

基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术鉴定中药三棱入血成分

汤钜添 陈少茹 张诚光

(广东省第二中医院, 广东 广州 510050)

[摘要] 目的: 基于超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-QE-Orbitrap-MS)技术鉴定中药三棱入血成分, 旨在为三棱的临床应用、研究提供药效物质基础和质量控制参考。方法: 制备三棱提取物, 将其对无特定病原体(SPF)级健康SD大鼠进行灌胃, 若干时间后在不同时间点对大鼠眼内眦静脉丛取血, 对三棱提取物以及大鼠血浆使用Agilent Eclipse Plus C18色谱柱(4.6 mm×100 mm, 1.8 μm)进行检测, 质谱分析使用电喷雾离子源, 再通过mzCloud、mzVault、OTCML等数据库的资料鉴定特征峰。结果: 三棱提取物共检出原型成分70个, 入血成分40个, 其中原型成分有20个入血成分, 剩余20个入血成分可能是代谢产物。主要代谢途径为包括黄酮类化合物、有机酸类化合物、苯丙素类化合物、萜类化合物、醛类化合物、氨基酸类化合物、糖类化合物、生物碱类化合物和蒽醌类化合物。结论: 基于UPLC-QE-Orbitrap-MS技术鉴定中药三棱入血成分的价值确切, 可明确三棱的主要入血成分及部分代谢产物, 为三棱的临床应用、研究提供药效物质基础和质量控制参考。

[关键词] 三棱; 入血成分; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法

[中图分类号] R 284.1 **[文献标识码]** B

三棱(别名, 萆根, 京三棱), 中药名, 为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum*, Buch.-Ham. 的干燥块茎。味苦, 性平, 归肝、脾经。三棱具有消积止痛、破血行气的作用, 常用于治疗痛经、胸痹心痛等。三棱含挥发油, 主要成分有苯乙醇、对苯二酚、十六酸等共21个成分。又含多种有机酸、三棱酸、苯甲酸等。三棱含药, 能对内皮细胞发挥保护作用, 使细胞氧化炎症和损伤降低, 继而使凝血级联反应降低, 但迄今尚未阐明三棱保护内皮细胞的药效物质。对三棱入血成分进行分析, 有助于探究药效物质基础, 鉴定其中药药效物质, 确认化合物和阐明未知结构为本研究的主要内容。高分辨质谱(high resolution mass spectrometer, HRMS)能对中药化学成分进行有效推断、鉴定, 所以凭借范围广、灵敏度高等优势, 能为中药体内外成分表征提供有效指导^[1-2]。基于此, 本研究以超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole electrospray ionization-orbitrap-mass spectrometry, UPLC-QE-Orbitrap-MS)技术鉴定中药三棱入血成分, 旨在为三棱临床应用、研究等提供有效数据参考, 详情如下。

1 资料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪

[Q-Exactive型, Thermo Fisher Scientific(美国)]; 高速离心机(HC-2518型, 安徽中科中佳); 旋转蒸发器(RE-52型, 上海亚荣); 真空干燥箱(DZF-6050型, 上海精宏); 1/10万电子天平(MS105型, 瑞士梅特勒-托利多仪器)。

1.1.2 药物与试剂 三棱, 产自山东, 药材符合研究要求。甲酸[Fisher公司(美国)]、乙腈[Fisher公司(美国)]均为质谱级, 纯净水(广州屈臣氏)。

1.1.3 实验动物 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级健康SD大鼠12只, 周龄为8周, 体质量为220~250 g。饲养于动物房, 温度为(22±1)℃、湿度为40%~70%, 光照周期: 12 h明亮和12 h黑暗。

1.2 方法

1.2.1 三棱提取物的制备 使用1/20万电子天平, 精准称取100 g三棱, 粉碎, 过筛(4号筛), 放置在圆底烧瓶(1000 mL)内。加500 mL 80%甲醇, 加热, 回流, 连续提取2次, 60 min·次⁻¹。提取后, 常温放凉, 过滤, 旋蒸, 水浴蒸干。随后, 加水复溶, 于容量瓶(100 mL)定容, 容量为100 mL, 即获得三棱提取物。

1.2.2 给药和样本采集 (1)含药血浆样本的采集: 随机选择SD大鼠6只作为观察组, 以三棱提取物灌胃, 剂量为2 g·kg⁻¹, 早晚各1次, 连续灌胃3 d。灌胃第3天, 禁食12 h, 但不禁水。第4天, 三棱提取物灌

[收稿日期] 2023-12-07

[作者简介] 汤钜添, 男, 主管中药师, 主要研究方向是中药的鉴定和分析。

胃后, 对大鼠眼内眦静脉丛取血, 剂量为 0.5 mL, 时间是灌胃后 10、15、30、45、60、90、120、180 min。各时间点采血后, 等体积混合血浆样本, 置入乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 抗凝管, 以转速 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心半径 83 mm, 时间 10 min 的参数离心, 提取含药血浆样本。(2) 空白血浆样本的采集: 剩余 SD 大鼠 6 只作为对照组, 0.9% 氯化钠注射液灌胃, 剂量与观察组相同。灌胃 2 h 后, 对大鼠眼内眦静脉丛取血, 剂量为 0.5 mL, 置入 EDTA 抗凝管, 离心参数与观察组相同, 提取的血浆为对照血浆样本。

1.2.3 血浆样本的处理与分析 取两组大鼠血浆样本, 每组各取剂量 50 μL , 共 100 μL , 置离心管内。加乙腈沉淀蛋白 (3 倍量), 涡流振荡 1 min, 再以转速 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心半径 83 mm, 时间 10 min 的参数离心, 取上清液 200 μL , 开展 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术分析。

1.2.4 色谱及质谱条件 采用 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱 (4.6 mm \times 100 mm, 1.8 μm), 配制流动相 (以 0.1% 甲酸乙腈溶液为溶液 A, 0.1% 甲酸水溶液为溶液 B, 二者相加成为流动相) 开展梯度洗脱, 流速 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 5 μL , 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。采用热喷雾电离源, 检测模式为正、负离子 Full MS-dd MS2。分辨率 70 000; 鞘气流速 $40 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 辅助气流量 $15 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$; 裂解电压 3.20 kV; 离子传输管温度 320 $^{\circ}\text{C}$; 辅助气温度 350 $^{\circ}\text{C}$ 。扫描方式为 Full MS-dd MS2; 质谱扫描范围为 m/z 100 ~ 1000; 碰撞能梯度为 20、40、60 eV。梯度洗脱: 0 ~ 10 min, 100% B; 10 ~ 20 min, 100% \rightarrow 70% B; 20 ~ 25 min, 70% \rightarrow 60% B; 25 ~ 30 min, 60% \rightarrow 50% B; 30 ~ 40 min, 50% \rightarrow 30% B; 40 ~ 45 min, 30% \rightarrow 0% B; 45 ~ 60 min, 0% B; 60 ~ 60.1 min, 0% \rightarrow 100% B; 60.1 ~ 70 min, 100% B。

1.3 统计分析

数据处理用版本为 CD 3.0 软件, 提取 raw 文件特征峰, 结合 mzCloud、mzVault、OTCML 等数据库的资料鉴定特征峰, 筛选标准为得分 > 80 分, 将筛选出的资料中的相关质谱信息 (目标化合物) 与特征峰进行比较, 开展化合物鉴定。

2 结果

2.1 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术分析结果

三棱提取物经 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术检测和 CD 3.0 软件分析, 共鉴定出 70 个原型成分。以三棱提取物灌胃的大鼠, 在其血浆内共检出入血成分 40 个, 其中原型成分有 20 个入血成分, 剩余 20 个入血成分可能是代谢产物。

2.2 药材成分鉴定

UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术分析三棱提取物的 70 个原型成分中, 包括黄酮类化合物有 26 个, 占比为 37.14% (26/70); 有机酸类化合物有 11 个, 占比为 15.71% (11/70); 苯丙素类化合物 8 个, 占比为 11.43% (8/70); 萜类化合物 6 个, 占比为 8.57% (6/70); 醛类化合物 5 个, 占比为 7.14% (5/70); 氨基酸类化合物 5 个, 占比为 7.14% (5/70); 糖类化合物 4 个, 占比为 5.71% (4/70); 生物碱类化合物 3 个, 占比为 4.29% (3/70); 蒽醌类化合物 2 个, 占比为 2.86% (2/70)。

2.2.1 黄酮类化合物 本研究鉴定出 26 个 (37.14%), 黄酮类化合物是一系列化合物, 其母核是 2-苯基色原酮, 基本活性是 C6-C3-C6, 生物活性较广泛。因为 A 环较稳定, 所以多数黄酮类化合物在 B、C 环发生裂解, 一般 15 (CH_3)、18 (H_2O) 等易出现裂解丢失, 继而形成碎片离子。且多级质谱, 进行特殊裂解处理后, 黄酮类化合物会在质谱条件下, 转变为黄酮苷元。在其 A、B 环上, 存在取代基, 如: 甲基、羟基等。在发生裂解反应时, 黄酮苷元以 C 环为中心, 发生 RDA 反应, 获取 A-、B- 等离子。由于裂解反应, 主要是 C-C、C-O 键断裂, 形成碎片离子, 常用于诊断中, 能帮助判断苷元类型。

2.2.2 有机酸类化合物 有机酸类化合物是指一些具有酸性的有机化合物, 含有羧基、酚羟基等。本研究鉴定出原型成分中, 共有 11 个 (15.71%) 有机酸类化合物, 包括 α -亚麻酸等, 数目仅次于黄酮类化合物。

2.2.3 苯丙素类化合物 本研究鉴定出 8 个 (11.43%), 苯丙素类化合物内有多重成分, 包括甲氧基香豆素、阿魏酸等, 占比最高的是香豆素类。对简单香豆素类成分分析发现, 在其发生裂解反应时, 主要有 3 种, 分别是失去 CO 、失去 CO_2 、失去 H_2O 。若是苯丙素类化合物的母核, 有羟基取代时, 易出现交替丢失情况, 通常为 CO 、 CO_2 交替丢失。

2.2.4 萜类化合物 本研究鉴定出 6 个 (8.57%), 萜类化合物包括藁本内酯、白术内酯 I 和 II 等。苯酞单体类化合物在质谱裂解中, H_2O 、 CO 、 CO_2 、烷基自由基等易出现丢失情况, 进而有特征碎片产生。

2.2.5 氨基酸类化合物 本研究鉴定出原型成分中, 共有 5 个 (7.14%) 氨基酸类化合物。按照文献查阅比对, 以及质谱解析, 得出: 氨基酸类化合物包括 L- 苏氨酸、L- 色氨酸等。

2.3 入血成分鉴定

40 个在三棱提取物灌胃的大鼠中检出的入血成分中, 其代谢途径主要有 2 种, 其 1 是 I 相代谢, 其 2 是 II 相代谢。其中 I 相代谢包含去甲基化 M-14 反应、氧化和还原反应等, II 相代谢包含葡萄糖醛酸化反应 M + 176 等。

3 讨论

中药三棱为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum*, Buch. -Ham. 的干燥块茎, 其性平、味苦, 入肝、脾经, 具有破血行气、消积止痛的效果, 为常用破血药, 自 1985 年为国家药典收载品种^[3]。三棱始载于《本草拾遗》(唐), 现收载在《中国药典》。黑三棱科仅有黑三棱 *Sparganium* 1 属, 19 种, 主要分布在寒带或北半球温带, 仅 1 或 2 种分布在新西兰等地。我国有 11 种, 南、北均有, 温带种类较多。《本草纲目》: “三棱破气散结, ……故难久服”。《本草经疏》: “三棱, ……此所以能治一切凝结停滞有形之坚积也”。可见, 三棱活血破血效果较强。现代药理表示, 三棱活血化瘀作用强度, 位居活血化瘀药的前 10 位, 且广泛用于妇科、心脑血管疾病治疗中^[4]。

UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术的灵敏度和分辨率较高, 能准确分辨药用植物中的复杂化学成分, 能实现快速鉴别^[5-7]。使用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术, 能全面、快速定性研究中药化学成分, 现已在很多中药或复杂未知物的鉴别分析中广泛使用^[8-10]。本研究对中药三棱入血成分鉴定中, 使用 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术, 能够有效分析三棱化学成分, 还能三棱的药效物质、质量控制等奠定了基础。笔者在设计本研究之前, 分别比较了不同溶剂系统对三棱的提取效果, 结果显示, 80% 甲醇提取时三棱提取物各成分水平较高, 同时, 考察了提取条件, 共使用 2 个提取条件, 分别是超声提取 (30 min、60 min)、回流提取 (30 min、60 min), 结果显示: 相比超声提取, 回流提取的效果更好, 且具有较好的分离度, 由此总结出提取方案, 在 80% 甲醇内, 进行回流提取, 时间为 60 min。同时, 取 SD 大鼠, 将制作的三棱提取物予大鼠灌胃后, 在不同采血时间点, 10、15、30、45、60、90、120、180 min, 血浆样本等体积混匀后, 其能检出最多的离子数目, 继而能够反映中药材三棱的入血成分。

本研究得出中药三棱入血共鉴定出入血成分有 40 个, 原型成分有 20 个入血成分, 剩余 20 个入血成分可能是代谢产物。而三棱成分共 70 个, 包括黄酮类化合物有 26 个, 占比为 37.14% (26/70); 有机酸类化合物有 11 个, 占比为 15.71% (11/70); 苯丙素类化合物 8 个, 占比为 11.43% (8/70); 萜类化合物 6 个, 占比为 8.57% (6/70); 醛类化合物 5 个, 占比为 7.14% (5/70); 氨基酸类化合物 5 个, 占比为 7.14% (5/70); 糖类化合物 4 个, 占比为 5.71% (4/70); 生物碱类化合物 3 个, 占比为 4.29% (3/70); 蒽醌类化合物 2 个, 占比为 2.86% (2/70)。

其中在抗炎、抗凝、保护内皮细胞等方面, 黄酮类化合物、有机酸类化合物均发挥了重要作用, 所以其是三棱的重要组成部分。然而参考相关研究^[11-12], 笔者也认为中药材的化合物成分较丰富, 所以本研究检验出的三棱成分仍不够全面, 可更进一步深入分析。

综上所述, 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术鉴定中药三棱入血成分的价值确切, 可明确三棱的主要入血成分及部分代谢产物, 为三棱的临床应用、研究提供药效物质基础和质量控制参考。

[参考文献]

- [1] 谢雨宸, 邹雪梅, 李红颖, 等. 基于 UPLC-Q-Executive Orbitrap MS 技术的藏药细叶亚菊的化学成分分析 [J]. 中国民族民间医药, 2022, 31 (20): 22-28.
- [2] 谢树春, 李小军, 程齐来, 等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 的赣南地区产铁皮石斛茎和根水提物的成分表征 [J]. 赣南医学院学报, 2022, 42 (9): 917-921, 936.
- [3] 孟天伟, 常虹, 李呈佳, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探究三棱-莪术药对治疗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30 (10): 861-870.
- [4] 徐男, 王亮, 孙蓉, 等. 基于整合药理学平台探究三棱抗血栓形成及抗血小板聚集的分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25 (5): 192-200.
- [5] 马蕾, 时海燕, 蔡梅超, 等. 经典名方温胆汤入血成分的 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术分析鉴定 [J]. 时珍国医国药, 2022, 33 (5): 1090-1097.
- [6] 陈剑, 吴昊, 刘润花, 等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 技术分析乌灵胶囊的化学成分 [J]. 中药材, 2022, 45 (3): 639-646.
- [7] 高慧, 熊晓莉, 张青, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术分析远志炮制前后成分变化 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (12): 1845-1854.
- [8] 梁琨, 张倩芸, 沈莉玲, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 技术分析黄芩清肺汤中黄芩、栀子单煎与合煎的成分变化 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32 (12): 1859-1864.
- [9] 陈梦倩, 王允吉, 冯芳. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 的栀子甘草豉汤化学成分分析 [J]. 广州化工, 2021, 49 (8): 97-103.
- [10] 孙成宏, 李翔子, 肖贺, 等. 基于 UPLC-ESI-QE-Orbitrap-MS 技术的首荟通便胶囊干预慢传输型便秘的代谢组学研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46 (3): 532-538.
- [11] 康俊丽, 黄海英, 刘雅敏, 等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 法测定补肺益肾方中 10 个入血成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39 (3): 441-450.
- [12] 黄海英, 康俊丽, 余亚辉, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap MS 法分析补肺益肾方的化学成分 [J]. 分析测试学报, 2019, 38 (1): 1-13.