

本文引用:夏丽琼,徐长琼,任秋芸,梅君,黎春辉,黎珊,唐奇,黄会保,李然.基于UPLC-MS/MS技术的张氏消肿定痛膏物质基础研究[J].湖南中医药大学学报,2021,41(11):1705-1710.

## 基于UPLC-MS/MS技术的张氏消肿定痛膏物质基础研究

夏丽琼<sup>1</sup>,徐长琼<sup>2</sup>,任秋芸<sup>3</sup>,梅君<sup>1</sup>,黎春辉<sup>1</sup>,黎珊<sup>2</sup>,唐奇<sup>1</sup>,黄会保<sup>1\*</sup>,李然<sup>2\*</sup>

(1.岳阳市中医医院药剂科,湖南岳阳414000;2.岳阳市妇幼保健院科研所,湖南岳阳414000;  
3.汕头大学医学院,广东汕头515000)

**[摘要]** 目的 研究了解张氏消肿定痛膏的药效物质基础。方法 基于液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术研究张氏消肿定痛膏中化学成分,并进行定性和相对含量分析。结果 基于广泛靶向代谢组学技术,检测到张氏消肿定痛膏中有542个化合物,其中种类最多的是黄酮类化合物122种,其次为酚酸77种;脂质的相对百分含量最高,为(24.01±4.23)%,黄酮类次之,为(17.95±3.01)%。结论 基于UPLC-MS/MS检测平台和MWDB数据库,能简单、高效检测到张氏消肿定痛膏的化学物质基础,为进一步明确其活性成分提供参考。

**[关键词]** 张氏消肿定痛膏;超高效液相色谱-串联质谱;黄酮;酚酸;脂质

**[中图分类号]**R284.1 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.11.010

### Material Basis Research of Zhang's Antiswelling and Relieving Pain Ointment Based on UPLC-MS/MS

XIA Liqiong<sup>1</sup>, XU Changqiong<sup>2</sup>, REN Qiuyun<sup>3</sup>, MEI Jun<sup>1</sup>, LI Chunhui<sup>1</sup>, LI Shan<sup>2</sup>, TANG Qi<sup>1</sup>, HUANG Huibao<sup>1\*</sup>, LI Ran<sup>2\*</sup>

(1. Pharmacy Department, Yueyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yueyang, Hunan 414000 China;

2. Scientific Research Institute, The Maternal and Child Health Hospital of Yueyang, Yueyang, Hunan 414000 China;

3. Medicine College, Shantou University, Shantou, Guangdong 515000 China)

**[Abstract]** **Objective** To study the material basis of Zhang's antiswelling and relieving pain ointment. **Methods** Based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) technique, the chemical constituents in Zhang's antiswelling and relieving pain ointment were studied, and the qualitative and relative percentage analysis were conducted. **Results** UPLC-MS/MS detected 542 compounds were detected in Zhang's antiswelling and relieving pain ointment, among which 122 kinds of flavonoids were the most, followed by 77 kinds of phenolic acids, and the relative percentage of lipids were the highest (24.01±4.23)%, followed by (17.95±3.01)% of flavonoids. **Conclusion** Based on the UPLC-MS/MS technique, the chemical substance base of Zhang's antiswelling and relieving pain ointment can be detected simply efficiently, which can provide reference for further defining its active ingredients.

**[Keywords]** Zhang's antiswelling and relieving pain ointment; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; flavonoids; phenolic acids; lipid

**[收稿日期]**2021-05-28

**[基金项目]**湖南省临床医疗技术创新引导项目(2018SK52301);湖南省临床医疗技术示范基地项目(2020SK4025);岳阳市基础研究项目(201834);岳阳市科技研发指导性计划项目(201820)。

**[作者简介]**夏丽琼,女,硕士,执业药师,研究方向:药物化学。

**[通信作者]**\* 黄会保,男,教授,E-mail:501622007@qq.com;李然,男,博士,助理研究员,E-mail:wwwlr@163.com。

“岳阳张氏正骨术”由张瑞林创立,历经百余年理论发展及实践验证,成为湖湘中医正骨的主流学派。2012年被国家中医药管理局确定为第一批全国十三大骨伤学术流派传承工作室建设项目,2017年获评“湖南省非物质文化遗产代表性项目”。

“岳阳张氏正骨术”提倡内外相合用药,百余年来积累了多种有效秘方,自拟自制过张氏消肿定痛膏、接骨止痛胶囊等10余种院内制剂。张氏消肿定痛膏是张氏正骨学术流派传承人在中医理论及张氏正骨学术思想指导下研制而成,由骨碎补、当归、红花、川芎、续断、龙血竭、王不留行、栀子、大黄等25味中药制成,在岳阳市中医医院及张氏正骨学术流派工作室临床工作中,历经20余年数万例的临床验证,具有行气、活血化瘀、消肿止痛的功效,对损伤软组织无菌性炎症的改变、局部急性炎症的修复具有重要促进作用。用于治疗急慢性软组织损伤,临床疗效显著,安全性良好<sup>[4]</sup>。然而,张氏消肿定痛膏治疗骨伤科疾病的物质基础研究尚不明确,本项目拟通过UPLC-MS/MS和MWDB数据库等广泛靶向代谢组学研究平台,研究张氏消肿定痛膏化学成分,了解其化合物种类及相对含量,初步明确张氏消肿定痛膏发挥药效作用的物质基础。

## 1 仪器与试剂

超高效液相色谱(Shim-pack UFLC SHI-MADZU CBM30A,日本岛津);串联质谱(Applied Biosystems 6500 QTRAP,美国SCIEX);BSA224S-CW型电子分析天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);甲醇、乙腈、乙醇为Merck色谱纯试剂;标准品(BioBioPha/Sigma-Aldrich);色谱柱:Agilent RRHD SB-C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm,1.8 μm);张氏消肿定痛膏由岳阳市中医医院骨伤科提供。

## 2 方法

### 2.1 供试品溶液的制备

张氏消肿定痛膏原药提取物制备:取各张氏消肿定痛膏原药0.5 g,置15 mL离心管中,加甲醇10 mL,超声提取1 h,加甲醇至刻度,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

### 2.2 测定条件

2.2.1 液相条件 流动相:A相为超纯水(加入0.1%的甲酸),B相为乙腈;洗脱梯度:0~9 min,5%~95%

B;9~10 min,95% B;10~11 min,95%~5% B;11~14 min,5% B;流速0.35 mL/min;柱温40 ℃;进样量2 μL。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)温度550 ℃,质谱电压5 500 V,帘气(curtain gas, CUR)30 psi,碰撞诱导电离(collision-activated dissociation, CAD)参数设置为高。在三重四级杆(QQQ)中,每个离子对根据优化的去簇压(declustering potential, DP)和碰撞能(collision energy, CE)进行扫描检测。

### 2.3 代谢物定性定量分析

(1)代谢物定性:基于MWDB数据库,根据二级谱信息进行物质定性,分析时去除了同位素信号,含K<sup>+</sup>离子、Na<sup>+</sup>离子、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>离子的重复信号,以及本身是其他更大分子量物质的碎片离子的重复信号。

(2)代谢物定量:获得不同样本的代谢物质谱分析数据后,用MultiaQuant软件处理数据,进行色谱峰的积分和校正工作,每个色谱峰的峰面积(Area)代表对应物质的相对含量,并对其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正。

### 2.4 样本质控分析

质控样本(QC)由样本提取物混合制备而成,用于分析样本在相同的处理方法下的重复性。在仪器分析的过程中,每10个检测分析样本中插入一个质控样本,以监测分析过程的重复性。

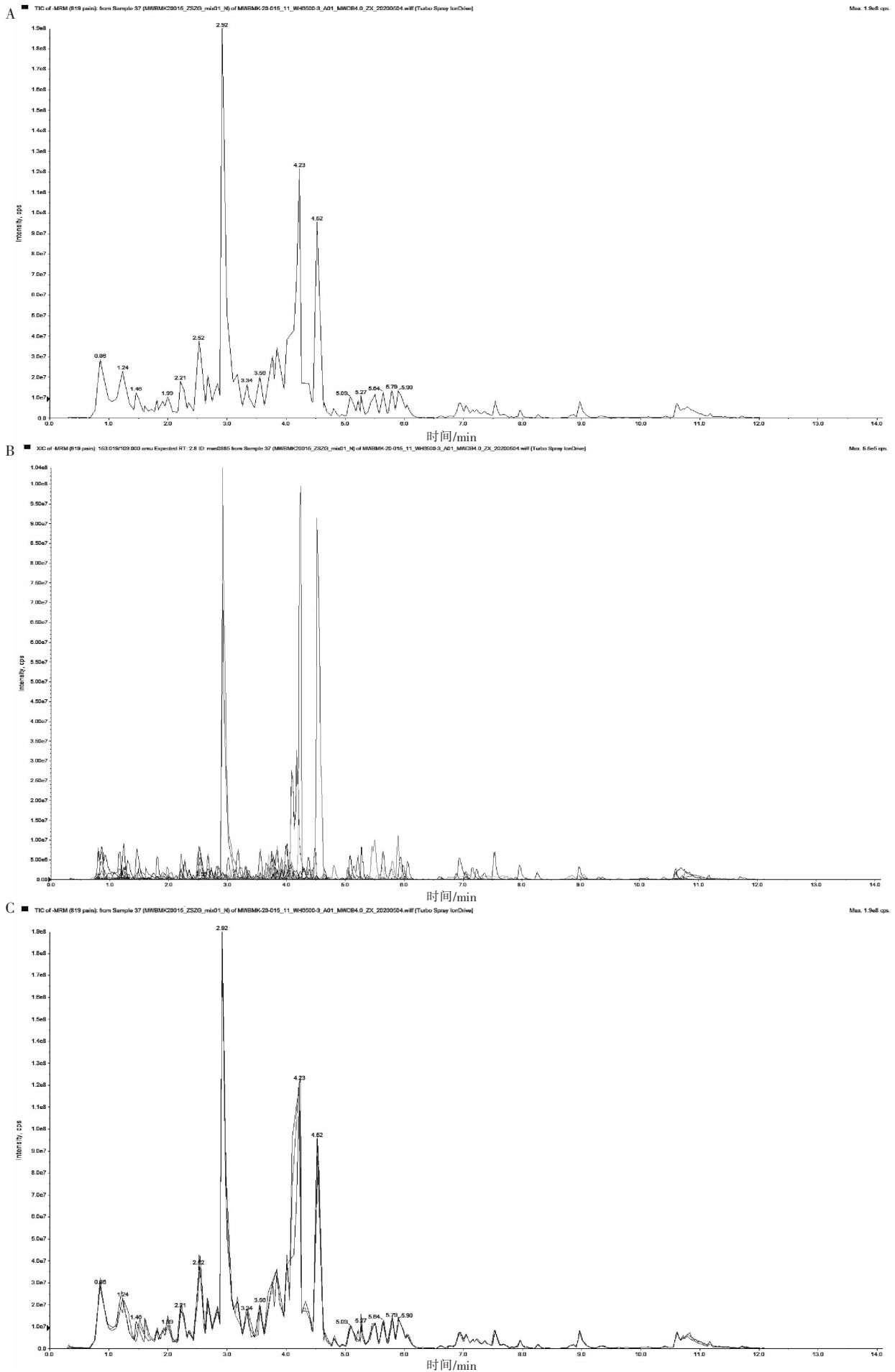
### 2.5 数据处理

将所检测物质按物质一级分类区分,得到所检测到各类化合物总数量;将所有检测到化合物峰面积相加定义为100%,计算单个色谱峰峰面积相对值,得该峰所对应化合物相对含量值,根据相对含量值比较每一类化合物总含量和该类化合物分布,列出部分相对含量较高或代表性化合物信息。

## 3 结果

### 3.1 数据质控

利用软件Analyst 1.6.3处理质谱数据。样品、混样质控QC样本的总离子流图(total ions current, TIC)及MRM代谢物检测多峰图(多物质提取的离子流谱图,XIC)见图1。通过对不同质控QC样本质谱检测分析的总离子流图进行重叠展示分析,可见该方法重复性及仪器稳定性良好,为数据的可靠性提



注:A.样品质谱分析总离子流图;B.MRM代谢物多峰图;C.QC 样本 TIC 重叠图

图1 张氏消肿定痛膏 UPLC-MS/MS 离子流图

供了重要的保障。

### 3.2 张氏消肿定痛膏检测化合物分类分析

张氏消肿定痛膏中总共检测到 542 种化合物,其中黄酮类化合物 122 种,酚酸 77 种,氨基酸及其衍生物 42 种,萜类 40 种,木脂素和香豆素 40 种,有机酸 34 种,生物碱 33 种,核苷酸及衍生物 26 种,脂质 25 种,醌类 12 种,鞣酸 9 种,维生素 8 种,糖及醇类 5 种,其他 69 种。见图 2A。

各类化合物总相对含量为脂质(24.01±4.23)%,黄酮(17.95±3.01)%,酚酸(13.37±1.79)%,木脂素和香豆素(7.38±1.27)%,氨基酸及其衍生物(5.79±1.92)%,生物碱(5.49±1.73)%,有机酸占(3.96±0.78)%,核苷酸及衍生物(3.79±1.19)%,萜类(3.17±0.21)%,醌类

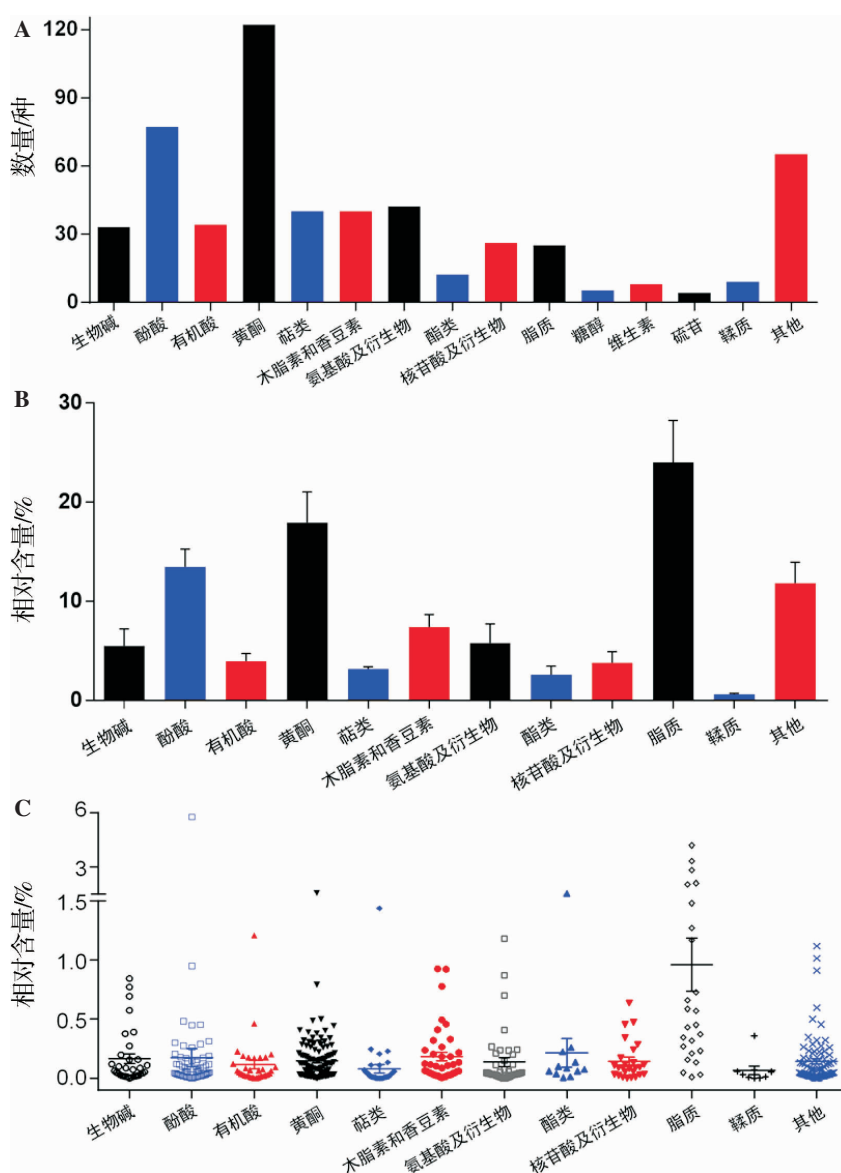
(2.59±0.87)%,鞣酸(0.60±0.12)%,其他化合物(11.80±2.13)%。见图 2B。

将同类物质相对百分含量进行统计,其中脂质、黄酮和酚酸平均含量较高,最高含量化合物为绿原酸及其同分异构体。见图 2C。

### 3.3 张氏消肿定痛膏主要成分

将每类物质相对含量进行排序,部分含量较高或部分代表性化合物。见表 1。

在张氏正骨膏所测得化合物中,氨基酸及其衍生物、酚酸、核苷酸及其衍生物、黄酮、木脂素和香豆素、生物碱、萜类、有机酸、脂质、醌类和鞣质中含量最高化合物依次为 L-精氨酸、绿原酸\*、2-脱氧腺苷\*、钝叶素、石防风素、木兰花碱、蛇藤酸、2-羟基十六



注:A.张氏消肿定痛膏中化合物分类及数量;B.张氏消肿定痛膏中化合物分类及总相对含量;C.张氏消肿定痛膏中化合物分类及相对含量散点图

图2 张氏消肿定痛膏中化合物种类及数量、总相对含量及各类成分相对含量值散点图

表1 张氏消肿定痛膏部分主要化合物(n=3)

序号	保留时间/min	分子式	化合物名称	化合物类型	相对含量/%
1	0.79	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	L-精氨酸	氨基酸及其衍生物	1.18±0.37
2	0.95	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	哌啶酸	氨基酸及其衍生物	0.87±0.12
3	2.92	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	绿原酸*	酚酸	5.79±0.93
4	2.52	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	新绿原酸*	酚酸	0.95±0.12
5	4.15	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	钝叶素	黄酮	1.56±0.55
6	6.95	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	李属异黄酮(樱黄素)*	黄酮	0.79±0.12
7	6.01	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	黄芩素	黄酮	0.50±0.01
8	3.33	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	肥皂草苷(异牡荆素-7-葡萄糖苷)	黄酮	0.13±0.02
9	8.69	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	石防风素	木脂素和香豆素	0.93±0.17
10	8.31	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	花椒素*	木脂素和香豆素	0.92±0.23
11	7.97	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	欧前胡素	木脂素和香豆素	0.78±0.12
12	5.36	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	白当归素	木脂素和香豆素	0.19±0.07
13	3.29	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	木兰花碱	生物碱	0.84±0.21
14	2.27	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO	去甲麻黄碱	生物碱	0.58±0.20
15	10.41	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	蛇藤酸	萜类	1.44±0.31
16	4.13	C <sub>44</sub> H <sub>64</sub> O <sub>24</sub>	藏红花素 1	萜类	0.06±0.01
17	10.61	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	γ-亚麻酸*	脂质	4.22±1.02
18	7.96	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	大黄素	醌类	1.53±0.32
19	4.48	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	麻黄双酮 C*	鞣质	0.06±0.01
20	2.27	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>14</sub>	2,3-二-O-没食子酰-D-葡萄糖	鞣质	0.36±0.09
21	5.48	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	狭叶墨西哥蒿素	其他	1.12±0.33
22	9.79	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	当归内酯	其他	0.91±0.11
23	7.67	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	新藜本内酯*	其他	0.60±0.10
24	2.93	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	羟基红花黄色素 A*	其他	0.35±0.08
25	7.57	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	川芎内酯 A	其他	0.02±0.02

注:\*表示同分异构体

烷酸、γ-亚麻酸\*、大黄素和 2,3-二-O-没食子酰-D-葡萄糖,其他类化合物中狭叶墨西哥蒿素含量最高。

#### 4 讨论

通过 UPLC-MS/MS 和 MWDB 数据库等广泛靶向代谢组学研究平台,在张氏消肿定痛膏中总共检测到 542 种化合物,其中黄酮类化合物种类最多,为 122 种,黄酮具有抗炎<sup>[5]</sup>、镇痛<sup>[6-7]</sup>作用;酚酸类 77 种,酚酸具有重要的抗炎<sup>[8]</sup>和治疗神经肌肉相关疾病<sup>[9]</sup>作用,与张氏消肿定痛膏适应症较一致。相对百分含量分析中最多的是脂质,占(24.01±4.23)%,黄酮(17.95±3.01)%,酚酸(13.37±1.79)%;具体到化合物,含量超过 1%的分别为绿原酸\*、γ-亚麻酸\*、α-亚麻酸\*、亚油酸、L-精氨酸、肉豆蔻酸、狭叶墨西哥蒿素、紫檀芪等。在列表中主要化合物来源与方剂中药材组成具有一定对应关系,如续断、当归、川芎、王不留行、红花、羌活、威灵仙中均含绿原酸<sup>[10-17]</sup>;大黄中含大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、没食子酸等<sup>[18-19]</sup>;

白芷中氧化前胡素水合物、白当归素<sup>[20-21]</sup>;红花中羟基红花黄色素 A<sup>[22]</sup>;当归、川芎中川芎内酯 A、川芎内酯 I、川芎内酯 F、川芎内酯 H、阿魏酸<sup>[23-25]</sup>;王不留行中肥皂草苷(异牡荆素-7-葡萄糖苷)、氢化阿魏酸<sup>[26-27]</sup>;骨碎补中新北美圣草苷<sup>[28]</sup>;栀子中藏红花素 1<sup>[29]</sup>;刘寄奴中含异泽兰黄素、狭叶墨西哥蒿素、异鼠李素、奇蒿黄酮等。本研究结果表明,基于 UPLC-MS/MS 技术对于复杂的中药复方物质基础研究具有简单、高效的特点;但也存在一定不足,如定性分析因仪器分辨率限制或化合物性质原因,分析准确性存在一定出入,部分同分异构体未能进行结构区分,后续研究中有待对主要化合物进行进一步验证;本文定量分析采用的是峰面积积分,但存在不同化合物在固定质谱条件下响应差异,导致峰面积归一法不能较精确反映实际含量,后续需使用标准品对主要成分进行准确定量分析。该项目研究结果为我们筛选张氏正骨膏主要化合物进行更深入研究提供了一定研究基础。

## 参考文献

- [1] 黄会保,陈辉明,彭亮.岳阳张氏正骨气血理论之以气为先[J].湖南中医药大学学报,2016,36(1):47-48.
- [2] 黄会保,张婉妮.岳阳张氏正骨流派学术思想探微[J].湖南中医杂志,2016,32(4):90-91.
- [3] 张伟,彭亮,黄会保.试论岳阳张氏正骨学术思想的“和”文化内涵[J].湖南中医杂志,2015,31(11):8-9,12.
- [4] 谢仁明,黄会保,陈辉明,等.岳阳张氏正骨术的流派传承与发展[J].中国中医骨伤科杂志,2016,24(9):72-73,77.
- [5] CHEN G Y, CHEN J Q, LIU X Y, et al. Total flavonoids of rhizoma drynariae restore the MMP/TIMP balance in models of osteoarthritis by inhibiting the activation of the NF- $\kappa$ B and PI3K/AKT pathways[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021: 1-14.
- [6] RAO P N, MAINKAR O, BANSAL N, et al. Flavonoids in the treatment of neuropathic pain[J]. Current Pain and Headache Reports, 2021, 25(7): 1-10.
- [7] ALGHAMDI S. Antinociceptive effect of the Citrus flavonoid eriocitrinon postoperative pain conditions[J]. Journal of Pain Research, 2020, 13: 805-815.
- [8] ALI S S, AHMAD W A N W, BUDIN S B, et al. Implication of dietary phenolic acids on inflammation in cardiovascular disease[J]. Reviews in Cardiovascular Medicine, 2020, 21(2): 225-240.
- [9] KOZA L A, WINTER A N, HOLSOPPLE J, et al. Protocatechuic acid extends survival improves motor function, diminishes gliosis, and sustains neuromuscular junctions in the hSOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1824.
- [10] 彭支莲,张丹,李业洪,等.正交法优选续断中绿原酸的提取工艺[J].江苏农业科学,2013,41(7):269-270.
- [11] 张丹,陶燕铎,曹伟国,等.重庆产续断中总酚酸与绿原酸的含量测定[J].中国医院药学杂志,2011,31(17):1463-1465.
- [12] 李伟霞,唐于平,尚尔鑫,等.当归、川芎和归芍药对中主要芳香酸类成分在血虚大鼠体内的代谢研究[J].中华中医药杂志,2013,28(5):1212-1218.
- [13] 朱邵晴,郭盛,钱大玮,等.基于多元功效成分的当归药材产地现代干燥加工方法研究[J].中国中药杂志,2017,42(2):264-273.
- [14] 袁德俊,吴涵,梁馨文,等.不同批次广东王不留行芦丁和绿原酸的含量比较[J].广西中医药,2019,42(4):56-59.
- [15] Bulgantuya Bumandorj, Narantsetseg Byambaakhuu, 叶日贵,等.红花的抗氧化活性成分研究[J].内蒙古大学学报(自然科学版), 2015,46(3):301-307.
- [16] 刘洋,郭慧清,杨乐,等.3种商品规格羌活体内抗炎作用差异与谱效关系研究[J].中草药,2019,50(24):6052-6058.
- [17] 许晨新.威灵仙水溶性成分及其体外透皮行为研究[D].淮阴:淮阴工学院,2020.
- [18] 闫海燕.HPLC法测定大黄提取物中芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量[J].化学与生物工程,2012,29(10):87-88,94.
- [19] 朱诗塔,李新中,雷鹏,等.不同煎煮法对大黄没食子酸含量的影响及与小肠推进作用的相关性[J].中南药学,2008,16(6):714-717.
- [20] 张平,马潇,李冬华,等.白芷饮片全国评价性抽验结果分析与多指标成分一测多评法研究[J].中草药,2019,50(14):3329-3336.
- [21] 边文海,张倩,王世祥.高效液相色谱法测定中药白芷中三种香豆素的肠吸收[C]//第二十届全国色谱学术报告会及仪器展览会论文集.西安,2015:53-54.
- [22] 罗晶,黄宇玫,曾文雪.红花中羟基红花黄色素A的提取工艺及其热稳定性研究[J].江西中医学院学报,2009,21(5):39-42.
- [23] 陈冉,尹丹丹,杨沫,等.超高效液相色谱法比较鲜川芎和川芎药材中6种成分含量[J].安徽中医药大学学报,2019,38(6):84-88.
- [24] 宋秋月,付迎波,刘江,等.当归的化学成分研究[J].中草药, 2011,42(10):1900-1904.
- [25] 熊耀坤,梁爽,洪燕龙,等.应用反相高效制备液相同时分离川芎中阿魏酸、洋川芎内酯I和H[J].中国中药杂志,2013,38(12): 1947-1950.
- [26] 鲁静,林一星,马双成.中药王不留行中刺桐碱和异肥皂草苷分离鉴定和测定[J].药物分析杂志,1998,18(3):.
- [27] 桑圣民,劳爱娜,王洪诚,等.中药王不留行化学成分的研究(II)[J].中草药,2000,31(3):169-171.
- [28] 李晓红,熊志立,虞明阳,等.基于主成分分析的骨碎补药材乙醇和环己烷提取物的高效液相色谱指纹图谱及指标成分的定量分析[J].色谱,2009,27(4):453-457.
- [29] 陈哲,赵庆生,秦雯,等.藏红花素I的分离制备及抗氧化与稳定性研究[J].食品研究与开发,2018,39(24):63-70.

(本文编辑 苏维)