

UPLC-Q-TOF-MS 分析补肾强身片中化学成分

林秀莲¹, 宋粉云^{2*}, 潘玄玄², 谢淑桐², 李华³

(1. 广东药科大学 中药学院, 广州 510006; 2. 广东药科大学 药学院, 广州 510006;
3. 广东省药品检验所, 广州 510180)

[摘要] **目的:** 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)对补肾强身片中的化学成分进行研究。**方法:** 以 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm), 流动相乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 电喷雾离子源, 正、负离子模式下采集数据。首先对有对照品的成分进行定性分析, 对于多数没有对照品的成分, 主要根据 UPLC-Q-TOF-MS 提供的准确相对分子质量和离子碎片信息并结合文献数据比对进行化学成分结构推测鉴定。**结果:** 共鉴定了补肾强身片中 50 个化学成分, 包括酚酸类 19 个、黄酮类 25 个、裂环烯醚萜类 4 个、苯乙醇苷类 1 个、生物碱类 1 个, 其中 12 个成分(原儿茶酸, 红景天苷, 原儿茶醛, 绿原酸, 金丝桃苷, 异槲皮苷, 特女贞苷, 朝藿定 C, 淫羊藿苷, 山柰酚, 宝霍苷 I, 紫云英苷)通过与对照品比对进行定性分析。**结论:** UPLC-Q-TOF-MS 可以简便、快速地对补肾强身片中化学成分定性分析, 该研究丰富了补肾强身片中化学成分的信息, 为补肾强身片药效物质基础研究、质量控制及其临床用药提供了参考。

[关键词] 补肾强身片; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱; 酚酸; 黄酮

[中图分类号] R284.1; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0061-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181809

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180629.0837.001.html>

[网络出版时间] 2018-06-29 14:01

Analysis on Chemical Constituents in Bushen Qiangshen Pills by UPLC-Q-TOF-MS

LIN Xiu-lian¹, SONG Fen-yun^{2*}, PAN Xuan-xuan², XIE Shu-tong², LI Hua³

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
2. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;
3. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the chemical constituents in Bushen Qiangshen pills (BQP) by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). **Method:** The UPLC separation was performed on Agilent SB-C₁₈ reversed-phase column (4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm) with acetonitrile-0.1% formic acid solution as mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.5 mL·min⁻¹, and the column temperature was 40 °C. Data were collected via positive and negative ion mode using ESI ion source. First of all, the qualitative analysis was conducted for the components with reference substances, and the major components without reference substances were identified according to the relative molecule weight and fragment information by UPLC-Q-TOF-MS as well as comparison with literature data. **Result:** Fifty compounds from BQP were identified, including 19 phenolic acids, 25 flavonoids, 4 olefins, 1 phenylethanolate and 1 alkaloid. 12 components (protocatechuic acid, salidroside, protocatechuic aldehyde, chlorogenic acid, hyperin, isoquercitrin, specnuezhenide, epimedin C, icariin, kaempferide, baohuoside I

[收稿日期] 20171221(022)

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

[第一作者] 林秀莲, 硕士, 从事现代分析方法在中药质量控制中的应用研究, E-mail: xiulianlin@163.com

[通信作者] * 宋粉云, 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

and astragalin) among them were qualitatively analyzed by comparing with reference substances. **Conclusion:** UPLC-Q-TOF-MS is convenient and rapid to analyze the chemical constituents in BQP, providing a reference for the study on material foundation of efficacy, quality control and clinical application of BQP.

[**Key words**] Bushen Qiangshen pills; UPLC-Q-TOF-MS; phenolic acid; flavonoids

补肾强身片收载于《卫生部药品标准中药成方制剂(第十五册)》,由淫羊藿、菟丝子、金樱子、女贞子、狗脊(烫)5味中药组成,具有补肾强身的功效,临床用于腰膝酸软、头晕耳鸣、眼花心悸、阳痿遗精的治疗^[1]。现有标准中仅采用显微鉴别、化学反应和薄层鉴别来评价补肾强身片的质量。目前,对补肾强身片的研究也仅局限于临床疗效观察、薄层鉴别^[2-3],而对于该方化学成分的研究也仅为淫羊藿苷、金丝桃苷、原儿茶酸等单一化学成分的定量测定^[4-6],尚未见文献报道对补肾强身片中的化学成分进行全面地定性分析。中药物质基础研究是中药现代化研究的一项重要内容,对控制中药质量、优化制剂工艺、阐明有效成分及其作用原理具有重要意义。近年来,UPLC-Q-TOF-MS因其速度快,选择性强,灵敏度高和分辨率高等优点在中药物质基础研究中得到广泛应用^[7]。通过液相色谱分离,利用串联高分辨飞行时间质谱的精确相对分子质量定性优势,可全面而快速地对中药复方多成分进行准确鉴定。因此,本研究采用UPLC-Q-TOF-MS,对补肾强身片中的化学成分进行了结构推测鉴定,丰富了其化学成分的信息,为补肾强身片药效物质基础研究、质量控制及其临床用药提供参考。

1 材料

G6540型四级杆飞行时间串联质谱仪,1290 Infinity Series型超高效液相色谱系统(美国Agilent公司)。CP224S型1/1万,CP225D型1/10万电子天平(德国Sartorius);KQ-300DE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q系列超纯水机(Millipore)。乙腈色谱纯(美国Honeywell公司),乙醇分析纯(广州化学试剂厂),水为超纯水。

对照品原儿茶酸(批号110809-201205,纯度99.9%),红景天苷(批号110818-201507,纯度99.8%),原儿茶醛(批号110810,纯度98.2%),绿原酸(批号110753-201415,纯度96.2%),金丝桃苷(批号111521-201507,纯度94.3%),异槲皮苷(批号111809-201403,纯度92.9%),特女贞苷(批号111926-201404,纯度97.3%),朝藿定C(批号111780-201503,纯度95.5%),淫羊藿苷(批号110737-201516,纯度94.2%),山柰酚(批号

110861-201310,纯度95.5%),宝霍昔I(批号110861-201310,纯度93.2%)均购自中国食品药品检定研究院;紫云英苷(批号480104,纯度98.0%)购自上海安谱实验科技股份有限公司。12批补肾强身片样品,分别购自北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂(批号14120174,14120175,14120994,14120996,15120512,15120513),景忠山国药(唐山)有限公司(批号140102,150203,150403,150503,150702,150705)。

2 方法

2.1 色谱条件 Agilent SB-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 2.7 μm);流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~14 min, 5%~15% B; 14~42 min, 15%~51% B);流速0.5 mL·min⁻¹;柱温40℃;进样量2 μL。

2.2 质谱条件 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;干燥气流速10.0 L·min⁻¹;干燥气温度350℃;雾化气压力241.3 kPa;碎裂电压175 V;毛细管电压正、负离子模式下分别为4 000, 3 500 V;碰撞能量25 V;数据处理采用Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.06.00。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 分别取对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含红景天苷20.7 μg,原儿茶酸20.5 μg,原儿茶醛23.4 μg,绿原酸21.0 μg,金丝桃苷23.3 μg,异槲皮苷20.1 μg,特女贞苷21.9 μg,紫云英苷32.1 μg,朝藿定C23.8 μg,淫羊藿苷23.5 μg,山柰酚21.6 μg,宝霍昔I24.3 μg的对照溶液,即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 取补肾强身片20片,除去包衣,研细,取约1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%乙醇25 mL,密塞,称定质量,超声处理30 min,放冷,再称定质量,用50%乙醇补足缺失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

3 结果与分析

在正、负离子模式下测定补肾强身片样品,得到质谱总离子流图(TIC),见图1。首先对有对照品的成分定性分析,对于多数没有对照品的成分,主要根

据 UPLC-Q-TOF-MS 提供的准确相对分子质量和离子碎片信息并结合文献数据比对进行化学成分确认,共从补肾强身片中鉴定出 50 个成分,其中酚酸类 19 个、黄酮类 25 个、裂环环烯醚萜类 4 个、苯乙醇苷类 1 个、生物碱类 1 个,见表 1。

3.1 酚酸类成分 从补肾强身片中鉴别出 19 个酚酸类成分,化合物 **4,9,11** 通过与对照品的保留时间和质谱数据比对确定为原儿茶酸、原儿茶醛、绿原酸。

根据一级质谱数据,化合物 **19,20** 母离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 367,可能分子式为 $C_{17}H_{19}O_9$,二级质谱碎片离子有 m/z 191,173,193,因此推断为阿魏酰奎宁酸。根据文献[14]报道,4-和 5-位取代时,二级质谱中的基峰离子分别为 m/z 173,191,因此鉴定

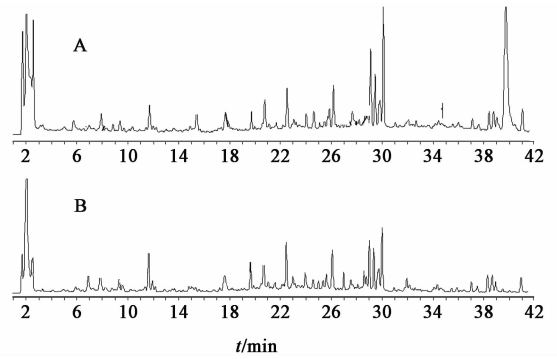


图1 补肾强身片正(A),负离子模式(B)下的总离子流
Fig.1 Total ion current (TIC) chromatograms of BQP in positive ion mode(A) and negative ion mode(B)

化合物 **19,20** 分别为 5-阿魏酰奎宁酸,4-阿魏酰奎宁酸。

表1 补肾强身片化学成分鉴定

Table 1 Identification of chemical constituents from BQP

化合物	<i>t</i> /min	相对分子质量 (<i>m/z</i>)	分子式	加合离子	碎片离子 (<i>m/z</i>)	名称	药材来源	参考文献
1	2.047	191.055 6	C ₇ H ₁₂ O ₆	$[M - H]^-$	179	奎宁酸	all	[8]
2	2.507	191.019 2	C ₆ H ₈ O ₇	$[M - H]^-$	111	柠檬酸	all	[9]
3	4.013	169.017 3	C ₇ H ₆ O ₅	$[M - H]^-$	125	没食子酸	b, e	[10]
4*	6.876	153.018 8	C ₇ H ₆ O ₄	$[M - H]^-$	109	原儿茶酸	a, b, c, e	-
5	7.737	515.119 0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	$[M - H]^-$	353, 191, 173	1,3-双咖啡酰奎宁酸	a, b, c, e	[11]
6	7.905	353.087 3	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	$[M - H]^-$	191, 179, 173, 135	新绿原酸	a, b, c, e	[12]
7*	8.699	299.113 1	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	$[M - H]^-$	179	红景天苷	c	-
8	9.243	433.134 6	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₂	$[M - H]^-$	209, 165	10-羟基木犀草苷二甲酯	c	[13]
9*	9.453	137.023 9	C ₇ H ₆ O ₃	$[M - H]^-$	109	原儿茶醛	all	-
10	10.373	337.092 3	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	$[M - H]^-$	191, 173, 163	3-对香豆酰奎宁酸	e	[14]
11*	11.503	353.087 3	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	$[M - H]^-$	191, 179, 173, 135	绿原酸	all	-
12	11.796	353.087 3	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	$[M - H]^-$	191, 179, 173, 135	隐绿原酸	all	[15]
13	12.079	627.156 1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	$[M + H]^+$	465, 303	槲皮素-3- <i>O</i> - β -D-半乳糖-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	d	[16]
14	12.716	179.034 4	C ₉ H ₈ O ₄	$[M - H]^-$	135	咖啡酸	c, d, e	[17]
15	13.553	487.087 7	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	$[M - H]^-$	325, 179	咖啡酰阿魏酰酒石酸	c, d	[18]
16	14.892	337.092 3	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	$[M - H]^-$	191, 173, 163, 119	4-对香豆酰奎宁酸	c, d	[14]
17	15.185	337.092 3	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	$[M - H]^-$	191, 173, 163, 119	5-对香豆酰奎宁酸	c, d	[14]
18	15.19	342.170 5	C ₂₀ H ₂₃ O ₄ N	$[M + H]^+$	297, 265	木兰碱	e	[18]
19	16.607	367.102 9	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	$[M - H]^-$	193, 191, 173	5-阿魏酰奎宁酸	c, d	[14]
20	17.109	367.102 9	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	$[M - H]^-$	193, 191, 173	4-阿魏酰奎宁酸	c, d	[14]
21	19.57	597.145 6	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	$[M + H]^+$	465, 303	槲皮素-3- <i>O</i> - β -D-半乳糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-芹糖苷	d	[16]
22*	20.986	465.103 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	$[M + H]^+$	303, 257, 229	金丝桃苷	d, e	-
23*	21.042	465.103 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	$[M + H]^+$	303, 257	异槲皮苷	d, e	-
24	22.127	579.171 4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	$[M + H]^+$	433, 287	山柰酚-3- <i>O</i> -二鼠李糖苷	e	[19]

续表 1

化合物	<i>t</i> /min	相对分子质量 (<i>m/z</i>)	分子式	加合离子	碎片离子 (<i>m/z</i>)	名称	药材来源	参考文献
25	22.257	515.119 0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M - H] ⁻	353, 191, 179, 173, 135	异绿原酸 B	d, e	[11]
26*	22.443	685.234 4	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₇	[M - H] ⁻	523, 299	特女贞苷	c	-
27	22.856	515.119 0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M - H] ⁻	353, 191, 179, 173, 135	异绿原酸 A	d, e	[11]
28*	22.954	449.108 4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M + H] ⁺	287	紫云英苷	d	-
29	23.356	685.234 4	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₇	[M - H] ⁻	523, 299	特女贞苷异构体 a	c	[20]
30	23.955	685.234 4	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₇	[M - H] ⁻	523, 299	特女贞苷异构体 b	c	[20]
31	24.069	515.119 0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M - H] ⁻	353, 191, 179, 173, 135	异绿原酸 C	d, e	[11]
32	24.967	795.271 2	C ₃₇ H ₄₆ O ₁₉	[M + H] ⁺	663, 517, 355, 299	淫羊藿苷 E	e	[21]
33	25.594	663.228 9	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₅	[M + H] ⁺	517, 355, 299	淫羊藿苷 A	e	[21]
34	26.079	447.092 7	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M + H] ⁺	271, 153	芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷	d	[22]
35	28.091	839.297 4	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	[M + H] ⁺	677, 531, 369, 313	hexandraside F	e	[23]
36	28.567	839.297 4	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₀	[M + H] ⁺	677, 531, 369, 313	朝定藿 A	e	[23]
37	28.990	809.286 8	C ₃₈ H ₄₈ O ₁₉	[M + H] ⁺	677, 531, 369, 313	朝藿定 B	e	[19]
38*	29.361	823.302 5	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	[M + H] ⁺	677, 531, 369, 313	朝藿定 C	e	-
39	29.646	823.302 5	C ₃₉ H ₅₀ O ₁₉	[M + H] ⁺	677, 531, 369, 313	宝藿苷 VI	e	[19]
40	29.760	461.108 4	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M + H] ⁺	285, 270	金合欢素 7- <i>O</i> -葡萄糖苷酸	e	[24]
41*	29.974	677.244 5	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	[M + H] ⁺	531, 369, 313	淫羊藿苷	e	-
42	30.930	881.307 9	C ₄₁ H ₅₂ O ₂₁	[M + H] ⁺	719, 531, 369, 313	朝藿苷丙	e	[25]
43	31.929	821.286 8	C ₃₉ H ₄₈ O ₁₉	[M + H] ⁺	677, 531, 369, 313	anhydroicaritin-3- <i>O</i> -rhamnoside (1-2)-furan acid-7- <i>O</i> -glucoside	e	[19]
44	31.344	533.202 3	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₁	[M + H] ⁺	387, 369, 313	淫羊藿素-3- <i>O</i> - α -鼠李糖苷	e	[19]
45*	32.117	287.055 6	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M + H] ⁺	189	山柰酚	d	-
46	32.556	923.318 5	C ₄₃ H ₅₄ O ₂₂	[M + H] ⁺	719, 531, 369, 313	epimedokoreanoside I	e	[19]
47	35.453	501.177 1	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₀	[M + H] ⁺	355, 299	宝藿苷 II	e	[26]
48	38.634	647.234 0	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₄	[M + H] ⁺	369, 313	箭藿苷 B	e	[26]
49	38.905	661.249 6	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₄	[M + H] ⁺	515, 369, 313	2'- <i>O</i> -rhamnosylcariside II	e	[19]
50*	40.917	515.191 7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₀	[M + H] ⁺	369, 313	宝藿苷 I	e	-

注: * 代表与对照品比对鉴定; all. 全部; a. 狗脊; b. 金樱子; c. 女贞子; d. 菟丝子; e. 淫羊藿。

根据一级质谱数据, 化合物 **10**, **16**, **17** 母离子 [M - H]⁻ 为 *m/z* 337, 可能分子式为 C₁₆H₁₇O₈, 二级质谱碎片离子有 *m/z* 191, 173, 163, 119, 因此推断为对香豆酰奎宁酸。3 个化合物的二级主要碎片离子分别为 *m/z* 163, 173, 191, 5-对香豆酰奎宁酸较 3-对香豆酰奎宁酸极性稍弱, 因此鉴定化合物 **10**, **16**, **17** 分别为 3-对香豆酰奎宁酸, 4-对香豆酰奎宁酸, 5-对香豆酰奎宁酸。

根据一级质谱数据, 化合物 **6**, **11**, **12** 母离子 [M - H]⁻ 为 *m/z* 353, 可能分子式为 C₁₆H₁₇O₉, 二级

质谱碎片离子有 *m/z* 191, 173, 179, 135, 因此推断为单咖啡酰奎宁酸。与对照品比对, 确认化合物 **11** 为绿原酸。4-位取代时, 二级质谱主要碎片离子为 *m/z* 173, 因此化合物 **12** 为隐绿原酸。1-, 3-和 5-位取代时主要碎片离子为 *m/z* 191, 而 3-位取代时 *m/z* 179 相对丰度较 1-和 5-位取代高^[12], 因此化合物 **6** 为新绿原酸。

根据一级质谱数据, 化合物 **5**, **25**, **27**, **31** 母离子 [M - H]⁻ 为 *m/z* 515, 可能分子式为 C₂₅H₂₃O₁₂, 二级质谱碎片离子有 *m/z* 353, 191, 173, 179, 135, 故推

断为双咖啡酰奎宁酸。化合物 **25, 27** 二级质谱碎片离子 m/z 173 相对分度较其他两化合物高, 根据文献[11]报道, 可判断为4-位取代, 化合物 **25** 的碎片离子 m/z 191 的丰度较化合物 **27** 高, 因此判断化合物 **25, 27** 分别为异绿原酸 B, 异绿原酸 C。在反相色谱中, 1, 3-双咖啡酰奎宁酸较异绿原酸 A 先洗出, 故将化合物 **25, 27** 分别鉴定为 1, 3-双咖啡酰奎宁酸、异绿原酸 C。

化合物 **15** 母离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 487, 可能分子式为 $C_{23}H_{19}O_{12}$, 主要二级质谱碎片离子有 m/z 325, 193, 179, 149, 根据文献[18]报道的数据, 鉴定为咖啡酰阿魏酰酒石酸。

化合物 **1, 2** 母离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 191, 二级质谱基峰离子分别为 179 和 111, 根据文献[8-9]数据, 鉴定化合物 **1, 2** 分别为奎宁酸, 柠檬酸。化合物 **3** 母离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 169, 二级质谱基峰离子为 m/z 125, 是母离子失掉 1 个羧基 COO^- 得到, 与文献[10]报道的没食子酸质谱数据一致, 鉴定为没食子酸。化合物 **14** 母离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 169, 二级质谱基峰离子为 m/z 135, 鉴定化合物 **14** 为咖啡酸。

3.2 黄酮类化合物 从补肾强身片中鉴别出 25 个黄酮类成分。根据母核骨架的不同, 将分离鉴定出的 25 个黄酮类成分主要分为以 8-异戊烯基山柰素 (anhydroicaritin), 8-异戊烯基山柰酚 (demethyl anhydroicaritin) 为苷元的黄酮苷类。

以 anhydroicaritin 为苷元的黄酮类化合物在 MS/MS 质谱分析中具有类似的裂解规律, 区别在 3 位和 7 位连接的糖基不同。在正离子模式下, 均能给出 $[M + H]^+$ 母离子峰, 丢失 3 位和 7 位的糖基得到苷元离子为 m/z 369, 苷元离子继续丢失 1 分子的 C_4H_8 (56) 得到碎片离子 m/z 313。化合物 **35 ~ 39, 41, 43, 46, 48 ~ 50** 同为以 anhydroicaritin 为苷元的黄酮苷类化合物。化合物 **35, 36** 母离子 $[M + H]^+$ 为 m/z 839, 可能分子式为 $C_{39}H_{50}O_{19}$, 碎片离子 m/z 677 可能由母离子丢失 1 个葡萄糖基 (162) 产生, m/z 677 丢失 1 个鼠李糖 (146) 得到碎片离子 m/z 531, 继续丢失 1 个葡萄糖基 (162) 得到苷元离子 m/z 369, 符合朝藿定 A 和 hexandraside F 裂解规律, 两者为同分异构体, 仅 3 位葡萄糖的连接位置不同, 前者为 3-*O*-rha²-glu, 后者为 3-*O*-rha³-glu。根据文献[23]报道, 在反相色谱中化合物 hexandraside F 较朝藿定 A 先洗出, 因此化合物 **35, 36** 分别为 hexandraside F, 朝藿定 A。化合物 **37** 母离子 $[M +$

$H]^+$ 为 m/z 809, 可能分子式为 $C_{38}H_{48}O_{19}$, 主要碎片离子有 m/z 677 $[M + H - xyl]^+$, 531 $[M + H - xyl - rha]^+$, 369 $[M + H - xyl - rha - glu]^+$, 313 $[M + H - xyl - rha - glu - C_4H_8]^+$, 与相关文献[19]数据比对, 鉴定为朝藿定 B。通过与对照品和相关文献数据比对, 将其他此类黄酮苷元化合物 **38, 39, 41, 43, 46, 48 ~ 50** 分别鉴定为朝藿定 C, 宝藿苷 VI, 淫羊藿苷, anhydroicaritin-3-*O*-rhamnoside(1-2)-furan acid-7-*O*-glucoside, epimedokoreanoside I, 箭藿苷 B, 2''-*O*-rhamnosylcariside II, 宝藿苷 I。

与上述 anhydroicaritin 结构相比, demethylanhydroicaritin 少 4'-位的甲基, 但其质谱裂解规律相似。在补肾强身片中共鉴定出 3 个以 demethylanhydroicaritin 为苷元的黄酮苷类化合物。化合物 **32, 33** 和 **47** 具有相同的二级特征碎片离子 m/z 355, 通过与现有文献[26]数据比对, 分别鉴定为淫羊藿苷 E, 淫羊藿苷 A, 宝藿苷 II。化合物 **32** 母离子 $[M + H]^+$ 为 m/z 795, 可能分子式为 $C_{38}H_{48}O_{19}$, 碎片离子 m/z 663 可能由母离子丢失 1 个木糖 (132) 产生, m/z 663 丢失 1 个鼠李糖 (146) 得到碎片离子 m/z 517, 继续丢失 1 个葡萄糖基 (162) 得到苷元离子 m/z 355, 苷元离子丢失 1 个 C_4H_8 (56) 得到碎片离子 m/z 299, 与淫羊藿 E 的裂解规律相符, 鉴定为淫羊藿 E。化合物 **37** 母离子 $[M + H]^+$ 为 m/z 663, 主要碎片离子有 m/z 517 $[M + H - rha]^+$, 355 $[M + H - rha - glu]^+$, 299 $[M + H - rha - glu - C_4H_8]^+$, 与相关文献[26]数据比对, 鉴定为淫羊藿苷 A。化合物 **47** 母离子 $[M + H]^+$ 为 m/z 501, 主要碎片离子有 m/z 355 $[M + H - rha]^+$, 299 $[M + H - rha - C_4H_8]^+$, 与相关文献[26]数据比对, 鉴定为宝藿苷 II。

除上述黄酮苷类化合物外, 还从补肾强身片中还鉴定出了 9 个一般黄酮苷类化合物, 其中化合物 **22, 23, 30, 47** 通过与对照品的保留时间和质谱数据比对确定为金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、山柰酚。化合物 **13** 母离子 $[M + H]^+$ 为 m/z 627, 可能分子式为 $C_{27}H_{30}O_{17}$, 主要碎片离子 m/z 465 可能由母离子丢失 1 个葡萄糖基 (162) 产生, m/z 465 继续丢失 1 个半乳糖 (162) 得到苷元离子 m/z 303, 根据文献[16]报道鉴定为槲皮素-3-*O*- β -D-半乳糖-7-*O*- β -D-葡萄糖苷。类似地, 化合物 **21, 24, 34** 鉴定为槲皮素-3-*O*- β -D-半乳糖-(2 \rightarrow 1)- β -D-芹糖苷、山柰酚-3-*O*-二鼠李糖苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷。化合物 **40** 母离子 $[M + H]^+$ 为 m/z 461, 可能分子式为

$C_{22}H_{23}O_{11}$, 主要碎片离子 m/z 285, 可能由母离子丢失 1 个葡萄糖醛酸(176)产生, m/z 285 继续丢失 1 个 CH_3 (15) 得到碎片离子 m/z 270, 与相关文献[24]数据比对, 鉴定为金合欢素 7-*O*-葡萄糖苷酸。化合物 44 母离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 533, 可能分子式为 $C_{27}H_{32}O_{11}$, 主要碎片离子 m/z 388, 可能由母离子丢失 1 个鼠李糖(145)产生, m/z 388 失去 1 个 H_2O 得到碎片离子 m/z 369, m/z 369 继续失去 1 个 C_4H_8 (56) 得到碎片离子 m/z 313, 与文献[19]报道的淫羊藿素-3-*O*- α -鼠李糖苷质谱裂解规律一致, 鉴定为淫羊藿素-3-*O*- α -鼠李糖苷。

3.3 裂环烯醚萜苷类 从补肾强身片中鉴别出 4 个裂环烯醚萜苷类成分。化合物 8 母离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 433, 可能分子式为 $C_{18}H_{26}O_{12}$, 主要二级质谱碎片离子有 m/z 209, 可能由母离子丢失 1 个葡萄糖基(162)和 2 个 CH_3O (31) 得到, m/z 209 继续失去 1 个 CO_2 (44) 得到碎片离子 m/z 165, 根据文献[13]质谱数据鉴定为 10-羟基木犀榄苷二甲酯。化合物 24, 27, 28 母离子 $[M-H]^-$ 均为 m/z 685, 且具有相同的主要碎片离子 m/z 523, 299, 可能分子式为 $C_{31}H_{42}O_{17}$, 化合物 24 通过与对照品的保留时间和质谱数据比对确定为特女贞苷, m/z 523 由母离子丢失 1 个葡萄糖基(162)产生, 继而酯键断裂丢失 1 个相对分子质量为 224 的基团得到碎片离子 m/z 299 (红景天苷), 判断化合物 27, 28 为特女贞苷异构体。

3.4 苯乙醇苷类 从补肾强身片中鉴别出 1 个苯乙醇苷类化合物。化合物 7 母离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 299, 碎片离子有 m/z 179, 通过与对照品的保留时间和质谱数据比对确定为红景天苷。

3.5 生物碱类 从补肾强身片中鉴别出 1 个生物碱类成分。化合物 18 母离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 342, 可能分子式为 $C_{20}H_{40}NO_4$, 碎片离子 m/z 297 可能由母离子丢失 1 个基团 $(CH_3)_2NH$ (45) 产生, 继续丢失 1 个基团 CH_3OH (32) 得到碎片离子 m/z 265, 与相关文献[17]数据比对, 鉴定为木兰碱。

4 讨论

为更全面地反映出各组方中药的信息, 根据主要成分的结构和性质, 试验分对提取溶剂、提取方式和提取时间进行了考察, 结果表明 50% 乙醇超声提取 30 min 为最佳条件。测定成分极性范围较大, 故采用反相色谱梯度洗脱法。黄酮类化合物常带有酚羟基, 未解离的羟基与固定相作用较强而导致拖尾, 同时为抑制酚酸类成分的解离, 故在流动相中加入

甲酸调节 pH。此外, 试验对质谱条件进行了优化。补肾强身片提取物中化学成分种类较多, 响应的模式各有不同, 因此采用正、负离子两种扫描方式对化合物进行定性分析。调节质谱碎片电压, 电压太大会将化合物打碎, 得不到稳定的母离子峰, 电压太小则不易得到碎片离子, 当设定为 175 V 时, 大部分化合成分母离子峰稳定存在, 且产生相应成分的碎片离子, 有利于对化合物进行定性分析, 因此选择碎片电压为 175 V。毛细管电压采用常规值, 正离子模式 4 kV, 负离子模式 3.5 kV。干燥气流速及雾化器压力逐针进样对比, 确定干燥气流速为 $10 L \cdot min^{-1}$, 雾化器压力为 241.3 kPa。

本试验采用 UPLC-Q-TOF-MS 法鉴定出补肾强身片中 50 个成分。研究表明, UPLC-Q-TOF-MS 法可以简便、快速地对方剂中化学成分进行定性研究, 为补肾强身片药效物质基础研究、质量控制及其临床用药提供了参考。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准——中药成方制剂. 第十五册[S]. 1997:9-10.
- [2] 贾福华. 补肾强身片的临床治验[J]. 中成药研究, 1982(8):28.
- [3] 王继玉, 卑国斌. 改进补肾强身片淫羊藿苷薄层色谱鉴别方法的建议[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(S1): 207-208.
- [4] 孙明, 郑爱华. HPLC 测定补肾强身片中淫羊藿苷的含量[J]. 中成药, 2006, 28(8):1231-1232.
- [5] 方慧祥, 杨坤芬, 冯玉茹. RP-HPLC 法测定补肾强身片中金丝桃苷的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(3): 413-415.
- [6] 穆天慧, 方慧祥, 黎海存. HPLC 法测定补肾强身片中原儿茶酸的含量[J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(9):13-14.
- [7] 雷勇胜, 宋丽明, 蒋庆峰. 液质联用技术在药物的有关物质分析中的应用[J]. 现代仪器, 2011, 17(4):9-13, 17.
- [8] Clifford M N, Johnston K L, Knight S, et al. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids [J]. J Agr Food Chem, 2003, 51(10):2900-2911.
- [9] 李辰辰, 陆小腾, 童华荣. HPLC-Q-TOF-MS-MS 测定桑椹中多酚类物质[J]. 食品科学, 2015, 36(2): 101-104.
- [10] XU J S, YANG L, ZENG X, et al. Characterization of compounds in the Chinese herbal drug Mu-Dan-Pi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization

- mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(22):3275-3288.
- [11] ZHANG J Y, ZHANG Q, LI N, et al. Diagnostic fragment-ion-based and extension strategy coupled to DFIs intensity analysis for identification of chlorogenic acids isomers in Flos Lonicerae Japonicae by HPLC-ESI-MSⁿ [J]. Talanta, 2013, 104:1-9.
- [12] 刘颖, 卢建秋, 张加余, 等. 苦碟子药材及其注射液中化学成分的 HPLC-ESI-MSⁿ 分析 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16):2675-2681.
- [13] 谭乐俊, 王萌, 任晓亮, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的中药水蜜丸制剂二至丸多成分稳定性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13):2260-2268.
- [14] Parveen I, Threadgill M D, Hauck B, et al. Isolation, identification and quantitation of hydroxycinnamic acid conjugates, potential platform chemicals, in the leaves and stems of *Miscanthus × giganteus* using LC-ESI-MSⁿ [J]. Phytochemistry, 2011, 72(18):2376-2384.
- [15] 王放, 张加余, 王青, 等. HPLC-HR-MSⁿ 法鉴定苦碟子注射液中酚酸类成分 [J]. 中南药学, 2013, 11(8):561-565.
- [16] 叶敏, 阎玉凝, 乔梁, 等. 中药菟丝子化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(2):115-117.
- [17] Jaiswal R, Kiprotich J, Kuhnert N. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family [J]. Phytochemistry, 2011, 72(8):781-790.
- [18] ZHOU J, SUN J B, ZHENG P, et al. Orthogonal array design for optimization of hollow-fiber-based liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for study of the pharmacokinetics of magnoflorine in rat plasma [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 403(7):1951-1960.
- [19] ZHAO H Y, SUN J H, FAN M X, et al. Analysis of phenolic compounds in Epimedium plants using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2008, 1190(1/2):157-181.
- [20] 宋梦晗, 张学兰, 李慧芬, 等. LC-TOF/MS 快速鉴定女贞子 4 种环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(16):14-17.
- [21] LI H F, GUAN X Y, YE M, et al. Qualitative and quantitative analyses of *Epimedium wushanense* by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Separation Sci, 2015, 34(12):1437-1446.
- [22] 邓皓月, 武媛媛, 袁磊, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析不同产地抱茎苦苣菜化学成分的差异 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(17):37-42.
- [23] 袁航. 黔淫羊藿的鉴定及质量评价研究 [D]. 北京:北京中医药大学, 2014.
- [24] 舒俊生, 黄桂东, 毛健. 滁菊 95% 乙醇提取液中黄酮类和酚酸类物质的鉴定及分离 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(4):207-213.
- [25] 袁杰, 龚又明, 鞠鹏, 等. HPLC-MS² 法分析朝鲜淫羊藿中的化学成分 [J]. 中草药, 2004, 35(4):371-374.
- [26] LI H F, GUAN X Y, YE M, et al. Qualitative and quantitative analyses of *Epimedium wushanense* by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2011, 34(12):1437-1446.

[责任编辑 顾雪竹]