

浙江中醫藥大學

硕士学位论文

论文题目：薄荷饮片指纹图谱及基于结构相似性分类的中药复杂成分鉴定研究

作者姓名：单琪媛

指导教师：丛晓东

学科专业：中药学

所在学院：药学院

提交日期2013年6月

浙江中医药大学研究生学位论文原创性声明

本人郑重声明：本人所提交的学位论文《薄荷饮片指纹图谱及基于结构相似性分类的中药复杂成分鉴定研究》是本人在导师的指导下，进行的研究工作及取得的研究成果。除文中已经加以标注引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明和致谢。

本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：

签字日期： 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解浙江中医药大学有关保留、使用学位论文的规定，同意浙江中医药大学保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权浙江中医药大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于

1、保密☐，在____年解密后适用本授权书。

2、不保密☐.

(请在以上相应方框内打“√”)

学位论文作者签名：

指导教师签名：

签字日期： 年 月 日

签字日期： 年 月 日

目录

摘要	I
ABSTRACT	III
前言	1
第一部分 薄荷挥发油气相指纹图谱研究	2
一、实验研究	2
（一）实验材料与方法	2
1. 实验药品	2
2. 实验仪器	2
3. 实验方法	3
4. 指纹图谱方法学考察	4
二、结果	10
（一）指纹图谱的建立与技术参数	10
（二）薄荷挥发油的GC指纹图谱相似度评价	15
（三）各批次薄荷挥发油收率	18
三、分析和讨论	19
四、小结	22
第二部分 薄荷饮片高效液相指纹图谱研究	23
一、薄荷饮片的指纹图谱测定	23
（一）实验材料与方法	23
1. 实验药品	23
2. 实验仪器	24
3. 实验方法	24
4 指纹图谱方法学考察	25
二、结果	32
（一）指纹图谱的建立与技术参数	32
三、分析与讨论	39
四、小结	40

第三部分 基于结构相似性分类的质谱辅助解析软件设计	41
一、软件原理、框架与功能设计	41
(一) 结构相似性分类鉴定步骤	41
(二) 软件框架与功能设计	43
(三) 软件稳定性验证	43
二、结果	43
(一) 软件模块功能示例	43
(二) 综合示例分析	50
(三) 验证试验及稳定性考察	51
三、分析和讨论	52
四、小结	52
第四部分 基于结构相似性分类的薄荷超高效液相-飞行时间质谱鉴定	53
一、基于化合物结构相似性分类的薄荷UPLC-QTOF/MS鉴定实验	53
(一) 实验材料与方法	53
1. 实验药品	53
2. 实验器材	53
3. 实验方法	53
二、结果	55
(一) 基于化合物结构相似性分类的中药复杂成分鉴定	55
(二) 半定量解析	61
(三) 结构解析及相关结构的比较	63
三、分析与讨论	67
四、小结	68
结论	69
附图	70
参考文献	73
致谢	76
文献综述	77

摘要

目的 建立薄荷气相、高效液相指纹图谱；编写质谱辅助解析软件；建立超高效液相-飞行时间质谱（Ultra performance liquid chromatography – quadrupole time of flight mass spectrometry, UPLC-QTOF/MS）方法，结合质谱辅助解析软件，全面鉴别薄荷成分。

方法 ① 收集不同产地的10批薄荷饮片，按照药典方法提取挥发油，对不同产地的10批薄荷挥发油样品，采用气相色谱法建立指纹图谱，优化色谱条件，利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算相似度，建立共有模式。

② 取不同产地的12批薄荷饮片，按照优化方法提取薄荷非挥发性成分，对不同产地的12批薄荷样品，采用高效液相色谱法建立指纹图谱，优化色谱条件，利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统计算相似度，建立共有模式。

③ 采用化合物结构相似性原理编写软件，通过共有离子搜索、化合物两两比对、化合物结构相似性聚类三个功能模块，全方位多角度诠释质谱碎片信息，通过物质群分类、核心化合物的选择诠释中药样本中化合物之间固有的结构关联，辅助解析质谱数据。通过采用文献质谱鉴定数据验证软件的可行性和稳定性。

④ 采用UPLC-QTOF/MS方法分析测定薄荷饮片，结合自主编写的结构相似性分类软件定性鉴别薄荷中非挥发性组分，利用二级或高能量碎片验证结构，并采用半定量方法直观比较饮片的各非挥发性成分含量差别。

结果 ① 建立了薄荷挥发油气相色谱指纹图谱，并通过指纹图谱相似度计算软件建立了指纹图谱的共有模式，薄荷挥发油有15个共有峰。对不同产地的10批薄荷挥发油进行相似度比较，其相似度分别达到了90%以上。

② 建立了薄荷非挥发性组分的高效液相色谱指纹图谱，并通过指纹图谱相似度计算软件建立了指纹图谱的共有模式，薄荷非挥发性成分有19个共有峰。对不同产地的12批薄荷非挥发性组分进行相似度比较，其中11批相似度达到90%以上。

③ 基于结构相似性原理，共有离子搜索、化合物两两比对、化合物结构相似性聚类功能模块共同分析解析质谱碎片信息，实现了复杂样本的物质群分类。验证试验证明了方法的可行性和稳定性。

④ 本文通过UPLC-QTOF/MS从薄荷提取液中鉴定出33个化合物，其中，30个化合物能成功依据结构相似程度分为7组，选择每组的核心化合物，利用组内成分的结构相似性关系能够简化质谱解析过程，并通过对照品、质谱二级或高能量碎片和文献数据对

鉴定出的化合物进行最终结构验证。半定量分析部分采用了泡泡图形式，二维信息的模式能够直观的快速反应化合物分组信息和含量信息。薄荷提取液中，黄酮类成分，香叶木苷，蒙花苷，百里香新的含量相对较高，酚酸类成分中迷迭香酸含量较高。并讨论了黄酮类以及酚酸类的可能质谱裂解过程。

结论 ① 薄荷挥发油气相指纹图谱的建立为整体控制薄荷传统有效成分的质量提供了有效依据。

② 薄荷饮片高效液相指纹图谱的建立为整体控制薄荷非挥发性有效成分的质量提供了依据。

③ 化合物结构相似性分类软件成功实现中药复杂样本的化合物物质群分类，从而为简化质谱解析流程，提高中药复杂成分的质谱解析效率提供了新思路。

④ UPLC-QTOF-MS联用技术可以快速分析并鉴定中药复杂样本中的化合物。通过结合使用基于结构相似性分类原理自主编写的软件，能够简化质谱分析流程，提高质谱解析效率，并能对样本中的化合物间固有的结构关系和质谱裂解规律、化合物含量等有全方位的了解。

主题词 指纹图谱；结构相似性分类；超高效液相-飞行时间质谱；薄荷

ABSTRACT

Studies on Fingerprints and Novel Software-based Method to Classify Structurally Similar Compounds Combined with Mass Spectrometry to Identify Complex Components of *Mentha Haplocalyx*

Objective To establish the fingerprints of *Mentha haplocalyx* by gas chromatography (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC); To develop a software combined mass spectrometry for complex components identification; To develop a software-based method combined with ultra performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF- MS) for identification of *Mentha haplocalyx*.

Methods ①10 batches of *Mentha haplocalyx* were extracted according to the volatile oil extracting method in Ch.P., the GC fingerprint and common pattern of 10 batches of *Mentha haplocalyx* were established by using chromatographic fingerprint evaluation system.

②12 batches of *Mentha haplocalyx* were extracted according to the optimized extracting method, the HPLC fingerprint and common pattern of 12 batches of *Mentha haplocalyx* were established by using chromatographic fingerprint evaluation system.

③A classification program was developed, in VBA and MATLAB environments. The classification program consisted of the following parts: Classification based on similarity; Compound-pair common ion collection; Common fragment ion searching.

④A novel software-based approach was developed to classify structurally similar compounds, and this was combined with UPLC-QTOF-MS to identify the individual components in an extract of *Mentha haplocalyx*.

Results ①The GC fingerprint method of *Mentha haplocalyx* was developed and common pattern was established by using the software for calculating the similarity of fingerprint. 15 common peaks were detected in peppermint oil. Comparing of the similarities between 10 batches samples were made and all had similarities above 90%.

②The HPLC fingerprint method of *Mentha haplocalyx* was developed and common pattern was established by using the software for calculating the similarity of fingerprint. 19 common peaks were detected in methanol extracted samples. Comparing of the similarities between 12 batches samples were made and 11 batches of them had similarities above 90%.

③Three software modules were built and help to elucidate the inner structural relation between each components. Software validation and robustness tests were performed.

④A total of 33 compounds were tentatively identified in samples of *Mentha haplocalyx* methanol extract, including 9 new minor constituents reported for the first time. Semi-quantitative analysis of the extract sample was also carried out.

Conclusion: ①The GC fingerprint method could be applied for the intrinsic quality control of volatile components in *Mentha haplocalyx*.

②The HPLC fingerprint method could be applied for the intrinsic quality control of non-volatile components in *Mentha haplocalyx*.

③This structural-similar classification software can help to identify complex components in herbal medicines.

④The results of this study demonstrate the enormous potential of this strategy, using classification based on structural similarity together with UPLC-QTOF-MS, for the identification and quantification of complex components in herbal medicines and related products.

Keywords Fingerprints; Structural similarity classification; ultra performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry; *Mentha haplocalyx*

前言

薄荷为唇形科植物薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)干燥地上部分,可疏散风热,清利头目,利咽,透疹,疏肝行气。用于风热感冒,风温初起,头痛,目赤等症状,为常用的辛凉解表药^[1]。传统有效成分为薄荷脑(薄荷醇),有血管舒张、减轻鼻粘膜充血、镇咳、解痉、治疗头痛、利胆、抗菌等作用^[2-4]。薄荷主要成分有挥发油、氨基酸、黄酮和酚酸;现代研究表明,薄荷具有解热发汗、镇静镇痛、抗菌抗病毒、抗炎等功效,且酚类成分(黄酮和酚酸)为其抗病毒抗菌抗炎的主要的有效成分^[5-12]。

中药的化学成分是发挥药效作用的物质基础,迄今为止人们已对中药进行了大量的化学研究,并从单味中药中分离得到大量化合物,其中不少已应用于临床。由于每一味中药所含化学成分复杂,临床应用可能存在多靶点多功效的情况,采用现代科学技术和高端仪器^[13-17],探索中药的传统药用组分之外的潜在活性成分则有可能将人们带入全新的研究领域,开发新的药用成分。因此,以全局研究策略探索潜在活性成分和传统药用组分具有同样重要的意义^[18-22]。在实验室已经摸索建立的薄荷新型饮片工艺和质量标准的基础上,本课题采集各地多批次薄荷饮片为研究对象,对薄荷整体成分采用气相、高效液相指纹图谱的方法全面表征薄荷挥发油以及非挥发性成分特征,为薄荷饮片的质量控制提供有效实践支持;并采用体外物质群策略全局检测薄荷非挥发性成分,编制基于化合物结构相似性分类原理的软件,对检索得成分进行分类,简化质谱解析流程,提高解析效率,全面表征中药复杂成分的定性定量信息,阐述化合物之间的内在关系,从而为鉴定中药中复杂化合物结构、直观比较各类别成分含量,以及推断总结中药多种化合物组群的质谱裂解规律提供新思路。

第一部分 薄荷挥发油气相指纹图谱研究

一、实验研究

(一) 实验材料与方法

1. 实验药品

1.1 对照品和试剂

薄荷脑对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 110728-200506, 供含量测定用); 丙酮 (Tedia Company, 批号: 1010907); 其他试剂均为分析纯。

1.2 药材饮片

10批薄荷饮片分别购自浙江、山东及安徽, 经浙江中医药大学来平凡教授鉴定为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分。10批薄荷饮片产地及批号见表1-1。

2. 实验仪器

Agilent 7890A型气相色谱仪(美国Agilent公司); 7683series自动进样器; GC Chem Station 色谱工作站(美国Agilent公司); Agilent 19091J-413(30m* 320um*0.25um)毛细管柱。AG285电子天平(0.01 mg, METTLER, Switzerland); 挥发油收集器及1000ml圆底烧瓶(浙江富阳科导科学仪器有限公司); KQ-500E型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DFT-200手提式高速中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司); 高速台式离心机TGL-16B(上海安亭科学仪器厂)。

表1-1 10批薄荷饮片来源及批号

Table 1-1. The metropolis and batch number of 10 batches of *Mentha haplocalyx*

编号	来源	批号
1	浙江中医药大学中药饮片公司	120317
2	大别山	100904
3	方回春堂	110816
4	杭州市双灵村农户A	110811
5	杭州市双灵村农户B	110812
6	杭州市双灵村农户C	110813
7	胡庆余堂	120129
8	烟台	100713
9	杭州	100916
10	杭州	100728

3. 实验方法

3.1 样品挥发油提取和测定

按照中国药典一部附录XD挥发油测定法甲法测定，即取薄荷饮片约100g，称定重量，加10倍量水与沸石数粒，振摇混合后，连接挥发油测定器与回流冷凝管。自冷凝管上端加水使充满挥发油测定器的刻度部分，并溢流入烧瓶时为止。置电热套中缓缓加热至沸，并保持微沸约5小时，至测定器中油量不再增加，停止加热，放置片刻，开启测定器下端的活塞，将水缓缓放出，至油层上端到达刻度0线上面5 mm处为止。放置1小时以上，再开启活塞使油层下降至其上端恰与刻度0线平齐，读取挥发油量，并计算供试品中挥发油的含量（%）。收集挥发油，加入无水硫酸钠保存。

3.2 样品溶液的制备

量取薄荷挥发油约1 ml，精密量取，加入丙酮5 ml使充分溶解。

3.3 对照品溶液的配制

取薄荷脑对照品适量，精密称定，加丙酮制成0.35 mg/ml薄荷脑对照品溶液。

3.4 色谱条件

进样口温度: 280 ℃; 压力: 7.6335psi, 总流量: 27.3ml/min, 隔垫吹扫流量: 3ml/min; 检测器温度: 280℃; 分流比: 20:1; H2流量: 30ml/min; 空气流量: 400ml/min; 尾吹流量(N2): 25ml/min, 载气: N2; 体积流量: 20 ml/min; 后运行: 2min. 毛细管柱升温程序见表 1-2:

表1-2 升温程序

	速率(℃/min)	数值(℃)	保持时间(min)	运行时间(min)
初始值		80	0	0
阶升1	5	100	6	10
阶升2	8	120	11	23.5
阶升3	5	140	5	32.5
阶升4	5	200	12	56.5

3.5 测定方法

取薄荷挥发油供试品溶液或对照品溶液1μl，分别注入气相色谱仪，记录57 min内的色谱峰，保留时间和峰面积。

4. 指纹图谱方法学考察

4.1 空白溶剂考察

取丙酮溶液，在已经确定的色谱条件下进样，结果见图1-1，表明试剂无干扰。



图1-1 空白溶剂的GC色谱图

Figure 1-1. The GC graph of blank solvents

4.2 精密度试验

取1份薄荷挥发油约1 ml，精密量取，按供试液制备方法制备供试液，连续进样6次分析，分别记录薄荷挥发油气相色谱图的峰数、峰面积、保留时间，选取峰面积之和占总面积90%以上的色谱峰，计算其相对保留时间和相对峰面积，实验及计算结果见图1-2和表1-3。各主要峰的相对保留时间的相对标准偏差RSD均小于1.0%；相对峰面积均小于3.0%，表明仪器的精密度良好。

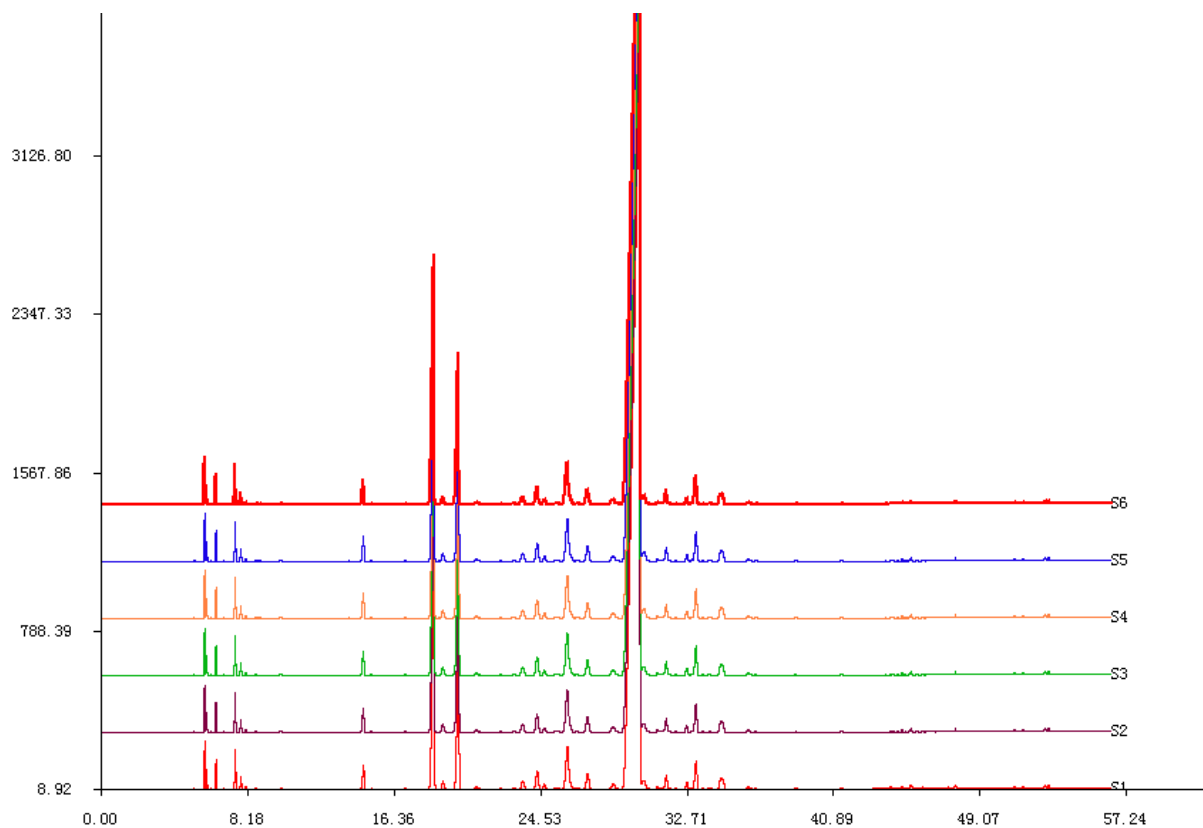


图1-2 样品精密度试验色谱图

Figure 1-2. Chromatogram of precision test

表1-3 精密度相似度评价结果

Table 1-3. The result of similarity of precision test

峰 号	相对保留时间		相对峰面积	
	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
1	0.23	0.03	0.28	0.74
2	0.30	0.04	0.28	0.79
3	0.59	0.03	0.30	1.28
4	0.75	0.02	3.88	1.25
5	0.81	0.02	2.21	1.27
6	0.95	0.02	0.17	1.29
7	0.98	0.02	0.33	1.20
8	1.00	0.02	1.00	1.28
9	1.05	0.02	0.09	1.29
10	1.15	0.02	0.15	1.66
11	1.21	0.02	36.66	1.34
12	1.22	0.03	0.23	0.52
13	1.27	0.01	0.22	2.7
14	1.34	0.01	0.48	1.54
15	1.40	0.01	0.31	1.13

4.2重复性试验

取6份薄荷饮片100g, 按照《中国药典》收载的“挥发油测定法”(2010年版一部附录XD) 甲法收集挥发油制备薄荷挥发油, 各取挥发油约1ml, 精密量取, 按3.1项下供试液制备方法制备供试样品, 注入气相色谱仪分析, 分别记录薄荷挥发油气相色谱图的峰数、峰面积、保留时间, 选取峰面积之和占总面积90%以上的色谱峰, 计算其相对保留时间和相对峰面积, 实验及计算结果见图1-3和表1-4。各主要峰的相对保留时间的相对标准偏差RSD均小于1.0%, 相对峰面积偏差RSD均小于3.0%, 表明方法的重复性良好。

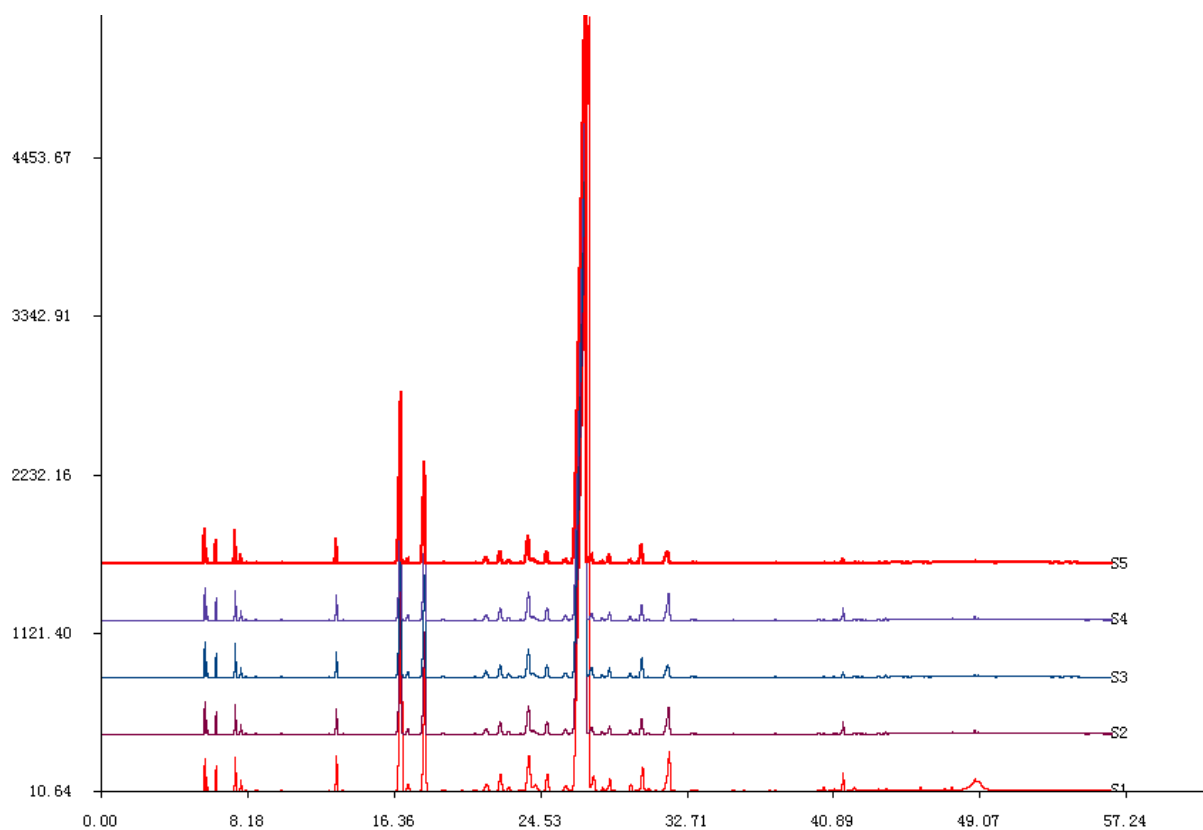


图1-3 样品重复性试验色谱图

Figure 1-3. Chromatogram of repetition test

表1-4 重复性相似度评价结果

Table 1-4. The result of similarity of repetition test

峰 号	相对保留时间		相对峰面积	
	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
1	0.24	0.00	0.34	0.06
2	0.27	0.01	0.25	0.03
3	0.31	0.01	0.39	0.06
4	0.55	0.02	0.37	0.01
5	0.70	0.11	4.46	0.41
6	0.76	0.10	2.69	0.08
7	0.90	0.08	0.23	0.01
8	0.93	0.04	0.41	0.01
9	1.00	0.06	1.00	0.00
10	1.04	0.03	0.37	0.01
11	1.14	0.25	44.41	0.44
12	1.15	0.18	0.35	0.06
13	1.19	0.05	0.25	0.02
14	1.27	0.07	0.50	0.06
15	1.33	0.11	0.82	0.24

4.3稳定性试验

取薄荷挥发油，分别在0、2、4、6、8、12 h进样进行检测，分别记录薄荷挥发油气相色谱图的峰数、峰面积、保留时间，选取峰面积之和占总面积90%以上的色谱峰，计算其相对保留时间和相对峰面积，实验及计算结果见图1-4和表1-5。实验结果表明，各主要峰的相对保留时间相对标准偏差RSD均小于1.0%，相对峰面积小于3.0%，表明样品溶液在12 h内稳定。

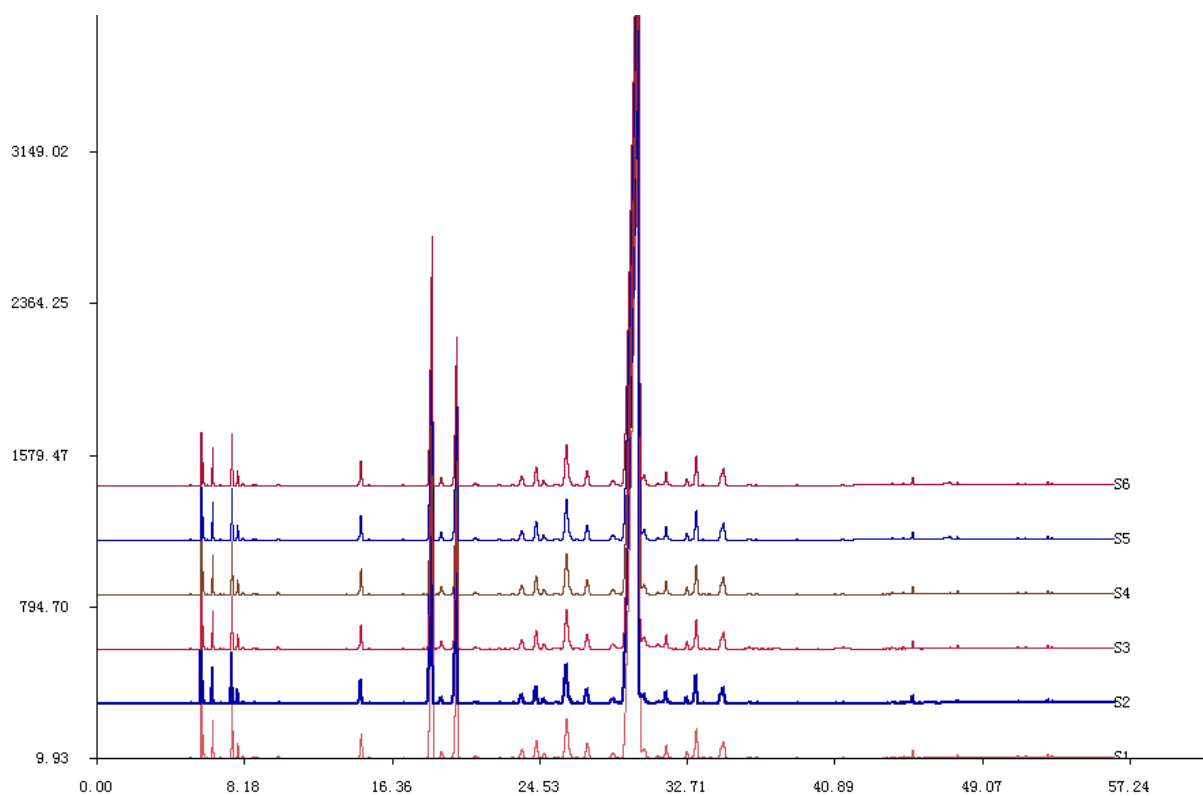


图1-4 样品稳定性实验结果

Figure 1-4. Chromatogram of stability test

表1-5 稳定性相似度评价结果

Table 1-5. The result of similarity stability test

峰 号	相对保留时间		相对峰面积	
	Mean	RSD (%)	Mean	RSD(%)
1	0.22	0.04	0.34	2.18
2	0.25	0.04	0.24	1.81
3	0.29	0.04	0.39	1.95
4	0.56	0.04	0.32	2.34
5	0.71	0.02	4.12	2.27
6	0.77	0.03	2.30	2.33
7	0.90	0.02	0.20	2.4
8	0.94	0.03	0.35	2.35
9	1.00	0.02	1.00	2.31
10	1.04	0.02	0.32	2.34
11	1.15	0.04	36.97	2.41
12	1.16	0.03	0.27	1.87
13	1.21	0.01	0.20	2.82
14	1.28	0.01	0.51	2.15
15	1.33	0.01	0.45	2.67

二、结果

（一）指纹图谱的建立与技术参数

1. 参照色谱峰的建立

根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》规定，制定指纹图谱必须设立参照物。主要用于指纹图谱技术参数（如共有峰的相对保留时间，相对峰面积等）的确定，有助于考察指纹图谱的稳定性和重现性，有助于色谱的辨认。实验中薄荷脑作为已知有效成分，其在指纹图谱中的保留时间适中，且峰面积较大。故选取薄荷脑(11号

峰) 作为参照物S。按上述色谱条件, 取薄荷脑参照物溶液和薄荷挥发油供试品溶液进样。

2 薄荷挥发油气相指纹图谱的建立

取10批薄荷饮片, 分别按照供试品溶液的制备方法处理, 按上述色谱条件进行测定, 记录各色谱图。采用由国家药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A 版》对10批薄荷挥发油气相图谱进行分析, 发现其中有15个峰为10批样品所共有的, 因此确定为共有指纹峰。采用相似度评价系统, 以中位数法生成指纹图谱共有模式, 结果如图1-5, 其中11号峰为薄荷脑。薄荷挥发油指纹图谱共有峰相对保留时间及峰面积的RSD见表1-6, 1-7。

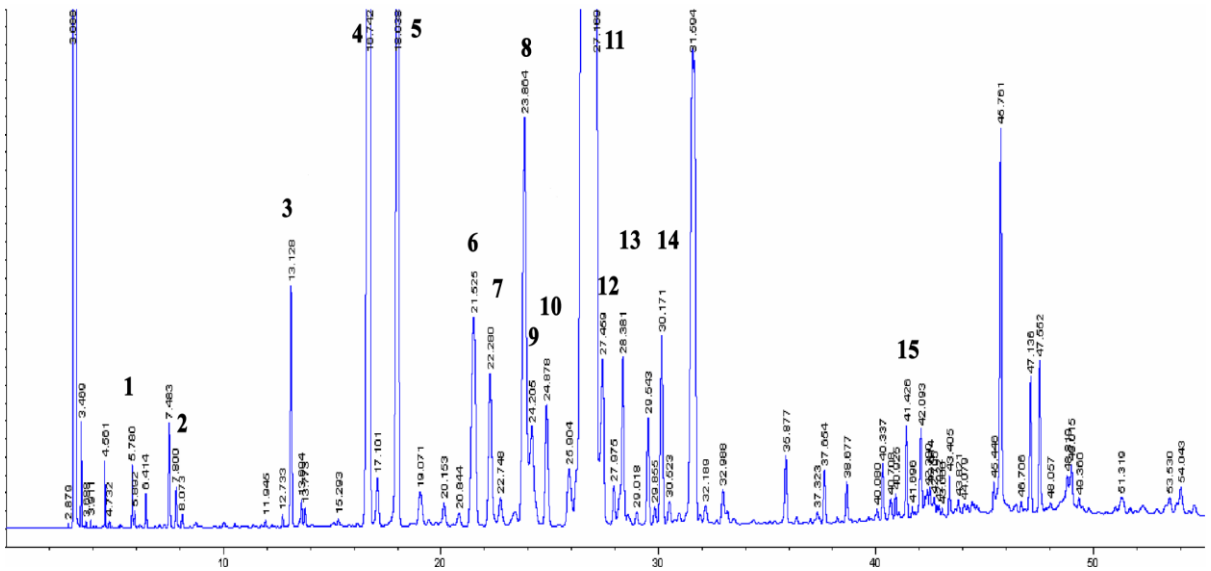


图1-5 薄荷气相指纹图谱的共有模式

Figure 1-5. The common pattern of gas chromatography fingerprint of *Mentha haplocalyx*

Table 1-6. 10批薄荷挥发油指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 1-6. The relative retention time of common peaks in fingerprint of 10 batches of *Mentha haplocalyx*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指 纹图谱	保留时间 RSD(%)	匹配 数目
1	0.242	0.242	0.242	0.243	0.242	0.242	0.242	0.242	0.242	0.242	0.242	0.00	10
2	0.314	0.314	0.314	0.314	0.314	0.314	0.313	0.314	0.314	0.314	0.314	0.00	10
3	0.550	0.551	0.550	0.551	0.550	0.551	0.550	0.550	0.550	0.550	0.550	0.00	10
4	0.701	0.706	0.704	0.702	0.703	0.702	0.702	0.702	0.701	0.702	0.703	0.03	10
5	0.754	0.757	0.756	0.758	0.758	0.757	0.756	0.756	0.757	0.757	0.757	0.02	10
6	0.903	0.901	0.902	0.901	0.902	0.901	0.903	0.902	0.902	0.901	0.901	0.02	10
7	0.933	0.934	0.933	0.934	0.934	0.934	0.933	0.934	0.934	0.934	0.934	0.01	10
8	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.01	10
9	1.014	1.012	1.012	1.012	1.015	1.012	1.016	1.014	1.014	1.013	1.013	0.04	10
10	1.043	1.043	1.042	1.043	1.043	1.043	1.042	1.043	1.043	1.043	1.043	0.01	10
11	1.136	1.133	1.136	1.135	1.140	1.135	1.141	1.139	1.138	1.137	1.136	0.06	10
12	1.149	1.147	1.149	1.148	1.152	1.149	1.153	1.151	1.151	1.150	1.149	0.05	10
13	1.189	1.189	1.189	1.189	1.189	1.190	1.190	1.189	1.190	1.189	1.189	0.02	10
14	1.266	1.266	1.264	1.265	1.265	1.265	1.265	1.264	1.264	1.264	1.265	0.02	10
15	1.737	1.738	1.736	1.739	1.737	1.739	1.736	1.736	1.737	1.736	1.737	0.00	10

表1-7 10批薄荷挥发油指纹图谱共有峰指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 1-7. The relative peak area of common peaks in fingerprint of 10 batches of *Mentha haplocalyx*

No	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹 图谱	相对峰 面积 RSD(%)	匹配 数目
1	0.2431	0.2078	0.2687	0.0828	0.1901	0.3978	0.2917	0.3467	0.0406	0.2008	0.2219	0.11	10
2	0.5431	0.2361	0.6126	0.6957	0.3717	0.4497	0.3675	0.3827	0.0826	0.1810	0.3708	0.19	10
3	0.2838	0.3238	0.3433	0.2452	0.2153	0.3828	0.3672	0.3717	0.2217	0.2646	0.2980	0.06	10
4	5.7799	4.1150	3.5520	10.0133	5.4067	4.9371	4.6609	4.1596	3.5600	3.4058	4.8260	1.95	10
5	2.1787	2.1497	0.8237	2.3570	1.7402	2.7770	2.6053	2.6728	1.5697	1.9012	2.0592	0.60	10
6	0.5473	0.3399	1.1156	0.3282	0.7034	0.2414	0.2223	0.2341	0.5717	0.3474	0.4668	0.28	10
7	0.3802	0.3577	0.2740	0.2497	0.2720	0.4218	0.3924	0.4015	0.3255	0.3319	0.3404	0.06	10
8	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.00	10
9	0.4831	0.1603	0.5499	0.6077	0.2640	0.2081	0.3386	0.1522	0.2964	0.1607	0.3102	0.17	10
10	0.1855	0.2849	0.2678	0.2257	0.2105	0.3878	0.3615	0.3713	0.2262	0.2614	0.2760	0.07	10
11	42.2060	44.9971	40.3804	45.6352	36.8159	44.6039	43.5070	44.7586	45.7149	47.9034	43.5775	3.16	10
12	1.5924	0.4436	0.4132	0.6971	0.7095	0.3927	0.6212	0.2765	0.3537	0.4101	0.5862	0.38	10

13	0.4649	0.3612	0.3087	0.0435	0.1658	0.2646	0.2481	0.2368	0.2846	0.3705	0.2783	0.12	10
14	0.4410	0.2186	0.7162	1.0780	0.3651	0.5747	0.5383	0.4545	0.3228	0.2201	0.4655	0.26	10
15	1.9696	0.0723	0.6457	0.0265	0.1561	0.1038	0.2227	0.1900	0.1012	0.0628	0.3378	0.59	10

（二）薄荷挥发油的GC指纹图谱相似度评价

各批次薄荷挥发油气相指纹图谱相似度评价采用由国家药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版》相似度软件来计算，10批薄荷挥发油的气相色谱图叠加图见图1-6。各批次薄荷挥发油气相指纹图谱相似度计算结果见表1-8，表1-9。结果表明，10批薄荷挥发油与对照指纹图谱的相似度值均大于0.9，符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》中有关规定，表明各批薄荷挥发油均与对照指纹图谱有良好的相似性。

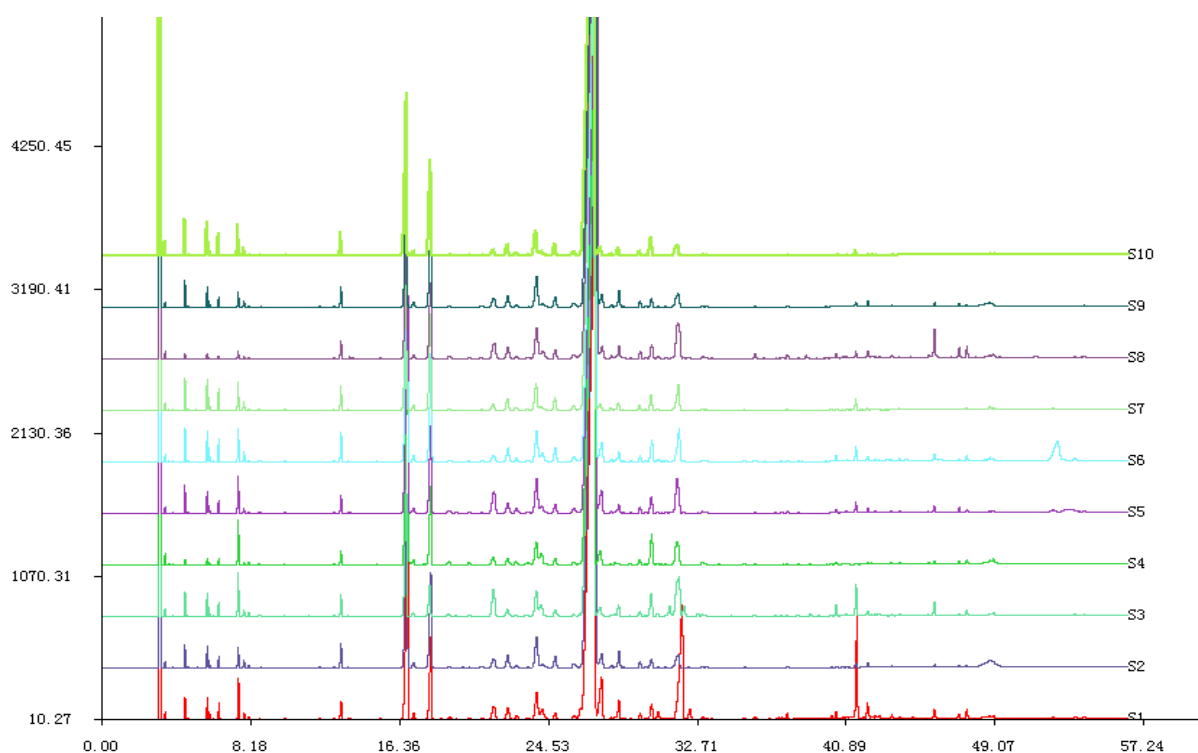


图1-6 10批薄荷挥发油气相指纹图谱

Figure 1-6. The GC fingerprint of 10 batches of drugs

表1-8. 10批薄荷挥发油指纹图谱相似度评价结果

峰 号	相对保留时间		相对峰面积	
	Mean	RSD (%)	Mean	RSD(%)
1	0.24	0.00	0.22	0.11
2	0.31	0.00	0.37	0.19
3	0.55	0.00	0.30	0.06
4	0.70	0.03	4.83	1.95
5	0.76	0.02	2.06	0.60
6	0.90	0.02	0.47	0.28
7	0.93	0.01	0.34	0.06
8	1.00	0.01	1.00	0.00
9	1.01	0.04	0.31	0.17
10	1.04	0.01	0.28	0.07
11	1.14	0.06	43.58	3.16
12	1.15	0.05	0.59	0.38
13	1.19	0.02	0.28	0.12
14	1.26	0.02	0.47	0.26
15	1.74	0.00	0.34	0.59

表1-9. 10批次薄荷挥发油的相似度计算结果

Table 1-9. The results of similarity of 10 batches of *Mentha haplocalyx*

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指 纹图谱
S1	1.000	0.991	0.997	0.997	0.998	0.999	0.998	0.998	0.998	0.990	0.998
S2	0.991	1.000	0.997	0.994	0.993	0.990	0.992	0.989	0.992	0.988	0.993
S3	0.997	0.997	1.000	0.999	0.999	0.997	0.998	0.997	0.998	0.991	0.999
S4	0.997	0.994	0.999	1.000	0.999	0.999	1.000	0.999	0.999	0.991	1.000
S5	0.998	0.993	0.999	0.999	1.000	0.999	0.999	0.999	0.999	0.991	0.999
S6	0.999	0.990	0.997	0.999	0.999	1.000	0.999	1.000	0.999	0.989	0.999
S7	0.998	0.992	0.998	1.000	0.999	0.999	1.000	0.999	1.000	0.990	1.000
S8	0.998	0.989	0.997	0.999	0.999	1.000	0.999	1.000	1.000	0.989	0.999
S9	0.998	0.992	0.998	0.999	0.999	0.999	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000
S10	0.990	0.988	0.991	0.991	0.991	0.989	0.990	0.989	0.990	1.000	0.991
对 照 指 纹图谱	0.998	0.993	0.999	1.000	0.999	0.999	1.000	0.999	1.000	0.991	1.000

（三）各批次薄荷挥发油收率

采用药典规定的水蒸气蒸馏法测定多批次薄荷饮片样品中挥发油含量：

表1-10. 10批薄荷饮片挥发油含量

批次	每100 g 挥发油含量 (ml)
S1	0.8
S2	0.7
S3	0.6
S4	1.2
S5	1.5
S6	1.5
S7	0.5
S8	1.2
S9	1.2
S10	1.1

其中，薄荷饮片中叶的比例越高，挥发油收率越高；采集时间距离检测时间越短，测得含量越高。

三、分析和讨论

1. 先后采用多种溶剂溶解薄荷油样品，丙酮、乙酸乙酯、乙醚溶剂对比图谱如下图所示。从出峰峰形、出峰数量、溶剂毒性等多方面考虑，选择丙酮作为最优溶剂。

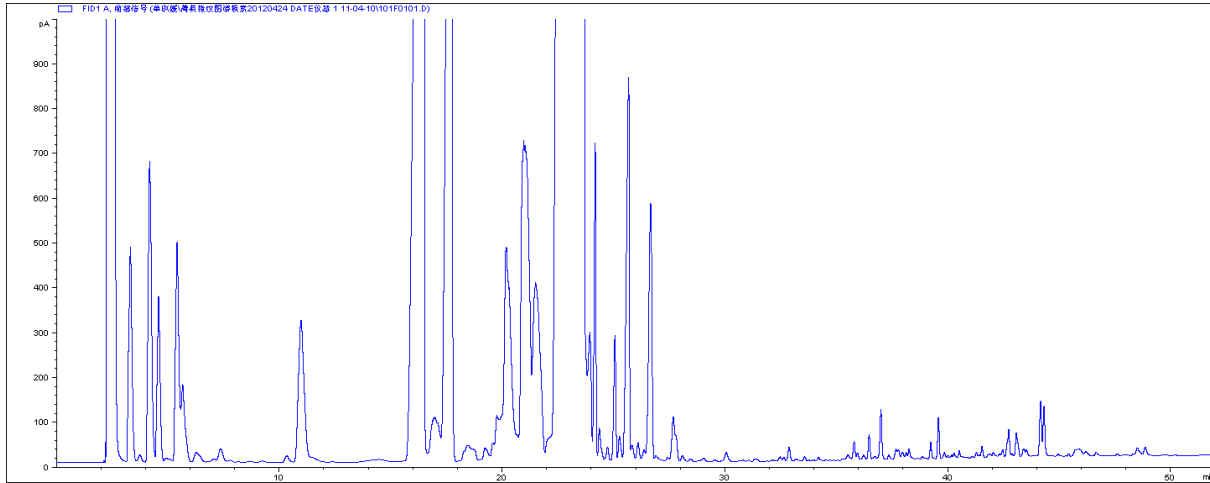


图1-7. 丙酮提取效果

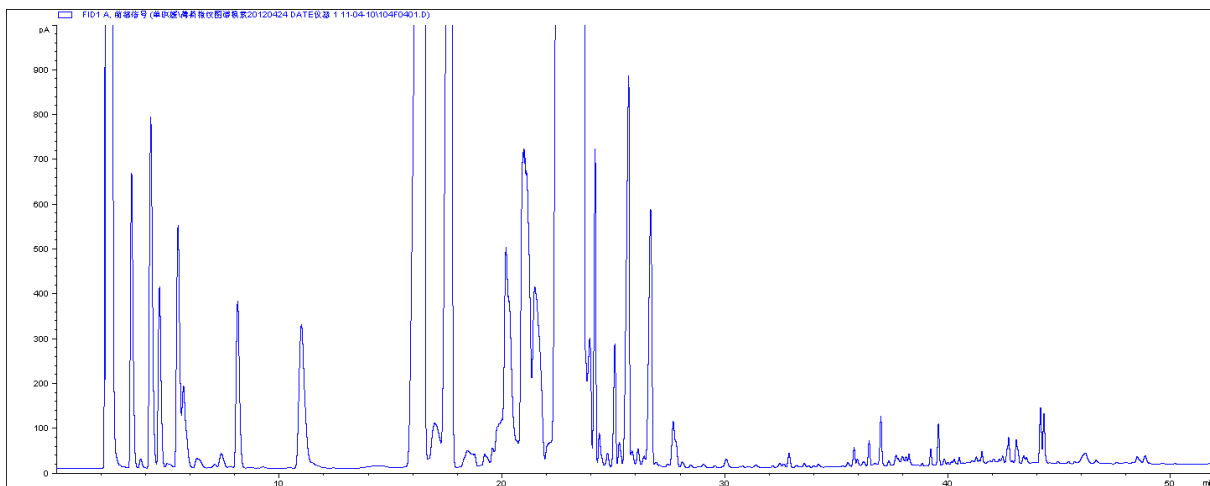


图1-8. 环己烷提取效果

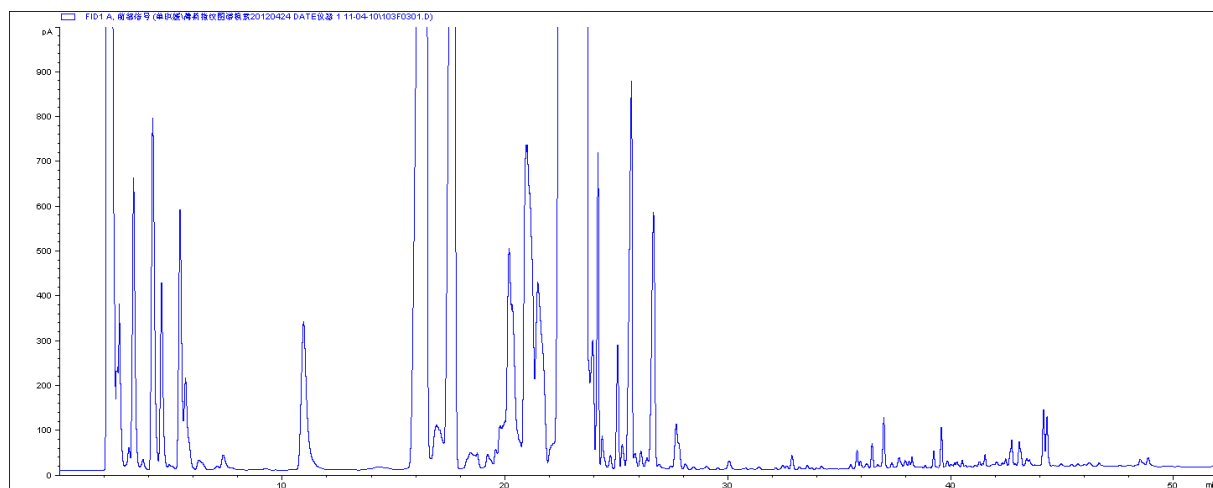


图1-9. 乙醚提取效果

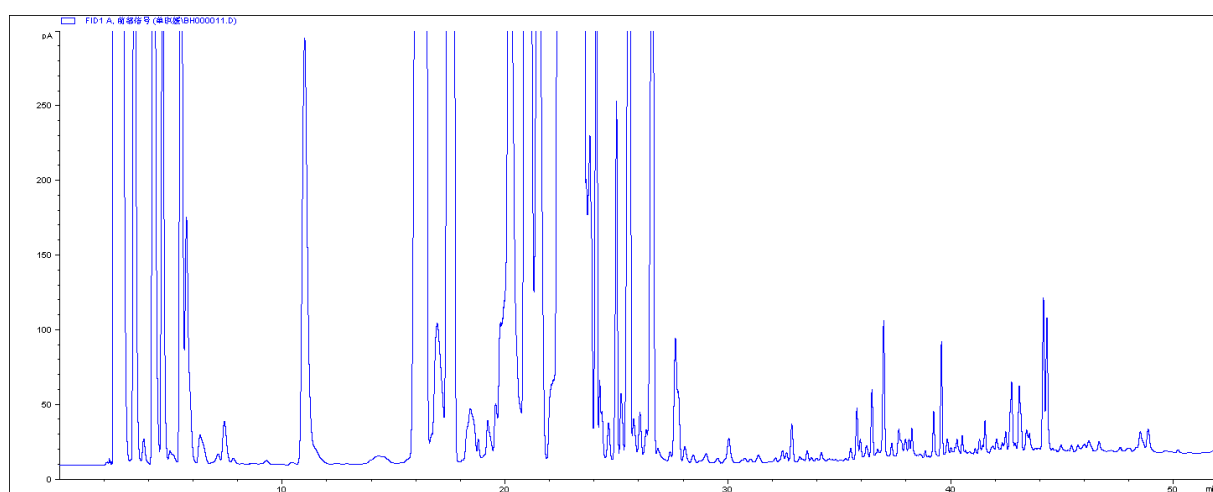


图1-10. 乙酸乙酯提取效果

2. 考察不同分流比对气相色谱图的影响，10:1，20:1；30:1分流比条件下的色谱图如下所示。最终选择20:1为最优条件，保证特征峰数量，同时不至于进样量过大导致色谱柱过载。

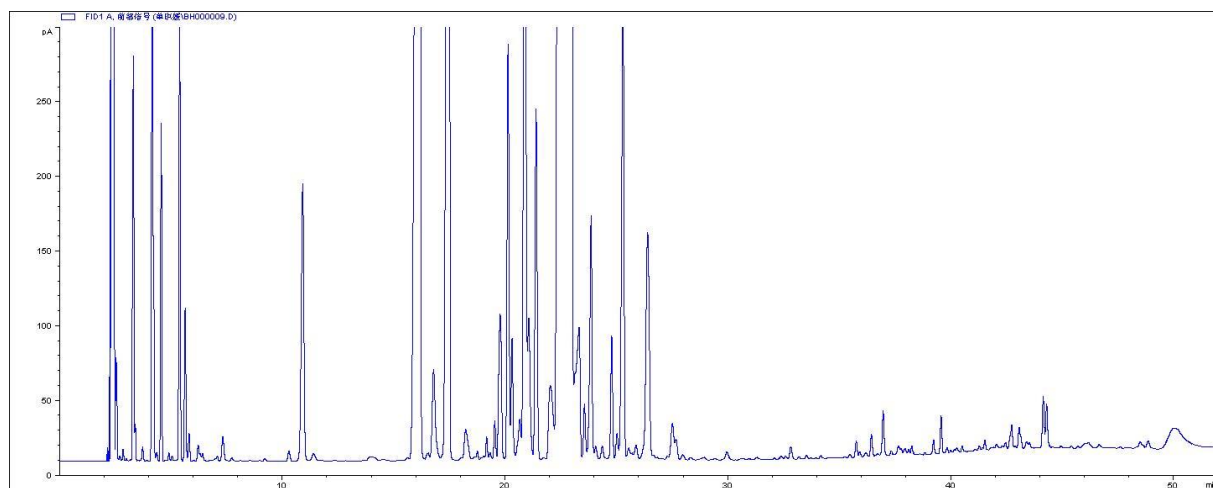


图1-11. 分流比10-1

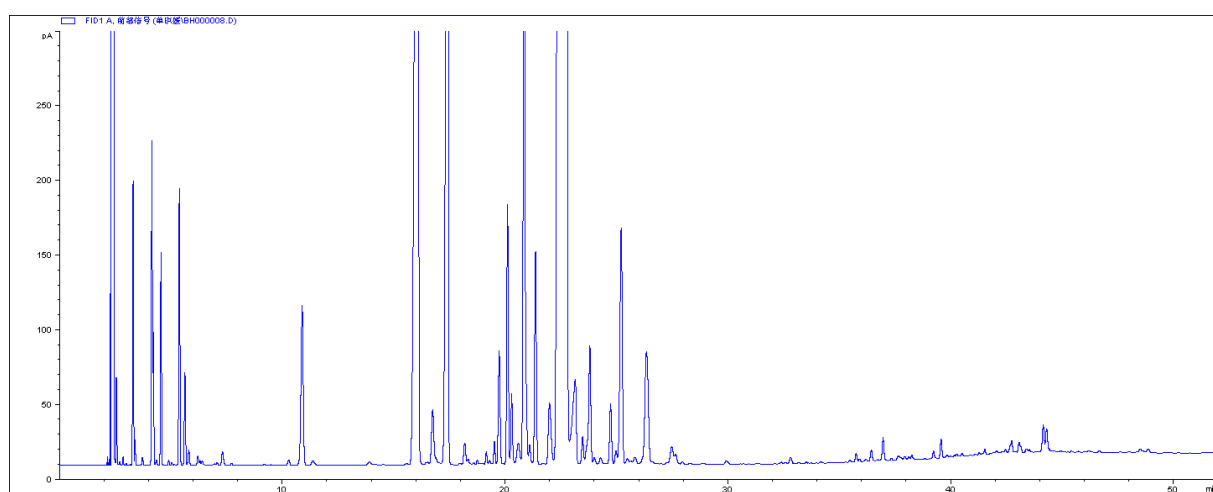


图1-12. 分流比20-1

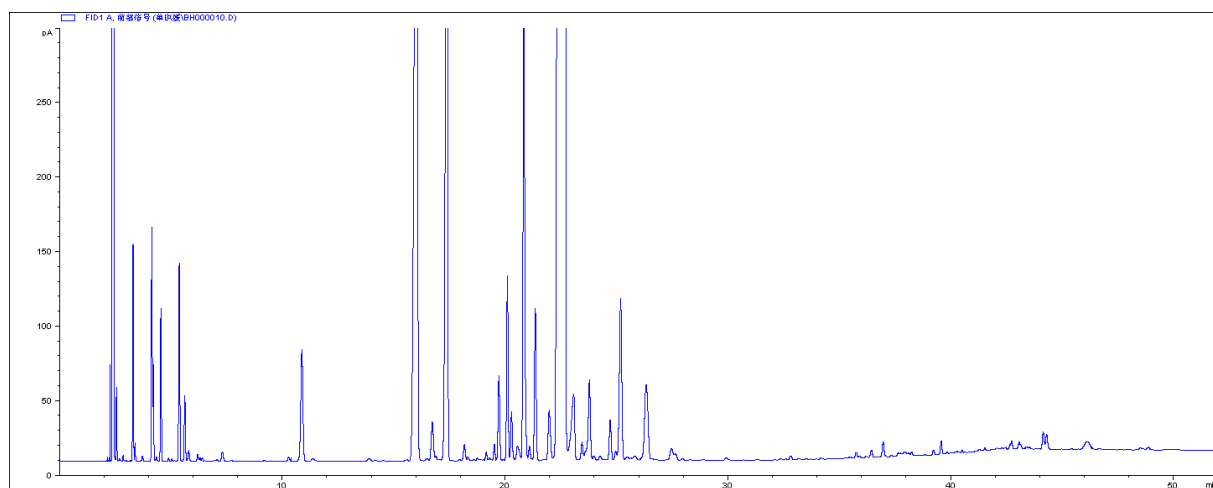


图1-13. 分流比30-1

3. 参照物的选择: 指纹图谱的参照物质一般选取容易获取的一个以上注射剂中的主要活性成分或指标成分, 主要用于考察指纹图谱的稳定程度和重现性, 并有助于色谱的辨认。本实验中采用薄荷挥发油中含量最高、主要药理活性成分的薄荷脑作为参照物。

4. 如需程序升温宜采用线性升温, 尽量避免复杂的多阶程序。

四、小结

本实验中采用水蒸气蒸馏法提取样品中挥发油, 并选择丙酮作为溶剂。通过不同分流比, 升温程序的考察, 确定最优指纹图谱条件。建立不同产地10批次薄荷挥发油气相指纹图谱, 通过指纹图谱相似性软件建立共有模式。对不同产地的10批薄荷挥发油进行比较, 相似度均达到90%以上, 有15个特征共有峰。经过精密度、稳定性、重复性考察, 说明此定性方法稳定可控, 为控制各产地薄荷饮片生产质量、研究薄荷中整体挥发性成分提供有效手段。

第二部分 薄荷饮片高效液相指纹图谱研究

一、薄荷饮片的指纹图谱测定

(一) 实验材料与方法

1. 实验药品

1.1 对照品与试剂

咖啡酸（中国药品生物制品检定所，批号：110885-200102）；橙皮苷（中国药品生物制品检定所，批号：110721-201014）；蒙花苷（中国药品生物制品检定所，批号：111528-200606）；迷迭香酸（上海同田生物技术有限公司，批号：E-0074）；香叶木素（上海同田生物技术有限公司，批号：E-0603）；香叶木苷（华立生物技术有限公司，批号：10090101）

甲醇、乙腈为色谱纯 Merck (Darmstadt, Germany); Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA); 其余均为分析纯。

1.2 样品

薄荷样品来自各地药店、中药饮片厂，或者于各地区采集，经浙江中医药大学来平凡教授鉴定为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分，按药典该饮片制备项下方法阴干、切制，得薄荷饮片。

12批薄荷饮片产地及批号见表2-1。

表2-1 12批薄荷饮片产地及批号

Table 2-1. The metropolis and batch number of 12 batches of *Mentha haplocalyx*

编号	产地	批号
1	方回春堂	110816
2	烟台	100713
3	胡庆余堂	120129
4	杭州双灵村农户A	110811
5	中药饮片有限公司	120317
6	安徽亳州药材市场	120308
7	杭州	100916
8	同仁堂	110517
9	杭州双灵村农户B	110812
10	杭州双灵村农户C	110813
11	安徽亳州药材市场	120314
12	杭州	100728

2. 实验仪器

Agilent 1200型系列高效液相色谱仪（美国Agilent公司），包括G1311A四元梯度泵、G1329A自动进样器、G1316A柱温箱、G1315D 二极管阵列检测检测器；AG285电子天平(0.01 mg, METTLER, Switzerland); 挥发油收集器及1000 ml圆底烧瓶(浙江富阳科导科学仪器有限公司); KQ-500E型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DFT-200手提式高速中药粉碎机(温岭市林大机械有限公司); 高速台式离心机TGL-16B(上海安亭科学仪器厂)。

3. 实验方法

3.1 样品溶液的制备

薄荷饮片粉碎，取饮片粉末约1.0 g，精密称定，加50 ml甲醇，超声30 min提取，过滤，甲醇定容至50 ml。取上清液离心，10 μ l 进样。

3.2 对照品溶液的配制

分别准确称取一定量的对照品（咖啡酸、橙皮苷、迷迭香酸、蒙花苷、香叶木素、香叶木苷），置棕色容量瓶中，加甲醇溶解并定容，作为对照品贮备液。

3.3 色谱条件

液相: Agilent 1200

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6mm×250mm, 5 μm)

流动相: B: 乙腈 C: 0.5%磷酸水溶液

检测波长: 340 nm

流速: 0.5 ml/min

柱温: 30℃

进样量: 10 μl

表2-2 梯度程序

时间(min)	B(%)	C(%)
0	10	90
60	45	55
70	90	10
80	90	10
90	100	0

4 指纹图谱方法学考察

4.1精密度试验

薄荷饮片粉碎，取约1.0 g，精密称定，按供试液制备方法制备供试液，连续进样 6 次分析，分别记录薄荷挥发油气相色谱图的峰数、峰面积、保留时间，选取峰面积之和占总面积90%以上的色谱峰，考察色谱峰的相似度。计算其相对保留时间和相对峰面积，实验及计算结果见图2-1和表2-3。各主要峰的相对保留时间的相对标准偏差RSD均小于1.0%；相对峰面积均小于3.0%，表明仪器的精密度良好。

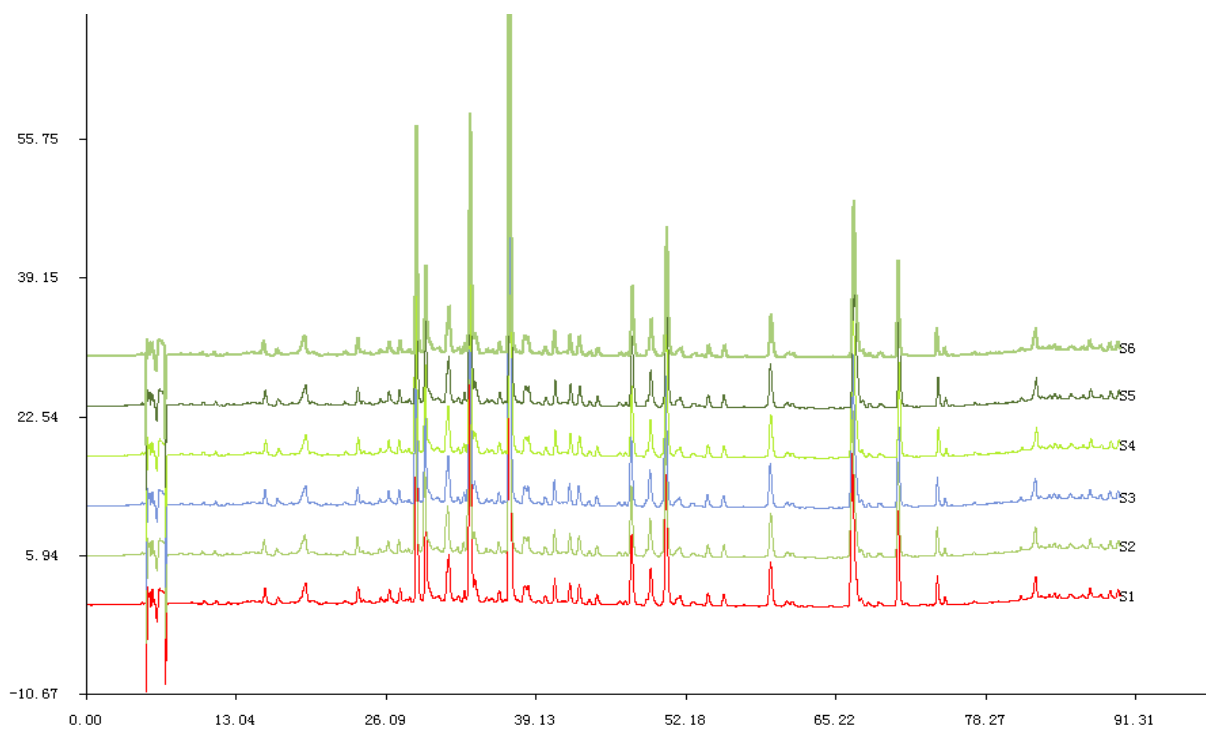


图2-1 样品精密度试验色谱图

Figure 2-1. Chromatogram of precision test

表2-3 精密度相似度评价结果

Table 2-3. The result of similarity of precision test

峰号	相对保留时间		相对峰面积	
	Mean	RSD(%)	Mean	RSD(%)
1	0.42	0.35	0.02	0.00
2	0.52	0.21	0.04	0.00
3	0.78	0.20	0.33	0.00
4	0.80	0.18	0.14	0.01
5	0.86	0.18	0.11	0.00
6	0.91	0.15	0.42	0.00
7	0.92	0.14	0.05	0.00
8	1.00	0.09	1.00	0.00
9	1.11	0.08	0.04	0.00
10	1.14	0.09	0.03	0.00
11	1.16	0.08	0.04	0.00
12	1.29	0.11	0.13	0.00
13	1.33	0.11	0.08	0.01
14	1.37	0.11	0.25	0.00
15	1.62	0.07	0.10	0.00
16	1.81	0.12	0.40	0.00
17	1.92	0.06	0.16	0.00
18	2.01	0.06	0.04	0.00
19	2.24	0.05	0.05	0.00

4.2重复性试验

取 6 份薄荷饮片粉末各约1.0 g，精密称定，按供试液制备方法制备供试液，注入高效液相色谱仪分析，分别记录薄荷挥发油气相色谱图的峰数、峰面积、保留时间，选取峰面积之和占总面积90%以上的色谱峰，考察色谱峰的相似度，实验结果见图2-2和表

2-4。各主要峰的相对保留时间的相对标准偏差RSD均小于1.0%，实验结果表明方法的重复性良好。

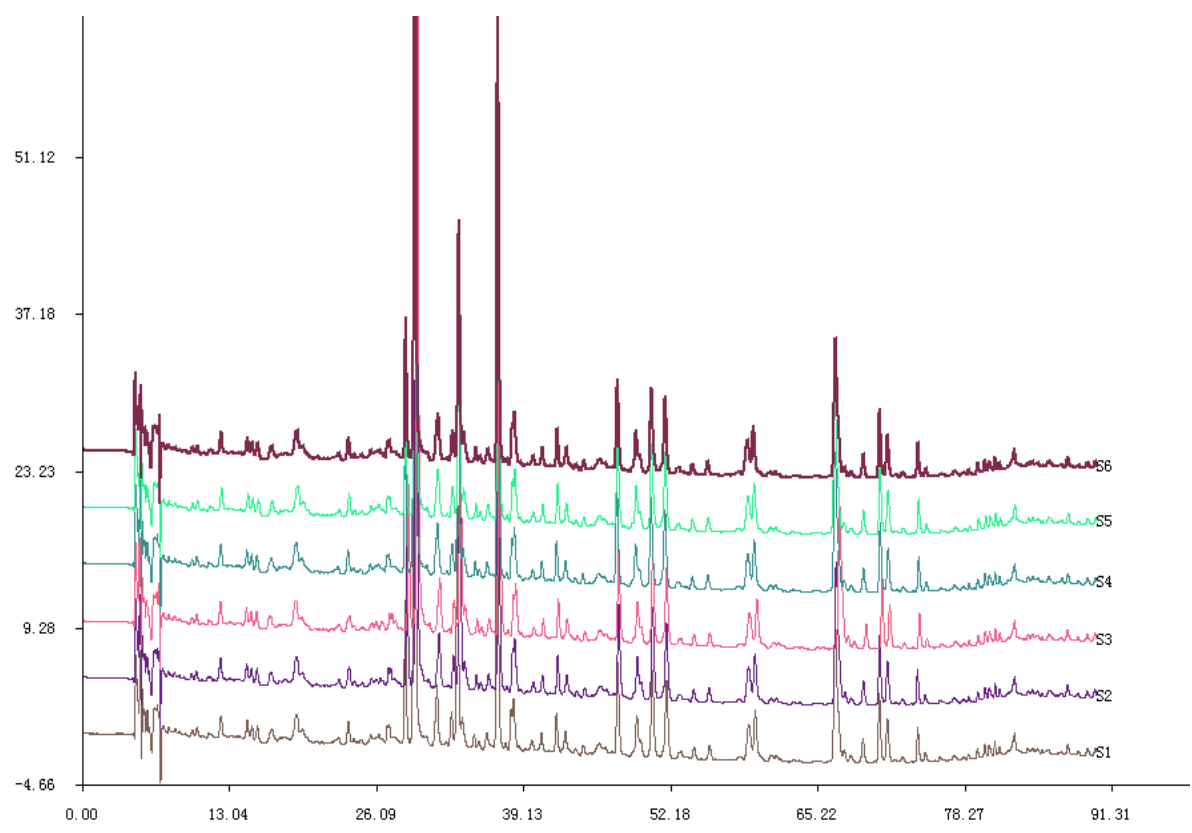


图2-2 样品重复性试验色谱图

Figure 2-2. Chromatogram of repetition test

表2-4 重复性相似度评价结果

Table 2-4. The result of similarity of repetition test

峰号	相对保留时间		相对峰面积	
	Mean	RSD(%)	Mean	RSD(%)
1	0.41	0.37	0.03	2.94
2	0.52	0.23	0.11	4.98
3	0.78	0.24	0.28	0.53
4	0.80	0.22	1.64	0.89
5	0.86	0.22	0.17	0.43
6	0.91	0.23	0.58	1.05
7	1.00	0.11	1.00	0.52
8	1.04	0.11	0.13	2.28
9	1.11	0.11	0.04	2.98
10	1.14	0.12	0.08	0.78
11	1.16	0.13	0.06	2.07
12	1.29	0.11	0.23	0.65
13	1.33	0.10	0.13	8.34
14	1.37	0.10	0.24	1.24
15	1.60	0.06	0.14	1.63
16	1.81	0.09	0.53	0.56
17	1.92	0.05	0.16	0.60
18	2.01	0.06	0.07	0.72
19	2.25	0.03	0.05	1.74

4.3稳定性试验

取薄荷饮片，按3.1项下供试液制备方法制备供试液，分别在0, 2, 4, 6, 8, 12 h进样进行检测，记录薄荷高效液相色谱图的峰数、峰面积、保留时间，选取峰面积之和占总面积 90% 以上的色谱峰，考察色谱峰相似度，实验结果见图2-3和表2-5。实验结果表明

各主要峰的相对保留时间相对标准偏差RSD均小于1.0%，相对峰面积小于3.0%，样品溶液在12 h内稳定。

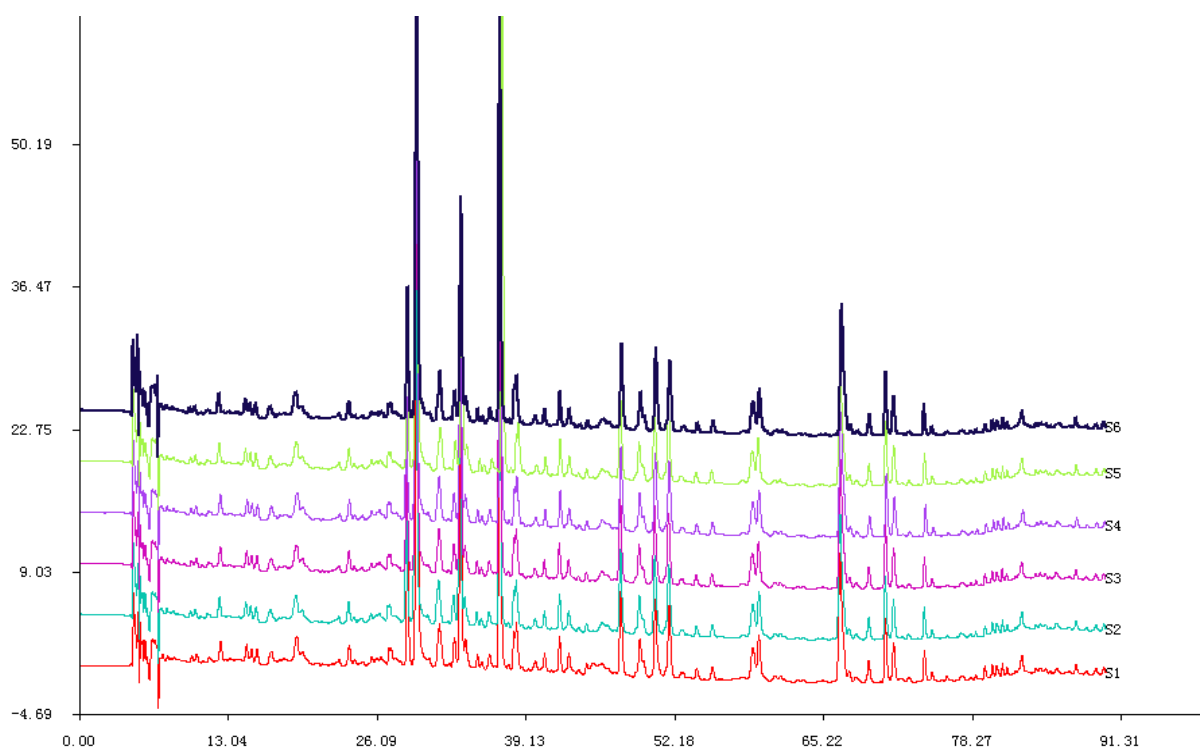


图2-3 样品稳定性实验结果

Figure 2-3. Chromatogram of stability test

表2-5 稳定性相似度评价结果

Table 2-5. The result of similarity stability test

峰号	相对保留时间		相对峰面积	
	Mean	RSD(%)	Mean	RSD(%)
1	0.42	0.40	0.03	1.24
2	0.52	0.18	0.10	2.37
3	0.78	0.20	0.28	0.40
4	0.80	0.18	1.63	0.56
5	0.86	0.22	0.17	0.82
6	0.91	0.20	0.57	0.53
7	1.00	0.26	1.00	0.47
8	1.04	0.07	0.12	1.05
9	1.11	0.10	0.04	2.81
10	1.14	0.09	0.08	0.43
11	1.16	0.08	0.06	2.86
12	1.29	0.12	0.23	0.26
13	1.33	0.12	0.13	1.78
14	1.37	0.12	0.24	1.58
15	1.62	0.09	0.16	1.28
16	1.81	0.10	0.53	0.52
17	1.92	0.05	0.16	0.24
18	2.01	0.05	0.07	0.41
19	2.24	0.05	0.05	2.49

二、结果

（一）指纹图谱的建立与技术参数

1. 参照色谱峰的建立

根据《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》规定，制定指纹图谱必须设立参照物。主要用于指纹图谱技术参数（如共有峰的相对保留时间，相对峰面积等）的确定，有助于考察指纹图谱的稳定性和重现性，有助于色谱的辨认。薄荷高效液相指纹图谱测定实验中，蒙花苷作为已知有效成分，其在指纹图谱中的保留时间适中，且峰面积较大。故选取蒙花苷(7号峰) 作为参照物S。按上述色谱条件，取蒙花苷参照物溶液和薄荷饮片供试品溶液进样。

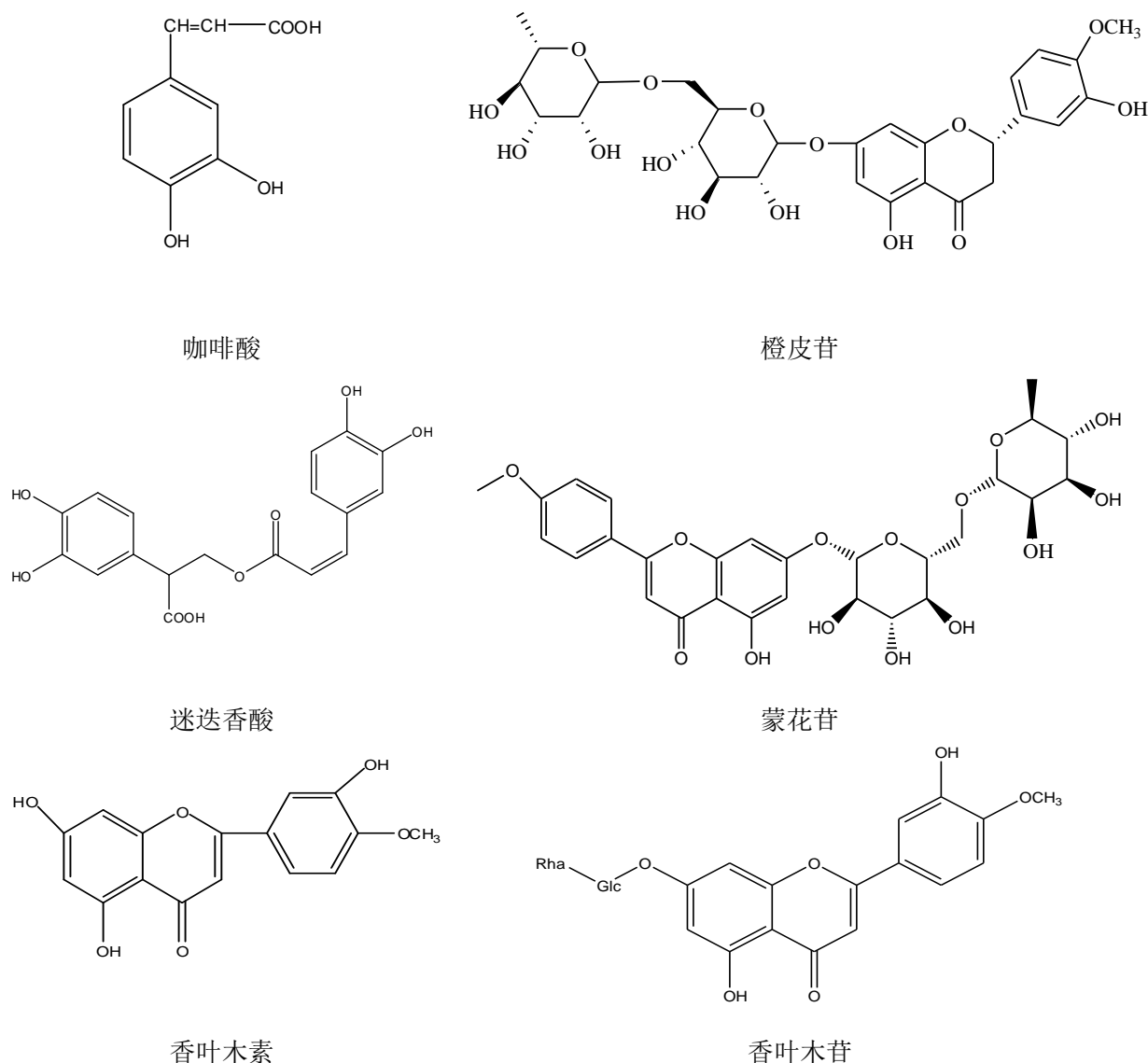


图2-4. 薄荷中5种成分的结构式

2 薄荷饮片的指纹图谱的建立

取12批薄荷饮片，分别按照供试品溶液的制备方法处理，按上述色谱条件进行测定，记录各色谱图。采用由国家药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版》对12批薄荷饮片高效液相指纹图谱进行分析，发现其中有19个峰为11批样品所共有的，因此确定为共有指纹峰。采用相似度评价系统，以中位数法生成指纹图谱共有模式，结果如图2-5。根据对照品相同色谱条件下图谱对照，确认其中2号峰为咖啡酸，3号峰为香叶木苷，4号峰为橙皮苷，6号峰为迷迭香酸，7号峰为蒙花苷，14号峰为香叶木素。薄荷饮片高效液相指纹图谱的共有峰相对保留时间及峰面积的RSD见表2-6, 2-7。

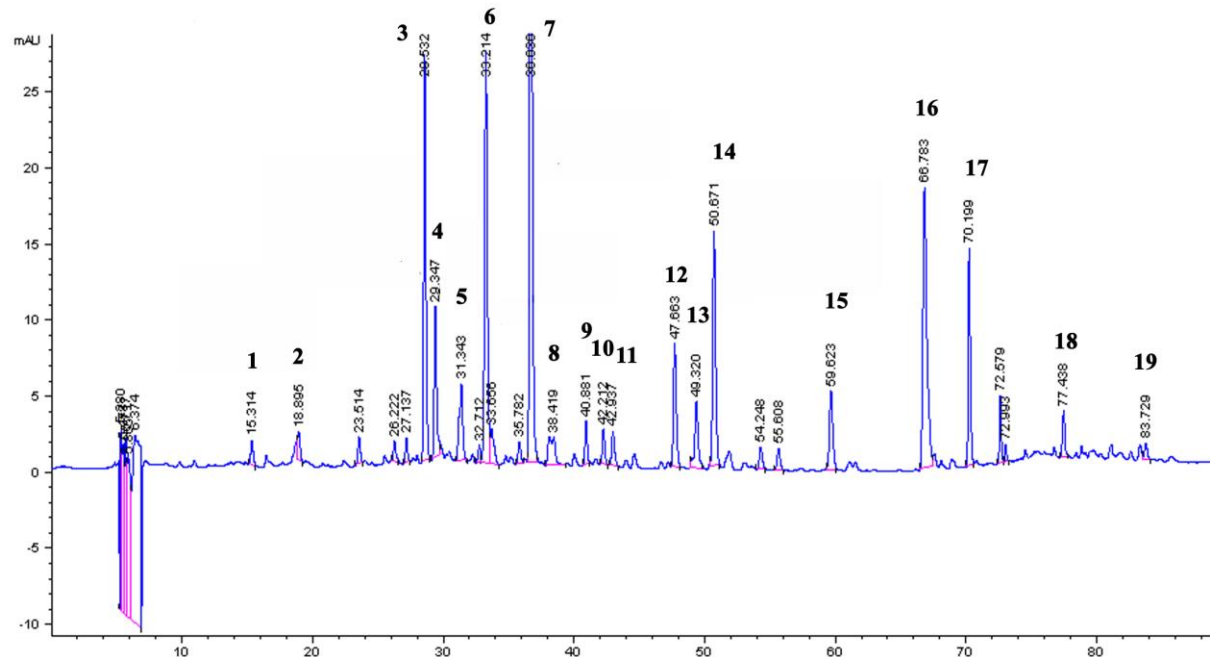


图2-5 薄荷饮片HPLC指纹图谱的共有模式

Figure 2-5. The common pattern of HPLC fingerprint of *Mentha haplocalyx*

3 薄荷饮片的高效液相指纹图谱相似度评价

各批次薄荷饮片高效液相指纹图谱相似度评价采用由国家药典委员会开发的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统2004A版》相似度软件来计算，12批薄荷饮片的高效液相色谱图叠加图见图2-9。各批次薄荷饮片非挥发性成分的高效液相指纹图谱相似度计算结果见表2-8。结果表明，12批薄荷饮片中，11批薄荷饮片与对照指纹图谱的相似度值均大于0.9，符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》中有关规定，表明各

批薄荷饮片均与对照指纹图谱有良好的相似性。其中第8批的相似性为0.852，为同仁堂药店购得薄荷饮片，由于饮片中的叶部位含量较其余各批次饮片的叶含量高，故可能检测成分及含量有差异。

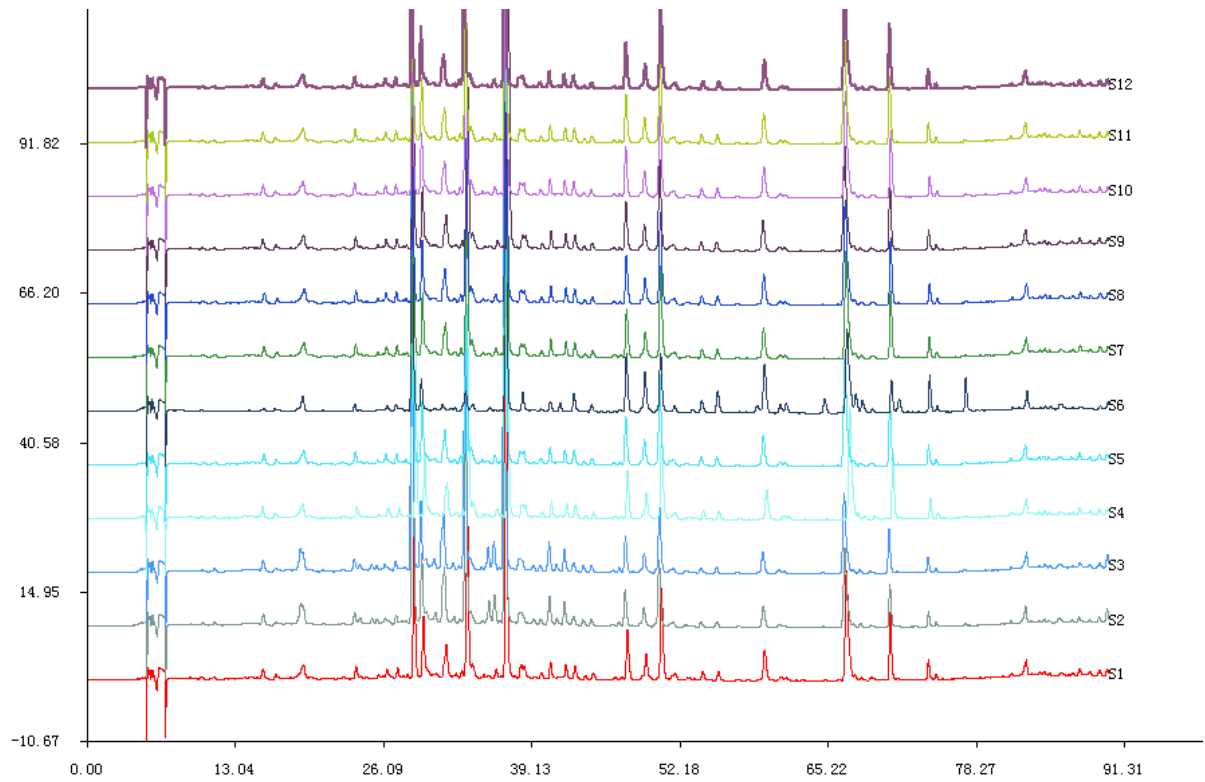


图2-6. 12批薄荷饮片HPLC指纹图谱指纹图谱

Figure 2-6. The HPLC fingerprint of 12 batches of *Mentha haplocalyx*

Table 2-6. 12批薄荷饮片HPLC指纹图谱共有峰相对保留时间

Table 2-6. The relative retention time of common peaks in fingerprint of 12 batches of *Mentha haplocalyx*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照指 纹图谱	保留时间 RSD(%)	匹配数目
1	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.43	0.42	0.42	0.42	0.42	0.42	0.00	11
2	0.52	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52	0.52	0.51	0.52	0.52	0.51	0.52	0.52	0.00	12
3	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.77	0.78	0.78	0.00	12
4	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.00	12
5	0.86	0.86	0.85	0.85	0.85	0.85	0.86	0.88	0.85	0.86	0.85	0.85	0.86	0.01	11
6	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.90	0.91	0.90	0.91	0.91	0.90	0.91	0.91	0.00	12
7	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	12
8	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.04	1.03	1.04	1.04	0.00	12
9	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.10	1.11	1.11	0.00	12
10	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.16	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	0.01	11
11	1.16	1.16	1.17	1.17	1.17	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	0.00	12
12	1.29	1.29	1.29	1.29	1.29	1.29	1.29	1.29	1.29	1.29	1.28	1.29	1.29	0.00	12
13	1.33	1.33	1.34	1.34	1.33	1.34	1.33	1.33	1.33	1.33	1.32	1.33	1.33	0.00	12
14	1.37	1.37	1.37	1.38	1.37	1.37	1.37	1.37	1.37	1.37	1.36	1.37	1.37	0.00	12

15	1.62	1.62	1.62	1.63	1.62	1.62	1.62	1.62	1.62	1.62	1.61	1.62	1.62	0.00	12
16	1.81	1.81	1.82	1.82	1.81	1.82	1.81	1.82	1.81	1.81	1.80	1.81	1.81	0.00	12
17	1.92	1.92	1.92	1.93	1.92	1.92	1.92	1.92	1.92	1.92	1.91	1.92	1.92	0.00	12
18	2.01	2.01	2.02	2.02	2.03	2.02	2.01	2.03	2.01	2.01	2.00	2.01	2.01	0.01	12
19	2.24	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.25	2.24	2.24	2.23	2.25	2.24	0.01	12

表2-7 12批薄荷饮片HPLC指纹图谱共有峰指纹图谱共有峰的相对峰面积

Table 2-7. The relative peak area of common peaks in fingerprint of 12 batches of *Mentha haplocalyx*

峰号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照指 纹图谱	相对峰面积 RSD(%)	匹配 数目
1	0.0244	0.0179	0.0178	0.8576	0.0244	0.0243	0.0243	0.0000	0.0248	0.0242	0.0248	0.0248	0.0217	0.24	11
2	0.0385	0.0624	0.0635	0.9136	0.0260	0.0384	0.0369	0.0587	0.0368	0.0375	0.0363	0.0387	0.0441	0.25	12
3	0.3350	0.6407	0.6421	0.9438	0.3308	0.3335	0.3298	0.9119	0.3319	0.3299	0.3293	0.3313	0.4361	0.24	12
4	0.1380	0.1061	0.1048	0.9619	0.1333	0.1479	0.1464	0.1086	0.1334	0.1358	0.1339	0.1465	0.1295	0.24	12
5	0.1079	0.1228	0.1220	1.0666	0.1069	0.1069	0.1058	0.0000	0.1080	0.1083	0.1090	0.1072	0.1060	0.28	11
6	0.4254	0.3940	0.3966	1.1047	0.4184	0.4257	0.4175	0.0803	0.4188	0.4161	0.4173	0.4252	0.3977	0.23	12
7	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.04	12
8	0.0718	0.0440	0.0442	1.3408	0.0729	0.0736	0.0738	0.0699	0.0722	0.0739	0.0713	0.0744	0.0656	0.37	12

9	0.0382	0.0494	0.0497	1.5002	0.0376	0.0373	0.0377	0.0420	0.0368	0.0379	0.0363	0.0372	0.0405	0.42	12
10	0.0313	0.0384	0.0379	1.5883	0.0310	0.0310	0.0306	0.0000	0.0307	0.0308	0.0303	0.0310	0.0311	0.45	11
11	0.0361	0.0188	0.0187	1.6648	0.0362	0.0367	0.0355	0.0755	0.0362	0.0361	0.0353	0.0361	0.0338	0.47	12
12	0.1321	0.0615	0.0675	1.8577	0.1308	0.1319	0.1312	0.2482	0.1314	0.1313	0.1309	0.1323	0.1209	0.50	12
13	0.0880	0.0329	0.0357	0.0000	0.0701	0.0755	0.0866	0.2024	0.0880	0.0867	0.0866	0.0873	0.0764	0.05	12
14	0.2555	0.1176	0.1182	0.0095	0.2528	0.2543	0.2530	0.2594	0.2541	0.2525	0.2513	0.2530	0.2204	0.08	12
15	0.1006	0.0443	0.0446	0.0117	0.0991	0.1002	0.0989	0.2303	0.0987	0.0979	0.0985	0.0995	0.0923	0.05	12
16	0.4059	0.1936	0.1927	0.0175	0.4017	0.4019	0.4009	0.5329	0.4014	0.3970	0.3999	0.3996	0.3571	0.14	12
17	0.1621	0.0670	0.0668	0.0180	0.1609	0.1620	0.1609	0.1264	0.1613	0.1600	0.1605	0.1618	0.1366	0.05	12
18	0.0448	0.0221	0.0221	0.0192	0.0444	0.0444	0.0443	0.1291	0.0442	0.0441	0.0441	0.0444	0.0431	0.03	12
19	0.0460	0.0264	0.0263	0.0204	0.0456	0.0436	0.0404	0.0648	0.0481	0.0452	0.0450	0.0456	0.0416	0.01	12

表2-8 12批薄荷饮片HPLC指纹图谱的相似度计算结果

Table 2-8. The results of similarity of 12 batches of *Mentha haplocalyx*

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照指 纹图谱
S1	1.000	0.940	0.940	0.999	0.961	0.995	0.999	0.826	0.972	0.961	0.972	0.999	0.995
S2	0.940	1.000	0.997	0.942	0.899	0.939	0.941	0.834	0.907	0.900	0.907	0.941	0.937
S3	0.940	0.997	1.000	0.939	0.920	0.944	0.938	0.861	0.923	0.921	0.923	0.938	0.943
S4	0.999	0.942	0.939	1.000	0.950	0.992	1.000	0.811	0.962	0.951	0.962	1.000	0.992
S5	0.961	0.899	0.920	0.950	1.000	0.978	0.950	0.891	0.993	1.000	0.993	0.950	0.980
S6	0.995	0.939	0.944	0.992	0.978	1.000	0.992	0.848	0.981	0.978	0.981	0.992	0.999
S7	0.999	0.941	0.938	1.000	0.950	0.992	1.000	0.812	0.962	0.951	0.963	1.000	0.992
S8	0.826	0.834	0.861	0.811	0.891	0.848	0.812	1.000	0.878	0.891	0.878	0.811	0.852
S9	0.972	0.907	0.923	0.962	0.993	0.981	0.962	0.878	1.000	0.993	1.000	0.962	0.987
S10	0.961	0.900	0.921	0.951	1.000	0.978	0.951	0.891	0.993	1.000	0.993	0.951	0.981
S11	0.972	0.907	0.923	0.962	0.993	0.981	0.963	0.878	1.000	0.993	1.000	0.963	0.987
S12	0.999	0.941	0.938	1.000	0.950	0.992	1.000	0.811	0.962	0.951	0.963	1.000	0.992
对照指 纹图谱	0.995	0.937	0.943	0.992	0.980	0.999	0.992	0.852	0.987	0.981	0.987	0.992	1.000

三、分析与讨论

1. 在采用高效液相指纹图谱方法考察各产地薄荷非挥发性指纹成分时,尝试了多种提取溶剂:水、甲醇、30%乙醇、50%乙醇、70%乙醇等,发现乙醇提取物出峰比较杂,水提取物出峰数量较少,而甲醇提取物主峰数量较多,经过优化后的提取条件下,HPLC指纹图谱出峰数目多且分离度最好。

2. 提取方法选择中,比较了回流提取法和超声提取法。考虑到回流提取所需温度较高,薄荷的非挥发性成分中含有大量的黄酮苷,苷类成分在回流的高温条件下容易被破坏,并且超声提取法简单易行,因此采用超声提取法提取薄荷饮片中的非挥发性成分。

3. 采用二极管阵列检测器全波长紫外扫描,在286 nm、300 nm、315 nm、340 nm、345 nm 和360 nm几个不同波长下获取数据,比较后表明340 nm色谱图峰形最好,出峰数目最多,各色谱峰相互之间分离度较好,故检测波长定为340 nm。

4. 色谱方法优化中,对比流动相甲醇,乙腈和不同比例的磷酸水溶液组合,在不同流速、不同柱温下的指纹图谱出峰效果图,最后得出最优指纹图谱条件为流动相C:0.5%的磷酸水溶液;B为乙腈;梯度洗脱;柱温:30℃;流速:0.5 ml/min;检测波长为340 nm。

5. 12批薄荷饮片提取液中,共检测到了19个共有峰,通过与对照品对照,确认其中2号峰为咖啡酸,3号峰为香叶木苷,4号峰为橙皮苷,6号峰为迷迭香酸,7号峰为蒙花苷,14号峰为香叶木素。11批的指纹图谱相似度达到0.9以上,符合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》中有关规定,表明各批薄荷饮片均与对照指纹图谱有良好的相似性。其中第8批的相似性为0.852,为同仁堂药店购得薄荷饮片,由于饮片中的叶部位含量较其余各批次饮片的叶含量高,故可能导致检测成分及含量有差异。

四、小结

通过研究各产地薄荷饮片，本节实验制订了薄荷饮片非挥发性成分的液相指纹图谱，建立其共有模式；检测出19个共有峰，对不同产地的薄荷进行相似度比较，其中11批相似度达到90%以上；通过对照品的保留时间和紫外光谱，与样品峰进行比对，最终确定6个成分，分别为咖啡酸、香叶木苷、橙皮苷、迷迭香酸、蒙花苷及香叶木素。经过精密度、稳定性、重复性考察，说明此定性方法稳定可控，为控制各产地薄荷饮片生产质量、研究薄荷中整体非挥发性成分提供有效手段。

第三部分 基于结构相似性分类的质谱辅助解析软件设计

一、软件原理、框架与功能设计

(一) 结构相似性分类鉴定步骤

1. 数据预处理

筛选峰强度达到预定值，质谱碎裂片断在 m/z 50-1000，质谱误差小于5 ppm. 所有符合限定条件的数据汇集到excel文件中。

2. 化合物分类鉴定策略

Step 1: 采用结构相似性分类程序，对目标化合物群进行分类。通过程序采集得化合物分类信息。

Step 2: 核心化合物选择原则。选择的核心化合物必须与组内其他化合物有较高的结构相似性，高的质谱强度，丰富的碎片信息，合适分子量大小，或者有标准品作为对照。所有以上因素需要综合考虑。

Step 3: 鉴定核心化合物（或不能被分组的化合物）。采用元素组成分析，数据库筛选，碎片解析，候选化合物筛选匹配的方法分析质谱数据。如果该化合物有标准品作为对照，则可跳过此步骤。详细解析流程如图3-1（通用质谱解析步骤）。

Step 4: 鉴定组内其他化合物。组内的核心化合物一旦被鉴定出，与之结构最相关的化合物可以优先鉴定（即参考软件part 3运行结果，聚类图中靠的较近的即结构相似性相对较大）。核心化合物鉴定出后，与其他组内成分进行比较，其中共有离子部分由核心化合物的结构得出，其余差异部分可以根据基团丢失（如 H_2O , CO , CO_2 , 糖苷等）综合推断。采用Step 3中的通用解析步骤进一步解析。重复此步骤，依据结构相关性最高到最低的顺序解析组内其他化合物，直到组内所有成分被解析出。

Step 5: 重复步骤3、4，解析所有组别

Step 6: 解析不能被分组的化合物。综合共有离子和化合物两两之间的共有离子比对结果，依据已经解出的共有离子结构和基团丢失信息，重复step3中的通用质谱解析步骤，得出最终解析结果。

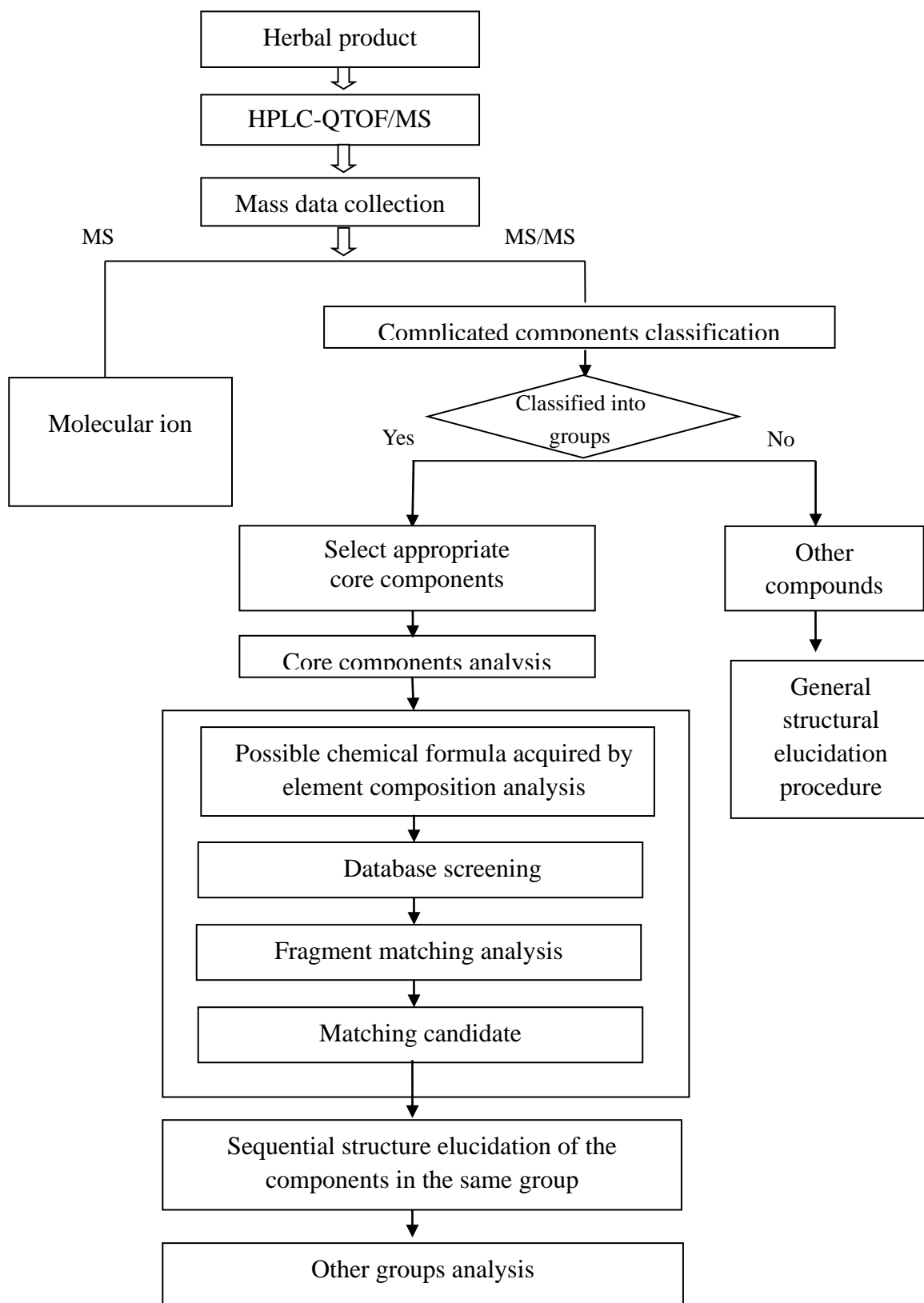


图 3-1. 超高效液相-飞行时间质谱的薄荷通用成分鉴定策略

Figure 3-1. General strategy for identification of components in samples of *Mentha haplocalyx* using UPLC-QTOF-MS.

(二) 软件框架与功能设计

1. 软件平台

采用Visual Basic for Applications (VBA; Microsoft, USA) 和MATLAB v7.1 (The Mathworks, Natick, USA)自主编写的软件辅助分析质谱数据。

2. 软件功能

2.1 共有离子搜寻

实现所有检测到的碎片离子的来源追溯。

2.2 两两化合物对共有离子搜集

化合物两两之间的共有离子数目和种类的统计计算。

2.3 基于结构相似性的分类

根据已检测到的化合物两两之间的共有离子数目（软件2.2运行结果）计算相似度，即两者间相同离子数目比上两化合物碎片总数。得到能够反映化合物结构相似度关系的聚类图。

(三) 软件稳定性验证

采用文献[23]中HPLC-MS方法分析栀子大黄汤的结构鉴定数据作为验证数据集。根据Wang和Feng的研究工作，栀子大黄汤中有30个成分成功鉴定出，包括环烯醚萜苷类，蒽醌和黄酮类成分。从中选择两个成分，即：橙皮素和大黄素甲醚，为稳定性试验中结构相关的外加化合物。

二、结果

(一) 软件模块功能示例

1. 共有离子搜索

对检测到的碎片离子进行统计，记录频数和化合物来源追溯。

表3-1 薄荷水提物UPLC-QTOF-MS检测结果的共有离子分析

碎片离子	出现频数	碎片来源（化合物编号）
55	1	19
57	1	4
59	1	2
62	1	4

65	1	19
67	1	19
69	5	2, 6, 8, 13, 19
73	3	2, 11, 12
74	1	8
77	2	11, 19
78	2	4, 13
79	3	2, 3, 7
83	1	19
84	1	15
85	1	2
89	4	4, 8, 11
91	4	2, 3, 6, 19
97	1	2
99	1	28
105	4	5, 8, 11, 28
106	2	4, 13
107	3	2, 3, 7
108	3	19, 22, 27
109	1	11
112	1	15
113	2	27, 32
115	2	11, 19
117	2	13, 19
119	2	6, 7
120	1	7
121	5	4, 7, 11, 15, 19

122	1	2
123	4	2, 3, 11, 12
127	2	7, 25
128	2	8, 26
132	2	11, 12
133	6	2, 11, 12, 17, 29, 30
134	4	1, 2, 3, 13
135	5	1, 2, 3, 8, 9
136	2	11, 27
138	1	4
140	1	15
141	1	4
145	4	6, 7, 11, 13
146	1	25
147	2	19, 26
148	3	27, 28, 32
149	2	2, 11
150	2	7, 19
151	7	3, 11, 22, 25, 27, 32, 33
152	2	4, 26
153	15	4, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 14, 16
155	4	20, 23, 26, 30
157	1	6
159	2	4, 11
160	1	2
161	4	4, 11, 12, 17
162	1	31

163	4	4, 18, 26, 32
164	1	11
165	1	28
167	1	4
168	2	15, 24
169	4	27, 30, 32, 33
171	2	19, 26
173	1	2
177	4	10, 11, 12, 13
178	1	7
179	8	1, 2, 3, 9, 11, 12, 28, 32
182	1	4
183	5	4, 20, 23, 26, 30
184	1	22
185	1	27
187	1	7
191	1	2
195	1	8
197	11	3, 4, 7, 9, 11, 12, 18, 25, 27, 32, 33
199	1	26
200	1	22
202	1	18
203	1	14
207	1	11
211	1	26
212	2	11, 22
213	2	23, 9

221	1	11
223	1	11
226	1	7
228	1	22
229	5	6, 9, 13, 14, 21
239	1	11
240	1	30
241	2	27, 29
242	4	16, 17, 18, 29
243	2	6, 18
245	1	7
249	1	11
250	1	11
256	2	22, 23
257	3	14, 21, 22
258	5	10, 13, 14, 21, 26
267	1	11
269	1	27
270	5	16, 17, 18, 26, 29
271	3	6, 7, 19
284	2	22, 27
285	5	16, 17, 18, 22, 29
286	5	10, 13, 14, 15, 21
287	2	5, 8
288	1	25
294	1	9
295	2	9, 11

297	1	27
298	2	31, 32
300	1	23
301	6	10, 13, 14, 15, 20, 21
303	3	7, 8, 13
312	2	27, 30
313	3	9, 11, 25
314	1	24
315	1	30
316	2	23, 32
321	2	9, 11
326	2	26, 32
329	3	24, 26, 33
330	2	27, 28
331	3	23, 25, 32
339	3	9, 11, 16
341	1	32
342	2	26, 27
343	1	32
345	2	26, 27
346	1	23
347	1	28
357	1	11
359	5	11, 12, 26, 32, 33
361	1	23
365	1	11
375	1	28

447	1	16
449	3	5, 8, 13
463	2	10, 14
465	1	13
475	1	9
493	2	9, 11
519	2	9, 11
593	1	16
607	1	9
609	1	10
611	1	13
655	1	9
673	1	9
677	1	11
717	2	9, 11

如表3-1所示，碎片离子69在5个化合物中被检出，分别来自于C2，C6，C8，C13和C19。

2. 两两化合物对共有离子搜集

该模块实现化合物两两之间的共有离子数目和种类的统计计算。如表3-2（部分）所示，化合物2和化合物6共有的碎片离子是69和91；化合物2和化合物12的共有碎片离子是73, 123, 133和179。

3. 基于结构相似性的分类

根据已检测到的化合物两两之间的共有离子数目（软件2.2部分运行结果）计算相似度，即两者间相同离子数目比上两化合物碎片总数。根据相似性大小得到能够反映化合物结构相似程度关系的聚类图。如图3-2所示，图中括号部分将分组情况标示出，第一组中，化合物17,18,13和14被分为一组，其中，化合物17,18结构相似程度最高，与组内的化合物13的相似程度较与组内化合物14的相似程度高。

表3-2 两两化合物对共有离子搜集（部分）

化合物1编号	化合物2编号	化合物对所共有的碎片离子
2	6	69, 91
2	7	79, 107
2	8	69, 135
2	9	135, 179
2	10	无
2	11	73, 123, 133, 149, 179
2	12	73, 123, 133, 179
2	13	69, 134

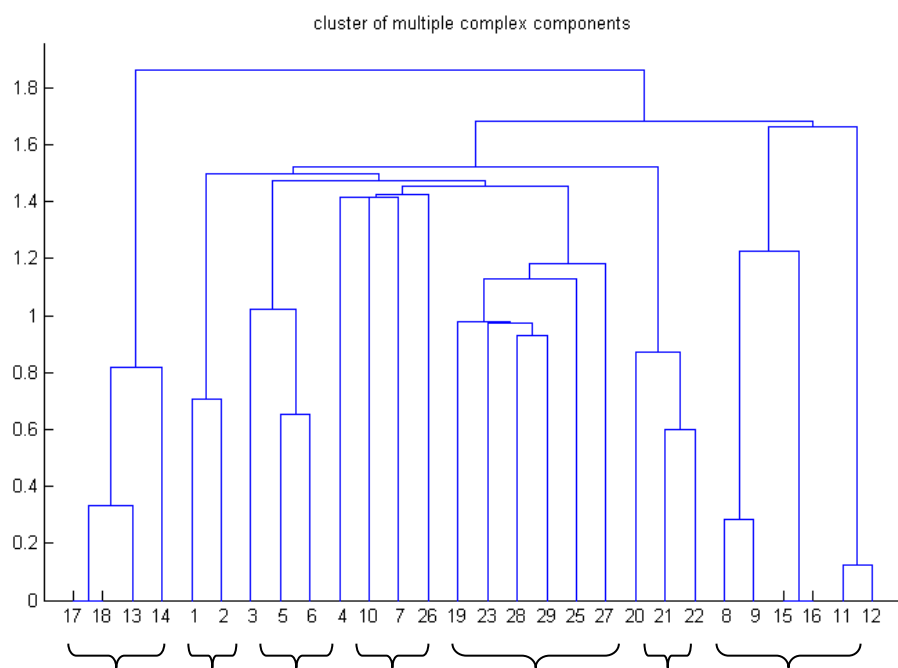


图3-2 结构相似性聚类分析图

（二）综合示例分析

详见第四部分。

（三）软件验证试验及稳定性考察

验证试验和稳定性测试结果如图3-3所示。30个化合物（包括两个外加化合物）中26个化合物能成功分为6组，外加两个成分没有改变分组结果。C4，C10，C7和C26因为缺少共同碎片离子，不能够分组，但同样可以通过一般的质谱解析过程进行结构。

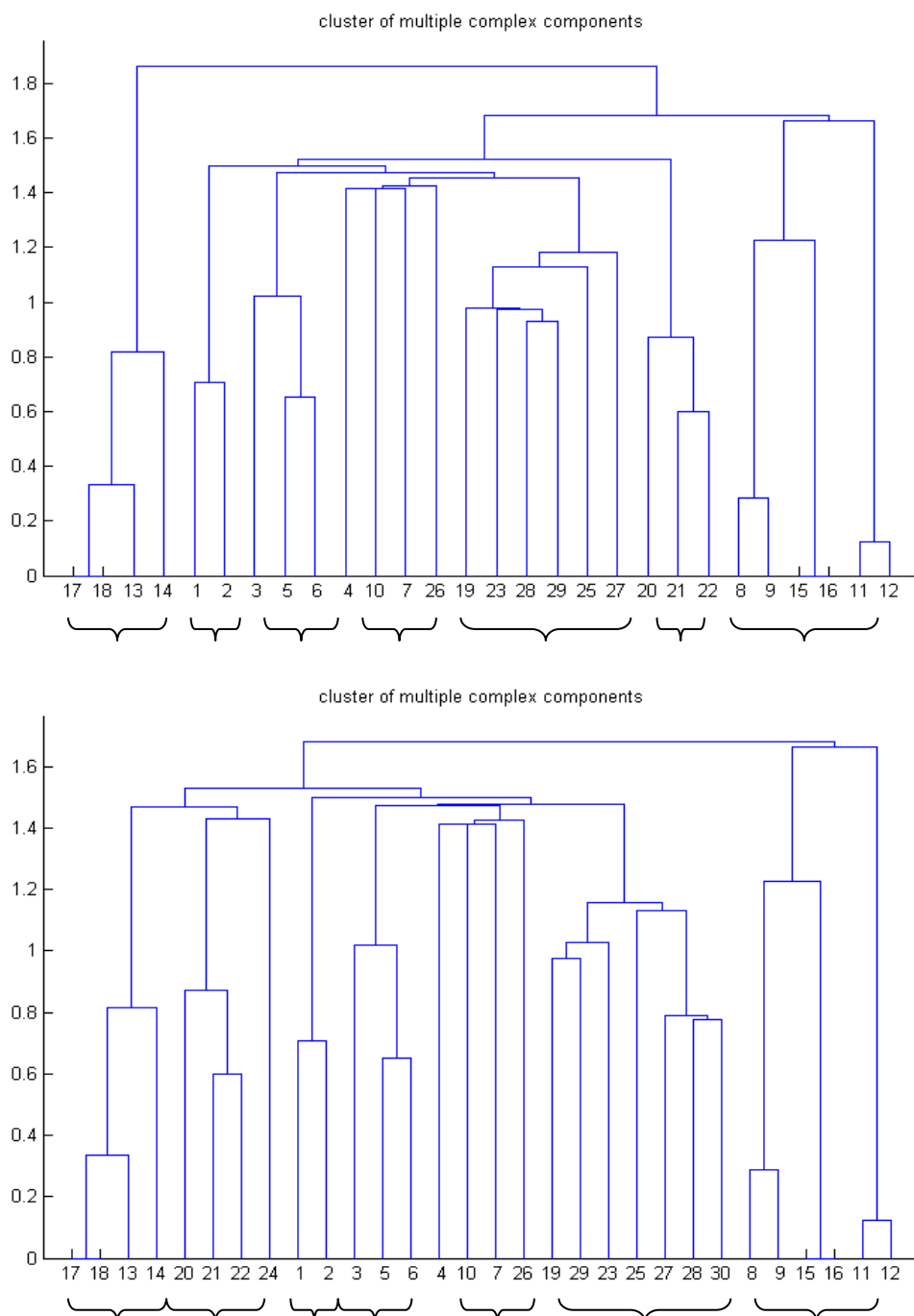


图3-3. 结构相似性软件的中药复方验证以及稳定性考察

Figure 3-3. Validation (A) and robustness test (B) results of Software by one typical herbal formula.

三、分析和讨论

软件分为三部分：共有离子搜索、两两化合物对共有离子分析、结构相似性分类。分别着眼于不同的出发点分析采集数据。

1. 共有离子搜索部分能够得到所有检测离子种类的信息，并且统计出某个离子分别由哪些化合物产生的。如果一类化合物具有明显的一组特征离子，那么同时具有这组特征离子，或者具有多个这类特征离子的化合物，就有很大的可能性是来源于该类化合物；与之具有多个共有离子的其他化合物或许都属于该类物质。

2. 两两化合物对共有离子分析部分着眼于分析两个化合物对之间的关系。当一个组中的核心化合物的结构已经鉴定出时，通过分析该核心化合物和其他组内化合物共享的碎片离子，可以大胆推断该化合物中有无与核心化合物相同或相似的部分。共有部分解析出后，分析剩余部分是否可以相差合理的中性丢失结构。这种关联解析方法，能够简化通常孤立、单一的质谱解析过程。

3. 结构相似性分类部分着眼于整个结构相似组群的分析，通过聚类图表能够清晰地显示出该组群化合物的结构亲缘程度，通过先解析出核心化合物结构这一突破点，解析与之结构相似度较高的组内其他化合物，随后再解析与之结构相似度次高的组内化合物。依次解析，最终整个组群根据这种连带关联分析，解析出全部的结构。

4. 采用文献数据考察基于结构相似性分类的UPLC-QTOF-MS鉴定方法的准确性和稳定性，30个化合物中有26个能够成功分组，外加2个结构相近的化合物不会对分组结果造成大的影响。

四、小结

本文首次基于化合物结构相似性分类原理，自主编写质谱辅助解析软件。通过文献数据的相关验证及稳定性考察，该自主编写的质谱数据辅助处理软件能够实现多角度分析阐述数据关系的目标，使得化合物之间、化合物组群内的关系较为清晰明了，有效关联解析质谱结构，能够简化一般质谱解析流程，加快解析效率。

第四部分 基于结构相似性分类的薄荷超高效液相-飞行时间质谱鉴定

一、基于化合物结构相似性分类的薄荷 UPLC-QTOF/MS 鉴定实验

(一) 实验材料与方法

1. 实验药品

1.1 对照品

咖啡酸（中国药品生物制品检定所，批号：110885-200102）；橙皮苷（中国药品生物制品检定所，批号：110721-201014）；蒙花苷（中国药品生物制品检定所，批号：111528-200606）；迷迭香酸（上海同田生物技术有限公司，批号：E-0074）；香叶木素（上海同田生物技术有限公司，批号：E-0603）；香叶木苷（上海同田生物技术有限公司）

1.2 试剂

丙酮（分析纯，Tedia Company，批号：1010907）；Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA)；甲醇、乙腈为色谱纯 Merck (Darmstadt, Germany)

1.3 样品

薄荷采于浙江杭州双灵村（批号100916），经浙江中医药大学来平凡教授鉴定为唇形科植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq.的干燥地上部分，按药典该饮片制备项下方法阴干、切制，得薄荷饮片。

2. 实验器材

色谱系统为Waters Acquity™ UPLC™系统(Waters Corp., Milford, MA, USA), 色谱柱为Waters Acquity™ UPLC™ BEH C18柱(100 × 2.1 mm, 1.7 μm), 质谱系统为Waters Synapt™ G2 MS (Waters Corp., Milford, MA, USA)。

3. 实验方法

3.1 样品溶液的制备

薄荷饮片粉碎，取粉末约2.0 g，精密称定，分别置250 ml具塞锥形瓶中，加50 ml甲醇，超声提取30 min，过滤，甲醇补足，定容至50 ml。样品过0.22 μm 滤膜，3 μl 进样。

3.2 对照品溶液的配制

分别准确称取一定量的对照品（咖啡酸、橙皮苷、迷迭香酸、蒙花苷及香叶木素），置棕色容量瓶中，精密称定，加甲醇溶解，制成0.01 mg/ml薄荷混合对照品溶液。样品过0.22 μm 滤膜，3 μl 进样。

3.3 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity™ UPLC™ BEH C18色谱柱(100 × 2.1 mm, 1.7 μm);

柱温: 40°C;

样品室温度: 8°C;

流动相组成: 溶剂A: 乙腈; 溶剂B: 0.1%甲酸水溶液

流速: 0.5 ml/min;

检测波长为340 nm;

进样量为 3 μl;

表4-1. 流动相梯度洗脱条件

Time (min)	%A	%B
0	10	90
0.2	10	90
13	60	40
18	95	5
20	95	5
20.1	10	90
23	10	90

3.4 质谱条件

质谱系统: Synapt G2 MS

电离方式: ESI+; ESI-

毛细管电压 (kV) : 3.0 (ESI +), 2.5 (ESI -)

采样锥孔电压: 40V

提取锥孔电压: 4V

源温度: 120°C

去溶剂化气流温度: 450°C

锥孔气流: 50 L/min

去溶剂化气流量: 750 L/min

软件系统: Masslynx 4.1 MassFragment™ (Waters Corp., Milford, MA, USA).

数据预处理：筛选峰强度达到预定值，质谱碎裂片断在 m/z 50-1000，质谱误差小于5 ppm。所有符合限定条件的数据汇集到excel文件中。采用Visual Basic for Applications (VBA; Microsoft, USA) 和MATLAB v7.1 (The Mathworks, Natick, USA)自主编写的软件辅助分析质谱数据。具体操作原则相见第三部分。

（一）基于化合物结构相似性分类的中药复杂成分鉴定

A

1: TOF MS ES+
BPI
2.69e5

Chromatogram A shows relative intensity (%) on the y-axis (0 to 100) versus time (min) on the x-axis (0 to 20.00). The base peak is at 18.00 min. Other significant peaks are labeled at 0.44, 0.60, 3.68, 3.77, 5.10, 5.75, 7.55, 9.03, 9.39, 10.67, 13.57, 13.72, 13.94, 16.43, 16.61, 18.74, 19.51, and 20.02 min.

B

1: TOF MS ES+
BPI
4.07e4

Chromatogram B shows relative intensity (%) on the y-axis (0 to 100) versus time (min) on the x-axis (0 to 20.00). The base peak is at 16.54 min. Other significant peaks are labeled at 0.48, 1.58, 1.76, 1.85, 3.28, 3.68, 3.80, 4.05, 5.75, 6.50, 7.17, 8.34, 9.06, 10.07, 11.75, 12.86, 13.36, 15.70, 16.54, 17.26, 18.23, 19.51, 20.34, and 20.60 min.

Figure 4-1. Base-peak intensity profile of *Mentha haplocalyx* extract in positive (A) and negative (B) ion mode.

表 4-2. 薄荷提取物中 UPLC-QTOF-MS 鉴定结果

Table 4-2. Characterization of phenolic components in *Mentha haplocalyx* extract using

UPLC-QTOF-MS					
No.	RT (min)	MW	Parent ions (m/z)	Typical fragment ions (m/z)	Tentative identification
1 ^a	0.74	180.0423	[M-H] ⁻ 179.0345	179.0364, 135.0432, 134.0349	Caffeic acid
2 ^b	0.75	192.0634	[M-H] ⁻ 191.0556	79.0535, 72.9931, 69.0345, 59.0147	Scopoletin
3	0.80	198.0528	[M-H] ⁻ 197.0450	123.0475, 107.0541, 91.0547, 79.0549	Danshensu
4 ^b	2.13	198.0528	[M-H] ⁻ 197.0450	89.0055, 78.0111, 62.0146, 57.0405	Vanillylmandelic acid
5	2.92	594.1585	[M+H] ⁺ 595.1663	449.1086, 287.0555, 153.0164, 105.0694	Luteolin-7-O-rutinoside
6	3.46	578.1636	[M+H] ⁺ 579.1714	271.0600, 153.0196, 145.0277, 119.0490, 91.0567, 67.0203, 53.4256	Isorhoifolin
7 ^b	3.50	432.1056	[M+H] ⁺ 433.1134	271.0611, 153.0187	Apigenin-7-O-glucoside
8	3.61	448.1006	[M+H] ⁺ 449.1084	303.0497, 287.0543, 195.0802, 153.0206, 135.0434, 128.0716, 105.0340, 89.0451, 74.1014, 69.0018	Luteolin-7-O-glucoside
9	3.78	718.1534	[M-H] ⁻ 717.1456	229.0158, 197.0454, 179.0307, 135.0419, 519.0908, 717.1498, 295.0535, 161.0237	Salvianolic acid B
10	3.85	608.1741	[M+H] ⁺ 609.1819	609.1824, 463.1268, 301.0711, 286.0485, 258.0509	Diosmin
11 ^b	3.86	718.1534	[M-H] ⁻	105.0331, 89.039,	Salvianolic acid L

			717.1456	77.0388, 72.9921	
12 ^a	3.86	360.0845	[M+H] ⁺ 359.0767	133.0291, 132.0219, 123.0451, 72.9926	Rosmarinic acid
13 ^a	3.92	610.1898	[M+H] ⁺ 611.1976	611.1967, 465.1393, 449.1439, 303.0865	Hesperidin
14 ^a	4.05	462.1162	[M+H] ⁺ 463.1240	463.1235, 301.0713, 286.0471, 258.0507, 257.0480, 229.0474, 203.0365, 153.0179	Diosmetin-7-O-glucopyranoside
15 ^b	5.22	300.0634	[M+H] ⁺ 301.0712	301.0700, 286.0457, 168.0043, 140.0092, 121.0292, 112.0162, 84.0222	5,6,4'-Trihydroxy-7-methoxyflavone
16 ^a	5.23	592.1792	[M+H] ⁺ 593.1870	593.1876, 447.1284, 338.9952, 285.0766, 270.0533, 242.0576, 153.0180	Buddleoside
17	5.35	446.1213	[M+H] ⁺ 447.1291	285.0779, 270.0569, 242.0590, 161.0625, 153.0186, 133.0671	Tilianine
18	5.60	284.0685	[M+H] ⁺ 285.0763	285.0757, 270.0523, 243.0649, 242.0555, 153.0158	5,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavone
19 ^{ab}	5.77	270.0528	[M+H] ⁺ 271.0606	271.0583, 171.0278, 153.0179, 150.0430, 147.0450, 121.0653, 117.0319, 115.0548, 108.0416, 91.0603, 83.0162, 77.0344, 68.9990, 67.0224, 65.0368, 55.0187	Apigenin
20	5.89	330.074	[M+H] ⁺ 331.0818	301.0362, 182.9940, 154.9984	Thymusin
21 ^a	6.17	300.0634	[M+H] ⁺ 301.0712	301.0718, 286.0477, 257.0461, 258.0529, 229.0501, 153.0195	Diosmetin

22 ^b	6.17	302.079	[M+H] ⁺ 303.0712	117.0332, 145.0290, 149.0599, 153.0176, 177.0557, 77.0395, 89.0390, 258.0426, 287.0529	Hesperetin
23	6.32	360.0845	[M+H] ⁺ 361.0923	361.0920, 346.0682, 331.0464, 316.0246, 300.0560, 256.0791, 213.0582, 182.9943, 155.0040, 145.0277	5,6,4'-Trihydroxy-7,8,3'-trimethoxyflavone
24	6.96	344.0896	[M+H] ⁺ 345.0974	329.0669, 314.0432, 168.0055	4'-O-Demethylgardenin D
25 ^b	7.28	360.0845	[M+H] ⁺ 361.0923	331.0431, 313.0326, 288.0266, 197.0058, 151.0024, 145.9881, 126.9887	5,3',4'-Trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone
26	7.79	374.1002	[M+H] ⁺ 375.108	359.0836, 345.0598, 342.0796, 329.0310, 326.0474, 270.0751, 258.0877, 211.0796, 199.0714, 182.9908, 171.0831, 163.0775, 154.9993, 152.0672, 128.0620, 147.0487	5,6-Dihydroxy-7,8,3',4'-tetramethoxyflavone
27	7.84	344.0896	[M+H] ⁺ 345.0974	345.0963, 330.0732, 312.0635, 297.0327, 284.0699, 269.0439, 241.0488, 197.0002, 185.0652, 169.0108, 151.0368, 148.0524, 136.0137, 113.0190, 108.0217	Xanthomicrol
28	8.31	374.1002	[M+H] ⁺ 375.1080	105.0721, 148.0440, 153.0676, 165.0132, 178.9653, 330.0325, 342.0706, 347.0806, 375.1082, 99.0419	Gardenin D
29 ^a	8.42	284.0685	[M+H] ⁺ 285.0763	285.0761, 270.0515, 242.0578, 241.0505,	Acacetin

				213.0562, 153.0186, 133.0653	
30	8.64	344.0896	[M+H] ⁺ 345.0974	315.0500, 312.0648, 240.0797, 182.9918, 169.0658, 154.9995, 133.0641	Pebrellin
31	9.24	358.1053	[M+H] ⁺ 359.1131	298.0831, 162.0677	5-Hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone
32	9.99	388.1158	[M+H] ⁺ 389.1236	359.0778, 343.0460, 341.0677, 331.0814, 326.0457, 316.0575, 298.0509, 197.0084, 178.9986, 169.0135, 163.0764, 151.0038, 148.0516, 113.0248	5-Hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone
33 ^b	10.96	358.1053	[M+H] ⁺ 359.1131	359.1128, 329.0676, 298.0843, 286.0447, 197.0095, 169.0137, 151.0023	Gardenin B

^a 与对照品相比

^b 薄荷样品中首次检出

图4-3(A)表现了33个成分的聚类分组情况，聚类图的底部包含了所有数据集，聚类图的枝干部分代表了一个数据点。聚类图可以视作由多个子聚类组成。薄荷样品中检出的33个成分中，其中30个成分能依据结构相似性成功分成7组。分组情况详见表4-3。

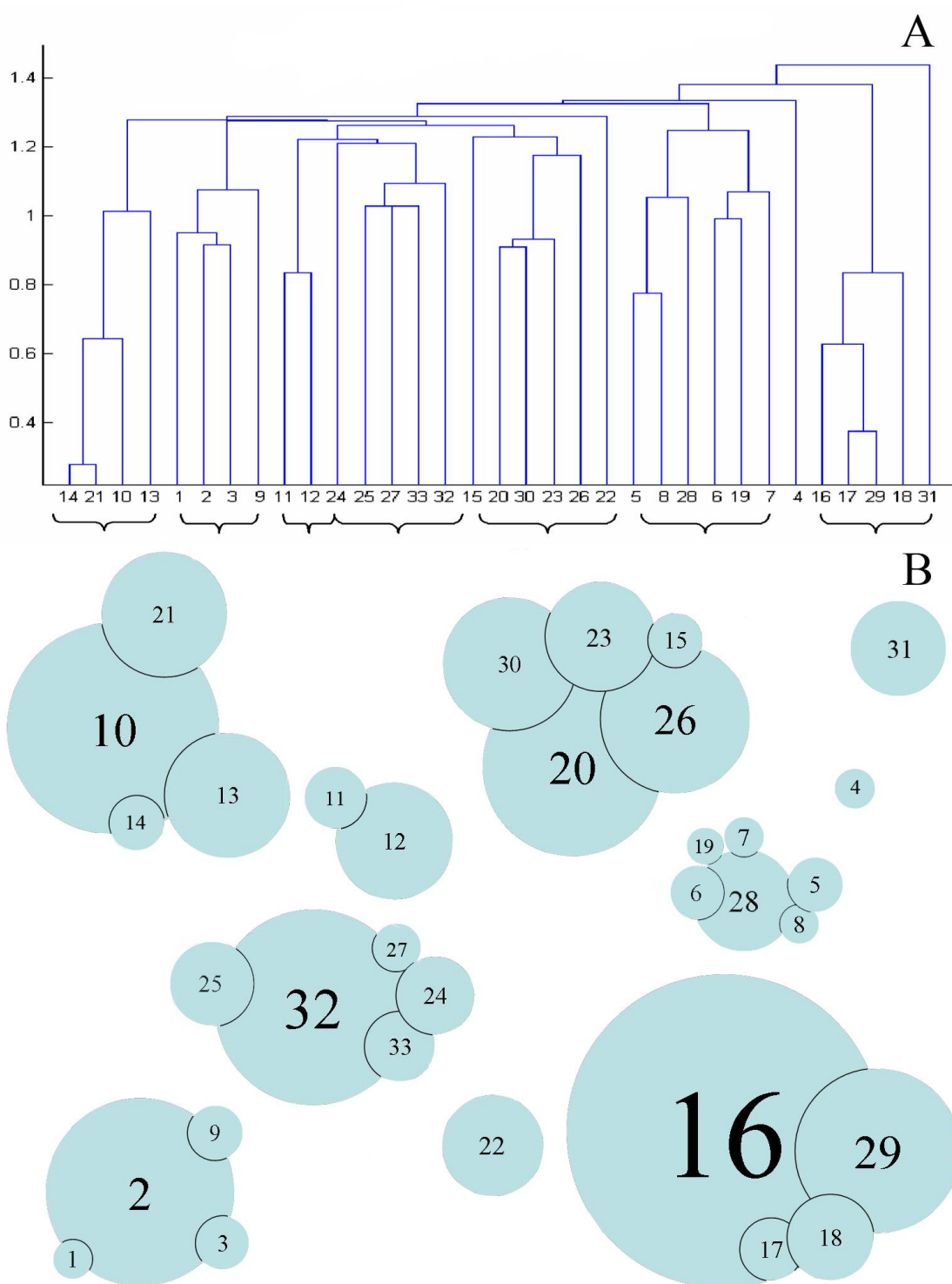


图 4-3. 基于结构分类法对薄荷提取物中的复杂成分的分类 (A) 和半定量结果 (B)

Figure 4-3. Classification of the multiple components detected in *Mentha haplocalyx* extract, based on structural clustering (A) and semi-quantification techniques (B), the area of each circle is in proportion to each constituent's content

表 4-3. 薄荷提取物中复杂成分基于结构相关性的分组结果

Table 4-3. Classification of the multiple complex components in samples of *Mentha haplocalyx* extract

Group no.	Group members	Identical common ions	Core component
1	14, 21, 10, 13	153, 229, 258, 286, 301, 463	14 ^a
2	1, 2, 3, 9	134, 135, 179	9
3	11, 12	73, 123, 132, 133, 161, 177, 179, 197, 359	12 ^a
4	24, 25, 27, 33, 32	151, 197, 331, 169, 148	27
5	15, 20, 30, 23, 26	155, 183, 301	23
6	5, 8, 28, 6, 19, 7,	69, 153, 271, 105, 287, 449	28
7	16, 17, 29, 18	153, 242, 270, 285	29 ^a

^a 标准品

根据核心化合物选择理论，即：选择高结构相似度，高质谱强度，具有丰富碎片信息，或者具有对照品做对照的原则，核心化合物很容易地选出。根据图4-3，在所有的7组化合物当中，组1,3,4,7分别选择了相似性最大的化合物作为核心化合物；然而在第5组中，C20（即编号为20的化合物），C23 和C30都享有相同的共同离子，并且都具有相似的强度，丰富的碎片以及合适的分子量，因此，这三个化合物都可选做核心化合物。

每组的核心化合物均在表4-3中列出。这些核心化合物的结构优先鉴定，然后根据组内其他化合物与之的关系，进一步解析组内其他化合物。

只有3个成分不能够被分组，即C4，C22和C31。这些化合物可以根据第三部分的步骤6解析出化合物结构。

（二）半定量解析

采用峰面积法半定量33个解析出结构的化合物。半定量结果如表4-4所示。所鉴定出的成分大多为多酚类物质，包括酚酸类和黄酮类。其中，酚酸类成分在负离子模式下成功检出，黄酮类成分在正离子模式下响应较强。

图4-3 结合了聚类分析以及半定量分析的结果，既能够反映出组内成分的结构相似性，又能体现出各成分间量的差异(图4-3B)。图中，每个泡泡代表一个被检出的化合物，多个泡泡粘在一起形成一个组，表明它们之间相对于其他化合物，有着较高的结构相似性。泡泡的大小与该化合物在样品中的含量成比例。

表 4-4. 薄荷提取物的半定量分析结果

Table 4-4. Semi-quantification data for samples of *Mentha haplocalyx* extract

No.	Compound	Positive mode	Negative mode
1	Caffeic acid	-	224.3
2	Scopoletin	-	5287.0
3	Danshensu	-	418.0
4	Vanillylmandelic acid	-	165.1
5	Luteolin-7-O-rutinoside	173.8	-
6	Isorhoifolin	161.2	-
7	Apigenin-7-O-glucoside	58.1	-
8	Luteolin-7-O-glucoside	32.0	-
9	Salvianolic acid B	-	177.9
10	Diosmin	8141.6	-
11	Salvianolic acid L	-	567.0
12	Rosmarinic acid	-	1709.1
13	Hesperidin	1962.5	-
14	Diosmetin-7-O-glucopyranoside	435.5	-
15	5,6,4'-Trihydroxy-7-methoxyflavone	381.2	-
16	Buddleoside	11913.6	-
17	Tilianine	1271.9	-
18	5,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavone	177.6	-
19	Apigenin	75.0	-

20	Thymusin	4865.6	-
21	Diosmetin	2288.7	-
22	Hesperetin	663.4	382.3
23	5,6,4'-Trihydroxy-7,8,3'-trimethoxyflavone	1424.2	-
24	4'-O-Demethylgardenin D	451.8	-
25	5,3',4'-Trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	821.2	-
26	5,6-Dihydroxy-7,8,3',4'-tetramethoxyflavone	2668.5	-
27	Xanthomicrol	201.2	-
28	Gardenin D	2873.0	-
29	Acacetin	4267.7	-
30	Pebrellin	2355.3	-
31	5-Hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone	5290.2	-
32	5-Hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone	1587.8	-
33	Gardenin B	399.3	-

(三) 结构解析及相关结构的比较

为了进一步研究不同成分的质谱裂解规律，采集8个标准品，即：咖啡酸，迷迭香酸，橙皮苷，香叶木素-7-O-葡萄糖苷，香叶木素，蒙花苷，芹菜素，刺槐素正负离子 MS^E 模式下的图谱。样品中的8个成分通过与标准品图谱对照，能够迅速得到鉴定结果。样品中的其他成分通过元素组成分析， MS^E 高低碰撞能量图谱、或者质谱二级扫描图谱与文献对比的方法进行鉴定。

组1中含有C14, C21, C10, 和C13, 其中化合物14和化合物21与组内化合物都有较高相似性，并且都有标准品作为对照。由于C14能够产生更多的碎片，所以选择C14作为组1的核心化合物。C14与C21相比相差 $C_6H_{10}O_5$ 部分；C14加上 $C_6H_{10}O_4$ 结构部分能够转化为C10。所有这些组内化合物碎片离子中都有几个共同碎片离子，表明它们具有相似的黄酮结构母核。由于已知C14为香叶木素-7-O-葡萄糖苷，因此，C10和C21相继鉴定为香叶木素和香叶木苷。C13有着黄酮类特有的RDA反应，而且与C14有相同的碎片离子

153.0179，此外，另一个碎片离子149.0599与C14的RDA反应另一部分特征碎片相差2 mDa，这意味着分子结构可能相差2H，因此，C13可以被推断为橙皮苷。这与文献中报道^[23-24]相一致。结构推断关系如图4-4所示。化合物的碎片验证如图4-5所示。

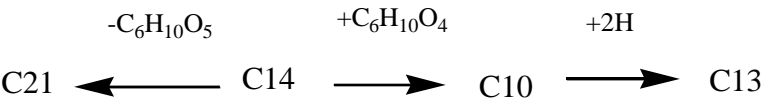


图4-4. 组1中结构相关化合物之间的关系

Figure 4-4. Diagram showing the structural relationships between each member of group 1.

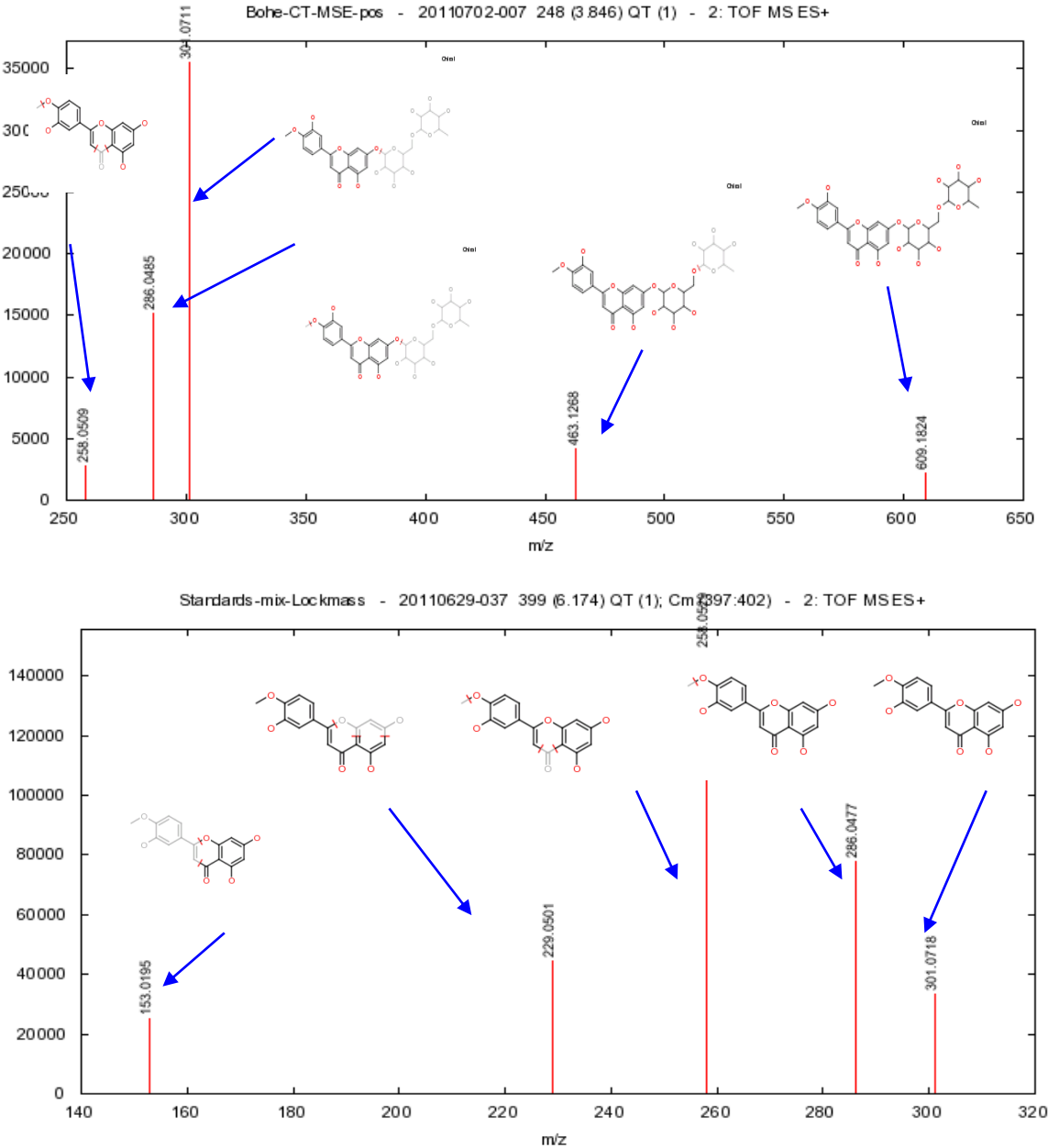


图 4-5. C10, C21的质谱高能碎片结构验证过程

C9是组2的核心化合物，(质谱碎片信息如图4-6) 因此首先需解析出C9的化合物结构。C9与C1相比有着共同的碎片离子135.0419 和179.0307。这两个碎片均为酚酸类成分的特征碎片。基于分子量信息，C9有可能是几个基本结构的聚合体，基本结构可能类似于丹参素，咖啡酸等。主要碎片为酯键的断裂，包括a键断裂和b键断裂，分别丢失丹参素[M-H-198]⁻ 和[M-H-198-16]⁻。随后的鉴定步骤采用一般解析步骤和中性丢失比较，可能的C9碎片裂解过程如图4-7所示。

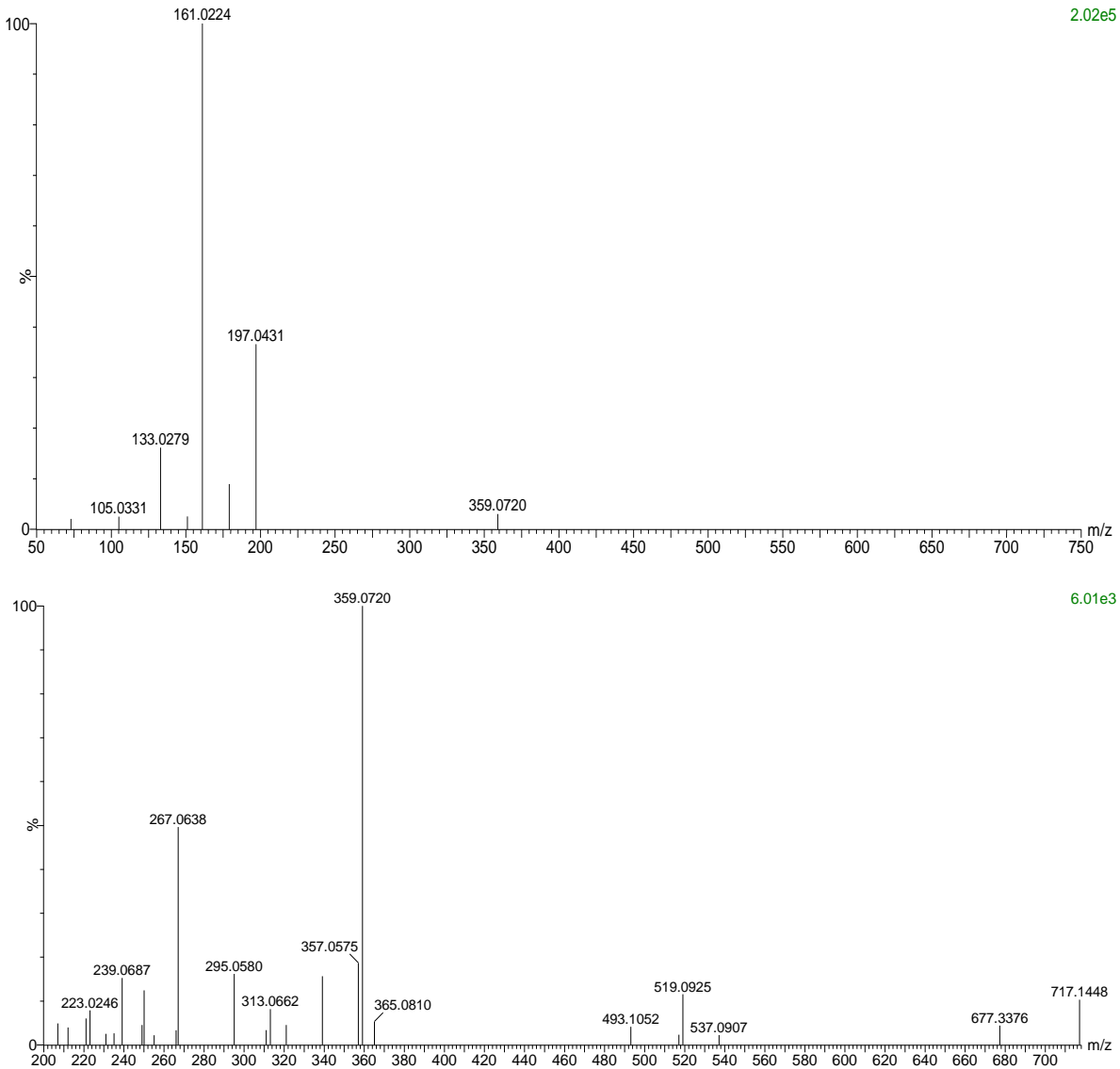


图 4-6. C9 化合物的质谱碎片信息

三、分析与讨论

1. 中药化学组成较为复杂,化合物类别范围较广,因此采用梯度洗脱分离待测样本。在高效液相检测方法中,采用5%磷酸作为流动相。由于磷酸为不挥发性酸,易对质谱造成污染,故质谱检测中分别考察了易挥发试剂(甲酸、乙酸铵)替代磷酸。质谱的检测灵敏度取决于被测化合物的离子化程度,而在流动相中加入易挥发试剂有助于化合物的离子化,提高质谱响应,有助于薄荷中含量极少化合物的检测。

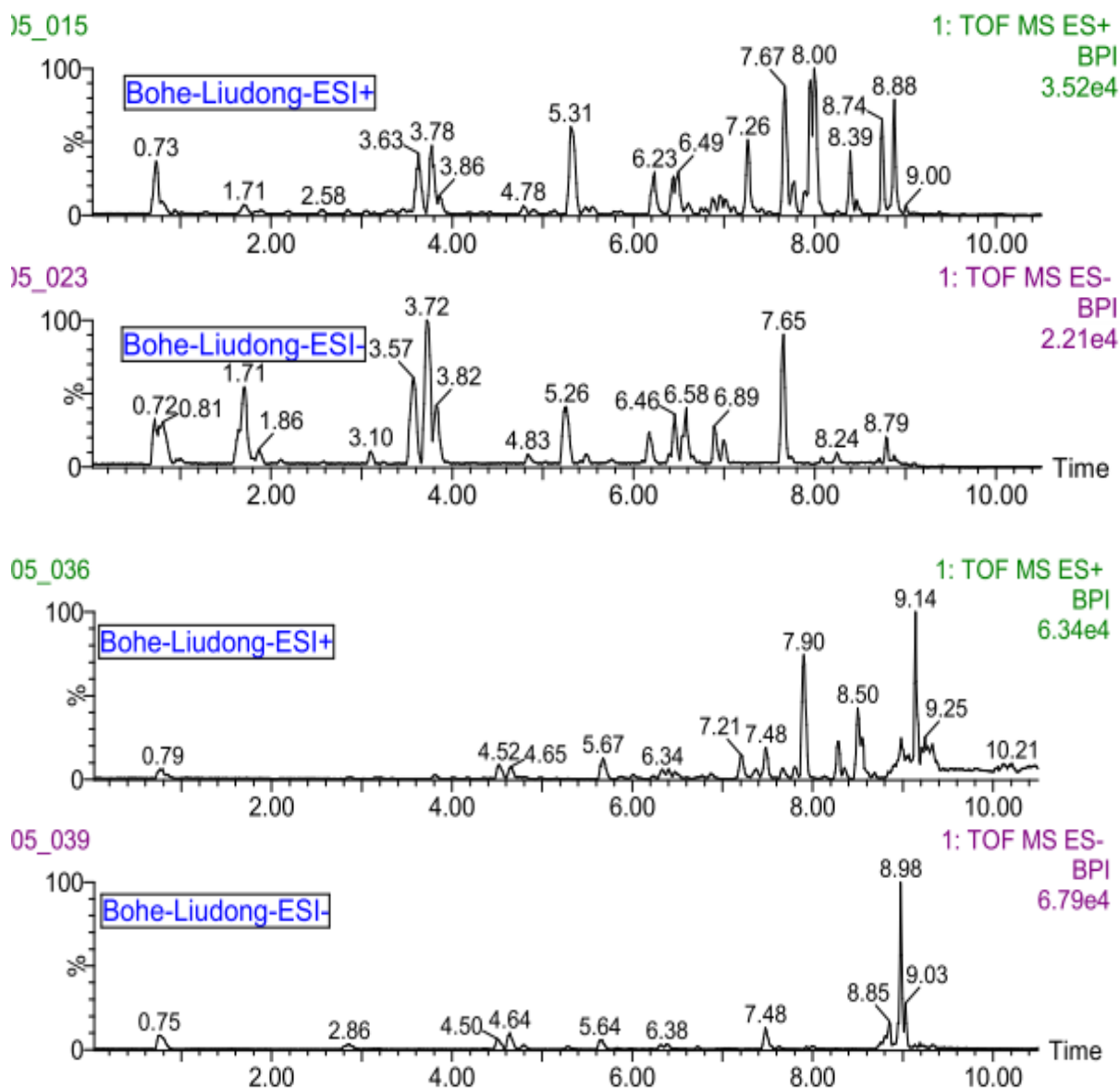


图4-8 甲酸系统、乙酸铵系统质谱正负离子模式对比

如图4-8所示,其中,甲酸系统在正负离子模式下检出化合物较多,干扰较少,故采用甲酸系统检测样品。此外,实验中考察甲醇-水、乙腈-水系统,发现乙腈-水可使薄

荷中各色谱峰得到较好分离，甲酸的加入可以优化峰形；通过化合物数据库可知目标化合物的相对分子质量范围，在既定的分子量范围进行质谱扫描，能够减少噪音，降低本底，增加色谱峰的分度。本文考察了不同离子化模式对分析结果的影响，结果发现，在正离子模式下黄酮类成分响应较好，而酸类成分在负离子模式下可获得较好的质谱信号，因此，本实验中采用正负离子模式分别扫描检测样品。

2. 飞行时间质谱可以提供待测化合物的精确分子量，进而匹配出化合物的可能分子式，结合自主编写的结构相似性分类软件，能够快速根据质谱碎片信息分析出化合物结构的相近程度，因此在有限标准品，或者缺少标准品的情况下，实现中药提取液中各类成分的快速定性分析。通过对液质联用结果的分析发现，薄荷提取液中主要含有多酚类化合物，即黄酮类、酚酸类及其他小分子化合物。

3. 半定量分析部分采用了泡泡图形式，二维信息的模式能够直观的快速反应化合物分组信息和含量信息。薄荷提取液中，黄酮类成分中，香叶木苷，蒙花苷，百里香新，的含量相对较高；酚酸类成分中迷迭香酸含量较高。

4. 本试验中讨论了黄酮类以及酚酸类的可能质谱裂解过程。通过质谱碎片信息可以看出，苷和对应的苷元之间有紧密的结构联系，酚酸类成分存在有较多的共同碎片离子。

5. 本文通过UPLC-Q-TOF/MS从薄荷提取液中成功鉴定出33个化合物，其中，30个化合物能成功依据结构相似性理论分为7组，选择每组的核心化合物，利用组内成分的结构相似性关系能够简化质谱解析过程，并通过对照品、质谱二级或高能量碎片和文献数据对鉴定出的化合物进行最终结构验证。

四、小结

本部分中，首次以泡泡图形式表达质谱半定量信息，这种二维信息的模式能够简洁明了反映化合物的结构分类信息，同时还能直观的比较该物质在样本中的含量信息。薄荷提取液中，30个化合物能成功依据结构相似性理论分为7组，选择每组的核心化合物，利用组内成分的结构相似性关系能够提高质谱解析效率。并通过UPLC-QTOF/MS结合化合物结构相似性分类法，从薄荷提取液中成功鉴定出33个化合物。

结论

第一，本文建立了薄荷挥发油气相色谱指纹图谱方法。对不同产地10批薄荷饮片进行气相指纹图谱分析，并通过指纹图谱相似度评价软件建立了薄荷挥发油气相指纹图谱共有模式。其中，薄荷挥发油存在15个共有指纹峰。薄荷挥发油气相色谱指纹图谱的建立为薄荷传统有效成分的整体质量控制提供了依据。

第二，本文建立了薄荷饮片的高效液相色谱指纹图谱方法。对不同产地12批薄荷饮片进行高效液相指纹图谱测定，通过指纹图谱相似度计算评价软件建立其中11批薄荷液相指纹图谱共有模式，其中薄荷非挥发性成分有19个共有峰；采用对照品对照的方法对其中6个峰进行指认，即：咖啡酸、香叶木苷、橙皮苷、迷迭香酸、蒙花苷及香叶木素。薄荷液相色谱指纹图谱的建立为整体控制薄荷饮片的质量提供了依据。其中第8批样品叶部分含量比较多，故高效液相指纹图谱相似性与其余批次样品有差别。

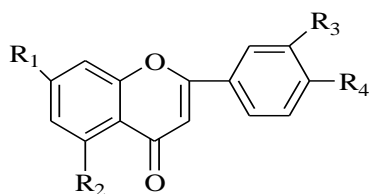
第三，本文首次提出基于结构相似性原理编写质谱辅助解析软件，通过共有离子搜索、化合物两两对比、化合物结构相似性聚类三个功能模块共同解析质谱碎片信息，实现了复杂样本的物质群分类，全方位多角度诠释质谱碎片信息。通过物质群分组信息、核心化合物的选择，诠释中药复杂样本中化合物之间固有的结构关联，辅助解析质谱数据。并通过验证试验论证了基于软件方法解析质谱数据的可行性和稳定性。化合物结构相似性分类软件成功实现中药复杂样本的化合物组群分类，从而为简化质谱解析流程，提高中药复杂成分的质谱解析效率提供了新思路。

第四，首次结合自主编写的结构相似性分类软件，采用UPLC-QTOF/MS方法分析鉴定薄荷中非挥发性组分。本文从薄荷提取液中成功鉴定出33个化合物。依据结构相似性分类策略，30个化合物可分为7组，各组内成分均有较高的结构相似程度，选择各组的核心化合物，利用组内成分与核心化合物、或化合物之间的内在固有结构关系，通过共有离子碎片对比，能够快速解析质谱数据、鉴定化合物结构；其中，样品中鉴定出9个微量成分，为薄荷中首次报道。

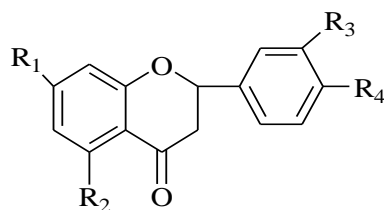
本文首次采用泡泡图形式反映薄荷样本中各成分含量以及各组物质群信息，二维信息的模式能够直观的反映出化合物基于结构相似性分类信息和半定量对比结果。

该方法可以快速分析并鉴定中药复杂样本中的化合物，并能对样本中的化合物间固有的结构关系和质谱裂解规律、化合物含量等有全方位的了解，为中药、植物药物复杂样本及相关制剂的质谱解析提供了一种全新的思路和解决办法。

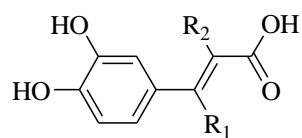
附图



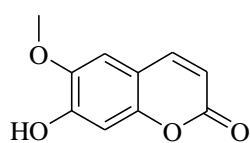
No.	Compound	Formula	R1	R2	R3	R4
5	Luteolin-7- <i>O</i> -rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	OGluRha	OH	OH	OH
6	Isorhoifolin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	OGluRha	OH	H	OH
7	Apigenin-7- <i>O</i> -glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	OGlu	OH	H	OH
8	Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	OGlu	OH	OH	OH
10*	Diosmin	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	OGluRha	OH	OH	OCH ₃
14	Diosmetin-7- <i>O</i> -glucopyranoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	OGlu	OH	OH	OCH ₃
16*	Buddleoside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	OGluRha	OH	H	OCH ₃
17	Tilianine	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	OGlu	OH	H	OCH ₃
18	5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	OCH ₃	OH	H	OH
19	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	OH	OH	H	OH
21	Diosmetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	OH	OH	OH	OCH ₃
29*	Acacetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	OH	OH	H	OCH ₃



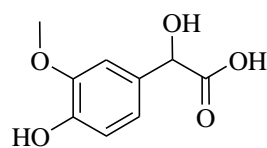
No.	Compound	Formula	R1	R2	R3	R4
13*	Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	OGluRha	OH	OH	OCH ₃
22	Hesperetin	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	OH	OH	OH	OCH ₃



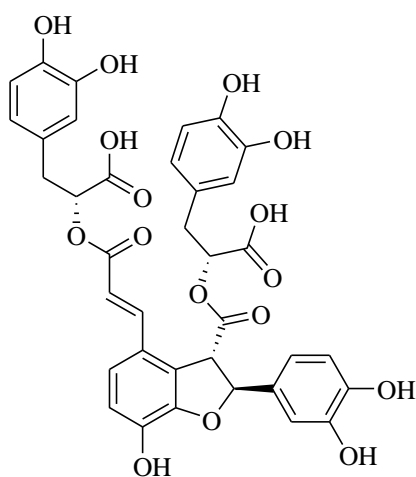
No.	Compound	Formula	R1	R2
1*	caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	H	H
3	danshensu	C ₉ H ₁₀ O ₅	H	OH



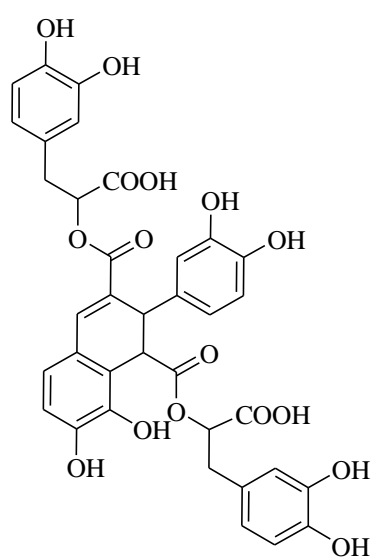
2 Scopoletin C₁₀H₈O₄



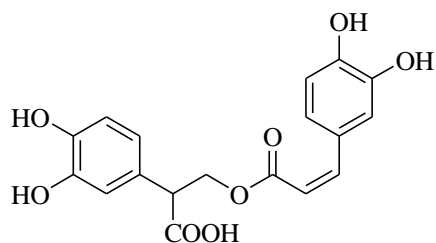
4 Vanillylmandelic acid C₉H₁₀O₅



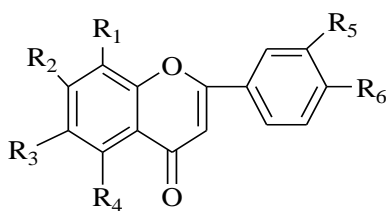
9 salvianolic acid B C₃₆H₃₀O₁₆



11 salvianolic acid L C₃₆H₃₀O₁₆



12* rosmarinic acid C₁₈H₁₆O₈



No.	Compound	Formula	R1	R2	R3	R4	R5	R6
15	5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	H	OCH ₃	OH	OH	H	OH
20	Thymusin	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	H	OH
23	5,6,4'-trihydroxy-7,8,3'-trimethoxyflavone	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	OH
24	5,3'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	H
25	5,3',4'-trihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OH
26	5,6-dihydroxy-7,8,3',4'-tetramethoxyflavone	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃
27	xanthomicrol	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	OH
28	gardenin D	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃
30	pebrellin	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	OCH ₃	OCH ₃	OH	OH	H	OCH ₃
31	5-hydroxy-6,7,3',4'-tetramethoxyflavone	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃
32	5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentamethoxyflavone	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃
33	gardenin B	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	OCH ₃

附图 1. 薄荷提取物中鉴定出成分的化学结构

Figure S1. Chemical structures of compounds identified in *Mentha haplocalyx* extract.

参考文献

1. 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, 2010.
2. 梁呈元, 李维林, 张涵庆, 等. 薄荷化学成分及其药理作用研究进展. 中国野生植物资源, 2003, 22(3): 9-12.
3. Edris AE , Farrag ES. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung*, 2003, 47(2) : 117~121.
4. Schuhmacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type1 and type2 in vitro. *Phytomedicine*, 2003, 10 (6-7): 504-510.
5. Berselli P R, Zava S, Montorfano G, et al. A mint purified extract protects human keratinocytes from short-term, chemically induced oxidative stress. *J Agric Food Chem*, 2010, 58: 11428-11434.
6. She G M, Xu C, Liu B, et al. Polyphenolic acids from mint (the aerial of *mentha haplocalyx* Briq.) with DPPH radical scavenging activity. *Journal of Food Science*, 2010, 75(4): 359-362.
7. Dorman H J, Kosar M, Baser K H, et al. Phenolic profile and antioxidant evaluation of *mentha x piperita* L.(peppermint) extracts. *Natural Product communications*, 2009, 4(4): 535-542.
8. Amabeoku G J, Erasmus S J, Ojewole J A, et al. Antipyretic and antinociceptive properties of *mentha longifolia* huds.(lamiaceae) leaf aqueous extract in rats and mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2009, 31(10): 645-649.
9. Lee M Y, Lee J A, Seo C S, et al. Protective effects of *mentha haplocalyx* ethanol extract in a mouse model of allergic asthma. *Phytotherapy Research*, 2011, 25: 863-869. (Phytother Res)
10. McKay D L, Blumberg B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*mentha piperita* L.). *Phytother Res*, 2006, 20: 619-633.
11. Grigoleit H G, Grigoleit P. Pharmacology and preclinical pharmacokinetics of peppermint oil. *Phytomedicine*, 2005, 12: 612-616.

12. Baliga M S, Rao S. Radioprotective potential of mint: a brief review. *Journal of cancer research and therapeutics*, 2010, 6(3): 255-262.
13. Qi L W, Yu Q T, Li P, et al. Quality evaluation of Radix Astragali through a simultaneous of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1134: 162-169.
14. Wang Y, Yang L, Wang Z T, et al. Characterization of fifty-one flavonoids in a Chinese herbal prescription Longdan Xiegan Decoction by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and photodiode array detection. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(12): 1767-78.
15. Li S L, Lai S F, Song J Z, et al. Decocting-induced chemical transformations and global quality of Du-Shen-Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC-Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 53(4): 946-957.
16. Yang L, Wang Y, Wang L, et al. Rapid quantification of iridoid glycosides analogues in the formulated Chinese medicine Longdan Xiegan Decoction using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 2098-103.
17. Krzyzanowska J, Janda B, Pecio L, et al. Determination of polyphenols in menthe longifolia and M. piperita field-grown and in vitro plant samples using UPLC-TQ-MS. *Journal of AOAC International*, 2011, 94(1): 43-50.
18. Hao H P, Cui N, Wang G J, et al. Global detection and identification of nontarget components from herbal preparations by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry and a strategy. *Anal Chem*, 2008, 80: 8187-8194.
19. Zheng C N, Hao H P, Wang X, et al. Diagnostic fragment-ion-based extension strategy for rapid screening and identification of serial components of homologous families contained in traditional Chinese medicine prescription using high-resolution LC-ESI-IT-TOF/MS: Shengmai injection as an example. *J Mass Spectrom*, 2009, 44, 230-244.
20. Zhou J L, Qi L W, Li P. Herbal medicine analysis by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 7582-7594.

21. Cheng X L, Wan J Y, Li P, et al. Ultrasonic/microwave assisted extraction and diagnostic ion filtering strategy by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of flavonoids in *Spatholobus suberectus*. *J Chromatogr A*, 2011, doi:10.1016/j.chroma.2011.06.091.
22. Wang H, Feng F. Identification of components in Zhi-Zi-Da-Huang decoction by HPLC coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, photodiode array and fluorescence detectors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, 49: 1157
23. 林彤, 段金廛, 钱大玮, 等. HPLC-MS/MS联用技术分析鉴定苏薄荷中的黄酮类成分. *中国天然药物*, 2006, 4(2): 111-115.
24. Hvattum E, Ekeberg D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, 2003, 38: 43-49.

致谢

三年寒暑，转瞬即逝，当我完成学业即将告别校园之际，首先要感谢导师丛晓东副教授和蔡宝昌教授。三年来，导师们无论在学习、工作还是生活中都给了我极大的关怀和帮助。导师们严谨的治学态度、开阔的思维、高度的敬业精神、正直豁达的人生态度给我留下了难以磨灭的印象。

特别感谢曹岗老师、杜伟峰老师对我实验的关心与耐心指导，提供了出色的实验平台，开阔了学术思维，并为我实验中遇到的困惑答疑解惑，以及对我论文完成过程不厌其烦的指导。

感谢我的同学华一卉、赵耀东、程亮、李晓萌、郭昊、陈雪怡、迟宗良、王苗苗，与你们朝夕相处让我明白什么叫同窗情谊，什么叫手足情深。感谢让我遇见你们每一个人，因为你们，我的三年研究生生活欢乐多多，从不寂寞。

感谢中药炮制技术研究中心以及中药饮片厂的所有员工给予我的帮助。

感谢浙江中医药大学为我提供了良好的学习和深造的机会，感谢浙江中医药大学各位领导和老师的关怀和支持。

感谢所有帮助和支持过我的朋友。

特别感谢我的家人，他们一如既往的支持，使我最终顺利完成学业。

在本文即将完成之际，向所有关心过我的人致以诚挚的谢意！

文献综述

液相-质谱联用技术在中药研究中的应用

中药是来源于自然，不经或经少量加工炮制而得的天然药物。中药蕴含着中华民族几千年的医疗实践经验，为中华民族的繁衍生息作出了巨大贡献，并因其副作用少、疗效广泛、具有调理保健作用的特点，逐渐被西方文化所接受。中药的化学成分是发挥药效作用的物质基础，迄今为止人们已对中药进行了大量的化学研究，并从单味中药中分离得到大量化合物，其中不少已应用于临床。但由于每一种中药所含化学成分复杂，很多成分含量较低，然而中药的临床应用经常存在多靶点多功效的情况，有可能是由中药中各成分协同作用导致，亦或是中药中单一或多个成分作用于体内不同靶点产生的效果。随着时代和现代检测技术的进一步发展，人们越来越认识到全面研究中药组分的必要性。

常规研究中药成分的分析手段如着眼于微观植物结构的显微鉴别、电镜技术；也有宏观的定性定量手段，如薄层色谱法、高效液相色谱法、气相色谱法、毛细管电泳技术等。然而中药中众多的微量、痕量活性成分为分析人员提出了更高的要求。液相-质谱联用技术能够结合液相的分离、定量能力和质谱的高分辨率、检测范围广等定性鉴别特点，广泛应用于各类样本的定性定量中。采用现代科学技术和高端仪器，探索中药中的传统药用组分之外的潜在活性成分有可能将人们带入新的研究领域，开发出新的药用成分，因此，以液相-质谱联用手段、全局研究的策略来探索中药中非挥发性组分具有重要的意义。

1. 药材分析

1.1 鉴定 Dan等[1]采用UPLC-ESI-MS方法分析鉴定三七中的皂苷组分，并采用多变量统计分析法区分三七不同部分的皂苷成分差异；统计结果显示，三七不同部位（花、茎、根）中的差异主要是由三七皂苷R4，三七皂苷Fa等成分导致。基于UPLC-ESI-MS方法的植物代谢产物分析能够揭示出基因差异、季节、种植方法以及地理因素对三七药材质量的影响；并成功鉴定出三七中25个皂苷类成分。Yang等[2]采用液相串联三重四级杆-线性离子阱质谱鉴定北沙参中的香豆素成分，首先对10个香豆素标准品（包括两个同分异构体）质谱裂解规律和色谱洗脱规律进行研究；采用多离子检测-子离子加强模式和母离子检测-子离子加强模式结合考察分析北沙参提取物。依据质谱裂解规律鉴定

出北沙参中41个香豆素类成分。Cao等[3]采用液相串联飞行时间质谱对山茱萸生品和炮制品的成分进行全局检测和鉴定。生品和制品中的39个成分被鉴定出，并对炮制过程中的几个可能影响因素进行了考察，实验结果表明炮制过程中发生的化学变化能够反映山茱萸的炮制机理，并与炮制条件密切相关。

1.2 定量 Song等[4]对5类忍冬花蕾中的环烯醚萜苷类成分进行定量分析。文中建立了毛细管液相质谱联用方法，依据保留时间、质谱分子离子和质谱裂解碎片对忍冬中马钱苷等8个环烯醚萜苷类成分在负离子模式下进行分析。定量限为1.9ng/ml，在选择性离子检测模式下，检测范围内的校正曲线都有显示出较好的线性关系 ($r^2 > 0.9938$)。Krzyzanowska等[5]对田间栽培、试管培养、愈伤组织、细胞混悬组织培养条件下的欧薄荷和胡椒薄荷中多酚类成分进行UPLC-TQ-MS定量测定。测定9种多酚类组分含量，其中田间栽培的两种薄荷含有多酚类成分含量较多，而试管培养、愈伤组织、细胞混悬组织培养条件下的含量较少。迷迭香酸在所有样本中均为主要成分。研究表明，在体外培养条件下，酚类成分的代谢经历了本质的改变。

2. 复方分析

2.1 定性 Wang等[6]采用配备二级阵列管和荧光检测器的液相串联电喷雾质谱分析鉴定梔子大黄汤中的成分。采用正负离子扫描，0.1%醋酸-甲醇梯度洗脱程序，根据保留时间，紫外光谱，荧光特征，提取离子流图，分子质量以及质谱碎片，鉴定出17个黄酮、5个蒽醌、2个香豆素和6个环烯醚萜类化合物，并提出可能的质谱碎裂规律。总结出的质谱碎裂规律可以应用于不同植物或复方，用来在缺少对照品的情况下鉴别复杂体系中的该类未知化合物。Zheng等[7]采用液相高分辨串联飞行时间质谱技术手段，结合诊断离子方法快速筛选鉴定生脉注射液中的同种属化合物。诊断离子策略的关键是能将复杂化合物分到已知化合物类别中，能简化现有的结构鉴定程序。首先对15个标准品以及五味子提取物进行分析，建立人参皂苷以及木脂素化合物结构分类库，随后利用诊断离子策略结合质谱分析方法，从生脉注射液样本中鉴定出超过30个人参皂苷以及20个木脂素类成分。

2.2 定量 Xu等[8]采用液相串联质谱分析大承气汤给药后大鼠血浆中的5个活性成分含量。建立了LC-ESI/MS/MS的厚朴酚，和厚朴酚，大黄素，大黄酸和芦荟大黄酸5种成分的血浆样品同时测定方法。格列喹酮作为内标，所有血浆样品采用蛋白沉淀的

方法进行预处理，以甲醇-0.1%甲酸 70: 30的条件洗脱，负离子选择性离子检测的模式同时测定。方法学验证表明，该方法能够成功测定大承气汤中5种成分的血浆中含量。

3 体内药物分析

3.1 代谢物鉴定 Gong等[9]采用化学组学和代谢组学结合策略解析复杂混合物的生物代谢网络。液相飞行时间质谱技术作为检测手段，结合创新方法策略共同分析大鼠给药脉络宁注射液后血浆中的代谢成分。该策略包括五个数据解析步骤：原始数据输出，内源性背景扣除，原化合物和代谢产物区分，化学组学和代谢组学关联，以及手动质谱碎片对比验证。其中，化学组学和代谢组学关联为关键步骤，具体方法是通过比对已知代谢途径的代谢产物分子质量，并经过碎片离子验证确定可能存在的代谢产物。脉络宁注射液大鼠给药后，从大鼠尿液中鉴定出162个代谢产物，其中143个通过手动匹配质谱碎片的方式得到了验证。Ni等[10]采用UPLC-QTOF-MS的方法鉴定大鼠灌胃给予连钱草提取物后的血浆及尿液代谢物。连钱草提取物中共有21个成分吸收入血，采用标准品对照，以及文献对照的方法成功鉴定出9个原型化合物和80个代谢产物。

3.2 药动学考察 Wang等[11]通过UPLC-QTOF/MS及模式识别方法对茵陈蒿汤给药的大鼠血浆进行多组分药动学筛选。采用半定量方法测定单次给药后的多组分血浆含量，并通过聚类分析及主成分分析方法评价药动学差异。该方法能成功监测21个原型化合物的血浆含量，通过比较体内成分的血药浓度的动态组成，其中的9种成分确定为目标化合物。该方法能够筛选出生物体内具有潜在药理活性的物质，为以后的植物产品中的新药研发提供新的思路。Zheng等[12]通过LC-MS/MS方法检测大鼠血浆中的京尼平酸含量，并应用于药动学研究中。其中，京尼平苷被选为内标化合物，固定相萃取处理血浆样品，采用负离子多反应检测模式，质谱转化检测为：京尼平酸 373.3-211.1；内标387.3-225.3。定量限为5 ng/ml，线性范围 10-4000 ng/ml，日间日内准确度和精密度小于±10%，方法学验证表明，该定量方法稳定，可靠。京尼平酸的药动学参数为： C_{\max} 3542.27±267.27 ng/ml; T_{\max} 1.00±0.00 h; $t_{1/2}$ 1.51±0.07 h; 消除常数 0.46±0.02 h⁻¹; AUC_{0-∞} 11173.90±964.23 ng·h/ml。

参考文献

1. Dan M, Su MM, Gao XF, et al. Metabolite profiling of *Panax notoginseng* using UPLC-ESI-MS. *Phytochemistry*, 2008, 69: 2237.
2. Yang W, Ye M, Liu M, et al. A practical strategy for the characterization of coumarins in *Radix Glehniae* by liquid chromatography coupled with triple quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 4587
3. Cao G, Zhang CR, Zhang Y, et al. Global detection and identification of components from crude and processed traditional Chinese medicine by liquid chromatography combined with hybrid ion trap and time-of-flight-mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2011, 34:1
4. Song Y, Li SL, Wu MH, et al. Qualitative and quantitative analysis of iridoid glycosides in the flower buds of *Lonicera* species by capillary high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detector. *Anal Chim Acta*, 2006, 564: 211
5. Krzyzanowska J, Janda B, Pecio L, et al. Determination of polyphenols in *mentha longifolia* and *M. piperita* field-grown and in vitro plant samples using UPLC-TQ-MS. *Journal of AOAC International*, 2011, 94(1): 43.
6. Wang H, Feng F. Identification of components in *Zhi-Zi-Da-Huang* decoction by HPLC coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, photodiode array and fluorescence detectors. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2009, 49: 1157
7. Zheng C N, Hao H P, Wang X, et al. Diagnostic fragment-ion-based extension strategy for rapid screening and identification of serial components of homologous families contained in traditional Chinese medicine prescription using high-resolution LC-ESI-IT-TOF/MS: Shengmai injection as an example. *J Mass Spectrom*, 2009, 44, 230
8. Xu FG, Liu Y, Zhang ZJ, et al. Rapid simultaneous quantification of five active constituents in rat plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after oral administration of *Da-Cheng-Qi* decoction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 47: 586.
9. Gong P, Cui N, Wu L, et al. Chemicalome and metabolome matching approach to elucidating biological metabolic networks of complex mixtures. *Anal Chem*, 2012, 84: 2995.

10. Ni SM, Qian DW, Duan JA, et al. UPLC-QTOF/MS-based screening and identification of the constituents and their metabolites in rat plasma and urine after oral administration of *Glechoma longituba* extract. *J Chromatogr B*, 2010, 878: 2741
11. Wang XJ, Sun H, Zhang AH, et al. Pharmacokinetics screening for multi-components absorbed in the rat plasma after oral administration traditional Chinese medicine formula Yin-Chen-Hao-Tang by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with pattern recognition methods. *Analyst*, 2011, 136(23): 5068
12. Zheng X; Huang XT; Li N, et al. Determination of geniposidic acid in rat plasma by LC-MS/MS and its application to in vivo pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B*, 2012, 887: 138