

· 药剂与炮制 ·

牛膝不同炮制品中化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析

陶益, 杜映珊, 黄苏润, 李伟东, 蔡宝昌*

(南京中医药大学 中药炮制重点实验室, 南京 210023)

[摘要] **目的:**比较生牛膝、酒牛膝及盐牛膝的各项质控指标及化学成分的差异。**方法:**按照 2015 年版《中国药典》的标准,测定生牛膝、酒牛膝及盐牛膝的水分、总灰分和醇溶性浸出物含量,考察指标成分含量测定方法的线性范围、精密性、稳定性、重复性及加样回收率,建立 UPLC-Q-TOF/MS 比较牛膝不同炮制品中主要化学成分相对含量的差异。**结果:**生牛膝、酒牛膝及盐牛膝的水分、总灰分及醇溶性浸出物的含量均符合 2015 年版《中国药典》的要求,运用高分辨质谱鉴定了 10 个主要化学成分,分别为苜蓿糖苷,苜蓿糖苷异构体,牛膝甾酮 A,水龙骨素 B, β -蜕皮甾酮,牛膝甾酮,姜状三七苷 R₁,人参皂苷 Ro,牛膝皂苷 I 和竹节参皂苷 IV。牛膝经酒炙后苜蓿糖苷,苜蓿糖苷异构体,水龙骨素 B, β -蜕皮甾酮和人参皂苷 Ro 的含量显著升高,而姜状三七苷 R₁,牛膝皂苷 I 和竹节参皂苷 IV 的含量则显著减低;盐炙后苜蓿糖苷,苜蓿糖苷异构体,牛膝甾酮 A,水龙骨素 B, β -蜕皮甾酮和牛膝甾酮含量显著升高,而姜状三七苷 R₁,人参皂苷 Ro,牛膝皂苷 I 和竹节参皂苷 IV 的含量则显著降低。**结论:**牛膝炮制后甾酮类和皂苷类成分的含量显著上升,而三萜皂苷类成分的含量则显著降低。

[关键词] 牛膝; 酒制品; 盐制品; 总灰分; 三萜皂苷类; β -蜕皮甾酮; 水龙骨素 B

[中图分类号] R283;R284.1;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)12-0001-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017120001

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1358.002.html>

[网络出版时间] 2017-03-24 13:58

Analysis of Chemical Constituents in Different Processed Products of *Achyranthis Bidentatae Radix* by UPLC-Q-TOF/MS

TAO Yi, DU Ying-shan, HUANG Su-run, LI Wei-dong, CAI Bao-chang*

(*Jiangsu Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of
Chinese Medicine, Nanjing 210023, China*)

[Abstract] **Objective:** To compare the quality control indexes and chemical constituents of crude and processed products of *Achyranthis Bidentatae Radix*. **Method:** According to standard in the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia*, the quality control indexes and chemical constituents of crude and processed products of *Achyranthis Bidentatae Radix* were investigated, such as water content, total ash content and alcohol soluble extract content. UPLC-Q-TOF/MS was established to compare the contents of major constituents in crude and processed products of *Achyranthis Bidentatae Radix*. Moreover, the linearity, precision, stability, repeatability and recoveries of the approach were well validated. **Result:** The water content, total ash content and alcohol soluble extract content of crude and processed products of *Achyranthis Bidentatae Radix* all met the requirements of the 2015 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. Ten major constituents were tentatively deduced. Compared with these

[收稿日期] 20170105(022)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09304005);江苏省自然科学基金青年项目(BK20140963)

[第一作者] 陶益,博士,助理研究员,从事中药炮制学研究,Tel:025-86798281,E-mail:taoyi1985812@126.com

[通讯作者] *蔡宝昌,博士,教授,从事中药炮制学研究,Tel:025-86798281,E-mail:bccai@126.com

of the crude products, the contents of benzyl glucoside, benzyl glucoside isomer, polypodine B, β -ecdysterone and ginsenoside Ro in the wine processed products were significantly increased. The contents of zingibroside R₁, bidentoside I and chikusetsusaponin IV were significantly decreased. For the salt processed products, the contents of benzyl glucoside, benzyl glucoside isomer, achyranthesterone A, polypodine B, β -ecdysterone and inokosterone were significantly increased. The contents of zingibroside R₁, ginsenoside Ro, bidentoside I and chikusetsusaponin IV were significantly decreased. **Conclusion:** The contents of phenolic glycosides and steroidal saponins are significantly increased, while the content of triterpenoid saponins is significantly decreased, which may be degraded under heating condition.

[**Key words**] Achyranthis Bidentatae Radix; wine-processed products; salt-processed products; total ash; triterpenoid saponins; β -ecdysterone; polypodine B

牛膝的功能主治为逐瘀通经、通利关节、利尿通淋,用于治疗经闭癥瘕、胞衣不下、跌扑损伤、风湿痹痛、足痿筋挛、尿血血淋^[1]。目前,2015年版《中国药典》收录了2种规格,即牛膝和酒牛膝。历代炮制文献中还记载着牛膝制炭、药汁制、炒制、盐制、焙制等,譬如宋代《太平圣惠方》记载:“牛膝二斤捣碎,用生地黄汁五升,浸一宿曝干”,又如宋代《扁鹊心书》记载:“盐水炒”^[2]。牛膝历代炮制方法繁多,但目前尚无牛膝不同炮制品的系统性研究报道。譬如童凯等^[3]建立了川牛膝及其炮制品的HPLC指纹图谱,共提取了25个主要色谱峰,指认了3个峰,即葛根素、杯苋甾酮、大豆苷元。张振凌等^[4]采用HPLC比较盐粒拌炒和盐水炙2种不同方法对牛膝中 β -蜕皮甾酮,25R-牛膝甾酮和25S-牛膝甾酮含量的影响,为牛膝盐制工艺研究提供参考。再如吴国学等^[5]比较不同种类、不同乙醇体积分数酒炮制牛膝饮片对急性血瘀模型大鼠血液流变学的影响,发现酒制牛膝宜采用含醇量>20%的黄酒,而不宜用白酒和低酒精度的黄酒。

本实验按2015年版《中国药典》四部通则0213项下酒炙法和盐炙法要求,炮制得到酒牛膝和盐牛膝;按2015年版《中国药典》^[1]质量标准对生牛膝、酒牛膝及盐牛膝进行各项指标检测,可以为盐牛膝质量标准的制定提供借鉴,同时建立UPLC-Q-TOF/MS对生牛膝、酒牛膝及盐牛膝的主要化学成分进行分析,系统揭示该药材炮制前后化学成分的转化规律,以及成分变化与药性改变的关联性,为其不同炮制品的临床应用提供科学依据。

1 材料

1100系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), Nexera X2型超高效液相色谱仪(日本岛津公司), Q-TOF 5600-plus型质谱仪(AB Sciex公司), Ultra pure型纯水仪(上海旦鼎国际贸易有限公司),

DHG-9023A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司), R-205型旋转蒸发仪(瑞士Buchi公司)。

牛膝药材在河南温县收集,经南京中医药大学蔡宝昌教授鉴定为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* 的干燥根,批号20151228,药材标本保存于南京中医药大学标本馆; β -蜕皮甾酮对照品(四川维克奇生物技术有限公司,批号150816,纯度 $\geq 98\%$),黄酒(绍兴女儿红酿酒有限公司),盐(江苏省盐业集团有限责任公司),水为超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 饮片制备

2.1.1 牛膝 取牛膝药材,除去杂质,洗净,润透,除去残留芦头,切段,干燥,备用。

2.1.2 酒牛膝 取净牛膝段100g,加黄酒20g拌匀,闷透,置炒制锅内,将锅放置于美的电磁炉上,炒制15min(500W,90~110℃,下同)。参照2015年版《中国药典》四部0213炮制通则中酒炙法炒至表面色略深,偶见焦斑,微有酒香气,取出,晾干,干燥,得酒牛膝97.2g,备用。

2.1.3 盐牛膝 取食盐2g用10mL水溶解;取净牛膝100g,加盐水拌匀,闷透,置炒制锅内,将锅放置于美的电磁炉上炒制15min。照2015年版《中国药典》四部0213炮制通则中盐炙法炒至表面色深,多有焦斑,微有咸味,取出,放凉,得盐牛膝98.9g,备用。

2.2 项目检查 根据2015年版《中国药典》规定,采用四部中通则0832第二法烘干法对生牛膝及2种炮制品中的水分进行检查;采用通则2302总灰分测定法对生牛膝及2种炮制品的总灰分进行检查;采用通则2201醇溶性浸出物测定法项下的热浸法测定生牛膝及2种炮制品的浸出物,见表1。结果

表明生牛膝和酒牛膝的上述项目均符合 2015 年版《中国药典》的标准。盐牛膝未被 2015 年版《中国药典》收载。

表 1 牛膝不同炮制品中水分、总灰分和醇溶性浸出物含量的测定 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Water content, total ash content and alcohol soluble extract content of crude *Achyranthis Bidentatae Radix* and its processed products ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

样品	水分	总灰分	醇溶性浸出物
生牛膝	13.10 ± 0.37	8.33 ± 0.26	9.07 ± 0.10
酒牛膝	9.98 ± 1.02	4.89 ± 0.41	11.23 ± 0.48
盐牛膝	10.79 ± 0.47	5.14 ± 0.38	10.91 ± 0.32

2.3 检测条件 色谱条件为 XBridge C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 45 min, 10% ~ 100% B; 45 ~ 55 min, 100% B), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 250 nm, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。质谱条件为扫描模式负离子模式, 毛细管温度 325 °C, 离子源电压 -4.5 kV, 喷雾气压 37.9 MPa, 去簇电压设定 -60 V, 加热气压 37.9 MPa, 离子源温度 550 °C, 一级质谱扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 500, 二级质谱激活类型碰撞诱导裂解 (CID)。

2.4 供试品溶液的制备 按 2015 年版《中国药典》规定, 取本品粉末 (过三号筛) 约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加水饱和和正丁醇 30 mL, 密塞, 浸泡过夜, 超声处理 (300 W, 40 kHz) 30 min, 滤过, 用甲醇 10 mL 分数次洗涤容器及残渣, 合并滤液和洗液, 蒸干, 残渣加甲醇使溶解并转移至 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.5 对照品溶液的制备 精密称取 β-蜕皮甾酮对照品适量, 加甲醇制成 1 g · L⁻¹ 的对照品溶液。

2.6 方法学考察

2.6.1 系统适用性试验 按 2015 年版《中国药典》牛膝项下要求对色谱系统进行适用性试验, 即用规定的 β-蜕皮甾酮对照品溶液对色谱系统进行试验, 计算理论板数按 β-蜕皮甾酮峰计算 > 4 000, 符合要求。

2.6.2 线性关系 精密吸取质量浓度分别为 62.5, 125, 250, 500, 1 000 mg · L⁻¹ 的对照品工作液适量, 按 2.3 项下色谱条件测定, 以质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得回归方程 $Y = 10\ 042X + 216.42$ ($r = 0.999\ 9$), 结果表明 β-蜕皮甾酮在 0.062 5 ~ 1 g · L⁻¹ 与峰面积呈良好线性关系。

2.6.3 精密度试验 取同一对照品溶液连续进样 6 次, 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算 β-蜕皮甾酮峰面积的 RSD 4.4%。

2.6.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液适量, 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算 β-蜕皮甾酮峰面积的 RSD 1.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.6.5 重复性试验 精密称取牛膝粉末, 共 6 份, 每份 1 g, 按 2.4 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算 β-蜕皮甾酮含量的 RSD 0.8%, 表明该方法重复性良好。

2.6.6 回收率试验 采取加样回收法, 取 6 份已知指标成分含量的同一批次样品约 1 g, 精密称定, 分别按照 1:1 精密加入对照品, 按 2.4 项下方法制备供试品溶液, 按 2.3 项下色谱条件测定, 计算加样回收率 99.83%, RSD 2.3%。

2.7 样品测定 精密吸取生牛膝及其炮制品的供试品溶液各 10 μL, 按 2.3 项下色谱条件测定, 采用面积归一化法计算, 结果生牛膝、酒牛膝及盐牛膝中 β-蜕皮甾酮质量分数分别为 0.09%, 0.10% 和 0.10%, 符合 2015 年版《中国药典》规定的 β-蜕皮甾酮质量分数不得少于 0.030% 的要求。

2.8 化学成分比较 精密吸取生牛膝、酒牛膝及盐牛膝供试品溶液及 β-蜕皮甾酮对照品溶液适量, 按 2.3 项下色谱条件测定, 结果显示 β-蜕皮甾酮的出峰时间约 10.62 min, 见图 1。

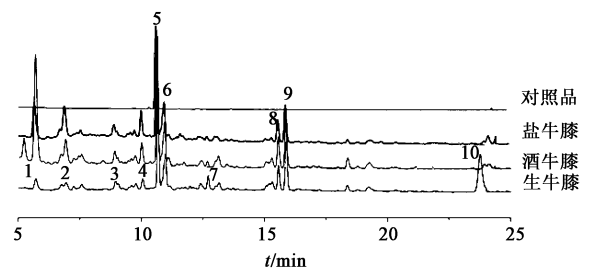


图 1 牛膝不同炮制品及 β-蜕皮甾酮对照品的 HPLC
Fig. 1 HPLC chromatograms of crude and processed products of *Achyranthis Bidentatae Radix* and reference substance of β-ecdysterone

牛膝中 10 个主要化学成分的高分辨质谱信息见表 2。峰 1 和 2 的 [M - H]⁻ 均为 *m/z* 235, 分子式均为 C₁₀H₂₀O₆, 主要二级碎片均为 *m/z* 161, 但是保留时间存在差异, 通过与对照品及文献 [6] 比对, 推断峰 1 和 2 分别为苜基葡萄糖苷及其异构体, *m/z* 161 为化合物葡萄糖基丢失苜基母核的产物。峰 3 和 4 的 [M - H]⁻ 均为 *m/z* 495, 分子式 C₂₇H₄₄O₈,

主要二级碎片均为 m/z 175, 峰 4 多 1 个碎片 m/z 157, 通过与对照品及文献 [7-8] 比对, 推断峰 3 和峰 4 分别为牛膝甾酮 A 和水龙骨素 B, m/z 175 为

化合物丢失 1 个 $C_{19}H_{28}O_4$ 的甾酮母核的产物, m/z 157 为化合物继续丢失 1 个 18 Da 的 H_2O 分子的产物。

表 2 牛膝不同炮制品化学成分的一级和二级质谱信息

Table 2 MS¹ and MS² informations of major constituents in extracts of crude *Achyranthis Bidentatae Radix* and its processed products

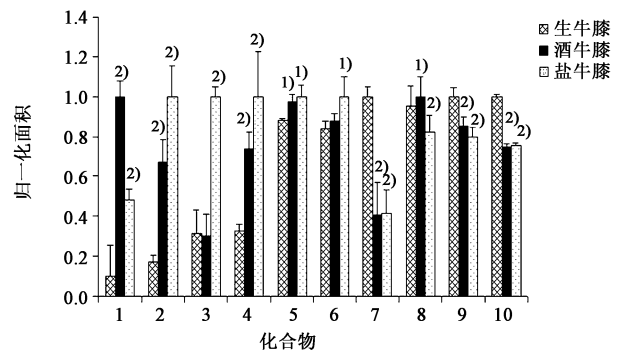
No.	MS ¹	MS ²	分子式	δ /ppm	鉴定成分
1	[M + HCOO] ⁻ 281.124 9	235.121 3, 161.043 8	C ₁₀ H ₂₀ O ₆	2.5	苜基葡萄糖苷
2	[M + HCOO] ⁻ 281.125 1	235.116 1, 161.043 3	C ₁₀ H ₂₀ O ₆	3.2	苜基葡萄糖苷异构体
3	[M + HCOO] ⁻ 541.302 4	495.296 5, 175.098 0	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	0.3	牛膝甾酮 A
4	[M + HCOO] ⁻ 541.302 6	495.299 0, 175.098 3, 157.088 7	C ₂₇ H ₄₄ O ₈	5.2	水龙骨素 B
5	[M + HCOO] ⁻ 525.207 3	479.302 9, 319.192 8, 159.103 2	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	0.4	β -蜕皮甾酮
6	[M + HCOO] ⁻ 525.308 4	479.303 3, 319.192 2, 159.102 6	C ₂₇ H ₄₄ O ₇	2.9	牛膝甾酮
7	[M - H] ⁻ 793.443 6	673.400 1, 631.388 3	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	7.1	姜状三七苷 R ₁
8	[M - H] ⁻ 955.490 7	835.451 6, 793.440 8	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	-0.1	人参皂苷 Ro
9	[M - H] ⁻ 953.443 9	909.457 5, 851.452 0, 793.444 9	C ₄₇ H ₇₀ O ₂₀	5.4	牛膝皂苷 I
10	[M - H] ⁻ 925.480 5	793.444 2, 631.389 7	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₈	0.3	竹节参皂苷 IV

峰 5 和 6 的 [M - H]⁻ 均为 m/z 479, 分子式为 C₂₇H₄₄O₇, 主要二级碎片为 m/z 319 和 m/z 159, 前者为化合物丢失 1 个 C₈H₁₅O₃ 的侧链的产物, 后者为化合物丢失甾体母核的产物, 通过与对照品及文献 [9] 比对, 推断峰 5 为 β -蜕皮甾酮, 峰 6 的保留时间比峰 5 略迟, 通过与文献 [10] 比对, 推断峰 6 为牛膝甾酮。峰 7 的 [M - H]⁻ 为 m/z 793, 分子式 C₄₂H₆₆O₁₄, 主要二级碎片为 m/z 673 和 m/z 631, 通过与对照品及文献 [11] 比对, 推断峰 7 为姜状三七苷 R₁, m/z 673 是化合物葡萄糖基发生 0,2 开裂丢失 1 个 120 Da 的 C₄H₈O₄ 碎片的产物, m/z 631 是化合物丢失 1 个 162 Da 的葡萄糖基团的产物。峰 8 的 [M - H]⁻ 为 m/z 955, 分子式 C₄₈H₇₆O₁₉, 主要二级碎片为 m/z 835 和 m/z 793, 通过与文献 [12] 比对, 推断峰 8 为人参皂苷 Ro, 前者碎片为化合物葡萄糖基发生 0,2 开裂丢失 1 个 120 Da 的 C₄H₈O₄ 碎片的产物, 后者碎片为化合物丢失 1 个 162 Da 的葡萄糖基团的产物。

峰 9 的 [M - H]⁻ 为 m/z 953, 分子式 C₄₇H₇₀O₂₀, 主要二级碎片为 m/z 909, m/z 851 和 m/z 793, 通过与文献 [13] 比对, 推断峰 9 为牛膝皂苷 I, m/z 909 为化合物失去 1 个 44 Da 的 CO₂ 中性碎片的产物, m/z 851 为化合物继续丢失 1 个 C₂H₂O₂ 的基团的产物, m/z 793 为化合物再继续丢失 1 个 C₂H₂O₂ 的基团的产物。峰 10 的 [M - H]⁻ 为 m/z 925, 分子式 C₄₇H₇₄O₁₈, 主要二级碎片为 m/z 793 和 m/z 631, 通过与文献 [14] 比对, 推断峰 10 为竹节参皂苷 IV, m/z 793 为化合物丢失 1 个 132 Da 的阿拉伯糖基的产

物, m/z 631 为化合物丢失 1 个 132 Da 的阿拉伯糖基和 1 个 162 Da 的葡萄糖基的产物。

生牛膝、酒牛膝及盐牛膝中 10 个主要化学成分质谱归一化面积比较见图 2。与生牛膝相比, 酒牛膝、盐牛膝的水分降低, 但考察含量变化时未扣除此因素。与生牛膝相比, 酒牛膝中化合物 1, 2, 4, 5, 8 含量显著上升, 分别为苜基葡萄糖苷, 苜基葡萄糖苷异构体, 水龙骨素 B, β -蜕皮甾酮和人参皂苷 Ro, 而化合物 7, 9 和 10 的含量则显著降低, 分别为姜状三七苷 R₁, 牛膝皂苷 I 和竹节参皂苷 IV。与生牛膝相比, 盐牛膝中化合物 1 ~ 6 的含量显著上升, 而化合物 7 ~ 10 的含量则显著降低。



与生品比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 2 生牛膝、酒牛膝及盐牛膝中主要化学成分的归一化峰面积比较
Fig. 2 Normalized peak areas of ten compounds in extracts of crude *Achyranthis Bidentatae Radix* and its processed products

3 讨论

牛膝为常用大宗药材品种, 临床应用广泛, 主产于河南焦作地区, 是河南主产的道地药材品种, “四

大怀药”之一^[11]。生牛膝、酒牛膝及盐牛膝的水分、总灰分及醇溶性浸出物测定结果均符合 2015 年版《中国药典》的要求。建立的 HPLC 具有良好的线性、精密度、准确度,回收率也符合要求,可以应用于牛膝不同炮制品中 β -蜕皮甾酮的质量控制。

牛膝中的化学成分主要为皂苷类。本文采用 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定的 10 个成分中,有 2 个酚酸类成分和 8 个皂苷类成分。苜基葡萄糖苷和苜基葡萄糖苷异构体为酚苷类成分,水龙骨科素 B 和 β -蜕皮甾酮为甾体皂苷,其含量的升高可能与炮制使牛膝表面脱水变得疏松,有利于酚苷类和甾体皂苷类成分溶出有关。姜状三七苷 R_1 ,牛膝皂苷 I 和竹节参皂苷 IV 均为三萜二糖苷类成分,在炮制加热条件下不稳定,容易脱去 1 个分子或 2 个分子的糖基生成三萜皂苷元,导致其含量降低。

研究表明牛膝中蜕皮甾酮有抑制破骨细胞分化、促成骨样细胞增殖活性、促进蛋白质合成的作用,而牛膝中三萜皂苷类成分具有保肝利胆、降血脂、强心等作用,能明显降低血清中甘油三酯、胆固醇和脂蛋白的含量^[15]。牛膝酒炙后能增强活血祛瘀、通经止痛的作用,盐炙后能增强补肝肾、强筋骨作用。上述甾体皂苷类成分含量的上升和三萜皂苷类成分含量的下降,可能会导致牛膝饮片药性的改变,从而产生临床疗效的差异。本文利用 UPLC-Q-TOF/MS 指认了生牛膝、酒牛膝及盐牛膝中的 10 个主要化学成分,但仅是从化学层面对牛膝不同炮制品化学成分的差异进行了剖析,并未将化学成分的变化和药性指标差异进行相关性分析,后续研究需深入探讨炮制品化学成分变化和药性改变的关联性,为牛膝不同炮制品的临床应用提供理论依据。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:72-73.

[2] 王孝涛. 历代中药炮制法汇典[M]. 南昌:江西科学技术出版社,1998:37-39.

[3] 童凯,李昭玲,闫燊,等. 川牛膝酒炙和盐炙前后 HPLC 化学指纹图谱及其主要药效成分变化研究[J]. 中草药,2016,47(4):580-584.

[4] 张振凌,胡婷婷,田双双,等. 不同盐制方法对牛膝中有效成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(3):10-13.

[5] 吴国学,张振凌,赵丽娜. 不同种类酒制牛膝对急性血瘀模型大鼠血液流变学的影响[J]. 中华中医药杂志,2011,26(3):498-501.

[6] Patra M, Awuah S G, Lippard S J. Chemical approach to

positional isomers of glucose-platinum conjugates reveals specific cancer targeting through glucose-transporter-mediated uptake *in vitro* and *in vivo* [J]. J Am Chem Soc, 2016, 138(38):12541-12551.

[7] WANG P, LI S Y, Ownby S, et al. Ecdysteroids and a sucrose phenylpropanoid ester from *Froelichia floridana* [J]. Phytochemistry, 2009, 70(3):430-436.

[8] da Rosa H S, de Camargo V B, Camargo G, et al. Ecdysteroids in *Sida tuberculata* R. E. Fries (Malvaceae): Chemical composition by LC-ESI-MS and selective anti-*Candida krusei* activity [J]. Food Chem, 2015, doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.144.

[9] Chakraborty S, Basu S. Dual inhibition of BACE1 and A β aggregation by β -ecdysone: Application of a phytoecdysteroid scaffold in Alzheimer's disease therapeutics [J]. Int J Biol Macromol, 2017, 95:281-287.

[10] WANG S S, XU H Y, YAN M. Characterization and rapid identification of chemical constituents of NaoXinTong capsules by UHPLC-linear ion trap/Orbitrap mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 111(10):104-118.

[11] WAN J Y, WANG C Z, LIU Z, et al. Determination of American ginseng saponins and their metabolites in human plasma, urine and feces samples by liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2016, doi:10.1016/j.jchromb.2016.02.008.

[12] YUAN J B, CHEN Y, LIANG J, et al. Component analysis and target cell-based neuroactivity screening of *Panax ginseng* by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2016, doi:10.1016/j.jchromb.2016.10.014.

[13] LI Y J, WEI H L, QI L W, et al. Characterization and identification of saponins in *Achyranthes bidentata* by rapid-resolution liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010, 24(20):2975-2985.

[14] LI F, CHENG T F, DONG X, et al. Global analysis of chemical constituents in Shengmai injection using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, doi:10.1016/j.jpba.2015.08.022.

[15] 高晓燕,王大为,李发美. 牛膝中蜕皮甾酮的含量测定及促成骨样细胞增殖活性 [J]. 药学报, 2000, 35(11):868-870.