

DESI-MSI 技术在经典名方芍药甘草汤质量控制中应用研究

曲缘章^{1,2}, 孙博^{1,3}, 朱广伟^{1*}, 马生军⁴, 万林春⁵, 李雅静⁶, 郭杰⁷, 李刚⁸, 杨林勇⁸, 李宝国^{2*}

1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700
2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355
3. 哈尔滨商业大学, 黑龙江 哈尔滨 150076
4. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052
5. 江西省药品检验检测研究院, 江西 南昌 330029
6. 北京中医药大学, 北京 100102
7. 天津中医药大学, 天津 300193
8. 盛实百草药业有限公司, 天津 300301

摘要: 目的 使用超高效液相色谱-二极管阵列检测器检测法 (UHPLC-DAD) 和解吸电喷雾电离-离子化质谱成像技术 (desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging, DESI-MSI) 对 15 批芍药甘草汤 (Shaoyao-Gancao-Decoction, SGD) 物质基准和对应实物进行分析, 考察 DESI-MSI 在经典名方 SGD 质量控制中的优势。方法 以 SGD 为研究模型, 采用传统 UHPLC-DAD 法建立物质基准指纹图谱, 并对 SGD 指标成分 (芍药苷、甘草苷、甘草酸) 含量、出膏率进行考察。同时, 以芍药甘草汤对应实物冻干粉为研究载体, 将其复溶后点样于定性滤纸, 并固定于载玻片制成样品, 以甲醇-甲酸 (1 000 : 1) 为喷雾溶剂, 体积流量 3 $\mu\text{L}/\text{min}$; 扫描范围 m/z 100~1 200; 空间分辨率 300 μm ; 喷雾气 (N_2) 压力 0.5 MPa; 离子源温度 120 $^\circ\text{C}$, 采用正负离子全扫描样本。结果 DESI-MSI 法能检测到 SGD 指标成分芍药苷、甘草苷、甘草酸以及共有峰成分芍药内酯苷等。同时, DESI-MSI 法还能检测到来自甘草、白芍的甘草皂苷 G2、甘草皂苷 J2、没食子酸、柠檬酸、对羟基苯甲酸等 11 种成分, 并对其相对含量进行直观呈现, 定性分析能力远强于 UHPLC-DAD 法。结论 基于 DESI-MSI 技术无需进行复杂的样品前处理, 可以在无对照品情况下进行复杂样品的定性、相对含量分析, 灵敏度高, 分析能力强, 可以作为经典名方物质基准、对应实物及配方颗粒样品的质控研究方法。

关键词: 经典名方; 芍药甘草汤; 解吸电喷雾电离-离子化质谱成像技术; UHPLC-DAD; 物质基准; 质量标准; 质量控制; 芍药苷; 甘草苷; 甘草酸; 芍药内酯苷; 甘草皂苷 G2; 甘草皂苷 J2; 没食子酸; 柠檬酸; 对羟基苯甲酸

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)13-3433-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.13.010

Study on application of DESI-MSI in quality control of classical famous prescription Shaoyao Gancao Decoction

QU Yuan-zhang^{1,2}, SUN Bo^{1,3}, ZHU Guang-wei¹, MA Sheng-jun⁴, WAN Lin-chun⁵, LI Ya-jing⁶, GUO Jie⁷, LI Gang⁸, YANG Lin-yong⁸, LI Bao-guo²

1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China
2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China
3. Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
4. School of Food Sciences and Pharmacy, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China
5. Jiangxi Institute for Drug Control, Nanchang 330029, China
6. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

收稿日期: 2019-11-08

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1706500); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2018ZX09721005); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助 (ZXKT17034)

作者简介: 曲缘章, 硕士, 从事中药质量标准以及经典名方、配方颗粒研究。E-mail: 17864190232@163.com

*通信作者 朱广伟, 博士, 助理研究员, 从事中药质量标准以及经典名方、配方颗粒研究。E-mail: gwzhu@icmm.ac.cn
李宝国, 博士, 副教授, 从事中药质量控制和活性物质研究。E-mail: lbg-3023@163.com

7. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

8. China Medico Corporation, Tianjin 300301, China

Abstract: Objective Using ultra-high performance liquid chromatography with diode array detection (UHPLC-DAD) and desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging (DESI-MSI) to analyze 15 batches of Shaoyao Gancào Decoction (SGD) substance benchmark and lyophilized powder in order to investigate the advantages of DESI-MSI in quality control of famous classical formulas. **Methods** Taking SGD as the research model, fingerprints of the substance benchmark were established by UHPLC-DAD, and the content of index components (paeoniflorin, liquiritin, glycyrrhizic acid) and the yield of dry extract were also investigated. Meanwhile, as the research carrier, the lyophilized powder corresponding to SGD was dissolved in methanol and dotted on qualitative filter paper with quantitative capillary, and fixed it on the slide to make samples. The samples were analyzed on a DESI-MSI system in positive and negative ion mode with methanol-formic acid (1 000 : 1, flow rate of 3 $\mu\text{L}/\text{min}$) as spray solvent, N_2 as spray gas (pressure of 0.5 MPa). The scanning range was m/z 100—1 200, the spatial resolution was 300 μm , the ion source temperature was 120 $^\circ\text{C}$. **Results** DESI-MSI can detect not only the index components of paeoniflorin, liquiritin, glycyrrhizic acid, but also the common peaks of albiflorin. At the same time, DESI-MSI could detect 11 other components from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and *Paeoniae Radix Alba*, such as licoricesaponin G2, licoricesaponin J2, gallic acid, citric acid, p-hydroxybenzoic acid, and present their relative content visually. The qualitative analysis ability of DESI-MSI was much better than UHPLC-DAD. **Conclusion** DESI-MSI can be used as the quality control method for substance benchmark and lyophilized powder and dispensing granules of classical famous formulas with advantages of high sensitivity, strong analytical ability, no complex sample pretreatment, qualitative and relative content analysis of complex samples without reference substance.

Key words: classical famous formulas; Shaoyao Gancào Decoction (SGD); desorption electrospray ionization-mass spectrometry imaging (DESI-MSI); UHPLC-DAD; substance benchmark; quality standard; quality control; paeoniflorin; liquiritin; glycyrrhizic acid; albiflorin; licoricesaponin G2; licoricesaponin J2; gallic acid; citric acid; p-hydroxybenzoic acid

芍药甘草汤 (Shaoyao-Gancào-Decoction, SGD) 源于张仲景之《伤寒杂病论》。该方组方精简, 疗效显著, 被历朝历代医家推崇, 沿用至今, 并且在基础上加减化裁, 用于治疗不同的病证, 被广泛应用于古、现代中医临床^[1]。现代药理学研究和临床实践也证实, SGD 具有显著的解痉^[2]、抗炎镇痛^[3]、止咳平喘^[4]、保肝利胆^[5]、抗 HBV 病毒^[6]、抗纤维化^[7]、保护胃黏膜^[8]、免疫调节^[9]、以及抗过敏、通便、保护跟腱组织^[10]等作用, 对多种痉挛性疾病、疼痛性疾病、炎症性疾病以及支气管哮喘、帕金森病、便秘等都有显著的治疗作用^[11-16]。作为第一批入选《古代经典名方目录》的复方, SGD 的煎煮工艺及质量标准研究对于后续经典名方的开发具有一定的指导意义^[17-18]。

高分辨质谱广泛应用于中药化学领域, 其对复杂中药化学成分的定性定量研究, 可以全面展现中药及其复方的药效成分, 不仅为药理学研究提供合理参考, 也为中药质量标准体系的构建提供关键依据^[19-21]。质谱成像 (mass spectrometry imaging, MSI) 作为一种新型分子成像技术, 近年来多应用于药物及其代谢物体内分布研究, 利用激光或离子束使样本表面分子离子化, 通过串联质谱测定离子化分子

质荷比, 直接从动物组织切片表面获得药物及其代谢物在体内的分子组成、相对丰度与空间分布状况, 并以彩色图像的形式表达^[22-27]。如王中华等^[28]应用敞开式空气动力辅助离子化-高分辨质谱成像技术对大鼠肾脏组织切片进行成像分析, 得到 38 种肾脏内源性产物在组织中的特异性分布, 直观体现了与肾脏渗透压梯度形成有关的多种小分子代谢物皮质-髓质轴向分布特征。

本研究以本课题组先前研究进展为基础^[29], 以经典名方作为研究对象, 参考《伤寒论》原文记载的制备方法制备 15 批 SGD 物质基准, 建立基于超高效液相色谱 (ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC) 的 SGD 物质基准特征图谱分析方法, 同时制备对应实物, 确定出膏率范围。并且以 SGD 对应实物为研究对象, 建立了基于解吸电喷雾电离 (desorption electrospray ionization, DESI)-离子化质谱成像技术 (DESI-MSI) 的经典名方质量控制方法, 对多组分进行定性定量分析, 为经典名方整体质量控制研究提供新思路、新方法。

1 材料

1290 Infinity II 型超高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司, 包括 G7167B 型自动进样系统, G7166B

型柱温箱, G7117A 型二极管阵列检测器 (DAD); Xevo G2 XS qtof. DESI MSI 质谱成像系统, 美国沃特世科技有限公司; BS-210S 型电子分析天平, 北京赛多利斯天平有限公司; LD510-2 型电子天平, 沈阳龙腾电子有限公司; H1650-W 型台式高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; LGJ-10E 真空冷冻干燥机, 四环福瑞科仪科技发展有限公司; HDZ20 型智能煎药壶, 美味世家永达基电器厂, 容量 2 L, 额定功率 500 W, 稳定电压 220 V。

对照品异甘草苷、新甘草苷、芹糖基甘草苷、甘草素、异甘草素、甘草次酸、苯甲酰芍药苷、氧化芍药苷、芍药内酯苷、没食子酸、没食子酸甲酯、1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖、儿茶素、丹皮酚、苯甲酸、刺芒柄花素, 批号分别为 17122201、17010203、18110902、17091402、18020606、18032102、17083005、17041001、1701302、17033104、17072503、18022805、14081301、15061201、15031601、15101401, 质量分数均 ≥ 98%, 成都普菲德生物技术有限公司; 对照品芍药苷、甘草苷、甘草酸铵, 批号分别为 17041401、L63P-J7XV、18012902, 质量分数依次为 98%、93.1%、98%, 购自中国食品药品检定研究院; 水为娃哈哈纯净水, 甲醇、乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。SGD 所用饮片均由盛实百草药业有限公司提供, 经新疆农业大学食品科学与药学学院马生军副教授鉴定, 饮片所用药材分别为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根, 豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎, 详细信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 SGD 物质基准研究

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取芍药苷、甘草苷、甘草酸铵对照品适量, 加甲醇分别配制成含芍药苷 1.8 mg/mL、含甘草苷 1.0 mg/mL、含甘草酸铵 0.9 mg/mL 的 3 组单一对照品溶液 (甘草酸质量 = 甘草酸铵质量/1.020 7), 置于冰箱中, 4 °C 保存, 备用。

2.1.2 SGD 物质基准及供试品溶液的制备 依据《伤寒论》原文记载以及相关文献报道^[30-31], 取白芍四两 (12 g)、炙甘草四两 (12 g), 以上 2 味药材置于煎药壶中, 根据书中记载加水三升 (600 mL) 并将煎药壶置于加热盘上, 武火煎煮至微沸, 再调整至文火保持微沸继续煎煮, 用 150 目筛网滤过, 得

表 1 SGD 的药材来源

Table 1 Source of medicinal materials in SGD

SGD 物质基准	白芍		炙甘草	
	批号	产地	批号	产地
S01	H170071001	安徽	H1805440	内蒙古
S02	S174240S01	安徽	H1802150	内蒙古
S03	H170114001	四处	H1805450	内蒙古
S04	S174190S01	安徽	H1700010	内蒙古
S05	18030602	安徽	H1700020	内蒙古
S06	H170106001	山东	H1700030	内蒙古
S07	H170118001	四川	H1700040	内蒙古
S08	H18015001	陕西	H1700050	内蒙古
S09	S172910S01	安徽	H1700060	内蒙古
S10	H170105001	山东	H1800670	甘肃
S11	H170011001	陕西	H1701740	内蒙古
S12	H170116001	四川	H1801580	内蒙古
S13	S180310S01	浙江	H1801590	内蒙古
S14	H180106001	陕西	H1805430	内蒙古
S15	H170117001	四川	H1801600	内蒙古

药液一升五合 (300 mL), 即得 SGD 物质基准, 并编号 S01~S15。精密吸取 SGD 物质基准 0.8 mL, 精密加入甲醇 0.8 mL, 涡旋充分混匀, 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用 0.22 μm 滤膜滤过, 取续滤液即得供试品溶液。

2.1.3 色谱条件 Thermo Accucore C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 2.6 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~10% 乙腈; 5~10 min, 10%~15% 乙腈; 10~18 min, 15%~20% 乙腈; 18~25 min, 20%~25% 乙腈; 25~35 min, 25%~40% 乙腈; 35~36 min, 40%~95% 乙腈; 36~46 min, 95% 乙腈; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 3 μL; 柱温 30 °C; 检测波长 230、254 nm。

2.1.4 方法学考察

(1) 线性关系考察: 精密吸取“2.1.1”项下芍药苷对照品溶液 0.2、0.4、0.8、1.0、1.6 mL, 分别移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度。按“2.1.3”项下色谱条件测定芍药苷的峰面积, 以芍药苷进样质量浓度为横坐标 (X), 230 nm 波长下峰面积为纵坐标 (Y), 计算得回归方程为 $Y = 20\ 723.781 X - 63.790$, $r^2 = 1.000\ 0$ 。

精密吸取“2.1.1”项下甘草苷对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mL, 分别加至 5 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度。按“2.1.3”项下色谱条件测定成分

的峰面积,以甘草苷进样质量浓度为横坐标(X),230 nm 波长下峰面积为纵坐标(Y),计算得回归方程为 $Y=35\ 260.159 X-111.631$, $r^2=1.000\ 0$ 。

精密吸取“2.1.1”项下甘草酸铵对照品溶液 0.2、0.4、0.8、1.0、1.6 mL,分别加至 5 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度。按“2.1.3”项下色谱条件测定成分的峰面积,以甘草酸铵进样质量浓度为横坐标(X),254 nm 波长下峰面积为纵坐标(Y),计算得回归方程为 $Y=10\ 935.277 X-1.25$, $r^2=0.999\ 9$ 。

(2) 精密度考察:取同一批 SGD 供试品溶液(S03),按照“2.1.3”项下色谱条件连续进样 6 次,计算芍药苷、甘草苷、甘草酸铵峰面积 RSD 值分别为 0.15%、0.09%、0.06%,表明仪器精密度良好。

(3) 稳定性试验:称取同一批 SGD 饮片适量,按照“2.1.2”项下方法制备 1 批供试品溶液(S03),分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h 按照“2.1.3”项下色谱条件进样,计算芍药苷、甘草苷、甘草酸铵峰面积 RSD 值分别为 0.54%、0.79%、0.83%,表明 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

(4) 重复性试验:称取同一批 SGD 饮片适量,按照“2.1.2”项下方法平行制备 6 批供试品溶液(S03),按照“2.1.3”项下色谱条件进样,计算芍药苷、甘草苷、甘草酸铵质量浓度的 RSD 值分别为 0.79%、0.77%、0.46%,表明本方法重复性良好。

(5) 加样回收率试验:精密称取已知各指标成分含量的 SGD 物质基准(S03),分别加入等量芍药苷、甘草苷、甘草酸铵对照品,按照“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.3”项下色谱条件测定,结果 3 者平均加样回收率分别为 101.73%、100.44%、99.51%,计 RSD 值依次为 0.54%、0.79%、0.83%。

2.1.5 样品测定 精密吸取“2.1.2”项下供试品溶液,按照“2.1.3”项下色谱条件测定,计算物质基准中芍药苷、甘草苷、甘草酸铵含量。结果见表 2。

2.1.6 SGD 出膏率研究 精密吸取混合均匀的“2.1.2”项下 SGD 物质基准 10 mL 于蒸发皿中,40 °C 真空干燥至恒定质量,称量质量,根据出膏率公式计算物质基准出膏率。见表 2。

$$\text{出膏率} = wV/(vM)$$

M 表示药材质量, V 表示 SGD 物质基准体积, v 表示取样体积, w 表示取样所得干膏质量

2.1.7 SGD 物质基准 UPLC-DAD 特征图谱研究 将“2.1.5”项下 SGD 物质基准色谱信息输入“中

表 2 SGD 物质基准的指标成分含量及出膏率

Table 2 Index components contents and dry extract rate of SGD substance benchmark

SGD 物质基准	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)			出膏率/%
	芍药苷	甘草苷	甘草酸	
S01	0.66	0.22	0.38	24.25
S02	0.66	0.22	0.38	25.25
S03	0.67	0.21	0.34	25.58
S04	0.65	0.32	0.53	27.75
S05	0.62	0.22	0.43	24.96
S06	0.68	0.16	0.34	24.67
S07	0.76	0.12	0.23	23.46
S08	0.70	0.12	0.31	25.96
S09	0.60	0.11	0.23	21.08
S10	0.64	0.10	0.24	23.00
S11	0.68	0.09	0.15	22.83
S12	0.51	0.08	0.33	23.79
S13	0.55	0.09	0.28	24.71
S14	0.70	0.12	0.33	19.33
S15	0.52	0.07	0.16	24.75

药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)进行分析,设置 SGD 物质基准 S01 为参照图谱,全谱峰匹配,见图 1。结果显示共有峰 21 个,指认 4 个。15 批 SGD 物质基准与对照特征图谱的相似度均 > 0.9,符合指纹图谱相似度要求。

2.2 SGD 对应实物 DESI-MSI 研究

2.2.1 SGD 对应实物供试品溶液的制备 按照“2.1.2”项下煎煮工艺以及表 1 中白芍和炙甘草饮片的配伍重新煎煮 15 批 SGD。每批汤剂分别精密量取 5 mL 置于 10 mL 罗口瓶中,使用冷冻干燥机冷冻干燥成 SGD 冻干粉,即对应实物。向罗口瓶中加入适量 50% 甲醇使对应实物复溶,将复溶液完全转移至 5 mL 量瓶中,超声 10 min 后冷却至室温,用 50% 甲醇定容,摇匀,用 0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得 SGD 对应实物供试品溶液。

2.2.2 对照品样本制备 取芍药苷、甘草苷、异甘草苷、新甘草苷、芹糖基甘草苷等 19 种对照品适量,分别置于 10 mL 量瓶中,甲醇定容,摇匀后,使用 5 μL 定量毛细管在定性滤纸上分别点样,晾干后,打孔器在点样中心位置打孔,并将打下的圆片附在已贴好双面胶的载玻片上,见图 2-A。

2.2.3 SGD 对应实物样本制备 取“2.2.1”项下 15 批 SGD 对应实物甲醇复溶液,使用 5 μL 定量毛

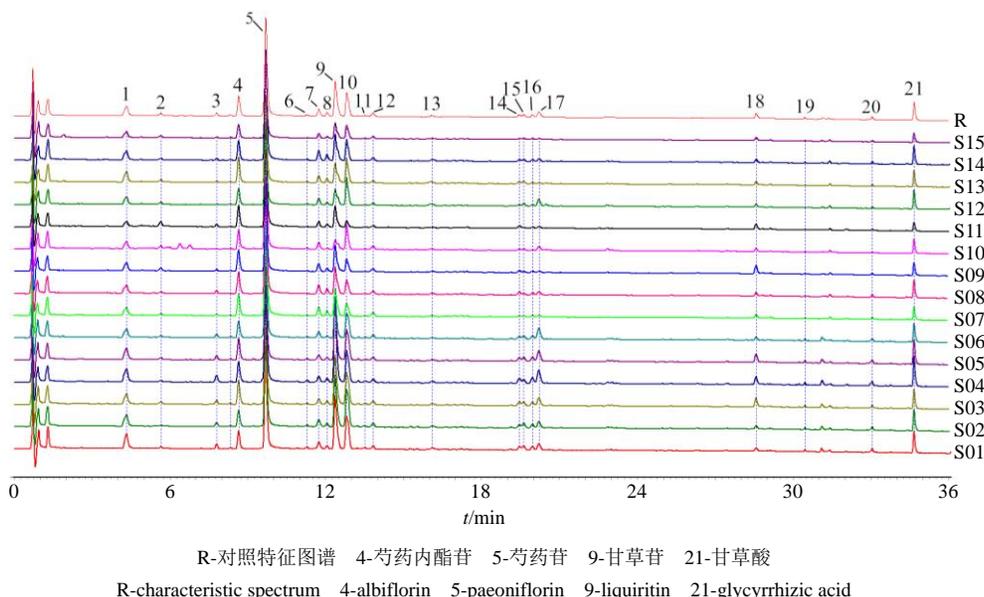
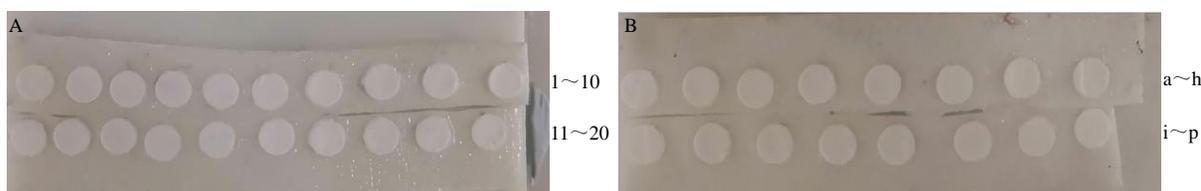


图 1 15 批 SGD 物质基准 (S1~S15) UHPLC-DAD 指纹图谱
Fig. 1 UHPLC-DAD fingerprints of 15 batches (S1—S15) of SGD



1-甲醇空白对照 2-甘草苷 3-异甘草苷 4-新甘草苷 5-芹糖基甘草苷 6-甘草素 7-异甘草素 8-甘草酸 9-甘草次酸 10-芍药苷 11-苯甲酰芍药苷 12-氧化芍药苷 13-芍药内酯苷 14-没食子酸 15-没食子酸甲酯 16-1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖 17-儿茶素 18-丹皮酚 19-苯甲酸 20-刺芒柄花素 a-甲醇空白对照 b~p-15 批 SGD 冻干粉甲醇复溶液样品
1-blank control 2-liquiritin 3-isoliquiritin 4-neoliquiritin 5-liquiritin apioside 6-glycyrrhizin 7-isoliquiritigenin 8-glycyrrhizic acid 9-glycyrrhetic acid 10-paeoniflorin 11-benzoylpaeoniflorin 12-oxypaeoniflorin 13-albiflorin 14-gallic acid 15-methyl gallat 16-1,2,3,4,6-O-pentagalloylglucose 17-catechin 18-paeonol 19-benzoic acid 20-formononetin a-blank control b—p-samples of 15 batches of SGD lyophilized powder dissolved in methanol

图 2 各对照品 (A) 及 SGD 对应实物样本 (B)
Fig. 2 Reference substance (A) and lyophilized powder samples (B)

细管在定性滤纸上点样, 晾干后, 打孔器在点样中心位置打孔, 并将打下的圆片附在已贴好双面胶的载玻片上, 见图 2-B。

2.2.4 质谱条件 解吸电喷雾电离离子源 (DESI), 可加热至 490 °C 定制毛细管; 灵敏度模式下操作, 正负离子全扫描, 扫描范围 m/z 100~1 200; 空间分辨率 300 μm ; 喷雾电压 3 kV; 采样锥电压 -40 V; 喷雾器 (氮气) 压力 0.5 MPa; 溶剂为甲醇-甲酸 (1 000 : 1), 体积流量 3 $\mu\text{L}/\text{min}$; 喷雾器入射角 60°; 收集角 10°; 总采集时间 122 min; 离子源温度 120 °C; 采样锥电压 -40 V; 数据采集采用 HD Imaging 软件 (美国 Waters 公司)。

2.2.5 定性分析 采用 Xevo G2 XS qtof. Desi MSI 方法, 按照“2.2.4”项下质谱条件对对照品样本和

SGD 对应实物样本进行分析, 图 3 为正、负离子模式下分别测定的 SGD 对应实物样本的总离子流图。通过比对对照品样本质谱成像结果及参考相关文献报道^[32-39], 确定各成分分子离子质荷比。

(1) 指标成分及共有峰 DESI-MSI 分析: 根据对照品样本的质谱成像结果并参考相关文献, 可以确定质荷比为 m/z 417.117 9 的分子离子源于甘草苷及其同分异构体; m/z 821.397 4 的分子离子源于甘草酸, m/z 525.159 9 和 m/z 503.152 3 的分子离子源于芍药苷及其同分异构体, 见图 4。图 4-A 为甘草苷及其同分异构体新甘草苷、异甘草苷 (m/z 417.117 9) 在对应实物样本中的含量分布; 图 4-B 为甘草酸的离子碎片 (m/z 821.397 4) 在对应实物样本中的含量分布; 图 4-C、D 为芍药苷及其同分

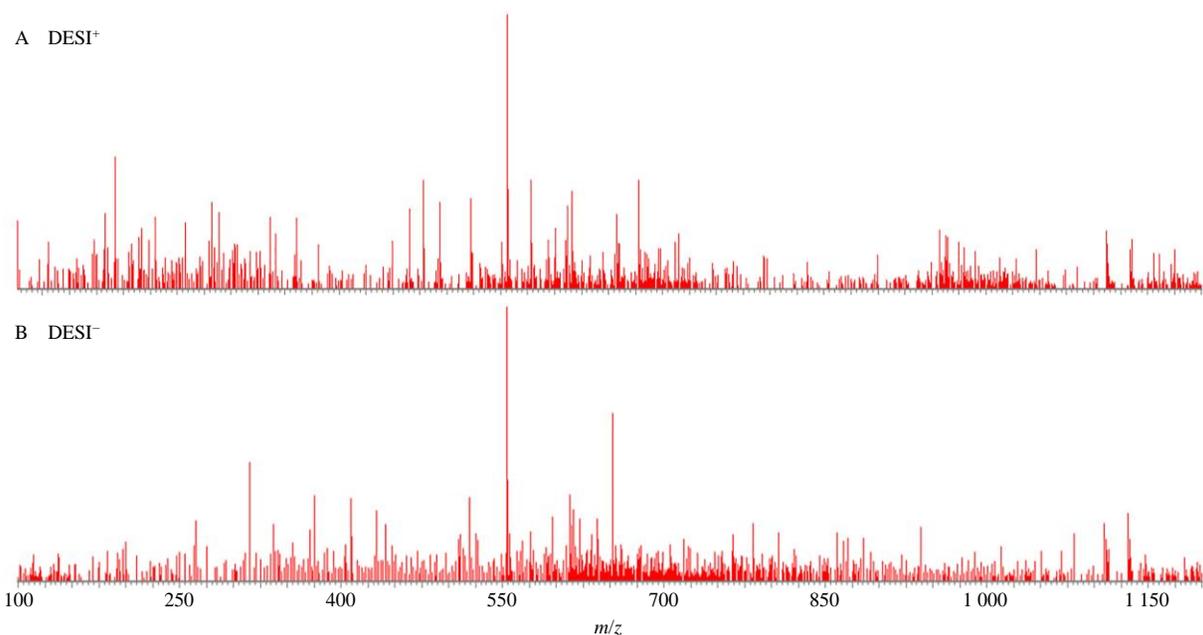
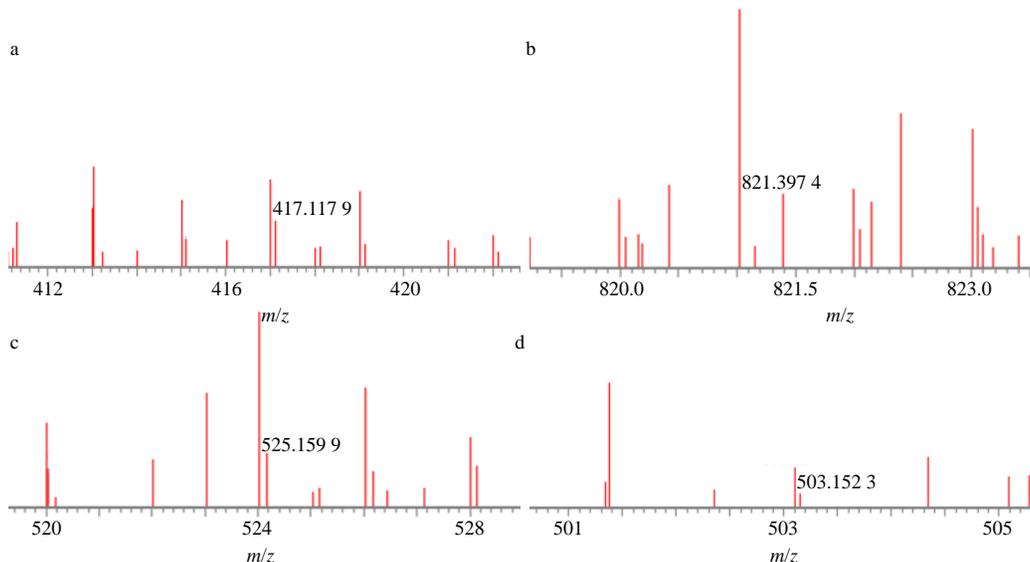
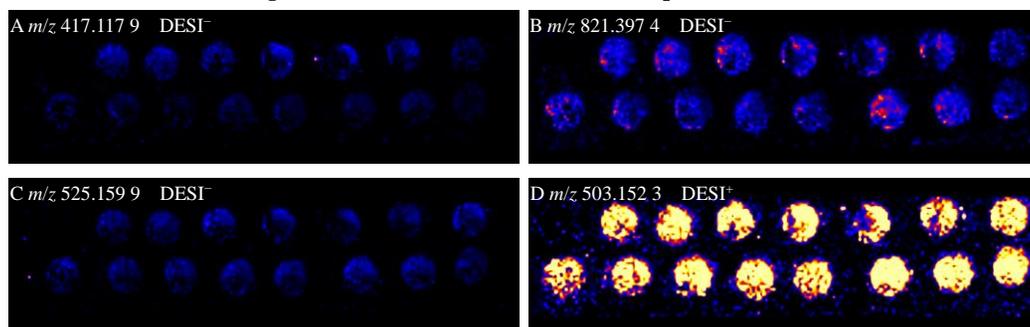


图 3 Xevo G2 XS qtof. Desi MSI 总离子流图

Fig. 3 Total ion current of Xevo G2 XS qtof. Desi MSI



A-甘草苷及其同分异构体 (新甘草苷、异甘草苷) B-甘草酸 C、D-芍药苷及其同分异构体 (芍药内酯苷) a~d-各成分质谱图
 A-liquiritinand its isomers (isoliquiritin, neoliquiritin) B-glycyrrhizic acid C, D-paeoniflorinand its isomers (albiflorin) a~d-mass spectrogram of each element

图 4 指标及共有峰定性成分在对应实物样本中的相对含量分布

Fig. 4 Relative content distribution of target components and common peak qualitative components in lyophilized powder samples

异构体芍药内酯苷 (m/z 525.159 9 和 m/z 503.152 3) 在对应实物样本中的含量分布, 指标成分质谱图见图 4-a~d。其他 DESI-MSI 详细分析结果见表 3。

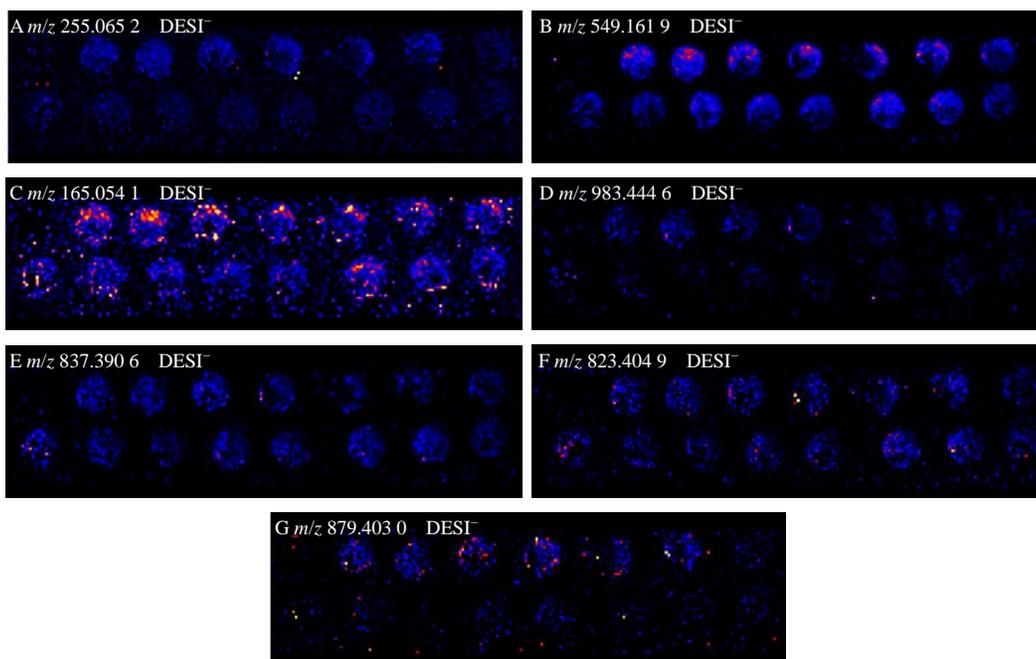
(2) 其他成分 DESI-MSI 分析: 除指标成分与共有峰中可定性的成分外, 查阅相关文献报道^[32-39], 还在 SGD 物质基准样本的分析结果中发现了多个已知化学成分。其在对应实物样本中的相对含量分布情况见图 5、6。具体 DESI-MSI 详细分析结果见表 3。

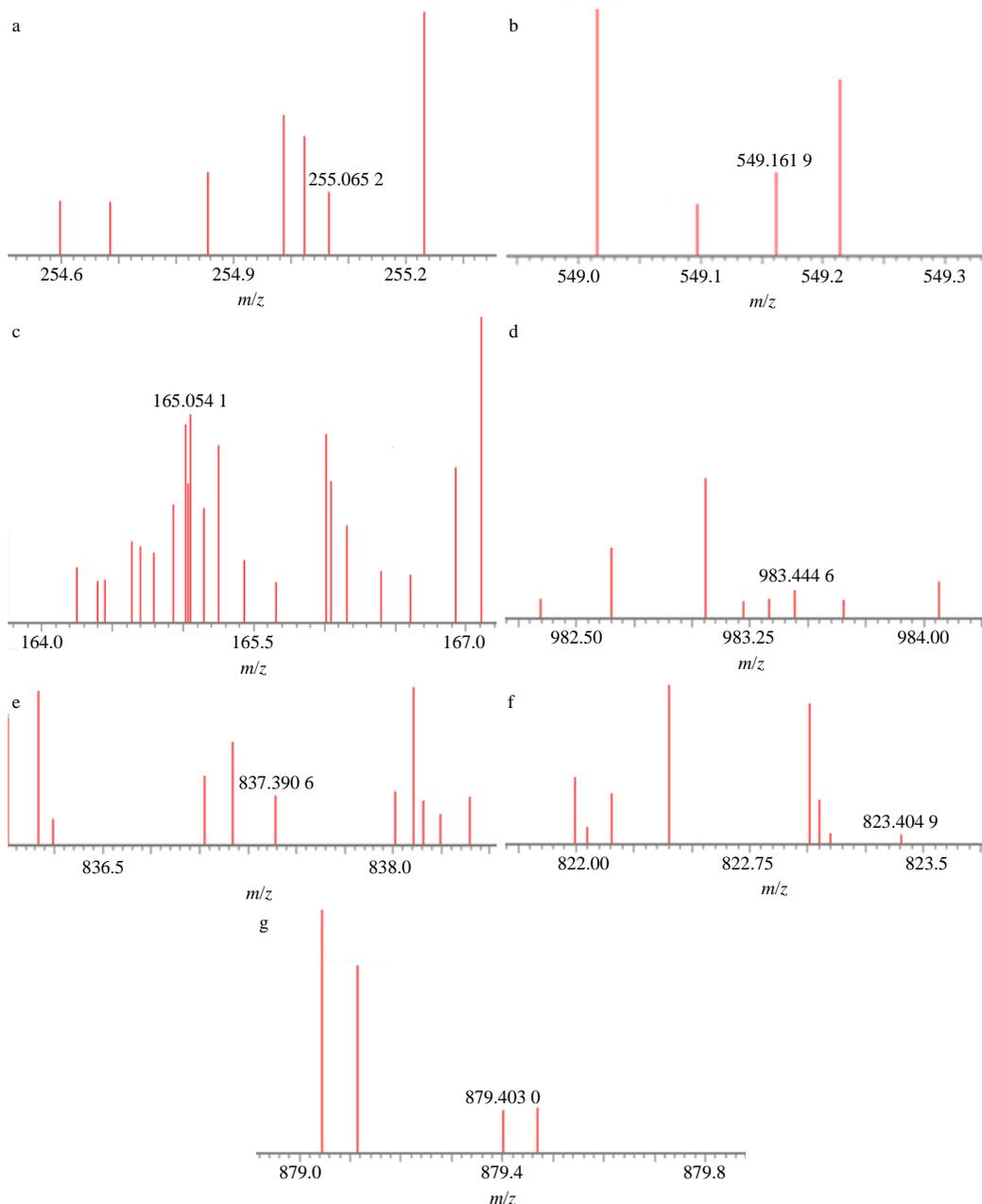
2.3 结果分析

各批次 SGD 物质基准中指标成分质量分数分别为芍药苷 0.51~0.76 mg/mL、甘草苷 0.07~0.32 mg/mL、甘草酸 0.15~0.53 mg/mL, 其中部分成分含量在不同批次中差异较大, 除所用不同产地不同批次的饮片质量不同等原因外, 在制备过程中, 所选取饮片的形状、大小、以及所用饮片的取材部位都是造成物质基准质量波动的主要原因。物质基准-对应实物的出膏率为 19.33%~27.75%, 平均出膏率

表 3 DESI-MSI 分析结果
Table 3 DESI-MSI analysis results

来源	名称	化学式	理论值 (m/z)	实测值 (m/z)	$\delta/(\times 10^{-6})$	分子离子
炙甘草	甘草苷及其同分异构体 (新甘草苷、异甘草苷)	$C_{21}H_{22}O_9$	417.118 0	417.117 9	-0.2	$[M-H]^-$
炙甘草	甘草酸	$C_{42}H_{62}O_{16}$	821.395 4	821.397 4	2.4	$[M-H]^-$
炙甘草	甘草素	$C_{15}H_{12}O_4$	255.065 7	255.065 2	-2.0	$[M-H]^-$
炙甘草	芹糖基甘草苷	$C_{26}H_{30}O_{13}$	549.160 2	549.161 9	3.1	$[M-H]^-$
炙甘草	对羟基苯丙酸	$C_9H_{10}O_3$	165.054 6	165.054 1	-3.0	$[M-H]^-$
炙甘草	甘草皂苷 A3	$C_{48}H_{72}O_{21}$	983.448 2	983.444 6	-3.7	$[M-H]^-$
炙甘草	甘草皂苷 G2	$C_{42}H_{62}O_{17}$	837.390 3	837.390 6	0.4	$[M-H]^-$
炙甘草	甘草皂苷 J2	$C_{42}H_{64}O_{16}$	823.411 0	823.404 9	-7.4	$[M-H]^-$
炙甘草	22 β -乙酰基甘草酸	$C_{44}H_{64}O_{18}$	879.400 8	879.403 0	2.5	$[M-H]^-$
白芍	芍药苷及其同分异构体 (芍药内酯苷)	$C_{23}H_{28}O_{11}$	525.160 2	525.159 9	-0.6	$[M+COOH]^-$
			503.152 3	503.152 3	0.0	$[M+Na]^+$
白芍	没食子酸	$C_7H_6O_5$	169.013 7	169.013 0	-4.1	$[M-H]^-$
白芍	蔗糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	341.107 8	341.107 8	0.0	$[M-H]^-$
白芍	柠檬酸	$C_6H_8O_7$	191.018 6	191.018 4	-1.0	$[M-H]^-$
白芍	6-O-galloylsucrose	$C_{13}H_{16}O_{10}$	331.065 9	331.066 1	0.6	$[M-H]^-$





A-甘草素及其同分异构体(异甘草素) B-芹糖基甘草苷 C-对羟基苯甲酸 D-甘草皂苷 A3 E-甘草皂苷 G2 F-甘草皂苷 J2 G-22β-乙酰基甘草酸 a~g-各成分质谱图

A-glycyrrhizin and its isomers (isoliquiritigenin) B-liquiritin apioside C-p-hydroxybenzoic acid D-licoricesaponin A3 E-licoricesaponin G2 F-licoricesaponin J2 G-22β-acetoxyglycyrrhizic acid a~g-mass spectrogram of each element

图 5 甘草其他成分在对应实物样本中的相对含量分布及各成分质谱图

Fig. 5 Relative content distribution of other components of licorice in lyophilized powder samples and mass spectrogram

为 24.09%，标准偏差 (RE) 为 2.02%。特征图谱研究表明，按照中医古籍中记载的制备工艺所制的 SGD 物质基准具有极高的相似性，相似性均 > 0.9，确定共有峰共有 21 个，指认 4 个，分别为芍药苷、芍药内酯苷、甘草苷、甘草酸，在对照特征图谱中分别对应 5、4、9、21 号色谱峰。在后续研究中，将继续对 SGD 对应实物进行系统研究，在相同色

谱条件下测量指标成分含量并绘制指纹图谱，同时计算物质基准-对应实物之间指标成分的转移率，以期为后期经典名方制剂的研发提供中间体调配方法的制定依据。

本研究应用 DESI-MSI 技术对 SGD 对应实物进行定性分析，在部分对照品缺失的情况下依然能够准确对其中 14 个成分进行定性，定性分析结果明显

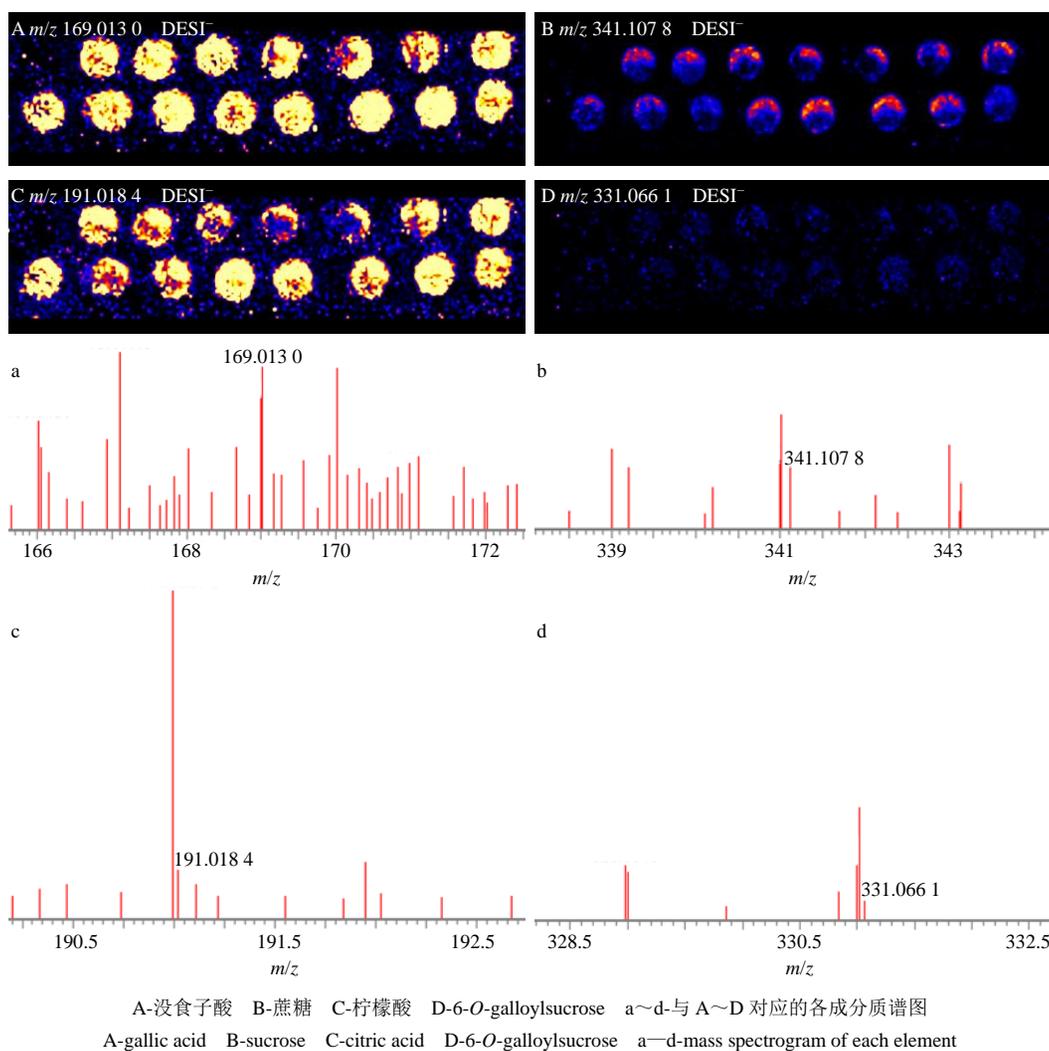


图 6 白芍其他成分在对应实物样本中的相对含量分布及各成分质谱图

Fig. 6 Relative content distribution of other components of *Paeoniae Radix Alba* in lyophilized powder samples and mass spectrogram

优于 UHPLC-DAD 法。但是,在有对照品的情况下, UHPLC-DAD 法可以进行定量与定性分析,而 DESI-MSI 定量能力却不及 UHPLC-DAD 法,二者各有优势。

3 讨论

SGD 组方精简,仅由白芍和炙甘草 2 味药材组成,因此在指标成分的选择上参考 2015 版《中国药典》中白芍和炙甘草的含量测定要求,选择芍药苷、甘草苷、甘草酸作为指标成分。

传统 UHPLC 作为高度稳定、可靠、重现性好的分离技术,广泛应用于中药质量标准研究,但在化学成分复杂的中药复方研究上,仍存在不可避免的局限性。本研究中 UHPLC 针对 SGD 建立专属性强的特征图谱,为经典名方质量标准研究提供了有意义的参考。

MSI 技术常用于动植物组织切片的成像研究,本研究将该技术应用于经典名方质控研究。该技术取样量少、预处理相对简单,4 h 即可完成 15 批 SGD 对应实物的样品分析(正、负离子模式下),远远小于 UHPLC-DAD 的分析时间(15 批 SGD 物质基准共计分析 11.5 h)。对比分析结果,DESI-MSI 获得数据信息量远大于 UHPLC-DAD,还可通过复方中单味药的单煎、阴性对照等方法确定各药味在复方中的专属性化学成分,从而在无对照品的情况下,快速完成对经典名方等复方制剂的质控。本方法无需考虑流动相选择、浓度梯度设置、色谱柱分离能力、检测器适用性等常规分析手段中常见的问题。

DESI-MSI 虽无法对指标成分做到精确定量,但仍可通过参考各批次样品中指标成分响应值,半定量分析比较指标成分在不同样品间的含量关

系。即便如此, DESI-MSI 仍提供了大量的结构信息, 后续可通过比较复方在 DESI-MSI 下各单味药单煎-合煎的成分分布关系, 结合药物及其代谢物在给药动物组织切片中的分布, 确定药效成分来源及作用靶点, 为经典名方质量标准体系的搭建筛选更为合理的指标成分, 也为后期药效物质基础研究奠定基础。

研究过程中部分操作仍可改进, 由 MSI 图谱可以看出部分成分在样本圆片上分布不均, 影响了分析结果直观性, 本研究虽已选择用于纸色谱的定性滤纸作为样品支持物, 但仍存在由于纸纤维分布不均导致样品扩散不均匀的现象。同样, 在样本制作过程中人为打孔位置、点样方式的选择等问题, 都会对化学成分在样本上的分布造成影响, 可见研制 DESI-MSI 配套的标准点样仪与点样板是十分必要的。本研究仅对样本进行了一级结构分析, 分析结果受同分异构体影响, 后续将研究二级甚至三级结构的分析是否对分析结果有较大改善。

参考文献

- [1] 曲缘章, 马生军, 朱广伟, 等. 芍药甘草汤的历史沿革与现代研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 216-225.
- [2] 杨 艳, 李东华, 王 洋, 等. 大剂量使用芍药与甘草配伍解痉作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 347-349.
- [3] 朱广伟, 张贵君, 汪 萌. 配伍组分、配伍比例对芍药甘草汤抗炎镇痛作用的影响 [J]. 药学与临床研究, 2014, 22(4): 323-325.
- [4] 关 炜, 王 洋, 李韶妮, 等. 芍药甘草汤对支气管哮喘作用机理的研究 [J]. 中国中医急症, 2011, 20(10): 1625-1626.
- [5] 宋 军, 赵军宁, 王晓东, 等. 芍甘多苷对四氯化碳亚急性肝损伤大鼠肝细胞线粒体保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(7): 931-934.
- [6] 戴 瑛, 赵军宁, 宋 军, 等. 芍药甘草汤有效成分群(芍甘多苷)抗乙型肝炎病毒作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(3): 36-39.
- [7] 赵军宁, 宋 军, 王晓东, 等. 芍甘多苷对 CCl₄ 肝纤维化大鼠的作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(2): 8-10.
- [8] 李 静. 加味芍药甘草汤对胃黏膜保护作用及机理的实验研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2006.
- [9] 石学魁, 王雅贤, 张晓莉, 等. 芍药甘草汤免疫学研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2006, 27(2): 18-20.
- [10] 张保国, 刘庆芳. 芍药甘草汤方剂学实验研究 [J]. 中成药, 2012, 34(7): 1354-1358.
- [11] 刘陶世, 赵新慧, 段金殿, 等. 荧光脂质体法研究芍药甘草汤对磷脂酶 A₂ 的抑制效应及其配伍作用 [J]. 中草药, 2008, 39(7): 1000-1004.
- [12] 张保国, 刘庆芳. 芍药甘草汤临床研究与新用 [J]. 中成药, 2012, 34(9): 1774-1777.
- [13] 范桂滨, 黄志刚. 大剂量芍药甘草汤治疗普通型肌肉痛性痉挛 68 例 [J]. 中医药临床杂志, 2007, 19(3): 248.
- [14] 宁云红, 郭承伟, 吕 璐. 芍药甘草汤治疗葡萄膜炎 [J]. 中医学报, 2019, 34(2): 384-387.
- [15] 王佳慧, 吕冠华. 吕冠华应用仲景方治疗便秘临床经验总结 [J]. 亚太传统医药, 2019, 15(1): 95-96.
- [16] 张科庄. 芍药甘草汤加味治疗指屈肌腱鞘炎探析 [J]. 光明中医, 2015, 30(10): 2150-2151.
- [17] 王智民, 刘菊妍, 刘晓谦, 等. 谈经典名方的化学、生产和质量控制研发和监管 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1819-1824.
- [18] 梁爱华, 韩佳寅, 陈士林, 等. 中药经典名方的质量与安全性考量 [J]. 中国食品药品监管, 2018, 173(6): 6-12.
- [19] 刘 俊, 朱宝平, 孙 志, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱的妇可靖胶囊中 11 种成分定量研究 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 353-359.
- [20] 冯 红, 潘桂湘. 高分辨质谱在中药化学成分分析中的应用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(8): 40-42.
- [21] 崔小芳, 杜晨晖, 裴香萍, 等. 基于肠道菌群转化的酸枣仁质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4634-4642.
- [22] 刘 念, 刘 锋, 许 彬, 等. 生物组织质谱成像方法的建立及其在微波辐射后大鼠海马组织的蛋白组分析中的应用 [J]. 分析化学, 2008, 36(4): 421-425.
- [23] Wu C, Ifa D R, Manicke N E, et al. Rapid, direct analysis of cholesterol by charge labeling in reactive desorption electrospray ionization [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(18): 7618-7624.
- [24] Dill A L, Eberlin L S, Zheng C, et al. Multivariate statistical differentiation of renal cell carcinomas based on lipidomic analysis by ambient ionization imaging mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(7/8): 2969-2978.
- [25] 邓远雄. 体内药物分析 [M]. 长沙: 中南大学出版社, 2016.
- [26] Tillner J, Wu V, Jones E A, et al. Faster, more reproducible DESI-MS for biological tissue imaging [J]. *J Am Soc Mass Spectr*, 2017, 28(10): 2090-2098.
- [27] Takáts Z, Wiseman J M, Cooks R G. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization

- (DESI): Instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology [J]. *J Mass Spectrom*, 2005, 40(10): 1261-1275.
- [28] 王中华, 何秉淑, 孙成龙, 等. 基于空气动力辅助离子化-超高分辨质谱成像技术的大鼠肾脏组织中多种类代谢物的分布研究 [J]. *分析化学*, 2018, 46(3): 406-412.
- [29] 孙 博, 赵一帆, 朱广伟, 等. DESI-MSI 在半夏泻心汤质量控制中的应用探索 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(07): 117-128.
- [30] 汉·张仲景. 伤寒杂病论 [M]. 刘世恩, 毛绍芳, 点校. 北京: 华龄出版社, 2000.
- [31] 李 冀. 方剂学 [M]. 第 2 版. 北京: 中国中医药出版社, 2016.
- [32] 谭菁菁, 赵庆春, 杨 琳, 等. 白芍化学成分研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(8): 1245-1248.
- [33] 练杭芸, 徐王彦君, 梁乾德, 等. UPLC-QTOF MS 法比较赤芍、白芍煎液化学成分差异 [J]. *质谱学报*, 2014, 35(3): 269-278.
- [34] 李 翔. 四逆汤化学成分和抗心肌缺血作用的研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2008.
- [35] 任 娟, 刘 晓, 李伟东, 等. 基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 的白芍炒制前后化学成分研究 [J]. *世界中医药*, 2019, 14(2): 268-273.
- [36] 谭淑瑜, 肖 雪, 朴胜华, 等. 白芍水溶性成分快速鉴定研究 [J]. *中药材*, 2017, 40(1): 94-100.
- [37] 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.
- [38] 杨 彬, 王 媛, 田 梦, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究法半夏中甘草化学成分 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(3): 45-49.
- [39] 孙立丽, 游广娇, 任晓亮, 等. 甘草化学成分快速定性分析与化学模式识别研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(5): 2074-2079.