

UHPLC/MSⁿ 质谱树技术与 Q/TOF 联用在利舒康胶囊成分鉴定中的应用

郭晓敏¹, 程捷恺², 张明², 李丹¹, 曹忠莲¹, 杨萍^{1*}

1. 复旦大学药学院 分析测试中心, 上海 201203

2. 青海益欣药业公司, 青海 西宁 810003

摘要: 目的 建立 UHPLC/MSⁿ 质谱树技术与 Q/TOF 联用的方法, 对中药复方制剂利舒康胶囊成分进行快速识别和鉴定。方法 以含有 0.5% 乙酸的甲醇-水 (3:1) 混合溶液作为提取液制备供试液, 采用 Thermo Synchronis C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 分离, 以乙腈-甲醇 (1:1) -0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 线性离子阱质谱采用正、负离子同时扫描模式并进行多级质谱碎裂, Q/TOF 高分辨质谱分别采用正、负离子扫描模式并进行二级质谱碎裂。结果 在线性离子阱正、负离子多级质谱树的验证下, 高分辨质谱在中药复方制剂利舒康胶囊中同时确认出生物碱类、黄酮类、三萜类、有机酸类、苯丙素类等各种电离模式下响应的小分子化合物, 22 个成分经与对照品比对而准确鉴定。结论 UHPLC-Q/TOF 高分辨质谱与 UHPLC/MSⁿ 质谱树推导技术的联用可以快速鉴定复杂体系中的化学成分, 同时也为该复方制剂的质量评价指标选择和药效物质研究奠定了基础。

关键词: 利舒康胶囊; Q/TOF 高分辨质谱; UHPLC/MSⁿ 质谱树; 生物碱类; 黄酮类; 三萜类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-1944-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.004

Application of UHPLC/MSⁿ spectral tree combined with Q/TOF in chemical profiling of Lishukang Capsules

GUO Xiao-min¹, CHENG Jie-kai², ZHANG Ming², LI Dan¹, CAO Zhong-lian¹, YANG Ping¹

1. Analytical and Testing Center, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

2. Qinghai Yixin Pharmaceutical Co., Ltd., Xining 810003, China

Abstract: Objective To develop a method for the rapid identification of the components in Lishukang Capsules with UHPLC/MSⁿ and Q/TOF. **Methods** The extraction solution was prepared by mixing methanol-water (3:1) and containing 0.5% acetic acid, and the components were separated on a Thermo Synchronis C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with gradient elution using acetonitrile: menthol (1:1, A) and water containing 0.5% acetic acid (B) as mobile phase. Linear ion trap mass spectrometry was performed in the positive and negative ion scan mode simultaneously with acquiring MSⁿ product ion. The Q/TOF high resolution mass spectrometry was performed in the positive and negative ion scan mode respectively and acquiring secondary mass spectrometry fragmentation. **Results** The constituents were identified by high resolution mass spectrometry combined with the multistage spectral-tree technique. With the standard reference substances, 22 components including alkaloids, flavonoids, triterpenes, organic acids and phenylpropanoids in complex natural products were confirmed. **Conclusion** The combination of UHPLC-Q/TOF and UHPLC/MSⁿ spectral-tree could rapidly profile the chemical constituents in complex system. This technique also can be used for the quality evaluation and efficacy material research.

Key words: Lishukang Capsules; Q/TOF high resolution mass spectrometry; UHPLC/MSⁿ spectral-tree; alkaloids; flavonoids; triterpenes

藏药是极具民族特色的传统药物, 藏药利舒康胶囊处方来源于高原地区民间, 以 4 味藏药手掌参、甘青青兰、红景天、烈香杜鹃辅以黄柏、甘草提取

制成。其具有改善睡眠、增强体力和防治高原病等临床作用, 是国家最早批准临床使用的传统中药复方制剂之一, 原标准收载于《国家中成药标准汇编》

收稿日期: 2017-03-16

作者简介: 郭晓敏 (1981—), 女, 科研助理, 研究方向为质谱分析及应用研究。Tel: (021)51980027 E-mail: guoxiaomin4081@163.com

*通信作者 杨萍 (1968—), 女, 高级工程师, 研究方向为中药质量评价及药效物质基础研究。Tel: (021)51980027 E-mail: yangping@fudan.edu.cn

内科气血津液科气血津液分册^[1], 文献报道中仅有对其盐酸小檗碱和黄柏的定量测定方法^[2]。但是该复方制剂成分复杂, 许多成分未知, 严重影响临床使用和质量控制。

液质联用技术以其超高的分离分析能力在中药复杂体系分析方面得到了广泛的应用, 尤其是高分辨质谱联用仪由于分辨率高、质量准确度高、灵敏度高、采集速度快、能够多种扫描和碎裂方式结合等特点, 在对未知物结构鉴定中发挥了不可或缺的作用。有研究采用高效液相色谱-电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱法(HPLC-Q/TOF-MS)对新疆大花红景天根茎中的化学成分进行了分离鉴定, 确定了红景天苷、红景天素、大花红景天苷等12个主成分^[3]; 烈香杜鹃主要集中在GC-MS对其挥发油成分的研究^[4], 以及熊果酸、齐墩果酸等几种三萜类成分的研究^[5]; 手掌参的氨基酸^[6]、木脂素类、芳香酸(醛、醇)衍生物酚苷类、酰胺类等成分^[7], 以及多糖的研究^[8]; 甘青青兰黄酮类、酚性类成分的研究^[9]等, 6味藏药提取制成的利舒康胶囊的成分鉴定则未见报道。

Q/TOF高分辨质谱联用仪在未知成分鉴定中优势突出, 但因为校正需要, 部分仪器在多组分分析中不能兼顾正离子响应(如生物碱等)和负离子响应成分(如有机酸等)的同时检测, 且在鉴定分析中产生的二级质谱碎片离子来源复杂, 难以按 $MS^1 \rightarrow MS^2 \rightarrow MS^3 \dots$ 进行逐级逻辑归属。本研究介绍基于LTQ XL线性离子阱采集的Mass Frontier质谱树解析技术在复杂中药体系利舒康胶囊成分鉴定中对高分辨质谱的补充应用。利舒康胶囊是多种提取方式获得的性质各异的天然成分并存的复方制剂, 分析鉴定难度较高, UHPLC/MSⁿ质谱树解析技术依赖于Mass Frontier应用程序, 该程序对MSⁿ质谱图采用树形数据结构。多级质谱树像结构“指纹”一样反映了MSⁿ实验中的分级质谱图的相关性, 给定节点的平行子离子质谱图可能来自任意母离子, 包括以各种碰撞能量和分离宽度采集的质谱图或提高化合物识别重现性的其他质谱图, 其在预测碎片和自动注释质谱图, 以及执行组分检索和碎片离子检索等方面, 对高分辨质谱在中草药复杂体系中的分析鉴定研究具有独特的补充作用。

1 仪器与材料

安捷伦1290超高效液相色谱仪串联ABSCIEX Triple TOF 5600⁺高分辨质谱系统, analyst[®]TF1.6

工作站; UltiMate 3000二元超高效液相色谱仪串联thermo LTQ XL高性能线性离子阱质谱仪; 5200DA超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司), 梅特勒ME 204E电子天平(万分之一, 梅特勒-托利多国际贸易有限公司), VORTEX-GENIE-2涡旋振荡器(美国Scientific Industries公司)。

乙腈、甲醇(色谱纯, 美国Fisher公司); 甲酸(色谱纯, 德国Merck公司); 水为Milli-Q系统纯化水(美国Millipore公司), 其余试剂为分析纯。

对照品儿茶素(质量分数96%, 批号BCBL6259V)、丁香酸(质量分数95%, 批号BCBL3337V)、对香豆酸(质量分数98%, 批号BCBN0412V)、槲皮素(质量分数95%, 批号SLBK4625V)购自Sigma公司; 没食子酸(质量分数98%, 批号11-2001)、红景天苷(质量分数97.5%, 批号08-1001)、绿原酸(质量分数98%, 批号25-1004)、阿魏酸(质量分数99.6%, 批号08-2001)、异甘草苷(质量分数98%, 批号17-1024)、甘草苷(质量分数98%, 批号05-1016)、芦丁(质量分数98%, 批号05-1001)、金丝桃苷(质量分数98%, 05-1007)、槲皮苷(质量分数98%, 批号05-1011)、鞣花酸(质量分数98%, 批号08-2005)、木犀草素(质量分数98%, 批号05-2008)、异鼠李素(质量分数98%, 批号05-2003)、甘草酸(质量分数93%, 批号07-1007)、小檗碱(质量分数98%, 批号21-003)、齐墩果酸(质量分数98%, 批号07-2004)、熊果酸(质量分数98%, 批号07-2001)、黄柏碱(质量分数98%, 批号16-2002)购自上海中药标准化研究中心; 药根碱(质量分数98%, 批号BBP60009)购自云南西力生物技术有限公司。

利舒康胶囊由青海益欣药业公司提供, 批号20150201, 执行国家药品标准, 质量标准号为WS-10677(ZD-0677)-2002-2012Z。

2 实验方法

2.1 质谱条件

高分辨质谱条件: Triple TOF 5600⁺四极杆飞行时间质谱仪采用电喷雾离子化(ESI)源, 扫描模式: 正离子模式, 喷雾电压(IS): 5 500 V, 离子化温度(TEM): 550 °C; 雾化气(GS1): 345 Pa; 辅助加热气(GS2): 414 kPa; 气帘气(CUR): 241 kPa; 去簇电压: 552 kPa, 碰撞能量(CE): 40 eV; 扫描模式: 负离子模式, 喷雾电压(IS): -4 500 V, 离子化温度(TEM): 450 °C; 雾化气(GS1): 345 kPa;

辅助加热气 (GS2): 414 kPa; 气帘气 (CUR): 241 kPa; 去簇电压: 552 kPa, 碰撞能量 (CE): -40 eV。一级质谱采集范围 m/z 100~1 200, 累积时间 250 ms, 二级质谱采集范围为 m/z 50~1 200, 累积时间 80 ms, 碰撞能量叠加 (CES): 15 eV。

高性能线性离子阱质谱条件: 可加热的电喷雾离子源 (HESI); 毛细管温度: 275 °C; 鞘气 (N_2) 流量 10.5 L/min; 辅助气 (N_2) 流量 0.15 L/min; 正离子模式: 喷雾电压: 3.2 kV; 毛细管电压: 25 V; 管透镜电压 (tube lens): 100 V; 负离子模式: 喷雾电压: 2.2 kV; 毛细管电压: -18 V; 管透镜电压 (tube lens): -100 V。正、负离子模式采集数据, 全扫质量范围: m/z 110~1 200; 多级质谱采用动态数据依赖扫描 (data-dependent scan), 选取上一级最高峰离子进行下级碎裂并进行动态排除, 以减少重复扫描。诱导碰撞解离 (CID) 碰撞能量为 35%, 其他参数为默认值。

2.2 色谱条件

色谱柱: Thermo Synchronis C_{18} 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m; 美国 Thermo 公司)。流动相 A 为水 (含 0.1% 甲酸), B 为乙腈-甲醇 (1:1) 混合液。洗脱梯度: 0~13 min, 10%~24% B; 13~20 min, 24%~30% B; 20~24 min, 30%~35% B; 24~30 min, 35%~50% B; 30~33 min, 50%~55% B;

33~40 min, 55%~85% B, 保持至 45 min; 45~46 min, 85%~95% B, 保持至 50 min。体积流量 0.35 mL/min; 柱温 30 °C; 样品室温度 4 °C; 进样量 2 μ L。

2.3 样品制备

2.3.1 利舒康样品的制备 称取 100 mg 利舒康粉末于 10 mL 离心管中, 加入 6 mL 含有 0.5% 乙酸的甲醇-水 (3:1) 混合溶液, 涡旋 3 min, 超声提取 30 min, 静置至室温, 取上清液过 0.22 μ m 滤膜, 待分析。

2.3.2 对照品溶液的制备 分别精密称定适量对照品, 用甲醇分别配制成 1 mg/mL 的对照品储备液, 置于 4 °C 冰箱保存。使用时根据需要用提取液稀释得对照品工作液。

3 结果与分析

研究流程见图 1。按照“2.3.2”项方法制备混合对照品溶液, 按“2.1”及“2.2”项下的色谱及质谱条件, 用 Triple TOF 5 600⁺ 高分辨质谱仪正、负离子模式分别采集混合对照品数据, 与样品数据进行比对; 用 LTQ XL 高性能线性离子阱质谱仪采集混合对照品和胶囊样品数据, 同时获得了正离子、负离子和多级质谱数据, 在 Mass FrontierTM 中, 提取各个化学成分离子树及多级质谱数据; Triple TOF 5600⁺ 高分辨质谱系统采集利舒康胶囊样品数据, Analyst TF 1.6 和 Peakview (Version 1.2, AB SCIEX) 软件

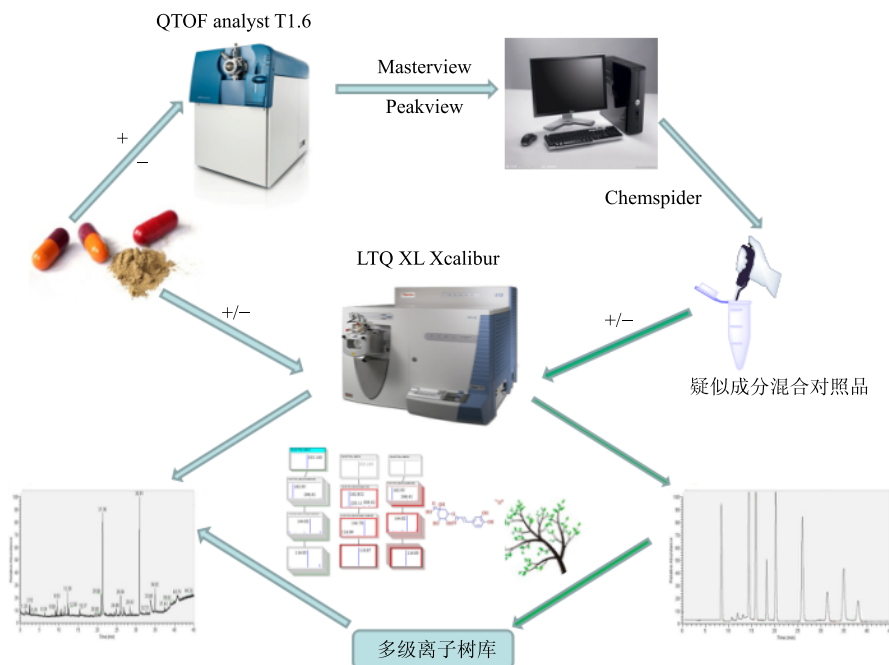


图 1 UHPLC/MSⁿ 质谱树技术与 Q/TOF 联用在利舒康胶囊成分鉴定中的应用流程

Fig. 1 Flow chart on use of UHPLC/MSⁿ spectral tree combined with Q/TOF in chemical profiling of Lishukang Capsule

对提取物的质谱数据进行处理。依据测定相对分子质量与理论精确相对分子质量的偏差小于 5×10^{-6} ，及同位素配比偏差小于 10% 的原则，确定各色谱峰对应化合物的分子式，通过 Chemspider 数据库对该系列化合物进行检索，得到利舒康胶囊中潜在的化学成分，并从可能的裂解和重排机理方面对高分辨预测的化学成分进一步确证。

3.1 高分辨质谱分析

利舒康样品按照“2.3.1”项下制备方法提取处理，混合对照品溶液按照“2.3.2”项下方法制备，在“2.1”和“2.2”项的色谱及质谱条件下，分别获得高分辨质谱一级及二级全扫数据，样品及混合对照品质谱图见图 2，推断可能的化学成分，结果见表 1。为不丢失成分，Q/TOF 按照“2.1”和“2.2”项下方法在正、负离子模式下分别采集，图 2-B-正离子模式中 17'，17'' 分别为图 2-B-负离子模式中 10、11、14 碎片离子苷元槲皮素的提取峰，图 2-B-负离子模式下则没有找到小檗碱、黄柏碱、药根碱

3 种成分。

3.2 UHPLC/MSⁿ 质谱树对照品验证

使用高性能线性离子阱质谱仪，按照“2.1”项中高性能线性离子阱质谱条件及“2.2”项中色谱条件，采用正、负离子同时监测模式、全扫描及自动触发多级质谱扫描的功能，分别采集利舒康样品与混合对照品溶液数据，提取每个对照品的多级离子树数据，并建立利舒康预测化学成分复合质谱数据库，再将采集的利舒康样品数据与该库条目匹配，结合保留时间查看匹配的库条目，利用 Mass Frontier Fragmentation LibraryTM (Mass Frontier 碎片库) 预测化学结构可能的裂解途径和重排机理，以进一步确认利舒康样品中的对照品成分。

选取了典型正离子响应与典型负离子响应同时检测的多级结果分析 (图 3~4)，以及通过逐级丢失糖后碎裂成槲皮素苷元判断系列成分 (图 5)，2 组同分异构体的多级鉴别 (图 6~9) 等作为典型结果分别进行分析。

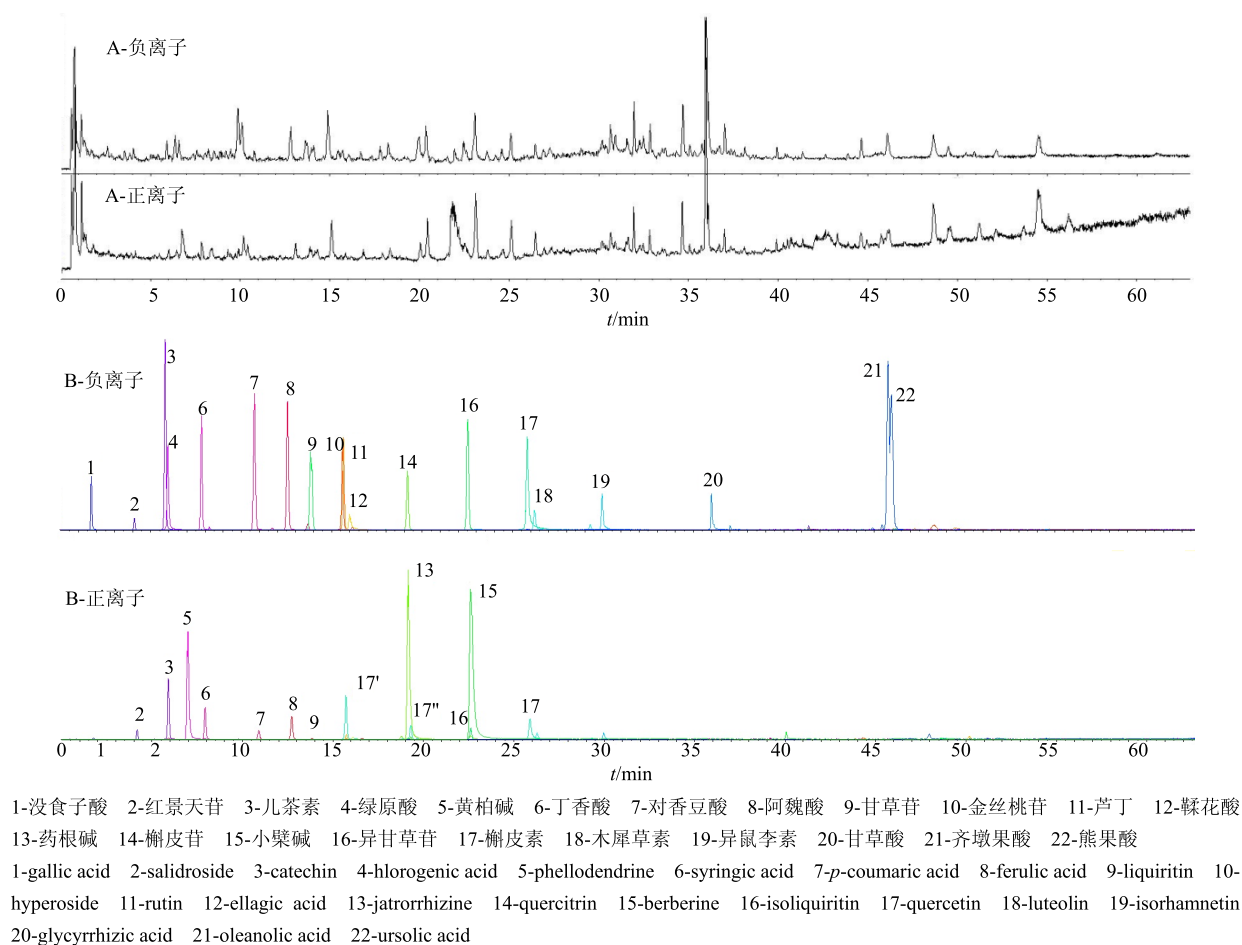


图 2 利舒康样品高分辨质谱总离子流图 (A) 和疑似成分混合对照品高分辨质谱 EIC 图 (B)

Fig. 2 Q/TOF total ion chromatogram of Lishukang Capsules (A) and extracted ion chromatogram of mixed standard sample (B)

表 1 利舒康胶囊的高分辨质谱化学成分鉴定

Table 1 Identification of chemical constituents from Lishukang Capsules with Q/TOF

峰号	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	碎片离子	一级误差 ($\times 10^{-6}$)	二级误差 MS/MS ($\times 10^{-6}$)	同位素比例偏差/%	模式	分子式	推测成分
1	169.014 3	1.706	125.025 2, 97.030 1, 83.013 1, 79.020 1	3.3	15.6	0.7	—	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸
2	299.113 6	4.093	179.047 8, 137.060 3, 119.050 6, 89.025 3	1.0	25.4	1.2	—	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	红景天苷
3	289.071 8	5.793	245.081 5, 203.071 2, 187.038 2, 161.060 2	0.6	*	3.3	—	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	儿茶素
4	353.087 8	5.937	191.050 7, 173.046 2, 135.045 9, 93.035 9	2.2	5.2	0.7	—	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸
5	342.170 1	6.800	192.101 8, 178.081 3, 149.080 8	0.2	12.5	2.9	+	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	黄柏碱
6	197.045 6	7.801	182.021 6, 166.998 7, 152.900 9, 137.024 6, 123.008 3, 95.014 0	0.6	7.8	1.4	—	C ₉ H ₁₀ O ₅	丁香酸
7	163.040 1	10.733	119.051 4, 104.027 7, 93.036 0, 72.935 5	3.6	11.1	1.1	—	C ₉ H ₈ O ₃	对香豆酸
8	193.050 6	12.562	178.023 7, 149.059 8, 115.015 1	0.8	26.8	0.6	—	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸
9	417.119 1	13.858	255.066 3, 135.009 0, 119.050 6, 91.020 2	2.9	6.4	1.4	—	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	甘草苷
10	463.088 2	15.597	300.028 6, 271.025 4, 254.025 4, 178.997 7, 151.003 5	3.1	9.2	0.9	—	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷
11	609.146 1	15.659	300.029 4, 179.001 8, 151.003 2	4.1	8.3	1.2	—	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁
12	300.999 0	16.005	257.011 2, 229.012 2, 185.022 6, 145.029 1	0.9	13.8	2.6	—	C ₁₄ H ₆ O ₈	鞣花酸
13	338.139 0	18.910	322.107 4, 308.091 5, 294.112 6, 279.088 7, 265.072 7, 251.092 0, 222.091 7	1.0	4.3	2.7	+	C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ ⁺	药根碱
14	447.093 3	19.194	285.041 3, 256.036 8, 151.002 0, 133.027 5	2.3	3.8	2.3	—	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	槲皮苷
15	336.123 0	21.890	320.091 1, 306.075 9, 292.096 3, 278.080 6, 262.086 2, 234.090 8	0.6	1.5	2.1	+	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺	小檗碱
16	417.119 1	22.526	255.068 2, 148.016 9, 135.009 1, 119.050 4, 91.021 3	4.1	6.1	1.4	—	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	异甘草苷
17	301.035 4	25.815	178.998 5, 151.004 0, 107.014 3, 83.016 0	1.3	7.4	1.2	—	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	槲皮素
18	285.040 5	26.221	133.029 4, 107.014 5, 83.014 9	0.5	4.1	9.1	—	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素
19	315.051 0	29.951	300.028 5, 255.029 8, 151.003 2, 107.014 3	1.2	5.0	1.6	—	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	异鼠李素
20	821.396 5	35.998	645.374 5, 351.060 4, 193.036 2, 113.025 0	11.8	11.1	2.3	—	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	甘草酸
21	455.353 1	45.762	281.234 1, 143.900 0, 83.026 6	4.7	13.1	3.5	—	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	齐墩果酸
22	455.353 1	45.945	424.138 5, 412.245 9, 394.228 2, 281.234 1, 143.900 0, 83.026 6	4.6	13.1	3.5	—	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	熊果酸

正离子和负离子分别采集：其中 5、13、15 负离子模式无信号，2、11、20 正离子模式为加 Na 峰；*无 MS/MS 数据

Positive and negative ions were collected respectively: 5, 13, 15 negative ion mode with no signal, 2, 11, 20 positive ion mode for addition of Na peak;

*lack of MS/MS data

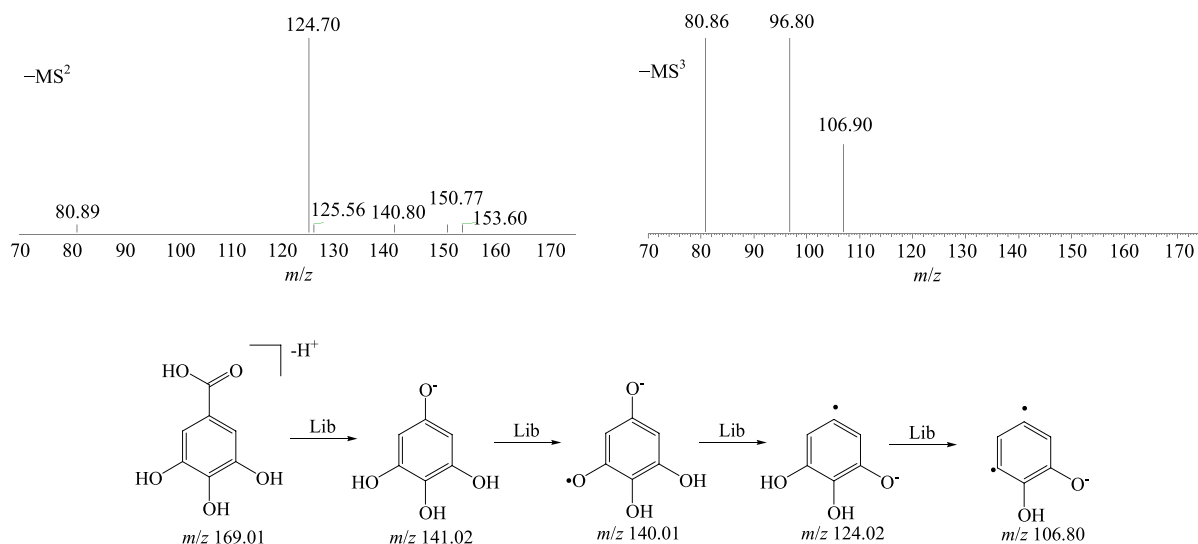


图 3 峰 1 (没食子酸) 的多级质谱和裂解途径

Fig. 3 MS^n spectra and possible fragmentation pathway for peak 1 (gallic acid)

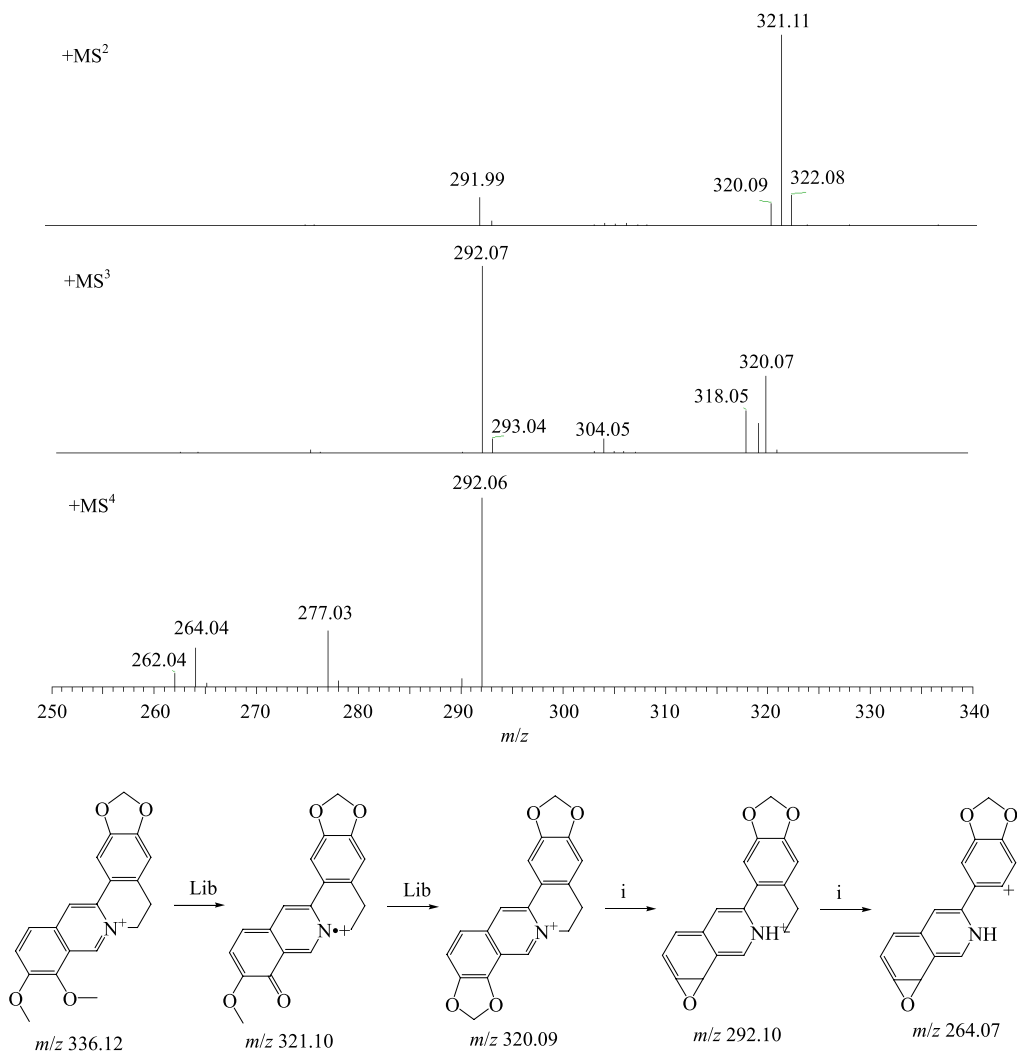


图 4 峰 15 (小檗碱) 的多级质谱和裂解途径

Fig. 4 MS^n spectra and possible fragmentation pathway for peak 15 (berberine)

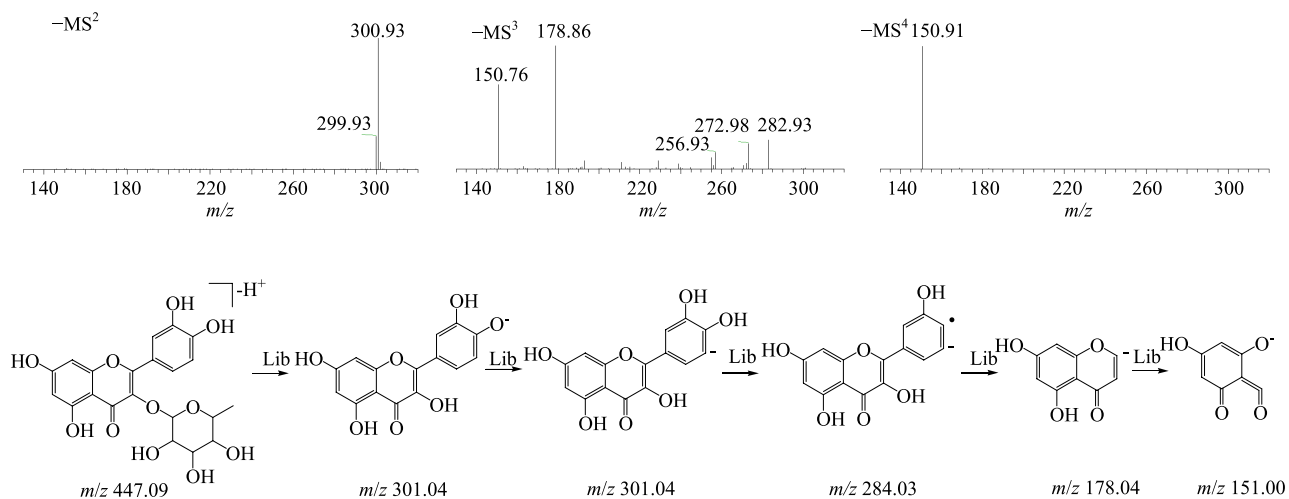


图 5 峰 14 (槲皮苷) 的多级质谱和裂解途径

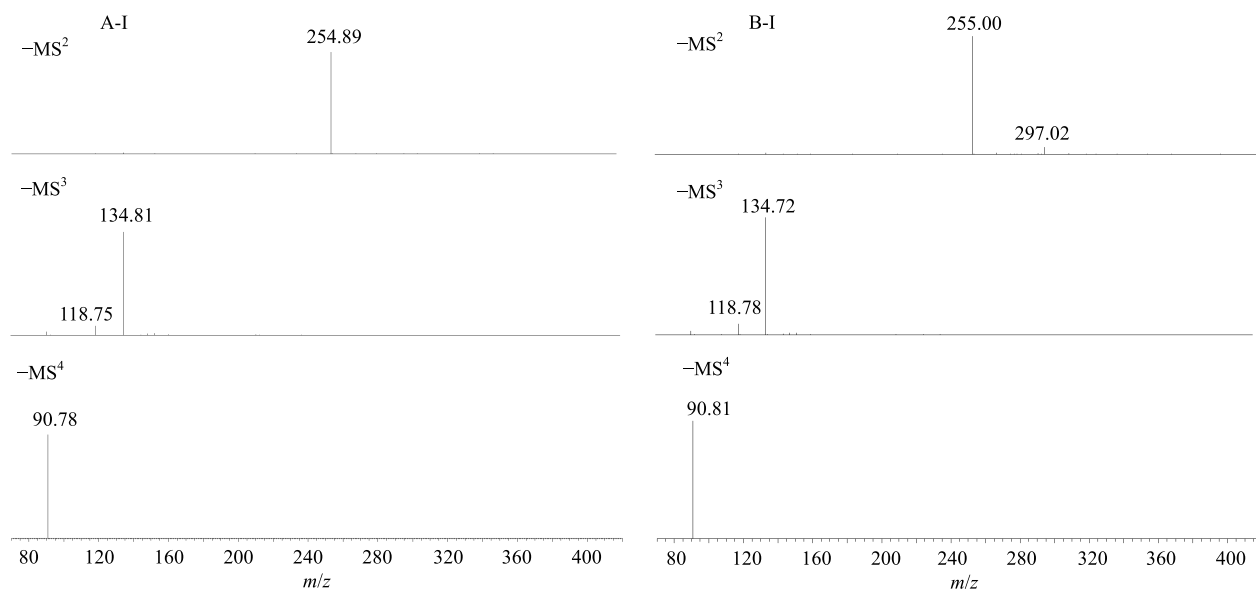
Fig. 5 MS^n spectra and possible fragmentation pathway for peak 14 (quercitrin)

图 6 峰 9 (甘草苷, A)、峰 16 (异甘草苷, B) 的负离子多级质谱 (I) 和裂解途径 (II)

Fig. 6 MS^n spectra (I) and possible fragmentation pathway (II) for peak 9 liquiritin (A) and peak 16 isoliquiritin (B) (NEG)

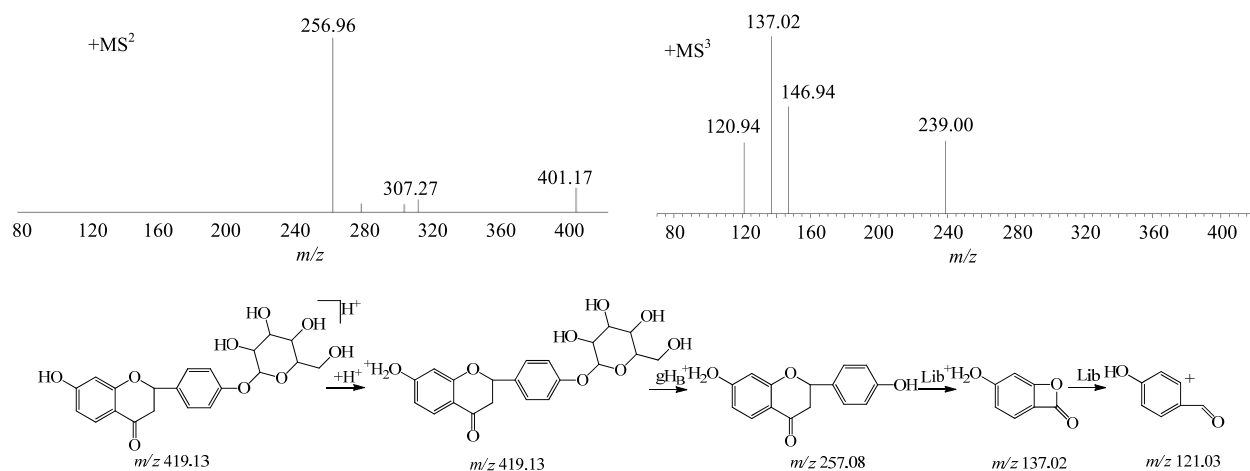


图 7 峰 9 (甘草苷) 的正离子多级质谱和裂解途径

Fig. 7 MS^n spectra in positive mode and possible fragmentation pathway for peak 9 (liquiritin)

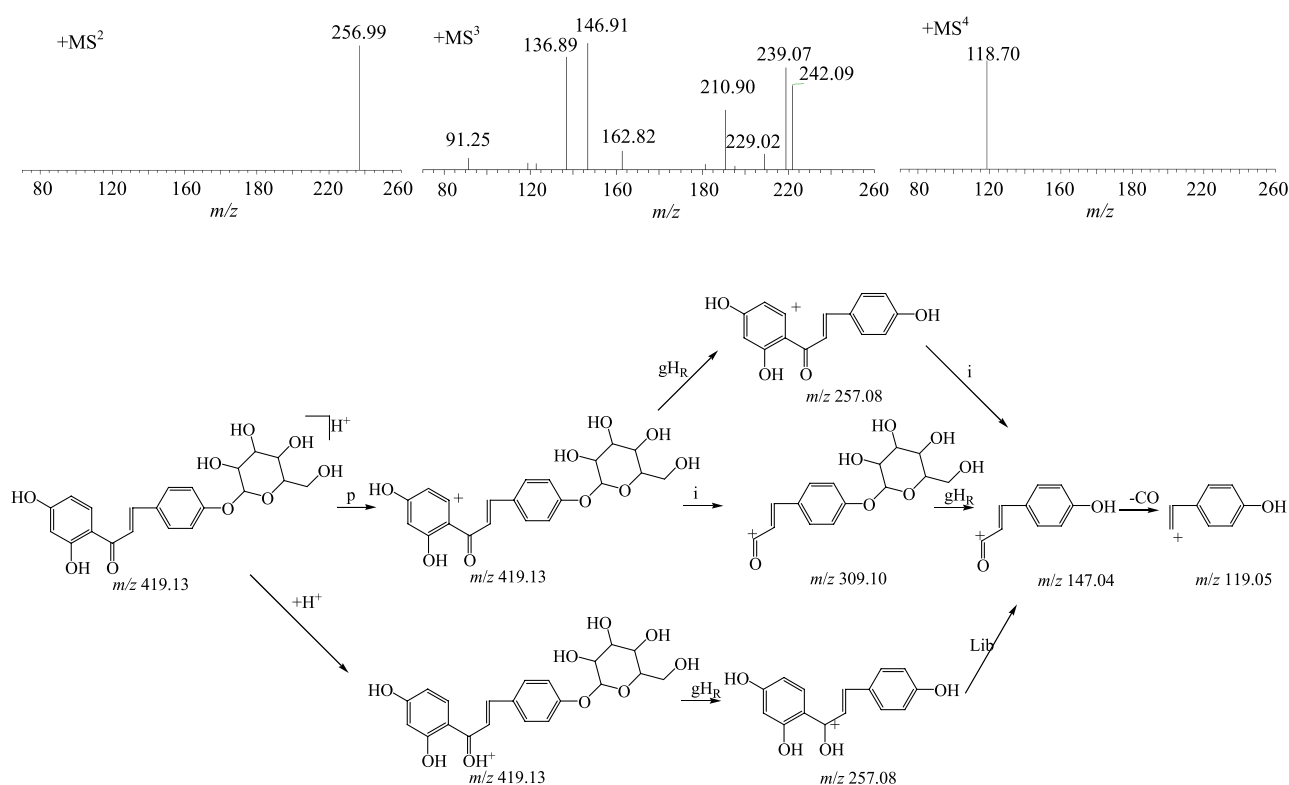
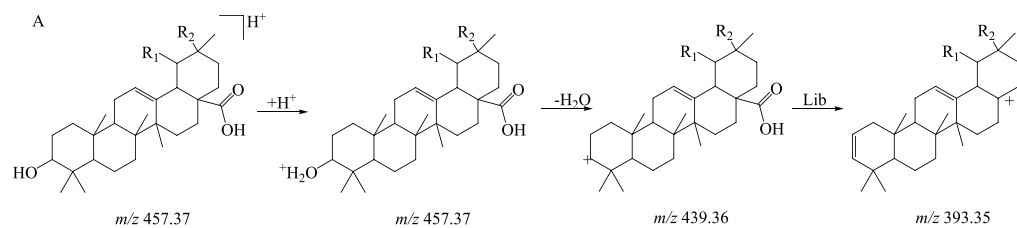
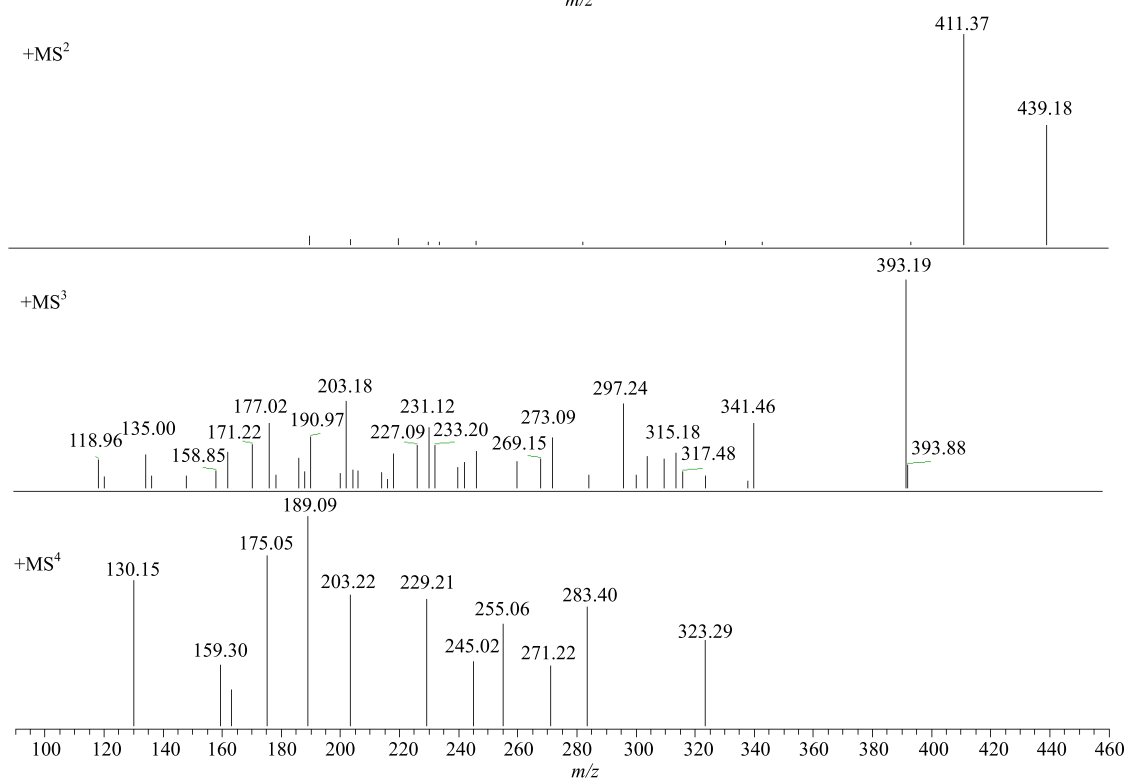
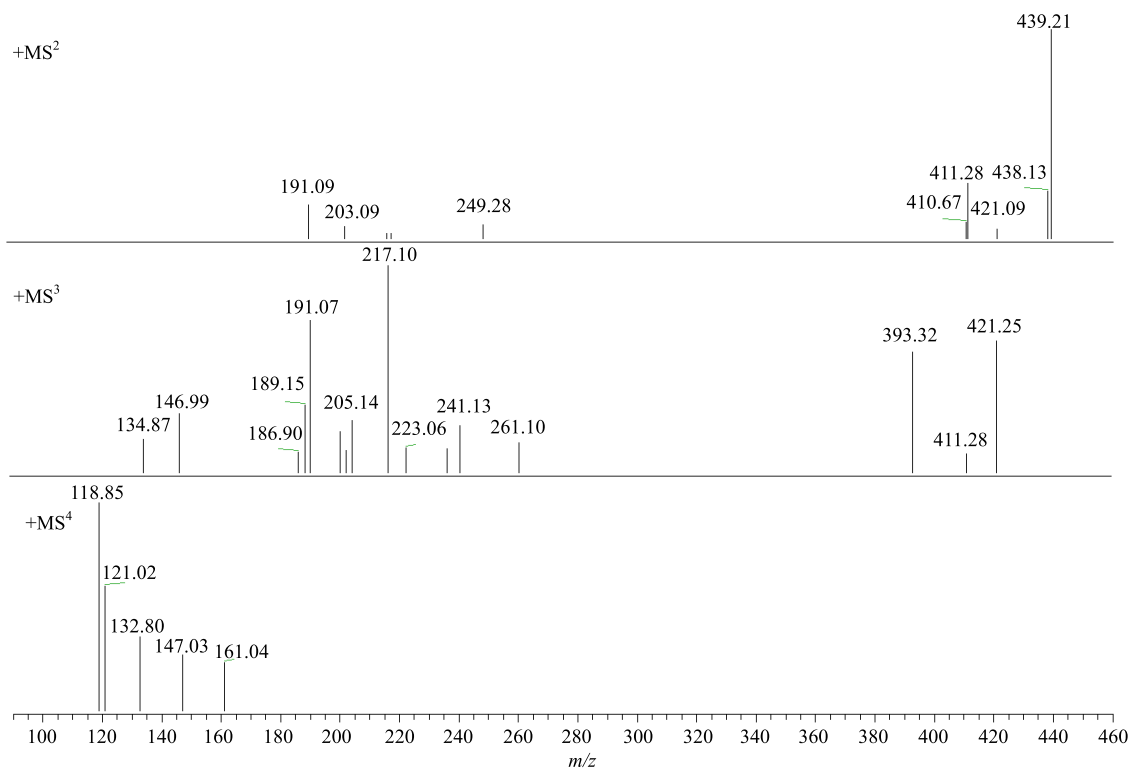


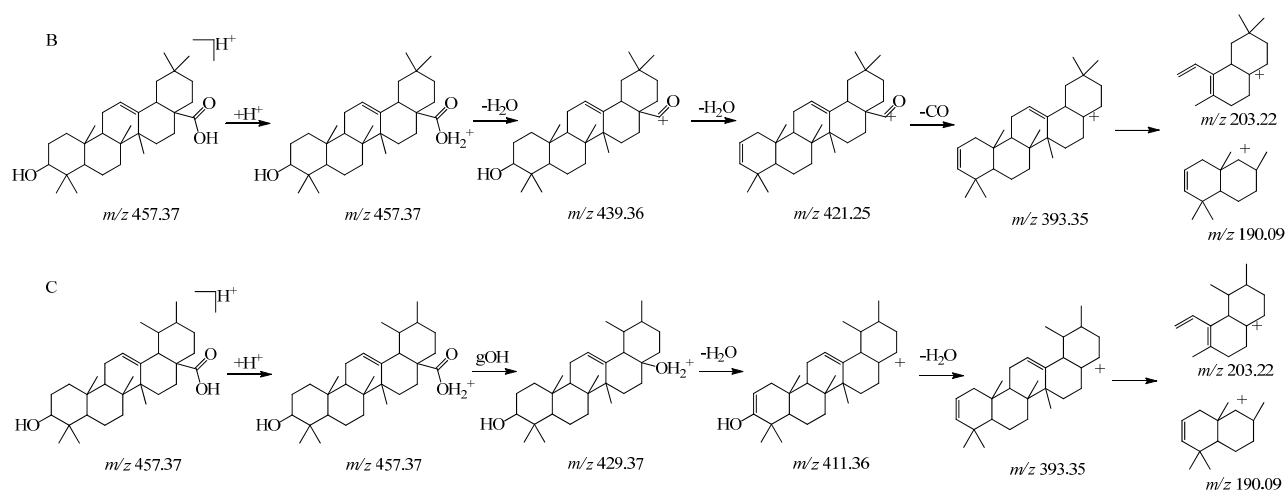
图 8 峰 16 (异甘草苷) 的正离子多级质谱和裂解途径

Fig. 8 MS^n spectra in positive mode and possible fragmentation pathway for peak 16 (isoliquiritin)

UHPLC/ MS^n 获得了同一分子的正、负多级质谱树与对照品的匹配结果, $MS \rightarrow MS^2$ 碰撞能量 25 eV, $MS^2 \rightarrow MS^3$ 碰撞能量 35 eV, $MS^3 \rightarrow MS^4$ 碰撞能量 40 eV, 结果见表 2。异甘草苷与甘草苷为同分异构体, 在负离子模式中多级碎片离子相同, m/z 417 $\rightarrow$ 255 ($M^2 - \text{Glu}$) $\rightarrow$ 135 ($M^3 - \text{C}_8\text{H}_8\text{O}$), 难以区分, 见图 6;

但由于结构上的差异, 在正离子模式中如图 7 和 8 所示, 表现出了不同的裂解形式, 二级碎片甘草苷以 m/z 135 离子碎片为主, 异甘草苷以 m/z 148 离子碎片为主, 辅助解释了高分辨中的二级谱图的异同^[10]; 芦丁、金丝桃苷、槲皮苷的黄酮苷元是槲皮素, 通过丢失糖后逐级碎裂, 裂解方式与图 5 类似,





齐墩果酸: $R_1=H$, $R_2=CH_3$; 熊果酸: $R_1=CH_3$, $R_2=H$

图 9 峰 21 (齐墩果酸) 和峰 22 (熊果酸) 的多级质谱和裂解途径

Fig. 9 MS^n spectra and possible fragmentation pathway for peak 21 (oleanolic acid) and peak 22 (ursolic acid)

表 2 利舒康胶囊 UHPLC/ MS^n 化学成分多级质谱树及匹配值

Table 2 UHPLC/ MS^n spectral tree and match results of chemical constituents from Lishukang Capsules

化合物	MS	MS^2	MS^3	MS^4	Tree Match	Spectrum Match	t_R/min
阿魏酸+	195.02	→ 176.80 162.68 135.63	→ 144.75	→ 116.86 100.79 88.77	813	1 000	14.63
对香豆酸-	162.79	→ 118.75	→ 74.47		920	None	12.60
丁香酸-	196.86	→ 181.84 152.82 168.88	→ 166.79 137.80	→ 122.70			
儿茶素-	289.05	→ 244.89 204.96 178.84	→ 202.87 226.95 186.88 160.89	→ 174.93 187.96 160.88 184.91			
甘草苷-	417.08	→ 254.89	→ 134.81 118.75	→ 90.78	930	999	16.12
甘草苷+	418.91	→ 256.96	→ 137.02 146.94 239.07	→ 118.76			
异甘草苷-	417.08	→ 255.00	→ 134.72 118.78	→ 90.81	966	1 000	25.47
异甘草苷+	419.05	→ 257.03	→ 146.81 239.03 136.78 241.98	→ 118.76 210.91			
甘草酸-	821.37	→ 351.01	→ 192.90 289.06 174.96 112.83	→ 130.68 174.83 112.78 162.93	928	933	38.09
黄柏碱+	342.08	→ 191.97	→ 176.83	→ 148.95	950	1 000	7.92

续表 2

化合物	MS		MS ²		MS ³		MS ⁴	Tree Match	Spectrum Match	t _R /min
[红景天苷+HCOO]−	344.90	→	298.91	→	178.76	→	88.63	919	919	4.96
					118.72		142.87			
					142.75		118.66			
					112.83		160.87			
					160.90		148.75			
槲皮苷−	447.05	→	300.93	→	178.80	→	150.78	806	1 000	22.45
槲皮素−	301.05	→	178.94	→	150.84	→	106.78	955	1 000	28.41
			150.82				82.69			
			272.97							
			256.92							
金丝桃苷−	453.05	→	300.97	→	178.72	→	150.92	868	984	18.49
					150.86					
芦丁−	609.14	→	300.96	→	178.92	→	150.87	772	1 000	18.71
					150.70					
绿原酸−	353.16	→	190.98	→	126.74	→	84.86	932	975	7.35
					172.96		98.69			
					84.73		108.75			
					92.69		82.77			
					110.74					
没食子酸−	168.84	→	124.71	→	106.77			926	942	1.97
					96.78					
					80.95					
木犀草素−	284.92	→	284.97	→	197.93			959	959	28.83
					213.04					
鞣花酸−	300.87	→	300.89							
			256.88	→	228.93	→	185.75			
					184.97		200.91			
小檗碱+	336.16	→	321.04	→	292.06	→	264.14	975	987	23.77
							277.02			
药根碱+	338.07	→	323.09	→	294.10	→	279.01	985	997	20.95
					307.03					
异鼠李素−	315.01	→	299.93	→	150.93	→	106.81	861	861	31.34
					270.95	→	242.94			
							226.90			
齐墩果酸−	455.36	→	407.29	→	391.36	→	201.17	888	888	47.94
							361.32			
					377.34	→	361.37			
							373.26			
齐墩果酸+	457.1	→	439.21	→	421.25	→	393.32			
					393.32		191.07			
					217.10	→	118.85			
熊果酸−	455.41	→	407.22	→	391.29					
					374.31					
					351.40					
熊果酸+	457.09	→	411.37	→	393.19	→	189.09	834	834	48.15
			439.18				203.18			

化合物后“+、−”号表示正、负离子模式
“+、−” means in positive or negative mode

都具有 m/z 301、284、178、151 的典型多级离子碎片^[11-13]，均用此方式取得极高的匹配度。图 4 的小檗碱典型裂解符合文献报道的以 N 为中心引发的 i 断裂，与 N 相连的 2 个环为苯环共轭结构，具有苯环共轭结构的电子转移顺利，更易于失去甲基^[14]。

齐墩果酸与熊果酸为差向异构体，在“2.1”项条件下高分辨质谱 IDA 扫描下，正离子模式无响应，负离子模式响应较好，但不仅一级图谱源内裂解几乎相同，二级碎片表现微弱，基线噪声严重干扰图谱判断；而在线性离子阱采集，由于二维离子阱的离子聚焦和存储作用，二者虽然负离子多级质谱相同，都有明显的 m/z 407 ($M^2-HCOOH-2H$)→391 (M^3-OH) 的峰，但正离子多级质谱还是有不同的表现，同时也给出了相应的裂解规律，如图 9 所示。

图 9 中，二者除具有共同裂解特征 (A) 以外，可能因为相邻 2 个甲基的空间结构影响，齐墩果酸同时也倾向于图 9-B 的裂解方式，而熊果酸倾向于图 9-C 的裂解方式，这样造成 2 种结构在多级图谱上齐墩果酸 m/z 439 (M^2-H_2O)→421 (M^3-H_2O) 和熊果酸的 411 ($M^3-HCOOH$)→393 (M^4-H_2O) 的丰度值就比较突出，二者后面 C、D 环的失去与文献报道^[15]一致。

LTQ XL 高性能线性离子阱质谱仪采集的利舒康样品数据，与利舒康预测化学成分复合质谱数据库进行匹配，结果见表 2。其中“Tree Match”指对照品和样品两者的离子树 (MS^1-MS^n) 匹配；“Spectrum Match”指两者二级或多级的质谱图的匹配。各 Match 下的数据表示的是匹配因子，匹配因子是由基于优化的点积函数的 HighChem 和 NIST 两种模式来的计算，值越高匹配度越高，1 000 表示完全匹配。

4 讨论

本研究建立了 UHPLC/ MS^n 质谱树技术与 Q/TOF 联用在 6 味中药提取物组成的复杂成药利舒康胶囊成分鉴定中的应用方法，高分辨质谱获得化合物的精确相对分子质量和同位素预测，疑似化学成分在线性离子阱采集的多级质谱树碎片中可以与预测对照品进行匹配，并建立多级谱库，该方法对高分辨质谱的成分鉴定起到了很好的补充验证作用。该方法优势突出，不仅能够对未知多组分中的各种结构同时获得正、负离子模式的多级响应碎片，而且在进行三级碎裂时，具有排

除二级图谱中没有完全碎裂的母离子干扰，而挑选到二级子离子得到三级碎裂，从而进行 $MS^1-MS^2-MS^3\cdots$ 的逐级逻辑归属；另外，在高分辨质谱二级碎片辅助推测分子式中，来源于非化合物本身的低强度碎片形成的本底噪音碎片会导致软件计算的二级所有碎片的平均偏差 MS/MS 误差过大 (表 1)，尤其是复杂中药中量低、响应差、相对分子质量小的成分，在对相同的质荷比推测出的多个 MS 误差相近的分子式选择判断时，大的 MS/MS 误差容易造成误判，而 $MS^1-MS^2-MS^3\cdots$ 离子树对断裂规律的检索，能够帮助进一步确认正确的成分信息。

Mass Frontier Fragmentation LibraryTM (Mass Frontier 碎片库) 总结 24 条常规电离、裂解和重组规则并从发行的文献整理出了大约 31 000 条裂解机理，本研究通过该碎片库预测出了 22 个化学结构可能的裂解和重排机理，预测的结果符合文献报道。除保留时间以外，线性离子阱采集的多级质谱结构碎片，可以为化合物的分析提供全面的数据，配合数据文件的高通量分析，使化合物的筛查和确证简化，达到了快速识别和鉴定中药复方制剂利舒康中化学成分的目的。这种鉴定方式尤其适用于非一种植物来源的具多种化学特性的混合成分的复杂样本，为结构的快速推测和验证提供了新的手段。

参考文献

- [1] 国家中成药标准汇编：内科气血津液分册 [S]. 2002.
- [2] 笔雪艳，郭珊珊，曹文静，等. HPLC 测定利舒康胶囊中盐酸小檗碱及黄柏碱含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(2): 72-74.
- [3] 霍佳丽，王建华，吴志军，等. 新疆大花红景天化学成分 HPLC-MS 研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(10): 1405-1407.
- [4] 张继，马君义，杨永利，等. 烈香杜鹃挥发性成分的分析研究 [J]. 中草药, 2003, 34(4): 304-305.
- [5] 戴胜军，于德全. 烈香杜鹃中的三萜类化合物 [J]. 中国天然药物, 2005, 3(6): 347-349.
- [6] 布日额，其其格玛，东格尔多尔吉. 手掌参中氨基酸的成分测定 [J]. 内蒙古民族大学学报：蒙医药学版, 2005, 15(1): 28-30.
- [7] 岳正刚，晔佳辰，朱承根，等. 手掌参的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21): 2852-2861.
- [8] 张晓红，博·格日勒图. 手掌参多糖的结构分析 [J]. 内蒙古大学学报：自然科学版, 2005, 36(2): 148-151.

- [9] 沈 杰, 叶蕴华, 周亚伟. 藏药甘青青兰的生物活性成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2009, 44(3): 170-175.
- [10] 周 燕, 王明奎, 廖 循, 等. 甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析 [J]. 分析化学, 2004, 32(2): 174-178.
- [11] 李自红, 魏 悦, 范 毅, 等. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析 [J]. 分析实验室, 2015, 24(2): 186-189.
- [12] 乔晓莉, 吴士杰, 祁向争, 等. 山楂中化学成分的上联/ESI-TOF/MS 分析 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(2): 120-124.
- [13] 宇 航, 戴海学, 汪明明, 等. 槲皮素的电喷雾离子阱质谱分析 [J]. 质谱学报, 2009, 30(6): 374-378.
- [14] 王道武, 刘志强, 郭明全, 等. 黄连中小檗碱及其同分异构体的电喷雾质谱研究 [J]. 分析化学, 2003, 31(9): 1101-1104.
- [15] 霍金海, 都晓伟, 孙国东, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 分析北青龙衣成分 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3379-3388.