

基于UPLC-Q-TOF/MS^E的UNIFI质谱数据库建立及其在血脂康胶囊化学成分的快速分析中的应用

田国芳¹, 薛岚², 刘曦², 裴欢², 唐煜^{1*}

(1. 清华大学药学院, 清华大学药学技术中心, 北京 100084; 2. 北京北大维信生物科技有限公司, 北京 100083)

摘要: 本研究采用UPLC-Q-TOF/MS^E技术结合UNIFI数据库开发了快速、全面、准确、高效的血脂康胶囊化学成分定性分析方法。利用化合物名称、分子量、分子式、结构式等信息建立UNIFI数据库, 并依据高分辨质量数、同位素分布、质量偏差、碎片离子匹配度、色谱保留行为等信息进行数据库自动检索, 实现药材和制剂中天然产物的定性鉴定。结合手动确证, 在血脂康胶囊及红曲药材中鉴定到82种化学成分, 对于其中的有机酸类、黄酮类、莫纳克林类、红曲色素类主要成分进行了质谱裂解规律分析, 确保鉴定准确度, 多种莫纳克林类化合物为首次采用LC-MS工作流程实现定性分析。综上, 本研究通过LC-MS技术阐明了血脂康胶囊的化学物质基础, 为血脂康胶囊中药制造过程中的关键质量属性控制和一致性评价提供了扎实的实验数据支持, 为基于血脂康胶囊的药效物质基础研究提供支撑。

关键词: UPLC-Q-TOF; MS^E; UNIFI数据库; 血脂康胶囊; 分析方法开发

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-2862-13

Rapid identification of chemical constituents in Xuezhikang Capsule by UPLC-Q-TOF/MS^E combined with the establishment of UNIFI MS database

TIAN Guo-fang¹, XUE Lan², LIU Xi², PEI Huan², TANG Yu^{1*}

(1. Center of Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. Beijing WBL Peking University Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100083, China)

Abstract: An UPLC-Q-TOF/MS^E technology coupled with UNIFI database was used to develop a rapid, high coverage, accurate and efficient chemical composition qualitative method for Xuezhikang Capsule. A UNIFI database was established utilizing compound name, formula, structure, following automatic matching with high-resolution mass numbers, isotope distributions, mass deviations, fragment ion matching, and chromatographic retention features in UNIFI database to achieve the qualitative results of natural products in Xuezhikang Capsules. Combined with manual confirmation, 82 chemical components were identified in Xuezhikang Capsules, and the MS² fragmentation pathway of typical organic acids, flavonoids, monacrinines, and monascus were analyzed to ensure accuracy of the LC-MS workflow. This study clarified the chemical substance basis of Xuezhikang Capsules by LC-MS technology, providing experimental data support for the identification of key quality attributes, quality control and consistency evaluation in the manufacturing process of Xuezhikang Capsules.

Key words: UPLC-Q-TOF; MS^E; UNIFI database; Xuezhikang Capsule; analytical method development

收稿日期: 2023-01-05; 修回日期: 2023-04-04.

基金项目: 清华大学实验室创新基金.

*通讯作者 Tel: 86-10-62795450, E-mail: tangyu@tsinghua.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0008

血脂康胶囊是以特制红曲为原料提取浓缩制成的中成药, 富含多种天然复合他汀类成分, 被誉为天然他汀^[1]。血脂康胶囊具有化浊降脂、活血化瘀、健脾消食之功效^[2], 广泛应用于治疗高脂血症、脂肪肝、动脉粥样硬化、高血压、冠心病、肾病综合征等, 其疗效确切、不良反应少, 受到临床重视^[3-5]。循证医学临床研究证明, 血脂康可以明显减少冠心病事件发生率, 降低总死亡率^[6]。其有效成分有极强的抗癌活性, 能抑制MCF-7人乳腺癌以及Walder 256肉瘤细胞株的生长, 对人肝癌PLC/PRF5和KB细胞也有抑制作用^[7]。此外, 还具有抗炎、抗氧化、抗补体、免疫抑制和促进血小板凝聚等活性^[8,9]。但其发挥效应的药效物质基础尚未明确, 为探究其药效物质, 对血脂康胶囊进行系统的化学物质基础研究具有必要性。

液相色谱质谱联用技术(LC-MS)以LC作为分离系统, MS为检测系统, 体现了色谱和质谱优势的互补, 将色谱对复杂样品的高分离能力, 与MS具有高选择性、高灵敏度及能够提供相对分子质量与结构信息的优点结合起来, 在药物分析、食品分析和环境分析等许多领域得到了广泛的应用^[10,11]。其中, 超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF)系统配置了高分辨质量分析器, 能够获得复杂体系中各类化合物的高精度质量数及高质量碎片离子, 广泛应用于中药制剂的化合物成分鉴定研究中^[12]。UNIFI科学系统是Waters公司开发的质谱数据处理系统, 该软件可自动进行特征峰提取及自动解析, 并与软件预设或用户自建的数据库中信息自动进行高分辨分子离子峰、碎片离子、保留时间、淌度值等关键信息匹配, 能够快速分析中药复方中的化学成分。解决了传统高分辨质谱处理流程中逐一手动标注化合物特征峰, 解析过程复杂且耗时较长的缺点^[13-15]。

本研究整理血脂康胶囊相关成分信息, 建立基于UNIFI软件的质谱数据库, 采用该数据库对血脂康胶囊的化学成分进行快速、准确地LC-MS表征, 为该制剂的中药化学成分分析及药效物质基础研究提供支持。

材料与amp;方法

供试品及试剂信息 红曲药材、胶囊制剂等供试品由北京北大维信生物科技有限公司提供。红曲药材一批次, 批号为H20211210; 制剂三批次, 批号分别为20211020、20211240、20211256。选取了9种他汀类、莫纳可林类、黄酮类、甾醇类标准品进行对照, 进一步提高所建立UNIFI数据库的数据质量及鉴定结果的准确度, 包括洛伐他汀(批号100600-202006, 纯度 $\geq 99\%$)、

麦角甾醇(批号111845-201604, 纯度 $\geq 96\%$)、大豆苷元(批号111502-202003, 纯度 $\geq 99\%$)、染料木素(批号111704-202104, 纯度 $\geq 99\%$)均购自中国食品药品检定研究院; 洛伐他汀酸钠(批号4339-040A2, 纯度 $\geq 97\%$)购自加拿大TLC公司; 莫纳可林J(批号ESS-139-24, 纯度 $\geq 95\%$)、脱氢莫纳可林K(批号ESL-029-24, 纯度 $\geq 99\%$)、美伐他汀(批号ESL-019-19, 纯度 $\geq 99\%$)、莫纳可林M(批号ONL-129-08, 纯度 $\geq 98\%$)均购自美国AOCS公司。乙醇、甲酸、乙腈、甲醇均购自美国Thermo Fisher公司; 去离子水, 制备自MilliQ Advantage A10超纯水机; 1.5 mL离心管、15 mL离心管及进样小瓶均购自美国Axygen公司。

实验仪器 高分辨液质联用分析采用Synapt G2-Si Q-TOF超高效液相色谱串联飞行时间质谱仪和液相色谱部分型号为ACQUITY UPLC I Class、UNIFI Portal科学信息系统和Masslynx V4.2色谱质谱工作站(美国Waters公司); Cosmosil 5C18-MS-II(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)色谱柱(美国Amresco公司); Vortex-2 Genie涡旋混合器(美国Scientific Industries公司); WD-9415C超声波清洗器(北京市六一仪器厂); 5910 Ri G冷冻离心机(德国艾本德公司)。

样品制备方法 对于红曲药材样品和血脂康胶囊制剂样品, 取红曲药材或者胶囊内容物0.3 g, 精密称定, 置于15 mL离心管内, 加入10 mL 75%乙醇水溶液(乙醇-水, 75:25), 超声10 min, 摇匀, 定容。取溶液适量, 5 000 r \cdot min⁻¹离心3 min后, 取上清液用0.22 μ m滤膜过滤, 取滤液1 mL装入进样小瓶中, 于4 $^{\circ}$ C避光保存, 待LC-MS分析。空白样品采用相同条件处理。

标准溶液制备 精密称定各标准品10 mg, 分别置于10 mL量瓶中, 加入乙腈溶解、超声、混匀、定容, 配制成1 mg \cdot mL⁻¹标准溶液储备液, 分别取各对照品储备液适量, 依次稀释、混合后配制成2 μ g \cdot mL⁻¹混合标准品工作液, 于4 $^{\circ}$ C避光保存。

色谱方法 本研究采用具有高峰容量、高分辨率的UPLC-Q-TOF/MS^F技术对血脂康胶囊供试品中的多种天然产物进行分析, 采用Cosmosil 5C18-MS-II(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m)色谱柱进行色谱分离, 流动相采用0.1%甲酸水作为A相, 含0.1%甲酸的乙腈甲醇溶液(乙腈-甲醇, 9:1)作为B相。梯度洗脱, 洗脱程序如下: 0~7 min, 6%~14% B; 7~15 min, 14%~33% B; 15~25 min, 33%~55% B; 25~43 min, 55%~85% B; 43~50 min, 85%~58% B; 50~55 min, 58%~6% B; 55~60 min, 6% B。流速为1 mL \cdot min⁻¹, 柱温为30 $^{\circ}$ C, 进样量15 μ L, 柱后分流50%后分别进行紫外256 nm和质谱检测。

质谱方法 高分辨质谱数据采集采用 Synapt G2-Si Q-TOF/MS 高分辨离子淌度质谱仪, 采用电喷雾电离源 (ESI), 扫描模式为 MS^E, 在 resolution mode, 正、负离子模式下分别进行样品分析。亮氨酸脑啡肽作为实时校正参比化合物, 离子源温度为 125 °C; 脱溶剂气为高纯氮气, 脱溶剂温度为 400 °C, 氮气流量为 800 L·h⁻¹; 锥孔气流速为 50 L·h⁻¹, 锥孔电压设置为 40 V; 毛细管电压在正、负离子模式下分别为 3 000 V (ESI⁺) 及 2 500 V (ESI⁻); 碰撞能区间设置为 10~50 eV; TOF 质量扫描范围设置为 *m/z* 50~1 200 Da。

UNIFI 质谱数据库的建立方法及数据处理流程

化合物信息采集及整理 对血脂康胶囊及红曲化学成分相关的文献报道进行查阅和总结, 通过检索

PubChem、Scifinder、Chemicalbook 数据库, 如表 1 所示, 获取共 101 种化合物的信息, 包括化合物中英文名称、分子式、分子量、结构式, 将这些信息与 .mol 格式化合物结构文件同时导入 UNIFI 数据库中。另外采用混合标准溶液直接获取了 9 种化合物的色谱质谱信息, 将两部分内容整合, 建立以血脂康胶囊主要成分他汀类、莫纳可林类、红曲色素类等数据库, 结合原有中药数据库中的有机酸、黄酮、甾体、糖类成分, 补充建立针对血脂康胶囊优化的 UNIFI 数据库。

LC-MS 原始数据处理及特征峰提取、鉴定 将 Masslynx 采集的 .raw 格式的原始数据导入到 UNIFI 软件中, 对特征峰进行识别、同位素分布拟合及元素组成匹配。选择基于 MS^E 数据的精确质量数筛查模板, 设定

Table 1 Chemical constituents database of Xuezhikang Capsula base on UNIFI software

No.	Compound name	Formula	<i>M</i> / <i>Da</i>	CAS No.
1	4-Methoxycinnamic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178.063 0	830-09-1
2	3-Hydroxy-4-methoxycinnamic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.057 9	537-73-5
3	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.057 9	1135-24-6
4	Ethylenediaminetetraacetic acid	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	292.090 7	60-00-4
5	Lunatinin	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	250.084 1	69364-81-4
6	Daidzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.057 9	486-66-8
7	Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.052 8	446-72-0
8	Cianidanol	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.079 0	154-23-4
9	Osthole	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	244.109 9	484-12-8
10	Glycitein	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.068 5	40957-83-3
11	Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.095 1	327-97-9
12	ML-236C	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	290.188 2	58889-18-2
13	ML-236A	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	306.183 1	58889-19-3
14	Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.240 2	60-33-3
15	Folic acid	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441.139 7	59-30-3
16	Monacolin Q	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	282.162 0	1879038-89-7
17	<i>α,β</i> -Hydromonacolin Q	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	300.172 5	118045-32-2
18	Dehydromonacolin L	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.193 3	1355394-52-3
19	Dehydromonacolin J	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	302.188 2	1355394-51-2
20	Dehydromonacolin MV2	C ₁₉ H ₂₆ O ₅	334.178 0	-
21	<i>α,β</i> -Dehydrodihydromonacolin L	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.208 9	531523-94-1
22	Monacolin R	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	304.203 8	1879038-90-0
23	Monacolin L	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	304.203 8	79394-47-1
24	Monacolin J	C ₁₉ H ₂₈ O ₄	320.198 8	79952-42-4
25	Dihydromonacolin L	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	306.219 5	86827-77-2
26	3 α -Hydroxy-3,5-dihydromonacolin L	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	322.214 4	119786-66-2
27	Sterculic acid	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	294.255 9	738-87-4
28	Monacolin L acid methyl ester	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	336.230 1	312710-94-4
29	Monalbidin N5	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	352.225 0	2769120-20-7
30	Rubropunctatine	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	354.146 7	514-67-0
31	Rubropunctamine	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	353.162 7	514-66-9
32	Monascin	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	358.178 0	21516-68-7
33	Dehydromonacolin N	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	344.198 8	1355394-50-1
34	6- α -O-Ethyl-4,6-dihydromonacoline L	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	350.245 7	-
35	Monacolin T	C ₂₁ H ₃₆ O ₅	368.256 3	-
36	Monacolin N1	C ₂₂ H ₃₄ O ₆	394.235 5	-
37	Monacolin U	C ₂₂ H ₃₈ O ₅	382.271 9	-
38	Rotiorinol A	C ₂₃ H ₂₆ O ₅	382.178 0	901309-41-9
39	Monascorubrin	C ₂₃ H ₂₆ O ₅	382.178 0	13283-90-4
40	Monascorubramin	C ₂₃ H ₂₇ NO ₄	381.194 0	3627-51-8
41	Robustadiol A	C ₂₃ H ₃₀ O ₅	386.209 3	88130-99-8

Continued

No.	Compound name	Formula	M_r /Da	CAS No.
42	Mevastatin	C ₂₃ H ₃₄ O ₅	390.240 6	73573-88-3
43	Monacolin M	C ₂₃ H ₃₄ O ₆	406.235 5	106909-04-0
44	Dehydromonacolin K	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	386.245 7	109273-98-5
45	Monacolin X	C ₂₄ H ₃₄ O ₆	418.235 5	96497-73-3
46	α,β -Dehydrodihydromonacolin K	C ₂₄ H ₃₆ O ₄	388.261 4	312710-92-2
47	Monacolin K	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	404.256 3	75330-75-5
48	Dihydromonacolin K	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	406.271 9	77517-29-4
49	Dehydromonacolin MV	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	406.271 9	935846-59-6
50	Lovastatin acid	C ₂₄ H ₃₈ O ₆	422.266 8	77550-67-5
51	Monacolin S	C ₂₄ H ₃₈ O ₇	438.261 8	–
52	Monacolin K methyl ester	C ₂₅ H ₄₀ O ₆	436.282 5	77934-80-6
53	Monacolin K ethyl ester	C ₂₆ H ₄₂ O ₆	450.298 1	77517-31-8
54	Ergosterol	C ₂₈ H ₄₄ O	396.339 2	57-87-4
55	Stigmasterin	C ₂₉ H ₄₈ O	412.370 5	83-48-7
56	Oxalic acid	C ₂ H ₂ O ₄	89.995 3	144-62-7
57	Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	60.021 1	64-19-7
58	Glycolic acid	C ₂ H ₄ O ₃	76.016 0	79-14-1
59	β -Glycyrrhetic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	470.339 6	471-53-4
60	Oleanolic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.360 3	508-02-1
61	Ursolic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.360 3	77-52-1
62	Pyruvic acid	C ₃ H ₄ O ₃	88.016 0	127-17-3
63	Malonic acid	C ₃ H ₄ O ₄	104.011 0	141-82-2
64	Propionic acid	C ₃ H ₆ O ₂	74.036 8	29102
65	Lactic acid	C ₃ H ₆ O ₃	90.031 7	50-21-5
66	Maleic acid	C ₄ H ₄ O ₄	116.011 0	110-16-7
67	Fumaric acid	C ₄ H ₄ O ₄	116.011 0	110-17-8
68	Succinic acid	C ₄ H ₆ O ₄	118.026 6	110-15-6
69	Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	134.021 5	6915-15-7
70	Tartaric acid	C ₄ H ₆ O ₆	150.016 4	526-83-0
71	Butyric acid	C ₄ H ₈ O ₂	88.052 4	107-92-6
72	4-Aminobutyric acid	C ₄ H ₉ NO ₂	103.063 3	20791
73	D-Glucuronic acid	C ₆ H ₁₀ O ₇	194.042 7	1700908
74	Nicotinic acid	C ₆ H ₅ NO ₂	123.032 0	59-67-6
75	Sorbic acid	C ₆ H ₈ O ₂	112.052 4	110-44-1
76	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	192.027 0	77-92-9
77	Shikimic acid	C ₇ H ₁₀ O ₅	174.052 8	138-59-0
78	Quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.063 4	77-95-2
79	Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	122.036 8	65-85-0
80	4-Hydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	138.031 7	99-96-7
81	Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	138.031 7	69-72-7
82	2,4-Dihydroxybenzoic acid	C ₇ H ₆ O ₄	154.026 6	89-86-1
83	Protocatechuic acid	C ₇ H ₆ O ₄	154.026 6	99-50-3
84	Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	170.021 5	149-91-7
85	2-Methoxybenzoic acid	C ₈ H ₈ O ₃	152.047 3	529-75-9
86	Vanillic acid	C ₈ H ₈ O ₄	168.042 3	121-34-6
87	3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.063 0	501-97-3
88	Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.052 8	530-57-4
89	Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	148.052 4	621-82-9
90	<i>trans</i> -Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	148.052 4	140-10-3
91	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	180.042 3	331-39-5
92	Formic acid	CH ₂ O ₂	46.005 5	64-18-6
93	Sulfamic acid	H ₃ NO ₃ S	96.983 4	5329-14-6
94	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₂	360.310 0	5989-81-1
95	Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.160 0	7660-25-5
96	Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.160 0	50-99-7
97	Xylose	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.130 0	58-86-6
98	Maltose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.300 0	69-79-4
99	Monacolin O	C ₂₅ H ₄₀ O ₈	468.580 0	–
100	Monacolin N	C ₁₆ H ₂₈ O ₃	304.420 0	–
101	Monasscusic acid A	C ₁₈ H ₂₆ O ₂	234.161 9	–

方法参数如下: 峰处理设置 2D 峰检测阈值为 200, 3D 峰低能量扫描阈值为 500, 高能量扫描阈值为 150, 应用 lockmass 校正, 正离子模式校正质量数为 556.276 6, 负离子模式校正质量数为 554.262 0; 在目标筛选设置中, 对于数据库中有保留时间的组分, 设置保留时间匹配阈值为 ± 0.1 min, 母离子质量偏差阈值设置为 ± 10 ppm, 从结构生成的预测碎片离子匹配容差设置为 5 mDa, 保留最大碎片离子数设置为 10, 将优化后数据库导入方法中, 保存为当前数据处理方法进行数据分析。

UNIFI 软件会将低能通道识别到的分子离子峰与建立的数据库自动匹配, 结合高能通道匹配到的碎片离子峰自动列出最佳匹配度的物质。为了增加准确性, 选择结合色谱保留时间、精确分子质量、特征碎片离子, 同系物极性差异等理化特征进行手动确证, 同时通过对照品信息和相关文献中化合物特点的对照, 对于特征峰的可靠鉴定结果进行标记。

未知化合物进一步手动鉴定及识别 对于未能在所建立的目标数据库中匹配的且具有较高峰面积的化合物, 使用 UNIFI 软件中的 Elucidate 功能进行解析, 主要分为三个途径进行分析: ① 利用 UNIFI 软件中自带的天然产物数据库进行检索; ② 采用内嵌的 ChemSpider 模块进行精确分子量和分子式的在线检索; ③ 若前两种方式均无法给出特征峰鉴定结果, 则采用 Elemental Composition 模块进行同位素 i-FIT 评分匹配, 结合分子离子、高能通道中的特征碎片及色谱保留行为, 推断其可能的结构类型。

报告生成及结果导出 化合物鉴定结果包括名称、分子式、 m/z 、质量偏差、分子量、加合离子、峰面积等信息, 可直接导出至 Excel 中。使用 UNIFI 软件中的报告功能可生成鉴定结果的 PDF 文件, 信息包括特征峰精确质量数的提取离子流图、MS¹ 低能谱图、MS² 的高能

谱图及碎片离子结构预测结果, 基于 UNIFI 软件提供的碎片离子结构进一步确定化合物鉴定结果。

结果

1 UPLC-Q-TOF/MS^E 分析方法的色谱条件优化

血脂康主要成分鉴定的采集条件优化包括液相色谱条件的优化和质谱条件的优化。建立适合分离血脂康中化合物的液相方法, 优化主要化合物的分离度, 是准确定性鉴定的先决条件, 可以降低后期定性鉴定假阴性的结果。通过文献调研和前期实验条件的摸索, 如图 1 所示, 研究对比了 Cosmosil 5C18-MS-II 色谱柱、Waters UPLC BEH C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m) 色谱柱、Waters UPLC HSS T3 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱, 最终选择了 Cosmosil 5C18-MS-II 色谱柱。流动相方面, 优化了甲醇、乙腈、异丙醇等不同配比, 以及添加甲酸、乙酸、乙酸铵等不同酸、盐的流动相体系, 选择了分离度和重复性俱佳的乙腈甲醇溶液体系, 添加甲酸进一步优化分离度, 采用该方法对多批次样品进行检测。

2 血脂康胶囊化学成分分析

2.1 基于自建 UNIFI 数据库的血脂康胶囊物质基础分析 采用建立的 UNIFI 数据库进行三批次血脂康胶囊和一批次红曲原料的化学成分检测, 以峰面积大于 1 000, 质量偏差小于 10 ppm 作为筛选条件, 并且手动确认, 选取结果中与建立数据库碎片离子相匹配的成分作为阳性结果。鉴定到 82 种组分, 结果如表 2 所示, 包括 33 种有机酸类化合物、24 种萜类化合物、7 种红曲色素类化合物、7 种他汀类化合物、5 种黄酮类化合物、4 种糖类化合物和 2 种甾醇类化合物。血脂康胶囊制剂样品的正、负离子模式下的质谱基峰离子流图 (BPI 图) 如图 2 所示, 图中序号对应表 2 中各化合物序号。

Table 2 Qualitative identification results of chemical components of Xuezhikang Capsula base on UNIFI database

Peak No.	Compound name	t_R /min	Formula	Diff / $\times 10^{-6}$	Molecular ion m/z	Fragment ion MS ²	Peak area			
							Lot. No. H20211210	Lot. No. 20211020	Lot. No. 20211040	Lot. No. 20211256
1	D-Glucuronic acid	2.63	C ₆ H ₁₀ O ₇	-5.8	193.048 4	157.036 5, 134.046 9, 123.055 9, 114.020 7, 113.025 0, 110.034 3, 89.029 1	876	14 289	14 823	13 659
2	Maltose	2.65	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-1.9	365.093 0	325.124 8, 296.077 0, 258.123 7, 184.080 2, 104.122 8, 86.111 6	102 373	1 364 014	1 190 990	1 383 216
3	Tartaric acid	2.65	C ₄ H ₆ O ₆	-2.6	149.021 9	134.047 0, 96.968 8, 78.958 6, 85.029 1, 72.992 6, 67.015 9	9 535	20 282	20 178	18 919
4	4-Aminobutyric acid	2.69	C ₄ H ₉ NO ₂	-4.2	102.055 6	71.013 3, 88.039 9, 74.024 4, 70.029 2, 59.013 2	-	14 237	14 464	11 983
5	Lactic acid	2.77	C ₃ H ₆ O ₃	-7.4	89.023 8	55.018 3, 59.013 2, 71.013 3, 73.029 0	-	103 584	103 842	101 214
6	Xylose	2.81	C ₅ H ₁₀ O ₅	-2.1	149.045 2	132.030 3, 119.034 8, 113.025 0, 101.024 2, 89.024 0, 83.013 1, 75.008 3, 71.013 2	-	26 364	28 224	27 332

Continued

Peak No.	Compound name	t_R /min	Formula	Diff / $\times 10^{-6}$	Molecular ion m/z	Fragment ion MS ²	Peak area			
							Lot. No. H20211210	Lot. No. 20211020	Lot. No. 20211040	Lot. No. 20211256
7	Fructose	2.86	C ₆ H ₁₂ O ₆	-1.2	179.055 9	132.030 3, 119.034 8, 113.025 0, 101.024 2, 89.024 0, 83.013 1, 75.008 3, 71.013 3	-	303 427	269 437	278 251
8	Glycolic acid	2.87	C ₂ H ₄ O ₃	-9.5	75.008 1	59.013 2	-	17 441	16 973	15 684
9	5-O-Acetyl- α -L-arabinofuranose	2.95	C ₇ H ₁₂ O ₆	-1.7	191.055 8	157.036 5, 134.047 0, 113.025 0, 123.055 9, 85.029 1, 75.008 3, 69.034 0, 57.033 9	-	79 455	97 701	81 799
10	Malic acid DL	3.28	C ₄ H ₆ O ₅	-1.6	133.014 0	115.003 5, 102.055 6, 88.039 9, 70.029 3	-	346 299	342 945	332 019
11	Fumaric acid	3.28	C ₄ H ₄ O ₄	-2.6	115.003 4	82.029 4	-	163 580	162 341	156 966
12	Malonic acid	3.78	C ₃ H ₄ O ₄	-3.8	103.003 3	88.040 0, 71.013 2, 59.013 2	-	3 624	3 747	3 565
13	Citric acid	4.14	C ₆ H ₈ O ₇	-0.3	191.019 7	173.007 7, 111.008 3, 96.957 3, 87.006 1	-	417 662	400 554	381 029
14	Succinic acid	4.56	C ₄ H ₆ O ₄	-4.9	117.018 8	73.029 0	-	8 229	9 050	8 548
15	Maleic acid	4.7	C ₄ H ₄ O ₄	-2.7	115.003 4	98.007 1, 71.013 3	-	16 245	17 853	16 797
16	<i>trans</i> -Cinnamic acid	5.68	C ₉ H ₈ O ₂	-7.9	147.044 0	71.013 4	-	6 002	3 256	3 443
17	Shikimic acid	6.11	C ₇ H ₁₀ O ₅	0.2	173.058 9	127.050 9, 96.961 6, 111.019 5, 113.029 1, 78.958 7, 78.958 7, 87.008 4, 71.013 4	661	8 158	8 267	7 705
18	Salicylic acid	11.76	C ₇ H ₆ O ₃	-2.8	137.024 0	122.061 0	-	7 245	8 321	8 538
19	Vanillic acid	11.79	C ₈ H ₈ O ₄	-0.5	169.056 5	123.045 2, 137.063 8, 102.949 2	-	20 219	23 920	20 665
20	3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid	12.24	C ₉ H ₁₀ O ₃	-1.6	165.055 5	129.066 1, 73.028 2	-	52 745	52 355	46 612
21	Quinic acid	12.25	C ₇ H ₁₂ O ₆	-27.4	193.065 4	70.080 0, 129.118 6, 145.066 0	-	25 389	26 591	23 342
22	Syringic acid	13	C ₉ H ₁₀ O ₅	-2.8	197.045 0	153.060 9, 163.077 5, 130.050 3, 121.028 9	-	44 036	37 359	34 663
23	Pulchellalactam	13.75	C ₉ H ₁₃ NO	-1.7	174.092 0	110.039 9, 84.060 9	10 090	95 996	84 544	79 336
24	Protocatechuic acid	14.08	C ₇ H ₆ O ₄	-0.6	153.019 2	135.961 1, 109.029 1, 91.018 4	-	652 767	584 749	510 170
25	Gallic acid	14.11	C ₇ H ₆ O ₅	-1.2	169.014 0	153.019 7, 109.029 1	-	64 772	61 014	52 139
26	Benzoic acid	14.22	C ₇ H ₆ O ₂	-2.4	121.029 2	162.019 8, 164.072 5, 145.062 2, 94.029 8, 59.013 4	-	10 418	8 838	8 154
27	Caffeic acid	14.99	C ₉ H ₈ O ₄	-1.8	179.048 2		974	9 173	11 599	10 338
28	Ferulic acid	16.12	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-1.2	193.050 4	161.060 2, 131.042 2, 89.024 1	-	45 429	40 217	36 787
29	3-Hydroxy-4-methoxy-cinnamic acid	18.26	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	-2.8	193.050 1	145.029 2, 122.063 3	-	9 994	10 030	9 656
30	Catechin	18.46	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	-1.5	289.071 3	147.081 4, 137.061 1	-	24 113	38 921	30 167
31	2,4-Dihydroxybenzoic acid	19.44	C ₇ H ₆ O ₄	-0.2	153.019 3	107.049 9	-	36 817	31 217	29 701
32	Monacolin Q	19.9	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	5.9	283.152 4	259.151 4, 215.123 3, 171.096 1, 143.064 3, 105.049 4, 93.049 3	104 933	-	-	-
33	Daidzein	20.06	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	0.1	253.030 0	132.021 9, 91.018 8, 77.039 3, 135.008 8, 131.049 6	485 135	3 899 368	3 637 921	3 410 499
34	4-Hydroxybenzoic acid	20.08	C ₇ H ₆ O ₃	-1.8	137.024 2	103.055 1, 93.034 3	-	35 229	25 782	25 822
35	4-Methoxycinnamic acid	20.12	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	-3.5	177.055 1	162.021 8, 159.044 6, 131.049 4, 107.049 8	-	4 600	4 371	4 419
36	Glycitein	20.38	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-0.7	283.061 2	268.037 8, 265.071 7, 175.039 5, 162.021 8, 149.060 7, 137.024 3, 93.034 3	614 625	356 303	328 875	285 907
37	α , β -Hydromonacolin Q	20.56	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	-4.8	301.163 4	241.139 9, 215.123 1, 165.049 3, 143.064 3, 105.049 4, 81.049 9	507 276	13 591	11 730	10 033
38	2-Methoxybenzoic acid	21.77	C ₈ H ₈ O ₃	-1.4	151.039 9	101.060 5, 137.061 0	-	18 145	18 832	16 522
39	Lunatinin	22.5	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	-0.3	249.056 0	205.050 1, 204.042 3, 137.060 7, 159.044 5, 177.128 2, 190.026 7	89 570	1 050 002	1 170 119	1 094 398
40	Genistein	23.27	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	0	271.072 8	253.064 6, 243.079 4, 215.084 4, 153.035 7, 91.069 9	597 519	5 677 178	5 477 400	5 122 723
41	Monalbidin N5	23.97	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	-8.9	351.214 7	211.122 7, 311.170 4, 139.112 7, 171.102 4, 183.138 9, 209.118 2, 229.144 2	29 915	268 816	233 721	210 265
42	Dehydromonacolin MV2	24.37	C ₁₉ H ₂₆ O ₅	-0.3	333.153 9	171.102 3, 173.059 6, 139.112 7, 121.029 5, 155.081 9, 111.045 0, 211.096 4	22 166	170 082	175 682	142 503

Continued

Peak No.	Compound name	t_R /min	Formula	Diff / $\times 10^{-6}$	Molecular ion m/z	Fragment ion MS ²	Peak area			
							Lot. No. H20211210	Lot. No. 20211020	Lot. No. 20211040	Lot. No. 20211256
43	Monacolin J	24.99	C ₁₉ H ₂₈ O ₄	9.8	321.190 1		223 355	–	–	–
44	3 α -Hydroxy-3,5-dihydro-monacolin L	25.61	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	–9.5	345.189 7	283.119 8, 227.160 2, 185.112 2, 157.080 2, 143.064 2, 105.049 3, 91.034 3	152 093	31 338	30 256	27 547
45	Dehydromonacolin N	26.46	C ₂₁ H ₂₈ O ₄	–1.3	343.191 0	83.013 6, 296.104 5, 319.191 1, 326.139 8, 237.090 4, 213.090 3, 113.096 9	1 365 850	1 321 654	1 463 439	1 313 218
46	Monacolin T	27.5	C ₂₁ H ₃₆ O ₅	–0.7	367.220 4	352.155 6, 323.201 0, 295.097 3, 251.106 9, 227.201 3, 183.012 1, 112.985 5	132 055	–	–	–
47	Monacolin S	28.06	C ₂₄ H ₃₈ O ₇	–2.2	437.244 8	213.135 5, 195.125 5, 143.101 4, 128.078 5, 67.068 9	65 233	245 056	230 630	198 961
48	Rubropunctamine	28.69	C ₂₁ H ₂₃ NO ₄	0	352.155 4	337.131 2, 313.143 3, 294.077 5, 250.088 3, 239.060 0, 226.087 5, 199.073 1	137 026	137 203	203 083	186 753
49	Chlorogenic acid	30.3	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	3.1	353.088 9	150.128 9, 107.050 0, 66.034 3, 311.169 2, 222.080 6, 198.0922, 163.0760	–	47 138	25 006	28 293
50	Monacolin N1	30.78	C ₂₂ H ₃₄ O ₆	–1.2	393.227 8	295.1720, 281.2481, 213.0903, 313.1796, 231.0653, 252.993 1, 197.058 9	–	39 731	37 186	32 854
51	Dehydromonacolin J	31.92	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	–0.3	303.179 5	249.145 2, 225.144 4, 91.034 4, 143.064 5	258 407	115 817	110 511	92 830
52	Monacolin R	32.67	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	–4.6	305.194 7	275.113 8, 257.102 6, 197.112 0	113 422	36 067	31 032	29 334
53	Monacolin X	32.79	C ₂₄ H ₃₄ O ₆	0.1	441.216 7	325.189 4, 243.188 6, 403.219 8, 315.116 7, 225.178 6, 223.162 9	577 296	4 013 873	3 995 584	3 589 582
54	Monacolin K methyl ester	33.16	C ₂₅ H ₄₀ O ₆	9.9	459.289 8	360.214 4, 261.141 9, 233.145 8	1 734 009	–	–	–
55	Monacolin M	33.41	C ₂₃ H ₃₄ O ₆	–1.2	429.215 4	382.190 7, 310.164 3, 195.096 3	37 702	71 415	75 500	63 236
56	Monascorubramin	33.47	C ₂₃ H ₂₇ NO ₄	–1.7	380.172 5	180.066 5, 113.096 9, 146.965 2, 215.107 0, 199.075 2, 231.065 9, 354.168 7	11 464	57 424	95 696	89 002
57	Monascorubrin	34.84	C ₂₃ H ₂₆ O ₅	18.2	383.171 1	271.219 0, 215.122 1, 69.048 3, 159.132 8, 187.127 5, 201.106 1	1 648 252	1 009 430	1 500 822	1 409 028
58	Lovastatin acid	35.38	C ₂₄ H ₃₈ O ₆	–0.5	421.264 0	319.187 0, 101.060 5, 85.0291 5	6 802 308	14 892 602	14 881 085	14 144 736
59	Monacolin L	36.54	C ₁₉ H ₂₈ O ₃	27.9	305.195 3	227.160 0, 145.080 2	227 410	268 411		217 457
60	Mevastatin	36.89	C ₂₃ H ₃₄ O ₅	19.6	413.220 3	337.185 1, 325.189 5, 220.052 5, 169.117 1, 143.101 6, 59.045 3	543 206	1 929 575	1 735 687	1 582 262
61	Monassusic acid A	37.48	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	–0.7	233.133 2	183.012 3, 130.087 1, 101.024 2, 89.024 3, 209.117 9, 172.098 0, 161.045 9, 119.035 2	58 068	417 441	401 220	362 604
62	Rubropunctatine	37.86	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	4.3	355.174 5	287.183 6, 241.176 8, 217.102 7, 315.179 9	1 345 094	10 773	3 568	8 197
63	Monascin	38.33	C ₂₁ H ₂₆ O ₅	–1.5	359.172 1	215.122 8, 187.125 4, 184.085 6, 159.134 2	7 532 339	2 762 643	5 381 906	5 173 440
64	Sterculic acid	38.56	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	2.5	293.249 3	279.232 9, 112.985 5, 83.013 0, 233.154 4	–	4 336	9 954	4 039
65	Dehydromonacolin MV	38.64	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	0	407.283 9	352.325 8, 262.234 5, 293.196 0, 319.180 8	262 691	–	–	–
66	Monacolin K	38.98	C ₂₄ H ₃₆ O ₅	17.7	427.235 7	325.189 5, 275.145 6, 201.179 1, 81.085 1, 373.244 1, 309.189 7	10 949 357	2 569 933	2 367 384	2 153 723
67	ML-236A	39.34	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	0	307.203 2	263.225 1, 163.127 0, 104.086 1, 189.143 4	79 969	–	–	–
68	ML-236C	39.87	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	–6.6	313.175 3	239.251 6, 171.096 6, 95.101 5, 71.100 4	–	82 594	116 386	102 528
69	Monacolin U	40.22	C ₂₂ H ₃₈ O ₅	–6.2	405.263 4	343.198 3, 275.145 6, 239.251 4, 67.068 9, 313.285 9, 331.295 7, 303.210 0	10 721	10 063	11 225	11 940
70	Dihydromonacolin L	41.54	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	–1.4	305.193 6	183.012 2, 253.253 8, 119.050 5, 96.960 3, 59.013 3, 171.103 2	15 005	232 651	272 294	256 969

Continued

Peak No.	Compound name	t_R /min	Formula	Diff ^a / $\times 10^{-6}$	Molecular ion m/z	Fragment ion MS ²	Peak area			
							Lot. No. H20211210	Lot. No. 20211020	Lot. No. 20211040	Lot. No. 20211256
71	Oleanolic acid	41.56	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	-1.1	455.352 6	255.233 1, 421.259 5, 339.200 5, 101.060 6, 370.166 0, 150.988 9	-	5 379	4 266	5 520
72	Monacolin K ethyl ester	42.01	C ₂₆ H ₄₂ O ₆	11.3	473.264 7	184.089 5, 104.122 9, 86.111 9, 125.016 1, 225.178 4, 339.300 5	45 804	8 625 390	8 994 605	8 377 235
73	Dihydromonacolin K	42.9	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	4.5	429.251 9	327.204 7, 227.194 2, 145.117 3, 105.085 8, 73.061 6, 388.347 7, 287.213 5, 269.203 5	5 339 528	11 652 522	10 612 139	12 123 037
74	Robustadiol A	43.03	C ₂₃ H ₃₀ O ₅	-0.9	385.201 7	339.201 4, 303.103 1, 311.166 6, 209.118 1, 150.989 0, 119.050 0, 263.105 8, 299.258 3	905 113	240 302	478 813	494 002
75	Dehydromonacolin K	44	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	0.1	409.224 4	307.175 5, 207.129 1, 155.100 6, 143.101 3	5 243 291	12 547 357	11 949 148	11 768 099
76	Stigmasterin	44.61	C ₂₉ H ₄₈ O	7.8	413.365 3	388.347 8, 276.282 2, 184.089 5, 146.998 5, 73.061 7	12 845	18 652	60 728	34 148
77	Linoleic acid	44.75	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	0.5	279.213 9	237.149 5, 139.076 6, 84.938 7	2 703 347	11 519 718	11 277 397	10 979 486
78	Rotiorinol A	44.99	C ₂₃ H ₂₆ O ₅	9	381.174 2	281.248 5, 183.012 3, 171.006 5, 96.966 7, 139.076 5, 255.233 0, 325.183 9, 364.170 5	-	732 997	644 250	612 424
79	6- α -O-Ethyl-4,6-dihydromonacolin L	45.11	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	-6.4	349.236 2	183.012 3, 171.006 5, 152.995 9, 78.958 7, 96.966 7, 119.050 0, 151.076 4, 231.066 3	-	246 598	231 563	222 912
80	Ursolic acid	45.41	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	0.2	455.353 2	281.248 5, 411.206 8, 352.155 5, 325.183 6, 253.091 4, 163.112 7	-	22 599	22 305	22 527
81	Ergosterol	46.8	C ₂₈ H ₄₄ O	3.8	419.330 1	352.350 8, 313.191 3, 247.162 3, 67.068 9, 173.148 4, 157.117 2	-	15 471	11 298	11 257
82	α,β -Dehydrodihydromonacolin K	50.87	C ₂₄ H ₃₆ O ₄	19.8	411.258 7	331.185 3, 287.213 8, 201.179 4, 145.117 4, 309.194 2, 241.209 7, 131.101 8	-	5 260 974	4 310 157	4 252 835

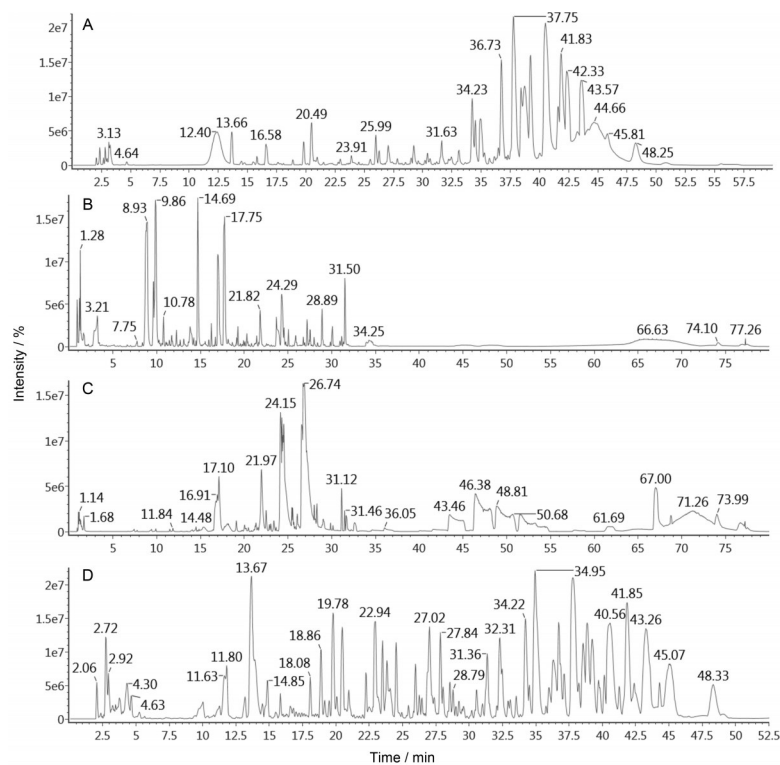


Figure 1 Optimization of different column and eluent systems. A: Cosmosil 5C18-MS-II column with isopropanol elution system; B: Waters UPLC BEH C18 column with methanol/acetonitrile elution system; C: Waters UPLC HSS T3 column with methanol/acetonitrile elution system; D: Cosmosil 5C18-MS-II column with methanol/acetonitrile elution system

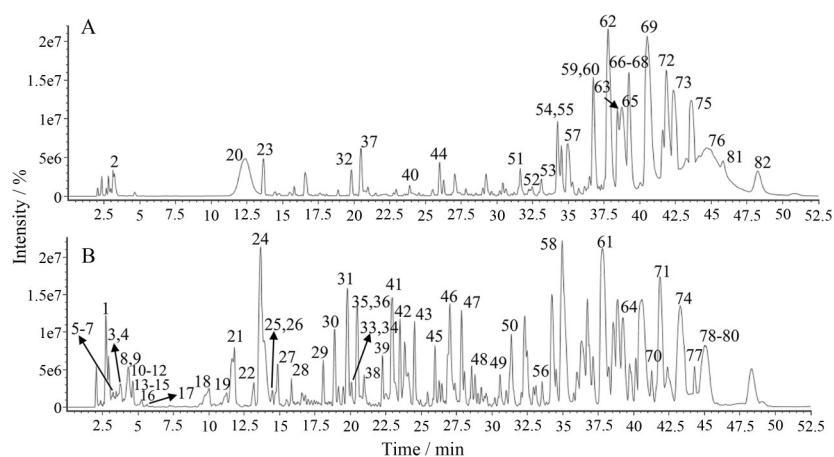


Figure 2 Base peak ion chromatogram of Xuezhikang Capsula (Lot No. 20211256) testing sample analysis in ESI⁺ (A) and ESI⁻ (B) mode (The numbers in Figure 2 correspond to the peak No. in Table 2)

2.2 红曲色素类化合物鉴定 红曲色素是红曲霉在生长代谢过程中产生的天然色素。血脂康胶囊中的红曲色素是多种色素成分的混合物，主要类型为红色素，是一种天然色素，安全性高，具有广泛的生物学活性，包括抗菌、抗癌等^[9]，其内源性衍生物能够抑制脂肪酶，调节脂质代谢，预防动脉粥样硬化，是血脂康胶囊的主要化学成分之一。本研究中共鉴定到红曲色素类成分 7 种，以化合物 63 为例，其保留时间为 38.33 min，极性较弱，在正离子模式下准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 为 359.172 1，匹配其分子式为 $C_{21}H_{26}O_5$ ，质量偏差 -1.5 ppm，在二级质谱图中可见其主要碎片离子为 m/z 215.122 8、

187.125 4、184.085 6、159.134 2，其主要裂解途径包括呋喃环裂解产生的 m/z 215.122 8，随后脱甲基产生 m/z 187.125 4，另一条裂解途径为呋喃环裂解产生的另外一部分碎片离子 m/z 187.125 4，随后脱甲基产生 m/z 159.134 2。基于此推测其质谱裂解途径如图 3 所示，该裂解途径与 UNIFI 软件给出的化合物匹配结果和碎片离子结构预测结果一致，结合其极性特征和分子式匹配结果，推测该化合物为红曲素。

2.3 莫纳可林类化合物鉴定 莫纳可林类化合物是红曲霉中分离提取的一类代谢物，具有低毒性、高效力的特点^[16]，其结构与 HMG-CoA 还原酶相似，可以竞争

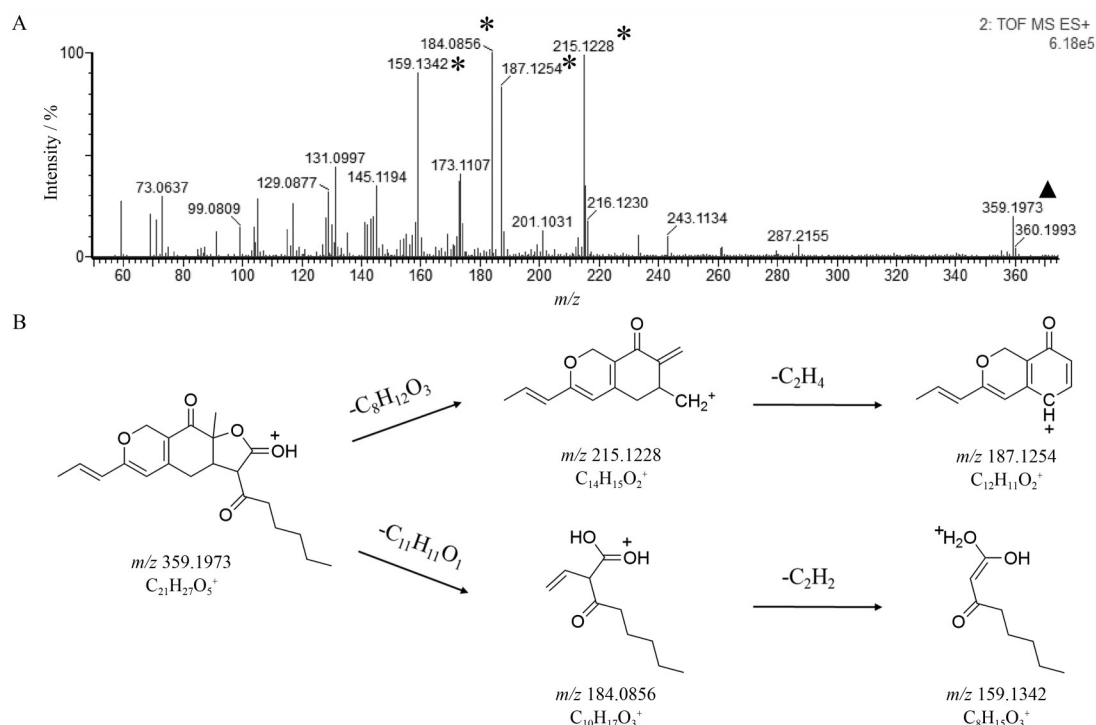


Figure 3 MS spectrum in high energy scan mode (A) and fragmentation pathway (B) of feature peak 63 in positive ion mode (▲: Precursor ion; *: Fragment ions)

性抑制该酶参与胆固醇合成, 从内源性代谢途径上减少胆固醇, 从而达到降低血脂的目的^[2,17]。与洛伐他汀相比, 以莫纳可林K为代表的莫纳可林类化合物生物利用度更高、降胆固醇效率更高、不良反应更少, 是血脂康胶囊发挥降血脂效果的主要药理成分。本研究中鉴定到莫纳可林及其代谢物共24种, 以特征峰75为例, 其保留时间为44 min, 极性较小, 在正离子模式下准分子离子峰 m/z 为409.224 4, 属加钠峰, 匹配其分子式为 $C_{24}H_{34}O_4$, 质量偏差0.1 ppm, 在二级质谱图中可见其主要碎片离子为 m/z 307.175 5、207.129 1、155.100 6、143.101 3, 其主要裂解途径包括C环裂解重排的逆狄尔斯-阿德尔 (RDA) 反应产生 m/z 307.175 5、207.129 1, 随后进一步脱烷基形成 m/z 155.100 6、143.101 3, 基于此推测其质谱裂解途径如图4所示, 该裂解途径与UNIFI软件给出的化合物匹配结果和碎片离子结构预测结果一致, 结合其极性特征和分子式匹配结果, 推测该化合物为脱氢莫纳可林K。

2.4 黄酮类化合物鉴定案例 黄酮类化合物是广泛存在于自然界植物中的一类化合物, 属于植物的次生代谢产物。具有抗自由基、抗氧化、提高机体免疫力以及抗炎镇痛的作用^[18]。本研究中鉴定到5种黄酮类化合物, 以特征峰40为例: 其保留时间为23.27 min, 极性中等, 在正离子模式下准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 为271.072 8,

匹配其分子式为 $C_{15}H_{11}O_5$, 质量偏差0 ppm, 在二级质谱图中可见其主要碎片离子为 m/z 253.064 6、243.079 4、215.084 4、153.035 7、91.069 9, 其中 m/z 253.064 6 为黄酮苷元典型的脱水产生的碎片离子, 而 m/z 243.079 4、215.084 4、153.035 7 则为RDA反应产生的碎片离子, 经过进一步开环重排产生 m/z 91.069 9, 基于此推测其质谱裂解途径如图5所示, 符合文献^[19]报道的黄酮类化合物的质谱裂解规律。参考UNIFI软件给出的化合物匹配结果和碎片离子结构预测, 结合标准品保留时间的进一步手动确证, 推测该化合物为染料木素。

2.5 有机酸类化合物鉴定案例 天然有机酸类化合物广泛分布于自然界植物中, 主要包括脂肪族有机酸和芳香族有机酸两大类, 常见的有柠檬酸、绿原酸、原儿茶酸、齐墩果酸等, 具有抗菌、抗炎、抗氧化等多种生理学活性^[20]。本研究中鉴定到33种有机酸类化合物, 其在血脂康胶囊中分布广泛, 来源多样, 是构成血脂康胶囊药理学活性的重要部分。以特征峰13为例: 其保留时间为4.14 min, 极性高, 在负离子模式下准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 为191.019 7, 具有典型的极性有机酸色谱质谱特征, 匹配其分子式为 $C_6H_8O_7$, 质量偏差0.3 ppm, 在二级质谱图中可见其主要碎片离子为 m/z 173.007 7、111.008 3、96.957 3、 m/z 87.006 1, 其中 m/z 173.007 7 为典型的有机酸脱水产生的碎片离子, 随后进一步发生脱

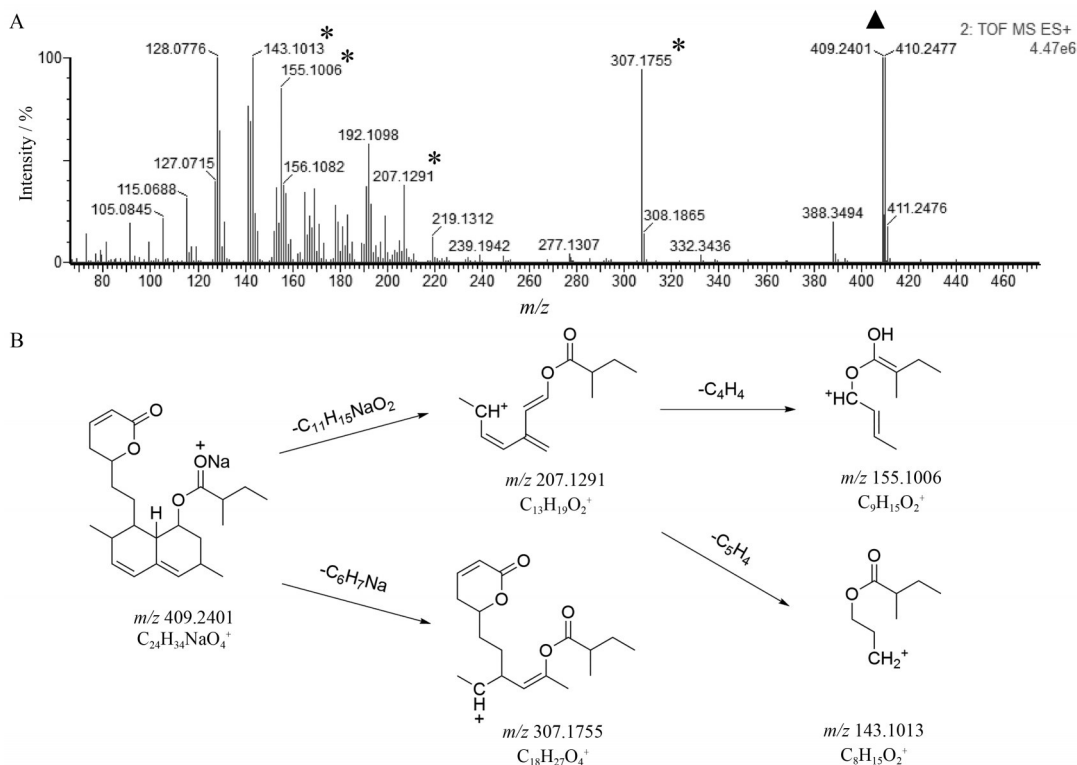


Figure 4 MS spectrum in high energy scan mode (A) and fragmentation pathway (B) of feature peak 75 in positive ion mode (▲: Precursor ion; *: Fragment ions)

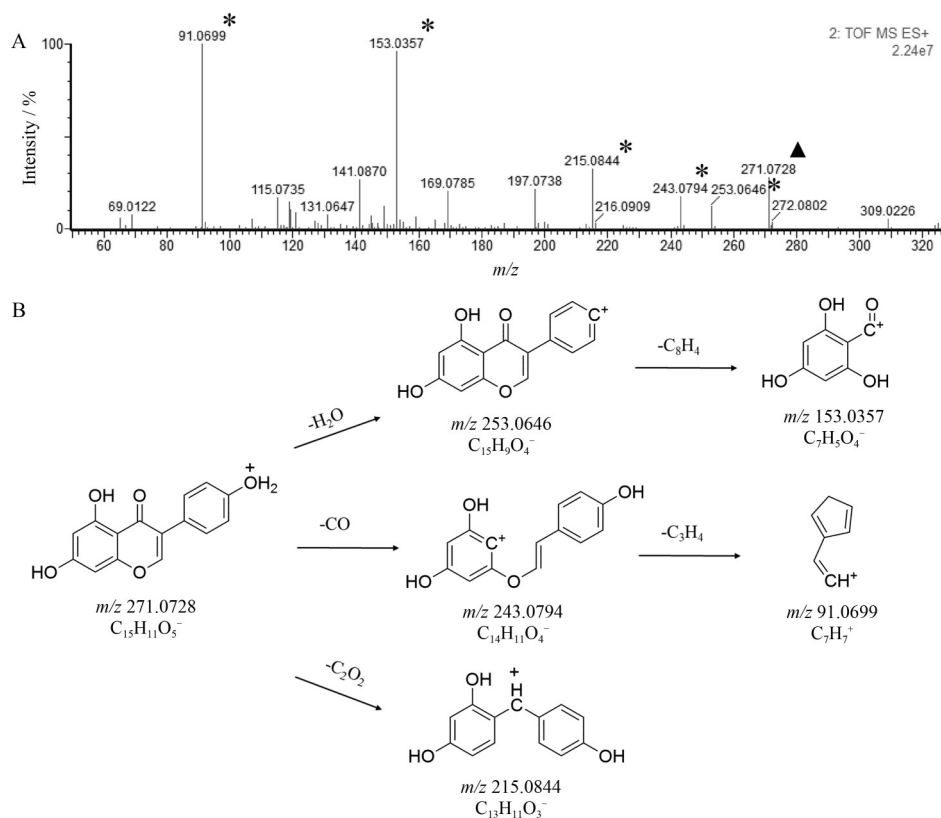


Figure 5 MS spectrum in high energy scan mode (A) and fragmentation pathway (B) of feature peak 40 in positive ion mode (▲: Precursor ion; *: Fragment ions)

甲基、脱羧基等反应产生其他碎片离子, 基于此推测其质谱裂解途径如图6所示, 符合文献^[21]报道的有机酸类化合物质谱裂解规律。参考UNIFI软件给出的化合物匹配结果和碎片离子结构预测, 推测该化合物为柠檬酸。

2.6 他汀类药物鉴定案例 他汀类药物能抑制内源性胆固醇合成, 降低包括总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白的血清水平^[22], 是血脂康胶囊发挥抗高脂血症和动脉粥样硬化引起的心血管疾病

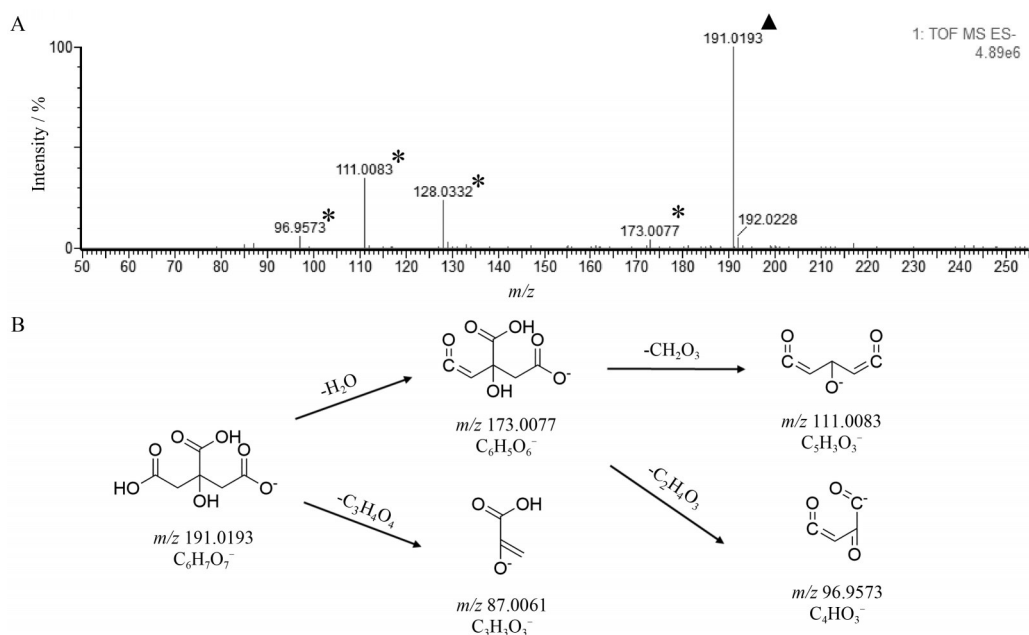


Figure 6 MS spectrum in high energy scan mode (A) and fragmentation pathway (B) of feature peak 13 in positive ion mode (▲: Precursor ion; *: Fragment ions)

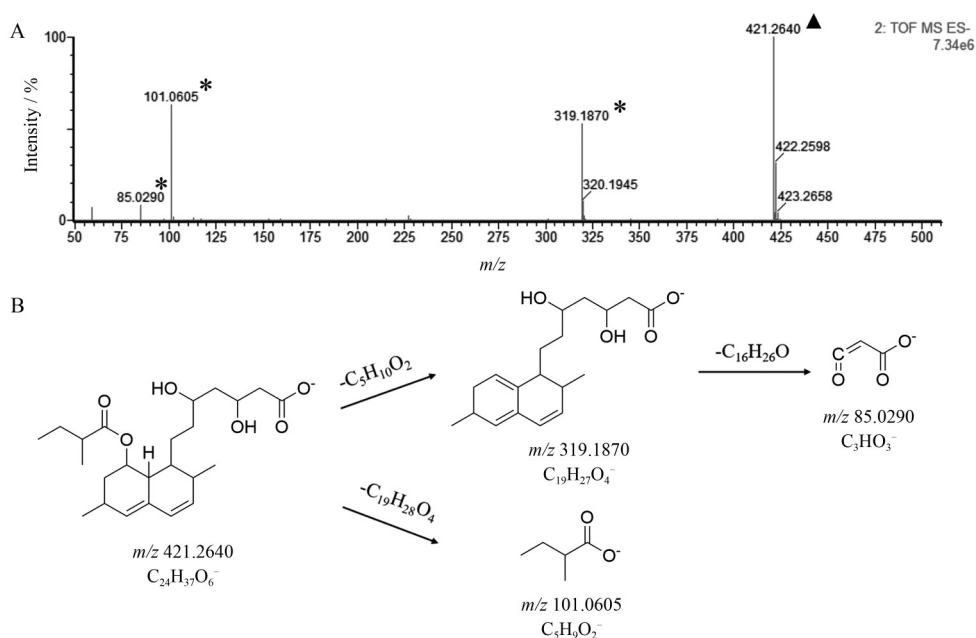


Figure 7 MS spectrum in high energy scan mode (A) and fragmentation pathway (B) of feature peak 58 in positive ion mode (▲: Precursor ion; *: Fragment ions)

治疗的主要药效成分之一,常作为血脂康胶囊的主要质控成分。以特征峰 58 为例:其保留时间为 35.38 min,极性较小,在负离子模式下准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 为 421.264 0,匹配其分子式为 $C_{24}H_{38}O_6$,质量偏差 -0.5 ppm,在二级质谱图中可见其主要碎片离子为 m/z 319.187 0、101.060 5、85.029 0,其中 m/z 319.187 0 及 m/z 101.060 5 为脱酯基产生的两部分主要碎片离子, m/z 319.187 0 随后产生多氢萘环断裂形成 m/z 85.029 0。基于此推测其质谱裂解途径如图 7 所示,参考 UNIFI 软件给出的化合物匹配结果和碎片离子结构预测,推测该化合物为洛伐他汀酸。

讨论

传统中药制剂化学物质基础复杂,手动对质谱原始数据进行处理费时费力,难以挖掘有用的信息。本研究采用 UNIFI 进行了血脂康胶囊的全面、快速、准确、高效的 LC-MS 数据分析和天然产物成分的鉴定工作,基于所建立的 UHPLC-ESI-QTOF/MS^E 分析方法,整合自建 UNIFI 数据库,在多批次血脂康胶囊和红曲原料中鉴定到 82 种组分,包括 33 种有机酸类化合物、24 种莫纳可林类化合物、7 种红曲色素类化合物、7 种他汀类化合物、5 种黄酮类化合物、4 种糖类化合物和 2 种甾醇类化合物,对于核心种类化合物采用质谱碎裂途径分析验证了该 UNIFI 软件工作流程的可行性和准确性,其中多种莫纳可林类化合物为首次采用 LC-MS 工作流程实现鉴定。在鉴定到的化合物中,莫纳

克林类化合物主要发挥降血脂作用^[17],红曲色素类则具有抗高血压、冠心病、糖尿病、动脉粥样硬化等生理学活性^[9],而同时检测到的黄酮、有机酸等化合物则发挥着抗菌、抗炎、抗氧化等功能^[18,20],充分印证了传统中药制剂多组分协同作用的药理学机制。首次通过 LC-MS 技术细致分析并阐明了血脂康胶囊的化学物质基础,在化合物覆盖范围、测试准确度、工作流程自动化等方面显著优于现有方法^[16,22-24]。本研究为基于网络药理学的关键质量属性辨识提供了实验基础,为血脂康胶囊的关键质量属性控制和一致性评价提供扎实的数据支持,为基于血脂康胶囊的药效物质基础研究和基于红曲的安全性研究等提供支撑。

在实验技术方面,由于本研究采用的基于 UNIFI 软件自建数据库和检索的工作流程仍无法在没有标准品的情况下准确区分同分异构体特征峰归属,对于莫纳可林类同分异构体,本研究通过标准品的保留时间标定其中一种化合物,如莫纳可林 M,进而将其他保留时间位置的特征峰标记为莫纳可林 M 的同分异构体二氢莫纳可林 K。但对于部分有机酸,如绿原酸、熊果酸等,其同分异构体在该色谱体系中难以产生有效的基线分离,因此只能通过优化质谱方法,得到更丰富的碎片离子进行解析,并尝试通过离子淌度技术对同分异构体实现基线分离,但目前该设备开启离子淌度后的数据采集仍存在降低分析灵敏度,丢失低丰度信息等核心技术难题,需要在今后的研究中进一步优化方法,实现同分异构体的解析和验证,更好地为中药制造

全流程提供质量控制支持。

作者贡献: 田国芳负责数据库构建、样品测试及文章撰写; 薛岚负责样品制备及文献查询; 刘曦负责课题监管及文章修改; 裴欢负责样品制备; 唐煜负责课题监管、文章撰写、文章审阅及技术指导。

利益冲突: 本文中所有作者声明无任何利益冲突。

References

- [1] Li XM, Shen XH, Duan ZW, et al. A new monacolin analogue from Xuezhikang Capsule [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2011, 46: 564-567.
- [2] Ma XM, Guo SR, Duan ZW, et al. Chemical constituents of Xuezhikang Capsula [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2007, 38: 650-652.
- [3] Li J, Zhu Y, Wang K. Clinical study on Xuezhikang Capsules combined with pravastatin in treatment of chronic heart failure [J]. Drugs Clin (现代药物与临床), 2022, 37: 2276-2280.
- [4] Meng TT, Xie XL, Li TT, et al. Oral Chinese patent medicine combined with statins in treatment of dyslipidemia: a network meta-analysis [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 1092-1104.
- [5] Ye F, Yu ZH, Yang JH, et al. Effect of Xuezhikang Capsule in treatment of coronary heart disease and its influence on vascular endothelial function and heart function [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2022, 40: 180-183.
- [6] Zhou K, Ding BH. Clinical observation on Xuezhikang Capsule for 116 cases of coronary heart disease with abnormal blood lipid [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2007, 48: 992-993.
- [7] Yang Z, Zhao JX, Zhang YG. Anti-neoplastic effect of Xuezhikang *in vitro* [J]. J Tradit Chin Med (中医杂志), 2008, 49: 1019-1022.
- [8] Li B, Hu SY, Wu X, et al. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of Xuezhikang capsule on patients with coronary heart diseases [J]. Prog Mod Biomed (现代生物医学进展), 2011, 11: 2289-2291.
- [9] Jiang YQ, Dong YJ, Zhou FJ, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological action and clinical application of Fermentum Rubrum [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 7379-7388.
- [10] Tang Y, Zhang JL. Recent developments in DNA adduct analysis using liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2020, 43: 31-55.
- [11] Ji H, Xu Y, Lu H, et al. Deep MS/MS-aided structural-similarity scoring for unknown metabolite identification [J]. Anal Chem, 2019, 91: 5629-5637.
- [12] Tang Y, Chen X, Wang D, et al. Discover and identify unknown alkylation DNA adducts induced by sulfonates using prediction driven-MRM-profiling strategy [J]. Talanta, 2021, 222: 121500.
- [13] Yuan FL, Liu CX, Wang Q, et al. Rapid detection and identification of compounds in Jiuwei Zhenxin Granules based on UPLC-Q-TOF/MS^E and UNIFI software [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2020, 43: 1997-2008.
- [14] Wang ML, Zhang QQ, Fu S, et al. Characterization of *Morinda officinalis* How. by UPLC-Q-TOF MS^E coupled with UNIFI database filter [J]. J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报), 2017, 38: 75-82.
- [15] Wu H, Tang MX, Tao XY, et al. Rapid identification of chemical constituents in cinobufacini injection by UPLC-ESI-QTOF/MS^E combined with UNIFI informatics platform [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32: 498-506.
- [16] Li YG, Zhang F, Wang ZT, et al. Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 35: 1101-1112.
- [17] Li XM, Shen XH, Duan ZW, et al. Advances in studies on secondary metabolites from *Monascus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2011, 42: 1018-1025.
- [18] Li XP, Yu MX, Kuang RT, et al. Research progress on the anti-tumor effect of flavonoid derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2021, 56: 913-923.
- [19] Ding YT, Zheng ZH, Zhao RY, et al. Rapid identification of chemical constituents in *Psoralea coryifolia* by UPLC-Q-TOF-MS^E combined with UNIFI informatics platform [J]. J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报), 2018, 39: 729-745.
- [20] Yu S, Zhang L, Shan MQ, et al. Simultaneous determination of eight organic acids in Chaenomelis Fructus by UFLC-MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 2465-2469.
- [21] Wang YC, Dong JX, Li JG, et al. Rapid analysis of chemical components of Wenjing Decoction Standard Decoction based on UPLC-Q-TOF/MS technology combined with UNIFI database [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2022, 39: 639-652.
- [22] Li XM, Xue L, Fu P, et al. Determination of lovastatin and lovastatin acid in Xuezhikang Capsules by HPLC [J]. China Pharm (中国药师), 2012, 15: 164-166.
- [23] Li Y, Sun X. Simultaneous content determination of 8 components in Xuezhikang Capsules by HPLC-DAD [J]. China Pharm (中国药房), 2019, 30: 2066-2070.
- [24] Tu WQ, Zhang LJ, Xu ZZ. Simultaneous determination of three constituents in Yixin Xuezhikang Capsules by HPLC [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2017, 39: 316-319.