

基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术活血止痛胶囊化学成分的快速分析

张纪红¹, 吴卫东⁴, 刘建庭^{2,3}, 许浚^{2,3}, 黄飞奇⁴, 刘丽¹, 张铁军^{2,3}, 陈常青^{2,3*}, 刘昌孝^{3*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 天津药物研究院 中药现代制剂与质量控制技术国家地方联合工程实验室, 天津 300301

3. 天津药物研究院 天津市中药质量标志重点实验室, 天津 300301

4. 江西百神昌诺药业有限公司, 江西 抚州 344000

摘要: 目的 采用超高效液相色谱四级杆-飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS), 对活血止痛胶囊化学成分进行快速分析。方法 采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸乙腈为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 0.4 mL/min; 分别在正、负离子模式下采集数据, Masslynx 4.1TM 软件分析处理数据。结果 在正、负离子模式下共鉴定出 113 个化合物, 包括萜类、皂苷类、有机酸类、苯醌类和其他类, 并对化合物的药材来源进行了归属。结论 建立的方法能够系统、快速、准确地鉴定活血止痛胶囊多种化学成分, 本研究为活血止痛胶囊质量评价指标选择及药效物质基础研究提供了参考。

关键词: 活血止痛胶囊; 超高效液相色谱四级杆-飞行时间质谱; 萜类; 皂苷类; 苯醌类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)12-3139-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.004

Rapid analysis of chemical constituents of Huoxue Zhitong Capsules based on UPLC-Q-TOF/MS

ZHANG Ji-hong¹, WU Wei-dong⁴, LIU Jian-ting^{2,3}, XU Jun^{2,3}, HUANG Fei-qi⁴, LIU Li¹, ZHANG Tie-jun^{2,3}, CHEN Chang-qing^{2,3}, LIU Chang-xiao³

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. National & Local United Engineering Laboratory of Modern Preparation and Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

3. Tianjin Key Laboratory of Quality Marker of Traditional Chinese Medicine, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

4. Jiangxi Baishen Changnuo Pharmaceutical Co., Ltd., Fuzhou 344000, China

Abstract: Objective To rapidly analyze the chemical constituents of Huoxue Zhitong Capsules performed by ultra-high performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS). **Methods** A Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used with 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid acetonitrile as a mobile phase. The flow rate was 0.4 mL/min; The samples were collected in positive and negative ion modes, respectively. The processed data was analyzed by Masslynx 4.1TM software. **Results** A total of 113 compounds were identified in positive and negative ion mode, including terpenoids, saponins, organic acids, benzoquinones and others, and the medicinal sources of the compounds were assigned. **Conclusion** The established method can systematically, quickly and accurately identify various chemical components of Huoxue Zhitong Capsule. This study provides a reference for the selection of quality evaluation indicators and the basis of pharmacodynamics of Huoxue Zhitong Capsule.

Key words: Huoxue Zhitong Capsule; UPLC-Q-TOF/MS; terpenoids; saponins; benzoquinones

收稿日期: 2019-12-23

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81830111); “中医药现代化研究” 重点专项资助 (2019YFC1711200)

作者简介: 张纪红, 女, 天津中医药大学中药学硕士研究生, 主要从事中药质量研究。Tel: 18322059171 E-mail: 965627793@qq.com

*通信作者 陈常青, 男, 研究员, 主要从事中药研究。E-mail: chencq@tjipr.com

刘昌孝, 中国工程院院士。E-mail: liucx@tjipr.com

活血止痛胶囊收载于《中国药典》2015 年版一部,是由当归、三七、醋乳香、冰片、土鳖虫、煅自然铜 6 味中药组成,具有活血散瘀、消肿止痛功效,用于跌打损伤、瘀血肿痛,临床主要用于治疗急、慢性软组织损伤类疾病^[1]。活血止痛胶囊临床疗效确切,但目前对活血止痛胶囊的药效物质基础研究未见报道,有关该复方的化学组成研究报道也多局限于单一指标的含量测定或单味药成分的定性分析^[2-9],致使其质量标准控制指标较单一,因此,全面分析活血止痛胶囊的化学成分显得尤为重要。

近年来,液质联用在中药复方物质组辨识中发挥着重要的作用,超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)技术具有“三高”(高效率、高灵敏度、高分辨率)的特点,同时还能得到化合物的相对分子质量、元素组成以及离子碎片等信息,可快速确定化合物的结构^[10]。本实验采用超高效液相色谱四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)技术,对活血止痛胶囊的化学成分进行定性分析,使用 MasslynxTM 4.1 软件进行数据分析,结合色谱行为和质谱信息及相关文献,共鉴定或表征了 113 个化合物,主要为萜类化合物 33 个、皂苷类化合物 40 个、有机酸类化合物 13 个、苯酚类化合物 22 个和 5 个其他类成分。为进一步阐明活血止痛胶囊药效物质基础及质量控制指标的选择提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity UPLC 超液相色谱仪、Xevo G2 Q-TOF 高分辨质谱(美国 Waters 公司); Acquity UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱(美国 Waters 公司); AB204-N 电子天平(德国 Meteler 公司); BT25S 电子天平(德国 Sartorius 公司); 超声波清洗仪(宁波新芝生物科技公司)。

1.2 试剂

对照品阿魏酸(批号 110773-201614)、咖啡酸(批号 110885-201703)、人参皂苷 Rg₁(批号 110703-201832)、人参皂苷 Rb₁(批号 110704-201827)、人参皂苷 Re(批号 110754-201827)、三七皂苷 R₁(批号 110745-201820)、人参皂苷 Rd(批号 111818-201603)购自中国食品药品检定研究院;所有对照品质量分数均大于 98.0%。色谱纯甲醇、乙腈、甲酸,购自天津康科德科技有限公司;纯净水购自杭州娃哈哈饮用水有限公司;活血止痛胶囊购自江西

百昌诺药业有限公司(批号 190403)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B), 梯度洗脱条件为 0~3 min, 92%~80% A; 3~22 min, 80%~35% A; 22~26 min, 35%~25% A; 26~27 min, 25%~5% A; 27~30 min, 5% A; 30~31 min, 5%~92% A; 31~35 min, 92% A; 柱温 45 °C; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 2 μL。

2.2 质谱条件

Xevo G2 Q-TOF 高分辨质谱仪, 配备电喷雾离子源(ESI), 正、负离子 2 种模式下进行监测, 毛细管电压正离子模式 3.0 kV, 负离子模式 2 kV。离子源温度 110 °C, 样品锥孔电压 30 V, 锥孔气体流量 50 L/h, 氮气脱气温度 350 °C, 脱气体积流量 800 L/h, 扫描范围 *m/z* 50~2 000, 内参校准液亮氨酸脑啡肽用于相对分子质量实时校正。

2.3 对照品溶液的制备

分别称取对照品三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、咖啡酸、阿魏酸适量, 精密称定, 加甲醇分别制成每毫升含 0.107、0.108、0.112、0.097、0.132、0.102、0.097 mg 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取活血止痛胶囊 10 粒, 装量差异检查后的内容物约 2.0 g(批号 190403), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 70%甲醇 20 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 用 70%甲醇溶液补足减失质量, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 得样品溶液供 UPLC-Q-TOF/MS 检测分析。

2.5 活血止痛胶囊样品分析

对活血止痛胶囊样品溶液进行检测分析, 所含各化学成分的色谱峰得到了较好的分离。正、负离子模式下, 活血止痛胶囊样品的色谱图(BPI)见图 1。

2.6 UPLC-Q-TOF/MS 成分鉴定

通过与对照品比对, 没有对照品的化合物根据碎片离子结合文献数据和公共数据库(如 MassBank、Chemspider), 分析质谱裂解规律, 在活血止痛胶囊样品中共鉴定得到 113 个化合物。其中 40 个皂苷类成分, 来源于三七; 33 个萜类成分,

来源于醋乳香; 22 个苯酞类成分, 主要来源于当归; 13 个有机酸类成分, 主要来源于当归; 5 个其他类成分。UPLC-Q-TOF/MS 数据见表 1。

2.7 主要化合物鉴定与归属

2.7.1 有机酸类化合物 主要存在于当归中, 其中酚酸类化合物主要为芳香烃中苯环上氢原子被羟基

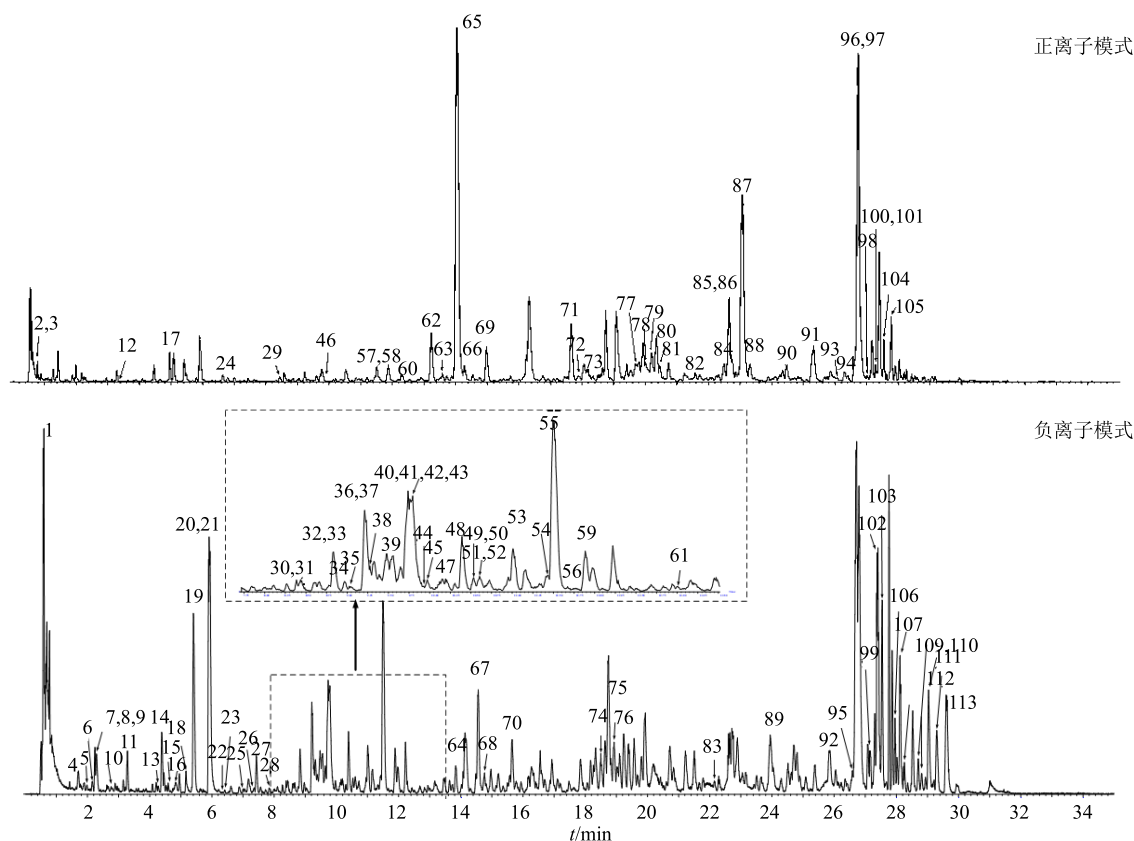


图 1 活血止痛胶囊 UPLC-Q-TOF/MS 正、负模式 BPI 图

Fig. 1 UPLC-Q-TOF/MS BPI diagram of Huoxue Zhitong Capsule under ESI⁺ and ESI⁻

表 1 活血止痛胶囊 UPLC-Q-TOF/MS 化学成分鉴定

Table 1 Identification of chemical components of Huoxue Zhitong Capsule by UPLC-Q-TOF/MS

峰号	t_R/min	分子式	监测离子	测量值	真实值	碎片离子	化合物	来源
1	0.57	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	387.113 9	387.114 4	377, 341	蔗糖	三七
2	0.77	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	132.102 5	132.103 3	124, 112	异亮氨酸	当归
3	0.82	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	132.102 5	132.103 2	112, 86, 70	亮氨酸	当归
4	1.71	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	353.087 3	353.084 3	341, 191, 158, 137	绿原酸	当归
5	2.05	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	179.034 4	179.033 3	145, 133, 116, 96	咖啡酸	当归
6	2.15	$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	165.018 8	165.018 5	148, 161, 121, 96	邻苯二甲酸	当归
7	2.24	$\text{C}_{42}\text{H}_{74}\text{O}_{16}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	879.495 3	879.496 6	552, 474, 443, 341	三七皂苷 J	三七
8	2.30	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	167.034 4	167.034 0	123	香草酸	当归
9	2.36	$\text{C}_{42}\text{H}_{74}\text{O}_{16}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	879.495 3	879.486 0	697, 545, 341	三七皂苷 J 异构体	三七
10	2.81	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	163.039 5	163.038 6	145, 131, 116	对香豆酸	当归
11	3.28	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	193.050 1	193.052 5	179, 165, 149	阿魏酸	当归
12	3.40	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	225.112 7	225.115 3	207, 166, 158, 130	洋川芎内酯 I	当归
13	4.30	$\text{C}_{53}\text{H}_{90}\text{O}_{23}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 139.584 9	1 139.576 8	613, 515, 341	yesanichinoside H	三七
14	4.39	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	187.097 0	187.096 3	163, 125, 141	壬二酸	当归
15	4.61	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{19}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 007.542 7	1 007.535 5	961, 895, 859, 839	三七皂苷 $\text{R}_3/\text{R}_6/20$ -氧代-人参皂苷 Rf	三七
16	4.81	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{19}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 007.542 7	1 007.534 0	961, 895, 859, 839	三七皂苷 $\text{R}_3/\text{R}_6/20$ -氧代人参皂苷 Rf	三七
17	5.09	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	225.112 7	225.114 1	207, 189, 161, 151, 143	洋川芎内酯 H	当归

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	监测离子	测量值	真实值	碎片离子	化合物	来源
18	5.17	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{19}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 007.545 7	1 007.533 6	961, 879	三七皂苷 M	三七
19	5.41	$\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{O}_{18}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	977.532 1	977.525 1	931, 799, 637, 529	三七皂苷 R_1	三七
20	5.88	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	845.489 9	845.492 6	835, 799, 637, 475	人参皂苷 Rg_1	三七
21	5.92	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	991.547 8	991.551 9	945, 847, 783	人参皂苷 Re	三七
22	6.35	$\text{C}_{45}\text{H}_{74}\text{O}_{17}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	885.484 8	885.485 8	845, 719, 614, 537	丙二酰基人参皂苷 Rg_1 异构体	三七
23	6.42	$\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{24}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 169.595 5	1 169.591 3	1 123, 1 003, 854, 799	三七皂苷 A	三七
24	7.00	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	189.091 6	189.092 4	171, 159, 131, 113	丁烯基苯酞异构体	当归
25	7.01	$\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{19}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 005.527 0	1 005.529 4	959, 887, 678, 469	三七皂苷 G	三七
26	7.31	$\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{O}_{24}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 167.579 9	1 167.576 4	1 121.887, 781	三七皂苷 B	三七
27	7.43	$\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	815.479 3	815.481 4	781, 637, 619, 579	三七皂苷 R_2 异构体	三七
28	7.85	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	355.118 2	355.117 2	311, 249, 174, 145, 116	阿魏酸松柏酯异构体	当归
29	8.45	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	355.248 4	355.248 2	337, 319, 301, 293, 275	incensole trioxide	醋乳香
30	8.65	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	205.086 5	205.087 9	190, 155, 116, 101	2-戊酰基苯甲酸	当归
31	8.67	$\text{C}_{60}\text{H}_{102}\text{O}_{28}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 315.653 4	1 315.649 8	1 269, 1 117, 917, 845	人参皂苷 Ra_0	三七
32	8.84	$\text{C}_{59}\text{H}_{100}\text{O}_{27}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 285.642 9	1 285.640 4	1 239, 945, 783, 745	三七皂苷 Fa	三七
33	8.85	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	205.086 5	205.087 5	179, 161, 116	Z-6,7-环氧藁本内酯	当归
34	8.97	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	845.489 9	845.491 1	835, 799, 637	人参皂苷 R_f	三七
35	9.04	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	207.102 1	207.103 7	163, 145	洋川芎内酯 G	当归
36	9.21	$\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	815.479 3	815.481 6	769, 637, 519, 475	三七皂苷 R_2	三七
37	9.22	$\text{C}_{45}\text{H}_{74}\text{O}_{17}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	885.484 8	885.476 6	845, 799, 637, 397	丙二酰基人参皂苷 Rg_1	三七
38	9.26	$\text{C}_{59}\text{H}_{100}\text{O}_{27}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 285.642 9	1 285.639 3	1 107, 945, 901, 783, 621, 459	人参皂苷 Ra_3	三七
39	9.46	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	205.086 5	205.087 7	171, 161, 116	洋川芎内酯 F	当归
40	9.71	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	829.494 9	829.492 9	783, 637, 553	人参皂苷 Rg_2	三七
41	9.72	$\text{C}_{59}\text{H}_{100}\text{O}_{27}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 285.642 9	1 285.633 7	1 107, 1 007, 829, 945, 783	三七皂苷 R_4	三七
42	9.74	$\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{23}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 154.600 6	1 154.599 4	1 131, 1 107, 683, 599	人参皂苷 Rb_1	三七
43	9.78	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_9$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	683.437 0	683.435 5	553, 501, 329	人参皂苷 Rh_1	三七
44	9.88	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	203.070 8	203.071 1	174, 145, 116	3-丁烯基-7-羟基苯酞	当归
45	9.93	$\text{C}_{57}\text{H}_{94}\text{O}_{26}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1 193.595 5	1 193.590 9	1 153, 1 107, 829, 683	丙二酰基人参皂苷 Rb_1	三七
46	9.97	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	121.065 3	121.066 2	121, 105, 93, 74	1-苯乙酮	当归
47	10.13	$\text{C}_{57}\text{H}_{94}\text{O}_{26}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1 193.595 5	1 193.595 5	1 087, 870, 683, 597	二酰基人参皂苷 Rb_1 异构体	三七
48	10.31	$\text{C}_{45}\text{H}_{74}\text{O}_{17}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	885.484 8	885.484 3	841, 515, 341	丙二酰基人参皂苷 Rg_1 异构体	三七
49	10.54	$\text{C}_{53}\text{H}_{90}\text{O}_{22}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 123.590 0	1 123.583 6	989, 683, 620, 597	人参皂苷 Rb_2	三七
50	10.56	$\text{C}_{53}\text{H}_{90}\text{O}_{22}$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	1 102.590 0	1 102.585 8	1 079, 1 060, 1 028, 1 010	人参皂苷 Rc	三七
51	10.62	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	203.070 8	203.070 7	173, 160, 145, 132	洋川芎内酯 C	当归
52	10.66	$\text{C}_{53}\text{H}_{90}\text{O}_{22}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 123.590 0	1 123.582 8	1 077, 983, 947	人参皂苷 Rb_3	三七
53	11.02	$\text{C}_{36}\text{H}_{62}\text{O}_9$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	683.437 0	683.433 0	683, 620, 597	人参皂苷 F_1	三七
54	11.43	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	203.070 8	203.070 6	145, 165, 116	洋川芎内酯 B	当归
55	11.50	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	991.547 8	991.541 9	945, 867, 833, 783, 621	人参皂苷 R_d	三七
56	11.68	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	203.070 8	203.070 8	187, 145, 116	洋川芎内酯 E	当归
57	11.86	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	193.122 9	193.123 8	175, 147, 137, 105, 93	洋川芎内酯 A	当归
58	11.87	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	339.253 5	339.254 6	321, 303, 285, 215	incensole dioxide	醋乳香
59	12.22	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	991.547 8	991.551 9	845, 867, 833	三七皂苷 K	三七
60	12.31	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	191.107 2	191.107 9	173, 145	正丁基苯酞	当归
61	13.01	$\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{O}_{17}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	961.537 2	961.541 3	915, 878, 783, 631	三七皂苷 Fe	三七
62	13.23	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	191.107 2	191.107 9	173, 145	E-藁本内酯	当归
63	13.57	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	189.091 6	189.092 4	171, 158, 131, 113	川芎内酯	当归
64	13.85	$\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{12}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	797.468 7	797.472 7	751, 611, 543	三七皂苷 T_5	三七
65	14.04	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	191.107 2	191.108 3	173, 145, 117, 105, 91	Z-藁本内酯	当归
66	14.29	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	189.091 6	189.091 9	171, 158, 130, 127	E-丁烯基苯酞	当归

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	监测离子	测量值	真实值	碎片离子	化合物	来源
67	14.49	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	829.494 9	829.495 4	783, 621, 517, 487	20(S)-人参皂苷 Rg_3	三七
68	14.76	$\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{O}_{17}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	961.537 2	961.538 1	915, 834, 783, 621	三七皂苷 Fd	三七
69	14.98	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	323.258 6	323.259 5	305, 287, 269	incensole oxide	醋乳香
70	15.64	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	829.494 9	829.495 2	783, 621, 517, 487	20(R)-人参皂苷 Rg_3	三七
71	17.65	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	323.258 6	323.258 1	305, 287, 269	incensole oxide	醋乳香
72	17.90	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	189.091 6	189.092 0	161, 147, 130, 119, 105	Z-丁烯基苯酚	当归
73	18.05	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	381.206 6	381.206 9	340, 284, 243, 225, 191	洋川芎内酯 O	当归
74	18.50	$\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{O}_{14}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	723.380 3	723.379 2	485, 295, 363, 460	姜糖酯 B	三七
75	18.91	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{12}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	811.484 4	811.490 5	765, 603, 439, 311	人参皂苷 Rk_1	三七
76	19.24	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{12}$	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	811.484 4	811.488 2	649, 540, 595, 471	人参皂苷 Rg_5	三七
77	19.76	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	381.206 6	381.206 7	335, 213, 191	洋川芎内酯 P	当归
78	20.01	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	381.206 6	381.206 1	335, 307, 283, 251	新当归内酯	当归
79	20.19	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	381.206 6	381.206 4	363, 335, 293	欧当归内酯 A	当归
80	20.35	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	381.206 6	381.206 2	347, 287, 191	riligustilide	当归
81	20.45	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	323.258 6	323.258 5	305, 287, 269	incensole oxide	醋乳香
82	21.57	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	365.269 2	365.269 9	347, 305, 287, 269	incensole oxide acetate	醋乳香
83	22.15	$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	515.373 6	515.376 6	487, 446, 401	乙酰基-11 α -羟基- β -乳香酸	醋乳香
84	22.48	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	365.269 2	365.269 8	347, 305, 287, 269	incensole oxide acetate	醋乳香
85	22.64	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	471.347 4	471.348 4	455, 398, 365	11-羧基- β -乳香酸	醋乳香
86	22.72	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	365.269 2	365.268 7	305, 287, 271	incensole oxide acetate	醋乳香
87	23.06	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	307.263 7	307.264 3	289, 271, 215, 201	incensole	醋乳香
88	23.29	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	365.269 2	365.268 7	347, 305, 287, 271	incensole oxide acetate	醋乳香
89	23.89	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	277.216 8	277.217 0	255, 248, 219, 206	亚麻酸	当归
90	24.24	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	365.269 2	365.269 4	347, 305, 287, 271	incensole oxide acetate	醋乳香
91	25.33	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	273.258 2	273.259 2	217, 229, 149, 163	西柏烯	醋乳香
92	25.85	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	279.232 4	279.234 2	255, 241	亚油酸	当归、 土鳖虫
93	26.08	$\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	497.363 1	497.363 3	437, 409, 391	3 α -乙酰基-9, 11 脱氧- β -乳香酸异构体	醋乳香
94	26.30	$\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	291.268 8	291.269 1	273, 229, 191, 161	thunbergol	醋乳香
95	26.64	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	455.352 5	455.356 4	415, 383, 339, 281	3 α -乙羟基甘遂-8,24-二烯-21-酸异构体	醋乳香
96	26.73	$\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	513.358 0	513.359 4	495, 453, 435, 407, 375	3-乙酰基-11-酮- β -乳香酸	醋乳香
97	26.80	$\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_4$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	497.363 1	497.363 5	437, 409, 391	3 α -乙酰基-9,11 脱氧- β -乳香酸	醋乳香
98	27.01	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	273.258 2	273.259 2	217, 229, 149, 163	西柏烯异构体	醋乳香
99	27.17	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	455.352 5	455.356 1	380, 351, 295, 269	3 α -乙羟基甘遂-8,24-二烯-21-酸	醋乳香
100	27.30	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	257.248 1	257.248 3	239, 184, 161, 109	棕榈酸	当归
101	27.30	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	425.378 3	425.378 3	407, 370, 324, 239	α -amyrenone	醋乳香
102	27.41	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	453.336 9	453.339 5	373, 353, 339, 325	β -elemenic acid	醋乳香
103	27.53	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	281.248 1	281.250 2	255, 164, 130	十八烯酸	当归
104	27.53	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	455.352 5	455.355 0	394, 381, 339, 281	3 α -乙羟基甘遂-7,24-二烯-21-酸	醋乳香
105	27.77	$\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	349.274 3	349.274 5	330, 312, 289, 271	incensole acetate	醋乳香
106	27.95	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	455.352 5	455.355 1	373, 353, 339, 325	α -elemenic acid	醋乳香
107	28.11	$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	497.363 1	497.365 7	455, 339, 265, 243	乙酰基- β -乳香酸异构体	醋乳香
108	28.26	$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	497.363 1	497.366 1	455, 383, 327, 279	乙酰基- β -乳香酸异构体	醋乳香
109	28.70	$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	497.363 1	497.365 6	453, 395, 339, 265	乙酰基- β -乳香酸异构体	醋乳香
110	28.84	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	455.352 5	455.355 3	409, 369, 339	α -乳香酸	醋乳香
111	29.05	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	455.352 5	455.355 3	409, 369, 339	β -乳香酸	醋乳香
112	29.29	$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	497.363 1	497.365 8	455, 437, 355	乙酰基- β -乳香酸	醋乳香
113	29.62	$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	497.363 1	497.365 4	437, 391, 243	乙酰基- α -乳香酸	醋乳香

所取代形成,是芳烃的含羟基衍生物,在质谱中易丢失羟基- COOH 、 CO_2 和 CO 等小分子而产生碎片离子峰^[11]。以阿魏酸为例,在负离子模式下,显示其准分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 193.050 8,其特征碎片离子 m/z 178,是准分子离子脱去 1 分子 CH_3 产生, m/z 149 是准分子离子脱去 CO_2 形成, m/z 134 是准分子离子在脱去 CH_3 基础上,继续脱去 CO_2 形成,通过与对照品比较,鉴定为阿魏酸。裂解途径见图 2。

2.7.2 皂苷类化合物 皂苷类化合物主要存在于三七中,结构中含有葡萄糖、鼠李糖、及阿拉伯糖等

多个糖基取代,在质谱中容易逐级丢失产生一系列碎片离子。以人参皂苷 Rb_1 为例,在负离子模式下,显示其准分子离子 m/z 1 107.595 1 $[\text{M}-\text{H}]^-$,其特征碎片离子为 m/z 945、 m/z 783、 m/z 459,是准分子离子峰失去 4 分子葡萄糖而产生,通过与对照品及相关文献^[12-13]比对,鉴定为人参皂苷 Rb_1 。裂解途径见图 3。

2.7.3 苯酞类化合物 主要来源于药材当归,苯酞类化合物容易侧链断裂脱烯(C_nH_{2n}),产生 $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6+\text{H}]^+$ 、 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_8+\text{H}]^+$ 等碎片离子。以 Z -藁本内酯为例,在正离子模式下,显

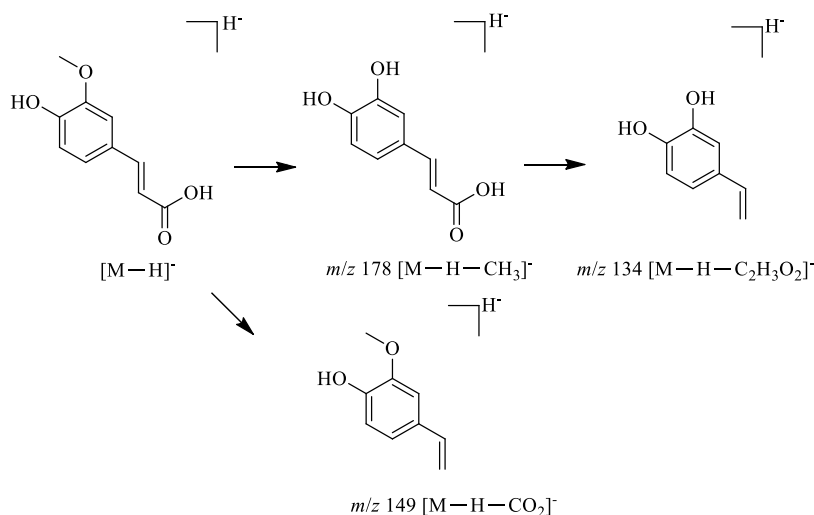


图 2 阿魏酸裂解途径

Fig. 2 Fragmentation pathway of ferulic acid

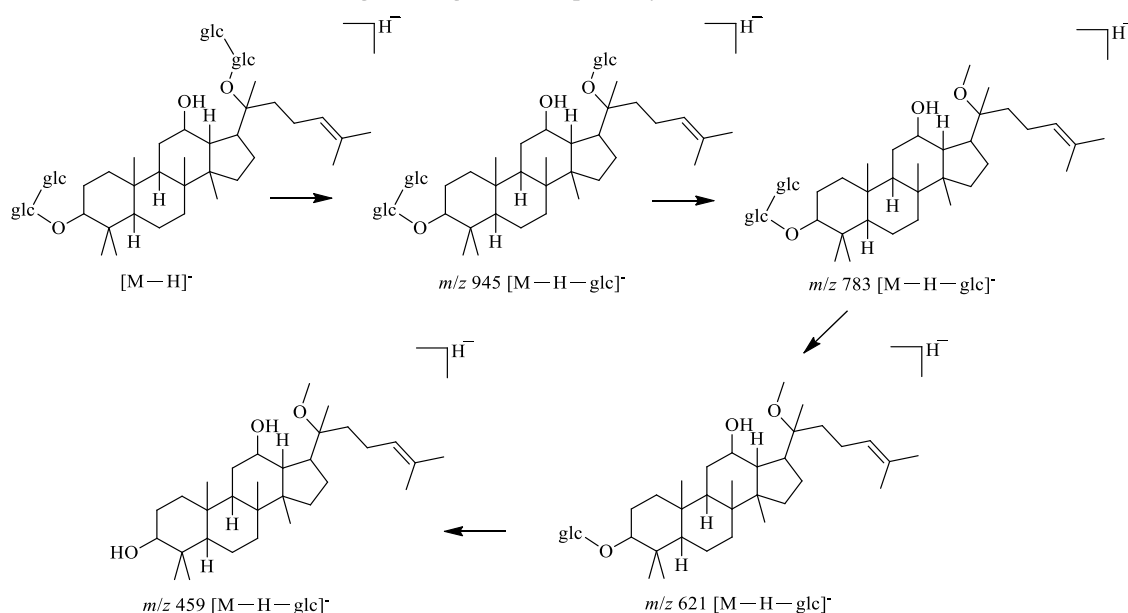


图 3 人参皂苷 Rb_1 裂解途径

Fig. 3 Fragmentation pathway of ginsenoside Rb_1

示其准分子离子峰 $[M+H]^+$, m/z 191.107 2, 其特征碎片离子有 m/z 173、145、117。 m/z 173 是准分子离子峰发生中性丢失 1 分子 H_2O , m/z 145 是 m/z 173 失去 CO 而产生, 继而发生中性丢失 C_2H_4 形成 m/z 117。通过文献比对^[14], 鉴定为 *Z*-藁本内酯。裂解途径见图 4。

2.7.4 萜类化合物 萜类化合物主要来源于药材醋乳香, 有五环三萜、四环三萜、大环二萜等。在正离子模式下, 四环三萜类化合物的裂解方式主要表现为 C-3、C-16 位取代基发生变化, 例如丢失 1 分子 H_2O 或丢失 1 分子 CH_3COOH ; 五环三萜类化合物主要表现为在 E 环的 C-28 位以麦氏重排的方式

缓慢的进行裂解。在负离子模式下, 四环三萜 C-16 位易丢失 1 分子 H_2O , C-20 位丢失 1 分子 CO_2 , C-10 位丢失 1 分子 CH_3CH_2COOH ; 五环三萜类化合物容易失去 1 个氢质子, 形成独特的前提离子。以 11α -羰基- β -乳香酸为例, 在正离子模式下, 显示其准分子离子峰 m/z 471.347 4 $[M+H]^+$, 其特征碎片离子 m/z 453、435、407、389。 m/z 453 是准分子离子失去 1 分子 H_2O 而产生, 再失去 1 分子 C_7H_{12} 产生 m/z 357。 m/z 435 是准分子离子失去 1 分子 H_4O_2 而产生, 再失去 1 分子 CO 产生 m/z 407, 再失去 1 分子 H_2O 产生 m/z 389。根据裂解规律及与文献比对^[15-16], 鉴定为 11α -羰基- β -乳香酸。裂解途径见图 5。

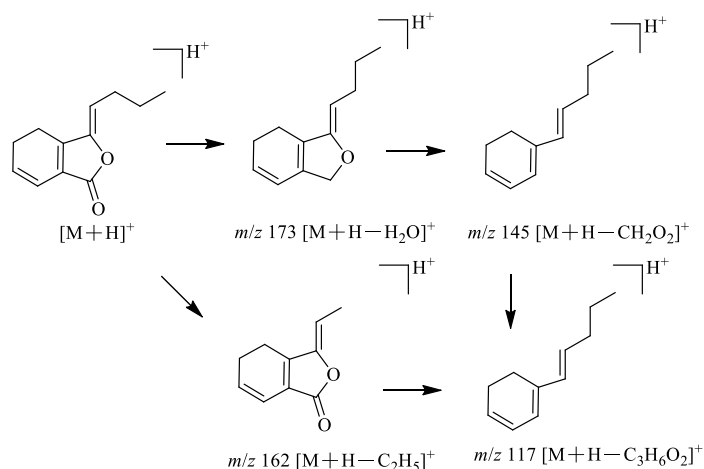


图 4 *Z*-藁本内酯裂解途径

Fig. 4 Fragmentation pathway of *Z*-ligustilide

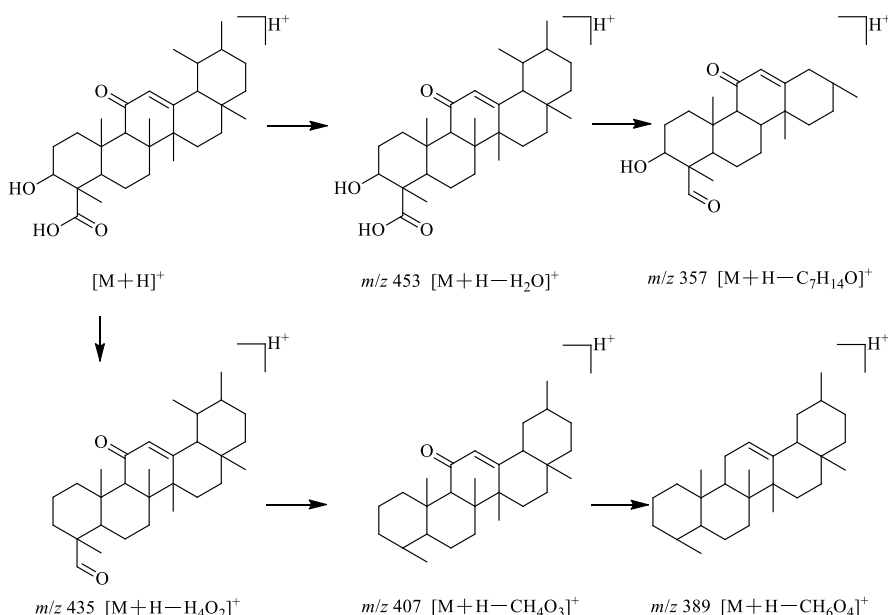


图 5 11α -羰基- β -乳香酸裂解途径

Fig. 5 Fragmentation pathway of 11α -keto- β -boswellic acid

3 讨论

为了更加全面地研究活血止痛胶囊中主要化学成分, 对分析条件进行了优化, 分别对提取溶剂、提取方式、提取时间及流动相进行了考察, 结果表明 70% 甲醇超声 30 min 为最佳提取条件, 流动相采用甲酸水 (水相) - 甲酸乙腈 (有机相), 可以使化合物的峰形得到改善。活血止痛胶囊中的化学成分种类较多, 为了全面对其化合物进行鉴定, 实验采用正、负离子 2 种模式进行分析。

当归是活血止痛胶囊中的君药, 有效成分挥发油可扩张血管, 缓解血管痉挛, 抑制心肌细胞肥大, 抗心律失常, 其中藁本内酯可干扰细胞内钙离子代谢^[17]; 活血止痛胶囊中的有效成分三七总皂苷抑制血小板聚集、止血、增强免疫系统, 抑制肿瘤等生物活性^[18-20]; 土鳖虫辅助当归增强其活血散瘀; 醋乳香活血定痛、消肿生肌; 自然铜具有接骨止痛, 二者协同促进骨折愈合和组织修复作用^[21]; 冰片可以促进有效成分传递到身体各个部位发挥作用。

本实验采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对活血止痛胶囊的体外主要化学物质基础进行研究, 共鉴定出 113 种化学成分, 主要为皂苷类、萜类、苯酚类和有机酸类等成分。并对化合物来源进行归属, 40 个皂苷类成分主要来源于药材三七; 33 个萜类成分主要来源于药材醋乳香, 主要为五环三萜、四环三萜和大环二萜; 22 个苯酚类成分主要来源于药材当归, 内酯类化合物占大部分; 13 个有机酸类成分主要来源于药材当归, 主要为脂肪酸和酚酸。本实验全面对活血止痛胶囊的主要化学成分进行辨识, 阐明活血止痛胶囊的主要化学物质组, 为进一步明确其药效物质基础和质量控制提供了参考。实验中也存在不足之处, 活血止痛胶囊中挥发性成分并不能完全用此方法可以辨识得出, 所以后期将会采用 GC-MS 的方法对当归中的挥发油、醋乳香和冰片进行分析; 自然铜属于矿物药、土鳖虫属于动物药此方法无法辨识其化学成分。对于未鉴定出的化合物, 还有待深入研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 林 辉, 邱晓静. HPLC 法测定活血止痛胶囊中阿魏酸的含量 [J]. 海峡药学, 2010, 22(8): 124-125.
- [3] 黄 东, 杨毅生, 李 杰. HPLC 法同时测定活血止痛胶囊中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 的含量 [J]. 江西中医药, 2013, 44(9): 50-51.
- [4] 韩 杰, 孔祥文, 李东辉. HPLC 法测定活血止痛胶囊

- 中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 、人参皂苷 R_{b_1} 及阿魏酸 [J]. 中成药, 2011, 33(7): 1186-1189.
- [5] 张彦东, 陈新国, 黄俊忠. RP-HPLC 法同时测定活血止痛散中三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_{g_1} 和人参皂苷 R_{b_1} 的含量 [J]. 今日药学, 2015, 25(9): 631-633.
- [6] 李媛媛, 许汉林, 程 刚, 等. 高效液相色谱法测定活血止痛软胶囊中阿魏酸的含量 [J]. 湖北中医药大学学报, 2016, 18(4): 31-35.
- [7] 王云灵, 濮存海, 马毅敏, 等. 活血止痛胶囊中土鳖虫的分子鉴定研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(20): 1562-1565.
- [8] 张同波. 活血止痛胶囊三七成分的含量测定 [J]. 中国医疗前沿, 2008, (20): 105-106.
- [9] 聂黎行, 孙 磊, 戴 忠, 等. 活血止痛胶囊中乳香来源鉴别方法研究 [J]. 中国医药导报, 2019, 16(9): 114-116.
- [10] 魏 娟, 姚广哲, 欧阳慧子, 等. UPLC-Q-TOF-MS/MS 法快速定性分析通脉养心丸中的化学成分 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(4): 393-399.
- [11] 唐 清, 郑玉莹, 关敏怡, 等. 基于 UFLC-Triple TOF MS/MS 技术的补肺活血胶囊化学物质基础研究 [J]. 中南药学, 2018, 16(12): 1677-1683.
- [12] Yang W Z, Qiao X, Li K, et al. Identification and differentiation of *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium*, and *Panax notoginseng* by monitoring multiple diagnostic chemical markers [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(6): 568-575.
- [13] Guo X J, Zhang X L, Guo Z M, et al. Hydrophilic interaction chromatography for selective separation of isomeric saponins [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1325(1): 121-128.
- [14] 游飞祥, 袁雪海, 许 浚, 等. 基于 HPLC-Q-TOF/MS 的六经头痛片化学成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4157-4166.
- [15] 宏 侠. 茯苓不同药用部位化学成分分析及赤茯苓质量标准研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2016.
- [16] 孙 燕. 沙棘中功效成分液相色谱-高分辨质谱精准检测鉴定技术研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
- [17] 王 华, 孙 娜. 当归的有效化学成分及药理作用研究进展分析 [J]. 山东化工, 2017, 46(18): 59-60.
- [18] Chen B, Jia X B. Apoptosis-inducing effect of ginsenoside R_{g_6} on human lymphocytoma JK cells [J]. *Molecules*, 2013, 18(7): 8109-8119.
- [19] Sun S, Wang C Z, Tong R, et al. Effects of steaming the root of *Panax notoginseng* on chemical composition and anticancer activities [J]. *Food Chem*, 2009, 118(2): 307-314.
- [20] Sun S, Qi L W, Du G J, et al. Red notoginseng: Higher ginsenoside content and stronger anticancer potential than Asian and American ginseng [J]. *Food Chem*, 2011, 125(4): 1299-1305.
- [21] 周 惠. 活血止痛软胶囊质量标准的研究以及与活血止痛散的比较 [D]. 广州: 华南理工大学, 2013.