

基于 HPLC-Q/TOF-MS 的经典名方保阴煎化学物质组快速辨识研究

马文凤¹, 刘 丽⁴, 何枢衡⁵, 姚杭琦⁴, 洪美闲⁵, 张纪红⁴, 张铁军^{2,3*}, 许 浚^{2,3*}

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 天津药物研究院 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300193

3. 天津药物研究院 天津市中药质量标志物重点实验室, 天津 300193

4. 天津中医药大学, 天津 301617

5. 亿帆医药股份有限公司, 安徽 合肥 230601

摘要: 目的 基于 HPLC-Q/TOF-MS 系统解析保阴煎化学物质组。方法 采用 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%甲酸水溶液进行梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 质谱条件为 X500R QTOF 质谱仪, 电喷雾离子源, 正、负离子模式扫描。结果 通过对照品确认、高分辨质谱数据分析及文献比对, 共鉴别出 52 个化学成分, 包括 17 个黄酮类、6 个酚酸类、12 个环烯醚萜类、8 个生物碱类、1 个苯乙醇苷类、4 个单萜类、2 个三萜类及 2 个其他类成分。结论 建立的方法可系统、准确、快速地鉴定保阴煎中的多种化学成分, 为后续保阴煎质量属性的确定提供了依据。

关键词: 保阴煎; HPLC-Q/TOF-MS; 黄酮类; 酚酸类; 环烯醚萜类; 生物碱类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)17-4181-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.17.026

Rapid identification of classical herbal formulae Baoyinjian's chemical substance based by HPLC-Q/TOF-MS

MA Wen-feng¹, LIU Li⁴, HE Shu-heng⁵, YAO Hang-qi⁴, HONG Mei-xian⁵, ZHANG Ji-hong⁴, ZHANG Tie-jun^{2,3}, XU Jun^{2,3}

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

4. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

5. Yifan Pharmaceutical Co., Ltd., Hefei 230601, China

Abstract: Objective To analyze the chemical constituent cluster of classical herbal formulae Baoyinjian systemically by HPLC-Q/TOF-MS. **Methods** The separation was performed on Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with gradient elution with acetonitrile-0.1% formic acid. The column temperature was 30 ℃, the flow rate was 1 mL/min, the injection volume was 10 μL, and the mass spectrometry condition was X500R QTOF mass spectrometer, electrospray ion source, positive and negative mode scanning. **Results** A total of 52 chemical constituents were identified by reference confirmation, literature comparison, and high mass spectrometry data analysis. The chemical constituent cluster was composed of 17 flavonoids, six phenolics, 12 iridoid glycosides, eight alkaloids, one phenethyl alcohol glycosides, four monoterpene glycoside, two triterpenes and two other compound. **Conclusion** This study can identify various chemical constituents of Baoyinjian systematically, accurately, and rapidly, which provides a basis for the determination of the quality attributes of Baoyinjian.

Key words: Baoyinjian; HPLC-Q/TOF-MS; flavonoids; phenolics; iridoid glycosides; alkaloids

收稿日期: 2019-08-19

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (81430096)

作者简介: 马文凤 (1993—), 女, 天津医科大学硕士研究生。E-mail: 1784265546@qq.com

*通信作者 张铁军, 研究员。E-mail: zhangtj@tjpr.com

许 浚, 研究员, 主要从事中药新药和中药质量研究。E-mail: xuj@tjpr.com

保阴煎出自明代张介宾·《景岳全书》，由白芍、生地黄、熟地黄、山药、川续断、黄芩、黄柏、生甘草 8 味药组成，临床常用于男妇带浊遗淋、色赤带血、脉滑多热、便血不止及血崩血淋，或经期太早，凡一切阴虚内热动血等症^[1]，该方现今仍广泛应用^[2-7]，但对其化学成分的研究未见报道，致使其质量无法得到控制，经典名方物质组辨识是制定质量标准的物质基础，近年来，液质联用技术在中药复方物质组快速识别中发挥着至关重要的作用^[8]，为经典名方物质组研究提供了强有力的技术支撑，本实验采用 HPLC-Q/TOF-MS 技术，通过对照品比对，结合准分子离子、二级碎片离子信息及相关文献，共鉴别出 52 个化学成分，包括 17 个黄酮类、6 个酚酸类、12 个环烯醚萜类、8 个生物碱类、1 个苯乙醇苷类、4 个单萜类、2 个三萜类及 2 个其他类成分，进一步明确保阴煎的物质基础，为质量属性研究提供了实验数据的支持。

1 仪器与试剂

ExionLC AC 液相色谱仪、X500R QTOF 质谱仪(美国 Sciex 公司); AB204-N 电子天平(德国 Meteler 公司); BT25S 电子天平(德国 Sartorius 公司); MB-1-2 封闭式调温加热器(北京科伟永兴仪器有限公司); 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技公司)。

芍药苷(批号 MUST-18032901)、梓醇(批号 MUST-17102510)购自成都曼斯特生物科技有限公司; 毛蕊花糖苷(批号 11530-201713)、黄芩苷(批号 110715-200514)、盐酸黄柏碱(批号 11895-201504)、盐酸小檗碱(批号 110713-201613)、川续断皂苷 VI(批号 111685-201707)、甘草苷(批号 111610-201607)、甘草酸铵(批号 110731-201619)购自中国食品药品检定研究院，所有对照品质量分数均大于 98%; 色谱纯甲酸、乙腈、甲醇购自天津康科德科技有限公司; 纯净水(杭州娃哈哈饮用水有限公司); 保阴煎物质基准(自制，以古籍记载的制备方法为依据制备而得的中药药用物质基准，也是衡量制剂与中医临床所用药用物质是否一致的标准^[9]): 白芍、生地黄、熟地黄、山药、川续断、黄芩、黄柏、生甘草 8 味药材饮片均由安徽亿帆医药股份有限公司提供，经天津药物研究院中药现代研究部张铁军研究员鉴定，均符合《中国药典》2015 年版一部有关规定。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取保阴煎物质基准 0.034 g，置 10 mL 量瓶中，

加水 8 mL，超声使溶解，加水至刻度，过 0.45 μm 微孔滤膜，取续滤液即得。

2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取黄芩苷、川续断皂苷 VI、盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱、芍药苷、梓醇、毛蕊花糖苷、甘草苷、甘草酸铵各对照品适量，加甲醇制成质量浓度为 65.2、14.5、11.3、90.4、59.0、15.9、9.83、10.14、12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱为迪马 Dimonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)，梯度洗脱条件为 0~8 min, 2%~5% A; 8~22 min, 5%~15% A; 22~40 min, 15%~35% A; 40~45 min, 35%~65% A; 45~50 min, 65%~100% A; 50~60 min, 100% A; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL ; 体积流量 1.0 mL/min。

2.4 质谱条件

Sciex X500R QTOF 质谱仪，正、负离子 2 种模式扫描测定，仪器参数如下：采用电喷雾离子源；雾化气 413.7 kPa，辅助气 413.7 kPa，气帘气 206.8 kPa，雾化温度 600 $^{\circ}\text{C}$ ，正负离子分别进行全扫描(ESI)，扫描质量范围 m/z 50~1 800；正离子模式下，毛细管电压 5 500 V，负离子模式下的毛细管电压 4 500 V，碎裂电压 40 V。

2.5 实验结果

通过对照品确认、文献比对及高分辨质谱数据分析，共鉴定出 52 个化学成分，包括 17 个黄酮类、6 个酚酸类、12 个环烯醚萜类、8 个生物碱类、1 个苯乙醇苷类、4 个单萜类、2 个三萜类、2 个其他类成分。总离子流图见图 1，具体成分信息见表 1。

2.5.1 黄酮类化合物 黄酮类化合物在植物体中大部分以游离形式或与糖结合成苷类或以碳糖基的形式存在，黄酮类化合物在质谱条件下，断裂方式主要有 CO、CO₂ 等中性离子丢失、RDA 裂解及糖基断裂。保阴煎物质基准中共鉴定出 17 个黄酮类化合物，包括化合物 7、42~44、46、55~63、65、67、72，以 58 号峰黄芩苷为例，保留时间为 41.109 min，根据负离子模式下，一级质谱信息显示，其准分子离子峰为 m/z 445.076 4，进一步进行二级质谱扫描，碎片离子为 m/z 269.043 2，比准分子离子峰少 176，是由于准分子离子丢失 C₆H₈O₆ 后形成的碎片，同理，正离子模式下，其准分子离子峰为 m/z 447.091 8，碎片离子为 m/z 271.060 3 也是由准分子离子峰丢失

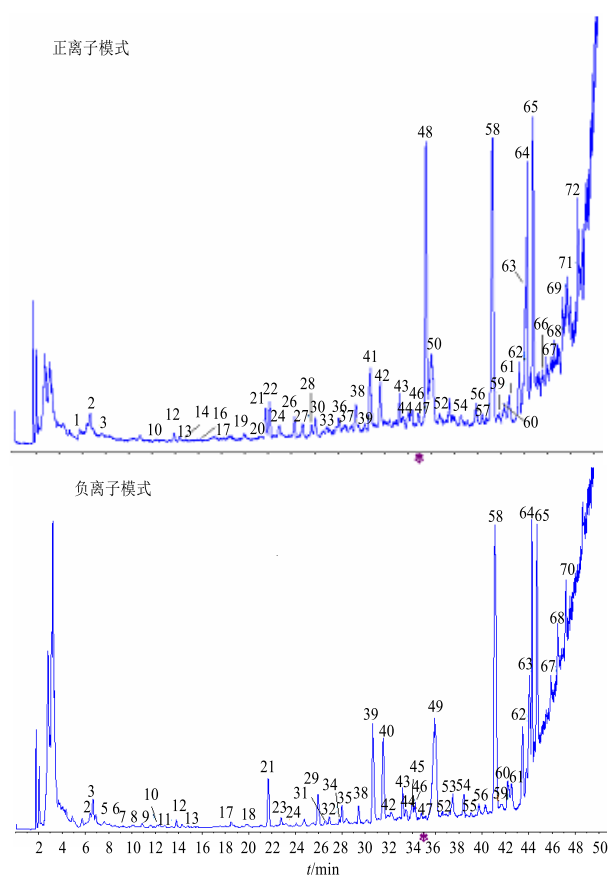


图 1 保阴煎总离子流图

Fig. 1 TIC of Baoyinjian

$C_6H_8O_6$ 后形成的碎片, 根据其裂解方式, 并与对照品比对, 鉴定该化合物为黄芩苷。可能的裂解途径见图 2。

2.5.2 酚酸类化合物 酚酸类化合物在负离子模式下主要以 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰形式存在, 主要发生 CO_2 或 H_2O 分子的中性丢失。当结构中含咖啡酸时, 易出现咖啡酰基的丢失, 当化合物结构中含阿魏酸时, 易出现阿魏酰基的丢失。保阴煎物质基准中共鉴定出 6 个酚酸类化合物, 包括化合物 **29**、**31**、**32**、**51**、**53**、**54**, 以绿原酸为例, 根据负离子模式下, 一级质谱信息显示, 其准分子离子峰为 m/z 353.087 2, 其碎片离子为 m/z 191.055 0, 由准分子离子峰丢失奎宁酰基所致, 根据其断裂方式, 鉴定该化合物为绿原酸。可能的裂解途径见图 3。

2.5.3 环烯醚萜类化合物 环烯醚萜类化合物主要以 $[M-H]^-$ 、 $[M+HCOO]^-$ 的分子离子峰形式存在, 主要发生 H_2O 、 $(CH_2O)_n$ 等中性离子及 Glc、TPT、MTP 的断裂, 保阴煎物质基准中共鉴定出 12 个环烯醚萜类化合物, 包括化合物 **5**、**8**、**11~13**、**18**、**21**、**23**、**34**、**35**、**49**、**50**, 以梓醇为例, 保留时间为 8.074 min, 根据负离子模式下, 一级质谱信息显示, 其准分子离子峰为 407.119 1 $[M+HCOO]^-$, m/z 361.114 3 的碎片离子为 $[M-H]^-$, 进一步进行二级质谱扫描, 碎片离子为 m/z 199.061 1, 为丢失 Glc

表 1 保阴煎化学成分的信息

Table 1 Identification of chemical constituents from Baoyinjian

峰号	t_R/min	正离子 (m/z)	(+)ESI-MS ^a (m/z)	负离子 (m/z)	(-)ESI-MS ^b (m/z)	分子式	结构鉴定	来源
1	5.774	638.190 1	598.198 0, 436.145 1, 331.125 1	—	—	未知	未知	生地
2	6.422	476.138 5 $[M+Na]^+$	274.091 3	452.141 2	200.056 8, 128.035 4	未知	未知	续断
3	6.738	—	—	191.019 0	111.008 0 $[M-H-CO_2-2H_2O]^-$, 87.008 1	$C_6H_8O_7$	柠檬酸 ^[10]	生地
4	7.822	821.395 6	563.158 7, 311.123 6, 276.144 0	—	—	未知	未知	地黄
5	8.074	—	—	407.119 1 $[M+HCOO]^-$	361.114 3, 199.061 1 $[M-H-Glc]^-$	$C_{15}H_{22}O_{10}$	梓醇 ^{*(10-11)}	地黄
6	9.234	—	—	765.231 2	657.189 0, 328.045 4, 219.845 7	未知	未知	未知
7	10.059	—	—	331.066 5 $[M+HCOO]^-$	331.067 2, 271.047 1	$C_{15}H_{10}O_6$	山奈酚 ^[12]	白芍
8	10.868	—	—	495.135 1 $[M+HCOO]^-$	449.130 0, 89.025 3 $[M-H]^-$	$C_{18}H_{26}O_{13}$	5-[α -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- α -D-glucopyranosyloxymethyl]-2-furancarboxaldehyde ^[13]	熟地
9	11.442	—	—	405.140 9 $[M+HCOO]^-$	197.082 5, 161.047 0	$C_{16}H_{24}O_9$	牡丹酮-1-O- β -D-葡萄糖苷或异构体 ^[14]	白芍
10	12.210	383.131 5 $[M+Na]^+$	149.023 5, 102.126 9	405.139 9 $[M+HCOO]^-$	293.879 2, 169.013 6	未知	未知	白芍
11	12.985	—	—	443.096 0 $[M+HCOO]^-$	397.090 4 $[M-H]^-$	$C_{15}H_{23}ClO_{10}$	glutinoside ^[11]	熟地
12	13.813	709.214 3	462.196 7, 300.144 0	685.220 4 $[M-H]^-$	685.225 2 $[M-H]^-$, 179.056 6 $[M-H-TPT]^-$	$C_{27}H_{42}O_{20}$	地黄苷 D ^[10]	地黄

续表 1

峰号	t_R/min	正离子 (m/z)	(+) ESI-MS ⁿ (m/z)	负离子 (m/z)	(-) ESI-MS ⁿ (m/z)	分子式	结构鉴定	来源
13	14.338	547.162 6 [M+Na] ⁺	149.023 5	569.172 0 [M+HCOO] ⁻	523.167 2 [M-H] ⁻ , 179.052 1, 119.034 1, 89.022 7	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₅	密力特苷 ^[10]	地黄
14	14.872	517.117 3 [M+Na] ⁺	263.139 5, 149.023 5	—	—	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	未知	白芍
15	15.233	517.117 6 [M+Na] ⁺	315.071 6, 149.023 5	—	—	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₅	没食子酰蔗糖或异构体 ^[12]	白芍
16	16.110	484.181 5	358.165 0, 149.023 5,	—	—	未知	未知	未知
17	18.490	279.047 8 [M+Na] ⁺	147.043 1	255.050 3	255.050 5, 179.035 0, 165.055 3	未知	未知	续断
18	19.742	—	—	461.166 5	461.166 5 [M-H] ⁻ , 315.107 9, 135.045 5	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	decaffeoyl-verbascoside ^[10]	地黄
19	19.882	298.142 7	298.144 1, 283.120 4, 254.117 3	—	—	C ₁₈ H ₁₉ NO ₃	3,4-dihydro-[(4-hydroxyphenyl)methyl]-7-methoxy-2-methyl-8-isoquinolino ^[15]	黄柏
20	21.200	342.168 9	192.101 6, 177.078 1	—	—	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	木兰花碱异构体 ^[15]	黄柏
21	21.745	399.125 0 [M+Na] ⁺	215.090 8, 179.069 7	375.129 0	375.128 6, 213.076 2 [M-H-Glc] ⁻	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	马钱苷 ^[16]	续断
22	22.159	342.168 2 [M+H] ⁺	192.099 8, 177.077 1	—	—	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	黄柏碱 ^[15]	黄柏
23	22.773	—	—	375.129 1 [M-H] ⁻	89.024 2, 59.013 9	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	马钱苷异构体 ^[16]	续断
24	23.120	448.195 0	448.196 2, 286.143 6	—	—	C ₂₃ H ₂₉ NO ₈	N-methylhigenamine-7-O-glucopymnoside ^[15]	黄柏
25	23.972	—	—	386.161 5 [M+HCOO] ⁻	340.154 8, 219.845 7	未知	未知	未知
26	24.238	342.168 7	342.168 3, 297.111 1	—	—	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	木兰花碱 ^[15]	黄柏
27	24.830	592.237 5	286.143 1, 255.101 3	—	—	未知	未知	未知
28	25.601	314.173 6	314.173 3, 269.116 7, 237.09, 11	—	—	C ₁₉ H ₂₃ NO ₃	oblongine ^[15]	黄柏
29	25.858	—	—	353.087 2	191.055 0 [M-H-C ₆ H ₆ O ₃] ⁻	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	绿原酸 ^[16]	续断
30	26.000	731.179 3	578.222 6, 377.083 7, 355.101 6	—	—	未知	未知	黄柏
31	26.500	—	—	353.087 2	191.056 1	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	隐绿原酸 ^[15]	续断或黄柏
32	26.933	—	—	367.102 9	193.049 9, 134.036 9	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	4-O-阿魏酰奎宁酸 ^[15]	黄柏
33	27.333	388.253 3	372.186 1, 177.054 1	—	—	未知	未知	甘草
34	27.749	—	—	435.150 2	227.092 6	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	马钱苷 ^[17]	续断
35	28.001	—	—	403.123 9 [M-HCOO] ⁻	125.024 3 [C ₆ H ₆ O ₃ -H] ⁻	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	獐牙菜苷 ^[16]	续断
36	28.001	356.185 0	356.184 6, 311.127 1, 279.101 0	—	—	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	N-甲基紫堇定碱 ^[15]	黄柏
37	28.3	893.340 3	640.258 3, 436.197 1, 359.134 2	—	—	未知	未知	续断
38	29.411	481.169 3	197.080 6, 105.033 1	525.160 8 [M+HCOO] ⁻	479.155 8, 121.029 9	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	芍药内酯苷 ^[12,14]	白芍
39	30.656	498.196 6 [M+NH ₄] ⁺	179.070 5, 161.059 8	479.156 2	449.144 9, 121.029 5	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	芍药苷 ^[12]	白芍
40	31.453	—	—	367.102 8	191.054 8, 173.044 6	未知	未知	熟地
41	31.725	369.117 2	177.053 7	—	—	未知	未知	黄柏
42	32.321	305.065 5	255.066 3	303.050 3	125.024 3	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	(2R, 3R)-3, 5, 7, 2', 6'-pentahydroxyflavanone ^[18]	黄芩
43	33.206	549.158 8	411.105 8, 393.097 8, 363.087 1, 309.075 7	547.145 3	547.143 1 [M-H] ⁻ , 337.070 3	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	chrysin-6-C- α -L-arabinoside-8-C- β -D-glucoside ^[18]	黄芩
44	34.042	419.133 7	257.079 7	417.118 4	417.118 4, 255.064 7	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	甘草苷 ^[19]	甘草
45	34.112	—	—	623.197 9	623.195 8, 461.166 1 [M-H-caffeoyl] ⁻ , 161.028 3 [M-H-MPT] ⁻	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	毛蕊花糖苷 ^[10-11]	地黄
46	34.252	549.159 0	495.129 4, 411.107 1, 375.086 1, 363.086 6	547.145 3	547.144 0 [M-H] ⁻ , 457.114 2, 337.071 4	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	chrysin-6-C- β -D-glucoside-8-C- α -L-arabinoside ^[18]	黄芩

续表 1

峰号	t_R/min	正离子 (m/z)	(+)ESI-MS ^a (m/z)	负离子 (m/z)	(-)ESI-MS ^a (m/z)	分子式	结构鉴定	来源
47	34.785	650.208 5 [M+NH ₄] ⁺	566.427 5, 549.159 1	631.166 7	631.166 1, 613.157 5, 313.056 2	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	没食子酰芍药苷或异构体 ^[12]	白芍
48	35.567	336.120 7	321.095 7, 292.093 3	—	—	C ₂₀ H ₁₇ NO ₄	小檗碱 ^[15]	黄柏
49	35.974	—	—	792.266 0	745.255 9	C ₃₃ H ₄₆ O ₁₉	cantleyoside ^[20]	续断
50	36.037	769.251 0	585.216 6, 423.164 0	—	—	C ₃₃ H ₄₆ O ₁₉	cantleyoside 异构体 ^[20]	续断
51	36.623	—	—	515.119 1	515.118 6 353.087 6, 173.045 6	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 B ^[17]	续断
52	36.882	639.782 79 [2M+H] ⁺	340.259 5 [M+H] ⁺	—	—	未知	未知	黄芩
53	37.520	—	—	515.119 1	515.119 1, 353.087 6, 173.045 6	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 A ^[17]	续断
54	38.483	517.133 9	499.122 5	515.119 2	515.118 2, 353.086 8, 173.045 1	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	异绿原酸 C ^[17]	续断
55	39.039	—	—	549.160 9	549.160 9, 255.066 5	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	芹糖基-甘草苷 ^[19]	甘草
56	39.763	433.111 7	271.069 9	431.097 9	431.098 0, 269.044 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	baicalein 7-O-β-D-glucoside ^[11]	黄芩
57	40.320	419.132 8	257.081 0	—	—	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	新甘草黄苷 ^[21]	甘草
58	41.109	447.091 8	271.060 3	445.076 4	269.043 2 [M-H-glucuronic acid] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	黄芩苷 ^[22]	黄芩
59	41.623	447.091 1	287.054 8	445.077 7	265.147 2	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	千层纸素 A-5-O-葡萄糖苷 ^[23]	黄芩
60	42.224	447.091 4	272.064 1	445.077 9	265.147 3	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	黄芩苷异构体 ^[23]	黄芩
61	42.463	449.107 0	273.074 7	447.092 5	271.059 6 [M-H-glucuronic acid] ⁻	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	5, 6, 7-trihydroxyflavone 7-O-glucuronide ^[17]	黄芩
62	43.368	447.090 7	271.060 5	445.077 0	269.044 0 [M-H-glucuronic acid] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	norwogonin 7-O-glucuronide ^[22]	黄芩
63	43.995	461.106 2	285.076 0	459.092 5	283.059 8 [M-H-glucuronic acid] ⁻ , 268.035 9 [M-H-glucuronic acid-CH ₃] ⁻	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷 ^[22]	黄芩
64	44.213	946.535 6	814.495 3, 461.106 8, 437.340 5	927.495 5	927.494, 603.388 6 [M-H-2Glc] ⁻ , 323.098 4 [2Glc-H] ⁻	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	川续断皂苷 VI ^[16]	续断
65	44.595	461.105 3	285.072 7	459.091 9	283.060 5 [M-H-glucuronic acid] ⁻ , 268.037 1 [M-H-glucuronic acid-CH ₃] ⁻	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	汉黄芩苷 ^[22,24]	黄芩
66	45.560	930.540 7	511.341 4, 352.339 0	—	—	未知	未知	续断
67	46.545	271.058 9 [M+Na] ⁺	253.241	293.178 1 [M+HCOO] ⁻	277.183 6	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	黄芩素 ^[22]	黄芩
68	47.167	823.410 2	453.335 2	821.396 5	821.392 6, 351.056 1	C ₄₉ H ₅₈ O ₁₁	甘草酸 ^[19]	甘草
69	47.772	352.338 3	228.194 7	—	—	未知	未知	黄柏或生地
70	48.077	—	—	821.393 4	351.056 5	未知	未知	熟地
71	48.100	471.201 3	352.337 8, 228.195 7	—	—	未知	未知	黄柏
72	48.642	285.074 7	285.075 2, 270.049 9	—	—	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	汉黄芩素 ^[22]	黄芩

*为通过对照品比对鉴定的成分

*Components identified by comparison of reference materials

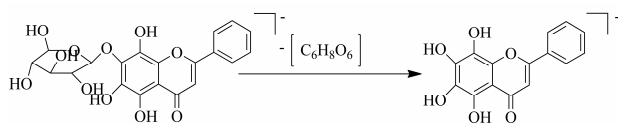


图 2 黄芩苷的质谱裂解途径

Fig. 2 Fragment pathways of baicalin

所致, 根据裂解规律, 并与对照品比对, 鉴定该化合物为梓醇。可能的裂解途径见图 4。

2.5.4 生物碱类化合物 季铵型生物碱类多数会发生 RDA 裂解、重排及丢失 CH₃、H₂O 等中性碎片

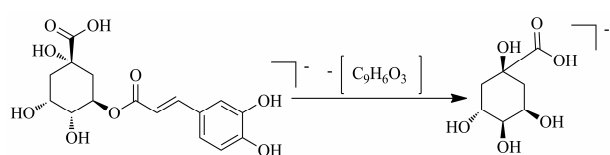


图 3 绿原酸的质谱裂解途径

Fig. 3 Fragment pathways of chlorogenic acid

分子, 保阴煎物质基准共鉴定出 8 个生物碱类化合物, 包括化合物 19、20、22、24、26、28、36、48, 以小檗碱为例, 保留时间为 35.567 min, 一级质谱

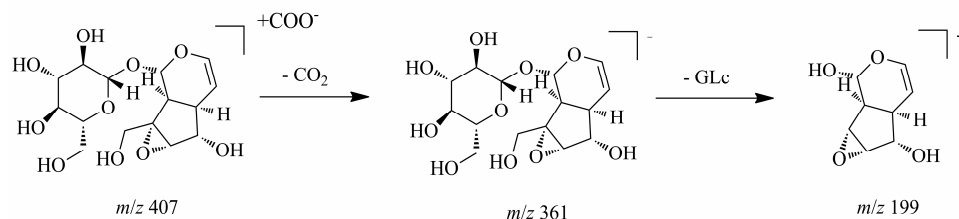


图 4 梓醇的质谱裂解途径

Fig. 4 Fragment pathways of catalpol

信息显示, 其准分子离子峰为 $m/z\ 336.120\ 7$, 进一步进行二级质谱扫描, 碎片离子为 $m/z\ 321.095\ 7$, 是由于准分子离子丢失 CH_3 后形成的碎片, 碎片离子 $m/z\ 292.093\ 3$ 为准分子离子峰失去 $2CH_3$ 所致, 根据裂解规律, 并与对照品比对, 鉴定该化合物为小檗碱。可能的裂解途径见图 5。

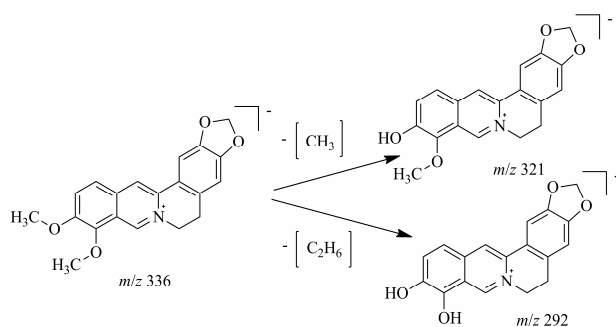


图 5 小檗碱的质谱裂解途径

Fig. 5 Fragment pathways of berberine

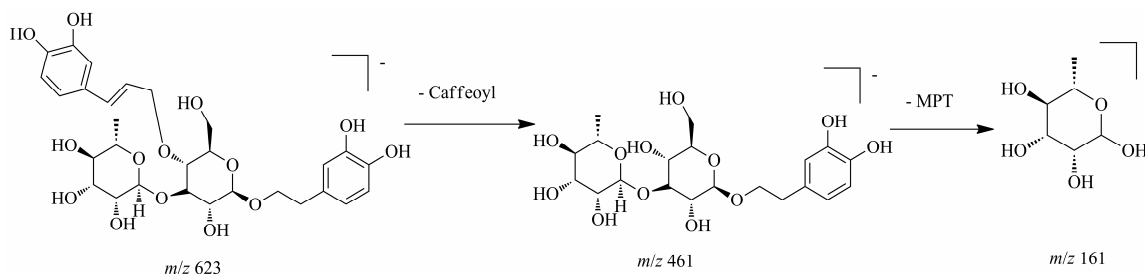


图 6 毛蕊花糖苷的质谱裂解途径

Fig. 6 Fragment pathways of acteoside

为准分子离子峰脱去 1 分子 $HCHO$ 形成的, 碎片离子 $m/z\ 121.029\ 5$ 为断裂的苯甲酸分子, 根据裂解规律, 并与对照品比对, 鉴定该化合物为芍药苷。可能的裂解途径见图 7。

2.5.7 三萜皂苷类化合物 五环三萜类的裂解多数为 RDA 裂解及 C 环裂解。保阴煎物质基准中该类化合物仅有川续断皂苷 VI、甘草酸, 川续断皂苷 VI 保留时间为 $44.213\ min$, 分子离子峰为 $m/z\ 927.495\ 5$, 碎片离子 $m/z\ 603.388\ 6$ 为分子离子失去

2.5.5 苯乙醇苷类化合物 苯乙醇苷类化合物主要发生糖基、酰基等的丢失, 保阴煎物质基准中共鉴定出 1 个苯乙醇苷类化合物, 保留时间为 $34.112\ min$, 其中 $m/z\ 623.197\ 9$ 为准分子离子峰, 碎片离子 $m/z\ 461.166\ 1$ 为准分子离子峰失去咖啡酰基所得, 碎片离子 $m/z\ 161.028\ 3$ 为准分子离子峰失去 MPT 所得, 根据裂解规律, 并与对照品比对, 鉴定该化合物为毛蕊花糖苷。可能的裂解途径见图 6。

2.5.6 单萜及其苷类化合物 单萜及其苷类化合物产生的分子离子峰较多, 如 $[M-H]^-$ 、 $[M+HCOO]^-$ 、 $[M+NH_4]^+$ 等, 易丢失 H_2O 及 CH_2O 分子, 或失去糖基分子, 质量数为 121 的碎片离子为苯甲酸碎片离子, 该碎片较为常见。保阴煎物质基准中共鉴定出 4 个单萜类化合物, 包括 9、38、39、47, 以芍药苷为例, 保留时间为 $30.656\ min$, 其分子离子峰为 $m/z\ 479.156\ 2$, 碎片离子 $m/z\ 449.144\ 9$

2 个糖基所得, 碎片离子 $m/z\ 323.098\ 4$ 即为失去的 2 个糖基, 根据裂解规律, 并与对照品比对, 鉴定该化合物为川续断皂苷 VI。可能的裂解途径见图 8。

2.5.8 其他类 结合碎片信息及文献比对, 还鉴定出 1 个鞣质类化学成分没食子酰蔗糖或异构体, 1 个有机酸类化学成分柠檬酸。

3 讨论

本实验考察了乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.2%磷酸水、乙腈-0.1%甲酸水, 发现以乙腈-0.1%甲酸水

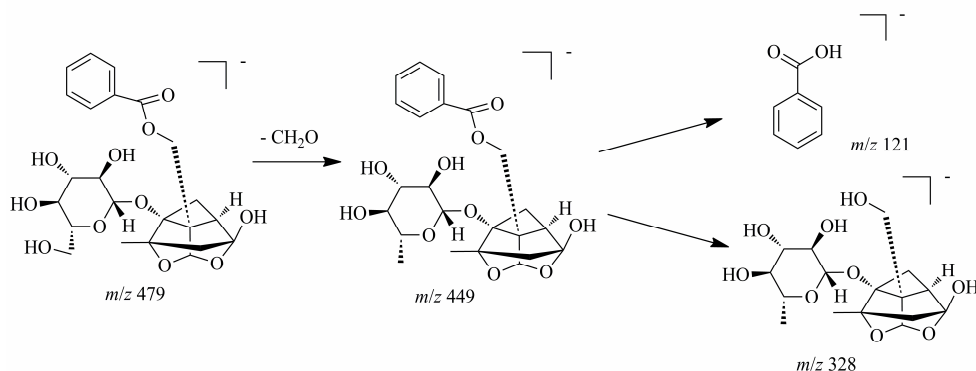


图 7 芍药苷的质谱裂解途径

Fig. 7 Fragment pathways of paeoniflorin

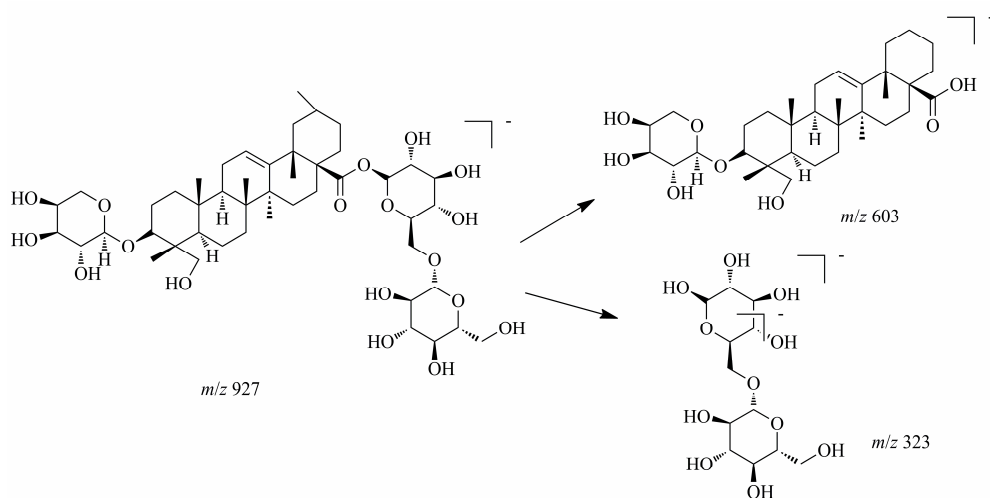


图 8 川续断皂苷 VI 的质谱裂解途径

Fig. 8 Fragment pathways of asperosaponin VI

为流动相时,由于检测波长为 230 nm,色谱图后半部分会出现塌陷,因此再对色谱条件摸索时,用的流动相为乙腈-0.1%磷酸水,考虑需要 HPLC-Q-TOF/MS 对物质组进行识别鉴定,最终在色谱条件摸索完成后,将流动相定为乙腈-0.1%甲酸水。

本实验采用 HPLC-Q/TOF-MS 对物质组进行研究,鉴定出的化学成分主要以黄酮类成分、环烯醚萜类成分、酚酸类成分、生物碱类成分、单萜类成分为主,其中黄酮类成分多数来源于黄芩,环烯醚萜类成分多数来源于生地黄、熟地黄,酚酸类多数来源于续断和黄柏、生物碱类成分均来源于黄柏,单萜类成分多数来源于白芍,物质基准中各成分都是各中药中含量高的主要成分,说明本实验室自制的保阴煎物质基准未失去各味药的主要成分,也未产生新的成分。研究发现在 ESI (+) 与 ESI (-) 2 种模式下,黄酮类成分、单萜类成分均有响应,环

烯醚萜类成分和酚酸类成分多数在 ESI (-) 模式下响应较好,生物碱类成分多数在 ESI (+) 模式下响应较好。

通过 HPLC-Q/TOF-MS 技术可快速识别鉴定保阴煎物质基准成分群,进一步明确了保阴煎的物质基础,为其质量属性的研究奠定了基础。而对于未鉴定出的化合物,还有待以后深入研究。

参考文献

- [1] 明. 张介宾. 景岳全书 (下册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1959.
- [2] 王景莲. 保阴煎合失笑散治疗上环后出血 30 例 [J]. 中国社区医师: 医学专业半月刊, 2009, 11(24): 141.
- [3] 张崇耀. 保阴煎加减治疗月经过多 60 例 [J]. 中国民间疗法, 2012, 20(11): 36-37.
- [4] 林 春, 冯金英, 香卫红. 加减保阴煎治疗阴虚血热型经期延长 48 例 [J]. 新中医, 2003, 35(3): 45.

- [5] 盛文贞, 刘金星. 加味保阴煎治疗气阴两虚性月经先期 61 例 [J]. 甘肃中医, 2009, 22(10): 35.
- [6] 李晓光, 张晓丹. 张晓丹教授运用保阴煎治疗血热型月经先期经验 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(15): 15-16.
- [7] 王春华, 边志强. 保阴煎加味治疗先兆流产 65 例 [J]. 中医临床研究, 2007, 15(8): 31.
- [8] 游飞祥, 袁雪海, 许 浚, 等. 基于 HPLC-Q-TOF/MS 的六经头痛片化学成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4157-4166.
- [9] 国家药品监督管理局. 关于发布古代经典名方中药复方制剂简化注册审批管理的规定的公告 [EB/OL]. <http://cnda.cfda.gov.cn/WS04/CL2050/228247.html>, 2018-05-29.
- [10] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1104-1108.
- [11] 宋青青, 赵云芳, 张 娜, 等. 生地黄 HPLC 指纹图谱的建立及其 HPLC-ESI-MS 分析 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4247-4252.
- [12] 谭淑瑜, 肖 雪, 朴胜华, 等. 白芍水溶性成分快速鉴定研究 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 94-100.
- [13] Li S L, Song J Z, Qiao C F, *et al.* A novel strategy to rapidly explore potential chemical markers for discrimination between raw and processed *Radix Rehmanniae* by UHPLC-TOFMS with multivariate statistical analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51(4): 812-823.
- [14] 刘 杰, 陈 琳, 范彩荣, 等. 基于 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 的白芍和赤芍主要成分定性定量研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1762-1770.
- [15] 孙振刚, 邱昆成, 李 丹, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap XL 分析知母-黄柏药对化学成分 [J]. 中药材, 2017, 40(1): 101-106.
- [16] 陶 益, 蒋妍慧, 唐克建, 等. 续断酒炙前后化学成分 UPLC-Q-TOF/MS 比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(4): 672-676.
- [17] Sun X G, Zhang Y F, Yang Y J, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of furofuran lignans, iridoid glycosides, and phenolic acids in *Radix Dipsaci* by UHPLC-Q-TOF/MS and UHPLC-PDA [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 154: 40-47.
- [18] Qiao X, Li R, Song W, *et al.* A targeted strategy to analyze untargeted mass spectral data: Rapid chemical profiling of *Scutellaria baicalensis* using ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry and key ion filtering [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1223(4): 83-95.
- [19] 马海娟, 高 简, 张亚丽, 等. 基于 HPLC-MSⁿ 的甘草成分快速鉴定及质谱裂解途径研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 1120-1123.
- [20] Ling Y, Liu K Y, Zhang Q, *et al.* High performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight-mass spectrometry as a powerful analytical strategy for systematic analysis and improved characterization of the major bioactive constituents from *Radix Dipsaci* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 98: 120-129.
- [21] 刘晓帆. 液质联用技术应用于小柴胡汤药效物质基础研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [22] Liu G Z, Ma J Y, Chen Y Z, *et al.* Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria baicalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(23): 4809-4814.
- [23] 刘大伟, 闫广利, 方 圆, 等. UPLC-ESI-TOF/MS 应用于黄芩化学成分的快速分析 [J]. 中医药信息, 2012, 29(4): 20-24.
- [24] Wu Y, Yan C Y, Li L, *et al.* Studies on the flavones using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2004(1047): 213-220.