

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的秦皮成分分析

闫佳靓¹, 王海超¹, 张玲¹, 曹桂云², 傅春升^{3*}, 田振华^{4*}(1.山东中医药大学药学院, 济南 250300; 2.山东宏济堂制药集团股份有限公司, 济南 250100; 3.山东中医药大学附属医院, 济南 250014; 4.山东中医药大学实验中心, 济南 250300)

摘要: 目的 利用超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)对秦皮进行成分分析。方法 采用 Halo 90Å C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm), 以 0.05%甲酸水溶液(A)-0.05%甲酸乙腈溶液(B)为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 进样量 5 μL。在电喷雾离子源(ESI)正、负离子模式下采集数据, 扫描范围 *m/z* 80~1 200, 通过与对照品的保留时间及质谱数据信息对比, 并结合精确相对分子质量、质谱裂解规律、质谱数据库(PubChem, ChemicalBook 等)及相关文献, 对秦皮的化学成分进行快速鉴定。结果 共鉴定出 72 种化学成分, 正离子下 19 种, 负离子下 53 种, 包括香豆素类 20 种, 环烯醚萜类 8 种, 苯乙醇苷类 10 种, 黄酮类 17 种, 有机酸类 16 种, 其他类 1 种, 其中 36 种成分为首次从秦皮中鉴定出来。结论 本研究建立了秦皮 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的分离鉴定方法, 全面阐明了秦皮的化学成分, 为秦皮的质量控制与药效物质基础提供了参考。

关键词: 秦皮; 超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱; 成分分析; 裂解规律

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1007-7693(2023)08-1009-12

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222148

引用本文: 闫佳靓, 王海超, 张玲, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的秦皮成分分析[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(8): 1009-1020.

Component Analysis of Fraxini Cortex Based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

YAN Jiajing¹, WANG Haichao¹, ZHANG Ling¹, CAO Guiyun², FU Chunsheng^{3*}, TIAN Zhenhua^{4*}(1.School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China; 2.Shandong Hongjitang Pharmaceutical Group Co., Ltd, Jinan 250100, China; 3.Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 4.Experimental Center of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analyze the composition of Fraxini Cortex by using ultra performance liquid chromatography-quadrupole electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS). **METHODS** Halo 90Å C₁₈(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm) as a chromatographic column, 0.05% formic acid aqueous solution(A)-0.05% formic acid acetonitrile(B) was used as the mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C, and the sample volume was 5 μL. The electrospray ionization(ESI) was used to collect data in positive and negative ion modes with the scan range *m/z* of 80–1 200. Compared with the retention time of reference substance, mass spectrometry data, and combing the accurate relative molecular mass, mass spectrometry fragmentation rule, mass spectrometry databases(PubChem, ChemicalBook, etc.) and related literatures, the chemical components of Fraxini Cortex was identified quickly and accurately. **RESULTS** A total of 72 chemical constituents were identified in this study, including 20 coumarins, 8 iridoids, 10 phenylethanol glycosides, 17 flavonoids, 16 organic acids and 1 other species, in which 19 compounds in positive ion mode and 53 in negative. Thirty-six of them were identified from Fraxini Cortex for the first time. **CONCLUSION** This study establishes a UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS method for the isolation and identification of compounds in Fraxini Cortex, which can comprehensively elucidate the chemical composition. This study will provide a reference for quality control and the material basis of pharmacological effects of Fraxini Cortex.

KEYWORDS: Fraxini Cortex; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; composition analysis; fragmentation pattern

秦皮始载于《神农本草经》, 列为中品, 为木犀科植物苦枥白蜡树(*Fraxinus rhynchophylla* Hance)、白蜡树(*Fraxinus chinensis* Roxb.)、尖叶白

蜡树(*Fraxinus szaboana* Lingelsh.)或宿柱白蜡树(*Fraxinus stylosa* Lingelsh.)的干燥枝皮或干皮^[1], 是临床常用中药。秦皮具有丰富的药理活性, 如

基金项目: 国家自然科学基金项目(81774173); 山东省青创人才引育计划

作者简介: 闫佳靓, 女, 硕士生 E-mail: yanjiajing0316@163.com ***通信作者:** 傅春升, 男, 硕士, 主任药师 E-mail: yfuchunsheng@163.com 田振华, 女, 硕士, 实验师 E-mail: tianzhenhuatina@163.com

抗菌、抗炎、抗氧化、抗高尿酸血症等^[2-3]，这与其含有多种化学成分如香豆素类、裂环烯醚萜类、苯乙醇苷类等密切相关^[4-5]。目前对秦皮物质基础研究不够全面，关于秦皮中其他特征成分尚未被有效地检测和鉴定，这较大地限制了该药在药理学和药效学方面的应用^[6-7]。因此，本研究基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的高灵敏度首次对秦皮中的化学成分进行全面分析与表征，有利于该药材资源的深入开发与利用，增加对其药效物质基础的全面认识及多成分的快速定性定量分析。

1 仪器与试剂

四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪串联 Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司)，配有电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur 3.0 数据处理系统；CPA 225 D 型 1/10 万分析天平(德国 Sartorius 公司)。

秦皮甲素(批号：KA04222CA14)、原儿茶醛(批号：TO1013FB14)、金丝桃苷(批号：M28GB143378)、橙皮苷(批号：K09S11L123847)、伞形花内酯(批号：SO4011BJ13)、咖啡酸(批号：YO9J8C28349)对照品均购自上海源叶生物科技有限公司，纯度均 $\geq 98\%$ ；红景天苷(批号：21042304；纯度：99.19%)、松果菊苷(批号：21042513；纯度：98.90%)、毛蕊花糖苷(批号：20092315；纯度：98.73%)对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司；秦皮乙素(批号：110741-200506)、绿原酸(批号：110753-200413)对照品均购自中国药品生物制品检定所，纯度均 $\geq 98\%$ ；东莨菪内酯对照品(中国食品药品检定研究院，批号：768-200103；纯度： $\geq 98\%$)；色谱纯级乙腈、甲醇、甲酸均购自美国赛默飞世尔科技公司；其余试剂均为分析纯，均购自上海国药集团化学试剂有限公司；蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

秦皮药材，产地为陕西省，经山东中医药大学刘红燕教授鉴定为木犀科植物白蜡树(*Fraxinus chinensis* Roxb.)的干燥枝皮或干皮。

2 方法

2.1 检测条件

2.1.1 色谱条件 Halo 90Å C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)；流动相为 0.05% 甲酸水溶液(A)-0.05% 甲酸乙腈溶液(B)，梯度洗脱(0~15 min, 2%→18%B；15~25 min, 18%→45%B；25~30 min, 45%→100%B；30~30.2 min, 100%→2%B；30.2~35 min, 2%B)；流速为 0.3 mL·min⁻¹；柱温为 30 °C；进样量为 5 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)正、负离子模式，鞘气 13.5 L·min⁻¹，辅助气流量 3 L·min⁻¹，喷雾电压 3 kV，毛细管温度 350 °C，辅助气温度 350 °C，碰撞能量 20, 40, 60 eV，检测方式为 Full MS/ddMS² (Full MS 分辨率为 70 000, dd-MS² 分辨率为 17 500)；质量扫描范围为 m/z 80~1 200；S-Lens RF Level 为 55。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 分别精密称取对照品秦皮甲素、秦皮乙素、东莨菪内酯、原儿茶醛、金丝桃苷、橙皮苷、伞形花内酯、红景天苷、松果菊苷、毛蕊花糖苷、咖啡酸、绿原酸适量，甲醇溶解，过 0.22 μm 滤膜备用。

2.2.2 供试品溶液的配制 秦皮药材粉碎后，过 60 目筛，取过筛后粉末 1 g，50% 甲醇 20 mL 超声提取 30 min，补足失重，过 0.22 μm 滤膜备用。

2.3 成分分析与鉴定方法

采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 分别在正、负离子模式下检测、采集数据，得到总离子流图。首先，根据 TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)所提供的秦皮的化学成分信息，结合 Chemspider(<http://www.chemspider.com/>)和 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库的化合物信息及采用 PubMed(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)和 CNKI 检索国内外相关研究文献，整理秦皮及其种属的已知化学成分，最终构建了秦皮化学成分信息数据库。采用 Xcalibur 3.0 软件，根据各成分的元素组成计算精确质量数，结合分子离子、碎片离子信息，分析标准品的质谱裂解规律，并对比相关文献、PubChem 数据库而鉴定化学成分。通过一级质谱图确定准分子离子峰，利用 Xcalibur 3.0 质谱工作站中的化学式预测功能，预测出化学式；根据二级质谱裂解碎片信息，进行相关基团和母核结构的推导，总结出特征碎片；参照标准品物质的质谱裂解规律对秦皮中化学成分的结构进行推测和指认。

3 结果与讨论

3.1 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 成分鉴定

取秦皮供试品溶液及对照品溶液适量，按“2.1.1”和“2.1.2”项下条件测定，得正、负离子下的总离子流图。按“2.3”项下方法分析确定化合物的结构，结果共鉴定了 72 种化学成分，其中正离子模式下 19 种，负离子模式下 53 种，包括香豆素类、环烯醚萜类、苯乙醇苷类、黄酮类、酚酸类等。鉴定化合物结果见表 1，正、负离子下的总离子流图见图 1。

表 1 正、负离子模式下秦皮化合物分析

Tab. 1 Compound analysis of Fraxini Cortex in positive and negative ion modes

序号	保留时间 t_R/min	监测 离子	理论值 m/z	实测值 m/z	分子式	主要碎片离子	化合物名称	误差 $\times 10^{-6}$	分类
1	0.67	[M-H] ⁻	195.049 9	195.050 2	C ₆ H ₁₂ O ₇	177.039 4, 159.028 7, 129.017 9	葡萄糖酸*	-1.628	有机酸类
2	0.72	[M-H] ⁻	191.018 6	191.018 9	C ₆ H ₈ O ₇	173.008 1, 147.028 5, 129.018 7, 111.007 2	柠檬酸*	-1.243	有机酸类
3	1.53	[M+H] ⁺	355.102 4	355.100 7	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	337.053 8, 179.071 0	6-羟基-7-羟甲基-香 豆素单葡萄糖苷	-4.671	香豆素类
4	1.87	[M+H] ⁺	355.102 4	355.100 5	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	324.081 9, 193.047 1, 192.039 4, 151.038 9, 133.049 6	东莨菪苷	-5.234	香豆素类
5	1.94	[M-H] ⁻	373.112 9	373.115 3	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	193.050 0, 179.055 6, 149.059 6, 119.033 4, 97.050 2	獐牙菜苦苷*	3.430	环烯醚萜类
6	2.27	[M-H] ⁻	315.108 5	315.108 5	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	153.054 4, 135.043 7, 123.043 6, 119.033 5, 109.027 8	4-[20(β -D-吡喃葡 萄糖基氧基)乙 基]-4-羟基-2,5- 环己二烯*	-0.129	苯乙醇苷类
7	2.52	[M+H] ⁺	127.039 0	127.039 3	C ₆ H ₆ O ₃	125.096 5, 109.028 9, 97.029 0, 69.070 7	5-羟甲基糠醛	2.593	有机酸类
8	2.71	[M-H] ⁻	403.123 5	403.124 3	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	357.023 3, 195.065 7, 151.074 8	secologanosi- 7-methylester*	-0.706	有机酸类
9	3.52	[M-H] ⁻	299.113 9	299.113 5	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	143.033 7, 131.033 3, 119.033 5, 113.022 9, 101.022 7, 89.022 8, 72.991 3, 71.012 2, 59.012 3	红景天苷 [▲]	-0.422	苯乙醇苷类
10	3.83	[M-H] ⁻	339.071 1	339.072 2	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	177.017 9, 133.028 2, 105.032 8, 89.038 0, 76.925 5	秦皮甲素 [▲]	0.132	香豆素类
11	4.91	[M-H] ⁻	431.154 8	431.155 8	C ₁₉ H ₂₈ O ₁₁	299.113 6, 149.044 2, 119.033 6, 99.007 1, 73.027 7, 59.012 2	Osmanthuside H	-0.197	苯乙醇苷类
12	4.95	[M-H] ⁻	221.008 1	221.008 5	C ₁₀ H ₆ O ₆	177.018 2, 149.023 2, 133.028 0, 118.099 0, 105.033 0, 89.037 8	6,7-二羟基-3-香豆 素酸	-2.992	香豆素类
13	4.99	[M-H] ⁻	353.086 7	353.087 6	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	191.055 2, 179.034 0, 173.044 5, 135.043 0, 109.027 7	绿原酸 [▲]	-0.581	有机酸类
14	5.03	[M-H] ⁻	137.024 4	137.023 1	C ₇ H ₆ O ₃	109.027 7	原儿茶醛 ^{▲*}	-9.614	有机酸类
15	5.25	[M+H] ⁺	193.049 5	193.049 5	C ₁₀ H ₈ O ₄	133.028 7, 137.060 1, 178.026 4	4-甲基七叶亭	-0.183	香豆素类
16	5.40	[M-H] ⁻	177.018 2	177.018 3	C ₉ H ₆ O ₄	149.023 1, 133.028 0, 105.033 0, 89.038 1	秦皮乙素 [▲]	-5.830	香豆素类
17	5.85	[M+H] ⁺	193.049 5	193.049 8	C ₁₀ H ₈ O ₄	103.054 7, 147.044 3, 175.039 2	7,8-二羟基-4-甲基 香豆素	1.371	香豆素类
18	6.41	[M+H] ⁺	179.070 3	179.070 4	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	161.059 9, 147.044 2	松柏醛	0.722	有机酸类
19	6.63	[M-H] ⁻	369.081 6	369.082 7	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	354.059 4, 207.029 2, 192.005 5, 163.002 0	秦皮苷	-0.054	香豆素类
20	7.03	[M-H] ⁻	383.097 2	383.099 4	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀	221.045 4, 161.023 2	fraxidin-8-O- β -羟基 香豆素	2.689	香豆素类
21	7.04	[M-H] ⁻	403.123 5	403.123 9	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	371.099 4, 223.060 7, 179.055 1, 165.055 6, 121.028 0	断氧化马钱子苷*	-1.698	环烯醚萜类
22	7.28	[M-H] ⁻	531.134 4	531.134 9	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₅	369.086 5, 207.029 2, 192.005 6	秦皮素双葡萄糖苷	-1.211	香豆素类
23	7.40	[M-H] ⁻	583.202 1	583.204 5	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₄	537.260 4, 89.022 6	女贞果苷 C*	2.180	环烯醚萜类
24	7.86	[M-H] ⁻	207.028 8	207.029 2	C ₁₀ H ₈ O ₅	192.005 5, 164.010 6	秦皮素	-3.365	香豆素类
25	7.99	[M+H] ⁺	223.060 1	223.060 3	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	208.036 7, 163.039 0, 190.026 2, 162.030 9	异秦皮啶	0.897	香豆素类
26	8.45	[M+H] ⁺	465.102 8	465.103 2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	303.050 2, 285.038 2	异槲皮苷*	0.962	黄酮类
27	8.81	[M-H] ⁻	367.102 4	367.104 1	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	193.049 7, 191.055 2, 173.044 7, 134.036 6, 93.033 0	3-O-阿魏酰基奎 宁酸*	1.756	有机酸类
28	9.14	[M+H] ⁺	193.049 5	193.049 8	C ₁₀ H ₈ O ₄	81.080 6, 121.102 0, 149.060 0	5,7-二羟基-4-甲基 香豆素	1.371	香豆素类
29	10.16	[M-H] ⁻	191.033 9	191.033 9	C ₁₀ H ₈ O ₄	104.025 3, 120.044 0, 148.015 8	东莨菪内酯 [▲]	-5.664	香豆素类
30	10.29	[M+H] ⁺	193.049 5	193.049 8	C ₁₀ H ₈ O ₄	133.028 7, 165.055 0, 178.026 4	异莨菪亭	1.371	香豆素类
31	10.90	[M+H] ⁺	163.039 0	163.039 0	C ₉ H ₆ O ₃	146.032 0, 135.044 3, 117.033 9, 105.070 3, 89.039 2	伞形花内酯 [▲]	0.180	香豆素类
32	11.25	[M-H] ⁻	639.192 0	639.194 2	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	529.158 7, 487.152 3, 179.033 9, 161.023 3	连翘苷木苷*	1.787	苯乙醇苷类
33	11.96	[M-H] ⁻	785.249 8	785.252 1	C ₃₃ H ₄₆ O ₂₀	623.220 0, 477.160 1, 461.163 7, 179.034 6, 161.023 2, 153.054 6, 135.043 8, 133.028 1	松果菊苷 ^{▲*}	1.443	苯乙醇苷类

续表 1

序号	保留时间 t_R /min	监测 离子	理论值 m/z	实测值 m/z	分子式	主要碎片离子	化合物名称	误差 $\times 10^{-6}$	分类
34	12.23	[M-H] ⁻	303.049 9	303.052 7	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	217.050 2, 177.017 9, 125.022 9	2',3,5,5',7-五羟基 黄酮*	5.524	黄酮类
35	13.08	[M-H] ⁻	555.170 8	555.171 8	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₅	223.060 7, 151.038 8, 123.043 5	Ligustaloside A	-0.592	环烯醚萜类
36	13.09	[M-H] ⁻	595.165 7	595.165 5	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	459.113 6, 151.002 4, 135.043 7	新北美圣草苷*	-2.257	黄酮类
37	13.21	[M+H] ⁺	451.123 5	451.123 6	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	163.039 2, 145.101 5	圣草酚-7-O-葡萄 糖苷*	0.249	黄酮类
38	13.67	[M-H] ⁻	577.155 2	577.156 3	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	457.118 1, 413.087 9, 311.056 7	牡荆素鼠李糖苷*	0.037	黄酮类
39	13.74	[M-H] ⁻	755.240 4	755.240 5	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₀	593.187 9, 161.023 2	连翘酯苷 B*	0.130	苯乙醇苷类
40	13.87	[M+H] ⁺	209.080 8	209.080 6	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	191.070 4, 177.054 8, 121.065 2	芥子醛	-1.126	有机酸类
41	13.97	[M-H] ⁻	463.088 2	463.088 9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	301.034 4, 300.028 1, 271.025 3, 255.030 0	金丝桃苷 [▲] *	0.002	黄酮类
42	14.28	[M-H] ⁻	477.139 1	477.140 6	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	161.023 3, 179.033 9	木通苯乙醇苷 A	1.831	苯乙醇苷类
43	14.33	[M-H] ⁻	701.228 7	701.231 2	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₈	539.179 9, 469.135 7, 315.108 7, 135.043 8	新女贞苷*	1.943	环烯醚萜类
44	14.63	[M-H] ⁻	555.170 8	555.172 3	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₄	393.119 2	Cassitoroside*	1.657	其他类
45	15.32	[M-H] ⁻	477.139 1	477.140 4	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	161.023 2, 135.043 9, 179.034 3, 315.109 1	木通苯乙醇苷 B	0.346	苯乙醇苷类
46	15.38	[M+H] ⁺	181.049 5	181.049 5	C ₉ H ₈ O ₄	161.039 1, 145.028 6, 164.042 5	咖啡酸 [▲]	-0.195	有机酸类
47	15.39	[M-H] ⁻	357.134 3	357.134 6	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	151.038 8, 136.015 2	松脂酚	0.667	有机酸类
48	15.43	[M-H] ⁻	623.198 5	623.198 6	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	461.167 0, 315.108 2, 179.033 6, 161.023 2, 135.043 8, 113.022 9, 71.012 3	毛蕊花糖苷 [▲] *	0.572	苯乙醇苷类
49	15.45	[M-H] ⁻	519.186 1	519.187 8	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	357.134 6, 342.111 0, 151.038 8, 136.015 1	鸦胆子苦醇*	1.185	有机酸类
50	15.52	[M-H] ⁻	193.049 5	193.049 8	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	178.026 2, 149.059 3, 134.036 0	阿魏酸	-4.310	有机酸类
51	15.80	[M-H] ⁻	593.186 5	593.188 5	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	285.039 8	香风草苷*	1.553	黄酮类
52	16.18	[M-H] ⁻	725.192 4	725.193 8	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	177.018 3, 339.071 8, 191.034 4	Escuside	0.480	香豆素类
53	16.34	[M+H] ⁺	273.075 8	273.076 0	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	153.018 4, 147.044 3, 119.049 7	柚皮素	0.916	黄酮类
54	16.43	[M-H] ⁻	521.129 0	521.130 1	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	359.077 5, 344.053 7, 329.029 8, 201.140 0	2',5,6'-三羟基-7,8- 二甲氧基黄酮 -2'-O-葡萄糖苷*	0.069	黄酮类
55	16.48	[M-H] ⁻	623.204 9	623.198 8	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	461.167 0, 179.033 8, 161.023 2	连翘酯苷 A*	1.054	苯乙醇苷类
56	17.42	[M-H] ⁻	553.155 2	553.154 2	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₄	177.018 5, 151.038 8, 101.022 8	女贞苷酸*	-3.758	环烯醚萜类
57	17.45	[M-H] ⁻	373.128 2	373.129 4	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	343.118 7, 313.108 5	8-羟基松脂素	3.271	有机酸类
58	17.59	[M-H] ⁻	609.181 4	609.183 1	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	447.153 3, 343.085 1, 325.074 5, 301.072 0, 302.076 0, 286.048 3, 242.058 4, 196.000 2	橙皮苷 [▲] *	0.996	黄酮类
59	17.72	[M-H] ⁻	607.165 7	607.166 9	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	299.056 3	Diosmin*	0.093	黄酮类
60	18.38	[M-H] ⁻	357.133 3	357.134 7	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	342.110 1, 313.104 9, 221.043 2	罗汉松树脂酚*	0.947	有机酸类
61	18.45	[M-H] ⁻	609.181 4	609.180 3	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	301.0738, 125.022 7	新橙皮苷*	-3.601	黄酮类
62	19.38	[M+H] ⁺	237.075 8	237.075 9	C ₁₂ H ₁₂ O ₅	222.051 9, 207.029 1, 193.049 1, 176.078 8, 133.101 4	6,7,8-三甲氧基香 豆素	0.633	香豆素类
63	19.60	[M-H] ⁻	539.175 9	539.177 1	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	377.123 6, 307.082 8, 223.060 5, 275.092 8, 149.023 1, 139.038 7, 121.027 9	橄榄苦苷	0.901	环烯醚萜类
64	19.80	[M+H] ⁺	217.049 5	217.049 6	C ₁₂ H ₈ O ₄	189.055 2, 174.954 2, 161.059 5	5-甲氧基补骨脂素*	0.298	香豆素类
65	20.36	[M-H] ⁻	329.102 0	329.103 1	C ₁₈ H ₁₈ O ₆	193.049 5, 160.308 2	4-(4-羟基苯基)- 5,6,7-三甲氧基 -2-二氢色原酮	0.117	黄酮类
66	21.93	[M+H] ⁺	373.128 2	373.127 6	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	343.117 7, 325.108 5	桔皮素*	-1.553	黄酮类
67	22.89	[M-H] ⁻	523.181 0	523.182 3	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	361.129 6, 291.087 7, 259.097 4, 101.022 8	女贞苷	0.383	环烯醚萜类
68	23.26	[M-H] ⁻	677.244 0	677.245 8	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₅	369.097 4, 205.050 2, 177.018 5	Wanepimedeside A*	-1.620	黄酮类
69	24.41	[M-H] ⁻	675.228 3	675.230 2	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₅	151.892 6	淫羊藿苷*	-1.694	黄酮类
70	26.71	[M-H] ⁻	645.217 8	645.219 5	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₄	483.167 1, 303.124 7, 165.054 7	箭藿苷 B*	0.963	黄酮类
71	27.86	[M+H] ⁺	207.065 2	207.065 5	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	192.041 9, 179.070 6, 164.046 7, 136.052 6, 163.039 0, 151.075 7	6,7-二甲氧基香豆素	1.520	香豆素类
72	28.55	[M-H] ⁻	329.232 3	329.233 6	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	171.101 6	9,12,13-三羟基-10- 十八烯酸*	0.767	有机酸类

注: [▲]表示与对照品对照; *表示首次鉴定。Notes: [▲]indicated comparison with the standard; * indicated the first identification.

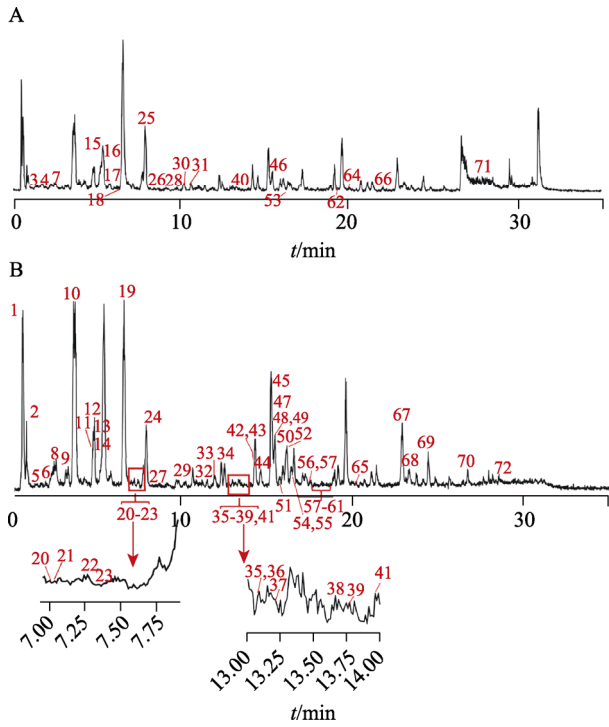


图1 秦皮正(A)、负(B)离子模式下总离子流图
Fig. 1 Total ion current diagram of Fraxini Cortex in positive(A) and negative(B) ion modes

3.2 化合物质谱裂解特征分析

3.2.1 香豆素类 香豆素类化合物是秦皮的主要活性成分^[7-8], 具有抗菌抗炎, 止咳、化痰、平喘, 促进尿酸排泄, 镇痛镇静, 调节血液循环, 抑制肠蠕动, 防紫外线等多种功能^[8]。在正、负离子下, 共鉴定出 20 种香豆素类化合物, 其中正离子模式下的化合物 **64** 为首次鉴定得到。以秦皮甲素、秦皮乙素来说明香豆素类化合物的裂解规律。

在负离子模式下, 化合物 **10**[M-H]⁻的 m/z 为 339, 其典型碎片离子为 m/z 177[M-H-Glu]⁻, m/z 133

[M-H-Glu-CO₂]⁻, m/z 105[M-H-Glu-CO₂-CO]⁻, m/z 89 [M-H-Glu-2CO₂]⁻, m/z 77[M-H-Glu-CO₂-2CO]⁻。其裂解途径: 首先葡萄糖苷键断裂, 丢失一分子葡萄糖, 随后连续丢失 2 分子 CO₂, 或者丢失 1 分子 CO₂ 后连续丢失 2 分子 CO。该化合物的保留时间、质谱行为与秦皮甲素对照品一致, 且碎片离子与文献报道^[9]一致, 故鉴定化合物为秦皮甲素。其二级质谱图和可能的裂解途径见图 2。

在负离子模式下, 化合物 **16**[M-H]⁻的 m/z 为 177, 其典型碎片离子为 m/z 149[M-H-CO]⁻, m/z 133[M-H-CO₂]⁻, m/z 133[M-H-CO₂-CO]⁻, m/z 133[M-H-2CO₂]⁻。其裂解规律: 在母离子的基础上丢失 1 分子 CO, 或者在母离子的基础上丢失 1 分子 CO₂ 后再丢失 1 分子 CO 或 CO₂。该化合物的保留时间、质谱行为与秦皮乙素对照品一致, 且碎片离子与文献报道^[10]一致, 故鉴定化合物为秦皮乙素。其二级质谱图和可能的裂解途径见图 3。

综上, 香豆素类化合物的主要裂解途径是母核侧链上的 CH₃、CO、CO₂ 基团、葡萄糖以及其他功能基团的断裂与丢失^[11]。由此裂解规律, 推测其他化合物, 如化合物 **19**, [M-H]⁻的 m/z 为 369, 其典型碎片离子为 m/z 354[M-H-CH₃]⁻, m/z 192 [M-H-CH₃-Glu]⁻, m/z 207[M-H-Glu]⁻, m/z 163[M-H-Glu-CO₂]⁻。其裂解规律: 首先葡萄糖苷键断裂, 丢失 1 分子葡萄糖, 随后可丢失 1 分子 CO₂, 或者丢失 1 分子 CH₃; 又或者甲氧基上先丢失 CH₃, 再断裂葡萄糖苷键, 丢失 1 分子葡萄糖。该化合物的分子式、质谱行为与文献报道^[12]一致, 故鉴定化合物为秦皮苷。推断秦皮甲素、秦皮乙素、秦皮苷的二级质谱图和可能的裂解途径见图 4。

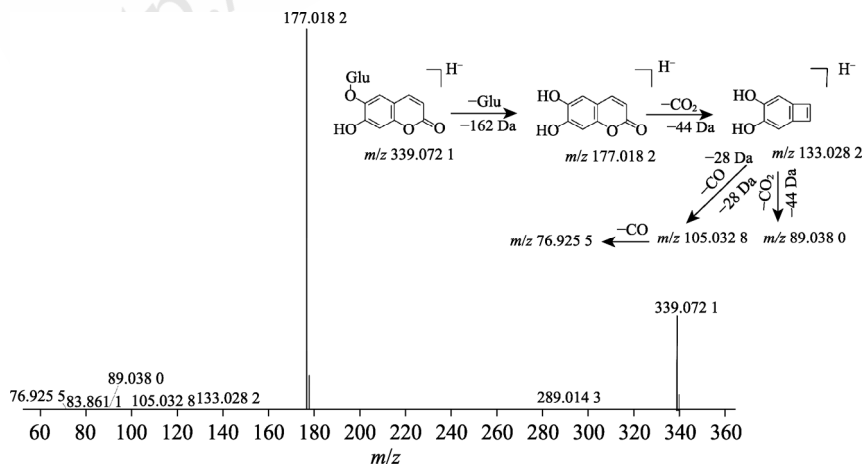


图2 秦皮甲素的二级质谱图和可能的裂解途径
Fig. 2 MS/MS spectrum and possible fragmentation pathways of esculin

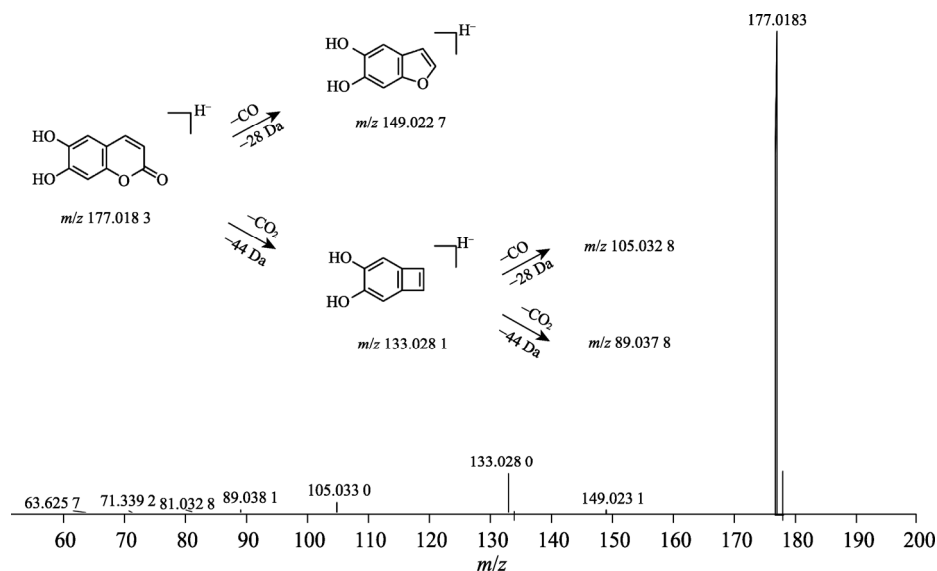


图3 秦皮乙素的二级质谱图和可能的裂解途径
Fig. 3 MS/MS spectrum and possible fragmentation pathways of esculetin

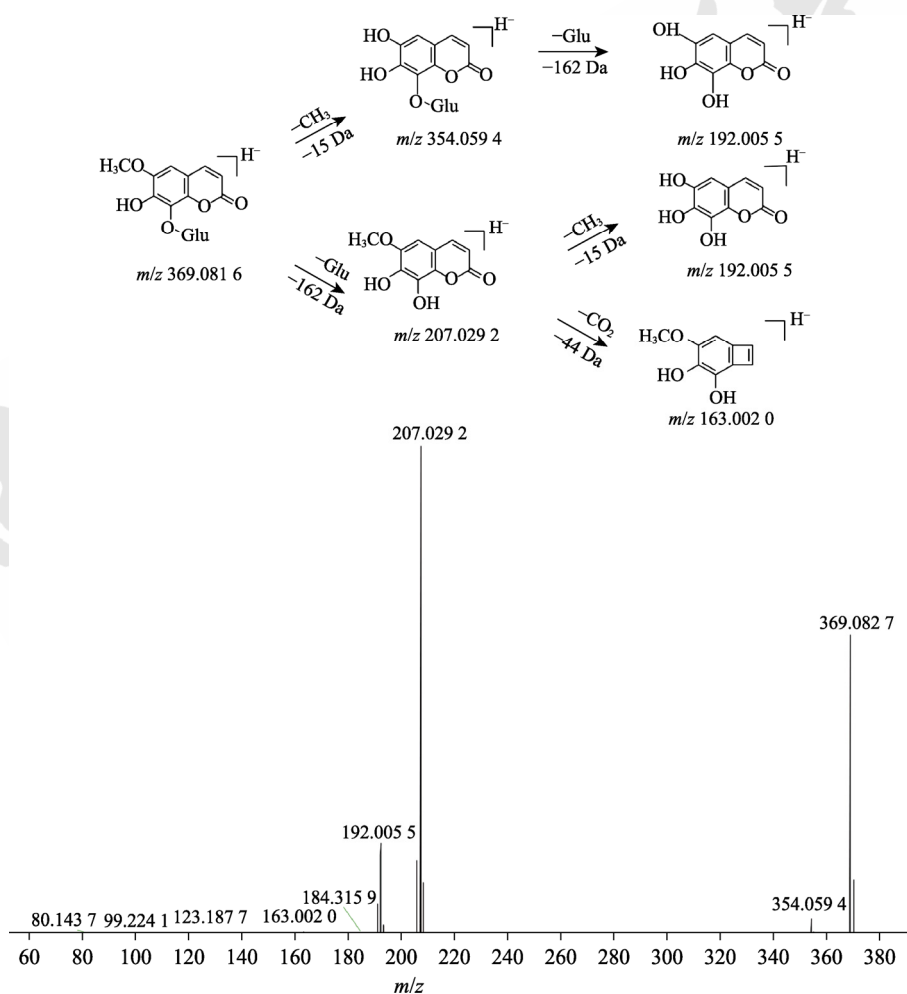


图4 秦皮苷的二级质谱图和可能的裂解途径
Fig. 4 MS/MS spectrum and possible fragmentation pathways of fraxin

3.2.2 环烯醚萜类 环烯醚萜类化合物的母核为环烯醚萜醇，具有环状烯醚及醇羟基(图 5A)，其

C7-C8 键断开，会变为裂环烯醚萜(图 5B)。环烯醚萜和裂环烯醚萜的 C6、C7、C8 位均可有取代

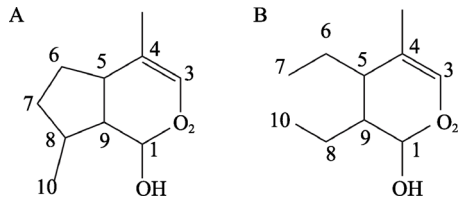


图5 环烯醚萜(A)、裂环烯醚萜(B)母核结构
Fig. 5 Parent nucleus structures of cycloetherenterpenes(A) and clecyletherenterpenes(B)

基(常为羟基或酯基), C1 位上有取代基如羟基, 常与 *D*-葡萄糖形成苷键且多为单糖苷, 由此形成环烯醚萜苷或裂环烯醚萜苷。秦皮中的环烯醚萜类化合物主要以裂环环烯醚萜苷形式存在, 少数以裂环烯醚萜的形式存在^[2]。化合物在电喷雾条件下, 裂环烯醚萜苷会发生裂解脱氢生成准分子离子峰[M-H]⁻, 在高能量状态下, 容易脱去母环上的功能基团, 丢失中性碎片 H₂O、CO₂、CH₃OH、CH₃COOH 和糖单元部分。本研究从秦皮提取物中鉴定到 8 种环烯醚萜类化合物, 均在负离子模式下采集得到, 其中化合物 5, 21, 23, 43, 56 为首次鉴定。以化合物 63 为例说明此类化合物的裂解规律。

在负离子模式下, 化合物 63 [M-H]⁻ *m/z* 为 539, 其典型碎片离子为 *m/z* 377[M-H-Glu]⁻, *m/z*

307[M-H-Glu-C₄H₆O]⁻, *m/z* 275[M-H-Glu-C₄H₆O-CH₃OH]⁻, *m/z* 121[M-H-Glu-C₄H₆O-CH₃OH-C₈H₁₀O₃]⁻。其裂解规律: 首先葡萄糖苷键断裂, 丢失一分子葡萄糖, 生成碎片离子 *m/z* 377, 随后丢失碎片 C₄H₆O, 生成碎片离子 *m/z* 307, 进而丢失烯醇片段的 CH₃OH, 生成碎片离子 *m/z* 275, 再丢失羟基酪醇 C₈H₁₀O₃, 最终得到碎片离子 *m/z* 121。该化合物分子式、质谱行为与文献报道^[13-14]一致, 故鉴定化合物为橄榄苦苷。其二级质谱图和可能的裂解途径见图 6。

3.2.3 苯乙醇苷类 在秦皮中, 苯乙醇苷类化合物与香豆素类、环烯醚萜类同为其特征性成分^[15]。本研究共鉴定到 10 种苯乙醇苷类成分, 均在负离子模式下采集得到, 其中化合物 6, 32, 33, 39, 48, 55 为首次鉴定。这些化合物都表现出一些相同的裂解规律, 主要为特征的中性碎片丢失, 如丢失咖啡酰基、乙酰基, 端基六碳糖(Glu)、脱氧六碳糖(Rha)以及脱水峰的产生等。除此之外, 在低 *m/z* 范围内, 它们的结构单元(包括苷元和糖苷配基)也会产生一系列特征碎片离子, 如来自咖啡酰基的碎片离子峰 *m/z* 179 以及其脱去 1 分子 H₂O 和 CO₂ 产生的碎片离子 *m/z* 161 和 135。以红景天

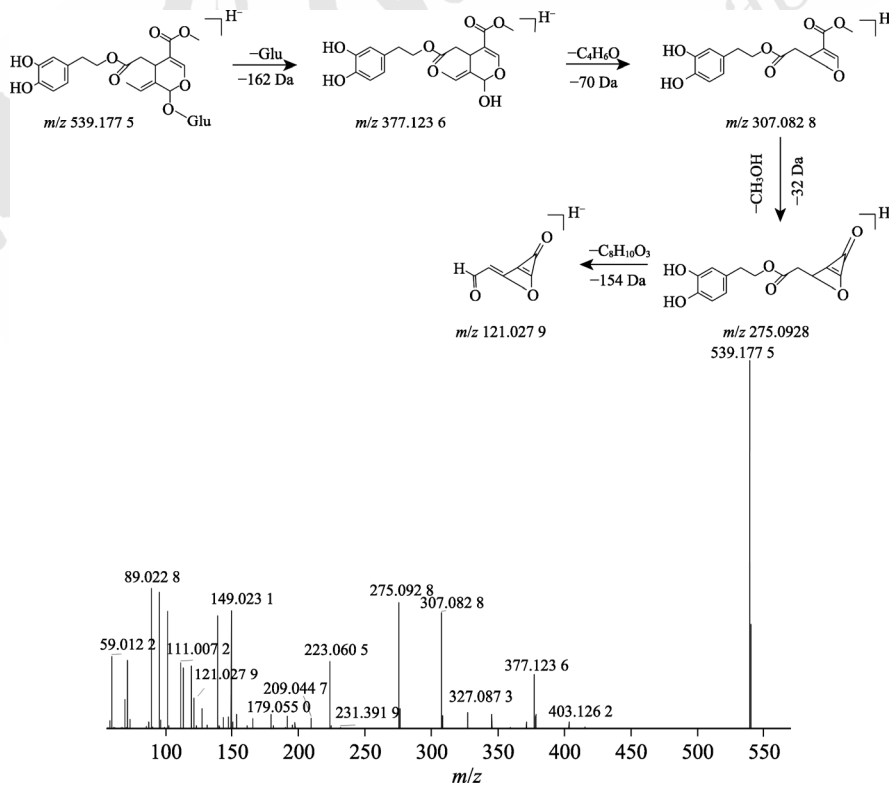


图6 橄榄苦苷的二级质谱图和可能的裂解途径
Fig. 6 MS/MS spectrum and possible fragmentation pathways of oleuropein

苷、松果菊苷为例说明此类化合物的裂解规律。

在负离子模式下，化合物 **9**[M-H]⁻的 m/z 为 299，其典型碎片离子为 m/z 137[M-H-Glu]⁻， m/z 119[M-H-Glu-H₂O]⁻。其裂解规律：在母离子的基础上丢失 1 分子葡萄糖基，再丢失 1 分子 H₂O。该化合物的保留时间、质谱行为与红景天苷对照品一致，且碎片离子与文献报道^[16]一致，故鉴定化合物为红景天苷。其二级质谱图和可能的裂解途径见图 7。

在负离子模式下，化合物 **33**[M-H]⁻的 m/z 为 785，其典型碎片离子为 m/z 623[M-H-CA]⁻， m/z 461[M-H-CA-Glu]⁻， m/z 477[M-H-CA-Rha]⁻， m/z 153[M-H-CA-Rha-2Glu]⁻，咖啡酰基(CA) m/z 179 及其特征碎片 m/z 161, 133, 135。其裂解规律：在母离子的基础上失去中性基团咖啡酰基，形成碎片离子 m/z 623，该碎片离子进一步中性丢失 1 分子鼠李糖和葡萄糖，产生碎片离子 m/z 461 及 m/z 477；与咖啡酰基结构相关的特征碎片离子有咖啡酰基 m/z 179，咖啡酰基先脱去 1 分子 H₂O 生成的碎片离子 m/z 161，进而脱去 1 分子 CO 生成的碎片离子 m/z 133，或脱去 1 分子 CO₂ 生成的碎片离子 m/z 135 以及脱去 1 分子 CO 产生的碎片离子 m/z 153。该化合物的保留时间、质谱行为与松果菊苷对照品一致，且碎片离子与文献报道^[17]一致，故鉴定化合物为松果菊苷。其二级质谱图和可能的裂解途径见图 8。

3.2.4 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^[18]。该类化合物在裂解过程中容易发生脱糖基、脱水、环的 RDA 裂解以及 CO、CO₂、CHO 等中性碎片的丢失。本研究共鉴定了 17 种黄酮类成分，其中负离子模式下 13 种，正离子模式下 4 种，其中正离子模式下的化合物 **26**, **37**, **66** 以及负离子模式下的化合物 **34**, **36**, **38**, **41**, **51**, **54**, **58**, **59**, **61**, **66**, **68**, **69**, **70** 为首次鉴定。以化合物 **41**, **58** 为例，说明黄酮类化合物的裂解规律。

在负离子模式下，化合物 **41** 的准分子离子为 m/z 463[M-H]⁻，糖链发生均裂脱去 1 分子半乳糖形成碎片离子 m/z 300[M-H-C₆H₁₁O₅]⁻，继而失去 1 分子 CO 和 1 个 H 形成碎片离子 m/z 271[M-H-C₆H₁₁O₅-CO-H]⁻；或糖链发生异裂脱去 1 分子半乳糖形成碎片离子 m/z 301[M-H-C₆H₁₀O₅]⁻，继而失去 1 分子 H₂O 和 1 分子 CO 形成碎片离子 m/z 255[M-H-C₆H₁₀O₅-H₂O-CO]⁻。该化合物的保留时间、质谱行为与金丝桃苷对照品一致，且碎片离子与文献报道^[19]一致，故鉴定化合物为金丝桃苷。其二级质谱图和可能的裂解途径见图 9。

在负离子模式下，化合物 **58** 的准分子离子为 m/z 609[M-H]⁻，脱去 1 分子 C₆H₁₀O₅ 形成碎片离子 m/z 447[M-H-C₆H₁₀O₅]⁻，继而失去 1 分子 C₆H₁₀O₄ 形成碎片离子 m/z 301[M-H-C₆H₁₀O₅-C₆H₁₀O₄]⁻。该化合物的保留时间、质谱行为与橙皮苷对照品一致，且碎片离子与文献报道^[20]一致，故鉴定化合物为橙皮苷。其二级质谱图和可能的裂解途径见图 10。

3.2.5 有机酸类 秦皮中含有酚酸及其衍生物和酚苷等多种酚类化合物^[21]，主要为芳香酸。芳香

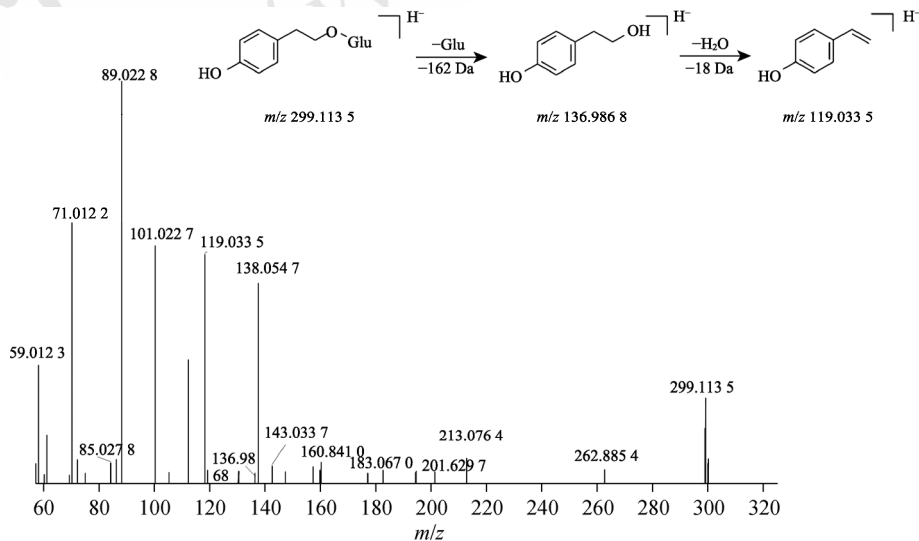


图 7 红景天苷二级质谱图和可能的裂解途径

Fig. 7 MS/MS spectrum and possible fragmentation pathways of salidroside

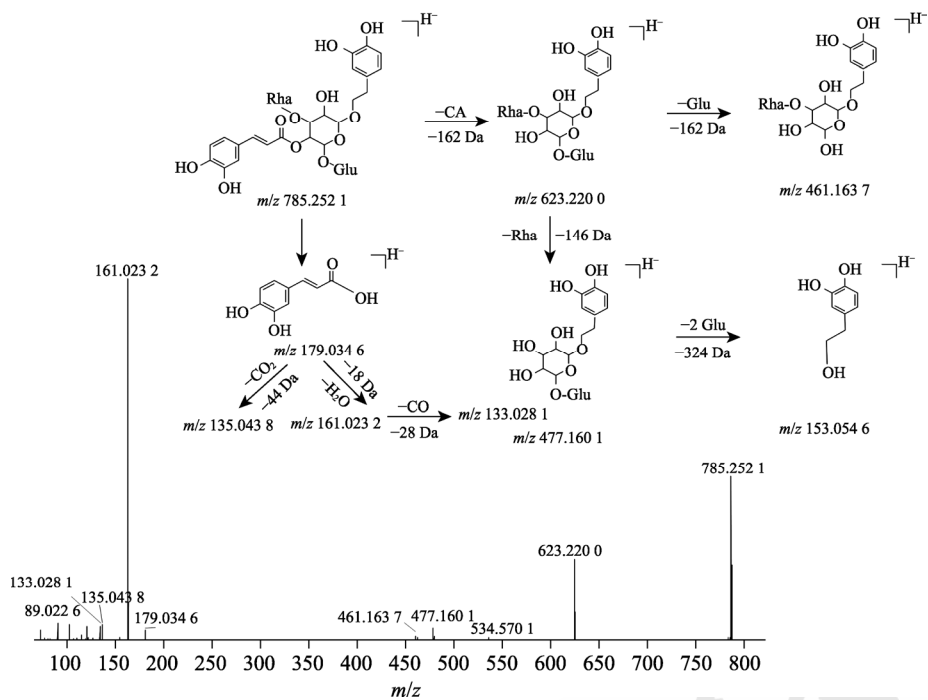


图 8 松果菊苷二级质谱图和可能的裂解途径

Fig. 8 MS/MS spectrum and possible fragmentation pathways of echinacoside

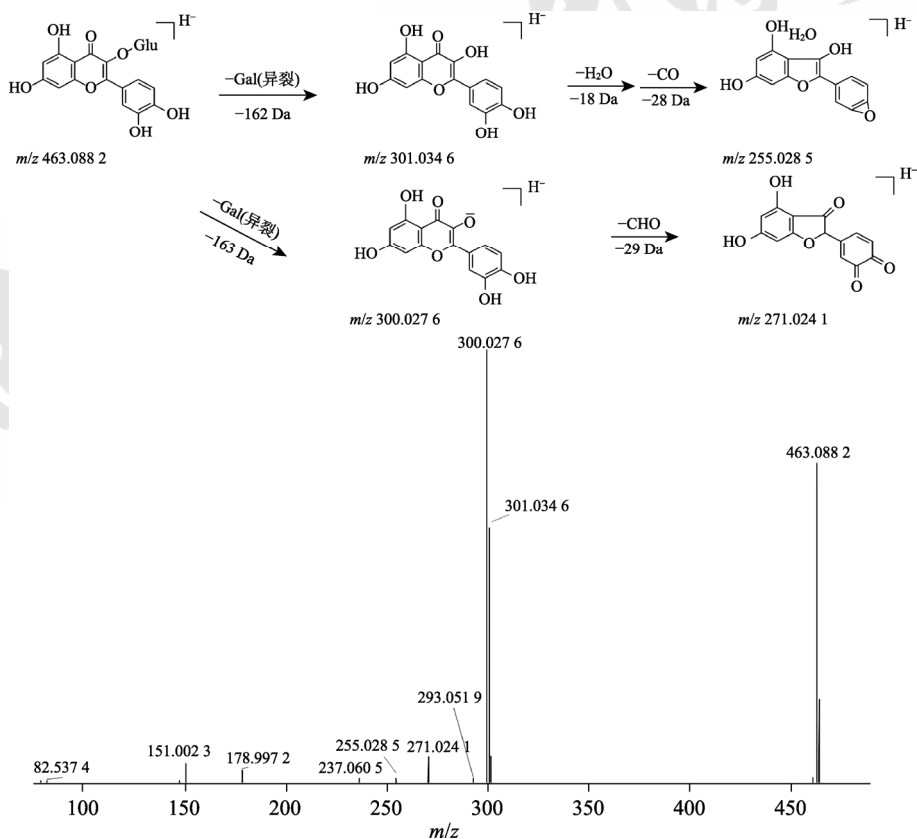


图 9 金丝桃苷二级质谱图和可能的裂解途径

Fig. 9 MS/MS spectrum and possible fragmentation pathways of hyperoside

酸中羧基与芳香烃基相连，故其质谱裂解规律先失去芳香基团，后失去 H_2O 、 CO_2 等小分子基团。

本研究在正、负离子模式下，共鉴定得到 16 种化合物，其中负离子下 12 种，正离子下 4 种，其中

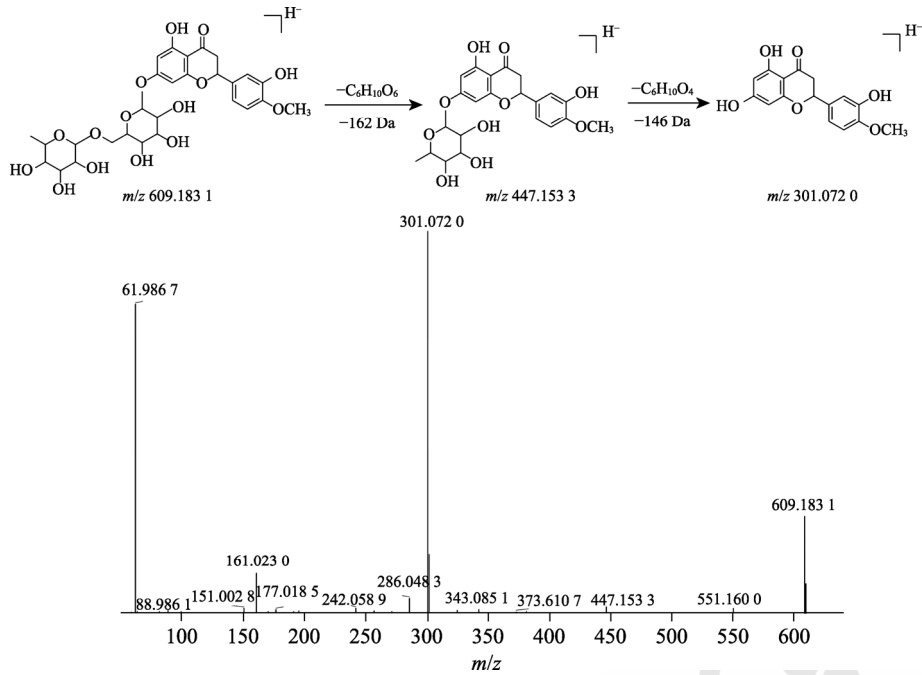


图 10 橙皮苷二级质谱图和可能的裂解途径

Fig. 10 MS/MS spectrum and possible fragmentation pathways of hesperidin

负离子模式下的化合物 **1**, **2**, **8**, **14**, **27**, **49**, **60**, **72** 为首次鉴定。以化合物 **13**, **14** 为例说明酚酸类化合物的裂解规律。

在负离子模式下, 化合物 **13** 的准分子离子为 m/z 353 $[M-H]^-$, 其主要的二级碎片离子为 m/z 191 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ 、 m/z 173 $[M-H-C_9H_6O_3-H_2O]^-$ 、 m/z 179 $[M-H-C_7H_{10}O_5]^-$ 、 m/z 135 $[M-H-C_7H_{10}O_5-CO_2]^-$, 经过与绿原酸对照品的保留时间、质谱行为比较, 且与文献报道^[22]一致, 确定此化合物为绿原酸。其二级质谱图和可能的裂解途径见图 11。

在负离子模式下, 化合物 **14** 的准分子离子为

m/z 137 $[M-H]^-$, 其主要的二级碎片离子为 m/z 109 $[M-H-CO]^-$, 经过与原儿茶醛对照品的保留时间、质谱行为比较, 且与文献报道^[19]一致, 故鉴定此化合物为原儿茶醛。其二级质谱图和可能的裂解途径见图 12。

3.2.6 其他类 本研究在负离子模式下采集到 1 种糖苷类化合物, 为化合物 **44**。由于糖基的存在, 糖苷类物质主要以脱去己糖产生特征碎片离子为主。化合物 **44** 裂解方式为其准分子离子峰 m/z 555 $[M-H]^-$ 脱去一分子葡萄糖基生成碎片离子 m/z 393 $[M-H-Glu]^-$ 。

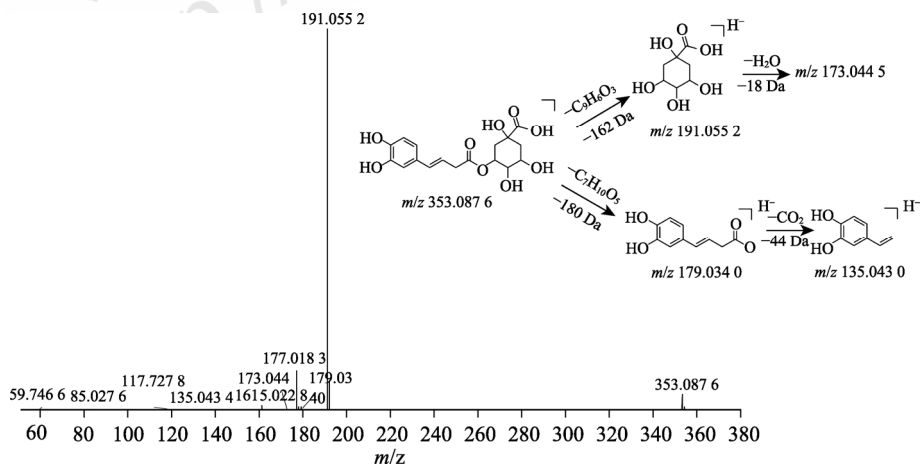


图 11 绿原酸二级质谱图和可能的裂解途径

Fig. 11 MS/MS spectrum and possible fragmentation pathways of chlorogenic acid

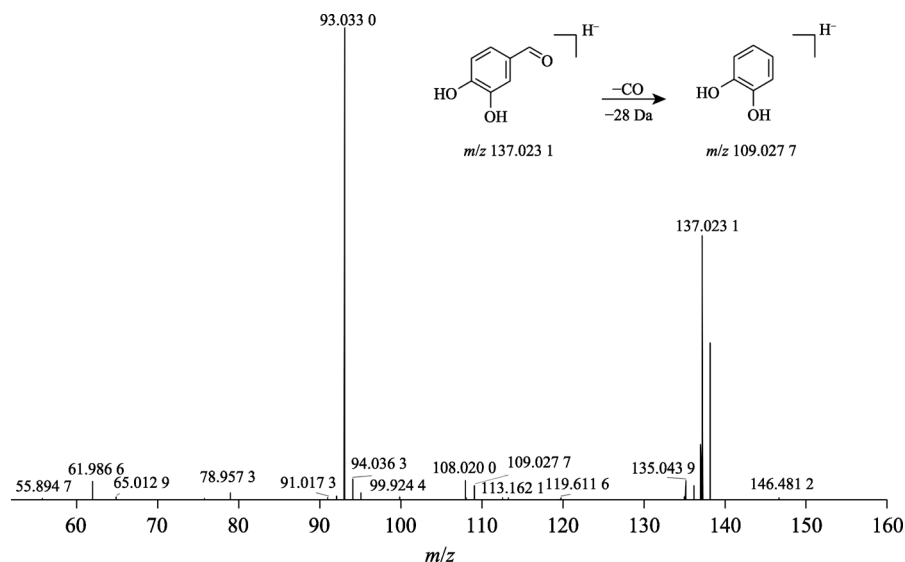


图 12 原儿茶醛二级质谱图和可能的裂解途径

Fig. 12 MS/MS spectrum and possible fragmentation pathways of protocatechualdehyde

4 结论

秦皮活性成分丰富，药理作用广泛，价格低廉，临床应用范围广^[23]。本研究采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术对秦皮的化学成分进行分析，共鉴定出 72 种化学成分，主要包括香豆素类、环烯醚萜类、苯乙醇苷类等，其中有 36 种成分首次在秦皮中鉴定到，进一步丰富和细化了秦皮有效成分信息特征，可为秦皮化学成分的分析提供参考，为其药理作用的深入研究提供科学依据，对秦皮的进一步研究具有重要意义。

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 282.
- [2] NIE A Z, LIN Z J, ZHANG B. Advance in studies on chemical constituents of Fraxini Cortex and their pharmacological effects[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(18): 3332-3341.
- [3] YANG B Y, YAN M Y, PAN J, et al. Progress in chemical constituents and pharmacological activities of cortex fraxini[J]. Inf Tradit Chin Med(中医药信息), 2016, 33(6): 116-119.
- [4] YE H, LI J W, ZENG B W, et al. HPLC method for simultaneous determination of four component contents in Fraxini Cortex[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2019, 36(12): 1087-1092.
- [5] ZHAO M M, DING W J, WANG S, et al. Simultaneous determination of nine coumarins in rat plasma by HPLC-MS/MS for pharmacokinetics studies following oral administration of Fraxini Cortex extract[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016(1025): 25-32.
- [6] WANG Y N, HAN F, SONG A H, et al. Rapid characterization of the chemical constituents of Cortex Fraxini by homogenate extraction followed by UHPLC coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and GC-MS[J]. J Sep Sci, 2016, 39(22): 4325-4334.
- [7] FU S. Studies on the methods for quality control of Cortex Fraxini[D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2014.
- [8] 刘丽梅, 李曼玲, 冯伟红, 等. HPLC 法测定秦皮中香豆素类成分的含量[J]. 中草药, 2004, 35(7): 819-822.
- [9] ZHU C S, LIN Z J, ZHANG B, et al. Qualitative and quantitative analysis of Chicory Root by LC/MS and HPLC[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报), 2016, 39(3): 247-251.
- [10] HU J, YANG Y Y, REN H, et al. Identification of chemical constituents in caulis of *Erycibe schmidtii* by UPLC-Q-exactive focus-MS/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2020, 26(18): 124-132.
- [11] LI X, SHI H, DING J X, et al. Analysis of chemical constituents as flavonoids and coumarins in Radix Ardisiae from different sources[J]. China Pharm(中国药房), 2021, 32(4): 443-452.
- [12] FU S, ZHANG J, LI T, et al. Multi-responses extraction optimization based on response surface methodology combined with polarity switching HPLC-MS/MS for the simultaneous quantitation of 11 compounds in Cortex Fraxini: Application to four species of Cortex Fraxini and its 3 confusable species[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014(91): 210-221.
- [13] LI H, YAO W F, LIU Q N, et al. Application of UHPLC-ESI-Q-TOF-MS to identify multiple constituents in processed products of the herbal medicine ligustri lucidi fructus[J]. Molecules, 2017, 22(5): 689.
- [14] ZHOU L, KANG J, FAN L, et al. Simultaneous analysis of coumarins and secoiridoids in Cortex Fraxini by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 47(1): 39-46.
- [15] PAN H, YE H, ZENG B W, et al. Study on HPLC fingerprint

- of cortex fraxini[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2019, 36(10): 878-881.
- [16] ZHANG W X, FENG M, MIAO Y L, et al. Analysis of chemical components of Huanbei Zhike Prescription based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(14): 3022-3034.
- [17] WANG X M. Study on effective components and mechanism of *Cistanche deserticola* in relieving physical fatigue[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2019.
- [18] LIU X M, YANG Y Y, HU J, et al. Identification of chemical constituents in Fengliaoqing Fengshi Dieda wine[J]. China Pharm(中国药房), 2020, 31(20): 2473-2480.
- [19] ZHOU M Y, HUO J H, SUN G D, et al. Identification of 45 kinds of chemical components of *Forsythia suspensa* by UPLC-Q-TOF-MS[J]. China Pharm(中国药房), 2019, 30(22): 3067-3073.
- [20] ZHOU M Y, HUO J H, SUN G D, et al. Analysis of chemical constituents of forsythia suspensa leaves based on UPLC-Q-TOF-MS technique[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2019, 42(11): 2582-2587.
- [21] LIU G Y, ZHOU J H, CUI X A. Research progress on chemical composition of Cortex Fraxini[J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志), 2016, 31(2): 220-222.
- [22] LIANG H B, JIANG Y J, YUAN X M, et al. Chemical constituents of Jingfang Granules based on GC-MS and UPLC-Q Exactive MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2022, 53(6): 1697-1708.
- [23] LE Y, ZHANG X Y, LI K. Esculetin regulates triple negative breast cancer cell stemness in hypoxia microenvironment through HIF-1 α [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2020, 39(9): 558-563.

收稿日期: 2022-06-15

(本文责编: 蔡珊珊)

中国现代应用药学
http://www.chinjmap.com