

· 药学基础 ·

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的吴茱萸化学成分分析

赵晓梅^{1,2}, 程宇欣^{2,3}, 梁彩霞², 郭杰², 刘晓谦², 冯伟红², 赵正保³, 闫利华^{2*}, 王智民^{2*}

(1. 山西中医药大学, 山西 晋中 030619;

2. 中国中医科学院 中药研究所 中药质量控制技术国家工程实验室, 北京 100700;

3. 山西医科大学, 太原 030001)

[摘要] 目的:采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术分析吴茱萸药材中的化学成分。方法:色谱条件为ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~3 min, 6%A; 3~4 min, 6%~10%A; 4~7 min, 10%~12%A; 7~8 min, 12%~14%A; 8~13 min, 14%~15%A; 13~15 min, 15%~20%A; 15~18 min, 20%~30%A; 18~21 min, 30%~49%A; 21~25 min, 49%~51%A; 25~27 min, 51%~73%A; 27~30 min, 73%~80%A; 30~31 min, 80%~100%A; 31~32 min, 100%A),流速0.4 mL·min⁻¹,柱温35℃。质谱条件为电喷雾离子源,正、负离子全扫描模式采集数据,检测范围 m/z 100~1 200。通过高分辨质谱数据分析、参考文献数据及对对照品确认,对吴茱萸药材的化学成分进行快速、全面的定性分析。结果:从吴茱萸70%甲醇提取物中共鉴定出92个化合物,包括生物碱类39个、黄酮类19个、柠檬苦素类12个、酚酸类20个和有机酸类2个;通过与对照品比对,准确归属了26个化合物。结论:吴茱萸药材化学成分类型多样,极性差异大,但不同产地、不同品种的药材样品中化学成分基本一致。该研究建立的方法能快速、准确地对吴茱萸的化学成分进行全面解析,为该药材药效成分和毒性成分的进一步阐明提供了实验依据。

[关键词] 吴茱萸; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS); 生物碱; 黄酮; 柠檬苦素; 酚酸; 有机酸

[中图分类号] R22;R28;R914;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)06-0113-14

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202051

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200806.1330.002.html>

[网络出版日期] 2020-8-6 16:22

Analysis of Chemical Constituents in Euodiae Fructus by UPLC-Q-TOF-MS/MS

ZHAO Xiao-mei^{1,2}, CHENG Yu-xin^{2,3}, LIANG Cai-xia², GUO Jie², LIU Xiao-qian², FENG Wei-hong²,
ZHAO Zheng-bao³, YAN Li-hua^{2*}, WANG Zhi-min^{2*}

(1. Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;

2. National Engineering Laboratory for Quality Control Technology of Chinese Herbal Medicines,
Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the chemical constituents in Euodiae Fructus by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). **Method:** The chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) as mobile phase (0-3 min,

[收稿日期] 20200611(009)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大项目(2018ZX09721-004-001);国家公益性行业科研专项(201507002);国家自然科学基金项目(31200244);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZXKT17063)

[第一作者] 赵晓梅,在读硕士,从事中药化学和质量评价研究,E-mail:zhao_1909@126.com

[通信作者] *闫利华,博士,研究员,从事中药化学和质量评价研究,E-mail:lhyan@icmm.ac.cn;

*王智民,博士,研究员,从事中药化学和质量评价研究,E-mail:zmwang@icmm.ac.cn

6%A; 3-4 min, 6%-10%A; 4-7 min, 10%-12%A; 7-8 min, 12%-14%A; 8-13 min, 14%-15%A; 13-15 min, 15%-20%A; 15-18 min, 20%-30%A; 18-21 min, 30%-49%A; 21-25 min, 49%-51%A; 25-27 min, 51%-73%A; 27-30 min, 73%-80%A; 30-31 min, 80%-100%A; 31-32 min, 100%A) for gradient elution. The column temperature was 35 °C, and the flow rate was 0.4 mL·min⁻¹. Mass spectrometry was performed using an electrospray ionization and data were collected in positive and negative ion modes, and the detection range was *m/z* 100-1 200. The chemical constituents in Euodiae Fructus were identified rapidly and comprehensively based on the accurate relative molecular mass and combined with literature data and reference substances. **Result:** A total of 92 chemical constituents were speculatively identified from the 70% methanol extract of Euodiae Fructus, including 39 alkaloids, 19 flavonoids, 12 limonoids, 20 phenolic acids and 2 organic acids. Among them, 26 compounds were confirmed by the reference substances. **Conclusion:** The compound types of Euodiae Fructus are multiple and quite different in polarity. The chemical compositions of Euodiae Fructus from different regions and species are similar. The established method is rapid and accurate, with which the chemical compositions of Euodiae Fructus have been identified comprehensively. Therefore, this study provides an experimental reference for further clarifying active and toxic constituents of Euodiae Fructus.

[Key words] Euodiae Fructus; ultra-high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS); alkaloids; flavonoids; limonoids; phenolic acids; organic acids

吴茱萸主产于湖南、贵州、江西、广西、浙江和安徽等地,具有散寒止痛、降逆止呕、助阳止泻等功效^[1-2],其药理作用主要表现在镇痛、抗炎、抗溃疡、止呕、止泻、降血压等方面^[3-4]。2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)中含吴茱萸制剂的提取工艺主要有3种:①粉碎成细粉,如戊己丸、艾附暖宫丸、四神丸等;②水煎煮,如肠康片、调经活血片、萆芩胃痛颗粒等;③60%乙醇提取,如左金胶囊、四神片等^[1]。本课题组前期对吴茱萸的化学成分进行了深入研究,从中分离得到了生物碱^[5]、黄酮^[6]、柠檬苦素^[5,7]及酚酸^[7]等成分。

吴茱萸应用形式多样,药理活性广泛,化学成分丰富,但是化学成分、功效及毒性的相关性尚不明确,具体的药效成分或毒性成分仍无定论。刘丽等^[8]在对吴茱萸化学成分、药理作用综述的基础上,对吴茱萸质量标志物(Q-marker)进行预测,得出生物碱、挥发油、柠檬苦素类成分是其主要的药效物质基础。黄伟等^[9]比较了吴茱萸不同组分对小鼠急性毒性的影响,结果表明吴茱萸不同组分均具有毒性,毒性强度为挥发油>全组分>醇提组分>水提组分。王亮等^[10]研究表明吴茱萸肝损伤的Q-marker为水溶性成分咖啡酰葡萄糖酸类。因此,建立一种灵敏、快速、简便的数据采集和分析方法,对吴茱萸药材中化学成分的全面分析和鉴定、系统阐释吴茱萸药效成分及毒性成分具有重要意义。

超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法

(UPLC-Q-TOF-MS/MS)具有分离速度快、灵敏度高、可提供精确相对分子质量等优点,常用于中药复杂体系中化学成分解析^[11]。近年来,黄小龙等^[12]采用HPLC-Q-TOF-MS/MS从吴茱萸中鉴定出21种生物碱。苏秀丽等^[13]采用液质联用技术从吴茱萸中鉴定出25种成分,其中17种为生物碱。这些研究的关注点均在生物碱类成分。本实验针对吴茱萸多基原、多产地的特点^[14],对不同产地、不同基原的10批吴茱萸药材中化学成分进行比较,发现其成分种类一致,选择1批具有代表性的药材进行分析。通过优化样品制备方法及色谱条件,可在32 min内对吴茱萸中有机酸、酚酸、黄酮、柠檬苦素、吡啶类生物碱、喹诺酮类生物碱进行全面解析,可为全面阐明该药材的药效成分和毒性成分提供实验依据。

1 材料

ACQUITY UPLC H-Class型超高效液相色谱仪和Xevo G2-S型Q-TOF质谱仪(配有电喷雾离子源及MassLynx 4.1质谱分析软件)均购自美国Waters公司,3120FG439405型手动移液器[艾本德(上海)国际贸易公司],BSA124S-CW型1/1万电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],XSE105DU型电子天平[梅特勒-托利多(上海)有限公司],FW100型高速万能粉碎机(天津市斯泰特仪器有限公司),DZKW-4型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司)。

异鼠李素-3-O-桑布双糖苷,异鼠李素-3-O-β-D-

半乳糖苷,异鼠李素-3-*O*- β -D-葡萄糖苷,异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷,柠檬黄素-3-*O*-芸香糖苷,槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷,去氢吴茱萸碱,7 β -羟基吴茱萸次碱,¹⁴N-甲酰二氢吴茱萸次碱,吴茱萸碱,吴茱萸次碱,goshuyamide- I, 1-甲基-2-正壬基-4(1H)-喹诺酮,1-甲基-2-[(Z)-6-十一烯基]-4(1H)-喹诺酮,1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮,吴茱萸卡品碱,1-甲基-2-[(6Z,9Z)-6,9-十五二烯基]-4(1H)-喹诺酮,二氢吴茱萸卡品碱,1-甲基-2-[(Z)-10-十五烯基]-4(1H)-喹诺酮对照品均为实验室自制,纯度均>95%;金丝桃苷、柠檬苦素、绿原酸、咖啡酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111521-201004, 110800-200404, 110753-200413, 110885-200102,纯度均>98%),新绿原酸和隐绿原酸对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为X-014-140801, Y-067-14080,纯度均>98%),芦丁对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号Y22S653719,纯度>98%),水为娃哈哈纯净水,乙腈、甲醇为色谱纯,甲酸为质谱纯,其余试剂均为分析纯。10批吴茱萸药材采自湖南、江西、广西、贵州等7省市10个种植基地,经中国中医科学院中药研究所闫利华研究员分别鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa*,石虎 *E. rutaecarpa* var. *officinalis* 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* var. *bodinieri* 的干燥近成熟果实;标本保存于中国中医科学院中药研究所质量标准研究中心。样品信息见表1。

表1 吴茱萸药材来源信息

Table 1 Information of crude drugs of *Euodiae Fructus*

样品编号	品种	产地	采集时间
1	石虎	广西柳城县龙头镇	2014-08
2	石虎	湖南新晃侗族自治县黄雷乡转水村	2014-08
3	吴茱萸	湖北黄石市阳新县坵上村	2015-07
4	疏毛吴茱萸	重庆秀山土家族苗族自治县清溪场镇	2014-09
5	疏毛吴茱萸	贵州松桃县正大乡	2015-09
6	石虎	江西樟树吴城乡	2014-08
7	石虎	广西桂林灵川县灵川镇	2016-08
8	疏毛吴茱萸	湖南吉首雅溪科技园	2015-09
9	吴茱萸	安徽黄山市歙县深渡镇漳岭山村	2015-09
10	吴茱萸	重庆荣昌安富镇通安村3组	2015-09

2 方法

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱

柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m),流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)进行梯度洗脱(0~3 min, 6%A; 3~4 min, 6%~10%A; 4~7 min, 10%~12%A; 7~8 min, 12%~14%A; 8~13 min, 14%~15%A; 13~15 min, 15%~20%A; 15~18 min, 20%~30%A; 18~21 min, 30%~49%A; 21~25 min, 49%~51%A; 25~27 min, 51%~73%A; 27~30 min, 73%~80%A; 30~31 min, 80%~100%A; 31~32 min, 100%A),柱温35 $^{\circ}$ C,流速0.4 mL·min⁻¹,进样量1 μ L。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测,雾化气体为氮气(N₂),脱溶剂气流量700 L·h⁻¹,脱溶剂气温度500 $^{\circ}$ C,锥孔气体流量50 L·h⁻¹,毛细管电压1.8 kV,锥孔电压40 V,补偿电压80 V,离子源温度120 $^{\circ}$ C,扫描范围 *m/z* 100~1 200。

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取各对照品适量,加甲醇使溶解,制成各成分质量浓度处于20~50 mg·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备 称取吴茱萸药材粉末(过50目筛)约0.3 g,精密称定,置100 mL具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,称定质量,超声提取(频率40 kHz,功率100 W)30 min,放冷,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经0.22 μ m微孔滤膜滤过,即得。

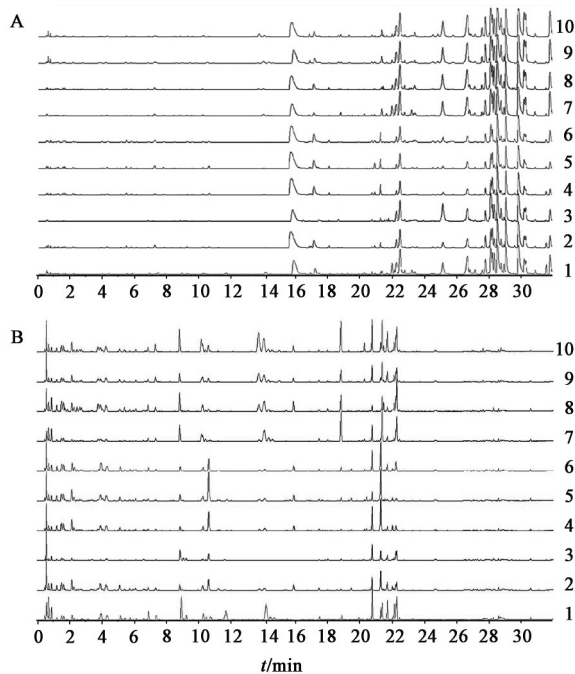
2.4 数据采集与处理 数据工作站为MassLynx 4.1软件,通过对所有样品的基峰离子流(BPI)图进行比较,筛选代表性药材进行质谱解析。

2.5 化学成分鉴定 查阅吴茱萸属植物相关文献,收集化学成分信息,应用MassLynx 4.1软件,根据测得的精确相对分子质量,在规定的误差范围内(\pm 3.0 ppm)计算可能的元素组成,通过分析各成分的保留时间、二级特征碎片离子、裂解规律结合对照品指认和文献数据,对化合物进行鉴定。

3 结果

3.1 不同产地吴茱萸的BPI比较 对不同产地吴茱萸进行UPLC-Q-TOF-MS/MS分析,见图1。结果发现各产地样品的BPI图基本相似,但各峰相应的离子强度有一定差异,说明不同产地吴茱萸中的化学成分种类基本一致,但含量存在差异。其中,广西柳城县龙头镇样品(样品1)中各离子强度相对都比较高,故以该样品为例,对吴茱萸的化学成分进行鉴定。

3.2 吴茱萸典型样品中化学成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS鉴定 采用UPLC-Q-TOF-MS/MS对样品1



A. 正离子模式; B. 负离子模式(图2同); 1~10. 表1中样品编号

图1 10批吴茱萸样品UPLC-Q-TOF-MS/MS分析的BPI

Fig. 1 BPI chromatograms of 10 batches of Euodiae Fructus by UPLC-Q-TOF-MS/MS

的70%甲醇提取物中的化学成分进行分析,见图2。结果发现生物碱类成分在正离子模式下有较高的响应;柠檬苦素类、黄酮类、酚酸和有机酸类成分在负离子模式下有较高的响应。从该样品70%甲醇

提取物中共鉴定出92个成分,包括生物碱类39个(吲哚类11个、喹诺酮类28个)和黄酮类19个、柠檬苦素类12个、酚酸类20个、有机酸类2个。其中有26个化合物经对照品比对后确认。92个化合物的相关质谱信息见表2。

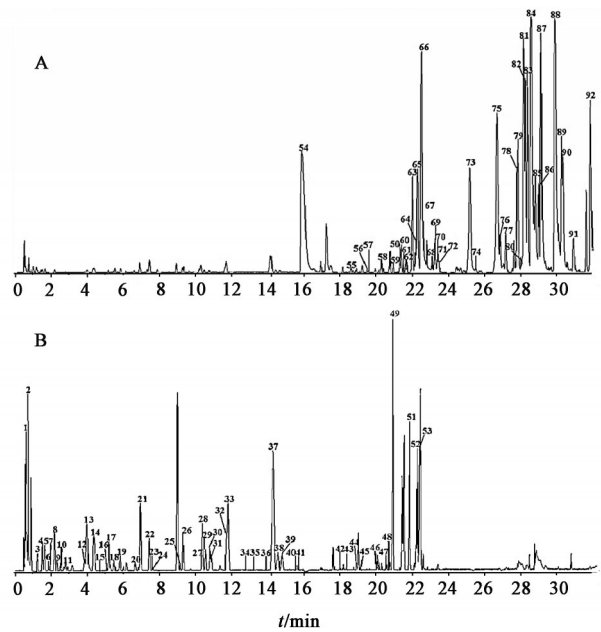


图2 吴茱萸典型样品UPLC-Q-TOF-MS/MS分析的BPI

Fig. 2 BPI chromatograms of typical sample of Euodiae Fructus by UPLC-Q-TOF-MS/MS

表2 吴茱萸化学成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS鉴定

Table 2 Identification of chemical constituents from Euodiae Fructus by UPLC-Q-TOF-MS/MS

化合物	t_R /min	分子式	m/z			离子 模式	结构 类型	名称	MS ² 碎片 m/z
			实测值	理论值	δ /ppm				
1	0.64	C ₆ H ₈ O ₇	191.019 3	191.019 2	0.5	负	OA	柠檬酸 ^[15-16]	155.951 0, 111.007 7
2	0.76	C ₆ H ₈ O ₇	191.019 2	191.019 2	0	负	OA	异柠檬酸 ^[15-16]	155.950 4, 111.007 9
3	1.26	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	357.081 6	357.082 2	-1.7	负	PA	咖啡酰葡萄糖 ^[17]	195.050 0, 179.033 8, 135.044 0
4	1.56	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	357.082 2	357.082 2	0	负	PA	咖啡酰葡萄糖 ^[17]	195.050 4, 179.034 5, 135.044 2
5	1.67	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	357.082 0	357.082 2	-0.6	负	PA	咖啡酰葡萄糖 ^[17]	195.050 5, 179.033 9, 135.044 0
6	1.86	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	315.107 8	315.108 0	-0.6	负	PA	4-O-β-D-葡萄糖基香草醇 ^[18]	153.054 9
7	1.92	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341.086 5	341.087 3	-2.3	负	PA	咖啡酰葡萄糖 ^[19]	179.031 8, 161.920 4, 135.045 6
8	2.20	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ ¹⁾	353.086 9	353.087 3	-1.1	负	PA	新绿原酸 ^[20-22]	191.055 1, 179.034 2, 135.044 0
9	2.35	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	357.081 8	357.082 2	-1.1	负	PA	咖啡酰葡萄糖 ^[17]	195.050 5, 179.034 5, 135.044 5
10	2.52	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341.086 9	341.087 3	-1.2	负	PA	咖啡酰葡萄糖 ^[19]	179.028 1, 161.890 6, 135.043 0
11	2.82	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371.096 8	371.097 8	-2.7	负	PA	阿魏酰葡萄糖 ^[23-24]	195.051 1, 193.049 3, 134.035 9
12	3.85	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371.097 2	371.097 8	-1.6	负	PA	阿魏酰葡萄糖 ^[23-24]	195.052 7, 193.049 9, 134.036 5
13	3.99	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	357.081 8	357.082 2	-1.1	负	PA	咖啡酰葡萄糖 ^[17]	195.050 2, 179.033 9, 135.044 2
14	4.35	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ ¹⁾	353.086 5	353.087 3	-2.3	负	PA	绿原酸 ^[20-22]	191.055 1, 179.033 5, 135.044 2
15	4.86	C ₉ H ₈ O ₄ ¹⁾	179.034 3	179.034 4	-0.6	负	PA	咖啡酸 ^[7]	161.020 0, 135.044 2

续表 2

化合物	t_R /min	分子式	m/z			离子 模式	结构 类型	名称	MS ² 碎片 m/z
			实测值	理论值	δ /ppm				
16	5.09	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.102 0	367.102 9	-2.5	负	PA 阿魏酰奎宁酸 ^[25-26]	193.050 2, 191.056 3	
17	5.19	C ₁₆ H ₁₈ O ₉ ¹⁾	353.087 4	353.087 3	0.3	负	PA 隐绿原酸 ^[20-22]	191.055 2, 179.034 2, 135.044 2	
18	5.47	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371.097 4	371.097 8	-1.1	负	PA 阿魏酰葡萄糖酸 ^[23-24]	195.050 2, 193.050 0, 134.036 3	
19	5.80	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341.086 5	341.087 3	-2.3	负	PA 咖啡酰葡萄糖 ^[19]	179.036 4, 161.059 0, 135.043 0	
20	6.64	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	449.108 5	449.108 4	0.2	负	FN 香树素-7-O-β-D-葡萄糖苷 ^[27]	287.054 2, 269.044 8	
21	6.93	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	371.097 8	371.097 8	0	负	PA 阿魏酰葡萄糖酸 ^[23-24]	195.050 3, 193.049 8, 134.036 5	
22	7.42	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.103 1	367.102 9	0.5	负	PA 阿魏酰奎宁酸 ^[25-26]	193.051 1, 191.055 6	
23	7.56	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₁	785.215 6	785.214 0	2.0	负	FN 异鼠李素-3-O-芸香糖-4'-O-β-D-葡 萄糖苷 ^[28]	623.162 1, 477.102 8, 315.050 3	
24	7.62	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	367.102 2	367.102 9	-1.9	负	PA 阿魏酰奎宁酸 ^[25-26]	193.049 4, 191.054 0	
25	9.11	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595.128 5	595.129 9	-2.4	负	FN 槲皮素-3-O-β-D-木糖-(1→2)-β-D- 半乳糖苷 ^[21]	463.082 8, 301.031 2	
26	9.27	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆ ¹⁾	595.130 2	595.129 9	0.5	负	FN 槲皮素-3-O-桑布双糖苷 ^[6]	463.084 3, 301.031 5	
27	10.04	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ ¹⁾	609.145 5	609.145 4	0.3	负	FN 芦丁 ^[7,29]	463.087 8, 301.033 9	
28	10.33	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ ¹⁾	463.087 1	463.087 7	-1.3	负	FN 金丝桃苷 ^[7]	301.033 1, 271.024 0	
29	10.51	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 6	609.145 6	0	负	FN 槲皮素-3-O-β-D-葡萄糖-7-O-α-L-鼠 李糖苷 ^[30-31]	463.084 1, 301.033 0	
30	10.75	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755.202 2	755.203 5	-1.7	负	FN 异鼠李素-3-O-[2-O-β-D-木糖-6-O- α-L-鼠李糖]-β-D-葡萄糖苷 ^[6]	315.047 3, 300.026 4	
31	10.82	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.086 5	463.087 7	-2.6	负	FN 异槲皮苷 ^[21]	301.032 7, 271.024 4, 255.028 9, 243.025 1	
32	11.66	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	639.155 9	639.156 1	-0.3	负	FN 柠檬黄素-3-O-β-D-木糖-(1→2)-β- D-葡萄糖苷 ^[21]	507.115 1, 345.058 5, 329.029 4, 315.048 2	
33	11.74	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ ¹⁾	609.145 3	609.145 6	-0.5	负	FN 异鼠李素-3-O-桑布双糖苷 ^[6]	315.048 2	
34	12.07	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433.076 9	433.077 1	-0.5	负	FN 槲皮素-3-O-α-D-吡喃阿拉伯糖苷 ^[21]	301.031 8, 271.024 1, 255.032 5, 243.034 4	
35	13.09	C ₂₃ H ₄₀ O ₁₅	663.228 5	663.228 9	-0.6	负	LN limonin diosphenol 17- β -D- glucopyranoside ^[32]	469.671 4, 229.057 3	
36	13.88	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂ ¹⁾	477.103 7	477.103 3	0.8	负	FN 异鼠李素-3-O-β-D-半乳糖苷 ^[6]	315.046 5	
37	14.21	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆ ¹⁾	623.161 9	623.161 2	1.1	负	FN 异鼠李素-3-O-芸香糖苷	315.050 6, 300.026 5	
38	14.47	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₇ ¹⁾	653.172 5	653.171 8	1.1	负	FN 柠檬黄素-3-O-芸香糖苷 ^[21]	345.061 4, 330.038 1	
39	14.71	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂ ¹⁾	477.103 2	477.103 3	-0.2	负	FN 异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖苷 ^[6]	315.047 0	
40	15.41	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	607.165 5	607.166 3	-1.3	负	FN 柯伊利素-7-O-芸香糖苷 ^[33]	299.055 0	
41	15.65	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	507.112 4	507.113 9	-3.0	负	FN 柠檬黄素-3-O-β-D-葡萄糖苷 ^[21]	345.053 7, 301.003 3, 286.010 5	
42	17.89	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₀	501.176 9	501.176 1	1.6	负	LN graucin A 或其异构体 ^[34]	457.186 5, 413.193 4, 162.838 7, 160.841 5, 146.964 3	
43	18.26	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₀	501.175 5	501.176 1	-1.2	负	LN graucin A 或其异构体 ^[34]	457.186 3, 413.195 8, 162.836 6, 160.841 1, 146.965 3	
44	18.81	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	515.154 4	515.155 3	-1.7	负	LN euodirutaecin A ^[35]	471.162 2, 383.151 2, 162.837 5, 160.841 0, 146.964 0	
45	19.03	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	515.156 3	515.155 3	1.9	负	LN euodirutaecin B ^[35]	471.157 9, 383.171 4, 162.838 0, 160.840 3, 146.964 7	
46	19.91	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.049 7	315.050 5	-2.5	负	FN 异鼠李素 ^[21]	300.026 5	
47	20.51	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₀	501.175 8	501.176 1	-0.6	负	LN (21R)石虎柠檬素 A ^[36]	471.165 9, 411.140 8, 235.925 4	
48	20.55	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₀	501.176 1	501.177 2	2.2	负	LN (21S)石虎柠檬素 A ^[36]	471.164 5, 411.138 8, 235.005 4	

续表 2

化合物	t_R /min	分子式	m/z			离子 模式	结构 类型	名称	MS ² 碎片 m/z
			实测值	理论值	δ /ppm				
49	20.78	C ₂₆ H ₃₀ O ₉	485.181 1	485.181 2	-0.2	负	LN 吴茱萸苦素 ^[37-38]	423.180 2, 397.163 5, 383.148 9	
50	21.32	C ₂₆ H ₃₀ O ₈ ¹⁾	471.201 9	471.201 7	-0.4	正	LN 柠檬苦素 ^[39]	427.208 9, 425.196 0, 161.059 4	
51	21.72	C ₂₆ H ₂₈ O ₉	483.165 5	483.165 5	0	负	LN 吴茱萸内酯醇 ^[37-38]	421.164 4, 395.148 6, 161.060 1	
52	22.14	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₀	527.191 6	527.191 7	-0.2	负	LN 吴茱萸苦素乙酸酯 ^[34,37]	485.181 3, 467.170 9, 383.148 0	
53	22.26	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₀	527.191 3	527.191 7	-0.8	负	LN 6 β -乙酰氧基-5-表柠檬苦素 ^[34,37]	485.181 1, 467.171 8, 383.151 8	
54	16.09	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O ¹⁾	302.129 8	302.129 3	1.7	正	IA 去氢吴茱萸碱 ^[40]	286.097 9, 273.084 7, 258.102 2	
55	18.61	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₃	336.134 3	336.134 8	-1.5	正	IA wuchuyamide II ^[41]	318.124 0, 304.108 2, 286.097 4, 161.070 7, 134.059 9	
56	19.51	C ₂₄ H ₂₃ N ₃ O ₇	466.161 3	466.161 4	-0.2	正	IA 吴茱萸次碱-10- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷 ^[42]	304.107 8, 286.096 7, 134.060 2	
57	19.59	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₂	304.108 0	304.108 6	-2.0	正	IA 1-羟基或3-羟基吴茱萸次碱 ^[43]	286.097 1, 257.094 2, 167.059 4	
58	20.31	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₃	322.155 3	322.155 6	-0.9	正	IA (<i>S</i>)-7-hydroxysecuritacarpine ^[44]	286.098 5, 173.083 3, 149.022 9, 134.060 0	
59	20.96	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₂ ¹⁾	304.108 5	304.108 6	-0.3	正	IA 7 β -羟基吴茱萸次碱 ^[45]	286.097 1	
60	21.41	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O ¹⁾	318.124 0	318.124 3	-0.9	正	IA ¹⁴ N-甲酰二氢吴茱萸次碱 ^[5]	171.091 5, 144.080 5	
61	21.51	C ₂₁ H ₂₉ NO ₂	328.226 8	328.227 7	-2.7	正	QA 1-甲基-2-[7-羟基-(<i>E</i>)-9-十一烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[46]	310.217 1, 186.091 0, 173.083 3	
62	21.58	C ₂₁ H ₃₁ NO ₂	330.242 6	330.243 3	-2.1	正	QA 1-甲基-2-[7-羟基-十一烷基]-4(1H)-喹诺酮 ^[46]	312.232 0, 298.182 0, 284.168 6, 270.182 4, 256.167 5, 186.091 3, 173.082 7	
63	22.00	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	308.176 9	308.176 3	1.9	正	IA 吴茱萸酰胺 ^[47]	286.096 9, 134.060 1	
64	22.18	C ₁₅ H ₁₇ NO ₂	244.133 5	244.133 8	-1.2	正	QA 2-羟基-4-甲氧基-3-(3'-甲基-2'-丁烯基)-喹诺酮 ^[48]	228.101 6, 200.070 3, 186.090 4, 173.083 9	
65	22.34	C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ¹⁾	304.145 1	304.145 0	0.3	正	IA 吴茱萸碱 ^[40]	286.097 5, 171.091 5, 161.070 4, 144.080 2, 134.059 8	
66	22.61	C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ¹⁾	288.114 0	288.113 7	1.0	正	IA 吴茱萸次碱 ^[40]	273.090 1, 244.086 3, 169.075 5	
67	22.81	C ₂₃ H ₃₃ NO ₂	356.258 6	356.259 0	-1.1	正	QA 1-甲基-2-[7-羟基-(<i>E</i>)-9-十三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[46]	338.248 4, 186.091 0, 173.083 4	
68	23.11	C ₂₃ H ₃₁ NO ₂	354.242 9	354.243 3	-1.1	正	QA 1-甲基-2-[7-羟基-(<i>E</i>)-9-十三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[46]	288.113 2, 228.137 5, 200.107 0, 186.091 1, 173.083 1	
69	23.28	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ¹⁾	306.160 7	306.160 6	0.3	正	IA goshuyamide- I ^[49]	286.097 5, 173.083 1, 144.080 3, 134.059 8	
70	23.39	C ₂₃ H ₃₃ NO ₃	372.253 3	372.253 9	-1.6	正	QA 双羟基吴茱萸卡品碱 ^[46]	354.242 4, 336.231 7, 186.090 9, 173.083 1	
71	23.44	C ₁₉ H ₂₅ NO	284.201 2	284.201 4	-0.7	正	QA 1-甲基-2-[(<i>Z</i>)-4-壬烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[46]	228.137 8, 200.107 7, 186.091 1, 173.083 2	
72	24.46	C ₂₁ H ₂₅ NO	308.201 0	308.201 0	-1.3	正	QA 1-甲基-2-[(1 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i>)-1,4,7-十一三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[50]	186.091 0, 173.082 4	
73	25.20	C ₁₉ H ₂₇ NO ¹⁾	286.217 7	286.217 1	2.1	正	QA 1-甲基-2-正壬基-4(1H)-喹诺酮 ^[5]	242.154 5, 214.121 8, 200.106 6, 186.091 3, 173.083 4	
74	25.51	C ₂₃ H ₂₇ NO	334.216 7	334.217 1	-1.2	正	QA 1-甲基-2-[(1 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> ,10 <i>E</i>)-1,4,7,10-十三四烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[50]	186.091 0, 173.083 2	
75	26.71	C ₂₁ H ₂₉ NO ¹⁾	312.232 9	312.232 7	0.6	正	QA 1-甲基-2-[(<i>Z</i>)-6-十一烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[5]	214.122 6, 200.106 8, 186.092 0, 173.082 7	
76	26.88	C ₂₃ H ₂₉ NO	336.233 3	336.232 7	1.8	正	QA 1-甲基-2-[(4 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i> ,10 <i>E</i>)-4,7,10-十三三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[50]	186.091 6, 173.083 4	
77	27.19	C ₂₀ H ₂₉ NO	300.232 8	300.232 7	0.3	正	QA 1-甲基-2-癸基-4(1H)-喹诺酮 ^[5]	186.091 4, 173.083 5	

续表 2

化合物	t_R /min	分子式	m/z			离子 模式	结构 类型	名称	MS ² 碎片 m/z
			实测值	理论值	δ /ppm				
78	27.82	C ₂₅ H ₃₁ NO	362.248 6	362.248 4	0.6	正	QA	1-甲基-2-[(3E,6Z,9Z,12E)-3,6,9,12-十五四烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[50]	186.091 3, 173.083 3
79	27.90	C ₂₃ H ₃₁ NO	338.248 4	338.248 4	0	正	QA	1-甲基-2-[(4Z,7Z)-4,7-十三二烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[43]	186.091 6, 173.083 4
80	28.08	C ₂₁ H ₂₉ NO	312.233 0	312.232 7	1.0	正	QA	1-甲基-2-[(Z)-6-十一烯基]-4(1H)-喹诺酮异构体 ^[51]	186.091 3, 173.083 4
81	28.12	C ₂₁ H ₃₁ NO ¹⁾	314.248 3	314.248 4	-0.3	正	QA	1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮 ^[5]	242.153 9, 228.138 3, 200.107 0, 186.091 9, 173.085 9
82	28.27	C ₂₅ H ₃₃ NO	364.264 6	364.269 6	1.6	正	QA	1-甲基-2-[(3E,6Z,9Z)-3,6,9-十五三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[50]	186.092 9, 173.083 9
83	28.39	C ₂₅ H ₃₃ NO	364.264 2	364.264 0	0.5	正	QA	1-甲基-2-[(6Z,9Z,12E)-6,9,12-十五三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[50]	186.091 2, 173.083 3
84	28.59	C ₂₃ H ₃₃ NO ¹⁾	340.264 6	340.273 7	1.8	正	QA	吴茱萸卡品碱 ^[5]	256.169 4, 242.154 0, 228.138 4, 214.122 5, 200.107 2, 186.095 8, 173.085 2
85	28.81	C ₂₃ H ₃₃ NO	340.264 3	340.265 9	0.9	正	QA	1-甲基-2-[(Z)-7-十三烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[52]	186.091 1, 173.083 1
86	29.00	C ₂₂ H ₃₃ NO	328.264 5	328.265 8	1.5	正	QA	2-十三烷基-4(1H)-喹诺酮 ^[52]	186.091 2, 173.083 4
87	29.13	C ₂₅ H ₃₅ NO ¹⁾	366.279 8	366.279 7	0.3	正	QA	1-甲基-2-[(6Z,9Z)-6,9-十五二烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[5]	242.154 3, 228.138 7, 186.095 2, 173.084 6
88	29.90	C ₂₃ H ₃₅ NO ¹⁾	342.291 7	342.279 7	0.9	正	QA	二氢吴茱萸卡品碱 ^[5]	256.169 9, 242.154 3, 200.107 3, 186.092 6, 173.087 0
89	30.27	C ₂₅ H ₃₇ NO ¹⁾	368.295 4	368.295 3	0.3	正	QA	1-甲基-2-[(Z)-10-十五烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[5]	228.151 9, 214.135 9, 186.091 4, 173.083 5
90	30.35	C ₂₅ H ₃₇ NO	368.295 2	368.295 3	-0.3	正	QA	1-甲基-2-[(Z)-9-十五烯基]-4(1H)-喹诺酮 ^[52]	186.091 0, 173.083 2
91	30.93	C ₂₄ H ₃₇ NO	356.295 3	356.295 3	0	正	QA	1-甲基-2-十四烷基-4(1H)-喹诺酮 ^[47]	186.091 2, 173.083 2
92	31.87	C ₂₅ H ₃₉ NO	370.311 8	370.316 5	2.2	正	QA	1-甲基-2-十五烷基-4(1H)-喹诺酮 ^[5]	186.091 3, 173.083 8

注: ¹⁾经对照品指认;正、负离子模式检测离子分别为[M+H]⁺, [M-H]⁻;OA. 有机酸类成分;PA. 酚酸类成分;FN. 黄酮类成分;LN. 柠檬苦素类成分;IA. 吡啶生物碱类成分;QA. 喹诺酮生物碱类成分。

3.3 化合物质谱裂解规律及结构鉴定

3.3.1 有机酸及酚酸类 从吴茱萸药材中共鉴定出有机酸类化合物2个, 酚酸及其酯类或苷类化合物20个, 均在负离子模式下响应较好。该类成分的结构式见图3。

化合物**1**和**2**为同分异构体。化合物**1**准分子离子峰为 m/z 191.019 3 [M-H]⁻, 二级质谱(MS²)特征碎片离子有 m/z 155.951 0 [M-H-2H₂O]⁻和继续失去一分子CO₂的碎片离子 m/z 111.007 7 [M-H-2H₂O-CO₂]⁻, 结合文献[15-16]推测化合物**1**和**2**分别为柠檬酸和异柠檬酸。

化合物**3~19, 21, 22, 24**主要为咖啡酸、阿魏酸等与奎宁酸、葡萄糖、葡萄糖酸结合形成的酯类或苷类衍生物。由于奎宁酸、葡萄糖和葡萄糖酸上均有多个羟基可被取代, 所以这类成分有多个同分异

构体。其中, 化合物**3~5, 9**和**13**为咖啡酰葡萄糖酸, 是由咖啡酸的羧基分别与葡萄糖酸2~6位碳上的羟基缩合而形成的5种同分异构体^[17]。以化合物**5**为例, 其准分子离子峰为 m/z 357.082 0 [M-H]⁻, MS²显示分子中酯键断裂形成的葡萄糖酸特征碎片离子 m/z 195.050 5 [M-H-C₆H₆O₅]⁻和咖啡酸负离子 m/z 179.033 9, 以及后者脱去一分子CO₂的特征碎片 m/z 135.044 0。化合物**6**的准分子离子峰为 m/z 315.107 8 [M-H]⁻, MS²中有脱掉一分子葡萄糖形成的香草醇苷元特征碎片离子 m/z 153.054 9 [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻。化合物**7, 10, 19**为咖啡酰葡萄糖^[19], 三者互为同分异构体, 裂解规律相似。以化合物**7**为例, 其准分子离子峰为 m/z 341.086 5 [M-H]⁻, MS²中有失去葡萄糖形成的咖啡酸特征碎片 m/z 179.031 8, m/z 161.920 4 和 m/z 135.045 6。化合物

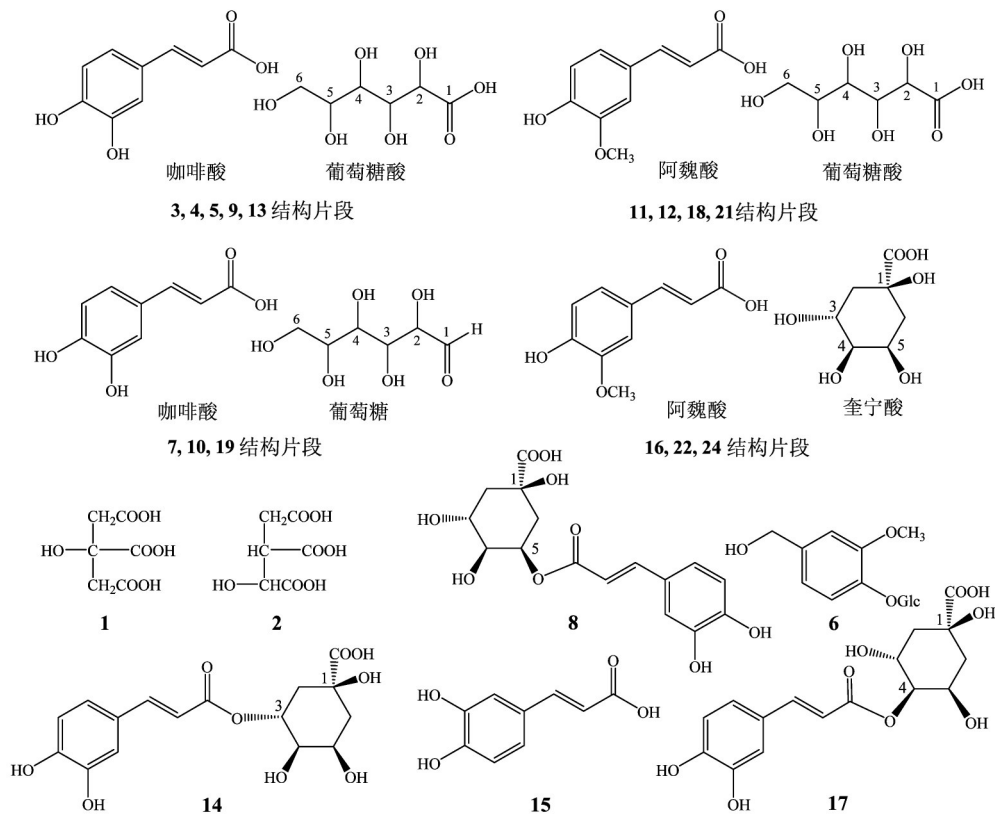


图3 吴茱萸中有机酸及酚酸类成分的结构式

Fig. 3 Structures of organic acids and phenolic acids in *Euodiae Fructus*

8, 14, 17三者互为同分异构体,裂解规律相似。以化合物14为例,准分子离子峰为 m/z 353.086 5 $[M-H]^-$, MS^2 的特征碎片离子有奎宁酸负离子 m/z 191.055 1^[20]和咖啡酸负离子 m/z 179.033 5^[21-22],后者继续脱去 CO_2 形成 m/z 135.044 2的特征碎片离子峰(与化合物15的碎片离子一致),经与对照品比对,鉴定为绿原酸,其可能的裂解途径见图4;同理,化合物8, 17分别鉴定为新绿原酸、隐绿原酸,这3种成分可通过色谱保留时间的不同得以区分^[7]。

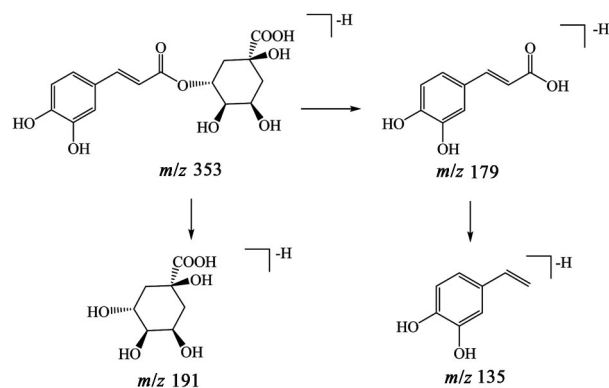


图4 绿原酸在负离子模式下可能的质谱裂解途径

Fig. 4 Possible fragmentation pathways of chlorogenic acid under negative ion mode

化合物11, 12, 18和21为同分异构体,以化合物18为例,其准分子离子峰为 m/z 371.097 4 $[M-H]^-$, MS^2 中存在葡萄糖酸特征离子 m/z 195.050 2及阿魏酸特征离子 m/z 193.050 0和 m/z 134.036 3,因此鉴定其为阿魏酰葡萄糖酸^[23-24]。化合物16, 22和24为同分异构体,以化合物22为例,其准分子离子峰为 m/z 367.103 1 $[M-H]^-$,在 MS^2 中存在奎宁酸负离子 m/z 191.055 6和阿魏酸负离子 m/z 193.051 1特征碎片,因此鉴定其为阿魏酰奎宁酸^[25-26]。

3.3.2 黄酮类 从吴茱萸药材中共鉴定出19个黄酮类化合物,包括黄酮和黄酮苷类。这类化合物主要为以异鼠李素、槲皮素、柠檬黄素、柯伊利素等为苷元,与鼠李糖、木糖、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖等结合形成的黄酮苷^[6,21,32]。在负离子模式下,黄酮苷类化合物易产生 $[M-H]^-$ 和 $[M-H-糖基]^-$ 等离子。该类成分的结构式见图5。

化合物20准分子离子峰为 m/z 449.108 5 $[M-H]^-$, MS^2 中显示失去一分子葡萄糖,再失去一分子水,分别生成的特征碎片离子 m/z 287.054 2和 m/z 269.044 8,鉴定为香树素-7-O- β -D-葡萄糖苷^[27],属于二氢黄酮醇苷类。化合物23, 30, 33, 36, 37和39的 MS^2 中均含异鼠李素苷元^[6,21,28]的特征碎片离子

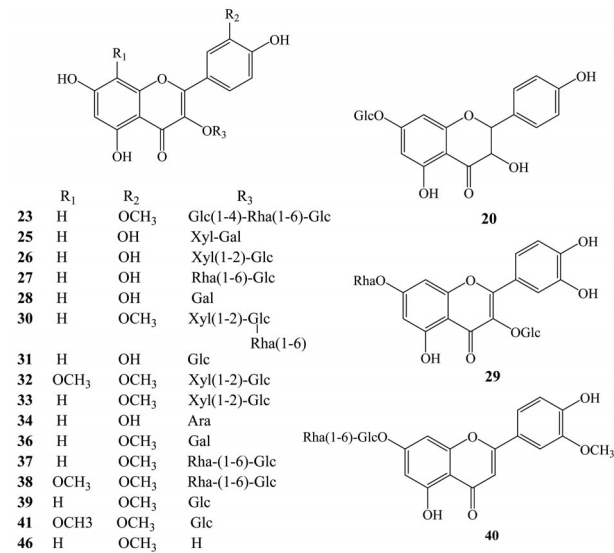


图5 吴茱萸中黄酮类成分的结构式
Fig. 5 Structures of flavonoids in Euodiae Fructus

峰 m/z 315 $[M-H]^-$ 。以化合物 37 为例进行解析,该成分为异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷,其准分子离子峰为 m/z 623.161 9 $[M-H]^-$,失去一分子葡萄糖和一分子鼠李糖后得到苷元碎片离子 m/z 315.050 6,与异鼠李素(化合物 46)的准分子离子峰一致,可能的裂解途径见图 6。化合物 23 为异鼠李素-3-*O*-芸香糖-4'-*O*- β -*D*-葡萄糖苷,准分子离子峰为 m/z 785.215 6 $[M-H]^-$,在 MS^2 中显示脱去一分子葡萄糖后的特征碎片离子为 m/z 623.162 1,继续脱去一分子鼠李糖和一分子葡萄糖后的特征碎片离子分别为 m/z 477.102 8 和 m/z 315.050 3。化合物 30, 33, 36 和 39 的裂解规律与化合物 37, 23 相似,见表 2。

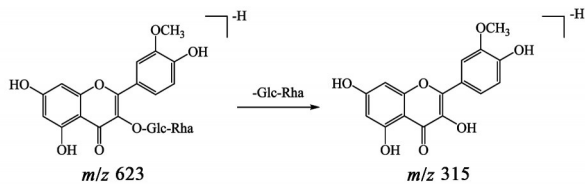


图6 异鼠李素-3-*O*-芸香糖苷在负离子模式下可能的质谱裂解途径

Fig. 6 Possible fragmentation pathways of isorhamnetin-3-*O*-rutinoside under negative ion mode

化合物 25~29, 31 和 34 的 MS^2 中均含有槲皮素苷元^[21]的特征碎片离子峰 m/z 301 $[M-H]^-$ 。其中,化合物 26 准分子离子峰为 m/z 595.130 2 $[M-H]^-$, MS^2 中有失去一分子木糖的特征碎片离子 m/z 463.084 3 及继续失去一分子葡萄糖的碎片离子 m/z 301.031 5,与对照品的质谱碎片及保留时间一致,鉴定为槲皮素-3-*O*-桑布双糖苷^[6]。化合物 27 为芦

丁,准分子离子峰为 m/z 609.145 5 $[M-H]^-$, MS^2 中的特征离子峰有 m/z 463.087 8 和 m/z 301.033 9,分别为其脱去鼠李糖基及芸香糖基所形成的碎片离子^[7,29]。化合物 29 准分子离子峰为 m/z 609.145 6 $[M-H]^-$, MS^2 中含有特征碎片离子 m/z 463.084 1 和 m/z 301.033 0,参考文献^[30-31]推测其为槲皮素-3-*O*- β -*D*-葡萄糖-7-*O*- α -*L*-鼠李糖苷。结合文献及以上裂解规律,分别对化合物 25, 28, 31 和 34 进行鉴定,结果见表 2。

化合物 32, 38 和 41 的 MS^2 中均含柠檬黄素苷元^[21]的特征碎片离子 m/z 345 $[M-H]^-$ 。其中,化合物 38 为柠檬黄素-3-*O*-芸香糖苷,其准分子离子峰为 m/z 653.172 5 $[M-H]^-$, MS^2 中显示其脱去芸香糖后的苷元特征离子 m/z 345.061 4。化合物 40 为柯伊利素-7-*O*-芸香糖苷^[32],准分子离子峰为 m/z 607.165 5 $[M-H]^-$, MS^2 中显示其脱去芸香糖形成的苷元特征离子 m/z 299.055 0。

3.3.3 柠檬苦素类 从吴茱萸药材中共鉴定出了 12 个柠檬苦素类成分,包括 1 个柠檬苦素苷和 11 个苷元。大多数柠檬苦素成分在正、负离子模式下均有响应,以负离子模式下响应更高。该类成分的结构式见图 7。

目前已发现的柠檬苦素苷类化合物结构均是由柠檬苦素苷元在 17 位与一分子葡萄糖以糖苷键的形式结合。化合物 35 准分子离子峰为 m/z 663.228 5 $[M-H]^-$, MS^2 特征碎片离子 m/z 469.671 4 和 m/z 229.057 3 与柠檬苦素负离子模式下的特征碎片一致,鉴定为 limonin diosphenol 17- β -*D*-glucopyranoside^[32]。化合物 42 和 43 为 graucin A 或其同分异构体^[34],其中,化合物 42 的准分子离子峰为 m/z 501.176 9 $[M-H]^-$, MS^2 中显示柠檬苦素类化合物失去 CO_2 产生的特征碎片离子 m/z 457.186 5 $[M-H-CO_2]^-$ 和 m/z 413.193 4 $[M-H-2CO_2]^-$ 。化合物 44 和 45 分别为 euodirutaecin A 和 euodirutaecin B^[35],结构中 C-17 位连有氧化呋喃环结构,因 C-23 羟基取代有 *R* 和 *S* 两种构型而形成同分异构体, MS^2 中碎片离子有 m/z 471 $[M-H-CO_2]^-$ 和 m/z 383 $[M-H-3CO_2]^-$ 。化合物 47 和 48 因结构中 21 位羟基取代有 *R* 或 *S* 构型而形成同分异构体^[36], MS^2 中显示失去 CO_2 和 CO 等产生特征碎片离子峰 m/z 471 $[M-H-CO-2H]^-$ 和 m/z 411 $[M-H-CO_2-CO-H_2O]^-$,分别鉴定为(21*R*)石虎柠檬素 A 和(21*S*)石虎柠檬素 A。化合物 49 为吴茱萸苦素^[37-38],准分子离子峰为 m/z 485.181 1 $[M-H]^-$, MS^2 中显示失去 CO_2 , CO 和

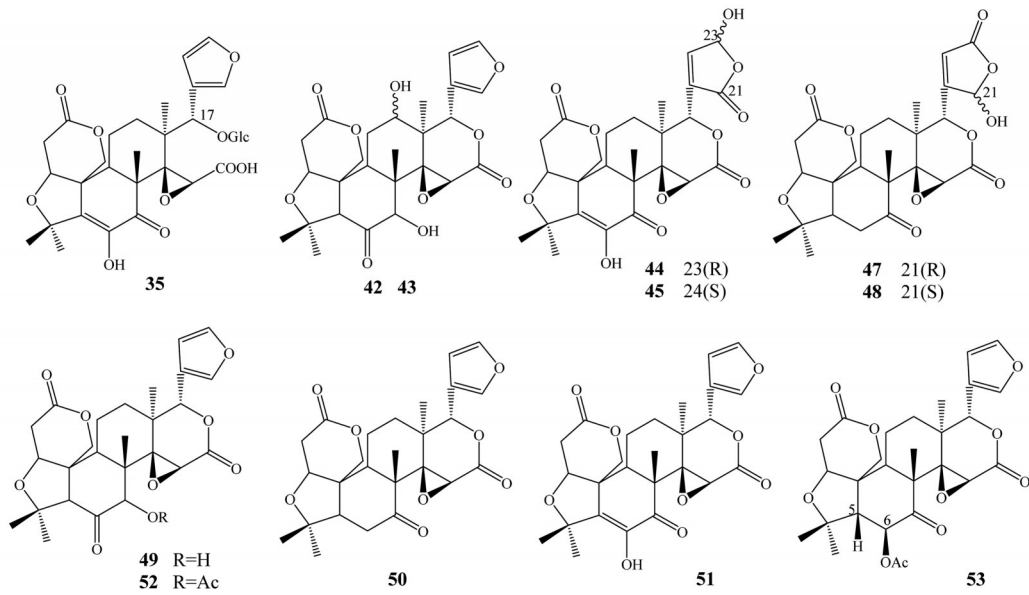


图7 吴茱萸中柠檬苦素类成分的结构式

Fig. 7 Structures of limonoids in *Euodiae Fructus*

H₂O 形成的碎片离子 m/z 423.180 2 [M-H-CO₂-H₂O]⁻, m/z 397.163 5 [M-H-2CO₂]⁻ 和 m/z 383.148 9 [M-H-3CO-H₂O]⁻。化合物 50 为柠檬苦素^[39], 在负离子模式下, 显示其准分子离子峰为 m/z 469.186 2 [M-H]⁻ 和 m/z 515.192 0 [M+HCOO]⁻; 正离子模式下其准分子离子峰为 m/z 471.201 9 [M+H]⁺, MS² 特征碎片离子有 m/z 427.208 9 [M+H-CO₂]⁺, m/z 425.196 0 [M+H-CO-H₂O]⁺ 和 m/z 161.059 4 [M+H-C₁₆H₂₂O₆]⁺, 裂解途径见图 8。化合物 51 准分子离子峰为 m/z 483.165 5 [M-H]⁻, MS² 特征碎片离子有 m/z 421.164 4 [M-H-H₂O-CO₂]⁻ 和 m/z 395.148 6 [M-H-2CO₂]⁻, 结合文献[37-38]推断为吴茱萸内酯醇。化合物 52 准分子离子峰为 m/z 527.191 2 [M-H]⁻, 在 MS² 中存在特征碎片 m/z 485.181 3 [M-H-CH₂CO]⁻, m/z 467.170 9 [M-H-CH₂CO-H₂O]⁻ 和 m/z 383.148 0 [M-H-CH₂CO-H₂O-3CO]⁻, 鉴定其为吴茱萸苦素乙酸酯^[34,37]。化合物 53 与 52 为同分异构体, MS² 中也存在碎片离子 m/z 485.181 1, m/z 467.171 8 和 m/z 383.151 8, 根据文献[34,37]推测其为 6β-乙酰氧基-5-表柠檬苦素。

3.3.4 生物碱类 从吴茱萸药材中共鉴定出 39 个生物碱类成分, 包括吲哚类生物碱 11 个(含 1 个生物碱苷)和喹诺酮类生物碱 28 个, 均在正离子模式下响应较好。吲哚类生物碱以吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸酰胺等为基本结构, 在此基础上通过结合或失去氢原子、羟基、乙酰基等基团形成结构更为丰富的化合物^[5]。因分子中含有环己烯结构, 可

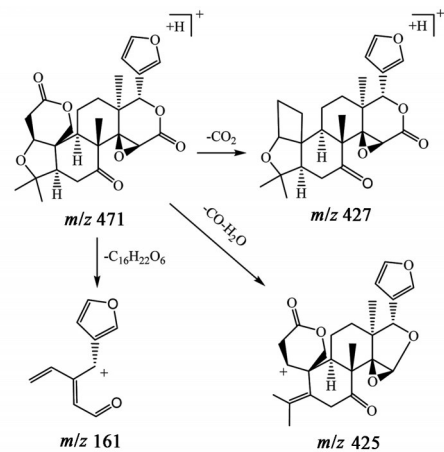


图8 柠檬苦素在正离子模式下可能的质谱裂解途径

Fig. 8 Possible fragmentation pathways of limonin under positive ion mode

发生逆狄尔斯-阿尔德(RDA)裂解^[13]。该类成分的结构式见图 9。

化合物 56 为生物碱苷类化合物, 准分子离子峰为 m/z 466.161 3 [M+H]⁺, MS² 中显示脱去一分子葡萄糖后的特征碎片离子 m/z 304.107 8 以及 m/z 286.096 7 和 m/z 134.060 2 等碎片离子, 结合文献[42]鉴定为吴茱萸次碱-10-O-β-D-葡萄糖苷, 裂解途径见图 10。

化合物 54 准分子离子峰为 m/z 302.129 8 [M+H]⁺, MS² 主要显示脱去 1 个 CH₃ 和 1 个 H 后产生的碎片离子 m/z 286.097 9 [M+H-CH₃-H]⁺, 鉴定为去氢吴茱萸碱^[40]。化合物 55 准分子离子峰为 m/z 336.134 3 [M+H]⁺, MS² 有 m/z 318.124 0 [M+H-

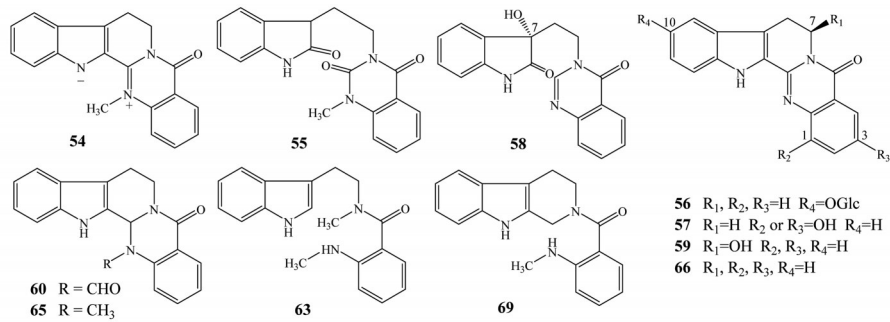


图9 吴茱萸中吲哚类生物碱的结构式

Fig. 9 Structures of indole alkaloids in *Euodiae Fructus*

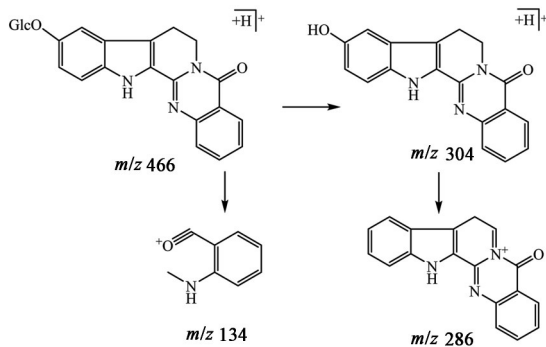


图10 吴茱萸次碱-10-O-β-D-葡萄糖苷在正离子模式下可能的质谱裂解途径

Fig. 10 Possible fragmentation pathways of rutaecarpine-10-O-β-D-glucopyranoside under positive ion mode

H_2O^+ , m/z 304.108 2, m/z 286.097 4, m/z 161.070 7 和 m/z 134.059 9 等碎片离子, 鉴定为 wuchuyamide II^[41]。化合物 58 准分子离子峰为 m/z 322.155 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS^2 特征碎片有 m/z 286.098 5, m/z 173.083 3, m/z 149.022 9, m/z 134.060 0 等, 鉴定为 (*S*)-7-hydroxysecorutaecarpine^[44]。化合物 59 准分子离子峰为 m/z 304.108 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS^2 显示失去一分子 H_2O 的特征碎片离子 m/z 286.097 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 鉴定为 7β-羟基吴茱萸次碱^[45]。化合物 57 与 59 为同分异构体, 特征碎片离子相同, 结合文献鉴定为 1-羟基或 3-羟基吴茱萸次碱^[43]。化合物 60 准分子离子峰为 m/z 318.124 0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS^2 的特征碎片离子有 m/z 171.091 5, m/z 144.080 5 等, 结合文献^[5]鉴定为 ¹⁴N-甲酰二氢吴茱萸次碱。化合物 63 准分子离子峰为 m/z 308.176 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS^2 中有 m/z 286.096 9 和 m/z 134.060 1 等碎片离子, 鉴定为吴茱萸酰胺^[47]。化合物 65, 66 的准分子离子峰及 MS^2 碎片离子与文献^[40]及对照品信息一致, 依次鉴定为吴茱萸碱和吴茱萸次碱。化合物 69 准分子离子峰为 m/z 306.160 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 其 MS^2 的特征碎片离子有 m/z 286.097 5, m/z 173.083 1, m/z 144.080 3 和 m/z

134.059 8, 结合文献^[49]鉴定为 goshuyamide- I, 其裂解途径见图 11。

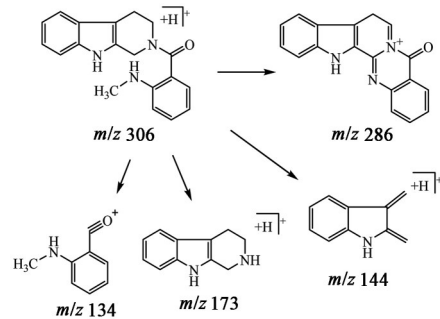


图11 goshuyamide- I 在正离子模式下可能的质谱裂解途径

Fig. 11 Possible fragmentation pathways of goshuyamide- I under positive ion mode

喹诺酮类生物碱因具有相似的结构母核, 在二级质谱中有特征碎片离子 m/z 186 和 m/z 173, 且丰度很高。由于母核侧链碳原子数目和双键的个数及位置不同, MS^2 中还有多个相差 14 Da 的碎片离子, 但丰度较低^[12, 48]。该类生物碱的结构式见图 12。

化合物 81 准分子离子峰为 m/z 314.248 3, MS^2 中特征碎片有 m/z 186.091 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{20}]^+$ 和 m/z 173.085 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{21}]^+$, 以及 m/z 242.153 9, m/z 228.138 3 等相差 14 Da 的碎片离子峰, 鉴定其为 1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮^[5], 裂解规律见图 13。根据相同的规律, 并参照相关文献对化合物 62, 64, 73, 77, 86, 88, 91 和 92 分别进行鉴定, 结果见表 2。

化合物 75 准分子离子峰为 m/z 312.232 9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, MS^2 中有特征碎片 m/z 186.092 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{18}]^+$ 和 m/z 173.082 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{19}]^+$ 及失去 C_nH_{2n} 的碎片离子 m/z 214.122 6, m/z 200.106 8 等, 鉴定其为 1-甲基-2-[(*Z*)-6-十一烯基]-4(1H)-喹诺酮^[5]。同理, 结合相应文献对化合物 71, 79, 84, 85, 87, 89

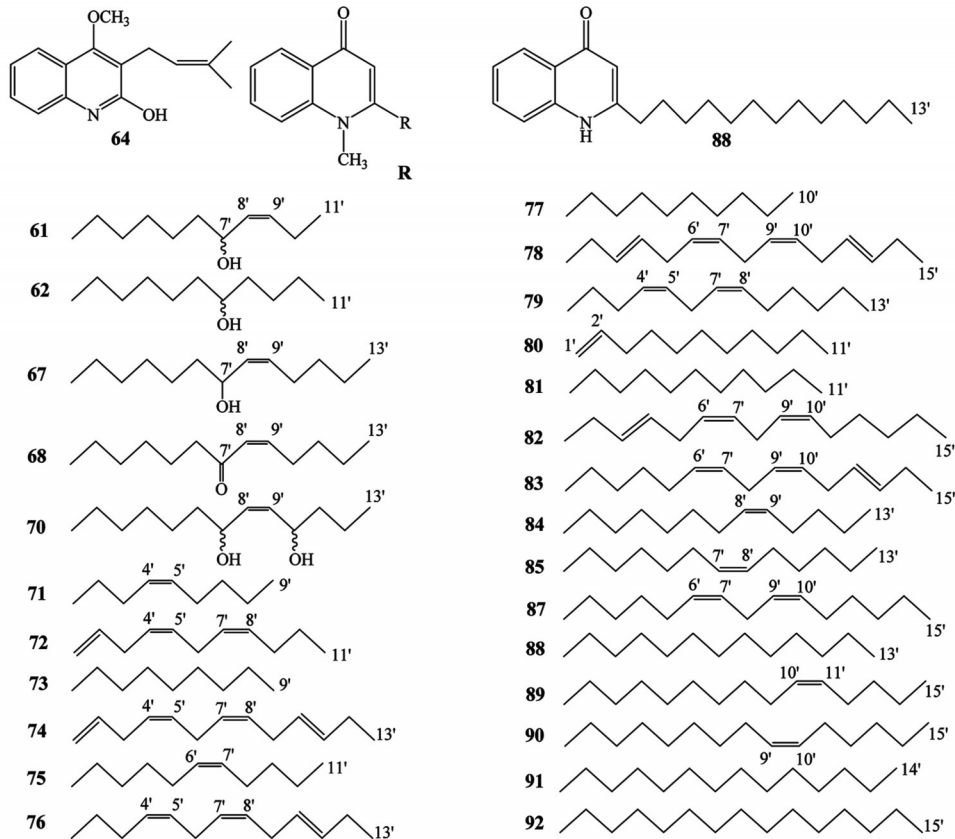


图12 吴茱萸中喹诺酮类生物碱的结构式
Fig. 12 Structures of quinolone alkaloids in *Euodiae Fructus*

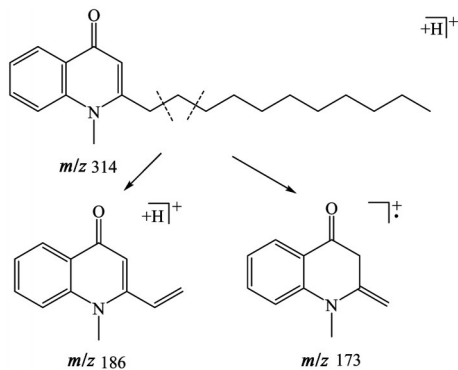


图13 1-甲基-2-正十一烷基-4(1H)-喹诺酮在正离子模式下可能的质谱裂解途径
Fig. 13 Possible fragmentation pathways of 1-methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone under positive ion mode

和90分别进行鉴定,结果见表2。

化合物67准分子离子峰为 m/z 356.258 6 $[M+H]^+$, 比吴茱萸卡品碱(化合物84)相对分子质量多16 Da, 即多1个氧原子, MS^2 中有脱去一分子 H_2O 形成的特征碎片 m/z 338.248 4 $[M+H-H_2O]^+$, 结合文献[46]鉴定为1-甲基-2-[7-羟基-(*E*)-9-十三烯基]-4(1H)-喹诺酮。化合物68准分子离子峰为 m/z 354.242 9 $[M+H]^+$, 比化合物67相对分子质量少2

Da, 即差2个H, 结合文献[46]鉴定为1-甲基-2-[7-羰基-(*E*)-9-十三烯基]-4(1H)-喹诺酮。化合物61准分子离子峰为 m/z 328.226 8 $[M+H]^+$, 比化合物75的相对分子质量多16 Da, 推测其结构为1-甲基-2-[7-羟基-(*E*)-9-十一烯基]-4(1H)-喹诺酮。化合物62准分子离子峰为 m/z 330.242 6 $[M+H]^+$, 比化合物81的相对分子质量多16 Da, 推测结构为1-甲基-2-[7-羟基-十一烷基]-4(1H)-喹诺酮。化合物70准分子离子峰为 m/z 372.253 3 $[M+H]^+$, 比吴茱萸卡品碱(化合物84)相对分子质量多32 Da, MS^2 中有分别脱去一分子和两分子 H_2O 形成的特征碎片 m/z 354.242 4 $[M+H-H_2O]^+$ 和 m/z 336.231 7 $[M+H-2H_2O]^+$, 故推测其为双羟基吴茱萸卡品碱。化合物61, 62, 70中羟基取代位置根据文献[46]推测, 已知结构中羟基多取代在7'位。结合质谱数据及上述化合物的裂解规律, 从中还鉴定出6个三烯或四烯类喹诺酮^[50], 分别为化合物72, 74, 76, 78, 82, 83, 见表2。这类化合物可能因稳定性较差, 尚未被分离制备出来, 仅从本文及少数文献^[50]中经质谱推测得到。因此, 这6个化合物双键的位置参照该类成分中含1~2个双键的已知化合物进行推测, 已知化合

物中双键的取代位置多在6'(7')位,9'(10')位,4'(5')位和7'(8')位等^[5,43,46,52]。

4 讨论

4.1 提取溶剂的选择 为了更全面地获取药材中所含化合物的信息,本研究首先对提取溶剂、色谱条件、质谱条件等进行了优化。考察了水,50%甲醇和70%甲醇3种溶剂对BPI图出峰情况的影响,与吴茱萸水提液相比,发现70%甲醇作为供试品溶液的提取溶剂时效果最优,不仅可检测到有机酸、酚酸、黄酮、柠檬苦素和吲哚类生物碱成分,还可对极性较弱的喹诺酮类生物碱有较好的响应。另外,70%甲醇作为提取溶剂时,离子峰强度较高且峰数量最多,故本实验选取70%甲醇作为提取溶剂。

4.2 吴茱萸化学成分分析 本研究采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术首先比较了不同产地、不同品种的10批吴茱萸药材,发现其化学成分基本一致,因此,从中选择1批典型样品进行分析。在32 min内对吴茱萸中92个化合物进行了鉴定和初步表征;通过与对照品比对,准确归属了26个化合物。从鉴定结果来看,吴茱萸70%甲醇提取物中的化学成分包括有机酸、酚酸、黄酮、柠檬苦素和生物碱,其中,有机酸类成分(0~1 min)主要为柠檬酸和异柠檬酸;酚酸类成分(1~8 min)主要以酚酸及其酯类形式存在;黄酮类成分(6~20 min)主要以苷类形式存在;生物碱包括吲哚类及其苷(16~23 min)和喹诺酮类(21~32 min);柠檬苦素类(13~23 min)以柠檬苦素及其酯类为主。对于部分同分异构体的精确结构,例如取代基位置、绝对构型等还需进一步结合核磁共振等技术进行确证。本实验建立了一种灵敏、快速、简便的方法对吴茱萸中化学成分进行系统性定性分析,全面阐明了其化学物质基础,丰富了该药材的成分信息,为进一步研究其药效成分和毒性成分提供了实验依据。

[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,2020:178-179.
[2] 刘珊珊,尹元元,闫利华,等. 吴茱萸药用植物资源调查[J]. 中国中医药信息杂志,2016,23(9):5-9.
[3] 杨志欣,孟永海,王秋红,等. 吴茱萸药理作用及其物质基础研究概况[J]. 中华中医药学刊,2011,29(11):2415-2417.
[4] 龚小见,周欣,蔡宗苇,等. 黔产吴茱萸化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2009,34(2):177-179.
[5] 尹元元,刘珊珊,韩利文,等. 吴茱萸生物碱类化学成

分及其抗血管生成活性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(5):45-53.

[6] LIU S S, DAI Y T, SUI F, et al. Flavonol glycosides from the fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2018, 20(9):867-874.
[7] 刘珊珊,周兴清,梁彩霞,等. 吴茱萸水提取物化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(8):58-64.
[8] 刘丽,张笑敏,许浚,等. 吴茱萸化学成分和药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析[J]. 中草药,2020,51(10):2689-2702.
[9] 黄伟,赵燕,孙蓉. 吴茱萸不同组分对小鼠急性毒性试验比较研究[J]. 中国药物警戒,2010,7(3):129-134.
[10] 王亮,孙凯滨,吴晓文,等. 吴茱萸水煎液肝毒质量标志物确认研究[J]. 中草药,2019,50(19):4547-4555.
[11] 孟晓伟,朱清,张妮,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术快速鉴定降香中化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(10):107-118.
[12] 黄小龙,沈冰冰,梁雪娟,等. HPLC-Q-TOF-MS/MS快速鉴别吴茱萸中的生物碱类组分[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(19):102-108.
[13] 苏秀丽,印敏,徐曙,等. UPLC-Q-TOF-MS法分析吴茱萸化学成分[J]. 中成药,2017,39(6):1223-1227.
[14] 梁彩霞,杨岚,张东,等. 吴茱萸UPLC指纹图谱的建立及质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(14):38-44.
[15] 王奇志,梁敬钰,陈军. 吴茱萸化学成分研究Ⅱ[J]. 中国药科大学学报,2005,36(6):520-522.
[16] 姚万龙,刘娅,姚喆,等. UPLC-TOF-MS分析乐脉颗粒的化学成分[J]. 中药材,2014,37(12):2286-2288.
[17] WANG L, WANG D J, GUO W, et al. Four new caffeoylgluconic acid positional isomers from the fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. J Asian Nat Prod Res, 2019, 21(11):1104-1111.
[18] 宋莉,石建功,林生,等. 亚麻子油饼的化学成分研究[J]. 药学报,2013,48(4):521-525.
[19] 许榭,章琪,曹跃,等. 狗脊中化学成分及其对DPPH清除作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(24):162-166.
[20] 谢岑,钟大放,陈笑艳. 鉴定大鼠注射绿原酸后体内的代谢产物[J]. 药学报,2011,46(1):88-95.
[21] 刘珊珊. 吴茱萸水溶性成分及其品质评价研究[D]. 北京:首都医科大学,2016.
[22] 黄婕,王国才,李桃,等. 黄荆的化学成分研究[J]. 中草药,2013,44(10):1237-1240.
[23] 李郭帅,马阳,耿婷,等. UPLC-Q-TOF-MS/MS分析复方南星止痛膏化学成分[J]. 中国中药杂志,2019,

- 44(2):298-307.
- [24] ZHAO M Y, YANG X W. Two new acylgluconic acids from the nearly ripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2008, 10(7/8): 759-763.
- [25] 马趣环, 石晓峰, 范彬, 等. 糙叶败酱正丁醇部位化学成分研究[J]. *中草药*, 2015, 46(11): 1593-1596.
- [26] 李雪改, 杨立国, 陈丽霞, 等. 黄连水提液化学成分的分离与鉴定[J]. *沈阳药科大学学报*, 2012, 29(3): 193-198, 226.
- [27] SLIMESTAD R, ANDERSEN Ø M, FRANCIS G W. Ampelopsin 7-glucoside and other dihydroflavonol 7-glucosides from needles of *Picea abies* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 35(2): 550-552.
- [28] 张成刚, 卢叶, 王峥涛, 等. 阔刺兔唇花全草的化学成分研究[J]. *中草药*, 2014, 45(22): 3224-3229.
- [29] 伍明江, 吴晓磊, 张德芹, 等. UPLC-Q-TOF/MS鉴定芦丁在大鼠体内的代谢产物[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(17): 91-97.
- [30] 史小平, 苏聪, 齐博文, 等. 地桃花中黄酮苷类成分研究[J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(19): 1670-1674.
- [31] SENATORE F, D'AGOSTINO M, DINI I. Flavonoid glycosides of *Barbarea vulgaris* L. (Brassicaceae) [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(7): 2659-2662.
- [32] OZAKI Y, MIYAKE M, MAEDA H, et al. Limonoid glucosides in *Tetradium rutaecarpa* [J]. *Phytochemistry*, 1991, 30(7): 2365-2367.
- [33] 胡传芹, 杨鑫宝, 杨秀伟, 等. 吴茱萸中的黄酮苷类化合物[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(17): 2571-2575.
- [34] SUGIMOTO T, MIYASE T, KUROYANAGI M, et al. Limonoids and quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa* Benth [J]. *Chem Pharm Bull*, 1988, 36(11): 4453-4461.
- [35] QIAN P, JIN H W, YANG X W. New limonoids from *Coptidis Rhizoma-Euodiae Fructus* couple [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(4): 333-344.
- [36] 盖玲, 饶高雄, 宋纯清, 等. 石虎化学成分研究[J]. *药学报*, 2001, 36(10): 743-745.
- [37] 赵楠, 李达翔, 李占林, 等. 吴茱萸化学成分的分离与鉴定[J]. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33(2): 103-109.
- [38] 夏梦雯, 潘争红, 程玲, 等. 丽江吴茱萸化学成分研究[J]. *中国药学杂志*, 2016, 51(9): 694-697.
- [39] REN W, XIN S K, HAN L Y, et al. Comparative metabolism of four limonoids in human liver microsomes using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with high-resolution LTQ-Orbitrap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2015, 29(21): 2045-2056.
- [40] 廖琼峰, 谢智勇, 张蕾, 等. 吴茱萸中吲哚喹啉类生物碱和吴茱萸内酯的质谱裂解分析[J]. *中药材*, 2008, 31(5): 673-676.
- [41] ZUO G Y, YANG X S, HAO X J. Two New indole alkaloids from *Evodia rutaecarpa* [J]. *Chin Chem Lett*, 2000, 11(2): 127-128.
- [42] ZHANG X L, SUN J, WU H H, et al. A new indoloquinazoline alkaloidal glucoside from the nearly ripe fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(20): 1917-1921.
- [43] ZHAO N, LI Z L, LI D H, et al. Quinolone and indole alkaloids from the fruits of *Euodia rutaecarpa* and their cytotoxicity against two human cancer cell lines [J]. *Phytochemistry*, 2015, 109: 133-139.
- [44] XIAO X, LUO J G, LIU R X, et al. New alkaloids from the leaves of *Evodia rutaecarpa* [J]. *Nat Prod Res*, 2016, 30(19): 2154-2159.
- [45] 李文兰, 孙向明, 陈晨, 等. 基于UPLC-Q-TOF MS的吴茱萸致肝毒性部位及入血成分分析[J]. *质谱学报*, 2017, 38(3): 282-293.
- [46] HUANG X, LI W, YANG X W. New cytotoxic quinolone alkaloids from fruits of *Evodia rutaecarpa* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(4): 709-714.
- [47] 饶高雄, 胡之璧, 宋纯清. 小粒吴茱萸的化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2004, 16(1): 28-30.
- [48] SHIN H K, DO J C, SON J K, et al. Quinolone alkaloids from the fruits of *Evodia officinalis* [J]. *Planta Med*, 1998, 64(8): 764-765.
- [49] SHOJI N, UMEYANA A, IUCHI A, et al. Two novel alkaloids from *Evodia rutaecarpa* [J]. *J Nat Prod*, 1989, 52(5): 1160-1162.
- [50] LING Y, HU P, ZHANG L F, et al. Identification and structural characterization of acylgluconic acids, flavonol glycosides, limonoids and alkaloids from the fruits of *Evodia rutaecarpa* by high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(9): 1593-1604.
- [51] 孙健, 温庆辉, 马琰岩, 等. 高效液相色谱串联质谱分析吴茱萸水煎液的化学成分[J]. *中国药物警戒*, 2014, 11(3): 154-157.
- [52] TANG Y Q, FENG X Z, HUANG L. Quinolone alkaloids from *Evodia rutaecarpa* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(3): 719-722.

[责任编辑 刘德文]