蒙药材山苦荬的成分鉴别及7种成分含量测定方法建立Δ

孙丽君[1*]，李　君[1,2]，王秋桐[3]，夏慧敏[1]，王跃武[1,2]，张　谦[1,2]，张慧文[1]，王焕芸[1#]（1.内蒙古医科大学药学院，呼和浩特　010110；2.内蒙古自治区新药筛选工程研究中心，呼和浩特　010110；3.内蒙古医科大学附属医院药物临床试验机构，呼和浩特　010110）

中图分类号　R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）24-3006-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.24.09

摘　要　目的　建立鉴别山苦荬的化学成分以及7种成分（绿原酸、木犀草素、槲皮素、芦丁、原儿茶酸、异绿原酸A、木犀草苷）的含量测定方法。**方法**　采用高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术对山苦荬的化学成分进行鉴定，采用高效液相色谱串联三重四极杆质谱技术测定山苦荬中绿原酸等7种成分的含量。**结果**　从山苦荬药材中共鉴别出45个成分，包括20个有机酸类成分、13个黄酮类成分、4个脂肪酸类成分、4个氨基酸成分、3个核苷类成分和1个香豆素类成分。绿原酸、木犀草素、槲皮素、芦丁、原儿茶酸、异绿原酸A、木犀草苷检测质量浓度的线性范围分别为503.00～25 150.00、42.00～2 100.00、5.05～252.50、20.05～1 002.50、25.10～1 255.00、750.00～37 500.00、196.00～9 800.00 ng/mL（r≥0.999 2），精密度、稳定性、重复性试验的RSD均小于3.00%（n=6），平均加样回收率为96.72%～105.84%（RSD均小于4.00%，n=6）。3批山苦荬中绿原酸等7种成分的含量范围分别为1 145.77～3 261.25、23.75～97.90、0.92～2.12、1.06～23.18、9.35～21.85、833.25～1 045.58、199.56～1 869.78 μg/g。**结论**　本研究所建立的鉴别和定量方法快速、简便，可用于山苦荬药材化学成分的鉴别和绿原酸等7种成分的含量测定。

关键词　山苦荬；高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术；高效液相色谱串联三重四极杆质谱技术；成分鉴别；含量测定

Method establishment of component identification and content determination of 7 components in Mongolian medicine *Ixeris chinensis*

SUN Lijun[1], LI Jun[1,2], WANG Qiutong[3], XIA Huimin[1], WANG Yuewu[1,2], ZHANG Qian[1,2], ZHANG Huiwen[1], WANG Huanyun[1]（1. College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. Inner Mongolia Autonomous Region Engineering Research Center of New Pharmaceutical Screening, Hohhot 010110, China; 3. Drug Clinical Trial Institution, the Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish the methods to identify the chemical components of *Ixeris chinensis*, and determine the contents of 7 components (chlorogenic acid, luteolin, quercetin, rutin, protocatechuic acid, isochlorogenic acid A, luteoloside). **METHODS** HPLC-Q-Exactive-MS was used to identify the chemical components of *I. chinensis*. The contents of 7 components in *I. chinensis*, including chlorogenic acid, were determined by HPLC-MS/MS. **RESULTS** A total of 45 components were identified in *I. chinensis*, including 20 organic acids, 13 flavonoids, 4 fatty acids, 4 amino acids, 3 nucleosides, and 1 coumarin. The linear range of chlorogenic acid, luteolin, quercetin, rutin, protocatechuic acid, isochlorogenic acid A and luteoloside were 503.00-25 150.00, 42.00-2 100.00, 5.05-252.50, 20.05-1 002.50, 25.10-1 255.00, 750.00-37 500.00, 196.00-9 800.00 ng/mL (r≥0.999 2), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all less than 3.00% (n=6), and average recovery ranged from 96.72% to 105.84% (all RSD<4.00%, n=6). The contents of 7 components in 3 batches of *I. chinensis* were 1 145.77-3 261.25, 23.75-97.90, 0.92-2.12, 1.06-23.18, 9.35-21.85, 833.25-1 045.58, 199.56-1 869.78 μg/g, respectively. **CONCLUSIONS** The established methods for identification and content determination are rapid and simple, and can be used for the identification of chemical components and the content determination of 7 components in *I. chinensis*.

KEYWORDS　*Ixeris chinensis*; HPLC-Q-Exactive-MS; HPLC-MS/MS; component identification; content determination

Δ **基金项目**　内蒙古自治区高等学校科学技术研究项目（No.NJZY22666）；内蒙古医科大学学科建设项目（No.YDK2022XK011）；内蒙古医科大学蒙药学“一流学科”青年教师科研创新能力提升项目（No.MYX2022-S20）

* **第一作者**　讲师，硕士。研究方向：中蒙药质量控制。E-mail：804142815@qq.com

\# **通信作者**　教授。研究方向：药物分析。E-mail：whuanyun999@163.com

山苦荬为菊科苦荬菜属多年生植物山苦荬*Ixeris chinensis*（Thunb.）Nakai的干燥全草，蒙医称之为“苏素-乌布斯”，现收录于《内蒙古蒙药材标准》。该药性寒、味苦，具有清血热、抗炎、抗氧化、保肝等功效，常用于蒙医

临床肝炎、肝胆热等疾病的治疗[1]。研究表明，山苦荬中所含绿原酸、槲皮素具有协同抗炎作用[2]；原儿茶酸可通过调控Toll样受体4/髓样分化因子88/核因子κB信号通路而达到改善肝脏炎症的目的[3]；在四氯化碳诱导的肝损伤小鼠模型中，木犀草素可显著降低其血清中谷草转氨酶、谷丙转氨酶的活性，并改善肝组织病理损伤，作用机制可能与激活核转录因子红系2相关因子2通路有关[4]；异绿原酸A、芦丁可通过增强抗氧化酶活性而抑制氧化应激反应，从而发挥保肝作用[5-6]。同时，课题组前期在山苦荬保肝活性部位筛选过程中发现，木犀草苷具有显著的保肝活性[1]。

药材所含成分含量的高低与其疗效密切相关，虽有学者采用高效液相色谱法和一测多评法对山苦荬药材进行了质量评价[7-8]，但受地域差异等因素影响，仅以单一或3种成分作为质量评价指标难以准确反映药材整体质量，加之目前关于山苦荬的物质基础研究有限，因此明确山苦荬的物质组成并进行质量控制对保障其临床应用的安全性和有效性具有良好的现实意义。基于此，本研究拟运用高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术对山苦荬药材的物质组成进行快速、全面的鉴别分析，并采用高效液相色谱串联三重四极杆质谱（high performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry，HPLC-MS/MS）技术对其所含绿原酸、木犀草素、槲皮素、芦丁、原儿茶酸、异绿原酸A、木犀草苷7种成分进行含量测定，旨在为该药材质量评价体系的建立、药效物质的挖掘提供数据支撑。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有HPLC-Q-Exactive型高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪[赛默飞世尔科技（中国）有限公司]，LC-MS8045型高效液相色谱-三重四极杆液质联用仪、AP135W型十万分之一电子天平（日本Shimadzu公司）等。

1.2 主要药品与试剂

异绿原酸A对照品（批号PS001052，纯度≥98.0%）、隐绿原酸对照品（批号PS011467，纯度≥98.0%）、木犀草苷对照品（批号PS013155，纯度≥98.0%）、木犀草素对照品（批号PS010346，纯度≥98.0%）均购自成都普思生物科技有限公司；绿原酸对照品（批号110753-202119，纯度≥98.5%）、槲皮素对照品（批号100081-202010，纯度≥99.0%）、原儿茶酸对照品（批号110809-202207，纯度≥98.0%）、枸橼酸对照品（批号100396-202104，纯度≥99.7%）、阿魏酸对照品（批号110773-201915，纯度≥99.0%）、芦丁对照品（批号100080-202012，纯度≥98.0%）均购自中国食品药品检定研究院；甲醇、乙腈均为色谱纯，甲酸均为分析纯，水为蒸馏水。

山苦荬药材（批号分别为C20210514、T20210607、H20210523）分别产自内蒙古赤峰市、通辽市、呼和浩特市，经内蒙古医科大学药学院中药资源教研室渠弼教授鉴定为菊科苦荬菜属植物山苦荬*I. chinensis*（Thunb.）Nakai的干燥全草。

2 方法与结果

2.1 山苦荬的成分鉴别

2.1.1 溶液的制备

（1）混合对照品溶液：精密称定绿原酸对照品5.03 mg、枸橼酸对照品4.12 mg、隐绿原酸对照品4.95 mg、阿魏酸对照品3.97 mg、木犀草素对照品4.20 mg、槲皮素对照品5.05 mg、芦丁对照品4.01 mg、原儿茶酸对照品5.02 mg、异绿原酸A对照品7.50 mg、木犀草苷对照品3.92 mg分别置于10 mL容量瓶中，甲醇溶解、超声、定容，得单一对照品贮备液，质量浓度分别为503.00、412.00、495.00、397.00、420.00、505.00、401.00、502.00、750.00、392.00 μg/mL；分别精密量取上述各单一贮备液100 μL于同一10 mL容量瓶中，得质量浓度分别为5.03、4.12、4.95、3.97、4.20、5.05、4.01、5.02、7.50、3.92 μg/mL的混合对照品溶液，于4 ℃下保存，备用。

（2）供试品溶液：取山苦荬药材（批号C20210514）粉末（过三号筛）约1.0 g，精密称定，放至50 mL锥形瓶中，加甲醇10 mL，称重，封口，超声（功率200 W，频率50 kHz）提取30 min，冷却至室温，再次称重，用甲醇补足失重，摇匀，经0.22 μm滤膜过滤，即得。

2.1.2 色谱与质谱条件

（1）色谱条件：以Agilent ZORBAX SB-Aq（4.6 mm×150 mm，5 μm）为色谱柱，以甲醇（A）-0.1%甲酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0～10 min，10%A；10～13 min，10%A→28%A；13～15 min，28%A→45%A；15～21 min，45%A→65%A；21～24 min，65%A→80%A；24～34 min，80%A→95%A；34～40 min，95%A），流速为0.4 mL/min，柱温为35 ℃，进样量为5 μL。

（2）质谱条件：采用电喷雾离子源（electron spray ionization，ESI）进行正、负离子扫描；喷雾电压为3.80 kV（正离子）/3.20 kV（负离子）；离子传输管温度为300 ℃（正离子）/400 ℃（负离子）；辅助气体积流量为30 L/min；辅助气温度为350 ℃；碰撞能量设置为30 eV；检测方式为Full MS/dd-MS^2，Full MS分辨率为70 000，dd-MS^2分辨率为17 500；扫描范围为*m/z* 110～1 200。

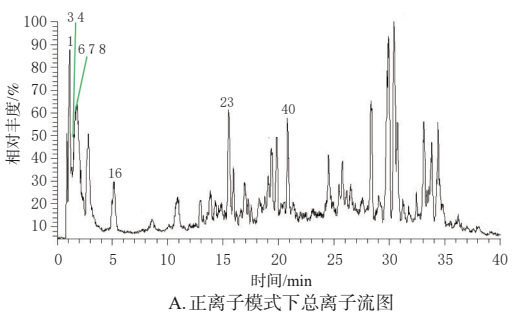
2.1.3 数据库建立与分析

采用中医药系统药理学数据库与分析平台（https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php）、中国知网、万方数据对山苦荬药材所含成分的名称、分子式、多级质谱碎片进行收集整理，建立本地数据库，利用Thermo Scientific Xcalibur 3.0软件，对山苦荬供试品溶液和混合对照品溶液在

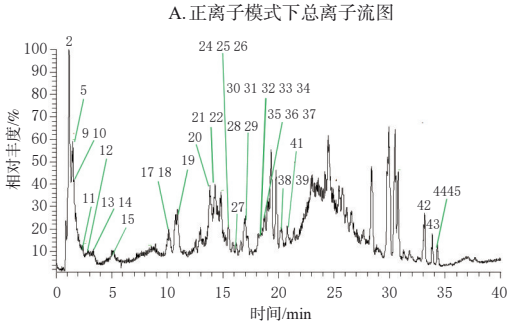
正、负离子模式下的总离子流数据进行处理，并与本地自建数据库比对，以一级质谱误差＜10 ppm为标准对山苦荬中的成分进行指认[9]，并将各成分元素组成、多级质谱碎片信息及与现有对照品比对作进一步确认，最终鉴定山苦荬中化学成分。

2.1.4　山苦荬药材化学成分鉴定

取“2.1.1”项下溶液，按“2.1.2”项下色谱与质谱条件进样分析，得山苦荬供试品溶液和混合对照品溶液正、负离子模式下的总离子流图（图1、图2）。结果显示，从山苦荬中共鉴定出45个化学成分，包括20个有机酸类成分、13个黄酮类成分、4个氨基酸类成分、4个脂肪酸类成分、3个核苷类成分、1个香豆素类成分，其中10个成分经与对照品比对得到进一步确证（表1）。

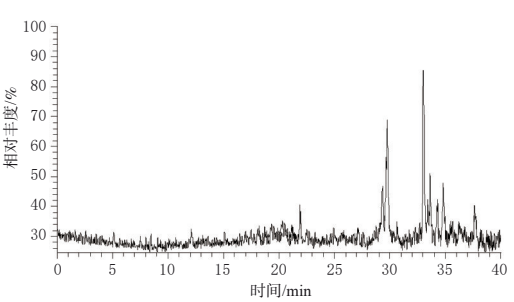


A. 正离子模式下总离子流图

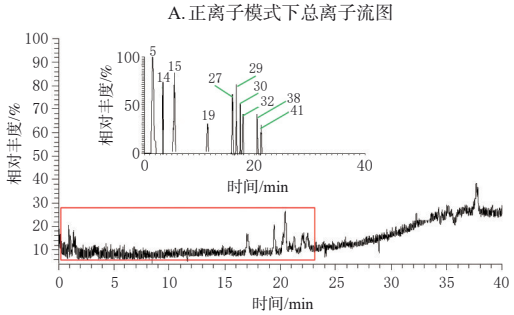


B. 负离子模式下总离子流图

图1　供试品溶液总离子流图



A. 正离子模式下总离子流图



B. 负离子模式下总离子流图

图2　混合对照品溶液总离子流图

表1　山苦荬中化学成分的分析结果

编号	化合物名称	保留时间/min	分子式	离子模式	理论分子量(*m/z*)	实测分子量(*m/z*)	误差/ppm	类型
1	精氨酸[9]	1.08	$C_6H_{14}N_4O_2$	$[M+H]^+$	175.118 95	175.120 27	7.525	氨基酸类
2	奎宁酸[9]	1.11	$C_7H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	191.055 01	191.055 40	2.018	有机酸类
3	脯氨酸[9]	1.20	$C_5H_9NO_2$	$[M+H]^+$	116.070 60	116.071 69	9.347	氨基酸类
4	酪氨酸[9]	1.46	$C_9H_{11}NO_3$	$[M+H]^+$	182.081 16	182.082 70	8.404	氨基酸类
5	枸橼酸a[9]	1.46	$C_6H_8O_7$	$[M-H]^-$	191.018 62	191.018 94	1.628	有机酸类
6	腺苷[10]	1.57	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	$[M+H]^+$	268.104 03	268.105 87	6.861	核苷类
7	腺嘌呤[11]	1.66	$C_5H_5N_5$	$[M+H]^+$	136.061 77	136.063 10	9.762	核苷类
8	次黄嘌呤[11]	1.74	$C_5H_4N_4O$	$[M+H]^+$	137.045 78	137.047 07	9.359	核苷类
9	2-甲基柠檬酸[12]	1.81	$C_7H_{10}O_7$	$[M-H]^-$	205.034 27	205.034 90	3.028	有机酸类
10	没食子酸[9]	1.90	$C_7H_6O_5$	$[M-H]^-$	169.013 14	169.013 00	−0.886	有机酸类
11	阿魏酰葡萄糖酸[13]	2.58	$C_{16}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	371.097 27	371.097 93	1.770	有机酸类
12	香草酸[11]	2.93	$C_8H_8O_4$	$[M-H]^-$	167.033 88	167.033 94	0.328	有机酸类
13	没食子酸乙酯[12]	3.22	$C_9H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	197.044 44	197.045 01	2.843	黄酮类
14	原儿茶酸a[9]	3.47	$C_7H_6O_4$	$[M-H]^-$	153.018 23	153.018 22	−0.099	有机酸类
15	绿原酸a[14]	5.12	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.086 70	353.088 07	3.856	有机酸类
16	色氨酸[10]	5.25	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	$[M+H]^+$	205.097 15	205.098 51	6.611	氨基酸类
17	秦皮乙素[15]	9.74	$C_9H_6O_4$	$[M-H]^-$	177.018 23	177.018 46	1.270	黄酮类
18	咖啡酸[9,13]	10.08	$C_9H_8O_4$	$[M-H]^-$	179.033 88	179.034 10	1.200	有机酸类
19	隐绿原酸a[9]	11.71	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.086 70	353.088 04	3.771	有机酸类
20	3-对香豆酰奎宁酸[16]	13.75	$C_{16}H_{18}O_8$	$[M-H]^-$	337.091 79	337.092 80	2.985	有机酸类
21	4-对香豆酰奎宁酸[16]	14.12	$C_{16}H_{18}O_8$	$[M-H]^-$	337.091 79	337.091 71	−0.249	有机酸类
22	5-阿魏酰奎宁酸[16]	14.19	$C_{17}H_{20}O_9$	$[M-H]^-$	367.102 35	367.103 70	3.654	有机酸类
23	欧前胡素[12]	15.21	$C_{16}H_{14}O_4$	$[M+H]^+$	271.096 48	271.097 50	3.742	香豆素类
24	4-阿魏酰奎宁酸[16]	15.40	$C_{17}H_{20}O_9$	$[M-H]^-$	367.102 35	367.103 76	3.818	有机酸类
25	木犀草素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷[14]	15.53	$C_{21}H_{18}O_{12}$	$[M-H]^-$	461.071 45	461.072 48	2.229	黄酮类
26	二氢阿魏酸[13]	15.56	$C_{10}H_{12}O_4$	$[M-H]^-$	195.065 18	195.063 26	−9.870	有机酸类
27	阿魏酸a[9,12]	16.25	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	193.049 53	193.050 14	2.407	有机酸类
28	鞣花酸[9,12]	16.89	$C_{14}H_6O_8$	$[M-H]^-$	300.997 89	300.999 18	4.274	黄酮类
29	木犀草苷a[14]	16.92	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^-$	447.092 18	447.093 93	3.964	黄酮类
30	异绿原酸Aa[14]	17.06	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.118 40	515.119 51	2.150	有机酸类
31	金丝桃苷[13]	17.13	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	463.087 10	463.088 47	2.953	黄酮类
32	芦丁a[9,12]	17.17	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M-H]^-$	609.145 01	609.147 46	4.020	黄酮类
33	紫草酸[13]	17.18	$C_{27}H_{22}O_{12}$	$[M-H]^-$	537.102 75	537.107 42	8.690	有机酸类
34	山柰酚-3-*O*-芸香苷[13]	17.23	$C_{27}H_{30}O_{15}$	$[M-H]^-$	593.150 09	593.152 53	4.103	黄酮类
35	咖啡酰阿魏酰酒石酸[14]	18.10	$C_{23}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	487.087 10	487.088 65	3.177	有机酸类
36	异绿原酸C[14]	18.52	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.118 40	515.120 73	4.518	有机酸类
37	芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷[14]	18.30	$C_{21}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	431.097 27	431.098 94	3.866	黄酮类
38	槲皮素a[9,12]	20.30	$C_{15}H_{10}O_7$	$[M-H]^-$	301.034 27	301.035 52	4.122	黄酮类
39	高车前素[9]	20.35	$C_{16}H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	299.055 01	299.056 52	5.034	黄酮类
40	芹菜素[17]	20.75	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M+H]^+$	271.060 09	271.062 10	5.536	黄酮类
41	木犀草素a[9,12]	20.85	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M-H]^-$	285.039 36	285.040 68	4.615	黄酮类
42	α-亚麻酸[9,12]	33.14	$C_{18}H_{30}O_2$	$[M-H]^-$	277.216 20	277.217 47	4.557	脂肪酸类
43	亚油酸[9—10,12]	33.83	$C_{18}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	279.231 85	279.233 31	5.205	脂肪酸类
44	棕榈酸[9,12]	34.32	$C_{16}H_{32}O_2$	$[M-H]^-$	255.231 85	255.233 11	4.910	脂肪酸类
45	油酸[9,12]	34.63	$C_{18}H_{34}O_2$	$[M-H]^-$	281.247 50	281.248 87	4.847	脂肪酸类

a：与现有对照品比对。

以有机酸类为例，山苦荬中20个有机酸类化合物被鉴定。该类化合物是由咖啡酸与奎宁酸通过酯化缩合产生，酯键断裂可产生奎宁酸特征碎片 *m/z* 191 和咖啡酸特征碎片 *m/z* 179；咖啡酸脱羧后产生特征碎片 *m/z* 135，依此可作为判断此类化合物的裂解规律[15]。以异绿原酸A（化合物30）为例，其在负离子模式下的准分子离子峰为 *m/z* 515.119 51$[M-H]^-$，Thermo Scientific Xcalibur 3.0软件拟合其分子式为$C_{25}H_{24}O_{12}$，误差为2.150 ppm；主要碎片离子峰为 *m/z* 353.088 23、191.055 48、179.034 16、

135.044 01，即准分子离子峰经高能撞击后，首先失去1分子咖啡酸基团产生 *m/z* 353.088 23[M－H－$C_9H_6O_3$]$^-$，进一步丢失1分子咖啡酸基团产生 *m/z* 191.055 48[M－H－$C_9H_6O_3$－$C_9H_6O_3$]$^-$，或丢失1分子奎宁酸基团产生 *m/z* 179.034 16[M－H－$C_9H_6O_3$－$C_7H_{10}O_5$]$^-$碎片离子峰，后者进一步脱去1分子CO_2产生 *m/z* 135.044 01[M－H－$C_9H_6O_3$－$C_7H_{10}O_5$－CO_2]$^-$。通过分子式、化合物裂解规律、相关文献[14]及与对照品比对，确认30号化合物为异绿原酸A。化合物30可能的裂解途径及二级质谱图见图3。

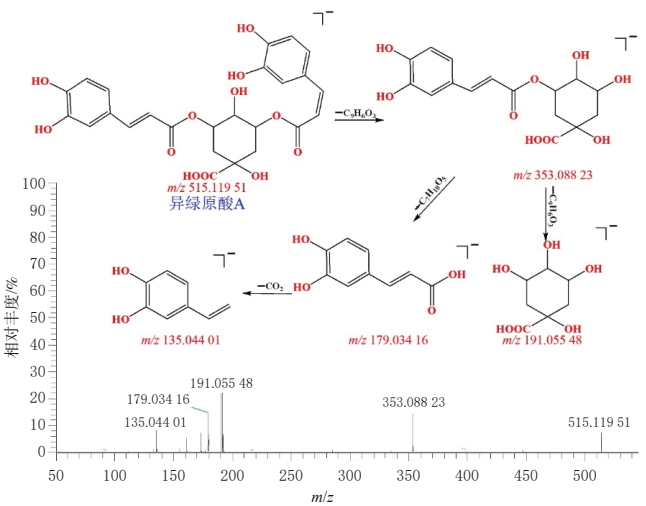


图3　化合物30可能的裂解途径及MS^2图

2.2　山苦荬中7种成分的含量测定

2.2.1　溶液的制备

（1）混合对照品溶液的制备：精密称定绿原酸对照品12.58 mg、异绿原酸A对照品5.25 mg、木犀草苷对照品9.80 mg对照品置于同一10 mL容量瓶中，精密量取“2.1.1”项下单一对照品贮备液木犀草素1 000 μL、槲皮素10 μL、芦丁200 μL、原儿茶酸100 μL置于上述同一10 mL容量瓶中，甲醇溶解、定容，得绿原酸、木犀草素、槲皮素、芦丁、原儿茶酸、异绿原酸A、木犀草苷质量浓度分别为1 258.00、42.00、0.51、8.02、5.02、525.00、980.00 μg/mL的混合对照品溶液，于4 ℃保存，加样回收率试验备用。

（2）供试品溶液的制备：按“2.1.1（2）”项下方法制备，摇匀，取1 mL溶液，置于10 mL容量瓶中，甲醇定容，摇匀，经0.22 μm滤膜过滤，即得。

（3）空白对照溶液的制备：取甲醇适量，按“2.1.1（2）”项下供试品溶液制备方法处理，即得。

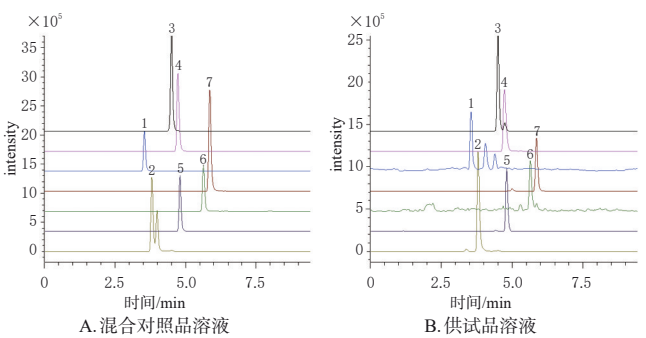
2.2.2　色谱与质谱条件

（1）色谱条件：以Shim-pack GIST-HP C_{18}（2.1 mm×100 mm，3 μm）为色谱柱，以甲醇（A）-0.1%甲酸溶液（B）为流动相进行梯度洗脱（0.01～0.3 min，10%A→23%A；0.3～3.0 min，23%A→45%A；3.0～4.3 min，45%A→65%A；4.3～5.5 min，65%A→95%A；5.5～7.0 min，95%A；7.0～7.01 min，95%A→10%A；7.01～9.5 min，10%A）；流速为0.25 mL/min，柱温为35 ℃，进样量为3 μL。

（2）质谱条件：采用ESI，以多反应监测（multiple reaction monitoring，MRM）模式进行负离子扫描；脱溶剂温度为526 ℃；雾化气流量为3 L/min；加热气流量为10 L/min。7个待测成分的质谱参数见表2，混合对照品溶液、供试品溶液图谱见图4（空白对照溶液图谱略）。

表2　7种成分的保留时间及质谱分析参数

峰号	成分	保留时间/min	定量离子对 *m/z*	碰撞能量/eV
1	原儿茶酸	3.539	152.9→108.9	18
2	绿原酸	3.807	353.3→190.9	16
3	异绿原酸A	4.500	515.3→353.0	15
4	木犀草苷	4.724	447.0→285.0	28
5	芦丁	4.798	609.0→301.0	33
6	槲皮素	5.638	301.0→150.9	22
7	木犀草素	5.857	284.8→133.0	32



1：原儿茶酸；2：绿原酸；3：异绿原酸A；4：木犀草苷；5：芦丁；6：槲皮素；7：木犀草素。

图4　7种成分的MRM色谱图

2.2.3　线性关系考察

精密量取“2.1.1（1）”项下绿原酸、木犀草素、槲皮素、芦丁、原儿茶酸、异绿原酸A、木犀草苷单一对照品贮备液适量于同一10 mL容量瓶中，甲醇稀释、定容，得质量浓度为50.300、4.200、0.505、2.005、2.510、75.000、19.600 μg/mL的混合对照品溶液，分别精密吸取上述混合对照品溶液10、20、50、100、200、400、500 μL，用甲醇分别定容至1 mL，制备系列质量浓度混合对照品溶液，按“2.2.2”项下色谱与质谱条件进样分析，分别以各成分质量浓度（*X*）为横坐标，峰面积（*Y*）为纵坐标，通过HPLC-MS/MS联用系统中LabSolutions软件对各待测成分进行线性拟合，结果见表3。

表3　山苦荬中7种成分的回归方程与线性范围

成分	回归方程	*r*	线性范围/(ng/mL)
原儿茶酸	$Y=9.22\times10^2X+4.58\times10^3$	0.999 7	25.10～1 255.00
绿原酸	$Y=6.91\times10^4X+1.99\times10^4$	0.999 5	503.00～25 150.00
异绿原酸A	$Y=6.49\times10^2X-4.56\times10^5$	0.999 3	750.00～37 500.00
木犀草苷	$Y=1.42\times10^3X+2.30\times10^5$	0.999 2	196.00～9 800.00
芦丁	$Y=3.89\times10^2X+2.79\times10^3$	0.999 9	20.05～1 002.50
槲皮素	$Y=1.79\times10^3X-6.32\times10^3$	0.999 4	5.05～252.50
木犀草素	$Y=1.47\times10^3X-3.90\times10^4$	0.999 8	42.00～2 100.00

2.2.4　精密度试验

取“2.2.3”项下混合对照品溶液（绿原酸、木犀草素、槲皮素、芦丁、原儿茶酸、异绿原酸A、木犀草苷质量浓度分别为2 515.00、210.00、25.25、100.25、125.50、3 750.00、980.00 ng/mL），按“2.2.2”项下色谱与质谱条件连续进样6次，记录峰面积。结果显示，各成分峰面积RSD均小于3.00%（n=6），表明仪器精密度良好。

2.2.5　稳定性试验

精密称定山苦荬药材粉末（批号C20210514）约1.0 g，精密称定，按“2.2.1（2）”项下方法制备供试品溶液，分别于室温下放置0、3、6、9、12、24 h时按“2.2.2”项下色谱与质谱条件进样分析，记录峰面积。结果显示，各成分峰面积RSD均小于3.00%（n=6），表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定性良好。

2.2.6　重复性试验

精密称定山苦荬药材粉末（批号C20210514）约1.0 g，平行6份，按“2.2.1（2）”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.2”项下色谱与质谱条件进样分析，记录峰面积并代入回归方程计算样品含量。结果显示，绿原酸、木犀草素、槲皮素、芦丁、原儿茶酸、异绿原酸A、木犀草苷平均含量分别为2 582.90、97.73、0.95、16.52、9.35、1 031.87、1 919.05 μg/g，且RSD均小于3.00%（n=6），表明方法重复性良好。

2.2.7　加样回收率试验

精密称定已知含量的山苦荬药材粉末（批号C20210514）6份，每份约0.5 g，精密称定，分别加入“2.2.1（1）”项下混合对照品溶液适量（加入量与已知量相等），按“2.2.1（2）”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.2”项下色谱与质谱条件进样分析，记录峰面积并计算加样回收率。结果显示，绿原酸、木犀草素、槲皮素、芦丁、原儿茶酸、异绿原酸A、木犀草苷的平均回收率分别为101.48%、99.83%、99.35%、96.72%、105.84%、98.29%、99.58%（RSD分别为2.24%、2.94%、3.22%、3.16%、3.07%、2.60%、2.44%，n=6）。

2.2.8　样品含量测定

取3批山苦荬药材（H20210523、T20210607、C20210514）各3份，按“2.2.1（2）”项下方法制备供试品溶液，再按“2.2.2”项下色谱与质谱条件进样测定，记录峰面积并代入回归方程计算样品含量，结果见表4。

表4　不同来源山苦荬中7种成分平均含量（n=3，μg/g）

批号	绿原酸	木犀草素	槲皮素	芦丁	原儿茶酸	异绿原酸A	木犀草苷
H20210523	1 145.77	23.75	2.12	23.18	21.85	833.25	199.56
T20210607	3 261.25	97.86	0.92	1.06	9.74	1 024.80	1 800.74
C20210514	2 632.21	97.90	0.95	16.43	9.35	1 045.58	1 869.78

3　讨论

3.1　样品前处理条件及成分鉴别的色谱和质谱条件优化

本课题组前期对样品处理方式（超声处理、加热回流处理）、处理时间（15、30、45 min）进行考察，结果显示，超声处理30 min的提取效率为最优。本课题组前期对不同流动相体系进行比较发现，相比于乙腈，以甲醇作为有机相时各成分的分离度更好；同时，在水相中加入0.1%甲酸能有效提高各成分的质谱响应并改善色谱峰峰形，故最终将流动相体系确定甲醇-0.1%甲酸溶液（梯度洗脱）。传统药材成分组成复杂多样，且各成分在不同电离模式下离子化程度和响应强度均有所差异，为全面、精准表征山苦荬药材所含化学成分，本研究采用正、负两种电离模式对山苦荬药材中的化学成分进行辨识分析。

3.2　含量测定的质谱条件优化

传统药材饮片中所含成分含量的高低与其药效的强弱、质量的优劣密切相关。为保障山苦荬药效和质量的稳定性，本研究通过HPLC-MS/MS技术对其中的绿原酸、木犀草素、槲皮素、芦丁、原儿茶酸、异绿原酸A、木犀草苷7种成分进行了含量测定。本课题组前期采用质谱全扫描方式对各待测成分的离子化模式进行了确认，结果显示，7种成分在负离子模式下的响应均优于正离子模式；在确认各待测成分的离子化模式后，本课题组通过设置不同碰撞能量分别进行产物离子扫描，初步获得碰撞能量、前体离子及产物离子后，采用质谱自动优化程序对碰撞能量、前体离子及产物离子进一步优化，最终获得各待测成分的质谱分析参数。

3.3　含量测定的结果分析

3批不同来源山苦荬药材含量测定结果表明，批号C20210514和批号T20210607的山苦荬药材中槲皮素、芦丁及原儿茶酸含量均明显低于批号H20210523样品，而其他各成分含量均明显高于批号H20210523样品；与批号T20210607样品相比，批号C20210514的山苦荬药材中芦丁含量较高，而绿原酸含量较低，其他成分含量则相当。由此可见，地域差异对山苦荬药材中上述成分的含量存在一定影响，但由于本研究涉及样本来源较为局限，后期将扩大药材收集范围，作进一步评价。

综上所述，本研究所建成分鉴别和含量测定方法快速、简便，可为山苦荬质量标准建立提供科学依据，也可为今后山苦荬血浆移行成分解析、移行-网络分析奠定数据基础。

参考文献

[1] 孙丽君，常福厚，白图雅，等. 山苦荬保肝活性部位筛选及其化学成分研究[J]. 中国药房，2021，32（9）：1089-1092.
SUN L J，CHANG F H，BAI T Y，et al. Screening of hepato-protective activity fractions from *Ixeris chinensis* and study on its chemical compositions[J]. China Pharm，2021，32（9）：1089-1092.

[2] 海宇. 绿原酸与槲皮素协同抗炎效应及用量优化研究[D]. 西安：西北大学，2021.
HAI Y. Research on the synergistic anti-inflammatory effect and dosage optimization of chlorogenic acid and

quercetin[D]. Xi'an:Northwest University,2021.
[3] 李佳. 原儿茶酸改善高脂诱导肝脏炎症及作用机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2021.
LI J. Effect of protocatechuic acid on liver inflammation induced by high fat and its mechanism[D]. Yangling: Northwest A & F University,2021.
[4] 代惠婷. 木犀草素对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用及机制研究[D]. 长春:吉林大学,2023.
DAI H T. The protective effect and mechanism of luteolin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [D]. Changchun:Jilin University,2023.
[5] 李晓红. 汞诱导肝肾损伤机制及芦丁的保护作用[D]. 西安:第四军医大学,2017.
LI X H. Mechanisms of liver and kidney injuries induced by mercury and protective effects of rutin[D]. Xi'an: The Fourth Military Medical University,2017.
[6] 胡居吾,吴磊,涂招秀,等. 蔓三七叶中分离绿原酸和异绿原酸及其抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(1):38-43.
HU J W,WU L,TU Z X,et al. Extraction and antioxidant activity of chlorogenic acids and isochlorogenic acids from *Gynura procumbens*(Lour.)Merr[J]. Nat Prod Res Dev,2019,31(1):38-43.
[7] 黄健军,梁爽,甘洋萦,等. 一测多评法同时测定山苦荬中3种成分[J]. 中成药,2021,43(3):680-685.
HUANG J J,LIANG S,GAN Y Y,et al. Simultaneous determination of three constituents in *Ixeridium chinensis* by QAMS[J]. Chin Tradit Pat Med,2021,43(3):680-685.
[8] 王志君,吴珊珊,娜仁图雅,等. HPLC法测定山苦荬中绿原酸的含量[J]. 内蒙古医科大学学报,2017,39(3):236-238,243.
WANG Z J,WU S S,NAREN T Y,et al. Content determination of chlorogenic acid in *Ixeris chinensis*(Thunb.)Nakai by HPLC[J]. J Inn Mong Med Univ,2017,39(3):236-238,243.
[9] 李君,王跃武,张谦,等. 基于HPLC-Q-Exactive-MS和HPLC-MS/MS技术的小儿解感颗粒定性与定量分析[J]. 中国医院药学杂志,2023,43(8):868-876.
LI J,WANG Y W,ZHANG Q,et al. Qualitative and quantitative analysis of Xiao'er Jiegan Granules by HPLC-Q-Exactive MS and HPLC-MS/MS technology[J]. Chin J Hosp Pharm,2023,43(8):868-876.
[10] 任洪民,张金莲,邓亚羚,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS的多花黄精酒制前后化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(4):110-121.
REN H M,ZHANG J L,DENG Y L,et al. Analysis of chemical constitutions of *Polygonatum cyrtonema* dried rhizomes before and after processing with wine based on UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae,2021,27(4):110-121.
[11] 李欣,唐力英,许静,等. 基于UPLC-LTQ-Orbitrap高分辨质谱的中药瓜蒌化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(1):201-210.
LI X,TANG L Y,XU J,et al. Analysis and identification of chemical components in *Trichosanthis fructus* by UPLC-LTQ-orbitrap-MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae,2019,25(1):201-210.
[12] 李郭帅,马阳,耿婷,等. UPLC-Q-TOF-MS/MS分析复方南星止痛膏化学成分[J]. 中国中药杂志,2019,44(2):298-307.
LI G S,MA Y,GENG T,et al. Rapid identification of chemical components in compound Nanxing acesodyne plaster by UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. China J Chin Mater Med,2019,44(2):298-307.
[13] 赵文燕,向茜,王蝉,等. 基于UPLC-Q-TOF/MS和模式识别技术阐释樟帮特色黄连水炒吴茱萸的炮制科学内涵[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(21):147-155.
ZHAO W Y,XIANG Q,WANG C,et al. Explanation of scientific connotation of Euodiae Fructus stir-fried with coptidis rhizoma based on UPLC-Q-TOF/MS and pattern recognition technology[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae,2022,28(21):147-155.
[14] 夏玉英,李菁,李楚源,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS分析感冒清热颗粒化学成分[J]. 中药材,2022,45(2):359-367.
XIA Y Y,LI J,LI C Y,et al. Analysis of chemical constituents of Ganmao Qingre Granules based on UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. J Chin Med Mater,2022,45(2):359-367.
[15] 胡静,杨媛媛,任慧,等. 光叶丁公藤中化学成分的UPLC-Q-Exactive Focus-MS/MS鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(18):124-132.
HU J,YANG Y Y,REN H,et al. Identification of chemical constituents in caulis of *Erycibe schmidtii* by UPLC-Q-exactive focus-MS/MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae,2020,26(18):124-132.
[16] 林秀莲,宋粉云,潘玄玄,等. UPLC-Q-TOF-MS分析补肾强身片中化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(19):61-67.
LIN X L,SONG F Y,PAN X X,et al. Analysis on chemical constituents in Bushen Qiangshen pills by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae,2018,24(19):61-67.
[17] SUN Q,WANG B,XU L L,et al. Quality consistency evaluation on three species of North Patrininae herba by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ion trap time-of-flight mass spectrometry and network pharmacology approaches[J]. J Sep Sci,2022,45(20):3852-3865.

(收稿日期:2023-07-03 修回日期:2023-11-16)
(编辑:曾海蓉)