

·实验研究·

本文引用:向 锋,周 宜,廖小娟,邹菊英,王竹鑫. 基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS的湖南新冠2号方的化学成分研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(9): 1313-1320.

## 基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS的湖南新冠 2号方的化学成分研究

向 锋,周 宜,廖小娟,邹菊英,王竹鑫\*

(湖南中医药大学第二附属医院,湖南长沙 410005)

**[摘要]** 目的 建立湖南新冠2号方的超高效液相色谱串联四级杆轨道阱质谱(UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)定性分析方法,系统阐明湖南新冠2号方中的化学成分。**方法** 使用ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),以0.1%甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱,流速0.3 mL/min,柱温35 °C,进样量2 μL,采用电喷雾离子源,在Full Scan MS/dd-MS<sup>2</sup>扫描模式下采集数据。**结果** 通过分析质谱数据、查阅相关文献以及参考相关数据库,从湖南新冠2号方中共鉴定出64个化学成分,其中包括34个黄酮类化合物、10个有机酚酸类化合物、10个三萜类化合物、3个环烯醚萜苷类、3个核苷类、2个氨基酸类化合物和2个脂肪酸类。**结论** UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS技术可全面快速分析湖南新冠2号方中的化学成分,为进一步研究湖南新冠2号方抗新型冠状病毒肺炎的药剂物质基础及质量控制提供一定的理论依据。

**[关键词]** 湖南新冠2号方;新型冠状病毒肺炎;超高效液相色谱串联四级杆轨道阱质谱;化学成分;黄酮

**[中图分类号]** R284.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.09.001

### Study on Chemical Constituents of Hunan No.2 Prescription of COVID-19 Based on UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

XIANG Feng, ZHOU Yi, LIAO Xiaojuan, ZOU Juying, WANG Zhuxin\*

(The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a qualitative analysis method of Hunan No.2 Prescription of COVID-19 by ultra high performance liquid chromatography tandem four stage rod orbital trap mass spectrometry (UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS), and to systematically elucidate the chemical constituents of Hunan No.2 Prescription of COVID-19. **Methods** The ACQUITY UPLC® BEH C<sub>18</sub> chromatographic column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) was used with 0.1% formic acid in water (A)-acetonitrile (B) as mobile phase for gradient elution. The volume flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 2 μL. The data were collected by electrospray ionization in Full Scan MS/dd-MS<sup>2</sup> scan mode. **Results** A total of 64 chemical constituents were identified from Hunan No.2 Prescription of COVID-19 by analyzing mass spectrometry data, consulting related literatures and referring to related databases, including 34 flavonoids, 10 organic phenolic acids, 10 triterpenoids, 3 iridoid glycosides, 3 nucleosides, 2 amino acids and 2 fatty acids. **Conclusion** UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS technology can comprehensively and quickly analyze the chemical constituents of Hunan No.2 Prescription of COVID-19, which provided a certain theoretical basis for further research on the pharmacological substance basis and quality control of Hunan No.2 Prescription of COVID-19 against COVID-19.

**[Keywords]** Hunan No.2 Prescription of COVID-19; COVID-19; UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; chemical constituents; flavonoids

**[收稿日期]** 2021-04-13

**[基金项目]** 湖南中医药大学中医药防治新型冠状病毒肺炎科研专项(2020XGXM18)。

**[作者简介]** 向 锋,男,硕士,初级中药师,研究方向:中药化学与分析。

**[通信作者]** \*王竹鑫,女,主任药师,E-mail: 144203164@qq.com。

由新型冠状病毒引起的肺炎正肆虐全球,严重危害各国人民的身心健康、社会经济发展及医疗公共卫生系统,人类社会面临着前所未有的危机。自疫情爆发以来,国内外许多药企和科研单位还没有研发出用于治疗新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019, COVID-19)的特效药,但中医药在阻断新冠肺炎病情进展、缩短病程、提高临床疗效等方面发挥了重要作用,为了充分发挥中医药的特色优势,各省市相继推出了中药预防方剂,得到了许多专家及权威人士的认可与肯定<sup>[1-2]</sup>。2020年2月10日,湖南省中医药管理局公布推广2个中药预防新冠肺炎处方,处方由多位医学药学专家经过反复分析论证制定,供全省机关、企事业单位、大专院校、中小学预防使用,其中湖南新冠2号方为体虚易感冒者、老年人、儿童的预防用药,处方由黄芪、山银花、陈皮、大枣、甘草5味常见中药组成<sup>[3]</sup>。赵谭军等<sup>[4]</sup>应用网络药理学方法探究湖南新冠2号方通过增强机体免疫力防治COVID-19感染的作用与机制,为老年人、儿童和免疫力低下者使用中医药方法防治COVID-19感染提供理论依据。然而,作为湖南省预防COVID-19的防疫预防药方,湖南新冠2号方的药效物质基础尚不明确。

明确中药复方的药效物质基础是推动和实现中药复方制剂现代化的关键和核心<sup>[5]</sup>。近年来,单味中药的化学成分已有较多报道,但中药复方因其成分复杂、类别多样等特点,其成分分离及鉴定具有一定的难度,关于湖南新冠2号方药效物质基础的研究尚无报道,因此,全面系统地分析湖南新冠2号方的化学成分对于明确其活性成分、作用机制以及质量标准研究具有重要意义。本研究首次采用超高效液相色谱串联四级杆轨道阱质谱(UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)技术对中药复方湖南新冠2号方中的化学成分进行定性分析,以为其质量控制和药效物质基础研究奠定科学基础。

## 1 材料

Thermo Q-Exactive Focus 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪、Dionex UltiMate 3000 戴安高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PL203 电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); RE-5023 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); Mighty-10 超纯水机(上海砾鼎水处理设备有限公司)。

黄芪(批号 200601)、山银花(批号 200207)、陈皮(批号 200501)、大枣(批号 200402)、甘草(批号 200207)均购自湖南新汇制药股份有限公司,经湖南中医药大学第二附属医院王竹鑫主任药师鉴定为合格药材;对照品绿原酸(批号 110753-201314)、柚皮苷(批号 110722-200610)、咖啡酸(批号 110885-201703)、异槲皮苷(批号 111908-201804)、甘草苷(批号 111610-201607)均购自中国食品药品检定研究院,甘草酸(批号 1405-86-3)购自上海诗丹德生物技术有限公司;甘草素(批号 PB0840-0005GM)购自成都普思生物科技股份有限公司;芦丁(批号 153-18-4)购自北京盛世康普化工技术研究所,纯度均大于 98%;甲醇、乙腈(Macklin 公司)、甲酸(赛默飞世尔科技有限公司)均为色谱纯。

## 2 方法

### 2.1 供试品溶液制备

按原方黄芪 30 g、山银花 15 g、陈皮 9 g、大枣 5 枚、甘草 7 g 称取药材,配比 10 倍量水煎煮 3 次,每次煎煮 1 h,过滤,合并滤液,浓缩至一定体积,精密移取 1 mL 至 50 mL 容量瓶中,甲醇定容,摇匀,经 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,即得供试品溶液,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

### 2.2 对照品溶液制备

取各标准品 2 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加入 50% 甲醇溶解定容至刻度,配制成浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品储备液,-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保持备用。检测前精密移取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,加入 50% 甲醇将对照品储备液稀释 10 倍,取适量溶液过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,即得。

### 2.3 色谱条件

ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ),流动相 A 为 0.1% 甲酸水, B 为乙腈,梯度洗脱条件为:(0~22 min, 2%~50% B; 22~25 min, 50%~95% B; 25~27 min, 95% B; 27~27.1 min, 95%~2% B; 27.1~30 min, 2% B),流速 0.3 mL/min,柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

### 2.4 质谱条件

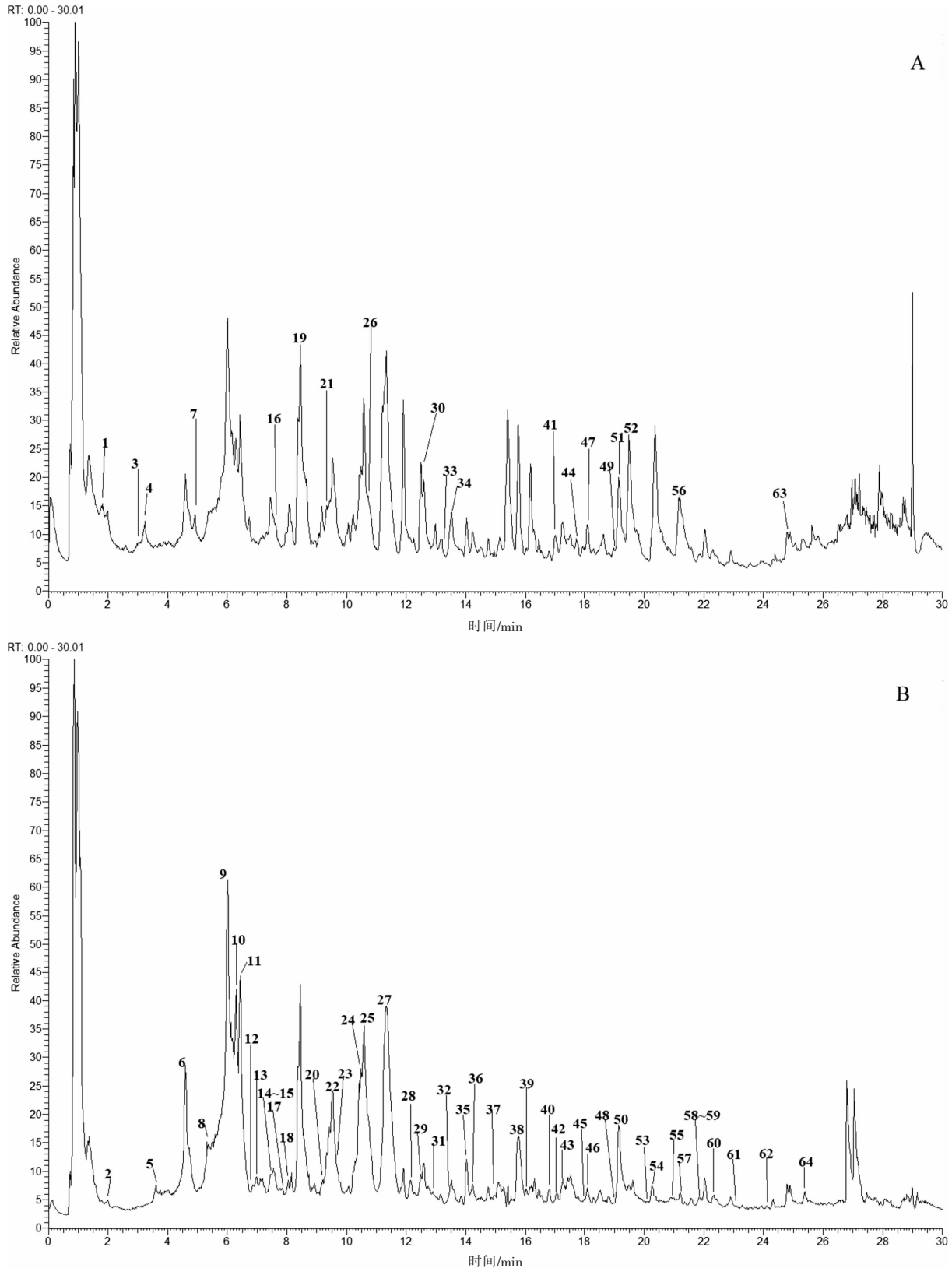
采用电喷雾离子源(ESI);正、负离子模式下扫描,扫描模式为 Full Scan MS/dd-MS<sup>2</sup>;质量扫描范围为 100~1 200 m/z;分辨率为 35 000;喷雾电压为 3.0 kV;鞘气流速为 30 arb;辅助气流速为 10 arb;毛细管温度为 320  $^{\circ}\text{C}$ ;S-lens RF 为 50。

### 3 结果与分析

#### 3.1 湖南新冠2号方中化学成分的鉴定

取供试品溶液,在“2.3”项色谱条件和“2.4”项质

谱条件下对湖南新冠2号方进行分析,使用 Thermo Xcalibur 4.0 软件对湖南新冠2号方的原始质谱数据进行处理,得到湖南新冠2号方在正离子和负离子模式下的总离子流图。见图1。



注:A.正离子模式;B.负离子模式

图1 湖南新冠2号方的UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS总离子流色谱图

根据准分子离子峰提供的相对分子质量,使用 Xcalibur 软件计算其分子式,选择理论值与实测值的偏差小于 10 ppm 的分子式,并根据从二级质谱图中获得的化合物相应的碎片离子信息,分析化合物的裂解情况,然后结合参考文献、数据库以及对照品裂解规律进一步推测核实湖南新冠 2 号方中的化学成

分。从湖南新冠 2 号方中共鉴定和推断出 64 个化学成分,其中包括 34 个黄酮类化合物、10 个有机酚酸类化合物、10 个三萜类化合物、3 个环烯醚萜苷类、3 个核苷类、2 个氨基酸类化合物和 2 个脂肪酸类。结果见表 1。

表 1 湖南新冠 2 号方中鉴定的化学成分

序号	TR/min	分子式	检测离子	测量值/(m/z)	误差/ppm	碎片离子/(m/z)	化合物	分类
1	1.802	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	268.102 3	-6.454	136.060 9	腺苷	核苷类
2	1.998	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	282.083 1	-0.619	150.040 4	鸟嘌呤核苷	核苷类
3	2.995	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	282.118 1	-5.602	136.060 9	甲基腺嘌呤核苷	核苷类
4	3.223	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	166.085 2	-6.353	120.080 2, 103.054 0	苯丙氨酸	氨基酸
5	3.750	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	153.017 6	-4.151	109.027 7, 91.017 1	二羟基苯甲酸	有机酸
6	4.593	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	353.085 9	-2.290	191.054 4, 179.033 3, 135.043 3	新绿原酸	有机酸
7	4.911	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	188.069 4	-6.408	146.059 1, 118.064 6	(E)-3-吡啶丙烯酸	氨基酸
8	5.584	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	375.127 8	-2.061	213.075 3, 169.085 3, 151.074 6	马钱苷酸	环烯醚萜苷类
9*	6.006	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	353.085 8	-2.573	191.054 4, 179.033 2, 173.043 8, 161.022 7, 135.043 4	绿原酸	有机酸
10	6.298	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	353.086 0	-2.007	191.054 5, 179.033 2, 135.043 3	隐绿原酸	有机酸
11*	6.422	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	179.033 2	-3.827	135.043 4, 89.022 7	咖啡酸	有机酸
12	6.670	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	373.112 4	-1.402	193.049 0, 167.033 3, 149.059 0, 119.033 2, 97.027 7, 89.022 7	獐牙菜苦苷	环烯醚萜苷类
13	7.036	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	153.017 6	-4.151	135.007 0, 109.027 7, 91.017 1	二羟基苯甲酸	有机酸
14	7.338	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	337.091 5	-0.872	191.054 4, 173.043 8, 163.038 4, 93.032 8	5-O-对香豆酰奎宁酸	有机酸
15	7.447	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	593.149 2	-1.511	503.119 7, 473.107 2, 383.075 4, 353.065 1, 325.069 9	维采宁-2	黄酮类
16	7.597	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	359.131 4	-6.289	197.079 6, 179.069 1, 151.074 3, 127.038 3	獐牙菜苷	环烯醚萜苷类
17	7.793	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	623.158 0	-4.270	503.116 8, 413.085 5, 383.075 4, 312.061 6	stellarin-2	黄酮类
18	8.062	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	367.101 5	-2.339	191.054 3, 173.043 7, 134.035 5, 93.032 8	3-O-阿魏酰奎宁酸	有机酸
19	8.434	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	165.053 5	-6.790	137.058 8	羟基肉桂酸	有机酸
20*	9.276	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	609.146 1	1.788	301.033 6, 300.026 1, 271.022 3, 273.039 2, 178.996 9, 151.002 0	芦丁	黄酮类
21	9.335	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	447.125 8	-6.202	285.073 7	黄豆黄苷	黄酮类
22*	9.510	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	417.117 1	-2.178	255.064 8, 135.006 9, 119.048 3	甘草苷	黄酮类
23*	9.597	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	463.086 3	-1.733	301.033 4, 300.026 1	异槲皮苷	黄酮类
24	10.411	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	515.116 9	-2.917	353.086 2, 191.054 4, 179.033 2, 173.043 8, 135.043 3	二咖啡酰奎宁酸	有机酸
25*	10.564	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	579.168 9	-3.336	271.059 9, 151.001 9	柚皮苷	黄酮类
26	10.836	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	479.115 3	-6.288	317.063 4	异鼠李素-O-葡萄糖苷	黄酮类
27	11.307	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	609.179 8	-2.621	302.073 5, 301.070 2	橙皮苷	黄酮类
28	12.147	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>13</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	549.159 1	-2.126	255.064 8, 135.007 0	甘草素-芹糖苷	黄酮类
29	12.456	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	417.117 3	-1.699	255.064 8, 135.007 0, 119.048 4	异甘草苷	黄酮类
30	12.583	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	431.130 9	-6.399	269.079 0	芒柄花苷	黄酮类
31*	12.900	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	255.065 0	-0.727	153.017 6, 135.007 0, 119.048 5	甘草素	黄酮类
32	13.448	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	285.039 3	-0.226	269.039 9, 241.048 3	木犀草素	黄酮类
33	13.458	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	463.157 0	-6.204	301.105 0, 167.069 3	紫檀苷	黄酮类
34	13.468	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	285.073 9	-6.454	270.050 4, 253.048 0	毛蕊异黄酮	黄酮类
35	14.173	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	593.185 2	-2.161	285.075 5, 270.052 2	枸橼苷	黄酮类
36	14.220	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	267.065 0	-0.694	252.041 5	芒柄花素或其同分异构体	黄酮类
37	15.059	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	271.060 0	-0.369	177.017 6, 151.001 9, 119.048 5, 107.012 1	柚皮素	黄酮类

续表 1

序号	TR/min	分子式	检测离子	测量值/(m/z)	误差/ppm	碎片离子/(m/z)	化合物	分类
38	15.755	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>18</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	723.211 3	-2.476	417.117 2,402.093 5,387.069 9,359.075 6	natsudaidain-3-O-HMG-β-glucoside	黄酮类
39	16.026	C <sub>46</sub> H <sub>72</sub> O <sub>21</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	983.445 9	-2.375	821.3943,645.3605,351.0553,193.0037	甘草皂苷 A3	三萜类
40	16.814	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>17</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	837.388 2	-2.540	485.3273,351.0553,193.0337,175.0230,113.0226	羟基甘草酸	三萜类
41	17.000	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	373.125 9	-6.109	358.1019,343.0789	桔皮素或其异构体	黄酮类
42	17.028	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	255.064 9	-1.119	153.017 5,135.007 0,119.048 4	异甘草素	黄酮类
43	17.261	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	267.064 9	-1.068	252.041 4	芒柄素或其同分异构体	黄酮类
44	17.734	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	301.105 1	-6.477	167.069 3	紫檀烷	黄酮类
45	18.062	C <sub>42</sub> H <sub>60</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	819.378 3	-1.784	351.055 5,193.033 8,175.023 0,113.022 6	甘草皂苷 E2	三萜类
46	18.106	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>17</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	837.387 9	-2.898	351.055 4,193.033 6,175.023 2,113.022 6	羟基甘草酸	三萜类
47	18.197	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	373.125 7	-6.645	358.102 3,343.078 9	桔皮素或其异构体	黄酮类
48	19.074	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>17</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	837.388 2	-2.540	351.055 3,193.033 9	羟基甘草酸	三萜类
49	19.118	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	271.094 7	-6.586	161.058 7,137.058 9,123.043 4	美迪紫檀素	黄酮类
50*	19.144	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	821.393 6	-1.812	351.055 3,193.033 7,175.023 1,157.012 6,113.022 7	甘草酸	三萜类
51	19.156	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	471.344 0	-6.124	453.332 6,317.208 8,235.167 9	甘草次酸	三萜类
52	19.498	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	403.136 1	-6.559	388.112 7,373.089 3,355.078 6	川陈皮素	黄酮类
53	20.110	C <sub>42</sub> H <sub>64</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	807.413 5	-3.279	351.055 3,193.033 6,175.023 2,113.022 6	甘草皂苷 B2	三萜类
54	20.264	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	823.406 0	-2.112	351.055 1,193.033 7,175.023 3,157.013 0,113.022 7	甘草酸的同分异构体	三萜类
55	21.095	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	355.117 2	-1.168	229.085 5,126.022 6	乌拉尔宁	黄酮类
56	21.158	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	373.125 6	-6.913	358.102 1,343.078 8	桔皮素或其异构体	黄酮类
57	21.220	C <sub>23</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	367.116 9	-1.947	352.093 5,309.039 1,297.039 1	黄宝石羽扇豆素或脱水淫羊藿素	黄酮类
58	21.801	C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>15</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	805.399 0	-1.859	351.055 5,193.033 6,175.023 3,113.022 6	甘草皂苷 C2	三萜类
59	21.837	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	353.101 4	-1.599	298.046 7,284.031 2	甘草黄酮醇	黄酮类
60	22.321	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	353.101 3	-1.882	285.111 8,125.022 6	甘草异黄酮醇	黄酮类
61	23.063	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	365.101 2	-2.095	307.023 4,295.023 4	甘草醇	黄酮类
62	24.122	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	353.101 7	-0.750	298.046 8,269.044 3	甘草宁 L	黄酮类
63	24.803	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	277.214 5	-6.156	149.131 4,135.116 0,121.100 6,107.085 2,93.067 9,79.054 3	十八碳四烯酸	脂肪酸
64	25.386	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	295.226 4	-1.258	227.215 9,195.137 4	13-羟基-9,11-十八碳二烯酸	脂肪酸

注:\*表示对照品化合物

## 3.2 各类化学成分的鉴定及裂解特点

### 3.2.1 黄酮类化合物的鉴定及裂解特点

本实验共鉴定了 34 个黄酮类化合物,是湖南新冠 2 号方中检出最多的一类化学成分。研究<sup>[11-12]</sup>发现此类化合物的质谱有一定的结构专属性,黄酮苷类化合物的结构特点主要是与葡萄糖、芸香糖等糖基缩合形成氧苷,在质谱高能碰撞下发生苷键的断裂,丢失糖基,生成高丰度的黄酮苷元碎片;黄酮苷元主要裂解方式有 C 环发生 RDA 裂解以及 CO、CO<sub>2</sub>、H<sub>2</sub>O、C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 等中性小分子的丢失,含有甲氧基的苷元还会发生

CH<sub>3</sub> 的丢失。黄酮类化合物 C 环断裂后形成的含有完整 A 环和 B 环的碎片离子对该类化合物的鉴定具有重要参考价值。以化合物 **22** 为例进行分析,该化合物在负离子模式下产生 m/z 417.117 1 [M-H]<sup>-</sup> 的分子离子峰,使用 Xcalibur 软件计算其分子式为 C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>,该化合物在二级质谱图中丢失一分子葡萄糖得到高丰度的碎片离子 m/z 255,该碎片为甘草苷的苷元碎片离子;随后苷元碎片离子通过 RDA 裂解形成含有 A 环的碎片离子 m/z 135 和含有 B 环的碎片离子 m/z 119;m/z 135 和 m/z 119 是

判断该化合物为黄酮类成分的特征性碎片。通过分析该化合物的相对分子质量、裂解途径,参考对照品以及查阅相关文献<sup>[13-14]</sup>,确定化合物 **22** 为甘草苷,其裂解途径见图 2。

化合物 **38** 在负离子模式下产生 609.146 1 [M-H] 的分子离子峰,使用 Xcalibur 软件计算其分子式为  $C_{27}H_{30}O_{16}$ ,该化合物在质谱高能碰撞下先丢失一分子芸香糖基,二级质谱图中出现高丰度的苷元母核离子  $m/z$  301 和  $m/z$  300,随后母核离子继续裂解出现  $m/z$  273、271、255、179、151 等碎片离子峰。结合相对分子质量、裂解途径,参考对照品以及查阅相关文献<sup>[15]</sup>,确定该化合物为芦丁。

**3.2.2 有机酸类化合物的鉴定及裂解特点** 本实验共鉴定了 10 个有机酸类化合物,该类化合物在负离子模式下能产生较高丰度的准分子离子峰,因其结构中含有羧基、羟基等特征基团,该类化合物在质谱高能碰撞下容易丢失  $CO_2$ 、 $H_2O$  等小分子<sup>[15-17]</sup>,湖南新冠 2 号方中的有机酸类成分主要包括苯丙素类化合物和苯甲酸类化合物。以化合物 **9** 为例,该化合物负离子模式下产生 353.085 8 [M-H] 的分子离子峰,由精确相对分子质量推测其分子式为  $C_{16}H_{28}O_9$ ,其二级质谱图出现高丰度的离子峰  $m/z$  191,该碎片离子为绿原酸在质谱高能碰撞下酯键断裂得到一

分子奎尼酸,随后奎尼酸脱水失去一分子  $H_2O$  形成碎片离子  $m/z$  173;同时二级质谱图中也出现  $m/z$  179,该离子峰为酯键断裂得到一分子咖啡酸,然后咖啡酸脱羧失去一分子  $CO_2$  得到碎片离子  $m/z$  135。结合相对分子质量、裂解途径,参考对照品以及查阅相关文献,确定化合物 **9** 为绿原酸<sup>[18-19]</sup>,其质谱裂解途径见图 3。

**3.2.3 三萜类化合物的鉴定及裂解特点** 本实验共鉴定了 10 个齐墩果烷型五环三萜,均为甘草酸类衍生物,此类化合物在质谱高能碰撞下苷键容易断裂,生成苷元碎片和糖基碎片,随后苷元发生 RDA 裂解,出现大量低丰度含 A、B 环和 D、E 环的碎片离子峰,糖基则易发生连续的脱水、脱羧,形成高丰度的碎片离子峰。此类成分在负离子模式下的二级裂解数据以糖基的裂解碎片为主,而在正离子模式下的二级裂解数据以苷元的裂解碎片为主。

以甘草酸为例,该化合物在负离子模式下产生 821.393 6[M-H] 的分子离子峰,由精确相对分子质量推测其分子式为  $C_{42}H_{62}O_{16}$ ,其负离子模式下的二级质谱图中出现高丰度的离子峰  $m/z$  351,该碎片离子为甘草酸苷键断裂脱去苷元后形成的二聚葡萄糖醛酸残基,随后二聚葡萄糖醛酸残基继续裂解得到高丰度的一分子葡萄糖醛酸残基碎片离子  $m/z$

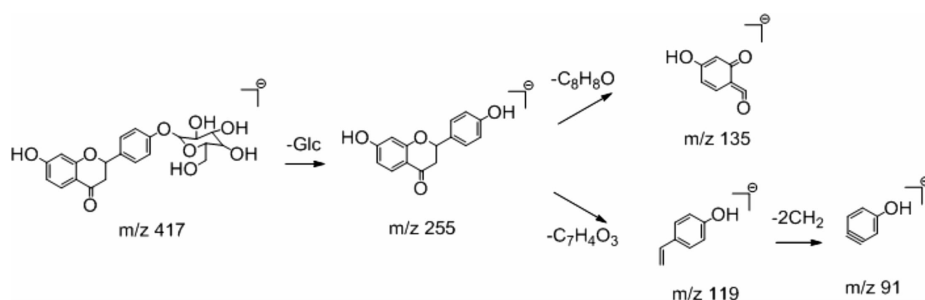


图 2 甘草苷的裂解途径

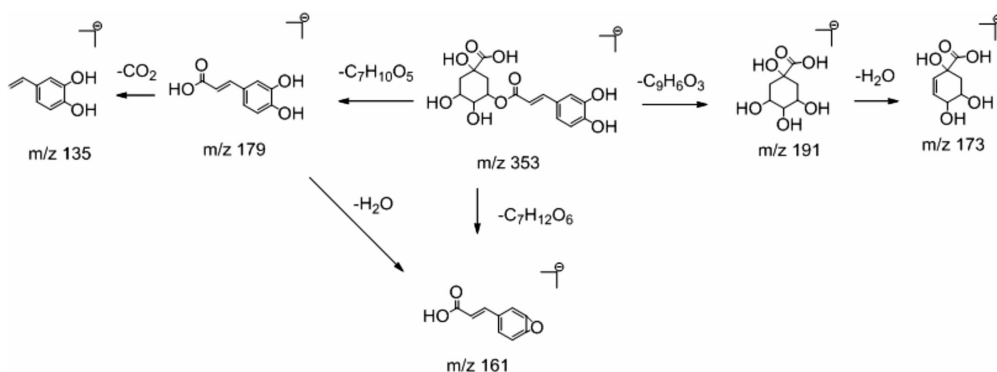


图 3 绿原酸的裂解途径

193,该碎片离子继续脱水、脱羧得到  $m/z$  175、157 以及高丰度的  $m/z$  113 等碎片,高丰度的碎片离子  $m/z$  351、193 和 113 可以作为此类化合物在负离子模式下的特征离子。甘草酸在正离子模式下的二级质谱图提供的裂解信息与负离子模式不同,正离子模式下产生 823.405 5  $[M+H]^+$  的分子离子峰,其二级质谱图里出现低丰度的苷元碎片离子  $m/z$  471,随后苷元失去一分子  $H_2O$  得到高丰度的碎片离子  $m/z$  453,该碎片离子继续脱羧得到  $m/z$  407,同时其 C 环发生 RDA 裂解,出现众多杂乱的碎片离子峰, $m/z$  471、453 可以作为此类化合物在正离子模式下的特征离子<sup>[20-21]</sup>。甘草酸在负离子和正离子模式下的质谱裂解途径见图 4、图 5。

3.2.4 其他类化学成分的鉴定 除上述成分外,还从湖南新冠 2 号方中检测出 3 个环烯醚萜苷类(化合物 8、12 和 16)、3 个核苷类(化合物 1、2 和 3)、2 个氨基酸类(化合物 4 和 7)和 2 个脂肪酸类(化合物 63 和 64)。

## 4 讨论

中药预防处方在防控 COVID-19 疫情期间发挥重要作用,中药复方药效物质基础研究是中药复方研究的关键问题。中药复方化学成分复杂多样在短时间内难以快速对其进行分离鉴定,LC-MS 具有高分离度、高灵敏度、高精密度的特点,在化学成分的

鉴定方面具有独特优势,可以在短时间内对复杂化学成分进行定性分析。本研究通过建立湖南新冠 2 号方的 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 定性分析方法,得到未知化合物在正、负离子下准分子离子峰的精确相对分子质量,运用 Xcalibur 软件计算化合物的分子式,通过二级质谱裂解碎片分析其裂解途径,结合 PubChem、MassBank、Metlin、Human Metabolome Database(HMDB)等数据库,以及参考相关文献,推测化合物的结构,从而实现从湖南新冠 2 号方中化学成分进行快速鉴定的目的。

湖南新冠 2 号方是由黄芪、山银花、陈皮、大枣、甘草 5 味中药组成,通过查阅相关文献以及本实验测得的分析结果可以推断出一部分化学成分的来源归属。陈皮、甘草中富含黄酮类成分,其中芦丁为 5 味药材中均含有的黄酮类成分,橙皮苷、柚皮苷、柚皮素、维采宁-2 等来源于陈皮,甘草素、异甘草素、甘草苷、乌拉尔宁等来源于甘草。此外,甘草中还富含三萜类成分,如:甘草酸、甘草次酸、羟基甘草酸等为来源于甘草中的三萜类成分。山银花中富含有机酸类成分,如:绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、咖啡酸、二咖啡酰奎宁酸等。苯丙氨酸、芒柄花苷、紫檀苷、毛蕊异黄酮等为来源于黄芪中的成分。大枣中检测出来的化学成分极少,仅芦丁来源于大枣。

本实验鉴定了湖南新冠 2 号方中 64 个化学成分,其中 34 个黄酮类化合物、10 个有机酚酸类化合

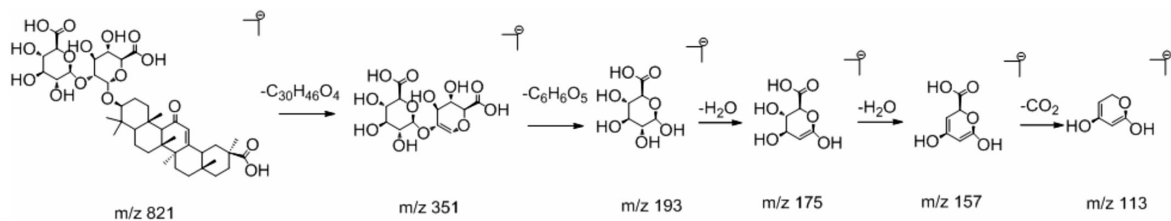


图 4 甘草酸在负离子模式下的裂解途径

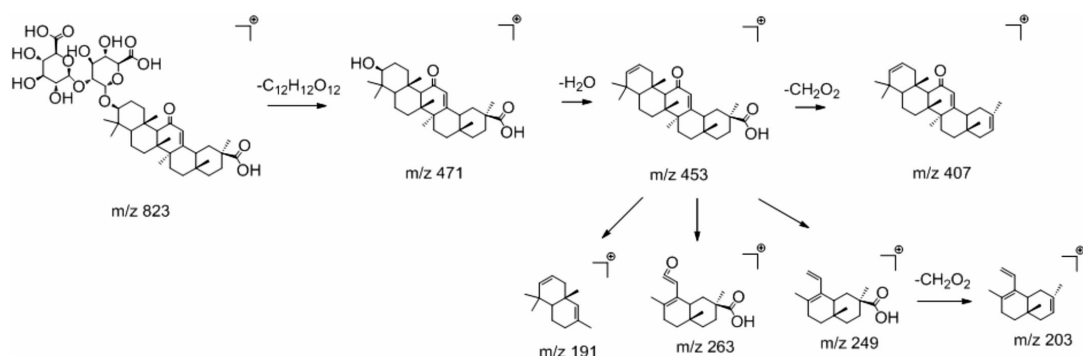


图 5 甘草酸在正离子模式下的裂解途径

物、10 个三萜类化合物、3 个环烯醚萜苷类、3 个核苷类、2 个氨基酸类和 2 个脂肪酸类化合物。黄酮类化合物是检出最多的一类化合物,负离子模式下响应度较高,具有调节机体免疫、抗炎、抗氧化等药理作用,黄酮类化合物对免疫细胞的调控与其对细胞信号通路的调节密切相关,主要通过介导核转录因子- $\kappa$ B、丝裂原活化蛋白激酶和 Toll 样受体等细胞信号通路,调控相关免疫分子的基因和蛋白质表达来实现。这类化合物可能是湖南新冠 2 号方通过增强机体免疫功能来预防 COVID-19 的主要药效成分,本研究为揭示湖南新冠 2 号方的药效物质基础,明确其质量控制标准提供一定的科学依据。

### 参考文献

- [1] 黄明,杨丰文,张俊华,等.张伯礼:此次中医药抗疫过程的一些经验和反思[J].天津中医药,2020,37(7):722-725.
- [2] 关媛媛,郝阳,王泓午,等.基于数据挖掘的新型冠状病毒肺炎地域性中医预防方用药规律探析[J].湖南中医药大学学报,2020,40(12):1508-1514.
- [3] 黄涛,欧阳波,肖作奇,等.预防 2 号方合剂的质量标准研究[J].中医药导报,2020,26(15):14-16,28.
- [4] 赵谭军,石雅宁,蒋永亮,等.湖南二号方调节机体免疫防治新型冠状病毒肺炎的网络药理学研究[J].中医药导报,2020,26(11):1-5,9.
- [5] 宋岳,王力,刘艳新.中药及复方的药效物质基础研究概况[J].中国实用医药,2011,6(31):237-238.
- [6] JIANG Y B, ZHONG M, PENG W. Qualitative Analysis of Plant-Derived Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Quadrupole-Time of Flight-Mass Spectrometry [J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2015, 14(5): 925-930.
- [7] YANG M, SUN J, LU Z, et al. Phytochemical analysis of traditional Chinese medicine using liquid chromatography coupled with mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1216(11): 2045-2062.
- [8] 祁昆,王洋,陈涛,等.液质联用在中药复方制剂研究中的应用[J].天津中医药大学学报,2017,36(5):396-400.
- [9] 吴文杰,周伟娥,张元,等.LC-MS/MS 技术在中药化学成分分析中的应用[J].时珍国医国药,2016,27(11):2735-2737.
- [10] MENG-QI J, YE-JUAN X, YUN X, et al. Using UPLC-MS/MS for characterization of Active components in extracts of yupingfeng and application to a comparative pharmacokinetic study in rat plasma after oral administration [J]. Molecules, 2017, 22(5): 810.
- [11] 牛江涛,曹瑞,司昕蕾,等.LC-MS 技术在天然产物黄酮类成分分析中的应用[J].中国现代中药,2020,22(9):1576-1579.
- [12] 唐瑰宝,陈楠,潘馨.液质联用技术在黄酮类化合物研究中的应用[J].海峡药学,2011,23(12):7-9.
- [13] 马海娟,高简,张亚丽,等.基于 HPLC-MS-n 的甘草成分快速鉴定及质谱裂解途径研究[J].中华中医药杂志,2018,33(3):1120-1123.
- [14] YE M, LIU S H, JIANG Z, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of PHY906, a Chinese medicine formulation for cancer therapy. [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, 21(22): 3593-3607.
- [15] 罗珊.苓桂术甘汤药效物质基础及质量控制方法研究[D].杭州:浙江大学,2020.
- [16] 陈方超,高守红,王志鹏,等.基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定藤梨根的化学成分[J].中国药房,2020,31(14):1725-1731.
- [17] 陈嘉慧,张雅心,刘孟华,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的丹参水提液全成分分析[J].广东药科大学学报,2020,36(1):1-9.
- [18] 李泮霖,李楚源,刘孟华,等.基于 UFLC-Triple-Q-TOF-MS/MS 技术的金银花、山银花化学成分比较[J].中南药学,2016,14(4):363-369.
- [19] 陈金梅,廖锦红,高金薇,等.UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究胆木药材水提物的化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(18):49-56.
- [20] 郭敏群,严曾豪,吴灏,等.基于 UFLC-Triple-Q-TOF-MS/MS 技术的白虎加桂枝汤化学物质基础[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(10):134-141.
- [21] 赵艳敏,刘素香,张晨曦,等.基于 HPLC-Q-TOF-MS 技术的甘草化学成分分析[J].中草药,2016,47(12):2061-2068.

(本文编辑 苏维)