

冯了性风湿跌打药酒的化学成分鉴定[△]

刘小妹^{1*}, 杨媛媛², 胡静¹, 任慧¹, 崔小敏¹, 陶宏迅³, 陈志永^{1#} (1. 陕西省中医药研究院, 西安 710003; 2. 西安市食品药品检验所, 西安 710054; 3. 澳门大学中华医药研究院, 澳门 999078)

中图分类号 R284.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)20-2473-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.20.08

摘要 目的: 鉴定冯了性风湿跌打药酒的化学成分。方法: 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术(UPLC-Q-Exactive-MS)。色谱柱为 Thermo Accucore aQ RP₁₈, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-甲醇(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30 °C, 进样量为 2 μL。离子源为加热电喷雾离子源; 离子模式为正、负离子模式; 鞘气、辅助气为氮气; 正离子模式的喷雾电压为 3.5 kV, 毛细管加热温度为 350 °C, 鞘气压力为 35 psi, 辅气压力为 15 arb, 离子源加热温度为 320 °C; 负离子模式的喷雾电压为 3.2 kV, 毛细管加热温度为 350 °C, 鞘气压力为 35 psi, 辅气压力为 15 arb, 离子源加热温度为 300 °C。质量轴校准为外标法(质量误差小于 5 ppm), 一级质谱扫描范围为 m/z 80.0~1 200.0(分辨率为 70 000), 二级质谱扫描范围为 m/z 80.0~1 200.0(分辨率为 17 500), 碰撞电压为 20、40、60 eV。检索中国知网、维普、PubMed 等数据库, 收集冯了性风湿跌打药酒中各味中药材的化学成分信息, 建立化学成分数据库; 结合上述成分数据库、相关文献以及对照品的保留时间和质谱裂解规律对化合物结构进行鉴定。结果与结论: 从冯了性风湿跌打药酒中共鉴定出 59 种化合物, 包括 12 种黄酮类(如圣草枸橼苷、橙皮苷)、8 种生物碱(如包公藤丙素或凹脉丁公藤碱、麻黄碱、伪麻黄碱)、9 种有机酸类(如绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸)、7 种香豆素类(如花椒毒酚)、4 种酯类、4 种氨基酸类和 15 种其他类(如挥发油、萜类、酰胺类等)。UPLC-Q-Exactive-MS 技术可快速、准确地鉴别冯了性风湿跌打药酒中的化学成分。

关键词 冯了性风湿跌打药酒; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术; 化学成分; 鉴定

Identification of Chemical Constituents in Fengliaoqing Fengshi Dieda Wine

LIU Xiaomei¹, YANG Yuanyuan², HU Jing¹, REN Hui¹, CUI Xiaomin¹, TAO Hongxun³, CHEN Zhiyong¹ (1. Shaanxi Academy of TCM, Xi'an 710003, China; 2. Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710054, China; 3. Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macau 999078, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To identify the chemical constituents of Fengliaoqing fengshi dieda wine. **METHODS:** An ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbital trap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive-MS) technique was used for identifying chemical constituents of Fengliaoqing fengshi dieda wine. The determination was performed on Thermo Accucore aQ RP₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-methanol (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 30 °C, and the sample size was 2 μL. HESI source was adopted, ion mode was positive and negative ion mode, nitrogen as sheath gas and auxiliary gas. The positive ion mode had spray voltage of 3.5 kV, capillary heating temperature of 350 °C, sheath gas pressure of 35 psi, auxiliary gas pressure of 15 arb, and ion source heating temperature of 320 °C. The negative ion mode had spray voltage of 3.2 kV, capillary heating temperature of 350 °C, sheath gas pressure of 35 psi, auxiliary gas pressure of 15 arb, and ion source heating temperature of 300 °C. The mass axis was calibrated by external standard method (mass error less than 5 ppm). The scanning range of the first mass spectrometry was m/z 80.0-1 200.0 (the resolution was 70 000), the scanning range of secondary mass spectrometry was m/z 80.0-1 200.0 (the resolution was 17 500), and the collision voltage was 20, 40, 60 eV. Retrieved from CNKI, VIP, PubMed and other database, the chemical constituents information of each Chinese traditional medicine in Fengliaoqing fengshi dieda wine were collected to establish chemical constituents database. The structure of the compounds was identified on the basis of above constituents database, the relevant literature, retention time of reference substance and MS fragmentation regularity. **RESULTS & CONCLUSIONS:** Fifty-nine compounds were identified in Fengliaoqing fengshi dieda wine, including 12 flavones (e.g. neoeriocitrin, hesperidin), 8 alkaloids (e.g. baogongteng C or erycibellin, ephedrine, pseudoephedrine), 9 organic acids (e.g. chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, neochlorogenic acid), 7 coumarins (e.g. xanthoxol), 4 esters, 4 amino acids, and 15 other categories (including volatile oils, terpenes, amides). UPLC-Q-Exactive-MS technology can quickly and accurately identify the chemical constituents in Fengliaoqing fengshi dieda wine.

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81973419, No.816-03264); 陕西省创新能力支撑计划项目(No.2018KJXX-073); 陕西省重点研发计划项目(No.2019SF-302); 西安市科技计划项目[No.20180-5103YX11SF37(17)]

* 药师, 硕士。研究方向: 中药质量控制与活性成分。电话: 029-85395696。E-mail: 1461022484@qq.com

通信作者: 副研究员, 博士。研究方向: 中药质量控制与活性成分。电话: 029-85395696。E-mail: 18829014325@163.com

cryptochlorogenic acid, neochlorogenic acid), 7 coumarins (e.g. xanthoxol), 4 esters, 4 amino acids, and 15 other categories (including volatile oils, terpenes, amides). UPLC-Q-Exactive-MS technology can quickly and accurately identify the chemical constituents in Fengliaoqing fengshi dieda wine.

KEYWORDS Fengliaoqing fengshi dieda wine; UPLC-Q-Exactive-MS; Chemical constituents; Identification

冯了性风湿跌打药酒是传承400余年的传世名方^[1],该药原方仅有丁公藤、麻黄、桂枝、陈皮、黄精等5味中药材,经多次修改后,方中添加了具有祛风活络功效的中药,现已演变成含有27味中药材的复方,但仍以丁公藤、麻黄、桂枝为主^[2]。冯了性风湿跌打药酒被收录于2015年版《中国药典》(一部),方中丁公藤祛风湿为方中君药,配以桂枝、麻黄、羌活、蚕沙、白芷发散风寒、祛风湿、舒筋络,香附、木香、厚朴、枳壳、陈皮、苍术、苦杏仁、猪牙皂行气、燥湿、化痰,茴香、当归、川芎、乳香、没药、五灵脂、牡丹皮温经、活血、祛瘀,白术、山药、补骨脂、黄精、菟丝子、泽泻补肝肾、强腰膝^[3-4],主要用于临床治疗风寒湿痹、手足麻木、跌扑损伤、瘀滞肿痛等症^[5]。现代药理研究表明,冯了性风湿跌打药酒具有改善微循环、抗炎消肿等作用^[6]。

目前,对于冯了性风湿跌打药酒的研究主要集中在含量测定方面^[7]。但由于其组方构成复杂、化学成分众多、分析方法单一,且尚未有关于该药化学成分分析的报道。近年来,液质联用技术在中药化学成分系统分析、快速辨识领域中得到了越来越广泛的应用,具有选择性强、灵敏度高、分离能力好等优点,适用于复杂体系的成分分析,并能够提供化合物的大量结构信息,可弥补紫外检测的定量灵敏度不高以及高效液相色谱无法对“全成分”定性分析的不足^[8]。为此,本研究采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术(UPLC-Q-Exactive-MS)对冯了性风湿跌打药酒的化学成分进行鉴别,旨在为其药效物质辨识、质量控制、作用机制研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Q-Exactive-Focus型静电场轨道阱高分辨质谱系统(包括离子源、离子透镜系统、质量分析器、高能碰撞池、检测器)和UltiMate 3000型UPLC系统(包括分离单元、检测器、Chromleon 7色谱工作站)均由美国Thermo Fisher Scientific公司提供;KQ-400DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);HH-S6A型电热恒温水浴锅(北京科伟永兴仪器有限公司);BS210S型、Max210g型万分之一电子分析天平,BT25S、Max21g型十万分之一电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

1.2 药品与试剂

东莨菪苷对照品(批号:16040805)、东莨菪内酯对照品(批号:161208)、伞形花内酯对照品(批号:18010202)、秦皮乙素对照品(批号:18092803)、咖啡酸对照品(批号:17122804)、绿原酸对照品(批号:1701904)、新绿原酸对照品(批号:17062003)、隐绿原酸

对照品(批号:17061401)、异绿原酸A对照品(批号:19061201)、异绿原酸B对照品(批号:17121201)、异绿原酸C对照品(批号:18070401)均购自上海圻明生物科技有限公司,纯度均大于98%;冯了性风湿跌打药酒(批号:170114,规格:500 mL)购自国药集团冯了性(佛山)药业有限公司;甲酸[LC-MS级,批号:182088,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Thermo Accucore aQ RP₁₈(150 mm×2.1 mm,2.6 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~5 min,5% A;5~60 min,5% A→95% A);流速:0.3 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:2 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源:加热电喷雾离子源(HESI);离子模式:正、负离子模式;鞘气、辅助气:氮气。正离子模式——喷雾电压:3.5 kV,毛细管加热温度:350 ℃,鞘气压力:35 psi,辅气压力:15 arb,离子源加热温度:320 ℃;负离子模式——喷雾电压:3.2 kV,毛细管加热温度:350 ℃,鞘气压力:35 psi,辅气压力:15 arb,离子源加热温度:300 ℃。质量轴校准:外标法(质量误差小于5 ppm);一级质谱扫描范围: m/z 80.0~1 200.0,分辨率:70 000;二级质谱扫描范围: m/z 80.0~1 200.0,分辨率:17 500;碰撞电压:20、40、60 eV。

2.2 溶液的制备

2.2.1 单一对照品溶液 精密称取东莨菪苷、东莨菪内酯、伞形花内酯、秦皮乙素、咖啡酸、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C对照品适量,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,混匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得适宜质量浓度的单一对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取冯了性风湿跌打药酒5 mL,置于蒸发皿中,水浴蒸干,残渣加80%甲醇溶解,稀释并用80%甲醇定容至50 mL量瓶中,混匀;精密量取5 mL,置于25 mL量瓶中,加80%甲醇稀释至刻度,混匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 化学成分数据库的建立

检索中国知网、维普网、PubMed等数据库,收集冯了性风湿跌打药酒中组方药材的化学成分信息。以麻黄^[9-11]、枳壳^[12-14]、桂枝^[15-16]、丁公藤^[17-20]、陈皮^[21-23]等(由于其余药材用量比例极少,且前期预试验发现这些药材相应的一级质谱信号响应不强,故仅检索上述5味主要药材)为主,建立包括化合物名称、分子式、相对分子量的化学成分数据库。采用Xcalibur 2.0软件计算相关化合

物的[M+H]⁺、[M-H]⁻准分子离子荷质比。

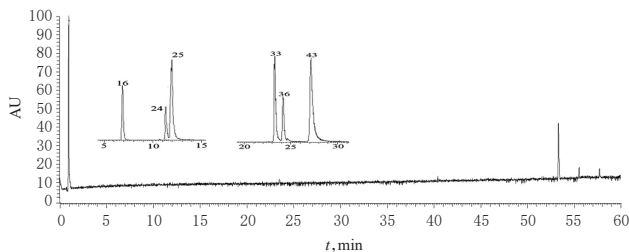
2.4 化合物成分的鉴定

取“2.2.1”项下各单一对照品溶液适量,按“2.1”项下试验条件进样测定,记录其质谱信息(图略)。取“2.2.2”项下供试品溶液适量,同法进样测定,得冯了性风湿跌打药酒化学成分的总离子流图(见图1)。选择分子量实测值与理论值误差小于5 ppm的分子与Xcalibur 2.0软件中的数据库进行匹配^[24],对所得化合物的二级质谱碎片离子信息进行分析,同时结合对照品的质谱裂解规律,参考“2.3”项下化学成分数据库和相关文献对化合物进行推测和结构鉴定。结果,冯了性风湿跌打药酒共推测和鉴定出59种化合物,其中生物碱类成分8种、黄酮类成分12种、有机酸类成分9种、香豆素类成分7种、酯类成分4种、氨基酸类成分4种,其他类成分15种,详见表1(表中,“*”表示与对照品对比,其余均为与所建数据库及文献对比;Glc表示葡萄糖基,Rha表示鼠李糖基)。

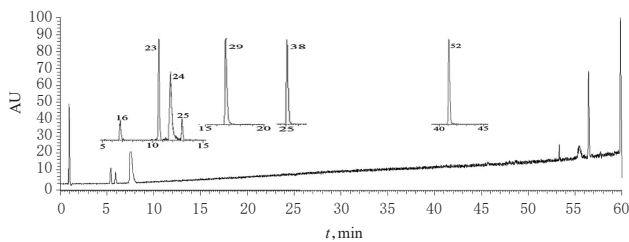
2.5 化合物裂解规律及特征

2.5.1 生物碱类 生物碱类成分是一类含氮的碱性有机化合物,大多数含有复杂的环状结构^[25]。本研究共鉴别出8种生物碱类成分,其中化合物11、13、14、15来源于麻黄;化合物8来源于丁公藤;化合物4、5、6来源于枳壳。

以化合物8为例,在正离子检测模式下其准分子离子为 m/z 144.101 8[M+H]⁺,推测可能的分子式为C₇H₁₃NO₂。高能量通道下产生二级离子碎片,其中环取代基上脱去1分子H₂O后形成碎片离子 m/z 126.090 9[M-H₂O+H]⁺,再脱去1分子H₂O形成碎片离子 m/z 108.080 6[M-2H₂O+H]⁺;碎片离子 m/z 81.100 6推断由



A. 负离子模式



B. 正离子模式

图1 冯了性风湿跌打药酒化学成分的总离子流图

Fig 1 Total ion chromatograms of Fengliaoxing fengshi diera wine

m/z 144.101 9的仲胺基 α 断裂脱去C₂H₇O₂所得。根据该裂解规律并参考化学成分数据库及相关文献^[26],推测化合物8为包公藤丙素或凹脉丁公藤碱,其可能的裂解途径见图2。

以化合物13、14为例,在正离子检测模式下其准分子离子均为 m/z 166.122 5[M+H]⁺,推测可能的分子式为C₁₀H₁₅NO。高能量通道下产生二级离子碎片,其中 m/z 148.111 8[M-H₂O+H]⁺为母离子脱去H₂O后产生的碎片, m/z 133.088 4[M-H₂O-CH₃+H]⁺为脱去H₂O后再脱去CH₃产生的碎片离子, m/z 117.069 8[M-H₂O-CH₃-NH₂+H]⁺为脱去H₂O后再脱去CH₃NH₂产生的碎片离

表1 冯了性风湿跌打药酒化学成分的UPLC-Q-Exactive鉴定结果

Tab 1 Identification of chemical constituents in Fengliaoxing fengshi diera wine by UPLC-Q-Exactive

峰号	保留时间, min	选定离子	分子式	m/z			碎片离子(裂解方式)	误差, ppm	化合物归属(化学名)	药材归属
				理论值	实测值					
1	0.91	[M+H] ⁺	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	175.118 9	175.118 8	175.118 7, 116.070 4	-0.571	精氨酸	枳壳	
2	0.94	[M+H] ⁺	C ₆ H ₉ NO ₂	118.086 2	118.086 1	118.086 0	-0.847	缬氨酸	枳壳	
3	0.98	[M+H] ⁺	C ₆ H ₉ NO ₂	116.070 6	116.070 5	116.070 4, 70.065 1	-0.862	脯氨酸	枳壳	
4	0.99	[M+H] ⁺	C ₇ H ₉ NO ₂	138.054 9	138.054 9	138.054 8	0	氨基苯甲酸	枳壳	
5	1.00	[M+H] ⁺	C ₆ H ₉ NO ₂	130.086 2	130.086 2	84.080 6[M-HCOOH+H] ⁺ , 70.065 1	0	哌啶甲酸	枳壳	
6	1.01	[M+H] ⁺	C ₇ H ₉ NO ₂	144.101 9	144.101 8	144.101 7	-0.694	哌啶乙酸	枳壳	
7	1.89	[M+H] ⁺	C ₆ H ₉ NO ₂	132.101 9	132.101 8	86.096 3	-0.757	亮氨酸或异亮氨酸	枳壳	
8	1.01	[M+H] ⁺	C ₇ H ₁₃ NO ₂	144.101 9	144.101 8	126.090 9[M-H ₂ O+H] ⁺ , 108.080 6[M-2H ₂ O+H] ⁺ , 81.100 6[M-C ₂ H ₇ O ₂ +H] ⁺	-0.694	包公藤丙素或凹脉丁公藤碱	丁公藤	
9	1.63	[M+H] ⁺	C ₆ H ₉ O ₃	127.038 9	127.038 9	109.028 2[M-H ₂ O+H] ⁺ , 81.033 4[M-CO-H ₂ O+H] ⁺ , 53.038 8[M-2CO-H ₂ O+H] ⁺	0	5-羟甲基糠醛	枳壳	
10	2.19	[M+H] ⁺	C ₈ H ₈ O	121.064 7	121.064 7	84.959 5, 102.970 0	0	苯乙醛/苯乙酮	桂枝	
11	4.06	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₃ NO	152.106 9	152.106 9	134.096 3[M-H ₂ O+H] ⁺ , 117.069 8[M-H ₂ O-NH ₃ +H] ⁺	0	去甲基(伪)麻黄碱	麻黄	
12	5.04	[M-H] ⁻	C ₇ H ₅ O ₄	153.019 3	153.019 3	109.029 4[M-CO ₂ -H] ⁻	0	原儿茶酸	麻黄, 桂枝, 丁公藤	
13	5.42	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₅ NO	166.122 6	166.122 5	148.111 8[M-H ₂ O+H] ⁺ , 133.088 4[M-H ₂ O-CH ₃ +H] ⁺ , 117.069 8[M-H ₂ O-CH ₃ NH ₂ +H] ⁺	-0.602	麻黄碱	麻黄	
14	5.92	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₅ NO	166.122 6	166.122 5	148.111 8[M-H ₂ O+H] ⁺ , 133.088 4[M-H ₂ O-CH ₃ +H] ⁺ , 117.069 8[M-H ₂ O-CH ₃ NH ₂ +H] ⁺	-0.602	伪麻黄碱	麻黄	
15	6.07	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₅ NO	180.138 2	180.136 7	162.127 5[M-H ₂ O+H] ⁺ , 147.104 1[M-H ₂ O-CH ₃ +H] ⁺ , 117.069 7[M-H ₂ O-CH ₂ -CH ₃ NH ₂ +H] ⁺	-8.327	甲基(伪)麻黄碱	麻黄	

续表 1
Continued tab 1

峰号	保留时间, min	选定离子	分子式	m/z		碎片离子(裂解方式)	误差, ppm	化合物归属(化学名)	药材归属
				理论值	实测值				
16'	6.87	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₆ O ₉	353.087 8	353.087 6	191.056 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 173.045 2[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H ₂ O-H] ⁻ , 179.034 8[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 135.045 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ -CO ₂ -H] ⁻	-0.566	新绿原酸(3-咖啡酰奎尼酸)	麻黄、丁公藤
17	7.97	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₆ O ₉ N	204.030 2	204.031 1	160.040 2[M-CO ₂ -H] ⁻	4.411	4,6-二羟基-2-喹啉羧酸	麻黄
18	9.02	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₂	123.045 1	123.044 8	61.988 3	-2.438	愈创木酚	桂枝
19	9.45	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₂	121.029 5	121.029 5	93.001 2, 61.988 3	0	3-羟基苯甲醛	桂枝
20	10.90	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	211.061 1	211.061 0	196.037 6[M-CH ₃ -H] ⁻ , 152.047 8[M-C ₂ H ₄ O ₂ -H] ⁻	-0.474	3-(2,4,5-三羟基苯基)丙酸甲酯	丁公藤
21'	10.94	[M-H] ⁻	C ₈ H ₆ O ₄	177.019 3	177.019 2	149.970 8[M-CO-H] ⁻ , 133.029 3[M-CO ₂ -H] ⁻ , 105.034 5	-0.565	秦皮乙素(6,7-二羟基香豆素)	丁公藤
	10.94	[M-H] ⁻	C ₈ H ₆ O ₄	177.019 3	177.019 2	149.970 8[M-CO-H] ⁻ , 141.868 1	-0.565	5,7-二羟基香豆素	枳壳
22	10.61	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ O ₉	355.102 3	355.101 9	193.049 4[M-Glc+H] ⁺ , 133.028 2[M-4CH ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺	-1.126	4H-1-苯并吡喃-4-酮, 6,8-b-D-吡喃葡萄糖氧基-5,7-二氢-2-甲基-	陈皮
	11.95	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₆ O ₉	353.087 8	353.087 6	191.055 9[M-Glc-H] ⁻ , 173.045 2[M-Glc-H ₂ O-H] ⁻	-0.566		陈皮
23'	10.61	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ O ₉	355.102 3	355.101 9	193.049 4[M-Glc+H] ⁺ , 133.028 2[M-Glc-CO-CH ₃ OH+H] ⁺	-1.126	东莨菪苷	丁公藤
	11.95	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₆ O ₉	353.087 8	353.087 6	191.055 9[M-Glc-H] ⁻ , 179.034 8, 135.045 0	-0.566		丁公藤
24'	11.72	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₆ O ₉	353.087 8	353.087 6	191.056 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 179.034 8[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻	-0.566	绿原酸(5-咖啡酰奎尼酸)	麻黄、丁公藤
25'	11.95	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₆ O ₉	353.087 8	353.087 6	191.056 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 173.045 2[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H ₂ O-H] ⁻ , 179.034 8[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 135.045 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ -CO ₂ -H] ⁻	-0.566	隐绿原酸(4-咖啡酰奎尼酸)	麻黄、丁公藤
26	14.63	[M+H] ⁺	C ₈ H ₁₀ O ₄	183.065 1	183.065 2	123.043 8[M-CHO-OCH ₃ +H] ⁺ , 105.934 7, 95.049 0	0.546	丁香醛	桂枝
27	14.99	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₄ NO ₄	218.045 8	218.045 7	174.055 7[M-COO-H] ⁻ , 159.032 3, 124.891 1	-0.459	4-羟基-6/(7-甲氧基-2-喹啉羧酸)	麻黄
28'	15.23	[M-H] ⁻	C ₈ H ₆ O ₃	161.024 4	161.025 0	132.981 5[M-CO-H] ⁻ , 117.966 2[M-CO ₂ -H] ⁻ , 104.986 3[M-2CO-H] ⁻	3.726	伞形花内酯(7-羟基香豆素)	丁公藤
29'	16.74	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	193.049 5	193.049 5	133.028 2[M-CO-CH ₃ OH+H] ⁺ , 178.025 8[M-CH ₃ +H] ⁺ , 165.054 5[M-CO+H] ⁺	0	东莨菪内酯(6-甲氧基-7-羟基香豆素)	丁公藤
30	17.89	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₅	593.151 1	593.150 9	473.106 4[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 353.066 2, 297.077 2[M-Rha-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻	-0.337	木犀草素-7-O-芸香糖苷或忍冬苷或异荊芥素-7-O-葡萄糖苷	枳壳
31	20.73	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₅	595.166 8	595.166 6	287.056 4[M-Rha-Glc-H] ⁻ , 151.003 5[M-Rha-Glc-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻	-0.336	圣草枸橼苷	枳壳
32	21.99、 24.00、 27.13	[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₃	533.130 0	533.129 9	353.087 6, 197.045 3, 173.045 2[C ₆ H ₈ O ₃ -H ₂ O-H] ⁻ , 135.045 0[C ₆ H ₈ O ₃ -CO ₂ -H] ⁻	-0.188	4-O-丁香酰基-5-O-咖啡酰奎尼酸或4-O-咖啡酰基-5-O-丁香酰基奎尼酸或4-O-香草酰基-5-O-咖啡酰基奎尼酸甲酯	丁公藤
33'	23.16	[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₂	515.119 4	515.119 3	197.045 4, 153.055 4, 173.045 0, 173.045 2, 197.045 4 353.086 5[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 191.055 9[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 173.045 2[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -H ₂ O-H] ⁻ , 179.034 8[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 135.045 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -CO ₂ -H] ⁻ , 161.024 1	-0.194	异绿原酸 B(3,4-二咖啡酰奎尼酸)	丁公藤
34	23.41	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	273.075 7	273.075 2	153.018 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺ , 147.043 8[M-C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺	-1.831	柚皮素	麻黄、枳壳
	30.41	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	271.061 1	271.061 1	177.019 3[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 151.003 5[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 119.050 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 107.013 7[M-C ₆ H ₈ O ₃ -CO ₂ -H] ⁻	0		麻黄、枳壳
35	23.43	[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₄	581.186 4	581.185 9	273.075 1[M-Rha-Glc+H] ⁺ , 195.028 5, 153.018 1[M-Rha-Glc-C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺	-0.860	柚皮苷	枳壳、陈皮
	23.53	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₄	579.171 9	579.170 4	271.060 9[M-Glc-Rha-H] ⁻ , 151.003 5	-2.590		陈皮
36'	24.22	[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₂	515.119 4	515.119 3	353.086 5[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 191.055 8[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 179.034 7[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 135.045 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -CO ₂ -H] ⁻	-0.194	异绿原酸 A(3,5-二咖啡酰奎尼酸)	丁公藤
37	24.22	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₄	577.156 2	577.156 0	413.086 6, 311.056 2[M-Rha-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 269.045 8[M-Rha-Glc-H] ⁻	-0.347	异荊芥素-2'-O-α-L-鼠李糖苷	麻黄
	24.22	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₈ O ₁₄	577.156 2	577.156 0	413.086 6, 293.045 3, 269.045 8[M-Rha-Glc-H] ⁻	-0.347	野漆树苷	枳壳
38	25.04	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₃	611.197 0	611.196 8	303.085 9[M-Rha-Glc+H] ⁺ , 195.028 6[M-Rha-Glc-C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺ , 177.054 4[M-Rha-Glc-C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺ , 153.018 1[M-Rha-Glc-C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺	-0.327	橙皮苷	麻黄、枳壳、陈皮
	25.21	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₃	609.182 4	609.182 5	301.071 6[M-Rha-Glc-H] ⁻	0.164		麻黄、枳壳、陈皮
39	25.10	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₁	465.139 1	465.138 8	303.085 7[M-Glc+H] ⁺ , 177.054 3[M-Glc-C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺ , 153.018 0[M-Glc-C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺	-0.645	橙皮素-7-O-β-D-葡萄糖苷	枳壳
40	25.09	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ O ₆	303.086 3	303.086 0	177.054 4[M-C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺ , 153.018 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ +H] ⁺	-0.990	橙皮素	枳壳、陈皮
	31.93	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ O ₆	301.071 7	301.071 6	286.048 0[M-CH ₃ -H] ⁺ , 151.003 5[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁺	-0.332		枳壳、陈皮
41	25.48	[M+H] ⁺	C ₁₇ H ₁₇ O ₂ N	284.128 1	284.127 7	147.043 9[M-C ₆ H ₈ NO+H] ⁺	-1.408	N-顺/反式对羟基苯乙基香豆	丁公藤
	25.62	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₁₇ O ₂ N	282.113 5	282.113 4	162.056 1, 146.965 7	-0.354	酰胺	丁公藤
42	26.62	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₉ O ₂ N	314.138 6	314.138 3	177.054 4[M-C ₆ H ₈ NO+H] ⁺	-0.955	N-顺/反式-对羟基苯乙基阿魏	丁公藤
	26.76	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₉ O ₂ N	312.124 1	312.124 0	297.100 3, 135.045 1[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻	-0.320	酰胺	丁公藤
43'	27.14	[M-H] ⁻	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₂	515.119 4	515.119 3	353.087 3[M-C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 191.055 9[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 173.045 2[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -H ₂ O-H] ⁻ , 179.034 7[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -H] ⁻ , 135.045 0[M-C ₆ H ₈ O ₃ -C ₆ H ₈ O ₃ -CO ₂ -H] ⁻	-0.194	异绿原酸 C(4,5-二咖啡酰奎尼酸)	丁公藤
44	27.25	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₀ O ₄	261.112 1	261.111 8	243.101 8[M-H ₂ O+H] ⁺	-1.149	橙皮内酯	枳壳
45	27.30	[M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	207.066 2	207.065 5	179.034 8[M-CO-H] ⁻ , 135.048 1[M-CO ₂ -CO-H] ⁻ , 161.024 1[M-H ₂ O-CO-H] ⁻	-3.381	咖啡酸乙酯	丁公藤

续表 1
Continued tab 1

峰号	保留时间, min	选定的离子	分子式	m/z		碎片离子(裂解方式)	误差, ppm	化合物归属(化学名)	药材归属
				理论值	实测值				
46	28.03	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	151.075 3	151.074 9	132.101 8, 104.963 2	-2.648	2-甲氧基-4-乙炔基苯酚	陈皮
47	29.68	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	471.201 3	471.200 8	425.196 1[M-CH ₂ O ₂ +H] ⁺ , 161.059 4[M-C ₁₀ H ₁₂ O ₆ +H] ⁺	-1.061	柠檬苦素	枳壳
48	29.95	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	287.091 4	287.091 0	153.018 0, 161.059 5	-1.393	独活内酯	枳壳
49	37.50	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	455.206 4	455.204 6	409.204 1[M-CH ₂ O ₂ +H] ⁺ , 161.201 1[M-C ₁₀ H ₁₂ O ₆ +H] ⁺	-3.954	黄柏酮	枳壳
50	40.22	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	197.153 6	197.153 4	138.956 1[M-CH ₂ -CO ₂ +H] ⁺ , 149.971 7, 152.151 3[M-3CH ₂ +H] ⁺	-1.014	乙酸香叶酯	陈皮
51	40.32	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	203.033 8	203.032 7	175.039 0[M-CO+H] ⁺ , 159.044 0[M-CO ₂ +H] ⁺ , 131.048 4[M-CO ₂ -CO+H] ⁺ , 147.043 8[M-2CO+H] ⁺ , 119.085 6[M-3CO+H] ⁺	-5.418	花椒酚	枳壳
52	41.07	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	403.138 7	403.138 1	388.114 5[M-CH ₂ +H] ⁺ , 373.091 1[M-2CH ₂ +H] ⁺	-1.488	5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮	枳壳
	41.07	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	403.138 7	403.138 1	388.114 5[M-CH ₂ +H] ⁺ , 373.091 1[M-2CH ₂ +H] ⁺	-1.488	川陈皮素	陈皮
53	41.40	[M+H] ⁺	C ₈ H ₈ O ₂	149.059 7	149.058 9	84.959 6, 132.101 7[M-OH+H] ⁺	-5.367	肉桂酸	麻黄
54	41.47	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	433.149 3	433.148 8	418.125 1[M-CH ₂ +H] ⁺ , 403.101 6[M-2CH ₂ +H] ⁺	-1.154	3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	枳壳
55	41.99	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃	194.082 2	194.082 1	194.081 9	-0.515	N-乙酰去甲肾上腺素	枳壳
56	42.19	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	445.114 0	445.1136	310.170 4[M-C ₈ H ₈ O ₂ -CH ₂ -H] ⁻ , 219.174 8, 283.175 6[M-Glc-H] ⁻	-0.899	3'-甲氧基葛根素	陈皮
57	44.05	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	373.128 1	373.127 8	358.104 3[M-CH ₂ +H] ⁺ , 343.080 6[M-2CH ₂ +H] ⁺	-0.804	5,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮	枳壳
58	46.52	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	299.164 1	299.161 6	173.078 4[M-C ₂ H ₂ -C ₆ H ₂ +H] ⁺ , 111.044 0	-8.357	葡萄柚内酯	枳壳
59	52.36	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	297.149 6	297.150 9	279.232 5, 162.076 9[M-C ₁₀ H ₁₅ -H] ⁻	4.375	橙皮油内酯	枳壳

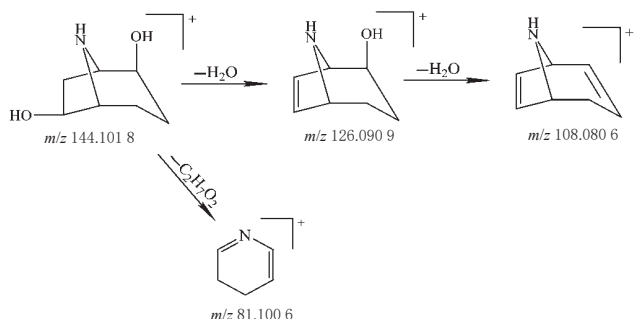


图2 包公藤丙素或凹脉丁公藤碱的裂解途径

Fig 2 Fragment pathways of baogongteng C or erycibellin

子。根据该裂解规律并参考化学成分数据库,并鉴于麻黄碱的出峰时间早于伪麻黄碱^[27],由此推测化合物 13 为麻黄碱,化合物 14 为伪麻黄碱。麻黄碱裂解途径见图 3。

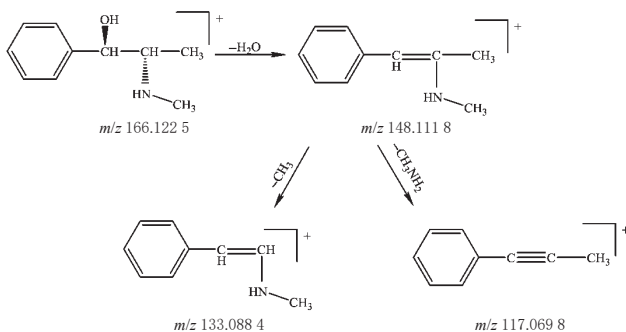


图3 麻黄碱的裂解途径

Fig 3 Fragment pathways of ephedrine

根据生物碱类化合物裂解的碎片信息,推测该类成分在质谱中发生高能碰撞时,可能会断裂羟基取代基,脱去 H₂O,或脱去 CH₃、CH₃NH₂ 等中性碎片离子或发生重排。

2.5.2 黄酮类 黄酮类成分常与糖结合成苷或以游离态(苷元)的形式存在,其母核为 2-苯基色原酮^[14]。本研究共鉴别出 12 种黄酮类成分,分别为化合物 30~31、34~35、37~40、52、54、56~57,麻黄、枳壳、陈皮为上述成分的主要来源药材。

以化合物 31 为例,在负离子检测模式下其准分子离子为 m/z 595.166 6[M-H]⁻,推测可能的分子式为 C₂₇H₃₂O₁₅。高能量通道下产生二级离子碎片,其中碎片离子 m/z 287.056 4[M-Rha-Glc-H]⁻比准分子离子质荷比小 308,推测是丢失了糖基碎片(-Rha 和 -Glc);碎片离子 m/z 151.003 5[M-Rha-Glc-C₈H₈O₂-H]⁻推测由母离子丢失糖基片段后,发生 C 环的逆狄尔斯-阿尔德反应(RDA)裂解丢失 C₈H₈O₂ 所得的残余碎片离子。根据该裂解规律并参考化学成分数据库及相关文献^[28],推测化合物 31 为圣草枸橼苷,其可能的裂解途径见图 4。

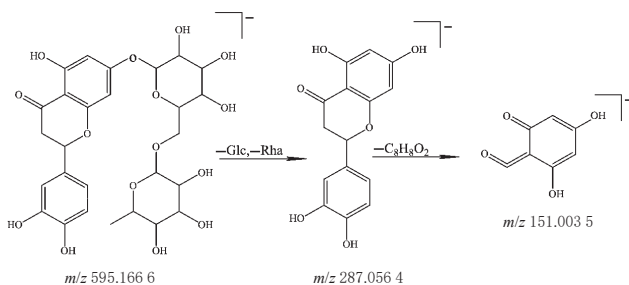


图4 圣草枸橼苷的裂解途径

Fig 4 Fragment pathways of eriocitrin

以化合物 38 为例,其在正、负离子模式下响应均较好。正离子模式下一级质谱结果显示,其准分子离子为 m/z 611.196 8[M+H]⁺;二级质谱结果显示,碎片离子 m/z 303.085 9[M-Rha-Glc+H]⁺的丰度为 100%,推测是丢

失了糖基碎片(-Rha和-Glc);碎片离子 m/z 195.028 6 $[M-Rha-Glc-C_6H_4O_2+H]^+$ 推测由 m/z 303.085 9 碎片离子发生C环的RDA裂解丢失 $C_6H_4O_2$ 碎片所得;碎片离子 m/z 177.054 4 $[M-Rha-Glc-C_6H_6O_3+H]^+$ 由 m/z 303.085 9 在发生C环RDA裂解的同时,B环的支链取代基发生聚合,丢失 $C_6H_6O_3$ 碎片所得;碎片离子 m/z 153.018 1 $[M-Rha-Glc-C_9H_{10}O_2+H]^+$ 为 m/z 303.085 9 发生C环裂解后残余的A环结构。负离子模式下一级质谱结果显示,其准分子离子为 m/z 609.182 5 $[M-H]^-$;二级质谱结果显示,碎片离子 m/z 301.071 6 $[M-Rha-Glc-H]^-$ 的丰度为100%,推测为丢失糖基碎片所得。根据该裂解规律,结合其相对分子量及一、二级质谱结果推测化合物38为橙皮苷,其可能的裂解途径见图5。

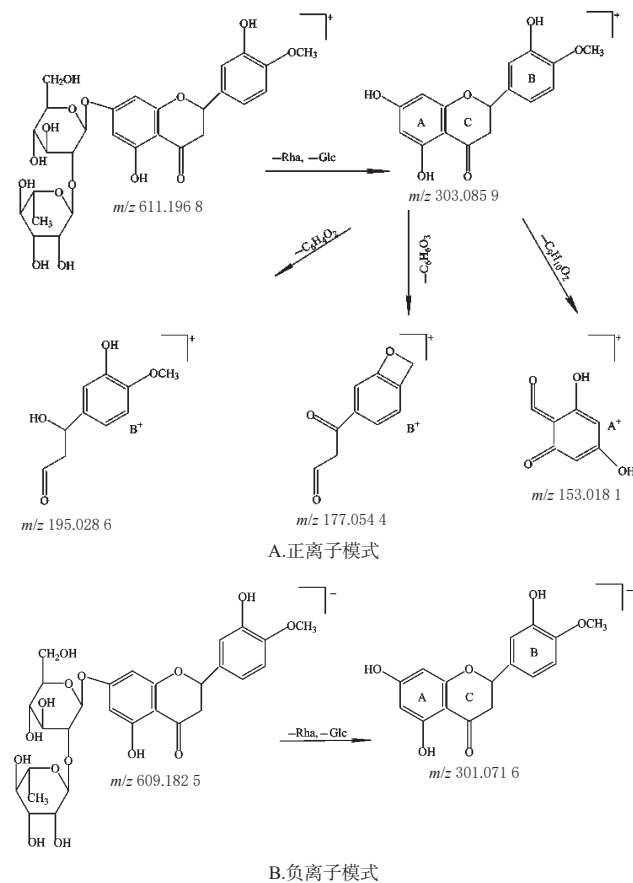


图5 橙皮苷的裂解途径

Fig 5 Fragment pathways of hesperidin

根据黄酮类化合物裂解的碎片信息,推测该类成分在质谱条件下主要的断裂方式包括 CH_3 、 H_2O 、 CO_2 、 CO 等中性离子的丢失、糖基(-Rha和-Glc)键的断裂及C环的RDA裂解。

2.5.3 有机酸类 有机酸类成分是丁公藤、麻黄、桂枝中的主要化合物。该类成分在负离子模式下能产生较高丰度的准分子离子峰;在二级质谱中,由于结构中含有羟基、羧基和特征基团,因此能产生丰度较高的 $[M-H_2O-H]^-$ 、 $[M-CO-H]^-$ 、 $[M-CO_2-H]^-$ 、 $[M-$

$COOH-H]^-$ 等碎片离子峰^[29]。冯了性风湿跌打药酒中的有机酸类化学成分主要包括单咖啡酰奎尼酸类化合物和双咖啡酰奎尼酸类化合物^[30]。本研究共鉴别出9种有机酸类化合物,分别为化合物12、16、24~25、33、36、43、45、53,麻黄、丁公藤、桂枝为上述成分的主要来源药材。

单咖啡酰奎尼酸类化合物主要由1分子的咖啡酸和1分子的奎尼酸通过酯化缩合生成,其一级质谱中可见较高丰度的准分子离子峰;二级质谱结果显示,在酯键断裂后,单咖啡酰奎尼酸类化合物失去咖啡酰基,得到奎尼酸的离子峰 m/z 191.056 0 $[M-C_9H_6O_3-H]^-$ 、咖啡酸的离子峰 m/z 179.034 8 $[M-C_7H_{10}O_5-H]^-$;奎尼酸脱水后得到 m/z 173.045 2 $[M-C_9H_6O_3-H_2O-H]^-$;此外,咖啡酸脱羧后得到 m/z 135.045 0 $[M-C_7H_{10}O_5-CO_2-H]^-$ 的特征碎片。绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸均属于单咖啡酰奎尼酸类化合物,二级质谱裂解规律与上述相同,不同之处在于取代基的位置可能会影响碎片离子的相对丰度。据文献报道,绿原酸二级裂解碎片强度以 m/z 191 最强, m/z 179、135 强度相当,且极弱;新绿原酸裂解强度为 m/z 191 > m/z 179 > m/z 135;隐绿原酸裂解强度以 m/z 191 最强, m/z 173、179 次之且强度相当, m/z 135 较弱小^[30]。参考上述文献及单咖啡酰奎尼酸类化合物的一级、二级质谱裂解规律,结合对照品初步鉴定化合物24、25、16分别为绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸。

以化合物25为例,该化合物由1分子的咖啡酸和1分子的奎尼酸酯化生成的缩酚酸^[26],在质谱条件下易出现酯键的断裂。一级质谱结果显示,在负离子模式下响应较好,得准分子离子 m/z 353.087 6 $[M-H]^-$,推测其可能的分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$ 。该化合物的二级离子碎片信息为 m/z 191.056 0、173.045 2、179.034 8、135.045 0,裂解途径为化合物在酯键断裂后,得到奎尼酸的离子峰 m/z 191.056 0 $[M-C_9H_6O_3-H]^-$;奎尼酸继续脱去 H_2O 生成 m/z 173.045 2 $[M-C_9H_6O_3-H_2O-H]^-$; m/z 179.034 8 $[M-C_7H_{10}O_5-H]^-$ 为断裂后所得咖啡酸的碎片离子, m/z 135.045 0 $[M-C_7H_{10}O_5-CO_2-H]^-$ 为咖啡酸继续脱去 CO_2 生成的碎片离子。根据化合物精确相对分子量、断裂途径并与对照品比对,鉴定化合物25为隐绿原酸,其可能的裂解途径见图6。

双咖啡酰奎尼酸类化合物是由2分子的咖啡酸和1分子的奎尼酸通过酯化缩合生成^[26]。异绿原酸A、B、C均属于双咖啡酰奎尼酸类化合物,其结构比单咖啡酰奎尼酸类多1分子的咖啡酰基,因此具有相似的结构碎片。在负离子模式下,异绿原酸A、B、C的一级质谱准分子离子均为 m/z 515.119 3 $[M-H]^-$;二级质谱结果显示,3个化合物均有失去1分子肉桂酸酯的碎片离子 m/z 353.086 5 $[M-C_9H_6O_3-H]^-$,该碎片具有和单咖啡酰奎

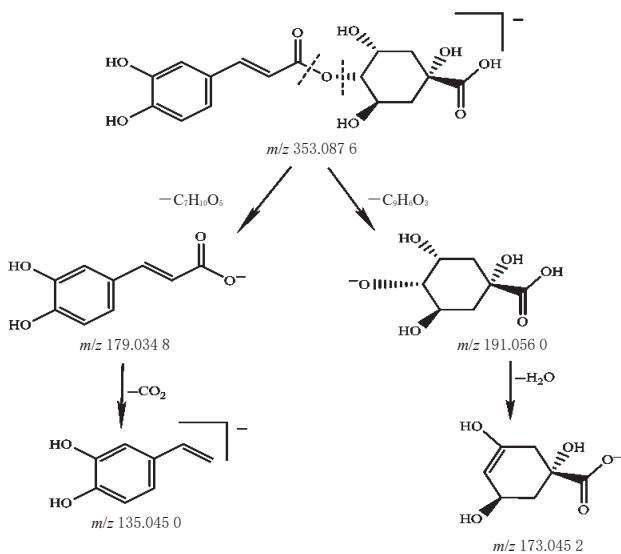


图6 隐绿原酸的裂解途径

Fig 6 Fragment pathways of cryptochlorogenic acid

尼酸类化合物相似的裂解途径,碎片离子 m/z 191 或 m/z 173 表明存在奎尼酸基团,碎片离子 m/z 179 或 m/z 135 表明存在咖啡酸基团,提示内部取代基位置的不同可能是区别的关键点。根据该裂解规律,经与对照品比对后推测化合物 36、33、43 分别为异绿原酸 A、B、C(其裂解途径图略)。

2.5.4 香豆素类 本研究共鉴别出 7 种香豆素类化合物,其结构简单,取代基均在苯环上,属于简单香豆素类化合物,分别为化合物 21、23、28~29、48、51、58,丁公藤、枳壳为上述成分的主要来源药材。其中,化合物 21 秦皮乙素和 5,7-二羟基香豆素互为同分异构体,秦皮乙素来源于丁公藤,5,7-二羟基香豆素来源于枳壳。

以化合物 29 为例,在正离子模式下准分子离子为 m/z 193.049 5 $[M+H]^+$,推测可能的分子式为 $C_{10}H_9O_4$ 。二级质谱结果显示,苯环上的甲氧基丢失甲基后形成碎片离子 m/z 178.025 8 $[M-CH_3+H]^+$,内酯位置处失去 CO 形成 m/z 165.054 5 $[M-CO+H]^+$ 碎片,碎片离子 m/z 133.028 2 $[M-CO-CH_3OH+H]^+$ 推断由 m/z 193.049 5 $[M+H]^+$ 内酯环上丢失 CO,苯环上甲氧基上丢失 CH_3 并脱去邻位的 OH 形成的特征碎片。根据该裂解规律,经与对照品比对后确定化合物 29 为东莨菪内酯,其可能的裂解途径见图 7。

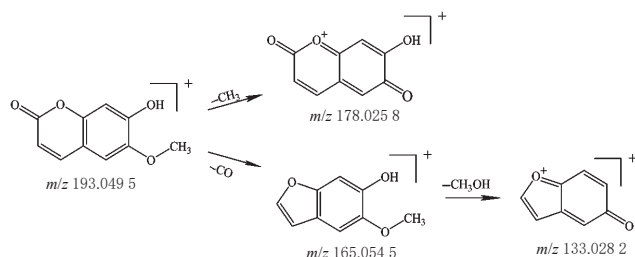


图7 东莨菪内酯的裂解途径

Fig 7 Fragment pathways of scopoletin

以化合物 51 为例,在正离子模式下其准分子离子为 m/z 203.033 7 $[M+H]^+$,推测可能的分子式为 $C_{11}H_6O_4$ 。二级质谱结果显示,分子离子峰丢失 1 分子 CO 得到碎片离子 m/z 175.039 0 $[M-CO+H]^+$,丢失 2 分子 CO、3 分子 CO 分别得到碎片离子 m/z 147.043 8 $[M-2CO+H]^+$ 、 m/z 119.085 6 $[M-3CO+H]^+$,丢失 1 分子 CO_2 得到碎片离子 m/z 159.044 0 $[M-CO_2+H]^+$,丢失 1 分子 CO_2 和 1 分子 CO 得到碎片离子 m/z 131.048 4 $[M-CO_2-CO+H]^+$ 。根据该裂解规律并参考化合物成分数据库及相关文献^[12],推测化合物 51 为花椒毒酚(其裂解途径图略)。

在香豆素类成分的二级裂解碎片中发现,其母核上的内酯位置有相似的中性基因丢失,主要为丢失 CO 或 CO_2 至氧失尽;同时,母核苯环上的取代基,烷基先丢失,有甲氧基取代时易丢失甲基产生碎片,有较大基团时易发生氢重排而产生中性基因丢失。

2.5.5 其他 (1)酯类成分。本研究共鉴别出 4 种酯类成分,分别为化合物 20、44、50、59,丁公藤、枳壳、陈皮为上述成分的主要来源药材。(2)氨基酸类成分。本研究共鉴别出 4 种氨基酸类成分,分别为化合物 1~3、7,枳壳为上述成分的主要来源药材。(3)其他类化合物。本研究共鉴别出 15 种其他类化合物,包括 4 种挥发油类(化合物 10、18~19、26),2 种萜类(化合物 47、49),2 种酰胺类(化合物 41~42),1 种酚类(化合物 46),6 种不确定分类的成分(化合物 9、17、22、27、32、55),桂枝、枳壳、丁公藤、陈皮、麻黄为上述成分的主要来源药材(裂解途径图略)。

3 讨论

本研究前期分别考察了 60% 甲醇、70% 甲醇、80% 甲醇、无水甲醇等不同溶剂的溶解效果。结果发现,以 80% 甲醇为溶剂时,仪器响应较高,图谱基线较为平稳,得到峰数较多,故选择 80% 甲醇为溶剂。同时,又考察了水-甲醇、0.1% 甲酸水溶液-甲醇和 0.1% 甲酸水溶液-乙腈等不同流动相系统。结果发现,流动相中加入少量的酸,能有效改善峰形,提高分离度,且甲醇、乙腈均未影响色谱峰峰形,故选择 0.1% 甲酸水溶液-甲醇为流动相进行梯度洗脱。

UPLC-Q-Exactive-MS 技术能通过正负离子切换和全扫描模式进行测定,根据精确质量进行定性研究,再根据二级质谱数据提高研究的准确性^[31]。为更好地检测与解析样品成分和低丰度的化合物,鉴别更多的分子离子峰,本研究采用正、负离子模式进行监测,该方法不仅可系统、全面地对冯了性风湿跌打药酒中的主要活性成分进行快速识别,还可对有效成分化学谱进行探索,为其药效物质、质量控制及作用机制研究奠定了基础。

本研究共鉴别出 59 种化合物,包括 12 种黄酮类、8 种生物碱、9 种有机酸类、7 种香豆素类、4 种酯类、4 种氨

基酸类、15种其他类(挥发油、萜类、酰胺类等)。有部分文献报道的化合物(如绿原酸甲酯、绿原酸乙酯)^[18-19]在正负离子模式下均未被发现,笔者推测这可能与供试品的处理方法以及试验条件不同有关,后续有待进一步验证。此外,笔者在分析样品的总离子流图发现,一些响应较强的色谱峰也未在已有数据库中找到对应的化合物,提示冯了性风湿跌打药酒还有一些未知的成分需后续研究开发。

综上所述,所建方法快速、准确,可用于鉴别冯了性风湿跌打药酒的化学成分。

参考文献

- [1] 钱振尧.冯了性药酒浅谈[J].中成药研究,1979(4):39.
- [2] 许实波,项辉,卢美,等.冯了性风湿跌打药酒新工艺的药效学比较研究[J].中山大学学报论丛,1994,29(6):169-176.
- [3] 谭珍,曹颖珍,王永健.冯了性风湿跌打药酒真伪品及掺假品的鉴别[J].中国中医药信息杂志,2006,13(9):56-57.
- [4] 姚血明,马武开,唐芳,等.中医外治法在痹证中的应用[J].风湿病与关节炎,2014,3(5):73-75.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:808-809.
- [6] 卢美,张坤芳,王永健,等.冯了性风湿跌打药酒工艺改革及其药理实验研究[J].中药材,1993,16(12):31-35.
- [7] 胡静,崔小敏,杨媛媛,等.HPLC法同时测定冯了性风湿跌打药酒中8个成分[J].时珍国医国药,2020,31(3):525-527.
- [8] 张黎媛.液质联用技术在中药质量控制中的应用[J].世界中医药,2018,13(2):513-516.
- [9] 成睿珍,张春艳,李玥,等.基于UPLC-DAD-TOF/MS结合HPLC-UV法的麻黄“先煎去沫”样品的化学成分分析[J].中草药,2018,49(8):1919-1923.
- [10] 李睿,曾岑,王平,等.基于GC-MS和UPLC-Q-TOF-MS的麻黄汤化学成分识别[J].中国中药杂志,2014,39(4):704-709.
- [11] 李小栋.桂枝麻黄各半汤化学成分的液相色谱-质谱分析及其抗炎活性研究[D].杭州:浙江工业大学,2015.
- [12] 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.
- [13] 马超一,高文远,高颖,等.枳壳化学成分和代谢成分的UPLC-PAD-Q-TOF/MS分析[J].药物评价研究,2010,33(2):110-115.
- [14] 何英杰.湘枳壳有效成分指纹图谱构建及活性分析[D].长沙:湖南农业大学,2018.
- [15] 朱伶俐,艾志福,徐丽,等.桂枝化学成分的分离鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(14):173-178.
- [16] 王丹,吴喜民,张东东,等.中药桂枝化学成分研究[J].中国中药杂志,2020,45(1):124-132.
- [17] 张朝凤,张紫佳,张勉,等.大果飞蛾藤的化学成分研究[J].中国药学杂志,2006,41(2):94-96.
- [18] 宋爽. I:毛叶丁公藤化学成分及药理活性研究; II:砂珍棘豆化学成分及药理活性研究[D].北京:中国协和医科大学,2010.
- [19] 周岳.光叶丁公藤化学成分及其抑制T细胞增殖和巨噬细胞分泌NO研究[D].成都:成都医学院,2016.
- [20] CLIFFORD MN, JOHNSTON KL, KNIGHT S, et al. Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(10):2900-2911.
- [21] 龙红萍,李欣,王婷婷,等.基于UPLC-LTQ-Orbitrap-MS的小儿扶脾颗粒的化学成分研究[J].中草药,2018,49(23):5522-5531.
- [22] 马琳,黄小方,欧阳辉,等.UHPLC/Q-TOF-MS/MS快速鉴定陈皮化学成分[J].亚太传统医药,2015,11(19):33-37.
- [23] 黄海英,康俊丽,余亚辉,等.基于UPLC-Q-Orbitrap MS法分析补肺益肾方的化学成分[J].分析测试学报,2019,38(1):1-13.
- [24] 张宁,高霞,周宇,等.UPLC-Q-TOF-MS/MS快速分析杏贝止咳颗粒化学成分[J].中国中药杂志,2018,43(22):4439-4449.
- [25] 李永芳.生物碱的提取和分离方法综述[J].中山大学研究生学刊(自然科学:医学版),2015,36(2):7-13.
- [26] 胡静,杨媛媛,任慧,等.光叶丁公藤中化学成分的UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(18):124-132.
- [27] 刘芹燕,巫兴东,陈东,等.苏黄止咳胶囊中非挥发性成分的LC-MS分析[J].中成药,2019,41(6):1434-1445.
- [28] SHI P, HE Q, SONG Y, et al. Characterization and identification of isomeric flavonoid O-diglycosides from genus *Citrus* in negative electrospray ionization by ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 598(1):110-118.
- [29] 郑娟梅,王海波,郑美玲,等.UPLC-Q-Orbitrap HRMS四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪在复方扶芳藤合剂中的定性应用[J].药物分析杂志,2020,40(5):889-899.
- [30] 张阿琴,李迹娜,张仓,等.LC-MS分析消癌平注射液中有有机酸类成分[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(4):88-90.
- [31] 陆石英,王海波,袁光蔚,等.UPLC-Q-Exactive技术分析民族药石笔木化学成分[J].中国新药杂志,2019,28(16):2032-2039.

(收稿日期:2020-06-02 修回日期:2020-09-09)

(编辑:陈宏)