

UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 法分析健脾扶正颗粒化学成分及入血成分

杨琼梁^{1,2}, 孔祥柏^{1,2}, 张小娟^{1,2}, 张旭^{1,2}, 潘娟^{1,2}, 聂格^{1,2}, 李足意^{1,2*}, 欧阳文^{1,3*}
(1. 浏阳市中医医院, 湖南长沙 410300; 2. 湖南中医药大学附属第二中西医结合医院, 湖南浏阳 410300; 3. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208)

摘要: 目的 分析健脾扶正颗粒化学成分及入血成分。方法 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 反相色谱柱; 流动相水 (含 0.1% 甲酸) -乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 6.0 μL; 加热电喷雾离子源; 正负离子扫描; 结合对照品、文献及数据库进行化学成分鉴定。结果 从中共鉴定出 164 种化学成分, 包括 35 种皂苷类、33 种苯丙素类、40 种黄酮类、13 种萜类、9 种有机酸类、4 种氨基酸类、4 种生物碱类、4 种低聚糖、4 种核苷类、2 种炔苷类、4 种环肽类、3 种酚类及 9 种其他类。含药血清中中共鉴定出 21 种化学成分, 包括 5 种原型化合物和 16 种代谢物。结论 该方法准确稳定, 可为健脾扶正颗粒后续药效物质基础、质量研究及临床应用提供数据支撑。

关键词: 健脾扶正颗粒; 化学成分; 入血成分; 分离鉴定; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)06-2078-12

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.06.048

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是临床最常见的消化系统疾病之一^[1], 主要表现为持续或反复发作的上腹痛、腹胀、恶心及呕吐等上腹部症状^[2], 属中医“胃痞”范畴。FD 的全球发病率高达 20% 以上, 其中欧洲国家发病率为 10%~40%^[3], 亚洲国家为 5%~30%^[4-5], 并呈现不断上升的趋势^[6]。FD 除了带给患者常见的胃肠道症状外, 还常伴随着睡眠障碍、焦虑、工作效率低等问题, 如果长期反复发作还会导致溃疡结肠炎、胃溃疡、十二指肠炎等更严重的胃肠道疾病, 这将严重影响患者的生活质量^[7-8]。健脾扶正颗粒是根据我院临床经验方研制的自制剂, 该方以黄芪为君药, 太子参、茯苓、白扁豆、鸡内金共为臣药, 砂仁、桔梗共为佐药, 醋五味子、牡蛎共为使药, 临床常用于治疗食后腹胀、呕吐、呃逆、便溏、纳差食少。

目前, 已有健脾扶正颗粒指纹图谱^[9]、临床疗效^[10]的报道, 但缺少对其化学成分的系统全面的分析表征, 其药效物质基础仍不明确, 故本实验采用超高效液相色谱-四极杆-轨道阱高分辨质谱联用 (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) 技术对健脾扶正颗粒所含化学成分进行定性分析, 并探讨大鼠灌胃给药后其入血成分, 以期阐明该制剂药效物质基础提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 Vanquish Flex UHPLC 色谱仪、Q Exactive 四极

杆轨道离子阱质谱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KQ3200D 超声波提取仪 (昆山市超声仪器有限公司); Mikro 220R 高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司); ACQUITY UPLC HSS T3 反相色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm, 美国 Waters 公司)。

1.2 试剂与药物 健脾扶正颗粒 (批号 240502) 为医院自制 (制剂备案号湘药制备字 Z20180050001)。毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 RFS-M02001902019)、毛蕊异黄酮甲醇 (批号 RFS-M02101903026)、太子参环肽 B (批号 RDD-T02402401030)、人参皂苷 Ro (批号 RDD-R03211812026)、刺芒柄花苷 (批号 RFS-M01301904002)、刺芒柄花素 (批号 RFS-C01801905020)、党参炔苷 (批号 RFS-D02602204021)、五味子醇甲 (批号 RDD-W00202306026)、五味子醇乙 (批号 RFS-W00802002011)、葫芦巴碱 (批号 RFS-H05702206014) (纯度 ≥98%, 成都瑞芬思德丹生物科技有限公司); 茯苓酸 B、桔梗皂苷 D (批号 MUST-23080108、DSTDJ001501, 纯度 ≥98%, 成都曼斯特生物科技有限公司); 乙腈、甲酸、水均为质谱纯 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.3 动物 SPF 级 SD 大鼠 18 只, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2022-0004], 饲养于浙江慧通测评技术 (集团) 有限公司

收稿日期: 2024-11-26

基金项目: 第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目 (国中医药人教函【2022】76 号); 长沙市卫健委中医药科研项目 (B202309); 湖南中医药大学校院联合基金项目 (2024XYLH128)

作者简介: 杨琼梁 (1992—), 女, 硕士, 主管中药师, 从事中药临床药学研究。Tel: 18711136758, E-mail: yql92@qq.com

* 通信作者: 李足意 (1987—), 男, 硕士, 副主任中药师, 从事中药临床药学、鉴定及加工炮制研究。Tel: 13787044813, E-mail: yanjiulou312@163.com

欧阳文 (1981—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事天然药物物质基础研究。Tel: 13348612563, E-mail: oyw810225@126.com

实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SCXK (浙) 2022-0041]。本研究经实验动物福利与伦理委员会审批 (审批号 HTDW-202405005)。

2 方法

2.1 健脾扶正颗粒制备 准确称取处方量的饮片, 第一次加入 10 倍量水煎煮 1.5 h, 第二次加入 8 倍量水煎煮 1 h, 过滤, 合并滤液, 减压浓缩至相对密度为 1.35~1.40 (60 ℃) 的稠膏。以稠膏: 辅料 (蔗糖: 糊精=4:1)=1:4.5 比例, 加入适量乙醇制软材, 12~14 目筛制粒, 60~80 ℃干燥, 整粒, 分袋 (12 g/袋), 即得。

2.2 供试品溶液制备 取 2 袋本品 (生药量 11.84 g/袋), 加适量水溶解, 取 200 μL 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 600 μL 甲醇, 超声处理 30 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

2.3 灌胃液制备 健脾扶正颗粒人用剂量为 1 次 2 袋, 每日 3 次, 换算后的大鼠剂量为 6.48 g/kg, 取健脾扶正颗粒, 加适量水溶解, 配制成质量浓度为 0.65 g/mL 的灌胃液。

2.4 对照品溶液制备 分别精密称取毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、太子参环肽 B、人参皂苷 Ro、刺芒柄花苷、刺芒柄花素、党参炔苷、五味子醇甲、五味子醇乙、葫芦巴碱、茯苓酸 B、桔梗皂苷 D 对照品各 5 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加入 50 mL 甲醇, 超声溶解, 补足减失质量, 制得质量浓度为 100 μg/mL 的母液。分别移取各对照品母液 10 μL, 加入 80 μL 超纯水, 涡旋混匀 1 min, 制得各对照品质量浓度为 5 μg/mL 的对照品溶液。

2.5 分组、给药与采血 大鼠适应性喂养 1 周, 随机平均分为空白对照组和给药 0.5 h 组、给药 1 h 组、给药 2 h 组、给药 4 h 组、给药 8 h 组。灌胃体积为每天 0.01 mL/g (灌胃剂量为人用等效剂量 6.48 g/kg), 空白对照组灌胃给予等量生理盐水, 连续 7 d, 最后一次灌胃前禁食 12 h, 灌胃后 30 min 及 1、2、4、8 h 后麻醉大鼠, 心脏取血 5 mL, 置于不加肝素钠的离心管内, 静置 1 h 后, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, 置于-80 ℃冰箱保存。

2.6 血清样本处理 取“2.5”项下空白血清及给药后各时间点混合血清各 100 μL, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 300 μL 甲醇, 涡旋振摇 10 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 取 270 μL 上清液, 真空离心浓缩 4 h, 加入 90 μL 50% 甲醇, 涡旋振摇 1 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得。

2.7 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 反相色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相水 (含 0.1% 甲酸) (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~1 min, 98% A, 1~14 min, 98%~70% A; 14~25 min, 70%~0% A; 25~28 min, 0% A, 28~28.1 min, 0%~98% A, 28.1~30 min, 98% A); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 ℃; 进样量 6.0 μL。

2.8 质谱条件 加热电喷雾 (HESI) 离子源; 正负离子扫描; 离子源电压 3.7、3.5 kV; 毛细管加热温度 320 ℃; 鞘气压力 30 psi (1 psi=6.895 kPa); 辅助气压力 10 psi;

溶剂加热蒸发温度 300 ℃; 鞘气、辅助气均为氮气; 碰撞气氮气, 压力 0.199 5 Pa。采用 Full scan/dd-MS² 模式采集数据, Full scan 参数: 分辨率 70 000, 自动增益控制目标 1×10⁶, 最大隔离时间 50 ms, 扫描范围 *m/z* 100~1 500; dd-MS² 参数: 分辨率 17 500, 自动增益控制目标 1×10⁵, 最大隔离时间 50 ms, 质量分离窗口 2, 碰撞能 10、30、60 V, 强度限定 1×10⁵。

2.9 数据处理 采用 Progenesis QI 3.0 软件处理采集的质谱数据, 分析色谱图信息。

3 结果

3.1 化学成分鉴定 健脾扶正颗粒的 UHPLC-Q-Orbitrap 正、负离子模式下的检测基峰图见图 1, 通过与对照品、对照品数据库、公共数据库及参考文献进行对比, 最终鉴定出 164 种化学成分, 包括 35 种皂苷类、33 种苯丙素类、40 种黄酮类、13 种萜类、9 种有机酸类、4 种氨基酸类、4 种生物碱类、4 种低聚糖、4 种核苷类、2 种炔苷类、4 种环肽类、3 种酚类以及 9 种其他类, 见表 1。

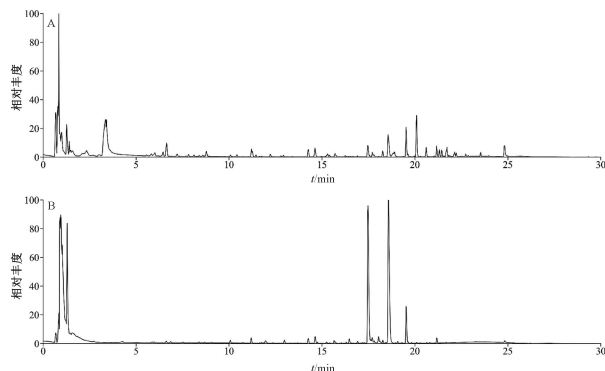


图 1 健脾扶正颗粒正 (A)、负 (B) 离子模式下基峰离子流图

3.2 化合物质谱裂解特征分析

3.2.1 黄酮类成分质谱裂解表征 共鉴定出 40 种黄酮类化合物, 该类化合物主要有黄酮苷元、黄酮 O 苷和黄酮 C 苷, 黄酮 O 苷容易脱去糖基生成黄酮苷元, 黄酮苷元容易失去 CO、CO₂ 和 H₂O 等碎片, 黄酮 C 苷的糖分子内部容易发生开裂, 失去分子量为 60、90、120 Da 的特征性碎片, 另外黄酮类化合物容易在 C 环上发生 RDA 裂解^[11-12]。以化合物 46 为例, 其在负离子模式下产生 *m/z* 491.120 1 [M+HCOO]⁻ 的加合离子峰, 通过糖键断裂产生碎片离子 *m/z* 283.061 3 [M-H-C₆H₁₀O₅]⁻, 然后甲氧基断裂失去一分子 CH₃ 生成 *m/z* 268.037 8 [M-H-C₆H₁₀O₅-CH₃]⁻ 的碎片离子。结合以上裂解规律、参考文献 [13] 并与对照品对比, 推测化合物 46 为毛蕊异黄酮葡萄糖苷, 见图 2。

3.2.2 皂苷类成分质谱裂解表征 共鉴定出 35 种皂苷类化合物, 其质谱行为通常表现为主要失去侧链上的糖基^[14]。以化合物 82 为例, 其在负离子模式下产生准分子离子 *m/z* 1 223.569 5 [M-H]⁻, 该离子糖苷键断裂失去 4 个糖基生成碎片离子 *m/z* 681.386 4 [M-H-C₂₁H₃₄O₁₆]⁻, 同

表 1 健脾扶正颗粒化学成分鉴定结果

编号	保留时间/min	加合物	m/z 实测值	m/z 理论值	误差 (10^{-6})	碎片离子 m/z	分子式	化合物名称
1	0.78	M+H	175.119 4	175.119 0	2.69	70.066 6, 175.119 5, 60.057 2, 116.071 4, 130.09 8, 158.092 9	$C_6H_{14}N_4O_2$	精氨酸
2	0.79	M+K	705.186 4	705.185 1	1.88	705.183 3, 365.106 1, 543.134 8, 203.052 3, 202.082 2, 381.080 0, 97.029 4	$C_{24}H_{42}O_{21}$	3F- α -D-半乳糖基棉子糖
3	0.81	M-H	242.079 4	242.078 2	4.91	78.956 4, 242.079 5, 168.041 4, 152.993 9	$C_9H_{13}N_3O_5$	胞苷
4*	0.85	M+H	138.055 3	138.055 0	2.14	138.055 4, 137.046 2, 94.066 3	$C_7H_7NO_2$	葫芦巴碱
5	0.87	M+FA-H	549.167 6	549.167 2	0.61	59.011 3, 383.119 8, 89.021 9, 179.054 6, 101.021 9, 71.011 3, 503.162 6, 341.109 1, 413.130 7, 221.065 9	$C_{18}H_{32}O_{16}$	β -葡聚糖
6	0.92	M+H	130.086 7	130.086 3	3.56	84.082 0, 130.086 8, 70.066 6	$C_6H_{11}NO_2$	D-高脯氨酸
7	0.95	M+FA-H	387.114 6	387.114 4	0.50	341.109 4, 59.011 3, 89.021 8, 71.011 3, 179.054 7, 119.032 5, 101.022, 113.022 1	$C_{12}H_{22}O_{11}$	A-kojibiose
8	0.98	M+NH4	522.204 4	522.202 8	2.94	527.159 7, 365.106, 354.108 6, 85.029 6, 354.611 1, 347.096, 245.051 0, 203.053 9, 127.039 6, 97.029 5	$C_{18}H_{32}O_{16}$	菊粉
9	1.27	M+H	130.050 4	130.049 9	4.13	84.045 6, 130.050 4, 84.082	$C_5H_7NO_3$	焦谷氨酸
10	1.40	M-H	243.061 9	243.062 2	-1.43	110.022 4, 128.033 2, 200.055 1, 243.063 0, 96.006 6, 182.044 1, 115.001 3, 82.027 2, 152.033 2, 71.010 1	$C_9H_{12}N_2O_6$	尿苷
11	1.41	M+H	268.104 7	268.104 1	2.26	136.062 2, 268.103 9	$C_{10}H_{13}N_3O_4$	腺苷
12	1.47	M+H	132.102 4	132.101 9	3.69	86.097 6, 72.938 5	$C_6H_{13}NO_2$	异亮氨酸
13	3.34	M+H	127.039 5	127.039 0	3.98	109.029 3, 81.034 8, 127.039 6, 53.040 2	$C_6H_6O_3$	5-羟甲基糠醛
14	3.41	M+H	243.098 0	243.097 6	1.89	124.040 0, 108.045 3, 56.051 1, 225.088 0, 102.056 0, 69.035 0, 164.070 9, 109.053 6, 74.061 2, 226.071 5	$C_{10}H_{14}N_2O_5$	胸苷
15	4.83	M-H	329.0885	329.0878	2.06	167.0333, 108.0193, 152.0096, 123.0429	$C_{14}H_{18}O_9$	香草酸葡萄糖苷
16	5.68	M-H	353.088 3	353.087 8	1.54	191.054 7, 179.033 7, 135.043 0, 353.088 4, 111.006 3, 78.956 3, 233.104 6	$C_{16}H_{18}O_9$	新绿原酸
17	5.86	M+FA-H	236.056 0	236.056 4	-1.84	192.065 4, 236.056 0, 67.015 7, 84.042 9	$C_{10}H_{16}NO_3$	3-糠基-2-吡咯羧酸酯
18	6.93	M-H	375.130 1	375.131 0	-2.23	375.130 0, 213.076 1, 59.011 3, 73.027 0, 341.109 5, 69.032 0, 71.011 2, 113.022 0, 258.077 6, 89.021 8	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	核黄素
19	7.36	M+FA-H	227.055 5	227.056 1	-2.58	111.006 4, 227.056 0, 183.061 4, 71.009 8, 58.003 5, 67.016 3, 139.074 3, 225.125 4, 115.001 4, 93.032 1	$C_9H_{10}O_4$	2-(3,4-二羟基-2-甲基苯基)乙酸
20	7.42	M+FA-H	451.146 4	451.145 7	1.47	243.093 0, 101.021 9, 405.138 7, 141.053 6, 155.033 1, 179.055 3, 89.021 8, 96.957 6, 59.011 2, 61.985 8	$C_{17}H_{26}O_{11}$	莫诺苷
21	7.42	M-H	353.088 2	353.087 8	1.25	191.054 8, 353.089 4, 111.006 4	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸
22	7.74	M-H	353.088 2	353.087 8	1.30	173.044 0, 135.043 1, 179.033 5, 191.054 7, 353.087 8, 93.032 1, 85.027 1, 111.042 9, 67.016 4	$C_{16}H_{18}O_9$	隐绿原酸
23	8.11	M+FA-H	315.109 1	315.108 5	1.77	237.076 8, 145.029 2, 150.485 6, 119.047 9, 261.375 2, 66.255 3, 65.835 7, 80.876 8, 106.368 7, 56.711 2	$C_{13}H_{18}O_6$	苯基 α -D-吡喃葡萄糖苷
24	8.26	M+FA-H	457.193 4	457.192 7	1.65	411.187 6, 71.011 3, 101.021 9, 59.011 6, 249.134 2, 85.026 9, 73.026 9, 113.022 0, 61.985 8, 116.926 3	$C_{17}H_{32}O_{11}$	grandoside
25	8.43	M+FA-H	251.055 9	251.056 1	-0.64	251.056 4, 161.059 2, 131.047 9, 103.052 8, 223.059 4, 130.040 3, 250.145 7, 147.043 7, 143.047 2, 205.049 7	$C_{11}H_{10}O_4$	5,7-二甲氧基香豆素
26	8.48	M+NH4	274.107 8	274.107 4	1.59	274.108 0, 103.055 2, 126.055 7, 131.049 6, 108.045 5, 107.050 0, 79.055 7, 149.060 0, 273.092 3	$C_{15}H_{12}O_4$	(Z)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl) prop-2-en-1-one
27	8.82	M-H	415.103 9	415.103 4	1.23	267.066 5, 415.103 9, 295.061 2, 277.051 3	$C_{21}H_{20}O_9$	葛根素

续表 1

编号	保留时间/min	加合物	m/z 实测值	m/z 理论值	误差 (10^{-6})	碎片离子 m/z	分子式	化合物名称
28	9.17	M+FA-H	435.151 1	435.150 8	0.80	435.150 1, 227.091 7, 101.021 9, 127.038 0, 275.291 7, 87.318 7, 127.048 0, 73.073 7, 187.097 7, 61.888 2	$C_{17}H_{26}O_{10}$	马钱苷
29	9.19	M+FA-H	375.166 5	375.166 1	1.15	255.088 5, 375.170 3, 341.108 6, 71.011 2, 59.011 3, 89.021 9, 111.006 2, 329.160 1, 374.220 9, 286.071 9	$C_{16}H_{26}O_7$	schizonpetoside a
30	9.19	M-H	593.152 1	593.151 2	1.61	593.152 4, 353.066 4, 297.076 8, 383.077 9, 473.108 5, 296.069 2, 325.072 7	$C_{27}H_{30}O_{15}$	multiflorin b
31	9.44	M+H	137.060 1	137.059 7	2.52	136.022 0, 137.060 1, 81.071 2, 95.086 6, 114.971 7, 93.071 0, 91.055 3, 136.075 8, 109.065 8, 136.112 2	$C_8H_8O_2$	4'-羟基苯乙酮
32	9.54	M+FA-H	373.150 9	373.150 4	1.21	164.082 4, 327.144 1, 165.089 8, 161.044 1, 134.045 3, 149.059 2, 241.082 9, 328.150 3, 199.358 2	$C_{16}H_{24}O_7$	百里唯唯 5-O- β -吡喃葡萄糖苷
33	9.60	M+H	153.055 0	153.054 6	2.03	131.974 8, 113.964 5, 72.938 6, 111.045 0, 125.060 4, 90.948 9, 153.055 1, 93.034 7, 65.040 1, 70.943 2	$C_8H_8O_3$	异香兰素
34	9.71	M-H	461.109 6	461.108 9	1.41	299.057 1, 461.109 0, 284.033 0, 255.030 1, 283.025 3, 111.006 4, 61.985 8, 116.926 8, 242.507 7, 182.756 9	$C_{22}H_{22}O_{11}$	异金雀黄素
35	9.79	M+H	165.055 0	165.054 6	2.30	147.044 4, 100.025 4, 119.049 9, 118.035 6, 91.055 4, 142.967 4, 139.982 6, 95.050 3	$C_9H_8O_3$	对香豆酸
36	9.80	M-H	563.141 3	563.140 6	1.22	563.140 1, 353.067 0, 383.078 8, 297.076 3, 443.097 9, 473.110 4, 503.123 7, 295.061 2	$C_{26}H_{28}O_{14}$	夏佛塔苷
37	10.03	M+FA-H	461.109 6	461.108 9	1.40	253.0502, 415.1037, 252.0426, 461.1085	$C_{21}H_{20}O_9$	大豆苷
38	10.22	M+FA-H	280.082 8	280.082 7	0.40	193.049 2, 164.070 0, 244.061 2, 109.014 6, 134.035 4, 178.025 5, 147.043 1, 262.072 0, 149.058 8, 176.070 3	$C_{12}H_{13}NO_4$	cherrianoine
39	10.42	M+H	447.129 5	447.128 6	1.93	285.076 2, 270.053 0	$C_{22}H_{22}O_{10}$	calycosin 7-O-葡萄糖苷
40	10.66	M-H	223.060 5	223.061 2	-2.92	123.030 3, 94.027 3, 180.101 4, 208.036 7, 109.0145, 96.043, 223.0606, 79.9547, 198.113, 193.0131	$C_{11}H_{12}O_5$	芥子酸
41	10.87	M+H	193.050 1	193.049 6	2.55	193.050 2, 128.020 0, 177.054 9, 133.028 9, 178.025 9, 111.969 1, 137.060 2, 167.977 8, 145.028 9, 192.084 1	$C_{10}H_8O_4$	东莨菪内酯
42	10.89	M+H-H ₂ O	177.055 0	177.054 6	2.15	145.028 8, 177.055 0, 117.034 3, 89.039 8, 149.060 2, 134.036 7, 149.023 9, 135.044 9, 55.936 0, 93.070 9	$C_{10}H_{10}O_4$	阿魏酸
43	11.01	M-H	429.082 8	429.082 7	0.33	253.050 3, 429.082 6, 113.022 0, 88.985 4, 85.027 1, 59.011 2, 71.011 3, 99.006 3, 89.021 9, 87.006 3	$C_{21}H_{18}O_{10}$	大豆苷元-7-O-葡萄糖醛酸苷
44	11.07	M-H	300.999 1	300.999 0	0.42	300.998 9	$C_{14}H_6O_8$	鞣花酸
45	11.13	M-H	417.119 3	417.119 1	0.46	255.066 1, 417.119 6, 119.048 0, 135.006 4, 153.017 5, 91.016 6, 72.990 4, 113.853 8, 383.321 0, 207.721 0	$C_{21}H_{22}O_9$	甘草苷
46*	11.20	M+FA-H	491.119 7	491.119 5	0.38	283.061 2, 268.037 8, 491.120 0	$C_{22}H_{22}O_{10}$	毛蕊异黄酮葡萄糖苷
47	11.52	M+H	477.140 0	477.139 2	1.82	315.087 0, 300.063 4, 477.141 6, 70.066 5	$C_{23}H_{24}O_{11}$	黄芪异黄酮葡萄糖苷
48	11.61	M-H	447.094 3	447.093 3	2.43	85.021 1, 269.138 2	$C_{21}H_{20}O_{11}$	木犀草苷
49	11.70	M-H	459.094 0	459.093 3	1.68	459.094 1, 113.021 9, 85.026 9, 116.926 1, 268.037 6, 283.060 9, 71.011 3, 59.011 3, 99.006 5, 111.006 3	$C_{22}H_{20}O_{11}$	花萼菌素-7-O- β -D-葡萄糖苷
50	12.22	M+H	265.097 4	265.097 2	0.74	265.097 8, 206.084 4, 247.087 1, 156.997 8, 207.090 2, 219.092 3	$C_{16}H_{12}N_2O_2$	川芎嗪
51	12.26	M+FA-H	603.230 6	603.229 4	1.98	59.011 3, 89.021 9, 71.011 2, 179.053 7, 101.021 8, 113.021 9, 119.033 0, 467.194 0, 161.043 7, 323.097 7	$C_{26}H_{38}O_{13}$	lobetyolinin
52	12.50	M+H-H ₂ O	327.086 6	327.086 3	1.02	267.065 7, 210.067 9, 98.985 2, 284.295 1, 181.065 2, 57.071 5, 207.066 2, 253.085 6, 182.071 6, 55.055 8	$C_{18}H_{16}O_7$	茯苓醇

续表 1

编号	保留时间/min	加合物	m/z 实测值	m/z 理论值	误差 (10^{-6})	碎片离子 m/z	分子式	化合物名称
53	12.62	M-H	579.172 8	579.171 9	1.60	151.001 7, 271.061 5, 579.172 2, 119.047 9, 107.011 5, 459.115 1, 65.000 6, 235.024 1, 83.011 3, 313.073 6	$C_{27}H_{32}O_{14}$	柚皮苷
54	12.71	M+FA-H	671.220 9	671.219 3	2.38	301.108 6, 463.161 2, 121.027 4, 625.214 8, 135.043 1, 271.060 4	$C_{29}H_{38}O_{15}$	异粘菌素-7,2'-二-O-葡萄糖苷
55	13.05	M-H	609.183 6	609.182 5	1.89	301.071 7, 609.182 2, 151.001 1, 164.009 7, 134.035 2, 286.048 9, 112.433 0	$C_{28}H_{34}O_{15}$	橙皮苷
56	13.46	M+H	338.196 4	338.196 2	0.55	86.097 8, 338.197 1, 161.096 8, 189.091 5, 132.102 5, 119.086 6, 91.055 4, 147.080 9, 292.190 4, 69.071 5	$C_{18}H_{27}NO_5$	阔叶千里光碱
57	13.67	M+H	488.251 0	488.250 4	1.29	510.235 1, 70.066 6	$C_{24}H_{33}N_5O_6$	太子参环肽 J
58*	13.70	M+FA-H	441.176 9	441.176 6	0.66	179.054 4, 143.069 1, 89.021 9, 215.106 6, 159.079 8, 185.095 8, 59.011 3, 89.037 2, 71.011 3, 119.032 6	$C_{20}H_{28}O_8$	党参炔苷
59	13.70	M-H	1 415.634 6	1 415.633 6	0.71	1415.635 5, 1005.493 9, 987.479 6, 383.119 4	$C_{64}H_{104}O_{34}$	桔梗皂苷 G1
60	13.84	M+H-2H ₂ O	327.159 3	327.159 0	0.70	137.060 2, 98.985 2, 163.075 9, 284.295 7, 133.065 2, 327.160 3, 57.071 6, 295.133 8, 131.049 8, 103.055 2	$C_{20}H_{26}O_6$	shikodomin
61	14.20	M-H	445.077 9	445.077 6	0.65	269.045 8, 113.022 2, 445.077 2	$C_{22}H_{18}O_{11}$	黄芩苷
62*	14.27	M+FA-H	475.124 5	475.124 6	-0.26	267.066 4, 252.042 5, 475.124 1	$C_{22}H_{22}O_9$	刺苈柄花苷
63	14.57	M-H	255.066 0	255.066 3	-0.85	255.066 0, 149.022 4, 91.016 5, 135.006 5	$C_{13}H_{12}O_4$	甘草素
64	14.64	M-H	253.050 3	253.050 6	-1.18	253.050 5, 149.022 3	$C_{13}H_{10}O_4$	大豆苷元
65	14.68	M+FA-H	737.374 1	737.375 4	-1.69	737.377 9, 165.101 5, 557.307 9, 540.285 8, 330.183 5, 542.301 0, 155.079 7, 129.101 0, 456.911 4, 96.00 7	$C_{37}H_{56}O_{12}$	3-O- β -D-吡喃葡萄糖基桔梗酸甲酯
66	14.79	M+FA-H	1 299.587 1	1 299.586 3	0.62	1 253.582 3, 843.440 2, 519.333 9, 471.311 5, 337.114 2, 179.054 7	$C_{58}H_{94}O_{29}$	桔梗苷 a
67	14.89	M+FA-H	1 267.560 7	1 267.560 1	0.52	1 267.561 5, 895.434 0, 485.291 4, 1 237.548 7	$C_{57}H_{90}O_{28}$	16-氧代桔梗皂苷 D
68	15.12	M+FA-H	353.103 4	353.103 1	0.83	353.103 1, 338.079 2, 323.057 1, 251.070 5, 279.065 5, 295.060 6, 322.084 0, 307.058 2, 207.080 8, 263.071 0	$C_{19}H_{16}O_4$	华法林
69	15.23	M+H	301.107 1	301.107 1	0.16	167.070 8, 261.160 3, 120.081 6, 152.047 3, 301.107 6, 134.036 7, 86.097 7	$C_{17}H_{16}O_5$	methylinissolin
70	15.25	M+FA-H	507.150 6	507.150 8	-0.34	299.092 9, 507.152 5, 269.046 6, 284.068 8, 384.519 9, 228.828 0, 390.626 2, 139.912 8, 151.066 1, 412.049 9	$C_{23}H_{26}O_{10}$	9,10-二氧基-紫檀-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷
71*	15.71	M+H	285.075 7	285.075 8	-0.19	299.062 8, 300.065 9, 95.086 6, 114.223 6, 124.383 7, 68.780 9, 72.904 2, 59.474 3, 83.311 7	$C_{16}H_{12}O_5$	毛蕊异黄酮
72	15.73	M+H	303.122 8	303.122 7	0.11	123.044 8, 167.070 8, 133.065 3, 161.059 8, 193.086 4, 149.060 2	$C_{17}H_{18}O_5$	7,2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮
73	15.73	M-H	463.161 5	463.161 0	1.27	301.108 7, 463.161 2, 121.027 0, 271.063 6, 135.042 2, 164.046 6, 286.085 5	$C_{22}H_{28}O_{10}$	黄芪黄素
74	16.05	M-H	461.145 9	461.145 3	1.36	299.092 4, 269.046 1, 284.070 5, 121.027 1, 241.051 2	$C_{22}H_{26}O_{10}$	芍药新苷
75	16.13	M+H	401.160 1	401.159 5	1.42	330.111 0, 383.150 4, 167.070 6, 401.159 8, 315.087 5, 269.080 9, 351.123 0, 217.086 9, 86.097 8, 107.050 1	$C_{22}H_{24}O_7$	戈米辛 r
76	16.21	M-H	1 253.581 4	1 253.580 8	0.49	1 253.581 4, 843.439 7, 519.332 3, 113.021 9, 663.374 9, 825.429 7	$C_{58}H_{94}O_{29}$	去苷糖桔梗皂苷 D3
77	16.29	M+FA-H	1 005.492 7	1 005.491 2	1.46	681.385 9, 1 005.495 3, 959.484 7, 89.022 0, 101.021 9, 71.011 2	$C_{47}H_{76}O_{20}$	deapi-platyocostide f
78	16.29	M+H	315.086 3	315.086 3	0	315.086 8, 300.063 4	$C_{17}H_{14}O_6$	华良姜素
79	16.31	M-H	1 091.528 0	1 091.528 0	0.02	1 091.530 3, 681.386 4, 337.114 6, 85.026 9, 101.021 9	$C_{52}H_{84}O_{24}$	去苷糖桔梗皂苷 D
80	16.33	M-H	459.093 6	459.093 3	0.69	268.037 8, 283.061 2, 113.022 1, 85.026 9, 459.093 5, 175.023 2, 163.002 2, 71.011 3, 59.011 3, 96.957 6	$C_{22}H_{20}O_{11}$	汉黄芩苷

续表 1

编号	保留时间/min	加合物	m/z 实测值	m/z 理论值	误差 (10^{-6})	碎片离子 m/z	分子式	化合物名称
81	16.34	M+FA-H	1 283.591 6	1 283.591 4	0.18	1 237.587 4, 827.445 2, 503.339 1, 665.392 2, 809.433 5	C ₅₈ H ₉₄ O ₂₈	桔梗苷 h
82*	16.46	M-H	1 223.570 2	1 223.570 2	-0.05	1 223.571 0, 469.156 5, 681.385 5, 113.022 1, 131.032 7	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₈	桔梗皂苷 D
83	16.48	M+FA-H	1 179.544 9	1 179.544 0	0.77	1 133.540 5, 681.385 9, 337.114 3, 723.395 4, 113.022 1	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₅	桔梗苷 b
84	16.48	M-H	1 369.627 3	1 369.628 1	-0.64	1 369.630 2, 469.155 6, 827.446 6, 131.032 6, 113.022 0	C ₆₅ H ₁₀₂ O ₃₂	桔梗苷 g ₃
85	16.49	M+FA-H	1 121.538 9	1 121.538 5	0.34	665.391 8, 1 075.534 3, 1 121.541 1, 337.114 4, 113.022 0, 101.021 9, 131.032 8, 85.026 9, 145.048 5	C ₅₂ H ₈₄ O ₂₃	桔梗苷 j
86	16.50	M+H	487.342 5	487.341 8	1.46	487.343 5, 95.086 5, 145.101 9, 119.086 2, 91.566 4, 109.102 1, 203.143 0, 107.086 5, 105.070 8, 187.148 9	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	16 α , 27-dihydroxy-dehydrotrametenolic acid
87	16.54	M+FA-H	889.445 3	889.443 9	1.63	843.439 0, 471.311 7, 519.334 0, 71.011 3, 89.021 6, 179.057 2, 101.023 0, 119.032 2, 113.022 0, 221.066 1	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₇	桔梗苷 i
88	16.57	M-H	1 265.581 9	1 265.580 8	0.85	1 265.581 3, 681.386 4, 469.156 3, 131.032 8, 113.021 8	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₉	3''-O-乙酰桔梗苷 D
89	16.58	M+FA-H	1 133.503 1	1 133.502 2	0.80	677.355 1, 1 087.498 9, 1 133.505 1, 337.113 8, 101.021 8, 85.026 8, 113.022 0, 131.033 3, 405.280 3	C ₅₂ H ₈₀ O ₂₄	桔梗苷 m ₃
90	16.58	M-H	279.123 7	279.123 8	-0.38	279.123 8, 169.085 4, 95.047 5, 69.031 9, 150.030 0	C ₁₃ H ₂₀ O ₅	psilostachyin
91	16.61	M-H	1 207.577 2	1 207.575 3	1.58	1 207.578, 469.156 1, 665.392 0, 131.032 8, 113.021 9, 85.026 9	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₇	远志皂苷 D
92	16.63	M-H	1 237.549 8	1 237.549 5	0.27	1 237.552 0, 1 027.477 4, 1 207.540 9, 485.292 0, 469.157 2	C ₅₇ H ₉₀ O ₂₉	桔梗酸 a
93	16.64	M-H	1 219.539 4	1 219.538 9	0.40	1 219.539 1, 677.353 3, 469.156 3, 131.032 8, 113.022 2, 85.026 9	C ₅₇ H ₈₈ O ₂₈	桔梗酸内酯
94	16.66	M+H	187.039 2	187.039 0	0.92	187.039 5, 131.049 8, 115.055 1, 143.049 6	C ₁₁ H ₆ O ₃	补骨脂素
95	16.72	M+FA-H	1 295.591 7	1 295.591 4	0.22	1 295.591 8, 843.439 4, 519.333 0, 663.375 0, 113.022 0, 1 249.593 0	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₈	3''-O-acetylpsilostachyin d
96	16.90	M+FA-H	543.223 9	543.223 6	0.53	543.222 9, 123.042 7, 96.957 4, 91.571 2, 279.960 3, 481.217 9, 525.213 7, 385.509 1, 111.364 1, 107.634 1	C ₂₈ H ₃₄ O ₈	当归甾异戈辛辛 o
97	16.92	M-H	269.045 6	269.045 5	0.13	269.045 6	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	芹菜素
98	17.08	M+H	187.039 2	187.039 0	0.99	187.039 5, 131.049 7	C ₁₁ H ₆ O ₃	异补骨脂素
99	17.41	M+H	845.453 7	845.453 0	0.89	521.349 4, 455.316 7, 485.327 5, 683.401 8, 95.086 7, 119.086 2, 187.148 9, 503.338 5, 203.143 7, 145.101 7	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₇	桔梗苷 k
100	17.57	M+H	521.347 9	521.347 3	1.19	485.327 6, 455.317 1, 503.338 3, 95.086 7, 119.086 2, 521.348 6, 203.143 6, 145.101 8, 105.070 9, 187.148 8	C ₃₀ H ₄₈ O ₇	3''-O-乙酰桔梗苷 D2 去糖基化
101	17.57	M+FA-H	727.391 7	727.391 0	0.92	681.386 4, 59.011 3, 71.011 3, 89.021 9, 101.022 0, 391.301 8	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₂	3-O- β -D-吡喃葡萄糖基桔梗二烯苷元
102	17.67	M-H	299.055 8	299.056 1	-0.88	284.032 9, 299.056 5, 153.989 0	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	香叶木素
103	17.73	M+H-H ₂ O	517.316 7	517.316 0	1.45	517.317 3, 187.148 5, 469.296 5, 119.086 2, 203.143 6, 455.316 0, 535.328 1, 95.087 1, 145.101 7, 105.070 8	C ₃₀ H ₄₆ O ₈	桔梗酸 b
104	17.76	M-H	269.045 4	269.045 5	-0.37	269.045 6	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	黄芩素
105*	17.79	M+H	779.445 1	779.445 1	0.02	801.428 2, 399.238 2	C ₄₀ H ₅₈ N ₈ O ₈	太子参环肽 B
106	17.80	M+FA-H	723.360 2	723.359 7	0.67	677.354 9, 71.011 4, 405.279 2, 85.026 8, 101.021 9, 99.006 2, 59.011 3	C ₃₆ H ₅₄ O ₁₂	桔梗苷 ml
107	17.84	M+H-H ₂ O	203.179 5	203.179 4	0.59	149.023 8, 203.179 9, 147.117 1, 119.086 6, 139.982 5, 105.070 9, 95.087 0, 109.102 1, 57.071 5, 203.144 2	C ₁₅ H ₂₄ O	(1ar, 4as, 7r, 7ar, 7br)-1, 1, 7-trimethyl-4-methylenedecahydro-1h-cyclopropa (E) azulen -7-ol
108	17.86	M+H-H ₂ O	487.342 1	487.341 8	0.62	469.333 7, 95.086 7, 119.086 3, 203.143 7, 187.148 5, 107.086 7, 93.070 9, 105.071 0, 133.101 6, 121.102 2	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	远志酸
109	17.87	M+FA-H	711.396 9	711.396 1	1.07	665.392 1, 59.011 3, 71.011 2, 101.021 9, 85.027 1	C ₃₆ H ₅₈ O ₁₁	远志酸-3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷
110*	17.89	M-H	955.491 3	955.490 8	0.57	955.492 6, 793.438 0	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	人参皂苷 Ro

续表 1

编号	保留时间/min	加合物	m/z 实测值	m/z 理论值	误差 (10^{-6})	碎片离子 m/z	分子式	化合物名称
111	17.96	M-H	255.065 9	255.066 3	-1.23	119.047 8, 255.064 6, 135.006 6, 153.017 3, 91.016 2, 219.844 5, 84.424 2, 139.289 8, 161.549 8, 187.491 3	$C_{15}H_{12}O_4$	异甘草素
112	18.11	M+H-H ₂ O	517.316 7	517.316 0	1.42	517.318 2, 499.307 4, 337.253 6, 355.265 3, 535.328 6, 299.062 0, 105.071 0, 107.086 4, 145.101 8, 93.070 9	$C_{30}H_{46}O_8$	桔梗酸 a
113	18.22	M+H-H ₂ O	205.086 1	205.085 9	0.78	149.023 8, 204.138 8, 57.071 5, 115.964 8, 139.982 7, 121.029 4, 165.113 7	$C_{12}H_{14}O_4$	阿魏酸乙酯
114*	18.26	M+H	269.080 8	269.080 9	-0.36	291.064 5, 81.071 2, 180.878 8, 159.405 0, 134.580 6, 99.636 1	$C_{16}H_{12}O_4$	刺苈柄花素
115	18.31	M+FA-H	871.471 1	871.469 7	1.64	825.461 4, 783.457 7, 166.706 7, 208.638 6, 484.275 2, 396.881 6, 96.958 2, 401.388 1, 438.079 6, 229.003 2	$C_{43}H_{70}O_{15}$	异黄芪皂苷 II
116	18.52	M-H	793.438 6	793.438 0	0.81	793.439 1, 75.006 2, 85.026 9, 631.384 9, 113.022 2, 569.381 7	$C_{42}H_{66}O_{14}$	竹节参皂苷WA
117	18.54	M+H	449.217 6	449.217 0	1.34	431.206 6, 342.147 2, 373.164 6, 327.125 4, 207.845 7, 311.130 6, 256.109 3, 105.030 8, 310.061 7, 67.288 2	$C_{24}H_{32}O_8$	戈米辛 q
118	18.63	M+H-H ₂ O	401.196 2	401.195 9	0.83	401.196 5, 370.178 0, 337.143 0, 338.154 6, 332.128 3, 369.170 7, 318.108 0, 417.334 7, 323.128 1, 419.208 1	$C_{23}H_{30}O_7$	戈米辛 s
119	18.76	M+H	817.424 9	817.424 3	0.68	839.408 1	$C_{42}H_{56}N_8O_9$	pseudostellarin g
120	18.92	M+H	317.138 4	317.138 4	0.15	201.055 1, 299.129 5, 55.055 8, 97.102 1, 145.064 9, 125.096 9, 79.055 6, 83.086 8, 81.071 2, 189.112 7	$C_{18}H_{20}O_5$	7-O-甲基异粘液菌醇
121	19.08	M+H	878.513 2	878.513 5	-0.30	900.497 6	$C_{45}H_{67}N_9O_9$	太子参环肽 E
122	19.08	M+H	455.352 3	455.352 0	0.57	437.342 9, 419.331 6, 109.102 0, 141.127 6, 95.086 6, 123.117 4, 107.086 6, 81.071 3, 119.086 3, 71.050 6	$C_{30}H_{46}O_3$	松苓新酸
123	19.27	M-H	911.502 2	911.501 0	1.40	911.502 6, 71.011 3, 85.027 3, 113.022 1, 75.006 1	$C_{47}H_{76}O_{17}$	黄芪甲苷 viii
124	19.27	M-H	283.061 1	283.061 2	-0.11	268.037 9, 283.060 8, 163.001 6, 109.998 2	$C_{16}H_{12}O_5$	刺槐素
125	19.37	M+H-H ₂ O	415.211 9	415.211 5	0.94	415.212 9, 384.194 2, 346.141 7, 369.170 9, 400.190 7, 328.132 0, 338.151 5, 385.203 4, 353.174 9, 323.128 9	$C_{24}H_{32}O_7$	isochisandrin
126	19.57	M+H	403.139 2	403.138 8	0.95	403.139 8, 373.092 6, 388.116 4, 183.028 7, 330.073 5, 211.023 6	$C_{21}H_{22}O_8$	川陈皮素
127	19.63	M-H	283.061 1	283.061 2	-0.23	268.038 1, 283.061 4, 109.998 6, 163.001 6, 165.988 4	$C_{16}H_{12}O_5$	鹰嘴豆芽素 A
128	19.75	M+H	387.180 6	387.180 2	0.80	409.163 9, 225.209 6, 127.281 4, 96.391 8, 76.616 5, 61.632 2, 69.537 2, 54.000 0	$C_{22}H_{26}O_6$	(-)-戈米辛 I2
129	19.91	M-H	323.129 0	323.128 9	0.45	119.047 8, 323.129 2, 221.081 2, 203.070 3	$C_{20}H_{20}O_4$	补骨脂甲素
130	19.94	M+FA-H	575.250 4	575.249 8	1.03	575.253 2, 529.244 4, 467.245 4, 413.234 6, 277.814 4, 485.254 7, 61.985 8, 354.097 5, 95.690 0, 112.812 9	$C_{29}H_{38}O_9$	tigloylgomisin q
131	19.95	M+H-H ₂ O	471.311 3	471.310 5	1.68	471.310 3, 453.300 9, 203.143 2, 423.288 8, 119.086 1, 187.148 3, 107.086 4, 471.246 1, 105.070 6, 340.461 0	$C_{29}H_{44}O_6$	18 α -hydroglycyrrhetic acid
132	19.95	M+NH ₄	254.211 6	254.211 4	0.72	95.086 7, 109.102 1, 81.071 2, 67.055 7, 237.185 5, 121.101 8, 254.212 2, 69.071 4, 57.071 5, 83.086 9	$C_{15}H_{24}O_2$	1, 2, 3, 3 α , 8, 8 α -hexahydro -2, 2, 8-trimethyl-5, 6-azulenemethanol
133	20.04	M+FA-H	795.454 9	795.453 6	1.60	749.449 3, 795.452 8, 59.011 2, 471.350 1, 603.392 7, 89.021 8, 496.235 6	$C_{41}H_{66}O_{12}$	α -常春藤皂苷
134*	20.09	M+H-H ₂ O	415.212 0	415.211 5	1.28	415.212 6, 384.194 2, 346.141 5, 338.151 8, 369.169 5, 328.132 2, 400.189 2, 385.200 5, 353.174 7, 342.146 8	$C_{24}H_{32}O_7$	五味子醇甲
135	20.19	M-H	645.365 2	645.364 4	1.20	645.366 1, 75.006 2, 85.026 9, 113.022 2	$C_{35}H_{54}O_{10}$	3-O- β -D-glucuronopyranosyl gypsenin
136	20.25	M+H	373.128 5	373.128 2	0.73	373.129 3, 343.081 9, 358.105 4, 297.077 0, 300.062 6	$C_{20}H_{20}O_7$	桔皮素
137	20.27	M+Na	891.472 0	891.471 2	0.88	891.472 7	$C_{45}H_{72}O_{16}$	黄芪皂苷 i
138	20.27	M+H-H ₂ O	455.352 5	455.352 0	1.19	437.342 8, 419.334 4, 109.102 1, 81.071 3, 141.127 6, 95.086 6, 107.086 5, 145.101 7, 185.133 0, 71.050 5	$C_{30}H_{48}O_4$	泽泻醇 b
139	20.30	M+NH ₄	548.249 9	548.249 0	1.63	401.160 6, 531.224 4, 383.149 4, 485.220 0, 337.107 3, 341.102 7, 352.130 8, 85.066 1, 353.138 0, 307.096 4	$C_{28}H_{34}O_{10}$	戈米辛 D

续表 1

编号	保留时间/min	加合物	m/z 实测值	m/z 理论值	误差 (10^{-6})	碎片离子 m/z	分子式	化合物名称
140	20.34	M+FA-H	239.128 3	239.128 9	-2.34	195.137 7, 154.061 6, 139.038 0, 167.142 2, 239.128 1	$C_{12}H_{18}O_2$	3-(S)-3-butyl-4,5-dihydrophthalide
141	20.36	M+H	389.196 2	389.195 9	0.76	389.196 8, 149.023 8, 287.091 9, 227.070 9, 71.086 9, 357.170 7, 167.034 6, 288.098 1, 137.060 1, 319.118 9	$C_{22}H_{28}O_6$	戈米辛 J
142*	20.61	M+H+H ₂ O	399.180 7	399.180 2	1.21	399.181 1, 330.110 4, 369.169 3, 368.163 5, 299.092 6, 315.088 5, 337.143 8, 326.116 7, 314.114 7, 353.139 6	$C_{23}H_{28}O_7$	五味子醇乙
143	20.65	M+Na	891.471 6	891.471 2	0.39	97.029 5, 139.039 4, 143.107 0, 217.071 5, 69.035 0, 109.102 3, 125.096 6, 141.127 2, 72.082 4, 717.402 8	$C_{45}H_{72}O_{16}$	异黄芪皂苷 i
144	21.10	M+H	501.249 1	501.248 3	1.55	401.197 5, 483.240 1, 55.055 9, 83.050 4, 370.177 2, 327.123 9, 338.150 9, 332.126 2, 323.129 2, 337.142 5	$C_{28}H_{36}O_8$	当归甙戈米辛 H
145	21.14	M+H	191.106 9	191.106 7	1.08	149.023 8, 191.106 9, 128.020 0, 189.164 1, 121.029 2, 173.096 9, 91.055 3, 105.070 8, 95.086 7, 146.030 3	$C_{12}H_{14}O_2$	藜本内酯
146	21.32	M+H	401.196 4	401.195 9	1.20	423.178 3	$C_{23}H_{28}O_6$	异南五味子木脂宁
147	21.35	M+H	417.191 2	417.190 8	1.02	300.098 3, 417.191 8	$C_{23}H_{28}O_7$	戈米辛 o
148	21.46	M+H+H ₂ O	505.222 5	505.222 1	0.83	105.034 5, 505.223 7, 95.050 4	$C_{30}H_{34}O_8$	苯甲酰戈米辛 h
149	21.52	M+H	385.165 0	385.164 6	1.00	385.165 3, 355.154 8, 383.332 3, 316.094 5, 354.145 5, 323.127 1, 81.071 2, 324.134 8, 343.118 0, 243.064 6	$C_{22}H_{24}O_6$	五味子苷 c
150	21.57	M+NH ₄	570.270 7	570.269 7	1.70	575.227 5, 356.161 9, 372.157 8, 341.139 4, 326.118 2, 358.138 8, 387.180 8, 315.124 0, 389.161 1, 431.207 6	$C_{31}H_{36}O_9$	苯甲酰戈米辛 q
151	21.68	M+Na	559.194 5	559.193 8	1.13	575.168 8, 431.206 8, 91.565 9, 387.182 9, 95.659 6, 153.388 4, 66.770 1, 201.674 6, 253.210 6, 193.983 6	$C_{30}H_{32}O_9$	苯甲酰戈米辛 p
152	21.71	M-H	265.123 3	265.123 4	-0.43	265.123 6, 247.112 5	$C_{18}H_{18}O_2$	厚朴酚
153	21.72	M+NH ₄	548.286 3	548.285 4	1.74	553.242 8, 415.175 3, 356.163 1, 372.158 3, 341.136 8, 358.141 5, 387.179 0, 315.122 9, 431.208 9, 453.188 2	$C_{29}H_{38}O_9$	当归甙戈米辛 q
154	21.75	M+NH ₄	404.171 0	404.170 4	1.65	245.081 5, 287.092 4, 227.070 7, 175.039 4, 113.217 6, 141.739 6, 203.279 7, 176.536 1, 187.710 4, 103.394 1	$C_{21}H_{22}O_7$	白花前胡甲素
155	21.81	M+H	339.159 4	339.159 1	0.97	339.160 0, 147.044 5, 69.071 4, 219.102 1, 271.097 5, 119.050 1, 151.039 6	$C_{21}H_{22}O_4$	补骨脂二氢黄酮甲醚
156*	22.05	M-H	483.311 6	483.311 6	0.13	483.311 9, 409.276 2, 410.281 5	$C_{30}H_{44}O_5$	茯苓酸 B
157	22.09	M+NH ₄	554.239 4	554.238 4	1.74	415.176 0, 340.130 6, 371.149 6, 342.109 5, 325.108 6, 373.127 4, 327.087 1, 310.118 6, 299.091 2, 295.096 1	$C_{30}H_{32}O_9$	五味子酯甲
158	22.14	M+NH ₄	538.208 3	538.207 1	2.18	559.126 2, 340.132 0, 371.148 9, 415.175 3, 342.110 0, 373.130 7, 308.372 3, 325.108 2, 437.160 2, 364.310 1	$C_{29}H_{28}O_9$	五味子素 d
159	22.18	M+H	233.153 9	233.153 6	1.09	233.154 0, 57.071 5, 69.071 3, 215.144 0, 95.086 7, 67.055 9, 79.055 6	$C_{15}H_{20}O_2$	土木香内酯
160	22.21	M+NH ₄	532.255 2	532.254 1	2.10	415.176 0, 340.132 0, 371.148 3, 342.110 0, 325.107 6, 299.092 1, 373.126 4, 312.100 9, 366.148 1, 327.084 7	$C_{28}H_{34}O_9$	五味子酯乙
161	22.47	M+H	403.212 2	403.211 5	1.58	425.195 3, 424.329 9, 423.321 6, 91.909 2, 119.085 9, 269.094 0, 76.665 7, 69.071 0, 167.488 1, 69.624 9	$C_{23}H_{30}O_6$	五味子酚
162	22.75	M+H	515.228 9	515.227 6	2.54	515.229 1, 385.166 1, 355.153 2, 316.094 8, 323.127 0, 312.099 5, 343.117 8, 354.146 2, 301.071 0, 298.083 3	$C_{28}H_{34}O_9$	当归甙戈米辛 p
163	23.54	M+H	417.227 8	417.227 2	1.35	191.107 1, 264.268 6, 81.071 3, 57.071 6, 147.117 0, 93.070 9, 91.055 4, 95.087 0	$C_{24}H_{32}O_6$	五味子甲素
164	23.96	M+H	401.196 7	401.195 9	1.94	401.197 3, 300.099 4, 301.105 4, 285.076 8, 331.119 1	$C_{23}H_{28}O_6$	五味子乙素

注: * 与对照品比对。

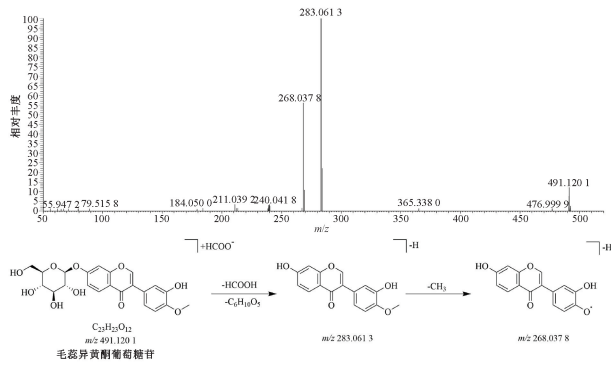


图2 毛蕊异黄酮葡萄糖苷二级质谱图及可能的裂解途径

时失去的4个糖基发生糖内键断裂生成 m/z 469.1563 的碎片离子, 另外该离子末端的呋喃糖键断裂, 生成 m/z 131.0327 $[C_5H_7O_4]^-$ 的呋喃糖基碎片离子, 然后进一步脱去一分子水生成碎片离子 m/z 113.0211 $[C_5H_7O_4-H_2O]^-$ 。结合以上裂解规律、参考文献 [15] 并与对照品对比, 推测化合物 **82** 为桔梗皂苷 D, 见图 3。

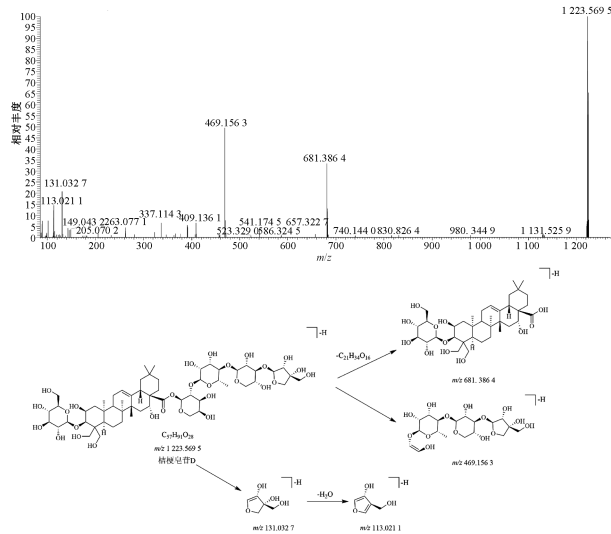


图3 桔梗皂苷 D 二级质谱图及可能的裂解途径

3.2.3 萜类成分质谱裂解表征 共鉴定出 13 种萜类化合物, 该类化合物容易发生麦氏重排和 RDA 裂解, 容易失去侧链。以化合物 **122** 为例, 其在正离子模式下产生 m/z 455.3534 $[M+H]^+$ 的准分子离子, 该离子连续失去二分子水分别生成碎片离子 m/z 437.3437 $[M+H-H_2O]^+$ 和 m/z 419.3324 $[M+H-2H_2O]^+$, 同时该离子发生 RDA 裂解生成碎片离子 m/z 141.1278 $[C_9H_{17}O]^+$, 然后侧链再失去一分子水生成碎片离子 m/z 123.1178 $[C_9H_{17}O-H_2O]^+$, 再连续失去 3 个 CH_2 后分别生成碎片离子 m/z 109.1019 $[C_9H_{17}O-H_2O-CH_2]^+$ 、95.0868 $[C_9H_{17}O-H_2O-2CH_2]^+$ 、81.0711 $[C_9H_{17}O-H_2O-3CH_2]^+$ 。结合以上裂解规律、文献 [16] 并与对照品对比, 推测化合物 **122** 为松苓新酸, 见图 4。

3.2.4 苯丙素类成分质谱裂解表征 共鉴定出 33 种苯丙素类化合物, 且主要为木脂素类。木脂素类化合物容易失去侧链上的甲基和甲氧基, 八元环上存在羟基的容易脱水,

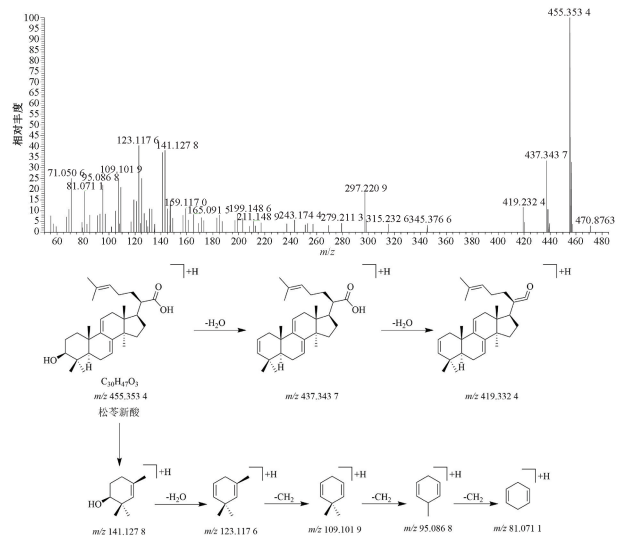


图4 松苓新酸二级质谱图及可能的裂解途径

八元环容易开环裂解生成五元环和七元环。以化合物 **134** 为例, 其在正离子模式下产生 m/z 415.2124 $[M+H-H_2O]^+$ 的脱水离子, 该离子容易脱去一系列 CH_3 、 CH_2O 和 CH_3O 碎片生成碎片离子 m/z 400.1903 $[M+H-H_2O-CH_3]^+$ 、385.2012 $[M+H-H_2O-CH_2O]^+$ 、384.1938 $[M+H-H_2O-CH_3O]^+$ 、369.1695 $[M+H-H_2O-CH_3O-CH_3]^+$ 、353.1759 $[M+H-H_2O-2CH_3O]^+$ 、338.1510 $[M+H-H_2O-2CH_3O-CH_3]^+$, 碎片离子 m/z 415.2124 中的八元环裂解失去 C_5H_9 生成五元环碎片离子 m/z 346.1410 $[M+H-H_2O-C_5H_9]^+$, 同时八元环裂解失去 C_3H_6 , 然后侧链再失去 CH_3O 生成七元环碎片离子 m/z 342.1819 $[M+H-H_2O-C_4H_9O]^+$, 再进一步脱去 CH_2 生成碎片离子 m/z 328.1318 $[M+H-H_2O-C_4H_9O-CH_2]^+$ 。结合以上裂解规律、参考文献 [17] 并与对照品对比, 推测化合物 **134** 为五味子醇甲, 见图 5。

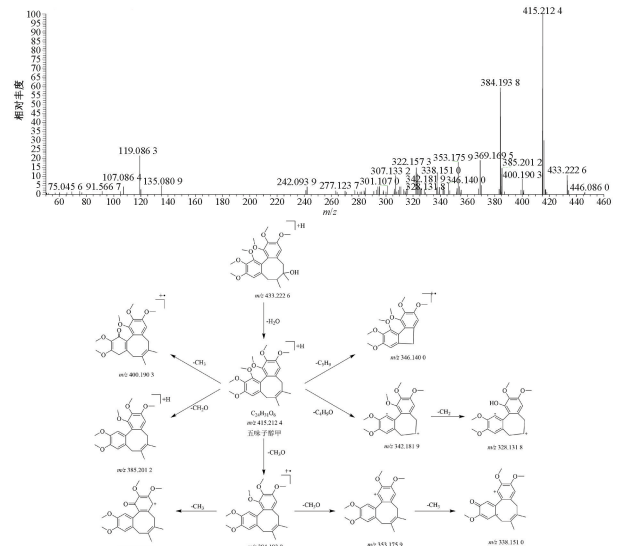


图5 五味子醇甲二级质谱图及可能的裂解途径

3.2.5 有机酸类成分质谱裂解表征 共鉴定出 9 种有机酸类化合物, 该类化合物容易失去 CH_3 、 H_2O 和 CO_2 等碎

片^[18]。以化合物 **21** 为例,其在负离子模式下产生 m/z 353.088 7 $[M-H]^-$ 的准分子离子,该离子失去一分子咖啡酰基生成奎尼酸离子 m/z 191.054 7 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$,再进一步失去侧链羧基和 2 分子 H_2O 后生成碎片离子 m/z 111.042 8 $[M-H-C_9H_6O_3-CH_2O_4]^-$ 。结合以上裂解规律、参考文献^[19],推测化合物 **21** 为绿原酸,见图 6。

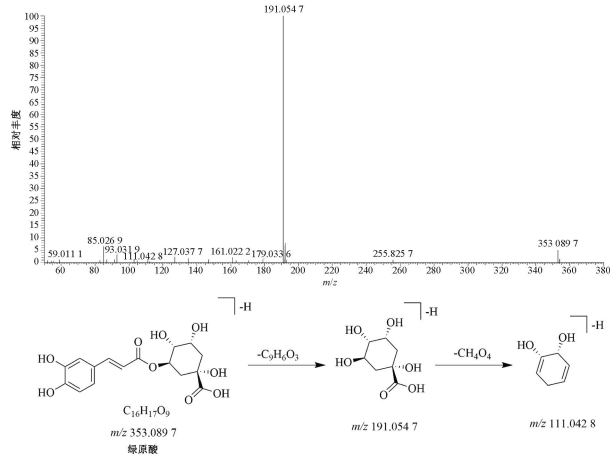


图 6 绿原酸二级质谱图及可能的裂解途径

3.2.6 其他类成分质谱裂解表征 共鉴定出 34 种,包括氨基酸类、生物碱类、低聚糖、核苷类、炔苷类、环肽类、酚类等化合物。以化合物 **58** 为例,其在负离子扫描模式下产生 m/z 441.179 2 $[M+HCOO]^-$ 的加合离子峰,该离子进行一系列糖苷键断裂和侧链断裂失去 Glu 、 H_2O 、 CH_2O 等碎片生成碎片离子 m/z 215.106 7 $[M-H-C_6H_{12}O_6]^-$ 、179.054 4 $[C_6H_{11}O_6]^-$ 、143.069 1 $[C_7H_{11}O_3]^-$ 、185.095 8 $[M-H-C_6H_{12}O_6-CH_2O]^-$ 、159.079 8 $[M-H-C_6H_{12}O_6-CH_2O-C_2H_2]^-$ 、89.021 9 $[C_7H_5]^-$,碎片离子 m/z 179.054 4 $[C_6H_{11}O_6]^-$ 通过单独或连续失去 $C_2H_4O_2$ 、 CH_3O 和 H_2O 生成碎片离子 m/z 119.032 7 $[C_6H_{11}O_6-C_2H_4O_2]^-$ 、89.021 9 $[C_6H_{11}O_6-CH_3O]^-$ 、71.011 3 $[C_6H_{11}O_6-CH_3O-H_2O]^-$ 和 59.011 3 $[C_6H_{11}O_6-2CH_3O]^-$ 。结合以上裂解规律、参考文献^[20]并与对照品对比,推测化合物 **58** 为党参炔苷,见图 7。

3.3 入血成分分析 血清样品的正、负离子模式下的检测基峰图见图 8。共鉴定出 21 种成分,其中原型化合物 5 种,代谢产物 16 种,代谢途径主要为脱羧基、醛糖酸化、硫酸盐化、2x 去饱和、甲基化、氧化(羟基化-环氧化-NS 氧化)等,代谢类型为 I 相、II 相代谢,见表 2。

4 讨论与结论

目前,在我国医药行业,尤其是在各级中医院中,中药医院制剂在保证临床用药,提高临床疗效、药学科研水平和增加经济、社会效益等方面都发挥了重要作用^[21-22]。但由于中药复方医院制剂本身存在成分复杂、基础研究薄弱、有效成分及作用机制不明确等因素,其制剂的安全性和有效性难以保证,从而成为制约中医药发展的瓶颈之一。随着新兴高端检测方法的出现,选择一种快速且准确的中

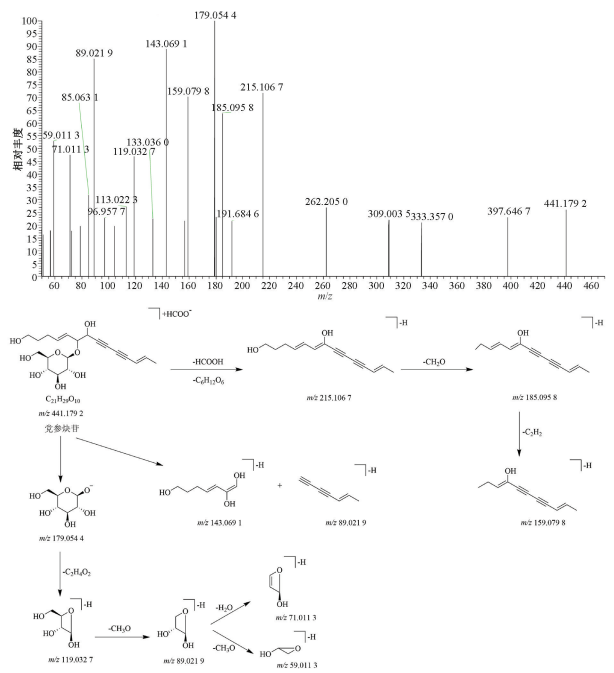


图 7 党参炔苷二级质谱图及可能的裂解途径

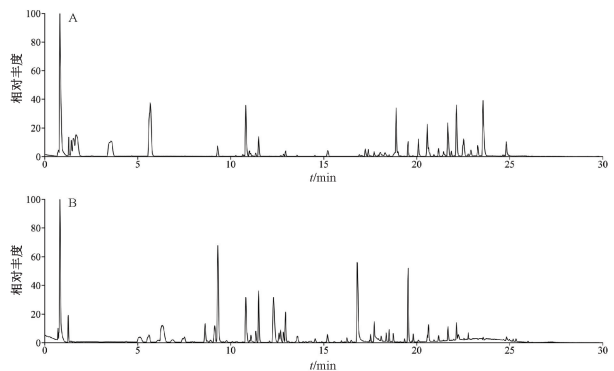


图 8 含药血清正 (A)、负 (B) 离子模式基峰离子流图

药复方鉴别方法对中药复方医院制剂的物质基础研究十分必要^[23]。本研究结果表明,利用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 可以全面、准确、快速地定性分析健脾扶正颗粒,在丰富健脾扶正颗粒的化学成分内涵的同时可为探究其药效物质基础、作用机制、提升质量控制研究及临床应用提供一定的理论依据。

本实验前期参考文献并考虑到中药复方制剂成分复杂,不同的成分在体内过程的药动学特征不同,为了更好地表征健脾扶正颗粒入血后的血中移行成分,同时也为了保证入血成分检出的全面性,最终选择检测的血清样本是不同时间点的混合样本。本研究所建立的测定方法稳定可靠,共鉴定化合物 164 种,以黄酮类、苯丙素类、皂苷类、萜类和有机酸为主,鉴定出入血原型成分 5 种,代谢产物 16 种,为黄酮类、苯丙素类、有机酸类和萜类成分。毛蕊异黄酮^[24]、刺槐素^[25]、黄芩素^[26]、黄芩苷^[27]、甘草素^[28]等黄酮类及其苷类成分具有抗炎、抗氧化应激、抗动脉粥样硬化及细胞保护等多种活性;五味子酯甲、五味子酯乙

表2 入血成分代谢产物鉴定结果

序号	t_R /min	加和物	m/z 理论值	m/z 实测值	误差(10^{-6})	原型	代谢反应	代谢类型
1	22.76	M+H	445.331 2	445.332 0	1.64	18 α -hydroglycyrrhetic acid	脱羧基	I相
2	2.93	M-H	357.082 7	357.083 1	1.15	2-(3,4-二羟基-3-甲基苯基)乙酸	醛糖酸化	II相
3	3.98	M-H	261.007 4	261.007 5	0.18	2-(3,4-二羟基-3-甲基苯基)乙酸	硫酸盐化	II相
4	2.93	M+FA-H	316.013 3	316.014 6	4.39	3-糠基-2-吡咯羧酸酯	硫酸盐化	II相
5	12.36	M-H	363.018 0	363.018 5	1.38	刺槐素	硫酸盐化	II相
6	24.44	M+H	429.372 7	429.373 6	1.97	泽泻醇 b	脱羧基	I相
7	11.63	M+H	447.092 2	447.093 4	2.81	黄芩素	醛糖酸化	II相
8	9.48	M-H	525.034 5	525.035 0	1.10	黄芩苷	硫酸盐化	II相
9	10.21	M-H	459.093 3	459.094 2	1.89	毛蕊异黄酮	醛糖酸化	II相
10	12.58	M-H	459.093 3	459.094 1	1.73	花萼菌素-7-O- β -D-葡萄糖苷	—	—
11	9.83	M-H	429.082 7	429.083 1	0.92	大豆苷元	醛糖酸化	II相
12	8.19	M-H	333.007 4	333.008 0	1.80	大豆苷元	硫酸盐化	II相
13	11.03	M-H	429.082 7	429.083 0	0.57	大豆苷元-7-O-葡萄糖醛酸苷	—	—
14	7.43	M-H	509.039 5	509.039 5	-0.13	大豆苷元-8-O-葡萄糖醛酸苷	硫酸盐化	II相
15	19.36	M+H	917.510 4	917.514 9	4.90	deapi-platycoside f	脱羧基	I相
16	20.30	M+NH ₄	548.249 6	548.249 9	0.64	戈米辛 D	—	—
17	16.93	M+H	417.190 8	417.191 5	1.61	异南五味子木脂宁	氧化(羟基化-环氧化-NS 氧化)	I相
18	17.82	M-H	269.081 9	269.081 2	-2.86	甘草素	甲基化	II相
19	4.56	M-H	401.108 9	401.109 2	0.63	莫诺昔	2x 去饱和	I相
20	22.10	M+NH ₄	554.239 0	554.239 1	0.16	五味子酯甲	—	—
21	22.21	M+NH ₄	532.254 7	532.255 3	1.13	五味子酯乙	—	—

注：“—”代表未进行代谢反应。

等苯丙素类成分^[29-30]具有具有保肝、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化和神经保护等药理作用；莫诺昔^[31]即萜类成分能治疗消化系统炎症与糖尿病肾病，具有抗氧化应激、抗炎等多种药理作用。这些可能是健脾扶正颗粒发挥药效作用的物质基础，但这些入血成分真正的药效作用仍有待确定，另外该医院制剂组方中含有牡蛎，但本研究未对其金属类成分进行专门检测，后续将采用电感耦合等离子体-质谱法进行检测，同时整合网络药理学及相关代谢组学等方法进一步深入研究，以明确健脾扶正颗粒药效的作用机制，为临床合理用药提供参考。

参考文献：

[1] 陈旻湖, 方秀才, 侯晓华, 等. 2022 中国功能性消化不良诊治专家共识[J]. 胃肠病学, 2023, 28(8): 467-481.

[2] Shrestha D B, Budhathoki P, Subedi P, et al. Acotiamide and functional dyspepsia: A systematic review and meta-analysis[J]. *Cureus*, 2021, 13(12): e20532.

[3] Sperber A D, Bangdiwala S I, Drossman, D A, et al. Worldwide prevalence and burden of functional gastrointestinal disorders, results of Rome Foundation Global Study[J]. *Gastroenterology*, 2021, 160(1): 99-114.

[4] Ford A C, Marwaha A, Sood R, et al. Global prevalence of, and risk factors for, uninvestigated dyspepsia: a meta-analysis [J]. *Gut*, 2015, 64(7): 1049-1057.

[5] Aziz I, Palsson O S, Whitehead W E, et al. Epidemiology, clinical characteristics, and associations for Rome IV functional

nausea and vomiting disorders in adults[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17(5): 878-886.

[6] Andreasson A, Talley N J, Walker M M, et al. An increasing incidence of upper gastrointestinal disorders over 23 years: A prospective population-based study in Sweden[J]. *Am J Gastroenterol*, 2021, 116(1): 210-213.

[7] 邓娜, 蔺晓源, 蔡光先. 功能性消化不良中医证型动物模型的研究概况[J]. 环球中医药, 2013, 6(2): 140-142.

[8] Caballero-Mateos A M, Caballero-Plasencia M R. How is the duodenal mucosa in functional dyspepsia? [J]. *Rev Esp Enferm Dig*, 2021, 113(6): 476-477.

[9] 聂格, 李晓玲, 石雨荷, 等. 健脾扶正颗粒 HPLC 指纹图谱的建立及 8 个化学成分含量测定[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(9): 1609-1616.

[10] 聂格, 童巧珍. 健脾补肺扶正颗粒治疗功能性消化不良 60 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2020, 36(3): 46-47.

[11] 郭少波, 徐露露, 蒋丽娟, 等. 迷迭香酸的大鼠体内代谢产物及代谢途径分析[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(21): 4704-4712.

[12] 王金凤, 马霞霞, 陈俊红, 等. UPLC-Q-TOF-MS 分析罗汉果叶醇提取物中化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(3): 328-334.

[13] 黄梦文, 吴欢, 于伟, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速辨识芪玉三龙汤化学成分[J]. 色谱, 2021, 39(7): 730-743.

[14] 康雨, 胡军华, 章晨峰, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法分析紫辛鼻鼈颗粒化学成分及入血成分[J]. 中成药, 2024,

- 46(4): 1093-1102.
- [15] Deng Y L, Ye X W, Chen Y F, *et al.* Chemical characteristics of *Platycodon grandiflorum* and its mechanism in lung cancer treatment[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 609825.
- [16] 方 潇, 丁晓萍, 陈霖霖, 等. 茯苓皮中三萜类化学成分的HPLC-LTQ-Orbitrap 分析[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(9): 2117-2121.
- [17] Huang X, Song F R, Liu Z Q, *et al.* Studies on lignan constituents from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. fruits using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry[J]. *J Mass Spectrom*, 2007, 42(9): 1148-1161.
- [18] 聂雨杉, 彭 潇, 马 雪, 等. UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS 法分析舒眠胶囊化学成分[J]. *中成药*, 2023, 45(1): 127-134.
- [19] 张 倩, 张加余, 隋丞琳, 等. HPLC-DAD-ESI-MS/MS 研究金银花水提工艺中绿原酸类成分的变化规律[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(23): 3564-3568.
- [20] Xie Q, Wang H X, Guan H D, *et al.* The *in vitro/in vivo* metabolic pathways analysis of lobetyol, lobetyolin, and lobetyolinin, three polyacetylenes from *Codonopsis Radix*, by UHPLC-Q/TOF-MS and UHPLC-MS/MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2023, 223: 115140.
- [21] 徐小龙, 伏东宁, 常志惠, 等. 中药医院制剂质量标准提高的研究进展[J]. *临床合理用药*, 2024, 17(23): 173-176.
- [22] 资 源. 基于中医药法视角医疗机构中药制剂发展现状及对策研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.
- [23] 吴 彤, 董晗硕, 刘 寅, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS^E 技术分析柴胡加龙骨牡蛎汤化学成分及入血成分[J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41(19): 2658-2671.
- [24] 符凯润, 李昕蓉, 魏小成, 等. 红芪黄酮类成分药理作用及机制研究进展[J]. *中草药*, 2024, 55(11): 3906-3915.
- [25] 王兆霞, 周 玲, 叶勒丹·马汉, 等. 刺槐素的药理研究进展[J]. *广西医学*, 2023, 45(2): 220-224.
- [26] 邱 爽, 牟佳佳, 邓雁如. 黄芩素的结构修饰及其药理活性研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2021, 31(5): 390-399.
- [27] 李 伟, 徐 伟. 黄芩苷药理作用研究进展[J]. *中西医结合研究*, 2022, 14(3): 193-196.
- [28] 石盘棋, 周 博, 孙晓燕, 等. 甘草黄酮苷元甘草素的研究及其应用[J]. *解放军医药杂志*, 2020, 32(5): 108-112.
- [29] 刘媛媛, 黄仕其, 李玉泽, 等. 五味子属植物木脂素类化学成分及其药理作用研究进展[J]. *中草药*, 2022, 53(6): 1903-1918.
- [30] 苏 维, 王欣悦, 付 港, 等. 南五味子属植物的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(1): 26-38.
- [31] 李 毛, 杨东东, 徐江雁. 莫诺苷药理作用研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(10): 70-75.