

基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的银黄清肺胶囊体外物质基础研究

周卿意骏^{1,2}, 卿志星¹, 蔡萍², 肖娟², 高尚⁴, 张水寒^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中医药研究院中药研究所, 湖南 长沙 410013

3. 湖南省 2011 数字医药协同创新中心, 湖南 长沙 410208

4. 湖南安邦制药有限公司, 湖南 长沙 410083

摘要:目的 采用高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱技术 (HPLC-Q-TOF-MS/MS) 对银黄清肺胶囊的化学成分进行检测和分析。方法 采用 Inertsil ODS-2 C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 反相 HPLC 梯度洗脱法分离各主要成分, 电喷雾电离源经正离子模式对色谱流出物进行检测, 四级杆飞行时间串联质谱法对各主要色谱峰进行归属; 采用对照品、检索文献及各成分的图谱数据分析的方法分析化学成分。结果 依据质谱裂解规律及文献检索, 在正离子模式下, 从银黄清肺胶囊样品中共鉴定出 54 个化合物。结论 本实验建立了一种基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对复方银黄清肺胶囊中化学成分进行鉴别的有效方法, 为其质量控制及物质基础研究提供了技术支持。

关键词: 银黄清肺胶囊; HPLC-Q-TOF-MS/MS; 麻黄碱; 苦杏仁苷; 贝母素甲; 槲皮素; 橙皮苷

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)20-3586-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.20.007

Study on substance basis of Yinhuang Qingfei Capsule *in vitro* by HPLC-Q-TOF-MS/MS

ZHOU Qing-yi-jun^{1,2}, QING Zhi-xing¹, CAI Ping², XIAO Juan², GAO Shang⁴, ZHANG Shui-han^{1,2,3}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Institute of Chinese Materia Medica, Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China

3. 2011 Collaboration and Innovation Center for Digital Chinese Medicine in Hunan, Changsha 410208, China

4. Anbang Pharmaceutical, Changsha 410083, China

Abstract: Objective To identify and analyze the chemical constituents in Yinhuang Qingfei Capsule by HPLC-Q-TOF-MS/MS method. **Methods** The HPLC method was used with the conditions that the column was Inertsil ODS-2 C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Column and electrospray ion (ESI) source was employed for the qualitative analysis under positive ion mode. These components were further analyzed by MS spectra, and by comparing with the corresponding reference substances and literature data. **Results** According to the MS principle and literature data, 54 compounds were identified from the sample of Yinhuang Qingfei Capsule. **Conclusion** An efficient HPLC-Q-TOF-MS/MS approach has been established for studying the chemical constituents in Yinhuang Qingfei Capsule, which paves a way for the quality control and further substance basis studies of the preparation.

Key words: Yinhuang Qingfei Capsule; HPLC-Q-TOF-MS/MS; ephedrine; amygdalin; peimine; quercetin; hesperidin

银黄清肺胶囊处方由北葶苈子、麻黄、苦杏仁、浙贝母、枇杷叶、大青叶等 14 味中药组成, 具有清肺化痰、止咳平喘的功效, 主要用于治疗慢性支气管炎急性发作之痰热壅肺证, 临床上作为治疗支气管炎急性发作的药物, 具有较好的疗效。该制剂具有速效、量小、疗程短的特点, 且其为中药小胶囊 (0.15 g/粒),

方便有吞咽困难的人群 (儿童/体虚老人) 服用。

中药复方通过多成分、多途径、多靶点发挥其治疗作用, 其复杂的化学组成与药效之间的关联性一直是人们关注的热点^[1]。目前, 随着液质联用技术的发展和成熟, 其高效、快速、简便的特点, 在快速分析鉴定中药化学成分方面的明显优势, 使其

收稿日期: 2016-04-23

基金项目: 长沙市生物与新医药产业科技支撑重大专项项目; 中药创新关键技术研究及产业化 (K1204035-31)

作者简介: 周卿意骏 (1990—), 男, 博士在读, 研究方向为中药制剂质量标准研究。Tel: 18673261196 E-mail: 1063170110@qq.com

*通信作者 张水寒, 女, 研究员, 博士生导师, 从事中药资源、中药制剂及质量标准研究、新药开发研究。

日渐成为中药复杂成分的有效分析方法。高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱 (HPLC-Q-TOF-MS/MS) 联用技术具有周期短、灵敏度高、选择性强等特点, 可在获得化合物准确相对分子质量碎片信息的基础上, 对被测成分进行快速分析鉴别, 对成分复杂的样品 (如中药复方) 尤其具有优势。银黄清肺胶囊复方含有黄酮类、生物碱类、皂苷类、木脂素类等化学成分, 成分极其复杂。本实验采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对银黄清肺胶囊的化学成分进行检测和分析。依据质谱裂解规律及文献检索, 从银黄清肺胶囊样品中鉴定出 54 个化合物, 可较全面地反映复方的化学组成, 对阐明其体外药效物质基础具有重要的意义。

1 仪器与材料

Agilent 1200 高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); 6530 Q-TOF 质谱仪 (美国安捷伦公司); 电喷雾离子源 (ESI); MassHunter 质谱工作站 (美国安捷伦公司); AL204 电子天平为梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司产品; KQ5200DE 型数控超声仪 (昆山市超声仪器有限公司)。

乙腈为色谱纯, 甲醇、甲酸均为分析纯, 水为娃哈哈纯净水。对照品盐酸麻黄碱 (批号 171241-201007)、柚皮苷 (批号 110722-201312)、橙皮苷 (批号 110721-201115) 均购自中国食品药品检定研究院, 质量分数 $\geq 98\%$ 。银黄清肺胶囊成品 (批号 130301) 由湖南安邦制药有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Inertil C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);

检测波长 210 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min; 柱后分流比为 2:1; 进样量 10 μ L; 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 2%~5%乙腈; 5~30 min, 5%~25%乙腈; 30~55 min, 25%~45%乙腈; 55~80 min, 45%~55%乙腈; 80~120 min, 55%~98%乙腈; 120~135 min, 98%乙腈; 135~150 min, 98%~2%乙腈。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI); 正离子模式扫描; 毛细管电压 4 000 V; 离子源温度 350 $^{\circ}$ C; 雾化器压力 276 kPa; 干燥器体积流量 6 L/min; 锥孔电压 65 V; 干燥器温度 350 $^{\circ}$ C; 碎片电压 130 V; 质量数扫描范围 m/z 100~1 200; 采样频率 0.1 s, 间隔 0.02 s; 碰撞能量分别采用 5、10、20、25 eV。测量样品前, 使用调谐液校准质量轴, 以保证质量精度误差小于 1×10^{-6} 。

2.3 供试品及对照品溶液的制备

取本品内容物, 混匀, 取胶囊粉末约 1.2 g, 精密称定, 置烧瓶中, 加入甲醇 30 mL, 称定质量, 超声 0.5 h, 放至室温, 用甲醇补足减失的质量, 滤过, 摇匀, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

分别取盐酸麻黄碱、橙皮苷、柚皮苷对照品适量, 加甲醇分别配成质量浓度为 0.02、0.02、0.04 mg/mL 的各对照品溶液。

2.4 供试品的检测

采用 HPLC-ESI-MS, 按“2.1”和“2.2”条件对银黄清肺胶囊中化学成分进行定性分析, 得到的正离子模式的质谱总离子流图见图 1。

2.5 化合物的鉴定与分析

通过 HPLC-ESI-MS 检测到的银黄清肺胶囊中

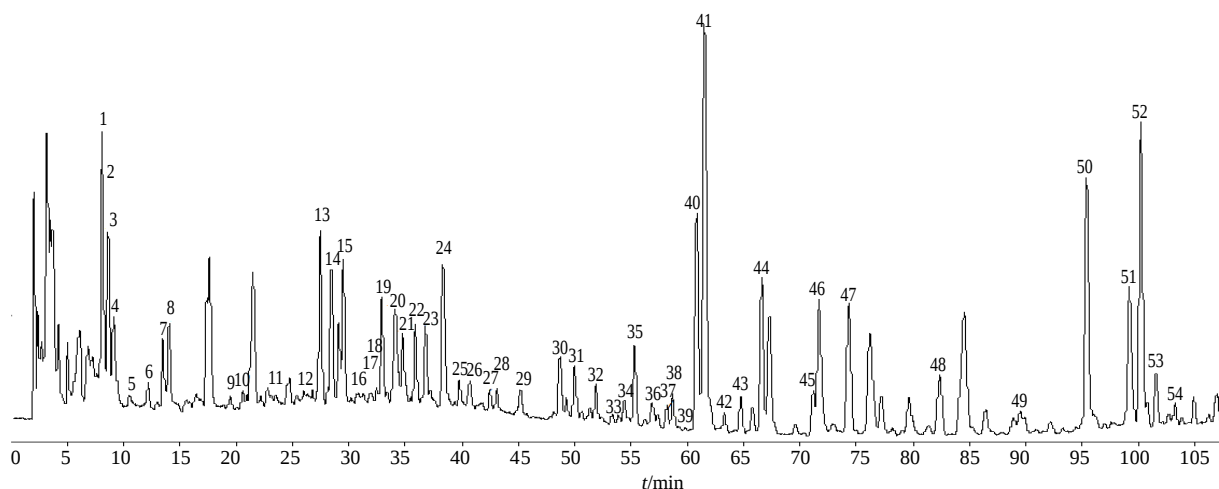


图 1 银黄清肺胶囊正离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of HPLC-Q-TOF-MS by positive mode for Yinhuang Qingfei Capsule

各化学成分的保留时间和质谱信息,并依据质谱裂解规律与查阅相关文献数据^[2-10]的方法对提取离子流图进行分析,鉴别出部分化学成分,共 54 种,见表 1。其中麻黄碱、苦杏仁苷、贝母素甲、贝母素乙、橙皮苷、槲皮素、甘草酸、五味子醇甲、薯蓣皂苷、薯蓣皂苷元的二级质谱图见图 2。

其中, t_R 为 8.611、9.275 min 的 1、4 号峰在 ESI^+ 模式下得到 m/z 166 的离子峰。文献报道^[11]麻黄中存在麻黄碱、伪麻黄碱,且相对分子质量为 165,推测 m/z 166 为其准分子离子峰。对 m/z 166 的离子峰进行 MS^2 分析,8.611 min 的峰得到 m/z 为 148 $[M+H-H_2O]^+$, 133 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$,

表 1 银黄清肺胶囊提取化合物的鉴定

Table 1 Identification of extracted compounds from Yinhuang Qingfei Capsules

峰号	t_R/min	实测值	理论值	MS^2	化合物	归属
1	8.611	166.123 0 $[M+H]^+$	166.122 6	148 $[M+H-H_2O]^+$, 133 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$, 117 $[M+H-H_2O-CH_3-NH_2]^+$	麻黄碱	麻黄
2	8.681	148.112 1 $[M+H]^+$	148.112 6	133 $[M+H-CH_3]^+$	5,6,7,8-四氢-4-甲基喹啉	麻黄
3	8.882	145.048 5 $[M+H]^+$	145.049 6	127 $[M+H-H_2O]^+$, 109 $[M+H-2H_2O]^+$	pyranone	甘草
4	9.275	166.123 1 $[M+H]^+$	166.122 6	148 $[M+H-H_2O]^+$, 133 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$	伪麻黄碱	麻黄
5	9.750	180.138 2 $[M+H]^+$	180.138 3	162 $[M+H-H_2O]^+$, 147 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$, 132 $[M+H-H_2O-2CH_3]^+$	甲基麻黄碱	麻黄
6	11.433	127.041 9 $[M+H]^+$	127.039 1	109 $[M+H-H_2O]^+$	5-羟甲基-2-呋喃甲醛	五味子
7	13.178	441.135 8 $[M+H]^+$	441.139 1	413 $[M+H-CH_3-CH_2]^+$, 385 $[M+H-C(CH_3)_3]^+$, 367 $[M+H-C(CH_3)_3-H_2O]^+$	银杏内酯 C	银杏叶
8	15.087	425.145 1 $[M+H]^+$	425.144 2	397 $[M+H-CH_3-CH_2]^+$, 369 $[M+H-C(CH_3)_3]^+$	银杏内酯 B	银杏叶
9	20.209	480.148 8 $[M+Na]^+$	480.147 6	347 $[M+Na-C_8H_7NO]^+$, 318 $[M+Na-glc]^+$	苦杏仁苷	苦杏仁
10	20.723	355.104 6 $[M+H]^+$	355.102 4	163 $[M+H-C_7H_{11}O_6]^+$	绿原酸	穿山龙
11	24.631	339.119 3 $[M+H]^+$	339.122 7	147 $[M+H-C_{11}H_{12}O_3]^+$, 119 $[M+H-C_{12}H_{12}O_4]^+$	黄羽扇豆魏特酮	甘草
12	27.389	249.146 2 $[M+H]^+$	249.148 5	234 $[M+H-CH_3]^+$, 205 $[M+H-COO]^+$	一枝蒿酮酸	一枝蒿
13	28.696	355.151 1 $[M+H]^+$	355.154 0	338 $[M+H-OH]^+$, 323 $[M+H-CH_3-OH]^+$, 268 $[M+H-OH-CH_3-C_4H_7]^+$	甘草苯并呋喃	甘草
14	31.348	611.201 1 $[M+H]^+$	611.197 0	465 $[M+H-rha]^+$, 303 $[M+H-rha-glc]^+$	橙皮苷	枳实
15	31.691	581.192 4 $[M+H]^+$	581.186 5	435 $[M+H-rha]^+$, 273 $[M+H-rha-glc]^+$	芸香柚皮苷	枳实
16	32.387	611.199 8 $[M+H]^+$	611.197 0	465 $[M+H-rha]^+$, 303 $[M+H-rha-glc]^+$	新橙皮苷	枳实
17	32.436	303.087 7 $[M+H]^+$	303.086 3	177 $[M+H-C_6H_4O_3]^+$, 153 $[M+H-C_9H_9O_2]^+$	橙皮素	枳实
18	32.799	465.107 9 $[M+H]^+$	465.102 8	303 $[M+H-glc]^+$, 285 $[M+H-glc-H_2O]^+$	槲皮素-4-O- β -D-半乳糖苷	枇杷叶
19	33.133	579.173 3 $[M+H]^+$	579.170 8	271 $[M+H-glc-rha]^+$	野漆树苷	枳实
20	33.677	414.332 2 $[M+H]^+$	414.336 7	396 $[M+H-H_2O]^+$	去氢鄂贝定碱	浙贝母
21	34.660	581.189 1 $[M+H]^+$	581.186 5	435 $[M+H-rha]^+$, 273 $[M+H-rha-glc]^+$	柚皮苷	枳实
22	34.688	273.077 0 $[M+H]^+$	273.075 7	153 $[M+H-C_8H_8O]^+$	柚皮素	枳实
23	37.266	431.130 5 $[M+H]^+$	431.133 7	269 $[M+H-glc]^+$	芒柄花苷	甘草
24	37.325	611.160 2 $[M+H]^+$	611.160 7	465 $[M+H-rha]^+$, 303 $[M+H-rha-glc]^+$	芦丁	银杏叶
25	40.526	885.492 8 $[M+H]^+$	885.484 2	723 $[M+H-glc]^+$, 577 $[M+H-glc-rha]^+$, 415 $[M+H-2glc-rha-C_8H_{16}O_2]^+$	纤细薯蓣皂苷	穿山龙
26	40.547	739.433 1 $[M+H]^+$	739.426 3	577 $[M+H-glc]^+$, 433 $[M+H-glc-C_8H_{16}O_2]^+$, 271 $[M+H-2glc-C_8H_{16}O_2]^+$	dracaenaside E	穿山龙
27	41.434	595.204 6 $[M+H]^+$	595.202 1	449 $[M+H-rha]^+$, 287 $[M+H-rha-glc]^+$	枳属苷	枳实
28	41.517	287.097 5 $[M+H]^+$	287.055 0	178 $[M+H-C_6H_4O_2]^+$, 153 $[M+H-C_8H_6O_2]^+$	木犀草素	银杏叶

续表 1

峰号	t_R/min	实测值	理论值	MS^2	化合物	归属
29	42.766	303.051 7 $[M+H]^+$	303.048 6	287 $[M+H-H_2O]^+$, 257 $[M+H-CO]^+$, 153 $[M+H-C_8H_6O_3]^+$	槲皮素	银杏叶
30	47.648	1 031.545 8 $[M+H]^+$	1 031.542 1	869 $[M+H-glc]^+$, 723 $[M+H-glc-rha]^+$, 577 $[M+H-glc-2rha]^+$, 415 $[M+H-2glc-2rha]^+$	伪原薯蓣皂苷	穿山龙
31	47.993	271.058 6 $[M+H]^+$	271.060 1	153 $[M+H-C_8H_6O_3]^+$, 119 $[M+H-C_7H_4O_4]^+$	芹菜素	银杏叶
32	53.916	269.078 5 $[M+H]^+$	269.080 8	252 $[M+H-OH]^+$	刺芒柄花素	甘草
33	55.147	823.405 6 $[M+H]^+$	823.411 1	647 $[M+H-gluA]^+$, 471 $[M+H-gluA]^+$, 453 $[M+H-2gluA-H_2O]^+$	甘草酸	甘草
34	57.681	415.133 2 $[M+H]^+$	415.138 7	384 $[M+H-OCH_3]^+$, 369 $[M+H-OCH_3-CH_3]^+$	苦鬼白毒素	浙贝母
35	59.155	403.136 1 $[M+H]^+$	403.138 7	388 $[M+H-CH_3]^+$, 373 $[M+H-2CH_3]^+$	川陈皮素	枳实
36	59.743	433.222 8 $[M+H]^+$, 450.251 0 $[M+NH_4]^+$	433.222 1, 450.248 6	415 $[M+H-H_2O]^+$, 400 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$, 384 $[M+H-H_2O-OCH_3]^+$, 346 $[M+H-H_2O-C_5H_9]^+$	五味子醇甲	五味子
37	59.771	501.252 4 $[M+H]^+$	501.248 3	415 $[M+H-C_5H_{10}O]^+$, 384 $[M+H-C_5H_{10}O-OCH_3]^+$	当归酰戈米辛 H	五味子
38	60.168	287.092 8 $[M+H]^+$	287.091 9	270 $[M+H-OH]^+$	甘草查耳酮 B	甘草
39	60.568	343.119 6 $[M+H]^+$	343.117 6	327 $[M+H-CH_4]^+$, 313 $[M+H-CH_2-CH_4]^+$, 299 $[M+H-CH_4-2CH_2]^+$, 282 $[M+H-CH_4-2CH_2-OH]^+$, 150 $[M+H-CH_4-CH_2-C_9H_8O_3]^+$	4',5,7,8-四甲氧基黄酮	枳实
40	64.097	419.136 0 $[M+H]^+$	419.133 7	257 $[M+H-glc]^+$, 239 $[M+H-glc-H_2O]^+$, 229 $[M+H-glc-CO]^+$	甘草苷	甘草
41	65.105	373.122 5 $[M+H]^+$	373.128 2	358 $[M+H-CH_3]^+$, 343 $[M+H-2CH_3]^+$	甜橙素	枳实
42	65.514	399.183 9 $[M+H]^+$, 417.186 8 $[M+H]^+$	399.180 2, 417.190 8	399 $[M+H-H_2O]^+$, 384 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$, 368 $[M+H-H_2O-OCH_3]^+$, 357 $[M+H-H_2O-C_3H_6]^+$, 343 $[M+H-H_2O-C_4H_8]^+$	五味子醇乙	五味子
43	65.534	416.349 8 $[M+H]^+$	416.352 3	398 $[M+H-H_2O]^+$, 220 $[M+H-C_{12}H_{20}O_2]^+$	鄂贝定碱	浙贝母
44	68.886	257.071 2 $[M+H]^+$	257.080 7	239 $[M+H-H_2O]^+$, 229 $[M+H-CO]^+$	甘草苷元	甘草
45	72.413	869.496 0 $[M+H]^+$	869.489 3	725 $[M+H-C_8H_{16}O_2]^+$, 415 $[M+H-2rha-glc]^+$, 271 $[M+H-2rha-glc-C_8H_{16}O_2]^+$	薯蓣皂苷	穿山龙
46	72.620	415.322 7 $[M+H]^+$	415.320 7	271 $[M+H-C_8H_{16}O_2]^+$, 253 $[M+H-C_8H_{16}O_2-H_2O]^+$	薯蓣皂苷元	穿山龙
47	72.654	577.379 5 $[M+H]^+$	577.373 5	433 $[M+H-C_8H_{16}O_2]^+$, 271 $[M+H-glc-C_8H_{16}O_2]^+$, 253 $[M+H-C_8H_{16}O_2-glc-H_2O]^+$	延龄草皂苷	甘草
48	82.195	537.206 8 $[M+H]^+$	537.211 9	431 $[M+H-C_7H_6O]^+$, 414 $[M+H-C_7H_6O-OH]^+$	五味子酯甲	五味子
49	93.666	417.230 7 $[M+H]^+$	417.227 2	402 $[M+H-CH_3]^+$, 386 $[M+H-OCH_3]^+$, 347 $[M+H-C_5H_{10}]^+$, 332 $[M+H-CH_3-C_5H_{10}]^+$, 316 $[M+H-OCH_3-C_5H_{10}]^+$	五味子甲素	五味子
50	97.168	432.350 5 $[M+H]^+$	432.347 2	414 $[M+H-H_2O]^+$	贝母素甲	浙贝母
51	98.323	430.335 1 $[M+H]^+$	430.331 6	412 $[M+H-H_2O]^+$	贝母素乙	浙贝母
52	98.780	401.199 9 $[M+H]^+$	401.195 9	386 $[M+H-CH_3]^+$, 370 $[M+H-OCH_3]^+$, 300 $[M+H-OCH_3-C_5H_{10}]^+$	五味子乙素	五味子
53	99.619	432.349 4 $[M+H]^+$	432.347 2	414 $[M+H-H_2O]^+$	浙贝宁	浙贝母
54	101.109	385.161 6 $[M+H]^+$	385.164 6	355 $[M+H-CH_2O]^+$, 285 $[M+H-CH_2O-C_5H_{10}]^+$, 257 $[M+H-CH_2O-C_5H_{10}-CO]^+$, 227 $[M+H-2CH_2O-C_5H_{10}-CO]^+$, 199 $[M+H-2H_2O-C_5H_{10}-2CO]^+$	五味子丙素	五味子

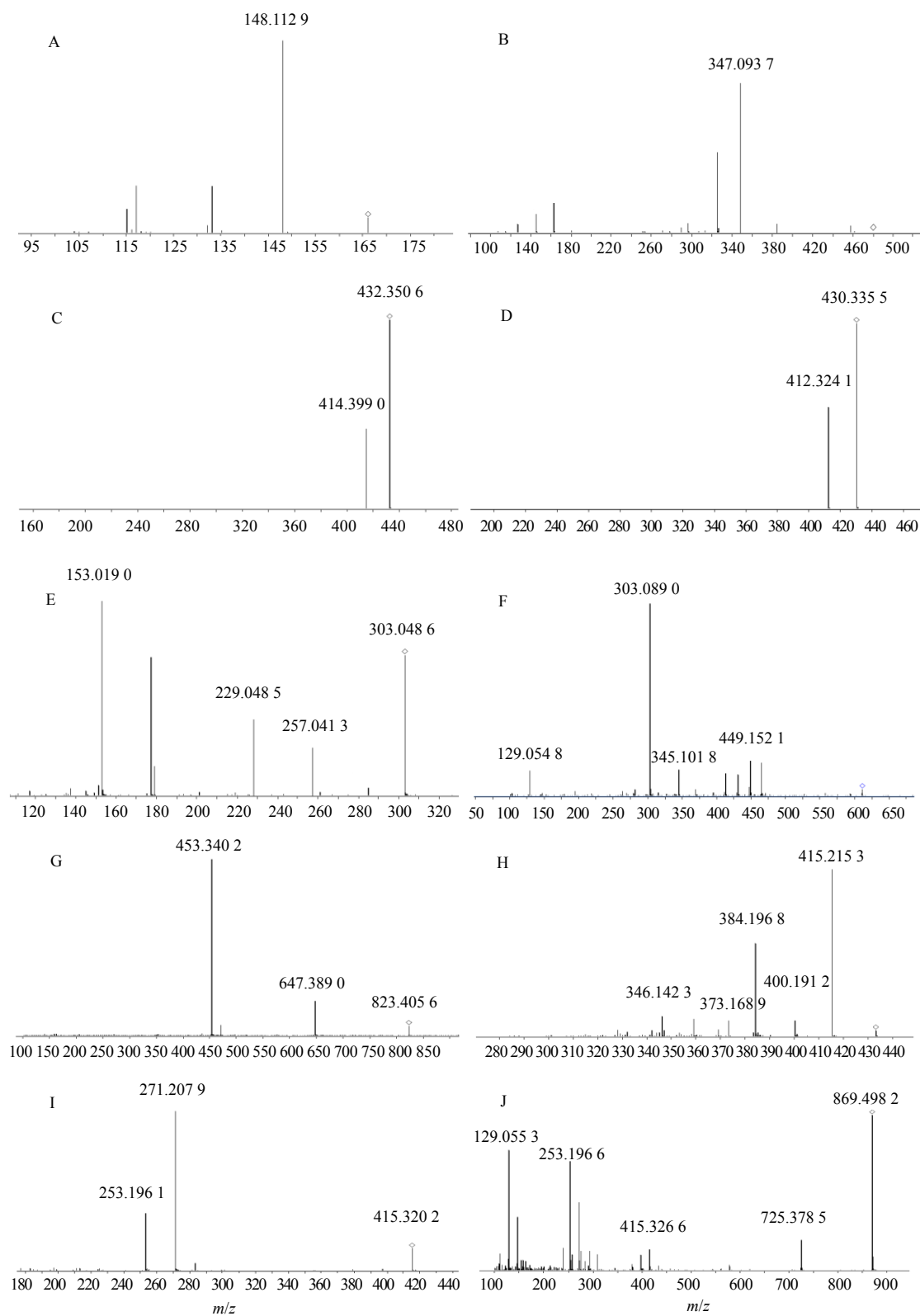


图 2 麻黄碱 (A)、苦杏仁苷 (B)、贝母素甲 (C)、贝母素乙 (D)、槲皮素 (E)、橙皮苷 (F)、甘草酸 (G)、五味子醇甲 (H)、薯蓣皂苷元 (I) 和薯蓣皂苷 (J) 的二级质谱图

Fig. 2 MS spectra of ephedrine (A), amygdalin (B), peimine (C), peiminine (D), quercetin (E), hesperidin (F), glycyrrhizic acid (G), schisandrin (H), diosgenin (I), and dioscin (J)

117 $[M+H-H_2O-CH_3-NH_2]^+$ 等碎片峰。9.275 min 的峰得到 m/z 为 148 $[M+H-H_2O]^+$ 、133 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$ 等碎片峰。根据元素组成分析,该两种化合物分子式为 $C_{10}H_{15}NO$, 相对分子质量理论值为 166.122 6, 实测值分别为 166.123 0、166.123 1。据此推测化合物分别为麻黄碱和伪麻黄碱,而根据出峰先后顺序与盐酸麻黄碱对照品比较,确定 8.611 min 的峰为麻黄碱,9.275 min 的峰为伪麻黄碱。

t_R 为 37.325、31.348、32.387 min 的 24、14、16 号峰在 ESI^+ 模式下得到 m/z 611 的离子峰。文献报道^[12-13]银杏叶和枳实中存在芦丁、橙皮苷、新橙皮苷,且相对分子质量为 610,推测 m/z 611 为其准分子离子峰。对 m/z 611 的离子峰进行 MS^2 分析,峰 24 得到 m/z 为 465 $[M+H-rha]^+$ 、303 $[M+H-rha-glc]^+$ 等碎片峰。峰 14 得到 m/z 为 465 $[M+H-rha]^+$ 、303 $[M+H-rha-glc]^+$ 等碎片峰。峰 16 得到 m/z 为 465 $[M+H-rha]^+$ 、303 $[M+H-rha-glc]^+$ 等碎片峰。根据元素组成分析,3 种化合物分子式分别为 $C_{27}H_{30}O_{16}$ 、 $C_{28}H_{34}O_{15}$ 、 $C_{28}H_{34}O_{15}$, 相对分子质量理论值分别为 611.160 7、611.197 0、611.197 0, 实测值分别为 611.160 2、611.201 1、611.199 8。据此推测峰 24 对应的化合物为芦丁,而根据出峰先后顺序与橙皮苷对照品比较,确定峰 14 的化合物为橙皮苷,峰 16 的化合物为新橙皮苷。

t_R 为 31.691、34.660 min 的 15、21 号峰在 ESI^+ 模式下均得到 m/z 581 的离子峰。文献报道^[14]枳实中存在芸香柚皮苷及柚皮苷,且相对分子质量均为 580,推测 m/z 581 为其准分子离子峰。对 m/z 581 的离子峰进行 MS^2 分析,15、21 号峰均得到 m/z 为 435 $[M+H-rha]^+$ 、273 $[M+H-rha-glc]^+$ 等碎片峰,说明二者是由相同苷元结合 1 个鼠李糖,1 个葡萄糖形成的糖苷,为同分异构体。根据元素组成分析,该 2 种化合物分子式均为 $C_{27}H_{32}O_{14}$, 相对分子质量理论值为 581.186 5,2 种化合物实测值分别为 581.192 4、581.189 1。根据出峰先后顺序与柚皮苷对照品比较,确定峰 15 的化合物为芸香柚皮苷,峰 21 的化合物为柚皮苷。

t_R 为 59.743 min 的 36 号峰在 ESI^+ 模式下得到 m/z 415、433、450 的离子峰。文献报道^[15]五味子中存在五味子醇甲,且相对分子质量为 432,推测 m/z 415、433、450 均为其准分子离子峰。对 m/z 415、433、450 的离子峰进行 MS^2 分析,均得到 m/z 为 415 $[M+H-H_2O]^+$ 、400 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$ 、384

$[M+H-H_2O-OCH_3]^+$ 、346 $[M+H-H_2O-C_5H_9]^+$ 等碎片峰。根据元素组成分析,该化合物分子式为 $C_{24}H_{32}O_7$, 因 3 个分子离子的碎片信息几乎完全相同,且保留时间几乎一致,推测 m/z 415 为五味子醇甲自然失去 1 分子 H_2O 所形成的分子离子, m/z 433 为五味子醇甲结合 H^+ 所形成的离子, m/z 450 为五味子醇甲结合 NH_4^+ 所形成的离子。3 种分子的相对分子质量理论值分别为 415.215 8、433.222 1、450.248 6, 实测值分别为 415.215 4、433.222 8、450.251 0。据此推测该化合物为五味子醇甲。

t_R 为 65.514 min 的 42 号峰在 ESI^+ 模式下得到 m/z 399、417 的离子峰。文献报道^[15]五味子中存在五味子醇乙,且相对分子质量为 416,推测 m/z 399、417 均为其准分子离子峰。对 m/z 399、417 的离子峰进行 MS^2 分析,均得到 m/z 为 399 $[M+H-H_2O]^+$ 、384 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$ 、368 $[M+H-H_2O-OCH_3]^+$ 、357 $[M+H-H_2O-C_3H_6]^+$ 、343 $[M+H-H_2O-C_4H_8]^+$ 等碎片峰。根据元素组成分析,该化合物分子式为 $C_{23}H_{28}O_7$, 因 2 个分子离子的碎片信息几乎完全相同,且保留时间几乎一致,推测 m/z 399 为五味子醇乙自然失去 1 分子 H_2O 所形成的分子离子, m/z 417 为五味子醇乙结合 H^+ 所形成的离子。2 种分子的相对分子质量理论值分别为 399.180 2、417.190 8, 实测值分别为 399.183 9、417.186 8。据此推测该化合物为五味子醇乙。

t_R 为 97.168、98.323、99.619 min 的 50、51、53 号峰在 ESI^+ 模式下分别得到 m/z 432、430、432 的离子峰。文献报道^[16]浙贝母中存在贝母甲素、贝母乙素及浙贝宁,且相对分子质量分别为 431、429、431,推测 m/z 432 为贝母甲素及浙贝宁准分子离子峰, m/z 430 为贝母乙素准分子离子峰。对 m/z 432 的离子峰进行 MS^2 分析,均得到 m/z 为 414 $[M+H-H_2O]^+$ 等碎片峰。对 m/z 430 的离子峰进行 MS^2 分析,得到 m/z 为 412 $[M+H-H_2O]^+$ 等碎片峰。根据元素组成分析,3 种化合物分子式为 $C_{27}H_{45}NO_3$ 、 $C_{27}H_{43}NO_3$ 、 $C_{27}H_{45}NO_3$, 相对分子质量理论值为 432.347 2、430.331 6、432.347 2, 实测值分别为 432.350 5、430.335 1、432.349 4。依据反相色谱柱的性质,极性大的物质较极性小的物质先出峰,贝母甲素相比贝母乙素多了 1 个羟基,极性大于贝母乙素,应于贝母乙素之前出峰,且文献报道^[16]中贝母甲素均与贝母乙素前出峰。因此,推测峰 50 的化合物为贝母甲素,峰 51 的化合物为贝母乙素,峰 53 的化合物为浙贝宁。

在分析银黄清肺胶囊的 HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 数据时可以发现,五味子木脂素类成分的共同质谱裂解规律:在正离子模式下,五味子中木脂素类成分会在结构的 8 元环上产生一种 α 裂解与 β 裂解相结合的一种裂解方式。以五味子甲素为例,五味子甲素的裂解途径见图 3。此外,在分析数据过程中,还可以发现,苷元类成分易于 3 号

位失去功能团,因为 3 号位最易结合功能团也最易失去功能团,如失去 -OH 等^[17]。而五味子醇甲和五味子醇乙分子在质谱正离子模式下均极易失去 1 分子 H_2O ,黄酮苷类及苷元类成分易发生 RDA 裂解,而三萜类成分由于多为芳香体系,环系多,分子结构紧密,几乎很难打碎母核得到碎片,一般裂解主要发生于取代基或者侧链结构上。

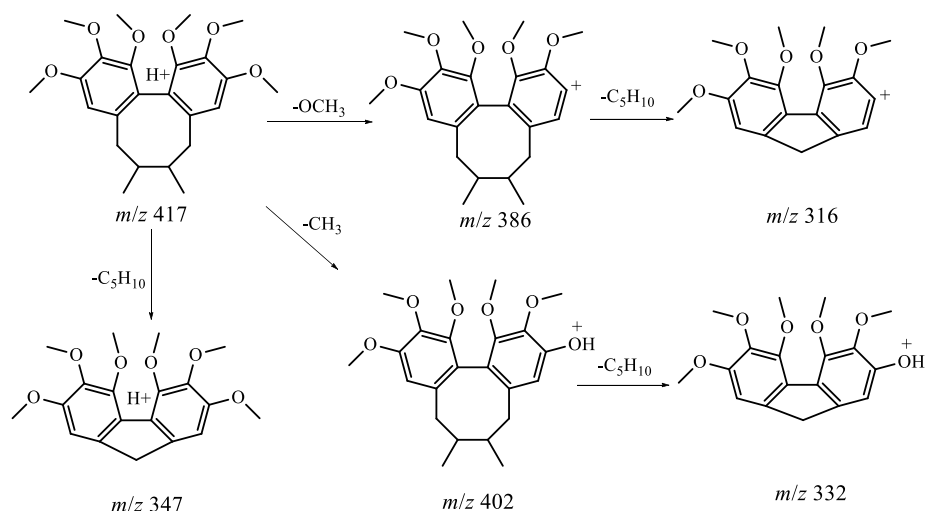


图 3 五味子甲素的可能裂解途径

Fig. 3 MS fragment pathway of deoxyschizandrin

3 讨论

本实验首次采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 联用技术,对银黄清肺胶囊的体外物质基础进行了研究。通过获得化合物精确相对分子质量,分析裂解规律,对银黄清肺胶囊中的化学成分进行测定,鉴定出 54 种银黄清肺胶囊中可能含有的化学成分,其中麻黄碱、橙皮苷、柚皮苷等成分通过与对照品对照进行确认,其他化学成分则通过二级质谱 (MS/MS) 联用所提供的结构信息通过解析化合物质谱裂解规律与查阅相关文献相结合的方式加以确认。

采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 联用技术对银黄清肺胶囊分别进行了正负离子模式的测定,结果表明银黄清肺胶囊中主要化学成分在正离子模式下响应良好,而在负离子模式下几乎没有响应,因此本研究选择使用正离子模式对银黄清肺胶囊进行测定。

在 ESI 正离子模式下,银黄清肺胶囊共检测到 96 种量较高的化合物,其中鉴定出 54 种化合物,各味药材的主要成分基本都获得了鉴定。其中 4 种化合物来源于麻黄,1 种化合物来源于苦杏仁,6

种化合物来源于浙贝母,6 种化合物来源于银杏叶,1 种化合物来源于枇杷叶,1 种化合物来源于一枝蒿,6 种化合物来源于穿山龙,10 种化合物来源于甘草^[18],8 种化合物来源于五味子,11 种化合物来源于枳实。其中石菖蒲由于主要为挥发性成分,采用液相色谱质谱联用并未检测到属于石菖蒲的化学成分。

本实验使用 HPLC-ESI-MS 技术,对银黄清肺胶囊的化学组成进行了初步的探索,并研究了几类化合物在 ESI-MS 中的裂解行为,为进一步研究银黄清肺胶囊的药效物质基础及作用机制提供了理论依据。

参考文献

- [1] 乔怀耀, 罗 荣, 吴 娟, 等. 舒肝解郁胶囊的 UPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 208-213.
- [2] 李素云, 李 峥, 李敬来, 等. 槲皮素及其糖类衍生物的研究进展 [J]. 解放军药学学报, 2011, 27(6): 540-543.
- [3] 乔 颖, 温 静, 宋 洋, 等. 基于 UPLC-PDA-MS/MS 技术的四逆散水煎液体外物质基础研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(11): 1672-1676.
- [4] 郭 戎, 束 艳, 张 丽, 等. 四逆散化学成分的

- UPLC-ESI/MS 分析 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(22): 3114-3118.
- [5] 夏丽文, 彭丽萍, 杨东华, 等. 超高效液相色谱-电喷雾飞行时间质谱分析五味子化学成分 [J]. 中医药信息, 2012, 29(4): 27-30.
- [6] 李锐, 黄胜雄, 周燕, 等. 穿龙薯蓣化学成分的液相色谱-质谱联用分析 [J]. 分析测试学报, 2004, 23(增刊): 89-92.
- [7] Xu L, Liu Y T, Wang T, *et al.* Development and validation of a sensitive and rapid non-aqueous LC-ESI-MS/MS method for measurement of diosgenin in the plasma of normal and hyperlipidemic rats: A comparative study [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877 (14/15): 1530-1536.
- [8] 黄鑫, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 五味子中木脂素类成分的高效液相色谱-电喷雾质谱研究 [J]. 化学学报, 2008, 66(9): 1059-1066.
- [9] 窦志华, 罗琳, 安莉萍, 等. 五味子乙醇提取物的 UPLC-MS/MS 分析 [J]. 医药导报, 2013, 32(2): 239-241.
- [10] 罗艺, 白钢, 罗国安, 等. 治咳川贝枇杷滴丸 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 19040-1944.
- [11] 孟翔宇, 宋凤瑞, 刘志强, 等. 麻黄中主要化合物的串联质谱研究 [J]. 质谱学报, 2006, 27(增刊): 55-56.
- [12] 夏晓晖, 张宇, 郝砚彬, 等. 银杏叶化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(9): 100-104.
- [13] 贾强, 白杨, 马燕, 等. 枳壳和枳实化学成分的 HPLC-ESI-MS 分析 [J]. 中草药, 2005, 36(2): 169-172.
- [14] 高雁, 李廷利, 等. 五味子有效成分的药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2011, 39(6): 104-106.
- [15] 王爱潮, 祁东利, 罗配, 等. 温胆汤 UPLC-UV-MS/MS 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2014, 45(32): 3408-3413.
- [16] 周建良, 刘伟, 郭增喜, 等. 基于快速液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱的浙贝母特征图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2832-2837.
- [17] Shang Y, Ma Y H, Zhou Y, *et al.* Biosynthesis, regulation, and domestication of bitterness in cucumber [J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1084-1088.
- [18] LC-Q-TOF-MS 及 LC-IT-MS 分析酸枣仁汤的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 457-465.