

· 中药工业 ·

黄精覆盆子发酵饮品化学成分的 UPLC-HRMS 分析[△]梅晓丹^{1,2}, 李洁², 王喻淇², 宋帅³, 乔延江², 林峰^{2,3*}, 张加余^{1*}

1. 滨州医学院 药学院, 山东 烟台 264003;

2. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488;

3. 江苏菌钥生命科技发展有限公司, 江苏 盐城 224100

[摘要] 目的: 研究发酵前后黄精覆盆子饮品中的化学成分。方法: 样品经固相萃取处理后, 采用 Waters HSS T3 UPLC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)和 0.1% 甲酸水溶液(A)与乙腈(B)流动相系统进行梯度洗脱, 应用液质联用技术检测发酵前后黄精覆盆子饮品中的化学成分。结果: 结合精确分子质量、多级质谱裂解信息、对照品比对以及文献报道, 总共筛选鉴定了 60 个化合物。其中, 甾体皂苷类成分有 42 个, 三萜类成分有 3 个, 黄酮类成分有 9 个, 生物碱类成分有 6 个。结论: 本研究为黄精覆盆子发酵饮品的微生物发酵工艺研究奠定了基础, 为其药用价值的进一步开发利用提供了借鉴。

[关键词] 黄精覆盆子发酵饮品; 超高效液相色谱-高分辨质谱法; 成分鉴定

[中图分类号] R283; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)04-0615-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190801003

Identification of Compounds in Polygonati Rhizoma and Rubi Fructus Fermentation Drinks by UPLC-HRMS

MEI Xiao-dan^{1,2}, LI Jie², WANG Yu-qi², SONG Shuai³, QIAO Yan-jiang², LIN Feng^{2,3*}, ZHANG Jia-yu^{1*}

1. Pharmacy Department, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China;

2. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

3. Jiangsu Junyao Life Science and Technology Development Co., Ltd., Yancheng 224100, China

[Abstract] **Objective:** To study the chemical compounds in Polygonati Rhizoma and Rubi Fructus Fermentation Drinks. **Methods:** After solid phase extraction of samples, Waters HSS T3 UPLC column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) and 0.1% formic acid-acetonitrile solution were used to detect the constituents in Polygonati Rhizoma and Rubi Fructus Fermentation Drinks. **Results:** Based on the accurate mass measurements, mass fragmentation behaviors, reference comparison and related literature reports, a total of 60 compounds were identified and characterized. Those compounds included 42 steroidal saponins, 3 triterpenoid saponins, 9 flavonoid components and 6 alkaloids. **Conclusion:** The study laid a foundation for the research of Polygonati Rhizoma and Rubi Fructus Fermentation Drinks, and provided reference basis for further development and utilization of medicinal value.

[Keywords] Polygonati Rhizoma and Rubi Fructus Fermentation Drinks; UPLC-HRMS; identification

中药发酵炮制技术在我国已有数千年的历史。张仲景的《金匱要略》、贾思勰的《齐民要术》以及李时珍的《本草纲目》等著名中药典籍中都有关于中药发酵炮制的记载和解释^[1-2]。该技术在适当的温度和湿度下, 借助生物转化作用对中药进行发酵,

从而达到减毒增效、扩大药用范围的目的^[3-4]。随着科技的进步与发展, 中药发酵炮制技术在中药研究领域应用更加广泛, 具有广阔的发展前景。

黄精覆盆子发酵饮品是 1 种由黄精和覆盆子等中药发酵制得的饮品。黄精和覆盆子均为我国常用

[△] **[基金项目]** 山东省青创人才引进创新研究团队; 滨州医学院高层次人才科研启动基金(2019KYQD06); 烟台市校地融合中药大健康产业化平台项目(2019XDRHXMP18)

* **[通信作者]** 张加余, 教授, 研究方向: 中药质量控制及体内代谢研究; Tel: (0535)6913719, E-mail: zhangjiayu0615@163.com
林峰, 高级工程师, 研究方向: 中药发酵; E-mail: linfeng_leo@163.com

中药,具有益肾功效,亦可用于食疗和保健。研究表明,黄精的主要化学成分为多糖、甾体皂苷、黄酮、蒽醌、木脂素以及生物碱等成分,具有抗衰老、抗肿瘤、抗菌、调节血糖和调节免疫等作用^[5-6];覆盆子中主要含有黄酮、萜类、甾醇以及挥发油等成分,用于治疗遗尿尿频、遗精滑精及目暗昏花等^[7-8]。本研究采用超高效液相色谱-高分辨质谱法(UPLC-HRMS)技术对黄精覆盆子饮品发酵前后的化学成分进行分析,以明确发酵前后其活性成分种类的变化,为其药用价值的进一步开发利用奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

LTQ-Orbitrap XL 质谱仪 [美国 Thermo Fisher 公司,配有电喷雾离子源(ESI)和 Xcalibur 2.1 工作站]; DIONEX Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); R200D 型电子分析天平(十万分之一,德国 Sartorius 公司); Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统(美国 Millipore 公司); KQ-250DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Grace Pure™ SPE C₁₈-Low 固相萃取小柱 [500 mg·(3 mL⁻¹), Sigma 公司]。

1.2 试药

对照品腺苷、芦丁、山柰酚、菝葜皂苷元和薯蓣皂苷元(成都曼思特生物科技有限公司,纯度≥98%);质谱级甲醇、乙腈(美国 Thermo Fisher 公司);色谱级甲酸(德国 Merck 公司);超纯水。

黄精、覆盆子和山药药材均购自亳州市华云中药饮片有限公司,均由北京中医药大学张媛副教授鉴定。

2 方法

2.1 溶液制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别取腺苷、芦丁、山柰酚、菝葜皂苷元和薯蓣皂苷元 5 种对照品适量,精密称定,加入甲醇配制成质量浓度约为 100 μg·mL⁻¹的储备液,用时稀释成浓度适宜的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 黄精覆盆子未发酵供试品溶液的制备:分别取黄精、覆盆子和山药粉末各 10 g,精密称定,加入 300 mL 纯净水,搅拌均匀

后,加入适量的 NaHCO₃ 和 K₂HPO₄ 等调节 pH 为 5.8~6.0,再加入 20 g 蛋白胍和 80 g 白砂糖,定容至 1000 mL。溶液在 90 °C 水浴条件下灭菌 30 min。

黄精覆盆子发酵供试品溶液的制备:分别取黄精、覆盆子和山药粉末各 10 g,精密称定,加入 300 mL 纯净水,搅拌均匀后,加入 K₂HPO₄ 调节 pH 为 4.5~5.0;然后在混合液中添加 1 g 纤维素酶和 1 g 果胶酶,于 50 °C 下酶解 90 min;再加适量的 NaHCO₃ 和 K₂HPO₄ 等调节 pH 为 5.8~6.0,然后加入 20 g 蛋白胍和 80 g 白砂糖,定容至 1000 mL。溶液在 90 °C 水浴条件下灭菌 30 min,待温度降至室温,接种肠膜明串珠菌肠膜亚种发酵(培养温度为 25 °C,发酵 20 d)。

供试品溶液的处理:取固相萃取小柱,先用 5 mL 甲醇活化,再用 5 mL 去离子水平衡。然后分别加入上述供试品溶液各 2 mL,依次用 5 mL 水和 5 mL 甲醇洗脱,收集甲醇洗脱液,于室温条件下用 N₂ 吹干,残渣加入 200 μL 2% 乙腈溶液复溶,涡旋振荡 3 min,14 000 r·min⁻¹(离心半径为 9.38 cm)离心 15 min,吸取上清液,即得。

2.2 分析条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Waters HSS T3 UPLC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~2 min, 2% B; 2~5 min, 2%~5% B; 5~35 min, 5%~25% B; 35~45 min, 25%~40% B; 45~46 min, 40%~90% B);柱温: 40 °C;流速: 0.3 mL·min⁻¹;进样量: 2 μL。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子模式;毛细管温度: 350 °C;管透镜电压: -110 V;毛细管电压: -35 V;喷雾电压: 3 kV;辅助气流速: 3 L·min⁻¹;鞘气流速: 9 L·min⁻¹;傅里叶高分辨扫描范围 *m/z* 50~1500;一级扫描分辨率: 30 000;二级质谱采用数据依赖性扫描方式进行数据获取;激活时间: 30 ms;激活能量单位: 0.25 q;归一化碰撞能量: 35%。

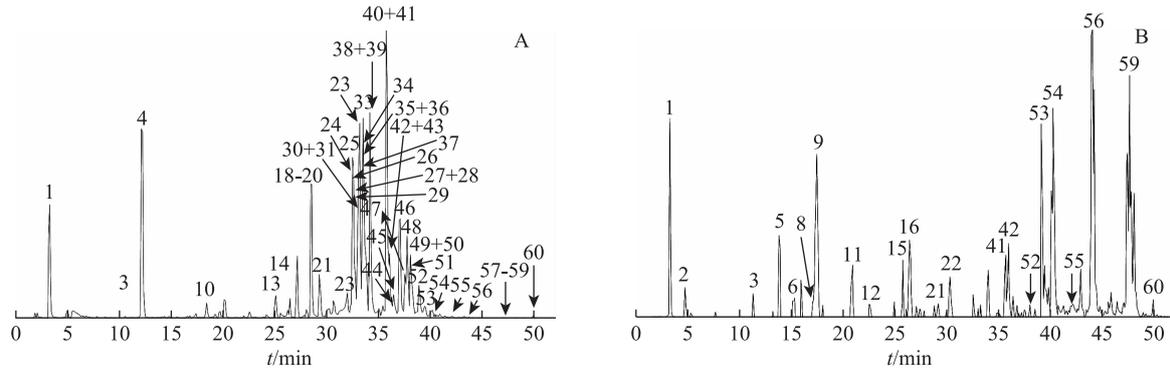
2.3 质谱数据的预处理

利用 Xcalibur 2.1 工作站处理数据,通过分子式预测模块预测母离子和子离子的分子式,相关参数设定为 C [0~50]、H [0~100]、O [0~20]、N [0~5]、环不饱和双键数 [0~15],质量精度误差在 1×10⁻⁵以内。

3 结果与讨论

本研究采用UPLC-HRMS技术对发酵前后黄精覆盆子饮品中的化学成分变化情况进行研究。结合对照品比对、文献报道以及液质提供的精确分子量

与多级质谱碎片离子信息,共分析鉴定了60个化学成分(发酵前49个,发酵后22个)。其中,甾体皂苷类成分有42个,三萜类成分有3个,黄酮类成分有9个,生物碱类成分有6个,结果见图1、表1。



注: A. 发酵前; B. 发酵后。

图1 黄精覆盆子发酵饮品的提取离子流图

表1 发酵前后黄精覆盆子饮品中化学成分的质谱信息

分子式 [M+H] ⁺	鉴定结果	裂解碎片及丰度	裂解碎片及方式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 (×10 ⁻⁶)	峰号	t _R	发 酵 前	发 酵 后	来源
C ₁₀ H ₁₄ O ₄ N ₅	腺苷	MS ² [268]: 136 (100), 268(10), 250(1)	MS ² [268]: 136(M+H-D- Rib), 250(M+H-H ₂ O)	268.104 03	268.103 58	-1.68	1*	3.43	+	+	黄精/ 山药
C ₉ H ₁₂ O ₂ N	polygonatine A or isomer	MS ² [166]: 120 (100), 166(5), 148(3)	MS ² [166]: 120(M+H- CO-H ₂ O), 148(M+H- H ₂ O)	166.086 25	166.086 20	-0.33	2	4.99	-	+	黄精
					166.085 94	-1.89	3	11.90	+	+	黄精
					166.086 09	-0.99	4	12.17	+	-	黄精
					166.085 89	-2.19	8	17.04	-	+	黄精
				166.085 80	-2.74	12	22.66	-	+	黄精	
C ₃₉ H ₆₁ O ₁₃	kingianoside B or isomer	MS ² [737]: 575 (100), 557(7), 397(5)	MS ² [737]: 575(M+H- Glc), 557(M+H-H ₂ O- Glc), 397(M+H-O-Glc- Gal)	737.410 66	737.415 16	4.09	5	13.84	-	+	黄精
					737.417 54	3.31	11	20.83	-	+	黄精
					737.408 63	-2.76	40	35.70	+	-	黄精
					737.408 33	-3.17	50	38.00	+	-	黄精
C ₃₂ H ₅₁ O ₉	huangjinoside C or isomer	MS ² [579]: 561 (100), 419(39), 269(38)	MS ² [579]: 561(M+H- H ₂ O), 419(M+H-CO-Ara)	579.352 76	579.347 78	-4.59	6	15.23	-	+	黄精
					579.348 69	-3.02	7	16.02	-	-	黄精
					579.351 32	-2.48	51	38.24	+	-	黄精
					579.350 59	-3.74	52	38.81	+	+	黄精
C ₃₉ H ₆₃ O ₁₇	huangjinoside L	MS ² [803]: 478 (100), 785(38), 461(2)	MS ² [803]: 478(M+H- Glc-Gal), 785(M+H- H ₂ O), 460(M+H-H ₂ O- Glc-Gal)	803.405 97	803.401 73	-2.28	9	17.54	-	+	黄精
C ₁₅ H ₁₃ O ₆	aromadendrin	MS ² [289]: 271 (100), 243(14), 216(6), 272(5)	MS ² [289]: 271(M+H- H ₂ O), 243(M+H-H ₂ O- CO)	289.070 66	289.070 34	-1.12	10	18.43	+	-	覆盆子
C ₂₁ H ₂₅ O ₁₀	phlorizin	MS ² [437]: 293 (100), 185(3), 275(3)	MS ² [437]: 275(M+H- Glc)	437.144 22	437.140 81	-3.80	13	25.01	+	-	覆盆子
C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	芦丁	MS ² [611]: 303 (100), 465(37), 449(4)	MS ² [611]: 303(M+H- Rha-Glc), 465(M+H- Rha), 449(M+H-Glc)	611.160 66	611.159 30	-2.22	14*	25.46	+	-	黄精/ 覆盆子

续表 1

分子式 [M+H] ⁺	鉴定结果	裂解碎片及丰度	裂解碎片及方式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 (×10 ⁻⁶)	峰号	t _R	发 酵 前	发 酵 后	来源
C ₃₉ H ₆₁ O ₁₄	kingianoside A or isomer	MS ² [753]: 591 (100), 573(52), 427(51), 735 (16)	MS ² [753]: 591 (M + H- Glc), 573 (M + H-H ₂ O- Glc), 735(M + H-H ₂ O)	753.405 58	753.411 80	2.25	15	25.74	-	+	黄精
					753.403 93	-2.19	22	30.35	-	+	黄精
					753.403 81	-2.35	25	32.41	+	-	黄精
					753.404 11	-1.95	29	32.90	+	-	黄精
					753.404 54	-1.38	33	33.37	+	-	黄精
					753.404 42	-1.54	46	36.89	+	-	黄精
				753.403 14	-3.24	47	37.58	+	-	黄精	
C ₃₂ H ₄₉ O ₉	huangjinoside A isomer	MS ² [577]: 559 (100), 286(11), 271(5), 417(3),	MS ² [577]: 559 (M + H- H ₂ O), 286(M + H-EF环), 271 (M + H-EF-CH ₃), 417 (M + H-Ara-CO)	577.337 11	577.340 33	4.57	16	26.45	-	+	黄精
					577.335 14	-3.41	49	38.00	+	-	黄精
C ₁₅ H ₁₁ O ₆	山柰酚	MS ² [287]: 287 (100), 241(28), 165(26), 153 (15), 269(6)	MS ² [287]: 241 (M + H- H ₂ O-CO), 165 (M + H- C ₆ H ₆ OH-CO), 153 RDA(M + H-C ₆ H ₆ O-C ₂ OH), 269 (M + H-H ₂ O)	287.055 01	287.054 26	-2.62	55*	42.05	+	+	黄精/ 覆盆子
C ₁₅ H ₁₁ O ₆	山柰酚 isomer	MS ² [287]: 287 (100), 241(36), 165(33), 153 (18), 269(6)	MS ² [287]: 241 (M + H- H ₂ O-CO), 165 (M + H- C ₆ H ₆ OH-CO), 153 RDA(M + H-C ₆ H ₆ O-C ₂ OH), 269 (M + H-H ₂ O)	287.055 01	287.054 44	-2.00	17	27.13	+	-	黄精/ 覆盆子
					287.054 50	-1.79	19	28.44	+	-	黄精/ 覆盆子
					287.054 78	-0.81	21	29.23	+	+	黄精/ 覆盆子
C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	quercitrin	MS ² [449]: 287 (100), 431(2), 329(1)	MS ² [449]: 287 (M + H- Rha-O), 431(M + H-H ₂ O)	449.107 83	449.106 99	-1.88	18	28.42	+	-	覆盆子
C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	nicotiflorin	MS ² [595]: 287 (100), 449(23), 577(3), 496(2)	MS ² [595]: 287 (M + H- Glc-Rha), 449 (M + H- Rha), 577(M + H-H ₂ O)	595.165 74	595.164 06	-2.83	20	28.44	+	-	覆盆子
C ₄₅ H ₇₃ O ₁₉	huangjinoside P or isomer	MS ² [917]: 593 (100), 431(82), 755(26)	MS ² [917]: 593 (M + H- 2Glc), 431 (M + H-2Glc- Fuc-O), 755(M + H-Glc)	917.474 05	917.471 86	-2.39	23	31.76	+	-	黄精
					917.473 45	-0.66	24	32.25	+	-	黄精
					917.473 51	-0.59	37	33.69	+	-	黄精
C ₃₉ H ₆₃ O ₁₄	huangjinoside E or isomer	MS ² [755]: 593 (100), 413(17), 431(10), 719(7)	MS ² [755]: 593 (M + H- Glc), 413 (M + H-Glc-Fuc- O-H ₂ O), 431 (M + H-Glc- Fuc-O), 719(M + H-2H ₂ O)	755.421 23	755.419 37	-2.46	26	32.53	+	-	黄精
					755.419 62	-2.13	32	33.12	+	-	黄精
					755.420 35	-1.16	35	33.54	+	-	黄精
					755.42029	-1.24	38	34.13	+	-	黄精
C ₄₅ H ₇₃ O ₁₈	neosibiricoside D or isomer	MS ² [901]: 739 (100), 577(23), 397(21), 415 (16)	MS ² [901]: 739 (M + H- Glc), 577 (M + H-2Glc), 397(M + H-2Glc-Gal-H ₂ O), 415(M + H-2Glc-Gal)	901.479 14	901.47717	-2.18	27	32.63	+	-	黄精
					901.477 05	-2.32	30	32.92	+	+	黄精
					901.479 00	-0.15	36	33.54	+	+	黄精
					901.477 23	-2.12	41	35.70	+	-	黄精
					901.477 05	2.32	42	36.03	+	-	黄精
				901.476 99	-2.38	45	36.39	+	-	黄精	
C ₃₃ H ₅₃ O ₉	huangjinoside D or isomer	MS ² [593]: 431 (100), 287(46), 575(7), 429(3)	MS ² [593]: 431 (M + H- HO-Fuc), 575 (M + H- H ₂ O), 429 (M + H-H ₂ O- Fuc)	593.368 41	593.366 94	-2.47	28	32.63	+	-	黄精
					593.367 80	-1.02	39	34.13	+	-	黄精
					593.367 25	-1.95	43	36.03	+	-	黄精
					593.366 82	-2.67	48	37.67	+	-	黄精
					593.366 76	-2.78	53	39.15	+	+	黄精
C ₄₅ H ₇₁ O ₁₉	pratoside D ₁	MS ² [915]: 897 (100), 744(72), 671(40), 431 (12)	MS ² [915]: 897 (M + H- H ₂ O), 431 (M + H-2Glc- Gal)	915.457 85	915.457 76	-0.70	31	32.99	+	-	黄精
C ₄₄ H ₆₉ O ₁₇	kingianoside K	MS ² [869]: 707 (100), 477(92), 571(13)	MS ² [869]: 707 (M + H- Glc), 571 (M + H-Glc-EF 环)	869.452 37	869.451 54	-1.59	34	33.40	+	-	黄精

续表 1

分子式 [M + H] ⁺	鉴定结果	裂解碎片及丰度	裂解碎片及方式	理论值 (<i>m/z</i>)	实际值 (<i>m/z</i>)	误差 ($\times 10^{-6}$)	峰号	<i>t_R</i>	发 酵 前	发 酵 后	来源
C ₄₅ H ₇₃ O ₁₇	gracillin or isomer	MS ² [885]: 723 (100), 431(83), 287 (33), 577 (27), 415(15)	MS ² [885]: 723 (M + H- Glc), 577 (M + H-Glc- Rha), 415 (M + H-2Glc- Rha)	885.483 67	885.482 24 885.482 54	-2.24 -1.90	44 54	36.29 40.22	+	- +	黄精 黄精
C ₃₀ H ₄₉ O ₅	arjunic acid	MS ² [489]: 471 (100), 453(41), 435 (19), 373 (6), 417(5)	MS ² [489]: 471 (M + H- H ₂ O), 453 (M + H-2H ₂ O), 435 (M + H-3H ₂ O), 373 (M + H-2H ₂ O-CO ₂), 417 (M + H- 4H ₂ O)	489.357 45	489.355 93	-3.10	56	43.94	+	+	覆盆子
C ₃₀ H ₄₉ O ₄	maslinic acid	MS ² [473]: 428 (100), 410 (68), 429(17), 411(14)	MS ² [473]: 429 (M + H- CO ₂), 411 (M + H-H ₂ O- CO ₂)	473.362 53	473.363 71	2.47	57	47.21	+	-	覆盆子
C ₃₀ H ₄₇ O ₆	2 α , 19 α , 24- trihydroxyurs- 12-ene-3-oxo- 28-acid	MS ² [503]: 456 (100), 467(43), 485 (28), 457 (18), 449(6)	MS ² [503]: 467 (M + H- 2H ₂ O), 485 (M + H-H ₂ O), 457 (M + H-H ₂ O-CO), 449 (M + H-3H ₂ O)	503.336 71	503.334 96	-3.48	58	47.65	+	-	覆盆子
C ₂₇ H ₄₅ O ₃	菝葜皂苷元	MS ² [471]: 283 (100), 399(24), 271(18)	MS ² [417]: 399 (M + H- H ₂ O), 271 (M + H-EF 环- CH ₃)	417.336 32	417.335 45	-2.08	59 *	47.67	+	+	黄精
C ₂₇ H ₄₃ O ₃	薯蓣皂苷元	MS ² [415]: 271 (100), 253(24), 397(3)	MS ² [415]: 271 (M + H-EF 环), 253 (M + H-EF 环- H ₂ O), 397 (M + H-H ₂ O)	415.320 67	415.319 70	-2.34	60 *	50.50	+	+	黄精/ 山药

注: *与对照品比对鉴定; +为检测到; -为未检测到; Glc为葡萄糖基; Rha为鼠李糖基; Gal为半乳糖基; Ara为阿拉伯糖基; Fuc为岩藻糖基; D-RibD为核糖基; EF为甾体皂苷的E、F环。

3.1 甾体皂苷类成分的分析鉴定

甾体皂苷类化合物是黄精的主要药效成分和特征性成分,具有调节血糖、调节免疫、抗肿瘤、抗抑郁、改善学习记忆等作用^[9]。该类成分的母核主要有菝葜皂苷元、薯蓣皂苷元及毛地黄糖苷元等^[10]。其中,薯蓣皂苷元为甾体皂苷元骨架的一级氧化水平,是高氧化甾体皂苷元生物合成的前体化合物。在多个级别的氧化水平上,借助不同位置的氧化反应,若干多氧取代化合物的产生构成了黄精属甾体皂苷元的分子多样性^[11]。此外,糖基部分的结构也是形成黄精属植物甾体皂苷分子多样性的关键因素,其连接糖基的主要有半乳糖、葡萄糖、阿拉伯糖、鼠李糖、木糖及岩藻糖等。本实验共鉴定了42个甾体皂苷类成分,以下选择代表性的甾体皂苷元和皂苷为例进行结构解析过程的阐释。

在正离子模式下, **M59** 的准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 417.335 45, 推测其分子式为 C₂₇H₄₅O₃, 误差为 -2.08×10^{-6} 。在其 ESI-MS² 图谱中, 产生了碎片离子 *m/z* 399 和 *m/z* 271。推测 *m/z*

399 是由 *m/z* 417 脱去 1 分子 H₂O 产生的, *m/z* 271 由 *m/z* 417 丢失 EF 环和 1 分子 CH₃ 形成。通过与对照品的多级质谱裂解行为与保留时间进行比对, 可将 **M59** 准确鉴定为菝葜皂苷元。

M60 的准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 415.319 70, 可知其分子式为 C₂₇H₄₃O₃ (误差 -2.34×10^{-6})。在其二级质谱图中, 产生了 *m/z* 397 [M + H-H₂O]⁺、271 [M + H-EF 环]⁺ 和 253 [M + H-EF 环-H₂O]⁺ 等碎片离子。结合对照品比对和相关文献^[12], 可将 **M60** 准确鉴定为薯蓣皂苷元。

M31 的色谱保留时间为 32.99 min, 其准分子离子峰 [M + H]⁺ 为 *m/z* 915.457 76, 推测其分子式为 C₄₅H₇₁O₁₉, 误差为 -0.70×10^{-6} 。在多级质谱裂解过程中, *m/z* 915 通过丢失 1 分子 H₂O 产生碎片离子。而另一个碎片离子 *m/z* 431 [M + H-2Glc-Gal]⁺ 的产生表明结构中存在 2 个葡萄糖基团和 1 个半乳糖基团。推断 **M31** 可能为 pratioidside D₁。

m/z 869.451 54 为 **M34** 正离子模式的准分子离子峰 [M + H]⁺, 分子式为 C₄₄H₆₉O₁₇ (误差 -1.59×10^{-6} 。

在其 ESI-MS² 图谱中, m/z 869 产生了碎片离子 707 $[M + H - \text{Glc}]^+$ 和 571 $[M + H - \text{Glc} - \text{EF 环}]^+$, 表明其分子结构中存在葡萄糖基团。由此可将 **M34** 鉴定为 kingianoside K。

3.2 三萜类成分的分析鉴定

覆盆子中含有较为广泛的萜类成分, 二萜类和三萜类是其特性成分, 其中尤以三萜类成分居多。三萜类化合物的母核主要为熊果酸型和齐墩果烷型, 以熊果酸型居多, 此类化合物多以结合态存在, 成苷后糖大多连在 28 位^[13]。本实验共鉴定了 3 个三萜类成分, 发酵前有 3 个, 发酵后有 1 个。

M56 的色谱保留时间为 43.94 min, 其准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 489.355 93。根据由高分辨质谱所获得的精确分子量推测其最可能的分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_5$, 误差为 -3.10×10^{-6} 。在二级质谱图中, $[M + H]^+$ 离子产生了 m/z 471 $[M + H - \text{H}_2\text{O}]^+$ 、453 $[M + H - 2\text{H}_2\text{O}]^+$ 、435 $[M + H - 3\text{H}_2\text{O}]^+$ 、417 $[M + H - 4\text{H}_2\text{O}]^+$ 和 373 $[M + H - 2\text{H}_2\text{O} - \text{CO}_2]^+$ 等一系列碎片离子。这些离子的产生证明该分子结构中存在羧基和多个羟基。由此可将 **M56** 鉴定为阿江榄仁酸(arjunic acid)。

在正离子模式下, **M57** 的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 473.363 71, 推断其最可能的分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{49}\text{O}_4$, 误差为 2.47×10^{-6} 。在质谱裂解过程中, m/z 473 脱去 1 分子 CO_2 产生二级碎片离子 m/z 429, m/z 429 进一步丢失 1 分子 H_2O 生成 m/z 411。以上裂解过程表明该分子结构中含有羧基和羟基。因此, **M57** 被鉴定为山楂酸(maslinic acid)。

M58 在正离子模式下的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 503.334 96, 其可能的分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_6$ (误差 -3.48×10^{-6})。 m/z 503 分别脱去 1 分子 H_2O 、2 分子 H_2O 和 3 分子 H_2O 产生 ESI-MS² 碎片离子 m/z 485、 m/z 467 和 m/z 449, m/z 485 进一步裂解, 脱去 1 分子 CO 生成 m/z 457。以上质谱裂解过程表明, 该分子结构中存在羧基和多个羟基。由此可将 **M58** 鉴定为 2α , 19α , 24 -三羟基熊果-12-烯-3-酮基-28-酸(2α , 19α , 24 -trihydroxyurs-12-ene-3-oxo-28-acid)。

3.3 黄酮类成分的分析鉴定

黄精和覆盆子中均含有黄酮类成分, 其存在形式既有游离型的, 也有与糖结合形成苷的。黄酮类化合物以 C6-C3-C6 为基本骨架, 根据中间三碳链的氧化程度、苯基连接位置以及三碳链是否呈环状等特点, 分为不同的类型。该类成分具有广泛的药理作用, 如降

血糖、抗氧化、抗肿瘤、抗菌及抗炎等。本实验总共检测到 9 个黄酮类成分, 发酵前有 9 个, 发酵后 2 个。

在正离子模式下, **M14** 的色谱保留时间为 25.46 min, 其准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 611.159 30, 推测其可能的分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{O}_{16}$ (误差 -2.22×10^{-6})。 m/z 611 相继脱去 1 分子鼠李糖基和 1 分子葡萄糖基生成碎片离子 m/z 303。同时, 二级碎片离子 m/z 465 $[M + H - \text{Rha}]^+$ 和 m/z 449 $[M + H - \text{Glc}]^+$ 的存在, 也表明该分子结构中存在鼠李糖(Rha)基团和葡萄糖(Glc)基团。结合对照品比对和文献参考^[14], 可将 **M14** 准确鉴定为芦丁。

M55 的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 287.054 26, 其色谱保留时间为 42.05 min, 其分子式可能为 $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_6$, 误差为 -2.62×10^{-6} 。其二级碎片离子 m/z 269 是由 m/z 287 脱去 1 分子 H_2O 产生, m/z 269 进一步脱去 1 分子 CO 生成 m/z 241, 表明其结构中存在羟基和羰基。同时, 碎片离子 m/z 165 $[M + H - \text{C}_6\text{H}_6\text{O} - \text{CO}]^+$ 的产生, 表明该分子结构中存在羟基和苯环。此外, 黄酮母核经逆狄尔斯-阿尔德反应(RDA)重排 C 环开裂并丢失 B 环产生碎片离子 m/z 153 $[M + H - \text{C}_6\text{H}_6\text{O} - \text{C}_2\text{OH}]^+$ 。结合对照品的保留时间和裂解规律^[15], 可将 **M55** 准确鉴定为山柰酚。

M20 在正离子模式下的色谱保留时间为 28.44 min, 其准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 595.164 06, 推测其可能的分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{O}_{15}$, 误差为 -2.83×10^{-6} 。在 ESI-MS² 图谱中, 产生了 m/z 287、 m/z 499 和 m/z 577 等碎片离子。 m/z 595 脱去 1 分子 Rha 生成 m/z 499, m/z 499 继续脱去 1 分子 Glc 产生 m/z 287, 提示该分子中含有鼠李糖基团和葡萄糖基团。此外, m/z 577 $[M + H - \text{H}_2\text{O}]^+$ 的存在表明结构中含有羟基。由此, **M20** 被鉴定为烟花苷(nicotiflorin)。

3.4 生物碱类成分的分析鉴定

黄精和山药中尚含有少量的生物碱类成分, 这些化合物药理活性众多, 主要为抗肿瘤、抗炎镇痛、抗菌、抗病毒以及杀虫等。本研究鉴定了 6 个生物碱类化合物, 包括发酵前 3 个和发酵后 5 个。

在正离子模式下, **M1** 的色谱保留时间为 3.43 min, 其准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 268.103 58, 其分子式可能为 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_4$, 误差为 -1.68×10^{-6} 。 m/z 136 和 250 为其 ESI-MS² 碎片离子。其中, m/z 268 丢失 1 分子 D-Rib 生成 m/z 136 (表明母核结构中含有核糖), m/z 268 丢失 1 分子

H₂O 产生碎片离子 m/z 250(表明母核结构中存在羟基)。结合对照品比对,将 M1 准确鉴定为腺苷。

4 结论

基于 UPLC-HRMS 技术,本研究对发酵前后黄精覆盆子饮品中的化学成分进行了分析检测。通过分析精确分子量、多级碎片信息,结合对照品和相关文献,本实验共鉴定了 60 个化学成分,包括 42 个甾体皂苷,3 个三萜,9 个黄酮和 6 个生物碱。这些化学成分有 53 个来源于黄精,12 个来源于覆盆子,2 个来源于山药。其中,从发酵前黄精覆盆子饮品中分析鉴定了 49 个成分,从发酵后黄精覆盆子饮品中分析鉴定了 22 个成分。结果表明,该饮品中的大多数黄酮类成分和三萜类成分在发酵之后消失;部分甾体皂苷类成分,如化合物康定玉竹苷 D₁(pratoside D₁),滇黄精皂苷 K(kingianoside K)以及黄精皂苷(huangjinoside)D、E、P,新西伯利亚蓼苷 D(neosibiricoside D)和它们的同分异构体在发酵后几乎消失;而腺苷、山柰酚、菝葜皂苷元和薯蓣皂苷元等成分在发酵前后均存在。本实验基本阐明了发酵前后黄精覆盆子饮品中的化学成分,可为其化学成分的进一步研究和质量评价提供参考。

参考文献

- [1] 王耀新,陈丽娜,韩国庆,等. 中药发酵技术研究概况[J]. 中医药信息,2018,35(6):120-124.
- [2] 孟凡涛,刘冬菊. 研究中药发酵炮制法[J]. 世界最新医学信息文摘,2018,18(10):8-9.
- [3] 曾庆文,曹军. 中药发酵的研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2005,26(5):545-547.
- [4] 胥敏,吴纯洁,严丹,等. 中药发酵技术传承与创新的探索[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(23):230-234.
- [5] 王婷,苗明三. 黄精的化学、药理及临床应用特点分析[J]. 中医学报,2015,30(5):714-715,718.
- [6] 姚荣林. 黄精的化学成分及药理研究[J]. 医疗装备,2014,27(9):20-21.
- [7] 苗菊茹,谢一辉,刘红宁. 覆盆子的研究进展[J]. 江西中医药,2004,35(1):54-55.
- [8] 程丹,李洁,周斌,等. 覆盆子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材,2012,35(11):1873-1876.
- [9] 张洁,马百平,杨云,等. 黄精属植物甾体皂苷类成分及药理活性研究进展[J]. 中国药理学杂志,2006,41(5):330-332.
- [10] 刘晓谦,易红,姚丽,等. 黄精属植物的研究进展及其开发前景[J]. 中国药理学杂志,2017,52(7):530-534.
- [11] 姜程曦,张铁军,陈常青,等. 黄精的研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. 中草药,2017,48(1):1-16.
- [12] 匡海学. 中药化学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:274-277.
- [13] 肖洪明. 掌叶覆盆子果实化学成分的研究[D]. 合肥:安徽大学,2011.
- [14] 李自红,魏悦,范毅,等. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 分析实验室,2015,34(2):186-189.
- [15] 高颖,戚楚露,张磊,等. 黄精新鲜药材的化学成分[J]. 药学与临床研究,2015,23(4):365-367.

(收稿日期:2019-08-01 编辑:王笑辉)

(上接第 608 页)

- [5] 陈思颖,吴耽,巩仔鹏,等. QuEChERS-高效液相色谱法测定铁皮石斛中多菌灵和甲基硫菌灵的残留量[J]. 贵州医科大学学报,2018,43(8):913-917.
- [6] 方翠芬,谭春梅,马临科,等. HPLC/MS/MS 测定铁皮石斛制剂中 12 种农药残留量[J]. 医药导报,2012,31(11):1481-1484.
- [7] 周敏,朱萌萌,何晓明,等. 分散固相萃取-气相色谱-串联质谱法测定铁皮石斛中 41 种农药的残留量[J]. 理化检验(化学分册),2019,55(2):162-170.
- [8] 刘超,梅丽宝,张绍龙,等. 全自动凝胶净化-浓缩-固相萃取/气相色谱-质谱法测定紫皮石斛中有机磷农药残留[J]. 中国无机分析化学,2015,5(4):8-12.
- [9] 钟冬莲. 铁皮石斛中农药多残留检测技术及应用研究[D]. 杭州:浙江工业大学,2017.
- [10] 钟冬莲,汤富彬,莫润宏,等. 分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定铁皮石斛中 8 种有机磷农药残留[J]. 分析实验室,2017,36(5):571-575.
- [11] 陈韵贤,吴春梅,梁志刚. 30 种有机磷农药残留在 5 种蔬菜中的基质效应比较[J]. 现代农业科技,2015(13):146-148,150.

(收稿日期:2019-06-10 编辑:戴玮)