

HPLC-Q-Exactive-MS 法鉴定巴特日七味丸中化学成分

杨琳¹, 张谦², 李君^{2*}

1. 呼伦贝尔市第四人民医院 药剂科, 内蒙古 呼伦贝尔 021000

2. 内蒙古医科大学 药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110

摘要: **目的** 基于高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (HPLC-Q-Exactive-MS) 技术对巴特日七味丸中化学成分分析鉴定。**方法** 使用 Agilent Zorbax SB-Aq 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 0.35 mL/min, 柱温为 35 ℃, 进样量为 10 μL。采用电喷雾离子源 (ESI), 检测方式: Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率: 70 000, dd-MS² 分辨率: 17 500, 扫描范围: m/z 110~1 200。喷雾电压: 3.80 kV (+)、3.20 kV (-), 碰撞能量: 30 eV, 离子传输管温度: 300 ℃ (+)、400 ℃ (-), 辅助气体流量: 30 L/min, 辅助气温度: 350 ℃。利用 Thermo Xcalibur 3.0 软件对在正、负离子模式下获得的总离子流数据进行处理, 以各成分保留时间、元素组成、多级质谱碎片信息、与部分对照品比对做进一步确认。**结果** 共鉴定出 81 个化学成分, 包括 29 个生物碱类成分、16 个黄酮类成分、12 个有机酸类成分、9 个没食子酸酯类成分、5 个倍半萜类成分、3 个鞣质类成分、4 个脂肪酸类成分、3 个氨基酸类成分, 其中 10 个成分经与对照品比对得到进一步确证。并考察了槲皮素、新乌头原碱、莽草酸、没食子酰葡萄糖、克里拉克、去氢木香内酯、L-脯氨酸、亚油酸的 MS² 图和可能的裂解途径。**结论** HPLC-Q-Exactive-MS 技术可对巴特日七味丸中成分进行了快速、全面的定性分析, 为巴特日七味丸的药效物质研究提供参考。

关键词: 巴特日七味丸; 高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱; 总离子流; 槲皮素; 亚油酸

中图分类号: R284 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)11-2714-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.009

Identification of chemical components in Batri Qiwei Pills by HPLC-Q-Exactive-MS

YANG Lin¹, ZHANG Qian², LI Jun²

1. Department of Pharmacy, Hulunbuir Fourth People's Hospital, Hulunbuir 021000, China

2. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China

Abstract: **Objective** To analyze and identify the chemical constituents in Batri Qiwei Pills based on HPLC-Q-Exactive-MS. **Methods** The separation was performed on Agilent Zorbax SB-Aq column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase of methanol - 0.1% formic acid aqueous solution by gradient elution. The flow rate was 0.35 mL/min, column temperature was 35 ℃, and the volume of sample injection was 10 μL. Electrospray ionization (ESI) was used. The detection mode was Full MS/dd MS², the resolution of Full MS was 70 000, the resolution of dd-MS² was 17 500, and the scanning range was m/z 110 — 1 200. Spray voltage was 3.80 kV (+) and 3.20 kV (-), collision energy was 30 eV, ion transfer tube temperature was 300 ℃ (+) and 400 ℃ (-), auxiliary gas volume flow was 30 L/min, and auxiliary gas temperature was 350 ℃. Total ion flow data obtained in both positive and negative ion modes were analyzed by Thermo XCalibur 3.0 software, and further confirms were carried on by retention time of each component, elemental composition, multi-level mass spectrometry fragment information, with comparison with some reference materials. **Results** A total of 81 components were identified in Batri Qiwei Pills, including 29 alkaloids, 16 flavonoids, 12 organic acids, 9 gallate esters, 5 sesquiterpenoids, 3 tannins, 4 fatty acids, and 3 amino acids. And 10 components were further confirmed by comparison with the reference substance. MS² and possible fragmentation pathway of quercetin, neoconitine, shikimic acid, gallic acid glucose, krillin, dehydroandrolactone, L-proline, and linoleic acid were investigated. **Conclusion** HPLC-Q-Exactive-MS method could be used to quickly identify the chemical components in Batri Qiwei Pills, providing reference for its study of pharmacological substances.

Key words: Batri Qiwei Pills; HPLC-Q-Exactive-MS; HPLC-MS/MS; total ion flow; quercetin; linoleic acid

收稿日期: 2023-09-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82360801); 内蒙古自治区自然科学基金资助项目 (2022LHQN08001); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目 (NJZY22655)

作者简介: 杨琳, 女, 副主任药师, 本科。E-mail: 15049736568@163.com

*通信作者: 李君, 男, 助理研究员, 硕士。E-mail: 827395247@qq.com

巴特日七味丸收载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(蒙药分册),由草乌叶、诃子、翻白草、茜草、黑云香、人工麝香、银珠7味药材组成^[1]。方中草乌叶杀黏、止痛,为君药;翻白草、黑云香止痛消肿,人工麝香开窍杀黏,共为臣药;茜草清热、止血、止泻,为佐药;诃子可调元、解毒,银朱起清热、收敛、疗伤之效,共为使药;诸药配伍共奏清瘟解毒、消“黏”、止痛、散瘀、止痢之功,蒙医临床常用于瘟疫盛热、白喉、脑炎、赤白痢疾等症^[1-2]。该方剂在临床应用多年,疗效已经得到了充分确证^[3-5]。近年来,针对巴特日七味丸的研究多关注质量标准构建^[6]、不良反应评价^[7]、临床疗效观察^[3-5],而对其化学组成的研究鲜有报道。传统复方中所含成分是其发挥功效的基础,对其全面、精准的辨识表征不仅有利于进一步的药效物质挖掘、质量标准提升、作用机制探究,更有助于推动其现代化、国际化进程。高分辨液-质联用技术因具备高效的分离能力、强大的结构解析能力,在传统复方定性鉴别过程中具备明显优势^[8-9]。因此,本研究采用高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱(HPLC-Q-Exactive-MS)技术对巴特日七味丸中成分进行快速、全面的定性分析,旨在为巴特日七味丸血清移行成分表征、作用机制阐明提供参考。

1 仪器与试药

AP135W型十万分之一电子天平(日本岛津公司);HPLC-Q-Exactive型高效液相色谱-质谱联用系统仪[美国赛默飞世尔科技(中国)有限公司];BSA224S万分之一天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];LC-MS 8045型三重四极杆液质联用仪(日本岛津公司);DS-7510DTH型数控超声波清洗器(上海生析超声仪器有限公司)。

巴特日七味丸(规格2g/10粒,批号2212226)购自内蒙古蒙药股份有限公司。木犀草素(批号PS010346,质量分数≥99.0%)、原儿茶酸(批号PU0918-0025,质量分数≥99.0%)、柯里拉京(批号PS0265-0020,质量分数≥98.0%)、新乌头碱(批号PS0489-0020,质量分数≥98.0%)、苯甲酰新乌头原碱(批号PS1132-0020,质量分数≥98.5%)、苯甲酰次乌头原碱(批号PS1134-0020,质量分数≥98.0%)对照品均购自成都普思生物科技有限公司;乌头碱(批号110720-202007,质量分数≥98.5%)、芦丁(批号100080-202012,质量分数≥98.5%)、苯甲酰乌头原碱(批号111794-202006,质

量分数≥99.5%)、次乌头碱(批号110798-202010,质量分数≥99.2%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈均为色谱纯,甲酸、乙酸铵均为分析纯[美国赛默飞世尔科技(中国)有限公司],水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取原儿茶酸5.62mg、乌头碱5.66mg、新乌头碱4.97mg、次乌头碱5.01mg、芦丁6.12mg、苯甲酰乌头原碱4.99mg、苯甲酰次乌头原碱4.64mg、木犀草素5.87mg、苯甲酰新乌头原碱4.78mg、柯里拉京6.22mg,分别置于10mL量瓶中,加甲醇适量,超声,加至刻度,制备单一对照品贮备液,质量浓度为562.00、566.00、497.00、501.00、612.00、499.00、464.00、587.00、478.00、622.00μg/mL。分别精密量取上述各贮备液20μL于同一10mL量瓶中,得质量浓度562.00、566.00、497.00、501.00、612.00、499.00、464.00、587.00、478.00、622.00ng/mL的混合对照品溶液,于4℃保存。

2.2 供试品溶液的制备

取巴特日七味丸,研磨,过筛,精密称取2.0g,置50mL锥形瓶中,加90%甲醇10mL,称定质量、封口,超声提取30min(功率200W,频率60kHz),冷却至室温,再次称定质量,90%甲醇补重,摇匀,经0.22μm滤膜滤过,即得,于4℃保存。

2.3 色谱-质谱条件

2.3.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-Aq 色谱柱(150mm×4.6mm, 5μm),流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:A5%(0.0~5.00min)→15%(10.00min)→28%(14.00min)→40%(19.00min)→60%(21.00min)→78%(25.00min)→95%(30.00~40.00min),体积流量为0.35mL/min,柱温为35℃,进样量为10μL。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),检测方式:Full MS/dd-MS²,Full MS分辨率:70 000,dd-MS²分辨率:17 500,扫描范围:*m/z* 110~1 200。喷雾电压:3.80kV(+),3.20kV(-),碰撞能量:30eV,离子传输管温度:300℃(+),400℃(-),辅助气体积流量:30L/min,辅助气温度:350℃。

2.4 数据库建立与分析

使用PubMed、中国知网、万方、TCMSP数据库对巴特日七味丸全方及各味药材所含成分的名称、分子式、离子化模式、多级质谱碎片进行收集

整理, 利用 Thermo Xcalibur 3.0 软件对巴特日七味丸供试品溶液和混合对照品溶液在正、负离子模式下获得的总离子流数据进行处理, 以自建数据库为基础, 以一级质谱偏差在 1×10^{-5} 以内为原则对巴特日七味丸中成分进行辨识分析, 以各成分保留时间、元素组成、多级质谱碎片信息、与部分对照品比对做进一步确认, 最终阐明各化学成分。

2.5 化学成分鉴定

取供试品溶液, 进样分析, 获得巴特日七味丸供试品溶液正、负离子模式下的总离子流图, 见图 1。按照以上分析方法对供试品中所含化学成分进行辨识分析, 结果在巴特日七味丸中共鉴定出 81 个化学成分, 包括 29 个生物碱类成分、16 个黄酮类成分、12 个有机酸类成分、9 个没食子酸酯类成分、

5 个倍半萜类成分、3 个鞣质类成分、4 个脂肪酸类成分、3 个氨基酸类成分, 其中 10 个成分经与对照品比对得到进一步确证, 见表 1。

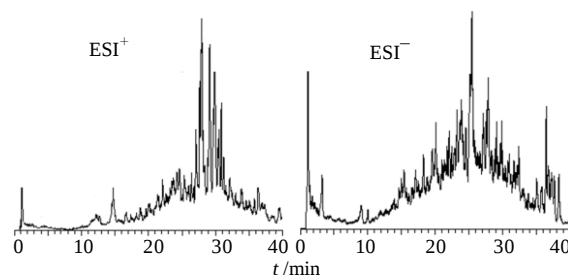


图 1 正、负离子模式下巴特日七味丸的总离子流图
Fig.1 Positive and negative total ion chromatogram of Bateria Qiwei Pills

表 1 巴特日七味丸中化学成分的 HPLC-Q-Exactive-MS 鉴定

Table 1 Identification of chemical compositions in Bateria Qiwei Pills by HPLC-Q-Exactive-MS

编号	成分	t_R/min	分子式	离子模式	理论值	实测值	误差	离子碎片 (MS)	来源
1	苹果酸 ^[10-11]	1.08	C ₄ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	133.013 14	133.013 67	3.911	133.013 67, 115.002 85	有机酸类
2	L-缬氨酸 ^[10]	1.12	C ₅ H ₁₁ NO ₂	[M+H] ⁺	118.086 25	118.085 98	-2.330	118.085 98	氨基酸类
3	精氨酸 ^[10-11]	1.16	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	[M+H] ⁺	175.118 95	175.118 45	-2.868	175.118 45	氨基酸类
4	L-脯氨酸 ^[10]	1.20	C ₅ H ₉ NO ₂	[M+H] ⁺	116.070 60	116.070 43	-1.509	116.070 43, 98.983 70, 06 558	氨基酸类
5	奎宁酸 ^[12-13]	1.22	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	191.055 01	191.056 29	6.676	191.056 29, 173.009 11, 007 97	有机酸类
6	莽草酸 ^[10-11]	1.34	C ₇ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	173.044 44	173.045 43	4.913	173.045 43, 155.034 98, 02, 137.023 94, 111.044 39, 93.033 67	有机酸类
7	诃子次酸 ^[10-11]	1.77	C ₁₄ H ₁₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	355.029 58	355.031 95	6.654	355.031 95, 337.021 61	鞣质类
8	柠檬酸 ^[13]	1.90	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.018 62	191.019 88	6.549	191.019 88, 173.009 02, 147.029 31, 111.007 95	有机酸类
9	琥珀酸 ^[11]	2.14	C ₄ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	117.018 23	117.018 53	2.520	117.018 53, 73.028 38	有机酸类
10	没食子酸 ^[10-11]	3.17	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.013 14	169.013 96	4.794	169.013 96, 125.023 76	有机酸类
11	没食子酰葡萄糖 ^[11,14]	3.37	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	[M-H] ⁻	331.065 97	331.068 66	8.116	331.068 66, 313.057 92, 169.013 93, 125.023 76	没食子酸酯类
12	原儿茶酸 ^[13]	6.62	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.018 23	153.018 92	4.476	153.018 92, 109.028 70	有机酸类
13	水杨酸 ^[13]	10.02	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.023 32	137.023 88	4.083	137.023 88	有机酸类
14	没食子酸甲酯 ^[13]	12.19	C ₈ H ₈ O ₅	[M-H] ⁻	183.028 79	183.029 95	6.628	183.029 95, 168.006 04, 124.015 86, 111.008 16	没食子酸酯类
15	附子灵 ^[10,15-16]	12.20	C ₂₄ H ₃₉ NO ₇	[M+H] ⁺	454.279 92	454.278 78	-2.529	454.278 78, 436.268 52	生物碱类
16	新乌头原碱 ^[10,15-16]	12.33	C ₂₄ H ₃₉ NO ₉	[M+H] ⁺	486.269 75	486.268 49	-2.608	486.268 49, 454.241 42, 436.231 75, 404.206 21	生物碱类
17	宋果灵 ^[10,15]	12.39	C ₂₂ H ₃₁ NO ₃	[M+H] ⁺	358.237 67	358.236 30	-3.825	358.236 30, 340.226 01	生物碱类
18	多根乌头碱 ^[10,16]	12.54	C ₂₂ H ₃₅ NO ₄	[M+H] ⁺	378.263 88	378.262 70	-3.133	378.262 70, 360.252 17	生物碱类

续表 1

编号	成分	t_R/min	分子式	离子模式	理论值	实测值	误差	离子碎片 (MS)	来源
19	异塔拉定 ^[10]	12.63	C ₂₃ H ₃₇ NO ₅	[M+H] ⁺	408.274 44	408.273 28	-2.865	408.273 28, 390.262 66	生物碱类
20	二没食子酰葡萄糖 ^[11,14]	12.74	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	483.076 93	483.080 60	7.594	483.080 60, 331.069 34, 没食子酸 313.058 38, 169.013 99, 酯类 125.023 71	
21	雷乌宁 ^[10,15]	12.77	C ₂₂ H ₃₃ NO ₃	[M+H] ⁺	360.253 32	360.252 04	-3.554	360.251 34, 342.241 64	生物碱类
22	儿茶素 ^[12]	12.89	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	289.070 66	289.073 06	8.287	289.073 06, 245.082 87, 黄酮类 179.035 00	
23	绿原酸 ^[17]	13.37	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 80	353.089 54	8.019	353.089 54, 191.056 37, 有机酸类 179.035 00, 173.045 39, 135.044 53	
24	乌头原碱 ^[10,15]	13.40	C ₂₅ H ₄₁ NO ₉	[M+H] ⁺	500.285 40	500.284 03	-2.755	500.284 03, 450.246 67	生物碱类
25	隐绿原酸 ^[17]	13.71	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.086 70	353.088 68	5.584	353.088 68, 191.056 50, 有机酸类 179.03514, 173.04538 135.04466	
26	次乌头原碱 ^[15-16]	14.00	C ₂₄ H ₃₉ NO ₈	[M+H] ⁺	470.274 84	470.273 62	-2.602	470.273 62, 438.247 56	生物碱类
27	二没食子酸酰葡萄糖 ^[11,14]	14.05	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₂	[M-H] ⁻	785.083 19	785.088 20	6.371	785.088 20, 301.000 49, 没食子酸 169.014 02, 125.023 55 酯类	
28	咖啡酸 ^[18]	14.20	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.033 88	179.035 02	6.338	179.035 02, 135.044 68	有机酸类
29	伪乌头宁 ^[10,15]	14.38	C ₂₅ H ₄₁ NO ₈	[M+H] ⁺	484.290 49	484.289 49	-2.072	484.289 49, 452.263 15	生物碱类
30	尼奥林 ^[10]	14.68	C ₂₄ H ₃₉ NO ₆	[M+H] ⁺	438.285 01	438.283 78	-2.816	438.283 78, 420.272 89	生物碱类
31	异紫堇定碱 ^[10]	14.77	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	[M+H] ⁺	342.169 98	342.168 79	-3.492	342.168 79, 297.111 30, 生物碱类 265.084 96	
32	塔拉乌头胺 ^[10,15-16]	14.87	C ₂₄ H ₃₉ NO ₅	[M+H] ⁺	422.290 00	422.288 36	-4.120	422.288 36, 390.262 12	生物碱类
33	柯里拉京 ^{*[11-12]}	15.12	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	[M-H] ⁻	633.072 24	633.076 97	7.471	633.076 97, 463.054 50, 鞣质类 301.000 61, 169.014 02	
34	三没食子酰葡萄糖 ^[11,14]	15.47	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	[M-H] ⁻	635.087 89	635.092 35	7.022	635.092 35, 301.000 61, 没食子酸 169.014 10, 125.023 87 酯类	
35	没食子儿茶素 ^[11-12]	15.64	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	[M-H] ⁻	305.065 57	305.068 57	6.804	305.068 57, 261.078 25 没食子酸 酯类	
36	展花乌头宁 ^[10,16]	15.99	C ₂₅ H ₄₁ NO ₆	[M+H] ⁺	452.300 66	452.298 98	-3.724	452.298 98, 420.272 64	生物碱类
37	没食子酸乙酯 ^[11-12]	16.08	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	197.044 44	197.045 87	7.207	197.045 87, 169.014 05, 没食子酸 125.023 92 酯类	
38	异展花乌头宁 ^[10,15]	16.89	C ₂₄ H ₃₇ NO ₇	[M+H] ⁺	452.264 27	452.261 75	-5.592	452.261 75, 434.253 66, 生物碱类 420.235 81, 402.226 38	
39	四没食子酰葡萄糖 ^[11,14]	16.92	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	[M-H] ⁻	169.014 05	787.105 71	8.717	787.105 71, 635.093 02, 没食子酸 169.013 72 酯类	
40	阿魏酸 ^[11,19]	17.47	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.049 53	193.051 03	7.743	193.051 03, 178.027 16, 有机酸类 149.060 47, 134.036 87	
41	异鼠李素-3-O-β-D-葡萄糖醛苷 ^[11-12]	17.54	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M-H] ⁻	477.102 75	477.106 99	6.882	477.106 99, 169.014 08, 黄酮类 125.023 81	
42	三没食子酰基莽草酸 ^[12]	17.63	C ₂₈ H ₂₂ O ₁₇	[M-H] ⁻	629.077 32	629.083 13	6.227	629.083 13, 477.070 31, 没食子酸 169.014 07, 125.023 82 酯类	

续表 1

编号	成分	t_R/min	分子式	离子模式	理论值	实测值	误差	离子碎片 (MS)	来源
43	14-苯甲酰-10 羟 基新乌头原碱 ^[12]	18.19	$\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	606.290 88	606.289 31	-2.602	606.289 31, 556.252 75, 524.226 75, 105.033 46	75, 生物碱类
44	牡荆素 ^[13]	18.62	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	433.112 92	433.111 02	-4.394	433.111 02, 415.101 01, 397.090 61, 313.069 31,	01, 黄酮类
45	关附甲素 ^[10,15]	18.86	$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{NO}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	344.258 40	344.257 17	-3.590	344.257 17, 326.246 70	生物碱类
46	槲皮素-3-O-葡 萄糖苷 ^[12]	19.62	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{13}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	477.066 36	477.063 17	-6.701	477.063 17, 301.037 05, 151.003 28	05, 黄酮类
47	焦次乌头碱 ^[10,15]	19.69	$\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{NO}_8$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	556.290 49	556.289 79	-1.265	556.289 79, 538.278 69, 520.268 01	69, 生物碱类
48	芦丁 ^{*[18]}	19.72	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	609.145 01	609.150 70	7.730	609.150 70, 301.035 95, 300.029 11, 151.003 04	95, 黄酮类
49	金丝桃苷 ^[13,18]	19.75	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	463.087 10	463.090 85	8.019	463.090 85, 301.034 85, 300.029 21	85, 黄酮类
50	苯甲酰新乌头 原碱 ^{*[10,15-16]}	20.04	$\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	590.295 97	590.294 86	-1.885	590.294 86, 558.269 04, 540.258 30, 508.231 84, 105.033 49	04, 生物碱类
51	苯甲酰乌头原 碱 ^{*[10,15-16]}	20.04	$\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	604.311 62	604.309 45	-3.596	604.309 45, 572.283 94, 105.033 49	94, 生物碱类
52	鞣花酸 ^[11-12]	20.13	$\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	300.997 89	301.000 58	8.925	301.000 58	鞣质类
53	苯甲酰次乌头 原碱 ^{*[10,15-16]}	20.96	$\text{C}_{31}\text{H}_{43}\text{NO}_9$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	574.301 05	574.299 38	-2.922	574.299 38, 542.273 13, 105.033 31	13, 生物碱类
54	焦新乌头 碱 ^[10,15-16]	21.13	$\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{NO}_9$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	572.285 40	572.284 00	-3.754	572.284 00, 105.033 42	生物碱类
55	木犀草素-7-O- 葡萄糖苷 ^[19]	21.15	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	447.092 18	447.095 79	8.057	447.095 79, 285.040 10	黄酮类
56	苯甲酰脱氧乌 头碱 ^[10,15-16]	21.31	$\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{NO}_9$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	588.316 70	588.315 49	-2.071	588.315 49, 556.289 49, 524.263 49, 105.033 42	49, 生物碱类
57	北乌头碱 ^[10]	21.46	$\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{NO}_{12}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	648.301 45	648.299 87	-2.441	648.299 87, 616.271 73, 588.278 87	73, 生物碱类
58	山柰酚-3-O- β -D- 葡萄糖苷 ^[19]	21.62	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	461.071 45	461.074 83	7.326	461.074 83, 315.016 33	黄酮类
59	焦乌头碱 ^[10,15-16]	22.09	$\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{NO}_9$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	586.301 05	586.299 74	-2.249	586.299 74, 554.273 62, 526.278 44, 105.033 48	62, 生物碱类
60	新乌头碱 ^{*[10,15-16]}	22.26	$\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{NO}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	632.306 53	632.305 18	-2.147	632.305 18, 572.284 18, 540.258 54, 105.033 55	18, 生物碱类
61	10-羟基乌头 碱 ^[10,15-16]	22.29	$\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{NO}_{12}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	662.317 10	662.315 61	-2.253	662.315 61, 602.294 62, 570.268 55, 105.033 50	62, 生物碱类
62	次乌头碱 ^{*[10,15-16]}	22.69	$\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{NO}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	616.311 62	616.310 12	-2.439	616.310 12, 584.283 14, 556.289 43, 524.262 82, 105.033 51	14, 生物碱类
63	乌头碱 ^{*[10,15-16]}	22.82	$\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{NO}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	646.322 18	646.320 56	-2.518	646.320 56, 586.299 87, 554.274 11, 526.279 05	87, 生物碱类

续表 1

编号	成分	tr/min	分子式	离子模式	理论值	实测值	误差	离子碎片 (MS)	来源
64	槲皮素 ^[12,18-19]	22.9	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.034 27	301.036 87	8.607	301.036 87, 273.042 27, 178.998 63, 151.003 33	黄酮类
65	柚皮素 ^[11-12]	23.02	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.060 09	271.062 68	7.518	271.062 68, 151.003 31, 119.049 51	黄酮类
66	脱氧乌头碱 ^[10, 15-16]	23.17	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₀	[M+H] ⁺	630.327 27	630.325 44	-2.908	630.325 44, 598.299 19, 570.304 38, 105.033 48	生物碱类
67	木犀草素 ^{*[18-19]}	24.62	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.039 36	285.042 05	6.422	285.042 05, 133.028 41	黄酮类
68	牡荆素鼠李糖苷 ^[11]	24.64	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	[M-H] ⁻	577.155 18	577.159 67	7.776	577.159 67, 269.046 91	黄酮类
69	羟基去氢木香内酯 ^[20]	24.68	C ₁₅ H ₁₈ O ₃	[M+H] ⁺	247.132 87	247.131 82	-4.253	247.131 82, 229.121 34	倍半萜类
70	异鼠李素 ^[15,17]	25.04	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	315.049 92	315.053 01	7.779	315.053 01, 300.029 33	黄酮类
71	二氢- α -环木香烯内酯 ^[21]	26.04	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	[M+H] ⁺	235.169 25	235.168 24	-4.322	235.168 24, 217.157 64	倍半萜类
72	芹菜素 ^[11-13]	26.57	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	269.044 44	269.047 12	8.924	269.047 12	黄酮类
73	木香内酯 ^[20]	26.85	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	[M+H] ⁺	249.148 52	249.147 66	-3.456	249.147 66, 231.137 15, 213.126 45, 195.116 10	倍半萜类
74	刺芒柄花素 ^[11-13]	28.25	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	269.080 83	269.079 74	-4.071	269.079 74	黄酮类
75	去氢木香内酯 ^[20-21]	29.12	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	[M+H] ⁺	231.137 95	231.136 93	-4.311	231.136 93, 213.126 34, 195.116 06, 185.131 85	倍半萜类
76	木香烯内酯 ^[20]	31.20	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	[M+H] ⁺	233.153 60	233.152 63	-4.188	233.152 63, 215.142 04, 187.147 86	倍半萜类
77	α -亚麻酸 ^[11-13]	35.31	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M-H] ⁻	277.216 20	277.218 78	7.283	277.218 78, 259.207 31	脂肪酸类
78	麝香酮 ^[22]	35.5	C ₁₆ H ₃₀ O	[M+H] ⁺	239.236 94	239.235 61	-5.568	239.235 61, 95.085 67	黄酮类
79	亚油酸 ^[11-13]	36.56	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	279.231 85	279.234 53	7.574	279.234 53, 261.222 02	脂肪酸类
80	棕榈酸 ^[11-13]	37.75	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	255.231 85	255.234 12	8.867	255.234 12	脂肪酸类
81	油酸 ^[11-13]	38.43	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻	281.247 50	281.250 15	7.398	281.250 15	脂肪酸类

* 与对照品比对

* confirmation versus standard substance

2.6 黄酮类成分鉴定

在巴特日七味丸中鉴定出 16 个黄酮类化合物, 分别为 22、41、44、46、48、49、55、58、64、65、67、68、70、72、74、78 号化合物, 过程以槲皮素 (化合物 64) 为例说明。槲皮素在 ESI⁻模式下可见 [M-H]⁻ m/z 301.036 87 准分子离子峰, 保留时间 22.90 min, Xcalibur 软件拟合其分子式为 C₁₅H₁₀O₇, 偏差为 8.607, 准分子离子峰经逆狄尔斯-阿德尔反应 (RDA) 产生 m/z 178.998 63 [M-H-RDA]⁻ 碎片离子峰, 进一步脱去 CO 后产生 m/z 151.003 33 [M-H-RDA-CO]⁻, 或直接脱去 CO 产生 m/z 273.042 27 [M-H-CO]⁻, 结合化合物的元素组成、裂解规律、碎片离子信息^[12, 18-19], 确认 64 号化合物为槲皮素, 其 MS² 质谱图和可能的裂解途径见图 2。

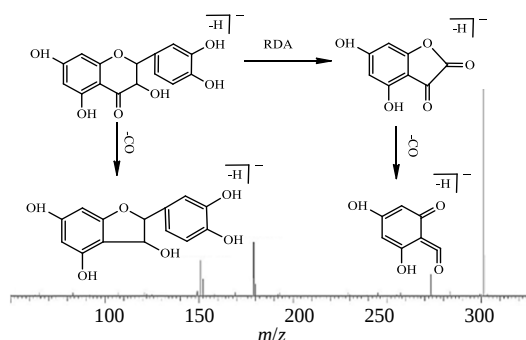
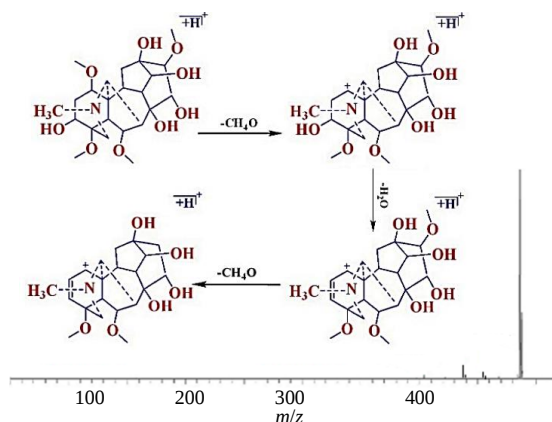
2.7 生物碱类成分鉴定

在巴特日七味丸中鉴定出 29 个生物碱类化合

物, 分别为 15~19、21、24、26、29~32、36、38、50、51、53、54、56、57、59~63、66 号化合物, 鉴定过程以新乌头原碱 (化合物 16) 为例说明。新乌头原碱 ESI⁺模式下可见 [M+H]⁺ m/z 486.268 49 准分子离子峰, 保留时间为 12.33 min, Xcalibur 软件拟合其分子式为 C₂₄H₄₀NO₉, 偏差为-2.608, 准分子离子峰经高能碰撞, 可产生 m/z 454.241.42 [M+H-CH₄O]⁺、436.231.75 [M+H-CH₄O-H₂O]⁺、404.206 21 [M+H-2CH₄O-H₂O]⁺ 碎片离子峰, 结合这些化合物的元素组成、裂解规律、碎片离子信息^[10, 15-16], 确认 16 号化合物为新乌头原碱, 其 MS² 质谱图和可能的裂解途径见图 3。

2.8 有机酸类成分鉴定

在巴特日七味丸中鉴定出 12 个有机酸类化合物, 分别为 1、5、6、8~10、12~13、23、25、28、40 号化合物, 过程以莽草酸 (化合物 6) 为例进行

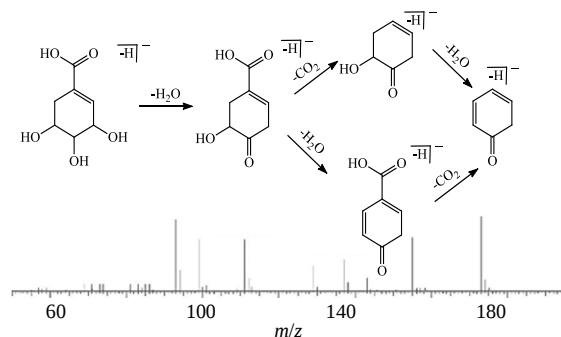
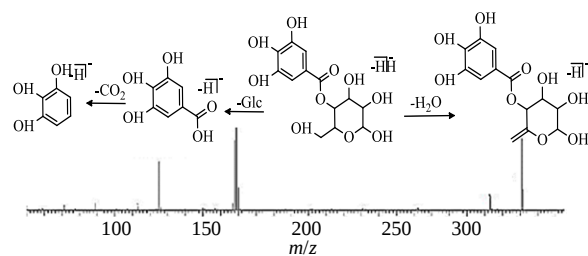
图 2 槲皮素的 MS² 图和可能的裂解途径Fig. 2 MS² spectra and possible fragmentation pathway of quercetin图 3 新乌头原碱的 MS² 图和可能的裂解途径Fig. 3 MS² spectra and possible fragmentation pathway of mesaconine

说明。莽草酸在 ESI-模式下可见 $[M-H]^-$ m/z 173.045 43 准分子离子峰, 保留时间为 1.34 min, Xcalibur 软件拟合其分子式为 $C_7H_9O_5$, 偏差为 4.913, 准分子离子峰丢失 CO_2 、 H_2O , 可产生 m/z 155.034 58 $[M-H-H_2O]^-$ 、137.023 94 $[M-H-2H_2O]^-$ 、111.044 39 $[M-H-CO_2]^-$ 、93.033 67 $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$ 碎片离子峰, 结合化合物的元素组成、裂解规律、碎片离子信息^[10-11], 确认 6 号化合物为莽草酸, 其 MS² 质谱图和可能裂解途径见图 4。

2.9 没食子酸酯类成分鉴定

在巴特日七味丸中鉴定出 9 个没食子酸酯类化合物, 分别为 11、14、20、27、34、35、37、39、42 号化合物, 鉴定过程以没食子酰葡萄糖 (化合物 11) 为例说明。没食子酰葡萄糖在 ESI-模式下可见 $[M-H]^-$ m/z 331.068 66 准分子离子峰, 保留时间为 3.37 min, Xcalibur 软件拟合其分子式为 $C_{13}H_{15}O_{10}$, 偏差为 8.116, 准分子离子峰脱去 H_2O 后产生 m/z

313.057 92 $[M-H-H_2O]^-$, 或脱去葡萄糖基产生 m/z 169.013 93 $[M-H-Glc]^-$ 碎片离子峰, 其进一步脱去 CO_2 产生 m/z 125.023 76 $[M-H-Glc-CO_2]^-$, 结合化合物的元素组成、裂解规律、碎片离子信息^[11, 16], 确认 11 号化合物为没食子酰葡萄糖, 其 MS² 质谱图和可能的裂解途径见图 5。

图 4 莽草酸的 MS² 图和可能的裂解途径Fig. 4 MS² spectra and possible fragmentation pathway of shikimic acid图 5 没食子酰葡萄糖的 MS² 图和可能的裂解途径Fig. 5 MS² spectra and possible fragmentation pathway of galloyl glucose

2.10 鞣质类成分鉴定

在巴特日七味丸中鉴定出 3 个鞣质类化合物, 分别为 7、33、52 号化合物, 鉴定过程以柯里拉京 (化合物 33) 为例进行说明。柯里拉京在 ESI-模式下可见 $[M-H]^-$ m/z 633.076 97 准分子离子峰, 保留时间为 15.12 min, Xcalibur 软件拟合其分子式为 $C_{27}H_{21}O_{18}$, 偏差为 7.471, 准分子离子峰脱去没食子酸基后产生 m/z 463.054 50 $[M-H-galloyl]^-$ 碎片离子峰, 同时产生 m/z 169.014 02 $[galloyl-H]^-$ 碎片离子峰, m/z 463.054 50 $[M-H-galloyl]^-$ 进一步脱去葡萄糖基, 产生了 m/z 301.000 61 $[M-H-galloyl-Glu]^-$, 结合该化合物的元素组成、裂解规律、碎片离子信息以及对照品的比对^[11-12], 确认 33 号化合物为柯里拉京, 其 MS² 质谱图和可能的裂解途径见图 6。

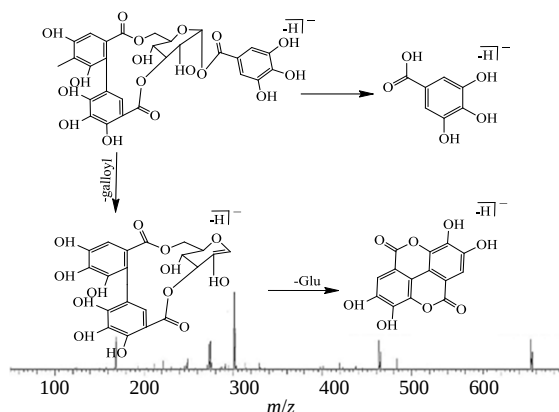


图6 柯里拉京的MS²图和可能的裂解途径

Fig. 6 MS² spectra and possible fragmentation pathway of corilagin

2.11 倍半萜类成分鉴定

在巴特日七味丸中鉴定出倍半萜类化合物 5 个, 分别为 69、71、73、75、76 号化合物, 鉴定过程以去氢木香内酯(化合物 75)为例进行说明。去氢木香内酯在 ESI⁺模式下可见[M+H]⁺ m/z 231.136 93 准分子离子峰, 保留时间为 29.12 min, Xcalibur 软件拟合其分子式为 C₁₅H₁₉O₂, 偏差为-4.311, 准分子离子峰经高能碰撞连续丢失 H₂O、CO 可产生 m/z 213.126 34 [M+H-H₂O]⁺、195.116 06 [M+H-2H₂O]⁺、185.131 85 [M+H-H₂O-CO]⁺ 碎片离子峰, 结合化合物的元素组成、裂解规律、碎片离子信息和对照品比对^[20-21], 确认 75 号化合物为去氢木香内酯, 其 MS² 质谱图及可能裂解途径见图 7。

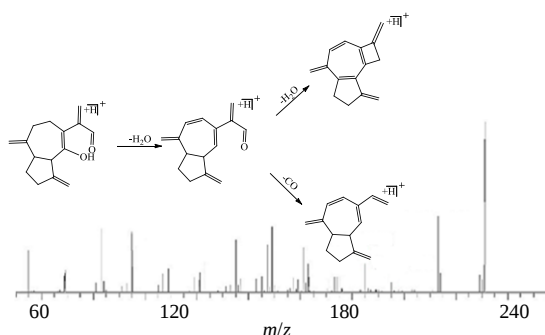


图7 去氢木香内酯的MS²图和可能的裂解途径

Fig. 7 MS² spectra and possible fragmentation pathway of dehydrocostuslactone

2.12 氨基酸、脂肪酸类成分鉴定

在巴特日七味丸中鉴定出 3 个氨基酸类化合物, 分别为 2、3、4 号化合物, 鉴定过程以 L-脯氨酸(化合物 4)为例说明。L-脯氨酸 ESI⁺模式下可

见[M+H]⁺ m/z 116.070 43 准分子离子峰, 保留时间为 1.20 min, Xcalibur 软件拟合其分子式为 C₅H₁₀NO₂, 偏差为-1.509, 准分子离子峰经高能碰撞丢失 H₂O、CO 可产生 m/z 98.984 34 [M+H-H₂O]⁺、70.065 58 [M+H-H₂O-CO]⁺ 碎片离子峰, 结合化合物的元素组成、裂解规律、碎片离子信息^[10], 确认 4 号化合物为 L-脯氨酸, 其 MS² 质谱图和可能的裂解途径见图 8。

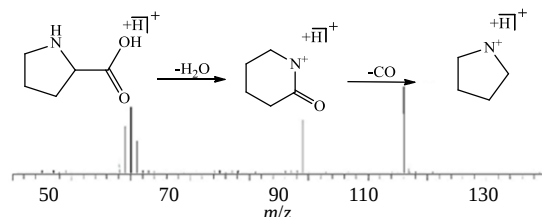


图8 L-脯氨酸的MS²图和可能的裂解途径

Fig. 8 MS² spectra and possible fragmentation pathway of L-proline

在巴特日七味丸中鉴定出 4 个脂肪酸类化合物, 分别为 77、79~81 号化合物, 鉴定过程以亚油酸(化合物 79)为例进行说明。亚油酸在 ESI⁻模式下可见[M-H]⁻ m/z 279.234 53 准分子离子峰, 保留时间为 36.56 min, Xcalibur 软件拟合其分子式为 C₁₈H₃₁O₂, 偏差为 7.574, 准分子离子峰丢失 H₂O 后产生 m/z 261.222 02 [M+H-H₂O]⁻ 碎片离子峰, 结合化合物元素组成、裂解规律、碎片离子信息^[11-13], 确认 79 号化合物为亚油酸, 其 MS² 质谱图和可能的裂解途径见图 9。

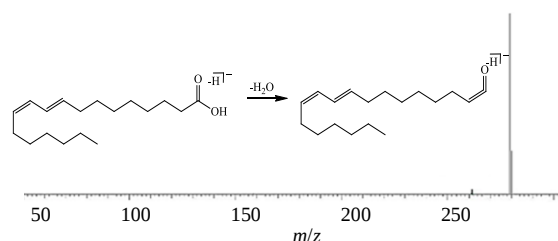


图9 亚油酸的MS²图和可能的裂解途径

Fig. 9 MS² spectra and possible fragmentation pathway of linoleic acid

3 讨论

传统复方作为一个多成分共存的复杂体系, 所含各成分理化性质差异较大, 在不同流动相条件下色谱反应不尽相同, 因此对不同流动相(乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-5 mmol/L 醋酸铵水溶液、甲醇-5 mmol/L 醋酸铵水溶液)进行考察, 结果在甲醇-

0.1%甲酸水溶液流动相下色谱峰数量较多,各成分质谱响应信息更丰富;同时,因生物碱类化合物中的氮原子电负性优于碳原子,使其更易捕获1个质子,使其在正离子电离模式下的质谱响应较好,而鞣质类、黄酮类、没食子酸酯类成分在负离子模式下的质谱响应相对更优,因此本研究采用正、负两种离子模式对巴特日七味丸样品进行了测定分析。

对样品处理方式、处理时间考察发现,加热回流处理和超声处理对色谱峰数量、质谱响应无明显影响,基于人力、时间成本考虑,研究采用了超声方式对样品进行处理,同时延长超声时间并未使色谱峰数量增加、质谱响应提高,因此,研究确定样品最优处理条件为超声处理30 min。

综上所述,本研究采用HPLC-Q-Exactive-MS技术对蒙药巴特日七味丸进行了定性研究,共鉴别获得81个化学成分,包括29个生物碱类成分、16个黄酮类成分、12个有机酸类成分、9个没食子酸酯类成分、5个倍半萜类成分、3个鞣质类成分、4个脂肪酸类成分、3个氨基酸类成分,该研究可为巴特日七味丸物质基础研究提供有力的数据支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准. 蒙药分册 [M]. 呼和浩特: 内蒙古科学技术出版社, 1998: 79.
- [2] 杨德志, 胡日查, 特木其乐. 蒙药巴特日-7作用机制的研究现状与展望 [J]. 内蒙古大学学报: 自然科学版, 2022, 53(4): 439-447.
- [3] 王巴达日呼, 乌恩岳苏. 巴特日七味丸联合美沙拉嗪对溃疡性结肠炎患者的临床疗效 [J]. 中成药, 2022, 44(7): 2166-2170.
- [4] 玉荣, 徐艳华, 巴图德力根, 等. 巴特日-7对输卵管炎大鼠抗炎作用机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(16): 2221-2223.
- [5] 吴春霞, 敖道呼, 牡兰, 等. 巴特日-7治疗儿童反复呼吸道感染的效果 [J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(16): 2548-2552.
- [6] 周佳, 韩继新. 蒙药巴特日七味丸中的鞣质含量测定 [J]. 内蒙古石油化工, 2019, 45(2): 19-20.
- [7] 李淑红, 包黎明, 李淑艳. 蒙药巴特日-7抗炎作用和急性毒性实验研究—以有效部位为研究对象 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2019, 21(7): 1393-1398.
- [8] 李红亮, 金思岑. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法分析金水六君煎化学成分 [J]. 中国药业, 2022, 31(18): 30-36.
- [9] 熊佩, 李凯琳, 龚开妍, 等. 基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS技术的血藤果化学成分分析 [J]. 中国药业, 2021, 30(18): 55-60.
- [10] 李君, 顾艳丽, 张谦, 等. 基于HPLC-Q-Exactive MS的蒙药那如-3醇提物成分分析 [J]. 中药材, 2022, 45(10): 2403-2410.
- [11] 李君, 胡玉霞, 张梦迪, 等. 蒙药三子散醇提物化学成分的HPLC-Q-Exactive-MS快速分析与鉴定 [J]. 中国药房, 2022, 33(11): 1348-1354.
- [12] 李胜男, 李君, 解红娟, 等. HPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS法鉴定森登-4味涂剂中化学成分 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(4): 811-819.
- [13] 李君, 王跃武, 张谦, 等. 基于HPLC-Q-Exactive-MS和HPLC-MS/MS技术的小儿解感颗粒定性与定量分析 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(8): 868-876.
- [14] 周坤, 简平, 梁文仪, 等. 基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS分析藏药诃子与毛诃子化学成分 [J]. 质谱学报, 2020, 41(3): 254-267.
- [15] 李郭帅, 马阳, 耿婷, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS分析复方南星止痛膏化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(2): 298-307.
- [16] 孙钰婧, 霍志鹏, 王玉, 等. 结肠炎奇效颗粒中化学成分的UPLC-Q-TOF/MS~E分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 157-167.
- [17] 高天元, 雷雨恬, 唐国琳, 等. 药用鸡矢藤药材化学成分的UPLC-Q-TOF-MS分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 134-141.
- [18] 赵文燕, 向茜, 王蝉, 等. 基于UPLC-Q-TOF/MS和模式识别技术阐释樟帮特色黄连水炒吴茱萸的炮制科学内涵 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(21): 147-155.
- [19] 肖观林, 江洁怡, 胥爱丽, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS的布芍调脂胶囊化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 190-199.
- [20] 姚子蔚, 边丽华, 李秋雨, 等. 甘松新酮、去氢木香内酯和甘松香酮H-3个倍半萜类成分的电喷雾质谱裂解规律研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(7): 2353-2360.
- [21] 郑加梅, 尚明越, 王嘉乐, 等. 木香的化学成分、药理作用、临床应用研究进展及质量标志物预测 [J]. 中草药, 2022, 53(13): 4198-4213.
- [22] 元小坡. 小金胶囊的化学成分及指纹图谱研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2019.

【责任编辑 解学星】