

石菖蒲中生物碱成分的分离与鉴定^Δ

胡小玲^{1*},唐 怡¹,袁金斌^{2#}(1.江西省中西医结合医院药剂科,南昌 330003;2.江西中医药大学药学院,南昌 330000)

中图分类号 R917;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0642-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.13

摘要 目的:分离并鉴定石菖蒲的生物碱成分,为进一步研究其药理活性奠定基础。方法:利用阳离子交换树脂分离石菖蒲的生物碱成分;采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS)法进行鉴定,色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse Plus-C₁₈,流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为0.3 mL/min,柱温为30 ℃,进样量为1 μL;离子源为电喷雾离子源,采用正离子模式检测,并结合Peakview 1.2等软件对生物碱成分进行分析。结果:石菖蒲中共检测到86个成分,并鉴定出5个生物碱成分,分别为菖蒲碱甲、*N*-反式阿魏酰酪胺、*N*-月桂基二乙醇胺、4-羟双氢鞘氨醇和5-丁基尿苷。结论:该试验结果可为石菖蒲生物碱成分的药理活性研究奠定基础。

关键词 石菖蒲;生物碱;超高效液相色谱串联质谱法;分离;鉴定

Isolation and Identification the Compositions of Alkaloids in *Acorus tatarinowii*

HU Xiaoling¹, TANG Yi¹, YUAN Jinbin² (1.Dept. of Pharmacy, Jiangxi Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine, Nanchang 330003, China; 2.College of Pharmacy, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To isolate and identify the compositions of alkaloids in *Acorus tatarinowii*, and to lay the foundation for further study of its pharmacological activity. METHODS: The compositions of alkaloids from *A. tatarinowii* was separated by cation exchange resin. UPLC-MS method was used to identify the alkaloids. The separation was performed on a Agilent Zorbax Eclipse Plus-C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 1 μL. ESI ion source was used to detect the fragments, the ion mode scan was positive. Peakview 1.2 and other softwares were used to analyze the compositions of alkaloids. RESULTS: 86 compositions were separated and 5 alkaloids were identified, such as tatarine A, *N*-trans-feruloyltyramine, *N*-lauryldiethanolamine, phytosphingosine and 5-butyluridine. CONCLUSIONS: The results of the study lay a foundation for the study of pharmacological activity of alkaloids from *A. tatarinowii*.

KEYWORDS *Acorus tatarinowii*; Alkaloids; UPLC-MS; Isolation; Identification

石菖蒲为天南星科植物石菖蒲(*Acorus tatarinowii* Schott)的干燥根茎,具有化湿开胃、开窍豁痰、醒神益智的功效^[1]。临床上,石菖蒲主要用于治疗健忘、中风失语、癫痫、老年痴呆症等^[2]。相关研究发现,在治疗老年痴呆症的方剂中,石菖蒲的使用频次最高^[3]。

目前,石菖蒲的主要研究侧重于其挥发油成分^[4-6],其非挥发性成分的报道却不多。石菖蒲的化学成分多样,除了挥发油以外,还有黄酮、醌类、生物碱类、三萜皂苷等^[7],均具有一定的药理活性。比如,劳安娜等^[8]研究发现石菖蒲中的生物碱成分菖蒲碱乙和菖蒲碱丙可作为预防、改善中老年记忆障碍及老年性痴呆。本文旨在通过阳离子交换树脂,针对性地分离出石菖蒲的生物碱

成分,再通过超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS)技术,对其进行成分分析,以期为进一步研究石菖蒲的药理活性奠定基础。

1 材料

1.1 仪器与软件

Triple TOF 5600 UPLC-MS仪(美国AB Sciex公司);Agilent Zorbax Eclipse Plus-C₁₈色谱柱(美国Agilent公司);BT224S万分之一电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);001×7阳离子交换树脂(西安蓝晓科技有限公司)。

Peakview 1.2 软件(<https://sciex.com.cn/software-support/softwaredownloads>)、Chemical book 软件(<https://www.chemicalbook.com/>)均由美国AB Sciex 公司开发。

1.2 药品与试剂

石菖蒲药材为2018年8月采集于南昌梅岭,经江西中医药大学袁金斌教授鉴定为*Acorus tatarinowii* Schott 的干燥根茎;磷酸盐缓冲液(PBS)粉末(北京中山金桥生

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260605)

* 副主任药师。研究方向:中药质量分析。E-mail:934812132@qq.com

通信作者:教授。研究方向:中药质量分析。E-mail:mmnc2013@163.com

物技术有限公司,批号:20180121);乙腈、甲酸、氢氧化钠、盐酸均为分析纯;水为娃哈哈纯净水。

2 方法

2.1 阳离子交换树脂的预处理

加2倍树脂体积的纯净水浸泡001×7阳离子交换树脂24 h,纯净水洗净后,装入层析柱中。用3~4倍体积的4%氢氧化钠冲柱,浸泡2 h后,用纯净水洗至中性;再用3~4倍体积的5%盐酸冲柱,浸泡2 h后,纯净水洗至中性,备用。

2.2 石菖蒲生物碱的提取

参考文献[8]中石菖蒲生物碱的提取方法,将100 g粉碎的石菖蒲,过六号筛(100目),置于超声提取器中,加入3 000 mL的蒸馏水,浸泡2 h后,50 ℃超声(功率:200 W,频率:30 kHz)提取2 h,抽滤,得滤液;将滤液于50 ℃减压浓缩后得石菖蒲粗提物。加入粗提物体积5倍的纯净水搅拌成粗提物混悬液,然后通过001×7阳离子交换树脂,静态吸附4 h;再用乙醇洗至洗脱液无色,用4%的氢氧化钠乙醇溶液对阳离子交换树脂进行解析,得解析液;5%盐酸调解析液pH至7,静置2 h后,15 000 r/min(离心半径为5 cm)离心15 min,取上清液50 ℃减压浓缩,即得石菖蒲生物碱浸膏,得率为5.49%。

2.3 色谱及质谱条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse Plus-C₁₈(100 μm×2.1 μm,1.8 μm);流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0.1~5 min,5%→20% B;5~14 min,20%→23% B;14~25 min,23%→46% B;25~35 min,46%→72% B;35~45 min,72%→80% B;45~50 min,80%→20% B);流速为0.3 mL/min;柱温为30 ℃;进样量为1 μL。

2.3.2 MS条件 离子源为电喷雾离子源(ESI),雾化气为60 Psi,辅助气为60 Psi,喷雾电压为5 500 V,离子源温度为600 ℃;在正离子模式下采集数据,数据采集范围为一级质荷比(*m/z*)100~1 000,二级*m/z* 50~1 000;采用基于信息关联数据采集(IDA)的一级和二级MS解析方法采集数据,碰撞能量为25 V。

2.4 石菖蒲生物碱成分分析

2.4.1 供试品溶液的制备 取“2.2”项下的石菖蒲生物碱浸膏1 mg,PBS溶解,0.22 μm微孔滤膜过滤,得质量浓度为5 mg/mL的供试品溶液。

2.4.2 成分分析 取“2.4.1”项下供试品溶液,按“2.3”项下条件进样测定,记录石菖蒲生物碱成分的总离子流图及部分成分的MS数据。

2.5 石菖蒲生物碱部分成分的结构鉴定

通过查阅石菖蒲的相关文献^[2-16],建立石菖蒲化学成分数据库,内容包括化学式、名称、二级碎片、理论相对分子质量和化学结构,然后采用Peakview 1.2软件对

石菖蒲的一级和二级MS数据进行处理。一级MS分析是依据测定相对分子质量与理论精确相对分子质量的偏差小于5.0×10⁻⁶、保留时间误差范围小于5.0%和同位素不匹配度小于10.0%的原则^[9],并结合建立石菖蒲化学成分数据库,确定色谱峰对应的化合物的分子式;二级MS分析是在已建立的石菖蒲化学成分数据库中检索匹配的化合物,并运用Chemical book软件查出其对应结构;然后将其结构与二级碎片信息比对,判断断裂的基团是否为其结构中的官能团;最后结合一级MS信息和二级MS的碎片信息,从而确定该化合物。

3 结果

3.1 石菖蒲生物碱成分分析结果

石菖蒲生物碱成分的总离子流图见图1。笔者对其主要的5个峰进行了鉴定,其MS数据信息见表1。

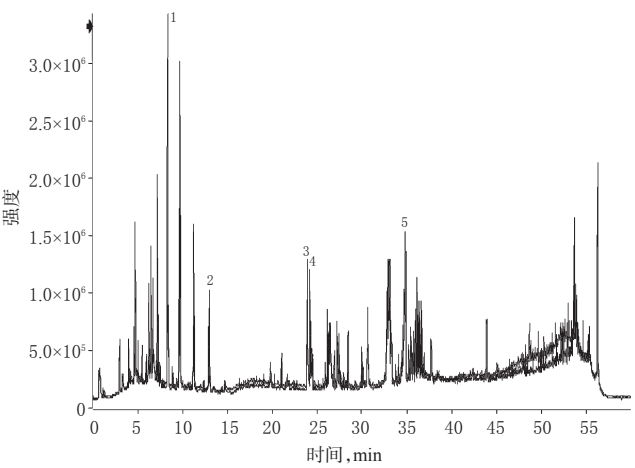


图1 石菖蒲生物碱成分的总离子流图
Fig 1 The total ion chromatograms of alkaloids of *A. tatarinowii*

表1 石菖蒲生物碱中部分成分的MS数据
Tab 1 MS data of some componets of alkaloids of *A. tatarinowii*

峰号	保留时间, min	加和离子	理论相对分子质量	实测相对分子质量	误差, ppm	碎片, Da
1	8.49	[M+H] ⁺	280.096 8	280.096 8	0.1	265.073 5, 218.065 8, 200.048 9
2	13.30	[M+H] ⁺	314.138 7	314.138 5	-0.5	194.064 6, 177.054 5, 145.027 7
3	23.98	[M+H] ⁺	274.274 1	274.274 2	0.3	256.263 2, 230.247 6, 212.236 4
4	24.29	[M+H] ⁺	318.300 3	318.300 4	0.5	300.289 1, 256.262 7
5	34.86	[M+H] ⁺	301.139 4	301.140 9	4.8	186.078 5, 171.004 3, 133.008 3

笔者前期查阅相关文献共找到14种石菖蒲生物碱成分,且经过分析,只有表1中的5个成分可通过后续的鉴定得以确定,故并未将全部成分的MS信息列出。

3.2 石菖蒲生物碱部分成分的结构鉴定

化合物1(峰1),保留时间为8.49 min,准分子离子峰[M+H]⁺ *m/z* 280.096 4,经Peakview 1.2软件推测其化学式可能为C₁₇H₁₃NO₃(误差为0.1 ppm);经MS裂解分析可知,[M+H]⁺ *m/z* 280.096 4先丢失2个甲氧基(—OCH₃)生成碎片离子 *m/z* 218.059 6;再丢失1个H₂O生成碎片

离子 m/z 200.048 9。结合相关文献[7]可推断化合物 1 为菖蒲碱甲。化合物 1 的 MS 裂解途径见图 2。

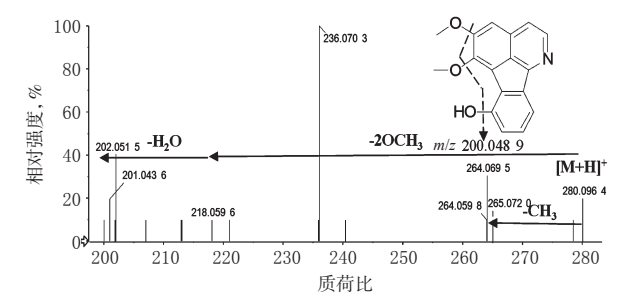


图 2 化合物 1 的 MS 裂解途径

Fig 2 MS fragmentation pathway of compound 1

化合物 2(峰 2), 保留时间为 13.30 min, 准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 314.133 4, 经 Peakview 1.2 软件推测其化学式可能为 $C_{18}H_{19}NO_4$ (误差为 0.5 ppm); 经 MS 裂解分析可知, $[M+H]^+$ m/z 314.133 4 丢失 1 个酰胺基部分而生成碎片离子 m/z 177.052 5; 再丢失 1 个 $-OCH_3$ 生成碎片离子 m/z 145.027 2。结合相关文献[10]可推断化合物 2 为 *N*-反式阿魏酰酪胺。化合物 2 的 MS 裂解途径见图 3。

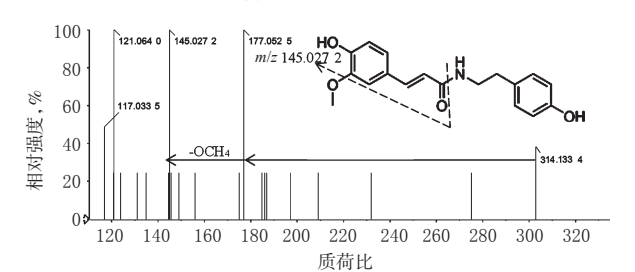


图 3 化合物 2 的 MS 裂解途径

Fig 3 MS fragmentation pathway of compound 2

化合物 3(峰 3), 保留时间为 23.98 min, 准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 274.274 4, 经 Peakview 1.2 软件推测其化学式可能为 $C_{16}H_{35}NO_2$ (误差为 0.3 ppm); 经 MS 裂解分析可知, $[M+H]^+$ m/z 274.274 2 丢失 1 个 H_2O 生成碎片离子 m/z 256.263 2; 再丢失 1 个 $-C_2H_2$ 生成碎片离子 m/z 230.247 6, 然后脱去 1 个 H_2O 而生成碎片离子 m/z 212.236 4。结合上述信息, 推断化合物 3 为 *N*-月桂基二乙醇胺(*N*-lauryldiethanolamine)。化合物 3 的 MS 裂解途径见图 4。

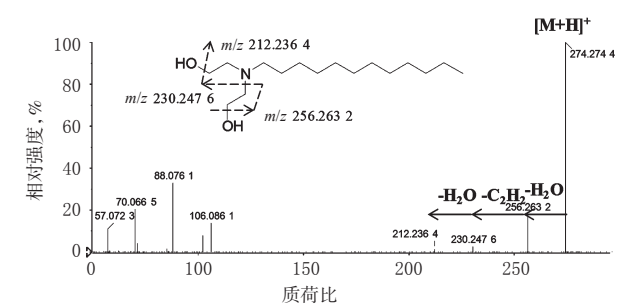


图 4 化合物 3 的 MS 裂解途径

Fig 4 MS fragmentation pathway of compound 3

化合物 4(峰 4), 保留时间为 24.29 min, 准分子离子

峰 $[M+H]^+$ m/z 318.298 9, 经 Peakview 1.2 软件推测其化学式可能为 $C_{18}H_{39}NO_5$ (误差为 0.5 ppm); 经 MS 裂解分析可知, $[M+H]^+$ m/z 318.298 9 丢失 1 个 H_2O 生成碎片离子 m/z 300.289 1, 再丢失 1 个丙基($-C_3H_5$)生成碎片离子 m/z 256.262 7。结合上述信息, 可推断化合物 4 为 4-羟双氢鞘氨醇(Phytospingosine)。化合物 4 的 MS 裂解途径见图 5。

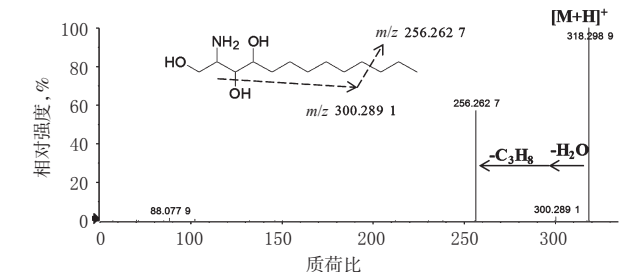


图 5 化合物 4 的 MS 裂解途径

Fig 5 MS fragmentation pathway of compound 4

化合物 5(峰 5), 保留时间为 34.86 min, 准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 301.139 2, 经 Peakview 1.2 软件推测其化学式可能为 $C_{13}H_{20}N_2O_6$ (误差为 4.8 ppm); 经 MS 裂解分析可知, $[M+H]^+$ m/z 301.139 2 丢失 1 个 $-C_5H_{12}N_2O$ 生成碎片离子 m/z 186.924 5; 再丢失 1 个一个甲基($-CH_3$)生成碎片离子 m/z 171.004 3。结合上述信息, 可推断化合物 5 为 5-丁基尿苷(5-butyluridine)。化合物 5 的 MS 裂解途径见图 6。

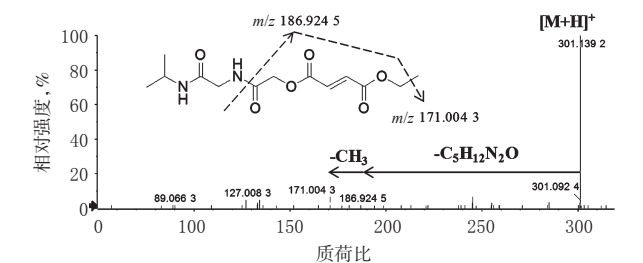


图 6 化合物 5 的 MS 裂解途径

Fig 6 MS fragmentation pathway of compound 5

4 讨论

本试验前期分别采用了正模式与负模式对石菖蒲进行分析, 发现正模式下响应更高, MS 信息更加明晰且背景少, 有利于确认分子离子或准分子离子, 从而可鉴定一些低含量的石菖蒲提取物, 故后续选用正离子模式进行试验。此外, 笔者还考察了 15、25、35 V 这 3 个碰撞能量对质谱的影响, 发现在 15 V 下, 一些分子量较大的母离子基本没有打碎; 在 35 V 下, 所得碎片离子中干扰离子太多, 不易鉴别化学成分, 故选用了 25 V 的碰撞能量。

本试验共鉴定出石菖蒲中 5 个生物碱成分, 经查阅文献[7, 10]可知, 化合物 1 和化合物 2 分别为菖蒲碱甲、*N*-反式阿魏酰酪胺。*N*-月桂基二乙醇胺、4-羟双氢鞘氨醇和 5-丁基尿苷为首次鉴定出的石菖蒲中的新化合物。

肉苁蓉治疗骨质疏松作用机制的网络药理学研究^Δ

王延涛^{1*}, 杨智华², 陈 怡³, 麦喆铎², 黄嘉华³, 孙治中³, 周 驰⁴, 李伟宽¹(1.广州市番禺区中医院综合科, 广州 511400; 2.广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510405; 3.广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 4.广州中医药大学第一附属医院保髋病区, 广州 510115)

中图分类号 R932;R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0645-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.14

摘 要 目的:采用网络药理学方法研究肉苁蓉治疗骨质疏松的作用机制。方法:通过检索中药系统药理学分析平台(TCMSP)获取肉苁蓉的活性成分,采用反向分子对接服务器 DRAR-CPI 及相关数据库 GeneCards、OMIM 筛选肉苁蓉活性成分治疗骨质疏松的作用靶标;采用软件 Cytoscape 构建肉苁蓉的“成分-靶标”网络,结合数据库 String 和 Cytoscape 绘制靶标间相互作用关系;通过服务器 Systems Dock WebSite 将靶标与活性成分进行分子对接评估二者间的结合活性以进行验证;最后再利用数据库 DAVID 对靶标基因进行基因本体分类富集分析与京都基因与基因组百科全书通路富集分析。结果:从肉苁蓉中筛选出的活性成分有 13 个,主要为毛蕊花糖苷、益母草碱、京尼平酸等;活性成分作用的潜在靶标有 43 个,主要有成骨分化特异性转录分子 2(RUNX2)、血管内皮生长因子(VEGF)、白细胞介素 6(IL-6)、骨生长蛋白因子(BGP)、肿瘤坏死因子(TNF)等;靶标作用涉及的信号通路有多条,主要为 WNT(Wingless/Integrated)、VEGF、TNF 等。结论:本研究初步探讨并验证了肉苁蓉治疗骨质疏松的主要靶标和通路,为后续进一步研究其作用机制奠定了基础。
关键词 肉苁蓉;骨质疏松;网络药理学;活性成分;靶标;分子对接;信号通路

综上所述,本研究共鉴定了石菖蒲中 5 个生物碱成分,即菖蒲碱甲、*N*-反式阿魏酰酪胺、*N*-月桂基二乙醇胺、4-羟双氢鞘氨醇和 5-丁基尿苷,可为石菖蒲生物碱成分的进一步研究奠定基础。

参考文献

[1] 黄月纯,魏刚.石菖蒲挥发油的气相色谱指纹图谱研究[J].中国药房,2005,16(21):1676-1677.
[2] 吴启端,吴清和.石菖蒲的药理研究进展[J].中药新药与临床药理,2006,17(6):477-480.
[3] 胡增晓,黄晏,刘港,等.中药复方治疗老年痴呆的用药规律分析[J].中药药理与临床,2012,28(5):252-256.
[4] 杨洁,陶汝俊,王垠芸,等.石菖蒲化学成分及其对中枢神经系统作用研究进展[J].药物资讯,2017,6(5):133-141.
[5] 卢成淑,冯宁,南国,等.石菖蒲及其活性成分防治阿尔茨海默病的研究进展[J].中草药,2016,47(7):1236-1242.
[6] 倪刚.石菖蒲、华桑化学成分及生物活性研究[D].北京:北京协和医学院,2010.
[7] 陈锋.菖蒲属植物的化学成分及药理作用[J].世界科学技术(中医药现代化),2011,13(6):1013-1017.
[8] 劳安娜,唐希灿,王洪诚,等.石菖蒲中菖蒲碱及它们的用

途:中国,ZL97106786.4[P].2013-02-19.
[9] YUAN J, 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 Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016.DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.10.014
[10] 吴春华,陈玥,李晓霞,等.石菖蒲化学成分的分离与结构鉴定[J].中国药物化学杂志,2014,24(3):209-213.
[11] KUMAR V, KUMAR S, SINGH B, et al. Quantitative and structural analysis of amides and lignans in zanthoxylum armatum by UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS[J]. *J Pharmaceut Biomed Anal*, 2014, 94(3):23-29.
[12] 杨颖达.3种植物的化学成分和生物活性研究[D].武汉:华中科技大学,2014.
[13] 赖显英,梁红,赵玉英.石菖蒲化学成分和药理作用研究[J].中国中药杂志,2002,27(3):161-166.
[14] 唐怡,任刚,黄群,等.石菖蒲挥发油化学成分的 GC-MS [J].江西中医药,2014,45(12):60-62.
[15] 唐怡,李健康,刘校妃,等.石菖蒲鲜、干药材及其不同部位中挥发油、 α -细辛醚和 β -细辛醚的含量比较[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(5):32-35.
[16] 吴启端,方永奇,李翎,等.不同剂量石菖蒲对中枢神经系统影响的实验研究[J].中国药房,2005,16(9):656-658.

^Δ 基金项目:广东省自然科学基金资助项目(No.2015A030310203); 广东省高水平大学建设项目(No.A1-AFD018171Z11057);广州中医药大学第一附属医院人才培优项目(No.2015QN01)
* 副主任中医师,硕士。研究方向:骨关节及脊柱退行性疾病。
电话:020-85926324。E-mail:515301800@qq.com

(收稿日期:2018-09-09 修回日期:2018-11-22)
(编辑:唐晓莲)