

静电场轨道阱高分辨质谱技术在壮药痛风立安胶囊中的定性应用

廖强¹, 陈松^{2*}, 李运容², 黎丽², 韦环³ (1. 广西壮族自治区食品药品审评查验中心, 南宁 530022; 2. 广西国际壮医医院, 南宁 530200; 3. 广西-东盟食品检验检测中心, 南宁 530022)

摘要:目的 利用静电场轨道阱高分辨质谱技术(Orbitrap HRMS), 建立壮药制剂痛风立安胶囊的高通量定性筛查方法。方法 液相部分采用 GOLD C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm) 色谱柱, 以体积分数 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈为流动相梯度洗脱, 流速 0.3 mL · min⁻¹, 进样量 3 μL; 柱温 35 °C; 质谱部分采用 HESI 离子源, Full MS/dd-MS² 模式, 离子扫描范围 100 ~ 1 500, 顶点激发 2 ~ 8 s。结果 通过 Orbitrap HRMS 的高通量筛查方法共筛选出 49 个化合物, 包括苯丙素类 19 个, 萜类 11 个, 有机酸类 10 个, 酚类 3 个, 蒽醌类 2 个, 生物碱及维生素类 2 个, 糖及糖醇类 2 个, 其中有 46 个化合物为从痛风立安胶囊中首次鉴定得到。结论 通过 Orbitrap HRMS 技术采集的高分辨率数据建立的方法, 首次对痛风立安胶囊进行了全面的定性表征, 为其多组分分析应用及质量标准提升、药效研究提供了物质基础及新的科学研究依据和参考。

关键词: 静电场轨道阱; 高分辨质谱; 痛风立安胶囊; 壮药; 定性; 苯丙素类; 萜类; 有机酸类

doi:10.11669/cpj.2024.14.010 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)14-1339-08

Qualitative Analysis of Zhuang Medicine Tongfeng Li'an Capsule by Q-Exactive Orbitrap HRMS Mass Spectrometry

LIAO Qiang¹, CHEN Song^{2*}, LI Yunrong², LI Li², WEI Huan³ (1. Guangxi Center for Food and Drug Evaluation and Inspection, Nanning 530022, China; 2. Guangxi International Zhuang Medicine Hospital, Nanning 530200, China; 3. Guangxi-Asean Food Inspection Center, Nanning 530022, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a high-throughput qualitative analysis method for the Zhuang medicine Tongfeng Li'an Capsule use by Q-exactive orbitrap HRMS mass spectrometry. **METHODS** HPLC part on GOLD C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.9 μm) and the gradient elution was performed with mobile phase consisting of 0.1% formic acid acetonitrile - 0.1% formic acid aqueous solution. Flow velocity was 0.3 mL · min⁻¹, injection volume was 3 μL, column temperature was maintained at 35 °C, mass spectrometry part used HESI ion source, Full MS/dd-MS² mode, ion scan range 100 - 1 500, vertex excitation for 2 - 8 s. **RESULTS** A total of 49 compounds were identified from Tongfeng Li'an Capsule by orbitrap HRMS, including 19 phenylpropanoids, 11 terpenes, 10 organic acids, 3 phenols, 2 anthraquinone, 2 alkaloids and vitamins, and 2 sugars and glycols. Among them, 46 compounds were identified for the first time from Tongfeng Li'an Capsule. **CONCLUSION** Data for high-resolution gather with orbitrap HRMS method was the first time comprehensive qualitative characterization conducted on Tongfeng Li'an Capsule, This provides a material basis and new scientific research basis and reference for its multi-component analysis application, quality standard improvement, and pharmacological research.

KEY WORDS: Q-exactive orbitrap; HRMS mass spectrometry; Tongfeng Li'an Capsule; Zhuang medicine; qualitative analysis; phenylpropanoid; terpene; organic acid

痛风立安胶囊(壮文名称:约黑尹, Ywhei qin) 为广西十大民族药院内制剂品种, 是由裸蒺(肿节风)、裸阴阳莲(虎杖)、构金银(忍冬藤)、构党马(粉萆薢)、哑腿马(车前草)、把拉缓(徐长卿)、裸缓坡(透骨草)、甘草(甘草)等 8 味药制成, 在壮医

中具有清热毒、除湿毒、祛风毒、消肿痛等功效, 适用于风湿热毒所致的隆炭(痛风)。痛风是由于体内尿酸过饱和沉积在关节局部等从而诱发炎症反应和组织破坏的进展性代谢疾病, 存在高发性、致残性和反复性等特点^[1], 目前在临床中多采用的降尿酸

基金项目: 黄瑞松全国老中医药专家传承工作室科研项目资助; 广西中医药大学校级科研项目资助(2023MS040); 广西国际壮医医院引进人才科研启动项目资助(GZ2023RC007); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目资助(zyyzdxk-2023165); 广西壮族自治区中医药管理局中药壮瑶药医院制剂质量提升项目资助(GZZJ202014)

作者简介: 廖强, 男, 硕士, 副主任药师 研究方向: 药品质量分析及审评 * **通讯作者:** 陈松, 男, 硕士, 副主任药师 研究方向: 药品工艺及制剂生产 Tel: (0771) 3376676

化学药物主要有非布司他、别嘌醇、苯溴马隆、秋水仙碱、非甾体抗炎药和糖皮质激素等^[2],然而长期使用这些药物容易导致胃肠道、肾功能损伤等不良反应。中医及民族医在辨证论治及整体观念治疗痛风方面有其独特的优势。

现代的中医将痛风归为痹证的范畴,属于湿热型痹症,而壮医学认为,痛风是由风毒、湿毒、热毒、酸毒等邪毒入侵造成^[3],痛风立安胶囊是根据壮医民族药的基本理论,采取排毒扶正的方法并经过长期临床实践和反复的药物筛选研制而成。经查阅文献,壮药痛风立安胶囊基于药理学对痛风的抗炎作用及临床机制研究已有报道^[4-5],研究表明痛风立安胶囊可能主要通过木犀草素、槲皮素调控痛风病程中多个靶点,从而抑制细胞因子活性、氧化还原反应及组织炎性渗出等来治疗痛风^[6],但未见有关该制剂处方中药材成分及进行多组分同时测定或指纹图谱等相关分析研究报道。因此,对制剂的组分进行分析具有重要意义。四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱联用技术(Orbitrap HRMS)近年来在中药化合物分析领域得到了快速发展,由于其高通量、高灵敏度的特性在食品、化妆品、环境等检测行业均得到广泛应用^[7-8]。Orbitrap HRMS 技术与常见的四级杆/飞行时间质谱技术(Q-TOF)相比无须实时校准,且最低仅需进行1次全扫描分析即可获得满足分析的高分辨数据,即使没有预先对目标化合物进行条件优化,也可对样品中可能存在的化合物同时进行高通量的定性筛查^[9-10]。

本研究使用 Orbitrap HRMS 技术对痛风立安胶囊制剂中的活性成分进行定性筛查,并对其活性成分的结构进行归属,建立了该制剂中化合物分析的物质基础,为该制剂的质量控制及药代学等研究提供了一套有效、完整、可控的分析方法。

1 仪器与试剂

四极杆/静电场轨道阱高分辨率质谱仪(Orbitrap HRMS,美国 Thermo Fisher 公司);XA205DU 电子分析天平(十万分之一,德国 Sartorius 公司);KQ-1000B 超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司);Milli-Q 型超纯水仪(美国密理博公司)。

对照品:芦荟大黄素(批号:110795-202011,按 97.5% 计)、毛蕊花糖苷(批号:111530-201914,按 95.2% 计)、没食子酸(批号:110831-201906,按 91.5% 计)、木犀草苷(批号:111720-201810,按 93.5% 计)、绿原酸(批号:110753-202119,按 96.3% 计)、薯蓣皂苷(批号:111707-201703,按

96.1% 计)、原儿茶酸(批号:110809-201906,按 97.7% 计)、原儿茶醛(批号:110810-201909,按 99.6% 计)、虎杖苷(批号:111575-201603,按 100% 计)、夏佛塔苷(批号:111912-202204,按 94.9% 计)、芦丁(批号:100080-202012,按 92.2% 计)、丹皮酚(批号:110708-201908,按 99.8% 计)、甘草酸铵(批号:110731-202122,按 94.4% 计)、枸橼酸(批号:111679-201602,按 97% 计,中国食品药品检定研究院);标准物质:莽草酸(批号:AL210416-11,纯度 99.05%,Stanford Chemicals),烟酰胺(批号:F0059076,纯度 99.9%,BePure);痛风立安胶囊(12 粒×3 板,批号:20200615,广西国际壮医医院);乙腈、甲酸为色谱纯,水为超纯水,其他试剂为分析纯。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品储备液 分别称取对照品芦荟大黄素、毛蕊花糖苷、没食子酸、木犀草苷、绿原酸、薯蓣皂苷、原儿茶酸、原儿茶醛、虎杖苷、夏佛塔苷、芦丁、丹皮酚、甘草酸铵、枸橼酸、莽草酸、烟酰胺各约 10 mg,精密称定,分别置于 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释制成约 0.1 mg·mL⁻¹的对照品储备液。

2.1.2 混合对照品溶液 分别精密吸取“2.1.1”项下各对照品储备液 1 mL 置于同一个 100 mL 量瓶中,使用甲醇稀释,最终制成含各对照品质量浓度约 1 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液 取装量项下的痛风立安胶囊样品,用研钵将样品研细,精密称取样品粉末 1.0 g,加入体积分数 50% 甲醇 50 mL,超声处理(功率 200 W,频率 50 kHz)30 min,摇匀过滤,取续滤液经过 0.22 μm 针孔滤膜过滤,即得。

2.2 色谱及质谱条件

色谱条件:Thermo Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.9 μm);以乙腈(含体积分数 0.1% 甲酸)为流动相 A,体积分数 0.1% 甲酸水溶液为流动相 B,梯度程序:0~2.0 min,5% A;2.0~42.0 min,5%~95% A;42.0~47.0 min,95% A;47.0~50 min,95%~5% A;柱流速为 0.3 mL·min⁻¹;进样体积 3 μL;柱温 35 °C。

质谱条件:离子源采用 Heated ESI 源,正、负离子同时采集,喷雾电压: +3.5 kV、3.2 kV,离子传输管温度:320 °C,鞘气流速:35 μL·min⁻¹,辅助气温度:300 °C,辅助气体流速:10 μL·min⁻¹,数据采集模式:Full MS/dd-MS²扫描模式:一级全扫描质谱选择分辨率 70 000 FWHM,二级质谱选择 17 500

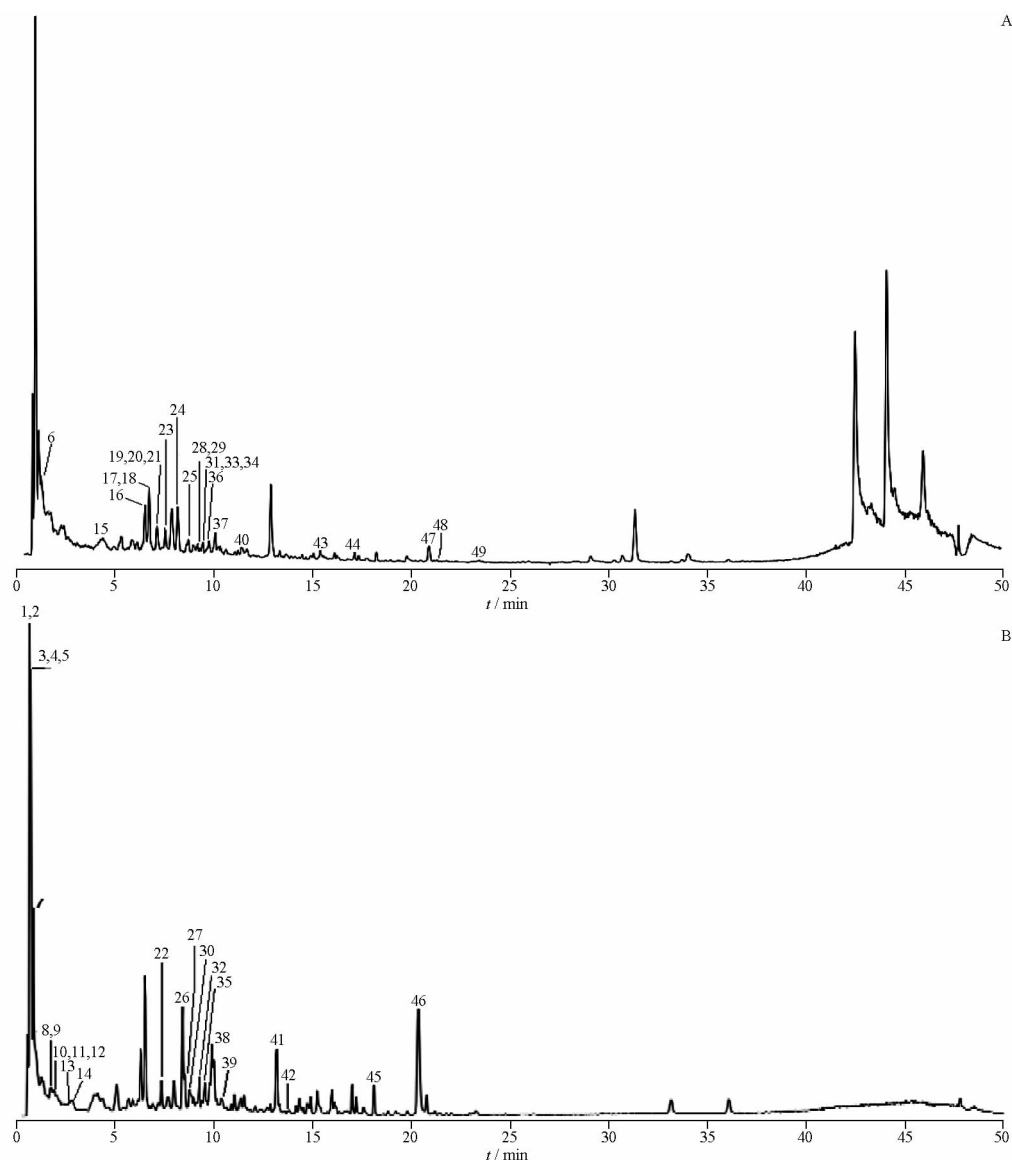
FWHM, m/z 扫描范围为 100 ~ 1 600, 顶点激发时间 6 ~ 8 s, 动态排除 6 s, 特定离子扫描模式为 off。

2.3 数据处理与结构分析

将“2.1”项下溶液进样后, 首先通过 Xcalibur 软件根据高分辨一级谱图数据提供的精确相对分子质量进行初步推测并判断其加荷方式, 再利用 Tracefinder 软件在 mzCloud 和 mzVault 数据库中进行二级谱图匹配, 对于匹配分数 ≥ 70 的成分, 其中一部分化合物通过进行对照品的对比准确鉴定, 另一部分使用 Compound Discoverer 软件并结合文献报道^[11-12]、Chemical Book、Mass Bank 等数据库提供的信息, 进一步通过碎片信息及裂解规律进行结构鉴定。

3 结果与分析

痛风立安胶囊供试品使用静电场轨道阱高分辨质谱技术采集到的总离子流图见图 1。根据“2.3”项下的数据处理方法得到的分析结果, 共鉴定出 49 个化合物, 包括苯丙素类 19 个, 萜类 11 个, 有机酸类 10 个, 酚类 3 个, 蒽醌类 2 个, 生物碱及维生素类 2 个, 糖及糖醇类 2 个, 除去已有文献报道的化合物异嗪皮啶、芦荟大黄素、大黄素-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷外, 其中有 46 个化合物为从痛风立安胶囊中首次鉴定得到, 有 16 个化合物经过与对照品比对而准确鉴定, 并系统归纳分析了各化合物在组方药物中的归属情况, 结果见表 1。



A - 正离子模式; B - 负离子模式; 图中各峰序号与表 1 中化合物序号相对应。

A - positive ion mode; B - negative ion mode; Each peak number in the figure corresponds to the compound number in Tab. 1.

图 1 痛风立安胶囊供试品总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of compound Tongfeng Li'an Capsule

表1 痛风立安胶囊化合物定性结果

Tab. 1 Qualitative results of Tongfeng Li'an Capsules compounds

No.	Compound (in Chinese)	Category	CAS	⁴ R /min	Molecular formula	Mode	m/z			Secondary fragment	Source
							Theory	Actual	Deviation		
1	Quinic acid (右旋奎宁酸)	organic acids	77-95-2	0.64	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	191.056 11	191.056 08	-0.17	127.04, 109.029, 93.034 1, 85.029	Sarcandrae Herba, Lonicerae Japonicae Caulis, Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma, Herba Clematidis
2	Sucrose (蔗糖)	sugars and glycols	57-50-1	0.64	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	341.108 93	341.108 98	0.14	179.056 7, 89.024 4	Lonicerae Japonicae Caulis, Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma, Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix
3	Mannitol (甘露醇)	sugars and glycols	87-78-5	0.67	C ₆ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	181.071 76	181.071 64	-0.66	101.024 5, 89.024 5, 71.013 8, 55.018 8	Plantaginis Herba, Herba Clematidis, Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma, Sarcandrae Herba
4	Shikimic acid (莽草酸) ¹⁾	organic acids	138-59-0	0.67	C ₇ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	173.045 55	173.045 07	-2.74	155.034 4, 137.024, 111.044 7, 93.034 2, 83.049 8	Sarcandrae Herba, Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma
5	Citric acid (枸橼酸) ¹⁾	organic acids	77-92-9	0.7	C ₆ H ₈ O ₇	[M-H] ⁻	191.019 73	191.019 81	0.39	111.008 4, 87.008 5, 85.029 3, 57.034 4	Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma, Lonicerae Japonicae Caulis, Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma, Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Plantaginis Herba, Sarcandrae Herba
6	Nicotinamide (烟酰胺) ¹⁾	vitamins	98-92-0	0.94	C ₆ H ₆ N ₂ O	[M+H] ⁺	123.055 29	123.055 58	2.35	106.029, 96.044 9, 95.049 6	Impatiensis Caulis, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix, Lonicerae Japonicae Caulis, Sarcandrae Herba
7	Gallic acid (没食子酸) ¹⁾	organic acids	149-91-7	1.02	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.014 25	169.013 89	-2.15	125.024 1, 107.013 4, 97.029, 81.034 1, 69.034 2	Sarcandrae Herba, Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma, Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix
8	Geniposidic acid (京尼平苷酸)	terpenes	27 741-01-1	1.71	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	373.114 02	373.114 53	1.37	123.044 8, 113.024, 89.024, 87.008 4	Plantaginis Herba, Lonicerae Japonicae Caulis
9	3,4-Dihydroxyphenylethanol (羟基酪醇)	phenols	10 597-60-1	1.78	C ₈ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	153.055 72	153.055 25	-3.05	123.044 9, 108.021 5, 95.013 3, 81.034 3	Plantaginis Herba
10	Cryptochlorogenic acid (隐绿原酸)	organic acids	905-99-7	1.9	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 81	353.087 95	0.4	179.034 8, 155.034 7, 135.044 8, 93.034, 85.029	Lonicerae Japonicae Caulis, Herba Clematidis
11	Chlorogenic acid (绿原酸) ¹⁾	organic acids	327-97-9	1.96	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 81	353.087 92	0.31	163.039 1, 145.028 6, 135.044 3, 111.044 5	Lonicerae Japonicae Caulis, Herba Clematidis, Sarcandrae Herba
12	Protocatechuic acid (原儿茶酸) ¹⁾	organic acids	99-50-3	1.98	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.019 33	153.019 58	1.61	109.029 5, 108.021 8, 81.034 5, 65.039 5	Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix, Lonicerae Japonicae Caulis, Herba Clematidis, Sarcandrae Herba, Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma, Plantaginis Herba
13	Protocatechualdehyde (原儿茶醛) ¹⁾	organic acids	139-85-5	2.63	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.024 42	137.023 93	-3.6	109.029 4, 108.021 7, 93.034 2, 81.034 2, 65.039 6	Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix, Lonicerae Japonicae Caulis, Herba Clematidis, Sarcandrae Herba, Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma, Plantaginis Herba
14	4-Hydroxybenzoic acid (对羟基苯甲酸)	organic acids	99-96-7	2.88	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.024 42	137.023 94	-3.49	93.034 2, 92.919 6, 65.039 3	Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma
15	Paeonol (丹皮酚) ¹⁾	phenols	552-41-0	3.96	C ₉ H ₁₀ O ₃	[M+H] ⁺	167.070 27	167.069 87	-2.39	125.059 5, 121.064 7, 111.044 1, 91.054 2, 84.96, 53.039	Sarcandrae Herba, Lonicerae Japonicae Caulis, Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma
16	Sweroside (獐芽菜苷)	terpenes	14 215-86-2	6.28	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺	359.133 36	359.133 63	-0.91	197.081, 179.070 5, 151.039 3, 127.039 3, 109.065 3	Lonicerae Japonicae Caulis
17	Paeonolide (丹皮酚原苷)	terpenes	72 520-92-4	6.44	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₂	[M+Na] ⁺	483.147 3	483.146 79	-1.05	483.147 7, 441.137 6, 317.084 6, 189.052 4	Cynanchi Paniculati Radix et Rhizoma
18	Loganin (马钱子苷)	terpenes	29 949-72-2	6.5	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	[M+NH ₄] ⁺	408.186 42	408.186 43	0.02	227.093, 127.040 3, 101.024 5, 67.019	Lonicerae Japonicae Caulis
19	(+)-Magnoflorine (木兰花碱)	alkaloids	2 191-49-5	6.85	C ₂₀ H ₂₄ N ₄ O ₄	[M] ⁺	342.169 98	342.169 74	-0.7	297.112 3, 282.089, 265.086, 237.091	Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma
20	Vicenin II (维采宁 II)	phenylpropanoids	23 666-13-9	7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M+H] ⁺	595.165 75	595.165 47	-0.47	391.079 6, 349.070 2, 337.070 2, 325.069 4, 295.059 4	Lonicerae Japonicae Caulis, Herba Clematidis
21	7-Hydroxycoumarin (7-羟基香豆素)	phenylpropanoids	93-35-6	7.04	C ₉ H ₆ O ₃	[M+H] ⁺	163.038 97	163.038 93	-0.27	135.044 5, 119.048 9, 107.049 3, 91.054 5	Plantaginis Herba, Herba Clematidis, Lonicerae Japonicae Caulis
22	Secoyloganin (断氧化马钱苷)	terpenes	58 822-47-2	7.33	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	403.124 58	403.124 45	-0.32	123.045, 121.029 3, 111.008 4, 101.024 3, 95.049 8, 89.024, 71.013 4, 69.034 2	Lonicerae Japonicae Caulis
23	4-Methyl-6,7-dihydroxycoumarin (异黄岩亭或6,7-二羟基-4-甲基香豆素)	phenylpropanoids	776-86-3 529-84-0	7.34	C ₁₀ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	193.049 54	193.049 44	-0.52	165.054 2, 147.043 9, 137.059 8, 123.043 9, 119.049 5	Lonicerae Japonicae Caulis, Herba Clematidis, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma
24	Schaftoside (复佛塔苷) ¹⁾	phenylpropanoids	51 938-32-0	8.01	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M+H] ⁺	565.155 18	565.155 4	0.38	403.080 8, 391.08, 379.080 7, 361.069 3, 337.069 5, 325.069 4, 307.059 7, 295.058 9	Impatiensis Caulis, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma, Plantaginis Herba
25	(-)-Syringaresinol di-O-glucoside (丁香树脂醇双葡萄糖苷)	phenylpropanoids	66 791-77-3	8.43	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₈	[M+NH ₄] ⁺	+760.302 24	760.301 45	-1.03	383.148 4, 330.109 3, 265.106 7, 217.085 7, 205.085 7, 167.070 1	Impatiensis Caulis, Lonicerae Japonicae Caulis
26	Polydatin (Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix 苷) ¹⁾	phenylpropanoids	27 208-80-6	8.51	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	[M-H] ⁻	389.124 19	389.126 01	4.66	389.1 243, 227.072, 185.061 3, 143.050 2	Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix
27	Plantamajoside (大车前苷)	phenylpropanoids	104 777-68-6	8.65	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	[M-H] ⁻	639.193 06	639.195 19	3.33	315.108 5, 179.034 8, 161.023 8, 133.029 2, 113.024, 71.013 5	Plantaginis Herba
28	Isorafixinin (异嗪皮啶)	phenylpropanoids	486-21-5	8.66	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	223.060 1	223.06	-0.45	208.036 7, 190.026, 163.038 9, 135.044, 107.049 5	Sarcandrae Herba

续表 1 (continued)

No.	Compound (in Chinese)	Category	CAS	t_R /min	Molecular formula	Mode	m/z			Secondary fragment	Source
							Theory	Actual	Deviation		
29	Isovitexin(异牡荆素)	phenylpropanoids	38 953-85-4	8.87	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M + H] ⁺	433.112 92	433.112 76	-0.36	379.081 5,361.070 4,349.070 8,337.070 8,323.092,313.070 7,283.060 8	Plantaginis Herba, Herba Clematidis, Glycyrrhizae Radix et Rhizoma
30	Rutin(芦丁) ¹⁾	phenylpropanoids	153-18-4	8.89	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M - H] ⁻	609.146 11	609.147 4	2.11	300.027 7,271.024 9,243.039 4,151.002 9	Herba Clematidis
31	Fraxinol(白蜡树精)	phenylpropanoids	486-28-2	9.1	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	[M + H] ⁺	223.060 1	223.060 06	-0.18	208.036 4,190.025 9,163.039,135.044 4,107.049 6	Sarcandrae Herba
32	Cynaroside(木犀草苷) ¹⁾	phenylpropanoids	5 373-11-5	9.18	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M - H] ⁻	447.093 28	447.093 66	0.84	285.040 3,256.037 6,227.034 8,199.039 8,151.003 3,133.029	Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix, Lonicerae Japonicae Caulis, Plantaginis Herba
33	Isoforsythiaside A(异连翘酯苷 A)	phenylpropanoids	357 910-26-9	9.25	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M + H] ⁺	625.212 7	625.212 1	-0.96	179.034 8,161.023 8,133.029 2,101.024	Plantaginis Herba
34	4-Methylumbelliferone(7-羟基-4-甲基香豆素)	phenylpropanoids	90-33-5	9.25	C ₁₀ H ₈ O ₃	[M + H] ⁺	177.054 62	177.054 47	-0.82	149.059 9,133.065,121.065 2,105.07,91.054 4	Sarcandrae Herba, Lonicerae Japonicae Caulis, Herba Clematidis
35	Acteoside(毛蕊花糖苷) ¹⁾	phenylpropanoids	61 276-17-3	9.4	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M - H] ⁻	623.198 14	623.198 91	1.24	161.023 8,135.045 1,133.029 2,113.023 9,95.013 8,85.029	Plantaginis Herba
36	Calceolarioside B(木通苯乙醇苷 B)	phenylpropanoids	105 471-98-5	9.53	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	[M + H] ⁺	479.154 79	479.154 45	-0.71	325.092 7,263.091 7,245.080 4,221.081 1,163.039	Plantaginis Herba
37	Isoacteoside(异麦角甾苷)	phenylpropanoids	61 303-13-7	9.89	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M + H] ⁺	625.212 7	625.212 28	-0.67	179.035 2,161.023 8,133.029 2,113.024 1	Plantaginis Herba
38	Apigenin 7-O-glucuronide(芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷)	phenylpropanoids	29 741-09-1	10.03	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M - H] ⁻	445.077 63	445.078 49	1.93	269.045 6,175.024 6,113.023 9,99.008 3,71.013 4	Plantaginis Herba
39	Isochlorogenic acid A/B/C(异绿原酸 A 或 B 或 C)	organic acids	14 534-61-3	10.44	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	[M - H] ⁻	515.119 5	515.120 14	1.43	353.088 3,191.056 1,179.034 9,173.045 2,135.044 8,93.034 1	Lonicerae Japonicae Caulis, Sarcandrae Herba
40	Resveratrol(白藜芦醇)	phenols	501-36-0	11.19	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	[M + H] ⁺	229.085 92	229.084 98	-4.11	211.075 2,183.080 2,165.069 3,135.043 6,119.048 8,107.049,91.054 2	Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix
41	Emodin-8-O-β-D-glucopyranoside(大黄素-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷)	anthraquinone	23 313-21-5	13.15	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M - H] ⁻	431.098 37	431.098 21	-0.38	269.045 4,240.042 7,225.055 5,210.032 1,181.065 7	Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix
42	Genistein(染料木素)	phenylpropanoids	446-72-0	13.8	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M - H] ⁻	269.045 55	269.045 75	0.72	224.047,181.065 8,159.044 3,133.029 2,107.013 4	Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma, Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix
43	Hederacoside C(常春藤苷 C)	terpenes	14 216-03-6	15.39	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₆	[M + H] ⁺	221.626 26	221.624 51	-1.43	189.164 1,147.065 3,129.054 9,111.044 5	Herba Clematidis
44	Pseudoprotodioscin(伪原薯蓣皂苷)	terpenes	102 115-79-7	16.99	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₁	[M + H] ⁺	1031.542 14	1031.540 41	-1.68	723.432 6,415.320 3,271.205 5,253.194 9	Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma
45	Glycyrrhizic acid(甘草酸) / Glycyrrhizic acid ammonium salt(甘草酸铵) ¹⁾	terpenes	1 405-86-3 53 956-04-0	18.09	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆ C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆ NH ₃	[M - H] ⁻	821.396 51	821.397 95	1.75	453.334 2,407.329 4,351.056 6,193.035, 113.024 2,99.008 5,71.013 3	Glycyrrhizae Radix et Rhizoma
46	Aloeemodin(芦荟大黄素) ¹⁾	anthraquinone	481-72-1	20.35	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M - H] ⁻	269.045 5	269.045	0.51	269.044 95,240.042 07	Polygoni Cuspidati Rhizoma et Radix, Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma
47	α-Hederin(α-常春藤苷)	terpenes	35 790-95-5	20.78	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	[M + H] ⁺	751.462 7	751.461	-2.26	455.351 5,437.341 6,409.346 1,225.076 3,203.179 6,147.065 5,129.054 6	Herba Clematidis
48	Pulchrenoside A(白头翁皂苷 A)	terpenes	129 724-84-1	21.21	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₂	[M + H] ⁺	751.462 7	751.461 3	-1.85	455.351 9,437.341 6,409.346 4,279.107 7,203.179 5,147.065 3,129.054 6,115.039 3	Herba Clematidis
49	Dioscin(薯蓣皂苷) ¹⁾	terpenes	19 057-60-4	23.28	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M + HCO ₂] ⁻	913.480 24	913.483 28	3.32	867.474 6,721.418 1,113.023 9,89.023 9	Dioscoreae Hypoglauciae Rhizoma

注: ¹⁾ - 经对照品比对确认过的化合物。Note: ¹⁾ - A compound confirmed by comparison with a control.

3.1 苯丙素类化合物的鉴定

痛风立安胶囊中包含了众多不同结构类型的苯丙素类化合物,这是一类以 C₆-C₃为基本母核的化合物,在植物体内多形成独立的化合物。本研究从痛风立安胶囊中鉴定出 19 个苯丙素类化合物,其中苯乙醇苷类成分 5 个、香豆素类成分 5 个、黄酮类成分 9 个。苯乙醇苷类化合物归属均来源于处方中的车前草,分别为异连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷 B、大车前苷,其中异连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷为同分异构体。苯乙醇苷类化合物在质谱中的断裂从糖苷键开始,然后发生 H₂O 和 CH₃ 等中性分子的丢失^[11],如异连翘酯苷 A、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、大车前苷的准

分子离子由 A 位断裂产生咖啡酸离子 m/z 179 进而脱去 1 分子 H₂O 生成二级离子碎片中的 m/z 161.023 8,另外准分子离子依次脱去咖啡酰基、鼠李糖残基,再继续丢失 1 分子葡萄糖并脱水后得到 m/z 133.029 2。

香豆素类化合物分别为异嗪皮啉、白蜡树精、异萜萜亭或 6,7-二羟基-4-甲基香豆素、7-羟基-4-甲基香豆素、7-羟基香豆素,均为简单香豆素及其与葡萄糖、鼠李糖连接形成的糖苷类化合物。其中化合物异嗪皮啉和白蜡树精为异嗪皮啉不同取代基位置差异的异构体,离子模式加合峰及二级碎片均相同。其准分子离子 m/z 223.060 0 [M + H]⁺ 通过丢失中性分子 CH₃ 及 H₂O 产生 m/z 208.036 4 [M + H - CH₃]⁺、

m/z 190.025 9 $[M + H - CH_3 - H_2O]^+$, 后继续裂解连续丢失 CO 产生 m/z 163、135 和 107 的二级碎片离子, 以白蜡树精为例, 其二级质谱图及可能的裂解途径见图 2。

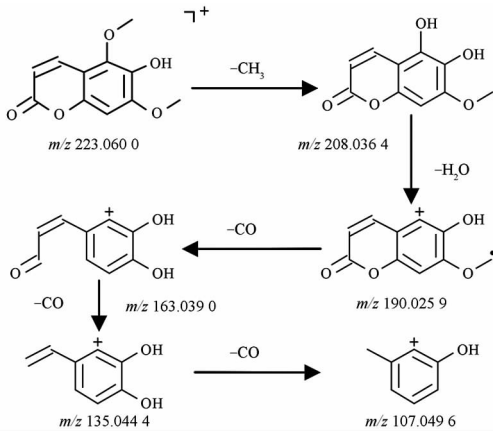


图 2 白蜡树精二级质谱图及质谱裂解途径(正离子模式)
Fig. 2 Secondary mass spectrogram and cleavage pathway of fraxinol (positive ion mode)

黄酮类化合物在质谱条件下的断裂方式主要通过 CO、CO₂、C₂H₂O、H₂O 等中性分子的丢失及 RDA 裂解以及羰基的断裂^[13]。本研究鉴定出的黄酮类化合物分别为维采宁 II、夏佛塔昔、丁香树脂醇双葡萄糖苷、异牡荆素、芦丁、木犀草苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷、染料木素、虎杖苷。

以异牡荆素为例, 该化合物在供试品中的保留时间为 8.87 min, 一级质谱得到 m/z 433.112 8 $[M + H]^+$ 的分子离子峰, 经过 Xcalibar 软件拟合后推测其分子式为 C₂₁H₂₀O₁₀ 可能性最大, 该化合物二级离子碎片信息主要有 m/z 379.081 5、361.070 4、349.070 8、337.070 8、323.092 0、313.070 7、283.060 8, 通过其断裂方式和经过 Compound Discoverver 软件匹配其二级质谱图后最终鉴定该化合物为异牡荆素, 其二级质谱图及可能的质谱裂解途径见图 3。

3.2 萜类化合物的鉴定

本研究共鉴定出 11 个萜类化合物, 主要由单萜类、三萜及其皂苷类化合物组成, 三萜类化合物有常春藤苷 C、 α -常春藤苷、白头翁皂苷 A、甘草酸铵、薯蓣皂苷、伪原薯蓣皂苷, 单萜类化合物均为环烯醚萜苷, 主要来源于处方中的忍冬藤, 包括有京尼平苷酸、獐牙菜苷、丹皮酚原苷、马钱子苷、断氧化马钱苷, 环烯醚萜苷在质谱裂解时多由母环上的取代基断裂开始, 如丢失 H₂O、CO₂、CH₂OH、CH₃COOH 和糖单元部分等。

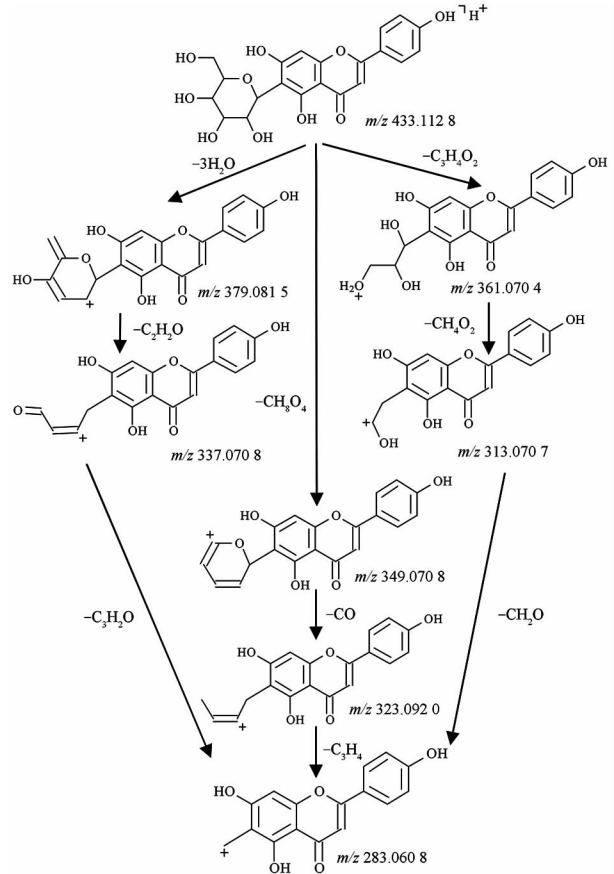


图 3 异牡荆素二级质谱图及质谱裂解途径(正离子模式)
Fig. 3 Secondary mass spectrogram and cleavage pathway of isovitexin (positive ion mode)

以獐牙菜苷为例, 该化合物在供试品中的保留时间为 6.28 min, 一级质谱得到 m/z 359.133 6 $[M + H]^+$ 的分子离子峰, 经过 Xcalibar 软件拟合后推测其分子式为 C₁₆H₂₂O₉ 可能性最大, 该化合物二级离子碎片信息主要有 m/z 197.081 0、179.070 5、151.039 3、127.039 3、109.065 3, 通过其断裂方式和经过 Compound Discoverver 软件匹配其二级质谱图后最终鉴定该化合物为獐牙菜苷, 其二级质谱图及可能的质谱裂解途径见图 4。

3.3 有机酸类化合物的鉴定

除了苯丙素类及萜类成分外, 痛风立安胶囊中还包含 10 个有机酸类成分, 分别为右旋奎宁酸、莽草酸、枸橼酸、没食子酸、隐绿原酸、绿原酸、原儿茶酸、原儿茶醛、对羟基苯甲酸、异绿原酸 A 或 B 或 C (以下简称 A/B/C), 多来源于处方中的肿节风和忍冬藤, 这些化合物多数为苯环或长链烷烃连接羟基或羧基而成, 一般在负离子模式下响应较好^[14]。在负离子模式下, 大多以 $[M - H]^-$ 准分子离子峰的形式存在, 高能碰撞下易丢失 CO₂ 或 H₂O 等中性

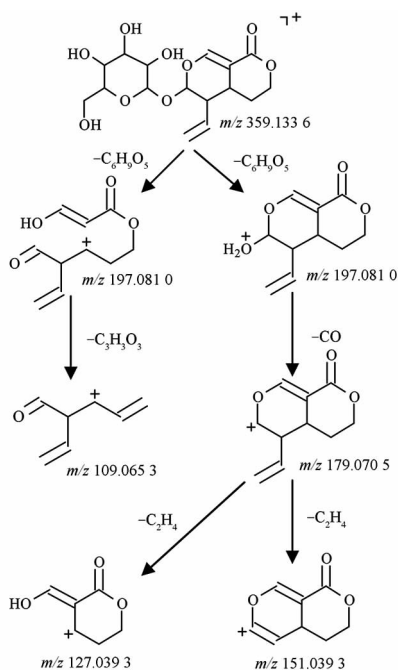


图4 獐牙菜苷二级质谱图及质谱裂解途径(正离子模式)
 Fig. 4 Secondary mass spectrogram and cleavage pathway of sweroside(positive ion mode)

离子,痛风立安胶囊中有很多奎宁酸与咖啡酰基、阿魏酰基和苯丙酰基结合而成的异构体,如隐绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A/B/C,通过研究此类化合物的裂解途径发现异绿原酸 A/B/C 相比隐绿原酸、绿原酸具有更高丰度的 m/z 173 碎片,而隐绿原酸、异绿原酸 A/B/C 相比绿原酸有更高丰度的 m/z 179 碎片,这与文献[15-16]报道一致,以异绿原酸 B 为例,此化合物二级质谱图及可能的裂解途径见图 5。

3.4 其他类化合物

此外,本研究还从痛风立安胶囊中鉴定出了萘醌类化合物大黄素-8- O - β -D-吡喃葡萄糖苷、芦荟大黄素;酚类化合物羟基酪醇、丹皮酚、白藜芦醇;生物碱类化合物木兰花碱、维生素类化合物烟酰胺、糖及糖醇类蔗糖、甘露醇等成分。

4 讨论与小结

本研究重点考察了甲醇-甲酸水、乙腈-甲酸水、乙腈(含甲酸)-甲酸水作为流动相时,各色谱峰分离效果。结果显示,当使用甲醇-甲酸水时,部分色谱峰峰形较差,分离度较低且有拖尾现象,同时质谱的响应也偏低;当有机相改为乙腈时,各色谱峰分离度有明显改善,峰形较好;当在有机相加入体积分数 0.1% 的甲酸时,各目标物在质谱的响应更好。

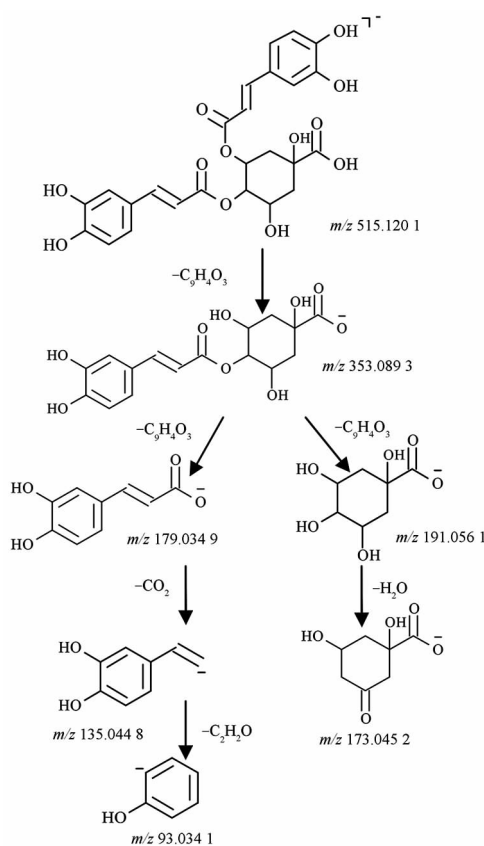


图5 异绿原酸二级质谱图及质谱裂解途径(负离子模式)
 Fig. 5 Secondary mass spectrogram and cleavage pathway of isochlorogenic acid (negative ion mode)

因此,本研究最终选择乙腈(含 0.1% 甲酸)-0.1% 甲酸水作为流动相进行梯度洗脱。

本研究考察了超声和加热回流提取 30 min 两种提取方式,结果发现两种方式提取进行分析的物质基本相同,考虑到加热回流对热不稳定的物质可能会在提取中降解且超声更便利,故选取超声进行提取。另外还对提取的溶剂考察了乙酸乙酯、体积分数 50% 甲醇、甲醇,结果乙酸乙酯提取到的化学物质最少,可能是由于处方的药物化学成分多为亲水性的物质,甲醇提取到的化学物质多为苯丙素类,在多样性上不如 50% 甲醇,故最终选取了 50% 甲醇作为提取溶剂。

本研究采用的基于 Orbitrap HRMS 技术在高分辨率[最高为 140 000 半峰全宽(FWHM)]及高质量精度上有强大优势,使得离子的质量数可达到 5 位,这对于准确、快速地在数据处理时拟合出组分的化学式具有不可替代的作用。

本研究从痛风立安胶囊中共鉴定出 49 个化合物,在复方制剂中各味药材均有涉及,丰富了痛风立安胶囊的化学物质组成信息,通过对复方制剂中处

方进行归属分析,发现来源于肿节风的有 14 种,来源于忍冬藤的有 19 种,来源于粉萆薢的有 12 种,来源于透骨草有 16 种,来源于徐长卿的有 5 种,来源于虎杖有 12 种,来源于车前草的有 16 种,来源于甘草的有 5 种。以上不同类型、不同植物来源的药物活性成分通过互补、协同等作用,从而实现了痛风立安胶囊在壮医药中发挥清热毒、除湿毒、祛风毒、调水道等治疗作用。

研究结果表明,建立的 Orbitrap HRMS 的化学成分研究方法可系统、全面、快速地对该制剂的主要活性成分进行定性。本研究首次从整体层面上对痛风立安胶囊中的有效化学成分进行了深入的探索,为明确该制剂的药效物质基础、指导临床用药和阐明药理学机制奠定了科学数据基础。

REFERENCES

- [1] DENG P, WANG S L, SUN X J, *et al.* Global trends in-research of gouty arthritis over past decade: a bibliometric analysis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 910400. DOI: 10.3389/fimmu.2022.910400.
- [2] KELLER S F, MANDELL B F. Management and cure of gouty arthritis[J]. *Med Clin North Am*, 2021, 105(2):297-310.
- [3] DENG F Y, WANG J F, LUO S J. Clinical observation on the treatment of acute gouty arthritis with Tongfenglian capsule [J]. *J Sichuan Tradit Chin Med* (四川中医), 2013, 31(2):95-96.
- [4] ZHAO X P, LI L, ZHONG C M, *et al.* Mechanism of traditional medicine Tongfeng Li'an granules on hyperuricemic rats based on regulating uric acid transporter[J]. *J Biobased Mater Bioenergy*, 2021, 15(4):536-541.
- [5] ZHAO X P, DU N N, LI F Z, *et al.* Study on anti-inflammatory effects and mechanism of Zhuang medicine Tongfeng li'an capsules on gouty arthritis[J]. *J Biobased Mater Bioenergy*(中国药房), 2023, 34(7):814-818.
- [6] SHU J L, ZHAI Y, XU W H, *et al.* Mechanism of Zhuang medicine Tongfengli'an capsule treating gout based on network pharmacology-molecular docking and experimental study[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2022, 38(2):178-185.
- [7] LI R, YANG L Q, ZHANG P Y, *et al.* Rapid screening of 24 tranquilizer drugs in fish and fishery products by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole /electrostatic field orbitrap high resolution mass spectroscopy [J]. *Chin J Chromatogr*(色谱), 2018, 36(2): 125-135.
- [8] HU L L, TANG X Q, GU W J. Detection of chloramphenicol in pork by ultra-high-performance liquid chromatography-Q extractive mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol* (中国卫生检验杂志), 2017, 27(21):3061-3064.
- [9] ZHANG J L, HUO F F, ZHOU Z G, *et al.* The principles and applications of an ambient ionization method-direct analysis in real time (DART) [J]. *Prog Chem*(化学进展), 2012, 24(1): 101-109.
- [10] KELLMANN M, MLIENSTER H, ZOMER P, *et al.* Full scan MS in comprehensive qualitative and quantitative residue analysis in food and feed matrices: how much resolving power is required [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2009, 20(8):1464-1476.
- [11] LI H R, WANG S P, SUN Z Q, *et al.* Analysis of chemical constituents in taohong siwu decoction material reference by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2022, 44(4):1349-1354.
- [12] LI Z L, ZHANG X J, WANG Z H, *et al.* The multiple constituents study of danhuang quyu capsule based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2017, 48(18): 3705-3713.
- [13] YAN X, ZHANG N, JI Z S, *et al.* Chemical constituents of Shenkun Yangxue Granules based on UPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2018, 49(18):4231-4240.
- [14] ZHAO X M, CHENG Y X, LIANG C X, *et al.* Analysis of chemical constituents in euodiae fructus by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2021, 27(6):113-126.
- [15] ZHANG Q, ZHANG J Y, SUI C L, *et al.* Regularity of changes in chlorogenic acids in *Lonicera japonica* extracts by HPLC-DAD-ESI-MS/MS[J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37(23):3564-3568.
- [16] YU W Y, WU H M, GUO X J, *et al.* Investigation of the chemical components of Ciwujia injection using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2023, 41(3):207-223.

(收稿日期:2024-01-16)