



基于UPLC-LTQ-Orbitrap-MS分析加味参芪地黄汤的化学成分

万众, 刘王振祖, 谈鸣岳, 徐东亮, 胡诚, 纪万里

Analysis of chemical ingredients of modified Shenqi Dihuang decoction by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS

WAN Zhong, LIU Wangzhenzu, TAN Mingyue, XU Dongliang, HU Cheng, JI Wanli

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202112054>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

联用超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱技术对扶正化瘀胶囊化学成分快速鉴别

Rapid identification of chemical constituents of Fuzheng Huayu capsules by UHPLC-TOF/MS

药学实践杂志. 2019, 37(5): 406-415 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.005

高效液相-高分辨飞行时间质谱对复方夏枯草消瘤方化学成分的鉴别

Identification of chemical constituents of Xiakucao Xiaoliu mixture by HPLC-TOF/MS

药学实践杂志. 2020, 38(2): 138-142, 155 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201907116

中国西沙群岛沐浴海绵的化学成分研究

Chemical constituents from *Spongia* sp., a marine sponge in Xisha Islands

药学实践杂志. 2017, 35(4): 315-320,382 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.007

中国南海山海绵 *Mycale* sp. 的化学成分研究

Study on chemical constituents of sponge *Mycale* sp. from the South China Sea

药学实践杂志. 2017, 35(4): 308-314 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.04.006

群海绵 *Agelas* sp. 的化学成分研究

Studies on the chemical constituents from marine sponge *Agelas* sp.

药学实践杂志. 2017, 35(5): 419-421,437 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.008

西沙群岛隋氏蒂壳海绵 *Theonella swinhoei* 的化学成分研究

Chemical constituents from the marine sponge *Theonella swinhoei*

药学实践杂志. 2018, 36(1): 55-60 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.01.011



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分析加味参芪地黄汤的化学成分

万众¹, 刘王振祖^{2a}, 谈鸣岳¹, 徐东亮¹, 胡 诚^{2b}, 纪万里³ (1. 上海中医药大学附属曙光医院泌尿中心, 上海 201203; 2. 上海中医药大学: a. 中药学院, b. 科技实验中心, 上海 201203; 3. 上海健康医学院药学院, 上海 201318)

[摘要] 目的 采用超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 技术分析鉴定加味参芪地黄汤中化学成分。方法 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T₃ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 流动相: 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈溶液 (B), 梯度洗脱, 流速为 0.3 ml/min。质谱采用电喷雾 (ESI) 离子源及静电场轨道离子阱质量分析器, 采集质谱碎片信息为正、负离子模式, 通过与对照品的相对保留时间进行比对, 并根据质谱碎片信息进行分析, 同时, 结合文献报道, 实现对加味参芪地黄汤中化学成分的准确鉴定。结果 研究发现加味参芪地黄汤水煎剂采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术共鉴定出 62 个化学成分, 包括 13 个芳香酸类、9 个黄酮类、8 个皂苷类成分、5 个芳香胺类、3 个酮酸类、2 个酚类、1 个芳香醌类及其他成分。结论 本研究所采用的鉴定分析方法高效、准确, 可应用于加味参芪地黄汤中化学成分的鉴定分析, 为其后期的药效物质基础作用机制提供重要的实验数据。

[关键词] 加味参芪地黄汤; 化学成分; 超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱

[中图分类号] R284.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2022)03-0231-07

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202112054

Analysis of chemical ingredients of modified Shenqi Dihuang decoction by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS

WAN Zhong¹, LIU Wangzhenzu^{2a}, TAN Mingyue¹, XU Dongliang¹, HU Cheng^{2b}, JI Wanli³ (1. Urinary Center, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine School of Pharmacy: a. School of Pharmacy, b. Science and Technology Experimental Center, Shanghai 201203, China; 3. School of Pharmacy, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the chemical compounds of Shenqi Dihuang decoction by the ultraperformance liquid chromatography coupled with linear quadrupole ion trap-orbitrap mass spectrometry (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS). **Methods** Waters ACQUITY UPLC HSS T₃ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) was used as chromatographic column with mobile phase: 0.1% formic acid water (A)-0.1% formic acid acetonitrile (B) with gradient elution, and flow rate was 0.3 ml/min. Electrospray ion source (ESI) and an electrostatic field orbital ion trap mass analyzer were adopted, which was used to collect mass spectrometry fragment information with positive and negative ion modes, by comparing with the relative retention time of the reference substance. In addition, the fragment information of the mass spectrum was used to identify the compounds. The accurate identification of the chemical components in Shenqi Dihuang decoction was confirmed with literature. **Results** The study found that UPLC-LTQ-Orbitrap-MS technology could be used to identify 62 chemical components, including 13 aromatic acids, 9 flavonoids, 8 saponins, and 5 aromatic amines, 3 keto acids, 2 phenols, 1 aromatic quinone and other ingredients in Shenqi Dihuang decoction. **Conclusion** The identification analysis method in this study was efficient and accurate, which could be applied to the identification and analysis of chemical components in Shenqi Dihuang decoction and provided the important experimental data for the research on the material basis and mechanism.

[Key words] Shenqi Dihuang decoction; chemical constituents; ultra performance liquid chromatography-ion trap-electrostatic field orbitrap mass spectrometry

参芪地黄汤, 源于清代医家沈金鳌的《杂病犀

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174122)

[作者简介] 万众, 硕士, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗前列腺癌研究

[通信作者] 胡 诚, 硕士, 实验师, 研究方向: 中药活性成分及药理研究, Email: hucheng10200@163.com; 纪万里, 博士, 讲师, 研究方向: 中药分析及活性成分研究, Email: snjiwanli@shutcm.edu.cn

烛》, 作为中医经典方剂, 具有益气养阴, 滋肾健脾之功效, 在临床上广泛应用于治疗肾病及前列腺疾病^[1-2]。加味参芪地黄汤是在由六味地黄汤的基础上加补气药而成^[3], 其中, 熟地黄具有滋肾的功效, 怀山药和茯苓兼具补肝渗湿之效, 温肝之山茱萸, 泽泻与丹皮具有泄浊清肝的作用。此外, 该方在补肝益肾方的基础上再伍以党参, 黄芪以益气补脾,

实则扩大了六味地黄丸的临床应用范围。此外,黄芪具有健脾益气的功效,补肾填精之熟地黄,两药具有固护正气之功效,共为君药。臣药为益气生津之党参和补益肝肾并能涩精之山萸肉、补脾阴又能固精之山药。山萸肉具有补益肝肾和涩精益阴的功效,可平补肾之阴阳,补脾肾阴、固肾亦能除湿之山药,与熟地黄三药相配,肾、肝、脾三脏共补,是为“三补”,泽泻具有利湿泄浊的功效,牡丹皮清热泻火,茯苓淡渗脾湿,是为“三泻”。三补三泻,平补阴阳,可补脾益肾。文献报道显示,参芪地黄汤可通过减轻蛋白尿症状及微炎症状态,从而改善肾功能^[4]。参芪地黄汤可降低糖尿病肾病大鼠模型肾组织中的 TGF- β 1、VEGF 的表达水平而发挥抗糖尿病肾病的作用^[5]。然而,加味参芪地黄汤由多味药组成,成分体系复杂,缺乏其活性成分的系统性研究。因此,明确加味参芪地黄汤中组分对进一步研究其药效作用意义重大。而中药复方具有成分体系复杂,这给分析分离带来了挑战。目前,超高效液相色谱技术联合质谱(Orbitrap-MS)已广泛应用于中药分析,Orbitrap-MS 是静电场轨道阱高分辨质谱,其分辨率高,能够提供准确的分子量^[6-8]。因此,本研究利用超高效液相色谱技术联合高分辨质谱(UPLC-Orbitrap-MS)建立加味参芪地黄汤化学成分的鉴定分析方法,依据对照品、质谱碎片信息及文献报道,此外,采用软件 Mass Frontier 预测分析代表性成分的裂解途径,明确加味参芪地黄汤的化学成分组成,以期研究该方药效物质基础提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LTQ-orbitrap 高分辨质谱仪、电喷雾离子源(ESI)及 Xcalibur2.1 数据处理系统、Ultimate 3000 超高效液相色谱仪(Thermo Fisher 公司);Eppendorf Centrifuge 5424R 高速离心机(艾本德中国有限公司);MS104S 型分析天平(梅特勒公司)。

1.2 试剂

党参(批号:2021042350,上海上药华宇药业有限公司);茯苓(批号:2021110104,上药余天成医药有限公司);淮山药(批号:2021090301,上海德华国药制品有限公司);熟地黄(批号:210816)、菟丝子(批号:210906)、牡丹皮(批号:210926)均购自上海虹桥中药饮片有限公司;制首乌(批号:20211112-1)、黄芪(批号:20211024-1)、泽泻(批号:20210924-2)均购自上海万仕诚国药制品有限公司;丹参(批

号:2107089,上海雷允上中药饮片厂有地黄苷 D(批号:J02GB153517)、有限公司);山萸肉(批号:21060201,上海德大堂国药有限公司);甘草(批号:21072209,上海蔡同德药业有限公司)。上述药材经上海虹桥饮片有限公司陈燕军药师鉴定,均符合 2020 版《中国药典》规定。对照品:5-羟甲基糠醛(批号:H12M9Z61023)、党参炔苷(批号:J30GB153014)、紫丁香苷(批号:Y14N11H131195)、茯苓新酸 B(批号:J10GB150678)、槲皮素(批号:C09S8Y43412)均购自上海源叶生物有限公司,对照品纯度均 >98%。乙腈和甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,购自 Thermo Fisher Scientific。

2 方法

2.1 加味参芪地黄汤化合物数据库的构建

依据加味参芪地黄汤各味药材,在 TCMSP 数据库(http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp_search.php)、中科院上海有机研究所化学专业数据库(<http://www.organchem.csdb.cn>)及中医药活性成分数据库 HIT(<http://lifecenter.sgst.cn/hit/>)、中医药活性成分数据库 TCMID(www.megabionet.org/tcmid/)中搜索,收集加味参芪地黄汤各味药材的化合物信息,共建立包含 786 种成分数据库。

2.2 加味参芪地黄汤的制备

取党参 6 g、黄芪 15 g、熟地黄 15 g、制首乌 15 g、菟丝子 15 g、山药 15 g、泽泻 10 g、丹参 10 g、茯苓 9 g、牡丹皮 9 g、山萸肉 9 g、炙甘草 5 g,加入 8 倍量水浸泡 2 h,煎煮 2 次,每次煎煮 30 min,过滤药渣,浓缩至 1 g/ml,精密移取该样品 5.00 ml,加 70% 甲醇定容至 50 ml,摇匀,离心 15 min (12 000 r/min),取上清液,通过 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3 混合对照品溶液的配制

分别称取各个对照品槲皮素、5-羟甲基糠醛、党参炔苷、紫丁香苷、地黄苷 D、茯苓新酸 B 1.0 mg,至 5 ml 容量瓶中,加甲醇适量,超声,溶解,加甲醇定容,作为对照品溶液。

2.4 色谱条件

采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T₃ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m),流动相:0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B),梯度洗脱(0 ~ 1 min, 5%B; 1 ~ 2 min, 5%B \rightarrow 40%B; 2 ~ 7 min, 40%B \rightarrow 80%B; 7 ~ 15.0 min, 80%B \rightarrow 95%B; 15.0 ~ 19.5 min, 95%B \rightarrow 5%B),流速 0.3 ml/min,柱温 35 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ l。

2.5 质谱条件

质谱的离子源方式为电喷雾,正离子毛细管喷雾电压为 3.8 kV,负离子毛细管喷雾电压为 4.0 kV,离子源温度为 100 °C,毛细管温度为 350 °C,鞘气流速为 45 arb,辅助气体流速 15 arb,扫描分辨率(R)为 60 000,质谱采集范围为 m/z 50 ~ 1 000,以动态数据依赖性扫描作为二级质谱扫描模式,其分辨率为 15 000,高能碰撞解离模式 (high energy collision dissociation, HCD)。

2.6 数据处理及分析方法

采用 Thermo Xcalibur 2.2 对质谱数据进行分析处理。根据建立的数据库,采用对照品比对、文献报道及 Thermo Xcalibur 2.2 workstation 软件预测分析相结合,对峰强度>10 000 的峰进行研究分析,从而鉴定化合物。采用 Mass Frontier (Thermo Scientific, Bremen, Germany) 用于分析和预测化合物的碎片信息及裂解规律。

3 结果

3.1 色谱峰鉴定分析

采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术分析加

味参芪地黄汤化学成分,在正、负离子模式下采集数据(图 1),通过质谱软件 Thermo Xcalibur 2.2 workstation 分析可能的碎片信息,确定每个离子峰的质谱裂解规律,结合对照品及文献报道进行比对分析,从而进行化合物的鉴定。本次研究从加味参芪地黄汤共鉴定出 62 个化合物,包括 13 个芳香酸类、9 个黄酮类、8 个皂苷类成分、5 个芳香胺类、3 个酮酸类、2 个酚类、1 个芳香醌类及其他成分,具体结果见表 1。

3.2 各类化合物鉴定分析

3.2.1 黄酮类化合物

黄酮类化合物具有抗炎、抗肿瘤活性,研究发现其具有良好的抗糖尿病肾病的作用^[9-10]。本次研究采用 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 共鉴定出 9 个黄酮类成分。以化合物 35 为例分析黄酮类化合物的裂解规律,化合物 35 在正离子模式下,形成准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 303.042 83,该离子峰进行碰撞诱导解离,进而色原酮母核发生 *i* 裂解,失去 $C_7H_6O_4$ 形成 m/z 149.06 碎片峰,此外,准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 303.042 83 色原酮母核可直接裂解

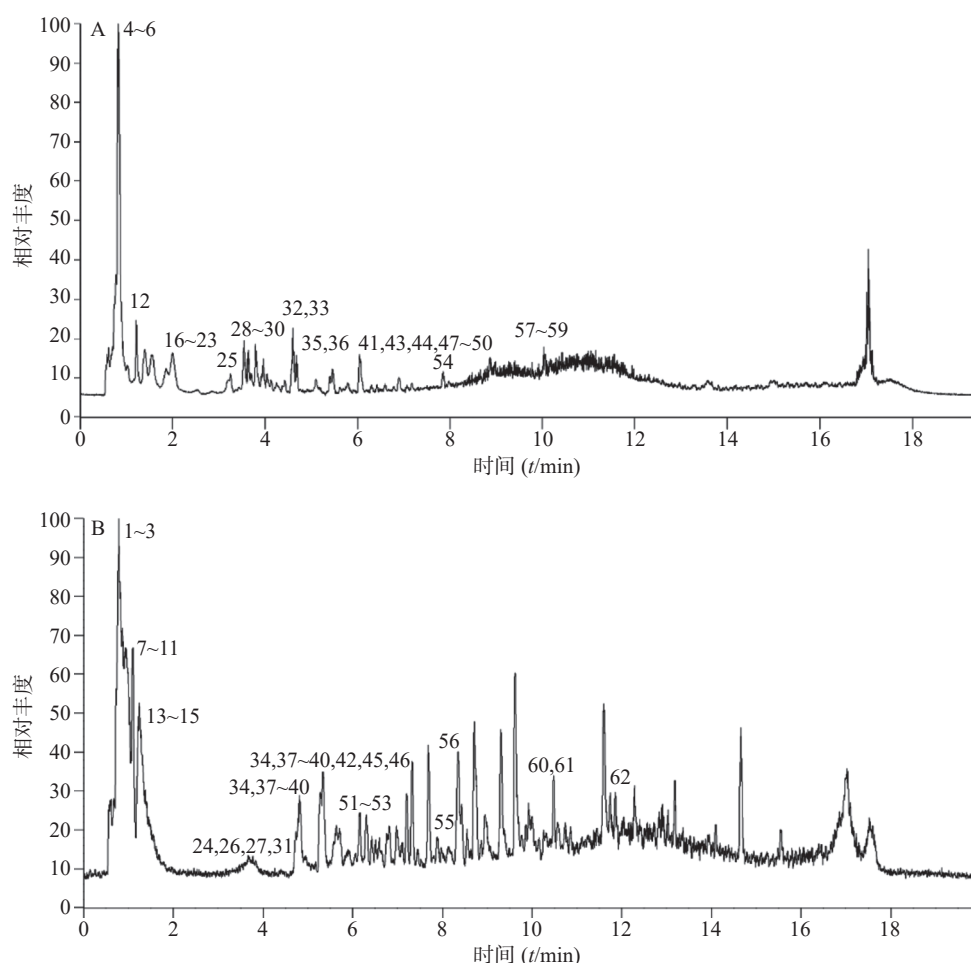


图 1 加味参芪地黄汤 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的正 (A)、负 (B) 离子模式下的总离子流图

表1 加味参芪地黄汤 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 成分分析结果

编号	化合物名称	$t_R(t/min)$	分子式	理论值	实际值	离子模式	误差/ $\times 10^{-6}$	碎片离子信息 (m/z)
1	1-脱氧-1-(甲氨基)己糖醇	0.73	$C_7H_{17}NO_5$	195.10229	195.10977	$[M-H]^-$	-4.63	176.05, 162.08, 159.01
2	麝香木酚	0.75	$C_4H_6N_2O_2$	114.03455	114.04268	$[M-H]^-$	-2.13	85.03
3	戊糖酸	0.78	$C_5H_{10}O_6$	166.03936	166.04721	$[M-H]^-$	-3.19	147.03
4	二甲基-4-羟色胺	0.81	$C_{12}H_{16}N_2O$	204.13353	204.12674	$[M+H]^+$	2.34	204.17, 188.11
5	氨基烯酸	0.82	$C_6H_{11}NO_2$	129.08625	129.07919	$[M+H]^+$	1.68	84.04
6	美索卡因	0.83	$C_{15}H_{24}N_2O$	248.19613	248.18908	$[M+H]^+$	0.85	221.05
7	丙二酸	1.09	$C_3H_4O_4$	104.00258	104.01085	$[M-H]^-$	-1.00	102.02, 93.60, 59.01
8	L-焦谷氨酸	1.09	$C_5H_7NO_3$	129.03421	129.04248	$[M-H]^-$	-0.89	120.07
9	琥珀酸	1.10	$C_4H_6O_4$	118.01823	118.02643	$[M-H]^-$	-1.48	99.01, 73.03
10	没食子酸	1.10	$C_7H_6O_5$	170.01314	170.02101	$[M-H]^-$	-3.02	125.02
11	柠檬酸	1.15	$C_6H_8O_7$	192.01862	192.02609	$[M-H]^-$	-4.75	173.01, 111.01
12	2,5-二甲基-1,3-噁唑-4,4,5(5H)-三羧酸三甲酯	1.21	$C_{11}H_{15}NO_7$	273.09212	273.08553	$[M+H]^+$	2.47	238.07, 192.07, 130.05, 97.03
13	亚甲基琥珀酸	1.21	$C_5H_6O_4$	130.018235	130.0264	$[M-H]^-$	-1.64	128.04
14	2-四氢糠酸	1.23	$C_5H_4O_3$	111.00767	112.01584	$[M-H]^-$	-1.78	94.64
15	地黄苷D*	1.81	$C_{27}H_{42}O_{20}$	686.22415	686.23109	$[M-H]^-$	2.01	505.15
16	丁卡因	2.00	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	264.19105	264.18419	$[M+H]^+$	1.56	247.18
17	5-羟甲基糠醛*	2.07	$C_6H_6O_3$	126.03897	126.03532	$[M+H]^+$	3.50	109.03, 81.03
18	联苯三酚	2.53	$C_6H_6O_3$	126.03897	126.03207	$[M+H]^+$	2.97	109.03, 81.03
19	N'-羟基-N-苯基辛二酰胺	3.37	$C_2H_4N_2O_3$	264.14684	264.14812	$[M+H]^+$	2.74	247.18
20	β -吡啶	3.51	$C_{11}H_8N_2$	168.07602	168.06909	$[M+H]^+$	2.05	150.06
21	邻羟基苯甲酸	3.54	$C_7H_6O_3$	138.03897	138.03186	$[M+H]^+$	1.22	111.04, 83.05, 79.02
22	紫丁香苷*	3.57	$C_{17}H_{24}O_9$	372.13125	372.19681	$[M+Na]^+$	-0.23	325.12, 232.07
23	2-萘胺	3.59	$C_{10}H_9N$	143.08077	143.07369	$[M+H]^+$	1.31	143.03
24	党参皂苷	3.61	$C_{29}H_{42}O_{18}$	677.23150	677.22874	$[M-H]^-$	3.43	497.22, 453.23
25	芹菜素-7-O-新橙皮糖苷	3.74	$C_{27}H_{30}O_{14}$	578.17083	578.16403	$[M+H]^+$	0.82	285.08, 270.05, 253.05
26	己基- β -龙胆二糖苷	3.89	$C_{18}H_{34}O_{11}$	426.20173	426.20035	$[M-H]^-$	-1.39	263.15, 161.05
27	党参苷I	3.90	$C_{21}H_{26}O_{12}$	470.13405	470.04950	$[M-H]^-$	-0.51	393.04, 169.01
28	齐墩果酸	3.90	$C_{30}H_{48}O_3$	456.36762	457.24234	$[M+H]^+$	0.48	385.19, 295.19, 277.18
29	四氰基对醌二甲烷	3.91	$C_{12}H_4N_4$	204.05087	204.04263	$[M+H]^+$	-4.71	146.06
30	香草醛	4.09	$C_8H_8O_3$	152.05462	152.04759	$[M+H]^+$	1.64	143.03, 125.02, 79.02
31	党参炔苷*	4.12	$C_{20}H_{28}O_8$	396.14238	396.14272	$[M-H]^-$	0.36	395.09, 305.10, 215.12, 185.09, 159.09
32	乙酰对氨基苯乙醚	4.18	$C_{10}H_{13}NO_2$	179.101905	179.09498	$[M+H]^+$	1.93	179.06, 175.03, 162.09, 138.09, 120.08, 112.08
33	苯酰甲酸	4.43	$C_8H_6O_3$	150.03897	150.03195	$[M+H]^+$	1.73	150.03, 121.03, 93.03
34	2-(5-甲基-1H-四唑-1-基)-N-(2-硝基苯基)乙酰胺	4.52	$C_{10}H_{10}N_6O_3$	261.073064	262.08262	$[M-H]^-$	4.53	231.07

(续表 1)

编号	化合物名称	t_R (t/min)	分子式	理论值	实际值	离子模式	误差/ $\times 10^{-6}$	碎片离子信息 (m/z)
35	槲皮素*	4.53	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.04992	302.04283	[M+H] ⁺	0.60	195.03, 167.07, 149.06
36	5,7-二羟基-4'-甲氧基 异黄酮	4.56	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.07575	284.06860	[M+H] ⁺	0.46	270.05, 255.07, 227.07, 175.04151.04, 123.04
37	1-(2,4,6-三硝基苯基)- 1H-苯并三唑	4.70	C ₁₂ H ₆ N ₆ O ₆	330.02650	330.03575	[M-H] ⁻	2.63	314.01
38	五碳醛糖基葡萄糖正 己醇苷	4.88	C ₁₇ H ₃₂ O ₁₀	396.19117	396.19102	[M-H] ⁻	4.43	349.20
39	N-(4-乙酰氨基苯基)- 2-(1,3-二甲基-2,6-二 氧代-1,2,3,6-四氢- 7H-嘌呤-7-基)乙酰胺	4.94	C ₁₇ H ₁₈ N ₆ O ₄	370.13057	370.13951	[M-H] ⁻	1.50	207.10, 161.02
40	高香草酸	5.03	C ₉ H ₁₀ O ₄	182.04953	182.05716	[M-H] ⁻	-4.13	166.03
41	创伤霉素	5.11	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	212.14852	212.14143	[M+H] ⁺	0.88	141.00, 105.04
42	黄芪甲苷	5.18	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	784.45253	784.45117	[M-H] ⁻	1.02	178.94, 160.94, 118.95
43	羟棕榈酰二氢鞘氨醇	5.19	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	302.30535	301.29842	[M+H] ⁺	1.12	286.05
44	2-[(二甲氨基)甲基]- 1-(3-甲氧基苯基)-1- 环己醇	5.34	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	263.19580	263.18913	[M+H] ⁺	2.30	177.13, 88.08
45	7-(4-硝基苯基)-4-蝶 啶胺	5.39	C ₁₂ H ₈ N ₆ O ₂	268.06250	268.07213	[M-H] ⁻	4.67	223.17
46	脱氨基神经氨酸	5.44	C ₉ H ₁₆ O ₉	268.07105	268.07811	[M-H] ⁻	-4.94	252.04
47	黄芪皂苷II	5.50	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	826.46069	826.46179	[M+Na] ⁺	3.12	669.40, 477.34
48	泽泻醇C-23-醋酸酯	5.62	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	528.73178	528.72631	[M+H] ⁺	2.35	451.32
49	降木脂素	5.66	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	302.12270	302.11595	[M+H] ⁺	1.75	167.07, 149.06, 133.06, 123.04
50	茛三酮	6.04	C ₉ H ₆ O ₄	178.033885	178.02666	[M+H] ⁺	1.23	151.04, 131.03
51	2-[3-(2-四唑基)-1-金 刚烷基]乙酰胺	6.05	C ₁₃ H ₂₀ N ₆ O	276.16148	276.17109	[M-H] ⁻	4.47	151.04
52	2,6-二甲基-4-(5-硝 基-2-吡啶基)吗啉	6.36	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₃	236.10296	237.11145	[M-H] ⁻	0.45	192.11
53	茯苓新酸B*	7.14	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	484.31050	484.32191	[M-H] ⁻	0.75	465.02, 409.03, 365.03
54	泽泻醇B乙酸酯	7.99	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	514.74113	514.76262	[M+H] ⁺	1.26	514.36
55	丹皮酚	8.10	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.06103	166.05575	[M-H] ⁻	3.52	122.03, 108.02
56	二苯并-γ-吡喃酮	8.71	C ₁₃ H ₈ O ₂	196.04405	196.05165	[M-H] ⁻	-3.98	149.24
57	邻苯二甲酸酐	8.92	C ₈ H ₄ O ₃	148.02332	148.01593	[M+H] ⁺	-0.76	147.80, 121.03
58	双丁苯乙酸	9.35	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	468.33123	468.32366	[M+H] ⁺	-0.65	450.93
59	Codonopyrrolidium A	10.54	C ₁₉ H ₂₈ NO ₅	350.20402	350.21410	[M+H] ⁺	3.67	268.21
60	甲酪氨酸	10.58	C ₁₀ H ₁₃ NO ₃	195.08116	195.08867	[M-H] ⁻	-4.49	145.24
61	非尼戊醇	10.70	C ₁₁ H ₁₆ O	164.11174	164.11961	[M-H] ⁻	-3.07	152.04
62	1-{1-[1-(2-甲氧基乙 基)-1H-四唑-5-基]戊 基}-4-甲基哌嗪	11.98	C ₁₄ H ₂₈ N ₆ O	296.224086	296.23344	[M-H] ⁻	3.32	277.22, 195.14

注: *表示该化合物由对照品进行指认。

失去-C₆H₆O₂, 形成 m/z 195.03 碎片峰, 进而失去-CO, 形成 m/z 167.07 碎片峰, 结合对照品比对, 化合物 35 鉴定为槲皮素, 其可能的质谱裂解途径见图 2。

3.2.2 炔类化合物

炔类化合物是党参中重要的活性成分, 本次鉴定出党参中党参炔苷这一化合物, 文献报道显示其具有抗炎、抗氧化的活性^[11]。根据多级碎片信息,

为其他炔类的裂解规律提供依据。31号峰在HCD碰撞模式下,形成准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 395.09272,该离子峰进行碰撞诱导解离,失去侧链的炔基- C_7H_6 ,形成碎片峰 m/z 305.10,有碎片离子 m/z 215.12,与准分子离子峰分子量相差 179 Da,推测可能丢失 1 个葡萄糖基,失去- $C_6H_{11}O_6$,形成碎片峰 m/z 215.12,进一步失去侧链的 CH_2O 、 C_2H_4 形成碎片峰 m/z 185.09 和 m/z 159.09,结合对照品比对,化合物 31 鉴定为党参炔苷,其可能的质谱裂解途径见图 3。

3.2.3 糠醛类化合物

糠醛类化合物具有抗氧化、改善学习记忆、抗过敏、抗炎症反应等作用^[12]。17号峰在HCD碰撞模式下,形成准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 127.03532 该离子峰,进而进行碰撞诱导解离,失去侧链的- H_2O ,形成 m/z 109.03 碎片峰,进一步失去侧链- CO ,最终保留呋喃母核结构,形成碎 m/z 81.03 片峰,结合文献报道^[13]和对照品比对,17号化合物鉴定为 5-羟甲基糠醛,其可能的质谱裂解途径见图 4。

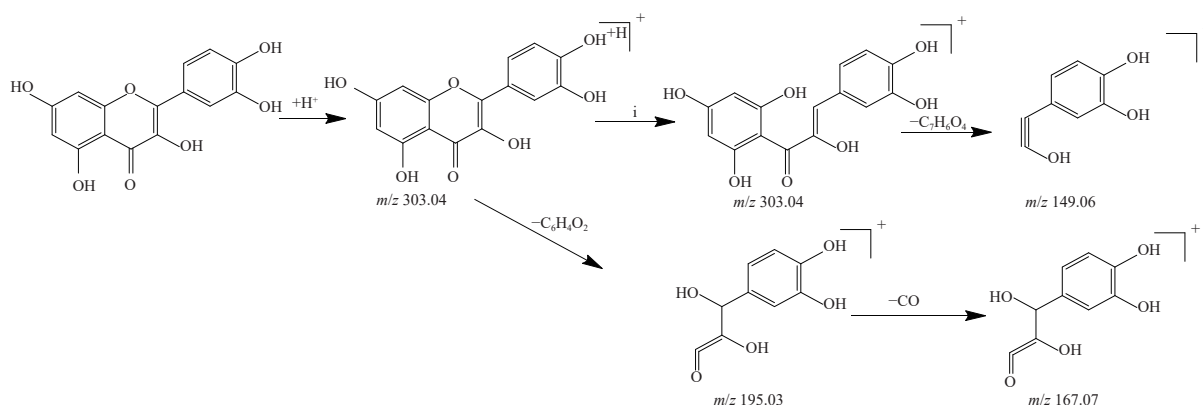


图 2 槲皮素的质谱裂解途径推断

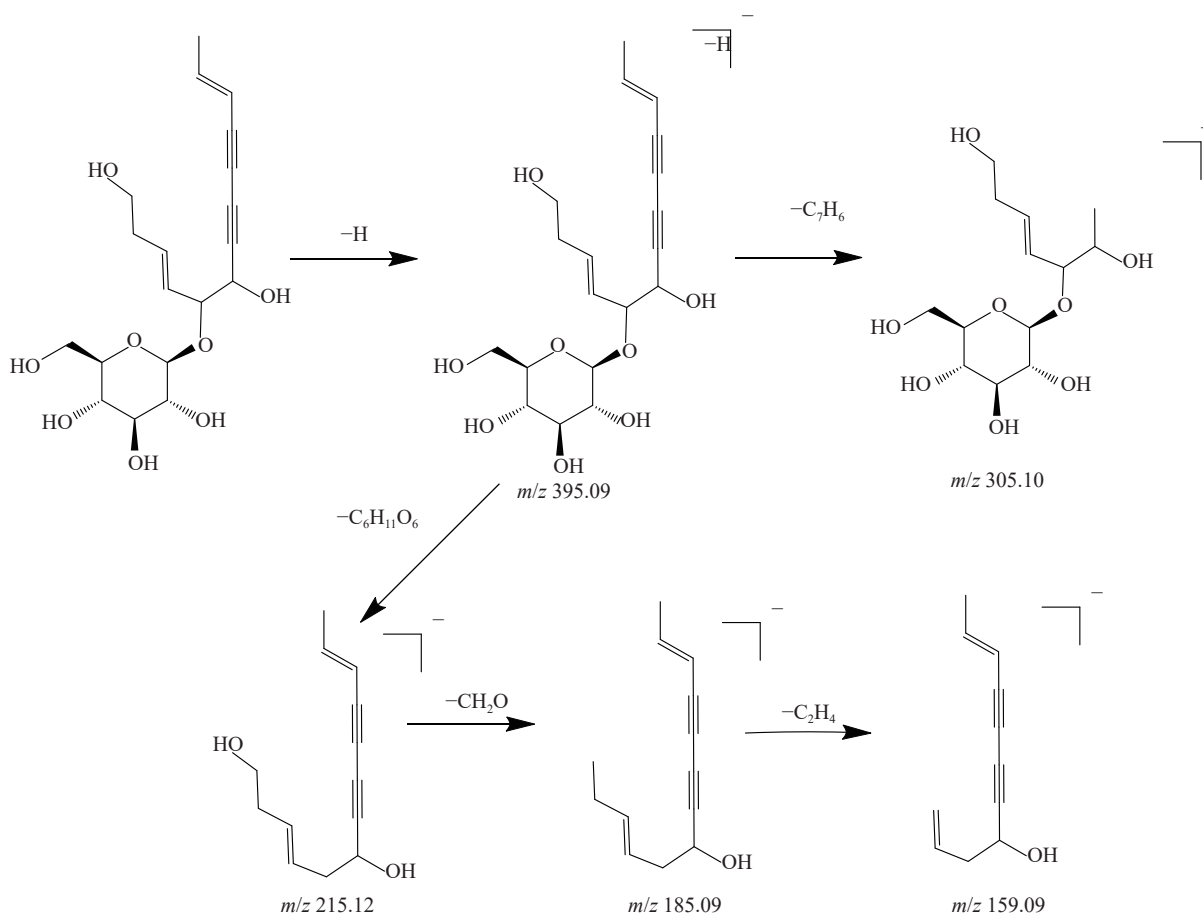


图 3 党参炔苷的质谱裂解途径推断

3.2.4 三萜类化合物

三萜类化合物是茯苓中重要的活性成分,研究发现其对慢性肾小球肾炎具有保护作用^[14]。本次鉴定出茯苓新酸 B 为三萜类化合物,分析其裂解规律。53 号峰在 HCD 碰撞模式下,形成准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 483.32191, 该离子峰进一步裂解形成的碎片峰有 m/z 465.02、 m/z 409.03、 m/z 365.03, 根据其化学结构和二级碎片信息,推断 m/z 465.02 离子碎片峰是由准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 483.32191, 裂解失去 $-H_2O$ 所形成, m/z 409.03 碎片峰是由准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 483.32191 失去 1 个侧链的丙酸基 $-C_3H_6O_2$ 所形成的, 而 m/z 365.03 离子碎片峰是由 m/z 409.03 碎片峰进一步失去 1 分子 CO_2 所形成。结合文献报道^[15] 和对照品比对, 化合物 53 鉴定为茯苓新酸 B, 其可能的质谱裂解途径见图 5。

4 讨论

加味参芪地黄汤作为经典方剂, 在临床广泛应用于治疗慢性肾病、肾小球肾炎及前列腺疾病等^[16-17], 现代药理学研究发现其具有抑制炎症反应、抗病毒、抗肿瘤等活性^[18-19], 其药理方面的文献报道较多, 而药效物质基础研究较少。

本研究发现在超高效液相色谱分离上, 虽然成分色谱峰没有完全分离开, 但借助于 LTQ-Orbitrap-MS/MS 的高效分离、高选择性的特点, 其可提供的准确的质量数信息^[20], 并结合特征碎片离子鉴别分析策略, 质谱数据采集采用正、负离子模式, 在相对误差小于 10 ppm 的条件下, 根据一级、多级质谱碎片及化合物精确质量数信息, ESI 属于软电离, 碎片较少, 依据 MS/MS 图谱可获取有效的结构信息^[21], 同时结合对照品比对及文献报道, 从而更为准确地鉴定加味参芪地黄汤中的化学成分。本次研究从加味参芪地黄汤中共鉴定出 62 个化学成分, 包括 13 个芳香酸类、9 个黄酮类、8 个皂苷类成分、5 个芳香胺类、3 个酮酸类、2 个酚类、1 个芳香醌类及其他成分。对黄酮类、三萜苷类、糖醛类等代表性化合物的裂解规律进行了研究。黄酮类化合物的裂解方式多以失去侧链基团, 最终形成保留色原酮母核的 $[M+H]^+$ 峰。本研究鉴定分析出 5-羟甲基糠醛这一成分, 是党参中重要的活性成分, 文献报道显示 5-羟甲基糠醛具有抗肿瘤活性, 可降低细胞内 ROS 的含量, 进而诱导细胞停滞在 G0/G1 期, 激活 DNA 损伤介导的 P53 磷酸化、AKT 通路和 MAPKs 通路, 导致细胞凋亡, 从而抑制肿瘤细胞的增殖^[22]。鉴定出党参标志性成分党

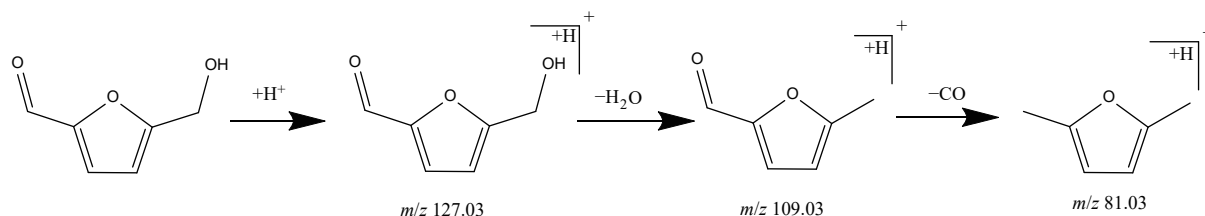


图 4 5-羟甲基糠醛的质谱裂解途径推断

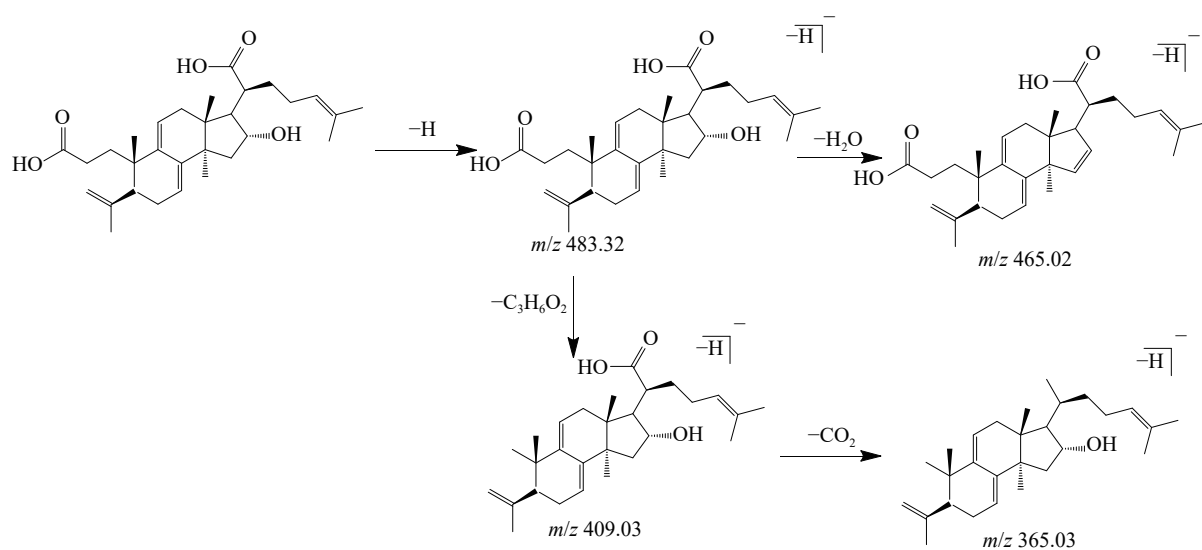


图 5 茯苓新酸 B 的质谱裂解途径推断

docosahexaenoic acid on the bilirubin neurotoxicity[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2013, 28(4): 801-807.

- [18] CHANG C Y, KUAN Y H, LI J R, et al. Docosahexaenoic acid reduces cellular inflammatory response following permanent fo-

cal cerebral ischemia in rats[J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(12): 2127-2137.

[收稿日期] 2022-01-20 [修回日期] 2022-04-09
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 237 页)

参炔苷这一化合物,文献报道研究显示党参炔苷具有抗肿瘤活性,此外,党参提取物能提高前列腺素的表达水平^[23]。鉴定出三萜类化合物茯苓新酸 B,作为茯苓中重要的活性成分,茯苓酸可减轻微血管内皮细胞氧化损伤的作用,还可抗细胞凋亡及促进细胞增殖^[24]。

本研究采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 方法鉴定加味参芪地黄汤化学成分尚属首次,为后续的抗慢性肾病、肾小球肾炎及前列腺疾病的药效物质基础及作用机制提供重要的实验数据。

【参考文献】

- [1] 顾坚毅,赵建华,华金骏,等.加味参芪地黄汤在晚期前列腺癌最大限度雄激素阻断治疗中的应用[J].*中国中医药信息杂志*, 2015, 22(12): 26-29.
- [2] 高伟利,余云辉.参芪地黄汤联合前列地尔注射液治疗慢性肾小球肾炎的效果观察[J].*河南医学研究*, 2018, 27(19): 3561-3562.
- [3] 韩晴,李淑菊.参芪地黄汤加味治疗肾脏疾病的验案分析[J].*黑龙江中医药*, 2018, 47(2): 49-50.
- [4] 黄丽丽,郭燕芬,陈煜宇,等.参芪地黄汤加减治疗早期糖尿病肾病的临床疗效观察[J].*广州医科大学学报*, 2019, 47(5): 103-106.
- [5] 瞿飞,高金梅,赵杰,等.参芪地黄汤对糖尿病肾病模型大鼠肾组织中TGF- β 1及VEGF表达的影响[J].*江苏中医药*, 2021, 53(7): 75-78.
- [6] 康莹,毛怡宁,王方方,等.UPLC-LTQ Orbitrap MS对沙棘叶化学成分的分析[J].*中国现代中药*, 2018, 20(11): 1340-1346,1366.
- [7] 马永青,王璐,刘颖,等.基于UPLC-LTQ-Orbitrap-MS技术快速解析杜仲颗粒化学成分[J].*分析测试学报*, 2019, 38(7): 817-822.
- [8] 周霖,孙志,王肖辉,等.基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS的参松养心胶囊化学成分识别及作用机制研究[J].*中国医院药学杂志*, 2020, 40(4): 375-380,396.
- [9] 罗影,左中夫,程雪,等.葛花总黄酮通过Nrf2/HO-1信号通路对1型糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J].*中成药*, 2021, 43(11):

3178-3182.

- [10] Anjaneyulu M, Chopra K. Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31(4): 244-248.
- [11] Yoon I S, Cho S S. Effects of lobetyolin on xanthine oxidase activity *in vitro* and *in vivo*: weak and mixed inhibition[J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(10): 1667-1670.
- [12] 王梅,王越欣,武英茹,等.5-羟甲基糠醛在中药加工过程中的变化及药理作用研究概况[J].*药物评价研究*, 2020, 43(11): 2319-2327.
- [13] 周佳,齐红艺. HPLC-MS/MS法同时测定玄参中8个成分的含量[J].*中国现代中药*, 2017, 19(5): 670-674.
- [14] 欧汝彪,于力,郝志宏,等.五环三萜类化合物对大鼠慢性肾病的保护作用[J].*中华实验外科杂志*, 2006, 23(2): 188-189.
- [15] 林慧敏,任强强,许文,等.基于UHPLC-Q Exactive轨道阱高分辨质谱分析八珍方化学成分[J].*福建中医药*, 2021, 52(9): 31-38.
- [16] 梁丽.参芪地黄汤治疗糖尿病肾病的临床观察[J].*中医临床研究*, 2021, 13(12): 60-61.
- [17] 韩佳妮.参芪地黄汤治疗早期糖尿病肾病的疗效[J].*医学信息*, 2019, 32(22): 139-141.
- [18] 海江,刘芳.参芪地黄汤加味治疗气阴两虚兼血瘀证糖尿病肾病临床疗效及对尿KIM-1、L-FABP影响[J].*辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(11): 163-166.
- [19] 彭君,秦鹏,邢天柱,等.参芪地黄汤联合穴位敷贴保肾贴治疗慢性肾小球肾炎疗效观察[J].*四川中医*, 2019, 37(7): 134-136.
- [20] 于国华,杨洪军,李俊芳,等.基于UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS技术分析枳实中的化学成分[J].*中国中药杂志*, 2016, 41(18): 3371-3378.
- [21] 张靖,徐筱杰,徐文,等.HPLC-LTQ-Orbitrap-MS快速鉴别党参药材中化学成分[J].*中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(9): 59-63.
- [22] 梅国栋,赵玲,陈建平,等.5-HMF抑制A375细胞增殖的信号转导通路[J].*中国科技论文*, 2014, 9(9): 1005-1008.
- [23] 王晓霞,庄鹏宇,陈金铭,等.党参化学成分的研究[J].*中草药*, 2017, 48(9): 1719-1723.
- [24] 苗树船,夏勋,张列.茯苓酸抑制H₂O₂诱导的脑微血管内皮细胞凋亡及促进细胞存活[J].*西部医学*, 2021, 33(7): 982-986.
- [收稿日期] 2021-12-19 [修回日期] 2022-03-11
[本文编辑] 李睿旻