

基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的小儿扶脾颗粒的化学成分研究

龙红萍^{1,2}, 李欣¹, 王婷婷¹, 卫军营¹, 李德凤¹, 张毅¹, 唐纯玉^{3,4}, 唐代凤^{3,4}, 吴宏伟^{1*}, 杨洪军^{1*}

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

3. 湖南时代阳光药业股份有限公司, 湖南 永州 425007

4. 湖南省抗感染中药工程技术研究中心, 湖南 永州 425007

摘要: 目的 系统阐明中药复方小儿扶脾颗粒中的化学成分, 建立一种对中药复方复杂成分快速鉴定的液质分析方法。方法 采用超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 对小儿扶脾颗粒成分进行分析, 色谱柱为 Waters HSS T3-C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min。根据 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 扫描提供化合物的准确相对分子质量、多级质谱数据、质谱碎片离子信息等, 参照对照品、文献报道等进行成分鉴定。**结果** 共鉴定了小儿扶脾中颗粒共 84 个化学成分, 主要包括黄酮类、糖苷类、酚酸及其酯类等, 并对各成分的药材来源进行归属, 同时根据质量规律和多级质谱裂解规律建立了快速鉴定黄酮类以及多甲氧基黄酮类化合物的方法。**结论** 对小儿扶脾颗粒的化学成分进行了较为全面的分析, 为其药效物质基础研究及质量控制提供了一定的理论依据。

关键词: 药效物质基础; 小儿扶脾颗粒; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS; 成分分析; 多甲氧基黄酮

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)23-5522-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.007

Study on chemical constituents from Xiaoer Fupi Granules based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS

LONG Hong-ping^{1,2}, LI Xin¹, WANG Ting-ting¹, WEI Jun-ying¹, LI De-feng¹, ZHANG Yi¹, TANG Chun-yu^{3,4}, TANG Dai-feng^{3,4}, WU Hong-wei¹, YANG Hong-jun¹

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

3. Hunan Time Sun Pharmaceutical Co., Ltd., Yongzhou 425007, China

4. Research Center of Anti-infection Chinese Medicine Engineering Technology, Yongzhou 425007, China

Abstract: Objective To clarify the chemical constituents from Xiaoer Fupi Granules and establish an effective identification method for the complex composition of Chinese material medica. **Methods** UPLC-LTQ-Orbitrap-MS was used to analyze the chemical constituents of Xiaoer Fupi Granules. The analysis was performed on Waters HSS T3-C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm). The mobile phase consisted of 0.1% ammonium formate (A)-acetonitrile (B), which was used for gradient elution, with the flow rate of 0.3 mL/min. This objective was achieved mainly depending on the information of the accurate mass and the multistage fragment ions obtained by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS, comparing the mass spectrometric data of the standard substance and consulting the reference literatures. **Results** A total of 84 compounds were identified in this study, including the flavones, glycosidics, phenolic acids, and its esters, and so on, which were attributed the herbs source of each compound. Meanwhile, an effective and quickly identification method for the glycosides, flavonoids, and polyoxyflavonoids were established based on the law of multistage mass spectrometry. **Conclusion** The comprehensive chemical constituents analysis of Xiaoer Fupi Granules will provide the scientific theory basis for the pharmacodynamic material basis and the quality control of this drug.

Key words: pharmacodynamic material basis; Xiaoer Fupi Granules; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS; component analysis; polymethoxyflavones

收稿日期: 2018-04-11

基金项目: 湖南省战略性新兴产业科技攻关类项目 (2016GK4050)

作者简介: 龙红萍 (1984—), 女, 博士, 主管药师, 从事天然产物活性成分与新药开发研究。Tel: (0731)85369253 E-mail: longhongping84@163.com

*通信作者 吴宏伟, 博士, 副研究员, 从事中药质量控制及代谢组学工作。E-mail: whw9905012@163.com

杨洪军, 博士, 研究员, 从事中药心脑血管药理研究及中药大品种培育。E-mail: hongjun0420@vip.sina.com

小儿厌食症 (infantile anorexia) 是儿科常见病、多发病, 长期厌食可导致小儿营养不良、贫血、佝偻病及免疫力低下, 甚则影响正常生长发育。中医理论认为, 小儿厌食症的发生主要是脾胃功能失调所造成的, 而小儿脾虚又是儿童常见的生理特性之一^[1]。小儿扶脾颗粒处方系名老中医根据经典名方“参苓白术散”精简化裁而成, 原为湖南中医药研究院附属医院临床经验方, 由白术、陈皮、山楂、党参、莲子、茯苓 6 味药材组成的复方中药, 诸药合用, 共奏健脾胃、助消化之功, 主治小儿脾胃气虚、消化不良、体质消瘦^[2-4]。小儿扶脾颗粒作为湖南省战略性新兴产业科技攻关项目中的中药大品种培育产品, 其临床疗效显著, 但缺乏系统性的物质基础研究。

复方中药药效物质基础研究一直是中药现代化研究的热点, 而对复方中药进行化学成分研究是从本质上阐明复方作用物质基础的重要前提, 由于复方中药成分复杂、类别多样等特点, 为其成分分离及鉴定带来一定的难度。液质联用技术在中药有效成分分析中得到广泛应用, 而 LTQ-Orbitrap MS 提供的精确相对分子质量和 MSⁿ 多级质谱信息对一个化合物的结构进行了更全面的描述, 提高了中药复杂体系化学成分的快速分析鉴定能力^[5-6]。

目前针对小儿扶脾颗粒物质基础研究鲜有报道, 本实验首次采用超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 技术对其化学成分进行研究, 建立整体和类群化学成分快速筛选鉴定方法, 结合对照品及相关文献, 根据实验获得的化合物质谱信息, 快速分析鉴定未知成分, 并对各成分进行药材归属。该方法为系统分析小儿扶脾颗粒化学成分建立了一种灵敏可靠、快速灵活的定性方法, 对研究化学组成复杂的中药复方体系具有广泛实用性。研究结果对明确小儿扶脾颗粒的药效物质基础、提升质量控制水平、确保临床用药安全有效等具有重要意义。

1 材料

1.1 仪器及软件

Thermo Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、Thermo LTQ-Orbitrap 质谱仪 (美国 Thermo 公司)、Xcalibur2.1 工作站 (美国 Thermo-fisher 公司); QI 数据处理软件 (美国沃特世公司); Eppendorf Centrifuge5424 R 离心机 (德国艾本德公司); Mettler Toledo PL402-L 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多集团)。

1.2 试剂及药材

色谱级甲醇、质谱级乙腈、质谱级甲酸均购自赛默飞世尔公司, 蒸馏水 (深圳屈臣氏蒸馏水有限公司)。

对照品牡荆素葡萄糖苷 (批号 111687-200501)、柚皮苷 (批号 110722-200610)、芸香柚皮苷 (批号 110734-200703)、橙皮苷 (批号 110721-201306)、新橙皮苷 (批号 110741-201104), 购于中国食品药品检定研究院; 槲皮素 (批号 CHB-M026-16031804)、绿原酸 (批号 CHB-Q-16051603)、新绿原酸 (批号 CHB-Q2-16071905)、隐绿原酸 (批号 CHB-Q3-16071905)、芦丁 (批号 CHB-L-16032204)、木犀草苷 (批号 CHB-C-160051206)、金丝桃苷 (批号 CHB-H-16041503)、桔皮素 (批号 CHB-M-16031206), 购于成都克洛玛生物科技有限公司; 川陈皮素 (实验室自制), 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮 (实验室自制); 所有对照品质量分数均大于 98%。

小儿扶脾颗粒提取物 (湖南省中医药研究院研制, 批号 20170412, 生药量: 每克干膏相当于 3.63 g 生药)。

2 方法

2.1 小儿扶脾颗粒化学成分数据库的构建

小儿扶脾颗粒由白术、陈皮、山楂、党参、莲子和茯苓 6 味中药组成, 随着近几十年来植物化学研究深入及质谱分析技术的不断发展, 积累了大量的化学成分信息, 通过国内外文献和相关的中药成分数据库的检索收集, 构建小儿扶脾颗粒 6 味中药材的化学成分数据库。

2.2 小儿扶脾颗粒供试品溶液和对照品溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 精密称取小儿扶脾颗粒提取物 2.0 g, 置于 25 mL 锥形瓶中, 精密加入 70% 的甲醇 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 冷却至室温, 称定质量后加 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 0.22 μm 的微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得小儿扶脾颗粒的供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取柚皮苷、橙皮苷、绿原酸对照品各 2 mg, 于 10 mL 的量瓶中, 用 70% 甲醇溶解并定容至刻度, 标记为混合对照品 1; 再精密称取新绿原酸、新橙皮苷、芸香柚皮苷各 2 mg, 于 10 mL 的量瓶中, 用 70% 甲醇溶解并定容至刻度, 标记为混合对照品 2; 另精密称取牡荆素葡萄糖苷、槲皮素、隐绿原酸、芦丁、木犀草苷、金

丝桃苷、桔皮素、川陈皮素、3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮各 5 mg, 于 25 mL 的量瓶中, 用 70% 甲醇溶解并定容至刻度, 标记为混合对照品 3; 3 个混合对照品溶液分别进样, 且进样前用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过。

2.3 色谱及质谱条件

2.3.1 液相条件 Waters HSS T3- C_{18} 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为甲醇 (A)-0.1% 甲酸水 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 3%~10% A; 5~25 min, 10%~40% A; 25~35 min, 40%~65% A; 体积流量 0.3 mL/min, 进样量 1 μL 。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子分别检测, 一级、多级模式分别扫描。离子源电压 3.5 kV, 毛细管加热温度为 350 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气压力 241.3 kPa, 辅气压力为 68.9 kPa, 离子源温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气、辅助气均为氮气。质谱质量轴校准采用外标法 (质量误差为 5×10^{-6}), 校准质量正离子选择 74.096 43、83.060 37、195.084 65、262.636 12、524.264 96 和 1 022.003 41, 负离子选择 230.101 74、249.152 99、407.280 30。一级全扫质量扫描范围为 m/z 100~1 500, 分辨率 30 000; 二级质谱采用依赖性扫描, 在一级扫描基础上选取前 3 强进行诱导碰撞解离 (CID) 获取其二级质谱数据。

3 结果与分析

3.1 小儿扶脾颗粒化学成分数据库的构建

通过台湾中医药资料库 (<http://tcm.cmu.edu.tw/>)、西北农林科技大学的中药系统药理学数据库和分析平台 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、华东师范大学生命科学院中医药生物信息数据库 (<http://www.megabionet.org/tcmid/>) 及电子数据库 Pubmed、Scifinder、CNKI 等^[7-18] 对小儿扶脾 6 味中药的化学成分进行了总结, 共检索到 541 个化学成分, 化合物信息包括化学成分名称、分子式、相对分子质量等信息, 其中白术 88 个、陈皮 103 个、山楂 91 个、党参 146 个、莲子 41 个、茯苓 72 个。

3.2 小儿扶脾颗粒样品主要色谱峰的鉴定及归属

为提高化合物的检出率, 实现化合物的高通量筛选, 本研究采用全扫描-动态排除和数据依赖性扫描, 建立了基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的液质联用分析方法, 对小儿扶脾颗粒中的化学成分进行检测和数据采集。根据各类化合物对照品和相关文献推测总结不同类别化合物的质谱裂解规律, 对于已知化合物, 通过提取离子流图和比对相关对照品

保留时间等达到准确快速鉴定, 对于未知化合物, 通过精确相对分子质量预测化合物分子式, 结合相关质谱裂解规律、文献数据、多级质谱碎片信息达到快速鉴定。结果共从小儿清解颗粒中快速鉴定化合物 84 个, 包括 31 个黄酮类化合物 (黄酮及其苷类 20 个, 多甲氧基黄酮类化合物 11 个)、8 个糖苷类化合物、6 个生物碱类化合物、12 个酚酸及其酯类化合物、7 个三萜类化合物, 其他化合物 20 个, 并对每个化合物的来源进行了归属。小儿扶脾颗粒 UPLC-LTQ-Orbitrap-MSⁿ 正、负离子模式下总离子流图见图 1, 小儿扶脾颗粒化学成分的保留时间、分子式、化合物名称、高分辨质谱母离子及差值、碎片离子信息、药材来源等信息数据见表 1。

3.3 各类化合物结构及裂解特点

3.3.1 多糖类化合物 小儿扶脾颗粒中的糖类化合物主要来自于茯苓, 与酸类化合物结合成苷, 在负离子模式下以 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 的准分子离子峰形式存在, 质谱高能碰撞下主要发生糖苷键断裂糖丢失, 以及 H_2O 的中性丢失而产生 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^{-}$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}_2\text{O}]^{-}$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-2\text{H}_2\text{O}]^{-}$ 离子碎片, 根据多糖类的质谱特点可以通过液质分析快速鉴定^[20]。本品鉴定出的糖类化合物主要有枸橼酸葡萄糖、枸橼酸二聚葡萄糖、五葡聚糖醛酸、 β -D-葡萄糖己烯醇苷、 β -D-葡萄糖正己醇苷等, 以化合物 3 枸橼酸二聚葡萄糖为例, 在负离子模式下得到 m/z 515.124 5 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 准分子离子峰, 根据二级质谱分析, 准分子离子峰在高能碰撞诱导解离, 首先丢失 1 分子 H_2O , 产生 m/z 497 碎片离子, 以及连续丢失 1 分子葡萄糖基 (glc, m/z 162)、2 分子葡萄糖基产生 m/z 353 碎片离子和枸橼酸的分子离子 m/z 191, 根据其碎片及断裂方式, 推测其结构为枸橼酸二聚葡萄糖, 见图 2。

3.3.2 黄酮类化合物 共鉴定了 31 个黄酮类化合物, 是小儿扶脾颗粒中成分最多的一类, 可分为 2 大类: 黄酮及其苷类和多甲氧基黄酮类。黄酮及其苷类化合物有 20 个, 复方中的单味药都有来源, 而 11 个多甲氧基黄酮类只存在陈皮中。黄酮苷类化合物的结构特点主要是与葡萄糖或鼠李糖等形成氧苷, 在质谱高能碰撞下连续苷键的断裂, 丢失糖基, 生成高强度的黄酮苷元碎片, 二级黄酮苷元质谱主要裂解方式有 $-\text{CO}$ 、 $-\text{CO}_2$ 、 $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}$ 、 H_2O 等中性离子的丢失等以及黄酮 C 环开环断裂模式。从小儿扶脾颗粒样品中鉴定的黄酮及其苷类成分有 6-羟基木犀

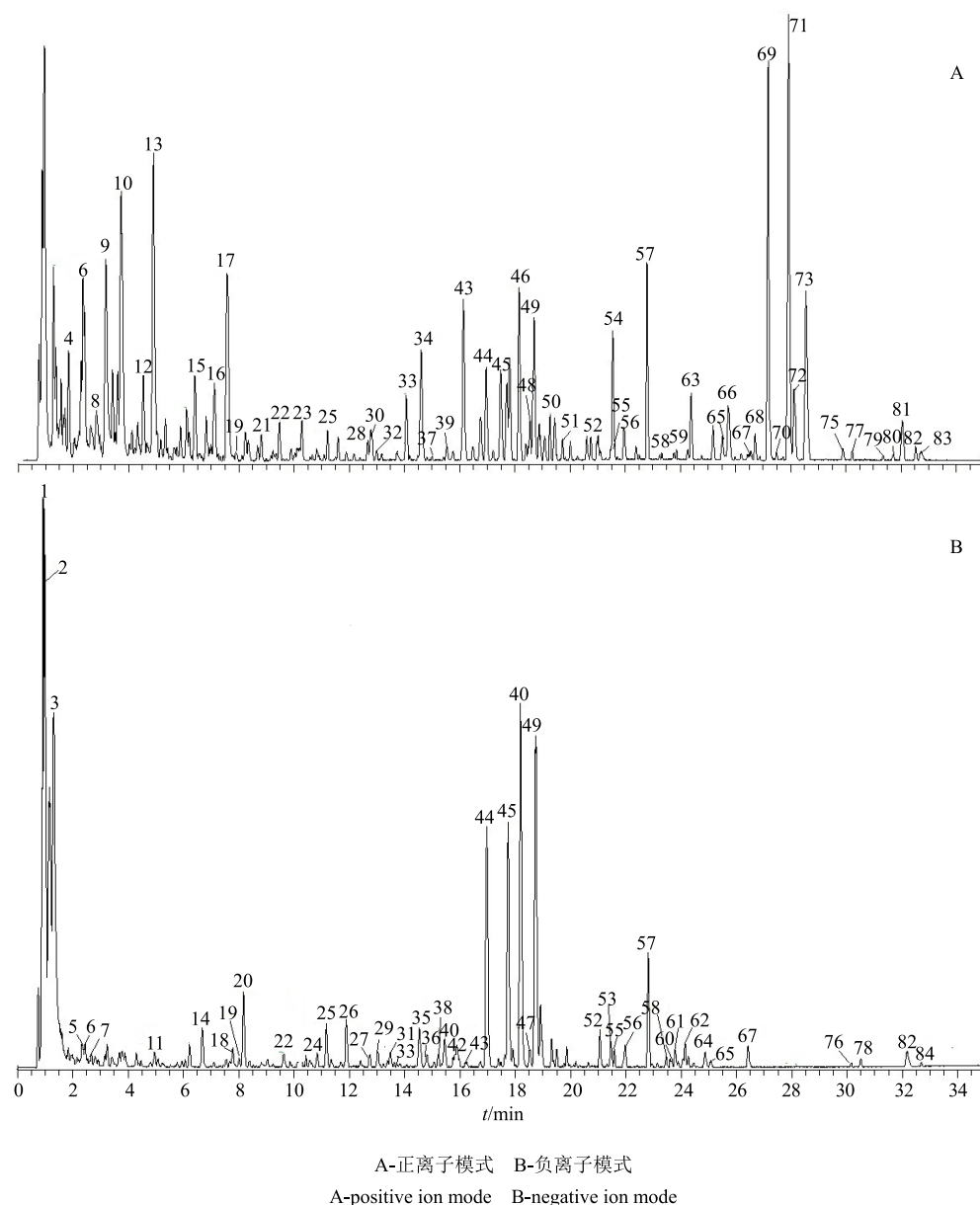


图 1 小儿扶脾颗粒 UPLC-LTQ-Orbitrap-MSⁿ 总离子流色谱图

Fig. 1 TIC of Xiaoer Fupi Granules by UPLC-LTQ-Orbitrap-MSⁿ

表 1 小儿扶脾化学成分质谱信息

Table 1 Mass spectrum information of compounds from Xiaoer Fupi Granules

序号	t_R/min	质荷比 (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物	碎片离子 (m/z)	来源
		M+H	M-H					
1	0.93		191.055 9	1.2	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	柠檬酸	-: 173, 147, 111	山楂 ^[8-10]
2	0.99		353.071 7	1.4	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	枸橼酸葡萄糖	-: 191, 173, 111	茯苓 ^[5,11-12]
3	1.28		515.124 5	2.1	$\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_{17}$	枸橼酸二聚葡萄糖	-: 353, 335, 317, 191, 173	茯苓 ^[5,11-12]
4	1.81	867.237 1		3.3	$\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_{27}$	五葡萄糖醛酸	+: 705, 543, 381, 209, 191	茯苓 ^[5,11-12]
5	2.36		337.112 6	1.8	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_9$	7-羟基香豆素葡萄糖苷酸	-: 319, 291, 205, 175	党参 ^[16-17]
6	2.45	283.140 0	281.124 7	-2.4	$\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_8$	辛酸	+: 265, 237	山楂 ^[8-10]
7	2.54		205.304 8	1.2	$\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_7$	甲基柠檬酸	+: 173, 155	山楂 ^[8-10]
8	2.69	445.191 9	443.174 6	0.8	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_8$	己烯雌酚葡萄糖苷酸	+: 427, 409, 363, 283 -: 425, 281, 237, 207	党参 ^[16-17]

续表 1

序号	t_R/min	质荷比 (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物	碎片离子 (m/z)	来源
		M+H	M-H					
9	3.19	127.038 9		3.0	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	间苯三酚	+: 109	山楂 ^[8-10]
10	3.73	263.154 8		1.5	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_6$	β -D-葡萄糖己烯醇苷	+: 161	党参 ^[16-17]
11	4.32		221.055 8	2.4	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$	β -桉叶醇	-: 203, 124	白术 ^[7]
12	4.53	425.198 2		2.7	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{11}$	槐糖己烯醇苷	+: 261, 222, 161	党参 ^[16-17]
13	4.90	297.156 1		1.2	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_8$	dipentaerythritol monoacetate	+: 279, 263, 237	党参 ^[16-17]
14*	5.29		353.086 4	0.3	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	绿原酸	-: 335, 191, 179	山楂 ^[8-10]
15	6.82	291.143 9		0.6	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	表儿茶素	+: 247, 207, 181	山楂 ^[8-10]
16	7.15	265.129 1		1.4	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_6$	β -D-葡萄糖正己醇苷	+: 247	白术 ^[7]
17	7.58	314.174 7		2.1	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_3$	莲心季胺碱	+: 269, 237, 175, 137, 107	莲子 ^[18]
18*	7.89		353.086 6	0.5	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	隐绿原酸	-: 191	山楂 ^[8-10]
19	8.02	153.019 9	151.007 2	0.2	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	原儿茶酸	+: 109	山楂 ^[8-10]
20	8.18		239.055 4	0.8	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5$	没食子酸异戊酯	-: 179, 149, 107	山楂 ^[8-10]
21	8.82	303.134 2		1.6	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	草质素	+: 285	党参 ^[16-17]
22	10.21	417.118 1	415.102 3	1.1	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	大豆苷	+: 399, 381, 255 -: 253	陈皮 ^[13-14,19]
23*	10.72	303.133 7		0.8	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	槲皮素	+: 285, 275, 259, 231	山楂/莲子 ^[8-10,18]
24	10.87		445.112 5	2.4	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	3'-甲氧基葛根素	-: 283, 265, 250	陈皮 ^[11]
25	11.18	595.166 5	593.149 3	1.3	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	山柰酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷	+: 577, 543, 433 -: 575, 473, 431, 353	山楂 ^[8-10]
26	11.88		433.112 5	1.0	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	异柚葡萄糖苷	-: 271, 151	山楂 ^[8-10]
27	12.78		425.201 2	1.8	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$	槐糖正己醇苷	-: 263, 161	白术 ^[7]
28	12.98	313.168 1		1.9	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_4$	12-千里光酰基-8-反式白术三醇	+: 283, 253	白术 ^[7]
29	13.03		563.137 8	0.4	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	芹菜苷	-: 431, 269, 251, 233	山楂/陈皮 ^[8-10,13-14,19]
30	13.12	261.112 1		0.6	$\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$	1,2,15-十五烷三醇	+: 253, 235, 205	白术 ^[7]
31	13.24		611.253 0	1.3	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	柚皮素-5,7-双-葡萄糖苷	-: 449, 431, 287	山楂 ^[8-10]
32	13.17	272.128 6		0.7	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_3$	去甲乌药碱	+: 254, 236	莲子 ^[16]
33*	13.36	449.108 0	447.091 6	1.5	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	木犀草苷	+: 431, 413, 383, 353 -: 357, 327	党参/莲子 ^[16-18]
34	13.49	471.206 8		0.4	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	党参苷 V	+: 407, 367, 325	党参 ^[16-17]
35	14.56	597.180 4	595.165 0	1.1	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	新北美圣草苷	-: 287, 151	山楂 ^[8-10]
36	14.78	457.301 1	455.296 0	0.5	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	熊果酸	+: 439, 411, 381 -: 437, 349	山楂/白术 ^[7-10]
37	15.05	432.346 6		0.4	$\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}_3\text{N}$	贝母甲素	+: 414, 396, 378	莲子 ^[18]
38*	15.18		609.183 9	1.6	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	芦丁	-: 591, 447, 343, 301	山楂/莲子 ^[8-10,18]
39	15.40	342.170 0		1.0	$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}$	3,4-二氢罂粟碱	+: 178	莲子 ^[18]
40*	15.42		463.086 8	0.6	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	金丝桃苷	-: 301	山楂/莲子 ^[8-10,18]
41	15.47		595.164 9	0.2	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	北美圣草苷	-: 459, 441, 357, 235	山楂 ^[8-10]
42	15.78		463.086 5	0.4	$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_4$	槲皮苷	-: 301	山楂/莲子 ^[8-10,18]
43	16.20	625.327 5	623.195 7	0.5	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$	甲基橙皮苷	+: 352, 313 -: 461, 315, 297, 167, 135	陈皮 ^[13-14,19]
44*	16.98	581.186 5	579.170 3	0.3	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	柚皮苷	+: 563, 545, 419, 401, 273 -: 459, 271, 151	陈皮 ^[13-14,19]
45*	17.72	581.186 2	579.170 3	0.8	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	芸香柚皮苷	+: 563, 545, 435, 419, 401, 383, 315, 273 -: 459, 357, 339, 313, 271, 235	陈皮 ^[13-14,19]
46*	18.19	611.196 4	609.184 0	1.1	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	新橙皮苷	+: 449, 431, 413, 369, 345, 303, 263 -: 301	陈皮 ^[13-14,19]

续表 1

序号	t_R/min	质荷比 (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	化合物	碎片离子 (m/z)	来源
		M+H	M-H					
47	18.51		441.175 2	2.4	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	熊果醇	—: 423, 379	山楂 ^[8-10]
48	18.60	355.184 9		1.8	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	14-乙酰基千里光酰基-12-反式 白术三醇	+: 337, 319	白术 ^[7]
49*	18.72	611.197 4	609.180 4	2.1	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	橙皮苷	+: 593, 575, 557, 465, 449, 303 —: 489, 343, 325, 301	陈皮 ^[13-14,19]
50	19.28	453.343 9		1.6	C ₃₁ H ₄₈ O ₂	22-去氢赤桐甾乙酸酯	+: 435, 387, 321	白术 ^[7]
51	19.44	261.111 8		3.3	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	乌药醚内酯	+: 243, 189	莲子 ^[18]
52*	21.05	595.202 6	593.185 6	1.4	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	牡荆素葡萄糖苷	+: 577, 437, 287 —: 309, 285	山楂 ^[8-10]
53	21.40		299.131 2	0.5	C ₁₈ H ₂₀ O ₄	咖啡酸甲酯	—: 279, 259	党参 ^[16-17]
54	21.55	366.170 8		0.7	C ₂₂ H ₂₄ NO ₄	去氢紫堇碱	+: 326	莲子 ^[18]
55	21.56	711.204 3	709.196 4	0.8	C ₃₉ H ₃₈ N ₂ O ₁₁	野罂粟碱	+: 405, 390 —: 647, 607, 567, 403	莲子 ^[18]
56	21.96	727.898 1	725.887 5	0.9	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₇	党参苷 III	+: 710, 700, 615, 566, 403	党参 ^[16-17]
57	22.80	725.229 4	723.211 9	0.3	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₈	melitidin	+: 419 —: 607, 417, 402	陈皮 ^[13-14,19]
58	23.15	511.213 1	509.195 6	1.2	C ₃₂ H ₅₂ O ₄	茯苓酸甲酯	+: 493, 465, 451, 403 —: 491, 401	茯苓 ^[5,11-12]
59	23.35	369.217 3		0.7	C ₂₂ H ₄₀ O ₄	2-丁烯二酸单十八酯	+: 337	陈皮 ^[13-14,19]
60	23.45		281.138 3	1.5	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	没食子酸异辛酯	—: 261, 237, 219, 191, 87	陈皮 ^[13-14,19]
61	23.67		301.070 9	2.1	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	橙皮素	—: 286, 268, 258, 242, 215, 199, 174, 164	陈皮 ^[13-14,19]
62	24.12		329.232 3	0.8	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	松香酸乙酯	—: 311, 309, 293, 229, 211	陈皮 ^[13-14,19]
63*	24.39	373.128 4		0.5	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	桔皮素	+: 358, 343, 329, 268, 136	陈皮 ^[13-14,19]
64	24.87		283.136 3	1.2	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	十八酸	—: 217	陈皮/党参 ^[13-14,16-17,19]
65	25.16	403.139 7		1.4	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	六甲氧基黄酮	+: 388, 373, 342, 324, 296, 235, 163	陈皮 ^[13-14,19]
66	25.74	373.128 4		1.2	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	异橙黄酮	+: 358, 313	陈皮 ^[13-14,19]
67	26.42		469.185 2	1.5	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	16 α -羟基松苓新酸	—: 321, 306, 229	茯苓 ^[5,11-12]
68	26.70	403.138 9		3.1	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	六甲氧基黄酮	+: 388, 373, 355, 327	陈皮 ^[13-14,19]
69*	27.18	403.138 5		2.1	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	川陈皮素	+: 388, 373, 355, 327, 163	陈皮 ^[13-14,19]
70	27.51	389.123 1		0.8	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	去甲基陈皮素	+: 374, 359, 341	陈皮 ^[13-14,19]
71*	27.92	433.149 7		0.6	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	+: 418, 403, 385, 323, 280, 213	陈皮 ^[13-14,19]
72	28.13	231.138 2		0.3	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	白术内酯 I	+: 213, 195, 185, 171, 149	白术 ^[7]
73	28.55	373.128 5		2.1	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	甜橙素	+: 358, 343, 312	陈皮 ^[13-14,19]
74	29.11	391.284 0		1.2	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	邻苯二甲酸二正辛酯	+: 373, 351, 333, 277	陈皮 ^[13-14,19]
75	29.84	403.138 6		1.8	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	六甲氧基黄酮	+: 388, 373, 355, 342	陈皮 ^[13-14,19]
76	30.16		313.237 5	0.4	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	十八烷二酸	—: 295, 277, 267, 249	白术 ^[7]
77	30.24	389.123 0		0.5	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮	+: 374, 359, 341	陈皮 ^[13-14,19]
78	30.49		313.237 4	0.6	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	十六碳二酸二甲酯	—: 298, 283, 267	白术 ^[7]
79	31.34	419.133 5		0.8	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	8-羟基-3,5,6,7,3',4'-六甲氧基黄酮	+: 404, 389, 371, 355	陈皮 ^[13-14,19]
80	31.71	233.133 5		0.4	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	白术内酯 II	+: 215, 187, 151	白术 ^[7]
81	32.04	233.133 6		0.5	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	异土木香内酯	+: 233, 215, 187, 151	白术 ^[7]
82	32.15	265.147 2		0.7	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	灌木远志酮 A	+: 247, 229	党参 ^[16-17]
83	32.55	521.339 4		1.1	C ₃₀ H ₄₈ O ₇	葫芦素 II _B	+: 503, 473	白术 ^[7]
84	32.69		339.231 7	1.3	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	1-peroxyferolide	—: 319, 163	党参 ^[16-17]

*为通过对照品比对鉴定 “+”-正离子模式 “-”-负离子模式

*confirmation by reference substance “+”-positive ion mode “-”-negative ion mode

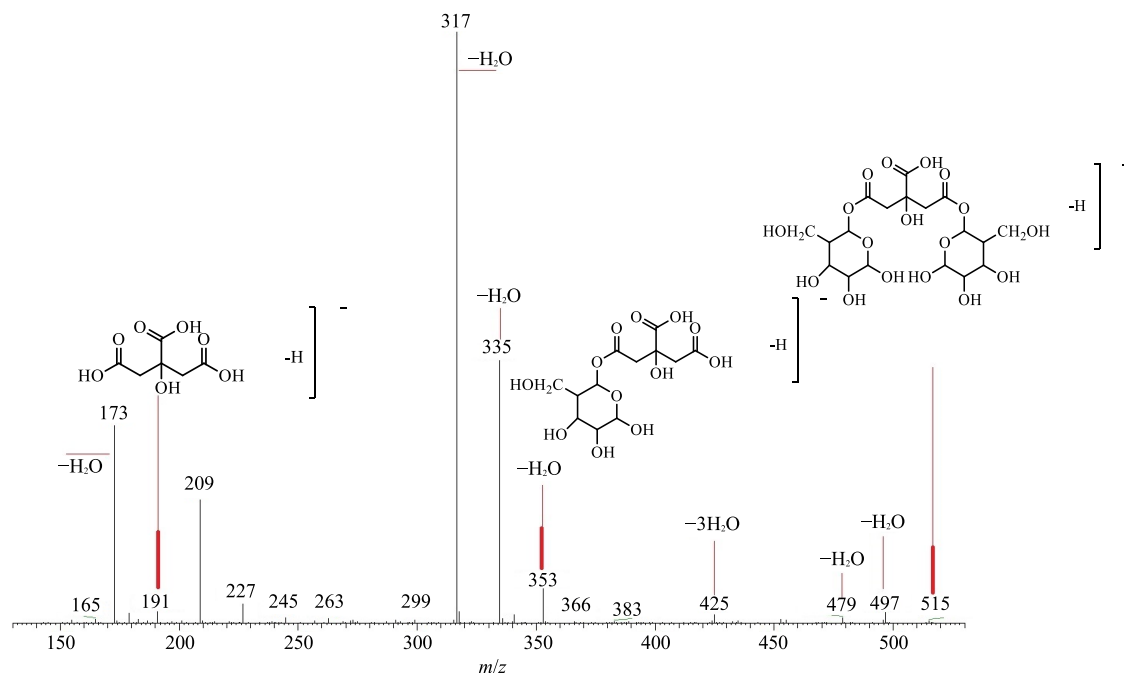


图 2 化合物 3 枸橼酸二糖的二级碎片

Fig. 2 Fragment pathways of compound 3

草素、大豆苷、槲皮素、木犀草苷、新北美圣草苷、芦丁、金丝桃苷、北美圣草苷、槲皮苷、甲基橙皮苷、柚皮苷、芸香柚皮苷、新橙皮苷、橙皮苷、牡荆素葡萄糖苷等，由于这类化合物的同分异构体较多，如柚皮苷(44)和异柚皮苷(45)，新橙皮苷(46)和橙皮苷(49)，结构见图 3，通过小儿扶脾化学成分数据库、相关文献参考以及对照品比对进行鉴定。

以橙皮苷(49)和新橙皮苷(46)为例，其一级质谱在正、负离子模式下的 $[M+H]^+$ 和 $[M-H]^-$ 一致，但与其对照品保留时间分别为 18.72 和 18.19 min，得以区分，橙皮苷在正、负离子模式下得到 m/z 611.197 4 $[M+H]^+$ ，633.179 4 $[M+Na]^+$ ，609.184 0 $[M-H]^-$ ，根据正离子的二级质谱的数据分析，可见 $[M+H]^+$ 连续丢失鼠李糖 (m/z 146) 和葡萄糖 (m/z 162) 而生成碎片离子 m/z 465, 303，

以及一些脱水峰 m/z 593, 575, 557, 448 等，并呈现出高强度的黄酮苷元离子峰 m/z 303，还可以看到苷元的裂解碎片峰 m/z 285, 195，见图 4。

多甲氧基黄酮为陈皮中常见的具有生物活性的一类化合物，属于柑橘属植物化学成分的一大特点^[20-23]，在黄酮的母核上不同位置有 4 个或以上的甲氧基取代，相比黄酮类化合物来说极性较弱。一级质谱在正离子模式下以 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 的准分子离子峰的形式存在，在负离子模式下无质谱检测信号，在相对分子质量方面，黄酮母核的分子式为 $C_{15}H_{10}O_2$ ，相对分子质量为 222，黄酮及多甲氧基黄酮在其 3,5,6,7,8,2',3',4',5' 增加 OH 和 OCH_3 ，因此其相对分子质量为 $(222+16n_1+30n_2)$ ， n 为取代基的个数，即黄酮及多氧甲基黄酮的相对分子质量为此一固定值 ($1 \leq n_1+n_2 \leq 10$)，这有助于液质分

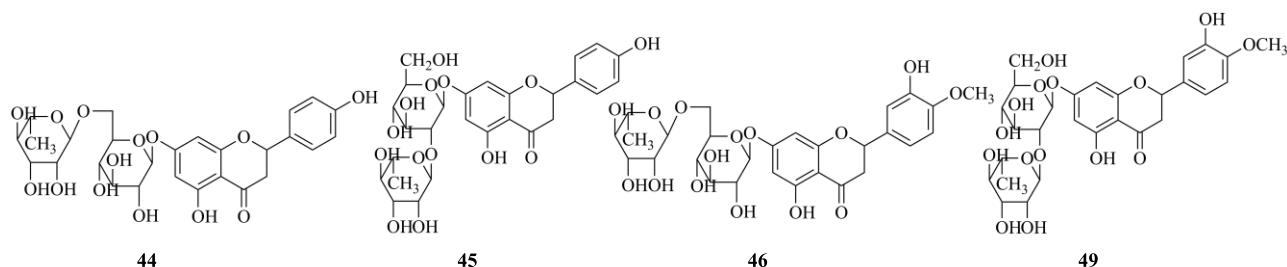


图 3 化合物 44~46、49 的结构

Fig. 3 Structures of compounds 44—46 and 49

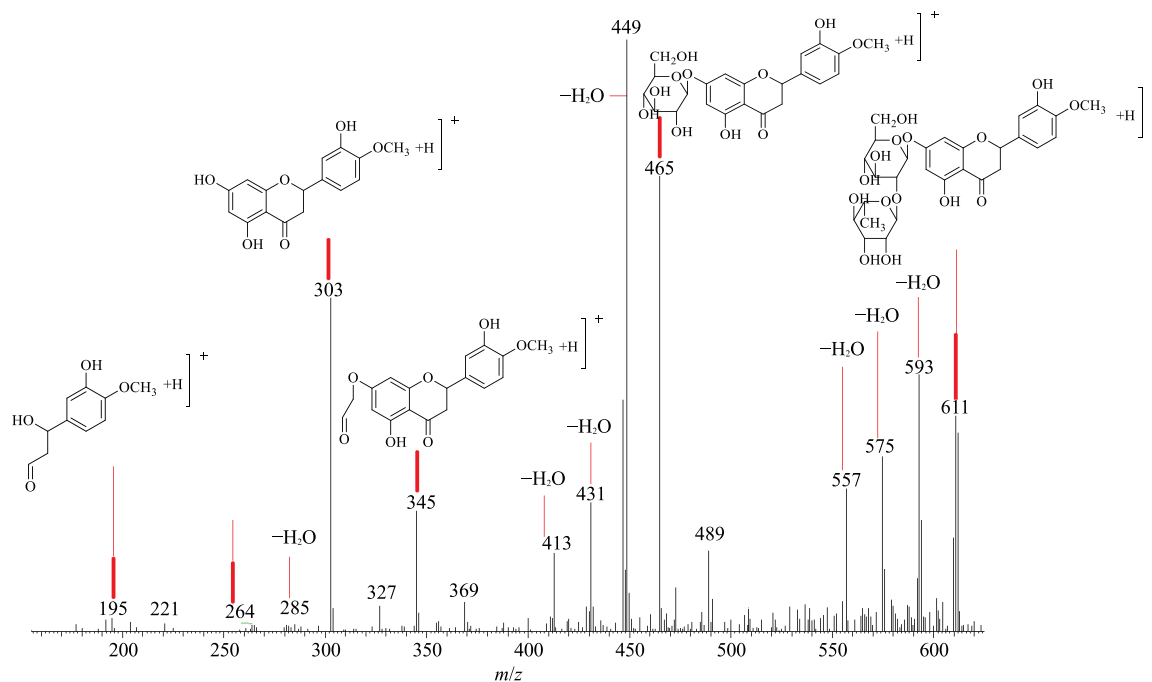


图 4 橙皮苷的 MS/MS 裂解过程

Fig. 4 MS/MS fragment pathways of compound 49

析黄酮及多甲氧基黄酮类成分的快速鉴定, 见表 2。从小儿扶脾颗粒中鉴定 11 个多甲氧基黄酮类, 根据此类化合物的分子式和相对分子质量规则, 分析得到 6 种结构类型的多甲氧基黄酮, 其中四甲氧基黄酮 1 个 (m/z 342)、五甲氧基黄酮 2 个 (m/z 372)、

六甲氧基黄酮 4 个 (m/z 402)、七甲氧基黄酮 1 个 (m/z 432)、羟基五甲氧基黄酮 2 个 (m/z 388), 羟基六甲氧基黄酮 1 个 (m/z 418)。由于这类化合物的同分异构体较多, 通过小儿扶脾颗粒化学成分数据库、相关文献参考以及对照品进行比对进行鉴定。

表 2 黄酮及多甲氧基黄酮分子式和相对分子质量规律表

Table 2 Rule of flavonoid and polymethoxyflavones molecular formula and molecular weight

取代基	母核	OH (16)	2OH (32)	3OH (48)	4OH (64)	5OH (80)	6OH (96)
—	C ₁₅ H ₁₀ O ₂	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
	222	238	254	270	286	302	318
OCH ₃	C ₁₆ H ₁₂ O ₃	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	C ₁₆ H ₁₂ O ₈	C ₁₆ H ₁₂ O ₉
(30)	252	268	284	300	316	332	348
2OCH ₃	C ₁₇ H ₁₄ O ₄	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	C ₁₇ H ₁₄ O ₉	C ₁₇ H ₁₄ O ₁₀
(60)	282	298	314	330	346	362	378
3OCH ₃	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	C ₁₈ H ₁₆ O ₉	C ₁₈ H ₁₆ O ₁₀	C ₁₈ H ₁₆ O ₁₁
(90)	312	328	344	360	376	392	408
4OCH ₃	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	C ₁₉ H ₁₈ O ₉	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₀	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₂
(120)	342	358	374	390	406	422	438
5OCH ₃	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₁	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₂	—
(150)	372	388	404	420	436	452	—
6OCH ₃	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₁	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₂	—	—
(180)	402	418	434	450	450	—	—
7OCH ₃	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₁	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂	—	—	—
(210)	432	458	464	480	—	—	—

括号内数值为相对分子质量

Number in parentheses means relative molecular mass

以川陈皮素(69)为例,其一级质谱在正离子模式下得到 m/z 403.138 5 $[M+H]^+$, 确定其分子式为 $C_{21}H_{22}O_8$, 通过黄酮类化合物相对分子质量规律确定为六甲氧基黄酮。根据正离子的二级质谱的数据分析,可见 $[M+H]^+$ 连续丢失 CH_3 而生成碎片离

子 387, 372, 以及脱甲氧基、羰基 m/z 342, 296 等, 还可以看到苷元的裂解碎片峰, 如 m/z 248, 235, 163 等, 与对照品比对, 确认化合物 69 为川陈皮素, 其裂解方式见图 5。

3.3.3 酚酸类化合物 小儿扶脾颗粒中已鉴定的酚

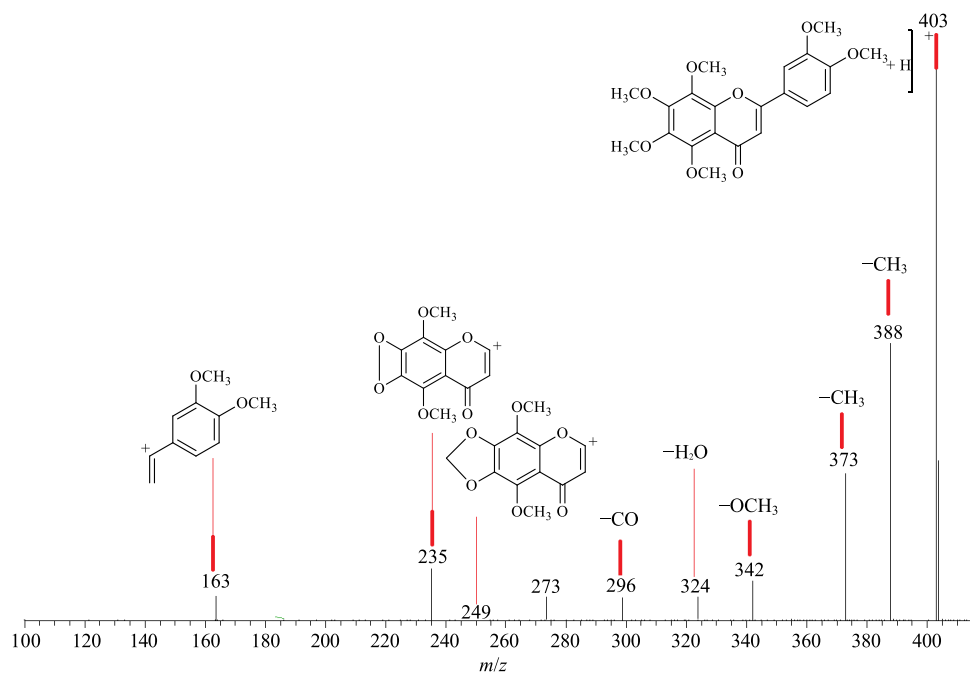


图5 川陈皮素的 MS/MS 裂解过程

Fig. 5 MS/MS fragment pathways of nobiletin

酸类化合物共 12 个, 酚酸类化合物一级质谱负离子模式的响应较好, 二级质谱主要表现为脱去 H_2O 、 CO , 从小儿扶脾颗粒中分离得到的酚酸类化合物主要有柠檬酸、辛酸、甲基柠檬酸、绿原酸、新绿原酸等, 以绿原酸为例, 根据其一级质谱数据, 在负离子模式下得到 m/z 353.086 4 $[M-H]^-$, 确定其分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$ 。根据负离子的二级质谱的裂解碎片峰, 如 m/z 335, 191, 179 等, 为脱去 1 个 H_2O 、 $[quinic\ acid-H]$ 和 $[caffeic\ acid-H]$, 与对照品比对, 确认化合物 14 为绿原酸。

4 讨论

复方中药成分复杂多样且极性差异较大, UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 具有高分离度, 高灵敏度, 高精密度的特点, 且在样品分析过程中实现一级质谱 MS 和多级质谱 MS^n 可同步采集, 同时得到一级质谱分子离子峰, 以及二级、三级碎片离子的质谱数据, 从而达到化合物成分的快速鉴定的目的。本实验采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 对小儿扶脾颗粒

成分进行分析, 结果从小儿扶脾颗粒中快速鉴定化合物 84 个, 主要为黄酮类、糖苷类、酚酸类等, 其中来源于白术 13 个、陈皮 25 个、山楂 22 个、党参 12 个、莲子 7 个、茯苓 5 个。

小儿扶脾颗粒的化学成分研究表明来源于中药陈皮和山楂的化合物较多, 共 47 个, 陈皮和山楂具有理气健脾之功效, 在我国用于促进消化功能已有上千年历史, 且在以上成分中黄酮类化合物较多。现代药理学研究表明多甲氧基黄酮类化合物(川陈皮素和橘皮素)具有更强提高胃蛋白酶活性, 促进蛋白酶排出量, 促进正常小鼠小肠推进运动, 增强肠蠕动的功能^[24]; 川陈皮素对小肠平滑肌收缩性产生双向调节作用^[25]; 橙皮苷可能通过升高血清胃泌素的含量和抑制血浆乙酰胆碱、P 物质、胃动素和血管活性肠肽的分泌来促胃肠运动^[26]; 由此可见, 小儿扶脾颗粒中的黄酮类化合物, 尤其是多甲氧基黄酮类化合物可能是治疗小儿脾胃气虚, 消化不良的药效物质基础。

通过 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 液质分析, 根据多糖类化合物的质谱裂解规律及特点, 从小儿扶脾中新发现了 3 个糖类化合物: 五葡聚糖醛酸、枸橼酸二聚葡萄糖、枸橼酸葡萄糖, 推导分析该类化合物可能来源于茯苓。同时根据黄酮类化合物分子式和相对分子质量特点, 以及裂解碎片等信息判断甲氧基取代个数, 并结合多级质谱裂解规律建立了快速鉴定和发现黄酮类及多甲氧基黄酮类化合物的方法。

研究结果表明, UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 可以快速、系统地对小儿扶脾中化学成分进行定性分析。研究较为全面系统地阐明小儿扶脾的化学成分组成、探究其药效物质基础, 为小儿扶脾的质量控制研究及临床应用提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 许志荣. 升脾降胃法治疗小儿厌食症临床体会 [J]. 中医儿科杂志, 2017, 13(1): 53-55.
- [2] 袁杰, 胡以信. 小儿扶脾颗粒治疗小儿厌食症的疗效观察 [J]. 临床医药实践, 2013, 22(2): 93-94.
- [3] 李朝平, 黄建良. 小儿扶脾颗粒治疗小儿厌食症疗效观察 [J]. 实用医药杂志, 2015, 32(7): 627-628.
- [4] 段讲用. 小儿扶脾颗粒联合硫酸锌治疗小儿厌食症的效果与安全性观察 [J]. 河南医学研究, 2016, 25(8): 1475-1476.
- [5] 康安, 郭锦瑞, 谢彤, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap 质谱联用技术分析茯苓中的化学成分 [J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 561-565.
- [6] 周立分, 赵栋云, 刘霞, 等. LTQ-Orbitrap MS 在中药研发中的应用 [J]. 江西中医药, 2017, 48(12): 75-78.
- [7] 钟艳梅, 冯毅凡, 郭姣. 基于 UPLC/Q-TOFMS 技术的白术药材化学成分快速识别研究 [J]. 质谱学报, 2015, 36(1): 72-77.
- [8] 乔晓莉, 吴士杰, 祁向争, 等. 山楂中化学成分的 UPLC/ESI-TOF/MS 分析 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(2): 120-124.
- [9] Nikolov N, Seligmann O, Wagner H, et al. New flavonoid-glycosides from *Crataegus monogyna* and *Crataegus pentagyna* [J]. *Planta Med*, 1982, 44(1): 50-53.
- [10] 詹琤琤, 段时振, 李杰. 中药山楂的化学成分与药理作用研究概况 [J]. 湖北中医杂志, 2012, 34(12): 77-79.
- [11] Zhu L, Xu J, Zhang S, et al. Qualitatively and quantitatively comparing secondary metabolites in three medicinal parts derived from *Poria cocos* (Schw.) Wolf using UHPLC-QTOF-MS/MS-based chemical profiling [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 150(11): 278-286.

- [12] 徐硕, 姜文清, 邱咏梅, 等. 茯苓的化学成分及生物活性研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2016, 31(3): 327-330.
- [13] 杨洁. 陈皮化学成分的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2013.
- [14] Zhao Y, Kao C P, Liao C R, et al. Chemical compositions, chromatographic fingerprints and antioxidant activities of *Citri Exocarpium Rubrum* (Juhong). [J]. *Chin Med*, 2017, 12(1): 6-21.
- [15] 吴宏伟, 雷海民, 李强, 等. 高效液相色谱法测定陈皮多甲氧基黄酮部位中 3 种黄酮的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 15(12): 1895-1897.
- [16] Ma X Q, Leung A K, Chan C L, et al. UHPLC UHD Q-TOF MS/MS analysis of the impact of sulfur fumigation on the chemical profile of *Codonopsis Radix* (Dangshen). [J]. *Analyst*, 2013, 139(2): 505-516.
- [17] 黄圆圆, 张元, 康利平, 等. 党参属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 239-250.
- [18] Sharma B R, Gautam L N S, Adhikari D, et al. A comprehensive review on chemical profiling of *Nelumbo nucifera*: Potential for drug development [J]. *Phytotherapy Res*, 2017, doi:10.1002/ptr.5732.
- [19] 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.
- [20] 许光. 基于质谱数据的糖组学解析系统和新方法研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.
- [21] 何英杰, 刘东波, 唐其, 等. 酸橙类中药材枳实和枳壳化学成分研究进展 [J]. 中药材, 2017, 40(6): 1488-1494.
- [22] Zhou D Y, Xing R, Xu Q, et al. Polymethoxylated flavones metabolites in rat plasma after the consumption of *Fructus aurantii*, extract: Analysis by liquid chromatography/electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(3): 543-549.
- [23] Zhou D Y, Xu Q, Xue X-Y, et al. Characterization of polymethoxylated flavones in *Fructus aurantii* by off-line two-dimensional liquid chromatography/electrospray ionization-ion trap mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 49(2): 207-213.
- [24] 傅曼琴, 肖更生, 吴继军, 等. 广陈皮促消化功能物质基础的研究 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(1): 56-64.
- [25] Xiong Y, Chen D, Yu C, et al. Citrus nobilisin ameliorates experimental colitis by reducing inflammation and restoring impaired intestinal barrier function [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(5): 829-842.
- [26] 宋玉鹏, 陈海芳, 胡源祥, 等. 陈皮及其主要活性成分对脾虚模型大鼠血清胃泌素、血浆乙酰胆碱、P 物质、胃动素和血管活性肠肽的影响 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(3): 79-83.