

UPLC-Triple-TOF-MS/MS 快速鉴定豨桐制剂的化学成分

杨宗翰, 陶冠琪, 宋文颖, 张其新, 徐世芳, 黄文康, 叶益萍* (杭州医学院药学院, 杭州 310013)

摘要: 目的 建立超高压液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法快速分析抗类风湿性关节炎中药复方豨桐制剂中的化学成分。方法 采用 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) 色谱柱, 以 0.1% 甲酸水溶液 (A)-0.1% 甲酸乙腈 (B) 作为流动相梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 分别在正离子、负离子模式下进行检测, 采用 Peakview 软件结合药材化合物数据库进行分析; 根据获得的精确相对分子量, 结合与对照品比对、二级质谱特征碎片以及文献报道确定化学成分。结果 推测鉴定了 78 个化学成分, 包括苯丙素类 20 个, 萜类 33 个, 黄酮类 19 个, 脂氧化物 6 个, 其中 2 个可能为新化合物。结论 该方法可以全面快速地鉴定豨桐制剂中的化学成分, 为豨桐丸、豨桐胶囊的质量控制和药效物质基础研究提供参考。

关键词: 豨桐制剂; 超高压液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法; 苯丙素; 萜类; 黄酮类; 脂氧化物

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)06-0777-10

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20224293

引用本文: 杨宗翰, 陶冠琪, 宋文颖, 等. UPLC-Triple-TOF-MS/MS 快速鉴定豨桐制剂的化学成分[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(6): 777-786.

Rapid Identification of Chemical Components in Xitong Preparations by UPLC-Triple-TOF-MS/MS

YANG Zonghan, TAO Guanqi, SONG Wenying, ZHANG Qixin, XU Shifang, HUANG Wenkang, YE Yiping* (School of Pharmacology, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a rapid analytical method to identify the chemical components in Xitong preparations for the treatment of rheumatoid arthritis by ultra-high performance liquid chromatography coupled triple time-of-flight mass spectrometry(UPLC-Triple-TOF-MS/MS). **METHODS** The analysis was performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) column with the mobile phase consisting of water containing 0.1% formic acid(A) and acetonitrile containing 0.1% formic acid(B) in gradient mode at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. Data acquisition was carried out under positive and negative ion modes. The processed data was analyzed by Peakview software and compound database. The chemical components were determined by comparison with standard products, combining with the characteristic fragments in secondary MS, and those in the related literatures. **RESULTS** Seventy-eight compounds were identified including 20 phenylpropanoids, 33 terpenes, 19 flavonoids, 6 oxylipins, two of which might be new compounds. **CONCLUSION** The method can be used for rapid identification of chemical compositions in Xitong preparations, which provides basis for quality control and elucidation of pharmacodynamic material basis of Xitong pills and capsules.

KEYWORDS: Xitong preparation; UPLC-Triple-TOF-MS/MS; phenylpropanoids; terpenes; flavonoids; oxylipins

豨桐丸最早记载于乾隆五十六年(1791年)的《济世养生集》, 具有清热燥湿, 疏风止痛的功效^[1]。豨桐丸由豨莶草和臭梧桐 2 味中药组成, 适用于风湿热痹, 临床用来治疗类风湿、风湿性关节炎、骨关节炎等疾病, 疗效良好^[2-3]。豨桐丸首次收录于中国药典 2010 年版, 延续至今, 且在丸剂基础上改剂型为胶囊剂^[4-5], 2 种剂型组方相同、提取方法相同。现代药理研究证明豨桐丸具有抗类风湿性关节炎和痛风性关节炎作用^[6-7]。处

方药味豨莶草为腺梗豨莶 *Siegesbeckia pubescens* Makino、豨莶 *S. orientalis* L. 和毛梗豨莶 *S. glabrescens* Makino 的地上部分^[5], 其富含二萜、倍半萜及其苷类、黄酮类成分等^[8]。臭梧桐含有苯乙醇苷类、黄酮类和二萜类成分等^[1]。有关豨桐制剂(豨桐丸和豨桐胶囊)的含量测定报道仅限于药典标准中对单一指标的测定, 其质量标准控制指标单一, 因此较全面分析豨桐制剂的化学成分显得尤为重要。

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGC21H280002)

作者简介: 杨宗翰, 男, 硕士 E-mail: a18758571161@163.com *通信作者: 叶益萍, 女, 博士, 研究员 E-mail: yeyiping2005@163.com

本研究采用 UPLC-Triple-TOF-MS/MS 技术鉴定豨桐制剂中的化学成分, 使用 Peakview 软件结合药材化合物数据库进行分析, 为其质量控制和物质基础研究奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Acquity™ ultra 型高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Triple TOF 5600+型飞行时间质谱, 配有电喷雾离子源 (美国 AB SCIEX 公司); METTER AL204 万分之一电子分析天平、METTER XS105 十万分之一电子分析天平均购自梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司。

1.2 试剂

豨桐制剂 (自制), 水为超纯水。秦皮乙素对照品 (成都埃法生物科技有限公司, 批号: AF22031405; 纯度: 98%); 芦丁对照品 (Chem Faces, 批号: CFN9962; 纯度: 98%); 木犀草素对照品 (成都普思生物科技股份有限公司, 批号: PS010346; 纯度: 98%); 豨莨菪 (上海博顿生物化工有限公司, 批号: 30-1007; 纯度: 98%)。毛蕊花糖苷 (批号: 21102721; 纯度: 98%)、异毛蕊花糖苷 (批号: 21102722; 纯度: 98%)、16-*O*-Acetyldarutoside (批号: 22012029; 纯度: 98%)、15-*O*-Acetyldarutoside (批号: 22012028; 纯度: 98%) 均购自上海同田生物有限公司。Pubeside D (批号: 20211102; 纯度: 98%) 由杭州医学院药学院制备。

豨莨菪药材购自杭州华东中药饮片公司 (批号: 20201225), 由杭州医学院李晓誉研究员经 DNA 条形码^[9-10]、性状、化学鉴别等方法鉴定为毛梗豨莨 *S. glabrescens* Makino、腺梗豨莨 *S. pubescens* Makino 和豨莨 *S. orientalis* L. 的地上部分混合品。臭梧桐药材购自杭州华东中药饮片公司 (批号: 20210603), 经李晓誉研究员鉴定为 *Clerodendrum trichotomum* 的全草。

2 方法

2.1 样品制备

2.1.1 豨桐制剂制备 参照中国药典 2020 年版豨桐胶囊制法^[5], 称取 500 g 豨莨草, 1000 g 臭梧桐, 加 10 倍量水煎煮 2 次, 每次 2h, 合并煎液, 滤过, 浓缩成稠膏, 减压真空干燥、粉碎得棕褐色粉末 463.9 g。

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称取秦皮乙素、

芦丁、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、木犀草素、豨莨菪、16-*O*-Acetyldarutoside、15-*O*-Acetyldarutoside、Pubeside D 对照品适量, 溶于甲醇, 即得混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取豨桐制剂粉末 (过 2 号筛) 约 0.1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 10% 乙醇溶液 25 mL, 称定质量, 超声处理 30 min, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 样品分析

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×150 mm, 1.8 μm) 色谱柱; 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A), 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B), 线性梯度洗脱 (0 min, 5%B; 0~25 min, 5%→40%B; 25~35 min, 40%→95%B)。流速为 0.3 mL·min⁻¹。柱温为 50 °C。检测波长为 254 nm, 进样量为 2 μL。

2.2.2 质谱条件 在 ESI 正、负离子模式下进行; 扫描范围: *m/z* 100~1 500; 雾化气 (GS1): 55 psi; 雾化气 (GS2): 55 psi; 气帘气 (CUR): 35 psi; 离子源温度: 600 °C (正), 550 °C (负); 离子源电压 (IS): 5 500 V (正)~4 500 V (负)。一级扫描: 去簇电压 (DP) 为 100 V; 聚焦电压 (CE) 为 10 V。二级扫描: 使用 TOF MS~Product Ion~IDA 模式采集质谱数据, CID 能量为 (40±20)eV, 进样前, 用 CDS 泵做质量轴校正, 使质量轴误差 < 2 × 10⁻⁶。

2.2.3 数据处理方法 采用 Peakview 软件 (AB SCIEX, version 1.2.0.3) 处理。

3 结果与分析

3.1 化合物鉴定

豨莨制剂溶液采用 UPLC-Triple-TOF-MS 在正、负离子模式下分析, 总离子流图见图 1。UPLC-Triple-TOF-MS 获得分子式和 MSⁿ, 通过与对照品比对, 没有对照品的化合物根据碎片离子与文献数据及处方药味化合物数据库, 分析质谱裂解规律, 共鉴定了 78 个化合物, 包括苯丙素类 20 个, 萜类 33 个, 黄酮类 19 个, 脂氧化物 6 个, 其中 2 个可能为新化合物, 见表 1。

3.2 主要化合物的鉴定与裂解规律

3.2.1 苯丙素类 本实验中一共鉴定了 20 种苯丙素类成分, 其中 15 个为苯丙素苷类化合物, 4 个为简单苯丙素类或其二聚体, 1 个为香豆素类。苯丙素苷类化合物主要来源于处方药味臭梧桐, 为臭梧桐的主要生物活性成分^[11-14]。

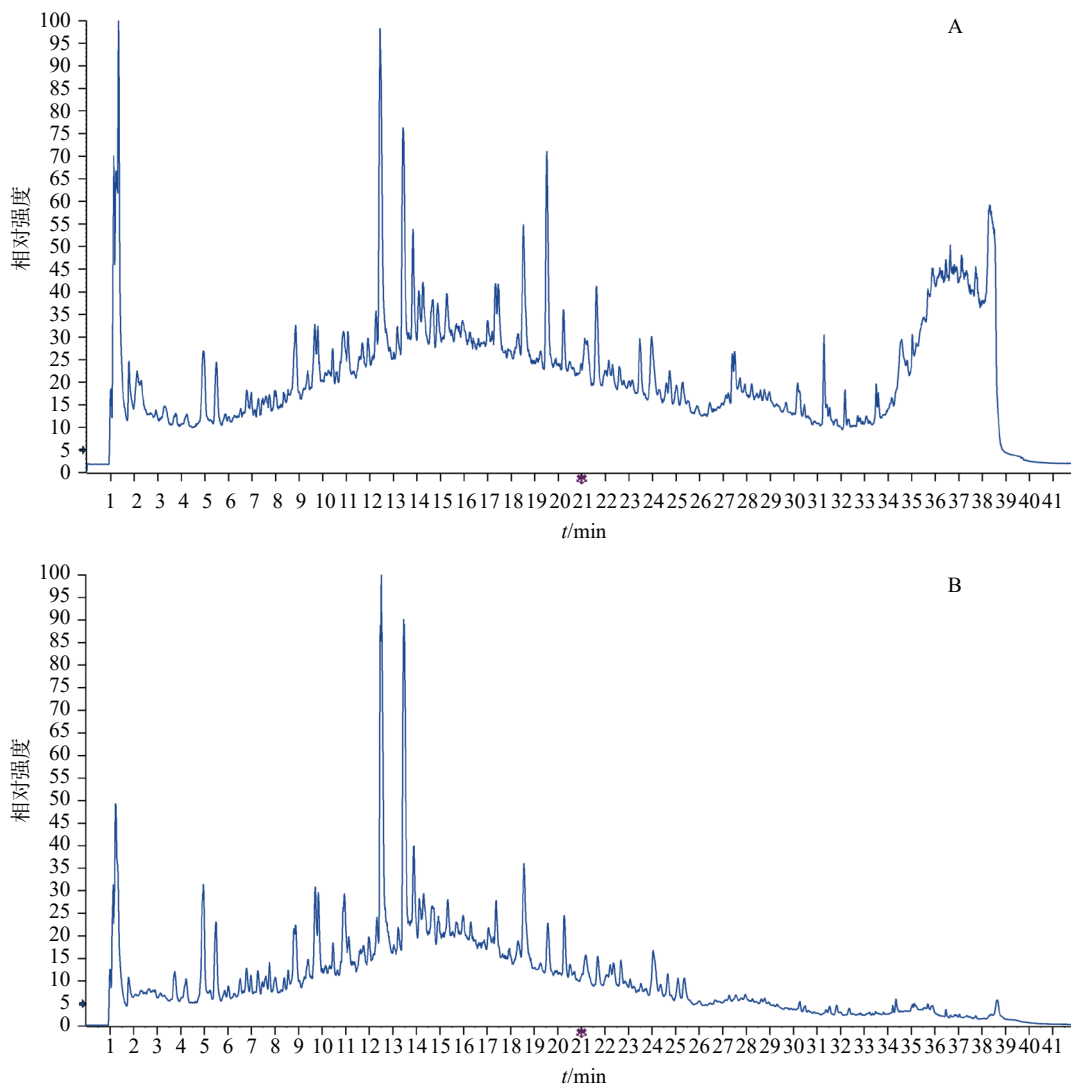


图 1 稀桐制剂质谱总离子流图

A-正离子模式; B-负离子模式。

Fig. 1 Total ion current diagram of Xitong preparation

A-Positive mode; B-negative mode.

表 1 稀桐制剂 UPLC-Triple-TOF-MS/MS 化学成分鉴定

Tab. 1 Identification of chemical components from Xitong preparations by UPLC-Triple-TOF-MS/MS

编 号	保留时 间/min	化合物	分子式	[M-H] ⁻ /[M- H+HCOOH] ⁻	误差/ ×10 ⁻⁶	MS ²⁽⁻⁾	[M+H] ⁺	误差/ ×10 ⁻⁶	MS ²⁽⁺⁾	化合物类型
1	2.85	去鼠李糖毛蕊花糖苷 (Desrhamnosyl acteoside)	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	477.146 2	-2.7	477.146 2, 459.152 3, 161.044 3, 151.039 5, 113.025 5				苯丙素苷类
2	4.94	脱咖啡酰基毛蕊花糖苷 (Decaffeoyl acteoside)	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	461.171 8	-4.1	461.171 8, 315.108 9, 297.098 1, 161.044 7, 135.045 0, 113.025 6	463.173 7	-3.2	197.082 3, 179.070 2, 144.080 6	苯丙素苷类
3	6.02	Inermioside A1	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₄	507.177 5	-3.4	507.177 5, 463.183 7, 161.044 1				环烯醚萜苷类
4	7.46	秦皮乙素 (Aesculetin) ^a	C ₉ H ₆ O ₄	177.018 5	-0.7	177.018 5, 149.023 5, 133.029 2, 105.035 7	179.026 6	6.2	133.025 5, 123.043 9, 51.027 7	苯丙素苷类
5	7.59	咖啡酸 (Caffeic acid)	C ₉ H ₈ O ₄	179.041 7	-3.4	179.041 7, 135.045 8				苯丙素苷类
6	8.00	Darendoside B	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₂	475.187 9	-3.1	475.187 9, 329.123 5, 161.043 8, 113.024 6	477.189 4	-1.7	145.064 7	苯丙素苷类
7	8.69	木犀草素 7-芸香糖苷 (Scolymoside)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.156 4	-3.5	593.156 4, 473.113 6, 383.078 6, 353.067 5, 297.076 4	595.158 5	1.1	595.158 5, 475.114 7, 457.107 6, 337.068 6, 325.069 3, 216.084 7	黄酮类

续表 1

编 号	保留时 间/min	化合物	分子式	[M-H] ⁻ /[M- H+HCOOH] ⁻	误差/ ×10 ⁻⁶	MS ²⁽⁻⁾	[M+H] ⁺	误差/ ×10 ⁻⁶	MS ²⁽⁺⁾	化合物类型
8	9.70	大车前苷 (Plantamajoside)	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	639.2	-0.5	639.200 0, 621.186 4, 529.158 0, 459.152 2, 179.034 2, 161.023 9				苯丙素苷类
9	9.72	Euphroside	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	375.136	-2.6	375.136 0, 191.019 2, 55.032 2				环烯醚萜苷类
10	9.84	车前草苷 D(Plantainoside D)	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	639.2	-0.5	639.200 0, 621.186 4, 529.158 0, 459.152 2, 179.034 2, 161.023 9				苯丙素苷类
11	10.93	海常黄苷 (Clerodendrin)	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₇	621.117 7	1.1	621.117 7, 475.126 7, 269.079 6, 161.023 1	623.119 5	4.5	623.119 5, 447.090 7, 271.059 0	黄酮类
12	11.61	芦丁 (Rutin) ^a	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609.146 1	-5.0	609.146 1, 301.035 4, 283.024 8, 151.003 7	611.153 4	-0.8	303.049 8, 249.111 9	黄酮类
13	11.89	染料木苷(Genistin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀				433.111 5	-3.2	433.111 5, 163.033 1	黄酮类
14	12.14	野黄芩苷 (Scutellarin)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461.077 6	-4.7	461.077 6, 285.041 3	463.080 2	0.8	463.080 2, 287.052 6	黄酮类
15	12.35	荜草苷(Orientin)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.100 7	0.2	447.100 7, 285.040 6	449.100 6	1.2	287.053 1, 145.026 1	倍半萜
16	12.50	毛蕊花糖苷 (Acteoside) ^a	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.203 6	-0.2	623.203 6, 461.145 3, 315.108 5, 161.045 5	625.204 3	0.9	325.089 7, 287.052 7, 163.038 4	苯丙素苷类
17	13.04	异绿原酸 A (Isochlorogenic acid A)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.125	-2.3	515.125 0, 353.086 9, 191.054 7, 179.033 4, 073.044 2	517.126 2	-3.3	163.076 2, 145.027 9	苯丙素类
18	13.15	6-C-葡萄糖-8-C-木糖芹 菜素 (Vicenin-2)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593.156 4	-3.5	593.156 4, 473.113 6, 383.078 6, 353.067 5, 297.076 4	595.158 5	1.1	595.158 5, 475.114 7, 457.107 6, 337.068 6, 325.069 3, 216.084 7	黄酮类
19	13.20	滨藜黄苷 (Cirsimarín)	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	475.129 8	-4.4	475.129 8, 431.135 9, 323.076 5, 161.024 6				黄酮类
20	13.47	异毛蕊花糖苷 (Isoacteoside) ^a	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.203 6	-0.2	623.203 6, 461.170 5, 161.024 4	625.204 3	0.9	325.089 7, 287.052 7, 163.038 4	苯丙素苷类
21	13.88	迷迭香酸 (Rosmarinic acid)	C ₁₈ H ₁₆ O ₈				361.164 5	-1.1	361.164 5, 343.153 0, 315.121 8, 165.054 6	苯丙素类
22	14.05	山柰酚-3-O-β-D-葡萄糖 苷 (Kaempferol 3-O-β- D-glucoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.100 7	0.2	447.100 7, 285.040 6	449.100 6	1.2	287.053 1, 145.026 1	黄酮类
23	14.14	金合欢素-7-O-β-D-葡萄 糖苷 (Acacetin 7-O-β- D-glucoside)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	445.083 9	-2.2	269.045 6	447.085 2	0.6	447.085 2, 271.059 7	黄酮类
24	14.20	Inerminoside C	C ₃₁ H ₄₆ O ₁₆	673.278 8	-3.0	673.278 8, 505.158 3, 193.050 6, 158.035 1, 149.060 8				环烯醚萜苷类
25	14.40	异绿原酸 B (Isochlorogenic acid B)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.125	-2.3	515.125 0, 353.086 9, 191.054 7, 179.033 4, 073.044 2	517.126 2	-3.3	163.076 2, 145.027 9	苯丙素类
26	14.63	焦地黄苯乙醇苷 D(Jionoside D)	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	637.219 7	-2.2	637.219 7, 461.170 0.175.039 9	639.221 1	-2.2	353.110 4, 177.053 1, 145.028 8	苯丙素苷类
27	14.60	高车前素 7-O-新橙皮糖 苷 (Hispidulin 7-O- neohesperidoside)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	607.173 3	-1.4	607.173 3, 299.056 5	609.174 1	-4.1	301.071 0, 286.047 0	黄酮类
28	14.75	高车前素 7-O-β-D-葡萄 糖苷 (Hispidulin 7-O- β-D-glucoside)	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	475.094 7	-1.6	475.049 7, 299.055 7, 284.031 9	477.096 7	2.6	301.070 8, 286.046 6, 163.075 9	黄酮类
29	15.14	木犀草苷 (Luteoloside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.100 7	0.2	447.100 7, 285.040 6	449.100 6	1.2	287.053 1, 145.026 1	黄酮类
30	15.49	汉黄芩苷 (Wogonin 7- O-β-D- glucuronide)	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁				461.106 5	-2.8	271.060 6, 163.039 8	黄酮类
31	15.51	(2β,5β,9β,10α,13α)-2,15, 16-Trihydroxypimar- 8(14)-en-18-oic acid	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	351.224 2	-2.1	351.224 2, 321.207 0				二萜类

续表 1

编 号	保留时 间/min	化合物	分子式	[M-H] ⁻ /[M- H+HCOOH] ⁻	误差/ ×10 ⁻⁶	MS ⁽⁻⁾	[M+H] ⁺	误差/ ×10 ⁻⁶	MS ⁽⁺⁾	化合物类型
32	15.98	Leucosceptoside A	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	637.219 7	-2.2	637.219 7, 461.170 0, 175.039 9	639.221 1	-2.2	353.110 4, 177.053 1, 145.028 8	苯丙素苷类
33	16.12	Zoapatanolide B	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361.165 7	-3.4	361.165 7, 343.155 1, 331.154 6, 317.139 4	363.172 9	-3.2	329.171 7, 311.173 8, 283.167 3, 227.108 8	倍半萜
34	16.15	2 α ,15-dihydroxy-3 β -(2'- hydroxy-2'-methyl-3'- acetoxy)butanoyloxy- 6 α , 18-diacetoxy- 4 α ,17-epoxyclerodan- 11,16-lactone	C ₃₁ H ₄₆ O ₁₄	641.286 7	-3.3	641.286 7, 479.231 0, 301.179 8				二萜类
35	16.81	鸢尾苷 (Tectoridin)	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.115 1	-2.4	343.213 0, 325.201 2, 209.116 7				黄酮类
36	16.87	Martinoside	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	651.235 3	-2.2	359.144 7, 253.143 5, 185.117 3				苯丙素苷类
37	17.38	角胡麻苷 D(Cistanoside D)	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅				653.242	-3.1	551.318 5, 177.053 7, 145.027 3	苯丙素苷类
38	18.18	蒙花苷 (Linarin)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄				593.183 6	-4.7	447.124 3, 285.073 7	黄酮类
39	18.32	木犀草素 (Luteolin) ^a	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.046 9	-3.1	285.046 9, 151.003 2, 133.030 1	287.047 7	4.3	287.047 7, 153.018 5	黄酮类
40	18.51	Isomartynoside	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	651.235 3	-2.2	359.144 7, 253.143 5, 185.117 3				苯丙素苷类
41	18.56	3,12-O- β -D- diglucopyranosyl- 11,16-dihydroxyabieta- 8,11,13-triene	C ₃₂ H ₃₀ O ₁₄	657.318 6	-2.2	657.318 6, 495.263 1				二萜类
42	18.70	Pubeside D ^a	C ₂₆ H ₄₂ O ₉	497.279 4	-1.8	543.281 8, 497.279 4	499.287 5	2.2	337.235 3, 283.204 4, 163.037 3	二萜类
43	18.92	焦地黄苯乙醇苷 (Jionoside C)	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₃	591.213 3	-3.8	591.213 3, 161.023 5				苯丙素苷类
44	19.57	奇任醇 (Kireinol) ^a	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	383.238 4	1.8()	383.238 4, 295.187 6, 277.183 5, 271.024 5				二萜类
45	20.28	豨莶苷 (Darutoside) ^a	C ₂₆ H ₄₄ O ₈	529.305 7	4.3	529.305 7, 483.300 5, 161.044 6, 113.025 0				二萜类
46	20.45	Clerodenoid A	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	347.192 6	-3.2	347.192 6, 329.174 6, 303.159 5, 271.132 5	349.193 7	-5	153.069 0, 147.078 1	二萜类
47	20.59	Croderodendrum B	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	355.125 1	-2.6	355.125 1, 189.055 1, 145.064 8	357.126	3.9	247.068 3, 147.045 5	二萜类
48	20.70	Ent-16,17,18- trihydroxykauran-19- oic acid	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	351.224 2	-2.1	351.224 2				二萜类
49	21.18	芹菜素 (Apigenin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.051 9	-3.5	269.051 9, 117.032 3	271.052 8	-1.8	271.052 8, 153.018 4	黄酮类
50	21.22	Villosin C	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	359.156 2	-3	359.156 2, 341.139 2, 315.123 4	361.158 2	2.5	343.153 7, 147.080 0	二萜类
51	21.65	16-O-malonylkireinol	C ₂₃ H ₃₆ O ₇	423.238 4	-3.1	423.214 6, 379.249 1, 84.993 1, 59.019 4				二萜类
52	21.69	16-乙酰基奇任醇 (16- acetylkireinol)	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	379.255 5	-2.1	379.255 5, 59.016 2				二萜类
53	21.72	15-O-malonylkireinol	C ₂₃ H ₃₆ O ₇	423.238 4	-3.1	423.214 6, 379.249 1, 84.993 1, 59.019 4				二萜类
54	21.89	穿心莲内酯 (Andrographolide)	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	349.208 5	-2.3	349.208 5, 245.189 7	351.209 3	-3.1	351.209 3	二萜类
55	22.36	Siegesbeckia C	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	335.229 4	-1.9	335.229 4, 305.211 1, 271.206 0				二萜类
56	22.55	Trichotomoside B	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	641.322 4	-4.3	641.322 4, 479.268 5, 317.211 5	643.325 1	2.5	643.325 1	苯丙素苷类

续表 1

编 号	保留时 间/min	化合物	分子式	[M-H] ⁻ /[M- H+HCOOH] ⁻	误差/ ×10 ⁻⁶	MS ²⁽⁻⁾	[M+H] ⁺	误差/ ×10 ⁻⁶	MS ²⁽⁺⁾	化合物类型
57	22.75	3-Dihydroteuvinone G	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	345.177 3	-2.0	345.177 3, 327.160 3, 301.145 2	347.178	-2.8	149.060 3, 145.064 7	二萜类
58	22.86	Ent-18-acetoxy-16,17- dihydroxykauran-19- oic acid	C ₂₂ H ₃₄ O ₆	393.234 8	-1.9	393.234 8, 349.101 2, 335.101 3, 59.017 2				二萜类
59	23.07	12-O-β-D- glucopyranosyl-3,11, 16-trihydroxyabieta- 8,11,13-triene	C ₂₆ H ₄₀ O ₉	495.266 7	-1.0	495.266 7, 333.206 5, 303.197 4				二萜类
60	24.15	Siegesbeckin E	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.239 8	-2.5	329.239 8, 211.132 6, 171.101 6				脂氧化物
61	24.34	Clerodenoid B	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361.171 7	-3.4	361.171 7, 217.138 0	363.172 9	-3.2	329.171 7, 311.173 8, 283.167 3, 227.108 8	二萜类
62	24.36	Siegesbeckin F	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	329.239 8	-2.5	329.239 8, 211.132 6, 171.101 6				脂氧化物
63	24.66	16-O-乙酰基豨莶苷 (16- O-Acetyldarutoside) ^a	C ₂₈ H ₄₆ O ₉	571.311 8	-3.4	571.311 8, 525.310 2, 465.287 3, 161.042 2, 101.024 4, 71.031 9, 59.013 9				二萜类
64	25.10	Siegesbeckia D	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	335.229 3	-2.3	335.229 3				二萜类
65	25.34	Trichotomoside A	C ₂₆ H ₃₄ O ₉	489.219 4	-1.8	489.219 4, 327.159 4, 283.132 5				苯丙素苷类
66	25.36	15-O-乙酰基豨莶苷 (15- O-Acetyldarutoside) ^a	C ₂₈ H ₄₆ O ₉	571.311 8	-3.4	571.311 8, 525.310 2, 433.258 0, 161.039 7				二萜类
67	25.41	16-O-malonyldarutoside	C ₂₉ H ₄₆ O ₁₁	569.296 6	-0.8	569.296 6, 525.310 3, 483.300 6, 465.287 5, 161.146 6, 101.024 4, 59.013 9				二萜类
68	26.00	Clerodenoid C	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	361.171 7	-3.4	361.171 7, 217.138 0	363.172 9	-3.2	329.171 7, 311.173 8, 283.167 3, 227.108 8	二萜类
69	26.03	15-O-malonyldarutoside	C ₂₉ H ₄₆ O ₁₁	569.298 3	-0.7	569.298 3, 525.311 8, 483.302 2, 465.289 2, 161.044 8, 101.025 0, 59.013 9				二萜类
70	26.68	5,6,4'-Trihydroxy-7,3'- Dimethoxyflavone	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.072 9	-3.1	329.072 9, 314.044 1, 299.020 3, 271.024 9	331.074	-5.0	316.052 8, 151.110 4	黄酮类
71	27.95	14-Deoxycoleon U	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	329.182 3	-2.6	329.182 3, 270.126 1				二萜类
72	28.77	2-Keto-16- Acetyloxykireinol	C ₂₂ H ₃₄ O ₅	377.239 3	-3.6	377.239 3, 362.240 1, 347.240 9, 59.017 4				二萜类
73	30.26	Teuvinone F	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	337.115	-1.2	337.115 0, 322.084 3, 307.059 0				二萜类
74	32.37	Ent-17-Isobutyryloxy-18- Hydroxykauran-19- Oic acid	C ₂₄ H ₃₈ O ₅	405.270 3	-4.0	405.270 3, 375.251 8, 271.206 1				二萜类
75	35.05	Siegesbeckin A	C ₁₉ H ₃₆ O ₅	343.255 6	-2.0	343.255 6, 213.186 4, 147.065 4, 85.065 3				脂氧化物
76	35.16	Siegesbeckin B	C ₁₉ H ₃₆ O ₅	343.255 6	-2.0	213.184 6				脂氧化物
77	35.72	Siegesbeckin C	C ₂₀ H ₃₈ O ₅	357.270 3	-4.6	227.199 6, 129.055 8				脂氧化物
78	35.92	Siegesbeckin D	C ₂₀ H ₃₈ O ₅	357.270 3	-4.6	227.199 6, 129.055 8				脂氧化物

注: ^a表示该成分通过与对照品比对确认。Note: ^aIndicated that the component has been confirmed by comparison with the reference substance.

苯丙素苷类化合物结构相似: 通过酯键和糖
苷键将葡萄糖与苯丙烯酸或苯乙醇连接, 糖的数

量和类型有所不同, 因此裂解规律相似。

以毛蕊花糖苷及其同分异构体异毛蕊花糖苷

为例解释说明苯丙素苷类化合物的质谱。毛蕊花糖苷在负离子模式下，发现 $[M-H]^-$ m/z 为 623.198 1 的准分子离子峰，二级质谱中丰度较高的离子峰鉴定为是酯键断裂而形成 m/z 为 161.045 5 和 461.145 3 的两部分，进一步可观察到糖基逐渐丢失而产生的碎片峰 m/z 315.108 5，但是丰度较低，见图 2。异毛蕊花糖苷的裂解和毛蕊花糖苷极其相近，并与对照品比对确定。

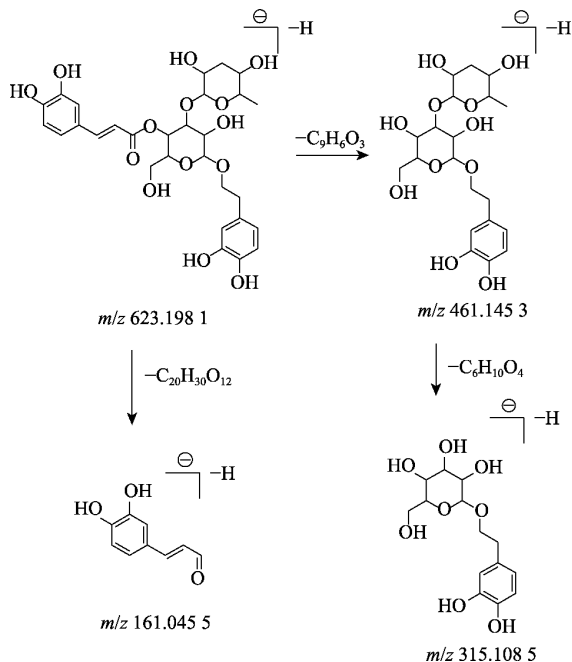


图 2 毛蕊花糖苷的 MS/MS 裂解规律
Fig. 2 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of acteoside

由对照品比对，鉴定出的香豆素类化合物为秦皮乙素，在负离子模式下发现 $[M-H]^-$ m/z 177.018 5 的准分子离子峰，二级质谱下可观察到 m/z 为 149.023 5 的碎片峰，鉴定为脱去 CO 的碎片离子，另外可观察到 m/z 为 133.029 2 和 105.035 7 的碎片峰，鉴定为是脱去 CO_2 的碎片离子以及其进一步失去乙烯的不稳定碎片，见图 3。

3.2.2 萜类 本实验中共鉴定了 31 个已知萜类成分，其中二萜类占 27 个，倍半萜 1 个，单萜 3 个。萜类化合物是豨桐制剂中重要的生物活性成分，既有来源于豨莖草^[8]，也有来源于臭梧桐^[15-17]。
3.2.2.1 二萜类 二萜类成分母核众多，有贝壳杉烷型二萜、海松二烯型二萜和松烷型二萜，豨莖草主要含有前 2 种类型二萜，臭梧桐主要含有松烷型二萜。质谱裂解相关研究较少，分析发现裂解方式受功能基影响较大，难以总结整体规律。

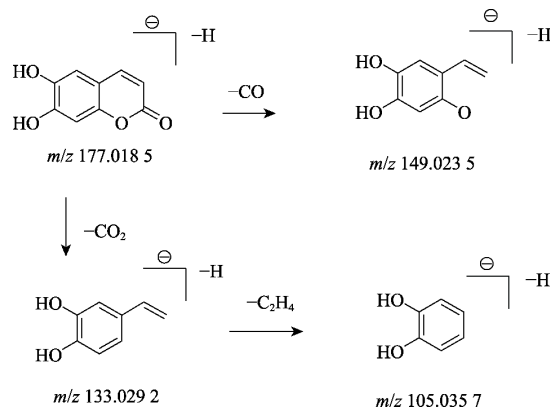


图 3 秦皮乙素的 MS/MS 裂解规律
Fig. 3 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of aesculetin

以 Ent-18-acetoxy-16, 17-dihydroxykauran-19-oic acid 为例解释贝壳杉烷型二萜的裂解，在负离子模式下发现 $[M-H]^-$ m/z 393.234 8 的准分子离子峰，二级质谱下发现脱去 CO_2 产生的 m/z 349.100 2 碎片峰，还可发现酯键脱甲酸产生的 m/z 335.010 3 和 m/z 59.017 2 的碎片峰，见图 4。与文献数据对比^[18]，确定其结构。

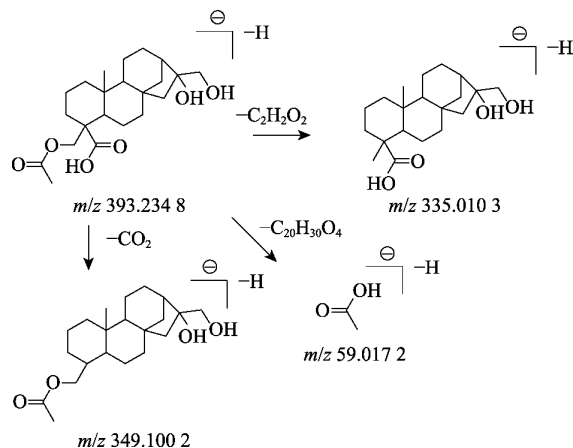


图 4 Ent-18-acetoxy-16, 17-dihydroxykauran-19-oic acid 的 MS/MS 裂解规律
Fig. 4 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of Ent-18-acetoxy-16, 17-dihydroxykauran-19-oic acid

以 16-O-乙酰基豨莖苷 (16-O-acetyldarutoside) 为例解释海松二烯型二萜的裂解，在负离子模式下发现 $[M-H]^-$ m/z 525.310 2 的准分子离子峰，二级质谱下可观察到 m/z 为 161.045 3 的糖基碎片峰，还可观察到酯键脱甲酸产生的 m/z 465.287 3 和 m/z 59.013 9 碎片峰，以及由于羟基存在导致 α -裂解产生 m/z 101.024 4 的侧链酯基碎片峰，及其进一步失去 CH_2O 产生 m/z 71.013 9 碎片峰，见图 5。15-O-乙酰基豨莖苷的裂解与 16-O-乙酰基豨

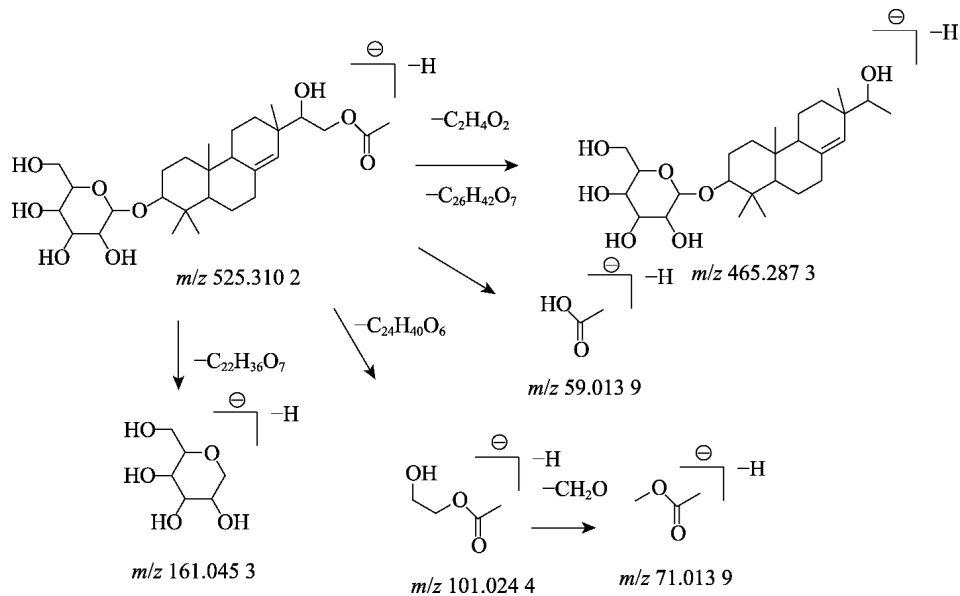


图5 16-O-乙酰基稀荛苣苷的MS/MS裂解

Fig. 5 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of 16-O-acetyldarutoside

荛苣苷极其相近，并与对照品比对确定。

3.2.2.2 倍半萜 1个倍半萜化合物为Zoapatanolide B。Zoapatanolide B在负离子模式下发现[M-H]⁻ *m/z* 361.1657的准分子离子峰，二级质谱发现以下碎片：丢失1分子H₂O产生*m/z* 343.1551碎片峰，准分子离子失去CO₂形成*m/z* 317.1394碎片峰，和由于C=C双键存在导致α断裂所产生的碎片峰*m/z* 331.1546，见图6。并且与文献数据比对^[19]，确认化合物结构。

3.2.2.3 环烯醚萜 3个环烯醚萜苷化合物分别为Inerminoside A1、C和Euphoside，以Inerminoside

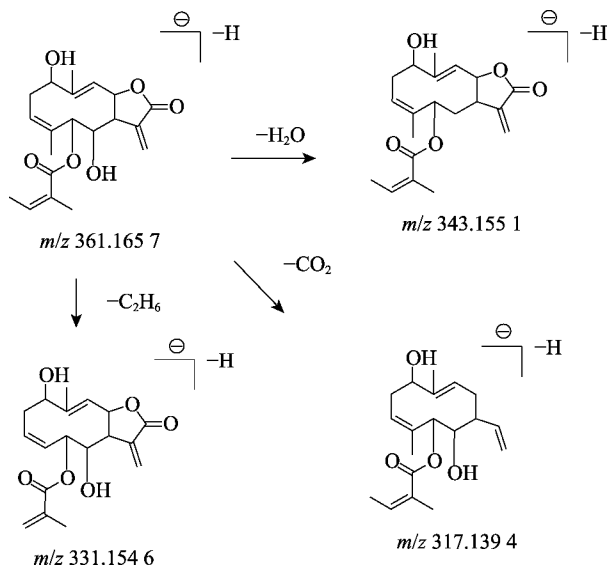


图6 Zoapatanolide B的MS/MS裂解

Fig. 6 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of Zoapatanolide B

C为例，在负离子模式下，发现[M-H]⁻ *m/z* 为673.2788的准分子离子峰，二级质谱下发现*m/z* 为158.0351和505.1563的碎片，它们是母离子酯键断裂形成的2个碎片峰，*m/z* 为505.1563的碎片峰继续失去糖分子形成*m/z* 为193.0506的碎片峰，然后又脱去CO₂进一步形成*m/z* 为149.0608的碎片峰，见图7。并且与文献数据比对^[20]，确认化合物结构。

3.2.3 黄酮类 本实验中共鉴定了19个黄酮类化合物，黄酮类化合物在2味药材中均普遍存在。它们结构相似，断裂方式也比较一致，以芦丁为

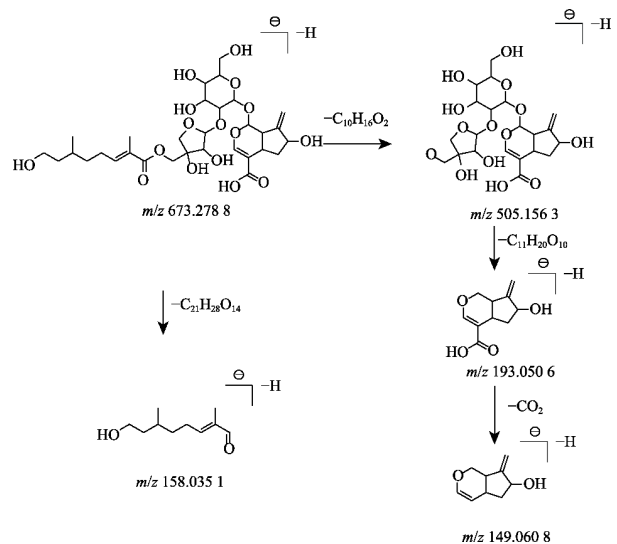


图7 Inerminoside C的MS/MS裂解

Fig. 7 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of inerminoside C

例, 首先发现 $[M-H]^-$ m/z 为 609.146 1 的准分子离子峰, 二级质谱中发现 m/z 为 301.035 4 的碎片, 为芦丁丢失芸香糖得到的碎片峰, 接下来有 2 种裂解方式, 一种是黄酮类化合物常见的 RDA 裂解, 得到 m/z 为 151.003 7 的碎片峰, 另一种是 A 环失去 1 分子水得到的碎片峰, m/z 为 283.024 8, 见图 8。

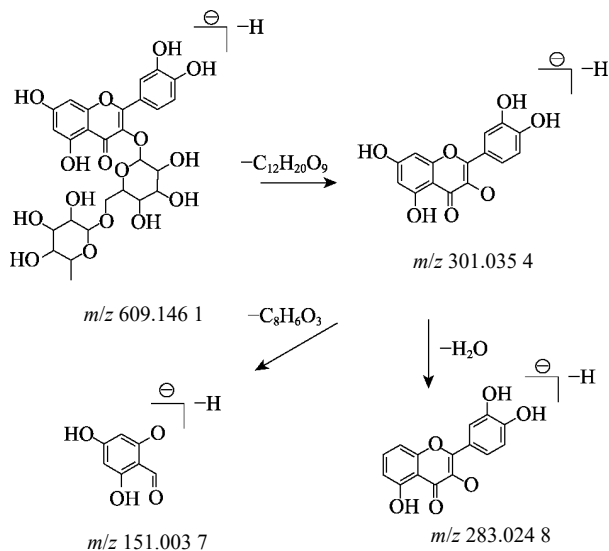


图 8 芦丁的 MS/MS 裂解

Fig. 8 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of lutein

3.2.4 脂氧化物类 脂氧化物类成分近年来才在豨莶草中被发现^[21], 研究者发现它们具有显著的抗菌作用, 共鉴定出 oxylipin 类成分 6 个 (Siegesbeckin A~F)。以 Siegesbeckin A 为例, 首先发现 $[M-H]^-$ m/z 为 343.255 6 的准分子离子峰, 二级质谱中检测到 m/z 为 213.186 4 和 147.065 4 的碎片, 分析鉴定为母离子酯和酯键断裂的碎片离子峰, 二级质谱还检测到丢失的烷基链碎片 m/z 85.065 3, 见图 9。

3.2.5 未知化合物的鉴定 15-*O*-malonylkirenol 和 16-*O*-malonylkirenol 已从腺梗豨莶中分离鉴定^[22], 前期项目组也从腺梗豨莶和毛茛豨莶中分离鉴定了这 2 个二萜成分, 说明他们含有丙二酰基取代的二萜成分。在本实验中豨桐制剂中鉴定出 15-*O*-malonylkirenol 和 16-*O*-malonylkirenol, 两者裂解途径十分相似, 其中 15-*O*-malonylkirenol 产生 m/z 423.238 4 的准分子离子峰, 裂解失去 1 个 CO_2 产生 m/z 379.249 3 的碎片峰。

根据 15-*O*-acetyldarutoside 和 16-*O*-acetyl-darutoside 的裂解规律以及丙二酰基取代基二萜的裂解

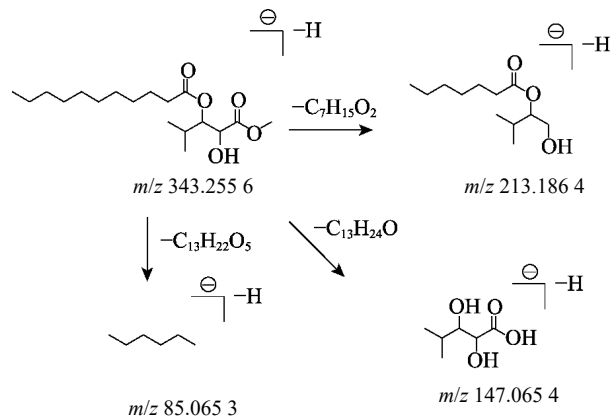


图 9 Siegesbeckin A 的 MS/MS 裂解

Fig. 9 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of siegesbeckin A

性质, 鉴定未知丙二酰基取代的二萜化合物。首先发现化合物 67 (保留时间 25.41 min) 产生 $[M-H]^-$ m/z 为 569.296 6 的准分子离子峰, 二级质谱中检测到丢失 1 个 CO_2 的碎片峰 m/z 525.310 3, 继续丢失 CH_3CO 的 m/z 为 483.300 6 碎片峰以及丢失 1 分子 H_2O 的碎片峰 m/z 465.287 5。同时产生 m/z 161.146 6 的糖基碎片峰, 糖基进一步裂解产生 m/z 101.024 4 碎片峰, 还可观察到由于酯基存在导致 α -裂解产生的 m/z 59.013 9 碎片峰, 见图 10。化合物 69 (保留时间 26.03 min) 和 67 的裂解规律几乎没有差别, 根据 15-*O*-acetyldarutoside 和 16-*O*-acetyl-darutoside 在液相色谱中保留时间顺序, 因此推断化合物 67 可能为 16-*O*-丙二酰基豨莶苷 (15-*O*-malonyldarutoside), 69 可能为 15-*O*-丙二酰基豨莶苷 (15-*O*-malonyldarutoside), 它们为新化合物。

4 讨论

豨桐制剂处方药味豨莶草有 3 种基原, 因其为野生采集的品种, 外观十分相近, 可能几种基原植物混合在一起, 本实验采用 DNA 条形码鉴定基原^[9-10], 可能包含 3 种基原植物。本研究通过 UPLC- Triple-TOF-MS/MS 对豨桐制剂中的化学成分进行了分析, 通过与对照品比对、数据库、裂解特征峰以及文献等数据信息进行分析共鉴定了 78 个化合物, 包括苯丙素类、萜类、黄酮类以及脂氧化物类。UPLC-Triple-TOF-MS/MS 具有快速高分离、高分辨能力, 是鉴定中药复方化学组成分析的有效方法。本实验全面地对豨桐制剂中主要化学成分进行鉴定, 阐明其主要化学组成, 为进一步的药效物质基础和质量控制提供参考。

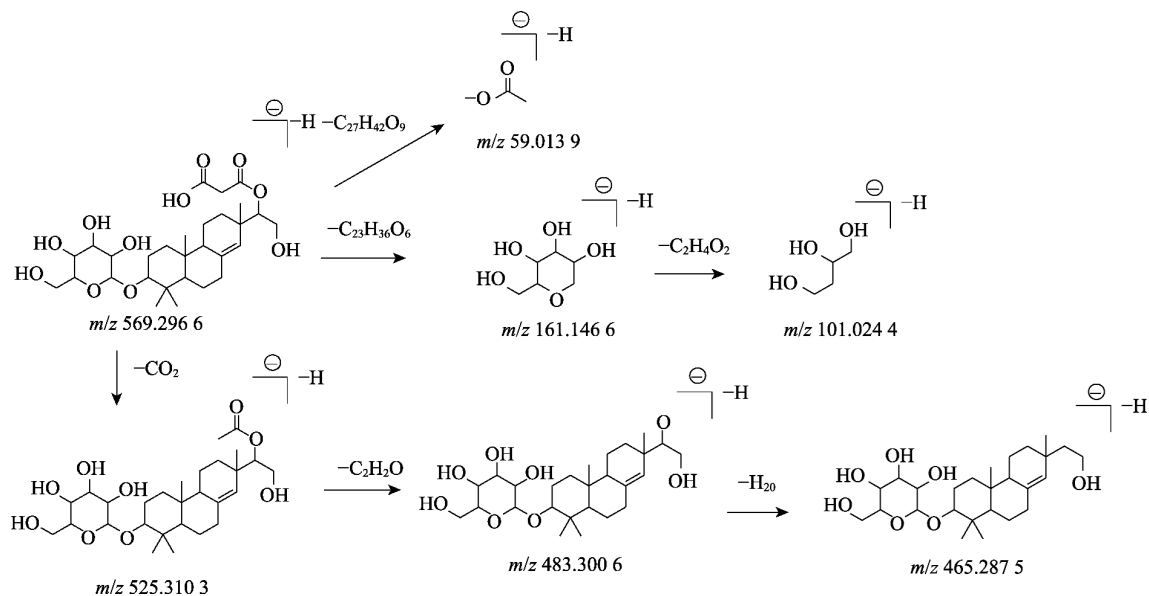


图 10 化合物 67 的 MS/MS 裂解

Fig. 10 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of compound 67

REFERENCES

- [1] WU W, SONG Z Q, TIAN K Y, et al. A textual study on classical prescription of Xitong Pill and advance in researches on chemical constituents and pharmacological activities of herbs in formula[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2020, 51(17): 4586-4597.
- [2] LIANG R Z, DING L. Efficacy and safety of Yitong pill combined with methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Nei Mongol J Tradit Chin Med*(内蒙古中医药), 2017, 36(9): 79-80.
- [3] LI W, TANG B F. Clinical observation on 120 cases of knee osteoarthritis treated by Yitong pill[J]. *Hunan J Tradit Chin Med*(湖南中医杂志), 2013, 29(2): 65-66.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2010: 1204.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2020: 1823.
- [6] JIA P, CHEN G, QIN W Y, et al. Xitong Wan attenuates inflammation development through inhibiting the activation of nuclear factor- κ B in rats with adjuvant-induced arthritis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016(193): 266-271.
- [7] JIA P, CHEN G. Effect and mechanism of Xitongwan on gouty arthritis induced by monosodium urate in rats[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(1): 96-101.
- [8] WANG Q, LIANG Y Y, LI K W, et al. Herba Siegesbeckiae: A review on its traditional uses, chemical constituents, pharmacological activities and clinical studies[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021(275): 114117.
- [9] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 2012: 452.
- [10] GAO X X, WEI J C, HONG L N, et al. Comparative analysis of chemical composition, anti-inflammatory activity and antitumor activity in essential oils from *Siegesbeckiaorientalis*, *S. glabrescens* and *S. pubescens* with an ITS sequence analysis[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2185.
- [11] KIM K H, KIM S, JUNG M Y, et al. Anti-inflammatory phenylpropanoid glycosides from *clerodendron trichotomum* leaves[J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(1): 7-13.
- [12] LEE J Y, LEE J G, SIM S S, et al. Anti-asthmatic effects of phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum* leaves and *Rumex gmelini* herbes in conscious guinea-pigs challenged with aerosolized ovalbumin[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(2/3): 134-142.
- [13] KIM H J, WOO E R, SHIN C G, et al. HIV-1 integrase inhibitory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum*[J]. *Arch Pharm Res*, 2001, 24(4): 286-291.
- [14] CHAE S, KANG K A, KIM J S, et al. Trichotomoside: A new antioxidative phenylpropanoid glycoside from *Clerodendron trichotomum*[J]. *Chem Biodivers*, 2006, 3(1): 41-48.
- [15] LI L, WU L, WANG M, et al. Abietane diterpenoids from *Clerodendrum trichotomum* and correction of NMR data of Villosin C and B[J]. *Nat Prod Commun*, 2014, 9(7): 907-910.
- [16] HU H J, ZHOU Y, HAN Z Z, et al. Abietane diterpenoids from the roots of *Clerodendrum trichotomum* and their nitric oxide inhibitory activities[J]. *J Nat Prod*, 2018, 81(7): 1508-1516.
- [17] ONO M, FURUSAWA C, MATSUMURA K, et al. A new diterpenoid from the leaves of *Clerodendron trichotomum*[J]. *J Nat Med*, 2013, 67(2): 404-409.
- [18] GAO X X, JIANG S Z, WANG J, et al. A novel *ent*-pimarane-type diterpenoid from *Siegesbeckia glabrescens* with anti-inflammatory activity[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2022, 24(3): 296-302.
- [19] QUIJANO L, CALDERÓN J S, GÓMEZ F, et al. Zoapatanolide A and B, two new heliangolides from *Montanoa tomentosa*[J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(8): 2041-2044.
- [20] CALIŞ I, HOSNY M, YÜRÜKER A. Inerminosides A1, C and D, three iridoid glycosides from *Clerodendrum inerme*[J]. *Phytochemistry*, 1994, 37(4): 1083-1085.
- [21] WU C, ZHANG Q Q, YANG F Y, et al. New oxylipins from *Siegesbeckia glabrescens* as potential antibacterial agents[J]. *Fitoterapia*, 2020(145): 104613.
- [22] MYAGCHILOV A V, SOKOLOVA L I, GOROVOY P G. New diterpenoids of *Siegesbeckia pubescens* (Makino) Makino[J]. *Biointerface Res Appl Chem*, 2022, 12(6): 8035-8041.

收稿日期: 2022-12-27

(本文责编: 曹粤锋)