芪白平肺颗粒醇提部位化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定

商　晶[1,2]，靳瑞婷[1,2]，李雪峰[1,2]，秦建平[1,2]，吴　云[1,2]，丁　岗[1,2]，王振中[1,2]，萧　伟[1,2*]

1. 江苏康缘药业股份有限公司，江苏 连云港　222047
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室，江苏 连云港　222047

摘　要：目的　研究芪白平肺颗粒醇提部位化学成分及醇提部位药材的合提与分提的差异性。**方法**　以 UPLC-Q-TOF-MS 作为分析方法，通过对比各色谱峰的保留时间、质谱图特征，结合文献报道，确认芪白平肺颗粒中醇提部位的化学成分，并以主成分分析明确醇提部位药材分提与合提的差异性。**结果**　对芪白平肺颗粒醇提部位中产生的 26 个离子进行鉴定，确定了 22 个离子的化学结构式，并推测了另外 4 个离子的化学结构式。并通过主成分分析对人参黄芪分提提取液和合提提取液进行分析，确定了 12 个化合物为人参黄芪合提与分提的差异物。**结论**　本实验为完善芪白平肺颗粒的工艺和质量标准研究提供参考依据。

关键词：芪白平肺颗粒；UPLC-Q-TOF-MS；主成分分析；分提；合提

中图分类号：R284.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2016)13 - 2246 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.13.008

UPLC-Q-TOF-MS analysis on constituents from ethanol extract fraction herbs of Qibai Pingfei Granule

SHANG Jing[1,2], JIN Rui-ting[1,2], LI Xue-feng[1,2], QIN Jian-ping[1,2], WU Yun[1,2], DING Gang[1,2], WANG Zhen-zhong[1,2], XIAO Wei[1,2]

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222047, China
2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222047, China

Abstract: Objective　To study the chemical constituents from the ethanol extract fraction herbs of Qibai Pingfei Granule (QPG), the difference of mixed decoction and separated decoction of ethanol extract fraction herbs in QPG. **Methods**　UPLC-Q-TOF-MS was used as the analytic method. The information on quasi-molecular ion, fragment ions, retention time, and references were synthetically analyzed to confirm the constituents in the ethanol extract fraction herbs of QPG. Principal components analysis was applied to process the acquired data, and marked differences between mixed decoction and separated decoction in the ethanol extract fraction herbs of QPG. **Results**　Twenty-two compounds were identified, and four compounds were tentatively identified among 26 ions. In addition, twelve compounds were determined as markers to distinguish the mixed decoction from the separated decoction of the ethanol extract fraction herbs in QPG. **Conclusion**　The findings obtained from the study can provide the useful information for the determination of bioactive substances, the perfection of quality standard, and the preparation technology of QPG.

Key words: Qibai Pingfei Granule; UPLC-Q-TOF-MS; principal components analysis; mixed decoction; separated decoction

芪白平肺颗粒（QPG）处方由黄芪、人参等 7 味药材组成，该方为治疗慢性阻塞性肺疾病的临床经验方，具有益气温阳、化痰散瘀之功效[1-4]。为了保证处方中人参与黄芪皂苷类成分的转移率，工艺确定为人参与黄芪以 70%乙醇提取，药渣与剩余药材再水提。为了简单快速地对人参与黄芪醇提物中化学成分进行鉴定，本实验对人参和黄芪乙醇提取物进行了 UPLC-Q-TOF-MS 分析，通过准分子离子峰和碎片离子并结合文献资料或与对照品对照，对 26 个碎片离子峰进行了鉴定，确定了 22 个离子的化学结构，并推测另外 4 个离子的化学结构。另外，中药化学成分复杂，在煎煮过程中，随着其中化学

收稿日期：2015-10-16

基金项目：科技部重大新药创制现代中药创新集群与数字制药技术平台（2013ZX09402203）

作者简介：商　晶，博士，研究方向为中药新药。Tel: 15950715010　E-mail: 771818591@qq.com

***通信作者**　萧　伟，男，研究员级高级工程师，博士，研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)811522367　E-mail: kanionlunwen@163.com

成分的溶出，往往会改变溶剂的理化性质，进而影响其他成分的溶出，含皂苷类成分的中药如人参、黄芪等，在提取过程中可形成胶团而发挥增溶作用[5-7]。为了研究人参黄芪在配伍煎煮时相互之间是否发生了助溶作用，本实验通过主成分分析（PCA），对人参黄芪分提和合提提取液进行了分析，确定了 12 个化合物的含量发生了变化，并对其结构进行了推测。

1 仪器与材料

Agilent 1290 超高压液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；Agilent 6538 Q-TOF 质谱仪（美国 Agilent 公司）；BP211D 型电子分析天平（德国 Sartorius 公司）；Centrifuge 5415D 高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；Milli-Q Academic 纯水机（美国 Millipore 公司）；KQ-250DB 型超声波清洗仪（昆山市超声波仪器有限责任公司）。

人参 *Ginseng Radix*（GR）和黄芪 *Astragali Radix*（AR）药材经连云港康缘大药房吴舟执业药师分别鉴定为五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根和根茎；豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。人参皂苷 Rb_1（110704-201223，质量分数 95.9%）、Rg_1（110703-201128，质量分数 93.4%）、Re（110754-201324，质量分数 92.7%）和黄芪甲苷（110781-201314，质量分数 95.8%）均购自中国食品药品检定研究院；甲醇（色谱纯，Merck 公司）；甲酸（色谱纯，Fluka 公司）；Millipore 超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件

2.1.1 液相条件 Proshell 120 SB-C_{18} 色谱柱（150 mm×4.6 mm，2.7 μm），柱温 30 ℃；流动相 A 为乙腈，B 为 0.2%甲酸水溶液，线性梯度洗脱：0～2 min，5%～25% A；2～7 min，25%～30% A；7～27 min，30%～38% A；27～35 min，38%～75% A；35～40 min，75%～95% A；40～43 min，95% A；体积流量 0.4 mL/min；进样量为 10 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾电离源（ESI），正负离子全扫描检测，扫描范围 *m*/*z* 50～3 000，加热毛细管温度 350 ℃，干燥气体积流量 10 L/min，喷雾器压力 310 kPa，毛细管电压 4 000 V（正离子模式），碎裂电压 135 V，锥孔电压 65 V。

2.2 样品制备

取人参和黄芪药材，粉碎，过 65 目筛，按 QBPF 颗粒处方比例进行配伍，并按照 QBPF 制备工艺进行提取，离心，取上清，作为合提提取液，平行制备 8 份。另外，取上述量人参和黄芪分别进行提取，分别平行制备 8 份，提取液临用前按照处方比例进行合并，混匀，离心，取上清，作为分提提取液。取上述提取液 1 mL，加入 4 mL 甲醇，混匀，放置 30 min，离心，取上清，作为供试品。

2.3 数据处理

原始数据文件通过 Masshunter B.03.01 软件转换为 mzData 文件后，导入 MZmine（version 2.2）进行处理[8-9]。最终的数据可以 CSV 的格式导出，以 Microsoft Office Excel（Microsoft Corporation）文件格式打开。将原始数据矩阵导入 SIMCA-P（version 11.5，瑞典 Umetrics 公司）软件中，转置后，行对应样品号（observation），列对应变量的峰面积（variables），进行多变量统计分析。

3 结果

3.1 结构鉴定

人参与黄芪合提与分提提取液总离子流图见图 1，结合对照品及相关文献数据[10-11]对比确认化学成分，对 26 个离子进行了鉴定，其中 10 个离子来自于人参，为人参皂苷类成分，16 个离子来自于黄芪，为黄芪皂苷类成分和黄酮类成分（表 1）。下面以离子 5 和离子 1 为例，说明表 1 中离子的鉴定过程。离子 5 保留时间 5.38 min，质谱给出 *m*/*z* 969.540 0 $[M+Na]^+$，表明该化合物相对分子质量为 946。进一步对碎片离子进行识别，可发现碎片离子 767.494 2 $[M-C_6H_{11}O_6]^+$、621.436 6 $[M-C_{12}H_{21}O_{10}]^+$、441.372 8 $[M-C_{18}H_{33}O_{16}]^+$ 分别为准分子离子依次脱去 1 个葡萄糖、1 个鼠李糖和 1 个葡萄糖，可以推断化合物 **1** 为由 2 分子葡萄糖、1 分子鼠李糖与苷元相连。通过与对照品对照及参考相关文献，确定其为 20*S*-人参皂苷 Re。离子 1 保留时间为 3.78 min，质谱给出 *m*/*z* 447.129 3 $[M+H]^+$，469.113 3 $[M+Na]^+$，表明该化合物相对分子质量为 446。进一步对碎片离子进行识别，可发现碎片离子 285.075 8 $[M-C_6H_9O_5]^+$为准分子离子脱去 1 个葡萄糖，可以推断该化合物是由 1 分子葡萄糖与苷元相连。通过参考相关文献数据[10-11]，推测其可能为毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、印度黄檀苷、3′-甲氧基-5′-羟基-异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷。

3.2 人参、黄芪分煎和合煎差异性分析

液质数据经过 MZmine 处理后，产生 4 804 个

变量，将原始数据矩阵导入 SIMCA-P（version 11.5，瑞典 Umetrics 公司）软件中，进行多变量统计分析。在 PCA 模式下，3 个主成分被提取，R^2_X 和 Q^2_Y 分别为 0.903 和 0.807，其得分图如图 2-a 所示，表明人参-黄芪分提组和合提组存在着明显的差异；在偏最小二乘判别分析（PLS-Da）模式下，2 个主成分被提取，R^2_X、R^2_Y 和 Q^2_Y 分别为 0.875、0.832 和 0.679，表明本实验所建立的主成分分析模式，不仅对变量具有很好的解释度，同时也有准确的预测性，其得分图如图 2-b 所示[12]。

根据分提组、合提组所构建的 PLS-Da 模型中每个模型的变量投影重要性（variable importance in

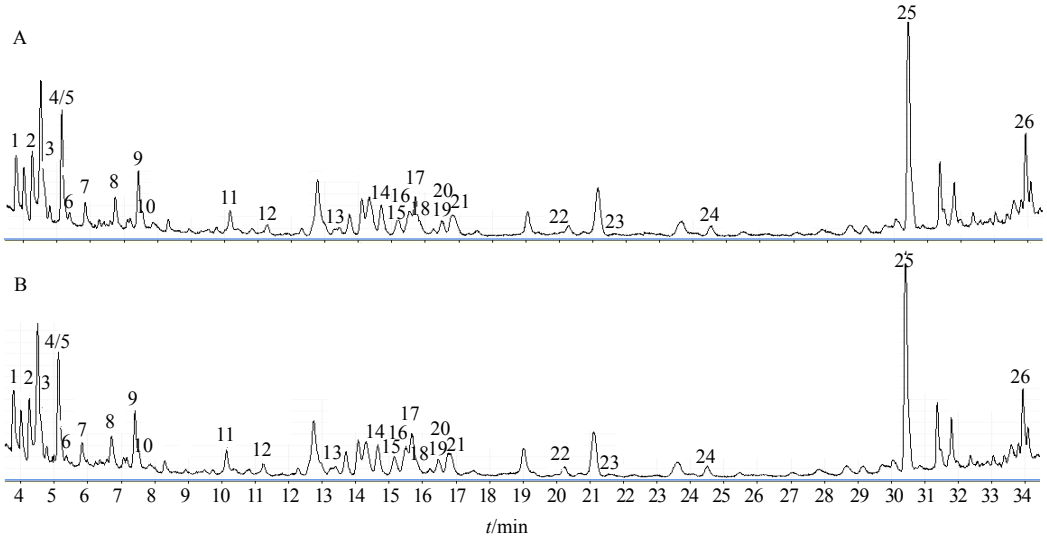

图 1　正离子模式下人参黄芪合提提取液 (A) 和分提提取液 (B) 总离子流图

Fig. 1　Total ion chromatogram of mixed decoction (A) and separated decoction (B) of GR and AR

表 1　人参黄芪提取液化学成分 UPLC-Q-TOF-MS 数据及结果推测

Table 1　Speculation on UPLC-Q-TOF-MS data of chemical constituents in extract of GR and AR

峰号	t_R/min	一级离子	测定值	理论值	误差	分子式	化合物
1	3.78	$[M+H]^+$	447.129 3	447.128 6	−1.6	$C_{22}H_{22}O_{10}$	毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、印度黄檀苷、3′-甲氧基-5′-羟基-异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷
2	4.19	$[M+Na]^+$	985.535 3	985.534 3	−1.0	$C_{48}H_{82}O_{19}$	20*S*-人参皂苷 Re_1、20*S*-人参皂苷 Re_2、20*S*-人参皂苷 Re_3、20-葡萄糖基-20*S*-人参皂苷 Rf、20*S*-三七皂苷 N
3	4.65	$[M+H]^+$	533.129 3	533.129 0	−0.5	$C_{25}H_{24}O_{13}$	毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷-6"-*O*-丙二酸酯
4	5.38	$[M+Na]^+$	823.481 8	823.481 4	−0.5	$C_{42}H_{72}O_{14}$	20*S*-人参皂苷 Rg_1
5	5.38	$[M+Na]^+$	969.540 0	969.539 3	−0.7	$C_{48}H_{82}O_{18}$	20*S*-人参皂苷 Re
6	5.58	$[M+H]^+$	489.139 3	489.139 1	−0.5	$C_{24}H_{24}O_{11}$	毛蕊异黄酮-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷-6"-*O*-乙酸酯
7	5.86	$[M+H]^+$	431.134 6	431.133 7	−2.0	$C_{22}H_{22}O_9$	芒柄花苷
8	6.75	$[M+Na]^+$	485.142 5	485.141 8	−1.5	$C_{23}H_{26}O_{10}$	(−)-美迪紫檀素-3-*O*-β-*D*-葡萄糖苷
9	7.47	$[M+H]^+$	465.175 1	465.175 5	0.9	$C_{23}H_{28}O_{10}$	2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、2',4'-二甲氧基-3'-羟基-异黄烷-6-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、3'-羟基-2',4'-二甲氧基异黄烷-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷
10	7.69	$[M+H]^+$	285.075 9	285.075 7	−0.7	$C_{16}H_{12}O_5$	毛蕊异黄酮
11	10.18	$[M+Na]^+$	823.482 2	823.481 4	−1.0	$C_{42}H_{72}O_{14}$	20*S*-人参皂苷 Rf
12	11.28	$[M+Na]^+$	793.471 9	793.470 9	−1.3	$C_{41}H_{70}O_{13}$	20*S*-人参皂苷 R_2
13	13.55	$[M+Na]^+$	1 131.593 3	1 131.592 2	−1.0	$C_{54}H_{92}O_{23}$	20*S*-人参皂苷 Rb_1
14	14.85	$[M+H]^+$	269.080 6	269.080 8	0.7	$C_{16}H_{12}O_4$	芒柄花黄素

续表 1

峰号	t_R/min	一级离子	测定值	理论值	误差	分子式	化合物
15	15.17	$[M+Na]^+$	1 233.624 6	1 233.623 9	−0.6	$C_{58}H_{98}O_{26}$	20*S*-人参皂苷 Ra_1
16	15.48	$[M+Na]^+$	979.488 7	979.487 3	−1.4	$C_{48}H_{76}O_{19}$	人参皂苷 Ro
17	15.52	$[M+H]^+$	301.107 5	301.107 1	−1.2	$C_{17}H_{16}O_5$	(−)-美迪紫檀素
18	15.83	$[M+Na]^+$	807.451 8	807.450 1	−2.1	$C_{41}H_{68}O_{14}$	黄芪皂苷 IV
19	16.52	$[M+Na]^+$	807.450 1	807.450 1	0.0	$C_{41}H_{68}O_{14}$	黄芪皂苷 III、异黄芪皂苷 IV
20	16.58	$[M+Na]^+$	1 107.582 7	1 107.581 6	−1.0	$C_{53}H_{90}O_{22}$	20*S*-人参皂苷 Rb_3
21	16.87	$[M+H]^+$	303.123 1	303.122 7	−1.2	$C_{17}H_{18}O_5$	(3*R*)-8,2'-二羟基-7,4'-甲氧基异黄烷
22	20.00	$[M+Na]^+$	969.539 4	969.539 3	−0.1	$C_{48}H_{82}O_{18}$	20*S*-人参皂苷 Rd
23	21.76	$[M+Na]^+$	849.461 6	849.460 7	−1.1	$C_{43}H_{70}O_{15}$	黄芪皂苷 II
24	24.55	$[M+H]^+$	827.479 1	827.478 7	−0.5	$C_{43}H_{70}O_{15}$	异黄芪皂苷 II
25	30.45	$[M+H]^+$	869.489 3	869.489 3	0.0	$C_{45}H_{72}O_{16}$	黄芪皂苷 I
26	33.94	$[M+Na]^+$	933.484 9	933.481 8	−3.3	$C_{47}H_{74}O_{17}$	乙酰黄芪皂苷 I

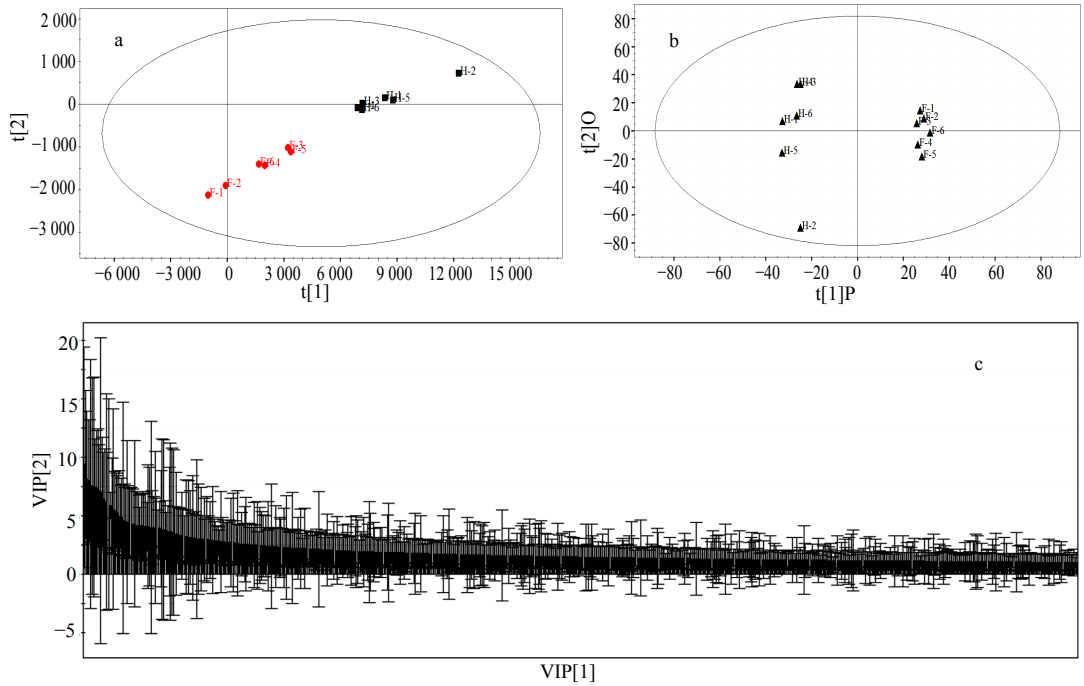

图 2 人参、黄芪合提与分提提取液分别在 PCA 和 PLS-Da 模式下得分图 (a、b) 和 PLS-Da 模式下 VIP＞1 的 VIP 图 (c)

Fig. 2 Score plot (a and b) and VIP plot (VIP > 1, c) of mixed decoction and separated decoction of GR and AR in PCA and PLS-Da pattern recognition

the projection，VIP）筛选出相对应的变量，提取出 VIP＞1 的变量（图 2-c），并对这些变量进行单因素方差检验（P＜0.05）。通常来说，VIP 值越大的变量，其对应的成分对分类意义越大。本实验共生成 VIP＞1 变量 712 个，通过方差分析确定了有统计学意义的变量 286 个，对 286 个变量所对应的离子进行鉴定，确定了 12 个离子能够解释人参黄芪分提与合提的差异性，分别对应表 1 中化合物 **4**、**6**～**8**、**11**～**13**、**17**、**21**、**24**～**26**，其在分提提取液和合提提取液中的变化趋势（以化合物一级离子峰面积均值表示）见图 3，相对于分提提取液，合提提取液中 12 个化合物的量均不同程度地上升，提示人参黄芪在煎煮过程中存在着相互助溶作用。

4 讨论

在质谱条件优化中，对于质谱的正负离子模式分别进行了考察，发现正离子模式下，除了产生准分子离子峰响应度较高外，还能产生较多的碎片离子峰，因此，选取正离子模式为质谱的电离模式。

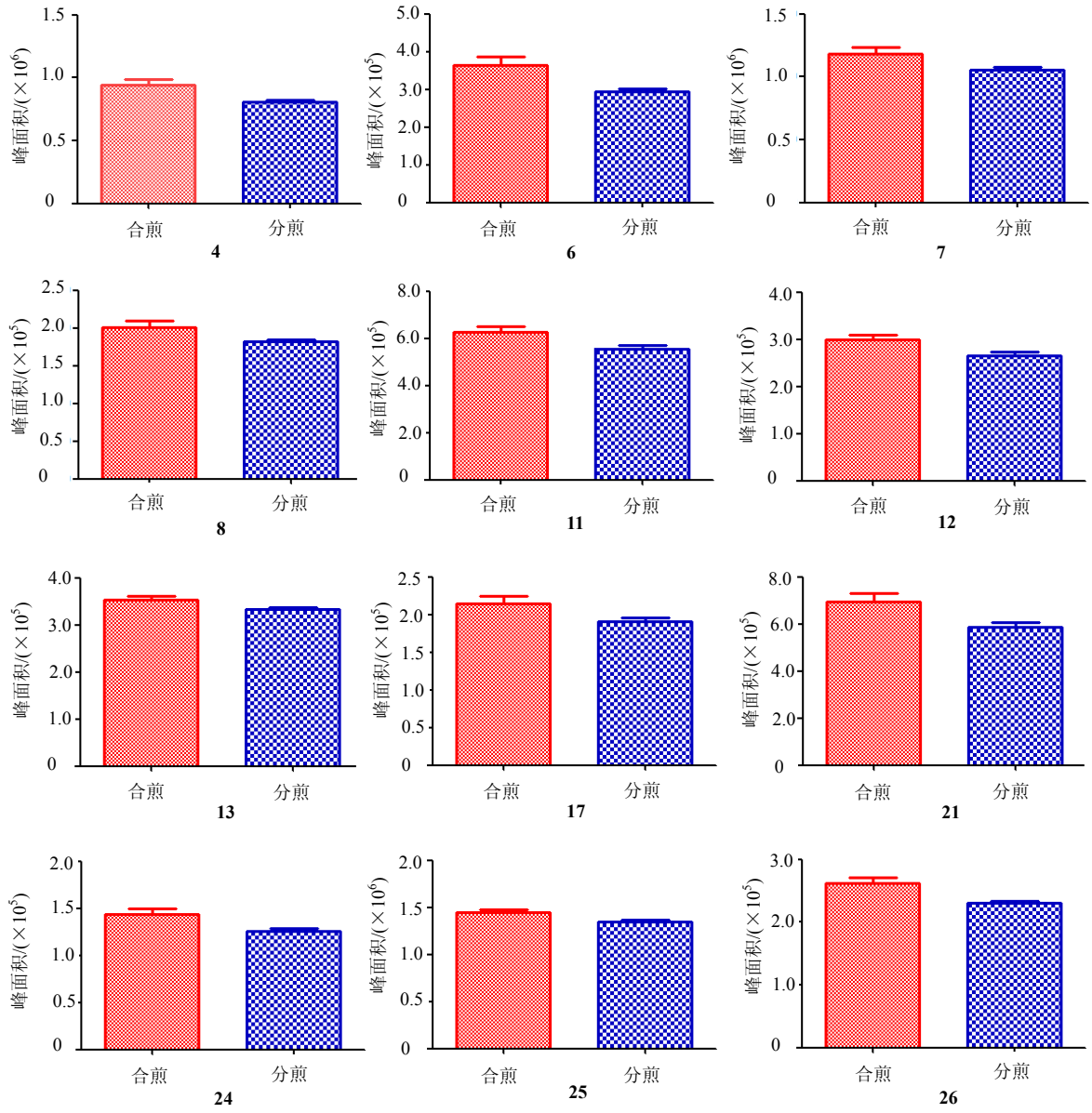

图 3　12 个差异化合物的变化趋势

Fig. 3　Change trend plots of 12 different compounds

另外，还考察了 0.1%、0.2%和 0.3%甲酸对于电离的影响，发现 0.2%甲酸能够获得较高的离子强度，因此，选取 0.2%甲酸作为流动相。人参中主要含人参皂苷类成分，黄芪中主要含黄芪皂苷类成分和黄酮类成分，皂苷类成分准分子离子峰主要为 $[M+Na]^+$，其碎片为脱糖基离子峰，黄酮类成分的准分子离子峰主要为 $[M+H]^+$。

本实验中，对人参黄芪提取液中 26 个离子进行了鉴定，其中 10 个离子来自于人参，为人参皂苷类成分，16 个离子来自于黄芪，为黄芪皂苷类成分和黄酮类成分。另外，通过 PCA 对人参黄芪分提提取液和合提提取液进行了分析，确定了 12 个化合物表出了较大差异，其中有 8 个来自于黄芪，4 个来自于人参，且合提液中的量均高于分提液，提示人参和黄芪在煎煮时能够产生相互助溶作用，可能与其含有大量的皂苷类成分有关。

另外，人参皂苷 Rg_1（**4**）、人参皂苷 Re（**5**）、人参皂苷 Rb_1（**13**）、黄芪甲苷（**18**）及毛蕊异黄酮（**10**）的转移率是芪白平肺颗粒工艺研究的主要指标。从本研究中可以发现，除人参皂苷 Re 外，其他 4 个化合物合提后的量均有所上升。因此，在进行芪白平肺颗粒的工艺时，有必要考虑人参黄芪配

伍提取时的相互助溶作用。同时，人参皂苷 Rg_1、Re、Rb_1 及黄芪甲苷的量为芪白平肺颗粒的质量控制指标，因此，在确定上述 4 个指标成分的质量控制范围时，也应当考虑人参黄芪配伍提取时的相互助溶作用。

参考文献

[1] 李泽庚, 王传博, 彭 波, 等. 芪白平肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病患者 BODE 指数的影响 [J]. 中医杂志, 2010, 51(11): 987-989.

[2] 李泽庚, 王传博, 彭 波, 等. 芪白平肺胶囊对慢阻肺痰瘀阻肺证模型大鼠 T 淋巴细胞亚群的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 7-9.

[3] 李泽庚, 王传博, 彭 波, 等. 芪白平肺胶囊对慢阻肺痰瘀阻肺证模型大鼠肺功能的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2009, 23(6): 51-53.

[4] 王传博, 李泽庚, 彭 波, 等. 芪白平肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病痰瘀阻肺证模型大鼠 NO、ET-1 及 FIB 的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(1): 94-96.

[5] Walthelm U, Dittrich K, Gelbrich G, *et al*. Effects of saponins on the water solubility of different model compounds [J]. *Planta Med*, 2001, 67(1): 49-54.

[6] Watanabe K, Fujino H, Morita T, *et al*. Solubilization of saponins of *Bupleuri Radix* with ginseng saponins: cooperative effect of dammarane saponins [J]. *Planta Med*, 1988, 54(5): 405-409.

[7] Nakayama K, Fujino H, Kasai R, *et al*. Solubilizing properties of saponins from *Sapindus mukurossi* Gaertn [J]. *Chem Pharm Bull*, 1986, 34(8): 3279-3283.

[8] Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, *et al*. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data [J]. *BMC Bioinform*, 2010, 11(1): 395-405.

[9] Wheelock C E, Goto S, Yetukuri L, *et al*. Bioinformatics strategies for the analysis of lipids [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 580(580): 339-368.

[10] 杨鑫宝, 杨秀伟, 刘建勋. 人参中皂苷类化学成分的研究 [J]. 中国现代中药, 2013, 15(5): 349-358.

[11] 郭 璐. 黄芪中皂苷类成分及黄芪甲苷结构修饰的研究 [D]. 成都: 西南交通大学 , 2014.

[12] 阿基业. 代谢组学数据处理方法——主成分分析 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(5): 481-489.