

· 化学与分析 ·

基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究法半夏中甘草化学成分

杨彬, 王媛, 田梦, 袁磊, 武媛媛, 李遇伯*

(天津中医药大学 中药学院, 天津 300193)

[摘要] 目的:应用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对法半夏中所含甘草化学成分进行研究。方法:以法半夏水提液作为供试品溶液,采用 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),乙腈-0.1% 甲酸水为流动相进行二元梯度洗脱,流速 0.25 mL·min⁻¹,柱温 35 °C。质谱采用电喷雾离子源(ESI),负离子模式下扫描采集数据,根据准分子离子及二级碎片离子,并结合对照品及文献报道的质谱数据对法半夏中所含甘草化学成分进行鉴定。结果:从法半夏中鉴定出 15 个甘草化学成分。其中三萜皂苷类成分 6 个,黄酮类成分 9 个。结论:该研究通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析技术,明确了法半夏中含有的 15 种甘草化学成分,可以为阐明半夏经甘草炮制成为法半夏后功效发生变化的物质基础及其临床合理应用提供依据。

[关键词] 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱; 法半夏; 甘草; 化学成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0045-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030045

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1553.010.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 15:53

Analysis on Chemical Constituents of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in Pinelliae Rhizoma Praeparatum by UPLC-Q-TOF-MS/MS

YANG Bin, WANG Yuan, TIAN Meng, YUAN Lei, WU Yuan-yuan, LI Yu-bo*

(College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the chemical components of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in Pinelliae Rhizoma Praeparatum (PRP) by using ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). **Method:** The aqueous extracts of PRP were separated on Waters Acquity BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with acetonitrile-0.1% formic acid solution as mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.25 mL·min⁻¹ and the column temperature was 35 °C. Mass spectrometric data were obtained under electrospray ionization (ESI) negative mode and the constituents were identified according to the exact relative molecular weight and fragment ions reported in the references. **Result:** Fifteen constituents were identified from Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in PRP, including 6 triterpenoid saponins and 9 flavonoids. **Conclusion:** Systematic research of the fifteen chemical constituents of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma in PRP was performed firstly in this study, which could provide the basis for clarifying the pharmacodynamic material basis and rational clinical application of PRP.

[Key words] UPLC-Q-TOF-MS/MS; Pinelliae Rhizoma Praeparatum; Glycyrrhizae Radix et Rhizoma; chemical components

[收稿日期] 20160621(021)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2011CB505300,2011CB505302)

[第一作者] 杨彬, 硕士, 助理实验师, 从事中药分析方向的研究, Tel: 022-59596221, E-mail: yang3023008@163.com

[通讯作者] *李遇伯, 博士, 副教授, 从事中药分析及代谢组学研究, Tel: 022-59596221, E-mail: yuboli1@163.com

法半夏由天南星科植物半夏的干燥块茎经甘草和石灰加工炮制而成,其功效较未经炮制的半夏发生了变化。半夏具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的功效,用于咳喘痰多,呕吐反胃,胸脘痞闷等证。而炮制后法半夏长于祛痰止咳^[1-3]。研究显示,半夏化学成分中总生物碱与其镇咳祛痰作用的相关性最大^[4],其中麻黄碱为其祛痰止咳的药效成分^[5,6]。近年来有学者研究表明,甘草酸与麻黄碱合用具有显著的协同作用^[7-8]。由于甘草酸为甘草的主要化学成分,因此法半夏长于祛痰止咳可能与其含有甘草化学成分,并与麻黄碱发生协同作用有关。由此可见,法半夏中甘草化学成分可能是其炮制后功效发生变化的重要物质基础。目前,甘草化学成分的研究较为深入,但法半夏中所含的甘草化学成分仍不明确^[9-10]。因此,研究法半夏中的甘草化学成分,对阐明其功效变化的物质基础及临床合理应用具有重要意义。本研究采用超高效液相色谱四级杆飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q-TOF-MS/MS),对法半夏中甘草的化学成分进行研究,以期为阐明半夏经甘草炮制成为法半夏后功效发生变化的物质基础及其临床合理应用提供依据。

1 材料

Acquity UPLC Class I 型超高效液相色谱仪, Xevo G2 Q-Tof 型高分辨四级杆-飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司);3-18K 型低温高速离心机(德国 Sigma 公司),RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂),FA2004A 型电子天平(上海精天电子仪器有限公司)。

法半夏购置于北京华邈中药工程技术开发中心,由天津中医药大学李天祥教授鉴定为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* 干燥块茎的炮制品,标本现存放于天津中医药大学中药学院科研实验室;甘草次酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号 110723,纯度 > 98%);甘草酸(批号 20150420,纯度 > 98%),芹糖甘草苷(批号 20151110,纯度 > 98%),异甘草苷(批号 20151028,纯度 > 98%)对照品均购于天津士兰科技有限公司;纯净水(浙江娃哈哈集团有限公司);乙腈(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);甲酸(色谱纯,德国 Merck 公司)。

2 方法

2.1 色谱条件 采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温 35 °C,流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B),梯度洗脱

(0 ~ 2 min, 1% A; 2 ~ 5 min, 1% ~ 6% A; 5 ~ 15 min, 6% ~ 10% A; 15 ~ 20 min, 10% ~ 20% A; 20 ~ 30 min, 20% ~ 40% A; 30 ~ 36 min, 40% ~ 50% A; 36 ~ 38 min, 50% ~ 70% A; 38 ~ 39 min, 70% ~ 99% A; 39 ~ 41 min, 99% A; 41 ~ 43 min, 99% ~ 1% A; 43 ~ 45 min, 1% A);流速 0.25 mL·min⁻¹,进样量 5 μL。

2.2 质谱条件 UPLC-Q-TOF-MS/MS 系统使用电喷雾离子源(ESI),负离子模式全扫描;离子源工作参数为毛细管电压 2.3 kV,锥孔电压 30 V,锥孔气流量 50 L·h⁻¹,脱溶剂气流量 800 L·h⁻¹,离子源温度 100 °C,脱溶剂气温度 350 °C,0.1 s 采集 1 次谱图,采用亮氨酸脑啡肽([M - H]⁻ = 554.2615)进行校正,质量扫描范围 m/z 100 ~ 1 000。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取法半夏药材 20.0 g 于圆底烧瓶中,加入 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min,回流提取 1.5 h 后 9 层纱布过滤,收集滤液;残渣加入 8 倍量蒸馏水,同法提取后合并 2 次滤液,10 min 减压浓缩至 100 mL,经 12 000 r·min⁻¹ 离心后取上清液作为供试品溶液。

2.4 数据分析 采用 MassLynx 4.1 软件对 UPLC-Q-TOF-MS/MS 总离子流图进行峰提取、峰对齐等处理,对各分子离子峰代表的化学标志物进行鉴定。其中,甘草酸、甘草次酸、芹糖甘草苷及异甘草苷采用对照品比对法进行鉴定;其他化学标志物根据精确相对分子质量和碎片离子,结合文献报道的质谱数据进行初步鉴定。

3 结果

法半夏供试品溶液按照 2.1、2.2 项下色谱质谱条件进样分析,获得法半夏负离子模式下的总离子流,见图 1。根据 ESI 离子源的工作原理可知,化合物在 ESI 电离过程中采用不同离子模式会得到或者失去 H⁺,从而得到准分子离子 [M + H]⁺ 或 [M - H]⁻,且由于化合物本身性质容易加和成二倍体,从而形成 [2M + H]⁺ 或 [2M - H]⁻;当化合物经过

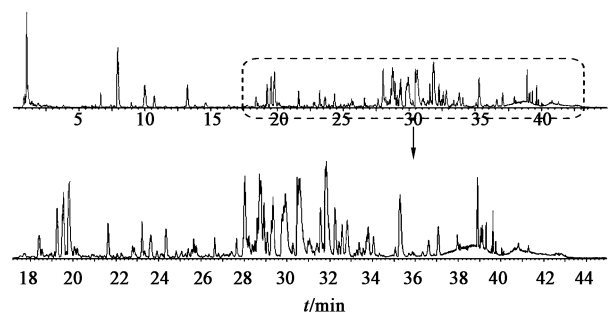


图 1 法半夏供试品溶液负离子模式 BPI 总离子流
Fig.1 BPI chromatograms of PRP in negative ESI mode

离子源轰击后其结构中特定的化学键会发生断裂,产生相应的离子碎片。

由于同一类化合物具有相近的化学键断裂方式,其共有的断裂碎片就可作为一类化合物的特征碎片离子,作为这类化合物结构鉴定的依据。本

研究根据化合物准确相对分子质量、准分子离子、特征碎片离子及其他碎片离子等信息,参考相关文献数据及与对照品对照,共鉴定出 15 个甘草化学成分。其中三萜皂苷类化合物 6 个,黄酮类化合物 9 个,见表 1。

表 1 法半夏中 15 个甘草化学成分 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析

Table 1 Chromatographic and mass spectral data of 15 compounds analyzed by UPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	t_R /min	化合物	结构分类	$[M-H]^-$ (m/z)	δ	分子式	二级碎片
1	18.41	鼠李糖甘草苷	黄酮类	563.175 2	-2.3	$C_{27}H_{32}O_{13}$	473,353,255,135 ^[11-15]
2	19.25	甘草苷	黄酮类	417.118 1	-1.2	$C_{21}H_{22}O_9$	255,135 ^[14-16]
3	19.51	异甘草苷	黄酮类	417.119 8	2.8	$C_{21}H_{22}O_9$	255,135 ^[14-15]
4	19.84	异佛来心苷	黄酮类	577.155 5	-0.3	$C_{27}H_{30}O_{14}$	549,255,135,119 ^[15]
5	22.86	芹糖甘草苷	黄酮类	549.160 9	0.2	$C_{26}H_{30}O_{13}$	417,255,135 ^[13,15]
6	23.23	异芹糖甘草苷	黄酮类	549.160 3	-0.9	$C_{26}H_{30}O_{13}$	417,255,135 ^[14-15]
7	23.64	甘草素	黄酮类	255.066 7	3.9	$C_{15}H_{12}O_4$	153,135,119 ^[10-13,15]
8	28.02	甘草皂苷 G ₂	三萜皂苷	837.391 8	1.0	$C_{42}H_{62}O_{17}$	661,485,351 ^[13-16]
9	28.30	异甘草素	黄酮类	255.066 7	3.9	$C_{15}H_{12}O_4$	153,135,119 ^[10-13,15]
10	30.48	甘草酸	三萜皂苷	821.395 4	-0.7	$C_{42}H_{62}O_{16}$	645,351,193,113 ^[10-16]
11	31.57	甘草皂苷 B ₂	三萜皂苷	807.416 4	-0.4	$C_{42}H_{64}O_{15}$	351,193,113 ^[15-16]
12	31.93	甘草皂苷 J ₂	三萜皂苷	823.411 5	-0.1	$C_{42}H_{64}O_{16}$	719,685,351 ^[15-16]
13	34.05	甘草皂苷 C ₂	三萜皂苷	805.401 9	1.1	$C_{42}H_{62}O_{15}$	351,311 ^[14-16]
14	39.31	甘草查尔酮 A	黄酮类	337.144 2	0.6	$C_{21}H_{22}O_4$	305,297 ^[13]
15	39.63	甘草次酸	三萜皂苷	469.332 4	1.3	$C_{30}H_{46}O_4$	425,279,255,119 ^[13-16]

3.1 三萜皂苷类化合物的鉴定 三萜皂苷类化合物为甘草的主要成分^[17-18]。法半夏中甘草三萜皂苷在 ESI 负离子源轰击下产生准分子离子 $[M-H]^-$,其结构中 2 分子的葡萄糖醛酸苷键断裂形成碎片离子 m/z 351 $[2 \times C_6H_8O_6 - H]^-$,进一步断裂形成 m/z 193 $[C_6H_8O_6 - H]^-$ 。 m/z 351 及 m/z 193 碎片离子丰度较大,可作为三萜皂苷类化合物的特征离子。此外,三萜皂苷类化合物还较易断裂成 $[M-H-H_2O]^-$, $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, $[M-H-C_6H_8O_6]^-$, $[M-H-2 \times C_6H_8O_6]^-$ 等碎片离子。

峰 10 准分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 821.395 4,通过裂解可产生特征碎片 m/z 351 及 m/z 193,推测其为三萜皂苷类化合物。与此同时,二级碎片中具有 $[M-H-H_2O]^-$, $[M-H-CO_2-H_2O]^-$, $[M-H-C_6H_8O_6]^-$ 等碎片离子,通过与甘草酸对照品二级图谱比对后确定其为甘草酸。其糖苷键断裂后形成甘草次酸(峰 15) $[M-H]^-$ m/z 469.332 4。具体断裂途径见图 2。

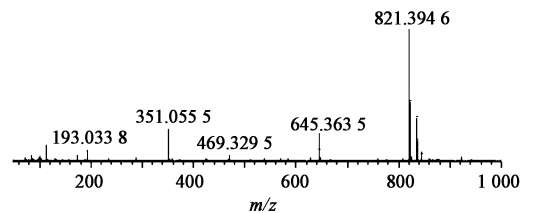


图 2 甘草酸负离子模式裂解规律
Fig. 2 Fragmentation pathway of glycyrrhizic acid in negative mode

峰 12 准分子离子 $[M-H]^-$ 为 m/z 823.411 5,通过裂解可产生特征碎片 m/z 351 及 m/z 193。通过对比文献报道,推测其为甘草皂苷 J₂。

此外,峰 8,11,13 通过裂解均可产生特征碎片 m/z 351 及 m/z 193,根据各准分子离子 $[M-H]^-$ m/z 837, m/z 807, m/z 805 及文献报道的碎片离子等信息,推测峰 8 为甘草皂苷 G₂;峰 11 为甘草皂苷 B₂;峰 13 为甘草皂苷 C₂。

3.2 黄酮类化合物的鉴定 法半夏中甘草黄酮类成分经鉴定主要为二氢黄酮及查尔酮类^[19-20],二者

互为同分异构体,在 ESI 负离子源轰击下产生准分子离子 $[M - H]^-$,同时较易产生二倍体离子 $[2M - H]^-$ 。黄酮苷类的糖苷键易断裂形成碎片离子 $[M - C_6H_8O_6 - H]^-$ m/z 255,可以作为两类成分特征离子。与此同时, m/z 255 通过 RDA 裂解,会继续断裂成 m/z 135 碎片离子,其进一步可断裂为 m/z 119 碎片离子。

峰 2,3 准分子离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 417.118 1,通过加成产生二倍体碎片离子 $[2M - H]^-$,断裂形成特征离子 $[M - C_6H_8O_6 - H]^-$ m/z 255,碎片离子 m/z 135 及 m/z 119。峰 3 通过对照品比对为具有查尔酮母核的异甘草苷;峰 2 通过对比文献报道,推测为具有二氢黄酮母核的甘草苷。具体裂解途径见图 3。此外峰 7,9 准分子离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 255.066 7,与文献报道有相同的裂解规律,故推测其分别为甘草素及异甘草素。因此甘草苷和异甘草苷的基本母核为甘草素和异甘草素。

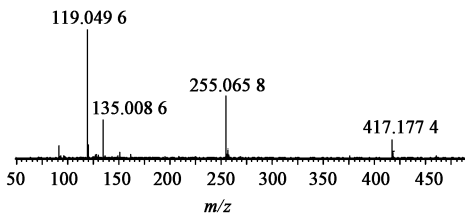


图 3 甘草苷负离子模式裂解规律

Fig. 3 Fragmentation pathway of liquiritin in negative mode

峰 1 准分子离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 563.175 2,断裂形成特征离子 $[M - glc - rha - H]^-$ m/z 255,碎片离子 m/z 473, m/z 353, m/z 135 及 m/z 119,同时具有鼠李糖碎片离子 m/z 161。通过对比文献报道推测其为鼠李糖甘草苷。

峰 5,6 准分子离子 $[M - H]^-$ 分别为 m/z 549.160 9 和 m/z 549.160 3,二级图谱中可见特征离子 m/z 255,碎片离子 m/z 417, m/z 135 及 m/z 119。峰 5 通过对照品比对鉴定其为芹糖甘草苷;峰 6 参考文献报道推断其为异芹糖甘草苷。

峰 4 准分子离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 577.155 5,断裂形成特征离子 $[M - 2glc - H]^-$ m/z 255,碎片离子 m/z 353, m/z 135 及 m/z 119。参考文献报道推测其为异佛来心苷。

峰 14 准分子离子 $[M - H]^-$ 为 m/z 337.144 2,断裂形成特征离子 $[M - 2H - OCH_3]^-$ m/z 305 及碎片离子 m/z 297,与文献报一致,故推测其为甘草查尔酮 A。

4 讨论

本研究从法半夏中鉴定出 15 个甘草化学成分,

其中皂苷类化合物 6 个,黄酮类化合物 9 个。其中,甘草酸为主要的皂苷类成分,其在口服后会水解为甘草次酸,对小鼠氨水引咳、二氧化硫引咳模型均有明显的镇咳作用^[21-22]。与此同时,相关学者研究表明甘草酸可以有效提高麻黄碱激动 β_2 -AR 的作用^[23],同时通过调节 Fyn, ErbB3, MSRA, c-Src, EGFR 等基因与麻黄碱产生协同作用^[24],增强止咳平喘的功效。此外,黄酮类化合物中甘草苷、异甘草素^[25]及芹糖甘草苷^[26]均有文献研究证实具有祛痰止咳平喘的功效。由此可见,法半夏中含有的两类甘草成分可能是其炮制后长于祛痰止咳的物质基础。本研究通过 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析明确了法半夏中含有的 15 种甘草化学成分,可以为阐明法半夏功效变化的物质基础及其临床合理应用提供依据。

[参考文献]

- [1] 杨冰月,李敏,吴发明,等.基于止咳效价评价半夏及其炮制品品质的方法研究[J].中草药,2015,46(17):2586-2592.
- [2] 苏彬,李书渊,陈艳芬,等.半夏及其炮制品镇咳祛痰作用的比较[J].广东药学院学报,2013,29(2):181-184.
- [3] 游秋云,王平.生半夏、法半夏水提物对小鼠镇静催眠作用的比较研究[J].湖北中医杂志,2013,35(3):3-5.
- [4] 曾颂,李书渊,吴志坚,等.半夏镇咳祛痰的成分-效应关系研究[J].中国现代中药,2013,15(6):452-455.
- [5] 吴皓,谈献和,蔡宝昌,等.半夏姜制对麻黄碱含量的影响[J].中国中药杂志,1996,21(3):157-158.
- [6] Oshio H, Tsukui M, Matsuoka T. Isolation of *l*-ephedrine from "pinelliae tuber" [J]. Chem Pharm Bull,1978,26(7):2096-2097.
- [7] 周斌.麻杏石甘汤药效物质基础研究及新药研制[D].天津:天津大学,2007.
- [8] 赵杰.麻黄类药对组成规律的基础研究-麻黄-甘草药对(I)[D].广州:南方医科大学,2012.
- [9] ZHANG Q Y, YE M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) [J]. J Chromatogr A, 2009,1216:1954-1969.
- [10] 周燕,王明奎,廖循,等.甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析[J].分析化学杂志,2004,32(2):174-178.
- [11] LI Y J, CHEN J, LI Y, et al. Screening and characterization of natural antioxidants in four *Glycyrrhiza* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2011,

- 1218;8181-8191.
- [12] XUE Q, WEI S, SHUAI J, et al. Separation and characterization of phenolic compounds and triterpenoid saponins in licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) using mobile phase-dependent reversed-phase \times reversed-phase comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2015, 1402:36-45.
- [13] Mohamed A F, Andrea P, Ludger A, et al. Comparative metabolite profiling and fingerprinting of medicinal licorice roots using a multiplex approach of GC-MS, LC-MS and 1D NMR techniques [J]. Phytochemistry, 2012, 76(4):60-72.
- [14] Montoro P, Maldini M, Russo M, et al. Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54(3):535-544.
- [15] WANG Y Y, HE S, CHENG X C, et al. UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprinting of traditional Chinese formula Sijunzi Tang [J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 80(3):24-33.
- [16] ZHENG Y F, QI L W, ZHOU J L, et al. Structural characterization and identification of oleananetype triterpene saponins in *Glycyrrhiza uralensis* Fischer by rapid-resolution liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, 24(22):3261-3270.
- [17] 冷晶, 朱云祥, 陈璐琳, 等. 甘草中2个新三萜皂苷 [J]. 中草药, 2015, 46(11):1576-1582.
- [18] 陶伟伟, 段金廛, 杨念云, 等. 乌拉尔甘草皂苷类成分研究 [J]. 中草药, 2013, 44(12):1552-1557.
- [19] 王青, 苗文娟, 向诚, 等. 乌拉尔甘草中黄酮类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(1):31-36.
- [20] 景晶, 赵金英, 华冰, 等. 甘草总黄酮抑制硫代乙酰胺诱导肝纤维化大鼠肝组织中 TGF- β_1 及 Caspase-3 的表达 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(15):3034-3040.
- [21] 俞腾飞, 田向东, 李仁, 等. 甘草黄酮、甘草浸膏及甘草次酸的镇咳祛痰作用 [J]. 中成药, 1993, 15(3):32-33.
- [22] 韩洁, 赵晶, 田维毅, 等. 肠菌群体外转化对甘草药用成分及镇咳作用的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(4):422-424.
- [23] 李若洁, 石倩, 程彬峰, 等. 甘草酸协同麻黄碱的平喘作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(3):183-186.
- [24] 石倩, 刘赓, 李若洁, 等. 利用基因芯片技术阐述甘草酸协同麻黄碱的分子作用机制 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4):85-90.
- [25] 张明发, 沈雅琴. 甘草及其提取物对呼吸系统的药理作用 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(4):262-267.
- [26] Kamei J, Nakamura R, Ichiki H, et al. Antitussive principles of *Glycyrrhizae Radix*, a main component of the Kampo preparation Bakumondo-to (Mai-men-dong-tang) [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 469(1/3):159-163.

[责任编辑 顾雪竹]