

基于高效薄层色谱-电喷雾质谱联用技术建立苦参和山豆根专属性特征图谱

李 凡¹, 谷丽华^{1,2*}, 金武燮^{1,2}, 李林楠¹, 韩竹箴¹, 杨 莉^{1,2}, 王峥涛^{1,2*}

(1. 上海中医药大学中药研究所, 中药标准化教育部重点实验室, 国家中医药管理局中药新资源与质量评价重点实验室, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203)

摘要: 苦参为苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根, 山豆根为越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎, 两者均来自豆科槐属, 成分和功效相似而有差异, 现有标准仅显示其生物碱类成分差异性难以体现, 不利于两味药材的质量控制。本研究利用高效薄层色谱技术多维度多层次分析优势, 对供试品制备方法和色谱参数进行优化, 整体展现苦参和山豆根共有和差异性特征成分。利用薄层色谱-电喷雾质谱 (HPTLC-ESI-MS) 在线鉴定技术对特征条带中化学成分进行快速鉴定, 并导向分离获得部分单体成分。结果从苦参与山豆根中共发现 17 个主要特征条带, 除了 3 个已知成分, 采用 HPTLC-ESI-MS 鉴定出另 12 个未知成分, 包括 1 种生物碱和 11 种黄酮成分, 后采用对照品对照或分离后经核磁共振波谱解析对鉴定结果进行了验证。最后采用优化后的色谱方法, 为苦参和山豆根建立了同一的薄层色谱专属性鉴别方法。HPTLC-ESI-MS 联用技术兼具薄层色谱简便、直观和整体性, 能快速鉴定目标成分结构。建立的特征图谱直观反映药材整体特征和特异性, 为其他同属、易混药材的分析鉴别提供了参考。

关键词: 苦参; 山豆根; 高效薄层色谱; 高效薄层色谱-质谱; 黄酮

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-3090-09

Characteristic identification of Sophorae Flavescentis Radix and Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma based on HPTLC-ESI-MS

LI Fan¹, GU Li-hua^{1,2*}, KIM Moo-seob^{1,2}, LI Lin-nan¹, HAN Zhu-zhen¹, YANG Li^{1,2}, WANG Zheng-tao^{1,2*}

(1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China)

Abstract: Sophorae Flavescentis Radix is the dried root of *Sophora flavescens* Ait. and Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma is the dried root and rhizome of *Sophora tonkinensis* Gagnep. The two drugs are both from the same genus *Sophora*, having similar and different compositions and efficacies, however, their differences are not fully demonstrated in current standard. In this study, the high-performance thin-layer chromatography with multi-dimensional and multi-level features combined with electric spray mass spectrometry (HPTLC-ESI-MS) was used to discover and identify the characteristic zones in extracts of Sophorae Flavescentis Radix and Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma, after optimizing the preparation method of the test solution and chromatographic parameters. As a result, 17 main characteristic zones were found on HPTLC chromatograms of Sophorae Flavescentis Radix and Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma, among them, besides 3 known chemicals, another 12 unknown components

收稿日期: 2023-02-24; 修回日期: 2023-08-01.

基金项目: 上海市“三年行动”计划项目 (ZY(2021-2023)-0215); 国家药典委员会标准项目 (2018Z003).

*通讯作者 Tel: 86-21-51522507, E-mail: lhgu@shutcm.edu.cn; ztwang@shutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0223

were identified by HPTLC-ESI-MS, they are 1 alkaloid and 11 flavonoids. The identification results were verified by the reference standards partially and nuclear magnetic resonance spectra after guided-isolation. Finally, a unified HPTLC specific identification method with different markers was established to identify *Sophorae Flavescentis Radix* and *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* simultaneously. Thanks to abundant chemical information provided when using diverse polarity mobile phases and derivatization reagents, the HPTLC technology offers a convenient strategy for discovery, quality evaluation, and identification of target chemicals when connecting with mass spectrometry.

Key words: *Sophorae Flavescentis Radix*; *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*; HPTLC; HPTLC-ESI-MS; flavonoid

中药所含成分复杂多样, 发挥药效的物质基础尚不明确, 往往是多成分的共同作用^[1], 因此对中药的质量评价, 不但要关注其特异性, 尤其要关注其整体性; 中药取之于自然, 非纯工业化产品, 地理、物候、种植、加工等诸多因素使其外观差异显著, 内在物质及含量也在一定范围内上下波动, 精细化分析很多时候不适合中药的质量控制, 而对药材的整体轮廓分析和主要差异成分的把控更具实际意义。薄层色谱 (TLC/HPTLC) 技术具有简便、快速、经济、直观等特点^[2], 其灵活的展开剂极性配比与丰富的显色试剂的使用, 使其在成分定性分析方面形成独特优势, 目前该技术已被各国药典广泛用于中草药定性鉴别分析, 与质谱技术联用还可对分离的未知成分结构进行快速鉴定^[3-5]。

苦参 (*Sophorae Flavescentis Radix*, SF) 和山豆根 (*Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*, ST) 均来自豆科槐属, 苦参为苦参 *Sophora flavescens* Ait. 的干燥根, 味苦, 寒; 归心、肝、胃、大肠、膀胱经, 具清热燥湿、杀虫、利尿之功。山豆根为越南槐 (*Sophora tonkinensis* Gagnep.) 的干燥根和根茎, 味苦, 寒; 有毒; 归肺、胃经, 具有清热解毒、消肿利咽之效^[6]。两药性苦味寒, 均具有清热消肿的功效, 不同之处在于苦参善清下焦湿热以及杀虫作用, 山豆根善清肺、胃热引起的上焦实热, 此外山豆根显示“有毒”。化学成分上, 两者均含有包括苦参碱、氧化苦参碱等喹诺里西啶生物碱类成分, 近年来还发现都含有丰富的黄酮成分^[7,8]。

《中华人民共和国药典》(2020年版一部) 苦参和山豆根薄层色谱鉴别及含量测定项下的指标成分均为生物碱类成分, 苦参的定性指标为苦参碱、氧化苦参碱和槐定碱, 采用了两种薄层色谱方法, 含量测定指标为苦参碱和氧化苦参碱; 山豆根的定性和定量指标均为苦参碱和氧化苦参碱。两种药材的薄层色谱鉴别方法差异较大, 形成的图谱却很相似, 易导致苦参和山豆根的基原鉴定错误。且苦参鉴别项中的薄层板需要做改性处理, 展开剂需要分层, 使用二次展开模式, 操作较为繁琐。本研究以山豆根和苦参为例, 通过对比不同

极性展开剂和不同显色剂下的薄层色谱图, 寻找两味药材共有条带和特异条带, 联合 HPTLC-ESI-MS 技术对目标条带进行在线鉴定, 获得目标成分, 建立同时鉴别山豆根和苦参的专属性薄层色谱鉴别方法, 为山豆根和苦参药材和饮片的质量标准提升提供参考。

材料与amp;方法

仪器与试剂 数控超声波清洗器 (Ultrasonic Cleaner, 美国 Branson 公司); 电子分析天平 (BSA124S-CW, 瑞士梅特勒托利多仪器公司); 电子分析天平 (BT-25S, 北京赛多利斯科学仪器有限公司); SF-TGL-16 离心机 (上海菲恰尔分析仪器有限公司); 双槽展开缸、薄层色谱自动点样仪、薄层色谱自动展开仪、薄层色谱成像仪、薄层色谱质谱接口仪均购自瑞士 CAMAG 公司; Milli-Q Synthesis A10 (Millipore, 美国 Bedford 公司); 线性离子阱质谱 (LTQ-MS, 21880, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 三重四极杆串联飞行时间质谱仪 (Agilent 6545 UPLC-QToF-MS, 美国 Agilent 公司); 核磁共振波谱仪 (Bruker Avance III 400 NMR spectrometer, 美国 Bruker Daltonics 公司); 制备液相色谱仪 (LC-3000, 北京创新恒通科技有限公司)。

色谱纯试剂甲醇和乙腈, 分析纯试剂甲醇、氨水、无水乙醇、三氯甲烷、二氯甲烷和乙酸乙酯, 200~300 目硅胶和 Sephadex LH-20 凝胶, 均购于上海国药集团化学试剂有限公司; 超纯水由 Milli-Q 纯水仪 (Millipore, Billerica, 美国) 制备; 高效硅胶预制 GF₂₅₄ 薄层板 (德国 Merck 公司); 高效硅胶预制 GF₂₅₄ 薄层板 (德国 MN 公司); 高效硅胶 GF₂₅₄ 预制薄层板和制备型硅胶预制薄层板 (烟台市化学工业研究所)。苦参碱 (matrine, 批号 T03F9F54046)、槐定碱 (sophoridine, 批号 Y19F7Y17832)、三叶豆紫檀苷 (trifolirhizin, 批号 Y06F6H1) 购自上海源叶生物科技有限公司; 氧化苦参碱 (oxymatrine, 批号 15032204) 购自南京狄尔格医药科技有限公司; 氧化槐果碱 (oxysophocarpine, 批号 7007)、马卡因 (maackiain, 批号 4106)、芒柄花素 (formononetin, 批号 3523)、苦参

酮 (kurarinone, 批号 7434)、苦参新醇 F (kushenol F, 批号 6120) 和 4',7-二羟基黄酮 (4',7-dihydroxyflavone, 批号 111787-201002) 购自诗丹德标准技术服务有限公司; 山豆根素 (sophoranone)、砂生槐黄酮 A (sophoraflavone A) 和黑豆黄素 (bayin) 为实验室自制。苦参对照药材 (121019-201407) 购自中国食品药品检定研究院; 山豆根对照药材 (SDG-20160315) 来自上海中药标准化研究中心; 苦参对照提取物 (EKS-20190801) 购自广州科曼生物科技有限公司。

实验材料 收集苦参 (SF) 和山豆根 (ST) 样品共 21 件, 经上海中医药大学王峥涛教授对其基原进行鉴定, 10 件苦参样品来源于苦参 *Sophora flavescens*, 11 件山豆根样品来源于越南槐 *Sophora tonkinensis*, 凭证标本存放于上海中药标准化研究中心标本库。样品信息见表 1。

Table 1 Sample information of commercial Sophorae Flavescens Radix and Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma samples. SF: Sophorae Flavescens Radix; ST: Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma

No.	Lot No.	Label name	Collection location	Identification result
1	SF-1	Kushen	Hebei	<i>Sophora flavescens</i>
2	SF-2	Kushen	Sichuan	<i>S. flavescens</i>
3	SF-3	Kushen	Hebei	<i>S. flavescens</i>
4	SF-4	Kushen	Jilin	<i>S. flavescens</i>
5	SF-5	Kushen	Hebei	<i>S. flavescens</i>
6	SF-6	Kushen	Shanxi	<i>S. flavescens</i>
7	SF-7	Kushen	Hebei	<i>S. flavescens</i>
8	SF-8	Kushen	Anhui	<i>S. flavescens</i>
9	SF-9	Kushen	Sichuan	<i>S. flavescens</i>
10	SF-10	Kushen	Shanxi	<i>S. flavescens</i>
11	ST-1	Shandougen	Shanghai	<i>Sophora tonkinensis</i>
12	ST-2	Shandougen	Shanghai	<i>S. tonkinensis</i>
13	ST-3	Shandougen	Anhui	<i>S. tonkinensis</i>
14	ST-4	Shandougen	Anhui	<i>S. tonkinensis</i>
15	ST-5	Shandougen	Anhui	<i>S. tonkinensis</i>
16	ST-6	Shandougen	Anhui	<i>S. tonkinensis</i>
17	ST-7	Shandougen	Anhui	<i>S. tonkinensis</i>
18	ST-8	Shandougen	Shanghai	<i>S. tonkinensis</i>
19	ST-9	Shandougen	Shanghai	<i>S. tonkinensis</i>
20	ST-10	Shandougen	Anhui	<i>S. tonkinensis</i>
21	ST-11	Shandougen	Northeast China	<i>S. tonkinensis</i>

对照品溶液的制备 取氧化苦参碱、氧化槐果碱、苦参碱和槐定碱各适量, 溶于甲醇, 分别配制成各含 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的生物碱对照品溶液; 取三叶豆紫檀苷、苦参酮、苦参新醇 F、芒柄花素、马卡因、山豆根素、4',7-二羟基黄酮、砂生槐黄酮 A 和黑豆黄素, 溶于甲醇, 分别配成含山豆根素 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 含 4',7-二羟基黄酮 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其他均各为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

供试品和对照药材溶液的制备 取药材粉末各

0.25 g , 加 80% 乙醇 5 mL , 超声处理 20 min , 离心 (6 min , $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取上清液, 作为供试品溶液。同法制备山豆根和苦参的对照药材溶液。取苦参对照提取物适量, 加甲醇超声 15 min , 制成每 1 mL 含 20 mg 的溶液, 作为苦参对照提取物溶液。

薄层色谱条件 按照薄层色谱法 (《中华人民共和国药典》2020 年版通则 0502) 试验, 分别吸取对照药材、提取物和供试品溶液各 $8 \mu\text{L}$, 点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上。分别用展开剂三氯甲烷-甲醇-浓氨试液 (9:1:0.1, 展开剂 1) 和正丁醇-冰醋酸-水 (7:1:1, 展开剂 2) 饱和 30 min , 展开, 展距为 8.5 cm ; 取出, 晾干。每种展开条件平行制备 2 张薄层板, 第一张显色前置可见光、紫外光 (254 和 365 nm) 下检视, 喷以 2% 三氯化铝乙醇溶液, 在 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热数分钟, 置可见光、紫外光 (365 nm) 下检视; 再喷以 10% 硫酸乙醇溶液, 在 $105 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热数分钟, 置可见光和紫外光 (365 nm) 下检视; 最后喷以碘化铯钾乙醇溶液, 置可见光下检视, 拍照记录。第二张平行制备的薄层板避光备用。

质谱条件 通过对比不同展开剂 (多维度) 和不同显色剂 (多层次) 薄层色谱图中目标条带, 将备用薄层板上的对应目标条带通过 TLC-MS Interface 装置的红外光标对准椭圆形萃取头位置, 流动相由 UPLC 仪器泵出, 经过 TLC-MS Interface 流经薄层板的目标条带位置, 将目标条带处的物质洗脱, 洗脱液通过管道继续流入 LTQ 型电喷雾质谱仪进行质谱分析。流动相溶剂组成为甲醇-水 (80:20), 流速为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。选择正、负离子模式分别检测, 选择最佳采集模式。毛细管喷雾电压 3.50 kV , 干燥温度 $300 \text{ }^\circ\text{C}$, 毛细管温度 $300 \text{ }^\circ\text{C}$, 毛细管电压 10 V , Tube Lens 电压 50 V , 鞘气体积流量 20 arb , 辅助气体积流量 10 arb , 反吹气体积流量 5 arb , 扫描质量范围 $m/z 100 \sim 1000$ 。

化学分离 取山豆根粉末 10 g , 100 mL 乙酸乙酯加热回流提取 3 次 (每次 1 h), 合并提取液, 滤过, 滤液旋干, 得浸膏 735 mg , 将浸膏用二氯甲烷-甲醇 (1:1) 5 mL 溶解, 经 Sephadex LH-20 (CH_2Cl_2 - CH_3OH , 1:1) 分离, 合并目标化合物收集液, 将收集液旋干, 得干膏 70 mg , 用甲醇复溶, 经薄层色谱制备分离、纯化得到条带 10 中的化合物 (15 mg)。

取山豆根粉末 20 g , 200 mL 70% 甲醇加热回流提取 3 次 (每次 1 h), 合并提取液, 滤过, 滤液旋干, 得浸膏 6 g , 取浸膏 2.5 g , 用水 5 mL 溶解, 经 D101 大孔树脂分离, 分别用水、10% 乙醇、30% 乙醇洗脱, 收集 30% 乙醇洗脱液, 将洗脱液旋干, 得浸膏 843 mg , 将浸膏用甲醇复溶, 经中压制备液相分离, 合并目标收集液, 旋干, 得干膏 41 mg , 用甲醇 10 mL 复溶, 经薄层色谱制备分离、

纯化得到条带 15 中的化合物 (5 mg)。

结果

1 特征性条带的发现

实验分别使用两种不同极性的展开剂和 3 种不同显色剂, 见图 1。展开剂 1 用于表征药材中小极性成分, 展开剂 2 用于表征展开剂 1 中原点未展开部位。共发现 17 个主要特征条带。

展开剂 1 的 365 nm 图谱中, 苦参可明显看到 6 个蓝色荧光条带, 根据 R_f 值依次标记为 2、4、5、6、7 和 9; 山豆根除了含有与苦参的共有条带 7 和 9, 还发现另两个亮蓝色的特征条带 3 和 8。展开剂 2 中山豆根还观察到两个明显的荧光条带 15 和 16。

展开剂 1 的可见光图谱中, 苦参自下而上发现一个棕红色条带, 两个橙黄色和一个浅黄色条带, 依次为 1、4、5 和 9, 其中 1 和 9 为苦参和山豆根的共有条带, 9 在山豆根中的含量明显高于苦参, 此外山豆根还有一个深红色特有带 10。展开剂 2 中苦参和山豆根均明

显看到一个黑棕色共同条带, 记为 17, 经硫酸乙醇显色后呈现黑棕色, 推测可能是糖类。

展开剂 1 的碘化铋钾显色的图谱中, 苦参含有四个橙色生物碱条带, 自下而上分别为 11、12、13 和 14, 山豆根含有橙色条带 11、12 和 14, 其中条带 12、13 和 14 分别是氧化苦参碱、槐定碱和苦参碱, 是药典的指标成分; 展开剂 2 中生物碱条带基本停留在原点附近, 可能由于展开剂中不含有碱性试剂, 生物碱在展开剂中溶解度欠佳所致。

2 特征条带的质谱鉴定

HPTLC-ESI-MS 在线联用技术被用于对薄层色谱图中主要特征条带中化学成分的鉴定。通过质谱获得一级质谱图, 改变碰撞能获得碎片离子, 参考文献信息对薄层色谱图中标注的未知条带中主要成分进行结构确证。从上述 14 个未知的主要特征条带中共鉴定出 12 个化学成分 (8、17 号条带未获得鉴定), 其中黄酮类成分 11 个, 两药共有黄酮 3 个, 分别是三叶豆紫檀苷 (1), 芒柄花素 (7) 和 马卡因 (9); 苦参中的特征成分有

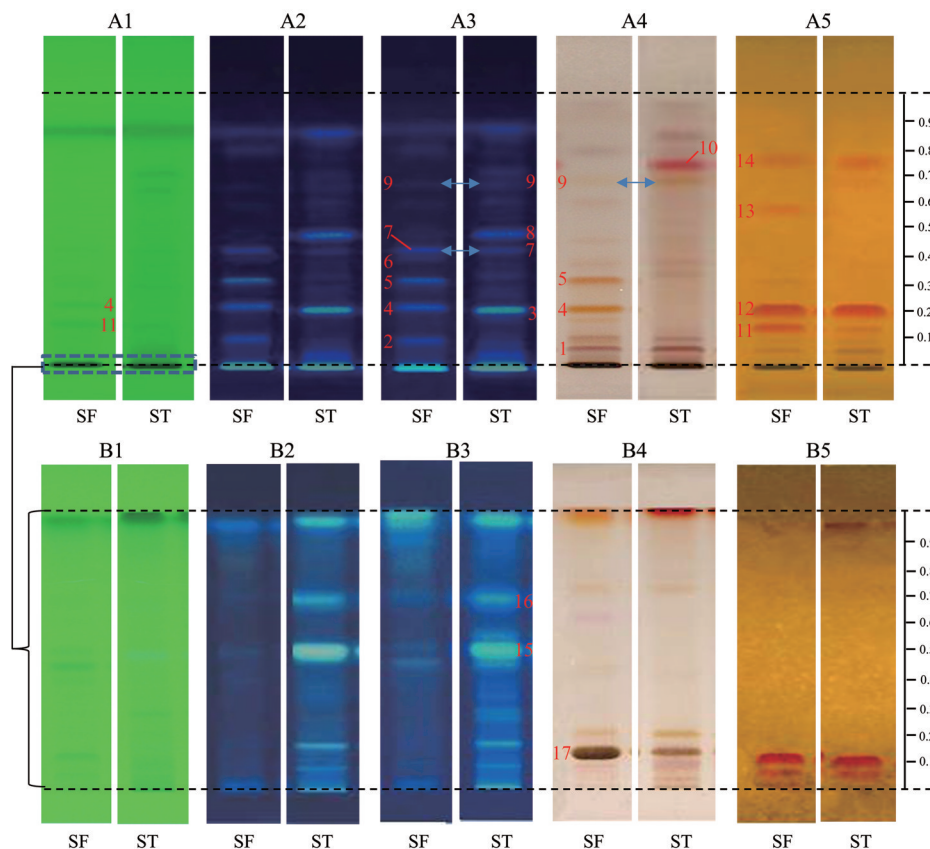


Figure 1 Comparison of HPTLC chromatograms of SF and ST. The mobile phase of A is the mixture of chloroform, methanol, and concentrated ammonia TS (9:1:0.1); the mobile phase of B is the mixture of *n*-butanol, glacial acetic acid, and water (7:1:1); A1/B1 are detected under UV 254 nm before derivatization; A2/B2 are detected under UV 365 nm before derivatization; A3/B3 are detected under UV 365 nm after derivatization using 2% solution of AlCl_3 in ethanol; A4/B4 are detected under visible light after derivatization using 10% sulfuric acid in ethanol; A5/B5 are detected under visible light after derivatization using potassium bismuth iodide TS in ethanol

苦参醇 I (2)、苦参酮 (4)、苦参新醇 F (5)、异黄腐醇 (6)、山豆根的特有成分有 4',7-二羟基黄酮 (3)、山豆根素 (10)、砂生槐黄酮 A (15) 和黑豆黄素 (16)。1 个未知生物碱成分被鉴定为氧化槐果碱 (11), 在苦参中含量明显高于山豆根。质谱信息和鉴定结果见表 2^[7-15]。以条带 10、11 和 15 为例对裂解碎片进行解析, 见图 2。条带 10 ($R_f = 0.75$) 在 ESI⁺ 模式下一级质谱图可见准分子离子峰 m/z 461.25 [M+H]⁺, 增加碰撞能之后获得二级质谱, 得到 m/z 376.08 [M+H-O-C₅H₉·]⁺、348.08 [M+H-CO₂-C₅H₉·]⁺、279.08 [M+H-CO₂-2C₅H₉·]⁺ 和 148.91 [^{1,3}A⁺-C₄H₈]⁺ 等碎片, 根据上述碎片信息结合文献^[13]初步将条带 10 中成分鉴定为山豆根素。条带 11 ($R_f = 0.15$) 在 ESI⁺ 模式下一级质谱图可见准分子离子峰 m/z 263.16 [M+H]⁺ 和加合离子峰 m/z 285.16 [M+Na]⁺, 二级质谱得到 m/z 245.08 [M+H-H₂O]⁺、203.08 [M+H-H₂O-C₃H₆]⁺、150.00 [M+H-H₂O-C₃H₅NO]⁺ 和 136.00 [M+H-H₂O-C₆H₇NO]⁺ 等碎片, 根据上述碎片信息结合文献^[4,9,14]初步将该成分鉴定为氧化槐果碱。采用氧化槐果碱对照品进行验证, 薄层板上相同 R_f 值处出现颜色

相同的条带, 表明鉴定结果正确。条带 15 ($R_f = 0.49$) 为非生物碱类成分, 其紫外光谱在 259 nm 处有最大吸收, 且极性较大, 可能是黄酮苷类成分, 其在 ESI⁺ 模式下一级质谱图可见加合离子峰 m/z 值为 563.48 [M+H]⁺ 和 585.38 [M+Na]⁺, 二级质谱脱去一分子鼠李糖得到 m/z 417.16 [M+H-Rha]⁺, 结合文献^[15]推测该条带成分为砂生槐黄酮 A。

3 条带 10 和 15 中化学成分的分离鉴定

黄酮类是本次鉴定的主要化学类型, 其中黄酮取代基及连接位置多样, 为验证 HPTLC-ESI-MS 鉴定结果的准确性, 选取小极性代表性条带 10 和大极性代表性条带 15, 采用硅胶柱、Sephadex LH-20 凝胶柱、制备薄层色谱、制备液相色谱结合薄层色谱进行分离, 获得两个单体化合物, 采用 NMR 和 UPLC-QToF-MS 数据对结构进行鉴定。鉴定结果与 HPTLC-ESI-MS 鉴定结果一致。

化合物 **10** (条带 10), 黄色粉末。UPLC-QToF-MS m/z 461.268 9 [M+H]⁺。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.78 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-5), 7.09 (2H, s, H-2',6'), 6.55

Table 2 Compounds identified in zones of SF and ST by HPTLC-ESI-MS

No.	R_f	MS	MS/MS	Formula	Compound	Exist in	Ref.
1	0.06	447.25 [M+H] ⁺	285.16 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ , 148.91 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₂ O-C ₂ H ₂ O] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	Trifolirhizin	SF, ST	[7, 8]
2	0.10	453.41 [M-H] ⁻	275.17 [^{1,4} A ⁻], 176.92 [^{1,3} A ⁻ -lavandulyl] ⁻ , 148.92 [^{1,3} A ⁻ -lavandulyl-CH ₂ O] ⁻ , 421.33 [M-H-CO ₂] ⁻	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	Kushenol I	SF	[8, 9]
3	0.21	253.08 [M-H] ⁻	135.08 [^{1,3} A ⁻], 117.08 [^{1,3} B ⁻], 209.08 [M-H-CO ₂] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	4',7-Dihydroxyflavone	ST	[10]
4	0.23	439.41 [M+H] ⁺	274.58 [^{1,4} A ⁺], 149.08 [^{1,4} A ⁺ -lavandulyl] ⁺ , 461.41 [M+Na] ⁺	C ₂₆ H ₃₀ O ₆	Kurarinone	SF	[8, 11]
5	0.32	423.41 [M-H] ⁻	261.08 [^{1,4} A ⁻], 161.08 [^{1,4} B ⁻]	C ₂₅ H ₂₈ O ₆	Kushenol F	SF	[9]
6	0.40	355.16 [M+H] ⁺	148.91 [^{1,3} A ⁺ -C ₄ H ₈ -CH ₂ O] ⁺ , 136.08 [^{1,3} A ⁺ -lanandulyl- CO-CH ₃ ·] ⁺ , 299.08 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	Isoxanthohumol	SF	[8, 9]
7	0.43	269.16 [M+H] ⁺	254.16 [M+H-CH ₃ ·] ⁺ , 291.16 [M+Na] ⁺	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	Formononetin	SF, ST	[8, 12]
9	0.66	283.33 [M-H] ⁻	267.08 [M-H-O] ⁻ , 255.08 [M-H-CO] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Maackiain	SF, ST	[8, 9]
10	0.75	461.25 [M+H] ⁺	376.08 [M+H-O-C ₅ H ₉ ·] ⁺ , 348.08 [M+H-CO ₂ -C ₅ H ₉ ·] ⁺ , 279.08 [M+H-CO ₂ -2C ₅ H ₉ ·] ⁺ , 148.91 [^{1,3} A ⁺ -C ₄ H ₈] ⁺ , 135.91 [M+H-ring B-CO-C ₅ H ₉ ·] ⁺	C ₃₀ H ₃₆ O ₄	Sophoranone	ST	[13]
11	0.15	263.16 [M+H] ⁺	245.08 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 285.16 [M+Na] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₂	Oxysophocarpine	SF, ST	[4, 9, 14]
12	0.22	265.33 [M+H] ⁺	203.08 [M+H-H ₂ O-C ₃ H ₆] ⁺ , 150.00 [M+H-H ₂ O-C ₃ H ₅ NO] ⁺ , 136.00 [M+H-H ₂ O-C ₆ H ₇ NO] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₂	Oxymatrine	SF, ST	[9, 14]
13	0.54	249.16 [M+H] ⁺	247.60 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 287.33 [M+Na] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	Sophoridine	SF	[9, 14]
14	0.76	249.16 [M+H] ⁺	205.13 [M+H-H ₂ O-C ₃ H ₆] ⁺ , 529.33 [2M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O	Matrine	SF, ST	[4, 9, 14]
15	0.49	563.48 [M+H] ⁺	148.11 [M+H-H ₂ O-C ₃ H ₅ NO] ⁺ , 136.11 [M+H-H ₂ O- C ₆ H ₉ NO] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	Sophoraflavone A	ST	[15]
16	0.66	417.31 [M+H] ⁺	150.12 [M+H-C ₅ H ₉ NO] ⁺ , 152.14 [M+H-C ₅ H ₇ NO] ⁺ , 148.11 [M+H-C ₅ H ₁₁ NO] ⁺ , 176.10 [M+H-C ₄ H ₉ O] ⁺ , 136.11 [M+H-C ₆ H ₁₁ NO] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	Bayin	ST	[15]
		585.38 [M+Na] ⁺	190.12 [M+H-C ₃ H ₇ O] ⁺ , 176.10 [M+H-C ₄ H ₉ O] ⁺ , 150.12 [M+H-C ₅ H ₉ NO] ⁺ , 148.11 [M+H-C ₅ H ₁₁ NO] ⁺				
		417.16 [M+H-Rha] ⁺	361.41 [M+H-2CO] ⁺ , 399.41 [M+H-H ₂ O] ⁺				

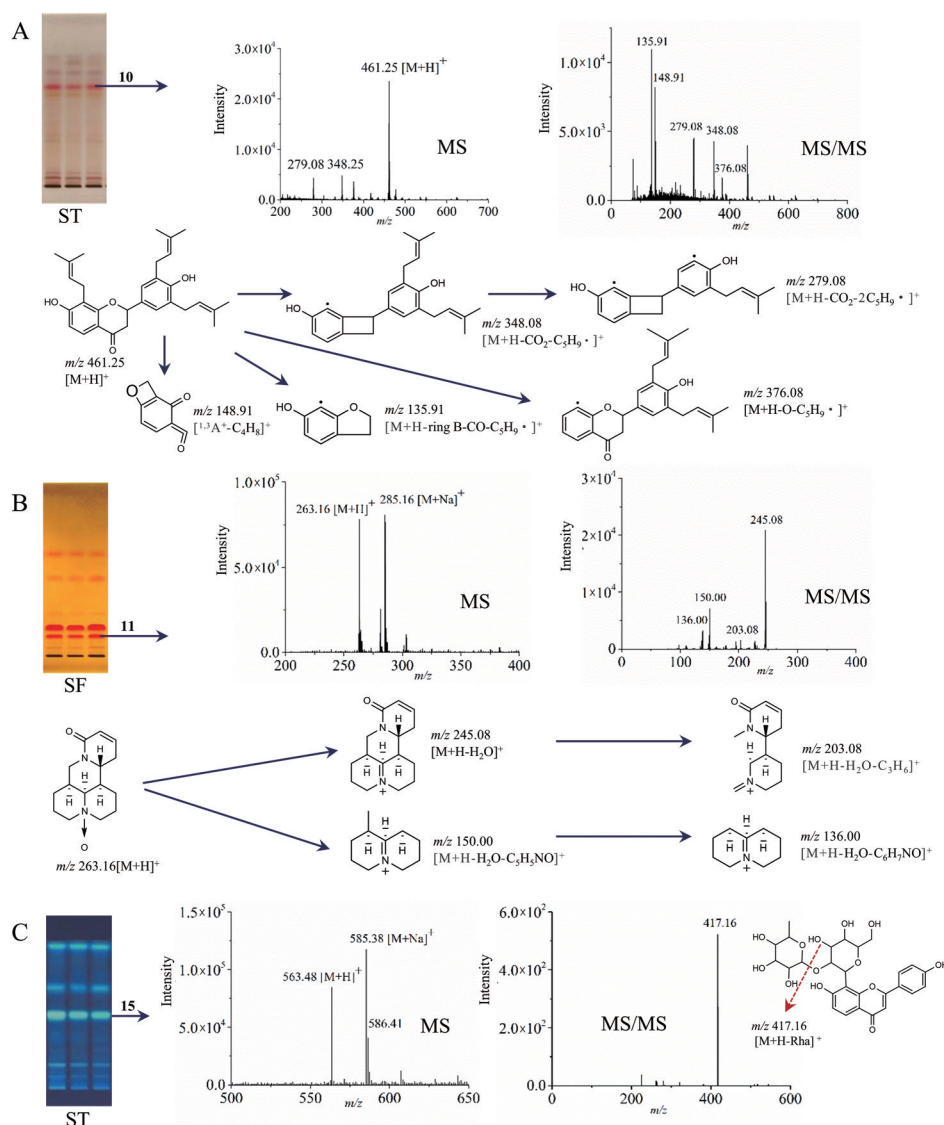


Figure 2 HPTLC-ESI-MS/MS spectra and fragmentation of zones 10 in HPTLC of *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* (A), 11 in *Sophorae Flavescentis Radix* (B) and 15 in *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* (C)

(1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-6), 5.38 (1H, m, H-2, 与 H-7", 12" 重叠), 5.35 (2H, m, H-7", 12", 与 H-2 重叠), 5.28 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2"), 3.44 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1"), 3.39 (4H, d, $J = 7.2$ Hz, H-6", H-11"), 3.03 (1H, dd, $J = 16.8, 13.3$ Hz, H-3b), 2.82 (1H, dd, $J = 16.8, 2.9$ Hz, H-3a), 1.80 (6H, s, Me-14", 15"), 1.78 (6H, s, Me-9", 10"), 1.77 (6H, s, Me-4", Me-5"). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 79.7 (C-2), 44.1 (C-3), 191.7 (C-4), 126.5 (C-5), 110.4 (C-6), 161.2 (C-7), 115.0 (C-8), 160.8 (C-9), 114.3 (C-10), 130.7 (C-1'), 125.7 (C-2'), 127.4 (C-3'), 152.9 (C-4'), 127.4 (C-5'), 125.7 (C-6'), 22.2 (C-1"), 121.0 (C-2"), 130.7 (C-3"), 17.9 (C-4"), 25.8 (C-5"), 29.5 (C-6"), 121.6 (C-7"), 134.7 (C-8"), 17.9 (C-9"), 25.8 (C-10"), 29.5 (C-11"), 121.6 (C-12"), 134.7 (C-13"), 17.9 (C-14"),

25.8 (C-15"). 该化合物的波谱数据与文献^[13,16]报道相一致, 确定为山豆根素。

化合物 **15** (条带 15), 浅黄色无定形粉末。UPLC-QToF-MS m/z 563.165 0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ_{H} 8.02 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', 6'), 7.96 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 6.98 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6), 6.96 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.69 (1H, s, H-3), 5.17 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, H-1"), 5.13 (1H, br. d, $J = 1.3$ Hz, H-1"), 4.35 (1H, t, $J = 10.0$ Hz, H-2"), 3.97 (1H, dd, $J = 12.1, 2.1$ Hz, H-6"a), 3.80 (1H, dd, $J = 12.1, 6.0$ Hz, H-6"b), 3.83 (1H, dd, $J = 3.0, 1.3$ Hz, H-2"), 3.68 (2H, m, H-3", 4"), 3.48 (1H, m, H-5"), 3.35 (1H, dd, $J = 9.6, 3.0$ Hz, H-3"), 3.07 (1H, t, $J = 9.6$ Hz, H-4"), 2.16 (1H, m, H-5"), 0.52 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, Me-6"). ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD)

δ_c 166.5 (C-2), 105.0 (C-3), 180.6 (C-4), 127.5 (C-5), 116.0 (C-6), 163.2 (C-7), 114.4 (C-8), 158.5 (C-9), 118.1 (C-10), 124.1 (C-1'), 130.2 (C-2'), 117.1 (C-3'), 162.8 (C-4'), 117.1 (C-5'), 130.2 (C-6'), 74.1 (C-1''), 78.1 (C-2''), 81.8 (C-3''), 72.6 (C-4''), 83.3 (C-5''), 63.2 (C-6''), 102.5 (C-1'''), 72.4 (C-2'''), 72.0 (C-3'''), 73.5 (C-4'''), 69.9 (C-5'''), 18.2 (C-6'''). 该化合物的波谱数据与文献^[15]报道基本一致, 确定为砂生槐黄酮A。

4 苦参和山豆根薄层色谱特征图谱建立

以三氯甲烷-甲醇-浓氨试液(9:1:0.1)为展开剂, 苦参以4种生物碱(氧化槐果碱、氧化苦参碱、槐定碱和苦参碱)和4种黄酮成分(三叶豆紫檀苷、苦参酮、苦参新醇F和马克因)为对照, 建立苦参的薄层色谱特征图谱, 见图3, 10批苦参样品与苦参对照药材、对照提取物色谱行为一致, 在对照品对应的位置, 均显相同颜色的条带。山豆根以2种生物碱(氧化苦参碱、苦参碱)和5种黄酮成分(三叶豆紫檀苷、4',7-二羟基黄酮、芒柄花素、马克因、山豆根素)为对照, 建立山豆根小极性部位的薄层色谱特征图谱, 再以正丁醇-冰醋酸-

水(7:1:1)为展开剂, 以砂生槐黄酮A和黑豆黄素为对照, 建立山豆根大极性部位的薄层色谱特征图谱, 11批山豆根样品与山豆根对照药材色谱行为一致, 在对照品对应的位置, 均显相同颜色的条带。

讨论

苦参和山豆根为基原相近、形态相似的易混药材, 针对现行标准中薄层色谱定性鉴别项之方法复杂、重现性不佳, 指标成分相似, 色谱行为相似, 易造成基原鉴定错误等现实问题。本研究秉持简便、绿色原则优化提取方法, 固定相采用常规的非改性硅胶板, 优化色谱条件, 选择大小两个极性展开剂, 对苦参和山豆根样品共薄层对比分析, 根据成分类型同时选择通用型和专属型显色剂, 同板依次显色和检视, 检视结果互不干扰, 同板提供多层次信息, 便于遴选具有鉴别意义的特征条带。采用HPTLC-ESI-MS在线鉴定技术对目标条带成分进行快速鉴定。在苦参中共发现和鉴定了11个化学成分(生物碱4个、黄酮7个), 山豆根中共发现和鉴定了10个化学成分(生物碱3个、黄酮7个), 两种

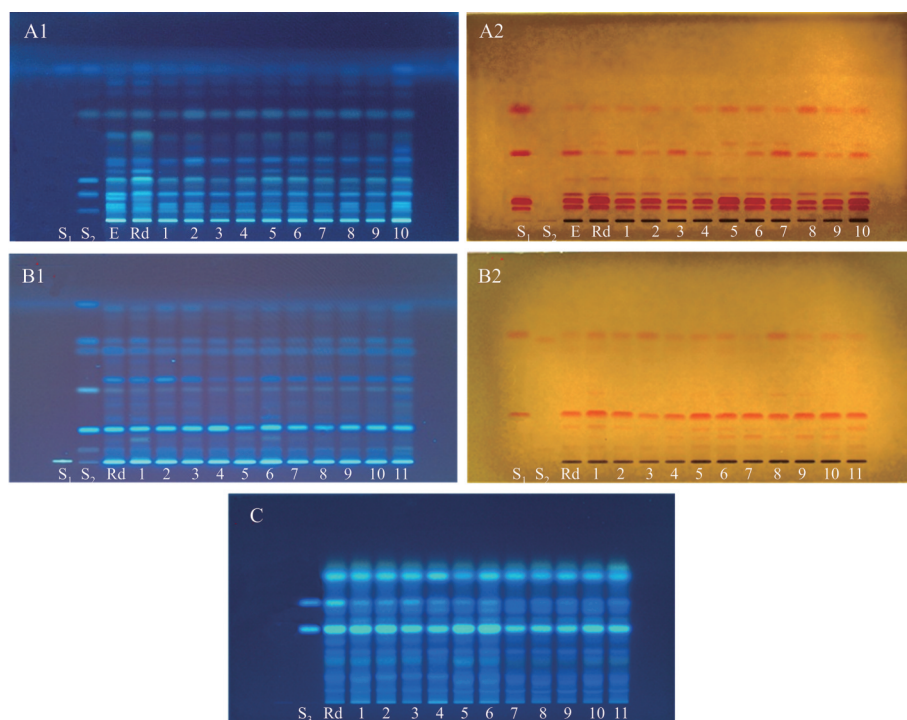


Figure 3 HPTLC chromatograms of *Sophorae Flavescentis Radix* (A) and *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* (B/C). The mobile phase of A/B is the mixture of chloroform, methanol and concentrated ammonia TS (9:1:0.1), and C is the mixture of *n*-butanol, glacial acetic acid, and water (7:1:1); A1/B1/C are detected under UV 365 nm after derivatization using 2% solution of aluminium chloride in ethanol, A2/B2 are detected under visible light after derivatization using potassium bismuth iodide TS in ethanol. S₁ in A are oxysophocarpine, oxymatrine, sophoridine and matrine (from low to up); S₂ in A are trifolirhizin, kurarinone, kushenol F and maackiain (from low to up); E and Rd in A are *Sophorae Flavescentis Radix* reference extract and *Sophorae Flavescentis Radix* reference drug, respectively; S₁ in B are oxymatrine and matrine (from low to up), S₂ in B are trifolirhizin; 4',7-dihydroxyflavone, formononetin, maackiain, sophoranone (from low to up), S₃ in C are sophoraflavone A and bayin (from low to up); Rd in B/C is *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* reference drug

药材共有成分6个(生物碱3个、黄酮3个)。

根据薄层色谱分析和HPTLC-ESI-MS鉴定结果,苦参和山豆根中生物碱成分主要为苦参碱型生物碱,如苦参碱、氧化苦参碱、槐果碱和氧化槐果碱。文献^[17-19]报道该类生物碱具有抗肿瘤、抗肝炎病毒、抗心血管疾病作用。此外,黄酮是苦参和山豆根中的第二类特征成分。苦参中黄酮含量约占2.01%左右^[20],有抑菌、抗病毒^[21,22]和抗炎、抗肿瘤活性^[23,24]。山豆根中黄酮含量约占5.7%^[25],总黄酮以及单体化合物以抗肿瘤^[26,27]、抗炎^[28,29]和抗菌活性^[30]研究较多。可见黄酮类成分不但是苦参和山豆根的主要成分,其生物活性与苦参和山豆根的功效具有一致性。山豆根自宋代首次记载以来,历代古籍未见山豆根“有毒”记载,1985年版《中华人民共和国药典》首次记载为有毒^[31],直至现版药典。目前多数研究认为山豆根的毒性成分为生物碱类(苦参碱、氧化苦参碱等)^[32],然而苦参中此类生物碱含量明显高于山豆根中含量^[6],但苦参在《中华人民共和国药典》中并无“有毒”记载,因此生物碱是否为其毒性成分还需更多研究。本文的薄层色谱图显示山豆根中黄酮类成分种类丰富且含量不低,具有显著的结构特异性^[33,34]和生物活性,因此推测黄酮类成分也可能与山豆根毒性有关,其相关药理、毒理及构效关系均值得深入研究。通过高效薄层色谱分析和质谱鉴定结果,遴选主要特征成分,建立同时表征两味药材中生物碱和黄酮两类成分的薄层色谱特征图谱,针对山豆根中大极性黄酮苷特征成分,新增一种薄层色谱方法,化学成分上更为全面地反映两味药材的整体相似性和差异性。

综上,本文采用多维度多层次高效薄层色谱技术联合薄层色谱-质谱在线检测技术从中药复杂成分中快速发现进而快速鉴定特征成分,建立的薄层色谱鉴别方法具有简便性、直观性和整体性,可全面反映药材的成分特征,为同属药材、易混药材的鉴别分析提供了参考。

作者贡献: 王峥涛和谷丽华负责药材采集和设计实验;李凡进行实验数据采集和分析;金武燮参与数据分析;李凡和韩竹箴负责分离鉴定;李凡、谷丽华、李林楠、杨莉和王峥涛撰写和修改论文。

利益冲突: 所有作者均不存在利益冲突。

References

- [1] Tu PF, Shi SP, Jiang Y. Strategies and approaches on exploring material basis of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2012, 43: 209-215.
- [2] Wang ZT. Recent advances and a prospect on the future development of quality assessment of traditional Chinese medicines [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2006, 4: 403-410.
- [3] Morlock GE. High-performance thin-layer chromatography combined with effect directed assays and high-resolution mass spectrometry as an emerging hyphenated technology: a tutorial review [J]. Anal Chim Acta, 2021, 1180: 338644.
- [4] Chen YL, Li LN, Xu R, et al. Characterization of natural herbal medicines by thin-layer chromatography combined with laser ablation-associated direct analysis in real-time mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2021, 1654: 462461.
- [5] Yang F, Gu LH, Han ZZ, et al. Rapid screening for natural lipase inhibitors from *Alisma orientale* combining high-performance thin-layer chromatography-bioautography with mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2021, 1170: 122599.
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 28-29.
- [7] Zhao YZ. Studies on the Chemical Constituents and Quality Control of *Sophora flavescens* Ait (苦参化学成分及质量控制研究) [D]. Changsha: Central South University, 2008.
- [8] Zhang L, Xu L, Xiao S, et al. Characterization of flavonoids in the extract of *Sophora flavescens* Ait. by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector and electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44: 1019-1028.
- [9] Li XN, Dong X, Bao BQ, et al. Rapid analysis on chemical constituents in roots of *Sophora flavescens* Ait by HPLC coupled with hybrid quadrupole-orbit trap MS [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2019, 42: 103-109.
- [10] Zhang X, Wang LF, Chen JQ, et al. Absorption mechanism of dragon's blood phenolic extracts in Caco-2 cells [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 4889-4895.
- [11] Bai Y, Guo MQ, Song FR, et al. Studies on flavonoids from *Sophora Flavescens* Ait using ESI-MSⁿ [J]. Chem J Chin Univ (高等学校化学学报), 2004, 25: 284-288.
- [12] Li H, Wan LR, Wang H, et al. Identification and mass spectrometric characterization of isomeric isoflavone aglycones by ESI-IT-TOF mass spectrometry [J]. Chem J Chin Univ (高等学校化学学报), 2007, 28: 2284-2289.
- [13] He CM, Cheng ZH, Chen DF. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in *Sophora tonkinensis* by LC/MS and HPLC [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11: 690-698.
- [14] Zhao QQ, Zhang YF, Fan XH. Simultaneous characterization of two types of major active components in Kushen by high performance liquid chromatography coupled to multi-stage mass spectrometry [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2011, 36: 762-769.
- [15] Shirataki Y, Yokoe I, Komatsu M. Two new flavone glycosides from the roots of *Sophora subprostrata* [J]. J Nat Prod, 1986, 49: 645-649.
- [16] Kajimoto S, Takanashi N, Kajimoto T, et al. Sophoranone,

- extracted from a traditional Chinese medicine Shan Dou Gen, induces apoptosis in human leukemia U937 cells *via* formation of reactive oxygen species and opening of mitochondrial permeability transition pores [J]. *Int J Cancer*, 2002, 99: 879-890.
- [17] Cao X, He Q. Anti-tumor activities of bioactive phytochemicals in *Sophora flavescens* for breast cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 1457.
- [18] Li Z, Yu KX. Exploration on mechanism of anti-coronavirus of *Sophora flavescens* through multi-pathway [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2020, 51: 888-894.
- [19] Yong GC, Shan J, Lei L, et al. Antiarrhythmic effects and ionic mechanisms of oxymatrine from *Sophora flavescens* [J]. *Phytother Res*, 2010, 24: 1844-1849.
- [20] Lu LP, Zhang L, Liao QF, et al. Research on method for determination of total flavonoids from root of *Sophora flavescens* Ait [J]. *Pharm Today (今日药学)*, 2011, 21: 146-148.
- [21] Yang ZX, Li X, Liu MY, et al. Isolation of antibacterial activity constituents of total flavonoids from *Sophora flavescens* and simultaneous determination of seven flavonoids by HPLC [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2016, 51: 2169-2174.
- [22] Li J, Zhang X, Shen X, et al. Phytochemistry and biological properties of isoprenoid flavonoids from *Sophora flavescens* Ait [J]. *Fitoterapia*, 2020, 143: 104556.
- [23] Sohn H, Son KH, Kwon C, et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai [J]. *Phytomed*, 2004, 11: 666-672.
- [24] Chen H, Yang J, Hao J, et al. A novel flavonoid kushenol Z from *Sophora flavescens* mediates mTOR pathway by inhibiting phosphodiesterase and Akt activity to induce apoptosis in non-small-cell lung cancer cells [J]. *Molecules*, 2019, 2: 4425.
- [25] Zhou YL, Zhang Y, Xu D, et al. The determination of total flavonoids content of *Sophora tonkinensis* [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药)*, 2016, 25: 13.
- [26] Sun D, Tao W, Zhang F, et al. Trifolirhizin induces autophagy-dependent apoptosis in colon cancer *via* AMPK/mTOR signaling [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 174.
- [27] Su WQ, Yang XN, He WD, et al. Influence and mechanism of maackiain on proliferation, migration, and apoptosis of nasopharyngeal carcinoma CNE1 cells [J]. *J Guangxi Med Univ (广西医科大学学报)*, 2021, 38: 258-264.
- [28] Chae H, Yoo H, Choi YH, et al. Maackiapterocarpin B from *Sophora tonkinensis* suppresses inflammatory mediators *via* nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways [J]. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39: 259-266.
- [29] Wang Y, Tao Y, Wang XY, et al. Formononetin inhibits Th2 type allergic contact dermatitis in mice [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志)*, 2016, 22: 88-91.
- [30] Cai JY, Wei KH, Xiong JW, et al. Extraction of flavonoids from *Sophora tonkinensis* Gapnep and their antioxidant and antibacterial activities [J]. *Fine Chem (精细化工)*, 2017, 34: 285-293.
- [31] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: People's Medical Press, 1985: 18.
- [32] Wang L, Lu J, Sun W, et al. Hepatotoxicity induced by radix *Sophorae tonkinensis* in mice and increased serum cholinesterase as a potential supplemental biomarker for liver injury [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2017, 69: 193-202.
- [33] Li F, Yang YG, Gu LH, et al. Advances in chemical constituents and bioactivities of *Sophorae Flavescentis Radix* [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med (上海中医药杂志)*, 2021, 55: 84-100.
- [34] Fu YM, Yu DX, Wang SN, et al. Research progress on pharmacological effects and mechanisms of flavonoids from *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2022, 53: 6234-6244.