

基于超高效液相高分辨质谱联用技术 研究参黄补虚颗粒的化学组成

程东岩¹ 王隶书¹ 高 军¹ 陈 昕² 王超楠²

(1. 吉林省中医药科学院 吉林 长春 130012)

(2. 长春中医药大学 吉林 长春 130117)

【摘要】目的：研究参黄补虚颗粒的化学成分组成。方法：基于超高效液相高分辨质谱联用技术对参黄补虚颗粒的化学成分进行全谱分析。结果：共鉴定出 305 个成分（正离子模式下 188 个，负离子模式下 144 个，两种模式下共有成分 27 个），其中无 CAS 号的化合物 27 个。结论：本研究首次建立了参黄补虚颗粒的化学成分全谱分析数据库，从而为该产品的后续开发研究以及药效物质研究提供参考。

【关键词】参黄补虚颗粒；超高效液相高分辨质谱联用；化学组成

Study Chemical Composition of Shenhuang Buxu Granules by UHPLC–HRMS

Dongyan Cheng¹ Lishu Wang¹ Jun Gao¹ Xin Chen² Chaonan Wang²

(1. Jilin College of Traditional Chinese Medicine, Changchun, Jilin, 130012)

(2. Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun, Jilin, 130117)

[Abstract] Objective: To study the chemical constituents of Shenhuang Buxu granules. Methods: The chemical constituents of Shenhuang Buxu granules were analyzed by ultra high performance liquid chromatography high resolution mass spectrometry. Results: 305 components were identified (188 in the positive ion mode, 144 in the negative ion mode, and 27 in both modes), including 27 compounds without CAS No. Conclusion: In this study, the full spectrum analysis database of chemical components of Shenhuang Buxu Granules was established for the first time, so as to provide a reference for the subsequent development and research of the product and the study of pharmacodynamic substances.

[key words] Shenhuang Buxu Granule; UHPLC–HRMS; Chemical constituent

参黄补虚颗粒是由本课题组在经典名方保元汤基础上加减化裁开发而成的中药 3.2 类新药，由黄芪、人参、醋五味子、甘草、丹参、肉桂六味中药组成，具有益气温阳、生津养血、行滞通痹之功，主治虚损劳怯、元气不足，症见倦怠乏力、少气畏寒等。为深入研究该产品的功效活性成分，课题组采用超高效液相高分辨质谱联用技术对参黄补虚颗粒的化学成分进行了全谱分析，从整体上了解了该产品的化学组成，从而为该产品的后续开发研究以及药效物质研究提供了有价值的参考依据。

1 仪器与材料

Thermo Vanquish UHPLC 超高效液相色谱仪(Thermo Fisher Scientific)；Q-Exactive HF 高分辨质谱(Thermo Fisher Scientific)；TGL-16M 离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司)；JXFSTPRP-48 全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司)；KQ-00DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；AUW120D 天平(Shimadzu Corporation)；GWB-2B 超纯水器(北京普析通用仪器有限责任公司)；G560E 涡旋

仪(INC Scientific Industries)。

参黄补虚颗粒，由本课题组自制，规格：5g/袋，批号为 220223。

甲醇、乙腈、甲酸、异丙醇、2-氯苯丙氨酸为 LC-MS 级。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱分析条件

2.1.1 色谱条件

使用 Zorbax Eclipse C18 色谱柱(1.8 μm* 2.1*100mm)，以 0.1% 甲酸溶液(A 相)-乙腈(B 相)为流动相进行梯度洗脱(0~2min, 5%B; 2~6min, 5%B→30%B; 6~7min, 30%B; 7~12min, 30%B→78%B; 12~14min, 78%B; 14~17min, 78%B→95%B; 17~20min, 95%B; 20~21min, 95%B→5%B; 21~25min, 5%B)；柱温为 30℃；流速为 0.3ml/min，进样量为 2 μl。

2.1.2 质谱条件：使用正、负离子 2 种模式扫描，加热器温度 325℃；鞘气流速：45arb；辅助气流速：15arb；吹扫气流速：1arb；电喷雾电压：3.5KV；毛细管温度：330℃；S-Lens RF Level：55%；扫描模

式：一级全扫描 (Full Scan, m/z 100~1500) 与数据依赖性二级质谱扫描 (dd-MS2, TopN=10); 分辨率: 120,000 (一级质谱) & 60,000 (二级质谱)。碰撞模式: 高能量碰撞解离 (HCD)。

2.2 样品提取

称取混合均匀的样品 100mg, 置于 2ml 离心管中, 加入 1ml 70% 甲醇和 3mm 规格钢珠, 用全自动样品快速研磨仪 (70Hz) 震荡破碎 3 分钟, 冷却后低温超声 (40KHZ) 10 分钟, 低温下 12000rpm 离心 10 分钟, 取上清液稀释 50 倍, 加入 $10 \mu\text{l}$ $100 \mu\text{g/ml}$ 内标, 过 $0.22 \mu\text{m}$ PTFE 滤头上机检测。

2.3 实验结果

2.3.1 离子流图 (图 1-1, 1-2)

2.3.2 鉴定结果

使用 Compound Discoverer 3.2 进行保留时间矫正、峰识别、峰提取等工作, 根据二级质谱信息利用 Thermo mz Cloud 在线数据库, Thermo mz Valut 本地数据库等, 进行物质鉴定。结果从参黄补虚颗粒中共鉴定出 305 个成分 (正离子模式下 188 个, 负离子模式下 144 个, 两种模式下共有成分 27 个), 其中无 CAS 号的化合物 27 个, 主要包括皂苷、黄酮、木脂素、酚酸类、菲醌类、内酯类等成分。这些成分共同构成了参黄补虚颗粒的药效物质基础。

正离子模式下鉴定出化合物: 包括 7- 甲氧基香豆素、当归酰基戈米辛 H、芹菜素、咖啡酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、白杨素、桂皮醛、肉桂酸、香豆素、隐丹参

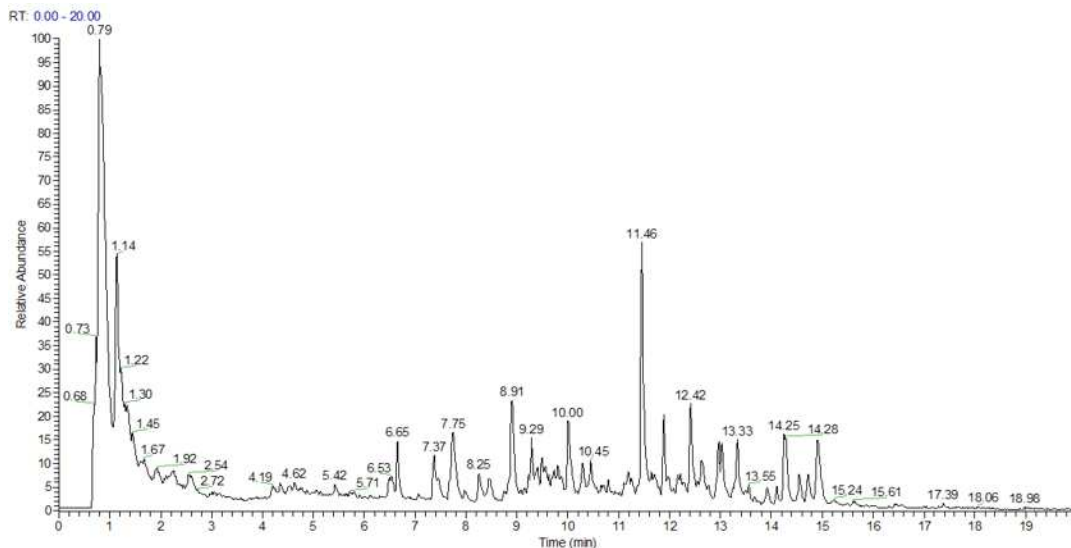


图 1-1 样本总离子流图 (正离子模式)

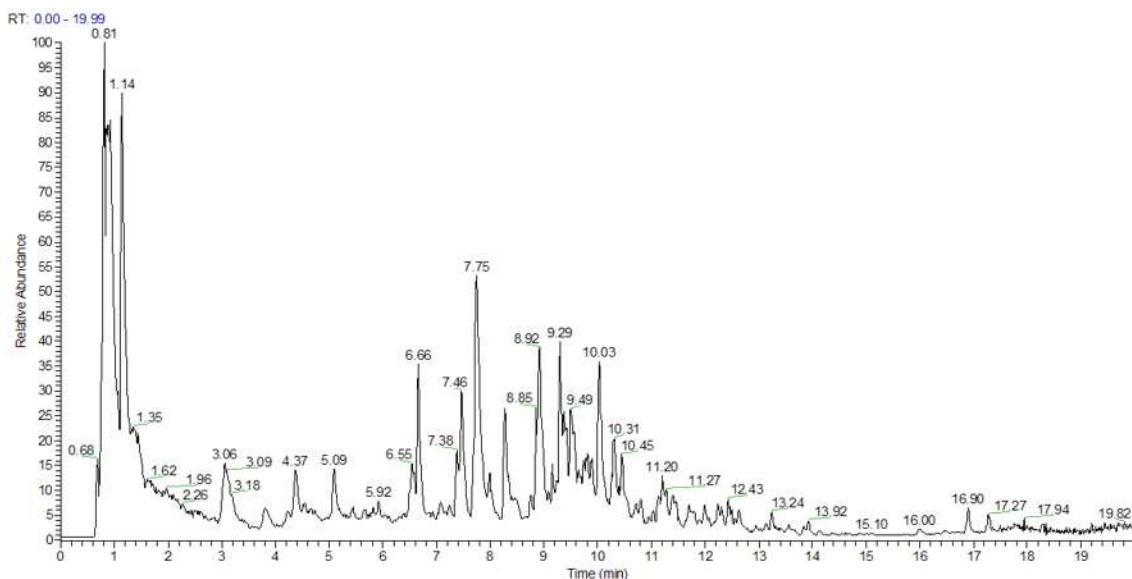


图 1-2 样本总离子流图 (负离子模式)

酮、莪术烯醇、二氢丹参酮 I、表木兰脂素 B、光甘草内酯、光果甘草酮、戈米辛 J、异阿魏酸、甘草查尔酮 C、羽扇烯酮、山楂酸、黄芪异黄烷、柚皮素、对羟基肉桂酸、原儿茶醛、原儿茶酸、人参皂苷 RH4、人参皂苷 RK2、拟人参皂苷 F11、丹酚酸 B、丹酚酸 C、五味子乙素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子酚、五味子甲素、五味子酯乙、丹参酮 IIA、熊果酸、熊果酮酸等。

负离子模式下鉴定出化合物：包括 20(R)-人参皂苷 Rg2、20(R)-人参皂苷 Rg3、20(R)-三七皂苷 R2、黄芪甲苷、人参皂苷 Ro、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Rf、光甘草定、橙皮素、甘草查尔酮 A、甘草黄酮 A、甘草昔元-7-O-β-D-芹糖-4'-O-β-D-葡萄糖苷、齐墩果酸等。

两种模式下共有成分：包括甘草次酸、毛蕊异黄酮、大豆异黄酮、大豆苷、刺芒柄花素、人参皂甙 Rd、人参皂苷 Rg5、羟基芫花素、异甘草素、异甘草苷、甘草查尔酮 B、甘草素、甘草苷、黄芪异黄烷苷、甘草酸、紫草酸、戈米辛 D、丹酚酸 A 等。

无 CAS 号的化合物：包括 4-Hydroxy-3-[2-(2-hydroxyphenyl)-2-oxoethyl]-2H-chromen-2-one、5,6,7-Trimethoxy-2-(2,3,4-trimethoxybenzylidene)indan-1-one、8-{3-Oxo-2-[(2E)-2-penten-1-yl]-1-cyclopenten-1-yl}octanoic acid、N,N-Dimethylpentylone、(15Z)-9,12,13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid、(2α,3β,19α)-2,3,19-Trihydroxyolean-12-en-28-oic acid、(3R,5R)-1,3,5-Trihydroxy-4-[[2E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenyl]oxy}cyclohexanecarboxylic acid、(3β,5ξ,6α,9ξ,12β)-20-(β-D-Glucopyranosyloxy)-3,12-dihydroxydammar-24-en-6-yl β-D-glucopyranoside、(3β,5ξ,9ξ)-3,23-Dihydroxy-1-oxoolean-12-en-28-oic acid、(3β,5ξ,9ξ)-3-[[2-O-(β-D-Glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl]oxy]-23-hydroxyolean-12-en-28-oic acid、(3β,5ξ,9ξ,18ξ)-28-Hydroxy-28-oxoolean-12-en-3-yl 6-deoxy-α-L-mannopyranosyl-(1→3)-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)]-β-D-glucopyranosiduronic acid、(3β,6α,9ξ,12β,20Z)-3,12-Dihydroxydammar-20(22),24-dien-6-yl 2-O-(6-deoxy-α-L-mannopyranosyl)-β-D-glucopyranoside、3,3'-Diisopropyl-6,6'-dimethyl-2,2',5,5'-biphenyltetrol 3,5-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-7-yl hexopyranoside、3-(tert-Butyl)-N-[4-(2,3-dihydroimidazo[2,1-b][1,3]thiazol-6-yl)phenyl]-1-methyl-1H-pyrazole-

5-carboxamide、3-[2-(β-D-Glucopyranosyloxy)-4-methoxyphenyl]propanoic acid、3-hydroxy-3-[(4,7,7-trimethyl-3-bicyclo[2.2.1]heptanyl)oxycarbonyl]pentanedioic acid、4-((5-(4-Nitrophenyl)oxazol-2-yl)amino)benzotrile、4-Acetyl-3-hydroxy-5-methylphenyl β-D-glucopyranoside、4-[[3S)-3-{5-[4-(Dimethylamino)phenyl]-1,3,4-oxadiazol-2-yl]-1-pyrrolidinyl]methyl]benzoic acid、5-[2-(3-Furyl)ethyl]-8a-(hydroxymethyl)-5,6-dimethyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1-naphthalene-carboxylic acid、6-Deoxyhexopyranosyl-(1→4)-[hexopyranosyl-(1→6)]-1-O-[27-hydroxy-3,27,28-trioxolup-20(29)-en-28-yl]hexopyranose、7-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-5-yl β-D-glucopyranoside、[1-(3,4-dihydroxy-5-methoxyphenyl)-7-(3,4-dihydroxyphenyl)heptan-3-yl] acetate、Calocarpin、N-(3-Chloro-4-morpholinophenyl)-6-oxo-1,4,5,6-tetrahydro-3-pyridazinecarboxamide、N-[[2R,4S,5S)-5-{4-(2-Methoxyphenyl)-1-piperazinyl]methyl}-1-azabicyclo[2.2.2]oct-2-yl]methyl]-1,3-benzodioxole-5-carboxamide。

3 结论

代谢物全谱分析，系通过色谱串联质谱技术，结合质谱数据库信息注释和分类，鉴定样品中小分子化合物，从而达到对其进行定性定量分析的目的。它能帮助我们整体上了解样本的性质，详细的描述样本中的物质组成和含量等信息。本研究通过液质联用技术可快速、有效地对参黄补虚颗粒中的化学成分进行分析，从而为该产品的后续开发研究以及药效物质研究提供参考。

参考文献：

- [1]Wang Xiaoming,Chang Xiaoyan,Luo Xiaomei,et al.An Integrated Approach to Characterize Intestinal Metabolites of Four Phenylethanoid Glycosides and Intestinal Microbe-Mediated Antioxidant Activity Evaluation In Vitro Using UHPLC-Q-Exactive High-Resolution Mass Spectrometry and a 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl-Based Assay[J].Frontiers in Pharmacology,2019,10:826
- [2]Chen Yanhua,Zhang Ruiping,Song Yongmei,et al.RRLC-MS/MS-based metabonomics combined with in-depth analysis of metabolic correlation network:finding potential biomarkers for breast cancer[J]. The Analyst,2009,134(10):2003-11

基金项目：吉林省科技发展计划项目（项目编号：20200404073YY）。