

HPLC-ESI-MS/MS 分析 黄芪蜜炙前后活性成分差异

吴红根¹, 钟淑梅², 彭璐², 吴卫刚², 李正¹, 李文龙^{1,3}

(1. 天津中医药大学中药制药工程学院, 天津 300193;

2. 九信(武汉)中药研究院有限公司, 湖北 武汉 430050; 3. 浙江大学药学院, 浙江 杭州 310058)

摘要:建立了 HPLC-ESI-MS/MS 联用技术分析生黄芪与炙黄芪的成分, 并比较两者成分差异。采用 Agilent ZORBAX SB-C18 色谱柱(4.6 mm×250 mm×5 μm), 以 0.1% 甲酸乙腈溶液-0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速 1 mL/min, 检测波长 203 nm, 柱温 25 °C; 使用 ESI 离子源, 分别在正、负离子模式下进行全扫描和二级扫描, 质量扫描范围 m/z 100~2 000。采用该方法鉴定了生黄芪与炙黄芪中的 62 种成分, 并对黄芪蜜炙前后的成分进行了比较, 实验结果可为黄芪炮制方法的选择提供参考依据。

关键词:黄芪; 蜜炙; HPLC-ESI-MS/MS; 活性成分; 鉴定

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2020)06-0637-11

doi: 10.7538/zpxb.2019.0121

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



HPLC-ESI-MS/MS Analysis of Active Component Differences in Astragalus before and after Honey-Fried

WU Hong-gen¹, ZHONG Shu-mei², PENG Lu², WU Wei-gang²,
LI Zheng¹, LI Wen-long^{1,3}

(1. College of Pharmaceutical Engineering of Traditional Chinese Medicine,
Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Joinative (Wuhan) Institute of Traditional Chinese Medicine Co., Ltd, Wuhan 430050, China;

3. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Honey-fried is one of the traditional Chinese medicine processing methods, which is processed with honey as an excipient. Honey can be used to make the traditional Chinese medicine more effective and milder. After the traditional Chinese medicine Astragalus was honey-fried, the effect of invigorating spleen-stomach and replenishing qi is stronger than that of raw products. Because of the various of active ingredients in

收稿日期: 2019-09-02; 修回日期: 2020-04-03

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1707000); 浙江省自然科学基金(LY17H280001)资助

作者简介: 吴红根(1995—), 女(汉族), 安徽安庆人, 硕士研究生, 中药学专业。E-mail: 1518579842@qq.com

通信作者: 李文龙(1980—), 男(汉族), 安徽太和人, 副研究员, 从事中药质量控制和制药过程分析技术研究。

E-mail: wshlwl@tjutc.edu.cn

Astragalus, it is necessary to figure out which ingredients changed after the honey-fried. In order to solve this problem, HPLC-ESI-MS/MS technology was used to analyze the effective components in raw Astragalus membranaceus and Astragalus membranaceus, besides, the difference between them was compared. Agilent ZORBAX SB-C18(4.6 mm×250 mm×5 μm) chromatographic column was adopted, and 0.1% formic acid-0.1% acetonitrile-formic acid was used as mobile phase with a flow rate of 1 mL/min through gradient elution. Detection wavelength was set at 203 nm and the column temperature was kept at 25 °C. The ESI ion source was used to collect data at positive and negative ion modes, and performed a full scan and a secondary scan. The scanning range was m/z 100-2 000. A total of 62 main signal peaks of radix astragali and astragali fried with honey were identified by HPLC-ESI-MS/MS, and a comprehensive analysis was performed on these effective components before and after honey-fried. This method can provide a reference for the selection of astragalus processing methods.

Key words: Radix astragali; honey-fried; HPLC-ESI-MS/MS; active component; identification

黄芪(Radix astragali)为豆科植物蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao)或膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.)的干燥根,是中医临床常用的传统中药之一,其主要成分包括黄酮、皂苷、多糖、氨基酸、有机酸、生物碱等^[1],具有免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、保护心脑血管等作用^[2]。黄芪的药用历史悠久,经炮制后方可入药,其炮制方法包括去芦、切制、蒸制、炒制、盐炙、酒炙、蜜炙、醋炙、米制等,其中蜜炙、炒制、酒炙、盐炙^[3]为常用方法。经炮制的药材可提高药效、降低毒性,便于调剂、利于贮藏,可保障临床用药安全有效,但是不同的炮制方法会对其有效成分产生影响。

中药最大的特点在于其化学成分多样且复杂,这不仅是其发挥疗效的物质基础,也是质量评价的重点与难点^[4]。目前对黄芪炮制前后成分变化的研究主要针对黄芪中的某一种成分,而同时研究多种成分变化的报道则较少^[5-7]。虽然以代表性成分为评价指标可快速、简便地对黄芪质量进行分析,但准确把握黄芪中各类成分的变化才能更全面地反映炮制前后的药效物质差异,有利于解释其生物活性与临床效用。

本研究以蜜炙前后的黄芪为研究对象,采用优化后的 HPLC 法对黄芪中的成分进行有效分离,利用 HPLC-MS/MS 联用技术获取生黄芪与炙黄芪样品的质谱信息,将其与文献报道的黄芪

中化学成分精确相对分子质量信息与二级质谱裂解信息进行比对,对生黄芪与炙黄芪中的主要信号峰进行鉴定,从而对比二者的成分。

1 实验部分

1.1 仪器

LC5090 高效液相色谱仪:福立仪器公司产品;TripleTOF 5600 高分辨串联质谱系统:美国 AB SCIEX 公司产品。

1.2 实验材料

生黄芪(20170202)及炙黄芪饮片(20170301):山西振东道地药材开发有限公司产品,原料来自同一批黄芪药材;甲醇、乙腈:均为色谱纯,德国默克公司产品;乙醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司产品;甲酸:色谱纯,美国恩科化学公司产品;实验用水:超纯水,由密理博超纯水仪制备。

1.3 样品溶液制备

取适量样品,由高速粉碎机制成粉末,精密称取 5 g 粉末,置于圆底烧瓶中,加入 125 mL 无水乙醇,于 100 °C 水浴回流提取 1 h 后过滤,药渣用 125 mL 无水乙醇回流提取 2 次,每次提取 1 h。将 3 次提取所得滤液全部合并,减压去除乙醇,然后加入甲醇使之完全溶解,将溶液转移至 25 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得样品溶液。溶液在进样前均用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C18 柱(4.6 mm×250 mm×5 μm); 流动相: A 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液, B 为含 0.1% 甲酸的水溶液; 梯度洗脱程序为 0~8 min (5% A), 8~15 min (5%~10% A), 15~30 min (10%~20% A), 30~70 min (20%~40% A), 70~80 min (40%~70% A), 80~100 min (70%~90% A), 100~110 min (90%~95% A); 进样量 10 μL; 流速 1 mL/min; 柱温 25 °C; 检测波长 203 nm。

1.4.2 质谱条件 电喷雾电离(ESI), 正离子模式(喷雾电压 4.5 kV), 负离子模式(喷雾电压 3.5 kV); 鞘气压力 2.07×10^5 Pa; 辅助气流速 3.33 L/min; 离子传输管温度 300 °C; 全扫描和二级扫描模式; 质量扫描范围 m/z 100~2 000。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱条件优化

在高效液相色谱中, 选择 203 nm 作为检测波长, 该条件下大部分物质都有紫外吸收。为了将色谱图上绝大部分的信号峰尽可能地分离, 在进行 HPLC 实验时, 分别考察了乙腈-水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液、0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液这 3 种流动相。结果表明, 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液作为流动相, 得到的色谱图基线平稳, 且能保证大部分信号峰得到较好分离, 故本实验选择此溶液作为流动相。

2.2 高效液相色谱-质谱联用结果分析

在正、负离子模式下, 将制备好的生黄芪与炙黄芪样品溶液进行全扫描, 发现样品溶液在负离子模式下的灵敏度较高。蜜炙前后两种溶液的负离子模式基峰图示于图 1。

在全扫描质谱图中, 大部分信号峰在负离子和正离子模式下都分别产生了 $[M-H]^-$ 和 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 同时还产生了 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 、 $[M+Cl]^-$ 、 $[M+FA-H]^-$ 等加和离子峰。根据成分的保留时间、质谱图、精确分子质量及经精确质量推断得到的分子式, 与文献数据进行比较分析, 得到了 60 多种主要成分, 且均为生黄芪与炙黄芪的共有峰。另外, 在主要信号峰中筛选出非包埋峰与非重

叠峰, 比较其在生黄芪与炙黄芪的峰面积, 发现 6 种成分的含量发生了明显变化, 结果列于附表 1。(请登录《质谱学报》官网 <http://www.jcmss.com.cn> 下载)

2.2.1 黄酮类及异黄酮类成分分析 黄酮是一种常见的具有活性的天然产物, 也是中药黄芪中重要的活性成分。由于黄酮类成分经常带有糖苷、甲基化苯酚等基团, 所以其二级质谱中常会出现损失 1 个葡萄糖残基(162 u)、1 个甲基($-CH_3$, 15 u)等碎片离子。经过分析鉴定, 本实验共得到了 18 种黄酮及异黄酮类成分, 其对应信号峰的解析如下。

在负离子模式下, 25 号峰的质谱图中存在 m/z 359.098 3 $[M-H]^-$ 和 m/z 395.074 2 $[M+Cl]^-$ 离子峰, 示于图 2, 根据 $[M-H]^-$ 峰计算得其分子式为 $C_{18}H_{16}O_8$ 。其二级质谱存在 m/z 182.022 2、167.000 4、138.031 8、123.007 9、108.024 2 碎片离子峰, 各峰间质量数差值为 15, 推测存在多个甲基。经查阅文献, 初步推断该化合物为 5, 2', 5'-三羟基-6, 7, 8-三甲氧基黄酮^[4]。

在负离子模式下, 26 号峰的质谱图示于图 3, 存在 m/z 623.161 6 $[M-H]^-$ 碎片离子。计算得分子式为 $C_{28}H_{32}O_{16}$, 初步推测该化合物为鼠李柠檬素-3, 4-二葡萄糖苷。

在负离子模式下, 29 号峰的质谱图中存在 m/z 461.108 4 $[M-H]^-$ 及 m/z 497.086 7 $[M+Cl]^-$ 离子峰, 在正离子模式下存在 m/z 463.123 7 $[M+H]^+$ 峰, 可计算得分子式为 $C_{22}H_{22}O_{11}$ 。其二级质谱存在 m/z 299.053 3 $[M-H-162]^-$ 碎片离子峰, 推测该成分为红车轴草素-7-O-β-D-葡萄糖苷。

在负离子模式下, 30、31 号峰的质谱图中存在 m/z 445.115 0 $[M-H]^-$ 、 m/z 481.090 5 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 491.119 0 $[M+FA-H]^-$ 离子峰, 计算得分子式为 $C_{22}H_{22}O_{10}$, 其二级质谱存在 m/z 283.062 7 $[M-H-162]^-$ 碎片离子峰。经分析, 该化合物为毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷。

在负离子模式下, 32 号峰的质谱图中存在 m/z 609.146 7 $[M-H]^-$ 离子峰, 其分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$, 二级质谱存在 m/z 227.033 2、211.037 3、178.998 1 等碎片离子峰, 与文献^[8]描述一致, 初步鉴定为芦丁。

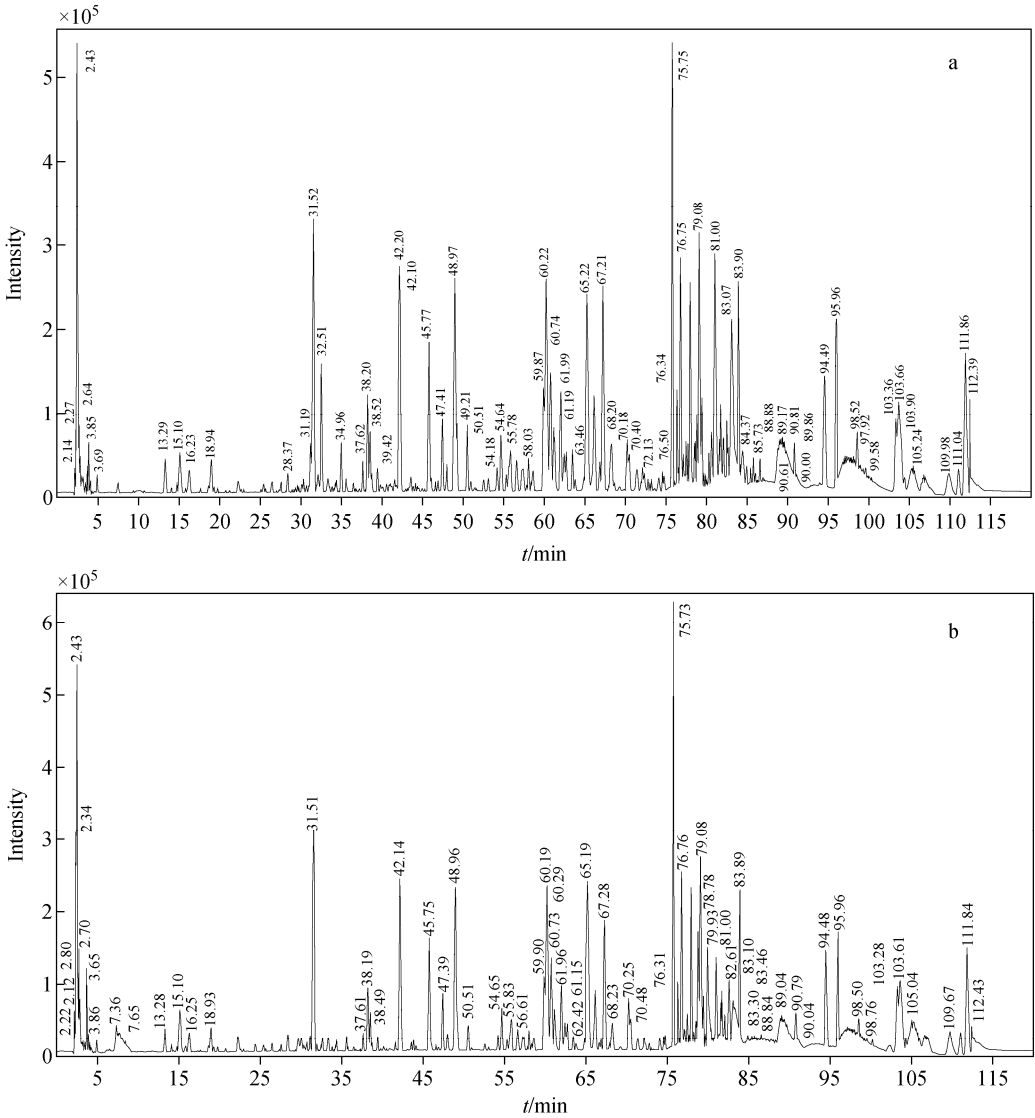


图 1 生黄芪(a)和炙黄芪(b)样品溶液的负离子模式基峰图
Fig. 1 Base peak diagram of radix Astragali sample (a) and Astragali fried with honey sample (b) in negative ion mode

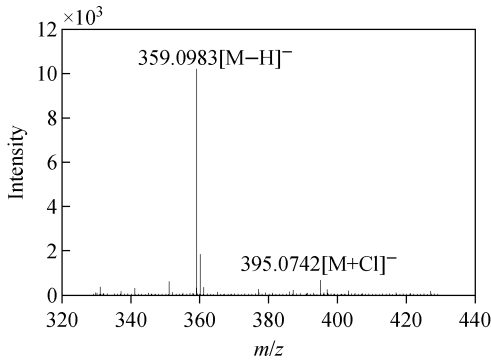


图 2 负离子模式下,25 号峰的质谱图
Fig. 2 Mass spectrum of peak 25 at negative ion mode

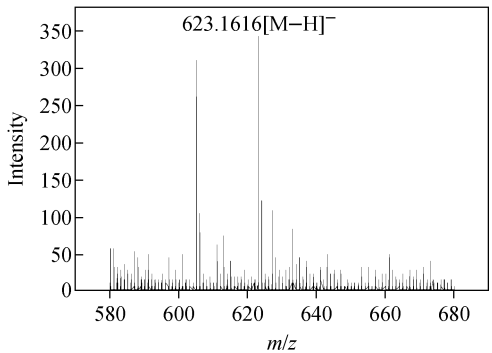


图 3 负离子模式下,26 号峰的质谱图
Fig. 3 Mass spectrum of peak 26 at negative ion mode

在负离子模式下, 33 号峰的质谱图中存在 m/z 431.097 2 $[M-H]^-$ 、 m/z 467.075 0 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 477.103 9 $[M+FA-H]^-$ 离子峰, 经计算得分子式为 $C_{21}H_{20}O_{10}$, 其二级质谱产生 m/z 269.044 6 碎片离子峰, 是损失 1 分子糖苷而产生的 $[M-H-162]^-$, 推测为芹菜素-7- $O\beta$ -D-葡萄糖苷。

在负离子模式下, 34 号峰的质谱图中存在 m/z 625.214 1 $[M-H]^-$ 、 m/z 661.191 3 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 671.219 7 $[M+FA-H]^-$ 离子峰, 计算得分子式为 $C_{29}H_{38}O_{15}$, 其二级质谱存在 m/z 301.109 1 碎片离子峰, 为连续丢失 2 分子糖苷而产生的 $[M-H-162-162]^-$, 推测为 7, 2'-二羟基-3', 4'-二甲氧基异黄烷-7, 2'-二葡萄糖苷。

在负离子模式下, 37 号峰的质谱图中存在 m/z 429.118 3 $[M-H]^-$ 、 m/z 465.095 5 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 475.124 5 $[M+FA-H]^-$ 离子峰, 计算得分子式为 $C_{22}H_{22}O_9$, 其二级质谱存在 m/z 267.065 8 $[M-H-162]^-$ 碎片离子峰, 推测为芒柄花苷。经比较发现, 37 号峰在生黄芪中的峰面积 ($4.372 3 \times 10^6$) 明显大于炙黄芪 ($3.610 7 \times 10^6$), 由此可见, 经过蜜炙后, 黄芪中芒柄花苷的含量下降。

在负离子模式下, 38 号峰的质谱图中存在 m/z 523.100 6 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 533.130 2 $[M+FA-H]^-$ 离子峰, 示于图 4, 计算得分子式为 $C_{25}H_{26}O_{13}$, 质量数比 30 号峰增加了 42 u (C_2H_2O)。且其二级质谱同样存在 m/z 283.061 1 $[M-H-42-162]^-$ 碎片离子峰, 呈现出的碎片裂解规律与 30 号峰类似, 可推断其为 6'- O -乙酰基芒柄花苷。

基毛蕊异黄酮苷。

在负离子模式下, 39 号峰的质谱图中存在 m/z 461.147 0 $[M-H]^-$ 、 m/z 497.121 8 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 507.150 6 $[M+FA-H]^-$ 离子峰, 计算得分子式为 $C_{23}H_{26}O_{10}$, 其二级质谱中存在 m/z 299.091 0 $[M-H-162]^-$ 、 m/z 284.067 5 $[M-H-162-CH_3]^-$ 、 m/z 269.044 4 $[M-H-162-CH_3-CH_3]^-$ 碎片离子峰。经文献比对, 鉴定其为 9, 10-二甲氧基紫檀烷-3- $O\beta$ -D-葡萄糖苷^[9]。比较发现, 39 号峰在生黄芪中的峰面积 ($2.545 1 \times 10^6$) 明显大于炙黄芪 ($1.956 6 \times 10^6$), 说明该成分的含量在经过蜜炙后有所下降。

在负离子模式下, 40、41 号峰的质谱图中存在 m/z 463.160 6 $[M-H]^-$ 、 m/z 499.137 7 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 509.166 7 $[M+FA-H]^-$ 离子峰, 计算得分子式为 $C_{23}H_{28}O_{10}$, 质量数比 34 号峰减少了 162 u, 推测是丢失 1 分子葡萄糖残基所致。其二级质谱存在 m/z 301.108 4、286.084 8、271.061 6 等碎片离子峰, 呈现出的裂解规律与 34 号峰相似, 但由于缺乏进一步的实验验证, 无法判断两者是否互为同分异构体, 暂且将其鉴定为 7, 2'-羟基-3', 4'-二甲氧基异黄烷-7- $O\beta$ -D-葡萄糖苷。

在负离子模式下, 42 号峰的质谱图中存在 m/z 283.061 3 离子峰, 在正离子模式下, 存在 m/z 285.076 4 离子峰, 计算得分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$, 质量数比 30 号峰减少了 162 u, 且其二级质谱呈现的裂解规律与 30 号峰相似, 可推测为毛蕊异黄酮。经比较发现, 42 号峰在生黄芪中的峰面积 ($3.800 6 \times 10^6$) 小于炙黄芪中 ($4.127 6 \times 10^6$), 说明经过蜜炙后, 毛蕊异黄酮的含量上升。

在负离子模式下, 43 号峰的质谱图示于图 5, 存在 m/z 507.107 3 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 517.135 7 $[M+FA-H]^-$ 离子峰, 计算得分子式为 $C_{24}H_{24}O_{10}$, 质量数比 37 号峰增加了 42 u (C_2H_2O)。其二级质谱存在 m/z 267.065 9 特征离子峰, 推测为 $[M-H-42-162]^-$ 峰, 呈现出的裂解规律与 37 号峰相似, 推测该成分为 6'- O -乙酰基芒柄花苷。

在负离子模式下, 46、48 号峰的质谱图分别示于图 6 和图 7, 存在 m/z 299.056 5 和 m/z

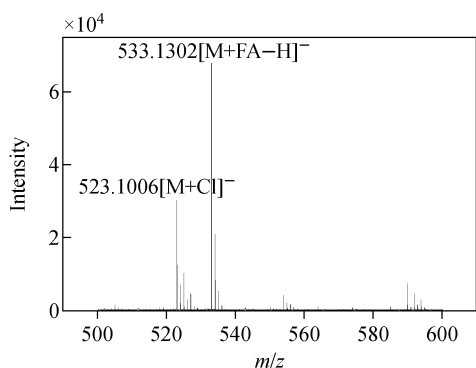


图 4 负离子模式下, 38 号峰的质谱图

Fig. 4 Mass spectrum of peak 38 at negative ion mode

301.071 4 离子峰, 计算得分子式为 $C_{16}H_{12}O_6$, 其二级质谱存在 m/z 284.029 7、 m/z 269.204 4 等碎片离子峰。与文献比较后, 可以初步将其鉴定为三羟基甲氧基异黄酮或鼠李柠檬素(三羟基甲氧基黄酮)^[4,9]。因为缺少标准对照品, 还需要开展核磁共振等相关实验对其结构进一步确证。

在负离子模式下, 52 号峰存在 m/z 267.066 8 离子峰, 在正离子模式下, 存在 m/z 269.081 4 离子峰, 计算得分子式为 $C_{16}H_{12}O_4$, 质量数比 37 号峰减少了 162 u, 是丢失 1 分子糖苷所导致的。负离子模式下, 其二级质谱图呈现的碎片裂解规律与 37 号峰类似, 据此可将其鉴定为芒柄花素。

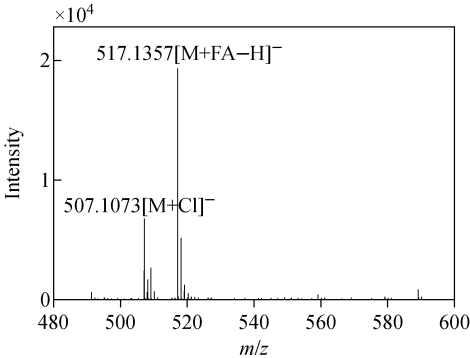


图 5 负离子模式下, 43 号峰的质谱图
Fig. 5 Mass spectrum of peak 43 at negative ion mode

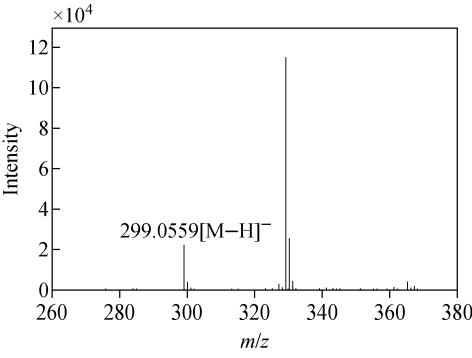


图 7 负离子模式下, 48 号峰的质谱图
Fig. 7 Mass spectrum of peak 48 at negative ion mode

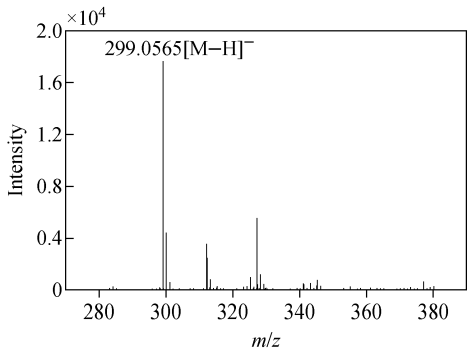


图 6 负离子模式下, 46 号峰的质谱图
Fig. 6 Mass spectrum of peak 46 at negative ion mode

在正、负离子模式下, 54 号峰的质谱图示于图 8, 存在 m/z 301.107 8、 m/z 299.092 1 离子峰。计算得分子式为 $C_{17}H_{16}O_5$, 在负离子模式下, 二级质谱存在 m/z 269.043 5、226.024 8 等碎片离子峰, 参阅文献后, 将其鉴定为 (6 α R, 11 α R)-10-羟基-3,9-二甲氧基紫檀烷^[4]。

在正、负离子模式下, 55 号峰的质谱图示于图 9, 在负离子模式下, 存在 m/z 301.108 4 离子峰, 在正离子模式下, 存在 m/z 303.123 6 离子峰。计算得分子式为 $C_{17}H_{18}O_5$, 在负离子模式下, 其二级质谱产生的碎片离子与文献^[4,10]

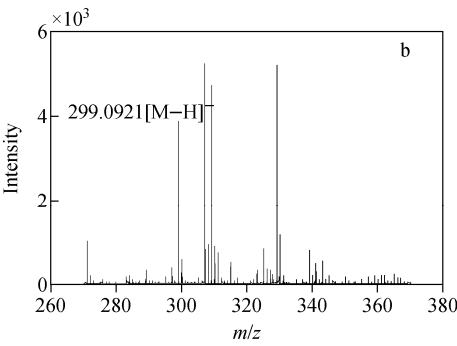
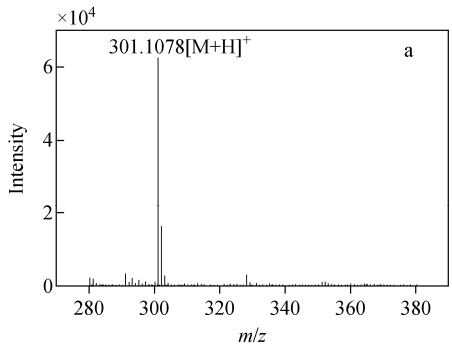


图 8 正(a)、负(b)离子模式下, 54 号峰的质谱图

Fig. 8 Mass spectra of peak 54 at positive (a) and negative (b) ion modes

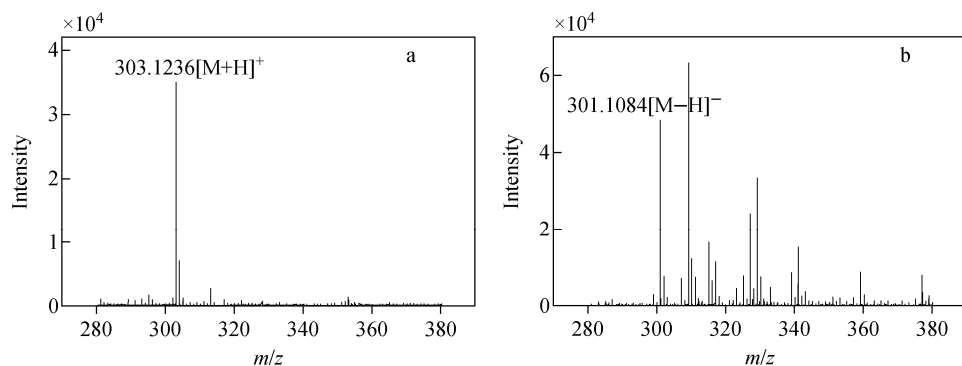


图9 正(a)、负(b)离子模式下,55号峰的质谱图

Fig. 9 Mass spectra of peak 55 at positive (a) and negative (b) ion modes

结果相似,初步推测该化合物为8,2'-二羟基-7,4'-二甲氧基异黄烷。

2.2.2 皂苷类成分的鉴定 皂苷是黄芪中一类主要的活性成分,大多以四环三萜为母核结构,并连有不同的糖。由于连接的糖类成分不同,在二级质谱中常会出现脱去不同糖基后的碎片离子及皂苷的苷元碎片离子。此外,由于皂苷的糖链上常常连接有一个或多个乙酰基^[11],因此二级质谱中也会出现丢失1个或多个乙酰基(42 u)的碎片离子峰。经分析,共鉴定得到13种皂苷类成分,对应的信号峰解析如下。

在负离子模式下,44、45号峰的质谱图中都存在 m/z 945.510 6 $[M-H]^-$ 、 m/z 981.488 3 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 991.516 7 $[M+FA-H]^-$ 离子峰,二者可能互为同分异构体。计算得分子式为 $C_{47}H_{78}O_{19}$,其二级质谱产生了 m/z 783.466 0 $[M-H-162]^-$ 及 m/z 765.455 3 $[M-H-180]^-$ 碎片离子峰,推测前者是丢失1分子葡萄糖残基而得,后者是丢失1分子葡萄糖而得。据此推测该化合物为黄芪皂苷V/VI/Ⅶ。但由于缺少标准对照品,还需开展核磁共振等相关实验对其进一步区分。

在负离子模式下,47号峰的质谱图中存在 m/z 687.390 7 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 697.419 2 $[M+FA-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_{36}H_{60}O_{10}$ 。与文献^[4]对比后,初步鉴定该化合物为膜荚黄芪茎叶皂苷C^[4]。

在负离子模式下,49号峰的质谱图中存在 m/z 819.435 0 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 829.463 4 $[M+FA-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_{41}H_{68}O_{14}$,其二级质谱存在 m/z 651.421 5、621.412 9、

489.358 9 碎片离子峰,分别是失去1分子木糖残基、1分子葡萄糖残基、1分子葡萄糖残基和1分子木糖残基产生的 $[M-H-132]^-$ 、 $[M-H-162]^-$ 、 $[M-H-132-162]^-$ 离子,通过参考文献^[12-13]并结合其保留时间,初步鉴定该化合物为黄芪皂苷Ⅲ。

在负离子模式下,50号峰存在 m/z 861.445 5 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 871.474 3 $[M+FA-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_{43}H_{70}O_{15}$,其二级质谱产生了 m/z 783.465 9 $[M-H-42]^-$ 、651.410 8 $[M-H-42-132]^-$ 、621.415 4 $[M-H-42-162]^-$ 、603.406 5 $[M-H-42-180]^-$ 、489.360 0 $[M-H-42-132-162]^-$ 碎片离子峰,据此鉴定该化合物为黄芪皂苷Ⅱ。

在负离子模式下,51号峰的质谱图中存在 m/z 783.457 6 $[M-H]^-$ 、 m/z 819.434 7 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 829.463 5 $[M+FA-H]^-$ 离子峰,推测该组分是49号峰的同分异构体,其二级质谱裂解规律与49号峰类似,根据保留时间的不同并结合文献^[12]对比,推断其为黄芪甲苷。

在负离子模式下,53号峰的质谱图中存在 m/z 861.445 8 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 871.474 7 $[M+FA-H]^-$ 离子峰,是50号峰的同分异构体,其二级质谱裂解规律与50号峰类似。与文献^[14]对比后,根据保留时间,初步推测该化合物为异黄芪皂苷Ⅱ。经比较发现,生黄芪中53号峰的峰面积($3.513 3 \times 10^6$)明显大于炙黄芪($2.495 0 \times 10^6$),说明经过蜜炙后,异黄芪皂苷Ⅱ含量下降。

在负离子模式下,56号峰的质谱图中存

在 m/z 911.507 6 $[M-H]^-$ 、 m/z 947.484 0 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 957.513 0 $[M+FA-H]^-$ 离子峰。计算得分子式为 $C_{47}H_{76}O_{17}$ ，其二级质谱产生了 m/z 615.396 0、457.372 5 碎片离子，与文献^[12] 比对后，推测其为黄芪皂苷Ⅷ。

在负离子模式下，57 号峰的质谱图中存在 m/z 941.516 7 $[M-H]^-$ 、 m/z 977.493 8 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 987.522 9 $[M+FA-H]^-$ 离子峰。计算得分子式为 $C_{48}H_{78}O_{18}$ ，质量数比 56 号峰增加了 30 u，且其二级质谱也产生了 m/z 615.398 5、457.371 5 碎片离子峰。据此推测其母核与大豆皂苷 I 相同，与文献^[12] 对比后，将其鉴定为黄芪皂苷Ⅷ。

在负离子模式下，58 号峰的质谱图中存在 m/z 861.446 0 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 871.474 3 $[M+FA-H]^-$ 离子峰，为 50、53 号峰的同分异构体，其二级质谱裂解规律与前两者相似，根据保留时间推测该化合物为环黄芪苷Ⅱ。

在负离子模式下，59、60 号峰的质谱图中均存在 m/z 903.457 8 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 913.487 5 $[M+FA-H]^-$ 离子峰，二者互为同分异构体。计算得分子式为 $C_{45}H_{72}O_{16}$ ，其二级质谱存在 m/z 825.480 3 $[M-H-42]^-$ 、 m/z 783.472 1 $[M-H-42-42]^-$ 、 m/z 651.415 4 $[M-H-42-42-132]^-$ 、 m/z 489.361 9 $[M-H-42-42-132-162]^-$ 碎片离子峰， m/z 651.415 4 特征峰为失去 1 分子二乙酰基木糖残基生成的， m/z 489.361 9 是在前者的基础上再失去 1 分子葡萄糖残基生成的。对比文献^[12,15] 数据后，根据保留时间的不同，判断 59、60 号峰分别为黄芪皂苷 I 与异黄芪皂苷 I。经比较发现，生黄芪中 59 号峰的峰面积 ($5.302\ 8 \times 10^6$) 明显大于炙黄芪 ($4.480\ 1 \times 10^6$)，说明经蜜炙后，黄芪皂苷 I 含量下降。

在负离子模式下，61 号峰的质谱图中存在 m/z 909.490 8 $[M-H]^-$ 、 m/z 945.468 5 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 955.496 0 $[M+FA-H]^-$ 离子峰。计算得分子式为 $C_{47}H_{74}O_{17}$ ，质量数比 59 号峰增加了 42 u，推测该化合物的化学结构比 59 号峰增加了 1 个乙酰基，且其二级质谱裂解规律与 59、60 号峰类似，故推测该化合物为乙酰黄芪皂苷 I。

2.2.3 氨基酸类成分的鉴定 氨基酸是黄芪

中典型的水溶性成分，由于其化学结构中存在氨基与羧基，因此二级谱图中通常会存在失去 1 分子 NH_3 (17 u)、1 分子 H_2O (18 u)、1 分子 CO_2 (44 u) 和 1 分子 $HCOOH$ (46 u) 的现象。但根据提取溶剂的不同，提取物中各成分的含量变化较大。由于此方法使用纯乙醇作为提取溶剂，氨基酸的含量明显降低，因此二级质谱碎片离子较少，只能凭借准分子离子峰及保留时间做简单鉴定，共鉴定得到 10 种氨基酸类成分。

在正、负离子模式下，1 号峰的质谱图中存在 m/z 175.119 1 $[M+H]^+$ 和 m/z 173.105 9 $[M-H]^-$ 离子峰，计算得分子式为 $C_6H_{14}N_4O_2$ ，初步鉴定该化合物为精氨酸。

在正、负离子模式下，2 号峰的质谱图中存在 m/z 133.061 0 $[M+H]^+$ 和 m/z 131.048 2 $[M-H]^-$ 离子峰，计算得分子式为 $C_4H_8N_2O_3$ ，初步鉴定该化合物为天门冬酰胺。

在正、负离子模式下，3 号峰的质谱图中存在 m/z 147.076 0 $[M+H]^+$ 和 m/z 145.063 3 $[M-H]^-$ 离子峰，计算得分子式为 $C_6H_{14}N_2O_2$ ，初步鉴定该化合物为赖氨酸。

在正、负离子模式下，4 号峰的质谱图中存在 m/z 120.065 7 $[M+H]^+$ 和 m/z 118.053 8 $[M-H]^-$ 离子峰，计算得分子式为 $C_4H_9NO_3$ ，初步鉴定该化合物为苏氨酸。

在正、负离子模式下，10 号峰的质谱图中存在 m/z 276.103 7 $[M+H]^+$ 和 m/z 274.092 7 $[M-H]^-$ 离子峰，计算得分子式为 $C_{10}H_{17}N_3O_6$ ，参阅文献^[12] 后初步鉴定该化合物为 Glu-Gln。

在正、负离子模式下，14 号峰的质谱图中存在 m/z 130.050 5 $[M+H]^+$ 和 m/z 128.037 6 $[M-H]^-$ 离子峰，计算得分子式为 $C_5H_7NO_3$ ，且正离子模式下其二级质谱存在 m/z 84.046 6、56.053 2 特征碎片离子，前者是由于失去 1 分子甲酸而生成的 $[M+H-46]^+$ 峰，与文献^[12] 报道一致，故初步鉴定该化合物为 L-焦谷氨酸。

在正、负离子模式下，16、19 号峰的质谱图中均存在 m/z 132.102 4 $[M+H]^+$ 和 m/z 130.088 7 $[M-H]^-$ 离子峰，两者可能互为同分异构体。计算得分子式为 $C_6H_{13}NO_2$ ，且正离子模式下二者的二级质谱均存在 m/z 86.096 3、56.053 2 特征碎片离子，前者是失去 1 分子甲酸得到的 $[M+H-46]^+$ 峰，与文献^[12] 报道一

致。但由于缺乏标准品,无法对二者进行进一步区分,暂且将其鉴定为亮氨酸、异亮氨酸。

在正、负离子模式下,17号峰的质谱图中存在 m/z 182.083 7 $[M+H]^+$ 和 m/z 180.067 4 $[M-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_9H_{11}NO_3$,初步鉴定该化合物为酪氨酸。

在正、负离子模式下,21号峰的质谱图中存在 m/z 166.086 4 $[M+H]^+$ 和 m/z 164.072 6 $[M-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_9H_{11}NO_2$,且正离子模式下其二级质谱存在 m/z 120.081 2、103.055 2 特征碎片离子,分别是损失 1 分子甲酸、1 分子甲酸及 1 分子氮得到的 $[M+H-46]^+$ 、 $[M+H-46-17]^+$ 峰,与文献^[12]报道一致,初步鉴定该化合物为苯丙氨酸。

2.2.4 生物碱类成分的鉴定 在正、负离子模式下,5号峰的质谱图中存在 m/z 104.107 8 $[M+H]^+$ 和 m/z 102.058 5 $[M-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_5H_{13}NO$,正离子模式下其二级质谱存在 m/z 60.089 1、58.069 0 碎片离子峰,与文献^[12]报道一致,初步鉴定该化合物为胆碱。

在正、负离子模式下,12号峰的质谱图中存在 m/z 116.074 1 $[M-H]^-$ 和 m/z 118.087 4 $[M+H]^+$ 离子峰,计算得分子式为 $C_5H_{11}NO_2$,初步鉴定为甜菜碱。

2.2.5 有机酸类成分的鉴定 在正、负离子模式下,23号峰的质谱图中存在 m/z 199.086 7 $[M+H]^+$ 和 m/z 197.045 0 $[M-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_9H_{10}O_5$,初步鉴定该化合物为丁香酸。

在正、负离子模式下,27号峰的质谱图中存在 m/z 195.065 9 $[M+H]^+$ 和 m/z 193.050 7 $[M-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_{10}H_{10}O_4$,初步鉴定该化合物为阿魏酸。

在正、负离子模式下,35号峰的质谱图中存在 m/z 169.088 0 $[M-H_2O-H]^-$ 、 m/z 187.098 4 $[M-H]^-$ 、 m/z 375.203 0 $[2M-H]^-$ 离子峰,根据准分子离子峰计算得其分子式为 $C_9H_{16}O_4$,初步鉴定该化合物为杜鹃花酸。经比较发现,在生黄芪谱图中 35 号峰的峰面积 ($1.024 4 \times 10^6$) 明显大于炙黄芪 ($6.826 4 \times 10^6$),说明杜鹃花酸的含量在经过蜜炙后有所下降。

2.2.6 糖类成分的鉴定 糖类是黄芪中一类

主要的有效成分。现代药理学证明,黄芪中的多糖具有增强免疫力的药理活性,由于其毒性较低,被广泛应用于临床治疗。本实验共鉴定出 5 种糖类成分。

在负离子模式下,6号峰的质谱图中存在 m/z 503.161 0 $[M-H]^-$ 、 m/z 539.137 6 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 549.166 4 $[M+FA-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_{18}H_{32}O_{16}$,其二级质谱中存在 m/z 161.045 9 碎片离子峰,推测是失去 2 分子糖基及 1 分子水得到的 $[M-H-162-162-18]^-$ 峰,故鉴定该化合物为棉子糖。

在负离子模式下,7号峰存在 m/z 341.108 6 $[M-H]^-$ 、 m/z 377.084 5 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 387.113 7 $[M+FA-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_{12}H_{22}O_{11}$,其二级质谱存在 m/z 179.056 8、89.025 2 碎片离子,前者为失去 1 分子糖基而形成的 $[M-H-162]^-$ 峰,将其鉴定为蔗糖。

在负离子模式下,8号峰的质谱图中存在 m/z 665.215 3 $[M-H]^-$ 、 m/z 701.191 9 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 711.219 9 $[M+FA-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_{24}H_{42}O_{21}$,其二级质谱存在 m/z 485.150 9、341.108 0、179.055 3 特征碎片离子峰,推测分别是失去 1 分子糖基及 1 分子水、2 分子糖基、3 分子糖基而形成的 $[M-H-162-18]^-$ 、 $[M-H-162-162]^-$ 、 $[M-H-162-162-162]^-$,据此将其鉴定为水苏糖。

在负离子模式下,9号峰的质谱图中存在 m/z 179.056 4 $[M-H]^-$ 离子峰,计算得分子式是 $C_6H_{12}O_6$,属于己糖。但由于未使用果糖及葡萄糖的标准对照品,仍需核磁技术进一步确定其结构。

在负离子模式下,11号峰的质谱图中存在 m/z 827.266 3 $[M-H]^-$ 、 m/z 863.245 7 $[M+Cl]^-$ 、 m/z 873.272 9 $[M+FA-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_{30}H_{52}O_{26}$,与文献^[12]对照后,将其初步鉴定为毛蕊花糖。

2.2.7 嘌呤、嘧啶及其核苷类成分的鉴定 在正、负离子模式下,13号峰的质谱图中分别存在 m/z 113.034 8 $[M+H]^+$ 和 m/z 111.011 4 $[M-H]^-$ 离子峰,计算得分子式为 $C_4H_4N_2O_2$,初步推测该化合物为尿嘧啶。

在正、负离子模式下,15号峰的质谱图中分别存在 m/z 136.062 1 $[M+H]^+$ 和 m/z

134.049 0[M-H]⁻ 离子峰,计算得分子式为 C₅H₅N₅,且正离子模式下二级质谱存在 m/z 119.035 8、92.025 7 特征碎片离子峰,两者分别是失去 1 分子氨、1 分子氮及 1 分子氰化氢而生成的,与文献^[12] 比对一致,故鉴定该化合物为腺嘌呤。

在负离子模式下,18 号峰的质谱图中存在 m/z 266.089 4[M-H]⁻、 m/z 302.066 1[M+Cl]⁻、 m/z 312.094 8[M+FA-H]⁻ 离子峰,计算得分子式为 C₁₀H₁₃N₅O₄,且二级质谱下存在 m/z 134.045 0 特征离子峰,推测是失去 1 分子核糖残基造成的[M-H-132]⁻ 峰,故鉴定该化合物为腺嘌呤核苷。

在负离子模式下,20 号峰的质谱图中存在 m/z 282.084 1[M-H]⁻、 m/z 318.060 7[M+Cl]⁻ 离子峰,计算其分子式为 C₁₀H₁₃N₅O₅,二级质谱下存在 m/z 150.040 2、133.015 5 特征离子峰,推测前者是失去 1 分子核糖残基导致的,后者是在前者的基础上再失去 1 分子氮导致的,故将其鉴定为鸟嘌呤核苷。

2.2.8 其他成分的鉴定 在负离子模式下,22 号峰的质谱图中存在 m/z 433.133 8[M-H]⁻、 m/z 469.109 9[M+Cl]⁻、 m/z 479.139 7[M+FA-H]⁻ 离子峰,计算得分子式为 C₁₈H₂₆O₁₂,其二级质谱存在 m/z 139.037 5、123.011 5 特征离子峰,推测前者是失去 1 分子戊糖残基及 1 分子己糖残基得到的[M-H-132-162]⁻ 离子峰,故将其鉴定为 Markhamioside F。

在负离子模式下,24 号峰的质谱图中存在 m/z 375.129 2[M-H]⁻、 m/z 411.105 8[M+Cl]⁻、 m/z 421.133 8[M+FA-H]⁻ 离子峰,计算得分子式为 C₁₇H₂₀N₄O₆,初步鉴定其为核黄素。

在正、负离子模式下,28 号峰的质谱图中分别存在 m/z 183.096 4[M+H]⁺ 和 m/z 181.051 1[M-H]⁻ 离子峰,计算得分子式为 C₉H₁₀O₄,初步鉴定该化合物为丁香醛。

在负离子模式下,36 号峰的质谱图中存在 m/z 593.151 6[M-H]⁻ 离子峰,计算得分子式为 C₂₇H₃₀O₁₅,其二级质谱存在 m/z 417.104 9、152.011 2 特征碎片离子,与文献^[12] 比对后,鉴定该化合物为大黄素二葡萄糖苷。

在负离子模式下,62 号峰的质谱图中存在 m/z 277.217 7[M-H₂O-H]⁻、 m/z 295.228 2[M-H]⁻、 m/z 331.203 7[M+Cl]⁻ 离子峰,计算得分子式为 C₁₈H₃₂O₃,与文献^[4] 比对后,初步鉴定该化合物为 13-羟基-9,11-十八碳二烯酸。

4 结论

本工作利用 HPLC-ESI-MS/MS 联用技术快速有效地对生黄芪及炙黄芪中的化学成分进行分离鉴定。通过分析信号峰的保留时间、质谱图信息、精确相对分子质量信息及计算得到的分子式,共鉴定出 62 个主要信号峰的成分,包括黄酮类及异黄酮类、皂苷类、糖类、生物碱类、氨基酸类、有机酸类、碱基及核苷类等。

经对比发现,生黄芪及炙黄芪都含有这 62 个主要信号峰的成分,未发现两者化学成分个数发生变化。但是,其中 6 个信号峰的峰面积在经过蜜炙后有明显变化,其中芒柄花苷、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、黄芪皂苷 II、黄芪皂苷 I、杜鹃花酸这 5 种成分含量下降,而毛蕊异黄酮的含量上升。

参考文献:

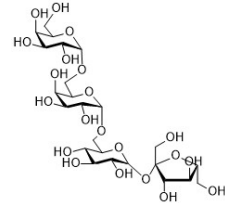
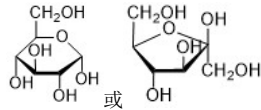
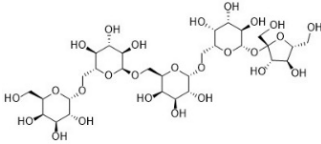
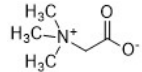
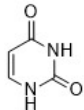
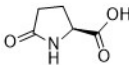
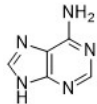
- [1] 温燕梅. 黄芪的化学成分研究进展[J]. 中成药, 2006, 28(6): 879-883.
WEN Yanmei. Research progress in chemical constituents of milkvetch root[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2006, 28(6): 879-883 (in Chinese).
- [2] 张蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3 203-3 207.
ZHANG Qiang, GAO Wenyuan, MAN Shuli. Chemical composition and pharmacological activities of Astragali Radix[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(21): 3 203-3 207 (in Chinese).
- [3] 王文兰, 陶波. 黄芪炮制方法历史沿革及研究进展[J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 38-40.
WANG Wenlan, TAO Bo. Investigation of historical evolution and new development of Astragalus Membranaceus[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2015, 11(6): 38-40 (in Chinese).
- [4] 陈婷, 田丰, 唐跃年, 刘艳, 林志燕, 王晔尘. HPLC-ESI-TOF/MS 对黄芪药材中 24 种化学成

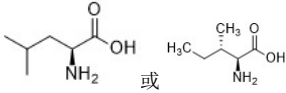
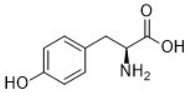
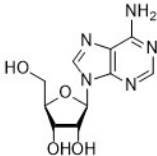
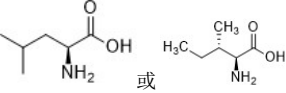
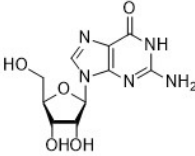
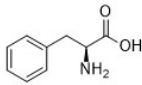
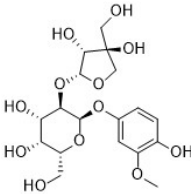
- 分的快速分离与鉴别[J]. 中国药师, 2014, 17(4): 593-596.
- CHEN Ting, TIAN Feng, TANG Yuenian, LIU Yan, LIN Zhiyan, WANG Yechen. Quick separation and identification of 24 chemical constituents in Radix Astragali by HPLC-ESI-TOF MS[J]. China Pharmacist, 2014, 17(4): 593-596 (in Chinese).
- [5] 李兴尚, 陈佳, 徐自升, 蔡宝昌. 黄芪炮制前后相关化学成分的变化研究[J]. 中国药房, 2012, 23(15): 1 399-1 402.
- LI Xingshang, CHEN Jia, XU Zisheng, CAI Baochang. Study on the variation of the chemical constituents in Astragalus membranaceus before and after processing[J]. China Pharmacy, 2012, 23(15): 1 399-1 402(in Chinese).
- [6] 吴云高, 杨建国, 王健生, 尤卫民. 不同炮制方法对黄芪中氨基酸成分含量的影响[J]. 中药材, 1992(9): 31-32.
- WU Yungao, YANG Jianguo, WANG Jiansheng, YOU Weimin. Effects of different processing methods on the contents of amino acid in astragalus membranaceus[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 1992(9): 31-32(in Chinese).
- [7] 余文强. 不同炮制方法对黄芪中糖类及黄酮类成分的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2017, 31(2): 114-115.
- YU Wenqiang. Effects of different processing methods on the contents of saccharides and flavonoids in astragalus membranaceus[J]. Clinical Research and Practice, 2017, 31(2): 114-115(in Chinese).
- [8] 李自红, 魏悦, 范毅, 朱杰, 赵天增. 芦丁的电喷雾离子阱质谱分析[J]. 分析实验室, 2015, 34(2): 186-189.
- LI Zihong, WEI Yue, FAN Yi, ZHU Jie, ZHAO Tianzeng. Analysis of rutin by electrospray iontrap mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2015, 34(2): 186-189(in Chinese).
- [9] 张靖, 邱小惠, 徐文, 朱大元, 徐筱杰, 卢传坚. 基于液质联用技术的复方三芪口服液化学成分特征图谱研究[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1 572-1 576.
- ZHANG Jing, QIU Xiaohui, XU Wen, ZHU Dayuan, XU Xiaojie, LU Chuanjian. Characteristic spectrum analysis of chemical components in Sanqi Oral Liquid by UPLC-MS/MS[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2013, 28(5): 1 572-1 576(in Chinese).
- [10] ZHAO H D, ZHANG Y P, GUO Y, SHI S Y. Identification of major α -glucosidase inhibitors in Radix Astragali and its human microsomal metabolites using ultrafiltration HPLC-DAD-MSⁿ [J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2015, 104: 31-37.
- [11] 易炳学, 余书琦, 张金莲, 李志强, 龚千锋. 黄芪的研究概况[J]. 江西中医药大学学报, 2014, 26(02): 98-100.
- YI Bingxue, YU Shuqi, ZHANG Jinlian, LI Zhiqiang, GONG Qianfeng. General research situation of Astragalus[J]. Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2014, 26(02): 98-100.
- [12] LIU M H, TONG X, WANG J X, ZOU W, CAO H, SU W W. Rapid separation and identification of multiple constituents in traditional Chinese medicine formula Shenqi Fuzheng Injection by ultra-fast liquid chromatography combined with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2013, 74(4): 141-155.
- [13] LI Z X, SONG X M, FU Z W, WU B, LING Y, SUN Z L, CHEN M C, XU D S, HUANG C G. Identification of the major constituents in Zhimu-Huangqi herb-pair extract and their metabolites in rats by LC-ESI-MSⁿ [J]. Chromatographia, 2013, 76(13/14): 767-780.
- [14] QI L W, WEN X D, CAO J, LI C Y, LI P, YI L, WANG Y X, CHENG X L, GE X X. Rapid and sensitive screening and characterization of phenolic acids, phthalides, saponins and isoflavonoids in Danggui Buxue Tang by rapid resolution liquid chromatography/diode-array detection coupled with time-of-flight mass spectrometry [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008, 22(16): 2 493-2 509.
- [15] LIU X H, ZHAO L G, LIANG J, GUO L, YANG Y L, HU F, ZHU R J, FENG S L. Component analysis and structure identification of active substances for anti-gastric ulcer effects in Radix Astragali by liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2014, 960(6): 43-51.

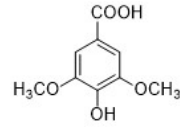
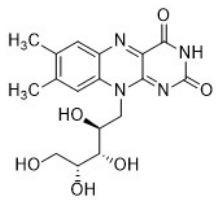
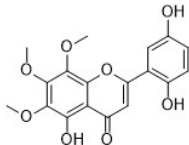
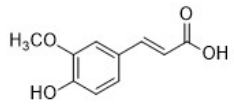
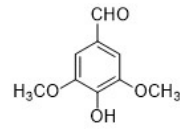
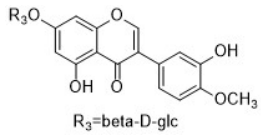
附表 1 黄芪中已鉴定成分的相关信息

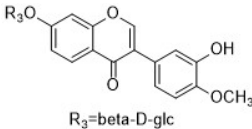
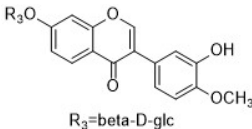
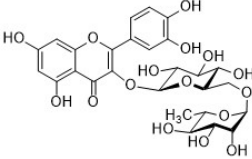
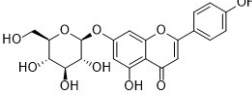
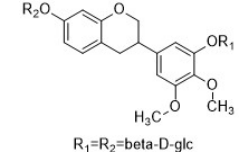
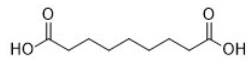
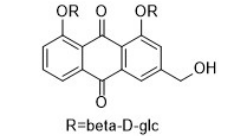
Attached table 1. Related information of identified components in Astragalus

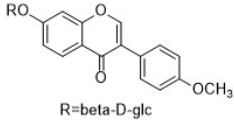
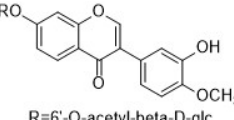
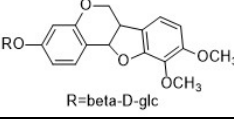
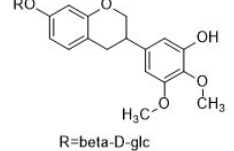
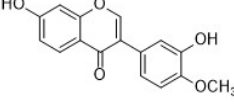
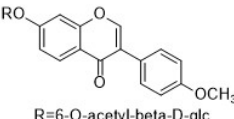
编号	t _R /min	分子式	母离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	化合物	结构式
1	2.182	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	173.1059[M-H] ⁻		精氨酸	
2	2.277	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	131.0482[M-H] ⁻		天门冬酰胺	
3	2.296	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	145.0633[M-H] ⁻		赖氨酸	
4	2.315	C ₄ H ₉ NO ₃	118.0535[M-H] ⁻		苏氨酸	
5	2.333	C ₅ H ₁₃ NO	104.1078[M+H] ⁺	60.0891、58.0690、56.052	胆碱	
6	2.39	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	539.1376[M+Cl] ⁻	221.0656、179.0559 161.0459[M-H-2glc-H ₂ O] ⁻ 、 119.0346、113.0237	棉子糖	
7	2.409	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	377.0845[M+Cl] ⁻	179.0568[M-H-glc] ⁻ 、 119.0334、113.0231、 101.0247、89.0252	蔗糖	

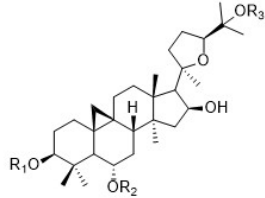
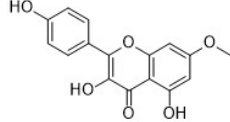
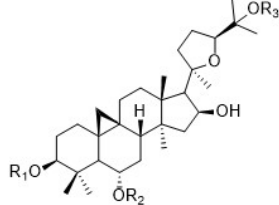
8	2.521	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	711.2199[M+FA-H] ⁻	485.1509[M-H-glc-H ₂ O] ⁻ 、 341.1080[M-H-2glc] ⁻ 、179.0553[M-H-3glc] ⁻	水苏糖	
9	2.54	C ₆ H ₁₂ O ₆	179.0564[M-H] ⁻		果糖/葡萄糖	
10	2.559	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆	274.0927[M-H] ⁻		Glu-Gln	/
11	2.578	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	873.2729[M+FA-H] ⁻		毛蕊花糖	
12	2.653	C ₅ H ₁₁ NO ₂	116.0741[M-H] ⁻		甜菜碱	
13	2.768	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	111.0114[M-H] ⁻		尿嘧啶	
14	3.013	C ₅ H ₇ NO ₃	130.0505[M+H] ⁺	84.0466[M+H-HCOOH] ⁺ 、56.0532	L-焦谷氨酸	
15	3.614	C ₅ H ₅ N ₅	136.0621[M+H] ⁺	119.0358[M+H-NH ₃] ⁺ 、 92.0257[M+H-NH ₃ -HCN] ⁺ 、65.0167	腺嘌呤	

16	3.975	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.1024[M+H] ⁺	86.0963[M+H-HCOOH] ⁺ 、 56.0532	亮氨酸/异亮氨酸	
17	4.089	C ₉ H ₁₁ NO ₃	180.0675[M-H] ⁻		酪氨酸	
18	4.185	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	312.0948[M+FA-H] ⁻	134.0450[M-H-ribose] ⁻ 、107.0353	腺嘌呤核苷	
19	4.324	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.1024[M+H] ⁺	86.0948[M+H-HCOOH] ⁺ 、56.0519	亮氨酸/异亮氨酸	
20	4.888	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	282.0841[M-H] ⁻	150.0402[M-H-ribose] ⁻ 、 133.0155[M-H-ribose-NH ₃] ⁻	鸟嘌呤核苷	
21	7.651	C ₉ H ₁₁ NO ₂	166.0864[M+H] ⁺	120.0812[M+H-HCOOH] ⁺ 、 103.0552[M+H-HCOOH-NH ₃] ⁺ 、 91.0562、77.0411	苯丙氨酸	
22	9.372	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₂	433.1338[M-H] ⁻	139.0375[M-H-C ₅ H ₈ O ₄ -glc] ⁻ 、123.0115	Markhamioside F	

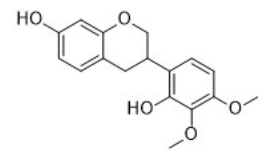
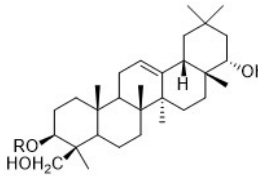
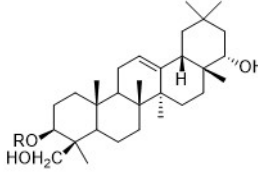
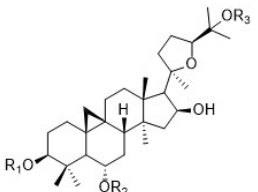
23	11.282	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.0450[M-H] ⁻		丁香酸	
24	15.375	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	375.1292[M-H] ⁻		核黄素	
25	15.777	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359.0983[M-H] ⁻	182.0222、167.0004、138.0318、123.0079、 108.0242	5, 2', 5'-三羟基-6, 7, 8-三甲氧基黄酮	
26	19.526	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623.1616[M-H] ⁻		鼠李柠檬素-3, 4-二葡萄糖苷	/
27	20.432	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0507[M-H] ⁻		阿魏酸	
28	25.984	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.0511[M-H] ⁻		丁香醛	
29	27.548	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.1084[M-H] ⁻	299.0533[M-H-glc] ⁻ 、284.0333、255.0281、 227.0341	红车轴草素 -7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	

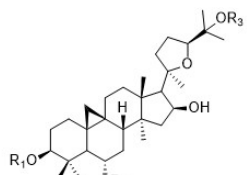
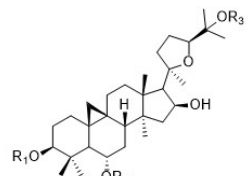
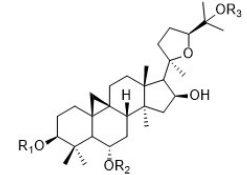
30	30.933	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	491.1190[M+FA-H] ⁻	283.0627[M-H-glc] ⁻ 、268.0379、239.0348、 211.0409	毛蕊异黄酮 -7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	
31	31.531	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	491.1192[M+FA-H] ⁻	283.0612[M-H-glc] ⁻ 、268.0370、239.0340、 211.0391	毛蕊异黄酮 -7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	
32	32.206	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.1460[M-H] ⁻	227.0332、211.0373、178.9981	芦丁	
33	34.479	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	477.1039[M+FA-H] ⁻	269.0446[M-H-glc] ⁻ 、239.0332、211.0368	芹菜素-7-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	
34	35.701	C ₂₉ H ₃₈ O ₁₅	671.2197[M+FA-H] ⁻	301.1091[M-H-2glc] ⁻ 、286.0843、271.0597、 179.0700、164.0461	7, 2'-二羟基-3', 4'-二甲氧基异黄烷-7, 2'-二葡萄糖苷	
35	38.524	C ₉ H ₁₆ O ₄	187.0984[M-H] ⁻		杜鹃花酸	
36	39.422	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.1516[M-H] ⁻	417.1049、241.0686、193.0482、152.0112	大黄素二葡萄糖苷	

37	42.151	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	475.1245[M+FA-H] ⁻	267.0658[M-H-glc] ⁻ 、252.0419、223.0385、 195.0437	芒柄花苷（芒柄花素 -7-O-β-D-葡萄糖苷）	
38	42.188	C ₂₅ H ₂₆ O ₁₃	533.1302[M+FA-H] ⁻	283.0611[M-H-42-glc] ⁻ 、268.0374、 239.0337、211.0389	6'-O-乙酰基毛蕊异 黄酮苷	
39	45.785	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₀	507.1506[M+FA-H] ⁻	299.0910[M-H-glc] ⁻ 、 284.0675[M-H-glc-CH ₃] ⁻ 、 269.0444[M-H-glc-CH ₃ -CH ₃] ⁻ 、241.0490	9，10-二甲氧基紫檀 烷-3-O-β-D-葡萄糖 苷	
40	46.579	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	509.1660[M+FA-H] ⁻	301.1051[M-H-glc] ⁻ 、286.1043、271.0593、 164.0447	7，2'-羟基-3'，4'-二 甲氧基异黄烷 -7-O-β-D-葡萄糖苷	
41	47.417	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	463.1606[M-H] ⁻	301.1084[M-H-glc] ⁻ 、286.0848、271.0616、 164.0470、149.0237	同 41	同 41
42	48.972	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.0613[M-H] ⁻	239.0351、223.0387、211.0397、195.0443、 182.0361	毛蕊异黄酮	
43	50.932	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₀	517.1357[M+FA-H] ⁻	267.0659[M-H-42-glc] ⁻ 、252.0414、223.0377 195.0433、132.0190	6'-O-乙酰基芒柄花 苷	

44	52.474	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₉	991.5167[M+FA-H] ⁻	783.4656[M-H-glc] ⁻	黄芪皂苷 V/VI/VII	 Astragaloside V R₁=beta-D-glc-beta-D-xyl, R₂=H, R₃=beta-D-glc Astragaloside VI R₁=beta-D-glc-beta-D-xyl, R₂=beta-D-glc, R₃=H Astragaloside VII R₁=beta-D-xyl, R₂=beta-D-glc, R₃=beta-D-glc
45	58.034	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₉	991.5179[M+FA-H] ⁻	783.4660[M-H-glc] ⁻ 、765.4553[M-H-180] ⁻ 、 489.3617	同 44	同 44
46	58.351	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.0565[M-H] ⁻		三羟基甲氧基黄酮/ 异黄酮	/
47	59.068	C ₃₆ H ₆₀ O ₁₀	697.4192[M+FA-H] ⁻		膜荚黄芪茎叶皂苷 C	/
48	60.028	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.0559[M-H] ⁻		鼠李柠檬素	
49	61.159	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	829.4634[M+FA-H] ⁻	651.4215[M-H-Xyl] ⁻ 、621.4129[M-H-glc] ⁻ 、 489.3589[M-H-Xyl-glc] ⁻ 、 383.2966	黄芪皂苷 III	 R₁=beta-D-glc-beta-D-xyl, R₂=H, R₃=H

50	61.892	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	871.4743[M+FA-H] ⁻	783.4659[M-H-42] ⁻ 、 651.4108[M-H-42-Xyl] ⁻ 、 621.4154[M-H-42-glc] ⁻ 、 603.4065[M-H-42-180] ⁻ 、 489.3600[M-H-42-Xyl-glc] ⁻	黄芪皂苷 II	 R ₁ =2'-O-acetyl-beta-D-xyl,R ₂ =beta-D-glc,R ₃ =H
51	62.004	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	829.4635[M+FA-H] ⁻	621.4057[M-H-glc] ⁻ 、 489.3614[M-H-Xyl-glc] ⁻ 、 383.2970、161.0443	黄芪甲苷	 R ₁ =beta-D-xyl,R ₂ =beta-D-glc,R ₃ =H
52	65.209	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	267.0668[M-H] ⁻	251.0349、223.0393、 195.0444、167.0491	芒柄花素	
53	67.209	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	871.4747[M+FA-H] ⁻	783.4634[M-H-42] ⁻ 、 651.4202[M-H-42-Xyl] ⁻ 、 603.3995[M-H-42-180] ⁻ 、 489.3653[M-H-42-Xyl-glc] ⁻	异黄芪皂苷 II	 R ₁ =3'-O-acetyl-beta-D-xyl,R ₂ =beta-D-glc,R ₃ =H
54	67.56	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	299.0921[M-H] ⁻	269.0435、226.0248、211.0390、195.0421	(6αR, 11αR)-10-羟 基-3, 9-二甲氧基紫 檀烷	/

55	69.277	C ₁₇ H ₁₈ O ₅	301.1084[M-H] ⁻	256.0369、227.0366、149.0227、121.0296	8, 2'-二羟基-7, 4'-二甲氧基异黄烷	
56	69.987	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₇	911.5076[M-H] ⁻	615.3960、457.3725、409.3454、143.0337	黄芪皂苷 VIII	 R=alpha-L-rha-beta-D-xyl-beta-D-glc
57	70.192	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	987.5229[M+FA-H] ⁻	733.4634、615.3985、457.3715、247.0822	大豆皂苷 I	 R=alpha-L-rha-beta-D-gal-beta-D-glc
58	70.395	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	871.4743[M+FA-H] ⁻	765.4485、603.3867[M-H-42-180] ⁻	环黄芪苷 II	 R ₁ =4'-O-acetyl-beta-D-xyl, R ₂ =beta-D-glc, R ₃ =H

59	75.746	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	913.4857[M+FA-H] ⁻	825.4803[M-H-42] ⁻ 、783.4721[M-H-42-42] ⁻ 、 651.4154[M-H-42-42-Xyl] ⁻ 、 489.3619[M-H-42-42-Xyl-glc] ⁻	黄芪皂苷 I	 R ₁ =2',3'-di-O-acetyl-beta-D-xyl,R ₂ =beta-D-glc,R ₃ =H
60	76.837	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	913.4855[M+FA-H] ⁻	825.4822[M-H-42] ⁻ 、783.4733[M-H-42-42] ⁻	异黄芪皂苷 I	 R ₁ =2',4-di-O-acetyl-beta-D-xyl,R ₂ =beta-D-glc,R ₃ =H
61	80.942	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₇	955.4960[M+FA-H] ⁻	825.4735、783.4701	乙酰黄芪皂苷 I	 R ₁ =2',3',4'-tri-O-acetyl-beta-D-xyl,R ₂ =beta-D-glc,R ₃ =H
62	83.895	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	295.2282[M-H] ⁻	195.1347、171.1075、97.0729、57.0510	13-羟基-9, 11-十八 碳二烯酸	