

UHPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析抗癆胶囊化学成分

谢 滢^{1,2,3}, 叶开文¹, 李 冰¹, 侯小涛^{1,2,3*}

(1. 广西中医药大学, 广西中药药效研究重点实验室, 广西 南宁 530200; 2. 广西中医药大学农作物废弃物协同创新中心, 广西 南宁 530200; 3. 广西中医药大学, 广西中医湿病方药理论与转化重点实验室, 广西 南宁 530200)

摘要: **目的** 建立 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析抗癆胶囊化学成分。**方法** 分析采用菲罗门 Kinetex C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈-0.1% 甲酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 40 ℃; 电喷雾离子源 (ESI); 正负离子模式。根据采集的色谱峰同位素丰度及一级、二级质谱, 计算高分辨精确分子质量并推测其裂解方式, 结合文献解析化合物结构。**结果** 共鉴定出 52 种化学成分, 主要为岩白菜素类和葡萄糖氧基苄基 2-异丁基苹果酸酯类, 还包括生物碱、酚类、黄酮类。**结论** 抗癆胶囊止咳成分主要为岩白菜素类、百部生物碱类化合物, 而葡萄糖氧基苄基 2-异丁基苹果酸酯类为主要止血物质。抗癆胶囊可能不是通过直接抗 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 活性治疗浸润性肺结核, 而是通过免疫调节活性起到辅助作用。

关键词: 抗癆胶囊; 化学成分; UHPLC-Q-TOF-MS/MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2024)10-3338-10

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2024.10.025

Analysis of chemical constituents in Kanglao Capsules by UHPLC-Q-TOF-MS/MS

XIE Yan^{1,2,3}, YE Kai-wen¹, LI Bing¹, HOU Xiao-tao^{1,2,3*}

(1. Guangxi Key Laboratory for Efficacy Study on Chinese Materia Medica, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Collaborative Innovation Center for Research on Functional Ingredients of Agricultural Residues, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 3. Guangxi Key Laboratory of TCM Formulas Theory and Transformation for Damp Diseases, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

KEY WORDS: Kanglao Capsules; chemical constituents; UHPLC-Q-TOF-MS/MS

抗癆胶囊由矮地茶、百部、穿破石、五指毛桃、白及、桑白皮组成, 在临床上主要治疗肺虚久咳、痰中带血, 除白及外其余 5 味中药均可用于咳嗽^[1-3]。其中, 矮地茶具有化痰止咳的功效, 治疗新久咳嗽、喘满痰多; 百部具有润肺、止咳、祛痰的功效, 治疗新久咳嗽、肺癆咳嗽、顿咳; 穿破石具有止咳化痰的功效, 治疗肺结核; 五指毛桃具有健脾益气的功效, 治疗脾虚浮肿、食少无力、肺癆咳嗽; 桑白皮具有泻肺平喘、利水消肿的功效, 治

疗肺热喘咳; 白及具有收敛止血、消肿生肌的功效, 治疗咯血、吐血。虽然有关矮地茶^[4]、百部^[5]、穿破石^[6-7]、五指毛桃^[8-9]、白及^[10]、桑白皮^[11]化学成分的研究已多有报道, 但目前抗癆胶囊的质量控制标准仅有显色鉴别, 无清晰的指标性成分。因此, 本研究应用 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析抗癆胶囊甲醇提取物, 通过文献对比二级质谱信息鉴别主要成分, 为今后制定其完善的质量标准及推测可能的药效物质基础提供依据。

收稿日期: 2023-05-23

基金项目: 广西省青年基金 (2020GXNSFBA297056); 广西省广西中药药效研究重点实验室运行补助项目 (20-065-38)

作者简介: 谢 滢 (1984—), 女, 博士, 讲师, 从事中药药效物质基础研究。Tel: (0771) 4733831, E-mail: y2y2020@126.com

* 通信作者: 侯小涛 (1969—), 女, 博士, 教授, 从事中药药效物质基础及其质量控制研究。E-mail: xthou@126.com

网络出版日期: 2023-10-25

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20231024.1512.004.html>.

1 材料

1.1 仪器 ExionLC 超高效液相色谱仪、X500R 高分辨质谱仪 (美国 AB Sciex 公司); EL204 电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Purelab Classic UV 超纯水仪 (英国 ELGA 公司)。

1.2 试剂与药物 抗癆胶囊购于桂林三金药业股份有限公司, 批号 190801。矮地茶、百部、穿破石、五指毛桃、白及、桑白皮饮片均购于广西仙荣中药科技有限公司, 批号 20220901、20220603、20221101、20230101、20220901、20220401, 经广西中医药大学廖月葵高级实验师鉴定为正品。绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、岩白菜素、去甲基岩白菜素、对叶百部碱、dactylorhin A、1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯对照品均购于成都普思生物科技有限公司, 批号 010694、001110、000974、010520、220228-05、230214-02、011099、011098。乙腈、甲酸均为色谱纯, 购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 甲醇为分析纯, 购于成都市科隆化学品有限公司; 水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件 菲罗门 Kinetex C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相乙腈 (A) -0.1% 甲酸 (B), 梯度洗脱 (0~12 min, 5%~10% A; 12~41 min, 10%~35% A; 41~45 min, 35%~43% A); 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 40 ℃; 进样量 3 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI); 正负离子扫描; IDA 模式; 毛细管电压 5 500、-4 500 V; 辅助气温度 600 ℃; 辅助气 (N₂) 55 psi (1 psi = 6.895 kPa); 气帘气 35 psi; 碰撞气 (N₂) 7 psi; 去簇电压 80、-80 V; TOF-MS、TOF-MS/MS 碰撞能量 10、35 V; 扫描范围 m/z 100~1 500。IDA 设置响应值超过 100 cps 的 10 个最高峰进行二级质谱扫描, 开启动态背景扣除。

2.3 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量, 甲醇制成对叶百部碱质量浓度为 0.01 mg/mL, 绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、岩白菜素、去甲基岩白菜素、dactylorhin A、1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯质量浓度均为 0.024 mg/mL 的溶液, 即得。

2.4 供试品溶液制备 取本品内容物粉末约 0.5 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 加入 5 mL

50% 甲醇, 称定质量, 超声提取 20 min, 放冷至室温, 50% 甲醇补足减失的质量, 过滤, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。分别称取矮地茶、百部、穿破石、五指毛桃、白及、桑白皮饮片 100 g, 加入 1 L 水煎煮 30 min, 过滤, 浓缩, 浓缩液冷冻干燥, 分别精密称取 0.5 g, 置于具塞锥形瓶中, 加入 15 mL 50% 甲醇, 称定质量, 超声提取 20 min, 放冷至室温, 50% 甲醇补足减失的质量, 过滤, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.5 数据分析 查阅国内外相关文献, 整理抗癆胶囊中 6 味中药所含的化学成分信息。根据 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 获得色谱峰的同位素丰度及一级、二级质谱, 利用 SCIEX OS 软件中 Explorer 模块的 Formula Finder 计算高分辨精确分子质量, 快速推测各色谱峰对应化合物的分子式, 依据 MS/MS 碎片信息推测其裂解方式, 解析化合物结构。

3 结果

取“2.4”项下供试品溶液适量, 在“2.1”“2.2”项条件下进样测定, 发现在正负离子模式下各成分分离、离子化程度均较好, 共鉴定出 52 种成分, 具体见表 1, 总离子流图见图 1。

3.1 苹果酸酯糖苷类及其衍生物 苹果酸酯糖苷由苹果酸、糖基、苄基组成, 在 ESI-MS 光谱中发现脱质子分子离子峰 $[M-H]^-$ 。在苹果酸酯糖苷的质谱中, 通常观察到 H₂O (18 Da)、COOH (45 Da)、C₆H₁₀O₅ (162 Da)、C₁₃H₁₇O₇ (285 Da) 碎片的丢失。以 dactylorhin A 为例^[38] (图 2), $[M-H]^-$ 分子离子峰为 m/z 887.315 0, MS² 图谱中碎片离子峰 m/z 887.315 0 通过中性丢失 C₆H₁₀O₅ 和 H₂O 形成碎片离子峰 m/z 707.252 6 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$; 碎片离子峰 m/z 887.315 0 丢失 glucopyranosyloxy-benzyl moiety 产生 m/z 619.221 6 $[M-H-C_{13}H_{16}O_6]^-$, 表明 glucopyranosyloxy-benzyl moiety 极易丢失碎片离子峰 m/z 619.221 6 通过 C₂-OH 位置中性丢失 glycone moiety 形成碎片离子峰 m/z 439.158 7 $[M-H-C_{13}H_{16}O_6-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$ 。碎片离子峰 m/z 439.158 7 进一步丢失 glucopyranosyloxy-benzyl moiety 产生 m/z 171.066 3 $[M-H-C_{13}H_{16}O_6-C_6H_{10}O_5-H_2O-C_{13}H_{16}O_6]^-$ 。碎片离子峰 m/z 153.055 2 是通过 m/z 171.066 3 丢失 H₂O 衍生而来的, 通过与相关文献比对, 鉴定为 dactylorhin A。基于类似的裂解方式, 根据分子式、MS² 片段和相关文献, 确定了其他 12 个化合物,

表 1 抗癆胶囊提取物中化学成分
Tab. 1 Chemical constituents in Kanglao Capsules extract

序号	保留时间/ min	实测值 <i>m/z</i>	理论值 <i>m/z</i>	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	离子模式	碎片峰 <i>m/z</i>	名称	来源**	文献	类型
1	0.997	331.102 4	331.103 5	-3.2	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	[M+FA-H] ⁻	123.045 1 (100%), 105.034 7	gastrodin	白及	[12]	苹果酸酯糖苷 及其衍生物
15	7.119	189.076 5	189.076 8	-1.8	C ₈ H ₁₄ O ₅	[M-H] ⁻	189.076 7, 145.087 2, 129.055 4 (100%), 127.076 4	isobutyramic acid	白及	[13]	
27	14.306	727.206 7	727.209 1	-3.3	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₉	[M-H] ⁻	727.206 6 (100%), 441.103 6, 423.093 0, 397.113 7, 379.104 5, 263.077 5, 217.051 3, 161.045 7	parishin B or C	穿破石	—	
31	17.467	619.221 9	619.224 4	-4.0	C ₂₆ H ₃₈ O ₁₄	[M+FA-H] ⁻	439.158 9, 171.065 7, 153.054 9 (100%)	daetylorhin A derivatives	白及	—	—
32	18.626	697.233 2	697.234 9	-2.5	C ₃₂ H ₄₂ O ₁₇	[M-H] ⁻	429.139 8 (100%), 261.098 2, 221.067 0, 161.045 9	bis { 4-[(2S, 4S, 5S, 6R)-3, 4, 5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2-yl] oxyphenyl } methyl } 3-hydroxy-3-methylpentanedioate	穿破石	[14]	
33	20.221	915.350 1	915.350 3	-0.3	C ₄₂ H ₆₀ O ₂₂	[M-H] ⁻	457.169 3 (100%), 373.111 3, 285.097 4, 211.058 2, 153.055 6	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯衍生物	白及	—	—
36	20.960	937.330 3	937.334 7	-4.7	C ₄₃ H ₅₆ O ₂₀	[M+FA-H] ⁻	937.329 7, 479.153 5, 457.170 7 (100%), 373.112 0, 285.098 3, 211.059 1, 153.056 1	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯衍生物	白及	—	
38	22.634	887.315 0	887.319 0	-3.7	C ₄₀ H ₅₆ O ₂₂	[M-H] ⁻	707.252 6, 619.221 6 (100%), 439.158 7, 179.055 8, 153.055 2	daetylorhin A *	白及	[15]	—
41	26.325	725.262 6	725.266 2	-4.6	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₇	[M-H] ⁻	457.172 8 (100%), 285.097 0, 153.055 1	1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯*	白及	[16]	
42	27.441	929.326 5	929.329 6	-4.3	C ₄₂ H ₅₈ O ₂₃	[M-H] ⁻	661.231 6 (100%), 481.173 9, 439.159 1, 221.066 7, 153.055 7	gymnoside III	白及	[15]	—
43	30.694	971.335 8	971.340 2	-4.5	C ₄₄ H ₆₀ O ₂₄	[M-H] ⁻	703.242 3 (100%), 661.233 6, 481.170 8, 439.159 4, 153.055 8	gymnoside VIII	白及	[17]	
45	35.449	1 013.349 0	1 013.351 0	-2.2	C ₄₆ H ₆₂ O ₂₅	[M-H] ⁻	745.255 9 (100%), 703.245 2, 481.172 2, 439.160 7, 153.055 7	acetyl-gymnoside VIII	白及	—	—
46	37.575	1 017.357 0	1 017.361 0	-3.7	C ₄₉ H ₆₂ O ₂₃	[M-H] ⁻	749.263 3 (100%), 439.159 8, 153.055 9	gymnoside V	白及	[12]	
47	39.389	1 059.367 0	1 059.372 0	-3.9	C ₅₁ H ₆₄ O ₂₄	[M-H] ⁻	791.273 9 (100%), 439.160 4, 153.056 1	gymnoside IX or gymnoside IX isomer	白及	[17-18]	—
48	39.963	1 059.368 0	1 059.372 0	-3.8	C ₅₁ H ₆₄ O ₂₄	[M-H] ⁻	791.276 1 (100%), 661.235 5, 569.202 8, 439.160 9, 153.056 2	gymnoside IX or gymnoside IX isomer	白及	[17-18]	
49	43.321	1 059.369 0	1 059.372 0	-0.3	C ₅₁ H ₆₄ O ₂₄	[M-H] ⁻	791.276 2 (100%), 661.235 6, 569.203 3, 439.160 9, 153.056 4	gymnoside IX or gymnoside IX isomer	白及	[17-18]	—
2	1.488	313.055 9	313.056 5	-1.9	C ₁₃ H ₁₄ O ₉	[M-H] ⁻	313.055 9 (100%), 193.014 5	去甲岩白菜素*	矮地茶	[19]	香豆素类
5	2.711	297.061 0	297.061 6	-2.0	C ₁₃ H ₁₄ O ₈	[M-H] ⁻	297.061 1, 219.029 7, 177.019 1 (100%), 133.029 7	demethoxybergenin	矮地茶	[20-21]	
9	3.744	327.070 8	327.072 2	-4.1	C ₁₄ H ₁₆ O ₉	[M-H] ⁻	312.047 6, 234.016 0, 192.005 7 (100%)	岩白菜素*	矮地茶	[20-21]	
11	4.652	489.124 3	489.125 0	-1.4	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₄	[M-H] ⁻	489.124 4, 327.072 3, 312.047 5, 249.041 6, 207.030 1 (100%), 192.006 3	11-β- <i>D</i> -glucopyranosyl bergenin	矮地茶	[21]	
29	16.119	479.081 6	479.083 1	-3.4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	[M-H] ⁻	313.055 9 (15%), 207.029 4 (27%), 193.013 3 (100%)	11- <i>O</i> -没食子酰岩白菜素	矮地茶	[21]	
37	22.339	447.092 8	447.093 3	-1.1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.092 3, 234.017 5, 207.030 1, 192.006 7 (100%), 164.011 8	(2 <i>R</i>)-2α-(4-hydroxybenzoyloxymethyl)-3β, 4α, 8, 10-tetrahydroxy-9-methoxy-2,3,4,4aα, 6, 10hβ-hexahydropyrano [3,2- <i>c</i>] [2] benzopyran-6-one	矮地茶	—	—
40	24.541	499.144 7	499.145 7	-2.0	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	327.070 8 (100%), 312.048 0, 207.029 8, 192.006 4	ethyl 2- [(2 <i>R</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>S</i> , 10 <i>S</i>)-10-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3, 4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-6-oxo-3,4,4a, 10h-tetrahydro-2 <i>H</i> -pyrano [3,2- <i>c</i>] isochromen-8-yl] oxy acetate	矮地茶	—	

续表 1

序号	保留时间/ min	实测值 m/z	理论值 m/z	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	离子模式	碎片峰 m/z	名称	来源**	文献	类型
8	3.404	338.195 0	338.196 2	-3.5	$C_{18}H_{27}NO_5$	[M+H] ⁺	338.195 2 (100%), 264.159 7, 236.165 0	6-hydroxycrooine	百部	[22]	生物碱类
10	4.431	322.200 2	322.201 3	-3.4	$C_{18}H_{27}NO_4$	[M+H] ⁺	322.200 3 (100%), 248.164 4	crooine isomer	百部	[23]	
13	5.072	322.200 7	322.201 3	-1.8	$C_{18}H_{27}NO_4$	[M+H] ⁺	322.200 7, 304.192 3, 248.164 0 (100%)	crooine	百部	[23]	
20	11.587	376.246 8	376.248 2	-3.8	$C_{22}H_{33}NO_4$	[M+H] ⁺	376.246 6 (100%), 302.211 6	对叶百部碱异构体	百部	[23]	
22	12.055	390.227 0	390.227 5	-1.8	$C_{22}H_{31}NO_5$	[M+H] ⁺	390.227 1 (100%), 372.217 3, 316.190 9, 298.181 5	stemonine	百部	[23]	
24	13.256	376.247 3	376.248 2	-2.5	$C_{22}H_{33}NO_4$	[M+H] ⁺	376.246 2 (100%), 302.210 5	对叶百部碱*	百部	[23]	
26	14.294	376.246 9	376.248 2	-3.5	$C_{22}H_{33}NO_4$	[M+H] ⁺	376.246 3 (100%), 302.211 0	对叶百部碱异构体	百部	[23]	
28	14.356	376.247 6	376.248 2	-1.7	$C_{22}H_{33}NO_4$	[M+H] ⁺	376.246 5 (100%), 302.210 9	对叶百部碱异构体	百部	[23]	
51	44.236	388.211 3	388.211 8	-1.2	$C_{22}H_{29}NO_5$	[M+H] ⁺	370.202 1 (100%), 300.160 2, 296.166 1, 200.144 3	stemosessifoin or isomer	百部	[24]	
52	44.857	388.211 4	388.211 8	-1.2	$C_{22}H_{29}NO_5$	[M+H] ⁺	370.202 4 (100%), 300.160 7, 296.166 2, 274.181 8, 200.144 3	stemosessifoin or isomer	百部	[24]	
3	2.346	353.087 1	353.087 8	-2.0	$C_{16}H_{18}O_9$	[M-H] ⁻	191.055 4 (100%), 179.034 6, 161.024 7, 135.044 9	新绿原酸*	桑白皮	[25-26]	酚类
4	2.617	197.046 0	197.045 5	2.3	$C_9H_{10}O_5$	[M-H] ⁻	182.021 9 (100%), 166.999 9, 123.009 5	丁香酸	五指毛桃	[27-28]	
6	3.003	163.040 2	163.040 1	0.8	$C_9H_8O_3$	[M-H] ⁻	119.050 3 (100%)	对羟基肉桂酸	五指毛桃	[28]	
7	3.066	137.024 6	137.024 4	1.3	$C_7H_6O_3$	[M-H] ⁻	137.025 0 (100%), 108.021 8	对羟基苯甲酸	五指毛桃	[29]	
12	4.928	353.086 9	353.087 8	-2.6	$C_{16}H_{18}O_9$	[M-H] ⁻	191.055 0 (100%)	绿原酸*	桑白皮	[25-26]	
14	5.211	353.086 7	353.087 8	-2.0	$C_{16}H_{18}O_9$	[M-H] ⁻	191.055 6, 179.034 4, 173.044 9, 135.044 8 (100%)	隐绿原酸*	桑白皮	[25-26]	
17	9.491	335.077 3	335.077 2	-2.2	$C_{16}H_{18}O_9$	[M-H ₂ O-H] ⁻	335.077 6, 179.034 9, 161.024 6, 135.045 4 (100%), 133.030 4	1-caffeoyl quinic acid	桑白皮	[30]	
18	10.035	335.076 5	335.077 2	-2.2	$C_{16}H_{16}O_8$	[M-H] ⁻	335.076 9, 179.035 4, 161.024 3 (100%), 135.045 3, 133.029 7	咖啡酰莽草酸	桑白皮	[31]	
19	10.436	335.076 8	335.077 2	-2.2	$C_{16}H_{16}O_8$	[M-H] ⁻	179.035 4, 173.045 8, 161.024 4 (100%), 135.045 6, 133.029 7	咖啡酰莽草酸	桑白皮	[31]	
21	11.664	335.076 7	335.077 2	-2.2	$C_{15}H_{14}O_6$	[M+FA-H] ⁻	335.076 7, 161.024 2 (100%), 135.045 3, 133.029 7	咖啡酰莽草酸	桑白皮	[31]	黄酮类
44	33.370	245.116 3	245.117 2	-3.8	$C_{15}H_{16}O_3$	[M+H] ⁺	245.118 4, 151.075 8, 137.060 3, 121.065 0 (100%)	batatasin III	白及	[32]	
50	43.898	259.131 9	259.132 9	-3.7	$C_{16}H_{18}O_3$	[M+H] ⁺	259.133 5, 151.075 8 (100%), 135.080 9, 121.065 5	3,5-dihydroxy-2'-methoxy-4-methyl biphenyl	白及	—	
16	7.777	449.108 1	449.108 9	-1.9	$C_{21}H_{22}O_{11}$	[M-H] ⁻	449.108 0, 287.056 4, 269.045 7, 259.061 2 (100%), 125.024 8	aromadendrin-7-O- β -D-glucopyranoside	穿破石	[14]	
23	13.080	303.051 0	303.051 0	-0.1	$C_{15}H_{12}O_7$	[M-H] ⁻	285.040 9, 241.050 8, 217.051 4, 175.040 6, 151.004 1, 125.024 7 (100%), 107.014 6	二氢桑色素	穿破石	[14]	
25	13.605	303.051 1	303.051 0	0.2	$C_{15}H_{12}O_7$	[M-H] ⁻	285.040 8, 217.050 8, 177.019 5, 149.025 1, 125.024 7 (100%)	二氢槲皮素	穿破石	[14]	
30	16.633	449.107 6	449.108 9	-3.0	$C_{21}H_{22}O_{11}$	[M-H] ⁻	303.050 5, 285.040 2, 151.003 6 (100%)	落新妇苷	桑白皮,矮地茶	[33-34]	
34	20.571	447.092 1	447.093 3	-2.7	$C_{21}H_{20}O_{11}$	[M-H] ⁻	447.091 8, 285.039 6 (100%), 257.045 4, 241.051 2, 151.003 7	山奈酚-7-O-葡萄糖苷	穿破石	[14]	
35	20.878	303.048 9	303.049 9	-3.3	$C_{15}H_{10}O_7$	[M+H] ⁺	303.049 5 (100%), 285.041 3, 257.045 9, 229.050 7, 153.019 1	槲皮素	矮地茶	[35]	
39	24.341	287.056 1	287.056 1	0	$C_{15}H_{12}O_6$	[M-H] ⁻	161.025 0, 151.004 0, 125.024 9 (100%)	香橙素	穿破石	[36-37]	

注：FA 表示甲酸，* 表示比对对照品，** 表示比对一级、二级质谱。

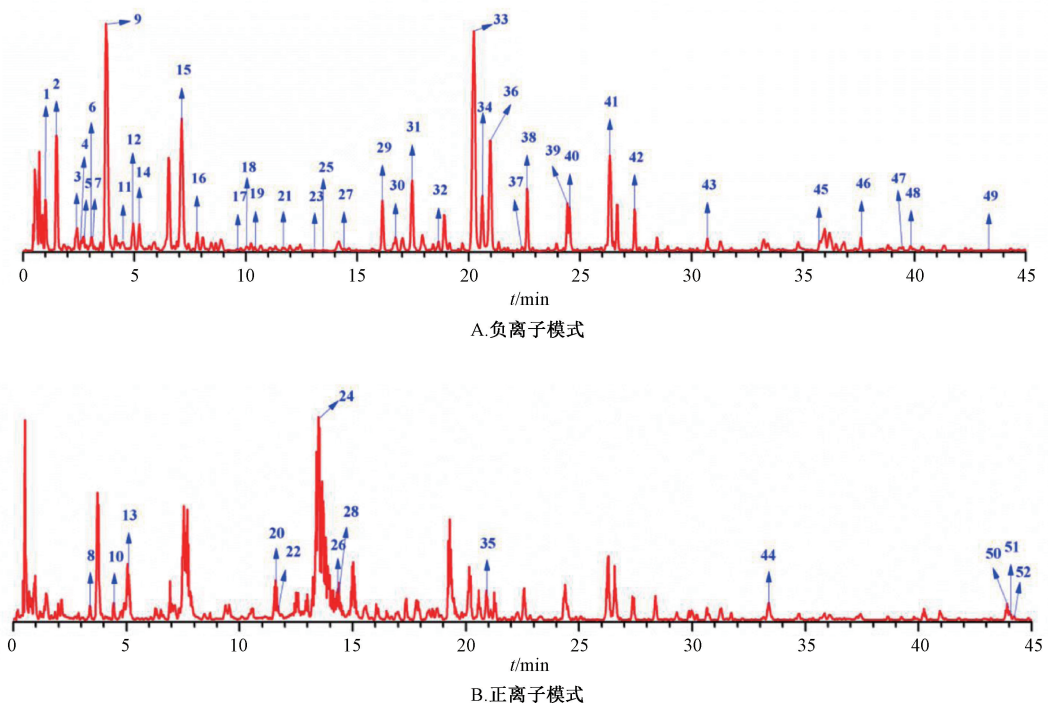


图 1 抗癆胶囊提取物总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of Kanglao Capsules extract

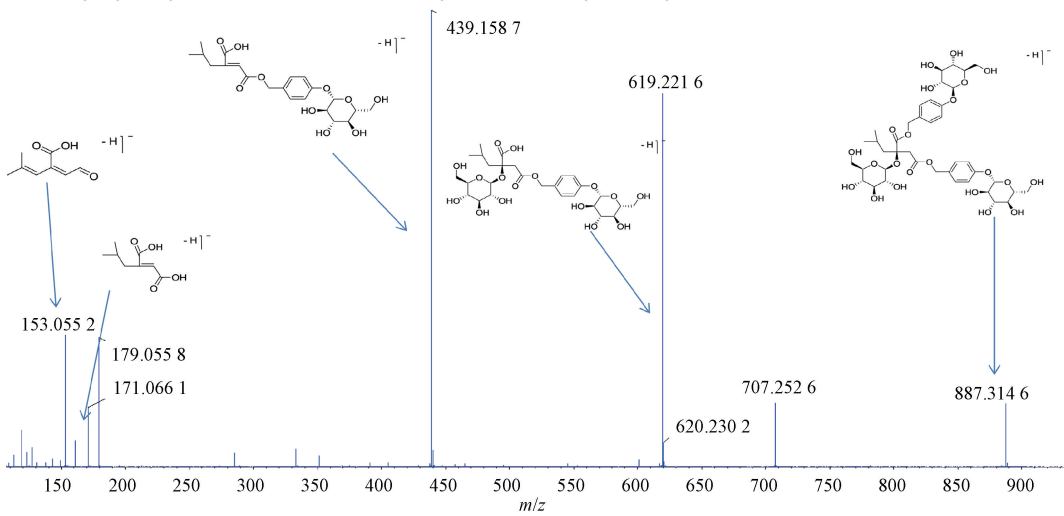


图 2 dactylorhin A 二级质谱图及其可能的裂解途径

Fig. 2 Secondary mass spectrometry and possible cleavage pathways of dactylorhin A

其中 2 个——parishin B or C 和 acetyl-gymnoside VIII 尚未有来源于处方中药味的报道。另外，保留时间 20. 221、20. 960 min 的 2 个化合物由于其 MS² 及 UV 最大吸收值与 1, 4-二 [4- (葡萄糖氧) 苄基] -2-异丁基苹果酸酯类似，推测为后者衍生物，而保留时间 17. 464 min 的化合物为 dactylorhin A 类似物。

3.2 香豆素类 脱质子分子离子峰 [M-H]⁻均在 ESI-MS 谱中发现，其中 m/z 192、234 是岩白菜素

类化合物的特色碎片离子峰，同时通常观察到 H₂O (18 Da)、CO (28 Da)、CH₃ (15 Da) 碎片的丢失。以岩白菜素为例 (图 3)，MS² 谱图中 [M-H]⁻ 通过中性丢失 CH₃ 形成碎片离子峰 m/z 312. 047 4 [M-H-CH₃]⁻，碎片离子峰 m/z 234. 015 9 由 m/z 312. 047 4 丢失 CHOCH₂OH 并脱水产生，即 [M-H-CH₃-CHOCH₂OH-H₂O]⁻，随后碎片离子峰 m/z 234. 015 9 通过中性丢失 CO 或丢失 CH₂CO 形成 m/z 206. 021 6 [M-H-CH₃-

$\text{CHOCH}_2\text{OH}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^-$ 、192.005 5 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{CHOCH}_2\text{OH}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CO}]^-$ ，碎片离子峰 m/z 192.005 5 进一步中性丢失 CO 形成 m/z 164.011 2 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3-\text{CHOCH}_2\text{OH}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CO}-\text{CO}]^-$ 。以类似的裂解方式，根据分子式、 MS^2 片段和相关文献确定了其他 6 个化合物，其中 2 个——(2*R*)-2*α*-(4-hydroxybenzoyloxymethyl)-3*β*, 4*α*, 8, 10-

tetrahydroxy-9-methoxy-2, 3, 4, 4*α*, 6, 10*β*-hexahydropyrano [3, 2-*c*] [2] benzopyran-6-one 和 ethyl 2- { [(2*R*, 3*S*, 4*S*, 4*αR*, 10*bS*)-10-(2-ethoxy-2-oxoethoxy)-3, 4-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)-9-methoxy-6-oxo-3, 4, 4*α*, 10*b*-tetrahydro-2*H*-pyrano [3, 2-*c*] isochromen-8-yl] oxy} acetate 未见来源于矮地茶报道。

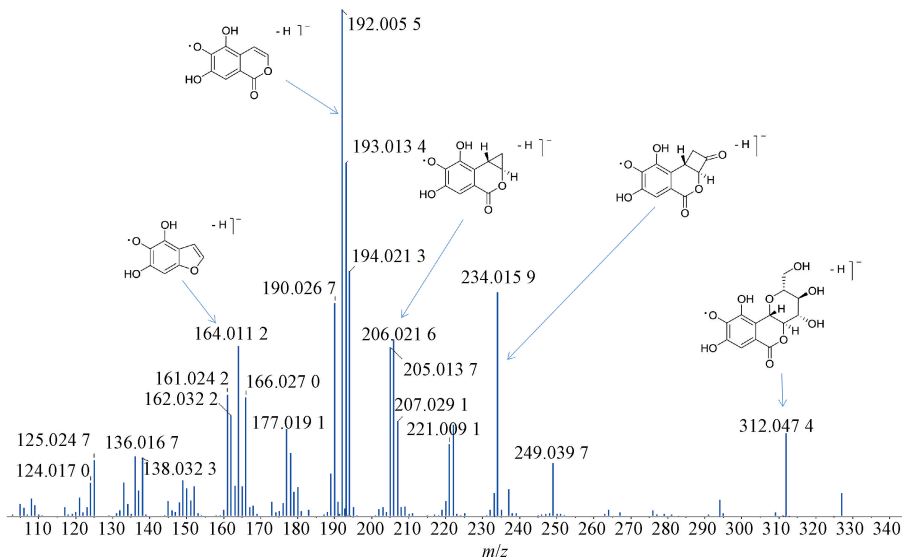


图 3 岩白菜素二级质谱图及其可能的裂解途径

Fig. 3 Secondary mass spectrometry and possible cleavage pathways of bergenin

3.3 生物碱类 ESI-MS 谱图显示出丰富的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子，没有碎裂，有时还观察到 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 离子。在 MS^2 光谱中都产生了相当于 $[\text{M}+\text{H}-74]^+$ 的丰富碎片离子，这是百部特征性生物碱的裂解共性，可能为氢转移到内酯环，通过四元过渡态消除中性碎片 $\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}(\text{OH})_2$ 产生的。除 $[\text{M}+\text{H}-74]^+$ 碎片外， MS^2 光谱还显示中性碎片 CO、 CO_2 、 H_2O 的丢失。基于类似裂解方式，根据分子式、 MS^2 片段和相关文献，确定其他化合物分别为 croomine 或其异构体、stemoninine、对叶百部碱或其异构体以及 stemosessifoline 或其异构体。以 croomine 为例（图 4）， MS^2 谱图 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 通过中性丢失 $\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}(\text{OH})_2$ 形成碎片离子峰 m/z 248.164 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{CH}=\text{C}(\text{OH})_2]^+$ 。

3.4 酚类 酚类化合物主要是咖啡酸的衍生物，主要包括咖啡酰奎宁酸和咖啡酰莽草酸。脱质子分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 均在 ESI-MS 谱中被发现，在咖啡酰奎宁酸中通常 m/z 191 ($\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_6^-$) 对应 $[\text{quinic acid}-\text{H}]^-$ ， m/z 173 ($\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_5^-$) 对应 $[\text{quinic acid}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ ， m/z 179 ($\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4^-$) 对应

$[\text{caffeic acid}-\text{H}]^-$ ；在咖啡酰莽草酸中不同的是 m/z 173 ($\text{C}_7\text{H}_9\text{O}_5^-$) 对应 $[\text{shikimic acid}-\text{H}]^-$ ， m/z 161 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{O}_3^-$) 对应 $[\text{caffeic acid}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ 。以化合物 3、12、14、17 为例，其分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 均为 m/z 353，推测 4 个化合物的分子式均为 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ 。在 MS^2 谱图中，碎片离子 m/z 191 表明这些化合物属于咖啡酰奎宁酸，通过丢失 caffeoyl moiety ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$, 162 Da) $[\text{M}-\text{H}-162]^-$ 形成。通过查阅相关文献及对对照品比对，确定化合物 3、12、14 分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸，17 为 1-咖啡酰奎宁酸。绿原酸可能的裂解途径见图 5。

化合物 18、19、21 分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 均为 m/z 335，推测三者分子式均为 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_8$ 。在 MS^2 谱图中，碎片离子 m/z 179、161 表明这些化合物属于咖啡酰莽草酸。来源于桑白皮的 3-*O*-咖啡酰莽草酸可能的裂解途径见图 6。

3.5 黄酮类 在一级质谱中显示分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ，黄酮苷类化合物常观察到糖基的丢失，形成的苷元 C 环呈现连续的 CO、 CO_2 中性丢失。二级

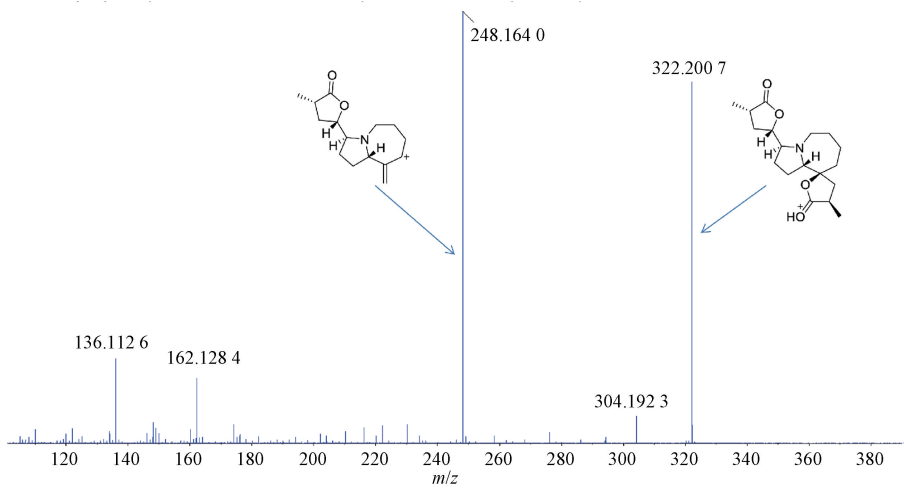


图 4 croomine 二级质谱图及其可能的裂解途径

Fig. 4 Secondary mass spectrometry and possible cleavage pathways of croomine

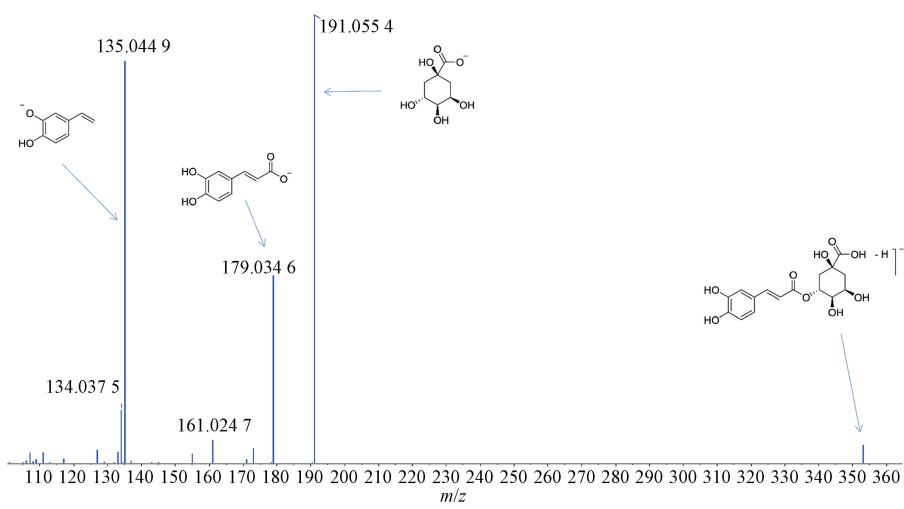


图 5 绿原酸二级质谱图及其可能的裂解途径

Fig. 5 Secondary mass spectrometry and possible cleavage pathways of chlorogenic acid

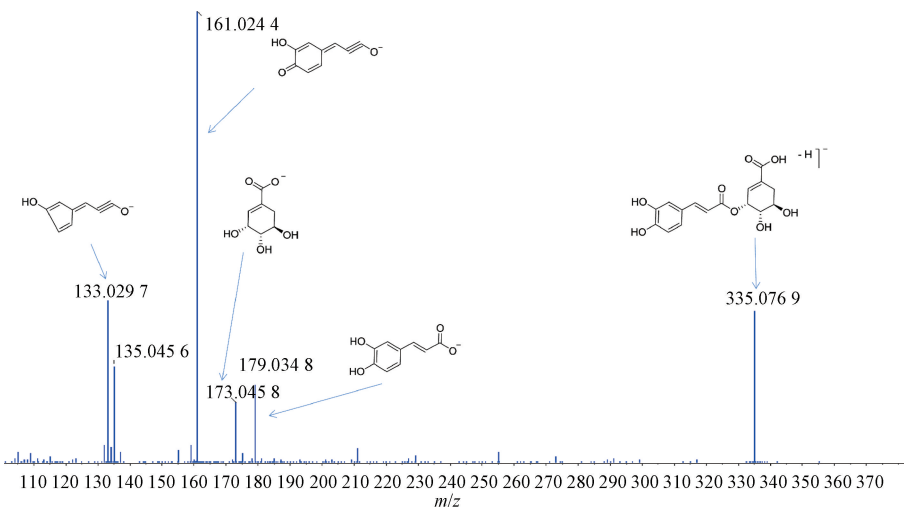


图 6 3-O-咖啡酰莽草酸二级质谱图及其可能的裂解途径

Fig. 6 Secondary mass spectrometry and possible cleavage pathways of 3-O-cafeoylshikimic acid

质谱中常出现 C 环 RDA 裂解, 形成^{1,3}A⁻碎片离子, 以及 C 环发生 1, 4 位裂解, 形成^{1,4}A⁻碎片离子。以黄烷-3-醇衍生物二氢桑色素为例 (图 7), 在一级质谱中显示分子离子峰为 m/z 303.051 0 [$M-H$]⁻, 二级质谱中 m/z 125.024 7 碎片离子由^{1,4}A⁻离子裂解产生, m/z 125.024 7 碎片离子对应天然产物间苯三酚。二氢桑色素通过脱水形成黄

酮苷元, 后者进一步呈现由 C 环 CO₂ 中性丢失形成 m/z 241.050 8 的峰。由于 A 环中 β-二羟基构型的存在呈现 C₃O₂ (68 Da) 丢失, 碎片离子 m/z 217.051 4 进一步丢失 C₂H₂O (42 Da), 形成双环碎片离子 m/z 175.040 6。C 环 RDA 裂解形成的^{1,3}A⁻碎片离子 m/z 151.004 1 进一步丢失 CO₂, 产生碎片离子 m/z 107.014 6。

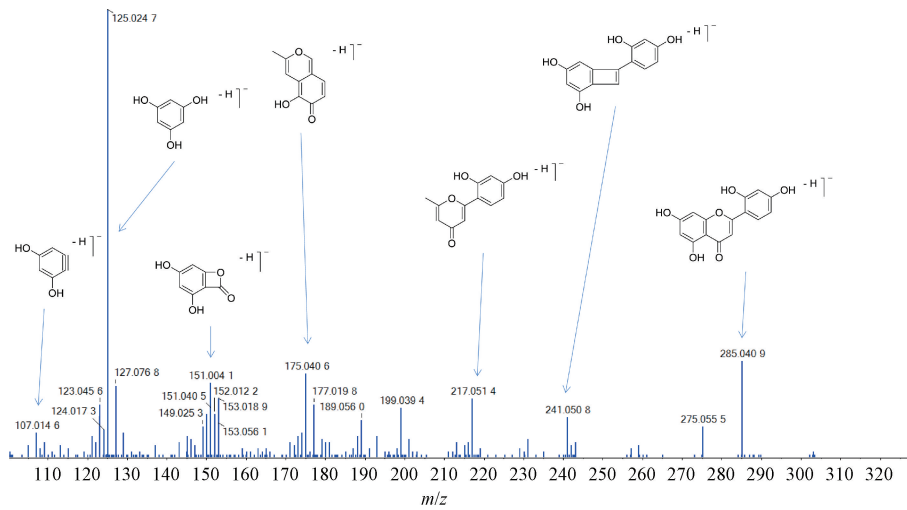


图 7 二氢桑色素二级质谱图及其可能的裂解途径

Fig. 7 Secondary mass spectrometry and possible cleavage pathways of dihydromorin

4 讨论与结论

本实验从抗癆胶囊提取物中鉴定出 52 种成分, 主要为岩白菜素类化合物和葡萄糖氧基苄基 2-异丁基苹果酸酯类, 其他包括生物碱类、酚类、黄酮类。

岩白菜素类化合物来源于矮地茶, 为胶囊的主要成分之一, 是控制该药材质量的指标成分, 与其作为君药一致。研究表明, 岩白菜素在 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv 感染的巨噬细胞和小鼠中没有显示直接的抗 *M. tuberculosis* H37Rv 活性, 但呈现强大的免疫调节作用^[39]。

葡萄糖氧基苄基 2-异丁基苹果酸酯类主要来源于白及, 具有自由基清除^[17]、神经保护、抗菌^[40]、NO 抑制^[38]等活性, 但对其抗 *M. tuberculosis* 的研究极少。从白及的功效来看, 葡萄糖氧基苄基 2-异丁基苹果酸酯类应与其止血作用相关, 由于热处理改变了葡萄糖氧基苄基 2-异丁基苹果酸酯类成分的相对含量, 故工艺中一部分白及以细粉入药^[38]。

生物碱类来源于百部, 具有独特的 perhydroazaazulene 特征^[41]及镇咳活性。例如, croomine 在柠檬酸诱导的豚鼠咳嗽模型中具有镇咳

作用, ID₅₀ 值为 0.18 mmol/kg^[42]。

酚类来源于桑白皮和五指毛桃, 但均不是两者特征性化合物。

黄酮类主要来源于穿破石, 但未发现其特征性戊基取代黄酮 prenylflavone。穿破石的另一典型咕吨酮类成分 xanthones^[6,43-44]是一种有前景的抗 *M. tuberculosis* H37Rv 活性骨架^[45-47], 但在胶囊中也未发现。

综上所述, 抗癆胶囊止咳成分主要为岩白菜素类、百部生物碱类化合物, 而葡萄糖氧基苄基 2-异丁基苹果酸酯类为主要止血成分, 同时其他酚类、黄酮类化合物可能起到抗氧化作用。由此推测, 该制剂可能不直接具有抗 *M. tuberculosis* H37Rv 活性, 而是通过免疫调节活性来治疗浸润性肺结核。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准第二卷 (2011 年版) [S]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2011.

[3] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质

量标准第三卷（2017 年版）[S]. 南宁：广西科学技术出版社，2017.

[4] Kobayashi H, de Mejía E. The genus *Ardisia*: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96(3): 347-354.

[5] Pilli R A, Rosso G B, C de Oliveira M. The chemistry of *Stemona alkaloids*: An update [J]. *Nat Prod Rep*, 2010, 27(12): 1908-1937.

[6] Hou A, Fukai T, Shimazaki M, *et al.* Benzophenones and xanthenes with isoprenoid groups from *Cudrania cochinchinensis* [J]. *J Nat Prod*, 2001, 64(1): 65-70.

[7] Zheng Z P, Zhu Q, Fan C L, *et al.* Phenolic tyrosinase inhibitors from the stems of *Cudrania cochinchinensis*[J]. *Food Funct*, 2011, 2(5): 259-264.

[8] Ye X S, Tian W J, Wang G H, *et al.* Phenolic glycosides from the roots of *Ficus hirta* Vahl. and their antineuroinflammatory activities[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(14): 4196-4204.

[9] Ye X S, Tian W J, Liu X Z, *et al.* Lignans and phenylpropanoids from the roots of *Ficus hirta* and their cytotoxic activities[J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(15): 3840-3849.

[10] Xu D L, Pan Y C, Chen J S. Chemical constituents, pharmacologic properties, and clinical applications of *Bletilla striata*[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1168.

[11] Chan E W, Lye P Y, Wong S K. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*[J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(1): 17-30.

[12] Wang R B, Qin Y D, Zhou J J, *et al.* Comprehensive evaluation of *Bletilla striata* and its substitutes by combining phenotypic characteristic, chemical composition, and anti-melanogenic activity[J]. *Phytochemistry*, 2022, 195: 113059.

[13] Yang C H, Xia T, Wang C H Q, *et al.* Using the UPLC-ESI-Q-TOF-MS^E method and intestinal bacteria for metabolite identification in the nonpolysaccharide fraction from *Bletilla striata*[J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(11): 4637.

[14] Choi Y H. Chemical constituents from *Cudrania tricuspidata*[D]. Seoul: Seoul National University, 2018.

[15] Wang X, Zhong X J, Zhou N, *et al.* Rapid characterizaiton of chemical constituents of the tubers of *Gymnadenia conopsea* by UPLC-Orbitrap-MS/MS analysis [J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 898.

[16] Li L M, Hao B, Zhang Y L, *et al.* Metabolite profiling and distribution of militarine in rats using UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. *Molecules*, 2020, 25(5): 1082.

[17] Morikawa T, Xie H H, Matsuda H, *et al.* Bioactive constituents from Chinese natural medicines. XVII. constituents with radical scavenging effect and new glucosyloxybenzyl 2-isobutylmalates from *Gymnadenia conopsea* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2006, 54(4): 506-513.

[18] 梅朝叶, 向文英, 杨 武, 等. UPLC-MS/MS 同时测定白及中 6 个指标成分的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(8): 1233-1237.

[19] Piacente S, Pizza C, Tommasi N, *et al.* Constituents of *Ardisia japonica* and their *in vitro* anti-HIV activity [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(6): 565-569.

[20] Yu K Y, Wu W, Li S Z, *et al.* A new compound, methylbergenin along with eight known compounds with cytotoxicity and anti-inflammatory activity from *Ardisia japonica* [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(22): 2581-2586.

[21] Yu K Y, Gao W, Li S Z, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of chemical constituents in *Ardisiae Japonicae Herba*[J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(22): 4347-4356.

[22] Schinnerl J, Kaltenegger E, Pacher T, *et al.* New pyrrolo [1, 2-a] azepine type alkaloids from *Stemona* and *Stichoneuron* (Stemonaceae) [J]. *Monatshefte für Chemie* , 2005, 136(9): 1671-1680.

[23] Zhou Y, Jiang R W, Hon P M, *et al.* Analyses of *Stemona alkaloids* in *Stemona tuberosa* by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(6): 1030-1038.

[24] Guo A, Jin L, Deng Z W, *et al.* New stemona alkaloids from the roots of *Stemona sessilifolia* [J]. *Chem Biodivers*, 2008, 5(4): 598-605.

[25] Liu C H, Wahefu A, Lu X Y, *et al.* Chemical profiling of Kaliziri injection and quantification of six caffeoyl quinic acids in Beagle plasma by LC-MS/MS[J]. *Pharmaceuticals (Basel)* , 2022, 15(6): 663.

[26] Wang L T, Gao M Z, Yang Q, *et al.* An efficient strategy based on liquid-liquid extraction with acid condition and HSCCC for rapid enrichment and preparative separation of three caffeoylquinic acid isomers from mulberry leaves [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, 57(8): 738-744.

[27] Gruz J, Novak O, Strnad M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS[J]. *Food Chem*, 2008, 111(3): 789-794.

[28] Cheng J, Yi X M, Chen H Y, *et al.* Anti-inflammatory phenylpropanoids and phenolics from *Ficus hirta* Vahl [J]. *Fitoterapia*, 2017, 121: 229-234.

[29] 刘绍华, 王延亮, 白家峰, 等. 岩木瓜茎干化学成分及 PTP1B 抑制活性研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(11): 1741-1746.

[30] Sanchez-Salcedo E M, Tassotti M, Rio D D, *et al.* (Poly) phenolic fingerprint and chemometric analysis of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry leaves by using a non-targeted UHPLC-MS approach [J]. *Food Chem*, 2016, 212: 250-255.

[31] Zhang Q F, Guo Y X, Zheng G D, *et al.* Chemical constituents comparison between *Rhizoma Smilacis Glabrae* and *Rhizoma Smilacis Chinae* by HPLC-DAD-MS/MS [J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(3): 277-281.

[32] Zhou D, Chang W H, Liu B, *et al.* Stilbenes from the tubers of

Bletilla striata with potential anti-neuroinflammatory activity[J]. *Bioorg Chem*, 2020, 97: 103715.

[33] Wu C, Wang H J, Liu Z Y, *et al.* Untargeted metabolomics coupled with chemometrics for leaves and stem barks of dioecious *Morus alba* L[J]. *Metabolites*, 2022, 12(2): 106.

[34] Feng S X, Yuan J, Zhao D, *et al.* Systematic characterization of the effective constituents and molecular mechanisms of *Ardisiae Japonicae Herba* using UPLC-Orbitrap Fusion MS and network pharmacology[J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): 0269087.

[35] Li Y F, Hu L H, Lou F C, *et al.* PTP1B inhibitors from *Ardisia japonica*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(1): 13-18.

[36] Chang C H, Lin C C, Kadota S, *et al.* Flavonoids and a prenylated xanthone from *Cudrania-Cochinchinensis* var. *gerontogea*[J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(3): 945-947.

[37] Kassem I A. A, El-Awdan S A, Saleh D O. Characterization of flavonoids and saponins from *Gleditsia triacanthos* by LC-ESI/MS/MS analysis; Pharmacological assessment of the anti-hyperglycemic and anti-ulcerogenic activities of *G. triacanthos* methanolic fruit extract and its *n*-butanol fraction [J]. *Pharmacognosy J*, 2021, 13(3): 631-639.

[38] Nishidono Y, Ishii T, Okada R, *et al.* Effect of heat processing on the chemical constituents and NO-suppressing activity of *Bletilla tuber*[J]. *J Nat Med*, 2020, 74(1): 219-228.

[39] Dwivedi V P, Bhattacharya D, Yadav V, *et al.* The phytochemical bergenin enhances T Helper 1 responses and antimycobacterial immunity by activating the MAP kinase pathway in macrophages[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 149.

[40] Zhou M, Yuan F, Ruan H L, *et al.* HPLC-PDA-guided isolation of glucosyloxybenzyl 2-isobutylmalates from the pseudobulbs of *Bletilla striata* with neuroprotective and antimicrobial activities [J]. *Phytochemistry*, 2022, 201: 113287.

[41] Greger H. Structural relationships, distribution and biological activities of *Stemona* alkaloids[J]. *Planta Med*, 2006, 72(2): 99-113.

[42] Lin L G, Leung H P, Zhu J Y, *et al.* Croomine- and tuberostemonine-type alkaloids from roots of *Stemona tuberosa* and their antitussive activity[J]. *Tetrahedron*, 2008, 64(44): 10155-10161.

[43] Fukai T, Oku Y, Hou A J, *et al.* Antimicrobial activity of isoprenoid-substituted xanthones from *Cudrania cochinchinensis* against vancomycin-resistant enterococci [J]. *Phytomedicine*, 2005, 12(6-7): 510-513.

[44] Chen L, Zhou Q, Li B, *et al.* A new flavonoid from *Cudrania cochinchinensis*[J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29(13): 1217-1221.

[45] Yuanita E, Sudirman, Dharmayani N K, *et al.* Quantitative structure-activity relationship (QSAR) and molecular docking of xanthone derivatives as anti-tuberculosis agents [J]. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*, 2020, 21: 100203.

[46] Elsaman T, Mohamed M S, Eltayib E M, *et al.* Xanthone: a promising antimycobacterial scaffold[J]. *Med Chem*, 2021, 17(4): 310-331.

[47] Suksamram S, Suwannapoch N, Phakhodee W, *et al.* Antimycobacterial activity of prenylated xanthones from the fruits of *Garcinia mangostana*[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2003, 51(7): 857-859.