

· 中药工业 ·

基于 HPLC-Q/TOF-MS 的经典名方苓桂术甘汤成分快速分析[△]

闵会^{1,2}, 罗婷婷^{1,2}, 印晓红^{1,2}, 徐斌^{1,2}, 查慧军^{1,2}, 王建方^{1,2}, 王如伟^{1,2*}

1. 浙江康恩贝制药股份有限公司, 浙江 杭州 310052;
2. 浙江省中药制药技术重点实验室, 浙江 杭州 310052

[摘要] 目的: 采用高效液相色谱-四级杆/飞行时间串联质谱法(HPLC-Q/TOF-MS)建立苓桂术甘汤成分快速分析方法, 实现对苓桂术甘汤物质基础的表征。方法: 采用 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以流动相乙腈(B)-0.1%甲酸水(A)溶液进行梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温为 25 °C, 进样量为 10 μL。质谱采用电喷雾离子源(ESI)正、负离子模式, 扫描范围 *m/z* 50 ~ 1000。结果: 对正负模式下的质谱信息进行分析, 并结合相关文献, 共鉴定出苓桂术甘汤中 60 个化学成分, 其中包括有机酸类成分 5 个、黄酮类成分 17 个、三萜类成分 24 个、内酯类成分 5 个, 另有氨基酸类、核苷酸类、糖苷类等成分。结论: HPLC-Q/TOF-MS 技术能实现对苓桂术甘汤的全成分快速分析、鉴定。

[关键词] 经典名方; 苓桂术甘汤; 高效液相色谱-四级杆/飞行时间串联质谱; 快速分析

[中图分类号] R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)03-0529-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20200114007

Rapid Analysis Components of Lingguizhugan Decoction with HPLC-Q/TOF-MS

MIN Hui^{1,2}, LUO Ting-ting^{1,2}, YIN Xiao-hong^{1,2}, XU Bin^{1,2}, ZHA Hui-jun^{1,2}, WANG Jian-fang^{1,2}, WANG Ru-wei^{1,2*}

1. Zhejiang CONBA Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310052, China;
2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Pharmaceutical Technology, Hangzhou 310052, China

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid analysis method by HPLC-Q/TOF-MS, and acquire the material basis characterization of Lingguizhugan Decoction. **Methods:** The analysis was performed on a Welch Ultimate XB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) HPLC column. The mobile phase consisted of acetonitrile (B) and 0.1% formic acid (A) was used as gradient elute. The flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, column temperature was 25 °C, and injection volume was 10 μL. The ESI was operated in positive mode and negative mode, and scanning range was *m/z* 50-1000. **Results:** Through the analysis of mass spectrometry data in positive and negative modes and with the help of relevant literature, a total of 60 chemical compounds in Lingguizhugan Decoction were identified, including 5 organic acid compounds, 17 flavonoid compounds, 24 triterpenoid compounds, 5 lactone compounds, besides, amino acids, nucleotides, and glycosides were also identified. **Conclusion:** Via the HPLC-Q/TOF-MS technology, it was achieved to rapidly analyze and identify the whole compounds of Lingguizhugan Decoction.

[Keywords] classical prescription; Lingguizhugan Decoction; HPLC-Q/TOF-MS; rapid analysis

经典名方是古方中药方剂的杰出代表, 经过几千年仍应用广泛、疗效确切, 具有明显的特色与优势, 是中医药事业的瑰宝。为支持中医药发展、缩

短中药方剂研发周期、降低研发成本, 国家食品药品监督管理局发布《关于印发中药注册管理补充规定的通知》(以下简称《通知》), 《通知》要求

[△] [基金项目] 重大科技专项重点社会发展项目(2013C03005)

* [通信作者] 王如伟, 教授级高级工程师, 研究方向: 药品研究开发及管理; Tel: (0571) 87774766, E-mail: wangrw@conbagroup.com

“来源于古代经典名方的中药复方制剂, 可仅提供非临床安全性研究资料, 并直接申报生产。”近年来, 经典名方的开发研究成为中医药事业的热点之一, 经典名方的中药制剂研发是新时期中药产业高质量发展的重要举措^[1-2]。

苓桂术甘汤出自东汉张仲景《金匱要略》, 其原处方为“茯苓四两, 桂枝(今肉桂)、白术各三两, 甘草二两, 上四味, 以水六升, 煮取三升, 分温三服。”主治中阳不足导致的痰饮水湿证^[3]。苓桂术甘汤在现代临床医学应用广泛, 主要用于心血管疾病、梅尼埃综合征、慢性支气管炎、盆腔炎和眼科疾病等^[4]。苓桂术甘汤是中医“异病同治”思想的典型代表方之一, 在健脾、利水、化痰方面有着显著效果, 且不良反应较小, 具有广泛的临床应用价值, 收录于《古代经典名方目录(第一批)》^[5-6]。

目前, 对于苓桂术甘汤的研究文献主要集中于药理作用及临床应用方面, 缺乏对其物质基础的研究。为快速高效分析苓桂术甘汤中化学物质成分, 本研究首次采用高效液相色谱-四级杆/飞行时间串联质谱法(HPLC-Q/TOF-MS)技术建立快速分析方法, 对苓桂术甘汤提取物进行快速分析鉴定, 明确其物质基础, 为其质量控制及药效物质基础等研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 6530 型 HPLC-Q/TOF-MS 高效液相-质谱联用仪; Milli-QA10 型纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试药

乙腈(Merck, 色谱纯); 甲酸(Aladdin, 色谱纯); 超纯水(自制)。

茯苓饮片(批号: 190226)、肉桂饮片(批号: 190215)、白术饮片(批号: 190312)、甘草饮片(批号: 190214)均购自杭州华东中药饮片有限公司。

2 方法与结果

2.1 方法

2.1.1 苓桂术甘汤提取物制备 取茯苓 12 g、肉桂 9 g、白术 9 g、甘草 6 g, 加水 1.2 L, 煎煮至 0.6 L, 趁热滤过, 减压浓缩至 200 mL, 置真空冷冻干燥器中干燥, 得苓桂术甘汤提取物。

2.1.2 供试品制备 取苓桂术甘汤提取物 0.2 g, 加水溶解, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 注入进样小瓶, 即得。

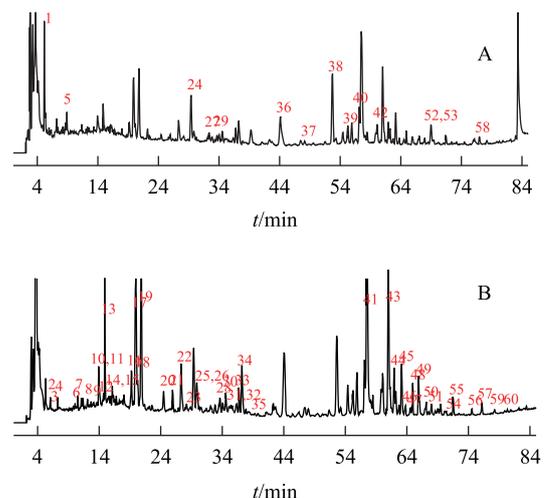
分别取各味中药粉末, 茯苓 1.2 g、肉桂 0.9 g、白术 0.9 g、甘草 0.6 g, 各加水 120 mL, 加热回流 1 h, 放冷, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 注入进样小瓶, 即得。

2.1.3 色谱条件 色谱柱: Welch Ultimate XB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以乙腈为流动相 B, 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A 进行梯度洗脱(0 ~ 10 min, 5% ~ 20% B; 10 ~ 15 min, 20% ~ 23% B; 15 ~ 30 min, 23% ~ 32% B; 30 ~ 40 min, 32% B; 40 ~ 50 min, 32% ~ 38% B; 50 ~ 60 min, 38% ~ 48% B; 60 ~ 70 min, 48% ~ 65% B; 70 ~ 75 min, 65% ~ 95% B; 75 ~ 85 min, 95% B); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

2.1.4 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI)正、负离子, Auto MS/MS 模式; 离子扫描范围 *m/z* 50 ~ 1000, 采集时间 85 min; 干燥气温度 300 °C, 干燥气流速 8 L·min⁻¹, 雾化气压力 241 316.6 Pa, 毛细管电压 3500 V, 裂解电压 175 V, 锥孔电压 65 V, 碰撞能 30 V。

2.2 结果

按照上述条件对苓桂术甘汤提取物及各味药材饮片进行分析, 得到苓桂术甘汤全方的总离子流(TIC)图, 见图 1。为了获得尽可能多的信息, 本研究采用正、负 2 种离子全扫模式对其成分进行定性分析。



注: A. 正离子模式; B. 负离子模式。

图 1 正、负离子模式下苓桂术甘汤的 TIC 图

根据一级质谱精确 m/z 找到化合物的准分子离子, 再通过二级质谱图得到化合物的碎片离子信息, 利用 PubChem、HMDB、MassBank 等数据库, 根据不同种类化合物的化学键断裂规律及相关文献信息, 对谱图中的化合物结构进行分析鉴定, 共得到苓桂

术甘汤中 60 个化合物。其中, 来源于甘草 43 个、肉桂 2 个、茯苓 3 个、白术 7 个, 2 味或 2 味以上共有的化学成分 5 个, 主要分为有机酸、黄酮、三萜皂苷、三萜酸、内酯等类成分, 化合物具体鉴定结果见表 1。

表 1 苓桂术甘汤物质基础解析结果

化合物	t_R	名称	m/z	分子式	模式	MS/MS	化合物种类	归属
1	5.163	L-2-氨基-3-亚甲基酸	144.102 0 [M+H] ⁺	C ₇ H ₁₃ NO ₂	ESI ⁺	84, 56	氨基酸	甘草
2	5.980	尿苷	243.062 3 [M-H] ⁻	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	ESI ⁻	110, 82, 68	核苷酸	全部
3	6.318	环磷酸鸟苷	344.040 5 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₇ P	ESI ⁻	150, 133	核苷酸	甘草
4	7.195	鸟苷	282.085 4 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	ESI ⁻	150, 133, 108, 80, 66	核苷酸	全部
5	8.875	槐果碱	247.180 6 [M+H] ⁺	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O	ESI ⁺	179, 136	生物碱	—
6	10.029	糖槭酚苷 C/D 或其他异构体	461.133 1 [M-H] ⁻	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₃	ESI ⁻	329, 167	糖苷	肉桂, 甘草
7	10.434	原儿茶酸葡萄糖苷	315.074 6 [M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	ESI ⁻	152, 108	糖苷	白术, 肉桂, 甘草
8	11.986	新绿原酸	353.090 2 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	ESI ⁻	191	有机酸	白术
9	13.473	羟基苯甲酸糖苷	299.077 8 [M-H] ⁻	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	ESI ⁻	137, 93	糖苷	甘草
10	13.875	葡萄糖基甘草苷/芹菜糖苷	711.217 8 [M-H] ⁻	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₈	ESI ⁻	579, 549, 417, 255	黄酮	甘草
11	14.078	绿原酸	353.090 2 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	ESI ⁻	191	有机酸	白术
12	14.483	隐绿原酸	353.090 2 [M-H] ⁻	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	ESI ⁻	191	有机酸	白术
13	14.820	5-乙氧基异邻苯二甲酸	209.046 1 [M-H] ⁻	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	ESI ⁻	165, 119, 93, 59	有机酸	甘草
14/15	16.237	夏佛塔苷/新夏佛塔苷	563.144 3 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	ESI ⁻	503, 473, 443, 383, 353	黄酮	甘草
16	19.138	芹糖甘草苷/芹糖异甘草苷/甘草苷元-7-O-芹糖-4'-O-葡萄糖苷	549.164 0 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	ESI ⁻	255, 429	黄酮	甘草
17	19.948	芹糖甘草苷/芹糖异甘草苷/甘草苷元-7-O-芹糖-4'-O-葡萄糖苷	549.164 0 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	ESI ⁻	255, 429	黄酮	甘草
18	20.286	4', 5-二羟基-7-葡萄糖氧基黄烷酮	433.115 6 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	ESI ⁻	271, 151, 119	黄酮	甘草
19	20.758	甘草苷	417.120 4 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	ESI ⁻	255, 135, 119	黄酮	甘草
20	24.402	决明子苷 B	565.159 0 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₄	ESI ⁻	271	黄酮	甘草
21	25.987	5, 7, 8-三羟基黄烷酮 7-葡萄糖苷	433.116 3 [M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	ESI ⁻	271, 151	黄酮	甘草
22	27.236	芹糖甘草苷/芹糖异甘草苷/甘草苷元-7-O-芹糖-4'-O-葡萄糖苷	549.164 0 [M-H] ⁻	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₃	ESI ⁻	255, 429	黄酮	甘草
23	28.821	6"-O-乙酰甘草苷	459.132 2 [M-H] ⁻	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₀	ESI ⁻	255, 135	黄酮	甘草
24	29.388	7-甲氧基甘草苷	431.134 0 [M+H] ⁺	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	ESI ⁺	269	黄酮	甘草
25	29.868	甘草糖苷 D1	695.202 4 [M-H] ⁻	C ₃₅ H ₃₆ O ₁₅	ESI ⁻	255	黄酮	甘草
26	30.002	甘草糖苷 C1	725.212 8 [M-H] ⁻	C ₃₆ H ₃₈ O ₁₆	ESI ⁻	255	黄酮	甘草

续表 1

化合物	t_R	名称	m/z	分子式	模式	MS/MS	化合物种类	归属
27	32.357	香豆素	147.044 0 [M + H] ⁺	C ₉ H ₆ O ₂	ESI ⁺	103, 91	内酯	肉桂
28	32.769	甘草糖苷 J ₂	823.415 6 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆	ESI ⁻	193, 175, 471	三萜	甘草
29	33.639	—	839.405 3 [M + H] ⁺	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	ESI ⁺	487, 469	三萜	甘草
30	34.523	DL-甘草素	255.066 5 [M - H] ⁻	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	ESI ⁻	147, 137, 119	黄酮	甘草
31	36.143	—	333.134 9 [M - H] ⁻	—	ESI ⁻	—	—	白术
32	36.278	乌拉尔甘草皂苷 F	895.398 7 [M - H] ⁻	C ₄₄ H ₆₄ O ₁₉	ESI ⁻	351	三萜	甘草
33	36.683	二羟基甘草次酸	853.388 7 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₈	ESI ⁻	677, 501	三萜	甘草
34	37.088	甘草皂苷 A ₃	983.452 1 [M - H] ⁻	C ₄₈ H ₇₂ O ₂₁	ESI ⁻	821, 645	三萜	甘草
35	39.274	肉桂酸	147.044 6 [M - H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₂	ESI ⁻	129, 103	有机酸	肉桂
36	44.031	甘草皂苷 G ₂	839.405 3 [M + H] ⁺	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	ESI ⁺	487, 469, 451	三萜	甘草
37	48.214	羟基甘草酸/异构体	839.405 3 [M + H] ⁺	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	ESI ⁺	487, 469, 451	三萜	甘草
38	52.668	羟基甘草酸/异构体	839.405 3 [M + H] ⁺	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	ESI ⁺	487, 469, 451	三萜	甘草
39	55.772	羟基甘草酸/异构体	839.405 3 [M + H] ⁺	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	ESI ⁺	487, 469, 451	三萜	甘草
40	57.121	羟基甘草酸/异构体	839.405 3 [M + H] ⁺	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	ESI ⁺	487, 469, 451	三萜	甘草
41	57.533	甘草酸	821.399 8 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	ESI ⁻	351, 193, 113	三萜	甘草
42	60.023	羟基甘草酸/异构体	839.405 3 [M + H] ⁺	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	ESI ⁺	487, 469, 451	三萜	甘草
43	61.042	乌拉尔甘草皂苷 B	821.400 8 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	ESI ⁻	351, 469, 645, 759	三萜	甘草
44	61.919	甘草皂苷 H ₂	821.401 6 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	ESI ⁻	351, 469, 645, 759	三萜	甘草
45	63.134	甘草皂苷 J ₂ /异构体	823.418 1 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆	ESI ⁻	647, 471, 351	三萜	甘草
46	63.741	甘草皂苷 J ₂ /异构体	823.416 6 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆	ESI ⁻	351	三萜	甘草
47	64.483	甘草皂苷 C ₂ /异构体	805.405 3 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	ESI ⁻	453, 629, 351	三萜	甘草
48	64.888	甘草皂苷 C ₂ /异构体	805.405 8 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₅	ESI ⁻	453, 629, 351	三萜	甘草
49	65.833	甘草皂苷 B ₂	807.421 0 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₅	ESI ⁻	455, 631, 351	三萜	甘草
50	67.115	甘草皂苷 K ₂	821.399 2 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	ESI ⁻	351, 469, 645, 759	三萜	甘草
51	67.925	甘草皂苷 J ₂ /异构体	823.414 8 [M - H] ⁻	C ₄₂ H ₆₄ O ₁₆	ESI ⁻	647, 351	三萜	甘草
52	68.997	白术内酯 III	249.145 8 [M + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	ESI ⁺	189, 163, 105, 91	内酯	白术
53	68.997	白术内酯 I	231.137 4 [M + H] ⁺	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	ESI ⁺	185, 143, 117, 105, 91	内酯	白术
54	71.096	16 α , 25-二羟基去氢齿孔酮酸	497.329 4 [M - H] ⁻	C ₃₁ H ₄₆ O ₅	ESI ⁻	—	三萜	茯苓
55	71.569	甘草黄酮醇	353.104 5 [M - H] ⁻	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	ESI ⁻	125, 57	黄酮	甘草
56	74.470	5-甲氧基光甘草酮	335.094 2 [M - H] ⁻	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	ESI ⁻	91	黄酮	甘草
57	76.224	异黄酮 B	351.089 8 [M - H] ⁻	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	ESI ⁻	241, 199, 107, 83, 65	黄酮	甘草
58	76.960	白术内酯 II	233.153 3 [M + H] ⁺	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	ESI ⁺	187, 131, 105	内酯	白术
59	78.316	茯苓新酸 B	483.313 9 [M - H] ⁻	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	ESI ⁻	409, 325, 73	三萜	茯苓
60	80.374	茯苓新酸 A	497.329 5 [M - H] ⁻	C ₃₁ H ₄₆ O ₅	ESI ⁻	423, 379, 73	三萜	茯苓

注：—表示未知化合物或未得到相关化合物的二级碎片。

2.2.1 有机酸类 有机酸广泛存在于各类中药中,其药理作用主要表现在抗炎、抗氧化等方面^[7]。本研究共鉴定出5种有机酸类成分,主要归属于白术、甘草和肉桂。峰8、11、12在负模式下准分子离子均为 m/z 353.090 2 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{16}H_{18}O_9$, 在二级质谱图中均能见 m/z 191 特征碎片, 是由母离子失去1分子咖啡酰基所得 $[M-C_6H_{10}O_5-H]^-$, 根据极性及其出峰顺序, 结合参考文献^[8] 鉴定峰8、11、12分别为新绿原酸、绿原酸和隐绿原酸。峰35的准分子离子为 m/z 147.044 6 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_9H_8O_2$, 在二级质谱图中可见 m/z 129, 103 碎片, 结合参考文献^[9] 鉴定为肉桂酸。

以绿原酸(化合物11)为例, 如图2所示, 说明其裂解规律, 其中 m/z 353.090 2 为绿原酸的准分子离子峰 m/z $[M-H]^-$, 裂解产生二级碎片离子为 m/z 191。

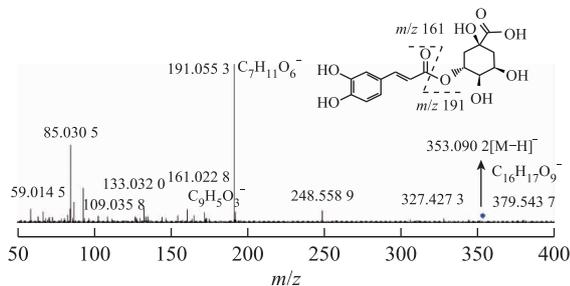


图2 ESI⁻模式下的绿原酸二级质谱图

2.2.2 黄酮类 黄酮类化合物被认定为中药重要的药效物质成分, 广泛存在于植物中。目前, 已有上万个黄酮类成分被发现, 其具有多样的生理活性, 临床上常用于治疗癌症、肿瘤、心脑血管疾病及调节免疫等^[10]。黄酮类化合物具有基本的 $C_6-C_3-C_6$ 结构, 天然黄酮类化合物多与糖基结合, 以黄酮苷的形式存在。因此, 在二级质谱响应中, 多呈现较高的黄酮苷元信号。本研究共鉴定17个黄酮类化合物, 全部归属于甘草。如峰19, 在负离子模式下其准分子离子为 m/z 417.120 4 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{21}H_{22}O_9$, 在二级质谱图中见明显 m/z 255 的黄酮苷元信号, 为准分子离子失去1 β -D-葡萄糖基所得 $[M-C_6H_{11}O_5-H]^-$, 结合参考文献^[9] 鉴定为甘草苷。峰23在负模式下准分子离子为 m/z 459.132 2 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{23}H_{24}O_{10}$, 在二级质谱图中可见明显的 m/z 255 黄酮苷元信号, 为母离子失去1糖基所得 $[M-C_8H_{13}O_6-H]^-$, 结合参考文献^[9] 鉴

定为6''-O-乙酰甘草苷。

以甘草苷(化合物19)为例, 如图3所示, 说明其断裂规律, 其中 m/z 417.120 4 为甘草苷的准分子离子峰 $[M-H]^-$, 裂解产生二级碎片离子为 m/z 255。

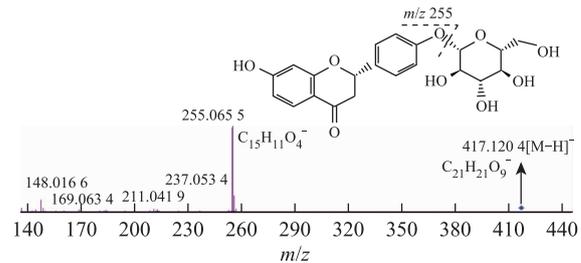


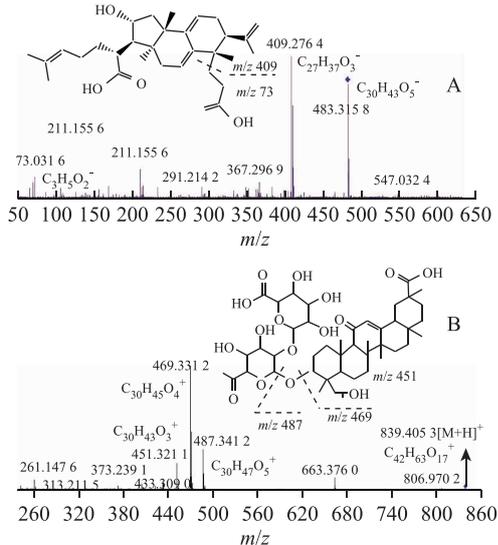
图3 ESI⁻模式下的甘草苷二级质谱图

2.2.3 三萜类 萜类化合物是自然界种类最多、分布最广泛的一类天然产物, 以异戊二烯作为结构单元, 通式为 $(C_5H_8)_n$ 。三萜类化合物多数含有6个异戊二烯单元, 多为四环三萜或五环三萜, 有游离存在于植物体中的, 也有与糖结合成三萜皂苷的。本研究共鉴定出24个三萜类成分, 其中包括3个归属于茯苓的三萜酸类和21个甘草中的三萜皂苷类。峰59在负离子模式下的准分子离子为 m/z 483.313 9 $[M-H]^-$, 分子式为 $C_{30}H_{44}O_5$, 在二级质谱图中明显找到 m/z 409, 325, 73 的碎片离子, m/z 409 为母离子失去1- CH_3CH_2COOH 基所得 $[M-CH_3CH_2COO-H]^-$, 子离子继续失去1分子 CO_2 得到 m/z 367 碎片, 其断裂规律符合三萜酸类裂解规律^[11], 因此, 鉴定化合物59为茯苓新酸B。同样的规律鉴定化合物60为茯苓新酸A, 化合物54为16 α , 25-二羟基去氢齿孔酮酸(16 α , 25-dihydroxydehydroeburiconic acid)。

鉴定出归属于甘草的三萜皂苷类成分共21个, 其与苷元结合的糖基易断裂, 因此, 在二级质谱响应中都呈现出强苷元信号。如峰36在正离子模式下的准分子离子为 m/z 839.405 3 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{42}H_{62}O_{17}$, 在二级质谱图中得到 m/z 487, 469, 451 碎片离子, m/z 469 为母离子失去2个 β -D-吡喃葡萄糖醛基所得 $[M-C_{12}H_{18}O_{13}+H]^+$, 再脱去1分子 H_2O 得到 m/z 451 $[M-C_{12}H_{18}O_{13}-H_2O+H]^+$, 结合参考文献^[12] 鉴定化合物36为甘草皂苷 G_2 。

以茯苓新酸B(化合物59)为例, 如图4A所示, 说明三萜酸类裂解规律, 其中 m/z 483.313 9 为茯苓新酸B的准分子离子峰 $[M-H]^-$, 裂解产生二级碎片离子为 m/z 409 和 73。以甘草皂苷 G_2 (化合物

36) 为例, 如图 4B 所示, 说明三萜皂苷类裂解规律, 其中 m/z 839.405 3 为甘草皂苷 G_2 的准分子离子峰 $[M+H]^+$, 裂解产生二级碎片离子为 m/z 487, 469 和 451。



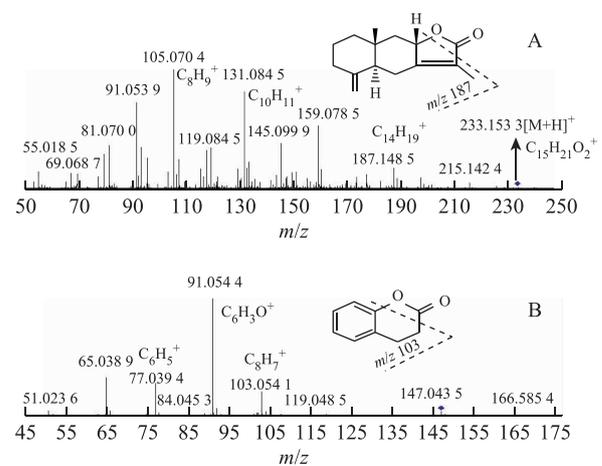
注: A. ESI⁻ 模式下的茯苓新酸 B; B. ESI⁺ 模式下的甘草皂苷 G_2 。

图 4 ESI⁻ 模式下的茯苓新酸 B 及 ESI⁺ 模式下的甘草皂苷 G_2 二级质谱图

2.2.4 内酯类 本研究共鉴定出内酯类成分 5 个, 其中包括白术内酯类 4 个和肉桂中的香豆素 1 个。峰 58 在正离子模式下的准分子离子为 m/z 233.153 3 $[M+H]^+$, 分子式为 $C_{15}H_{20}O_2$, 在二级质谱图中得到碎片 m/z 187, 131 和 105。其中, m/z 187 为母离子失去 $1-CH_2O_2$ 得到 $[M-CH_2O_2+H]^+$, m/z 131 为子离子内部发生重排反应, 失去 $1-C_4H_8$ 所得 $[M-CH_2O_2-C_4H_8+H]^+$, 进一步失去 $1-C_2H_2$ 得到 m/z 105 碎片, 结合参考文献 [13] 鉴定为白术内酯 II。香豆素属于苯丙素类化合物, 天然苯丙素类化合物具有 C_6-C_3 结构, 因其也具有内酯结构, 二级质谱中裂解规律和白术内酯类似。峰 27 在正离子模式下的准分子离子为 m/z 147.044 0 $[M+H]^+$, 其分子式为 $C_9H_6O_2$, 在二级质谱图中得到碎片 m/z 103, 为母离子失去 $1-CH_2O_2$ 所得 $[M-CH_2O_2+H]^+$, 结合参考文献 [14] 鉴定为香豆素。

以白术内酯 II (化合物 58) 为例, 如图 5A 所示, 说明其裂解规律, 其中 m/z 233.153 3 为白术内酯 II 的准分子离子峰 $[M+H]^+$, 裂解产生二级碎片离子为 m/z 187, 131 和 105。图 5B 为香豆素 (化合物 27) 的裂解规律, 其中 m/z 147.044 0 为香豆素的准

分子离子峰 $[M+H]^+$, 裂解产生二级碎片离子为 m/z 103 和 91。



注: A. ESI⁺ 模式下的白术内酯 II; B. ESI⁺ 模式下香豆素。

图 5 ESI⁺ 模式下的白术内酯 II 及香豆素二级质谱图

除了以上类别的化合物外, 本研究还得到少数氨基酸、核苷酸、糖苷类化合物。

3 讨论

中药具有成本低、疗效好、不良反应小的优点, 因其多成分、多靶点的特点对于慢性疾病的治疗具有显著优势。随着系统生物学、信息学、网络药理学等技术的不断发展, 针对复杂性疾病的多靶点创新药研发是未来药物研发的重要途径。经典名方在几千年的历史中发挥着重要的临床价值, 在中药新药研发中意义重大^[15-16]。但也因其化学物质复杂, 药效物质基础难以明确, 有效性研究证据不足致使研发困难重重。HPLC-Q/TOF-MS 具有高分辨率、高灵敏度的特点, 能实现化合物复杂体系的快速分析。本研究为全面表征苓桂术甘汤的物质基础成分, 基于 HPLC-Q/TOF-MS 技术, 对液相流速、柱温、毛细管电压、碰撞能等多个参数进行优化, 建立了苓桂术甘汤成分快速分析的方法; 再通过一级质谱图找到化合物的准分子离子, 然后再根据二级碎片信息, 结合文献分析各类化合物的裂解规律, 最终共鉴定 60 个化合物。该方法快速、准确、灵敏度高, 为苓桂术甘汤的药效物质基础研究、质量控制等研究提供参考。但高分辨质谱技术仍然存在一定局限性, 无法区分同分异构体, 因此, 通过该技术鉴定同分异构体比较困难。

本研究所鉴定的 60 个化合物, 其中来源于甘草的 42 个、肉桂的 2 个、茯苓的 3 个、白术的 7 个,

2味或2味以上共有的化学成分5个。因古代经典名方均为水煎煮提取,而茯苓中的三萜类成分和水不溶性多糖类成分难用水溶出,本方法完全还原古方,因此,在苓桂术甘汤提取物中检测到的茯苓特征成分较少。肉桂、白术中含有较多挥发油类成分,挥发油在煎煮过程中受火候、煎煮时间等影响,存在不同程度的损失,因此,肉桂和白术的特征成分也较少。本研究的意义在于提供一种快速分析方法,表征苓桂术甘汤的化学物质基础,为其质量控制提供参考,考虑到实际煎煮过程对挥发性成分的影响难以控制,因此,未专门针对挥发性成分进行补充研究。不同的煎煮工艺会影响各成分的溶出,因此,不同煎煮工艺下苓桂术甘汤的物质基础可能会存在差异,后期也会持续研究与关注。

参考文献

- [1] 陈畅,程锦堂,刘安.经典名方研发策略[J].中国中药杂志,2017,42(9):1814-1818.
- [2] 张倩,韩星星,毛春芹,等.中药复方制剂开发的机遇与挑战:古代经典名方研究开发的问题分析[J].中国中药杂志,2019,44(19):4300-4308.
- [3] 张仲景.金匱要略[M].北京:人民卫生出版社,2017:44-45.
- [4] 张立康,王作顺.苓桂术甘汤临床应用研究概况[J].湖南中医杂志,2019,35(9):181-182.
- [5] 刘冬涵,薛宇涛,罗菊元,等.经典名方苓桂术甘汤的物质基准量值传递分析[J].中国中药杂志,2019,44(24):5421-5428.
- [6] 王奕博,黄平情,杜媛媛,等.基于第一批经典名方的分析与思考[J].中国中药杂志,2019,44(11):2191-2196.
- [7] 汤喜兰,刘建勋,李磊.中药有机酸类成分的药理作用及在心血管疾病的应用[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(5):243-246.
- [8] 陈玮玲.基于色谱-质谱技术研究青钱柳叶化学成分[D].南昌:南昌大学,2017.
- [9] ALLEN F, GREINER R, WISHART D. Competitive fragmentation modeling of ESI-MS/MS spectra for putative metabolite identification[J]. Metabolomics, 2015 11(1):98-110.
- [10] 溢萍.黄酮类化合物药理作用的分析[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(70):151,166.
- [11] JIN J, ZHOU R, XIE J, et al. Insights into triterpene acids in fermented mycelia of edible fungus *Poria cocos* by a comparative study[J]. Molecules, 2019, 24(7): E1331.
- [12] 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.
- [13] 孟永海,马智超,张振朋,等.基于UPLC/Q-TOF-MS分析白术炮制前后差异性成分[J].中国食品添加剂,2019,30(4):145-153.
- [14] 郝元元. LC-MS/MS法测定柚子皮中香豆素类物质组成及含量[J].食品研究与开发,2019,40(16):146-152.
- [15] 孙晓波.来源于经典名方的中药新药高质量发展战略思考[J].中国药理学与毒理学杂志,2019,33(9):662.
- [16] 徐旭,王玉丽,涂正伟,等.经典名方药理学研究思路探讨[J].药物评价研究,2017,40(12):1816-1820.

(收稿日期:2020-01-14 编辑:王笑辉)

(上接第505页)

- [5] JING R, LI H Q, HU C L, et al. Phytochemical and pharmacological profiles of three *Fagopyrum buckwheats*[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(4):589.
- [6] 黄莎,王建勇,陈庆富,等.金荞麦叶茶有效成分的抗氧化作用研究[J].粮食与油脂,2016,29(2):30-32.
- [7] 严晶,袁嘉嘉,刘丽娜,等.金荞麦药理作用及临床应用研究进展[J].山东中医杂志,2017,36(7):621-624.
- [8] 王安虎,夏明忠,蔡光泽,等.金荞麦的栽培产量及其有效成分含量研究[J].西昌学院学报(自然科学版),2011,25(2):1-3.
- [9] 杨明宏,卢进,张玉方,等.金荞麦采收 SOPP 探讨与研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2002,4(1):56-58.
- [10] 陈维洁,阮培均,梅艳,等.不同采收期对金荞麦根茎产量及品质的影响[J].现代农业科技,2017(10):78-79.
- [11] 杨玺文,张燕,李隆云.药用植物金荞麦研究进展[J].中国现代中药,2019,21(6):837-846.
- [12] 焦连魁,曾燕,赵润怀,等.金荞麦资源研究进展[J].中国现代中药,2016,18(4):519-525.

(收稿日期:2020-03-18 编辑:戴玮)