

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2024)21-0027-06

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.21.008



超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法分析强骨饮化学成分*

邓祖跃¹, 蒋霞¹, 李志豪¹, 黄旭², 黄俊俊³

(1. 浙江省食品药品检验研究院, 浙江 杭州 310052; 2. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310003; 3. 浙江中医药大学附属第二医院, 浙江 杭州 310005)

摘要:目的 建立鉴定强骨饮化学成分的超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)法。方法 色谱柱为 Kromasil 100-5-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液-乙腈(正离子模式)和 0.5 mmol/L 乙酸铵水溶液-乙腈(负离子模式), 梯度洗脱, 在正、负离子模式下对强骨饮进行质谱检测。根据质谱仪捕捉的化合物精准相对分子质量及二级碎片离子信息, 与 Agilent TCM Library-V20-04-17 数据库的信息比对及查阅相关文献, 对强骨饮的化学成分进行定性分析。结果 共鉴定出 35 种化学成分, 其中有机酸类 10 种, 黄酮类、环烯醚萜类各 4 种, 酯类 3 种, 糖苷类、皂苷类、氨基酸类、生物碱类、核苷类、色酮类各 2 种, 黄烷醇类、嘌呤类各 1 种。结论 该研究首次对强骨饮的化学成分进行了全面定性分析, 为后期质量控制和确定其可能的药效物质基础研究提供了参考。

关键词:超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法; 强骨饮; 化学成分; 定性分析

Chemical Component Analysis of Qiangguyin Based on UPLC-Q-TOF-MS/MS

DENG Zuyue¹, JIANG Xia¹, LI Zhihao¹, HUANG Xu², HUANG Junjun³

(1. Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou, Zhejiang, China 310052; 2. The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China 310003; 3. The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang, China 310005)

Abstract: Objective To establish an ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) method for identifying the chemical components of Qiangguyin. **Methods** The chromatographic column was Kromasil 100-5-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile (positive ion mode) and 0.5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution-acetonitrile (negative ion mode) with gradient elution. Mass spectrometry detection of Qiangguyin was performed under the positive and negative ion modes. Based on the precise relative molecular weight and secondary fragment ion information of the components captured by the mass spectrometer, combined with the Agilent TCM Library-V20-04-17 database, the chemical components of Qiangguyin were qualitatively analyzed by comparing and consulting relevant literature. **Results** A total of 35 chemical components were identified, including ten organic acids, four flavonoids and four iridoid, three esters, two glycosides, two saponins, two amino acids, two alkaloids, two nucleosides, two chromones, one flavanol, and one purine. **Conclusion** This study conducted a comprehensive qualitative analysis of the chemical components of Qiangguyin for the first time, which provides a reference for the quality control and determination of the possible pharmacological substance basis research of this product.

Key words: UPLC-Q-TOF-MS; Qiangguyin; chemical components; qualitative analysis

骨质疏松是一种由多种因素导致骨量减少, 骨脆性增加, 易发生骨折的慢性骨代谢性疾病, 严重影响患者的身心健康和^[1]。目前, 临床主要采用钙剂、双膦酸盐、雌激素等化学药物进行治疗, 虽有一定疗效, 但

*基金项目: 浙江省中医药科技计划项目[2021ZB178]。

第一作者: 邓祖跃, 男, 博士, 主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)dzy7317@sina.com。

- [9] ZHANG BB, SHAN GS, MA QQ, et al. An improved and scalable synthesis of zolpidem via a CuI/BINOL-mediated tandem reaction of imine and alkyne[J]. Heterocyclic Communications, 2017, 23(6): 445-448.
- [10] 周竟成. 酒石酸唑吡坦的合成工艺研究[J]. 天津药学, 2002, 14(1): 69-70.
- [11] G. C. 施勒莫. 咪唑并(1,2-A)吡啶-3-乙酰胺类的制备方法: CN1668617A [P]. 2005-09-14.
- [12] 廖凡, 关禹, 黄文武, 等. 酒石酸唑吡坦的绿色合成工艺研究[J]. 中国药物化学杂志, 2018, 28(1): 39-42.
- [13] 马晓宁, 蒋涛, 李昌亮. 酒石酸唑吡坦片中 2 种杂质的合成[J]. 中国药师, 2018, 21(8): 1496-1497.
- [14] 马晓宁, 梁晟, 蒋涛, 等. 酒石酸唑吡坦片中杂质的色谱-质谱结构鉴定[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 1087-1096.
- [15] 王玲兰, 龚翠云, 朱跃芳, 等. 高效液相色谱法同时测定富马酸伏诺拉生中活性成分含量及成盐率研究[J]. 中国药业, 2023, 32(11): 63-66.

(收稿日期: 2023-11-27; 修回日期: 2024-05-11)

存在副作用^[2-4]。中医中药治疗骨有关的疾病历史悠久,且疗效明显,不良反应少^[5]。强骨饮由鹿角霜、忍冬藤、鸡血藤、秦艽、防风、露蜂房、肉桂、川芎、黄芪、骨碎补、杜仲、续断 12 味中药组方,具有补肾强骨、舒经通络作用。杨依然等^[6]自拟益气温经方(强骨饮)在临床的应用显示,对骨质疏松症有明显治疗作用。SHI 等^[7]对强骨饮给药后的体内蛋白质的表达变化进行了深入研究,发现体内蛋白质的变化为强骨饮治疗骨质疏松的体内作用机制。但对强骨饮的物质基础研究较少,由于本复方制剂药味较多,成分复杂,故对其进行系统研究,明确其化学成分,对其质量控制和药效物质基础的研究具有重要意义。超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)法具有高分离度、高灵敏度、高选择性、高精密度等特点,能准确检测各种物质的离子质量数,广泛用于研究中药及中药复方的化学成分^[8-9]。本研究中采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法对强骨饮的化学成分进行鉴定,为其药效物质基础研究和质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1290 Infinity II 型超高效液相色谱仪、6545 Q-TOF 型高分辨质谱仪(美国 Agilent 公司);XPR205 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);UA22MFDN 型超声清洗仪(德国 Wiggins 公司,功率为 400 W,频率为 37 kHz);5430R 型水平离心机(德国 Eppendorf 公司);Milli-Q Academic 型纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

马钱苷酸对照品(批号为 111865-202005),升麻素苷对照品(批号为 111522-202214),毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号为 111920-201907),升麻素对照品(批号为 111710-200602),川续断皂苷 VI 对照品(批号为 111685-201908),5-O-甲基维斯阿米醇苷对照品(批号为 111523-202212),腺苷对照品(批号为 110879-201703),鸟嘌呤对照品(批号为 140631-202008),尿苷对照品(批号为 110887-202104),苯丙氨酸对照品(批号为 140676-200405),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(批号为 I1233241239),乙腈(批号为 I1133829105),质谱仪用水(批号为 Z0761241138),均为质谱纯,购自德国 Merck 公司;乙酸铵(质谱纯,上海阿拉丁生物科技股份有限公司,批号为 A2211012);甲酸(质谱纯,上海安普实验科技股份有限公司,批号为 Y6170039);水为超纯水(用常规试剂配制);强骨饮(浙江省立同德医院自制)。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:A 为 0.1% 甲酸水溶液(正离子模式)和 0.5 mmol/L 乙酸铵水溶液(负离子模式),B 为乙腈,梯度洗脱(程序见表 1);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:212, 254, 321 nm;进样量:2 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution program of the mobile phase (%)					
时间	流动相 A	流动相 B	时间	流动相 A	流动相 B
0~5.0 min	98	2	30.0~40.0 min	60→5	40→95
5.0~15.0 min	98→80	2→20	40.0~40.1 min	5→98	95→2
15.0~30.0 min	80→60	20→40	40.1~55.0 min	98	2

2.1.2 质谱条件

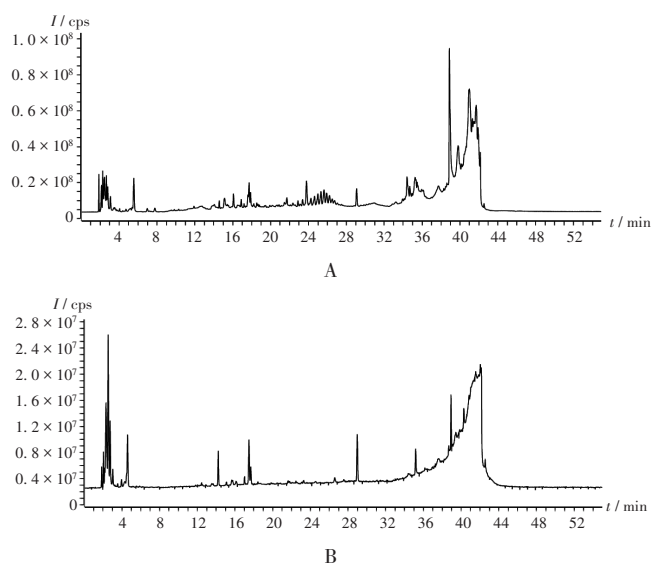
检测模式:负离子/正离子模式;离子源:电喷雾电离;正离子毛细管电压:4 000 V;负离子毛细管电压:3 500 V;质荷比(*m/z*)扫描范围:100~1 500;干燥气温度:320℃;干燥气流量:8 L/min;雾化气压力:40 psig;碰撞电压:175 V;二级碰撞能量:10~50 V。

2.2 溶液制备

按强骨饮处方取相应药材,按以下步骤制备。先取中药饮片鹿角霜 20 g,加水 200 mL,浸泡 30 min,煮沸 30 min。再加入已用 2 200 mL 水先行浸泡 30 min 的其他中药饮片(忍冬藤 25 g,鸡血藤 25 g,秦艽 15 g,防风 15 g,露蜂房 20 g,肉桂 10 g,川芎 12 g,黄芪 30 g,骨碎补 20 g,杜仲 15 g,川续断 30 g),煮沸 30 min,补加水 500 mL,再煮沸 30 min。合并汤剂,滤过,将滤液浓缩至生药质量浓度为 2.8 g/mL 的溶液。为防止溶液浓度过高污染仪器,预试验时取溶液 1.0 mL,加水 99 mL,混匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。取对照品各适量,精密称定,加甲醇制成质量浓度为 20~100 μg/mL 的混合对照品溶液,作为对照品溶液。

2.3 化学成分分析

采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 法对强骨饮的化学成分进行分析,将获得的质谱数据导入 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 10.0 软件,建立工作流程检索数据库,根据一级质谱提供的精确分子量,并与 Agilent TCM Library-V20-04-17 数据库搜索到的相关数据匹配、比对,对色谱峰进行初步推测,再依据部分对照品和提供的保留时间及高能碰撞产生的碎片离子信息,结合文献,对强骨饮的化学成分进行鉴定。共检出 35 种化合物,包括 10 种有机酸类,4 种黄酮类,4 种环烯醚萜类,3 种酯类,2 种糖苷类,2 种皂苷类,2 种氨基酸类,2 种生物碱类,2 种核苷类,2 种色酮类,1 种黄烷醇类,1 种嘌呤类。详见图 1 和表 2。



A. 正离子模式 B. 负离子模式

图1 强骨饮总离子流图

A. Positive ion mode B. Negative ion mode

Fig. 1 Total ion chromatograms of Qiangguyin

2.4 化合物鉴定

有机酸类成分:共鉴定出10种有机酸类成分,主要来源于骨碎补、川芎、鸡血藤、续断、忍冬藤、秦艽、露蜂房。化合物4,11,12,26通过与数据库对比分析,分别鉴定为异柠檬酸(isocitric acid)、苯基丙氨酸(phenylalanine)、(E)-4-O-β-D-吡喃葡萄糖基反式咖啡酸[(E)-4-O-β-D-glucopyranosyl sinapic acid]、3,5-二咖啡酰-表-奎宁酸(isochlorogenic acid A)。化合物3在负离子模式扫描下,保留时间为3.056 min时,检测到分子离子峰[M-H]⁺为m/z 133.014 4,与文献[10]中的质谱信息对比分析,推测化合物3为苹果酸(malic acid)。化合物13在正离子模式扫描下,保留时间为14.574 min时,检测到分子离子峰[M+H]⁺为m/z 377.144 0,与文献[12]中的质谱信息对比分析,推测化合物13为马钱苷酸(loganic acid)。化合物16在正离子模式扫描下,保留时间为16.117 min时,检测到分子离子峰[M+H]⁺为m/z 355.102 0,与文献[13]中的质谱信息对比分析,推测化合物16为绿原酸(3-O-cafeoylquinic acid)。化合物17在负离子模式扫描下,保留时间为17.466 min时,检测到分子离子峰[M-H]⁺为m/z 179.034 5,与文献[13]中的质谱信息对比分析,推测化合物17为咖啡酸(caffeic acid)。化合物18在正离子模式扫描下,保留时间为17.818 min时,检测到分子离子峰[M+H]⁺为m/z 195.065 1,与文献[14]中的质谱信息对比分析,推测化合物18为阿魏酸(ferulic acid)。化合物34在正离子模式扫描下,保留时间为41.190 min时,检测到分子离子峰[M+H]⁺为m/z 257.189 7。由

图2可见,重要碎片离子有m/z 163.075 3,161.107 1,147.091 5。分子离子峰[M+H]⁺为m/z 257.189 7,推测丢失对羟基苯基得碎片离子峰m/z 163.075,丢失-C₄H₈, -CH₂, -C₂H₂得碎片离子峰m/z 163.07,丢失-C₂H₂得碎片离子峰m/z 147.091 5。根据文献[19-20]中的质谱信息对比分析,确定化合物34为补骨脂酚(bakuchiol),补骨脂酚在8号和9号碳位会发生断裂而产生m/z 137,119 2种碎片离子,在二级质谱图中也有体现,其裂解途径见图3。

黄酮类成分:共鉴定出4种黄酮类化合物,主要来源于骨碎补、黄芪、鸡血藤。化合物23在负离子模式扫描下,保留时间为20.518 min时,检测到分子离子峰[M-H]⁺为m/z 595.166 8,与文献[18]中的质谱信息对比分析,推测化合物23为新北美圣草苷(neoeriocitrin)。化合物25在正离子模式扫描下,保留时间为22.510 min时,检测到分子离子峰[M+H]⁺为m/z 581.185 2,其特征二级质谱碎片离子主要有m/z 562.341 4[M-OH]⁺,m/z 504.337 8[M-OH-CH₂COCH₃]⁺,与文献[18]中的质谱信息对比分析,推测化合物25为柚皮苷(naringin)。化合物28在负离子模式扫描下,保留时间为28.682 min时,检测到分子离子峰[M-H]⁺为m/z 283.060 8,与文献[17]中的质谱信息对比分析,推测化合物28为毛茸黄酮(calycosin)。化合物31在正离子模式扫描下,保留时间为34.906 min时,检测到分子离子峰[M+H]⁺为m/z 269.080 7,其特征二级质谱碎片离子主要有m/z 244.128 1[M-CH₂CH₂]⁺,m/z 214.253 4[M-CHO-CH₂CH₃]⁺,与文献[17]中的质谱信息对比分析,推测化合物31为芒柄花素(formononetin)。

环烯醚萜类成分:共鉴定出4种环烯醚萜类成分,主要来源于秦艽、续断。化合物20通过与数据库对比分析,鉴定为lisianthosid。化合物14在负离子模式扫描下,保留时间为16.047 min时,检测到分子离子峰[M-H]⁺为m/z 373.113 9,与文献[12]中的质谱信息对比分析,推测化合物14为獐牙菜苦素(swertiamarin)。化合物15在正离子模式扫描下,保留时间为16.056 min时,检测到分子离子峰[M+H]⁺为m/z 519.170 4,与文献[12]中的质谱信息对比分析,推测化合物15为6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷(6'-O-β-D-glucosylgentiopicroside)。化合物19在正离子模式扫描下,保留时间为17.818 min时,检测到分子离子峰[M+H]⁺为m/z 359.133 7,其特征二级质谱碎片离子主要有m/z 342.211 4[M-O]⁺,与文献[15]中的质谱信息对比分析,推测化合物19为獐牙菜苷(sweroside)。

酯类成分:共鉴定出3种酯类化合物,主要来源于

表 2 强骨饮主要化学成分鉴定结果

Tab. 2 Identification results of the main components of Qiangguyin

序号	化合物名称	保留时间 (min)	离子 模式	化学式	质荷比(<i>m/z</i>)		ppm	二级碎片离子	归属	参考来源	化合物 类别
					测定值	理论值					
1	甜菜碱(betaine)	2.501	+	C ₅ H ₁₁ NO ₂	118.086 4	118.086 5	-0.85	104.107 1	黄芪	数据库	生物碱
2	脯氨酸(proline)	2.626	+	C ₅ H ₉ NO ₂	116.071 2	116.070 9	2.58	102.127 7	露蜂房	数据库	氨基酸
3	苹果酸(malic acid)	3.056	-	C ₄ H ₆ O ₅	133.014 4	133.013 5	6.77	112.985 6	露蜂房	文献[10]	有机酸
4	异柠檬酸(isocitric acid)	4.527	-	C ₆ H ₈ O ₇	191.019 8	191.018 9	4.71	128.035 3	露蜂房	数据库	有机酸
5	喜树次碱(venoterpine)	5.028	+	C ₆ H ₁₁ NO	150.091 1	150.091 6	-3.33	131.107 0	忍冬藤	数据库	生物碱
6	尿苷(uridine)	6.954	+	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	245.076 5	245.077 0	-2.04	224.128 0,194.117 5	露蜂房	文献[10]	核苷
7	(+)-没食子儿茶素[(+)-gallocatechin]	7.616	+	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	307.083 2	307.081 3	6.19	288.149 1,241.153 2	鸡血藤	文献[11]	黄酮醇
8	异亮氨酸(isoleucine)	7.720	+	C ₆ H ₁₃ NO ₂	132.102 1	132.102 1	0.00	118.086 5	露蜂房	文献[10]	氨基酸
9	腺苷(adenosine)	9.935	+	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	268.103 8	268.104 3	-1.86	224.128 0,210.111 4	防风	数据库	核苷
10	鸟嘌呤(guanine)	10.303	+	C ₅ H ₅ N ₅ O ₆	152.056 6	152.057 2	-3.95	137.045 0	露蜂房	文献[10]	嘌呤
11	苯基丙氨酸(phenylalanine)	11.899	+	C ₉ H ₉ NO ₂	166.086 4	166.086 5	-0.60	166.086 4,100.075 7	露蜂房	数据库	有机酸
12	(<i>E</i>)-4- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖基反式咖啡酸 [(<i>E</i>)-4- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranosyl sinapic acid]	13.545	-	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341.087 6	341.086 7	2.64	248.966 5,197.807 7	续断,忍冬藤	数据库	有机酸
13	马钱苷酸(loganic acid)	14.574	+	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	377.144 0	377.144 0	0.00	359.133 6,197.080 8,179.070 2	秦艽	文献[12]	有机酸
14	獐牙菜苦素(swertiamarin)	16.047	-	C ₁₈ H ₂₂ O ₁₀	373.113 9	373.112 8	2.95	353.087 7,226.978 5,178.977 7	秦艽	文献[12]	环烯醚萜
15	6'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖基龙胆苦苷 (6'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucosylgentiopicroside)	16.056	+	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄	519.170 4	519.170 4	0.00	404.249 0,344.227 9	秦艽	文献[12]	环烯醚萜
16	绿原酸(3- <i>O</i> -caffeoylquinic acid)	16.117	+	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355.102 0	355.102 3	-0.84	344.228 1,327.201 3,163.038 8	忍冬藤	文献[13]	有机酸
17	咖啡酸(caffeic acid)	17.466	-	C ₉ H ₈ O ₄	179.034 5	179.034 2	1.68	160.841 9	忍冬藤	文献[13]	有机酸
18	阿魏酸(ferulic acid)	17.818	+	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.065 1	195.065 4	-1.54	177.054 8,151.096 5	川芎	文献[14]	有机酸
19	獐牙菜苷(sweroside)	17.818	+	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	359.133 7	359.133 5	0.56	342.211 4,288.149 1,195.065 1	续断	文献[15]	环烯醚萜
20	lisanthioside	17.879	+	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₈	717.258 1	717.259 2	-1.53	427.170 3,359.133 7,1 947.080 7	续断	数据库	环烯醚萜
21	升麻素-4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷(4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucosyl-5- <i>O</i> -methylvisamminol)	18.558	+	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	469.170 5	469.170 1	0.85	460.274 4,388.252 8,288.149 9	防风	文献[16]	糖苷类
22	毛蕊异黄酮葡萄糖苷(calycosin-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside)	20.189	+	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	447.128 4	447.128 4	0.00	430.263 5,400.217 3,355.232,178.158 7	黄芪	文献[17]	糖苷类
23	新北美圣草苷(neoeriocitrin)	20.518	-	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	595.166 8	595.165 3	2.52	248.960 7,197.807 6,160.841 8	骨碎补	文献[18]	黄酮类
24	升麻素(cimifugin)	21.488	+	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	307.117 4	307.117 6	-0.65	288.149 1,239.148 3	防风	文献[16]	色酮类
25	柚皮苷(naringin)	22.510	+	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.185 2	581.186 0	-1.38	562.341 3,504.337 8,288.149 3,224.128 1	骨碎补	文献[18]	黄酮类
26	3,5-二咖啡酰-表-奎宁酸(isochlorogenic acid A)	23.428	+	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₂	517.133 1	517.133 8	-1.35	499.122 4,430.300 4,195.123 3	续断	数据库	有机酸
27	5- <i>O</i> -甲基维斯阿米醇(5- <i>O</i> -methylvisamminol)	27.156	+	C ₁₆ H ₁₈ O ₅	291.122 5	291.122 7	-0.69	239.148 2,224.128 1,151.096 5	防风	文献[16]	色酮类
28	毛异黄酮(calycosin)	28.682	-	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.060 8	283.060 3	1.77	248.960 7,197.807 5	黄芪	文献[17]	黄酮类
29	川续断皂苷Ⅵ(asperosaponinⅥ)	28.996	-	C ₆₇ H ₇₆ O ₁₈	927.494 2	927.493 2	1.08	226.977 8,197.807 6	续断	文献[15]	皂苷类
30	藏岩仙皂苷 A(cauloside A)	28.998	-	C ₃₃ H ₅₀ O ₈	603.389 8	603.388 2	2.65	359.074 0	续断	文献[15]	皂苷类
31	芒柄花素(formononetin)	34.906	+	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	269.080 7	269.081 0	-1.11	244.128 1,214.253 4	鸡血藤	文献[11]	黄酮类
32	邻苯二甲酸二乙酯(diethyl phthalate)	35.211	+	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	223.096 6	223.096 6	0.00	214.253 0,149.023 7	续断	数据库	酯类
33	对苯二甲酸二辛酯(dioctyl terephthalate)	41.007	+	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	391.284 5	391.283 8	1.79	371.101 8,282.279 1,223.063 5	续断	数据库	酯类
34	补骨脂酚(hakuchiol)	41.190	+	C ₁₈ H ₂₄ O	257.189 7	257.189 9	-0.78	163.075 3,161.107 1,147.091 5	骨碎补	文献[19-20]	有机酸
35	邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate)	41.862	+	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	279.159 1	279.159 0	0.36	256.263 2,205.085 7	骨碎补	数据库	酯类

注:ppm为百万分比,ppm=(测定值-理论值)×10⁶。*为经与对照品对比鉴定。

Note: ppm refers to parts per million, ppm=(measured value-theoretical value)×10⁶.* refers to the comparison and identification with the reference substance.

骨碎补、续断。化合物 32, 33, 35 通过与数据库对比分析,分别鉴定为邻苯二甲酸二乙酯(diethyl phthalate)、对苯二甲酸二辛酯(dioctyl terephthalate)、邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate)。

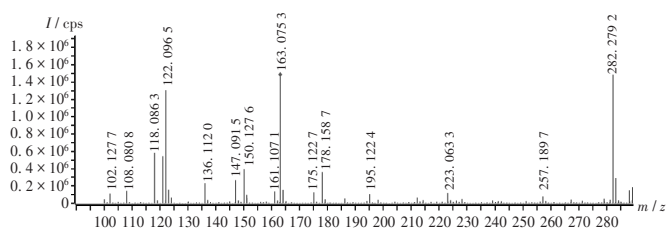


图2 补骨脂酚二级质谱图

Fig. 2 Secondary mass spectrogram of bakuchiol

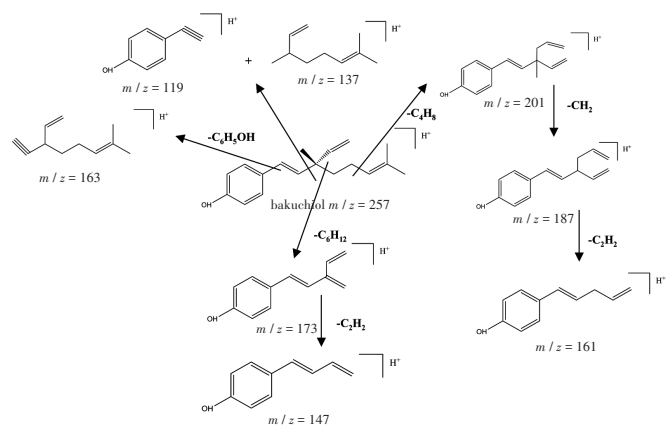


图3 补骨脂酚裂解途径

Fig. 3 The cleavage pathway of bakuchiol

糖苷类成分:共鉴定出2种糖苷类化合物,主要来源于防风、黄芪。化合物21在正离子模式扫描下,保留时间为18.558 min时,检测到分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 469.170 5,与文献[16]中的质谱信息对比分析,推测化合物21为升麻素-4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(4'-O- β -D-glucosyl-5-O-methylvisamminol)。化合物22在正离子模式扫描下,保留时间为20.189 min时,检测到分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 447.128 4,其特征二级质谱碎片离子主要有 m/z 430.263 5 $[M - O]^+$,与文献[17]中的质谱信息对比分析,推测化合物22为毛蕊异黄酮葡萄糖苷(calycosin-7-O- β -D-glucoside)。

皂苷类成分:共鉴定出2种皂苷类化合物,主要来源于续断。化合物29在负离子模式扫描下,保留时间为28.996 min时,检测到分子离子峰 $[M - H]^+$ 为 m/z 927.494 2,与文献[15]中的质谱信息对比分析,推测化合物29为川续断皂苷VI(asperosaponin VI)。化合物30在负离子模式扫描下,保留时间为28.998 min时,检测到分子离子峰 $[M - H]^+$ 为 m/z 603.389 8,与文献[15]中的质谱信息对比分析,推测化合物30为葳岩仙皂苷A(cauloside A)。

氨基酸类成分:共鉴定出2种氨基酸类化合物,主要来源于露蜂房。化合物2通过与数据库对比分析,鉴定为脯氨酸(proline)。化合物8在正离子模式扫描下,保留时间为7.720 min时,检测到分子离子峰 $[M + H]^+$

为 m/z 132.102 1,与文献[10]中的质谱信息对比分析,推测化合物8为异亮氨酸(ileucine)。

生物碱类成分:共鉴定出2种生物碱类化合物,主要来源于黄芪、忍冬藤。化合物1,5通过与数据库对比分析,分别鉴定为甜菜碱(Betaine)、喜树次碱(venoterpine)。

核苷类成分:共鉴定出2种核苷类化合物,主要来源于露蜂房、防风。化合物9通过与数据库对比分析,鉴定为腺苷(adenosine)。化合物6在正离子模式扫描下,保留时间为6.954 min时,检测到分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 245.076 5,与文献[10]中的质谱信息对比分析,推测化合物6为尿苷(uridine)。

色酮类成分:共鉴定出2种色酮类化合物,主要来源于防风。化合物24在正离子模式扫描下,保留时间为21.488 min时,检测到分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 307.117 4,其特征二级质谱碎片离子主要有 m/z 288.149 1 $[M - H_2O]^+$,与文献[16]中的质谱信息对比分析,推测化合物24为升麻素(cimifugin)。化合物27在正离子模式扫描下,保留时间为27.156 min时,检测到分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 291.122 5,与文献[16]中的质谱信息对比分析,推测化合物27为5-O-甲基维斯阿米醇(5-O-methylvisamminol)。

黄烷醇类成分:共鉴定出1种黄烷醇类化合物,主要来源于鸡血藤。化合物7在正离子模式扫描下,保留时间为7.616 min时,检测到分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 307.083 2,其特征二级质谱碎片离子主要有 m/z 288.149 1 $[M - H_2O]^+$,与文献[11]中的质谱信息对比分析,推测化合物7为(+)-没食子儿茶素[(+)-gallocatechin]。

嘌呤类成分:共鉴定出1种嘌呤类化合物,主要来源于露蜂房。化合物10在正离子模式扫描下,保留时间为10.303 min时,检测到分子离子峰 $[M + H]^+$ 为 m/z 152.056 6,其特征二级质谱碎片离子主要有 m/z 137.045 0 $[M - CH_2]^+$,与文献[10]中的质谱信息对比分析,推测化合物10为鸟嘌呤(guanine)。

3 讨论

强骨饮所含化学成分较复杂,本研究中基于UPLC-Q-TOF-MS/MS法,将所得数据与Agilent TCM Library-V20-04-17数据库对比分析,参考相关文献,并结合化合物的裂解规律初步定性分析了强骨饮的化学成分,并对各成分进行了中药药味归属,确定强骨饮的标志性单体成分为马钱苷酸、升麻素-4'-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和川续断皂苷VI。2020年版《中国药典(一部)》中,秦艽、防风、黄芪、续断

药材的含量测定项分别为马钱苷酸、升麻素-4'-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、川续断皂苷VI。本研究中共鉴定出35种化学成分,上述4种化学成分均有检出,表明指标性成分的制订基本合理,可在此基础上进一步建立含量测定方法,以控制其质量。另外,强骨饮中的鹿角霜、忍冬藤、鸡血藤、川芎、骨碎补、露蜂房、肉桂、杜仲暂未制订单体类指标性成分,在本品的质量标准研究中可增加对上述药材的薄层鉴别的定性研究。本研究中还鉴定出了绿原酸、马钱苷酸、阿魏酸、柚皮苷等成分,2020年版《中国药典(一部)》中车前子药材的鉴别项为京尼平苷酸、毛蕊花糖苷,忍冬藤药材的鉴别项为绿原酸,川芎药材的鉴别项为阿魏酸,骨碎补药材的鉴别项为柚皮苷,后续可在此基础上进行薄层鉴别研究,进而形成本品完整的质量标准。本研究中也初步揭示了强骨饮的药效物质基础,如骨碎补中的补骨脂酚,鸡血藤中的芒柄花素,秦艽中的獐牙菜苦素和马钱苷酸,骨碎补中的补骨脂酚具有抗骨质疏松、调血脂、抗炎、抗氧化等作用^[19],鸡血藤中的芒柄花素具有抗菌、抗病毒作用^[11],秦艽中的獐牙菜苦素和马钱苷酸具有抗炎、镇痛作用^[12]。

本研究仍有不足,各成分的鉴别主要依靠数据库、文献等理论支撑,缺少对照品试验验证,部分同分异构体或结构相似的化合物无法准确确定其结构,后续可结合相关标准品对试验结果进行进一步鉴别。同时,本研究结果为中药复方产品的深度开发及其质量控制提供了方法学参考。

参考文献

- [1] TILMAN DR, SUNDEEP K, LORENZ CH. Osteoporosis: now and the future[J]. The Lancet, 2011, 377(9773): 1276 - 1287.
- [2] TUMAY S, LALE O, NURSEL CB. An overview and management of osteoporosis[J]. Eur J Rheumatol, 2017, 4(1): 46 - 56.
- [3] BHADADA SK, CHADHA M, SRIRAM U, et al. The Indian Society for Bone and Mineral Research (ISBMR) position statement for the diagnosis and treatment of osteoporosis in adults[J]. Arch Osteoporos, 2021, 16(1): 102.
- [4] MARK C, HOROWITZ TZ. Cytokines and Estrogen in Bone: Anti - Osteoporotic Effects[J]. Science, 1993, 260(5108): 626 - 627.
- [5] WANG YL, FENG Y, LI MM, et al. Traditional Chinese medicine in the treatment of chronic kidney diseases: theories, applications, and mechanisms [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 917975.
- [6] 杨依然, 史晓林, 刘 钟, 等. LC - MS 法筛选强骨饮对绝经后骨质疏松症患者全血差异蛋白的研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(12): 1676 - 1679.
- [7] SHI XL, LI CW, LIANG BC, et al. Weak cation magnetic separation technology and MALDI - TOF - MS in screening serum protein markers in primary type I osteoporosis[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14 (4): 15285 - 15294.
- [8] WANG YY, HE S, CHENG XC, et al. UPLC - Q - TOF - MS/MS fingerprinting of Traditional Chinese Formula SiJunZiTang[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 80: 24 - 33.
- [9] SANG QN, JIA QQ, ZHANG HY. Chemical profiling and quality evaluation of Zhishi - Xiebai - Guizhi Decoction by UPLC - Q - TOF - MS and UPLC fingerprint[J]. J Pharm Biome Anal, 2021, 194: 113771.
- [10] ZHAO HA, ZHU M, WANG HR, et al. Identification and quantitation of bioactive components from honeycomb (Nidus Vespae)[J]. Food Chemistry, 2020, 314(1): 126052.
- [11] 王春丽, 潘春柳, 姚李祥, 等. 鸡血藤的化学成分和药理作用研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2021, 35(2): 96 - 102.
- [12] 彭美晨, 艾晓辉. 秦艽花化学成分、药理作用及其临床应用的研究进展[J]. 中南药学, 2021, 19(6): 1243 - 1249.
- [13] CAI ZC, WANG CC, ZOU LS, et al. Comparison of Multiple Bioactive Constituents in the Flower and the Caulis of *Lonicera japonica* Based on UFLC - QTRAP - MS/MS Combined with Multivariate Statistical Analysis[J]. Molecules, 2019, 24(10): 1936.
- [14] LI HB, CHEN F. Preparative isolation and purification of chuanxiongine from the medicinal plant Ligusticum chuanxiong by high - speed counter - current chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1047(2): 249 - 253.
- [15] SMITH SA, DONOGHUE MJ. Combining Historical Biogeography with Niche Modeling in the Caprifoliaceae Clade of *Lonicera* (Caprifoliaceae, Dipsacales)[J]. Syst Biol, 2010, 59(3): 322 - 341.
- [16] KREINER J, PANG E, LENON GB, et al. Saposhnikovia divaricata: a phytochemical, pharmacological, and pharmacokinetic review[J]. Chin J Nat Med, 2017, 15(4): 255 - 264.
- [17] FU J, WANG ZH, HUANG LF, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of Astragalus membranaceus (Huangqi) [J]. Phytotherapy Research, 2014, 28(9): 1275 - 1283.
- [18] CHANG EJ, LEE WJ, CHO SH, et al. Proliferative effects of flavan - 3 - ols and propylgallate on MCF - 7 and osteoblastic cells[J]. Arch Pharm Res, 2003, 26 (8): 620 - 630.
- [19] SUN JS, LIN CY, DONG GC, et al. The effect of Gu - Sui - Bu (Drynaria fortunei J. Sm) on bone cell activities[J]. Biomaterials, 2002, 23(16): 3377 - 3385.
- [20] WANG PL, YAO ZH, ZHANG FX, et al. Identification of metabolites of PSORALEAE FRUCTUS in rats by ultraperformance liquid chromatography coupled with quadrupole time - of - flight tandem mass spectrometry analysis [J]. Pharm Biomed Anal, 2015, 112: 23 - 35.

(收稿日期: 2023 - 11 - 16; 修回日期: 2024 - 09 - 30)