

基于UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ技术的小儿感冒口服液 潜在苦味关键质量属性研究

王晓萌^{1,2}, 陆影^{1,2}, 胡小艳^{1,2}, 马金辰^{1,2}, 郭新雨^{1,2}, 韩燕雨^{1,2}, 王静^{1,2},
张晓梦^{1,2}, 李明爽^{1,2}, 李楠^{1,2}, 戴幸星^{1,2}, 姚璐³, 杜菁^{3*}, 吴志生^{1,2*}

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488; 2. 中药制药与新药开发教育部工程研究中心, 北京 102488;
3. 北京同仁堂科技发展股份有限公司, 北京 100079)

摘要: 采用超高效液相色谱-线性离子阱-串联静电场轨道阱质谱 (UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ) 联合 BitterX 数据库对真实生产世界小儿感冒口服液无糖中间体的潜在苦味关键质量属性进行辨识。采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸-水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱, 分别在正、负离子模式下对小儿感冒口服液无糖中间体进行数据采集。根据高分辨质谱提供的准分子离子峰和多级质谱碎片, 获取目标化合物的精确分子量和结构信息, 结合保留时间, 参照对照品、文献报道等相关数据对化合物进行分析, 共鉴定包括黄酮类、生物碱类、苯丙素类等共 57 个化学成分。进一步, 采用 BitterX 数据库预测化学成分与苦味受体结合的概率, 辨识潜在苦味关键质量属性, 最终预测得到其中包括地骨皮甲素、蒙花苷在内的 33 个潜在苦味化学成分。该研究较为全面地表征了小儿感冒口服液无糖中间体的化学物质基础, 为筛选苦味化合物提供了有效的方法, 为进一步改善小儿感冒口服液的苦味等不良口感提供了科学依据。

关键词: 关键质量属性; UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ; 苦味物质; 质谱分析

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-2882-08

Characterization of potential bitterness critical quality attributes in Xiaoer Ganmao Oral Liquid based on UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ

WANG Xiao-meng^{1,2}, LU Ying^{1,2}, HU Xiao-yan^{1,2}, MA Jin-chen^{1,2}, GUO Xin-yu^{1,2}, HAN Yan-yu^{1,2},
WANG Jing^{1,2}, ZHANG Xiao-meng^{1,2}, LI Ming-shuang^{1,2}, LI Nan^{1,2}, DAI Xing-xing^{1,2}, YAO Lu³,
DU Jing^{3*}, WU Zhi-sheng^{1,2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China; 2. Engineering
Research Center of Chinese Medicine Production and New Drug Development, Beijing 102488, China; 3. Beijing
Tongrentang Technology Development Co., Ltd., Beijing 100079, China)

Abstract: To identify the bitter compounds of real-world Xiaoer Ganmao Oral Liquid sugar-free intermediates, an integrated strategy has been developed by using ultra-high performance liquid chromatography with linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry (UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ) method and BitterX database prediction. The chromatographic operating conditions were as follows, chromatographic column: Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), mobile phase: 0.1% formic acid-water solution (A)-acetonitrile (B) with gradient elution. The

收稿日期: 2023-02-07; 修回日期: 2023-06-06.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC3501902); 国家优秀青年科学基金项目 (82022073); 国家自然科学基金项目 (82274110); 中央高校基本科研业务费北京中医药大学揭榜挂帅项目 (2022-JYB-JBZR-018, 2022-JYB-JBZR-019).

*通讯作者 Tel: 86-10-87632888, E-mail: daturae@163.com;

Tel: 86-10-53912101, E-mail: wzs@bucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0121

data were collected in positive and negative ion modes, respectively. The accurate molecular mass and structural information of the target compounds were obtained based on quasi-molecular ions and fragmentation ions provided by high-resolution mass spectrometry. The compounds were identified by combining retention time, reference substances, reports, and other relevant data, and a total of 57 constituents including flavonoids, alkaloids, and phenylpropanoids were finally identified. Further, the BitterX database was used to predict binding probability of compounds to bitter receptors and identify potential bitter critical quality attributes, finally 33 potential bitter compounds, including kukoamine A and linarin, were predicted. This study comprehensively characterized the material basis of Xiaoe Ganmao Oral Liquid sugar-free intermediates, it provides an effective method for bitter compound screening and a reference for further improving the undesirable taste of Xiaoe Ganmao Oral Liquid.

Key words: critical quality attribute; UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ; bitterness; mass spectrometry

苦味质量属性是影响中药口服液体剂开发及生产过程控制的质量属性之一^[1,2]。在2015年版《中华人民共和国药典》一部所收载的618种中药材中,以苦味为主味的药材有200种,占32.4%。同时,苦味是众多不良口感中存在最广泛、最令人难以接受的滋味之一,且人感知苦味的阈值较其他味觉低,以苦味为主不良口感的存在,使中药开发的适口性面临着巨大的挑战。小儿感冒口服液的用药人群为儿童,其组方中有8味药的描述中均涉及苦。苦味物质基础影响其口感,进而影响儿童患者用药顺应性,因此明确其苦味关键质量属性,对口感进行优化是生产制造过程中亟待解决的现实问题^[3]。

目前,针对中药大品种小儿感冒口服液的物质基础研究鲜有报道,本实验采用超高效液相色谱-线性离子阱-串联静电场轨道阱质谱(UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ)技术对其化学成分进行研究,结合对照品及相关文献,根据质谱信息快速分析鉴定化合物,研究小儿感冒口服液潜在苦味关键质量属性。BitterX数据库是一种在线开放平台,能够将化学物质的分子结构与苦味受体hTAS2Rs家族的蛋白结构进行整合以预测结合率,是苦味物质基础研究和新苦味物质发现的有力工具,将液质联用技术解析得到的化学成分通过BitterX预测最终得到潜在苦味关键质量属性。研究结果对明确小儿感冒口服液的药效物质基础、质量控制、口感提升等具有重要意义。

材料与方法

试剂 小儿感冒口服液无糖中间体(批号18261372,北京同仁堂股份有限公司);超纯水(规格500 mL/瓶,广州屈臣氏食品饮料有限公司);甲酸(批号151871,CAS号64-18-6,质量分数≥95.0%)、乙腈(批号WXBB5870V,CAS号75-05-8,质量分数≥99.9%)(美国赛默飞世尔科技有限公司);对照品绿原酸(批号5077,CAS号327-97-9,质量分数≥98.0%)、3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸(批号8334,CAS号89919-62-0,质量分数≥98.0%)、木犀草苷(批号

10527,CAS号5373-11-5,质量分数≥98.0%)、连翘苷(批号3212,CAS号487-41-2,质量分数≥98.0%)、连翘酯苷A(批号3639,CAS号79916-77-1,质量分数≥98.0%)、靛玉红(批号10164,CAS号479-41-4,质量分数≥98.0%)(上海诗丹德标准技术服务有限公司)。

仪器 Ultimate 3000超高效液相色谱仪,LTQ-Orbitrap XL质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)、Xcalibur 2.1化学工作站(美国赛默飞世尔科技有限公司);TG16MW台式高速离心机(湖南赫西仪器有限公司);SQP电子分析天平(德国Satorius公司)。

理论滋味量化描述 统计组方中药物在《中药药典》中性状项下的记载,根据味的排序分别赋值1、0.5、0.25;并根据味的描述程度,直接描述赋值1(如“苦”)、弱化描述赋值0.5(如“微苦”)、强化描述赋值1.5(如“极苦”“苦甚”);排序分值乘以描述程度分值为药物味的最终得分;计算药物在复方中的剂量权重。药物味的最终得分乘以剂量权重为该味在复方中的贡献值,将全方某一味分值相加,即得全方该味的分值。

样品制备 对照品溶液制备:取上述对照品适量,精密称定,置于量瓶中,加入甲醇溶液并定容制成混合对照品溶液。供试品溶液制备:取小儿感冒口服液无糖中间体,以10 000 r·min⁻¹离心10 min后取上清液备用。

色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈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);梯度洗脱程序见表1;柱温35 °C;进样2 μL;流速0.3 mL·min⁻¹。

质谱条件 使用LTQ-Orbitrap XL质谱仪进行正、负两种模式扫描测定,采用电喷雾离子源,鞘气和辅助气均为氮气;鞘气流速40 arb,辅助气流速20 arb(1 arb = 0.33 L·min⁻¹);碰撞气为氦气;电离源电压3.0 kV;离子源温度350 °C;管透镜电压110 V;干燥气流速15 L·min⁻¹;碰撞电压6~10 V;一级质谱图谱采用傅里叶变换高分辨全扫描(FT),扫描范围 m/z 100~1 200;检测分辨率30 000;二级质谱数据采用数据依赖型扫描(DDS)。

Table 1 Gradient elution profile

No.	Time/min	Acetonitrile/%
1	0	5
2	0	5
3	2	5
4	3	20
5	12	22
6	14	46
7	26	100
8	28	100
9	29	5
10	30	5

质谱数据分析 基于数据库、文献记载的小儿感冒口服液10味药的化学成分及多级碎片信息,建立小儿感冒口服液化学成分数据库。采用高分辨数据处理软件Xcalibur Qual Browser,根据各成分的原子组成计算精确相对分子质量,在小儿感冒口服液化学成分数据库中搜索化合物。参照对照品的保留时间,筛选分子质量数误差 $\delta < 5$ ppm的化学成分,结合二、三级质谱裂解规律及相关文献报道,推测其可能的化学成分信息。

BitterX数据库预测 将小儿感冒口服液无糖中间体质液解析所得化合物的CAS号、MOL文件或结构式上传至BitterX数据库中,预测化合物与各苦味受体结合的概率^[4],定义结合概率大于70%的化合物为小儿感冒口服液的潜在苦味化学成分。

结果

1 理论滋味特征量化描述

小儿感冒口服液药物组成、滋味描述及其赋值、剂量及其权重见表2。

小儿感冒口服液苦味的最终得分为 $0.5 \times 0.0835 + 0.25 \times 0.0835 + 1 \times 0.0835 + 0.5 \times 0.1385 + 1 \times 0.0835 + 0.25 \times 0.0835 + 1 \times 0.0835 + 0.5 \times 0.0835 = 0.45$ 、酸味0.07分、淡味0.14分、甘味0.21分、辛味0.14分、咸味0分。计算得出苦味在所有滋味中占比最高,达44.55%,因此,苦味是小儿感冒口服液中需要重点关注的滋味。

Table 2 Flavor assignment for Xiaoyer Ganmao Oral Liquid

Name	Flavor description	Flavor weight	Dose/g	Dose weight
Pogostemonis Herba	Slightly bitter	Bitter 0.5	85	0.0835
Chrysanthemi Flos	Sweet, slightly bitter	Sweet 1, bitter 0.25	85	0.0835
Forsythiae Fructus	Bitter	Bitter 1	85	0.0835
Isatidis Folium	Slightly sour, bitter, astringent	Sour 0.5, bitter 0.5, astringent 0.25	141	0.1385
Isatidis Radix	Slightly sweet, then bitter and astringent	Sweet 0.5, bitter 1	85	0.0835
Rehmanniae Radix	Slightly sweet, slightly bitter	Sweet 0.5, bitter 0.25	85	0.0835
Lycii Cortex	Slightly sweet and then bitter	Sweet 0.5, bitter 1	85	0.0835
Cynanchi Atrati Radix et Rhizoma	Slightly bitter	Bitter 0.5	85	0.0835
Menthae Haplocalycis Herba	Pungent, cool	Pungent 1	141	0.1385
Gypsum Fibrosum	Light	Light 1	141	0.1385

2 小儿感冒口服液化学成分的结构鉴定

采用上述色谱、质谱条件,分别获取正、负离子模式下的小儿感冒口服液无糖中间体数据,正、负离子下的总离子流图(total ion chromatogram, TIC)见图1,峰号与表3中编号一致。最终共鉴定化学成分57个,其中黄酮类22个、生物碱类3个、苯丙素类9个、有机酸类8个、环烯醚萜类3个、嘌呤类2个、氨基酸类4个、酚类3个、木脂素类2个、吡啶类1个、萘醌类1个,相关质谱信息见表3。

2.1 黄酮类化合物的结构鉴定 本研究共检测到小儿感冒口服液无糖中间体中22个黄酮类成分,主要来自复方中的菊花、地黄、板蓝根和连翘。黄酮类化合物是以2-苯基色原酮为基本骨架而衍生的化合物,现在泛指3个碳原子连接2个苯环形成的一类化合物。其中的黄酮苷类成分在二级质谱碎片信息中常可见脱去不同类型糖基的苷元碎片离子,黄酮苷元成分的二级碎片质谱图中,常见裂解 H_2O 、 CH_3 、 CO 、 CO_2 等分子后产生的不同的碎片离子信息。

小儿感冒口服液无糖中间体中主要推测得到以木犀草素为代表的黄酮类成分及木犀草苷为代表的黄酮苷类成分。其中化合物**33**在负离子模式下一级质谱中得到准分子离子峰 m/z 447.091 00 $[M-H]^-$,预测分子式可能为 $C_{21}H_{20}O_{11}$,误差为-2.657,与木犀草苷一致。进一步,在其二级质谱中发现碎片离子为 m/z 285.034 79,可推断为失去一分子葡萄糖的木犀草素苷元 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ 。对比木犀草苷对照品的二级质谱碎片信息,发现两者的保留时间及裂解规律一致,推测化合物**33**为木犀草苷,其裂解过程见图2A。化合物**26**、**27**、**29**~**32**、**35**、**43**、**51**、**55**在二级质谱中均存在失去糖基的碎片离子^[5-9]。

化合物**49**在负离子模式下一级质谱中得到准分子离子峰 m/z 285.039 55 $[M-H]^-$,预测分子式可能为 $C_{15}H_{10}O_6$,误差为-3.197,与木犀草素一致。进一步,在其二级质谱中发现碎片离子 m/z 266.982 57、257.131 77、216.777 53、198.997 44,推测碎片离子 m/z 266.982 57

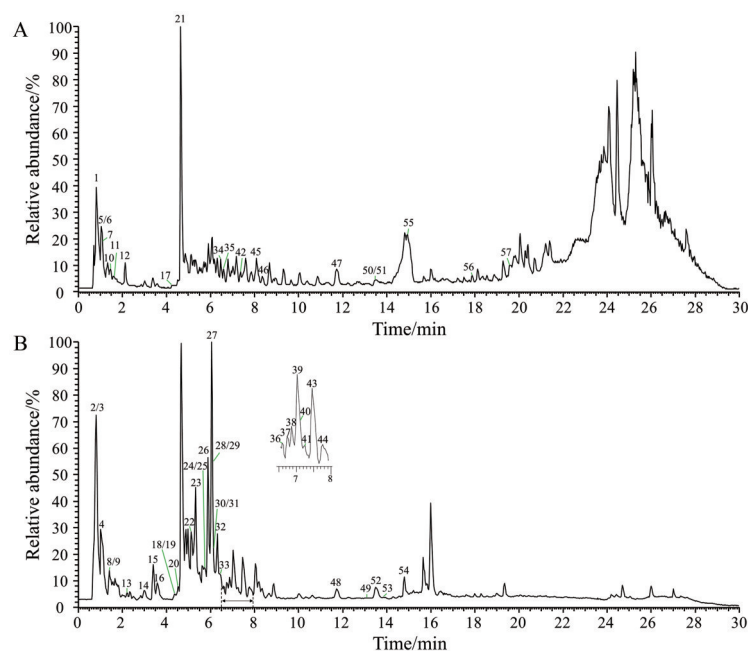


Figure 1 The total ion chromatogram of Xiaoer Ganmao Oral Liquid sugar-free intermediates in positive (A) and negative (B) ion mode. The peak numbers are the same as Table 3

Table 3 Results of UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ analysis of Xiaoer Ganmao Oral Liquid sugar-free intermediates. *Compounds identified by comparing with reference standards

No.	t_R /min	Name	Formula	Adduct	Found mass	Error/ 10^{-6}	MS ²	MS ³	Class
1	0.79	γ -Aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂	+H	104.070 51	-0.914	86.858 64, 59.721 45		Amino acid
2	0.80	Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	-H	133.013 75	-3.733	114.872 16, 86.687 93, 70.717 41		Organic acid
3	0.80	Quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	-H	191.055 21	-4.718	172.915 51, 126.803 86, 108.820 54, 84.758 36	108.772 55, 98.793 11, 84.831 68, 80.813 14	Organic acid
4	1.01	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	-H	191.018 81	-4.794	172.966 13, 128.796 78, 110.808 53		Organic acid
5	1.02	Valine	C ₅ H ₁₁ NO ₂	+H	118.085 94	-2.669	101.893 60		Amino acid
6	1.02	Guanine	C ₅ H ₅ N ₅ O	+H	152.056 37	-2.081	134.782 88, 109.906 75, 108.758 09, 106.717 73		Purine
7	1.05	Epigoitrin	C ₅ H ₇ NOS	+H	130.031 74	-2.854	83.734 13, 69.827 96		Alkaloid
8	1.40	Guanosine	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	-H	282.083 22	-4.154	149.936 28	150.069 05, 132.777 11, 125.857 57, 106.786 71, 81.847 73	Purine
9	1.40	Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	-H	167.034 19	-4.742	151.825 61, 122.809 74, 107.803 42	122.916 06, 107.842 30	Organic acid
10	1.48	Leucine	C ₆ H ₁₃ NO ₂	+H	132.101 62	-2.159	131.950 50, 85.799 97	85.981 98	Amino acid
11	1.65	Indole-3-carboxaldehyde	C ₉ H ₇ NO	+H	146.059 91	-0.893	117.870 03		Indole
12	2.07	Phenprobamate	C ₉ H ₁₁ NO ₂	+H	166.086 15	-0.633	148.925 51, 119.902 73		Amino acid
13	2.21	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-H	193.049 99	-2.283	177.936 98, 148.949 33, 133.907 14		Phenylpropanoid
14	3.09	Rosmarinic acid	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	-H	359.075 10	-5.962	196.960 30		Phenol
15	3.39	Loganic acid	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	-H	375.127 11	-6.825	168.979 71, 150.969 97, 124.906 36		Iridoid
16	3.70	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	-H	179.034 21	-4.312	134.942 79	134.908 52, 106.541 18, 90.754 52	Organic acid
17	4.28	Forsythoside E	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₂	+Na	485.161 87	4.927	339.140 35		Phenylpropanoid
18	4.44	Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	-H	137.023 91	-3.703	92.875 89		Organic acid
19	4.44	Protocatechualdehyde	C ₇ H ₆ O ₃	-H	137.023 91	-3.703	118.808 70, 108.883 68		Phenol
20	4.47	Decaffeoyl verbascoside	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	-H	461.164 40	-4.444	315.122 62, 297.108 40, 160.827 48, 134.989 01		Phenylpropanoid
21	4.56	Kukoamine A	C ₂₈ H ₄₂ N ₄ O ₆	+H	531.316 83	-3.723	367.386 96, 164.883 09		Alkaloid

Continued

No.	t_R /min	Name	Formula	Adduct	Found mass	Error/ 10^{-6}	MS ²	MS ³	Class
22	5.13	Verbascoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	-H	623.198 24	0.155	461.255 13, 315.252 75	315.172 42, 134.979 13	Phenylpropanoid
23	5.29	Geniposide	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	-H	387.129 73	0.155	225.108 40		Iridoid
24	5.71	Calceolarioside A	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	-H	477.137 97	-4.747	315.074 10, 297.060 55, 178.873 96, 160.921 08, 134.859 53		Phenylpropanoid
25	5.74	Forsythoside A*	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	-H	623.197 20	-1.514	461.246 40, 443.261 54, 179.055 18		Phenylpropanoid
26	5.80	Naringenin-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	-H	433.112 88	-2.632	271.139 80, 150.941 25		Flavonoid
27	6.04	Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	-H	609.180 11	-3.912	447.189 03, 429.292 91, 301.037 48, 179.064 33	286.095 52, 242.025 45, 150.921 17, 124.916 51	Flavonoid
28	6.10	3,5-Di- <i>O</i> -caffeoylquinic acid*	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	-H	515.118 84	-1.280	353.085 94, 190.971 63, 178.883 30	190.899 60, 178.889 98, 172.938 14, 154.892 46, 134.891 28, 110.910 83	Phenylpropanoid
29	6.10	Isoquercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-H	463.085 66	-5.483	299.956 91		Flavonoid
30	6.20	Saponin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-H	593.149 54	-2.787	431.173 83, 341.139 59, 311.172 55		Flavonoid
31	6.20	Luteolin-7- <i>O</i> -rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	-H	593.149 54	-2.787	285.009 58		Flavonoid
32	6.28	Astragaln	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-H	447.091 19	-4.685	284.979 00		Flavonoid
33	6.38	Cynaroside*	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-H	447.091 00	-2.657	285.034 79		Flavonoid
34	6.44	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	+H	287.054 35	-2.315	259.078 52, 230.931 98, 153.859 50		Flavonoid
35	6.58	Kaempferol-3- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	+H	449.106 11	-3.847	162.894 29, 287.039 98		Flavonoid
36	6.65	Isoacteoside	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	-H	623.197 20	-1.514	461.244 20, 315.152 65		Phenylpropanoid
37	6.80	Eriodictyol	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	-H	287.054 78	-4.638	150.803 47, 134.835 27	108.807 39, 106.844 30, 82.934 88, 64.732 49	Flavonoid
38	6.92	Isoscoparin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	-H	461.108 28	-1.420	371.088 81, 341.148 93		Flavonoid
39	7.02	Chlorogenic acid*	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-H	353.086 18	-4.603	191.084 17, 178.882 42, 135.039 72	190.984 24, 172.951 84, 126.857 38, 110.913 15	Phenylpropanoid
40	7.11	Epipinoresinol-4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucoside	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁	-H	519.185 49	-3.265	357.124 69, 338.999 88		Lignan
41	7.16	Isovitexin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-H	431.097 08	-2.992	341.109 07, 311.076 57		Flavonoid
42	7.34	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	+H	149.096 10	-7.300	148.980 58		Phenol
43	7.40	Diosmin	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	-H	607.163 82	-4.485	299.001 90		Flavonoid
44	7.63	4-Hydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	-H	151.039 35	-4.750	108.920 41		Organic acid
45	8.16	Chrysoeriol	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	+H	301.070 04	-2.075	301.156 56		Flavonoid
46	8.22	Diosmetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	+H	301.069 89	-2.573	301.117 74		Flavonoid
47	11.38	Forsythn*	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	+Na	557.199 65	-3.748	395.307 01, 309.168 09, 184.855 62		Lignan
48	11.49	Martynoside	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	-H	651.226 32	-4.796	475.233 58		Iridoid
49	13.12	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-H	285.039 55	-3.197	266.982 57, 257.131 77, 216.777 53, 198.997 44		Flavonoid
50	13.46	Acacetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	+H	285.075 16	-2.070	270.046 72, 285.130 77		Flavonoid
51	13.46	Linarin	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	+H	593.184 51	-3.324	285.018 74		Flavonoid
52	13.64	Wogonin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-H	283.059 84	-4.793	268.014 53, 239.158 97		Flavonoid
53	13.75	Acacetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-H	283.059 84	-4.797	267.957 28		Flavonoid
54	14.85	Rhein	C ₁₅ H ₈ O ₅	-H	283.024 57	-0.852	239.175 90, 182.536 04		Anthraquinones
55	15.05	Tilianin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	+H	447.128 78	0.462	285.057 50		Flavonoid
56	17.84	Indirubin	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂	+H	263.081 18	-1.232			Alkaloid
57	19.61	Linolenic acid	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	+H	279.231 63	-4.740	261.166 63, 243.185 55, 94.845 15	243.132 89, 173.070 57, 134.859 38, 92.830 72	Organic acid

是由准分子离子峰失去一分子水形成的 [M-H-H₂O]⁻, 碎片离子 m/z 257.131 77 是由准分子离子峰失去一分子 CO 而形成 [M-H-CO]⁻, 碎片离子 m/z 216.777 53 是由 A 环破裂丢失 C₃O₂ 碎片而形成 [M-H-C₃O₂]⁻, 在此

基础上失去一分子水得到碎片离子 m/z 198.997 44 [M-H-C₃O₂-H₂O]⁻。结合文献报道的质谱行为^[10], 推测化合物 **49** 为木犀草素。化合物 **34**、**50**、**52**、**53** 同样存在脱去 H₂O、CH₃、CO 等分子的情况^[11-13]。

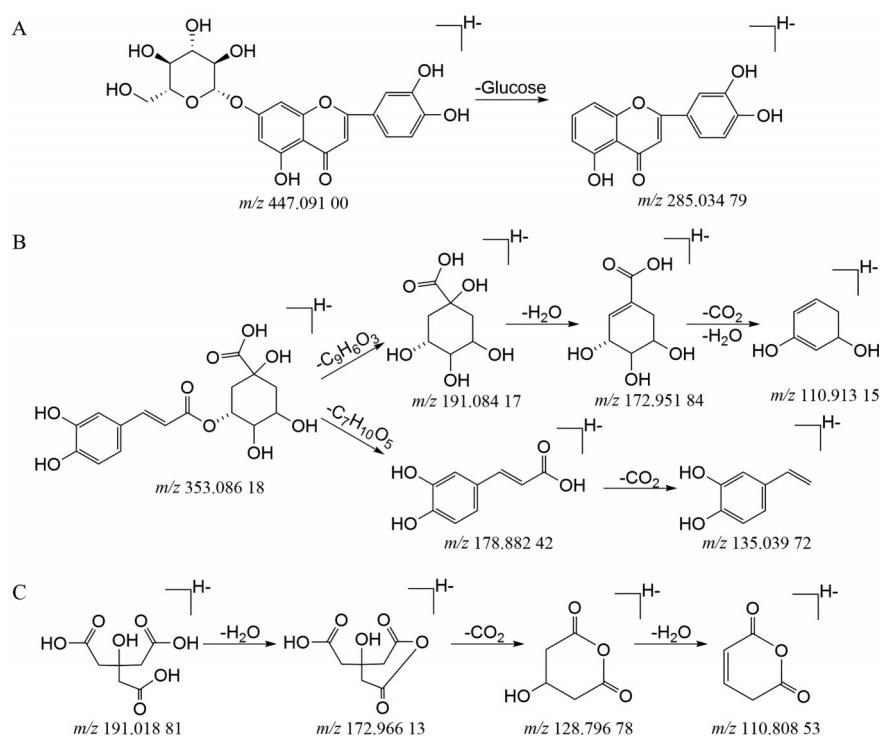


Figure 2 Possible fragmentation pathway of cynaroside (A), chlorogenic acid (B) and citric acid (C) in negative mode

2.2 苯丙素类化合物的结构鉴定 本研究共检测到小儿感冒口服液无糖中间体中9个苯丙素类成分^[14],主要来自复方中的地黄、菊花和连翘。苯丙素是天然存在的一类苯环与三个直链碳连接(C₆-C₃基团)构成的化合物。一般具有苯酚结构,是酚性物质。包括苯丙烯、苯丙醇、苯丙酸、香豆素及木脂素类等。

小儿感冒口服液无糖中间体中主要推测得到以绿原酸、阿魏酸为代表的苯丙酸类成分,以及以连翘脂苷A为代表的苯乙醇苷类。其中,化合物**39**在负离子模式下一级质谱中得到准分子离子峰 m/z 353.086 18 [M-H]⁻,预测分子式可能为C₁₆H₁₈O₉,误差为-4.603,与绿原酸一致。进一步,在其二级质谱中发现碎片离子 m/z 191.084 17、178.882 42、135.039 72,推测碎片离子 m/z 191.084 17为准分子离子峰脱去C₉H₆O₃形成[M-H-C₉H₆O₃]⁻,碎片离子 m/z 178.882 42为准分子离子峰脱去C₇H₁₀O₅而形成[M-H-C₇H₁₀O₅]⁻,在此基础上脱去一分子CO₂形成135.039 72 [M-H-C₇H₁₀O₅-CO₂]⁻。在其三级质谱中发现碎片离子 m/z 172.951 84、110.913 15,推测分别为[M-H-C₉H₆O₃-H₂O]⁻和[M-H-C₉H₆O₃-2H₂O-CO₂]⁻。对比绿原酸对照品的二、三级质谱碎片信息,发现两者的保留时间及裂解规律一致,推测化合物**39**为绿原酸,其裂解过程见图2B,质谱信息见图3。通过与标准品及文献报道的质谱行为对比,化合物**28**同样出现了脱去C₉H₆O₃基团的行为^[15],推测为3,5-

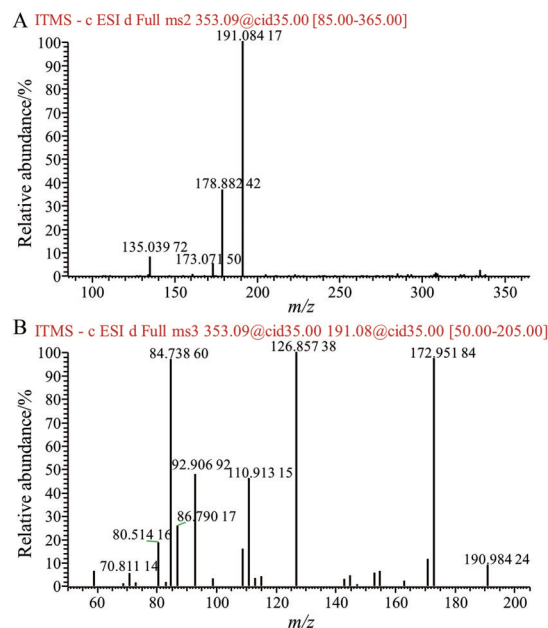


Figure 3 MS² (A) and MS³ (B) spectra of chlorogenic acid in negative mode

二-O-咖啡酰奎宁酸,即异绿原酸A。

化合物**25**在负离子模式下一级质谱中得到准分子离子峰 m/z 623.197 20 [M-H]⁻,预测分子式可能为C₂₉H₃₆O₁₅,误差为-1.514,与连翘脂苷A一致。进一步,在其二级质谱中发现碎片离子 m/z 461.246 40、443.261 54、179.055 18,推测碎片离子 m/z 461.246 40

为准分子离子峰先脱去 1 分子鼠李糖, 形成碎片离子 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$, 在此基础上脱去一分子水形成碎片离子 m/z 443.261 54 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O]^-$, 进一步脱去 $C_{13}H_{12}O_6$ 形成碎片离子 m/z 179.055 18 $[M-H-C_6H_{10}O_5-H_2O-C_{13}H_{12}O_6]^-$ 。对比连翘脂苷 A 对照品的二级质谱碎片信息, 发现两者的保留时间及裂解规律一致, 推测化合物 **25** 为连翘脂苷 A。

2.3 有机酸类化合物的结构鉴定 本研究共检测到小儿感冒口服液无糖中间体中 8 个有机酸类成分, 负离子模式下的响应效果优于正离子模式。有机酸类化合物多存在羰基、酚羟基等酸性基团, 常见小分子有机酸类多通过脱去 CO_2 、 H_2O 、 $HCOOH$ 等形成对应的二级碎片离子。

化合物 **4** 在负离子模式下一级质谱中得到准分子离子峰 m/z 191.018 81 $[M-H]^-$, 预测分子式可能为 $C_6H_8O_7$, 误差为 -4.794 , 与柠檬酸一致。进一步, 在其二级质谱中发现碎片离子 m/z 172.966 13、128.796 78、110.808 53, 推测准分子离子峰先脱去一分子水形成 m/z 172.966 13 $[M-H-H_2O]^-$, 在此基础上脱去一分子 CO_2 形成 m/z 128.796 78 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$, 接着又脱去一分子水形成 m/z 110.808 53 $[M-H-H_2O-CO_2-H_2O]^-$, 结合文献报道的质谱行为^[9], 推测化合物 **4** 为柠檬酸, 其裂解过程见图 2C。同时, 化合物 **2**、**9**、**16**、**18**、**57** 也存在脱去 CO_2 、 H_2O 等形成对应的二级碎片离子。

3 小儿感冒口服液潜在苦味关键质量属性辨识

化学成分与苦味受体的结合概率如图 4 所示, 化合物编号与表 3 中编号一致。预测得到 33 种化合物与至少一种苦味受体结合概率大于 70%, 其中, 地骨皮甲素能与 5 种苦味受体结合, 蒙花苷能与 4 种苦味受体结合, 毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 A、连翘脂苷 A、紫云英苷、异毛蕊花糖、表松酯素-4'- O - β -D-葡萄糖苷、香叶木苷、汉黄芩素、大黄酸能与 3 种苦味受体结合; 33 种化合物中共有黄酮类 17 种, 生物碱类 2 种, 苯丙素类 6 种 (包括苯乙醇苷类 5 种), 有机酸类 2 种, 氨基酸类 (苦味肽的组成部分) 1 种, 木脂素类 1 种 (木脂素糖苷), 蒽醌类 1 种, 吡啶类 1 种, 酚类 2 种。在所得 13 种苦味受体中, T2R14 与 23 种化合物、T2R39 与 24 种化合物的结合率大于 70%。

讨论

本研究首先基于中国药典对于药物滋味的记载, 将滋味描述语言按照一定规则转换成滋味量化值, 结合剂量权重计算药物各滋味分值, 表征了苦味的严重程度, 对其苦度进行初步定量评价, 对苦度定量评价及口感改善方式的选择等相关研究具有一定指导意义。

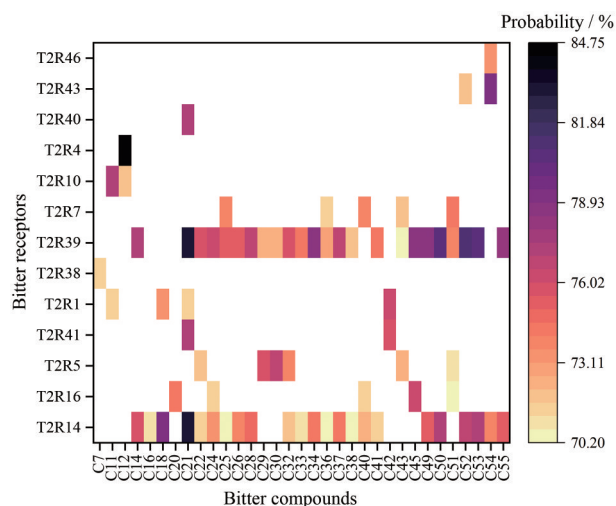


Figure 4 Probability of compounds in Xiaoer Ganmao Oral Liquid binding with bitter receptors. The compound (C) numbers are the same as Table 3

进一步, 建立了一种 UHPLC-LTQ-Orbitrap MSⁿ 结合 BitterX 数据库的潜在苦味关键质量属性辨识方法, 对小儿感冒口服液无糖中间体中化学成分进行了解析, 并最终获取了 33 种潜在苦味化学成分, 与文献^[6]报道苦味化合物多呈生物碱、黄酮类、苷类及苦味肽等一致, 预测得到的化合物中有 26 种在此范围内, 表明此方法可有效筛选苦味化合物, 并且筛选得到的地骨皮甲素 (生物碱类)、蒙花苷 (黄酮类) 极有可能为小儿感冒口服液关键的苦味物质基础。此外, 与苦味受体 T2R14、T2R39 结合概率大于 70% 的化合物数量最多。本研究以简便、快速的方法对苦味关键质量属性进行高通量筛选, 为其口感改善的必要性提供了依据, 在此基础上可进一步将潜在苦味关键质量属性抽提以进行验证。该结果同时为明确小儿感冒口服液药效物质基础、提升质量控制水平、阐明口感提升的机制研究等提供参考。

作者贡献: 王晓萌、陆影负责实验研究、分析数据和文章撰写; 胡小艳、郭新雨、韩燕雨、王静、张晓梦负责实验研究; 马金辰、李明爽、戴幸星、姚璐负责思路指导; 吴志生研究员、杜菁副研究员、李楠副研究员负责思路指导和对文章的知识性内容进行审阅并提供研究经费。

利益冲突: 所有作者均声明没有利益冲突。

References

- [1] Wu ZS, Qiao YJ, Xiao W, et al. Four critical engineering and technical problems in manufacturing measurement of Chinese materia medica [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 2841-2855.
- [2] Wu ZS, Qiao YJ. Manufacturing Surveying of Chinese Materia Medica (中药制造测量学) [M]. Beijing: Science Press, 2021:

- 1-9.
- [3] Lu Y, Zeng JQ, Ma JC, et al. Critical quality attribute characterization of big brand TCM: taste formulation optimization strategy and application of Xiaoer Ganmao Oral Liquid based on taste quality attribute [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 3488-3494.
- [4] Huang W, Shen Q, Su X, et al. BitterX: a tool for understanding bitter taste in humans [J]. Sci Rep, 2016, 6: 23450.
- [5] Zhao N. Studies on the Serum Pharmacochemistry of Banlangen Based on the LC-MS (基于液质联用技术的板蓝根血清药物化学初步研究) [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2015.
- [6] Yan J, Zhao CF, Li BP, et al. Chemical constituents and antioxidant activity of Radix Isatidis [J]. J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报), 2017, 38: 248-255.
- [7] Zhou MY, Huo JH, Sun GD, et al. Identification of 45 kinds of chemical components of *Forsythia suspensa* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. China Pharm (中国药房), 2019, 30: 3067-3073.
- [8] Du JS, Wu LQ, Liu JG, et al. Rapid analysis of chemical constituents in chrysanthemum based on UPLC-Q-TOF-MS technology [J]. Chin Med Mat (中药材), 2017, 40: 621-623.
- [9] Zhang BY, Jiang ZZ, Wang YF, et al. Analysis of chemical constituents in fresh, dried and prepared Rehmanniae Radix by UPLC/ESI-Q-TOF MS [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2016, 38: 1104-1108.
- [10] Li H. Study on the *In Vivo* Metabolism and Anti-Inflammatory Mechanism of Simiao Yong'an Decoction and Its Active Ingredients (四妙勇安汤及活性成分体内代谢与抗炎作用机制研究) [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2020.
- [11] Ye LH, Guo YL, Yang Y, et al. Analysis of chemical constituents in Lianqiao by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Pharm Clin Chin Mater Med (中药与临床), 2020, 11: 14-18.
- [12] Zhang Y, Ma HL, Mai X, et al. Identification of components and metabolites of *Mentha haplocalyx* in rats plasma by UHPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. China Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 3927-3934.
- [13] Chen XY, Zhang L, Wu Y, et al. Rapid analysis of chemical compositions in the flavonoid fraction of *Mentha haplocalyx* Briq. with LCMS-IT-TOF [J]. Beijing Univ Tradit Chin Med (北京中医药大学学报), 2015, 38: 546-550.
- [14] Huan XH, Li ML, Xing JG, et al. Analysis and identification of chemical constituents of compound Muniziqi Granules based on chromatography-mass spectrometry [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2021, 43: 1366-1375.
- [15] Mao CY. Study on Quality Evaluation Standard of the Flower of Chrysanthemum Morifolium Ramat Based on the Correlation of Ingredients and Efficacy (基于成分-药效关联的中药菊花质量标准与评价研究) [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2020.
- [16] Ke XM, Zhang LS, Zhang DK, et al. Research and development strategy and practice of traditional Chinese medicine decoction companion based on "grape-shot theory": Huanglian Jiedu Decoction as an example [J]. China Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 4443-4454.