

内蒙古3种野生藜芦化学成分定性定量分析^Δ

韩文杰*,张屏,常福厚,梁雨娜,赵红梅,包保全[#](内蒙古医科大学药学院,呼和浩特 010110)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)08-0937-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.08.06



摘要 目的 对内蒙古3种野生藜芦(藜芦、毛穗藜芦、兴安藜芦)的化学成分进行定性和定量分析。方法 运用高效液相色谱串联四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术,通过查阅SciFinder、ChemSpider数据库和相关文献以及与对照品比对,鉴别藜芦、毛穗藜芦、兴安藜芦的化学成分。运用高效液相色谱法测定3种野生藜芦中虎杖苷、氧化白藜芦醇和白藜芦醇的含量。结果 共鉴定出31个化合物,包括13个芪类、11个黄酮类、4个有机酸类、2个糖苷类、1个巴西苏木素类化合物;绝大多数化合物为其中2种或3种野生藜芦所共有,仅有2个黄酮类化合物山柰酚和木犀草素为兴安藜芦所特有。3种野生藜芦中虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇的总含量为6.618~11.292 mg/g,总含量由高到低依次为藜芦、毛穗藜芦、兴安藜芦;虎杖苷、白藜芦醇含量最高的是毛穗藜芦,氧化白藜芦醇含量最高的是藜芦。结论 3种野生藜芦中大部分成分相似,仅山柰酚和木犀草素为兴安藜芦所特有。虎杖苷、氧化白藜芦醇和白藜芦醇的含量在3种野生藜芦中存在较大差异。

关键词 藜芦;兴安藜芦;毛穗藜芦;芪类;高效液相色谱串联四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术;定性分析;定量分析

Qualitative and quantitative analysis of chemical compounds in 3 species of wild *Veratrum* from Inner Mongolia

HAN Wenjie, ZHANG Ping, CHANG Fuhou, LIANG Yuna, ZHAO Hongmei, BAO Baoquan (College of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To conduct qualitative and quantitative analysis for the chemical compounds in 3 species of wild *Veratrum* (*V. nigrum*, *V. maackii*, *V. dahuricum*) from Inner Mongolia. **METHODS** HPLC-Q-Exactive-MS/MS technology was used to identify the chemical components of *V. nigrum*, *V. maackii* and *V. dahuricum* by consulting SciFinder, ChemSpider database and related literatures and comparing with the reference substance. The contents of polydatin, oxyresveratrol and resveratrol in 3 species of wild *Veratrum* were determined by HPLC. **RESULTS** A total of 31 compounds were identified, including 13 stilbenes, 11 flavonoids, 4 organic acids, 2 glycosides, 1 brasilin. Most of the compounds were shared by 2 or 3 species of wild *Veratrum*, only 2 flavonoids kaempferol and luteolin were owned by *V. dahuricum*. The total contents of polydatin, oxyresveratrol and resveratrol in 3 species of wild *Veratrum* were in the range of 6.618-11.292 mg/g, and the total contents of them in *V. nigrum* were the highest, followed by *V. maackii* and *V. dahuricum*. The contents of polydatin and resveratrol in *V. maackii* were the highest, and the content of oxyresveratrol in *V. nigrum* was highest. **CONCLUSIONS** Most of the components of 3 species of wild *Veratrum* are similar, only kaempferol and luteolin are unique to *V. dahuricum*. The contents of polydatin, oxyresveratrol and resveratrol are significantly different among 3 species of wild *Veratrum*.

KEYWORDS *Veratrum nigrum*; *Veratrum maackii*; *Veratrum dahuricum*; stilbene; HPLC-Q-Exactive-MS/MS; qualitative analysis; quantitative analysis

蒙药“阿格希日嘎”,中文名藜芦,是藜芦属野生植物藜芦 *Veratrum nigrum* Linnaeus 的干燥根及根茎。藜芦为蒙医“寒热症总泻药”,用于蒙医八大疗法中的泻下法,具有重要的地位和药用价值^[1]。藜芦的同属不同种植物毛穗藜芦 *V. maackii* Regel 和兴安藜芦 *V. dahuricum* (Turcz.) Loes. f. 与其交叉分布,3种野生藜芦形态相近,易出现混淆使用的现象,同时内蒙古部分地区也存在将

毛穗藜芦和兴安藜芦作为藜芦替代品入药的情况^[2-3]。藜芦属植物的主要成分有芪类、生物碱类、黄酮类等。其中,芪类是具有二苯乙烯基本母核的一类成分,因存在较多的酚羟基而具有很强的抗氧化活性,为藜芦的主要活性成分之一,典型代表成分为白藜芦醇及其类似物^[4];此外,该类成分还具有抗炎、抗肿瘤、激活巨噬细胞、抗血小板聚集、抗过敏、消除自由基等作用^[5-8]。本文以藜芦属植物特征性芪类成分为主要研究对象,利用高效液相色谱串联四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(high-performance liquid chromatography tandem quadrupole-electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry, HPLC-Q-Exactive-MS/MS)技术,对内蒙古3种

Δ 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(No.81760-9111)

* 硕士研究生。研究方向:中蒙药药理学。E-mail:2670440491@qq.com

通信作者:教授,硕士生导师,博士。研究方向:天然药化、蒙药物质基础和资源可持续利用。E-mail:baobaoquan123@yeah.net

野生藜芦(藜芦、毛穗藜芦、兴安藜芦)进行化学成分鉴定,并采用HPLC法对代表性芪类成分(虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇)进行含量测定,以明确3种野生藜芦中芪类成分的差异,为三者的鉴别和质量评价提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括UltiMate 3000型HPLC系统(美国Dionex公司),Q-Exactive型高分辨质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Nexera液相色谱仪及配备的LC-20AD-XR型四元梯度泵、SIL-20A型自动进样器、CTO-10AS型柱温箱、SPD-M20A型紫外检测器(日本Shimadzu公司),AB135-S型十万分之一分析天平(瑞士Mettler Toledo公司),HH-4型数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司),WR-100型微型粉碎机(鹤壁市天冠仪器仪表有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

虎杖苷对照品(批号T15A10F85743,纯度 $\geq 98\%$)、氧化白藜芦醇对照品(批号R28N6S6681,纯度 $\geq 98\%$)、白藜芦醇对照品(批号R26J10S94040,纯度 $\geq 98\%$)均购自上海源叶生物科技有限公司;桑皮苷A对照品、3'-甲氧基白藜芦醇对照品、白藜芦醇-4,3'-O- β -D-二葡萄糖苷对照品、白藜芦醇-4'-O- β -D-葡萄糖苷对照品、氧化白藜芦醇-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷对照品均由本课题组分离自制,纯度均大于98%^[9];乙腈(色谱纯)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;甲酸、氨水、三氯甲烷、甲醇均购自天津市津东天正化学试剂厂,均为分析纯;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为超纯水。

藜芦、毛穗藜芦、兴安藜芦均为本课题组野外采集,经内蒙古医科大学包保全教授鉴定,分别为藜芦(*V. nigrum* Linnaeus)、毛穗藜芦*V. maackii* Regel、兴安藜芦*V. dahuricum* (Turcz.) Loes. f.,其具体来源信息见表1。所有植物标本均存放于内蒙古医科大学药学院。藜芦药材由本课题组自制:取上述3种野生藜芦属植物的根及根茎,去除泥沙,于阴凉处干燥,即得。

表1 3种野生藜芦样品的来源信息

编号	样品	品种鉴定	采集地	采集日期
A1	藜芦	<i>V. nigrum</i> Linnaeus	内蒙古锡林郭勒盟桑根达来镇乌日和沁敖包	2018-07-19
A2	藜芦	<i>V. nigrum</i> Linnaeus	内蒙古锡林郭勒盟西乌旗古日斯台额木图山	2018-07-21
A3	藜芦	<i>V. nigrum</i> Linnaeus	内蒙古锡林郭勒盟东乌旗萨麦苏木	2018-07-22
B1	兴安藜芦	<i>V. dahuricum</i> (Turcz.) Loes. f.	内蒙古呼伦贝尔鄂伦春自治旗	2018-08-09
B2	兴安藜芦	<i>V. dahuricum</i> (Turcz.) Loes. f.	内蒙古呼伦贝尔额尔古纳市	2018-08-10
B3	兴安藜芦	<i>V. dahuricum</i> (Turcz.) Loes. f.	内蒙古呼伦贝尔额尔古纳市	2018-08-05
C1	毛穗藜芦	<i>V. maackii</i> Regel	内蒙古呼伦贝尔鄂伦春自治旗	2018-08-09
C2	毛穗藜芦	<i>V. maackii</i> Regel	内蒙古呼伦贝尔额尔古纳市	2018-08-10
C3	毛穗藜芦	<i>V. maackii</i> Regel	内蒙古呼伦贝尔额尔古纳市	2018-08-10

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 取样品粉末(过四号筛)约0.1 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加入50%乙醇25 mL,称定质量,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理30 min,放冷,再称定质量,用50%乙醇补足减失的质量,摇匀,取上清液,用0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

2.1.2 对照品溶液 取“1.2”项下各对照品适量,精密称定,置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容,制成所需质量浓度的混合对照品溶液,用0.45 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱与质谱条件

2.2.1 色谱条件 以Apollo C₁₈(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m)为色谱柱,以乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(0~5 min,5% A \rightarrow 10% A;5~20 min,10% A \rightarrow 15% A;20~40 min,15% A \rightarrow 40% A;40~55 min,40% A \rightarrow 95% A);流速为1.0 mL/min;检测波长为306 nm;柱温为35 $^{\circ}$ C;进样量为10 μ L。

2.2.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源,以负离子模式扫描;辅助气体积流量为30 L/min,辅助气温度为200 $^{\circ}$ C;喷雾电压为3.50 kV;离子传输管温度为300 $^{\circ}$ C;碰撞能量为45 eV;检测方式为一级母离子全扫描和数据依赖的二级子离子扫描(full MS/dd-MS²),full MS分辨率为70 000,dd-MS²分辨率为17 500,扫描范围为m/z 110~1 000。

2.3 定性分析

2.3.1 数据处理 通过查阅SciFinder、ChemSpider数据库和相关文献,本课题组收集整理了藜芦属植物中各类化学成分的结构鉴定信息,包括分子式、相对分子量、结构式和一级、多级质谱信息,含芪类化合物31个、黄酮类化合物42个、酚酸类化合物13个,旨在为化合物的质谱鉴定提供参考。运用Xcalibur 3.0软件进行质谱数据处理,通过高分辨质谱计算分子式并推测可能的裂解规律,质谱误差范围 $\delta \leq 5 \times 10^{-6}$ ppm。根据分子量和碎片离子,结合对照品相关信息、相同类型化合物的裂解规律^[10]、文献报道的质谱数据^[11-30]进行结构鉴定。

2.3.2 分析与鉴定 取藜芦、毛穗藜芦、兴安藜芦供试品溶液适量,按“2.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录总离子流图(图1)。共鉴定出31个化合物,其中包括13个芪类化合物(化合物1~13)、11个黄酮类化合物(化合物15~23、30~31)、4个有机酸类化合物(化合物14、25、27、28)、2个糖苷类化合物(化合物24、26)、1个巴西苏木素类化合物(化合物29)。绝大多数化合物为其中2种或3种野生藜芦所共有,仅2个黄酮类化合物山柰酚和木犀草素为兴安藜芦所特有。鉴定结果见表2。

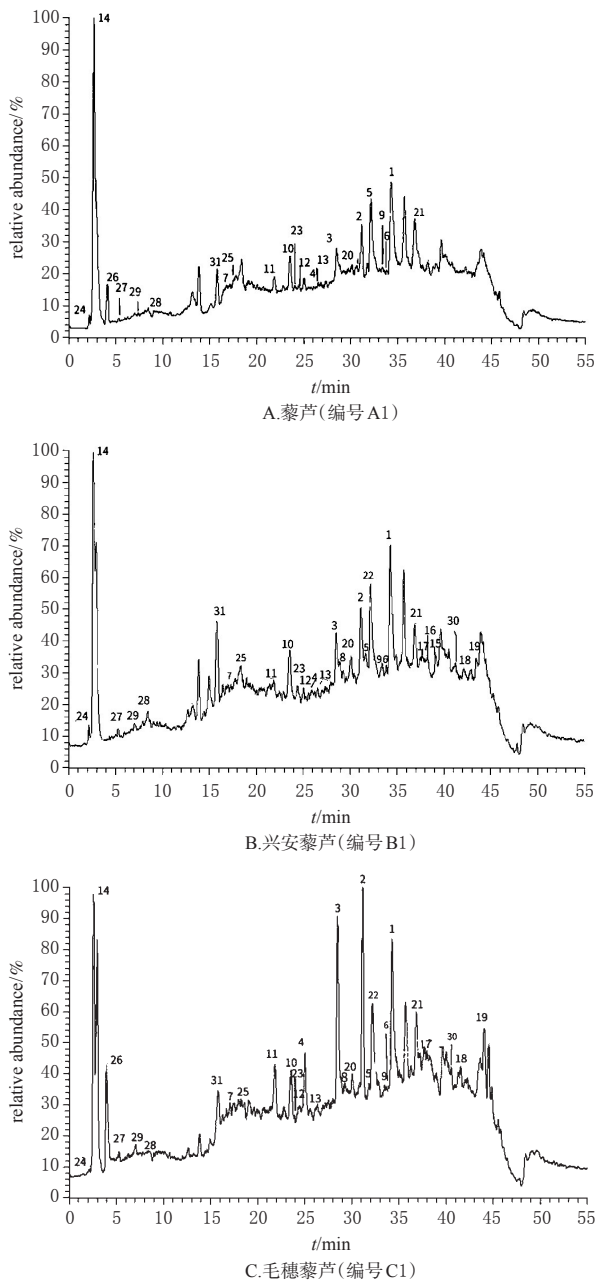


图1 3种野生藜芦在负离子模式下的总离子流图

2.3.3 芪类化合物的裂解规律 在负离子模式下,芪类化合物的主要裂解途径为失去取代糖基而形成苷元,苷元继续发生狄尔斯-阿尔德反应(Diels-Alder reaction, RDA),产生质量数为42的 C_2H_2O 中性丢失。下文以化合物3为例,对该类化合物质谱裂解规律进行推导。

化合物3的分子式为 $C_{20}H_{22}O_8$,保留时间为28.50 min。在负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 389.125 7 $[M-H]^-$,其裂解途径主要通过糖苷键断裂形成苷元碎片离子峰 m/z 227.072 6 $[M-H]^-$;苷元进一步裂解,分别通过苯环A与苯环B内部发生RAD裂解而形成特征性碎片离子峰 m/z 185.061 1、143.050 5 $[M-H]^-$ (图2)。综合上述碎片信息和裂解规律,再结合对照品的保留时间、二级碎片离子信息和文献报道的碎片信息^[13],最终

将化合物3鉴定为虎杖苷。

2.3.4 黄酮类化合物的裂解规律 在负离子模式下,黄酮类化合物的裂解有多种情况。下文以化合物15为例,对黄酮和异黄酮苷元C环上的RDA裂解规律进行推导。

化合物15的分子式为 $C_{15}H_{10}O_6$,保留时间为39.26 min。在负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 285.041 9 $[M-H]^-$ 。在二级质谱中,该化合物可以生成一系列的碎片离子峰,其中 m/z 241.049 9($C_{14}H_{10}O_4^-$)为木犀草素母核C环失去羰基再失去氧原子所得的碎片离子峰;同时,母核C环发生RDA裂解后分别形成碎片离子峰 m/z 151.003 7、133.029 8 $[M-H]^-$ (图3)。综合上述碎片信息和裂解规律,再结合二级碎片离子信息和文献报道的碎片信息^[21],最终将化合物15鉴定为木犀草素。

2.3.5 有机酸类化合物的裂解规律 有机酸类化合物结构中存在羟基和羧基,故在其二级质谱中会出现 $[M-H_2O]^-$ 和 $[M-CO_2]^-$ 的碎片离子。下文以化合物25为例,对有机酸类化合物的裂解规律进行推导。

化合物25的分子式为 $C_9H_8O_4$,保留时间为17.46 min。在负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 179.034 2 $[M-H]^-$ 。在二级质谱中,该化合物母离子失去1分子 CO_2 形成 m/z 135.003 0 $[M-H-CO_2]^-$ 的碎片离子峰(图4)。综合上述碎片信息和裂解规律,再结合二级碎片离子信息和文献报道的碎片信息^[26],最终将化合物25鉴定为咖啡酸。

2.4 定量分析

2.4.1 专属性考察 取“1.2”项下虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇对照品各适量,精密称定,加甲醇溶解并定容,制成上述成分质量浓度分别约为5、20、15 $\mu g/mL$ 的混合对照品溶液。取空白溶剂(甲醇)、混合对照品溶液和按“2.1.1”项下方法制备的藜芦、毛穗藜芦、兴安藜芦供试品溶液各适量,按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图5,空白溶剂图略)。结果显示,虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇的分离度分别为1.03、1.05、1.02,空白溶剂不干扰其测定。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.4.1”项下混合对照品溶液1、5、10、15、20 μL ,按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分峰面积(y)为纵坐标、进样量(x)为横坐标进行线性回归,结果见表3。

2.4.3 精密度试验 取兴安藜芦(编号B2)粉末适量,按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,再按照“2.2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇峰面积的RSD分别为1.84%、1.26%、1.43%($n=6$),表明方法精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(编号B2),分别在室温条件下放置0、2、4、8、12、24 h时按照

表2 3种野生藜芦中的化学成分(负离子模式)

化合物	保留时间/min	分子式	准分子离子峰		误差/ppm	主要碎片离子峰[M-H] ⁻	化合物	藜芦	兴安藜芦	毛穗藜芦
			理论值	测定值						
1	35.29	C ₁₆ H ₂₂ O ₅	227.071 3	227.071 8	2.20	227.071 8, 85.043 8, 143.052 0,	白藜芦醇 ^[11]	+	+	+
2	31.51	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	243.066 2	243.066 8	2.45	243.066 8, 201.056 4, 199.074 6, 175.074 5	氧化白藜芦醇 ^[12]	+	+	+
3	28.50	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389.124 1	389.125 7	4.11	389.125 7, 227.072 6, 185.061 1, 143.050 5	虎杖苷 ^[13]	+	+	+
4	25.05	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	389.124 1	389.125 0	4.11	389.125 0, 227.072 9	白藜芦醇-4'-O-β-D-葡萄糖苷 ^[14]	+	+	+
5	32.25	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₃	551.177 0	551.177 1	0.18	551.177 1, 227.072 8	白藜芦醇-4,3'-O-β-D-二葡萄糖苷 ^a	+	+	+
6	33.71	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	419.139 8	419.138 8	2.48	419.138 8, 257.083 8, 241.052 3	土大黄苷 ^[15]	+	+	+
7	16.84	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₄	567.171 9	567.172 3	-0.71	567.172 3, 405.123 2, 243.086 8	桑皮苷A ^[16]	+	+	+
8	29.96	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₃	565.192 6	565.191 9	1.24	565.191 9	5-甲基白藜芦醇-3,4'-O-二葡萄糖苷 ^[17]	-	+	+
9	33.66	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	257.080 8	257.080 0	3.11	257.080 0, 241.052 1	3'-甲氧基白藜芦醇 ^a	+	+	+
10	23.54	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	405.118 0	405.117 8	0.50	405.117 8, 243.067 0, 199.074 6	氧化白藜芦醇-2-O-β-D-葡萄糖苷 ^a	+	+	+
11	21.58	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	405.118 0	405.118 1	0.25	405.118 1, 243.067 8	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷 ^a	+	+	+
12	24.28	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₃	551.177 0	551.176 5	-1.09	551.176 5, 227.072 2	白藜芦醇-3,5-O-β-D-二葡萄糖苷 ^[18]	+	+	+
13	26.56	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₃	551.177 0	551.175 9	2.00	551.175 9, 389.127 9, 227.072 7	桑皮苷 ^[19]	+	+	+
14	2.84	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	191.056 1	191.055 8	1.57	191.055 8, 173.043 6	奎尼酸 ^[20]	+	+	+
15	39.26	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	285.040 5	285.041 9	4.91	285.041 9, 151.003 7, 133.029 8	木犀草素 ^[21]	-	+	-
16	38.78	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	285.040 4	285.041 2	2.81	285.041 2, 257.103 7	山柰酚 ^[22]	-	+	-
17	37.02	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	269.045 5	269.045 6	-0.37	269.045 6	芹菜素 ^[23]	-	+	+
18	41.25	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313.071 8	313.072 5	-2.24	313.072 5	pectolinaligenin ^[17]	-	+	+
19	43.92	C ₁₈ H ₁₂ O ₅	283.061 2	283.060 5	2.47	283.060 5, 268.039 8	金合欢素 ^[17]	-	+	+
20	30.08	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	447.092 2	447.092 1	2.46	447.092 1, 301.072 5, 271.011 2	槲皮素-7-O-鼠李糖苷 ^[24]	+	+	+
21	37.01	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	445.114 0	445.115 7	-4.64	445.115 7, 283.064 6	金合欢素-7-O-葡萄糖苷 ^[25]	+	-	+
22	33.20	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	431.098 4	431.100 4	3.29	431.100 4, 269.047 3	芹菜素-7-O-葡萄糖苷 ^[25]	-	+	+
23	23.52	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	463.088 1	463.087 3	1.73	463.087 3, 301.072 3	槲皮素-3-O-葡萄糖苷 ^[22]	+	-	+
24	2.60	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341.108 9	341.110 2	-3.81	341.110 2	蔗糖 ^[17]	+	+	+
25	17.46	C ₈ H ₆ O ₄	179.034 9	179.034 2	3.91	179.034 2, 135.003 0	咖啡酸 ^[26]	+	+	+
26	4.10	C ₁₂ H ₁₈ O ₁₁	341.108 9	341.107 2	4.89	341.113 2, 89.023 7	异麦芽酮醇 ^[21]	+	-	+
27	5.26	C ₈ H ₆ O ₅	133.014 2	133.014 1	0.75	133.014 1, 115.003 2	苹果酸 ^[27]	+	+	+
28	9.07	C ₈ H ₆ O ₄	153.019 3	153.019 4	-0.65	153.019 4, 109.029 3	原儿茶酸 ^[27]	+	+	+
29	7.49	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	285.076 8	285.077 3	-1.75	285.077 3	巴西苏木素 ^[28]	+	+	+
30	41.57	C ₁₆ H ₁₆ O ₅	269.053 4	269.053 5	-0.37	269.053 5	去甲汉黄芩素 ^[29]	-	+	+
31	16.01	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₅	595.166 8	595.165 5	2.18	595.165 5	圣草棉苷 ^[30]	+	+	+

a: 结合对照品鉴定的化合物; +: 含有此化合物; -: 不含有此化合物

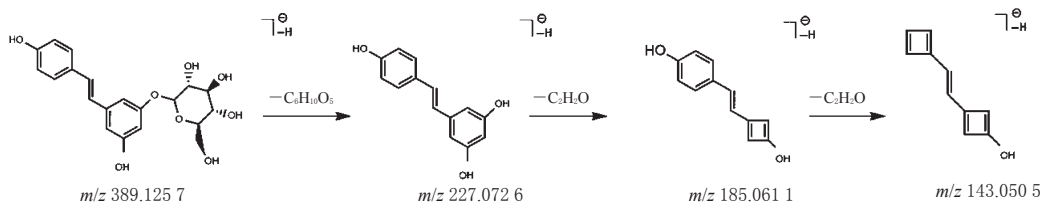


图2 化合物3的主要质谱裂解途径

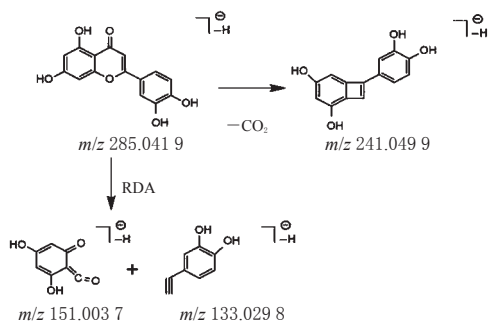


图3 化合物15的主要质谱裂解途径

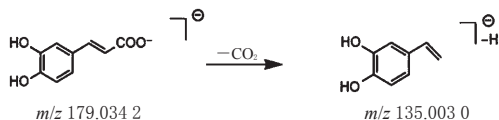
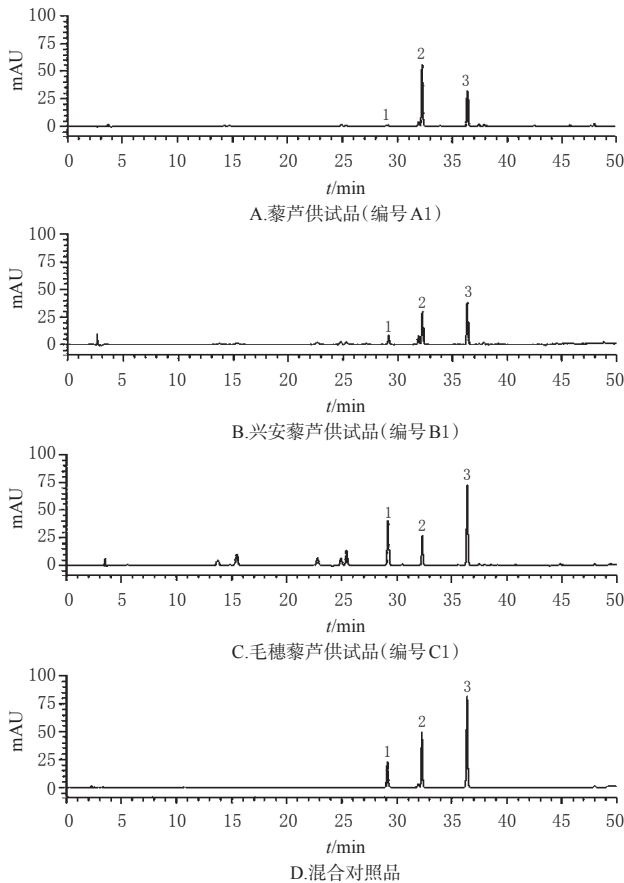


图4 化合物25的主要质谱裂解途径

“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇峰面积的RSD分别为0.87%、0.84%、0.68%(n=6),表明供试品溶液在24 h内的稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取兴安藜芦(编号B2)粉末6份,按照“2.1.1”项下方法制备成供试品溶液,按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并代入回归方程计算含量。结果显示,虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇含量的RSD分别为1.55%、0.67%、1.82%(n=6),表明方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 称取已知含量的兴安藜芦(编号B2)粉末9份,每份约0.5 g,精密称定,分别置于具塞锥形瓶中,按已知量的80%、100%、120%加入虎杖苷、



1: 虎杖苷; 2: 氧化白藜芦醇; 3: 白藜芦醇

图5 3种野生藜芦供试品溶液和混合对照品溶液的高效液相色谱图

表3 虎杖苷等3种芪类成分的回归方程和线性范围

待测成分	回归方程	r	线性范围/ μg
虎杖苷	$y=2\,029\,799.5x-1\,107.6$	0.999 8	0.005 1~0.102 0
氧化白藜芦醇	$y=2\,102\,304.9x-6\,518.1$	0.999 8	0.020 1~0.402 0
白藜芦醇	$y=2\,657\,121.3x-1\,692.0$	0.999 8	0.015 7~0.314 0

氧化白藜芦醇、白藜芦醇的单一对照品溶液(质量浓度均为0.1 mg/mL),按照“2.1.1”项下方法制备成供试品溶液,再按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算平均加样回收率。结果显示,虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇的平均加样回收率分别为99.01%、99.65%、100.01%,RSD分别为2.04%、0.36%、0.93%($n=9$),详见表4。

2.4.7 样品含量测定 取藜芦、兴安藜芦、毛穗藜芦各3批,按照“2.1.1”项下方法制备成供试品溶液,再按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并代入回归方程计算含量。每样品重复测定6次,结果见表5。由表5可知,9批样品中虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇总含量为6.618~11.292 mg/g;藜芦中3种芪类成分的总含量最高,其次是毛穗藜芦,最后是兴安藜芦。毛穗藜芦中虎杖苷、白藜芦醇的含量均高于藜芦、兴安藜芦,藜芦中氧化白藜芦醇的含量高于兴安藜芦、毛穗藜芦。

表4 虎杖苷等3种芪类成分的加样回收率试验结果

待测成分	取样量/ g	已知量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	加样回收率/ %	平均加样回收率/ %	RSD/ %
虎杖苷	0.049 9	0.064 2	0.051 2	0.113 8	96.88	99.01	2.04
	0.049 9	0.064 2	0.051 2	0.115 9	100.98		
	0.049 8	0.064 0	0.051 2	0.114 5	98.63		
	0.050 2	0.064 6	0.064 0	0.125 4	95.00		
	0.049 9	0.064 2	0.064 0	0.128 7	100.78		
	0.050 1	0.064 4	0.064 0	0.127 8	99.06		
	0.050 2	0.064 6	0.076 8	0.140 4	98.70		
	0.050 3	0.064 7	0.076 8	0.142 1	100.78		
	0.050 4	0.064 8	0.076 8	0.141 8	100.26		
氧化白藜芦醇	0.050 0	0.158 5	0.127 2	0.286 2	100.39	99.65	0.36
	0.050 6	0.160 4	0.127 2	0.286 9	99.45		
	0.050 1	0.158 8	0.127 2	0.285 0	99.21		
	0.050 3	0.159 5	0.159 0	0.318 6	100.06		
	0.050 0	0.158 5	0.159 0	0.316 9	99.62		
	0.050 1	0.158 8	0.159 0	0.317 2	99.62		
	0.050 0	0.158 5	0.190 8	0.348 1	99.37		
	0.050 1	0.158 8	0.190 8	0.348 8	99.58		
	0.050 1	0.158 8	0.190 8	0.348 7	99.53		
白藜芦醇	0.050 0	0.108 1	0.082 6	0.191 6	101.09	100.01	0.93
	0.050 6	0.109 4	0.082 6	0.191 0	98.79		
	0.050 1	0.108 3	0.082 6	0.190 1	99.03		
	0.050 3	0.108 7	0.103 2	0.211 2	99.32		
	0.050 0	0.108 1	0.103 2	0.210 3	99.03		
	0.050 1	0.108 3	0.103 2	0.212 3	100.78		
	0.050 0	0.108 1	0.123 8	0.232 7	100.65		
	0.050 1	0.108 3	0.123 8	0.232 9	100.65		
	0.050 1	0.108 3	0.123 8	0.233 0	100.73		

表5 3种野生藜芦中虎杖苷、氧化白藜芦醇、白藜芦醇含量的测定结果(mg/g, $n=6$)

样品(编号)	虎杖苷	氧化白藜芦醇	白藜芦醇	总含量
藜芦(A1)	0.173	7.535	2.484	10.192
藜芦(A2)	0.247	8.875	2.170	11.292
藜芦(A3)	0.226	7.968	2.074	10.268
兴安藜芦(B1)	0.910	4.355	2.252	7.517
兴安藜芦(B2)	1.286	3.170	2.162	6.618
兴安藜芦(B3)	1.257	4.355	2.252	7.864
毛穗藜芦(C1)	3.474	2.586	3.415	9.475
毛穗藜芦(C2)	3.590	2.057	3.976	9.623
毛穗藜芦(C3)	3.967	2.134	3.050	9.151

3 讨论

根据文献报道,藜芦属植物中的芪类化合物多含酚羟基^[12],在溶液中很容易解离为酸根离子,在负离子扫描模式下质谱响应较强,可获得准分子离子峰 $[M-H]^-$ 。因此,本研究选择负离子模式进行质谱扫描。

3种野生藜芦生境喜阴,产地分布广泛,分布地域存在重叠现象,导致三者较易混淆,常出现兴安藜芦、毛穗藜芦替代藜芦入药的情况。本研究利用HPLC-Q-Exactive-MS/MS技术对内蒙古3种野生藜芦进行了定性分析。结果显示,共鉴定出31个化合物,其中山柰酚和木犀草素为兴安藜芦所特有。木犀草素具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抑菌、保护神经系统等作用^[31],山柰酚具有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抗炎、抗菌、增强机体免疫等作

用^[32],但兴安藜芦在抗肿瘤、抗炎、抗氧化等方面的药理作用是否强于藜芦、毛穗藜芦,兴安藜芦是否能替代藜芦还需进一步研究。

近年来,芪类化合物的抗炎活性得到了广泛的关注和研究,其中白藜芦醇可通过诱导甲酰化的甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸或钙离子载体 A23187 来减弱炎症反应^[33],也可通过抑制核因子 κ B 来发挥抗炎作用^[34-35]。本研究利用 HPLC 法对内蒙古 3 种野生藜芦中 3 种代表性芪类成分进行了定量分析。结果显示,3 种野生藜芦中均含有代表性芪类成分虎杖苷、氧化白藜芦醇和白藜芦醇,其总含量为 6.618~11.292 mg/g。其中,藜芦中上述成分的总含量最高,其次是毛穗藜芦,最后是兴安藜芦;毛穗藜芦中虎杖苷、白藜芦醇含量均高于藜芦、兴安藜芦,藜芦中氧化白藜芦醇的含量高于兴安藜芦、毛穗藜芦。

综上所述,本研究通过 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 技术和 HPLC 法对 3 种野生藜芦进行了定性定量分析,结果发现,3 种野生藜芦中大部分成分相似,仅山柰酚和木犀草素为兴安藜芦所特有。白藜芦醇、氧化白藜芦醇和虎杖苷的含量在 3 种野生藜芦中存在较大差异。

参考文献

[1] 中国医学百科全书编辑委员会.中国医学百科全书:蒙医学[M].上海:上海科学技术出版社,1992:40-44.

[2] 中华本草编委会,国家中医药管理局.中华本草:蒙药卷[M].上海:上海科学技术出版社,2004:413-415.

[3] 内蒙古植物志编委会.内蒙古植物志:第五卷[M].2版.呼和浩特:内蒙古人民出版社,2016:458-462.

[4] 成孟华,饶高雄.藜芦属植物化学成分和药理作用的研究进展[J].中草药,2021,52(18):5758-5774.

[5] 闫静,王振月,刘丹宁,等.白藜芦醇及其甙(苷)的生物活性研究进展[J].中医药学报,2000,28(2):39-41.

[6] 徐光,张礼萍,陈力芳,等.二苯乙烯类化合物对蛋白激酶 C 的抑制作用[J].药学学报,1994,29(11):818-822.

[7] SHIMIZU K, YASUTAKE S, KONDO R. A new stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Chlorophora excelsa*[J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2003, 51(3): 318-319.

[8] 雷小平,刘波,朱娜,等.杂环取代的二苯乙烯类化合物抗癌活性研究[J].中国新药杂志,2000,9(8):540-542.

[9] 王淑慧,张屏,伊丽娜,等.蒙药材藜芦的化学成分和抗氧化活性研究[J].中药材,2018,41(3):608-612.

[10] 李晓娜,董馨,李娜,等.四味土木香散化学成分 HPLC-Q-Exactive-MS/MS 高分辨质谱快速分析鉴定[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(6):121-131.

[11] 刘一,李娜,马丽萍,等. LC-MS/MS 法测定人血浆中白藜芦醇的浓度[J].中国药房,2012,23(47):4433-4436.

[12] 赵立波,王宇航,司霞,等.血浆样品预处理环境的 pH 值

对芪类化合物 HPLC-MS/MS 检测方法基质效应的影响[J].中国药学杂志,2014,49(15):1358-1363.

[13] 董静,王弘,万乐人,等.高效液相色谱/电喷雾-离子阱-飞行时间质谱分析鉴定中药虎杖中的主要化学成分[J].色谱,2009,27(4):425-430.

[14] 罗益远,蔡中齐,刘训红,等.基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术分析同基源何首乌和首乌藤中差异化学成分[J].天然产物研究与开发,2017,29(12):2068-2074.

[15] 董红娇,陈晓虎,曾锐. UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析民族药小大黄的化学成分[J].中草药,2016,47(14):2428-2435.

[16] 郑甜碧,万晶琼,杨翠云,等.基于 HPLC-ESI-MS 技术的桑白皮、桑根皮及外粗皮主要成分定性定量研究[J].中国中药杂志,2021,46(9):2237-2244.

[17] 汤建.兴安藜芦抗肿瘤活性成分的发现及结构修饰[D].上海:上海交通大学,2008.

[18] 李沙沙.毛穗藜芦地上部分化学成分及藜芦生物碱药代动力学研究[D].开封:河南大学,2016.

[19] THOMAS PANNAKAL S, EILSTEIN J, PRASAD A, et al. Comprehensive characterization of naturally occurring antioxidants from the twigs of mulberry (*Morus alba*) using on-line high-performance liquid chromatography coupled with chemical detection and high-resolution mass spectrometry[J]. Phytochem Anal, 2022, 33(1): 105-114.

[20] 苏日娜,罗维早,魏荣锐,等.基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS 技术的特色藏族药高原荨麻化学成分快速识别研究[J].中国中药杂志,2019,44(8):1607-1614.

[21] 张昱,马惠玲,麦曦,等.基于 UHPLC-Q-TOF-MS/MS 技术鉴定薄荷在大鼠体内的入血成分及代谢产物[J].中草药,2017,48(19):3927-3934.

[22] 李伟,冯育林,黎田儿,等. UPLC-Q-TOF/MS 技术结合诊断离子方法快速分析连钱草中黄酮类化合物[J].质谱学报,2016,37(6):504-516.

[23] 张亚洲,王涛,邹树良,等.芹菜素在大鼠体内代谢产物的鉴定与分析[J].中国药房,2016,27(4):479-482.

[24] 崔小敏,万兆新,任慧,等.基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术的白毛银露梅化学成分研究[J].中药材,2020,43(8):1901-1906.

[25] 杜憬生,吴立群,刘敬功,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的菊花化学成分快速分析[J].中药材,2017,40(3):621-623.

[26] 苏美英,周婷婷,周茂金. LC/MSⁿ 鉴定咖啡酸在大鼠体内的代谢产物[J].中国现代应用药学,2009,26(6):501-505.

[27] 贾晓华,王维,高梦园,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析藜芦中化学成分[J].天津中医药大学学报,2021,40(1):104-111.

(下转第 956 页)