

五神汤中化学成分研究

张 敏, 朱先宏, 石 芸, 秦昆明, 高 珣*

江苏海洋大学药学院, 江苏 连云港 222005

摘要: 目的 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS 联用技术研究中药复方五神汤中的化学成分, 归纳总结不同类型化合物的裂解规律。方法 采用 ShiM-pack XR-ODS C₁₈ 色谱柱 (75 mm×3.0 mm, 2.2 μm), 流动相为乙腈 (B)-水 (A), 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 °C; 电喷雾离子源 (ESI), 在正、负离子模式下对五神汤提取液进行质谱检测。结果 从五神汤提取液中分析鉴定出 95 个化合物, 包括 27 个黄酮类、15 个酚酸类、11 个环烯醚萜类、5 个香豆素类、5 个生物碱类、4 个苯乙醇苷类以及 28 个其他类化合物, 并对金丝桃苷、木犀草苷、新绿原酸、京尼平苷酸、马钱苷酸、毛蕊花糖苷、异麦角甾苷、秦皮甲素等主要化学成分进行裂解规律解析。结论 建立的方法准确可靠, 揭示了中药复方五神汤的潜在有效成分。关键词: 五神汤; UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS; 金丝桃苷; 木犀草苷; 新绿原酸; 京尼平苷酸; 马钱苷酸; 毛蕊花糖苷; 异麦角甾苷; 秦皮甲素

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)18-6131-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.004

Chemical constituents in Wushen Decoction

ZHANG Min, ZHU Xianhong, SHI Yun, QIN Kunming, GAO Xun

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

Abstract: Objective To study the compounds in Wushen Decoction (五神汤) based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS technology, and to summarize the cracking laws of different types of compounds. **Methods** The chromatography was performed on ShiM-pack XR-ODS C₁₈ column (75 mm × 3.0 mm, 2.2 μm) with acetonitrile (B)-water (A) as mobile phase and gradient elution. Volume flow rate was 0.5 mL/min and column temperature was 30 °C. An electrospray ion source (ESI) was used to detect the extract of Wushen Decoction by mass spectrometry in positive and negative ion modes. **Results** A total of 95 compounds, including 27 flavonoids, 15 phenolic acids, 11 iridoid glycosides, 5 coumarins, 5 alkaloids, 4 phenylethanol glycosides and other 28 compounds, were identified from the extract of Wushen Decoction. The cracking laws of their main chemical components such as hyperoside, luteolin, nechlorogenic acid, geniposide, loganin, verbascoside, isoacteoside and esculin were analyzed. **Conclusion** The established method is accurate and reliable, which reveals the potential effective components of the traditional Chinese medicine compound Wushen Decoction.

Key words: Wushen Decoction; UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS; hyperoside; luteolin; nechlorogenic acid; geniposide; loganin; verbascoside; isoacteoside; esculin

五神汤源自清代陈士铎的《洞天奥旨·皮肤痈》篇^[1], 主要用于防治湿热蕴蒸而致的多皮肤痈, 处方由金银花、牛膝、车前子、茯苓和紫花地丁五味药组成, 均收录于《中国药典》一部 2020 年版。《辨证录》中记载“茯苓、车前子以利水, 紫花地丁以清热, 又用金银花、牛膝补中散毒。”全方五药以清热、利湿、散毒为主, 是治疗皮肤痈的经典方剂^[2-4]。

超高效液相色谱-串联四极杆静电场轨道阱-质

谱 (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS) 联用技术能精确、快速地对初级和次级代谢产物进行分析, 因此普遍应用于复杂的中药化学成分体系分析中^[5-7]。本研究拟采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS 技术对五神汤提取液中的化合物进行系统分析, 并结合现有报道对化合物的质谱裂解规律进行分类和总结^[8-10]。为后续五神汤的药效物质基础研究提供理论和数据支持。

收稿日期: 2024-05-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (82104349); 国家自然科学基金面上项目 (82374038); 江苏省中医药管理局面上项目 (KK24004)

作者简介: 张 敏 (1997—), 女, 硕士研究生, 从事中药分析研究。E-mail: minzhang20211021@163.com

*通信作者: 高 珣 (1984—), 女, 副教授, 博士, 主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: gaoxun_2017@163.com

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Scientific™Q Exactive™ 质谱仪和 Dionex Ultimate 3000 RSLC 液相色谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); MS105DU 型十万分之一电子分析天平(梅特勒托利多仪器上海有限公司); BSM-120.4 万分之一电子天平(上海卓精电子科技有限公司); DZTW 型加热套、RE-52AA 型旋转蒸发仪(上海力辰邦西仪器有限公司); DHG-9080A 型鼓风干燥箱(上海博珍仪器设备制造厂)。

1.2 药材与试剂

金银花(批号 220720, 产地河南)、紫花地丁(批号 201225, 产地河北)、茯苓(批号 22122802, 产地安徽)、车前子(批号 220737, 产地江西)及牛膝(批号 22011701, 产地河北)均购自北京同仁堂药房; 芦丁(批号 FY00B4067)、没食子酸(批号 PS000518)、原儿茶酸(批号 PS012560)、奎尼酸(批号 PS001245)、杨梅素(批号 PS001011)、京尼平苷酸(批号 PS000518)、咖啡酸(批号 PU1191-0025)对照品均购自成都普思生物科技股份有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$; 木犀草苷(批号 FY1466B7017)、绿原酸(批号 FY1435B516)、槲皮素(批号 FY160B7158)、秦皮乙素(批号 FY00B5112)、秦皮甲素(批号 FY00B4067)、毛蕊花糖苷(批号 FY1624B0602)、 β -蜕皮甾酮(批号 FY00B5006)对照品均购自南通飞宇生物科技有限公司, 质量分数均 $\geq 98\%$; 甲醇和乙腈(HPLC 级)均购自上海麦克林生化科技股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 分别取芦丁、没食子酸、原儿茶酸、奎尼酸、杨梅素、京尼平苷酸、咖啡酸、木犀草苷、绿原酸、槲皮素、秦皮乙素、秦皮甲素、毛蕊花糖苷、 β -蜕皮甾酮对照品适量, 置于棕色量瓶中, 用 80% 的甲醇溶解稀释, 并定容至 25 mL, 制备成 200 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液, 取各对照品储备液适量, 稀释成约 5 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 五神汤各味药材粉碎, 过 60 目筛, 按处方配比称取五神汤药材粉末 39 g, 加入 25 倍量水, 浸泡 60 min, 提取 105 min, 加热回流提取 3 次, 合并续滤液, 减压浓缩(60 $^{\circ}\text{C}$)至 250 mL。精密移取 0.5 mL 浓缩液, 置于 10 mL 量瓶中, 用蒸馏水稀释并定容至刻度, 摇匀, 即得五

神汤供试品溶液(7.8 mg/mL)。

2.2 色谱和质谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 ShiM-pack XR-ODS C_{18} 柱(75 mm $\times$ 3.0 mm, 2.2 μm); 流动相: 乙腈(B)-水(A); 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL ; 梯度洗脱程序: 0.01~4 min, 2%~8% B; 4~5 min, 8%~10% B; 5~9 min, 10%~17% B; 9~12 min, 17%~20% B; 12~16 min, 20%~23% B; 16~16.5 min, 23%~2% B。

2.2.2 质谱条件 HESI-II 离子源, 正、负离子模式; 离子源温度 550 $^{\circ}\text{C}$; 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; 一级质谱母离子扫描范围 m/z 50~900, 二级质谱扫描范围为 m/z 50~800; 扫描时间为 21 min。

2.3 构建化学成分数据库

结合课题组前期研究^[11-12], 以及文献报道的关于金银花、紫花地丁、茯苓、车前子及牛膝中已明确的化学成分, 进行数据整理, 建立包括化合物的名称、分子式、相对分子质量、碎片离子等信息的“五神汤化学成分数据库”。

2.4 结果

将采集的高分辨液质数据通过 Xcalibur 定性筛查软件, 结合 Massbank 等数据库, 对比化合物一级、二级质谱信息等对化合物进行确认。共分析比对出五神汤提取液中 95 个化合物, 总离子流图见图 1, 五神汤化学成分信息详见表 1。其中包括 27 个黄酮类化合物, 15 个酚酸类化合物, 11 个环烯醚萜类化合物、5 个香豆素类化合物、5 个生物碱类化合物、4 个苯乙醇苷类化合物以及其他类化合物。

2.4.1 黄酮类成分的鉴定分析 正、负离子模式下共鉴定出黄酮类化合物 27 种, 主要来自于金银花和紫花地丁。其中, 以黄酮糖苷类化合物居多, 裂解规律以糖苷键断裂的情形较为普遍^[13], 例如化合物中常失去 1 分子葡萄糖残基、鼠李糖或木糖后, 自身结构会转变为黄酮苷元结构, 在二级裂解过程中, 化合物自身的 CO、CO₂ 及其邻位-OH 也易于丢失。

以化合物 75 ($t_{\text{R}}=13.71$ min) 和 65 ($t_{\text{R}}=12.75$ min) 为例, 在负离子模式下, 其准分子离子峰分别为 $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$ (m/z 447.093 02 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$)、 $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{12}$ (m/z 463.087 77 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$), 在 ESI-二级质谱碎片峰中可以观察到 m/z 284.032 68 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^{-}$ 、 m/z 300.027 50 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^{-}$ 是由准分子离子峰失去葡萄糖残基所产生, m/z 284.032 68 $[\text{M}-$

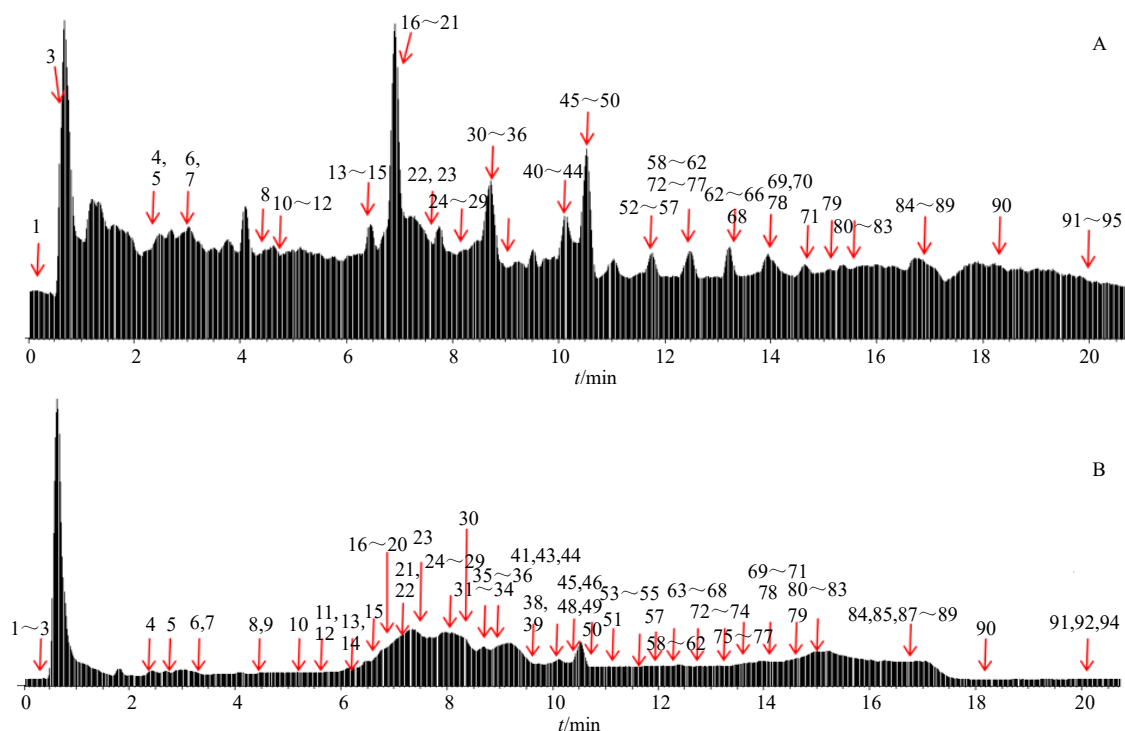


图 1 五神汤在正 (A)、负 (B) 离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagrams of Wushen Decoction in positive (A) and negative (B) ion modes

表 1 五神汤化学成分信息

Table 1 Compound information of Wushen Decoction

峰号	化合物	t_R/min	分子式	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	MS/MS 碎片 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	类型
1	亚油酸	0.08	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	281.247 50	—	—	-0.024	脂肪酸
				—	279.232 95	—	-0.013	
2	没食子酸	0.61	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$	—	169.014 24	—	-0.013	酚酸
3	甜菜碱	0.70	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2$	118.086 25	—	118.086 13	-0.044	生物碱类
				—	116.071 70	—	-0.016	
4	龙胆酸	2.35	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	155.033 88	—	—	-0.034	酚酸
				—	153.019 33	153.019 41, 109.029 58	-0.013	
5	桃叶珊瑚苷	2.72	$\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_4$	185.080 83	—	—	-0.029	环烯醚萜类
				—	183.066 28	—	-0.012	
6	烟酸	3.31	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	124.039 30	—	—	-0.040	有机化合物
				—	122.024 75	—	-0.014	
7	尿囊素	3.49	$\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_3$	159.051 26	—	—	-0.042	生物碱类
				—	157.036 71	—	-0.021	
8	油酸	4.59	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	283.263 15	—	89.059 65, 133.085 85	-0.024	脂肪酸
				—	281.248 60	—	-0.013	
9	原儿茶酸	4.60	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_9$	—	153.993 90	—	-0.021	酚酸
10	壬二酸	5.32	$\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_4$	189.112 13	—	—	-0.029	脂肪酸
				—	187.097 58	187.097 61, 125.097 27	-0.012	

表 1 (续)

峰号	化合物	t_R/min	分子式	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	MS/MS 碎片 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	类型
11	奎宁酸	5.66	$C_7H_{12}O_6$	193.070 66	—	—	−0.024	酚酸
				—	191.056 11	—	−0.007	
12	黄连碱	5.77	$C_{19}H_{14}NO_4$	321.099 55	—	—	−0.029	生物碱类
				—	319.085 00	—	−0.019	
13	秦皮乙素	6.18	$C_9H_6O_4$	179.033 88	—	111.080 31, 95.049 00, 119.049 15	−0.029	香豆素类
				—	177.019 33	177.019 38, 133.029 53	−0.011	
14	秦皮甲素	6.18	$C_{15}H_{16}O_9$	341.086 70	—	—	−0.025	香豆素类
				—	339.072 15	—	−0.015	
15	香草酸	6.51	$C_8H_8O_4$	169.049 53	—	—	−0.031	酚酸
				—	167.034 98	—	−0.012	
16	桃叶珊瑚苷	7.18	$C_{15}H_{22}O_9$	347.133 65	—	—	−0.025	环烯醚萜类
				—	345.119 10	—	−0.016	
17	京尼平苷酸	7.25	$C_{16}H_{22}O_{10}$	375.128 57	—	374.186 58, 213.075 10, 151.038 96, 79.054 25	−0.003	环烯醚萜类
				—	373.114 02	373.113 86, 193.050 67, 149.060 84, 119.035 07	0	
18	大车前苷	7.26	$C_{29}H_{36}O_{16}$	641.207 61	—	—	−0.002	黄酮类
				—	639.193 05	—	−0.003	
19	阿魏酸	7.28	$C_{10}H_{10}O_4$	195.065 18	—	195.065 05, 151.038 83, 177.054 35	−0.027	酚酸
				—	193.050 63	—	−0.011	
20	香荆芥酚	7.29	$C_{10}H_{14}O$	151.111 74	—	—	−0.011	单萜
				—	149.097 18	—	−0.056	
21	氧化芳樟醇	7.40	$C_{10}H_{18}O_2$	171.137 95	—	—	−0.037	单萜
				—	169.123 40	—	−0.018	
22	杨梅素	7.61	$C_{15}H_{10}O_8$	319.044 84	—	—	−0.012	黄酮类
				—	317.030 29	317.030 40, 255.030 18, 163.003 75	−0.001	
23	咖啡酸	7.92	$C_9H_8O_4$	181.049 53	—	—	−0.029	酚酸
				—	179.034 98	179.035 01, 135.045 21	0.121	
24	毛蕊花糖苷	8.03	$C_{29}H_{36}O_{15}$	625.212 69	—	—	−0.011	苯乙醇苷类
				—	623.198 14	—	−0.006	
25	新绿原酸	8.03	$C_{16}H_{18}O_9$	355.102 35	—	—	−0.024	酚酸
				—	353.087 80	353.086 79, 191.056 23	−0.015	

表 1 (续)

峰号	化合物	t_R/min	分子式	$[M+H]^+$	$[M-H]^-$	MS/MS 碎片 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	类型
26	绿原酸	8.03	$C_{16}H_{18}O_9$	355.102 35 —	— 353.087 80	— 353.088 10, 191.056 23	-0.012 -0.015	酚酸
27	异绿原酸	8.03	$C_{16}H_{18}O_9$	355.102 35 —	— 353.087 80	— 353.087 16, 191.056 20, 135.045 24	-0.015	酚酸
28	隐绿原酸	8.03	$C_{16}H_{18}O_9$	355.102 35 —	— 353.087 80	— 353.086 85, 191.056 14, 135.045 20	-0.013 -0.015	酚酸
29	马钱苷酸	8.05	$C_{16}H_{24}O_{10}$	377.144 22 —	— 375.129 67	377.083 92, 163.039 14 375.128 97, 169.087 16, 113.024 48、	-0.003 -0.002	环烯醚萜类
30	大蒜素	8.34	$C_6H_{10}OS_2$	163.024 58 —	— 161.010 02	— —	-2.895 -2.973	有机硫类化合物
31	芥子酸	8.56	$C_{11}H_{12}O_5$	225.075 75 —	— 223.061 19	165.054 52, 151.038 85, 95.049 07 —	0 -0.030	酚酸
32	东茛菪内酯	8.61	$C_{10}H_8O_4$	193.049 53	—	—	-0.030	香豆素类
33	异茛菪亭	8.61	$C_{10}H_8O_4$	193.049 53	—	—	-0.030	香豆素类
34	獐牙菜苷	8.65	$C_{16}H_{22}O_9$	359.133 65 —	— 357.119 10	197.080 63, 127.038 86 —	-0.024 -0.015	环烯醚萜类
35	9-8-表番木鳖酸	8.75	$C_{16}H_{24}O_{10}$	377.144 22 —	— 375.129 67	377.083 92, 163.039 14 375.128 97, 195.066 50, 151.076 48	-0.003 0	环烯醚萜类
36	忍冬苷	8.89	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.165 74 —	— 593.151 19	— —	-0.011 -0.006	黄酮类
37	地黄苷	9.16	$C_{31}H_{40}O_{15}$	653.243 99	—	—	-0.010	环烯醚萜类
38	紫丁香苷	9.52	$C_{17}H_{24}O_9$	373.149 30 —	— 371.134 75	— 371.099 73, 191.056 11, 173.045 67	-0.009 -0.005	苯丙醇苷类
39	梓醇	9.85	$C_{15}H_{22}O_{10}$	363.128 57 —	— 361.114 02	— —	-0.003 0	环烯醚萜类
40	表小檗碱	10.03	$C_{20}H_{18}NO_4$	337.130 85	—	—	-0.028	生物碱类
41	<i>N</i> -反式-阿魏酰酪胺	10.08	$C_{18}H_{19}NO_4$	314.138 68 —	— 312.124 13	314.207 12, 172.107 96, 84.055 51 177.019 41, 285.040 68	-0.015 -0.004	生物碱类

表 1 (续)

峰号	化合物	<i>t_R</i> /min	分子式	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS/MS 碎片 (<i>m/z</i>)	误差 (×10 ⁻⁶)	类型
42	松苓新酸	10.20	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	455.351 97	—	—	-0.004	甾醇
43	车前草苷 D	10.22	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₆	641.207 61	—	—	-0.002	黄酮类
				—	639.193 05	—	-0.003	
44	黄芩苷	10.40	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	447.092 18	—	—	-0.017	黄酮类
				—	445.077 63	—	-0.010	
45	香草乙酮	10.53	C ₉ H ₁₀ O ₃	167.070 27	—	—	-0.004	芳香族酮类
				—	165.055 71	—	-0.045	化合物
46	sarracenin	10.53	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	227.091 40	—	165.054 57, 107.049 03	0	环烯醚萜类
				—	225.076 84	—	-0.030	
47	7-甲氧基香豆素	10.53	C ₁₀ H ₈ O ₃	177.054 62	—	177.054 50, 149.059 51, 91.054 12	-0.004	香豆素类
				—	—	—	-0.042	
48	centauroside	10.53	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₉	759.270 60	—	—	-0.007	环烯醚萜类
				—	757.256 05	—	-0.003	
49	栀子苷	10.53	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	389.144 22	—	107.049 05, 65.054 61	-0.003	环烯醚萜类
				—	387.129 67	387.128 45, 193.050 77, 123.045 26	0	
50	新苯丙素苷	10.74	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	623.197 04	—	—	-0.011	苯丙素类
				—	621.182 49	—	-0.005	
51	野黄芩素	11.65	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	—	285.040 60	137.024 42, 166.998 60	0.370	黄酮类
52	牛膝甾酮	11.71	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	481.315 98	—	—	0	甾体类
53	蜕皮甾酮	11.71	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	481.315 98	—	—	0	甾体类
				—	479.301 42	—	-0.014	
54	芦丁	11.77	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.160 66	—	—	-0.002	黄酮类
				—	609.146 10	609.146 12, 300.027 50, 271.024 81	-0.013	
55	水龙骨甾酮 B	11.85	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	497.310 89	—	—	-0.010	甾体类
				—	495.296 34	—	-0.003	
56	表丁香脂素	11.89	C ₂₂ H ₂₆ O ₈	419.170 04	—	—	-0.010	酚类
57	柠檬酸	11.93	C ₆ H ₈ O ₇	193.034 27	—	—	-0.047	有机酸类
				—	191.019 72	191.019 73, 173.009 17, 85.029 57	-0.030	
58	α-松油醇	12.37	C ₁₀ H ₁₈ O	155.143 04	—	—	-0.011	单萜
				—	153.128 48	—	-0.056	
59	<i>d</i> -柠檬烯	12.37	C ₁₀ H ₁₆	137.132 47	—	—	-0.052	单萜
				—	135.117 92	—	-0.028	
60	高车前素	12.41	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.070 66	—	—	-0.015	黄酮类
				—	299.056 11	—	-0.004	
61	桑黄素	12.41	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.070 66	—	—	-0.015	黄酮类
				—	299.056 11	—	-0.004	

表 1 (续)

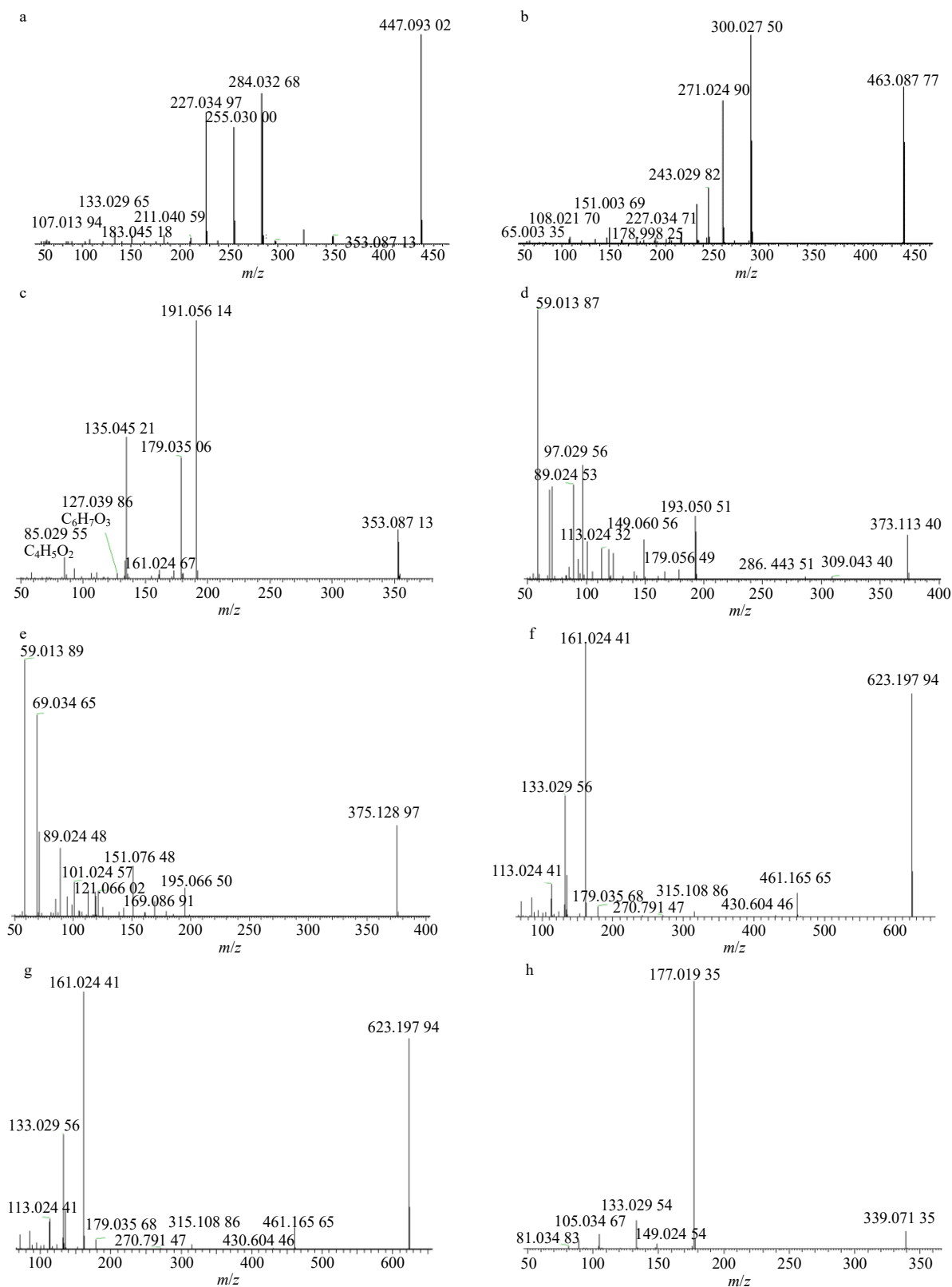
峰号	化合物	t_R/min	分子式	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}-\text{H}]^-$	MS/MS 碎片 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	类型
62	金圣草素	12.58	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	—	301.035 40	151.003 68, 107.013 85	—	黄酮类
63	槲皮素	12.64	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	303.049 92 —	— 301.035 37	— 301.035 28, 151.003 69	−0.030 −0.019	黄酮类
64	草质素	12.64	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	303.049 92 —	— 301.035 37	— 301.035 28, 151.003 69	−0.030 −0.019	黄酮类
65	金丝桃苷	12.74	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	465.102 75 —	— 463.088 19	— 463.087 80, 300.027 56, 271.024 87	−0.005 −0.020	黄酮类
66	木通苯乙醇苷 A	12.86	$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$	— —	— 477.140 23	— —	−0.017 −0.010	苯乙醇苷类
67	泽兰黄酮	12.87	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	—	315.051 20	243.029 90, 174.032 24	0.340	黄酮类
68	异麦角甾苷	12.90	$\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$	625.212 69 —	— 623.198 14	— —	−0.011 −0.006	苯乙醇苷类
69	黄芩素	14.18	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	271.060 09 —	— 269.045 54	— —	−0.037 −0.025	黄酮类
70	芹菜素	14.18	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	271.060 09 —	— 269.045 54	— —	−0.037 −0.025	黄酮类
71	黄藤素	14.64	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_4$	353.162 15 —	— 351.147 60	— —	−0.027 −0.018	黄酮类
72	紫云英苷	13.06	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	449.107 83 —	— 447.093 28	— 447.092 80, 284.032 68, 255.029 92	−0.017 −0.010	黄酮类
73	车前子苷	13.13	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	467.118 40 —	— 465.103 84	— —	−0.005 −0.020	黄酮类
74	木通苯乙醇苷 B	13.34	$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$	479.154 78 —	— 477.140 23	— —	−0.017 −0.010	苯乙醇苷类
75	木犀草苷	13.71	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	449.107 83 —	— 447.093 28	— 447.092 80, 284.032 68, 255.029 92	−0.017 −0.010	黄酮类
76	异绿原酸 B	13.87	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	517.134 05 —	— 515.119 49	— —	−0.005 −0.018	酚酸
77	野漆树苷	13.92	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	579.170 83 —	— 577.156 27	177.054 47, 135.043 90 —	−0.003 −0.015	黄酮类
78	hypolaetin-8-glucoside	14.20	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	465.102 75 —	— 463.088 19	— 463.087 80, 300.027 56, 271.024 87	−0.005 −0.020	黄酮类
79	异绿原酸 A	14.97	$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$	517.134 05 —	— 515.119 49	— —	−0.005 −0.018	酚酸

表 1 (续)

峰号	化合物	<i>t_R</i> /min	分子式	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	MS/MS 碎片 (<i>m/z</i>)	误差 (×10 ⁻⁶)	类型
80	异绿原酸 C	15.20	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	517.134 05	—	—	-0.005	酚酸
				—	515.119 49	—	-0.018	
81	高车前苷	15.40	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.123 48	—	—	-0.017	黄酮类
				—	461.108 93	—	-0.010	
82	石竹素	15.40	C ₁₅ H ₂₄ O	221.189 99	—	—	-0.009	倍半萜
				—	219.175 43	—	-0.040	
83	汉黄芩素	15.55	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.075 75	—	—	0	黄酮类
				—	283.061 19	—	-0.024	
84	马来酸	16.91	C ₄ H ₄ O ₄	117.018 23	—	—	-0.044	二羧酸
				—	115.003 68	115.003 96, 71.013 92	-0.016	
85	木犀草素	17.02	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.055 01	—	287.054 84, 153.018 30, 213.054 23	0.249	黄酮类
				—	285.040 46	285.040 41, 133.029 53, 93.034 71	-0.004	
86	α-亚麻酸	17.02	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	279.231 85	—	—	-0.024	脂肪酸
87	山柰酚	17.02	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.055 01	—	287.054 84, 153.018 25, 121.028 53	-0.016	黄酮类
				—	285.040 46	285.040 41, 239.034 38, 133.029 53	-0.004	
88	漆黄素	17.02	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.055 01	—	287.054 84, 153.018 25, 121.028 53	-0.016	黄酮类
				—	285.040 46	285.040 41, 239.034 38, 185.160 94, 133.029 53, 93.034 71	-0.004	
89	异鼠李素	17.04	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	317.065 57	—	—	-0.029	黄酮类
				—	315.051 02	315.051 15, 285.040 47, 177.019 36	-0.019	
90	月桂酸	18.27	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	201.184 90	—	—	-0.033	脂肪酸
				—	199.170 35	—	-0.017	
91	金合欢醇	19.96	C ₁₅ H ₂₆ O	223.205 64	—	—	-0.009	倍半萜
92	豆甾烷醇	20.46	C ₂₉ H ₅₂ O	—	415.394 53	—	-0.023	甾醇类
93	β-谷甾醇	20.53	C ₂₉ H ₅₀ O	415.393 44	—	—	-0.003	四环三萜
94	棕榈酸乙酯	20.68	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	285.278 80	—	—	-0.024	酯类
				—	283.264 25	—	-0.013	
95	亚麻酸乙酯	20.76	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	307.263 15	—	—	-0.022	酯类

H—C₆H₁₀O₅]⁻继续以 RDA 裂解的方式产生碎片 *m/z* 153.093 28 [M—H—C₈H₄O₂]⁻, 同时失去 1 分子 CO 产生 *m/z* 271.024 90 [M—H—CO]⁻ 碎片离子, 用

msaabank 数据库及文献报道^[14-15]进行比对, 推测化合物分别为木犀草苷和金丝桃苷, 二级质谱图见图 2, 裂解规律见图 3。



a-木犀草苷; b-金丝桃苷; c-绿原酸; d-京尼平苷酸; e-马钱苷酸; f-毛蕊花糖苷; g-异毛蕊花糖苷; h-秦皮甲素。
a-luteolioside; b-hyperoside; c-chlorogenic acid; d-geniposidic acid; e-loganic acid; f-verbascoside; g-isoacteoside; h-esculin.

图 2 化合物的二级质谱图

Fig. 2 Secondary mass spectrum of compounds

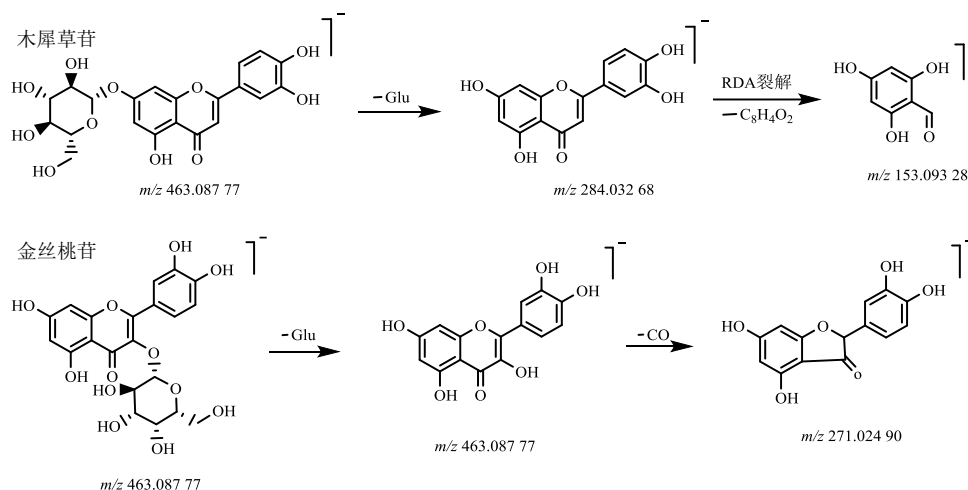


图 3 木犀草苷和金丝桃苷的质谱裂解规律图

Fig. 3 Mass spectrum cracking rule of luteoloside and hyperoside

2.4.2 酚酸类成分的鉴定分析 鉴定出的酚酸类成分主要来自于五神汤中的金银花, 包括绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、柠檬酸等。该类化合物在负离子模式下有较好的响应, 且在二级裂解过程中易丢失 H_2O 和 $-\text{COOH}$ 。

以化合物 **25** 为例 ($t_{\text{R}}=7.06$ min), 在负离子模式下, 其准分子离子峰 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ (m/z 353.087 13

$[\text{M}-\text{H}]^-$), 在二级碎片质谱峰中产生 m/z 179.035 06 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ 和 m/z 135.045 21 $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$ 碎片离子, 分别为丢失 1 分子的葡萄糖残基- $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ 和失去 1 分子 CO_2 产生; 并同时以 m/z 191.056 14 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3]^-$ 碎片离子的形式存在, 结合对照品以及文献数据报道^[16], 推测其为绿原酸, 二级质谱图见图 2, 裂解规律见图 4。

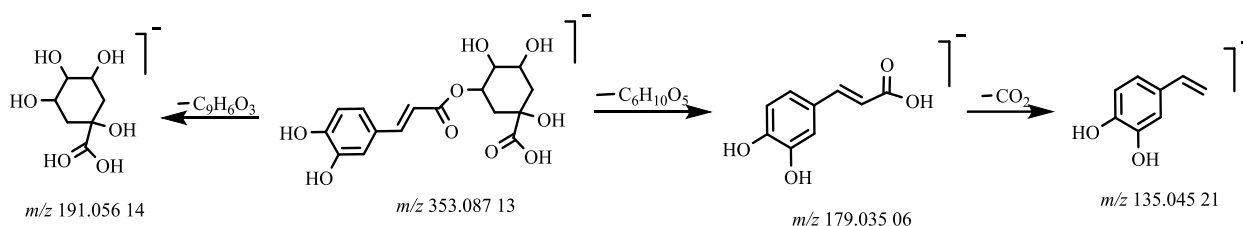


图 4 绿原酸的质谱裂解规律图

Fig. 4 Mass spectrum cracking rule of chlorogenic acid

2.4.3 环烯醚萜类化合物的鉴定分析 鉴定出的环烯醚萜类化合物主要来自于五神汤中的金银花和车前子, 包括马钱苷酸、京尼平苷酸、栀子苷、桃叶珊瑚苷等。该类化合物中包含基团较多, 如葡萄糖基团、芹菜基团等, 容易和糖类成分结合形成苷元结构, 在二级裂解过程中也易丢失葡萄糖残基、 $-\text{OH}$ 和 $-\text{COOH}$ 等结构, 形成大量的碎片离子。

以化合物 **17** ($t_{\text{R}}=7.25$ min) 和 **29** ($t_{\text{R}}=5.36$ min) 为例, 在负离子模式下, 其准分子离子峰 $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{O}_{10}$ (m/z 373.113 40 $[\text{M}-\text{H}]^-$)、 $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_{10}$ (m/z 375.128 97 $[\text{M}-\text{H}]^-$), 分别产生 m/z 193.050 51 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ 、 m/z 149.060 56 $[\text{M}-\text{H}-\text{COOH}]^-$ 和 m/z 195.066 50 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ 、 m/z 151.076 48 $[\text{M}-$

$\text{H}-\text{COOH}]^-$ 、 m/z 121.066 02 $[\text{M}-\text{H}-\text{OH}-\text{CH}_3]^-$ 二级碎片离子, 推测 **17** 号化合物为丢失 1 分子的葡萄糖残基- $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ 和失去 1 分子 $-\text{COOH}$; 推测 **29** 号丢失 1 分子的葡萄糖残基- $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ 后, 继而失去 1 分子 $-\text{COOH}$ 以及 $-\text{CH}_3$ 和 $-\text{OH}$ 产生的碎片离子。结合 Msaabank 数据库及相关文献^[17], 推测其为京尼平苷酸和马钱苷酸, 二级质谱图见图 2, 裂解规律见图 5。

2.4.4 苯乙醇苷类化合物的鉴定分析 鉴定出的萜类化合物主要来自于五神汤中的车前子, 包括马钱苷酸、京尼平苷酸、栀子苷、桃叶珊瑚苷等。该类化合物中包含基团较多, 如葡萄糖基团、芹菜基团等, 容易和糖类成分结合形成苷元结构, 在二级裂

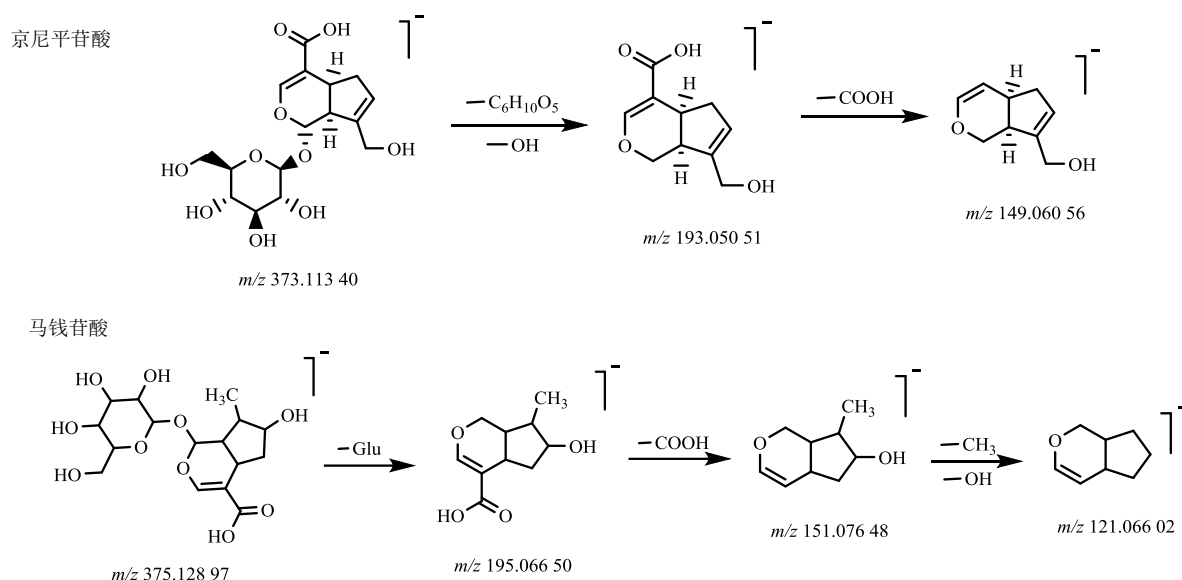


图 5 京尼平苷酸和马钱苷酸的质谱裂解规律图

Fig. 5 Mass spectrum cracking rule of geniposidic acid and loganic acid

解过程中也易丢失葡萄糖残基、-OH 和-COOH 等结构，形成大量的碎片离子。

以化合物 **24** ($t_R=8.03$ min) 和 **68** ($t_R=12.9$ min) 为例，在负离子模式下，其准分子离子峰 $C_{29}H_{35}O_{15}$ (m/z 623.197 94 $[M-H]^-$)，在二级碎片质谱峰中观察到 m/z 461.165 65 $[M-H-C_6H_{10}O_4]^-$ ，是由糖苷断裂失去一分子鼠李糖产生，同时酯键断裂生成 m/z 315.108 86 $[M-H-C_8H_8O_2]^-$ 碎片离子，再失去 1 分子葡萄糖生成碎片 m/z 161.024 41 $[M-H-C_6H_{10}O_5]^-$ ，最终脱羧基产生碎片离子 m/z 133.029 56 $[M-H-COOH]^-$ 。根据文献报道^[8]，推测化合物为毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷，二级质谱图见图 2，裂解规律见图 6。

2.4.5 香豆素类化合物的鉴定分析 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、甲氧基香豆素等。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。由此，推测 14 号化合物为秦皮甲素，二级质谱图见图 2，裂解规律见图 7。

2.4.6 生物碱类化合物的鉴定分析 鉴定出的生物碱化合物主要来自于五神汤中的车前子，包括甜菜碱、表小檗碱、黄连碱、尿囊素等。生物碱大多以正离子的形式存在，因此，在正负离子扫描模式下，正离子下的响应更好。在二级质谱分析时，该类化合物断裂以 N^+ 为中心进行裂解，如-CH₃、-C₄H₈ 等，

造成多甲基的丢失，形成大量的碎片离子。

2.4.7 其他类化合物 液质鉴定出五神汤中含有许多种化合物，除了以上类型的化合物外，还有脂肪酸、脂肪酯类、甾酮类以及挥发油类物质等。脂肪酸及脂肪酯类包含油酸、亚油酸、月桂酸、棕榈酸乙酯、亚麻酸乙酯等；甾酮类包含 β -蜕皮甾酮和牛膝甾酮，是牛膝中的主要化学成分；挥发油类包括 α -松油醇、芳樟醇等。

3 讨论

3.1 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS 条件优化

五神汤处方由金银花、紫花地丁、茯苓、牛膝和车前子 5 味药材组成。由于中药复方中的成分较为复杂，将各组分离快速分离分析，难度较大，因此对流动相系统的考察和确定显得尤为重要。本实验前期对甲醇-水、乙腈-水不同配比的流动相系统以及加入不同比例的甲酸 (0.1%~0.5%) 进行考察，发现“乙腈-水”系统的峰容量较多且具有更高的分离度和灵敏度，同时明显缩短分析时间。因此，最终选择“乙腈-水”作为流动相。对 LC 的不同体积流量 (0.2、0.3、0.4、0.5 mL/min) 和不同柱温 (25、30、35 和 40 °C) 进行了考察，结果表明，体积流量为 0.5 mL/min，柱温为 30 °C 时，待测物峰形较好，分离度高。

3.2 五神汤主要化学成分研究

建立的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS 分析方法快速、准确地从五神汤中分析鉴定出 95 个化合物，包括 27 个黄酮类、15 个酚酸类、11 个环烯

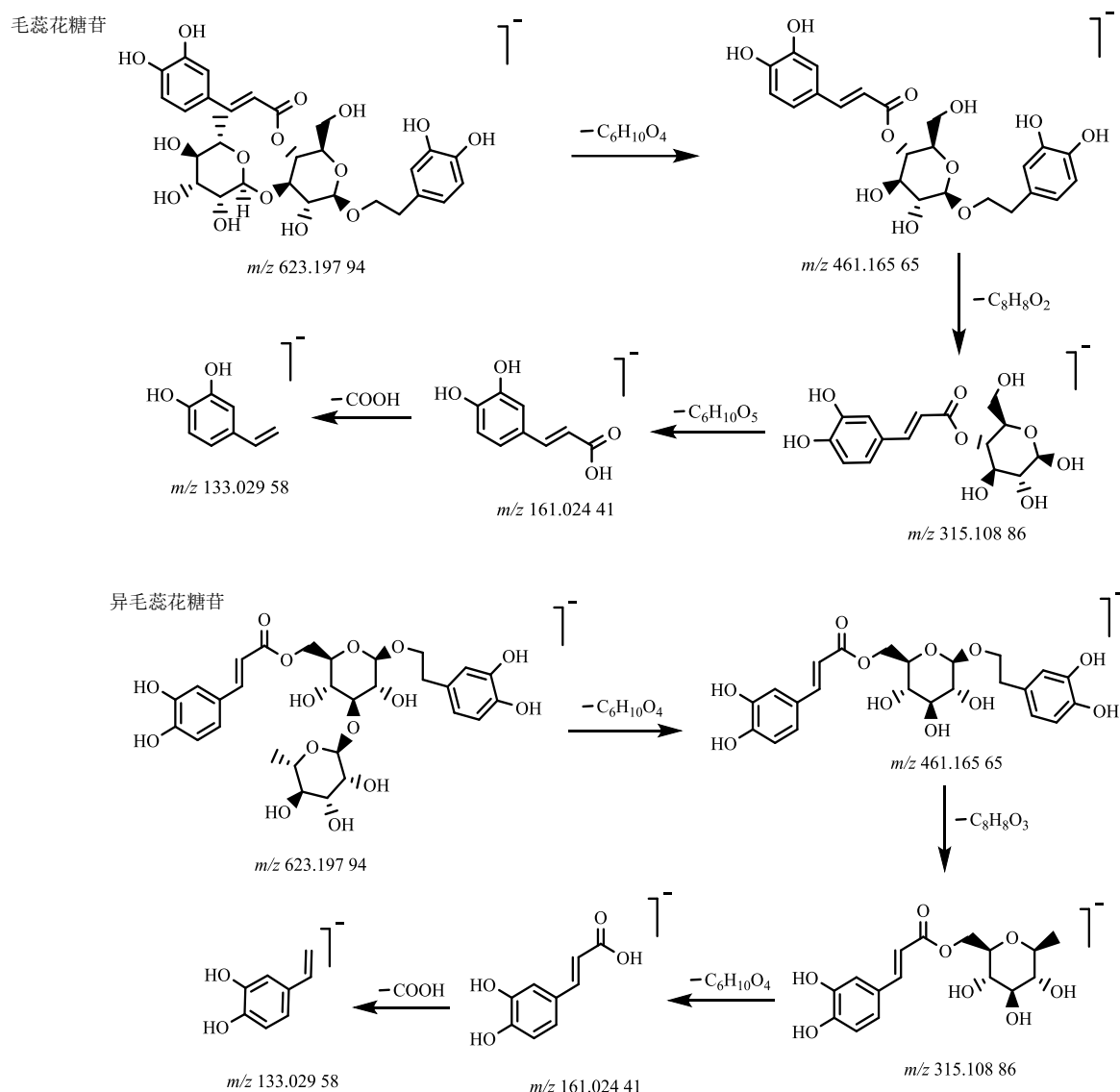


图 6 毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷的质谱裂解规律图

Fig. 6 Mass spectrum cracking rule of verbascoside and isoacteoside

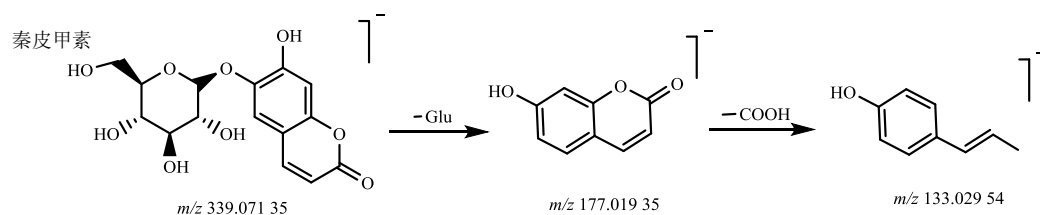


图 7 秦皮甲素的质谱裂解规律图

Fig. 7 Mass spectrum cracking rule of esculin

醚萜类、5 个香豆素类、5 个生物碱类、4 个苯乙醇苷类以及其他类化合物。其中，基于对照品的色谱峰与质谱数据，准确鉴定了 17 个化合物，包括 8 个酚酸类化合物（没食子酸、原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸、奎宁酸、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原

酸 C）、4 个黄酮类化合物（槲皮素、芦丁、木犀草苷、杨梅素）、2 个香豆素类化合物（秦皮甲素和秦皮乙素）、1 个环烯醚萜类化合物（京尼平苷酸）、1 个苯乙醇苷类化合物（毛蕊花糖苷）和 1 个甾体类化合物（ β -蜕皮甾酮）。通过与天然化合物数据库、

massbank 等数据库的分子离子、二级碎片离子比对,并参考相关文献,推测出其他 78 个化合物。

本研究采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS/MS 联用技术对中药复方五神汤水提液中的化合物进行系统分析,共分析鉴定出 95 个化合物,结果表明,黄酮类和酚酸类化合物为五神汤的最主要化学成分,且据文献报道,具有较好的抗炎、抗氧化活性。以上结果表明了五神汤主要化学成分的鉴定与归属,从化学角度展示了五神汤的物质基础,为今后五神汤的药效学研究奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 清·陈士铎著. 洞天奥旨 [M]. 柳长华等点校. 北京: 中国中医药出版社, 1991.
- [2] 王娟. 五神汤内服熏蒸治疗湿热下注型下肢丹毒疗效及对血清 NO、TNF- α 、IL-1 β 的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2017, 26(22): 2405-2407.
- [3] 钮晓红, 陆春红, 张晓洁, 等. 清火解毒法对大鼠下肢丹毒模型的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(8): 1940-1943.
- [4] 李晨晨. 赛金膏外敷联合五神汤加减内服治疗下肢丹毒疗效观察 [J]. 中医药临床杂志, 2020, 32(10): 1930-1932.
- [5] 李丹, 李爱平, 李科, 等. 液质联用技术在中药化学成分定性分析中的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(10): 2112-2119.
- [6] 周秀娟, 李燕芳, 陈莹, 等. 基于 UPLC-Q Exactive 四级杆-轨道阱液质联用法快速建立清热灵颗粒中潜在中药质量标志物 (Q-Marker) 成分库 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 67-74.
- [7] 夏慧敏, 张慧文, 刘宏, 等. HPLC-Q-Exactive-MS/MS 快速鉴定蒙药三子散化学成分 [J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(21): 3005-3014.
- [8] Liu G R, Qiao S, Liu T B, *et al.* Simultaneous determination of 18 chemical constituents in traditional Chinese medicine of antitussive by UPLC-MS-MS [J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(9): 1540-1552.
- [9] Cheng S, Sun W, Zhao X N, *et al.* Simultaneous determination of 32 pyrrolizidine alkaloids in two traditional Chinese medicine preparations by UPLC-MS/MS [J]. *J Anal Methods Chem*, 2022, 2022: 7611501.
- [10] 朱伟豪, 杜伟锋, 罗云云, 等. 基于 UPLC-Triple-TOF-MS 液质联用技术分析薏苡仁中的脂肪酸及其酯类化学成分 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 3876-3883.
- [11] 王冉, 闫占宽, 吴文静, 等. 基于化学模式识别分析的五神汤指纹图谱研究 [J]. 广州化工, 2023, 51(3): 155-159.
- [12] 闫占宽, 张敏, 刘钦伟, 等. 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 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(5): 1047-1056.
- [13] 唐明, 高霞, 耿婷, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的七味通痹口服液化学成分分析 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2226-2236.
- [14] 都丽娜, 杨德志, 乌兰, 等. 液质联用技术联合网络药理学探讨苏格木勒-4 汤治疗失眠的作用机制 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2023, 25(12): 3866-3889.
- [15] 崔红静, 姜丽, 张启云, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术分析越鞠丸水提物的化学成分及入血成分 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(8): 865-874.
- [16] 于新颖, 尹然, 张瓚, 等. 基于 HPLC-Q-TOF MS 的栀子柏皮汤化学成分研究 [J/OL]. 沈阳药科大学学报 (2023-11-23)[2024-09-08]. <https://doi.org/10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2023.0757>.
- [17] 盛益华, 王洪, 李思迪, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS 鉴定杜仲不同部位中化学成分及其降血糖活性研究 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6228-6240.
- [18] 高文雅, 赵海誉, 高双荣, 等. 液质联用技术鉴定至宝三鞭丸化学成分 [J]. 中成药, 2024, 46(1): 161-169.

[责任编辑 王文倩]