

· 论著 ·

基于UHPLC-Q-TOF/MS技术鉴定肺脾气虚汤的化学成分及其入血成分

吴晋¹, 赵婧^{2a}, 庞涛^{2b} (1. 福建省药品审核查验中心, 福建 福州 350003; 2. 海军军医大学第二附属医院: a. 中医科, b. 药剂科, 上海 200003)

[摘要] 目的 对肺脾气虚汤中的主要化学成分及SD大鼠口服后的入血成分进行鉴定, 为分析其药效物质基础提供参考。方法 采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱(UHPLC-Q-TOF/MS)技术对肺脾气虚汤提取液及SD大鼠口服肺脾气虚汤后的血清样本进行数据采集, 并通过对照品、自建质谱数据库、MS FINDER数据库及查阅文献对其化学成分及入血成分进行快速鉴定。结果 共从肺脾气虚汤中鉴定出56种化学成分, 主要为黄酮类、三萜类、酚类成分, 化合物大多来源于炙黄芪、陈皮、茯苓和党参; 含药血清中检测到11种原形成分, 包含芒柄花素、黄芪甲苷IV和新橙皮苷等化合物。结论 该研究较为全面的阐明了肺脾气虚汤化学成分组成及药材来源, 并初步分析了其入血成分, 为进一步对该方的药效物质基础及质量控制研究提供了科学依据。

[关键词] 肺脾气虚汤; UHPLC-Q-TOF/MS; 化学成分; 入血成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-2024(2022)05-0446-08

[DOI] 10.12206/j.issn.2097-2024.202204079

Identification of chemical constituents and blood-absorbed ingredients of FeiPi QiXu decoction by UHPLC-Q-TOF/MS

WU Jin¹, ZHAO Jing^{2a}, PANG Tao^{2b} (1. Fujian drug Inspection Center, Fuzhou 350003, China; 2a. Department of TCM, 2b. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] **Objective** To identify the chemical constituents and blood-absorbed ingredients of FeiPi QiXu decoction, and provide reference for clarifying the material basis of its efficacy. **Methods** An ultrahigh performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UHPLC-Q-TOF/MS) method was applied to analyze the data of FeiPi QiXu decoction extraction and the serum samples of SD rats after oral administration. The chemical constituents and blood-absorbed ingredients were quickly identified by chemical reference substance, self-built mass spectrometry database, MSFINDER database and the relevant literature. **Results** A total of 56 chemical constituents were identified from FeiPi Deficiency Decoction, mainly were flavonoids, triterpenoids and phenols. Most of the compounds came from Radix Astragali praeparata cum melle, Citri Reticulatae Pericarpium, Poria and Codonopsis Radix. 11 prototype compounds were identified in the serum, including Formononetin, Astragaloside IV and Neohesperidin. **Conclusion** This study comprehensively clarified the chemical composition and source of medicinal materials, and preliminarily analyzed its blood-absorbed ingredients, which could provide a scientific basis for further study on the pharmacodynamic material basis and quality control of FeiPi QiXu decoction.

[Key words] FeiPi QiXu decoction; UHPLC-Q-TOF/MS; chemical constituents; blood-absorbed ingredients

肺脾气虚汤由法半夏, 陈皮, 党参, 炙黄芪, 茯苓, 藿香, 砂仁等七味中药组成, 其中, 炙黄芪、党参共为君药, 补肺脾之气, 益卫固表, 法半夏、陈皮、茯苓, 健脾祛湿, 化痰利肺是为臣药, 藿香芳香化浊, 辟秽和中, 是为佐药, 砂仁行气调中, 和胃醒脾,

为使药。作为从第4版新型冠状病毒感染肺炎诊疗方案便被纳入中医治疗方案的方剂之一, 该方主治新冠患者恢复期出现的肺脾气虚证, 对气短、倦怠乏力、纳差呕恶、痞满、大便无力、便溏不爽、舌淡胖、苔白腻等症状具有良好疗效^[1]。但治疗新冠的中药方剂均由多味中药组成, 化学成分复杂, 目前诸多文献均侧重于基于公开数据库查询方剂组成的各个药味所含的化合物开展网络药理学研究^[2-5], 而没有对方剂的化学成分群进行系统考察。其次, 中药复方体内与体外之间化学成分具有重要关联,

[基金项目] 上海市科学技术委员会项目(21S21902700)

[作者简介] 吴晋, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 中药质量管理、中药成分分析, Email: 49252422@qq.com

[通信作者] 庞涛, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药制剂生产、中药成分分析, Email: schwienu_tao@163.com

针对复方进入机体内的化学成分群进行分析是有助于发现活性物质的有效手段^[6]。

目前尚未见肺脾气虚汤的化学成分及入血成分研究的报道,因此本研究通过UHPLC-Q-TOF/MS技术首次对肺脾气虚汤所含化学成分进行快速分析鉴定,并对化学成分的药材来源进行归属,在此基础上开展其血中药源性成分的辨识,以期为进一步阐明肺脾气虚汤的活性成分,并为今后质量控制提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪(UHPLC-Q-TOF/MS)购自美国安捷伦公司,包含1290 Infinity型UHPLC及6530型Q-TOF/MS系统;CPA255D型1/10万电子天平购自德国Sartorius公司;Lyovapor L-200型冷冻干燥机购自瑞士Buchi公司;Centrifuge 5810R高速台式冷冻离心机购自德国Eppendorf公司;SK7200H型超声波清洗器购自上海科导超声仪器有限公司;Milli-Q型纯化水系统购自美国Millipore公司;HC-800Y高速多功能粉碎机购自武汉海纳电器有限公司。

1.2 药品与试剂

法半夏(批号191115042)、陈皮(批号19090603)、党参(批号19102901)、炙黄芪(批号19650710)、茯苓(批号19122304)、藿香(批号19051410)、砂仁(批号19102211)等饮片均购自吴江上海蔡同德堂中药饮片有限公司,以上样品均经上海中医药大学陈万生教授鉴定为正品。

琥珀酸(批号A0727AS)、绿原酸(批号J0120AS)、芦丁(批号O0714AS)、芒柄花素(批号N0301AS)等对照品均购自大连美仑生物技术有限公司(纯度>97.0%)。甲醇、乙腈为质谱纯(德国Merck公司);甲酸为质谱纯(美国ThermoFisher公司);超纯水由MILI-Q净水系统制备(美国Millipore公司);其他均为分析纯试剂。

1.3 动物

本研究所用动物为8周龄雄性SD大鼠,SPF级,购自上海市计划生育科学研究所实验动物经营部(合格证编号20180006021172),大鼠饲养于温度(22~26℃)、湿度(40%~70%)、12h明暗循环可控的室内环境,可自由进食饮水。

2 试验方法

2.1 对照品溶液的制备

精密称取琥珀酸,加入超纯水配置成浓度为

1.0 mg/ml的对照品储备液,分别精密称取绿原酸、芦丁、芒柄花素各对照品适量,加入含5% DMSO的甲醇分别配置成浓度为1.0 mg/ml的对照品储备液,所有储备液配制完成后均放于-20℃冰箱保存备用。精密吸取上述储备溶液各10 μl,置于1.5 ml离心管中,加入甲醇,涡旋混匀,配制成各对照品浓度均为10 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2 供试品溶液的制备

将方剂所有药材冷冻干燥,用高速粉碎机分别打粉并过四号筛,并按处方比例混合,精密称取约0.500 g,置于100 ml具塞锥形瓶中,精密加入10倍体积70%甲醇,密塞、称定重量,超声波提取法提取(760 W, 50 kHz)30 min,冷却,70%甲醇补足失重,滤过,3 000 r/min离心10 min,取1.0 ml上清液于1.5 ml EP管中,12 000 r/min离心10 min,取200 μl上清液于进样小瓶中,待进样分析。另取方剂10倍体积纯净水浸泡过夜,回流提取1.5 h后用纱布过滤,药渣用8倍体积水继续回流提取1 h,过滤并离心,合并上清液,减压浓缩,得到浸膏供入血成分分析研究。

2.3 血清样本的制备和前处理

SD大鼠给药前适应性喂养1周后,随机分为2组,即空白对照组与肺脾气虚汤给药组,每组6只。给药组大鼠灌胃给予方剂提取物(10倍临床给药剂量),空白对照组大鼠灌胃给予等体积水。给药1 h后眼眶静脉丛取血1.5 ml于5 ml促凝管中,室温下静置2 h,4℃下3 000 r/min离心10 min,取100 μl血清于1.5 ml EP管中,加入4倍体积甲醇,涡旋混匀1 min,4℃12 000 r/min离心15 min,取上清液,真空冷冻干燥后,加入100 μl 80%甲醇复溶,涡旋混匀1 min,4℃12 000 r/min离心15 min,取上清液进行检测。

2.4 UHPLC-Q-TOF/MS分析条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相:0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),色谱洗脱梯度见表1,后运行时间为3 min;流速0.3 ml/min;柱温30℃;进样体积2 μl,检测波长254 nm。

采用电喷雾离子源(ESI),分别在正、负离子模式下采集数据,数据采集范围 m/z 100~1 700,离子源温度350℃,毛细管电压正离子为4.0 kV,负离子为3.5 kV,雾化气压力45 Psi,干燥气流速11 L/min,鞘气流速11 L/min,鞘气温度350℃,碎片电压140 V,碰撞能量30 V。

表1 色谱洗脱梯度

时间(<i>t</i> /min)	A(%)	B(%)
0	95	5
3	95	5
15	65	35
29	5	95
30	5	95

2.5 肺脾气虚汤化学成分数据库的建立

基于中国知网、Pubmed、TCMSP 中英文在线数据库网站, 查询肺脾气虚汤各味药材所含化学成分, 并汇总其化学成分信息, 导入 Agilent PCDL Manager B.08 软件构建方剂化学成分数据库。

3 结果

3.1 肺脾气虚汤的化学成分鉴定结果

将采集得到的质谱数据导入到 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 软件中, 利用前期建立的肺脾气虚汤化学成分数据库初步识别其所含化学成分(绝对峰高 ≥ 2000 , 匹配容差 $\leq \pm 5$ ppm), 接下来对初步识别的化学成分进行进一步确认。采用对照品及 MS DIAL4.70 软件结合 MS FINDER 3.5.2 软件对数据库及离子碎片比对功能确认化合物信息^[7]。

肺脾气虚汤在“2.2”及“2.4”项条件下得到的

总离子流色谱图见图 1。通过导入自建数据库得到肺脾气虚汤的初步鉴定结果, 并进一步通过与对照品、MS FINDER 数据库比对及查阅文献等方法最终共从肺脾气虚汤鉴定出 56 种化学成分, 见表 2。其中正离子模式下识别出 8 种化学成分, 负离子模式下识别出 46 种化学成分。此外, 大豆皂苷 I 和茯苓酸在正、负两种模式下均被识别到。这些成分中有 4 种成分来源于法半夏^[13-14], 9 种成分来源于陈皮, 7 种成分来源于党参^[15-16], 10 种成分来源于茯苓^[17-18], 13 种成分来源于炙黄芪^[19-20], 1 种成分来源于藿香^[21], 3 种成分来源于砂仁^[22]。此外, 也有化学成分为多个药材的共有成分, 均在表格中标出。化合物来源占比最高的为炙黄芪、党参等药材, 与其配伍占比相似。

肺脾气虚汤含有多种有机酸类成分, 如原儿茶酸、阿魏酸等, 该类成分在质谱中易在能量的撞击下丢失 CO_2 、 CH_2 、 CO 等分子。如化合物 11 在 7.141 min 产生 m/z 153.019 4[M-H]⁻ 峰, 判断该化合物的分子式为 $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$, 在二级质谱扫描下产生 m/z 109.028 8, 推测其为 m/z 153.019 4 丢失一分子 CO_2 产生的碎片离子, 通过与对照品及 MS FINDER 数据库及文献综合比对, 鉴定该化合物为原儿茶酸^[23], 裂解规律见图 2。化合物 14 在 8.86 min 产生 m/z 193.050 8[M-H]⁻ 的准分子离子峰, 判断其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$, 而二级质谱图中可观察到 m/z

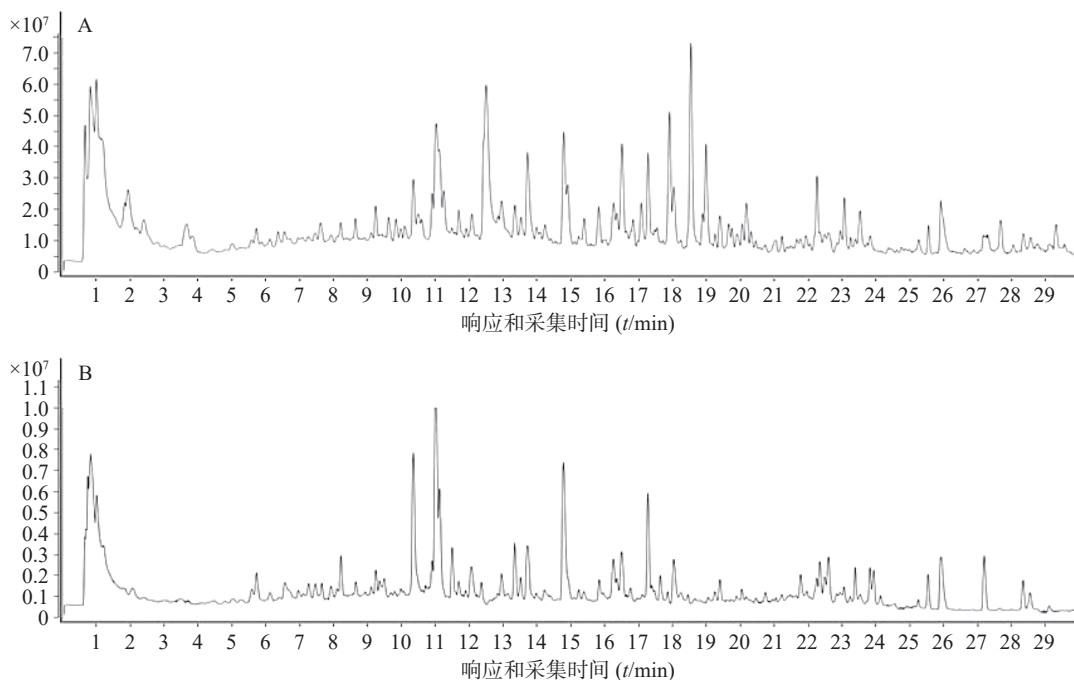


图1 肺脾气虚汤供试品总离子流色谱图

A.正离子模式; B.负离子模式

表2 肺脾气虚汤化学成分鉴定结果

编号	RT (t/min)	m/z	离子模式	分子式	理论分子量	实测分子量 (Tgt)	误差 (Tgt, ppm)	名称	类别	来源
1	0.702	175.1183	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174.1111	174.1117	-3.57	L-精氨酸	氨基酸类	党参
2	0.766	195.0522	[M+Hac-H] ⁻ 、 [M-H] ⁻	C ₅ H ₄ N ₄ O	136.0384	136.0385	-1.06	次黄嘌呤	生物碱类	党参,法半夏
3	1.073	282.0835	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	283.0918	283.0917	0.45	鸟苷	生物碱类	法半夏,炙黄芪
4* [#]	1.153	117.0193	[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₄	118.0266	118.0266	-0.37	琥珀酸	有机酸类	党参,法半夏
5	1.807	124.0391	[M+H] ⁺	C ₆ H ₅ NO ₂	123.0319	123.032	-1.2	烟酸	生物碱类	党参
6	1.875	284.1484	[M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ NO ₅	283.141	283.142	-3.36	党参醇	生物碱类	党参
7	2.41	268.1534	[M+Na] ⁺ 、 [M+H] ⁺	C ₁₄ H ₂₁ NO ₄	267.1462	267.1471	-3.31	党参碱	生物碱类	党参
8*	5.723	355.1023	[M+K] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.0954	354.0951	0.28	绿原酸	苯丙素类	党参,藿香,砂仁
9	5.905	169.0495	[M+K] ⁺ 、 [M+H] ⁺	C ₈ H ₈ O ₄	168.0422	168.0423	-0.6	香草酸	酚类	党参,砂仁,法半夏
10	6.15	375.1294	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	376.1366	376.1383	-4.53	核黄素	维生素类	炙黄芪
11 [#]	7.141	153.0194	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₄	154.0266	154.0266	0.25	原儿茶酸	酚类	藿香,砂仁
12	7.653	593.1518	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594.159	594.1585	0.87	忍冬苷	黄酮类	陈皮
13	8.211	741.2245	[M+FA-H] ⁻ 、 [M-H] ⁻	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₉	742.2316	742.232	-0.54	柚皮苷4'-葡萄糖苷	黄酮类	陈皮
14	8.86	193.0508	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.0581	194.0579	1.05	阿魏酸	酚酸类	党参,法半夏,炙黄芪,砂仁
15	8.917	163.0399	[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₃	164.0474	164.0473	0.32	4-羟基肉桂酸	酚类	炙黄芪
16*	9.247	609.146	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.1531	610.1534	-0.49	芦丁	黄酮类	陈皮
17	9.35	595.1666	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	596.174	596.1741	-0.24	圣草苷	黄酮类	陈皮
18	9.73	743.274	[M+Na] ⁺ 、 [M+K] ⁺	C ₃₂ H ₄₈ O ₁₈	720.2848	720.2841	1.05	铜锤玉带草炔苷B	聚乙炔苷	党参
19	10.033	521.13	[M+FA-H] ⁻ 、 [M-H] ⁻	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	476.1313	476.1319	-1.21	奥刀拉亭-7-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷	黄酮类	炙黄芪
20 [#]	10.294	137.0246	[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₃	138.0319	138.0317	1.67	对羟基苯甲酸	酚类	砂仁
21	10.357	579.1721	[M-H] ⁻	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.1796	580.1792	0.64	柚皮芸香苷	黄酮类	陈皮
22	10.454	447.0946	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.1022	448.1006	3.56	异红草素	黄酮类	陈皮
23	10.704	431.0988	[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.1063	432.1056	1.52	染料木苷	黄酮类	炙黄芪
24 [#]	11.023	609.1824	[M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.1899	610.1898	0.19	新橙皮苷	黄酮类	陈皮
25	11.125	359.0775	[M+FA-H] ⁻ 、 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.0793	314.079	0.76	熊竹素	黄酮类	炙黄芪
26	12.833	285.041	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.0484	286.0477	2.16	木犀草素	黄酮类	党参
27	13.334	593.1879	[M+FA-H] ⁻ 、 [M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	594.1949	594.1949	0.15	香蜂草苷	黄酮类	陈皮
28	13.345	285.077	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	286.0843	286.0841	0.6	甘草查尔酮B	黄酮类	炙黄芪
29	14.677	315.0875	[M-H] ⁻	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	316.0949	316.0947	0.53	垂崖豆藤异黄烷酮	黄酮类	炙黄芪
30	15.144	163.0766	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164.084	164.0837	1.44	覆盆子酮	酚类	砂仁
31	15.896	255.0668	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.0739	256.0736	1.26	异甘草素	黄酮类	炙黄芪,法半夏
32* [#]	16.761	313.072	[M+FA-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.0743	268.0738	0.72	芒柄花素	黄酮类	炙黄芪
33	16.396	991.5086	[M+FA-H] ⁻ 、 [M-H] ⁻	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₉	946.5111	946.5137	-2.82	黄芪甲苷 VII	三萜类	炙黄芪
34	16.476	283.0613	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.0686	284.0685	0.34	汉黄芩素	黄酮类	党参,炙黄芪
35	16.647	837.3905	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.3977	838.3987	-1.2	甘草皂苷G2	三萜类	法半夏

(续表 2)

编号	RT (t/min)	m/z	离子模式	分子式	理论分子量	实测分子量 (Tgt)	误差 (Tgt, ppm)	名称	类别	来源
36	16.966	297.0403	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	298.0476	298.0477	-0.46	sophorophenol one	黄酮类	炙黄芪
37 [#]	17.102	829.4583	[M+FA-H] ⁻ 、 [M-H] ⁻	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	784.4599	784.4609	-1.33	黄芪甲苷 IV	三萜类	炙黄芪
38	18.241	941.5103	[M-H] ⁻	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	942.5174	942.5188	-1.46	大豆皂苷I	三萜类	炙黄芪
	18.246	943.5236	[M+H] ⁺	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	942.5149	942.5188	-4.13	大豆皂苷 I		炙黄芪
39	19.049	499.3421	[M-H] ⁻	C ₃₁ H ₄₈ O ₅	500.3495	500.3502	-1.29	茯苓酸H	三萜类	茯苓
40	19.908	891.4684	[M+Na] ⁺ 、 [M+K] ⁺	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	868.4793	868.482	-3.12	黄芪甲苷 I	三萜类	炙黄芪
41 [#]	21.531	469.3314	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	470.3392	470.3396	-0.86	甘草次酸	三萜类	法半夏
42	21.793	471.3474	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.3545	472.3553	-1.67	山楂酸	三萜类	藿香
43	21.963	541.3524	[M+Hac-H] ⁻ 、 [M-H] ⁻	C ₃₁ H ₄₆ O ₄	482.3382	482.3396	-2.83	猪苓酸C	三萜类	茯苓
44	22.214	483.3133	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	484.3202	484.3189	2.81	茯苓酸B	三萜类	茯苓
45	22.339	483.348	[M+Hac-H] ⁻ 、 [M-H] ⁻	C ₃₁ H ₄₈ O ₄	484.3551	484.3553	-0.27	3-表去氢土莫酸	三萜类	茯苓
46	22.601	485.3635	[M-H] ⁻	C ₃₁ H ₅₀ O ₄	486.3706	486.3709	-0.58	块苓酸	酚类	茯苓
	22.606	525.3319	[M+K] ⁺ 、 [M+H] ⁺	C ₃₁ H ₅₀ O ₄	486.3693	486.3709	-3.31			茯苓
47	22.817	389.1231	[M-H] ⁻	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	390.1306	390.1315	-2.23	云杉新苷	糖苷类	砂仁
48	25.242	513.3582	[M-H] ⁻	C ₃₂ H ₅₀ O ₅	514.3655	514.3658	-0.68	茯苓新酸 HM	三萜类	茯苓
49	25.527	525.3588	[M-H] ⁻	C ₃₃ H ₅₀ O ₅	526.3659	526.3658	0.15	3-表去氢茯苓酸	三萜类	茯苓
50 [#]	25.902	527.3743	[M-H] ⁻	C ₃₃ H ₅₂ O ₅	528.3814	528.3815	-0.19	茯苓酸	三萜类	茯苓
51	25.982	455.3525	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	456.3597	456.3603	-1.47	齐墩果酸	三萜类	党参
52 [#]	27.189	279.2333	[M+FA-H] ⁻ 、 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.2404	280.2402	0.62	亚油酸	脂肪酸类	党参, 炙黄芪, 法半夏
53 [#]	27.394	241.2172	[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242.2245	242.2246	-0.22	十五烷酸	脂肪酸类	法半夏
54	27.394	485.3265	[M-H] ⁻	C ₃₀ H ₄₆ O ₅	486.3334	486.3345	-2.31	茯苓酸G	三萜类	茯苓
55	28.339	255.2329	[M-H] ⁻	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.2402	256.2402	-0.09	棕榈酸	脂肪酸类	法半夏
56 [#]	28.532	281.2487	[M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.256	282.2559	0.28	顺-10-十七碳烯酸甲酯	脂肪酸类	陈皮

注: *为通过与对照品比对确定, #为入血原形成分。

178.031 0、m/z 149.060 3、m/z 134.037 6等碎片离子, 推测它们分别为准分子离子峰产生的 [M-CH₂-H]⁻峰、[M-CO₂-H]⁻峰、[M-CO₂-CO₂-H]⁻峰, 根据参考文献及 MS FINDER 数据库推测该化合物为阿魏酸^[24]。

黄酮类成分为肺脾气虚汤中检测到的主要类别, 该类成分易在质谱扫描下发生糖苷键的断裂、脱羰基、脱甲基及 RDA 裂解等^[25]。如化合物 13 可在 8.211 min 观察到 m/z 741.2245[M-H]⁻峰, 判断其分子式为 C₃₃H₄₂O₁₉, 在其质谱碎片中观察到 m/z 433.1143[M-C₁₂H₂₀O₉-H]⁻及 m/z 271.0632 [M-C₁₂H₂₀O₉-C₆H₁₀O₅-H]⁻, 为其逐步丢失糖苷键产生的碎片离子, 结合文献及 MS FINDER 数据库推测该化合物为柚皮苷 4'-葡萄糖苷。化合物 32 可

在 16.761 min 观察到其准分子离子峰 m/z 313.0720, 判断其分子式为 C₁₆H₁₂O₄, 并观察到 m/z 253.053 6, 为该化合物脱去甲基产生的碎片离子 [M-CH₂-H]⁻, 与对照品及 MS FINDER 数据库比对, 鉴定该化合物为芒柄花素, 柚皮苷 4'-葡萄糖苷及芒柄花素裂解规律见图 3。

3.2 肺脾气虚汤的入血成分鉴定

将血清样本数据导入 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 软件中, 并将 3.1 项中识别得到的化合物构建为带有保留时间的肺脾气虚汤入血成分数据库, 根据化合物的保留时间及分子特征共筛选得到肺脾气虚汤的 11 种入血原形成分(图 4, 表 2)。其中, 茯苓酸来源于茯苓, 琥珀酸来源于党参、法半夏, 十五烷酸、棕榈酸来源于法半

夏,原儿茶酸来源于藿香、砂仁,对羟基苯甲酸来源于砂仁,芒柄花素和黄芪甲苷 IV 来源于炙黄芪,新

橙皮苷及顺-10-十七碳烯酸甲酯来源于陈皮,亚油酸来源于党参、炙黄芪和法半夏。

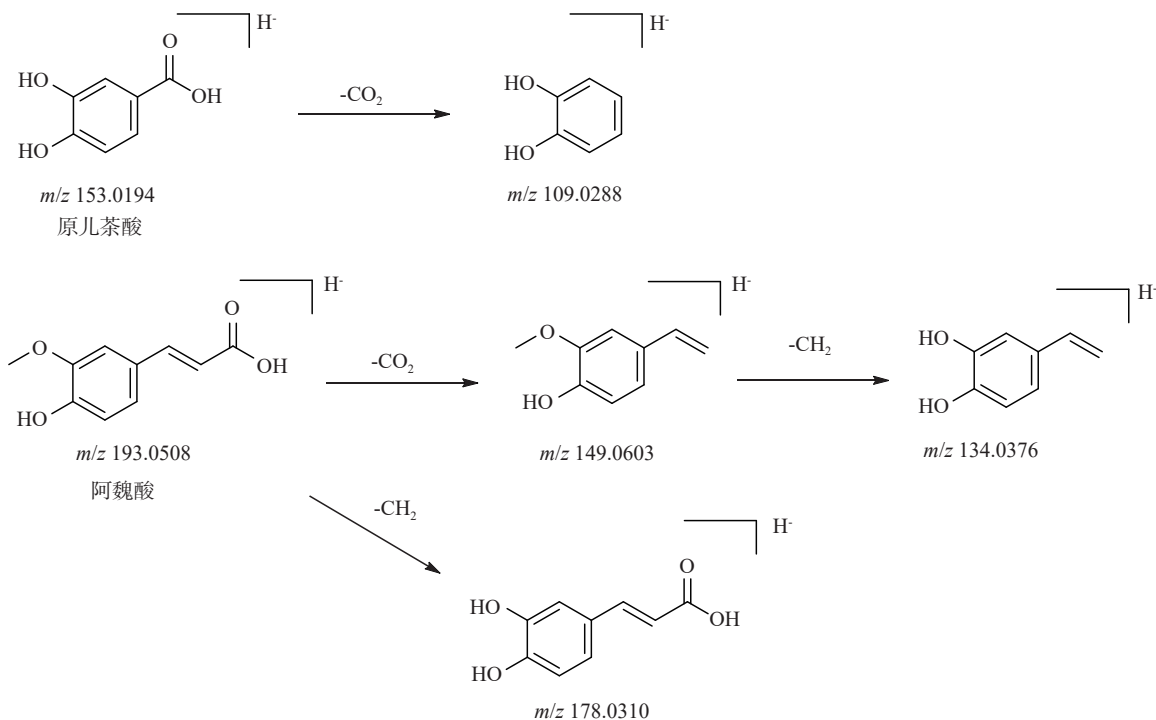


图2 原儿茶酸及阿魏酸可能的裂解途径

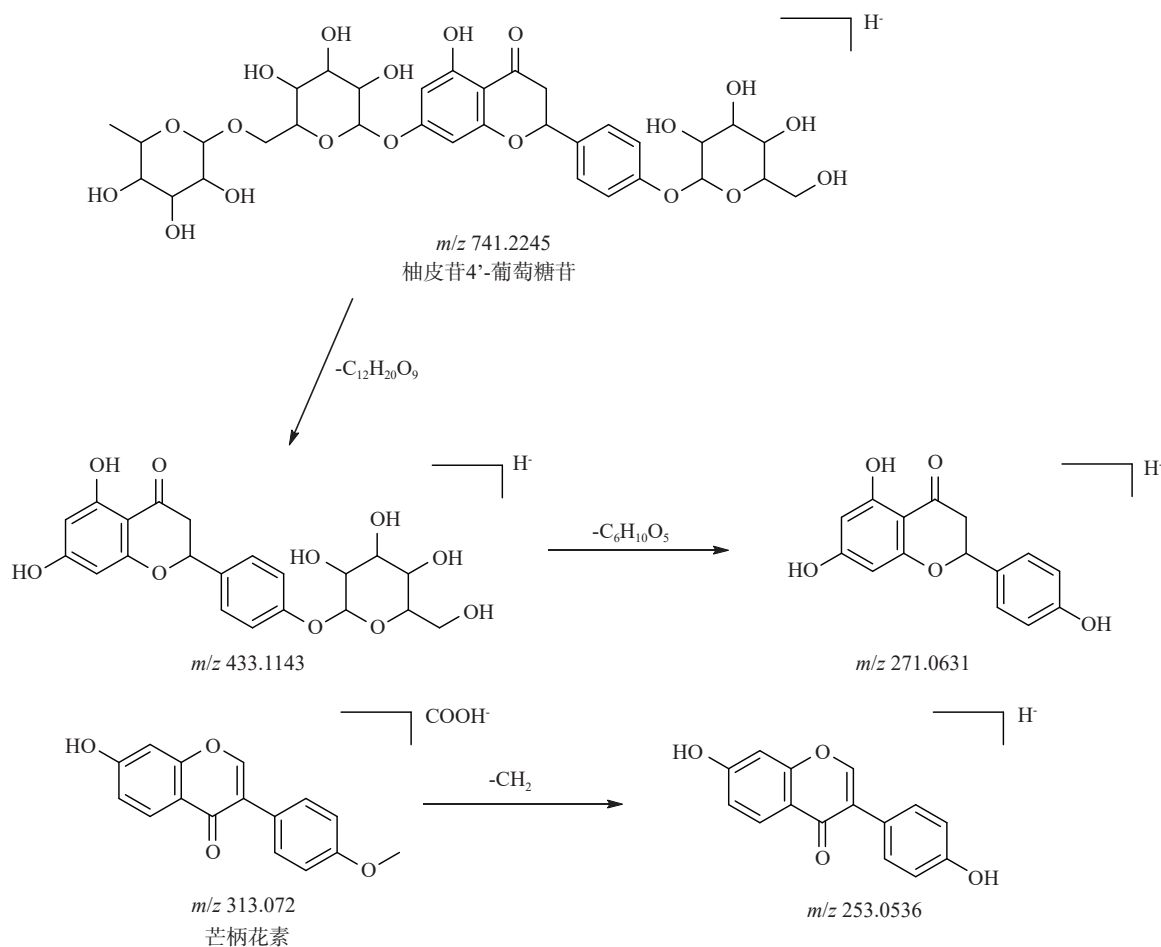


图3 柚皮苷4'-葡萄糖苷及芒柄花素可能的裂解途径

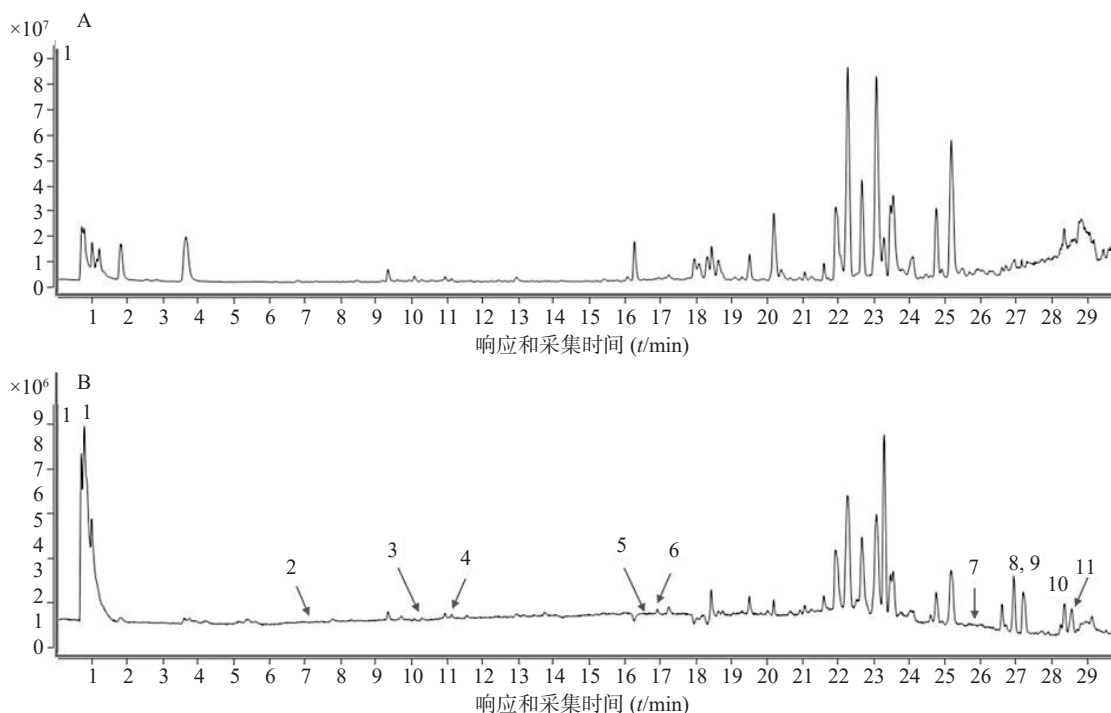


图 4 血清样本总离子流色谱图

1. 琥珀酸; 2. 原儿茶酸; 3. 对羟基苯甲酸; 4. 新橙皮苷; 5. 芒柄花素; 6. 黄芪甲苷 IV; 7. 茯苓酸; 8. 十五烷酸; 9. 亚油酸; 10. 棕榈酸; 11. 顺-10-十七碳烯酸甲酯 A. 正离子模式; B. 负离子模式

4 讨论

新冠肺炎患者恢复期常见的中医证候有肺脾气虚、气阴两虚和余邪未尽。另外, 由于患者的脾胃失和气阴两虚, 容易出现情志失调。肺脾气虚汤含有黄芪、党参、茯苓、陈皮、半夏、藿香、砂仁等, 具有扶正祛邪、补肺固表、益气健脾、燥湿化痰、化浊除湿之功, 为香砂六君子汤、参苓白术散、补中益气汤的主要组成药物^[7-10]。从现代医学的角度来说, 使用上述药物, 可以有效防止恢复期患者出现凝血、炎症、免疫和器官功能障碍^[11], 以及稳定患者情绪防止病情演变的作用^[12]。

根据我们的分析结果发现, 入血原形成分中原儿茶酸、新橙皮苷等是具有代表性的有效成分, 在现代药理学研究中均被证实有助于新冠肺炎患者的“扶正祛邪”。例如, 来自于藿香的原儿茶酸由于具有多个酚羟基, 已经被实验证实具有抑制蛋白酶 3CLpro 的功能^[26], 发挥抗炎活性^[27]; 还可以通过改善海马和大脑皮层中的神经递质、内分泌因子改善抑郁大鼠的行为和神经生化改变^[28]。新橙皮苷是黄酮类化合物的主要活性成分, 具有很强的抗炎、抗氧化特性, 以及神经保护和安神作用^[29], 近期研究表明其由于具有与人类 AAK1 蛋白和 SARS-CoV-2 NSP16 蛋白结合的潜力, 被作为一种潜在的双重活性成分而受到关注^[30-31]。黄芪甲苷 IV 是黄

芪的主要活性成分, 在机体免疫系统、循环系统、泌尿系统、内分泌系统等多种系统具有正向调节作用^[32-33]。上述成分经口服被吸收入血在体内进行循环, 证实了方剂多成分多途径发挥功效的特点, 是肺脾气虚汤发挥药效的物质基础。

5 结论

本研究首次运用 UHPLC-Q-TOF/MS 对肺脾气虚汤的化学成分和入血成分进行分析, 所鉴别出的化合物为其发挥药效的物质基础, 该方法准确性高、稳定性好、灵敏度高、分析时间短, 证实了基于入血成分的活性成分识别是一种筛选中药活性物质的快速有效方法。

【参考文献】

- [1] 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第五版 修正版)[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(2): 136-138.
- [2] HUANG K, ZHANG P, ZHANG Z H, et al. Traditional Chinese Medicine (TCM) in the treatment of COVID-19 and other viral infections: Efficacies and mechanisms[J]. *Pharmacol Ther*, 2021, 225: 107843.
- [3] 徐宇琴, 陈燕, 傅真杰, 等. 基于网络药理学探究连花清瘟胶囊治疗新冠肺炎的作用机制[J]. 浙江中医药大学学报, 2021, 45(10): 1154-1161, 1168.
- [4] 雷卓异, 范晓茜. 基于网络药理学和分子对接探讨预防肺炎一号方预防新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制[J].

- 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(10): 3541-3550.
- [5] 杨娜, 吴波, 陶国水, 等. 化湿败毒方治疗新型冠状病毒肺炎的网络药理学探究[J]. 山东中医药大学学报, 2022, 46(2): 218-226.
- [6] XU H Y, ZHANG Y Q, WANG P, et al. A comprehensive review of integrative pharmacology-based investigation: a paradigm shift in traditional Chinese medicine[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6): 1379-1399.
- [7] 陈凯欣, 尹力为, 李滋平. 基于数据挖掘的各省新型冠状病毒肺炎中医药治疗方案用药规律研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(5): 100-107.
- [8] 张佳, 李晓东. 基于数据挖掘的各地区新冠肺炎恢复期中药组方用药规律研究[J]. *湖北中医药大学学报*, 2020, 22(6): 117-121.
- [9] 闫玉凤, 董平. 上海市新型冠状病毒肺炎恢复期患者中药饮片用药特点分析[J]. *江苏中医药*, 2020, 52(4): 80-83.
- [10] 邵灿灿, 王豪杰, 孟鹏飞, 等. 新型冠状病毒肺炎的中医认识及治疗现状[J]. *中医学报*, 2020, 35(4): 704-708.
- [11] MAO K M, TAN Q, MA Y L, et al. Proteomics of extracellular vesicles in plasma reveals the characteristics and residual traces of COVID-19 patients without underlying diseases after 3 months of recovery[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 541.
- [12] 赵静, 刘剑锋, 王燕平, 等. 中药复方分期治疗新冠肺炎的网络药理学分析[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2020, 22(2): 278-288.
- [13] 陶嘉磊, 单进军, 袁斌. MS-DAIL联合MS-FINDER鉴定中药黄酮类化合物[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(10): 3704-3711.
- [14] 王依明, 王秋红. 半夏的化学成分、药理作用及毒性研究进展[J]. *中国药房*, 2020, 31(21): 2676-2682.
- [15] 谢琦, 程雪梅, 胡芳弟, 等. 党参化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2020, 54(8): 94-104.
- [16] GAO S M, LIU J S, WANG M, et al. Exploring on the bioactive markers of *Codonopsis radix* by correlation analysis between chemical constituents and pharmacological effects[J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 236: 31-41.
- [17] 邓桃妹, 彭代银, 俞年军, 等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. *中草药*, 2020, 51(10): 2703-2717.
- [18] RÍOS J L. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria Cocos*[J]. *Planta Med*, 2011, 77(7): 681-691.
- [19] SU H F, SHAKER S, KUANG Y, et al. Phytochemistry and cardiovascular protective effects of Huang-Qi (*Astragali Radix*)[J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(4): 1999-2038.
- [20] 戴瑜婷, 张雪燕, 王艺璇, 等. 黄芪的现代研究进展及其质量标志物的预测分析[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(7): 1754-1764.
- [21] 凡杭, 聂安政, 包莉, 等. 藿香化学成分与药理作用研究进展[J]. *中国野生植物资源*, 2021, 40(11): 45-53.
- [22] 徐方方, 陈伟英, 蔡婉娜, 等. 砂仁的化学成分及质量控制方法的研究进展[J]. *世界中医药*, 2020, 15(24): 3881-3886, 3894.
- [23] 黄斌, 胡燕珍, 李雪, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术分析乌蕨中的化学成分[J]. *实用中西医结合临床*, 2021, 21(9): 155-159.
- [24] 秦伟瀚, 冉继春, 叶良红, 等. UPLC-Q/TOF法同时定性定量分析滇芩药材中主要化学成分[J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3576-3582.
- [25] 吴茵, 白万军, 魏欣. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术分析木蝴蝶中化学成分[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(2): 196-200.
- [26] BAHUN M H, JUKI U0107 M, OBLAK D, et al. Inhibition of the SARS-CoV-2 3CL pro main protease by plant polyphenols[J]. *Food Chem*, 2022, 373(Pt B): 131594.
- [27] HAQ M M, CHOWDHURY M A R, TAYARA H, et al. A report on multi-target anti-inflammatory properties of phytoconstituents from *Monochoria hastata* (Family: Pontederiaceae)[J]. *Molecules*, 2021, 26(23): 7397.
- [28] THAKARE V N, PATIL R R, SURALKAR A A, et al. Protocatechuic acid attenuate depressive-like behavior in olfactory bulbectomized rat model: behavioral and neurobiochemical investigations[J]. *Metab Brain Dis*, 2019, 34(3): 775-787.
- [29] WANG X H, DAI C, WANG J, et al. Therapeutic effect of neohesperidin on TNF- α -stimulated human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes[J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(10): 741-749.
- [30] AL-SANEA M M, ABELYAN N, ABDELGAWAD M A, et al. Strawberry and ginger silver nanoparticles as potential inhibitors for SARS-CoV-2 assisted by in silico modeling and metabolic profiling[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2021, 10(7): 824.
- [31] YANG R C, LIU H, BAI C, et al. Chemical composition and pharmacological mechanism of Qingfei Paidu Decoction and Ma Xing Shi Gan Decoction against Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): in silico and experimental study[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104820.
- [32] TAN Y Q, CHEN H W, LI J. Astragaloside IV: an effective drug for the treatment of cardiovascular diseases[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3731-3746.
- [33] JIANG B, YANG Y J, DANG W Z, et al. Astragaloside IV reverses simvastatin-induced skeletal muscle injury by activating the AMPK-PGC-1 α signalling pathway[J]. *Phytother Res*, 2020, 34(5): 1175-1184.
- [收稿日期] 2022-04-19 [修回日期] 2022-08-04
[本文编辑] 李睿旻