

• 药剂与工艺 •

基于 UPLC-Q Exactive 四级杆-轨道阱液质联用法快速建立清热灵颗粒中潜在中药质量标志物 (Q-Marker) 成分库

周秀娟¹, 李燕芳¹, 陈莹¹, 陈晓虎², 瞿燕³, 任晓东⁴, 曾锐^{1*}

1. 西南民族大学药学院, 四川 成都 610041
2. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121
3. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 610016
4. 纽约州立大学石溪分校化学学院, 美国 纽约 11794

摘要: 目的 基于中药质量标志物 (Q-Marker) 理念, 使用 UPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨液质联用技术, 对清热灵颗粒主要化学成分进行快速识别和鉴定, 建立清热灵颗粒的潜在 Q-Marker 库, 为探讨建立中成药清热灵颗粒的系统质量控制方法奠定基础。方法 以 50% 甲醇作为提取液制备供试液, 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 进行分离, 以甲醇-0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 质谱采用负离子监测模式、全扫描及自动触发二级质谱扫描的功能, 对清热灵颗粒中成分进行识别及鉴定。并采用 Autodock vina 1.1.2 软件, 以 H5N1 禽流感病毒为神经氨酸酶受体, 利用 AutoDock Tools 1.5.6 程序确定靶蛋白的活性口袋, 对所选标志物进行分子对接研究。结果 通过高分辨 UPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨液质联用技术共鉴定了 39 个化学成分, 包括黄酮类化合物 25 个, 苯乙醇苷类 6 个, 有机酸 4 个, 三萜类化合物 2 个, 木脂素类 2 个。32 个化学成分为首次在该制剂中鉴别出, 其中 15 个为专属性成分, 建议其中的黄芩苷、汉黄芩苷、连翘酯苷 A、甘草苷、连翘酯苷 E、连翘酯苷 B、异甘草苷、黄芩素、连翘苷、汉黄芩素、甘草素 11 个成分可作为清热灵颗粒的 Q-Marker。结论 通过高分辨 UPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨液质联用技术, 可以快速分析和确定中成药清热灵颗粒的化学成分, 建立清热灵颗粒的潜在 Q-Marker 库。

关键词: 中药质量标志物; UPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨液质联用; 清热灵颗粒; 成分库; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 连翘酯苷 A; 甘草苷; 连翘酯苷 E; 连翘酯苷 B; 异甘草苷; 黄芩素; 连翘苷; 汉黄芩素; 甘草素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)01-0067-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.010

Rapid establishment of Q-Marker database for Qingreling Granules with UPLC coupled with hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry

ZHOU Xiu-juan¹, LI Yan-fang¹, CHEN Ying¹, CHEN Xiao-hu², QU Yan³, REN Xiao-dong⁴, ZENG Rui¹

1. College of Pharmacy, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China
2. Chongqing Food and Drug Control Research Institute, Chongqing 401121, China
3. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610016, China
4. College of Chemistry, Stony Brook University, New York 11794, US

Abstract: Objective To establish the Q-Marker database for Chinese medicine Qingreling Granules (QG) based on the concept of Q-Marker by the method of ultra high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry (UPLC-quadrupole-orbitrap MS) to recognize and identify the chemical constituents, and study the quality of QG. **Methods** The 50% methanol extract was separated on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), and eluted with a gradient of

收稿日期: 2016-10-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603309); 国家留学基金委资助项目 (CSC201500850007); 四川省科技支撑计划 (2014SZ0131); 四川省科技厅基础研究项目 (2015JY0009)

作者简介: 周秀娟 (1986—), 硕士研究生。Tel: 15882491209 E-mail: xiujuanzhou214@163.com

*通信作者 曾锐, 副教授, 主要从事药物制剂及民族药研究。Tel: (028)85522315 E-mail: rzeng@swun.edu.cn

methanol-water containing 0.1% formic acid. Constituents of QG were identified by HRMS in the negative ion mode using both full scan and two-stage threshold-triggered mass modes. Eleven Q-Marker were docked by Autodock vina 1.1.2 software, using H₅N₁ avian influenza virus as the Neuraminidase receptor, and the active site of target protein were determined by the Auto Dock 1.5.6 program. **Results** A total of 39 compounds were identified, including 25 flavonoids, 6 phenylethanoid glycosides, 4 organic acids, 2 triterpenoids, and 2 lignan ingredients. Totally 15 components were specific and 32 chemical compositions were reported for the first time in QG by the method of UPLC-quadrupole-orbitrap MS. Baicalin, wogonoside, forsythoside A, liquiritin, forsythoside E, forsythoside B, isoliquiritin, baicalein, phillyrin, wogonin, and liquirtigenin could be used to establish the Q-Marker database. **Conclusion** To establish Q-Marker database for Chinese medicine QG and identify the compounds in QG by the method of UPLC-quadrupole-orbitrap MS.

Key words: Q-Marker; UPLC-quadrupole-orbitrap mass spectrometry; Qingreling Granules; database; baicalin; wogonoside; forsythoside A; liquiritin; forsythoside E; forsythoside B; isoliquiritin; baicalein; phillyrin; wogonin; liquirtigenin

清热灵颗粒 (Qingreling Granules, QG) 为药典收录的经典品种, 为清热解毒常用药, 该制剂由甘草、黄芩、连翘、大青叶 4 味中药组成, 具有清热解毒之功效, 常用于感冒发热、咽喉肿痛、热邪壅肺证。该制剂收载于《中国药典》2010、2015 年版第一部^[1-2], 目前清热灵颗粒的质量标准仅对黄芩苷做了 HPLC 定量限度及连翘苷薄层检测进行了要求。该制剂属于刘昌孝院士等^[3-4]提出的新概念——“中药质量标志物 (Q-Marker)” 控制中成药质量的代表制剂。经笔者检索, 目前仅有 HPLC 法同时测定 5 个成分 (黄芩苷、连翘苷、汉黄芩苷、黄芩素和汉黄芩素) 的报道^[5], 距离 Q-Marker 还有较大差距^[3]。在本课题组前期对单味中药的次生代谢快速鉴别的基础上^[6-7], 拟采用 UPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪联用技术, 负离子监测模式、采用全扫描, 建立一种可快速确认清热灵颗粒中多种化学成分的方法, 为建立该制剂的 Q-Marker 系统质控方法奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器与设备

UPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱, 赛默飞世尔科技公司, 美国; Ultimate 3000 超高效液相色谱系统, 美国 DIONEX 公司; ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 美国 Waters 公司; ESJ200-4 万分之一电子天平, 沈阳龙腾电子有限公司; BT25S 十万分之一电子天平, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司; KQ5200E 型超声波清洗器, 昆山超声仪器有限公司。

1.2 药品与试剂

清热灵颗粒购于正大青春宝药业, 批号为 1604109。甲醇为色谱纯 (美国默克公司), 色谱纯

甲酸 (美国 Sigma-Aldrich 公司), 均为 LC-MS 级; 水为纯净水, 美国 Milli-Q SP Regent Water System; 甲醇为分析纯, 质量分数 ≥99.5%。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

取装量差异下的清热灵颗粒, 研细, 取 0.3 g, 精密称定, 置于 25 mL 量瓶中, 精密加入 50% 甲醇适量, 25 °C, 超声处理 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 定容, 摇匀, 滤过, 即得。

2.2 色谱条件与质谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱条件为 0~2 min, 5% 甲醇; 2~10 min, 5%~20% 甲醇; 10~25 min, 20%~30% 甲醇; 25~35 min, 30% 甲醇; 35~40 min, 30%~80% 甲醇; 40~45 min, 80% 甲醇; 45~46 min, 80%~5% 甲醇; 46~50 min, 5% 甲醇; 体积流量为 0.3 mL/min; 进样室温度 10 °C; 柱温 35 °C; 进样量 2 μL。

2.2.2 质谱条件 离子源为 HESI 源, 负离子检测模式, 鞘气压力 206.84 kPa; 辅助气体积流量 8 L/min; 喷雾电压 2.00 kV; 离子传输管温度 320 °C; 辅助气温度 350 °C; 扫描模式: Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500, 扫描范围 *m/z* 80~1 200。MS/MS 模式时, 所用碰撞能为阶梯能量 30 eV 和 40 eV。

2.3 数据处理

使用 Xcalibur 3.0 软件 (赛默飞科技有限公司, 美国) 进行质谱数据处理, 通过高分辨率质谱信息推导其可能的分子式, 质谱偏差范围 $\delta \leq 5 \times 10^{-6}$ 。

使用已报道的数据分析方法^[6-8]构建清热灵颗粒的化学成分相关信息数据库, 结合化合物的一级、

二级质谱及裂解规律进行分析和鉴别。

2.4 与 H5N1 禽流感病毒神经氨酸酶的对接

神经氨酸酶是流感治疗药物的作用靶点之一，是分布于流感病毒被膜上的一种糖蛋白，故本实验选择其为对接蛋白^[9-10]。分子对接采用 Autodock vina 1.1.2 (<http://vina.scripps.edu/>) 软件，受体为 H5N1 禽流感病毒神经氨酸酶 (pdb ID:2HU0)，利用 AutoDock Tools 1.5.6 (<http://autodock.scripps.edu/>) 程序确定靶蛋白的活性口袋，以晶体结构中天然配体为中心的一定范围内的空间定义为活性口袋。活性口袋三维坐标为 $x: 1.830, y: 18.656, z: 108.293$ ，大小为 $x: 15, y: 15, z: 15$ ；小分子的三维结构通过 Avogadro 软件构建并进行能量优化，然后由 AutoDock Tools 1.5.6 处理生成对接所需的格式。DS Visualizer (<http://accelrys.com/>) 软件用于进行相互作用分析及作图。

3 结果与分析

为了更准确地检测清热灵颗粒中的成分，对样品处理、色谱条件以及质谱条件等进行了优化，并对样品进行分析，在基峰离子流图负离子模式下显示更为丰富的信息，故选择负离子模式分析，基峰离子流图见图 1。通过 UPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱分析，共鉴定了 39 个化学成分，包括黄酮类化合物 25 个，有机酸 4 个，苯乙醇苷类 6 个，三萜类化合物 2 个，木脂素类 2 个。被鉴定化合物的保留时间、相对分子质量、一级质谱以及二级质谱碎片离子见表 1。

1 号峰 (甘草苷)、2 号峰 (异甘草苷)、3 号峰 (甘草素)、4 号峰 (异甘草苷) 为甘草专属成分，10 号峰 (黄芩苷)、11 号峰 (汉黄芩苷)、12 号峰 (黄芩素)、13 号峰 (汉黄芩素) 为黄芩专属成分，20 号峰 (连翘苷)、28 号峰 (连翘酯苷 A)、29 号峰 (连翘酯苷 H)、30 号峰 (连翘酯苷 I)、31 号峰 (连翘酯苷 E)、32 号峰 (连翘酯苷 B) 为连翘专属成分。

3.1 成分鉴别

3.1.1 黄酮类 1 号峰化合物的鉴别

1 号峰为黄酮类化合物中的甘草苷，以甘草苷为例对其裂解途径进行探讨。

甘草苷主要的碎片离子为 m/z 255.065 03，为甘草苷脱去 1 分子糖 ($C_6H_{10}O_5$) 产生的碎片离子，同时其也是异甘草苷、甘草素、异甘草素的特征分子离子峰，甘草苷的 MS^2 的碎片离子主要为 m/z 135.007 48、119.048 07、91.017 56，其中碎片离子 m/z 135.007 48 和 m/z 119.048 07 为甘草苷 B 环 C_1-C_2 和 C_3-C_4 键断裂形成， m/z 91.017 56 (C_6H_3O) 为碎片离子 A 环侧链 C-O 键和 C-C 键断裂形成，故鉴定 1 号化合物为甘草苷。

10 号峰化合物黄芩苷的分子离子峰为 m/z 445.077 42，特征碎片离子为 $[M-C_6H_{10}O_6]$ m/z 269.045 47。

33 号峰化合物芦丁的分子离子峰为 m/z 609.147 09，特征碎片离子为 m/z 300.027 89，为准分子离子峰脱掉 2 分子糖后产生的，根据负离子模

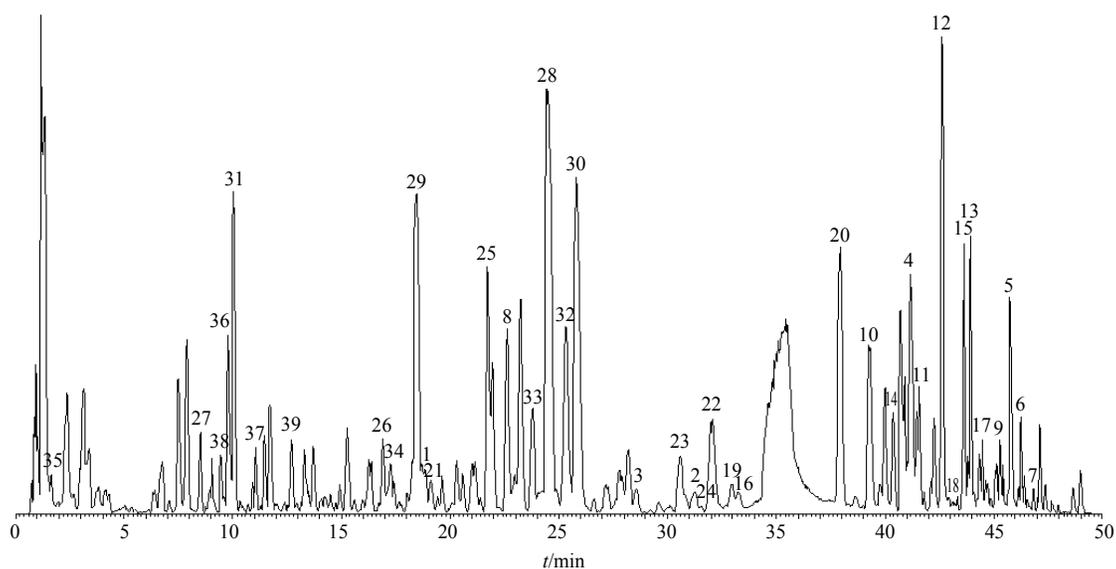


图 1 清热灵颗粒的总离子流图 (负离子模式, 峰号与表 1 中所标化合物序号一致)

Fig. 1 Total ion chromatogram of QG (negative ion mode, peak numbers were same as compound numbers in Table 1)

表 1 UPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱对清热灵颗粒中化学成分的鉴定分析

Table 1 Characterization of chemical constituents in QG by UHPLC-quadrupole-orbitrap MS

序号	出峰时间/min	分子式	偏差 ($\times 10^{-6}$)	相对分子质量		m/z		鉴定的成分
				理论值	实际值	一级质谱	二级质谱	
1	18.83	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	1.440	417.118 00	417.119 35	447.093 57	255.065 03, 135.007 48, 119.048 07, 91.017 56	甘草苷 ^[11]
2	31.17	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	1.441	417.118 00	417.780 06	417.780 06	255.066 33	异甘草苷
3	28.55	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	1.176	255.065 18	255.066 35	255.066 35	135.044 04, 119.049 05	甘草素
4	42.17	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	1.175	255.065 18	255.066 47	255.066 47	135.044 04	异甘草素
5	45.75	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	1.197	821.395 41	821.397 77	821.397 77	644.335 21, 351.217 80	18 β -甘草酸
6	46.23	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	1.187	821.395 41	821.397 83	821.397 83	645.350 77, 351.087 86	18 α -甘草酸
7	46.57	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	1.395	365.101 96	365.110 34	365.110 34	306.215 88, 295.191 74	甘草酚
8	22.61	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	1.087	431.097 27	431.097 27	431.097 27	341.066 93, 311.035 68, 299.019 68, 283.061 34, 117.927 45	牡荆苷
9	45.42	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	1.405	367.117 60	367.120 00	367.120 00	353.107 03, 309.207 52, 227.045 78	甘草香豆素
10	39.24	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	1.012	445.076 53	445.077 42	445.077 42	269.045 47, 102.841 04, 100.180 03, 71.820 03, 59.160 03, 51.310 03	黄芩苷
11	41.21	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	1.472	459.092 18	459.093 51	459.093 51	283.061 28, 268.037 90, 175.023 88	汉黄芩苷
12	42.61	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	1.330	269.092 18	269.093 87	269.093 87	251.092 93, 241.050 72, 197.117 52	黄芩素
13	43.94	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	1.450	283.060 09	283.061 34	283.061 34	268.038 09, 239.128 62	汉黄芩素 ^[12]
14	40.69	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	1.412	459.092 18	459.093 66	459.093 66	283.061 40, 269.237 24, 175.023 94	千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷
15	42.98	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	1.721	343.081 22	343.082 76	343.082 76	324.507 17, 299.308 99, 136.394 36, 123.565 03, 94.100 59	5,2-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮
16	33.55	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	1.196	285.030 00	285.040 56	285.040 56	267.030 03, 243.123 69	山柰酚
17	44.34	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	1.215	253.049 53	253.050 75	253.050 75	208.691 68, 118.027 53	白杨黄素
18	43.61	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	1.286	373.091 79	373.093 20	373.093 20	358.070 37, 243.046 45	黄芩新素-II
19	32.93	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	1.283	533.217 30	533.209 35	579.208 50	371.149 99	牛蒡子苷
20	37.94	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	1.763	533.217 30	533.209 98	579.208 98	533.203 86, 369.061 61	连翘苷
21	19.17	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	1.346	285.039 36	285.040 65	285.040 65	241.071 69, 218.030 61, 133.910 03, 65.569 62	木犀草素
22	32.04	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1.442	447.092 18	447.093 60	447.093 60	299.149 51	木犀草苷
23	30.58	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1.252	447.092 18	447.093 48	447.093 48	299.030 88, 271.061 37, 155.050 02, 151.038 91	槲皮苷
24	31.20	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	1.412	447.092 18	447.093 51	447.093 51	341.034 30, 269.045 81, 229.050 02	异荭草素
25	21.94	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	1.839	609.183 23	609.183 04	609.183 04	300.144 96, 287.056 27	橙皮苷
26	16.90	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	1.953	609.183 23	609.087 95	609.087 95	343.127 780, 325.083 7, 302.124 60	新橙皮苷
27	8.53	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	1.301	299.112 50	299.113 83	299.113 83	345.119 29, 299.113 83, 119.033 79	毛柳苷
28	24.23	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	1.313	623.197 04	623.198 67	623.198 67	477.140 01, 161.023 36	连翘酯苷 A
29	18.46	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	1.503	623.197 04	623.198 30	623.198 30	161.023 48	连翘酯苷 H
30	25.80	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	1.193	623.197 04	623.198 30	623.198 30	161.023 32	连翘酯苷 I
31	10.05	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	-0.403	463.181 00	463.180 60	463.180 60	317.122 80, 155.070 22	连翘酯苷 E
32	25.17	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	1.342	755.239 30	755.241 39	755.241 39	623.198 73, 161.023 30	连翘酯苷 B

续表 1

序号	出峰时间/min	分子式	偏差 ($\times 10^{-6}$)	相对分子质量		m/z		鉴定的成分
				理论值	实际值	一级质谱	二级质谱	
33	23.80	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	1.321	609.145 01	609.147 09	609.147 09	300.027 89, 270.330 57, 252.754 36, 243.077 39	芦丁
34	17.64	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	1.768	463.087 10	463.088 87	463.088 87	301.129 55, 271.061 46, 254.050 77	金丝桃苷
35	1.65	C ₄ H ₆ O ₄	-0.095	117.018 23	117.018 14	117.018 14	99.082 34	丁二酸
36	9.79	C ₉ H ₈ O ₄	0.205	179.033 88	179.034 09	179.034 09	135.044 34	咖啡酸
37	10.72	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1.581	353.086 70	353.090 00	353.090 00	319.093 81, 227.200 02, 191.019 08, 173.044 69, 154.973 13	绿原酸
38	9.68	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	1.641	353.086 70	353.088 35	353.088 35	230.087 74, 318.061 80	隐绿原酸
39	12.69	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	1.301	301.047 60	301.030 00	301.030 00	255.123 96, 274.072 81, 151.002 55, 106.440 02, 64.856 55	槲皮素

除连翘酯苷 E 外均为负离子模式

In addition to forsythiaside E were negative ion mode

式下精确相对分子质量和二级质谱碎片信息及与文献报道^[13]比较, 鉴定 33 号峰化合物为芦丁。

3.1.2 木脂素类 20 号峰化合物的鉴别 多数木脂素类化合物可得到分子离子峰。发生苯基裂解, 产生相应的碎片离子。木脂素苷可失去糖基, 20 号峰化合物在负离子模式下, 结合 1 分子甲酸, 得到 m/z 579.208 98 的分子离子峰, MS² 的主要碎片离子为 m/z 369.061 61, 即为准分子离子峰脱糖 (C₆H₁₀O₅)、甲酸形成的, 结合二级碎片信息以及文献报道^[14]比较, 鉴定 20 号峰化合物为连翘苷。

3.1.3 苯乙醇苷类 28 号峰化合物的鉴别 连翘酯苷 A、连翘酯苷 H、连翘酯苷 I 为连翘中最明显的同分异构体, 具有相似的裂解途径, 在负离子模式下三者均具有 m/z 623 的分子离子峰。28 号峰化合物的分子离子峰为 m/z 623.023 36, 正离子模式与负离子模式出峰时间相同, 该化合物在负离子模式下主要的碎片离子有 [M-C₆H₁₀O₄] m/z 477.140 01 和 [M-C₆H₁₀O₄-C₈H₉O₂-C₆H₉O₄-H₂O] m/z 161.023 36, 故鉴定该化合物为连翘酯苷 A。根据文献报道^[15]以及化合物极性, 可以鉴定出 29 号峰化合物为连翘酯苷 I, 可以鉴定出 30 号峰化合物为连翘酯苷 H。32 号峰化合物连翘酯苷 B 也有明显的分子离子峰 m/z 755.241 39, 主要的碎片离子有 [M-C₅H₉O₄] m/z 623.198 73、[M-C₅H₉O₄-C₆H₁₁O₄-C₈H₈O₂-C₆H₈O₆] m/z 161.023 30。31 号峰化合物连翘酯苷 E 在正离子模式下的分子离子峰为 m/z 463.180 60, 正负离子模式下, 出峰时间相同。

3.1.4 有机酸类 37 号峰化合物的鉴别 35、36、37、

38 号峰分别为丁二酸、咖啡酸、绿原酸^[16-17]、隐绿原酸。在负离子模式下, 37 号峰化合物的裂解方式为分子离子峰为 m/z 353.090 00, 六元环 3 位的酯键断裂后形成 m/z 191.019 08 的碎片离子峰, 继续脱去 1 分子 H₂O 形成 m/z 173.044 69 的碎片离子峰, 继续脱去 1 分子 H₂O 形成 m/z 154.973 13 的碎片离子峰。

3.1.5 三萜类 5 号峰化合物的鉴别 5、6 号峰分别 18 β -甘草酸、18 α -甘草酸, 通常情况下甘草酸指的是 18 β -甘草酸。在负离子模式下, 甘草酸的裂解方式为分子离子峰为 m/z 821.397 77, 主要的碎片离子有 [M-C₆H₉O₆-2H] m/z 644.335 21 和 [M-C₄₀H₄₂O₄-2H] m/z 351.217 80, 根据文献报道^[18]鉴定甘草酸先出峰。

3.2 与神经氨酸酶的对接结果

11 个专属性成分均与神经氨酸酶具有较好的亲和力, 其对接强弱顺序为汉黄芩苷 (化合物 11)、黄芩苷 (化合物 10)、连翘酯苷 A (化合物 28)、甘草苷 (化合物 1)、连翘酯苷 E (化合物 31)、连翘酯苷 B (化合物 32)、异甘草苷 (化合物 2)、黄芩素 (化合物 12)、连翘苷 (化合物 20)、汉黄芩素 (化合物 13) 和甘草素 (化合物 3)。图 2 展示了汉黄芩苷 (化合物 11)、连翘酯苷 A (化合物 28) 和甘草苷 (化合物 1) 这 3 种亲和力较强的专属性成分与神经氨酸酶的结合模式图。

4 讨论与展望

本实验通过建立清热灵颗粒成分数据库、检索公共数据库, 使用 UPLC-Q Exactive 四级杆-静电场

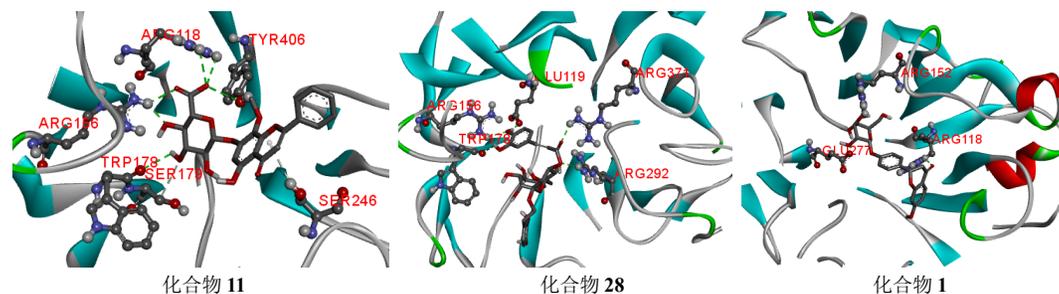


图 2 化合物 11、28 和 1 与神经氨酸酶的预测结合模式

Fig. 2 Predicted binding mode of compounds 11, 28, and 1 with neuraminidase

轨道阱联用方法,快速鉴定 39 种成分。在这 39 种化合物中包括黄酮类化合物 25 个,有机酸 4 个,苯乙醇苷类 6 个,三萜类化合物 2 个,木脂素类 2 个,其中除黄芩苷、连翘苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素和甘草酸有报道进行鉴别外,其他 32 个化学成分均为首次在清热灵颗粒中被鉴定出,其中能代表清热灵颗粒制剂的专属性成分共有 11 个。中药是多成分复杂体系,有活性成分、辅助成分、无效成分,还有专属性成分、普通成分^[3],同时受到品种、产地、栽培、采收加工、炮制、贮运影响;而中成药经过炮制加工,提取初级代谢产物,也有次级代谢产物,同样也有活性成分、辅助成分、无效成分、专属性成分和普通成分,在中成药生产过程中亦受到提取纯化、制剂成型、贮运等方面的影响;临床上使用中成药与人体代谢环境及各成分间交互作用^[3],在过去由于仪器分析技术和统计模型方法的制约,很少进行中药海量数据多元的追踪和分析,客观上导致中成药标准难以代表中成药质量^[3-5]。

现代研究表明,在该制剂中,甘草中的甘草苷、异甘草苷、异甘草素、甘草素等具有清热解毒、祛痰止咳作用^[19],异甘草苷可以透过细胞膜从而破坏细胞膜完整性起到抗真菌的效果^[20];异甘草素还具有增强免疫的活性^[21],可以抑制乳腺癌细胞的迁移;另外,甘草素能降低促炎性细胞因子的表达,在抗炎的同时还具有神经保护特性,在抗抑郁方面也表现出较好的活性^[22],同时研究表明甘草素的肠吸收及血脑屏障通透性好^[23],这也是“性-效-物”关联研究的体现。黄芩中的黄芩苷、汉黄芩苷、汉黄芩素、黄芩素具有抗炎作用^[24],黄芩苷、汉黄芩苷的肠道通透性也较好^[25],除此之外,汉黄芩苷还具有抑制肿瘤血管生成的作用^[26];汉黄芩素除抗炎外,还具抑制肿瘤细胞增殖的作用^[27];黄芩素还可以减少脑组织含水量、血脑屏障渗漏、神经细胞凋

亡、神经功能缺损,对脑出血模型大鼠血脑屏障的保护作用^[28]。连翘中的连翘苷、连翘酯苷 A、连翘酯苷 H、连翘酯苷 I、连翘酯苷 E、连翘酯苷 B 等^[29]及大青叶中绿原酸等均具有抗菌、抗病毒等相关活性^[30],其中连翘酯苷 A 通过抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、NO 和 PGE2 的产生来实现其抗炎作用^[31],连翘酯苷 A 在 P-gp 及 CYP3A 酶的底物的作用下产生的被动吸收,其在十二指肠、空肠、回肠、结肠段的吸收未发生明显变化^[32],也可说明该物质的“性-效-物”的关联关系;连翘酯苷 B 抗菌、抗炎作用还表现在可抑制肺炎克雷伯菌外排泵的活性,从而抗肺炎的作用^[33],这也是次级代谢产物发挥作用活性的体现。

根据清热灵颗粒功能主治、专属性成分的活性进行评价、活性成分的可测性和与 H5N1 禽流感病毒神经氨酸酶的对接结果,确定 11 个专属性成分可作为质量标志物,且选择顺序为汉黄芩苷(化合物 11)、黄芩苷(化合物 10)、连翘酯苷 A(化合物 28)、甘草苷(化合物 1)、连翘酯苷 E(化合物 31)、连翘酯苷 B(化合物 32)、异甘草苷(化合物 2)、黄芩素(化合物 12)、连翘苷(化合物 20)、汉黄芩素(化合物 13)和甘草素(化合物 3),供《中国药典》提高清热灵颗粒标准参考。

本课题组后续将继续清热灵颗粒剂“性-效-物”的研究,对分析出这 11 个 Q-Marker 进一步定量分析,通过清热灵作用相关典型靶标蛋白结合的活性虚筛和蛋白互作,结合代谢组学探讨清热灵质控方法^[3,5]。因此,对中药的复杂体系的快速确定,是 Q-Marker 研究的第一阶段,直接影响后续研究的可行性和可靠性。

近年来,中药分析研究使用了多种高分辨液质联用技术,如 UPLC-Q-TOF MS、UPLC-Q-TOF MS-NMR、UPLC-Q Exactive MS 技术等^[34-36],通过建

立模型专属化学成分库的方法可以快速确认成分。本实验在完成中药复杂体系的成分快速指认方面做出探索,为进一步进行清热灵颗粒 Q-Marker 的研究奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [4] 熊亮, 彭成. 基于中药质量标志物 (Q-Marker) 的基本条件研究益母草和赶黄草的 Q-Marker [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2212-2220.
- [5] 张铁军, 许浚, 申秀萍, 等. 基于中药质量标志物 (Q-Marker) 的元胡止痛滴丸的“性-效-物”三元关系和作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2199-2211.
- [6] 徐金钟, 邢丽红, 王书芳, 等. HPLC-UV 定量分析清热灵颗粒中的 5 个成分 [J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(2): 147-149.
- [7] Li J H, Kuang G, Chen X H, *et al.* Identification of chemical composition of leaves and flowers from *Paeonia rockii* by UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS [J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 947-952.
- [8] 董红娇, 陈晓虎, 曾锐. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨液质联用快速分析民族药小大黄的化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(14): 2428-2435.
- [9] Muthuri S G, Venkatesan S, Myles P R, *et al.* Effectiveness of neuraminidase inhibitors in reducing mortality in patients admitted to hospital with influenza A H1N1pdm09 virus infection: a meta-analysis of individual participant data [J]. *Lancet Respir Med*, 2014, 2(5): 395-404.
- [10] 池絮影, 傅咏梅, 崔曰新, 等. 板蓝根化学成分与抗流感病毒神经氨酸酶活性相关性的探讨 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 3982-3989.
- [11] Liu G, Qiao S, Liu T, *et al.* Simultaneous determination of 18 chemical constituents in traditional Chinese medicine of antitussive by UPLC-MS-MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016: 1540-1552.
- [12] Fong S Y K, Yin C W, Zhong Z. Development of a SPE-LC/MS/MS method for simultaneous quantification of baicalein, wogonin, oroxylin A and their glucuronides baicalin, wogonoside and oroxyloside in rats and its application to brain uptake and plasma pharmacokinetic studies [J]. *J Pharmaceutical Biomed*, 2014, 97: 9-23.
- [13] 罗玲, 黄玉娟, 黄琴, 等. UPLC-MS-MS 同时测定双黄连粉针中 7 种活性成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(13): 80-84.
- [14] 张晨曦, 刘素香, 赵艳敏, 等. 基于液质联用技术的连翘化学成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2053-2060.
- [15] 季宇彬, 姜薇, 范玉玲, 等. 甘草黄酮的研究进展 [J]. 中草药, 2004, 35(9): 附 5-附 6.
- [16] 罗彬, 张进忠. 连翘提取物化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 143-146.
- [17] 王福男. 中药连翘的化学成分研究 [D]. 北京: 中国协和医科大学, 2009.
- [18] 白洁, 王冬梅, 杨得坡. 长萼小连翘醇提物中黄酮类与金丝桃素类成分的 HPLC/DAD-MS 联用分析 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(2): 185-187.
- [19] 丁楠, 高晓黎. 18 α -甘草酸和 18 β -甘草酸差向异构体的比较研究概况 [J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(13): 1312-1315.
- [20] Luo J, Li Z, Wang J, *et al.* Antifungal activity of isoliquiritin and its inhibitory effect against *Peronophythora litchi* Chen through a membrane damage mechanism [J]. *Molecules*, 2016, 21(2): 237-248.
- [21] Wang K L, Hsia S M, Chan C J, *et al.* Inhibitory effects of isoliquiritigenin on the migration and invasion of human breast cancer cells [J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2013, 17(4): 337-349.
- [22] Su Q, Tao W, Huang H, *et al.* Protective effect of liquiritigenin on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration [J]. *Psychiat Res*, 2016, 240: 131-136.
- [23] 吕鹏, 卞广兴, 温利青, 等. 甘草素在体肠吸收及体外血脑屏障通透性研究 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(8): 661-666.
- [24] Cai W, Fu Y, Zhang W, *et al.* Synergistic effects of baicalein with cefotaxime against *Klebsiella pneumoniae*, through inhibiting CTX-M-1 gene expression [J]. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 181-190.
- [25] Cai Y, Li S, Li T, *et al.* Oral pharmacokinetics of baicalin, wogonoside, oroxylin A 7-O- β -d-glucuronide and their aglycones from an aqueous extract of *Scutellariae Radix* in the rat [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1026: 124-133.
- [26] Huang Y, Zhao K, Hu Y, *et al.* Wogonoside inhibits angiogenesis in breast cancer via suppressing Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Mol Carcinogen*, 2015, 55(11): 1598-1612.
- [27] Yang L, Wang Q, Li D, *et al.* Wogonin enhances antitumor activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo* through ROS-mediated downregulation of cFLIPL and IAP proteins [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(5): 618-626.
- [28] Chen M, Lai L F, Li X F, *et al.* Baicalein attenuates

- neurological deficits and preserves blood-brain barrier integrity in a rat model of intracerebral hemorrhage [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(11): 3095-3102.
- [29] Su W, Xu H, Huang H. Effects of the extract of *Forsythia suspensa* on influenza A H1N1 infection *in vitro* [J]. *J Med Plants Res*, 2010, 4(14): 1468-1471.
- [30] Nakamura N, Hayasaka S, Zhang X Y, *et al.* Effects of baicalin, baicalein, and wogonin on interleukin-6 and interleukin-8 expression, and nuclear factor-kappaB binding activities induced by interleukin-1beta in human retinal pigment epithelial cell line [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 77(2):195-202.
- [31] Wang Y, Zhao H, Lin C, *et al.* Forsythiaside a exhibits anti-inflammatory effects in LPS-stimulated BV2 microglia cells through activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(4): 1-7.
- [32] 周 伟, 狄留庆, 毕肖林, 等. 在体肠循环法研究连翘酯苷 A 的肠吸收机制 [J]. *药学学报*, 2010, 45(11): 1373-1378.
- [33] 钟海琴, 张 顺, 蔡 挺. 连翘酯苷 B 对肺炎克雷伯菌外排泵活性的影响 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2013, 32(4): 303-306.
- [34] 谭乐俊, 王 萌, 任晓亮, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 的中药水蜜丸制剂二至丸多成分稳定性研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(13): 2260-2268.
- [35] Zhang H B, Zhang T J, Xu J, *et al.* Rapid analysis and identification of absorbed components and their metabolites of Yuanhu Zhitong Dropping Pill in rat plasma and brain tissue using UPLC-Q-TOF/MS with multivariate statistical analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(2): 154-163.
- [36] 丁晓萍, 费毅琴, 肖 凌, 等. 珍珠明目滴眼液及珍珠液中蛋白多肽类成分的分析 [J]. *中草药*, 2016, 47(6): 911-916.