

畲药树参茎化学成分分析及抗炎活性部位高效液相指纹图谱的建立

刘敏¹, 张晓芹², 黄绳武³, 余乐¹, 范蕾^{1*}, 陈梦¹, 陈张金¹, 陈桂云¹, 陈琴鸣¹, 顾正兵⁴(1.丽水市质量检验检测研究院, 浙江 丽水 323000; 2.丽水市中医院, 浙江 丽水 323000; 3.浙江中医药大学, 杭州 310053; 4.泰州丹鼎生物科技有限公司, 江苏 泰州 225400)

摘要: 目的 对畲药树参茎所含化学成分进行确证分析, 并建立抗炎活性部位的高效液相色谱指纹图谱。方法 采用液相色谱-质谱联用、核磁共振波谱仪等分析仪器分离鉴定树参茎中的化学成分; 采用高效液相色谱法建立抗炎活性部位指纹图谱: 色谱柱为 Waters SunfireTM C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-混合水溶液(含甲酸 0.2% 和四氢呋喃 0.2%), 梯度洗脱。检测波长为 256 nm, 柱温 30 °C, 体积流量为 1.0 mL·min⁻¹, 分析时间为 80 min, 进样量为 5 μL。结果 从树参茎中共分离鉴定出 10 个化合物, 分别是绿原酸(1)、3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸(2)、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸(3)、4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸(4)、saikolignanoside A(5)、芦丁(6)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(7)、紫丁香苷(8)、松柏醇(9)、芥子醛葡萄糖苷(10); 12 批样品抗炎活性部位指纹图谱相似度为 0.901~0.992, 均符合要求。结论 树参茎中主要含有酚酸类、黄酮类、苯丙素类化合物; 建立的指纹图谱不仅能体现树参茎抗炎的化学物质基础, 而且鉴别方法简便、重复性好, 可为树参茎的品质评价及主要抗炎活性成分的确证提供科学依据。

关键词: 树参茎; 抗炎; 活性部位; 高效液相色谱法; 指纹图谱

中图分类号: R284.1 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)19-2505-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.19.011

引用本文: 刘敏, 张晓芹, 黄绳武, 等. 畲药树参茎化学成分分析及抗炎活性部位高效液相指纹图谱的建立[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(19): 2505-2510.

Analysis Chemical Constituents in the Stems of She Medicine *Dendropanax Dentiger* and Establishing HPLC Fingerprint of Its Anti-inflammatory Active Fraction

LIU Min¹, ZHANG Xiaoqin², HUNG Shengwu³, YU Le¹, FAN Lei^{1*}, CHEN Meng¹, CHEN Zhangjin¹, CHEN Guiyun¹, CHEN Qinming¹, GU Zhengbing⁴(1.Lishui Institute for Quality Inspection and Testing, Lishui 323000, China; 2.Lishui Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lishui 323000, China; 3.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 4.Taizhou Danding Biotechnology Co., Ltd., Taizhou 225400, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To confirm and analyze the chemical constituents in the stems of *Dendropanax dentiger*, and establish the HPLC fingerprint of its anti-inflammatory active fraction. **METHODS** Compounds were isolated and identified by LC-MS, NMR and other analysis instruments. HPLC with Waters SunfireTM C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used. Mobile phase consisted acetonitrile-aqueous solution including 0.2% formic acid and 0.2% tetrahydrofuran with gradient elution. Detection wavelength was 256 nm. Column temperature was 30 °C. Flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and analytic time was 80 min. Injection volume was 5 μL. **RESULTS** Ten compounds were isolated and identified as chlorogenic acid(1), 3,4-O-caffeylquinic acid methyl ester(2), 3,5-O-caffeylquinic acid methyl ester(3), 4,5-O-caffeylquinic acid methyl ester(4), saikolignanoside A(5), rutin(6), kaempferol-3-O-rutinoside(7), syringin(8), coniferol(9), sinapaldehyde glucoside(10). Under the same fingerprint chromatogram condition, the methodological results were satisfactory to 12 batches of the anti-inflammatory active fractions. And the similarity range was 0.901~0.992. **CONCLUSION** The stems of *Dendropanax dentiger* mainly contain phenolic acids, flavonoids and phenylpropanoids. The established fingerprint can not only reflect the chemical basis of anti-inflammatory of the She medicine, but the identification method also is simple and reproducible. It can provide a scientific basis for the quality evaluation and the confirmation of main anti-inflammatory active components of the stems of *Dendropanax dentiger*.

KEYWORDS: stems of *Dendropanax dentiger*; anti-inflammatory; active fraction; HPLC; fingerprint

树参为五加科树参属树参 *Dendropanax dentiger* (Harms) Merr. 的灌木或乔木, 用药历史悠久, 被载录《中华本草》《中药大辞典》《全国中草药汇编》《中国畲族医药学》等书籍中, 具有祛风除湿、活血消肿的功效, 可用于治疗风湿病、

关节炎、半身不遂等疾病, 是我国江西和浙江一带使用频率较高的 30 种畲药之一^[1-3], 其抗风湿的药用部位包括根、茎、树皮, 其中树参的茎曾作为医院制剂“枫荷梨”制剂的主药被广泛应用于临床, 疗效显著, 深受患者欢迎。但是, 因饮片

基金项目: 浙江省药品监督管理局科技计划项目(2020003)

作者简介: 刘敏, 女, 硕士, 副主任中药师 E-mail: 2001lm2005@163.com *通信作者: 范蕾, 女, 副主任中药师 E-mail: 20662835@qq.com

质量标准的缺乏,不仅临幊上不敢随意应用树参,就连曾经被广泛应用于抗风湿的“枫荷梨”制剂也因其饮片质量标准的缺失而停止应用。目前,对于畲药树参的前期基础研究还较少,为探究树参的起效物质基础,项目组在前期研究中开展了树参主要药用部位茎的纯水、乙醇、氯仿、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇等不同溶剂提取物对肿瘤坏死因子 α 诱导的人滑膜关节炎成纤维细胞HFLS-OA增殖抑制率的研究,研究结果表明其正丁醇提取物有较强的抗炎活性,同时采用LC-MS、NMR等分析仪器对主要化学成分进行了确证,进而采用普及度更高的HPLC建立了树参茎抗炎活性部位的指纹图谱,为揭示树参抗炎活性药效物质基础提供了科学依据。

1 仪器与试剂

Waters acquity液质色谱仪; Bruker AVANCE-III 400 MHz核磁共振波谱仪; 安捷伦1260高效液相色谱仪; 梅特勒XS105DU电子天平。

紫丁香苷(批号:111574-201605;含量:95.2%)、绿原酸(批号:110753-201716;含量:99.3%)、芦丁(批号:100080-201409;含量:91.9%)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(批号:112007-201602;含量:90.8%)、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸(批号:111782-201706;含量:97.3%)对照品均购自中国食品药品检定研究院;4,5-O-二咖啡酰奎宁酸(批号:102317;含量 $\geq 95\%$)和saikolignanose A(批号:103203;含量 $\geq 95\%$)对照品均购自江苏永健医药科技有限公司;芥子醛葡萄糖苷对照品(德思特生物技术有限公司,批号:DST210311-292;含量 $\geq 95\%$);乙腈、甲酸、四氢呋喃为色谱纯;氯仿、石油醚、乙醚、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇为分析纯;水为娃哈哈纯净水。

树参茎样品共12批,经李建良副主任中药师鉴定为五加科植物树参 *Dendropanax dentiger*。具体信息见表1。

2 方法与结果

2.1 主要化学成分的分析

2.1.1 液相色谱-质谱联用分析法 根据项目组前期开展的树参叶液相色谱-质谱联用确证化学成分的方法,以干燥并过二号筛的5号样品粉末约2 g,精密加入80%甲醇,水浴加热回流提取2 h,冷却至室温后,用提取溶剂补足减失的重量,过滤,滤液作为供试品,色谱条件、质谱条件、混合对照品

表1 树参茎样品信息表

Tab. 1 Sample information table of *Dendropanax dentiger*

样品编号	采收地	采集日期
1	丽水市莲都区庞山村	2018-07-02
2	丽水市青田县黄肚村	2018-07-07
3	丽水市云和县朱村	2018-07-09
4	丽水市松阳县大东坝镇	2018-07-09
5	丽水市景宁县草鱼塘	2018-07-14
6	丽水市青田县章村	2018-07-19
7	丽水龙泉市	2019-03-21
8	福建省宁德市	2019-03-21
9	丽水市遂昌县垵口乡	2020-04-10
10	福建省南平市	2020-04-27
11	丽水市青田县章村	2020-05-24
12	丽水市青田县仰天湖	2020-06-14

的制备均按项目组已建立的方法操作^[4],采用对照品对照,经质谱归属分析,确证了茎中含有的绿原酸(1)、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸(3,异绿原酸A)、芦丁(6)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(7)、紫丁香苷(8)5个成分,对照品、样品质谱总离子流色谱图见图1,归属分析见表2。

表2 树参茎中各化合物的质谱归属

Tab. 2 MS and MS² attribution of compounds of the stems of *Dendropanax dentiger*

序号	分子量 MW/Da	保留时间/ min	母离子子/m/z	归属	子离子子/m/z	归属	化合物
1	372	4.6	417	[M+COOH] ⁻	209	[M-H-glc] ⁻	紫丁香苷
2	354	4.6	353	[M-H] ⁻	191	[M-H-caffeyl] ⁻	绿原酸
3	610	6.1	609	[M-H] ⁻	301	[M-H-rha-glc] ⁻	芦丁
4	594	6.5	593	[M-H] ⁻	285	[M-H-rha-glc] ⁻	山柰酚-3-O-芸香糖苷
5	516	6.8	515	[M-H] ⁻	353	[M-H-caffeyl] ⁻	3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸

注:glc葡萄糖碎片(MW=162);caffeyl咖啡酰基碎片(MW=162);rha鼠李糖碎片(MW=146)。

Note: glc glucose fragment(MW=162); caffeyl caffeyl fragment(MW=162); rha rhamnolide fragment(MW=146)。

2.1.2 核磁共振波谱法

2.1.2.1 提取与分离 取10 kg混合药材,用30%乙醇提取3次,每次6倍量体积,合并提取液,浓缩至水溶液,正丁醇萃取,最终得正丁醇萃取物186.3 g。正丁醇萃取物用甲醇溶解,硅胶拌样,石油醚/乙酸乙酯/甲醇/水梯度洗脱。根据薄层点板情况,得到9个流份(SS-1~SS-9)。SS-1先用

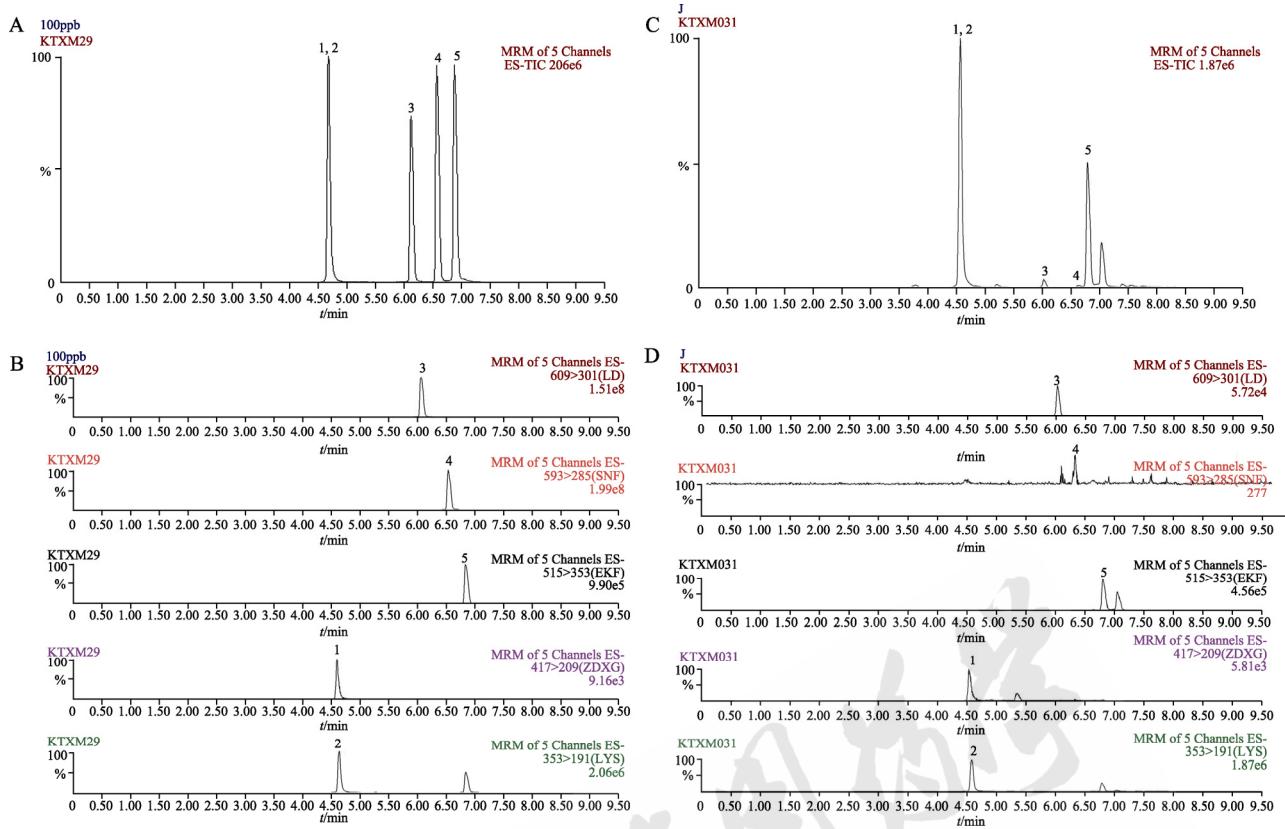


图 1 对照品及供试品质谱离子流色谱图

A-混合对照品溶液总离子流色谱图; B-混合对照品溶液中各化合物提取离子色谱图; C-供试品溶液总离子流色谱图; D-供试品溶液中各化合物提取离子色谱图; 1-紫丁香苷; 2-绿原酸; 3-芦丁; 4-山柰酚-3-O-芸香糖苷; 5-3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸。

Fig. 1 Ion current chromatogram of reference substance and test quality spectrum

A-TIC chromatogram of mixed reference solution; B-extracted ion chromatogram of mixed reference solution; C-TIC chromatogram of the sample; D-extracted ion chromatogram of compounds in the sample; 1-syringin; 2-chlorogenic acid; 3-rutin; 4-kaempferol-3-O-rutinoside; 5-3,5-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester.

Sephadex LH-20 柱分离, 洗脱剂为 40% 乙醇, 再经液相制备(50 mm×250 mm C₁₈ 柱, 流动相为 22% 乙腈, 波长为 256 nm, 流速为 50 mL·min⁻¹), 收集目标流份得化合物 5(23 mg, 白色粉末)。SS-3 先用 Sephadex LH-20 柱分离(50 mm×250 mm C₁₈ 柱, 洗脱剂为 50% 乙醇), 液相跟踪检测后, 再经液相制备(50 mm×250 mm C₁₈ 柱, 流动相为 35% 乙腈, 波长为 325 nm, 流速为 50 mL·min⁻¹), 收集目标流份得化合物 2(20 mg, 白色粉末)和化合物 4(18 mg, 白色粉末)。SS-5 先用 Sephadex LH-20 柱分离(洗脱剂为 40% 乙醇), 再用液相制备(50 mm×250 mm C₁₈ 柱, 流动相为 22% 乙腈, 波长为 256 nm, 流速为 50 mL·min⁻¹), 收集目标流份得化合物 9(14 mg, 黄色粉末)。SS-7 先用 Sephadex LH-20 柱分离(洗脱剂为 40% 乙醇), 再用液相制备(50 mm×250 mm C₁₈ 柱, 流动相为 25% 乙腈, 波长为 256 nm, 流速为 50 mL·min⁻¹), 收集目标流份得化合物 10(19 mg, 类白色粉末)。

2.1.2.2 结构鉴定 化合物 2, 白色粉末。¹H-NMR

(CD₃OD, 400 MHz) δ _H: 7.59(1H, d, *J*=15.8 Hz, 7''-H), 7.56(1H, d, *J*=15.8 Hz, 7'-H), 7.06(1H, d, *J*=2.0 Hz, 2''-H), 7.04(1H, d, *J*=2.0 Hz, 2'-H), 6.94(1H, dd, *J*=8.3, 2.1 Hz, 6''-H), 6.89(1H, dd, *J*=8.2, 2.1 Hz, 6'-H), 6.79(1H, d, *J*=8.2 Hz, 5''-H), 6.75(1H, d, *J*=8.2 Hz, 5'-H), 6.31(1H, d, *J*=15.8 Hz, 8''-H), 6.27(1H, d, *J*=15.8 Hz, 8'-H), 5.66(1H, m, 3-H), 5.02(1H, dd, *J*=9.0, 3.3 Hz, 4-H), 4.40(1H, m, 5-H), 2.38~2.06(4H, m, 2, 6-H); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ _C: 178.0(-COOH), 168.6 (C-9''), 168.5(C-9'), 149.6 (C-4', 4''), 147.4/ 147.3 (C-7', 7''), 146.8(C-3', 3''), 127.8(C-1'), 127.7(C-1''), 123.2(C-6'), 123.1(C-6''), 116.5(C-5'), 116.5(C-5''), 115.3(C-2'), 115.1(C-2''), 115.0(C-8''), 114.9(C-8'), 76.5(C-1), 75.2(C-4), 70.1(C-5), 65.8(C-3), 41.9 (C-2), 37.0(C-6)。以上数据与文献报道^[5]基本一致, 且与异绿原酸 B 对照品在 HPLC 保留时间一致, 故鉴定化合物为 3,4-O-二咖啡酰奎宁酸(异绿原酸 B), 结构式见图 2。

化合物 **4**, 白色粉末。¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ _H: 7.48(1H, d, J =15.8 Hz, 7"-H), 7.42(1H, d, J =15.8 Hz, 7'-H), 7.03(2H, brs, 2', 2"-H), 6.97(2H, m, 6', 6"-H), 6.75(1H, d, J =8.3 Hz, 5', 5"-H), 6.24(1H, d, J =15.8 Hz, 8"-H), 6.15(1H, d, J =15.8 Hz, 8'-H), 5.39(1H, m, 5-H), 4.96(1H, d, J =7.6 Hz, 4-H), 4.18(1H, brs, 3-H), 2.21~1.81(4H, m, 2, 6-H); ¹³C-NMR(CD₃OD, 100 MHz) δ _C: 175.4(-COOH), 166.5(C-9"), 166.1(C-9'), 149.0(C-4', 4"), 146.0(C-7', 7"), 125.9(C-1', 1"), 121.9/121.8(C-6', 6"), 116.3/116.2(C-5', 5"), 115.3(C-2', 2"), 114.3(C-8'), 114.1(C-8"), 74.2(C-1), 74.0(C-4), 68.2(C-5), 67.0(C-3), 38.0(C-2)。以上数据与文献报道^[5]基本一致, 且与异绿原酸 C 对照品在 HPLC 保留时间一致, 故鉴定化合物为 4,5-O-二咖啡酰奎宁酸(异绿原酸 C), 结构式见图 2。

化合物 **5**, 白色粉末。¹H-NMR(CD₃OD, 400 MHz) δ _H: 6.91(1H, s, 2'-H), 6.90(1H, s, 6'-H), 6.64(1H, s, 2-H), 6.55(1H, d, J =7.8 Hz, 5-H), 6.48(1H, d, J =15.0 Hz, 7"-H), 6.45(1H, d, J =7.8 Hz, 6-H), 6.31(1H, dt, J =15.0, 5.1 Hz, 8'-H), 4.65(1H, d, J =6.9 Hz, 1"-H), 4.10(2H, d, J =4.6 Hz, 9'-H), 3.80(1H, m, 8-H), 3.76(3H, s, 3'-OCH₃), 3.65(3H, s, 3-OCH₃), 3.61(1H, m, 9a-H), 3.58(1H, m, 6"-a-H), 3.46(1H, m, 6"-b-H), 3.45(1H, m, 9b-H), 3.25(1H, m, 2"-H), 3.23(1H, m, 5"-H), 3.16(1H, m, 4"-H), 3.00(1H, m, 3"-H), 2.90(1H, dd, J =14.2, 6.1 Hz, 7a-H), 2.66(1H, dd, J =14.2, 8.8 Hz, 7b-H); ¹³C-NMR(CD₃OD, 100 MHz) δ _C: 152.2(C-3'), 147.5(C-3), 144.6(C-4), 143.3(C-4'), 138.5(C-5'), 133.6(C-1'), 131.9(C-1), 130.4(C-8'), 129.1(C-7'), 121.3(C-6), 118.2(C-6'), 115.4(C-5), 113.0(C-2), 108.4(C-2'), 104.0(C-1"), 77.2(C-3"), 76.9(C-5"), 74.9(C-2"), 70.0(C-4"), 65.2(C-9), 62.0(C-9'), 61.3(C-6"), 56.3(3'-OCH₃), 55.7(3-OCH₃), 41.1(C-8), 37.8(C-7)。以上数据与文献报道^[6]一致, 故鉴定该化合物为 saikolignanoside A, 结构式见图 2。

化合物 **9**, 黄色粉末。ESI-MS *m/z*: 181.086 0 [M+H]⁺; ¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ _H: 6.99(1H, s, 2-H), 6.79(1H, d, J =8.1 Hz, 6-H), 6.71(1H, d, J =8.1 Hz, 5-H), 6.41(1H, d, J =15.9 Hz, 7-H), 6.17(1H, dt, J =15.9, 5.5 Hz, 8-H), 4.07(2H, d, J =5.4 Hz, 9-H), 3.78(3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR(DMSO-d₆, 100 MHz) δ _C: 148.3(C-3), 129.5(C-7), 127.8(C-8), 119.9(C-6), 115.9(C-5), 62.2(C-9), 56.0(-OCH₃)。以上数据与文献报道^[7]基本一致, 且与松柏醇对照品在 HPLC 保留时间一致, 故鉴定化合物为松柏醇, 结构式见图 2。

化合物 **10**, 类白色粉末。¹H-NMR(DMSO-d₆, 400 MHz) δ _H: 9.65(1H, d, J =8.0 Hz, 9-H), 7.64(1H, d, J =16.0 Hz, 7-H), 7.10(2H, s, 2, 6-H), 6.91(1H, dd, J =16.0, 8.0 Hz, 8-H), 5.10(1H, d, J =5.7 Hz, Glc-1-H), 4.95~4.05(6H, m, Glc-2, 3, 4, 5, 6-H), 3.82(6H, s, OCH₃X2); ¹³C-NMR(DMSO-d₆,

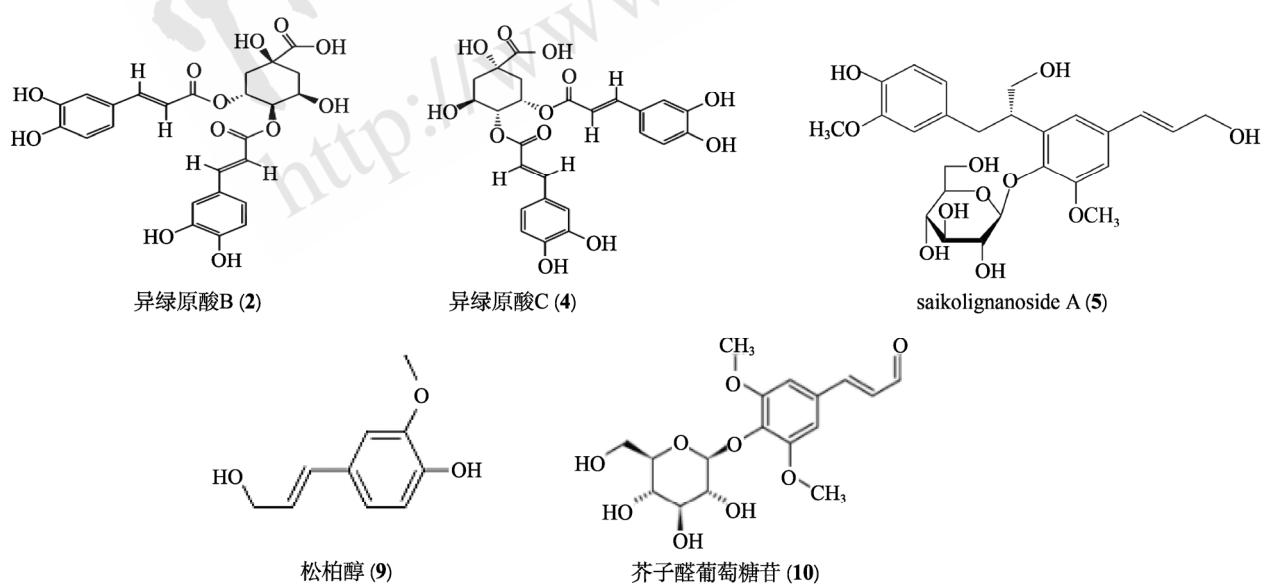


图 2 化合物的结构式
Fig.2 Chemical structures of compounds

100 MHz) δ_C : 194.3(C-9), 152.8(C-7), 153.5(C-3, 5), 136.9(C-4), 129.4(C-1), 127.9(C-8), 107.1(C-2, 6), 102.0(C-1'), 77.4(C-5'), 76.6(C-3'), 74.2(C-2'), 69.9(C-4'), 60.8(C-6'), 56.5(3, 5-OCH₃)。以上数据与文献报道^[8]基本一致,且与芥子醛葡萄糖苷对照品在HPLC保留时间一致,故鉴定化合物为芥子醛葡萄糖苷,结构式见图2。

2.2 树参茎液相指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 SunfireTM C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),流动相为乙腈(A)-混合水溶液(含甲酸 0.2%和四氢呋喃 0.2%)(B),梯度洗脱: 0~5 min, 4%→9%A; 5~35 min, 9%→14%A; 35~50 min, 14%A; 50~60 min, 14%→20%A, 60~80 min, 20%→30%A。检测波长为 256 nm,柱温30 °C,体积流量为 1.0 mL·min⁻¹,分析时间为80 min,进样量为 5 μ L。

2.2.2 供试品溶液的制备 称取干燥过二号筛树参茎粉末 100 g,用 8 倍量 80%乙醇加热回流提取 3 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩至无醇味,置于减压干燥箱内烘干。称取醇提后所得浸膏混悬于 50 mL 水中,转移到分液漏斗中,正丁醇萃取,重复 3 次,收集萃取所得成分至蒸发皿中减压干燥得浸膏(活性部位)。称取上述相当于原药材 5 g 的浸膏,用甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中,过滤,即得供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液的制备 分别精密称取对照品适量至 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容制成含紫丁香苷为 468.7 mg·L⁻¹、绿原酸 513.4 mg·L⁻¹、芥子醛葡萄糖苷 283.1 mg·L⁻¹、saikolignanoseide A 720.0 mg·L⁻¹、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸 214.1 mg·L⁻¹、4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸 400.0 mg·L⁻¹的对照品储备液。再分别精密移取上述对照品储备液 2, 2, 1, 1, 4, 1 mL 于同一 15 mL 量瓶中,加甲醇定容,即得混合对照品溶液。

2.2.4 方法学考察 以分离度较好、保留时间适中的绿原酸为参照,进行精密度、重复性、稳定性考察。

2.2.4.1 精密度考察 取 5 号样品按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,记录色谱图,相对保留时间的 RSD 为 0.07%~0.23%,相对峰面积的 RSD 为 0.15%~2.96%,结果表明各共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积基本一致,测定结果精密度较好。

2.2.4.2 重复性试验 按“2.2.2”项下的方法同时制备 6 份供试品溶液,分别进样,记录色谱图,相对保留时间的 RSD 为 0.07%~0.27%,相对峰面积的 RSD 为 1.85%~4.67%,结果表明方法重复性较好。

2.2.4.3 稳定性试验 取 5 号样品按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别在 0, 2, 6, 12, 24, 48 h 进样,记录色谱图,相对保留时间的 RSD 为 0.06%~0.41%,相对峰面积的 RSD 为 0.62%~2.91%,结果表明样品在 48 h 内基本稳定。

2.2.5 指纹图谱的建立及相关分析

2.2.5.1 指纹图谱的建立和相似度分析 取 12 批树参样品按“2.2.2”项下制备供试品溶液,另取“2.2.3”项下混合对照品溶液,均按“2.2.1”项下色谱条件测定,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.0 版)进行评价,以 S1 为参照图谱,选择时间宽度 0.5,生成色谱的方法为平均值,生成对照图 R,确定了 9 个共有峰,各批样品与对照指纹图谱比较相似度值为 0.901~0.992。结果见图 3~5。

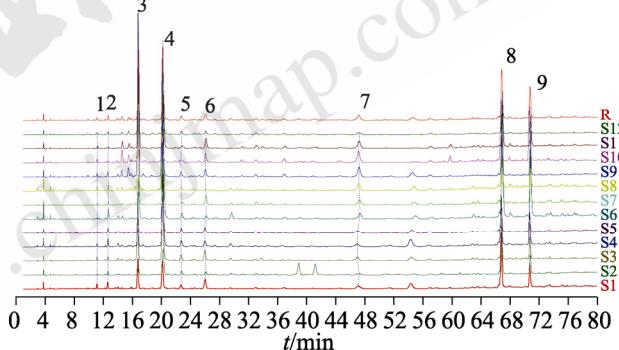


图 3 12 批样品汇总图
1,2,5-未知峰; 3-紫丁香苷; 4-绿原酸; 5-芥子醛葡萄糖苷; 6-saikolignanoseide A; 7-3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸; 8-4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸。

Fig. 3 Fingerprint of 12 batches of *Dendropanax dentiger*
1,2,5-unknown peak; 3-syringin; 4-chlorogenic acid; 6-sinapaldehyde glucoside; 7-saikolignanoseide A; 8-3,4-O-caffeoylequinic acid methyl ester; 9-4,5-O-caffeoylequinic acid methyl ester.

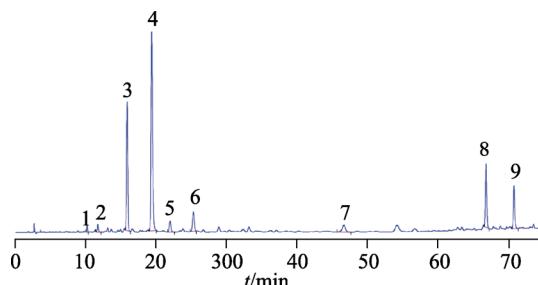


图 4 典型样品图
Fig. 4 Typical chromatogram of *Dendropanax dentiger*

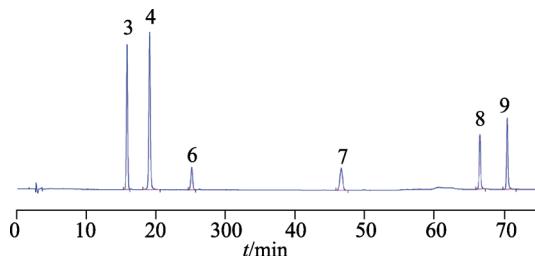


图 5 混合对照品色谱图

3-紫丁香苷；4-绿原酸；6-芥子醛葡萄糖苷；7-saikolignanoside A；8-3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸；9-4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸。

Fig. 5 Chromatogram of mixed reference

3-syringin; 4-chlorogenic acid; 6-sinapaldehyde glucoside; 7-saikolignanoside A; 8-3,4-O-caffeoylequinic acid methyl ester; 9-4,5-O-caffeoylequinic acid methyl ester.

2.2.5.2 共有指纹峰的相对保留时间 以绿原酸为参照物,计算各色谱峰的相对保留时间,结果其相对保留时间为0.529~3.644, RSD为0.14%~0.31%。

2.2.5.3 共有指纹峰的相对峰面积 以绿原酸为参照物,计算各色谱峰的相对峰面积,结果其相对峰面积为0.003 48~1.785, RSD为52.42%~85.15%。

3 讨论

采用LC-MS联用、NMR法对树参茎中所含的化合物进行了分析,共分离鉴定出10个化合物,分别是绿原酸、3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸(异绿原酸B)、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸(异绿原酸A)、4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸(异绿原酸C)、saikolignanoside A等酚酸成分,芦丁、山柰酚-3-O-芸香糖苷等黄酮类成分,紫丁香苷、松柏醇、芥子醛葡萄糖苷等苯丙素类化合物。

通过液相色谱-质谱联用可根据相对分子质量、特征碎片进行成分鉴别,但是质谱对所用色谱柱、流动相有特定的要求,未能对样品中的紫丁香苷和绿原酸进行完全分离,而在普通液相中可应用的色谱柱类型更加丰富,通过调节流动相,可将上述2种成分完全分离,并且方法简单,便于推广应用,故而,本项目组在液相色谱-质谱联用分析结果的基础上,建立了树参茎高效液相指纹图谱鉴别方法。

通过指纹图谱的研究,发现紫丁香苷、绿原酸、芥子醛葡萄糖苷、saikolignanoside A、3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸为抗炎活性部位的主要化学成分;不同树参茎样品在13~15 min、28~44 min、50~64 min有小峰的差别,

为提高分离度,和项目组已建立的叶的指纹图谱条件^[4]相比,将流动相中四氢呋喃用量提高到了0.2%。树参是常绿植物,上述3个时间段色谱峰差异性产生的原因和样品的生长年限、生长环境以及采收季节等因素息息相关。需要扩充样品类型进行相关因素的细化分类研究,进而揭示根源。

本研究确证了绿原酸(1)、3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸(2)、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸(3)、4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸(4)、saikolignanoside A(5);黄酮类:芦丁(6)、山柰酚-3-O-芸香糖苷(7);苯丙素类:紫丁香苷(8)、松柏醇(9)、芥子醛葡萄糖苷(10)10个化合物,其中紫丁香苷、绿原酸、芥子醛葡萄糖苷、saikolignanoside A、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸为指纹图谱的特征成分,因3,4-O-二咖啡酰基奎宁酸(异绿原酸B)主要存在树参茎的水提取液中,山柰酚-3-O-芸香糖苷主要存在醇溶液中,2个化合物在活性部位中量极少,不同样品活性部位中芦丁、松柏醇含量差异极大,故未作为指纹图谱的共有峰。

REFERENCES

- [1] 雷后兴,李永福.中国畲族医药学[M].北京:中国中医药出版社,2007.
- [2] 贾敏如,李星炜.中国民族药志要[M].北京:中国医药科技出版社,2005: 217.
- [3] 雷后兴,李建良.中国畲药学[M].北京:人民军医出版社,2014: 175.
- [4] LIU M, CHEN M, CHEN G Y, et al. Establishing fingerprint of the leaves of *Dendropanax dentiger* based on LC-MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(1): 40-44.
- [5] NI F Y, SONG Y L, LIU L, et al. Preparation technology of isochlorogenic acids A, B, and C[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2015, 46(3): 369-373.
- [6] LI X N, CHU C, MAO H Q, et al. Chemical constituents from *Lycii Cortex*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(9): 805-808.
- [7] ZHONG H H, FANG S Q, CHEN Y J, et al. Chemical constituents from *Eupatorium lindleyanum* and their anti-inflammatory activities[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2017, 39(2): 329-333.
- [8] REN G, LUO Z P, LI W Y, et al. Isolation and anti-PMN respiratory burst activity of phenylpropanoids compounds from *Dendropanax Chevalieri*[J]. Chin Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2013, 19(14): 80-83.

收稿日期: 2021-09-06

(本文责编: 沈倩)