

基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的参桂胶囊中主要化学成分研究

李 宁

郑州大学附属肿瘤医院, 河南省肿瘤医院 药学部, 河南 郑州 450008

摘 要:目的 为更加全面、系统、快速地表征参桂胶囊有效化学成分谱, 采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术对参桂胶囊中主要化学成分进行快速识别和归属分类。方法 采用 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)为流动相进行梯度洗脱, 以实现化合物的前期分离; 然后通过 Q-Orbitrap MS 正、负离子同时监测, 一级全扫描及自动触发二级质谱扫描的模式捕捉未知成分的精确相对分子质量及碎片离子信息, 同时与对照品的保留时间和质谱数据信息进行匹配, 并结合相关文献以及 Chemical Book、Mass Bank 等数据库最终实现对中药中复杂成分的快速准确识别。结果 本研究共鉴定出 40 种化学成分, 其中包括 16 种皂苷类、6 种有机酸类、13 种内酯类及 5 种其他类。结论 本法可快速、准确地识别参桂胶囊中主要化学成分, 同时为其进一步的药效物质基础、质量控制及临床合理应用等研究奠定了科学的前期基础。

关键词: 参桂胶囊; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; 皂苷类; 有机酸类; 内酯类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)03-0573-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.03.007

Main chemical constituents of Shengui Capsules based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

LI Ning

Department of Pharmacy, Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Henan Cancer Hospital, Zhengzhou 450008, China

Abstract: Objective In order to study the chemical profile of Shengui Capsules, a novel ultra high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) was applied to establish a method to recognize and classify the ingredients accurately and rapidly. **Methods** ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ chromatographic column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was employed and the separation was performed with the mobile phase consisting of acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution. The information of accurate mass and multistage fragment ions were obtained by the novel “monitored simultaneously for positive and negative ions, Full MS scan and automatic trigger secondary mass spectrometry” mode of Q-Orbitrap MS technology. Then, the complex chemical constituents would be identified by comparing the relative retention time and the mass data of the reference substance, and consulting the reference literature or Mass Bank, Chemical Book network database at the same time. **Results** Forty chemical components were finally identified in this study, including the 16 triterpene saponins, 6 organic acids, 13 lactones, and 5 other classes. **Conclusion** The method established in this study could be used to rapidly, accurately, and systematically identify the main chemical constituents of Shengui Capsules. Moreover, this study will lay a scientific preliminary foundation for the further pharmacodynamic material basis, quality control improvement and the rational clinical use.

Key words: Shengui Capsule; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; triterpene saponins; organic acids; lactones

参桂胶囊是由红参、桂枝和川芎 3 味药材在传统中医药理论的指导下配伍精制而成的中药复方制剂, 目前收载于《中国药典》2015 年版一部。该药具有益气通阳、活血化瘀之功效, 临床上主要用于

心阳不振、气虚血瘀等证的治疗, 症如胸部刺痛、面色少华, 以及冠心病、心绞痛等^[1]。

参桂胶囊疗效确切, 临床应用广泛, 然而中药化学成分复杂多样, 且中药疗效是药物中多种活性

收稿日期: 2018-06-19

作者简介: 李 宁, 男, 副主任药师, 研究方向为中药质量控制。Tel: (0371)65587016 E-mail: lining7621@126.com

成分综合协同作用的共同结果,因此,明确药物化学成分组成对于中药临床使用的安全、有效具有至关重要的作用^[2-3]。查阅文献发现,当前鲜有关于参桂胶囊化学成分的相关报道,虽然有个别研究对该药中的阿魏酸和桂皮醛含量进行了相应规定,但仍难以较为全面地表征该药的化学成分组成^[4-5]。因此,当前亟需建立一种系统、准确的分析方法以对参桂胶囊中的化学成分进行快速识别和全面表征,同时为该药更加安全、有效地临床应用提供一定的技术保障。

随着分析方法的快速发展,具有高分离性、高灵敏度以及高选择性的液质联用技术已经成为中药复杂化学成分分析的重要手段。本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术建立一种科学、准确的分析方法以实现参桂胶囊中主要化学成分的精确定性,共鉴定出 40 种化学成分,其中包括 16 种皂苷类、6 种有机酸类、13 种内酯类及 5 种其他类,并明确各成分的药材归属。该研究将为参桂胶囊的化学成分分析提供一定的科学依据,同时为其今后药效物质基础、质量控制及临床合理应用等研究奠定扎实的前期基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UHPLC-Q-Orbitrap 液质联用系统: Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪配置四元梯度泵、自动进样器、在线脱气机及柱温箱(美国 Dionex 公司); Q Exactive 型高分辨质谱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 型色谱柱(美国 Waters 公司); MDS-6G 型多通量微波消解/萃取系统(上海新仪微波化学科技有限公司); New Classic MS 型十万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 上海有限公司)。

1.2 试剂

对照品人参皂苷 Re (批号 MUST-17020715)、人参皂苷 Rg₁ (批号 MUST-17021414)、人参皂苷 Rg₃ (批号 MUST-17030711)、肉桂酸(批号 MUST-17031604)、原儿茶酸(批号 MUST-16032112)、原儿茶醛(批号 MUST-15091608)、阿魏酸(批号 MUST-15091605)、洋川芎内酯 I (批号 MUST-16053115)、Z-藁本内酯(批号 MUST-16060801)、阿魏酸乙酯(批号 MUST-15103105)、

豆甾醇(批号 MUST-17062802)、欧当归内酯 A (批号 MUST-16041516)、绿原酸(批号 MUST-16031610)均购于成都曼思特生物科技有限公司; 洋川芎内酯 A (批号 wkq16050603) 购于四川维克奇生物科技有限公司; 以上对照品经峰面积归一化法测定质量分数均大于 99%。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯(美国 Fisher 公司); 水为超纯水(电导率为 0.1~0.055 μs/cm); 其他试剂为分析纯(均购于天津科密欧化学试剂有限公司); 参桂胶囊(上海玉丹药业有限公司, 批号 20170802)。

2 方法

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 以乙腈为流动相 A, 0.1% 甲酸水溶液为流动相 B, 梯度洗脱: 0~1.0 min, 5% A; 1.0~3.0 min, 5%~30% A; 3.0~15.0 min, 30%~40% A; 15.0~25.0 min, 40%~50% A; 25.0~32.0 min, 50%~65% A; 32.0~42.0 min, 65%~100% A; 42.0~47.0 min, 100% A; 体积流量为 0.2 mL/min; 进样量 5 μL; 柱温 40 °C。

2.1.2 质谱条件 UHPLC-Q Exactive 液质联用仪(Thermo Fisher 公司, 美国): 离子源采用 HESI 源(heated ESI), 辅助气和离子传输管温度分别为 300 °C 和 320 °C, 辅助气体积流量为 10 μL/min; 正离子模式: 喷雾电压 3.50 kV, 鞘气体积流量 40 μL/min; 负离子模式: 喷雾电压 2.80 kV, 鞘气体积流量 38 μL/min。本实验扫描方式采用正、负离子同时扫描的 Full MS/dd-MS² 模式, 其中包括 1 次一级(分辨率为 70 000 FWHM) 全扫描和 1 次数据依赖的(分辨率为 17 500 FWHM) 二级扫描 2 个事件, 质荷比窗口宽度设置为 2, 碰撞能梯度为 20、50、100 eV, 扫描范围 m/z 80~1 200。

2.2 溶液的制备

2.2.1 样品溶液的制备 取参桂胶囊 3 粒, 去壳, 取内容物约 1.0 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密量取并加入纯甲醇 50 mL, 密塞并称定质量, 微波萃取(功率 600 W) 17 min, 摇匀后经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得样品溶液。

2.2.2 对照品溶液的制备 取各对照品约 1.0 mg, 精密称定并置于 10 mL 量瓶中, 加入纯甲醇并稀释至刻度, 摇匀制备成 0.1 mg/mL 的单一对照品储备液; 分别量取上述储备液适量, 混合后加入纯甲醇

稀释, 使最终制备成各质量浓度均为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3 化学结构分析

按照“2.1”项下优化后的色谱、质谱条件进样, 根据高分辨质谱提供的准分子离子及加荷离子等信息推测并得到一级质谱的精确相对分子质量, 经 Xcalibur 2.0 软件拟合计算相应的分子式, 并与 CD (compound discovery, 2.1) 化合物分析鉴定软件和本地数据库相匹配, 初步对在高分辨质谱下捕捉到的各种成分进行前期推测, 再依据对照品、参考文献、Mass Bank 或 Chemical Book 等数据库提供的相对保留时间及高能碰撞下产生的碎片离子信息进一步确认, 最终达到准确性未知化学成分的目的。

3 结果与分析

参桂胶囊样品及混合对照品溶液在色谱、质谱条件下采集得到的 UHPLC-Q-Orbitrap 总离子流图, 分别见图 1 及图 2。按照“2.3”项下方法确定的化合物结构, 从本品中共鉴定得到 40 种化学成分, 其中 14 种经对照品比对确证, 结果见表 1。

3.1 皂苷类

从本品中鉴定出的皂苷类化合物主要为人参皂苷, 该类化合物是人参属植物特有的一种固醇类化合物, 来源于参桂胶囊中的人参。人参皂苷类化合物具有相同的基本结构, 其母核结构大部分是由 17 个碳原子组成的四元环, 同时由于该类化合物中含有多个葡萄糖基团, 其在质谱条件下易依次发生糖

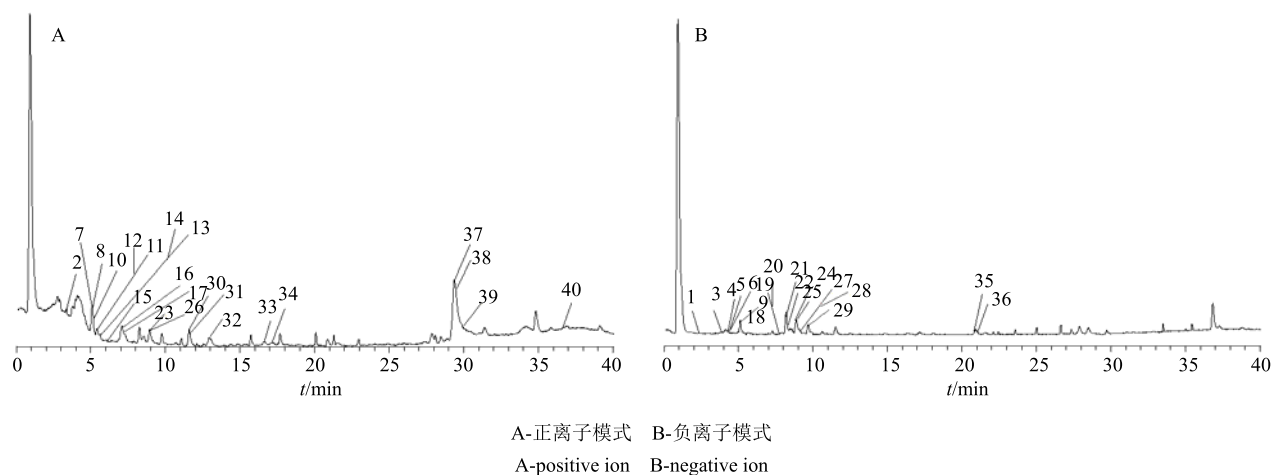


图 1 参桂胶囊总离子流图
Fig. 1 Total ion chromatogram of Shengui Capsules

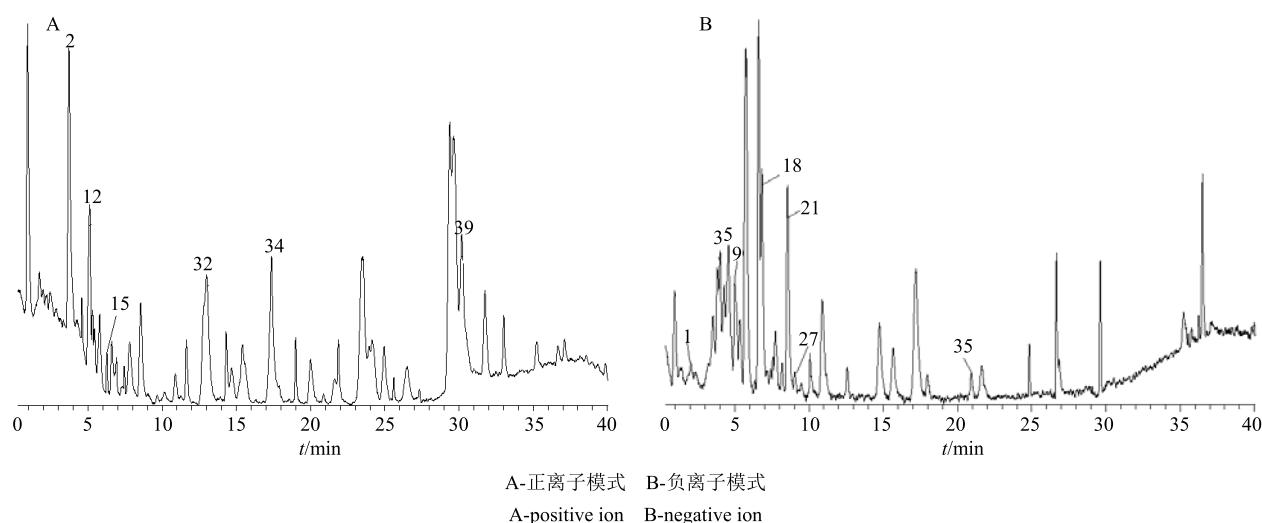


图 2 混合对照品总离子流图
Fig. 2 Total ion chromatogram of mixed standard references

表 1 参桂胶囊化学成分鉴定结果

Table 1 Chemical composition identified in Shengui Capsules

编号	化合物名称	分子式	t/min	m/z (实测)	m/z (理论)	误差 ($\times 10^{-6}$)	模式	碎片离子 m/z	归属
1	原儿茶酸 ^R	C ₇ H ₆ O ₄	2.39	153.018 19	153.019 33	-7.463	负	109.03 [M-H-CO ₂] ⁻ , 91.02 [M-H-CO ₂ -H ₂ O] ⁻	b
2	原儿茶醛 ^R	C ₇ H ₆ O ₃	3.50	139.038 70	139.038 97	-1.946	正	111.04 [M+H-CO] ⁺ , 93.03 [M+H-CO-H ₂ O] ⁺ , 65.04 [M+H-CO-H ₂ O-CO] ⁺	b
3	绿原酸 ^R	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.85	353.087 86	353.087 80	0.155	负	191.06 [M-H-C ₆ H ₆ O ₃] ⁻ , 173.04 [M-H-C ₆ H ₆ O ₃ -H ₂ O] ⁻ , 161.02 [M-H-C ₇ H ₁₂ O ₆] ⁻ , 135.04 [M-H-C ₈ H ₁₀ O ₇] ⁻ , 109.03 [M-H-C ₈ H ₁₀ O ₇ -C ₂ H ₂] ⁻	c
4	香草醛 ^[6]	C ₈ H ₈ O ₃	4.51	151.038 96	151.040 06	-7.332	负	136.02 [M-H-CH ₃] ⁻ , 123.04 [M-H-CO] ⁻ , 108.02 [M-H-CO-CH ₃] ⁻	c
5	阿魏酸 ^R	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	4.68	193.049 87	193.050 63	-3.948	负	178.03 [M-H-CH ₃] ⁻ , 149.06 [M-H-CO ₂] ⁻ , 134.04 [M-H-CO ₂ -CH ₃] ⁻ , 121.03 [M-H-CO ₂ -C ₂ H ₄] ⁻	c
6	洋川芎内酯 H ^[7]	C ₁₂ H ₆ O ₄	4.71	223.096 98	223.097 58	-2.699	负	179.11 [M-H-CO ₂] ⁻ , 161.10 [M-H-CO ₂ -H ₂ O] ⁻ , 121.03 [M-H-CO ₂ -C ₄ H ₁₀] ⁻	c
7	洋川芎内酯 J ^[8]	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	5.01	227.127 11	227.127 78	-2.974	正	209.12 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 191.11 [M+H-H ₂ O-H ₂ O] ⁺ , 163.11 [M+H-H ₂ O-H ₂ O-CO] ⁺ , 153.05 [M+H-H ₂ O-C ₄ H ₈] ⁺ , 145.10 [M+H-H ₂ O-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺	c
8	洋川芎内酯 K	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	5.03	209.116 61	209.117 22	-2.921	正	191.11 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 163.11 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 153.05 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 145.10 [M+H-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺ , 95.05 [M+H-H ₂ O-CO-C ₃ H ₈] ⁺ , 77.04 [M+H-H ₂ O-CO-C ₃ H ₈ -H ₂ O] ⁺	c
9	人参皂苷 Re ^R	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	5.10	945.537 72	945.542 83	-5.413	负	799.48 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁻ , 783.49 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 637.44 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 475.38 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₃ -C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 161.05 [M-H-C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃] ⁻	a
10	人 参 皂 苷 Rk ₃ /Rh ₄ ^[9]	C ₃₆ H ₆₀ O ₈	5.11	621.433 65	621.436 09	-3.935	正	441.37 [M+H-C ₆ H ₁₂ O ₆] ⁺ , 423.36 [M+H-C ₆ H ₁₂ O ₆ -H ₂ O] ⁺ , 405.35 [M+H-C ₆ H ₁₂ O ₆ -H ₂ O-H ₂ O] ⁺ , 313.25 [M+H-C ₆ H ₁₂ O ₆ -H ₂ O-C ₈ H ₁₄] ⁺	a
11	洋川芎内酯 F ^[7]	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	5.41	207.100 97	207.101 57	-2.901	正	189.09 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 179.11 [M+H-CO] ⁺ , 161.10 [M+H-CO-H ₂ O] ⁺ , 123.04 [M+H-CO-C ₄ H ₈] ⁺	c
12	洋川芎内酯 I ^R	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	5.41	225.111 34	225.112 13	-3.534	正	207.10 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 189.09 [M+H-H ₂ O-H ₂ O] ⁺ , 179.11 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺	c
13	异香豆素	C ₉ H ₆ O ₂	5.48	147.043 62	147.044 05	-2.965	正	119.05 [M+H-CO] ⁺ , 103.05 [M+H-CO ₂] ⁺ , 91.05 [M+H-CO-CO] ⁺ , 77.04 [M+H-CO ₂ -C ₂ H ₂] ⁺	b
14	香豆素 ^[10]	C ₉ H ₆ O ₂	5.51	147.043 64	147.044 05	-2.829	正	119.05 [M+H-CO] ⁺ , 103.05 [M+H-CO ₂] ⁺ , 91.05 [M+H-CO-CO] ⁺ , 77.04 [M+H-CO ₂ -C ₂ H ₂] ⁺	b
15	肉桂酸 ^R	C ₉ H ₈ O ₂	6.37	149.059 34	149.059 70	-2.456	正	131.05 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 103.05 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 77.04 [M+H-H ₂ O-CO-C ₂ H ₂] ⁺	b
16	反式桂皮醛	C ₉ H ₈ O	7.06	133.064 44	133.064 79	-2.641	正	115.05 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 105.07 [M+H-CO] ⁺ , 103.05 [M+H-CH ₂ O] ⁺ , 91.05 [M+H-CO-CH ₂] ⁺ , 79.05 [M+H-CO-C ₂ H ₂] ⁺ , 77.04 [M+H-CH ₂ O-C ₂ H ₂] ⁺	b
17	桂皮醛	C ₉ H ₈ O	7.09	133.064 44	133.064 79	-2.641	正	115.05 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 105.07 [M+H-CO] ⁺ , 103.05 [M+H-CH ₂ O] ⁺ , 91.05 [M+H-CO-CH ₂] ⁺ , 79.05 [M+H-CO-C ₂ H ₂] ⁺ , 77.04 [M+H-CH ₂ O-C ₂ H ₂] ⁺	b
18	人参皂苷 Rg ₁ ^R	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	7.27	799.481 51	799.484 92	-4.278	负	637.43 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 475.38 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃ -C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 391.29 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃ -C ₆ H ₁₀ O ₃ -C ₆ H ₁₂] ⁻ , 161.04 [M-H-C ₃₆ H ₆₂ O ₉] ⁻	a
19	人参皂苷 F ₃ /F ₅ ^[11]	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	7.84	769.470 64	769.474 36	-4.841	负	637.43 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄] ⁻ , 475.38 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 391.29 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₃ -C ₆ H ₁₂] ⁻ , 161.05 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₃₀ H ₅₂ O ₄] ⁻ , 131.03 [M-H-C ₃₆ H ₆₂ O ₉] ⁻	a
20	三七皂苷 R ₂ ^[12]	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	7.84	769.470 64	769.474 36	-4.481	负	637.43 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄] ⁻ , 475.38 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 391.29 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₃ -C ₆ H ₁₂] ⁻ , 161.05 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₃₀ H ₅₂ O ₄] ⁻	a

续表 1

编号	化合物名称	分子式	t/min	m/z (实测)	m/z (理论)	误差 ($\times 10^{-6}$)	模式	碎片离子 m/z	归属
21	人参皂苷 Rb ₁ ^R	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	8.18	1 107.592 16	1 107.595 66	-3.162	负	945.54 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 783.50 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 621.47 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 459.39 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 375.29 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻	a
22	人参皂苷 F ₂	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	8.47	783.486 27	783.490 01	-4.780	负	637.43 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁻ , 475.38 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 391.29 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₂] ⁻ , 161.04 [M-H-C ₃₆ H ₆₂ O ₈] ⁻	a
23	洋川芎内酯 G ^[7]	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	8.80	209.116 64	209.117 22	-2.778	正	191.11 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 163.11 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 149.06 [M+H-H ₂ O-C ₃ H ₆] ⁺ , 135.04 [M+H-H ₂ O-C ₄ H ₈] ⁺ , 91.05 [M+H-H ₂ O-C ₄ H ₈ -CO ₂] ⁺	c
24	人参皂苷 Rb ₂ ^[13]	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	8.85	1 077.581 54	1 077.585 09	-3.301	负	945.55 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄] ⁻ , 783.49 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 621.44 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 459.39 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 131.03 [M-H-C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈] ⁻	a
25	人参皂苷 Rb ₃ ^[13]	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	8.89	1 077.581 54	1 077.585 09	-4.456	负	945.55 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄] ⁻ , 915.53 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 783.49 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 131.03 [M-H-C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈] ⁻	a
26	人参皂苷 Rg ₅	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	8.95	767.490 91	767.494 00	-4.031	正	605.44 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ , 443.39 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ , 425.38 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺ , 407.37 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O-H ₂ O] ⁺ , 297.26 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O-H ₂ O-C ₈ H ₁₄] ⁺	a
27	阿魏酸乙酯 ^R	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	9.03	221.081 28	221.081 93	-2.950	负	177.09 [M-H-CO ₂] ⁻ , 149.10 [M-H-CO ₂ -CO] ⁻ , 134.04 [M-H-CO ₂ -C ₃ H ₇] ⁻ , 121.03 [M-H-CO ₂ -C ₄ H ₈] ⁻ , 93.03 [M-H-CO ₂ -C ₄ H ₈ -CO] ⁻	c
28	人参皂苷 Ro ^[14]	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	9.10	955.489 26	955.490 80	-1.615	负	793.44 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 613.37 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₂ O ₆] ⁻ , 587.40 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₇ H ₁₀ O ₇] ⁻ , 569.38 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₂ O ₆ -CO ₂] ⁻	a
29	人参皂苷 Rc ^[13]	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	9.68	1 077.580 57	1 077.585 09	-4.201	负	945.55 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄] ⁻ , 915.53 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 783.49 [M-H-C ₃ H ₈ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 131.03 [M-H-C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈] ⁻	a
30	人参皂苷 Rh ₃ /RK ₂	C ₃₆ H ₆₀ O ₇	11.58	605.438 90	605.441 18	-3.767	正	441.37 [M+H-C ₆ H ₁₂ O ₆] ⁺ , 425.38 [M+H-C ₆ H ₁₂ O ₆] ⁺ , 407.37 [M+H-C ₆ H ₁₂ O ₆ -H ₂ O] ⁺ , 331.26 [M+H-C ₆ H ₁₂ O ₆ -C ₈ H ₁₄] ⁺	a
31	人参皂苷 Rg ₆	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₂	11.61	767.490 78	767.494 00	-4.201	正	605.44 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ , 443.39 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺ , 425.38 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺ , 407.37 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O-H ₂ O] ⁺ , 297.26 [M+H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O-H ₂ O-C ₈ H ₁₄] ⁺	a
32	洋川芎内酯 A ^R	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	13.01	193.121 90	193.122 30	-2.104	正	175.11 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 147.12 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 137.06 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 91.05 [M+H-H ₂ O-CO-C ₄ H ₈] ⁺	c
33	新川芎内酯 ^[7]	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	16.94	195.137 36	195.137 95	-3.056	正	177.13 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 149.13 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 125.06 [M+H-C ₅ H ₁₀] ⁺	c
34	Z-藁本内酯 ^R	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	17.14	191.106 17	191.106 65	-2.544	正	173.10 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 163.11 [M+H-CO] ⁺ , 145.10 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 135.04 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 91.05 [M+H-C ₄ H ₈ -CO ₂] ⁺	c
35	人参皂苷 Rg ₃ ^R	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	20.94	783.486 15	783.490 01	-4.934	负	621.44 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 459.39 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 375.29 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₂] ⁻ , 161.04 [M-H-C ₃₆ H ₆₂ O ₈] ⁻	a
36	人参皂苷 Rg ₂	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	21.54	783.486 82	783.490 01	-4.078	负	621.44 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 459.39 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ , 375.29 [M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₂] ⁻ , 161.04 [M-H-C ₃₆ H ₆₂ O ₈] ⁻	a
37	洋川芎内酯 C	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	29.37	205.085 28	205.085 92	-3.125	正	149.02 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 121.03 [M+H-C ₄ H ₈ -CO] ⁺ , 93.03 [M+H-C ₄ H ₈ -CO-CO] ⁺	c
38	洋川芎内酯 B	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	29.40	205.085 27	205.085 92	-3.173	正	149.02 [M+H-C ₄ H ₈] ⁺ , 121.03 [M+H-C ₄ H ₈ -CO] ⁺ , 93.03 [M+H-C ₄ H ₈ -CO-CO] ⁺	c
39	欧当归内酯 A ^R	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	30.56	381.204 71	381.206 03	-3.478	正	191.11 [M+H-C ₁₂ H ₁₄ O ₂] ⁺ , 173.10 [M+H-C ₁₂ H ₁₄ O ₂ -H ₂ O] ⁺ , 149.06 [M+H-C ₁₂ H ₁₄ O ₂ -C ₃ H ₆] ⁺ , 135.04 [M+H-C ₁₂ H ₁₄ O ₂ -C ₄ H ₈] ⁺	c
40	亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	37.30	281.246 67	281.247 50	-2.975	正	263.24 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 245.23 [M+H-H ₂ O-H ₂ O] ⁺ , 161.13 [M+H-H ₂ O-H ₂ O-C ₆ H ₁₂] ⁺	a,c

R-对照品; a-红参; b-桂枝; c-川芎

R-reference substance; a-Ginseng Radix et Rhizoma Rubra; b-Cinnamomi Ramulus; c-Chuanxiong Rhizoma

苷键的断裂而逐步脱去葡萄糖基。本实验从参桂胶囊中鉴定出的人参皂苷类化合物共有 16 种, 主要包括人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Re 、人参皂苷 Rk_3/Rh_4 、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 F_3/F_5 、三七皂苷 R_2 、人参皂苷 F_2 、人参皂苷 Rb_2 、人参皂苷 Rb_3 、人参皂苷 Rg_5 、人参皂苷 Ro 、人参皂苷 Rc 、人参皂苷 Rh_3/Rk_2 、人参皂苷 Rg_6 、人参皂苷 Rg_3 、人参皂苷 Rg_2 。

以人参皂苷 Rb_1 推断过程为例, 该化合物在供试品中的保留时间为 8.29 min, 在混合对照品中的保留时间为 8.18 min, 一级质谱信息显示其在负离

子模式下响应较好, 并得到 m/z 1 107.60 的准分子离子峰 $[M-H]^-$, 经 Xcalibur 软件拟合后推测其分子式为 $C_{54}H_{92}O_{23}$, 该化合物的二级离子碎片信息主要有 m/z 945.54 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 、783.50 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5]^-$ 、621.47 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5]^-$ 、459.39 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5]^-$ 、375.29 $[M-H-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5-C_6H_{10}O_5-C_6H_{12}]^-$, 符合皂苷类化合物裂解规律, 通过比较对照品的保留时间及二级碎片离子信息, 最终确定该化合物为人参皂苷 Rb_1 , 其质谱裂解途径见图 3。

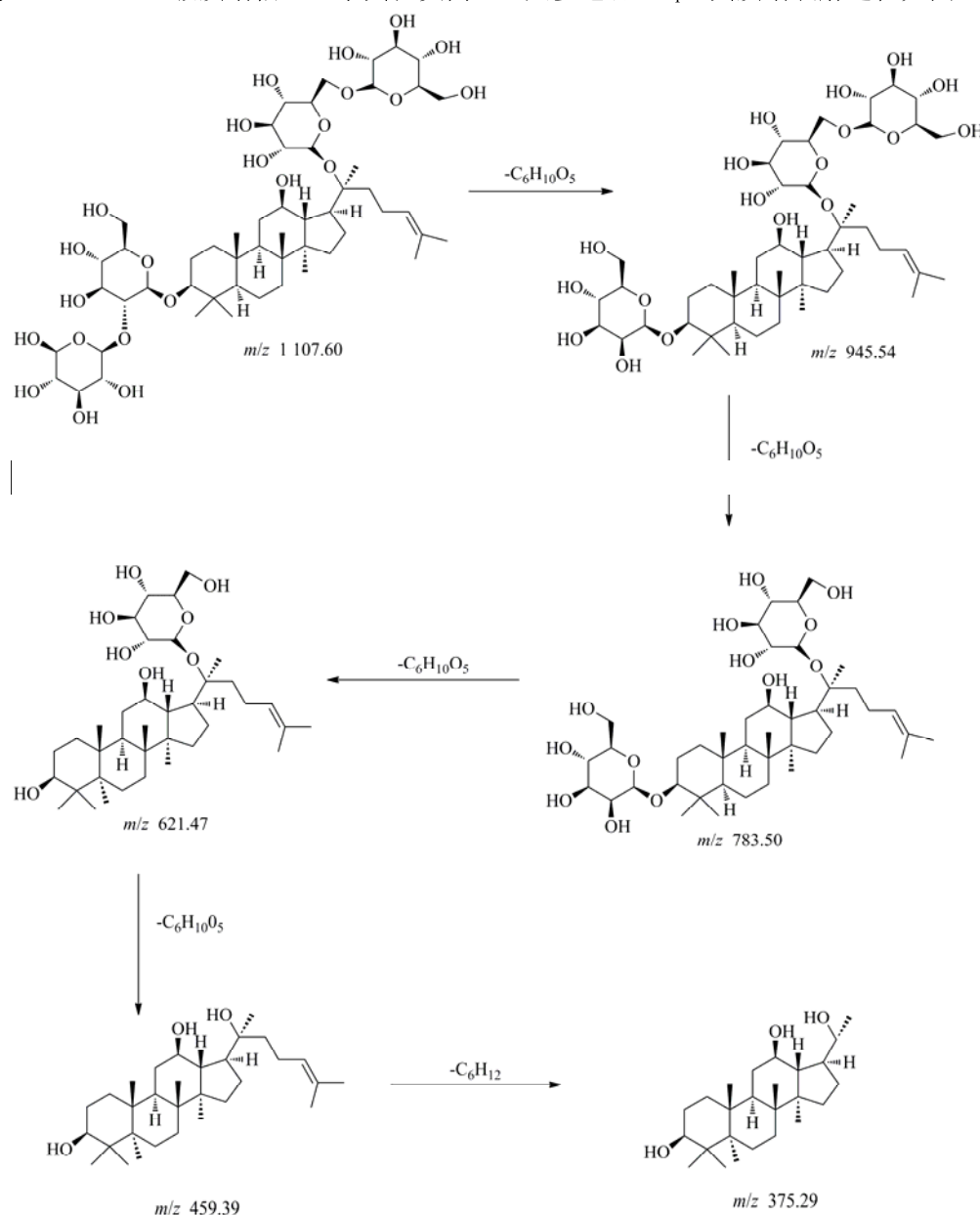


图 3 人参皂苷 Rb_1 的质谱裂解途径

Fig. 3 MS fragmentation pathways of ginsenoside Rb_1

3.2 有机酸类

有机酸类是一类广泛存在于自然界植物中具有酸性的有机化合物, 该类化合物在质谱条件下常以 $[M-H]^-$ 准分子离子峰的形式存在, 高能碰撞下多产生 $[M-H-H_2O]^-$ 或 $[M-H-CO_2]^-$ 的碎片离子; 当化合物中存在咖啡酸时易出现咖啡酰基的丢失或含丹参素时易出现丹参素的丢失。本实验从参桂胶囊中共鉴定出 6 种有机酸类化合物, 分别为绿原酸、原儿茶酸、原儿茶醛、阿魏酸、肉桂酸、亚油酸。

以绿原酸为例, 该化合物在供试品中的保留时

间为 3.85 min, 在混合对照品中的保留时间为 3.80 min, 一级质谱信息显示其在负离子模式下响应最好, 并得到 m/z 353.09 的准分子离子峰 $[M-H]^-$, 经 Xcalibar 软件拟合可能的分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, 该化合物在碰撞下得到的二级碎片离子信息主要有 m/z 191.06 $[M-H-\text{caffeoyl}]^-$ 、 m/z 173.04 $[M-H-\text{caffeoyl}-H_2O]^-$ 、161.02 $[M-H-C_7H_{12}O_6]^-$ 、135.04 $[M-H-C_8H_{10}O_7]^-$ 和 109.03 $[M-H-C_8H_{10}O_7-C_2H_2]^-$, 其裂解途径符合有机酸类化合物的裂解规律, 并与对照品对比, 最终确定该化合物为绿原酸, 绿原酸的质谱裂解途径见图 4。

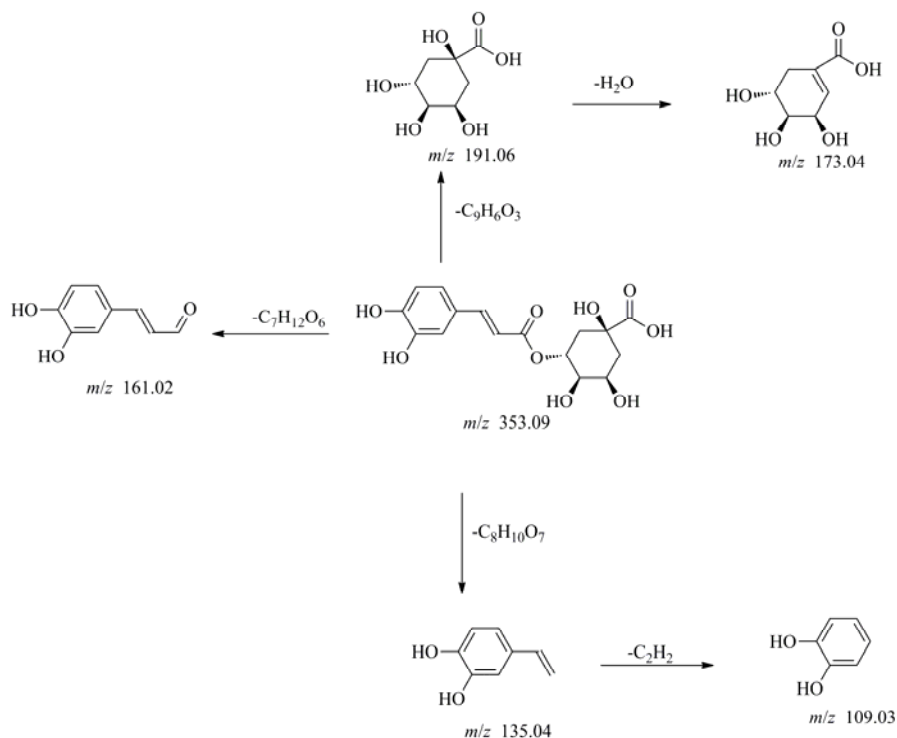


图 4 绿原酸的质谱裂解途径

Fig. 4 MS fragmentation pathways of chlorogenic acid

3.3 内酯类

内酯类化合物是主要存在于川芎、当归等伞形科植物中且具有内酯环结构的一类活性成分, 其中洋川芎内酯类分布更为广泛, 是中药植物中的主要活性及代谢成分, 药用价值较高。质谱条件下, 具有不饱和侧链内酯类化合物极易失去末端烷基而生成 $[M+H-C_2H_5]^+$ 、 $[M+H-C_3H_6]^+$ 或 $[M+H-C_4H_8]^+$ 等质谱特征峰; 具有饱和侧链内酯类化合物, 则易失去饱和侧链而生成 $[M+H-C_4H_9]^+$ 的特征峰。本实验从参桂胶囊中共鉴定出 13 种内酯类化合物, 分别为欧当归内酯 A、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 J、洋川芎内酯 K、洋川芎内酯 F、洋川芎内酯

I、洋川芎内酯 G、阿魏酸乙酯、洋川芎内酯 A、新川芎内酯、Z-藁本内酯、洋川芎内酯 C 和洋川芎内酯 B。

以欧当归内酯 A 为例, 该化合物在供试品中的保留时间为 30.56 min, 在混合对照品中的保留时间为 30.56 min。一级质谱信息显示其在正离子模式下响应最好, 并得到 m/z 381.20 的准分子离子峰 $[M+H]^+$, 经 Xcalibar 软件拟合可能的分子式为 $C_{24}H_{28}O_4$, 该化合物在碰撞下得到的二级碎片离子信息主要有 m/z 191.11 $[M+H-C_{12}H_{14}O_2]^+$ 、173.10 $[M+H-C_{12}H_{14}O_2-H_2O]^+$ 、149.06 $[M+H-C_{12}H_{14}O_2-C_3H_6]^+$ 和 m/z 135.04 $[M+H-C_{12}H_{14}O_2-C_4H_8]^+$, 其

裂解途径符合内酯类化合物的裂解规律, 并与对照品对比, 最终确定该化合物为欧当归内酯 A, 欧当归内酯 A 的质谱裂解途径见图 5。

3.4 其他类

此外, 本实验还从参桂胶囊中鉴定出了其他类

化合物如香豆素、异香豆素、桂皮醛、反式桂皮醛和香草醛。

4 讨论

本实验重点考察了甲醇-水、甲醇-甲酸水、乙腈-水和乙腈-甲酸水溶液作为流动相系统时, 各色

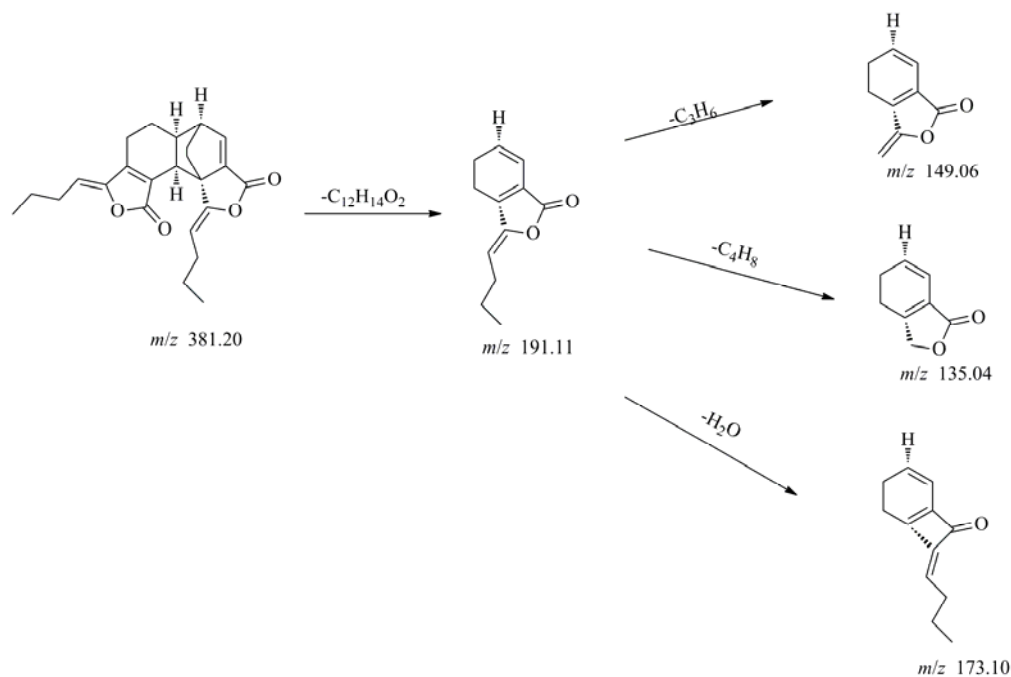


图 5 欧当归内酯 A 的质谱裂解途径

Fig. 5 MS fragmentation pathways of levistilide A

谱峰的分离效果。结果显示, 当采用甲醇作为有机相时, 色谱峰整体基线不平稳, 峰形较差, 分离度较低且拖尾严重; 而当有机相使用乙腈时, 各色谱峰分离度较高, 基线波动较小, 峰形较好; 当在水相中加入 0.1% 的甲酸时, 各目标待测物峰形更佳, 质谱响应更好。因此, 本实验最终选择乙腈-0.1% 甲酸水作为流动相进行梯度洗脱。

本研究采用的 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 同时具有高分辨率和质量精度的强大优势, 其首先利用四级杆对待测离子进行了预分离, 然后通过灵敏度极高的 Orbitrap 检测器对待测离子的精确质量数进行检测, 该仪器具有极高的分辨率 (最高为 140 000 FWHM), 使得离子的质量数检测结果高度精准, 可精确至小数点后 5 位, 因此, 本实验经仪器分析和数据处理后, 最终拟合得到的待测组分元素组成结果可靠, 准确性较高, 对于未知化合物的准确快速定性具有不可替代的作用。此外, 本实验还可在一个分析方法中同时实现快速正、负离子扫描切换, 并且能够同时保持超高的质量精度, 极大地提高了

分析速度; Q-Orbitrap HRMS 还能显著消除基质的背景干扰, 显著增强仪器的选择性, 最终提高样品分析的准确性。

本实验以 UPLC[®] BEH C₁₈ 为分离柱, 以乙腈-0.1% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱, 通过 HESI 源进入高分辨质谱, 并采用先进的正负离子同时监测、一级全扫描及自动触发二级质谱扫描的模式最终实现对参桂胶囊中化学成分的快速识别及准确鉴定。结果, 从参桂胶囊中共鉴定出 40 种化学成分, 包括 16 种皂苷类、6 种有机酸类、13 种内酯类和 5 种其他类, 通过对比复方制剂中有关 3 味单药材的相关文献, 发现其中来源于红参的有 17 种、来源于桂枝有 7 种、来源于川芎的有 17 种, 且都是各中药材中的特征性成分。以上不同类别、不同来源的药物活性成分可通过协同或互补等作用, 从而实现多成分、多通路、多靶点的治疗效果, 最终使参桂胶囊发挥益气通阳、活血化瘀的显著功效。

研究结果表明, 本实验建立的基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 的化学成分研究方法可系统、全面、

准确地对参桂胶囊中的主要活性成分进行快速、准确识别。本研究首次从整体层面上对参桂胶囊的有效成分化学谱进行深入探索,为明确其药效物质基础提供了一定的科学依据,并为该复方制剂化学成分及其作用机制的进一步研究奠定了扎实的前期基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 左莉华, 周霖, 李卓伦, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 的天丹通络胶囊中化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1031-1040.
- [3] 祁昆, 王洋, 陈涛, 等. 液质联用在中药复方制剂研究中的应用 [J]. 天津中医药大学学报, 2017, 36(5): 396-400.
- [4] 邓向涛, 董玉秀. 参桂胶囊中阿魏酸的含量测定 [J]. 河南中医学院学报, 2007(1): 47-48.
- [5] 谢耀轩, 李明, 王淑红. 高效液相色谱法测定参桂胶囊中桂皮醛的含量 [J]. 今日药学, 2012, 22(9): 544-546.
- [6] 孙蕊, 郑永杰, 张榕. 白酒中香草醛两种测定方法的研究 [J]. 齐齐哈尔大学学报: 自然科学版, 2009, 25(6): 68-70.
- [7] 刘洋, 罗志强, 吕贝然, 等. 多成分药物序贯代谢方法用于川芎水煎液多成分不同阶段吸收代谢研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7): 1178-1182.
- [8] 陈燊文. 安胎丸的质量控制及物质基础研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2016.
- [9] 陈广通, 杨敏. 三七皂苷 R_1 在大鼠体内的代谢产物分析 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 485-487.
- [10] 孙明谦, 卢建秋, 张宏桂. 呋喃香豆素类化合物电喷雾质谱裂解途径 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(1): 82-85.
- [11] 朱慧明. 基于液质联用技术的芪蒴强心胶囊中多组分分析与药代动力学研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2014.
- [12] 赵静, 秦振娟, 彭冰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF MS 技术的三七中皂苷类成分质谱裂解规律研究 [J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 97-108.
- [13] 杨琳, 缪宇, 殷惠军, 等. LC-ESI-MSⁿ 法鉴定心悦胶囊中西洋参皂苷类成分 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 1942-1947.
- [14] 卢新义, 何娟, 陈衍斌, 等. 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法同时快速鉴定复方延寿参胶囊的化学成分 [J]. 西北药学杂志, 2018, 33(2): 181-185.