

LC-Q-TOF-MS/MS 分析鉴定枇杷清肺饮物质基准的化学成分

吴丽瑶¹, 潘东玥¹, 陈青檀², 栾连军^{1*} (1. 浙江大学药学院, 杭州 310058; 2. 河北医科大学医学影像学院, 石家庄 050011)

摘要:目的 采用 LC-Q-TOF-MS/MS 分析鉴定枇杷清肺饮物质基准的化学成分。方法 自制枇杷清肺饮物质基准冻干粉, 并用 10% 乙醇提取, 使用 Inertsustain C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈(A)-0.3% 甲酸水溶液(B) 为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 采用电喷雾离子源。结果 通过整合文献资料整理、对照品比对以及数据库查询与自行推断, 最终从枇杷清肺饮物质基准中初步鉴定出 63 个化合物, 包括 16 种生物碱、8 种黄酮类化合物、2 种倍半萜苷、2 种酚酸类与其他 8 类物质。结论 该方法可用于鉴定枇杷清肺饮的化学成分, 能明确化合物的结构与组成, 为后续质量控制提供参考。

关键词: 枇杷清肺饮; 物质基准; 高分辨质谱; 化学组成

中图分类号: R284.1; R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)05-0646-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20213797

引用本文: 吴丽瑶, 潘东玥, 陈青檀, 等. LC-Q-TOF-MS/MS 分析鉴定枇杷清肺饮物质基准的化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(5): 646-653.

Identification of Chemical Compounds in Pipa Qingfei Decoction by LC-Q-TOF-MS/MS

WU Liyao¹, PAN Dongyue¹, CHEN Qingtan², LUAN Lianjun^{1*} (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. College of Medical Imaging, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To identification the chemical compounds in Pipa Qingfei decoction by LC-Q-TOF-MS/MS. **METHODS** Standard freeze-dried powder of Pipa Qingfei decoction was prepared and extracted by 10% ethanol solution. Inertsustain C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) chromatographic column was applied with acetonitrile(A)-0.3% formic acid aqueous solution(B) as mobile phase for gradient elution, flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, and column temperature was 30 °C, with electron spray ionization(ESI). **RESULTS** Through the integration of literature, comparison of reference materials, and database query and inference, 63 compounds, including 16 alkaloids, 8 flavonoids, 2 sesquiterpenoid glycosides, 2 phenolic acids, and 8 other substances, were preliminarily identified from the material baseline of Pipa Qingfei Drink. **CONCLUSION** This method can be used to identify the chemical components of Pipa Qingfei decoction, clarify the structure and composition of the compound, and provide a reference for subsequent quality control.

KEYWORDS: Pipa Qingfei decoction; material reference; high resolution MS; chemical compounds

物质基准是以古代医籍中记载的古代经典名方制备方法为依据制备而得的中药基准物质, 除成型工艺, 其余制备方法应当与古代医籍记载基本一致, 以此为参比, 指导后续的复方制剂研究。物质基准是经典名方复方制剂研究的核心和基础^[1]。

枇杷清肺饮出自清代典籍《医宗金鉴》, 原方记载: 人参三分, 枇杷叶二钱(刷去毛, 蜜炙), 甘草三分(生), 黄连一钱, 桑白皮二钱(鲜者佳), 黄柏一钱。水一盅半, 煎七分, 食远服。因冻干粉可较好地保存, 同时具有水溶性好、成分破坏极少和不易结块的优点, 枇杷清肺饮可制备成冻干粉形式的物质基准进行保存与后续检测。液相色谱质谱联用技术融合了液相色谱的分离能力和质谱的高灵敏度、高分辨率、高专属性特点, 因

此采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱联用技术(UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS), 对枇杷清肺饮物质基准化学成分进行分析鉴定^[2]。目前枇杷清肺饮质量控制的方法尚未对其化学组成进行充分研究, 本实验通过液质联用法鉴定其化学组成, 希望为进一步明确其药效物质基础和建立质量评价体系奠定基础。

1 仪器与试剂

Waters 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)串联 Triple TOF TM 5600+质谱系统(美国应用生物公司), 配备 ESI 离子源。Inertsustain C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); AL204 万分之一电子分析天平、METTER XS105 十万分之一电子分析天平均购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

作者简介: 吴丽瑶, 女, 硕士 E-mail: nyxwwyx@126.com

*通信作者: 栾连军, 男, 硕士, 副教授 E-mail: lljun@zju.edu.cn

枇杷清肺饮物质基准冻干粉(自制); 甲酸(色谱级, 比利时赛默飞世尔科技公司); 乙腈(色谱级, 美国天地有限公司); 水为超纯水。对照品: 盐酸小檗碱(含量: 86.7%; 批号: 110713-201814; 供鉴别及含量测定使用)与甘草酸铵(含量: 97.7%; 批号: 110731-201720; 供鉴别及含量测定使用)由中国食品药品检定研究所提供; 绿原酸(纯度: 98.37%; 批号: MUST-18030620)、甘草苷(纯度: 98.50%; 批号: MUST-16032801)、盐酸药根碱(纯度: 98.62%; 批号: MUST-18072611)、盐酸黄连碱(纯度: 99.58%; 批号: MUST-19052111)与盐酸黄柏碱(纯度: 98.44%; 批号: MUST-18072611)由成都曼斯特生物科技有限公司提供。

实验使用药材购于亳州中药材市场, 经浙江大学徐娟华副教授进行鉴定为枇杷叶[*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.]、桑白皮(*Morus alba* L.)、黄连(*Coptis chinensis* Franch.)、黄柏(*Phellodendron chinense* Schneid.)、甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)。

2 方法

2.1 枇杷清肺饮物质基准冻干粉制备

称取蜜炙枇杷叶饮片 6 g, 桑白皮饮片 4 g, 黄连 3 g, 黄柏 3 g, 甘草 4 g, 人参 1 g 加入煎药壶中, 加入一定量纯净水, 大火加热至沸腾, 煮沸一定时间后趁热过滤药液。取上清液转入旋转蒸发器蒸发浓缩。移出浓缩液, 转入冷冻干燥机中, 冻干, 得枇杷清肺饮物质基准冻干粉样品。

2.2 对照品溶液配制

取盐酸黄连碱、盐酸药根碱、盐酸黄柏碱、盐酸小檗碱、绿原酸、甘草苷、甘草酸铵对照品适量, 溶于甲醇溶液, 即得。

2.3 供试品溶液配制

取枇杷清肺饮物质基准冻干粉(过二号筛)约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 10% 乙醇溶液 25 mL, 称定重量, 超声处理 30 min, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 色谱条件

Inertsustain C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱, 流动相为乙腈(A)-0.3%甲酸(B), 梯度洗脱(0~5 min, 0%→10%A; 5~20 min, 10%→25%A; 20~45 min, 25%→35%A; 45~65 min, 35%→50%A; 65~70 min, 50%→80%A; 70~80 min, 80%A), 柱温为 30 ℃, 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 紫外检测波

长为 270 nm。

2.5 质谱检测条件

分别在 ESI 正、负离子模式下进行, 离子源温度 600 ℃(+)和 550 ℃(-), 气帘气压力 35 psi, 雾化气压力 55 psi(Gas 1: 空气, 55 psi; Gas 2: 空气, 55 psi), 离子喷雾电压+5 500 V 和-4 500 V, 碰撞电压 50 eV 和-10 eV。扫描范围: 一级质谱扫描范围为 *m/z* 100~1 500, 二级质谱扫描范围为 *m/z* 50~1 500。

2.6 数据处理方法

采用 Peakview 软件(AB SCIEX, version 1.2.0.3)处理。

3 结果与分析

3.1 实验图谱

按“2”项下方法检测, 得到正负检测模式下的离子流图, 见图 1。

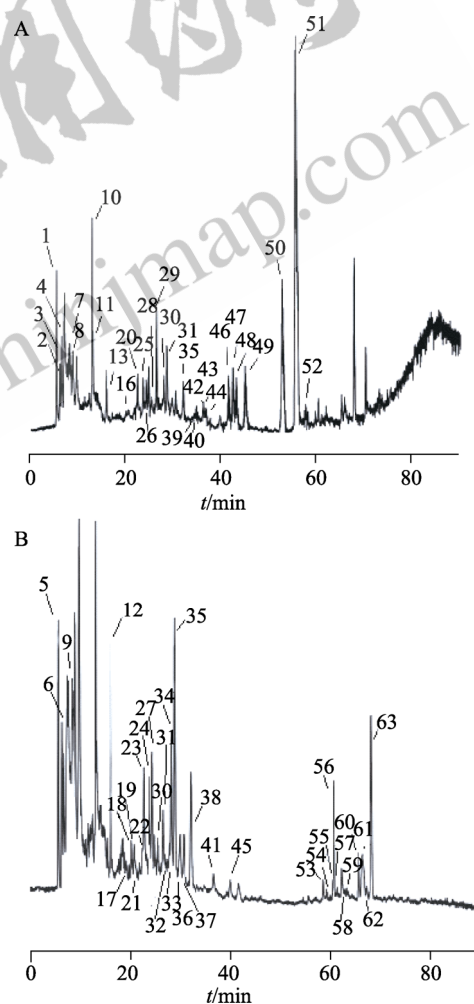


图1 质谱总离子流图

A-正离子模式下供试品溶液; B-负离子模式下供试品溶液。

Fig.1 Total ion current diagram of Pipa Qingfei decoction
A-positive mode; B-negative mode.

3.2 数据分析

枇杷清肺饮化学成分信息见表 1。

3.2.1 生物碱类 枇杷清肺饮物质基准中含有种类丰富的生物碱，黄连与黄柏药材中含有喹啉类

表 1 枇杷清肺饮化学成分信息表^[3-17]

Tab. 1 Compounds information of Pipa Qingfei decoction^[3-17]

峰号	保留时间/min	分子式	分子量/Da	正离子模式			负离子模式			化合物名称
				精准质量数 [M+H] ⁺	碎片离子/ m/z	质量误差/ ppm	精准质量数 [M-H] ⁻	碎片离子/ m/z	质量误差/ ppm	
1	5.49	—	—	—	—	—	—	—	—	未鉴定
2	5.74	—	—	—	—	—	—	—	—	未鉴定
3	6.19	C ₆ H ₁₃ NO ₄	163.173	164.092 1	146.081 6, 110.061 5, 80.052 3, 69.037 5	1.3	—	—	—	1-脱氧野尻霉素
4	6.52	C ₂₀ H ₂₆ N ₆ O ₆	446.463	447.198 0	—	2.6	—	—	—	未鉴定
5	7.14	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.157	—	—	—	179.053 0	119.036 7, 119.026 1, 89.023 1	2.9	葡萄糖
6	8.27	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₉	730.673	—	—	—	729.223 9	452.043 0, 392.024 3	2.1	桑皮苷+葡萄糖
7	8.92	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.168	193.070 6	129.055 5	1.7	191.020 1	173.045 1, 127.049 7, 109.030 0	2.2	奎宁酸
8	9.70	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₉	730.673	543.131 7	381.081 2, 280.998 3	1.9	683.223 2	387.114 1, 341.107 6	-2.6	桑皮苷+葡萄糖
9	9.76	C ₃₄ H ₄₄ O ₂₂	804.709	—	—	—	683.226 8	387.113 0, 341.107 9, 179.055 4	-3.7	桑皮苷+葡萄糖
10	12.93	C ₆ H ₈ O ₇	192.124	193.133 6	119.050 2, 91.057 4	0.0	191.000 1	111.010 0	-1.0	柠檬酸
11	13.12	C ₆ H ₈ O ₇	192.124	193.000 2	—	-0.1	191.000 4	111.009 1, 87.010 2	-1.2	异柠檬酸
12	15.19	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₁	418.397	—	—	—	417.138 3	293.087 9, 233.066 1	-1.1	未鉴定
13	15.96	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₀	360.318	362.145 3	153.055 0	2.3	359.098 9	197.044 0, 179.034 3	3.0	葡萄糖醛酸
14	18.74	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	568.532	—	—	—	359.096 7	197.044 0, 182.019 7, 138.032 3	2.5	未鉴定
15	19.50	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.313	—	—	—	353.054 1	191.054 9, 179.034 1, 135.045 3	-1.3	绿原酸同分异构体
16	20.09	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.313	355.103 2	135.034 6	1.8	353.087 0	191.005 3, 179.033 2, 135.045 4	-2.3	绿原酸同分异构体
17	20.65	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	568.531	—	—	—	567.172 2	405.127 1, 243.065 8, 255.053 7	-4.5	桑皮苷 A
18	21.86	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₆	684.691	—	—	—	683.253 0	521.203 6, 359.149 4, 329.138 8	-2.5	鸦胆子碱 A
19	22.23	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₆	684.691	—	—	—	683.292 3	521.202 8, 359.147 7, 329.137 2	-2.0	鸦胆子碱 A
20	22.70	C ₂₃ H ₂₉ NO ₈	447.485	448.195 8	448.196 8, 286.144 4, 255.102 1	2.5	—	—	—	evoeuropine
21	22.89	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₃	478.450	479.175 2	209.081 6, 185.081 2	-1.9	477.163 0	477.162 8, 293.087 2, 233.066 3	-3.5	phenylpropanine
22	22.95	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.313	355.000 4	163.042 0	-0.6	353.087 1	191.005 1, 173.044 0, 162.838 9, 134.035 6	-1.3	绿原酸同分异构体
23	23.66	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.313	354.095 2	314.176 1, 163.040 0	-1.3	353.0871	191.005 1, 173.045 0, 162.838 8, 134.037 1	-1.8	绿原酸
24	23.92	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.526	595.166 0	—	0.4	593.154 0	503.101 2, 403.191 4, 383.078 0, 353.067 7	-2.4	山柰酚-7-新橙皮糖苷
25	24.31	C ₂₀ H ₂₁ NO ₅	355.391	356.149 1	206.081 2, 191.057 8, 163.063 3	2.1	—	—	—	木兰花碱
26	24.46	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	341.408	343.174 4	193.106 1, 178.081 4	2.1	—	—	—	黄柏碱
27	24.79	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	422.477	—	—	—	421.162 0	385.007 1, 255.090 0	-3.5	桑酮醇 C

续表 1

峰号	保留时间/min	分子式	分子量/Da	正离子模式			负离子模式			化合物名称
				精准质量数 [M+H] ⁺	碎片离子/ <i>m/z</i>	质量误差/ ppm	精准质量数 [M-H] ⁻	碎片离子/ <i>m/z</i>	质量误差/ ppm	
28	26.01	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	564.500	565.156 1	427.103 0, 379.082 1	0.7	563.140 0	473.110 1, 443.097 6, 353.067 4	-2.9	夏佛塔苷
29	26.47	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	341.408	342.171 1	282.084 0, 286.085 5, 237.091 2	3.3	340.154 3	325.131 3, 310.108 3, 252.042 0	2.5	predicentrine
30	26.81	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.240	—	—	—	371.093 4	193.051 1, 177.040 2	-2.1	山柰酚
31	27.77	C ₉ H ₈ O ₄	180.159	—	—	—	179.034 1	179.034 4, 135.044 2	-2.1	咖啡酸
32	28.01	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.340	369.118 0	177.055 1, 145.029 0, 117.035 1	0.8	367.102 2	191.0484, 173.0440, 134.0374, 93.0361	-2.1	绿原酸甲酯或同分异构
33	28.65	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.340	369.119 1	177.055 1, 145.028 9, 117.035 1	3.2	367.100 9	191.054 5, 173.044 2, 134.037 1	-2.2	绿原酸甲酯或同分异构体
34	28.93	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.525	—	—	—	610.147 9	285.0413, 429.0761	—	芦丁
35	29.72	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.340	396.118 2	177.065 0, 145.029 3, 177.034 1	0.8	367.104 2	191.055 6, 173.045 4, 134.033 5, 93.037 1	—	绿原酸甲酯或同分异构体
36	30.53	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	550.515	551.135 1	257.081 2, 137.023 0	-0.6	549.160 7	549.162 3 255.065 2, 162.837 1, 135.008 0	-1.9	甘草苷元-7- <i>O</i> - <i>D</i> -芹糖-4'- <i>O</i> - <i>D</i> -葡萄糖苷
37	31.05	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.400	419.133 2	257.081 2, 239.072 0, 137.025 1	1.3	417.118 2	255.066 0, 135.008 1, 119.050 1	-2.5	异甘草苷
38	32.07	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.400	419.133 2	257.082 0, 137.022 1	1.3	417.119 0	255.068 4, 135.008 0, 119.051 3	-2.3	甘草苷
39	34.43	C ₁₉ H ₁₇ NO ₄	323.348	324.124 2	308.192 1, 280.096 7, 266.082 2, 322.108 1, 307.084 0, 279.089 0, 250.086 1, 222.097 3	0.9	—	—	—	四氢巴马汀
40	34.87	C ₁₉ H ₁₅ NO ₄	321.332	322.107 9	661.505 6, 205.166 4 308.091 9, 294.077 1	2.2	—	—	—	小檗红碱
41	36.30	C ₄₀ H ₇₀ O ₈	678.990	679.512 1	661.505 6, 205.166 4 308.091 9, 294.077 1	-3.0	677.501 3	533.004 0, 451.332 8	2.4	未鉴定
42	36.52	C ₁₉ H ₁₃ NO ₄	319.316	320.092 0	308.091 9, 294.077 1	2.7	—	—	—	德卡林碱
43	36.76	C ₁₉ H ₁₃ NO ₄	319.316	320.092 6	308.092 0, 294.076 8, 290.082 1	3.0	—	—	—	德卡林碱同分异构体
44	37.67	C ₃₆ H ₃₄ O ₁₂	658.658	676.259 0	334.109 2, 319.085 4	1.5	—	—	—	木脂素
45	39.78	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	460.437	—	—	—	845.461 2	799.495 3, 637.438 8, 475.379 0	-0.7	6"- <i>O</i> -乙酰基异甘草素
46	41.50	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	337.375	338.137 3	323.112 0, 295.117 6, 281.101 0	3.3	—	—	—	非洲防己碱
47	42.47	C ₂₀ H ₁₇ NO ₄	335.359	336.124 2	336.123 2, 320.090 9, 292.096 1	3.2	—	—	—	表小檗碱
48	43.24	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	337.375	338.139 1	322.108 0, 294.113 1, 279.089 4, 265.073 1, 234.089 3	2.7	—	—	—	药根碱
49	45.09	C ₁₉ H ₁₃ NO ₄	319.316	320.093 3	322.099 7, 294.140 0	4.0	—	—	—	黄连碱
50	52.91	C ₂₁ H ₂₁ NO ₄	351.402	352.154 1	352.153 7, 336.127 1, 308.128 2, 294.112 0, 279.088 3	3.6	—	—	—	巴马汀

续表 1

峰号	保留时间/min	分子式	分子量/Da	正离子模式			负离子模式			化合物名称
				精准质量数 [M+H] ⁺	碎片离子/ <i>m/z</i>	质量误差/ ppm	精准质量数 [M-H] ⁻	碎片离子/ <i>m/z</i>	质量误差/ ppm	
51	55.63	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	337.375	336.126 6	336.127 3, 321.096 4, 293.100 7, 279.084 4, 276.097 6	-0.1	—	—	—	小檗碱
52	57.79	C ₂₀ H ₁₉ NO ₄	337.375	336.125 4	337.129 1, 321.099 0, 293.102 5	-0.1	—	—	—	小檗碱
53	58.24	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	985.086	809.435 0	647.380 0, 615.392 0, 453.339 4	0.4	821.403 0	351.046 1	1.7	甘草皂苷 A3 或同分异构体
54	59.81	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.943	—	—	—	821.402 6	351.056 2	-2.0	甘草皂苷 A3 或同分异构体
55	60.18	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.943	—	—	—	837.420 3	675.359 9, 529.300 0	-0.9	甘草皂苷 G2 或同分异构体
56	60.48	C ₃₉ H ₆₆ O ₁₈	822.941	—	—	1.0	821.428 1	675.369 1, 529.308 2	-2.0	licorisesaponin A3
57	61.17	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.943	—	—	—	837.419 0	675.361 3, 529.300 9	-0.8	甘草皂苷 G2 或同分异构体
58	62.08	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.943	—	—	—	879.401 2	675.361 2, 529.306 7	-1.9	甘草皂苷 G2 或同分异构体
59	65.32	C ₃₅ H ₆₆ O ₂₂	838.894	839.415 1	685.358 1, 509.325 4, 375.055 3	-0.4	721.381 3	675.368 1, 529.304 3, 383.289 1	-2.2	倍半萜苷 1
60	66.17	C ₃₅ H ₆₆ O ₂₂	838.894	823.382 8	667.351 2, 491.314 1, 379.059 0	-0.8	721.234 0	677.369 0, 531.310 0, 383.230 0	-1.0	倍半萜苷 2
61	66.87	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.943	—	—	—	837.405 6	351.059 1	-0.9	甘草皂苷 G2 或同分异构体
62	67.95	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	822.944	647.381 1	453.337 1, 407.332 3	-3.0	821.403 9	821.404 1, 645.351 0, 193.034 1	-1.2	甘草酸
63	70.81	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	273.459	274.273 8	256.264 0, 88.077 8	4.9	—	—	—	未鉴定

生物碱，多以离子形式存于溶液中。生物碱类的生物活性极强，为枇杷清肺饮中重要的成分。在本次检测中一共检出 16 种生物碱成分，喹啉碱类生物碱占 15 种，结构类似糖类的特殊生物碱 1 种。喹啉类生物碱主要来源于黄连和黄柏，具有相同的喹啉母核，因此裂解规律相似。在负离子模式中生物碱无响应，在正离子模式中，常常能观察到结合了一个 H⁺ 的准分子离子峰 [M+H]⁺ 336.126 6。

以小檗碱为例解释说明喹啉类生物碱的质谱裂解过程。对照品溶液和供试品溶液中小檗碱准分子离子峰在裂解过程中，均出现丢失甲基 [M+H-CH₃]⁺ 的碎片离子的特征，再进一步脱掉与 N 相连的 H，出现 [M+H-CH₄]⁺ *m/z* 321.096 4 的碎片离子。在二级质谱 MS/MS 图谱中，可观察到同时脱去 H 与 CO 离子碎片，得到 [M-CH₄-CO]⁺。裂解途径推测见图 2。

源于桑白皮的结构近似糖类的生物碱 1-脱氧野尻霉素。生物碱类物质在正离子模式下质谱响应较好，在负离子模式下无明显质谱响应。1-脱氧野尻霉素质谱裂解方式类似于糖类。1-脱氧野尻霉素在正离子模式下首先与 H⁺ 结合，形成 [M+H]⁺ 为

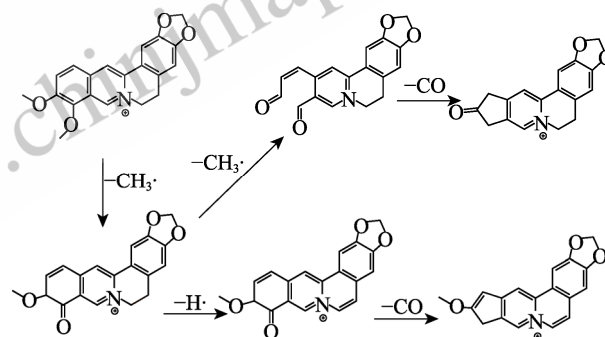


图 2 小檗碱裂解规律

Fig. 2 Secondary cracking process of berberine

164.092 1 的准分子离子峰。其二级质谱的特征离子碎片的 *m/z* 为 146.081 6, 110.061 5, 80.052 3。可观察到 1-脱氧野尻霉素在二级质谱中逐步脱去 H₂O，进一步裂解脱去 CH₂OH 等，直到剩余吡啶母核。其裂解途径推测见图 3。

3.2.2 三萜皂苷类 共检测到 8 个三萜皂苷成分 (化合物 53~59, 化合物 62)，三萜皂苷成分在裂解上与其他苷类存在相似性。甘草酸作为质谱响应较高的三萜皂苷成分 (化合物 62) 在负离子模式下形成准分子离子峰 [M-H]⁻ *m/z* 821.403 9。甘草酸

分子通过重排反应丢失 1 个葡萄糖醛酸残基, 得到碎片 m/z 为 645.353 4; 在二级质谱中检测到二聚葡萄糖醛酸残基碎片 m/z 351.059 2, 和一葡萄糖醛酸基团碎片离子 m/z 193.034 1。其二级裂解规律推测见图 4。

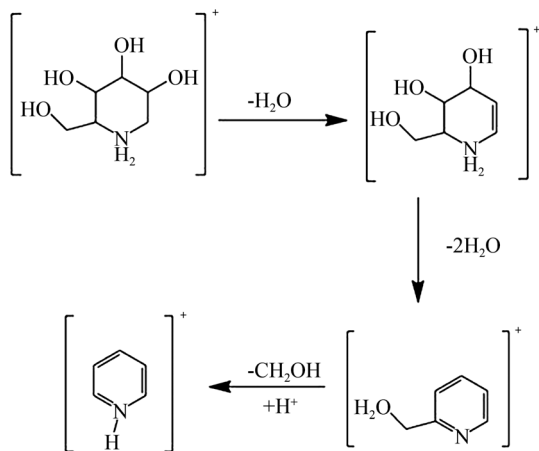


图 3 1-脱氧野尻霉素裂解规律

Fig. 3 Secondary cracking process of 1-deoxynojirimycin

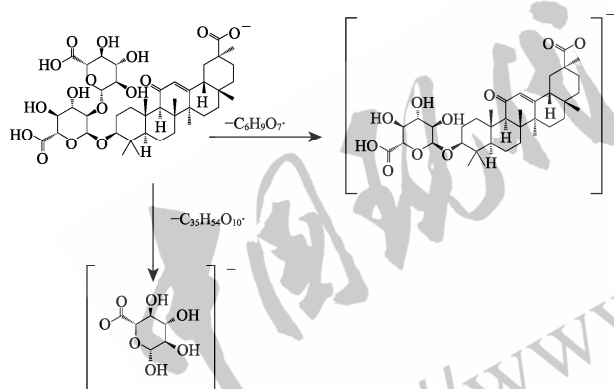


图 4 甘草酸裂解规律

Fig. 4 Secondary cracking process of glycyrrhizic acid

3.2.3 黄酮类 枇杷清肺饮物质基准中的黄酮类成分数量较多, 同样也是该方剂的重要成分, 黄酮类化合物的准分子离子在裂解过程中, 糖链经过重排反应逐个丢失糖残基, 直到留下母核离子碎片。如甘草苷(化合物 38), 通过与对照品溶液保留时间比对确定, 在负离子模式下主要丢失 H 形成了 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, m/z 417.119 0。二级质谱中丢失葡萄糖残基 ($-C_6H_{10}O_5$) 形成了碎片 m/z 255.068 4, 该碎片为甘草苷的母核碎片离子。甘草苷的母核经过 RDA 裂解反应, 进而形成碎片 m/z 135.008 0 和碎片 m/z 119.051 3。 m/z 255 的离子碎片同时作为判断黄酮类成分的特征性碎片。

另外在二级质谱中能够观察到甘草苷形成的不稳定碎片 m/z 91.020 2。推测裂解途径见图 5。

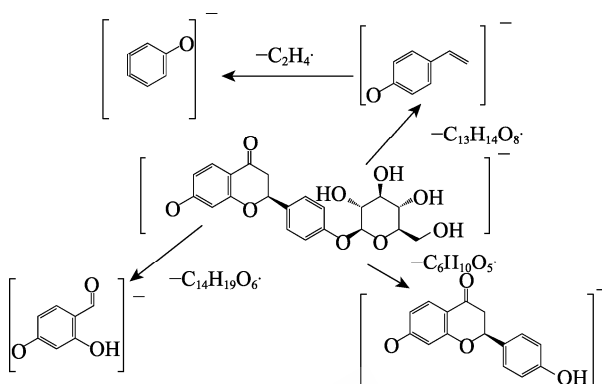


图 5 甘草苷裂解规律

Fig. 5 Secondary cracking process of liquiritin

3.2.4 苯丙酸类 从枇杷清肺饮供试品溶液中分离得到 9 种苯丙酸类化合物, 包括由咖啡酸和绿原酸及其母核衍生的酯类物质。苯丙酸类化合物分子在枇杷清肺饮中较为常见, 苯丙酸类化合物结构中具有特征性的羧基或羰基, 在裂解过程中容易丢失小分子碎片。

根据对照品绿原酸的保留时间 23.6 min, 于枇杷清肺饮图谱相应保留时间下找到质谱信号响应。根据一级及二级质谱图谱的比较, 发现绿原酸对照品的质谱裂解方式与相应保留时间下的二级质谱吻合。因此判定该保留时间下的化合物为绿原酸。

绿原酸衍生化合物(例如绿原酸甲酯)。在负离子模式下能够发现 $[M-H]^-$ m/z 353.087 1 的准分子离子峰。在 MS/MS 二级质谱中, 准分子离子的酯键断裂, 形成 m/z 191.005 1, 173.045 0 等具有绿原酸特征的碎离子峰。 m/z 为 173.045 0 的离子具有咖啡酸结构, 可继续丢失 $-CO_2$ 碎片继而形成 m/z 为 134.037 1 的碎片离子峰。推测裂解途径见图 6。

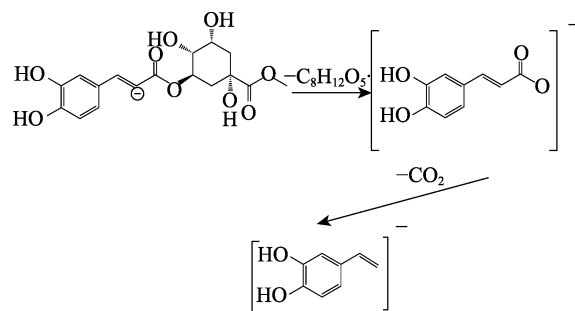


图 6 绿原酸甲酯裂解规律

Fig. 6 Secondary cracking process of methyl chlorogenate

3.2.5 倍半萜苷类 此类成分在相关药材研究中记载较少,对于其质谱裂解规律为笔者的推测。在枇杷清肺饮物质基准中发现的倍半萜苷类成分是由一个倍半萜母核与 3 个芸香糖残基结合形成的氧苷结构。倍半萜苷的裂解方式类似于黄酮苷,以脱去糖残基为主要反应。倍半萜苷的准分子离子通过重排反应逐个脱去糖残基。若糖基链为直线排列,则碎片离子响应强度随质荷比减少而逐渐降低;若糖链具有支链结构,则会出现碎片离子峰的强度比准分子离子峰更强的情况。逐步脱去糖残基的过程可观察到各碎片离子峰的质荷比以约 158 的差值下降。推测裂解途径见图 7。

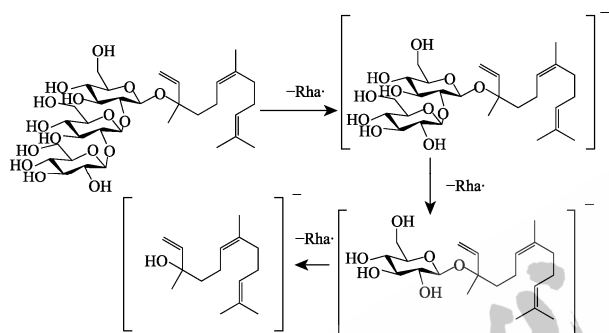


图 7 倍半萜苷 1 裂解规律

Fig. 7 Secondary cracking process of sesquiterpene glycosides 1

3.2.6 二苯乙烯类 二苯乙烯类物质主要来源于桑白皮。以桑皮苷 A 为例推测二苯乙烯类化合物在质谱中主要的裂解方式。桑皮苷 A 在质谱中首先形成 m/z 567.172 2 的母离子,随后形成 m/z 405.127 1 的碎片离子,该碎片离子进行继续裂解,形成 m/z 225.053 7, 243.065 8 的碎片离子。其中 m/z 243 和 225 的碎片离子为二苯乙烯类化合物的特征碎片。因质谱裂解的能量限制,未观察到苯环裂解形成的碎片。推测裂解途径见图 8。

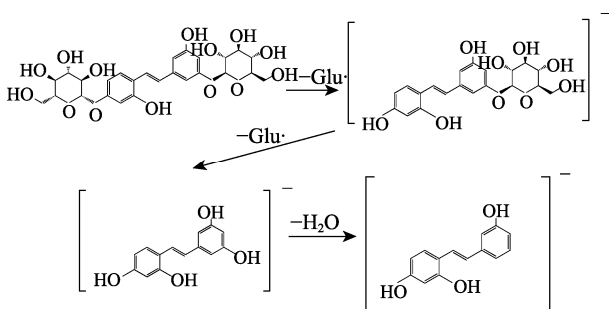


图 8 桑皮苷 A 裂解规律

Fig. 8 Secondary cracking process of mulberroside A

4 总结

通过 LC-Q-TOF-MS/MS 对枇杷清肺饮物质基准的化学组成进行了分析,采用正离子和负离子模式检测,对枇杷清肺饮物质基准冻干粉进行分析鉴定,利用得到的相对保留时间、分子量以及碎片信息对化合物进行鉴别分析。通过与对照品、数据库、文献等信息进行比对,共鉴定了 63 个化合物,包括生物碱类、三萜类、黄酮类、皂苷类、倍半萜类等成分,其中 7 个成分的质谱数据与对照品的质谱数据进行过比对;43 个化合物有文献数据支持;6 个成分通过质谱数据及碎片信息进行推测;7 个成分未能鉴定。LC-Q-TOF-MS/MS 结合了高效液相色谱仪的快速高分离能力,高分辨质谱仪的高分辨率和高灵敏度的特性,是中药复方化学组成分析的有效方法,有效提高了中药化合物鉴定效率。本研究初步明确了枇杷清肺饮中化学成分,对后续研究提供了基础信息和参考依据。

REFERENCES

- [1] DAI Y T, JIN R N, WU Z L, et al. Research strategies for quality standards of famous classical formula based on standard decoction (material reference)[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(2): 164-174.
- [2] WANG S F, ZHU Y X, SHAO Q, et al. Identification of chemical constituents in two traditional Chinese medicine formulae by liquid chromatography-mass spectrometry and off-line nuclear magnetic resonance[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016(117): 255-265.
- [3] JIANG X, HUANG L F, WU L B, et al. UPLC-QTOF/MS analysis of alkaloids in traditional processed *Coptis chinensis* franch[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012(2012): 942384.
- [4] LI E N, LUO J G, KONG L Y. Qualitative and quantitative determination of seven triterpene acids in *Eriobotrya japonica* Lindl. by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and mass spectrometry[J]. Phytochem Anal, 2009, 20(4): 338-343.
- [5] LI Y B, ZHANG T J, ZHANG X L, et al. Chemical fingerprint analysis of *Phellodendri Amurensis* Cortex by ultra performance LC/Q-TOF-MS methods combined with chemometrics[J]. J Sep Sci, 2010, 33(21): 3347-3353.
- [6] WU L B, JIANG X, HUANG L F, et al. Processing technology investigation of loquat (*Eriobotrya japonica*) leaf by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry combined with chemometrics[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64178.
- [7] CUI X, CHEN R, ZHENG P, et al. Characterization of Cortex *Phellodendri* by UPLC-Q-TOF MS^E[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2017, 45(16): 105-107.

- [8] DING J H, FENG Y F, LI W M, et al. Rapid analysis of flavonoids extraction from Mori Cortex by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2017, 23(6): 78-84.
- [9] ZHAO L, CHEN J, YIN M, et al. Analysis of sesquiterpene glycosides from loquat leaves by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2015, 37(7): 1498-1502.
- [10] LIU W, NISAR M F, WAN C P. Characterization of phenolic constituents from *Prunus cerasifera* Ldb leaves[J]. J Chem, 2020, 2020: 5976090.
- [11] JIN J. Studies on chemical components analyze of Huanglian Jiedu decoction and the effect of anti-hyperlipidemia[D]. Changchun: Jilin University, 2008.
- [12] LI L X, QIAO B, LI Y B, et al. Changes of chemical constituents in Phellodendri Chinensis Cortex before and after charring based on RPLC/Q-TOF-MS technology[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43(7): 1314-1319.
- [13] CUI Y Y, ZHOU Y F, MA Y Q, et al. Differences analysis of chemical composition of raw and fried *Glycyrrhiza uralensis* based on UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chin Prev Med(中国药房), 2020, 31(9): 1049-1053.
- [14] ZHAO L, CHEN J, LV H, et al. A new sesquiterpene glycoside from the leaves of *Eriobotrya japonica*[J]. Chem Nat Compd, 2015, 51(6): 1103-1106.
- [15] TAO Y, JIANG Y H, LI W D, et al. Rapid characterization and determination of isoflavones and triterpenoid saponins in Fu-Zhu-Jiang-Tang tablets using UHPLC-Q-TOF/MS and HPLC-UV[J]. Anal Methods, 2016, 8(21): 4211-4219.
- [16] CHEN P D, ZHOU X, DING A W. Constituents in aqueous extract of honey fried licorice by HPLC-MS[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2014, 36(10): 2115-2120.
- [17] LU C Y, LI J S, DI L Q, et al. Determination and multivariate statistical analysis of amino acids, nucleosides and alkaloid in mulberry leaves from different origins[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(9): 1052-1057.
- 收稿日期: 2022-04-15
(本文责编: 曹粤锋)