

UPLC-ESI-QTOF/MS^E 结合 UNIFI 快速 分析华蟾素注射液化学成分

吴欢^{1,3*}, 唐卯星², 陶欣怡¹, 占翔¹, 仇静文¹, 高波⁴, 李庆林^{1,3}

¹安徽中医药大学科研实验中心, 合肥 230038; ²四川大学化学学院, 成都 610065;

³新安医学教育部重点实验室, 合肥 230038;

⁴安徽华润金蟾药业股份有限公司, 淮北 235000

摘要:采用超高效液相色谱-电喷雾离子源-四级杆飞行时间质谱(UPLC-ESI-QTOF/MS)结合 UNIFI 天然产物信息平台快速分析华蟾素注射液化学成分。利用 QTOF/MS 非信息依赖扫描的 MS^E 模式采集复杂组分质谱信息, 将采集的质谱数据文件和自建化学成分库导入 UNIFI, 进行智能匹配, 随后使用 MassLynx 工作站逐个核对。本实验共辨识 76 个化学成分, 其中蟾蜍二烯羧酸内酯类 36 个、生物碱类 12 个(包括 1 种新成分)、小分子肽类 13 个、有机酸类 7 个、酰胺类 4 个、甾醇类 2 个、其他类 2 个。本方法能快速分离、分析华蟾素注射液复杂组分, 为该制剂的毒-效成分及质量控制研究奠定了基础。

关键词:华蟾素注射液; UPLC-ESI-QTOF/MS; UNIFI; 化学成分

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)3-0498-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.3.020

Rapid identification of chemical constituents in Cinobufacini injection by UPLC-ESI-QTOF/MS^E combined with UNIFI informatics platform

WU Huan^{1,3*}, TANG Mao-xing², TAO Xin-yi¹, ZHAN Xiang¹, QIU Jing-wen¹, GAO Bo⁴, LI Qing-lin^{1,3}

¹Scientific Research & Experiment Center, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

²School of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

³Key Laboratory of Xin'an Medicine, Ministry of Education, Hefei 230038, China;

⁴Anhui China Resources Jin Chan Pharmaceutical Co., Ltd., HuaiBei 235000, China

Abstract: To systemic analysis the chemical profile of Cinobufacini injection using ultra-high performance liquid chromatography electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-QTOF/MS) in MS^E mode combined with UNIFI platform. The original MS^E data of collected samples and the self-built chemical composition database were imported into UNIFI platform. Then, the chemical constituents of Cinobufacini injection were screened automatically through UNIFI platform and checked one by one through MassLynx workstation. A total of 76 chemical components in Cinobufacini injection were identified, including 36 bufadienolides, 12 alkaloids (including a new compound), 13 peptides, 7 organic acids, 4 amides, 2 sterols and 2 other components. UPLC-ESI-QTOF/MS^E combined with UNIFI informatics platform can quickly separate and analyze the complex natural products, and the results laid a foundation for further study on quality control and toxic-active ingredients of Cinobufacini injection.

Key words: Cinobufacini injection; UPLC-ESI-QTOF/MS; UNIFI; chemical constituents

华蟾素为中华大蟾蜍 (*Bufo gargarizans* Cantor) 或黑眶蟾蜍 (*Bufo melanostictus* Schneider) 干燥表皮

(蟾皮)的水煎煮提取物, 主要成分有蟾蜍二烯羧酸内酯类、吲哚生物碱类及多肽类等^[1-4]。华蟾素注射液是华蟾素的灭菌水溶性制剂, 抗癌谱广, 临床主治中晚期肝癌、肺癌、胰腺癌等病症^[5]。现代药理学研究表明华蟾素抑瘤效应可能与其调控 Caspase-10

收稿日期: 2019-11-19 接受日期: 2020-04-01

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81903765); 安徽省高等学校自然科学基金重点项目(KJ2019A0478); 安徽省博士后研究人员科研活动资助项目(2017B193)

* 通信作者 Tel: 86-55165169051; E-mail: wuhuanpcu@163.com

介导的死亡受体通路、P38MAPK 信号通路等作用有关^[6]。但其发挥抑瘤效应的物质基础尚未明确,为探究其药效物质,对华蟾素注射液化学物质基础作系统研究是必要的。

超高效液相色谱-电喷雾离子源-四极杆飞行时间质谱(UPLC-ESI-QTOF/MS)集合了液相色谱的高分离效能和高分辨质谱的强大表征能力^[7],已广泛应用于中药的体内外物质基础研究。在定性分析过程中,以往科研工作者常手动提取色谱峰,并根据准分子离子、特征碎片离子、保留时间等信息对化合物进行逐一辨识,解析过程复杂且耗时^[8]。UNIFI 是一个高效的智能化数据分析平台,可将 MS^E 模式采集的组分质谱数据与自建数据库中成分进行智能匹配,快速识别中药复杂组分^[9-11]。本研究拟通过 UPLC-ESI-QTOF/MS^E 结合 UNIFI 对华蟾素注射液中化学组分进行分析,为该制剂的毒-效成分及质量控制研究奠定基础。

1 仪器与材料

Acquity I Class-Xevo G2-XS 型 UPLC-ESI-QTOF/MS(美国 Waters 公司);ADW-1002-B 型超纯水机(美国 Aquapro 公司);华蟾素注射液(10.0 mL/支,批号:180410-2,安徽华润金蟾药业股份有限公司);甲酸(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);乙腈、甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);乙酸乙酯(分析纯,江苏强盛功能化学股份有限公司);MassLynx 4.1 工作站(美国 Waters 公司);UNIFI 天然产物信息平台(美国 Waters 公司)。

2 方法

2.1 华蟾素注射液样品溶液、空白溶液及混合对照溶液的制备

取华蟾素注射液 20 mL,减压蒸干,4 mL 甲醇复溶,离心(12 000 rpm,10 min)后取上清液,过 0.22 μm 微孔滤膜。另取灭菌水溶液 20 mL,制备方法同华蟾素样品溶液。称取脯氨酸、蟾蜍噻啉、日蟾毒它灵、沙蟾毒精、远华蟾毒精、蟾毒它灵、华蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾毒精等 9 种对照品适量,加甲醇溶解,0.22 μm 微孔滤膜过滤后置于进样小瓶。

2.2 液相色谱条件

Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm),流速:0.2 mL/min,柱温:35 ℃,进样量:2 μL,流动相:0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序:0 min,3% B;3 min,3% B;5 min,5% B;7 min,10% B;11~13 min,30% B;15

min,38% B;18 min,50% B;20 min,60% B;24~27 min,90% B;28~31 min,3% B。

2.3 质谱条件

工作站:MassLynx 4.1 软件;电喷雾离子源以正离子模式(ESI⁺)采集数据,应用亮氨酸-脑啡肽实时校正。质量扫描范围 50~1 200 m/z;毛细管电压 3.0 kV;锥孔电压 40 kV;离子源温度 120 ℃;脱溶剂气体(N₂)温度 350 ℃;脱溶剂气体流速:600 L/h。设置低碰撞能量为 6 eV,高碰撞能量为 20~50 eV。

2.4 UNIFI 数据处理方法

已知化合物的分析策略:1)华蟾素化学成分库的建立。以华蟾素、蟾皮、蟾酥为关键词检索华蟾素化学成分定性研究文献,使用 ChemDraw 绘制已知成分结构式,并导入 UNIFI 库;2)初步分析结果。UPLC-ESI-QTOF/MS^E 采集的华蟾素注射液样品溶液及空白样品溶液原始文件导入 UNIFI 进行样品间比对,筛查出华蟾素相关分离组分;基于 UNIFI 库进行自动匹配,快速识别分离组分(设置参数:2D 峰值检测最小峰面积设为 200;3D 峰值检测中,高能量与低能量下获取的峰强度分别为 150 和 500;质量误差范围:±10 ppm;选择加合离子:[M+H]⁺和[M+Na]⁺);3)人工复核。利用 MassLynx 工作站,结合组分的准分子离子精密质量、保留时间、碎片离子信息及文献,复核上述鉴定结果。

对于 UNIFI 未能匹配的具有较高响应值的化合物,使用软件中的 Elucidate 功能进行解析:1)利用 UNIFI 软件中 Library Search 对系统自带的中药数据库(包含 6 000 多种天然产物)进行检索;2)利用 ChemSpider 进行在线检索;3)若检索无果,UNIFI 软件中的 Elemental-Composition 可以根据同位素模式(i-FIT 得分)匹配以及准分子离子、主要碎片离子精密质量推测分子式,结合已知化合物的母体结构及特征碎片离子识别化合物。

3 结果

3.1 UPLC-ESI-QTOF/MS 条件的优化

通过查阅文献得知,蟾皮、蟾酥中复杂组分的分离多采用乙腈-有机酸水系统^[12]。因此,洗脱液主要考察了乙腈-水,乙腈-0.5% 乙酸溶液,乙腈-0.1% 甲酸溶液。结果显示,乙腈-0.1% 甲酸溶液作为洗脱液时,华蟾素注射液中各成分的峰形较为尖锐且分离度较好;另比较了正负两种离子检测模式,ESI⁺ 模式下具有更好的离子化效率且峰数更多。

3.2 华蟾素注射液中化学成分分析

共识别华蟾素注射液中 76 个化学成分(空白、混合对照及样品溶液的总离子流图见图 1),其中蟾蜍二烯羟酸内酯类 36 个(峰 28、34、36~39、41~61、63~67、69~71、75),生物碱类 12 个(包括 1 种新成分)(峰 12、14、15、17~19、21、22、25~27、32),

氨基酸、核苷及小分子肽类共 13 个(峰 1~4、6~11、13、29、35),小分子有机酸类 7 个(峰 16、23、30、31、33、40、74),酰胺类 4 个(峰 5、24、68、72),甾醇类 2 个(峰 73 和 76)及其他类 2 个(峰 20 和 62)。本实验所鉴定的化合物质谱信息见表 1。

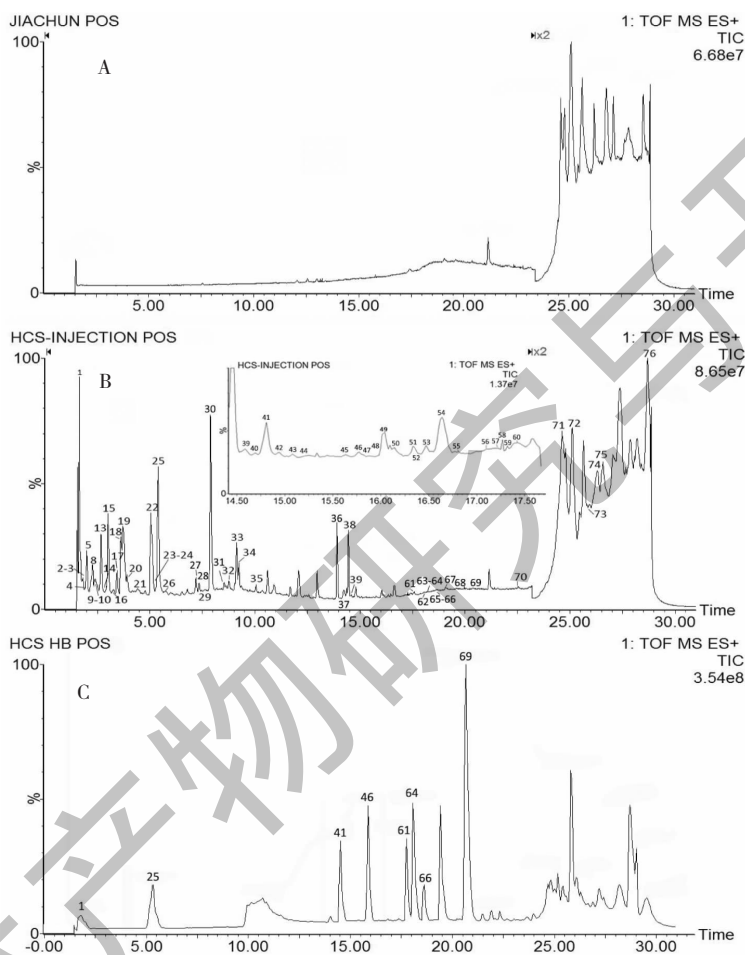


图 1 ESI⁺模式下空白样品(A)、华蟾素注射液(B)和混合对照溶液(C)的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of blank sample (A), Cinobufacini injection sample (B) and mixed reference solution (C) in ESI⁺ mode

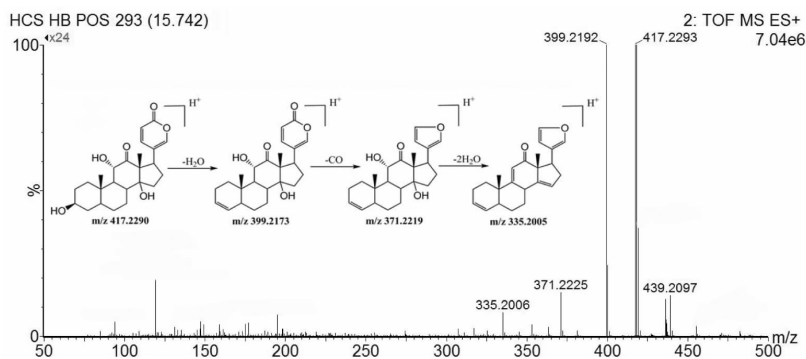
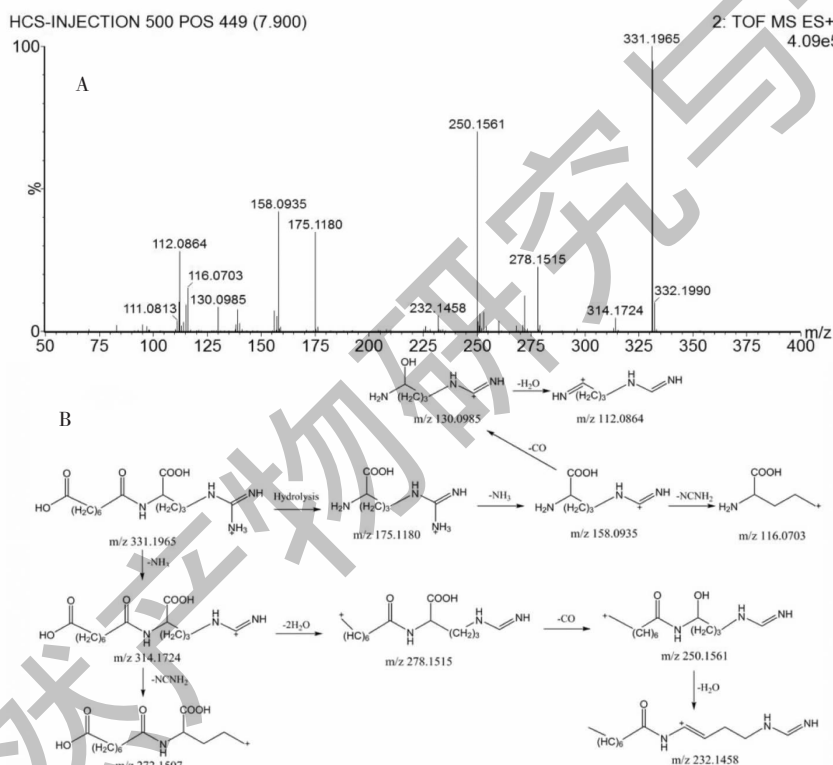
3.2.1 蟾蜍二烯羟酸内酯类

蟾蜍二烯羟酸内酯类成分共有 36 个,以峰 46 为例简述其结构推导过程。峰 46 在 15.74 min 处的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 417.229 3,通过软件元素分析推测其分子式为 $C_{24}H_{32}O_6$;根据其高碰撞能量下碎片离子的精密质量,发现脱去一分子 H_2O 的碎片离子 $[M + H - H_2O]^+$ (m/z 399.219 2),继而脱去一分子 CO 产生 $[M + H - H_2O - CO]^+$ (m/z 371.222 5)的碎片离子,再脱去 2 分子 H_2O ,产生

$[M + H - 3H_2O - CO]^+$ (m/z 335.200 6)的碎片离子。其裂解行为及保留时间与沙蟾毒精对照品一致(图 2),确认峰 46 为沙蟾毒精。其它蟾蜍二烯羟酸内酯类成分以类似步骤进行识别。

3.2.2 生物碱类

生物碱类成分共有 12 个(包括 1 种新成分),其中吲哚类生物碱 11 个。现以峰 25 为例进行质谱解析。化合物 25 的 t_R 为 5.40 min,准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 283.077 0($C_{12}H_{14}N_2O_4S$);根据其

图2 ESI⁺模式下化合物46的质谱图及裂解途径Fig. 2 Mass spectrum and proposed fragmentation pathways of compound 46 in ESI⁺ mode图3 ESI⁺模式下化合物30的质谱图(A)及裂解途径(B)Fig. 3 Mass spectrum (A) and proposed fragmentation pathways (B) of compound 30 in ESI⁺ mode

碎片离子的精密质量,发现脱去SO₃的碎片离子[M + H-SO₃]⁺ (m/z 203.1170),随后还发现[M + H-SO₃]⁺连续脱甲基的碎片离子[M + H-SO₃-CH₃]⁺ (m/z 188.0954), [M + H-SO₃-2CH₃]⁺ (m/z 173.0715)。其裂解行为与文献^[3]报道的蟾蜍噻啉裂解行为极为相似,推测化合物25为蟾蜍噻啉,这一结果用蟾蜍噻啉对照品作了验证。其它生物碱类成分以类似步骤进行识别,其中峰27为未曾报道成分。

峰27的t_R为6.79 min,一级质谱中的准分子离子峰[M + H]⁺为m/z 201.1011 (C₁₂H₁₂N₂O, Cal. 201.1022);根据其碎片离子的精密质量,在ESI⁺模式下,先脱去CH₄产生碎片离子[M + H-CH₄]⁺ (m/z 185.0740),随后依次脱去CN、C₂H₂O、NH,产生[M + H-C₂H₄N]⁺ (m/z 160.0756)、[M + H-C₂H₄N-C₂H₂O]⁺ (m/z 118.0651)、[M + H-C₂H₄N-C₂H₂O-NH]⁺ (m/z 103.0561)的碎片离子。根据其精密质

量及裂解行为,推测峰 27 为峰 22(脱氢蟾蜍色胺)进一步脱氢的代谢物。

3.2.3 小分子有机酸类

小分子有机酸类化合物共有 7 个。以峰 30 为例对其进行质谱裂解分析。峰 30 的 t_R 为 7.90 min,一级质谱中的准分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 331.196 5 ($C_{12}H_{26}N_4O_5$, Cal. 331.198 1),根据其碎

片离子的精密质量,推测该成分依次发生水解,脱 NH_3 、 H_2O 、 $NCNH$ 、 CO 等裂解反应,均属辛二酰精氨酸的特征裂解反应。其碎片裂解行为(图 3)与文献^[12]报道的辛二酰精氨酸裂解行为一致,推测峰 30 为辛二酰精氨酸。其它小分子有机酸类成分以类似步骤进行识别。

表 1 华蟾素注射液样品在 ESI⁺ 模式下检测出的化学成分

Table 1 Identification of chemical constituents from Cinobufacini injection sample in ESI⁺ mode

No.	化合物 Compound	保留时间 t_R (min)	分子式 Formula	测量值 Observed mass (Da)	计算值 Calculated mass (Da)	误差 Mass error (ppm)	加合物 Adducts	碎片离子 MS/MS
1	脯氨酸 Proline *	1.63	$C_5H_9NO_2$	116.070 7	116.071 2	-4.3	$[M + H]^+$	116.070 7, 98.059 5, 82.039 6
2	次黄嘌呤 Hypoxanthine	1.65	$C_5H_4N_4O$	137.045 8	137.046 3	-3.6	$[M + H]^+$	137.045 8, 119.036 4, 110.035 7
3	黄嘌呤 Xanthine	1.71	$C_5H_4N_4O_2$	153.040 4	153.041 3	-5.9	$[M + H]^+$	153.040 4, 136.013 7, 110.035 7
4	尿苷 Uridine	1.82	$C_9H_{12}N_2O_6$	267.058 3	267.059 3	-3.7	$[M + H]^+$	267.058 3, 169.057 7, 124.006 4
5	蟾蜍环酰胺 D Bufogarganzanine-D	2.00	$C_8H_{12}N_2O_3$	185.093 5	185.092 6	4.9	$[M + H]^+$	141.065 5, 114.054 0, 94.065 4, 86.095 2
6	腺嘌呤 Adenine	2.17	$C_5H_5N_5$	136.063 1	136.062 3	5.9	$[M + H]^+$	136.063 1, 119.036 4, 92.024 6
7	腺苷 Adenosine	2.18	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	268.105 0	268.104 6	1.5	$[M + H]^+$	268.105 0, 136.063 1, 119.036 4, 92.024 6
8	胸苷 Thymidine	2.26	$C_{10}H_{14}N_2O_5$	265.081 4	265.080 0	5.2	$[M + Na]^+$	243.096 5, 127.049 8, 110.022 8, 109.039 8
9	鸟嘌呤 Guanine	2.37	$C_5H_5N_5O$	152.057 3	152.057 2	0.7	$[M + H]^+$	152.057 3, 135.031 5, 110.035 7
10	鸟苷 Guanosine	2.37	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	284.100 4	284.099 5	3.2	$[M + H]^+$	284.100 4, 152.057 3, 135.031 5, 110.035 7
11	胸腺嘧啶 Thymine	2.47	$C_5H_6N_2O_2$	127.049 8	127.050 2	-3.1	$[M + H]^+$	127.049 8, 110.022 8, 109.039 8
12	4,9-脱水河豚毒素 4,9-Anhydro-tetrodotoxin	2.53	$C_{13}H_{19}N_3O_5$	298.139 6	298.140 3	-2.3	$[M + H]^+$	298.139 6, 235.145 3, 204.065 8
13	环甘氨酸脯氨酸二肽 Cyclo-Pro-Gly-dipeptide	2.69	$C_7H_{10}N_2O_2$	155.082 4	155.082 1	1.9	$[M + H]^+$	127.086 7, 109.076 2, 99.092 2, 82.065 3
14	蟾蜍色胺氮氧化物 Bufotenine nitrogen oxide	2.75	$C_{12}H_{16}N_2O_2$	221.128 0	221.129 0	-4.5	$[M + H]^+$	221.128 0, 189.101 2, 173.090 4
15	5-羟色胺 Serotonin	3.01	$C_{10}H_{12}N_2O$	177.101 4	177.102 8	-7.9	$[M + H]^+$	177.101 4, 160.075 6, 143.073 1, 130.065 8
16	己二酰精氨酸 Adipyl-arginine	3.03	$C_{12}H_{22}N_4O_5$	303.165 9	303.166 8	-3.0	$[M + H]^+$	303.165 9, 268.128 9, 250.120 5, 175.118 0
17	5-甲氧基色胺 5-Methoxy-tryptamine	3.43	$C_{11}H_{14}N_2O$	191.118 6	191.118 4	1.0	$[M + H]^+$	191.118 6, 160.075 6, 148.076 9, 133.053 4
18	N-三甲基-五羟色胺 Bufotenidine	3.62	$C_{13}H_{18}N_2O$	219.148 7	219.149 7	-4.6	$[M + H]^+$	160.075 6, 142.066 2, 132.080 4, 115.054 1
19	蟾蜍色胺 Bufotenine	3.76	$C_{12}H_{16}N_2O$	205.134 1	205.134 1	0	$[M + H]^+$	205.134 1, 160.075 6
20	邻乙氧苯甲酸胺 Ethenzamide	3.93	$C_9H_{11}NO_2$	166.085 4	166.086 8	-8.4	$[M + H]^+$	166.085 4, 137.057 8, 77.038 0
21	蟾蜍绿啶 Bufoviridine	4.36	$C_{12}H_{16}N_2O_4S$	285.090 1	285.090 9	-2.8	$[M + H]^+$	285.090 1, 205.131 2

续表 1 (Continued Tab. 1)

No.	化合物 Compound	保留时间 t_R (min)	分子式 Formula	测量值 Observed mass (Da)	计算值 Calculated mass (Da)	误差 Mass error (ppm)	加合物 Adducts	碎片离子 MS/MS
22	脱氢蟾蜍色胺 Dehydrobufotenine	5.05	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O	203.117 7	203.118 4	-3.4	[M + H] ⁺	188.095 4, 173.071 5, 146.059 5, 118.065 1
23	庚二酰精氨酸 Pimeloyl-arginine	5.13	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₅	317.182 6	317.182 5	0.3	[M + H] ⁺	317.182 6, 264.132 8, 258.134 8
24	蟾蜍环酰胺 C Bufogargarizanine-C	5.18	C ₁₆ H ₂₆ N ₄ O ₉	419.177 0	419.177 8	-1.9	[M + H] ⁺	419.177 0, 317.178 9
25	蟾蜍噻啉 Bufothionine*	5.40	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	283.077 0	283.075 3	6.0	[M + H] ⁺	203.117 0, 188.095 4, 173.071 5, 159.090 8
26	蟾蜍丁酸 Bufobutanosic-acid	5.77	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₄	277.118 4	277.118 3	0.4	[M + H] ⁺	277.118 4, 177.102 5, 159.114 0
27	脱四氢蟾蜍色胺 Dehydro-dehydrobufotenine	6.79	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O	201.101 1	201.102 2	-5.5	[M + H] ⁺	185.074 0, 160.075 6, 118.065 1, 103.056 1
28	脂蟾毒配基-3-硫酸铵 Resibufogenin-3-sulfate-ammonium	7.29	C ₂₄ H ₃₅ NO ₇ S	482.225 0	482.221 2	7.9	[M + H] ⁺	482.225 0, 187.107 4
29	甘氨酸亮氨酸二肽 Gly-Leu-Gly-Leu	7.70	C ₁₆ H ₃₀ N ₄ O ₅	359.228 9	359.229 4	-1.4	[M + H] ⁺	328.187 5, 289.176 5, 271.165 9, 253.155 3
30	辛二酰精氨酸 Suberoyl-arginine	7.90	C ₁₄ H ₂₆ N ₄ O ₅	331.196 5	331.198 1	-4.8	[M + H] ⁺	250.156 1, 175.118 0, 158.093 5, 116.070 3
31	壬二酰精氨酸 Azelal-arginine	8.54	C ₁₅ H ₂₈ N ₄ O ₅	345.213 0	345.213 8	-2.3	[M + H] ⁺	345.213 0, 303.190 0, 282.182 6, 267.177 7
32	N-乙酰-5-羟基色胺 N-Acetyl-5-hydroxy-tryptamine	8.64	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₂	219.112 2	219.113 4	-5.5	[M + H] ⁺	146.062 0, 130.068 1, 117.055 6, 60.075 6,
33	癸二酰精氨酸 Sebacyl-arginine	9.24	C ₁₆ H ₃₀ N ₄ O ₅	359.229 0	359.229 4	-1.1	[M + H] ⁺	359.229 0, 328.179 7, 272.150 7, 253.155 4
34	3β-甲酸酯脂蟾毒配基 3β-Formyloxylresibufogenin	9.52	C ₂₅ H ₃₂ O ₅	435.215 5	435.214 7	1.8	[M + Na] ⁺	435.215 5, 413.232 8
35	核黄素 Riboflavin	10.17	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	377.147 2	377.146 1	2.9	[M + H] ⁺	377.147 2, 243.086 9
36	嚏根草醇 Hellebrigenol	13.76	C ₂₄ H ₃₄ O ₆	419.242 8	419.241 8	2.4	[M + H] ⁺	401.233 6, 383.222 9, 365.211 9, 347.201 5
37	11α,19-二羟基南美蟾毒精 11α,19-Dihydroxymarinobufagin	14.39	C ₂₄ H ₃₂ O ₇	433.219 7	433.222 6	-6.7	[M + H] ⁺	433.219 7, 417.226 5, 399.215 0
38	ψ-异沙蟾蜍精 ψ-Bufarenogin	14.41	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	417.229 0	417.227 7	3.1	[M + H] ⁺	399.215 0, 335.198 1, 301.143 2, 279.158 4
39	16-去乙酰基-19-氧代华蟾毒它灵 16-Desacetyl-19-oxocinobufotalin	14.56	C ₂₄ H ₃₀ O ₇	431.207 9	431.207 0	2.1	[M + H] ⁺	431.207 9, 227.061 1, 209.047 5
40	吲哚-3-乙酸 Indole-3-acetic-acid	14.70	C ₁₀ H ₉ NO ₂	176.069 9	176.071 2	-7.4	[M + H] ⁺	176.069 9, 130.065 8
41	日蟾毒它灵 Gamabufotalin*	14.79	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	403.250 4	403.248 2	5.5	[M + H] ⁺	385.235 6, 367.228 4, 349.215 4, 271.206 4
42	异沙蟾蜍精 Bufarenogin	14.95	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	417.229 0	417.227 7	3.1	[M + H] ⁺	399.215 0, 371.222 0, 279.158 4, 227.106 8
43	日蟾毒它灵-3-草酸盐 Gamabufotalin-3-oxalate	15.08	C ₂₆ H ₃₄ O ₈	475.230 9	475.232 6	3.5	[M + H] ⁺	415.212 5, 397.202 0, 379.191 4
44	11α-羟基南美蟾毒精 11α-Hydroxymarinobufagin	15.21	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	417.229 0	417.227 7	3.1	[M + H] ⁺	399.215 0, 371.222 0, 335.198 1
45	19-羟基蟾毒灵 19-Hydroxylbufalin	15.64	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	403.250 4	403.248 4	4.9	[M + H] ⁺	403.250 4, 385.236 7, 349.217 2, 271.206 3
46	沙蟾毒精 Arenobufagin*	15.74	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	417.229 0	417.227 7	3.1	[M + H] ⁺	399.215 0, 371.221 9, 335.200 5

续表 1 (Continued Tab. 1)

No.	化合物 Compound	保留时间 t_R (min)	分子式 Formula	测量值 Observed mass (Da)	计算值 Calculated mass (Da)	误差 Mass error (ppm)	加合物 Adducts	碎片离子 MS/MS
47	嚏根草配基 Hellebrigenin	15.83	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	417.229 0	417.227 7	3.1	[M + H] ⁺	399.215 0, 371.222 0, 335.198 1
48	去乙酰蟾毒它灵 Desacetylbufotalin	15.98	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	403.250 4	403.248 2	5.5	[M + H] ⁺	385.235 6, 367.228 4, 349.214 3, 253.191 3
49	去乙酰华蟾毒它灵 Desacetylcinobufotalin	16.04	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	417.229 0	417.227 7	3.1	[M + H] ⁺	399.217 3, 371.221 9, 335.200 5
50	南美蟾毒精 Marinobufagin	16.13	C ₂₄ H ₃₂ O ₅	401.230 6	401.232 8	-5.5	[M + H] ⁺	383.222 5, 367.228 4, 349.215 4, 271.206 4
51	1β-羟基华蟾毒精 1β-Hydroxycinobufagin	16.27	C ₂₆ H ₃₄ O ₇	459.238 0	459.238 3	-0.6	[M + H] ⁺	459.238 0, 415.208 5, 236.128 4
52	12β-羟基脂蟾毒精醇 12β-Hydroxyresibufaginol	16.35	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	417.229 0	417.227 7	3.1	[M + H] ⁺	399.215 0, 335.198 1, 279.158 4, 159.079 2
53	5β, 12β-二羟基华蟾毒精 5β, 12β-Dihydroxycinobufagin	16.42	C ₂₆ H ₃₄ O ₈	475.230 9	475.233 2	-4.8	[M + H] ⁺	475.230 9, 417.229 0
54	去乙酰华蟾毒精醇 Desacetylcinobufaginol	16.47	C ₂₄ H ₃₂ O ₆	417.229 0	417.227 7	3.1	[M + H] ⁺	399.215 0, 371.222 0, 335.198 1, 243.170 5
55	12β-羟基华蟾毒精 12β-Hydroxycinobufagin	16.79	C ₂₆ H ₃₄ O ₇	459.236 1	459.238 3	-4.8	[M + H] ⁺	363.196 7, 279.158 4
56	蟾毒它里灵 Bufotalinin	17.10	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	415.212 7	415.212 1	1.4	[M + H] ⁺	415.212 7, 397.208 3, 379.188 5, 351.197 5
57	19-氧代-华蟾毒它灵 19-oxo-Cinobufotalin	17.23	C ₂₆ H ₃₂ O ₈	473.216 8	473.217 5	-1.5	[M + H] ⁺	473.215 7, 377.179 0, 331.159 3, 349.166 7
58	华蟾毒精醇 Cinobufaginol	17.25	C ₂₆ H ₃₄ O ₇	459.238 0	459.238 3	-0.6	[M + H] ⁺	459.238 0, 347.208 0, 265.978 4
59	阿根廷蟾毒精 Argentino-genin	17.38	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	415.212 7	415.212 1	1.4	[M + H] ⁺	415.212 7, 397.208 3, 379.188 5, 351.197 5
60	脂蟾毒精醇 Resibufaginol	17.47	C ₂₄ H ₃₂ O ₅	401.230 6	401.232 8	-5.5	[M + H] ⁺	383.222 5, 367.228 4, 349.215 4, 271.206 4
61	远华蟾毒精 Telocinobufagin*	17.90	C ₂₄ H ₃₄ O ₅	403.250 4	403.248 2	5.5	[M + H] ⁺	385.235 6, 367.228 4, 349.215 4
62	阿达林 Adalimine	18.07	C ₁₃ H ₂₃ NO ₂	226.180 1	226.180 7	-2.7	[M + H] ⁺	208.172 7, 180.171 4
63	去乙酰华蟾毒精 Desacetylcinobufagin	18.15	C ₂₄ H ₃₂ O ₅	401.230 6	401.232 8	-5.5	[M + H] ⁺	383.222 5, 349.215 4, 271.206 4
64	蟾毒它灵 Bufotalin*	18.18	C ₂₆ H ₃₆ O ₆	445.257 3	445.259 0	-3.8	[M + H] ⁺	385.228 9, 367.223 3, 349.216 4, 241.113 0
65	19-氧代-蟾毒灵 19-oxo-Bufalin	18.47	C ₂₄ H ₃₂ O ₅	401.231 3	401.232 8	-2.5	[M + H] ⁺	383.222 5, 365.211 9, 347.201 3, 251.180 1
66	华蟾毒它灵 Cinobufotalin*	18.64	C ₂₆ H ₃₄ O ₇	459.238 0	459.238 3	-0.6	[M + H] ⁺	459.238 0, 417.224 8, 381.207 3, 363.191 8
67	3-乙酰基-日蟾毒它灵 3-Acetyl-gamabufotalin	19.11	C ₂₆ H ₃₆ O ₆	445.257 3	445.259 0	-3.8	[M + H] ⁺	367.223 3, 349.216 4, 241.113 0
68	N,N-二丁基二甲酰胺 N,N-Dibutyl-formamide	19.62	C ₉ H ₁₉ NO	158.155 3	158.154 5	5.1	[M + H] ⁺	158.155 3, 130.254 9
69	华蟾毒精 Cinobufagin*	20.60	C ₂₆ H ₃₄ O ₆	443.239 9	443.242 8	-6.5	[M + H] ⁺	401.233 3, 365.212 2, 347.201 5, 319.206 6
70	脂蟾毒精 Resibufagin	22.40	C ₂₄ H ₃₁ O ₅	399.216 4	399.216 6	-0.5	[M + H] ⁺	381.206 9, 363.196 2, 345.185 6, 239.180 0
71	去乙酰华蟾毒精-3-单辛二酸酯 Desacetylcinobufagin-3-hemisubertae	24.62	C ₃₂ H ₄₄ O ₈	579.290 8	579.293 4	-4.5	[M + Na] ⁺	579.290 8, 318.177 8, 301.140 7

续表 1 (Continued Tab. 1)

No.	化合物 Compound	保留时间 t_R (min)	分子式 Formula	测量值 Observed mass (Da)	计算值 Calculated mass (Da)	误差 Mass error (ppm)	加合物 Adducts	碎片离子 MS/MS
72	亚油酸酰胺 Linoleamide	25.15	C ₁₈ H ₃₃ NO	280.264 4	280.264 0	1.4	[M + H] ⁺	280.264 4, 263.236 9, 235.242 0
73	7 α -羟基胆甾醇 7 α -Hydroxycholesterol	26.12	C ₂₇ H ₄₆ O ₂	403.355 3	403.357 6	-5.7	[M + H] ⁺	403.355 3, 364.362 6
74	十八烯酸 Oleic-acid	26.24	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	283.262 9	283.263 7	-2.8	[M + H] ⁺	283.262 9, 255.233 5
75	3-Epi-蟾毒灵 3-Epi-Bufo-lin	26.66	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	387.251 9	387.253 5	-4.1	[M + H] ⁺	387.251 9, 367.226 8, 349.216 2
76	胆固醇 Cholesterol	28.47	C ₂₇ H ₄₆ O	409.346 3	409.344 6	4.2	[M + Na] ⁺	409.346 3, 387.361 9, 369.351 3

注: * 经对照品确证结构。

Note: * Identifications confirmed with standard compound.

4 讨论

由于中药及其制剂的化学成分十分复杂,传统人工逐一解谱过于耗时耗力,且对分析者的质谱知识储备量要求甚高。UNIFI 是一个简单高效的数据分析平台,它具有数据采集、数据挖掘、库检索和报表生成等功能,能够精简化合物的分析流程,以便从复杂的样本中快速获取色谱-质谱信息并识别化合物。

在本研究中,UPLC 具有分离效能高的特点,结合 QTOF/MS 的 MS^E 数据采集模式,一针进样能同时获取组分的准分子离子及碎片离子信息(MS^E 模式下高、低能量碰撞诱导解离过程之间快速切换进行数据采集)^[13];然后利用 UNIFI(通过预设参数,依据库中导入成分的结构信息对分离组分进行自动匹配并解析可能的裂解途径)对复杂样品及其阴性对照进行智能化比对分析,快速辨识中药及制剂中的复杂组分。鉴于华蟾素注射液中含有丰富的蟾蜍二烯羧酸内酯类(强心甙体类)和吲哚生物碱类成分,流动相中加入少量有机酸,有助于改善峰形和 ESI⁺ 模式下的离子化效果,因此水相包含 0.1% 的甲酸。

本研究所建立的 UPLC-ESI-QTOF/MS^E 结合 UNIFI 的分析方法,共辨识华蟾素注射液中 76 个化学成分。其中蟾蜍二烯内酯类 36 个(沙蟾毒精、日蟾毒它灵、远华蟾毒精等)、生物碱类 12 个(蟾蜍色胺、5-羟色胺、蟾蜍噻啉等)、氨基酸、核苷及小分子肽类共 13 个(次黄嘌呤、脯氨酸、环甘氨酸-脯氨酸二肽等)、小分子有机酸类 7 个(辛二酰精氨酸、十八烯酸等)、酰胺类 4 个、甾醇类 2 个和其他类 2 个。

综上,UPLC-ESI-QTOF/MS^E 凭借其高灵敏、高

分辨率的特质联合 UNIFI 智能化数据处理系统能快速分离、分析复杂天然产物,简化了中药及其制剂中化学成分的解析流程;利用该方法,本研究快速分析了华蟾素注射液中主要化学成分,为该制剂的毒-效成分及质量控制研究奠定了物质基础。另外,华蟾素注射液中的蟾蜍二烯羧酸内酯类成分的同分异构体较多,且多为取代基位置异构体,UPLC-ESI-QTOF/MS^E 结合 UNIFI 对取代基位置异构体的识别和区分尚存不足,需进一步通过对照品或 NMR 进行确定。

参考文献

- Liu JQ, Si N, Yang J, et al. Identification of bufadienolides profiling in cinobufacino by HPLC-DAD-FT-ICR-MS method [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49:244-248.
- Cao YT, Cui KK, Wu JH, et al. Correlative study of bufogenin constituent sin venom of *Bufo bufo gargarizans* [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2019, 44:1850-1856.
- Zhang Y, Yuan B, Takagi N, et al. Comparative analysis of hydrophilic ingredients in toad skin and toad venom using the UHPLC-HR-MS/MS and UPLC-QqQ-MS/MS methods together with the anti-inflammatory evaluation of indolealkylamines [J]. Molecules, 2019, 24:86.
- Gao B, Wu X, Bian BL. Analysis and evaluation of the analgesic activity of polypeptides from Cinobufacini Injection [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2018, 33:3134-3137.
- Chen YL, Hao YY, Guo FJ, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Bufo-nis Venenum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48:2579-2588.
- Zhan X, Wu H, Wu H, et al. Metabolites from *Bufo gargarizans*

- zans(Cantor, 1842): a review of traditional uses, pharmacological activity, toxicity and quality control[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 246: 112178.
- 7 Wu H, Chen Y, Li QL, et al. Intervention effect of Qi-Yu-San-Long Decoction on Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice; insights from UPLC-QTOF/MS-based metabolic profiling[J]. J Chromatogr B; Anal Technol Biomed Life Sci, 2018, 1102-1103: 23-33.
- 8 Wu X, Zhao HY, Wang HJ, et al. Qualitative and quantitative analysis of cinobufacini injection using rapid separation liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and HPLC-photodiode array detection, a feasible strategy for the quality control of Chinese medicine injections[J]. J Sep Sci, 2013, 36: 492-502.
- 9 Zhang FX, Li M, Qiao LR, et al. Rapid characterization of *Ziziphi Spinosae Semen* by UPLC/Qtof MS with novel informatics platform and its application in evaluation of two seeds from *Ziziphus* species[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 122: 59-80.
- 10 Deng L, Shi AM, Liu HZ, et al. Identification of chemical ingredients of peanut stems and leaves extracts using UPLC-QTOF-MS coupled with novel informatics UNIFI platform[J]. J Mass Spectrom, 2016, 51: 1157-1167.
- 11 Fu J, Wu H, Wu H, et al. Rapid characterization of triterpenoid saponins in *Achyranthes bidentate* Blume by UPLC-QTOF/MS in MS^E mode combined with UNIFI screening platform[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1054-1061.
- 12 Ren W, Han L, Luo M, et al. Multi-component identification and target cell-based screening of potential bioactive compounds in toad venom by UPLC coupled with high-resolution LTQ-Orbitrap MS and high-sensitivity Qtrap MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410: 4419-4435.
- 13 Wu H, Chen Y, Li ZG, et al. Untargeted metabolomics profiles delineate metabolic alterations in mouse plasma during lung carcinoma development using UPLC-QTOF/MS in MS^E mode[J]. R Soc Open Sci, 2018, 5: 181143.

(上接第 524 页)

- 50 Lai YS, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) extracts on hydrogen peroxide- and lipopolysaccharide-treated RAW264.7 macrophages[J]. Food Funct, 2012, 3: 1294-1301.
- 51 Luo M, et al. Cajanol, a novel anticancer agent from pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] roots, induces apoptosis in human breast cancer cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway[J]. Chem Biol Interact, 2010, 188: 151-160.
- 52 Liang L, et al. The phytoestrogen compound cajanol from pigeonpea roots is associated with the activation of estrogen Receptor α -dependent signaling pathway in human prostate cancer cells[J]. Phytother Res, 2013, 27: 1834-1841.
- 53 Fu YJ, et al. Cell cycle arrest and induction of apoptosis by cajanol stilbene acid from *Cajanus cajan* in breast cancer cells[J]. Phytomedicine, 2015, 22: 462-468.
- 54 Zu YG, et al. Comparative study on the antiherpetic activity of aqueous and ethanolic extracts derived from *Cajanus cajan* (L.) Millsp[J]. Forsch Komplementmed, 2010, 17: 15-20.
- 55 Zhang DM, et al. Cajanol stilbene acid relaxes rat renal arteries; roles of Ca²⁺ antagonism and protein kinase C-dependent mechanism[J]. PLoS One, 2012, 7: e47030.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社