

基于 UFLC-Triple-TOF-MS/MS 技术的白虎 加桂枝汤化学物质基础

郭敏群¹, 严曾豪², 吴灏², 林娜^{1,3*}

(1. 广州中医药大学, 广州 510006; 2. 中山大学生命科学学院, 广州 510275;
3. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**采用超快速高效液相色谱串联四级飞行时间质谱(UFLC-Triple-TOF-MS/MS)对白虎加桂枝汤的化学成分进行研究。**方法:**采用 Phenomenex C₁₈ 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 2.6 μm),以 0.1% 甲酸乙腈溶液和 0.1% 甲酸水溶液为流动相,梯度洗脱,柱温 40 °C,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 5 μL;采用高分辨三重四级杆飞行时间质谱,分别在正、负离子模式下进行检测;借助 Peakview 软件中 Formula Finder 功能计算化合物的元素组成,调用软件中 IDA explore 功能,获得该质量数的二级碎片离子,结合文献数据和对照品数据比对进行化合物结果鉴定。**结果:**通过精确相对分子质量的质谱裂解规律,定性白虎加桂枝汤的 35 个化合物,包括甾体皂苷类 16 个、三萜皂苷类 6 个、黄酮类 7 个、有机酸类 4 个和其他类 2 个,其中 10 个成分(知母皂苷 AⅢ,知母皂苷 I,知母皂苷 BⅢ,知母皂苷 BⅡ,新芒果苷,芒果苷,芹糖甘草苷,甘草苷,甘草酸和肉桂酸)通过与对照品比对确认,并对化合物的药材来源进行归属。**结论:**UFLC-Triple-TOF-MS/MS 可以简便、快速地对白虎加桂枝汤中化学成分进行定性。相关研究为该方的药效物质基础研究、质量控制以及作用原理阐释提供了参考。

[关键词] 白虎加桂枝汤;超快速高效液相色谱串联四级飞行时间质谱;化学物质基础

[中图分类号] R283.6;R289;R284.1;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)10-0127-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190713

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181217.1817.015.html>

[网络出版时间] 2018-12-19 09:46

Chemical Material Basis of Extract of Baihu Jia Guizhi Tang by UFLC-Triple-TOF-MS/MS

GUO Min-qun¹, YAN Zeng-hao², WU Hao², LIN Na^{1,3*}

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To systematically identify the chemical constituents in extract of Baihu Jia Guizhi Tang (BHGZT) by ultra-fast liquid chromatography/triple time-of-flight tandem mass spectrometry (UFLC-Triple-TOF-MS/MS). **Method:** Phenomenex C₁₈ (3.0 mm × 100 mm, 2.6 μm) was eluted with acetonitrile (containing 0.1% formic acid) and 0.1% formic acid solution as the mobile phase in a gradient mode. The column temperature was set at 40 °C, the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, and the injection volume was 5 μL. High-resolution triple quadrupole flight mass spectrometry was adopted to test in both positive and negative modes. Formula finder function in peakview software was used to calculate the element composition of the compounds, and IDA explore function in the software was invoked to obtain secondary fragmentation ions of this mass number. And

[收稿日期] 20180930(009)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81630107)

[第一作者] 郭敏群,在读硕士,从事中药学研究,Tel: 010-64014411-2869,E-mail: guominqun66@163.com

[通信作者] *林娜,博士,研究员,博士生导师,从事方剂的作用原理研究,Tel: 010-64014411-2869,E-mail: linna888@163.com

the compounds were identified based on literature data and the reference substances. **Result:** On the basis of the mass fragmentation regularity of accurate molecular weight, 35 compounds were identified in BHGZT, including 16 steroid saponins, 6 triterpenoid saponins, 7 flavonoids, and 4 organic acids and 2 others. Among them, 10 components (timosaponin A III, timosaponin I, timosaponin B III, timosaponin B II, new mangiferin, mangiferin, liquiritin apioside, liquiritin, glycyrrhizic acid and cinnamic acid) were confirmed by comparing with reference substances, and the sources of the compound were identified. **Conclusion:** UFLC-Triple-TOF-MS/MS can be used to characterize the chemical composition of BHGZT simply and quickly. Relevant researches provide references for the research of pharmacodynamic material basis, the quality control and the explanation of mechanism of action.

[**Key words**] Baihu Jia Guizhi Tang; UFLC-Triple-TOF-MS/MS; chemical material basis

白虎加桂枝汤出自张仲景的《金匱要略》，由桂枝、石膏、知母、炙甘草和粳米组成，具有清热泻火、通络止痛的功效。临床多应用于类风湿关节炎、痛风性关节炎和小儿咳嗽等急证的治疗，尤其适用于热痹^[1-3]。目前，已有白虎加桂枝汤治“痹”生物内涵探索的实验报道^[4-6]，笔者也基于靶标网络分析阐述了这一经方治疗类风湿关节炎的作用机制^[7]。然而，相关的药效物质基础至今仍不清楚。曾有学者通过 HPLC 对白虎加桂枝汤中的知母皂苷 B II，芒果苷，甘草苷，甘草酸和肉桂酸等几个成分进行定量分析^[8-9]；此外，也有学者采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究白虎汤单方的物质基础，共鉴定出 42 个化合物^[10]并对其中的新芒果苷、芒果苷、甘草苷等 10 个成分定量，以及采用 LC-MS 或 GC-MS 围绕知母、桂枝、炙甘草等组成白虎加桂枝汤方的单味中药材进行化学成分研究等^[11-21]，这些研究各具特点，但均侧重局部，难以阐明白虎加桂枝汤整方的药效物质，目前尚未见对本方较系统、全面的化学成分分析的研究报道。超快速高效液相色谱与飞行时间质谱联用 (UFLC-Triple-TOF-MS/MS) 技术具有简便、快捷、准确和灵敏的优点，能够较完整保留中药的化学信息。本研究拟采用该技术，对白虎加桂枝汤的化学成分进行在线分离和检测，并根据化合物的精确相对分子质量、碎片离子峰、色谱保留时间及对照品信息，结合相关文献信息对虎加桂枝汤的药效物质基础进行研究，为该方剂的进一步研究和发展应用提供科学依据。

1 材料

超快速高效液相色谱仪 (包括 LC-20AD-XR 型二元泵, SIL-20AD-XR 型自动进样器, CTO-20A 型柱温箱, 日本 Shimadzu 公司); Triple TOF 5600 型四极杆-飞行时间质谱 (美国 AB Sciex 公司); Simplicity 型超纯水系统 (美国 Millipore 公司); DTN-0.5/01

型多功能提取浓缩机组 (浙江温兄机械阀业有限公司); CT-C-II 型热风循环烘箱 (常州市润邦干燥设备科技有限公司); 微量移液器 (德国 Eppendorf 公司); MS205DU 型半微量天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司)。

知母 (Anemarrhenae Rhizoma), 桂枝 (Cinnamomi Ramulus), 炙甘草 (Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle) 和石膏 (Gypsum Fibrosum) 均购自北京同仁堂药店, 经中国中医科学院中药研究所张村研究员鉴定均符合 2015 年版《中国药典》规定。对照品甘草酸 (批号 5520, 纯度 96.5%), 芹糖甘草苷 (批号 5569, 纯度 96.6%), 芒果苷 (批号 5586, 纯度 99.4%), 甘草苷 (批号 3802, 纯度 96.8%), 知母皂苷 B II (批号 5155, 纯度 95.1%), 均购自上海诗丹德标准技术服务有限公司; 对照品知母皂苷 A₃ (批号 MUST-18040108, 纯度 ≥ 98%), 新芒果苷 (批号 MUST-18032315, 纯度 ≥ 98%), 知母皂苷 I (批号 MUST-18032402, 纯度 ≥ 98%), 知母皂苷 B III (批号 MUST-18032209, 纯度 ≥ 96%) 均购自成都曼思特生物科技有限公司; 肉桂酸 (批号 110786-200503) 购自中国食品药品检定研究院。乙腈 (色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 甲酸 (美国 Sigma 公司)。

2 方法

2.1 样品制备 取石膏、知母、炙甘草、粳米、桂枝按 12:3:1:6:2 的比例投药。知母、炙甘草、粳米、桂枝温水浸泡 1 h, 石膏单独先煎 30 min 后加入其他药物, 加 8 倍量水, 保持微沸, 煎煮 30 min, 纱布过滤; 取药渣加 6 倍量的水二次煎煮 20 min, 纱布过滤并与第一次滤液合并, 单效减压浓缩得浓缩液。浓缩液于热风循环烘箱 (70 °C) 干燥得干膏, 粉碎后得浸膏粉。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 精密称取白虎加桂枝汤浸膏

粉 0.1 g, 至 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液 精密称取各对照品, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得到每毫升分别含甘草苷 9.86 mg, 甘草酸 10.75 mg, 芒果苷 9.34 mg, 知母皂苷 B II 10.88 mg, 芹糖甘草苷 8.95 mg, 新芒果苷 9.46 mg, 知母皂苷 A III 10.67 mg, 肉桂酸 9.80 mg, 知母皂苷 B III 5.50 mg, 知母皂苷 I 4.94 mg 的对照品母液。分别取适量母液稀释 50 倍, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 得 10 个单对照品溶液。

2.3 分析条件

2.3.1 色谱条件 Phenomenex C_{18} 色谱柱 (3 mm \times 100 mm, 2.6 μm), 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 流动相 0.1% 甲酸乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~6 min, 95% B; 6~8 min, 95%~85% B; 8~12 min, 85%~81% B; 12~21 min, 81%~80% B; 21~33 min, 80%~65% B; 33~43 min, 65%~58% B; 43~48 min, 58%~95% B)。进样量 5 μL 。

2.3.2 质谱条件 质谱采用电喷雾离子源 (ESI) 正、负离子模式检测, 高分辨、动态背景扣除模式, 分别设定一级 (TOF-MS) 和二级 (Product Ion) 检测参数。

TOF-MS 参数: 扫描时间 0.15 s, 采集时间 48 min, 采集范围 100~2 000 Da, 雾化气流速 (GS1) 55 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 脱溶剂气流速 (GS2) 55 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 气帘气流速 (CUR) 35 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 脱溶剂气温度 (TEM) 550.0 $^{\circ}\text{C}$, 离子喷雾电压 (ISVF) 5 500/-4 500 V, 去簇电压 (DP) ± 80 V, 碰撞能 (CE) ± 10 V。

Product Ion 参数: 扫描时间 0.08 s, 采集时间 48 min, 采集范围 50~2 000 Da, 雾化气流速 (GS1) 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 脱溶剂气流速 (GS2) 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 气帘气流速 (CUR) 35 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 脱溶剂气温度 (TEM) 550.0 $^{\circ}\text{C}$, 离子喷雾电压 (ISVF) 5 500/-4 500 V, 去簇电压 (DP) ± 80 V, 碰撞能 (CE) ± 40 V, 碰撞能分散度 (CES) ± 20 V, 离子释放延迟 (IRD) 67, 离子束宽度 (IRW) 25。

2.4 分析方法 根据 TOF-MS 一级质谱得到化合物的精确质荷比 (m/z), 借助 Peakview 软件中 Formula Finder 功能计算化合物的元素组成 (Mass tolerance 及 Intensity tolerance 分别设定为 5 ppm 和 10%); 调用软件中 IDA explore 功能, 获得该质量数的二级碎片离子; 根据白虎加桂枝汤组方中各中药文献报道化学成分信息可进一步推测可能的化合物。

3 结果与讨论

供试品分别在正、负离子模式下进行一级和二级

扫描, 样品正、负模式总离子流见图 1。通过与对照品比对, 确证了 10 个化合物; 通过相对分子质量和裂解碎片离子信息解析, 并与文献数据比较, 指证了 25 个化合物; 共 35 个化合物, 其中 5 个成分源于桂枝, 12 个成分源于甘草, 18 个成分源于知母。见表 1。

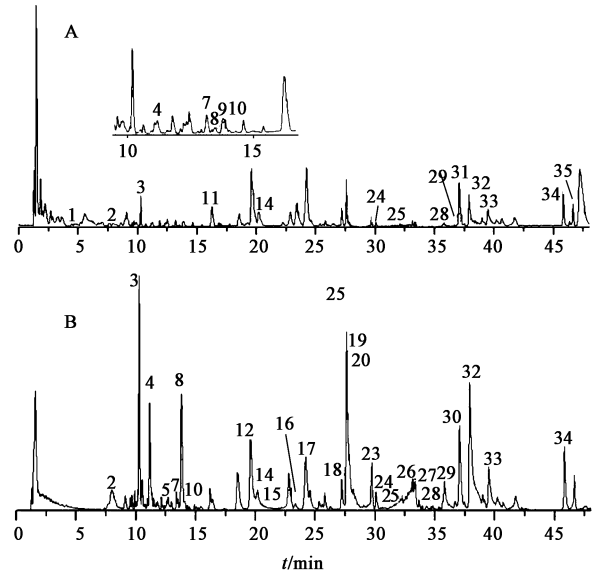


图 1 白虎加桂枝汤正模式 (A) 及负模式 (B) 总离子流

Fig. 1 Total ion chromatogram of extract of Baihu Jia Guizhi Tang in positive (A) and negative (B) mode

3.1 甾体皂苷类化合物的裂解规律 知母中主要成分是皂苷类和黄酮类化合物。知母皂苷与皂苷元的母核不同, 可分为螺甾烷类皂苷和呋甾烷类皂苷两大类。螺甾烷类以菝葜皂苷元链接不同的糖链构成的知母皂苷 A III, 知母皂苷 A IV, 知母皂苷 A II 等。呋甾烷类如知母皂苷 B I, 知母皂苷 B II, 知母皂苷 B III 等。知母皂苷类成分主要裂解是丢失糖链、侧链和脱水。

3.1.1 螺甾烷类化合物 34 号峰的正离子质谱中可以观察 m/z 741, 579, 417, 399, 该化合物与对照品知母皂苷 A III 的保留时间、质谱数据一致, 故确证 34 号峰为知母皂苷 A III, 裂解过程见图 2。31 号峰正离子模式下有 $741[\text{M} + \text{H}]^+$, $417[\text{M} + \text{H} - \text{Gal} - \text{Glc}]^+$, $399[\text{M} + \text{H} - \text{Gal} - \text{Glc} - \text{H}_2\text{O}]^+$ 碎片, 碎片信息与 34 号峰相似, 保留时间不同, 推测为 34 号峰的同分异构体, 结合文献推测为知母皂苷 A IV。13 号峰的准分子离子峰为 $757[\text{M} + \text{H}]^+$, 比 34 号峰多了 m/z 16; 35 号峰的准分子离子峰为 $579[\text{M} + \text{H}]^+$, 比 34 号峰少了 m/z 162。结合二级质谱数据和文献报道, 推测 13 号峰为知母皂苷 A II, C-2 位多了 1 个羟基; 35 号峰为知母皂苷 A I, C-3 位上少了 1 个糖。

表 1 基于 UFLC-Triple-Q-TOF-MS/MS 技术的化学成分鉴定

Table 1 Identification of chemical constituents by UFLC-Triple-Q-TOF-MS/MS

No.	t_R /min	分子式	[M + H] ⁺ (δ)/ppm	[M - H] ⁻ (δ)/ppm	主要裂解碎片		化合物	归属	参考文献
					正模式	负模式			
1	4.200	C ₉ H ₈ O	133.064 8 (-0.3)		105.069 9		肉桂醛	桂枝	[22]
2	7.995	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	211.060 3 (0.9)	209.045 7 (0.5)	147.047 0, 107.049 8	165.056 2, 121.065 3	对羟基苯丙二酸	甘草	[10]
3	9.894	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₆	585.1448 (-0.4)	583.130 2 (-0.4)	567.135 2, 423.092 2, 405.082 1	565.136 2, 403.069 9, 373.059 2	新芒果昔 ¹⁾	知母	[12, 18]
4	11.106	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	423.091 8 (-0.8)	421.077 (-0.3)	387.070 3, 339.049 1, 303.049 7, 273.039 3	403.070 2, 331.047 7, 313.073 5, 301.036 8, 259.026 6	芒果昔 ¹⁾	知母	[12, 18]
5	12.627	C ₉ H ₈ O ₃		163.040 8 (4.5)		119.049 2, 93.035 1	4-羟基肉桂酸	桂枝	[19]
6	13.346	C ₉ H ₈ O ₃		163.040 1 (0.4)		119.047 6, 93.032 6	3-羟基肉桂酸	桂枝	[19]
7	13.447	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.133 4 (-0.7)	417.118 (-1.1)	257.080 7, 147.043 6, 137.022 6	255.066 0, 135.008 4	新异甘草昔	甘草	[14]
8	13.748	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	551.174 7 (-2.1)	549.161 4 (0.1)	257.079 8, 137.022 7	417.121 1, 255.066 2, 135.009 2	芹糖甘草昔 ¹⁾	甘草	[14]
9	13.810	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.080 9 (-0.7)		147.044 1, 137.022 9		甘草素	甘草	[14]
10	13.836	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.133 0 (-1.5)	417.119 (-0.1)	257.080 7, 147.043 8, 137.022 7	417.108, 255.066 4, 135.009 2	甘草昔 ¹⁾	甘草	[10, 20]
11	16.976	C ₉ H ₆ O ₂	147.043 9 (-0.6)		103.055 4, 91.01 78		香豆素	桂枝	[18-19]
12	19.436	C ₄₅ H ₇₆ O ₂₀	935.498 1 (1.5)			981.508 3, 935.498 1, 773.443 5	知母皂昔 E ₁ 或知母皂昔 N	知母	[14, 23]
13	19.454	C ₃₉ H ₆₄ O ₁₄	757.436 2 (-0.8)		595.380 1, 433.329 6		知母皂昔 A II	知母	[14, 23]
14	20.039	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	551.175 4 (-0.8)	549.160 9 (-0.8)	419.130 3, 257.080 3, 137.021 9	255.066 8, 135.008 7, 119.050 7	芹糖异甘草昔	甘草	[14]
15	22.102	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₉		1 227.566 3 (1)		1 095.537 3, 1 065.523 5, 933.480 6, 771.422 1	Karatavioside C	知母	[21]
16	23.461	C ₉ H ₈ O ₂	149.059 7 (0.2)	147.046 3 (8)		103.056 6, 77.040 7	肉桂酸 ¹⁾	桂枝	[18-19]
17	23.942	C ₄₅ H ₇₆ O ₂₀		935.488 1 (2.5)		981.498 9, 935.497 8, 773.439 5	知母皂昔 E ₁ 或知母皂昔 N	知母	[14, 23]
18	27.112	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₉		917.478 9 (1.9)		755.428 0, 593.363 3	知母皂昔 D 或知母皂昔 M	知母	[14, 23]
19	27.563	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₉		919.491 7 (0.9)		757.445 3, 595.390 5	知母皂昔 B II ¹⁾	知母	[14, 24]
20	27.567	C ₅₁ H ₈₆ O ₂₃		1 065.549 2 (0.7)		919.503 7, 757.465 7	知母皂昔 B II-鼠李糖昔	知母	[16]
21	28.403	C ₅₁ H ₈₆ O ₂₄		1 081.544 3 (0.6)		919.504 4, 757.44 66	Asparagoside G	知母	[16]

续表 1

No.	t_R /min	分子式	$[M + H]^+$ /ppm	$[M - H]^-$ /ppm	主要裂解碎片		化合物	归属	参考文献
					正模式	负模式			
22	28.825	$C_{56}H_{92}O_{28}$		1 211.571 2 (0.8)		1 079.548 0, 755.423 7	知母皂苷 H1	知母	[14, 23]
23	29.540	$C_{45}H_{74}O_{19}$	919.488 1 (-1.7)	917.476 7 (1.7)		755.428 4	知母皂苷 D 或知母皂苷 M	知母	[14, 23]
24	30.994	$C_{42}H_{62}O_{18}$	855.398 5 (-2.7)	853.388 5 (2.6)	679.364 4, 503.335 8, 485.324 5	351.058 6, 193.034 6	22-羟基-甘 草皂苷 G2	甘草	[16]
25	32.321	$C_{48}H_{72}O_{21}$	985.462 4 (-1.5)	983.450 6 (1.3)	809.432 6, 647.378 6, 615.388 6, 453.336 2	821.408 1, 351.058 8	甘草皂苷 A3	甘草	[16]
26	33.302	$C_{45}H_{74}O_{18}$	903.493 7 (-1.2)	901.482 0 (2)		739.437 9	知母皂苷 B III ¹⁾	知母	[14, 23]
27	33.924	$C_{51}H_{84}O_{23}$		1 063.535 6 (2.4)		901.495 6, 739.438 0	知母皂苷 B IV	知母	[22]
28	35.740	$C_{42}H_{62}O_{17}$	839.405 0 (-1.2)	837.394 2 (3.3)	663.372 1, 487.340 3, 469.329 6	351.058 3, 193.033 5	甘草皂苷 G	甘草	[14]
29	36.603	$C_{42}H_{62}O_{17}$	839.404 9 (-1.3)	837.393 5 (2.5)	663.369 8, 487.341 7, 469.331 5	351.0597, 193.0361	羟基甘草酸	甘草	[14]
30	37.014	$C_{39}H_{66}O_{14}$		757.438 7 (1)		595.390 9, 433.329 1	知母皂苷 I ¹⁾	知母	[25-27]
31	37.046	$C_{39}H_{64}O_{13}$	741.440 9 (-1.5)		417.335 7, 399.324 5		知母皂苷 A IV	知母	[11]
32	37.889	$C_{42}H_{62}O_{16}$	823.409 2 (-2.3)	821.398 5 (2.4)	647.374 7, 471.344 9, 453.333 2	351.058 2, 193.035 9	甘草酸 ¹⁾	甘草	[14]
33	39.501	$C_{42}H_{62}O_{16}$	823.409 5 (-2)	821.398 7 (2.7)	647.377 3, 471.343 4, 453.334 5	351.058 2, 193.035 7	甘草酸同分 异构体	甘草	[14]
34	46.539	$C_{39}H_{64}O_{13}$	741.440 8 (-1.5)	739.428 7 (1.7)	579.386 7, 417.335 3, 399.324 7	577.380 6, 161.046 0	知母皂苷 A III ¹⁾	知母	[8, 27]
35	46.598	$C_{33}H_{54}O_8$	579.388 4 (-1.2)		435.274 9, 417.336 5		知母皂苷 A I	知母	[26, 28]

注: ¹⁾与对照品比对。

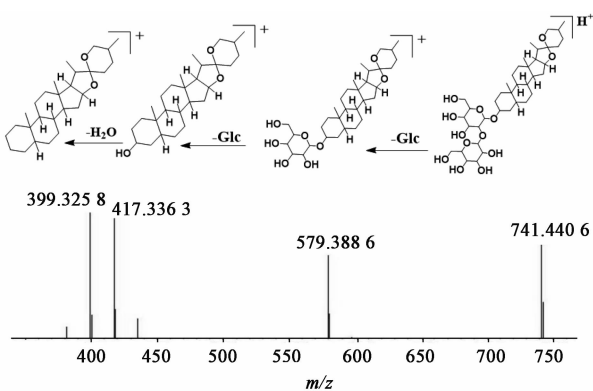


图 2 知母皂苷 A III 裂解过程和二级质谱
Fig. 2 Fragmentation pathways and product ion spectrum of timosaponin A III

3.1.2 呋甾烷类化合物 19 号峰的负离子质谱数据 919 $[M - H]^-$, 757 $[M - H - Glc]^-$, 595 $[M - H -$

Gal - Glc] $^-$ 与对照品知母皂苷 B II 的保留时间、质谱数据一致, 故确证 19 号峰为知母皂苷 B II。12 号峰与 17 号峰的质谱数据基本一致, 准离子分子峰和碎片离子峰均比 27 号峰的多 m/z 16, 推测该化合物比知母皂苷 B II 多 1 个羟基。根据文献报道, 知母皂苷 N 的 C-2 位上比知母皂苷 B II 多 1 个羟基; 知母皂苷 E1 是知母皂苷 N 的同分异构体, C-2 位和 C-15 位上各有 1 个羟基, 故推测 12 号峰与 17 号峰为知母皂苷 E1 或者知母皂苷 N。20 号峰的准离子分子峰为 1 065 $[M - H]^-$, 失去一分子鼠李糖得 m/z 919, 再失去一分子葡萄糖得 m/z 757, 结合文献报道, 推测该化合物为知母皂苷 B II - 鼠李糖苷。21 号峰比知母皂苷 B II 多了 m/z 162, 结合文献报道, 推测该化合物为 asparaguside G。

26 号峰的负离子质谱数据 901 $[M - H]^-$, 739

$[M - H - Glc]^-$, 与对照品知母皂苷 B Ⅲ 的保留时间、质谱数据一致, 故确证 26 号峰为知母皂苷 B Ⅲ。18 号峰与 23 号峰的质谱裂解规律和相对分子质量相同, 说明二者互为同分异构体。碎片 $917[M - H]^-$, $755[M - H - Glc]^-$, $593[M - H - Gal - Glc]^-$, 结合文献报道, 推测 18 号峰和 23 号峰为知母皂苷 D 或知母皂苷 M。27 号峰负离子质谱数据 $1\ 063[M - H]^-$, $901[M - H - Glc]^-$, $739[M - H - Gal - Glc]^-$, 结合文献报道, 推测 27 号为知母皂苷 B Ⅳ。

15 号峰比 17 号峰多了一分子芹糖和一分子葡萄糖, 结合文献, 推测 15 号峰为 karatavioside C。22 号峰的负离子质谱数据 $1\ 211[M - H]^-$, 失去一分子鼠李糖得 $m/z\ 1\ 079$, 再失去两分子葡萄糖得 $m/z\ 755$, 结合文献推测该化合物为知母皂苷 H1。30 号峰的负离子质谱数据 $757[M - H]^-$, $595[M - H - Glc]^-$, $433[M - H - Gal - Glc]^-$ 与对照品知母皂苷 I 的保留时间、质谱数据一致, 故确证 30 号峰为知母皂苷 I。

3.2 黄酮类化合物的裂解规律 3 号峰的负离子质谱数据 $598[M - H]^-$, $565[M - H - H_2O]^-$, $421[M - H - Glc]^-$, $403[M - H - Glc - H_2O]^-$, $331[M - H - H - Glc - C_3H_6O_3]^-$, $301[M - H - H - Glc - C_4H_8O_3]^-$ 与对照品新芒果苷的保留时间、质谱数据一致, 故确证 3 号峰为新芒果苷。4 号峰的负离子质谱数据 $421[M - H]^-$, $403[M - H - H_2O]^-$, $331[M - H - C_3H_6O_3]^-$, $301[M - H - C_4H_8O_3]^-$, $259[M - H - Glc]^-$ 与对照品芒果苷的保留时间、质谱数据一致, 故确证 4 号峰为芒果苷。

10 号峰在 ESI 源正离子模式有碎片 $419[M + H]^+$, $257[M + H - Glc]^+$, $147[M + H - Glc - C_6H_6O_2]^+$, $137[M + H - Glc - C_8H_6O]^+$, 根据元素分析结果确定分子式为 $C_{21}H_{22}O_9$, 推测 $m/z\ 256$ 为其苷元相对分子质量, $m/z\ 147, 137$ 苷元部分的裂解规律符合黄酮类化合物的裂解规律, 且正负离子质谱数据与对照品甘草苷的保留时间、质谱数据一致, 故确证 10 号峰为甘草苷。7 号峰的质谱裂解规律和分子信息与峰 10 非常接近, 准分子离子峰的质荷比一样, 说明二者互为同分异构体, 但 7 号峰的极性大于 10 号峰, 结合文献报道, 推测 7 号峰为新异甘草苷。9 号峰的正离子质谱信息 $257[M + H]^+$, $147[M + H - C_6H_6O_2]^+$, $137[M + H - C_8H_6O]^+$, 质谱裂解规律与 10 号峰相似, 比其少了一分子糖, 结合文献推测 9 号峰为甘草素。

8 号峰的负离子质谱中可以观察到 $m/z\ 549, 417, 255, 135$, 比 13 号峰多 $m/z\ 132$, 且 8 号峰的正、负离子质谱数据与对照品芹糖甘草苷的保留时间、质谱数据一致, 故确证 6 号峰为芹糖甘草苷, 裂解过程见图 3。14 号峰是 8 号峰的同分异构体, 结合文献报道, 推测 14 号峰为异芹糖甘草苷。

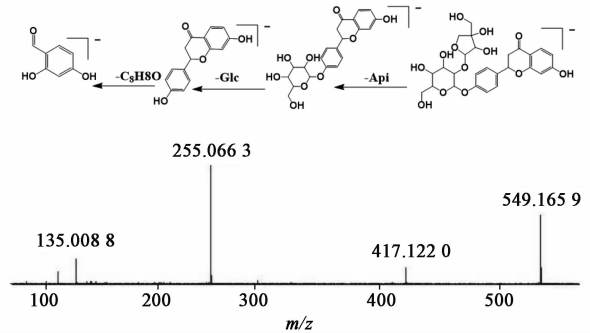


图 3 芹糖甘草苷裂解过程和二级质谱

Fig. 3 Fragmentation pathways and product ion spectrum of liquiritin apioside

3.3 三萜皂苷类化合物的裂解规律 32 号峰以 ESI 源正离子模式有碎片 $m/z\ 823, 647, 471, 453$, 根据元素分析结果确定分子式为 $C_{42}H_{62}O_{12}$, 确定结构中有 2 个葡萄糖醛酸。该化合物的正、负离子质谱数据与对照品甘草酸的保留时间、质谱数据一致, 故确证 32 号峰为甘草酸, 裂解过程见图 4。33 号峰的极性比 32 号峰小, 其裂解规律与相对分子质量基本一致, 推测其为甘草酸的同分异构体。

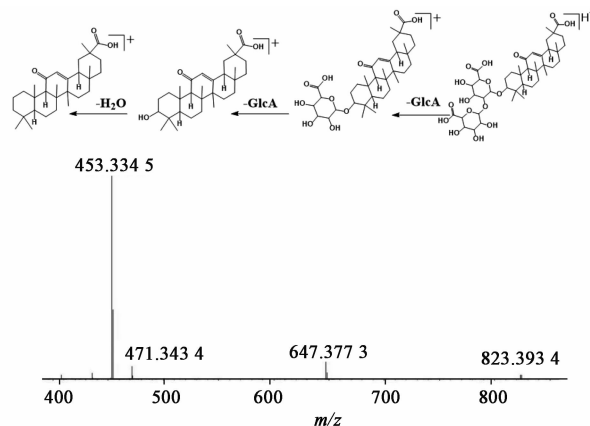


图 4 甘草酸裂解过程和二级质谱

Fig. 4 Fragmentation pathways and product ion spectrum of glycyrrhizic acid

28, 29 号峰的分子离子峰均比 32 号峰多 $m/z\ 16, 839[M + H]^+$, $663[M + H - GlcA]^+$, $487[M + H - 2GlcA]^+$, $469[M + H - 2GlcA - H_2O]^+$, 裂解规律与 32 号峰一样, 脱去两分子葡萄糖醛酸和一分子

水,结合文献报道,推测 28,29 号峰为甘草酸的 1 个羟基化产物。24 号峰比 28,29 号峰又多 m/z 16,裂解规律一样,结合文献报道,推测为甘草酸的 2 个羟基化产物。25 号峰比 32 号峰多 m/z 162,裂解规律为脱葡萄糖醛酸、葡萄糖和水,结合文献报道,推测 25 号峰为甘草皂苷 A3。

3.4 有机酸类化合物的裂解规律 有机酸类成分通常丢失 H_2O, CO, CO_2 而产生碎片离子峰。16 号峰正离子质谱中可以观察 m/z 131, 103, 77, 与对照品肉桂酸的保留时间、质谱数据一致,确证 16 号峰为肉桂酸,裂解过程见图 5。5,6 号峰的准分子离子峰 $163 [M - H]^-$ 比 16 号峰多 m/z 16,裂解规律均是先脱掉一分子 CO_2 ,再脱掉一分子 $C_3H_2O_2$,结合文献报道,推测 5,6 号峰为肉桂酸的一个羟基化产物。

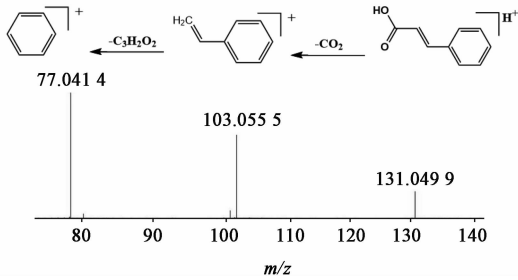


图 5 肉桂酸裂解过程和二级质谱

Fig. 5 Fragmentation pathways and product ion spectrum of cinnamic acid

2 号峰质谱数据 $209 [M - H]^-$, $211 [M + H]^+$, 根据元素分析结果确定分子式为 $C_{10}H_{10}O_5$ 。ESI 源负离子模式下 $165 [M - H - CO_2]^-$, $121 [M - H - 2CO_2]^-$ 接连失去两分子 CO_2 ,且正模式下丢失一分子丙二酸得 m/z 107,结合文献报道,推测 2 号峰为对羟基苯基丙二酸。

4 结论

本实验采用 UFLC-Triple-TOF-MS/MS 技术对白虎加桂枝汤中的化学成分进行研究,通过分析各色谱峰相对分子质量、碎片离子信息、色谱保留时间和质谱裂解规律以及对对照品比对和相关文献资料比对,确证了白虎加桂枝汤中 35 个化合物,包括 16 个甾体皂苷类,6 个三萜皂苷类,7 个黄酮类,4 个有机酸类和 2 个其他类,其中甾体皂苷源自于知母,黄酮类主要源自于炙甘草,有机酸类主要源自于桂枝。相关研究结果为阐明白虎加桂枝汤的药效物质基础提供了参考,也表明了 UFLC-Triple-TOF-MS/MS 有利于更简便、快速、全面地定性分析中药方剂中的化

学成分。

[参考文献]

[1] 马学玉. 加味白虎加桂枝汤治疗类风湿关节炎湿热痹阻证临床研究 [J]. 中医学报, 2016, 31 (10): 1573-1577.

[2] 傅平, 胡涛, 杨明杰, 等. 白虎加桂枝汤配方颗粒炼膏外敷治疗手足痛性关节炎 30 例 [J]. 中医外治杂志, 2016, 25(1): 11-12.

[3] 胡爽杨. 《金匱要略》白虎加桂枝汤治疗小儿咳嗽的临床应用心得 [J]. 环球中医药, 2013, 6(S1): 58.

[4] 徐世军, 李磊, 张文生, 等. 基于方证相关理论的治“痹”经方药效学比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3131-3134.

[5] 徐世军, 代渊, 李磊, 等. 基于“方证相关”理论的治“痹”经方调控 T 细胞亚群比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(15): 2030-2032.

[6] 徐世军, 李磊, 张文生, 等. 基于“方证相关”理论的治“痹”经方调控 TLR/TRAF 信号通路的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(8): 1025-1029.

[7] 李玮婕, 卢建秋, 毛霞, 等. 基于靶标网络分析的治痹寒热经方抗类风湿关节炎作用机制对比研究 [J]. 药学学报, 2018, 53(9): 1387-1397.

[8] 彭平, 王梦婕, 李晓盈, 等. 高效液相色谱法同时测定白虎加桂枝汤中 5 个有效指标性成分的含量 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2017, 19(8): 1391-1395.

[9] 李春来, 李伟东, 吴育, 等. HPLC 同时测定白虎汤中 4 种有效成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 78-80.

[10] ZHONG W F, TONG W S, ZHOU S S, et al. Qualitative and quantitative characterization of secondary metabolites and carbohydrates in Bai-Hu-Tang using ultraperformance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and ultraperformance liquid chromatography coupled with photodiode array detector [J]. J Food Drug Anal, 2017, 25(4): 946-959.

[11] SHAN L, WU Y, YUAN L, et al. Rapid screening of chemical constituents in Rhizoma Anemarrhenae by UPLC-Q-TOF/MS combined with data postprocessing techniques [J]. Evid Based Compl Alt, 2017, 2017: 4032820.

[12] PENG Y, ZHAO L, LIN D, et al. Determination of the chemical constituents of the different processed products of *Anemarrhena asphodeloides* Rhizomes by high-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogra,

- 2016,30(4):508-519.
- [13] 王秋萍,张承,李俐. 两地桂枝挥发油化学成分分析[J]. 安徽农业科学,2015,43(11):113-115.
- [14] 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.
- [15] 马海娟,高简,张亚丽,等. 基于 HPLC-MSⁿ 的甘草成分快速鉴定及质谱裂解途径研究[J]. 中华中医药杂志,2018,33(3):1120-1123.
- [16] WEI F, JIANG X, GAO H Y, et al. Liquiritin induces apoptosis and autophagy in cisplatin (DDP)-resistant gastric cancer cells in vitro and xenograft nude mice in vivo [J]. Int J Oncol, 2017, 51(5):1383-1394.
- [17] 陈丽敏,林辉,徐大量,等. 桂枝甘草汤挥发性成分的 GC-MS 测定研究[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(4):418-421.
- [18] QIAO X, LI R, SONG W, et al. A targeted strategy to analyze untargeted mass spectral data: rapid chemical profiling of *Scutellaria baicalensis* using ultra-high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry and key ion filtering[J]. J Chromatogr A, 2016, 1441:83-95.
- [19] 许文,吴献,黄鸣清,等. 栝楼桂枝汤的血清药物化学研究[J]. 中草药,2017,48(10):2033-2043.
- [20] 高厚明,胡兆流,郑平,等. HPLC-MS 测定小儿安神补脑颗粒中 8 个成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(19):73-78.
- [21] 梁可,崔思娇,张琦,等. UPLC 同时测定桂枝中 5 种活性成分的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(23):3298-3301.
- [22] 杨松,贾英,毕开顺. RP-HPLC 法测定桂枝中 4 种活性成分的含量[J]. 药物分析杂志,2004,24(2):143-146.
- [23] LIU X W, ZHANG F, GAO S H, et al. Metabolite profiling of Zi-Shen pill in rat biological specimens by UPLC-Q-TOF/MS[J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(2):145-160.
- [24] 张宇伟,赵云芳,商婷婷,等. 中药知母化学成分研究[J]. 亚太传统医药,2017,13(11):16-18.
- [25] JI X, FENG Y F, RUI W. Rapid analysis of xanthenes and steroidal saponins in extract of *Rhizoma Anemarrhenae* by ultra-performance liquid chromatography/Quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [C] // International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. IEEE Computer Society, 2012:477-485.
- [26] ZHAO Y, KANG L, YU H, et al. Simultaneous determination of steroidal saponins in *Anemarrhena asphodeloides* Bge. by ultra high-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. J Chin Pharm Sci, 2013(3):226-233.
- [27] 邱昆成,孙振刚,何倩梅,等. LC-MS-MS 测定配伍黄柏对知母中 4 种有效成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(14):84-88.
- [28] 季德,季德,苏晓楠,黄紫炎,等. HPLC-MS 法测定知母盐炙前后 8 种成分变化[J]. 中草药,2017,48(9):1784-1790.

[责任编辑 顾雪竹]