

· 药剂与炮制 ·

栀子金花丸化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 快速鉴定与分析

李玲云¹, 王云², 刘梦娇³, 张雪², 李晓庆¹, 戴业佳⁴, 麻印莲², 张村^{1,2,4*}

(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450008; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 哈尔滨 150076;
4. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230000)

[摘要] 目的: 采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间高分辨率质谱技术(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对栀子金花丸整方的化学成分进行定性分析。方法: 采用 Waters ACQUITY BEH C₁₈ 超高效液相色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱, 流速 0.4 mL · min⁻¹, 以正、负离子模式扫描的一级和二级质谱信息, 结合文献报道, 对栀子金花丸的主要色谱峰进行归属鉴别。结果: 根据质谱裂解规律、保留时间及参考文献等信息, 初步推测鉴定出 65 个化学成分, 其中, 20 个黄酮类成分, 9 个环烯醚萜类成分, 8 个有机酸类成分, 6 个生物碱类成分, 6 个萘醌类成分, 4 个甾体皂苷类成分, 3 个鞣质类成分, 3 个二萜色素类成分, 3 个双苯吡酮类成分, 1 个单萜类成分, 1 个二萜酮类成分和 1 个柠檬苷素类成分。结论: 建立的方法分离度好、灵敏度高, 可同时对栀子金花丸不同类型化合物进行快速分析, 有助于开展进一步的活性成分和质量控制研究。

[关键词] 栀子金花丸; 环烯醚萜类; 黄酮类; 萘醌类; 生物碱类; 有机酸类; 甾体皂苷类; 鞣质

[中图分类号] R283.6; R942; R284.1; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0001-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2017140001

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1004.006.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 10:04

Analysis of Chemical Components in Zhizi Jinhua Wan by UPLC-Q-TOF-MS/MS

LI Ling-yun¹, WANG Yun², LIU Meng-jiao³, ZHANG Xue², LI Xiao-qing¹,
DAI Ye-jia⁴, MA Yin-lian², ZHANG Cun^{1,2,4*}

(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China; 3. Center of Research on Life Sciences and Environmental Sciences,
Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;
4. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230000, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the chemical constituents of Zhizi Jinhua Wan (ZZJHW) by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with electrospray time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) for quality control of commercial preparations. **Method:** The assay was performed on a ACQUITY BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) using a gradient elution program with mixtures of acetonitrile and

[收稿日期] 20170221(017)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304307001); 国家自然科学基金项目(81173553, 81473356)

[第一作者] 李玲云, 在读硕士, 从事饮片质量评价及炮制原理研究, Tel: 010-64087690, E-mail: 1095088179@qq.com

[通讯作者] * 张村, 研究员, 博士生导师, 从事中药化学、中药炮制研究, Tel: 010-64087690, E-mail: zhc95@163.com

low concentration of formic acid aqueous solution as mobile phases at a flow rate of 0.4 mL · min⁻¹. UPLC-Q-TOF-MS/MS was developed for rapid and high-throughput screening of the preliminary chemical profile of ZZJHW in both positive and negative ion modes, the main peaks were confirmed basically according to MS² fragment ions combined with the relevant literature. **Result:** Based on the retention time, fragmentation patterns and literature reports, a total of 65 compounds were identified or tentatively characterized in ZZJHW, including 9 iridoids, 8 organic acids, 6 anthraquinones, 20 flavonoids, 4 steroidal saponins, et al. **Conclusion:** This work provides a good example for simultaneous analysis of different types of chemical constituents which may be helpful for the quality control and further phytochemical studies of ZZJHW.

[**Key words**] Zhizi Jinhua Wan; iridoids; flavonoids; anthraquinones; alkaloids; organic acids; steroidal saponins; tannins

栀子金花丸出自《宣明论方》,被历版《中国药典》收载,由栀子、黄芩、黄连、黄柏、金银花、大黄、知母和天花粉 8 味中药组成,具有清热泻火、凉血解毒的功效,临床上主要用于治疗肺胃热盛、口舌生疮、牙龈肿痛、目赤眩晕、咽喉肿痛、吐血衄血、大便秘结等^[1]。目前关于栀子金花丸的质量控制研究主要集中在薄层鉴别和 HPLC 多指标成分定量分析方面,2015 年版《中国药典》在含量测定项下仅选择了栀子苷为指标成分,对方中其他药味的成分未做要求。而中药复方的疗效是多成分、多靶点整体协同作用的结果,衡量质量控制的指标应以多成分为主。

目前文献中也探讨了多指标的质量控制方法^[2-4]。例如陈晓虎等^[5]利用 UPLC 测定了栀子金花丸中 11 种成分的含量,这 11 种成分分别来自栀子、黄芩、大黄、黄连;陈帅等^[6]对栀子金花丸进行了 HPLC 指纹图谱研究,标记了 30 个共有峰并建立了其抗氧化活性的谱效关系,但并未对这些成分进行指认。栀子金花丸作为一个复杂的复方体系,仅以栀子、大黄、黄芩和黄连中的主要成分进行定量不足以全面评价该制剂的内在质量,本实验拟采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对栀子金花丸中化学成分进行鉴定分析,为全面评价和控制该制剂的质量提供依据,同时为其活性成分的体外快速分析提供有益参考。

1 材料

ACQUITY UPLC 型超高效液相色谱仪和 Xevo G2-S Q-TOF 型质谱检测器(美国 Waters 公司),FA2204B 型 1/1 万电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。大黄素、大黄酚、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、汉黄芩素、绿原酸、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、黄芩素对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为 110758-200110, 110796-201118, 110732-

201108, 110713-201212, 111514-200403, 110753-201314, 0757-200206, 110758-200611, 110795-200806, 111595-200905, 纯度均 ≥ 98%),黄芩苷、大黄素甲醚-8-*O*-葡萄糖苷对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 KA0825FA14, YY90235, 纯度均 ≥ 98%),汉黄芩苷、芦丁、槲皮素、西红花苷 I 对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为 15010914, 15042714, 15011404, 15111212, 纯度均 ≥ 98%),栀子新苷、山栀子苷、栀子苷酸、去乙酰车叶草苷酸甲酯、羟异栀子苷、鸡屎藤次苷甲酯、京尼平-1-*O*-龙胆二糖苷、京尼平苷、千层纸素 A 及 6'-*O*-对香豆酰基京尼平龙胆双糖苷对照品(自制,经 HPLC 面积归一化法测定纯度均 > 98%),栀子金花丸(北京同仁堂制药有限公司,批号 4082395,规格 6 g/袋),水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用 ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 1.7 μm),流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 5 min, 6% A; 5 ~ 7 min, 6% ~ 17% A; 7 ~ 9 min, 17% ~ 20% A; 9 ~ 13 min, 20% ~ 30% A; 13 ~ 17 min, 30% ~ 40% A; 17 ~ 18 min, 40% ~ 50% A; 18 ~ 20 min, 50% ~ 100% A; 20 ~ 26 min, 100% A),柱温室温,流速 0.4 mL · min⁻¹,进样量 1 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正、负离子检测,氮气流速 600 L · h⁻¹,去溶剂化温度 350 °C,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 30 kV,碰撞能量 15 ~ 45 eV,离子源温度 120 °C,扫描范围 *m/z* 50 ~ 1 500。

2.3 对照品溶液的制备 精确称量各对照品置于 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇充分溶解后定容,制成适宜质量浓度的混合对照品溶液,经 0.45 μm 微孔

滤膜过滤,即得。

2.4 供试品溶液的制备 取栀子金花丸样品适量,粉碎(过 40 目筛),精密称定 0.5 g 置于锥形瓶中,加入 50% 甲醇 25 mL,称定质量,超声 30 min,称定,用甲醇补足减失的质量,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.5 成分分析

2.5.1 LC-MS/MS 成分鉴定 总离子流图见图 1。根据总离子流色谱峰上所得到的准分子离子峰确定化合物的相对分子质量,通过 MassLynx™ V4.1 质谱分析软件在 10 ppm 的质量偏差范围内计算其精确分子式,对各化合物进行初步鉴定。通过二级质谱的裂解碎片离子信息结合文献进一步比对推测,最终推测出化合物 65 个,包括 20 个黄酮类成分,9 个环烯醚萜类成分,8 个有机酸类成分,6 个生物碱类成分,6 个萜醌类成分,4 个甾体皂苷类成分,3 个鞣质类成分,3 个二萜色素类成分,3 个双苯吡酮类成分,1 个单萜类成分,1 个二萜酮类成分和 1 个柠檬苷素类成分。其中有 25 个成分可通过与对照品比较保留时间、一级质谱和多级质谱信息得到确证。

65 个化合物中,13 个成分来源于栀子,10 个成分来源于大黄,15 个成分来源于黄芩,7 个成分来源于黄连或黄柏,7 个成分来源于金银花,7 个成分来源于知母,另有 6 个成分来源于栀子或金银花。其他化合物均采用类似的鉴定方法,同时参考文献中质谱碎片信息进行鉴定^[7-35],结果见表 1。

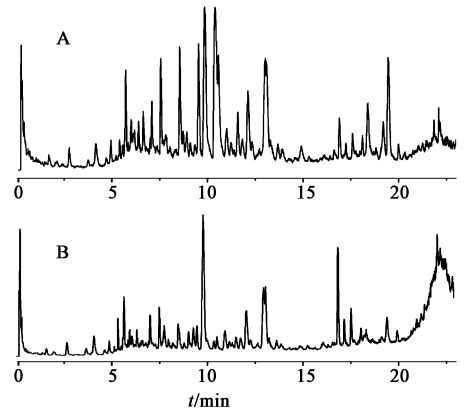


图 1 栀子金花丸正离子模式总离子流(A)和负离子模式总离子流(B)

Fig. 1 TIC of Zhizi Jinhua Wan in positive(A) and negative(B) ion modes

表 1 栀子金花丸中化学成分的鉴定

Table 1 Identification of compounds in Zhizi Jinhua Wan by UPLC-Q-TOF-MS/MS

| No. | <i>t_R</i> /min | 分子式 | 相对分子质量 /Da | [M + H] ⁺ | | [M - H] ⁻ | | 碎片离子 | | 推测化合物 | 类型 |
|-----------------|------------------------------|---|---------------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|--|--|--|----|
| | | | | 实测值 | 理论值 | 实测值 | 理论值 | ESI(+) | ESI(-) | | |
| 1 ¹⁾ | 1.69 | C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁ | 392.131 9 | 393.138 5 | 393.139 7 | 391.124 5 | 391.124 0 | 415.119 0[M + Na] ⁺ , 431.095 5[M + K] ⁺ , 375.124 8[M + H - H ₂ O] ⁺ , 397.108 2[M + Na - H ₂ O] ⁺ | 437.127 0[M + HCOO] ⁻ , 783.254 6[2M - H] ⁻ , 373.110 2[M - H - H ₂ O] ⁻ | 山栀子 苷 ^[7-8] | b |
| 2 ¹⁾ | 1.70 | C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀ | 374.121 3 | | | 373.110 2 | 373.113 5 | 397.108 2[M + Na] ⁺ , 413.082 8[M + K] ⁺ | 409.086 9[M + Cl] ⁻ , 419.114 0[M + HCOO] ⁻ , 747.236 1[2M - H] ⁻ , 211.056 3[M - H - glc] ⁻ | 栀子苷 酸 ^[7,9] | b |
| 3 | 2.03 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 354.095 1 | 355.100 3 | 355.102 9 | 353.084 3 | 353.087 3 | 377.081 2[M + Na] ⁺ , 163.031 6[M + H - QA] ⁺ | 707.177 0[2M - H] ⁻ , 191.051 2[QA - H] ⁻ , 179.031 5[CA - H] ⁻ , 135.043 2[CA - H - H ₂ O - C ₂ H ₂] ⁻ | 3- <i>O</i> -咖啡酰 奎尼酸 ^[10-11] , 5- <i>O</i> -咖啡酰奎 尼酸 ^[12-13] | d |
| 4 ¹⁾ | 2.10 | C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁ | 404.131 9 | | | 403.123 1 | 403.124 0 | 427.115 4[M + Na] ⁺ , 443.090 7[M + K] ⁺ , 409.017 2[M + Na - H ₂ O] ⁺ | 449.129 2[M + HCOO] ⁻ , 241.068 9[M - H - glc] ⁻ | 去乙酰车 叶草苷 甲酯 ^[8,14] | b |
| 5 ¹⁾ | 2.75 | C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁ | 404.131 9 | | | 403.123 1 | 403.124 0 | 427.119 6[M + Na] ⁺ , 443.095 0[M + K] ⁺ | 449.129 2[M + HCOO] ⁻ , 241.068 9[M - H - glc] ⁻ | 羟异 栀子苷 ^[8] | b |
| 6 | 2.75 | C ₁₆ H ₂₆ O ₈ | 346.162 8 | 347.167 2 | 347.170 6 | 345.155 5 | 345.154 9 | 167.101 1[M + H - C ₆ H ₁₂ O ₆] ⁺ | 391.156 9[M + HCOO] ⁻ | jasminoside B ^[9] | i |
| 7 | 3.76 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | 290.079 0 | | | 289.071 4 | 289.071 2 | | 579.155 0[2M - H] ⁻ , 245.079 3[M - H - CO ₂] ⁻ | 儿茶素 ^[15] | e |
| 8 ¹⁾ | 3.77 | C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁ | 404.131 9 | | | 403.123 1 | 403.124 0 | 427.119 6[M + Na] ⁺ , 443.095 0[M + K] ⁺ | 449.129 2[M + HCOO] ⁻ , 241.068 9[M - H - glc] ⁻ | 鸡矢藤次 苷酸甲酯 ^[7,9] | b |
| 9 | 3.93 | C ₉ H ₈ O ₄ | 180.042 3 | | | 179.034 3 | 179.034 4 | | 135.043 2[M - H - CO ₂] ⁻ | 咖啡酸 ^[16-17] | d |

续表 1

| No. | t_R /min | 分子式 | 相对分子质量 /Da | [M + H] ⁺ | | [M - H] ⁻ | | 碎片离子 | | 推测化合物 | 类型 |
|------------------|---------------|---|---------------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|---|--|--|----|
| | | | | 实测值 | 理论值 | 实测值 | 理论值 | ESI(+) | ESI(-) | | |
| 10 | 4.06 | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | 516.126 8 | 517.135 3 | 517.134 6 | 515.118 7 | 515.119 0 | 539.136 9[M + Na] ⁺ , 555.112 9[M + K] ⁺ , 355.100 3[M + H - caffeoyl] ⁺ , 163.031 6[M + H - QA - caffeoyl] ⁺ | 353.084 3[M - H - caffeoyl] ⁻ , 191.054 1[QA - H] ⁻ , 179.034 3[CA - H] ⁻ | 异绿原酸 B ^[17] | d |
| 11 ¹⁾ | 4.14 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 354.095 1 | 355.100 3 | 355.102 9 | 353.084 3 | 353.087 3 | 377.081 2[M + Na] ⁺ , 393.057 3[M + K] ⁺ , 731.184 4[2M + Na] ⁺ , 163.031 6[M + H - QA] ⁺ , 135.037 3[M + H - QA - CO] ⁺ | 707.182 5[2M - H] ⁻ , 191.054 1[QA - H] ⁻ | 绿原酸 ^[17-18] | d |
| 12 | 4.73 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 464.095 5 | 465.100 3 | 465.103 3 | 463.085 9 | 463.087 7 | 303.044 5[M + H - glc] ⁺ | | 金丝桃苷 ^[10,13] , 异槲皮苷 ^[12] | a |
| 13 | 4.91 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 354.095 1 | 355.100 3 | 355.102 9 | 353.084 3 | 353.087 3 | 163.016 0[M + H - QA] ⁺ | 707.182 5[2M - H] ⁻ , 191.054 1[QA - H] ⁻ , 179.034 3[CA - H] ⁻ , 135.045 5[CA - H - H ₂ O - C ₂ H ₂] ⁻ | 4-O-咖啡酰奎尼酸 ^[10,18] | d |
| 14 | 4.96 | C ₂₅ H ₂₈ O ₁₆ | 584.137 7 | 585.143 4 | 585.145 6 | 583.129 3 | 583.129 9 | 607.124 9[M + Na] ⁺ , 567.133 5[M + H - CH ₃] ⁺ , 465.100 3[M + H - C ₄ H ₈ O ₄] ⁺ , 303.044 5[M + H - C ₄ H ₈ O ₄ - glc] ⁺ | | 新芒果苷 ^[19] | j |
| 15 ¹⁾ | 5.41 | C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅ | 550.189 8 | 551.195 5 | 551.197 6 | 549.182 4 | 549.181 9 | 573.182 3[M + Na] ⁺ , 589.154 7[M + K] ⁺ , 389.140 2[M + H - glc] ⁺ , 227.085 3[M + H - 2glc] ⁺ | 595.189 1[M + HCOO] ⁻ | 京尼平-1-O-β-龙胆二糖苷 ^[7] | b |
| 16 | 5.67 | C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁ | 422.084 9 | 423.090 6 | 423.092 7 | 421.078 5 | 421.077 1 | 405.078 8[M + H - H ₂ O] ⁺ , 387.068 2[M + H - 2H ₂ O] ⁺ , 303.044 5[M + H - C ₄ H ₈ O ₄] ⁺ | 843.166 2[2M - H] ⁻ , 331.042 1[M - H - C ₃ H ₆ O ₃] ⁻ , 301.031 6[M - H - C ₄ H ₈ O ₄] ⁻ | 芒果苷 ^[20] | j |
| 17 ¹⁾ | 5.73 | C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀ | 388.136 9 | | | 387.128 9 | 387.129 1 | 411.122 2[M + Na] ⁺ , 777.293 6[2M + H] ⁺ | 433.136 8[M + HCOO] ⁻ , 225.075 3[M - H - glc] ⁻ , 207.064 6[M - H - glc - H ₂ O] ⁻ , 123.044 0[M - H - glc - C ₄ H ₆ O ₃] ⁻ | 栀子苷 ^[7,9] | b |
| 18 | 5.83 | C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅ | 422.084 9 | 423.090 6 | 423.092 7 | 421.078 5 | 421.077 1 | 303.044 5[M + H - C ₄ H ₈ O ₄] ⁺ | 843.154 3[2M - H] ⁻ , 403.123 1[M - H - H ₂ O] ⁻ , 331.042 1[M - H - C ₃ H ₆ O ₃] ⁻ , 301.038 7[M - H - C ₄ H ₈ O ₄] ⁻ | 异芒果苷 ^[19] | j |
| 19 | 6.00 | C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ | 342.170 5 | 342.168 0 | 342.170 5 | | | 297.107 4[M + H - (CH ₃) ₂ NH] ⁺ , 265.081 5[M + H - (CH ₃) ₂ NH - CH ₃ OH] ⁺ | | 木兰花碱 ^[19,21] | c |
| 20 | 6.15 | C ₁₅ H ₁₀ O ₇ | 302.042 7 | | | 301.035 2 | 301.034 8 | | 603.079 5[2M - H] ⁻ , 283.020 2[M - H - H ₂ O] ⁻ , 273.038 8[M - H - CO] ⁻ , 257.431 0[M - H - CO ₂] ⁻ | 粘毛黄芩素 ^[22] | a |
| 21 | 6.40 | C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁ | 404.131 9 | | | 403.123 1 | 403.124 0 | 427.119 6[M + Na] ⁺ | 807.569 0[2M - H] ⁻ , 371.095 4[M - H - CH ₃ OH] ⁻ , 223.061 1[M - H - glc - H ₂ O] ⁻ , 179.053 5[M - H - glc - H ₂ O - CO ₂] ⁻ | 断氧化马钱子苷 ^[13,23] | b |
| 22 | 6.71 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄ | 578.163 6 | 579.174 5 | 579.171 4 | 577.155 6 | 577.155 7 | 271.054 8[M + H - rha - glc] | | 芹菜素-7-O-芸香糖苷 ^[12] | a |
| 23 | 6.77 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 610.153 4 | 611.165 2 | 611.161 2 | 609.145 1 | 609.145 6 | 633.146 7[M + Na] ⁺ , 303.083 7[M + H - rha - glc] ⁺ | 301.070 7[M - H - rha - glc] ⁻ | 木犀草素-O-二己糖苷 ^[10-11] | a |
| 24 ¹⁾ | 6.90 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 610.153 4 | 611.165 2 | 611.161 2 | 609.145 1 | 609.145 6 | 633.146 7[M + Na] ⁺ , 465.100 3[M + H - rha] ⁺ , 303.044 5[M + H - rha - glc] ⁺ | 463.085 9[M - H - rha] ⁻ | 芦丁 ^[8] | a |
| 25 ¹⁾ | 7.01 | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ | 446.084 9 | | | 445.075 8 | 445.077 1 | | 283.023 6[M - H - glc] ⁻ , 239.031 8[M - H - glc - CO ₂] ⁻ , 211.041 4[M - H - glc - CO ₂ CO] ⁻ | 大黄酸 8-O-β-D-葡萄糖苷 ^[25] | f |
| 26 | 7.10 | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂ | 462.079 8 | 463.085 8 | 463.087 7 | 461.069 5 | 461.072 0 | 287.050 2[M + H - gluA] ⁺ | 285.039 3[M - H - gluA] ⁻ | 野黄芩苷 ^[23] | a |

续表 1

| No. | t_R /min | 分子式 | 相对分子质量 /Da | [M + H] ⁺ | | [M - H] ⁻ | | 碎片离子 | | 推测化合物 | 类型 |
|------------------|---------------|---|---------------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|---|--|--|----|
| | | | | 实测值 | 理论值 | 实测值 | 理论值 | ESI(+) | ESI(-) | | |
| 27 | 7.83 | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | 516.126 8 | 517.135 3 | 517.134 6 | 515.118 7 | 515.119 0 | 499.124 1[M + Na - H ₂ O] ⁺ , 163.031 6[M + H - QA - caffeoyl] ⁺ | 1 031.241 5[2M - H] ⁻ , 353.084 3[M - H - caffeoyl] ⁻ , 191.054 1[QA - H] ⁻ , 179.034 3[CA - H] ⁻ , 135.043 2[CA - H - H ₂ O - C ₂ H ₂] ⁻ | 异绿原酸 A ^[17] | d |
| 28 | 8.27 | C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀ | 862.195 6 | | | 861.185 5 | 861.187 8 | | 699.134 1[M - H - glc] ⁻ | 番泻苷 A ^[15-16] | k |
| 29 | 8.44 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 464.095 5 | | | 463.085 9 | 463.087 7 | 303.083 7[M + H - glc] ⁺ | 301.067 2[M - H - glc] ⁻ | 金丝桃苷 ^[10] /异槲皮苷 ^[12] | a |
| 30 | 8.63 | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | 516.126 8 | 517.135 3 | 517.134 6 | 515.118 7 | 515.119 0 | 499.124 1[M + Na - H ₂ O] ⁺ , 163.034 2[M + H - QA - caffeoyl] ⁺ | 1 031.241 5[2M - H] ⁻ , 353.084 3[M - H - caffeoyl] ⁻ , 191.054 1[QA - H] ⁻ , 179.034 3[CA - H] ⁻ | 异绿原酸 C ^[17] | d |
| 31 | 8.72 | C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ | 338.139 2 | | | | | 323.107 1[M - CH ₃] ⁺ , 322.103 7[M - CH ₃ - H] ⁺ | 135.043 2[CA - H - H ₂ O - C ₂ H ₂] ⁻ | 非洲防己碱 ^[21] | e |
| 32 | 8.75 | C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ | 336.123 6 | | | | | 320.087 1[M - CH ₃] ⁺ , 292.092 1[M - CH ₃ - H - CO] ⁺ | | 表小檗碱 ^[26] | e |
| 33 | 8.93 | C ₂₀ H ₂₀ NO ₄ | 338.139 2 | | | | | 323.110 7[M - CH ₃] ⁺ , 322.103 7[M - CH ₃ - H] ⁺ | | 药根碱 ^[26] | e |
| 34 ¹⁾ | 9.11 | C ₃₂ H ₄₀ O ₁₇ | 696.226 5 | 697.238 7 | 697.234 4 | 695.219 0 | 695.218 7 | 719.221 6[M + Na] ⁺ , 735.195 9[M + K] ⁺ , 309.094 3[M + H - gen] ⁺ | 741.218 8[M + HCOO] ⁻ , 1 391.441 5[2M - H] ⁻ | 6-对香豆酰基京尼平龙胆双糖苷 ^[14] | b |
| 35 | 9.17 | C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁ | 462.116 2 | 463.125 4 | 463.124 0 | 461.104 7 | 461.108 4 | 485.102 7[M + Na] ⁺ , 287.050 2[M + H - gluA] ⁺ | | 二氢千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷 ^[23] | a |
| 36 | 9.22 | C ₃₁ H ₃₂ O ₁₆ | 660.169 0 | 661.176 4 | 661.176 9 | 659.162 4 | 659.161 2 | 683.165 2[M + Na] ⁺ , 699.136 5[M + K] ⁺ , 499.124 1[M + H - caffeoyl] ⁺ | 497.127 2[M - H - caffeoyl] ⁻ | 3,4-二氧咖啡酰-5-氧(3-羟基-3-甲基)戊二酰奎尼酸 ^[27] | d |
| 37 | 9.35 | C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁ | 462.116 2 | 463.121 0 | 463.124 0 | 461.109 1 | 461.108 4 | 485.107 2[M + Na] ⁺ , 947.237 3[M + 2Na] ⁺ | 923.225 0[2M - H] ⁻ , 313.053 1[M - H - C ₉ H ₈ O ₂] ⁻ | 2-O-桂皮酰基-没食子酰葡萄糖 ^[25] | e |
| 38 ¹⁾ | 9.89 | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ | 446.084 9 | 447.096 8 | 447.092 7 | 445.075 8 | 445.077 1 | 469.076 0[M + Na] ⁺ , 271.054 8[M + H - gluA] ⁺ , 253.044 6[M + H - gluA - H ₂ O] ⁺ | 891.162 0[2M - H] ⁻ , 269.043 3[M - H - gluA] ⁻ | 黄芩苷 ^[22] | a |
| 39 ¹⁾ | 10.38 | C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ | 336.123 6 | | | | | 320.087 1[M - CH ₃] ⁺ , 292.092 1[M - CH ₃ - H - CO] ⁺ | | 小檗碱 ^[26] | c |
| 40 ¹⁾ | 10.43 | C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄ | 976.378 8 | | | 975.373 2 | 975.370 9 | | 1 021.380 1[M + HCOO] ⁻ , 651.267 5[M - H - 2glc] ⁻ | 反式-西红花苷 I ^[28-29] | g |
| 41 ¹⁾ | 10.59 | C ₂₁ H ₂₁ NO ₄ | 351.147 1 | 352.152 8 | 352.154 9 | | | 337.122 3[M - CH ₃] ⁺ , 308.123 7[M - CH ₃ - H - CO] ⁺ | | 巴马汀 ^[26] | c |
| 42 | 11.01 | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ | 446.084 9 | 447.092 5 | 447.092 7 | 445.075 8 | 445.077 1 | 271.054 8[M + H - gluA] ⁺ | 891.162 0[2M - H] ⁻ , 269.043 3[M - H - gluA] ⁻ | 去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷 ^[23, 30] | a |
| 43 | 11.41 | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ | 446.084 9 | 447.092 5 | 447.092 7 | 445.075 8 | 445.077 1 | 271.054 8[M + H - gluA] ⁺ | 891.155 9[2M - H] ⁻ , 269.043 3[M - H - gluA] ⁻ | 芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷 ^[22] | a |
| 44 | 11.61 | C ₂₉ H ₂₆ O ₁₅ | 614.127 2 | | | 613.119 3 | 613.119 3 | 463.121 0[M - H - C ₈ H ₈ O ₃] ⁻ | 461.104 7[M - H - C ₈ H ₈ O ₃] ⁻ | 1,6-二没食子酰基-2-桂皮酰葡萄糖 ^[25] | e |
| 45 | 12.11 | C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁ | 460.100 6 | 461.106 4 | 461.108 4 | 459.092 7 | 459.092 7 | 921.220 1[2M + H] ⁺ , 285.070 6[M + H - gluA] ⁺ , 270.048 5[M + H - gluA - CH ₃] ⁺ | 919.190 8[2M - H] ⁻ , 431.097 6[M - H - CO] ⁻ , 283.058 1[M - H - gluA] ⁻ , 268.036 4[M - H - gluA - CH ₃] ⁻ | 千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷 ^[22,31] | a |
| 46 ¹⁾ | 12.29 | C ₃₈ H ₃₄ O ₁₉ | 814.325 9 | | | | | 873.323 8[M + Na] ⁺ , 675.230 1[M + Na - glc] ⁺ | 859.317 3[M + HCOO] ⁻ , 651.220 4[M - H - glc] ⁻ | 西红花苷 II ^[28-29] | g |

续表 1

| No. | t_R /min | 分子式 | 相对分子质量 /Da | [M + H] ⁺ | | [M - H] ⁻ | | 碎片离子 | | 推测化合物 | 类型 |
|------------------|---------------|---|---------------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|---|---|--|----|
| | | | | 实测值 | 理论值 | 实测值 | 理论值 | ESI(+) | ESI(-) | | |
| 47 ¹⁾ | 12.64 | C ₂₁ H ₂₀ O ₉ | 416.107 0 | | | 415.102 8 | 415.102 9 | 439.098 3[M + Na] ⁺ 855.223 0[2M + Na] ⁺ | 253.046 3[M - H - glc] ⁻ 225.050 7[M - H - glc - CO] ⁻ | 大黄酚葡萄糖苷 ^[16] | f |
| 48 | 12.72 | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ | 446.084 9 | 447.092 5 | 447.092 7 | 445.075 8 | 445.077 1 | 271.054 8[M + H - gluA] ⁺ | 269.043 3[M - H - gluA] ⁻ | 黄芩苷异构体 ^[22] | a |
| 49 | 13.03 | C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁ | 460.100 6 | 461.106 4 | 461.108 4 | 459.092 7 | 459.092 7 | 921.220 1[2M + H] ⁺ , 285.070 6[M + H - gluA] ⁺ , 270.048 5[M + H - gluA - CH ₃] ⁺ | 919.190 8[2M - H] ⁻ , 283.058 1[M - H - gluA] ⁻ , 268.036 4[M - H - gluA - CH ₃] ⁻ | 汉黄芩苷 ^[22,31] | a |
| 50 | 13.29 | C ₄₅ H ₇₆ O ₁₉ | 920.498 1 | | | 919.488 9 | 919.490 3 | 943.506 5[M + Na] ⁺ , 903.506 5[M + H - H ₂ O] ⁺ , 579.391 2[M + H - H ₂ O - 2glc] ⁺ | 965.497 0[M + HCOO] ⁻ | 知母皂苷 B-Ⅱ ^[19-20] | h |
| 51 ¹⁾ | 15.75 | C ₁₆ H ₁₂ O ₅ | 284.068 5 | | | 283.061 5 | 283.060 6 | | 240.042 9[M - H - CH ₃ - CO] ⁻ | 大黄素甲醚 ^[24,32] | f |
| 52 | 17.70 | C ₂₆ H ₃₀ O ₈ | 470.194 1 | 471.201 2 | 471.201 9 | 469.183 4 | 469.186 2 | | 515.188 4[M + HCOO] ⁻ | 黄柏内酯 ^[33] | l |
| 53 ¹⁾ | 18.09 | C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄ | 976.378 8 | | | 975.373 2 | 975.370 9 | | 1 021.373 6[M + HCOO] ⁻ , 651.267 5[M - H - 2glc] ⁻ , 283.020 2[M - H - 2glc - 2glc - CO ₂] ⁻ | 顺式-西红花苷 I ^[28-29] | g |
| 54 | 18.12 | C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈ | 902.487 5 | | | 901.481 3 | 901.479 7 | 925.491 7[M + Na] ⁺ , 579.391 2[M + Na - 2glc] ⁺ , 417.335 7[M + Na - 3glc] ⁺ | 947.483 4[M + HCOO] ⁻ | 知母皂苷 B-Ⅲ ^[20] | h |
| 55 ¹⁾ | 18.27 | C ₁₅ H ₈ O ₆ | 284.032 1 | | | 283.023 6 | 283.024 3 | | 255.027 7[M - H - CO] ⁻ , 239.031 8[M - H - CO ₂] ⁻ , 211.038 4[M - H - CO ₂ - CO] ⁻ , 183.040 9[M - H - CO ₂ - 2CO] ⁻ | 大黄酸 ^[9,32] | f |
| 56 ¹⁾ | 18.42 | C ₁₆ H ₁₂ O ₅ | 284.068 5 | | | 283.061 5 | 283.060 6 | | 268.061 5[M - H - CH ₃] ⁻ | 汉黄芩素 ^[30-31] | a |
| 57 | 18.55 | C ₁₈ H ₁₆ O ₇ | 344.089 6 | | | 343.081 2 | 343.081 8 | | 328.056 6[M - H - CH ₃] ⁻ , 313.035 0[M - H - 2CH ₃] ⁻ , 283.058 1[M - H - 2CH ₃ - CO] ⁻ | 黄芩新素 I ^[23] | a |
| 58 ¹⁾ | 18.69 | C ₁₅ H ₁₀ O ₄ | 254.057 9 | | | 253.049 5 | 253.050 1 | | 239.031 8[M - H - CH ₂] ⁻ , 235.956 2[M - H - H ₂ O] ⁻ , 225.893 3[M - H - CO] ⁻ | 大黄酚 ^[32] | f |
| 59 ¹⁾ | 19.26 | C ₁₆ H ₁₂ O ₅ | 284.068 5 | | | 283.061 5 | 283.060 6 | 270.048 5[M + H - CH ₃] ⁺ | 268.036 4[M - H - CH ₃] ⁻ | 千层纸素 A ^[22,31] | a |
| 60 | 19.05 | C ₁₉ H ₁₈ O ₈ | 374.100 2 | 375.105 0 | 375.108 0 | 373.090 4 | 373.092 3 | 345.092 5[M + H - 2CH ₃] ⁺ | | 黄芩新素 II ^[23] | a |
| 61 ¹⁾ | 19.48 | C ₁₉ H ₁₈ O ₈ | 374.100 2 | 375.105 0 | 375.108 0 | 373.090 4 | 373.092 3 | 397.087 9[M + Na] ⁺ , 771.201 4[2M + Na] ⁺ , 360.080 2[M + H - CH ₃] ⁺ , 345.058 3[M + H - 2CH ₃] ⁺ | 747.191 3[2M - H] ⁻ , 358.066 1[M - H - CH ₃] ⁻ , 343.043 2[M - H - 2CH ₃] ⁻ | 5,6-二羟基-7,8,2',6'-四甲氧基黄酮 ^[34] | a |
| 62 | 19.99 | C ₃₉ H ₆₄ O ₁₃ | 740.434 7 | 741.445 3 | 741.442 5 | | | 763.430 4[M + Na] ⁺ , 579.391 2[M + H - glc] ⁺ , 417.331 5[M + H - 2glc] ⁺ , 285.074 1[M + H - 2glc - 114 - H ₂ O] ⁺ | | 知母皂苷 A-Ⅲ ^[20,35] | h |
| 63 | 20.35 | C ₁₈ H ₁₆ O ₇ | 344.089 6 | | | 343.081 2 | 343.081 8 | | 328.052 9[M - H - CH ₃] ⁻ , 313.035 0[M - H - 2CH ₃] ⁻ , 283.058 1[M - H - 2CH ₃ - CO] ⁻ | 二羟基-三甲氧基黄酮 ^[31] | a |
| 64 | 21.43 | C ₃₂ H ₆₈ O ₁₉ | 756.435 5 | 757.443 5 | 757.443 3 | 755.426 5 | 755.427 7 | 779.428 6[M + Na] ⁺ , 795.402 3[M + K] ⁺ , 595.384 3[M + H - glc] ⁺ , 433.328 9[M + H - 2glc] ⁺ , 415.319 1[M + H - 2glc - H ₂ O] ⁺ | 801.431 1[M + HCOO] ⁻ | 知母皂苷 G ^[35] | h |
| 65 ¹⁾ | 21.48 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 270.052 8 | | | 269.046 6 | 269.045 0 | | 241.049 8[M - H - CO] ⁻ , 225.050 7[M - H - CO ₂] ⁻ | 大黄素 ^[32] | f |

注: glc. 葡萄糖; gluA. 葡萄糖醛酸; rha. 鼠李糖; QA. 奎尼酸; CA. 咖啡酸; a. 黄酮类; b. 环烯醚萜类; c. 生物碱类; d. 有机酸类; e. 鞣质类; f. 萘醌类; g. 二萜色素类; h. 甾体皂苷类成分; i. 单萜类; j. 双苯吡酮类; k. 二蒽酮类; l. 柠檬苷素类; ¹⁾ 表示经由对照品比对的化合物。

2.5.2 环烯醚萜类成分 鉴别出的 9 个环烯醚萜类化合物,其中 8 个来源于栀子,1 个来源于金银花。以 17 号峰栀子苷的鉴别为例来说明环烯醚萜类成分的结构鉴定过程,在保留时间 5.73 min 下,根据准分子离子峰 m/z 387.128 9 $[M - H]^-$ 及 m/z 389.140 2 $[M + H]^+$, 计算其精确分子式 $C_{17}H_{24}O_{10}$, 相对分子质量 388.136 9 Da, 而碎片离子 m/z 433.136 8 $[M + HCOO]^-$ 则进一步验证了其相对分子质量,故初步推测其为栀子苷。负离子模式下,二级碎片离子 m/z 225.075 3 是由准分子离子峰脱去一分子葡萄糖残基(162 Da)产生的, m/z 225.075 3 进一步丢失一分子水产生 m/z 207.064 6 的二级碎片离子,另外 m/z 225.075 3 离子的 2 个氢原子发生转移,相应位置断裂,形成了碎片离子 m/z 123.044, 在正离子模式下还检测到 $[M + Na]^+$ 峰 m/z 411.122 2 和 $[2M + H]^+$ 峰 m/z 777.293 6, 并且其相对保留时间、分子离子峰和二级质谱碎片信息与对照品完全一致,故鉴定该化合物为栀子苷,其裂解方式见图 2。说明环烯醚萜类化合物的裂解方式是以糖苷键断裂为主,丢失一分子葡萄糖基(162 Da)和 H_2O , 苷元再次通过逆狄尔斯-阿德尔反应(RDA)方式裂解。

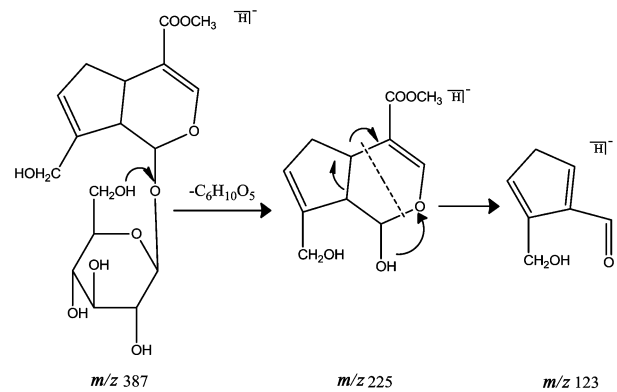


图 2 栀子苷的质谱裂解途径

Fig. 2 Mass spectrometric fragmentation pathway of geniposide

2.5.3 黄酮类成分 共鉴定出 20 个黄酮类化学成分,大多数来自于黄芩,部分来自金银花、栀子等药材。以 24 号峰芦丁和 49 号峰汉黄芩苷为例来说明黄酮类化合物的裂解规律。在保留时间 6.90 min 下,根据准分子离子峰 m/z 609.145 1 $[M - H]^-$ 和 m/z 611.165 2 $[M + H]^+$, 质谱软件给出其相对分子质量 610.153 4 Da, 正离子模式下 m/z 611.165 2 先脱掉鼠李糖产生碎片离子 m/z 465.100 3, 进一步脱掉一分子葡萄糖生成碎片离子 m/z 303.044 5, 负离子模式下, m/z 609.145 1 脱掉一分子鼠李糖生成

碎片离子 m/z 463.085 9, 再比对对照品芦丁的保留时间,结合文献的相关信息,推断 24 号峰为芦丁。保留时间 6.77 min 的正负离子模式下,同样出现了准分子离子峰 m/z 609.145 6 $[M - H]^-$ 和 m/z 611.165 2 $[M + H]^+$, 推测 23 号峰为芦丁的同分异构体,在正、负离子模式下该化合物分别出现了二级离子碎片 m/z 303.083 7 和 301.070 7, 推测为准分子离子峰失去一分子鼠李糖和一分子葡萄糖形成的,说明该化合物为黄酮苷类成分,结合文献报道信息,推测该化合物为木樨草素-O-二己糖苷。在保留时间 13.03 min 下,质谱给出准分子离子峰为 m/z 459.092 7 $[M - H]^-$ 和 m/z 461.106 4 $[M + H]^+$, 计算其相对分子质量 460.100 6 Da, 负离子模式下,在 m/z 459.092 7 $[M - H]^-$ 的基础上脱掉 176 Da 基团生成 m/z 283.058 1 的碎片离子, m/z 268.036 4 与 283.058 1 相差 15, 推测其为 m/z 283.058 1 失掉 1 个 CH_3 所得,此外还出现了 m/z 919.190 8 $[2M - H]^-$; 正离子模式下准分子离子峰 m/z 461.106 4 $[M + H]^+$, 去掉 1 个 176 Da 产生 m/z 285.070 6 碎片,该碎片继续丢失 1 个 CH_3 生成 m/z 270.048 5。综合这些碎片离子信息并与对照品比对,推测 49 号峰为汉黄芩苷。综上所述,黄酮苷类成分裂解时通常会失去葡萄糖,产生苷元离子,苷元离子通过 RDA 再裂解,常见方式为脱去一分子甲基(15 Da); 而葡萄糖醛酸苷类成分裂解时则易脱去葡萄糖醛酸基(176 Da)。根据此裂解方式,推测峰 20, 22, 26, 35, 38, 42, 43, 45, 48, 56, 57, 59, 60, 61, 63 分别为粘毛黄芩素 I, 芹菜素-7-O-芸香糖苷, 野黄芩苷, 二氢千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷, 黄芩苷, 去甲汉黄芩素-7-O-葡萄糖醛酸苷, 芹菜素-7-O-β-D 葡萄糖醛酸苷, 千层纸素 A-7-O-葡萄糖醛酸苷, 黄芩苷异构体, 汉黄芩素, 黄芩新素 I, 千层纸素 A, 黄芩新素 II, 5, 6-二羟基-7, 8, 2', 6'-四甲氧基黄酮和二羟基-三甲氧基黄酮, 而峰 12 或峰 29 推测为金丝桃苷/异槲皮苷, 因没有更多的信息参照, 不能判断其具体归属。

2.5.4 生物碱类成分 推测的 6 个生物碱类成分均来自于黄连和黄柏。以 19 号峰木兰花碱和 41 号峰巴马汀为例来说明生物碱类成分的裂解途径。在保留时间 6.00 min 正离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 342.168 0, 质谱软件给出其分子式 $C_{20}H_{24}NO_4$, 准分子离子峰脱掉 $(CH_3)_2NH$ 基团得到碎片离子峰 m/z 297.107 4, 该碎片继续失掉 CH_3OH 生成 m/z 265.081 5, 与文献所报道的碎片信息一致, 因此, 推测该化合物为木兰花碱。在保留时间 10.59 min

正离子模式下,准分子离子峰为 m/z 352.152 8,可推断其分子式可能为 $C_{21}H_{21}NO_4$,在进一步的质谱裂解中,给出了二级碎片离子峰 m/z 337.122 3 $[M - CH_3]^+$ 和 m/z 308.123 7 $[M - CH_3 - H - CO]^+$ 。其保留时间与对照品的一致,碎片信息也与文献报道的巴马汀的碎片一致,故推测 41 号成分为巴马汀;其部分裂解过程见图 3。因黄连、黄柏中

生物碱多以阳离子形式存在,所以在扫描时,负离子模式响应较低,正离子模式响应很强,二级质谱碎片离子多是以 N^+ 为中心引发的断裂,失去 1 个或几个甲基,进而再失去一分子羰基。与 N^+ 相连的 2 个环若是苯环共轭结构,则更易失去甲基。根据这些信息推测峰 31,32,33,39 分别为非洲防己碱、表小檗碱、药根碱和小檗碱。

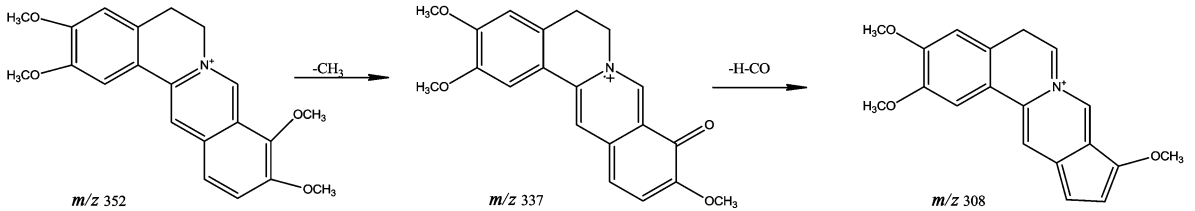


图 3 巴马汀的质谱裂解途径

Fig. 3 Mass spectrometric fragmentation pathway of palmatine

2.5.5 有机酸类成分 推测出 8 个有机酸类成分,来自于栀子和金银花。在保留时间 4.14 min 负离子模式下,根据准分子离子峰 m/z 353.084 3 $[M - H]^-$ 和 m/z 355.100 3 $[M + H]^+$,计算其精确分子式为 $C_{16}H_{18}O_{19}$,相对分子质量 354.095 1 Da,负离子模式下有离子峰 m/z 707.182 5 $[2M - H]^-$ 及二级特征碎片离子 m/z 191.054 1 $[QA - H]^-$;在正离子模式下出现了 m/z 377.081 2 $[M + Na]^+$ 峰和 m/z 393.057 3 $[M + K]^+$ 峰,同时还有 m/z 731.184 4 $[2M + Na]^+$ 碎片出现,二级碎片离子 m/z 163.031 6 由准分子离子脱掉一分子奎尼酸产生, m/z 163.031 6 继续丢掉 1 个 CO 生成 m/z 135.037 3 离子碎片。结合绿原酸对照品的保留时间,因此,推断该化合物为绿原酸。在保留时间 4.06,7.83,8.63 min 负离子模式下,均有准分子离子峰 m/z 515.118 7 $[M - H]^-$,在 7.83 min 及 8.63 min 的处尚有离子碎片 m/z 1031.241 5 $[2M - H]^-$,说明这 3 个化合物的相对分子质量均为 516.126 8 Da,互为同分异构体。在这 3 个保留时间下的二级碎片信息中均出现了 m/z 353.084 3

$[M - H - \text{caffeoyl}]^-$, m/z 191.054 1 $[QA - H]^-$, m/z 179.034 3 $[CA - H]^-$ 碎片离子,这些是有机酸类成分裂解的特征碎片离子,所以推断该 3 个化合物为有机酸类成分。在正离子模式下,三者均有准分子离子峰 m/z 517.126 8 $[M + H]^+$ 和二级质谱碎片 m/z 163.031 6 $[M + H - QA - CA]^+$,此外还有碎片离子 m/z 539.136 9 $[M + Na]^+$ 和 m/z 499.124 1 $[M + Na - H_2O]^+$ 等信息。结合离子碎片信息,与参考文献中异绿原酸各同分异构体的信息一致,再根据异绿原酸本身性质及文献中保留时间的参照,推测这 3 个化合物分别为异绿原酸 B,异绿原酸 A 和异绿原酸 C。异绿原酸 C 的裂解途径见图 4。有机酸类化合物在质谱裂解中,常易脱掉咖啡酰氧基基团或奎尼酸基团形成 m/z 191.054 1 $[QA - H]^-$ 和 m/z 179.034 3 $[CA - H]^-$ 的特征碎片离子,另外还会失掉一些小分子 CO , CO_2 和 H_2O 等。根据这个裂解规律,推测峰 3 为 3-O-咖啡酰奎尼酸/5-O-咖啡酰奎尼酸,峰 9 为咖啡酸,峰 13 为 4-O-咖啡酰奎尼酸,峰 36 为 3,4-二氧咖啡酰-5-氧(3-羟基-3-甲基)戊二酰奎尼酸。

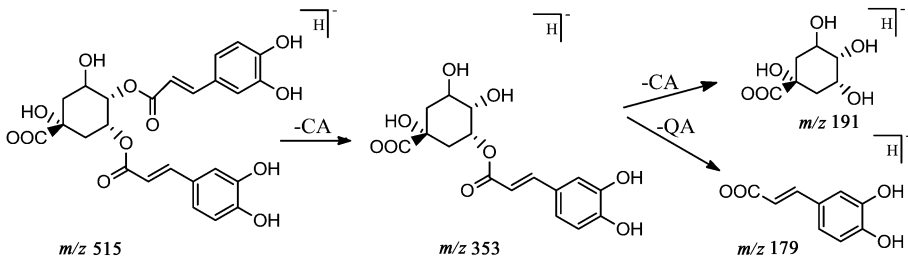


图 4 异绿原酸 C 的质谱裂解途径

Fig. 4 Mass spectrometric fragmentation pathway of isochlorogenic acid C

2.5.6 蒽醌类成分 共归属了 6 个蒽醌类成分,包括 2 个蒽醌苷类化合物和 4 个游离蒽醌类化合物,均来自于大黄。以 51 号峰大黄素甲醚和 55 号峰大黄酸为例。在保留时间 15.75 min 负离子模式下,根据准分子离子峰为 m/z 283.061 5 $[M - H]^-$, 计算其精确分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$, 相对分子质量 284.068 5 Da, 准分子离子峰脱掉脱掉一分子 CH_3 和一分子 CO 形成特征碎片离子 m/z 240.042 9 $[M - H - CH_3 - CO]^-$, 查阅相关文献,其与大黄素甲醚的裂解特征一致,再通过对照品的比对,确定 51 号峰为大黄素甲醚。在保留时间 18.27 min 负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 283.023 6 $[M - H]^-$, 计算其相对分子质量 284.032 1 Da, 分子式 $C_{15}H_8O_6$, 准分子离子峰进一步裂解,脱掉一分子 CO_2 形成特征碎片离子 m/z 239.031 8 $[M - H -$

$CO_2]^-$, 表明其分子侧链结构中可能含有羧基基团, m/z 239.031 8 再脱去一分子 CO 或两分子 CO 形成特征碎片离子 m/z 211.038 4 $[M - H - CO_2 - CO]^-$ 和 m/z 183.040 9 $[M - H - CO_2 - 2CO]^-$, 综合碎片信息,与文献报道的大黄酸的裂解特征一致,与对照品的相对保留时间也保持一致,故推测 55 号峰为大黄酸,裂解过程见图 5。由上可知,蒽醌类成分因共轭环内羰基的存在,在裂解时会首先脱掉母核的 CO , 其次常以 CO, CO_2, H_2O, CH_3 和 CH_3O 等中性碎片的形式失掉侧链取代基。故根据大黄蒽醌类成分侧链取代基的差异,结合相关文献报道,推测 58 和 65 号峰分别为大黄酚和大黄素,25 和 47 号峰因为有葡萄糖基的丢失及苷元的再裂解特征,推测是蒽醌苷类成分,分别为大黄酸 8- O - β - D -葡萄糖苷和大黄酚葡萄糖苷。

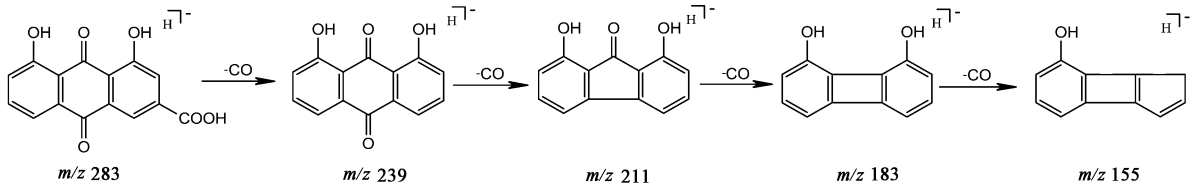


图 5 大黄酸的质谱裂解途径

Fig. 5 Mass spectrometric fragmentation pathway of rhein

2.5.7 萜类成分 推测出 4 个萜类成分,包括 3 个二萜色素类成分和 1 个单萜类成分,均来源于栀子。

其中 3 个二萜色素类成分均为藏红花素类色素成分,以 40 号峰和 53 号峰西红花苷 I 为例。在保留时间 10.43 min 和 18.09 min 负离子模式下,均有准分子离子峰 m/z 975.373 2 $[M - H]^-$ 及 m/z 1 021.380 1 $[M + HCOO]^-$, 计算其精确分子式 $C_{44}H_{64}O_{24}$, 相对分子质量 976.378 8 Da, 推断二者互为同分异构体, m/z 975.373 2 先脱去一端的两分子糖基,生成 m/z 651.267 5 的碎片离子,再脱掉另一端的 2 个糖基同时失掉一分子 CO_2 , 产生 m/z 283.020 2 的二级碎片离子。这些碎片离子信息与文献报道的西红花苷 I 一致,故可判断这 2 个化合物为西红花苷 I, 又因反式结构的保留时间相对较短,可以由此区别出二者。西红花苷 I 裂解过程见图 6。栀子藏红花素类成分的裂解方式主要是糖苷键的断裂,丢掉葡萄糖基团,再丢失 CO_2 中性分子,此外,藏红花素类化合物常有同分异构体的情况,但顺式结构在色谱柱上的保留时间较反式结构长,可以由此初步判断顺反异构体。依此推测 46 号峰为西红花苷 II。6 号峰的碎片离子信息与文献报道的

吻合,是一个单萜类成分,推测其为 jasminoside B。

2.5.8 甾体皂苷类成分 甾体皂苷为知母中的主要成分,也是知母的特征性成分。以 64 号峰知母皂苷 G 为例来说明皂苷类成分的裂解规律。在保留时间 21.43 min 负离子模式下,根据准分子离子峰 m/z 755.426 5 $[M - H]^-$ 和 m/z 757.443 5 $[M + H]^+$, 计算其相对分子质量 756.435 5 Da; 正离子模式下有明显 m/z 779.428 6 $[M + Na]^+$ 和 m/z 795.402 3 $[M + K]^+$ 碎片,而 m/z 757.443 5 $[M + H]^+$ 先脱去一分子葡萄糖基产生 m/z 595.384 3 碎片,再脱去第 2 个葡萄糖基生成碎片 m/z 433.328 9, 该碎片继续失掉一分子 H_2O 生成 m/z 415.319 1 的碎片离子。这些碎片信息与文献报道的知母皂苷类成分的裂解特征一致,故判断该化合物为知母皂苷 G。共鉴别出 4 个知母甾体皂苷类成分,由于知母皂苷的结构中通常含有一定数量的糖基,故裂解时容易先失去糖基。正离子模式下,皂苷类成分都有 $[M + Na]^+$ 峰,个别皂苷会有 $[M + H]^+$ 峰。由此推测 50, 54, 62 号峰分别为知母皂苷 B-II, 知母皂苷 B-III 和知母皂苷 A-III。

2.5.9 其他成分 根据准分子离子峰,计算化合物

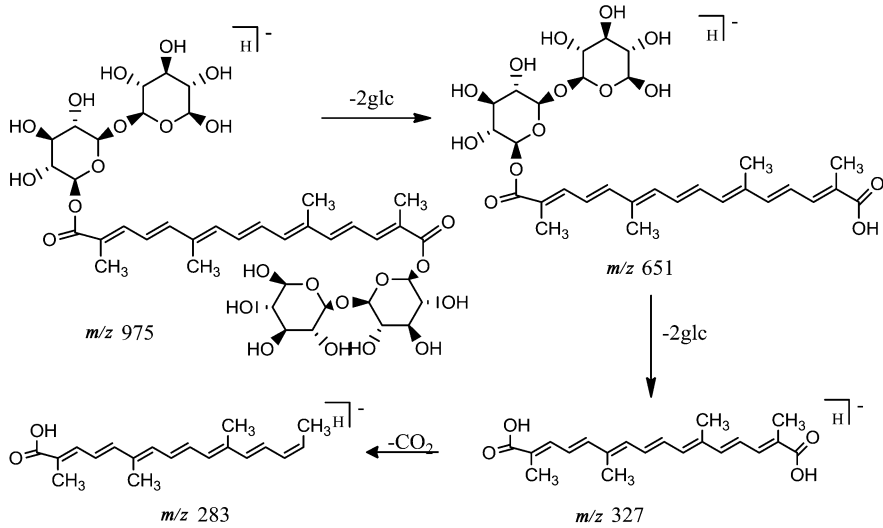


图 6 西红花苷 I 的质谱裂解途径

Fig. 6 Mass spectrometric fragmentation pathway of crocin-I

的分子式及相对分子质量,结合文献信息,还推测出 3 个鞣质类化合物,分别为 7 号峰儿茶素,37 号峰 2-O-桂皮酰基-没食子酰葡萄糖和 44 号峰 1,6-二没食子酰基-2-桂皮酰基葡萄糖,1 个二萜酮类化合物即 28 号峰番泻苷 A,这些成分均来自于大黄。推测出 3 个双苯吡酮类化合物,分别是 14 号峰新芒果苷,16 号峰芒果苷和 18 号峰异芒果苷,均来自于知母。同时根据文献信推测出 1 个来源于黄柏的柠檬苷素类成分即 52 号峰黄柏内酯。

3 讨论

栀子金花丸是由 8 味中药组成的中药复方,其化学成分组成复杂,而 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术具有分辨率高、分析时间短、准确灵敏的特点,是中药成分实现有效鉴定的便捷途径之一。本实验尝试运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对栀子金花丸中的各种成分进行了定性鉴别,根据质谱中给出的相对分子质量、分子碎片峰和色谱保留规律,并参考相关文献,归属推测了 65 种化合物,共 12 类化合物,包括黄酮类成分、环烯醚萜类成分、有机酸类成分、生物碱类成分、蒽醌类成分、甾体皂苷类成分、鞣质类成分、二萜色素类成分、双苯吡酮类成分、单萜类成分、二萜酮类成分和柠檬苷素类成分。其中环烯醚萜类化合物主要来源于栀子和金银花;黄酮类化合物大部分来源于黄芩,小部分来源于金银花和栀子;有机酸类成分来源于栀子和金银花;蒽醌类成分,鞣质类和二萜酮类均来源于大黄;生物碱类成分均来源于黄连和黄柏;萜类成分均来源于栀子;甾体皂苷类成分和双苯吡酮类成分来源于知母;柠檬苷素类成分来源于黄柏。这些成分涵盖了栀子金花丸的 7 味药

材,基本明确了栀子金花丸的化学组成。而单味药天花粉的化学成分主要是天花粉蛋白、植物凝血素和多糖等,结构复杂多变,相关文献报道较少,不能有效地对天花粉中成分进行鉴别,需要结合其他的分析手段进一步研究。此外,不同类型化合物因其结构的共性可能具有其特有的裂解方式,实验结果中对此进行了相关总结,可为其他中药或中药复方的化学成分研究提供参考。

基于以上成分的裂解规律可知,环烯醚萜类、二萜色素类、蒽醌类和甾体皂苷类在负离子模式下有良好信号,能生成较强的 $[M-H]^-$ 准分子离子,适合进行多级质谱的研究,因此,选择 ESI 负离子模式进行环烯醚萜类、蒽醌类和甾体皂苷类化合物裂解规律的研究。生物碱在正离子模式下有较好信号,在负离子模式下较弱,选择 ESI 正离子模式下进行生物碱类化合物裂解规律的研究。而黄酮类和有机酚酸类则是在正、负离子模式下均有较好的响应,2 个模式下的结果可以相互印证,选择正、负离子式下进行黄酮和有机酚酸类均可。研究结果表明 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术可在缺少对照品的情况下,全面地、有效地分析栀子金花丸的成分,为栀子金花丸的质量标准研究提供了依据,为栀子金花丸的药效物质基础及作用机制研究提供了实验基础,同时该方法的建立也为中药复方体系化学成分的研究提供了有益参考。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1165-1166.
[2] 牛德斌. HPLC 测定栀子金花丸中 2 类成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):96-97.

- [3] 郝乘仪,郭淑,朱鹤云,等. 高效液相色谱法同时测定栀子金花丸中9个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2014,34(9):1571-1575.
- [4] 赵倩.“一测多评”法用于栀子金花丸多成分含量测定的可行性研究[D]. 北京:中国中医科学院,2014.
- [5] 陈晓虎,苏晶,王慧,等. UPLC法同时测定栀子金花丸中11种成分[J]. 中草药,2014,45(7):955-959.
- [6] 陈帅,王慧竹,薛健飞,等. 栀子金花丸 HPLC 指纹图谱及其与体外抗氧化活性的相关性分析[J]. 中国药房,2016,27(22):3077-3080.
- [7] HAN Y, WEN J, ZHOU T T, et al. Chemical fingerprinting of *Gardenia jasminoides* Ellis by HPLC-DAD-ESI-MS combined with chemometrics methods[J]. Food Chem,2015,188:648-657.
- [8] 姚蓝. 基于栀子炒炭存性的物质基础内涵研究[D]. 北京:中国中医科学院,2014.
- [9] ZHU H Y, BI K S, HAN F, et al. Identification of the absorbed components and metabolites of Zhi-Zi-Da-Huang decoction in rat plasma by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015,111:277-287.
- [10] 张丽媛,李遇伯,李利新,等. RRLC-Q-TOF/MS 分析金银花的化学成分[J]. 中南药学,2012,10(3):204-208.
- [11] 李小琴,孙晓红,蔡爽,等. 采用 UPLC-ESI-MS/MS 以及主成分聚类分析研究不同品种金银花的化学成分及其差异[J]. 药学学报,2009,44(8):895-904.
- [12] 李泮霖,李楚源,刘孟华,等. 基于 UFLC-Triple-Q-TOF-MS/MS 技术的金银花、山银花化学成分比较[J]. 中南药学,2016,14(4):363-369.
- [13] 白雪,黄惠锋,吴修红,等. HPLC-DAD-MS/MS 法分析金银花中化学成分[J]. 食品与药品,2015,17(1):5-8.
- [14] 叶日贵,白梅荣,包明兰,等. 栀子化学成分的 LC-MSD Trap 与 UV 分析[J]. 中成药,2015,37(7):1503-1507.
- [15] 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.
- [16] 张依倩,王玉,张兰兰,等. 道地产区大黄药材 HPLC-DAD-MS 指纹特征研究[C]//中国药学会. 中国药学会大会暨第十届中国药师周大会论文集:2010年卷. 天津:天津药学会,2010:17-19.
- [17] 任爱农,顾学红,王大为. 清气凉营注射液中15个成分的 HPLC/ESI/MS 分析研究[J]. 中成药,2011,33(3):369-373.
- [18] QIAN Z M, WEN X D, LI H J, et al. Analysis of interaction property of bioactive components in Flos Lonicerae Japonicae with protein by microdialysis coupled with HPLC-DAD-MS [J]. Biol Pharm Bull, 2008,31(1):126-130.
- [19] 陆薪如,秦民坚,徐德然. HPLC-ESI-MS/MS 法鉴定通
- 关丸的主要化学成分[J]. 中国天然药物,2008,6(4):283-291.
- [20] 王可人. 知母百合药对的化学成分分析及药动学研究[D]. 上海:第二军医大学,2011.
- [21] 郭锦明,王跃飞,胡丽萍,等. 黄连生物碱的 HPLC-MS 分析[J]. 中成药,2011,33(1):110-113.
- [22] 何秋毅,宋伟峰,马葵斌,等. 高效液相色谱串联质谱分析黄芩水煎液的有效成分[J]. 中国药物经济学,2012(5):40-42.
- [23] 向青,王小花,林慧,等. HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 法的银黄颗粒主要成分定性定量研究[J]. 中成药,2015,37(1):105-112.
- [24] WU H, LI X X, YAN X M, et al. An untargeted metabolomics-driven approach based on LC-TOF/MS and LC-MS/MS for the screening of xenobiotics and metabolites of Zhi-Zi-Da-Huang decoction in rat plasma [J]. J Pharm Biomed Anal,2015,115:315-322.
- [25] 刘艳杰,王倩,姜民,等. 基于谱效-构效关系筛选大黄中酪氨酸酶活性抑制成分的方法研究[J]. 中草药,2012,43(11):2120-2126.
- [26] 邓雅婷,廖琼峰,毕开顺,等. 黄连-吴茱萸药对化学成分的 HPLC-DAD-MS 分析[J]. 药学学报,2008,43(3):299-302.
- [27] Bergonzi M C, Righeschi C, Isacchi B, et al. Identification and quantification of constituents of *Gardenia jasminoides* Ellis (Zhizi) by HPLC-DAD-ESI-MS[J]. Food Chem,2012,134(2):1199-1204.
- [28] HE W, LIU X, XU H, et al. On-line HPLC-ABTS screening and HPLC-DAD-MS/MS identification of free radical scavengers in *Gardenia (Gardenia jasminoides* Ellis) fruit extracts[J]. Food Chem,2010,123(2):521-528.
- [29] 高凤阳,高晓燕,张加余,等. HPLC-DAD-MS/MS 对栀子中色素成分的研究[J]. 北京中医药大学学报,2012,35(5):343-348.
- [30] 赵胜男,李守拙. 黄芩药材中黄酮类成分的 HPLC-MS 研究[J]. 承德医学院学报,2012,29(4):345-347.
- [31] 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.
- [32] 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:自科版,2006,28(4):403-406.
- [33] 孙健,马吉胜,金瑾,等. 黄连解毒汤各成分的 HPLC-UV/MS 定性定量测定方法研究[J]. 药学学报,2006,41(4):380-384.
- [34] 刘慧. 基于“黄芩清肺汤”的黄芩栀子饮片炮制配伍物质基础研究[D]. 北京:中国中医科学院,2015.
- [35] 张慧,肖红斌,梁鑫淼. HPLC-ESI-MS/MS 鉴定知母中的甾体皂甙[C]//中国色谱学会. 大连国际色谱学术报告会论文集:2007年卷. 大连:中国化学会色谱专业委员会,2007:58-59.

[责任编辑 刘德文]