

UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱在线快速识别 黄芪建中汤的化学成分

胡英还^{1,2,3}, 许文倩^{1,2,3}, 秦雪梅^{1,3*}, 刘月涛^{1,3*}

(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 化学化工学院,
3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006)

摘要: 本文采用 UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱建立了快速、灵敏的液质联用方法在线快速鉴定黄芪建中汤的化学成分, 构建了较为全面的黄芪建中汤化学成分谱, 用于该复方的质量评价。依据离子峰的保留时间、精确分子量和多级质谱碎片, 与对照品及文献报道数据比较, 对黄芪建中汤的整体化学成分进行了在线快速鉴定。共鉴定了黄芪建中汤中 71 种化学成分, 主要包括皂苷类和黄酮类, 另外还有个别生物碱类和酚类化合物等。这些成分中, 来源于黄芪的有 20 种、白芍 14 种、甘草 37 种、生姜 3 种、桂枝大枣各 2 种, 为黄芪建中汤的质量控制以及药效物质基础研究提供了科学依据。

关键词: 黄芪建中汤; 化学成分; UHPLC-Q Exactive 轨道阱高分辨质谱

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0964-07

Rapid identification of chemical constituents in Huangqi Jianzhong Tang by UHPLC coupled with hybrid quadrupole-orbitrap MS

HU Ying-huan^{1,2,3}, XU Wen-qian^{1,2,3}, QIN Xue-mei^{1,3*}, LIU Yue-tao^{1,3*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, 2. College of Chemistry and Chemical Engineering,
3. Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of TCM, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: This study was designed to establish an ultra-liquid chromatography-mass spectrometry method for the reliable identification the multiple chemical components in Huangqi Jianzhong Tang (HQJZ). The ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry method was applied to identify the chemical constituents in the HQJZ rapidly. A total of 71 compounds including two major categories of saponins and flavonoids were identified or tentatively deduced on the basis of their retention behaviors, fragments of multistage mass spectrometry or by comparing with reference substances and literatures. Among them, 20 compounds were from Astragali Radix, 14 were from Paeoniae Radix Alba, 37 were from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle, 3 were from Rhizoma Zingiberis Recens, 2 were from Cinnamomi Ramulus and Jujubae Fructus, respectively. The LC-MS method was used to qualitatively analyze the chemical constituents of HQJZ, which provides a scientific basis for the quality control of HQJZ.

Key words: Huangqi Jianzhong Tang; chemical constituent; UHPLC-Q Exactive quadrupole-orbitrap MS

收稿日期: 2016-12-30; 修回日期: 2017-02-04.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (3157010673); 山西省青年科技研究基金资助项目 (2015021193).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-351-7018379,

E-mail: qinxm@sxu.edu.cn; yuetaoliu@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1191

黄芪建中汤出自张仲景《金匮要略·血痹虚劳病脉证治》篇, 具有温中补虚、缓急止痛的功效。其组方由黄芪、白芍、甘草、桂枝、生姜、大枣煎水取汁, 外加饴糖组成。现代临床多用于治疗脾虚性慢性萎缩性胃炎和十二指肠溃疡等胃黏膜损伤所致疾病, 是

治疗虚寒性胃病的主方^[1,2]。目前关于黄芪建中汤的研究多集中于临床药效以及其加减方的应用,其整体的化学成分以及药效物质基础未见相关报道。为了明确其活性成分并阐述该复方的药效物质基础和作用机制,其整体化学成分研究十分必要。

超高效液相色谱(UHPLC)技术是近年发展起来的分离技术,其特点是超高效、超高分离度和高灵敏度,在中药等复杂体系的分离分析上显示出巨大的优势。Q Exactive LC-MS/MS 系统具有高通量的扫描和多重检测能力,尤其是其快速交替的正负极扫描模式非常适用于分析复杂体系,能得到高质量质谱图和化合物精确分子量,为复杂体系提供高度可靠的定性和定量测试结果^[3]。

本研究采用 UHPLC-Q Exactive 对黄芪建中汤及其组方中各单味药的化学成分进行了全面分析,得到了其所含成分的高分辨精确分子量以及裂解碎片离子信息,在高分离度、高灵敏度的条件下快速获得丰富的样品信息,为黄芪建中汤的质量控制以及药效物质基础研究提供科学依据。

材料与amp;方法

仪器与试剂 UHPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱(美国 Thermo 公司);十万分之一天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。超纯水由 Milli-Q Integral Water Purification System(美国 Millipore 公司)制备,甲酸、乙腈为色谱纯(美国 Thermo 公司),其他实验试剂均为分析纯。

对照品 毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、(6aR,11aR)9,10-二甲氧基紫檀烷、(6aR,11aR)9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷、黄芪皂苷 I、II、III、IV 均购于上海永恒生物科技有限公司,批号依次为 20120428、20120528、20120505、20120515、20120506、20100202、20111125、20110503、20120516、20120315;芒柄花苷、毛蕊异黄酮购于成都曼斯特公司,批号为:13021808、13082713;甘草苷和芍药苷购于中国食品药品检定研究院,批号分别为 111610-200604 和 110736-200731,对照品纯度均达到 98%以上。

药材 本实验中所用到的黄芪采自山西省浑源县恒山,炙甘草、白芍、桂枝均购于安国市祁澳中药饮片有限公司,大枣和生姜购于当地市场,各药材均经山西大学秦雪梅教授鉴定,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var.

mongholicus (Bge.) Hsiao] 的干燥根,炙甘草为豆科植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 干燥根的加工炮制品,白芍为毛茛科植物芍药 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 的干燥根,桂枝为樟科植物肉桂 (*Cinnamomum cassia* Presl) 的干燥嫩枝,生姜为姜科植物姜 (*Zingiber officinale* Rosc.) 的新鲜根茎,大枣为鼠李科植物枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.) 的成熟果实。

数据分析采用 Xcalibur 3.2 数据软件处理系统(美国 Thermo 公司),化合物指认参照 Chemspider 数据库(网络版)。

全方供试品溶液的制备 按处方比例分别称取黄芪、白芍、甘草、桂枝、生姜和大枣,加 4 倍量水,浸泡 30 min 后加热回流提取 2 h,纱布过滤,残渣加 3 倍量水,煮沸回流 2 h,过滤,合并两次滤液,于旋转蒸发仪中减压浓缩至每毫升含 9.2 g 生药量。取样品溶液 0.2 mL 加甲醇 1 mL,涡旋 1 min,超声提取 20 min,高速离心 (13 000 r·min⁻¹) 15 min,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样分析。

各单味药及其阴性方样品制备 按各单味药在复方中的配比,分别称取各单味药,同上法分别制备单味药及各单味药的阴性方供试液。

对照品溶液制备 分别精密称取芒柄花苷、芒柄花素、(6aR,11aR)9,10-二甲氧基紫檀烷、(6aR,11aR)9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖苷、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、黄芪皂苷 I、II、III、IV、甘草苷和芍药苷对照品适量,用甲醇制备单一对照品储备液,取适量各对照品储备液混合并稀释得到混合对照品溶液,均置于 4 °C 冰箱保存。

超高效液相色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC HSS T3 液相色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm, 美国 Waters 公司),流动相为 A: 0.1% 甲酸水溶液; B: 乙腈。洗脱程序为 0→3 min: 1% B; 3→13 min: 20% B; 13→15 min: 25% B; 15→18 min: 30% B; 18→20 min: 40% B; 20→23 min: 60% B; 23→25 min: 99%→1% B。柱温为 30 °C,流速为 0.25 mL·min⁻¹,进样量为 10 μL。

质谱条件 HESI 离子源,正负离子模式均检测,质量扫描范围均为 *m/z* 50~1 500,喷雾电压: 正离子模式为 3.5 kV,负离子模式为 2.5 kV,鞘气体积流量为 35 个流量单位,辅助体积流量为 10 个流量单位,毛细管温度 320 °C,透镜电压 55 kPa,质量分辨率 70 000。

结果

1 黄芪建中汤主要色谱峰归属

应用 UHPLC-Q Exactive 对黄芪建中汤、其单味药供试品溶液、阴性方溶液和对照品溶液进行分析。图 1 为正负离子模式下测定黄芪建中汤的总离子流 (TIC) 图。通过与单味药离子流图保留时间比对以及阴性方验证初步判断峰来源, 再进一步根据该保留时间下的质谱图确定峰的归属。已鉴定的成分中来源于黄芪的有 20 种、白芍 14 种、甘草 37 种、生姜 3 种、桂枝大枣各 2 种, 其中蔗糖为 6 种药材的共有成分, 芒柄花苷与芒柄花素为黄芪和甘草两味药材的共有成分。因复方中所含化学成分多, 且含量较低, 很难将其完全分开, 因此存在个别峰不止含有一种物质的现象。鉴定的 58 个色谱峰中, 11、16、27、38、39、42、43、54 和 55 号峰分别包含 2 种成分, 45 和 46 号分别包含 3 种成分。

2 黄芪建中汤主要色谱峰的定性鉴定

通过对照品比对鉴定出峰 13、15、16、25、29、30、31、43、45、46、49 和 53 分别为芍药苷、毛蕊异黄酮苷、甘草苷、芒柄花苷、(6*aR*,11*aR*) 9,10-二甲氧基紫檀烷-3-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、芒柄花素、黄芪皂苷 IV、(6*aR*,11*aR*) 9,10-二甲氧基紫檀烷、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮、黄芪皂苷 II 和黄芪皂苷 I。其他的峰根据其精确分子量及其特征模式下产生的碎片离子, 应用 Xcalibur 3.2 计算其可能的化学组

成 (误差小于 5 ppm), 然后通过其特征碎片离子峰信息、归属信息以及已有的相关化学成分信息报道, 推断其可能的结构。正负离子模式下共分析推断出 71 种化合物, 分析鉴定结果见表 1^[4-14]和表 2^[4-8, 11, 14-20]。从分析鉴定的结果来看, 黄芪中主要为黄酮类物质以及黄芪皂苷, 甘草和白芍中多为皂苷类物质, 桂枝、生姜中鉴定出的物质很少, 这可能是因为在其中多为挥发性小分子物质, 在开放性的煎煮过程中有所损失以至于含量太低难以检测到。

下面以甘草皂苷 A3、H2、K2、乌拉尔甘草皂苷 B、

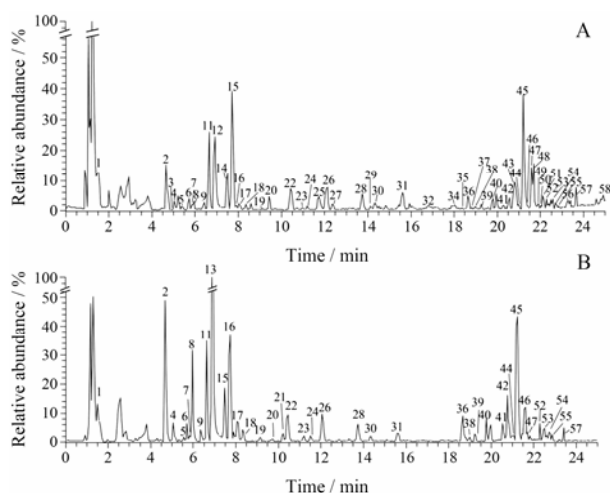


Figure 1 Total ion chromatogram (TIC) of Huangqi Jianzhong Tang (HQJZ) extract in positive mode (A), TIC of HQJZ extract in negative mode (B). The peak numbers were in accordance with Table 1 and 2

Table 1 Identification of the chemical constituents of HQJZ by UHPLC-ESI-MSⁿ in positive mode. A: Astragali Radix; C: Cinnamomi Ramulus; P: Paeoniae Radix Alba; G: Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle; Z: Zingiberis Rhizoma Recens; J: Jujubae Fructus. *Identified by comparing with the reference standards

No.	<i>t_R</i> /min	Identification	Molecular formula	[M+H] ⁺ / [M+Na] ⁺	Error/ppm	Fragment	Reference	Source
1	1.48	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-365.105 6	0.459	203.052 7, 185.042 1	4	A, C, P, G, Z, J
6	5.71	Paeoniflorin sulfonate	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃ S	-567.114 9	1.058	-	5	P
9	6.39	Schaftoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565.155 5/587.137 4	0.563	547.144 8, 475.126 8, 445.113 2, 385.088 7, 355.079 9	6	G
10	6.44	Zizyphusin	C ₂₀ H ₂₄ NO ₄ ⁺	342.170 2/-	0.629	297.112 3, 265.086 0, 237.090 8	7	J
11	6.61	Albiflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	481.171 2/-	1.583	319.117 8, 197.081 0, 133.065 0	8	P
13*	6.89	Paeoniflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	-503.152 6	0.531	341.099 6, 219.062 5		P
14	7.42	Isoliquiritin apioside	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	-573.157 8	-0.038	419.133 5, 257.080 8	8	G
15*	7.71	Calycosin-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glycoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.128 7/-	0.283	285.076 0, 279.052 2		A
16	7.78	Liquiritigenin-7,4'-diglucoside	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.189 9/-	3.418	419.134 0, 257.081 0, 239.070 2	7	G
18	8.25	Apigenin-hex	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.113 0/-	0.177	215.070 3, 243.064 9, 153.017 8	9	A
19	9.10	Galloylalbiflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	-655.163 6	0.395	493.111 6, 371.074 1	10	P

								Continued	
No.	t_R / min	Identification	Molecular formula	$[M+H]^+/[M+Na]^+$	Error/ ppm	Fragment	Reference	Source	
20	9.65	Pratensein-7- <i>O</i> -glucose	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.123 1/-	-0.838	301.070 8, 286.047 4, 269.044 5, 241.049 4	9	A	
21	9.71	Rhamnocitrin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.070 9/323.052 6	0.782	245.138 1, 231.065 2, 167.034 0	9	G	
23	11.14	Liquirtin apioside	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	551.174 3/-	-2.934	419.133 7, 257.080 9, 239.070 2, 137.023 5	6	G	
24	11.25	Glycyroside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	563.176 6/-	1.212	419.133 5, 269.081 0, 254.057 1	6	G	
25*	11.97	Ononin	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	431.134 1/-	1.024	269.081 0, 254.057 3		G, A	
26	12.04	Isoliquiritin	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.134 0/431.134 1	0.743	269.081 0	11	G	
27	12.25	Calycosin-7- <i>O</i> -glc-6"- <i>O</i> -acetate	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁	489.139 7/-	1.149	285.076 0, 270.052 4, 253.049 6, 225.054 6, 137.023 4	9	A	
27	12.34	Chrysin or isomer	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	255.065 4/-	0.763	227.070 4, 197.889 2	9	G	
29*	13.73	Astraisoflavan-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	463.159 6/485.141 8	-0.233	301.107 0		A	
30*	14.50	Clycosin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.075 9/307.077 5	0.526	270.052 3, 253.049 4, 225.054 7		A	
31*	15.65	7,2'-Dihydroxy-3',4'- dimethoxyisoflavane-7- <i>O</i> -glucoside	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	465.175 5/487.157 5	-0.050	303.122 5, 167.070 3		A	
32	16.82	Dihydroxy-dimethoxy isoflavone	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	315.086 5/-	0.588	300.062 9, 283.066 1, 255.065 3	9	A	
35	18.49	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.060 0/-	-0.369	253.049 7, 243.056 1, 215.070 3, 153.018 3	9	G	
37	18.70	22-Acetoxylicorice G2	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₉	897.412 4/-	1.052	527.337 2	8	G	
38	18.86	Formononetin-7- <i>O</i> -glc-6"- <i>O</i> -acetate	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀	473.144 5/495.125 9	0.585	269.080 9, 254.057 1, 213.091 0	9	A	
38	18.92	Dihydroxy-trimethoxy DHIF	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	317.102 1/339.080 3	0.427	299.091 6, 289.107 2, 183.065 4, 163.039 0, 135.044 2, 107.049 5	9	A	
39	19.09	7-hydroxy-6,4'-dimethoxyisoflavan	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	299.091 4/-	0	284.067 6, 267.063 4	9	A	
39	19.19	Licorice saponine A3	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	985.463 9/-	-0.306	823.409 3, 809.431 5, 647.381 6, 615.389 5, 453.336 3, 203.142 1	8	G	
40	19.79	22-Acetoxyglycyrrhizin	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₈	881.419 0/-	2.830	351.058 0, 193.034 4	8	G	
41	20.54	Isoliquiritigenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.080 8/-	-0.099	155.033 9, 137.023 5	11	G	
42	20.74	Licorice saponine G2	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	839.406 3/-	0.470	469.331 5	8	G	
43*	20.83	Formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	269.080 8/-	-0.132	254.057 1, 237.054 5, 213.090 7		G, A	
45*	21.12	Astragaloside IV	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	-/807.450 3	-1.110	627.387 0, 495.348 3		A	
45	21.20	Uralsaponin B	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	823.407 8/-	-3.961	647.378 9, 453.336 4	12	G	
46*	21.62	3-Hydroxy-9,10-dimethoxytercarpan	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	301.107 0/-	-0.166	167.070 4		A	
46*	21.63	7,2'-Dihydroxy-3',4'-dimethoxy isoflavan	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	303.121 9/-	-2.640	193.086 0, 181.086 0, 167.070 3, 149.059 8		A	
49*	22.06	Astragaloside II	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	-/849.461 0	0.350	789.443 8, 669.397 0		A	
50	22.10	6-Gingerol	C ₁₆ H ₂₇ O ₄	-/317.172 3	-0.096	277.179 9, 259.269 2, 177.091 1	6	Z	
51	22.17	Licorice saponine C2	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	807.416 7/829.397 5	0.684	631.384 4, 455.350 8, 437.341 6	6	G	
53*	22.59	Astragaloside I	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	869.489 2/891.471 3	0.048	831.460 5, 711.407 7, 651.388 1, 477.366 9		A	
54	22.74	Gancaonin C	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	339.122 8/-	0.294	283.060 2	11	G	
55	22.79	Licochalcone A	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	339.159 2/-	0.337	271.096 7, 297.148 6, 121.028 7	8	G	
55	22.85	Isoastragaloside I	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	869.489 2/891.471 3	0.110	831.460 5, 711.407 7, 651.388 1, 477.366 9	13	A	
56	22.95	Glycyrol	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	367.117 8/-	0.505	339.123 4	14	G	
57	23.51	6-Shogaol	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	277.179 6/-	-0.798	259.169 4, 177.091 1, 137.059 8	6	Z	
58	24.76	Glycyrrhetic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	471.347 2/-	0.729	453.336 2, 317.211 7	14	G	

Table 2 Identification of the chemical constituents of HQJZ by UHPLC-ESI-MSⁿ in negative mode. *Identified by comparing with the reference standards

No.	<i>t_R</i> / min	Identification	Molecular formula	[M-H] ⁻ / [M+HCOO] ⁻	Error /ppm	Fragment	Reference	Source
1	1.48	Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.108 8/ 387.114 3	2.703	179.055 5, 89.023 4	4	A, C, P, G, Z, J
2	4.69	Gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	169.013 6/-	2.664	125.023 6	8	P
3	4.90	Isomaltodebenzoyl paeoniflorin	C ₂₂ H ₃₄ O ₁₄	-/567.193 5	2.713	521.187 7, 323.098 2, 263.078 3, 179.055 5	15	P
4	5.02	Glucopyranosyl paeonisuffrone	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	359.134 7/-	2.899	197.081 6	16	P
5	5.56	Mudanpioside F	C ₁₆ H ₂₄ O ₈	343.139 7/-	2.786	181.087 0, 151.075 3	16	P
6	5.71	Paeoniflorin sulfonate	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃ S	543.118 1/-	1.412	-	5	P
7	5.87	Oxypaeoniflora	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₂	495.151 1/ 541.156 6	2.822	465.141 0, 333.098 5, 165.054 8, 137.023 7	17	P
8	5.99	Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	147.044 5/-	3.019	102.947 9, 87.924 3, 58.957 9	18	C
11	6.52	Isomalto paeoniflorin	C ₂₉ H ₃₈ O ₁₆	641.208 7/ 687.214 7	1.715	611.197 9, 489.160 2, 323.097 7	16	P
11	6.61	Albiflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	-/525.161 4	2.157	479.155 9, 283.082 4, 121.028 7	8	P
12	6.74	Glucoliquiritin apioside	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₈	711.215 3/-	3.107	549.161 1, 417.118 5, 255.066 2, 135.008 1, 119.049 4, 91.018 0	8	G
13*	6.89	Paeoniflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	-/525.161 9	3.109	449.145 6, 177.055 5		P
14	7.42	Isoliquiritin apioside	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	549.161 8/-	2.791	417.119 8, 255.066 1, 153.018 5, 135.008 0	8	G
16*	7.73	Liquiritin	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.119 5/-	3.575	255.066 1, 153.018 5, 135.008 0, 119.049 4 91.017 9		G
17	8.12	Galloylpaeoniflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₅	631.167 2/-	2.303	491.118 2, 399.093 5	14	P
22	9.79	5-Hydroxyliquiritin	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	433.114 1/-	2.717	271.061 1, 151.003 0	7	G
24	11.25	Glycyroside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃	561.161 3/-	1.876	267.066 3, 252.042 7	6	G
26	12.04	Isoliquiritin	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.119 5/-	3.575	297.077 9, 135.008 0, 119.049 4, 91.018 0	11	G
28*	13.75	Liquiritigenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.066 2/-	3.978	153.0186, 135.008 3, 119.049 4, 91.018 0	11	G
30*	14.50	Clycosin	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.061 3/-	4.240	268.037 7		A
31*	15.65	7,2'-Dihydroxy-3',4'- dimethoxyisoflavane-7- <i>O</i> -glucoside	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	465.175 5/-	-0.050	-		A
33	17.68	Licorice saponine J2	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆	823.412 1/-	1.214	351.056 8	8	G
34	18.23	24-Hydroxyl-licorice A3	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₂	999.443 8/-	0.650	837.389 2, 485.324 4, 351.085 0	8	G
36	18.66	Benzoylpaeoniflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	583.181 9/ 629.187 7	1.539	553.172 1, 535.162 1, 431.134 8, 165.055 1	16	P
37	18.70	22-Acetoxylicorice G2	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₉	895.396 9/-	1.228	351.056 9	8	G
39	19.19	Licorice saponine A3	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	983.450 2/-	0.813	821.396 4, 807.408 0, 645.364 2, 351.056 9	8	G
40	19.79	22-Acetoxylicorice glycyrrhizin	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₈	879.402 1/-	1.364	351.058 0, 193.034 4	8	G
41	20.54	Isoliquiritigenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.066 2/-	3.978	153.018 6, 135.008 3, 119.049 4, 91.018 0	11	G
42	20.75	Licorice saponine E2	C ₄₂ H ₆₀ O ₁₆	819.381 2/-	2.121	351.056 9	19	G
42	20.74	Licorice saponine G2	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	837.391 3/-	1.194	351.056 9	8	G
43*	20.81	Formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.066 3/-	4.174	252.042 7, 223.039 8, 195.044 7		G, A
43	20.92	22-Acetoxylicorice C2	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₇	863.406 9/-	1.069	801.404 7, 351.056 9	8	G
44	20.97	Benzoylalbiflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	583.181 9/ 629.187 6	0.877	461.146 5, 121.028 7	16	P
45	21.19	Licorice saponine H2	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.396 3/-	1.096	803.388 4, 759.392 2, 645.361 7, 351.056 8	14	G
46	21.60	Glycyrrhizic acid	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.396 3/-	1.096	351.056 9, 193.035 0	20	G
47	21.63	Licorice saponine B2	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	807.414 1/-	-2.535	631.385 0, 351.056 9, 193.034 9	11	G
48	21.65	Licorice saponine K2	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.396 9/-	1.826	351.056 9	14	G
52	22.29	Glycoumarin	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	367.118 8/-	3.228	352.094 3, 309.040 5	14	G
54	22.77	4- <i>O</i> -Methylglabridin	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	337.144 7/-	3.750	332.120 4	14	G
56	22.95	Glycyrol	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	365.103 0/-	2.918	307.024 8, 295.024 7	14	G
57	23.51	6-Shogaol	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	275.165 5/-	4.829	254.986 4, 231.175 3	6	Z
58	24.76	Glycyrrhetic acid	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	469.332 7/-	3.119	425.342 7, 355.266 3	14	G

甘草素和异甘草素为例,对化合物的结构鉴定过程进行介绍。

根据甘草皂苷 A3 的分子式得到其精确分子量为 984.456 0,在正离子模式下提取其 $[M+H]^+$ 峰 m/z 985.463 9,得到保留时间为 19.19 min 的提取离子峰。在正离子一级质谱图中,其 $[M+Na]^+$ 峰 m/z 1007.444 9 的存在进一步证明 m/z 985.463 9 为准分子离子峰。在正离子二级质谱图中, $[M+H]^+$ 发生糖基开裂,分别丢失六碳糖 $C_6H_{10}O_5$ 、己糖醛酸 $C_6H_8O_6$ 的中性分子后产生特征碎片离子 823.409 3、809.431 5 和 647.381 6。在此基础上再失去一分子 CH_3OH 得到 615.389 5 碎片离子,失去羧基后得到 601.477 2 碎片离子。随后失去 $C_7H_9O_5$ 得到 11-oxo, Δ^{12} -齐墩果烯类五环三萜母环正离子 m/z 471.346 7,失去一分子水生成 m/z 453.336 3,然后经过 RDA 裂解以及麦氏重排得到碎片 203.142 1 等碎片离子。

同样,在负离子模式下提取 $[M-H]^-$ 峰 m/z 983.450 2,得到保留时间为 19.19 min 的提取离子峰。在负离子一级质谱图中 $[M+Na-2H]^-$ 1005.430 5 与正离子模式中 $[M+Na]^+$ 得以互相验证,在负离子二级质谱图中同样检测到糖基开裂碎片离子 821.396 4、807.408 0、645.364 2。其裂解规律进一步得到了验证。此外,在负离子模式下,甘草皂苷多会形成 $[glucuroglucuronic\ acid-H]^-$ m/z 351.056 9 的碎片离子^[7]。

乌拉尔甘草皂苷 B、甘草皂苷 H2 和甘草皂苷 K2 互为同分异构体,分子式均为 $C_{42}H_{62}O_{16}$,在负离子模式中检测到 $[M-H]^-$ m/z 821.396 3 得到的峰保留时间分别为 21.19 min 和 21.60 min,在正离子模式中检测到 m/z 823.407 8,保留时间为 21.20 min,经文献查阅,乌拉尔甘草皂苷 B 在碎裂的过程中易产生 $[M+H-C_{12}H_{17}O_{12}]^+$ 或 $[M-H-C_{12}H_{17}O_{12}]^-$ 的特征碎片^[11],而只在正离子模式下的二级谱图中检测到 m/z 453.336 4 该碎片离子,因此推测正离子模式下保留时间为 21.20 min 的物质为乌拉尔甘草皂苷 B。而甘草皂苷 H2 与甘草皂苷 K2 的区别是甘草皂苷 H2 在 11 位为羰基取代,而甘草皂苷 K2 在 24 位则是羟基取代,因此在负离子模式下的两个峰出峰顺序应为甘草皂苷 H2 和甘草皂苷 K2。通过文献查证与推测结果一致^[12]。

甘草素和异甘草素互为同分异构体,分子式均为 $C_{15}H_{12}O_4$,在负离子模式下提取 $[M-H]^-$ m/z 255.066 2,得到了保留时间分别为 13.75 min 和 20.54 min 的两个峰,且其均能产生 153.018 6、135.008 3、119.049 4 的二级特征碎片,经查阅文献^[12]以及根据

其极性大小判断,甘草素因其极性较大应先出峰,故推断保留时间为 13.75 min 处为甘草素,20.54 min 处为异甘草素。

讨论

本研究首次采用 UHPLC-Q Exactive 对黄芪建中汤以及其组方中各单味药的化学成分进行了全面分析,得到了其所含成分的高分辨精确分子量以及裂解碎片离子信息,在高分离度、高灵敏度的条件下快速获得丰富的样品信息。根据其精确分子量、质谱裂解碎片信息,并经文献报道比对以及对照品指认,共分析鉴定了 71 种成分,主要包括皂苷类和黄酮类。本研究较全面地阐明了黄芪建中汤的化学组成,为黄芪建中汤的质量控制以及药效物质基础研究奠定了基础。

蔗糖为初级代谢产物,各单味药和阴性方中均能检测到,为 7 种药材的共有成分。同样,芒柄花素与芒柄花苷在甘草和黄芪中也均有较高的响应,文献也报道这两种植物均含有这两种成分,因此,它们都归属到两味药材中。

在初期优化条件的过程中,考察了水提液直接分析以及将水提浓缩液经甲醇超声处理后再进样分析,结果显示,经甲醇超声处理后得到的信息较为丰富。

黄芪建中汤是在小建中汤的基础上加黄芪后得到的复方,黄芪在复方中充当君药的作用。黄芪单味药中,其皂苷类成分响应较高,而在复方中,除了皂苷类成分之外,黄芪中的黄酮类物质的响应较其在单味药中有所提升。这可能是因为复方中其他物质增加了黄芪中黄酮类物质的溶解度。另一方面,这些物质可能在复方中起到一定的治疗或者辅助治疗的作用。

此外,在分析过程中还发现,有的峰不止含有一种物质,在以往的研究中也有类似的情况。一方面可能是因为复方成分多且种类杂,极性相差不多的物质在实验条件下难以分开;另一方面可能是在煎煮过程中成分之间发生的相互作用。

References

- [1] Sun N, Liu WG, Wang XP, et al. A study on Huangqi Jianzhong decoction influence on gastric mucosal pathologic of rats with chronic atrophic gastric with spleen deficiency [J]. J Henan Univ Chin Med (中医学报), 2005, 20: 11-12.
- [2] Liu WG. Therapeutic Effect of Radix Astragalii on Chronic Atrophic Gastritis of Spleen Deficiency Type in Rats (黄芪建

- 中汤对大鼠脾虚型慢性萎缩性胃炎干预作用的研究) [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2005.
- [3] Wang YW. A new tool of confirmatory quantitative analysis UPLC coupled with hybrid quadrupole-orbitrap MS [J]. Mod Sci Instrum (现代科学仪器), 2011, 5: 138–140.
- [4] Wang H, Liu YQ, Yang HM, et al. Identification on fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose in sugar free foods by LC-MS [J]. J Anal Chem (分析化学), 2010, 38: 873–876.
- [5] Mu HD, Zhu JB, Ding Y, et al. Analysis of chemical constituents of Radix Paeoniae Alba by UPLC/Q-TOF-MS [J]. Chin J Anal Lab (分析实验室), 2013, 7: 113–117.
- [6] Yan Z, Chen Y, Li T, et al. Identification of metabolites of Si-Ni-San, a traditional Chinese medicine formula, in rat plasma and urine using liquid chromatography/diode array detection/triple-quadrupole spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2012, 885–886: 73–82.
- [7] Yan LL. Effective Substances Research of Chemical Composition of Banxia Xiexin Decoction with UPLC/Q-TOF-MS (基于液质联用技术的半夏泻心汤药效物质定性研究) [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2013.
- [8] Qi Y, Li S, Pi Z, et al. Chemical profiling of Wu-tou decoction by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Talanta, 2014, 118: 21–29.
- [9] Zhang J, Xu XJ, Xu W, et al. Rapid characterization and identification of flavonoids in Astragali Radix by UHPLC coupled with linear ion trap-orbitrap mass spectrometry [J]. J Chromatogr Sci, 2015, 53: 70–76.
- [10] Lian HY, Xu WYJ, Liang QD, et al. Chemical comparison between decoctions of Radix Paeoniae Rubra and Radix Paeoniae Alba by UPLC/Q-TOF-MS [J]. J Chin Mass Spectrom Soc (质谱学报), 2014, 35: 269–278.
- [11] Chen PD, Zhou X, Ding AW. Constituents in aqueous extract of honey fried licorice by HPLC-MS [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2014, 36: 2115–2120.
- [12] Cai LN, Zhang ZL. Structure of yellow licorice saponin [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 1991, 26: 447–450.
- [13] Li R, Fu TJ, Ji YQ, et al. High performance liquid chromatography mass spectrometry study on the chemical constituents of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) and *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao [J]. Chin J Anal Chem (分析化学), 2005, 33: 1676–1680.
- [14] Xu W, Huang M, Li H, et al. Chemical profiling and quantification of Gua-Lou-Gui-Zhi decoction by high performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and ultra-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2015, 986–987: 69–84.
- [15] Chen LL. Study on the Chemical Constituents of Gui-Zhi-Tang by LC-MS and Evaluation of Its Anti-inflammatory Activity (桂枝汤化学成分液相色谱-质谱分析及抗炎活性研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [16] Wang S, Chen L, Leng J, et al. Fragment ion diagnostic strategies for the comprehensive identification of chemical profile of Gui-Zhi-Tang by integrating high-resolution MS, multiple-stage MS and UV information [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 98: 22–35.
- [17] Ren JQ, Liu CM, Wang LQ, et al. Determination of chemical compositions in extract of Radix Paeoniae Alba by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2014, 10: 1375–1376.
- [18] Zhang W, Wang X, Qin JP, et al. Rapid identification of 6 kinds of chemical composition in Guizhi Fuling Capsule by DART-Q-TOF-MS [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2014, 39: 4118.
- [19] Huang XD, Wu QC. Studies on chemical constituents of Zhi Gancuo Decoctions [J]. China Pharm (中国药师), 2012, 15: 1409–1411.
- [20] Yan M, Li LF, Li HD. Comparative research progress of 18 potential isomers of glycyrrhizic acid, glycyrrhetic acid [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2010, 21: 562–566.