

基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱的葛根芩连汤的化学成分分析

王婷婷, 安 骞*, 梁 琨, 纪万里, 徐艳文, 陆 杰, 尤丽莎, 王新宏

上海中医药大学, 上海 201203

摘要: 目的 基于超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 的分析方法鉴定葛根芩连汤中化学成分。方法 采用色谱柱 Dikma Endeavorsil C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水 (A)-乙腈 (B), 体积流量 0.3 mL/min, 梯度洗脱。质谱采用 ESI 源, 正负离子模式分别采集一级、二级质谱数据。结果 通过对照品指认、软件预测分析, 结合文献报道, 从葛根芩连汤中鉴定出 67 个化合物, 包括黄酮类 36 个、生物碱类 12 个、三萜类及三萜皂苷类 4 个及其他 15 个。结论 利用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 系统阐明葛根芩连汤中化学成分, 并初步归纳其各类主要化学成分的质谱裂解特点, 为葛根芩连汤的质量控制和作用机制研究提供了参考依据。

关键词: 葛根芩连汤; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS; 化学成分; 碎片离子; 黄酮类; 生物碱类; 三萜类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)06-1498-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.017

Chemical constituent analysis of Gegen Qinlian Decoction based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS

WANG Ting-ting, AN Rui, LIANG Kun, JI Wan-li, XU Yan-wen, LU Jie, YOU Li-sha, WANG Xin-hong

Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective Identification of chemical constituents from Gegen Qinlian Decoction by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS. **Methods** The analysis was performed on Dikma Endeavorsil C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) with mobile phase of 0.1% formic acid water solution (A)-acetonitrile (B) for gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min. The UPLC-LTQ-Orbitrap-MS was equipped with an Electrospray ionization ion probe and MS¹ and MS² data of samples were collected in positive and negative ion mode, respectively. **Results** A total of 67 constituents were identified from Gegen Qinlian Decoction by reference substance identification, software prediction analysis and related literature reports, including 36 flavonoids, 12 alkaloids, four triterpenoids and triterpenoid saponins, and 15 other ingredients. **Conclusion** In this study, UPLC-LTQ-Orbitrap-MS was used to systematically elucidate the chemical constituents of Gegen Qinlian Decoction, and the fragmentation characteristics of its main chemical constituents were preliminarily explained and summarized, which provided a reference for the quality control and mechanism research of Gegen Qinlian Decoction.

Key words: Gegen Qinlian Decoction; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS; chemical constituents; fragment ions; flavonoids; alkaloids; triterpenoids

葛根芩连汤由葛根、黄芩、黄连和炙甘草 4 味中药组成, 是医圣张仲景的名方之一^[1], 有解表清里、升清止利的功效, 临床上广泛用于治疗急性、慢性肠道炎症, 细菌性痢疾, 病毒性腹泻等, 疗效显著^[2-4]。急性肠炎是一种由细菌、病毒等引起的急性肠道炎性损伤性疾病^[5], 目前发现环境、遗传、微生物感染和免疫系统失调等因素与其发生发展密切相关^[6]。虽然葛根芩连汤治疗急性肠炎的临床报道较多, 但是对其药效物质基础却缺乏系统性的研

究。复方中药药效物质基础研究一直是中药现代化研究的热点, 而对复方中药进行化学成分研究是从本质上阐明复方作用物质基础的重要前提, 由于复方中药成分复杂、类别多样等特点, 为其成分分离及鉴定带来一定的难度。超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱组合式高分辨质谱 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 是基于 LTQ 的多级质谱功能及 Orbitrap 高分辨能力的一种分析方法^[7-8], 具有高灵敏度、高分辨率和精确相对质量测定等优点, 尤其

收稿日期: 2019-10-11

基金项目: 上海市科技创新行动计划自然科学基金 (19ZR1451900)

作者简介: 王婷婷 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物分析。

*通信作者 安 骞, 女, 副教授, 研究方向为药物分析与体内过程研究。Tel: (021)51322183 E-mail: anruimw@126.com

适用于缺乏对照品的中药复杂体系定性鉴定及新化合物发掘。

本研究首次采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术建立了葛根芩连汤中化学成分定性分析的方法,根据所获得分子碎片峰、精确相对分子质量、色谱峰的保留时间等色谱信息,建立整体和类群化学成分快速筛选鉴定方法,并结合对照品比对分析和相关文献报道,快速分析鉴定未知成分,并对各成分进行药材归属。结果发现葛根芩连汤中主要的成分为黄酮类、生物碱类及皂苷类成分,其中黄酮类成分来源于葛根、黄芩和炙甘草,生物碱类成分均来源于黄连,皂苷类成分均来源于炙甘草。

通过研究从葛根芩连汤中推测和鉴定了 67 个成分,包括黄酮类 36 个、生物碱类 12 个、三萜类及三萜皂苷类 4 个及其他 15 个,并对各类化合物的裂解规律进行了分析和归纳。以研究所得实测数据为基础,后期将进行网络药理学分析及筛选有效成分。这较之目前网络药理学研究大多基于已有数据库中的中药化学成分进行靶点预测及功能分析的方法所得结果更加真实、可靠,对葛根芩连汤质量标志物的筛选、药效物质和质量控制研究及确保临床应用安全有效等具有重要意义。

1 材料

1.1 仪器与软件

Ultimate 3000 超高效液相色谱仪与 LTQ-Orbitrap 质谱仪(美国 Thermo 公司),配有 Xcalibur 2.1 工作站(美国 Thermo-fisher 公司); Milli-Q 超纯水机(Millipore 公司); XS105 型电子天平(瑞士 Metler Toledo 公司); Mass Frontier 7.0 裂解分析软件(美国 Thermo 公司)。

1.2 试剂与药材

HPLC 级乙腈、HPLC 级甲醇(Dikma Technologies Inc.); AR 级乙醇(国药集团有限公司); HPLC 级甲酸(美国 Thermo-fisher 公司); 葛根(批号 190225)、黄芩(批号 190222)、黄连(批号 190124)和炙甘草(批号 190307)均购自上海康桥药业有限公司,上述药材均经上海虹桥饮片厂陈燕军主管药师鉴定,分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根,唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎以及豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。对照品均购自上海源叶生物科技有限公

司,质量分数经 HPLC 检测均 $\geq 98\%$,葛根素(批号 T19M7F11461)、大豆苷(批号 Y18J8H40159)、甘草苷(批号 Z10J8X39611)、黄连碱(批号 P05M9F55053)、表小檗碱(批号 W06M8Z30708)、药根碱(批号 Z11M8S35794)、小檗碱(批号 Y18N8S48598)、盐酸巴马汀(批号 Z12J7X15968)、异甘草苷(批号 R07D8F50056)、甘草素(批号 Z20J8X40265)、黄芩苷(批号 P16S8F44143)、汉黄芩苷(批号 P09J8F28328374)、黄芩素(批号 C20M8Y31962)、甘草酸(批号 P11A9F58301)、汉黄芩素(批号 C19A8Q34235)、异甘草素(批号 C03A8Q41092)、千层纸素 A(批号 Y29D6Y17716)。

2 方法

2.1 葛根芩连汤化学成分数据库的构建

中药复方被视作一个复杂体系,其中往往含有上百种成分,本研究在检索传统中药数据库 TCMS^[9] (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform)、TCMDatabase@Taiwan^[10] 及 TCMID (traditional Chinese medicine integrative database)^[11] 等收集相关的活性化合物的基础上,结合国内外文献报道,构建葛根芩连汤化学结构数据库。

2.2 葛根芩连汤供试品和对照品溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 按处方比例葛根-黄芩-黄连-炙甘草(5:3:3:2)称取药材适量^[12],加 8 倍量蒸馏水,葛根先煎 20 min,余药共煎 30 min,滤过;再加 8 倍量蒸馏水,煎煮 30 min,滤过,合并 2 次的滤液,浓缩至相当于原生药量 1 g/mL 的浓煎液,取浓煎液 2 mL 至 10 mL 量瓶中,用无水乙醇定容。混匀,放置过夜,取上清液过 0.22 μm 的微孔滤膜,作为供试品溶液备用。

2.2.2 对照品溶液的制备 取对照品葛根素、小檗碱、千层纸素 A、甘草素、甘草苷、甘草酸、盐酸巴马汀、黄芩苷和汉黄芩苷适量,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液 1;取对照品大豆苷、表小檗碱、汉黄芩素、异甘草素、异甘草苷、药根碱、黄连碱和黄芩素,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液 2,进样前用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,2 个混合对照品溶液分别进样分析。

2.3 色谱及质谱条件

2.3.1 色谱条件 Dikma Endeavorsil C₁₈ (100 mm $\times$

2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B), 体积流量 0.3 mL/min, 梯度洗脱: 0~0.5 min, 5% B; 0.5~1.5 min, 5%~10% B; 1.5~3 min, 10%~14% B; 3~4.5 min, 14% B; 4.5~8 min, 14%~16.5% B; 8~10 min, 16.5%~18.5% B; 10~13 min, 18.5%~24% B; 13~15.5 min, 24%~50% B; 15.5~17.5 min, 50%~100% B; 17.5~20 min, 100% B; 20~22.5 min, 100%~5% B; 22.5~24 min, 5% B。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI), 正、负离子分别检测模式, 毛细管喷雾电压 3.21 kV, 毛细管温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 离子源温度为 300 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气体积流量 35 arb, 辅助气体流量 15 arb。样品一级质谱采用 FT 全扫描模式, 分辨率 R 为 60 000, 采集范围 m/z 50~1 000, 二级质谱采用依赖性扫描模式 (Data dependent scan, DDS), 分辨率 R 为 15 000。碰撞解离方式为碰撞诱导解离 (collision induced dissociation, CID), 通过离子阱检测得到碎片离子信息。

3 结果与分析

3.1 葛根芩连汤化学成分数据库的构建

通过 3 大化学成分数据库检索及国内外文献报道, 共总结归纳得到 457 个化合物, 并记录化合物信息, 包括化合物中英文名称、分子式和精确相对分子质量及化合物结构式, 其中葛根 53 个、黄芩 126 个、黄连 50 个、甘草 228 个。

3.2 色谱峰的鉴定

在上述色谱和质谱条件下, 应用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 对葛根芩连汤中化学成分进行定性分析, 葛根芩连汤的正、负离子模式的总离子流图见图 1。化合物的鉴定分以下 2 方面: (1) 根据相关对照品保留时间和裂解规律比对; (2) 检索构建的葛根芩连汤数据库内信息, 根据精确相对分子质量, 利用 Xcalibur 2.1 工作站计算未知化合物可能的元素组成和可能的分子式 (误差范围 $\pm 1.0 \times 10^{-5}$)。最后结合 Mass frontier 7.0 软件和相关文献报道数据, 分析推导相关化合物的裂解规律。从葛根芩连汤快速鉴定出 67 个化合物, 包括 36 个黄酮类成分、12 个生物碱类、4 个三萜类及三萜皂苷类成分、15 个其他成分。结果见表 1。

3.3 各类化合物的分析鉴定

3.3.1 黄酮类化合物 黄酮类化合物是葛根芩连汤中最主要的一类化合物, 本研究基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱共鉴定了 36 个黄酮类化合物。

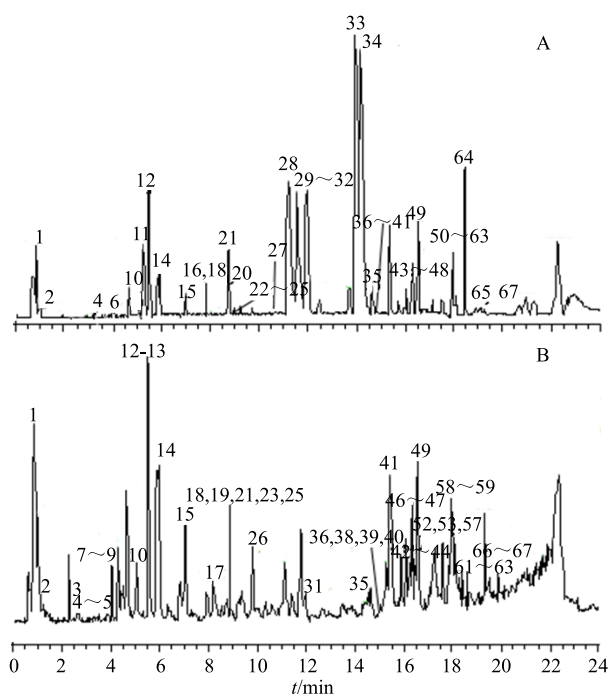


图 1 葛根芩连汤的 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of UPLC-LTQ-Orbitrap-MS of Gegen Qinlian Decoction in positive mode (A) and negative mode (B)

12 号峰在正离子模式下, 准分子离子峰为 m/z 417.12 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 在负离子模式下检测到 m/z 415.10 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 利用软件 Xcalibur 2.1 分析其元素组成并推导其可能的分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$, 且与对照品葛根素的裂解碎片信息一致 (图 2) [13], 故鉴定其为葛根素。葛根素在正离子模式下, 分别失去 1 分子 H_2O 、2 分子 H_2O 得到碎片离子 m/z 399 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 、 m/z 381.1 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O} \times 2]^+$, 再进一步丢失 $-\text{CH}_2\text{O}$, 得到 m/z 351.09 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O} \times 2 - \text{CH}_2\text{O}]^+$, 其可能的裂解规律见图 3。

15 号峰在正、负离子检测模式下的 m/z 分别为 417.12 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、415.10 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 元素分析推测可能的分子式 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$, 且与对照品大豆苷的保留时间和裂解规律相同 [14], 故 15 号峰鉴定为大豆苷。在正离子模式下, 大豆苷丢失 1 分子葡萄糖糖基, 生成 m/z 255.06 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}]^+$ 的碎片离子, 其裂解规律见图 4。

在正离子模式下, 47 号峰可得到母离子 m/z 285.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 负离子模式下, 分子离子峰为 283.06 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 软件预测可能的分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ 。正离子模式下的碎片离子有 m/z 270.05

表1 葛根芩连汤中化学成分解析结果

Table 1 Analysis of chemical constituents in Gegen Qilian Decoction

峰号	t_R/min	分子式	偏差 ($\times 10^{-6}$)	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	二级碎片离子	化合物	来源	
1	0.86	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	-1.333	365.105 43	365.104 10	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	蔗糖	葛根	
2	0.93	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3$	-4.128	159.051 26	159.050 61	$[\text{M}+\text{H}]^+$	尿囊素	葛根	
3	2.61	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_9$	1.592	315.071 05	315.071 56	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$109.03 [\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{Glucose}]^-$, $108.02 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}_7]^-$	3-羧基-4-羟基苯氧葡萄糖苷	黄连
4	3.57	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	-2.848	205.097 15	205.096 57	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$188.07 [\text{M}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$	L-色氨酸	葛根
5	3.71	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	0.854	353.086 70	353.087 01	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$191.06 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]^-$, $179.04 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$, $161.02 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{10}\text{O}_5-\text{H}_2\text{O}]^-$	绿原酸	黄连
6	3.84	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	-1.377	595.165 74	595.164 37	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$577.16 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $433.11 [\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}]^+$	新西兰牡荆苷 II	甘草
7	4.48	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	-0.323	623.160 66	623.160 46	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$415.07 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_7]^-$	水仙苷	甘草
8	4.55	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	0.979	431.154 78	431.155 21	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$191.06 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_5]^-$, $179.06 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_8]^-$	darendoside A	黄芩
9	4.59	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_8$	2.442	285.060 49	285.061 19	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$153.02 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4]^-$	乌拉尔新苷	甘草
10	5.01	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	-1.622	565.155 18	565.153 56	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$433.11 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4]^+$, $415.10 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$	夏佛托苷	甘草
11	5.21	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4$	-2.673	342.169 98	342.169 07	$[\text{M}]^+$	$297.11 [\text{M}-\text{C}_2\text{H}_7\text{N}]^+$, $265.09 [\text{M}-\text{C}_2\text{H}_7\text{N}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$	木兰碱	黄连
12	5.45	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	-2.250	417.118 01	417.117 07	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$399.11 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $381.10 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}\times 2]^+$, $351.09 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}\times 2-\text{CH}_2\text{O}]^+$	葛根素*	葛根
13	5.48	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$	0.057	475.181 00	475.181 03	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$439.00 [\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}\times 2]^-$, $415.10 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^-$, $379.00 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}\times 2]^-$	darendroside B	黄芩
14	5.88	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	-4.301	447.128 57	447.126 60	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$429.12 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $411.11 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}\times 2]^+$, $393.10 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}\times 3]^+$	3'-甲氧基葛根素	葛根
15	6.94	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	-2.562	417.118 01	417.116 94	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$255.06 [\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}]^+$	大豆苷*	葛根
16	7.95	$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$	-2.162	208.096 81	208.096 37	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$165.09 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}]^+$, $150.07 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$	唐松草林碱	黄连
17	8.26	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$	3.693	207.065 18	207.065 95	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$192.04 [\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$, $148.05 [\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{CH}_3]^-$	反式-3,4-二甲氧基肉桂酸	黄连
18	8.32	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	-2.109	303.049 92	303.049 29	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$257.04 [\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}_2]^+$, $229.05 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_3]^+$	槲皮素	甘草
19	8.54	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$	0.457	361.164 56	361.164 73	$[\text{M}-\text{H}]^-$	$346.14 [\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$, $331.15 [\text{M}-\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^-$	开环异落叶松脂醇	黄连
20	8.66	$\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NO}_4$	-2.249	322.107 38	322.106 66	$[\text{M}]^+$	$294.10 [\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$	小檗红碱	黄连
21	8.70	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	-2.718	461.144 22	461.142 97	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$358.00 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_7\text{O}_3]^+$, $299.09 [\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}]^+$	8-甲氧基芒柄花苷	葛根
22	8.92	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_3$	-2.602	192.065 51	192.065 02	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$149.06 [\text{M}+\text{H}-\text{CHNO}]^+$, $133.06 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}]^+$	降氧化北美黄连次碱	黄连
23	9.12	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	-2.588	257.080 83	257.080 17	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$239.07 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $137.02 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}]^+$	甘草素*	甘草

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	偏差 ($\times 10^{-6}$)	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	二级碎片离子	化合物	来源
24	9.16	$\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{NO}_5$	-2.156	352.117 94	352.117 19 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$337.09 [\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, $308.09 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^+$	8- <i>O</i> -小檗碱	黄连
25	9.18	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	-2.841	441.115 60	441.114 35 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	$321.04 [\text{M}+\text{Na}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4]^+$	甘草苷*	甘草
26	9.79	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$	0.905	521.201 73	521.202 21 $[\text{M}-\text{H}]^-$	$329.14 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6]^-$	(+)-l-ariciresinol gluciside	黄连
27	10.78	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_5$	5.799	405.169 65	405.172 00 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$377.00 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$, $359.00 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_3\text{H}_{10}]^+$	葛根香豆素	葛根
28	11.11	$\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{NO}_4$	-3.325	320.091 73	320.090 67 $[\text{M}]^+$	$292.10 [\text{M}-\text{CO}]^+$, $290.08 [\text{M}-\text{CH}_2\text{O}]^+$	黄连碱*	黄连
29	11.48	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_4$	-2.468	338.138 68	338.137 85 $[\text{M}]^+$	$323.12 [\text{M}-\text{CH}_3]^+$, $294.11 [\text{M}-\text{CH}_3-\text{H}-\text{CO}]^+$	非洲防己碱	黄连
30	11.49	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4$	-1.947	336.123 03	336.122 38 $[\text{M}]^+$	$320.09 [\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^+$, $308.13 [\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$	表小檗碱*	黄连
31	11.87	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$	-2.517	563.175 91	563.174 50 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$431.13 [\text{M}+\text{H}-\text{furanose}]^+$, $413.12 [\text{M}+\text{H}-\text{furanose}-\text{H}_2\text{O}]^+$	黄甘草苷	甘草
32	11.88	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_4$	-2.734	338.138 68	338.137 76 $[\text{M}]^+$	$323.12 [\text{M}-\text{CH}_3]^+$, $294.11 [\text{M}-\text{CH}_3-\text{H}-\text{CO}]^+$	药根碱*	黄连
33	13.96	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_4$	-7.124	336.123 03	336.120 64 $[\text{M}]^+$	$321.10 [\text{M}-\text{CH}_3]^+$, $320.09 [\text{M}-\text{CH}_3-\text{H}]^+$, $292.10 [\text{M}-\text{CH}_3-\text{HCO}]^+$	小檗碱*	黄连
34	14.13	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_4$	-5.835	352.154 33	352.152 28 $[\text{M}]^+$	$337.13 [\text{M}-\text{CH}_3]^+$, $336.12 [\text{M}-\text{CH}_3-\text{H}]^+$, $308.13 [\text{M}-\text{CH}_3-\text{HCO}]^+$	巴马汀*	黄连
35	14.37	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_8$	-2.460	347.076 14	347.075 29 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$332.05 [\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, $314.04 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3]^+$	5,7,2',5'-四羟基-8,6'-二甲氧基黄酮	黄芩
36	15.01	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	-2.741	419.133 66	419.132 51 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$257.08 [\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}]^+$	异甘草苷*	甘草
37	15.11	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9$	-2.734	431.133 65	431.132 48 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$269.08 [\text{M}+\text{H}-\text{Glucose}]^+$	芒柄花苷	葛根
38	15.20	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	-2.648	255.065 18	255.064 51 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$237.05 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $227.07 [\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$, $199.08 [\text{M}+\text{H}-\text{CO}\times 2]^+$	大豆苷元	葛根
39	15.27	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	-2.398	271.060 09	271.059 45 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$253.05 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $243.05 [\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$	7,8,4'-三羟基异黄酮	葛根
40	15.33	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	-4.491	447.092 18	447.090 18 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$271.06 [\text{M}+\text{H}-\text{Glucuronide acid}]^+$	黄芩苷*	黄芩
41	15.34	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_5$	-2.899	269.044 44	269.043 67 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$241.05 [\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$	考迈斯托醇	葛根
42	15.75	$\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_{15}$	-1.147	651.228 34	651.227 60 $[\text{M}-\text{H}]^-$	$487.16 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5]^-$, $475.18 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3]^-$, $457.17 [\text{M}-\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4]^-$	马蒂苷	黄芩
43	15.79	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	-3.039	273.075 75	273.074 92 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$131.05 [\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4]^+$	柚皮素	甘草
44	15.84	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	-3.714	449.107 83	449.106 10 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$273.08 [\text{M}+\text{H}-\text{Glucuronide acid}]^+$	二氢黄芩苷	黄芩
45	15.86	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$	-3.544	289.070 66	289.069 64 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$271.06 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	红花定	黄芩
46	16.18	$\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_6$	-0.875	299.055 01	299.054 14 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$271.06 [\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$	光甘草轮	甘草
47	16.37	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	-2.806	285.075 75	285.074 95 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$270.05 [\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, $267.08 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $257.04 [\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$	3'-甲氧基大豆苷元	葛根
48	16.41	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	-3.005	301.070 66	301.069 76 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$286.05 [\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, $283.06 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $245.08 [\text{M}+\text{H}-\text{CO}\times 2]^+$	韧黄芩素 II	黄芩
49	16.49	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	-2.099	461.107 83	461.106 87 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$285.08 [\text{M}+\text{H}-\text{Glucuronide acid}]^+$	汉黄芩苷*	黄芩
50	16.60	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$	-4.204	315.086 31	315.084 99 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$300.06 [\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, $285.04 [\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^+$	黄芩黄酮 I	黄芩
51	16.92	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_4$	-2.464	469.331 23	469.330 08 $[\text{M}+\text{H}]^+$	$451.32 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $433.31 [\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}\times 2]^+$, $423.32 [\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}_2]^+$	异甘草内酯及其异构体	甘草

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	偏差 ($\times 10^{-6}$)	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	二级碎片离子	化合物	来源
52	17.28	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	-2.287	271.060 09	271.059 48 $[\text{M}+\text{H}]^+$	253.05 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, 243.05 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$	黄芩素*	黄芩
53	17.35	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{17}$	-0.985	839.405 97	839.405 15 $[\text{M}+\text{H}]^+$	645.36 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{Glucuronide acid}]^+$, 487.34 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucuronide acid}\times 2]^+$, 469.33 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucuronide acid}\times 2-\text{H}_2\text{O}]^+$	甘草皂苷 G2	甘草
54	17.49	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	-2.138	269.080 83	269.080 26 $[\text{M}+\text{H}]^+$	254.06 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 241.05 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$, 237.05 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^+$, 213.09 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}\times 2]^+$	芒柄花素	葛根
55	17.53	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$	-1.766	471.346 88	471.345 12 $[\text{M}+\text{H}]^+$	425.34 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$, 407.33 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}\times 2-\text{CO}]^+$, 317.12 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2]^+$	甘草次酸	甘草
56	17.56	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$	-2.286	823.411 06	823.409 18 $[\text{M}+\text{H}]^+$	647.38 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucuronide acid}]^+$, 471.35 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucuronide acid}\times 2]^+$, 453.33 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucuronide acid}\times 2-\text{H}_2\text{O}]^+$	甘草酸*	甘草
57	17.84	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$	-2.432	345.096 87	345.096 04 $[\text{M}+\text{H}]^+$	330.07 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 315.05 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^+$, 312.06 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$	韧黄芩素 I	黄芩
58	17.93	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	-1.824	285.075 75	285.075 23 $[\text{M}+\text{H}]^+$	270.05 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$	汉黄芩素*	黄芩
59	17.96	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$	-2.490	375.107 44	375.106 51 $[\text{M}+\text{H}]^+$	360.08 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$, 345.08 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^+$, 342.07 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{H}_2\text{O}]^+$, 327.05 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{O}]^+$	黄芩黄酮 II	黄芩
60	18.03	$\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{NO}_5$	-2.608	358.068 59	358.067 66 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	302.07 $[\text{M}+\text{Na}-\text{CO}-\text{C}_2\text{H}_4]^+$	8-氧化黄连碱	黄连
61	18.10	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$	-3.205	287.091 40	287.090 48 $[\text{M}+\text{H}]^+$	271.10 $[\text{M}+\text{H}-\text{O}]^+$, 183.03 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_8]^+$	二氢千层纸素 A	黄芩
62	18.13	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	-1.929	285.075 75	285.075 20 $[\text{M}+\text{H}]^+$	270.05 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$	千层纸素 A*	黄芩
63	18.34	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$	-1.005	367.117 61	367.116 61 $[\text{M}+\text{H}]^+$	339.12 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$, 311.05 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8]^+$, 283.06 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_5\text{H}_8\text{O}]^+$	甘草醇	甘草
64	18.40	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_6$	-4.005	437.195 86	437.191 86 $[\text{M}+\text{H}]^+$	407.19 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_2\text{O}]^+$	kanzonols K 及其异构体	甘草
65	18.77	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_5$	-1.130	371.185 30	371.184 17 $[\text{M}+\text{H}]^+$	315.12 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8]^+$, 303.12 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_5\text{H}_8]^+$, 235.13 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2]^+$	glyasperins D	甘草
66	18.81	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_6$	0.680	419.148 91	419.149 20 $[\text{M}-\text{H}]^-$	391.16 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}]^-$	甘草宁 H 及其异构体	甘草
67	18.82	$\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_6$	-1.385	423.180 21	423.178 83 $[\text{M}+\text{H}]^+$	367.12 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8]^+$	glyasperins A	甘草

*该化合物是由对照品进行指认

*This compound was identified using reference standards

$[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$ 、267.08 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 、257.04 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}]^+$ 。根据其裂解规律结合文献报道^[15], 确定 47 号峰为 3'-甲氧基大豆苷元。

40 号峰在正离子模式下, 可观察到准分子离子峰 m/z 447.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 和加钠峰 469.07 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 在负离子模式下, 可观测到分子离子峰 m/z 445.08 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 综合元素分析结果确定分子式为

$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$, 同时其与对照品黄芩苷的保留时间和裂解碎片相同, 故确定其为黄芩苷。黄芩苷是由黄芩苷元通过氧原子与 1 分子葡萄糖醛酸相连而成。在质谱高能的碰撞下, 葡萄糖醛酸与黄芩苷元的相连的碳氧键容易断裂^[16], 在本实验中质谱检测到黄芩苷母离子丢失 1 分子葡萄糖醛酸, 得到碎片离子 m/z 271.06 $[\text{M}+\text{H}-\text{glucuronide acid}]^+$ 。44 号峰在正离子

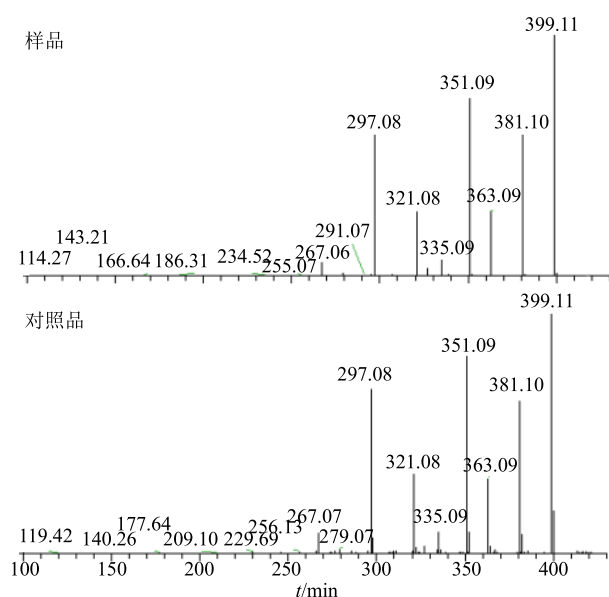


图 2 12 号峰和对照品质谱比对分析

Fig. 2 MS comparison analysis of peak 12 with reference substances

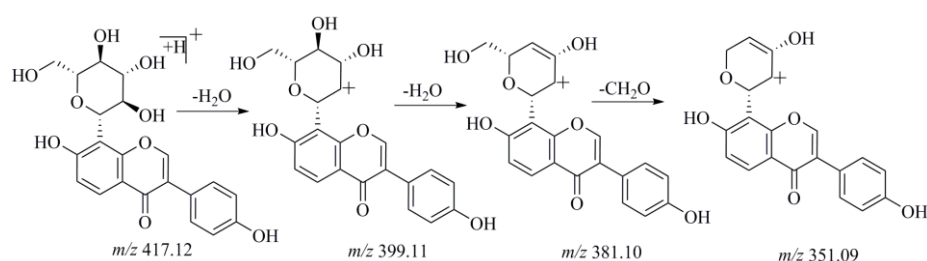


图 3 葛根素的裂解途径推断

Fig. 3 Fragmentation process deduction of puerarin

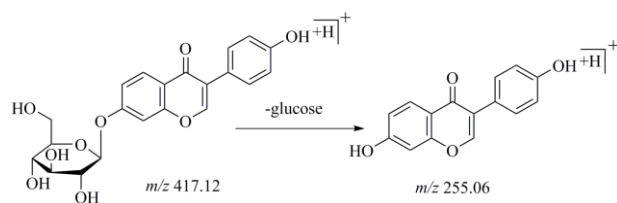


图 4 大豆苷的裂解途径推断

Fig. 4 Fragmentation process deduction of daidzin

综上,对于黄酮苷类化合物而言,一方面在质谱中高能碰撞可能会使苷键断裂,失去糖基,生成黄酮苷元;另一方面,苷元部分容易丢失 $-\text{CH}_2\text{O}$ 、 H_2O 、 $-\text{CO}$ 、 $-\text{CH}_3$ 等中性基团。鉴定的其他黄酮苷类成分如 6 号峰新西兰牡荆苷 II、21 号峰 8-甲氧基芒柄花苷、36 号峰异甘草苷、37 号峰芒柄花苷、38 号峰大豆苷元等均符合此裂解规律。

3.3.2 生物碱类成分 所鉴定的 12 个生物碱类化合物均来自于葛根苓连汤中的黄连,黄连中生物碱

模式下,可观察到准分子离子峰 m/z 449.11 $[\text{M}+\text{H}]^+$,加钠峰 471.09 $[\text{M}+\text{Na}]^+$,碎片离子 273.08 $[\text{M}+\text{H}-\text{glucuronide acid}]^+$,在负离子模式下,可检测到 m/z 447.09 $[\text{M}-\text{H}]^-$,软件根据元素分析预测可能的分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ 。44 号峰与黄芩苷相比,多了 2 个 H 原子,裂解规律与黄芩苷相同,所以确定 44 号峰为二氢黄芩苷。

48 号峰在正、负离子模式下,可以分别观察到准分子离子峰为 m/z 301.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 、299.06 $[\text{M}-\text{H}]^-$,软件综合元素分析预测分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$,与数据库中黄酮类化合物荭黄芩素 II 的分子式相同。二级碎片离子有 m/z 286.05、283.06、245.08。与软件 Mass frontier 7.0 对荭黄芩素 II 结构式进行的裂解分析一致,发现母离子丢失 1 分子 $-\text{CH}_3$ 、1 分子 H_2O 、2 分子 CO 分别生成碎片离子 m/z 286.05 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$ 、283.06 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 、245.08 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}\times 2]^+$,故确定 48 号峰为荭黄芩素 II。

多为季胺碱, N 原子上已有 1 个正电荷,所以在正离子模式下响应好,且 m/z 的值就是生物碱类的相对分子质量。

32 号峰的准分子离子峰为 m/z 338.14 $[\text{M}]^+$,软件综合元素分析结果预测分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_4$,与对照品药根碱的保留时间和裂解碎片信息相同,因此确定 32 号峰为药根碱。药根碱丢失 1 分子 $-\text{CH}_3$ 得到碎片离子 m/z 323.12,丢失 $-\text{CH}_3-\text{H}-\text{CO}$,得到碎片离子 m/z 294.11。而与 32 号峰相近的 29 号峰的准分子离子峰也为 m/z 338.14 $[\text{M}]^+$,分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_4$,是药根碱的同分异构体,结合文献报道确定其为非洲防己碱^[17],其裂解规律见图 5。

20 号峰的分子离子峰为 m/z 322.11 $[\text{M}]^+$,软件综合元素分析预测其分子式为 $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NO}_4$,失去 $-\text{C}_2\text{H}_4$,得到质荷比为 294.1 的碎片离子,结合文献报道,确定其为小檗红碱^[17]。综上推测生物碱类成

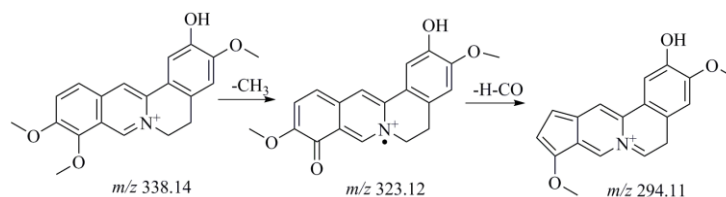


图 5 非洲防己碱的裂解途径推断

Fig. 5 Fragmentation process deduction of columbamine

分容易失去 C (9) 位的 $-\text{OCH}_3$ 的 $-\text{CH}_3$, 生产羰基, 继而失去 $-\text{CO}$, 与 N 相连的 H 等。或者以 N 为中心引起失去 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}_2\text{H}_4$ 等的 i 断裂。

3.3.3 三萜及三萜皂苷类成分 所鉴定的 4 个三萜类和三萜皂苷类化合物来源于方中的甘草, 56 号峰的母离子为 m/z 823.41 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 预测其可能的分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$, 母离子丢失 1 分子葡萄糖醛酸, 得到 m/z 647.38 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucuronic acid}]^+$, 失去 2 分子葡萄糖醛酸得到 m/z 471.35 $[\text{M}+\text{H}-\text{Glucuronic acid} \times 2]^+$, 再进一步失去 1 分子水, 得到碎片离子 m/z 453.33 $[\text{M}+\text{H}-\text{glucuronic acid} \times 2-\text{H}_2\text{O}]^+$ 。碎片信息和保留时间与对照品甘草酸一致^[18], 故确定 56 号峰为甘草酸, 其裂解规律见图 6。

53 号峰的正离子模式下分子离子峰为 839.41 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 负离子模式下分子离子峰为 837.39 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 根据元素组成综合分析预测出可能的分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{17}$, 与构建的葛根芩连汤数据库中甘草皂苷 G2 的分子式相同。二级碎片离子有 m/z 645.36、487.34、469.33。裂解的碎片与软件 Mass frontier 7.0

对甘草皂苷 G2 结构式进行裂解分析的匹配度高, 母离子丢失 1 分子水和 1 分子葡萄糖醛酸, 得到碎片离子 m/z 645.36 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{glucuronic acid}]^+$, 母离子丢失 2 分子葡萄糖醛酸, 得到碎片离子 m/z 487.34 $[\text{M}+\text{H}-\text{glucuronic acid} \times 2]^+$, 再进一步失去 1 分子 H_2O , 得到碎片离子 m/z 469.33 $[\text{M}+\text{H}-\text{glucuronic acid} \times 2-\text{H}_2\text{O}]^+$ 。

55 号峰的分子离子峰为 m/z 471.35 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 软件综合元素分析预测其分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$, 与构建的葛根芩连汤数据库中甘草次酸的分子式相同。二级碎片离子有 m/z 425.34、407.33、317.12。与软件 Mass frontier 7.0 对甘草次酸结构式进行的裂解分析高度吻合, 分子离子峰丢失 $-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}$, 得到碎片离子 m/z 425.34, 丢失 $-\text{H}_2\text{O} \times 2-\text{CO}$, 得到碎片离子 m/z 407.33, 丢失 $-\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2$, 得到碎片离子 m/z 317.12, 所以确定 55 号峰为甘草次酸。

综上, 推测三萜皂苷类成分, 在质谱中高能碰撞, 容易脱去 glucuronic acid 部分以及 H_2O , 而对于三萜类成分容易失去 H_2O 、 CO 等中性基团。

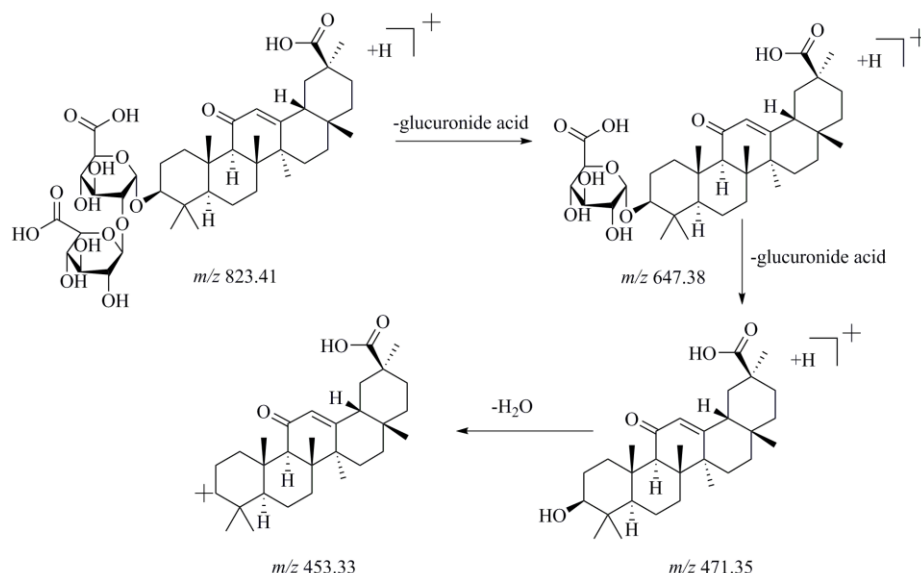


图 6 甘草酸的裂解途径推断

Fig. 6 Fragmentation process deduction of glycyrrhizic acid

3.3.4 其他类成分 除了黄酮类成分、生物碱类成分和三萜及三萜皂苷类成分,葛根芩连汤中还有很多其他类的成分,如酚酸类、香豆素类、木脂素类和苯乙醇苷类成分等。

5 号峰在负离子模式下,可得到准分子离子峰为 m/z 353.09 $[M-H]^-$, 碎片离子 m/z 191.06 $[M-H-C_9H_6O_3]^-$ 、179.04 $[M-H-C_7H_{10}O_5]^-$ 、161.02 $[M-H-C_7H_{10}O_5-H_2O]^-$ 。软件综合元素分析预测其分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$ 。根据其裂解规律结合文献报道^[19],确定 5 号峰为绿原酸。

41 号峰在正离子模式下,准分子离子峰为 m/z 269.04 $[M+H]^+$, 负离子模式下,分子离子峰为 m/z 267.03 $[M-H]^-$, 根据元素组成综合分析预测出可能的分子式为 $C_{15}H_8O_5$, 与构建的葛根芩连汤数据库中考迈斯托醇的分子式相同。正离子模式下的二级碎片离子有 m/z 241.05。与软件 Mass frontier 7.0 对考迈斯托醇的结构裂解分析高度匹配,母离子丢失 1 分子 CO , 得到碎片离子 m/z 241.05 $[M+H-CO]^+$ 。所以推测 41 号峰为考迈斯托醇。

4 讨论

UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱各成分的一级 FT 全扫描再结合二级依赖性扫描模式可在较短的时间内同时实现母、子离子信息高分辨采集,通过 Xcalibur 2.1 工作站推测可能的分子式,要求误差范围 $\pm 1.0 \times 10^{-5}$, 从而保证预测的化合物分子式的准确性,同时在正负离子模式下分别进样,为鉴定葛根芩连汤中化学成分提供更全面的信息,与传统的质谱相比具有更高分辨率、更全面鉴定等优点。

中药复方成分复杂,本研究基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱建立了一种高效,灵敏,快捷的化合物定性方法,从葛根芩连汤中共鉴定出 67 个化学成分,其中鉴定的 36 个黄酮类成分,来自于葛根,黄芩和甘草。所鉴定的 12 个生物碱类成分均来源于黄连,而 4 个三萜及三萜皂苷类成分来自于甘草。对葛根芩连汤中各类成分进行裂解规律研究发现,黄酮苷类成分,在质谱高能碰撞中,苷键容易断裂,丢失糖基(如葡萄糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸等),生成黄酮苷元,而苷元部分容易丢失一些中性基团,如 $-CH_2O$ 、 H_2O 、 $-CO$ 、 $-CH_3$ 等。生物碱类成分如巴马汀、药根碱,非洲防己碱等容易失去 C(9)位的 $-OCH_3$ 的 $-CH_3$, 生产羰基,继而失去 $-CO$, 与 N 相连的 H 等。或者以 N 为中心引起失去 $-CH_3$ 、 C_2H_4 等的 i 断裂。而对于三萜皂苷类成分而言,与

黄酮苷类成分相似,首先丢失的也是糖基(如葡萄糖醛酸等),再进一步会丢失 H_2O 分子。三萜类成分容易失去 H_2O 、 CO 等中性基团。

结果表明,UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 可以快速、系统地对葛根芩连汤中化学成分进行定性分析,不仅丰富了葛根芩连汤的化学成分内涵,而且可为探究其药效物质基础和作用机制,提升质量控制研究及临床应用提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 陈 烨,袁 瑾,王新宏,等.葛根芩连汤及不同配伍对肝细胞色素 P450 酶的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(8): 1593-1598.
- [2] An R, You L, Zhang Y, et al. A rapid UPLC method for simultaneous determination of eleven components in 'Ge-Gen-Qin-Lian' decoction [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2014, 10(40): 464-469.
- [3] Wu Y, Wang D, Yang X, et al. Traditional Chinese medicine Gegen Qinlian decoction ameliorates irinotecan chemotherapy-induced gut toxicity in mice [J]. *Biomed Pharmacother* 2019, 109: 2252-2261.
- [4] Liu C S, Liang X, Wei X H, et al. Comparative metabolism of the eight main bioactive ingredients of Gegen Qinlian Decoction by the intestinal flora of diarrhoeal and healthy piglets [J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(3): e4421.
- [5] 李淑艳,王玉华,吴东兴,等.大鼠急性肠炎模型制备方法的建立与探讨 [J]. 中成药, 2018, 40(2): 444-446.
- [6] Huang Y J, Hu N, Gao X J, et al. Alterations of testosterone metabolism in microsomes from rats with experimental colitis induced by dextran sulfate sodium [J]. *Chemico-Biol Inter*, 2015, 232: 38-48.
- [7] Cheng Q, Shou L, Chen C, et al. Application of ultra-high-performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry for identification, confirmation and quantitation of illegal adulterated weight-loss drugs in plant dietary supplements [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1064: 92-99.
- [8] 严 华,云 环,刘 鑫,等. UHPLC-LTQ Orbitrap MS 测定鸡肉组织中 5 种糖皮质激素残留 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(8): 909-914.
- [9] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminformatics*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [10] Chen C Y. TCM Database@Taiwan: The world's largest

- traditional Chinese medicine database for drug screening in silico [J]. *PLoS One*, 2012, 6(1): e15939.
- [11] Xue R, Fang Z, Zhang M, *et al.* TCMID: Traditional Chinese medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(D1): D1089-D1095.
- [12] 张艺竹, 安 飏, 袁 瑾, 等. 基于药代动力学参数分析比较葛根芩连汤的不同配伍肠吸收特性 [J]. *药学学报*, 2013, 48(10): 1611-1617.
- [13] 高 越. 基于组学和网络药理学的养心氏片抗心衰作用机理研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2016.
- [14] 李晓明, 杨 滨, 黄璐琦. 高效液相色谱-质谱联用分析鉴别葛根的异黄酮成分 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(11): 1337-1339.
- [15] 张启云, 彭国梅, 李冰涛, 等. UHPLC-Q-TOF/MS 技术分析葛根醇提液中化学成分 [J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(4): 513-518.
- [16] 杨培树, 张 娜, 郝文立. 电喷雾串联质谱法鉴定黄芩药材的化学成分 [J]. *中药材*, 2017, 40(2): 369-372.
- [17] 张 潇, 苗祥贞, 袁炎炎, 等. 基于 LTQ-Orbitrap 高分辨质谱分析黄芩连中的成分 [J]. *中药材*, 2018, 41(5): 1114-1118.
- [18] 赵艳敏, 刘素香, 张晨曦, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析 [J]. *中草药*, 2016, 47(12): 2061-2068.
- [19] 李 宁. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的参桂胶囊中主要化学成分研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(3): 573-581.