

## 基于 UPLC-ESI-IT-TOF/MS 方法的芪苓温肾消囊方化学成分分析

张晓川<sup>1,2,3</sup>, 王 玉<sup>2,3,4</sup>, 张依倩<sup>1,2,3</sup>, 霍志鹏<sup>2,3</sup>, 何 毅<sup>2,3\*</sup>, 李 萍<sup>1\*</sup>

1. 中国药科大学 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009

2. 天士力控股集团有限公司研究院 现代中药开发中心, 天津 300410

3. 天士力制药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410

4. 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072

**摘要:** 目的 通过建立 UPLC-ESI-IT-TOF/MS 分析方法对芪苓温肾消囊方提取物化学成分进行分析, 结合文献报道, 初步推测可能的起效成分。方法 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 以乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相梯度洗脱; 体积流量为 0.4 mL/min; ESI 源正负离子模式检测。结果 通过对照品比对、质谱数据以及参考文献, 共指认出来源于黄芪、淫羊藿、苍术、丹参 4 味药材共 36 个化学成分, 其中包括 19 个黄酮类成分、11 个酚酸类成分、4 个三萜皂苷类成分、1 个倍半萜苷类及 1 个生物碱类成分。结论 对芪苓温肾消囊方提取物的化学成分进行了较为全面的分析, 初步阐明了芪苓温肾消囊方的药效物质基础, 对于复方中药化学成分物质基础研究及质量控制具有重要意义。

**关键词:** 芪苓温肾消囊方; 黄芪; 淫羊藿; 苍术; 丹参; UPLC-ESI-IT-TOF/MS; 黄酮; 酚酸

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)07-1094-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.07.006

## Identification of chemical constituents in Qiling Wenshen Xiaonang Formula by UPLC-ESI-IT-TOF/MS

ZHANG Xiao-chuan<sup>1,2,3</sup>, WANG Yu<sup>2,3,4</sup>, ZHANG Yi-qian<sup>1,2,3</sup>, HUO Zhi-peng<sup>2,3</sup>, HE Yi<sup>2,3</sup>, LI Ping<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. TCM Research Center, Tasly Academy, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine, Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300410, China

4. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

**Abstract: Objective** To establish a method for the content identification of chemical constituents in Qiling Wenshen Xiaonang Formula by using UPLC-ESI-IT-TOF/MS, which can infer the potential active ingredients in the formula, combining with literature.

**Methods** The chromatography separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with acetonitrile-0.1% formic acid in water by gradient elution. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in both positive and negative ion mode. **Results** A total of 36 chemical constituents were identified by ESI/MS through comparison on chemical standards and literature data, including 19 flavonoids, 11 phenolic acids, four triterpenoid saponins, one sesquiterpene glycoside, and one alkaloid. **Conclusion** This study introduces a comprehensive analysis method for chemical ingredients in Qiling Wenshen Xiaonang Formula, and lays a foundation for the further analysis on the substance basis research. The results provide a significant guidance for the substance basis research and quality control of compound Chinese materia medica.

**Key words:** Qiling Wenshen Xiaonang Formula; *Astragali Radix*; *Epimedii Herba*; *Atractylodis Rhizoma*; *Salviae Miltiorrhizae Radix*; UPLC-ESI-IT-TOF/MS; flavonoids; phenolic acids

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是青春期及育龄期女性常见的妇科疾病,

在育龄期妇女中的发病率是 6%~10%<sup>[1]</sup>。中医学认为 PCOS 的病机为“天癸失序、痰壅胞宫”, 与脾

收稿日期: 2015-12-04

基金项目: 国家科技重大专项课题——面向国际的创新中药大平台建设 (2013ZX09402202)

作者简介: 张晓川 (1990—), 男, 硕士在读, 研究方向为中药新药开发。E-mail: zhangxiaochuan@tasly.com

\*通信作者 李 萍, 女, 教授。E-mail: liping2004@126.com

何 毅, 女, 博士。E-mail: heyi@tasly.com

肾功能失调有关。现代医学研究发现 PCOS 是由于下丘脑-垂体-卵巢轴调节功能异常,从而导致内分泌紊乱,出现以高雄激素血症、胰岛素抵抗及排卵障碍为主要特征,临床表现为闭经、不孕、肥胖、多毛的四联症<sup>[2-3]</sup>。

芪苓温肾消囊方(原名补肾化痰方)是治疗 PCOS 的多年临床经验方,由黄芪 *Astragali Radix*、淫羊藿 *Epimedii Herba*、苍术 *Atractylodis Rhizoma*、茯苓 *Poria*、丹参 *Salviae Miltiorrhizae Radix* 5 味药材组成,具有补肾化痰、健脾祛湿、调经止痛等功效,临床随症加减使用,疗效显著。尹倩等<sup>[4]</sup>利用补肾化痰方对患者进行治疗,比较内分泌指标,结果显示,治疗组疗效显著,可明显改善高雄激素血症,促进排卵。常惠等<sup>[1]</sup>利用补肾化痰方对孕期高雄激素血症大鼠进行治疗,发现其能降低雄激素水平,逆转卵巢的多囊改变,改善排卵功能。梁晨等<sup>[5]</sup>通过实验发现补肾化痰方能改善胰岛素抵抗及糖脂代谢功能,可能与胰岛素信号传导分子蛋白表达的调控有关。目前针对芪苓温肾消囊方的物质基础研究鲜有报道。本研究采用 UPLC-ESI-IT-TOF/MS 分析方法对其化学成分进行全面的研究,并对部分特征成分来源进行了指认,为其物质基础及质量标准研究提供指导。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

超高效液相-离子阱-飞行时间串联质谱仪(日本岛津公司,包括自动进样器、二元梯度泵、柱温箱、在线脱气机、PDA 检测器、LC-solution3.6 色谱工作站);电子天平(XS205,瑞士 METTLER TOLEDO 公司),Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司),超声波清洗器(KQ-500DV,昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

对照品:绿原酸(批号 110753-200413)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 111920-201505)、金丝桃苷(批号 111521-201205)、迷迭香酸(批号 111871-201203)、淫羊藿苷(批号 110737-200415)、芒柄花素(批号 111703-200602)、黄芪甲苷(批号 110781-201314)均购自中国食品药品检定研究院;毛蕊异黄酮(批号 201304)、紫草酸(批号 201309)、芒柄花苷(批号 201306)、丹酚酸 A(批号 201307)、宝藿苷 I(批号 201102)、箭藿苷 B(批号 AW412S)、苍术苷 A(批号 AW413A)、朝藿定 A(批号

AM774E)、朝藿定 B(批号 AM775E)、朝藿定 C(批号 AM776E)购自天津一方科技有限公司;所有对照品质量分数均 $\geq 98.0\%$ 。芪苓温肾消囊方提取物(批号 20150701,天士力研究院现代中药开发中心提供)。黄芪[批号 20140425-01,豆科(Leguminosae)植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根]、淫羊藿[批号 20150324,小檗科(Berberidaceae)植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim. 的干燥叶]、苍术[批号 20140430-01,菊科(Compositae)植物茅苍术 *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC. 的干燥根茎]、茯苓[批号 20141250,多孔菌科(Polyporaceae)真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核]、丹参[批号 20141201,唇形科(Labiatae)植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎]均由天士力现代中药资源有限公司提供,药材均经过中国药科大学李萍教授鉴定。

甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司),甲酸(色谱纯,上海润捷公司)。

## 2 方法

### 2.1 对照品溶液的制备

称取适量的绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、金丝桃苷、迷迭香酸、紫草酸、芒柄花苷、丹酚酸 A、淫羊藿苷、芒柄花素、黄芪甲苷、宝藿苷 I、箭藿苷 B、苍术苷 A、朝藿定 A、朝藿定 B、朝藿定 C 对照品于同一量瓶中,加入适量甲醇超声溶解,冷却至室温,定容至刻度,即得混合对照品溶液。

### 2.2 提取物供试品溶液的制备

精密称取芪苓温肾消囊方提取物 0.5 g,置于具塞锥形瓶内,精密加入 40%甲醇 10 mL,称定质量,超声(功率 100 W,频率 40 kHz) 40 min,冷却至室温,补足减失质量,摇匀,离心,取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,即得。

### 2.3 单味药材供试品溶液制备

称取芪苓温肾消囊方中各单味药材,加水适量回流提取 2 次,每次 0.5 h,按照原处方工艺对各药材进行单独提取,根据处方中药材的配比及出膏率,称取适量各药材浸膏干粉,按“2.2”项方法制备,得各药材的供试品溶液。

### 2.4 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  (100 mm $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱。流动相:0.1%甲酸水

溶液 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱条件为 0~2 min, 2% B; 2~10 min, 2%~16% B; 10~12 min, 16% B; 12~13 min, 16%~18% B; 13~35 min, 18%~40% B; 35~38 min, 40%~60% B; 38~40 min, 60%~99% B; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 2  $\mu$ L。

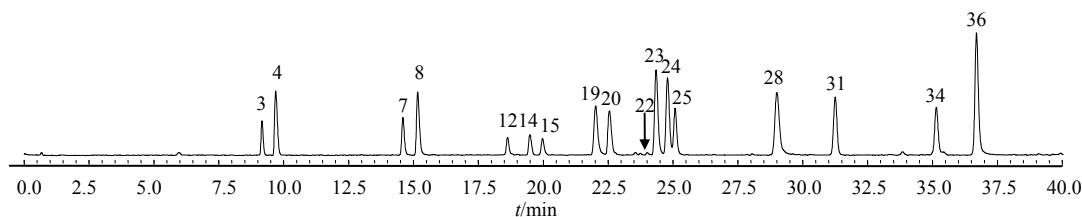
## 2.5 质谱条件

采用电喷雾电离离子源 (ESI), 正负离子分别检测, 扫描范围  $m/z$  100~1 200, 以三氟醋酸钠作校正液, 雾化气为高纯氮气, 碰撞气为氩气, 离子源温度 250 °C, 毛细管电压负离子模式 3.5 kV, 正

离子模式 4.5 kV, 雾化气体积流量 1.5 L/min。

## 3 UPLC-ESI-IT-TOF/MS 分析结果

采用 UPLC-ESI-IT-TOF/MS 技术对芪苓温肾消囊方提取物样品溶液及各个药材溶液进行分析, 混合对照品溶液负离子模式下总离子流图见图 1, 芪苓温肾消囊方的正负离子模式下总离子流图见图 2。对方中 5 味药材进行了归属研究, 色谱图见图 3。根据化合物精确相对分子质量、碎片信息、对照品及参考相关文献, 共指认 36 个化合物, 具体结果见表 1 和 2。指认的化合物来源于黄芪、淫羊藿、苍术、丹参 4 味药材, 包括 19 个黄酮类成分、11



3-苍术苷 A 4-绿原酸 7-毛蕊异黄酮葡萄糖苷 8-金丝桃苷 12-迷迭香酸 14-紫草酸 15-芒柄花苷 19-毛蕊异黄酮 20-丹酚酸 A 22-朝藿定 A 23-朝藿定 B 24-朝藿定 C 25-淫羊藿苷 28-芒柄花素 31-黄芪甲苷 34-箭藿苷 B 36-宝藿苷 I  
3-atractylside A 4-chlorogenic acid 7-calycosin 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside 8-hyperoside 12-rosmarinic acid 14-lithospermic acid 15-ononin 19-calycosin 20-salvianolic acid A 22-epimedin A 23-epimedin B 24-epimedin C 25-icariin 28-formononetin 31-astragaloside IV 34-sagittatoside B 36-baohuoside I

图 1 混合对照品溶液负离子模式下总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of mixed reference substances in negative ion mode

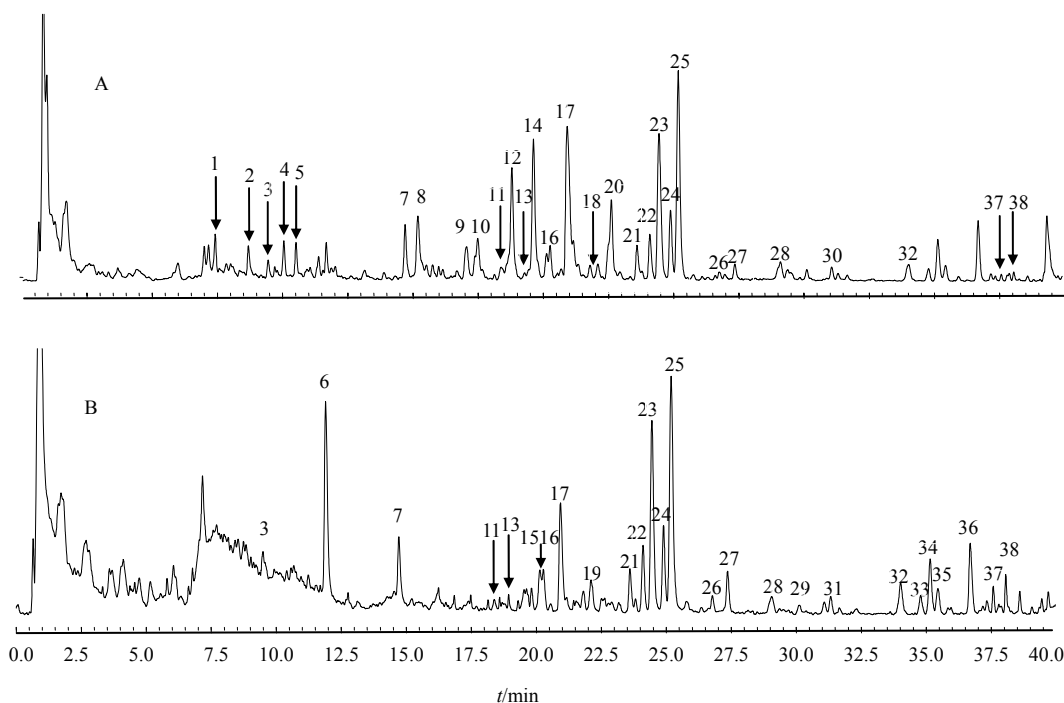
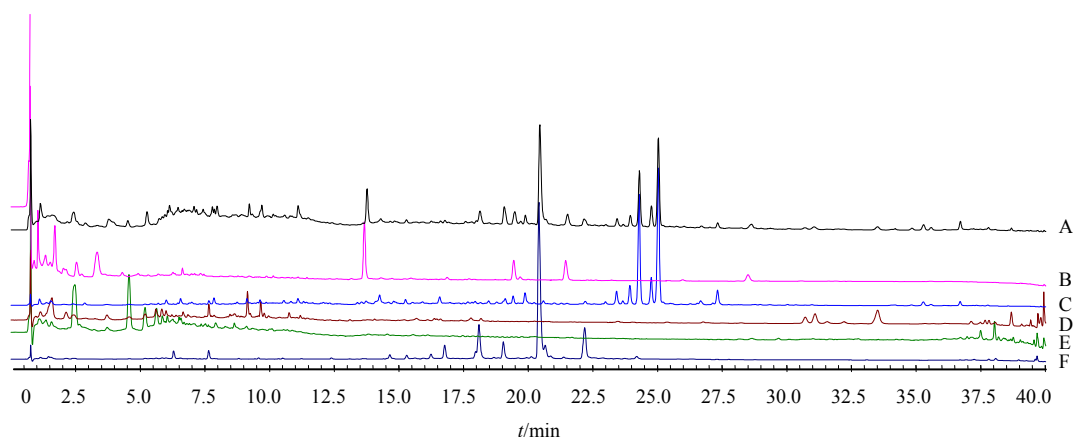


图 2 芪苓温肾消囊方提取物 UPLC-ESI-IT-TOF/MS 的负 (A) 和正 (B) 离子流图

Fig. 2 Total ion chromatogram of extract from Qiling Wenshen Xiaonang Formula in negative (A) and positive (B) ion mode by UPLC-ESI-IT-TOF/MS



A-芪苓温肾消囊方提取物 B-黄芪提取物 C-淫羊藿提取物 D-苍术提取物 E-茯苓提取物 F-丹参提取物

A-extract of QLWSXN B-extract of *Astragali Radix* C-extract of *Epimedii Folium* D-extract of *Atractylodis Rhizoma* E-extract of *Poria* F-extract of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*

图 3 芪苓温肾消囊方提取物及各个药材 UPLC 色谱图 (254 nm)

Fig. 3 UPLC of extract from Qiling Wenshen Xiaonang Formula and each medicinal materials (254 nm)

表 1 芪苓温肾消囊方提取物的 UPLC-ESI-IT-TOF/MS 负离子模式下的数据及化合物归属

Table 1 Data and compounds attribution of extract from Qiling Wenshen Xiaonang Formula by UPLC-ESI-IT-TOF/MS

峰号	$t_R$ /min	分子式	质荷比 ( $m/z$ )			化合物	碎片离子 ( $m/z$ )	来源	文献
			测量值	理论值	误差 ( $\times 10^{-3}$ )				
1	7.415	$C_9H_{10}O_5$	197.046 3	197.045 0	-6.597 5	丹参素	395.0998	e	6
2	8.681	$C_{16}H_{18}O_9$	353.088 9	353.087 3	-4.531 5	新绿原酸	191.0573, 179.0362	b, c	7
3*	9.465	$C_{21}H_{36}O_{10}$	493.229 7	493.228 5	-2.432 9	苍术苷 A	—	c	8
4*	10.043	$C_{16}H_{18}O_9$	353.088 1	353.087 3	-2.265 7	绿原酸	191.0573	b, c	7
5	10.513	$C_{16}H_{18}O_9$	353.088 7	353.087 3	-4.078 3	异绿原酸	191.0573	b, c	7
7*	14.695	$C_{22}H_{22}O_{10}$	491.122 9	491.119 0	-7.941 0	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	—	a	9
8*	15.200	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463.089 0	463.087 7	-2.807 2	金丝桃苷	—	b	10-11
9	17.067	$C_{27}H_{22}O_{12}$	537.103 8	537.103 3	-0.930 9	丹酚酸 H 或 I	339.0418, 295.0595	e	12-13
10	17.479	$C_{20}H_{18}O_{10}$	417.084 9	417.082 2	-6.473 5	丹酚酸 D	238.4944, 129.0642	e	12-13
11	18.399	—	609.184 0	—	—	未知	301.0680	a	—
12*	18.779	$C_{18}H_{16}O_8$	359.077 4	359.076 7	-1.949 4	迷迭香酸	161.0273	e	6
13	18.937	$C_{32}H_{38}O_{16}$	677.205 7	677.208 2	3.691 6	温哥华苷 E	515.1519	b	14
14*	19.633	$C_{27}H_{22}O_{12}$	—	—	—	紫草酸	493.117 0, 295.061 7	e	15
16	20.267	$C_{32}H_{38}O_{15}$	661.218 9	661.213 3	-8.469 3	淫羊藿苷 A	353.1036	b	14,16
17	20.932	$C_{36}H_{30}O_{16}$	717.147 7	717.145 6	-2.928 3	丹酚酸 B	519.0953, 321.0411	e	13
18	21.790	$C_{36}H_{30}O_{16}$	717.143 7	717.145 6	2.649 4	异丹酚酸 B 或丹酚酸 E	519.0890, 321.0387	e	12
20*	22.611	$C_{26}H_{22}O_{10}$	493.114 4	493.113 5	-1.825 1	丹酚酸 A	295.0624	e	6
26	26.759	—	821.251 1	—	—	未知	—	b	—
27	27.363	$C_{39}H_{48}O_{19}$	819.272 6	819.271 2	-1.708 8	脱水淫羊藿素-3-O-鼠李糖 (1→2)- 呋喃酸-7-O-葡萄糖	—	b	17
28*	28.975	$C_{16}H_{12}O_4$	267.065 7	267.069 6	-14.603 1	芒柄花素	—	a	18
30	31.065	$C_{26}H_{28}O_{10}$	499.160 1	499.160 4	0.601 0	宝藿苷 II	353.1007	b	17
32	34.037	$C_{43}H_{70}O_{15}$	871.471 6	871.469 1	-2.868 7	黄芪皂苷 II	—	a	19-20
37	37.568	$C_{45}H_{72}O_{16}$	913.480 1	913.480 1	-0.443 4	黄芪皂苷 I	867.4670	a	19-20
38	38.043	$C_{45}H_{72}O_{16}$	913.479 9	913.480 1	-0.224 4	异黄芪皂苷 I	867.4670	a	19-20

\*经过对照品确证; a-黄芪 b-淫羊藿 c-苍术 d-茯苓 e-丹参, 下表同

\*Compared with reference compounds; a-*Astragali Radix* b-*Epimedii Folium* c-*Atractylodis Rhizoma* d-*Poria* e-*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, same as below

表 2 芪苓温肾消囊方提取物的 UPLC-ESI<sup>+</sup>-IT-TOF/MS 正离子模式下的数据及化合物归属Table 2 Data and compounds attribution of extract from Qiling Wenshen Xiaonang Formula by UPLC-ESI<sup>+</sup>-IT-TOF/MS

峰号	<i>t<sub>R</sub></i> /min	分子式	质荷比 ( <i>m/z</i> )			化合物	碎片离子 ( <i>m/z</i> )	来源	文献
			测量值	理论值	误差 ( $\times 10^{-3}$ )				
3 <sup>*</sup>	9.465	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>10</sub>	471.216 8	471.220 6	8.106 6	苍朮苷 A	—	c	8
6	11.909	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	342.168 5	342.170 5	5.944 4	木兰碱	297.1003, 265.0850	b	21
7 <sup>*</sup>	14.695	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	447.130 2	447.129 1	-2.460 1	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	—	a	9
11	18.399	—	611.194 4	—	—	未知	—	a	—
13	18.937	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>16</sub>	679.222 4	679.223 8	2.061 2	温哥华苷 E	517.1760	b	14
15 <sup>*</sup>	20.140	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	431.132 3	431.134 2	4.407 0	芒柄花苷	269.0779	a	9,18
16	20.267	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>15</sub>	663.224 9	663.228 9	6.031 1	淫羊藿苷 A	517.1686, 355.1194, 299.0548	b	14,16
17	20.932	C <sub>36</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	701.144 1	701.150 7	9.413 1	丹酚酸 B	521.0931, 323.0526	e	13
19 <sup>*</sup>	22.103	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	285.072 8	285.076 3	12.277 4	毛蕊异黄酮	—	a	18
21	23.596	C <sub>39</sub> H <sub>50</sub> O <sub>20</sub>	839.298 1	839.297 4	-0.834 0	温哥华苷 F	677.2436, 531.1745, 369.1365	b	21
22 <sup>*</sup>	24.101	C <sub>39</sub> H <sub>50</sub> O <sub>20</sub>	839.287 0	839.297 4	12.391 3	朝藿定 A	677.2385, 531.1827, 369.1307	b	14
23 <sup>*</sup>	24.446	C <sub>38</sub> H <sub>48</sub> O <sub>19</sub>	809.284 2	809.286 8	3.212 7	朝藿定 B	677.256 0, 531.186 1, 369.132 0, 313.0693	b	14,21
24 <sup>*</sup>	24.892	C <sub>39</sub> H <sub>50</sub> O <sub>19</sub>	823.301 3	823.302 5	1.457 5	朝藿定 C	677.230 3, 531.185 8, 369.129 1, 313.0759	b	14,21
25 <sup>*</sup>	25.208	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>15</sub>	677.242 1	677.244 6	3.691 4	淫羊藿苷	531.1849, 369.1317, 313.0697	b	14,21
26	26.759	—	823.366 7	—	—	未知	531.1785, 369.1315	b	—
27	27.363	C <sub>39</sub> H <sub>48</sub> O <sub>19</sub>	821.277 5	821.286 8	11.323 7	脱水淫羊藿素-3- <i>O</i> -鼠李糖 (1→2)-呋喃酸-7- <i>O</i> -葡萄糖	677.2399, 531.1823	b	17
28 <sup>*</sup>	28.975	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	269.080 2	269.081 4	4.403 9	芒柄花素	—	a	18
29	30.115	C <sub>31</sub> H <sub>36</sub> O <sub>14</sub>	633.217 9	633.218 3	0.631 7	大花淫羊藿苷 F	—	b	16
31 <sup>*</sup>	31.318	C <sub>41</sub> H <sub>68</sub> O <sub>14</sub>	807.449 4	807.450 7	1.610 0	黄芪甲苷	—	a	19-20
32	34.037	C <sub>43</sub> H <sub>70</sub> O <sub>15</sub>	849.463 3	849.461 2	-2.472 2	黄芪皂苷 II	—	a	19-20
33	34.782	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub>	531.184 4	531.186 6	4.141 7	淫羊藿次苷 I	369.1343, 313.0651	b	16
34 <sup>*</sup>	35.128	C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> O <sub>14</sub>	647.234 6	647.234 0	-0.927 0	箭藿苷 B	515.1997, 369.1291	b	21
35	35.416	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>14</sub>	661.250 8	661.249 6	-1.814 7	2"-鼠李糖淫羊藿次苷 II	515.1934, 369.1286	b	21
36 <sup>*</sup>	36.680	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>10</sub>	515.190 8	515.191 7	1.746 9	宝藿苷 I	369.1311	b	16
37	37.568	C <sub>45</sub> H <sub>72</sub> O <sub>16</sub>	891.477 5	891.471 8	-6.393 9	黄芪皂苷 I	—	a	19-20
38	38.043	C <sub>45</sub> H <sub>72</sub> O <sub>16</sub>	891.487 0	891.471 8	-17.050 5	异黄芪皂苷 I	—	a	19-20

个酚酸类成分、4 个三萜皂苷类成分、1 个倍半萜苷类及 1 个生物碱类成分。对各类成分的化合物进行了特征解析。

### 3.1 黄酮类化合物解析

7 号峰 ( $t_R$  14.695 min) 的一级正负离子分别给出  $m/z$  447  $[M+H]^+$  和  $m/z$  491  $[M+HCOO]^-$  的峰, 确定化合物相对分子质量 446, 且此峰归属于黄芪药材。与对照品比对, 确定 7 号峰是毛蕊异黄酮葡萄糖苷。

16 号峰 ( $t_R$  20.267 min) 的一级正负离子分别给出  $m/z$  663  $[M+H]^+$  和  $m/z$  661  $[M-H]^-$  的峰, 确定化合物相对分子质量 662, 且此峰归属于淫羊藿药材。二级质谱以  $m/z$  663 为母离子失去鼠李糖基产生  $m/z$  517  $[M+H-Rha]^+$  的碎片; 进一步失去葡萄糖基产生  $m/z$  355  $[M+H-Rha-Glc]^+$  的碎片, 即苷元; 苷元失去 C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> 得到  $m/z$  299 的碎片离子。以  $m/z$  661 为母离子失去鼠李糖基和葡萄糖基产生  $m/z$  353  $[M-H-Rha-Glc]^-$  的碎片离子。各峰得到碎片

信息与文献报道一致<sup>[16]</sup>,确定16号峰是淫羊藿苷A。

### 3.2 酚酸类化合物解析

17号峰( $t_R$  20.932 min)的一级负离子给出  $m/z$  717  $[M-H]^-$  的峰,且归属于丹参药材,推测17号峰是丹酚酸B。以  $m/z$  717 为母离子断裂失去1分子丹参素产生  $m/z$  519,继续失去1分子丹参素形成  $m/z$  321<sup>[13]</sup>的碎片离子。

### 3.3 三萜皂苷类化合物解析

37号峰( $t_R$  37.568 min)和38号峰( $t_R$  38.043 min)的2个峰归属于黄芪药材,且都有  $m/z$  891  $[M+Na]^+$  峰,  $m/z$  867  $[M-H]^-$  峰和  $m/z$  913  $[M+HCOO]^-$  峰,确定相对分子质量为868,二者属于同分异构体,根据二者极性以及参考文献<sup>[19]</sup>,推测37号峰为黄芪皂苷I,38号峰为异黄芪皂苷I。

### 3.4 倍半萜苷类化合物解析

3号峰( $t_R$  9.465 min)的一级正负离子分别给出  $m/z$  471  $[M+Na]^+$  峰和  $m/z$  493  $[M+HCOO]^-$  峰,计算分子式为  $C_{21}H_{36}O_{10}$ ,对照各个药材紫外色谱图的保留时间,此峰归属于苍术药材。与对照品比对,确定3号峰为苍术苷A。

### 3.5 生物碱类化合物解析

6号峰( $t_R$  11.909 min)的一级正离子给出  $m/z$  342  $[M+H]^+$  峰,它的二级碎片离子有  $m/z$  297  $[M-(CH_3)_2NH]^+$  和  $m/z$  265  $[M-(CH_3)_2NH-CH_3OH]^+$ ,且此峰归属于淫羊藿药材,参考文献数据<sup>[21]</sup>,推测6号峰为木兰碱。

## 4 讨论

本研究分别针对不同的提取溶剂和不同的流动相进行了考察,最终确定40%甲醇超声提取效果最好,以0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相各色谱峰峰形及分离度最好。本方中的黄酮类成分在正离子模式下响应好,丹参药材中的酚酸类成分在负离子模式下响应较好,因此采用正负离子模式同时对芪苓温肾消囊方提取物进行检测,从而获得化学成分全面的质谱信息。

中药复方一般由多味药材组成,化学成分复杂,加上对照品价格昂贵,很难实现对复方提取物的定性定量研究。本研究采用UPLC-ESI-IT-TOF/MS方法可以获得化学成分的多级质谱碎片,从而推测其化学组成,为中药复方的化学成分分析提供了一种快速有效的方法。该方法已被广泛应用于中药复方研究的各个方面。

本研究共指出芪苓温肾消囊方中黄芪、淫羊

藿、苍术、丹参药材里的36种化学成分,以皂苷、黄酮、酚酸类为主,多来源于君药黄芪、臣药淫羊藿和使药丹参。现有文献已报道黄芪注射液对雌激素受体具有激活作用<sup>[22]</sup>。Lv等<sup>[23]</sup>研究了黄芪甲苷对糖尿病大鼠体内肝葡萄糖酶的作用,发现黄芪甲苷可显著降低大鼠血糖和胰岛素水平。张洁等<sup>[24]</sup>发现淫羊藿总黄酮能降低糖尿病小鼠的血糖,增加肌糖原和肝糖原的量。李芳芳等<sup>[25]</sup>发现淫羊藿苷对卵泡颗粒细胞分泌雌二醇有直接刺激作用。张秋华等<sup>[26]</sup>通过研究发现苍术水提物可以降低大鼠链脲雷素引起的高血糖,血清胰岛素水平以剂量依赖性被升高,血清淀粉酶恢复正常水平。根据以上文献报道来看,本研究所指认出来的化学成分,推测可能是芪苓温肾消囊方的主要药效成分,对于改善高雄激素血症及胰岛素抵抗具有明显的效果。然而,本研究未检测到佐药茯苓来源的化学成分,原因可能是茯苓所含成分绝大多数是多糖类成分,且极性较大在上述分离条件下无法指认。郑彩云<sup>[27]</sup>研究发现茯苓多糖能降低四氧嘧啶诱导的大鼠血糖升高,且具有抗脂质过氧化作用。另外,王念等<sup>[28]</sup>发现糖尿病大鼠发病过程当中存在内质网应激,而黄芪多糖可以减轻内质网应激,从而增加胰岛素的敏感性;据此推测多糖类成分也是本方的有效成分,但检测方法有待进一步开发。本研究对芪苓温肾消囊方提取物的化学成分进行全面解析,发现其所含有的主要成分与文献中报道的多囊卵巢综合征相关药理活性成分具有良好的一致性,从而在一定程度上体现潜在的药效物质基础和组方的合理性。

## 参考文献

- [1] 常惠,匡洪影,丛晶,等.补肾化痰复方颗粒对孕期高雄激素血症大鼠雌性子代生殖内分泌的影响[J].中华中医药杂志,2011,26(12):2872-2875.
- [2] 吴效科.从天癸失序、痰壅胞宫探讨多囊卵巢综合征病机及治疗[J].中国中西医结合杂志,2009,29(7):588-589.
- [3] 汪文来,刘梅洁,赵红霞,等.多囊卵巢综合征的中医临床研究[J].中国医药导刊,2014,16(2):308-310.
- [4] 尹倩,侯丽辉,刘颖华,等.补肾化痰方对多囊卵巢综合征患者高雄激素血症影响的临床观察[J].上海中医药杂志,2015,49(8):53-55.
- [5] 梁晨,丛晶,常惠,等.补肾化痰复方对多囊卵巢综合征模型大鼠卵巢内胰岛素信号传导分子的调控[J].中国中西医结合杂志,2011,31(12):1639-1644.
- [6] Cao J, Qi L W, Chen J, et al. Application of liquid chromatography electrospray ionization time-of-flight

- mass spectrometry for analysis and quality control of compound Danshen preparations [J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(4): 397-405.
- [7] Zhang H Y, Hu P, Luo G A, *et al.* Screening and identification of multi-component in Qingkailing injection using combination of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and liquid chromatography/ion trap mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 577(2): 190-200.
- [8] 单晨啸, 崔小兵, 柴 川, 等. 基于 UPLC/Q-TOF-MS 分析麸炒北苍术的成分变化 [J]. *中成药*, 2013, 35(12): 2703-2707.
- [9] Yi L, Qi L W, Li P, *et al.* Simultaneous determination of bioactive constituents in Danggui Buxue Tang for quality control by HPLC coupled with a diode array detector, an evaporative light scattering detector and mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(2): 571-580.
- [10] 朱粉霞, 赵永刚, 贾晓斌. 淫羊藿炮制前后 UPLC-PDA-MS 的指纹图谱研究 [J]. *化学学报*, 2012, 70(5): 635-642.
- [11] 刘丽萍, 徐晓芳, 孙东东, 等. 淫羊藿水提部位化学成分的 HPLC-ESI-Q-TOF-MS 分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(19): 112-116.
- [12] Wei Y J, Li P, Shu B, *et al.* Analysis of chemical and metabolic components in traditional Chinese medicinal combined prescription containing *Radix Salvia miltiorrhiza* and *Radix Panax notoginseng* by LC-ESI-MS methods [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(8): 797-809.
- [13] 郭增军, 龙丽辉, 徐 颖, 等. UPLC-ESI-MS 分析丹参药材、脂溶性及水溶性提取物的色谱、质谱行为及相关性 [J]. *中药材*, 2010, 33(6): 925-929.
- [14] Zhao H Y, Sun J H, Fan M X, *et al.* Analysis of phenolic compounds in *Epimedium* plants using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1190(1/2): 157-181.
- [15] 王红蕾, 齐 崑, 吴小东, 等. 丹参水溶性多酚酸的多级串联电喷雾离子阱质谱断裂机理解析 [J]. *质谱学报*, 2008, 29(3): 129-136.
- [16] 袁 杰, 龚又明, 鞠 鹏, 等. HPLC-MS<sup>2</sup> 法分析朝鲜淫羊藿中的化学成分 [J]. *中草药*, 2004, 35(4): 15-18.
- [17] 曹树萍. 淫羊藿类及蛇类药材的鉴定和质量评价研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [18] 王 平, 梁逸曾. HPLC-DAD-MS 研究黄芪的化学成分 [J]. *中草药*, 2011, 42(2): 226-229.
- [19] Chu C, Cai H X, Ren M T, *et al.* Characterization of novel astragaloside malonates from *Radix Astragali* by HPLC with ESI quadrupole TOF MS [J]. *J Liq Chromatogr*, 2010, 33(4/5): 570-581.
- [20] Wang D, Song Y, Li S L, *et al.* Simultaneous analysis of seven astragalosides in *Radix Astragali* and related preparations by liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2006, 29(13): 2012-2022.
- [21] 袁 航, 曹树萍, 陈抒云, 等. RRLC-DAD-ESI-MS<sup>2</sup> 分析天平山淫羊藿中的 11 个化学成分 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(7): 1156-1160.
- [22] 王海彬, 王军舰, 黄 辉, 等. 黄芪注射液对雌激素受体的激活作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(11): 2113-2115.
- [23] Lv L, Wu S Y, Wang G F, *et al.* Effect of astragaloside IV on hepatic glucose-regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(2): 219-224.
- [24] 张 洁, 韩爱萍, 丁选胜. 淫羊藿总黄酮对四氧嘧啶糖尿病小鼠降糖作用的研究 [J]. *安徽医药*, 2011, 15(8): 935-936.
- [25] 李芳芳, 李 恩, 吕占军, 等. 淫羊藿甙对大鼠卵泡颗粒细胞和肾上腺皮质细胞分泌功能的影响 [J]. *中国中药杂志*, 1997, 22(8): 499-500.
- [26] 张秋华, 张晓枫, 张秋菊. 苍术的化学成分与药理研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 1997, 8(6): 505-506.
- [27] 郑彩云. 茯苓多糖抗糖尿病作用的实验研究 [J]. *中国医疗前沿*, 2010, 5(14): 12-13.
- [28] 王 念, 毛先晴, 王 沈, 等. 黄芪多糖减轻 2 型糖尿病大鼠内质网应激和增加胰岛素敏感性的实验研究 [J]. *公共卫生与预防医学*, 2007, 18(4): 13-16.