



基于UHPLC-Q-TOF/MS技术快速分析消痰通腑方化学成分

秦焯, 黄玮, 顾雨芳, 张慈安, 修丽娟, 唐继贵, 张凤, 刘焯

Rapid analysis of chemical components of Xiaotan Tongfu formula based on UHPLC-Q-TOF/MS

QIN Ye, HUANG Wei, GU Yufang, ZHANG Ci'an, XIU Lijuan, TANG Jigui, ZHANG Feng, LIU Xuan

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202109029>

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痰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

三色片醇提物抗补体活性物质的UPLC-Q-TOF-MS/MS研究

Study on components with anti-complement activity from ethanol extract of Sanse tablets by UPLC-Q-TOF-MS/MS

药学实践杂志. 2021, 39(4): 322-330 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202101036

基于UHPLC-Q-TOF/MS技术对扶正化痰胶囊入血成分的快速鉴别

Rapid identification of chemical constituents in serum and plasma of Fuzheng Huayu capsules by UHPLC-TOF/MS

药学实践杂志. 2020, 38(3): 250-254, 267 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.201906027

红色诺卡菌细胞壁骨架中化学成分的鉴别与单糖含量测定

Identification of chemical components and monosaccharide assay in *Nocardia rubra* cell wall skeleton

药学实践杂志. 2020, 38(5): 423-430 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202003073

基于UPLC-Q-TOF-MS技术鉴定防风在大鼠体内的入血成分及代谢产物

Identification of components and metabolites of *Saposhnikoviae Radix* decoction in rats' plasma by UPLC-Q-TOF-MS

药学实践杂志. 2019, 37(6): 512-517 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.008



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

基于UHPLC-Q-TOF/MS技术快速分析消痰通腑方化学成分

秦 焯¹, 黄 玮², 顾雨芳³, 张慈安³, 修丽娟³, 唐继贵³, 张 凤³, 刘 焯³ (1. 中国人民解放军中部战区总医院, 湖北 武汉 430014; 2. 上海市闵行区古美社区卫生服务中心, 上海 201102; 3. 海军军医大学长征医院, 上海 200003)

[摘要] 目的 探明消痰通腑方的主要化学成分, 为方剂药效物质基础研究和临床治疗提供科学依据。方法 采用超高效液相色谱四极杆飞行时间质谱法(UHPLC-Q-TOF/MS)对消痰通腑方化学成分进行鉴定, 色谱条件为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1mm×100 mm, 1.7 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 柱温 30 °C, 流速 0.3 ml/min, 进样量 1 μl, 检测波长 254 nm; 质谱条件为电喷雾离子源(ESI), 正、负离子全扫描模式采集质谱数据, 根据对照品、自建质谱数据库和在线获得的化合物质谱数据库对色谱峰进行物质鉴定。结果 初步鉴定出 55 个化合物, 分别来自黄连、重楼、大黄、天南星、法半夏。结论 本文所建立的 UHPLC-Q-TOF/MS 方法能系统、准确地鉴别消痰通腑方的化学成分, 可为该方剂的质量标志物筛选和有效成分研究提供参考。

[关键词] 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱; 化学成分; 消痰通腑方

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2022)04-0339-08

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202109029

Rapid analysis of chemical components of Xiaotan Tongfu formula based on UHPLC-Q-TOF/MS

QIN Ye¹, HUANG Wei², GU Yufang³, ZHANG Ci'an³, XIU Lijuan³, TANG Jigui³, ZHANG Feng³, LIU Xuan³ (1. the General Hospital of the Central Theater Command of the PLA, Wuhan 430014, China; 2. Gumei Community Health Service Center, Shanghai 201102, China; 3. Changzheng hospital, Naval Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective** To rapidly explore the chemical components of Xiaotan Tongfu formula, and to provide scientific basis for the basic research and clinical treatment of the formula. **Methods** Analysis was performed on an Agilent 1290 ultra-performance liquid chromatography system coupled with an Agilent 6530 accurate quality Q-TOF/MS system, by using a Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), with a gradient elution applying 0.1% aqueous formic acid solution and acetonitrile as a mobile phase. The flow rate was 0.3 ml/min. The column temperature was 30°C. The injection volume was 1 μl, and the detection wavelength was 254 nm. Mass spectrometry (MS) data were collected in both positive and negative ESI ion modes. Components in the formula were identified by using the in-house compound database, and comparing the retention time (tR), MS1 and MS2 data with the standard compounds, and the online compound MS database. **Results** A total of 55 compounds were identified from *Coptis coptidis*, *Pseudomonas solani*, *Rhubarb*, *Araceae artemisiae* and *Pinellia chinensis*. **Conclusion** The established UHPLC-Q-TOF/MS method could systematically and accurately identify the chemical components from Xiaotan Tongfu formula, and provided a reference for the quality marker selection and the research on the active ingredient.

[Key words] UHPLC-Q-TOF/MS; chemical components; Xiaotan Tongfu formula

消痰通腑方应用于治疗胃肠癌前病变患者已有十余年, 能够延缓胃肠癌前患者向肿瘤的进展, 同时对脓毒症等危重症患者的胃肠功能恢复有较好疗效^[1-5]。该方剂由法半夏、生大黄、制大黄、制

南星、重楼和黄连六味中药配伍组成, 法半夏、制大黄为主药, 旨在消痰止呕、泄下通腑之意。半夏乃燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结之良药, 法半夏为半夏的炮制品, 倍其化痰之力; 制大黄为生大黄炒制, 泻下力缓, 能通达肠腑而推陈出新, 又不伤正气, 两者合用, 既燥湿化痰, 又缓消积滞, 达消痰通腑之功。黄连既能泻脾胃之火, 又能燥痰饮之湿。

目前对该方剂的研究集中在药理功效方面, 尚无对该方剂化学成分、有效成分的相关研究报道。寻找中药复方的临床药效基础, 是长期困扰中医人临床研究的难点。超高效液相色谱四极杆飞行时

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No.81804008)

[作者简介] 秦 焯, 硕士, 主管药师, 研究方向: 医院药学、临床药学, Email: kiki.807@163.com

[通信作者] 张 凤, 博士, 副主任药师, 研究方向: 生药学、临床药学, Email: fengzhangky@aliyun.com; 刘 焯, 博士, 副主任医师, 研究方向: 中西医结合防治消化系统疾病, Email: 18616630816@163.com

间质谱法(UHPLC-Q-TOF/MS)是一种简便、快速、高灵敏度的现代分析技术,能够提供化合物的精确分子量、元素组成以及离子碎片信息(MS1和MS),广泛用于中药化学成分的快速分析和鉴别^[6-7]。本研究拟采用此方法对消痰通腑方的化学成分开展研究,为其质量标志物筛选和探明药效物质提供实验依据。

1 材料

Agilent 1290 Infinity型超高效液相色谱和6530型四极杆-飞行时间串联质谱仪(美国安捷伦);CPA255D型1/10万电子天平(德国Sartorius);Eppendorf mini spin离心机、Eppendorf 5430r离心机(德国Eppendorf);Lyovapor L-200冷冻干燥机(瑞士BUCHI);Milli-Q型纯水系统(美国Millipore);SK7200H型超声仪(上海科导超声仪器有限公司)。

甘草酸(批号:F610137)、重楼皂苷I(批号:F278755)、重楼皂苷II(批号:F297228)、重楼皂苷VI(批号:F483230)、薯蓣皂苷(批号:F543583)、重楼皂苷H(批号:F297228)、奎宁酸(批号:F435708)、柠檬酸(批号:F594530)、异佛莱心苷(批号:F109963)、芹糖异甘草苷(批号:F667242)购自上海一飞生物科技有限公司,异佛莱心苷纯度为95%,其余对照品纯度均 $\geq 98\%$;芦荟大黄素(批号:D1226AS)、大黄素甲醚(批号:O1026AS)、大黄酚(批号:D0316AS)、大黄酸(批号:N1107AS)购自大连美仑生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$;水为去离子水;甲醇、乙腈、甲酸(质谱纯,德国E. Merck公司);其余试剂均为分析纯。

消痰通腑免煎剂由法半夏、生大黄、制大黄等药物组成。由江阴制药厂生产,长征医院监制,生产批号:20200420。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

精密称定免煎剂0.5g,加入70%甲醇50ml,超声提取30min,得70%甲醇提取物(简称醇提液);精密称定免煎剂0.5g,加入70~80℃热水50ml,搅拌5min,超声提取30min得水提液。提取液于3000r/min离心10min,取上层溶液1.5ml置离心管中,再经15000r/min离心10min,取上清液过0.22 μm 微孔滤膜,即得。

2.2 对照品溶液制备

精密称取适量甘草酸、芦荟大黄素等对照品,加甲醇分别制成每1ml含对照品1mg的储备溶

液。精密吸取上述储备溶液各10 μl ,置于1.5ml离心管中混合,涡旋混匀,加入甲醇配制成各对照品浓度分别为10 $\mu\text{g/ml}$ 的混合标准溶液。

2.3 化合物分析库的建立和数据分析

从已有的药材化合物成分分析文献中获取该方剂各味药的成分信息,确保数据库中收录的化合物能够在已发表的文献中检索可得,在基于Agilent自带的default文档上建立方剂化合物数据库。采用Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0软件对数据进行分析。

2.4 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1mm \times 100mm,1.7 μm),以0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~3min,5%B;3~15min,5%~35%B;15~30min,35%~95%B),柱温30℃,流速0.3ml/min,进样量1 μl ,检测波长254nm。

2.5 质谱条件

ESI离子源,分别在正、负离子模式下采集数据,采集范围100~1700m/z。离子源温度350℃,毛细管电压3.5kV(正离子)、4.0kV(负离子),雾化气压力45Psi,干燥气流速11L/min,鞘气流速11L/min,鞘气温度350℃,碎片电压140V。对照品和消痰通腑方的UHPLC-Q-TOF/MS色谱图分别见图1和图2。

2.6 化合物的鉴定

在全扫描质谱图中,大多数对照品化合物在正模式下显示[M+H]⁺离子,或在负模式下显示[M-H]⁻。由于流动相中存在Na⁺和甲酸,部分化合物中观察到[M+Na]⁺和[M+HCOOH-H]⁻,少许化合物中观察到[M+K]⁺、[M+NH₄]⁺及[M+CH₃COOH-H]⁻。

化合物的鉴定首先使用Agilent 10.0软件中的按化学式查找功能,根据精确质量、同位素丰度,以及上述分子离子峰进行鉴定。当有对照品时,通过比较其在图谱上的保留时间和m/z信息与对照品的相关信息进行鉴别。在没有对照品的情况下,主要根据质谱信息(包括化合物二级质谱信息)和参考文献进行初步的鉴定。根据质谱信息和参考文献进行初步鉴定时,通过导入已建立的方剂化合物数据库,利用Agilent 10.0软件进行识别,并结合Massbank、Pubchem、Chemspider等在线数据库进行辅助分析,根据化合物准确分子量及碎片信息进行判断,排除假阳性结果。例如:

化合物1:通过数据库识别到0.906min的分子离子峰在正负离子模式下分别出现m/z 175.1193

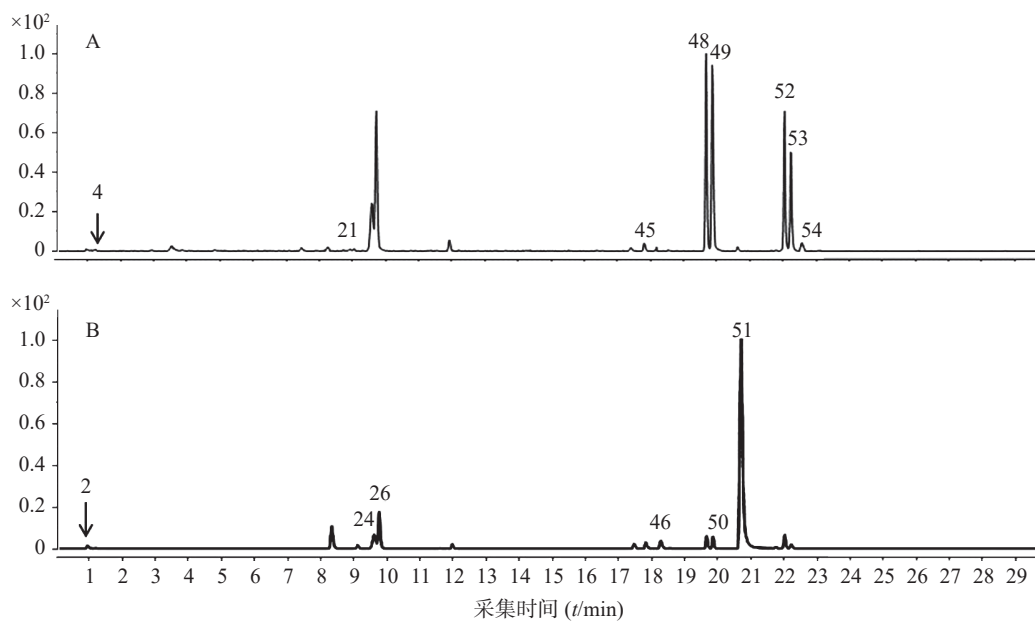


图1 混合对照品的UHPLC-Q-TOF/MS色谱图
A.正离子模式;B.负离子模式

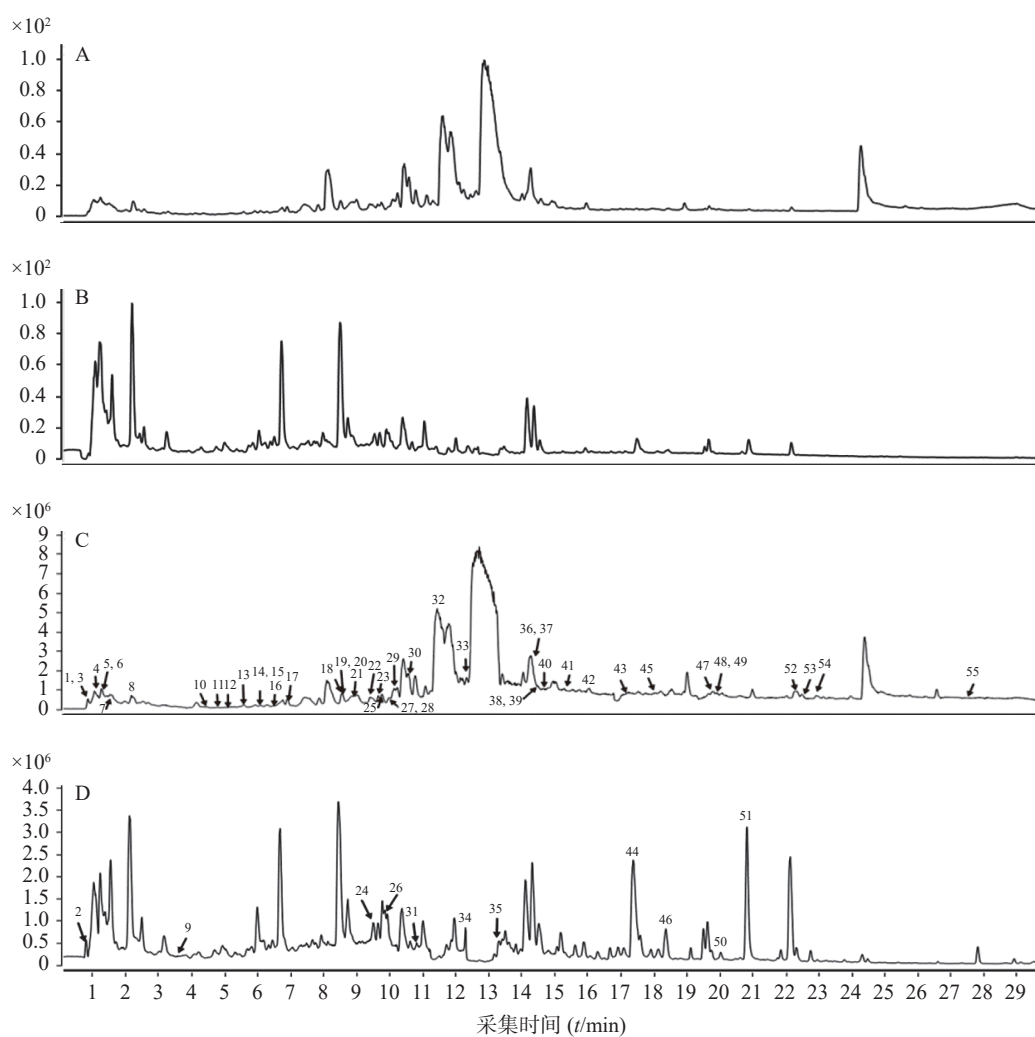


图2 消痰通腑方的UHPLC-Q-TOF/MS色谱图

A.水提液正离子模式;B.水提液负离子模式;C.70% 甲醇提取物正离子模式;D.70% 甲醇提取物负离子模式

的 $[M+H]^+$ 离子和 m/z 173.1036 的 $[M-H]^-$ 离子, 软件自动生成匹配度最高分值的分子式为 $C_6H_{14}N_4O_2$, 说明其可能为精氨酸。其次, 结合 Massbank 在线数据库对其二级碎片离子进行查找, 发现正离子模式下可识别到 158、116 碎片离子, 负离子模式下可识别到 173、131 等碎片离子, 因此, 推断化合物 1 为精氨酸, 结合我们建立化合物数据库信息, 判断该化合物来源于黄连或制半夏^[8]。

化合物 12: 通过数据库识别到 1.394 min 的分子离子峰在正负离子模式下分别出现 m/z 333.0878 的 $[M+H]^+$ 离子和 m/z 331.0672 的 $[M-H]^-$ 离子, 软件自动生成匹配度最高分值的分子式为 $C_{13}H_{16}O_{10}$ 。其次, 化合物产生 m/z 169 没食子酸的特征碎片离子, 而大黄中的简单酚酸类成分基本结构主要是没

食子酸、对香豆酸、阿魏酸、对羟基苯丙酸等, 因此, 推测该化合物为来源于大黄的没食子酸-3-O- β -D-葡萄糖苷^[9]。

化合物 44: 负离子模式下在 17.208 min 识别到 m/z 837.3886 的 $[M-H]^-$ 离子, 软件自动生成匹配度最高分值的分子式为 $C_{42}H_{62}O_{17}$ 。其次, 化合物产生 m/z 351 的离子峰, 为其结构中 2 分子的葡萄糖醛酸苷键断裂形成的碎片离子 m/z 351 $[2 \times C_6H_8O_6-H]^-$ 离子, 因此, 推断化合物 44 为甘草皂苷 G2, 来源于法半夏^[10]。

考虑到此中药方剂以水冲服的方式, 本研究还同步分析了水提液的化学成分, 结果亦参见图 2 和表 1。结果表明, 70% 甲醇提取物能够识别的化合物比水提液识别的化合物多 10 个, 且化合物的峰

表 1 消痰通腑方的鉴定分析结果

序号	质量	相对时间 (min)	分子式	m/z (MS1)	部分特征离子峰	m/z (MS2)	差异(Δ ppm)	名称	来源药材	来源文献
1	174.1115	0.906	$C_6H_{14}N_4O_2$	175.1193	$[M+H]^+$	175,158,116	-1.01	精氨酸	黄连*, 制半夏	[8,11]
	174.1113	0.906		173.1036	$[M-H]^-$	173,131	-2.40			
2	192.0617	0.965	$C_7H_{12}O_6$	191.0552	$[M-H]^-$	191,173,111	-4.71	奎宁酸	黄连	[8]
3	251.1022	0.996	$C_{10}H_{13}N_5O_3$	252.1093	$[M+H]^+$	252,194,137	0.79	脱氧腺苷	重楼, 制半夏	[11-12]
4	192.0281	1.189	$C_6H_8O_7$	230.9906	$[M+K]^+$		1.73	柠檬酸	黄连	[12]
	192.0276	1.168		191.0203	$[M-H]^-$	191,111,103	3.14			
5	332.0767	1.394	$C_{13}H_{16}O_{10}$	333.0878	$[M+H]^+$		4.61	没食子酸-3-O- β -D-葡萄糖苷	大黄*	[13]
	332.0746	1.395		331.0672	$[M-H]^-$	271,169	0.30			
6	170.0216	1.396	$C_7H_6O_5$	171.0289	$[M+H]^+$	171,155,153	0.29	没食子酸	大黄*	[13]
	170.0216	1.520		169.0143	$[M-H]^-$	125,111	0.42			
7	131.0945	1.508	$C_6H_{13}NO_2$	132.1018	$[M+H]^+$	132,86	-0.76	异亮氨酸	天南星, 制半夏	[11,14]
	131.0939	1.475		130.0869	$[M-H]^-$		-3.84			
8	165.079	2.273	$C_9H_{11}NO_2$	166.0864	$[M+H]^+$	166,120	0.60	苯丙氨酸	天南星, 制半夏	[11,14]
	165.0792	2.238		164.0723	$[M-H]^-$		3.66			
9	354.0946	3.752	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0874	$[M-H]^-$	353,191	-1.13	绿原酸	黄连*	[8]
10	204.0899	4.31-	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	205.0973	$[M+H]^+$	159,146	0.10	色氨酸	黄连*, 制半夏	[8,11]
	204.0897	4.207		203.0819	$[M-H]^-$	142,116	-0.69			
11	326.1026	4.812	$C_{15}H_{18}O_8$	325.0919	$[M-H]^-$	325,235,145	2.86	对香豆酸-O-葡萄糖苷	大黄	[13]
12	452.1327	5.06-	$C_{21}H_{24}O_{11}$	475.1211	$[M+Na]^+$		0.00	儿茶素-O-葡萄糖苷/表儿茶素-O-葡萄糖苷	大黄	[13]
	452.1319	4.993		451.1239	$[M-H]^-$	451,137	-1.55			
13	578.143	5.392	$C_{30}H_{26}O_{12}$	579.1505	$[M+H]^+$		0.94	原花青素B2	大黄*	[13]
	578.1417	5.277		577.1345	$[M-H]^-$	577,289	-1.23			

(续表 1)

序号	质量	相对时间 (min)	分子式	m/z(MS1)	部分特征离子峰	m/z (MS2)	差异(Δ ppm)	名称	来源药材	来源文献
14	290.0797	6.073	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	291.0867	[M+H] ⁺	161	1.37	儿茶素	大黄	[13]
	290.0794	5.995		289.0721	[M-H] ⁻	245,203,187	1.04			
15	194.0586	6.076	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	217.0492	[M+Na] ⁺	177, 145	4.68	阿魏酸	大黄	[13]
16	654.1949	6.449	C ₃₃ H ₃₄ O ₁₄	653.1871	[M-H] ⁻	653,313,169	-0.77	4-(4'-羟基苯基)-2-丁酮-O-阿魏酰-没食子酰-葡萄糖苷	大黄	[13]
17	484.0858	6.826	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	483.078	[M-H] ⁻	313,169	0.00	没食子酸-O-没食子酰基葡萄糖苷	大黄	[15]
18	164.0470	8.434	C ₉ H ₈ O ₃	163.0397	[M-H] ⁻	163,155	-2.45	对香豆酸	大黄	[13]
19	564.1492	8.589	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565.1559	[M+H] ⁺	565,505	1.24	夏佛托昔	天南星	[16]
	564.1478	8.556		563.1418	[M-H] ⁻		2.13			
20	322.1093	8.578	C ₁₉ H ₁₆ NO ₄ ⁺	323.1163	[M+H] ⁺	265,189	3.40	格兰地新	黄连	[17]
21	284.0687	8.920	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.076	[M+H] ⁺	242	1.05	大黄素甲醚	大黄	[18]
22	564.1871	9.192	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₃	587.1756	[M+Na] ⁺	356,322	3.58	鼠李糖甘草苷	法半夏	[16]
23	234.0533	9.318	C ₁₂ H ₁₀ O ₅	235.0604	[M+H] ⁺	222,189	1.28	2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色原酮	大黄	[13]
	234.0531	9.262		233.0458	[M-H] ⁻		1.29			
24	578.1641	9.686	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.1554	[M-H] ⁻	577,146	-1.55	异佛莱心苷	法半夏	[11]
25	442.0921	9.820	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	443.0976	[M+H] ⁺	393,123	4.81	表儿茶素没食子酸酯	大黄	[13]
	442.0901	9.820		441.0824	[M-H] ⁻		0.23			
26	550.1704	9.845	C ₂₆ H ₁₈ O ₁₀	549.1614	[M-H] ⁻	283,239	0	芹糖异甘草苷	法半夏	[10]
27	446.0856	9.912	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	469.0733	[M+Na] ⁺	279,248	-1.71	大黄酸-8-O-β-D-葡萄糖苷	大黄	[15]
	446.0848	9.845		445.0772	[M-H] ⁻		-0.90			
28	478.1471	9.978	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	479.1551	[M+H] ⁺		0.63	异莲花掌苷	大黄	[15]
	478.1472	9.922		477.14	[M-H] ⁻	313	-0.42			
29	310.1058	10.092	C ₁₅ H ₁₈ O ₇	333.0949	[M+Na] ⁺		1.20	2-O-桂皮-β-D-葡萄糖苷	大黄	[13]
	310.1055	10.002		355.1035	[M+HCOOH-H] ⁻	345	0.00			
30	234.0897	10.684	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	235.097	[M+H] ⁺	235	2.13	2-(2'-羟丙基)-5-甲基-7-羟基色原酮	大黄	[13]
	234.0895	10.631		233.0822	[M-H] ⁻		1.29			
31	862.1953	10.833	C ₄₂ H ₃₈ O ₂₀	861.1888	[M-H] ⁻	699,654	0.46	番泻苷 B	大黄	[13]
32	320.0893	11.572	C ₁₉ H ₁₄ NO ₄	321.0991	[M+H] ⁺	292,234	-1.90	黄连碱	黄连	[19]
33	399.1665	12.363	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	422.1598	[M+Na] ⁺	350,336,292	4.69	秋水仙碱	天南星	[20]
34	462.1161	12.313	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.1088	[M-H] ⁻	461,331,169	-0.22	桂皮酸-O-没食子酰-葡萄糖苷	大黄	[9]
35	418.1257	13.394	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.1188	[M-H] ⁻	255,213	-0.72	异甘草苷	法半夏	[10]
36	1048.5438	14.102	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₂	1071.5336	[M+Na] ⁺	869,577	-0.93	重楼皂苷G	重楼	[21]
	1048.5457	14.078		1047.5386	[M-H] ⁻		0.48			

(续表 1)

序号	质量	相对时间 (min)	分子式	m/z (MS1)	部分特征离子峰	m/z (MS2)	差异(Δ ppm)	名称	来源药材	来源文献
37	408.1422	14.182	$C_{20}H_{24}O_9$	431.1314	[M+Na] ⁺	306,292	0.23	6-甲氧基 模素-8-O- β - D-葡萄糖苷	大黄	[13]
	408.1424	14.112		407.1352	[M-H] ⁻		0.98			
38	432.1053	14.372	$C_{21}H_{20}O_{10}$	455.0942	[M+Na] ⁺	455,292	-1.54	芦荟大黄素- 3-羟甲基-O- 葡萄糖苷	大黄	[13]
	432.1060	14.317		431.0989	[M-H] ⁻		1.16			
39	1046.5283	14.384	$C_{51}H_{82}O_{22}$	1047.5356	[M+H] ⁺	415,172	-1.43	polyphyllosi de III	重楼	[20]
	1046.5282	14.852		1091.5286	[M+HCOOH -H] ⁻		0.55			
40	416.1109	14.554	$C_{21}H_{20}O_9$	439.0999	[M+Na] ⁺	439,336	-0.23	大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖 苷	大黄	[13]
	416.1104	14.487		415.1032	[M-H] ⁻		-0.72			
41	286.048	15.273	$C_{15}H_{10}O_6$	287.0552	[M+H] ⁺		0.74	木犀草素	黄连*	[8]
	286.0484	15.216		285.0412	[M-H] ⁻	285,215,199	2.20			
42	446.1213	15.932	$C_{22}H_{22}O_{10}$	469.1104	[M+Na] ⁺	469,283	-0.21	大黄素甲醚- 8-O- β -D葡 萄糖苷	大黄	[15]
	284.0687	15.865		283.0616	[M-H] ⁻		1.41			
43	450.1523	17.150	$C_{22}H_{26}O_{10}$	473.1413	[M+Na] ⁺	473,230	-1.06	决明柯酮-O- 乙酰基葡萄 糖苷	大黄	[15]
	450.1528	17.097		449.1469	[M-H] ⁻		3.56			
44	838.3969	17.208	$C_{42}H_{62}O_{17}$	837.3886	[M-H] ⁻	661,351	-3.34	甘草皂苷G2	法半夏	[10]
45	822.4012	17.943	$C_{42}H_{62}O_{16}$	845.392	[M+Na] ⁺		-3.17	甘草酸	法半夏*	[10]
	822.4031	17.914		821.3959	[M-H] ⁻	351,193	-0.83			
46	284.0328	18.384	$C_{15}H_8O_6$	283.0257	[M-H] ⁻	239	3.18	大黄酸	大黄	[18]
47	884.4779	19.643	$C_{15}H_{20}O_3$	907.4652	[M+Na] ⁺	685,292	-1.10	纤细薯蓣皂 苷	重楼	[21]
	884.4762	19.622		929.4748	[M+HCOOH -H] ⁻		-0.43			
48	870.4622	19.768	$C_{44}H_{70}O_{17}$	893.4502	[M+Na] ⁺	376,251	-0.34	重楼皂苷H	重楼	[21]
	870.4607	19.622		915.459	[M+HCOOH -H] ⁻		-0.55			
49	854.4664	19.773	$C_{44}H_{70}O_{16}$	877.4557	[M+Na] ⁺	877,306	-1.31	重楼皂苷II	重楼	[21]
	870.4646	19.750		869.4546	[M-H] ⁻		0.69			
50	738.4219	19.932	$C_{39}H_{62}O_{13}$	783.4170	[M+HCOOH -H] ⁻	783,146	-0.26	重楼皂苷VI	重楼	[21]
51	270.0537	20.820	$C_{15}H_{10}O_5$	269.0460	[M-H] ⁻	225,146	1.86	芦荟大黄素	大黄	[18]
52	868.482	22.136	$C_{45}H_{72}O_{16}$	891.4746	[M+Na] ⁺	725,415	3.70	薯蓣皂苷	重楼	[22]
	868.482	22.104		913.4809	[M+HCOOH -H] ⁻		0.77			
53	854.4668	22.323	$C_{44}H_{70}O_{16}$	877.4572	[M+Na] ⁺	196,140	0.43	重楼皂苷I	重楼*	[21]
	854.4655	22.297		899.4609	[M+HCOOH -H] ⁻		-1.07			
54	254.0577	22.790	$C_{15}H_{10}O_4$	255.0647	[M+H] ⁺	196	-1.96	大黄酚	大黄	[18]
55	576.4428	27.329	$C_{35}H_{60}O_6$	599.4282	[M+Na] ⁺	429,355	6.67	胡萝卜苷	天南星*	[23]
	576.4374	27.263		621.4349	[M+HCOOH -H] ⁻		-2.68			

注: *表示在水提液中未检测出的化合物

面积也较高。与70%甲醇提取方式获得化合物相比,水提液识别的是即将吸收入血的体外化合物群的信息,而70%甲醇提取液识别的则是方剂中更多的化合物的信息,有助于解析其多成分的特征,保证消痰通腑免煎剂所含有的化合物的准确性,也有助于免煎剂生产的质量控制。

通过上述分析方法得到55种化合物,其中,精氨酸、奎宁酸、柠檬酸、黄连碱、格兰地新、绿原酸、木犀草素、色氨酸共8个化合物来自黄连;脱氧腺苷、薯蓣皂苷、重楼皂苷G、polyphyllaside III、重楼皂苷II、纤细薯蓣皂苷、重楼皂苷H、重楼皂苷VI、重楼皂苷I共9个化合物来自重楼;异亮氨酸、苯丙氨酸、夏佛托苷、秋水仙碱、胡萝卜苷共5个化合物来自天南星;精氨酸、脱氧腺苷、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、鼠李糖甘草苷、异佛莱心苷、芹糖异甘草苷、异甘草苷、甘草皂苷G2、甘草酸共10个化合物来自法半夏;没食子酸-3-O- β -D-葡萄糖苷、没食子酸、对香豆酸-O-葡萄糖苷、儿茶素-O-葡萄糖苷/表儿茶素-O-葡萄糖苷、原花青素B₂、儿茶素、阿魏酸、4-(4'-羟基苯基)-2-丁酮-O-阿魏酰-没食子酰-葡萄糖苷、没食子酸-O-没食子酰基葡萄糖苷、对香豆酸、大黄素甲醚、2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色原酮、表儿茶素没食子酸酯、大黄酸-8-O-葡萄糖苷、异莲花掌苷、2-O-桂皮- β -D-葡萄糖苷、2-(2'-羟丙基)-5-甲基-7-羟基色原酮、番泻苷B、桂皮酸-O-没食子酰-葡萄糖苷、6-甲氧基酸模素-8-O- β -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素-3-羟甲基-O-葡萄糖苷、大黄酚-8-O-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-D葡萄糖苷、决明子酮-O-乙酰基葡萄糖苷、大黄酸、芦荟大黄素、大黄酚共27个化合物来自生大黄或制大黄,具体参见表1。其中,部分化合物例如精氨酸、脱氧腺苷、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸是根茎类化合物的共有化学成分,在黄连、重楼及半夏中均可以检测到,因此,根据化合物的文献检索进行了相应的归属。

3 讨论

中药方剂在中医临床实践中形成了以汤剂为主的口服给药方式,药材煎煮制备获得复方时是否会导致化学成分的改变,消痰通腑方免煎剂是否需要对上述化合物进行检测来确定方剂的质量均未知。再有,中药方剂具有多成分、多靶点、多途径、整合调节的作用特点,因此,有必要对消痰通腑方所含所有药材的化学成分群进行分析,初步确定其化学成分特征,为后期研究和临床应用提供数据

参考。

为了实现化合物的高效、快速提取,首先考察了不同的超声提取溶剂(水、70%及100%甲醇溶液)、提取时间(30、45和60 min)、样品与溶剂的比例(1:5、1:10和1:20),结果表明,以10倍溶剂即50 ml的75%甲醇溶液超声提取30 min为最佳样品制备方法。为了获得分离效果好、总离子流强的色谱图,选择了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水(含0.1%甲酸)和乙腈-水(含0.1%甲酸)流动相体系进行分析。结果表明,乙腈-0.1%甲酸水溶液组成的流动相在正、负离子扫描模式下均表现出良好的分离效果和丰富的信号响应。除此以外,本研究还考察了不同流速(0.3、0.4和0.5 ml/min)和不同柱温(25、30和35 °C)对于分析效果的影响。结果显示,当柱温在30 °C,流速为0.3 ml/min时,色谱峰形尖锐、色谱图基线稳定,柱压平稳。

本研究采用的分析方法具有快捷、简便、易行,样品用量小和高通量等特点,且样品前处理简单,所建立的方法可用于快速鉴别消痰通腑方免煎剂的化学成分。所鉴定的化合物中包括多数具有抗炎抗肿瘤等活性的化合物。例如,已有文献表明,重楼皂苷类成分如重楼皂苷I可以通过诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖和转移等发挥抗肿瘤作用^[24-25];天南星中的夏佛托苷可以通过诱导自噬激活发挥抗肿瘤细胞增殖作用^[26];黄连碱作为黄连中的主要成分之一,具有抗真菌、胃黏膜保护、细胞毒等一些药理活性^[27];含大黄的方剂具有辅助放、化疗增敏减毒的功效,所含化合物大黄酸、大黄素甲醚在抗炎、抗肿瘤等方面都具有显著效果^[28]。

综上,本研究基于UHPLC-Q-TOF/MS技术开展消痰通腑方免煎剂中的化学成分分析,丰富了全方的物质基础研究,为进一步明确其质量控制标志物和药效物质研究提供了科学依据。

【参考文献】

- [1] 石变. 消痰通腑方对脓毒症患者胃肠功能及炎症反应的影响[D]. 上海: 第二军医大学, 2012.
- [2] 刘焯, 矫健鹏, 周昱岐, 等. 从痰论治结肠癌前病变探析: 魏品康教授临证经验撷英[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(6): 1-3.
- [3] 刘焯, 顾雨芳, 孙昱玮, 等. 消痰通腑方对结肠癌前病变小鼠IL-6、AICD表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2015, 49(4): 78-82.
- [4] 刘焯, 顾雨芳, 修丽娟, 等. 消痰通腑方对结肠癌前病变模型小鼠结肠黏膜上皮NF- κ B/IL-6/STAT3和AICD蛋白表达水平的影响[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(12): 70-75.
- [5] 石变, 李秋蓉, 修丽娟, 等. 消痰通腑颗粒对脓毒症患者胃肠

- 功能障碍的影响研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019, 27(1): 1-5,10.
- [6] 张纪红, 吴卫东, 刘建庭, 等. 基于UPLC-Q-TOF/MS技术活血止痛胶囊化学成分的快速分析[J]. 中草药, 2020, 51(12): 3139-3146.
- [7] YANG N, DONG Y Q, WU M F, et al. Establishing a rapid classification and identification method for the major triterpenoids of *Alisma orientale*[J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(3): 384-394.
- [8] 郝艺铭, 霍金海, 王涛, 等. UPLC-Q-TOF/MS技术分析黄连中非生物碱类成分[J]. 中药材, 2020, 43(2): 354-358.
- [9] 王晴, 卢志威, 刘月红, 等. UPLC-Q-TOF/MS^E结合诊断离子过滤方法快速分析大黄中酚类成分[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1922-1931.
- [10] 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.
- [11] LEE J Y, PARK N H, LEE W, et al. Comprehensive chemical profiling of *Pinellia* species tuber and processed *Pinellia* tuber by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1471: 164-177.
- [12] 周浓, 张杰, 潘兴娇, 等. HPLC法同时测定重楼属药用植物中10种核苷和碱基[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2927-2932.
- [13] 曹瑞, 窦志华, 倪丽丽, 等. HPLC指纹图谱、Q-TOF/MS定性及多成分定量相结合的大黄饮片质量评价研究[J]. 中草药, 2019, 50(5): 1100-1110.
- [14] 王星, 池玉梅, 康安. 超高效液相色谱-串联质谱法定性和高效液相色谱法定量分析天南星中氨基酸成分[J]. 色谱, 2014, 32(12): 1326-1332.
- [15] 李丹丹, 张慧, 李思雨, 等. 基于HPLC指纹图谱及UPLC-Q-TOF-MS法的3种不同来源大黄差异成分研究[J]. 中国药房, 2019, 30(23): 3240-3245.
- [16] 王琴霞. 天南星和虎掌南星饮片质量标准及其有机酸部位的研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [17] 陈军辉, 赵恒强, 李文龙, 等. 高效毛细管电泳-电喷雾飞行时间质谱联用分析黄连中的生物碱[J]. 化学学报, 2007, 65(23): 2743-2749.
- [18] 刘月红, 黄政海, 董玲, 等. 高效液相色谱法同时测定大黄中14种成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(23): 4514-4519.
- [19] ZHAO H, ZHOU S, ZHANG M, et al. An in vitro AChE inhibition assay combined with UF-HPLC-ESI-Q-TOF/MS approach for screening and characterizing of AChE inhibitors from roots of *Coptis chinensis* Franch[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 120: 235-240.
- [20] 穆丽莎. 天南星抗癌有效部位制备工艺及质量控制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [21] 王本伟, 张洁瑾, 李悦悦, 等. HPLC-TOF/MS鉴别大鼠给药重楼提取物后尿液中甾体皂苷类成分[J]. 第二军医大学学报, 2013, 34(4): 421-424.
- [22] 王本伟, 赵亮, 张海, 等. 加速溶剂萃取-HPLC-TOF/MS法同时测定重楼中6种甾体皂苷类成分[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(5): 549-552.
- [23] 满薇. 天南星科植物虎掌南星的化学成分及天南星的质量控制研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2012.
- [24] 朱燕, 谢丽, 杨觅, 等. 重楼抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 癌症进展, 2015, 13(2): 164-166.
- [25] HE J, YU S, GUO C, et al. Polyphyllin I induces autophagy and cell cycle arrest via inhibiting PDK1/Akt/mTOR signal and downregulating cyclin B1 in human gastric carcinoma HGC-27 cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109189.
- [26] KIM P S, SHIN J H, JO D S, et al. Anti-melanogenic activity of schaftoside in *Rhizoma Arisaematis* by increasing autophagy in B16F1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(1): 309-315.
- [27] 张志辉, 邓安珺, 于金倩, 等. 黄连碱药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(17): 2750-2754.
- [28] 袁向飞, 谢俊木子, 谭晓华. 大黄及其有效成分抗肿瘤的研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2018, 24(3): 363-366.

[收稿日期] 2021-09-06 [修回日期] 2022-03-03

[本文编辑] 陈盛新