

UPLC-Q-TOF/MS 技术结合 UNIFI 数据库快速分析止痛化癥胶囊的化学成分^Δ

吴福林*,王翠竹,董庆海,王涵,谭静,林红强,刘金平,李平亚*(吉林大学药学院,长春 130021)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)17-2336-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.17.07

摘要 目的:对止痛化癥胶囊(简称“ZTHZC”)中的化学成分进行快速鉴定,为进一步阐明其药效物质基础和全面质量控制提供参考。方法:采用超高效液相色谱与飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF/MS)技术对 ZTHZC 中化学成分进行分离。通过查阅 ZTHZC 化学成分及其单味中草药的化学成分相关的文献报道,将化学成分的化学结构保存成.mol格式的文件,补充完善 UNIFI 数据库。通过 UNIFI 数据库筛查,对 ZTHZC 中化学成分进行定性分析,依据其精确分子质量、特征离子、中性丢失、二级质谱裂解规律、色谱保留行为以及结合对照品信息和文献报道等对其进行验证。结果:共鉴定出了 70 个化学成分,包括 38 个有机酸及有机酸酯类、8 个生物碱类、9 个黄酮类、5 个三萜皂苷类、5 个醛类、2 个酮类、1 个醌类、1 个聚炔类和 1 个单萜类化合物。结论:建立的方法能快速检测、鉴定 ZTHZC 的化学成分,本研究结果为其质量控制、药效物质基础的阐明提供了科学依据。

关键词 止痛化癥胶囊;化学成分;UNIFI 数据库;超高效液相色谱与飞行时间质谱联用技术

Rapid Analysis of Chemical Components of Zhitong Huazheng Capsules Based on UPLC-Q-TOF/MS Technology Combined with UNIFI Database

WU Fulin, WANG Cuizhu, DONG Qinghai, WANG Han, TAN Jing, LIN Hongqiang, LIU Jinping, LI Pingya (School of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To rapidly identify chemical components of Zhitong huazheng capsules (shorted for “ZTHZC”), and to provide reference for further elucidating the pharmacodynamic material basis and overall quality control. METHODS: UPLC-Q-TOF/MS method was adopted to separate the chemical components of ZTHZC. By reviewing literatures that related to chemical components of ZTHZC and its single Chinese traditional medicinal crops, the chemical structure of the chemical components was saved into a .mol format file, and supplemented the UNIFI database. The chemical constituents of ZTHZC were qualitatively analyzed by UNIFI database screening, and validated according to their precise molecular mass, characteristic ions, neutral loss, secondary mass spectrometry cleavage, chromatographic retention behavior, combined reference information and literature reports. RESULTS: A total of 70 chemical components were identified in this experiment, including 38 organic acids and

- 线测定与比较指导原则[S]. 2015-02-05.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:583-584.
- [5] 张启明,谢沐风,宁保明,等.采用多条溶出曲线评价口服固体制剂的内在质量[J].中国医药工业杂志,2009,40(12):946-955.
- [6] 孙婷,姜建国,郭永辉,等.不同厂家比沙可啶肠溶片仿制剂与参比制剂溶出曲线的相似性评价[J].中国药房,2017,28(9):1268-1271.
- [7] 孙婷,姜建国,刘云,等.双溶出-HPLC系统在盐酸特拉唑嗪片一致性评价中的应用[J].沈阳药科大学学报,2017,34(11):987-993.
- [8] 郑淑凤,郭伟斌,王玉,等.氯雷他定片溶出度测定方法的改进[J].中国现代应用药学,2015,32(2):178-181.
- [9] 秦斌,谭志欣,殷果,等.富马酸酮替芬片溶出度的测定[J].中国现代应用药学,2015,32(1):72-75.
- [10] 姜择慧,吴勇.市售保泰松片溶出度方法的考察[J].中国药师,2014,17(6):962-964.
- [11] 谢沐风.具有区分力的溶出曲线[J].中国医药工业杂志,2014,45(7):687-689.
- [12] 张锦琳,袁耀佐,张娅,等.评价国产利福平胶囊与参比制剂体外溶出一致性研究[J].中国药科大学学报,2018,49(5):603-609.
- [13] 董宁,刘慧颖,孙立新.盐酸小檗胺片溶出度测定方法的建立及其体外溶出性能评价[J].中国药房,2018,29(17):2356-2359.
- [14] 张银龙,袁利兵,李巧霞,等.帕博西尼胶囊溶出度检测方法的建立及多介质溶出曲线测定[J].中国新药杂志,2018,27(5):574-579.

Δ 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No.20160301003YY)

* 硕士研究生。研究方向:天然药物化学成分及其生物活性。

E-mail:wuf117@mails.jlu.edu.cn

通信作者:教授,博士生导师。研究方向:天然药物化学成分及其生物活性。E-mail:lipy@jlu.edu.cn

(收稿日期:2019-02-10 修回日期:2019-04-06)

(编辑:刘萍)

organic acid esters, 8 alkaloids, 9 flavonoids, 5 triterpenoid saponins, 5 aldehydes, 2 ketones, 1 quinone, 1 polyacetylene and 1 monoterpenoid. CONCLUSIONS: This study provides a rapid detection and identification method for chemical components of ZTHZC, and also provides a scientific basis for the clarification of ZTHZC's quality control and pharmacodynamics.

KEYWORDS Zhitong huazheng capsules; Chemical components; UNIFI database; UPLC-Q-TOF/MS

止痛化癥胶囊(简称“ZTHZC”)是由党参、炙黄芪、炒白术、丹参、当归、鸡血藤、三棱等19味中药炮制而成,主治益气活血、散结止痛,用于气虚血瘀所致的月经不调、痛经,症见行经后错、经量少、有血块、行经小腹疼痛,慢性盆腔炎见上述证候者^[1]。临床上将其广泛用于治疗痛经、盆腔炎及子宫腺肌病等妇科疾病^[2-5],疗效甚好。目前,对于ZTHZC化学成分的研究主要集中在几种有效成分(如丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B)的含量测定上^[6-8],制剂中许多其他化学成分还未明确。而中药复方具有多成分、多靶点的特点,因此,对于ZTHZC药效物质基础需要进一步研究。

近年来,超高效液相色谱与飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF/MS)技术已经成为天然药物中活性成分快速分离和鉴定的有力手段。而UNIFI数据库是一个简单、高效、全面的平台,包括从600多种中药中发现的6000多种化合物信息,能够将数据采集、峰提取、分子式确定、数据库检索及生成报告相结合,对化学成分进行快速、全面地定性分析^[9]。将UPLC-Q-TOF/MS与UNIFI数据库相结合,已经被应用到传统中药及复方中化学成分的快速鉴定中^[10-12]。基于此,本研究将采用UPLC-Q-TOF/MS技术结合UNIFI数据库,对ZTHZC的化学成分进行快速、全面的筛查分析,为进一步阐明其药效物质基础以及全面的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Xevo G2-XS Q-TOF四级杆飞行时间质谱仪、ACQUITY UPLC二元泵和样品管理器(美国Waters公司);N-A35氮气发生器(上海金液科技有限公司);FA1104N电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);R501旋转蒸发仪(上海豫康科教仪器设备有限公司);TGL-16aR飞鸽超离速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

ZTHZC(吉林金宝药业股份有限公司,批号:20161010,规格:0.3 g/粒);木樨草素(批号:111520-200504)、阿魏酸(批号:110773-201012)、山柰酚(批号:110861-201310)、柠檬酸(批号:111679-201602)、咖啡酸(批号:110885-201102)、咖啡酸乙酯(批号:111678-200401)、原儿茶醛(批号:110810-200205)、黄芪甲苷(批号:0781-200311)、迷迭香酸(批号:11871-2001102)、双氢槲皮素(批号:180317)等10个对照品均购自中国食品药品检定研究院(纯度:均 $\geq 98\%$);延胡索乙素(批号:17022720)、党参炔苷(批号:17062207)、紫草酸(批号:171220)、奎宁酸(批号:20150321)、丹酚酸B(批号:

150927)、芒柄花黄素(批号:17031005)、丹参素(批号:151106)、原儿茶酸(批号:171109)、丹酚酸A(批号:171217)、丹酚酸C(批号:171105)等10个对照品均购自北京普天同创生物科技有限公司(纯度:均 $\geq 98\%$);乙腈(美国Fisher公司,色谱级);甲酸钠、亮氨酸-脑啡肽(美国Sigma公司,色谱级);水为屈臣氏纯净水。

2 方法

2.1 样品溶液的制备

取ZTHZC内容物,研细,过40目筛。取粉末约1 g,用80%甲醇在80℃水浴中提取3次,每次3 h,合并3次提取液。将提取液过滤后,将滤液合并,旋干。用80%甲醇1.0 mL将提取物溶解,过0.22 μm 滤膜,收集滤液,备用。

2.2 混合对照品溶液的制备

精密称定对照品木樨草素0.001 1 g、阿魏酸0.001 0 g、山柰酚0.001 2 g、柠檬酸0.001 3 g、咖啡酸0.001 5 g、咖啡酸乙酯0.001 6 g、原儿茶醛0.001 8 g、黄芪甲苷0.002 1 g、迷迭香酸0.001 5 g、双氢槲皮素0.001 9 g、延胡索乙素0.002 5 g、党参炔苷0.001 1 g、紫草酸0.002 6 g、奎宁酸0.001 4 g、丹酚酸B 0.002 7 g、芒柄花黄素0.002 3 g、丹参素0.002 4 g、原儿茶酸0.002 1 g、丹酚酸A 0.001 6 g、丹酚酸C 0.002 6 g,置于同一10 mL量瓶中,加入甲醇溶解,定容,即得。

2.3 检测条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C_{18} (100 mm \times 2.1 mm,1.7 μm);柱温:30℃;样品管理器温度:15℃;流动相:0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B),梯度洗脱(0~2 min,10% B;2~26 min,10% \rightarrow 90% B;26~28 min,90% B;28~29 min,90% \rightarrow 10% B;29~30 min,10% B);流速:0.4 mL/min;进样体积:10 μL 。

2.3.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源(ESI),连续扫描模式,采用正、负离子检测模式(ESI^+ 、 ESI^-);扫描范围:质荷比(m/z)100~1 500;毛细管电压:3.0 kV;锥孔电压:40 V;锥孔气流量:50 L/h;脱溶剂氮气流量:600 L/h;氩气流量:0.15 mL/min;离子化源温度:120℃;脱溶剂气温度:300℃。采用亮氨酸-脑啡肽 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 质荷比(m/z)为556.277 1、 $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 为554.262 0作为Lock Spray校正标准液(100 pg/mL),对仪器进行实时校正,其校正流速为正离子模式(15 $\mu\text{L}/\text{min}$),使用甲酸钠溶液对仪器进行校正。

2.4 数据的采集与处理

取“2.1”项下样品溶液,按“2.3”项下条件进行分析,记录图谱。采用UPLC-Q-TOF/MS模式采集数据,使用

UNIFI 数据库软件进行 ZTHZC 化学成分的自动识别。第一步,先通过查阅 ZTHZC 化学成分及其单味中草药的化学成分相关的文献报道,将化学成分的化学结构保存成 .mol 格式的文件,然后导入 UNIFI 数据库中,作为原有的传统中药库的补充,并建立了 ZTHZC 数据库;第二步,将原始数据通过 Waters Compression and Archival Tool v1.10 软件进行压缩;第三步,应用 UNIFI 数据库软件自动筛查、鉴定化合物,代替传统的人工提峰、计算分子式以及分析碎片断裂情况;第四步,建立一个过滤筛选方法,即设定质量误差为 $-5 \sim 5$ ppm,且响应值大于 3 000;最后,通过结合碎片离子理论精确质量数、相对保留时间和分子式匹配软件 Elemental composition、化合物结构匹配软件 MassFragment、离线及在线质谱数据库 (PubMed、Mass Bank、Chemspider、METLIN) 及相关文献对各主要化合物进行人工识别和确认。

3 结果

在 ZTHZC 中共检测到 70 个化合物,包括 38 个有机酸及有机酸酯、8 个生物碱、9 个黄酮、5 个三萜皂苷、5 个醛类、2 个酮类、1 个醌类、1 个聚炔类和 1 个单萜类化合物。

ESI⁺、ESI⁻ 模式下的质谱基峰离子流图见图 1,化合物的鉴定结果见表 1,ZTHZC 中鉴定出的各类化合物的结构图见图 2。

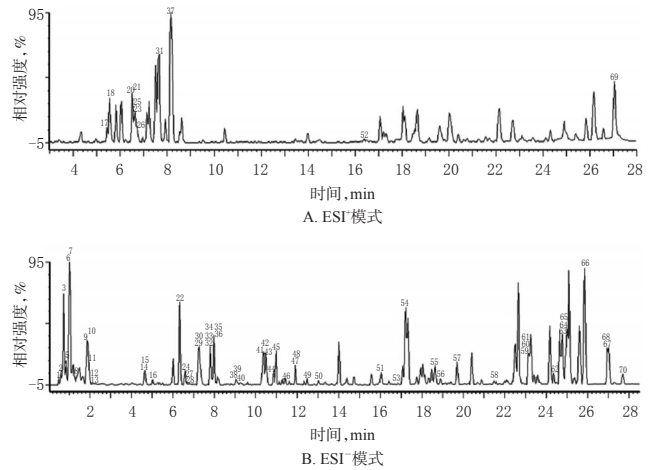


图 1 ZTHZC 在 ESI⁺、ESI⁻ 模式下的基峰离子流图
Fig 1 Base peak ion chromatogram of ZTHZC in ESI⁺ and ESI⁻

表 1 ZTHZC 中化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定结果

Tab 1 UPLC-Q-TOF/MS identification results of chemical constituents of ZTHZC

化合物序号	保留时间, min	理论值, Da	实测值, Da	加和离子	质量误差, ppm	主要质谱碎片 (<i>m/z</i>)	化合物名称
1	0.63	314.079 0	314.076 6	+HCOO	-4.91	359.074 8[M+HCOO] ⁻	2',7-二羟基-4',5'-二甲氧基异黄酮
2	0.69	134.021 5	134.021 6	-H	0.43	133.014 3[M-H] ⁺ , 115.003 2[M-H-H ₂ O] ⁺	2-羟基-丁二酸
3	0.75	192.027 0	192.027 4	-H	2.19	191.020 1[M-H] ⁺ , 114.019 3[M-H-H ₂ O-CH ₂ COOH] ⁺ , 109.008 4[M-H-2H ₂ O-HCOOH] ⁺ , 86.024 9[M-H-HCOOH-CH ₂ COOH] ⁺ , 81.030 0[M-H-H ₂ O-2HCOOH] ⁺	柠檬酸
4	0.86	206.042 7	206.042 6	-H	-0.04	205.035 4[M-H] ⁺ , 174.008 8[M-H-OCH ₃] ⁺ , 141.014 6[M-H-H ₂ O-HCOOH] ⁺ , 128.019 1[M-H-OCH ₃ -HCOOH] ⁺	1-柠檬酸单甲酯
5	0.94	500.131 9	500.130 2	+HCOO	-3.13	545.128 4[M+HCOO] ⁻ , 355.034 5[M-H-CH ₂ -3COCH ₃] ⁺ , 291.057 4[M-H-CH ₂ -C ₁₀ H ₁₆ O ₄] ⁺	(+)-儿茶素五乙酸酯
6	1.03	198.052 8	198.052 6	-H	-1.04	196.972 7[M-H] ⁺ , 178.966 7[M-H-H ₂ O] ⁺ , 152.961 0[M-H-HCOOH] ⁺ , 134.993 3[M-H-H ₂ O-HCOOH] ⁺	丹参素
7	1.04	136.052 4	136.052 0	-H	-3.30	135.044 7[M-H] ⁺	苯甲酸甲酯
8	1.27	154.026 6	154.026 1	-H	-3.21	153.018 8[M-H] ⁺ , 107.029 0[M-H-HCOOH] ⁺	原儿茶酸
9	1.89	304.058 3	304.061 0	+HCOO	4.61	349.059 2[M+HCOO] ⁻ , 136.023 9[M-H-C ₁₀ H ₁₆ O ₄] ⁺	双氢槲皮素
10	1.90	138.031 7	138.031 6	-H	-0.46	137.024 4[M-H] ⁺	原儿茶醛
11	1.91	192.063 4	192.062 5	-H	-4.45	191.055 3[M-H] ⁺ , 137.023 9[M-H-3H ₂ O] ⁺	奎宁酸
12	2.00	130.063 0	130.062 3	+HCOO	-3.80	175.060 5[M+HCOO] ⁻ , 114.039 7[M-H-CH ₃] ⁺	3-羟基-2,5-己二酮
13	2.10	180.042 3	180.041 7	-H	-3.02	179.034 1[M-H] ⁺	咖啡酸
14	4.66	194.057 9			-3.34	193.050 0[M-H] ⁺ , 122.029 5[M-H-C ₁₀ H ₁₆ O ₄] ⁺	阿魏酸
15	4.67	194.057 9			-3.34	193.050 0[M-H] ⁺ , 121.028 4[M-H-C ₁₀ H ₁₆ O ₄] ⁺	咖啡酸甲酯
16	5.04	492.126 8			-2.06	491.118 5[M-H] ⁺	5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮-2'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷
17	5.46	341.162 7	194.057 3	-H	1.03	342.170 3[M+H] ⁺ , 283.098 4[M+H-OCH ₃ -C ₁₀ H ₁₆] ⁺ , 271.081 2[M+H-CH ₂ -C ₁₀ H ₁₆ N] ⁺ , 178.085 1[M+H-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺ , 163.085 6[M+H-CH ₂ -C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺ , 151.074 6[M+H-C ₁₀ H ₁₆ NO ₅] ⁺	延胡索单酚碱
18	5.56	355.178 4	194.057 3	-H	2.36	356.186 5[M+H] ⁺ , 323.151 4[M+H-CH ₂ -H ₂ O] ⁺ , 310.128 0[M+H-CH ₂ -OCH ₃] ⁺ , 307.157 5[M+H-H ₂ O-OCH ₃] ⁺ , 192.101 2[M+H-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺ , 177.078 4[M+H-CH ₂ -C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺ , 174.073 5[M+H-H ₂ O-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺	元胡宁
19	6.02	418.090 0	492.125 8	-H	2.33	417.083 7[M-H] ⁺ , 371.079 2[M-H-HCOOH] ⁺ , 196.045 8[M-H-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺ , 190.051 4[M-H-HCOOH-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺ , 174.040 5[M-H-HCOOH-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺	丹酚酸 D
20	6.52	337.131 4	337.132 8	+H	4.08	338.140 1[M+H] ⁺ , 323.115 2[M+H-CH ₃] ⁺ , 308.106 1[M+H-2CH ₃] ⁺ , 307.109 7[M+H-OCH ₃] ⁺ , 292.113 7[M+H-CH ₂ -OCH ₃] ⁺ , 277.097 6[M+H-2CH ₂ -OCH ₃] ⁺	去氢南天竹啡碱
21	6.54	369.157 6	369.158 5	+H	2.41	370.165 8[M+H] ⁺ , 339.138 7[M+H-OCH ₃] ⁺ , 324.115 2[M+H-CH ₂ -OCH ₃] ⁺ , 309.065 2[M+H-2CH ₂ -OCH ₃] ⁺ , 191.072 4[M+H-C ₁₀ H ₁₆ NO ₅] ⁺ , 180.084 4[M+H-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺	α-别隐品碱
22	6.60	360.084 5	360.084 7	-H	0.42	359.077 4[M-H] ⁺ , 196.045 9[M-H-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺ , 180.034 7[M-H-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺ , 162.024 4[M-H-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺	迷迭香酸
23	6.64	355.178 4	355.178 4	+H	0.01	356.185 6[M+H] ⁺ , 341.158 2[M+H-CH ₃] ⁺ , 310.136 1[M+H-CH ₂ -OCH ₃] ⁺ , 192.100 9[M+H-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺ , 178.085 9[M+H-C ₁₀ H ₁₆ O ₅] ⁺ , 151.064 5[M+H-C ₁₀ H ₁₆ O ₅ N] ⁺	延胡索乙素
24	6.65	396.178 4	396.177 4	+HCOO	-2.40	441.175 6[M+HCOO] ⁻ , 256.061 1[M-H-C ₁₀ H ₁₆ O-3H ₂ O] ⁺	党参炔苷

续表 1
Continued tab 1

化合物序号	保留时间, min	理论值, Da	实测值, Da	加和离子	质量误差, ppm	主要质谱碎片(m/z)	化合物名称
25	6.67	324.136 2	324.135 7	+H	-1.42	325.143 0[M+H] ⁺ , 310.119 2[M+H-CH ₃] ⁺ , 307.136 1[M+H-H ₂ O] ⁺ , 292.116 2[M+H-H ₂ O-CH ₃] ⁺ , 283.079 0[M+H-C ₂ H ₅] ⁺ , 190.040 6[M+H-C ₂ H ₅ -C ₂ H ₅ O] ⁺ , 163.090 2[M+H-CH ₂ -C ₂ H ₅ O] ⁺	补骨脂查尔酮
26	6.74	369.194 0	369.194 2	+H	0.60	370.201 5[M+H] ⁺ , 340.137 3[M+H-2CH ₃] ⁺ , 325.106 2[M+H-3CH ₃] ⁺ , 309.115 6[M+H-2CH ₂ -OCH ₃] ⁺ , 206.116 3[M+H-C ₁₀ H ₁₅ O ₂] ⁺ , 192.083 5[M+H-C ₁₀ H ₁₅ O] ⁺	延胡索甲素
27	6.80	538.111 1	538.112 5	-H	2.50	537.105 2[M-H] ⁻ , 493.115 3[M-COOH] ⁻ , 313.075 4[M-COOH-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 295.062 4[M-COOH-C ₆ H ₅ O] ⁻ , 267.068 4[M-COOH-C ₁₀ H ₁₅ O ₂] ⁻ , 185.025 4[M-COOH-C ₁₀ H ₁₅ O ₂ -C ₆ H ₅ O ₂] ⁻	紫草酸
28	6.89	552.126 8	552.128 0	-H	2.26	551.120 7[M-H] ⁻ , 353.064 4[M-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 321.040 2[M-OCH ₂ -C ₆ H ₅ O ₂] ⁻	紫草酸单甲酯
29	7.24	718.153 4	718.153 4	-H	0.01	717.146 1[M-H] ⁻ , 519.091 5[M-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 339.048 6[M-C ₆ H ₅ O ₂ -C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 321.038 8[M-2C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 197.044 0[M-C ₂ H ₅ O ₂] ⁻	丹酚酸 B
30	7.29	430.126 4	430.124 2	+HCOO	-4.51	475.122 4[M-HCOO] ⁻ , 267.064 5[M-Glu] ⁻	刺蒺藜花苷
31	7.64	351.147 1	351.147 9	+H	2.34	352.155 2[M+H] ⁺ , 336.122 3[M-CH ₃] ⁺ , 321.098 3[M-2CH ₃] ⁺ , 320.128 4[M-OCH ₃] ⁺ , 308.127 5[M-CH ₂ -OCH ₃] ⁺ , 163.053 9[M-2CH ₂ -C ₁₀ H ₁₅ O ₂] ⁺	防己碱
32	7.81	494.121 3	494.121 6	-H	0.54	493.114 3[M-H] ⁻ , 311.054 5[M-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 295.060 6[M-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 293.044 4[M-OH-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 197.045 1[M-C ₁₀ H ₁₅ O ₂] ⁻ , 179.034 1[M-C ₁₀ H ₁₅ O] ⁻	丹酚酸 A
33	7.82	492.105 6	492.106 4	+HCOO	1.39	537.104 6[M+HCOO] ⁻ , 295.060 0[M-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 185.023 3[M-C ₆ H ₅ O ₂ -C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 179.033 3[M-C ₁₀ H ₁₅ O ₂] ⁻	丹酚酸 C
34	7.91	202.120 5	202.120 8	-H	1.45	201.113 5[M-H] ⁻ , 183.103 1[M-OH] ⁻ , 139.112 8[M-OH-COOH] ⁻	癸二酸
35	7.92	286.047 7	286.049 0	-H	4.48	285.041 7[M-H] ⁻ , 133.029 4[M-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻	木犀草素
36	7.99	284.068 5	284.069 4	-H	3.17	283.062 1[M-H] ⁻ , 268.038 1[M-CH ₃] ⁻	汉黄芩素
37	8.17	365.162 7	365.163 8	+H	2.90	366.171 0[M+H] ⁺ , 334.146 4[M-OCH ₃] ⁺ , 323.147 1[M-CH ₂ -OCH ₃] ⁺ , 303.085 3[M-2CH ₂ -OCH ₃] ⁺ , 176.061 5[M-2CH ₂ -C ₁₀ H ₁₅ O ₂] ⁺	去氢延胡索甲素
38	9.06	148.088 8	148.088 9	+HCOO	0.56	193.087 1[M+HCOO] ⁻	3-苯基-2-丁酮
39	9.13	208.073 6	208.073 7	-H	0.88	207.066 5[M-H] ⁻	咖啡酸乙酯
40	9.27	286.047 7	286.047 8	-H	0.11	285.040 5[M-H] ⁻	山柰酚
41	10.33	206.094 3	206.093 5	-H	-3.65	205.086 3[M-H] ⁻	对甲氧桂皮酸乙酯
42	10.37	330.240 6	330.240 1	-H	-1.47	329.232 9[M-H] ⁻ , 229.144 1[M-OH-C ₆ H ₅] ⁻ , 211.133 1[M-COOH-C ₆ H ₅] ⁻ , 183.137 7[M-OH-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻	三棱酸
43	10.51	268.073 6	268.074 8	-H	4.46	267.942 6[M-H] ⁻ , 251.004 4[M-CH ₃] ⁻	芒柄花黄素
44	10.87	176.083 7	176.082 9	+HCOO	-3.78	221.081 1[M+HCOO] ⁻	桂皮酸乙酯
45	10.99	784.460 9	784.464 6	+HCOO	4.43	829.462 8[M+HCOO] ⁻	黄芪甲苷
46	11.44	822.403 8	822.406 9	-H	3.84	821.399 7[M-H] ⁻	甘草酸
47	11.91	826.471 5	826.476 3	+HCOO	4.55	871.474 5[M+HCOO] ⁻ , 697.418 2[M-COCH ₂ -C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 667.168 7[M-OCOCH ₂ -C ₆ H ₅ O ₂] ⁻	黄芪皂苷 II
48	11.95	652.418 6	652.420 3	+HCOO	2.43	697.418 5[M+HCOO] ⁻	膜荚黄芪茎叶皂苷 C
49	12.49	826.471 5	826.477 1	+HCOO	4.43	871.475 3[M+HCOO] ⁻	异黄芪皂苷 II
50	13.05	310.214 4	310.214 9	-H	1.44	309.207 6[M-H] ⁻ , 185.118 0[M-C ₆ H ₅ O] ⁻ , 99.081 8[M-OH-C ₂ H ₅ O ₂] ⁻	9, 16-二羟基-10, 12, 14-三烯-十八碳酸
51	16.05	270.255 9	270.256 4	+HCOO	1.69	315.254 6[M+HCOO] ⁻	十七酸
52	16.50	296.141 2	296.140 7	+H	-1.81	319.129 7[M+Na] ⁺ , 297.148 0[M+H] ⁺ , 282.123 3[M-CH ₃] ⁺ , 264.111 8[M-CH ₂ O] ⁺ , 253.120 8[M-CH ₂ -CH ₂ O] ⁺	隐丹参酮
53	16.88	184.182 7	184.182 4	+HCOO	-1.26	229.180 6[M+HCOO] ⁻	正十二烷醛
54	17.25	296.235 1	296.234 8	-H	-1.07	295.227 6[M-H] ⁻ , 195.138 2[M-OH-C ₆ H ₅] ⁻	Coronarin acid
55	18.62	298.250 8	298.250 7	-H	-0.34	297.243 4[M-H] ⁻ , 281.249 1[M-OH] ⁻ , 269.212 0[M-C ₂ H ₃] ⁻ , 155.106 9[M-C ₆ H ₁₇ O] ⁻	蓖麻油酸
56	18.91	212.214 0	212.213 9	+HCOO	-0.39	257.212 1[M+HCOO] ⁻	正十四烷醛
57	19.72	254.261 0	254.261 0	+HCOO	0.14	299.259 2[M+HCOO] ⁻	正十七烷醛
58	21.59	332.147 1	332.144 8	+HCOO	-4.25	377.143 0[M+HCOO] ⁻	玄参种武 A
59	23.18	254.224 6	254.224 8	+HCOO	0.88	299.223 0[M+HCOO] ⁻ , 71.014 6[M-C ₁₅ H ₃₁] ⁻	棕榈烯酸
60	23.19	280.240 2	280.240 4	-H	0.54	325.237 5[M+HCOO] ⁻ , 279.233 1[M-H] ⁻ , 71.014 6[M-C ₁₅ H ₃₁] ⁻	亚油酸
61	23.21	356.292 7	356.291 8	+HCOO	-2.03	401.290 1[M+HCOO] ⁻ , 299.222 3[M-C ₆ H ₅] ⁻ , 279.233 4[M-C ₆ H ₅ O ₂] ⁻ , 89.024 7[M-C ₁₅ H ₃₁ O] ⁻ , 71.014 6[M-OH-C ₁₅ H ₃₁ O] ⁻	2, 3-二羟丙基油酸
62	24.35	310.323 6	310.323 4	+HCOO	-0.47	355.321 6[M+HCOO] ⁻	正二十一烷醛
63	24.82	314.245 7	314.246 4	-H	2.05	313.239 1[M-H] ⁻	癸二酸二丁酯
64	25.01	328.261 4	328.260 8	-H	-1.65	327.253 5[M-H] ⁻ , 281.248 9[M-COOH] ⁻ , 279.232 6[M-2OH-CH ₃] ⁻	9, 12-二羟基-15-十九碳酸
65	25.02	282.255 9	282.256 0	-H	0.25	281.248 7[M-H] ⁻ , 265.051 7[M-CH ₃] ⁻	棕榈油酸乙酯
66	25.85	308.271 5	308.272 1	+HCOO	1.69	353.270 3[M+HCOO] ⁻ , 279.232 0[M-C ₂ H ₃] ⁻ , 71.014 6[M-C ₁₅ H ₃₁] ⁻	亚油酸乙酯
67	26.98	296.271 5	296.271 3	+HCOO	-0.76	341.269 5[M+HCOO] ⁻ , 279.232 6[M-CH ₃] ⁻ , 253.216 2[M-C ₆ H ₅] ⁻	油酸甲酯
68	26.99	284.271 5	284.271 5	-H	-0.26	341.269 5[M+HCOO] ⁻ , 283.264 2[M-H] ⁻ , 255.232 3[M-C ₆ H ₅] ⁻	十八碳酸
69	27.05	390.277 0	390.278 4	+Na	3.47	413.267 7[M+Na] ⁺ , 301.140 4[M-3C ₆ H ₅] ⁺ , 233.088 3[M-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₅] ⁺ , 189.014 7[M-C ₆ H ₅ -C ₆ H ₅ -C ₆ H ₅] ⁺	邻苯二甲酸二-(2-乙基己基)酯
70	27.69	310.287 2	310.287 4	+HCOO	0.50	355.285 6[M+HCOO] ⁻ , 71.014 7[M-C ₁₅ H ₃₁] ⁻	油酸乙酯

3.1 有机酸及有机酸酯类化合物的鉴定

有机酸及有机酸酯类化合物是 ZTHZC 的主要活性

成分, 基于 UNIFI 数据库所推断出的裂解碎片, 结合相关参考文献的质谱数据及对照品比对的方法, 鉴定出有

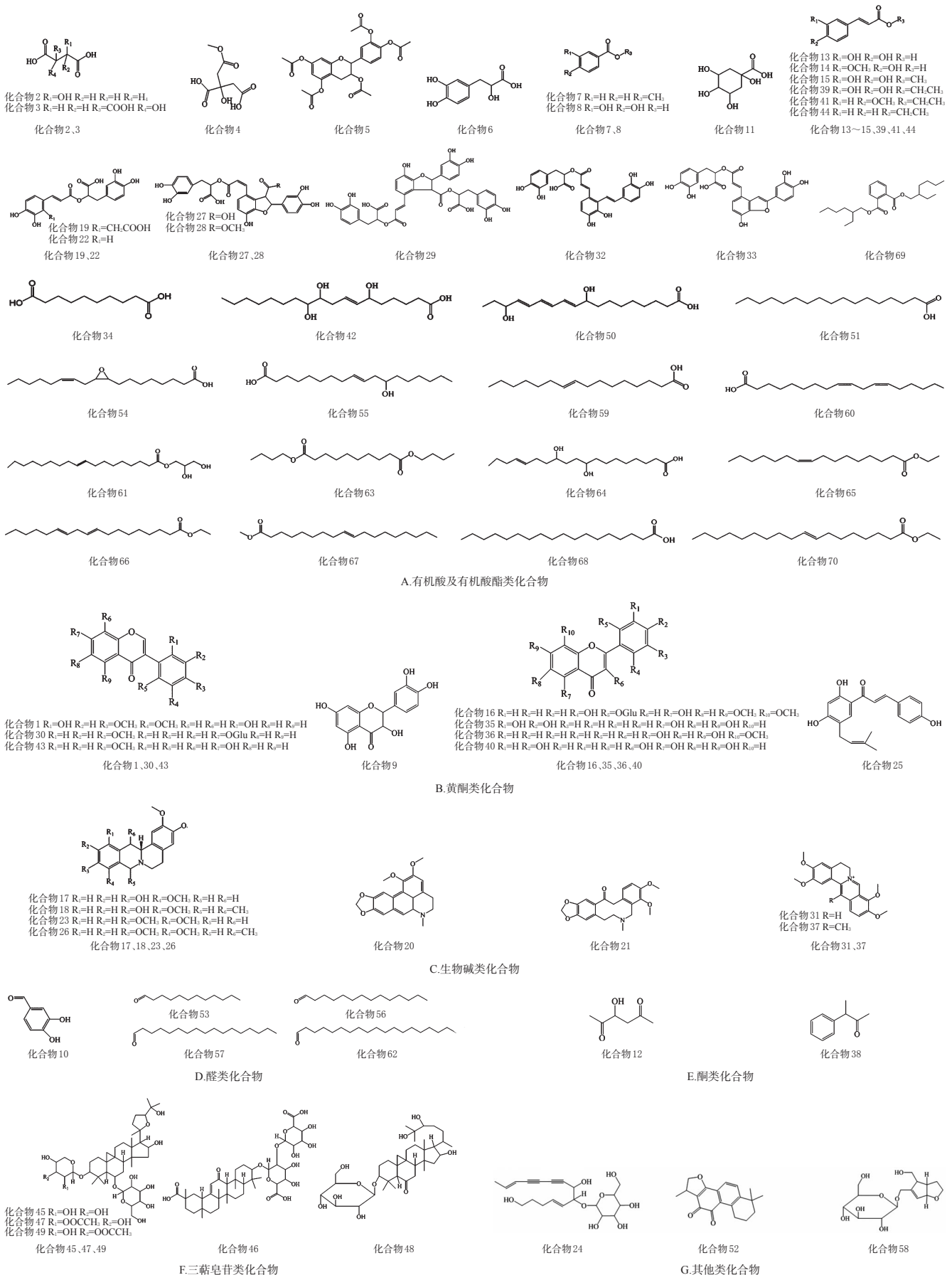


图2 ZTHZC 中鉴定出的各类化合物的结构图

Fig 2 Chemical structures of compounds identified in ZTHZC

机酸及有机酸酯类化合物 38 个,下面以化合物 6 和化合物 65 为例,简述其鉴定过程。

(1) 化合物 6: 在 ESI^- 模式下, 化合物 6 的保留时间为 1.03 min, 准分子离子峰 m/z 196.972 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 以 m/z 196.972 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 为母离子进行二级质谱(MS/MS)扫描, 主要产生 3 个碎片离子, 即 m/z 178.966 7 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ 、 m/z 152.961 0 $[\text{M}-\text{H}-\text{HCOOH}]^-$ 、 m/z 134.993 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{HCOOH}]^-$, 与丹参素对照品的碎片离子基本一致, 再结合文献[13]报道, 可将其鉴定为丹参素。丹参素对照品和化合物 6 的 MS/MS 图见图 3。

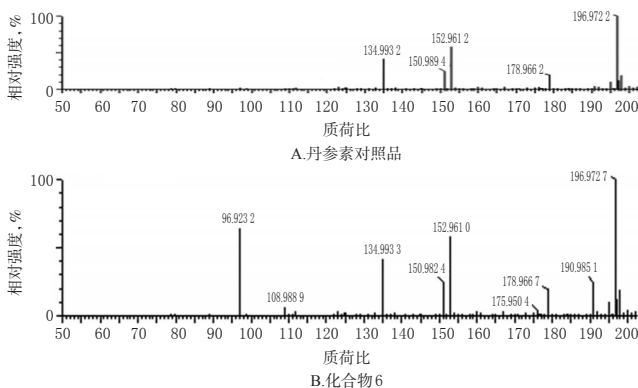


图 3 丹参素对照品和化合物 6 的 MS/MS 图 (ESI^-)
Fig 3 MS/MS spectrums of danshensu in control and compound 6 (ESI^-)

(2) 化合物 65: 在 ESI^- 模式下, 化合物 65 的保留时间为 25.02 min, 准分子离子峰 m/z 281.248 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 以 m/z 281.248 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 为母离子进行 MS/MS 扫描, 主要产生 1 个碎片离子, 即 m/z 265.051 7 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$, 再结合文献[14]报道, 可将其鉴定为棕榈油酸乙酯。化合物 65 的 MS/MS 图见图 4。

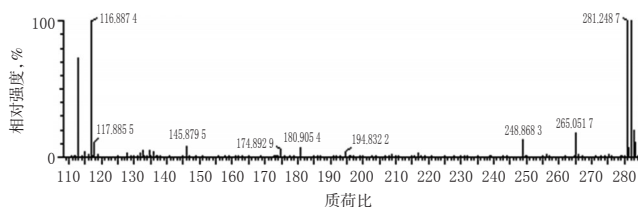


图 4 化合物 65 的 MS/MS 图 (ESI^-)
Fig 4 MS/MS spectrum of compound 65 (ESI^-)

3.2 生物碱类化合物的鉴定

在 ESI^+ 模式下, 生物碱类化合物共鉴定出 8 个, 下面以化合物 23 为例, 简述其鉴定过程: 化合物 23 保留时间为 6.64 min, 准分子离子峰 m/z 356.185 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 以 m/z 356.185 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为母离子进行 MS/MS 扫描, 主要产生 5 个碎片离子, 即分别为 m/z 341.158 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, m/z 310.136 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{OCH}_3]^+$, m/z 192.100 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2]^+$, m/z 178.085 9 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_2]^+$, m/z 150.064 5 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}]^+$, 与延胡索乙素对照品的碎片离子基本一致, 再结合文献[15]报道, 可将其鉴定为延胡索乙素。延胡索乙素对照品和化合物 23 的 MS/MS 图见图 5。

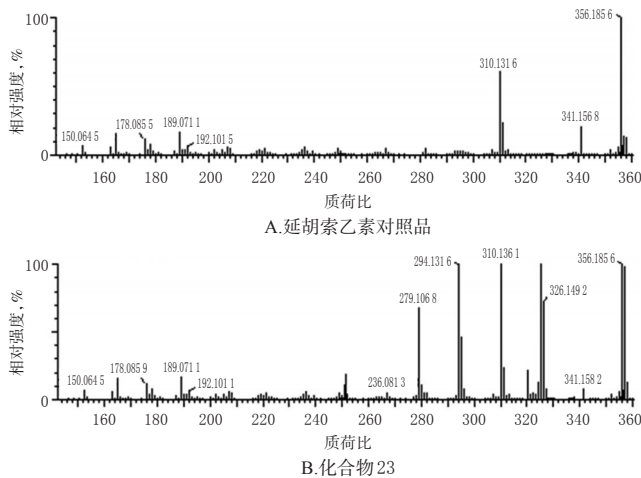


图 5 延胡索乙素对照品和化合物 23 的 MS/MS 图 (ESI^+)
Fig 5 MS/MS spectrums of tetrahydropalmatine control and compound 23 (ESI^+)

3.3 黄酮类化合物的鉴定

在 ESI^- 模式下, 黄酮类化合物共鉴定出 9 个, 下面以化合物 43 为例, 简述其鉴定过程: 化合物 43 保留时间为 10.51 min, 准分子离子峰 m/z 267.942 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$; 以 m/z 267.942 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 为母离子进行 MS/MS 扫描, 主要产生 1 个碎片离子, 即 m/z 251.004 4 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$, 这与芒柄花黄素对照品的碎片离子基本一致, 再结合文献[16]报道, 可将其鉴定为芒柄花黄素。芒柄花黄素对照品和化合物 43 的 MS/MS 图见图 6。

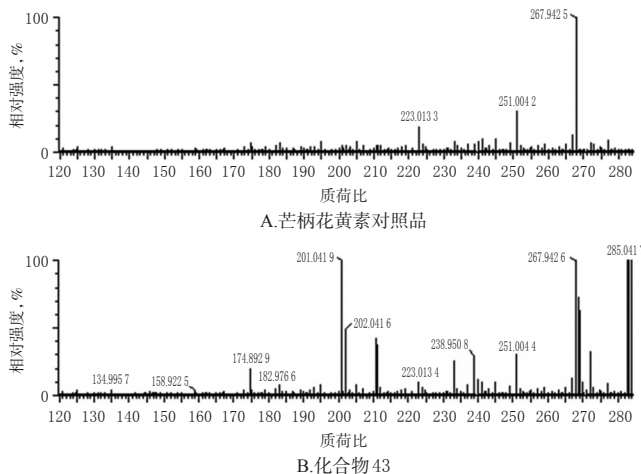


图 6 芒柄花黄素对照品和化合物 43 的 MS/MS 图 (ESI^-)
Fig 6 MS/MS spectrums of formononetin control and compound 43 (ESI^-)

3.4 三萜皂苷类化合物的鉴定

在 ESI^- 模式下, 三萜皂苷类化合物共鉴定出 5 个, 下面以化合物 47 为例, 简述其鉴定过程: 化合物 47 保留时间为 11.91 min, 准分子离子峰 m/z 871.454 5 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$; 以 m/z 871.454 5 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 为母离子进行 MS/MS 扫描, 主要产生 2 个碎片离子, 即 m/z 697.418 2 $[\text{M}-\text{COCH}_3-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2]^-$, m/z 667.167 8 $[\text{M}-\text{H}-\text{OCOCH}_3-$

C₅H₁₀O₂]⁻。结合文献[17]报道,可将其鉴定为黄芪皂苷Ⅱ。化合物47的MS/MS图见图7。

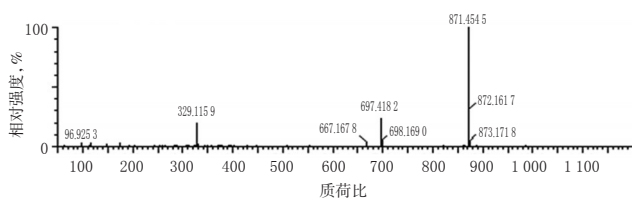


图7 化合物47的MS/MS图(ESI⁻)

Fig 7 MS/MS spectrum of compound 47(ESI⁻)

3.5 醛类、酮类及其他类化合物的鉴定

应用提取离子色谱法结合UNIFI数据分析平台,在ESI⁺、ESI⁻检测模式下,推断出5个醛类,2个酮类及其他类成分(包括1个醌类、1个聚炔类、1个单萜类化合物),其鉴定过程同上(不再一一列出)。

4 讨论

在本研究中,笔者首次运用UPLC-Q-TOF/MS技术结合UNIFI数据分析平台定性分析了ZTHZC中的化学成分。UPLC能够对各成分进行高效地分离,Q-TOF-MS具有高灵敏度、高分辨率,能够进行精准检测,Q-TOF/MS的MS数据采集模式可通过低碰撞能扫描和高碰撞能扫描之间快速切换同时完成两种扫描功能的数据采集,排除假阳性结果,同时进行母离子、子离子、中性缺失分析。在低碰撞能扫描下得到相关分子离子峰及其加合峰的信息,在高碰撞能扫描下得到相关碎片峰的信息,两者再通过保留时间进行关联,UNIFI能够快速筛查鉴定,将三者结合,即可实现快速地分离、检测、鉴定ZTHZC的化学成分。本研究共鉴定了70个化学成分,包括38个有机酸及有机酸酯类、8个生物碱类、9个黄酮类、5个三萜皂苷类、5个醛类、2个酮类、1个醌类、1个聚炔类和1个单萜类化合物。2015年版《中国药典》(一部)规定,利用薄层色谱法进行丹参鉴别和采用高效液相色谱法测定丹参素的含量来控制止痛化癥胶囊的质量^[1],但是对于中药大复方,单一的成分含量测定不足以反映药品的整体质量。而本研究检测到的丹酚酸B等酚酸类、延胡索乙素等生物碱类及黄芪甲苷等都可作为质量控制标准,可保障药品更加有效、安全。本研究为中药材及中药复方化学成分的分析提供了一种快速检测的方法,同时也为ZTHZC的质量控制、药效物质基础的阐明提供了科学依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国中医药科技出版社,2015:630.
 [2] 王楠,章根琴.止痛化癥胶囊联合孕三烯酮胶囊治疗子宫腺肌病临床观察[J].新中医,2017,49(6):77-79.
 [3] 朱建波,顾红红.止痛化癥胶囊联合抗生素治疗慢性盆腔炎临床观察[J].新中医,2017,49(4):97-100.
 [4] 王敏.止痛化癥胶囊治疗原发性痛经22例临床疗效观察

[J].中国民族民间医药,2014,23(9):34.

[5] 方巧兰,黄逸玲.止痛化癥胶囊治疗痛经123例[J].实用中医药杂志,2008,24(5):308.
 [6] 张焯,周浓,夏从龙. HPLC测定止痛化癥胶囊中川楝素的含量[J].亚太传统医药,2010,6(2):30-31.
 [7] 杨晓腾,李井涛,郭美玲. HPLC-ELSD法测定止痛化癥胶囊中黄芪甲苷的含量[J].中国药事,2012,26(7):751-753.
 [8] 陈斌,余岳林,张少敏,等.用HPLC法测定止痛化癥胶囊中丹参素、原儿茶醛、阿魏酸和丹酚酸B的含量[J].药学服务与研究,2007,7(1):71-73.
 [9] 谭静,林红强,刘鹤鹤,等.基于UPLC-Q-TOF/MS技术的血栓心脉宁片成分分析[J].质谱学报,2019,40(3):244-252.
 [10] WANG CZ, ZHANG NQ, WANG ZZ, et al. Rapid characterization of chemical constituents of platycodon grandiflorum and its adulterant adenophora stricta by UPLC-QTOF-MS/MS[J]. *J Mass Spectrom*, 2017, 52(10):643-656.
 [11] 王美玲,张清清,付爽,等. UPLC-Q-TOF MS^E技术结合UNIFI数据库筛查方法快速分析巴戟天化学成分[J].质谱学报,2017,38(1):75-82.
 [12] 任晓蕾,霍金海,孙国东,等.UPLC-Q-TOF-MS法分析防风中香豆素类化学成分[J].中国药房,2019,30(3):349-354.
 [13] CHEN X, LOU Z, ZHANG H, et al. Identification of multiple components in Guanxinning injection using hydrophilic interaction liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and reversed-phase liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2011, 25(11):1661-1674.
 [14] KWAK HS, KANG YS, HAN KO, et al. Quantitation of fatty acid ethyl esters in human meconium by an improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Life Sci*, 2010, 878(21):1871-1874.
 [15] 韩彦琪,许浚,龚苏晓,等.基于HPLC-QTOF/MS及G蛋白偶联受体分析的延胡索物质基础及作用机制研究[J].药学学报,2016,51(8):1302-1308.
 [16] SINGH SP, WAHAJUDDIN, YADAV DK, et al. Quantitative determination of formononetin and its metabolite in rat plasma after intravenous bolus administration by HPLC coupled with tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Life Sci*, 2010, 878(3/4):391-397.
 [17] JUNG JY, JUNG Y, KIM JS, et al. Assessment of peeling of Astragalus roots using ¹H NMR and UPLC-MS-based metabolite profiling[J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(43):10398-10407.

(收稿日期:2019-04-02 修回日期:2019-05-20)

(编辑:林静)