

五神汤化学成分鉴定及京尼平苷酸、秦皮甲素、咖啡酸、木犀草苷、 β -蜕皮甾酮和毛蕊花糖苷定量检测

闫占宽¹, 张敏², 刘钦伟³, 李军毅³, 李辉辉³, 冯静⁴, 张燕^{1*}

1. 江苏恒瑞医药股份有限公司, 江苏 连云港 222000

2. 江苏海洋大学 药学院, 江苏 连云港 222005

3. 江苏原创药物研发有限公司, 江苏 连云港 222069

4. 辽宁省疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110005

摘要: 目的 采用超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱法 (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS) 对五神汤中的化学成分进行鉴定, 进而对五神汤中京尼平苷酸、秦皮甲素、咖啡酸、木犀草苷、 β -蜕皮甾酮和毛蕊花糖苷 6 种成分进行含量测定。方法 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS 法鉴定五神汤中的化学成分, 采用 ACQUITY UPLCTMBEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) 进行分离, 以 0.1% 甲酸-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 254 nm, 柱温 30 $^{\circ}$ C; 电喷雾离子源 (ESI) 全扫模式; 根据一级质谱中的分子离子, 推测化合物的相对分子质量和元素组成; 再利用二级质谱信息, 与对照品及文献报道中化合物信息库进行比对, 推测五神汤的体外化学成分。HPLC 法检测五神汤中京尼平苷酸、秦皮甲素、咖啡酸、木犀草苷、 β -蜕皮甾酮和毛蕊花糖苷, Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 mm), 流动相为 0.1% 磷酸水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱, 检测波长 254 nm, 体积流量 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。结果 共检测到五神汤中的 71 种化学成分, 主要包括黄酮类、酚酸类、三萜皂苷类以及香豆素类; 6 种成分在浓度范围内线性关系良好, 平均加样回收率为 89.6%~93.0%。京尼平苷酸、秦皮甲素、咖啡酸、木犀草苷、 β -蜕皮甾酮和毛蕊花糖苷在 10 批样品中的平均质量浓度依次为 2.92、2.48、1.72、1.38、2.08、1.77 mg·g⁻¹。结论 建立的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS、HPLC 法可用于五神汤化学成分的鉴定和含量测定。

关键词: 五神汤; 超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱法; 京尼平苷酸; 秦皮甲素; 咖啡酸; 木犀草苷; β -蜕皮甾酮; 毛蕊花糖苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 05-1047-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.05.014

Identification of chemical constituents and content determination of geniposidic acid, aesculin, caffeic acid, luteoloside, β -ecdysterone, and verbascoside in different batches of Wushen Decoction

YAN Zhankuan¹, ZHANG Min², LIU Qinwei³, LI Junyi³, LI Huihui³, FENG Jing⁴, ZHANG Yan¹

1. Jiangsu Hengrui Pharmaceuticals Co., LTD., Lianyungang 222000, China

2. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China

3. Jiangsu Original Drug Research and Development Co., LTD., Lianyungang 222069, China

4. Liaoning Provincial Center for Disease Prevention and Control, Shenyang 110005, China

Abstract: Objective To establish a method for the identification of chemical constituents in Wushen Decoction (WSD) by UPLC-Q-Exactive orbitrap-MS/MS, then, establish a method for the determination of six components of WSD: geniposidic acid, esculin, caffeic acid, luteoloside, β -ecdysterone and verbascoside by HPLC. **Methods** Identification of chemical components in WSD by UPLC-Q-Empirical Orbitrap MS/MS method, the separation was performed on an ACQUITY UPLCTMBEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), the detection wavelength was 254 nm and the column temperature was 30 $^{\circ}$ C. Mass spectrum conditions:

收稿日期: 2023-02-25

基金项目: 辽宁省自然科学基金面上项目 (2021-MS-361)

第一作者: 闫占宽 (1975—), 男, 副高级工程师, 主要从事药品质量研究。E-mail: zhankuan_yan@163.com

*通信作者: 张燕, 女, 硕士研究生, 主要从事药品质量研究。E-mail: yan_zhang_123@163.com

electrospray ion source (ESI) full sweep mode. The mobile phase was eluted by gradient elution with 0.1% formic acid water and acetonitrile at 254 nm. Infer the relative molecular weight and elemental composition of the compound based on the molecular ions in the primary mass spectrometry. By utilizing the secondary mass spectrometry information and comparing it with the reference material and the compound information library in literature, the *in vitro* chemical composition of WSD can be inferred. HPLC method was used to detect geniposidic acid, aesculin, caffeic acid, luteoloside, β -ecdysterone and verbascoside, Aglient Eclipse XDB-C₁₈ column (150 mm \times 4.6 mm, 5 mm), mobile phase consisting of 0.1% phosphoric acid water (A) - acetonitrile (B), gradient elution, detection wavelength of 254 nm, volume flow rate of 1.0 mL \cdot min⁻¹, column temperature of 30 $^{\circ}$ C, injection volume of 10 μ L. **Results** A total of 71 chemical components were detected in WSD, including flavonoids, phenolic acids, triterpenoid saponins and coumarins, according to primary, secondary and control samples by mass spectrometry. The linear relationships of the six components were good in the concentration range, and the average recoveries were 89.6%—93.0%. The average contents of geniposidic acid, aesculin, caffeic acid, luteoloside, β -ecdysterone and verbascoside in ten batches of samples were 2.92, 2.48, 1.72, 1.38, 2.08, and 1.77 mg \cdot g⁻¹, respectively. **Conclusion** The established UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS and HPLC method are stable, reliable and can be used for the identification and content determination of the chemical constituents of WSD.

Key words: Wushen Decoction; UPLC-Q-Exactive orbitrap-MS/MS; geniposidic acid; aesculin; caffeic acid; luteoloside; β -ecdysterone; verbascoside

五神汤源自清代陈士铎《洞天奥旨·骨痛》^[1-2], 主要用于治疗湿热蕴蒸而致的多骨痛, 由金银花、牛膝、车前子、茯苓和紫花地丁 5 味药材组成^[3-4]。处方中金银花疏散风热、清血散热^[5-6]; 牛膝强健筋骨, 引邪下行^[7-8]; 车前子清利湿热^[9]; 茯苓利水消肿^[10-11]; 紫花地丁消肿散痛^[12-13]。5 味药材配伍, 可清热解毒、扶正固本、活血化瘀, 是治疗骨痛的经典方剂。现代医学根据五神汤的组方特性和祛瘀化毒的治疗功效, 将该方及其加味方应用于慢性骨髓炎的治疗, 疗效颇佳^[14]。慢性骨髓炎发病处多为长骨骨干, 病程较久且病情繁复。如果医治不彻底将会造成肢体形态异常与肢体功能退化, 甚至会导致骨折、关节僵硬等临床并发症的出现, 更有甚者会出现罕见癌症, 极大程度上威胁患者生命^[15]。

UPLC-Q-Exactive orbitrap-MS/MS 技术具有快速、高效、强筛选性能, 可用于复杂化学成分的鉴定。因此, 本实验利用该方法首次建立了五神汤中化学成分的鉴定方法, 对其复杂化学成分进行定性分析, 并对其中 6 个目标成分进行了含量测定^[16-19], 以期为深入探讨五神汤的药效物质基础以及质量控制研究提供理论和方法参考。

1 材料

1.1 主要仪器

Thermo Scientific™ Q Exactive™ 型四极杆 Orbitrap 质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); ACQUITY 超高效液相色谱仪(美国沃特世公司); DFY-200A 型高速万能粉碎机(上海比昂仪器有限公司); LC-20AT 型岛津高效液相色谱仪(日本岛津公司); XS205DU 型十万分之一电子分析天平(瑞士

梅特勒-托利多公司); Avanti J-26SXP 型高速冷冻离心机[美国贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司]; KQ2200DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Milli-Q Integral 型超纯水机(德国 Millipore 公司)。

1.2 试药及主要试剂

五神汤自制粉末: 各组成药材粉碎后过 60 目筛。为使实验结果具有代表性, 实验前期于全国各地中药材市场购买了 10 批五神汤各组成单味药材, 置于阴凉处备用。经中国医科大学药学院靳鑫副教授鉴定, 金银花药材为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾; 车前子鉴定为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 或平车前 *P. depressa* Willd. 的干燥成熟的种子; 茯苓经鉴定为多孔菌科真菌 *Poria cocos* (Schw.) Wolf. 的干燥菌核; 紫花地丁经鉴定为堇菜科植物紫花地丁 *Viola yedoensis* Makino 的干燥全草; 牛膝经鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根。将不同来源的 5 种药材随机匹配, 匹配结果见表 1。

对照品: β -蜕皮甾酮(批号 FY00B5006, 质量分数 $\geq 98\%$)、京尼平苷酸(批号 FY161B7628, 质量分数 $\geq 98\%$)、秦皮甲素(批号 FY00B4067, 质量分数 $\geq 98\%$)、毛蕊花糖苷(批号 FY1624B0602, 质量分数 $\geq 98\%$)、咖啡酸(批号 FY132B5723, 质量分数 $\geq 98\%$)、木犀草苷(批号 FY1466B7017, 质量分数 $\geq 98\%$), 均购自南通飞宇生物科技有限公司; 乙腈(HPLC 级)、甲醇(HPLC 级)均购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 甲酸(HPLC 级, 美国 Dikma 公司)。

表1 5味药材随机匹配信息

Table 1 Random matching information of five medicine materials

编号	金银花	车前子	茯苓	紫花地丁	牛膝
S1	江苏东海	江西吉安	安徽岳西	河北巨鹿	河南安阳
S2	河南封丘	江西吉安	湖南靖州	山东临沂	河南焦作
S3	河南封丘	江西吉安	安徽安庆	河北巨鹿	河南新密
S4	山东临沂	江西九江	湖北黄冈	河北安国	河南焦作
S5	河南新密	江西吉水	湖北黄冈	河北安国	河北安国
S6	河南原阳	四川广汉	安徽亳州	江苏沐阳	广东佛山
S7	河南新密	贵州铜仁	安徽六安	江苏沐阳	河南安阳
S8	福建福州	河南岳阳	云南昆明	四川广汉	河南新密
S9	山东平昌	江西九江	安徽亳州	河北巨鹿	河南新密
S10	福建福州	江西吉水	河南安阳	山东临沂	河南焦作

表2 梯度洗脱程序

Table 2 Gradient elution program of HPLC method

t/min	0.1% 甲酸水(A)/%	乙腈(B)/%
0	95	5
5	85	15
15	70	30
25	65	35
30	2	98
35	95	5

2 方法与结果

2.1 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS 法定性研究

色谱条件: ACQUIFY UPLC™ HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B); 体积流量 0.2 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样量 3 μL; 梯度洗脱程序见表2。

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 采用正负离子扫描检测; 离子源温度 550 °C; 气帘气(CUR): 206.84 kPa; 雾化气(gas1)和辅助气(gas2)为高纯度氮气, 均为 379.21 kPa; 一级质谱扫描范围为 *m/z* 100~1 500, 二级质谱扫描范围为 *m/z* 50~1 500; 扫描时间为 35 min。

五神汤在正、负离子模式下的总离子流色谱图见图1。根据一级质谱中的分子离子, 推测化合物的相对分子质量和元素组成; 再利用二级质谱信

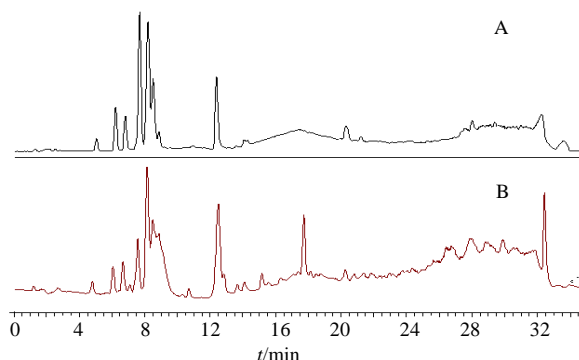


图1 五神汤在负(A)、正(B)离子模式下的总离子流色谱图
Fig. 1 Base peak ion chromatograms of WSD in negative (A) and positive (B) ionization mode

息, 与对照品及通过广泛查阅文献建立的专属于五神汤的化合物信息库进行比对, 推测五神汤的体外化学成分。结果共检测出 71 种成分(表3), 其中来自于金银花药材的成分共有 25 种, 来自于牛膝药材的共有 17 种, 来自于茯苓药材的共有 17 种, 来自于车前子药材的共有 8 种, 来自于紫花地丁药材的共有 4 种。鉴定出来的 71 种化学成分主要包括黄酮类、酚酸类、三萜皂苷类以及香豆素类等。

表3 五神汤化学成分信息

Table 3 Compound information of WSD

编号	<i>t_R</i> /min	鉴定结果	分子式	<i>m/z</i>		MS/MS 碎片(<i>m/z</i>)
				[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	
1	1.74	1-caffeoylquinic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.095 6	—	191.031 5、135.152 7
2*	1.94	geniposidic acid	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	—	373.153 1	279.232 6
3	2.08	kingiside	C ₂₆ H ₃₂ N ₂ O ₁₂	565.194 9	—	391.052 6、279.165 0
4	2.13	unknown	C ₃₅ H ₃₆ O ₁₈	—	743.190 7	—
5*	6.89	chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	—	353.089 5	191.096 9
6	7.73	neochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	—	352.086 7	191.058 0
7	7.88	achyranthoside D	C ₅₃ H ₈₂ O ₂₅	—	1 117.515 1	997.503 2、793.436 1
8*	8.04	esculetin	C ₉ H ₆ O ₄	—	178.027 1	—
9*	8.15	rutinum	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	—	608.144 9	301.033 4
10	8.56	hyperoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	—	462.088 2	301.193 6
11	8.65	loniceri	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	—	592.151 2	593.150 7

续表3

编号	t_R/min	鉴定结果	分子式	m/z		MS/MS 碎片 (m/z)
				$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	
12	8.69	centauroside	$C_{34}H_{46}O_{19}$	759.263 8	—	595.042 8、525.163 5
13	8.71	aldosecologanin or centauroside	$C_{34}H_{46}O_{19}$	—	759.262 7	595.203 0、525.160 3、493.167 3
14	8.76	aldosecologanin	$C_{34}H_{46}O_{19}$	—	756.256 0	595.051 8、525.062 8
15	8.78	unknown	$C_{30}H_{26}O_{15}$	—	625.126 6	—
16	8.80	rhoifolin	$C_{27}H_{30}O_{14}$	—	577.164 1	457.113 1、423.106 4、337.070 2、313.068 4
17	8.85	acteoside	$C_{29}H_{36}O_{15}$	—	623.204 8	487.145 5、477.139 8、297.098 3、135.045 7
18	9.06	16 α -hydroxy-lanosta-8,24(31)-dien-21-oic-acid	$C_{30}H_{46}O_3$	455.345 2	—	—
19	9.06	dehydrotrametenolic acid	$C_{30}H_{46}O_3$	455.344 1	—	437.337 1、313.217 8、295.238 9
20*	9.14	acteoside	$C_{29}H_{36}O_{15}$	—	625.205 9	461.168 0、315. 111 6、161. 023 9
21	9.49	achyranthoside II	$C_{41}H_{62}O_{15}$	795.408 3	—	747.392 1、673.391 0、455.351 0
22	9.24	baicalin	$C_{21}H_{18}O_{11}$	—	447.084 3	269.045 8、241.050 8、223.040 2、197.060 9
23	9.98	tryptophan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	—	203.089 3	188.071 1、170.060 5、159.052 1、132.081 0
24	10.06	28-desglucosylchikusetsusaponin IV	$C_{41}H_{64}O_{13}$	765.4352	—	631.383 1、455.351 0、339.203 2
25	10.08	<i>L</i> -phenylalaninosecologanin B	$C_{25}H_{31}NO_{10}$	—	504.195 3	342.130 7、324. 122 4、272. 0927、228.103 3
26	10.13	aisochlorogenic acid A	$C_{25}H_{24}O_{12}$	—	514.119 5	353.095 1、179.034 9
27	10.29	alonijapospiside A	$C_{27}H_{31}NO_{12}$	—	559.177 3	264.084 5
28	10.36	isochlorogenic acid B	$C_{25}H_{24}O_{12}$	—	514.119 5	353.095 1、179.034 9
29	10.63	<i>BL</i> -phenylalaninosecologanin B	$C_{25}H_{31}NO_{10}$	506.195 3	—	324.047 3、342.163 2
30	10.68	isochlorogenic acid C	$C_{25}H_{24}O_{12}$	—	514.119 5	353.095 1、179.034 9
31*	10.79	caffeic acid	$C_9H_8O_4$	—	178.033 9	161.002 5、151.193 1
32	11.42	ferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	—	195.058 4	1 178. 040 2、165. 052 9、121. 030 1
33	11.19	3,5-dimethoxy-benzyl alcohol-4- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside	$C_{15}H_{22}O_9$	347.126 9	—	—
34	11.33	<i>D</i> (-)-salicin	$C_{13}H_{18}O_7$	287.105 8	—	—
35	11.53	achyranthoside C	$C_{47}H_{72}O_{20}$	957.461 1	—	835.442 1、793.431 0、631.382 3
36	13.04	chikusetsusaponin V	$C_{48}H_{76}O_{19}$	957.497 5	—	793.432 3、569.382 3、455.341 5
37*	13.05	quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	—	300.035 3	283.091 1、201.017 1
38	14.35	isorhamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$	317.058 8	—	300.027 8、151.001 7、121. 026 7
39	15.29	achyranthoside E	$C_{46}H_{70}O_{19}$	—	925.450 5	793.432 3、631.383 2
40	15.65	luteolin	$C_{15}H_{10}O_6$	288.050 6	—	153.015 5、133.021 1
41	15.74	<i>N</i> -feruloyltyramine	$C_{18}H_{19}NO_4$	314.131 9	—	177.053 2、145.023 1
42	15.92	achyranthoside IV	$C_{41}H_{60}O_{15}$	793.392 6	—	673.392 3、631.382 1、455.351 0
43	16.34	loniceranan B	$C_{18}H_{26}O_{11}$	419.148 0	—	342.094 9
44	18.35	25 <i>R</i> -inokosterone	$C_{27}H_{44}O_7$	—	479.309 2	319.192 4、159.103 2
45	18.78	inokosterone A	$C_{27}H_{44}O_8$	—	495.304 2	495.291 0、391.194 6、175.092 3
46	19.39	trametenolic acid	$C_{30}H_{48}O_3$	—	455.359 7	323.223 5
47	19.59	16 α -hydroxydehydrotrametenolic acid T1	$C_{30}H_{46}O_4$	—	469.339 0	—
48	19.73	ecdysterone	$C_{27}H_{44}O_7$	—	479.309 2	319.192 4、159.103 2
49	19.98	polypodine B	$C_{27}H_{44}O_8$	—	495.304 1	495.291 0
50	20.77	8-epiloganic acid	$C_{17}H_{26}O_{10}$	—	389.153 1	390.152 6、227.083 5
51	20.33	dehydropachymic acid	$C_{33}H_{50}O_5$	527.365 2	—	451.353 8
52	20.57	poricoic acid D	$C_{31}H_{46}O_6$	515.328 8	—	497.329 1、479.017 9

续表3

编号	t_R/min	鉴定结果	分子式	m/z		MS/MS 碎片(m/z)
				$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	
53	20.59	25S-inokosterone	$\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_7$	—	479.309 2	319.192 4、159.103 2
54	22.16	achyranthoside G	$\text{C}_{47}\text{H}_{72}\text{O}_{20}$	—	955.462 2	832.442 1、793.322 3、455.356 2
55	23.24	cryptochlorogenic acid	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$	—	352.086 7	191.054 4
56	24.94	oleic acid	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	—	281.255 3	—
57	26.84	eburionic acid	$\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_3$	471.376 5	—	—
58	28.06	poricoic acid E	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_6$	—	499.313 2	482.302 1、265.291 2
59	28.14	luteolin 7-O-rutinoside	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	—	593.159 0	285.153 8
60	28.24	apigenin	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	271.052 2	—	225.055 4、201.055 3、151.003 6
61	28.35	29-hydroxydehydropachyymic acid	$\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_6$	543.361 2	—	—
62	28.72	β -P-hydroxybenzoyl dehydrotumulosic acid	$\text{C}_{38}\text{H}_{52}\text{O}_6$	—	603.376 9	—
63	29.88	poricoic acid DM	$\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_6$	527.345 6	—	—
64	30.21	poricoic acid B	$\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_5$	485.319 4	—	467.014 6、449.100 2
65	30.54	hydroxyl-carboxyl phenylpropionic acid	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_5$	—	209.052 2	165.055 8、121.066 1、93.034 7
66	30.70	luteolide	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	449.100 0	—	285.040 7
67	30.95	hydroquinone O- β -D- glucopyranoside	$\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_7$	271.090 1	—	123.045 3、93.034 7
68	31.00	N-acetyl glutamic acid-1-ethyl-5- methyl ester	$\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_5$	232.110 1	—	—
69*	31.79	oleanolic acid	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	—	458.367 6	501.357 3
70	32.30	isoacteoside	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$	—	623.204 8	487.145 5、477.139 8、297.098 3、135.045 7
71	32.32	25-hyoxypachymic acid	$\text{C}_{33}\text{H}_{52}\text{O}_6$	—	543.375 8	527.372 1、295.239 3

*与对照品对照指认

*Identification by comparison with reference substance

2.1.1 酚酸类成分的分析 鉴定出的酚酸类成分主要来自于五神汤中的君药金银花,包括绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C、咖啡酸等。通过查阅文献,对化合物的质谱裂解模式进行详细分析,为酚酸类成分的鉴定提供了可靠依据。以5号峰为例,保留时间为6.89 min,其分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$,由软件计算出其相对分子质量为354.094 5,在负离子模式下丢失H形成了准分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 为353.089 5。二级质谱中丢失1分子的葡萄糖残基- $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$,碎片离子显示 m/z 191.013 4,结合对照品以及文献数据报道^[20],推测其为绿原酸,为五神汤中的君药金银花在《中国药典》2020年版中记载的含量测定的指标性成分。裂解途径见图2。

2.1.2 黄酮类成分的分析 解析出的黄酮类成分多存在于金银花、车前子和紫花地丁中。五神汤中的黄酮类化合物具有相似的裂解规则,以9号峰为

例,保留时间为8.15 min,准分子离子峰为609.144 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$,推测分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$,相对分子质量为610.142 5,准分子离子峰脱去1个鼠李糖基产生二级碎片离子 m/z 463.082 4,继而失去芸香糖得到碎片离子 m/z 301.033 2,继续发生裂解得到碎片离子 m/z 151.005 9。结合文献总结出以上化合物裂解规则^[21],推测出该物质为芦丁。裂解途径见图3。

2.1.3 三萜皂苷类成分的分析 五神汤中的三萜皂苷类成分主要来自于臣药牛膝,也是牛膝发挥抗炎作用的主要活性成分。五神汤中的三萜皂苷类成分的裂解途径具有一定的相似性。以70号峰为例,保留时间为31.79 min,在负离子模式下有较好的响应, m/z 处给出分子离子峰 $[\text{M}-\text{H}]^-$,根据软件推测其分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$,同时质谱数据显示了发生在侧链的RDA裂解特征峰 m/z 248、208,根据文献推测出该物质为齐墩果酸^[22],为评价牛膝质量的指标性成分。裂解途径见图4。

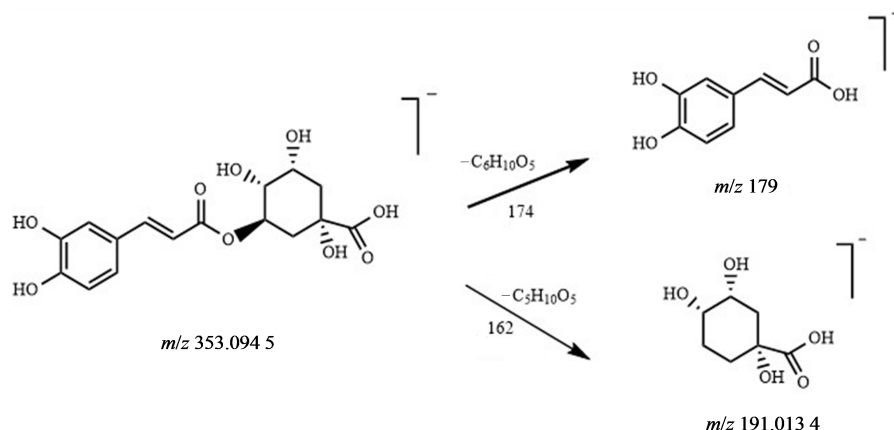


图2 绿原酸裂解途径

Fig. 2 Chlorogenic acid cracking pathway

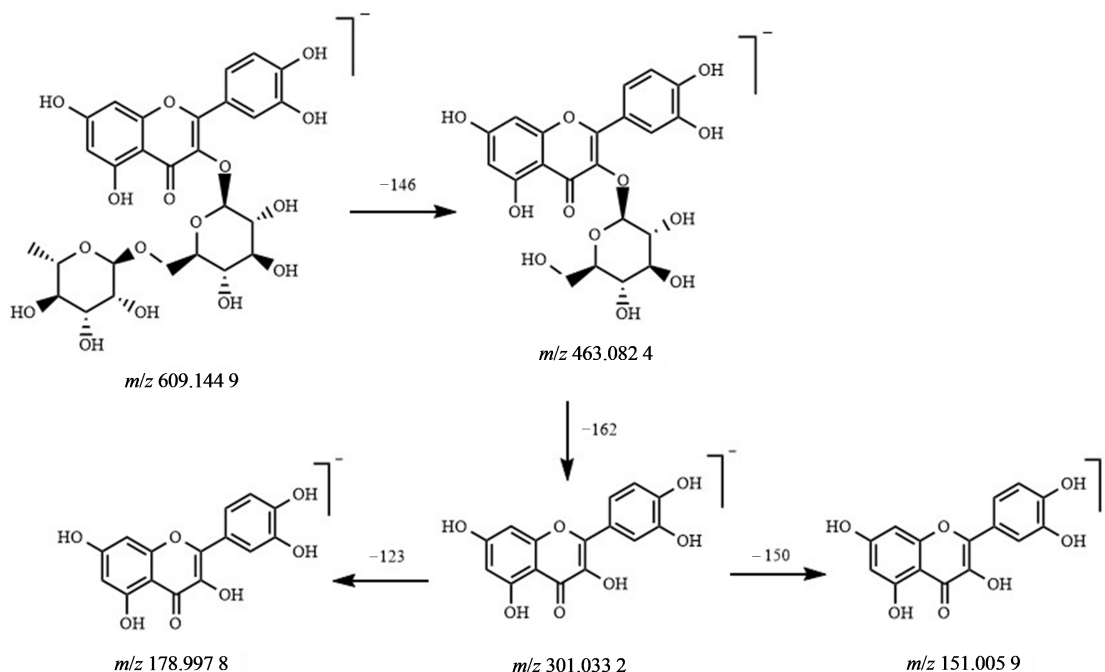


图3 芦丁裂解途径

Fig. 3 Rutin cracking pathway

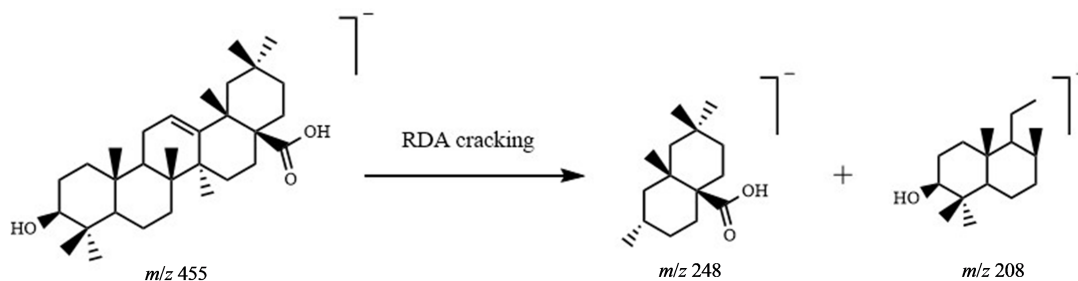


图4 齐墩果酸裂解途径

Fig. 4 Oleanolic acid cracking pathway

2.1.4 香豆素类成分的分析 五神汤中鉴定出的香豆素成分主要来自于紫花地丁,包括秦皮乙素、秦皮甲素、6-羟基香豆素-7-O- α -L-鼠李糖基-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-葡萄糖苷等。香豆素类化合物的裂解规则为在

CID裂解中易发生开环,在二级质谱裂解中母离子容易丢失中性分子,侧链丢失其他基团。这种裂解方式是香豆素类化合物的特征裂解规则^[23]。秦皮乙素裂解途径见图5。

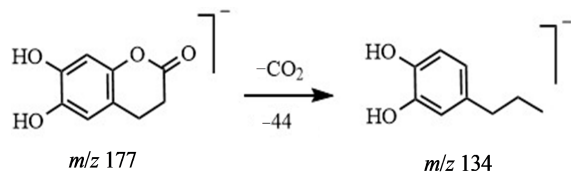


图5 秦皮乙素裂解途径

Fig. 5 Acetonitrin cracking pathway

2.2 HPLC法检测五神汤中京尼平苷酸、秦皮甲素、咖啡酸、木犀草苷、β-蜕皮甾酮和毛蕊花糖苷

2.2.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 mm);流动相为0.1%磷酸水(A)-乙腈(B);梯度洗脱;检测波长254 nm;体积流量1.0 mL·min⁻¹;柱温30 °C;进样量10 μL;梯度洗脱程序见表4。

表4 梯度洗脱程序

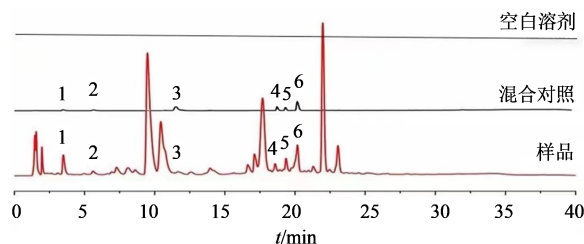
Table 4 Gradient elution program of HPLC method

t/min	0.1%磷酸水(A)/%	乙腈(B)/%
0	92	8
10	88	12
15	80	20
20	75	25
30	64	36
35	54	46
45	92	8

2.2.2 溶液的制备 对照品溶液制备:精密称取秦皮甲素、木犀草苷、β-蜕皮甾酮、京尼平苷酸、咖啡酸、毛蕊花糖苷对照品适量,置于25 mL棕色量瓶中,用50%甲醇溶解并定容至刻度线,摇匀,即制得质量浓度分别为415.60、371.20、579.20、356.00、453.60、381.60 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液,过0.45 μm微孔滤膜,于4 °C条件下储存备用。

供试品溶液制备:精密称取S1批五神汤药材粉末1 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入10 mL体积分数为50%的甲醇溶液,摇匀,称定质量,超声处理40 min(超声频率40 kHz、超声功率100 W),放冷后再次称质量,以50%甲醇补足减少质量。5 000 rmin⁻¹离心10 min,取上清液3 mL,用50%甲醇定容至10 mL,摇匀,过0.45 μm微孔滤膜,即得供试品溶液。

2.2.3 专属性考察 分别吸取混合对照品溶液、供试品溶液以及空白溶剂,按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,见图6。结果各组峰之间无干扰,分离度符合要求,表明该方法专属性良好。



1-京尼平苷酸; 2-秦皮甲素; 3-咖啡酸; 4-木犀草苷; 5-β-蜕皮甾酮; 6-毛蕊花糖苷

1-genipine glycoside; 2-esculine; 3-caffeic acid; 4-luteolin; 5-β-ecdysterone; 6-litenin

图6 五神汤中6种成分的HPLC专属性色谱图

Fig. 6 HPLC specific chromatograms of six components in WSD

2.2.4 线性范围 精密吸取混合对照品溶液8.0、5.0、1.5、1.2、1.0、0.8 mL置于25 mL棕色量瓶中,以50%甲醇稀释并定容,摇匀,制备线性系列溶液。按“2.2.1”项下的色谱条件进样,对6种成分的质量浓度及相对应的峰面积进行线性回归,结果见表5。

表5 五神汤中6种成分的线性相关性

Table 5 Linear relationships of six components from WSD

待测物	线性方程	R ²	线性范围/ (μg·mL ⁻¹)
京尼平苷酸	$Y=8\ 775.2 X-196\ 533$	0.999 9	28.48~356.00
秦皮甲素	$Y=6\ 015.8 X-144\ 482$	0.999 8	33.25~415.60
咖啡酸	$Y=21\ 911 X-669\ 513$	0.999 7	36.29~453.60
木犀草苷	$Y=21\ 124 X-457\ 079$	0.999 3	29.76~371.20
β-蜕皮甾酮	$Y=19\ 685 X-657\ 605$	0.999 8	46.34~579.20
毛蕊花糖苷	$Y=29\ 857 X-660\ 686$	0.999 3	30.53~381.60

2.2.5 精密度 精密称取同1批次五神汤样品粉末(S1),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件连续6次进样,计算得京尼平苷酸、秦皮甲素、咖啡酸、木犀草苷、β-蜕皮甾酮和毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为1.95%、2.28%、2.37%、2.53%、1.13%、2.68%,表明仪器的精密度良好。

2.2.6 重复性 精密称取同1批次五神汤样品粉末(S1),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液6份,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,京尼平苷酸、秦皮甲素、咖啡酸、木犀草苷、β-蜕皮甾酮、毛蕊花糖苷的质量分数RSD值分别为0.60%、1.36%、1.12%、1.29%、1.47%、2.09%,表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性 移取供试品溶液(批次S1),分别在室温下放置0、2、4、8、12、24 h进样测定,京尼平苷

酸、秦皮甲素、咖啡酸、木犀草苷、 β -蜕皮甾酮和毛蕊花糖苷峰面积的RSD分别为1.45%、1.21%、0.56%、1.86%、1.27%、1.21%，表明供试品溶液在24 h内稳定性较好。

2.2.8 加样回收率 精密称取已知含量的S1批次五神汤样品9份，每份0.5 g，按对照品加入量与样品中待测成分之比为0.8:1、1:1、1.2:1，精密加入低、中、高质量浓度的对照品，按“2.2.2”项下方法制备

供试品溶液，进样分析。结果表明6种成分的平均回收率均在89.6%~93.0%，RSD值在4.4%~10.4%，表明建立的方法准确度良好。

2.2.9 样品含量测定 精密称取10批五神汤样品粉末，制备供试品溶液，按照“2.2.1”项下色谱方法进行样分析，根据线性方程利用外标法计算含量，结果显示，10批五神汤样品中6种成分的含量差异较大，各成分的RSD值在6.69%~17.54%。测定结果见表6。

表6 各成分定量测定结果

Table 6 Results of samples content determination

样品	京尼平苷酸/ (mg·g ⁻¹)	秦皮甲素/ (mg·g ⁻¹)	咖啡酸/ (mg·g ⁻¹)	木犀草苷/ (mg·g ⁻¹)	β -蜕皮甾酮/ (mg·g ⁻¹)	毛蕊花糖苷/ (mg·g ⁻¹)	总计/ (mg·g ⁻¹)
S1	3.12	2.38	1.73	1.46	2.02	1.87	12.58
S2	2.92	2.83	1.68	1.41	2.24	1.91	12.99
S3	2.92	2.72	1.31	1.28	2.52	1.75	12.50
S4	2.98	2.75	1.46	1.43	2.02	1.72	12.36
S5	1.85	2.08	1.95	1.12	1.89	1.59	10.48
S6	3.50	2.35	1.81	1.44	2.25	1.87	13.22
S7	2.70	2.43	2.32	1.52	1.96	1.87	12.80
S8	3.11	2.22	1.90	1.28	1.98	1.57	12.06
S9	3.21	1.94	1.36	1.40	2.00	1.81	11.72
S10	2.88	2.50	1.70	1.43	1.92	1.76	12.19
RSD/%	14.87	12.05	17.54	8.50	9.45	6.69	

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

流动相考察:研究前期对于建立HPLC法同时测定五神汤中6种成分的含量进行了探索和优化，分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液等常见的流动相系统对于五神汤中各物质的洗脱效果。相比之下，以0.1%磷酸水(A)-乙腈(B)作为流动相时基线相对平稳，峰形良好，分离效果更为理想。

检测波长考察:选择检测波长时，考察了样品在203、254、330 nm等不同检测波长下的出峰情况，结果发现色谱峰在254 nm下得到的色谱峰信息较全、响应值较高，具有良好的代表性，故将254 nm确定为五神汤定量测定的检测波长。

3.2 指标性成分的选择

在实验开展前期，查阅了《中国药典》2020年版一部中对于五神汤中各味药材已经明确的检测指标，发现来自于金银花的咖啡酸，来自于车前子的京尼平苷酸和毛蕊花糖苷，来自于紫花地丁的秦皮甲素和木犀草苷以及来自于牛膝的 β -蜕皮甾酮是各单味药材的主要活性成分，均具有解热镇痛、抗

炎抑菌、抗氧化、调节免疫功能等药理作用，与五神汤功效密切相关。

五神汤是由金银花、牛膝、车前子、茯苓和紫花地丁5味药材组成的复方制剂，目前尚无研究对五神汤中含有的药效成分进行明确报道，本实验利用UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS方法初步建立了快速、可靠、简便的五神汤化学成分分析方法。通过与对照品、文献数据库、准分子离子以及二级碎片离子的比对，从五神汤中共解析出72个成分，主要为酚酸类、黄酮类、三萜皂苷类以及香豆素类等，进而利用HPLC法对10批五神汤中覆盖5味药材的6个有效成分(京尼平苷酸、秦皮甲素、咖啡酸、木犀草苷、 β -蜕皮甾酮和毛蕊花糖苷)进行定量研究。该方法简便可靠，可为五神汤的药效物质基础、质量标准以及日后的临床用药提供理论和数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈士铎. 洞天奥旨 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1991.
Chen S D. *Dongtian Aozhi* [M] Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 1991.

- [2] 陈士铎. 辩证录 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007.
Chen S D. *Dialectical Record* [M] Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2007.
- [3] 王彬, 武亭宇, 王博龙. 基于网络药理学和分子对接技术探讨五神汤治疗丹毒的作用机制 [J]. 通化师范学院学报, 2022, 43(2): 12-18.
Wang B, Wu T Y, Wang B L. Mechanism of Wushen Decoction in treating erysipelas based on network pharmacology and molecular docking [J]. *J Tonghua Norm Univ*, 2022, 43(2): 12-18.
- [4] 吕品, 李晓天. 基于体外试验和网络药理学研究金银花抗炎抗菌活性及分子机制 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(14): 1678-1685.
Lyu P, Li X T. Molecular mechanism of anti-inflammatory and antibacterial activity of *Lonicerae japonicae Flos* based on *in vitro* experiments and network pharmacology [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2021, 38(14): 1678-1685.
- [5] 刘天亮, 杨林林, 董诚明, 等. 基于化学模式识别的不同产地金银花HPLC指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4833-4843.
Liu T L, Yang L L, Dong C M, et al. Study on HPLC fingerprint of *Lonicera japonica Flos* from different areas based on chemical pattern recognition [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2022, 53(15): 4833-4843.
- [6] Ding Y, Cao Z Y, Cao L, et al. Antiviral activity of chlorogenic acid against influenza A (H1N1/H3N2) virus and its inhibition of neuraminidase [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45723.
- [7] 熊婷, 何堃, 孙梦盛, 等. 基于网络药理学的牛膝防治阿尔茨海默病的物质基础与作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(1): 142-149.
Xiong T, He K, Sun M S, et al. Network pharmacology-based study on material basis and mechanism of *Achyranthis Bidentatae Radix* in treatment of Alzheimer's disease [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(1): 142-149.
- [8] Xu X X, Zhang X H, Diao Y, et al. *Achyranthes bidentate* saponins protect rat articular chondrocytes against interleukin-1 β -induced inflammation and apoptosis *in vitro* [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2017, 33(2): 62-68.
- [9] 赵宏, 陈晨, 赵岩, 等. 车前子多糖对膜性肾病大鼠肾损伤和肠道菌群的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(22): 92-99.
Zhao H, Chen C, Zhao Y, et al. Effect of polysaccharides from *Plantaginis Semen* on renal injury and gut microbiota in rats with membranous nephropathy [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2021, 27(22): 92-99.
- [10] 韩思婕, 潘翔, 朱芊芊, 等. 茯苓多糖调节2型糖尿病模型大鼠肝脏糖异生的机制研究 [J]. 中国药房, 2022, 33(13): 1581-1587.
Han S J, Pan X, Zhu Q Q, et al. Study on the mechanism of *Poria cocos* polysaccharides on the regulation of gluconeogenesis in liver of type 2 diabetic mellitus model rats [J]. *China Pharm*, 2022, 33(13): 1581-1587.
- [11] Jeong J W, Lee H H, Han M H, et al. Ethanol extract of *Poria cocos* reduces the production of inflammatory mediators by suppressing the NF-kappa B signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2014, 14: 101.
- [12] 顾生玖, 姚志仁, 顾超豪, 等. 基于响应面法优化紫花地丁多酚与黄酮的提取工艺 [J]. 食品研究与开发, 2022, 43(9): 88-95.
Gu S J, Yao Z R, Gu C H, et al. Optimization of the extraction of polyphenols and flavonoids from *Viola philippica* by response surface methodology [J]. *Food Res Dev*, 2022, 43(9): 88-95.
- [13] 李艳丽, 胡彦武. 紫花地丁抗炎作用及机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 244-247.
Li Y L, Hu Y W. Studies on anti-inflammatory effects and mechanism of *Viola yedoensis* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2012, 18(24): 244-247.
- [14] 吕小琴. 刘清泉解读五神汤 [N]. 中国中医药报, 2017-08-21(004).
Lv X Q. Liu Qingquan's Interpretation of Wushen Tang [N]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2017-08-21 (004).
- [15] 秦大平, 张晓刚, 宋敏, 等. 从扶阳养筋理论探讨慢性骨髓炎的中医治疗策略 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(8): 1157-1160.
Qin D P, Zhang X G, Song M, et al. Discussion on TCM treatment strategy of chronic osteomyelitis from the theory of Fuyang and nourishing tendons [J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med*, 2019, 25(8): 1157-1160.
- [16] 刘广辉. 五神汤加减治疗慢性骨髓炎患者的临床疗效观察 [J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(6): 249-250.
Liu G H. Clinical observation on the treatment of chronic osteomyelitis with modified Wushen Decoction [J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2016, 10(6): 249-250.
- [17] 郭光鑫, 孙颖, 栾海鹏, 等. 基于网药方法探究透脓散治疗慢性骨髓炎的分子作用机制 [J]. 世界中医药, 2022, 17(6): 773-778.
Guo G X, Sun Y, Luan H P, et al. Exploration of molecular action mechanism of Tounong Powder in the treatment of chronic osteomyelitis based on pharmacy network [J]. *World Chin Med*, 2022, 17(6): 773-778.
- [18] 黄申, 朱波, 张巧艳, 等. 基于UPLC指纹图谱和黄酮醇苷含量的不同来源银杏叶的质量比较 [J]. 中草药,

- 2022, 53(13): 4125-4131.
- Huang S, Zhu B, Zhang Q Y, et al. Quality comparison of *Ginkgo biloba* leaves from different sources based on UPLC fingerprint and flavonoid glycosides content [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(13): 4125-4131.
- [19] 赵秋龙, 张丽, 卞晓坤, 等. UPLC-QTRAP-MS分析不同产地茯苓药材中8个三萜酸类成分 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(7): 1169-1177.
- Zhao Q L, Zhang L, Bian X K, et al. Analysis of 8 triterpene acids in *Poria* from different habitats based on UPLC-QTRAP-MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2020, 40(7): 1169-1177.
- [20] 张佩杰, 曹妍, 张珂, 等. 利用HPLC-IT-TOF-MS分析新疆一枝蒿的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(19): 4658-4666.
- Zhang P J, Cao Y, Zhang K, et al. Chemical profiling of *Artemisia rupestris* using HPLC-IT-TOF-MS [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(19): 4658-4666.
- [21] 王银洁, 刘本臣, 刘军, 等. UPLC-Q-TOF-MS法鉴定消肿止痛液有效部位的化学成分 [J]. 中国药房, 2019, 30(23): 3232-3239.
- Wang Y J, Liu B C, Liu J, et al. Identification of chemical components in active fraction of Xiaozhong Zhitong Lotion by UPLC-Q-TOFMS [J]. China Pharm, 2019, 30(23): 3232-3239.
- [22] 曲正义, 郑培和, 李亚丽, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法对三七果中皂苷类成分的快速鉴定 [J]. 分析化学, 2022, 50(2): 225-259.
- Qu Z Y, Zheng P H, Li Y L, et al. Rapid identification of saponins in *Panax notoginseng* fruits by ultra high performance liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2022, 50(2): 225-259.
- [23] 赵敏敏. 秦皮药代动力学及秦皮接骨胶囊质量控制方法研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015.
- Zhao M M. Study on pharmacokinetics of cortex fraxini and quality control method of cortex fraxini jiegu capsule [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.

[责任编辑 兰新新]