

基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的沉香化气丸化学成分分析

潘玄玄¹, 宋粉云^{1*}, 李 华²

1. 广东药科大学药学院, 广东 广州 510006

2. 广东省药品检验所, 广东 广州 510180

摘要: 目的 采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对中药复方沉香化气丸中的化学成分进行定性分析。方法 采用 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm), 以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱, 体积流量为 0.8 mL/min; 采用 ESI 源在正、负离子模式下分别采集数据。根据化合物准确的相对分子质量及二级碎片离子信息, 结合参考文献数据及与对照品对照, 鉴定沉香化气丸的主要化学成分。结果 从沉香化气丸中分离和鉴定出 73 个化学成分, 包括 36 个黄酮类、16 个 2-(2-苯乙基) 色酮类、7 个三萜皂苷类、2 个倍半萜内酯及 12 个其他类成分。结论 UPLC-Q-TOF/MS 联用技术为鉴别沉香化气丸中化学成分提供简便、快速、准确的方法, 为进一步分析沉香化气丸的物质基础及质量控制提供了新技术方法。

关键词: 沉香化气丸; UPLC-Q-TOF/MS; 黄酮类; 2-(2-苯乙基) 色酮类; 三萜皂苷类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)13-2984-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.13.006

Identification of chemical compositions in Chenxiang Huaqi Pills by UPLC-Q-TOF/MS

PAN Xuan-xuan¹, SONG Fen-yun¹, LI Hua²

1. College of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China

Abstract: Objective To analyze the main chemical constituents of traditional Chinese medicine compound Chenxiang Huaqi Pills by using UPLC-Q-TOF/MS technology. **Methods** The separation was performed on Phenomenex Kinetex C₁₈ column (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm), and the gradient elution of acetonitrile-0.1% formic acid was used as mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min. The data was collected by the positive and negative ion modes using Q-TOF/MS and ESI source. The main chemical constituents of Chenxiang Huaqi Pills were identified according to the exact molecular mass, the cleavage fragments of MS/MS, the literature data, and the reference control. **Results** A total of 73 chemical components were separated and identified in Chenxiang Huaqi Pills, including 36 flavonoids, 16 2-(2-phenylethyl) chromones, 7 triterpenoid saponins, 2 sesquiterpene lactones, and 12 other components. **Conclusion** This study showed that UPLC-Q-TOF/MS technology provided a simple, rapid, and accurate method for the identification of chemical constituents in Chenxiang Huaqi Pills, which provided a new technology method for the pharmacological basis and quality control of Chenxiang Huaqi Pills.

Key words: Chenxiang Huaqi Pills; UPLC-Q-TOF/MS; flavonoids; 2-(2-phenylethyl) chromones; triterpenoid saponins

中药复方是中医用药的主要形式, 其作用特点是通过“多成分、多靶点、多途径”对机体发挥整体的治疗作用, 但所含成分极为复杂, 大多数复方中的化学成分尚不清楚, 难以开展药物的治疗机制研究。因此, 对其化学成分进行全面的分析是明确

药效物质基础的先决条件。传统方法对于中药复方的成分鉴定主要是采用传统提取及色谱分离技术, 通过核磁共振 (NMR) 和质谱 (MS) 等分析技术鉴定其结构, 这种方法需要经过复杂的分离和提取过程, 毒性较大, 难以全面地分析复方中多类成分。

收稿日期: 2017-11-23

基金项目: 上海市药物 (中药) 代谢产物研究重点实验室开放课题 (2015SHDX1001)

作者简介: 潘玄玄 (1992—), 女, 硕士, 从事现代分析方法在中药质量控制中的应用研究。Tel: 18925120542 E-mail: 1141475121@qq.com

*通信作者 宋粉云 (1965—), 女, 硕士, 教授, 从事现代分析方法在中药质量控制中的应用研究。

Tel: (020)39352136 E-mail: songfenyun2011@163.com

UPLC-Q-TOF/MS 技术具有高灵敏度、高分辨率和精确相对分子质量测定等优点, 现已广泛应用于中药复杂体系成分的定性鉴别研究^[1]。

沉香化气丸收载于《中国药典》2015 年版一部中, 全方由沉香、木香、广藿香、醋香附、陈皮、砂仁、醋莪术、六神曲(炒)、炒麦芽、甘草 10 味药组成, 用于肝胃气滞、不思饮食、噯气泛酸等^[2]。目前, 对于沉香化气丸复方的研究仅局限于基本的药材鉴别、药效实验研究和少量几种成分的含量测定^[3-5], 对于复方中化学成分的定性鉴别未见文献报道。因此, 本实验采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对沉香化气丸的化学成分进行系统研究, 通过精确的相对分子质量得到化合物的分子式, 根据有关化合物结构的二级碎片离子信息, 结合文献报道的质谱裂解规律及对照品比对, 从而推断化合物的结构, 为进一步阐明沉香化气丸的药效物质基础和建立质量控制体系提供依据。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1290 Infinity 超高效液相色谱系统(美国安捷伦公司); Agilent 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF 高分辨四级杆-飞行时间质谱仪(美国安捷伦公司), 配有标准电喷雾离子源(ESI), MassHunter Acquisition 色谱工作站和 Qualitative Analysis 数据处理软件; Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司); KQ-300DE 型超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司), Sartorius CP225D 型十万分之一电子天平。

1.2 试药

对照品沉香四醇(质量分数 96.8%, 批号 111980-201501)、甘草苷(质量分数 93.7%, 批号 111610-201106)、橙皮苷(质量分数 95.3%, 批号 110721-201316)、甘草酸铵(质量分数 93.1%, 批号 110731-201418)、木香烃内酯(质量分数 99.0%, 批号 111524-201509)、去氢木香内酯(质量分数 99.7%, 批号 111525-201510)、广藿香酮(质量分数 100%, 批号 111822-201102)、 α -香附酮(质量分数 99.7%, 批号 110748-201513)均购于中国食品药品检定研究院, 维采宁-2(批号 16011122)购于上海同境生物科技有限公司, 芸香柚皮苷(批号 MUST-16030408)、柚皮苷(批号 MUST-15091804)、川陈皮素(批号 MUST-15110911)、桔红素(批号 MUST-15110912)、吉马酮(批号 MUST-15051913)均购于成都曼思特生物科技有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$ 。乙腈(LC-MS 级, 美国 Fluka 公司), 甲醇(分析纯, 广州化学试剂

厂), 甲酸(LC-MS 级, 美国 Fluka 公司)。沉香化气丸样品(批号 151208)为成都地奥集团天府药业股份有限公司产品。

2 方法

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex Kinetex C₁₈ 柱(100 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μ m); 流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 梯度洗脱: 0~7 min, 12%~16% A; 7~14 min, 16%~21% A; 14~16 min, 21%~32% A; 16~19 min, 32%~42% A; 19~24 min, 42%~46% A; 24~30 min, 46%~48% A; 30~34 min, 48%~72% A; 34~36 min, 72%~80% A; 36~40 min, 80%~90% A; 40~44 min, 90% A; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样量 2 μ L。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式下分别采集数据, 扫描范围 m/z 100~1 100, 干燥气体积流量 12 L/min, 干燥气温度 350 $^{\circ}$ C, 雾化器压力 395.88 kPa, 裂解电压 175 V, 正离子模式: 毛细管电压 4 000 V, 碰撞能量 10 eV 和 30 eV, 参比离子 m/z 121.050 873 和 922.009 798; 负离子模式: 毛细管电压 3 500 V, 碰撞能量 30 eV, 参比离子 m/z 112.985 587 和 1 033.988 109。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取沉香化气丸样品, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL, 称定质量, 超声(功率 300 W, 频率 40 kHz), 处理 45 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 即得。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取维采宁-2、沉香四醇、甘草苷、芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、甘草酸、川陈皮素、桔红素、木香烃内酯、去氢木香内酯、广藿香酮、 α -香附酮、吉马酮对照品适量, 加甲醇分别制成质量浓度为维采宁-2 21.60 μ g/mL、沉香四醇 8.37 μ g/mL、甘草苷 14.16 μ g/mL、芸香柚皮苷 13.94 μ g/mL、柚皮苷 5.40 μ g/mL、橙皮苷 10.11 μ g/mL、甘草酸 18.66 μ g/mL、木香烃内酯 14.50 μ g/mL、广藿香酮 7.26 μ g/mL、川陈皮素 22.10 μ g/mL、桔红素 22.20 μ g/mL、去氢木香内酯 19.80 μ g/mL、 α -香附酮 75.80 μ g/mL、吉马酮 21.00 μ g/mL 的对照品溶液。

3 结果

3.1 沉香化气丸中化合物的鉴定与分析

取沉香化气丸样品, 按“2.2.1”项下方法制备

供试品溶液,按“2.1”项下的分析条件,进样测定,分别得到沉香化气丸的正、负离子模式下的总离子流图,如图 1 所示。利用 Q-TOF 获得各成分的精确相对分子质量及 MS/MS 二级碎片离子信息,结合

相关文献数据及部分对照品的质谱信息,从沉香化气丸中共定性鉴别出 73 个化学成分,包括 36 个黄酮类、16 个 2-(2-苯乙基)色酮类、7 个三萜皂苷类、2 个倍半萜内酯及 12 个其他类成分,见表 1。

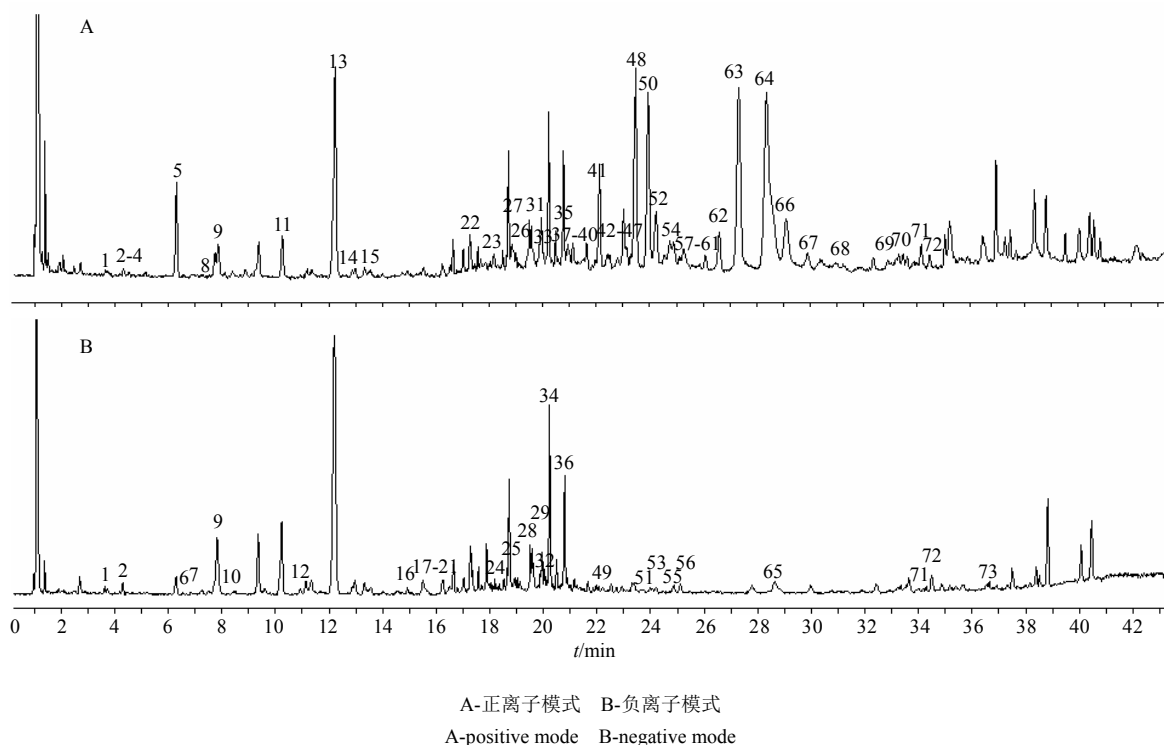


图 1 沉香化气丸提取液的 UPLC-Q-TOF/MS 总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatograms of Chenxiang Huaqi Pills extracting solution by UPLC-Q-TOF/MS

表 1 沉香化气丸提取液中化合物的 UPLC-Q-TOF/MS 定性分析结果

Table 1 Qualitative analysis results of chemical constituents in Chenxiang Huaqi Pills extracting solution by UPLC-Q-TOF/MS

峰号	t_R /min	化合物	分子式	理论值 (m/z)	母离子	测定值 (m/z)	碎片离子 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	参考文献	来源
1	3.638	维采宁-2 ^a	$C_{27}H_{30}O_{15}$	594.152 6	$[M+H]^+$	595.160 2	577, 505, 475	-0.55	6	C, D
					$[M-H]^-$	593.160 8	575, 503, 473			
2	4.201	stellarin-2	$C_{28}H_{32}O_{16}$	624.169 0	$[M+H]^+$	625.177 4	607, 559, 487	-1.74	6	C
					$[M-H]^-$	623.170 3	533, 503, 383			
3	4.650	rotundine B	$C_{15}H_{23}NO$	233.177 6	$[M+H]^+$	234.184 9	146	1.46	7-8	E
4	5.121	(+)- β -rotunol	$C_{15}H_{23}NO$	233.177 2	$[M+H]^+$	234.184 5	216, 188, 160, 146	3.18	7,9	E
5	6.299	沉香四醇 ^a	$C_{17}H_{18}O_6$	318.110 4	$[M+H]^+$	319.117 7	301, 283, 255, 227, 164	-0.27	10-11	A
6	7.192	圣草次苷	$C_{27}H_{32}O_{15}$	596.182 7	$[M-H]^-$	595.175 4	287, 459	1.39	12	C
7	7.284	甘草素-4'-O-芹糖-(1-2)- β -吡喃葡萄糖	$C_{26}H_{30}O_{13}$	550.180 2	$[M-H]^-$	549.172 9	255, 135, 429, 413, 293	-3.91	13-15	G
8	7.707	aquilarone B	$C_{17}H_{18}O_6$	318.110 0	$[M+H]^+$	319.117 3	301, 283, 255, 227, 164	0.99	10	A

续表 1

峰号	t_R/min	化合物	分子式	理论值 (m/z)	母离子	测定值 (m/z)	碎片离子 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	参考文献	来源
9	7.847	甘草苷 ^a	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.140 5	[M-H] ⁻	417.133 2	255, 135	2.78	14-15	G
					[M+Na] ⁺	441.115 8	257, 147, 137			
10	7.927	甘草素-7-O-芹糖-(1-2)- β -吡喃葡萄糖	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	550.178 8	[M-H] ⁻	549.171 5	417, 255, 135	-1.37	15	G
11	10.230	芸香柚皮苷 ^a	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.177 7	[M+H] ⁺	581.185 0	435, 419, 273	2.55	16	C
12	11.363	柚皮苷 ^a	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.188 6	[M-H] ⁻	579.181 3	459, 271	0.02	6,17	C
13	12.230	橙皮苷 ^a	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.188 7	[M+H] ⁺	611.196 3	465, 449, 431, 345, 303	1.22	6,17	C
14	12.8	香叶木苷	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	608.174 5	[M+H] ⁺	609.181 4	463, 301	-0.66	6,12,17	C
15	13.311	新橙皮苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.188 7	[M+H] ⁺	611.196 0	465, 449, 431	1.72	16	C
16	14.914	芹糖异甘草苷	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	550.179 9	[M-H] ⁻	549.172 6	417, 255, 135	-3.37	14-15	G
17	15.535	异甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.164 2	[M-H] ⁻	417.156 9	255, 148, 135	-3.37	14-15	G
18	15.626	neolicuroside isomer	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	550.180 3	[M-H] ⁻	549.173 0	429, 255, 135	-4.09	14-15	G
19	16.242	新甘草苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.164 2	[M-H] ⁻	417.135 5	255, 135	-3.37	15	G
20	16.501	甘草素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.074 0	[M-H] ⁻	255.066 3	210, 135	1.63	14,18	G
					[M+H] ⁺	257.080 9	147, 137			
21	16.673	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-3,5-heptanediol	C ₁₉ H ₂₄ O ₄	316.180 9	[M-H] ⁻	315.173 6	163, 149, 121, 106	5.82	19	F
22	17.311	香风草苷	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	594.194 7	[M+H] ⁺	595.202 0	541, 449, 433 415, 329, 287	0.22	6,16	C
23	18.144	citrusin III	C ₃₆ H ₅₃ N ₇ O ₉	727.390 7	[M+H] ⁺	728.398 0	700, 615, 502, 339	-0.34	6,17	C
24	18.190	甘草皂苷 A3	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	984.458 2	[M-H] ⁻	983.450 9	805, 351	-1.59	14-15	G
25	18.781	yunganogenin K-O-GluA-GluA	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.402 4	[M-H] ⁻	837.395 1	351	-4.38	20	G
26	18.839	6,8-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)chromone	C ₁₇ H ₁₄ O ₄	282.088 8	[M+H] ⁺	283.096 1	283, 192, 164	1.37	10,21	A
27	19.418	qinanone g (isomer 1)	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	326.115 4	[M+H] ⁺	327.122 7	221, 107	0	10	A
28	19.569	甘草皂苷 G2	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.403 8	[M-H] ⁻	837.396 5	351	-6.05	14	G
					[M+H] ⁺	839.404 2	487, 469			
29	19.603	glabric acid-O-GluA-GluA	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.404 6	[M-H] ⁻	837.397 3	351	-7.01	20	G
30	19.673	qinanone g (isomer 2)	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	326.114 0	[M+H] ⁺	327.121 3	220, 177, 107	4.29	10	A
31	19.997	异甜橙黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372.119 0	[M+H] ⁺	373.126 3	357, 343, 329, 315	5.05	6,17	C
32	20.051	glyyunnansapogenin E-O-GluA-GluA	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.404 3	[M-H] ⁻	837.397 0	351	-6.65	20	G
33	20.142	5-羟基-6,7,3',4',5'-五甲氧基黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	388.115 6	[M+H] ⁺	389.122 9	374, 359, 341, 316	0.5	17,22	C
34	20.258	甘草酸 ^a	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	822.406 8	[M-H] ⁻	821.399 5	351, 193	-3.64	14	G
					[M+H] ⁺	823.413 1	647, 453			
35	20.443	qinanone g (isomer 3)	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	326.115 4	[M+H] ⁺	327.122 7	221, 205, 107	0	10	A
36	20.792	glycyrrhizin isomer	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	822.408 9	[M-H] ⁻	821.401 6	351, 193	-6.19	14	G
37	20.947	甜橙黄酮	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372.120 4	[M+H] ⁺	373.128 2	357, 343, 329, 312	1.29	6,17	C
38	21.145	异黄芩配基甲醚	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	342.110 0	[M+H] ⁺	343.117 3	328, 313, 285	0.92	6,17	C
39	21.619	7-hydroxy-2-(2-phenylethyl)chromone	C ₁₇ H ₁₄ O ₃	266.094 5	[M+H] ⁺	267.101 8	176, 161, 137	-0.86	10,21	A
40	21.932	二羟基四甲氧基黄酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	374.099 6	[M+H] ⁺	375.106 9	360, 342, 317 299, 183, 168	1.45	17	C
41	22.140	川陈皮素 ^a	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	402.131 4	[M+H] ⁺	403.138 7	388, 373, 355, 327	0.11	6,17,23	C
42	22.408	黄芩配基甲醚	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	342.109 9	[M+H] ⁺	343.117 2	327, 313, 299, 282	1.21	6,17	C
43	22.759	isocorymbolone	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236.177 1	[M+H] ⁺	237.184 4	219, 201	2.14	24	C, E
44	23.078	3,5,6,7,8,3',4',5'-七甲氧基黄酮	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	432.140 7	[M+H] ⁺	433.149 3	418, 403, 385	3.03	6,17	C
45	23.132	莪术二酮	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	236.178 1	[M+H] ⁺	237.184 4	219, 201, 159	-2.09	25-26	F

续表 1

峰号	t_R/min	化合物	分子式	理论值 (m/z)	母离子	测定值 (m/z)	碎片离子 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	参考文献	来源
46	23.148	6,7-dimethoxy-2-[2-(4'-methoxyphenyl) ethyl] chromone	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_5$	340.125 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$	341.132 5	220, 121	-0.07	10,21	A
47	23.293	AH13	$\text{C}_{34}\text{H}_{30}\text{O}_8$	566.194 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	567.201 4	549, 531, 283, 267, 255, 239	-0.10	10	A
48	23.449	6,7-dimethoxy-2-(2-phenylethyl) chromone	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_4$	310.120 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	311.128 2	220, 205, 177	-1.34	10,21	A
49	23.499	semilicoisoflavone B	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$	352.095 1	$[\text{M}-\text{H}]^-$	351.087 8	333, 321, 296, 265	-1.10	13	A
50	23.935	桔红素 ^a	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$	372.120 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	373.128 2	358, 343, 325, 297	2.63	6	G
51	24.051	licochalcone D	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$	354.145 1	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.139 4	321, 298, 284, 177	4.65	15,27	C
52	24.167	3,5-dihydroxy-7,3',4'-trimethoxyflavone	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$	344.090 3	$[\text{M}+\text{H}]^+$	345.096 9	330, 315, 302, 167	-0.06	28	D
53	24.258	5-(1,1-二甲基烯丙基)-3,4,4-三羟基-2-甲氧基查耳酮	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$	354.147 2	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.139 9	323, 295, 283, 270, 149	-1.28	15,27	G
54	24.712	莪术醇	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$	236.177 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$	237.184 4 259.165 5	219, 201, 159	2.14	25	F
55	24.815	liconeolignan	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$	354.145 2	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.137 8	227, 192, 125	4.65	27	G
56	25.085	lcoisoflavone A	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$	354.111 9	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.103 1	284, 267, 243, 216, 201	-4.34	27	G
57	25.127	cypersol B	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$	236.176 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$	237.184 0 259.166 2	219, 201, 179	3.84	29	E
58	25.302	2-(2-phenylethyl)chromone	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_2$	250.099 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	251.106 9	173, 160, 121	-0.98	10,21	A
59	25.585	5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8$	388.115 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	389.122 9	374, 359, 341, 197	0.50	17,22	C
60	25.655	6-methoxy-2-(2-phenylethyl)chromone (isomer 1)	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_3$	280.110 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	281.117 4	190, 151	-0.64	10,21	A
61	26.136	6-methoxy-2-[2-(4'-methoxyphenyl) ethyl] chromone	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_4$	310.119 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	311.126 8	190, 121	3.18	10,21	A
62	26.553	6-methoxy-2-(2-phenylethyl)chromone (isomer 2)	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_3$	280.109 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	281.116 9	190, 151, 124	1.15	10	A
63	27.328	木香烃内酯 ^a	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$	232.145 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	233.153 6	215, 187, 159, 145, 131	3.90	30-31	B
64	28.362	去氢木香内酯 ^a	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_2$	230.130 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	231.138 0	213, 185, 157, 143	-0.19	30-31	B
65	28.567	lcoisoflavone B	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$	352.094 6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	351.087 3	283, 265, 241, 199, 139	0.32	13,27	G
66	28.621	广藿香酮 ^a	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$	224.104 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	225.111 9	203, 185, 159, 139	1.05	32	D
67	29.124	香附烯酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$	218.167 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	219.174 4	201, 163, 145, 135	-0.27	29	E
68	31.244	dehydroxy AH21	$\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_7$	548.182 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	549.189 9	531, 497, 458	1.60	10	A
69	33.270	α -香附酮 ^a	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$	218.168 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	219.175 3	201, 177, 163, 111	-4.39	7-9	E
70	33.601	甘草宁 E	$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_6$	424.223 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$ $[\text{M}-\text{H}]^-$	425.231 0 423.195 5	369, 221, 191 229, 193, 174	2.95	13	G
71	34.133	吉马酮 ^a	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2$	218.166 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	219.173 8	201, 159, 175, 133	2.48	25	F
72	34.463	glyrallin B	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_6$	422.173 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$ $[\text{M}-\text{H}]^-$	423.180 3 421.178 0	367, 311 366, 352, 309	-0.20	27	G
73	36.635	angustone B	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_6$	420.159 2	$[\text{M}-\text{H}]^-$	419.151 9	351, 265, 219, 199	-2.11	27	G

^a表示经对照品鉴定 A-沉香 B-木香 C-陈皮 D-广藿香 E-醋香附 F-醋莪术 G-甘草^aFurther confirmation in comparison with standard compounds A-Aquilariae Lignum Resinatum B-Aucklandiae Radix C-Pericarrum Citri Retieultae D-Pogostemonis Herba E-Cyperis Rhizoma F-Curcumae Rhizoma G-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma

3.2 黄酮类

通过比较出峰时间及分析质谱的可能裂解规律, 结合参考文献及对照品比对, 在正、负离子模式下从沉香化气丸中共鉴定出了 36 个黄酮类化合物, 包括 12 个二氢黄酮(苷)类、14 个多甲氧基黄酮(苷)类、5 个异黄酮类及 5 个查耳酮类, 以化合物 **9**、**11** 和 **41** 为例, 化合物 **9** 在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 417 $[M-H]^-$, 丢失葡萄糖基产生高丰度的碎片离子 m/z 255 $[M-H-C_6H_{12}O_5]^-$, 该碎片离子因 C 环发生 RDA 裂解产生碎片离子 m/z 135, 通过相关文献报道^[14-15]及对照品比对, 推测化合物 **9** 为甘草苷。化合物 **11** 在正离子模式下的准分

子离子峰为 m/z 581 $[M+H]^+$, 通过丢失 1 分子单糖基团产生 m/z 419 的碎片离子, 该离子进一步脱水生成 m/z 401 的碎片离子; m/z 581 也可通过中性丢失鼠李糖基产生 m/z 435, 继续进一步丢失单糖基团得到碎片离子 m/z 273。结合质谱裂解规律及元素分析结果, 确定分子式为 $C_{27}H_{32}O_{14}$, 通过对照品比对及文献报道^[16], 推测化合物 **11** 为芸香柚皮苷, 二级质谱图及可能的裂解过程见图 2。化合物 **41** 母离子为 m/z 403 $[M+H]^+$, 其二级质谱主要的碎片离子为 m/z 388 $[M+H-CH_3]^+$ 、 m/z 373 $[M+H-2CH_3]^+$ 、 m/z 355 $[M+H-2CH_3-H_2O]^+$, 结合文献报道^[6,17,23]及与对照品比对, 推测化合物 **41** 为川陈皮素。

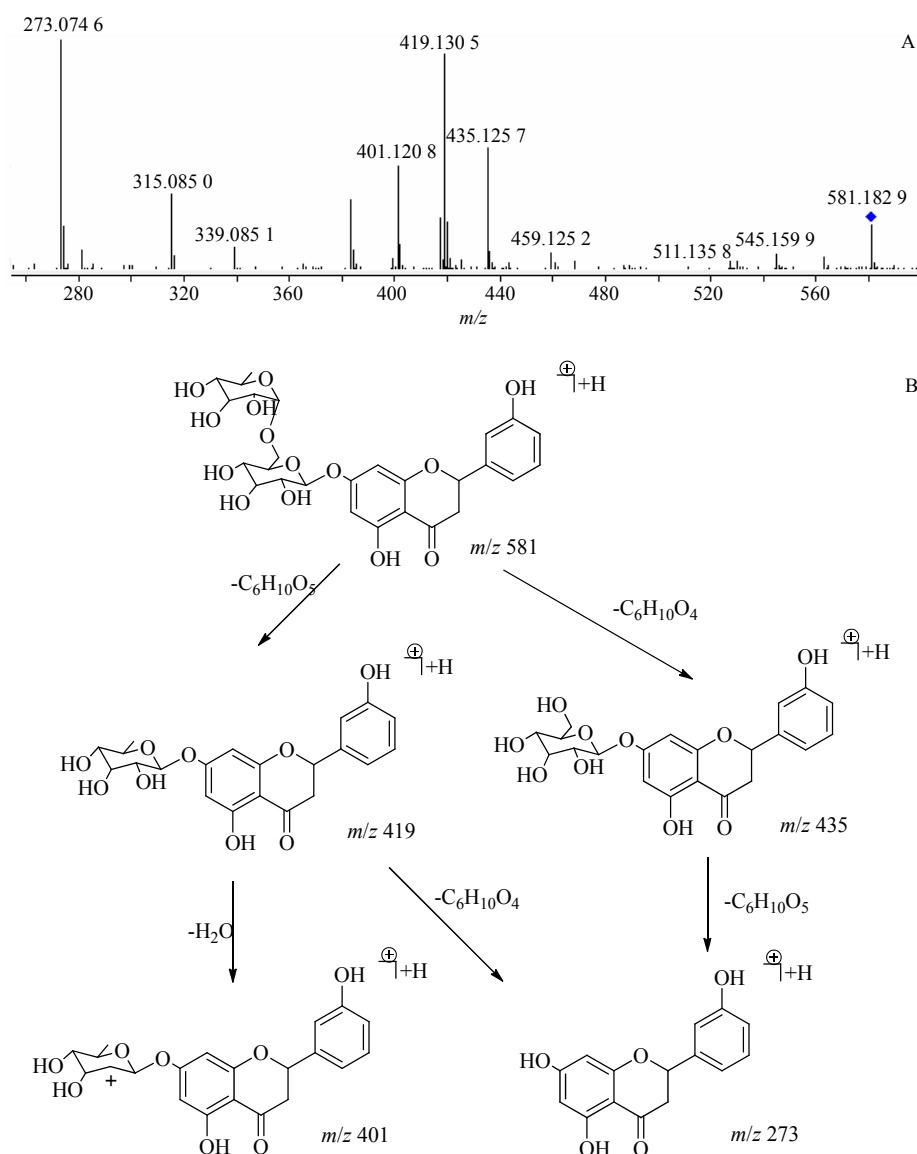


图 2 芸香柚皮苷正离子模式下二级质谱图 (A) 及可能的裂解过程 (B)

Fig. 2 ESI-MS²(+) spectrum (A) and proposed fragmentation process (B) of narirutin

3.3 2-(2-苯乙基) 色酮类

在正离子模式下, 化合物 5 的母离子为 m/z 319 $[M+H]^+$, 根据元素组成可计算出该化合物的分子式为 $C_{17}H_{18}O_6$, 其二级质谱主要的碎片离子为 m/z 301 $[M+H-H_2O]^+$ 、 m/z 283 $[M+H-2H_2O]^+$ 、 m/z 255 $[M+H-2H_2O-CO]^+$ 、 m/z 227 $[M+H-2H_2O-2CO]^+$ 及 m/z 164 $[M+H-C_7H_7]^+$ 。通过对照品的质谱信息、出峰时间及文献数据的比对^[10-11], 确定该化合物为沉香四醇, 二级质谱图及可能的裂解规律

见图 3。化合物 26、27、30、35、39、46、48、58、60~62 的正离子二级质谱图中有碎片峰 m/z 160 $[C_{10}H_8O_2]$ 、 m/z 177 $[C_{10}H_8O_2 + OH]$ 、 m/z 191 $[C_{10}H_8O_2 + OCH_3]$ 、 m/z 192 $[C_{10}H_6O_2 + OH \times 2]$ 、 m/z 221 $[C_{10}H_7O_2 + OCH_3 \times 2]$ 、 m/z 121 $[C_7H_6 + OCH_3]$ 与 m/z 137 $[C_7H_5 + OH + OCH_3]$, 产生这些特征片段的碎片离子是由于连接色酮与苯基之间的 CH_2-CH_2 键发生断裂, 不同取代的色酮部分形成不同的特征碎片。根据二级质谱信息及文献报道^[10-11,21], 可推

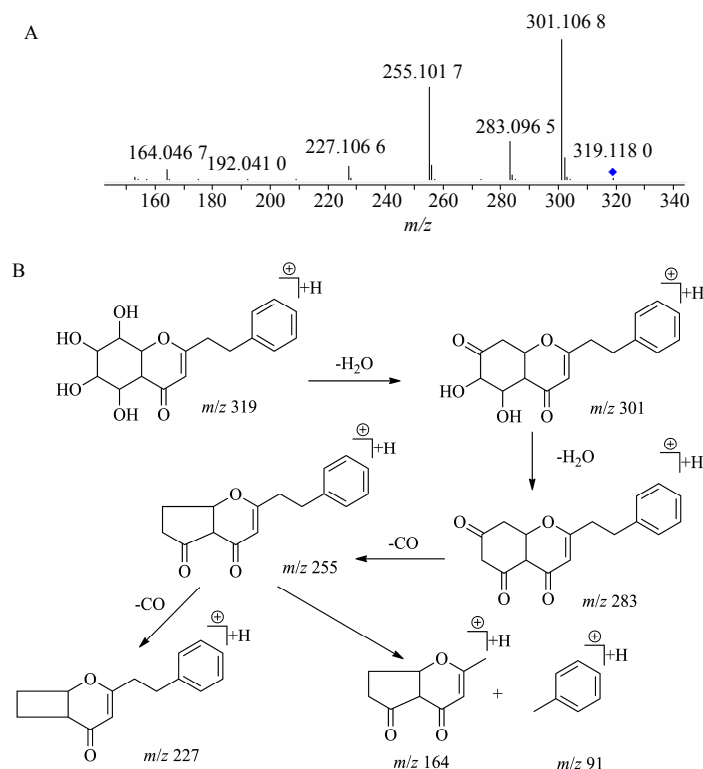


图 3 沉香四醇正离子模式下二级质谱图 (A) 及可能的裂解过程 (B)

Fig. 3 ESI-MS² (+) spectrum (A) and proposed fragmentation process (B) of agarotetrol

测出 11 个化合物。

3.4 三萜皂苷类化合物

从沉香化气丸中鉴定出 7 个三萜皂苷类化合物, 以化合物 34 为例阐述三萜皂苷类化合物可能的裂解规律。在负离子模式下的分子离子峰为 m/z 821 $[M-H]^-$, 根据精确相对分子质量可确定其分子式为 $C_{42}H_{62}O_{16}$, 在负离子二级质谱的碎片峰中给出 m/z 645 $[M-H-GluA]^-$ 、 m/z 469 $[M-H-2GluA]^-$ 及 2 分子葡萄糖醛酸的结构 m/z 351。通过对照品的质谱信息、出峰时间及与文献数据的比对^[14,33], 确定该化合物为甘草酸, 二级质谱图及可能的裂解规律见图 4。

4 讨论

本实验根据各种成分的结构和性质, 考虑到复方中所含挥发性成分较多, 综合超声提取、加热回流提取、索氏提取等方法的优缺点, 超声提取法简单、快速、高效, 因此实验采用超声提取法对沉香化气丸进行处理。对提取溶剂 (30%、50%、80%、100% 甲醇及水、乙醇、醋酸乙酯) 进行考察, 结果表明甲醇提取所得到的化学成分信息最多, 因此选择甲醇作为提取溶剂。对提取时间 30、45、60 min 进行考察, 结果发现提取时间超过 45 min, 提取效果无明显差别, 故提取时间为 45 min。

实验中分别采用正、负两种离子模式进行全扫

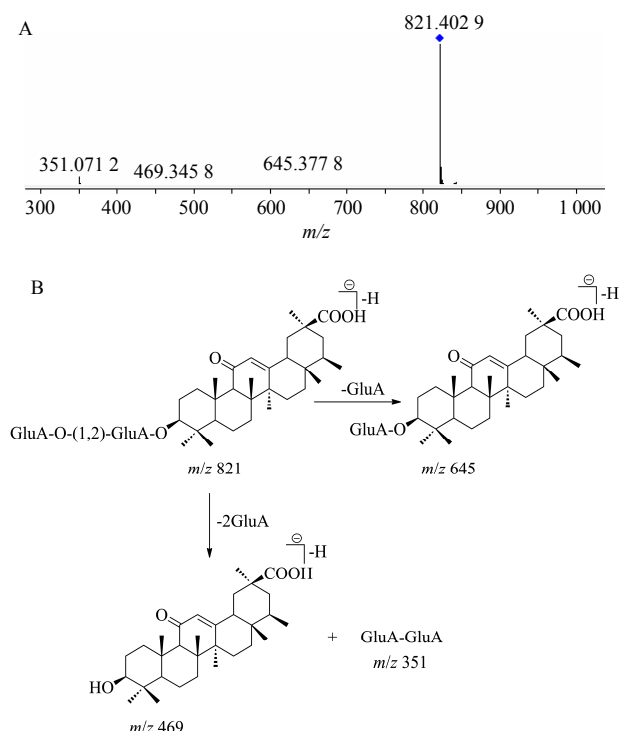


图4 甘草酸负离子模式下二级质谱图(A)及可能的裂解过程(B)

Fig. 4 (+) ESI-MS² spectrum (A) and proposed fragmentation process (B) of glycyrrhizin

描检测,发现陈皮及沉香中的成分在正离子模式下响应比负离子模式好,甘草中的成分在负离子模式下有较高的响应值,为了得到多种成分的较高响应值,最终采用正、负离子2种采集模式进行检测。Q-TOF/MS参数优化项主要包括毛细管电压、干燥气体体积流量、雾化气压力、裂解电压及碰撞能量等。实验发现,选择正、负离子模式下的毛细管电压为4 000 V及3 500 V,有利于沉香化气丸中各种成分的检测;干燥气体体积流量及雾化气压参数的选择与被分析物的组成成分、流动相的体积流量及水相比关系密切,考虑到实验中流动相的体积流量及水相的比例均较高,因此选择干燥气体体积流量为12 L/min和雾化气压力为395.88 kPa。调节碰撞能量,直接影响被分析物母离子的碎片离子信息,本实验考虑到各种化合物的结构不同,选择2种碰撞能量10 eV及30 eV,通过调节碰撞能量获得丰富的碎片离子信息,进而帮助化合物的鉴别。

UPLC-Q-TOF/MS液质联用技术,采用小粒径填料的色谱柱,具有更高的分离度,更快的分析速度及更高的灵敏度等优点。本研究首次对沉香化气

丸中的化学成分进行全面地定性分析,分离和鉴定了复方中的73个化合物,阐明了组方中6个化合物的可能裂解规律,表征了复方中复杂的化学物质基础,为进一步阐明沉香化气丸的药效物质基础及质量控制提供了新的技术资料和方法。

参考文献

- [1] Hu C, Liang Q, Tang X, *et al.* In vivo metabolite identification of bakuchiol in rats by UPLC/ESI-PDA-QTOF-MS [J]. *Fitoterapia*, 2015, 106: 129-134.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 刘建存, 艾淑珍, 栗奕兴, 等. 沉香化气丸对胃溃疡的疗效分析 [J]. 长沙医学院学报, 2010(1): 9-12.
- [4] 吕琪新. 沉香化气丸加多潘立酮治疗功能性消化不良餐后不适综合征 37 例 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2012, 20(11): 517-518.
- [5] 马丽娜, 郭伟英. 毛细管气相色谱法同时测定沉香化气丸中 3 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1559-1563.
- [6] Ye X, Cao D, Zhao X, *et al.* Chemical fingerprint and metabolic profile analysis of *Citrus reticulata* 'Chachi' decoction by HPLC-PDA-IT-MSⁿ and HPLC-quadrupole-orbitrap-MS method [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 970: 108-120.
- [7] Kandikattu H K, Rachitha P, Krupashree K, *et al.* LC-ESI-MS/MS analysis of total oligomeric flavonoid fraction of *Cyperus rotundus* and its antioxidant, macromolecule damage protective and antihemolytic effects [J]. *Pathophysiology*, 2015, 22(4): 165-173.
- [8] Peerzada A M, Ali H H, Naeem M, *et al.* *Cyperus rotundus* L: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174: 540-560.
- [9] Kumar K H, Razack S, Nallamuthu I, *et al.* Phytochemical analysis and biological properties of *Cyperus rotundus* L [J]. *Industrial Crops Prods*, 2014, 52: 815-826.
- [10] Li Y, Sheng N, Wang L, *et al.* Analysis of 2-(2-phenylethyl) chromones by UPLC-ESI-Q/MS and multivariate statistical methods in wild and cultivated agarwood [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, doi: 10.3390/ijms17050771.
- [11] Li J, Chen D, Jiang Y, *et al.* Identification and quantification of 5,6,7,8-tetrahydro-2-(2-phenylethyl) chromones in Chinese eaglewood by HPLC with diode array detection and MS [J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(23): 3733-3740.
- [12] Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, *et al.* Flavonoid composition of citrus juices [J]. *Molecules*, 2007, 12(8): 1559-1563.

- 1641-1673.
- [13] Qiao X, Song W, Ji S, *et al.* Separation and characterization of phenolic compounds and triterpenoid saponins in licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) using mobile phase-dependent reversed-phase × reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1402: 36-45.
- [14] Farag M A, Porzel A, Wessjohann L A. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques [J]. *Phytochemistry*, 2012, 76: 60-72.
- [15] 陈佩东, 周 习, 丁安伟. 炙甘草水煎液的 HPLC-MS 分析 [J]. 中成药, 2014, 36(10): 2115-2120.
- [16] Zhang J, Gao W, Liu Z, *et al.* Systematic analysis of main constituents in rat biological samples after oral administration of the methanol extract of *Fructus Aurantii* by HPLC-ESI-MS/MS [J]. *Iranian J Pharm Res*, 2014, 13(2): 493-503.
- [17] Zheng G D, Zhou P, Yang H, *et al.* Rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for identification of chemical constituents in *Citri Reticulatae Pericarpium* [J]. *Food Chem*, 2013, 136(2): 604-611.
- [18] 张 永, 严安定, 高 建. 液质联用技术鉴定甘草提取物中的主要化学成分 [J]. 中成药, 2012, 34(6): 1111-1115.
- [19] Jiang H, Timmermann B N, Gang D R. Use of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to identify diarylheptanoids in turmeric (*Curcuma longa* L.) rhizome [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1111(1): 21-31.
- [20] Ji S, Wang Q, Qiao X, *et al.* New triterpene saponins from the roots of *Glycyrrhiza yunnanensis* and their rapid screening by LC/MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 90: 15-26.
- [21] Lancaster C, Espinoza E. Evaluating agarwood products for 2-(2-phenylethyl) chromones using direct analysis in real time time-of-flight mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrometry*, 2012, 26(23): 2649-2656.
- [22] Zhang J Y, Zhang Q, Zhang H X, *et al.* Characterization of polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the peels of 'Shatangju' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) by online high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(36): 9023-9034.
- [23] Su Z H, Zou G A, Preiss A, *et al.* Online identification of the antioxidant constituents of traditional Chinese medicine formula Chaihu-Shu-Gan-San by LC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry and microplate spectrophotometer [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 454-461.
- [24] Kandikattu H K, Rachitha P, Krupashree K, *et al.* LC-ESI-MS/MS analysis of total oligomeric flavonoid fraction of *Cyperus rotundus* and its antioxidant, macromolecule damage protective and antihemolytic effects [J]. *Pathophysiology*, 2015, 22(4): 165-173.
- [25] Lv D, Cao Y, Dong X, *et al.* Analysis and pharmacokinetic study of curdione in *Rhizoma Curcumae* by UPLC/QTOF/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(6): 782-787.
- [26] 吕狄亚. 中药莪术化学成分分析及药代动力学研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2011.
- [27] Li Y J, Chen J, Li Y, *et al.* Screening and characterization of natural antioxidants in four *Glycyrrhiza* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(45): 8181-8191.
- [28] 张 岗. 广藿香非挥发性成分研究 [D]. 广州: 广东药学院, 2007.
- [29] Jaiswal Y, Liang Z, Guo P, *et al.* Tissue-specific metabolite profiling of *Cyperus rotundus* L. rhizomes and (+)-nootkatone quantitation by laser microdissection, ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, and gas chromatography mass spectrometry techniques [J]. *J Agr Food Chem*, 2014, 62(29): 7302-7316.
- [30] Kumar A, Kumar S, Kumar D, *et al.* UPLC/MS/MS method for quantification and cytotoxic activity of sesquiterpene lactones isolated from *Saussurea lappa* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2): 1393-1397.
- [31] Zhang J, Hu X, Gao W, *et al.* Pharmacokinetic study on costunolide and dehydrocostuslactone after oral administration of traditional medicine *Aucklandia lappa* Decne. by LC/MS/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1): 191-197.
- [32] Chen H, Li Y, Wu X, *et al.* LC-MS/MS determination of pogostone in rat plasma and its application in pharmacokinetic studies [J]. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27(9): 1092-1099.
- [33] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2061-2068.