

通络生骨胶囊原粉化学成分鉴定及牡荆苷含量测定

吴革林^{1,2}, 范瑞鑫³, 梁楚玲^{3,4}, 邢 冷¹, 谢永建¹, 龚 平¹, 周 鹏¹, 李 博^{3,4*}

(¹ 浙江赞生药业有限公司, 台州 318000; ² 杭州赞生医药有限公司, 杭州 310052; ³ 中国药科大学(杭州)创新药物研究院, 杭州 310018; ⁴ 中国药科大学药学院, 南京 211198)

摘 要 采用 UPLC-MS/MS 对通络生骨胶囊原粉中的化合物进行分析鉴定, 并建立牡荆苷 HPLC 含量测定方法。通过采用 Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以 0.2% 甲酸-甲醇为流动相进行梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 流速 0.3 mL/min, 进样量 1 μL; 通过 ESI 质谱源, 在正、负离子模式下分别采集数据, 成功鉴定出通络生骨胶囊原粉中的 12 个黄酮类和 3 个芪类化合物。同时, 采用 XBridge C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.05% 冰醋酸-甲醇为流动相进行梯度洗脱, 柱温 30 ℃, 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μL, 建立了牡荆苷的 HPLC 含量测定方法。该方法在 10~40 μg/mL 范围内线性关系良好 ($R=1.000$), 平均回收率为 96.7%。这些方法的建立为通络生骨胶囊原粉的质量控制和开发利用提供了科学依据。

关键词 通络生骨胶囊; 化学成分; UPLC-MS/MS; 牡荆苷; HPLC

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2025)02-0166-10

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2024090301

引用本文 吴革林, 范瑞鑫, 梁楚玲, 等. 通络生骨胶囊原粉化学成分鉴定及牡荆苷含量测定 [J]. 中国药科大学学报, 2025, 56(2): 166 – 175.

Cite this article as: WU Gelin, FAN Ruixin, LIANG Chuling, *et al.* Identification of chemical components and determination of vitexin in the raw powder of *Tongluo Shenggu* capsule[J]. *J China Pharm Univ*, 2025, 56(2): 166 – 175.

Identification of chemical components and determination of vitexin in the raw powder of *Tongluo Shenggu* capsuleWU Gelin^{1,2}, FAN Ruixin³, LIANG Chuling^{3,4}, XING Leng¹, XIE Yongjian¹, GONG Ping¹, ZHOU Peng¹, LI Bo^{3,4*}

¹Zhejiang Pralife Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000; ²Hangzhou Zansheng Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310052;

³China Pharmaceutical University Hangzhou Institute of Innovative Pharmaceuticals, Hangzhou 310018; ⁴School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract The present study employed UPLC-MS/MS to analyze and identify compounds in the raw powder of *Tongluo Shenggu* capsules. An HPLC method for the determination of vitexin content was established. The analysis of this drug was performed on a 30 ℃ thermostatic Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) column, with the mobile phase comprising 0.2% formic acid-methanol flowing at 0.3 mL/min in a gradient elution manner. Mass spectrometry was detected by ESI sources in both positive and negative ion modes for qualitative identification of chemical constituents. 12 flavonoid and 3 stilbenes compounds in the raw powder of *Tongluo Shenggu* capsules were successfully identified. Additionally, an HPLC method for the determination of vitexin content was established using a XBridge C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with a mobile phase of 0.05% glacial acetic acid in methanol for gradient elution, at a column temperature of 30 ℃, a flow rate of 1.0 mL/min, and an injection volume of 20 μL. The method demonstrated good linearity in the concentration range of 10 μg/mL to 40 μg/mL ($R=1.000$) with an average recovery rate of 96.7%. The establishment of these methods provides a scientific basis for the quality control and development of the raw powder of *Tongluo Shenggu* capsules.

Key words *Tongluo Shenggu* capsule; chemical components; UPLC-MS/MS; vitexin; HPLC

通络生骨胶囊(*Tongluo Shenggu capsule*)是由木豆叶提取物制得的通络生骨胶囊原粉与其他辅料组成的单方制剂, 目前已被列为国家卫生健康委员会全国髋关节治疗中心治疗股骨头坏死的核心药物, 具有活血健骨、化瘀止痛、解毒消肿、降低氧化损伤等功效^[1]。

通络生骨胶囊原粉由木豆叶经水提、浓缩、干燥等一系列工艺后制得, 因此通络生骨胶囊的主要有效成分为木豆叶所含化合物。目前研究表明^[2-6], 木豆叶含有黄酮类成分 30 多种、芪类成分近 30 种, 另有甾体、香豆素、三萜类等其他成分。但在当前木豆叶药材化学成分与质量控制^[7-8]的文献研究中, 木豆叶的提取溶剂主要为乙酸乙酯^[9]、乙醇^[10-12]等有机溶剂。有机溶剂提取物能显著降低糖尿病小鼠血糖, 具有抗糖尿病作用^[13], 同时能够抑制氧化应激与炎症反应, 对肝有保护作用^[14]。而通络生骨胶囊原粉为木豆叶水提物, 其在活性方面区别于有机溶剂提取物, 能抑制破骨细胞形成, 治疗股骨头缺血性坏死^[15], 同时能通过促进血管生成, 保护心肌免受缺血损伤^[16]。目前对于木豆叶水提物的相关研究较少, 其化学成分组成尚未明确。本研究重点对通络生骨胶囊原粉的化学成分进行了鉴定, 为通络生骨胶囊的工艺控制、质量评价和质量提升提供技术依据, 同时也补充了木豆叶化学成分组成, 为药理活性成分研究奠定基础。

牡荆苷为木豆叶含有的一种黄酮类化合物, 是其主要有效成分, 具有保护心脑血管^[17]、减轻肾组织损伤^[18]、抑菌抗炎^[19]等作用。本研究在明确通络生骨胶囊原粉化学成分的基础上, 同时开发了牡荆苷的含量测定方法, 可用于通络生骨胶囊原粉的质量控制。

1 材 料

1.1 药品与试剂

通络生骨胶囊原粉(批号: 20220902-03, 浙江赞生药业有限公司); 甲醇、甲酸(质谱级, 美国赛默飞世尔科技公司); 甲醇(色谱纯, 美国捷特贝克公司); 冰醋酸(分析纯, 江苏永华化学股份有限公司); 实验用水均为经 Milli-Q 纯水机制备的超纯水。

1.2 仪 器

UPLC-XEVO TQ-S 三重四极杆超高效液相色谱-质谱联用仪(美国沃特世公司); LC-40B 高效液相色谱仪(日本岛津公司); BSA224S 万分之一电子

天平(德国赛多利斯公司); KQ-300E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XPR6UD5/A 电子天平(瑞士梅特勒托利多仪器有限公司); Milli-Q 超纯水仪(德国默克公司)。

2 方 法

2.1 化学成分鉴定方法

2.1.1 供试品溶液制备 取通络生骨胶囊原粉 0.5 g, 置 50 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇至量瓶体积的 80%, 超声处理 1 h, 冷却至室温, 50% 甲醇定容, 摇匀, 即得供试品储备液。精密量取 1.0 mL 供试品储备液至 100 mL 量瓶中, 50% 甲醇定容, 摇匀, 0.22 μm 尼龙滤膜滤过, 弃去滤液 0.5 mL, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.1.2 UPLC 色谱条件 采用 Acquity UPLC[®] BEH C₁₈(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 流动相为 0.2% 甲酸水溶液(A)和甲醇(B); 梯度洗脱程序: 0 min~5.0 min, 95%~80% A; 5.0~18.0 min, 80%~75% A; 18.0~33.0 min, 75.0%~0.0% A; 33.0~35.0 min, 0.0%~95.0% A; 流速为 0.3 mL/min, 进样量为 1 μL , 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 自动进样器温度为室温, 检测波长为 270 nm。

2.1.3 LC-MS/MS 条件 质谱检测采用电喷雾离子源(ESI), 正离子和负离子模式分别测定。正离子模式(+)脱溶剂气温度 220 $^{\circ}\text{C}$, 流量 550 L/h, 毛细管电压 4.5 kV, 锥孔电压 30 V。负离子模式(-)脱溶剂气温度 500 $^{\circ}\text{C}$, 流量 600 L/h, 毛细管电压 4.5 kV, 锥孔电压 35 V。

2.2 牡荆苷含量测定方法

2.2.1 供试品溶液制备 取通络生骨胶囊原粉 0.5 g, 置 50 mL 量瓶中, 加入 50% 甲醇至量瓶体积的 80%, 超声处理 1 h, 冷却至室温, 50% 甲醇定容, 摇匀, 0.22 μm 尼龙滤膜滤过, 弃去滤液 0.5 mL, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液制备 取牡荆苷对照品适量, 50% 甲醇溶液并稀释制成浓度为 0.02 mg/mL 的溶液。

2.2.3 HPLC 色谱条件 采用 Waters XBridge C₁₈(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为 0.05% 冰醋酸(A)和甲醇(B); 梯度洗脱程序: 0~40 min, 76% A; 40~50 min, 76%~15% A; 50~60 min, 15% A; 60~65 min, 15%~76% A; 流速为 1.0 mL/min,

进样量为 20 μL , 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长为 267 nm。

3 结果与分析

3.1 UPLC 和 LC-MS/MS 结果

参照“2.1.1”项下方法配制通络生骨胶囊原粉溶液并进样分析, 得到 UPLC 图谱, 结果见图 1。在正离子和负离子模式下, 通过全扫描获得 26 个化学成分前体离子信息。对 26 个化学成分进行子离子扫描, 得到各成分对应的二级碎片离子信息。通络生骨胶囊原粉化学成分 LC-MS/MS 分析结果详见表 1。

3.2 化合物鉴定

根据得到的前体离子和碎片离子数据, 并结合现有文献报道^[20-27]对各化合物进行鉴定, 鉴定结果见表 2。

3.2.1 黄酮类化合物的鉴定 化合物 9、10 在一级质谱中扫描到相同的准分子离子峰 m/z 581 $[\text{M}+\text{H}]^+$,

在二级质谱中均检测到 m/z 563 $[\text{M}-18+\text{H}]^+$ 、 m/z 545 $[\text{M}-36+\text{H}]^+$ 、 m/z 527 $[\text{M}-54+\text{H}]^+$ 、 m/z 491 $[\text{M}-90+\text{H}]^+$ 、 m/z 443 $[\text{M}-138+\text{H}]^+$ 、 m/z 425 $[\text{M}-156+\text{H}]^+$ 、 m/z 395 $[\text{M}-186+\text{H}]^+$ 、 m/z 341 $[\text{M}-240+\text{H}]^+$ 等碎片离子, 由此推测这两个化合物结构中可能存在两个糖取代

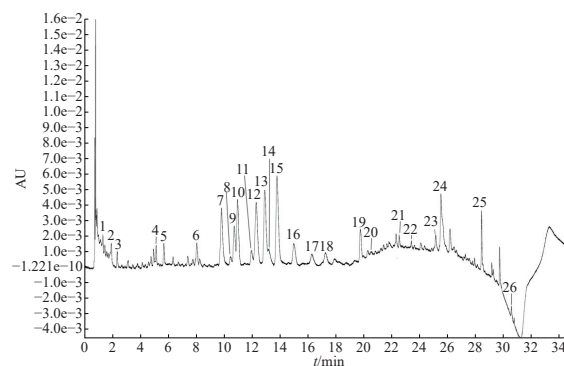


Figure 1 Typical UPLC chromatogram of the raw powder of Tongluo Shenggu capsule

Table 1 LC-MS/MS data of the raw powder of Tongluo Shenggu capsule

Compd.	t_R/min	Adduct	Precursor (m/z)	Fragments (m/z)
1	0.96	$[\text{M}-\text{H}]^-$	191.21	147.60, 127.19, 84.78, 57.18
2	1.99	$[\text{M}+\text{H}]^+$	284.33	223.06, 214.75, 202.02, 152.04, 135.27, 115.29
3	2.79	$[\text{M}+\text{H}]^+$	434.79	403.10, 388.56, 201.34
4	5.40	$[\text{M}+\text{H}]^+$	294.98	277.01, 172.71, 156.83, 130.23, 84.16
5	5.68	$[\text{M}+\text{H}]^+$	295.06	277.08, 201.01, 156.83, 130.23, 91.28
6	8.10	$[\text{M}+\text{H}]^+$	611.63	592.94, 575.53, 557.17, 539.06, 515.46, 491.11, 473.13, 443.34, 395.07, 371.09
7	9.85	$[\text{M}+\text{H}]^+$	595.49	577.45, 558.83, 541.03, 523.11, 474.97, 456.97, 355.27
8	9.90	$[\text{M}+\text{H}]^+$	595.88	577.83, 530.51, 458.07, 427.97, 394.37
9	10.76	$[\text{M}+\text{H}]^+$	581.40	563.42, 545.37, 527.13, 491.29, 443.21, 425.04, 395.45, 340.93
10	11.08	$[\text{M}+\text{H}]^+$	581.02	563.27, 544.86, 491.05, 443.10, 395.32, 341.31
11	12.26	$[\text{M}+\text{H}]^+$	449.28	430.78, 413.18, 353.04, 328.94, 299.03
12	12.56	$[\text{M}+\text{H}]^+$	448.70	430.84, 413.24, 352.91, 329.06, 299.16
13	12.98	$[\text{M}+\text{H}]^+$	565.14	547.41, 529.05, 510.81, 499.06, 325.37
14	13.62	$[\text{M}+\text{H}]^+$	565.14	546.96, 529.36, 511.00, 499.01, 325.045
15	13.94	$[\text{M}+\text{H}]^+$	564.82	547.09, 529.17, 511.32, 499.46, 325.05
16	14.94	$[\text{M}+\text{H}]^+$	433.07	415.09, 397.42, 379.06, 366.75, 313.25, 283.21
17	16.90	$[\text{M}+\text{H}]^+$	432.94	414.90, 397.04, 378.68, 367.01, 313.25, 283.09
18	17.23	$[\text{M}+\text{H}]^+$	365.35	346.92, 254.58, 183.35, 155.17, 126.92
19	19.46	$[\text{M}+\text{H}]^+$	534.98	499.06, 396.97, 379.02, 295.28
20	20.61	$[\text{M}+\text{H}]^+$	397.36	379.25, 321.86, 2269.70, 209.18, 114.17
21	22.79	$[\text{M}+\text{H}]^+$	588.61	493.21, 408.58, 278.75
22	23.90	$[\text{M}+\text{H}]^+$	521.20	493.46, 398.70, 228.50, 209.24
23	24.74	$[\text{M}+\text{H}]^+$	341.24	323.39, 295.08, 209.18, 139.10, 97.33
24	25.53	$[\text{M}+\text{H}]^+$	301.20	283.21, 269.12, 219.13, 163.27
25	28.78	$[\text{M}-\text{H}]^-$	311.25	293.06, 236.85, 206.04, 188.24
26	30.53	$[\text{M}-\text{H}]^-$	253.32	235.12, 221.23, 186.22, 97.24

Table 2 Identification results of each compound

Compd.	t_R /min	Compound	Formula
6	8.10	Lucenin-II	$C_{27}H_{30}O_{16}$
7	9.85	vicenin-II	$C_{27}H_{30}O_{15}$
9	10.76	Isocarlinoside	$C_{26}H_{28}O_{15}$
10	11.08	Carlinoside	$C_{26}H_{28}O_{15}$
11	12.26	Orientin	$C_{21}H_{20}O_{11}$
12	12.56	Homoorientin	$C_{21}H_{20}O_{11}$
13	12.98	Isoshaftoside	$C_{26}H_{28}O_{14}$
14	13.62	Schaftoside	$C_{26}H_{28}O_{14}$
15	13.94	Neoshaftoside	$C_{26}H_{28}O_{14}$
16	14.94	Vitexin	$C_{21}H_{20}O_{10}$
17	16.90	Isovitexin	$C_{21}H_{20}O_{10}$
19	19.46	6,8-Di-C- α -L-arabinopyranosyl apigenin	$C_{25}H_{26}O_{13}$
21	22.79	Cajanstilbenoids A	$C_{40}H_{44}O_4$
22	23.90	Cajanstilbenoids B	$C_{35}H_{36}O_4$
23	24.74	Amorfrutin A	$C_{21}H_{24}O_4$

基。根据化合物 **9**、**10** 的质谱信息,结合文献 [20] 发现两个化合物相对分子质量与刺苞菊苷相符,其分子式均为 $C_{26}H_{28}O_{15}$ 。根据这两个化合物在反相色谱柱上出峰时间差异,结合文献 [21] 初步鉴定出峰较快的化合物 **9** 为异刺苞菊苷(isocarlinoside)、出峰较慢的化合物 **10** 为刺苞菊苷(carlinoside)。黄酮类化合物的主要裂解途径为糖羟基脱水、糖取代基单元断裂、糖取代基单元内部的断裂、黄酮苷元上 CO 的中性丢失以及发生 RDA (retro-Diels-Alder) 反应等^[22],据此推导得到的化合物 **10** 裂解过程详见图 2。

化合物 **6** 在正离子模式下扫描到的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 611, 在二级质谱中检测到了 m/z 593 $[M-H_2O+H]^+$ 、 m/z 575 $[M-2H_2O+H]^+$ 、 m/z 557 $[M-3H_2O+H]^+$ 、 m/z 539 $[M-4H_2O+H]^+$ 、 m/z 515 $[M-2H_2O-2CH_2O+H]^+$ 、 m/z 491 $[M-4CH_2O+H]^+$ 、 m/z 473 $[M-H_2O-4CH_2O+H]^+$ 、 m/z 443 $[M-H_2O-5CH_2O+H]^+$ 。

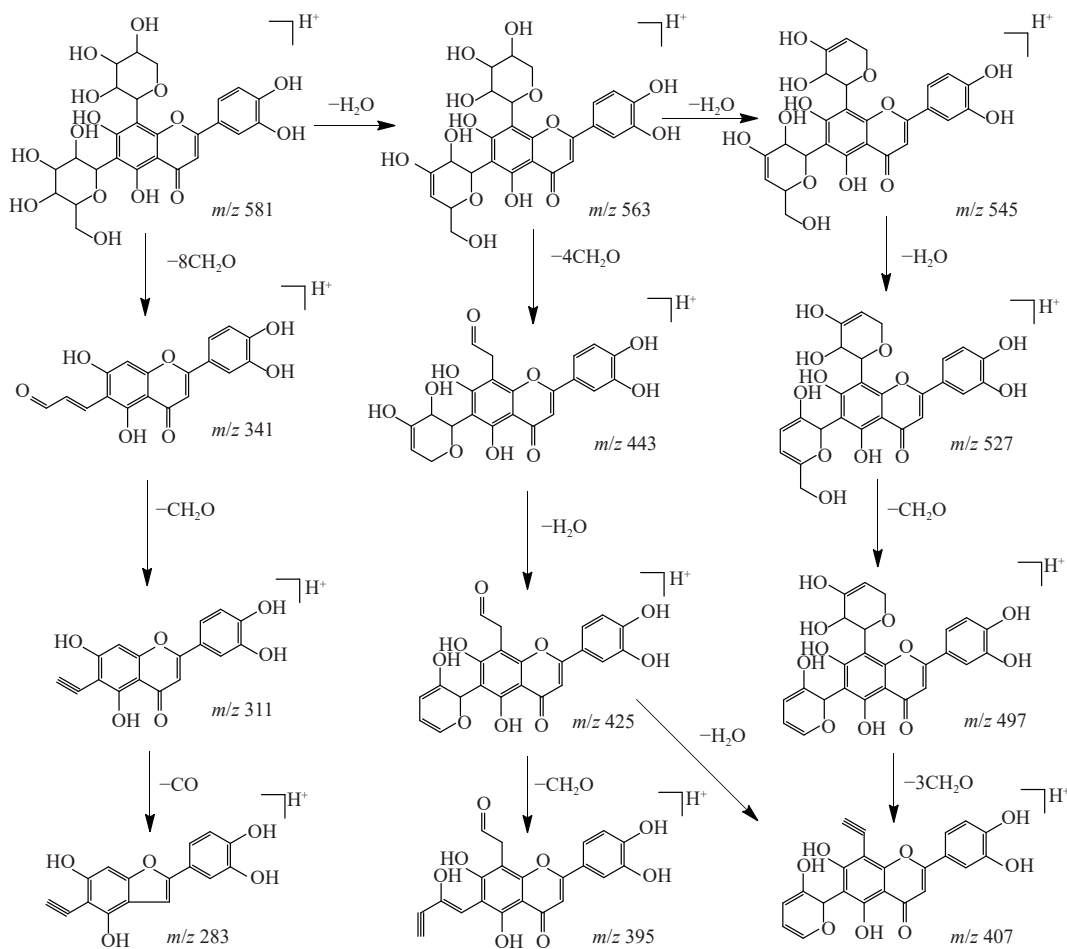


Figure 2 Fragmentation pathway of compound **10**

m/z 395 $[M-H_2O-5CH_2O+H]^+$ 、 m/z 371 $[M-8CH_2O+H]^+$ 、 m/z 341 $[M-9CH_2O+H]^+$ 等碎片离子,由此推测其结构中可能存在两个糖取代基,化合物 **6** 的相对分子质量比化合物 **9**、**10** 大 30,推测其结构中两个糖取代基均为葡萄糖。参照文献 [20] 发现化合物 **6** 的信息与 lucenin- II 数据相符,初步鉴定化合物 **6** 为 lucenin- II,其分子式为 $C_{27}H_{30}O_{16}$ 。

化合物 **8** 在正离子模式下扫描到的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 595,具有和化合物 **6** 类似的、失去相同质量数的二级碎片离子,如 m/z 577 $[M-H_2O+H]^+$ 、 m/z 559 $[M-2H_2O+H]^+$ 、 m/z 541 $[M-3H_2O+H]^+$ 、 m/z 523 $[M-4H_2O+H]^+$ 、 m/z 475 $[M-4CH_2O+H]^+$ 、 m/z 457 $[M-H_2O-4CH_2O+H]^+$ 、 m/z 355 $[M-8CH_2O+H]^+$ 等,由此推测化合物 **8** 和化合物 **6** 一样存在两个葡萄糖取代基,化合物 **8** 的相对分子质量比化合物 **6** 小 16,推测其黄酮苷元为芹菜素,其分子元素组成为 $C_{27}H_{30}O_{15}$ 。参照文献 [20] 发现化合物 **8** 的信息与 vicenin- II 数据相符,初步鉴定化合物 **8** 为 vicenin- II。

化合物 **11**、**12** 在正离子模式下扫描到的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 449,在二级质谱中均检测到了 m/z 431 $[M-H_2O+H]^+$ 、 m/z 413 $[M-2H_2O+H]^+$ 、 m/z 353 $[M-2H_2O-2CH_2O+H]^+$ 、 m/z 329 $[M-4CH_2O+H]^+$ 、 m/z 299 $[M-5CH_2O+H]^+$ 等碎片离子,推测其结构中只存在一个糖取代基,参照文献 [20] 发现化合物 **11** 的信息与荭草苷数据相符,其分子元素组成为 $C_{21}H_{20}O_{11}$,根据这两个化合物出峰时间差异,结合文献^[23-24],初步鉴定出峰较快的化合物 **11** 为荭草苷(orientin)、出峰较慢的化合物 **12** 为异荭草苷(homoorientin)。

化合物 **13**、**14**、**15** 在正离子模式下扫描到的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 均为 m/z 565,具有和化合物 **8** 类似的、失去相同质量数的二级碎片离子,如 m/z 547 $[M-H_2O+H]^+$ 、 m/z 529 $[M-2H_2O+H]^+$ 、 m/z 511 $[M-3H_2O+H]^+$ 、 m/z 499 $[M-2H_2O-2CH_2O+H]^+$ 、 m/z 325 $[M-8CH_2O+H]^+$ 等,由此推测化合物 **13**、**14**、**15** 和化合物 **8** 一样存在两个糖取代基,这 3 个化合物的相对分子质量比化合物 **8** 小 30,推测其中一个糖取代基为阿拉伯糖基,其分子元素组成为 $C_{26}H_{28}O_{14}$ 。与文献 [20] 比对,发现这 3 个化合物的质谱信息与夏佛塔苷相符,根据这 3 个化合物出峰时间差异,结合文献 [23] 初步鉴定出峰最快的化合物

13 为异夏佛塔苷(isoshaftoside)、出峰较慢的化合物 **14**、**15** 分别为夏佛塔苷(schaftoside)和新夏佛塔苷(neoshaftoside)。

化合物 **16**、**17** 在正离子模式下扫描到相同的准分子离子峰 m/z 433 $[M+H]^+$,在二级质谱中均检测 m/z 415 $[M-H_2O+H]^+$ 、 m/z 397 $[M-2H_2O+H]^+$ 、 m/z 379 $[M-3H_2O+H]^+$ 、 m/z 367 $[M-2H_2O-CH_2O+H]^+$ 、 m/z 313 $[M-4CH_2O+H]^+$ 和 m/z 283 $[M-5CH_2O+H]^+$ 等碎片离子,推测这两个化合物结构中只存在一个糖取代基。根据化合物 **16**、**17** 的质谱信息,与文献 [21] 比对,发现这两个化合物与牡荆苷一致,其分子式均为 $C_{21}H_{20}O_{10}$ 。根据这两个化合物出峰时间差异,结合文献 [9],初步鉴定出峰较快的化合物 **16** 为牡荆苷(vitexin)、出峰较慢的化合物 **17** 为异牡荆苷(isovitexin)。将化合物 **16** 的准分子离子峰时间与牡荆苷对照品的在 UPLC 色谱图上出峰时间进行比对,确认化合物 **16** 为牡荆苷,化合物 **16** 的二级质谱图及裂解过程详见图 3。

化合物 **19** 在正离子模式下扫描到的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 535,在二级质谱中检测到了 m/z 499 $[M-2H_2O+H]^+$ 、 m/z 397 $[M-H_2O-4CH_2O+H]^+$ 、 m/z 379 $[M-2H_2O-4CH_2O+H]^+$ 、 m/z 295 $[M-8CH_2O+H]^+$ 等碎片离子,推测其结构中可能存在两个糖取代基,化合物 **19** 的相对分子质量比化合物 **16**、**17**、**18** 小 30,推测两个糖取代基均为阿拉伯糖基,其分子元素组成为 $C_{25}H_{26}O_{13}$ 。参照文献 [25] 发现化合物 **19** 的信息与芹菜素-6,8-二-C-阿拉伯糖苷数据相符,初步鉴定化合物 **19** 为芹菜素-6,8-二-C-阿拉伯糖苷(6,8-Di-C- α -L-arabinopyranosyl apigenin)。

3.2.2 芪类化合物的鉴定 芪类化合物是具有二苯乙烯母核或其聚合物的一系列化合物,其结构中常连接有甲氧基、羟基、异戊烯基等官能团。化合物 **21** 在正离子模式下扫描到的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 589,在二级质谱中检测到了丢失 96 的碎片离子 m/z 493 $[M-2CH_2-C_5H_8+H]^+$,推测该化合物中可能存在甲氧基和异戊烯基取代基;在二级质谱中检测到了丢失 180 的碎片离子 m/z 409 $[M-2CH_2-2C_6H_5+H]^+$,推测该化合物中可能存在苯基。与文献 [26] 进行比对,发现该化合物的信息与 cajanstilbenoids A 相符,初步鉴定为 cajanstilbenoids A,其分子元素组成为 $C_{40}H_{44}O_4$ 。

化合物 **22** 在正离子模式下扫描到的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 521,在二级质谱中检测到了丢

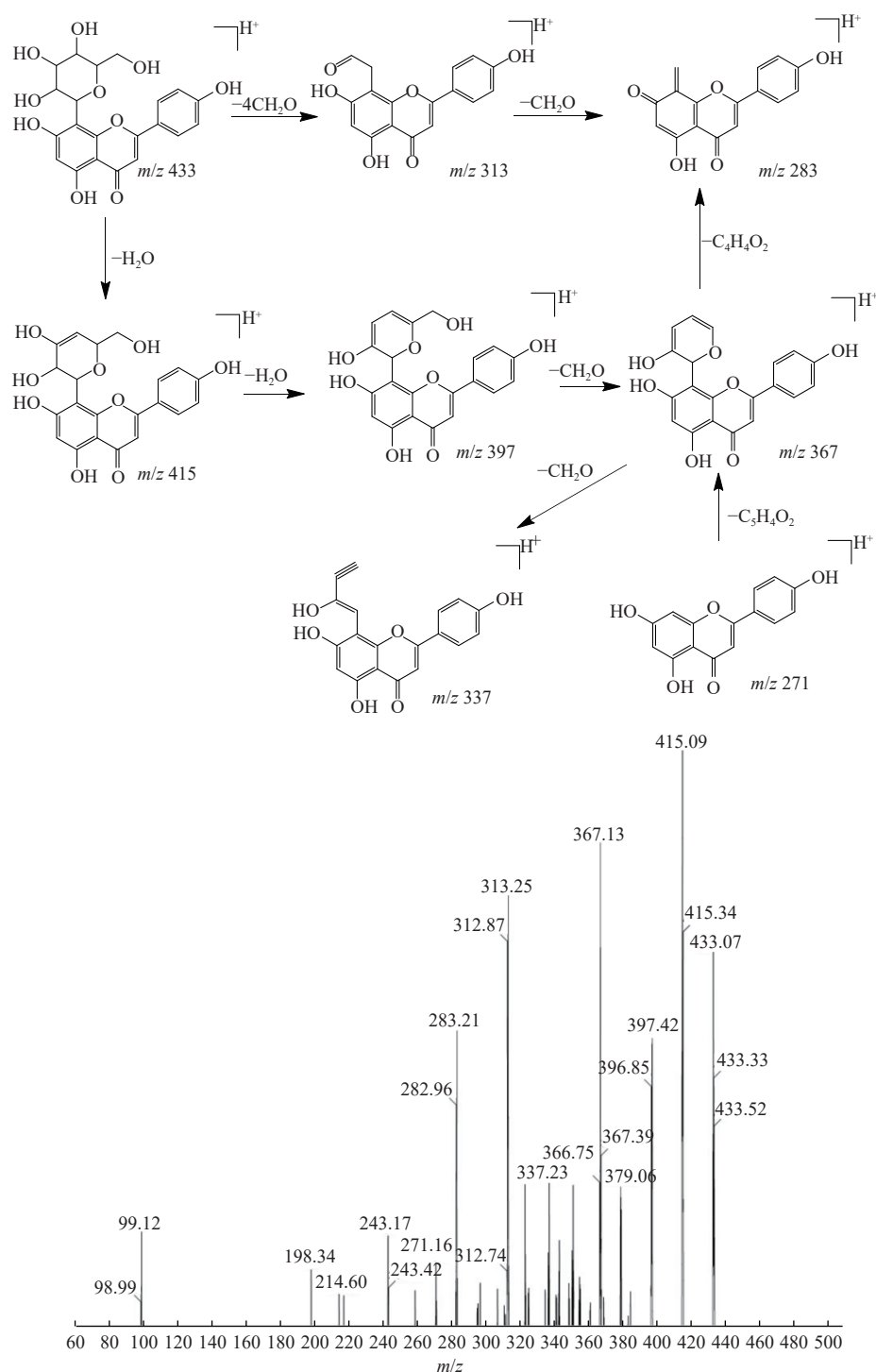


Figure 3 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of compound 16

失 28 的碎片离子 m/z 493 $[M-2 CH_2+H]^+$, 推测该化合物中可能存在甲氧基, 在二级质谱中检测到了丢失 122 的碎片离子 m/z 399 $[M-H_2O-C_7H_4O+H]^+$, 推测该化合物中可能存在羟基和苯甲氧基。与已有文献 [26] 进行比对, 发现该化合物的信息与 cajanstilbenoids B 相符, 初步鉴定为 cajanstilbenoids

B, 其分子元素组成为 $C_{35}H_{36}O_4$ 。化合物 22 二级质谱图及推导所得裂解图见图 4。

化合物 23 在正离子模式下扫描到的准分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 m/z 341, 与已有文献 [27] 进行比对, 发现该化合物的相对分子质量与 Amorfrutin A 相符, 其分子元素组成为 $C_{21}H_{24}O_4$ 。假设化合物 23

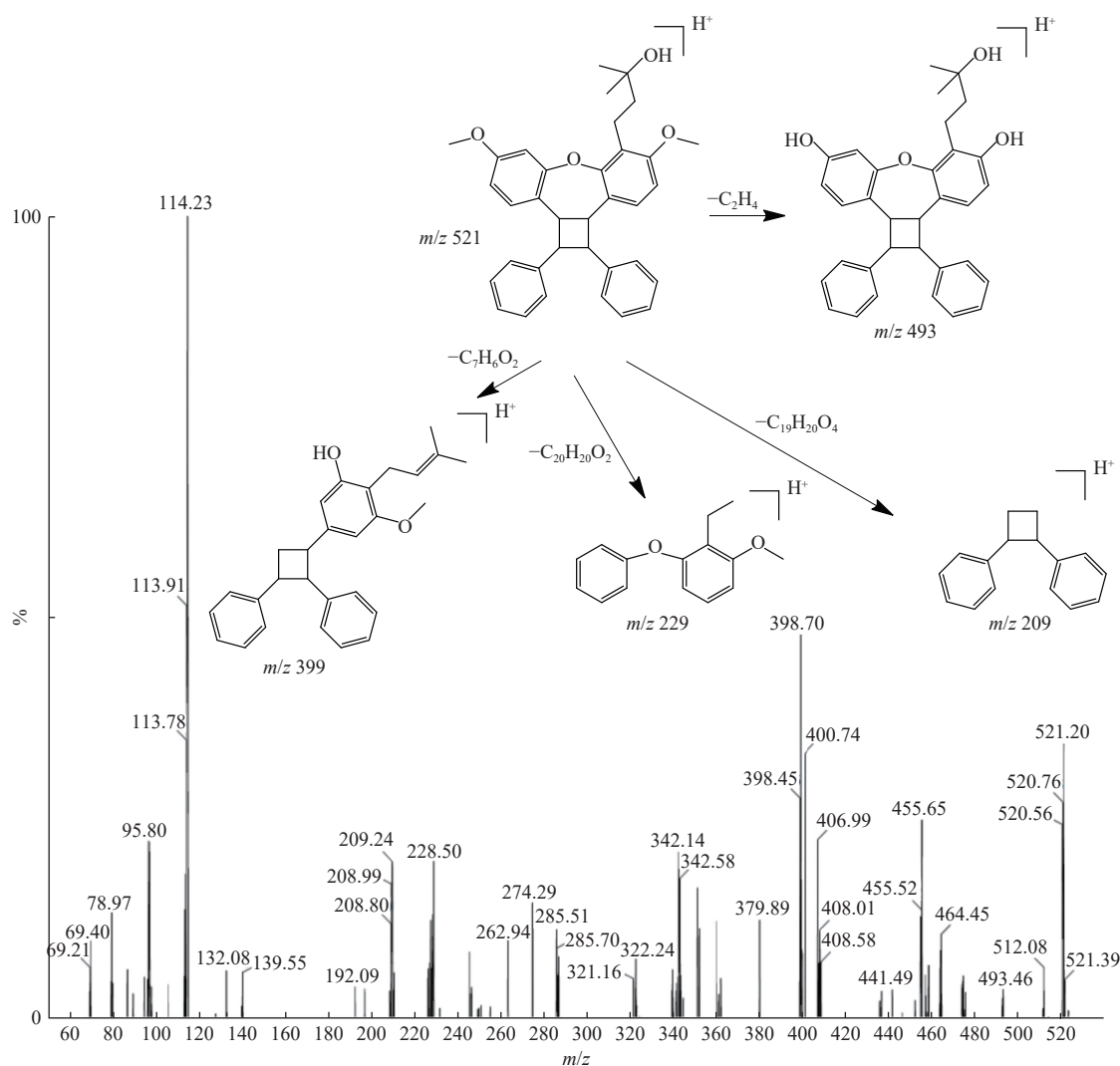


Figure 4 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of compound 22

为 Amorfrutin A, 根据化合物 23 的二级碎片离子在 Amorfrutin A 结构式的基础上进行推导, 能推导出裂解过程, 初步鉴定化合物 23 为 Amorfrutin A, 进一步确认需要对照品比对。Amorfrutin A 结构式及推导所得裂解过程见图 5。

3.3 含量测定方法学考察

3.3.1 系统适用性试验 照“2.2.1”、“2.2.2”项下制备供试品溶液及对照品溶液, 照“2.2.3”项下色谱条件测定, 记录色谱图, 考察系统适用性。结果表明, 牡荆苷与相邻峰分离度良好, 其他成分对测定无干扰。色谱图见图 6。

3.3.2 线性关系考察 取牡荆苷对照品适量, 50% 甲醇定量稀释成 0.1 mg/mL 的线性储备液。精密量取线性储备液、依次稀释至质量浓度分别为 10、16、20、25、30、40 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 照“2.2.3”项下色

谱条件测定, 以对照品质量浓度为横坐标(X), 以色谱峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 得到回归方程 $Y=4.890 \times 10^7 X - 10.339 \times 10^4$ ($R=1.000$), 表明 10~40 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内牡荆苷质量浓度与峰面积线性关系良好。

3.3.3 系统精密性 照“3.3.1”项下制备对照品溶液, 按照“2.2.3”项下色谱条件连续进样 5 针, 记录结果, 计算峰面积 RSD。结果显示牡荆苷峰面积 RSD 为 0.3%, 表明系统精密性良好。

3.3.4 日内精密性与日间精密性试验 取通络生骨胶囊原粉, 照“2.2.1”项下制备 6 份供试品溶液后, 照“2.2.3”项下色谱条件测定牡荆苷含量。再于另一日期同法测定。结果显示, 牡荆苷含量 RSD 分别为 1.0% ($n=6$)、1.0% ($n=6$) 及 1.0% ($n=12$), 表明日内精密性与日间精密性良好。

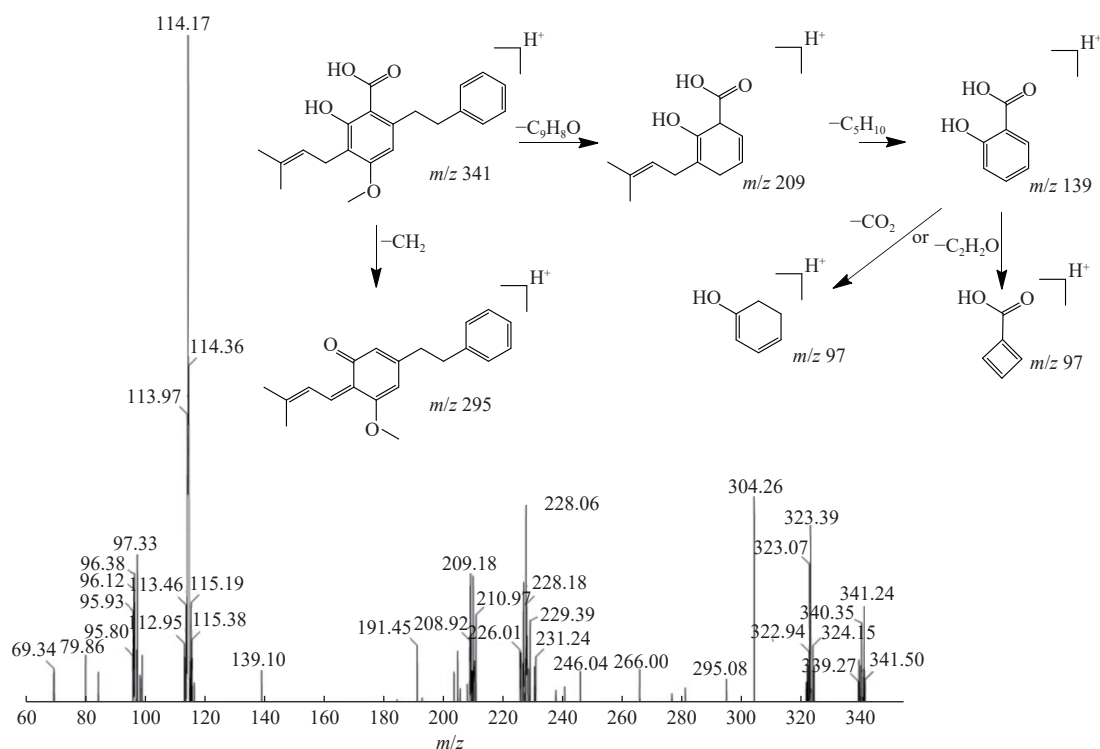


Figure 5 MS/MS spectrum and fragmentation pathway of compound 23

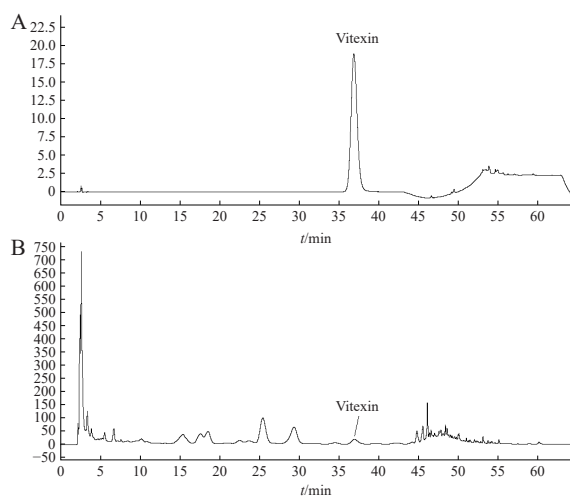


Figure 6 Typical HPLC chromatograms of Vitexin reference substance (A) and the raw powder of Tongluo Shenggu capsule (B)

3.3.5 准确度/回收率试验 精密称取 9 份通络生骨原粉 500 mg 置 100 mL 量瓶中, 分别精密加入牡荆苷对照品 1, 2, 3 mg 每个质量水平制备 3 份, 加入 50% 甲醇至刻度, 超声处理 1 h, 冷却至室温即得, 照“2.2.3”项下色谱条件测定, 按外标法计算样品中牡荆苷的含量, 计算回收率。结果显示, 9 份溶液牡荆苷回收率在 94.2%~99.8% 之间, 回收率均值为 96.7%, RSD 为 1.7%, 表明方法准确度良好。

3.3.6 定量限与检测限 取牡荆苷对照品溶液适量, 用 50% 甲醇逐步稀释, 照“2.2.3”项下色谱条件测定。当溶液信噪比 S/N 大于 10 时, 该溶液浓度作为定量限浓度。取定量限溶液进一步稀释至 S/N 大于 3 时的浓度作为检测限浓度。结果表明定量限浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 检测限浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3.7 溶液稳定性考察 按照“2.2.1”项与“2.2.2”项下分别配制供试品溶液与对照品溶液, 分为若干份, 分别置于室温条件及 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 照“2.2.3”项下色谱条件分别于 0、1、3、5 d 测定, 计算与 0 天牡荆苷含量相比较的 RAD。结果表明置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 与室温条件下的对照品溶液及置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下的供试品溶液在 5 d 内的稳定性均良好。

3.3.8 耐用性考察 以“2.2.3”项下色谱条件为基础, 考察柱温 $\pm 2^{\circ}\text{C}$, 流速 $\pm 0.1\text{ mL/min}$, 检测波长 $\pm 5\text{ nm}$, 水相初始比例 $\pm 0.5\%$ 时牡荆苷含量测定结果的变化。各条件相对于正常条件下牡荆苷的相对平均偏差在 0.6%~2.0% 之间, 说明色谱条件在考察的范围内耐用性良好。

4 讨论

4.1 通络生骨胶囊原粉化学成分鉴定

当前木豆叶的提取物的文献报道主要以乙醇、

乙酸乙酯、氯仿、石油醚等有机溶剂作为提取溶剂,所鉴定化合物包括有机酸类、多酚类、萜类、甾体类、香豆素类、黄酮类、类黄酮类和芪类等化合物。而通络生骨胶囊原粉为木豆叶枝叶切段后的水提取物,因此当前检测并解析出的化合物主要为水溶性相对较好的黄酮苷类。当前检测到的 26 个化合物中鉴定出了 12 个黄酮类化合物和 3 个芪类化合物,而在文献中检测到的三萜类、甾体类、香豆素类等成分,在本研究中并未被鉴定到。

在分析方法方面,目前文献方法主要为使用正相或反相硅胶色谱及凝胶柱将各成分分离后,通过核磁共振谱进行鉴定^[10-11],而本研究使用的 UPLC-MS/MS 在灵敏度高、专属性强的同时,拥有操作简便,检测速度快的特点,能够通过相对分子质量及碎片离子进行化合物结构的鉴定,确保鉴定结果的准确性,同时便于化合物裂解机制的研究。

本研究尚有 11 个化合物暂未完成结构分析和鉴定,有待后续结合红外光谱、核磁共振等其他手段进行深入研究。这些化合物的相对分子质量及碎片离子信息,目前尚未见有关文献报道,可能是由于木豆叶产地的不同,以及提取、干燥等加工工艺过程中化学成分发生如苷类脱去糖基,萜类发生氧化、开环等转化^[28-29]的原因。

4.2 牡荆苷含量测定

在含量测定方法开发时,考虑到了 UPLC 与 HPLC 的差异。UPLC 在灵敏度和分离度方面具有优势,在中药化学成分鉴定中能对各成分起到较好的分离效果。在仪器联用方面,可与质谱联用进行复杂样品的分析与鉴定。而在单个成分含量测定时,方法着重于该成分与其他成分的分离效果。考察时发现 HPLC 的分离效果同样适用于牡荆苷的含量测定。同时 UPLC 对仪器与色谱柱的要求更为严格。考虑到两者各自优势与实际应用上的成本与效益,选择 HPLC 建立含量测定分析方法。

通过测定牡荆苷在 220~400 nm 范围内的紫外吸收图谱,发现牡荆苷在 267 和 342 nm 处有两个最大吸收峰,267 nm 处峰为尖峰,342 nm 处峰为宽峰,两吸收峰吸收强度差异不大,故选定 267 nm 作为检测波长来测定通络生骨原粉中的含量。另对色谱柱、柱温、流速等影响牡荆苷分离效果的条件进行了筛选比较。在使用常用的流动相甲醇-水和乙腈-水体系考察分离效果时发现,牡荆苷在乙腈-

水体系中分离效果不好,故采用甲醇-水体系。考虑到直接用甲醇-水体系分离时,容易产生拖尾,因此在流动相中加入少量冰醋酸。经过方法学考察,结果表明研究建立的分析方法适用于通络生骨胶囊原粉中牡荆苷含量的测定。

5 小 结

本研究使用高效快速的 UPLC,结合三重四极杆质谱对通络生骨胶囊原粉化学成分进行定性分析,根据超高效液相色谱保留时间、质谱获得的相对分子质量与碎片离子信息,结合相关文献完成了通络生骨原粉部分化合物的初步表征,共发现 26 个化学成分。已鉴定出的化合物中包含 12 个黄酮类化合物(lucenin- II、vicenin- II、异刺苞菊苷、刺苞菊苷、异荭草苷、荭草苷、异夏佛塔苷、夏佛塔苷、新夏佛塔苷、牡荆苷、异牡荆苷、芹菜素-6, 8-二-C-阿拉伯糖苷)和 3 个芪类化合物(cajanstilbenoids A、cajanstilbenoids B、amorfrutin A)。黄酮类化合物和芪类化合物在通络生骨胶囊治疗骨质疏松和股骨头坏死等方面具有良好的药理活性。研究同时建立了测定黄酮类活性成分牡荆苷的 HPLC 含量测定方法,且通过方法学验证证明方法准确度高,耐用性好,具有可行性,牡荆苷在样品中相对稳定,不易发生显著变化,可作为质量控制的指标成分。当前研究对于通络生骨胶囊原粉的质量控制指标的制订具有重要的参考价值。

References

- [1] Yuan WA, Du J, Wen H, *et al.* A multi- center, randomized, double- blind, double- dummy, positive- controlled clinical study on *Tongluo Shenggu* Capsule in treatment of osteonecrosis of femoral head (syndrome of stagnation of sinews and vessels)[J]. *Shanghai J Tradit Chin Med* (上海中医药杂志), 2019, **53**(8): 53-59.
- [2] Cai JZ, Dai W, Zhang NL. Advance on chemical constituents and pharmacological activities of *Cajanus cajan* (L.) Millsp[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, **32**(3): 515-524.
- [3] Patel NK, Bhutani KK. Pinostrobin and *Cajanus* lactone isolated from *Cajanus cajan* (L.) leaves inhibits TNF- α and IL-1 β production: *in vitro* and *in vivo* experimentation[J]. *Phy-tomedicine*, 2014, **21**(7): 946-953.
- [4] Ajaiyeoba EO, Ogbale OO, Abiodun OO, *et al.* Cajachalcone: an antimalarial compound from *Cajanus cajan* leaf extract[J]. *J Parasitol Res*, 2013, **2013**: 703781.

- [5] Cai JZ, Tang R, Ye GF, *et al.* A halogen-containing stilbene derivative from the leaves of *Cajanus cajan* that induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. *Molecules*, 2015, **20**(6): 10839-10847.
- [6] Ahmad L, Mujahid M, Mishra A, *et al.* Protective role of hydroalcoholic extract of *Cajanus cajan* Linn leaves against memory impairment in sleep deprived experimental rats[J]. *J Ayurveda Integr Med*, 2020, **11**(4): 471-477.
- [7] Xu AL, Bi XL, Li SM, *et al.* Establishment of HPLC fingerprints of *Cajanus cajan* leaves and determination of two constituents[J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2017, **39**(7): 1435-1439.
- [8] Fu LN, Wang LT, Wang JD, *et al.* Quality evaluation of different *Cajanus cajan* leaves based on RP-HPLC-DAD fingerprint combined with chemometrics and determination of main components[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2022, **53**(24): 7880-7886.
- [9] Zhang HC. *On-line structure identification of chemical constituents in Cajanus cajan leaves by UPLC-QTOF-MS and separation and purification by HSCCC*(木豆叶中化学成分在线结构鉴定与 HSCCC 分离纯化研究)[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2017.
- [10] Lei XY, Zhou QR, Chen Y, *et al.* Chemical constituents from the twigs and leaves of *Cajanus cajan*[J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2021, **44**(8): 1880-1883.
- [11] Zhao YX, Lei XY, Qin GF, *et al.* Chemical constituents from twigs and leaves of *Cajanus cajan*(II)[J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2022, **45**(12): 2895-2899.
- [12] Zhang NL, Cai JZ, Hu YJ, *et al.* Study on chemical constituents from leaves of *Cajanus cajan*[J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2017, **40**(5): 1116-1118.
- [13] Gargi B, Semwal P, Jameel Pasha SB, *et al.* Revisiting the nutritional, chemical and biological potential of *Cajanus cajan* (L.) millsp[J]. *Molecules*, 2022, **27**(20): 6877.
- [14] Nwaechefu OO, Olaolu TD, Akinwunmi IR, *et al.* *Cajanus cajan* ameliorated CCl₄-induced oxidative stress in Wistar rats via the combined mechanisms of anti-inflammation and mitochondrial-membrane transition pore inhibition[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 289: 114920.
- [15] Liu JF, Zeng P, Nong J, *et al.* Effect of Tongluo Shenggu Capsule on Toll-like receptor 4 signaling pathway in rats with steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Chin J Tissue Eng Res* (中国组织工程研究), 2021, **25**(26): 4150-4155.
- [16] Sun L, Li JH, Li J, *et al.* Effects and mechanism of Pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) leaves on proliferation, migration, and tube formation of hypoxic human umbilical vein endothelial cells *in vitro*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, **279**: 114394.
- [17] Wu T, Sheng YN, Tian Y, *et al.* Vitexin regulates heat shock protein expression by modulating ROS levels thereby protecting against heat-stress-induced apoptosis[J]. *Molecules*, 2023, **28**(22): 7639.
- [18] Zhang S, Zhang SX, Wang H, *et al.* Vitexin ameliorated diabetic nephropathy via suppressing GPX4-mediated ferroptosis[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, **951**: 175787.
- [19] Liu H, Huang MR, Xin DD, *et al.* Natural products with anti-tumorigenesis potential targeting macrophage[J]. *Phytomedicine*, 2024, **131**: 155794.
- [20] Hussein SR, Abdel Latif RR, Marzouk MM, *et al.* Spectrometric analysis, phenolics isolation and cytotoxic activity of *Stipagrostis plumosa* (Family Poaceae)[J]. *Chem Pap*, 2018, **72**(1): 29-37.
- [21] He XA. *Analysis of chemical constituents of Cajanus cajan leaves and study on anti-cell proliferation activity of monomers in vitro*(木豆叶化学成分分析及单体体外抗细胞增殖活性研究)[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019.
- [22] Lin HY, Huang JM, Duan TX, *et al.* Study on different substituents in A-ring effect on fragmentation pathway of flavonoids using electrospray ion trap mass spectrometry[J]. *China Meas Test* (中国测试), 2013, **39**(5): 59-61,64.
- [23] Feng GW, Li CB, Liao SG, *et al.* Rapid detection and identification of two isomeric C-glycosides, orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2011, **31**(7): 1263-1268.
- [24] Li ZH, Feng ZY, Chen B, *et al.* Study on extraction methods and HPLC detection conditions of flavone, orientin and isoorientin from *Tetragium hemsleyanum*[J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2023, **42**(12): 48-52.
- [25] Huang MQ, Zhang YP, Xu SY, *et al.* Identification and quantification of phenolic compounds in *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* (Siebold et Zucc.) Hand. -Mazz. using liquid chromatography combined with quadrupole time-of-flight and triple quadrupole mass spectrometers[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 108: 11-20.
- [26] Zhang NL, Shen XC, Jiang XF, *et al.* Two new cytotoxic stilbenoid dimers isolated from *Cajanus cajan*[J]. *J Nat Med*, 2018, **72**(1): 304-309.
- [27] Zhang NL, Zhu YH, Huang RM, *et al.* Two new stilbenoids from *Cajanus cajan*[J]. *Z Für Naturforschung B*, 2012, **67**(12): 1314-1318.
- [28] Liu W, Kong Y, Zu YG, *et al.* Determination and quantification of active phenolic compounds in pigeon pea leaves and its medicinal product using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2010, **1217**(28): 4723-4731.
- [29] Su SL, Yan H, *et al.* "Sweating" of traditional Chinese medicinal materials during primary processing and its mechanisms of enzymatic reaction and chemical conversion[J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2013, **44**(10): 1219-1225.