

· 基础研究 ·

基于质谱技术的甘草饮片及其炮制品化学成分
系统分析和差异成分分析[△]孙玉振¹, 王文娟¹, 孙宏远¹, 王美元¹, 李翰林¹, 刘舒², 刘忠英^{1*}

1. 吉林大学 药学院, 吉林 长春 130021;

2. 中国科学院 长春应用化学研究所/吉林省中药化学与质谱重点实验室/长春质谱中心, 吉林 长春 130022

[摘要] 目的: 对甘草饮片及其炮制品中所含的成分进行系统性分析, 寻找并鉴别出3组甘草饮片的潜在质量标志物。方法: 运用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法结合对照品质谱信息、相对分子质量、串联质谱信息、质谱数据库, 以及相关参考文献分析鉴定甘草饮片及其炮制品成分; 利用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)寻找差异性化合物, 并根据相对分子质量、串联质谱信息和相关文献鉴定差异性化合物。利用单因素方差分析从差异性化合物中寻找潜在的质量标志物。结果: 从甘草饮片及其炮制品中初步推测了60个化合物, 主要为黄酮类和皂苷类化合物。根据PCA、OPLS-DA和单因素方差分析寻找到3个潜在质量标志物。结论: 甘草饮片经炮制后成分含量会发生变化, 可能会改变甘草的药性, 潜在质量标志物可以为甘草饮片及其炮制品的质量控制、药效研究和临床使用提供参考。

[关键词] 甘草; 主成分分析; 差异成分分析; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法; 潜在质量标志物

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2023)01-0047-11

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20220425003

Chemical Profiling and Differential Components of Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and Its Processed Products

SUN Yu-zhen¹, WANG Wen-juan¹, SUN Hong-yuan¹, WANG Mei-yuan¹, LI Han-lin¹, LIU Shu², LIU Zhong-ying^{1*}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China;

2. National Center of Mass Spectrometry in Changchun & Jilin Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine
Chemistry and Mass Spectrometry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences,
Changchun 130022, China

[Abstract] **Objective:** To systematically analyze the chemical components contained in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and its processed products, and identify the potential quality marker (Q-marker) of the three Glycyrrhizae Radix et Rhizoma products. **Methods:** Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS^E), in combination with reference substance spectrum information, relative molecular mass, ion fragments, mass spectrometry database, and related reference data, was employed to identify the chemical components in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and its processed products. The principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were performed to identify the differential components, which were identified based on relative molecular mass, ion fragments, and related literature data. The one-way analysis of variance (ANOVA) was carried out to screen out the potential Q-markers from the differential components. **Results:** Sixty compounds were preliminarily identified in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma and its processed products, mainly including flavonoids and saponins. PCA, OPLS-DA, and ANOVA identified 3 potential Q-markers. **Conclusion:** The content of chemical components in Glycyrrhizae Radix et Rhizoma will change after processing, which may alter the nature (warm or cold) of this herb. The

[△] [基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20190304098YY); 吉林省预算内基本建设资金项目(2022C041-4)

* [通信作者] 刘忠英, 教授, 博士生导师, 研究方向: 生化分析和药物分析; Tel: 0431-85619704, E-mail: liuzy@jlu.edu.cn

potential Q-markers can provide a basis for the quality control, efficacy research, and clinical use of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and its processed products.

[Keywords] *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; PCA; differential component analysis; UPLC-Q-TOF-MS^E; potential Q-marker

甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *G. inflata* Bat. 或光果甘草 *G. glabra* L. 的干燥根和根茎,具有补气、解毒、祛痰、清热等功效,在中药配伍中应用极为广泛^[1-2]。在临床和方剂的实际应用中,使用了不同的甘草饮片制品,如炙甘草汤中所用甘草为炙甘草,厚朴温中汤中所用甘草为烤甘草或炒甘草,甘麦大枣汤中所用甘草为生甘草等。甘草饮片炮制种类有多种,如蜜制、清炒、姜制、酒制等,中药炮制后其活性成分会产生变化^[3],在临床使用中有一定的区别。因此,研究甘草饮片炮制后有效成分的变化和不同甘草饮片炮制品之间的差异性就显得尤为重要。

关于甘草饮片、清炒甘草和炙甘草成分、含量和差异物研究报道很多。陈佳等^[4]对甘草和炙甘草进行了部分差异成分的指纹图谱对比和含量差异对比;文旺等^[5]对3组甘草饮片炮制品进行了差异化合物分析和差异物含量分析;段伟萍等^[6]对常用的甘草饮片进行分析鉴定和含量变化推测;崔园园等^[7]分析了甘草和炙甘草的差异成分和变化趋势。但对于甘草饮片、清炒甘草和炙甘草全成分分析、质量标志物分析方面还略有空缺。因此,本研究借助超高压液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS^E)、UNIFI平台和Progenesis QI平台快速识别和分析鉴定3组甘草饮片的成分和差异成分,总结了不同类别化合物碎裂规律,分析3组甘草饮片炮制品的化学成分种类和含量差异,寻找甘草饮片炮制前后的潜在质量标志物,为不同甘草饮片炮制品的质量控制、药效研究和临床使用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC型液相色谱系统、Q-TOF SYNAPT G2 HDMS型高分辨质谱仪均购于美国Waters公司;98-1-B型电子控温加热套(天津市泰斯特仪器有限公司);Milli-Q Gradient A10型超纯水系统(美国Millipore公司);DFT-200型手提式高速万能粉碎机

(温岭市林大机械有限公司);BS 110S型分析天平(德国Sartorius公司);Allegra X-30型高速离心机(美国Beckman Coulter公司)。

1.2 试药

对照品甘草苷(批号:210910,纯度>98%)、异甘草苷(批号:151227,纯度>98%)、芹糖甘草苷(批号:190107,纯度>98%)、甘草素(批号:WH0806,纯度>99%)、芹糖异甘草苷(批号:220629,纯度>98%)、甘草酸(批号:210628,纯度>98%)、甘草查耳酮A(批号:190223,纯度>98%)和甘草次酸(批号:160103,纯度>98%)均购于上海融禾医药科技发展有限公司;甘草皂苷G₂(批号:CFN92915,纯度>98%,武汉中标科技有限公司);蜂蜜(批号:FL006-210101,吉林省华侨药业集团有限公司);水为自制超纯水;乙腈(批号:LOT F22M3S203)、甲醇(批号:LOT 210154)均购于英国Fisher Scientific公司;色谱级甲酸(美国ROE Scientific公司);亮氨酸脑啡肽(LE,批号:W16122114,美国Waters公司)。

甘草饮片购于北京美康堂医药科技有限公司,产地为内蒙古,批号为201123001,经吉林省中医药研究院黄青教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根茎,甘草饮片经检测均符合《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2020年版(一部)有关规定。

2 方法

2.1 样品的准备

取蜂蜜1 000.0 g置于控温电磁炉内,控温120℃加热至色泽深、黏度大、半透明、带光泽、浓稠时取出,放冷得炼蜜^[8]。按照《中国药典》2020年版中蜜炙法(通则0213),取100.0 g甘草饮片用炼蜜25.0 g炒至黄色至深黄色、不粘手时取出,晾凉,得炙甘草,平行制备8批(ZGC1~ZGC8)。取甘草饮片100.0 g以0.6倍量水润湿,直至将水分全部吸入饮片后,放入炒锅内电磁炉控温在250℃炒至黄或深黄,得清炒甘草^[9],平行

制备8批(QGC1~QGC8)。将甘草饮片、清炒甘草和炙甘草分别粉碎至细粉(过四号筛),备用(存放在中国科学院长春应用化学研究所1号楼214室)。

2.2 供试品、对照品及质量控制溶液的制备

精密称取甘草饮片、清炒甘草、炙甘草粉末各1.000 g置于具塞锥形瓶中,加入70%乙醇50 mL,称定质量,具塞静置30 min,在120 Hz、25 °C超声60 min再称定质量,用70%乙醇补足缺失的质量,摇匀滤过,取滤液在10 000 r·min⁻¹(离心半径为6 cm)离心5 min,取上清液用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

精密称取甘草苷、异甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷、甘草素、甘草酸、甘草皂苷G₂、甘草查耳酮A、甘草次酸对照品适量,用甲醇超声溶解,配制成0.01 mg·mL⁻¹的对照品溶液。

为评估仪器的稳定性和可重复性,平行制备多批清炒甘草和炙甘草,取甘草饮片及其炮制品每组第1个样本各0.5 mL涡旋混匀制备质量控制样本(QC),间隔8个样本进针,对仪器和方法的稳定性进行评价。

2.3 超高效液相色谱和质谱条件

采用Waters C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm),柱温为25 °C,流动相为0.1%甲酸水(B)-乙腈(A),进样量为10 μL,流速为0.3 mL·min⁻¹。梯度洗脱(0~2 min, 95%B; 2~8 min, 95%~78%B; 8~16 min, 78%~70%B; 16~23 min, 70%~64%B; 23~29 min, 64%~62%B; 29~42 min, 62%~18%B; 42~44 min, 18%~10%B; 44~46 min, 10%~5%B; 46~47 min, 5%~95%B; 47~50 min, 95%B)。

采用电喷雾离子源(ESI)采集正、负2种扫描模式下的离子碎片信息,MS^E扫描模式,扫描范围为 m/z 50~1200,扫描时间为0.5 s,毛细管电压为2.35 kV,源温为100 °C,脱溶剂温度为350 °C,锥孔气体(N₂)流量为35.0 L·h⁻¹,脱溶剂气(N₂)流量为500.0 L·h⁻¹,锥孔电压为20 V,Trap MS碰撞能量为30~50 eV,采用LE实时校正。

2.4 甘草饮片及其炮制品成分分析数据处理

采用MassLynx 4.1软件获取UPLC-Q-TOF-MS^E质谱数据;使用UNIFI平台(Waters, USA)、ChemBank(<http://chembank>)、PubChem(<http://pubchem.ncbi>).

nlm.nih.gov/、MassBank(<http://www.massbank.jp/>)、ChemSpider(<http://www.chemspider.com/>)等数据库根据相对分子质量、离子碎片和碎裂规律鉴别甘草饮片及其炮制品中的成分。

2.5 甘草饮片及其炮制品差异成分数据处理

利用Progenesis QI 2.4软件处理甘草饮片及炮制品的UPLC-Q-TOF-MS^E原始质谱数据,应用主成分分析(PCA)模型预测甘草饮片及其炮制品的离散情况和差异程度,在PCA的基础上应用正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)甘草饮片及其炮制品的差异,通过S型图(S-Plot)和变量重要性投影(VIP)值对两组之间可能的差异物进行筛选,并根据保留时间、相对分子质量、质荷比(m/z)结合数据库对可能的差异物进行鉴别,并使用单因素方差分析差异显著性。

3 结果

3.1 甘草饮片及其炮制品的化学成分分析

应用UNIFI平台及质谱数据库平台分别分析鉴定甘草饮片及其炮制品中的化合物,并归纳总结了二氢黄酮、二氢查耳酮和五环三萜皂苷类化合物的裂解规律。研究对比发现甘草饮片与清炒甘草和炙甘草的化合物种类相同,甘草饮片总离子流图见图1, UPLC-Q-TOF-MS^E色谱及质谱数据见表1。从甘草饮片及其炮制品中初步鉴定出60个化合物,主要包括黄酮类化合物34个、三萜皂苷20个、香豆素类3个、木脂素类1个、有机酸类1个、糖类1个。其中黄酮类和三萜皂苷类是甘草饮片、清炒甘草和炙甘草中的主要成分。

3.1.1 二氢黄酮结构解析 化合物6的准分子离子峰为 m/z 549.161 6 [M-H]⁻,在二级质谱中母离子丢失1分子葡萄糖基(Glu)和1个分子蔗糖基(Api)后得到该黄酮苷元 m/z 255.064 9 [M-Glu-Api+2H₂O+H]⁻、黄酮元经过裂解形成 m/z 135.011 0 [C₈H₇O]⁻、119.049 7 [C₇H₃O₃]⁻。然后参照芹糖甘草苷对照品负离子模式的二级质谱比对可以确定化合物6为芹糖甘草苷。研究还发现,在二级质谱中可见明显的 m/z 255.064 9,未见丢失1个氧原子的 m/z 239.070 8,这可能是苷元中B环与C-4'的O相连接形成共轭,结构较为稳定。芹糖甘草苷的二级串联质谱图及其裂解方式见图2。

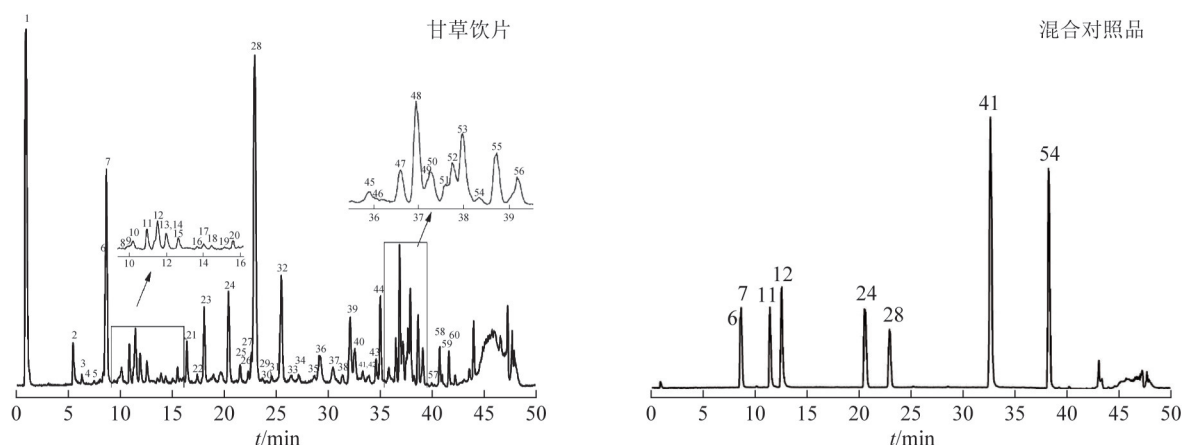


图1 甘草饮片负离子模式总离子流图和混合对照品负谱模式总离子流图

表1 甘草饮片的UPLC-Q-TOF-MS^E色谱及质谱数据

编号	t_R	名称	分子式	理论值 (m/z)	$[M-H]^-$ 实测值(m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	参考文献
1	0.97	蔗糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.116 2	341.109 8	4.10	179.057 2, 161.046 9	
2	5.33	苯乳酸	$C_9H_{10}O_3$	166.063 0	165.056 5	7.88	121.067 4	[11]
3	6.37	glucosoliquiritin	$C_{27}H_{32}O_{14}$	580.179 2	579.173 8	4.14	417.121 4, 255.067 4, 165.057 0, 135.010 1	[12]
4	6.53	glucosoliquiritin apioside	$C_{32}H_{40}O_{18}$	712.221 5	711.215 9	3.09	549.161 8, 429.109 2, 297.079 6	[12]
5	7.53	夏佛托昔	$C_{26}H_{28}O_{14}$	564.147 9	563.142 3	3.91	473.113 5, 383.071 0	[13-14]
6 [*]	8.60	芹糖甘草苷	$C_{26}H_{30}O_{13}$	550.168 6	549.161 6	1.46	417.120 7, 255.064 9, 135.011 0, 119.049 7	
7 [*]	8.71	甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	418.126 4	417.119 7	2.64	255.067 3, 161.026 1, 148.017 6, 135.009 6	
8	9.80	6''-O-乙酰基芹糖异甘草苷	$C_{28}H_{32}O_{14}$	592.179 2	591.173 7	3.89	549.165 4, 255.068 1, 177.020 4, 135.010 4	[12]
9	10.01	6''-O-乙酰基甘草苷	$C_{23}H_{24}O_{10}$	460.137 0	459.131 1	4.14	256.072 7, 135.010 3, 119.051 8, 91.021 4	[12]
10	10.15	四羟基查耳酮-4'-O-葡萄糖苷	$C_{21}H_{22}O_{10}$	434.12 13	433.115 5	4.62	271.063 5, 177.021 4, 151.005 4, 136.017 7	[11]
11 [*]	10.87	芹糖异甘草苷	$C_{26}H_{30}O_{13}$	550.168 6	549.162 6	3.28	417.123 4, 255.068 0, 135.010 2, 119.051 9	
12 [*]	11.41	异甘草苷	$C_{21}H_{22}O_9$	418.126 4	417.118 2	-0.96	255.064 9, 135.011 0, 119.049 7, 91.020 2	
13	11.88	甘草苷 A	$C_{36}H_{38}O_{16}$	726.216 0	725.211 5	4.55	695.204 2, 549.165 3, 255.068 3, 135.010 7	[15]
14	11.89	甘草苷 D ₂ /D ₁	$C_{35}H_{36}O_{15}$	696.205 4	695.201 2	5.18	549.165 3, 399.112 1, 255.068 3, 135.010 7	[10, 15]
15 [*]	12.47	甘草素	$C_{15}H_{12}O_4$	256.073 6	255.067 9	8.23	119.051 7, 135.045 0	
16	13.85	刺芒柄花素	$C_{16}H_{12}O_4$	268.073 6	267.068 2	8.99	252.044 7	[11, 12]
17	14.00	甘草皂苷 G ₂ 同分异构体	$C_{42}H_{62}O_{17}$	838.398 7	837.392 9	2.39	819.390 4, 661.361 6, 351.059 7, 193.037 3	[11,13,15-16]
18	14.49	24-羟基-甘草皂苷 A ₃	$C_{48}H_{72}O_{22}$	1 000.451 5	999.447 8	4.10	837.395 9, 819.387 4, 661.364 0, 351.059 7	[10]
19	15.11	乌拉尔皂苷 F	$C_{44}H_{64}O_{19}$	896.404 2	895.399 8	3.80	853.394 2, 821.401 0, 351.060 0	[10]
20	15.56	22-羟基-甘草皂苷 G ₂	$C_{42}H_{62}O_{18}$	854.393 6	853.388 1	2.70	821.388 2, 645.955 0, 351.060 8	[10]
21	16.54	甘草皂苷 A ₃	$C_{48}H_{72}O_{21}$	984.456 6	983.450 5	1.73	821.397 7, 645.368 2, 351.059 0, 193.036 9	[10]

续表 1

编号	t_R	名称	分子式	理论值 (m/z)	$[M-H]^-$ 实测值(m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	参考文献
22	17.47	22- <i>beta</i> -甘草酸	$C_{44}H_{64}O_{18}$	880.409 3	879.402 5	1.14	661.355 2, 351.059 9, 193.037 0, 175.027 3	[13]
23	18.12	甘草皂苷 G_2 同分异构体	$C_{42}H_{62}O_{17}$	838.398 7	837.392 0	1.31	661.362 2, 351.058 6, 193.036 9	[11,13,15-16]
24*	20.43	甘草皂苷 G_2	$C_{42}H_{62}O_{17}$	838.398 7	837.392 7	2.15	661.357 6, 485.335 4, 351.055 5, 193.035 1	
25	21.54	云甘苷 L_1/J_1	$C_{48}H_{72}O_{20}$	968.461 7	967.456 5	2.69	937.317 6, 821.399 8, 645.363 6, 351.058 7	[10]
26	22.34	云甘苷 G_1	$C_{48}H_{74}O_{21}$	986.472 3	985.467 8	3.35	839.411 9, 663.382 5, 497.116 8, 351.060 1	[10]
27	22.64	甘草皂苷 G_2 同分异构体	$C_{42}H_{62}O_{17}$	838.398 7	837.391 7	0.96	661.362 4, 485.331 7, 441.341 0, 194.040 9	[11,13,15-16]
28*	22.93	甘草酸	$C_{42}H_{62}O_{16}$	822.403 8	821.396 2	0.24	645.366 0, 469.334 2, 351.058 1, 193.036 4	
29	23.32	甘草皂苷 B_2	$C_{42}H_{64}O_{15}$	808.424 5	807.416 0	-0.87	627.353 8, 583.363 2, 537.358 7, 469.333 0	[13,17]
30	24.17	甘草皂苷 J_2 或其同分异构体	$C_{42}H_{64}O_{16}$	824.419 4	823.413 7	2.55	497.114 7, 351.058 9, 193.036 5	[18]
31	24.71	甘草皂苷 B_2 同分异构体	$C_{42}H_{64}O_{15}$	808.424 5	807.417 3	0.74	351.058 6, 289.036 6, 193.036 6	[13,17]
32	25.58	甘草皂苷 H_2	$C_{42}H_{62}O_{16}$	822.403 8	821.396 4	0.49	645.364 1, 351.058 0, 193.036 4	[19]
33	26.57	甘草酸同分异构体	$C_{42}H_{62}O_{16}$	822.403 8	821.396 5	0.61	645.365 1, 351.058 6, 193.036 2, 113.025 3	
34	27.29	甘草皂苷 J_2 或其同分异构体	$C_{42}H_{64}O_{16}$	824.419 4	823.411 8	0.24	647.380 4, 351.058 4, 193.036 7, 113.025 2	[18]
35	28.55	甘草异黄酮 B 或其同分异构体	$C_{20}H_{16}O_6$	352.094 7	351.088 4	4.27	337.109 2, 174.957 4	[20]
36	29.13	甘草香豆素	$C_{21}H_{20}O_6$	368.126 0	367.119 4	3.27	337.073 8, 225.056 2, 148.017 6, 145.030 0	[20]
37	30.35	粗毛甘草素 C	$C_{21}H_{24}O_5$	356.162 4	355.156 0	3.94	323.129 2, 283.061 4, 203.072 5, 135.046 1	
38	31.29	甘草查耳酮 D 或其同分异构体	$C_{20}H_{18}O_6$	354.110 3	353.104 8	6.51	323.126 2, 283.064 4, 218.094 2, 203.071 4	[11]
39	32.03	甘草黄酮醇 A	$C_{20}H_{18}O_6$	354.110 3	353.104 3	5.10	297.041 7, 269.046 9, 227.036 6, 162.033 8	[21]
40	32.50	甘草苯并呋喃	$C_{20}H_{18}O_6$	354.110 3	353.104 9	6.80	201.093 4, 187.040 3, 146.038 4, 107.015 0	[21]
41*	33.11	甘草查耳酮 A	$C_{20}H_{18}O_5$	338.115 4	337.109 8	6.53	282.055 0, 253.051 8, 225.056 0	
42	33.31	甘草酚	$C_{21}H_{18}O_6$	366.110 3	365.103 2	1.92	335.058 2, 307.026 0, 295.026 1, 145.030 1	
43	34.61	甘草黄酮醇同分异构体	$C_{20}H_{18}O_6$	354.110 3	353.104 7	6.23	269.047 4, 241.052 5, 146.967 0	[21]
44	35.01	甘草异黄酮 B 或其同分异构体	$C_{20}H_{16}O_6$	352.094 7	351.088 2	3.70	199.077 1, 151.004 3	[21]
45	35.84	kanzonol W	$C_{20}H_{16}O_5$	336.099 8	335.093 7	5.07	253.053 6, 176.012 3, 148.016 8, 107.014 9	
46	36.04	kanzonol C	$C_{25}H_{28}O_4$	392.198 8	391.191 6	1.53	203.072 5, 187.113 2, 159.082 9, 132.058 6	
47	36.55	粗毛甘草素 D	$C_{22}H_{26}O_5$	370.178 0	369.171 4	3.25	267.067 1, 203.072 4, 147.046 0, 135.045 9	[22]
48	36.92	3',6'-二异戊二烯黄檀素	$C_{25}H_{28}O_6$	424.188 6	423.182 0	2.84	351.124 9, 245.082 9, 214.062 4, 174.033 3	
49	37.18	去氢粗毛甘草素 D	$C_{22}H_{24}O_5$	368.162 4	367.154 4	-0.54	337.108 1, 227.071 4, 151.076 5, 132.058 1	[20]

续表 1

编号	t_R	名称	分子式	理论值 (m/z)	$[M-H]^-$ 实测值(m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	参考文献
50	37.22	6,8-二异戊二烯基柚皮素	$C_{25}H_{28}O_5$	408.193 7	407.184 9	-2.46	367.153 3, 309.072 9, 203.070 4, 146.966 8	
51	37.55	isoangustone A or isomer	$C_{25}H_{26}O_6$	422.172 9	421.169 2	9.73	352.009 1, 309.044 7, 201.094 3, 125.025 7	[23]
52	37.71	甘草宁 E	$C_{25}H_{28}O_6$	424.188 6	423.184 2	8.03	229.089 6, 193.089 3, 124.018 1	[16]
53	37.93	isoangustone A or isomer	$C_{25}H_{26}O_6$	422.172 9	421.167 8	6.41	365.105 8, 297.042 6, 219.068 0, 175.077 8	[23]
54 [*]	38.31	甘草次酸	$C_{30}H_{46}O_4$	470.339 6	469.332 4	1.28	425.341 3	
55	38.67	isoangustone A or isomer	$C_{25}H_{26}O_6$	422.172 9	421.166 0	2.14	381.134 0, 227.072 4, 193.087 9, 124.017 5	
56	39.14	isoangustone A or isomer	$C_{25}H_{26}O_6$	422.172 9	421.166 1	2.37	352.108 6, 281.045 8, 219.066 9, 176.012 3	
57	39.99	3-羟基光甘草酚	$C_{25}H_{28}O_5$	408.193 7	407.186 9	2.46	408.193 7	[21]
58	40.72	angustone B	$C_{25}H_{24}O_6$	420.157 3	419.153 6	9.78	219.068 7, 199.073 3, 133.068 6	[21]
59	40.98	胀果甘草宁	$C_{25}H_{24}O_5$	404.162 4	403.155 4	1.98	404.162 4, 387.124 9, 319.099 3, 161.024 7	
60	42.24	熊果酸	$C_{30}H_{48}O_3$	456.360 4	455.354 0	3.07	311.219 3, 277.218 5	

注: *表示该化合物经过与对照品比对, 表 2 同。

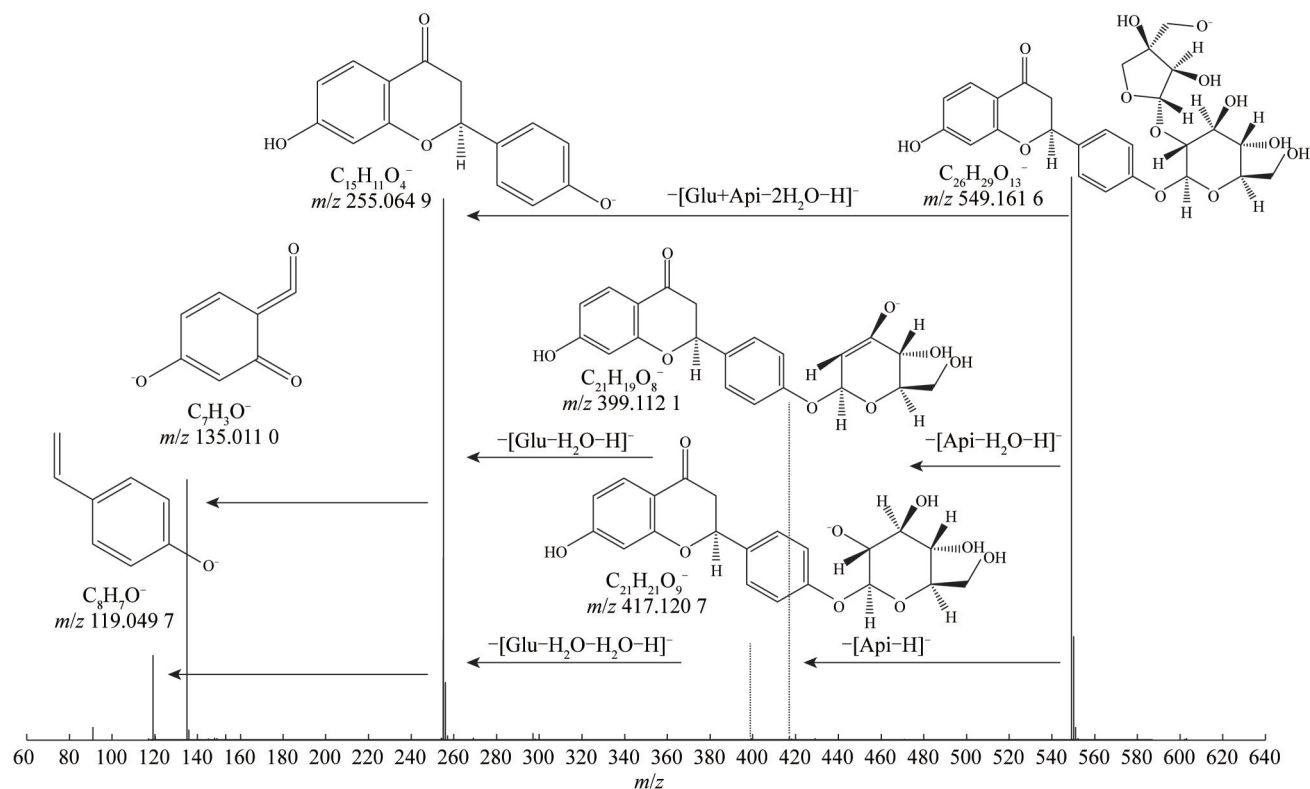


图 2 芹糖甘草苷可能的裂解方式

3.1.2 二氢查耳酮结构解析 化合物 **12** 的准分子离子峰为 m/z 417.118 2 $[M-H]^-$, 在二级质谱中母离子丢失 1 分子 Glu 得到 255.064 9 $[M-Glu+H_2O]^-$, 然后黄酮母核经过 RDA 裂解形成 m/z 135.011 0 $[C_8H_7O]^-$ 、119.049 7 $[C_7H_3O_3]^-$ 。分析发现化合物 **12**

的二级质谱信息与异甘草苷对照品二级质谱信息基本一致, 可以确定化合物 **12** 为异甘草苷, 异甘草苷的二级串联质谱图及其裂解方式见图 3。

3.1.3 五环三萜类结构解析 化合物 **24** 的准分子离子峰为 m/z 837.392 9 $[M-H]^-$, 在二级质谱中,

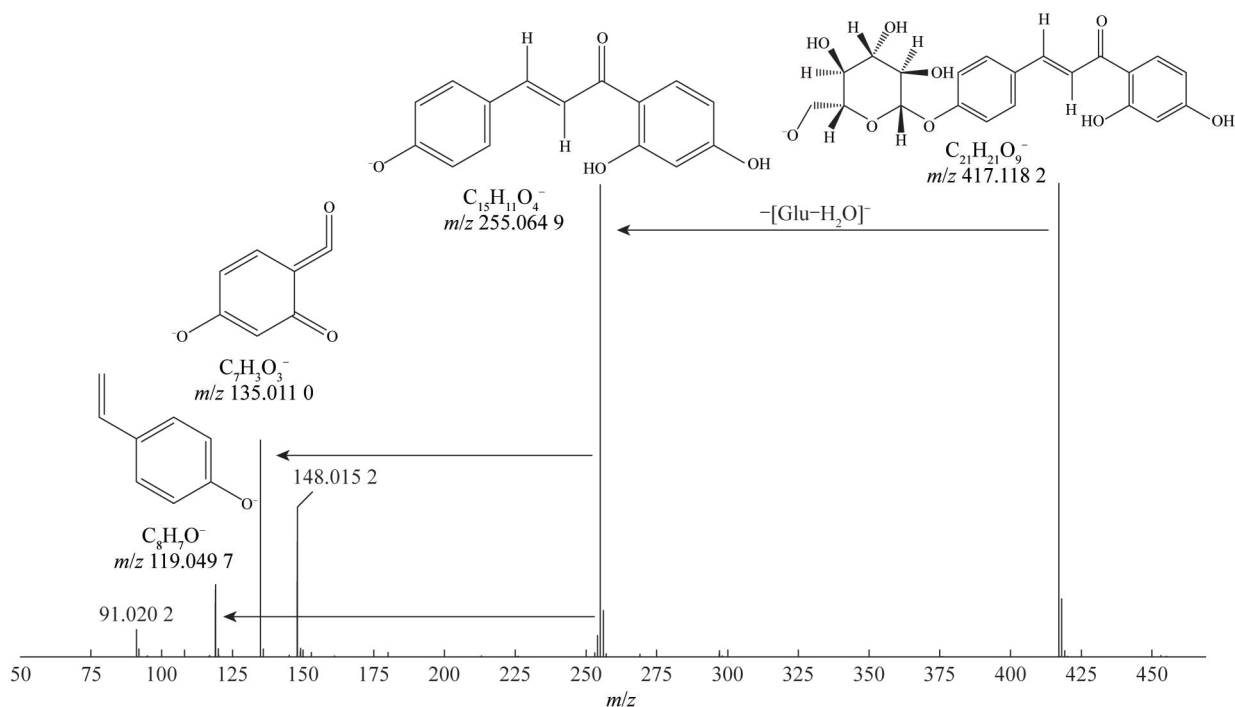
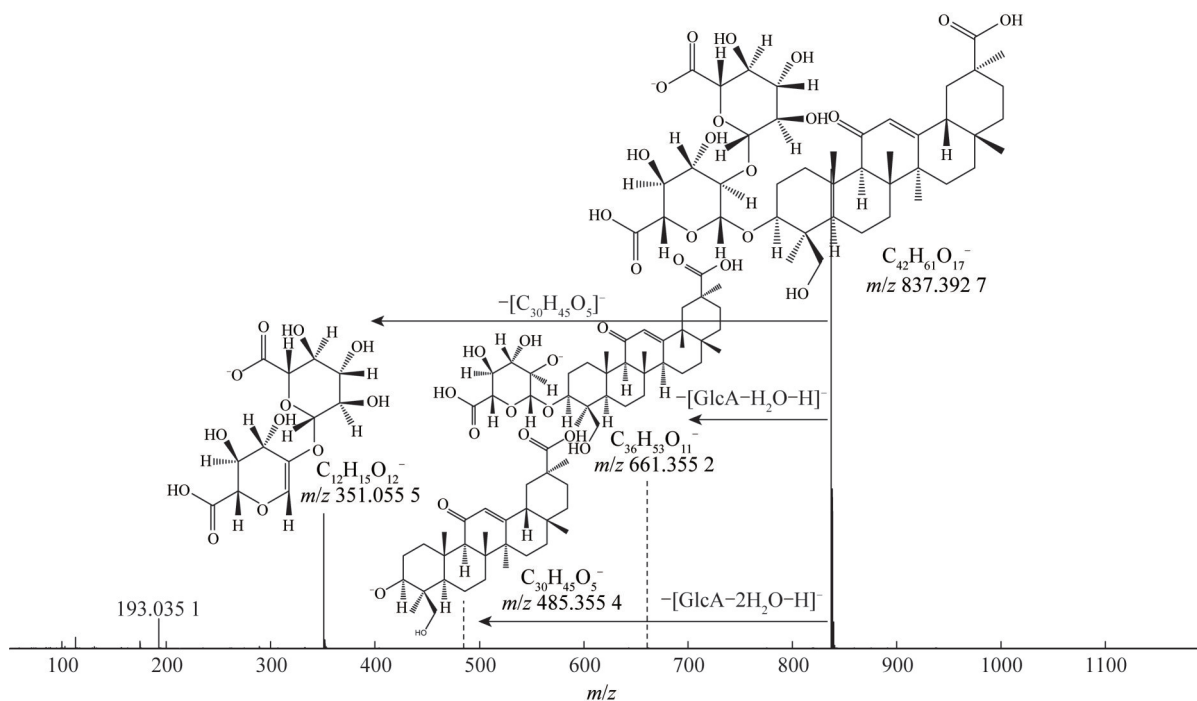


图3 异甘草苷可能的裂解途径

可以观察到明显的 m/z 351.055 5、661.357 6、485.335 4。 m/z 661.357 6 $[M - \text{GlcA} + \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^-$ 由母离子丢失葡萄糖醛酸基 (GlcA) 得到, 再丢失 GlcA 得到 m/z 485.335 4 $[M - 2\text{GlcA} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^-$ 。研究发现 m/z 351.055 5 响应值非常高, 推测五环三萜类 C_3 位醚键更容易断裂。然后将化合物 **24** 二级质谱图与

甘草皂苷 G_2 对照品对比, 发现化合物 **24** 与甘草皂苷 G_2 对照品二级质谱基本一致, 可以确定化合物 **24** 为甘草皂苷 G_2 , 可能的裂解方式如图4。

此外, 研究发现化合物 **17**、**23**、**27** 的准分子离子峰都为 m/z 837.392 7, 二级质谱中的碎片离子 m/z 661.367 6、485.335 4、351.055 5 与甘草皂苷 G_2 的

图4 甘草皂苷 G_2 可能的裂解方式

碎片离子相同,因此推测化合物**17**、**23**、**27**都为甘草皂苷 G_2 的同分异构体。化合物**22**、**28**和甘草酸的二级质谱中都有 m/z 645.366 0和351.055 5推测化合物**20**、**25**和甘草酸可能都是齐墩果烷型五环三萜类皂苷,结合文献[10]推测化合物**20**、**25**可能是22-羟基甘草皂苷 G_2 、云甘苷 L_1/J_1 。

3.2 生甘草及其炮制品成分多元统计分析

3.2.1 甘草饮片及其炮制品PCA 研究发现甘草中主要成分是黄酮类和皂苷类,均较稳定。黄酮类和皂苷类成分在负离子模式的响应值高、总离子流图受杂峰影响小、质谱信息明确,因此应用UPLC-Q-TOF-MS^E技术的负离子模式采集和分析样本。应用PCA对甘草饮片及其炮制品的组间差异进行分析,结果见图5A,甘草饮片、清炒甘草和炙甘草存在显著性差异。

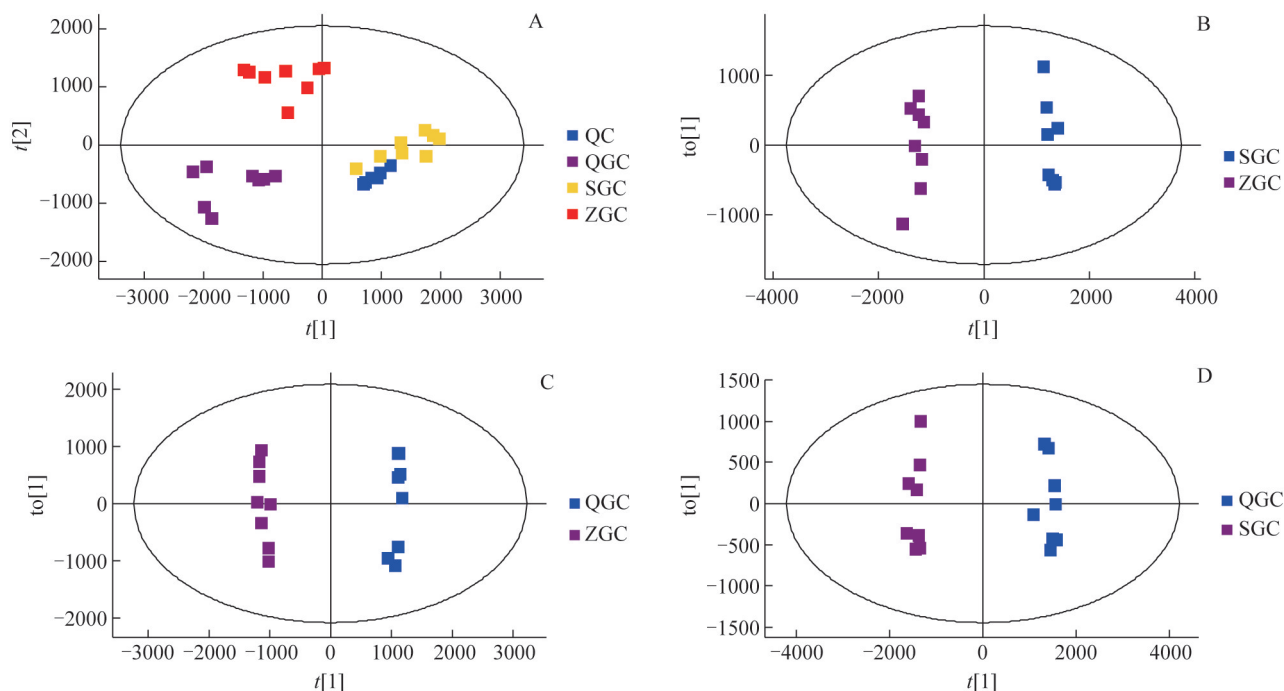
3.2.2 甘草饮片及其炮制品OPLS-DA 为了进一步明确甘草饮片及其炮制品之间的成分差异,利用OPLS-DA对两组之间的差异成分进行分析(图5B、图5C、图5D),为了验证OPLS-DA模型可靠,进行了200轮随机排列。使用模型解释率(R^2Y)和模型预测率(Q^2)参数来评估模型的可靠性。在负离子模式下甘草饮片和炙甘草的 R^2Y 和 Q^2 分别为99%和

98%;清炒甘草和炙甘草的 R^2Y 和 Q^2 均为99%;甘草饮片和清炒甘草 R^2Y 和 Q^2 分别99%和97%,模型拟合参数值接近1,表明本研究建立的OPLS-DA模型有良好的可靠性。将VIP值的绝对值 ≥ 4 、 $P < 0.05$ 的成分认定为是差异性化合物并在S-plot图进行标注,离子强度见图6,鉴定化合物见表2。将差异性化合物用单因素方差分析进行显著性分析,将3组相互存在显著性差异的化合物进行标记。

4 讨论

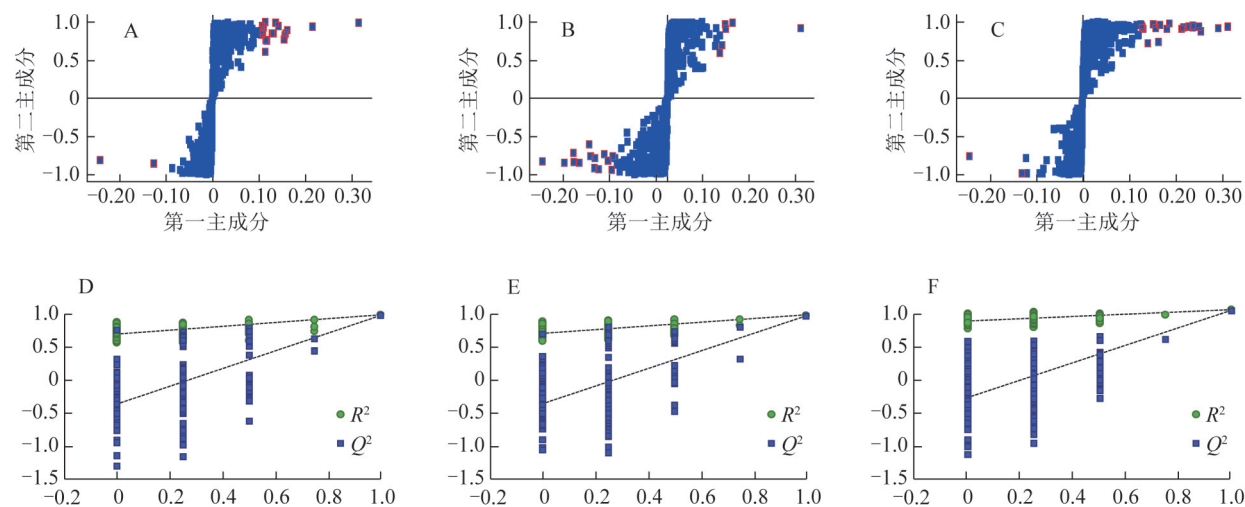
研究发现甘草的主要成分是黄酮类和五环三萜类皂苷,经过清炒后甘草饮片中化合物**2**、**3**、**7**、**9**等苷类成分降低,这可能是由受热后分解所造成。清炒甘草中化合物**35**、**37**、**39**、**47**等黄酮、异黄酮等成分稍有减少或相同(图7)。在炙甘草中,化合物**20**、**21**、**24**、**26**等皂苷类化合物降低程度要小于清炒甘草,结果与参考文献[12]相同,原因可能是炮制过程中蜂蜜里的蔗糖、果糖高温熔化后包裹在甘草饮片的四周,减少了甘草饮片与热源的直接接触,对甘草饮片起到了一定的保护作用。

研究发现20个差异化合物中,22-羟基-甘草皂苷 G_2 、云甘苷 G_1 在清炒甘草中含量最低,在生甘草中含量最高,这是蜂蜜对甘草片的保护作用使皂苷



注: A. 甘草饮片及其炮制品PCA图; B、C、D. 分别为甘草饮片和炙甘草、清炒甘草和炙甘草、清炒甘草和甘草饮片的OPLS-DA图; QC. 质量控制样本; SGC. 甘草饮片; QGC. 清炒甘草; ZGC. 炙甘草。

图5 甘草饮片及其炮制品PCA及OPLS-DA



注：A、D. 甘草饮片和炙甘草的S-plot图和200次置换检验的OPLS-DA模型的交叉验证图；B、E. 清炒甘草和炙甘草的S-plot图和200次置换检验的OPLS-DA模型的交叉验证图；C、F. 甘草饮片和清炒甘草的S-plot图和200次置换检验的OPLS-DA模型的交叉验证图。

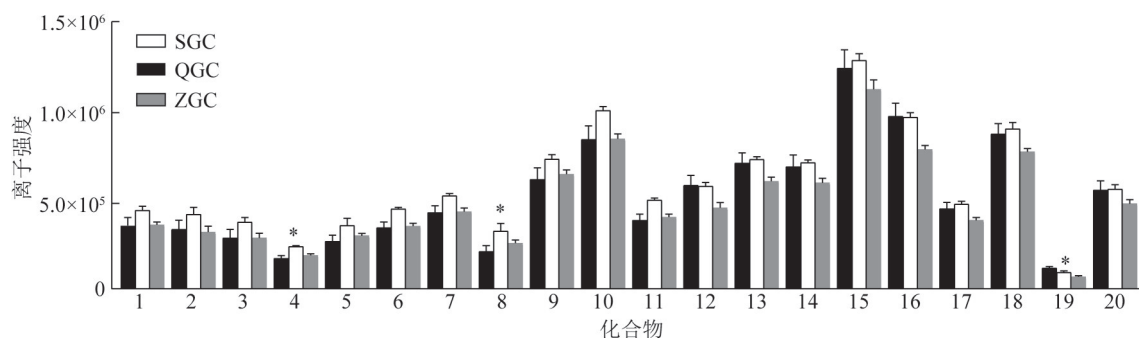
图6 甘草饮片及其炮制品的多元统计分析

表2 甘草饮片及其炮制品差异性化合物

序号	化合物名称	化合物种类	分子式	理论值 (m/z)	[M - H] ⁻ 实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	参考文献
1	苯乳酸	有机酸	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.063 0	165.056 5	7.88	[11]
2*	芹糖甘草苷	二氢黄酮类	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	550.168 6	549.161 6	1.46	
3*	甘草苷	二氢黄酮类	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	418.126 4	417.119 7	2.64	
4	22-羟基-甘草皂苷 G ₂	五环三萜类皂苷	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₈	854.393 6	853.388 1	2.70	[10]
5	甘草皂苷 A ₃	五环三萜类皂苷	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	984.456 6	983.450 5	1.73	[10]
6	甘草皂苷 G ₂ 同分异构体	五环三萜类皂苷	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.398 7	837.392 0	1.31	[11,13,15-16]
7*	甘草皂苷 G ₂	五环三萜类皂苷	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	838.398 7	837.392 7	2.15	
8	云甘草 G ₁	五环三萜类皂苷	C ₄₈ H ₇₄ O ₂₁	986.472 3	985.467 8	3.35	[10]
9*	甘草酸	五环三萜类皂苷	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	822.403 8	821.396 2	0.24	
10	甘草皂苷 H ₂	五环三萜类皂苷	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	822.403 8	821.396 4	0.49	[19]
11	甘草酸同分异构体	五环三萜类皂苷	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	822.403 8	821.396 5	0.61	
12	甘草异黄酮 B或其同分异构体	异黄酮类	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	352.094 7	351.088 4	4.27	[20]
13	甘草香豆素	香豆素类	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	368.126 0	367.119 4	3.27	[20]
14	粗毛甘草素 C	黄酮类	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	356.162 4	355.156 0	3.94	
15	甘草黄酮醇 A	异黄酮类	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	354.110 3	353.104 3	5.10	[21]
16	甘草苯并呋喃	新木脂素类	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	354.110 3	353.104 9	6.80	[21]
17	粗毛甘草素 D	黄酮类	C ₂₂ H ₂₆ O ₅	370.178 0	369.171 4	3.25	[22]
18	3',6'-二异戊二烯黄檀素	异黄酮类	C ₂₅ H ₂₈ O ₆	424.188 6	423.182 0	2.84	
19	6,8-二异戊二烯基柚皮素	黄酮类	C ₂₅ H ₂₈ O ₅	408.193 7	407.184 9	- 2.46	
20	isoangustone A or isomer	异黄酮类	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	422.172 9	421.169 2	9.73	[23]

类成分降低程度减低。6,8-二异戊二烯基柚皮素在清炒甘草中最高，在炙甘草中最低，推测是由黄酮苷经过高温降解而来，这3个化合物在3组甘草之间的差异有统计学意义，因此可以初步推测为甘草饮片及其炮制品的潜在的质量标志性差异物。

总之，本研究采用UPLC-Q-TOF-MS^E技术结合UNIFI天然产物信息平台从甘草饮片及其炮制品中初步分析和推测出60个化合物，并阐述了部分化合物在质谱中的裂解规律，为后续学者研究提供皂苷和黄酮裂解规律参考。另外，研究初步推测了3个



注: *表示该化合物在3组甘草之间都有显著性差异。

图7 甘草饮片及其炮制差异性化合物 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

甘草饮片及其炮制品的潜在的质量标志物, 这可以作为甘草饮片、清炒甘草和炙甘草质量控制、药效学研究、临床使用剂量的参考。也能够作为下一步实验甘草饮片与甘草饮片炮制品在药物代谢动力学方向差异分析的前期基础。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:88-89.
- [2] 刘刚,吴燕,刘育辰,等. 乌拉尔甘草化学成分研究进展[J]. 中国现代中药,2021,23(11):2006-2016.
- [3] 唐廷猷. 中药炮制原理研究史初探(新中国部分)[J]. 中国现代中药,2017,19(11):1639-1642.
- [4] 陈佳,张权,杨蕊,等. 甘草药材及其炮制品炙甘草化学模式识别分析[J]. 药物分析杂志,2020,40(11):1963-1976.
- [5] 文旺,李莉,李德坤,等. 基于液质联用技术和植物代谢组学的甘草炮制品化学成分差异性分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(17):104-110.
- [6] 段伟萍,李缘媛,郑云枫,等. 基于LC-MS/MS法分析生、炙甘草中水溶性成分[J]. 中成药,2020,42(5):1237-1243.
- [7] 崔园园,周永峰,马艳芹,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS法分析生、炙甘草中化学成分的差异性[J]. 中国药房,2020,31(9):1049-1053.
- [8] 朱宝萌. 炼蜜炮制规律及其机理研究[D]. 济南:山东大学,2014.
- [9] 石立强. 经典名方“厚朴温中汤”组方饮片确定、化学成分分析及质量标准研究[D]. 长春:吉林大学,2020.
- [10] WANG S F, CHEN L L, LENG J, et al. Fragment ion diagnostic strategies for the comprehensive identification of chemical profile of Gui-Zhi-Tang by integrating high-resolution MS, multiple-stage MS and UV information[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 98: 22-35.
- [11] XU T T, YANG M, LI Y F, et al. An integrated exact mass spectrometric strategy for comprehensive and rapid characterization of phenolic compounds in licorice[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2013, 27 (21) : 2297-2309.
- [12] OTA M, XU F, LI Y L, et al. Comparison of chemical constituents among licorice, roasted licorice, and roasted licorice with honey[J]. J Nat Med, 2018, 72(1) : 80-95.
- [13] TAN G G, ZHU Z Y, ZHANG H, et al. Analysis of phenolic and triterpenoid compounds in licorice and rat plasma by high-performance liquid chromatography diode-array detection, time-of-flight mass spectrometry and quadrupole ion trap mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, 24(2):209-218.
- [14] YIN Q W, WANG P, ZHANG A H, et al. Ultra-performance LC-ESI/quadrupole-TOF MS for rapid analysis of chemical constituents of Shaoyao-Gancao Decoction[J]. J Sep Sci, 2013, 36(7) : 1238-1246.
- [15] FARAG M A, PORZEL A, WESSJOHANN L A. 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: 60-72.
- [16] TAO W W, DUAN J N, GUO J M, et al. Simultaneous determination of triterpenoid saponins in dog plasma by a validated UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after administration of total saponin of licorice[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 75: 248-255.
- [17] WANG Y Y, HE S, CHENG X C, et al. UPLC-Q-TOF-MS/MS fingerprinting of traditional Chinese formula SiJunZiTang[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 80: 24-33.
- [18] 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.
- [19] WANG S F, WANG H Q, LIU Y N, et al. Rapid discovery and identification of anti-inflammatory constituents from traditional Chinese medicine formula by activity index, LC-MS, and NMR[J]. Sci Rep, 2016, 6:31000.
- [20] 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,2004,32(2):174-178.
- [21] 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(45):8181-8191.
- [22] ALI Z, HAWWAL M, AVULA B, et al. Phenoxychromone and 4-hydroxyisoflavans from the roots of *Glycyrrhiza uralensis*[J]. Nat Prod Res, 2022, 36: 3850-3857.
- [23] LEE Y S, KIM S H, KIM J K, et al. Rapid identification and preparative isolation of antioxidant components in licorice[J]. J Sep Sci, 2010, 33(4/5):664-671.

(收稿日期: 2022-04-25 编辑: 吴美琪)