

基于 UHPLC-Q Extractive 轨道阱高分辨质谱的 款冬花、叶的化学比较

李 静^{1,2}, 李 娟^{1,2}, 贾金萍³, 张俊杰³, 闫 艳¹, 高晓霞¹, 秦雪梅¹, 李震宇^{1*}

(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 化学化工学院, 3. 大型仪器中心, 山西 太原 030006)

摘要: 款冬花是中医临床常用药材, 具有止咳化痰作用。款冬叶也具有相似的药理作用。对款冬叶和花进行系统的化学比较, 有助于进一步促进款冬叶的资源利用。本研究采用高分辨液质联用技术对款冬花和叶进行了化学比较, 采用靶标和非靶标结合的指认策略鉴定化学成分 43 种, 进一步分析显示款冬酮、款冬花素酯等倍半萜类物质在花中的含量远远高于叶, 而绿原酸、异绿原酸等苯丙素类物质在叶中的含量高于花蕾; 黄酮类物质金丝桃苷、槲皮素在款冬花和叶中含量接近, 而芦丁、山柰酚在款冬花中含量较高。说明款冬花和叶含有相似的化学成分, 但款冬叶中以绿原酸类为代表的苯丙素类成分含量较高, 而这类成分与止咳化痰作用密切相关。本研究为款冬叶的资源利用奠定了基础。

关键词: 款冬; 液质联用; 化学比较

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 03-0444-09

Comparison of flower buds and leaves of *Tussilago farfara* L. by UHPLC-Q Extractive Hybrid Quadrupole Orbitrap MS

LI Jing^{1,2}, LI Juan^{1,2}, JIA Jin-ping³, ZHANG Jun-jie³, YAN Yan¹, GAO Xiao-xia¹,
QIN Xue-mei¹, LI Zhen-yu^{1*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, 2. College of Chemistry and Chemical Engineering,
3. Scientific Instrument Center, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The flower bud of *Tussilago farfara* L. has been commonly used in the treatment of cough, bronchitis and asthmatic disorders in the Traditional Chinese Medicine. In Europe, the leaves were also used as herbal drugs with similar pharmacological activities. In order to utilize the leaves, it is important to conduct the chemical comparison between the flower buds and the leaves. In this study, ultra high liquid chromatography (UHPLC) coupled with Q Extractive high resolution mass spectrometry (HR-MS) was used to compare the chemical composition of the flower buds and leaves of *T. farfara* L. forty three metabolites were identified by the combination of targeted and untargeted approach. The results suggest that the sesquiterpenes, such as tussilagone and 7β -(3'-ethyl-*cis*-crotonoyloxy)- 1α -(2'-methylbutyryloxy)-3(14)-dehydro-*Z*-notonipetranone were higher in the flower buds. While the phenylpropanoids, such as cholorogenic acid and isochlorogenic acid were higher in the leaves. The flavonoids, such as hyperin and quercetin exhibited no difference between the flower buds and leaves, while the rutin and kaempferol were higher in the flower buds. The leaves and flower buds had similar chemical components, and the phenylpropanoids, which were closely related with the antitussive and

收稿日期: 2017-09-21; 修回日期: 2017-11-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31270008); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JIN-34); 山西省科技创新重点团队 (201605D131045-18); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室 (201605D111004).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-351-7018379, E-mail: lizhenyu@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0943

expectorant activities, were found at higher concentrations in the leaves. The results presented here laid the basis for the rational utilization of the leaves of *T. farfara* L.

Key words: *Tussilago farfara*; LC-MS; chemical comparison

款冬花为菊科植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾, 主产于我国的山西、河南、陕西和甘肃等地, 具有润肺下气、止咳化痰的功效, 用于新久咳嗽、喘咳痰多、劳嗽咳血。款冬花始载于《神农本草经》, 列为中品, 谓其“主咳逆上气, 善喘, 喉痹, 诸惊痫, 寒热邪气”^[1]。款冬花是中医临床常用药材, 也是复方麻杏石甘汤^[2]、紫菀散^[3]等多种复方的重要组成原料。

款冬在欧洲同样是一种具有悠久历史的药用植物, 但其用药部位为叶, 同样用于止咳化痰^[4]。目前市场上由于款冬花价格较高, 经常出现非药用部位花梗、根茎等掺杂现象, 而叶子的产量较高可以有效避免掺假现象; 此外, 由于款冬花蕾的发育在地下进行, 采收相对困难。从药用资源的角度来看, 叶比花蕾具有明显的优势。因此, 系统比较款冬花、叶的成分对促进款冬资源有效利用有重要意义。

本课题组前期曾采用气质联用^[5]和核磁共振^[6]对款冬花、叶的化学成分进行了比较。近年来, 液质联用技术广泛地应用于多种药用植物及复方的化学分析, 如酸枣仁^[7]、黄芪建中汤^[8]、远志^[9]、藤黄^[10]等。本文拟采用高分辨液质联用技术结合 Xcalibur 3.2、Compound Discover 2.0、Mass Frontier 7.0 等软件对款冬花、叶的化学成分进行进一步深入比较, 为款冬叶资源利用奠定基础。

材料与方法

仪器与试剂 Thermo fisher U3000 超高效液相色谱仪, 配置在线脱气机、四元梯度泵、柱温箱、自动进样器 (Thermo Fisher Scientific), Thermo Scientific Q Extractive 质谱仪 (Thermo Scientific, Germany); Xcalibur 3.2 软件; Compound Discover 2.0 软件; Mass Frontier 7.0 软件; 十万分之一天平 (德国赛得利斯集团)。乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯 (Thermo Fisher

Scientific)、水为娃哈哈纯净水

药品 对照品咖啡酸 (批号: 14100803) 购自 MUST 公司; 芦丁 (批号: 140912) 购自上海盛中医药化工有限公司; 异绿原酸 A (批号: 14062009)、异绿原酸 B (批号: 14122417)、异绿原酸 C (批号: 14062011) 购自成都普瑞法科技开发有限公司; 山柰酚 (批号: YJ-141119)、绿原酸 (批号: YJ-141004)、金丝桃苷 (批号: YJ-150109) 购自江苏永健医药有限公司; 槲皮素 (批号: 100081-200907) 中国药品生物制品检定所; 没食子酸 (批号: 20130729) 上海源叶生物科技有限公司, 款冬酮、色原酮、款冬花素酯为本实验室自制, 纯度为 98% 以上。连续 3 个年度的款冬花、叶药材均采自山西沁县 (表 1), 经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定, 并保存于山西大学中医药现代研究中心。

对照品溶液的制备 取对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制备成浓度为 1.650 mg·mL⁻¹ 芦丁; 1.170 mg·mL⁻¹ 山柰酚; 1.559 mg·mL⁻¹ 没食子酸; 1.341 mg·mL⁻¹ 槲皮素; 1.414 mg·mL⁻¹ 异绿原酸 A; 1.696 mg·mL⁻¹ 异绿原酸 B; 1.171 mg·mL⁻¹ 异绿原酸 C; 1.062 mg·mL⁻¹ 金丝桃苷; 1.276 mg·mL⁻¹ 咖啡酸; 1.251 mg·mL⁻¹ 款冬酮; 1.032 mg·mL⁻¹ 色原酮; 0.978 mg·mL⁻¹ 款冬花素酯的对照品溶液。

供试品溶液的制备 分别取 3 批不同年限的款冬花、款冬叶粉碎, 每一批平行备样 3 份, 分别取样品粉末 (过 4 号筛) 约 0.5 g, 精密称定, 精密加入甲醇 10 mL, 称定重量, 超声提取 20 min, 取出, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 过滤。过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液作为供试品溶液。

色谱条件 色谱柱: Wasters BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸乙腈 (A), 0.1% 甲酸水 (B)。梯度洗脱: 0~2 min, 10%~20% A; 2~

Table 1 Flower buds and leaves of *T. farfara* L. from different stages

Category	No.	Producing areas	Harvest period	Growing method
Flower buds (H)	KD-29	Qin County, Shanxi Province	2013.11	Cultivation
	KD-30	Qin County, Shanxi Province	2014.11	Cultivation
	KD-33	Qin County, Shanxi Province	2015.11	Cultivation
Leaves (Y)	KY-1	Qin County, Shanxi Province	2013.07	Cultivation
	KY-2	Qin County, Shanxi Province	2014.07	Cultivation
	KY-5	Qin County, Shanxi Province	2015.07	Cultivation

6 min, 20% A; 6~7 min, 20%~67% A; 7~14 min, 67%~73% A; 14~18 min, 73%~80% A; 18~19 min, 80%~95% A; 流速: 0.3 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; DAD 检测器扫描范围为 190~400 nm; 进样量 3 μL。

质谱条件 离子源: 电喷雾离子源 (ESI); 扫描方式: 正负离子同时扫描; 喷雾电压: 3.5 kV; 鞘气流速: 45 psi (1 psi ≈ 6.9 kPa); 辅助气流速: 15 psi; 毛细管温度: 320 °C; 探头加热器温度: 300 °C; 最大喷雾电流: 100 A; S-Lens 分辨率: 55; 扫描范围: m/z 80~1500; 质量分辨率: 70000。

数据处理和分析 将采集到的原始质谱数据利用 Xcalibur 13.0 软件进行峰提取、峰匹配, 用 Compound Discover 2.0 软件进行峰对齐及归一化等预处理, 导出样品名称、保留时间、质荷比以及对应的离子强度组成的数据集。其主要参数设置如下: 保留时间范围 0~22 min; 质荷比范围为 80~1200 Da; 偏差为 5 ppm; 噪音消除水平 6; 响应强度阈值为 50; Mass Frontier 7.0 软件进行化合物结构和峰匹配, 阈值一般为 5%, 可根据峰相对强度做调整。将上述处理的积分数据导入 SIMCA-P 13.0 (Umetrics, Sweden) 软件中进行 PCA 分析 (principal component analysis), 用单变量分析寻找差异代谢物, 对比款冬花、叶化学成分差异, 在 SPSS 软件中对差异成分进行 ANOVA 分析。

本研究拟采用靶标与非靶标结合的方法进行成分鉴定, 并依据结构指认的可靠性从高到低分为 4 个层次 (I、II、III、IV), 具体策略如下: ① 采用 SciFinder、Elsevier SD、Web of Science 数据库, 将文献中有关款冬花的化合物数据进行全面收集整理, 共收录 91 个次级代谢产物信息, 包括苯丙素类、黄酮类、三萜类、甾体类、生物碱类、倍半萜类、色原酮等, 建立化合物库, 包括化合物的名称、分子式、精确分子量、结构式 (ChemBioDraw Ultra 12.0, Cambridge Soft, USA, 保存为 MOL file 格式) 信息; ② 将质谱原始数据 (Xcalibur 3.2 Raw file) 导入 Mass Frontier 7.0 Chromatogram Manager 中, 筛选准分子离子峰的二级谱图, 当关注相对强度较低的峰时, 通过同位素峰、正负离子模式的准分子离子峰、报道物质特征结构碎片等信息筛选二级谱图; ③ 将所建数据库①中的结构式和②确定的二级图谱导入 Database Manger 中, 设置阈值为 3%, 按照公式 1 计算二级碎片匹配率, 红色离子峰代表匹配成功, 同时得到匹配的碎片结构和裂解机制。可通过对照品进一步确认的定为 I 类化合物, 部分结构和二级碎片离子在 Mass Frontier 7.0 可以匹配, 但未通过对照品确

认为的 II 类化合物; 在谱图中只能找到化合物的准分子离子峰, 无二级碎片或仅有少量碎片信息, 推测化合物在样本中含量较低, 定为 IV 类化合物。以上 3 类化合物定为靶标指认; ④ 第 III 类化合物的指认是非靶标指认, 分别将 9 个 H 组、Y 组和一个空白溶剂 (blank) 的谱图导入 Compound Discover 2.0 中, 谱峰归一化, 设置预测化合物的分子组成为 C、H、O、N, 并将化合物碎片匹配值设置在 70% 以上, 通过 CD 数据库 (<http://www.mzcloud.org>) 进行结构指认, 计算结果显示分子离子峰、分子式、分子量、不同样本的谱峰强度、匹配度等信息, 根据匹配度的高低及碎片峰推断化合物。

结果

1 款冬花、叶指认策略及结果

目前未见文献报道采用液质联用技术分析款冬植物化学成分。采用靶标和非靶标指认方法, 从款冬花、叶中共指认了 43 种化合物, 结果见表 2。

2 靶标成分的分析

2.1 I 类化合物的质谱解析

2.1.1 黄酮类化合物 芦丁在正离子模式下可以观察到 m/z 611.1610 [M+H]⁺ 和 633.1430 [M+Na]⁺ 的准分子离子峰, 负离子模式下观察到 m/z 609.1465 [M-H]⁻, 筛选准分子离子峰的二级碎片后导入化学结构, 正离子模式下匹配度较好, 得到 m/z 465 [M+H-fuc]⁺、303 [M+H-fuc-glu]⁺、285 [M+H-fuc-glu-H₂O]⁺ 和 257 [M+H-fuc-glu-H₂O-CO]⁺ 的碎片离子, 通过与芦丁对照品的质谱行为进行对比, 确认 22 号为芦丁 (图 1)。采用对照品比对的方法鉴定的化合物还包括金丝桃苷 (23)、槲皮素 (32)、山柰酚 (33)。

2.1.2 苯丙素类物质 绿原酸在正离子模式下观察到 m/z 355.1023 [M+H]⁺ 和 377.0845 [M+Na]⁺ 的准分子离子峰, 在 Mass Frontier 7.0 匹配的碎片 m/z 163 为 [M+H]⁺ 和 [M+Na]⁺ 脱去奎尼酸部分产生的咖啡酰基正离子; 此外, [M+H]⁺ 峰产生的碎片离子还包括: m/z 337 [M+H-H₂O]⁺、 m/z 193 [M+H-caffeoyl]⁺、 m/z 181 [M+H-quinatate]⁺、163 [M+H-quinatate-H₂O]⁺, 通过与绿原酸对照品的质谱行为进行对比, 确认为 16 号为绿原酸。异绿原酸 A、B 和 C 的结构较绿原酸多一分子的咖啡酰基, 因此具有相似的结构碎片, 裂解规律见图 2。异绿原酸 A、B 和 C 最终通过与对照品比对完成鉴定。

2.1.3 倍半萜类物质 款冬花素酯在正离子模式下观察到 m/z 431.2792 [M+H]⁺ 和 453.2613 [M+Na]⁺ 的

Table 2 Chemical constituents identified in the extracts of *T. farfara*. *Represents confirmed by the standards; a, b, c, d represent the I, II, III, IV; H,Y represent the flower buds and leaves. The matching ratio of I or II=The number of matched fragments /the MS² fragments with threshold greater than 3%

Compd.	<i>t_R</i> /min	Molecular Formula	Selected ion	Experimental	Theoretical	Error (ppm)	MS/MS fragmentaion	Identification	mzCloud Best Match	Source
1c	0.645	C ₅ H ₁₃ NO	[M+H] ⁺	104.107 3	104.106 9	0.3	60.081 3	Choline	87.5	H,Y
2c	0.668	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	147.076 3	147.076 4	0.0	130.049 9	D(-)-Glutamine	88.5	H,Y
3c	0.671	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	116.070 8	116.070 6	0.2	116.070 8, 70.065 7	D-(+)-Proline	87.3	H,Y
4c	0.673	C ₅ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	147.029 1	147.028 7	0.4	129.018 5, 103.039 2, 101.023 5, 87.007 8, 85.028 5	D- α -Hydroxyglutaric acid	85.7	H,Y
5c	0.677	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	118.086 4	118.086 2	0.2	100.024 6, 72.081 3	Valine	80.0	H,Y
6c	0.688	C ₅ H ₄ N ₄ O	[M+H] ⁺	137.046 7	137.045 6	-0.8	95.085 8	Hypoxanthine	83.7	H,Y
7c	0.689	C ₄ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	133.013 1	133.013 4	2.3	115.002 7, 71.012 8	Malic acid	83.7	H,Y
8c	0.691	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	268.103 9	268.104 0	-0.5	136.061 8	Adenosine	94.9	H,Y
9a*	0.883	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.013 7	169.013 1	3.6	125.023 6	Gallic acid	100	H,Y
10c	1.022	C ₉ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	166.086 2	166.086 2	0.2	142.967 0, 131.049 2, 120.081 0	L-Phenylalanine	89.1	H,Y
11c	1.280	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	229.154 9	229.154 6	1.2	173.984 9, 142.086 2, 70.065 6	Leucylproline	89.4	H,Y
12c	1.365	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	[M+H] ⁺	341.086 6	341.086 7	-0.2	-	Esculin	88.7	Y
13b	1.407	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 1	193.949 5	3.4	178.026 8, 175.039 2, 149.060 3	Ferulic acid [11]	91.1	H,Y
14c	1.437	C ₁₁ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	188.070 6	188.070 6	0.4	170.060 0, 146.060 1, 144.080 8, 118.065 3	Indole-3-acrylic acid	94.3	H,Y
15b	1.686	C ₁₅ H ₁₅ O ₉	[M-H] ⁻	191.055 5	191.055 0	0.0	173.044 6, 127.039 2, 102.947 8, 93.033 6, 85.028 5	D(-)-Quinic acid [12]	90.9	H,Y
16a*	1.712	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	355.102 3 377.084 5	355.102 3 377.084 4	0.1 0.3	215.052 5 197.041 7, 185.021 2, 179.031 6	3-O-Caffeoylquinic acid	71.4	H,Y
17c	1.766	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.023 7	137.023 3	2.8	92.919 0, 93.033 5	Salicylic acid	78.7	H,Y
18a*	2.122	C ₉ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺ [M-H] ⁻	181.049 4 179.034 4	181.049 5 179.033 8	-0.3 3.4	135.044 4	Caffeic acid	100	H,Y
19c	2.419	C ₉ H ₆ O ₂	[M+H] ⁺	147.044 0	147.044 0	0.1	128.950 8, 119.049 2, 123.964 5	Coumarin	76	H,Y
20c	2.495	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.018 6	153.018 2	2.8	109.028 6, 103.919 2, 96.958 9	2,4-Dihydroxybenzoic acid	83.9	H,Y
21d	3.257	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	369.118 0 391.284 0	369.118 0 391.099 6	0.1 -0.9		Methyl 3-O-caffeoylquininate		H,Y
22a*	3.341	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	611.161 0 633.143 0	611.160 6 633.142 6	0.6 0.7	465.102 7, 303.049 9 487.084 3, 331.099 7, 325.031 8	Rutin	93.8	H,Y
23a*	3.487	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	465.102 9 487.084 9	465.102 7 487.084 7	0.3 0.5	325.032 0 324.023 8, 303.049 8, 185.041 9	Hyperin	85.7	H,Y
24b	3.828	C ₁₉ H ₂₇ O ₆ N	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	366.191 3 388.172 8	366.191 1 388.173 0	0.6 -0.5	168.101 8, 153.090 9, 150.091 3 135.080 4, 125.059 7, 122.060 1	Senkirkine [13]	72.7	H,Y
25c	3.889	C ₉ H ₆ O ₃	[M+H] ⁺	163.038 9	163.038 9	0.1	145.028 4, 135.044 1, 117.033 6, 107.049 3, 89.038 9	7-Hydroxycoumarine	73.4	H,Y
26a*	3.911	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	517.134 1 539.116 1	517.134 0 539.116 0	0.2 0.3	499.123 7, 181.049 5, 163.038 9 377.084 1, 359.073 9, 355.102 3	3,4-Dicaffeoylquinic acid	90.0	H,Y
27c	3.947	C ₈ H ₆ O ₂	[M+H] ⁺	135.044 0	135.044 0	0.1	117.033 6, 95.049 4, 89.038 9	Phthalaldehyde	78.2	H,Y
28a*	4.011	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	517.134 0 539.116 1	517.134 0 539.116 0	0.1 0.3	499.123 8, 181.049 5, 163.038 9 377.084 1, 359.073 9, 355.102 3	3,5-Dicaffeoylquinic acid	90.0	H,Y
29d	4.061	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ [M+Na] ⁺	449.107 5 471.089 7	449.107 8 471.089 7	-0.6 -0.1	287.054 7	Kaempferol-3-O-glucoside		H,Y

										Continued	
Compd.	t_R /min	Molecular Formula	Selected ion	Experimental	Theoretical	Error (ppm)	MS/MS fragmentaion	Identification	mzCloud Best Match	Source	
30a*	4.582	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M+H] ⁺	517.134 0	517.134 0	0.0	499.123 5, 181.049 5, 163.038 9	4,5-Dicaffeoylquinic acid	90.0	H,Y	
			[M+Na] ⁺	539.116 1	539.116 0	0.3	377.084 5, 359.073 3, 355.102 3				
31c	4.872	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 2	193.049 5	3.6	178.027 2, 161.023 7, 139.039 0	Isoferulic acid	84.1	H,Y	
32a*	7.240	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺	303.047 9	303.049 9	-0.7	285.039 9	Quercetin	100.0	H,Y	
			[M-H] ⁻	301.035 4	301.034 2	4.0	257.044 7, 229.049 7, 165.018 5				
33a*	8.052	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	287.054 9	287.055 0	-0.3	153.018 0, 121.028 3	Kaempferol	66.7	H,Y	
34a*	8.285	C ₁₃ H ₁₄ O ₃	[M+H] ⁺	219.101 5	219.101 5	0.1	181.049 4, 177.091 0, 163.038 9, 145.101 5	2,2-Dimethyl-6-acetylchromanone	80.0	H,Y	
35c	8.854	C ₈ H ₇ N	[M+H] ⁺	118.065 2	118.056 1	1.0	105.045 1, 95.049 5, 91.054 6	Indole	71.2	H,Y	
36d	11.413	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	333.205 8	333.206 0	-0.6		8-Angeloylxy-3,4-epoxy-bisabola-7(14),10-dien-2-one		H,Y	
37d	11.381	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	345.206 1	345.206 0	0.4	217.158 7	7β-(3'-Ethylcis-crotonoyloxy)-5,6-dehydro-3,14-dehydro-Z-notonipetralactone		H,Y	
38b	12.327	C ₂₈ H ₄₂ O ₈	[M+H] ⁺	507.294 9	507.295 2	-0.5	431.279 2, 347.221 5, 317.211 0	Tussilagolactone	80.0	H,Y	
39b	13.145	C ₂₈ H ₄₂ O ₇	[M+H] ⁺	491.300 3	491.300 3	0.0	453.261 2	14-Acetoxy-7β-(3'-ethylcis-crotonoyloxy)-1α-(2'-methylbutyryloxy)-notonipetranone	90.0	H,Y	
			[M+Na] ⁺	513.281 9	513.282 7	-0.6	351.192 6, 339.192 8, 255.134 9, 237.124 6, 215.143 2, 173.095 8, 137.057 3, 125.057 3				
40a*	14.45	C ₂₃ H ₃₄ O ₅	[M+H] ⁺	391.247 7	391.247 9	-0.4	331.227 0, 218.130 1, 217.159 0	Tussilagone	83.3	H,Y	
41d	15.951	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	[M+H] ⁺	317.211 1	317.211 1	0.0		7β-Seneciolyoxyoplopa-3(14)Z,8(10)-dien-2-one		H,Y	
42a*	15.983	C ₂₆ H ₃₈ O ₅	[M+H] ⁺	431.279 2	431.279 7	0.5	329.211 1	7β-(3'-Ethyl-cis-crotonoyloxy)-1α-(2'-methylbutyryloxy)-3(14)-dehydro-Z-notonipetranone	88.9	H,Y	
				453.261 3	453.261 1	0.5	317.211 1, 237.125 2, 215.143 3, 173.096 3				
43b	17.389	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	[M+H] ⁺	331.226 6	331.226 7	-0.4	218.130 1, 217.159 0, 175.148 2	Tussilagonone	80.0	H,Y	

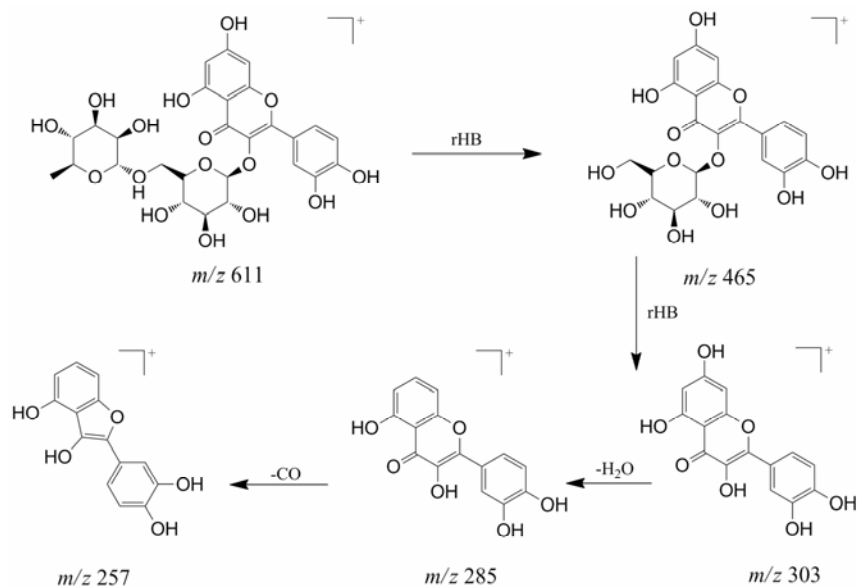


Figure 1 Fragmentation process of rutin

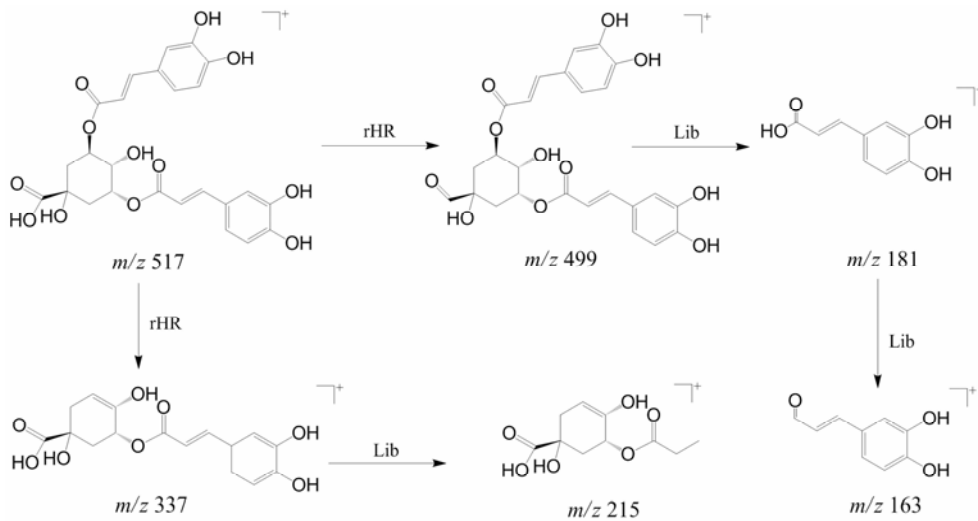


Figure 2 Fragmentation process of isochlorogenic acids

准分子离子峰, 在 Mass Frontier 7.0 中导入二级碎片和化学结构, 匹配的碎片包括 m/z 329 $[M+H-MebuO]^+$ 、 m/z 317 $[M+H-MesenO]^+$ 、 m/z 233 $[M+H-MesenO-C_3H_8O]^+$ 、 m/z 215 $[M+H-MesenO-MebuO]^+$ 、 m/z 173 $[M+H-MesenO-MebuO-C_3H_6]^+$ 、 m/z 115 $[MesenO+H]^+$ 、 m/z 103 $[MebuO+H]^+$, 通过与款冬花素酯对照品的质谱行为进行对比确认 42 号为款冬花素酯 (图 3)。款冬酮也通过类似的方法得到鉴定。

2.2 II 类化合物的质谱解析

2.2.1 倍半萜类物质 Tussilagolactone 分子式为 $C_{18}H_{24}O_8$, 比款冬素酯多一个氧原子和 14 位取代基 $OAc^{[14]}$, 该成分在 1、7 位取代基 (分别为 MesenO、MebuO) 与款冬花素酯相同, 在正离子模式下产生 m/z 507.2949 $[M+H]^+$ 和 529.2769 $[M+Na]^+$, 在 Mass

Frontier 7.0 中匹配的二级碎片包括 m/z 447 $[M+H-OAC]^+$ 、431 $[M+H-OAC-O]^+$ 、347 $[M+H-OAC-O-MebuO]^+$ 、317 $[M+H-OAC-O-MesenO]^+$ 、233 $[M+H-OAC-O-MesenO-MebuO]^+$, 可能的裂解规律如图 4 所示。

2.2.2 苯丙素类化合物 阿魏酸的分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$, 负离子模式下产生 m/z 193.05019 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, 二级碎片有 m/z 178、175、149、134, 负离子模式下 Mass Frontier 7.0 匹配度较差, 结合文献^[11] 裂解规律推断该物质为阿魏酸。

2.3 IV 类化合物的质谱解析

次级代谢物库中化合物 3-*O*-咖啡酰基奎尼酸甲酯 (21), 分子式为 $C_{17}H_{20}O_9$, 正离子模式下产生 m/z 369.1180 $[M+H]^+$ 和 391.2840 $[M+Na]^+$ 的准分子离子

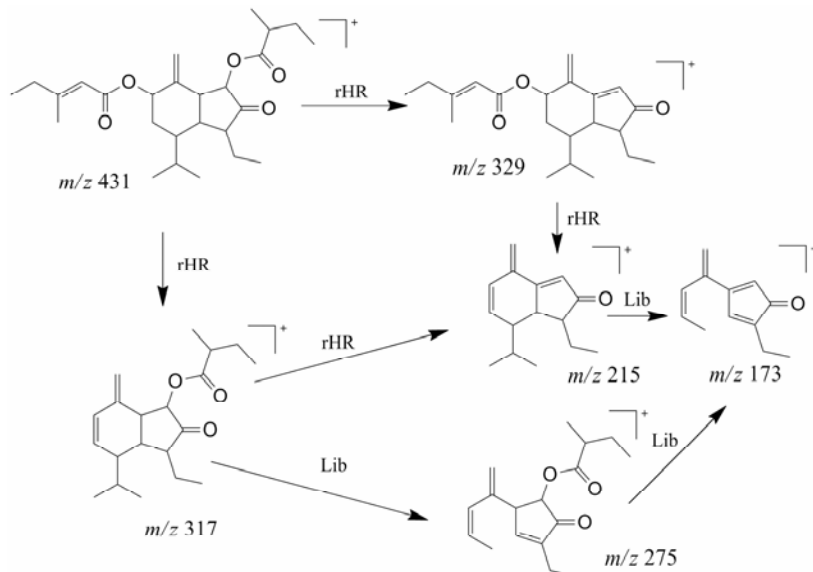


Figure 3 Fragmentation process of 7β-(3'-ethyl-cis-crotonyloxy)-1α-(2'-methylbutyryloxy)-3(14)-dehydro-Z-notonipetranone

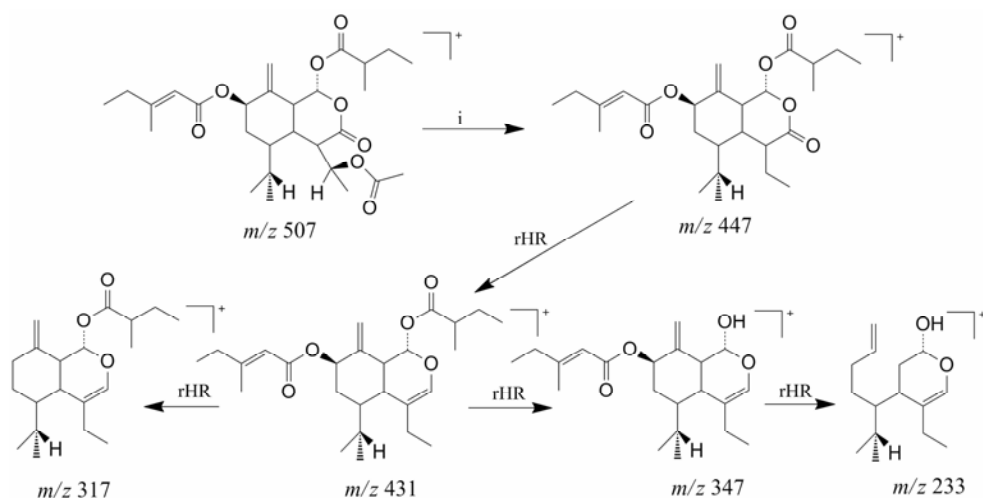


Figure 4 Fragmentation process of tussilagolactone

峰, 但无该准分子离子峰的二级碎片。此类物质还包括款冬中黄酮类物质山柰酚-3-*O*-葡萄糖苷^[15], 倍半萜类物质 8-angeloylxy-3,4-epoxy-bisabola-7(14),10-dien-2-one^[16]、7 β -(3'-ethylcis-crotonoyloxy)-5,6-dehydro-3,14-dehydro-*Z*-notonipetalactone^[17]、7 β -senecioyloxyoplopa-3(14)*Z*,8(10)-dien-2-one^[18]。

3 非靶标成分分析

III类化合物即为非靶标化合物, 该类化合物多为初级代谢产物, 通过 Compound Discover 2.0 及其关联的数据库 (<http://www.mzcloud.org>) 检索并与二级碎片进行相似性比对, 所鉴定的成分包括黄嘌呤、胆碱、苯丙氨酸、3-吡啶丙烯酸、水杨酸等 20 个化合物。匹配度均在 70% 以上, 其中腺苷匹配度最高为 94.9%, 吡啶最低为 71.2%, 其余物质大多在 85% 以上。

4 款冬花、叶比较

无监督的模式识别方法 PCA 分析是通过降维技术把具有一定相关性的指标约化为几个综合指标, 可以反映数据的原始状态, 从而直观地显示不同样品之间的整体差异。以前两个主成分为坐标轴构建的得分散点图 (R_2 : 0.72, Q_2 : 0.542) 可见款冬花、叶可明显区分 (图 5), 说明二者化学组成存在显著差异。

运用 GraphPad Prism 5.01 软件对表 1 化合物总离子流图谱峰未重叠物质进行单变量分析 (图 6), 花中含量较高的化合物有黄酮类物质芦丁、山柰酚; 倍半萜类物质款冬素酯、款冬酮、款冬花酮、14-acetoxy-7 β -(3'-ethyl-cis-crotonoyloxy)-1 α -(2'-methylbutyryloxy)-notonipetranone、tussilagolactone、7 β -(3'-ethyl-cis-crotonoyloxy)-5,6-dehydro-3,14-dehydro-*Z*-notonipetalactone、8-angeloylxy-3,4-epoxy-bisabola-7(14),10-

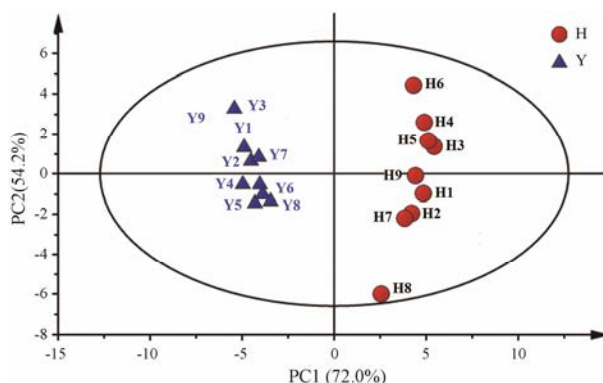


Figure 5 PCA score plots of the UPLC-MS spectra data of flower buds (H) and leaves (Y)

dien-2-one; 以及其他类物质脯氨酸、羟基戊二酸、苹果酸、色原酮。叶中含量较高的化合物有苯丙素类物质绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、异阿魏酸、阿魏酸, 肾形千里光碱以及次黄嘌呤、没食子酸、苯丙氨酸、3-吡啶丙烯酸、水杨酸、2,4-二羟基苯甲酸等其他化合物。款冬叶中特有的成分是马栗树皮甙。金丝桃苷、槲皮素、咖啡酸、奎尼酸、亮氨酸脯氨酸、谷氨酰胺在花和叶中含量无显著差异。

讨论

本文采用液质联用技术对款冬花、叶化学成分进行了比较。与前期研究相比, 新检测款冬代谢物 4 种, 即液质联用技术可以更加灵敏的检测款冬中的次级代谢产物, 与本课题组前期基于核磁共振和气质联用的分析互为补充, 全面揭示款冬花和叶的化学差异。通过靶标和非靶标结合的指认策略, 结合文献报道、标品比对及软件识别和数据库关联, 一共指认了款冬中 43 种化学成分。款冬花和叶含有相似的化学成

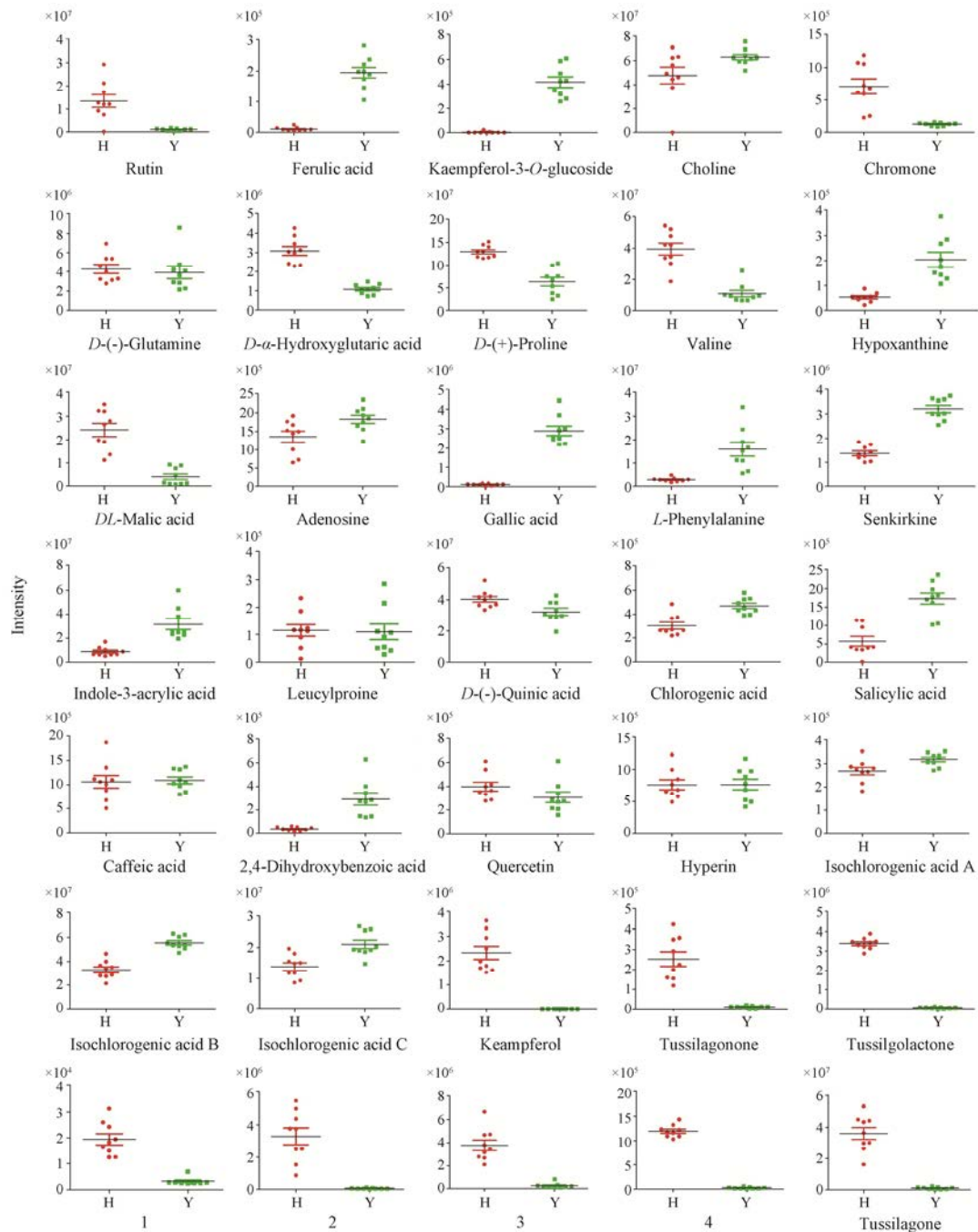


Figure 6 Quantification of compounds of flower buds (H) and leaves (Y) from *T. farfara* L. 1: 7β -(3'-Ethyl-*cis*-crotonoyloxy)-1 α -(2'-methylbutyryloxy)-3(14)-dehydro- *Z*-notonipetrane; 2: 14-Acetoxy-7 β -(3'-ethyl-*cis*-crotonoyloxy)-1 α -(2'-methylbutyryloxy)-notonipetrane; 3: 7β -(3'-Ethyl-*cis*-crotonoyloxy)-5,6-dehydro-3,14-dehydro- *Z*-notonipetrane; 4: 8-Angeloyloxy-3,4-epoxy-bisabol-7(14),10-dien-2-one

分, 款冬酮、款冬花素酯等倍半萜类物质在花中的含量远远高于叶, 而绿原酸、异绿原酸等苯丙素类物质在叶中的含量高于花蕾; 黄酮类物质金丝桃苷、槲皮素在款冬花和叶中含量接近, 而芦丁、山柰酚在款冬花中含量较高, 与课题组之前的研究结果^[6]基本一致。

本课题组前期研究显示款冬花和叶均具有明显的止咳化痰作用, 且叶的作用略优于花, 说明以绿原酸类为代表的苯丙素类成分与款冬花止咳化痰作用

相关性较大^[19], 也与其他课题组的研究结果一致^[20]。鉴于款冬叶具有明显的资源和采收优势, 在后续工作中应对其是否可代替花蕾入药进行系统的研究。目前《中国药典》中款冬花的质量评价指标为款冬酮, 建议在款冬花质量标准提升中加入苯丙素类成分。文献报道款冬酮为代表的倍半萜类具有显著的抗炎作用, 但由于中药多为水煎入药, 而低极性的倍半萜类在水提物中含量较低, 这类成分与款冬花止咳化痰

的关系也值得进一步研究。

References

- [1] Li J, Zhang S, Qin XM, et al. Comparison on chemical constituents in raw and honey baked *Farfarae Flos* by NMR-based metabolomic approach [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2015, 46: 3009–3016.
- [2] Zhou XN. The Clinical Study of Compound *MaxingShiGan* Decoction Prevent and Treat RILI Caused by CCRT in Patients with Stage III Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) (复方麻杏石甘汤防治III期 NSCLC 同步放化疗所致放射性肺损伤的临床研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang Chinese Medical University, 2016.
- [3] Liu KY. Studies on Therapeutic Basis of Ziwan Powder and Development of New Drug (紫菀散药效物质基础的研究及新药研制) [D]. Tianjin: Tianjin University, 2006.
- [4] Tys J, Szopa A, Lalak J, et al. A botanical and pharmacological description of petasites species [J]. *Curr Issues Pharm Med Sci*, 2015, 28: 151–154.
- [5] Xue SY, Li ZY, Zhi HJ, et al. Metabolic fingerprinting investigation of *Tussilago farfara* L. by GC-MS and multivariate data analysis [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2012, 41: 6–12.
- [6] Zhi HJ, Qin XM, Sun HF, et al. Metabolic fingerprinting of *Tussilago farfara* L. using ^1H NMR spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23: 492–501.
- [7] Zhang F, Li M, Qiao L, et al. Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae* Semen by UPLC/Q TOF MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Ziziphus* species [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 122: 59–80.
- [8] Liu YT, Hu YH, Xu WX, et al. Rapid identification on chemical constituents in Huangqi Jianzhong Tang by UHPLC coupled with hybrid quadrupole-orbitrap MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 964–970.
- [9] Zhang F, Li X, Li Z, et al. UPLC/Q-TOF MS-based metabolomics and qRT-PCR in enzyme gene screening with key role in triterpenoid saponin biosynthesis of *Polygala tenuifolia* [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e105765.
- [10] Zhou A, Li QL, Peng DY, et al. Analysis of xanthenes in gamboge by HPLC-PDA-ESI/MS [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 838–842.
- [11] Wang XM, Zhang F, Liu Y, et al. LC-MS/MS determination of caffeic acid, ferulic acid, and isoferulic acid in *Rhizoma Cimicifugae* [J]. *Tianjin J Tradit China Med (天津中医药)*, 2014, 31: 686–689.
- [12] Han J, Ye M, Guo H, et al. Analysis of multiple constituents in a Chinese heal preparation *Shuang-Huang-Lian* oral liquid by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44: 430–438.
- [13] Pu SB, Xu DR, Zhang M, et al. The detection of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in flos by LC/MSⁿ [J]. *Chin J Nat Med (中国天然药物)*, 2004, 2: 293–297.
- [14] Masao K, Noriko S. Studies on the Constituents of *Tussilago farfara* L. II. Structures of new sesquiterpenoids isolated from the flower buds [J]. *Chem Pharm Bull*, 1992, 40: 2753–2755.
- [15] Liu YF, Yang LW, Wu B. Studies on the constituents of *Tussilago farfara* L. [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2007, 32: 2378–2381.
- [16] Park HR, Yoo MY, Seo JH, et al. Sesquiterpenoids isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. inhibit diacylglycerol acyltransferase [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 10493–10497.
- [17] Shi W, Han GQ, Gao JJ. Two new sesquiterpenoids from *Tussilago farfara* L. [J]. *Chin Chem Lett*, 1995, 6: 585–586.
- [18] Yasunori Y, Hirokazu K, Masao K, et al. Structures of oplopane-type sesquiterpenoids from the flower buds of *Tussilago farfara* L. [J]. *Chem Pharm Bull*, 1999, 47: 705–707.
- [19] Li ZY, Zhi HJ, Zhang FS, et al. Metabolomic profiling of the antitussive and expectorant plant *Tussilago farfara* L. by nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 75: 158–164.
- [20] Wu QZ, Zhao DX, Xiang J, et al. Antitussive, expectorant, and anti-inflammatory activities of four caffeoylquinic acids isolated from *Tussilago farfara* [J]. *Pharm Biol*, 2016, 54: 1117–1124.