

分类号 Q6



学号 2018113072003 UDC 577

## 全日制硕士学术学位论文

### 超高效液相色谱-质谱联用技术在独脚金内酯类化合物 定向检测和中药代谢组学上的应用研究

---

作 者 姓 名: 杨娟

指 导 教 师: 王悦悦 教授

杨胜祥 教授

专 业 名 称: 生物物理学

研 究 方 向: 生物大分子结构与功能

所 在 学 院: 光机电工程学院

论 文 提 交 日 期: 2022 年 5 月 27 日

浙 江 农 林 大 学

**Zhejiang A&F University**  
**Dissertation for the Degree of Master**



**Study on the application of ultra-performance liquid  
chromatography-mass spectrometry in directional detection of  
strigolactone compounds and metabonomics of traditional  
chinese medicin**

**Supervisor: Professor YueyueWang**

**Co-supervisor: Professor ShengxiangYang**

**Major: Biophysics**

**Research Field: Structure and function of biological  
macromolecules**

**Date of Submission: May 27, 2022**

**Hangzhou, Zhejiang, China**



## 摘要

液质联用即液相色谱-质谱联用（LC-MS）技术，是将作为分离系统的液相色谱技术与作为检测系统的质谱技术相结合的一种分析检测技术。该技术在天然产物分离分析中具有广泛的应用，与传统的分析检测技术相比具有高效快速，灵敏度高的特点，样品只需进行简单预处理或衍生化，尤其适用于含量少、不易分离获得或在分离过程中易失活的组分的分析。本论文包括三个方面的研究内容：一是利用液质联用技术对红花根系分泌物中独脚金内酯类化合物结构进行分析鉴定；二是通过培养皿滤纸法测定红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发以及幼苗生长的化感效应；三是利用液质联用技术对不同产地铁皮石斛的代谢组学进行了研究。具体内容如下：

1. 通过水培红花植物种苗，在水培液中收集其根系分泌物，利用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法（UPLC-Q-TOF-MS）对其进行检测分析。首先，构建已知独脚金内酯类化合物的 UNIFI 数据库。其次，通过提取的液质检测数据与 UNIFI 数据库比对、质谱裂解数据分析和参考已知化合物的文献质谱数据分析红花根系分泌物中的独脚金内酯类化合物。最后，在红花根系分泌物中鉴定了五种独脚金内酯类化合物，分别为列当醇、7-氧代列当醇乙酸酯、列当醇乙酸酯、5-脱氧独脚金醇、Fabacyl acetate。

2. 将收集到的红花根系分泌物稀释成 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.5 mg/mL、5.0 mg/mL 5 个浓度梯度，通过培养皿滤纸法研究不同浓度的红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子的萌发以及幼苗生长的影响。研究结果显示，0.1~1.0 mg/mL 浓度下的红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发和幼苗生长有促进作用，2.5~5.0 mg/mL 浓度下的红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发和幼苗生长有抑制作用。结果表明低浓度的红花根系分泌物对杂草马齿苋和狗尾草生长具有显著的促进作用，高浓度的红花根系分泌物对杂草马齿苋和狗尾草生长具有显著的抑制作用。因此可以评估农田生态系统中红花根系分泌物对伴生杂草的防控能力，为今后红花根系分泌物应用于杂草防控和新型除草剂的开发及应用提供一定的理论依据。

3. 采集广西桂平、云南文山、浙江乐清三个不同产地的铁皮石斛的样品，采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对其进行化学成分分析，结合软件 SIMCA-Pt 13.0，通过主成分分析（PCA）和偏最小二乘判别分析（OPLS-DA）等多元变量分析方法研究三个

不同产地的铁皮石斛代谢产物差异,依据相对分子质量,二级碎片,采用 ChemSpider 数据库、HMDB 数据库和文献对比对差异代谢物进行鉴定。结果表明,在铁皮石斛中分离鉴定出 27 个主要化合物,PCA 分析结果表明同一产地的铁皮石斛聚集在一起,不同来源的铁皮石斛样品是完全分离的,说明同一产地样品间的种内差异性较小,而不同产地样品间的种内差异性较大。通过 OPLS-DA 分析发现广西桂平和浙江乐清有 4 种差异代谢物,云南文山和浙江乐清有 4 种差异代谢物,主要为类黄酮和萜类化合物。该研究方法能较好地地区分不同地区的铁皮石斛,从而有助于铁皮石斛的产地溯源。

**关键词:** 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱; 定性检测; 代谢组; 红花; 铁皮石斛

**ABSTRACT**

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) is an analysis and detection technology that combined liquid chromatography as a separation system with mass spectrometry as a detection system. This technology has a wide range of applications in the separation and analysis of natural products. It is efficient, fast and sensitive compared with the traditional analysis and detection technology. The samples only need simple pretreatment or derivatization and it is especially suitable for the analysis of components with small content which is difficult to be separated or easy to inactivate in the separation process. This thesis includes three aspects of research content: Firstly, the structure of strigolactone compounds in root exudates of safflower was analyzed by LC-MS; Secondly, the allelopathic effects of root exudates of safflower on seed germination and seedling growth of *Portulaca oleracea* L. and *Setaria viridis* (L.) Beauv. were measured by the petri dish filter paper method; Thirdly, the metabolomics of *Dendrobium officinale* from different habitats was studied by liquid chromatography-mass spectrometry. The details are as follows:

1. The root exudates of safflower seedlings were collected in hydroponic solution and analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). Firstly, construct the UNIFY database of known strigolactone compounds. Secondly, by comparing the data of liquid chromatography-mass spectrometry with the UNIFY database, analysing the mass spectrometric cleavage data and referencing the mass spectrometry data of known compounds to analyse the strigolactone compounds in root exudates of safflower. Finally, five strigolactone compounds were identified from root exudates of safflower which were Orobanchol, 7-Oxo-orobanchyl acetate, Orobanchyl acetate, 5-Deoxystrigol, Fabacyl acetate.

2. The collected root exudates of safflower were diluted into five concentration gradients of 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5.0 mg/mL, and the effects of different concentrations of safflower root exudates on seed germination and seedling growth of *P. oleracea* L. and *S. viridis* (L.) Beauv. were studied by petri dish filter paper method. The study showed that the root exudates of safflower at a concentration of 0.1~1.0 mg/mL significantly promoted seed germination and seedling growth of *P. oleracea* L. and *S. viridis* (L.) Beauv. , while the concentration of 2.5~5.0 mg/mL of safflower root exudates inhibited the seed germination and seedling growth of *P. oleracea* L. and *S.*

*viridis* (L.) Beauv. . The results showed that low concentration of safflower root exudates obviously promoted the growth of *P. oleracea* L. and *S. viridis* (L.) Beauv. , while high concentration of safflower root exudates inhibited the growth of *P. oleracea* L. and *S. viridis* (L.) Beauv. . Therefore, we can evaluate the weed control ability of safflower root exudates from agroecosystems, which provides a theoretical basis for the application of safflower root exudates in weed control and the development and application of new herbicides in the future.

3. The samples of *D. officinale* from Guiping, Guangxi, Wenshan, Yunnan, Yueqing, zhejiang were collected. The chemical compositions of *D.officinale* were analyzed by UPLC-Q-TOF-MS, the differences in metabolites of *D.officinale* from three different habitats were studied by combining with software SIMCA-Pt 13.0 and using multivariate statistical analysis methods such as principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA), and the differential metabolites were identified by ChemSpider and HMDB database based on relative molecular weight and secondary fragments. The results showed that 27 compounds were isolated and identified from *D. officinale* and PCA analysis showed that the *D. officinale* samples from the same origin were clustered together, while the samples from different sources were completely separated, indicating that the intraspecific difference between the samples from the same origin was small, but the intraspecific difference between the samples from different origin was large. The OPLS-DA analysis showed that there were four different metabolites in *D. officinale* from Guiping of Guangxi and Yueqing of Zhejiang and four different metabolites in *D. officinale* from Wenshan of Yunnan and Yueqing of Zhejiang, which mainly were flavonoids and terpenoids. This research method can better distinguish *D. officinale* from different regions, thus contributing to the origin tracing of *D. officinale*.

**Key words:** UPLC-Q-TOF-MS; Qualitative detection; Metabolome; Safflower; *Dendrobium officinale*

## 目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
1 前言.....	1
1.1 液质联用技术.....	1
1.1.1 液相色谱.....	1
1.1.2 质谱.....	2
1.2 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱技术.....	3
1.2.1 UPLC-Q-TOF-MS 技术的基本原理.....	3
1.2.2 UPLC-Q-TOF-MS 研究现状.....	4
1.3 研究目的与意义.....	10
2 UPLC-Q-TOF-MS 对红花根系分泌物中独脚金内酯类物质的研究.....	12
2.1 材料与方法.....	12
2.1.1 试剂和仪器.....	12
2.1.2 TT 培养液的制备.....	13
2.1.3 红花催芽.....	13
2.1.4 幼芽的培养.....	13
2.1.5 TT 培养液的培养.....	13
2.1.6 红花根系分泌物的收集.....	14
2.1.7 色谱和质谱条件.....	14
2.1.8 数据分析.....	14
2.2 红花根系分泌物独脚金内酯类化合物的检测结果与讨论.....	14
2.2.1 构建已知独脚金内酯的 UNIFI 化学结构信息数据库.....	14
2.2.2 红花根系分泌物中独脚金内酯类化合物的分析.....	22
2.3 本章小结.....	28
3 红花根系分泌物对两种杂草种子萌发及幼苗生长的化感效应.....	29
3.1 材料制备与数据处理方法.....	29
3.1.1 材料和试剂.....	29
3.1.2 实验仪器.....	29
3.1.3 红花根系分泌物的粗收集.....	30
3.1.4 马齿苋和狗尾草萌发试验.....	30
3.1.5 数据处理方法.....	30
3.2 结果与讨论.....	31
3.2.1 红花根系分泌物对马齿苋种子萌发的影响.....	31
3.2.2 红花根系分泌物对马齿苋芽苗长度的影响.....	32
3.2.3 红花根系分泌物对马齿苋根长度的影响.....	33
3.2.4 红花根系分泌物对狗尾草种子萌发的影响.....	33
3.2.5 红花根系分泌物对狗尾草芽苗长度的影响.....	34
3.2.6 红花根系分泌物对狗尾草根长度的影响.....	35
3.2.7 红花根系分泌物对 2 种伴生杂草生长的综合化感效应指数.....	36
3.3 本章小结.....	37



4 UPLC-Q-TOF-MS 对不同产地铁皮石斛代谢组学的比较.....	39
4.1 材料制备与测试方法.....	39
4.1.1 样品和试剂.....	39
4.1.2 样品制备.....	39
4.1.3 UPLC 分析.....	40
4.1.4 质量状况.....	40
4.1.5 化学成分分析.....	40
4.1.6 实验数据处理.....	40
4.2 结果与讨论.....	41
4.2.1 化合物的鉴定.....	41
4.2.2 铁皮石斛的种内差异性分析.....	43
4.2.3 铁皮石斛的不同化学成分的鉴定.....	44
4.3 本章小结.....	45
5 结论与展望.....	46
5.1 全文总结.....	46
5.2 工作展望.....	47
参考文献.....	48
个人简介.....	56
致谢.....	57

# 1 前言

## 1.1 液质联用技术

液质联用 (LC-MS) 又叫液相色谱-质谱联用技术, 是 20 世纪 70 年代发展起来的一门新的仪器分析方法。主要由液相色谱和质谱两部分组成, 液相色谱在 LC-MS 中被作为分离系统, 质谱在 LC-MS 中被作为检测系统。该技术集液相色谱 (LC) 的高分离能力、质谱 (MS) 的高效快速和高灵敏度于一体, 可以快速获得巨大的结构信息量<sup>[1]</sup>。与气质联用 (GC-MS) 技术相比, LC-MS 联用技术不需对样品进行烦琐的衍生化预处理, 可适用于热不稳定、不易挥发、不易衍生和分子量较大的物质的分析检测。

### 1.1.1 液相色谱

液相色谱在液质联用技术中被作为分离系统, 对样品起到分离作用, 样品在液相色谱柱中, 随着流动相的移动, 与固定相发生反复的吸附-脱附, 不同组分之间吸附和脱附效率不同, 其在色谱柱中的保留时间也不尽相同, 吸附和脱附效率高的组分会率先分离出, 效率低的则会在色谱柱中停留更久的时间, 由此实现了样品的分离<sup>[2]</sup>。液相色谱中的色谱填料可以直接对色谱系统的分离效率和数据的准确性产生影响, 是其最重要的部分。无机基质填料、有机基质填料和复合材料是现有的主要三大类色谱填料, 无机基质填料中的多孔二氧化硅微球填料具有机械强度高、热和溶剂稳定性好、表面易于修饰和生物兼容性好等优点, 已成为应用最广泛的色谱填料<sup>[3]</sup>。除此之外有机基质填料中的聚合物型色谱填料, 因其化学稳定性、易于被衍生化及负载能力强等特点, 也越来越受到科研工作者的重视<sup>[4-5]</sup>。

传统液相色谱固定相的粒度一般在 100  $\mu\text{m}$ -150  $\mu\text{m}$  左右, 固定相的粒度不能太小的主要原因是因为流动相是依靠重力缓慢地流过色谱柱。分离后的样品先需要被分级, 收集后再进行分析, 使得经典液相色谱不仅分离效率低、分析速度慢, 而且操作也比较复杂。直到 20 世纪 60 年代, 发展出粒度小于 10  $\mu\text{m}$  的高效固定相, 并使用了高压输液泵和自动记录的检测器, 克服了传统液相色谱的缺点, 发展成高效液相色谱 (HPLC)。随着液相色谱技术的发展, 另一种液相色谱即超高效液相色谱 (UPLC) 系统, 借助于 HPLC 的理论及原理, 由于具有小颗粒填料、非常低系统体积及快速检测手段等全新技术, 其更高的分离能力和更高的峰容量得到越来越广泛的应用, 例如常见的十八烷基硅胶键合柱, 它的粒径是 5  $\mu\text{m}$ , 而超高效液相色谱的色谱柱, 会达到 3.5  $\mu\text{m}$ , 甚至 1.7  $\mu\text{m}$ 。这样的孔径更加利于物质分离。它可以缩短分析时间是因为其系统具有较宽的线速度<sup>[6]</sup>, 并且高分辨能力使信噪比增强, 峰变窄, 检测物的分析选择性和效率得到提高。因此, UPLC 比 HPLC 能获得更多代谢物的信息, 对于复杂代谢物的分离具有显著优势<sup>[7]</sup>。

### 1.1.2 质谱

质谱在液质联用技术中被作为检测系统，它是通过测量化合物质荷比 ( $m/z$ ) 进行定性定量的仪器，经过液相色谱分离的各组分在不同时间进入质谱部分，通过离子化后，同一个组分中又会产生不同的离子碎片，离子碎片之间的质量数也并不同，经质谱的质量分析器将离子碎片按质量数分开，经检测器得到质谱图<sup>[8]</sup>。质谱根据质量分析器种类可分为低分辨质谱和高分辨质谱两种，低分辨质谱是有四极杆分析器 (Q)、离子阱 (IT)、三重四极杆 (QQQ)、和四极杆-线性离子阱 (Q-Trap) 等质量分析器的质谱仪，高分辨质谱则有静电场轨道阱 (Orbitrap)、飞行时间 (TOF) 和傅立叶变换离子回旋共振 (FT-ICR) 等<sup>[9]</sup>。从表 1.1 中可知，Prasad<sup>[10]</sup>和 Bedair 等<sup>[11-12]</sup>就目前用于代谢物鉴定的主要 5 种现代质谱的几种功能和特点进行了比较，TOF-MS 与其他质谱相比，具有很高的精确度、分辨率、分析速度及线性响应能力，Q-TOF-MS 较 TOF-MS 相比具有相当或更好的灵敏度、准确度，且扫描模式多、数据获取速度快、数据处理方式多样，而且理论上 Q-TOF-MS 对检测的目标化合物没有数量上的限制。

表 1.1 各种质谱系统性能比较表

Table 1.1 Performance comparison table of various mass spectrometry systems

质谱	检测灵敏度	质量精确度	质量分辨率	线性响应	数据获取速度	数据处理能力	分析速度	代谢物鉴定
TOF	高	好	好	中到好	高	强	快	根据质量位移快速假定代谢变化
Q-TOF	高	很好	很好	中到好	高	很强	快	快速假定可能的代谢变化和位置变化
Q-Trap	中等	差	低	中到好	低到中	中等	中等	限于 MS <sup>n</sup> 的应用
Orbitrap	低	差	低	很好	低到高	中等	中等	限于 MS <sup>2</sup> 的应用
FT-ICR	高	好	好	很好	中到高	中等	中等	代谢物筛选； 生物转化位置的 鉴定

## 1.2 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱技术

超高效液相色谱四级杆飞行时间质谱联用技术（UPLC-Q-TOF-MS）是近年来复杂基质多组分分析鉴定的最有效的方法之一<sup>[13]</sup>，该技术是将超高效液相色谱（UPLC）和四级杆（Q）、飞行时间质谱（TOF-MS）串联而成的一种质谱技术。其中，UPLC 作为色谱分离系统，是质谱检测器的最佳入口<sup>[14-16]</sup>；Q 和 TOF-MS 作为分析器。

### 1.2.1 UPLC-Q-TOF-MS 技术的基本原理

UPLC-Q-TOF-MS 联用技术由超高效液相色谱和四极杆飞行时间质谱共同发挥作用，下面分别阐述这两个仪器的基本原理。

UPLC 基本原理如下：UPLC 是根据固定相和流动相中的分配系数、吸附量等亲和度，使待分离的各种物质发生分离的<sup>[17-18]</sup>。在外力作用下，固定相的表面被含有样品的流动相（液体）通过，固定相被固定在色谱柱中并且与流动相不相溶。当固定相被流动相中携带的混物流经时，混合物中的各组分可以与固定相发生相互作用<sup>[19]</sup>。由于混合物中各组分在性质和结构上的差异，与固定相之间产生的作用力的大小、强弱不同，随着流动相的移动，混合物在两相间经过反复多次的分配平衡，使得固定相中的各组分保留的时间不同，从而按一定次序由固定相中先后流出。与合适的柱后检测方法结合之后可以实现混合物中各组分的分离与检测<sup>[20]</sup>。如图 1.1 是 UPLC 基本原理示意图。

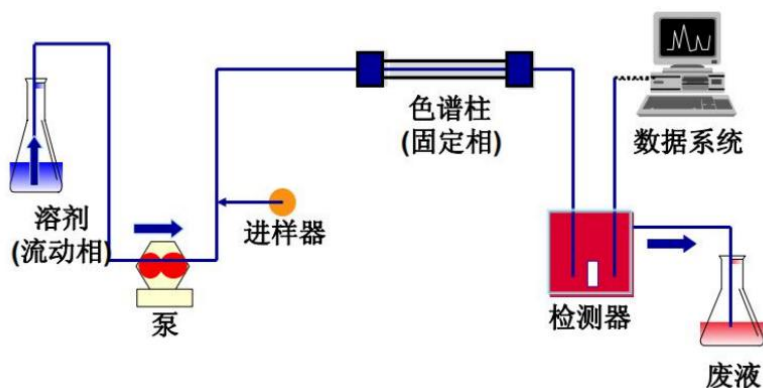


图 1.1 UPLC 基本原理

Figure 1.1 Basic principles of UPLC

Q-TOF-MS 基本原理如下：Q-TOF-MS 主要由真空系统、离子源加速区、漂移区、检测器和数据处理系统五部分组成。Q-TOF-MS 的基本原理是离子源产生的带电离子在加速电场的作用下进入无场漂移区，以恒定的速度飞向离子接收器。带电离子所受到的电场力大小和飞行时间会不同，是因为其质荷比的不同，根据到达检测器的时间的不同，不同质量的离子可以按  $m/z$  值大小进行分离。不同离子到达检测器的时间与

离子  $m/z$  的平方根成正比, 样本分子根据其  $m/z$  的大小先后到达检测器, 通过信号转换形成可见的质谱图<sup>[21]</sup>。仪器的分辨能力越好表明飞行时间距离越长, 故现在多使用反射式飞行时间质谱, 这种质谱可以让带电离子先飞一段时间后, 再经反射区的相应作用, 带电离子掉头飞行, 此运行方式可以在相同体积下对仪器性能产生大幅度提高<sup>[22-23]</sup>。

UPLC-Q-TOF-MS 是将 UPLC 和 Q-TOF-MS 通过接口联结起来的一种质谱技术, 主要由超高效液相色谱、离子源、质量分析器、检测器四部分组成。在全扫描模式下, 化合物经 UPLC 流出, 通过双喷雾离子源离子化后, 直接由四极杆经六极杆碰撞室导入飞行时间质量分析器, 进行反射模式下的精确质量分析。

综上所述, 我们可以看出超高效液相色谱发挥了分离样品的作用, 四极杆飞行时间质谱仪发挥了检测样品的作用, 因此, 我们将超高效液相色谱和四极杆飞行时间质谱仪联用, 在分析检测方面有着独特的优势, 对多数物质的检测灵敏度超过了其它方法, 从而实现其在天然产物检测分析、中药代谢组学等方面的应用。

## 1.2.2 UPLC-Q-TOF-MS 研究现状

UPLC-Q-TOF-MS 作为一种新兴的前沿分析检测方法, 是一种可以同时定性定量的检测技术, 在峰容量、灵敏度、分辨率、分析速度及采集信息等方面都有着巨大的优势, 目前已在生化分析、天然产物分析、药物和保健食品分析以及环境污染物分析等许多领域得到了广泛的应用。现将近年来此技术在天然产物的检测分析和中药代谢组学中的应用进行综述。

### (1) UPLC-Q-TOF-MS 在天然产物检测分析中的应用

UPLC-Q-TOF-MS 将高效液相色谱优秀的分离能力与质谱高灵敏度和高专属性的检测有机地结合在一起, 在天然产物研究中发挥着越来越重要的作用。该技术可以有效应用于天然药物有效成分和目标成分的快速发现和表征中, 具体进展如下:

①在天然药物有效成分中的应用进展: 天然药物是药物的一个重要组成部分。天然药物来自动物、植物等, 往往含有结构、性质不尽相同的多种成分。Huang 等<sup>[24]</sup>采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对中国南方 9 种仙人草的化学成分和抗氧化活性进行了研究。共鉴定出 57 种化合物, 其中多酚类化合物 45 种, 萜类化合物 6 种, 其他化合物 6 种, 并且多酚含量与抗氧化活性呈显著正相关, 广东饶坪产的南方仙人草抗氧化活性最强, 对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制作用最强, 从而对多酚成分有深入的了解与认识, 并且为南方仙人草作为膳食抗氧化剂和降糖剂的潜在丰富来源的商业应用提供了指南。Ju 等<sup>[25]</sup>采用 UPLC-Q-TOF-MS 在正负离子模式下分析和鉴定了鱼腥草水提物的主要成分。根据精确分子量和离子碎片特征共鉴定出 63 种化合物, 包括 29 种有机酸及其苷, 17 种黄酮类化合物, 7 种挥发物, 4 种嘧啶和嘌呤衍生物, 2 种生物碱, 2 种氨基酸, 1 种异香兰素和 1 种香豆素。用肿瘤坏死因子 (TNF) 诱导 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> 细胞氧化应

激,以评价鱼腥草水提物的抗氧化活性作用,此结果为鱼腥草水提物的抗氧化作用提供了分子层面的证据,突出了其治疗氧化应激引起的肌肉损伤或疾病方面的潜力。Deng 等<sup>[26]</sup>采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对桔梗(PG)的化学成分进行分析,利用中药系统药理学数据库、TCMSP、GeneCards 等数据库得到了可能的肺癌(LC)靶点,结果从 PG 中鉴定出 47 种化合物,主要包括三萜类皂苷、甾体类皂苷和黄酮类化合物,筛选出桔梗苷 D 等 9 种主要活性成分,并且采用数据挖掘方法,收集到 545 种潜在药物靶点和 2664 种与疾病相关的靶点。分子对接结果表明,该活性成分与潜在的关键靶点结合良好,从而为探索 PG 对 LC 的作用机制提供了新的思路。拓扑分析结果显示,可能参与 LC 治疗的信号通路包括 MAPK 信号通路和 P13K-AKT 信号通路。

②在目标成分的快速发现和表征中的应用进展:现今药物分析领域研究中的一个重点内容是药物活性成分的快速发现和表征。基于大数据时代的高效计算能力,通过 UPLC-Q-TOF-MS 建立的各种快速鉴定方法,即使是传统的中药复方,也能在短时间内准确分析各种数据。气血双补剂是一味著名的传统中药配方,具有补气增血的功效。Chen 等<sup>[27]</sup>利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对气血双补剂的成分进行了分离和鉴定,在 42 min 的时间里就成功完成了包括查尔酮、三萜、原人参三醇和黄酮等物质在内的 56 种成分的解析。Zhang 等<sup>[28]</sup>利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术快速鉴定丹红注射液中的有效成分。丹红注射液的组分复杂,是用中药丹参和红花根提取物以 3:1 的比例配制而成。该实验已成功在丹红注射液中鉴定出包括 33 种酚酸、2 种 C-糖基喹啉查尔酮、6 种 O-苷黄酮类、4 种环烯醚萜苷、6 种有机酸、5 种氨基酸和 3 种核酸在内的 63 种组分。Wu 等<sup>[29]</sup>利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术快速表征黑果枸杞果实中的多酚类成分,初步确定了 26 种多酚类成分,其中在黑枸杞果实中首次发现 19 种多酚类成分。此类实验均进一步阐释了复杂药物组分中的成分结构,并为复方药物的快速分离和鉴定做出了探索。

## (2) UPLC-Q-TOF-MS 在中药代谢组学研究中的应用

代谢组学是后基因组时代的一门新学科,它与基因组学、转录组学和蛋白质基因组学一起构成了“系统生物学”<sup>[30-31]</sup>。与其他组学相比,代谢组学具有以下优点,第一代谢物的种类远少于基因和蛋白质的数量;第二代谢组学研究不需要全基因组测序或建立大量表达序列标签数据库;第三代谢组更接近生物体的表型,上游基因、蛋白质层面的变化能在许多下游代谢产物中得到放大,使得这些变化更容易被观察到;第四机体的生理和病理状态可以被代谢物的整体变化直接反应出来;第五生物代谢物的通用性相对较大,可以寻找到针对某种或一类代谢物的分析方法,而不考虑物种的优势。因此,代谢组学研究不仅可以发现生物对各种内外环境干扰的不同反应,而且可以区分不同个体之间的表型差异。随着分析技术的发展与应用,核磁共振(NMR)<sup>[32-33]</sup>、液相色谱-质谱联用(LC-MS)技术<sup>[34]</sup>、气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术<sup>[35]</sup>普遍应

用于代谢组学研究，三类分析技术各有优缺点，具体见表 1.2。

表 1.2 代谢组学不同分析技术性能比较

Table 1.2 Comparison of performance of different metabolomics analysis techniques

方法	普适性	样品前处理	化合物谱库
NMR	高，适用于含氢代谢产物	简便，无破坏性	完善，可定性单一 本不能鉴定混合物
LC-MS	高，适用于非挥发性代谢产物	较复杂，有破坏性	不完善，可定性单一 或混合样品
GC-MS	低，适用于挥发性及稳定性好的 代谢产物	较复杂，有破坏性	完善，可定性单一或 混合样品

液质联用代谢组学分析先通过 UPLC-Q-TOF-MS 等不同液质联用技术对全部或部分代谢产物进行代谢轮廓分析，然后通过多元统计学方法进行模式识别等数据处理，最后做出合理的代谢阐释，具体流程如图 1.2 所示。

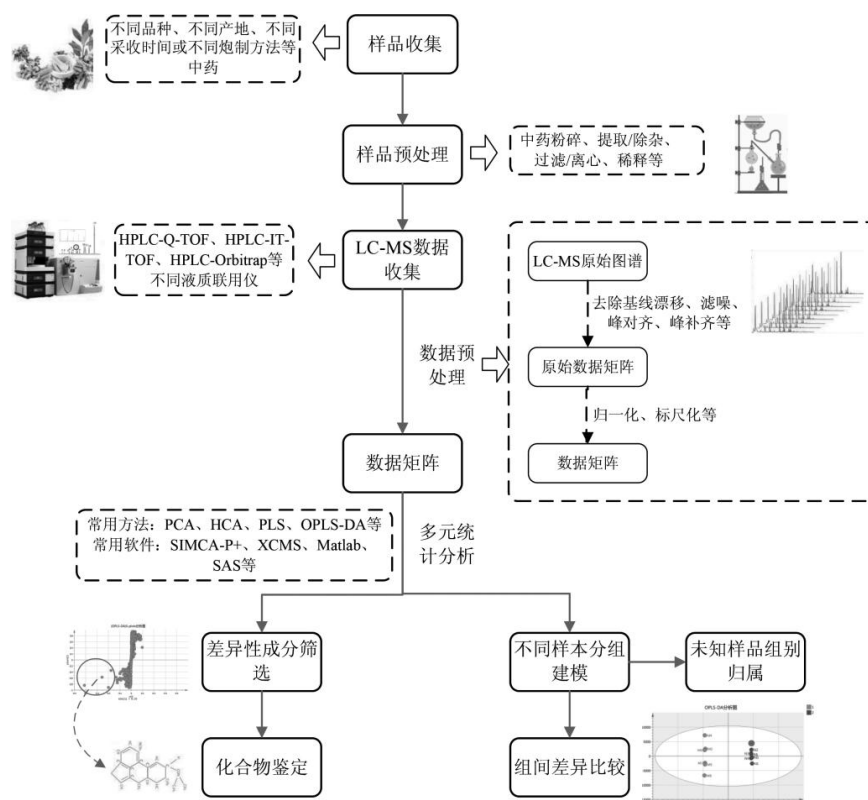


图 1.2 LC-MS 代谢组学分析流程

Figure 1.2 LC-MS metabolomics analysis process

(图片引用自：基于 LC-MS 代谢组学技术在中药化学成分中的应用<sup>[36]</sup>)

近些年来, UPLC-Q-TOF-MS 具有操作简单、准确、快速、无需对照品等特点, 逐渐成为中药代谢组学领域的主要方法, UPLC-Q-TOF-MS 在中药代谢组学中的应用主要有中药溯源研究、中药真伪鉴别研究、中药道地性研究、中药药效机制研究、中药质量控制研究和中药指纹图谱的建立。

①UPLC-Q-TOF-MS 在中药溯源研究中的进展: 中药品种混杂, 中药品种混合的主要原因之一是中药溯源的多样性和复杂性, 主要表现为<sup>[37]</sup>, 一是将同一科不同属的中药定义为一种药材; 二是将不同科、属的中药定义为一种药材; 三是同一药材在不同地区有不同来源; 四是药材名称的相似性导致基源复杂。UPLC-Q-TOF-MS 技术可以有效解决这些问题。苦豆子是一种被广泛用于治疗因胃火引起的牙龈、舌头肿胀和口腔溃疡的传统中药, 主要发源于中国四川和广西。Zong 等<sup>[38]</sup>建立了 UPLC-Q-TOF-MS 鉴别苦豆子根中生物碱的方法, 并将其应用于两个不同生境苦豆子根中生物碱的鉴定。结果鉴定出 24 种生物碱化合物, 其中包括 6 种新的生物碱类化合物。此外, 该实验还研究了四川和国州苦豆子生物碱含量的差异。随着中国海参养殖的迅速发展和海参在亚洲的商业普及, 海参在水产养殖中的地位日益重要。Zhao 等<sup>[39]</sup>采用 UPLC-Q-TOF-MS 结合正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 和 KEGG 代谢途径分析方法对不同产地的海参的体壁代谢产物进行分析鉴定, 发现了不同产地的海参的体壁代谢物有明显的区别, 其中差异代谢物主要为氨基酸和脂类。KEGG 代谢途径分析表明, 脂质代谢、氨基酸代谢和蛋白质代谢与地理起源密切相关, 这些结果可作为判别日本刺参产地的依据。Zhao 等<sup>[40]</sup>通过 UPLC-Q-TOF/MS 和多元统计分析技术对四川、河北、河南、山西和安徽五个不同产地采集的芍药样品进行分析, 比较不同产地芍药的差异。该实验利用国家药典委员会开发的中药色谱指纹图谱相似度评价系统对共有峰的相对峰面积进行分析, 并且采用对照品和文献进行比较, 得到 12 种共有峰, 鉴定出 10 种主要化学成分。经 PLS-DA 分析发现, 所有样本均按生境明确分为 5 组, 通过 VIP 值图分析, 5 种不同生境样品的主要差异成分为峰 2,6 (没食子酸乙酯)、10 (gallopaeoniflorin) 和 12 (苯甲酰芍药苷)。研究发现, 不同地区的芍药化学成分基本相似, 但这四种成分的含量有所不同。基于 UPLC-Q-TOF-MS 的代谢组学技术不仅可以区分不同溯源中药, 明确药材品种, 保证药物的质量和疗效, 还可以筛选出不同溯源中药之间的主要差异代谢物, 为研究不同中药药效差异的机理提供依据。

②UPLC-Q-TOF-MS 在中药真伪鉴别研究中的进展: 药材的真伪鉴别是中药质量控制的首要环节, 尤其是珍贵药材的真伪鉴别。假冒中药的主要存在形式有假冒伪劣药品、掺假、染色的药材和饮片。Xie 等<sup>[41]</sup>采用 UPLC-Q-TOF-MS 和多元统计分析技术对人参、三七、日本人参、西洋参和高丽参等 5 种中药材的代谢产物进行了分析检测。主成分分析结果表明, 五种人参属植物可鉴定出 5 种不同的植物化学成分, 化学标记物为人参皂苷 Rf, 20(S)-伪人参皂苷 F11, 丙二酰吉西诺苷 Rb1 和吉西诺苷 Rb2,



说明该方法可应用于中草药及其他天然产物中一类代谢物的快速分析,并适用于具有相似化学成分的复杂样品的鉴别。Liu 等<sup>[42]</sup>采用 UPLC-Q-TOF-HDMS 技术,结合 PCA 和 S-plot,成功鉴别了青蒿和艾蒿,PCA 图谱完整地显示出青蒿和艾蒿在苯丙素类成分(如咖啡酸、绿原酸、二咖啡酰奎尼酸和阿魏酸)上的区别。由此说明代谢组学技术可以从中药的整体代谢图谱中快速鉴别中药的真伪,并基于“去共性,找出特色”的基本思路来鉴别中药的真伪<sup>[43]</sup>,可用于有效的市场监管,确保市场上药材质量的稳定可靠。

③UPLC-Q-TOF-MS 在中药道地性研究中的进展:正品药材是指在特定的自然条件和生态环境地区生产的药材。生物因素,即遗传因素、环境因素和人为因素,是影响真药材有效活性成分的主要因素。遗传是内因,环境是外因,它们通过调节中药次生代谢产物的生物途径影响产物的合成和积累<sup>[44]</sup>,人为因素是主要通过栽培技术、收获加工、加工方法和市场流通等方面影响中药的质量。Ning 等<sup>[45]</sup>应用 UPLC-Q-TOF-MS 技术,结合多维统计分析方法对 4 个不同产地的冬凌草进行代谢组学分析,采用主成分分析和偏最小二乘判别分析,发现冬凌草的代谢特征明显不同于非道地产区,并且四个地理位置采集的样品中鉴定出的化合物是不同的,其中有 12 种化合物被认为是负责区分的标记化合物。Zhang 等<sup>[46]</sup>采用 UPLC-Q-TOF-MS 对江油附子、汉中附子、布托附子和微山附子的化学成分进行了研究。结合主成分分析方法,发现江油附子与汉中附子化学成分相似,但与新兴地区有显著差异,结合 PLS-DA 法鉴定出 7 种特征成分,其中不同产地的各乌头碱含量不相同,根据各成分的基本毒性,下乌头碱和中乌头碱是区分江油乌头、布托乌头和微山乌头的关键毒性因子,江油附子毒性低于布托附子和微山附子毒性,江油附子较低的毒性有利于保证临床用药的安全性,这可能是形成真附子的重要原因之一。由此研究者可以通过高分辨质谱代谢组学技术对道地药材化学成分进行研究,并结合模式识别等多元统计分析方法,从整体上探讨特征性化学成分及其分布规律,分析道地药材其道地性所在,同时还联合多元统计方法研究活性成分与基因、环境间的关联性,探索药材的“道地性”。

④UPLC-Q-TOF-MS 在中药药效机制研究中的进展:目前研究者将代谢组学与网络药理学联合预测药物在疾病中的作用机制,通过代谢组学技术高通量整体性分析,可筛选出特异性成分,通过网络药理学构建“成分-靶点-通路-疾病”网络,并进行生物学信息注释,预测药物作用机制和活性成分。淫羊藿,一种传统中草药,有治疗骨质疏松症(OP)的作用,但其抗骨质疏松作用的分子机制尚不清楚。Zhang 等<sup>[47]</sup>利用 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学对骨质疏松症大鼠血清进行分析,通过采用多变量数据分析系统和网络数据库筛选及鉴定潜在的生物标志物,揭示了淫羊藿乙醇提取物(Ext-epi)对生物标志物和代谢通路的影响,探讨了 Ext-epi 对治疗骨质疏松症的潜在机制。结果显示,筛选出 46 个潜在生物标志物,进一步的通路实验表明,关键通路分析包括花生四烯酸代谢、甘油磷脂代谢等潜在靶点,这些靶点与 Ext-epi 对骨质

疏松症的保护作用有关。总之,基于 UPLC-Q-TOF/MS 代谢组学的分析为了解此疾病的发病机制和评价天然产物的干预效果提供有效的策略。二氢杨梅素(DMY)是藤茶中一种重要的黄酮物质,对肝损伤具有保护作用。Gao 等<sup>[48]</sup>研究发现系统地利用大鼠血清、尿液、肝脏标本进行生化分析、病理观察和 UPLC-Q-TOF-MS 代谢组学研究,以评价 DMY 干预的大黄素毒性,口服 DMY 后,DMY 可通过改善肝脏代谢减轻肝脏损伤。在大鼠尿液和血清中的 15 种代谢物中,约有 8 种被 DMY 显著调节。代谢途径分析表明,谷胱甘肽代谢、嘧啶代谢和色氨酸代谢是影响最大的途径,预计有 18 个蛋白可能是 DMY 在缓解大黄素诱导的肝损伤过程中的潜在靶点。斑蝥素是从传统中药斑蝥中提取的主要生物活性化合物,已被证明是一种具有广泛抗肿瘤活性的天然成分。然而,斑蝥素由于其潜在的毒性作用,特别是肝毒性,在临床上的应用相对受限。虽然斑蝥素诱导的肝损伤已有报道,但其潜在的分子机制尚不清楚。Zhu 等<sup>[49]</sup>采用基于 UPLC-Q-TOF/MS 的代谢组学方法,结合血液生化分析、组织病理学检查和细胞凋亡检测,探讨斑蝥素诱导肝毒性的机制。在斑蝥素暴露组中,共鉴定出 54 种显著改变的代谢产物和 14 种紊乱的代谢途径。其中,根据斑蝥素治疗后肝脏损伤过程中的高影响值和潜在生物学功能,选择了氧化谷胱甘肽、谷胱甘肽、3-亚磺丙氨酸和去氧胆-3-葡萄糖苷酸四种代谢物。这有助于更深入地了解斑蝥素致肝毒性的机制。

⑤UPLC-Q-TOF-MS 在中药质量控制研究中的进展:中药质量优劣与中药种植、采收、加工、提取、制剂、贮存所有环节息息相关,对每一环节进行质量控制,才能确保最后产品的质量。现研究者将中药多指标化学成分评价模式与代谢组学技术相结合,寻找质量标志物<sup>[50]</sup>,评价中药质量。巴戟天是一种重要的中草药和功能性食品,其主要成分为蒽醌类和环烯醚萜苷类。主要化合物的定量分析是了解巴戟天药材质量和疗效的必要步骤,但目前还没有基于液质联用的定量分析方法。Zhao 等<sup>[51]</sup>采用 UPLC-Q-TOF-MS,多反应监测(MRM)模式进行定量分析。研究结果发现从该方法检测分析出 6 种目标化合物,可为山茱萸药材的质量控制和主要成分的鉴别提供依据。Raphael 等<sup>[52]</sup>采用基于非靶向 UPLC-Q-TOF-MS 的代谢组学和电子耦合等离子体发射光谱(ICP-OES)对卢萨卡和铜带的 10 批和 8 批干姜进行分析。研究发现代谢组学方法产生了 11 种不同的代谢物,来自两个地点的样本具有明显区别,其中 8 种代谢物在卢萨卡的样品中含量更高,而另外 3 种代谢物在铜带的样品中含量更高。此研究可揭示赞比亚两个省生姜质量的差异。代谢组学在中药质量研究中应用广泛,表现出整体性和系统性的独特优势,为中药多指标化学成分及指纹图谱质量评价提供依据,在今后研究中可将对照药材与代谢组学联合用于中药质量的快速判别,便于市场的监管及药厂药材的质量监控。

⑥UPLC-Q-TOF-MS 在中药指纹图谱建立中的进展:天然药物或中草药在应用时需要考虑的核心问题是质量控制。不同批次之间的药材在药用成分上存在着显著差别,而这种差别是由季节、产地、气候等的差异和变化决定的,单一的检测手段建立

的指纹图谱也越发不能满足质量检测的要求。因此,建立合理、准确的中药指纹图谱用以中药质量控制就显得尤为重要。Sang 等<sup>[53]</sup>利用 UPLC-Q-TOF-MS 方法对枳实薤白桂枝汤的指纹图谱共有峰进行鉴定并标定了 148 种化合物,结合相似度分析(SA)、层次聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等化学计量学方法,建立了优化的 UPLC 指纹图谱分析方法,研究结果有助于揭示枳实薤白桂枝汤的化学基础,具有潜在的质量评价价值。Xu 等<sup>[54]</sup>建立了基于 UPLC-Q-TOF-MS 的血清代谢指纹图谱来考察补骨脂(FP)的肝肾毒性。即利用偏最小二乘判别分析和正交偏最小二乘判别分析等多元统计方法来评价 FP 的毒性效应,寻找潜在的生物活性标志物和代谢途径。共鉴定出 10 种内源性代谢物,涉及磷脂代谢、氨基酸代谢、嘌呤代谢、抗氧化系统活性等相关代谢途径。结果表明,长期暴露于高剂量 FP 乙醇提取物(EEFP)可能引起大鼠肝肾毒性,因此血清代谢组学可以提高 FP 毒性的诊断效率,使其更加准确和全面。Li 等<sup>[55]</sup>采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 代谢指纹图谱,研究了 10 种中国人字果属植物的化学成分,并评价了其大麻素受体(CB1/CB2)的激动活性,共分析鉴定出 128 种化学成分,属于生物碱类、黄酮类、三萜皂苷类、酚酸类等。半定量统计学表明,生物碱类和黄酮类成分分布广泛,其中生物碱类成分最丰富,三萜皂苷类成分主要分布在纵肋人字果和务川人字果中。DNA 测序结果将这 10 个物种划分为 3 个类群,此外,本属 9 种植物提取物对 CB2 受体均表现出激动活性。这一综合分析揭示了该属药用植物的化学类型分布,为该属药用植物的前瞻性资源利用提供线索。

综上所述,UPLC-Q-TOF-MS 技术既可以有效应用于天然产物的检测分析,如独脚金内酯类化合物和铁皮石斛化学成分的检测分析,又可以应用于中药代谢组学研究,如不同产地铁皮石斛的代谢组学研究,从而快速、高效助力于铁皮石斛的产地溯源。

### 1.3 研究目的与意义

红花和铁皮石斛为我国传统中草药,其成分的分析鉴定通常利用柱层析提取、分离、制备,得到纯品后进行鉴定和表征,流程工作量大、耗时长,在制备超痕量未知物时尤其困难。UPLC-QTOF-MS 技术在天然产物的成分解析中具有独特的优点,常用于未知物质结构的定性分析;代谢组学是对某一生物体或细胞在一特定时期或条件下所有代谢产物同时进行定性和定量分析,是运用整体与综合分析于一体的技术,结合化学信息学分析方法确定目标差异代谢物,以此阐明生物体的代谢过程和变化机制。UPLC-Q-TOF-MS 是代谢组学研究的主要工具,具有分离速度快、进样体积小、准确度高、可以同时分析样品中上百种代谢物,较传统方法获得更丰富、更清晰的信息。因此本论文利用 UPLC-Q-TOF-MS 对独脚金内酯类化合物进行

定性检测，并且应用此技术对不同产地铁皮石斛进行非靶向代谢组学研究，其主要研究目的及意义如下：

（1）利用 UPLC-Q-TOF-MS 定性分析红花根系分泌物中独脚金内酯类化合物的种类，建立了测定红花根系分泌物中的独脚金内酯类物质的液质联用分析方法。

（2）独脚金内酯作为一种“自杀性”萌发剂，在农田杂草控制中具有潜在的优势。前期研究表明红花根系分泌物中富含独脚金内酯类化合物。所以，本论文测定红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发以及幼苗生长的化感效应，为今后红花根系分泌物应用于杂草防控和新型除草剂的开发及应用提供理论依据。

（3）铁皮石斛作为中草药种类中极其珍稀的中药材，别称黑节草、云南铁皮、铁皮斗等，被誉为“九大仙草”之首，但是因为不同产地的铁皮石斛品种混杂，不易区分。因此本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS 的非靶向代谢组学研究 and 多变量分析，包括主成分分析（PCA）、偏最小二乘判别分析（PLS-DA）以及正交偏最小二乘分析（OPLS-DA），应用于铁皮石斛的代谢指纹分析，研究不同生境植物的代谢差异，可以有效区分不同产地的铁皮石斛药材，建立一套基于 UPLC-Q-TOF-MS 的铁皮石斛产地溯源模型。

## 2 UPLC-Q-TOF-MS 对红花根系分泌物中独脚金内酯类物质的研究

独脚金内酯是植物根系分泌的一些天然的独脚金醇类化合物以及人工合成类似物的总称，而自然界中独脚金内酯类化合物含量低且极不稳定，因此需要一套高效、灵敏的检测技术分析研究此类化合物。本实验通过选定红花植物，水培红花植物种苗，在水培液中收集其根系分泌物，利用UPLC-Q-TOF-MS技术结合UNIFI数据库分析红花根系分泌物中的独脚金内酯类化合物，以期定性分析鉴定出此类化合物，建立一套独脚金内酯类化合物鉴别方法，为独脚金内酯类化合物的定性分析提供技术支撑。

### 2.1 材料与方法

#### 2.1.1 试剂和仪器

本试验用到的实验试剂如下表 2.1 所示：

表 2.1 实验药品与试剂  
Table 2.1 The main drugs and reagents used in this research

试剂	分子式	级别	生产厂家
硝酸钾	$\text{KNO}_3$	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
尿素	$\text{H}_2\text{NCONH}_2$	A.R.	宁波市化学试剂有限公司
二水合磷酸二氢钠	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
硫酸钾	$\text{K}_2\text{SO}_4$	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
无水氯化钙	$\text{CaCl}_2$	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
无水硫酸镁	$\text{MgSO}_4$	A.R.	天津市大茂化学试剂厂
4-吗啉乙磺酸	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
70%乙醇	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
1%次氯酸钠	$\text{NaClO}$	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
乙酸乙酯	$\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$	A.R.	国药集团化学试剂有限公司

此次试验用到的实验仪器如下表 2.2 所示：

表 2.2 实验仪器

Table 2.2 The main equipment used in this research

仪器名称	型号/规格	生产厂家
生化培养箱	NB-LRH-70	上海一恒科学仪器有限公司
分析天平	FA2004 型	上海良平仪器仪表有限公司
旋转蒸发器	OSB-2100 型	上海爱郎仪器有限公司
超声波清洗器	KQ-300 型	昆山市超生仪器有限公司
液质联用仪	Waters ACQUITY	杭州瑞析科技有限公司
UPLC®SYNAPT™		

### 2.1.2 TT 培养液的制备

在分析天平上分别称取 0.2887 g 硝酸钾, 0.0600 g 尿素, 0.0499 g 二水合磷酸二氢钠, 0.1740 g 硫酸钾, 0.1880 g 氯化钙, 0.2400 g 硫酸镁和 0.3900 g 4-吗啉乙磺酸, 混合后, 用 2 L 无菌水溶解, 搅拌均匀<sup>[56]</sup>。将溶液保存在清洗干净的无菌瓶中, 待试验所需时备用。

### 2.1.3 红花催芽

将大量红花种子分别放入水中漂浮, 筛选出饱满、优良的种子。配制浓度为 70% 的乙醇, 浸泡红花种子 2 min, 用灭菌水冲洗至无醇味; 然后用 1% 次氯酸钠将种子浸泡 1 min, 用灭菌水冲洗干净<sup>[57]</sup>。此过程是对种子表面进行灭菌, 打破种子休眠, 使种子快速发芽。将完成上述步骤的种子移到铺有湿润滤纸的培养皿中, 每个培养皿中放置 15-20 颗种子, 然后铺上纱布, 并保持纱布处于湿润状态。将培养皿放入设置温度为 27 °C 的生化培养箱中, 使其处于黑暗状态。要定期查看补水, 确保纱布一直处于湿润状态, 待种子萌发, 期间根据需要适当补水。

### 2.1.4 幼芽的培养

将发育良好的幼芽移种到含有湿润纱布的塑料容器中, 纱布要覆盖塑料容器, 然后将其放置到尺寸更大且有一定量自来水的塑料容器中<sup>[58]</sup>。完成上述操作后, 将塑料容器一并放在温度仍为 27 °C 的生物培养箱中, 每天光照培养 12 小时、黑暗培养 12 小时, 共培养 3 天。

### 2.1.5 TT 培养液的培养

量取适量的 TT 培养液于 250 mL 的容器中, 容器口用纱布包裹, 挑选长势良好的红花幼苗移种到 TT 培养液中, 使根部完全浸在培养液中。培养期间, 温度与光照

时间与上述保持不变, 每 3 天更换培养液和样品, 共培养 12 天。同时, 用无菌水培养作为对照<sup>[59]</sup>。

### 2.1.6 红花根系分泌物的收集

将上述培养的 TT 培养液收集合并、过滤得到含有分泌物的溶液。用乙酸乙酯对培养液进行萃取(等体积萃取三次), 合并乙酸乙酯萃取液, 减压浓缩得到分泌物粗浸膏, 将其放入 4℃ 冰箱中保存备用。

### 2.1.7 色谱和质谱条件

色谱柱: AcquityUPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相: 乙腈(A)~0.1%甲酸水(B), 梯度洗脱(0~1 min, 2%A; 1~10 min, 2%~30%A; 10~12 min, 30%~100%A; 12~13 min, 100%A; 13~13.5 min, 2%A; 13.5~15 min, 2%A), 柱温: 40℃; 流速: 0.4 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 5 μL。

采用正、负离子模式; 毛细管电压分别为 3.0、2.5 kV; 锥孔电压分别为 45、30 V; 离子源和脱溶剂气温度分别为 110、400 ℃; 脱溶剂氮气和锥孔气体积流量分别为 800、50 L/h; 采样频率为 0.1 s, 间隔 0.02 s; 相对分子质量记录范围为 50-1800, 采用亮氨酸-脑啡肽([M+H]<sup>+</sup>= 556.2771, [M-H]<sup>-</sup>= 554.2615) 对其进行实时校正。数据采集模式采用 MS<sup>E</sup> 模式, 碰撞能量分别采用 20、30、40、50 eV。

### 2.1.8 数据分析

收集文献已报道独脚金内酯的化学结构信息(结构式、分子式、质谱数据等), 导入到 UNIFY 软件中, 构建独脚金内酯类化合物的结构信息数据库。采用 Waters UNIFY 1.8.2.169 软件对正、负离子模式下收集到的红花根分泌物 UPLC-Q-TOF-MS 的 Raw data (MS<sup>E</sup> 采集模式, 含全部一级、二级质谱峰信息) 进行分析, 与构建的独脚金内酯类化合物的结构信息数据库进行比对, 使用 UNIFI 软件通过母离子的精确质量数、同位素峰度模型、子离子精确质量数等参数自动匹配中药数据库里已有化合物, 误差小于 5 ppm, 至少匹配上 1 个子离子, 且一级质谱响应值大于 10000 筛选鉴定结果, 软件自动产生提取离子流图、一级质谱匹配结果和二级碎片匹配结果。

## 2.2 红花根系分泌物独脚金内酯类化合物的检测结果与讨论

### 2.2.1 构建已知独脚金内酯的 UNIFI 化学结构信息数据库

通过 Scifinder 数据库, 查找天然独脚金内酯类化合物的文献, 按照下表 2.3 逐一梳理天然独脚金内酯类化合物的结构信息(结构式、分子式、质谱数据等)。并将该表导入到 UNIFI 软件中, 构建已知独脚金内酯的 UNIFI 化学结构信息数据库。

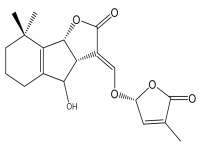
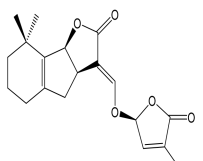
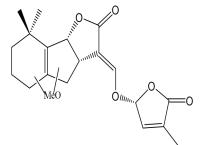
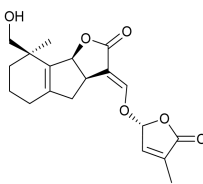
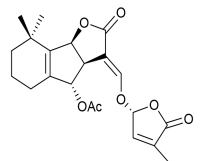
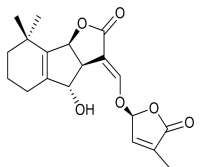
表 2.3 独脚金内酯质谱结构数据库

Table 2.3 Strigolactone mass spectrometry structure database

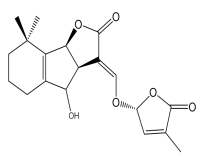
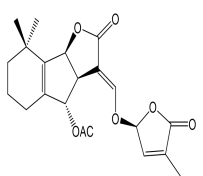
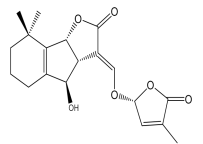
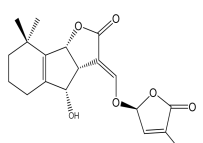
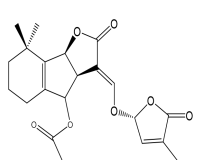
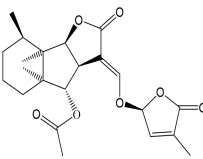
名称	结构式	分子式	分子量	MS <sup>1</sup> /( <i>m/z</i> )	MS <sup>2</sup> 碎片/( <i>m/z</i> )	离子源	参考文献
独脚金醇 (Strigol)		C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	346.37	<i>m/z</i> 346	231, 249, 97	M <sup>+</sup>	Phytochemical analysis, 2019, 30(1): 110 - 116 <sup>[60]</sup>
黑朔醇 (alectrol)		C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	388.37	<i>m/z</i> 411	351, 254	[M+Na] <sup>+</sup>	Phytochemistry, 2008, 69(2): 427 - 431 <sup>[61]</sup>
高粱内酯 (sorgolactone)		C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	316.34	<i>m/z</i> 317	221, 260, 123	[M+H] <sup>+</sup>	Plant signaling & behavior, 2015, 10(8): e1049792 <sup>[62]</sup>
列当醇 (orobanchol)		C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	346.38	<i>m/z</i> 347	394, 329, 232	[M+H] <sup>+</sup>	Frontiers in plant science, 2022, 13: 835160 <sup>[63]</sup>
5-脱氧独脚金醇 (5-Deoxystrigol)		C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	330.37	<i>m/z</i> 329	315, 233, 215	M <sup>+</sup>	Journal of pesticide science, 2018, 43(3): 198 - 206 <sup>[64]</sup>



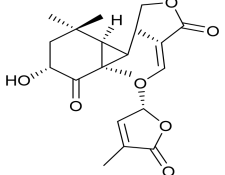
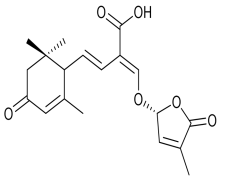
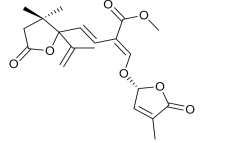
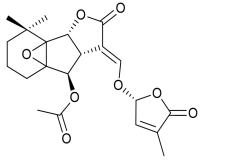
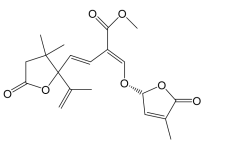
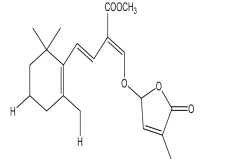
UPLC-Q-TOF-MS 对红花根系分泌物中独脚金内酯类物质的研究

2'-epi-5-脱氧独脚金醇 (2'-epi-5-deoxystrigol)		C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	330.40	<i>m/z</i> 330	349, 310, 218	M <sup>+</sup>	Molecular plant, 2013, 6(1):153 - 163 <sup>[65]</sup>
ent-2'-epi-5-脱氧独脚金醇 (ent-2'-epi-5-deoxystrigol)		C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	330.37	<i>m/z</i> 330	346, 380, 97	M <sup>+</sup>	Molecular plant, 2013, 6(1):153 - 163 <sup>[65]</sup>
甲氧基-5-脱氧独脚金醇 (Methoxy-5-deoxystrigol)		C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	362.42	<i>m/z</i> 363	208, 177	[M+H] <sup>+</sup>	Journal of pesticide science, 2017, 42(2): 58 - 61 <sup>[66]</sup>
sorgomol		C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	346.00	<i>m/z</i> 369	100, 107	[M+Na] <sup>+</sup>	Plant physiology, 2021, 185(3): 902 - 913 <sup>[67]</sup>
列当醇乙酸酯 (Orobanchyl acetate)		C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	388.16	<i>m/z</i> 389	345, 290, 248	[M+H] <sup>-</sup>	Plants, 2021, 10(12): 2552 <sup>[68]</sup>
2'-epi -列当醇 (2'-epi-orobanchol)		C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> O <sub>6</sub>	346.37	<i>m/z</i> 346	233, 205, 97	[M] <sup>+</sup>	PloS one, 2014, 9(8): e104201 <sup>[69]</sup>

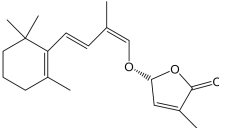
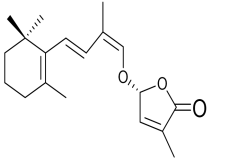
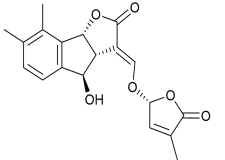
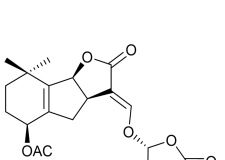
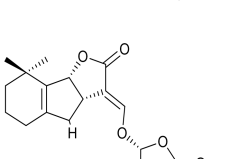
UPLC-Q-TOF-MS 对红花根系分泌物中独脚金内酯类物质的研究

ent-2'-epi-列当醇 (ent-2'-epi-orobanchol)		C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	346.37	<i>m/z</i> 347	263, 205	[M+H] <sup>+</sup>	PloS one, 2014, 9(8): e104201 <sup>[69]</sup>
2'-epi-列当醇乙酸酯 (2'-epi-orobanchol acetate)		C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> O <sub>8</sub>	405.42	<i>m/z</i> 405	253, 234	[M] <sup>+</sup>	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(19):10485 - 10490 <sup>[70]</sup>
4-epi-列当醇 (4-epi-orobanchol)		C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	346.37	<i>m/z</i> 369	265, 233	[M+Na] <sup>+</sup>	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(19):10485 - 10490 <sup>[70]</sup>
4,2-bisepi-列当醇 (4,2-bisepi-orobanchol)		C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	346.37	<i>m/z</i> 369	204, 203	[M+Na] <sup>+</sup>	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(19):10485 - 10490 <sup>[70]</sup>
4-O-acetylorobanchol		C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> O <sub>7</sub>	389.40	<i>m/z</i> 389	120, 95	M <sup>+</sup>	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(19):10485 - 10490 <sup>[70]</sup>
2-Epi-4a,8a-epoxy orobanchyl acetate		C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> O <sub>8</sub>	404.14	<i>m/z</i> 405	344, 316, 307	[M+H] <sup>+</sup>	Phytochemistry, 2009, 70(2): 211 - 215 <sup>[71]</sup>

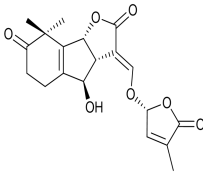
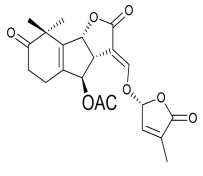
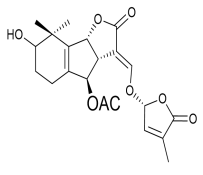
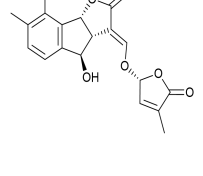
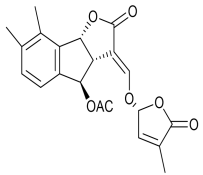
UPLC-Q-TOF-MS 对红花根系分泌物中独脚金内酯类物质的研究

avenaol		C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	376.40	<i>m/z</i> 376	377, 359	M <sup>+</sup>	Phytochemistry, 2014, 103: 85 - 88 <sup>[72]</sup>
heliolactone		C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	360.12	<i>m/z</i> 383	327, 246	[M+Na] <sup>+</sup>	Phytochemistry, 2014, 108: 122 - 128 <sup>[73]</sup>
zealactone		C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	376.15	<i>m/z</i> 377	359, 345, 327	[M+H] <sup>+</sup>	Phytochemistry, 2017, 137: 123 - 131 <sup>[74]</sup>
Fabacyl acetate		C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	404.14	<i>m/z</i> 405	427, 343, 246	[M+H] <sup>-</sup>	Phytochemistry, 2009, 70(2): 211 - 215 <sup>[71]</sup>
methyl zealactone		C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> O <sub>7</sub>	376.16	<i>m/z</i> 377	273, 255	[M+H] <sup>+</sup>	Journal of Pesticide Science, 2017, 42(2): 58 - 61 <sup>[66]</sup>
Lotuslactone		C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> O <sub>9</sub>	432.13	<i>m/z</i> 433	431, 414, 372	[M+H] <sup>+</sup>	Phytochemistry, 2019, 157: 200 - 205 <sup>[75]</sup>

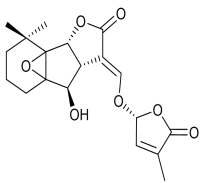
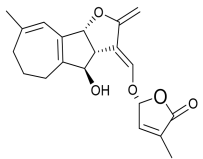
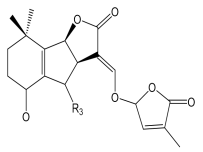
UPLC-Q-TOF-MS 对红花根系分泌物中独脚金内酯类物质的研究

carlactone (CL)		$C_{19}H_{26}O_3$	302.18	$m/z$ 303	190, 97	$[M+H]^+$	The New Phytologist, 2018, 218(4): 1522 - 1533 <sup>[76]</sup>
carlactonoic acid		$C_{19}H_{24}O_5$	332.00	$m/z$ 333	186, 154	$[M+H]^+$	Frontiers in Plant Science, 2020, 11(5): 434. <sup>[77]</sup>
solanacol		$C_{19}H_{18}O_6$	342.00	$m/z$ 342	148, 152	$M^+$	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(15): 6326 - 6332 <sup>[78]</sup>
strigyl acetate		$C_{21}H_{25}O_7$	389.42	$m/z$ 389	286, 253	$M^+$	Journal of Experimental Botany, 2018, 69(9): 2305 - 2318. <sup>[79]</sup>
4-脱氧列当醇 (4-deoxyorobanchol)		$C_{19}H_{22}O_5$	330.00	$m/z$ 329	331, 270	$[M-H]^-$	The New Phytologist, 2018, 218(4): 1522 - 1533 <sup>[76]</sup>

UPLC-Q-TOF-MS 对红花根系分泌物中独脚金内酯类物质的研究

7-氧代列当醇 (7-oxoorobanchol)		C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	360.00	<i>m/z</i> 361	245, 180	[M+H] <sup>+</sup>	Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2009, 73(6): 1367 - 1370 <sup>[80]</sup>
7-氧代列当醇乙酸酯 (7-oxoorobanchyl acetate)		C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	402.00	<i>m/z</i> 403	343, 246	[M+H] <sup>+</sup>	Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2009, 73(6): 1367 - 1370 <sup>[80]</sup>
7-羟基列当醇乙酸酯 (7-hydroxyorobanchyl acetate)		C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	404.44	<i>m/z</i> 425	362, 344, 247	[M+H] <sup>+</sup>	Journal of Pesticide Science, 2014, 39(3): 121 - 126 <sup>[81]</sup>
solanacol		C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	342.00	<i>m/z</i> 342	227, 201	[M] <sup>+</sup>	Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2015, 79(8): 1240 - 1245 <sup>[82]</sup>
solanacyl acetate		C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	384.00	<i>m/z</i> 384	342, 245, 227	[M] <sup>+</sup>	Molecular Plant, 2013, 6(1): 153 - 163 <sup>[65]</sup>

UPLC-Q-TOF-MS 对红花根系分泌物中独脚金内酯类物质的研究

Fabacol		$C_{23}H_{27}O_9$	447.45	$m/z$ 448	367, 270	$[M+H]^+$	Phytochemistry, 2009, 70(2): 211 - 215 <sup>[71]</sup>
Medicaol		$C_{19}H_{20}O_6$	344.12	$m/z$ 344	326, 247, 229	$[M]^+$	Phytochemistry, 2015, 111: 91 - 97 <sup>[83]</sup>
Strigone		$C_{19}H_{20}O_7$	360.40	$m/z$ 360	247, 230, 201	$[M]^+$	Phytochemistry, 2013, 87: 60 - 64 <sup>[84]</sup>

### 2.2.2 红花根系分泌物中独脚金内酯类化合物的分析

采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对红花根系分泌物中的化学成分进行分析,按照 2.1.8 小节的数据处理方法分析了阴阳离子模式的基峰色谱图 (BPI) (图 2.1) 中各分子离子峰及其碎片的相互对应关系,鉴定了 5 个独脚金内酯类化合物。结果表明,阴离子模式比阳离子模式可以获得更多的信息,在阴离子模式的 BPI 色谱图中显示了独脚金内酯类化合物的整体图谱。

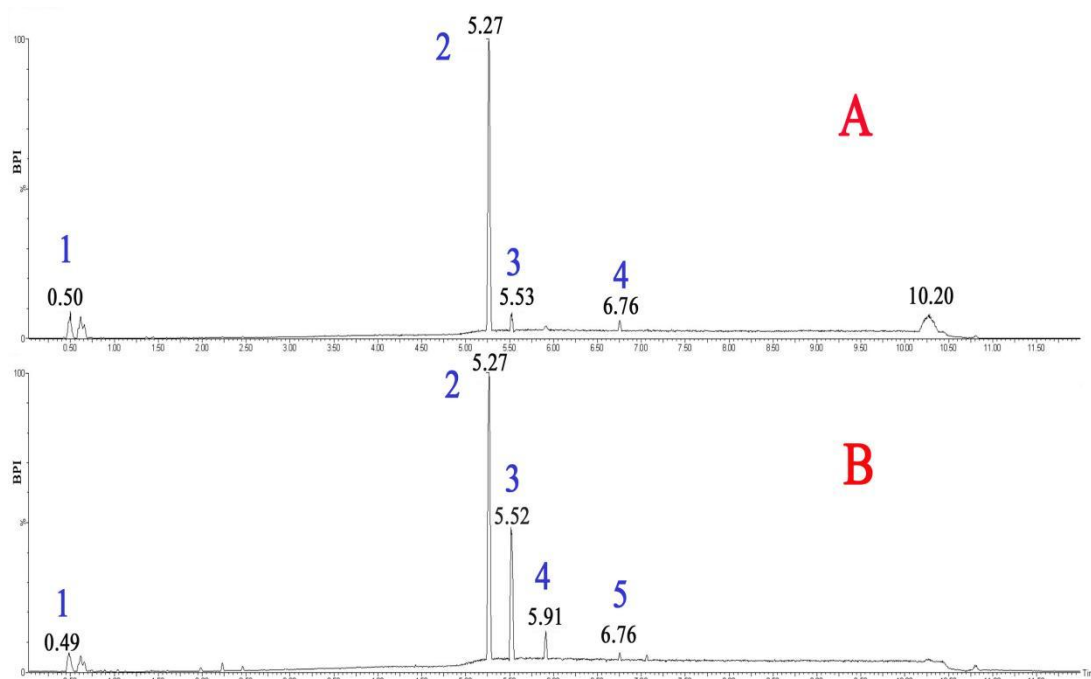


图 2.1 红花独脚金内酯类物质的阳离子模式 BPI (A) 和阴离子模式 BPI (B) 色谱图

Figure 2.1 Cationic mode BPI (A) and anionic mode BPI (B) chromatograms of auricolactone from safflower

在保留时间 0.49 min, 1 号峰的准分子离子峰为  $m/z$  389.3421  $[M+H]^+$ , 得到其元素组成  $C_{21}H_{24}O_7$ , 二级质谱中主要碎片离子峰有  $m/z$  345.1206  $[M+H-CO_2]^+$  和 248.0188  $[M+H-CO_2-D]^+$ , 依次丢失  $CO_2$  和 D 环, 通过上述所构建的独脚金内酯的质谱结构数据库 (表 2.3), 并且使用 UNIFI 软件对阴阳离子模式下红花根分泌物中独脚金内酯的 UPLC-Q-TOF-MS 的 Raw data ( $MS^E$  采集模式) 进行分析比对, 如图 2.2 所示, 可以确定峰 1 是列当醇乙酸酯 (Orobanchyl acetate)。列当醇乙酸酯的裂解途径如图 2.3 所示。

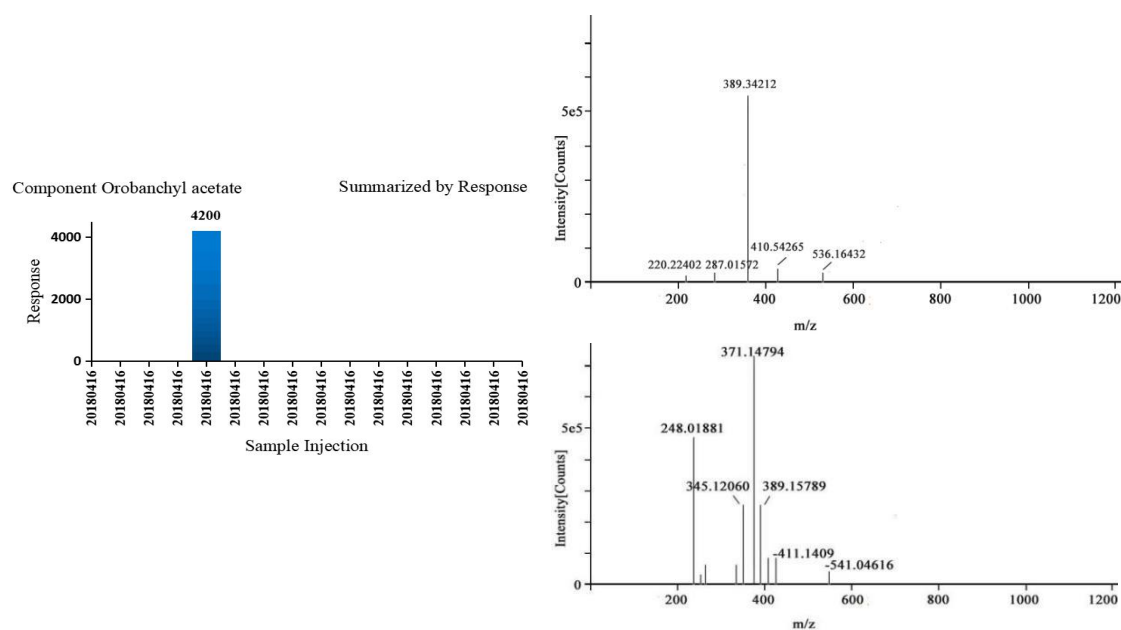


图 2.2 化合物 1 与数据库对比分析

Figure 2.2 Comparative analysis of compound 1 and database

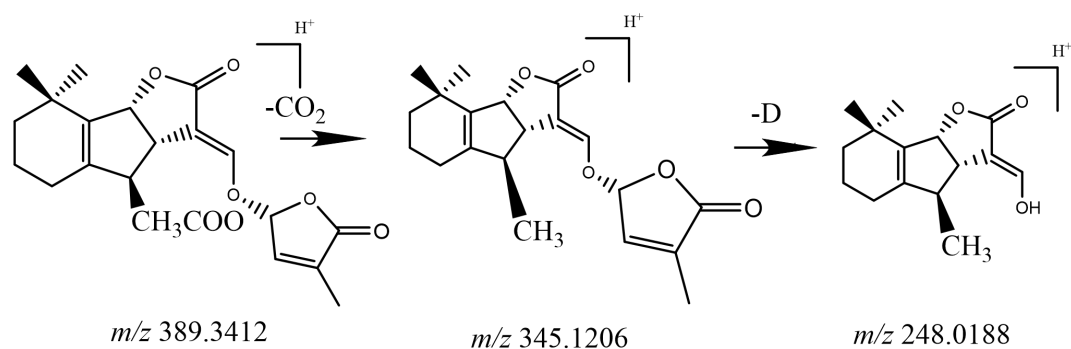


图 2.3 列当醇乙酸酯的裂解途径

Figure 2.3 MS fragmentation pathway of Orobanchyl acetate

在保留时间 5.27 min, 2 号峰的准分子离子峰为  $m/z$  347.0312 $[M+H]^+$ , 得到其元素组成  $C_{19}H_{22}O_6$ , 二级质谱中主要碎片离子峰  $m/z$  329.0157 $[M+H-H_2O]^+$ 和 232.0387 $[M+H-H_2O-D]^+$ , 依次丢失一个水分子和 D 环, 通过上述所构建的独脚金内酯的质谱结构数据库 (表 2.3), 并且使用 UNIFI 软件对阴阳离子模式下红花根系分泌物中独脚金内酯的 UPLC-Q-TOF-MS 的 Raw data ( $MS^E$  采集模式) 进行分析比对, 如图 2.4 所示, 可以确定峰 2 是列当醇 (orobanchol)。列当醇的裂解途径如图 2.5 所示。



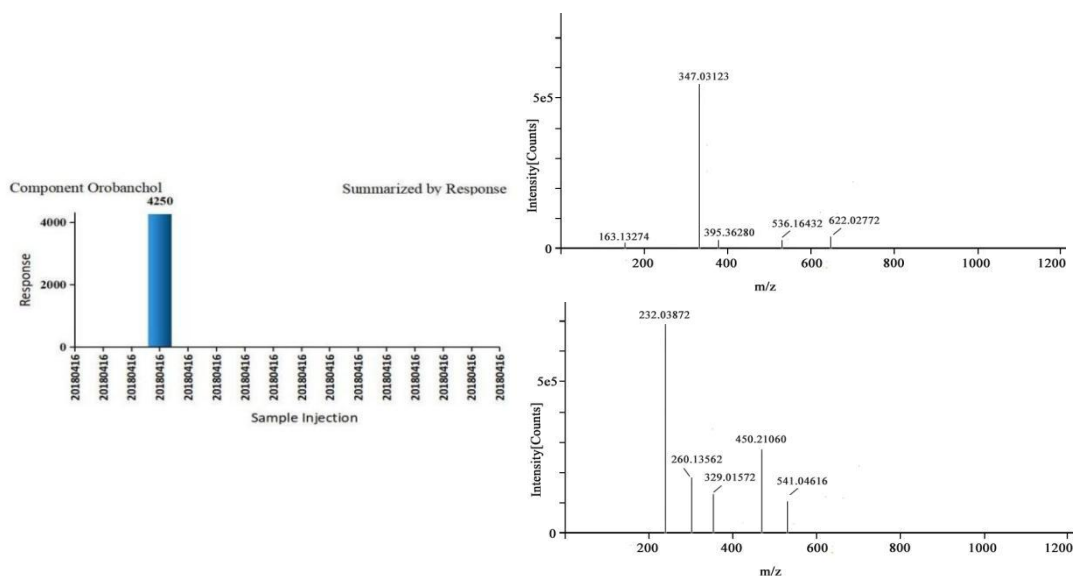


图 2.4 化合物 2 与数据库对比分析

Figure 2.4 Comparative analysis of compound 2 and database

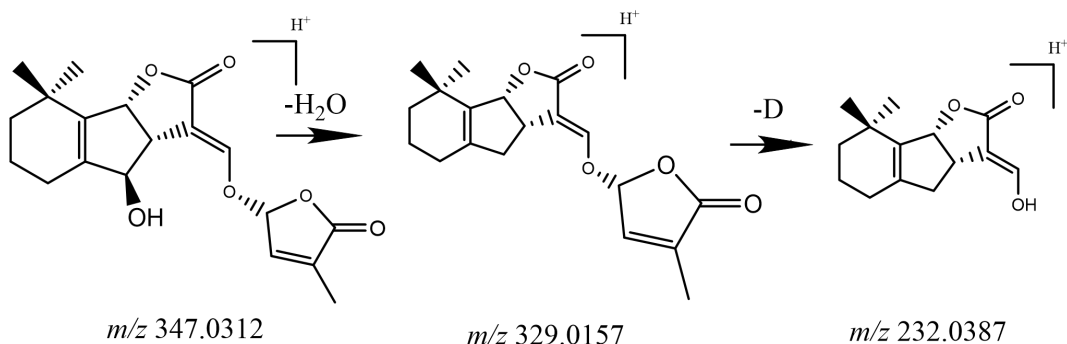


图 2.5 列当醇的裂解途径

Figure 2.5 MS fragmentation pathway of orobanchol

在保留时间 5.52 min, 准分子离子峰为  $m/z$  330.1547  $M^+$ , 得到其元素组成  $C_{19}H_{22}O_5$ , 二级质谱中主要碎片离子峰有  $m/z$  315.1302  $[M-CH_3]^+$ , 233.0671  $[M-D]^+$ , 215.0092  $[M-D-H_2O]^+$  和 187.0885  $[M-D-H_2O-CO]^+$ , 分别丢失一个  $CH_3$  和 D 环, 并且在丢失 D 环的基础上依次丢失一个  $H_2O$  分子和 CO 分子, 通过上述所构建的独脚金内酯的质谱结构数据库 (表 2.3), 并且使用 UNIFI 软件对阴阳离子模式下红花根分泌物中独脚金内酯的 UPLC-Q-TOF-MS 的 Raw data ( $MS^E$  采集模式) 进行分析比对, 如图 2.6 所示, 从而可以确定峰 3 是 5-脱氧独脚金醇 (5-Deoxystrigol)。5-脱氧独脚金醇的裂解途径如图 2.7 所示。

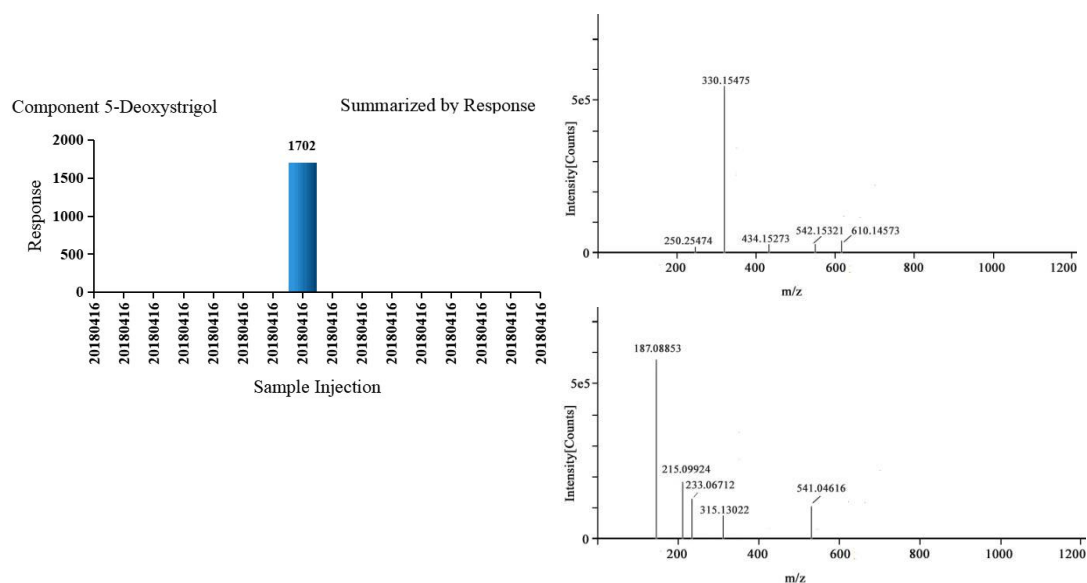


图 2.6 化合物 3 和数据库对比分析

Figure 2.6 comparative analysis of compound 3 and database

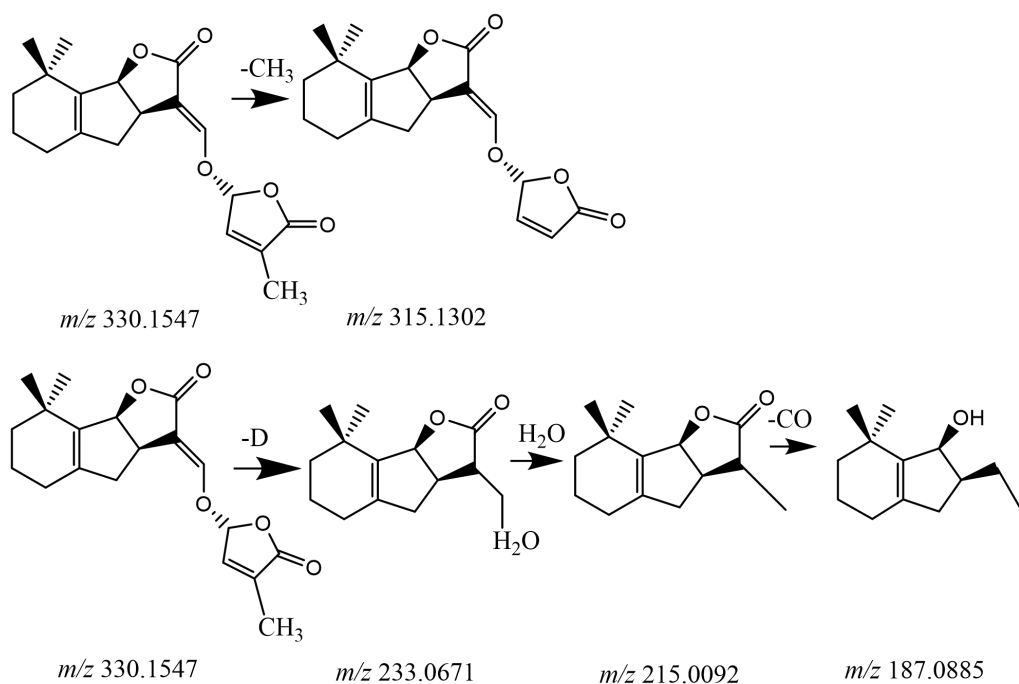


图 2.7 5-脱氧独脚金醇的裂解途径

Figure 2.7 MS fragmentation of 5-Deoxystigol

在保留时间 5.91 min, 准分子离子峰为  $m/z$  405.2132  $[M+H]^+$ , 得到其元素组成  $C_{21}H_{24}O_8$ , 二级质谱中主要碎片离子峰有 345.0239  $[M+H-AcOH]^+$ 、248.0139  $[M+H-AcOH-D \text{ ring}]^+$ , 依次丢失一个乙酸和一个 D 环, 通过上述所构建的独脚金内

酯的质谱结构数据库（表 2.3），并且使用 UNIFI 软件对阴阳离子模式下红花根系分泌物中独脚金内酯的 UPLC-Q-TOF-MS 的 Raw data ( $MS^E$  采集模式) 进行分析比对，如图 2.8 所示，从而可以确定峰 4 是 Fabacyl acetate。Fabacyl acetate 的裂解途径如图 2.9 所示。

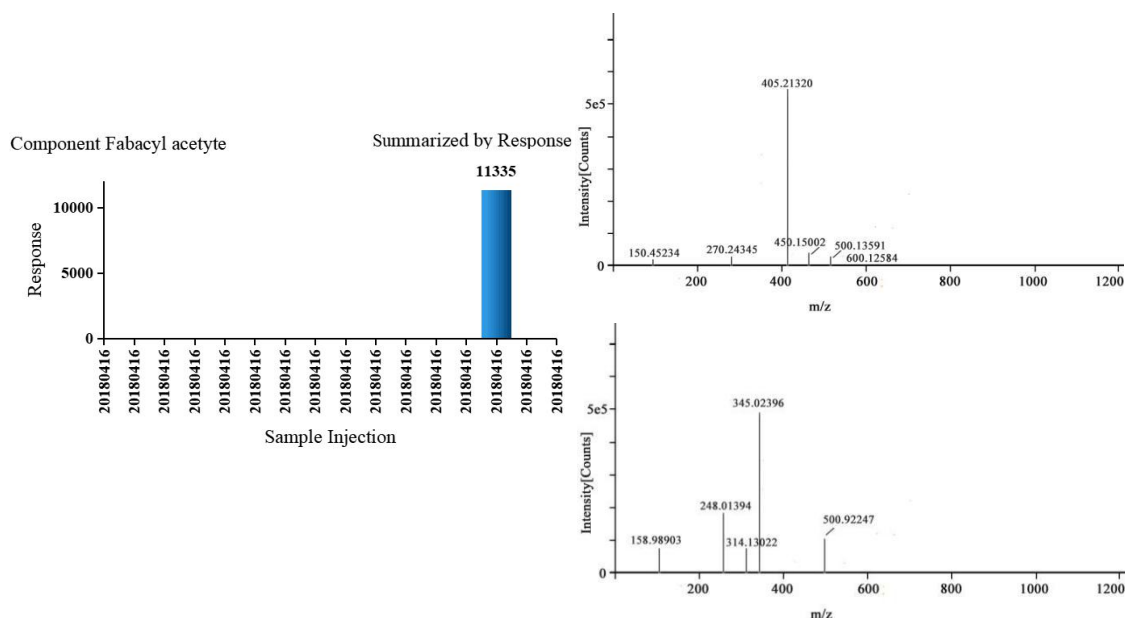


图 2.8 化合物 4 和数据库对比分析

Figure 2.8 Comparative analysis of compound 4 and database

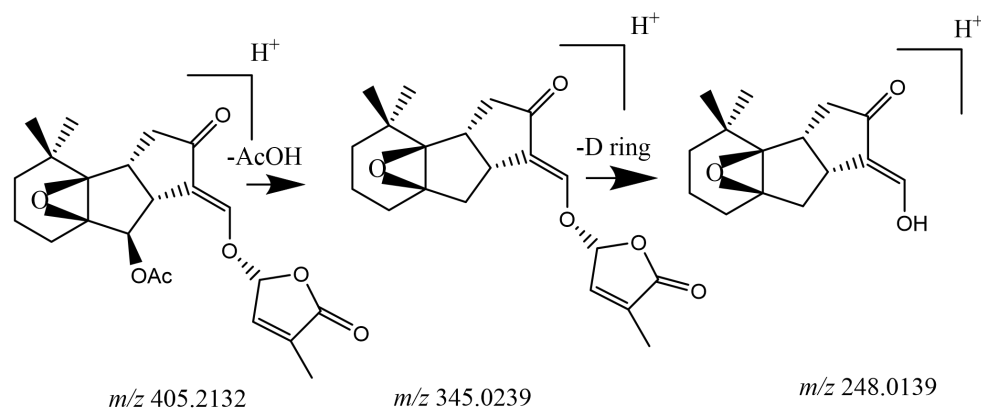


图 2.9 Fabacyl acetate 的裂解途径

Figure 2.9 MS fragmentation of Fabacyl acetate

在保留时间 6.76 min，准分子离子峰为  $m/z$  403.1241 $[M+H]^+$ ，得到其元素组成  $C_{21}H_{22}O_8$ ，二级质谱中主要碎片离子峰有  $m/z$  343.1346  $[M+H-AcOH]^+$  和  $m/z$  246.1098  $[M+H-AcOH-D ring]^+$ ，依次丢失一个乙酸和一个 D 环，通过上述所构建的独脚金内酯的质谱结构数据库（表 2.3），并且使用 UNIFI 软件对阴阳离子模式下红花根分泌

物中独脚金内酯的 UPLC-Q-TOF-MS 的 Raw data ( $MS^E$  采集模式) 进行分析比对, 如图 2.10 所示, 从而可以确定峰 5 是 7-氧代列当醇乙酸酯 (7-Oxo-orobanchyl acetate)。7-氧代列当醇乙酸酯的裂解途径如图 2.11 所示。

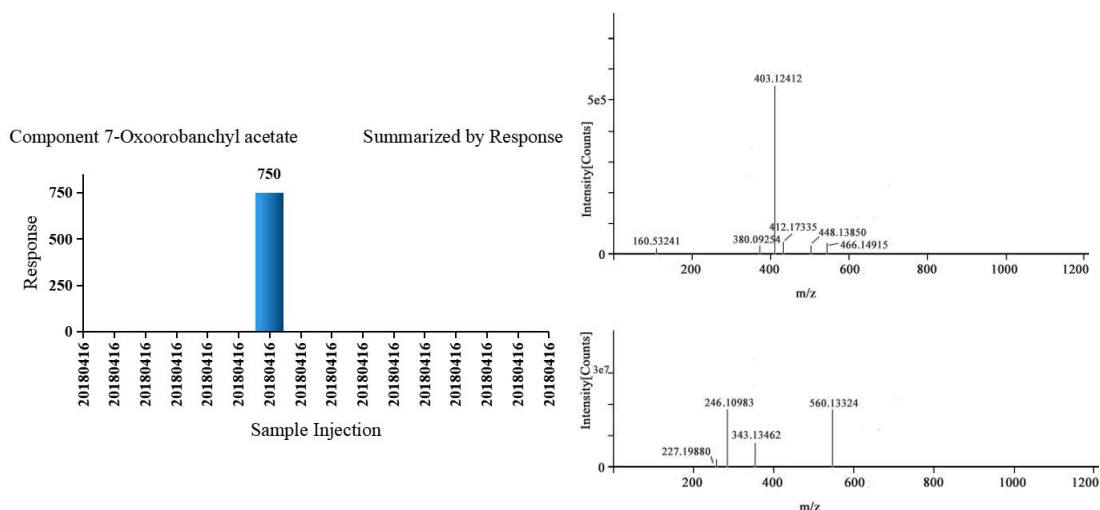


图 2.10 化合物 5 和数据库对比分析

Figure 2.10 Comparative analysis of compound 5 and database

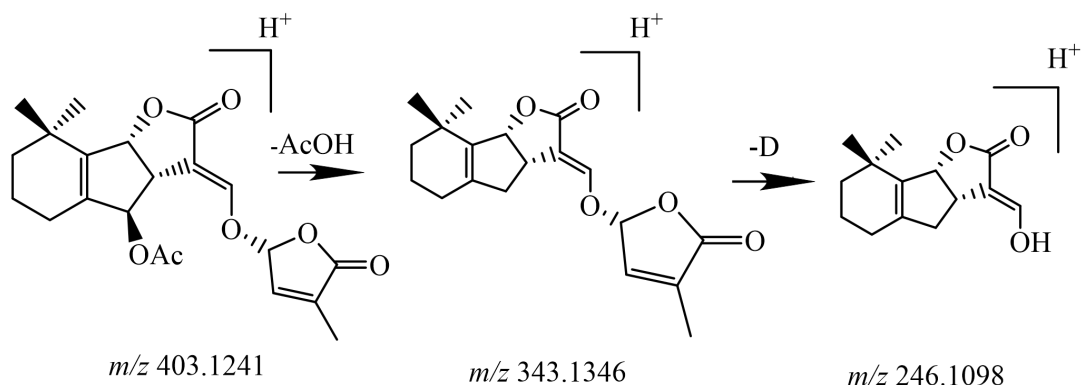


图 2.11 7-氧代列当醇乙酸酯的裂解途径

Figure 2.11 MS fragmentation of 7-Oxo-orobanchyl acetate

表 2.4 汇总了红花根系分泌物中化合物的鉴定结果, 共鉴定出 5 种独脚金内酯类化合物, 分别为列当醇、7-氧代列当醇乙酸酯、列当醇乙酸酯、5-脱氧独脚金醇、Fabacyl acetate。其中列当醇、列当醇乙酸酯和 5-脱氧独脚金醇在菊科植物如红花、向日葵等和豆科植物如豌豆等是主要的独脚金内酯类化合物。此外, 菊科和豆科植物可以产生和分泌相似的独脚金内酯混合物, 这表明在该类植物中独脚金内酯可以通过共同或相似的途径合成<sup>[85]</sup>。在法国万寿菊的两个品种中, 独脚金内酯的分泌量没有明显的差异, 而在同一属的两个品种之间存在着显著的差异, 非洲金盏花根系分泌物中可以检测到

7-氧代列当醇乙酸酯，而两种法国金盏花根系分泌物中均未检测到这种独脚金内酯<sup>[86]</sup>。可食用牛蒡子、红花和白穗草的根系分泌物中均分离出 Fabacyl acetate，表明这可能是菊科植物中的次要独脚金内酯。并且研究人员在分泌 Fabacol 的植物根系的分泌物中没有检测到 Fabacyl acetate，说明在这些植物中由 Fabacyl acetate 转化为 Fabacol 的过程非常迅速<sup>[87-88]</sup>，导致这种独脚金内酯无法被检测到。

表 2.4 UPLC-Q-TOF-MS 分析的 5 种化合物的色谱和质谱数据

Table 2.4 Chromatography and mass spectral data of the 5 compounds analyzed by UPLC-Q-TOF-MS

顶峰	保留时间/ min	化合物	准分子离子峰	分子式	碎片离子峰
1	0.49	Orobanchyl acetate	389.3421 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	345, 248
2	5.27	Orobanchol	347.0312 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	329, 232
3	5.52	5-Deoxystrigol	330.1547 M <sup>+</sup>	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	315, 233, 215, 187
4	5.91	Fabacyl acetate	405.2132 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	345, 248
5	6.76	7-Oxoorobanchyl acetate	403.1241 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	343, 246

## 2.3 本章小结

本章通过水培红花植物种苗，在水培液中收集其根系分泌物，利用 UPLC-Q-TOF-MS 对其进行检测分析。首先，构建已知独脚金内酯类化合物的 UNIFI 数据库。其次，通过提取的液质检测数据与 UNIFI 数据库比对、质谱裂解数据分析和参考已知化合物的文献质谱数据分析红花根系分泌物中的独脚金内酯类化合物。最后，在负离子模式下的 BPI 色谱图中显示出了独脚金内酯类化合物的整体图谱，分别为列当醇、7-氧代列当醇乙酸酯、列当醇乙酸酯、5-脱氧独脚金醇、Fabacylacetate。由此建立了一套独脚金内酯类化合物定性分析鉴别方法。

### 3 红花根系分泌物对两种杂草种子萌发及幼苗生长的化感效应

独脚金内酯类化合物能够刺激寄生植物种子萌发,但是这类化合物对非寄生杂草影响的研究还不够深入。在上一章的研究中揭示了红花根系分泌物中富含独脚金内酯类化合物,本章选择红花根系分泌物作为实验样品,以两种常见的农田杂草马齿苋(*Portulaca oleracea* L.)和狗尾巴草(*Setaria viridis* (L.) Beauv.)为供试对象,研究红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草两种伴生杂草的化感效应,为独脚金内酯类化合物在非寄生杂草中的影响及研究提供理论依据。

#### 3.1 材料制备与数据处理方法

##### 3.1.1 材料和试剂

红花、马齿苋和狗尾草种子均从种子公司购买。本实验用到的试剂如下表 3.1:

表 3.1 实验药品与试剂

Table 3.1 The main drugs and reagents used in this research

试剂	分子式	级别	生产厂家
硝酸钾	KNO <sub>3</sub>	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
尿素	H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	A.R.	宁波市化学试剂有限公司
二水合磷酸二氢钠	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
硫酸钾	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
无水氯化钙	CaCl <sub>2</sub>	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
无水硫酸镁	MgSO <sub>4</sub>	A.R.	天津市大茂化学试剂厂
4-吗啉乙磺酸	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub> S	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
70%乙醇	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
1%次氯酸钠	NaClO	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
乙酸乙酯	CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	A.R.	国药集团化学试剂有限公司

##### 3.1.2 实验仪器

本实验用到的仪器如下表 3.2:

表 3.2 实验仪器

Table 3.2 The main equipment used in this research

仪器名称	型号/规格	生产厂家
生化培养箱	NB-LRH-70	上海一恒科学仪器有限公司
分析天平	FA2004 型	上海良平仪器仪表有限公司
旋转蒸发器	OSB-2100 型	上海爱郎仪器有限公司
超声波清洗器	KQ-300 型	昆山市超生仪器有限公司
高速台式冷冻离心机	TGL-16	杭州瑞析科技有限公司
培养皿	LBPD035S	上海泰坦科技股份有限公司

### 3.1.3 红花根系分泌物的粗收集

将红花按照第二章 2.1.3~2.1.5 所述方法培养后，再收集其根系分泌物。将上述培养的 TT 培养液收集合并、过滤得到含有分泌物的溶液。用乙酸乙酯对培养液进行萃取（等体积萃取三次），合并乙酸乙酯萃取液，减压浓缩得到分泌物粗浸膏，将其放入 4℃冰箱中保存备用。

### 3.1.4 马齿苋和狗尾草萌发试验

试验种子采用红花种子同样的方法灭菌，利用培养皿滤纸法<sup>[89]</sup>，并按照国家标准《农作物种子检验规程》的方法进行。将浓缩的红花根系分泌物用丙酮溶解，配置 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.5 mg/mL、5.0 mg/mL 五个浓度梯度。将灭菌处理的马齿苋种子 30 粒和狗尾草种子 30 粒放入铺有 7 cm 滤纸的培养皿中。分别向马齿苋和狗尾草培养皿中加入 1 mL 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 g/mL 5 种不同浓度的红花根系分泌物。对照组加等量蒸馏水。每个浓度设置 3 组平行，置于 25℃黑暗培养箱中。7 d 后统计种子萌发和芽生长情况，计算种子萌发率（%），测定幼苗芽长和根长。

### 3.1.5 数据处理方法

发芽率（GR）= 萌发种子数/种子总数×100%；如果  $T > C$ ，则  $RI = 1 - (C/T)$ ；如果  $T < C$ ，则  $RI = (T/C) - 1$ ，其中  $C$  为红花根分泌物浓度为 0 时的对照值， $T$  为红花根分泌物浓度为 0.1~5.0 mg/mL 时的处理值， $RI$  为化感反应指数。 $RI > 0$  为促进作用， $RI < 0$  为抑制作用，其绝对值反映化感作用的强弱。

实验数据采用 spss 25.0 软件进行单因素方差分析和 LSD 分析。在 Microsoft Excel 中绘制相关数据，在 Microsoft word 中进行比较。数据用平均值±标准误表示。\*（显著）： $P < 0.05$ ，\*\*（极显著）： $P < 0.01$ 。

## 3.2 结果与讨论

### 3.2.1 红花根系分泌物对马齿苋种子萌发的影响

从表 3.3 和图 3.1 中可以看出,当红花根分泌物浓度为 0.1 mg/mL 时,RI 值为正值,相对促进率为 1.31%,极显著促进马齿苋种子的发芽。当红花根分泌物浓度为 0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 时,RI 值均为负值,相对抑制率分别为 3.81%和 2.12%,马齿苋种子的萌发和对照组相比存在差异但不显著。当红花根分泌物浓度为 2.5 mg/mL 和 5 mg/mL 时,RI 值为负值,相对抑制率分别为 8.96%和 12.81%,极显著抑制马齿苋种子的发芽。结果表明,红花根系分泌物对马齿苋种子的萌发有极显著影响,低浓度可以促进马齿苋种子萌发,高浓度抑制马齿苋种子的萌发。

表 3.3 根分泌物对马齿苋发芽率的影响

Table 3.3 Effect of the root exudates on germination percentage of *Portulaca oleracea* L.

根分泌物浓度/ (mg/mL)	发芽率	化感反应指数
0	86.67%±6.65%	0.00%
0.1	87.80%±8.40%	1.31%
0.5	84.37%±5.77%	-3.81%
1.0	82.23%±3.87%	-2.12%
2.5	78.90%±10.70%	-8.96%
5.0	75.57%±1.96%	-12.81%

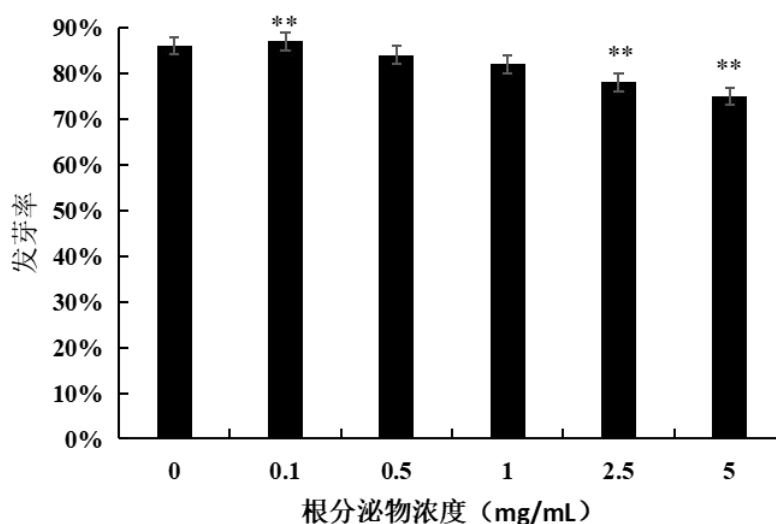


图 3.1 根分泌物浓度对马齿苋发芽率的影响

Figure 3.1 Effect of the root exudates on germination percentage of *Portulaca oleracea* L.

注 a: \*-显著,  $P < 0.05$

注 b: \*\*-极显著,  $P < 0.01$



### 3.2.2 红花根系分泌物对马齿苋芽苗长度的影响

从表 3.4 和图 3.2 中可以看出,当红花根系分泌物浓度为 0.1 mg/mL 时,RI 值为正值,相对促进率为 14.93%,对马齿苋芽苗长度有极显著促进作用。当红花根系分泌物浓度为 0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 时,相对抑制率分别为 4.43%和 10.35%,马齿苋芽苗长度和对照相比存在差异但不显著。当红花根系分泌物浓度为 2.5 mg/mL 和 5 mg/mL 时,RI 值为负值,相对抑制率分别为 35.19%和 55.62%,对马齿苋芽苗长度有极显著抑制作用。结果表明,红花根系分泌物对马齿苋芽苗长度有极显著影响,低浓度可以促进马齿苋芽苗生长,高浓度抑制马齿苋芽苗生长。

表 3.4 根分泌物对马齿苋芽苗长度的影响

Table 3.4 Effect of the root exudates on seeding lenth of *Portulaca oleracea* L.

根分泌物浓度/ (mg/mL)	芽苗长度 (mm)	化感反应指数
0	23.79±5.35	0.00%
0.1	27.97±5.36	14.93%
0.5	24.89±4.43	4.43%
1.0	24.62±4.23	10.35%
2.5	15.42±3.63	-35.19%
5.0	10.56±3.24	-55.62%

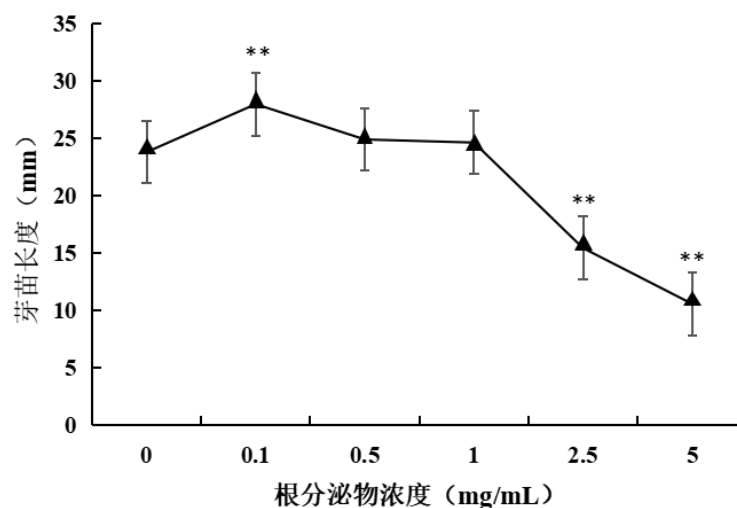


图 3.2 根分泌物对马齿苋芽苗长度的影响

Figure 3.2 Effect of the root exudates on seeding length of *Portulaca oleracea* L.

a: \*-显著,  $P < 0.05$

b: \*\*-极显著,  $P < 0.01$

### 3.2.3 红花根系分泌物对马齿苋根长度的影响

从表 3.5 和图 3.3 中可以看出, 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.5 mg/mL 和 5.0 mg/mL 红花根系分泌物浓度下的化感反应指数分别为-0.74%、4.76%、-5.30%、6.33%和-0.09%, 马齿苋根长度和对照相比存在差异但不显著。结果表明, 红花根系分泌物对马齿苋根的生长无显著影响。

表 3.5 根分泌物对马齿苋根长度的影响

Table 3.5 Effect of the root exudates on root length of *Portulaca oleracea* L.

根分泌物浓度/ (mg/mL)	根长度 (mm)	化感反应指数
0	54.04±8.44	0.00%
0.1	53.65±8.5	-0.74%
0.5	56.74±8.06	4.76%
1.0	51.32±9.33	-5.30%
2.5	57.46±9.78	6.33%
5.0	53.99±9.89	-0.09%

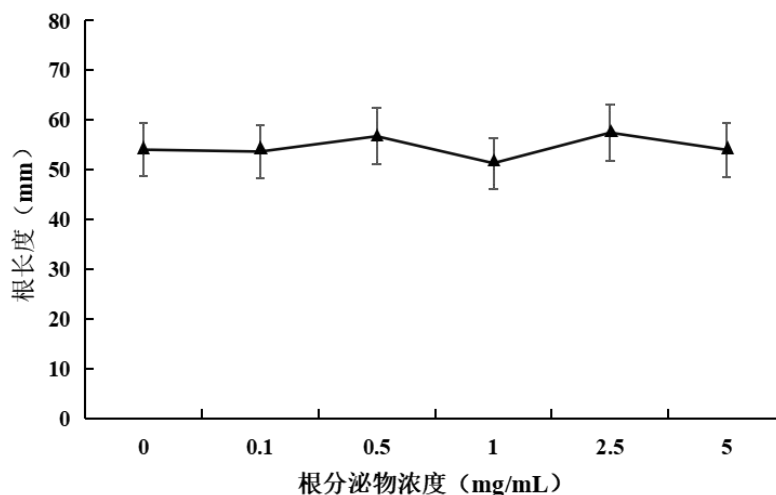


图 3.3 根分泌物对马齿苋根长度的影响

Figure 3.3 Effect of the root exudates on root length of *Portulaca oleracea* L.

### 3.2.4 红花根系分泌物对狗尾草种子萌发的影响

从表 3.6 和图 3.4 中可以看出, 当红花根系分泌物浓度为 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 时, RI 值为正值, 相对促进率分别为 1.89%、5.85%和 6.42%, 狗尾草种子萌发和对照相比存在差异但不显著。当红花根系分泌物浓度为 2.5 mg/mL 和 5 mg/mL 时, RI 值为负值, 相对抑制率分别为 28.49%和 39.62%, 对狗尾草种子萌发有极显著抑制作用。结果表明, 红花根系分泌物对狗尾草种子萌发有极显著影响, 高浓

度可以抑制狗尾草种子的萌发。

表 3.6 根分泌物对狗尾草发芽率的影响

Table 3.6 Effect of the root exudates on germination percentage of *Setaria viridis* (L.) Beauv.

根分泌物浓度/ (mg/mL)	发芽率	化感反应指数
0	35.33%±3.79%	0.00%
0.1	34.67%±4.16%	1.89%
0.5	35.67%±4.73%	5.85%
1.0	34.00%±3.00%	6.42%
2.5	24.33%±6.11%	-28.49%
5.0	21.33%±3.06%	-39.62%

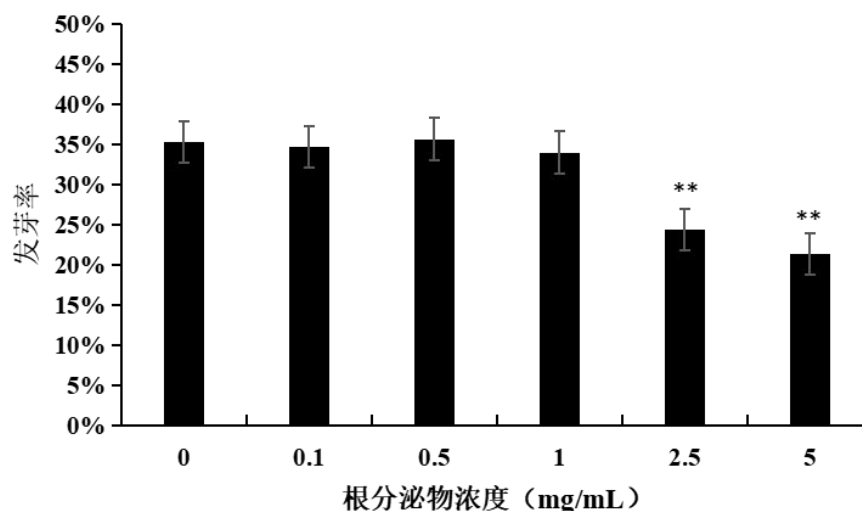


图 3.4 根分泌物对狗尾草发芽率的影响

Figure 3.4 Effect of the root exudates on germination percentage of *Setaria viridis* (L.) Beauv.

a: \*-显著,  $P < 0.05$

b: \*\*-极显著,  $P < 0.01$

### 3.2.5 红花根系分泌物对狗尾草芽苗长度的影响

从表 3.7 和图 3.5 中可以看出, 当红花根系分泌物浓度为 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 时, RI 值为正值, 相对促进率分别为 16.34%、29.87%和 18.04%, 狗尾草芽苗长度和对照相比存在差异但不显著。当红花根系分泌物浓度为 2.5 mg/mL 和 5 mg/mL 时, RI 值为负值, 相对抑制率分别为 8.41%和 6.55%, 对狗尾草芽苗长度有极显著抑制作用。结果表明, 红花根系分泌物对狗尾草芽苗的生长有极显著影响, 高浓度可以抑制狗尾草芽苗的生长。

表 3.7 根系分泌物对狗尾草芽苗长度的影响

Table 3.7 Effect of the root exudates on seeding growth of *Setaria viridis* (L.) Beauv.

根分泌物浓度/ (mg/mL)	芽苗长度/ (mm)	化感反应指数
0	28.46±4.93	0.00%
0.1	27.46±6.38	16.34%
0.5	28.17±6.39	29.87%
1.0	28.96±5.33	18.04%
2.5	22.34±6.06	-8.41%
5.0	13.89±6.46	-6.55%

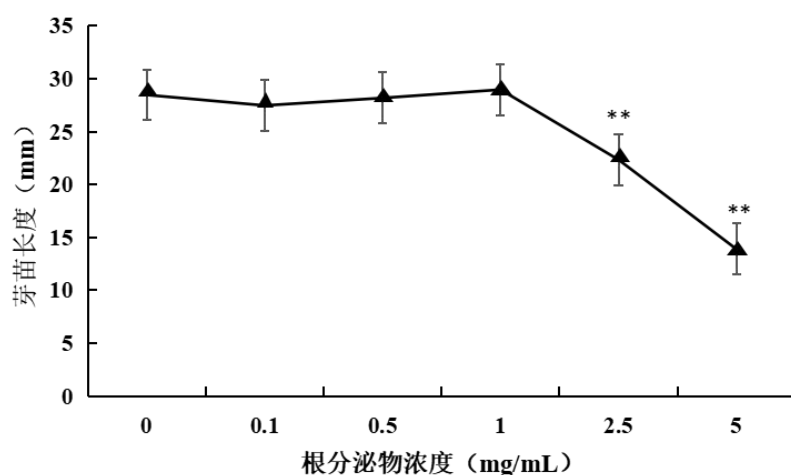


图 3.5 根系分泌物对狗尾草芽苗长度的影响

Figure 3.5 Effect of the root exudates on root seeding growth of *Setaria viridis* (L.) Beauv.

a: \*-显著,  $P < 0.05$

b: \*\*-极显著,  $P < 0.01$

### 3.2.6 红花根系分泌物对狗尾草根长度的影响

从表 3.8 和图 3.6 中可以看出, 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.5 mg/mL 和 5.0 mg/mL 红花根系分泌物浓度下的化感反应指数分别为-0.56%、2.76%、-4.30%、5.33%和-1.09%, 狗尾草根长度与对照相比存在差异但不显著。结果表明, 红花根系分泌物对狗尾草根的生长无显著影响。

表 3.8 根分泌物对狗尾草根长度的影响

Table 3.8 Effect of the root exudates on root length of *Setaria viridis* (L.)

根分泌物浓度/ (mg/mL)	根长度 (mm)	化感反应指数
0	58.04±8.44	0.00%
0.1	57.65±8.50	-0.56%
0.5	58.74±8.06	2.76%
1.0	56.32±9.33	-4.30%
2.5	59.46±9.78	5.33%
5.0	57.99±9.89	-1.09%

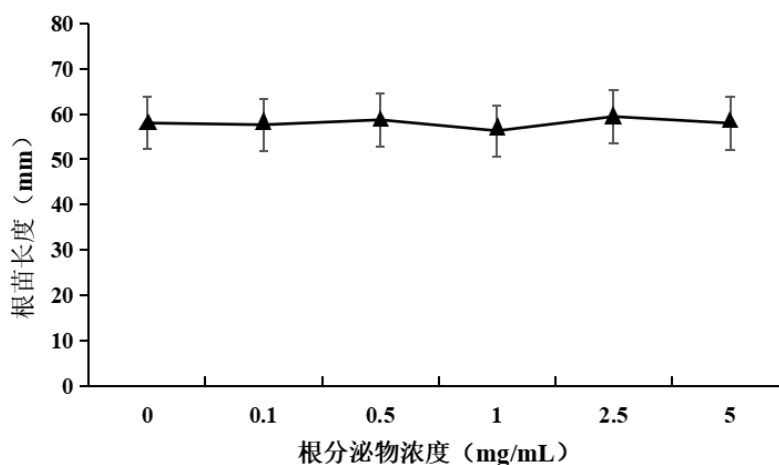


图 3.6 根系分泌物对狗尾草根长度的影响

Figure 3.6 Effect of the root exudates on root seedling growth of *Setaria viridis* (L.) Beauv.

a: \*-显著,  $P < 0.05$

b: \*\*-极显著,  $P < 0.01$

### 3.2.7 红花根系分泌物对 2 种伴生杂草生长的综合化感效应指数

基于 2 种伴生杂草的发芽率、芽苗长度和根长度 3 个指标的 RI 值, 综合评价红花根系分泌物对 2 种杂草化感作用的类型及强弱。结果显示 (表 3.9), 不同浓度的红花根系分泌物对 2 种杂草的化感作用类型及强弱表现相同。当红花根系分泌物浓度为 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL 时, 相对促进率分别为 5.17%、1.79%、2.36%, 可以促进马齿苋种子萌发及幼苗生长, 当红花根系分泌物浓度为 2.5 mg/mL、5.0 mg/mL 时, 相对抑制率分别为 12.61%、22.84%, 可以抑制马齿苋种子萌发及幼苗生长; 当红花根系分泌物浓度为 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL 时, 相对促进率分别为 5.83%、13.49%、6.39%, 可以促进狗尾草种子萌发及幼苗生长, 当红花根系分泌物浓度为 2.5 mg/mL、5.0 mg/mL 时, 相对抑制率分别为 10.19%、15.42%, 可以抑

制狗尾草种子萌发及幼苗生长,说明低浓度的红花根系分泌物促进马齿苋和狗尾草种子萌发及幼苗生长,高浓度的红花根系分泌物抑制马齿苋和狗尾草种子萌发及幼苗生长,并且随着红花根系分泌物浓度增加至 5.0 mg/mL 时,狗尾草和马齿苋种子萌发和幼苗生长受到的化感抑制作用最强。

表 3.9 红花根系分泌物对两种伴生杂草生长的综合化感效应指数

Figure 3.9 Comprehensive allelic effect index of root exudates of safflower on the growth of two weeds

根分泌物浓度/ (mg/mL)	马齿苋	狗尾草
0	0.00%	0.00%
0.1	5.17%	5.83%
0.5	1.79%	13.49%
1.0	2.36%	6.39%
2.5	-12.61%	-10.19%
5.0	-22.84%	-15.42%

马齿苋是一年生双子叶草本,狗尾草是一年生单子叶草本,这两种杂草均具有生命力旺盛、繁殖能力强的特征,是世界范围内常见的杂草种类<sup>[90]</sup>。本研究结果显示,高浓度的红花根系分泌物能够对狗尾草和马齿苋的种子萌发和幼苗生长产生显著的抑制活性。这些结果表明,红花根部可通过释放化感物质,对狗尾草和马齿苋产生化感作用,化感物质能够抑制杂草的生长发育,是绿色植物源除草剂开发的理想先导化合物<sup>[91]</sup>。因此红花根系分泌物理论上可作为一种新型植物除草剂开发利用,然而在自然界中植物根系分泌物含量极低,在土壤中也极其不稳定,很难从土壤中收集一定量用于研究,乃至富集用于工业化生产。在人工条件下植物根系分泌物也无法进行大规模的化学合成,这类化感物质的开发和利用将受到很大的限制,因此,资源的成本效益和可持续利用的资源需要进一步探索。此外,这类化感物质是否可以成为绿色植物的除草剂,需要在结构修饰、作用机制、生态毒理、化合物类型等方面开展进一步的研究。

### 3.3 本章小结

为了研究红花根系分泌物对农田生态系统中伴生杂草的影响,本实验通过将收集到的红花根系分泌物稀释成 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、2.5 mg/mL、5.0 mg/mL 5 个浓度梯度,利用培养皿滤纸法研究不同浓度的红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子的萌发以及幼苗生长的影响。研究结果显示,0.1~1.0 mg/mL 浓度下的红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发及幼苗生长有促进作用,2.5~5.0 mg/mL 浓度下的红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发和幼苗生长有抑制作用,而 0.1~5.0 mg/mL 浓度下的红花根系分泌物浓度对马齿苋和狗尾草

根的生长无显著影响。以上结果表明低浓度的红花根系分泌物对杂草马齿苋和狗尾草生长具有显著的促进作用，高浓度的红花根系分泌物对杂草马齿苋和狗尾草生长具有显著的抑制作用。因此可以评估农田生态系统中红花根系分泌物对伴生杂草的防控能力，为今后红花根系分泌物应用于杂草防控和新型除草剂的开发及应用提供一定的理论依据。

## 4 UPLC-Q-TOF-MS 对不同产地铁皮石斛代谢组学的比较

UPLC-Q-TOF-MS 是代谢组学研究的主要工具, 由于具有高分辨率和灵敏度, 已广泛应用于复杂样品的分析, 可以同时分析样品中上百种代谢物, 较传统方法获得更丰富、更清晰的信息。因此本实验通过选定广西桂平、云南文山、浙江乐清的铁皮石斛作为研究课题的样品, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对其进行化学成分分析, 结合软件 SIMCA-Pt 13.0, 通过主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 等多元变量分析方法研究三个不同产地的铁皮石斛代谢产物差异, 应用于铁皮石斛的代谢指纹图谱分析, 以期能较好地地区分不同地区的铁皮石斛, 从而有助于铁皮石斛的产地溯源。

### 4.1 材料制备与测试方法

#### 4.1.1 样品和试剂

共采集 32 个铁皮石斛, 其中广西桂平 10 份, 云南文山 10 份, 浙江乐清市 12 份。HPLC 级高纯度试剂购自 Sigma-Aldrich (中国)。分析高级溶剂和化学试剂购自上海化工有限公司。

实验药品与试剂如表 4.1 所示。

表 4.1 实验药品与试剂

Table 4.1 The main drugs and reagents used in this research

试剂	分子式	级别	生产厂家
70%乙醇	CH <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> OH	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
1%次氯酸钠	NaClO	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
乙酸乙酯	CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
80%甲醇	CH <sub>3</sub> OH	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
甲酸	HCOOH	A.R.	国药集团化学试剂有限公司
乙腈	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N	A.R.	天津市大茂化学试剂厂

#### 4.1.2 样品制备

用 80% 甲醇 (1.5 mL) 提取磨碎筛选后的植物材料 0.1 g, 室温下通过超声提取 30 min。超声波协助提取后, 混合物 5000 rpm 离心 10 min。用微孔滤膜过滤上清液, 滤液用于色谱分析。



### 4.1.3 UPLC 分析

色谱柱: AcquityUPLC HSS T3 (2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm), 流动相: 0.1%甲酸水溶液(溶剂 A)~乙腈(溶剂 B), 梯度洗脱(0~2 min, 2%A; 2~11 min, 5%B~95%; 11~15 min, 5%~95%B; 15~17 min, 100%B; 17~19 min, 0%A), 柱温: 40℃; 流速: 0.4 mL · min<sup>-1</sup>; 进样量: 1.0 mL (全循环注入)。

### 4.1.4 质量状况

质谱数据使用 Waters ACQUITY UPLC®SYNAPT™高清晰度质谱仪系统(Waters, Milford, USA)记录, 该系统配备电喷雾离子源和采用 MSE 模型的混合四极飞行时间(Q-TOF)质谱仪。Q-TOF 仪器在 V 模式下进行 MS 实验, TOF 的数据在  $m/z$  50-1200 之间采集。优化条件下反溶剂气体在 600 L/h, 在正模式中温度为 250℃。在负模式中温度为 350℃, 锥气体在 50 L/h 和源温度 100℃, 毛细管正压 3.0 kV 和毛细管负压 1.7 kV, 利用亮氨酸-脑啡肽作为锁定质量数(正极模式质荷比为  $m/z$  556.2771; 负极模式质荷比为  $m/z$  554.2615)。质谱数据采集采用全自动扫描模式, 0-19 min, 正离子模式和负离子模式, 各离子模式产生低、高碰撞能量数据通道。将低 CE 扫描功能设置为 6 V, 收集完整前体离子的信息, 将第二次扫描功能从 20 V 提升到 55 V, 从前一次扫描的离子中获取片段离子数据。使用 MassLynx 4.1 软件计算出前驱体和片段离子的准确质量和组成。

### 4.1.5 化学成分分析

收集 QC 样品的阴离子和阳离子数据, 导入 Waters UNIFI 1.8.2.169 定性分析软件, 结合相关文献, 利用 Scifinder 建立的铁皮石斛化合物数据库进行筛选。

数据筛选参数: 保留时间: 0.5-14.0 min, 扫描范围: 100-1500, 匹配误差: 100 mDa。该属化合物已在数据库中搜索。根据质量偏差小于  $5 \times 10^{-6}$  的原理, 确定了各色谱峰对应化合物的分子式, 然后在建立的铁皮石斛化学成分数据库中进一步搜索匹配的化合物。

### 4.1.6 实验数据处理

由 UPLC-Q-TOF-MS 得到的数据通常包括保留时间、 $m/z$  和离子强度, 导出并在 SIMCA-Pt13.0 (Umetrics AB, 马尔莫, 瑞典) 中进行样本分类和多元分析。主成分分析(PCA)用于调查数据集内的分组、趋势和聚类, 它是一种用于探索性数据分析、降维、图形聚类和分类的多变量数据分析方法。在化学计量学中, 主成分分析的主要用途是使用图形来可视化潜在的数据结构, 对数据的解释打开了更深层次的理解, 而不是只看单个变量。在主成分分析之后, 采用正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)

监督分析方法对不同来源的样品进行分类，寻找潜在的不同化学成分。再使用 Prism 6.0 (GraphPad Software, USA) 软件进行单因素方差分析。

## 4.2 结果与讨论

### 4.2.1 化合物的鉴定

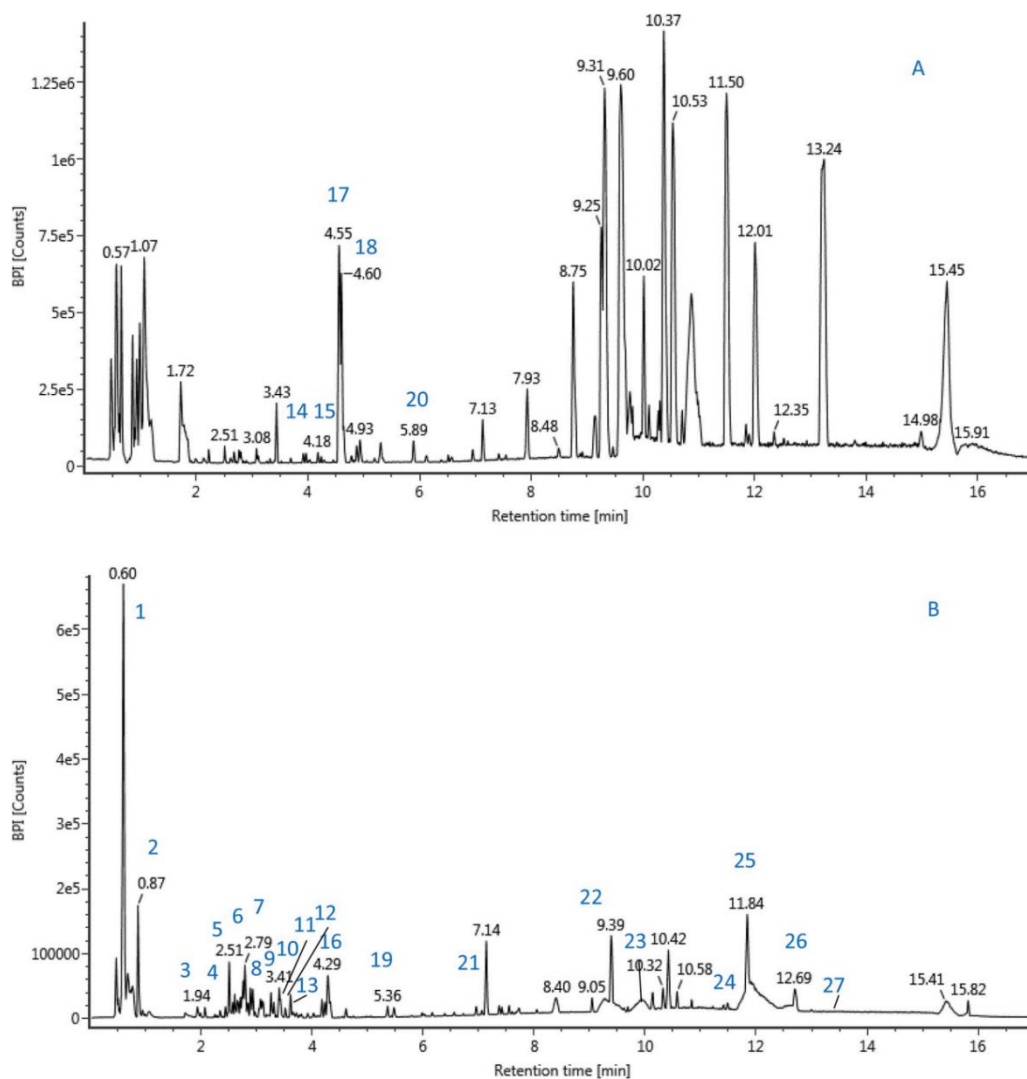


图 4.1 铁皮石斛阳性 (A) 和阴性 (B) BPI 色谱图

Figure 4.1 Positive (A) and negative (B) BPI chromatography of *Dendrobium officinale*

如图 4.1 表示的是铁皮石斛阳性和阴性 BPI 色谱图, 其中 A 图是阳性 BPI 色谱图, B 图是阴性 BPI 色谱图, 对铁皮石斛中的化合物进行了高和低碰撞能 (CE) 的正离子和负离子极性模式的电离实验。结果表明, 阴性检测比阳性检测更灵敏。具有代表性的低 CE 模式下的 BPI 色谱图显示了铁皮石斛中化学成分的整体图谱, 大多数化合物都被完整地检测到, 包括一些次要的化合物。在流动相中加入甲酸, 不仅可以作为

色谱修饰剂,还可以生成加成离子 $[M-H+HCOOH]^-$ ,有利于分子离子 $[M-H]^-$ 的确认<sup>[92]</sup>。

如表 4.2 所示,在铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 所有峰中共鉴定出 27 种化合物。从表中可以看出这二十七种化合物的分子式、准分子离子峰以及碎片离子峰。这 27 种化合物代表了铁皮石斛的主要成分,其中大部分也被报道为铁皮石斛的主要生物活性成分<sup>[93]</sup>。

表 4.2 UPLC-Q-TOF-MS 分析的 27 个化合物的色谱和质谱数据

Table 4.2 Chromatography and mass spectral data of the 27 compounds analyzed by UPLC-Q-TOF-MS

顶峰	保留时间/ min	化合物	准分子离子峰	分子式	碎片离子峰
1	0.61	Amotin	341.1317 $[M+HCOO]^-$	$C_{15}H_{20}O_6$	267, 237, 215, 195, 179, 165
2	0.87	Scopoletin	191.0312 $[M-H]^-$	$C_{10}H_8O_4$	173
3	1.72	Cyani-3-(6-malonylglucoside)-7,3'-bis[6-(4-glucosyl-phydroxybenzoyl)glucoside]	1482.4156 $[M+CH_3COO]^-$	$C_{62}H_{71}O_{38}$	1355, 1217, 989, 886, 844, 707, 546
4	2.25	Dendronobiloside A	563.2132 $[M-H]^-$	$C_{27}H_{48}O_{12}$	401, 239
5	2.51	(+)-Lirioresinol B	417.1454 $[M-H]^-$ , $[M+HCOO]^-$	$C_{22}H_{26}O_8$	375
6	2.57	(+)-Medioresinol	389.1610 $[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}O_7$	232, 209, 205, 181, 163, 161
7	2.76	Dendromonilside E	621.2145 $[M+Na]^+$ , $[M+NH_4]^+$	$C_{28}H_{38}O_{14}$	313, 283, 209, 167
8	3.13	Acanthoside B	579.2073 $[M-H]^-$ , $[M+Cl]^-$ , $[M+HCOO]^-$	$C_{28}H_{36}O_{13}$	521, 491, 433, 417, 402, 385, 387, 361
9	3.31	Dendronobiloside B	603.204 $[M+Na]^+$ , $[M+NH_4]^+$ 463.2576 $[M+HCOO]^-$ $[M+Na]^+$	$C_{21}H_{38}O_8$	505, 463, 401, 265, 235, 193, 191, 181 354, 301, 224, 179, 165, 164
10	3.41	(+)-Medioresinol	433.1549 $[M+HCOO]^-$	$C_{21}H_{24}O_7$	373, 358
11	3.43	Dendroside A	461.2421 $[M+HCOO]^-$	$C_{21}H_{36}O_8$	343, 205 137, 121

UPLC-Q-TOF-MS 对不同产地铁皮石斛代谢组学的比较

			[M+Na] <sup>+</sup>		
12	3.61	Dendronobiloside A	609.3101	C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O <sub>12</sub>	493, 447,
			[M+HCOO] <sup>-</sup>		329, 315
13	3.69	Dendronobilin M	323.1467 [M+Na] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>	177, 149
14	3.92	Dendromonilside A	415.2318 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>	245, 165
15	4.18	Naringenin	273.0774 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	153, 147,
					119
16	4.23	N-Isopentenyl dendrobine	331.2572 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> NO	242
				2	
17	4.55	Gigantol	275.1287 [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	151, 137,
					122, 119
18	4.60	Dendroside F	469.1851 [M+K] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	191, 177,
					167, 161,
					153, 150
19	5.36	Dendronobiloside B	417.2541 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	293, 291,
					255
20	5.89	Dendrocandin B	505.1831 [M+Na] <sup>+</sup> , [M+H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	437, 295,
					121
21	6.96	Nobilin E	543.2033 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>32</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	422, 407,
					392
22	9.27	Moscatin	239.0701 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	223
23	9.54	Vanilloside	313.2755 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	241, 151
24	11.49	Dihydroxy-dimethoxydibenzyl	273.3045 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	255, 243,
					195
25	11.84	Monohydroxy-trimethoxydibenzyl	287.3309 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	269, 257,
					201
26	12.70	Dihydroresveratrol	229.2510 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	211, 153
27	13.39	p-Hydroxy-cinnamic acid	163.1503 [M-H] <sup>-</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	145, 119

#### 4.2.2 铁皮石斛的种内差异性分析

由 UPLC-Q-TOF-MS 得到铁皮石斛的数据, 导出并在 SIMCA-Pt13.0 中进行样本分类和多元分析, 如主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)、单因素方差分析。用主成分分析测定来源相同的铁皮石斛的 4.2.1 中检测到的具有生物活性的化学成分的种内差异性, 以及来源不同的化学成分的种内差异性, 结果如图 4.2, 从图 4.2A 可以看出, 同一产地的铁皮石斛聚集在一起, 不同来源的铁皮石斛样品是完全分离的, 说明同一产地样品间的差异性较小, 而不同产地样品间的种内差异性较大。从图 4.2B 可以看出, 广西桂平铁皮石斛聚集在一起, 而浙江乐清的铁皮石斛完全分离, 说明广西桂平铁皮石斛的种内差异性比浙江乐清要小。广西桂平和浙江乐清样品沿 PC<sub>1</sub> 轴分离较好, R<sup>2</sup>X、R<sup>2</sup>Y 和 Q<sup>2</sup> 分别达到 0.532、0.993 和 0.984(图 4.2B)。

从图 4.2C 可以看出, 广西桂平和浙江乐清的铁皮石斛的 OPLS-DA 分析交叉验证模型具有良好的预测效果和交叉验证, 而  $n=200$ ,  $R^2=0.182$ ,  $Q^2=-0.385$ , 表明模型没有过度拟合。利用协方差和相关负荷构造的 S-Plot 图来查找不同的化学成分, 并且其表明广西和云南铁皮石斛的化学成分是不同的。图 4.2D 筛选标准为①协方差  $P>0.4$ ; ②相关系数  $P>0.8$ ; ③Mann-Whitney 非参数检验  $P<0.001$ , 他可以作为鉴别不同产地铁皮石斛的依据<sup>[94]</sup>。

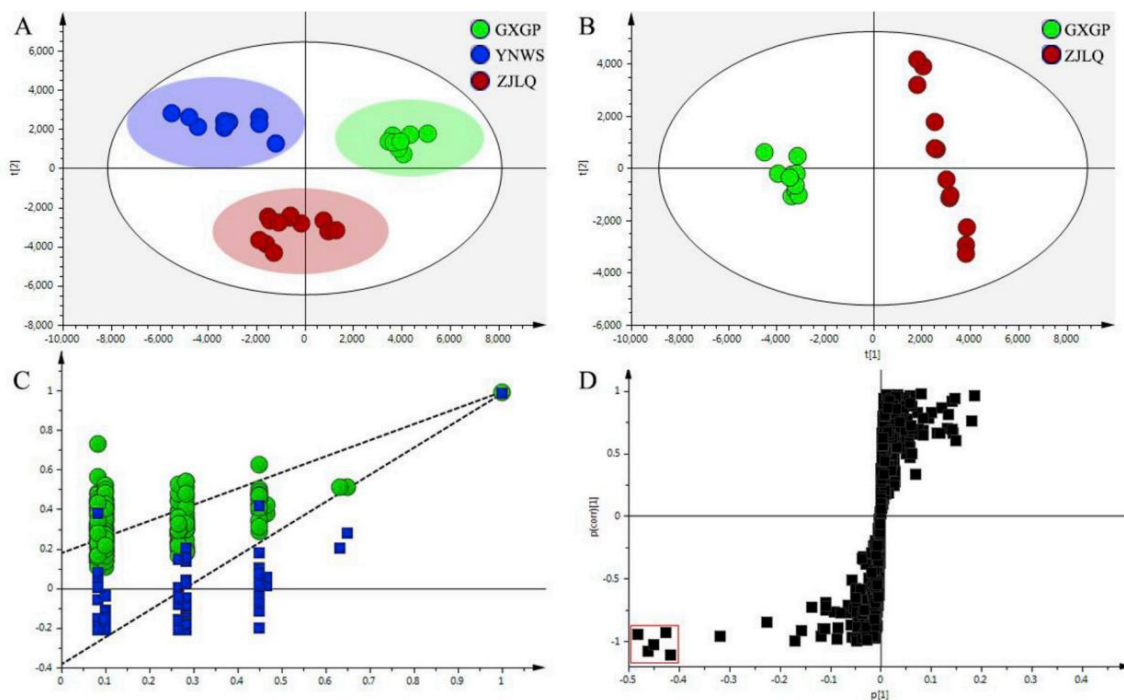


图 4.2 铁皮石斛来源的差异分析

Figure 4.2 Analysis of the differences in the origin of *Dendrobium officinale*

A-得分图; B-得分图; C-置换检验图; D-S-plot

GXGP-广西桂平; YNWS-云南文山; ZJLQ-浙江乐清

### 4.2.3 铁皮石斛的不同化学成分的鉴定

收集铁皮石斛 QC 样品的阴离子和阳离子数据, 导入 Waters UNIFI 1.8.2.169 定性分析软件, 结合相关文献, 利用 Scifinder 建立的铁皮石斛化合物数据库进行筛选。准确的相对分子质量由初级质谱测定, 并通过二次质谱分析获得分裂信息, 结合 ChemSpider 和 HMDB 数据库及文献, 初步得出广西桂平和浙江乐清的不同化学成分为二羟基二甲氧基二苄基 ( $m/z$  273.3045  $[M-H]^-$ )、单羟基三甲氧基二苄基 ( $m/z$  287.3309  $[M-H]^-$ )、Dendronobiloside A ( $m/z$  563.6592  $[M-H]^-$ ) 和 Vanillide ( $m/z$  313.2755  $[M-H]^-$ )。同样, 云南文山和浙江乐清样品的不同化学成分也被筛选鉴定为二羟基二

甲氧基二苄基 ( $m/z$  273.3045  $[M-H]^-$ ), 单羟基三甲氧基二苄基 ( $m/z$  287.3309  $[M-H]^-$ ), 二氢白藜芦醇 ( $m/z$  229.2510  $[M-H]^-$ ) 和对羟基肉桂酸 ( $m/z$  163.1503  $[M-H]^-$ ), 其中二羟基二甲氧基二苄基和单羟基三甲氧基二苄基是铁皮石斛中常见的化学成分。

### 4.3 本章小结

为了更加准确、高效的区分不同产地的铁皮石斛, 本实验建立了一种基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的代谢组学分析方法。即通过采集广西桂平、云南文山、浙江乐清三个不同产地的铁皮石斛的样品, 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对其进行化学成分分析, 结合软件 SIMCA-Pt 13.0, 通过主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 等多元变量分析方法研究三个不同产地的铁皮石斛代谢产物差异, 依据相对分子质量, 二级碎片, 利用 ChemSpider 和 HMDB 数据库及文献对比对差异代谢物进行鉴定。结果表明, 在铁皮石斛中分离鉴定出 27 种主要化合物, 是铁皮石斛的主要生物活性成分; PCA 分析结果表明同一产地的铁皮石斛聚集在一起, 不同来源的铁皮石斛样品是完全分离的, 说明同一产地样品间的种内差异性较小, 而不同产地样品间的种内差异性较大; 通过 OPLS-DA 分析发现广西桂平和浙江乐清有 4 种差异代谢物, 分别为二羟基二甲氧基二苄基、单羟基三甲氧基二苄基、Dendronobiloside A 和 Vanillide。云南文山和浙江乐清有 4 种差异代谢物, 即二羟基二甲氧基二苄基、单羟基三甲氧基二苄基、二氢白藜芦醇和对羟基肉桂酸, 主要为类黄酮和萜类化合物。该研究方法能较好地地区分不同地区的铁皮石斛, 从而有助于铁皮石斛的产地溯源。

## 5 结论与展望

### 5.1 全文总结

LC-MS 技术以其高效快速的分离能力、超高的灵敏度在很多领域得到广泛的应用。随着科技软件的发展,检测技术在液相色谱及液质联用技术的支持下开始了广泛应用,准确度也逐渐变高,检测技术也在随之发生着不断的改进与发展。此外,随着现代化高新技术的不断发展,UPLC-Q-TOF-MS 将 UPLC 和 Q-TOF-MS 结合起来,既体现了 UPLC 的高分离性能,又体现了质谱强大的鉴别能力,在分析检测方面有着独一无二的优势,对多数物质的检测灵敏度高于其他方法,因此 UPLC-Q-TOF-MS 技术为天然产物研究提供了一个高效、切实可行的分析途径。本文首先利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对红花根系分泌物中独脚金内酯类化合物化学成分进行定性分析,研究发现红花根系分泌物中富含独脚金内酯,然后分析红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发及幼苗生长的影响,最后利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术研究不同产地铁皮石斛的代谢组学。实验结论如下:

1、在红花根系分泌物中分离鉴定出 5 种独脚金内酯类化合物,分别为列当醇、7-氧代列当醇乙酸酯、列当醇乙酸酯、5-脱氧独脚金醇、*Fabacyl acetate*。该研究方法定性分析了红花根系分泌物中独脚金内酯类化合物的种类,建立了测定红花根系分泌物中的独脚金内酯类物质的液质联用分析方法。

2、测定红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发及幼苗生长的影响,0.1~1.0 mg/mL 浓度下的红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发和幼苗生长有促进作用,2.5~5.0 mg/mL 浓度下的红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发和幼苗生长有抑制作用。研究证实红花根系分泌物能够分泌化感物质,产生化感作用,低浓度的红花根系分泌物对杂草马齿苋和狗尾草生长具有显著的促进作用,高浓度的红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草生长具有显著的抑制作用,并且随着分泌物浓度的提高,抑制作用越显著,说明红花的化感物质能通过活体根系分泌进入生态系统中,对玉米、水稻等农田中伴生杂草马齿苋和狗尾草产生抑制作用。因此可以掌握农田生态系统中红花根系分泌物与伴生杂草之间的化感作用关系、规律及特点,评估红花根系分泌物对伴生杂草的防控能力,为今后这种化感物质应用于杂草防控和新型除草剂的开发及应用提供一定的理论依据。

3、对不同产地铁皮石斛的代谢组学分析表明,在铁皮石斛中分离鉴定出 27 个主要化合物,PCA 分析结果表明同一产地的铁皮石斛聚集在一起,不同来源的铁皮石斛样品是完全分离的,说明同一产地样品间的种内差异性较小,而不同产地样品间的种内差异性较大。通过 OPLS-DA 分析发现广西桂平和浙江乐清有 4 种差异代谢物,分别为二羟基二甲氧基二苄基、单羟基三甲氧基二苄基、*Dendronobiloside A* 和

Vanillide。云南文山和浙江乐清有 4 种差异代谢物，分别为二羟基二甲氧基二苄基、单羟基三甲氧基二苄基、二氢白藜芦醇和对羟基肉桂酸，其中前两个是常见的化学成分。来自浙江的铁皮石斛的价格远高于国内其他产区的铁皮石斛，这可能是由于气候、环境或地理位置等因素，使生长在浙江乐清的铁皮石斛具有较高的活性成分含量和较高的药用价值。该研究方法能较好地地区分不同地区的铁皮石斛，从而有助于铁皮石斛的产地溯源。

## 5.2 工作展望

本文基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析鉴定了红花根系分泌物中独脚金内酯类化合物的分子组成，并通过培养皿滤纸法测定了红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发及其幼苗生长的化感效应，同时利用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对不同产地铁皮石斛的代谢组学进行了深入的研究。但还有许多工作需要在更深层面上进行进一步的研究和验证：

1. 本研究虽然已分析鉴定了红花根系分泌物中独脚金内酯类物质的种类，但是对于这 5 种独脚金内酯类物质的生物活性，以及是否可应用于实际生产当中，还需要持续不断的研究。
2. 本研究虽然证实了红花根系分泌物对马齿苋和狗尾草种子萌发及幼苗生长的化感效应，但是对红花根系分泌物中化感物质的种类以及作用机制没有进行深入探讨，因此未来的研究可从此方面着手进行。
3. 按照本研究的思路，未来可进一步扩大铁皮石斛来源及样本数量，为铁皮石斛产地差异研究和质量评价提供数据基础。



## 参考文献

- [1] MARCO B, DEIRDRE C. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis[J]. *The Analyst*, 2020, 145(4): 1129 - 1157.
- [2] RUNE M, et al. LC-MS Spectra Processing[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2020, 2051: 59 - 77.
- [3] ZHAO W, HU K, HU C, et al. Silica gel microspheres decorated with covalent triazine-based frameworks as an improved stationary phase for high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 232(1487): 83 - 88.
- [4] CHIARA F, SALVATORE F, et al. Application of Sub-2 Micron Particle Silica Hydride Derivatized with Vancomycin for Chiral Separations by Nano-Liquid Chromatography[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1985: 239 - 250.
- [5] MA L, LIU S, YAO L, et al. Preparation and chromatographic performance evaluation of cucurbituril immobilized silica[J]. *Journal of Chromatography A*, 2015, 1376(9): 64 - 73.
- [6] WON T J, HEUNG B L. A UPLC-ESI-Q-TOF method for rapid and reliable identification and quantification of major indole alkaloids in *Catharanthus roseus*[J]. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1080(30): 27 - 36.
- [7] ZHAO X, WANG B, XIE K, et al. Development and comparison of HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS methods for determining eight coccidiostats in beef[J]. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1087-1088: 98 - 107.
- [8] SARAH T, ANNA S, ANDREAS S, et al. Mass spectrometry techniques for imaging and detection of metallodrugs[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2021, 61: 123 - 134.
- [9] 张俊杰, 贾金萍, 秦雪梅. 质谱技术在中药研究中的应用进展[J]. *分析测试学报*, 2017, 36(5): 579 - 587.
- [10] PRASAD B, GARG A, TAKWANI H, et al. Metabolite identification by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30(2): 360 - 387.
- [11] BEDAIR M, SUMNER L W. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27(3): 238 - 250.
- [12] THILAKARATHNA S H, RUPASINGHE H P. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement[J]. *Nutrients*, 2013, 5(9): 3367 - 3387.
- [13] SHIZUKA S, SATORU N, HIROSHI A. Quantitative and Confirmatory Analysis of Pesticide Residues in Cereal Grains and Legumes by Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry[J]. *Foods*, 2021, 30(1): 78 - 79.
- [14] BAI G, ZHANG T, HOU Y, et al. From quality markers to data mining and intelligence assessment:

- A smart quality-evaluation strategy for traditional Chinese medicine based on quality markers[J]. *Phytomedicine*, 2018, 44(5): 109 - 116.
- [15] PAUL D R, IAN D W, JEREMY K N, et al. Ion mobility spectrometry combined with ultra performance liquid chromatography/mass spectrometry for metabolic phenotyping of urine: Effects of column length, gradient duration and ion mobility spectrometry on metabolite detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 982(2): 1 - 8.
- [16] LUTFUN N, ALEV O, SATYAJIT D S. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010-2019)[J]. *Phytochemical Analysis: PCA*, 2020, 31(4): 413 - 457.
- [17] CHEN Y, NELSON B. High performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry for the speciation of the hydride and chemical vapour-forming elements As, Se, Sb and Hg: A critical review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 671(1) : 9 - 26.
- [18] QADIR M, DANGROO N A, AGNIHOTRI V K, et al. Isolation, characterisation, antifungal activity and validated UPLC/MS/MS method for quantification of novel compound from *Artemisia tournefortiana* Reichb[J]. *Natural Product Research*, 2021, 6: 1 - 11.
- [19] ADITYA A J, PANKAJ P N. Determination of Proton Pump Inhibitors by Spectrophotometric, Chromatographic and by Hyphenated Techniques: A Review[J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2021, 51(6): 527 - 548.
- [20] PRAFULLA K S, NAGESWARA R R, TERESA C, et al. An overview of experimental designs in HPLC method development and validation[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 147(30): 590 - 611.
- [21] DARREN R A, BRETT C M. Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications[J]. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 2019, 40(3): 135 - 146.
- [22] JIA J, LIU M, WEN Q, et al. Screening of anti-complement active ingredients from *Eucommia ulmoides* oliv. branches and their metabolism in vivo based on uhplc-q-tof/MS/MS[J]. *Journal of Chromatography B*, 2019, 1124(15): 26 - 36.
- [23] THANH B, SOHYUN B, RONILDA D C, et al. Development and validation of a simple, fast, and sensitive LC/MS/MS method for the quantification of oxfendazole in human plasma and its application to clinical pharmacokinetic study[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, 171: 111 - 117.
- [24] HUANG J, DING L, TIAN W, et al. Polyphenolic profiling, antioxidant properties, and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase of *Mesona chinensis* benth from Southern China[J]. *Microchemical Journal*, 2021, 168: 106399.
- [25] JU L, ZHANG J, WANG F, et al. Chemical profiling of *Houttuynia cordata* Thunb. by UPLC-Q-TOF-MS and analysis of its antioxidant activity in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cells[J]. *Journal of*

- Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 204(10): 114271 - 114272.
- [26] DENG Y, YE X, CHEN Y, et al. Chemical Characteristics of *Platycodon grandiflorum* and its Mechanism in Lung Cancer Treatment [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 398(2): 8644.
- [27] CHEN L, WANG Q, QIN K, et al. Chemical profiling of Qixue Shuangbu Tincture by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole-time-of-flight high-definition mass spectrometry (UPLC-QTOF/MS)[J]. *Chinese Natural Medicine*, 2016, 14(2): 141 - 146.
- [28] ZHANG Q, DONG X, LIU X, et al. Rapid separation and identification of multiple constituents in Danhong Injection by ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Natural Medicine*, 2016, 14(2): 147 - 160.
- [29] WU T, LV H, WANG F, et al. Characterization of polyphenols from *Lycium ruthenicum* fruit by UPLC-Q-TOF/MS(E) and their antioxidant activity in Caco-2 cells[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(11): 2280 - 2288.
- [30] MARKUS M, JULIJANA L, MARTIN G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics[J]. *Molecular Cell Biology*, 2019, 20(6): 353 - 367.
- [31] WOLFENDER J, LITAUDON M, TOUBOUL D, et al. Innovative omics-based approaches for prioritisation and targeted isolation of natural products - new strategies for drug discovery[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(6): 855 - 868.
- [32] SCOSSA F, BENINA M, ALSEEKH S, et al. The Integration of Metabolomics and Next-Generation Sequencing Data to Elucidate the Pathways of Natural Product Metabolism in Medicinal Plants[J]. *Planta Media*, 2018, 84(12-13): 855 - 873.
- [33] CHEN R, WANG X, ZHANG Y, et al. Simultaneous extraction and separation of oil, proteins, and glucosinolates from *Moringa oleifera* seeds[J]. *Food Chemistry*, 2019, 300(1): 125162.
- [34] ALVAREZ S, NALDRETT M J. Mass spectrometry based untargeted metabolomics for plant systems biology[J]. *Emerging Topics in Life Sciences*, 2021, 5(2): 189 - 201.
- [35] SONG L, LIU H, WANG Y, et al. Application of GC/MS-based metabolomic profiling in studying the therapeutic effects of HuangbaiZhimu herb-pair(HZ) extract on streptozotocin-induced type 2 diabetes in mice[J]. *Journal of Chromatography B*, 2015, 997(1): 96 - 104.
- [36] 江美芳, 高崎, 王丹丹. 基于 LC-MS 代谢组学技术在中药化学成分中的应用[J]. *中国医药导报*, 2020, 17(25): 134.
- [37] YU Y, YAO C, GUO D. Insight into chemical basis of traditional Chinese medicine based on the state-of-the-art techniques of liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 2021, 11(6): 1469 - 1471.
- [38] ZONG X, WANG Y, XIONG J, et al. Characterization of alkaloids in radix *Sophora tonkinensis* by

- UPLC-Q-TOF-MS/MS and its application in the comparison of two different habitats[J]. *Natural Product Research*, 2022, 36(1): 429 - 431.
- [39] ZHAO G, ZHAO W, HAN L, et al. Metabolomics analysis of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in different geographical origins using UPLC-Q-TOF/MS[J]. *Food Chemistry*, 2020, 333(15): 127453.
- [40] ZHAO Q, BIAN X, QIAN D, et al. Comparative study on differences of *Paeonia lactiflora* from different habitats based on fingerprint and chemometrics[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44(15): 3316 - 3322.
- [41] XIE G, ROBERT P, SU M, et al. Ultra-performance LC/TOF MS analysis of medicinal *Panax* herbs for metabolomic research[J]. *Journal of Separation Science*, 2008, 31(6-7): 1015 - 1026.
- [42] LIU N, MARTINE C, MICHEL F, et al. Metabolomic investigation of the ethnopharmacological use of *Artemisia afra* with NMR spectroscopy and multivariate data analysis[J]. *Journal of Ethnopharmacol*, 2010, 128(1): 230 - 235.
- [43] SALEH A, ASAPH A, YARIV B, et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices[J]. *Nature Methods*, 2021, 18(7): 747 - 756.
- [44] RAMLA S, CELINE R, CHRISTEL N, et al. Effects of ecological factors on secondary metabolites of medicinal plants and research methods[J]. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2017, 69(8): 1041 - 1043.
- [45] NING Z, LU C, ZHANG Y, et al. Application of plant metabonomics in quality assessment for large-scale production of traditional Chinese medicine[J]. *Plant Medicine*, 2013, 79(11): 897 - 908.
- [46] ZHANG D, HAN X, LI R, et al. Analysis on characteristic constituents of crude *Aconitum carmichaelii* in different regions based on UPLC-Q-TOF-MS[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(3): 463 - 469.
- [47] ZHAO J, XU J, XU Y, et al. High-Throughput Metabolomics Method for Discovering Metabolic Biomarkers and Pathways to Reveal Effects and Molecular Mechanism of Ethanol Extract From *Epimedium* Against Osteoporosis[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 1318.
- [48] GAO J, SHI N, GUO H, et al. UPLC-Q-TOF/MS-Based Metabolomics Approach to Reveal the Hepatotoxicity of Emodin and Detoxification of Dihydromyricetin[J]. *ACS Omega*, 2021, 6(8): 5348 - 5358.
- [49] ZHU S, LONG R, SONG T, et al. UPLC-Q-TOF/MS Based Metabolomics Approach to Study the Hepatotoxicity of Cantharidin on Mice[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2019, 32(11): 2204 - 2213.
- [50] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Mark-er): 中药产品质量控制的新概念[J]. *中草药*, 2016, 47(9): 1443 - 1457.
- [51] ZHAO X, WEI J, YANG M. Simultaneous Analysis of Iridoid Glycosides and Anthraquinones in

- Morinda officinalis* Using UPLC-QqQ-MS/MS and UPLC-Q/TOF-MS<sup>E</sup>[J]. *Molecules*, 2018, 23(5): 1070.
- [52] RAPHAEL N A, MARIA A S, MOSES M. Untargeted UPLC-Q/TOF-MS-based metabolomics and inductively coupled plasma optical emission spectroscopic analysis reveal differences in the quality of ginger from two provinces in Zambia[J]. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2018, 70(9): 1262 - 1271.
- [53] SANG Q, JIA Q, ZHANG H, et al. Chemical profiling and quality evaluation of Zhishi-Xiebai-Guizhi Decoction by UPLC-Q-TOF-MS and UPLC fingerprint[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 194(5): 113771.
- [54] XU L, TANG X, HAO F, et al. Hepatotoxicity and nephrotoxicity assessment on ethanol extract of Fructus Psoraleae in Sprague Dawley rats using a UPLC-Q-TOF-MS analysis of serum metabolomics[J]. *Biomedical Chromatography*, 2021, 35(6): e5064.
- [55] LI P, SHEN J, LI Y, et al. Metabolite profiling based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and the biological evaluation of medicinal plants of Chinese Dichocarpum (Ranunculaceae)[J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2021, 18(10): e2100432.
- [56] TADANO T, TANAKA A. The effect of low phosphate concentrations in culture medium on early growth of several crop plants[J]. *Plant Natural*, 1980, 51: 399 - 404.
- [57] IKUO T, TADAO A. Target-based selectivity of strigolactone agonists and antagonists in plants and their potential use in agriculture[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(9): 2241 - 2254.
- [58] BOOKER J, SIEBERER T, WRIGHT W, et al. MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone[J]. *Developmental Cell*, 2005, 8(3): 443 - 449.
- [59] GUO W, ZHANG Z, LIU Q, et al. Research progress of root exudates collection technology[J]. *The Journal of Applied Ecology*, 2019, 30(31): 3951 - 3962.
- [60] CARLOS R, ROSA M V, JOSE M G, et al. A new UHPLC-MS/MS method for the direct determination of strigolactones in root exudates and extracts[J]. *Phytochemical Analysis: PCA*, 2019, 30(1): 110 - 116.
- [61] XIE X, KAORI Y, DAI K, et al. Isolation and identification of alectrol as (+)-orobanchyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(2): 427 - 431.
- [62] NIHARIKA B, SMITA T, SATISH C B. Photomodulation of strigolactone biosynthesis and accumulation during sunflower seedling growth[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2015, 10(8): e1049792.
- [63] TAKATOSHI W, KOTOMI U, YUKIHIRO S. Structure Elucidation and Biosynthesis of Orobanchol[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 835160.
- [64] KOTOMI U, HITOMI N, MASA HARU M, et al. Bioconversion of 5-deoxystrigol stereoisomers to

- monohydroxylated strigolactones by plants[J]. *Journal of Pesticide Science*, 2018, 43(3): 198 - 206.
- [65] XIE X, KAORI Y, TAKAYA K, et al. Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco[J]. *Molecular Plant*, 2013, 6(1): 153 - 163.
- [66] XIE X, TAKAYA K, KAORI Y, et al. Methyl zealactonoate, a novel germination stimulant for root parasitic weeds produced by maize[J]. *Journal of Pesticide Science*, 2017, 42(2): 58 - 61.
- [67] TAKATOSHI W, SHUNSUKE I, KASUMI S, et al. Identification and characterization of sorgomol synthase in sorghum strigolactone biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2021, 185(3): 902 - 913.
- [68] SHMUEL G, JOSEPH H, EVGENY S, et al. Characterization of a Chickpea Mutant Resistant to *Phelipanche aegyptiaca* Pers. and *Orobanche crenata* Forsk[J]. *Plants*, 2021, 10(12): 2552.
- [69] CATARINA C, TATSIANA C, MUHAMMAD J. Differential activity of *Striga hermonthica* seed germination stimulants and *Gigaspora rosea* hyphal branching factors in rice and their contribution to underground communication[J]. *PloS One*, 2014, 9(8): e104201.
- [70] KOTOMI U, SAKI N, SATORU M, et al. Ent-2'-epi-Orobanchol and its acetate, as germination stimulants for *Striga gesnerioides* seeds isolated from cowpea and red clover[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(19): 10485 - 10490.
- [71] XIE X, KAORI Y, YUTA H, et al. Fabacyl acetate, a germination stimulant for root parasitic plants from *Pisum sativum*[J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(2): 211 - 215.
- [72] HYUN I K, TAKAYA K, PICHIT K, et al. Avenaol, a germination stimulant for root parasitic plants from *Avena strigosa*[J]. *Phytochemistry*, 2014, 103: 85 - 88.
- [73] KOTOMI U, TOSHIO F, SHUHEI U, et al. Heliolactone, a non-sesquiterpene lactone germination stimulant for root parasitic weeds from sunflower[J]. *Phytochemistry*, 2014, 108: 122 - 128.
- [74] TATSIANA V C, KATHARINA G, ALEXANDRE L, et al. Zealactones. Novel natural strigolactones from maize[J]. *Phytochemistry*, 2017, 137: 123 - 131.
- [75] XIE X, NARUMI M, KAORI Y, et al. Lotuslactone, a non-canonical strigolactone from *Lotus japonicus*[J]. *Phytochemistry*, 2019, 157: 200 - 205.
- [76] KAORI Y, NARUMI M, TOMOYASU S, et al. Conversion of carlactone to carlactonoic acid is a conserved function of MAX1 homologs in strigolactone biosynthesis[J]. *The New Phytologist*, 2018, 218(4): 1522 - 1533.
- [77] MUHAMMAD J, BOUBACAR A K, WANG J, et al. A New Series of Carlactonoic Acid Based Strigolactone Analogs for Fundamental and Applied Research[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11(5): 434.
- [78] JUAN A L, TATSIANA C, PATRICK M, et al. Susceptibility of the tomato mutant high pigment-2dg (hp-2dg) to *Orobanche* spp. infection[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(15): 6326 - 6332.
- [79] MOE I, KASUMI S, KAZUMA K, et al. Evidence for species-dependent biosynthetic pathways for

- converting carlactone to strigolactones in plants[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(9): 2305 - 2318.
- [80] XIE X, KAORI Y, KURITA J, et al. 7-Oxoorobanchyl acetate and 7-Oxoorobanchol as germination stimulants for root parasitic plants from flax (*Linum usitatissimum*)[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(6): 1367 - 1370.
- [81] XIE X, TAKAYA K, HYUN I K, et al. 7 $\alpha$ - and 7 $\beta$ -Hydroxyorobanchyl acetate as germination stimulants for root parasitic weeds produced by cucumber[J]. *Journal of Pesticide Science*, 2014, 39(3): 121 - 126.
- [82] HIROSHI K, MAMI F, MASAKI K, et al. A concise synthesis of optically active solanacol, the germination stimulant for seeds of root parasitic weeds[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79(8): 1240 - 1245.
- [83] TAMAMI T, HIDEO H, KOHKI A. Medicaol, a strigolactone identified as a putative didehydro-orobanchol isomer, from *Medicago truncatula*[J]. *Phytochemistry*, 2015, 111: 91 - 97.
- [84] TAKAYA K, XIE X, HYUN I K, et al. Strigone, isolation and identification as a natural strigolactone from *Houttuynia cordata*[J]. *Phytochemistry*, 2013, 87: 60 - 64.
- [85] CARLOS R, ROSA M V, JOSE M G, et al. Quantification of Strigolactones[J]. *Phytochemistry*, 2020, 2083: 199 - 208.
- [86] ZWANENBURG B, BLANCOANIA D. Strigolactones: new plant hormones in the spotlight[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2018, 69(9): 2205 - 2218.
- [87] RASMUSSEN A, DEPUYDT S, GOORMACHTIG S, et al. Strigolactones, fine-tune the root system[J]. *Planta*, 2013, 238(4): 615 - 626.
- [88] TRABELSI K Y, ABBES Z, AMRI M, et al. Characterization of strigolactones produced by *Orobanche foetida* and *Orobanche crenata* resistant faba bean (*Vicia faba* L.) genotypes and effects of phosphorous, nitrogen, and potassium deficiencies on strigolactone production[J]. *South African Journal of Botany*, 2017, 108: 15 - 22.
- [89] FERNANDEZ C, RIAL O R, CANCHO G B, et al. Determination of fungicideresidues in white grapes for winemaking by gas chromatographywith mass spectrometric detection and assessment of matrix effects[J]. *Journal of AOAC International*, 2003, 86(5): 1008 - 1014.
- [90] 杨浩娜, 柏连阳. 棉田反枝苋和马齿苋对草甘膦的抗药性[J]. *棉花学报*, 2014, 26(6): 492 - 498.
- [91] SOLTYS D, KRASUSKA U, BOGATEK R, et al. Allelochemicals as bioherbicides—present and perspectives[J]. *IntechOpen Press*, 2013, 20: 517 - 542.
- [92] WANG Y, HE S, CHENG X, et al. UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprinting of Traditional Chinese Formula SiJunZiTang[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 80: 24 - 33.
- [93] TANG H, ZHAO T, SHENG Y, et al. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: a Review on its

- ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and industrialization[J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017: 7436259.
- [94] YANG S, ELIZABETH L, GEORGIA P, et al. Propensity score weighting for causal subgroup analysis[J]. *Statistics in Medicine*, 2021, 40(19): 4294 - 4309.





## 致谢

时光荏苒，岁月如梭，一转眼间到了毕业的时刻。回想在大学学习的时间，不禁感慨万分。从与浙江农林大学的相识到相知，与她的感情越来越浓厚。毕业临别之际，除了对浙农林的感激之情外，更多的是留恋与不舍。在攻读硕士学位期间，我不仅收获了丰富的理论知识，研读了很多关于生物物理学专业的文献著作，而且还认识了许多知识渊博、师德高尚的老师，结识了来自全国各地的同学们。丰富而充实的学习让我的生活充满了快乐，老师们的授课内容开阔了我的视野提升了我的素养，教会了我处理问题的方式方法。同学们之间的情谊胜似兄弟姐妹之情，在学习期间，我们结下了深厚的友谊，学会了相互学习、相互尊重、相互提高。

这篇论文是在尊敬的导师杨胜祥教授和王悦悦的悉心指导下完成的。从论文的选题、写作到最后的修改，王宏鹏教授给了我很大的帮助和指导；尤其在论文的改进过程中，他们在百忙之中抽出时间亲自修改，着实令我感动。在论文的撰写过程中，我也明显感觉到自身知识的匮乏，同时也更加坚定了我查资料、读专著、搞调研的信心和决心。

这篇论文历时近一年，几易其稿，不断完善，最终成型，在论文最后的答辩修改过程中老师们也给了我很大帮助，对论文的修改提出了很多宝贵的意见，在此一并表示衷感谢！同时也感谢家人和理学研全体同学们的支持和帮助。