

UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 法分析软坚清脉颗粒化学成分

董文敏^{1,2,3}, 贾成林³, 王新宏², 梁 琨^{2*}, 陈 颖^{2,3*}

(1. 上海市浦东医院, 上海 201399; 2. 上海中医药大学, 上海 201203; 3. 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院, 上海 200082)

摘要: **目的** 建立 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 法分析软坚清脉颗粒化学成分。**方法** 该复方颗粒 50% 甲醇提取液的分析采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸水-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min。通过对照品、文献、Mass Frontier 软件预测裂解规律, 鉴定化学成分。**结果** 共鉴定出 58 种成分, 包括 22 种黄酮、9 种萜类、3 种脂肪酸、4 种羧酸、20 种其他类成分。**结论** 该方法快速准确, 可为软坚清脉颗粒物质基础和质量控制研究提供依据。

关键词: 软坚清脉颗粒; 化学成分; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)01-0293-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.056

下肢动脉硬化闭塞症是动脉粥样硬化累及下肢的一种表现, 特点是形成斑块、血栓造成管腔狭窄甚至阻塞, 最终导致动脉远端的缺血^[1]。我国超过 5 500 万人患病^[2], 并且死亡率在 4%~22% 之间^[3-4]。

软坚清脉颗粒是中医脉管病专家、上海市名中医奚九一教授所创, 由垂盆草、蒲黄、豨莶草、海藻及煅牡蛎组成, 可通过改善缺血症状、降低截肢率从而改善下肢动脉硬化闭塞症的症状, 具有较好的临床疗效^[5]。方中垂盆草性甘淡凉, 归肝、胆、心包经, 具有清热解毒、利湿退黄的功效; 蒲黄性平, 归肝、心包经, 具有化瘀止血、活血止痛等功效; 豨莶草性苦寒, 归肝、肾经, 具有祛风除湿、通利关节, 清热解毒之效; 海藻性苦寒咸, 归肝、肾、胃经, 具有消痰软坚、利水消肿等功效; 煅牡蛎性咸微寒, 归肝、胆、肾经, 具有软坚散结、收敛固涩等功效。中药复方成分复杂, 尤其是含量较低、无明显特征紫外吸收的化合物, 薄层色谱和高效液相色谱难以分析^[6]。UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术可以快速分离复杂样品, 提供高分辨和快速扫描速度的多级质谱信息, 已广泛应用于中药复方定量及定性鉴定分析^[7-8], 具有扫描速度快、分辨率高、灵敏度高、分离效率高等优点^[9]。

课题组前期发现, 软坚清脉颗粒可增加下肢动脉硬化闭塞症大鼠下肢血流量, 降低炎症因子, 改善生化指标。本实验采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术, 结合精确分子量与质谱二级碎片离子信息、保留时间、数据库、相关

文献, 鉴定软坚清脉颗粒化学成分及其质谱裂解规律, 以期探究该制剂药效物质基础及作用机制奠定基础。

1 材料

LTQ-Orbitrap Elite 高分辨质谱仪、Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); JA2003 电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); Centrifuge 5424R 高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); DL-120D 超声波清洗器 (上海之信仪器有限公司); Milli-Q 超纯水机 (美国 Millipore 公司)。

山柰酚 (批号 MB6888)、槲皮素 (批号 B20527)、木犀草素 (批号 B20888)、异鼠李素 (批号 B21554)、咖啡酸 (批号 B20660)、阿魏酸 (批号 YY90050)、异槲皮苷 (批号 B21529)、柚皮素 (批号 B21596)、槲皮苷 (批号 B20526) 对照品均购于上海源叶生物科技有限公司; 芦丁 (批号 100080-200306) 对照品购于中国食品药品检定研究院; 异鼠李素-3-O-新橙皮苷 (批号 12-2008)、香蒲新苷 (批号 18-2015) 对照品均购于上海中药标准化研究中心, 纯度均≥98%。软坚清脉颗粒 (批号 20200401, 上海中医药大学附属上海市中西医结合医院委托上海练塘药业有限公司生产)。甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯 (国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水 (Milli-Q 超纯水机制备)。

2 方法

2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸 (A) -乙腈 (B),

收稿日期: 2022-08-08

基金项目: 上海市“医苑新星”青年医学人才培养资助计划 (2019YXRC06-18); 上海市卫生健康委员会临床研究专项 (202140334); 虹口区卫生健康委员会中医药课题 (HKQ-ZYY-2021-16); 浦东新区卫生系统重点亚专科基金 (PWZy2020-14); 上海中医药大学预算内科研项目 (2021LK062); 复旦大学附属浦东医院重点专科专病诊治中心项目 (Tszk2020-05)

作者简介: 董文敏 (1992—), 女, 硕士, 研究方向为特色中药复方物质基础与作用机制。E-mail: dongwenmin2019@163.com

* **通信作者:** 梁 琨 (1979—), 女, 博士, 讲师, 从事中药活性物质研究。Email: dolphin000000@163.com

陈 颖 (1980—), 男, 博士, 副主任药师, 从事特色中药复方物质基础与作用机制研究。E-mail: lcys7382@163.com

梯度洗脱 (0~5 min, 10% B; 5~10 min, 10%~25% B; 10~20 min, 25%~40% B; 20~30 min, 40%~60% B; 30~40 min, 60%~80% B; 40~45 min, 80%~95% B; 45~50 min, 95% B); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 ℃; 进样量 2 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI); 毛细管喷雾电压负离子 3.2 kV; 离子源温度 400 ℃; 毛细管温度 350 ℃; 鞘气体积流量 35 L/min, 辅助气体流量 15 L/min; 分辨率 60 000, 采集范围 m/z 50~1 200; 二级质谱模式 data dependent scan, 分辨率 30 000; 碰撞方式 CID, 能量 30 eV。

2.3 供试品溶液制备 取本品约 1 g, 精密称定, 加入适量 50% 甲醇溶解, 超声 (功率 360 W, 频率 40 kHz) 提取 60 min, 摇匀, 4 ℃、6 000 r/min 离心 10 min, 取 5 mL 上清液, 挥干后用初始流动相定容至 10 mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.4 对照品溶液制备 精密称取槲皮素、山柰酚、芦丁、异鼠李素、香蒲新苷、异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷、咖啡酸、

柚皮素、异槲皮苷、槲皮苷、阿魏酸对照品适量, 甲醇溶解, 即得对照品溶液 A; 精密称取木犀草素对照品适量, 甲醇溶解, 即得对照品溶液 B, 各成分质量浓度均约为 10 μg/mL, 置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

2.5 化学成分库建立 软坚清脉颗粒中 5 味药材所含化学成分由 TCMS_P、TCMID、TCM Database@Taiwan 等数据库进行收录, 参考相应文献报道进行建库, 具体内容包括化合物的分子式、精确分子量、结构式、名称等。

2.6 数据分析 采用 Thermo Xcalibur QualBrowser 2.2 软件对原始数据进行处理, 通过对照品、文献结合化学成分库检索匹配 (误差<1.0×10⁻⁵), 如存在同分异构体则以照品确认。再采用 Mass Frontier 软件结合文献进行裂解规律预测, 并与二级质谱图中碎片信息进行比对。

3 结果

3.1 成分分析 共鉴定出 58 个化合物, 包括黄酮类 22 个、萜类 9 个、脂肪酸类 3 个、羧酸类 4 个, 以及苯丙素类、油酸、酯类等其他类 20 个, UPLC-LTQ-Orbitrap/MS 总离子流图见图 1, 鉴定结果见表 1。

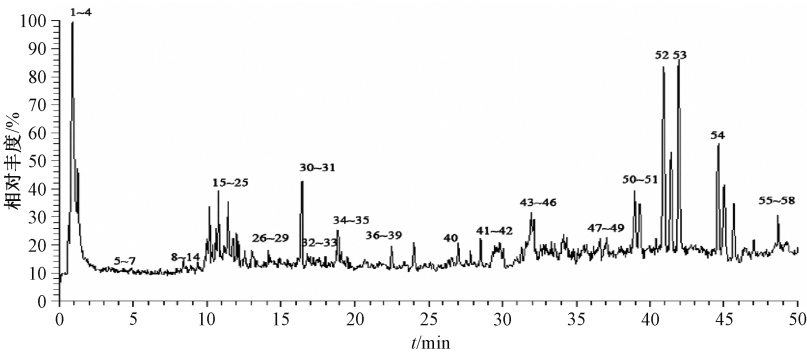


图 1 软坚清脉颗粒 UPLC-LTQ-Orbitrap/MS 总离子流图 (负离子模式)

表 1 软坚清脉颗粒成分鉴定结果

编号	保留时间/ min	分子式	预测值 m/z	实测值 m/z	碎片离子	成分	误差 ($\times 10^{-6}$)	来源
1	1.11	C ₃ H ₆ O ₃	89.023 3	89.023 9	71.01	lactic acid	0.56	蒲黄
2	1.21	C ₄ H ₆ O ₄	117.018 2	117.018 6	99.01, 73.03	succinic acid	0.37	稀荛苳草/蒲黄
3	2.09	C ₇ H ₆ O ₄	153.018 2	153.019 7	109.03	protocatechuic acid	1.48	蒲黄
4	2.38	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O	218.103 6	218.103 4	223.46, 204.51, 188.11, 187.11	trans-zeatin	-0.23	海藻
5	3.38	C ₇ H ₆ O ₃	137.023 3	137.023 5	93.03	4-oxoniobenzoate	0.21	海藻
6	4.84	C ₉ H ₈ O ₄	179.033 9	179.035 1	135.05	caffeic acid *	1.19	海藻
7	5.67	C ₇ H ₆ O ₂	121.028 4	121.028 7	93.03, 73.48	p-hydroxy benzaldehyde	0.31	稀荛苳草/蒲黄/海藻
8	8.00	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.118 4	515.118 2	497.11, 480.26, 471.13, 448.10, 447.09	3,4-dicaffeoyl quinic acid	-0.17	稀荛苳草
9	8.14	C ₉ H ₈ O ₃	163.039 0	163.040 4	119.05, 112.84, 101.02, 84.18	4-hydroxycinnamic acid	1.42	蒲黄
10	9.38	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.087 1	463.087 3	301.04	isoquercitrin *	0.24	蒲黄
11	9.68	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 0	609.139 0	301.03	rutin *	-5.97	垂盆草/蒲黄
12	9.81	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755.202 9	755.195 4	300.03	quercetin-3- <i>O</i> -(2g- α -rhamnosyl)- rutinoside	-7.55	蒲黄
13	9.85	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.049 5	193.050 7	178.03, 149.06, 134.04	ferulic acid *	1.19	稀荛苳草
14	9.98	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	739.208 0	739.214 6	593.15	kaempferol-3- <i>O</i> -(2g- α -rhamnosyl)- rutinoside	6.60	蒲黄
15	10.12	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	769.218 6	769.211 3	605.15, 314.04	typhaneoside *	-7.27	蒲黄
16	10.67	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.150 1	593.145 1	429.08, 285.03, 257.03	kaempferol-3- <i>O</i> -neohesperidoside	-4.96	蒲黄
17	10.77	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.092 2	447.096 5	285.04	quercitrin *	-0.45	垂盆草

续表 1

编号	保留时间/ min	分子式	预测值 <i>m/z</i>	实测值 <i>m/z</i>	碎片离子	成分	误差/ (×10 ⁻⁶)	来源
18	10.80	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.160 7	623.160 7	357.06,315.05,300.03,271.02,255.03	isorhamnetin-3- <i>O</i> -neohesperidoside *	-5.20	蒲黄
19	11.07	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.145 0	609.139 7	300.03	quercetin-3- <i>O</i> -neohesperidoside	-5.36	蒲黄
20	11.35	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.160 7	623.155 0	459.09,314.04	isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoideside	-5.63	蒲黄
21	11.76	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.102 8	477.099 7	357.06,315.04,285.04,151.00	isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside	-3.08	垂盆草
22	12.06	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	491.118 4	491.118 2	477.10,476.10,473.24,461.07	tricin-7- <i>O</i> -glucoside	-0.24	垂盆草
23	12.16	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.118 4	515.116 2	353.09	3,4-dicaffeoyl quinic acid or 3,5-dicaffeoyl quinic acid	-2.19	稀荬草
24	12.51	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.034 3	301.032 6	273.04,257.04,179.00,151.00	quercetin *	-1.66	垂盆草
25	12.64	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.097 3	431.097 8	283.04	cosmosiin or vitexin	0.57	垂盆草
26	13.79	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343.081 2	343.081 8	325.07	3,3',4'-trimethoxy quercetin	0.56	稀荬草
27	14.46	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.039 4	285.037 7	267.03,241.05,199.04,151.00,133.03	luteolin *	-1.64	垂盆草
28	14.53	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.097 3	431.101 2	285.04	cosmosiin or vitexin	-0.45	稀荬草
29	15.81	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	351.216 6	351.214 5	291.19	ent-2β,15,16-trihydroxypimar- 8(14)-en-19-oic acid	-2.09	稀荬草
30	16.32	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.060 1	271.058 4	177.02,151.00	naringenin *	-1.69	蒲黄
31	16.90	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.065 6	329.066 2	314.04,313.04,311.22,309.21	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3- methoxyphenyl)-3-methox	0.64	稀荬草
32	16.96	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.039 4	285.038 0	151.00	r 3,4'- <i>O</i> -dimethyl quercetin kaempferol *	-1.40	垂盆草
33	17.44	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.049 9	315.048 3	300.03	isorhamnetin *	-1.68	垂盆草
34	18.79	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.232 3	329.230 2	229.14,211.13,171.10	pinellie acid or 1-hydroxy-1,2- ethanediy diotanoate	-2.09	稀荬草
35	19.47	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	335.221 7	335.219 6	317.21,291.19,289.21,267.16	ent-16β,17-dihydroxy- kauran-19-oic acid	-2.05	稀荬草
36	21.40	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.065 6	329.063 7	314.04,299.02	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3- methoxyphenyl)-3-methoxy or 3', 4'- <i>O</i> -dimethyl quercetin	-1.89	蒲黄
37	22.45	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	265.143 4	265.145 3	96.96	3β-hydroxybalchanolide	1.85	稀荬草
38	22.49	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	313.237 3	313.235 6	295.23,201.11,171.10	12,13-dihydroxy-9 <i>Z</i> - octadecanoic acid	-1.71	稀荬草
39	23.73	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	353.232 3	353.233 2	335.22	12-hydroxykirenol	0.97	稀荬草
40	26.43	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	319.226 8	319.224 8	301.21,273.22,260.87,251.16,207.14	ent-14β,16-epoxy-8-pimarene- 3α,15-diol or 14β,16-epoxy- ent-3β,15α,19-trihydroxypimar-7- ene or ent-16-acetoxy-8(14)- pimarene-3,15s-diol	-1.95	稀荬草
41	29.68	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	293.211 1	293.209 4	275.20,265.22,211.13,183.14,171.10	13-oxo-9e,11e-octadecadienoic acid	-1.77	稀荬草
42	29.92	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.211 1	317.212 0	311.15	grandifloric acid or (4β)-19- hydroxy-kaur-16-en-18-oic acid	0.89	稀荬草
43	31.65	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	317.211 1	317.209 1	299.20,255.21,179.11	grandifloric acid or (4β)-19- hydroxy-kaur-16-en-18-oic acid	-1.98	稀荬草
44	32.02	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295.226 8	295.225 0	277.21	vernolic acid	-1.82	稀荬草
45	32.19	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	319.226 8	319.224 7	301.21,207.14	ent-14β,16-epoxy-8-pimarene-3α, 15-diol or 14β,16-epoxy-ent-3β, 15α,19-trihydroxypimar-7-ene or ent-16-acetoxy-8(14)- pimarene-3,15s-diol	-2.07	稀荬草
46	33.58	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	319.226 8	319.224 8	301.21,257.23,155.07	ent-14β,16-epoxy-8-pimarene-3α, 15-diol or 14β,16-epoxy-ent-3β,15α, 19-trihydroxypimar-7-ene or ent-16- acetoxy-8(14)-pimarene-3,15s-diol	-1.98	稀荬草
47	36.77	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	487.341 8	487.338 0	425.34,265.18,263.16,223.17	euscaphic acid	-3.76	稀荬草
48	37.25	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	321.242 4	321.243 2	303.23	darutigenol	0.81	稀荬草

续表 1

编号	保留时间/ min	分子式	预测值 m/z	实测值 m/z	碎片离子	成分	误差/ ($\times 10^{-6}$)	来源
49	37.79	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.232 3	329.230 3	311.22, 293.21, 211.13, 199.13, 181.12	pinellie acid or 1-hydroxy-1,2-ethanediy l dioctanoate	-1.93	稀荛草
50	39.08	C ₂₆ H ₄₀ O ₆	447.274 1	447.270 7	415.25, 347.26, 175.04, 160.02	siegesesteric acid I	-3.40	稀荛草
51	40.61	C ₁₉ H ₃₆ O ₅	343.247 9	343.245 7	213.18	3-dodecanoyloxy-2-hydroxy-4-methylpentanoic acid methyl ester	-2.23	稀荛草
52	41.35	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	303.231 9	303.230 0	259.24, 205.19	arachidonic acid	-1.88	蒲黄
53	42.06	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	347.221 7	347.220 1	347.22, 331.39	16 β - <i>H</i> -ent-kaurane-17,18-dioic acid, 17-methylester	-1.57	稀荛草
54	44.56	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	255.231 9	255.230 3	237.22	palmitic acid	-1.54	垂盆草
55	48.43	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	471.346 9	471.343 0	427.35, 409.34, 393.31	hederagenin	-3.87	稀荛草
56	48.53	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	283.263 2	283.261 5	265.25	stearic acid	-1.65	蒲黄
57	48.63	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	309.278 8	309.276 9	291.27	(<i>E</i>)-icos-2-enoic acid	-1.92	蒲黄
58	48.66	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	427.357 1	427.353 5	409.35, 397.31, 369.33, 363.36, 337.34	3 β -hydroxy poriferast-5-en-7-one	-3.57	蒲黄

注：* 为与对照品比对。

3.2 质谱裂解规律研究

3.2.1 黄酮类 共鉴定出 22 个，主要为黄酮苷元、黄酮苷。前者（如槲皮素、异鼠李素、山柰酚等）在负离子模式下易发生一系列中性小分子的丢失，如 CO、CO₂、CH₃、H₂O、CHO₂ 等；C 环易发生 RDA 裂解反应，即主要断裂在 1、2 号位 C-O 键与 2、3 号位或 3、4 号位的 C-C 键，产生 A 环和 B 环两个碎片离子；还有部分 C 环中间双氧结构的 C 环脱去 CO₂ 后变成 1 个四元环结构，而后者（如槲皮苷、异槲皮苷等）结构特点主要是黄酮苷元与葡萄糖、鼠李糖等形成氧苷，在负离子模式下发生连续苷键的断裂，形成丢失 1 个或多个糖的次级苷或苷元碎片离子，从而生成高强度的黄酮苷元碎片。

黄酮苷元以峰 24 为例，其保留时间为 12.51 min，准分子离子峰 m/z 301.032 6 [M-H]⁻，二级质谱图显示母离子失去 CO 形成的碎片离子峰 m/z 273.04，或失去 CO₂ 形成的碎片离子峰 m/z 257.04，分子离子峰经 RDA 裂解形成 m/z 179.00，进一步失去 CO 形成的碎片离子峰 m/z 151.00。根据精确分子质量、特征碎片离子、对照品结合文献 [10] 比对，推测该成分为槲皮素，其二级质谱图及裂解途径见图 2。

峰 27 也有相似的中性丢失和 RDA 裂解，其保留时间为 14.46 min，准分子离子峰 m/z 285.037 7 [M-H]⁻，二级质谱图显示有失去 H₂O 形成的碎片离子峰 m/z 267.03、失去 CO₂ 形成的碎片离子峰 m/z 241.05、失去 C₄H₆O₂ 形成的碎片离子峰 m/z 199.04，以及经 RDA 反应分别形成的碎片离子峰 m/z 151.00、 m/z 133.03。根据精确分子量、特征碎片离子、对照品结合文献 [11] 比对，推测该成分为木犀草素，其二级质谱图及裂解途径见图 3。

黄酮苷以峰 18 为例，其保留时间为 10.80 min，准分子离子峰 m/z 623.160 7 [M-H]⁻，二级质谱图上显示失去新橙皮糖形成碎片离子峰 m/z 315.05，再失去 1 个 CO₂ 形成碎片离子峰 m/z 271.02；失去 C₁₀H₁₈O₈ 形成碎片离子峰 m/z 357.06，失去 C₁₃H₂₃O₉ 形成碎片离子峰 m/z 300.03，

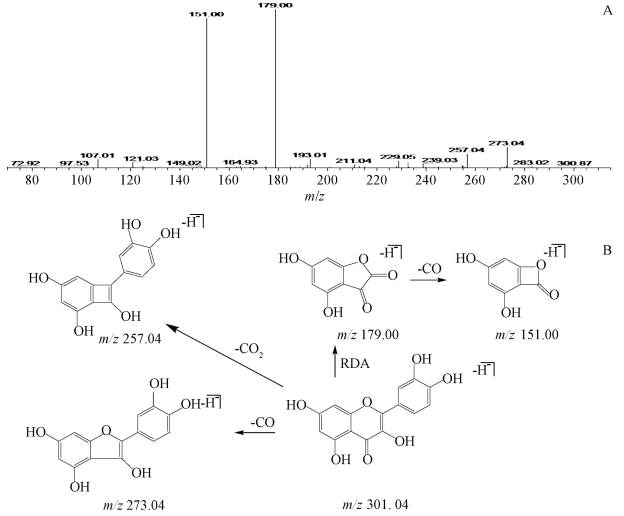


图 2 槲皮素二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

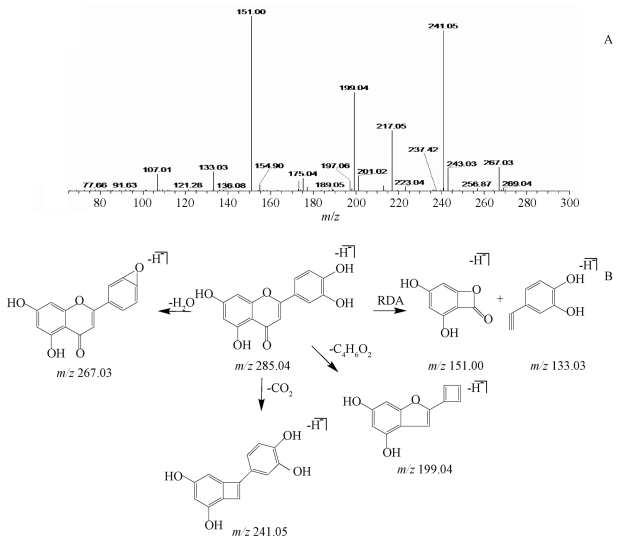


图 3 木犀草素二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

再进一步失去 CHO₂ 形成碎片离子峰 m/z 255.03。根据精确分子量、特征碎片离子、对照品结合文献 [12] 比对，

判断该成分为异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷，其二级质谱图及裂解途径见图 4。

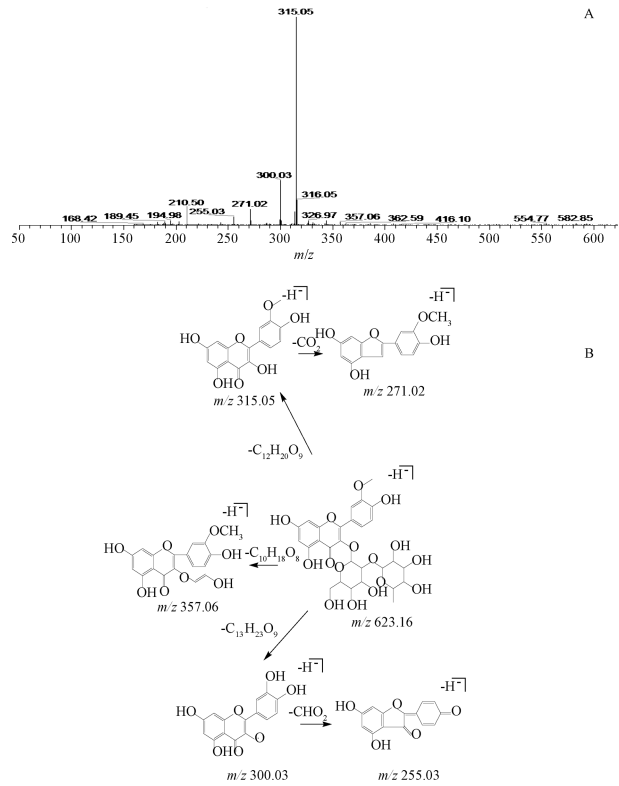


图 4 异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

3.2.2 有机酸类 该类化合物在负离子模式下主要脱去甲基和羧基，产生一系列碎片离子。以峰 13 为例，其保留时间为 9.85 min，准分子离子峰 m/z 193.050 7 $[M-H]^-$ ，其二级质谱图上有失去 CO_2 形成碎片离子峰 m/z 149.06，再进一步失去 CH_3 形成 A 碎片离子峰 m/z 134.04，准分子离子峰失去 CH_3 形成碎片离子峰 m/z 178.03。根据精确分子量、特征碎片离子、对照品结合文献 [13] 比对，推测该成分为阿魏酸，其二级质谱图及裂解途径见图 5。

3.2.3 萜类 该类化合物在负离子模式下经质谱碰撞下易发生脱水。以峰 48 为例，其保留时间为 37.25 min，准分子离子峰 m/z 321.243 2 $[M-H]^-$ ，二级质谱图上显示失去 H_2O 形成碎片离子峰 m/z 303.23。根据精确分子量、特征碎片离子结合 Mass Frontier 软件预测，推测该成分为稀荑精醇，其二级质谱图及裂解途径见图 6。

3.2.4 醚类 该类化合物在负离子模式下易发生脱水。以峰 45 为例，其保留时间为 32.02 min，准分子离子峰 m/z 295.225 0 $[M-H]^-$ ，二级质谱图上显示失去 H_2O 形成碎片离子峰 m/z 277.21。根据精确分子量、特征碎片离子结合 Mass Frontier 软件预测，推测该成分为斑鸠菊酸，其二级质谱图及裂解途径见图 7。

4 讨论

本实验分别考察了不同流动相体系对分离效果的影响，包括乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸、甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸。

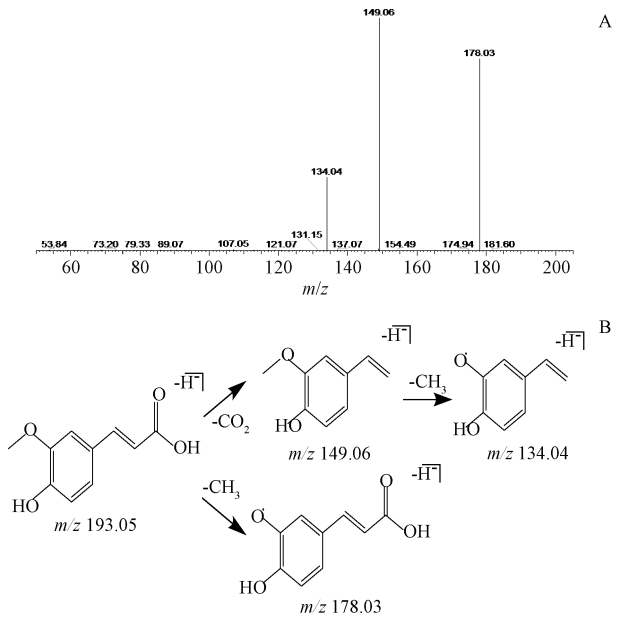


图 5 阿魏酸二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

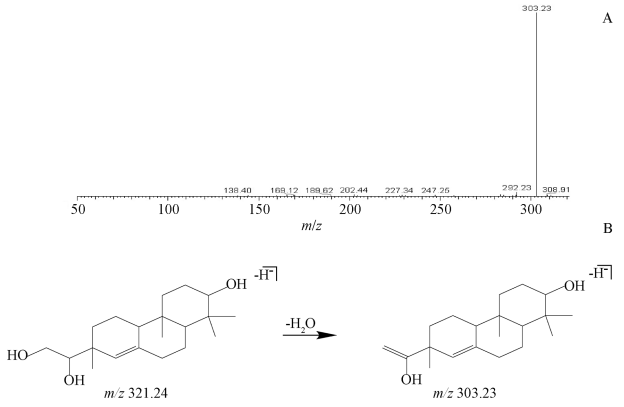


图 6 稀荑精醇二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

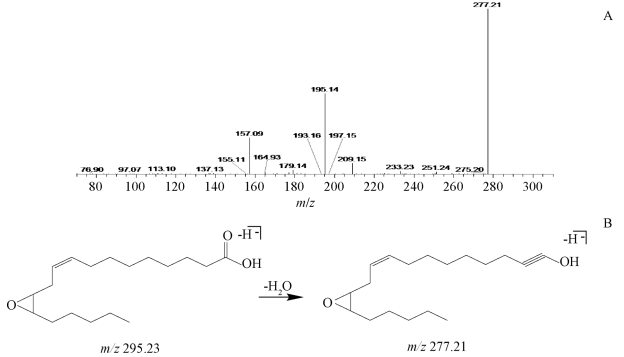


图 7 斑鸠菊酸二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

结果表明，在流动相的水相中加入 0.1% 甲酸可有效改善软坚清脉颗粒中成分的质谱响应强度；乙腈相较于甲醇能够提高颗粒剂中成分的分离效果，因此采用乙腈-0.1% 甲酸水作为流动相体系。此外，分别考察了不同的提取溶剂对提取效率的影响，不同的提取溶剂有 25%、50%、75%、90% 甲醇，以质谱响应值、峰个数及峰形等作为考察指标，最终选择 50% 甲醇作为提取溶剂。为全面鉴定软坚清脉颗粒中化学成分，分别用正负离子模式进行分析，发现在不同

模式下黄酮类、萜类等成分均在负离子模式出峰，响应较高，因此采用负离子模式。

下肢动脉硬化闭塞症具有发病率、截肢率较高等特点，中药复方由于其多成分、多靶点等特点，对于本病治疗更显优势，而本次研究对象软坚清脉颗粒已取得了较好的临床疗效。由表 1 可知，软坚清脉颗粒的主要成分为黄酮苷及其苷元类成分，如槲皮素、山柰酚及异鼠李素可通过抑制 Rhoa 蛋白，具有抑制血栓形成、降低促炎细胞因子水平，从而减轻炎症反应^[14-16]，因此可初步推断软坚清脉颗粒中黄酮类成分可能为主要的活性成分。

综上所述，本研究采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术对软坚清脉颗粒化学成分进行快速表征，共鉴定 58 个化合物。该分析方法具有快速、灵敏及高分辨率等优点，可作为软坚清脉颗粒质量控制的方法，为进一步探究其药效物质基础及机制通路提供可靠依据。

参考文献：

[1] Akagi D, Hoshina K, Akai A, *et al.* Outcomes in patients with critical limb ischemia due to arteriosclerosis obliterans who did not undergo arterial reconstruction[J]. *Int Heart J*, 2018, 59(5): 1041-1046.

[2] Santulli G, Wronska A, Uryu K, *et al.* A selective microRNA-based strategy inhibits restenosis while preserving endothelial function[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(9): 4102-4114.

[3] van Netten J J, Fortington L V, Hinchliffe R J, *et al.* Early post-operative mortality after major lower limb amputation: a systematic review of population and regional based studies[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2016, 51(2): 248-257.

[4] He X M, Zheng Y Q, Liu S Z, *et al.* Altered plasma MicroRNAs as novel biomarkers for arteriosclerosis obliterans[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(2): 196-206.

[5] 王 健, 奚九一, 赵兆琳. 软坚清脉方对肢体动脉硬化性闭塞主证的临床研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2004, 10(2): 5-8.

[6] 苏 靖, 戴荣继. 液质联用技术在中药研究中的应用[J]. 生命科学仪器, 2014, 12(Z1): 38-42.

[7] Ji W, Wang T, Xu Y, *et al.* Identifying the active compounds and mechanism of action of Banxia Xiexin decoction for treating ethanol-induced chronic gastritis using network pharmacology combined with UPLC-LTQ-Orbitrap MS[J]. *Comput Biol Chem*, 2021, 93: 107535.

[8] Duan H, Wang W, Li Y, *et al.* Identification of phytochemicals and antioxidant activity of *Premna microphylla* Turcz. stem through UPLC-LTQ-Orbitrap-MS [J]. *Food Chem*, 2022, 373: 131482.

[9] 刘荣霞, 果德安, 叶 敏, 等. 液质联用技术 (LC/MS) 在中药现代研究中的应用[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2005, 7(5): 33-40.

[10] 孙 倩. 基于液质联用技术的大小蓟多组分分析与黄酮类成分的药物代谢动力学研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.

[11] 许倩倩, 包贝华, 张 丽, 等. UPLC-QTOF-MS 分析乌菟莓成分及多组分定量研究[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(4): 517-524.

[12] Du L Y, Zhao M, Tao J H, *et al.* The metabolic profiling of isorhamnetin-3-O-neohesperidoside produced by human intestinal flora employing UPLC-Q-TOF/MS[J]. *J Chromatogr Sci*, 2017, 55(3): 243-250.

[13] 肖观林, 江洁怡, 胥爱丽, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的布芍调脂胶囊化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(14): 190-199.

[14] Tao X, Chen Q, Li N, *et al.* Serotonin-RhoA/ROCK axis promotes acinar-to-ductal metaplasia in caerulein-induced chronic pancreatitis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 1099.

[15] Sharma D, Gondaliya P, Tiwari V, *et al.* Kaempferol attenuates diabetic nephropathy by inhibiting RhoA/Rho-kinase mediated inflammatory signalling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1610-1619.

[16] Wang C, Nan X, Pei S, *et al.* Salidroside and isorhamnetin attenuate urotensin II-induced inflammatory response *in vivo* and *in vitro*: Involvement in regulating the RhoA/ROCK II pathway [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(4): 292.