

基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的七味通痹口服液化学成分分析

唐 明^{1,2}, 高 霞^{1,2}, 耿 婷^{1,2*}, 王佳佳^{1,2}, 陈夏霖^{1,2}, 曹 亮^{1,2}, 王振中^{1,2}, 肖 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘 要: 目的 采用高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱联用技术 (HPLC-Q-TOF-MS/MS) 对七味通痹口服液中的化学成分进行定性表征。方法 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 25 °C; 采用电喷雾离子源, 正、负离子全扫描模式下采集数据, 根据精确质荷比、二级碎片离子信息, 结合对照品和文献数据鉴定七味通痹口服液中的化学成分。结果 共指出七味通痹口服液制剂中 72 个化学成分, 包括生物碱类、黄酮类、氨基酸类、酚酸类及苯丙素类等, 其中 18 个化合物经对照品比对。结论 该研究为七味通痹口服液的药效物质基础及质量控制的深入研究奠定了基础。

关键词: 七味通痹口服液; HPLC-Q-TOF-MS/MS; 化学成分谱; 生物碱类; 黄酮类; 酚酸类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)08-2226-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.005

Identification of chemical constituents in Qiwei Tongbi Oral Liquid by HPLC-Q-TOF-MS/MS

TANG Ming^{1,2}, GAO Xia^{1,2}, GENG Ting^{1,2}, WANG Jia-jia^{1,2}, CHEN Xia-lin^{1,2}, CAO Liang^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To study the chemical constituents of Qiwei Tongbi Oral Liquid (七味通痹口服液) by using high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS). **Methods** The analysis was performed on Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of methanol and 0.1% formic acid aqueous solution was used as gradient elution. The flow rate was 1.0 mL/min and column temperature was 25 °C. The mass spectrometry was acquired in both negative and positive ion modes by using electron spray ionization (ESI). These components were further analyzed based on high-resolution mass-to-charge ratios, fragment ion species and other information combined with reference substance and literature data. **Results** A total of 72 compounds were identified and predicted, including alkaloids, flavonoids, amino acid, phenolic acids and phenylpropanoids, of which 18 compounds were verified by reference substances. **Conclusion** This study lay the foundation for elucidating its active components, and provide reference for the quality control of Qiwei Tongbi Oral Liquid.

Key words: Qiwei Tongbi Oral Liquid; HPLC-Q-TOF-MS/MS; chemical composition spectrum; alkaloids; flavonoids; phenolic acids

七味通痹口服液是由蚂蚁、青风藤、鸡血藤、鹿衔草、石楠藤、千年健、威灵仙 7 味药材组成, 具有补肾壮骨、祛风蠲痹之功效, 主治类风湿性关

节炎证属肝肾不足、风湿阻络证^[1]。目前, 关于七味通痹口服液的研究侧重于临床疗效和药效机制等方面, 对其全面的化学成分解析尚未见报道。中

收稿日期: 2020-11-07

基金项目: 江苏省自然科学基金-青年基金资助项目 (BK20180268); 江苏省工信厅 2020 年度工业和信息产业转型升级专项资金项目 (多组分中药研究关键技术)

作者简介: 唐 明, 硕士研究生。Tel: 18851101081 E-mail: tangming199408@163.com

*通信作者: 肖 伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152367 E-mail: kanionlunwen@163.com

耿 婷, 博士, 从事中药化学成分和药代动力学研究。Tel: 18001598290 E-mail: yilinger110@126.com

药的化学成分复杂多样, 发挥药理作用的活性成分种类众多, 具有多途径、多靶点协同作用的药效特征, 这导致中药复杂的化学成分研究成为中药物质基础研究和现代化发展中的重点和难点^[2]。中药药效物质基础是指中药针对某一病症发挥药效作用的物质基础总和, 它是研究中药药效和作用机制的关键, 也是中药质量控制的基础^[3-4]。目前, 中药物质基础研究方法主要包括: 基于体内药理活性追踪并寻求中药的有效部位(群)或最佳配伍; 基于体外筛选与体外模型结合谱图分析等技术, 明确中药的活性成分(群); 利用网络药理学筛选活性成分, 寻求成分-靶点-基因的网络结构, 预测中药药效物质基础和作用机制等^[5]。这些研究所应用的技术主要包括化学成分分离、配伍和拆方分析、血清药物化学、以活性为导向的药效物质分离与筛选等; 近些年来, 代谢组学、谱效关系研究、多靶点高通量筛选、现代分子生物技术、网络药理学、结合基因表达谱芯片技术以及结合分子对接技术等也逐渐被广泛应用^[3,6-7]。无论使用何种技术, 明确中药的化学成分从而完善其物质基础研究对控制中药质量和阐明药效物质基础具有重要意义^[8]。HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析技术是现在中药成分研究领域中应用广泛的定性测定方法, 可以尽可能的检测出中药所含的化学成分, 具有高速、高灵敏度以及高选择性等特点^[9]。本实验运用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对七味通痹口服液的化学成分进行鉴定分析, 为七味通痹口服液的质量控制以及药效物质基础的深入研究提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1290 超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Agilent 6538 QTOF 质谱仪(美国安捷伦公司); Centrifuge 5424R 高速离心机(Eppendorf 公司); KH2200B 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); Pacific TII7 超纯水仪(美国赛默飞公司); Mettler Toledo ME303E 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); Mettler Toledo XS205DU 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

对照品木兰花碱(批号 R27J7F18588, 质量分数 $\geq 98\%$)、刺芒柄花苷(批号 RO4J6F2, 质量分数 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司; 异槲皮苷(批号 YH-140404)购自上海永恒生物科技有限公司; 清风藤碱(批号 Q-O82-161019, 质量分数 $\geq 98\%$)购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 青藤碱

(批号 110774-200507)、L-谷氨酸(批号 111576-200201)、苯丙氨酸(批号 140676-200405)购自中国食品药品检定研究院, 芒柄花素(批号 111703-201504)、槲皮苷(批号 111538-201606, 质量分数 90.6%)、没食子酸(批号 110831-201204, 质量分数 89.9%)、原儿茶酸(批号 110809-201205, 质量分数 99.9%)、染料木苷(批号 111709-201702, 质量分数 99.9%)、染料木素(批号 111704-201302, 质量分数 99.1%)、腺嘌呤(批号 110886-201102, 质量分数 99.4%)、水晶兰苷(批号 111870-201303, 质量分数 95.3%)、缬氨酸(批号 140681-201202, 质量分数 99.6%)、D-焦谷氨酸(批号 100785-201402, 质量分数 99.7%)、5-羟甲基糠醛(批号 11626-201610, 质量分数 100%)均购自中国食品药品检定研究院; 七味通痹口服液(江苏康缘阳光药业有限公司, 批号 20180505); 甲醇、甲酸均为色谱级, 水为超纯水。

2 方法

2.1 检测条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B), 洗脱梯度: 0~10 min, 1%~3% A; 10~35 min, 3%~20% A; 35~50 min, 20%~30% A; 50~70 min, 30%~55% A; 70~75 min, 55%~100% A; 75~85 min, 100% A。柱温 25 $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 5 μ L。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式检测, 离子扫描范围设置为 m/z 50~1500; 雾化气压力 40 psi (1 psi $\approx$ 6.895 kPa); 锥孔电压 65 V; 裂解电压 135 V; 毛细管电压, 正离子模式 4000 V、负离子模式 3500 V; 干燥气体积流量 10.0 L/min; 干燥气温度 350 $^{\circ}$ C; 碰撞能量分别设定为 10、20、30、40 V。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 分别取木兰花碱、异槲皮苷、5-羟甲基糠醛、清风藤碱、青藤碱、L-谷氨酸、苯丙氨酸、芒柄花素、槲皮苷、没食子酸、原儿茶酸、芒柄花苷、染料木苷、染料木素、腺嘌呤、水晶兰苷、缬氨酸和 D-焦谷氨酸对照品适量, 精密称定, 加 50%甲醇制成含各成分 10~30 mg/L 的混合对照品溶液, 14 000 r/min 离心 10 min, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 用移液管吸取 1 mL 七味通痹口服液于 10 mL 的量瓶中, 用超纯水定容至刻度, 摇匀, 14 000 r/min 离心 10 min, 即得。

3 结果与分析

3.1 化合物数据库的建立

查阅七味通痹口服液中 7 味组方药材(蚂蚁、青风藤、鸡血藤、鹿衔草、石楠藤、千年健、威灵仙)的相关文献,整理并建立化合物信息数据库,包括化合物名称、分子式、精确相对分子质量及所属化学类型等信息。自建数据库中收集了 48 个蚂蚁中化合物、69 个青风藤中化合物、119 个鸡血藤中化合物、24 个鹿衔草中化合物、36 个石楠藤中化合物、84 个千年健中化合物、49 个威灵仙中化合物。

3.2 成分鉴定

采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术,按 2.1 项下条件检测供试品溶液和混合对照品溶液,对七味通痹口服液中化学成分进行定性分析,得到的正、负离子模式的总离子流图(TIC),见图 1。

利用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.04.00 软件生成的化合物分子式,选择误差在 5×10^{-6} 以内的分子式与建立的数据库进行匹配,推测出可能的化合物。采用 Target 模式对初步筛选的化学成分进行 MS/MS 检测,精确输入相应目标化合物的相对分子质量和保留时间,使用 10、20、30 和 40 V 不同碰撞能量进行样品检测,根据实验结果选择合适的碰撞能量值下的 MS/MS 信息进行结构推断。共推测和鉴定出 72 个化合物,其中 18 个化

合物经对照品比对验证,结果见表 1。

1、2、3、6、10、13、14、17 号峰为氨基酸类化合物;8、34、40、44、45、50、55、59 号峰为苯丙素类化合物;16、18、19、20、24、47 号峰为酚酸类化合物;48、52、54、57、60、62~69 号峰为黄酮类化合物;25~33、35~39、41、43、49、51、53、58、71 号峰为生物碱类化合物;42、56、61、70 号峰为萜类化合物;11 号峰为核苷类化合物;22 号峰为烷酸酯类化合物;72 号峰为脂肪酸类化合物;4、5、7、9、12、15、21、23、46 号峰为其他类化合物。

3.3 七味通痹口服液化学成分质谱裂解规律分析

3.3.1 氨基酸类化合物分析 氨基酸是一类含有酸性羧基和碱性氨基的有机化合物,各类植物和动物体内含量丰富。经文献分析发现,蚂蚁体内的蛋白质含量高达干质量的 40%~67%^[10,12],游离氨基酸含量为 1.88%,水解氨基酸含量为 3.49%^[12],而在七味通痹口服液中其余 6 味药材的化学成分研究中,尚未见氨基酸类成分的报道。因此,推测七味通痹口服液中该类化合物主要归属于蚂蚁药味。在正离子模式的一级质谱图中,氨基酸类给出的准分子离子峰是 $[M+H]^+$ 。MS/MS 中氨基酸类的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 相对丰度较低,实验结果发现正离子模式下大多数氨基酸失去 NH_3 、 $HCOOH$,与文献报道^[50-51]相符合。结合建立的数据库和对照品

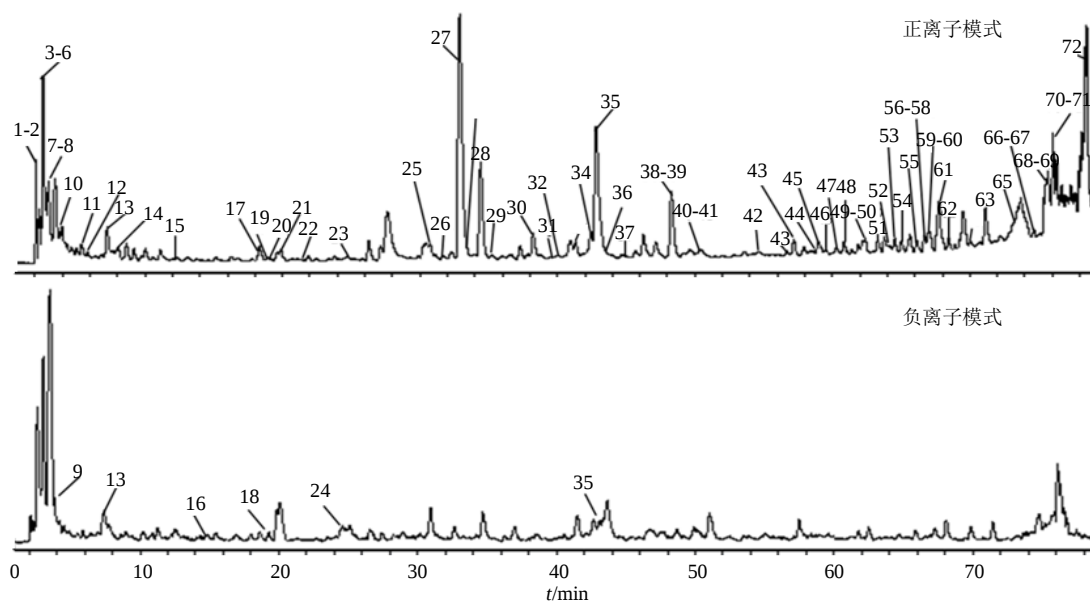


图 1 七味通痹口服液供试品 TIC 图

Fig. 1 Total ion chromatograms of Qiwei Tongbi Oral Liquid

表1 HPLC-Q-TOF MS/MS 鉴定七味通痹口服液中的化学成分

Table 1 Identification of chemical constituents from Qiwei Tongbi Oral Liquid by HPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	分子离子峰	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS (m/z)	化合物名称	来源
1	2.182	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	146.105 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	147.112 8	0.03	84.081 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}-\text{NH}_3]^+$	赖氨酸 ^[10-13]	蚂蚁
2	2.328	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	174.117 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	175.119 3	-1.99	158.094 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$, 116.071 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{N}_3]^+$, 70.065 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{N}_3-\text{HCOOH}]^+$	精氨酸 ^[10-13]	蚂蚁
3	2.378	$\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$	133.037 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	134.044 7	0.63	117.074 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$	天冬氨酸 ^[10,12-13]	蚂蚁
4	2.395	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$	162.052 8	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	180.086 2	2.49	162.075 9 $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{H}_2\text{O}]^+$	R-苹果酸二甲酯 ^[14]	千年健
5	2.528	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$	182.078 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	183.086 6	-1.56	165.052 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 147.044 5 $[\text{M}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, 129.035 4 $[\text{M}+\text{H}-3\text{H}_2\text{O}]^+$	D-半乳糖醇 ^[15]	千年健
6	2.566	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$	147.053 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$	148.060 7	-1.79	102.054 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}]^+$, 56.049 6 $[\text{M}+\text{H}-2\text{HCOOH}]^+$	谷氨酸*	蚂蚁
7	2.590	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	180.063 4	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	198.096 6	3.10	180.082 3 $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{H}_2\text{O}]^+$, 163.059 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	葡萄糖 ^[15]	千年健
8	2.828	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_7$	390.167 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	391.174 3	2.13	361.550 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^+$	7S,8R-3,3',5'-trimethoxy-4',7'-epoxy-8,5'-neolignan-4,9,9'-triol ^[16]	鸡血藤
9	3.663	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	134.021 5	$[\text{M}-\text{H}]^-$	133.014 0	1.86	89.149 9 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$	R-苹果酸 ^[14]	千年健
10	3.985	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	117.079 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	118.086 7	-3.77	72.080 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}]^+$, 55.054 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}-\text{NH}_3]^+$	缬氨酸*	蚂蚁
11	5.280	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$	135.054 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	136.062 0	-1.68	119.035 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$	腺嘌呤*	蚂蚁
12	5.837	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	123.032 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	124.039 4	-0.77	80.049 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$, 78.034 3 $[\text{M}-\text{COOH}]^+$	烟酸 ^[16-17]	鸡血藤
13	7.242	$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3$	129.042 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	130.050 0	-1.00	84.044 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}]^+$	焦谷氨酸*	蚂蚁
14	8.011	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	131.094 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	132.102 3	-2.99	115.042 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$, 86.099 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}]^+$, 69.033 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}-\text{NH}_3]^+$	亮氨酸 ^[10-13]	蚂蚁
15	12.294	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	390.116 2	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	413.105 8	-0.89	251.060 5 $[\text{M}+\text{Na}-\text{Glc}]^+$	水晶兰苷*	鹿衔草
16	14.612	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	170.021 5	$[\text{M}-\text{H}]^-$	169.014 4	1.17	125.022 6 $[\text{M}-\text{H}-\text{COO}]^-$	没食子酸*	鹿衔草
17	18.490	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	165.079 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	166.086 2	0.33	120.080 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}]^+$, 103.052 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}-\text{NH}_3]^+$, 77.039 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}-\text{NH}_3-\text{C}_2\text{H}_2]^+$	苯丙氨酸*	蚂蚁
18	19.650	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	138.031 7	$[\text{M}-\text{H}]^-$	137.024 4	0.13	93.044 6 $[\text{M}-\text{H}-\text{COO}]^-$	水杨酸 ^[18]	鹿衔草/ 鸡血藤
19	19.658	$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_7$	286.105 3	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	309.094 6	-0.41	147.045 2 $[\text{M}+\text{Na}-\text{Glc}]^+$	异高熊果苷 ^[19]	鹿衔草
20	19.736	$\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2$	124.052 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	125.059 7	0.05	107.048 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	鹿蹄草素 ^[20-21]	鹿衔草
21	20.134	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	126.031 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	127.039 0	-0.23	109.027 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 81.033 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$	5-羟甲基糖醛*	蚂蚁
22	21.900	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$	176.082 7	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	194.117 2	1.83	177.090 0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 165.091 3 $[\text{M}+\text{Na}-\text{CH}_2\text{CH}_2]^+$	2-(3-苯基)丙烯酸乙酯 ^[22]	青风藤
23	24.233	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$	470.142 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	471.149 7	0.01	294.207 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3]^+$	5-O-feruloyl-3-O-(β -D-glucopyranosyl)-2-deoxy-D-ribofuranose ^[23,24]	威灵仙
24	24.393	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	154.026 6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	153.019 7	0.86	109.027 2 $[\text{M}-\text{H}-\text{COO}]^-$	原儿茶酸*	鹿衔草/ 鸡血藤
25	30.766	$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_4$	331.178 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	332.185 7	0.22	300.155 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$	4-hydroxy-3,6-dimethoxy-17-methyl-morphinan-7-one ^[25]	青风藤

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	分子离子峰	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS (m/z)	化合物名称	来源
26	31.661	$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_6\text{Cl}$	383.113 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	384.120 5	0.89	348.146 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCl}]^+$, 341.081 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2]^+$, 305.100 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-\text{HCl}]^+$, 299.090 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-\text{HCl}-\text{CH}_4]^+$	尖防己定碱 ^[26-27]	青风藤
27	32.743	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$	329.162 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	330.170 5	-1.56	241.088 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{NC}_3\text{H}_7-\text{CH}_4\text{O}]^+$, 213.093 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{NC}_3\text{H}_7-\text{CH}_4\text{O}-\text{CO}]^+$, 209.061 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{NC}_3\text{H}_7-\text{CH}_4\text{O}-\text{CH}_4\text{O}]^+$	青藤碱*	青风藤
28	33.383	$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{Cl}$	397.129 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$	398.136 6	-0.27	362.158 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCl}]^+$, 341.079 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{NC}_3\text{H}_7]^+$, 305.100 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{NC}_3\text{H}_7-\text{HCl}]^+$	尖防己碱 ^[26-28]	青风藤
29	35.977	$\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_8$	656.309 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	657.317 6	-0.85	642.173 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 330.169 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4]^+$	双青藤碱 ^[28]	青风藤
30	38.214	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_4$	313.131 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	314.139 8	-3.55	300.119 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2]^+$	穆坪马兜铃酰胺 ^[29-30]	青风藤
31	39.678	$\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}_3$	327.183 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	328.190 8	-0.24	255.103 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{NC}_4\text{H}_{11}]^+$	假毕拔酰胺 A ^[31]	石楠藤
32	40.095	$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{NO}_6\text{Cl}$	397.129 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$	398.135 2	3.24	362.150 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{HCl}]^+$, 341.078 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{NC}_3\text{H}_7]^+$, 305.097 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{NC}_3\text{H}_7-\text{HCl}]^+$	dauricumine ^[27]	青风藤
33	41.322	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_3$	297.136 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	298.143 6	0.57	281.048 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$, 265.015 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3-\text{CH}_4]^+$	土藤碱 ^[26,29]	青风藤
34	42.298	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_9$	372.142 0	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	395.132 5	-3.15	364.117 1 $[\text{M}+\text{Na}-\text{CH}_2\text{OH}]^+$, 233.077 4 $[\text{M}+\text{Na}-\text{Glc}]^+$	紫丁香苷 ^[22,32]	青风藤
35	42.820	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4^+$	342.170 5	$[\text{M}]^+$	342.170 5	-1.51	297.113 1 $[\text{M}-\text{NHC}_2\text{H}_5]^+$, 265.086 2 $[\text{M}-\text{NHC}_2\text{H}_5-\text{CH}_4\text{O}]^+$	木兰花碱*	青风藤
36	43.833	$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_3$	219.089 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	220.096 2	2.82	178.126 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2-\text{C}_2\text{H}_4]^+$, 162.072 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4-\text{CH}_2\text{O}]^+$	7-乙氧基-3-吡啶甲酸甲酯 ^[33-34]	威灵仙
37	45.067	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$	329.162 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	330.170 3	-0.96	299.110 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_2\text{CH}_3]^+$, 267.108 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}-\text{NH}_2\text{CH}_3-\text{CH}_4\text{O}]^+$	异青藤碱 ^[28,30]	青风藤
38	48.211	$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_4$	327.147 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	328.153 4	2.85	297.106 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_2\text{CH}_3]^+$, 265.086 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}-\text{NH}_2\text{CH}_3-\text{CH}_4\text{O}]^+$	清风藤碱*	青风藤
39	48.264	$\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{NO}_4$	355.178 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	356.186 0	-1.03	340.175 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_4]^+$, 264.079 7 $[\text{M}+\text{H}-2\text{C}_2\text{H}_6\text{O}]^+$	四氢巴马汀 ^[27]	青风藤
40	50.056	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$	324.136 0	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	342.169 7	0.33	327.145 1 $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{CH}_3]^+$, 312.123 7 $[\text{M}+\text{NH}_4-\text{CH}_2\text{O}]^+$	eupomatenoid-7 ^[31]	石楠藤
41	50.180	$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}$	325.131 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	326.138 4	0.87	296.101 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^+$	碎叶紫堇碱 ^[35]	青风藤
42	54.865	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}$	202.172 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	203.179 4	0.13	161.127 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_6]^+$, 146.104 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{CH}_3]^+$	去氢白芷(蒲)烯 ^[36]	千年健
43	56.417	$\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_4$	321.099 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	322.107 2	0.57	290.075 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_4\text{O}]^+$	蝙蝠葛波酚碱 ^[27]	青风藤
44	57.249	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_8$	418.162 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	419.170 5	-1.09	404.211 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$	丁香脂素 ^[37]	鸡血藤
45	58.790	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$	522.210 1	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	545.199 8	-0.86	365.165 5 $[\text{M}+\text{Na}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6]^+$	7S,8R-dihydrodehydrodiconiferyl alcohol 4-O- β -D-glucopyranoside ^[46]	鸡血藤
46	59.130	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	122.036 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	123.044 1	-0.36	105.034 2 $[\text{M}-\text{OH}]^+$, 77.039 1 $[\text{M}-\text{COOH}]^+$	苯甲酸 ^[38]	石楠藤
47	59.507	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	194.057 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	195.064 9	1.46	177.054 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	异阿魏酸 ^[34,39]	威灵仙
48	60.112	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	432.105 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	433.113 2	-0.64	271.060 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$, 243.063 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{CO}]^+$, 215.079 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-2\text{CO}]^+$	染料木苷*	鸡血藤

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	分子离子峰	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	MS/MS (m/z)	化合物名称	来源
49	61.071	$\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_4$	337.131 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	338.139 6	-2.71	323.115 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 307.142 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{CH}_4]^+$	青风藤定碱 ^[26,40]	青风藤
50	62.226	$\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{O}_{13}$	580.215 6	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	598.249 3	-2.63	419.174 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$	β -D-丁香脂素葡萄糖苷 ^[32,41]	青风藤
51	62.920	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4^+$	336.123 0	$[\text{M}]^+$	336.122 9	0.40	320.052 2 $[\text{M}-\text{CH}_2-2\text{H}]^+$	表小碱 ^[35,42]	青风藤
52	63.777	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	464.095 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	465.103 0	-0.53	303.050 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$	异槲皮苷*	鹿衔草
53	64.017	$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$	329.162 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	330.169 9	0.26	299.132 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_2\text{CH}_3]^+$, 267.097 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_2\text{CH}_3-\text{CH}_4\text{O}]^+$, 239.069 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{NH}_2\text{CH}_3-\text{CH}_4\text{O}-\text{CO}]^+$	8,14-二氢萨鲁塔里定碱 ^[26,28,40]	青风藤
54	64.258	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	610.153 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	611.161 0	-0.55	449.103 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$	8-C- β -D-葡萄糖基山奈酚-3-O- β -D-葡萄糖苷 ^[38]	石楠藤
55	65.420	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4$	326.151 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	327.159 4	-0.96	297.099 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^+$	利卡灵 ^[31]	石楠藤
56	66.278	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$	152.120 1	$[\text{M}+\text{H}]^+$	153.127 2	1.25	109.100 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{CHO}-\text{CH}_3]^+$	柠檬醛 ^[10,43]	蚂蚁
57	66.625	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	448.100 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	449.107 9	-0.14	303.178 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4]^+$	槲皮苷*	鹿衔草
58	66.756	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_3$	283.120 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	284.128 0	0.42	137.061 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_3]^+$	N-p-香豆酰酪胺 ^[38]	石楠藤
59	66.984	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$	354.146 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	355.154 0	0.07	325.063 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^+$, 295.132 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}-\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}]^+$	异风藤奎醇 A ^[38]	石楠藤
60	67.247	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9$	430.126 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	431.133 3	0.83	269.081 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}]^+$, 254.057 8 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{CH}_3-\text{CO}]^+$, 226.055 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glc}-\text{CH}_3-\text{CO}]^+$	芒柄花苷*	鸡血藤
61	67.606	$\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$	220.182 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	221.190 1	-0.49	203.179 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	柏木烯醇 ^[36]	千年健
62	67.867	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	286.047 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	287.055 0	0.05	259.058 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$	山奈酚/木犀草素 ^[44]	鹿衔草
63	68.084	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_5$	300.099 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	301.107 1	-0.17	273.184 0 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$, 181.070 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_6\text{O}]^+$	杜鹃素 ^[45]	威灵仙
64	70.327	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	254.057 9	$[\text{M}+\text{H}]^+$	255.065 0	0.73	199.073 7 $[\text{M}+\text{H}-2\text{CO}]^+$	大豆苷元 ^[46]	鸡血藤
65	73.449	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	284.068 5	$[\text{M}+\text{H}]^+$	285.075 5	0.88	270.052 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 257.492 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$	毛蕊异黄酮/樱黄素 ^[18,46-47]	鸡血藤
66	73.879	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	270.052 8	$[\text{M}+\text{H}]^+$	271.060 1	0.00	243.064 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$, 215.065 4 $[\text{M}+\text{H}-2\text{CO}]^+$	染料素*	鸡血藤/ 威灵仙
67	74.867	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	300.063 4	$[\text{M}+\text{H}]^+$	301.070 8	-0.45	273.083 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$, 257.129 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}-\text{O}]^+$, 225.149 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}-\text{O}-\text{CH}_4\text{O}]^+$	6-hydroxybiochain A ^[24,48]	威灵仙
68	75.249	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	330.074 0	$[\text{M}+\text{H}]^+$	331.081 9	-2.03	287.063 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}-\text{O}]^+$	苜蓿素 ^[44]	鹿衔草
69	75.321	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	268.073 6	$[\text{M}+\text{H}]^+$	269.080 5	1.25	254.055 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 226.064 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{CO}]^+$	芒柄花素*	鸡血藤/ 威灵仙
70	76.401	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}$	136.125 2	$[\text{M}+\text{H}]^+$	137.132 5	-0.17	95.058 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_6]^+$	β -桂叶烯/3-萜烯 ^[36]	千年健
71	76.575	$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_5$	351.110 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	352.117 8	0.42	336.322 6 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_4]^+$	蝙蝠葛宁碱 ^[26-28]	青风藤
72	78.861	$\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_4$	356.292 7	$[\text{M}+\text{H}]^+$	357.298 5	4.02	267.103 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3]^+$	十八碳烯酸单甘油酯 ^[49]	蚂蚁

*为与对照品比对的化合物

*compound confirmed by standard

比对, 共推断出 8 个氨基酸类成分, 分别为赖氨酸 (峰 1)、精氨酸 (峰 2)、天冬氨酸 (峰 3)、谷氨酸 (峰 6)、缬氨酸 (峰 10)、焦谷氨酸 (峰 13)、亮氨酸 (峰 14) 和苯丙氨酸 (峰 17), 其中峰 6、10、

13 和 17 经与对照品对照确认。

峰 17 经与对照品对照确定为苯丙氨酸。以峰 17 的解析为例了解氨基酸的质谱裂解规律。根据精确相对分子质量的准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$

166.086 2 推断其可能为苯丙氨酸 ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$)；其碎片离子的裂解途径如图 2 所示，碎片离子 m/z 120.080 5 (基峰，最稳定) 为准分子离子峰脱去 HCOOH 所形成； m/z 120.080 5 离子脱去 NH_3 得到 m/z 103.052 7 碎片离子，其进一步脱去 C_2H_2 基团得到 m/z 77.039 5 的碎片离子。峰 2 为无对照品的化合物，其准分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 为 175.119 3，

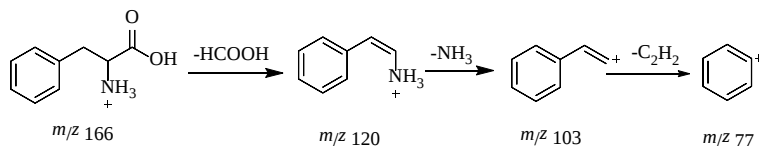


图 2 苯丙氨酸可能的裂解途径

Fig. 2 Proposed fragmentation pathway of phenylalanine

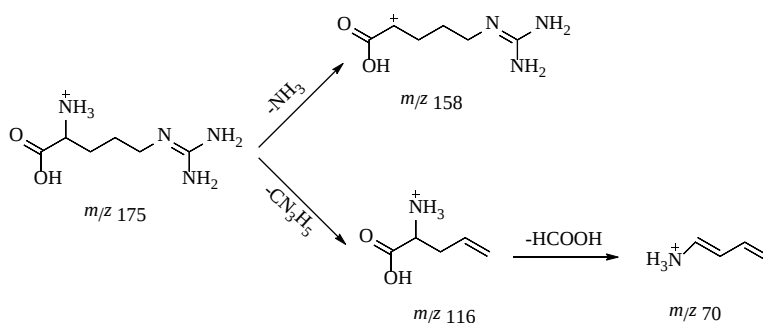


图 3 精氨酸可能的裂解途径

Fig. 3 Proposed fragmentation pathway of L-arginine

3.3.2 酚酸类化合物分析 酚酸是一类简单多酚类物质，结构中有一个芳香环，且环上有一至多个酚羟基取代^[52]。在七味通痹口服液中该类化合物主要归属于鹿衔草、鸡血藤和威灵仙等药味。从碎片离子来看，该类化合物在负离子模式下响应较高且易丢失 COO^- ，在正离子模式下易丢失 H_2O 。结合建立的数据库和对照品比对，共推断出 6 个酚酸类成分，分别为没食子酸 (峰 16)、水杨酸 (峰 18)、异高熊果苷 (峰 19)、鹿蹄草素 (峰 20)、原儿茶酸 (峰 24) 和异阿魏酸 (峰 47)，其中峰 16 和 24 经与对照品对照确认。

峰 24 经与对照品对照确定为原儿茶酸。以峰 24 的解析为例了解酚酸的质谱裂解规律。根据精确分子量的准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 153.019 7 推断其可能为原儿茶酸 ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$)；其碎片离子 m/z 109.027 2 (基峰，最稳定) 为准分子离子峰脱去 COO^- 所形成。峰 18 为无对照品的化合物，其准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 为 137.024 4，给出化合物的分子式为 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$ ，推断其可能为水杨酸。其准分子离子峰脱去 COO^- 得到 m/z 93.044 6 碎片离子，故可指认

给出化合物的分子式为 $\text{C}_6\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$ ，推断其可能为精氨酸。其碎片离子的裂解途径如图 3 所示，精氨酸为直链型氨基酸，结构不稳定，准分子离子峰脱去 NH_3 、 CN_3H_5 分别得到 m/z 158.094 8 和 m/z 116.071 2 碎片离子，其中其 m/z 116.071 2 碎片离子进一步脱去 HCOOH 得到 m/z 70.065 1 的碎片离子，故可指认其为精氨酸。

其为水杨酸。

3.3.3 黄酮类化合物分析 黄酮类化合物是一类存在于自然界的、具有 2-苯基色原酮结构的化合物。在七味通痹口服液中该类化合物主要归属于鸡血藤、鹿衔草和威灵仙等药味。从碎片离子来看，黄酮结构中的 C 环易发生 RDA (Retro-Diels-Alder) 裂解反应，即断裂主要发生在 C1 与 C2 位和 C3 与 C4 位，产生 A 环和 B 环 2 个碎片离子。若化合物中有甲氧基存在时，化合物首先失去甲基，然后化合物的 C 环丢失碎片 CO 等。另外，黄酮苷类化合物在二级质谱中大多是脱去糖基形成苷元离子，而且脱去糖基的黄酮苷元，和相对应的黄酮类化合物的裂解规律一致^[53]。结合建立的数据库和对照品比对，共推断出 13 个黄酮类成分，分别为染料木苷 (峰 48)、异槲皮苷 (峰 52)、8-C- β -D-葡萄糖基山柰酚-3-O- β -D-葡萄糖苷 (峰 54)、槲皮苷 (峰 57)、芒柄花苷 (峰 60)、山柰酚/木犀草素 (峰 62)、杜鹃素 (峰 63)、大豆苷元 (峰 64)、毛蕊异黄酮/樱黄素 (峰 65)、染料木素 (峰 66)、6-hydroxybiochainA (峰 67)、苜蓿素 (峰 68) 和芒柄花素 (峰 69)，其

中峰 48、52、60、66 和 69 经与对照品对照确认。

峰 48 和峰 66 经与对照品对照确定为染料木苷和染料木素。以峰 48 和峰 66 的解析为例了解黄酮苷和黄酮苷元的质谱裂解规律。根据峰 66 的精确相对分子质量的准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 271.060 1 推断其可能为染料木素 ($C_{15}H_{10}O_5$)；其碎片离子的裂解途径如图 4 所示，准分子离子峰脱去 CO 得到 m/z 243.064 3 碎片离子，接着继续脱去 CO 得到 m/z 215.062 5 碎片离子，黄酮结构中的 C

环易发生 RDA 裂解反应得到 m/z 153.126 3 碎片离子。根据峰 48 的精确相对分子质量的准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 433.113 2 推断其可能为染料木苷 ($C_{21}H_{20}O_{10}$)；其碎片离子的裂解途径如图 4 所示，准分子离子峰脱去 $C_6H_{10}O_5$ 得到 m/z 271.060 1 碎片离子，接着分别脱去 2 个 CO 得到 m/z 243.063 5 和 m/z 215.079 4 碎片离子，黄酮结构中的 C 环发生 RDA 裂解反应得到 m/z 153.017 1 碎片离子，裂解规律同峰 48 一致。

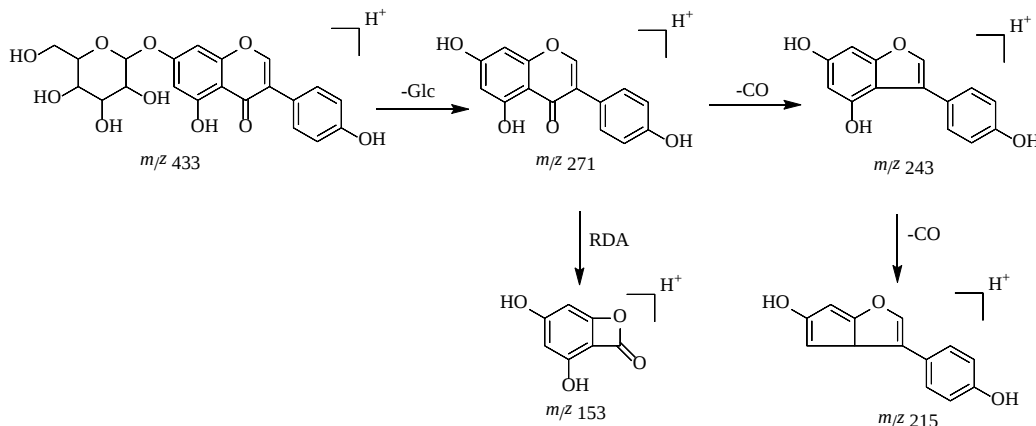


图 4 染料木苷和染料木素可能的裂解途径

Fig. 4 Proposed fragmentation pathway of genistin and genistein

3.3.4 生物碱类化合物分析 生物碱类化合物大多数有复杂的环状结构，有显著的生物活性，是中草药中重要的有效成分之一，在七味通痹口服液中该类化合物主要归属于青风藤、石楠藤和威灵仙等药味。结合建立的数据库和对照品比对，共推断出 21 个生物碱类成分，分别为 4-hydroxy-3,6-dimethoxyl-17 (峰 25)、尖防己定碱 (峰 26)、青藤碱 (峰 27)、尖防己碱 (峰 28)、双青藤碱 (峰 29)、穆坪马兜铃酰胺 (峰 30)、假毕拔酰胺 A (峰 31)、dauricumine (峰 32)、土藤碱 (峰 33)、木兰花碱 (峰 35)、7-乙氧基-3-吡啶碳酸甲酯 (峰 36)、异青藤碱 (峰 37)、清风藤碱 (峰 38)、四氢巴马汀 (峰 39)、碎叶紫堇碱 (峰 41)、蝙蝠葛波酚碱 (峰 43)、青风藤定碱 (峰 49)、表小檗碱 (峰 51)、8,14-二氢萨鲁塔里定碱 (峰 53)、*N-p*-香豆酰酪胺 (峰 58) 和蝙蝠葛宁碱 (峰 71)，其中峰 27、35 和 38 经与对照品对照确认。

制剂中检测到的生物碱主要是苕基异喹啉类生物碱，其中按生物碱骨架又分为阿朴啡类、吗啡烷类和小檗碱类。以吗啡烷类和阿朴啡类生物碱为例，吗啡烷类生物碱易断裂含氮的环状结构，然后失

去氮及其连接的取代基形成 $[M+H-NH_3]^+$ 、 $[M+H-NH_2CH_2]^+$ 和 $[M+H-NHCH_2CH_2]^+$ 的碎片^[54-55]，此外，苯环上也易失去 CH_3OH 形成含氧三元环，同时含氧三元环易转化为羰基，紧接着失去羰基导致苯环减少 1 个碳形成五元环^[56]。阿朴啡类生物碱也易失去氮及其连接的取代基^[52-53]，苯环上的裂解规律与吗啡烷类生物碱类似^[55]。

峰 27 经与对照品对照确定为青藤碱 (吗啡烷类)。以峰 27 的解析为例了解生物碱的质谱裂解规律。根据峰 27 的精确相对分子质量的准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 330.170 5 推断其可能为青藤碱 ($C_{19}H_{23}O_4$)；其碎片离子的裂解途径如图 5 所示，准分子离子峰脱去 $CH_2CHNHCH_3$ 和苯环上的 CH_3OH 得到 m/z 241.088 4 碎片离子，接着分别脱去 CO、 CH_4O 、2H 得到 m/z 为 213.093 2、209.061 5、239.072 9 的碎片离子，其中 m/z 为 213.093 2 的碎片离子继续脱去 CH_3OH 形成 m/z 为 181.066 7 的碎片离子， m/z 为 239.072 9 的碎片离子同样脱去 CH_3OH 形成 m/z 为 207.046 1 的碎片离子。

峰 33 为无对照品的化合物，其准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 为 298.143 6，给出化合物分子式为

$C_{18}H_{19}NO_3$, 推断其可能为土藤碱(阿朴啡类)。其碎片离子的裂解途径如图 6 所示, 准分子离子峰脱去 NH_3 得到 m/z 281 碎片离子, 接着苯环上相邻的 2 个甲氧基脱去 CH_4 形成五元环, 得到 m/z 265 碎片离子, 故可指认其为土藤碱。

4 讨论

本实验采用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术, 利用 MassHunter 软件给出的准分子离子信息, 结合化合物数据库、二级碎片离子信息以及与 18 个对照品比对, 并参考相关文献资料, 实现了七味通痹口服液中的 72 个化合物的快速辨析与归属。所推测和鉴定的化合物中涵盖了 21 个生物碱、13 个黄酮、8 个氨基酸、8 个苯丙素、6 个酚酸、4 个萜类、1 个

核苷、1 个脂肪酸、1 个烷酸酯和 9 个其他类等多种类型的化合物。实验前期对色谱和质谱条件均进行了全面系统地优化, 包括色谱柱、有机相、流动相 pH 值、洗脱梯度及碎裂电压等, 确定了上述最佳检测条件。此外, 还考察了样品提取溶剂和超声时间的影响, 发现以纯水作为提取溶剂时色谱峰的数目相对较多, 分离效果较佳, 超声时间对色谱图几乎无影响, 从而确定了上述最适宜的供试品制备方法。尽管对检测和提取方法均进行了充分考察, 但是七味通痹口服液的制剂生产过程中添加了千年健的挥发油, 由于本研究检测条件的限制, 仅检测到了 3 个挥发油类成分, 因此, 在今后的研究过程中, 可以采用 GC-MS 等技术对制剂中挥发性成分

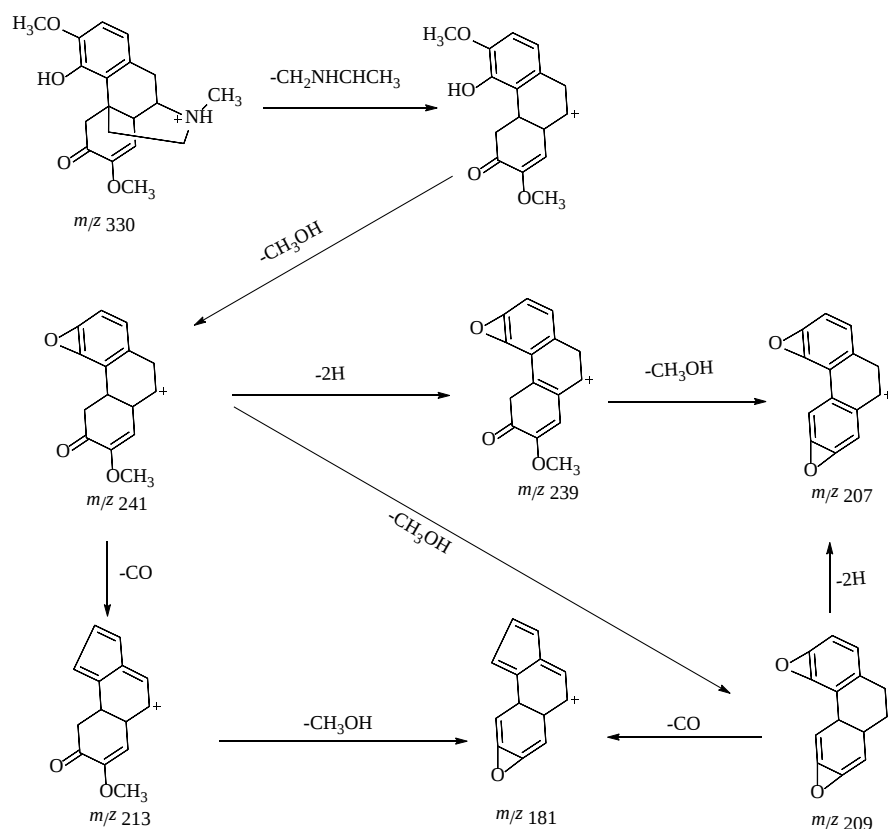


图 5 青藤碱可能的裂解途径

Fig. 5 Proposed fragmentation pathway of sinomenine

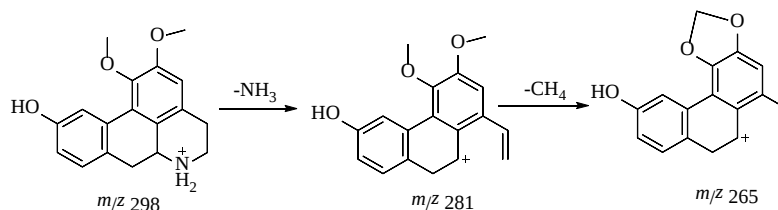


图 6 土藤碱可能的裂解途径

Fig. 6 Proposed fragmentation pathway of tuduranine

进行进一步研究,使制剂中的挥发油类化学成分更加明确。本实验首次运用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术,对七味通痹口服液的化学成分进行了全面系统地解析,并研究总结了氨基酸类、核苷类、黄酮类和生物碱类化合物在质谱中的裂解规律,为七味通痹口服液的药效物质基础和质量控制的深入研究提供了实验及理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王若琪. 七味通痹口服液治疗类风湿性关节炎的机理研究 [J]. 临床合理用药杂志, 2010, 3(17): 1-4.
- [2] 邵怡, 杨玉佩, 李家宇, 等. HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析防风芍药汤水煎液的化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 54-59.
- [3] 毕肖林, 马世堂, 狄留庆, 等. 中药药效物质筛选与辨识的研究思路及进展 [J]. 中草药, 2018, 49(22): 5229-5234.
- [4] 吴茜, 毕志明, 李萍, 等. 基于整体观的中药药效物质基础的生物活性筛选/化学在线分析研究新进展 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(4): 289-293.
- [5] 张丹参. 中药有效成分的作用机制和物质基础 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 656.
- [6] 赵建荣, 李晓玫. 中药复方物质基础研究的现状与进展 [J]. 中草药, 2003, 34(11): 963-966.
- [7] 陈君, 林朝展, 付剑江, 等. 2013 年国家自然科学基金“中药药效物质”研究方向项目申请与资助情况述评 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(2): 211-215.
- [8] 魏文峰, 王昶, 张树明, 等. 串联质谱技术在中药化学成分分析中的应用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14): 351-354.
- [9] 刘佳铭, 苗水, 李雯婷, 等. 高分辨质谱技术在农药残留检测中的应用 [J]. 分析试验室, 2020, 39(1): 116-124.
- [10] 杨桂平, 李庆大. 蚂蚁的化学成分 [J]. 中小企业科技信息, 1996(12): 8-9.
- [11] 揣冰洁. 蚂蚁化学成分研究 [J]. 农业与技术, 2000, 20(6): 37.
- [12] 蔡毅, 李爱媛, 谢沛珊, 等. 蚂蚁及其制剂的成分研究 [J]. 时珍国医研究, 1993, 4(1): 12-14.
- [13] 黄如彬, 潘颖, 陈瑞, 等. 棕褐沙林蚁的化学成分分析 [J]. 首都医学院学报, 1994, 15(3): 200-203.
- [14] 解笑瑜, 王瑞, 师彦平. 中药千年健的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14): 2325-2327.
- [15] 胡永美, 杨中林, 叶文才, 等. 千年健化学成分研究 (II) [J]. 中成药, 2006, 28(12): 1794-1796.
- [16] 张祎, 邓岫, 李晓霞, 等. 鸡血藤化学成分的分离与结构鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(3): 174-178.
- [17] 苏贤君. 中药鸡血藤 *Spatholobus suberectus* Dunn. 化学成分的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [18] 廖辉, 张凌, 金晨, 等. 丰城鸡血藤的化学成分分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 62-67.
- [19] 张园园, 张玉杰, 王秀丽, 等. 鹿衔草中异高熊果苷、高熊果苷血药浓度测定及大鼠灌胃给药后药动学研究 [J]. 中国药房, 2015, 26(1): 40-42.
- [20] 王西发, 张建民, 曹爱兰, 等. 鹿衔草的化学成分 [J]. 中草药, 1988, 19(1): 8-10.
- [21] 潘薇薇, 裴刚, 王亚敏, 等. 鹿衔草的化学成分研究 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(3): 221-222.
- [22] 周瑾, 吕磊, 梁李娟, 等. HPLC-TOF/MS 鉴别青风藤不同溶剂提取物及给药后大鼠血浆中的化学成分 [J]. 中南药学, 2014, 12(5): 414-418.
- [23] 杨军, 宋娜丽. 威灵仙化学成分分离鉴定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(9): 41-45.
- [24] 付强, 王萍, 杜宇凤, 等. 威灵仙化学成分及其药理活性最新研究进展 [J]. 成都大学学报: 自然科学版, 2018, 37(2): 113-119.
- [25] 郭志峰, 郭婷婷, 马瑞欣. 气-质联用分析青风藤中的生物碱 [J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2007, 27(1): 50-53, 74.
- [26] 曹吉慧, 赵桂森, 冯延江. 青风藤的化学成分与药理作用 [J]. 现代药物与临床, 2008, 23(2): 62-66.
- [27] 黄筑艳, 张援虎, 周岚, 等. 青风藤化学成分的研究 (II) [J]. 中草药, 2009, 40(2): 193-196.
- [28] 王有志, 李春荣, 莫志贤. 青风藤化学成分与药理研究进展 [J]. 医药导报, 2004, 23(3): 177-179.
- [29] 宋永彬, 程维明, 曲戈霞, 等. 青风藤化学成分的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2007, 24(2): 79-81.
- [30] 韩丹, 刁玉林, 徐晶晶, 等. 青风藤生物碱化学成分及药理作用研究 [A] // 中华中医药学会中药化学分会第八届学术年会论文集 [C]. 北京: 中华中医药学会中药化学分会, 中华中医药学会, 2013: 139.
- [31] 冀治鑫, 赵兵, 李文婧, 等. 石楠藤的化学成分、药理及临床应用研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(18): 9663-9665.
- [32] 班小红, 黄筑艳, 李焱, 等. 青风藤化学成分的研究 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1831-1832.
- [33] 阎山林, 陈丽佳, 李正翔, 等. 威灵仙的化学成分及生物活性的研究进展 [J]. 天津药学, 2016, 28(2): 48-52.
- [34] 张敏. 威灵仙化学成分及生物活性研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(7): 165-168.
- [35] 宋少辉, 张援虎, 黄筑艳. 青风藤中生物碱的研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 327-328.
- [36] 余金明, 刘冰, 王宪庆, 等. HELP 与 GC-MS 法分析千

- 年健挥发油成分 [J]. 中药材, 2010, 33(9): 1421-1424.
- [37] 杨冉冉. 中药鸡血藤的质量控制及对斑马鱼抗血栓作用的初步研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.
- [38] 赵国伟. 石南藤的化学成分研究 [D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [39] 赵阳, 梁丽珍, 李厚金, 等. 威灵仙的化学成分研究 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2012, 51(3): 63-67.
- [40] 陈雅研, 邱翠嫦, 沈莉, 等. 清风藤微量生物碱的研究 [J]. 北京医科大学学报, 1991, 23(3): 235-237.
- [41] 陈曦, 王艳龙. 青风藤研究现状及展望 [J]. 江西中医药, 2011, 42(2): 69-72.
- [42] 刘激激, 朱尧, 汪悦. 青风藤生物碱的活性成分及药理作用研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(8): 1765-1769.
- [43] 刘德文. 拟黑多刺蚁(*Polyhachis vicina* Roger)化学成分和药理活性研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2004.
- [44] 郑绍军, 杨丹丹, 朱瑞, 等. 鹿衔草化学成分的分离与鉴定 [J]. 化学与生物工程, 2016, 33(12): 31-33.
- [45] 李佳, 刘继永. 中药威灵仙的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 特产研究, 2011, 33(1): 67-71.
- [46] 舒顺利. 鸡血藤升白有效部位筛选和化学成分研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [47] 余弯弯, 双鹏程, 张凌. 鸡血藤化学成分及药理作用研究概况 [J]. 江西中医药大学学报, 2014, 26(4): 89-92.
- [48] 董彩霞, 武可泗, 史社坡, 等. 棉团铁线莲黄酮类成分研究 [J]. 中国药学: 英文版, 2006, 15(1): 15-20.
- [49] 郑巍, 郭良君, 谭兴起. 拟黑多刺蚁化学成分的研究 [J]. 中南药学, 2012, 10(3): 178-180.
- [50] 渠琛玲, 张寒琦, 张华蓉, 等. 电喷雾质谱法研究氨基酸的质谱碎裂及其与人参皂苷 Rb_3 的相互作用 [J]. 高等学校化学学报, 2008, 29(9): 1721-1726.
- [51] 张玉, 董文婷, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的广地龙化学成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(2): 252-262.
- [52] 叶小琴. 酚酸及黄酮醇结构对其二元复合体系抗氧化效应的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [53] 李想. 黄酮醇类化合物 ESI-ITMSⁿ 质谱裂解规律的量子化学研究 [D]. 佳木斯: 佳木斯大学, 2015.
- [54] 张水英. 豆豉姜的生物碱成分及其品质评价研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [55] 谈英, 韩晓妮, 张跃飞, 等. 基于 UPLC-Q/TOF MS 对不同产地东北铁线莲化学成分的比较 [J]. 沈阳药科大学学报, 2019, 36(5): 399-403.
- [56] 左姿. 基于 LMD-LC-MS/MS 技术的博落回根中生物碱的组织化学研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.

[责任编辑 王文倩]