

• 药剂与工艺 •

基于组学方法的蒙药复方森登-4 配伍机制研究

王曦烨^{1,2,3}, 李 丹^{1,2}, 唐兴盟^{1,2}, 许 良^{1,2*}

1. 内蒙古民族大学化学化工学院, 内蒙古 通辽 028042

2. 天然产物化学及功能分子合成自治区重点实验室, 内蒙古 通辽 028042

3. 内蒙古蒙医药工程技术研究院, 内蒙古 通辽 028042

摘要: 目的 探究蒙药复方森登-4 的配伍机制。方法 蒙药文冠木与梔子、川楝子、诃子以 5:3:1:1 的比例配伍后得到蒙药复方森登-4; 配伍前后的样品采用 Waters Acquity BEH-C₁₈ 柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 为色谱柱, 0.1% 甲酸水溶液-甲醇为流动相进行梯度洗脱, 柱温 40 °C, 体积流量 0.4 mL/min, 进样量 10 μL; 并将超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS) 技术与主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 相结合, 对蒙药复方森登-4 配伍前后组方中君药文冠木主要化学成分变化情况进行了分析。结果 在 PCA 与 OPLS-DA 模型中, 文冠木与复方森登-4 均可明显得到区分; 配伍后 8 个化合物在两组间存在显著差异 ($P < 0.05$), 其中儿茶素、没食子儿茶素、双氢杨梅素、槲皮素的溶出量在配伍后下降, 而 xanthocerasic acid、3β-hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid、3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid、芦丁的溶出量升高。结论 蒙药复方森登-4 的抗炎及抗风湿活性可能与其中的君药文冠木配伍之后某些指标成分的溶出量变化有一定关系。

关键词: 蒙药; 复方森登-4; 文冠木; 梔子; 川楝子; 诃子; 质谱; 配伍; 化学标记物; 儿茶素; 没食子儿茶素; 双氢杨梅素; 槲皮素; xanthocerasic acid; 3β-hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid; 3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid; 芦丁

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)05-0736-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.05.008

Research on compatibility mechanism of Mongolian medicine Sendeng-4 based on metabonomic methods

WANG Xi-ye^{1,2,3}, LI Dan^{1,2}, TANG Xing-meng^{1,2}, XU Liang^{1,2}

1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University for the Nationalities, Tongliao 028042, China

2. Key Laboratory of Natural Product Chemistry and Functional Molecular Synthetic Autonomous Region, Tongliao 028042, China

3. Mongolian Medicine Engineering Technology Research Institute of Inner Mongolia, Tongliao 028042, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of the compatibility of Mongolian medicine Sendeng-4. **Methods** Sendeng-4 was composed of *Xanthocerasis Sorbifoliae Lignum* seu *Ramulus et Folium* and its co-decoction with *Gardeniae Fructus*, *Toosendan Fructus*, and *Chebulae Fructus* with a mass ratio of 5:3:1:1. BEH C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) was used as the chromatographic column, water (0.1% formic acid)-methanol were used as mobile phase for the gradient elution, and the ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-MS), principle component analysis (PCA), and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to analyze the chemical constituent changes of *Xanthocerasis Sorbifoliae Lignum* seu *Ramulus et Folium* and its co-decoction. **Results** The significant differences between the group of *Xanthocerasis Sorbifoliae Lignum* seu *Ramulus et Folium* and Sendeng-4 were observed in PCA and OPLS-DA model. There were significant differences among eight chemical compounds after compatibility ($P < 0.05$). The relative contents of catechin, (-)-gallocatechin, dihydromyricetin, quercetin decreased, xanthocerasic acid, 3β-hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid, 3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid, and rutin were increased. **Conclusion** Maybe the anti-inflammatory and anti-rheumatic activity of Sendeng-4

收稿日期: 2015-11-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30760299, 81260682, 81560702); 内蒙古自治区蒙医药科技重大专项子课题 (GCY201508034)

作者简介: 王曦烨, 讲师, 博士, 研究方向为药物代谢组学。Tel: 15114750911 E-mail: wangxiye1983@163.com

*通信作者 许 良, 教授, 博士, 研究方向为天然产物化学。Tel: 13947521310 E-mail: nmgl66@163.com

have the relationship with the content changes of some index component in *Xanthoceras Sorbifoliae Lignum seu Ramulus et Folium* after compatibility.

Key words: Mongolian medicine; Sendeng-4; *Xanthoceras Sorbifoliae Lignum seu Ramulus et Folium*; *Gardeniae Fructus*; *Toosendan Fructus*; *Chebulae Fructus*; mass spectrometry; compatibility; chemical markers; catechin; (-)-galocatechin; dihydromyricetin; quercetin; xanthoceric acid; 3 β -hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid; 3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid; rutin

蒙药文冠木 *Xanthoceras Sorbifoliae Lignum seu Ramulus et Folium* 为无患子科 (Sapindaceae) 文冠果属 *Xanthoceras* Bunge 植物文冠果 *Xanthoceras sorbifolium* Bunge 的茎干或枝条的干燥木部。蒙医理论认为该药具有燥“协日乌素”、清热、消肿、止痛的作用，用于游痛症、痛风症、热性“协日乌素”病、青腿病、皮肤瘙痒、脱发、黄水疮、风湿性心脏病、关节疼痛、淋巴结肿大、浊热的治疗^[1-2]。蒙药复方森登-4 是由文冠木、梔子、川楝子、诃子共研细末而后制成汤剂，方中文冠木能够燥黄水、消肿止痛，为君药；川楝子清热、燥黄水，为臣药；梔子清血热，为佐药；诃子解毒、调理体素，为使药。本方具有清热、燥黄水、消肿功能，主治痛风、痹病、关节黄水病和水肿^[3]。

目前，组学方法已被广泛应用于药物的指纹图谱鉴定^[4]、药物炮制^[5-7]、药物代谢^[8-10]等方面的研究，而多元线性回归分析法已被应用于复方森登-4 的药效物质基础研究^[11-12]，但文冠木配伍产生复方森登-4 的机制研究未见报道。为进一步研究文冠木的配伍机制，本实验采用超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS) 技术结合化学计量学方法，利用主成分分析 (PCA) 对文冠木与复方森登-4 的轮廓进行区分、利用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 寻找文冠木与复方森登-4 间的化学标记物，用于揭示文冠木配伍生成复方森登-4 后抗炎及抗风湿活性增强的原因。

1 仪器和试药

Waters 超高效液相色谱仪，Waters Xevo G-2S QTOF 质谱仪，Waters, UK; F-54BW 型 pH 计，HORIBA, Japan。甲醇、甲酸为色谱纯试剂，美国 Fisher 公司；提取用乙醇为分析纯，北京化工厂；水为超纯水 (18.2 M Ω ·cm)。

文冠木为无患子科植物文冠果 *Xanthoceras sorbifolia* Bunge 的干燥茎干，购于安国市健仁药材有限公司；梔子为茜草科梔子属植物梔子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的果实，购于亳州市药州商行；川楝子为楝科楝属植物川楝 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果实，购于亳州市中正中药材饮

片有限公司；诃子为使君子科植物诃子 *Terminalia chebula* Retz. 的干燥成熟果实，购于安国市京源中药饮片有限公司；所有中药饮片均由内蒙古民族大学化学化工学院从事天然产物研究工作的包玉敏教授进行鉴定。

对照品槲皮素 (批号 100081-201509)、芦丁 (批号 100080-201409)、儿茶素 (批号 110877-201203)、没食子儿茶素 (批号 111987-201501)、双氢杨梅素 (批号 110878-201102) 购于成都曼斯特生物科技有限公司，所有对照品质量分数均 $\geq 98\%$ 。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及质谱分析条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity BEH-C₁₈ 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)；柱温 40 $^{\circ}$ C；流动相为 0.1% 甲酸水溶液-甲醇，二元线性梯度洗脱：0~8 min, 1%~80% 甲醇；8~12 min, 80%~100% 甲醇；12~14 min, 100% 甲醇；14~15 min, 100%~1% 甲醇；15~17 min, 1% 甲醇；体积流量 0.4 mL/min；进样量 10 μ L。

2.1.2 质谱条件 ESI 离子源，采用正离子模式，扫描范围： m/z 100~1 000，毛细管电压 3 000 V，锥孔电压 40 V，离子源温度 100 $^{\circ}$ C，雾化温度 400 $^{\circ}$ C，壳气体积流量 800 L/h。质谱以亮氨酸脑啡肽做内标，甲酸钠校正质量轴。

2.1.3 数据处理方法 所有 UPLC-MS 数据均使用 Masslynx V4.1 软件进行峰提取、峰对齐及归一化处理，用 EZinfo 2.0 软件进行 PCA、OPLS-DA 分析。

2.2 供试品溶液的制备

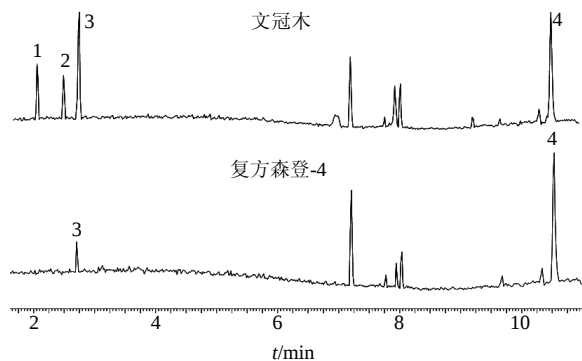
2.2.1 文冠木单味药材供试品溶液的制备 取文冠木药材粉末 1.5 g，精密称定，以 95% 乙醇 15 mL 为溶剂，水浴回流提取 2 次，每次 2 h，减压抽滤，合并 2 次提取液，旋转蒸发挥干溶剂，残渣用 2 mL 甲醇溶解，0.45 μ m 微孔滤膜滤过，待测。

2.2.2 复方森登-4 供试品溶液的制备 分别称取 1.5 g 文冠木、0.9 g 川楝子、0.3 g 梔子、0.3 g 诃子，将 4 种粉末混合，以 95% 乙醇 30 mL 为溶剂，水浴回流提取 2 次，每次 2 h，减压抽滤，合并 2 次提取液，旋转蒸发挥干溶剂，残渣用 2 mL 甲醇溶解，

0.45 μm 微孔滤膜滤过, 待测。

2.3 UPLC-MS 图谱分析

蒙药文冠木、复方森登-4 (文冠木、川楝子、栀子、诃子共煎液) 的基峰色谱图见图 1。由图可见, 文冠木配伍后儿茶素的溶出量明显下降, 没食子儿茶素、双氢杨梅素所代表的色谱峰消失, 而芦丁的溶出量略有升高。文冠木配伍过程中, 由于其



1-没食子儿茶素 2-双氢杨梅素 3-儿茶素 4-芦丁
1-(-)gallocatechin 2-dihydromyricetin 3-catechin 4-rutin

图 1 文冠木与复方森登-4 的基峰离子色谱图

Fig. 1 Base peak ion chromatograms of *Xanthoceras Sorbifoliae Lignum seu Ramulus et Folium* and *Sendeng-4*

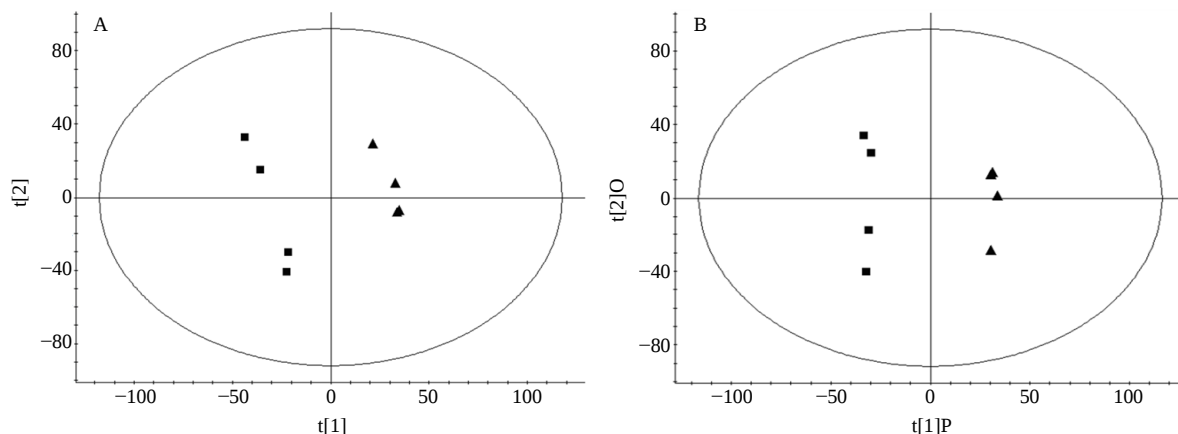


图 2 文冠木 (■) 与复方森登-4 (▲) 的 PCA (A) 和 OPLS-DA (B) 得分图

Fig. 2 PCA (A) and OPLS-DA (B) score plot of *Xanthoceras Sorbifoliae Lignum seu Ramulus et Folium* (■) and *Sendeng-4* (▲)

模型质量良好。

为了找到引起文冠木配伍变化的化学标记物, 需要利用有监督的识别模式——OPLS-DA 分析。有监督的模式识别方法可以扩大组间差异, 但需要利用外部模型验证方法排列实验来证明模型的有效性。从图 2-B 可以看出, 在 OPLS-DA 得分图中文冠木与森登-4 依然可以被明显区分, 而模型质量评价指标分别为 $R_Y^2=0.8358$, $Q^2=0.8150$ 。

它单味药含有复杂的化学成分, 如甘草中含有大量的甘草酸、甘草次酸等物质^[13], 致使共煎液的 pH 值相对于文冠木单煎液发生了变化 (文冠木单煎液与复方森登-4 溶液的 pH 值分别为 6.2、5.4), 文冠木中的黄酮类成分在此 pH 值条件下不稳定, 容易与其他成分发生反应, 因而导致其溶出量下降; 有研究表明^[14], 当 pH 值在 4~6 时, 药材中芦丁的量比较稳定, 而当 $\text{pH}<4$ 或 $\text{pH}>6$ 时, 芦丁的量急剧减少, 因此配伍后 pH 值为 5.4 的条件可能有利于芦丁的溶出; 另一方面, 川楝子中同样含有一定量的芦丁^[15], 因此, 文冠木经配伍后芦丁的溶出量反而升高。

2.4 PCA 与 OPLS-DA 结果分析

无监督的模式识别方法——PCA 分析可以反映数据的原始状态, 直观地显示不同样品间的整体差异, 故首先对文冠木与复方森登-4 样品进行 PCA 分析, 结果见图 2。从图 2-A 可以看出, 文冠木与复方森登-4 样品可明显区分, 这说明文冠木配伍后某些化学成分的相对质量分数发生了明显变化, 模型质量评价指标分别为 $R_X^2[1]=0.5025$, $R_X^2[2]=0.3174$, 表明模型大致能够反映 84% 的变量信息,

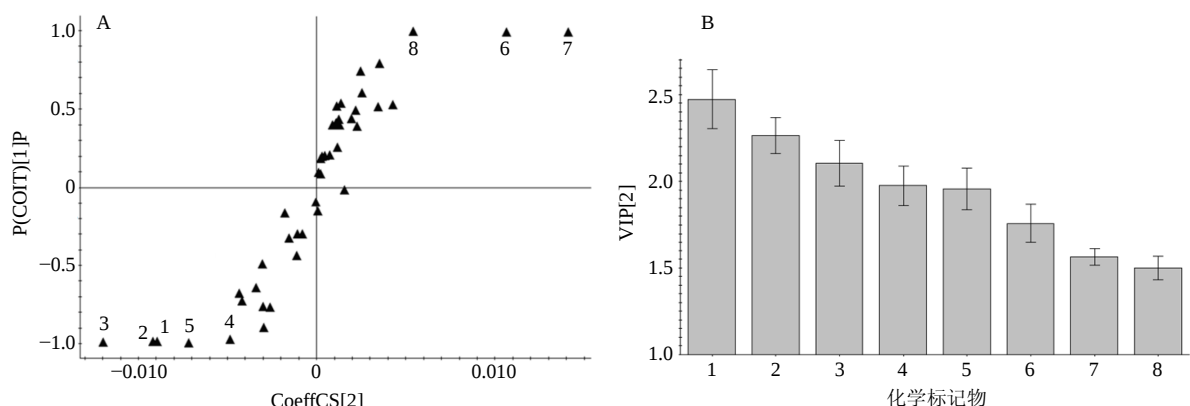
为进一步确定配伍后各成分变化情况, 采用 OPLS-DA 对文冠木、复方森登-4 进行了分析, 得到了 S-Plot 图 (图 3-A) 以及 VIP 图 (图 3-B)。在图 3-A 中, “S” 曲线中的每 1 个点代表 1 个变量, 变量对分类的重要程度由 VIP 值的大小来衡量, 变量离原点越远, VIP 值越大。根据图 3-B 中的 VIP 值对变量进行筛选, 取 $\text{VIP}>1.0$ 的物质作为化学标记物。通过与对照品比对、高分辨质谱数据及文献

报道资料对化学标记物进行鉴定, 共得到 8 种化学标记物 ($P < 0.05$), 分别为儿茶素 (1)、没食子儿茶素 (2)、双氢杨梅素 (3)、槲皮素 (4)、xanthocerasic acid (5)、 3β -hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid (6)、3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid (7)、芦丁

(8)。文冠木与复方森登-4 的化学标记物推断结果见表 1。

2.5 文冠木与复方森登-4 化学标记物相对质量分数的比较

利用 Masslynx V4.1 软件对 UPLC-MS 数据进行



1- 儿茶素 2- 没食子儿茶素 3- 双氢杨梅素 4-xanthocerasic acid 5- 槲皮素 6- 3β -hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid 7-3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid 8- 芦丁, 下图同
1-catechin 2-(-)-gallo catechin 3-dihydromyricetin 4-xanthocerasic acid 5-quercetin 6- 3β -hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid 7-3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid 8-rutin, same as below

图 3 文冠木与复方森登-4 的 OPLS-DA S-Plot (A) 与 VIP 图 (B)

Fig. 3 OPLS-DA S-Plot (A) and VIP (B) of *Xanthocerasis Sorbifoliae Lignum seu Ramulus et Folium* and Sendeng-4

表 1 文冠木与复方森登-4 中化学标记物的数据

Table 1 Data of chemical markers of *Xanthocerasis Sorbifoliae Lignum seu Ramulus et Folium* and Sendeng-4

序号	保留时间/min	测量值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差/ $\times 10^{-6}$	分子式	趋势*	化合物
1	2.72	291.086 8	291.086 3	1.8	$C_{15}H_{15}O_6$	↓	儿茶素
2	2.03	307.081 1	307.081 2	0.3	$C_{15}H_{15}O_7$	↓	没食子儿茶素
3	2.46	321.060 8	321.060 5	1.0	$C_{15}H_{13}O_8$	↓	双氢杨梅素
4	9.23	471.348 7	471.349 6	2.0	$C_{30}H_{47}O_4$	↑	xanthocerasic acid
5	4.00	303.049 3	303.049 9	2.1	$C_{15}H_{11}O_7$	↓	槲皮素
6	9.83	457.367 1	457.367 6	1.2	$C_{30}H_{49}O_3$	↑	3β -hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid
7	10.54	455.351 6	455.352 0	0.9	$C_{30}H_{47}O_3$	↑	3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid
8	11.98	611.160 2	611.160 7	0.9	$C_{27}H_{31}O_{16}$	↑	芦丁

*复方森登-4 相对于文冠木的量, ↓ 下降, ↑ 上升

*content of Sendeng-4 related to *Xanthocerasis Sorbifoliae Lignum seu Ramulus et Folium*, ↓ decrease, ↑ increase

处理, 得到了文冠木与复方森登-4 中所有化学标记物的相对质量分数, 从图 4 中可以看到, 儿茶素、没食子儿茶素、双氢杨梅素、槲皮素的相对质量分数下降, 而 xanthocerasic acid、 3β -hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid、3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid、芦丁的相对质量分数升高。

3 讨论

本实验采用 UPLC-MS 技术与化学计量学相结

合的方法研究蒙药复方森登-4 配伍前后其君药文冠木的主要化学成分的变化情况。复方森登-4 配伍后, 文冠木中 3 种成分 xanthocerasic acid、 3β -hydroxytirucalla-7,24-dien-21-oic acid、3-oxotirucalla-7,24-dien-21-oic acid 的量增加, 已有的研究表明, 这 3 种成分具有显著抑制 HIV 病毒的活性^[16], 因此, 文冠木配伍组成森登-4 之后其抗 HIV 病毒的活性可能增强; 文献报道^[17-18]芦丁经大鼠 ip, 对植入羊毛

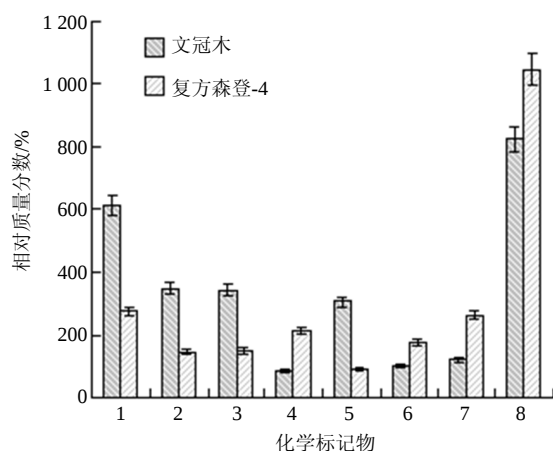


图4 文冠木与复方森登-4间化学标记物的相对质量分数变化图

Fig. 4 Relative content changes of chemical marker between *Xanthoceras sorbifoliae Lignum seu Ramulus et Folium* and Sendeng-4

球的发炎过程有明显的抑制作用, 芦丁的硫酸酯钠对大鼠热浮肿同样有很强的抗炎作用, 而本实验结果显示, 文冠木配伍后其抗炎镇痛指标成分芦丁的量明显增加, 因此, 本实验结果在一定程度上阐释了蒙药复方森登-4配伍的科学原理, 即蒙药复方配伍后其中一些活性指标成分的量增加导致了药效的增强。

参考文献

- [1] 中国医学科学院药用植物资源开发研究所. 中药志 (第5册) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 1977.
- [3] 武娜, 许海杰, 董玉. 蒙药森登-4 复方研究进展 [J]. 内蒙古医学院学报, 2010, 32(3): 5-8.
- [4] 秦建平, 李家春, 吴建雄, 等. 基于 UPLC 结合化学计量学方法的龙血竭指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(6): 1114-1118.
- [5] 胥敏, 杨诗龙, 张超, 等. 基于气味客观化的黄连及其炮制品鉴别研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 4(1):

89-93.

- [6] 李娟, 张松, 秦雪梅, 等. 基于 NMR 代谢组学技术的款冬花生品与蜜炙品化学成分比较 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3009-3016.
- [7] 李艺, 范玛莉, 邢婕, 等. 龟龄集中细辛特殊炮制工艺的代谢组学研究 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2385-2393.
- [8] 韩利文, 赵亮, 楚杰, 等. 采用 GC-MS 代谢组学技术表征阿司咪唑诱导斑马鱼心脏毒性的内源性代谢物 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(1): 45-50.
- [9] 高家荣, 庄星星, 魏良兵, 等. 基于 UPLC/QTOF-MS 技术的丹蛭降糖胶囊在 2 型糖尿病大鼠体内尿液代谢组学研究 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2096-2103.
- [10] 田俊生, 左亚妹, 孙海峰, 等. GC-MS 代谢组学分析逍遥散干预抑郁模型大鼠盲肠代谢物组的变化规律 [J]. 中草药, 2015, 46(13): 1931-1936.
- [11] 许良, 毕开顺. 多元线性回归分析法在蒙药森登-4 汤谱效关系解析中的应用 [J]. 计算机与应用化学, 2008, 25(10): 1189-1192.
- [12] 许良, 高扬, 刘妍, 等. 蒙药森登-4 汤抗炎镇痛有效部位及其化学成分的研究 [J]. 时珍国医国药, 2013, 24(1): 1-3.
- [13] 彭伟, 蒋燕萍, 傅超美, 等. 四逆汤中甘草与其他药味配伍药效成分变化规律研究 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 84-88.
- [14] 张宝善, 陈锦屏, 刘芸. 加工条件对红枣中芦丁含量变化的影响研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(8): 175-177.
- [15] 李振华, 徐金娣, 鞠建明, 等. 川楝子水提化学成分的分析 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 496-501.
- [16] Ma C, Nakamura N, Hattori M, et al. Inhibitory effects on HIV-1 protease of constituents from the wood of *Xanthoceras sorbifolia* [J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(2): 238-242.
- [17] 李玉山. 芦丁的资源、药理及主要剂型研究进展 [J]. 氨基酸和生物资源, 2013, 35(3): 13-16.
- [18] 藏志和, 曹丽萍, 钟铃. 芦丁药理作用及制剂的研究进展 [J]. 医药导报, 2007, 26(7): 758-760.