

复方枫荷除痹酊中苗药五香血藤化学成分研究

骆金山¹ 姜德文² 罗雅文² 黄德颜³ 龙楚仪² 张永豪² (通讯作者)

1.贵州省江口县中医医院, 贵州 江口 554400

2.黔东南民族职业技术学院, 贵州 凯里 556000

3.凯里学院大健康学院, 贵州 凯里 556011

摘要: 目的 建立液质联用(LC-MS)方法分析复方枫荷除痹酊中苗药五香血藤的化学成分。方法 五香血藤粗粉采用超声法提取, 提取液减压浓缩得到提取物。以 Waters Acquity uplc hss T3 (100×2.1 mm, 1.8μm) 为色谱柱, 乙腈-0.1%甲酸水为流动相, 等度洗脱, 在正负离子模式下采集五香血藤的质谱数据。结果 通过对高分辨质谱提供的一级质谱和二级质谱进行解析, 结合参考文献和数据库进行确认, 本次实验从苗药五香血藤中检识出 35 个化合物, 其中木脂素类 4 个、萜类化合物 6 个、黄酮类 9 个、酚酸类化合物 2 个、苯丙素类化合物 2 个、其他化合物 12 个。结论 本研究采用液质联用技术初步对五香血藤的化学成分进行了鉴定, 为阐明五香血藤的活性物质奠定了理论基础, 提高了苗药复方“枫荷除痹酊”的质量控制。

关键词: 苗药; 五香血藤; LC-MS; 化学成分

枫荷除痹酊是一种复方制剂, 具有祛风除湿、通络止痛、活血化痰的功效, 主要用于腰腿疼痛、手足麻木、关节肿痛等症状的治疗, 它由多味药物组成, 其中苗药五香血藤作为重要成分之一。五香血藤来源于五味子科南五味子属植物长梗南五味子 *Kadsura longipedunculata Finet et Gagnep.* 的干燥根, 别名小血藤, 钻骨风等, 始载于《贵州草药》和《中药大辞典》, 具有理气止痛, 祛风通络, 活血消肿之功效^[1-3]。贵州苗族常以五香血藤煎水服用, 治疗气滞腹痛和月经不调, 也与其他药材泡酒服用, 治疗跌打损伤和风湿麻痹^[4-5]。研究表明五香血藤含有三萜、木脂素和挥发油^[6-8], 然而现有文献对五香血藤的化学成分研究仍鲜有报道。本文利用高效液相色谱和四级杆-轨道阱质谱技术对五香血藤进行系统的成分分析, 丰富该苗药的物质基础, 以期为枫荷除痹酊后续质量控制、药效机制研究提供有力支撑。

1 材料

Dionex Ultimate 3000 RSLC 高效液相色谱仪 (HPG-双三元低压梯度泵), 美国 Dionex 公司, 制造商 Thermo Fisher Scientific 公司; 四极杆-轨道阱质谱仪 (Thermo Scientific Q Exactive Focus), 制造商 Thermo Fisher Scientific 公司; 离子源 (HESI-II), 制造商 Thermo Fisher Scientific 公司; Waters Acquity uplc hss T3 (100×2.1 mm, 1.8μm) 色谱柱 (制造商美国 waters 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); UFB400 型烘

箱 (德国 Memmert 公司); 实验所用水均为娃哈哈矿泉水 (杭州娃哈哈集团有限公司), 试剂为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司) 和色谱纯 (德国默克公司)。

五香血藤购于贵州祥和堂中药饮片有限公司 (产地为贵州省麻江县), 药材批号: 20230801, 经黔东南民族职业技术学院张永豪副教授鉴定为五味子科植物长梗南五味子 *Kadsura longipedunculata Finet et Gagnep.* 的干燥根。

2 方法

2.1 色谱条件

Waters Acquity uplc hss T3 (100 mm × 2.1 mm, 1.8μm) 色谱柱, 流动相为水 (0.1%甲酸) (B) — 乙腈 (0.1%甲酸) (C); 梯度洗脱 (0~2min, 5% C; 2~42min, 5%~95% C; 42~47min, 95% C; 47~47.1min, 95%~5% C; 47.1~50min, 5% C); 柱温 40℃; 进样量 10μL; 流量 0.3mL/min。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源 (ESI), 毛细管温度 320℃, 多反应离子监测 (MRM) 进行定量分析, 采用负离子检测模式, 源喷射电压为 3.0 kV (+)/2.5 kV (-), 离子源温度 350℃, 全质谱扫描范围为 100~1500 m/z, 隔离度宽度: 1.5m/z, 雾化气为 (GS1, N2) 压力 50 psi; 辅助加热气 (GS2, N2) 为 50 psi; 气帘气 (N2) 为 35psi; 接口加热, 全程通入氮气, MRM 模式定量。

离子源参数设置: 正负离子电压为 3.0 kV (+)/2.5 kV (-), 毛细管温度为 320℃; 鞘气为 35 arb; 辅助气为 10 arb;

表 1 LC-MS 分析鉴定结果

NO.	RT (min)	Name	Formula	m/z	mzVault Best Match
1	0.866	Citric acid	C6H8O7	192.02559	88
2	1.224	Shikimic acid	C7H10O5	174.05127	93.8
3	1.291	L-Pyroglutamic acid	C5H7NO3	129.04224	61.3
4	1.93	Gallic acid	C7H6O5	170.02008	90.8
5	3.597	Epigallocatechin	C15H14O7	306.07291	95.7
6	4.836	Cianidanol	C15H14O6	290.07819	93.5
7	8.725	Procyanidin B1	C30H26O12	578.14097	91.9
8	9.969	Cryptochlorogenic acid	C16H18O9	354.09394	96.7
9	11.146	(+)-Catechin hydrate	C15H14O6	290.0781	95.8
10	11.308	Coumarin	C9H6O2	164.04689	90.1
11	11.491	2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde	C8H8O3	170.05739	90.1
12	12.31	Ailanthone	C20H24O7	376.15088	50.8
13	12.861	Rutin	C27H30O16	610.15117	81.9
14	13.37	Rutin	C27H30O16	610.15116	91.6
15	13.537	Isoquercitrin	C21H20O12	464.09384	95.1
16	14.523	Ferulaldehyde	C10H10O3	161.03571	89.4
17	14.728	Quercitrin	C21H20O11	448.09897	94.4
18	15.032	Azelaic acid	C9H16O4	188.10336	96.1
19	15.246	Anisic aldehyde	C8H8O2	136.05204	51
20	16.869	Atractyloside A	C21H36O10	494.23457	81.2
21	17.242	Sebaic acid	C10H18O4	202.11914	88.4
22	17.555	Isoalantolactone	C15H20O2	232.14567	50.1
23	18.006	Isoeugenol acetate	C12H14O3	206.09361	48.4
24	18.635	Toosendanin	C30H38O11	574.2391	71.1
25	18.921	Naringenin	C15H12O5	272.06745	91.3
26	21.299	Curcumenol	C15H22O2	234.16106	83.1
27	25.431	Gomisin J	C22H28O6	388.18736	85.5
28	25.503	Taccalonolide A	C36H46O14	702.28621	48
29	27.817	Methyl hexadecanoate	C17H34O2	316.25999	86.8
30	28.503	18 β -Glycyrrhetintic Acid	C30H46O4	224.17807	76.6
31	30.287	Schisanhenol	C23H30O6	402.20291	88
32	30.308	α -Linolenic acid	C18H30O2	278.22355	91.9
33	32.84	Schizandrin A	C24H32O6	416.21848	88.7
34	34.154	Schizandrin B	C23H28O6	400.18736	88.1
35	38.533	Glabrolide	C30H44O4	234.16132	74.4

穿透气为 0 arb; Probe Heater Temperature 为 350 ℃; S-Lens 设定值为 60。

质谱扫描参数设置: Scan mode 设定值为 Full MS-ddms2, Full MS scan range 设定值为 100 to 1500 m/z; Spectrum data type 设定值为 Profile; Resolution 设定值为 Full MS: 70,000 和 MS/MS: 17,500; AGC target 设定值为 MS/MS: 2e5; Maximum IT 设定值为 Full MS: 100 ms 和 MS/MS: 50 ms; Loop count 设定值为 3; MSX count 设定值为 1; Isolation width 设定值为 1.5 m/z; NCE (Stepped NCE) 设定值为 20, 40, 60; Minimum AGC target 设定值为 8e3; Intensity Threshold 设定值为 1.6e5; Dynamic exclusion 设定值为 5 s。

2.3 供试品溶液的配制

将五香血藤药材置于 60 ℃ 烘箱内烘干至恒重备用。精密称取五香血藤粉末 (过 3 号筛) 0.5 g, 置于 150 ml 锥形瓶中, 加入 25 ml 的 75% 甲醇, 超声 60 min, 过滤, 滤渣再加入 25 ml 的 75% 甲醇, 超声 60 min, 过滤, 合并滤液, 浓缩至 25 ml, 用 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤, 所得

溶液即为供试品溶液。

3 结果

3.1 LC/MS 分析五香血藤的总离子流

采用 LC/MS 联用技术对五香血藤提取物中的化学成分进行定性分析, 在正负离子模式的检测下, 得到 (+) ESI-MS 和 (-) ESI-MS 的质谱总离子流图 (TIC 色谱图)。对照数据、标准推断出 35 个准分子离子峰, 五香血藤在正、负离子模式下的 TIC 色谱图如图 1-2 所示。



图 1 五香血藤在正离子模式下的 TIC 色谱图

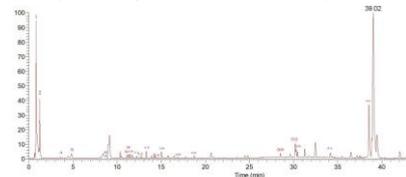


图 2 五香血藤在负离子模式下的 TIC 色谱图

3.2 五香血藤化合物检识结果

结合液质联用技术对图 1 和图 2 进行分析,通过保留时间,分子离子峰,分子式,精确分子量和 *mz*Vault Best Match 等质谱信息,结合相关文献共鉴定出个 35 化合,其中有 4 个木脂素类: Gomisin J(27), Schisanhenol(31), Schizandrin A(33), Schizandrin B(34); 6 个萜类: Atractyloside A(20), Isoalantolactone(22), Toosendanin(24), Curcumenol(26), Methyl hexadecanoate(29), Glabrolide(35); 10 个黄酮类: Epigallocatechin(5), Cianidanol(6), Procyanidin B1(7), (+)-Catechin hydrate(9), Rutin (13), Rutin (14), Isoquercitrin(15), Quercitrin(17), Anisic aldehyde(19), Naringenin(25); 2 个苯丙素类: Coumarin(10), Ferulaldehyde(16); 2 个酚类: Gallic acid(4), Cryptochlorogenic acid(8); 12 个其他化合物 Citric acid(1), Shikimic acid(2), L-Pyroglutamic acid(3), 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde(11), Ailanthone(12), Azelaic acid (18), Sebacic acid (21), Isoeugenol acetate(23), Taccalonolide A(28), Methyl hexadecanoate(29), α -Linolenic acid(32), 为阐明五香血藤的化学成分提供了基础。

通过分析五香血藤正、负离子模式下的 TIC 色谱图得出表 1 的 LC-MS 分析鉴定结果。

4 讨论与结论

本实验采用 LC/MS 联用技术对五香血藤提取物的化学成分进行系统的分析,用 ESI 离子源在正负离子模式下进行全扫描,得出所提取化合物的质谱总离子流图,且每个化合物都各有一个特定的质谱峰,其中 Citric acid(1), Shikimic acid(2), Epigallocatechin (5), Cianidanol(6), Cryptochlorogenic acid(8), Coumarin(10), Ailanthone(12), Rutin(13), Azelaic acid(18), Isoeugenol acetate(23), Schizandrin B(34), Glabrolide (35)这 12 个化合物的正、负离子峰是高度稳和的。利用质谱总离子流图中的主要峰进行对照数据、文献,最终检识结果显示,检识得到苗药五香血藤的化学成分共 35 个化合物。通过对苗药五香血藤

化学成分的研究,我们发现其中具有多种生物活性成分,为苗药五香血藤的药用价值也提供了理论依据,也能使枫荷除痹酊复方中的质量标准得到提高,为后续的研究提供坚实的科学依据基础。

参考文献:

- [1]贵州省中医研究所.贵州草药[M].贵阳:贵州人民出版社,1970.
 - [2]南京中医药大学.中药大辞典[M].上海:上海科学技术出版社,2006.
 - [3]田国,赵超,陈华国.五香血藤的薄层色谱研究[J].贵州师范大学学报(自然科学版), 2009,27(04):102-104+118.
 - [4]汪毅.中国苗族药物彩色图集[M].贵阳:贵州科技出版社,2002.
 - [5]包骏,冉楚雄.贵州苗族医药研究与开发[M].贵阳:贵州科学技术出版社,1999.
 - [6]江雪清,干正洋,晏晨等.黔产五香血藤化学成分的研究(II)[J].中国实验方剂学杂志, 2014,20(16):67-70.
 - [7]Si-Yuan Shao, Xin-Zhu Qi, Hua Sun, Shuai Li. Hepatoprotective lignans and triterpenoids from the roots of *Kadsura longipedunculata*[J]. Fitoterapia, 2020,142:104487.
 - [8]秦翱,杨占南,周欣等.黔产五香血藤挥发油的研究[J].华西药学杂志,2009,24(02):147-149.
- 作者简介:** 骆金山(1987—),男,学士,主管中药师、主管西药师、执业药师,研究方向:临床中药应用研究。E-mail:276110009@qq.com。通讯作者:张永豪(1987—),男,硕士,副教授,研究方向:中药民族药(苗侗瑶药)基础研究及其应用 E-mail:501209935@qq.com。
- 基金项目:** 贵州省科技支撑计划项目(合同编号:黔科合支撑[2022]一般289号);贵州省教育厅自然科学研究项目(合同编号:黔教技[2023]099号)。