

基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析

赵艳敏¹, 刘素香², 张晨曦¹, 刘岱琳¹, 张铁军^{2*}

1. 中国人民武装警察部队后勤学院 生药与药剂学教研室, 天津 300309

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 采用高效液相色谱-电喷雾质谱联用技术 (HPLC-Q-TOF-MS) 对甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 50% 甲醇提取物中的化学成分进行分析鉴定。方法 Diamonsil II C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 反相 HPLC 梯度洗脱法分离各主要成分; 电喷雾电离源经正、负离子模式对色谱流出物进行检测, 四级杆飞行时间串联质谱法对各主要色谱峰进行归属; 选择甲酸钠溶液为内标校正。结果 通过二级高分辨质谱分析结合对照品数据及相关文献, 从甘草 50% 甲醇提取物中共鉴定出 40 个化学成分, 包括 28 个黄酮类、11 个三萜皂苷类和 1 个香豆素类化合物。结论 利用液质联用技术鉴定甘草中的化合物并提供结构信息, 为快速分析甘草药材的物质基础提供可行方法。

关键词: 甘草; 高效液相色谱-电喷雾质谱; 黄酮类成分; 三萜类成分; 香豆素类成分

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)12-2061-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.12.007

Analysis on chemical constituents from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* by HPLC-Q-TOF-MS

ZHAO Yan-min¹, LIU Su-xiang², ZHANG Chen-xi¹, LIU Dai-lin¹, ZHANG Tie-jun²

1. College of Logistics, University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To analyze the main chemical constituents of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* by HPLC-Q-TOF-MS in the positive and negative ions mode. **Methods** The chromatographic fingerprint was obtained with Diamonsil II C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and gradient elution with 0.05% H₂O-formic acid (A)-acetonitrile (B), and the flow rate was 1 mL/min. The column temperature was maintained at 35 °C. The detection wavelength was of 200–600 nm. Positive and negative ions MS information of Bruker Daltonics 1200 HPLC-Q-TOF was coupled with elemental analysis and compared with the literature data to analyze the compounds information. **Results** Combined with the accurate relative molecular mass of compounds provided by HPLC-Q-TOF-MS, 40 compounds were identified in the ethanolic extract from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, which include 28 flavonoids, 11 triterpenoids saponins, and one coumarin. **Conclusion** The method provides the technical support for the quality control of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, and contributes the reference data to elucidating the potential basis of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*. **Key words:** *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; HPLC-Q-TOF-MS; flavonoids; triterpenoids; coumarin

甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* 是常用的传统中药, 也是疏风解毒胶囊的原料药材之一, 具有补脾益气、润肺止咳、缓急止痛、清热解毒的功效^[1], 同时甘草在我国多个传统经典方剂中承担着调和诸药、缓和药性的作用。现代药理学研究显示甘草具有抗溃疡、解痉、抗菌、抗炎、调血脂、镇痛和雌性激素样作用等多种功效^[2]。甘草中的化学成分主要有三萜类、黄酮类、香豆素类和多糖类等^[2-5], 目

前从甘草中分离鉴定的三萜类成分有 60 多种, 黄酮类成分有 100 多种^[4]。甘草的化学成分比较复杂, 而且由于品种和产地不同, 其化学成分差异较大, 因此建立一种微量、快速的定性识别方法, 对于分析其作用物质基础具有重要的意义。近年来应用液质联用分析甘草中的化学成分取得一定进展^[6-9], 有学者利用 HPLC/ESI-MSⁿ 联用方法对东北产甘草的化学成分进行分析, 根据多级质谱 (ESI-MSⁿ) 所得的

收稿日期: 2016-02-18

作者简介: 赵艳敏 (1987—), 女, 博士研究生, 研究方向为天然产物活性成分研究。

*通信作者 张铁军, 男, 研究员, 研究方向为中药现代化及新药创制。Tel: 13502065858 E-mail: tiezheng4@sina.com

碎片峰, 结合紫外光谱、HPLC 的保留时间以及参考文献报道共推测出 22 个化学成分的可能结构^[8]。也有学者利用 HPLC-MS 的方法分析了炙甘草中的 38 个化学成分^[9]。本实验在大量文献工作的基础上, 利用 HPLC-Q-TOF-MS 方法分析了甘草的化学成分组成, 首次在一个液质条件下识别并鉴定了 40 个主要色谱峰的组成, 其中包括 28 个黄酮类成分、11 个三萜皂苷类成分和 1 个香豆素类成分, 为快速确定甘草的药效物质基础、质量控制提供数据支撑。

1 仪器与试剂

1200HPLC-TOF/MS (Bruker Daltonics), 1200 HPLC (Agilent technology), Milli-Q 超纯水系统 (法国 Millipore 公司)。甲醇和乙腈 (色谱纯, 美国 Merck 公司), 对照品甘草酸 (批号 731-9001)、甘草苷 (批号 111610201106) 购自中国食品药品检定研究院, 异甘草苷 (批号 J140320011) 购自将来试剂公司, 甘草素 (批号 FB-31001) 购自上海永恒生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%。甘草药材购于内蒙古亿利能源股份有限公司甘草分公司, 由天津药物研究院张铁军研究员鉴定为乌拉尔甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根。

2 方法

2.1 对照品溶液配制

准确称量甘草酸、甘草苷、甘草素、异甘草苷对照品各 2.00 mg, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加入适量 50% 甲醇溶解, 并以 50% 甲醇定容, 得到质量

浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 对照品贮备液。检测前利用 50% 甲醇溶液将对照品贮备液稀释 10 倍, 待测。

2.2 供试品溶液配制

取甘草粉末 1 g, 加入 50% 甲醇 20 mL 置圆底烧瓶中, 称定质量, 超声提取 30 min, 冷却后称定质量, 并用 50% 甲醇补足减失质量, 摇匀。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液备用。

2.3 色谱-质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil II C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 以 0.05% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0~20 min, 5%~25% B; 20~30 min, 25%~30% B; 30~35 min, 30%~35% B; 35~45 min, 35%~60% B; 45~60 min, 60% B; 60~70 min, 60%~70% B, 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL ; 200~600 nm 全波长扫描。

2.3.2 质谱条件 分流比设为 1:4, 正负离子分别进行全扫描 (ESI), 扫描质量范围 m/z 50~1 200; 干燥气体的体积流量 6 L/min, 干燥气温度 180 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气压 80 kPa。正离子模式下, 毛细管电压 4 500 V, 负离子模式下的毛细管电压 2 600 V, 碎裂电压 70 V 选择甲酸钠溶液为内标校正。甘草提取物的 HPLC-Q-TOF-MS 的总离子流图见图 1。

3 结果与讨论

如图 1 所示, 在甘草 50% 甲醇提取液中通过 HPLC-Q-TOF-MS 检测, 正负离子流数据分析, 共识

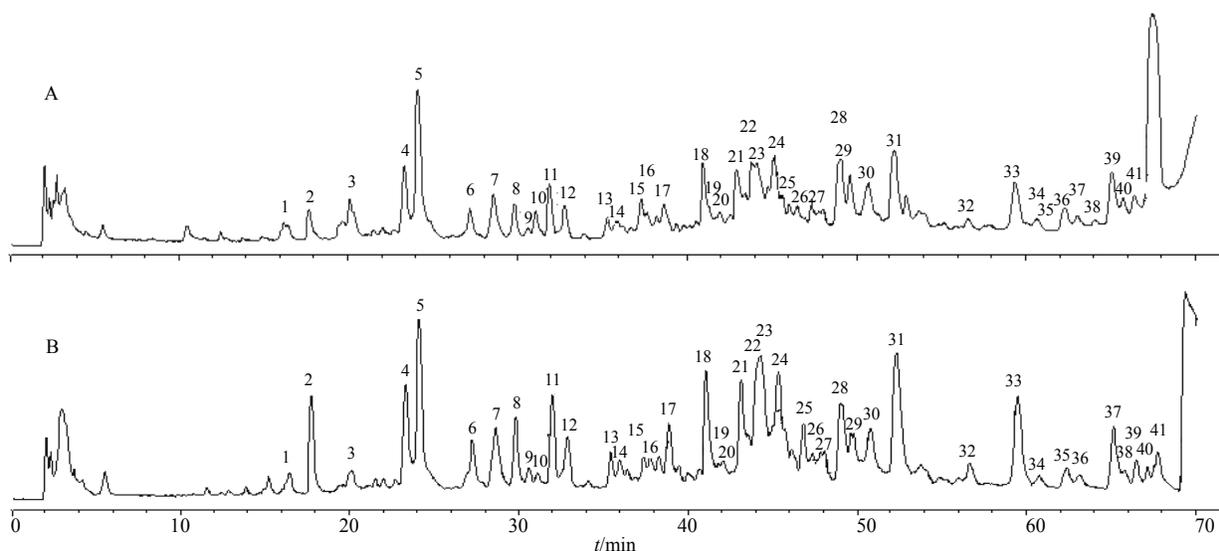


图 1 甘草提取液 HPLC-Q-TOF-MS 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of HPLC-Q-TOF-MS by positive mode (A) and negative mode (B) for extraction of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

别了 41 个色谱峰,通过质谱裂解碎片分析并结合文献报道数据对照,鉴定了 40 种化合物,包括 28 个黄酮类、11 个三萜皂苷类和 1 个香豆素类化合物,结果如表 1 所示。

3.1 黄酮类化合物的分析鉴定

黄酮类成分是甘草药材中的一类主要成分。本实验通过 HPLC-Q-TOF-MS 数据分析,结合文献对比共识别了 28 种黄酮类化合物,其中查耳酮类 5 个、二氢黄酮类 7 个、黄酮及黄酮醇类 6 个、异黄酮类 4 个、黄烷类 6 个。

3.1.1 二氢黄酮类化合物 5 号峰的正离子质谱中可以观察到 441.126 8 [M+Na]⁺, 419.136 7 [M+H]⁺, 403 [M + H - Glucose]⁺, 271 [M + H - Glucose - Arabinose]⁺, 负离子质谱中观察到 417.127 5 [M-H]⁻,

根据元素分析结果综合分析确定分子式为 C₂₁H₂₂O₉。根据其裂解规律可以判断结构中存在 2 个糖取代基。此外苷元部分的裂解规律符合黄酮类化合物的裂解规律(图 2),且与对照品甘草苷的质谱裂解规律^[10](图 3)完全一致,因此将 5 号峰化合物鉴定为甘草苷。而 15 号峰的正负离子模式下分别给出了 257.072 7 [M+H]⁺和 256.070 2 [M-H]⁻,确定分子式为 C₁₅H₁₂O₄。根据其极性,并与对照品甘草素的质谱对照,确定 15 号峰是 5 号峰的苷元结构,鉴定为甘草素。4 号峰的质谱信息正离子中可以观察到 573.163 7 [M+Na]⁺和 549.168 0 [M-H]⁻,分析确定其分子式为 C₂₆H₃₀O₁₃。根据其裂解碎片可以判断其与 5 号峰相比较仅多出了一个丢失蔗糖基 *m/z* 132 的碎片峰,检索文献报道^[11]确定峰 4 化合物为甘草素-4'-蔗糖苷。

表 1 甘草中化学成分解析结果

Table 1 Chemical constituents identified in extracts from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*

峰号	<i>t_R</i> /min	碎片离子 (<i>m/z</i>)	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	相对分子质量	化合物
1	16.4	735.227 4 [M+Na] ⁺ , 603.2 [M+Na-Apiose] ⁺ , 419.1 [M+H-Apiose-Glucose] ⁺ , 419.1 [M+H-Apiose-Glucose×2] ⁺	711.216 1	712	异甘草苷元-7- <i>O</i> -蔗糖-7, 4'- <i>O</i> -二葡萄糖苷
2	17.7	233.041 9 [M+Na] ⁺	209.049 2	210	未知
3	20.1	587.140 8 [M+Na] ⁺ , 565 [M+H] ⁺ , 403 [M+H-Glucose] ⁺ , 271 [M+H-Glucose-Arabinose] ⁺	563.149 9	564	夏佛塔苷
4	23.3	573.163 7 [M+Na] ⁺ , 551 [M+H] ⁺ , 419 [M+H-Apiose] ⁺ , 257 [M+H-Apiose-Glucose] ⁺	549.168 0	550	甘草素-4'-蔗糖苷
5	24.1	441.126 8 [M+Na] ⁺ , 419.136 8 [M+H] ⁺ , 257 [M+H-Glucose] ⁺	417.127 6	418	甘草苷
6	27.2	419.132 2 [M+H] ⁺ , 257 [M+H-Glucose] ⁺	417.129 5	418	异甘草苷
7	28.6	505.121 6 [M+H] ⁺ , 257 [M+H-Glucuronide-acetyl] ⁺	503.127 3	504	5-羟基甘草苷元-6'-乙酰基葡萄糖苷
8	29.8	551.167 7 [M+H] ⁺ , 419 [M+H-Apiose] ⁺ , 257 [M+H-Apiose-Glucose] ⁺	549.153 1	550	甘草苷元-7- <i>O</i> -蔗糖-4'-葡萄糖苷
9	30.6	551.167 7 [M+H] ⁺ , 419 [M+H-Apiose] ⁺ , 257 [M+H-Apiose-Glucose] ⁺	549.153 2	550	蔗糖异甘草苷
10	31.1	431.122 0 [M+H] ⁺ , 269 [M+H-Glucose] ⁺	475.112 3	430	7-甲氧基甘草苷
11	32.0	419.132 4 [M+H] ⁺ , 257 [M+H-Glucose] ⁺	[M+HCOO] ⁻ 417.127 3	418	新甘草苷
12	32.9	419.132 4 [M+H] ⁺ , 257 [M+H-Glucose] ⁺	417.126 1	418	新异甘草苷
13	35.9	825.426 2 [M+H] ⁺ , 649 [M+H-Glucuronide acid] ⁺ , 473 [M+H-Glucuronide acid×2] ⁺ , 455 [487-H ₂ O] ⁺ , 287	823.405 4	824	11-羟基甘草酸
14	37.4	539.032 4 [2M+H] ⁺ , 269 [M+H] ⁺	267.035 3	268	考迈斯托醇
15	37.8	257.072 7 [M+H] ⁺ , 137 [M+H-120] ⁺	255.072 9	256	甘草素
16	38.3	257.072 7 [M+H] ⁺ , 137 [M+H-120] ⁺	255.070 2	256	异甘草素
17	38.9	855.396 4 [M+H] ⁺ , 679 [M+H-Glucuronide acid] ⁺ , 503 [M+H-Glucuronide acid×2] ⁺ , 467 [503-H ₂ O×2] ⁺	853.398 1	854	二羟基甘草次酸

续表 1

峰号	t_R /min	碎片离子 (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	相对分子质量	化合物
18	40.9	839.395 1 $[M+H]^+$, 663 $[M+H-Glucuronide\ acid]^+$, 487 $[M+H-Glucuronide\ acid \times 2]^+$, 469 $[487-H_2O]^+$	837.397 0	838	甘草皂苷 G
19	43.1	839.395 4 $[M+H]^+$, 663 $[M+H-Glucuronide\ acid]^+$, 487 $[M+H-Glucuronide\ acid \times 2]^+$, 469 $[487-H_2O]^+$	837.397 0	838	羟基甘草酸
20	43.5	839.395 4 $[M+H]^+$, 663 $[M+H-Glucuronide\ acid]^+$, 487 $[M+H-Glucuronide\ acid \times 2]^+$, 469 $[487-H_2O]^+$	837.397 0	838	羟基甘草酸
21	43.9	809.436 8 $[M+H]^+$, 633 $[M+H-Glucuronide\ acid]^+$, 457 $[M+H-Glucuronide\ acid \times 2]^+$	807.429 9	808	甘草皂苷 B
22	44.3	823.405 7 $[M+H]^+$, 647 $[M+H-Glucuronide\ acid]^+$, 471 $[M+H-Glucuronide\ acid \times 2]^+$	821.402 1	822	甘草酸
23	45.3	823.399 2 $[M+H]^+$, 647 $[M+H-Glucuronide\ acid]^+$, 471 $[M+H-Glucuronide\ acid \times 2]^+$	821.398 4	822	乌拉尔甘草皂苷 B
24	45.7	823.399 2 $[M+H]^+$, 647 $[M+H-Glucuronide\ acid]^+$, 471 $[M+H-Glucuronide\ acid \times 2]^+$	821.409 7	822	甘草皂苷 H2
25	46.1	823.399 2 $[M+H]^+$, 647 $[M+H-Glucuronide\ acid]^+$, 471 $[M+H-Glucuronide\ acid \times 2]^+$	821.406 4	822	甘草皂苷 K2
26	46.7	825.426 9 $[M+H]^+$, 649 $[M+H-Glucuronide\ acid]^+$, 473 $[M+H-Glucuronide\ acid \times 2]^+$, 455 $[487-H_2O]^+$, 289	823.405 9	824	甘草皂苷 J2
27	47.3	393.108 8 $[M+Na]^+$	369.106 2	370	乌拉尔醇
28	49.0	369.125 4 $[M+H]^+$, 285.1, 193.0	367.126 5	368	甘草宁 N
29	49.6	357.125 8 $[M+H]^+$	355.118 5	356	乌拉尔宁
30	50.8	355.118 8 $[M+H]^+$, 299.1	353.110 8	354	甘草黄酮醇
31	52.3	355.121 0 $[M+H]^+$, 299.1, 205.1	353.107 6	354	异甘草黄酮醇
32	56.6	355.123 7 $[M+H]^+$, 299.1, 205.1	351.093 9	354	甘草宁 L
33	59.4	353.104 9 $[M+H]^+$, 297.1	351.120 5	352	甘草宁 M
34	60.7	375.131 5 $[M+Na]^+$, 353.1 $[M+H]^+$, 337.1, 329.3	351.130 2	352	甘草宁 G
35	62.4	393.172 6 $[M+Na]^+$, 371.3 $[M+H]^+$, 303.1, 218.1	369.175 6	370	kanzonol R
36	63.0	359.137 0 $[M+Na]^+$, 337 $[M+H]^+$, 313.1, 221.1, 205.1, 129.1	335.131 8	336	5-甲氧基光甘草酮
37	65.1	425.225 5 $[M+H]^+$, 221.1	423.221 5	424	kanzonol H 及其异构体
38	66.4	431.229 1 $[M+Na]^+$, 409.2 $[M+H]^+$, 353.1, 329.3	407.233 9	408	dehydroxy kanzonol H 及其异构体
39	67.1	425.225 7 $[M+H]^+$, 221.1	423.221 6	424	kanzonol H 及其异构体
40	67.5	423.208 3 $[M+H]^+$, 221.1	421.207 9	422	kanzonol J 及其异构体
41	67.7	423.208 3 $[M+H]^+$, 221.1	421.207 9	422	kanzonol J 及其异构体

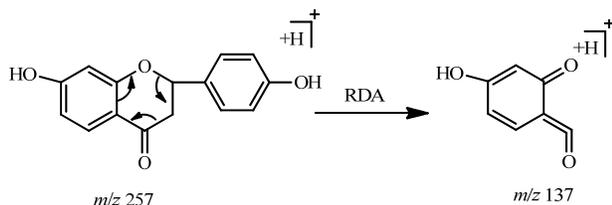


图 2 5 号峰的苷元部分裂解过程推断

Fig. 2 Partial fragmentation process of aglycon on peak 5

7 号峰的质谱给出了正离子 $505.135\ 3\ [M+H]^+$, $257\ [M+H-Glucuronide-acetyl]^+$, 负离子 $503.127\ 3\ [M-H]^-$, 根据元素分析结果综合分析确定分子式为 $C_{24}H_{24}O_{12}$ 。参考文献报道^[10]确定 7 号峰苷元与甘草苷的苷元相同, 仅是连接的糖为糖醛酸, 且 2 位被乙酰化, 在质谱裂解碎片中能够观察到脱去乙酰基的碎片峰。因此确定 7 号峰的结构可能为 5-羟基甘草

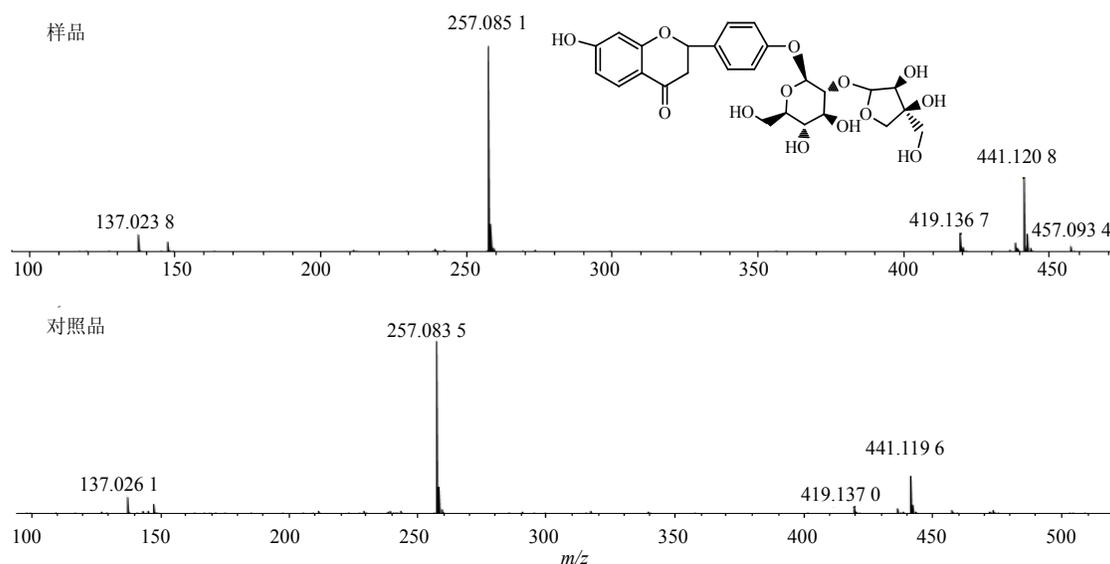


图 3 5 号峰和对照品的质谱比对分析

Fig. 3 MS analysis of Peak 5 and comparison with reference substances

昔元-6'-乙酰基葡萄糖苷。

8 号峰的质谱给出了正离子 551.167 7 $[M+H]^+$ ，负离子 549.153 1 $[M-H]^-$ ，综合分析确定分子式为 $C_{26}H_{30}O_{13}$ 。质谱裂解规律中还可以观察到 419 $[M+H-Apiose]^+$ ，257 $[M+H-Apiose-Glucose]^+$ ，这些信息与 5 号峰非常相近，但是极性降低很多，说明其极性基团减少，2 个羟基均被糖苷化，是一个双糖连的结构。结合文献报道^[8]确定 8 号峰化合物为芹糖甘草苷。

11 号峰的质谱裂解规律和分子信息与峰 5 非常接近，相对分子质量和分子式相同，说明其与 5 号峰互为同分异构体结构。但二者极性相差较大，11 号峰出峰时间晚，结合文献提供的化合物信息，将 11 号峰化合物确定为新甘草苷^[8]。

29 号峰的正离子质谱给出了 m/z 357.167 5 $[M+H]^+$ ，负离子质谱中观察到 m/z 355.153 2 $[M-H]^-$ ，根据元素分析结果综合分析确定分子式为 $C_{20}H_{20}O_6$ 。结构中有 RDA 裂解的碎片 m/z 153，说明 A 环中比 5 号峰多出 1 个羟基；在其质谱的裂解碎片中有丢失 m/z 56 的碎片峰 m/z 301，说明 B 环中存在异戊烯基结构，检索文献报道^[12-13]对比化合物信息确定 29 号峰化合物为乌拉尔宁。

3.1.2 查耳酮类化合物 6 号峰的正负离子质谱结合元素分析确定分子式为 $C_{21}H_{22}O_9$ 。其相对分子质量和分子式与 5 号峰完全一致，裂解的碎片与峰 5 也非常接近，但是出峰时间晚，极性低于峰 5，裂

解峰的比例有差别，说明二者互为同分异构体。6 号峰的质谱数据与对照品异甘草苷的质谱数据完全一致，因此判断 6 号峰为异甘草苷。16 号峰的正负离子质谱数据结合元素分析确定分子式为 $C_{15}H_{12}O_4$ 。其与 6 号峰相比较丢失了 1 分子的葡萄糖基，检索文献报道^[8]确定 16 号峰化合物为异甘草素。

9 号峰与 6 号峰相比较多 1 个芹糖基碎片，鉴于在二氢黄酮的分析鉴别中存在甘草苷和芹糖基甘草苷的一组化合物，结合文献分析确定 9 号峰化合物是异甘草苷的芹糖基化产物，确定为异甘草苷-4'-芹糖基。如表 1 所示，12 号峰的质谱裂解碎片信息与 6 号峰非常接近，但是极性降低较多，借鉴二氢黄酮的鉴定过程，确定峰 12 化合物为新异甘草苷。

峰 1 的极性最大，其正离子质谱中可以观察到 735.2 $[M+Na]^+$ ，负离子质谱中观察到 711.2 $[M-H]^-$ ，根据元素分析结果综合分析确定其相对分子质量为 712，分子式为 $C_{32}H_{40}O_{18}$ 。而且在质谱的裂解过程中可以确定结构中存在两分子葡萄糖和 1 分子芹糖碎片。检索文献报道^[14]结合化合物极性分析，确定峰 1 化合物为异甘草昔元-7-O-芹糖-7, 4'-O-二葡萄糖苷。

3.1.3 黄酮和黄酮醇类化合物 3 号峰的正离子质谱中可以观察到 587.135 7 $[M+Na]^+$ ，565.160 8 $[M+H]^+$ ，403 $[M+H+Glucose]^+$ ，271 $[M+H-Glucose-Arabinose]^+$ ，负离子质谱中观察到 563.149 9 $[M-H]^-$ ，根据元素分析结果综合分析确定分子式为 $C_{26}H_{28}O_{14}$ ，该化合物的裂解过程说明其为二糖苷类

化合物, 结合化合物的极性并与文献报道^[13]的化合物及其裂解规律相对将其鉴定为夏佛塔昔。

10 号峰的质谱信息给出了 431.122 0 $[M+H]^+$ 和 475.112 3 $[M+HCOO]^-$, 通过元素分析给出了分子式为 $C_{22}H_{22}O_9$, 与 5 号峰相比较, 其极性弱于 5 号峰, 且结构中多出一个甲氧基结构, 由于 4' 位连有糖苷键, 因此推测甲氧基连接为 7 位, 故将 10 号峰化合物确定为 7-甲氧基甘草苷。

30 号峰的正离子质谱中可以观察到 355.108 8 $[M+H]^+$, 负离子质谱中观察到 353.108 6 $[M-H]^-$, 确定分子式为 $C_{20}H_{18}O_6$ 。在质谱信息中可以观察到脱去 m/z 68 的碎片峰和发生 RDA 裂解的 m/z 221 的碎片峰, 根据连有异戊烯基黄酮类化合物的质谱裂解规律^[13]可以确定异戊烯基连接在 A 环, 结合文献信息^[15]分析, 确定 30 号峰化合物为甘草黄酮醇。

27 号峰的质谱信息与 29 号峰相比较极性较大, 通过对其正负离子中 393.108 8 $[M+Na]^+$ 和 369.106 2 $[M-H]^-$ 的分析确定分子式为 $C_{20}H_{18}O_7$, 根据其质谱裂解过程确认其与 29 号峰比较丢失了 2 个氢原子, 但是多出了 1 个羟基取代, 结合文献报道^[12]确定峰 27 为黄酮醇类化合物, 结构鉴定为乌拉尔醇。

36 号峰极性非常小, 通过分析其质谱信息确定分子式为 $C_{21}H_{20}O_4$, 在质谱信息中可以观察到发生 RDA 裂解的 m/z 221 的碎片峰, 对比甘草中报道的化合物^[16]确定其为异戊烯基与羟基发生环合使极性减小, 为 5-甲氧基光甘草酮。

3.1.4 异黄酮类成分 31 号峰、32 号峰通过正负离子信息以及元素分析后确定其分子式为 $C_{20}H_{18}O_6$, 与 30 号峰互为同分异构体, 3 组峰的质谱主要裂解信息都是相近的, 但 31 和 32 号峰出现了异黄酮的特征碎片峰 m/z 205, 因此和文献对比确定 31 峰为异甘草黄酮醇, 32 号峰为甘草宁 L^[17]。按照相同的解析方法确定了 33 号峰的分子式为 $C_{21}H_{20}O_5$, 质谱的裂解碎片中有丢失 m/z 56 的碎片峰 m/z 297, 说明结构中存在异戊烯基结构, 结合文献报道确定 33 号峰为甘草宁 M^[17]。34 号峰是 33 号峰的同分异构体, 也是异黄酮类结构, 与文献对照鉴定为甘草宁 G^[18]。28 号峰通过元素分析确定其分子式为 $C_{21}H_{20}O_6$, 其质谱裂解信息与 33 号峰非常接近, 但是极性大于峰 33, 发现该化合物结构中多出一个羟基, 结合文献确定其为甘草宁 N^[16]。

3.1.5 黄烷类成分 黄烷类成分是甘草液质分析中极性相对较小的一类成分。35 号峰的正离子质谱中

给出了 393.172 6 $[M+Na]^+$, 负离子质谱中给出了 369.175 6 $[M-H]^-$, 元素分析确定分子式为 $C_{22}H_{26}O_5$ 。在其正离子的质谱裂解中可以观察到 218, 163 的碎片峰, 且 218 的碎片峰信号较强。通过文献检索在甘草中还存在 Kanozol 系列的黄烷类化合物^[19-20]。根据相对分子质量和化合物的极性确定 35 号峰化合物为 kanozol R, 如图 4 所示, 218 的碎片峰是 C 环发生 RDA 裂解产生的碎片峰。

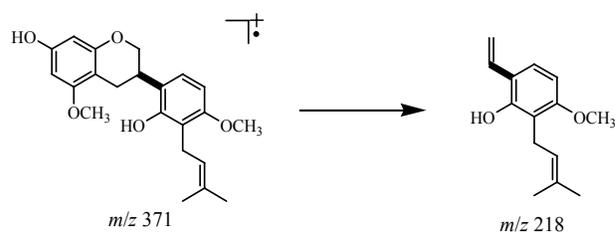


图 4 Kanozol R (35 号峰) 的主要裂解过程

Fig. 4 Main fragmentation process of Kanozol R (Peak 35)

根据同样的方法, 37 号峰和 39 号峰的相对分子质量相同, 分子式为 $C_{26}H_{32}O_5$, 该化合物与 35 号峰相比多出了一个异戊烯基且与羟基发生环合反应, 质谱裂解中主要出现的峰为 m/z 221 的碎片峰也是其 C 环发生 RDA 裂解的产物, 与文献报道的化合物 Kanozol H 的性质相近。因此将 37 号峰和 39 号峰鉴定为 Kanozol H 及其同分异构体。38 号峰与 37 号峰相比较为脱去了一分子羟基的结构, 故将 38 号峰鉴定为 Dehydroxy Kanozol H 及其异构体。而 40 号和 41 号峰极性更小, 分子式为 $C_{26}H_{30}O_5$, 其在 Kanozol H 的结构基础上, 另一侧的异戊烯基也与羟基发生环合反应, 因此确定结构为 Kanozol J 及其同分异构体。

3.2 三萜皂苷类化合物的分析鉴定

三萜皂苷类成分是甘草药材中的另一类重要成分。本文利用 HPLC-Q-TOF-MS 在指纹图谱体系下共识别了 11 个三萜皂苷类化合物, 均为甘草酸类衍生物。

以 22 号峰为例阐述三萜皂苷类成分的裂解规律和结构鉴定的解析过程。该化合物的正离子质谱中可以观察到 m/z 823.405 7 $[M+H]^+$, 负离子质谱中给出了 m/z 823.402 1 $[M-H]^-$, 综合分析确定了其分子式为 $C_{42}H_{62}O_{16}$ 。在正离子质谱的碎片峰中可以 m/z 647 $[M+H-Glucuronide\ acid]^+$ 和 471 $[M+H-Glucuronide\ acid \times 2]^+$, 确定结构中连接 2 个葡萄糖醛酸的结构。470 应该为苷元的相对分子质量。之后又观察到 m/z 304、262、206 和 175 的碎片峰。分析结构可能是由于发生了麦氏重排和 RDA 裂解产生的碎片。详细裂解过程如图 5 所示。苷元的结

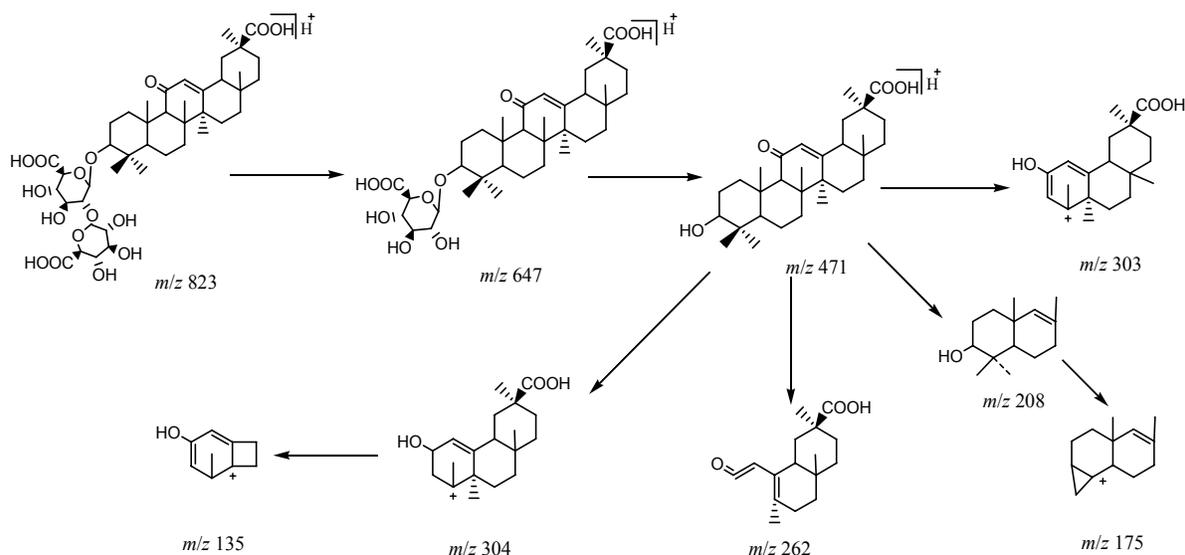


图 5 甘草酸 (22 号峰) 的裂解过程

Fig. 5 Fragmentation process of glycyrrhizic acid (Peak 22)

构中由于 C-11 位羰基的存在, C-1 上又具有可转移的 γ H 原子, 容易发生麦氏重排, 并伴随烯丙键 (C₇-C₈ 之间) 均裂, 生成 m/z 303 碎片离子; 麦氏重排伴随 C-1 上 1 个 H 原子转移也引起烯丙键 (C₇-C₈ 之间) 均裂, 生成的 m/z 304 离子也具有相当的丰度, 继续丢失 CH₃ 及中性分子 C₉H₁₄O₂ 生成 m/z 135 (有时为基峰)。由于具有以上特征的裂解碎片峰, 并和标准品甘草酸的质谱裂解信息^[21]对比, 将 22 号峰化合物鉴定为甘草酸。

18、19、20 号峰的分子离子峰均比 23 号峰多出 m/z 16, 且在质谱裂解中脱糖的碎片峰是相同的, 都具有脱去 2 分子糖醛酸的碎片峰, 仅比苷元碎片多出 1 个脱掉 1 分子水 (m/z 18) 的碎片峰。因此可以确定苷元在甘草酸苷元的基础上进行了羟基化。因此离子流中 18、19、20 号峰均为甘草酸的 1 个羟基化的产物。同理, 17 号峰在 1 个羟基化产物的基础上又多出了 1 个 m/z 16, 且糖链裂解碎片也是一致的, 仅苷元部分又多出了 1 个脱掉 1 分子水的碎片峰, 因此确定 17 号峰为甘草酸 2 个羟基化的产物。

21 号峰的正离子质谱中观察到 m/z 809.436 8 [M+H]⁺, 633 [M+H-Glucuronide acid]⁺, 457 [M+H-Glucuronide acid×2]⁺, 而负离子质谱中可以观察到 m/z 807.429 9 的负离子质谱, 从而确定该化合物的相对分子质量为 808.424 5, 且元素分析确定其分子式为 C₄₂H₆₄O₁₅。通过质谱分析确定该化合物与峰 22 相比较, 苷元部分缺少一个氧原子, 且 RDA 裂解只获得了 289 碎片峰, 说明三萜皂苷的 C 环结构

发生了变化, 通过文献报道比较^[20], 确定该化合物为的羰基被还原, 鉴定为甘草皂苷 B。

13 号峰的极性在甘草皂苷中相对较大, 其正离子中可以观察到 m/z 825.424 4 [M+H]⁺, 649 [M+H-Glucuronide acid]⁺, 473 [M+H-Glucuronide acid×2]⁺, 而负离子质谱中可以观察到 m/z 823.423 6 [M-H]⁻, 从而确定该化合物的相对分子质量为 824.419 4, 且元素分析确定其分子式为 C₄₂H₆₄O₁₆。通过质谱分析确定其苷元部分的结构发生变化, 出现了苷元 m/z 473 的脱水峰 m/z 455, 同时也出现了碎片峰 m/z 287, 这是 C 环发生变化后得到的, 而且与甘草酸的裂解规律相比较, m/z 304 的碎片峰改变为 m/z 287 说明开始的脱水反应发生在 C 环, 说明 C 环不存在羰基, 羰基结构被还原, 这样结合文献的化合物信息^[12], 确定峰 13 为 11 位被还原的甘草酸的结构, 鉴定为 11-羟基甘草酸。26 号峰的阴正离子质谱数据分析结果发现其与 13 号峰的元素组成完全相同, 但是极性相差较大。且在质谱的裂解碎片中, 26 号峰的质谱裂解中存在 289 的碎片峰, 说明其化合物的 C 环与峰 21 的 C 环相近, 不存在羰基结构, 并根据分析已经获得的甘草皂苷成分, 结合文献数据对比, 确定 26 号峰是在 24 位进行了羟基化, 鉴定结构为甘草皂苷 J2。

23、24 和 25 号峰的正负离子对比分析, 确定其相对分子质量和元素分析与峰 22 完全相同, 均为 C₄₂H₆₂O₁₆。但其极性比甘草酸略大一些。结合文献报道的化合物^[12,21]的极性和液相色谱中出峰的先后

顺序推测 23 号峰为乌拉尔甘草皂苷 B, 24 号峰化合物为甘草皂苷 H2, 25 号峰化合物为甘草皂苷 K2。

3.3 香豆素类化合物的鉴定

15 号峰的质谱中给出正离子 539.121 0 [2M+H]⁺, 269.082 4 [M+H]⁺, 负离子 267.070 7 [M-H]⁻,

根据元素分析确定了分子式为 C₁₅H₈O₅。该化合物主要裂解峰为 *m/z* 146.9, 是香豆素类化合物的主要裂解峰^[22]。参考甘草中分离化合物的文献报道^[12], 结合化合物的出峰时间和裂解规律(图 6), 确定该化合物为甘草素。

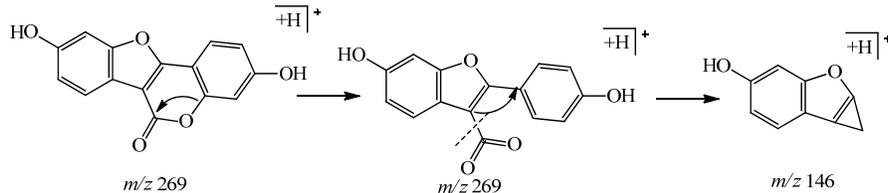


图 6 甘草素 (15 号峰) 的裂解过程

Fig. 6 Fragmentation process of coumestrol (Peak 15)

4 讨论

本研究利用液质联用技术, 对甘草的化学成分进行了分析鉴定, 分析了 44 个色谱峰, 鉴定了 40 个色谱峰对应的化合物, 其中包括 28 个黄酮类成分、11 个三萜皂苷类成分和 1 个香豆素类化合物。本研究首次在 1 个液质条件下识别出了 40 个色谱峰对应的化合物, 为甘草的全面质量控制和其在复方中的配伍规律的研究奠定基础, 并为甘草参与组方其他复方制剂的物质基础研究和成分分析鉴定提供了参考。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 胡金锋, 沈凤嘉. 甘草植物化学成分研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 1996, 8(3): 77-91.
- [3] 刘勤, 刘永隆. 黄甘草化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1989, 24(7): 525-531.
- [4] Hatano T, Takagi M, Ito H, *et al.* Acylated flavonoid glycosides and accompanying phenolics from licorice [J]. *Phytochemistry*, 1998, 47(2): 287-293.
- [5] 王彩兰, 张如意, 韩永生, 等. 乌拉尔甘草中新香豆素的化学研究 [J]. 药学学报, 1991, 26(2): 147-151.
- [6] 段天玻, 马长华, 王文全, 等. HPLC-MS 法鉴定甘草的指纹图谱 [J]. 中国药师, 2009, 12(4): 414-417.
- [7] 张娟, 刘芬, 李宁, 等. UPLC-TOF-MS 法鉴定胀果甘草药渣中黄酮类成分 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(6): 558-561.
- [8] 张永, 严安定, 高建. 液质联用技术鉴定甘草提取物中的主要化学成分 [J]. 中成药, 2012, 34(6): 1111-1116.
- [9] 陈佩东, 周习, 丁安伟. 炙甘草水煎液的 HPLC-MS 分析 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 2115-2120.
- [10] 徐英, 董静, 王弘, 等. 电喷雾-离子阱-飞行时间质谱联用研究黄酮和异黄酮苷元 C 环的裂解规律 [J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(1): 46-50.
- [11] Zhang Q Y, Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-cao (licorice) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1954-1969.
- [12] 刘晓帆. 液质联用技术应用于小柴胡汤药效物质基础研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [13] 霍文杰, 高英, 李卫民, 等. 甘草中异戊烯基类黄酮的富集及高效液相色谱-质谱联用分析 [J]. 北方药学, 2013, 10(11): 1-2.
- [14] Yahara S, Nishioka I. Flavonoid glucosides from licorice [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(23): 2108-2109.
- [15] Fukai T, Marumo A, Kaitou K, *et al.* Anti-Helicobacter pylori flavonoids from licorice extract [J]. *Life Sci*, 2002, 71(12): 1449-1463.
- [16] Minpei K, Yoshihiro M, Shinichi H, *et al.* Phenolics from *Glycyrrhiza glabra* roots and their PPAR- α ligand-binding activity [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(2): 962-970.
- [17] Fukai T, Wang Q H, Takayama M, *et al.* Structures of five new prenylated flavonoids, Gancaonin L, M, N, O, and P from aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* [J]. *Heterocycles*, 1990, 30(2): 373-382.
- [18] Nomura T, Fukai T, Wang Q H, *et al.* Structures of six isoprenoid-substituted flavonoids, Gancaonins F, G, R, I, Glycyrol, and isoglycyrol from Xibei Licorice [J]. *Heterocycles*, 1989, 29(2): 1761-1772.
- [19] Shakhnoza S A, Valentina I V. *Natural compounds-flavonoids*. [M]. New York: Springer, 2013.
- [20] Nomura T, Fukai T. Phenolic constituents of Licorice (*Glycyrrhiza* species) [J]. *Chem Inform*, 1998, 29(13): 1-158.
- [21] 刘运爱, 王彩兰, 黄卫东, 等. 甘草次酸及衍生物的质谱研究 [J]. 质谱学报, 1996, 17(1): 27-35.
- [22] 李坤平, 高崇凯, 李卫民. UPLC/ESI-TOF-MS/MS 分析蛇床子提取物中香豆素类化合物 [J]. 中成药, 2009, 31(4): 584-587.