

基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 方法的丹黄祛瘀胶囊中多种化学成分研究

李卓伦^{1,2}, 王振辉³, 周霖^{1,2}, 姜晓芳^{1,2}, 刘晓静⁴, 左莉华^{1,2}, 康建^{1,2}, 李泽运^{1,2}, 孙志^{1,2*}, 张晓坚^{1,2*}

1. 郑州大学第一附属医院药学部, 河南 郑州 450052

2. 河南省精准临床药学重点实验室, 河南 郑州 450052

3. 河南理工大学医学院, 河南 焦作 454000

4. 郑州大学药物研究院, 河南 郑州 450001

摘要: 目的 为系统阐明复方中药制剂丹黄祛瘀胶囊中的化学成分组成, 建立一种同时对中药复杂成分实现精准、快速鉴定的高效分析方法。方法 本研究采用超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Orbitrap HRMS), 对丹黄祛瘀胶囊中的化学成分进行鉴定分析, 通过 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 扫描提供的化合物精确相对分子质量、多级碎片离子信息, 同时与对照品的相对保留时间和质谱数据进行比对, 并结合相关参考文献从而实现化合物鉴定的准确性。结果 共鉴定出 59 种化学成分, 其中主要包括黄酮类、苯酚内酯类、醌类、单萜苷类、有机酸类及其他类。结论 可系统、准确、快速地鉴定丹黄祛瘀胶囊中的多种化学成分, 并为其药效物质基础及质量控制等研究提供了科学的理论依据。

关键词: 丹黄祛瘀胶囊; 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱; 黄酮类; 苯酚内酯类; 单萜苷类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)18-3705-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.007

The multiple constituents study of Danhuang Quyu Capsule based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS

LI Zhuo-lun^{1,2}, WANG Zhen-hui³, ZHOU-Lin^{1,2}, JIANG Xiao-fang^{1,2}, LIU Xiao-jing⁴, ZUO Li-hua^{1,2}, KANG Jian^{1,2}, LI Ze-yun^{1,2}, SUN-Zhi^{1,2}, ZHANG Xiao-jian^{1,2}

1. Pharmaceutical department, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Laboratory of Accurate Clinical Pharmaceutical of Henan Province, Zhengzhou 450052, China

3. Medical College, Henan Polytechnic University, Jiaozuo 454000, China

4. Medicament Academy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

Abstract: Objective In order to clarify the chemical constituents in traditional Chinese medicine (TCM) compound preparation of Danhuang Quyu Capsule and establish an efficient analysis method for the identification of the complex components in TCM accurately and rapidly. **Methods** An ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) was used to perform an identification analysis of the chemical constituent in the Danhuang Quyu Capsule. This objective was achieved mainly depending on the information of the accurate mass and the multistage fragment ions obtained by UPLC-Q-Orbitrap, comparing the relative retention time and the mass spectrometric data of the standard substance and consulting the reference literature. **Results** Fifty nine compounds were identified in this study, including the flavones, phthalides, anthraquinones, alkaloids, monoterpene glycosides, organic acids, and other categories. **Conclusion** This study can identify various chemical constituents of Danhuang Quyu Capsule systematically, accurately and rapidly. What's more, the scientific theory basis will be provided for the pharmacodynamic material basis and the quality control of this drug at the same time.

Key words: Danhuang Quyu Capsule; UPLC-Q-Orbitrap HRMS; flavones; phthalides; monoterpene glycosides

收稿日期: 2017-06-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603287); 郑州大学第一附属医院创新基金项目 (2015); 北京卫健康公益基金项目 (YWKJJKYII-B16240)

作者简介: 李卓伦, 硕士, 研究方向为质谱分析和中药质量控制。Tel: (0371)66862570 E-mail: lzl19920512@126.com

*通信作者: 孙志, 博士, 研究方向为质谱分析和中药质量控制。Tel: (0371)66862570 E-mail: sunzhi2013@163.com

张晓坚, 主任药师, 研究方向为医院药学。Tel: (0371)66913047 E-mail: zhangxiaojian_yxb@163.com

丹黄祛瘀胶囊是妇科常用中成药之一,主要由丹参、黄芪、元胡等20余味中药材提取加工而成,目前已被国家食品药品监督管理局颁药标准^[1]和《国家中成药标准汇编》^[2]收载,该药具有活血止痛、软坚散结之功效,临床上主要用于气虚血瘀、痰湿凝滞引起的慢性盆腔炎,症见白带增多者等^[3-4]。丹黄祛瘀胶囊疗效显著,应用范围广且不良反应少,在妇科类疾病的治疗方面发挥着重要作用,但目前该药的药效物质基础尚不明确,在临床应用方面也受到了一定的限制,不利于该药治疗疾病机制的系统化研究。中药具有多靶点、多层次、多成分协同发挥药效的特点,明确其药效成分,阐明药效物质基础对于丹黄祛瘀胶囊更好、更科学地应用于临床起着至关重要的作用。但目前尚未有关丹黄祛瘀胶囊化学成分分析的研究报道,有少数研究仅对其中的个别成分进行了定量测定,无法较全面地反映该药的化学组成^[4-6],因此当前亟需建立一种高通量、高分辨率、高准确度同时又尽可能提供化合物海量数据信息的分析方法以对该药进行系统地研究。超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)具有超高的识别分辨能力,其分辨率可达百万级以上,质量精度可高达 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6}$ ^[7],该技术通过全扫描/数据依赖的二级扫描(Full MS/dd-MS²)模式,在一个分析周期内即可完成对样品的高精度一级、二级及多级扫描,最终得到准确质量数(Accurate mass, AM)和准确离子碎片信息,为化合物的准确鉴定提供了客观依据。该方法较其他成分定性方法具有更加快速、准确、高选择性的特点,已经逐渐成为中药复杂体系中药效成分快速分离和鉴定的重要手段。

本实验首次使用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术,为系统分析丹黄祛瘀胶囊的化学成分建立一种灵敏度高、准确性好的定性方法,同时结合组方中各药材所含化学成分的相关文献,根据高分辨质谱获得的精准相对分子质量、碎片离子峰、保留时间及对照品信息,可快速分析鉴定未知化合物,本研究结果共鉴定出59种化合物,主要涉及到黄酮类、苯酞内酯类、醌类、单萜苷类、有机酸类及其他类,这些活性成分之间的协同互补机制对于丹黄祛瘀胶囊发挥显著临床疗效具有至关重要的作用。该方法对今后研究中药复杂体系化学组成具有广泛的适用性和借鉴意义,为丹黄祛瘀胶囊的药效物质基础研究和质量控制水平的提升奠定基础。

1 仪器与试剂

UPLC-Q-Orbitrap 液相色谱-质谱联用系统: Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司), Q Exactive 型高分辨质谱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); BX7200HP 台式超声波清洗器(上海新苗医疗器械制造有限公司); AL104 型万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 上海有限公司)。

对照品原儿茶醛(MUST-15091608)、柚皮素(MUST-16032406)、(+)-儿茶素(MUST-16030812)、木犀草苷(MUST-16012405)、5-羟甲基糠醛(MUST-16031202)、原儿茶酸(MUST-16032112)、隐丹参酮(MUST-16022403)、Z-蒿本内酯(MUST-16060801)、阿魏酸(MUST-15091605)、丹参素(MUST-15082714)、丹酚酸B(MUST-15081916)、丹参素钠(MUST-16030206)、没食子酸(MUST-15042910)、咖啡酸(MUST-15090803)、迷迭香酸(MUST-15082904)、丹酚酸A(MUST-16012810)、槲皮素(MUST-16031804)、金丝桃苷(MUST-16032113)、芍药内酯苷(MUST-16051601)、苯甲酰芍药苷(MUST-16061803)、苦参碱(MUST-15082608)和芍药苷(MUST-16041901)购于成都曼思特生物科技有限公司,二氢丹参酮I(wkq16072105)、洋川芎内脂A(wkq16050603)、大黄素甲醚(wkq16070403)、芦荟大黄素(wkq16072704)、姜黄素(wkq16071501)、大黄素(wkq16071004)、黄芪甲苷(wkq16042601)购于四川省维克奇生物科技有限公司,质量分数均大于99%;甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司),乙腈、甲酸(色谱纯,美国 Fisher 公司),水为超纯水,其他试剂均为分析纯。丹黄祛瘀胶囊(吉林龙鑫药业有限公司,批号为161009026)。

2 方法

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为沃特世 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 以乙腈为流动相A,以0.1%甲酸水溶液为流动相B,梯度洗脱,洗脱程序为0~2.5 min, 5% A; 2.5~20.0 min, 5%~25% A; 20.0~35.0 min, 25%~65% A; 35.0~45.0 min, 65%~100% A; 45.0~50.0 min, 100% A; 体积流量为0.2 mL/min; 进样量5 μL; 柱温40℃。

2.1.2 质谱条件 UPLC-Q Exactive 液质联用仪:

离子源采用 HESI 源 (heated ESI), 辅助气体流量为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 辅助气温度为 300 $^{\circ}\text{C}$, 离子传输管温度 320 $^{\circ}\text{C}$; 正离子模式: 鞘气体积流量 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, 喷雾电压 3.50 kV; 负离子模式: 鞘气体积流量 38 $\mu\text{L}/\text{min}$, 喷雾电压 2.80 kV。扫描方式采用正、负离子 Full MS/dd-MS² 模式, 其中包括 1 次一级全扫描 (分辨率为 70 000 FWHM) 和 1 次数据依赖的二级扫描 (分辨率为 17 500 FWHM) 2 个事件, 质荷比窗口宽度设置为 2, 碰撞能梯度为 20、30、40 eV, 扫描范围 80~1 200。

2.2 供试品溶液和对照品溶液制备

取本品 3 粒, 去除胶囊壳后, 取内容物约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入纯甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 (功率 200 W, 频率 50 kHz) 30 min, 摇匀, 滤过, 续滤液用纯甲醇稀释 10 倍, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后即得供试品溶液。

取各对照品约 1.0 mg, 精密称定后, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加入纯甲醇, 并稀释至刻度, 摇匀, 使制备成 0.1 mg/mL 的单一对照品储备液; 分别精密量取上述单一对照品储备液适量, 混合后加入纯甲醇稀释, 最终制备成各对照品质量浓度均为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3 化合物结构分析

按照“2.1”项条件进样后, 根据质谱提供的准分子离子和加荷离子等信息推测并得到一级质谱的精确相对分子质量, 经 Xcalibur 2.0 软件拟合分子式, 并与数据库进行比对, 对色谱峰进行初步推测, 再依据对照品或参考文献提供的保留时间及高能碰撞下产生的碎片离子信息, 进一步推断待测化学成分。

3 结果

丹黄祛瘀胶囊在“2.1”项下色谱及质谱条件下采集的 UPLC-Q-Orbitrap 总离子流图, 见图 1。根据“2.3”项下数据分析方法, 共鉴定出 59 种化学成分, 其中经对照品比对鉴定得到有 29 种, 结果见表 1。

3.1 黄酮类

黄酮类化合物在植物界分布广泛, 在植物体内大部分与糖结合成苷类或以碳糖基的形式存在, 也有以游离形式存在的, 查阅相关文献报道^[8-10], 可知黄酮类化合物在质谱条件下的断裂方式主要有

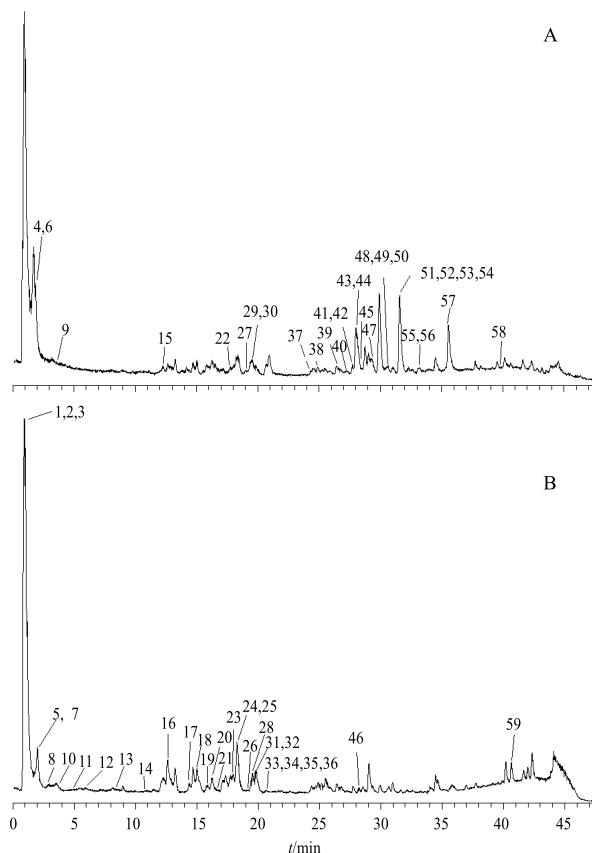


图 1 正离子 (A) 和负离子 (B) 模式下丹黄祛瘀胶囊总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram (TIC) of Danhuang Quyu Capsule under positive mode (A) and negative mode (B)

CO、CO₂、C₂H₂O、H₂O 等中性离子的丢失及 1, 3A⁺、0, 2A⁺、0, 2B⁺等 RDA 裂解 (图 2) 以及糖基的断裂。在本品中, 共鉴定了 8 种黄酮类化合物, 包括柚皮素、(+)-儿茶素、槲皮素、毛蕊异黄酮、山柰黄素、刺芒柄花素、木犀草苷和金丝桃苷。

以槲皮素为例, 该化合物在负离子模式下响应较好, 根据一级质谱信息, 经 Xcalibur 软件拟合分子离子峰 [M-H]⁻ 分子式为 C₁₅H₉O₇, 分析化合物 (26) 的二级质谱信息发现, 其裂解途径符合黄酮类化合物裂解规律。经分析, 母离子 m/z 301.035 7 在 1,2 处断裂同时转移形成 m/z 179.00 (C₈H₃O₅) 碎片, 碎片 m/z 151.00 (C₇H₃O₄) 由母离子 m/z 301.035 7 发生 Diels-Alder (RDA) 反应丢失 CO 产生, m/z 151.00 继续中性丢失 CO₂ 后产生了碎片离子峰 m/z 107.01 (C₆H₃O₂), 通过比对对照品的保留时间, 质谱一级、二级离子碎片等信息, 最终确定 26 号峰为槲皮素。

表1 丹黄祛瘀胶囊化学成分鉴定

Table 1 Mass spectrum information of 59 identified compounds in Danhuang Quyu Capsule

峰号	化合物	t_R/min	理论值 (m/z)	测定值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	离子模式	分子式	碎片离子
1	半乳糖	0.99	179.056 1	179.055 6	3.406	负	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	161.04, 89.02, 71.01
2	琥珀酸	1.27	117.019 3	117.018 3	0.469	负	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$	99.01, 73.03
3	没食子酸	1.40	169.014 2	169.013 6	2.486	负	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	125.02
4	苦参碱	1.75	249.196 1	249.195 8	-1.284	正	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{ON}_2$	—
5	丹参素	1.92	197.045 6	197.045 5	2.792	负	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$	179.03, 135.04, 109.03
6	5-羟甲基糠醛	1.96	127.039 0	127.039 0	0.310	正	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	109.03, 81.03
7	丹参素钠	2.02	219.027 5	219.027 3	4.180	负	$\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_5\text{Na}$	205.01
8	原儿茶酸	2.34	153.019 3	153.018 5	1.862	负	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	109.03
9	原儿茶醛	3.55	139.039 0	139.039 0	-0.004	正	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	111.04, 93.03
10	对羟基苯甲酸	3.65	137.024 4	137.023 5	1.164	负	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	93.03
11	(+)-儿茶素	4.96	289.071 8	289.072 0	4.481	负	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$	245.08, 179.03, 109.03
12	咖啡酸	5.93	179.035 0	179.034 3	2.429	负	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	135.04
13	香草醛	8.14	151.040 1	151.039 4	2.512	负	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	136.02
14	阿魏酸	10.78	193.050 6	193.050 1	3.133	负	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	178.03, 149.06, 134.04
15	芍药内酯苷	12.27	481.170 4	481.261 3	5.932	正	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	—
16	金丝桃苷	12.58	463.088 2	463.088 7	3.407	负	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	300.03, 271.02, 255.03
17	木犀草苷	14.20	447.093 3	447.093 8	3.561	负	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	285.04, 257.05, 229.05, 213.06
18	丹酚酸 D	14.95	417.082 7	417.083 3	3.901	负	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	197.05, 175.04
19	2,4-二羟基苯乙酮	15.77	151.040 1	151.039 3	1.850	负	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	107.05
20	迷迭香酸	16.17	359.077 2	359.077 6	4.167	负	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	197.05, 179, 03, 161.02
21	异隐丹参酮	16.50	331.155 1	331.155 1	3.381	负	$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_5$	—
22	1,5-二羟基-3-甲基蒽醌	17.61	255.065 2	255.065 0	-0.648	正	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	—
23	樟脑酸	18.01	199.097 6	199.097 0	2.333	负	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}_4$	155.11
24	芍药苷	18.12	479.155 9	479.138 2	-2.759	负	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	449.11, 327.00, 121.02
25	丹酚酸 B	18.28	717.146 1	717.146 8	3.472	负	$\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	519.09, 321.04
26	槲皮素	19.03	301.035 3	301.035 7	4.853	负	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	179.00, 151.00, 107.01
27	山柰黄素	19.16	287.055 0	287.054 8	-0.922	正	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	—
28	癸二酸	19.42	201.113 2	201.112 8	3.205	负	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4$	183.10, 139.11
29	毛蕊异黄酮	19.47	285.075 8	285.075 4	-1.193	正	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	270.05
30	大黄素甲醚	19.47	285.075 8	285.075 4	-1.193	正	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	270.05, 253.05, 225.05, 197.06, 169.06
31	丹酚酸 A	19.79	493.114 0	493.114 7	3.502	负	$\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	295.06, 185.02, 109.03
32	苯甲酰芍药苷	19.80	583.182 1	583.178 1	-8.023	负	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$	335.05, 291.06
33	柚皮素	21.36	271.061 4	271.061 5	5.018	负	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	151.00, 119.05
34	丹酚酸 C	21.54	491.098 4	491.101 1	7.731	负	$\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	311.06, 293.05, 249.06, 135.04
35	芦荟大黄素	21.65	269.045 8	269.045 6	4.832	负	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	225.06
36	大黄素	21.65	269.045 6	269.045 8	4.832	负	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	225.06
37	亚丁基苯酞	24.30	189.091 0	189.090 8	-0.879	正	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$	171.08, 143.09, 133.03
38	刺芒柄花素	24.96	269.080 8	269.080 5	-1.098	正	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	254.06
39	黄芪甲苷	26.59	785.468 2	785.468 3	0.258	正	$\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$	437.34
40	丹参二醇 A	27.33	313.107 1	313.106 8	-0.767	正	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_5$	295.23, 277.22
41	3-O-乙酰齐墩果酸	27.70	455.352 0	455.351 6	-0.904	正	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	437.34, 419.33, 297.22, 141.13, 123.12

续表 1

峰号	化合物	t_R/min	理论值 (m/z)	测定值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	离子模式	分子式	碎片离子
42	乙酸肉桂酯	27.75	177.091 0	177.090 9	-0.600	正	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$	145.06, 117.07
43	洋川芎内酯 A	27.98	193.122 3	193.122 2	-0.447	正	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2$	175.11, 147.12, 137.06
44	苍术酮	28.03	217.158 7	217.158 5	-0.791	正	$\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$	199.15, 175.11, 161.10
45	丹参酮 II _B	28.40	311.127 8	311.127 4	-1.304	正	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_4$	267.14
46	姜黄素	29.26	367.118 7	367.120 5	7.805	负	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$	217.05, 173.06, 149.06, 134.04
47	匙叶桉油烯醇	29.50	221.190 0	221.189 8	-0.777	正	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	203.18, 109.10
48	Z-蒿本内酯	30.30	191.106 7	191.106 5	-0.713	正	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$	173.10, 145.10, 117.07
49	二氢丹参酮 I	30.46	279.101 6	279.101 3	-1.114	正	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_3$	261.09, 233.10, 205.10, 149.02
50	丹参新酮	30.59	283.169 3	283.168 9	-1.224	正	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_2$	147.12
51	丹参酮 V	31.62	315.159 1	315.158 8	-0.970	正	$\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_4$	297.15, 279.14, 251.14
52	黄樟醚	31.63	163.075 4	163.075 2	-0.957	正	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$	135.08, 117.07
53	3,4-二甲基苯甲醛	31.64	135.080 4	135.080 4	-0.085	正	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}$	107.09
54	对乙基苯甲醛	31.64	135.080 4	135.080 4	-0.085	正	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}$	117.07, 107.09
55	异丹参酮 I	33.01	277.085 9	277.085 7	-0.941	正	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_3$	249.09
56	隐丹参酮	33.14	297.148 5	297.148 3	-0.912	正	$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_3$	279.14, 251.14
57	溶血卵磷脂	35.18	496.339 8	496.339 3	-0.898	正	$\text{C}_{24}\text{H}_{50}\text{NO}_7\text{P}$	184.07, 104.11
58	豆甾醇	39.99	413.377 8	413.377 7	-0.248	正	$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$	395.37, 368.35, 255.21, 213.16, 159.12
59	亚油酸	40.69	279.233 0	279.233 1	4.739	负	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	261.22

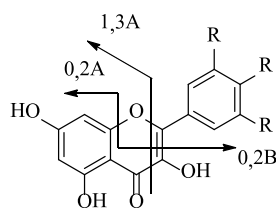


图 2 黄酮类化合物的主要裂解方式

Fig. 2 Cracking law of flavonoid

黄酮苷类化合物在多级裂解 (MS^n) 时, 容易丢失糖基^[11]。在本实验中, 负离子模式下峰 17 和 16 响应较好。二级质谱数据显示峰 17 和 16 的母离子丢失 1 分子 $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ 后产生基峰, 推测这种 2 种成分均为含葡萄糖基的苷类物质。在峰 17 的二级质谱图中, 出现了 m/z 447.093 78、 m/z 285.040 74、 m/z 257.045 78、 m/z 229.051 35 及 m/z 213.056 15 等碎片离子, 分别对应 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{CO}]^-$ 、 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-2\text{CO}]^-$ 和 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{CO}-\text{CO}_2]^-$ 离子峰。将一级、二级质谱数据与对照品比较, 鉴定峰 17 为木犀草苷。峰 16 裂解方式与峰 17 类似, 与对照品对比后, 推测峰 16 为金丝桃苷, 又称为异槲皮苷。木犀草苷的质谱裂解途径如图 3 所示。

3.2 苯酞内酯类

苯酞内酯类成分多来自药材当归, 该类化合物在正离子模式下响应较好, 高能碰撞下易生成丢失 CO 、 H_2O 及烷基链的特征碎片离子^[12-13]。在本品中共鉴别出了 3 种苯酞内酯类化合物, 包括 Z-蒿本内酯、洋川芎内酯 A 和亚丁基苯酞。

以 Z-蒿本内酯为例, 该化合物在正离子模式下出峰, 根据其一级、二级质谱数据及裂解规律, 可知 m/z 191.106 52 为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰, 相对分子质量为 190.11, 经软件拟合分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$, 二级质谱数据中, 有 m/z 173.096 02、 m/z 145.101 17、 m/z 117.070 01 等碎片离子, 分别为 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$ 、 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$ 。结合以上信息及相关文献报道^[14], 并与对照品比对后, 鉴定 48 号峰为 Z-蒿本内酯。Z-蒿本内酯的质谱裂解途径如图 4 所示。

3.3 醌类

醌类化合物广泛存在于动植物和矿物中, 以蒽醌类居多, 萘醌和苯醌类次之, 大多具有重要的生物活性。大多数该类化合物在负离子模式下的响应明显好于正离子, 质谱高能碰撞下逐步失去 CO 分子, 且伴随 CO_2 丢失; 苯环上的取代基, 如 CH_3 、

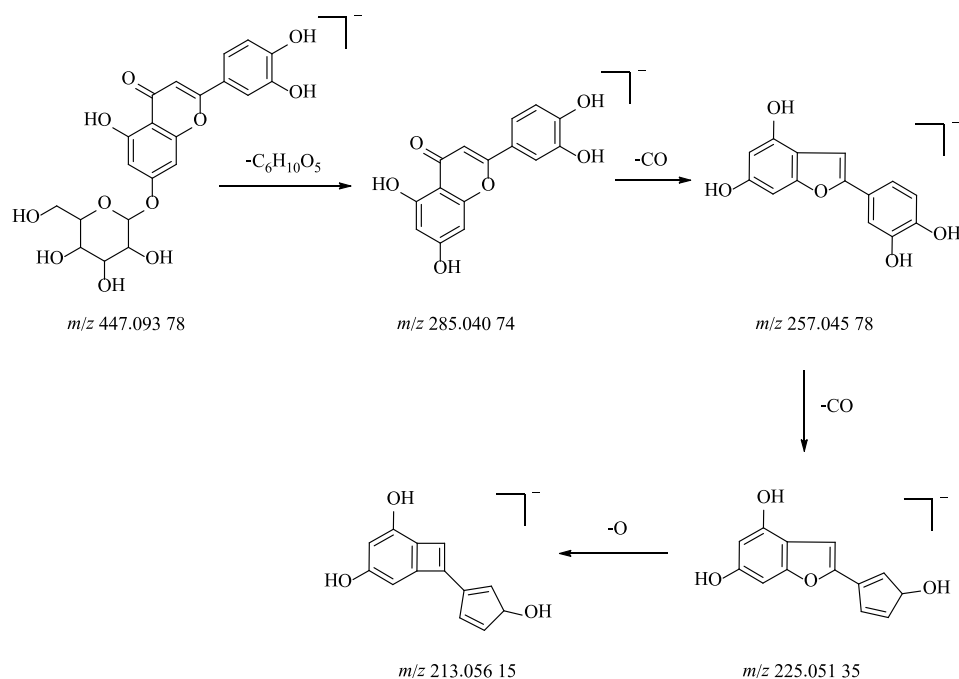
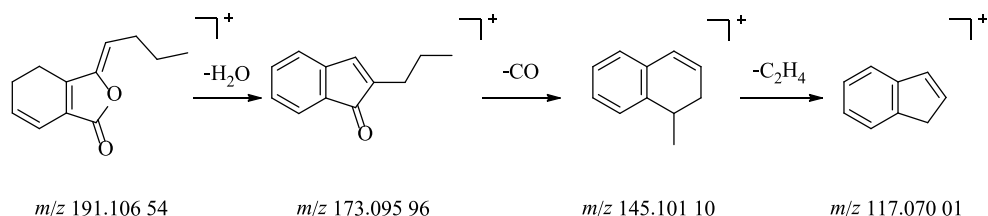


图 3 木犀草苷的质谱裂解途径

Fig. 3 Fragment pathways of luteoloside

图 4 *Z*-蒿本内脂的质谱裂解途径Fig. 4 Fragment pathways of *Z*-ligustilide

CH_3O 易丢失形成碎片离子；另外蒽醌苷类成分易发生苷键断裂而丢失糖苷配基^[15]。本品共鉴定 12 种醌类化合物，其中蒽醌类衍生物有大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄素和 1,5-二羟基-3-甲基蒽醌；菲醌类衍生物有隐丹参酮、二氢丹参酮 I、丹参二醇 A、丹参酮 II_B、丹参酮 V、异丹参酮 I、异隐丹参酮和丹参新酮。

以大黄素甲醚为例，该化合物在正、负离子模式下均有响应，相对分子质量为 284.08。软件拟合分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$ ，该化合物二级质谱碎片离子有 m/z 285.075 41、270.051 97、253.049 07、225.054 23、197.060 15 和 169.064 90 分别对应 $[M+H]^+$ 、 $[M+H-CH_3]^+$ 、 $[M+H-CH_3-OH]^+$ 、 $[M+H-CH_3-OH-CO]^+$ 、 $[M+H-CH_3-OH-2CO]^+$ 和 $[M+H-CH_3-OH-3CO]^+$ ，根据其断裂方式，并与对照品

比对及参考相关文献，鉴定该化合物为大黄素甲醚。大黄素甲醚的裂解途径如图 5。

3.4 单萜苷类

单萜苷类成分主要来自药材白芍，该类化合物通常在负离子模式下响应较好，其中母离子主要以 $[M-H]^-$ 或 $[M+COOH]^-$ 形式存在，高能碰撞下常失去苯甲酸 (BA) 而形成 $[M-H-122]^-$ 和相对分子质量为 121 的 $[BA-H]^-$ 特征离子峰，此外该化合物中的 $[M-H-CH_2O]^-$ 、 $[M-H-162-BA]^-$ 等特征离子也较为常见^[16-17]。本品中鉴定出单萜苷类化合物共 3 种，分别为苯甲酰芍药苷、芍药苷及其同分异构体芍药内酯苷。以白芍的代表性成分芍药苷 (峰 24) 为例，Q-Orbitrap 提供的分子离子峰 m/z 479.138 2，经软件拟合后分子式为 $C_{23}H_{29}O_{11}$ ，推测该离子峰可能为芍药苷或芍药苷内酯，在二级

质谱中提取的系列碎片离子为 m/z 449.11、327.00、和 121.02 分别对应 $[M-H-CH_2O]^-$ 、 $[M-H-C_7H_6O_2-CH_2O]^-$ 和 $[BA-H]^-$ 离子峰, 最后经芍药苷对照品进行对比后, 确定 24 号峰为芍药苷, 15 号峰为芍药内酯苷。芍药苷的裂解途径见图 6。

3.5 有机酸类

有机酸类化合物质谱行为呈现: 在负离子模式下, 大多以 $[M-H]^-$ 准分子离子峰的形式存在, 高能碰撞下易产生 $[M-H-CO_2]^-$ 或 $[M-H-H_2O]^-$

的碎片离子; 当化合物结构中含没食子酸时, 易出现没食子酸丢失 $[M-H-gallicacid]^-$ 和没食子酸残基碎片离子; 化合物结构中含咖啡酸时, 易出现咖啡酰基丢失 $[M-H-caffeoyl]^-$ 和咖啡酸碎片离子^[18-20]。本品中鉴定出有机酸类化合物共 16 种, 包括阿魏酸、咖啡酸、迷迭香酸、没食子酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、原儿茶酸、丹参素、丹参素钠、姜黄素、丹酚酸 C、亚油酸、丹酚酸 D、琥珀酸、癸二酸和樟脑酸。

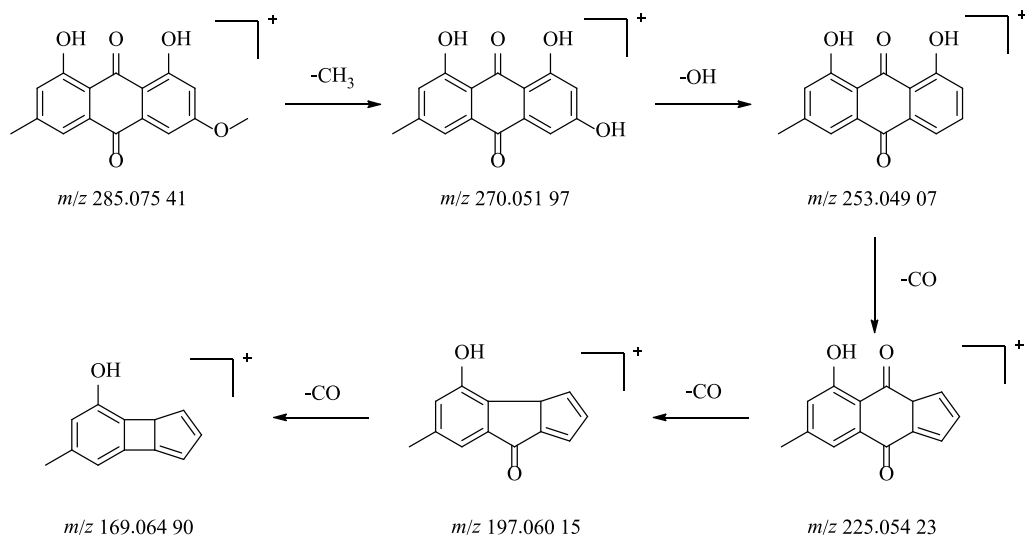


图 5 大黄素甲醚的质谱裂解途径

Fig. 5 Fragment pathways of emodin-3-methyl ether

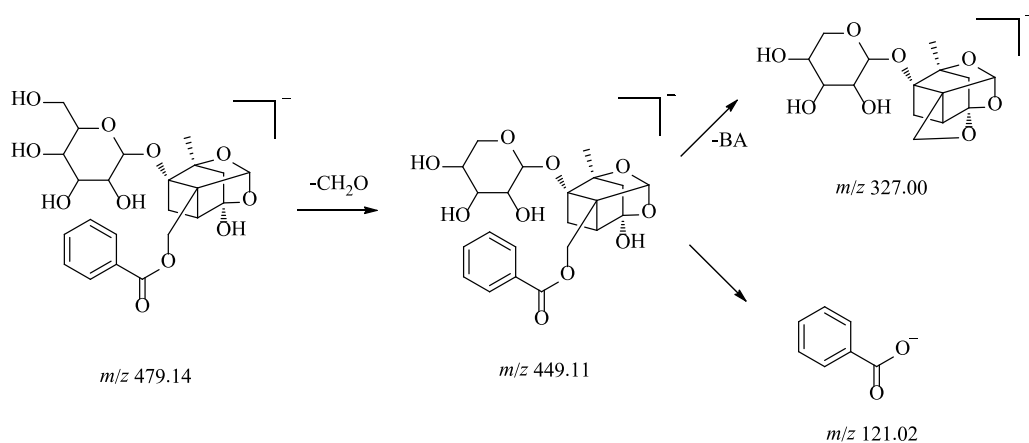


图 6 芍药苷的质谱裂解途径

Fig. 6 Fragment pathways of paeoniflorin

以迷迭香酸为例, 该化合物是丹参素和咖啡酸的二聚体, 由于酯键两侧均具有较强的吸电子基团, 因此酯键部位极易发生断裂。在负离子模式下出峰, 该化合物的准分子离子峰为 $[M-H]^-$ (m/z 359.076 4), 经软件拟合分子式为 $C_{18}H_{16}O_8$,

在质谱高能碰撞下, 产生的系列碎片离子主要有 m/z 197.05、179.03 和 161.02, 其中二聚体发生咖啡酰基和丹参素羟基酯键断裂, 分别丢失丹参素 ($C_9H_{10}O_5$) 和咖啡酰基 ($C_9H_7O_3$), 产生 m/z 161.02 和 m/z 197.05 离子峰。由于羟基的电负性强于羰基,

故丹参素羟基容易得到质子,从而发生中性丢失丹参素的概率远大于咖啡酰基,因此 m/z 161.02 的丰度最强,常作为迷迭香酸的特异性鉴别离子。以上裂解过程与迷迭香酸的裂解特点完全一致,并经过对照品进行比对后,确认 20 号峰为迷迭香酸。

3.6 其他类

此外,在本品中还检测到了原儿茶醛、5-羟基糠醛、黄芪甲苷、苦参碱、苍术酮、豆甾醇、乙酸肉桂酯、匙叶桉油烯醇、对羟基苯甲酸、3,4-二甲基苯甲醛、对乙基苯甲醛、2,4-二羟基苯乙酮、香草醛、半乳糖、溶血卵磷脂、3-*O*-乙酰齐墩果酸和黄樟醚等成分,相关信息见表 1。

4 讨论

4.1 分析方法的选择

UPLC-Q-Orbitrap 技术集合了超高效液相色谱的高效分离能力、四级杆强大的离子选择能力和静电场轨道的高分辨扫描能力,可提供高质量的全扫描和 MS/MS 数据,具有高分辨、高灵敏度以及高分析速度的显著优点。此外,与其他类型的串联杂交质谱相比较,Q-Orbitrap 在性能和可操作性上具有领先优势,如 Full MS/SIM 扫描模式与三重四级杆质谱相比,明显简化了质谱参数的优化,使仪器使用更加人性化、简单化和批量化,因此本实验选择 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 作为中药复杂成分分析的重要手段。

4.2 检测条件的优化

在优化色谱条件时,本实验分别考察了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.1%甲酸水作为流动相系统,结果表明乙腈-水的色谱分离效果明显优于甲醇水,当在水相中添加 0.1%的甲酸时,各成分的峰形更佳,质谱响应更好。此外,本实验采用了正、负离子同时扫描的模式对化合物进行检测,结果发现其在不同的离子模式下响应各不相同,根据质谱扫描时的响应强度并针对不同成分的理化性质,最终确定了不同化合物的离子扫描模式。

本实验共鉴定丹黄祛瘀胶囊中 59 个成分,其中黄酮类化合物 8 个、苯酚内酯类 3 个、醌类化合物 12 个、单萜苷类化合物 3 个,有机酸类化合物 16 个、其他类的化学成分 17 个。以上成分中,黄酮类化合物具有抗氧化、抗血栓的作用;苯酚内酯类具有明显的抗脑缺血、改善神经系统损伤等作用;蒽醌类具有降血压、调血脂和抗动脉粥样硬化等血管保护作用;单萜苷类具有抗炎、解痉镇痛以及神经

元保护的药理作用;酚酸类在心血管保护、抗血栓、抗炎、抗氧化等方面作用明显。以上不同来源、不同种类的药物活性成分可通过协同或互补等作用,从而使丹黄祛瘀胶囊发挥活血止痛,软坚散结等显著疗效。

研究结果表明,UPLC-Q-Orbitrap HRMS 可高效、全面、系统地对丹黄祛瘀胶囊中的化学成分进行快速定性研究,能够从整体上阐明丹黄祛瘀胶囊的化学成分组成,对于深入研究其药效物质基础和质量控制方法以及临床应用提供理论指导。

参考文献

- [1] 国家药品标准(试行)[S]. 2012.
- [2] 国家中成药标准汇编:外科妇科分册[S]. 2002.
- [3] 陈琪珍,淑娜,陈雄.丹黄祛瘀胶囊联合克林霉素治疗慢性盆腔炎的临床研究[J].现代药物与临床,2017,32(5):844-847.
- [4] 解世全,王巍,赵焕君.HPLC 测定丹黄祛瘀胶囊中丹参素钠的含量[J].广州化工,2012,40(15):157-158.
- [5] 王巍,解世全,陈晓明.HPLC 测定丹黄祛瘀胶囊中延胡索乙素的含量[J].广州化工,2012,40(14):139-140.
- [6] 付小六.HPLC 测定丹黄祛瘀胶囊中丹参酮 II_A 的含量[J].中成药,2008,30(3):460-461.
- [7] Zubarev R A, Mskarov A. Orbitrap mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(11): 5288-5296.
- [8] Hashimoto M, Suzuki T, Iwashina T. New acylated anthocyanins and other flavonoids from the red flowers of clematis cultivars[J]. *Nat Prod Commun*, 2011, 6(11): 1631-1636.
- [9] Ma Y, Li Q M, Heuvel H, *et al*. Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1997, 11(12): 1357-1364.
- [10] Justesen U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Mass Spectrom*, 2001, 36(2): 169-178.
- [11] Jin Y, Xiao Y S, Zhang F F, *et al*. Systematic screening and characterization of flavonoid glycosides in *Carthamus tinctorius* L. by liquid chromatography/UV diode-array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(3): 418-430.
- [12] Chen L, Qi J, Chang Y X, *et al*. Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal formula Danggui Shaoyao San by

- HPLC-DAD-ESI-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2009, 50(2): 127-137.
- [13] Zhang X L, Liu L F, Zhu L Y, *et al*. A high performance liquid chromatography fingerprinting and ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry chemical profiling approach to rapidly find characteristic chemical markers for quality evaluation of dispensing granules, a case study on *Chuanxiong Rhizoma* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 88(1): 391-400.
- [14] 杨岱琳, 佟玲, 李晓稳, 等. UPLC-Q-TOF/MS^E 方法分析养血清脑颗粒的化学成分 [J]. *药学学报*, 2016, 51(5): 797-805.
- [15] 高亮亮. 唐古特大黄、药用大黄和掌叶大黄的化学成分和生物活性研究 [D]. 北京: 北京协和医学院中国医学科学院, 2012.
- [16] 牛研, 王书芳. LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSⁿ 分析当归芍药散中化学成分 [J]. *中草药*, 2014, 45(8): 1056-1062.
- [17] 夏忠庭, 鲍丽颖, 何毅, 等. 基于 UPLC-ESI-IT-TOF/MS 方法分析郁舒片中脂溶性成分 [J]. *药学学报*, 2015, 50(5): 587-593.
- [18] 朱云祥, 陈璐琳, 龚婧如, 等. LC-Q-TOF-MS 及 LC-IT-MS 分析酸枣仁汤的化学成分 [J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(3): 457-465.
- [19] Wei W L, Huang L F. Simultaneous determination of ferulic acid and phthalides of *Angelica sinensis* based on UPLC-Q-TOF/MS [J]. *Molecules*, 2015, 20(3): 4681-4694.
- [20] 毛艳, 张瑞萍, 贺金华, 等. 高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱分析紫草中酚酸类化合物 [J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(7): 1199-1206.