

利用在线加压溶剂提取-超高效液相色谱-离子阱-飞行时间-质谱法定性分析片仔癯化学成分组

李 玮¹, 蒋珍珍², 李 茜¹, 屠鹏飞¹, 宋青青^{1*}, 于 娟^{2*}, 宋月林¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 中药现代研究中心, 北京 100029;

2. 漳州片仔癯药业股份有限公司, 福建 漳州 363000)

摘要:片仔癯(Pien-Tze-Huang)是由三七、牛黄、蛇胆、麝香等名贵中药经加工精制而成的中药制剂。片仔癯中的三七皂苷、胆汁酸以及麝香酮等主要化学成分已被深入研究,然而其全方化学成分组成尚未被整体阐明。该文建立了在线加压溶剂提取-超高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱(online PLE-UHPLC-IT-TOF-MS)法,快速、直接分析片仔癯化学成分组。将少量片仔癯粉末(0.3 mg)均匀地平铺于预柱芯尾端,之后用正相硅胶填充预柱芯,滤膜密封后构成提取池。提取池装入预柱套后置于70℃的柱温箱内,连接于UHPLC-IT-TOF-MS分析系统。通过引入一个二位六通电子阀,将整个分析过程自动在提取相和洗脱相间切换。提取相用时3 min,以0.1% (v/v)甲酸水为提取溶剂,流速为0.2 mL/min;洗脱相以0.1% (v/v)甲酸水和乙腈为流动相进行梯度洗脱,IT-TOF-MS检测。通过与对照品、相关文献和自建中药数据库对照,并总结相关质谱裂解规律,从片仔癯中共检测到73个化学成分,初步鉴定并归属了其中71个,36个来源于三七,15个来源于蛇胆,9个来源于牛黄,11个可能来源于牛黄与蛇胆,另有2个结构无法确定。该研究深入解析了片仔癯的化学成分组,为其质量分析提供了丰富的信息。同时,该文构建的online PLE-UHPLC-IT-TOF-MS分析系统为中药复杂体系快速、直接分析提供了可靠的工具。

关键词:在线加压溶剂提取;片仔癯;化学成分组;质谱裂解途径;来源归属

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2021)05-0478-10

Chemome profiling of Pien-Tze-Huang by online pressurized liquid extraction-ultra-high performance liquid chromatography-ion trap-time-of-flight mass spectrometry

LI Wei¹, JIANG Zhenzhen², LI Han¹, TU Pengfei¹,

SONG Qingqing^{1*}, YU Juan^{2*}, SONG Yuelin¹

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Zhangzhou Pien-Tze-Huang Pharmaceutical Co., Ltd., Zhangzhou 363000, China)

Abstract: Pien-Tze-Huang is one of the most famous traditional Chinese medicine prescriptions and consists of several precious medicinal materials, such as *Notoginseng Radix et Rhizoma*, *Bovis Calculus*, *Snake Gall*, and *Moschus*. However, its formula has not been completely revealed. It is mainly applied for the treatment of acute and chronic viral hepatitis, carbuncle, and boils caused by blood stasis, unknown swelling, bruises, and various inflammation disorders. The chemical composition of Pien-Tze-Huang is extremely complicated. Thus far, extensive attention has been paid to the principal chemical families in Pien-Tze-Huang, such as

收稿日期:2020-10-20

* 通讯联系人. Tel: (010) 64286100, E-mail: song_qingqing@163.com (宋青青); Tel: (0596) 2301615, E-mail: 13906945397@163.com (于娟).

基金项目: 国家自然科学基金项目(82003911, 81773875, 81973444); 漳州片仔癯药业股份有限公司.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (Nos. 82003911, 81773875, 81973444); Zhangzhou Pien-Tze-Huang Pharmaceutical Co., Ltd.

ginsenosides, bile acids, and muscone derivatives. Comprehensive chemical profiling, although of immense importance for systematic quality control, has not been achieved. Therefore, we configured a platform, namely online pressurized liquid extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-ion trap-time-of-flight mass spectrometry (online PLE-UHPLC-IT-TOF-MS), to characterize the chemical profile of Pien-Tze-Huang in detail as well as to conduct source attribution, aiming to clarify the chemome of Pien-Tze-Huang and to provide a reliable method for quality assessment. A sub-microgram amount of Pien-Tze-Huang powder (0.3 mg) was placed in a hollow guard column, which was subsequently filled with clear silica gel. Filter membranes were used to seal the extraction vessel. The vessel was then placed in an adapted guard column holder and maintained in a thermal column oven (70 °C). Metal tubing was used to connect the outlet of the guard column holder to the mass spectrometer. The extraction phase was maintained for 3 min by employing 0.1% (v/v) formic acid aqueous solution as the extraction solvent with a flow rate of 0.2 mL/min. Moreover, a six-port two-position electronic valve was introduced to automatically switch the system from extraction to elution phases. Within the elution phase, 0.1% (v/v) formic acid aqueous solution and acetonitrile composed the mobile phase, and the extracts were eluted with a gradient program. Because of the elevated temperature and pressure, the physical and chemical properties of water, especially polarity and solubility, were modified. Therefore, warm water could be an eligible green solvent to achieve wide polarity-spanned extraction. In addition, IT-TOF-MS was employed to acquire tandem mass spectrometry information. The mass fragmentation pathways of saponins and bile acids were carefully studied.

Finally, according to authentic compounds, mass fragmentation pathways, reference information in the literature, and accessible databanks, a total of 73 signals were observed from Pien-Tze-Huang, of which 71 components were tentatively identified and assigned. Among them, 36 were from *Notoginseng Radix et Rhizoma*, 15 from Snake Gall, and 9 from *Bovis Calculus*, while the occurrences of the other 11 components were synergistically contributed by both *Bovis Calculus* and Snake Gall, through retrieving the in-house chemical database that was built by considering all accessible chemical information from *Notoginseng Radix et Rhizoma*, *Bovis Calculus*, Snake Gall, and *Moschus*. The other two compounds were assigned as unknown compounds. However, none of the components were assigned to *Moschus* because they mainly contained hydrophobic compounds, such as cycloketones, cholesterol, and sterols, among others, and it was difficult to detect them with the current measurement program. The extraction efficiency of online PLE was assessed by comparing it with the efficiency obtained from ultrasonication at the same time. According to base peak ion current chromatograms (BPCs) and mass spectrometry information, the efficiency of online PLE was greater than that of ultrasonic extraction, even through direct analysis. Online PLE-UHPLC-IT-TOF-MS is not only a tool fit for the concept of green analytical chemistry, but also a reliable analytical pipeline for the direct characterisation of other complicated matrixes. Above all, this study clarified the chemome of Pien-Tze-Huang and provided meaningful information for the quality control of this famous TCM prescription.

Key words: online pressurized liquid extraction; Pien-Tze-Huang; chemome profiling; mass fragmentation pathways; source attribution

片仔癀(Pien-Tze-Huang)具有清热解毒、消肿止痛、凉血化瘀之功效^[1],可用于热毒血瘀所致急性慢性肝炎,痈疽疔疮,跌打损伤、无名肿痛及各种炎症。其药用历史悠久,为国家一级中药保护制剂,目前公开组方包括三七、牛黄、蛇胆、麝香 4 味名贵中药。现代药理研究表明片仔癀具有治疗急慢性肝炎、溃疡、外伤、脑保护、抗肿瘤等作用^[2-5]。片仔癀中三七皂苷、胆汁酸以及麝香酮等主要化学成分已被系统研究,但对片仔癀复方的化学成分进行全面表征和解析的相关研究较少。中药复方是中医治病的主要临床用药形式,其化学成分并不是各单味中药化学成分的相加,需要全面、系统地阐明复方化学成分组,进而为其质量控制标准及药效研究提供可靠的依据。

常用的提取方法如浸渍、回流和超声等费时费力,还需要大量的溶剂和药材,提取效率低。本课题组前期建立了在线加压溶剂提取方法(online pressurized liquid extraction, online PLE),采用水作为绿色提取溶剂,通过升温和加压提高水对药材中化学成分的溶解和提取能力,实现了快速、高效提取。Online PLE 模块可以连接于液相色谱系统实现直接分析,有效地避免了不稳定化学成分在提取等制备过程中发生降解^[6]。课题组利用该仪器平台定性、定量表征大小鼠粪便以及远志、肉苁蓉等中药的化学成分组成^[7-9]。片仔癀含有的牛磺酸结合型胆汁酸由于酰胺键的存在易发生水解或氧化^[10],利用在线加压溶剂提取方法能够有效降低该类成分在提取时降解的可能性。并且,online PLE 可以实现毫克级样品分析,特别适合贵重药材的化学成分组成表征。因此,本研究利用在线加压溶剂提取-超高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱(online PLE-UHPLC-IT-TOF-MS)对片仔癀化学成分组进行快速、全面分析。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与药材

岛津分析型超高效液相色谱仪,包含 LC-20AD 泵、CTO-20A 柱温箱、SIL-20A 自动进样器、SPD-M20A 紫外检测器、DGU-20A 脱气机、CBM-20A 控制器和色谱工作站(日本岛津公司);岛津质谱仪 IT-TOF-MS(日本岛津公司);万分之一电子天平(METTLER XS105 型,瑞士梅特勒-托利多仪器有

限公司);超声波清洗器(南京垒君达超声电子设备有限公司);超纯水净化系统(美国密理博有限公司);超速离心机(德国艾本德公司)。Phenomenex 预柱芯(型号:AJ0-4287)和适配的 Security Guard™ 预柱套(型号:KJ0-4282,飞诺美公司)。预柱芯去除硅胶,用于填装片仔癀粉末。

质谱级甲醇、甲酸、乙腈购于美国赛默飞世尔公司,超纯水由实验室 Milli-Q 纯水系统制备。片仔癀(粒)购自北京金象大药房医药连锁有限责任公司,批号为 1908096。

对照品人参皂苷 Rc、Rd、Re、Rf、Rg2、Rg3、Rh1、Rh2、Ro、F1、F2、拟人参皂苷 F11、三七皂苷 R1 均由北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室提供,经 HPLC-二极管阵列检测器-IT-TOF-MS 检测,纯度均大于 95%。胆酸(CA)、熊去氧胆酸(UDCA)、猪去氧胆酸(HDCA)、鹅去氧胆酸(CDCA)、甘氨酸胆酸(GCA)、牛磺鹅去氧胆酸(TCDCA)均购自上海源叶生物科技有限公司,经 HPLC-蒸发光散射检测器检测,纯度均大于 98%。

1.2 Online PLE-UHPLC-IT-TOF-MS 分析方法的建立

1.2.1 Online PLE 提取及色谱洗脱条件

提取 取片仔癀样品一粒,用研钵研磨成细粉,精密称取 0.3 mg,置于空预柱芯的尾端,用正相硅胶填充预柱芯,构成提取池。将提取池装入 Phenomenex Security Guard™ 预柱套中,置于 70 °C 的柱温箱内。构建 online PLE-UHPLC-IT-TOF-MS 检测系统,0.1% (v/v) 甲酸水为提取溶剂,流速为 0.2 mL/min,提取 3 min。通过引入一个二位六通阀,将在线加压提取模块直接连入液相色谱系统实现直接分析。当二位六通阀处于 1-2 位连接,通过自动进样 2 μL 0.1% (v/v) 甲酸水触发提取阶段,系统提取流路装置图见图 1a。

洗脱及分析 采用 Waters HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)。流动相组成为 0.1% (v/v) 甲酸水(A)和乙腈(B)。梯度洗脱程序:0~3 min, 0% B; 3~18 min, 0% B~36% B; 18~28 min, 36% B~55% B; 28~41 min, 55% B~85% B; 41~43 min, 85% B~95% B; 43~43.01 min, 95% B~0% B; 43.01~48 min, 0% B,流速为 0.2 mL/min。在提取 3 min 后,二位六通阀切换至 1-6 位,进入洗脱分析程序。

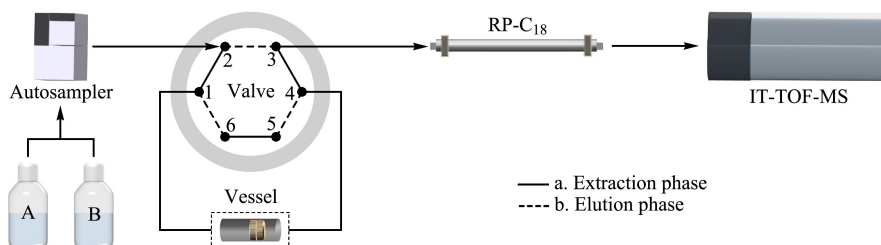


图1 在线加压溶剂提取-超高效液相色谱-离子阱-飞行时间质谱系统装置图

Fig. 1 Schematic diagram of the online pressurized liquid extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-ion trap-time of flight mass spectrometry platform

A: water; B: acetonitrile.

1.2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式下 MS^1 扫描范围: m/z 100~1 500, MS^2 扫描范围: m/z 50~1 500; 碰撞诱导解离 (CID) 能量: 90%。喷雾室电压: -3.5 kV; 曲型脱溶剂管 (CDL) 温度: 200 °C; 加热模块温度: 200 °C; 干燥气电压: 100 MPa; 雾化气流速: 1.5 L/min; 检测器电压: 1.5 kV。离子阱压力: 3.0×10^{-2} Pa; 碰撞室压力: 2.0×10^{-4} Pa; 各级质谱的重复次数为 3, 离子累积时间为 30 ms。

1.3 对照品溶液制备与分析

精密称定各对照品适量, 用甲醇溶解, 配制成 10 g/L 的对照品储备液。精密吸取各对照品储备液适量, 用甲醇稀释, 制备成混合对照品溶液。预柱芯仅用正相硅胶填充, 自动进样器吸取 2 μ L 混合对照品溶液注入分析系统, 按 1.2 节条件分析。

1.4 超声提取样品的制备与分析

1.4.1 供试品溶液的制备

精密称定约 50 mg 片仔癯粉末, 用 1 mL 甲醇超声提取 30 min 后, 室温 12 000 r/min 离心 10 min, 用 0.22 μ m 滤膜过滤上清液, 取续滤液待用。

1.4.2 分析条件

实验装置与图 1b 相同, 二位六通阀处于 1-6 位。梯度洗脱程序: 0~3 min, 0% B~5% B; 3~18 min, 5% B~36% B; 18~48 min 同 1.2.1 节梯度。色谱柱、流动相及流速等色谱条件与质谱条件同 1.2.1 节和 1.2.2 节。

1.5 化学信息数据库的建立

在中国知网、SCIFinder、Pubmed 等数据库中广泛检索片仔癯 4 味单味药三七、牛黄、蛇胆和麝香的化学成分分离和分析文献, 将三七皂苷、胆汁酸、麝香酮、甾体激素等化学类型的结构和质谱信息录入 Microsoft Excel 软件, 自建化学成分数据库。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的优化

为了增大在线加压溶剂提取方法的效率, 优化所有化合物的色谱及质谱行为, 本实验在课题组前期工作^[8]的基础上, 进一步对提取和色谱条件进行优化。随着提取流速的升高 (0.1、0.2 和 0.3 mL/min), 系统反压也会增加, 当选择 0.2 mL/min 为提取流速时, 能够满足片仔癯中化学成分全面提取所需的压力和提取效率; 同时, 随着提取温度的升高 (50、60、70 °C), 水的黏度降低且溶出能力增强, 提取效率增高, 故最终选择 70 °C 为提取温度; 对提取时间 (3、4 和 5 min) 进行优化, 发现 3 min 即可提取完全, 且此时提取液体积并不会影响色谱洗脱时的峰形。由于本实验仅引入一个二位六通阀, 故需要优化合适的流动相作为提取溶剂, 首先对比了水、0.05% 甲酸水、0.1% 甲酸水对提取效率和色谱峰形的影响, 0.1% 甲酸水能够产生更好的色谱峰形、增强质谱响应; 之后, 考察了提高提取流动相中乙腈的体积分数为 5%、10%、15% 时的提取效果, 结果表明大多数成分难以提取出来, 色谱峰数量和响应显著降低, 故选择 0.1% 甲酸水作为提取溶剂。最终, 本实验选择 0.1% 甲酸水作为提取溶剂, 提取流速、提取时间及提取温度分别为 0.2 mL/min、3 min 和 70 °C。片仔癯中化学成分类型丰富, 为了各化学成分有较好的色谱保留, 提高色谱峰容量, 最终选择了耐纯水的 Waters HSS T3 色谱柱。

2.2 在线加压溶剂提取法与超声提取法的对比

在相同的液相色谱和质谱条件下, 对比了在线加压溶剂提取法与超声提取法的提取效率。从二者的基峰色谱图 (见图 2) 可以看出, 两种方法检出的色谱峰具有一定的相似性, 然而在线加压溶剂提取

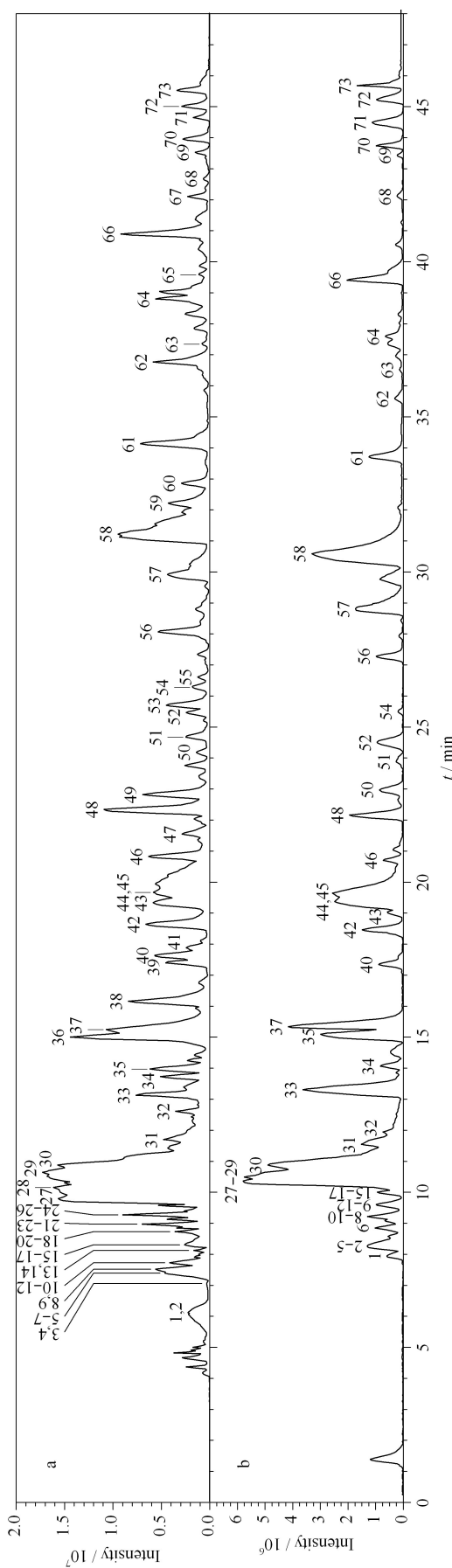


图 2 负离子模式下片仔癯的基峰离子流色谱图
 Fig. 2 Base peak current chromatograms of Pien-Tze-Huang in negative ion mode
 a. online pressurized liquid extraction; b. ultrasonic extraction. For peak Nos., see Table 1.

法(见图 2a)的提取效率显著高于甲醇超声提取。通过指认两张色谱图上的色谱峰,可以发现甲醇超声提取所得到的化学成分在在线加压溶剂提取样品中均有检出,且从色谱峰数量来看,在线加压溶剂提取仅需片仔癯 0.3 mg 即可提取出更多的化学成分,尤其是对于中等极性化学成分的提取效率明显高于超声提取(见图 2b)。综上,在线加压溶剂提取方法能够高效、快速地提取中药化学成分。

2.3 片仔癯中皂苷类及胆酸类化合物的质谱裂解规律推导

由于麝香的化学成分主要为极性较小的大环酮及胆甾醇等化合物,难以在 C_{18} 色谱柱上洗脱,且也未能检出麝香相关的化学成分。因此,本实验主要对片仔癯中三七、蛇胆与牛黄中的皂苷及胆酸类对照品的质谱行为进行分析,总结其裂解规律,用于片仔癯中化学成分的鉴定。

2.3.1 皂苷类化合物的鉴定

片仔癯中皂苷类化合物主要来源于三七,多为达玛烷型四环三萜,在 C-3、C-6 和 C-20 位连接有葡萄糖、鼠李糖等组成的糖链。按照苷元的不同,主要分为人参二醇型和人参三醇型人参皂苷。

以人参皂苷 Rg3 (ginsenoside Rg3, 65(图 2 中色谱峰号,下同))为例,阐述皂苷类化合物的质谱裂解规律及途径。负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 829.4822 ($[M+HCOO]^-$),二级质谱图中检测到碎片离子主要为 m/z 783.4747 ($[M-H]^-$)、621.4249 ($[M-H-glc]^-$) 和 459.3678 ($[M-H-2glc]^-$) (见图 3a),由于人参皂苷 Rg3 的 C-3 位连接一个两分子葡萄糖残基的糖链,推测其碎片离子分别由准分子离子丢失甲酸分子、一分子葡萄糖以及两分子葡萄糖产生, m/z 459.3678 为其苷元特征碎片,人参皂苷 Rg3 的质谱裂解途径见图 3b。化合物 58、59 与 65 具有相同的准分子离子峰,三者预测分子式均为 $C_{42}H_{72}O_{13}$,化合物 65 与 59 具有相同的二级碎片,推断为一组同分异构体。

结合文献^[11],在负离子模式下,皂苷类化合物一级质谱中易产生 $[M-H]^-$ 或 $[M+HCOO]^-$ 的准分子离子峰,其糖苷键断裂,会中性丢失葡萄糖残基(162 Da)、木糖残基(132 Da)、阿拉伯糖残基(132 Da)、鼠李糖残基(146 Da)和水(18 Da),从而形成苷元碎片离子,其中人参二醇型和人参三醇型人参皂苷元的碎片离子分别为 m/z 459 和 m/z 475。

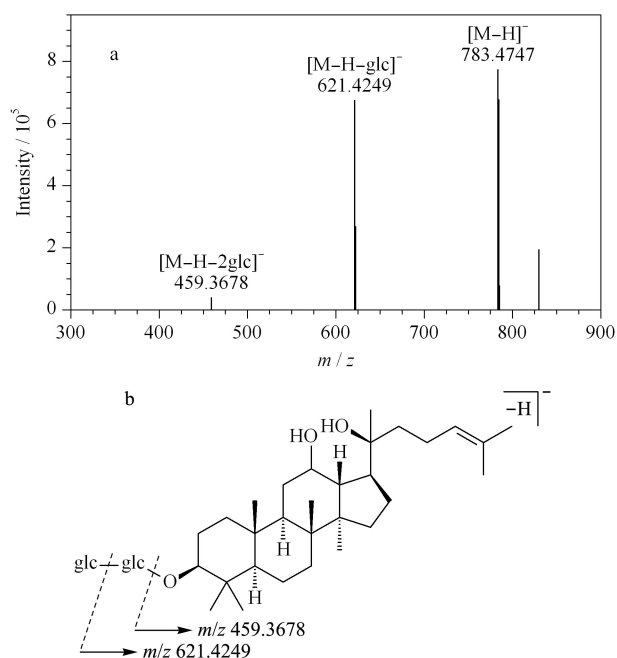


图3 人参皂苷 Rg3 的 (a) MS² 图谱和 (b) 质谱裂解途径
Fig. 3 (a) MS² spectrum and (b) mass fragmentation pathway of ginsenoside Rg3

2.3.2 胆酸类化合物的鉴定

游离胆酸结构中存在羧基以及多个羟基,脱羧基反应以及失羟基为主要的裂解方式。有研究表明羟基位置不同其丢失水分子的能力也不同,且强弱顺序依次递减(7 α >6 α >12 α >3 α)^[12]。当12位存在羟基时,会与24位羧基之间发生质子转移,进而得到[M-H-CH₂O₂]⁻碎片。以胆酸(cholic acid, CA, 55)为例,阐述游离型胆酸类化合物的质谱裂解规律。在负离子模式下,CA的准分子离子为m/z 407.2785([M-H]⁻),CA在C-3、C-7以及C-12位均有羟基取代,在二级质谱中能够看到丢失水分子以及羧基所生成的主要碎片离子为m/z 389.2666([M-H-H₂O]⁻)、361.2698([M-H-CH₂O₂]⁻)、345.2771([M-H-H₂O-CO₂]⁻)、343.2618([M-H-H₂O-CH₂O₂]⁻)和327.2652([M-H-2H₂O-CO₂]⁻)(见图4a),其质谱裂解途径见图4b。

以牛磺鹅去氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA, 50)为例,阐述牛磺酸结合型胆酸的质谱裂解规律。在负离子模式下,TCDCA的准分子离子峰为m/z 498.2873([M-H]⁻),二级碎片离子主要为m/z 480.2806([M-H-H₂O]⁻)和355.2612([M-H-H₂O-C₂H₆NO₃S]⁻)(见图5a)。

TCDCA中C-24位羧基与牛磺酸基形成酰胺键易断裂,归属碎片离子分别为分子离子峰丢失水分子、牛磺酸残基产生,并未见母核碎裂的相关碎片离子,其质谱裂解途径见图5b。

以甘氨酸胆酸(glycocholic acid, 42)为例,阐述

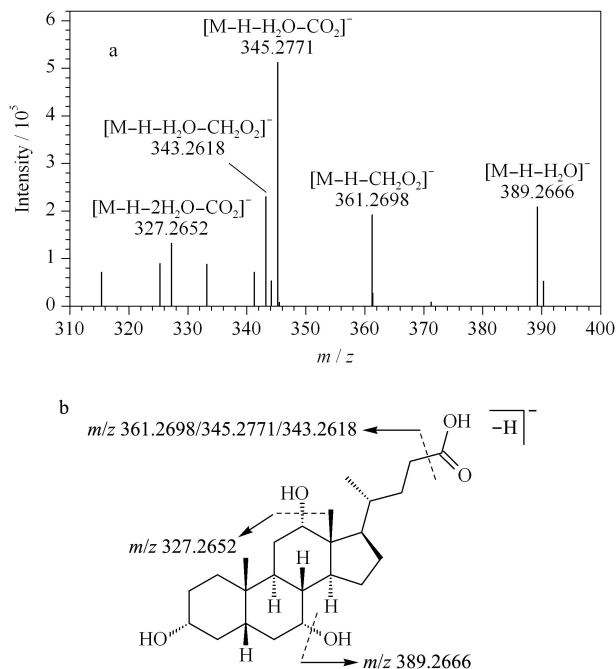


图4 胆酸的 (a) MS² 图谱和 (b) 质谱裂解途径
Fig. 4 (a) MS² spectrum and (b) mass fragmentation pathway of cholic acid

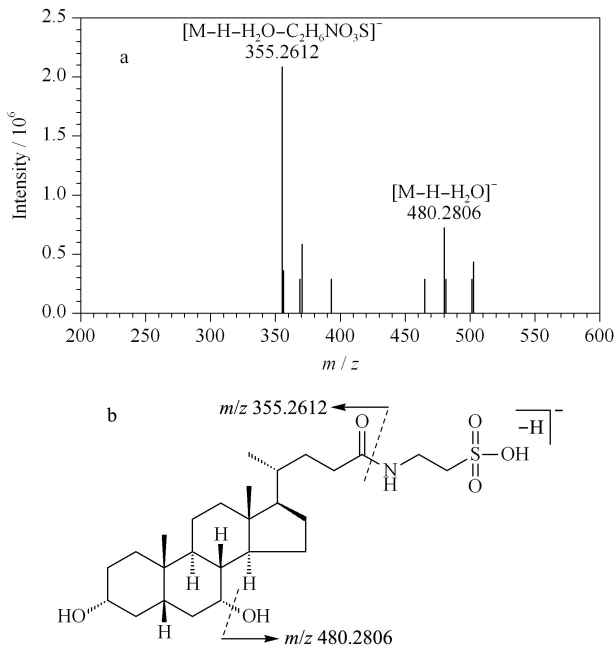


图5 牛磺鹅去氧胆酸的 (a) MS² 图谱和 (b) 质谱裂解方式
Fig. 5 (a) MS² spectrum and (b) mass fragmentation pathway of taurochenodeoxycholic acid

甘氨酸结合型胆酸的质谱裂解规律。在负离子模式下,准分子离子峰 m/z 464.3001 ($[M-H]^-$)。甘氨酸结合型胆酸是由胆酸的 24 位羧基经酰胺键与甘氨酸相连形成,酰胺键易发生断裂,同时,由于甘氨酸包括羧基,C-26 位易发生脱羧失去 44 Da (CO_2)。故碎片离子归属为 m/z 446.2895 ($[M-H-H_2O]^-$)、402.2987 ($[M-H-H_2O-CO_2]^-$)、382.2730 ($[M-H-2H_2O-CH_2O_2]^-$) 和 353.2466 ($[M-H-2H_2O-C_2H_4NO_2]^-$) (见图 6a), 推测准分子离子峰会丢失水分子、二氧化碳分子、甲酸分子以及甘氨酸残基生成相应的碎片离子,甘氨酸胆酸的质谱裂解途径见图 6b。

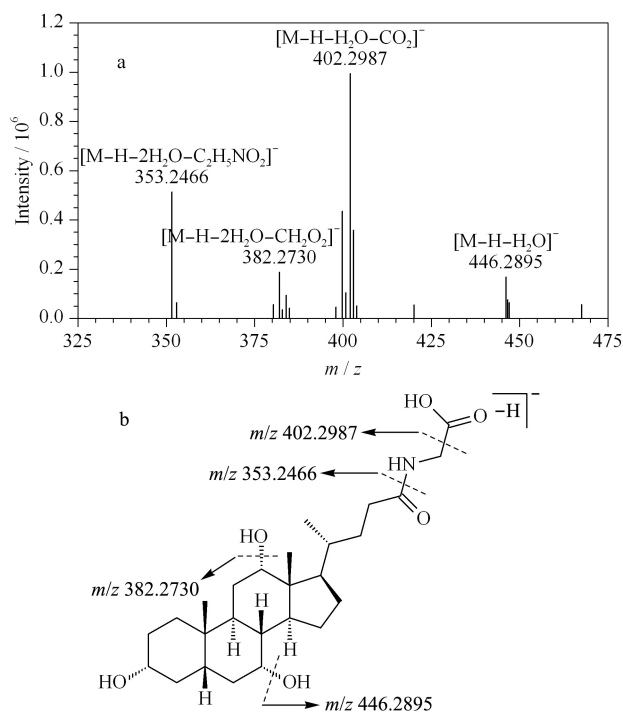


图 6 甘氨酸胆酸的 (a) MS² 图谱和 (b) 质谱裂解途径

Fig. 6 (a) MS² spectrum and (b) mass fragmentation pathway of glycocholic acid

综上,游离型胆酸和结合型胆酸在负离子模式下可得到 $[M-H]^-$ 或 $[M+HCOO]^-$ 的准分子离子峰。由于甾体母核上存在多个羟基取代,在 MS² 中可生成一定数目的脱水离子 $[M-H-nH_2O]^-$ 。游离胆酸及甘氨酸结合型胆酸结构中均存在羧基,故会脱羧失去 CO_2 (44 Da)。结合型胆酸均由胆酸与牛磺酸和甘氨酸经酰胺键连接,故会生成相应的丢失牛磺酸残基与甘氨酸残基的碎片 $[M-C_2H_6NO_3S]^-$ 和 $[M-C_2H_4NO_2]^-$ 。本实验所采用的 IT-TOF-MS 在 CID 模式下采集数据,并未发现低质量数的牛磺

酸结合型以及甘氨酸结合型的特征碎片,如 m/z 80 (SO_3^-)、124 ($C_2H_6NO_3S^-$) 以及 74 ($C_2H_4NO_2^-$),而且大部分的甾体母核在检测条件下并未发生碎裂。

2.4 片仔癀化学成分表征

本工作采用 online PLE-UHPLC-IT-TOF-MS 方法在负离子模式下检测片仔癀样品,其基峰色谱图见图 2a。通过主要成分皂苷以及胆酸类化合物的质谱行为总结,结合对照品以及相关文献,最终从片仔癀中鉴定了 71 个化学成分,仍有 2 个化合物的结构尚未确认。通过与对照品比对,化合物 9、13、44、45、58、61、65、70、42、50、55、64、66 和 68 分别鉴定为三七皂苷 R1、人参皂苷 Rf、Rd、Re、Rg2、F2、Rg3、Rh2、GCA、TCDCa、CA、UDCA、HDCA 和 CD-CA。结合参考文献^[12,13]及裂解途径,从片仔癀中初步鉴定了 35 个皂苷类化合物和 34 个胆酸类化合物。对比自建的三七、蛇胆、牛黄和麝香的化学成分数据库,对鉴定的成分进行归属,其中三七来源化学成分 36 个,包括 1 个炔的脂肪酸苷(化合物 1)以及 35 个皂苷(化合物 2~13、18、19、22、23、31、33~36、43~47、49、54、56、58、59、61、62、65 和 70),蛇胆来源化学成分 15 个,均为胆汁酸类化合物(化合物 14、15、16、17、20、21、24、25、26、32、37、38、40、41 和 53),牛黄来源化学成分 9 个,为化合物 51、57、63、64、66、67、68、69 和 71,牛黄和蛇胆共有成分 11 个,为化合物 27、28、29、30、39、42、48、50、52、55 和 60 (见表 1)。

2.5 讨论

中药常用的提取方法,如连续回流法、超声提取法等,需要大量的溶剂和药材,费时费力,且不适用于贵细中药材的分析。本文建立了在线加压溶剂提取方法,采用水作为绿色提取溶剂,通过升温 and 加压改变水的理化性质,提高水对药材中化学成分的溶解和提取能力。同时,本法提取效率高,仅需微量样品,提取 3 min,可提取出中药复方中丰富的化学成分。

通过质谱检测发现片仔癀的主要化学成分类型为皂苷和胆酸,且经各已知单味药化学成分数据库比对,皂苷多来源于中药三七,胆酸类主要来源于牛黄和蛇胆,由于麝香的化学成分主要为大分子环酮及胆甾醇等小极性化合物,本方法并未能检出该类成分,后续将利用气相色谱或超临界流体色谱-串联质谱等技术对其进行检测和鉴定。

表 1 片仔癯的化学成分信息
Table 1 Information of the chemical components of Pien-Tze-Huang

No.	t_R in Fig. 2a/ min	Adduct ion	MS ¹ (m/z)	Formula	Error/ 10 ⁻⁶	MS ² (m/z)	Tentative identification	Source Ref.
1	5.52	[M+HCOO] ⁻	549.1841	C ₂₂ H ₃₂ O ₁₃	2.91	503.1850, 341.1057, 179.0582	notoginsenic acid β -sophoroside [#]	NG [14]
2	5.87	[M+HCOO] ⁻	861.4828	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₅	-2.90	653.4138	notoginsenoside SPI [#]	NG [15]
3	6.68	[M+2HCOO] ²⁻	592.2883	C ₅₃ H ₆₀ O ₂₃	-5.91	569.2781	yesaninoside-H	NG [16]
4	6.89	[M+HCOO] ⁻	1007.5416	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	-1.59	961.5339, 799.4840, 637.4307, 475.3812	notoginsenoside R3/notoginsenoside R6/20-O-glucoginsenoside Rf	NG [14]
5	7.17	[M+HCOO] ⁻	879.5001	C ₄₂ H ₇₄ O ₁₆	4.78	833.4832, 785.7090, 671.4084	notoginsenoside J/isomer [#]	NG [14]
6	7.24	[M+HCOO] ⁻	1007.5425	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₉	-0.69	961.5343, 799.4841, 637.4272, 475.3674	notoginsenoside R3/notoginsenoside R6/20-O-glucoginsenoside Rf	NG [14]
7	7.31	[M+HCOO] ⁻	879.5001	C ₄₂ H ₇₄ O ₁₆	4.78	833.4832, 785.7090, 671.4084	notoginsenoside J/isomer [#]	NG [14]
8	7.48	[M+HCOO] ⁻	977.5323	C ₄₈ H ₈₂ O ₂₀	-0.41	931.5145	notoginsenoside ST-5	NG [14]
9	7.52	[M-H] ⁻	931.5273	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	0.11	799.4784, 769.4697, 637.4238, 475.3735	notoginsenoside R1 [*]	NG [14]
10	7.57	[M-H] ⁻	931.5273	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₈	0.32	799.4763, 637.4263	notoginsenoside R1 isomer	NG [14]
11	7.68	[M+HCOO] ⁻	991.5496	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	1.31	945.5354, 783.4815, 621.4317, 459.3765	notoginsenoside K/isomer	NG [17]
12	7.76	[M+HCOO] ⁻	845.4865	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	-4.61	799.4821, 637.4260, 475.3742	ginsenoside Rg1 [#]	NG [14]
13	7.85	[M+HCOO] ⁻	845.4950	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	5.44	799.4773, 637.4278, 475.3748	ginsenoside Rf [*]	NG -
14	8.06	[M-H] ⁻	530.2765	C ₂₆ H ₄₂ NO ₈ S	-5.66	512.2659	tauro-3 α , 7 α , 12 α , 23R-tetrahydroxy-5 β -cholenic acid/isomer	SG [18]
15	8.11	[M-H] ⁻	530.2776	C ₂₆ H ₄₂ NO ₈ S	-3.21	512.2659	tauro-3 α , 7 α , 12 α , 23R-tetrahydroxy-5 β -cholenic acid/isomer	SG [18]
16	8.39	[M-H] ⁻	530.2762	C ₂₆ H ₄₂ NO ₈ S	-5.85	512.2738	tauro-3 α , 7 α , 12 α , 23R-tetrahydroxy-5 β -cholenic acid/isomer	SG [18]
17	8.48	[M-H] ⁻	512.2667	C ₂₆ H ₄₃ NO ₇ S	-4.29	480.2223, 456.2491, 358.1651	tauro- Δ 8- β , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholenic acid/isomer	SG [18]
18	8.50	[M+HCOO] ⁻	815.4782	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	-1.96	769.4655, 637.4238, 475.3735	notoginsenoside R2/pseudoginsenoside RT3/isomer	NG [16]
19	8.55	[M-H] ⁻	1239.6423	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	3.55	945.5369, 783.4814, 459.3795	notoginsenoside Ra3/ginsenoside R4/notoginsenoside Fa	NG [14]
20	8.60	[M-H] ⁻	530.2766	C ₂₆ H ₄₃ NO ₈ S	-5.28	512.2660	tauro-3 α , 7 α , 12 α , 23R-tetrahydroxy-5 β -cholenic acid/isomer	SG [18]
21	8.64	[M-H] ⁻	512.2674	C ₂₆ H ₄₃ NO ₇ S	-2.54	494.2202, 387.2546, 369.2400	tauro- Δ 8- β , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 β -cholenic acid/isomer	SG [18]
22	8.71	[M-H] ⁻	1239.6360	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	-1.1	945.5367, 783.4932, 459.3841	ginsenoside Ra3/notoginsenoside R4/notoginsenoside Fa [#]	SG [18]
23	8.78	[M-H] ⁻	1239.6407	C ₅₉ H ₁₀₀ O ₂₇	2.26	945.5398, 783.4816, 459.3772	ginsenoside Ra3/notoginsenoside R4/notoginsenoside Fa [#]	SG [16]
24	8.99	[M-H] ⁻	423.2731	C ₂₄ H ₄₀ O ₆	-2.1	405.2617, 387.2546, 359.2597, 325.2513	3 α , 6 β , 7 α , 12 α -tetrahydroxy bile acid/isomer	SG -
25	9.09	[M-H] ⁻	530.2767	C ₂₆ H ₄₂ NO ₈ S	-5.09	512.2635, 476.2432	tauro-3 α , 7 α , 12 α , 23R-tetrahydroxy-5 β -cholenic acid/isomer	SG [18]
26	9.27	[M-H] ⁻	512.2666	C ₂₆ H ₄₂ NO ₇ S	-4.10	456.2306, 358.1544, 328.1518	tauro-3 α , 7 α -dihydroxy-12-oxo-5 β -cholenic acid/isomer	SG [18]
27	9.58	[M-H] ⁻	514.2820	C ₂₆ H ₄₃ NO ₇ S	-4.67	496.2716, 480.2223, 358.1647, 353.2382	taurocholic acid/tauro-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 α -cholenic acid/isomer BC/SG [19]	BC/SG [19]
28	10.00	[M-H] ⁻	514.2827	C ₂₆ H ₄₃ NO ₇ S	-3.31	496.2707, 353.2382, 329.2513	taurocholic acid/tauro-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 α -cholenic acid/isomer BC/SG [18]	BC/SG [18]
29	10.42	[M-H] ⁻	514.2846	C ₂₆ H ₄₃ NO ₇ S	0.39	496.2722, 353.2466, 329.2496	taurocholic acid/tauro-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 α -cholenic acid/isomer BC/SG [20]	BC/SG [20]
30	10.84	[M-H] ⁻	514.2825	C ₂₆ H ₄₃ NO ₇ S	-3.89	496.2642, 353.2453	taurocholic acid/tauro-3 α , 7 α , 12 α -trihydroxy-5 α -cholenic acid/isomer BC/SG [21]	BC/SG [21]
31	11.47	[M+HCOO] ⁻	947.5239	C ₄₆ H ₇₈ O ₁₇	1.90	901.5056	chikusetsusaponin L5	NG [14]
32	12.52	[M-H] ⁻	512.2686	C ₂₆ H ₄₂ NO ₇ S	-0.2	456.2306, 358.1544, 328.1518	tauro-3 α , 7 α -dihydroxy-12-oxo-5 β -cholenic acid/isomer	SG [18]
33	13.01	[M-H] ⁻	1107.5913	C ₅₄ H ₆₅ O ₂₃	-3.97	945.5398, 783.4833, 765.4795	ginsenoside Rb1 [#]	NG [14]
34	13.40	[M-H] ⁻	1107.5999	C ₅₄ H ₆₅ O ₂₃	3.79	945.5380, 783.4814, 765.4736	yesaninoside-E [#]	NG [14]
35	13.75	[M+HCOO] ⁻	815.4796	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	-0.25	769.4657, 637.4254, 475.3859	notoginsenoside R2/pseudoginsenoside RT3/isomer	NG [14]
36	15.06	[M+HCOO] ⁻	815.4758	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	-4.91	769.4657, 637.4252, 475.3665	notoginsenoside R2/pseudoginsenoside RT3/isomer	NG [14]
37	15.55	[M-H] ⁻	530.2770	C ₂₆ H ₄₃ NO ₈ S	-4.34	512.2633	tauro-3 α , 7 α , 12 α , 23R-tetrahydroxy-5 β -cholenic acid/isomer	SG [18]

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

No.	t_R in Fig. 2a/ min	Adduct ion	MS ¹ (m/z)	Formula	Error/ 10 ⁻⁶	MS ² (m/z)	Tentative identification	Source Ref.
38	16.13	[M-H] ⁻	423.2740	C ₂₄ H ₄₀ O ₆	-2.84	405.2602, 325.2517	3 α , 6 β , 7 α , 12 α -tetrahydroxy bile acid/isomer	SG
39	17.11	[M-H] ⁻	405.2623	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	-5.68	359.2492, 343.2637	3 α , 12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholic acid/isomer	BC/SG [21]
40	17.79	[M-H] ⁻	423.2737	C ₂₄ H ₄₀ O ₆	-9.21	405.2613, 325.2517	3 α , 6 β , 7 α , 12 α -tetrahydroxy bile acid/isomer	SG
41	18.58	[M-H] ⁻	423.2731	C ₂₄ H ₄₀ O ₆	-7.80	405.2673, 325.2513	3 α , 6 β , 7 α , 12 α -tetrahydroxy bile acid/isomer	SG
42	18.98	[M-H] ⁻	464.3001	C ₂₆ H ₄₃ NO ₆	-3.66	446.2895, 402.2987, 382.2730, 353.2466	glycocholic acid*	BC/SG
43	19.31	[M+HCOO] ⁻	991.5481	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	-0.20	945.5323, 851.5223, 726.4848, 673.5301	gypenoside VIII	NG [17]
44	19.89	[M+HCOO] ⁻	991.5483	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	0.00	945.5388, 783.4813, 621.4303, 459.3799	ginsenoside Rd*	NG
45	20.03	[M-H] ⁻	945.5457	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	3.07	783.4815, 765.4795, 621.4319, 459.3767	ginsenoside Re*	NG
46	20.47	[M+HCOO] ⁻	683.4354	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	-3.22	637.4279, 475.3736	ginsenoside Rh1/isomer [#]	NG [14]
47	21.57	[M-H] ⁻	945.5458	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	3.17	783.4807, 621.4295, 459.3835	notoginsenoside K/isomer	NG [14]
48	22.34	[M-H] ⁻	405.2607	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	-9.62	343.2625, 289.2152, 251.1989	3 α , 12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholic acid/isomer	BC/SG [21]
49	22.95	[M+HCOO] ⁻	683.4376	C ₃₆ H ₆₂ O ₉	0.00	637.4263, 475.3761	ginsenoside Rh1/isomer [#]	NG [14]
50	23.48	[M-H] ⁻	498.2881	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	-2.81	480.2806, 355.2612	taurochenodeoxycholic acid*	BC/SG [17]
51	24.42	[M-H] ⁻	498.2879	C ₂₆ H ₄₅ NO ₆ S	-3.21	480.2756, 355.2607	taurodeoxycholic acid [#]	BC [17]
52	25.56	[M-H] ⁻	405.2633	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	-3.21	343.2632, 289.2158, 251.1991	3 α , 12 α -dihydroxy-7-oxo-5 β -cholic acid/isomer	BC/SG [21]
53	25.82	[M-H] ⁻	487.2368	C ₂₄ H ₄₀ O ₈ S	0.82	452.1676, 408.2813	cholic acid-sulfate	SG
54	26.05	[M-H] ⁻	915.5297	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	-2.84	-	gypenoside IX	NG [14]
55	26.79	[M-H] ⁻	407.2785	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	-4.42	389.2666, 361.2698, 345.2771, 343.2618, 327.2652	cholic acid*	BC/SG
56	27.16	[M+HCOO] ⁻	815.4796	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₃	-0.25	769.4657, 637.4307, 475.3812	notoginsenoside R2/pseudoginsenoside RT3/isomer	NG [14]
57	29.50	[M-H] ⁻	448.3042	C ₂₀ H ₃₃ NO ₅	-5.80	404.3812, 386.3058, 355.2611	glycochenodeoxycholic acid	BC [22]
58	30.95	[M+HCOO] ⁻	829.4933	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	-2.65	783.4795, 637.4115, 475.3675	ginsenoside Rg2*	NG
59	31.67	[M+HCOO] ⁻	829.4918	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	-4.46	783.4793, 621.4165, 459.3762	ginsenoside Rg3 isomer	NG [14]
60	32.56	[M-H] ⁻	448.3054	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	-3.12	430.2918, 402.2990, 386.3048	glycodeoxycholic acid [#]	BC/SG [22]
61	33.96	[M+HCOO] ⁻	829.4933	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	-2.65	783.4795, 621.4337	ginsenoside F2*	NG
62	36.57	[M-H] ⁻	665.4277	C ₃₇ H ₆₂ O ₁₀	1.05	-	notoginsenoside T2/isomer	NG [14]
63	37.39	[M-H] ⁻	465.3209	C ₂₇ H ₄₆ O ₆	2.79	401.3024, 383.2961, 263.1984	tetrahydroxycholestan-26- <i>oic</i> acid [#]	BC
64	38.65	[M-H] ⁻	391.2815	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	1.20	345.2769, 327.2698	ursodeoxycholic acid*	BC
65	39.23	[M+HCOO] ⁻	829.4974	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₃	2.29	783.4743, 621.4149, 459.3672	ginsenoside Rg3*	NG [14]
66	40.56	[M-H] ⁻	391.2838	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	-4.09	345.2788, 327.2657	hyodeoxycholic acid*	BC
67	40.76	[M-H] ⁻	389.2681	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	-4.11	371.2567, 309.2194	ketodeoxycholic acid [#]	BC
68	41.52	[M-H] ⁻	391.2838	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	-4.09	373.2574	chenodeoxycholic acid*	BC
69	42.50	[M-H] ⁻	391.2838	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	-4.09	345.2792, 327.2700	deoxycholic acid [#]	BC
70	43.57	[M+HCOO] ⁻	667.4365	C ₃₆ H ₆₂ O ₈	-9.29	621.4281, 459.3800	ginsenoside Rh2*	BC
71	44.24	[M-H] ⁻	421.2950	C ₂₃ H ₄₂ O ₅	-2.14	375.2884, 273.2215	methyl chololate	BC
72	44.62	[M-H] ⁻	299.2565	C ₁₈ H ₃₆ O ₃	-8.35	281.2453, 253.2515, 225.2123	unknown	N. A.
73	45.29	[M-H] ⁻	795.5396	C ₄₃ H ₇₆ N ₂ O	-2.51	405.2581, 389.2588, 343.2570	unknown	N. A.

NG: Notoginseng Radix et Rhizoma; BC: Bovis Calculus; SG: Snake Gall; * Confirmed with authentic compounds; # Inferred from mass fragmentation pathways; N. A.: not applicable.

3 结论

本文采用 online PLE-UHPLC-IT-TOF-MS 法对片仔癀成分组进行快速全面分析,为其质量控制研究提供可靠的依据。通过对照品比对、质谱裂解规律推断以及相关文献参考,共鉴定 71 个化学成分,推测其中 36 个化合物来源于三七,15 个化合物来源于蛇胆,9 个化合物来源于牛黄,11 个为牛黄与蛇胆来源成分。Online PLE-UHPLC-IT-TOF-MS 法不仅简化了样品前处理步骤,节省了溶剂和人力,而且能够实现中药复方制剂的直接分析,践行了绿色化学的理念,提高了分析的准确度和灵敏度。

参考文献:

[1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Part 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 7, 11, 70, 384, 670
国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 7, 11, 70, 384, 670

[2] Zheng H, Wang X, Zhang Y, et al. J Ethnopharmacol, 2019, 244(15): 111856

[3] Zhang X, Zhang Y, Tang S, et al. J Ethnopharmacol, 2018, 219(12): 117

[4] Huang M Q, Xu W, Zhang Y P, et al. J Chromatogr B, 2016, 1027(1): 27

[5] Chen H, Feng J, Zhang Y, et al. Evid-based Compl Alt, 2015, 2015: 454279

[6] Song Q Q, Liu Y, Zhang L L, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2016, 34(6): 572
宋青青, 刘瑶, 张玲玲, 等. 色谱, 2016, 34(6): 572

[7] Song Y L, Song Q Q, Li J, et al. Sci Rep, 2016, 6: 27303

[8] Song Q Q, Li J, Liu X, et al. J Chromatogr A, 2016, 1438: 189

[9] Song Y L, Song Q Q, Li J, et al. J Chromatogr A, 2016, 1454: 58

[10] Zhang J, Fan Y Q, Gong Y J, et al. J Chromatogr B, 2017: 245

[11] Zhao J, Qin Z X, Peng B, et al. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2017, 38(1): 97
赵静, 秦振娟, 彭冰, 等. 质谱学报, 2017, 38(1): 97

[12] Lan K, Su M, Xie G, et al. Anal Chem, 2016, 88(14): 7041

[13] Shan G S, Zhao Q M, Pan D, et al. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2020, 41(4): 340
单国顺, 赵启苗, 潘多, 等. 质谱学报, 2020, 41(4): 340

[14] Wang T, Guo R, Zhou G, et al. J Ethnopharmacol, 2016: 234

[15] Gu C, Lv J, Zhang X, et al. J Nat Prod, 2015, 78(8): 1829

[16] Liu P, Heshuil Y U, Zhang L, et al. Chin J Nat Med, 2015, 13(6): 471

[17] Yao H, Shi P, Shao Q, et al. Chin Med, 2011, 6(1): 9

[18] Zhang J, Peng J, Chen X, et al. J Chromatogr B, 2016, 1036/1037: 157

[19] Jia J, Sun J M, Zang H, et al. Jilin Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 33(3): 271
贾静, 孙佳明, 臧浩, 等. 吉林中医药, 2013, 33(3): 271

[20] Zhang J. [Master Dissertation]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology, 2017
张洁. [硕士学位论文]. 武汉: 华中科技大学, 2017

[21] Chen X Y, Zhang J, Fan Y Q, et al. Journal of Chinese Pharmaceutical Science, 2019, 54(17): 1380
陈晓颀, 张洁, 范叶琴, 等. 中国药理学杂志, 2019, 54(17): 1380

[22] Liu Y G, Tan P, Liu S S, et al. Pharmacogn Mag, 2015, 42(11): 304