

# 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 的川佛手化学成分分析

胡瀚文, 赵永艳, 杨天龙, 郑振兴, 彭腾, 邓放\*

(成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

**[摘要]** **目的:** 应用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术, 分析鉴定中药川佛手中的化学成分。**方法:** 采用 Thermo Scientific Accucore™ C<sub>18</sub> 色谱柱(3 mm × 100 mm, 2.6 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C。高分辨质谱采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式扫描, 扫描方式为全扫描/数据依赖二级扫描(Full MS/dd-MS<sup>2</sup>)。数据运用 Compound Discoverer 3.0 软件分析, 根据化合物的精确相对分子质量、色谱保留时间、特征离子碎片信息, 结合 mzCloud 网络数据库、中药成分高分辨质谱数据库(OTCML)、文献信息和相关对照品进行鉴定。**结果:** 从川佛手中共鉴定了 54 个化学成分, 包括黄酮类 16 个, 香豆素类 17 个, 柠檬苦素类 3 个, 核苷及其碱基类 6 个, 有机酸类 2 个, 芳香醛类 3 个, 氨基酸类 1 个, 其他类成分 6 个。**结论:** 该法可全面、准确地分析鉴定川佛手中的主要化学成分, 研究结果为阐明川佛手的药效物质基础、优选质量控制指标提供了方法学参考和理论依据, 对进一步开发利用川佛手资源具有指导意义。

**[关键词]** 川佛手; 化学成分; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 黄酮; 香豆素; 柠檬苦素

**[中图分类号]** R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)07-0148-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200715

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191218.1533.008.html>

**[网络出版时间]** 2019-12-19 08:53

## Analysis and Identification of Chemical Constituents of Citri Sarcodactylis Fructus by UPLC-Q-Orbitrap HRMS

HU Han-wen, ZHAO Yong-yan, YANG Tian-long, ZHENG Zhen-xing, PENG Teng, DENG Fang\*  
(Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine under Ministry of Education,  
State Key Laboratory and Breeding Base for Systematic Research Development and Utilization of  
Chinese Medical Resources, Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology,  
School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze and identify the chemical constituents of Citri Sarcodactylis Fructus by an ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) method. **Method:** Compounds were separated on Thermo Scientific Accucore™ C<sub>18</sub> column (3 mm × 100 mm, 2.6 μm). The mobile phase was 0.1% formic acid solution and 0.1% formic acetonitrile solution. The flow rate was 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, and the column temperature was set at 30 °C. HRMS was performed using an electrospray ion source (ESI), and scanned in a positive ion mode by means of full scan/data dependent secondary scan (Full MS/dd-MS<sup>2</sup>). Compound Discoverer 3.0 software that could be linked to mzCloud network database and local high-resolution mass spectrometry database of traditional Chinese medicine

**[收稿日期]** 20190824(004)

**[基金项目]** 四川省科技厅重点研发项目(2018SZ0069)

**[第一作者]** 胡瀚文, 在读硕士, 从事中药药效物质基础与质量标准研究, E-mail: 1420021042@qq.com

**[通信作者]** \* 邓放, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础与质量标准研究, E-mail: dengf99@163.com

components was used to analyze the data, based on accurate molecular mass, retention behaviors and characteristic ion fragmentation of the compounds, as well as literature information and relevant reference materials. **Result:** Totally 54 chemical constituents in Citri Sarcodactylis Fructus were identified, including 16 flavonoids, 17 coumarins, 3 limonoids, 6 nucleosides and nucleobases, 2 organic acids, 3 aromatic aldehydes, 1 amino acid and 6 other components. **Conclusion:** The established UPLC-Q-Orbitrap HRMS method can be used to effectively and rapidly identify main chemical constituents of Citri Sarcodactylis Fructus. The findings provide a methodological reference and theoretical foundation for defining the pharmacodynamic material base and optimizing quality control index of Citri Sarcodactylis Fructus, which is of guiding significance for further development and utilization of the resources.

[ **Key words** ] Citri Sarcodactylis Fructus; chemical constituents; UPLC-Q-Orbitrap HRMS; flavonoids; coumarins; limonoids

佛手为芸香科柑橘属植物佛手 *Citrus medica* var. *sarcodactylis* 的干燥果实,具有疏肝理气,和胃止痛,燥湿化痰的功效<sup>[1]</sup>。佛手按产地可分为川佛手、广佛手、金佛手等,主要含有挥发油、黄酮、香豆素、多糖等活性成分<sup>[2-3]</sup>。川佛手主要分布于四川盆地的边缘山区,主产于四川合江、宜宾、沐川、犍为、雅安、夹江等地,在四川省已有数百年的栽培历史,其产量大,质佳,作为药食同源药材,具有极大的开发价值<sup>[4]</sup>。但在 2015 年版《中国药典》(一部)中,仅以单一成分橙皮苷作为佛手药材的含量测定指标,难以准确反映药材的真实品质和区分不同产地佛手的质量。目前有学者采用 HPLC 法对川佛手中的木犀草素,6,7-二甲氧基香豆素,茛菪亭,5,7-二甲氧基香豆素,7-羟基香豆素,橙皮苷,槲皮素,阿魏酸进行含量测定,以评价不同产地川佛手药材的质量差异<sup>[5]</sup>。

近年来,超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术广泛地应用于中药复杂体系的组分分析,具有分离效率高、扫描速度快、高通量、高分辨率、高灵敏度的特点<sup>[6]</sup>。为进一步阐明川佛手中的化学成分和药效物质基础,本实验建立了一种基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术分析川佛手中主要成分的方法,借助 Compound Discoverer 3.0 软件,结合 mzCloud 网络数据库及 Thermo 中药成分高分辨质谱数据库(OTCML)对化合物进行定性分析,从川佛手中共鉴定出 54 个成分,为进一步研究其活性成分、优选质量控制指标提供了方法学参考。

## 1 材料

Vanquish 型超高效液相色谱联用 Q Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);KQ3200E 型超声波清洗器

(频率 40 kHz,功率 650 W,昆山市超声仪器有限公司);Discovery DV215CD 型 1/10 万电子天平(美国 Ohaus Corporation 公司);BS124S 型 1/1 万分析天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

川佛手饮片购于四川百胜药业有限公司(批号 180601B25-01A50),经成都中医药大学药学院龙飞副教授鉴定为佛手 *Citrus medica* var. *sarcodactylis* 的干燥果实。

对照品橙皮苷,川橙皮素,橙皮素,5,7-二甲氧基香豆素,6,7-二甲氧基香豆素,欧前胡素,异欧前胡素,7-羟基香豆素,佛手柑内酯,诺米林,黄柏酮,腺苷(英国 PureChemLand 公司,批号分别为 PCL-#-H633, PCL-#-No478, PCL-#-He502, PCL-#-Dn023, PCL-#-Dm279, PCL-#-Im044, PCL-#-Is482, PCL-#-Hc100, PCL-#-Bp100, PCL-#-No100, PCL-#-Ob261, PCL-#-Ad559,纯度均 >98%);对照品香叶木素、香叶木苷、白当归素、甲基橙皮苷(四川省维克奇生物科技有限公司,批号分别为 wkq18022407, wkq18032306, wkq18082202, wkq18081302, 纯度 >98%, >98%, >98%, >95%);对照品柠檬苦素(成都曼思特生物科技有限公司,批号 MUST-17030220,纯度 99.03%)。色谱纯乙腈、甲酸(美国 Fisher 公司),水为屈臣氏蒸馏水,甲醇为分析纯。

## 2 方法

**2.1 色谱条件** Thermo Scientific Accucore™ C<sub>18</sub> 色谱柱(3 mm × 100 mm, 2.6 μm),流动相 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 9 min, 5% ~ 17% B; 9 ~ 17 min, 17% ~ 30% B; 17 ~ 25 min, 30% ~ 50% B; 25 ~ 30 min, 50% ~ 80% B; 30 ~ 35 min, 80% ~ 99% B; 35 ~ 40 min, 99% B),流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 3 μL。

**2.2 质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI),正离子

模式检测。喷雾电压 3.2 kV, 离子源温度 350 °C, 鞘气流速 35 arb, 辅助气流速 10 arb, 离子传输管温度 320 °C。扫描模式为全扫描/数据依赖二级扫描 (Full MS/dd-MS<sup>2</sup>), 一级分辨率 70 000, 二级分辨率 17 500, 扫描范围  $m/z$  100 ~ 1 500, 碰撞能量梯度为 20, 40, 60 eV。

**2.3 对照品溶液的制备** 分别精密称取各对照品适量, 加甲醇溶解并定容至 10 mL, 制成单一对照品储备液。临用前取各对照品储备液适量并混合, 用甲醇稀释至各对照品质量浓度均约为 1 mg·L<sup>-1</sup>, 即得混合对照品溶液。

**2.4 供试品溶液的制备** 取川佛手粉末(过 2 号筛)约 1 g, 精密称定, 置 50 mL 锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇 25 mL, 称定质量, 超声(40 kHz, 150 W)处理 30 min, 再称定质量, 用 70% 甲醇补足缺失的质量, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

**2.5 数据处理** 将采集得到的原始数据导入 Compound Discoverer 3.0 软件, 通过其向导设置及方法模板, 建立未知化合物鉴定流程, 对原始数据进行峰对齐和峰提取, 通过提取得到的分子离子色谱峰、同位素峰拟合出可能的分子式, 并将二级碎片实测谱图与 mzCloud 网络数据库及本地中药成分数据库 OTCML 进行匹配, 对匹配结果设置过滤参数为: 峰面积阈值 80 000, 一级及二级质量偏差 5 ppm, 匹配度分值高于 80。对过滤后的离子与数据库中的化合物信息及对照品和相关文献比对, 进行化合物的分析鉴定。

### 3 结果

按上述条件, 对川佛手 70% 甲醇提取液进样分析( $n = 3$ )。结果从川佛手中共鉴定了 54 个化合物, 包括黄酮类 16 个, 香豆素类 17 个, 柠檬苦素类 3 个, 核苷及其碱基类 6 个, 有机酸类 2 个, 芳香醛类 3 个, 氨基酸类 1 个, 其他类 6 个, 其中 17 个化合物经与对照品比对而确认。正离子模式下供试品及混合对照品的总离子流图(TIC)见图 1, 各化合物相关数据见表 1<sup>[7-14]</sup>。

**3.1 黄酮类化合物的鉴定** 本实验从川佛手中共鉴定了 16 个黄酮类化合物, 包括 9 个黄酮苷和 7 个黄酮苷元, 其中橙皮苷、橙皮素、甲基橙皮苷、川陈皮素、香叶木苷、香叶木素经与对照品比对得到准确鉴定。黄酮苷元类化合物的质谱裂解特征主要为丢失 CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O 等中性分子及发生 RDA 裂解而形成一系列特征离子峰, 黄酮苷类化合物主要通过连续丢失糖基而形成丰度较高的黄酮苷元<sup>[15]</sup>。

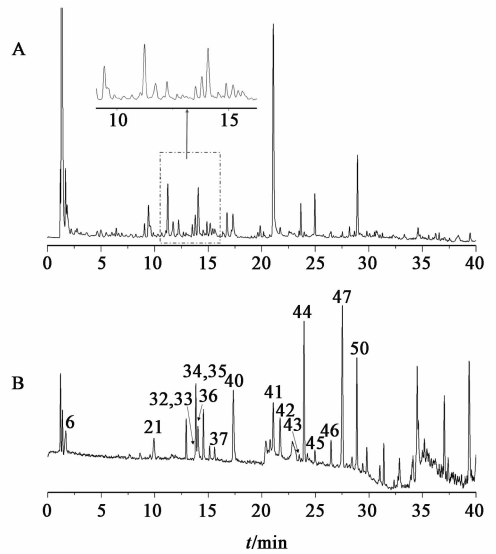


图 1 川佛手供试品(A)及 17 个对照品(B)正离子模式下的总离子流

Fig. 1 Total ion chromatogram (TIC) of Citri Sarcodactylis Fructus (A) and 17 reference substances (B) in positive mode

例如, 化合物 34 的保留时间为 13.79 min, 正离子模式下得到准分子离子  $m/z$  611.196 41 [M + H]<sup>+</sup>, 预测其分子式为 C<sub>28</sub>H<sub>34</sub>O<sub>15</sub>。在二级质谱中, 可见丢失芸香糖基后形成的苷元碎片离子  $m/z$  303.085 91 [M + H - C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>]<sup>+</sup>, 继而发生 RDA 裂解形成碎片离子  $m/z$  177.054 44 [M + H - C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub> - C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>]<sup>+</sup>,  $m/z$  153.018 08 [M + H - C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub> - C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>]<sup>+</sup>。根据化合物的二级质谱裂解特征, 经 mzCloud 网络数据库和本地中药成分数据库 OTCML 检索, 推测该化合物为橙皮苷, 最后经与对照品比对而确定。二级质谱见图 2, 质谱裂解途径见图 3。

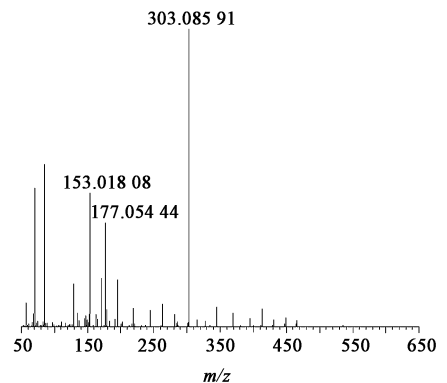


图 2 橙皮苷二级质谱

Fig. 2 MS<sup>2</sup> spectrum of hesperidin

**3.2 香豆素类化合物的鉴定** 本实验从川佛手共鉴定了 17 个香豆素类化合物, 包括 2 个香豆素苷, 7 个线性呋喃香豆素及 8 个简单香豆素, 其中 5, 7-

表 1 川佛手中化学成分信息

Table 1 Characterization of chemical constituents of Citri Sarcodactylis Fructus

No.	$t_R/\text{min}$	$[M + H]^+$	$\delta/\text{ppm}$	分子式	碎片离子	化合物	类型
1	1.32	116.070 87	-1.92	$C_5H_9NO_2$	70.065 79	脯氨酸	a
2	1.46	124.039 42	-0.94	$C_6H_5NO_2$	96.044 89, 80.050 10	烟酸	b
3	1.66	112.050 91	-1.63	$C_4H_5N_3O$	95.024 47	胞嘧啶	c
4	1.68	123.055 44	-1.16	$C_6H_6N_2O$	106.029 14, 96.044 87	烟酰胺	b
5	1.69	113.034 81	-2.55	$C_4H_4N_2O_2$	96.008 45, 95.024 42, 70.029 39	尿嘧啶	c
6	1.69	268.104 10	0.77	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	136.061 81	腺苷 <sup>1)</sup>	c
7	1.71	123.044 15	-1.24	$C_7H_6O_2$	95.049 53	对羟基苯甲醛	d
8	1.76	137.045 91	-0.48	$C_5H_4N_4O$	110.035 10	次黄嘌呤	c
9	2.04	282.119 69	-0.07	$C_{11}H_{15}N_5O_4$	136.061 69	2'-甲氧基腺苷	c
10	4.21	298.096 83	-0.37	$C_{11}H_{15}N_5O_3S$	136.061 77	5-脱氧-5-甲硫腺苷	c
11	4.64	188.070 53	0.21	$C_{11}H_9NO_2$	170.060 00, 146.059 92, 144.080 69, 115.054 43	3-吡啶丙烯酸	e
12	4.64	146.060 00	0.26	$C_9H_7NO$	118.065 24, 117.057 50	4-吡啶甲醛	b
13	4.97	325.091 74	0.59	$C_{15}H_{16}O_8$	163.038 82, 119.049 26, 107.049 40	茵芋苷	f
14	5.59	209.044 39	-0.16	$C_{10}H_8O_5$	194.021 06, 163.038 97, 149.023 39, 135.044 16	秦皮素	f
15	6.43	127.039 14	-0.59	$C_6H_6O_3$	109.028 63, 99.044 37, 97.028 72,	5-羟甲基糠醛	b
16	6.44	133.064 80	-0.36	$C_9H_8O$	105.070 28	肉桂醛	d
17	7.91	377.145 20	0.37	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	359.133 82, 243.087 37, 172.086 75	维生素 B <sub>2</sub>	b
18	8.16	595.165 28	0.45	$C_{27}H_{30}O_{15}$	577.155 46, 559.144 10, 541.133 91, 457.113 37, 427.102 81, 121.028 61	维采宁 II	g
19	8.74	385.112 67	0.10	$C_{17}H_{20}O_{10}$	223.059 94, 208.036 53, 162.031 07	6,7-dimethoxy-2-oxo-2H-chromen-8-yl- $\beta$ -D-glucopyranoside	f
20	9.43	137.059 72	0.36	$C_8H_8O_2$	109.065 03, 94.041 67	对甲氧基苯甲醛	d
21	10.01	163.038 94	0.31	$C_9H_6O_3$	135.044 27, 119.049 36, 107.049 48, 95.049 45	7-羟基香豆素 <sup>1)</sup>	f
22	11.03	611.160 03	0.39	$C_{27}H_{30}O_{16}$	465.101 01, 303.049 50, 285.039 31, 153.017 99, 129.054 61	芦丁	g
23	11.03	303.049 59	0.82	$C_{15}H_{10}O_7$	257.044 43, 229.049 70, 165.018 40, 153.018 26, 137.023 41	槲皮素	g
24	11.05	433.112 55	0.15	$C_{21}H_{20}O_{10}$	415.102 63, 397.091 86, 367.081 12, 283.060 15, 121.028 74	牡荆素	g
25	12.23	219.065 19	0.75	$C_{12}H_{10}O_4$	191.070 19, 177.054 55, 165.054 53, 149.059 63, 119.049 29	7-乙酰氧基-4-甲基香豆素	f
26	12.44	287.054 69	0.63	$C_{15}H_{10}O_6$	258.051 15, 165.018 33, 153.018 13, 137.023 10, 121.028 48	山柰酚	g
27	12.44	595.165 65	0.22	$C_{27}H_{30}O_{15}$	449.106 60, 287.054 84	山柰酚-3-O-芸香糖苷	g
28	12.74	625.176 70	0.02	$C_{28}H_{32}O_{16}$	317.065 61, 285.039 06	水仙苷	g
29	12.75	317.065 67	0.06	$C_{16}H_{12}O_7$	302.041 87, 285.039 03, 274.046 57, 153.018 20	异鼠李素	g
30	12.83	579.170 78	0.09	$C_{27}H_{30}O_{14}$	433.112 55, 271.059 78, 153.018 23	野漆树苷	g
31	13.37	273.075 68	0.24	$C_{15}H_{12}O_5$	255.064 79, 179.033 34, 153.018 14, 147.043 96, 119.049 27	柚皮素	g

续表 1

No.	$t_R/\text{min}$	$[M + H]^+$	$\delta/\text{ppm}$	分子式	碎片离子	化合物	类型
32	13.51	301.070 01	1.38	$C_{16}H_{12}O_6$	286.047 18, 258.052 40, 229.049 24	香叶木素 <sup>1)</sup>	g
33	13.51	609.180 66	0.53	$C_{28}H_{32}O_{15}$	463.123 60, 301.070 74	香叶木昔 <sup>1)</sup>	g
34	13.79	611.196 41	1.17	$C_{28}H_{34}O_{15}$	303.085 91, 177.054 44, 153.018 08	橙皮昔 <sup>1)</sup>	g
35	13.79	303.085 91	1.29	$C_{16}H_{14}O_6$	285.075 78, 177.054 57, 163.038 94, 153.018 19	橙皮素 <sup>1)</sup>	g
36	14.08	207.065 16	0.99	$C_{11}H_{10}O_4$	191.033 71, 179.070 08, 163.038 77, 151.075 24	6,7-二甲氧基香豆素 <sup>1)</sup>	f
37	15.58	625.213 01	-0.27	$C_{29}H_{36}O_{15}$	427.138 03, 317.101 99, 129.054 84	甲基橙皮昔 <sup>1)</sup>	g
38	15.64	195.065 17	0.41	$C_{10}H_{10}O_4$	177.054 46, 163.038 76, 149.059 63, 145.028 27, 117.033 63	阿魏酸	e
39	17.18	177.054 70	0.68	$C_{10}H_8O_3$	162.031 07, 149.059 60, 133.064 77, 121.064 93	4-甲基伞形酮	f
40	17.32	335.112 24	1.27	$C_{17}H_{18}O_7$	317.101 65, 299.091 13, 233.044 20, 231.028 58, 203.033 62	白当归素 <sup>1)</sup>	f
41	21.08	207.065 02	0.98	$C_{11}H_{10}O_4$	192.041 53, 179.070 42, 164.046 65, 151.075 30	5,7-二甲氧基香豆素 <sup>1)</sup>	f
42	21.72	217.049 35	0.29	$C_{12}H_8O_4$	202.025 86, 174.030 98	佛手柑内酯 <sup>1)</sup>	f
43	23.49	471.200 81	0.55	$C_{26}H_{30}O_8$	425.195 28, 95.013 15	柠檬苦素 <sup>1)</sup>	h
44	23.93	403.138 55	0.54	$C_{21}H_{22}O_8$	388.114 72, 373.091 25, 327.085 66, 211.023 28, 183.028 56	川陈皮素 <sup>1)</sup>	g
45	24.96	515.227 05	-0.99	$C_{28}H_{34}O_9$	469.221 95, 411.216 34, 95.013 13	诺米林 <sup>1)</sup>	h
46	26.48	455.206 45	0.04	$C_{26}H_{30}O_7$	409.200 62, 391.189 91, 95.013 16	黄柏酮 <sup>1)</sup>	h
47	27.53	271.096 16	1.09	$C_{16}H_{14}O_4$	203.033 72, 175.038 83, 159.044 05	欧前胡素 <sup>1)</sup>	f
48	27.53	203.033 69	0.89	$C_{11}H_6O_4$	185.023 45, 175.038 85, 159.043 91	花椒毒酚	f
49	28.19	301.106 69	0.83	$C_{17}H_{16}O_5$	245.044 17, 233.044 24, 215.033 69	珊瑚菜素	f
50	28.88	271.096 19	0.99	$C_{16}H_{14}O_4$	203.033 91, 175.038 93, 159.044 16	异欧前胡素 <sup>1)</sup>	f
51	28.88	203.033 87	0.81	$C_{11}H_6O_4$	175.038 59, 159.043 88	佛手酚	f
52	28.95	193.049 55	0.62	$C_{10}H_8O_4$	178.025 76, 165.054 40, 149.059 65, 137.059 66	5,7-二羟基-4-甲基香豆素	f
53	29.30	299.164 09	0.47	$C_{19}H_{22}O_3$	243.101 26, 217.085 74, 189.054 46, 175.038 85, 147.043 93	王草素	f
54	33.22	300.289 89	0.14	$C_{18}H_{37}NO_2$	283.263 09, 97.101 65, 85.101 58	十六酰胺乙醇	b

注: a. 氨基酸类; b. 其他类; c. 核苷及其碱基类; d. 芳香醛类; e. 有机酸类; f. 香豆素类; g. 黄酮类; h. 柠檬苦素类; <sup>1)</sup> 经与对照品比对确认。

二甲氧基香豆素, 6,7-二甲氧基香豆素, 7-羟基香豆素, 欧前胡素, 异欧前胡素, 佛手柑内酯, 白当归素经与对照品比对而准确鉴定。在二级碎裂过程中, 香豆素类化合物的裂解特征主要为丢失 CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> 等中性分子。以化合物 41 为例,  $t_R = 21.08 \text{ min}$ , 正离子模式下得到准分子离子  $m/z$  207.065 02  $[M + H]^+$ , 预测其分子式为  $C_{11}H_{10}O_4$ 。在二级质谱中, 可见其分别丢失一分子 CH<sub>3</sub> 或 2 分子 CO 形成的碎片离子  $m/z$  192.041 53  $[M + H - CH_3]^+$ , 151.075 30  $[M + H - 2CO]^+$ , 或连续丢失一分子 CO 和一分子

CH<sub>3</sub> 形成碎片离子  $m/z$  179.070 42  $[M + H - CO]^+$ ,  $m/z$  164.046 65  $[M + H - CO - CH_3]^+$ 。根据化合物的二级质谱裂解特征, 经过数据库检索及与对照品比对, 确认该化合物为 5,7-二甲氧基香豆素。二级质谱图 4, 质谱裂解途径见图 5。

**3.3 柠檬苦素类化合物的鉴定** 本实验从川佛手中共鉴定了 3 个柠檬苦素类化合物, 分别为柠檬苦素、诺米林、黄柏酮, 均与对照品比对而准确鉴定。例如, 化合物 43 保留时间为 23.49 min, 正离子模式下得到准分子离子  $m/z$  471.200 81  $[M + H]^+$ , 预测

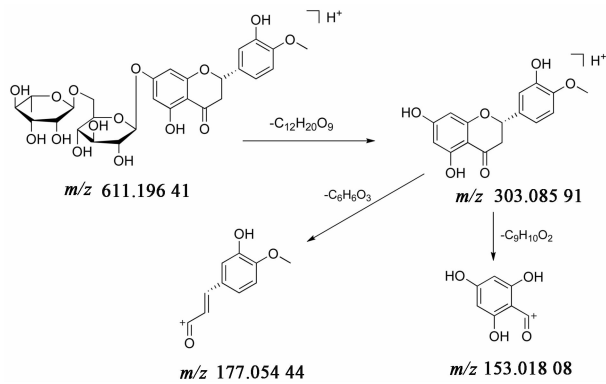


图 3 橙皮苷质谱裂解途径

Fig. 3 MS fragmentation pathway of hesperidin

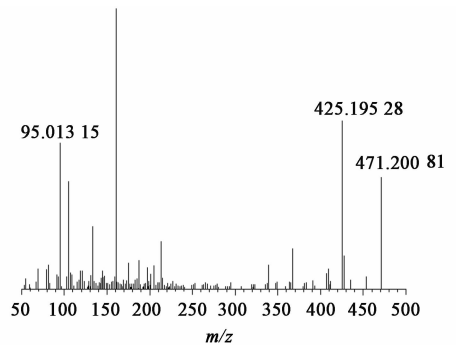


图 6 柠檬苦素二级质谱

Fig. 6 MS<sup>2</sup> spectrum of limonin

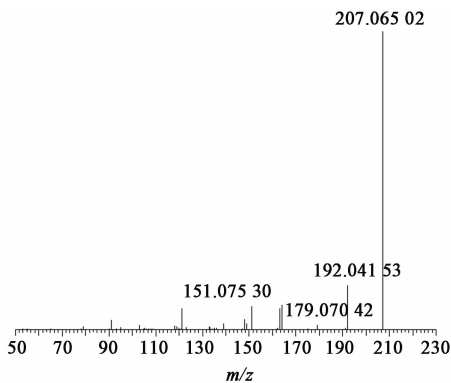


图 4 5,7-二甲氧基香豆素二级质谱

Fig. 4 MS<sup>2</sup> spectrum of 5,7-dimethoxycoumarin

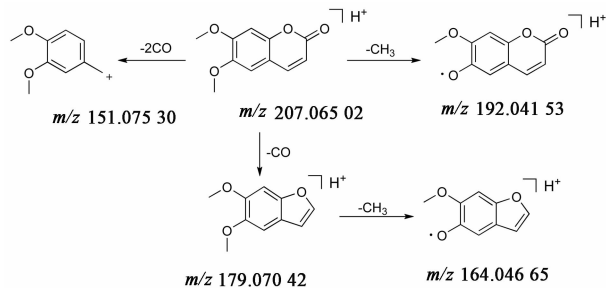


图 5 5,7-二甲氧基香豆素质谱裂解途径

Fig. 5 MS fragmentation pathway of 5,7-dimethoxycoumarin

其分子式为  $C_{26}H_{30}O_8$ 。二级质谱中出现  $m/z$  425.195 28  $[M + H - CH_2O_2]^+$ ,  $m/z$  95.013 15  $[M + H - C_{21}H_{28}O_6]^+$  等碎片离子。经过数据库检索,及与对照品比对,鉴定该化合物为柠檬苦素。相似的,鉴定化合物 45,46 分别为诺米林、黄柏酮。二级质谱见图 6,质谱裂解途径见图 7。

**3.4 核苷及其碱基类化合物的鉴定** 本实验从川佛手中共鉴定了 6 个核苷及其碱基类化合物,其二级质谱裂解特征主要为丢失一分子核糖,碱基主要丢失一分子  $NH_3$ 。例如,化合物 6 的准分子离子为

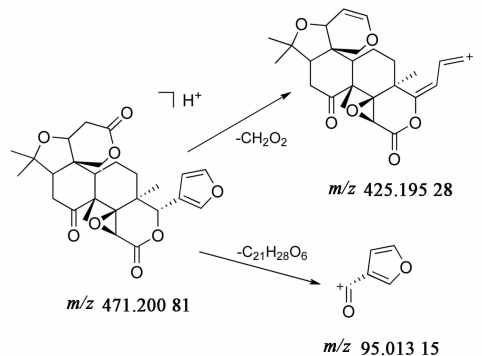


图 7 柠檬苦素质谱裂解途径

Fig. 7 MS fragmentation pathway of limonin

$m/z$  268.104 10  $[M + H]^+$ ,  $C_{10}H_{13}N_5O_4$  为其预测分子式,在二级质谱中,失去一分子呋喃核糖残基形成碎片离子  $m/z$  136.061 81  $[M + H - C_5H_8O_4]^+$ 。经过数据库检索及与对照品比对,鉴定该化合物为腺苷。二级质谱见图 8,质谱裂解途径见图 9。

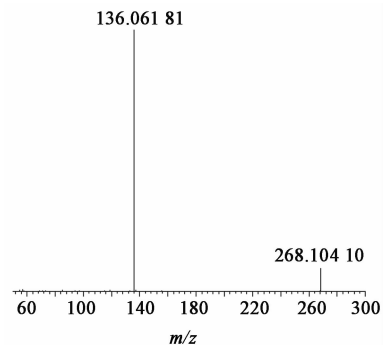


图 8 腺苷二级质谱

Fig. 8 MS<sup>2</sup> spectrum of adenosine

**3.5 有机酸类化合物的鉴定** 本实验从川佛手中共鉴定了 2 个有机酸类化合物,二级质谱中主要丢失  $H_2O$ ,  $HCOOH$ ,  $CO_2$  等中性分子。例如化合物 38 在正离子模式下得到准分子离子  $m/z$  195.065 17  $[M + H]^+$ , 预测其分子式为  $C_{10}H_{10}O_4$ 。二级质谱中

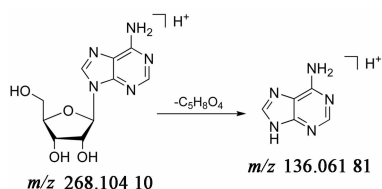


图 9 腺苷质谱裂解途径

Fig. 9 MS fragmentation pathway of adenosine

可见失去一分子  $H_2O$  形成的碎片  $m/z$  177.054 46  $[M + H - H_2O]^+$ , 或依次失去一分子  $CH_3OH$  和一分子  $H_2O$  形成的碎片  $m/z$  163.038 76  $[M + H - CH_3OH]^+$ ,  $m/z$  145.028 27  $[M + H - CH_3OH - H_2O]^+$ , 或依次失去一分子  $HCOOH$  和一分子  $CH_3OH$  形成的碎片  $m/z$  149.059 63  $[M + H - HCOOH]^+$ ,  $m/z$  117.033 63  $[M + H - HCOOH - CH_3OH]^+$ 。经过数据库检索及与文献 [10] 比对, 推断该化合物为阿魏酸。二级质谱见图 10, 质谱裂解途径见图 11。

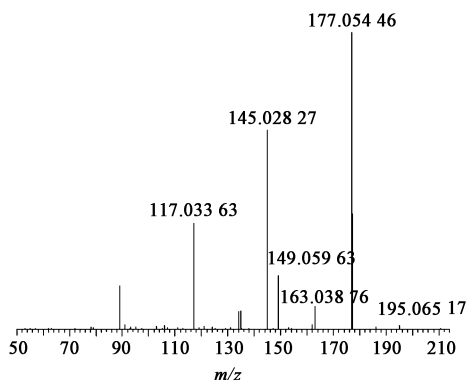


图 10 阿魏酸二级质谱

Fig. 10 MS<sup>2</sup> spectrum of ferulic acid

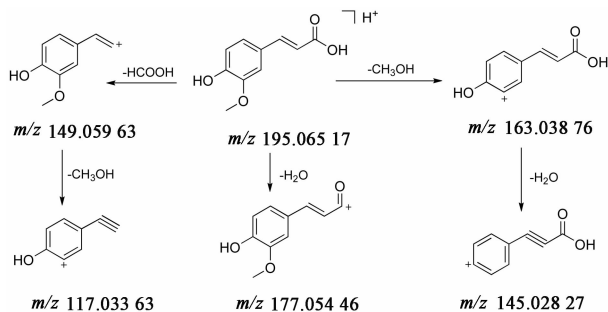


图 11 阿魏酸质谱裂解途径

Fig. 11 MS fragmentation pathway of ferulic acid

**3.6 芳香醛类化合物的鉴定** 本实验从川佛手中共鉴定了 3 个芳香醛类化合物, 二级质谱裂解特征主要为丢失一分子  $CO$ 。例如, 化合物 7 在正离子模式下的准分子离子为  $m/z$  123.044 15  $[M + H]^+$ , 预

测其分子式为  $C_7H_6O_2$ 。在二级质谱中, 丢失一分子  $CO$  得到碎片离子  $m/z$  95.049 53  $[M + H - CO]^+$ 。经过数据库检索, 及与文献 [10] 比对, 推断该化合物为对羟基苯甲醛。二级质谱见图 12, 质谱裂解途径见图 13。

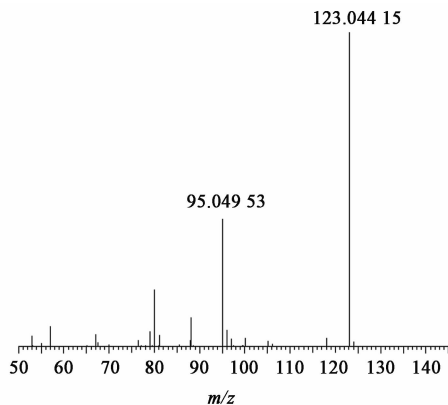


图 12 对羟基苯甲醛二级质谱

Fig. 12 MS<sup>2</sup> spectrum of 4-hydroxybenzaldehyde

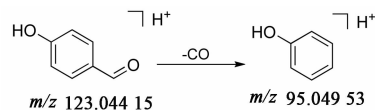


图 13 对羟基苯甲醛质谱裂解途径

Fig. 13 MS fragmentation pathway of 4-hydroxybenzaldehyde

## 4 讨论

实验前期分别采用了正负离子同时扫描、正负离子分开扫描的方法对川佛手中的化合物进行检测, 发现在正离子模式下质谱响应信号更丰富, 因此选用正离子扫描模式。在此基础上根据色谱峰分离情况对色谱条件及样品提取条件进行了优化。

在 2015 年版《中国药典》(一部) 中, 佛手的含量测定指标成分为橙皮苷, 规定不得少于 0.030%; 而来源于佛手同科同属植物的中药陈皮的含量测定指标也为橙皮苷, 其规定不得少于 3.5%。两者相比, 佛手中橙皮苷含量甚微, 且橙皮苷在多数柑橘属植物中都有存在, 仅此单一成分难以有效反映佛手的真实品质。本实验基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对川佛手中的化学成分进行分析, 表征了总离子流图中的主要色谱峰, 共鉴定了 54 个化合物, 其中 17 个通过与对照品比对而准确鉴定, 较为全面地阐明了川佛手的化学物质基础。其中的两大类成分黄酮和香豆素, 具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗动脉粥样硬化、抗糖尿病、抗高血压等药理活性, 可能为川佛手发挥药效的物质基础<sup>[16-17]</sup>。通过对川佛手化学成分的分析, 为进一步阐明其活性成分、优选质量控

制指标提供了理论依据。

本次实验从川佛手中鉴定出的化学成分与文献采用 UPLC-Q-TOF-MS<sup>[18]</sup> 分析广佛手的化学成分有较大不同,多种成分(如牡荆素、柚皮素、秦皮素和 4-甲基伞形酮等)在广佛手中未报道,而广佛手中有较多脂肪酸类成分在川佛手中未检出,这可能与样品检测条件不同有关,因脂肪酸类化合物主要在负离子模式下响应,同时也提示不同产地佛手具有差异性。川佛手的栽培范围广泛,有必要从化学成分方面对不同产地川佛手进行深入研究,为其质量控制提供基础。

[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,2015:178-179.

[2] 张思获,杨海燕,曾俊,等. 佛手的研究进展[J]. 中华中医药杂志,2018,33(8):3510-3514.

[3] 赵永艳,胡瀚文,彭腾,等. 佛手的化学成分药理作用及开发应用研究进展[J]. 时珍国医国药,2018,29(11):2734-2736.

[4] 万德光,彭成,赵军宁. 四川道地中药材志[M]. 成都:四川科学技术出版社,2005:320-327.

[5] 崔广林,李隆云,谭均,等. 不同产地川佛手中 8 种化学成分的分析与评价[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(2):250-260,324.

[6] 贺美莲,郭常川,石峰,等. Orbitrap 高分辨质谱技术在药物分析领域中的应用进展[J]. 药物分析杂志,2019,39(1):105-110.

[7] 张静娴,胡青,于泓,等. HILIC/ESI-Orbitrap HRMS 法结合 Compound Discoverer 软件快速智能化鉴定瓜蒌皮注射液中的化学成分[J]. 药学学报,2018,53(10):1705-1712.

[8] 李欣,唐力英,许静,等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱的中药瓜蒌化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(1):201-210.

[9] CHAN Y Y, HWANG T L, KUO P C, et al. Constituents

of the fruits of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and the effect of 6, 7-dimethoxy-coumarin on superoxide anion formation and elastase release [J]. *Molecules*, 2017,22(9):1454.

[10] 孙燕,冯峰,黄特辉,等. 基于 UPLC-Q-Exactive 技术结合 OTCML 数据库快速分析沙棘的功效成分[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(7):1192-1202.

[11] 罗美霞,吴波,胡坪君,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的砂糖橘皮化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(21):45-51.

[12] 姬瑞芳,全庆华,郭晓宇,等. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 法快速分析鬼箭羽中的化学成分[J]. 质谱学报,2018,39(5):540-551.

[13] 于国华,杨洪军,李俊芳,等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术分析枳实中的化学成分[J]. 中国中药杂志,2016,41(18):3371-3378.

[14] TIAN Y L, SHI R, GAO M, et al. Differentiation of furanocoumarin isomers with ratio of relative abundance of characteristic fragment ions and application in *Angelicae Dahuricae Radix*[J]. *Chromatographia*, 2017, 80(9):1401-1410.

[15] LI C, HUANG C P, LU T L, et al. Tandem mass spectrometric fragmentation behavior of lignans, flavonoids and triterpenoids in *Streblus asper*[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2014,28(21):2363-2370.

[16] KANIKA P, GIREESH K S, DINESK K P. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin [J]. *Chin J Integrative Med*, 2018,24(7):551-560.

[17] SAIRAM K V, GURUPADAYYA B M, CHANDAN R S, et al. A review on chemical profile of coumarins and their therapeutic role in the treatment of cancer [J]. *Current Drug Delivery*, 2016,13(2):186-201.

[18] 钟艳梅,冯毅凡,郭皎. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的广佛手化学成分快速鉴定研究[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(12):1965-1970,2040.

[责任编辑 顾雪竹]