

肿痛涂膜剂化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

苏海萍, 韩越*

(天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150)

[摘要] 目的:采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对肿痛涂膜剂的化学成分进行分析。方法:采用 ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 并以甲醇-0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 质谱使用 ESI 离子源, 正负离子模式扫描采集数据。结果:根据精确相对分子质量和碎片离子分析, 并结合相关文献及对对照品数据, 共鉴定出 34 个化合物, 包含 10 个有机酸、鞣质类成分, 9 个萜类成分, 8 个黄酮类成分, 3 个蒽醌类成分, 4 个皂苷类成分。结论:建立了一种基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的定性分析方法, 为研究肿痛涂膜剂的化学成分, 以及进一步研究其作用机制提供了依据。

[关键词] 肿痛涂膜剂; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 化学成分; 大黄素; 血竭素; 三七皂苷 R₁

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0063-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220063

Chemical Constituents from Zhongtong Film Coating by UPLC-Q-TOF-MS/MS

SU Hai-ping, HAN Yue*

(Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150 China)

[Abstract] **Objective:** To analyze and identify the chemical constituents from Zhongtong film coating by UPLC-Q-TOF-MS/MS. **Method:** The analysis was performed on an ACQUITY BEH C₁₈ reverse phase column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm). The mobile phase consisted of methyl alcohol and 0.1% formic acid was used for gradient elution, the flow rate was 0.4 mL·min⁻¹. Quadrupole-time of flight-mass spectrometry was applied for the qualitative analysis under positive and negative ion modes and ESI ion source was used for mass spectra. **Result:** The results indicated that 34 compounds from Zhongtong film coating had been identified, including 10 compounds of organic acids and tannins, 9 compounds of terpenoids, 8 compounds of flavonoids, 3 compounds of anthraquinones, and 4 compounds of saponins. **Conclusion:** The efficient separation ability of UPLC and high sensitive detection of MS are used in this study, which will provide an identification of the chemical composition and provide a basis for the further study on its mechanism.

[Key words] Zhongtong film coating; UPLC-Q-TOF-MS/MS; chemical constituents; emodin; dracorhodin; notoginsenoside R₁

肿痛涂膜剂由大黄、血竭、三七、栀子、侧柏叶、骨碎补、续断、赤芍、泽兰、天花粉等 17 味中药组成, 具有舒筋活血、散瘀消肿、止痛之效, 临床用于跌打损伤和瘀血肿痛的治疗, 是天津中医药大学第二附属医院的常用制剂品种, 已有 30 多年的临床应用背景。本方中以大黄清热凉血、散瘀消肿为君药; 血

竭、三七等活血散瘀、消肿止痛药为臣药, 这些药物外用起到活血散瘀消肿的功效。课题组前期对本文提取工艺进行了研究, 在此基础上, 为了明确肿痛涂膜剂的化学成分, 为下一步阐释该药的药效物质基础及作用机制提供依据, 本实验运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 对肿痛涂膜剂的化学成分进行定性研

[收稿日期] 20160507(005)

[基金项目] 中医中西医结合卫生局级科研项目(13102)

[第一作者] 苏海萍, 副主任药师, 从事中药制剂研究及新药研发工作, Tel:13352071079, E-mail:suhaiping0511@126.com

[通讯作者] *韩越, 硕士, 中药师, 从事中药制剂研究工作, Tel:18602238683, E-mail:hanyuetj@126.com

究,并进行了化学物质的药材归属。UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术可在较短时间内完成化学成分的分析工作,避免粗提、纯化的繁琐过程。该技术的运用,给肿痛涂膜剂的化学成分研究提供了一种高效、准确的分析方法。

1 材料

Xevo G2-S 型 Q-TOF 质谱仪(美国 Waters 公司,配有 UPLC® /MS^E 数据采集系统,ESI 离子源,Masslynx V4.1 数据分析软件,二元高压泵,自动进样器,柱温箱),Milli-Q 型纯水器(美国 Millipore 公司),Toledo XS 205 型分析天平(瑞士 Mettler 公司),SK2200HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

大黄、血竭、三七等实验用饮片药材由河北美威中药材有限公司提供,经天津中医药大学第二附属医院饮片鉴定室鉴定符合 2015 年版《中国药典》要求,经制剂室制备得肿痛涂膜剂样品;对照品大黄素(供含量测定用,批号 110756-200110),大黄酚(供含量测定用,批号 110796-201319),血竭素(供含量测定用,批号 110811-200704),三七皂苷 R₁(供含量测定用,批号 110745-201318)均购于中国食品药品检定研究院;甲醇、甲酸色谱纯(德国 Merck 公司)。

2 方法与结果

2.1 液相及质谱检测条件 液相条件:采用 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~10 min, 5%~50% B; 10~17 min, 50%~95% B),流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,进样量 2.0 μL。

质谱条件:采用电喷雾电离源(ESI),正负离子模式,质量扫描范围为 *m/z* 100~1 200,碰撞电压 45~40 eV,毛细管电压 2.0 kV,锥孔电压 30 V,离

子源温度 100 °C,去溶剂温度 450 °C,锥孔气体流量 50 L·h⁻¹,去溶剂气体流量 800 L·h⁻¹。

2.2 样品溶液的制备 精密称取涂膜剂 0.6 g,加甲醇超声(53 kHz)溶解至 50 mL 量瓶中,超声 30 min,14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取对照品大黄素、大黄酚适量,精密称定,加甲醇超声溶解,定容,制成质量浓度分别为 0.102 4, 0.303 2 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。精密称取对照品三七皂苷 R₁,血竭素高氯酸盐适量,精密称定,加甲醇超声溶解,定容,制成质量浓度分别为 1.31, 1.14 g·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.4 肿痛涂膜剂的化学成分鉴定 用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对肿痛涂膜剂成分进行定性分析,ESI-MS 的质谱总离子流图见图 1。

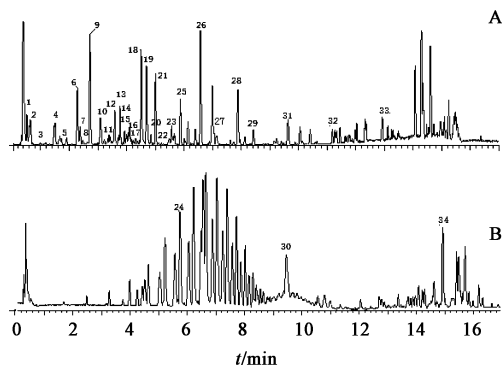


图 1 肿痛涂膜剂负离子(A)和正离子(B)模式的总离子流
Fig.1 Total ion chromatogram of negative(A) and positive(B) ions for Zhongtong film coating

结合样品中各色谱峰的精确质量数、分子式及碎片峰信息,再分析各单味药已有报道的化学成分,推测了各色谱峰可能的结构。图 1 中主要色谱峰的保留时间,质谱信息,推测的分子式,化合物及其碎片离子归属等见表 1。

表 1 肿痛涂膜剂化学成分分析

Table 1 Analysis on chemical components from Zhongtong film

No.	<i>t_R</i> /min	理论 <i>m/z</i>	δ	分子式	化合物	碎片离子归属 / <i>m/z</i>	药材归属
1	0.523	191.019 5	1.6	C ₆ H ₈ O ₇	柠檬酸	111 [M - H - H ₂ O - CO ₂ - H ₂ O] ⁻	赤芍 ^[6]
2	0.628	169.014 0	1.8	C ₇ H ₆ O ₅	没食子酸	125 [M - H - CO ₂] ⁻	大黄 ^[7-8] 、赤芍 ^[20]
3	1.174	341.087 8	1.5	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	咖啡酰基-4-O-β-葡萄糖苷	179[M - H - Glc] ⁻ , 135[M - H - Glc - CO ₂] ⁻	骨碎补 ^[22]
4	1.508	375.129 6	1.3	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	马钱苷酸	213[M - H - Glc] ⁻ , 169[M - H - Glc - CO ₂] ⁻ , 151[M - H - Glc - CO ₂ - H ₂ O] ⁻	续断 ^[11]
5	1.917	549.181 5	-0.7	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	京尼平-1-β-D-龙胆双糖苷	387[M - H - Glc] ⁻ , 225[M - H - 2 Glc] ⁻	栀子 ^[15]
6	2.293	387.128 9	-0.5	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	京尼苷	387[M - H] ⁻ , 225[M - H - Glc] ⁻	栀子 ^[15]

续表 1

No.	t_R /min	理论 m/z	δ	分子式	化合物	碎片离子归属 / m/z	药材归属	
7	2.391	403.124	2	-1.1	$C_{16}H_{22}O_9$	獐牙菜苷	195 [M - H - Glc] ⁻ , 125 [M - H - C ₄ H ₇ O] ⁻	续断 ^[11]
8	2.494	479.155	6	0.6	$C_{23}H_{28}O_{11}$	芍药内酯苷	357 [M - H - HCOOH - benzoic acid] ⁻	赤芍 ^[20]
9	2.713	479.154	3	-2.1	$C_{23}H_{28}O_{11}$	芍药苷	449 [M - H - CH ₂ O] ⁻ , 327 [M - H - CH ₂ O - benzoic acid] ⁻	赤芍 ^[20]
10	3.172	441.081	8	-0.9	$C_{22}H_{18}O_{10}$	表儿茶素没食子酸酯	289 [M - H - galloyl] ⁻ , 169 [M - H - epicatechin] ⁻	大黄 ^[7-8]
11	3.384	595.166	4	0.2	$C_{27}H_{32}O_{15}$	新北美圣草苷	459 [M - H - (4-vinylbenzene-1,2-diol)] ⁻ , 287 [M - H - Rha - Glc] ⁻	骨碎补 ^[22]
12	3.630	515.118	8	-0.4	$C_{25}H_{24}O_{12}$	异绿原酸 A/B/C	353 [M - H - caffeoyl] ⁻ , 191 [M - H - 2caffeoyl] ⁻	续断 ^[11]
13	3.718	515.118	9	-0.2	$C_{25}H_{24}O_{12}$	异绿原酸 A/B/C	353 [M - H - caffeoyl] ⁻ , 191 [M - H - 2caffeoyl] ⁻	续断 ^[11]
14	3.775	447.093	0	0.7	$C_{21}H_{20}O_{11}$	槲皮苷	301 [M - H - Rha] ⁻	侧柏叶 ^[24]
15	3.937	579.171	9	0.9	$C_{27}H_{32}O_{14}$	柚皮苷	271 [M - H - Rha - Glc] ⁻	骨碎补 ^[22]
16	4.078	515.119	0	0.0	$C_{25}H_{24}O_{12}$	异绿原酸 A/B/C	353 [M - H - caffeoyl] ⁻ , 191 [M - H - 2caffeoyl] ⁻	续断 ^[11]
17	4.107	359.076	7	0.0	$C_{18}H_{16}O_8$	迷迭香酸	197 [M - H - caffeoyl] ⁻ , 161 [M - H - danshensu] ⁻	泽兰 ^[13]
18	4.506	461.108	6	0.4	$C_{22}H_{22}O_{11}$	2-O-桂皮酰基-没食子 酰- β -D-葡萄糖	313 [M - H - cinnamic acid] ⁻ , 169 [M - H - cinnamoyl-glucose] ⁻ , 147 [M - H - galloyl- glucose] ⁻	大黄 ^[7-8]
19	4.703	299.093	3	4.7	$C_{17}H_{16}O_5$	2',6'-二羟基-4,4'-二 甲氧基查耳酮	193 [M - H - (2-methoxycyclohexa-1,3-dien- 5-yne)] ⁻ , 167 [M - H - (1-ethynyl-4- methoxybenzene)] ⁻	血竭 ^[30]
20	4.740	931.532	3	0.4	$C_{47}H_{80}O_{18}$	三七皂苷 R ₁	931 [M - H] ⁻ , 637 [M - H - Xyl - Glc] ⁻ , 475 [M - H - Xyl - 2Glc] ⁻	三七 ^[29]
21	5.010	799.485	9	1.9	$C_{42}H_{72}O_{14}$	人参皂苷 R _{g1} /R _f	637 [M - H - Glc] ⁻ , 475 [M - H - 2Glc] ⁻	三七 ^[29]
22	5.215	613.119	7	0.7	$C_{29}H_{26}O_{15}$	2-O-桂皮酰基-1,6-二 没食子酰基-葡萄糖	465 [M - H - cinnamic acid] ⁻ , 313 [M - H - cinnamic acid-galloyl] ⁻ , 169 [M - H - (2-O- cinnamoyl-galloyl-glucose)] ⁻	大黄 ^[7-8]
23	5.575	431.098	3	1.2	$C_{21}H_{20}O_{10}$	芹菜素-7-O-葡萄糖苷	269 [M - H - Glc] ⁻ , 225 [M - H - Glc - CO ₂] ⁻	天花粉 ^[28]
24	5.673	476.308	0	-0.9	$C_{31}H_{23}O_5$	去甲基血竭红素	371 [M + H-styrene] ⁺ , 341 [M + H - CH ₃ - CH ₂ O] ⁺	血竭 ^[31]
25	5.881	539.212	8	-0.2	$C_{26}H_{36}O_{12}$	睡菜苦苷	161 [M - H - Glc] ⁻	续断 ^[17]
26	6.576	927.509	6	2.7	$C_{47}H_{76}O_{18}$	川续断皂苷 VI	603 [M - H - 2Glc] ⁻	续断 ^[17]
27	7.739	283.024	5	0.7	$C_{15}H_8O_6$	大黄酸	239 [M - H - CO ₂] ⁻ , 211 [M - H - CO ₂ - CO] ⁻	大黄 ^[7-8]
28	7.951	945.549	9	0.8	$C_{48}H_{82}O_{18}$	人参皂苷 Re/Rd	945 [M - H] ⁻ , 991 [M + HCOO] ⁻	三七 ^[29]
29	8.330	945.549	0	0.0	$C_{48}H_{82}O_{18}$	人参皂苷 Re/Rd	945 [M - H] ⁻ , 991 [M + HCOO] ⁻	三七 ^[29]
30	9.299	267.103	2	0.9	$C_{17}H_{15}O_3$	血竭素	252 [M - H - CH ₃] ⁺ , 224 [M - H - CH ₃ - CO] ⁺	血竭 ^[31]
31	9.623	269.045	4	1.5	$C_{15}H_{10}O_5$	大黄素	241 [M - H - CO] ⁻ , 225 [M - H - CO ₂] ⁻	大黄 ^[7-8]
32	11.067	253.050	1	0.0	$C_{15}H_{10}O_4$	大黄酚	225 [M - H - CO] ⁻ , 210 [M - H - CH ₃] ⁻	大黄 ^[7-8]
33	13.261	455.352	8	0.7	$C_{30}H_{48}O_3$	熊果酸	152 [M - H - 甾体母核断裂 302 碎片] ⁻	续断 ^[11] 、泽兰 ^[13]
34	14.641	289.254	3	0.0	$C_{15}H_{12}O_6$	圣草酚	153 [M + H - (4-vinylbenzene-1,2-diol)] ⁺	骨碎补 ^[22]

2.5 肿痛涂膜剂化学成分的 MS/MS 分析

2.5.1 对照品的质谱行为分析 大黄素如图 2 所示,在负离子模式下给出明显的准分子离子峰 m/z 269 $[M - H]^-$,脱去中性分子 CO 后的碎片离子峰 m/z 241 $[M - H - CO]^-$,随后再脱去 1 个 CO_2 形成 m/z 197 $[M - H - CO_2 - CO]^-$ 的碎片离子峰;以及大黄素脱去 1 个 CO_2 形成的 m/z 225 $[M - H - CO_2]^-$ 碎片离子峰^[1-3]。

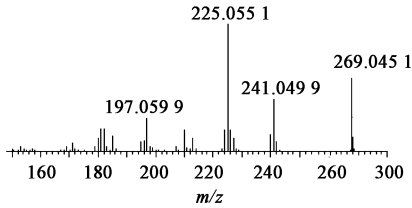


图 2 大黄素 ($t_R = 9.623$ min) 的 MS²

Fig. 2 MS² spectrum (ESI⁻) of $t_R = 9.623$ min

大黄酚如图 3 所示,在负离子模式下给出明显的准分子离子峰 m/z 253 $[M - H]^-$,脱去 CH_2 后形成 m/z 239 $[M - H - CH_2]^-$;以及脱去 CO 基后形成特征碎片 m/z 225 $[M - H - CO]^-$,随后脱去 CH_3 后的特征碎片 m/z 210 $[M - H - CH_3]^-$ ^[3]。

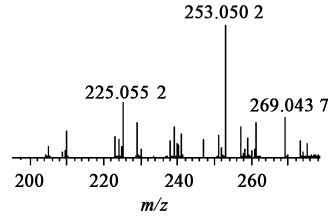
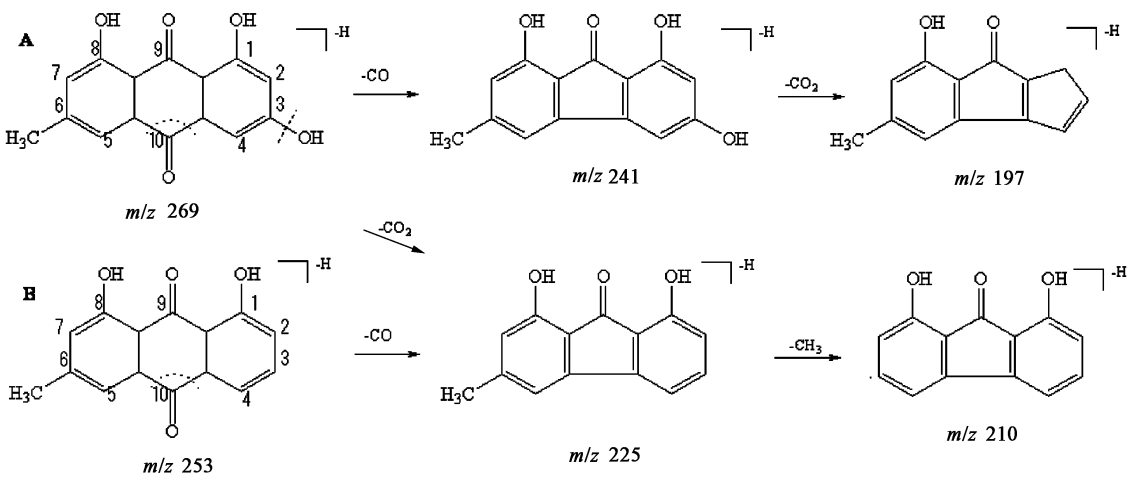


图 3 大黄酚 $t_R = 11.067$ min 的 MS²

Fig. 3 MS² spectrum (ESI⁻) of $t_R = 11.067$ min

大黄素及大黄酚的二级质谱中均可见 m/z 225 的特征离子峰,其裂解途径如图 4 所示。



A. 大黄素; B. 大黄酚

图 4 大黄素和大黄酚的裂解途径

Fig. 4 Proposed fragmentation pathway of emodin and chrysophanol

血竭素如图 5 所示,在正离子模式下血竭素脱去 1 分子 CH_3 后形成碎片离子峰 m/z 252 $[M + H - CH_3]^+$,再脱去 CO 后形成 m/z 224 $[M + H - CH_3 - CO]^+$ 的碎片离子峰^[4]。

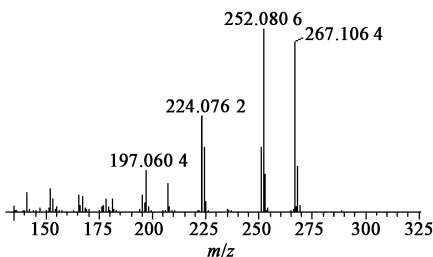


图 5 血竭素 $t_R = 7.901$ min 的 MS²

Fig. 5 MS² spectrum (ESI⁺) of $t_R = 7.901$ min

三七皂苷 R_1 如图 6 所示,在负离子模式下给出明显的准分子离子峰 m/z 931 $[M - H]^-$,以及脱去 1 个木糖和 1 个葡萄糖形成的碎片离子峰 m/z 637 $[M - H - Xyl - Glc]^-$ 和再脱去 1 个葡萄糖形成的碎片离子峰 m/z 475 $[M - H - Xyl - 2Glc]^-$,推测为三七皂苷 R_1 ^[5]。

2.5.2 有机酸、鞣质类成分 本文共分析鉴定出该类成分 10 个,分别为柠檬酸(1),没食子酸(2),咖啡酰基-4-O- β -葡萄糖(3),表儿茶素没食子酸酯(10),异绿原酸 A/B/C(12, 13, 16),迷迭香酸(17),2-O-桂皮酰基-没食子酰基- β -D-葡萄糖(18)及 2-O-桂皮酰基-1,6-二没食子酰基-葡萄糖(22)。

化合物 1 在负离子模式下给出明显的准分子

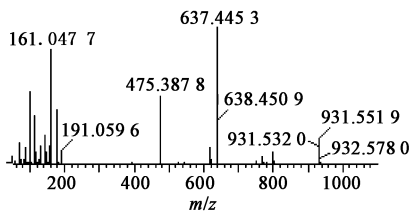


图 6 三七皂苷 R₁ (t_R = 4.74 min) 的 MS²

Fig. 6 MS² spectrum (ESI⁻) of t_R = 4.74 min

离子峰 m/z 197 [M - H]⁻, 及 129 [M - H - H₂O - CO₂]⁻, 111 [M - H - H₂O - CO₂ - H₂O]⁻, 87 [M - H - H₂O - CO₂ - ethenone]⁻ 的特征碎片离子峰, 推断该化合物为柠檬酸^[6]。

大黄中的主要鞣质类成分为没食子酸和儿茶素、表儿茶素, 在化合物 **2**, **10**, **18**, **22** 中均可以看到 m/z 169 的没食子酰基特征片段。化合物 **2** 在负离子模式下给出 m/z 169 [M - H]⁻ 的准分子离子峰, 脱去 1 分子 CO₂ 后获得 m/z 125 [M - H - CO₂]⁻ 的特征碎片峰, 推断为没食子酸。化合物 **10** 脱去 1 分子表儿茶素片段得到 m/z 169 [M - H - epicatechin]⁻ 的碎片离子峰, 或者脱去 1 分子没食子酰基获得 m/z 289 [M - H - galloyl]⁻ 的表儿茶素片段碎片离子峰, 结合文献, 推测其为表儿茶素没食子酸酯。化合物 **18** 与 **22** 中均可见 m/z 147 的肉桂酰基碎片。化合物 **18** 脱去 1 分子肉桂酸获得 m/z 313 [M - H - cinnamic acid]⁻ 的碎片离子峰, 再脱去 1 分子葡萄糖获得 m/z 169 [M - H - cinnamoyl - Glc]⁻ 的没食子酰基碎片离子峰, 或者化合物 **18** 直接脱去 1 分子没食子酰基-葡萄糖获得 m/z 147 [M - H - galloyl - Glc]⁻ 的桂皮酰基特征离子峰, 结合文献推断为 2-*O*-桂皮酰基-没食子酰-β-*D*-葡萄糖。在化合物 **22** 中可见 m/z 465 [M - H - cinnamic acid]⁻ 与 m/z 313 [M - H - cinnamic acid-galloyl]⁻ 的碎片离子峰, 及再脱去 1 分子葡萄糖而得到的 m/z 169 的没食子酰基特征碎片峰, 因此推测化合物 **22** 为 2-*O*-桂皮酰基-1, 6-二没食子酰基-葡萄糖^[7-8]。

化合物 **3** 在负离子模式下给出明显的准分子离子峰 m/z 341 [M - H]⁻, 其脱去 1 分子葡萄糖得到 m/z 179 [M - H - Glc]⁻ 的碎片离子峰, 再脱去 1 分子 CO₂ 得到 m/z 135 [M - H - Glc - CO₂]⁻ 的碎片离子峰, 结合文献推测为咖啡酰基-4-*O*-β-葡萄糖苷^[9]。化合物 **12**, **13**, **16** 为 3 个成分为同分异构体, 在负离子模式下具有相同的准分子离子峰 m/z 515 [M - H]⁻, 连续丢失 1 分子咖啡酰基, 2 分子咖啡

酰基形成相应的碎片离子 m/z 353 [M - H - caffeoyl]⁻ 和 m/z 191 [M - H - 2caffeoyl]⁻, 再脱去 1 分子 H₂O 形成 m/z 173 [M - H - 2caffeoyl - H₂O]⁻ 的碎片离子峰。因此给合文献推测该化合物为异绿原酸 A, B, C^[10-11]。化合物 **17** 在负离子模式下给出明显的准分子离子峰 m/z 359 [M - H]⁻, 脱去 1 分子咖啡酰基后, 产生碎片离子 m/z 197 [M - H - caffeoyl]⁻ 或脱去 1 分子丹参素, 产生碎片离子 m/z 161 [M - H - danshensu]⁻, 因此推测该化合物为迷迭香酸^[12-13]。由此可见, 含咖啡酰基或奎宁酸类的有机酸一般易于从咖啡酰基片段和奎宁酸片段处断裂, 获得 m/z 191 的奎宁酸片段离子峰和 m/z 179 的咖啡酰基片段离子峰, 咖啡酰基片段易进一步脱去中性分子 CO₂, 奎宁酸片段易进一步脱去 H₂O。

2.5.3 萜类成分 本文分析鉴定出环烯醚萜类成分 6 个, 包括马钱苷酸 (**4**), 京尼平-1-β-*D*-龙胆双糖苷 (**5**), 京尼平苷 (**6**), 獐牙菜苷 (**7**), 睡菜苦苷 (**25**), 川续断皂苷 VI (**26**)。

化合物 **4** 在负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 375 [M - H]⁻, 其脱去 1 分子葡萄糖得到 m/z 213 [M - H - Glc]⁻ 的碎片离子峰, 再相继脱去 1 分子 CO₂ 和 H₂O, 得到 m/z 169 [M - H - Glc - CO₂]⁻ 和 m/z 151 [M - H - Glc - CO₂ - H₂O]⁻ 的碎片离子峰, 结合文献推断该化合物为马钱苷酸^[14]。化合物 **5** 在负离子模式下给出明显的准分子离子峰 m/z 549 [M - H]⁻, 加合 1 分子甲酸 [M + HCOO]⁻ 形成 m/z 595 的碎片离子峰, 脱去 1 分子葡萄糖得到 m/z 387 [M - H - Glc]⁻ 的碎片离子峰, 及再脱去 1 分子葡萄糖得到 m/z 225 [M - H - 2Glc]⁻ 的碎片离子峰, 推测为京尼平-1-β-*D*-龙胆双糖苷。化合物 **6** 京尼平苷在负离子模式下给出明显的准分子离子峰 m/z 387 [M - H]⁻, 加合 1 分子甲酸 [M + HCOO]⁻ 形成 m/z 433 的碎片离子峰, 脱去 1 分子葡萄糖形成 m/z 225 [M - H - Glc]⁻ 的碎片离子峰, 结合文献推测其为京尼平苷^[15]。化合物 **7** 在负离子模式下与甲酸加合给出 m/z 403 [M + HCOO]⁻ 的峰, m/z 357 [M - H]⁻ 为该化合物的准分子离子峰, 脱去 1 分子葡萄糖给出 m/z 195 [M - H - Glc]⁻ 的碎片离子峰, 再脱去 C₄H₇O 得到 m/z 125 [M - H - Glc - C₄H₇O]⁻ 的碎片离子峰。结合文献推断该化合物为獐牙菜苷^[16]。化合物 **25** 在负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 539 [M - H]⁻, 以及 m/z 161 [glucose]⁻ 的碎片离子峰, 结合文献推

测该化合物为睡菜苦苷。化合物 **26** 在负离子模式下与甲酸加合给出 m/z 973 $[M + HCOO]^-$ 的峰, m/z 928 $[M - H]^-$ 为该化合物的准分子离子峰, 脱去 2 分子葡萄糖给出 m/z 603 $[M - H - 2Glc]^-$ 的碎片离子峰。结合文献推断该化合物为川续断皂苷 VI^[17]。通过上述质谱裂解行为可见, 在负离子模式下, C-4 为甲氧基的环烯醚萜苷易与甲酸加合, 生成 $[M + HCOO]^-$ 的碎片离子峰, 同时常先丢失葡萄糖取代基。分析其结构发现, 这是由于环烯醚萜类成分的结构中存在半缩醛羟基, 其性质活泼, 故该类化合物多以苷类的形式存在, 也常先丢失其葡萄糖基。

其他萜类成分 3 个, 包括单萜类成分芍药内酯苷 (**8**), 芍药苷 (**9**) 和五环三萜类成分熊果酸 (**33**)。化合物 **8** m/z 479 $[M - H]^-$ 为准分子离子峰, 加合 1 分子甲酸形成 m/z 525 $[M + HCOO]^-$ 的碎片离子峰, 随后脱去 1 分子苯甲酸得到 m/z 357 $[M - H - HCOOH - benzoic acid]^-$ 的碎片离子峰, 脱去苯甲酸酯另一部分得到 m/z 121 的离子碎片, 结合文献推测该化合物为芍药内酯苷。化合物 **9**, m/z 479 $[M - H]^-$ 为准分子离子峰, 加合 1 分子甲酸形成 m/z 525 $[M + HCOO]^-$ 的碎片离子峰, 葡萄糖基中脱去 1 分子甲醛, 形成 m/z 449 $[M - H - CH_2O]^-$ 的碎片离子峰, 进一步脱去 1 分子苯甲酸形成 m/z 327 的碎片离子, 结合文献推测该化合物为芍药苷。 m/z 162 的碎片离子峰为 m/z 327 丢失 1 分子葡萄糖形成的芍药苷母核结构的碎片离子峰, 这两种物质均为单萜类成分^[18-20]。

化合物 **33** 在负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 455 $[M - H]^-$, m/z 153 $[M - H - \text{甾体母核断裂 } 302 \text{ 碎片}]^-$ 的碎片离子峰, 结合文献推断该化合物为熊果酸^[11]。

2.5.4 黄酮及其衍生物类成分 本文分析鉴定出黄酮及其衍生物类成分 8 个, 包括新北美圣草苷 (**11**), 槲皮苷 (**14**), 柚皮苷 (**15**), 2',6'-二羟基-4,4'-二甲氧基查耳酮 (**19**), 芹菜素-7-O-葡萄糖苷 (**23**), 去甲基血竭红素 (**24**), 血竭素 (**30**) 和北美圣草素 (**34**)。

化合物 **11** m/z 595 $[M - H]^-$ 为准分子离子峰, 脱去 1 分子乙烯基苯及 2 分子二元醇给出 m/z 459 $[M - H - (4\text{-vinylbenzene-1,2-diol})]^-$ 的碎片离子峰, 再脱去 1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖给出 m/z 151 $[M - H - (4\text{-vinylbenzene-1,2-diol}) - Rha-Glc]^-$ 的碎片离子峰, 化合物 **11** 直接脱去 1 分子鼠李糖和 1 分子葡萄糖给出 m/z 287 $[M - H - Rha - Glc]^-$ 的

碎片离子峰, 结合文献推测该化合物为新北美圣草苷^[21-22]。化合物 **34** 在正离子模式下给出 m/z 289 $[M + H]^+$ 的准分子离子峰, 其脱去 1 分子乙烯基苯及 2 分子二元醇给出 m/z 153 $[M + H - (4\text{-vinylbenzene-1,2-diol})]^+$ 的碎片离子峰, 结合文献推测其为圣草酚^[21-22]。化合物 **14** 在负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 447 $[M - H]^-$, 脱去 1 分子鼠李糖后形成 m/z 301 $[M - H - Rha]^-$ 的碎片离子峰, 碎片离子 m/z 301 为槲皮素的特征离子峰, 因此推测该化合物为槲皮苷^[23-24]。化合物 **15** 在负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 579 $[M - H]^-$, 脱去 1 分子鼠李糖, 1 分子葡萄糖后形成 m/z 271 $[M - H - Rha - Glc]^-$ 的碎片离子峰, 碎片离子 m/z 271 为柚皮素的特征离子峰, 因此推测该化合物为柚皮苷^[22,25]。化合物 **19** 在负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 299, 以及 m/z 193 $[M - H - (2\text{-methoxycyclohexa-1,3-dien-5-yne})]^-$ 和 m/z 167 $[M - H - (1\text{-ethynyl-4-methoxybenzene})]^-$ 的特征碎片离子峰, 结合文献推测该化合物为 2',6'-二羟基-4,4'-二甲氧基查耳酮 (**19**)^[30]。化合物 **23** 在负离子模式下给出准分子离子峰 m/z 431 $[M - H]^-$, 脱去 1 分子葡萄糖得到 m/z 269 $[M - H - Glc]^-$ 的碎片离子峰, 随后脱去 1 分子 CO_2 得到 m/z 225 $[M - H - Glc - CO_2]^-$ 的碎片离子峰, 结合文献推测该化合物为芹菜素-7-O-葡萄糖苷^[26-27]。化合物 **24** 在正离子模式下给出 m/z 283 $[M + H]^+$ 的加合质子峰, 脱去 1 分子苯乙烯后形成 m/z 371 $[M + H\text{-styrene}]^+$ 的碎片离子峰, 随后脱去 1 分子 CH_3 和 1 分子 CH_2O 后, 形成 m/z 341 $[M + H - CH_3 - CH_2O]^+$ 的碎片离子峰, 结合文献推测其为去甲基血竭红素^[4]。

2.5.5 皂苷类成分 本文分析鉴定出皂苷类成分 4 个, 分别为三七皂苷 R_1 (**20**), 人参皂苷 R_{g_1}/R_f (**21**), 人参皂苷 R_e/R_d (**28, 29**)。由于流动相中存在 $HCOO^-$, 人参皂苷类成分在负离子模式下均检测到 $[M + HCOO]^-$ 峰。化合物 **21** 所示, 在负离子模式下均给出准分子离子峰 m/z 799 $[M - H]^-$ 及加合离子峰 m/z 845 $[M + HCOO]^-$, 其脱去 1 分子葡萄糖后得到碎片离子峰 m/z 637 $[M - H - Glc]^-$, 及再脱去 1 分子葡萄糖后的碎片离子峰 m/z 475 $[M - H - 2Glc]^-$, 结合文献推测该化合物为人参三醇型皂苷人参皂苷 R_{g_1}/R_f 。化合物 **27, 28** 所示, 在负离子模式下均给出准分子离子峰 m/z 945 $[M - H]^-$ 及加合离子峰 m/z 991 $[M + HCOO]^-$ 结合文献推测

该化合物为人参皂苷 Re/Rd^[10]。

2.5.6 蒽醌类成分 本文分析鉴定出蒽醌类成分 3 个,分别为大黄酸(27),大黄素(31),和大黄酚(32)。化合物 27 m/z 283 $[M - H]^-$ 为准分子离子峰, m/z 239 $[M - H - CO_2]^-$ 为准分子离子脱去 1 分子 CO_2 的产物,再脱去 1 分子 CO 形成 m/z 211 $[M - H - CO_2 - CO]^-$ 的准分子离子峰,结合文献推断该化合物为大黄酸^[1]。

化合物 20,30,31,32 与对照品质谱图中信息对应,裂解规律也在对照品质谱行为中有所分析,因此鉴定为三七皂苷 R_1 ,血竭素,大黄素及大黄酚。

3 讨论

在肿痛涂膜剂中大黄为君药,主要指标性成分为蒽醌类化合物,由于该类化合物在 ESI 负离子模式下生成较强的 $[M - H]^-$ 准分子离子,有良好的信号,但在正离子模式下的加合质子峰 $[M + H]^+$ 较弱,因此选择 ESI 负离子模式对其进行研究^[3]。中药血竭为本方中的贵重药材,为棕榈科植物麒麟竭果实渗出的树脂类药材,主要含血竭素,而市场上经常用由百合科植物剑叶龙血树提取的树脂类药材来代替使用,其中不含血竭素^[29-30]。通过对药品 ESI 正负离子模式的研究发现,血竭素在负离子模式下没有出峰,而在正离子模式下有很好的响应,因此选择 ESI 正离子模式对其进行研究,应用该方法快速有效的鉴别了血竭的特征化合物。

人参皂苷是人参属植物特有的三萜类化合物,在负离子模式下逐一脱糖,可以看到 m/z 为 459 的原人参二醇型皂苷的皂苷元特征碎片离子和 m/z 为 475 的三醇型皂苷的皂苷元特征碎片离子峰。由于人参皂苷中存在多种同分异构体,在质谱中产生相同的离子碎片,如人参皂苷 R_{g1} 和 R_f , R_e 和 R_d ,很难仅通过相对分子质量和碎片离子将其区分。下一步可以结合对照品的质谱行为进一步加以区分定性。

本研究运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术,结合化合物的精确相对分子质量、多级质谱信息以及相关文献研究,共确定了包括有机酸、鞣质类成分,萜类成分,黄酮及其衍生物类成分,蒽醌类成分、和皂苷类成分在内的 32 个化合物,并快速的追踪到中药复方中指标成分,如本方中的大黄素、血竭素和三七皂苷 R_1 ,为进一步建立质量控制标准和研究药效物质基础提供可靠依据。

[参考文献]

[1] 马小红,沈少林,韩凤梅,等. 大黄蒽醌类化合物电喷雾质谱研究[J]. 湖北大学学报,2006,28(4):

403-406.

[2] 董静,王弘,陈世忠. 蒽醌类化合物的电喷雾串联质谱研究[C]. 南昌:第九届全国中药和天然药物学术研讨会,2008.

[3] 董静,王弘,万乐人,等. 高效液相色谱/电喷雾-离子阱-飞行时间质谱分析鉴定中药虎杖中的主要化学成分[J]. 色谱,2009,27(4):425-430.

[4] 史剑美. 中药麒麟竭的活性成分分析[D]. 杭州:浙江大学,2010;33.

[5] 康利平,赵阳,余河水. 采用 UPLC-Q-TOF/MS^E 鉴别参松养心胶囊有效部位中的化学成分[J]. 药学报,2011,46(10):1231-1236.

[6] 牛研,王书芳. LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSⁿ 分析当归芍药散中化学成分[J]. 中草药,2014,45(8):1056-1062.

[7] 蒋海强,容蓉,吕青涛. 大黄化学成分的液相色谱-质谱联用鉴别[J]. 时珍国医国药,2011,22(7):1705-1706.

[8] 孙慧,朱超,章弘扬,等. 大黄及其炮制品的液质联用分析及物质基础比较[J]. 中成药,2009,31(3):420-425.

[9] Jaiswal R, Karakose H, Ruhmann S, et al. Identification of phenolic compounds in plumfruits (*Prunus salicina* L. and *Prunus domestica* L.) by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and characterization of varieties by quantitative phenolic fingerprints[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(49):12020-12031.

[10] 朱慧明. 基于液质联用技术的茛菪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;28.

[11] 杜伟锋,贾永强,姜东京,等. 基于 HPLC-ESI-MS 法续断发汗前后的成分分析[J]. 中草药,2014,45(22):3251-3255.

[12] 王红蕾,齐崑,吴小东,等. 丹参水溶性多酚酸的多级串联电喷雾离子阱质谱断裂机理解析[J]. 质谱学报,2008,29(3):129-136.

[13] 任强,王红玲,周志刚,等. 泽兰的化学成分、质量分析及药理作用研究进展[J]. 中国药房,2015,26(18):2588-2592.

[14] Papalexandrou A, Magiatis P, Perdetaoglou D, et al. Iridoids from *Scabiosa variifolia* (Dipsacaceae) growing in Greece[J]. Biochem Syst Ecol,2003,31(1):91-93.

[15] 朱强,王艳娟,王振中,等. HPLC-PDA-MS/MS 法研究热毒宁注射液生成过程中梔子化学成分的变化[J]. 沈阳药科大学学报,2013,30(6):429-437.

[16] 孙欣光,黄文华,郭宝林. 续断的化学成分研究[J]. 现代药物与临床,2014,29(5):459-464.

- [17] Kouno I, Tsuboi A, Nanri M, et al. Acylated triterpene glycoside from roots of *dipsacus asper* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(1):338-339.
- [18] 母会丹, 朱靖博, 丁燕, 等. 白芍化学成分的 UPLC/Q-TOF-MS [J]. *分析实验室*, 2013, 32(7):113-117.
- [19] 韩聪敏, 朱靖博, 丁燕, 等. 超高压液相色谱-飞行时间质谱法分析牡丹皮化学成分 [J]. *大连工业大学学报*, 2014, 33(3):166-170.
- [20] 陆小华, 马骁, 王建, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2015, 46(4):595-602.
- [21] Jimenez-Sanchez C, Lozano-Sanchez J, Marti N, et al. Characterization of polyphenols, sugar, and other polar compounds in persimmon juices produced under different technologies and their assessment in terms of compositional variations [J]. *Food Chem*, 2015 (182): 282-291.
- [22] 陶益, 蒋妍慧, 李伟东, 等. 骨碎补不同炮制品化学成分的差异研究 [J]. *现代医药卫生*, 2015, 31(23): 3549-3551.
- [23] 夏玮, 古丽加玛丽·阿比斯, 潘晨, 等. 腊梅花中黄酮类化合物的 UHPLC/QTOF-MS 分析 [J]. *中成药*, 2014, 36(11):2345-2349.
- [24] 孙立立, 杨书斌, 江波, 等. 炮制对侧柏叶化学成分的影响 [J]. *中成药*, 2006, 28(6):821-823.
- [25] 孙倩. 基于液质联用技术的大小蓟多组分分析与黄酮类成分的药代动力学研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013:89.
- [26] 张维冰, 王智聪, 张凌仪. 超高效液相色谱-二极管阵列检测-串联质谱法测定菊花中的 10 种咖啡酰基奎宁酸和 22 种黄酮类化合物 [J]. *分析化学*, 2013, 41(12):1851-1861.
- [27] 李爱峰, 孙爱玲, 柳仁民, 等. 栝楼果皮化学化学成分研究 [J]. *中药材*, 2014, 37(3):428-431.
- [28] 韩凤梅, 张玲, 蔡敏, 等. 三七药材皂苷类成分的电喷雾离子阱质谱特征图谱研究 [J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2006, 28(2):176-180.
- [29] 刘薇, 李明华, 陆以云, 等. 基于特征离子的血竭和龙血竭的 UPLC-QTOF/MS 定性鉴别方法的建立 [J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(10):1777-1781.
- [30] 龚文君. 中药血竭的质量控制研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2008:17.

[责任编辑 顾雪竹]

《中国实验方剂学杂志》简介

《中国实验方剂学杂志》主编为吴以岭院士,由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中华中医药学会共同主办。以报道、介绍中医药研究为主旨的专业性学术期刊,创刊于1995年10月,目前为半月刊。

随着中医药政策扶持力度的加大和中医药科技创新的振兴,在中医药事业蓬勃发展的进程中,《中国实验方剂学杂志》也进入快速发展阶段! 以下是本刊在各权威数据库中的最新评价数据及收录情况:

①中国知网《中国学术期刊影响年报》(2016年版):影响力指数(CI)学科排序3/122(中医药类122本期刊中排第3名);复合影响因子1.319,学科排序9/122;

②万方数据《中国科技期刊引证报告(扩刊版)》: H 指标为16,总被引频次15 664,复合影响因子1.620,在中医药类122本期刊中排序分别为第2,2,11名;

③入选“中国科学引文数据库来源期刊”(CSCD 2015—2016);

④入选最新版《北大中文核心期刊要目总览》(2014年版);

⑤入选“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊2016年版);

⑥入选“RCCSE 中国核心学术期刊”(2015—2016)。