

UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 法分析甘草干姜汤配伍前后化学成分变化

张倩芸, 董文敏, 王新宏, 安 翥, 尤丽莎*, 梁 琨*
(上海中医药大学, 上海 201203)

摘要: 目的 采用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 法分析甘草干姜汤配伍前后的化学成分变化。方法 该药物的分析采用 Dikma Endeavorsil C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 0.1% 甲酸-乙腈, 梯度洗脱; 电喷雾离子源, 负离子模式采集多级质谱信息, 通过对照品、精确相对分子质量等质谱信息及文献报道, 鉴定配伍前后的化学成分变化。结果 共鉴定出 66 种成分, 其中新甘草苷、新异甘草苷、桑辛素、光甘草酮等 15 种成分为配伍前后的差异物质。结论 该方法灵敏、高效, 可较全面反映甘草干姜汤配伍前后化学成分变化, 为其配伍机制的阐释奠定基础。

关键词: 甘草干姜汤; 化学成分; 配伍; 超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS)

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)01-0311-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.058

甘草干姜汤源自《伤寒杂病论》, 由甘草与干姜组成, 具有温补脾肺、益气助阳功效, 治疗四肢厥逆、咽喉干燥、烦躁不安等阳虚津亏证等^[1], 临床常用于治疗咳嗽和痰症^[2-5]。甘草干姜汤的研究集中在药效学, 如鲁法庭等^[6]用甘草干姜汤化裁方法治疗支气管炎; 陈雁南^[7]等利用加味甘草干姜汤联合维生素 B₁₂ 治疗复发性口腔溃疡。但甘草干姜汤配伍前后的成分差异不明确, 缺乏相关研究。

超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 作为高分辨质谱技术, 能够提供化合物精确的质量数, 已广泛应用于中药复杂体系中化学成分的鉴定分析。本研究采用该技术建立甘草干姜汤化学成分分析方法, 根据精确相对分子质量、多级质谱碎片信息、对照品及文献报道, 借助 Mass Frontier 软件预测裂解规律, 鉴定其化学成分, 比较甘草干姜汤配伍前后的化学成分差异, 为探究该方配伍规律奠定基础。

1 材料

LTQ-Orbitrap 高分辨质谱仪、Xcalibur 2.1 数据处理系统、Mass Frontier 分析软件、Ultimate 3000 超高效液相色谱仪 (美国 Thermo Fisher 公司); Centrifuge 5424R 高速离心机 (德国艾本德公司); XS105 型电子天平 (十万分之一, 瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

甘草 (批号 210322)、干姜 (批号 210302) 饮片均购自上海康桥中药饮片有限公司, 经上海虹桥饮片有限公司陈燕军药师鉴定为正品, 均符合 2020 年版《中国药典》规定。甘草苷 (批号 05-1016)、异甘草苷 (批号 Y15A10H95344)、甘草素 (批号 C26A10Q87040)、异甘草

素 (批号 H03D9Z76567)、甘草酸 (P04A8F41091)、6-姜酚 (批号 Y03D11Y132894)、8-姜酚 (批号 P24A10F96114)、10-姜酚 (批号 Y27A9H60176) 对照品均购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度均 ≥98%。

2 方法

2.1 化学成分数据库建立 通过检索 TCMSP 数据库和华东师范大学研究团队提供的中医药活性成分数据库 TCMID, 收集甘草、干姜所含成分信息, 排除冗余, 建立包含 218 种成分的数据库。

2.2 样品溶液制备 称取甘草、干姜饮片适量, 分为配伍前组、配伍后组, 其中配伍前组为分别煎煮两者, 按 2:1 比例吸取水煎液, 摇匀, 浓缩, 制成生药量为 0.5 g/mL 的溶液; 配伍后组为按照 2:1 比例称取两者, 加入 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 45 min, 滤过, 合并滤液, 浓缩制成生药量为 0.5 g/mL 的溶液。精密移取配伍前后溶液各 2 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 60% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.3 对照品溶液制备 精密称取甘草苷、甘草素、甘草酸、6-姜酚、异甘草素、异甘草苷、8-姜酚、10-姜酚对照品适量, 甲醇溶解, 摇匀, 得贮备液。精密吸取甘草苷、甘草素、甘草酸、6-姜酚贮备液适量, 置于量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液 A (质量浓度为 10 μg/mL); 精密吸取异甘草素、异甘草苷、8-姜酚、10-姜酚贮备液适量, 置于量瓶中, 甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液 B (质量浓度为 10 μg/mL), 进样前用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

收稿日期: 2022-03-11

基金项目: 上海中医药大学预算内项目 (2021LK108)

作者简介: 张倩芸, 女, 硕士生。Tel: 13564123200, E-mail: xiaolongbaobao0115@126.com

* 通信作者: 尤丽莎, 女, 博士, 副教授, 从事中药质量控制研究。Tel: (021) 51322184, E-mail: youlisha@126.com

梁 琨, 女, 博士, 讲师, 从事中药质量控制研究。Tel: (021) 51322184, E-mail: dolphin000000@163.com

2.4 色谱条件 Dikma Endeavorsil C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 0.1% 甲酸 (A) -乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~9 min, 10%~38% B; 9~20 min, 38%~60% B; 20~25 min, 60%~90% B; 25~29 min, 90%~95% B); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 ℃; 进样量 2 μL。

2.5 质谱条件 电喷雾离子源; 负离子扫描; 毛细管喷雾电压-3.2 kV, 温度 350 ℃; 鞘气体积流量 10.5 L/min; 辅助气体积流量 4.5 L/min; 分辨率 60 000; 采集范围 *m/z* 50~1 300; 二级质谱采用动态数据依赖性扫描模式, 分辨率 30 000; 裂解方式碰撞诱导解离。

2.6 数据分析 采用 Thermo Xcalibur 2.2 workstation 软件进行处理, MassFrontier 软件进行预测和匹配未知成分的裂解规律及碎片信息。

3 结果

3.1 成分鉴定 取“2.2”项下样品溶液适量, 在“2.4”“2.5”项条件下进样测定, 根据相对分子质量、碎片峰、对照品进行比对, 采用 Mass Frontier 软件预测裂解途径, 总离子流图见图 1, 结果见表 1。由此可知, 共鉴定出 66 种成分, 其中 15 种为配伍前后差异物质。

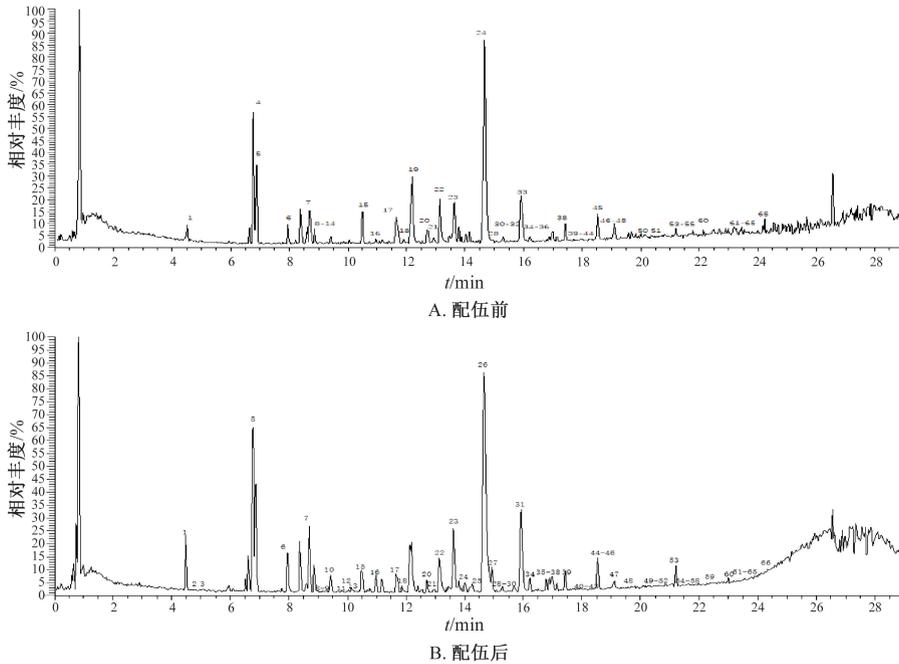


图 1 甘草干姜汤 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 总离子流图

表 1 甘草干姜汤化学成分鉴定结果

编号	保留时间/min	分子式	理论值 <i>m/z</i>	实测值 <i>m/z</i>	二级碎片	名称	归属	配伍后	配伍前
1	4.52	C ₇ H ₆ O ₄	153.018 24	153.019 29	109.03	原儿茶酸	甘草	+	+
2	4.70	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.121 19	417.118 01	119.05, 135.01, 255.07	新甘草苷或新异甘草苷	甘草	+	-
3	5.11	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.118 01	417.121 19	119.05, 135.01, 255.07	新甘草苷或新异甘草苷	甘草	+	-
4	6.99	C ₁₂ H ₁₄ O ₈	285.060 49	285.063 75	109.03, 153.02	乌拉尔新苷	甘草	-	+
5	7.01	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	579.170 83	579.170 29	255.07, 417.06	甘草素-7,4'-二葡萄糖苷	甘草	+	+
6	7.87	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.118 01	417.118 10	135.01, 255.07	甘草苷*	甘草	+	+
7	8.70	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.097 27	431.098 27	311.06, 269.04	牡荆素	甘草	+	+
8	9.39	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.065 19	255.065 61	119.05, 135.01	甘草素*	甘草	+	+
9	9.49	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	417.118 01	417.119 23	119.05, 135.01, 255.07	异甘草苷*	甘草	+	+
10	9.54	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	549.160 27	549.162 48	255.07, 417.12	芹糖甘草苷	甘草	+	+
11	9.88	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.055 02	299.055 30	199.04, 239.01, 255.07	7,2',4'-三羟基-5-甲氧基-3-芳基香豆素	甘草	+	+
12	9.99	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.065 19	255.065 84	119.05, 135.01	异甘草素*	甘草	+	+
13	10.29	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.060 10	283.060 55	163.04, 268.04	毛蕊异黄酮或樱黄素	甘草	+	+
14	10.33	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₂	503.118 40	503.119 32	259.19, 341.10, 459.13	6'-乙酰甘草苷	甘草	-	+
15	10.51	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.060 10	271.060 52	119.05, 135.01	柚皮素	甘草	+	+
16	10.74	C ₂₁ H ₂₆ O ₆	373.164 57	373.163 76	165.06, 179.07, 193.16	六氢姜黄素	干姜	+	+
17	11.84	C ₄₂ H ₆₀ O ₁₇	835.374 68	835.371 95	631.17, 659.34, 773.37	24-hydroxy-3β-[(2-O-β-D-glucopyranuronosyl-β-D-glucopyranuronosyl)oxy]-11-oxo-22β-hydroxyoleana-12-ene-30-oic acid γ-lactone	甘草	+	+

续表1

编号	保留时间/min	分子式	理论值 m/z	实测值 m/z	二级碎片	名称	归属	配伍后	配伍前
18	11.93	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	275.164 17	275.164 11	135.04, 260.14	6-姜烯酚	干姜	+	+
19	12.31	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	983.448 24	983.443 54	371.15, 537.36, 821.40	甘草酸 A3	甘草	+	+
20	12.79	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	837.390 33	837.389 77	271.10, 382.28, 417.20	甘草皂苷 G2	甘草	+	+
21	12.82	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₈	853.385 24	853.385 68	242.02, 351.06, 793.03	二羟基甘草次酸	甘草	+	+
22	13.16	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.395 41	821.392 09	351.06, 645.36, 759.39, 803.38	甘草酸*	甘草	+	+
23	13.65	C ₁₇ H ₂₆ O ₆ S	357.136 64	357.136 47	145.05, 174.96	6-姜磺酸	甘草	+	+
24	14.43	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	469.331 24	469.331 82	355.26, 425.34	甘草次酸	甘草	+	+
25	14.46	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	193.085 92	193.086 49	178.06	姜油酮	干姜	+	+
26	14.53	C ₄₂ H ₆₀ O ₁₆	819.379 76	821.391 97	351.06, 627.35	甘草皂苷 E2	甘草	+	+
27	14.74	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.395 41	821.392 09	351.06, 645.36	甘草酸异构体	甘草	+	+
28	15.33	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	323.127 79	323.127 75	175.08, 279.14	光甘草定或光甘草宁	甘草	+	+
29	15.54	C ₂₇ H ₃₄ O ₅	437.232 25	437.232 64	369.19, 391.24	甘草异黄酮 A	甘草	+	-
30	15.61	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	355.117 62	355.117 43	106.04, 174.96, 212.08	Z-形刺酮素 B	甘草	+	+
31	15.85	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	355.154 00	355.153 81	135.05, 233.12, 323.13	粗毛甘草素 C	甘草	+	+
32	15.91	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	807.416 15	807.415 77	351.06, 631.39, 745.42	甘草皂苷 B2	甘草	-	+
33	16.17	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	293.174 73	293.174 04	193.16, 249.18	6-姜酚*	干姜	-	+
34	16.30	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	351.086 31	351.086 40	125.23, 297.05	甘草宁 M	甘草	+	+
35	16.51	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	353.138 35	353.138 28	201.09, 277.12, 321.11	甘草新木脂素	甘草	+	+
36	16.52	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	351.122 70	351.122 80	201.09, 270.05	甘草宁 A 或甘草宁 G	甘草	+	+
37	16.77	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361.164 56	361.161 29	236.10, 293.17	冬凌草乙素	干姜	+	-
38	17.00	C ₂₁ H ₁₈ O ₆	365.101 96	365.104 06	145.93, 163.94	甘草酚	甘草	+	+
39	17.14	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	353.101 97	353.104 31	106.04, 174.96, 212.08	甘草黄酮醇	甘草	+	+
40	18.07	C ₂₀ H ₂₀ O ₄	323.127 79	323.127 84	175.08, 213.09, 279.14	光甘草定或光甘草宁	甘草	+	+
41	18.14	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	337.107 05	337.107 24	282.05, 293.05	北美甘草醇 A	甘草	+	+
42	18.15	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	805.400 50	805.397 83	351.06, 629.37	甘草皂苷 C2	甘草	+	+
43	18.30	C ₂₁ H ₁₈ O ₅	349.107 05	349.109 34	279.03, 291.03	甘草茎醇 B	甘草	+	+
44	18.42	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	335.091 40	335.091 40	213.06, 291.10, 307.10	kanzonol W 或光甘草酮或 5-甲氧基甘草根素 或甘草异黄酮	甘草	+	+
45	18.72	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	339.122 70	339.122 47	125.23, 161.29, 193.95	北美甘草醇 B	甘草	+	+
46	18.84	C ₂₂ H ₂₂ O ₆	381.133 27	381.132 05	311.05, 323.05, 351.09, 366.11	甘草利酮	甘草	+	+
47	19.24	C ₂₀ H ₁₈ O ₄	321.112 14	321.112 12	175.08, 306.09	光甘草素	甘草	+	+
48	19.76	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	277.179 82	277.180 18	205.16, 221.12, 233.19	1-(4-羟基-3-甲氧基苯基)癸烷-5-酮	干姜	+	+
49	20.13	C ₂₅ H ₃₀ O ₅	409.200 95	409.204 71	365.21, 391.20	(2R)-1-[2, 4-二羟基-3-(3-甲基-2-烯基)苯基]-2-羟基-3-[4-羟基-3-(3-甲基-2-烯基)苯基]丙烷-1-酮	甘草	+	-
50	20.57	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	335.091 40	335.091 37	307.10, 317.08	kanzonol W 或光甘草酮或 5-甲氧基甘草根素 或甘草异黄酮	甘草	+	+
51	20.64	C ₂₁ H ₂₂ O ₆	369.133 27	369.132 97	161.02, 207.10	粗毛甘草素 B	甘草	+	+
52	20.69	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	391.190 39	391.193 39	187.11, 203.07, 221.08	(E)-1-[2, 4-二羟基-3-(3-甲基-2-烯基)苯基]-3-[4-羟基-3-(3-甲基-2-烯基)苯基]丙-2-烯-1-酮	甘草	+	-
53	21.29	C ₂₁ H ₂₀ O ₅	351.122 70	351.123 90	139.04, 175.08, 229.05	甘草宁 A 或甘草宁 G	甘草	+	+
54	21.47	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	321.206 04	321.207 21	127.11, 193.16	8-姜酚*	干姜	+	+
55	21.70	C ₂₂ H ₂₆ O ₅	369.169 65	369.172 30	161.02, 207.10	粗毛甘草素 D	甘草	+	+
56	21.82	C ₂₅ H ₃₀ O ₄	393.206 04	393.205 72	324.14, 349.22, 375.20	kanzonol X	甘草	+	-
57	21.83	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	421.164 57	421.164 12	227.07, 352.16, 376.16	粗毛甘草素 A	甘草	+	-
58	21.85	C ₂₅ H ₂₄ O ₆	419.148 92	419.148 41	351.16, 375.16, 391.16	桑辛素或甘草宁 H	甘草	+	-
59	22.14	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	335.091 40	335.088 41	317.08, 320.07	kanzonol W 或光甘草酮或 5-甲氧基甘草根素 或甘草异黄酮	甘草	+	-
60	23.06	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	407.185 30	407.188 90	341.76, 363.20	胀果甘草宁 A	甘草	+	+
61	23.23	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	337.143 44	337.143 49	106.04, 212.08	甘草查尔酮 C 或甘草查尔酮 A	甘草	+	+
62	23.26	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	337.143 44	337.143 55	128.62, 180.02	甘草查尔酮 C 或甘草查尔酮 A	甘草	+	+
63	23.58	C ₂₅ H ₂₈ O ₆	423.180 21	423.175 99	193.09, 229.09, 405.17	3'-(γ, γ-二甲基烯丙基)-基维酮	甘草	+	+
64	23.64	C ₂₅ H ₂₄ O ₆	419.148 92	419.153 17	364.09, 391.16	桑辛素或甘草宁 H	甘草	+	+
65	23.83	C ₂₁ H ₃₄ O ₄	349.237 34	349.237 30	193.16, 331.23	10-姜酚*	干姜	+	+
66	24.25	C ₂₅ H ₂₆ O ₄	389.174 74	389.174 29	159.08, 185.10, 203.07, 219.10	(2S)-2-[4-羟基-3-(3-甲基丁烯基)苯基]-8, 8-二甲基-2, 3-二氢吡喃并[2, 3-f]色烯-4-酮	甘草	+	-

注: * 为与对照品比对, + 为含有相应成分, - 为不含相应成分。

3.2 裂解规律研究

3.2.1 黄酮类 该类化合物是甘草干姜汤中重要的抗癌、抗氧化、抑菌成分,包括甘草苷、柚皮素、光甘草定等。其中,光甘草定可抑制炎症介质白三烯和血栓素的生成^[8],甘草素、甘草苷对白血病 HL-60 细胞增殖有显著的抑制作用^[9]。

发生 RDA 裂解产生的 m/z 135.01 碎片峰。6 号峰的准分子离子峰 m/z 417.12 $[M-H]^-$, 保留时间为 7.87 min, 推测分子式为 $C_{21}H_{22}O_9$; 二级质谱检测出碎片峰 m/z 255.07 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$ 、 m/z 135.01 $[M-C_{14}H_{18}O_6-H]^-$, 其中前者与 m/z 417.12 相比缺少一分子葡萄糖, 判断是由准分子离子峰脱去葡萄糖形成, 与对照品比对后鉴定为甘草苷, 其二级质谱图及裂解途径见图 2。

黄酮苷在多级质谱中会丢失糖, 有时还能得到 C 环上

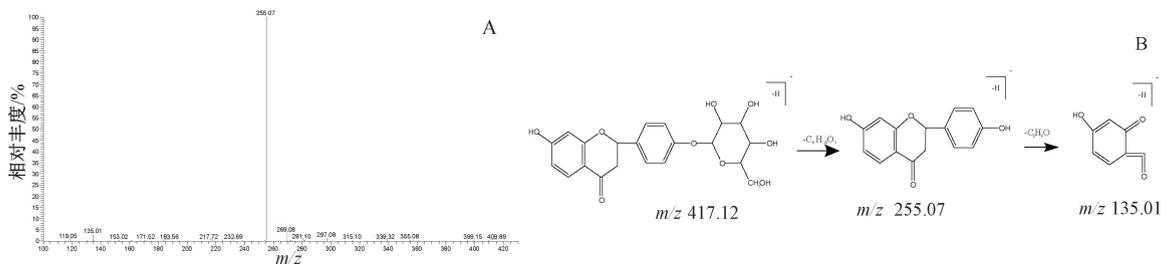


图 2 甘草苷二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

8 号峰准分子离子峰 m/z 255.07 $[M-H]^-$, 保留时间为 9.39 min, 推测分子式为 $C_{15}H_{12}O_4$; 主要二级碎片离子为 m/z 119.05 $[M-C_7H_4O_3-H]^-$ 、 m/z 135.01 $[M-C_7H_4O_2-H]^-$,

后者由黄酮类化合物发生 RDA 裂解产生, 与对照品比对后鉴定为甘草素^[10], 其二级质谱图及裂解途径见图 3。

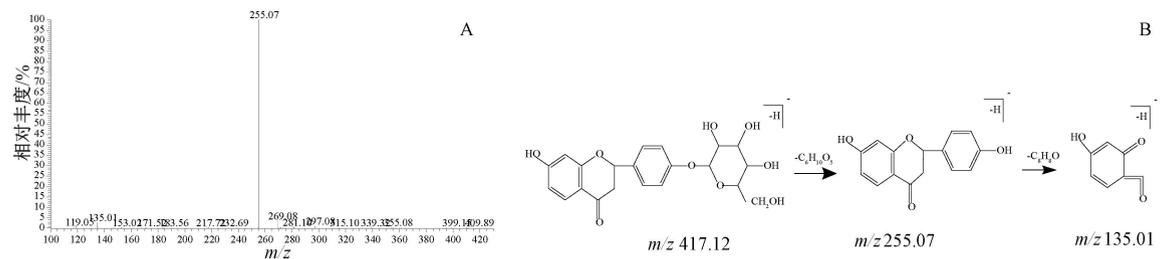


图 3 甘草素二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

12 号峰保留时间为 9.99 min, 准分子离子峰 m/z 255.06 $[M-H]^-$, 推测分子式与 8 号峰相同; 碎片峰主要有 m/z 119.05 $[M-C_7H_4O_3-H]^-$ 、 m/z 135.01 $[M-C_7H_4O_2-H]^-$, 与甘草素是同分异构体, 但出峰时间晚, 极性低于 8 号峰, 与对照品比对后鉴定为异甘草素。

10.51 min, 分子式为 $C_{15}H_{12}O_5$; 碎片峰有 m/z 119.05 $[M-C_8H_8O_3-H]^-$ 、 m/z 135.01 $[M-C_8H_8O_2-H]^-$, 后者是 C 环发生 RDA 裂解产生, 其裂解方式与二氢黄酮裂解方式一致, 与对照品比对后鉴定为柚皮素^[11], 其二级质谱图及裂解途径见图 4。

15 号峰准分子离子峰 m/z 271.06 $[M-H]^-$, 保留时间

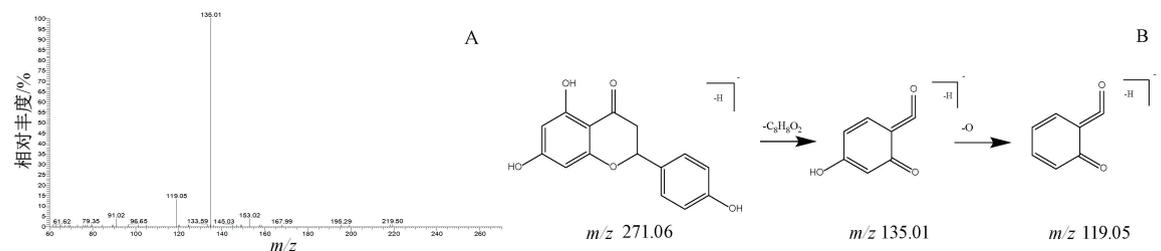


图 4 柚皮素二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

3.2.2 姜酚类 干姜中该类成分能缓解结肠炎、胃溃疡等消化系统疾病的症状, 包括 6-姜酚、8-姜酚、10-姜酚等。33 号峰准分子离子峰 m/z 293.17 $[M-H]^-$, 保留时间为 16.17 min, 分子式为 $C_{17}H_{26}O_4$; 主要二级碎片离子为 m/z 193.16 $[M-C_6H_{12}O-H]^-$ 、 m/z 249.18 $[M-CO_2-H]^-$, 后者为准分子离子峰丢失一分子 CO_2 得到, 前者碎片离子为准分子

离子峰的 5-羟基-3-酮基部位发生麦氏重排得到, 与对照品比对后鉴定为 6-姜酚, 其二级质谱图及裂解途径见图 5。

54 号峰保留时间为 21.47 min, 分子式为 $C_{19}H_{30}O_4$, 准分子离子峰 m/z 321.21 $[M-H]^-$; 碎片峰有 m/z 127.11 $[M-C_{11}H_{14}O_3-H]^-$ 、 m/z 193.16 $[M-C_8H_{16}O-H]^-$, 是由准分子离子峰 5-羟基-3-酮基部位通过麦氏重排而得到, 与对照品

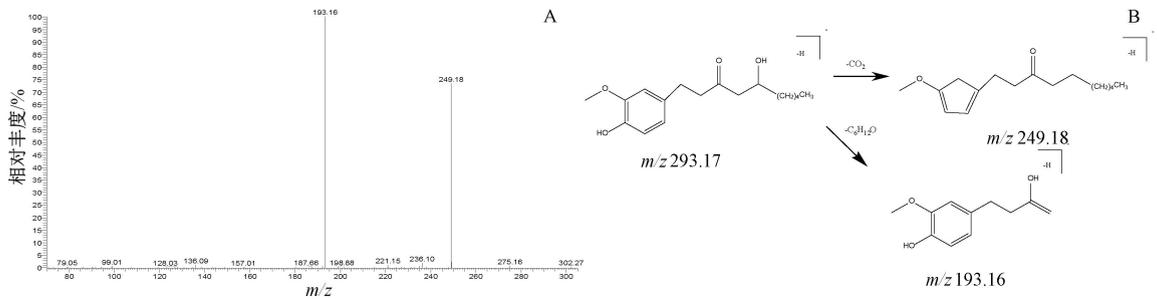


图5 6-姜酚二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

比对后鉴定为8-姜酚。同理, 65号峰推测为10-姜酚, 其存在麦氏重排而得到的 m/z 193.16 碎片峰。另外, 还有中性丢失一分子水得到的 m/z 331.23 碎片峰。由此推断, 姜酚类化合物裂解时主要途径为中性丢失一分子 H_2O 或 CO_2 , 同时发生5-羟基-3-酮基部分的麦氏重排。

3.2.3 三萜及其皂苷类 22号峰分子离子峰 m/z 821.40 $[M-H]^-$, 保留时间为13.16 min, 产生高丰度的碎片离子

有 m/z 351.06 $[M-C_{30}H_{46}O_4-H]^-$ 、 m/z 645.36 $[M-C_6H_8O_6-H]^-$ 、 m/z 759.39 $[M-CH_2O_3-H]^-$ 、 m/z 803.38 $[M-H_2O-H]^-$ 、 m/z 803.38 碎片离子为准分子离子峰失去一分子水得到, 继续失去一分子 CO_2 得到 m/z 759.39 碎片离子, 其糖苷部分裂解为 m/z 351.06 碎片峰, 准分子离子峰失去一分子葡萄糖醛酸产生 m/z 645.36 碎片离子, 与对照品比对后鉴定为甘草酸, 其二级质谱图及裂解途径见图6。

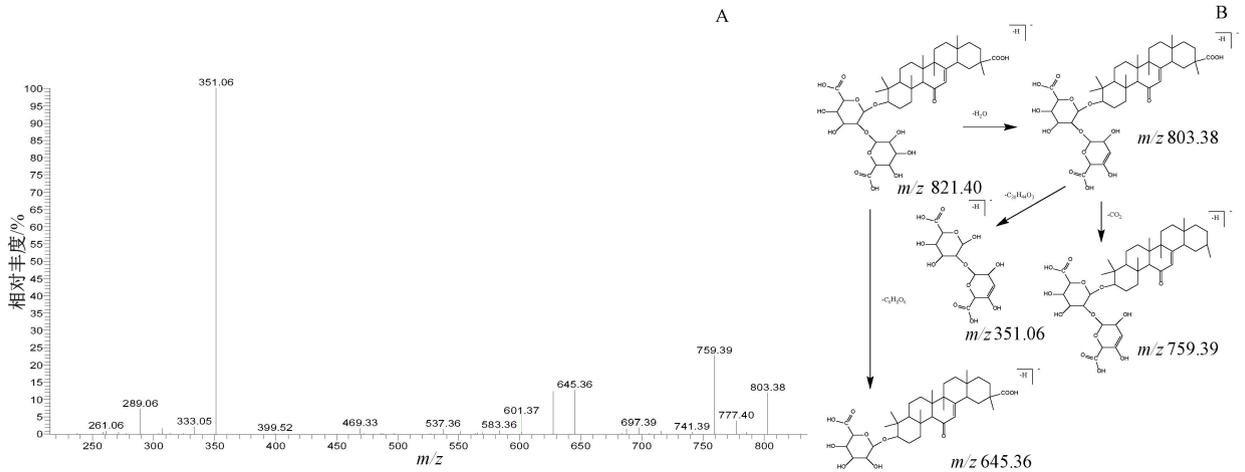


图6 甘草酸二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

24号峰分子离子峰 469.33 $[M-H]^-$, 保留时间为14.43 min, 产生高丰度的碎片离子有 m/z 355.26 $[M-C_5H_6O_3-H]^-$ 、 m/z 425.34 $[M-CO_2-H]^-$; 准分子离子峰脱去一分子

CO_2 后得到 m/z 425.34 $[M-CO_2-H]^-$ 碎片离子峰, 进一步失去1个 C_4H_6O 基团得到 m/z 355.26 碎片峰, 与对照品比对后鉴定为甘草次酸, 其二级质谱图及质谱裂解途径见图7。

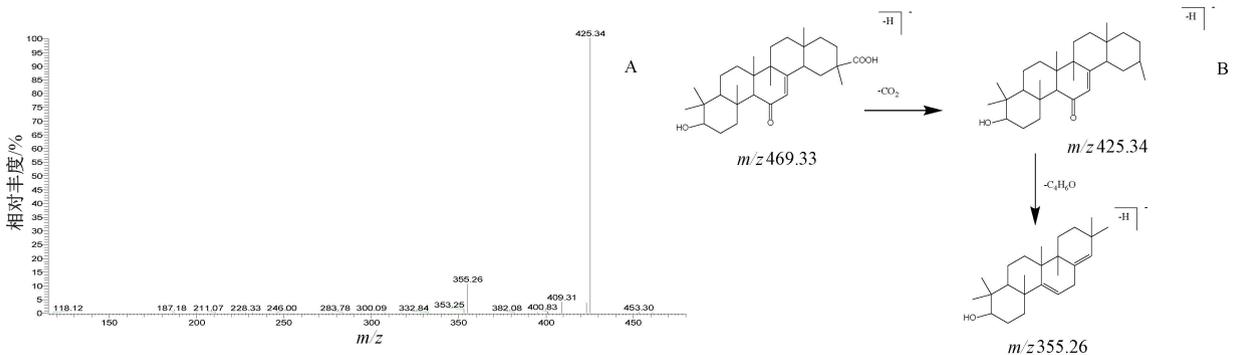


图7 甘草次酸二级质谱图 (A) 及裂解途径 (B)

4 讨论

甘草干姜汤中黄酮类化合物大多来源于甘草, 如甘草

苷、甘草素、光甘草定等, 具有抗菌、抗炎、抗氧化、降血糖等作用^[12]。干姜中挥发油, 如6-姜酚、8-姜酚等姜辣

素成分,可有效祛痰止咳。通过甘草干姜配伍前后的成分差异分析,探索甘草干姜汤相须为用、协同增效的物质基础。结果表明,甘草干姜汤配伍后有效成分增多。配伍前甘草干姜汤鉴定出55种成分,而配伍后鉴定出62种成分,配伍前后共鉴定出66种成分,其中新甘草苷、新异甘草苷、桑辛素、光甘草酮等差异成分可能是甘草干姜相须为用的效应成分。

甘草干姜汤配伍前后差异成分的药理作用可能直接与甘草干姜汤的治疗效果相关。甘草查尔酮是治疗金黄色葡萄球菌感染的潜在成分^[13],本研究发现,甘草配伍干姜后增加了甘草查尔酮的溶出,这可能是甘草干姜汤抗菌能力增强的原因;光甘草酮具有抗流感病毒的作用^[14],这可能是其治疗呼吸道感染的有效成分,与干姜配伍后该成分溶出增加,起增效作用;桑辛素通过破坏细胞膜结构,抑制金黄色葡萄球菌的磷酸生物合成途径^[15],其溶出增加也是甘草、干姜相须为用的结果,这些差异成分可能是甘草干姜汤发挥药效的关键,体现了甘草干姜汤配伍应用的合理性。

综上所述,本研究采用UPLC-LTQ-Orbitrap-MS技术,比较全面地对甘草干姜汤配伍前后化合物进行鉴定,对差异成分进行比较。该方法具有高准确度和高灵敏度的特点,为研究甘草干姜汤物质基础研究提供参考。

参考文献:

[1] 袁成凤,康 研,段 启,等.唐祖宣教授运用甘草干姜汤经验探析[J].世界中西医结合杂志,2021,16(11):2007-2009;2013.

[2] 康 荻,李 彧,朱 曼,等.肺痿论治干预肺纤维化大鼠肺功能的实验研究[J].世界中医药,2017,12(2):390-393;397.

[3] 陆国辉,李艳茹,高健美.甘草干姜汤对博莱霉素诱导的大鼠肺纤维化SIRT1和TGF- β 1蛋白表达的影响[J].中药药理与临床,2014,30(6):25-28.

[4] 刘瀚阳.温阳化饮方和甘草干姜汤对慢性阻塞性肺疾病寒饮蕴肺证大鼠模型干预的比较性研究[D].济南:山东中

医药大学,2011.

[5] 孙慧兰,吴伟康.四逆汤有效成分不同组合抗心肌缺血再灌注损伤的作用研究[J].中草药,2002,33(4):47-50.

[6] 鲁法庭.甘草干姜汤化痰方法治疗支气管炎(寒证咳嗽)实验研究[D].成都:成都中医药大学,2004.

[7] 陈雁南,段 优.加味甘草干姜汤联合维生素B₁₂治疗复发性口腔溃疡的临床效果[J].世界中医药,2020,15(21):3308-3312.

[8] Adianti M, Aoki C, Komoto M, et al. Anti-hepatitis C virus compounds obtained from *Glycyrrhiza uralensis* and other *Glycyrrhiza* species [J]. *Microbiol Immunol*, 2014, 58(3): 180-187.

[9] Xie S R, Wang Y, Liu C W, et al. Liquiritigenin inhibits serum-induced HIF-1 α and VEGF expression via the AKT/mTORp70S6K signalling pathway in HeLa cells [J]. *Phytother Res*, 2011, 26(8): 1133-1141.

[10] 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.

[11] Liu G, Qiao S, Liu T, et al. Simultaneous determination of 18 chemical constituents in traditional chinese medicine of antitussive by UPLC-MS-MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(9): 1540.

[12] Zhang Q Y, Ye M. Chemical analysis of the Chinese herbal medicine Gan-Cao (licorice) [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(11): 1954-1969.

[13] Zhou T Z, Deng X, Qiu J. Antimicrobial activity of licochalcone E against *Staphylococcus aureus* and its impact on the production of staphylococcal alpha-toxin [J]. *J Microbio Biotech*, 2012, 22(6): 800-805.

[14] Grienke U, Braun H, Seidel N, et al. Computer-guided approach to access the anti-influenza activity of licorice constituents [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(3): 563-570.

[15] Pang D, Liao S, Wang W, et al. Destruction of the cell membrane and inhibition of cell phosphatidic acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*: an explanation for the antibacterial mechanism of morusin [J]. *Food Funct*, 2019, 10(10): 6438-6446.