

复方罗欧咳祖帕抗氧化活性及黄酮、酚酸类化学成分分析研究

李 玮¹, 李 莉^{1*}, 刘佳倪¹, 王晓梅^{1*}, 刁娟娟², 王新玲¹¹新疆医科大学药学院; ²新疆医科大学中心实验室, 乌鲁木齐 830011

摘要:复方罗欧咳祖帕提取物分别用系列浓度乙醇溶液进行洗脱, 分离得到 4 个洗脱部位, 采用 DPPH 自由基清除率、OH 自由基清除率、T-AOC 总抗氧化能力为指标进行抗氧化活性评价, 同时探究复方罗欧咳祖帕不同洗脱部位总多酚和总黄酮含量, 通过 UHPLC-QE-MS 指认复方罗欧咳祖帕中主要黄酮类和酚酸类化合物信息, 利用质谱数据库及相应裂解规律匹配法对含有 MS 数据的峰进行物质鉴定。结果表明: 复方罗欧咳祖帕不同洗脱部位均具有抗氧化活性, 并呈现一定的量效关系, 其中复方罗欧咳祖帕 20% 乙醇洗脱部位的抗氧化能力较强。复方罗欧咳祖帕总多酚总黄酮含量较高, 其不同洗脱部位中 20% 乙醇洗脱部位总黄酮含量最高 (276.24 mg/g), 40% 乙醇洗脱部位中总多酚含量最高 (130.5 mg/g)。UHPLC-QE-MS 分析复方罗欧咳祖帕中主要化学成分, 正负离子模式共检出 99 种黄酮、酚酸类化合物。通过对新疆抗哮喘复方罗欧咳祖帕的抗氧化活性及其化学成分进行分析。表明复方罗欧咳祖帕具有较好的抗氧化能力, 且含有丰富的黄酮、酚酸类化合物。旨在为复方罗欧咳祖帕物质基础研究提供实验参考。

关键词:复方罗欧咳祖帕; 抗氧化活性; UHPLC-QE-MS; 总黄酮; 总多酚

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022) Suppl-0010-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.S.002

Study on antioxidant activity and flavonoids and phenolic acids components of Loki Zupa

LI Wei¹, LI Li^{1*}, LIU Jia-ni¹, WANG Xiao-mei¹, DIAO Juan-juan², WANG Xin-ling¹¹College of Pharmacy, Xinjiang Medical University; ²Central Laboratory, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract: The extracts of the compound Loki Zupa were eluted with a series of ethanol solutions, and 4 elution sites were separated. The DPPH radical scavenging rate, the OH radical scavenging rate, and the total antioxidant capacity of T-AOC were used as indexes to evaluate the antioxidant activity, and the content of total polyphenols and total flavonoids in different elution parts of the compound Loki Zupa was explored. UHPLC-QE-MS was used to identify the main flavonoids and phenolic acid compounds in the compound Loki Zupa, and the self-built MS database and the corresponding fragmentation law matching method were used to identify the peaks containing MS data. The results showed that the different elution parts of compound Loki Zupa all had antioxidant activity and showed a certain dose-effect relationship. Among them, the 20% ethanol elution part of compound Loki Zupa had stronger antioxidant capacity. The content of total flavonoids in the total polyphenols of compound Loki Zupa is higher, and the total flavonoids content in the 20% ethanol elution part is the highest (276.24 mg/g) in the different elution parts, and the total polyphenol content is the highest in the 40% ethanol elution part (130.5 mg/g). UHPLC-QE-MS analysis of the main chemical components in the compound Loki Zupa, a total of 99 kinds of flavonoids and phenolic acid compounds were detected in the positive and negative ion mode. Through the analysis of the antioxidant activity and chemical components of the Xinjiang anti-asthma compound Loki Zupa. It shows that the compound Loki Zupa has good antioxidant capacity and is rich in flavonoids and phenolic acid compounds. The aim is to provide experimental reference for the research on the material basis of compound Loki Zupa.

Key words: Loki Zupa; antioxidant activity; UHPLC-QE-MS; total flavonoids; total polyphenols

复方罗欧咳祖帕是新疆地区治疗哮喘的传统方剂,具有温肺平喘、化痰止咳的功效^[1,2]。该复方主要由神香草 *Hyssopus cuspidatus* Boriss 和喜碱鸢尾 *Iris halophila* 两味新疆特色药用植物组成^[3],研究表明,神香草含有挥发油、酚酸、黄酮、萜类等有效成分,且黄酮、酚酸类化学成分含量较高^[4-11];喜碱鸢尾根中主要化学成分也多为黄酮类、异黄酮类化合物,从鸢尾属植物分离得到的许多异黄酮类化合物、三萜类化合物和苯醌类化合物具有显著的抗炎活性^[12-17]。

目前,学者仅从单味药的角度对神香草、喜碱鸢尾中主要化学成分和药理作用进行研究,且研究较少,从整体的复方配伍上对复方罗欧咳祖帕的研究,更是鲜有报道。复方罗欧咳祖帕作为经典的民族药,尚存在临床定位不清、药材基原与化学成分不明、物质基础不清等问题,严重影响了其疗效发挥和推广应用,有关复方罗欧咳祖帕化学组成、物质基础、药效活性均有待系统深入的研究。

因此,本实验主要对复方罗欧咳祖帕进行抗氧化活性评价,并检测其中总多酚、总黄酮的含量,通过 UHPLC-QE-MS 鉴别其中主要化学成分。初步探究复方罗欧咳祖帕物质基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1290 UHPLC 超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);Q Exactive Focus 高分辨质谱(Thermo Fisher Scientific 公司);ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm);Heraeus Fresco17 离心机(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);DRT-SX 智能恒温电热套(郑州长城科工贸有限公司);N-1001 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);DZKW-D-2 电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司);MODUL YOD-230 全自动定量浓缩系统(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);AB135-S 电子天平(梅特勒-托利多国际有限公司);Multiskan GO 型 Fisher 全波长酶标仪(赛默飞世尔科技(中国)有限公司)。

神香草(批号:Y1911044,新疆维吾尔药业有限责任公司);喜碱鸢尾根(批号 190523,新疆恩萨尔维吾尔医药饮片药业有限公司);没食子酸(批号 508F021,北京索莱宝科技有限公司);芦丁(批号:10080-201409,纯度 > 92%);抗坏血酸(批号 20190214,天津市北联精细化学品开发有限公司);

硫酸亚铁(批号 20130820,天津市福晨化学试剂厂);总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(批号 20200622,北京索莱宝科技有限公司);1,1-二苯基-2-苦基胍(批号:5C5LI-GA,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.2 复方罗欧咳祖帕及洗脱部位的制备

按照临床用药的配伍比例,采用水煎煮法制备复方罗欧咳祖帕粗提物,收集提取液后加入乙醇使成 70% 乙醇溶液,静置过夜,收集上清液,浓缩使成浸膏后冷冻干燥呈粉末,即得复方罗欧咳祖帕提取物(LZ),再将 LZ 通过 AB-8 大孔吸附树脂,用体积分数为 0%、20%、40%、60% 的乙醇依次洗脱,收集不同乙醇浓度的洗脱液,浓缩蒸干。得到 LZ-0% 乙醇洗脱部位(LZ-0%)、LZ-20% 乙醇洗脱部位(LZ-20%)、LZ-40% 乙醇洗脱部位(LZ-40%)、LZ-60% 乙醇洗脱部位(LZ-60%),备用。

1.3 抗氧化活性研究

1.3.1 DPPH 自由基清除能力测定

参照文献^[18]的方法进行 DPPH 自由基清除实验,在 517 nm 处测定各试管的吸光度 A_x ,以 1 mL 蒸馏水代替样品溶液测得吸光度 A_0 ,以无水乙醇 2 mL 代替 DPPH 溶液测得吸光度 A_1 ,以 Vc 为阳性对照,按照公式(1)计算清除率,每组平行测定 3 次,结果取平均值。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = [A_0 - (A_x - A_1) / A_0] \times 100\% \quad (1)$$

1.3.2 OH 自由基清除能力测定

参照文献^[19,20]的方法进行 OH 自由基清除实验,在 510 nm 处测定各试管的吸光度 A_x ,结果取平均值;以 2 mL 蒸馏水代替样品溶液测得吸光度 A_0 ,以蒸馏水 2 mL 代替 H₂O₂ 溶液测得吸光度 A_1 ,以 Vc 为阳性对照,按照公式(2)计算清除率,每组平行测定 3 次,结果取平均值。

$$\text{OH 自由基清除率} = [A_0 - (A_x - A_1) / A_0] \times 100\% \quad (2)$$

1.3.3 T-AOC 总抗氧化能力测定

根据试剂盒说明书进行操作^[21]:临用前配制系列浓度 FeSO₄ 标准溶液,作为测定管;吸取混合液 180 μL,蒸馏水 24 μL,充分混匀,以抗坏血酸为标样做对照管,反应 10 min,吸取 200 μL 于 96 孔板,测定 593 nm 吸光值。计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$,按照试剂盒说明以 FeSO₄ 终浓度为横坐标,以 ΔA 为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程 $y = 5.126 2x + 0.035 7, R^2 = 0.999 5$,结果表明在质量浓度 0.01 ~ 2.00 mg/mL 范围内二变量呈现良好的线性关系。

将复方罗欧咳祖帕以相同方式,加入测定管中,计算 ΔA ,带入方程求得 x (mg/mL),根据公式(3)计算复方罗欧咳祖帕和Vc的总抗氧化能力。

$$\text{总抗氧化能力 (U/mL)} = C \times V_{\text{总}} / V_{\text{样}} \quad (3)$$

1.4 化学成分分析

1.4.1 总黄酮含量的测定

1.4.1.1 标准曲线绘制

采用亚硝酸钠-硝酸铝法^[20]进行总黄酮含量测定,精密称取芦丁对照品 2.50 mg,用甲醇定容至 25 mL 容量瓶,作为对照品储备液。从储备液中精密吸取 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 mL 至 10 mL 容量瓶,加入 400 μ L 质量分数 5% 的 NaNO_2 溶液,摇匀,6 min 后加入 400 μ L 质量分数 10% 的 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 溶液,摇匀,6 min 后再加入 4 mL 质量分数 4% 的 NaOH 溶液,室温避光放置 15 min 后,以甲醇代替样品提取液为空白调零,在 510 nm 处测定吸光度。所得线性回归方程: $y = 10.628x + 0.0235$,回归系数: $R^2 = 0.9970$,表明芦丁质量浓度在 0.002 ~ 0.04 mg/mL 范围内与吸光度具有良好的线性关系。

1.4.1.2 复方罗欧咳祖帕总黄酮含量测定

复方罗欧咳祖帕总黄酮含量测定方法同“1.4.1.1”,甲醇代替样品提取液为空白调零,在 510 nm 处测定吸光度,重复 3 次,取平均值。

1.4.2 总多酚含量的测定

1.4.2.1 标准曲线的绘制

采用福林酚法^[20]进行总多酚含量测定,精密称取没食子酸对照品 2.50 mg,用蒸馏水定容至 25 mL 容量瓶,作为对照品储备液。再从储备液中精密吸取 0、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 mL 至 25 mL 容量瓶,加入 1.5 mL 福林酚试剂,8 min 后加入 1.5 mL 10% Na_2CO_3 溶液,蒸馏水定容至刻度,25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h,在 765 nm 处测定吸光度。所得线性回归方程: $y = 144.77x + 0.0728$,回归系数: $R^2 = 0.9992$,表明没食子酸质量浓度在 0.001 ~ 0.06 mg/mL 范围内与吸光度具有良好的线性关系。

1.4.2.2 复方罗欧咳祖帕总多酚含量测定

复方罗欧咳祖帕总多酚含量测定方法同“1.4.2.1”,蒸馏水代替样品提取液为空白调零,在 765 nm 处测定吸光度,重复 3 次,取平均值。

1.4.3 UHPLC-MS 化学主要成分分析

为进一步阐明复方罗欧咳祖帕中化学成分,实验采用 UHPLC-QE-MS 指认复方罗欧咳祖帕中主要黄酮类和酚酸类化合物信息,利用自建二级质谱数

据库及相应裂解规律匹配法对含有 MS 数据的峰进行物质鉴定^[22]。

1.4.3.1 样品制备

精密称取 10.00 mg 复方罗欧咳祖帕提取物,加入 100 μ L 70% 甲醇,混匀,置冰水浴超声 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后将样本以 12 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,经 0.22 μ m 滤膜过滤后上机检测。

1.4.3.2 色谱条件

Agilent 超高效液相 1290 UHPLC 控制下按照下表中的流动相参数进行分析,进样体积为 5 μ L。

表 1 超高效液相色谱流动相条件

Table 1 UHPLC mobile phase conditions

时间 Time (min)	0.1% 甲酸-水 Water with 0.1% (V/V) formic acid (%)	乙腈 Acetonitrile (%)
0	95	5
3.5	85	15
6.0	70	30
6.5	70	30
12.0	30	70
12.5	30	70
18.0	0	100
22.0	0	100
25.0	0	100
26.0	95	5
30.0	95	5

2 结果

2.1 DPPH 自由基清除能力

由图 1 可知,复方罗欧咳祖帕及乙醇洗脱部位对 DPPH 自由基都表现出清除能力。

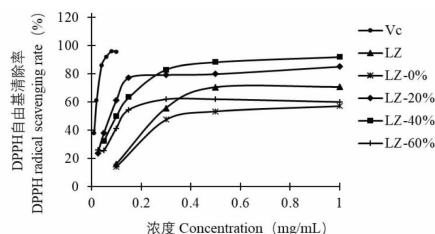


图 1 复方罗欧咳祖帕及其各洗脱部位 DPPH 自由基清除能力

Fig. 1 The DPPH scavenging ability of Loki Zupa and its elution parts

由表 1 可知,复方罗欧咳祖帕及洗脱部位中, DPPH 自由基清除能力最好的是 LZ-20% (IC_{50} 为 0.092 mg/mL),整体而言,20% 乙醇洗脱部位对 DPPH 自由基的清除能力高于其他部位。

表 1 复方罗欧咳祖帕及其各洗脱部位 DPPH 自由基清除能力的 IC₅₀ 值

Table 1 The IC₅₀ value of the scavenging ability of DPPH free radicals of Loki Zupa and its elution parts

样品 Sample	Vc	LZ	LZ-0%	LZ-20%	LZ-40%	LZ-60%
IC ₅₀	0.009	0.457	0.653	0.092	0.141	0.183

2.2 OH 自由基

由图 2 可知,复方罗欧咳祖帕方及各乙醇洗脱部位对 OH 自由基都表现出清除能力。

由表 2 可知,复方罗欧咳祖帕及洗脱部位中,OH 自由基清除能力较强的是 LZ-20% (IC₅₀ 为 0.659 mg/mL),整体而言,20% 乙醇洗脱部位对 OH 自由基的清除能力高于其他部位。

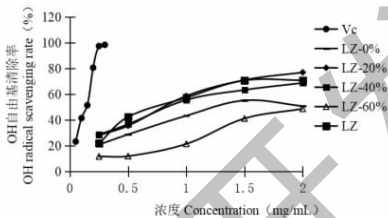


图 2 复方罗欧咳祖帕及其各洗脱部位 OH 自由基清除能力
Fig. 2 The OH scavenging ability of Loki Zupa and its elution parts

表 2 复方罗欧咳祖帕 OH 自由基清除能力的 IC₅₀ 值

Table 2 The IC₅₀ value of the scavenging ability of OH free radicals of Loki Zupa and its eluent parts

样品 Sample	Vc	LZ	LZ-0%	LZ-20%	LZ-40%	LZ-60%
IC ₅₀	0.12	1.322	0.713	0.659	0.899	1.061

2.3 T-AOC 总抗氧化能力

由图 3 可知,复方罗欧咳祖帕及系列乙醇洗脱部位抗氧化能力大小依次为:LZ-20% > LZ-40% > SXC > LZ > LZ-0% > LZ-60%。复方罗欧咳祖帕及各乙醇洗脱部位均有较好的抗氧化能力。其中,LZ-20% 抗氧化能力高于其他部位。

为 225.30 ± 1.22 mg/g, LZ-60% 总黄酮含量为 181.44 ± 0.95 mg/g,结果见图 4。其中 LZ-20% 中总黄酮含量最高。

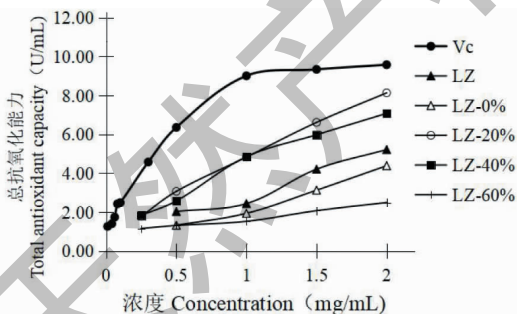


图 3 复方罗欧咳祖帕及其各洗脱部位总抗氧化能力
Fig. 3 The total antioxidant capacity of Loki Zupa and its eluent parts

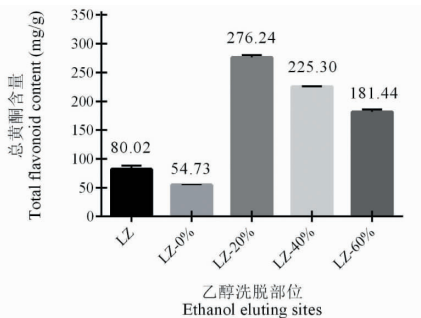


图 4 复方罗欧咳祖帕及不同洗脱部位中总黄酮含量
Fig. 4 The content of total flavonoids in Loki Zupa and different eluent parts

2.4 总黄酮含量

经测定,得到复方罗欧咳祖帕不同洗脱部位总黄酮含量,LZ 总黄酮含量为 82.02 ± 0.77 mg/g,LZ-0% 总黄酮含量为 54.73 ± 0.80 mg/g,LZ-20% 总黄酮含量为 276.24 ± 1.08 mg/g,LZ-40% 总黄酮含量

2.5 总多酚含量

经测定,得到复方罗欧咳祖帕及系列乙醇洗脱部位总多酚含量,LZ 总多酚含量为 47.53 ± 1.33 mg/g,LZ-0% 总多酚含量为 16.95 ± 1.21 mg/g,LZ-20% 总多酚含量为 112.00 ± 1.74 mg/g,LZ-40% 总多酚含量为 130.50 ± 2.14mg/g,LZ-60% 总多酚含量为 94.39 ± 1.96 mg/g,结果见图 5。其中 LZ-40% 中总多酚含量最高。

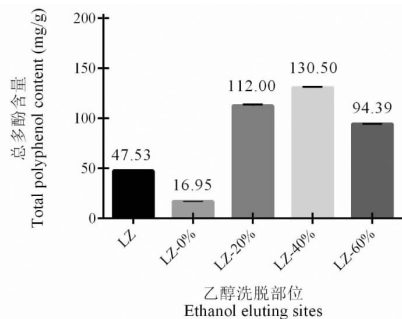


图5 复方罗欧咳祖帕及不同洗脱部位中总多酚含量

Fig. 5 Content of total polyphenols in Loki Zupa and it different elution parts

2.6 基于UHPLC-QE-MS技术的活性部位化学成分分析

2.6.1 样品测定

按“1.4.3.2”项下质谱条件,分别在正、负离子模式下,对复方罗欧咳祖帕供试品溶液进行扫描检测,正离子模式下的离子图见图6,负离子模式下的离子图见图7。

2.6.2 数据处理

使用XCMS软件将质谱原始导入。进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等工作,利用系统自建二级质谱数据库及相应裂解规律匹配法对含有MSMS数据的峰进行物质鉴定。

2.6.3 成分信息的指认

通过各化合物的离子峰初步确定其分子量和

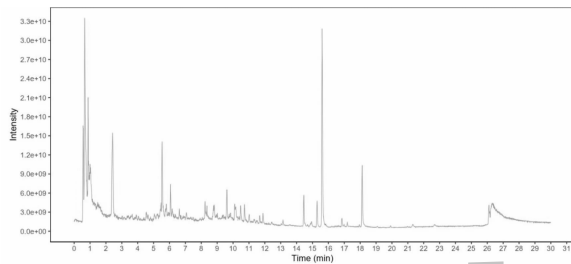


图6 正离子模式下复方罗欧咳祖帕的基峰离子色谱图

Fig. 6 Base peak chromatogram of Loki Zupa under positive ion mode

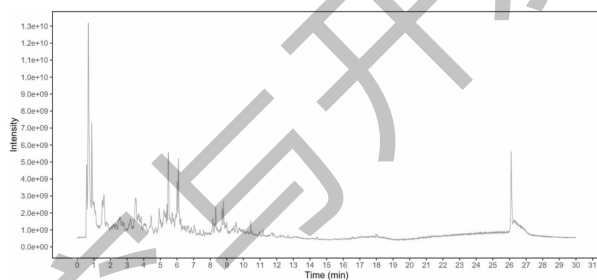


图7 负离子模式下复方罗欧咳祖帕的基峰离子色谱图

Fig. 7 Base peak chromatogram of Loki Zupa under negative ion mode

分子式通过二级质谱裂解碎片,结合数据库筛选和相关文献考察,对复方罗欧咳祖帕进行成分信息指认,共确定复方罗欧咳祖帕中主要黄酮,酚酸类化合物99个,指认结果见表3、4。

表3 正离子模式下复方罗欧咳祖帕黄酮类、酚酸类成分鉴定结果

Table 3 Identification results of flavonoids in Loki Zupa under positive ion mode

编号 No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	质荷比 m/z	化合物 Compound	类型 Class
1	0.62	$C_{18}H_{22}O_5$	319.15	玉米赤霉烯酮 Zearalenone	酚酸类
2	0.89	$C_6H_5NO_3$	140.03	4-硝基苯酚 4-Nitrophenol	酚酸类
3	1.09	$C_9H_{10}O_3$	167.07	1-(4-羟基-2-甲氧基苯基)-乙酮 Isopeonol	酚酸类
4	1.39	$C_9H_{10}O_3$	167.07	丹皮酚 Paeonol	酚酸类
5	1.62	$C_7H_6O_2$	123.04	苯甲酸 Benzoic acid	酚酸类
6	2.25	$C_8H_8O_4$	169.05	苔色酸 Orsellinic acid	酚酸类
7	2.63	$C_7H_6O_3$	139.04	原儿茶醛 Protocatechualdehyde	酚酸类
8	3.25	$C_8H_8O_2$	137.06	2-羟基苯乙酮 2-Hydroxyacetophenone	酚酸类
9	3.28	$C_8H_8O_3$	153.05	4-甲氧基水杨醛 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde	酚酸类
10	3.63	$C_7H_6O_2$	123.04	3-羟基苯甲醛 3-Hydroxybenzaldehyde	酚酸类

续表 3 (Continued Tab. 3)

编号 No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	质荷比 m/z	化合物 Compound	类型 Class
11	4.00	$C_{15}H_{10}O_5$	271.06	染料木素 Genistein	黄酮类
12	4.17	$C_{26}H_{28}O_{13}$	549.16	葛根素芹菜糖苷 Puerarin apioside	黄酮类
13	4.38	$C_8H_8O_3$	153.05	香草醛 Vanillin	酚酸类
14	4.40	$C_8H_8O_4$	169.05	异香草酸 Isovanillic acid	酚酸类
15	4.54	$C_8H_9NO_2$	152.07	对乙酰氨基酚 Paracetamol	酚酸类
16	4.81	$C_9H_{10}O_4$	183.06	丁香醛 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzaldehyde	酚酸类
17	5.02	$C_{10}H_{14}O$	151.11	百里酚 Thymol	酚酸类
18	5.31	$C_{27}H_{30}O_{15}$	595.16	烟碱 Nicotiflorin	黄酮类
19	5.34	$C_{21}H_{20}O_{10}$	433.11	牡荆苷 Apigenin-8-C-glucoside	黄酮类
20	5.41	$C_{22}H_{22}O_{11}$	463.12	射干苷 Tectoridin	黄酮类
21	5.54	$C_{17}H_{14}O_7$	331.08	鸢尾黄酮乙素 Iristectorigenin B	黄酮类
22	5.65	$C_{22}H_{22}O_{11}$	463.12	香叶木素-7-O- β -D-葡萄糖苷 Diosmetin-7-O- β -D-glucopyranoside	黄酮类
23	5.73	$C_{28}H_{32}O_{16}$	625.17	异鼠李素-3-O-新橙皮苷 Isorhamnetin-3-O-nehesperidine	黄酮类
24	5.79	$C_{27}H_{30}O_{14}$	579.17	野漆树苷 Apigenin-7-O-neohesperidoside	黄酮类
25	6.33	$C_{22}H_{23}O_{12}$	479.12	矮牵牛素-3-O- β -吡喃葡萄糖苷 Petunidin-3-O- β -glucopyranoside	黄酮类
26	6.36	$C_{15}H_{16}O_6$	293.10	去甲升麻精 Norcimifugin	黄酮类
27	6.46	$C_{22}H_{22}O_{11}$	463.12	高车前苷 Homoplantagin	黄酮类
28	6.54	$C_{18}H_{14}O_8$	359.07	白射干素 Dichotomitin	黄酮类
29	6.91	$C_{17}H_{14}O_7$	331.08	棕矢车菊素 Jaceosidin	黄酮类
30	6.97	$C_{16}H_{12}O_7$	317.06	异鼠李素 Isorhamnetin	黄酮类
31	7.08	$C_{28}H_{32}O_{14}$	593.18	蒙花苷 Linarin	黄酮类
32	7.93	$C_{15}H_{10}O_5$	271.06	芹菜素 Apigenin	黄酮类
33	8.10	$C_{16}H_{12}O_6$	301.07	山奈素 Kaempferide	黄酮类
34	9.61	$C_{17}H_{14}O_6$	337.07	滨藜黄素 Cirsimaritin	黄酮类
35	9.62	$C_{17}H_{14}O_6$	315.09	鼠李草黄酮 Gnaphaliin	黄酮类
36	10.16	C_8H_8O	121.06	苯乙醛 Phenylacetaldehyde	酚酸类
37	10.53	$C_{16}H_{14}O_5$	287.09	樱花素 Sakuranetin	黄酮类
38	10.95	$C_{22}H_{34}O_3$	347.25	银杏酸 GA15:1 Ginkgolic acid C15:1	酚酸类
39	11.85	$C_{16}H_{12}O_5$	285.07	金合欢素 Acacetin	黄酮类
40	12.77	$C_{17}H_{24}O_3$	277.18	6-姜烯酚 6-Shogaol	酚酸类
41	13.47	$C_{16}H_{12}O_5$	285.07	鸡豆黄素 A Biochanin A	黄酮类
42	13.74	$C_{18}H_{20}O_2$	269.15	己烯雌酚 Diethylstilbestrol (Stilbestrol)	酚酸类
43	14.94	$C_{30}H_{48}O_3$	457.37	熊果酸 Ursolic acid	酚酸类
44	15.62	$C_{10}H_{16}O$	135.12	香芹醇;香芹酚 Carveol	酚酸类
45	16.58	$C_6H_6O_3$	127.04	麦芽酚 Maltol	黄酮类
46	26.23	$C_9H_{10}O_4$	182.98	香草酸甲酯 Methyl vanillate	酚酸类

表4 负离子模式下复方罗欧咳祖帕黄酮类、酚酸类成分鉴定结果

Table 4 Identification results of flavonoids in Loki Zupa under negative ion mode

编号 No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	质荷比 m/z	化合物 Compound	类型 Class
1	2.52	C ₇ H ₆ O ₃	137.02	水杨酸 Salicylic acid	酚酸类
2	1.58	C ₈ H ₈ O ₄	167.04	4-甲氧基水杨酸 4-Methoxysalicylic acid	酚酸类
3	7.61	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.05	异鼠李素 Isorhamnetin	黄酮类
4	8.94	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.07	鸢尾黄酮乙素 Iristectorigenin B	黄酮类
5	3.49	C ₇ H ₆ O ₂	121.03	对羟基安息香醛 <i>p</i> -Hydroxybenzaldehyde	酚酸类
6	1.37	C ₆ H ₆ O ₃	125.02	焦性没食子酸 Pyrogallol	酚酸类
7	1.56	C ₈ H ₈ O ₃	151.04	4-羟基苯乙酸 4-Hydroxyphenylacetic acid	酚酸类
8	1.10	C ₇ H ₁₀ O ₅	173.05	莽草酸 Shikimic acid	酚酸类
9	3.38	C ₇ H ₆ O ₅	169.01	没食子酸 Gallic acid	酚酸类
10	6.10	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.11	高车前苷 Homoplantagin	黄酮类
11	1.98	C ₈ H ₁₀ O ₃	153.06	羟基酪醇 3,4-Dihydroxyphenylethanol	酚酸类
12	3.36	C ₇ H ₆ O ₄	153.02	原儿茶酸 Protocatechuic acid	酚酸类
13	13.33	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	293.18	6-姜酚 6-Gingerol	酚酸类
14	7.01	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₄	581.19	柚皮苷二氢查尔酮 Naringin dihydrochalcone	黄酮类
15	6.89	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	329.07	棕矢车菊素 Jaceosidin	黄酮类
16	3.75	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.05	丁香酸 Syringic Acid	酚酸类
17	2.17	C ₈ H ₈ O ₃	151.04	对甲氧基苯甲酸 <i>p</i> -Anisic acid	酚酸类
18	6.94	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	417.08	槲非醇 3- <i>O</i> -阿拉伯糖苷 Kaempferol 3- <i>O</i> -arabinoside	黄酮类
19	6.17	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343.08	散亭 Santin	黄酮类
20	5.73	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577.16	野漆树苷 Apigenin 7- <i>O</i> -neohesperidoside	黄酮类
21	6.95	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285.04	山奈酚 Kaempferol	黄酮类
22	2.93	C ₈ H ₈ O ₃	151.04	2-羟基苯乙酸 2-Hydroxyphenylacetic Acid	酚酸类
23	5.69	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	477.10	矮牵牛素-3- <i>O</i> -β-吡喃葡萄糖苷 Petunidin-3- <i>O</i> -β-glucopyranoside	黄酮类及苷类
24	4.99	C ₁₄ H ₁₆ O ₉	327.07	岩白菜素 Bergenin	酚酸类
25	7.80	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269.05	染料木素 Genistein	黄酮类
26	4.19	C ₈ H ₈ O ₃	151.04	香草醛 Vanillin	酚酸类
27	6.41	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	461.11	射干苷 Tectoridin	黄酮类
28	2.65	C ₆ H ₆ O ₂	109.03	邻苯二酚 Catechol	酚酸类
29	7.03	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.06	山槐素(高丽槐素) Inermin	类黄酮
30	4.44	C ₁₉ H ₂₂ O ₁₀	409.12	芦荟宁 Aloenin	酚酸类
31	9.89	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	313.07	柳穿鱼黄素 Pectolinarigenin	黄酮类
32	2.59	C ₁₂ H ₁₆ O ₇	271.08	熊果苷 Arbutin	酚酸类
33	8.20	C ₁₄ H ₁₈ O ₇	297.10	云杉素 picein	酚酸类
34	10.26	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	283.06	鹰嘴豆芽素 A Biochanin A	黄酮类
35	9.86	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.07	松属素 Pinocembrin	黄酮类
36	5.60	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343.08	松萝酸 Usnic acid	酚酸类
37	6.53	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.06	高车前素 Hispidulin	黄酮类

续表 4(Continued Tab. 4)

编号 No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	质荷比 m/z	化合物 Compound	类型 Class
38	7.16	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	299.06	山奈素 Kaempferide	黄酮类
39	9.39	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	193.09	尼泊金异丁酯 Isobutyl 4-hydroxybenzoate	酚酸类及苷类
40	7.95	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₂	491.12	橙黄决明素-6-O-葡萄糖苷 Aurantio-obtusin-6-O- β -D-glucoside	黄酮类
41	7.21	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.05	泽兰黄酮 Eupafolin	黄酮类
42	5.25	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463.09	金丝桃苷(紫花杜鹃素丁;槲皮素-3-O- β -D-半乳糖苷) Quercetin-3-O-galactoside	黄酮类
43	8.64	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271.06	柚皮素 Naringenin	黄酮类
44	3.57	C ₉ H ₁₀ O ₄	181.05	香草酸甲酯 Methyl vanillate	酚酸类及苷类
45	5.41	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431.10	异牡荆素 Isovitexin	黄酮类
46	1.57	C ₇ H ₈ O ₂	123.05	苔黑酚葡萄糖苷 Orcinol	酚酸类
47	2.24	C ₈ H ₉ NO ₂	150.06	对乙酰氨基酚 Paracetamol	酚醚
48	3.91	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195.07	乙酰丁香酮 3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone	酚酸类
49	3.31	C ₉ H ₁₀ O ₃	165.06	4-甲氧基苯乙酸 4-Methoxyphenylacetic acid	酚酸类及苷类
50	9.29	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343.08	石吊兰素 Lysionotin	黄酮类
51	6.48	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	299.11	红景天苷 Rhodiolioside	酚酸类
52	4.68	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.09	木犀草素-4'-O-葡萄糖苷 Luteolin-4'-O-glucoside	黄酮类
53	7.37	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	457.08	表没食子儿茶素没食子酸酯 Epigallocatechin-3-gallate	黄酮类

3 讨论

研究表明复方罗欧咳祖及其乙醇洗脱部位对 DPPH 自由基、OH 自由基均有较好的清除作用,且通过 T-AOC 实验印证了其总抗氧化能力随剂量依赖性增加,通过比较实验结果,综合以 LZ-20% 体外抗氧化活性最强,LZ-20% 清除 DPPH 自由基、OH 自由基和 T-AOC 的 IC₅₀ 分别为 0.092、0.659 和 1.076 mg/mL,表明复方罗欧咳祖帕具有较好的抗氧化能力,从维持氧化/抗氧化平衡的角度为治疗哮喘提供实验依据。

实验对复方罗欧咳祖帕中总黄酮、总多酚成分进行含量测定,实验结果表明:复方罗欧咳祖帕中 20% 乙醇洗脱部位总黄酮含量最高,为 276.24 ± 1.08 mg/g;40% 乙醇洗脱部位中总多酚含量最高,为 130.50 ± 2.14 mg/g,且经 LC-MS 初步成分指认发现复方罗欧咳祖帕正负离子模式下共有 99 个黄酮和酚酸类化合物,为复方罗欧咳祖帕进一步的开发利用提供参考。

实验为黄酮类成分的后续研究提供了依据,同时也比较了新疆复方罗欧咳祖帕复方不同配方的含量差异,发现新疆复方罗欧咳祖帕复方的总黄酮与抗氧化相关性更为显著,对其进一步开发利用奠定

了物质基础。

参考文献

- Muhanmadjan A, Abdumijit A, Amangul E, et al. Uygui medicine to treat asthma preparations "LuououKe zupa" research overview[J]. Xinjiang Med J(新疆医学), 2017, 47(2): 123-128.
- Mohammadtursun N, Li Q, Abuduwaki M, et al. Loki zupa alleviates inflammatory and fibrotic responses in cigarette smoke induced rat model of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chin Med, 2020, 15: 92.
- Zhang J, Yan SH, Li XL, et al. Investigation and analysis on the quality status of Xinjiang Uygu medicinal materials[J]. Chin Pharm Affairs(中国药事), 2021, 35: 263-268.
- Jiang JJ, Wang Y, Shi Y, et al. Study on the *Ziphora clinopodioides* Lam ethanol extract antioxidant activity[J]. J Xinjiang Med Univ(新疆医科大学学报), 2017, 40: 1138-1141.
- Liu D, Zhu XT, Xiang J, et al. Sesquiterpenes from aerial parts of *Hyssopus cuspidatus*[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2019, 50: 1049-1054.
- Zhang YJ, Kang YT, He JH, et al. Triterpenoids constituents of *Hyssopus cuspidatus*[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 43: 347-349.

- 7 Cai XC, Maimaiti A, Wang XT, et al. Chemical constituents of anti-asthmatic active site from overground part of *Hyssopus cuspidatus* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2021, 44: 848-852.
- 8 Ding JW, Sun LL, Maimaiti A. Research summary of common medicinal materials of ethnic medicine in Xinjiang [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm* (中国民族民间医药), 2021, 30(5): 49-59.
- 9 Saebi A, Minaei S, Mahdavian A R, et al. Precision harvesting of medicinal plants: elements and ash content of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) as affected by harvest height [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2021, 199: 753-762.
- 10 Zhao L, Ji Z, Li K, et al. HPLC-DAD analysis of *Hyssopus cuspidatus* Boriss extract and mensuration of its antioxygenation property [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 228.
- 11 Aletengtuya, Jang M, Guo Yt, et al. Antioxidant and vasodilative effects of *Hyssopus officinalis* Boriss essential oil on isolated rat thoracic aorta [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 579-585.
- 12 Yang Y, Yang S, Zhao CQ, et al. Simultaneous determination of three anti-inflammatory active ingredients in *Iris bloudowii* by HPLC [J]. *China Pharm* (中国药师), 2020, 23: 1849-1851.
- 13 Yang Y, Lu J, Zhao CQ, et al. Simultaneous determination of two effective flavonoids in *Iris scariosa* by HPLC [J]. *Chem Eng* (化学工程师), 2020, 34(7): 30-32.
- 14 Kalbinur G, Nabijan M, Patigul A, et al. LC-ESI-Q-TOF-MS/MS analysis of the chemical constituents of ethanol extracts from *Iris halophila* Pall [J]. *Res Pract Chin Med* (现代中药研究与实践), 2019, 33(6): 19-23.
- 15 Zou Gx, Sun XL, Wang GH, et al. Regulation effect of iristec-torigenin A on secretion of inflammatory factor in mouse RAW 264. 7 cells induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin Pharm* (中国药业), 2017, 26(22): 1-3.
- 16 Mubareke W, Ma JJ, Aziguli, et al. Screening of anti-inflammatory active sites of water extract of *Iris halophila* root and analysis of its chemical constituents [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学), 2021, 27(12): 157-167.
- 17 Duan LH, Li ZQ, Wu ZZ, et al. Investigation of antioxidant capacity of tectoridin [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26: 2046-2049.
- 18 Wang YP, Jia XS, Wang Y, et al. Effects of different drying methods on flavonoids content and antioxidant activity of *Epidemii Folium* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2021, 52: 4193-4200.
- 19 Abdel-Megeed RM, El Newary SA, Kadry MO, et al. *Hyssopus officinalis* exerts hypoglycemic effects on streptozotocin-induced diabetic rats via modulating GSK-3beta, C-fos, NF-kappaB, ABCA1 and ABGA1 gene expression [J]. *J Diabetes Metab Disord*, 2020, 19: 483-491.
- 20 Li W, Li L, Wang XM, et al. Determination of total polyphenols and total flavonoids in compound *Loki zupa* and study on antioxidant activity [J]. *J Xinjiang Med Univ* (新疆医科大学学报), 2021, 44: 842-845.
- 21 Xiang JM, Zhao QY, Yuan H, et al. Physicochemical properties and antioxidant activities of melanin from Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*) [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33: 453-461.
- 22 Ge Q, Wan JQ, Zhu YL, et al. Qualitative and quantitative analysis of nucleoside components in *Cordyceps cicadae* by LC-MS and HPLC [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31: 1857-1863.