

· 药学基础 ·

基于UHPLC-QTOF-MS/MS辨识的侧柏叶 炒炭前后化学成分分析

石典花^{1,2}, 戴衍朋¹, 王丽凤³, 周倩¹, 张学兰^{2*}, 张军^{1*}

(1. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 2. 山东中医药大学, 济南 250355;

3. 山东省妇幼保健院, 济南 250014)

[摘要] 目的:对侧柏叶炒炭前后化学成分进行辨识。方法:采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(UHPLC-QTOF-MS/MS)对侧柏叶及其制备的侧柏炭进行化学成分辨识和比较,色谱条件为ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),以0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~3.5 min, 5%~15%B; 3.5~6 min, 15%~30%B; 6~6.5 min, 30%B; 6.5~12 min, 30%~70%B; 12~12.5 min, 70%B; 12.5~18 min, 70%~100%B; 18~22 min, 100%B),进样量5 μL,流速0.4 mL·min⁻¹;质谱条件为电喷雾离子源,正、负离子全扫描模式采集一、二级质谱数据。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/MS数据的色谱峰进行物质鉴定。结果:正、负离子模式分别辨识出了77,76种变化趋势一致的物质,侧柏叶炒炭后消失的成分基本为氨基酸类、酮醛等易挥发性成分,而新产生成分包括6种黄酮苷元类(鼠李素,3,6,3'-三羟基黄酮,6,7,3'-三羟基黄酮,4'-羟基-2'-甲基-3,4,5-三甲氧基查尔酮,草质素,3',5'-二甲氧基-3,5,7,4'-四羟基黄酮),3种香豆素类(7-羟基香豆素,7,8-二羟基香豆素和8-乙酰基-7-羟基香豆素)及3种苯甲酸类(3-甲基苯邻二酚、邻苯二酚、色酮-3-甲酸)。其中辨识出的化学物质中共计黄酮类成分40种(槲皮苷、槲皮素、山柰酚等)。结论:侧柏叶炒炭后化学成分发生了明显的量变和质变,辨识出的主要有效成分黄酮类可为侧柏叶炒炭前后功效变化物质基础的确定提供依据。

[关键词] 侧柏叶; 炒炭品; 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(UHPLC-QTOF-MS/MS); 化学成分; 炮制; 黄酮类; 物质基础

[中图分类号] R22;O657;R28;R943.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)08-0107-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202354

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200922.1735.002.html>

[网络出版日期] 2020-9-23 9:27

Chemical Composition Analysis of Platycladi Cacumen Before and After Being Carbonized Based on Identification by UHPLC-QTOF-MS/MS

SHI Dian-hua^{1,2}, DAI Yan-peng¹, WANG Li-feng³, ZHOU Qian¹, ZHANG Xue-lan^{2*}, ZHANG Jun^{1*}

(1. Shandong Academy of Chinese Medicine, Ji'nan 250014, China;

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China;

3. Shandong Maternal and Child Health Care Hospital, Ji'nan 250014, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the chemical constituents of Platycladi Cacumen before and after being carbonized. **Method:** Chemical constituents in 3 batches of Platycladi Cacumen and its carbonized products were identified and compared by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-

[收稿日期] 20200703(004)

[基金项目] 国家科技基础性工作专项(2014FY111100);全国中药特色技术传承人才培养项目(国中医药人教函[2019]43号);国家中医药管理局中药炮制技术传承基地建设项目;山东省中医药科技发展计划项目(2015-173,2017-130);山东省职业教育技艺技能传承创新平台项目(201712)

[第一作者] 石典花,博士,副研究员,从事中药炮制研究,Tel:0531-82949829,E-mail:shidianhua81@163.com

[通信作者] *张学兰,硕士,教授,从事中药饮片制备技术及质量控制研究,Tel:0531-89628081,E-mail:zhang8832440@sina.com;

*张军,副研究员,从事中药炮制研究,Tel:0531-82949800,E-mail:sdzyybg@sina.com

mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS/MS). Chromatographic separation was performed on an ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) as mobile phase for gradient elution (0-3.5 min, 5%-15%B; 3.5-6 min, 15%-30%B; 6-6.5 min, 30%B; 6.5-12 min, 30%-70%B; 12-12.5 min, 70%B; 12.5-18 min, 70%-100%B; 18-22 min, 100%B). The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹ and the injection volume was 5 μL. Mass spectrometry was performed by an electrospray ionization, and the primary and secondary mass spectrometry data were collected with the full scan mode of positive and negative ions, the peaks containing MS/MS data were identified by self-established secondary mass spectrometry database and corresponding fragmentation law matching method. **Result:** A total of 77 and 76 substances with the same change trend were identified under positive and negative ion modes. After being carbonized, the disappeared components of *Platycladi Cacumen* were mainly amino acids, ketone aldehydes and other volatile components. Among newly produced components, there were 6 kinds of flavonoid aglycones (rhamnetin, 6, 7, 3'-trihydroxyflavone, 3, 6, 3'-trihydroxyflavone, 4'-hydroxy-2'-methyl-3, 4, 5-trimethoxychalcone, herbacetin and 3', 5'-dimethoxy-3, 5, 7, 4'-tetrahydroxyflavone), 3 kinds of coumarins (7-hydroxycoumarin, 7, 8-dihydroxycoumarin and 8-acetyl-7-hydroxycoumarin) and 3 kinds of benzoic acids (3-methylcatechol, pyrocatechol and chromone-3-carboxylic acid). There were a total of 40 flavonoids (quercitrin, quercetin, kaempferol, etc.) among these identified chemical constituents. **Conclusion:** There are significant quantitative and qualitative changes in the chemical compositions of *Platycladi Cacumen* after being carbonized. The flavonoids, the identified main active ingredients, can provide data reference for further study on the material basis of efficacy changes of *Platycladi Cacumen* before and after being carbonized.

[Key words] *Platycladi Cacumen*; carbonized products; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS/MS); chemical compositions; processing; flavonoids; material basis

侧柏叶为柏科植物侧柏的枝梢及叶,多在夏、秋二季采收,阴干。其气清香,味苦涩,归肺、肝、脾经,具有凉血止血、化痰止咳、生发乌发的功效^[1]。侧柏叶经炒炭后,寒凉之性趋于平和,专于收涩止血,常用于热邪不盛的各种出血证^[2]。侧柏叶炒炭前后功效的改变是基于物质基础的变化,有研究发现炒炭对侧柏叶中的黄酮^[3-9]、挥发油^[10-11]、鞣质^[12-13]、氨基酸^[14]及无机元素^[15]等成分均产生了较明显的影响,但相关报道主要是针对某一类成分,研究相对较为单一。

本研究拟采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(UHPLC-QTOF-MS/MS)对不同产地侧柏叶及其制备的侧柏炭中化学成分进行辨识,以系统分析侧柏叶炒炭前后化学成分及其变化情况,同时对辨识出的主要有效成分黄酮类化合物进行梳理,以期明确侧柏叶炒炭前后物质基础的变化提供参考。通过对辨识成分的进一步确认可找到侧柏炭的特征成分,将其作为侧柏炭质控标准研究的定性定量指标,可为建立符合侧柏炭自身特点的质控标准提供实验依据。

1 材料

Nexera UHPLC LC-30A型超高效液相色谱仪(日本岛津公司),Triple TOF 5600型高分辨质谱仪(美国AB Sciex公司),Heraeus Fresco17型离心机(赛默飞世尔有限公司),BSA124S-CW型电子天平(德国赛多利斯公司),JXFSTPRP-24型研磨仪(上海净信科技有限公司),明澈-D24UV型纯水仪(德国默克密理博公司),YM-080S型超声仪(深圳市方奥微电子有限公司)。

L-2-氯苯丙氨酸(上海恒柏生物科技有限公司,批号JL170417004,纯度≥98%),侧柏叶(采自济南燕子山、南山及临沂东山,阴干),经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定均为柏科植物侧柏*Platycladus orientalis*的枝梢及叶,侧柏炭为上述侧柏叶按2015年版《中华人民共和国药典》(一部)侧柏叶炮制项下炒炭要求及实验室确定的最佳工艺制备^[16]。水为超纯水,甲醇、乙腈、甲酸均为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

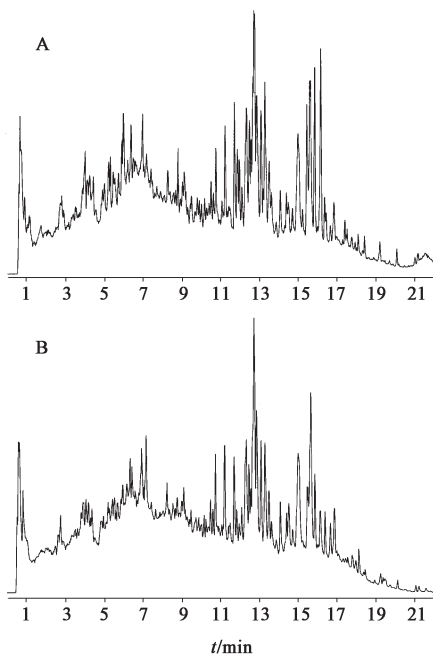
2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 分别取侧柏叶及侧柏炭粉末(过40目筛)各0.1 g,精密称定,分别加入80%

甲醇 500 μL , 加钢珠匀浆 240 s(频率 45 Hz); 置冰水浴超声处理 1 h, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h; 将上述溶液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min(离心半径 8.6 cm), 取上清液过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜, 即得。

2.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 ($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{m}$), 流动相选择 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~3.5 min, 5%~15%B; 3.5~6 min, 15%~30%B; 6~6.5 min, 30%B; 6.5~12 min, 30%~70%B; 12~12.5 min, 70%B; 12.5~18 min, 70%~100%B; 18~22 min, 100%B), 流速设定 $0.4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 $5\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3 质谱条件 Analyst TF 1.7 控制下基于信息依赖型采集(IDA)功能进行一、二级质谱数据采集。在每个数据采集循环中, 筛选出强度最强且强度 > 100 的分子离子进行对应的二级质谱数据采集。轰击能量 40 eV, 碰撞能差 20 eV。电喷雾离子源(ESI), 雾化气压力(GS1) 0.38 MPa, 辅助气压力 0.38 MPa, 气帘气压力 0.24 MPa, 离子源温度 $550\text{ }^{\circ}\text{C}$, 喷雾电压 5.5 kV(正离子模式)或 -4 kV(负离子模式)。侧柏叶及侧柏炭正、负离子模式下的总离子流色谱图(TIC)分别见图 1, 2。



A. 侧柏叶(济南燕子山); B. 侧柏炭(济南燕子山)(图 2 同)

图 1 侧柏叶及侧柏炭在正离子模式下检测的 TIC

Fig. 1 TIC of Platycladi Cacumen and Platycladi Cacumen Carbonisata determined under positive ion mode by UHPLC-QTOF-MS/MS

2.4 数据处理 将质谱原始数据导入 Progenesis QI 软件进行保留时间校正、峰识别、峰提取、峰积

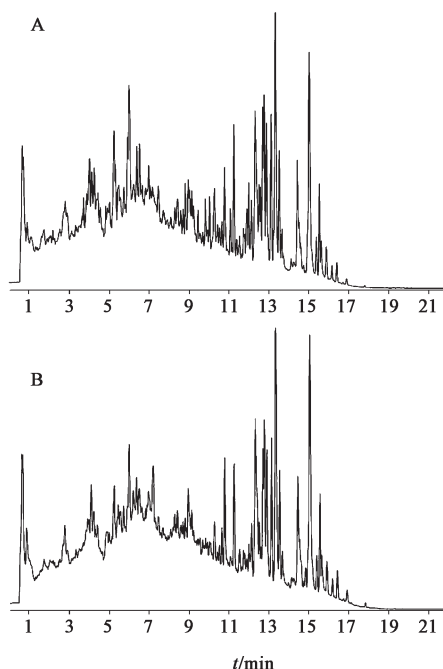


图 2 侧柏叶及侧柏炭在负离子模式下 UHPLC-QTOF-MS/MS 检测的 TIC

Fig. 2 TIC of Platycladi Cacumen and Platycladi Cacumen Carbonisata determined under negative ion mode by UHPLC-QTOF-MS/MS

分、峰对齐等处理, 利用 Biotree 自建二级质谱数据库及相应裂解规律匹配法对含有 MS/MS 数据的峰进行鉴定。Biotree 中药对照品自建库包含 3 千多种对照品, 一级谱图、二级质谱碎片信息全面, 结合中药数据库 5 万多种物质信息, 总结并整合收录在微谱, SciFinder, PubChem, ChemSpider 等数据库中的中药来源种属物质信息, 包括生物碱、黄酮、酚酸、苯丙素、醌类及其苷类、甾体类及其苷类、萜类物质等, 针对侧柏叶所含化合物进行搜库, 结果正离子模式共检出 113 种物质, 负离子模式共检出 93 种物质, 进一步分析发现, 正、负离子模式均检出的物质有 22 种, 分别为 (+)-儿茶素, 4-吡哆酸, D-(-)-柠檬酸, 表儿茶素, 脱镁叶绿酸盐 A, 顺式-8, 11, 14-二十碳三烯酸, 棉纤维素, 3-香豆酸, 杨梅苷, 薹苷, 绣线菊苷, 蒽薹苷, 槲皮苷, 高车前苷, 棉黄素 3-甲醚, 芹菜素, 鸢尾黄素, 苜蓿素, 香叶木素, 槲皮素 3'-甲基醚, 3, 7-二羟基-3', 4'-二甲氧基黄酮, 金合欢素。此情形下优先选择峰面积大的相对比较准确, 故正离子模式仅保留脱镁叶绿酸盐 A, 顺式-8, 11, 14-二十碳三烯酸和高车前苷 3 种物质, 其余 19 种物质以负离子模式检测为准。调整后正、负离子模式下分别检出了 94, 90 种准物质; 通过对上述物质变化情况进行分析, 分别去除正离子模式下 17 种、负离子

模式下14种变化趋势不一致的物质,最终正、负离子模式。同时,将侧柏炭与相应侧柏叶中同一物质的峰子模式下分别保留了77,76种变化趋势一致的物面积进行对比,详细信息见表1,2。

表1 侧柏叶及侧柏炭UHPLC-QTOF-MS/MS正离子模式检测的辨识成分变化

Table 1 Compositions and their changes of raw and carbonized products of *Platycladi Cacumen* determined under positive ion mode by UHPLC-QTOF-MS/MS

No.	t_R /min	m/z 或 M	化合物	峰面积比 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	变化 情况
1	0.65	116.070 4	<i>L</i> -脯氨酸 <i>L</i> -proline	0	—
2	0.72	365.104 8	蔗糖 sucrose	0.22±0.05	↓
3	0.72	527.156 4	松三糖 melezitose	0.39±0.10	↓
4	0.85	150.076 7	1-甲基腺嘌呤 1-methyladenine	—	+
5	0.90	268.104 3	腺苷 adenosine	1.47±0.46	↑
6	1.01	132.101 8	<i>L</i> -异亮氨酸 <i>L</i> -isoleucine	0	—
7	1.15	190.049 8	犬尿酸 kynurenic acid	0	—
8	1.42	147.043 4	4-香豆酸 4-coumaric acid	0	—
9	1.58	166.086 0	<i>L</i> -苯丙氨酸 <i>L</i> -phenylalanine	0.19±0.07	↓
10	2.40	187.063 6	3-吲哚丙烯酸 3-indoleacrylic acid	0	—
11	2.49	200.046 8	<i>D</i> -4-氯苯丙氨酸 <i>D</i> - <i>p</i> -chlorophenylalanine	1.03±0.05	≈
12	2.70	194.057 4	阿魏酸 ferulic acid	0.59±0.13	↓
13	2.90	165.053 9	3,4-二羟基苯基丙酸 3,4-dihydroxyhydrocinnamic acid	13.26±8.25	↑
14	3.70	464.094 9	异槲皮苷 isoquercitin	0.15±0.09	↓
15	3.77	290.078 6	(-)-表儿茶素(-)-epicatechin	0.66±0.05	↓
16	3.84	182.093 7	二氢松柏醇 dihydroconiferyl alcohol	0.99±0.12	≈
17	3.91	289.070 7	黄颜木素 fustin	0.06±0.08	↓
18	4.18	449.108 2	山柰酚-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 kaempferol-7- <i>O</i> -glucoside	0.18±0.09	↓
19	4.80	303.049 8	槲皮素 quercetin	0.13±0.07	↓
20	5.21	319.044 4	杨梅素 myricetin	0.36±0.14	↓
21	5.30	163.074 7	肉桂酸甲酯 methyl <i>trans</i> -cinnamate	0.23±0.19	↓
22	5.44	354.093 8	东莨菪苷 scopolin	39.95±28.73	↑
23	5.90	131.048 5	反式肉桂酸 <i>trans</i> -cinnamic acid	0.16±0.22	↓
24	5.92	287.053 9	山柰酚 kaempferol	0.35±0.10	↓
25	5.99	435.091 2	槲皮素-3- <i>D</i> -木糖苷 reynoutrin	0.12±0.04	↓
26	6.22	197.080 0	4',6'-二甲氧基-2'-羟基苯乙酮 4',6'-dimethoxy-2'-hydroxyacetophenone	0.57±0.14	↓
27	6.31	463.122 5	高车前苷 homoplantagin	0.36±0.09	↓
28	6.33	493.133 3	金橙决明酞苷 aurantio-obtusin- β - <i>D</i> -glucoside	0.51±0.14	↓
29	6.50	287.054 7	橡精 datiscetin	0.29±0.05	↓
30	6.63	509.128 2	丁香亭-3-半乳糖苷 syringetin-3-galactoside	0.65±0.04	↓
31	6.87	250.156 1	羟基缬草烯酸 hydroxyvalerenic acid	1.08±0.08	≈
32	7.70	133.100 5	左旋香芹酮 <i>L</i> -carvone	0.20±0.20	↓
33	7.72	446.120 1	黄豆黄苷 glycitin	0.31±0.11	↓
34	8.23	151.112 1	香芹酮 carvone	0	—
35	8.79	333.205 0	夏至草素 marrubiin	0.33±0.14	↓
36	8.95	539.096 0	3,8"-联芹素元 3,8"-biapigenin	0.54±0.08	↓
37	9.13	336.229 2	5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> -二羟基-7 <i>E</i> ,9 <i>E</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -花生四烯酸 5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> -dihydroxy-7 <i>E</i> ,9 <i>E</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> -eicosatetraenoic acid	0.80±0.11	↓

续表 1

No.	t_R /min	m/z 或 M	化合物	峰面积比 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	变化 情况
38	9.13	372.156 3	牛蒡子苷元 arctigenin	1.28±0.14	↑
39	9.25	293.210 2	9-酮基-10E,12Z,15Z-十八碳三烯酸 9-oxo-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid	0.57±0.09	↓
40	9.41	216.172 1	3-羟基十二碳酸 3-hydroxydodecanoic acid	0.35±0.07	↓
41	10.17	269.189 5	4-雄烯二酮 4-androstene-3,17-dione	0.32±0.08	↓
42	10.44	285.220 4	二十碳五烯酸 cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid	0.37±0.08	↓
43	10.44	310.213 4	9-过氧氢基-10E,12Z,15Z-亚麻酸 9-hydroperoxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid	1.02±0.11	≈
44	10.81	226.192 6	肉豆蔻油酸 myristoleic acid	0.55±0.11	↓
45	11.22	329.100 9	3-羟基-6,3',4'-三甲氧基黄酮 3-hydroxy-6,3',4'-trimethoxyflavone	0.47±0.18	↓
46	11.26	133.101 7	桃金娘烯醛(-)-myrtenal	0	-
47	11.72	298.083 1	7,4'-二甲氧基-3-羟基黄酮 7,4'-dimethoxy-3-hydroxyflavone	0.67±0.17	↓
48	11.88	276.208 5	亚麻油酸 stearidonic acid	0.10±0.04	↓
49	12.54	203.178 6	金合欢醛 farnesal	1.15±0.11	≈
50	12.56	259.241 3	5 α -雄烷-3 β -醇 5 α -androstan-3 β -ol	1.10±0.05	≈
51	12.56	296.234 5	斑鸠菊酸 12(13)-epoxy-9Z-octadecenoic acid	0.18±0.04	↓
52	12.59	341.207 8	18-羟基-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-二十碳五烯酸 18-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoic acid	0.29±0.07	↓
53	12.66	288.244 3	全反式二氢视黄醇 all-trans-13,14-dihydroretinol	0.94±0.02	≈
54	12.66	336.252 1	异甜菊醇 isosteviol	4.95±2.62	↑
55	12.88	269.225 6	9-顺式-松香油 9-cis-retinol	0.95±0.03	≈
56	12.95	277.215 4	9,12-十八碳二烯酸 9,12-octadecadienoic acid	0.78±0.15	↓
57	12.95	295.226 1	9-酮基-10E,12Z-十八碳二烯酸 9-oxo-10E,12Z-octadecadienoic acid	0.65±0.14	↓
58	13.09	295.225 9	9-酮基-10(E),12(E)-十八碳二烯酸 9-oxo-10(E),12(E)-octadecadienoic acid	1.96±0.6	↑
59	13.13	278.151 1	邻苯二甲酸二丁酯 dibutyl phthalate	0.55±0.08	↓
60	13.36	147.116 6	顺式茉莉酮 cis-jasmone	0	-
61	13.50	205.194 3	雪松醇 cedrol	0.55±0.04	↓
62	13.50	284.213 1	3-脱氢视黄醇 3-dehydroretinol	1.00±0.05	≈
63	13.59	321.241 3	18-羟基二十碳四烯酸 18-hydroxyeicosatetraenoic acid	0.54±0.17	↓
64	13.86	205.194 3	(-)-蓝桉醇(-)-globulol	0.34±0.04	↓
65	14.39	201.163 0	α -香附酮 α -cyperone	0.74±0.05	↓
66	14.69	114.091 0	ε -己内酰胺 ε -caprolactam	0.54±0.43	↓
67	14.99	302.223 6	异海松酸 isopimaric acid	0.96±0.05	≈
68	15.05	354.275 4	1-亚油酸单甘油酯 C18:2 1-monolinoleoyl-rac-glycerol	1.94±0.42	↑
69	15.26	261.219 9	麝香酮 muscone	-	+
70	15.83	280.239 3	9E,11E-十八碳二烯酸 9E,11E-octadecadienoic acid	0.93±0.07	≈
71	16.11	177.163 3	7,8-二氢紫罗兰酮 7,8-dihydro- α -ionone	0.71±0.20	↓
72	16.13	356.291 2	单油酸甘油酯 monoolein	3.84±1.13	↑
73	16.17	592.267 0	脱镁叶绿酸盐 A pheophorbide A	0	-
74	16.36	306.254 9	顺式-8,11,14-二十碳三烯酸 cis-8,11,14-eicosatrienoic acid	1.06±0.09	≈
75	16.38	219.173 8	2,6-二叔丁基-4-羟基苯醇 2,6-di-tert-butyl-4-hydroxymethylphenol	0.68±0.11	↓
76	16.84	283.262 3	3-羟基十八烷酸 3-hydroxyoctadecanoic acid	1.00±0.08	≈
77	18.91	397.381 4	β -谷甾醇 β -sitosterol	0.83±0.23	↓

注:M.精确相对分子质量(有2个及以上加合物时,直接以M表示);质荷比加合方式包括M+H,M+Na,M+H-H₂O,M+NH₄;峰面积比表示侧柏炭与侧柏叶中同一成分的峰面积比值;+.新产生成分;-.炒炭后消失成分;≈.峰面积基本不变;↑.峰面积升高;↓.峰面积降低(表2同)。

表2 侧柏叶及侧柏炭UHPLC-QTOF-MS/MS负离子模式检测的辨识成分变化

Table 2 Compositions and their changes of raw and carbonized products of Platycladi Cacumen determined under negative ion mode by UHPLC-QTOF-MS/MS

No.	t_R /min	m/z 或 M	化合物	峰面积比 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	变化 情况
1	0.62	387.113 1	<i>D</i> -(+)-海藻糖 <i>D</i> -(+)-trehalose	0.20±0.05	↓
2	0.75	134.021 6	<i>dl</i> -苹果酸 <i>dl</i> -malic acid	0.85±0.07	↓
3	0.82	173.045 7	莽草酸 shikimic acid	1.42±0.30	↑
4	0.87	191.020 9	柠檬酸 citric acid	2.77±1.79	↑
5	0.89	180.066 5	<i>L</i> -酪氨酸 <i>L</i> -tyrosine	0	—
6	0.96	147.030 0	<i>D</i> -(—)-柠苹果酸 <i>D</i> -(—)-citramalic acid	1.76±0.21	↑
7	1.03	182.046 1	4-吡哆酸 4-pyridoxic acid	0.03±0.03	↓
8	1.07	183.030 1	3,4-二羟基扁桃酸 3,4-dihydroxymandelic acid	3.03±0.86	↑
9	1.10	169.014 1	没食子酸 gallic acid	2.19±0.76	↑
10	1.39	125.024 4	1,2,3-苯三酚 1,2,3-benzenetriol	8.55±2.90	↑
11	1.74	305.066 7	表儿茶素(—)-epigallocatechin	0.12±0.01	↓
12	1.76	131.035 0	戊二酸 glutaric acid	19.18±18.02	↑
13	2.39	203.082 6	<i>L</i> -色氨酸 <i>L</i> -tryptophan	0	—
14	2.51	577.135 8	原花青素 B ₂ procyanidin B ₂	0.11±0.04	↓
15	2.64	137.024 2	3,4-二羟基苯甲醛 3,4-dihydroxybenzaldehyde	6.09±3.01	↑
16	2.76	109.029 3	邻苯二酚 pyrocatechol	—	+
17	2.90	289.071 5	(+)-儿茶素(+)-catechin	0.15±0.02	↓
18	2.96	175.061 1	2-异丙基苹果酸 2-isopropylmalic acid	0.38±0.06	↓
19	2.99	183.030 0	5-羟基异香草酸 5-hydroxyisovanillic acid	—	+
20	3.22	164.047 3	2,3-二羟基-1-苯并呋喃-2-羧酸 2,3-dihydro-1-benzofuran-2-carboxylic acid	3.15±1.52	↑
21	3.35	167.034 9	3-甲氧基水杨酸 2-hydroxy-3-methoxybenzoic acid	5.83±2.12	↑
22	3.51	153.019 2	原儿茶酸 3,4-dihydroxybenzoic acid	4.21±1.12	↑
23	3.60	121.029 5	对羟基苯甲醛 4-hydroxybenzaldehyde	2.08±0.62	↑
24	3.65	197.045 5	丁香酸 syringic acid	—	+
25	3.76	289.071 6	(—)-儿茶素(—)-catechin	0.71±0.22	↓
26	3.85	177.019 5	7,8-二羟基香豆素 7,8-dihydroxycoumarin	—	+
27	3.90	153.019 3	2,6-二羟基苯甲酸 2,6-dihydroxybenzoic acid	0.08±0.04	↓
28	4.01	181.051 1	高香草酸 homovanillic acid	—	+
29	4.22	479.082 1	棉纤维素 gossypin	0.35±0.05	↓
30	4.40	163.040 1	3-香豆酸 3-coumaric acid	0.28±0.14	↓
31	4.69	167.035 1	香草酸 vanillic acid	—	+
32	4.79	161.024 5	7-羟基香豆素 7-hydroxycoumarin	—	+
33	5.08	175.024 8	维生素 C vitamin C	0	—
34	5.18	123.045 2	3-甲基苯邻二酚 3-methylcatechol	—	+
35	5.22	463.086 8	杨梅苷 myricitrin	0.33±0.07	↓
36	5.40	189.018 7	色酮-3-甲酸 chromone-3-carboxylic acid	—	+
37	5.45	203.035 1	8-乙酰基-7-羟基香豆素 8-acetyl-7-hydroxycoum-arin	—	+
38	5.63	433.076 7	薷苷 avicularin	0.07±0.06	↓
39	5.70	463.087 1	绣线菊苷 spiraeoside	0.29±0.13	↓
40	5.82	433.077 1	篇薷苷 guaiaverin	0.09±0.04	↓

续表2

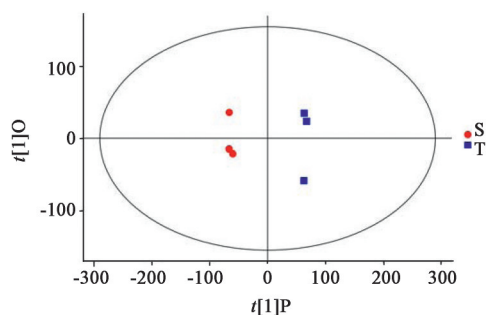
No.	t_R /min	m/z 或 M	化合物	峰面积比 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	变化 情况
41	5.91	177.055 5	松柏醛 coniferyl aldehyde	—	+
42	5.97	447.090 6	槲皮苷 quercitrin	0.41±0.08	↓
43	6.00	299.019 7	异去甲蟛蜞菊内酯 demethylwedelolactone	0.10±0.03	↓
44	6.36	331.045 6	棉黄素 3-甲醚 gossypetin 3-methylether	22.72±1.19	↑
45	6.41	301.035 0	5,7,3',4',5'-五羟基黄酮 5,7,3',4',5'-pentahydroxyflavone	2.45±0.85	↑
46	6.73	269.045 1	3,6,3'-三羟基黄酮 3,6,3'-trihydroxyflavone	—	+
47	6.91	301.035 2	草质素 herbacetin	—	+
48	7.03	315.050 3	6-甲氧基藤黄菌素 6-methoxyluteolin	10.30±1.75	↑
49	7.07	345.060 9	3',5'-二甲氧基-3,5,7,4'-四羟基黄酮 3',5'-dimethoxy-3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone	—	+
50	7.07	493.226 7	苍术苷 A atractyloside A	0.56±0.10	↓
51	7.55	269.044 9	6,7,3'-三羟基黄酮 6,7,3'-trihydroxyflavone	—	+
52	7.69	461.107 7	红车轴草异黄酮-7-O-葡萄糖苷 pratensein-7-O-glucoside	0.44±0.14	↓
53	7.94	152.034 7	4-硝基间甲苯酚 3-methyl-4-nitrophenol	4.35±4.60	↑
54	8.06	269.045 1	芹菜素 apigenin	1.04±0.10	≈
55	8.08	299.055 6	鸢尾黄素 tectorigenin	2.98±0.79	↑
56	8.27	329.066 1	苜蓿素 tricin	2.11±0.71	↑
57	8.29	299.055 5	香叶木素 diosmetin	0.60±0.11	↓
58	8.40	315.050 3	槲皮素 3'-甲醚 quercetin 3'-methyl ether	39.84±8.15	↑
59	8.59	641.317 5	甜菊双糖苷 steviolbioside	0.58±0.10	↓
60	8.70	327.123 1	4'-羟基-2'-甲基-3,4,5-三甲氧基查尔酮 4'-hydroxy-2'-methyl-3,4,5-trimethoxychalcone	—	+
61	8.91	227.128 5	反-愈伤酸 trans-traumatic acid	0.47±0.01	↓
62	9.18	229.144 0	十二烷二酸 dodecanedioic acid	0.67±0.16	↓
63	9.27	313.070 8	3,7-二羟基-3',4'-二甲氧基黄酮 3,7-dihydroxy-3',4'-dimethoxyflavone	0.44±0.12	↓
64	9.27	315.050 3	鼠李素 rhamnetin	—	+
65	9.41	215.165 1	12-羟基十二碳酸 12-hydroxydodecanoic acid	0.40±0.08	↓
66	9.68	343.081 7	5,7-二羟基-3',4',5'-三甲氧基黄酮 tricin methyl ether	0.26±0.23	↓
67	9.91	283.060 7	金合欢素 acacetin	0.47±0.06	↓
68	10.54	297.076 5	3',4'-二甲氧基-7-羟基异黄酮 3',4'-dimethoxy-7-hydroxyisoflavone	0.47±0.10	↓
69	11.15	313.238 0	12,13-二羟基-9Z-十八烯酸 12,13-dihydroxy-9Z-octadecenoic acid	0.89±0.04	↓
70	11.51	365.231 8	20-羟花生四烯酸 20-hydroxyarachidonic acid	0.83±0.08	↓
71	11.60	329.175 2	鼠尾草酚 carnosol	1.09±0.10	≈
72	11.74	285.206 5	十六烷二酸 hexadecanedioic acid	0.75±0.19	↓
73	13.07	333.205 2	13,14-二氢-15-酮-前列腺素 J ₂ 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin J ₂	0.20±0.08	↓
74	13.63	323.258 8	11-羟基-12E,14Z-二十碳二烯酸 11-hydroxy-12E,14Z-eicosadienoic acid	0.13±0.04	↓
75	15.50	304.239 4	顺式-5,8,11,14-二十碳四烯酸 cis-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid	0.87±0.11	↓
76	17.96	309.279 2	Δ ² -二十碳烯酸 Δ ² -cis-eicosenoic acid	1.82±0.40	↑

2.5 数据分析 基于UHPLC-QTOF-MS/MS所测数据涉及物质种类多以及检测样本量偏少的特性,在这些变量中既包含与分类变量相关的差异变量,也包含大量互相间可能存在关联的无差异变量。因此,这可能会导致如果使用主成分分析(PCA)或

偏最小二乘法(PLS)进行分析,由于相关变量的影响,差异变量会分散到更多的主成分上,无法进行更好的可视化和后续分析,故选择采用正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)对结果进行分析。通过分析,可以过滤掉检出物中与分类变量不相关的

正交变量,并对非正交变量和正交变量分别分析,从而获取更加可靠的检出物的组间差异与实验组的相关程度信息。使用SIMCA 15.0.2对数据进行对数(log)转换加UV格式化处理后,首先对第一主成分进行OPLS-DA建模分析,模型的质量用7折交叉验证进行检验;然后用交叉验证后得到的 R^2Y (模型对分类变量Y的可解释性)和 Q^2 (模型的可预测性)对模型有效性进行评判;最后通过置换检验,随机多次($n=200$)改变分类变量Y的排列顺序得到不同的随机 R^2Y 和 Q^2 ,对模型有效性做进一步的检验,通过检验说明建立的模型符合样本数据的真实情况,同时原模型具有良好的稳健性($R^2Y=0.998$, $Q^2=0.959$)。侧柏炭对侧柏叶的OPLS-DA模型得分散点图见图3,图中横坐标表示第一主成分的预测主成分得分,纵坐标表示正交主成分得分,结果发现侧柏炭和侧柏叶区分显著。

进一步分析发现,侧柏炭与侧柏叶相比,正、负离子模式下所得检出物均差异较大,见图4。火山图中每个点代表1个检出物,散点大小代表OPLS-DA模型的VIP值,散点越大VIP值越大。散点颜色代表最终的筛选结果,显著增加的检出物以红色表

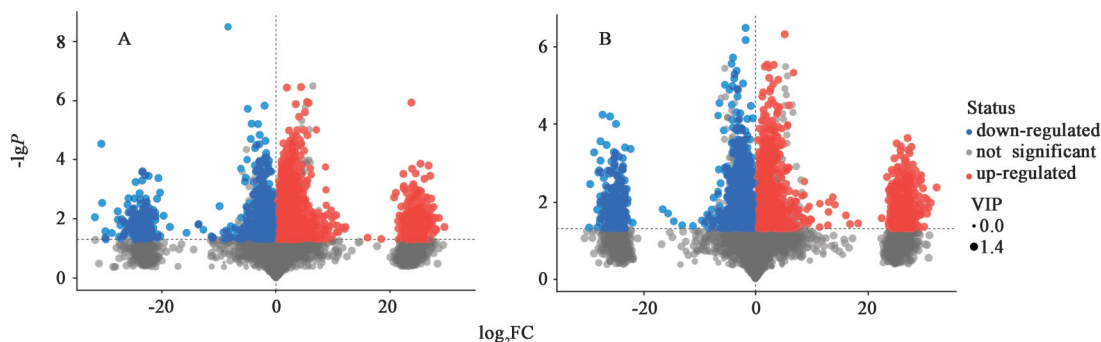


T. 侧柏炭; S. 侧柏叶(图5同)

图3 侧柏炭组对侧柏叶组的OPLS-DA模型得分散点

Fig. 3 Score scatter plot of OPLS-DA model for Platycladi Cacumen Carbonisata group vs Platycladi Cacumen group

示,显著下降的检出物以蓝色表示,非显著差异的检出物为灰色,说明侧柏叶炒炭前后化学成分发生了明显的变化。对上述分析得到的差异检出物进行聚类分析,根据其定量值计算欧式距离矩阵,以完全连锁方法对差异检出物进行聚类分析,见图5。横坐标代表侧柏叶和侧柏炭,纵坐标代表该组对比较的差异代谢物,不同位置的色块代表对应位置检出物的相对表达量(红色代表显著增加,蓝色代表显著降低),同样可见侧柏叶炒炭前后化学成分发生了明显的变化。



A. 正离子; B. 负离子(图5同); FC. 差异倍数(fold change)

图4 侧柏炭较侧柏叶的差异检出物筛选火山分析

Fig. 4 Volcano plots of differential detection for Platycladi Cacumen Carbonisata and Platycladi Cacumen

2.6 黄酮类化合物的辨识 根据本课题组前期工作及文献研究,黄酮类成分为侧柏叶炒炭后增强止血的主要活性成分^[17-18],故对上述辨识结果中黄酮类化合物进行了汇总,共计40种,包括槲皮素,槲皮素-3-D-木糖苷,异槲皮苷,山柰酚-7-O-葡萄糖苷,高车前苷,山柰酚,杨梅素,3-羟基-6,3',4'-三甲氧基黄酮,丁香素-3-半乳糖苷,7,4'-二甲氧基-3-羟基黄酮,3,8"-联芹菜苷元,篇蓄苷/蓄苷,5,7,3',4',5'-五羟基黄酮,苜蓿素,芹菜素,槲皮苷,杨梅苷,棉纤维素,金合欢素,3,7-二羟基-3',4'-二甲氧基黄酮,香叶木素,棉黄素3-甲醚,6-甲氧基藤黄菌素,槲皮素3'-甲

基醚,草质素,3,6,3'-三羟基黄酮,6,7,3'-三羟基黄酮,3',5'-二甲氧基-3,5,7,4'-四羟基黄酮,鼠李素,红车轴草异黄酮-7-O-葡萄糖苷,3',4'-二甲氧基-7-羟基异黄酮,鸢尾黄素,黄颜木素,原花青素B₂,黄豆黄苷,表儿茶素,(-)-儿茶素,4'-羟基-2'-甲基-3,4,5-三甲氧基查尔酮,绣线菊苷。

在上述黄酮类化合物中,黄酮苷类的裂解均是先脱掉相应的糖,生成相应的苷元后通过脱掉H, OH, CO或者通过黄酮类化合物特定的逆狄尔斯-阿尔德反应(RDA)裂解或裂解方式II进行裂解。以槲皮苷和山柰酚-7-O-葡萄糖苷为例,裂解方式解析

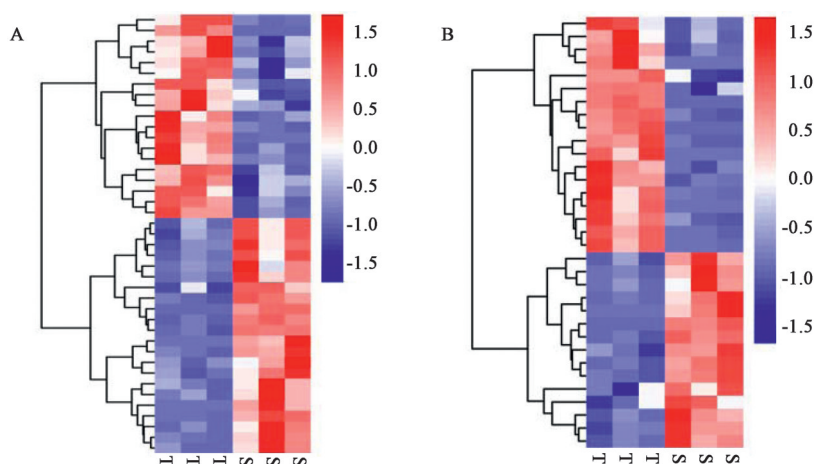


Fig. 5 Hierarchical clustering analysis of Platycladi Cacumen Carbonisata and Platycladi Cacumen

柞酚经裂解方式 II 裂解的碎片离子, m/z 153.016 9 为山柞酚经 RDA 裂解伴随 H 转移脱去 $C_8H_6O_2$ 的碎片离子, 对照数据库推断该化合物为山柞酚。

基于本文研究结果可知,炒炭对侧柏叶多种化学成分产生了较大的影响,侧柏叶炒炭后消失的物质有 12 种,分别为 *L*-脯氨酸, *L*-异亮氨酸,犬尿酸, 4-香豆酸, 3-吡啶丙烯酸,桃金娘烯醛,顺式茉莉酮, 香芹酮,脱镁叶绿酸盐 A, *L*-酪氨酸, *L*-色氨酸,维生素 C。明显降低的有 79 种,其中降低 90% 以上的 7 种,降低 50%~90% 的 42 种,降低 10%~50% 的 30 种;基本不变的有 15 种;新产生 19 种,分别为 1-甲基腺嘌呤,麝香酮,邻苯二酚, 5-羟基异香草酸,丁香酸, 4'-羟基-2'-甲基-3, 4, 5-三甲氧基查尔酮,高香草酸,香草酸, 7-羟基香豆素, 3-甲基苯邻二酚,色酮-3-甲酸, 8-乙酰基-7-羟基香豆素,松柏醛, 3, 6, 3'-三羟基黄酮,草质素, 6, 7, 3'-三羟基黄酮, 7, 8-二羟基香豆素,鼠李素和 3', 5'-二甲氧基-3, 5, 7, 4'-四羟基黄酮;升高的有 28 种,其中升高 <50% 的 3 种,升高 50%~100% 的有 4 种,升高 100% 以上有 21 种,合计检出 153 种变化趋势一致的化合物。

综合分析后发现,侧柏叶炒炭后消失的成分基本为高热下性质不稳定或被破坏的氨基酸类^[19-20]和酮醛等易挥发类成分。而新产生成分中5种是黄酮苷元类,3种为香豆素类及3种苯甲酸类。另外基于前期研究和文献调研,侧柏炭的主要有效成分为黄酮类成分,为此对侧柏叶及侧柏炭中检出物中的黄酮类成分进行梳理和汇总,结果共辨识出的黄酮类成分有40种。通过初步分析发现炒炭后侧柏叶中原含有的黄酮苷类化合物含量均明显下降了,查阅

文献发现,寒凉类药物具有镇静、解热、消炎、抗菌、降血压等作用^[21],而侧柏叶中的槲皮苷、异槲皮苷、杨梅苷等黄酮苷类均与寒凉之性明显相关^[22-24],因此,该变化可用于初步解析侧柏叶炒炭后寒凉之性减弱。虽然UHPLC-QTOF-MS/MS能够同时检测出多种类化合物,但其亦存在一定的局限性,后续会在本文研究基础上进一步采用薄层色谱法(TLC)及高效液相色谱法(HPLC)等分析技术对侧柏叶炒炭前后主要有效成分黄酮类及其变化情况进行确认和验证,以期侧柏叶炒炭前后功效变化物质研究提供参考依据。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:225-226.
- [2] 肖永庆,李丽. 中华医学百科全书·中药炮制学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2016:150-151.
- [3] 谭晓亮,李瑞海,贾天柱. 侧柏叶炮制前后成分的对比[J]. 实用药物与临床,2015,18(11):1359-1362.
- [4] 于生,单鸣秋,丁安伟,等. 侧柏叶炮制前后总黄酮的含量变化[J]. 现代中药研究与实践,2010,24(1):51-54.
- [5] 孙立立,杨书斌,江波,等. 炮制对侧柏叶化学成分的影响[J]. 中成药,2006,28(6):821-823.
- [6] 吴怀恩,甄汉深,韦志英,等. 侧柏叶不同炮制品中槲皮苷与槲皮素的含量测定[J]. 时珍国医国药,2009,20(2):354-356.
- [7] 姚晓东. 侧柏炭质量标准及止血机理研究[D]. 南京:南京中医药大学,2006.
- [8] 陈学松,张涛. 侧柏叶不同炮制品中槲皮苷含量的比较[J]. 中国中药杂志,2006,31(10):847-849.
- [9] 陈国佩,黄开艳. 侧柏叶炮制的实验研究[J]. 中药材,1994,17(5):24-27.
- [10] 蒋纪洋,李同永,李存兴,等. 侧柏叶炮制研究初探[J]. 中药通报,1987,12(11):22-23.
- [11] 孙立靖,谢英渤. 色质联用分析炮制工艺对侧柏叶挥发油的影响[J]. 山东师大学报:自然科学版,2001,16(3):357-360.
- [12] 张华,邢书东. 侧柏炭炮制程度的研究[J]. 山东医药

工业,2002,21(4):8-9.

- [13] 曾祥丽,丁安伟,单鸣秋. 侧柏叶炮制前后鞣质的含量测定[J]. 中国中医药信息杂志,2008,15(4):45-46.
- [14] 孙延君,李瑞海. 不同产地侧柏叶药材及炮制前后氨基酸成分比较分析[J]. 亚太传统医药,2017,13(8):52-55.
- [15] 孙立靖,任建成. 中药侧柏叶饮片中无机元素的含量测定[J]. 山东师大学报:自然科学版,1999,14(4):400-402.
- [16] 石典花,宗珊珊,王军,等. 基于市售侧柏炭饮片质量问题探讨其“炒炭存性”的质控标准[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(3):21-26.
- [17] 刘晨,柳佳,郑传柱,等. 侧柏炭止血作用活性部位筛选[J]. 中国中药杂志,2014,39(16):3152-3156.
- [18] 薛露,刘晨,丁安伟,等. 侧柏炭黄酮类成分群对干酪母致血热复合出血模型大鼠的止血作用研究[J]. 中国医院药学杂志,2016,36(17):1486-1491.
- [19] CHEN L, SONG F R, LIU Z Q, et al. Multi-residue method for fast determination of pesticide residues in plants used in traditional chinese medicine by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2012, 1225:132-140.
- [20] 崔兵兵,辛义周,马传江. 中药炮制对中药化学成分及药效影响的研究进展[J]. 药学研究,2019,38(7):403-406.
- [21] 胡爱萍. 关于中药药性理论现代化研究的思考[J]. 光明中医,2006,21(10):20-22.
- [22] 杨琳. 槲皮苷药理活性研究进展[J]. 亚太传统医药,2015,11(6):61-63.
- [23] XIE W Y, WANG M, CHEN C, et al. Hepatoprotective effect of isoquercitrin against acetaminophen-induced liver injury[J]. Life Sci, 2016, 152:180-189.
- [24] DOMITROVIĆ R, RASHED K, CVIJANOVIĆ O, et al. Myricitrin exhibits antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice[J]. Chem Biol Interact, 2015, 230:21-29.

【责任编辑 刘德文】