

HPLC-ESI-Q-TOF-MS 法分析金钱草颗粒的化学成分^Δ

汪 丹^{1,2*}, 蔡 甜³, 吴志军³, 蒋学华^{1#} (1. 四川大学华西药学院, 成都 610041; 2. 成都大学医学院, 成都 610106; 3. 中国科学院成都生物研究所, 成都 610041)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)12-1651-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.12.23

摘 要 目的: 建立分析金钱草颗粒化学成分的方法。方法: 采用高效液相色谱-电喷雾-飞行时间质谱(HPLC-ESI-Q-TOF-MS)法。色谱条件: 色谱柱为 Inertsil ODS-4, 流动相为 0.1% 甲酸-甲醇(梯度洗脱), 流速为 0.8 ml/min, 柱温为 30 ℃, 进样量为 15 μl; 质谱条件: 离子源为电喷雾离子源(负离子模式), 端板偏移电压为 -500 V, 毛细管电泳电压为 3 500 V, 载气为氦气, 雾化和干燥气体为高纯度氮气, 流速为 6 L/min, 压力为 1.0 bar, 干燥气温度为 180 ℃, 扫描范围为 50~1 500 m/z。采用 ChemBioDraw Ultra 13.0 和 Bruker 数据分析软件 4.0 版分析化学成分分子式。结果: 从金钱草颗粒中鉴定出 27 种化学成分, 分别为蔗糖、尿苷、没食子酸、新绿原酸、表没食子儿茶素、原儿茶酸、绿原酸、夏佛塔苷、咖啡酸、异夏佛塔苷、香草酸、阿魏酸、金丝桃苷、迷迭香酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮苷、杨梅素、对羟基苯甲酸、槲皮素、柚皮素、木犀草素、山柰酚、异鼠李素、芹菜素、大黄素。结论: 咖啡酸、迷迭香酸、香草酸、表没食子儿茶素、尿苷、大黄素均为首次从金钱草制剂中被发现并报道。
关键词 金钱草颗粒; 高效液相色谱-电喷雾-飞行时间质谱法; 化学成分

Analysis of the Chemical Compositions in Jinqiancao Granule by HPLC-ESI-Q-TOF-MS
WANG Dan^{1,2}, CAI Tian³, WU Zhijun³, JIANG Xuehua¹ (1. West China School of Pharmacy Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. School of Medicine, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the analysis of chemical compositions in Jinqiancao granule. METHODS: HPLC-ESI-Q-TOF-MS was adopted. The chromatographic conditions: the column was Inertsil ODS-4 with mobile phase of 0.1% formic acid- methanol (gradient elution) at a flow rate of 0.8 ml/min, column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 15 μl. MS conditions: ion source was ESI (negative ion mode), endplate offset voltage was -500 V, capillary electrophoresis was 3 500 V, carrier gas was helium gas, atomization and drying gas was high purity nitrogen gas at a flow rate of 6 L/min and a pressure of 1.0 bar, drying air temperature was 180 ℃. Scanning range was 50-1 500 m/z. ChemBioDraw Ultra13.0 and Bruker data analysis software 4.0 were used to analyze the chemical composition molecular formula. RESULTS: A total of 27 kinds of chemical components were identified in Jinqiancao granule, involving sucrose, uridine, gallic acid, new chlorogenic acid, (-)-epigallocatechin, protocatechuic acid, chlorogenic acid, schaftoside, caffeic acid, schaftoside, vanillic acid, ferulic acid, hyperin, rosmarinic acid, rutin, isoquercitrin, astragaloside, quercetin-3-rhamnoside, myricetin, 4-hydroxybenzoic acid, quercetin, naringenin, luteolin, kaempferol, isorhamnetin, apigenin and emodin. CONCLUSIONS: Caffeic acid, rosmarinic acid, vanillic acid, (-)-epigallocatechin, uridine and emodin are firstly found and reported in the chemical compositions in Jinqiancao granule.
KEYWORDS Jinqiancao granule; HPLC-ESI-Q-TOF-MS; Chemical compositions

金钱草颗粒是以报春花科珍珠菜属植物过路黄 *Lysimachia christinae* Hance 的干燥全草(金钱草)为原料制成的单方制剂, 临床用于治疗尿路感染、排出胆囊和泌尿系统结石, 也可用于痈肿疔疮、毒蛇咬伤等症。

对金钱草药材的化学成分研究发现, 其主要含酚酸类、黄

酮类、脂肪酸类等成分^[1-4]。传统的天然产物先分离纯化后再利用波谱技术鉴定其结构^[1]的分析模式烦琐, 存在重复分离已知成分和获得新成分纯品困难等问题。而仅使用高效液相色谱(HPLC)法来进行成分分析, 若要求组分分离度良好则耗时长, 且存在无法检测到无紫外吸收组分的问题。液相-三重四

(3): 409.
[15] Grouzi E. Update on argatroban for the prophylaxis and
Δ 基金项目: 国家自然科学基金青年项目(No.21305137)
* 实验师, 硕士研究生。研究方向: 临床药学、药质谱分析。
E-mail: wangdan@cdu.edu.cn
通信作者: 教授, 博士生导师。研究方向: 临床药学、药剂学、药事管理。电话: 028-85503024。E-mail: jxh1013@vip.163.com

treatment of heparin-induced thrombocytopenia type II [J].
J Blood Med, 2014, 13(5): 131.
[16] Hursting MJ, Murray PT. Argatroban anticoagulation in renal dysfunction: a literature analysis [J]. *Nephron Clin Pract*, 2008, 109(2): c80.
(收稿日期: 2015-05-23 修回日期: 2016-01-06)
(编辑: 刘 柳)

级杆质谱联用(LC-ESI-QQQ-MS)分析更适合测定混合物中已知成分的含量,不适合鉴别未知化合物的结构^[2]。中药提取物的成分复杂,仍有大量不易分离的未知成分未被报道。对于金钱草中未知化合物的分析,虽有研究者通过气相色谱-质谱(GC-MS)法检测并推断了金钱草挥发油中所含化学成分^[3-4],但这些挥发油成分不适合作为金钱草颗粒的指标成分。而2015年版《中国药典》和相关文献中均无金钱草颗粒的完善的质量标准或指纹图谱。故本研究采用HPLC-电喷雾-飞行时间质谱(ESI-Q-TOF-MS)法对4家企业的10批次金钱草颗粒的化学成分进行了分析,并鉴定了部分共有活性成分的结构,希望为金钱草颗粒的指纹图谱建立和其质量控制方法完善提供试验数据。

1 材料

1.1 仪器

1100型HPLC仪(美国Agilent公司);Q-TOF型质谱仪(德国Bruker公司);UW8200S型万分之一电子天平(日本Shimadzu公司);超纯水机(美国艾科浦公司);KQ5200B型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);TGL-16B型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

金钱草颗粒[重庆科瑞制药(集团)有限公司,批号:744567、744572、774621(分别简称为KR1、KR2、KR3);重庆和平制药有限公司,批号:140882、140524、140815(分别简称为HP1、HP2、HP3);成都迪康药业有限公司,批号:140502、140709、140720(分别简称为DK1、DK2、DK3);重庆东方药业股份有限公司,批号:140704(简称为DF),规格均为10 g/小袋];绿原酸对照品(批号:140322)、阿魏酸对照品(批号:130528)、咖啡酸对照品(批号:130425)、没食子酸对照品(批号:130718)、香草酸对照品(批号:130312)、表没食子儿茶素对照品(批号:130621)、荭草素对照品(批号:130829)、槲皮苷对照品(批号:130508)、槲皮素对照品(批号:130809)、山柰酚对照品(批号:141204)、芦丁对照品(批号:140225)、异鼠李素对照品(批号:151127)、大黄素对照品(批号:150707)均购自四川省维克奇生物科技有限公司(纯度均>98%);芹菜素对照品(批号:140731-1)、尿苷对照品(批号:150730)、迷迭香酸对照品(批号:150420)、对羟基苯甲酸对照品(批号:140801)、大黄素对照品(批号:150730)、原儿茶酸(批号:140531)均购自成都瑞芬思生物科技有限公司(纯度均>98%);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Inertsil ODS-4(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.1%甲酸(A)-甲醇(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.8 ml/min;柱温:30 ℃;进样量:15 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间,min	A,%	B,%
0~2	90	10
2~5	90→50	10→50
5~15	50→5	50→95
15~25	5→0	95→100
25~28	0→90	100→10
28~35	90	10

2.1.2 质谱条件 离子源:电子轰击离子源(ESI),负离子模式;端板偏移电压:−500 V,毛细管电泳电压:3 500 V;载气:氦气;雾化和干燥气体:高纯度氮气;流速:6 L/min;压力:1.0 bar;干燥气温度:180 ℃。扫描范围:50~1 500 m/z。质谱数据采用Bruker数据分析软件4.0处理。选择12 eV作为MS²的主要碰撞能,对于黄酮类化合物中的杨梅素、木犀草素、山柰酚、异鼠李素、芹菜素、大黄素碰撞能设为20 eV。对于响应峰强较低、不满足MS²试验的化合物,改用混合供试品溶液B作补充MS²试验。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量,分别置于5 ml量瓶中,加甲醇约4 ml,超声(功率:160 W,频率:40 kHz,下同)处理20 min,加甲醇定容,制成质量浓度为1 mg/ml的单一对照品溶液,−20 ℃贮藏,备用。

2.2.2 单一供试品溶液 将样品研磨粉碎后,每次取粉末2.500 0 g,精密称定,置于25 ml量瓶中,加甲醇定容,盖上瓶盖,用封口胶封口,浸泡2 h,于50 ℃水浴中超声处理15 min,放冷,静置4 h,除掉多糖和蛋白质沉淀,吸取上清液,以半径为9 cm、14 000 r/min离心5 min,取上清液,备用。

2.2.3 混合供试品溶液 (1)溶液A[质量控制(QC)样品]:分别取10批次样品粉末各0.250 0 g,精密称定,置于同一25 ml量瓶中,其余操作同“2.2.2”项下方法,制成溶液A。(2)溶液B(高质量浓度,作补充MS²试验):随机取4家企业各1个批次样品粉末1.000 0 g,精密称定,置于同一10 ml量瓶中,其余操作同“2.2.2”项下方法,制成溶液B。

2.2.4 空白对照溶液 不加药物,其余操作同“2.2.2”项下方法,制成空白对照溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积和相对保留时间。结果,各待测成分峰面积的RSD均<0.000 297%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 取“2.2.3”项下溶液A适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时进样测定,记录峰面积和相对保留时间。结果,各待测成分峰面积的RSD均<0.005 36%(n=6),表明供试品溶液在24 h内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一批样品(KR1)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积和相对保留时间。结果,各待测成分峰面积的RSD均<0.000 527%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.4 金钱草颗粒可能的化学成分数据库建立

根据国内外专业数据库(PubMed、ChemSpider、中国知网、Google学术)和相关研究文献^[1-8],汇总金钱草及其同属植物所含化学成分目前已报道的超过200种,使用ChemBioDraw Ultra 13.0和Bruker数据分析软件4.0版根据其分子式,计算各成分的精确质量数(Mr)及其各准分子离子峰[M−H][−]、[M−H+CH₃COOH][−]、[M+Cl][−]、[M+H]⁺、[M+Na]⁺的精确质量数。建立金钱草颗粒化学成分(JGC)数据库。

2.5 指纹图谱的建立及共有峰的确认

取10批次样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品,再按“2.1”项下试验条件进样测定,得叠加色谱^[9-10],详见图1。根据Bruker数据分析4.0版软件对10批次样品色谱图进行分析,得到31种化学成分的共有峰色谱,详见图2。

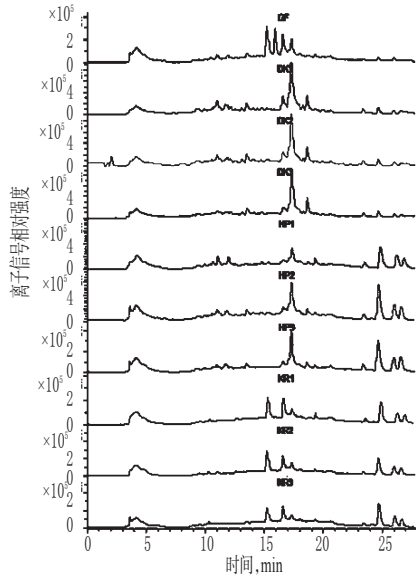


图1 10批次金钱草颗粒的叠加色谱图

Fig 1 Overlapping chromatograms of 10 batches of Jinqiancao granule

2.6 成分筛查及鉴定

表2 金钱草颗粒中化学成分1~24的MS结果

Tab 2 MS information of compound No. 1-24 in Jinqiancao granule

序号	保留时间,min	化学成分	分子式	[M-H] ⁻ 计算值,m/z	[M-H] ⁻ 实测值,m/z	误差,ppm	碎片离子
1	3.8	蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂	341.108 9	341.108 1	2.6	179[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁻
2	6.4	尿苷 ^[9]	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₆	243.062 3	243.063 0	3	110[M-H-C ₄ H ₈ NO ₄] ⁻
3	8.9	没食子酸 ^[9]	C ₇ H ₆ O ₅	169.014 2	169.014 4	0.9	125[M-H-CO ₂] ⁻
4	9.6	新绿原酸 ^[7,11,12]	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 8	353.088 5	1.9	135[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 179[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 191[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
5	9.8	表没食子儿茶素 ^[12]	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305.066 7	305.067 4	2.4	125[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 165[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 179[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
6	10.1	原儿茶酸 ^[2]	C ₇ H ₆ O ₄	153.019 3	153.019 8	3.1	108[M-H-CHO ₂] ⁻ , 109[M-H-CO ₂] ⁻
7	10.3	绿原酸 ^[2,7,11,13]	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.087 8	353.087 3	1.3	135[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 173[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 179[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 191[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
8	11.3	咖啡酸 ^[2,6-7,11,13]	C ₈ H ₆ O ₄	179.035 8	179.035 8	4.7	135[M-H-CO ₂] ⁻
9	11.5	香草酸 ^[9]	C ₈ H ₆ O ₄	167.035 8	167.035 6	3.9	91[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 108[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 123[M-H-CO ₂] ⁻ , 152[M-H-CH ₃] ⁻
10	12.7	阿魏酸 ^[2]	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.050 6	193.051 2	2.7	134[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 149[M-H-CO ₂] ⁻ , 178[M-H-CH ₃] ⁻
11	12.7	金丝桃苷 ^[11]	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	463.088 2	463.087 6	1.3	300[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 301[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
12	12.8	迷迭香酸 ^[7]	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.077 2	359.078 4	3.3	161[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 179[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 197[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
13	12.9	异槲皮苷 ^[11]	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	463.088 0	463.088 3	1.3	300[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 301[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
14	13.7	紫云英苷 ^[11]	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	447.093 3	447.091 9	3	284[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 285[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
15	13.75	槲皮苷 ^[11]	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	447.093 3	447.091 9	3	300[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 301[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
16	13.8	杨梅素 ^[5,12]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	317.030 3	317.031 6	4	151[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 179[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
17	14.7	对羟基苯甲酸 ^[5,11]	C ₇ H ₆ O ₃	137.024 4	137.024 4	0.1	93[M-H-CO ₂] ⁻
18	15.3	槲皮素 ^[1,2,5]	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.035 4	301.035 1	1	151[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
19	15.4	柚皮素 ^[2]	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.061 2	271.061 5	1	151[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 177[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
20	15.8	木犀草素 ^[2,13]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.040 5	285.041 4	3.2	133[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 151[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 175[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 199[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻
21	16.5	山奈酚 ^[2,11]	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.040 5	285.040 5	0	169[M-H-C ₆ O ₃] ⁻ , 185[M-H-C ₆ O ₃] ⁻ , 229[M-H-C ₆ O ₃] ⁻
22	16.7	异鼠李素 ^[1,13]	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	315.051 0	315.051 9	2.7	151[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 300[M-H-CH ₃] ⁻
23	16.9	芹菜素 ^[2,11]	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 5	269.046 7	4.3	117[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 149[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₃] ⁻ , 225[M-H-CO ₂] ⁻
24	21.2	大黄素 ^[14]	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.045 5	269.043 3	4.8	181[M-H-C ₆ O ₃] ⁻ , 225[M-H-CO ₂] ⁻ , 241[M-H-CO] ⁻

化学成分28~31在紫外波段内无吸收,HPLC无法检测到。在不断增大碰撞能的试验中,直至母离子消失,在ESI源条件下也未得到MS²的碎片(详见表4)。依据其裂解特性推

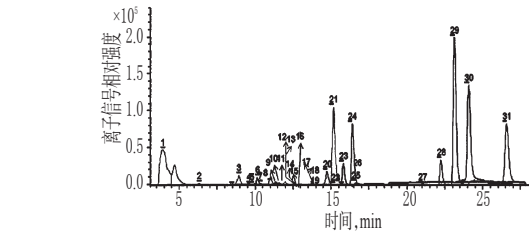


图2 10批次金钱草颗粒共有峰色谱图

Fig 2 Chromatograms of the common peaks of 10 batches of Jinqiancao granule

依据JGC数据库,对JGC供试品溶液中采集到的共有物质峰数据进行成分筛查,初步推测出31种化学成分,其精确分子量准确(误差度均<5 ppm),准确度良好。鉴定原则参考欧盟2013年发布的对农药残留鉴定的指导原则(国内无相关明确的未知物鉴定指导原则),采用的质谱证据等级为一级或二级,准确度得分≥4分,可信度高。

在负离子模式下,先通过精确分子量、氮规则、不饱和度等确定共有峰的分子式,再通过与对照品或文献对比保留时间、MS²的碎片、中性丢失,准确鉴定出24种化学成分,其相关数据及鉴定依据见表2。其中的化学成分1蔗糖可能由辅料中引入,不作为制剂的活性成分。

受限于化学成分25~27本身的质量浓度在负离子模式下MS²的碎片峰较弱,不易辨识,增加测定化合物25~27在正离子模式下的MS²的碎片,最终鉴定其为夏佛塔苷、异夏佛塔苷、芦丁,详见表3。

断为长链化合物,结合其分子式、同位素计算值(mSigma)和文献报道,推测可能为亚麻酸、亚油酸、棕榈酸(十六酸)和硬脂酸,其推测还有待进一步考证。

表3 金钱草颗粒中化学成分25~27的MS结果
Tab 3 MS information of compound No. 25-27 in Jinqiancao granule

序号	保留时间,min	化学成分	分子式	[M-H] ⁻ /[M+H] ⁺ 计算值,m/z	[M-H] ⁻ /[M+H] ⁺ 实测值,m/z	误差,ppm	碎片离子
25	11.1	夏佛塔苷 ^[9]	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	563.140 6/565.155 2	563.138 6/565.153 2	3.6/3.4	547[M+H-H ₂ O] ⁺ ,529[M+H-2H ₂ O] ⁺ ,511[M+H-3H ₂ O] ⁺ ,427[M+H-C ₆ H ₅ O ₂] ⁺
26	11.7	异夏佛塔苷 ^[9]	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	563.140 6/565.155 2	563.141 4/565.157 2	1.3/-3.5	547[M+H-H ₂ O] ⁺ ,529[M+H-2H ₂ O] ⁺ ,511[M+H-3H ₂ O] ⁺
27	12.7	芦丁 ^[11-13]	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 6/611.160 7	609.147 7/611.197 6	2.7/0.9	[M+H-C ₆ H ₅ O ₂] ⁺

表4 金钱草颗粒中化学成分28~31的MS结果
Tab 4 MS information of compound No. 28-31 in Jinqiancao granule

序号	保留时间,min	化学成分	分子式	[M-H] ⁻ 计算值,m/z	[M-H] ⁻ 实测值,m/z	误差,ppm	mSigma
28	22.2	亚麻酸 ^[9]	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	277.217 3	277.218 0	2.3	12.82
29	23.1	亚油酸 ^[9]	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	279.233 0	279.233 3	1.2	28.1
30	24.0	棕榈酸(十六酸) ^[9]	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255.233 0	255.233 3	1.3	28.4
31	26.5	硬脂酸 ^[9]	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	283.264 3	283.264 8	1.8	35.51

在鉴定出的化学成分中,咖啡酸、迷迭香酸、香草酸、表没食子儿茶素、尿苷、大黄素6个共有的活性成分属于首次在金钱草制剂中被发现。

3 讨论

3.1 易误判的两组同分异构体的鉴别

化学成分4、7其分子式均为C₁₆H₁₈O₉。其碎片峰相似,为同分异构体,经与绿原酸对照品对比后鉴定化学成分7为绿原酸,依据文献报道结合保留时间,绿原酸异构体出峰先后顺序,鉴定化学成分4为新绿原酸。

化学成分14、15的分子式为C₂₁H₂₀O₁₁,据金钱草的化学成分报道,可能为荭草素、异荭草素、槲皮苷、紫云英苷(黄芪苷)。而试验中在保留时间13.7 min处先得到以m/z 284、m/z 285为主的碎片,后又同时得到了m/z 284、m/z 285、m/z 300、m/z 301的碎片,且m/z 300和m/z 301碎片的丰度有所增加。在相同的碰撞能条件下,单一物质的碎片的丰度比值是较稳定的,这说明保留时间在13.7 min附近的m/z 447.09的峰内应该混有两种物质。进一步用槲皮苷对照品进行对比,槲皮苷的保留时间为13.75 min,碎片为m/z 300和m/z 301,而文献[14]表明在反相柱和流动相醇含量陆续增加的条件下,紫云英苷(碎片m/z 284、m/z 285)比槲皮苷(碎片m/z 300、m/z 301)先出峰,所以开始看到的m/z 284、m/z 285的峰是紫云英苷的碎片,之后由于两种物质未完全分开,MS⁺同时出现了4种碎片。故鉴定化学成分14、15分别为紫云英苷(黄芪苷)、槲皮苷^[15]。

3.2 微生物污染会影响仪器灵敏度

试验发现,水相的流动相贮备瓶滤头易滋生微生物,微生物本身不带电,在试验中,微生物若不断吸附在检测器上,会降低仪器灵敏度,导致峰强降低,虽仪器处于待机状态休整后灵敏度可恢复,但却不利于连续进样测定。故使用完后,需将水相瓶中液体换成有机相,并冲洗管路,抑制微生物生长。

3.3 HPLC-ESI-Q-TOF-MS法建立中药指纹图谱的注意事项

液-质联用在检测到母离子的同时也常会检测到其碎片离子,此现象在文中提到的酚酸类化合物中常见,故需在排除碎片峰、空白背景峰并确定母离子峰后,才能建立真实、可靠的中药指纹图谱。

综上所述,本试验运用HPLC-ESI-Q-TOF-MS法,从金钱草颗粒中鉴别了27种化学成分并推测出4种无紫外吸收的长链羧酸结构,其中咖啡酸、迷迭香酸、香草酸、表没食子儿茶素、尿苷、大黄素6个成分属于首次在金钱草制剂中被发现并报道。此法具有预处理简单、高通量、快速、比HPLC法和QQQ-MS法定性更准确等优点,极大地丰富了金钱草中活性

成分和指纹图谱指标选择的范围,为金钱草制剂指纹图谱的建立奠定了化学物质基础。

参考文献

[1] 杨念云,段金廛,李萍,等.金钱草中黄酮类化合物的分离与结构鉴定[J].中国药学杂志,2006,41(21):1 621.

[2] Sun D, Dong L, Guo P, *et al.* Simultaneous detection of flavonoids and phenolic acids in *Herba lysimachiae* and *Herba desmodii styracifolii* using liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Food Chem*,2013,138(1): 139.

[3] 侯冬岩,回瑞华,李铁纯,等.金钱草化学成分的分析(I)[J].鞍山师范学院学报,2004,6(2):36.

[4] 刘瑞来,刘俊勋,林志奎,等.不同方法提取的金钱草挥发油化学成分的GC-MS分析[J].安徽农业科学,2012,40(12):7 036.

[5] 高飞飞,赵德,邓君.珍珠菜属植物的化学成分和药理作用研究进展[J].中国现代应用药学,2011,28(10):907.

[6] 金丽鑫.金钱草对照药材标定技术标准的研究[D].成都:成都中医药大学,2012.

[7] 黄天赐,聂晶,张立群.连钱草中黄酮,有机酸类成分的HPLC 指纹图谱[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(1): 132.

[8] 朱求方,王永毅,瞿海斌.连钱草的化学成分研究[J].中草药,2013,44(4):387.

[9] 宋洁瑾,陈涛,李进.丹芪偏瘫胶囊挥发性成分的GC-MS 指纹图谱研究[J].中国药房,2015,26(33):4 716.

[10] 倪亮,马越鸣,徐宏喜.藤黄属化合物及其代谢物检测方法研究进展[J].中国新药与临床杂志,2015,34(10): 733.

[11] 许文,傅志勤,林婧,等.HPLC-Q-TOF-MS和UPLC-QqQ-MS的三叶青主要成分定性定量研究[J].中国中药杂志,2014,39(22):4 365.

[12] 薛彩福,郭建明,钱大玮,等.黄葵醇提取物中黄酮类成分在体肠吸收研究[J].药学报,2011,46(4):454.

[13] 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.

[14] 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:自然科学版,2007,28(4): 403.

[15] Huang M, Xu S, Xu W, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Jin-Mu-Gan-Mao tablet by high-performance liquid chromatography with diode-array detection and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*,2014(37):3 497.

(收稿日期:2015-12-31 修回日期:2016-02-17)
(编辑:张 静)