

基于 UPLC-Q-TOF-MS 的人参配方颗粒化学成分及指纹图谱研究

王 静^{1,2}, 姚长良², 张建青², 李佳媛², 姚 帅², 果德安^{1,2*}

1. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 中国科学院上海药物研究所 中药标准化技术国家工程研究中心, 上海 201203

摘要: **目的** 采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF-MS) 对人参配方颗粒标准汤剂化学成分进行快速表征, 阐明人参配方颗粒的化学物质基础, 并建立指纹图谱方法对人参配方颗粒进行质量控制。 **方法** 采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 在正、负离子模式下分别采集人参配方颗粒标准汤剂的质谱数据, 通过 MS DIAL 软件辅助解析、数据库检索和对照品比对等方法快速分析人参配方颗粒标准汤剂化学成分。并采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 乙腈-0.01% 磷酸水溶液为流动相, 建立人参配方颗粒指纹图谱方法。 **结果** 从人参配方颗粒标准汤剂中共鉴定出 57 个化合物, 包括皂苷 25 个、氨基酸及其衍生物 12 个、碱基及核苷 5 个、其他类成分 15 个。建立的人参配方颗粒指纹图谱有 8 个共有峰, 分别为人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rc、Ro、Rb₁、Rb₂、Rd。指纹图谱方法精密度、稳定性、重复性良好, 不同厂家不同批次人参配方颗粒的成分基本相同, 仅含量上存在一定差异。 **结论** 该研究基本阐明了人参配方颗粒的化学物质基础, 建立的指纹图谱方法为人参配方颗粒的质量控制提供了方法参考。

关键词: 人参配方颗粒; 指纹图谱; UPLC-Q-TOF-MS; 高效液相色谱; 人参皂苷; 人参皂苷 Rg₁; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rf; 人参皂苷 Rc

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2022)11-3286-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.11.003

Study on chemical components and chromatographic fingerprints of Ginseng Dispensing Granules based on UPLC-Q-TOF-MS

WANG Jing^{1,2}, YAO Chang-liang², ZHANG Jian-qing², LI Jia-yuan², YAO Shuai², GUO De-an^{1,2}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. National Engineering Research Center of TCM Standardization Technology, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

Abstract: **Objective** Ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was adopted to rapidly characterize the chemical constituents from standard decoction of Ginseng Dispensing Granules, elucidate the chemical basis of Ginseng Dispensing Granules, and establish an HPLC fingerprint for their quality control. **Methods** An ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) column was used for the gradient elution with acetonitrile (A)-0.1% formic acid (B) as the mobile phases, and the data was collected in positive and negative modes. The chemical constituents of Ginseng Dispensing Granules were analyzed and identified by MS DIAL software, comparing with reference standards and searching database. The HPLC fingerprint was established on an ACQUITY UPLC HSS T3 column (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) with acetonitrile -0.01% phosphoric acid as the mobile phases. **Results** A total of 57 compounds, including 25 saponins, 12 amino acids and their derivatives, five bases and nucleosides, together with 15 other compounds, were identified in the standard decoction of Ginseng Dispensing Granules. The HPLC fingerprint of Ginseng Dispensing Granules was established with eight common peaks, respectively ginsenoside Rg₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rf, ginsenoside Rc, ginsenoside Ro, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rb₂, and ginsenoside Rd. And the precision, stability and reproducibility of the HPLC fingerprint were acceptable. The components in

收稿日期: 2022-02-15

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (82130111); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (82003938)

作者简介: 王 静, 女, 硕士研究生。E-mail: jingwang0105@163.com

*通信作者: 果德安, 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药化学与现代质量标准研究。Tel: (021)50271516 E-mail: daguo@simm.ac.cn

different batches of Ginseng Dispensing Granules from different manufacturers were basically similar, and only slight differences existed in contents. **Conclusion** The results of this study clarified the chemical substance basis of Ginseng Dispensing Granules, and the established HPLC fingerprint provided a method reference for the quality control of Ginseng Dispensing Granules.

Key words: Ginseng Dispensing Granules; fingerprint; UPLC-Q-TOF-MS; HPLC; ginsenoside; ginsenoside Rg₁; ginsenoside Re; ginsenoside Rf; ginsenoside Rc

中药配方颗粒是由单味中药饮片经水提、浓缩、干燥、制粒而成,具有便携、易于贮存和使用等特点,是对传统中药饮片的补充^[1-3]。虽然中药配方颗粒已经获得广泛的应用,但其化学物质基础及质量控制研究仍然滞后。人参为五加科人参属植物 *Panax ginseng* C. A. Mey. 的干燥根及根茎^[4]。由于其具有大补元气、除邪明目和益智安神等功效,是常用的补益要药^[5-6]。目前,对于人参药材化学物质基础已有深入研究,主要含有皂苷、糖、挥发性成分、脂、蛋白质及甾醇类等成分^[7-11],其中皂苷类成分研究最多,Zuo 等^[12]从人参中鉴定了 286 个人参皂苷。人参配方颗粒应用广泛,其由人参经水提制得,化学物质基础与人参药材存在明显差异。但目前人参配方颗粒的物质基础研究鲜有报道,因此也阻碍了科学可行的人参配方颗粒质量控制方法的构建。本研究采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术,通过数据库检索、对照品比对和 MS DIAL 软件辅助解析等方法快速分析人参配方颗粒标准汤剂化学成分,并建立人参配方颗粒的指纹图谱方法,从而达到控制人参配方颗粒质量的目的。

1 仪器与材料

Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪、Waters Xevo G2-S Q-TOF 质谱仪(Waters 公司,美国);P180H 型超声波水浴锅(德国埃尔玛公司);Quintix 224-1 CN-1 型电子天平(赛多利斯北京有限公司);Agilent 1290 型超高效液相色谱仪,配置 Agilent G7111B 四元泵、Agilent G7129A 进样器、Agilent G7115A DAD 检测器;Milli-Q Integral 超纯水系统(Millipore 公司, Bedford, 美国)。

色谱纯乙腈(批号 UCNA1H, Honeywell),分析纯甲醇(批号 20210208, 国药集团上海化学试剂有限公司),质谱级甲酸(批号 UUQBH-JX, 梯希爱上海化成工业发展有限公司),色谱级磷酸(批号 20200731, 色谱级, Tedia 公司)。

对照品人参皂苷 Rg₁(ginsenoside Rg₁, 批号 3852, 质量分数 98.0%)、人参皂苷 Re(ginsenoside Re, 批号 4147, 质量分数 98.0%)、人参皂苷 Rf

(ginsenoside Rf, 批号 3071, 质量分数 98.0%)、人参皂苷 Rc(ginsenoside Rc, 批号 7879, 质量分数 98.0%)、人参皂苷 Ro(ginsenoside Ro, 批号 8689, 质量分数 98.0%)、人参皂苷 Rd(ginsenoside Rd, 批号 8262, 质量分数 98.0%)、人参皂苷 Rb₁(ginsenoside Rb₁, 批号 2326, 质量分数 98.0%)、人参皂苷 Rb₂(ginsenoside Rb₂, 批号 9039, 质量分数 98.0%)均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。

18 批人参配方颗粒来源信息见表 1。人参药材购自上海雷允上药业有限公司,经上海药物研究所中药现代化中心姚帅高级实验师鉴定为五加科人参属植物人参 *P. ginseng* C. A. Mey., 符合《中国药典》2020 版一部人参项的有关规定。

表 1 18 批人参配方颗粒来源

Table 1 Sources of 18 batches of Ginseng Dispensing Granules

编号	批号	厂家
S1	211201001	上海万仕诚药业有限公司
S2	211201002	上海万仕诚药业有限公司
S3	211201003	上海万仕诚药业有限公司
S4	1071251	广东一方制药有限公司
S5	A1120551	广东一方制药有限公司
S6	A1120541	广东一方制药有限公司
S7	A1120561	广东一方制药有限公司
S8	A1129571	广东一方制药有限公司
S9	A1105171	广东一方制药有限公司
S10	A1129582	广东一方制药有限公司
S11	2006001C	华润三九医药股份有限公司
S12	2103002C	华润三九医药股份有限公司
S13	2005003C	华润三九医药股份有限公司
S14	2005001C	华润三九医药股份有限公司
S15	2005002C	华润三九医药股份有限公司
S16	21056494	江阴天江药业有限公司
S17	21100641	江阴天江药业有限公司
S18	21060091	江阴天江药业有限公司

2 方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取人参皂苷 Rg₁、Re、Rf、Rc、Ro、Rb₁、Rb₂、Rd 对照品适量,分别加 50%甲醇水制成 100 μg/mL 的对照品溶液。

2.2 供试品溶液制备

2.2.1 人参配方颗粒供试品的制备 取人参配方颗粒适量, 研细, 称取 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇水 20 mL, 超声处理 30 min, 14 000 r/min 离心, 取上清液, 即得。

2.2.2 人参配方颗粒标准汤剂及其供试品的制备 标准汤剂 (实验室自制): 取人参药材粉末 100 g, 加 10 倍量水浸泡 30 min, 武火加热沸腾后保持微沸煎煮 60 min, 经 150 目滤布滤过, 药渣加 8 倍量水, 保持微沸煎煮 30 min, 合并滤液, 浓缩, 冻干, 得人参配方颗粒标准汤剂粉末^[3,13]; 精密称取 1 g 粉末, 加 50% 甲醇水 20 mL, 超声处理 30 min, 14 000 r/min 离心, 取上清液, 即得。

2.3 色谱、质谱条件

2.3.1 人参配方颗粒标准汤剂的成分分析 色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~1 min, 2% A; 1~16 min, 2%~30% A; 16~25 min, 30%~44% A; 25~28 min, 44%~95% A; 28~29 min, 95%~100% A; 29~32 min, 100% A), 柱温为 30 °C; 进样体积为 2 μL; 体积流量为 0.3 mL/min。

质谱条件: 电喷雾离子源采用正、负离子模式进行数据采集, 以氮气为雾化气和锥孔气, 采集方法为 fast DDA。正离子模式参数: 毛细管电压为 2.5 kV, 锥孔电压为 40 V, 离子源温度为 120 °C, 去溶剂气温度 450 °C, 锥孔气体积流量 30 L/h, 去溶

剂气体积流量 600 L/h。负离子模式参数: 毛细管电压为 2.0 kV, 锥孔电压为 40 V; 离子源温度为 120 °C; 去溶剂气温度 450 °C, 锥孔气体积流量 50 L/h, 去溶剂气体积流量 800 L/h。扫描范围 m/z 100~1500, 采集时间 0.1 s, 当基峰离子强度高于 10 000 时, 触发前三强母离子的二级扫描。碰撞能低质量端设置为 10~30 V, 高质量端设置为 30~50 V。

2.3.2 人参配方颗粒指纹图谱 色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.01% 磷酸水溶液 (A) 和乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~20 min, 20%~24% B; 20~33 min, 24%~28% B; 33~60 min, 28%~36% B), 柱温为 35 °C, 进样体积为 2 μL, 检测波长为 203 nm; 体积流量为 0.3 mL/min。

2.4 数据处理

首先, 将采集的高分辨质谱数据通过 MSconvert 软件进行数据格式转换, 后将转换格式后的数据导入 MS DIAL 软件中进行解卷积、峰提取、代谢物鉴定。并结合高分辨质谱数据提供的准分子离子及二级碎片信息, 使用 Masslynx 软件进行数据分析。

3 结果

3.1 人参配方颗粒标准汤剂的物质基础研究

采用 UPLC-QTOF-MS 技术获得人参配方颗粒标准汤剂的高分辨质谱数据, 其在正、负离子模式下的基峰离子流图见图 1。通过数据解析共鉴定 57 个化合物, 包括皂苷 25 个、氨基酸及其衍生物 12 个、碱基及核苷 5 个、其他类成分 15 个, 鉴定结果见表 2。

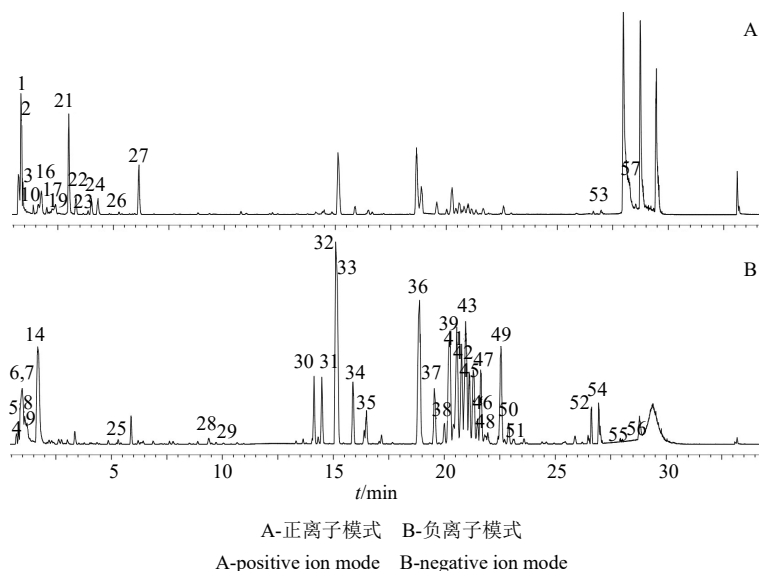


图 1 人参配方颗粒标准汤剂基峰离子流图

Fig. 1 Basic peak chromatograms of Ginseng Dispensing Granules standard decoction

表 2 人参配方颗粒标准汤剂成分鉴定

Table 2 Composition identification of Ginseng Dispensing Granules standard decoction

序号	t_R/min	质量数(m/z)	分子式	加和离子	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	化合物名称	参考文献
1	0.79	175.120 5	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	$\text{M}+\text{H}$	1.0	175.120 5, 158.093 0, 130.097 5, 116.071 7, 70.067 2	精氨酸	14-15
2	0.80	337.171 8	$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7$	$\text{M}+\text{H}$	-0.5	337.171 8, 175.120 9, 158.093 2	精氨酸葡萄糖苷	16
3	0.83	499.225 0	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_{12}$	$\text{M}+\text{H}$	-0.1	499.225 0, 337.169 2, 175.120 7, 158.093 6	精氨酸葡萄糖二糖苷	16
4	0.86	195.047 7	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$	$\text{M}-\text{H}$	-2.8	195.049 6, 177.036 7, 147.026 8, 129.013 1, 99.001 5, 74.998 9, 59.003 2	葡萄糖酸	17
5	0.86	209.028 0	$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_8$	$\text{M}-\text{H}$	-1.7	209.027 7, 191.017 4, 133.010 0, 129.015 4, 85.020 8, 71.004 4, 57.023 3	葡萄糖二酸	18
6	0.95	191.057 7	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_6$	$\text{M}-\text{H}$	2.1	191.057 7, 127.039 1, 85.030 2	奎宁酸	19-20
7	0.96	341.106 9	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	$\text{M}-\text{H}$	-1.5	341.107 3, 179.053 0, 119.028 9, 89.016 3, 71.000 40, 59.003 4	蔗糖	19
8	0.98	503.160 3	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	$\text{M}-\text{H}$	-0.9	503.158 7, 341.102 2, 221.063 9, 179.052 3, 119.027 6, 89.016 3	棉子糖	17,20
9	1.03	133.009 6	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$	$\text{M}-\text{H}$	-4.1	133.009 3, 115.004 3, 71.014 6	苹果酸	14,20
10	0.92	116.069 5	$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$	$\text{M}+\text{H}$	-1.7	116.070 8, 70.064 6	脯氨酸	18,21
11	1.19	266.122 6	$\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_7$	$\text{M}+\text{H}$	-1.4	248.113 6, 230.103 6, 194.085 5, 98.058 6	γ -氨基丁酸葡萄糖苷	17
12	1.37	136.064 0	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$	$\text{M}+\text{H}$	1.7	136.062 5, 119.035 1	腺嘌呤	19-20
13	1.49	123.057 3	$\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$	$\text{M}+\text{H}$	1.5	123.057 4, 96.044 2, 80.050 2	烟酰胺	18,22
14	1.62	191.018 1	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	$\text{M}-\text{H}$	-1.1	191.015 7, 173.008 5, 129.016 4, 111.002 0, 87.000 3, 57.022 0	柠檬酸	18,20
15 ^a	1.62	274.092 0	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_7$	$\text{M}+\text{H}$	-0.7	238.070 7, 192.066 7, 130.049 3, 97.029 7	脯氨酸戊糖苷	
16	1.71	130.050 9	$\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}_3$	$\text{M}+\text{H}$	0.5	130.049 6, 84.046 7	<i>L</i> -焦谷氨酸	15,19
17	2.11	182.081 7	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3$	$\text{M}+\text{H}$	0.0	165.057 5, 136.078 3, 123.046 7	酪氨酸	15,21
18	2.17	113.035 7	$\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$	$\text{M}+\text{H}$	0.6	113.036 2, 96.007 3, 70.065 6	尿嘧啶	19-20
19	2.30	132.102 1	$\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_2$	$\text{M}+\text{H}$	-0.4	86.097 9	亮氨酸	15,21
20 ^a	2.55	294.155 9	$\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{NO}_7$	$\text{M}+\text{H}$	0.6	276.147 2, 230.138 0, 144.102 3, 86.101 7	异亮氨酸果糖苷	
21	2.90	268.104 8	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_4$	$\text{M}+\text{H}$	0.2	268.105 4, 136.063 5	腺苷	16,22
22 ^a	3.15	252.109 2	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_3$	$\text{M}+\text{H}$	-0.5	252.109 2, 136.063 5	虫草素	
23	3.22	284.099 1	$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5$	$\text{M}+\text{H}$	-0.4	225.127 6, 152.058 9, 135.031 4, 110.035 4	鸟苷	20-21
24	3.99	166.086 8	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$	$\text{M}+\text{H}$	0.0	120.083 4, 103.057 6	苯丙氨酸	14,15
25	5.31	382.098 9	$\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_8$	$\text{M}-\text{H}$	-1.0	266.087 8, 206.068 5, 115.006 5	琥珀酰腺苷	17
26	5.32	127.041 2	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$	$\text{M}+\text{H}$	1.7	127.039 9, 109.034 6	麦芽酚	17
27	6.14	205.098 2	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$	$\text{M}+\text{H}$	0.5	188.071 2, 159.094 0, 118.065 0	色氨酸	14-15
28	9.39	337.092 7	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_8$	$\text{M}-\text{H}$	0.4	191.056 3, 173.044 293.352	香豆酰奎宁酸	22
29	10.67	163.041 1	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	$\text{M}-\text{H}$	1.6	163.036 7, 119.050 7	对香豆酸	17,20
30 ^c	14.05	1 007.540 0	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{19}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	-3.1	961.534 7, 799.479 7, 637.433 1	PPT-3Glc	
31 ^s	14.40	977.529 4	$\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{O}_{18}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	-2.7	931.524 9, 799.484 1, 637.430 6	三七皂苷 R1	
32 ^s	15.07	845.489 3	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	-0.6	845.489 3, 799.486 6, 637.434 5, 475.381 5	人参皂苷 R _{g1}	
33 ^s	15.12	991.549 4	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	1.6	945.541 5, 783.490 1, 637.430 3, 475.380 8, 119.028 4	人参皂苷 Re	
34	15.89	885.482 2	$\text{C}_{45}\text{H}_{74}\text{O}_{17}$	$\text{M}-\text{H}$	-2.6	841.494 6, 781.471 9, 619.421 0, 475.381 0	丙二酰人参皂苷 R _{g1}	19,23
35	16.37	1 031.542 7	$\text{C}_{51}\text{H}_{84}\text{O}_{21}$	$\text{M}-\text{H}$	1.6	987.550 2, 945.539 6, 927.529 4, 637.428 7	丙二酰人参皂苷 Re	19,23
36 ^s	18.80	845.489 3	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	-0.6	799.481 5, 637.431 0, 475.380 2	人参皂苷 Rf	
37	19.47	815.478 6	$\text{C}_{41}\text{H}_{70}\text{O}_{13}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	-0.7	769.470 6, 637.431 0, 475.377 2, 161.042 3	三七皂苷 R ₂	19,23
38 ^s	20.14	829.492 4	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	-2.5	783.487 5, 637.429 9, 475.378 0, 161.041 4	人参皂苷 R _{g2}	
39 ^s	20.24	1 153.603 0	$\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{23}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	2.4	1 107.588 6, 945.537 9, 783.486 3, 179.051 9	人参皂苷 Rb ₁	

续表 1

序号	t_R/min	质量数(m/z)	分子式	加和离子	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	化合物名称	参考文献
40 ^a	20.40	329.232 3	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_5$	$\text{M}-\text{H}$	-0.5	329.231 9, 229.142 0, 211.133 7, 171.099 9, 139.107 8, 99.072 2	9,10,13-TriHOME	
41	20.53	1 193.598	$\text{C}_{50}\text{H}_{98}\text{O}_{31}$	$\text{M}-\text{H}$	-3.7	1 149.602 9, 1 107.588 0, 945.542 2	丙二酰人参皂苷 Rb_1	19,23
42 ^s	20.80	1 123.594 0	$\text{C}_{53}\text{H}_{90}\text{O}_{22}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	4.0	1 077.583 5, 783.493 3, 621.433 1	人参皂苷 Rc	
43 ^s	20.94	955.487 1	$\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$	$\text{M}-\text{H}$	-3.2	955.487 5, 793.431 8, 569.382 1, 455.351 5	人参皂苷 Ro	
44	21.16	1 163.586 5	$\text{C}_{49}\text{H}_{96}\text{O}_{30}$	$\text{M}-\text{H}$	-4.5	1 119.592 7, 1 077.580 2, 1 059.568 6, 945.542 5, 765.487 1	丙二酰人参皂苷 Rc	19,23
45 ^s	21.32	1 123.587 0	$\text{C}_{53}\text{H}_{90}\text{O}_{22}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	-3.0	1 077.580 8, 783.480 7, 621.435 7	人参皂苷 Rb_2	
46 ^s	21.49	1 123.587 0	$\text{C}_{53}\text{H}_{90}\text{O}_{22}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	-3.0	1 077.580 1, 783.481 0, 621.434 3	人参皂苷 Rb_3	
47	21.64	1 163.586 0	$\text{C}_{49}\text{H}_{96}\text{O}_{30}$	$\text{M}-\text{H}$	-4.5	1 119.592 7, 1 077.580 2, 1 059.568 6	丙二酰人参皂苷 Rb_2	19,23
48	21.80	1 163.586 3	$\text{C}_{49}\text{H}_{96}\text{O}_{30}$	$\text{M}-\text{H}$	-4.5	1 119.592 7, 1 077.580 2, 1 059.568 6	丙二酰人参皂苷 Rb_3	19,23
49 ^s	22.55	991.549 4	$\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{18}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	1.6	945.544 1, 783.488 3, 621.433 3, 161.041 3	人参皂苷 Rd	
50 ^c	22.64	793.435 9	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{14}$	$\text{M}-\text{H}$	-1.5	793.437 8, 631.383 2	OA-Glc-GlurA	
51	22.90	1 031.543 3	$\text{C}_{51}\text{H}_{84}\text{O}_{21}$	$\text{M}-\text{H}$	1.6	987.550 2, 945.539 6, 927.529 4, 637.428 7	丙二酰人参皂苷 Rd	19,23
52 ^c	26.59	793.435 9	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{14}$	$\text{M}-\text{H}$	-1.5	793.436 5, 731.439 7, 631.390 4, 569.382 7, 455.351 5	OA-Glc-GlurA	
53	26.74	261.184 5	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2$	$\text{M}+\text{H}$	-1.0	261.184 3, 105.034 4	人参环氧炔醇	24
54 ^s	26.96	829.496 3	$\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	1.4	783.489 1, 621.434 3, 459.380 0, 161.041 4	人参皂苷 Rg_3	
55 ^c	27.50	631.382 9	$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_9$	$\text{M}-\text{H}$	-1.7	631.382 4, 555.364 1, 455.347 5	OA-Glur A	
56	28.00	811.479 6	$\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{12}$	$\text{M}+\text{HCOO}$	-4.8	765.477 7, 603.429 7, 161.042 3	人参皂苷 Rg_5	12,25
57	28.25	279.232 0	$\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$	$\text{M}+\text{H}$	-0.4	201.052 1, 95.085 3, 81.068 8	亚麻酸	19

s-用对照品比对 a-与 MS DIAL 数据库中二级质谱图进行比较鉴定 c-根据裂解规律进行推断

s-refers to compounds identified by comparing with reference standard a-refers to compounds identified by comparing with MS/MS data obtained from MS DIAL c-refers to compounds characterized according to fragmentation rules

3.1.1 皂苷类 皂苷类成分是人参的主要药效成分之一,是由苷元和 1 个或几个糖组成,人参中人参皂苷大部分为原人参三醇(PPT)和原人参二醇(PPD)型,含有少量的齐墩果酸(OA)型皂苷^[12,25]。通常在负离子模式下具有较好的响应,形成丰富的 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 或 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 离子,母离子中的糖苷键断裂产生一系列脱糖碎片和苷元离子。本研究共鉴定和推测出 25 个皂苷类化合物,包括 PPT 型 9 个(30~38),PPD 型 11 个(39、41、42、44~49、51、54),OA 型 4 个(43、50、52、55),其他型 1 个(56)。以化合物 32 为例,在负离子模式下,产生加和离子峰 m/z 845.489 3 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$,根据其元素组成推导其分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{14}$ 。母离子碎裂产生 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 准分子离子峰 m/z 799.486 6,随后相继丢失六碳糖产生 m/z 637.434 5 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ 与 PPT 苷元离子 m/z 475.381 5 $[\text{M}-\text{H}-2\text{Glc}]^-$ 。根据以上质谱碎片信息以及与对照品比对,32 鉴定为 PPT 型人参皂苷 Rg_1 。化合物 54 负离子模式下,产生加和离子峰 m/z 829.496 3 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$,根据其元素

组成推导其分子式为 $\text{C}_{42}\text{H}_{72}\text{O}_{13}$ 。母离子碎裂产生 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 准分子离子峰 m/z 783.489 1,随后相继丢失六碳糖产生 m/z 621.434 3 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ 与 PPD 苷元离子 m/z 459.380 0 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{Glc}]^-$ 。根据以上质谱碎片信息,54 鉴定为 PPD 型人参皂苷 Rg_3 。化合物 43 在负离子模式下,产生 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 准分子离子峰 m/z 955.487 1;母离子碎裂产生 m/z 793.431 8 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ 、569.382 1 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{Glc}-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}]^-$ 与苷元离子 455.351 5 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}-\text{Glc}-\text{GlurA}]^-$ 。根据以上质谱碎片信息以及与对照品比对,43 鉴定为 OA 型人参皂苷 Ro 。化合物 56 在负离子模式下,产生 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ 加和离子峰 m/z 811.479 6,母离子碎裂产生 m/z 765.477 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 准分子离子峰、随后丢失六碳糖产生 m/z 603.429 7 $[\text{M}-\text{H}-\text{Glc}]^-$ 。根据以上质谱碎片信息结合文献报道^[12],56 鉴定为人参皂苷 Rg_5 。

3.1.2 氨基酸及其衍生物 在人参配方颗粒标准汤剂中共鉴定出 12 个氨基酸及其衍生物(1~3、10、11、15~17、19、20、24、27)。在正离子模式下,

化合物 **27** 产生 m/z 205.098 2 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 对应分子式 $C_{11}H_{12}N_2O_2$; 其主要的二级碎片有 m/z 188.071 2 $[M+H-NH_3]^+$ 、159.094 0 $[M+H-HCOOH]^+$ 、118.065 0 $[M+H-C_3H_5NO_2]^+$, 结合数据库匹配及其碎片信息并参考文献^[14,15], **27** 鉴定为色氨酸。化合物 **3** 在正离子模式下产生 499.225 0 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 对应的分子式为 $C_{18}H_{34}N_4O_{12}$ 。其主要的二级碎片有 m/z 337.172 3 $[M+H-Glc]^+$ 、175.121 2 $[M+H-Glc-Glc]^+$ 、158.091 4 $[M+H-Glc-Glc-NH_3]^+$, 其中 m/z 175.120 7 的碎片表明结构中含有精氨酸, 结合数据库匹配及碎片信息并参考文献数据^[16], 推测 **3** 为精氨酸葡萄糖二糖苷。

3.1.3 碱基及核苷 在人参配方颗粒标准汤剂中共鉴定出 5 个碱基及核苷类成分 (**12**、**18**、**21**、**23**、**25**)。化合物 **21** 在正离子模式下产生 m/z 268.104 8 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰, 对应分子式 $C_{10}H_{11}N_5O_4$; 其主要的二级碎片离子 m/z 136.063 5 分子组成与腺嘌呤碱基一致。因此, 结合数据库匹配和二级碎片并参考文献数据^[16,22], **21** 鉴定为腺苷。

3.1.4 其他类 在人参配方颗粒标准汤剂中共鉴定出 15 个其他类成分 (**4**~**9**、**13**、**14**、**22**、**26**、**28**、**29**、**40**、**53**、**57**)。其中, 化合物 **7** 在负离子模式下产生 m/z 341.106 9 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, 对应分子式 $C_{12}H_{22}O_{11}$ 。其主要的二级碎片离子 m/z 179.053 0 $[M-H-Glc]^-$ 、119.028 9 $[M-H-Glc-C_2H_4O_2]^-$ 、59.003 4 $[M-H-Glc-C_4H_8O_4]^-$ 。基于上述碎片信息, 结合数据库匹配并参考文献^[19], **7** 鉴定为蔗糖。化合物 **14** 在负离子模式下产生 m/z 191.018 1 $[M-H]^-$ 的准分子离子峰, 对应分子式 $C_6H_8O_7$ 。其主要的二级碎片离子 m/z 173.008 5 $[M-H-H_2O]^-$ 、 m/z 129.016 4 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ 、 m/z 111.002 0 $[M-H-2H_2O-CO_2]^-$ 、 m/z 87.000 3 $[M-H-2H_2O-2CO_2]^-$ 。基于上述碎片信息, 结合数据库匹配并参考文献数据^[18,20], **14** 鉴定为柠檬酸。

3.2 人参配方颗粒指纹图谱的建立

3.2.1 色谱条件优化 分别以乙腈-0.01%磷酸水溶液、乙腈-0.02%磷酸水溶液、乙腈-0.1%磷酸水溶液等流动相系统进行梯度洗脱试验, 流动相为乙腈-0.01%磷酸水溶液时, 色谱峰分离较佳, 因此选定的流动相为乙腈-0.01%磷酸。同时, 考察了 25、30、35、40 °C 不同柱温对分离的影响, 色谱峰分离受柱温影响较大, 温度越高, 分离度越佳。由于 40 °C

条件较为极端, 因此选择条件较温和、分离度较佳的 35 °C。并通过梯度优化, 确定最佳的洗脱梯度为 0~20 min, 20%~24%乙腈; 20~33 min, 24%~28%乙腈; 33~60 min, 28%~36%乙腈。

3.2.2 精密度试验 取样品 S1 作为供试品, 精密称取 1 份样品, 按供试品溶液制备方法制备成供试品溶液, 进样分析。结果表明, 各主要色谱峰相对保留时间和其相对峰面积无明显变化, 以 2 号峰人参皂苷 Re 为参照峰, 其 RSD 均小于 2.0%, 表明仪器稳定, 精密度良好。

3.2.3 重复性试验 取精密度试验中同一批作为供试品, 精密称取 6 份样品, 按供试品溶液制备方法制备成供试品溶液, 进样分析。结果表明, 各主要色谱峰相对保留时间和其相对峰面积无明显变化, 以 2 号峰人参皂苷 Re 为参照峰, 其 RSD 均小于 2.0%, 表明方法重复性良好。

3.2.4 稳定性试验 取精密度试验中同一批样品作为供试品, 按“2.2”项方法制备成供试品溶液, 分别在 0、3、6、9、12、15、18、24 h 进样分析。以 2 号峰人参皂苷 Re 为参照峰, 各主要色谱峰相对保留时间和其相对峰面积 RSD 均小于 2.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.2.5 指纹图谱的建立及相似度评价 将 18 批人参配方颗粒按“2.2”项方法制成供试品溶液, 按“2.3”项指纹图谱的色谱条件对其进行检测, 记录色谱图, 数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)”, 以 S1 号样品的色谱图作为参照图谱进行全谱峰匹配, 以平均值法生成对照图谱 (图 2) 并计算相似度。结果表明, 经过与对照品比对, 指认了 8

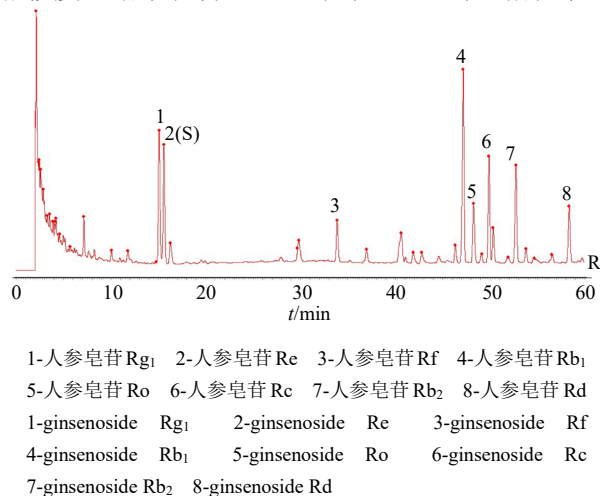


图 2 人参配方颗粒对照图谱

Fig. 2 Reference fingerprint of ginseng dispensing granules

个共有峰: 1 号峰为人参皂苷 R_{g1} , 2 号峰为人参皂苷 R_c , 3 号峰为人参皂苷 R_f , 4 号峰为人参皂苷 R_{b1} , 5 号峰为人参皂苷 R_o , 6 号峰为人参皂苷 R_c , 7 号峰为人参皂苷 R_{b2} , 8 号峰为人参皂苷 R_d 。18 批

人参配方颗粒样品的指纹叠加图谱, 见图 3, 各批样品与对照图谱的相似度分别为 0.917、0.917、0.927、0.983、0.994、0.994、0.997、0.997、0.993、0.989、0.989、0.993、0.990、0.972、0.989、0.994、

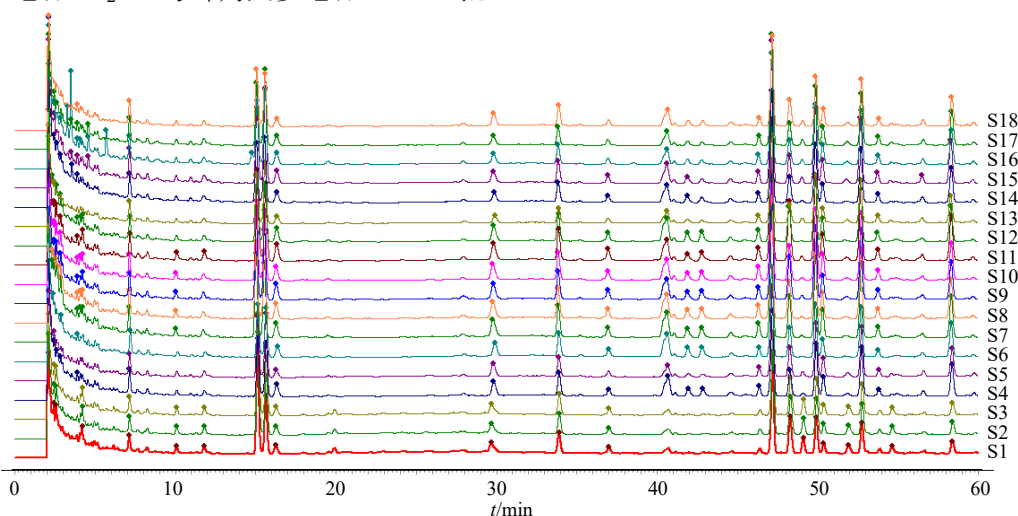


图 3 不同厂家 18 批人参配方颗粒指纹图谱

Fig. 3 Fingerprints of 18 batches of Ginseng Dispensing Granules from different manufacturers

0.992、0.984, 样品相似度均大于 0.900。

4 讨论

目前, 人参化学研究多集中于药材中皂苷成分, 人参配方颗粒的研究多集中于其药效作用, 而人参配方颗粒中的化学物质基础尚不明确^[26-29]。液质联用技术将液相色谱对复杂样品的高分离能力与质谱的高分辨率、高灵敏度以及能提供化合物的元素组成及离子碎片信息等特点结合起来, 可用于化合物的快速鉴定, 目前已被广泛应用于中药化学成分鉴定和指纹图谱研究^[30-32]。本研究运用 UPLC-Q-TOF/MS 技术, 采用正、负离子 2 种模式进行质谱扫描, 通过数据库检索、对照品比对和 MS DIAL 软件辅助解析等方法快速分析人参配方颗粒中的化学成分, 共鉴定出 57 个化合物, 包括皂苷 25 个、氨基酸及其衍生物 12 个、碱基及核苷 5 个、其他类成分 15 个, 为后续人参配方颗粒的质量控制与药效研究提供了物质基础信息。

中药配方颗粒由于失去了原有饮片所具有的形态学指纹, 需要建立完善可行的质量标准, 以控制药品的安全性、稳定性、有效性^[33]。指纹图谱能够较为全面地反映中药整体的质量信息, 因此可被用于对中药配方颗粒的质量控制^[34-37]。基于此, 本研究建立了人参配方颗粒指纹图谱, 在进行指纹图谱条件建立的过程中, 本研究对不同流动相体系、柱

温、洗脱梯度等色谱参数进行了优化, 从而获得峰形较好、色谱峰分离度较佳的指纹图谱条件。并应用于不同厂家的人参配方颗粒质量控制中。不同厂家不同批次的成分基本相同, 仅含量上存在一定差异, 可能与原药材的来源不同或辅料加入量有关; 本研究仍存在配方颗粒样品批次过少, 代表性不够等问题。与现有人参配方颗粒标准^[38]相比, 本方法分析时间较短, 色谱峰分离情况更佳, 可以应用于提升人参配方颗粒质量控制水平。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 殷佳, 潘晔, 蔡雪朦, 等. 中药传统汤剂、浸膏剂和配方颗粒剂的比较 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3871-3875.
- [2] 何军, 朱旭江, 杨平荣, 等. 中药配方颗粒的现状与发展新思路 [J]. 中草药, 2018, 49(20): 4717-4725.
- [3] 中华人民共和国药典委员会. 中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求(征求意见稿) [S]. 2016: 1-2.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 8-9.
- [5] Xu W Q, Choi H K, Huang L F. State of *Panax ginseng* research: A global analysis [J]. *Molecules*, 2017, 22(9): 1518.
- [6] Patel S, Rauf A. Adaptogenic herb ginseng (*Panax*) as medical food: Status quo and future prospects [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 85: 120-127.
- [7] Yang W Z, Hu Y, Wu W Y, et al. Saponins in the genus

- Panax* L. (Araliaceae): A systematic review of their chemical diversity [J]. *Phytochemistry*, 2014, 106: 7-24.
- [8] Yang W Z, Ye M, Qiao X, *et al.* A strategy for efficient discovery of new natural compounds by integrating orthogonal column chromatography and liquid chromatography/mass spectrometry analysis: Its application in *Panax ginseng*, *Panax quinquefolium* and *Panax notoginseng* to characterize 437 potential new ginsenosides [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 739: 56-66.
- [9] Shi X J, Yang W Z, Qiu S, *et al.* Systematic profiling and comparison of the lipidomes from *Panax ginseng*, *P. quinquefolius*, and *P. notoginseng* by ultrahigh performance supercritical fluid chromatography/high-resolution mass spectrometry and ion mobility-derived collision cross section measurement [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1548: 64-75.
- [10] Yang W Z, Shi X J, Yao C L, *et al.* A novel neutral loss/product ion scan-incorporated integral approach for the untargeted characterization and comparison of the carboxyl-free ginsenosides from *Panax ginseng*, *Panax quinquefolius*, and *Panax notoginseng* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 177: 112813.
- [11] Shi X J, Yang W Z, Qiu S, *et al.* An in-source multiple collision-neutral loss filtering based nontargeted metabolomics approach for the comprehensive analysis of malonyl-ginsenosides from *Panax ginseng*, *P. quinquefolius*, and *P. notoginseng* [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 952: 59-70.
- [12] Zuo T T, Zhang C X, Li W W, *et al.* Offline two-dimensional liquid chromatography coupled with ion mobility-quadrupole time-of-flight mass spectrometry enabling four-dimensional separation and characterization of the multicomponents from white ginseng and red ginseng [J]. *J Pharm Anal*, 2020, 10(6): 597-609.
- [13] 陈士林, 刘安, 李琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(8): 1367-1375.
- [14] Jiang M Y, Cao J L, Zhang C B, *et al.* A comprehensive strategy for quality evaluation of Wushe Zhiyang Pills by integrating UPLC-DAD fingerprint and multi-ingredients rapid quantitation with UPLC-MS/MS technology [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 210: 114556.
- [15] 吴锦忠, 李向高, 杨继祥. 鲜人参与红参氨基酸成分比较研究 [J]. 中药材, 1990, 13(5): 27-28.
- [16] 雷冬梅, 姚长良, 陈雪冰, 等. 基于 RP-Q-TOF-MS 和 HILIC-Q-TOF-MS 的经典名方当归补血汤成分分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(8): 2109-2120.
- [17] Horai H, Arita M, Kanaya S, *et al.* MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences [J]. *J Mass Spectrom*, 2010, 45(7): 703-714.
- [18] Song Q Q, Song Y L, Zhang N, *et al.* Potential of hyphenated ultra-high performance liquid chromatography-scheduled multiple reaction monitoring algorithm for large-scale quantitative analysis of traditional Chinese medicines [J]. *RSC Adv*, 2015, 5(71): 57372-57382.
- [19] Zhu H L, Lin H Q, Tan J, *et al.* UPLC-QTOF/MS-based nontargeted metabolomic analysis of mountain- and garden-cultivated ginseng of different ages in northeast China [J]. *Molecules*, 2018, 24(1): 33.
- [20] 高健, 吕邵娃. 人参化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药导报, 2021, 27(1): 127-130.
- [21] 熊佩, 李凯琳, 龚开妍, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术的血藤果化学成分分析 [J]. 中国药业, 2021, 30(18): 55-60.
- [22] Pan X L, Li Z L, Qian S H, *et al.* Chemical constituents of the flower buds of *Panax ginseng* [J]. *Chem Nat Compd*, 2015, 51(3): 559-560.
- [23] Christensen L P. Chapter 1 ginsenosides: Chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2008, 55: 1-99.
- [24] 杨秀伟, 王洪平, 张友波, 等. 人参根和根茎中新的聚乙炔类化学成分 [J]. 中草药, 2021, 52(1): 14-22.
- [25] Qiu S, Yang W Z, Yao C L, *et al.* Nontargeted metabolomic analysis and “commercial-homophyletic” comparison-induced biomarkers verification for the systematic chemical differentiation of five different parts of *Panax ginseng* [J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1453: 78-87.
- [26] 左刚, 张彤, 李非洲, 等. 加味人参养荣配方颗粒与传统饮片治疗气虚证临床对比研究 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(1): 106-109.
- [27] 吴昊, 刘同彦, 刘佳, 等. 人参饮片与配方颗粒药效的比较研究 [J]. 人参研究, 2017, 29(1): 8-10.
- [28] 张鹏, 邬兰, 李西文, 等. 人参饮片标准汤剂的评价及应用探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(7): 2-11.
- [29] 刚晓超. 中药配方颗粒人参对非小细胞肺癌术后(肺脾两虚)患者 T 淋巴细胞亚群的影响研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2015.
- [30] 陈明曦, 李艳梅, 孙婷, 等. 液相色谱-质谱联用技术在中药质量研究中的应用 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 19(1): 12-17.
- [31] Yu Y, Yao C L, Guo D A. Insight into chemical basis of traditional Chinese medicine based on the state-of-the-art techniques of liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6): 1469-1492.
- [32] 严华, 张慧秀, 白宗利, 等. 基于特征图谱的人参属药

- 材西洋参、人参、三七的比较 [J]. 世界中医药, 2021, 16(6): 887-895.
- [33] 张慧, 陈燕, 汪佳楠, 等. 指纹图谱技术在中药配方颗粒质量评价及过程控制中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(19): 3822-3827.
- [34] 毛明强, 翟艳敏, 封亮, 等. 基于汤剂煎煮特征的中药配方颗粒制备技术发展与应用 [J]. 世界中医药, 2020, 15(15): 2228-2233.
- [35] 李帅锋, 郑传柱, 张丽, 等. 不同产地何首乌 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2149-2154.
- [36] 毕晓黎, 胥爱丽, 李养学. 三七配方颗粒的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 54-57.
- [37] Yang W Z, Zhang Y B, Wu W Y, *et al.* Approaches to establish Q-markers for the quality standards of traditional Chinese medicines [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7(4): 439-446.
- [38] 人参配方颗粒 [S]. 2021: 1-2.

[责任编辑 王文倩]