

基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速分析肠炎宁片中主要化学成分

谭林威^{1,2}, 金辉辉^{1,2}, 刘永祥³, 钱 正^{1,2}, 史经昊³, 吴 旦^{1,2}, 王建方^{1,2}, 胡江宁^{1,2*}

1. 浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江 杭州 310052

2. 浙江省中药制药技术重点实验室, 浙江 杭州 310052

3. 江西康恩贝中药有限公司, 江西 上饶 334400

摘 要: **目的** 为更加全面、系统、快速地表征肠炎宁片中的化学物质基础, 采用高效液相色谱-四级杆飞行时间高分辨质谱 (HPLC-Q-TOF-MS/MS) 技术对肠炎宁片中化学成分进行快速识别和归属分类。**方法** 采用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇 (A) -0.05% 乙酸水 (B) 为流动相进行梯度洗脱, 质谱负离子模式监测及二级质谱扫描进行数据采集。通过高分辨质谱数据, 结合 Pubmed、Hmdb、Massbank 数据库、参考相关文献以及对照品比对, 鉴定肠炎宁片的主要化学成分。**结果** 从肠炎宁片中共鉴定了 51 个化学成分, 包括 2 个苯丙素类、8 个环烯醚萜类、12 个黄酮类、4 个鞣质类、23 个有机酸类及 2 个其他类成分。**结论** 全面地阐述了肠炎宁片中的化学物质基础, 为提升肠炎宁片质量评价体系和阐明其药效物质提供了依据。

关键词: 肠炎宁片; 高效液相色谱-四级杆飞行时间高分辨质谱; 黄酮类; 环烯醚萜类; 有机酸类; 苯丙素类; 鞣质类
中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)16-4124-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.004

Main chemical constituents of Changyanning Tablets based on HPLC-Q-TOF-MS/MS

TAN Lin-wei^{1,2}, JIN Hui-hui^{1,2}, LIU Yong-xiang³, QIAN Zheng^{1,2}, SHI Jing-hao³, WU Dan^{1,2},
WANG Jian-fang^{1,2}, HU Jiang-ning^{1,2}

1. Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310052, China

2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China

3. Jiangxi CONBA Chinese Medicine Co., Ltd., Shangrao 334400, China

Abstract: **Objective** To study the chemical constituents of Changyanning Tablets, a high performance liquid chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS) was established to recognize and classify the ingredients accurately and rapidly. **Methods** Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ chromatographic column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was employed and the separation was performed with the mobile phase consisting of methanol-0.05% acetic acid aqueous solution. The information of accurate mass and multistage fragment ions were obtained by the monitored simultaneously for positive and negative ions. The main chemical constituents of Changyanning Tablets were identified by high resolution mass spectrometry data, combining with Pubmed, Hmdb, Massbank network database, reference literature and comparing the reference. **Results** Fifty-one chemical components were finally identified in this study, including two phenylpropanoids, eight iridoids, 12 flavonoids, four tannins, 23 organic acids, and two other classes. **Conclusion** This study comprehensively studies the material basis in Changyanning Tablets, which provides a basis for improving the quality evaluation system of Changyanning Tablets and lays the foundation for elucidating the active components mechanism.

Key words: Changyanning Tablets; HPLC-Q-TOF-MS/MS; flavonoids; iridoids; organic acids; phenylpropanoids; tannins

肠炎宁片属于胃肠道用药, 具有清热利湿、行气的作用; 用于急、慢性胃肠炎, 腹泻细菌性痢疾, 小儿消化不良等病症, 全方由金毛耳草、地锦草、枫香树叶、香薷和樟树根 5 味药组成^[1]。肠炎宁片

收稿日期: 2020-05-10

基金项目: 中药潜力品种的技术升级研究项目 (2013C03005)

作者简介: 谭林威 (1990—), 男, 助理工程师, 主要从事中药研发及管理。E-mail: tanlw@conbagroup.com

*通信作者 胡江宁 Tel: (0571)87774786 E-mail: hujn@conbagroup.com

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成分综合协同利用的共同结果^[2]。当前对肠炎宁片化学成分的相关报道,虽然有个别研究对该药中的没食子酸、鸡屎藤次苷甲酯和槲皮素等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^[3-5]。除此之外,对单味药材的化学成分研究亦鲜有报道。查阅文献发现,金毛耳草中主要有环烯醚萜、黄酮、三萜等成分^[6],地锦草中主要有环烯醚萜、鞣质等成分^[7-9],枫香树叶主要含黄酮、鞣质等成分^[10-11],香薷中主要有黄酮、萜类等成分^[12-13],樟树根主要为挥发油类成分^[14-15]。因此,研究肠炎宁片中的化学成分对其药效物质基础的阐释和质量控制有重要的意义。

近年来,许多分析技术被应用于生物和非生物标本的药物综合筛选,高效液相色谱/四极飞行时间质谱(HPLC/Q-TOF MS)是一种强大的分析工具,用于表征许多复杂材料^[16-17]。该技术具有高灵敏度和高精度的特点,为中药等复杂物质中不同化学成分的鉴别提供了详细的化学信息。HPLC-Q-TOF-MS 技术能够基于精确的离子质量测量和特征同位素模式对化学式的预测,初步识别未知化合物^[18]。此外,分析所需的样品体积非常小^[19]。Q-TOF-MS 技术在多种药物家族筛选中的成功应用已被许多研究者报道^[18,20]。因此,本研究采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对肠炎宁片进行定性分析,借助 Q-TOF 高分辨的优势对肠炎宁片中的化学物质基础进行全面表征。在此基础上,进一步对鉴定成分进行药味归属,为肠炎宁片质控指标的筛选和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 材料

1.1 仪器

KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);1260 液相色谱系统(含在线真空脱气机、高压二元梯度泵、盘式自动进样器、柱温箱,美国 Agilent 公司);6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS(美国 Agilent 公司);Milli-QA10 纯水机;AL104 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.2 试药与试剂

肠炎宁片(批号 180504,江西康恩贝制药有限公司);没食子酸(批号 118031-201605,质量分数 90.8%);绿原酸(批号 110753-201817,质量分数 96.8%);金丝桃苷(批号 111521-201809,质量分

数 94.9%)、芦丁(批号 100080-201811,质量分数 91.7%)、迷迭香酸(批号 111871-201706,质量分数 90.5%)、异槲皮苷(批号 111809-201804,质量分数 97.2%)均购自中国食品药品检定研究院;鸡屎藤次苷甲酯(批号 100042-201810,HPLC 检测质量分数 $\geq 98\%$)购自上海鸿永生物科技有限公司;莽草酸(批号 SLBX2267,HPLC 检测质量分数 $\geq 99\%$)购自 Sigma 公司;柯里拉京(批号 111623-200302,HPLC 检测质量分数 $\geq 98\%$)购自中国食品药品检定研究院;色谱甲醇(货号 I0970007835,德国 Merck 公司);其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 检测条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μ m),流动相为甲醇(A)-0.05%乙酸溶液(B),梯度洗脱:0~15 min,5%~10% A;15~20 min,10% A;20~50 min,10%~30% A;50~80 min,30%~50% A,体积流量 1 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,检测波长 320 nm,进样量 10 μ L。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),负离子模式,扫描范围 m/z 100~1 000;毛细管电压(Vcap):4 000 V(-);雾化器压力(Nebulizer):240 kPa;裂解电压(Fragmentor):65 V;锥孔电压(Skimmer):65 V;干燥气体积流量(Drying Gas):10 L/min;碰撞能量 20 eV。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取没食子酸、绿原酸、莽草酸、柯里拉京、金丝桃苷、芦丁、迷迭香酸、异槲皮苷对照品适量,精密称定,加 50%甲醇制成各成分质量浓度分别为 50.05、50.25、51.01、50.32、51.22、50.15、50.08、50.65 μ g/mL 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取肠炎宁片 20 片,研细,取 0.15 g,精密称定,精密加水 10 mL,称定质量,超声提取 10 min,放冷至室温,用水补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得。

3 结果

采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS,按“2.1”项下条件检测供试品溶液和混合对照品溶液,并对肠炎宁片中化学成分进行定性分析,得到的负离子模式的总离子流图(TIC),结果见图 1。通过查阅中英文相关文献,收集单味药材的化学成分信息,建立化

学成分数据库。利用软件 Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.06.00 对供试品进行一级质谱分析, 确定其分子离子峰, 并结合精确相对分子质量初步推断其分子式。在此基础上, 根据二级质谱信息, 得到化合物的碎片离子信息, 结合对照品以

及相关文献的报道, 并用 Pubmed、Hmdb、Massbank 等化学数据库进行再验证, 从肠炎宁片中鉴定了 51 个化合物, 包括 2 个苯丙素类、8 个环烯醚萜类、12 个黄酮类、4 个鞣质类、23 个有机酸类及 2 种其他类成分。结果见表 1。

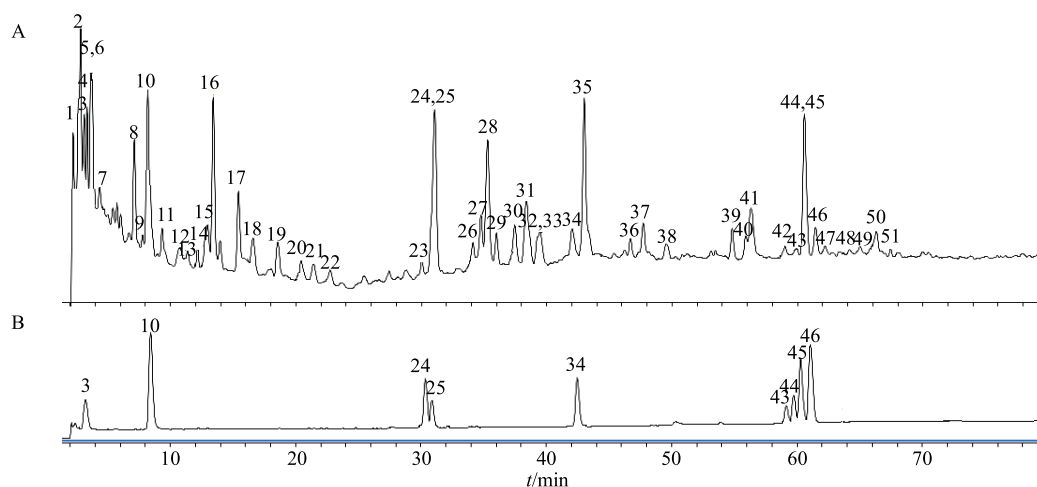


图 1 样品 (A) 和混合对照品 (B) 总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagram of sample (A) and mixed reference substances (B)

表 1 肠炎宁片化学成分 HPLC-Q-TOF-MS/MS 鉴定

Table 1 Identification of chemical constituents from compound Changyanning Tablet by HPLC-Q-TOF-MS/MS

编号	t_R/min	m/z	分子式	化合物	MS^{2-}	误差 ($\times 10^{-6}$)	类别	归属
1	2.79	191.054 5 $[M-H]^-$	$C_7H_{12}O_6$	奎宁酸	127.039 4, 85.029 6, 171.029 0, 109.028 8	7.87	有机酸	all
2	3.24	133.013 2 $[M-H]^-$	$C_4H_6O_5$	苹果酸	115.003 3, 71.014 1	7.81	有机酸	all
3	3.41	173.044 4 $[M-H]^-$	$C_7H_{10}O_5$	莽草酸	111.045 8, 93.034 2, 73.030 3, 83.052 0	6.59	有机酸	j、d、f
4	3.73	355.029 9 $[M-H]^-$	$C_{14}H_{12}O_{11}$	诃子次酸	337.018 6, 293.027 5, 249.039 3, 205.049 2, 161.058 7	2.20	有机酸	d、f
5	3.78	191.018 6 $[M-H]^-$	$C_6H_8O_7$	柠檬酸	173.012 5, 154.995 8, 147.029 4, 129.018 1	5.86	有机酸	all
6	4.63	188.054 6 $[M-H]^-$	$C_7H_{11}O_5N$	<i>N</i> -acetyl- <i>DL</i> -glutamic acid	167.020 2, 134.046 4, 122.024 5	9.76	氨基酸	all
7	5.36	331.064 3 $[M-H]^-$	$C_{13}H_{16}O_{10}$	6- <i>O</i> -没食子酰葡萄糖	191.025 2, 283.262 8, 259.045 2, 235.023 9	8.34	有机酸	d、f
8	7.09	389.107 1 $[M-H]^-$	$C_{16}H_{22}O_{11}$	水晶兰苷/去乙酰车叶草苷酸/鸡屎藤次苷	227.053 6, 209.042 8, 183.063 9, 165.053 1, 191.032 0, 147.042 3	4.70	环烯醚萜	f、j
9	7.83	483.074 2 $[M-H]^-$	$C_{20}H_{20}O_{14}$	1,6-di- <i>O</i> -galloyl- β - <i>D</i> -glucose/金缕梅鞣质	331.064 7, 313.055 4, 169.012 5	2.13	有机酸	d、f
10	8.30	169.013 2 $[M-H]^-$	$C_7H_6O_5$	没食子酸	141.016 2, 125.023 2	6.16	有机酸	j、d、r、f
11	9.52	315.070 1 $[M-H]^-$	$C_{13}H_{16}O_9$	2-hydroxy-3-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxybenzoic acid	152.009 5, 108.020 7	6.50	有机酸	j、d、r、f
12	10.63	331.063 3 $[M-H]^-$	$C_{13}H_{16}O_{10}$	1- <i>O</i> -galloylglucose	271.043 1, 211.022 2, 169.011 6, 125.022 9, 193.012 2	11.35	有机酸	d、f

续表 1

编号	t_R/min	m/z	分子式	化合物	MS^{2-}	误差 ($\times 10^{-6}$)	类别	归属
13	11.41	431.118 8 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₂	车叶草苷酸或异构体	251.054 5, 165.055 2	1.62	环烯醚萜	j
14	12.22	213.075 0 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₄ O ₅	巴戟醚萜	169.085 3, 123.080 0、151.073 6	8.63	环烯醚萜	j
15	13.03	197.043 6 [M-H] ⁻	C ₉ H ₁₀ O ₅	没食子酸乙酯/丁香酸	179.031 1, 151.037 2, 135.043 2	9.83	有机酸	j、r
16	13.17	329.049 3 [M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₄ O ₁₀	二羟基苯甲酸葡萄糖苷酸	153.052 5	6.42	有机酸	r
17	15.43	153.017 2 [M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₄	原儿茶酸	109.029 0, 91.018 2	13.84	有机酸	all
18	15.94	295.044 8 [M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₂ O ₈	菜豆酸	163.039 1, 119.049 3	3.85	有机酸	d、r
19	18.91	353.087 1 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	新绿原酸	191.055 2, 179.034 2, 161.023 7, 135.044 2, 93.035 5	1.99	有机酸	j、f
20	20.66	373.112 5 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	獐芽菜苦苷	306.809 3, 256.074 3, 211.059 2, 167.069 8, 149.060 2, 123.044 2	4.06	环烯醚萜	j
21	21.44	463.143 3 [M+CH ₃ COOH-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	去乙酰车叶草苷酸甲酯	403.119 2, 241.069 1, 223.058 5, 193.047 0, 139.038 7	5.20	环烯醚萜	j
22	22.55	549.216 5 [M+CH ₃ COOH-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₄ O ₁₂	everiatoside K	327.141 3, 249.098 7, 161.043 2	4.32	苯丙素	r
23	30.04	465.232 0 [M+CH ₃ COOH-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	6-β-羟基栀子苷或其异构体	405.142 1, 243.086 3	4.58	环烯醚萜	j/j、r、f
24	30.92	353.110 1 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸	191.055 5, 179.035 6, 173.049 0, 135.045 8, 161.023 6	-3.29	有机酸	j、f
25	31.14	463.146 1 [M+CH ₃ COOH-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	鸡屎藤次苷甲酯	241.071 2, 223.060 2, 197.082 5, 179.038 3	-0.83	环烯醚萜	j
26	34.09	341.086 7 [M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	咖啡酸葡萄糖苷	179.034 8	3.23	有机酸	r
27	34.45	167.034 1 [M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₄	香草酸	152.012 5, 108.027 1, 96.018 0	5.25	有机酸	all
28	34.97	353.085 7 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	隐绿原酸	191.054 5, 179.033 9, 173.044 0, 161.024 5, 135.044 0	5.95	有机酸	j、f
29	36.12	179.033 4 [M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₄	咖啡酸	135.043 1	8.79	有机酸	j、d、r、z
30	37.14	387.163 8 [M+CH ₃ COOH-H] ⁻	C ₁₆ H ₂₄ O ₇	杜鹃素/表杜鹃素/白桦苷 或其异构体	207.097 3, 164.082 9	5.81	黄酮	r
31	38.22	456.148 6 [M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁	苦杏仁苷或其异构体	323.091 8, 294.097 9	-0.32	糖苷	r
32	39.09	291.012 7 [M-H] ⁻	C ₁₃ H ₈ O ₈	短叶苏木酚酸或 phyllanthusin E	247.022 0, 203.032 5, 191.032 8, 175.038 1, 159.043 7	6.65	有机酸	d、f
33	39.69	337.090 2 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	4-对香豆酰奎宁酸	191.033 9	7.96	苯丙素	f
34	42.47	633.066 4 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	柯里拉京	463.050 6, 300.997 3, 275.018 5	1.68	鞣质	d
35	43.41	447.150 2 [M+CH ₃ COOH-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	京尼平苷	225.075 2, 207.064 2, 123.044 3	1.55	环烯醚萜	j
36	47.29	593.149 5 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	新西兰牡荆苷	575.134 7, 503.117 1, 473.106 7, 353.063 7, 325.077 9	3.18	黄酮	r
38	48.07	191.032 1 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₈ O ₄	东莨菪内酯	176.009 9, 148.015 5, 134.032 8, 120.021 1	15.01	内酯	j、d、f
39	50.27	193.050 5 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸	178.027 7, 149.058 9, 134.038 0	0.68	有机酸	d、z
40	54.08	595.129 0 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	槲皮素-3-山梨糖苷	300.025 3, 271.023 3, 178.994 4	2.45	黄酮	d
41	56.21	521.129 9 [M-H] ⁻	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	异迷迭香酸苷	359.076 5, 323.076 1, 179.033 3, 161.023 3	0.31	黄酮	r

续表 1

编号	t_R/min	m/z	分子式	化合物	MS^2	误差 ($\times 10^{-6}$)	类别	归属
42	56.44	461.071 7 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	木犀草素-3'-葡萄糖醛酸或 异构体或野黄芩苷	285.038 8, 175.024 1	1.84	黄酮	r
43	59.14	463.084 6 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷	300.026 1, 178.995 9, 151.002 9	7.76	黄酮	f, d
44	59.88	463.085 3 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	异槲皮苷	301.033 9, 300.026 1, 271.019 7, 255.035 2	6.25	黄酮	f, d
45	60.35	609.143 5 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁	463.084 6, 300.025 1, 273.022 5, 255.028 6, 151.002 7	4.28	黄酮	f, d, r, j
46	60.43	359.075 6 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	迷迭香酸	197.043 4, 179.032 9, 161.022 8, 135.043 7	4.56	有机酸	r
47	61.44	445.075 0 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	黄芩苷/芹菜素-7-O-葡萄糖 醛酸苷	269.042 0, 175.023 7, 113.023 0	5.91	黄酮	r
48	62.23	300.996 7 [M-H] ⁻	C ₁₄ H ₆ O ₈	鞣花酸	283.994 9, 257.005 8, 245.002 9, 201.019 4, 173.022 0	7.59	鞣质	all
49	65.22	447.090 9 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	山柰酚-3-O-葡萄糖苷	284.030 2, 255.029 1, 227.030 5, 151.002 0	5.32	黄酮	d, r, f
50	66.02	593.148 0 [M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	山柰酚-3-O-芸香糖苷	285.038 2, 256.027 2, 186.038 2	5.38	黄酮	j, d, f
51	67.10	623.156 3 [M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	异鼠李素-3-O-葡萄糖- 7-O-鼠李糖苷	315.047 3, 462.985 7, 161.046 6	8.75	黄酮	j, f

all 表示 5 种药材均有; d 表示地锦草; f 表示枫香树叶; j 表示金毛耳草; r 表示香薷; z 表示香樟

all represent the five herbs; d represent *Euphorbia humifusa* Herba; f represent *Liquidambar formosana* Hance; j represent *Hedyotis Chrysoticha*; r represent *Elsholtzia ciliate* (Thunb.) Hyland; z represent *Cinnamomum camphora* root

3.1 黄酮类化合物分析

黄酮类化合物是自然界中广泛存在的一大类化合物,泛指 2 个苯环通过 3 个碳相互连接而成,其基本母核为 2-苯基色原酮,具有抗炎抗病毒等活性,此类化合物丢失中性碎片 CO、H₂O,黄酮苷类则常脱去糖基。以峰 44 异槲皮苷为例,负离子模式下可见准分子离子峰 [M-H]⁻ m/z 463.085 3,该化合物的二级质谱图中出现了 300.026 1 和 301.033 9 的碎片离子,为脱去 1 个 H 与 1 分子中性葡萄糖或 1 分子中性葡萄糖的槲皮苷元碎片的离子峰为槲皮素失去 1 分子 CO 后分子结构重新脱去 2 个 H 的碎片离子,255.035 2 为槲皮素失去 1 个分子 CO 后又脱去 1 分子羟基的碎片离子,由此推断该化合物具有槲皮素母核,并结合对照品及文献报道^[21]信息,推断化合物为异槲皮苷,其可能的裂解途径见图 2。峰 45 在负离子模式下准分子离子峰 [M-H]⁻ m/z 609.143 5,可推断其分子式为 C₂₇H₃₀O₁₆,结合文献及二级碎片离子信息,所得二级质谱中有明显的碎片离子 m/z 463.084 6, 300.025 1, 273.025 5, 255.028 6, 151.002 7。与对照品中芦丁母离子裂解形成的特征

碎片离子一致,结合保留时间,确定此化合物为芦丁。峰 51 在负离子模式下准分子离子峰 [M-H]⁻ m/z 593.148 0,结合文献报道^[22]及二级碎片离子,所得二级质谱图中有明显的碎片离子 m/z 285.038 2 [M-H-Rha-Glu]⁻, 256.027 2 [M-H-Rha-Glu-CO]⁻, 186.038 2 [M-H-Rha-Glu-C₄H₄O₃]⁻。未出现黄酮碳苷裂解的特征碎片,推测该化合物为烟花苷(山柰酚-3-O-芸香糖苷)。依据上述裂解规律推测其他峰。

3.2 酚酸类化合物

该类化合物均存在于单味药材,其基本结构是酚羟基取代的芳香环、丙烯酸、脂类和萜类氨基酸等成分,主要分为羟基苯甲酸类和羟基肉桂酸类。该类化合物易丢失水和 COOH,且在负离子模式下响应较高。芳香酸中羧基与芳香烃基相连,故其质谱裂解规律先失去芳香基团,后失去 H₂O、CO₂ 等小分子基团。以 24 号化合物绿原酸为例,绿原酸由 1 分子的奎宁酸和 1 分子的咖啡酸组成,在 30.92 min,负离子模式下可见准分子离子峰 [M-H]⁻ m/z 353.110 1,二级裂解图谱可见 m/z 191.055 5 [M-H-

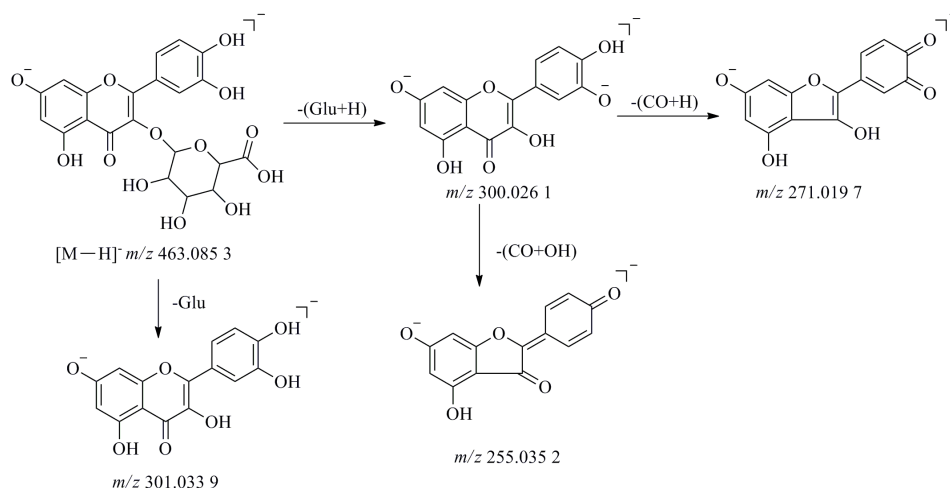


图 2 异槲皮苷裂解途径

Fig. 2 Fragmentation pathway of isoquereitrin

$C_9H_6O_3]^-$, m/z 179.035 6 $[M-H-C_7H_{10}O_5]^-$ 的碎片离子, 提示其酰氧键的断裂, 产生了奎宁酸和咖啡酸碎片, 随后 2 碎片离子有进一步裂解, 失去 1 分子 CO_2 或水, 产生了 m/z 173.049 0 $[M-H-C_9H_6O_3-H_2O]^-$, m/z 135.045 8 $[M-H-C_9H_6O_3-CO_2]^-$, m/z 161.023 6 $[M-H-C_7H_{10}O_5-H_2O]^-$ 的碎片离子, 经对照品比对, 确认该化合物为绿原酸, 结合文献报道^[23]和特征离子碎片推测其可能的裂解途径见图 3。峰 39 在一级质谱中可见准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 193.050 5, 主要的二级质谱碎片离子为 m/z 178.027 7 $[M-H-CH_3]^-$ 、 m/z 149.058 9 $[M-H-CO_2]^-$ 、 m/z 134.038 0 $[M-H-CO_2-CH_3]^-$, 经分析和对照品比对, 确认峰 39 为阿魏酸, 结合文献报道^[24]和特征离子碎片推测其可能的裂解途径见图 4。依据上述裂解规律推测其他峰。

3.3 环烯醚萜类化合物

该类化合物主要存在于金毛耳草药材中, 常与苯乙醇苷类成分在植物中共存, 其结构特征为 C-1 位连接有葡萄糖, C-3、4 位存在双键或 C-4 为存在羧基, C-6~8 或 C-10 为常含有羟基, 或失去羟基形成双键或环氧醚键。在电喷雾条件下, 环烯醚萜苷会发生裂解脱氢生成准分子离子峰 $[M-H]^-$, 在高能量状态下, 容易脱去母环上的功能基团, 丢失中性 H_2O 、 CO_2 、 CH_3OH 、 CH_3COOH 和糖单元部分。峰 8 在一级质谱中可见准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 389.107 1, 主要的二级质谱碎片离子为 m/z 227.053 6 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 、 m/z 183.063 9 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO_2]^-$ 、 m/z 165.053 1 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO_2-H_2O]^-$ 、 m/z 209.042 8 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$ 、 m/z 191.032 0 $[M-H-C_6H_{10}O_5-2H_2O]^-$ 、

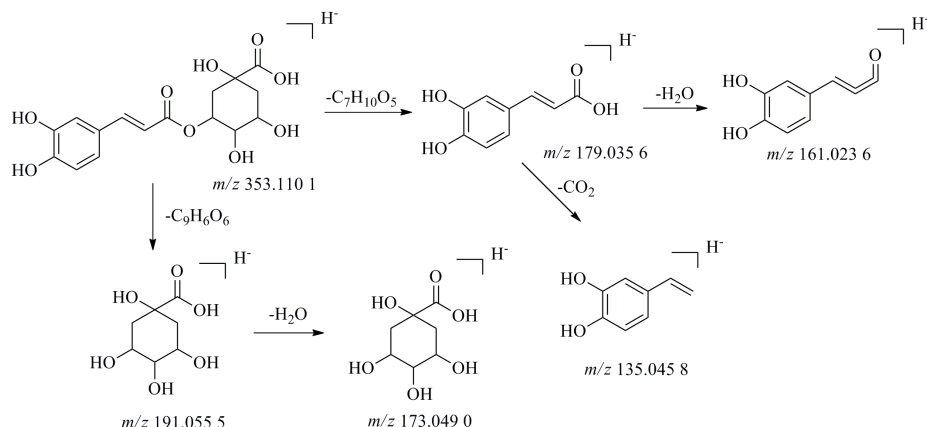


图 3 绿原酸裂解途径

Fig. 3 Fragmentation pathway of chlorogenic acid

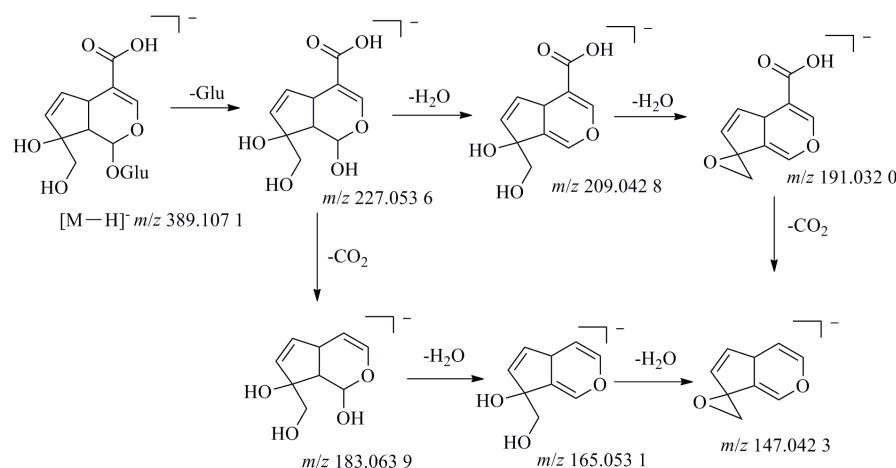


图 4 阿魏酸裂解途径

Fig. 4 Fragmentation pathway of ferulic acid

m/z 147.042 3 $[M-H-C_6H_{10}O_5-2H_2O-CO_2]^-$ 结合文献报道^[25]和特征离子碎片推测峰 8 可能为水晶兰苷/去乙酰车叶草苷酸/鸡屎藤次苷, 其可能的裂解途径见图 5。采用类似的方法, 对其他成分进行相应的鉴定。

以 25 号峰为例, 负离子模式下一级质谱可见准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 403.125 7, 计算其精确分子式为 $C_{17}H_{24}O_{11}$, 相对分子质量为 404, 而碎片离

子 $[M+CH_3COOH-H]^-$ 为 m/z 463.146 1 则进一步验证了其相对分子质量, 主要二级裂解图谱碎片离子为 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ m/z 241.071 2、 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$ m/z 223.060 2、 $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO_2]^-$ m/z 197.082 5、 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O-CO_2]^-$ m/z 179.038 3, 经分析和对照品比对, 确认峰 25 为鸡屎藤次苷甲酯通过特征离子碎片推测其可能的裂解途径见图 6。

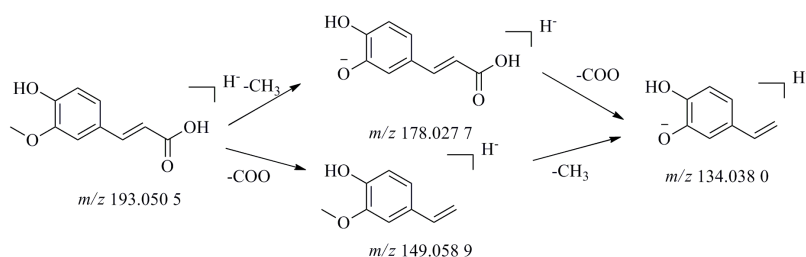


图 5 去乙酰车叶草苷酸可能裂解途径

Fig. 5 Fragmentation pathway of desacetyl asperulosidic acid

4 讨论

中药具有疗效好、成本低、相对低毒性, 但其复杂的化学成分及药效物质不明确致使中药质量控制与药理机制研究困难重重, 因此对中药及相关制剂进行全面的化学表征非常必要, 对于明确药效物质基础及其作用机制研究意义重大。随着质谱技术的发展, 实现高效准确的复杂体系快速分析成为可能, 通过化合物的质谱一级、二级信息, 可快速获取其结构信息, 同时结合庞大的数据库还可能探索未知成分、挖掘中药中潜在的有效物质。色谱-质谱联用技术应用于化合物结构鉴定可为中药多组分鉴

定研究提供更可靠依据。

HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术是采用高效液相 (HPLC) 为分离系统, 电喷雾 (ESI) 和四级杆飞行时间 (Q-TOF) 串联式的多级质谱模式为质谱裂解系统, 对中药、民族药及血清代谢等复杂的多组分样品进行快速识别分析鉴定其结构。具有分辨率高、灵敏度高、选择性高、扫描范围广等特点, 能给出精确的相对分子质量信息和二级特征裂解碎片离子信息等优点^[27]。

本研究基于前期建立的特征图谱色谱条件进行质谱定性分析, 因质谱具有高灵敏度, 在分离度上

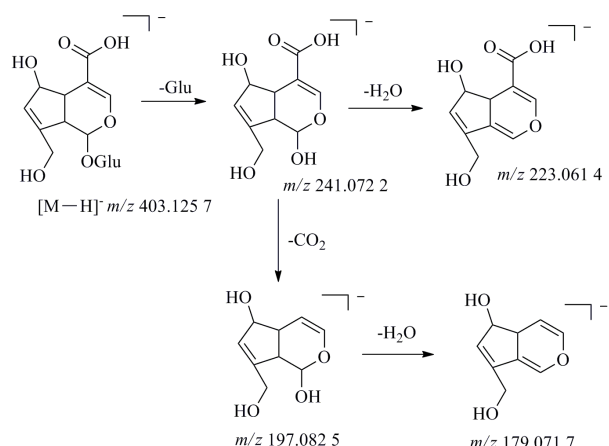


图 6 鸡屎藤次苷甲酯可能裂解途径

Fig. 6 Fragmentation pathway of feretoside

要求不高,通过精确的碎片离子信息获得可能的成分信息,因此色谱柱选择常规的 C_{18} 柱进行分析。

本研究选择了超声法进行提取,该法具有实验设备简单,提取效率高,操作简便,省时等优点;分别考察了甲醇、25%甲醇-水、50%甲醇-水、75%甲醇-水以及水溶剂,结果表明,用水做提取溶剂,紫外色谱图包含的色谱峰较多,色谱峰分离较好,故选用水作为提取溶剂。此外在溶剂用量(10、15、20、25、30 mL)和提取时间(10、20、30 min)上分别进行了考察,结果表明 10 mL 提取溶剂用量和提取 10 min 色谱峰响应较高,且样品为全溶解状态。

通过比较正负离子模式下的总离子流图发现,正离子模式下色谱峰的响应强度低于负离子模式,所以本研究最终选择了负离子模式进行成分解析。

本研究首次采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对肠炎宁片中的化学成分进行了表征,分析鉴定了其中 51 个化合物。通过比对复方制剂中有关 5 种单味药材的相关文献,发现金毛耳草中 27 个,主要为环烯醚萜和有机酸;地锦草中 26 个,主要为鞣质、黄酮和有机酸;香薷中 25 个,主要为黄酮和有机酸;枫香树叶中 28 个,其所含成分较为复杂,与其他味药材存在多处交叉;樟树根中 9 个,相对归属成分较少且含量较低,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。

本实验中解析了肠炎宁片的化学物质基础,为进一步明确其药效物质和质量控制提供了实验依据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.

- [2] He Y, Li Z, Wang W, *et al.* Chemical profiles and simultaneous quantification of *Aurantii fructus* by use of HPLC-Q-TOF-MS combined with GC-MS and HPLC methods [J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2189-2208.
- [3] 李 晶, 李才堂, 周国平, 等. 肠炎宁片定性定量方法研究 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(1): 68-71.
- [4] 余德发, 王志琴, 曹建国, 等. 高效液相色谱法测定肠炎宁片中山素素的含量 [J]. 江西中医药大学学报, 2003, 15(2): 56-59.
- [5] 黄 勇. RP-HPLC 法测定肠炎宁制剂中槲皮素的含量 [J]. 广州化工, 2012, 40(20): 98-99.
- [6] 马明娟, 罗永明, 杨美华. 黄毛耳草的研究进展 [J]. 中国药业, 2011, 20(24): 21-24.
- [7] 王婷婷, 文今福, 金松南. 地锦草的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 泰山医学院学报, 2012, 33(8): 629-632.
- [8] 安惠霞, 李治建, 古丽娜·达吾提, 等. 地锦草的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2866-2868.
- [9] 田 瑛, 刘细桥, 董俊兴. 中药地锦草芹菜素糖苷类化合物 [J]. 药科学报, 2009, 44(5): 496-499.
- [10] 谢琼琚, 钟有添. 枫香树叶的研究进展 [J]. 赣南医学院学报, 2014, 34(4): 651-653.
- [11] 袁 惠. 枫香树叶化学成分及质量标准研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2014.
- [12] 丁晨旭, 纪兰菊. 香薷化学成分及药理作用研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2005, 39(5): 63-65.
- [13] 李卷梅, 聂少平, 李景恩, 等. 香薷多糖的乙醇分级纯化及其性质 [J]. 食品科学, 2010, 31(19): 182-185.
- [14] 李振华, 温 强, 戴小英, 等. 樟树资源利用现状与展望 [J]. 江西林业科技, 2007, 6(9): 30-36.
- [15] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药材标准 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2014.
- [16] Wang H, Li Y, Huang Y, *et al.* Chemical profiling of lobelia chinensis with high-performance liquid chromatography/ quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC/Q-TOF MS) reveals absence of lobeline in the herb [J]. *Molecules*, 2018, 23(12): 3258-3271.
- [17] Zhang A, Sun H, Wang X. Mass spectrometry-driven drug discovery for development of herbal medicine [J]. *Mass Spectr Rev*, 2018, 37(3): 307-320.
- [18] Aszyk J, Kotwasik A. The use of HPLC-Q-TOF-MS for comprehensive screening of drugs and psychoactive substances in hair samples and several "legal highs" products [J]. *Monatshefte Fur Chem*, 2016, 147(8): 1407-1414.
- [19] Fornal E, Stachniuk A, Wojtyla A, *et al.* LC-Q/TOF mass spectrometry data driven identification and spectroscopic

- characterisation of a new 3,4-methylenedioxy-*N*-benzyl cathinone (BMDP) [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 72(9): 139-144.
- [20] Broecker S, Herre S, Wust B, *et al*. Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2 500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 400(1): 101-117.
- [21] 杜憬生, 吴立群, 刘敬功, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的菊花化学成分快速分析 [J]. 中药材, 2017, 40(3): 621-623.
- [22] 王卫记, 罗建光, 孔令义. HPLC-ESI-MSⁿ 分析酸枣仁有效部位的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(21): 2768-2773.
- [23] 李 宁. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的参桂胶囊中主要化学成分研究 [J]. 中草药, 2019, 50(3): 573-581.
- [24] 吴吉洋, 高方圆, 叶晓岚, 等. 创新药物川阿格雷及其拼合分子阿魏酸和川芎嗪的质谱裂解规律 [J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(7): 755-758.
- [25] 赵祥升, 杨美华, 吴海峰, 等. 巴戟天中环烯醚萜苷和蒽醌在电喷雾离子源负离子模式下的质谱裂解行为 [J]. 质谱学报, 2018, 39(3): 342-350.
- [26] 钟艳梅, 冯毅凡, 郭 姣. 基于 UPLC/Q-TOF MS 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.