2 个葡萄糖醛酸离子, 苷元, [M-H-C₁₅H₁₀O₆-C₆H₆O₅]⁻; 芹菜素-7-β-D-吡喃葡萄糖苷 MS¹ 图谱显示该化合物的准分子离子峰为 m/z 433. 112 0 [M+H]⁺, 与其分子式 C₂₁H₂₀O₁₀, 能够很好地吻合; MS² 图谱中主要的碎片离子为 m/z 253. 113 4, 313. 070 6, 271. 059 1, 结合化合物结构, 归属各碎片离子分别为 [M+H-C₆H₁₂]⁺, [M+H-C₇H₄O₂]⁺, 苷元; 木犀草素 MS¹ 显示该化合物的准分子离子峰为 m/z 287. 053 9 [M+H]⁺, 与其分子式 C₁₅H₁₀O₆, 能够很好地吻合; MS² 图谱给出主要的碎片离子为 m/z 153. 094 2, 135. 116 5, 其苷元结构 A 环的 C1 ~ C3 位易发生 RDA 裂解, 产生 m/z 153. 094 2 [C₇H₅O₄]⁺ 的碎片离子, 可以作为黄酮类化合物的特征离子, 特征离子进一步失去 1 个水分子形成 m/z 135. 116 5 的碎片离子。本文检测的黄酮糖苷大多数都为黄酮-O-糖苷, 发生的裂解主要以糖苷键的断裂、糖环的交叉环切除裂解为主,

最终丢失为黄酮苷元。

3.4 脂肪酸类成分的鉴定 脂肪酸属于挥发油类, 在紫苏中的含量较高^[4]。将亚油酸对照品注入系统, 获得其 MS¹ 和 MS² 图谱。MS¹ 谱图中显示该化合物的准分子离子峰为 m/z 279. 233 0 [M-H]⁻, 与其分子式 C₁₈H₃₂O₂, 能够很好地吻合; MS² 图谱给出主要的碎片离子分别为 m/z 261. 222 7, 178. 879 3, 归属各碎片离子为 [M-H-H₂O]⁻, [M-H-COOH-C₄H₈]⁻。脂肪酸类裂解时易产生 COOH, (CH₂)_n 等碎片。

3.5 三萜酸类成分的鉴定 三萜酸类化合物齐墩果-12 烯和乌苏-12-烯型化合物在碎裂时易失去 H₂O, CO 等分子, 同时 C 环发生 RDA 裂解, 出现 m/z 208 的碎片, 继而裂解失去 H₂O, COOH, C₅H₁₀, CH₂ 等碎片。将齐墩果酸对照品注入系统, 获得其 MS¹ 和 MS² 图谱。齐墩果酸 MS¹ 谱图中显示准分子离子峰为 m/z 457. 367 6 [M+H]⁺, 与其分子式 C₃₀H₄₈O₃, 能够很好地吻合; MS² 图谱给出主要的碎片离子为 m/z 439. 359 9, 411. 363 3, 249. 185 4, 203. 170 9, 191. 179 1, 归属各碎片离子分别为 [M+H-H₂O]⁺, [M+H-H₂O-CO]⁺, [M+H-C₁₄H₂₄O]⁺, [M-C₁₄H₂₄O-COOH]⁺, [M+H-C₁₆H₂₄O₂-H₂O]⁺。羽扇豆醇型三萜化合物算盘子酮 MS¹ 图谱显示该化合物的准分子离

子峰为 m/z 423.363 7 $[M+H]^+$, 与其分子式 $C_{30}H_{46}O$, 能够很好地吻合; MS^2 图谱中主要的碎片离子为 m/z 405.352 4, 215.179 9, 归属各碎片离子分别为 $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-C_{14}H_{24}O]^+$ 。灵芝醇 A 为四环三萜类, 其 MS^1 图谱显示该化合物的准分子离子峰为 m/z 439.357 3 $[M+H]^+$, 与其分子式 $C_{30}H_{46}O_2$, 能够很好地吻合; MS^2 图谱给出主要碎片离子为 m/z 393.351 7, 259.169 3, 137.132 6, 归属各碎片离子分别为 $[M-COOH]^+$, $[M+H-C_{12}H_{20}O]^+$, $[M+H-C_{12}H_{20}O-COOH]^+$ 。

3.6 有机酸类成分的鉴定 紫苏中有机酸类成分种类和含量较多, 将丹参素对照品注入系统, 获得其 MS^1 和 MS^2 图谱。丹参素 MS^1 图谱准分子离子峰为 197.045 0 $[M-H]^-$, 与其分子式 $C_9H_{10}O_5$, 能够很好的吻合; MS^2 图谱的主要的碎片离子为 m/z 179.034 3, 152.893 9, 归属各碎片离子分别为 $[M-H-H_2O]^-$, $[M-H-COOH]^-$ 。柠檬酸 MS^1 图谱显示该化合物的准分子离子峰为 m/z 191.019 3 $[M-H]^-$, 与其分子式 $C_6H_8O_7$, 能够很好地吻合; MS^2 图谱给出主要的碎片离子为 m/z 173.008 3, 128.034 1, 归属各碎片离子分别为 $[M-H-H_2O]^-$, $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 。

4 讨论

紫苏叶和紫苏梗是传统中药紫苏的不同入药部位, 二者药效差异较大, 活性成分必然存在着较大的差异, 本研究通过 LC-MS 技术分析鉴定了紫苏叶和紫苏梗的非挥发性成分, 比较了二者成分的种类和含量差异, 为临床药效提供物质基础研究, 有利于合理的开发利用紫苏资源。对紫苏中的苯丙素类, 氨基酸类, 黄酮类, 三萜酸类, 有机酸类的特征成分进行裂解推理并总结裂解规律, 为之后该类成分的定性研究提供了基础。

本文采用 UPLC-Q-ExactiveOrbitrap-MS 技术, 建立了一种快速鉴定紫苏中化学成分的方法, 相对于低分辨质谱, 该方法具有高灵敏度、高质量精度、高分辨率等优点, 同时辅助以 Mass Frontier 软件进行裂解规律的推理与验证, 提高了化合物结构鉴定的精准度, 避免了粗提物纯化的复杂过程, 为紫苏药效物质基础及作用机制研究提供了理论依据。

供试品溶液的制备, 分别考察了纯甲醇, 80% 甲醇-水, 70% 甲醇-水溶剂, 结果发现当 80% 甲醇-水作为提取溶剂时得到的色谱峰峰数目最多且响应值较高, 故选择其作为药材的提取溶剂。在 LC-MS 分析时流动相考察了 A 相水、水-0.05% 甲酸、

水-0.1% 甲酸, B 相乙腈、乙腈-0.05% 甲酸等几种不同的流动相组成, 比较发现 A 相水-0.05% 甲酸和 B 相乙腈-0.05% 甲酸作为流动相进行梯度洗脱时色谱峰能够有较好的分离度, 且峰形较好, 质谱的离子化效率更高。

本实验为了更加全面地表征和鉴定紫苏中的化合物, 采用了正、负离子两种质谱扫描模式, 通过 LC-MS 技术共鉴定出 4 种氨基酸, 7 种苯丙素, 10 种黄酮, 12 种三萜酸, 7 种有机酸, 4 种脂肪酸类成分, 10 种未知成分, 共 54 种化学成分, 其中算盘子酮等 6 种三萜酸首次在紫苏植物中发现, 结果表明紫苏中黄酮类, 苯丙素类, 有机酸类, 三萜酸类化合物较多, 且响应较高。三萜酸类化合物是具有多种生物活性的天然产物, 具有很高的药用价值, 其构效关系的研究及开发利用值得进一步探讨。三萜酸类成分存在大量的同分异构现象, 如齐墩果酸和熊果酸, 科罗索酸和山楂酸等, 极大地丰富了紫苏中化合物的种类, 扩展了紫苏的临床药用功效, 同时也增加了紫苏中三萜类成分定性分析的难度, 本研究中由于条件限制未能将所有的同分异构体化合物分离鉴定出来。有 10 个响应较高的化学成分未能在已有数据库和相关文献中找到, 这表明紫苏中还有一些未知的活性成分, 有待进一步研究。

比较紫苏叶与紫苏梗的总离子流图及化学成分, 发现二者中化合物的种类及含量存在明显差异。本实验鉴定出紫苏叶中的 45 种成分, 紫苏梗中的 32 种成分, 二者有 23 种相同成分, 在已确定的成分中紫苏叶特有 1 种烷醇, 2 种苯丙素, 3 种有机酸, 3 种三萜酸, 6 种黄酮类成分, 紫苏梗中特有 3 种氨基酸成分, 1 种黄酮类成分; 二者分别还含有多种不同的化学成分, 但由于文献数据及质谱信息的不足, 尚无法鉴定出这些化合物的结构。比较二者共有的黄酮和三萜酸类成分, 发现紫苏叶中的含量远高于紫苏梗。综上所述, 紫苏叶中有机酸类、黄酮类、三萜酸类成分的种类和含量较高, 氨基酸种类与含量较低, 这可能是二者药效的物质基础差异之一。同时紫苏的成分和含量受产地、季节、提取方式的影响而差异巨大, 这些因素有待进一步考察研究。

[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.
- [2] KWAK J, JU J. Inhibitory activities of *Perilla*

- frutescens* Britton leaf extract against the growth, migration, and adhesion of human cancer cells [J]. *Nutr Res Pract*, 2015, 9(1): 11-16.
- [3] 李卫萍, 魏长玲, 张琛武, 等. 紫苏栽培种质的形态分类及化学型关系研究[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(3): 454-459.
- [4] WANG J, XUE S, ZHAO G H. Comparative study on chemical components and *in vitro* antioxidant capacity of essential oil from different parts of *Perilla frutescens* [J]. *Food Sci*, 2013, 34(7): 86-91.
- [5] LIU J H, STEIGEL A, REININGER E, et al. Two new prenylated 3-benzoxepin derivatives as cyclooxygenase inhibitors from *Perilla frutescens* var. *acuta* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(3): 403-405.
- [6] GU L, WU T, WANG Z. TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta* [J]. *Food Sci Technol*, 2009, 42(1): 131-136.
- [7] JUN H I, KIM B T, SONG G S, et al. Structural characterization of phenolic antioxidants from purple perilla (*Perilla frutescens* var. *acuta*) leaves [J]. *Food Chem*, 2014, 148(4): 367-372.
- [8] NITTA M, KOBAYASHI H, OHNISHI-KAMEYAMA M, et al. Essential oil variation of cultivated and wild *Perilla* analyzed by GC/MS [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2006, 34(1): 25-37.
- [9] HUANG B, LEI Y, TANG Y, et al. Comparison of HS-SPME with hydrodistillation and SFE for the analysis of the volatile compounds of Zisu and Baisu, two varietal species of *Perilla frutescens* of Chinese origin [J]. *Food Chem*, 2011, 125(1): 268-275.
- [10] BANNO N, AKIHISA T, TOKUDA H, et al. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, 68(1): 85-90.
- [11] 史月姣, 王瑛, 朱惠照, 等. LC-MS快速分析紫苏水煎液中的主要化学成分[J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(8): 1417-1423.
- [12] LEE Y H, KIM B, KIM S, et al. Characterization of metabolite profiles from the leaves of green perilla (*Perilla frutescens*) by ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry and screening for their antioxidant properties [J]. *J Food Drug Anal*, 2017, 25(4): 776-788.
- [13] YI F, TAN X L, YAN X, et al. In silico profiling for secondary metabolites from *Lepidium meyenii* (maca) by the pharmacophore and ligand-shape-based joint approach [J]. *Chin Med*, 2016, 11(1): 42.
- [14] PURWAHA P, SILVA L P, HAWKE D H, et al. An artifact in LC-MS/MS measurement of glutamine and glutamic acid: in-source cyclization to pyroglutamic acid [J]. *Analyt Chem*, 2014, 86(12): 5633-5637.
- [15] CHANG Y-X, ZHANG Q-H, LI J, et al. Simultaneous determination of scopoletin, psoralen, bergapten, xanthotoxin, columbianetin acetate, imperatorin, osthole and isoimperatorin in rat plasma by LC-MS/MS for pharmacokinetic studies following oral administration of Radix Angelicae Pubescentis [J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2013, 77(2): 71-75.
- [16] 蒋虎刚, 赵信科, 蔺文燕, 等. 基于HPLC-Q-TOF-MS/MS定性分析当归中多种香豆素类成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(13): 157-162.
- [17] LIN L Z, MUKHOPADHYAY S, ROBBINS R J, et al. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis [J]. *J Food Compos Anal*, 2007, 20(5): 361-369.
- [18] 王翌臣, 王焕军, 张玲, 等. 大狼把草的化学成分液质联用快速鉴定分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(17): 80-87.
- [19] XIANG Z, YU C, JINHUA L, et al. Neuraminidase inhibitory activity and constituent characterization of *Fagopyrum dibotrys* [J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 1998.
- [20] 曲建辉. 安梨中三萜类化合物的分离提取与成分分析[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2014.
- [21] YANG X, LI G, CHEN L, et al. Quantitative determination of hederagenin in rat plasma and cerebrospinal fluid by ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method [J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(21): 1973-1979.
- [22] 盛节英, 周洪雷, 周倩, 等. 基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS分析宣木瓜饮片化学成分[J]. *中草药*, 2018, 49(20): 4773-4779.

[责任编辑 顾雪竹]