

基于 HPLC 指纹图谱和 LC-Q-TOF/MS 的加味黄芪桂枝五物汤化学成分研究

汤书婉¹, 李新亮¹, 马莉¹, 郑云枫^{1*}, 李存玉¹, 成小兰², 曹鹏^{1,2}, 彭国平^{1*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210000

2. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210000

摘要: 目的 建立加味黄芪桂枝五物汤 (Jiawei Huangqi Guizhi Wuwu Decoction, JHD) HPLC 指纹图谱, 鉴定其主要化学成分, 并阐明指纹图谱共有峰的成分归属。方法 HPLC 指纹图谱检测采用 Hypersil ODS 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.2% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量 1 mL/min, 检测波长为 250 nm, 柱温为 30 ℃; 运用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”进行相似度评价, 并以高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱 (liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, LC-Q-TOF/MS) 方法对指纹图谱中化学成分进行分析, 通过对照品、化合物质谱信息结合文献报道鉴定其结构, 进一步通过药材指纹图谱阐明共有峰的成分归属。结果 建立了 JHD 的 HPLC 指纹图谱, 确定了 20 个共有峰, 10 批样品相似度为 0.920~0.990。在此基础上共鉴定出 JHD 中 70 个化学成分, 包括 28 个黄酮类、23 个三萜类、5 个单萜苷类、5 个有机酸类、5 个姜辣素类及 4 个其他类化合物。结论 HPLC 指纹图谱结合 LC-Q-TOF/MS 定性鉴别, 能够体现 JHD 组分整体特征, 可为其质量控制研究奠定基础。

关键词: 加味黄芪桂枝五物汤; 指纹图谱; 高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱法; 毛蕊异黄酮苷; 芒柄花苷; 桂皮醛; 芍药苷; 甘草酸

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)03-0711-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.005

Research on chemical composition of Jiawei Huangqi Guizhi Wuwu Decoction based on HPLC fingerprint and LC-Q-TOF/MS

TANG Shu-wan¹, LI Xin-liang¹, MA Li¹, ZHENG Yun-feng¹, LI Cun-yu¹, CHENG Xiao-lan², CAO Peng^{1,2}, PENG Guo-ping¹

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

2. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

Abstract: Objective To establish the HPLC fingerprint of Jiawei Huangqi Guizhi Wuwu Decoction (加味黄芪桂枝五物汤, JHD), identify its main chemical components, and clarify the components of the common peaks of the fingerprint. **Methods** A Hypersil ODS column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was selected for HPLC fingerprint, acetonitrile and 0.2% formic acid aqueous solution was used as the mobile phase in a gradient elution. The mobile phase was set at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 250 nm and the column temperature was 30 ℃. The “Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of TCM” was used to evaluate the similarity of the HPLC fingerprints of samples. The chemical components in the fingerprint were analyzed by the liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-Q-TOF/MS). The structure was identified by comparison with standards and mass spectrum information reported in the literature. Then, the origin of ingredients was clarified by combining the fingerprints of single medicinal material. **Results** The HPLC fingerprints were established with 20 common peaks obtained. The similarity of 10 batches of samples was 0.920—0.990. Seventy components of JHD were identified, including 28

收稿日期: 2022-02-25

基金项目: 重大新药创制科技重大专项 (2019ZX09301145)

作者简介: 汤书婉 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药化学与分析。Tel: 18260581807 E-mail: tang_swan@163.com

*通信作者: 彭国平, 教授, 博士生导师, 主要从事中药化学与分析研究。E-mail: guopingpeng@sohu.com

郑云枫, 教授, 主要从事中药制药工艺与质量评价研究。E-mail: zyunfeng88@126.com

flavonoids, 23 pentacyclic triterpene saponins, 5 monoterpene glycosides, 5 organic acids, 5 gingerols and 4 other kinds of compounds.

Conclusion HPLC fingerprint binding LC-Q-TOF/MS qualitative identification reflects the overall characteristics of JHD. It can lay the foundation for its quality control study.

Key words: Jiawei Huangqi Guizhi Wuwu Decoction; fingerprints; HPLC-Q-TOF/MS; calycosin-7-glucoside; ononin; cinnamaldehyde; paeoniflorin; glycyrrhizic acid

加味黄芪桂枝五物汤 (Jiawei Huangqi Guizhi Wuwu Decoction, JHD) 是由经典名方黄芪桂枝五物汤与芍药甘草汤衍化而来, 由黄芪、桂枝、生姜、大枣、白芍、甘草 6 味药组成。具有益气温经、和血通痹之功效, 主治血痹阴阳俱微、寸口关上微、尺中小紧、外证身体不仁, 如风痹状^[1]。现代研究表明, 该方能显著预防化疗药物奥沙利铂引起的外周神经病变, 有效保护外周神经元线粒体稳态, 降低化疗引起的神经元损伤^[2-3], 减轻肿瘤患者在临床治疗时的疼痛, 具有良好的临床应用前景。

JHD 组方中涉及的药味较多, 成分复杂^[4-5], 增加了质量控制标准建立的难度。物质基础是制剂质量控制的关键^[6], 通过指标成分的含量检测或特征图谱的单一手段, 难以体现复方制剂质量控制体系的科学性和全面性^[7-8]。液质联用技术具有高效、高分辨率、高灵敏度等优点, 已广泛应用于中药复方的化学成分分析。本研究基于 HPLC 建立了 JHD 的指纹图谱, 同时采用 LC-Q-TOF/MS 技术, 结合对照品指认与文献报道, 对指纹图谱中的共有峰进行定性鉴别, 进一步对各共有成分的归属进行了解析, 以期对 JHD 的新药开发奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪、2998 PDA 检测器 (美国 Waters 公司); AB SCIEX Triple TOF™ 5600 型高分辨质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); SCIENTZ-10ND 型真空冷冻干燥机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); 梅特勒 MS-105DU 1/10 万电子天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); TG16 A-WS 型离心机 (南京以马内利仪器设备有限公司); DW-0.25K 型智能数显恒温电热套 (南通市通州畅通电热厂)。

1.2 材料

对照品毛蕊异黄酮苷 (批号 111920-201606, 质量分数 97.6%)、芒柄花素 (批号 111703-201504, 质量分数 97.5%)、黄芪甲苷 (批号 110781-201717, 质量分数 96.9%)、桂皮醛 (批号 110710-201821,

质量分数 99.6%)、甘草苷 (批号 111610-201908, 质量分数 95.0%)、甘草酸铵 (批号 110731-201619, 质量分数 93.0%)、6-姜辣素 (批号 111833-201806, 质量分数 99.9%)、8-姜酚 (批号 111993-201601)、10-姜酚 (批号 111994-201501)、芍药苷 (批号 110736-201943, 质量分数 95.1%) 均购自中国食品药品检定研究院; 对照品毛蕊异黄酮 (批号 JBZ-0786)、芒柄花苷 (批号 JBZ-0778)、黄芪皂苷 I (批号 JBZ-0501)、异甘草苷 (批号 JBZ-1503)、芹糖甘草苷 (批号 JBZ-1725)、芹糖异甘草苷 (批号 JBZ-0996) 均购自南京金益柏生物科技有限公司 (质量分数 ≥ 98%); 丙二酰毛蕊异黄酮苷、丙二酰芒柄花苷、丙二酰黄芪皂苷 I、乌拉尔皂苷 B、甘草皂苷 G2 均由实验室前期分离纯化获得^[9-10], 经 HPLC 分析, 质量分数 ≥ 98%。乙腈 (色谱纯, 美国 Tedia 公司); 甲酸 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 超纯水 (Milli-Q 超纯水系统制备); 其余试剂均为分析纯。

6 种饮片均经南京中医药大学严辉副教授鉴定, 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根; 桂枝为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥嫩枝; 白芍为毛茛科芍药属植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根; 生姜为姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rose. 的新鲜根茎; 大枣为鼠李科植物枣 *Ziziphus jujube* Mill. 的干燥成熟果实; 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。并依照《中国药典》2020 年版各项下方法检测, 饮片质量均符合规定, 样品信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 采用 Hypersil ODS 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以乙腈 (A) -0.2% 甲酸 (B) 为流动相, 梯度洗脱程序为: 0~25 min, 15%~32% A; 25~60 min, 32%~70% A; 检测波长 250 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源 (ESI), 采用正、负离子模式检测; 扫描范围 m/z 50~1500;

表 1 药材产地及批号

Table 1 Batch number of origin of medicinal materials

编号	黄芪		桂枝		生姜		白芍		大枣		甘草	
	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地	批号	产地
S1	20042909	宁夏固原	190601	广西贵港	20191205	云南蒙自	1904292	安徽亳州	1901121	新疆巴音郭楞蒙古	19074001	内蒙古杭锦旗
S2	20042914	宁夏固原	191001	广西贵港	20191209	云南蒙自	1909231	安徽亳州	1902021	新疆巴音郭楞蒙古	19088001	内蒙古杭锦旗
S3	20042903	宁夏固原	191101	广西贵港	20191212	云南蒙自	1911021	安徽亳州	1904071	新疆巴音郭楞蒙古	19079001	内蒙古杭锦旗
S4	20042905	宁夏固原	191025	广西北海	20200416	云南蒙自	1904201	安徽亳州	1906231	新疆巴音郭楞蒙古	19080001	内蒙古杭锦旗
S5	20191202	宁夏固原	190425	广西北海	20200421	云南蒙自	1812011	安徽亳州	1909141	新疆巴音郭楞蒙古	19077001	内蒙古杭锦旗
S6	20191201	宁夏固原	191103	广西北海	20200429	云南蒙自	1903011	安徽亳州	1910101	新疆巴音郭楞蒙古	19078001	内蒙古杭锦旗
S7	19101002	宁夏固原	190928	广西北海	20200503	云南蒙自	1710131	安徽亳州	1910161	新疆巴音郭楞蒙古	19081001	内蒙古杭锦旗
S8	19122501	宁夏固原	190318	广西北海	20200510	云南蒙自	1810012	安徽亳州	1911011	新疆巴音郭楞蒙古	19075001	内蒙古杭锦旗
S9	19122502	宁夏固原	190919	广西北海	20200515	云南蒙自	1810052	安徽亳州	1911021	新疆巴音郭楞蒙古	19101601	内蒙古杭锦旗
S10	19122503	宁夏固原	190906	广西北海	20200523	云南蒙自	1812207	安徽亳州	1912121	新疆巴音郭楞蒙古	19041901	内蒙古杭锦旗

喷雾电压 5500 V；离子喷雾空载电压 5500 V；解簇电压 100 V；碰撞能量 10 V；离子源温度 550 ℃；雾化器压力 413 kPa；辅助加热器压力 413 kPa；气帘气压力 275 kPa。

2.2 对照品溶液的制备

取对照品毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芒柄花素、芒柄花苷、丙二酰毛蕊异黄酮苷、丙二酰芒柄花苷、丙二酰黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 I、黄芪甲苷、桂皮醛、甘草苷、甘草酸铵、6-姜辣素、8-姜酚、10-姜酚、芍药苷、异甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、乌拉尔皂苷 B、甘草皂苷 G2 适量，精密称定，加甲醇适量，混匀，配制成混合对照品母液。

2.3 供试品溶液的制备

称取黄芪 90 g、生姜 45 g、桂枝 45 g、白芍 45 g、大枣 45 g、甘草 30 g，回流提取 2 次，第 1 次加入 10 倍量水，提取 2 h，滤过；第 2 次加入 8 倍量水，提取 1 h，滤过，合并滤液。60 ℃减压浓缩至含生药 2 g/mL，真空冷冻干燥 12 h，粉碎成中粉。精密称取冻干粉末 1.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 50%甲醇 25 mL，密塞，称定质量，超声处理（功率 240 W、频率 45 kHz）15 min，放冷，再称定质量，用 50%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过。取续滤液，0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 S1 号样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，以 19 号峰的保留时间和峰面积作为参考，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。20 个共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1%，相对峰面积

的 RSD 小于 3%，表明仪器和试验方法精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取 S1 号样品 6 份，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件分别进样，以 19 号峰的保留时间和峰面积作为参考，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。20 个共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1%，相对峰面积的 RSD 小于 5%，表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取 S1 号样品，按“2.3”项下方法制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12、24 h 内按“2.1”项下色谱条件进行测定，以 19 号峰的保留时间和峰面积作为参考，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。20 个共有峰相对保留时间的 RSD 小于 1%，相对峰面积的 RSD 小于 3%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 共有峰标记 以“2.3”项下方法制备的 10 批 JHD 供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，将数据导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2012 版软件进行分析，共选取 20 个共有峰，对照图谱采用“中位数”法生成，使用多点校正对色谱峰进行匹配。JHD 的 HPLC 对照指纹图谱见图 1，10 批供试品溶液的指纹图谱见图 2。

2.5.2 相似度评价 10 批 JHD 与对照指纹图谱相似度分别为 0.920~0.990，具体数据见表 2。

2.5.3 共有峰的指认及相关分析 按“2.3”项下方法制备的各单味药供试品溶液，以及缺少各单味药的阴性供试品溶液（S1 中各批次单味药及阴性样品），以“2.1”项下色谱条件进行测定，见图 3，通过比对其保留时间、阴性样品色谱图，确定 JHD 指

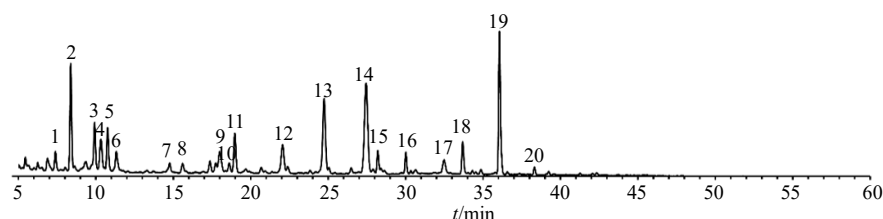


图 1 JHD 的 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 1 Reference HPLC fingerprint of JHD

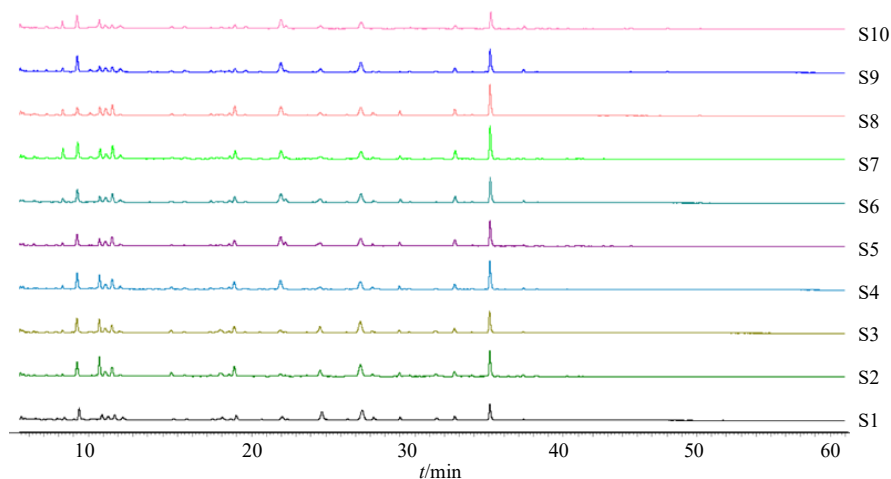


图 2 10 批 JHD 的 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of 10 batches of JHD

表 2 10 批 JHD 的指纹图谱相似度

Table 2 HPLC fingerprints of 10 batches of JHD

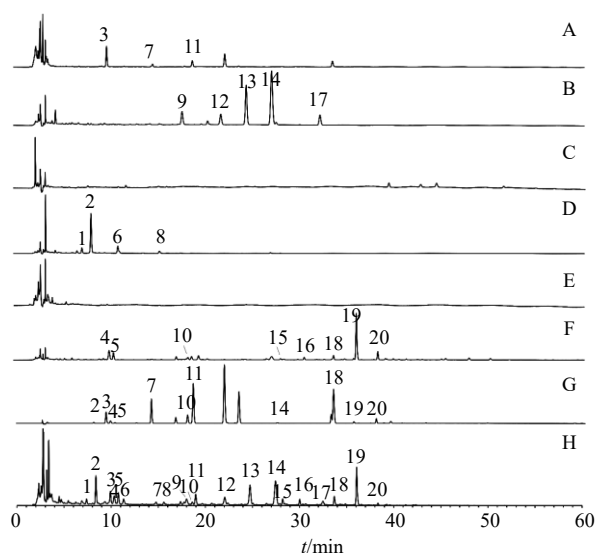
样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	对照指纹图谱
S1	1.000	0.922	0.949	0.865	0.880	0.898	0.838	0.838	0.892	0.870	0.920
S2	0.922	1.000	0.992	0.941	0.918	0.919	0.909	0.904	0.894	0.896	0.960
S3	0.949	0.992	1.000	0.943	0.929	0.939	0.913	0.902	0.926	0.916	0.971
S4	0.865	0.941	0.943	1.000	0.981	0.976	0.977	0.962	0.956	0.944	0.987
S5	0.880	0.918	0.929	0.981	1.000	0.994	0.975	0.975	0.960	0.931	0.987
S6	0.898	0.919	0.939	0.976	0.994	1.000	0.970	0.968	0.975	0.944	0.990
S7	0.838	0.909	0.913	0.977	0.975	0.970	1.000	0.969	0.931	0.913	0.973
S8	0.838	0.904	0.902	0.962	0.975	0.968	0.969	1.000	0.920	0.891	0.966
S9	0.892	0.894	0.926	0.956	0.960	0.975	0.931	0.920	1.000	0.962	0.971
S10	0.870	0.896	0.916	0.944	0.931	0.944	0.913	0.891	0.962	1.000	0.955
对照指纹图谱	0.920	0.960	0.971	0.987	0.987	0.990	0.973	0.966	0.971	0.955	1.000

纹图谱中的 20 个特征峰在 6 味药材中的归属,并与混合对照品溶液比对,确定了其中 11 个成分,其中 3 (毛蕊异黄酮苷)、7 (丙二酰毛蕊异黄酮苷)、11 (芒柄花苷) 号峰来源于黄芪; 9、12、13、14 (桂皮醛)、17 号峰来源于桂枝; 1、2 (芍药苷)、6、8

号峰来源于白芍; 4 (芹糖甘草苷)、5 (甘草苷)、10 (芹糖异甘草苷)、15、16、18 (甘草皂苷 G2)、19 (甘草酸)、20 (乌拉尔甘草 B) 号峰来源于甘草。

2.6 质谱定性分析

为了更为全面地解析 JHD 中化学成分的组成,



A-黄芪 B-桂枝 C-生姜 D-白芍 E-大枣 F-甘草 G-混合对照品溶液 H-JHD

A-Astragali Radix B-Cinnamomi Ramulus C-Zingiberis Rhizoma Recens D-Paeoniae Radix Alba E-Jujubae Fructus F-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma G-mixed standard solution H-JHD

图 3 单味药与 JHD 的 HPLC 指纹图谱对比

Fig. 3 Comparison of HPLC fingerprints of single herb and JHD

采用 LC-Q-TOF/MS 正、负离子模式获得 JHD 指纹图谱中化合物的质谱信息见图 4，并采用对照品对色谱峰进行确认，同时结合处方中各药材化学成分研究相关文献报道^[11-17]，建立了各单味药成分的化

合物数据库，共鉴定了 70 个化合物，见表 3。

选择代表性化合物对成分结构鉴定过程进行解析。其中，黄酮类化合物在正离子模式下响应较高，同时可以检测到丰富二级碎片离子峰，进一步依据它们的准分子离子峰及碎片离子进行了结构鉴定。以 15 号峰 ($t_R=10.744$ min) 毛蕊异黄酮苷为例，其准分子离子峰为 m/z 447.130 3 $[M+H]^+$ ，在误差范围内计算得到的分子式为 $C_{22}H_{22}O_{10}$ ，在二级质谱图中，可见碎片离子 m/z 285.070 6 $[M+H-Glc]^+$ ，再失去 B 环上 CH_3 得到 m/z 270.052 1 $[M+H-Glc-CH_3]^+$ ，或失去 1 分子 $-CH_3OH$ 得到 m/z 253.048 7 $[M+H-Glc-CH_3OH]^+$ ，其裂解规律如图 5 所示。

三萜皂苷类化合物具有多氢蒽的五环母核，以峰 46 甘草皂苷 G2 为例，在正离子模式下，其准分子离子峰为 m/z 839.407 4 $[M+H]^+$ ，确定其分子式为 $C_{42}H_{62}O_{17}$ ，进一步在其二级质谱图中，从分子离子峰失去 1 分子葡萄糖醛酸基及同时失去 2 分子葡萄糖醛酸基，形成 m/z 663.377 6 $[M+H-GlcA]^+$ 及苷元碎片离子 m/z 487.341 9 $[M+H-2GlcA]^+$ ，苷元碎片离子 m/z 487.341 9 由于结构中 3-OH 的性质活泼，很容易失去 H_2O 形成基峰 $[B]^+$ ，相对分子质量为 m/z 469.330 9 $[aglycone+H-H_2O]^+$ ，进一步同时或连续丢失中性分子 H_2O 及 CH_2O ，形成碎片离子

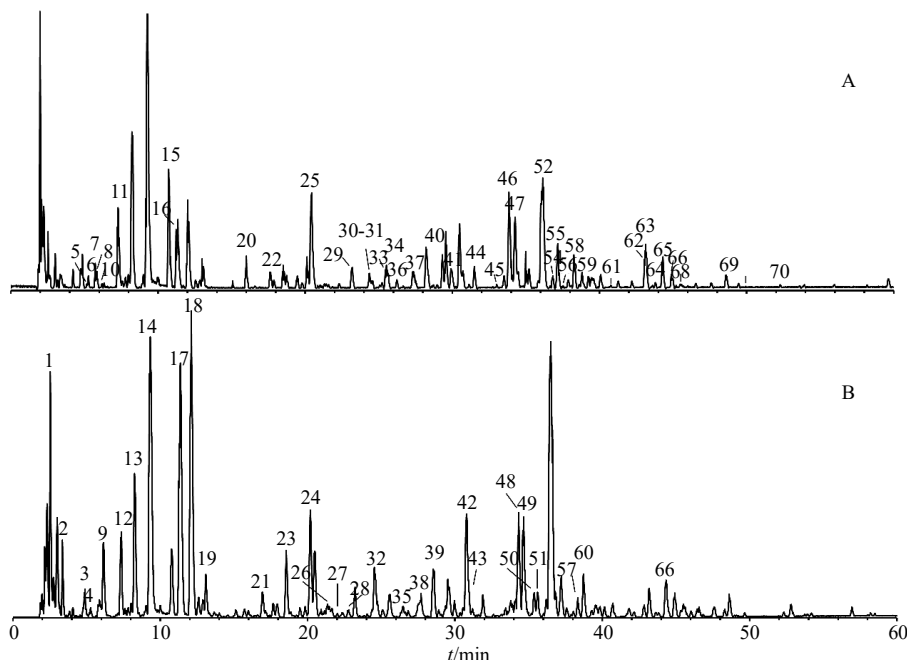


图 4 JHD 的正离子 (A) 和负离子 (B) BPI 图

Fig. 4 Base peak intensity (BPI) diagram of positive (A) and negative (B) of JHD

表 3 JHD 中化学成分定性分析
Table 3 Qualitative analysis of chemical constituents of JHD

峰号	t_R/min	化合物	分子式	离子模式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	来源
					实测值	理论值			
1	2.54	柠檬酸	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	191.019 9	191.018 6	6.7	173.009 7, 129.019 4, 111.009 7, 87.010 0, 85.030 6	P
2	3.36	没食子酸	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	169.014 5	169.013 1	8.0	125.024 7, 124.017 5, 123.009 1, 95.014 9, 79.020 7	P
3	4.87	新甘草苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	417.117 5	417.118 0	-1.2	255.065 8, 135.008 8, 119.051 5	G
4	5.04	原儿茶醛	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	137.024 8	137.024 5	2.1	109.028 7, 93.035 9	P
5	5.26	染料木苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	433.158 7	433.158 7	0	325.114 1, 271.116 8, 253.110 0, 235.090 2	A
6	5.27	2-甲氧基桂皮醛	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_2$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	163.060 8	163.060 1	4.3	145.050 4	C
7	5.74	zizyphusin	$\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4^+$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	342.171 6	342.171 8	-0.7	297.112 3, 265.086 6, 237.091 4, 222.068 1	J
8	5.82	山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	595.167 2	595.165 8	2.4	449.130 1, 287.064 0, 153.066 1, 135.040 4	A, P, J
9	6.15	对羟基苯基丙二酸	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	209.045 6	209.044 5	5.5	165.055 9	G
10	6.44	金丝桃苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	465.082 3	465.081 6	1.5	303.012 4, 285.078 2, 257.080 1	A, P
11	7.29	2-甲氧基桂皮酸	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	179.070 2	179.070 3	-0.4	161.059 6, 151.075 0, 145.050 0	C
12	7.33	异麦芽糖基芍药或 6'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖芍药内酯苷	$\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	687.212 9	687.213 1	-0.3	611.196 8, 593.186 0, 471.149 6, 323.097 9, 165.055 8, 121.030 0	P
13	8.27	芍药内酯苷	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	525.159 8	525.160 3	-0.9	479.154 5, 283.080 9, 121.030 3	P
14*	9.32	芍药苷	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	525.159 1	525.160 3	-2.2	479.154 2, 449.142 8, 327.108 2, 165.054 6, 121.030 0	P
15*	10.74	毛蕊异黄酮苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	447.130 3	447.128 6	3.9	285.070 6, 270.052 1, 253.048 7	A
16	11.15	2-羟基桂皮醛	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	149.023 5	149.023 3	1.2	121.030 3, 65.043 7	C
17*	11.36	芹糖甘草苷	$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	549.157 6	549.160 3	-4.9	255.065 1, 135.008 9	G
18*	12.10	甘草苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	417.116 8	417.118 0	-2.9	255.065 3, 135.008 7, 119.050 8	G
19	13.10	没食子酰芍药苷	$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	631.166 1	631.165 8	0.6	615.153 1, 613.153 9, 491.120 5, 399.098 6, 313.056 5, 271.045 4, 169.015 3	P
20*	15.99	丙二酰毛蕊异黄酮苷	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	533.132 0	533.132 5	-0.9	285.076 0, 270.052 7	A
21	16.94	5-羟基甘草苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	负离子	433.111 7	433.112 9	-2.8	271.060 7, 151.003 8	G
22	17.64	异芍药苷	$\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	481.168 7	481.170 4	-3.6	319.117 0, 197.081 0, 179.069 9, 161.059 8, 133.065 0	P
23*	18.56	芹糖异甘草苷	$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	549.160 0	549.160 3	-0.5	255.066 4, 135.009 2	G
24*	20.19	异甘草苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	417.116 4	417.118 0	-3.9	255.065 4, 148.017 1, 135.009 3, 119.051 3, 91.020 5	G
25*	20.42	芒柄花苷	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_9$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	431.134 8	431.133 7	2.6	269.081 1, 254.057 6	A
26	21.14	甘草素	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	255.065 6	255.065 2	1.6	135.009 1, 119.050 5, 91.020 0	G
27	21.99	甘草皂苷 P2	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{17}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	837.389 4	837.390 3	-1.1	351.057 3	G
28	22.72	3,2',4'-三羟基-4-甲氧基查耳酮	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	285.076 6	285.075 8	3.0	270.053 5, 177.019 1, 150.032 5, 149.024 7, 121.030 1	G

续表 3

编号	t_R/min	化合物	分子式	离子模式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	来源
					实测值	理论值			
29	23.19	鼠李素	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	301.107 1	301.107 1	0	167.069 9	G
30	23.25	astraperocarpin-3-O-Glc	$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	463.148 1	463.148 1	0	301.108 0, 269.084 2, 167.068 6	A
31	24.35	黄芪异黄烷	$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	303.123 4	303.122 7	2.3	193.086 1, 181.085 9, 167.070 2, 161.059 1, 123.044 7	A
32	24.56	异甘草素	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	255.065 6	255.065 2	1.6	135.008 5, 119.050 3, 91.019 9	G
33*	25.54	毛蕊异黄酮	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	285.076 0	285.075 8	0.9	270.054 5, 253.049 6, 225.054 7, 214.062 3, 213.054 6, 197.059 6, 137.023 8	A
34*	25.55	丙二酰基芒柄花苷	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	517.134 8	517.134 1	1.4	169.079 3, 253.051 2	A
35	26.37	欧亚甘草糖苷 A 或其同分异构体	$\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	725.207 0	725.207 6	-0.8	549.159 3, 531.149 6, 399.108 2, 255.065 7, 193.051 4, 135.009 6	G
36	27.35	22-乙酰基甘草皂苷 G2	$\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_{19}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	897.411 9	897.411 5	0.5	527.336 7	G
37	27.39	丙二酰基黄芪紫檀烷苷	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	567.190 1	567.192 0	-3.3	549.160 3, 302.138 0, 301.135 1, 269.084 5, 167.070 4	A
38	27.67	22-羟基-甘草皂苷 G2	$\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_{19}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	895.396 3	895.395 8	0.6	351.053 4	G
39	28.54	甘草皂苷 A3	$\text{C}_{48}\text{H}_{72}\text{O}_{21}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	983.446 5	983.445 9	0.6	821.396 2, 351.057 1	G
40	28.58	丙二酰基异黄烷苷	$\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	568.207 9	568.209 2	-2.2	515.151 3, 411.151 0, 369.133 0, 231.067 5, 167.069 6	A
41	30.01	6"-O-乙酰基-芒柄花苷	$\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	473.146 3	473.144 2	4.4	269.068 1, 254.057 1, 237.056 8	A
42	30.78	22 β -乙酰基甘草酸	$\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_{18}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	879.400 9	879.400 9	0	881.407 7, 351.057 1	G
43	31.18	芹菜素	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	269.080 6	269.080 8	-0.9	253.049 9, 237.055 7, 123.030 1, 117.039 0	A
44	31.50	乌拉尔皂苷 E	$\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{O}_{17}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	837.392 9	837.393 8	-1.1	485.328 0, 467.317 4, 449.307 6, 437.306 1, 141.018 4	G
45*	33.46	黄芪甲苷	$\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	785.476 0	785.477 6	-2.0	605.402 6, 587.394 8, 569.394 2, 473.361 0, 437.342 9, 419.329 6, 143.106 9, 125.096 9	A
46*	33.87	甘草皂苷 G2	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{17}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	839.407 4	839.406 0	1.7	663.377 6, 487.341 9, 469.330 9, 451.321 6, 439.321 9	G
47	34.20	黄芪皂苷 III	$\text{C}_{44}\text{H}_{86}\text{O}_{26}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1 031.522 7	1 031.521 0	1.6	869.388 1, 497.363 2, 437.342 5, 353.072 4, 285.188 8, 217.122 5	A
48	34.32	甘草皂苷 Q2	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{17}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	837.390 4	837.390 3	0.1	351.056 8, 193.034 7	G
49	34.64	甘草皂苷 E2	$\text{C}_{42}\text{H}_{60}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	819.379 0	819.379 8	-0.9	351.055 4	G
50	35.36	乌拉尔皂苷 N	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{17}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	837.389 5	837.390 3	-1.0	351.052 6	G
51	35.61	22-乙酰基甘草皂苷 C2	$\text{C}_{44}\text{H}_{64}\text{O}_{17}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	863.407 2	863.406 0	1.4	351.058 3	G
52	36.11	甘草皂苷 K2	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	823.412 0	823.411 1	1.1	647.378 7, 471.347 2, 453.337 6	G
53*	36.49	甘草酸	$\text{C}_{42}\text{H}_{62}\text{O}_{16}$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	821.395 2	821.395 4	-0.3	351.055 3, 193.035 2	G
54	36.82	黄芪皂苷 II	$\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{O}_{15}$	$[\text{M}+\text{H}]^+$	828.474 6	828.474 8	-0.3	648.422 7, 630.409 1, 612.367 4, 474.363 6, 456.355 6, 438.345 2, 419.329 7	A

续表 3

峰号	<i>t_R</i> /min	化合物	分子式	离子模式	<i>m/z</i>		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (<i>m/z</i>)	来源
					实测值	理论值			
55*	37.17	芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	269.080 0	269.080 8	-3.1	253.048 5, 237.053 8, 225.053 3, 197.059 6, 169.064 3, 152.061 7, 118.041 9	A
56	37.98	7-羟基-3',4'-二甲氧基异黄酮	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	299.090 7	299.091 4	-2.3	284.069 1, 256.070 7, 243.103 3, 168.056 9	A
57	38.34	甘草皂苷 B2	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	[M-H] ⁻	807.414 9	807.416 2	-1.5	351.055 1	G
58	38.28	甘草皂苷 C2	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	[M+H] ⁺	807.403 7	807.404 4	-0.9	631.393 7, 455.340 9, 454.340 9, 436.337 1, 149.132 6	G
59	38.64	3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	[M+H] ⁺	301.108 0	301.107 1	3.2	269.083 2, 241.079 4, 167.070 4, 152.047 5, 134.034 0	A
60*	38.73	乌拉尔皂苷 B	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	[M-H] ⁻	821.392 1	821.389 5	3.1	351.056 2	G
61	41.68	黄芪异黄烷苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	[M+H] ⁺	465.182 3	465.181 4	1.9	303.131 0, 285.262 6, 193.083 3, 167.067 0, 133.062 4, 123.044 3	A
62	43.04	6-姜酚	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	[M+H] ⁺	295.191 8	295.190 4	4.8	277.179 9, 195.104 1	Z
63*	43.14	6-姜辣素	C ₁₆ H ₂₇ O ₄	[M+H] ⁺	317.173 2	317.174 7	-4.8	277.180 0, 177.090 8	Z
64*	43.21	黄芪皂苷 I	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	869.487 1	869.489 3	-2.5	689.421 9, 671.415 8, 653.404 2, 635.405 5, 473.361 2, 455.350 5, 437.341 3, 419.330 7, 157.048 9	A
65	44.30	姜黄素	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	[M+H] ⁺	369.133 4	369.133 3	0.4	285.075 7, 270.052 3, 255.063 2	Z
66	44.32	甘草香豆素	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	[M-H] ⁻	367.118 7	367.117 6	3.0	227.070 1, 139.040 3, 124.017 1	G
67	44.92	异黄芪皂苷 I	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	[M+H] ⁺	869.488 2	869.489 3	-1.3	689.424 5, 671.414 3, 653.406 0, 473.360 1	A
68*	45.85	丙二酰黄芪皂苷 I	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₉	[M+H] ⁺	955.525 1	955.526 1	-1.0	757.429 5, 739.399 1, 721.428 3, 437.342 5, 419.327 3, 303.070 7	A
69*	50.95	10-姜酚	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	[M+H] ⁺	351.129 2	351.128 6	1.8	333.102 7, 207.060 1, 195.105 1	Z
70*	53.60	8-姜酚	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	[M+H] ⁺	323.224 0	323.223 2	2.5	305.212 3, 207.100 6, 195.105 4	Z

“*” 与对照品比对 A-黄芪 C-桂枝 P-白芍 G-甘草 Z-生姜 J-大枣

“***” compared with standards A-*Astragali Radix* C-*Cinnamomi Ramulus* P-*Paeoniae Radix Alba* G-*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* Z-*Zingiberis Rhizoma Recens* J-*Jujubae Fructus*

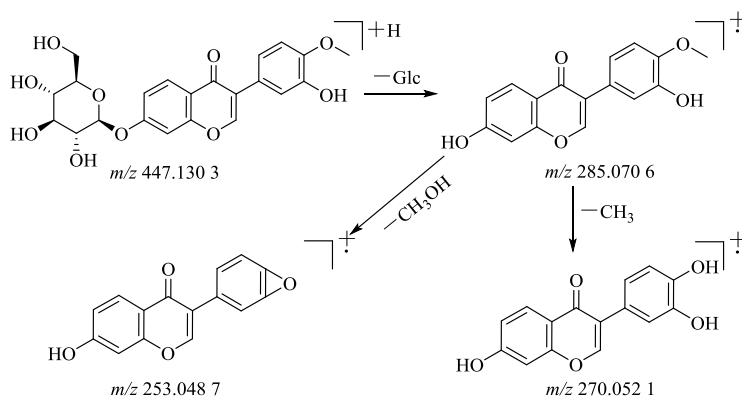


图 5 毛蕊异黄酮苷在正离子模式下裂解规律图

Fig. 5 Fragmentation of mass spectra of calycosin-7-glucoside in positive ion mode

m/z 451.321 6 $[B-H_2O]^+$ 及 m/z 439.321 9 $[B-CH_2O]^+$, 其裂解规律见图 6。

芍药苷(峰 14)是白芍中一类萜烷单萜苷,在 JHD 中含量相对较高,其在负离子模式下,呈现加甲酸的准分子离子峰 m/z 525.159 1 $[M+HCOO]^-$, 二级质谱图中见 m/z 479.154 2 $[M-H]^-$, 以及失去 1 分子甲醛形成的碎片离子 m/z 449.142 8 $[M-H-CH_2O]^-$, 进一步可分别形成苯甲酸碎片离子峰 m/z 121.030 0 及失去苯甲酸的 m/z 327.108 2 $[M-H-CH_2O-C_7H_6O_2]^-$ 碎片离子;而 m/z 165.054 6 碎片离子则为萜烷结构所形成的特征碎片离子,其裂解

规律见图 7。

3 讨论

10 批 JHD 指纹图谱中,不同批次样品之间的相似度波动范围较大,从各样品的指纹图谱中,可以发现峰 12、13 具有明显差异,成分归属结果显示峰 12 与峰 13 来源于桂枝。进一步分析样品来源发现, S1~S3 号样品中所用的桂枝来自广西省贵港市,其余样品中的桂枝均来自广西省北海市。除产地差异外,桂枝药材商品规格等级也不同,贵港市的为桂枝中粒,北海市的为桂枝小粒,而不同规格等级的药材,其活性成分的含量存在差异^[18-19]。因

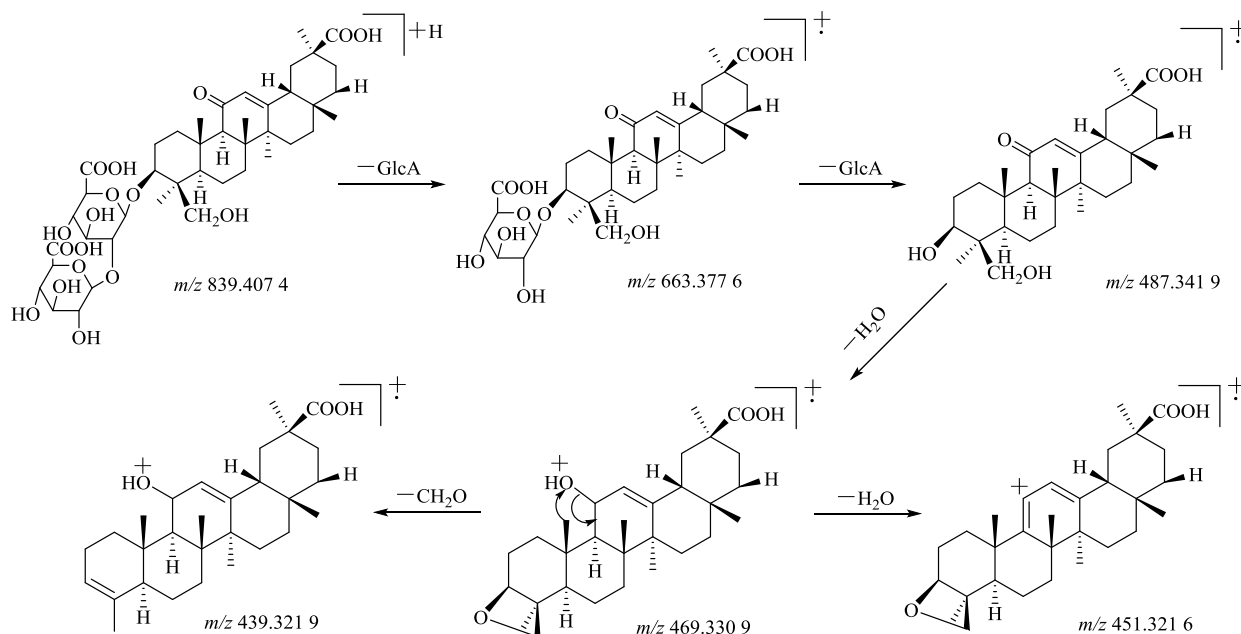


图 6 甘草皂苷 G2 在正离子模式下裂解规律

Fig. 6 Fragmentation of mass spectra of licorice saponin G2 in positive ion mode

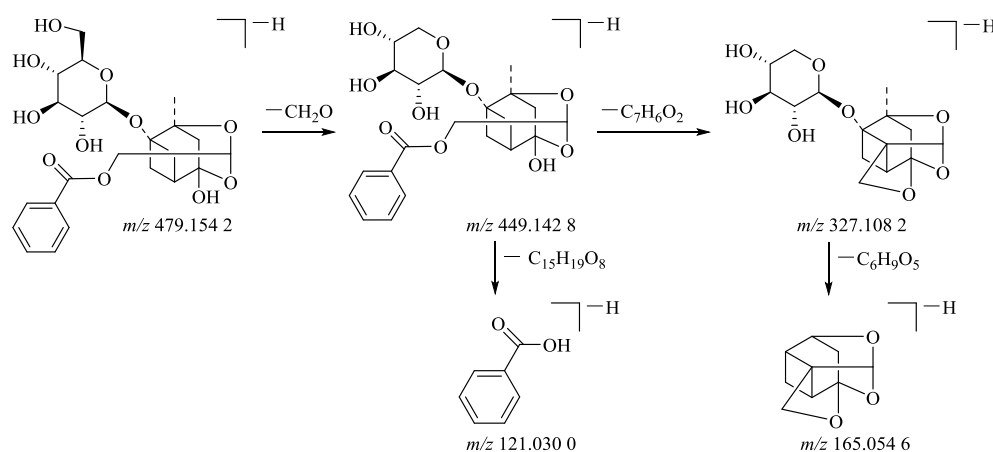


图 7 芍药苷在负离子模式下裂解规律

Fig. 7 Fragmentation of mass spectra of paeoniflorin in negative ion mode

此,在中药方剂以及中成药的质量标准的制定过程中,需要保证所用的原药材的质量稳定可靠^[20],严格控制药材的来源以及所采用的规格等级,从而能够提高中药方剂与中成药药效的稳定性。

JHD 指纹图谱研究中标定出 20 个共有峰,均明确了其相应药味的归属,其中源于桂枝的共有峰 9、12、13、14(桂皮醛)、17 在质谱中未被检测到。这可能是由于桂皮醛等成分具有较强的挥发性,成分在进入质谱检测时经电喷雾离子化加热过程中因挥发而损失,因此未能体现在质谱信息中,相关文献也报道了类似的结果^[21]。

在 JHD 质谱鉴定的 70 个成分中,来自黄芪和甘草饮片中的成分多为黄酮类(28 个)及三萜类(23 个)化合物,白芍中以单萜苷类(5 个)及有机酸类化合物(5 个)为主,生姜中主要以姜辣素类(5 个)成分为主,而大枣中鉴定出的化合物相对较少,可能是由于大枣中主要功效物质为大极性的糖类组分,质谱鉴定存在一定困难。此外,质谱图中一些响应较好的成分如黄芪甲苷由于结构中没有共轭体系,紫外吸光系数低,因而在 HPLC-UV 指纹图谱中未能体现。黄芪为方中的君药,其皂苷类化合物具有抗菌、强心、免疫调节等作用^[22],因此可针对这些皂苷类成分的结构特点,建立 HPLC-ELSD 指纹图谱或多成分含量测定,完善对 JHD 的质量控制。

本研究中采用的质谱检测方法其灵敏度高,依据丰富的质谱信息结合对照品及文献,能够鉴定出较多的化学成分,可以较为全面地反映 JHD 中的化学成分信息;而 HPLC 指纹图谱是目前控制中药复方整体质量的常用方法,仪器设备相对于质谱来说可及性较好,比较适用于常规分析与检验,二者相结合,既可从总体上反映 JHD 中所含化学成分的信息,又体现了处方中各药味在方中的贡献,为其质量控制及药效物质基础提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张仲景. 金匱要略 [M]. 何任, 何若苹整理. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 21.
- [2] Cheng X, Huo J, Wang D, *et al.* Herbal medicine AC591 prevents oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in animal model and cancer patients [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 344.
- [3] Fang Y, Ye J, Zhao B, *et al.* Formononetin ameliorates oxaliplatin-induced peripheral neuropathy via the

KEAP1-NRF2-GSTP1 axis [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101677.

- [4] Xiao Q L, Bai X L, Gao P, *et al.* Application of convolutional neural network-based feature extraction and data fusion for geographical origin identification of *Radix Astragali* by visible/short-wave near-infrared and near infrared hyperspectral imaging [J]. *Sensors*, 2020, 20(17): 4940.
- [5] Russo M, Serra D, Suraci F, *et al.* The potential of e-nose aroma profiling for identifying the geographical origin of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) roots [J]. *Food Chem*, 2014, 165: 467-474.
- [6] Niu J T, Cao R, Si X L, *et al.* Material basis of the difference between *Hedysari Radix* and honey-processed *Hedysari Radix* in buzhong yiqi [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 4543761.
- [7] 洪婷婷, 张钰明, 杨琳洁, 等. 经典名方半夏泻心汤水煎液的 HPLC 指纹图谱及黄芩、黄连量值传递研究 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5166-5176.
- [8] 李学林, 王柯涵, 康欢, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的黄柏配方颗粒汤剂与标准汤剂、传统汤剂对比研究 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 91-100.
- [9] Zheng Y F, Qi L W, Cui X B, *et al.* Oleanane-type triterpene glucuronides from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer [J]. *Planta Med*, 2010, 76(13): 1457-1463.
- [10] Zheng Y F, Duan W P, Sun J, *et al.* Structural identification and conversion analysis of malonyl isoflavonoid glycosides in *Astragali Radix* by HPLC coupled with ESI-Q TOF/MS [J]. *Molecules*, 2019, 24(21): 3929.
- [11] 任浚琪, 刘春明, 王乐奇, 等. 白芍化学成分的高效液相色谱-电喷雾质谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(10): 1727-1731.
- [12] 郑云枫, 段伟萍, 杨阳, 等. 多成分定性/定量分析结合模式识别分析 3 个主产区乌拉尔甘草水溶性特征组分 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2544-2551.
- [13] Wang C Z, Qi L W, Yuan C S. Cancer chemoprevention effects of ginger and its active constituents: Potential for new drug discovery [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(7): 1351-1363.
- [14] 袁鹏飞, 张雯, 徐风, 等. 高效液相色谱/电喷雾-离子阱-飞行时间质谱联用法分析桂枝汤的化学成分 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(2): 145-151.
- [15] 刘杰, 陈琳, 范彩荣, 等. 基于 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 的白芍和赤芍主要成分定性定量研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1762-1770.
- [16] 朱映黎, 刘磊, 张建军, 等. 高效液相色谱法测定鹿胎丹参白芍颗粒中葛根素、芍药苷及丹酚酸 B 含量 [J].

- 世界中医药, 2022, 17(22): 3139-3142.
- [17] 胡英还. 黄芪建中汤体内外化学成分研究 [D]. 太原: 山西大学, 2018.
- [18] 刘威, 李红娟, 张帅, 等. HPLC 测定不同商品规格桂枝中香豆素、肉桂醇、肉桂酸、桂皮醛的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 134-138.
- [19] 李聪, 黄诗雨, 陈丽华, 等. 药材部位、产地及采收期对中药挥发油成分的差异性分析 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5395-5404.
- [20] 孙莹莹, 孙巍, 王萍, 等. 基于 UPLC 指纹图谱的逍遥片批次一致性评价研究 [J]. 中草药, 2020, 51(20): 5154-5165.
- [21] 刘祥东, 梁琼麟, 罗国安, 等. 液质联用技术在医药领域中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1): 110-116.
- [22] Xu J Y, Guan Z B, Wang X W, *et al.* Network pharmacology and experimental evidence identify the mechanism of astragaloside IV in oxaliplatin neurotoxicity [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2021, 15: 99-110.

[责任编辑 王文倩]