

基于UPLC-Q-TOF-MS^E技术分析麸炒前后 枳实及其辅料麦麸化学成分的差异

彭芳芳, 林桂梅*, 臧彬如

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的:应用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS^E)技术结合UNIFI数据库筛查方法快速分析和鉴定枳实麸炒前后的差异性化学成分以及辅料麦麸的化学成分。方法:采用ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量2 μL,流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~11 min, 98%~70%B; 11~15 min, 70%~55%B; 15~16 min, 55%~35%B; 16~20 min, 35%~5%B; 20~20.5 min, 5%~98%B; 20.5~22 min, 98%B);选择电喷雾离子源(ESI),正离子检测模式,质量扫描范围 m/z 50~1 500;结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)寻找枳实炮制前后的差异性成分,并检测炮制后麦麸的化学成分。结果:初步鉴定枳实中含有64种化学成分,麸炒枳实58种化学成分,炮制后麦麸18种化学成分,枳实与麸炒枳实差异性成分19个,主要为挥发油、黄酮类、酚酸类、香豆素类和皂苷类成分。结论:从麸炒前后差异性成分和辅料麦麸携带的化学成分结果分析,麸炒能够缓和枳实的峻烈之性,证实了麸炒对于枳实炮制工艺的必要性,可为枳实的炮制机制研究提供较为全面的实验依据。

[关键词] 枳实; 麸炒品; 麦麸; UNIFI数据库; 化学成分; 炮制机制; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS^E)

[中图分类号] R22;R28;R943.1;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)24-0144-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201551

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200509.1629.001.html>

[网络出版日期] 2020-5-11 10:09

Analysis of Differential Chemical Compositions of Aurantii Fructus Immaturus Before and After Stir-frying with Bran and Chemical Compositions of Wheat Bran After Processing by UPLC-Q-TOF-MS^E

PENG Fang-fang, LIN Gui-mei*, ZANG Bin-ru

(School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To quickly analyze and identify the differential chemical compositions of Aurantii Fructus Immaturus before and after stir-frying with bran and chemical compositions of wheat bran after processing by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS^E) combined with UNIFI database screening method. **Method:** ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) was used for chromatographic separation with 0.1% formic acid solution (A)-acetonitrile (B) as the mobile phase for gradient elution (0-11 min, 98%-70%B; 11-15 min, 70%-55%B; 15-16 min, 55%-35%B; 16-20 min, 35%-5%B; 20-20.5 min, 5%-98%B; 20.5-22 min, 98%B) at the flow rate of 0.3 mL·min⁻¹ and the injection volume of 2 μL. The analytes were determined in positive ion mode with electrospray ionization (ESI) and data collection range of m/z 50-1 500. Principal component analysis (PCA)

[收稿日期] 20200219(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81503248);辽宁省自然科学基金项目(2019-MS-230)

[第一作者] 彭芳芳,在读硕士,从事中药炮制原理研究,E-mail:1223510881@qq.com

[通信作者] *林桂梅,博士,副教授,从事中药炮制原理研究,Tel:0411-85890151,E-mail:linguimeil982@163.com

and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to find the component differences between raw and processed products of *Aurantii Fructus Immaturus*, and the chemical compositions of wheat bran after processing were determined. **Result:** There were 64 compounds in raw products, 58 compounds in bran-fried products, and 18 compounds in wheat bran. There were 19 different components between raw and processed products of *Aurantii Fructus Immaturus*, mainly volatile oil, flavonoids, phenolic acid, coumarins and saponins. **Conclusion:** Based on the analysis of these different components before and after stir-frying with bran and the chemical compositions carried by wheat bran, the stir-frying with bran can alleviate the intensity of *Aurantii Fructus Immaturus*, which proves the necessity of stir-frying with bran for the processing technology of this herb, and provides a comprehensive experimental basis for research on processing mechanism of *Aurantii Fructus Immaturus*.

[Key words] *Aurantii Fructus Immaturus*; bran-fried products; wheat bran; UNIFI database; chemical composition; processing mechanism; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS^E)

枳实始载于《神农本草经》，其生品具有破气消积、化痰散痞的功效^[1]。古代文献记载枳实“麸皮制去燥性而和胃”，认为生品破气作用强烈，麸炒后得到缓和，可免伤正气；麦麸作为炮制辅料，能和中益脾，与中药共制能缓和药物的燥性，以此作为枳实“生峻熟缓”这一炮制机制的理论基础。现代文献研究发现，枳实主要含有黄酮类、挥发油、生物碱和香豆素类化合物^[2-3]。其中，枳实内含量较高的挥发油和黄酮类成分会刺激胃肠，经麸炒后，麦麸吸收了枳实中部分挥发油成分，缓解了枳实的燥烈之性，降低了其对胃肠道的刺激，同时所含的黄酮类成分也不会被酶解破坏，进而增强消导理气的功效^[4]。为了进一步了解麸炒对枳实化学成分的影响，本实验就枳实与麸炒枳实之间的化学成分差异进行比较，同时对炮制后的麦麸是否会携带枳实化学成分以及其携带的具体成分进行考察，另外，简要分析了辅料炒和清炒2种炮制工艺的差异，为枳实炮制机制研究提供参考。

UPLC-Q-TOF-MS^E是一种具有高通量筛选检测和高分辨、高灵敏定性能力的新型分析技术，其良好的分离效果和对复杂化合物快速、高效的数据分析能力满足了中药多个领域的研究需要^[5]；UNIFI是一个可以对化学成分进行快速、全面定性分析的平台，其数据库中包含了近600味中药的数千种化学成分信息，可通过获取质谱数据，迅速找出样品间的成分差异，大大提高了工作效率；二者常结合用于化学成分的分离、检测和鉴定^[6]。本实验拟采用UPLC-Q-TOF-MS^E技术和UNIFI平台，结合主成分分析和正交偏最小二乘法-判别分析对枳实炮制前后及其辅料麦麸的差异性化学成分进行

分析与鉴定，探索炮制工艺参数对枳实中化学成分的影响，以期对枳实及其炮制品的差异性研究提供参考。

1 材料

ACQUITY UPLC I-Class型超高效液相色谱-Xevo G2-XS型飞行时间串联四极杆质谱仪(美国Waters公司，配有MassLynx 4.1工作站)，FA1004B型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)，AE240型1/10万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)，DFT-100型手提式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司)，Milli-Q型纯水仪(美国Millipore公司)。

枳实饮片购于江西樟树药材市场，经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* 的干燥幼果，麦麸(大连权健中药饮片有限公司，批号180401)，橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷、芸香柚皮苷、辛弗林对照品(江苏永健医药科技有限公司，批号分别为YJ-16026，YJ-150520，YJ-151012，14259-46-2，YJ-151012，纯度均>98%)，水为超纯水，乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 样品的制备

2.1.1 麸炒枳实 取大小分等的枳实100 g，麦麸10~15 g。将炒锅加热至所需温度(约180℃)，均匀撒入麦麸即刻烟起时，投入净枳实，快速翻动，炒至枳实表面淡黄，麦麸焦黑色时，立即取出，筛出炮制后的麦麸，放凉^[7]。同法重复6次，得到6份麸炒枳实和6份炮制后麦麸。

2.1.2 清炒枳实 称取大小分等的枳实100 g。将炒锅加热至所需温度(约180℃)，投入净枳实，快速

翻动,炒至枳实表面淡黄时,立即取出,放凉。同法重复6次,得到6份清炒枳实。

2.1.3 清炒麦麸 取麦麸10~15 g。将炒锅加热至所需温度(约180℃),均匀撒入麦麸即刻烟起时,快速翻动,炒至麦麸焦黑色时,立即取出,放凉。同法重复6次,得到6份清炒麦麸。

2.2 供试品溶液的制备 将枳实、麸炒枳实和清炒枳实经粉碎机粉碎成粗粉,精密称取枳实、麸炒枳实和清炒枳实各2.0 g,麦麸、清炒麦麸和炮制后麦麸各1.5 g,分别加入70%乙醇50 mL回流提取2次,每次1 h,过滤,合并提取液,于蒸发皿中进行浓缩,加甲醇使溶解并定容至50 mL,经0.22 μm微孔滤膜滤过,待测。

2.3 对照品溶液的制备 精确称取橙皮苷、新橙皮苷、柚皮苷、芸香柚皮苷、辛弗林对照品适量,加75%甲醇充分使溶解并定容至刻度,制成质量浓度均为10 μg·L⁻¹的混和对照品溶液,进样前经孔径为0.22 μm的微孔滤膜过滤。

2.4 检测条件

2.4.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),柱温35℃,流速设定0.3 mL·min⁻¹,进样量2 μL,流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0~11 min,98%~70%B;11~15 min,70%~55%B;15~16 min,55%~35%B;16~20 min,35%~5%B;20~20.5 min,5%~98%B;20.5~22 min,98%B)。

2.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子检测模式,雾化气(N₂)流速40 L·h⁻¹,离子源温度100℃,脱溶剂气温度400℃,流速设定800 L·h⁻¹,毛细管电压2 kV,MS^E全扫描模式检测。传输碰撞能量在低能量扫描时,通道为关闭状态;高能量扫描时,传输碰撞能量20~30 eV,质量扫描范围 m/z 50~1 500。采用质量锁定(Lock-Mass)技术,以亮氨酸-脑啡肽调谐液作为实时校正溶液,确保相对分子质量的准确测定。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 精密吸取枳实供试品溶液,按2.4项下条件连续进样6次,计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的RSD,考察仪器的精密度。

2.5.2 稳定性试验 精密吸取枳实供试品溶液,分别于制备后0,4,8,12,24 h按2.4项下条件检测,计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的RSD,考察供试品溶液的稳定性。

2.5.3 重复性试验 精密称取枳实样品1.0 g,按

2.2项下方法制备6份供试品溶液,按2.4项下条件测定,计算主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的RSD,考察该方法的重复性。

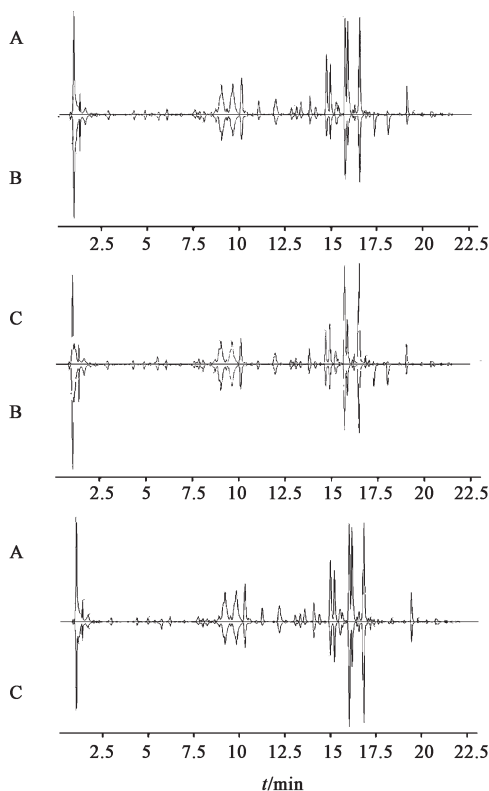
2.6 数据采集与分析 采用UPLC-Q-TOF-MS^E技术采集数据,通过UNIFI数据处理系统对各提取液的化学成分进行自动识别和质谱分析。查阅相关文献建立枳实的化学成分数据库,作为原有的传统中药库的补充;将MS^E数据导入UNIFI数据处理系统,利用UNIFI的自动筛查、鉴定功能,代替传统的人工提取色谱峰、计算分子式以及分析碎片断裂情况^[8],建立筛选方法,设定质量误差-5~5 ppm,响应值>2 000,经过MassLynx 4.1工作站对各正离子模式基峰离子流图进行逐个核对;结合化合物裂解规律对采集到的碎片离子的相对保留时间和理论精确质量数等进行碎片信息推导,并参考在线质谱数据库(ChemSpider)和相关文献完成各化学成分的人工识别和定性分析。

3 结果

3.1 方法学考察 在精密度试验、稳定性试验及重复性试验中,计算各主要色谱峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均<3%,表明仪器精密度良好、各供试品溶液在24 h内稳定且该方法重复性良好。

3.2 枳实炮制前后总离子流图比较 将枳实、麸炒枳实和清炒枳实的UPLC-Q-TOF-MS^E总离子流图制作成镜像图进行比较分析,见图1。结果发现麸炒枳实与枳实二者峰数目和相对保留时间略有不同,尤其是响应强度较低的成分,部分化学成分响应强度有明显差别;清炒枳实与枳实二者峰数目几乎一致,部分成分响应强度有明显差别;麸炒枳实与清炒枳实二者峰数目和响应强度均略有不同。说明辅料和加热对枳实的化学成分种类影响较小,而对其含量影响更为明显。

3.3 主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA) 使用EZinfo 3.0软件,通过PCA和OPLS-DA找出化合物谱的差异,见图2。由图2(A)可知,枳实、清炒枳实和麸炒枳实可以明显分开,并各自聚为一类,说明枳实炮制前后的化学成分存在差异,且加热和辅料对枳实化学成分的影响是明显不同的。为进一步证实麸炒前后化学成分的差异性,采用OPLS-DA研究枳实麸炒前后的差异化学成分,其得分图见图2(B),结果发现枳实与麸炒品可明显分开,采用常用的变量重要性投影(VIP)值对组间质量差异标志物进行筛选,当VIP值>1时,认为存在潜在差异化学成分^[9],可以通过

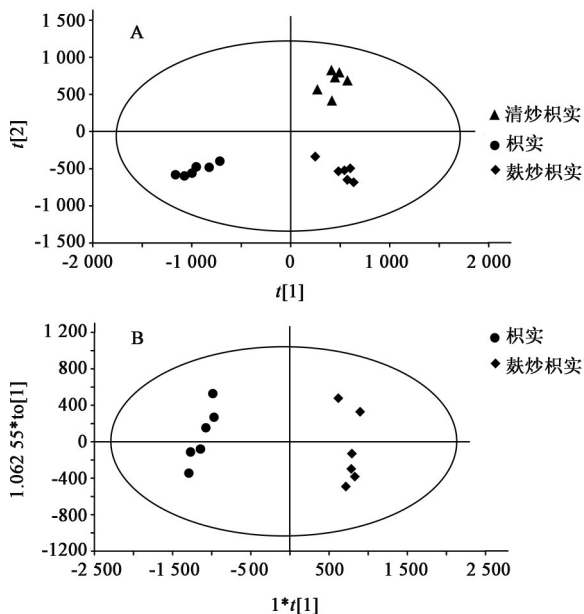


A. 麸炒枳实; B. 枳实; C. 清炒枳实

图1 不同枳实炮制品的UPLC-Q-TOF-MS^E总离子流镜像分析

Fig. 1 Mirror image analysis of total ion chromatograms of different processed products of *Aurantii Fructus Immaturus*

VIP值和柱状载荷图对两组样品间的差异化学成分进行考察。



A.PCA; B.OPLS-DA

图2 不同枳实炮制品UPLC-Q-TOF-MS^E数据的得分

Fig. 2 Score plots of UPLC-Q-TOF-MS^E data from different processed products of *Aurantii Fructus Immaturus*

3.4 枳实麸炒前后差异化学成分的鉴定 利用MassLynx 4.1工作站和UNIFI数据库自动匹配筛选功能对枳实麸炒前后差异的化学成分进行定性分析,同时对VIP值>1的差异显著的化学成分进行结构鉴定。结果鉴定出枳实和麸炒枳实的19个差异化学成分,详细数据见表1,其中化合物1,2,5,6,10,12~15,19为枳实不同于麸炒枳实的化学成分,化合物3,4,7~9,11,16~18为麸炒枳实不同于枳实的化学成分。

对具有代表性的化合物进行鉴定过程的分析,化合物7为酚酸类,准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 195.054 1,含有 $[M+H-CH_3O]^+$ m/z 164.131 9和 $[M+H-C_3H_5O_2]^+$ m/z 124.093 3等碎片离子,与文献[13]报道的反式阿魏酸的结构一致,可推测该化合物为反式阿魏酸。化合物8为挥发油,准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 151.103 9,含有 $[M+H-CHO]^+$ m/z 122.018 2和 $[M+H-C_3H_5]^+$ m/z 110.062 1等碎片离子,与文献[14]报道的紫苏醛结构一致,推测该化合物为紫苏醛。化合物10为黄酮类,准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 595.197 6,含有 $[M+H-C_7H_7O-C_4H_{12}O_5]^+$ m/z 348.074 0, $[C_{16}H_{15}O_5]^+$ m/z 287.094 3, $[C_7H_5O_4]^+$ m/z 153.013 2等碎片离子,与文献[15]报道的枸橼苷结构一致,故推测该化合物为枸橼苷。化合物14为香豆素类,准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 163.031 8,含有 $[M+H-O]^+$ m/z 147.041 8和 $[M-H_2O]^+$ m/z 144.130 8等碎片离子,与文献[17]报道的伞形花内酯结构一致,可推测该化合物为伞形花内酯。化合物17为皂苷类,准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 577.436 1,含有 $[M+H-C_9H_{24}]^+$ m/z 445.051 6, $[M+H-C_3H_4O-C_{25}H_{39}O]^+$ m/z 166.100 3, $[C_5H_9O_5]^+$ m/z 149.035 3等碎片离子,与文献[20]报道的 β -胡萝卜苷结构一致,推测该化合物为 β -胡萝卜苷。另外,部分化合物为传统数据库中自带成分,未找到明确记载的文献,由于在UNIFI筛选结果中均显示较好的响应度,结合母离子和碎片离子进行了推测,结果可作为参考。

3.5 炮制前后差异性化学成分解析 据文献[22-23]记载,枳实中黄酮类化合物的质量分数约22.45%~33.76%,具有理气、行滞和调节胃肠道的作用。由上述实验结果可知,黄酮类成分种类在枳实中较多,其中枸橼苷具有抑制脂多糖(LPS)与巨噬细胞结合,纠正辅助性T细胞17/调节性T细胞(Th17/Treg)失衡,减轻结肠炎的作用[24]。对于酚酸性成分,其种类在麸炒枳实中较多,并且多与辅料

表 1 枳实与麸炒枳实的差异性成分分析

Table 1 Differential composition analysis of raw and bran-fried products of *Aurantii Fructus Immaturus*

化合物	t_R /min	名称	分子式	[M+H] ⁺ m/z				参考文献
				理论值	实测值	δ /ppm	典型碎片	
1	0.99	1,3,5-trihydroxy-10-methyl-2-(3-methyl-2-buten-1-yl)-9(10H)-acridinone	C ₁₉ H ₁₉ NO ₄	326.131 4	326.131 6	-2.8	295.010 6, 257.018 7	-
2	1.07	顺式-头-头-3,4,3',4'-柠檬油素二聚体 <i>cis</i> -head-to-head-limettin dimer	C ₂₂ H ₂₀ O ₈	413.115 8	413.115 5	-2.7	347.042 9, 110.037 0	[10]
3	2.21	橙花醚 nerol oxide	C ₁₀ H ₁₆ O	153.120 1	153.119 4	-4.9	138.071 6, 98.048 2	-
4	2.87	2-氨基丁酸 2-aminobutanoic acid	C ₄ H ₉ NO ₂	104.063 3	104.062 9	-3.8	89.131 1, 59.038 5	-
5	4.65	葡萄内酯 auranthen	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	299.156 8	299.163 8	4.7	204.071 2, 164.033 4, 136.085 2, 108.054 2	[11]
6	5.65	6,7-二羟基香豆素 6,7-dihydroxycoumarin	C ₉ H ₆ O ₄	179.026 6	179.027 0	2.2	150.053 9, 147.026 0, 137.056 1	[12]
7	7.34	反式阿魏酸 (<i>E</i>)-ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.057 9	195.054 1	0.2	164.131 9, 124.093 3	[13]
8	10.22	紫苏醛 <i>dl</i> -perillaldehyde	C ₁₀ H ₁₄ O	151.104 4	151.103 9	-3.0	122.018 2, 110.062 1	[14]
9	10.36	4-(1,1-dimethylpropyl)phenol	C ₁₁ H ₁₆ O	165.120 1	165.119 6	-2.4	150.076 2, 134.021 9, 122.073 4	-
10	11.79	枸橼苷 poncirin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	595.194 8	595.197 6	4.6	406.121 3, 348.074 0, 287.094 3, 153.013 2	[15]
11	12.39	4',5,6,7-四甲氧基黄酮 4',5,6,7-tetramethoxyflavanone	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	343.343 9	343.343 2	-1.4	311.023 1, 178.016.2	[16]
12	14.90	8-7-methoxy-2H-chromen-2-one	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	261.104 8	261.103 6	2.2	190.054 1, 160.041 3	-
13	16.69	3,5,6-trihydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	361.084 5	361.084 7	-3.6	346.072 2, 345.102 0, 317.069 2, 287.058 9	-
14	19.35	伞形花内酯 umbelliferone	C ₉ H ₆ O ₃	163.031 6	163.031 8	0.4	147.041 8, 144.130 8, 122.112 6	[17]
15	19.36	α -松油烯 α -terpinene	C ₁₀ H ₁₆	137.125 2	137.125 5	1.8	94.041 7, 91.055 5	[18]
16	19.69	对香豆酸 (<i>E</i>)- <i>p</i> -coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	165.047 3	165.046 3	-4.9	148.021 9, 120.082 6, 94.049 1	[19]
17	20.16	β -胡萝卜苷 β -daucosterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	577.438 9	577.436 1	-1.4	445.051 6, 420.256 8, 166.100 3, 149.035 3	[20]
18	20.72	棕榈酸 hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	257.240 2	257.247 5	3.5	242.063 3, 212.092 8	[21]
19	21.21	3,8-二葡萄糖基香叶木素 3,8- <i>di</i> -C-glucosyldiosmetin	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.169 0	625.168 0	-1.6	373.091 0, 355.088 6	-

麦麸本身含有的酚酸性成分相同,例如,在麸炒枳实中检出的反式阿魏酸,为麦麸中含有的化学成分,推测其在炮制后仍具有活性且被枳实吸附,因此,在麸炒枳实中被检测出来。有报道称反式阿魏酸具有抗氧化、抗癌、溶解血栓及抑菌等多种活性,对离体大鼠冠状动脉血管有舒张作用,认为其可能与激活血管平滑肌细胞上的电压依赖性 K⁺ 通道(K_v 通道),细胞肌浆网内钙释放以及外 Ca²⁺ 通道阻滞有关^[25-26]。香豆素类成分葡萄内酯对正常小鼠小肠平滑肌具有双向调节作用,低剂量时能明显促进小鼠胃肠动力,高剂量则具有明显的抑制作用^[27-28],枳实经麸炒后未检测到葡萄内酯,说明麸炒后降低了其对胃肠道的作用。由此推断,麸炒能够缓和枳实的峻烈之性,尤其是对胃肠道兴奋作用的缓和效果较为明显。

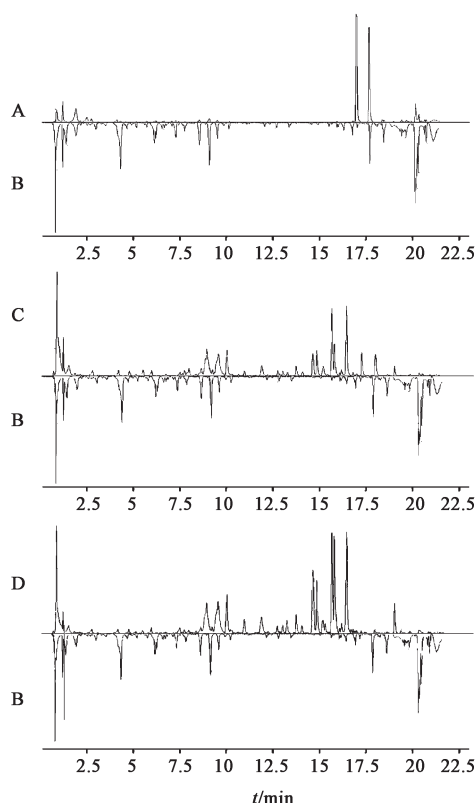
为验证炮制工艺参数对枳实化学成分的影响,

对清炒枳实进行了相关的化学成分鉴定,简要分析了清炒枳实与枳实、麸炒枳实的化学成分差异。结果发现清炒枳实与枳实的化学成分差异主要表现为挥发油类成分的变化,与麸炒枳实的化学成分差异主要表现为挥发油、香豆素类和皂苷类成分的变化,说明加热和辅料均对枳实挥发性成分含量影响较为明显,且辅料较加热对枳实化学成分成分影响程度更大。

3.6 炮制前后差异性成分含量的比较 差异成分的含量可利用各样品对应的峰强度数值来表示,通过对枳实、麸炒枳实及清炒枳实样品间同一物质峰强度的平均值进行比较,推测出几种含量变化较明显的化学成分,分别为川陈皮素(nobiletin),橙皮苷(hesperidin),异樱花苷(isosakuranin),酪胺(tyramine),香蜂草苷(didymine),黄柏酮(obacunone)等。上述化学成分在枳实中含量较高,

清炒枳实次之,说明麸炒较清炒使枳实中部分成分含量降低明显。

3.7 炮制前后的枳实与炮制后麦麸的总离子流图比较 将炮制后麦麸与清炒麦麸、枳实与炮制后麦麸、麸炒枳实与炮制后麦麸的UPLC-Q-TOF-MS^E总离子流图进行镜像图分析,见图3。结果发现炮制后麦麸与清炒麦麸相比,峰数目明显增多;而从枳实与炮制后麦麸、麸炒枳实与炮制后麦麸的总离子流镜像图来看,炮制后麦麸与枳实、麸炒枳实的部分色谱峰存在相同的保留时间,且这些色谱峰响应强度也存在较大差异,推测炮制后麦麸不同程度地携带了枳实中的部分化学成分。



A. 清炒麦麸;B. 炮制后麦麸;C. 枳实;D. 麸炒枳实

图3 枳实与麦麸炮制前后的UPLC-Q-TOF-MS^E总离子流镜像分析

Fig. 3 Mirror image analysis of UPLC-Q-TOF-MS^E total ion chromatograms of Aurantii Fructus Immaturus and wheat bran before and after processing

3.8 炮制后麦麸的化学成分鉴定 利用UNIFI枳实数据库对炮制后麦麸的成分进行筛选与鉴定。首先,排除制样过程中枳实碎屑掺杂的问题。2015年版《中国药典》中对枳实的性状描述为“本品呈半球形……质坚硬”,可见枳实的硬度大、流动性好,其掉屑可能性较小;其次,为了消除炮制过程中可能出现的枳实碎屑掉落的干扰,在麸炒结束后,对

炮制后的麦麸进行过筛,筛选出片形较为完整的麦麸进行下一步实验;最后,在麦麸制样过程中,与枳实所用实验器具严格分开。麦麸本身小且轻薄,不需要进一步粉碎,也最大程度保证了麦麸、清炒麦麸和炮制后麦麸在整个制样过程不会接触到枳实饮片。结果初步鉴定出了18种化学成分,包含4种挥发油,4种黄酮类成分,3种酚酸性成分,3种香豆素类成分,2种生物碱类成分,2种皂苷类成分。见表2。

同样对炮制后麦麸中的代表性化合物进行鉴定过程分析。化合物**3**为挥发油,准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 153.120 5,含有 $[M-CH_3]^+$ m/z 138.122 7, $[M+H-C_3H_7]^+$ m/z 110.014 9等碎片离子,与文献[29]报道的胡椒酮结构一致,推测该化合物为胡椒酮。化合物**8**为黄酮类,准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 361.083 2,含有碎片离子 $[M+H-CH_3]^+$ m/z 346.072 2, $[M+H-O]^+$ m/z 345.102 0, $[M+H-CH_3-CH-O]^+$ m/z 317.069 2等,由于是传统数据库中成分,未查到明确记载的文献,初步推测该化合物为3, 5, 6-trihydroxy-3', 4', 7-trimethoxyflavone。化合物**13**为挥发油,准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 221.182 1,含有碎片离子 $[M+H-C_2H_6]^+$ m/z 191.104 4, $[M+H-C_3H_{11}O-CH_3]^+$ m/z 119.071 4等,与文献[31]报道的氧化丁香烯结构一致,可推测该化合物为氧化丁香烯。化合物**15**为麦麸中含量较高的皂苷类成分,其准分子离子峰为 $[M+H]^+$ m/z 415.386 7,含有 $[M+H-C_6H_{13}]^+$ m/z 330.041 2, $[M+H-C_{10}H_{21}]^+$ m/z 274.151 3, $[C_7H_{14}O]^+$ m/z 114.094 1等碎片离子,与参考文献[15,21]报道的 β -谷甾醇结构一致,推测该化合物为 β -谷甾醇。另外,还有部分化合物未找到明确记载的文献,但结果可作为参考。

3.9 枳实麸炒前后与炮制后麦麸相同成分响应面积的比较 枳实、麸炒枳实与炮制后麦麸相同化合物的响应面积以各样品对应的峰强度数值表示,可对其相对含量进行考察,见表3。

由表3可知,表2中化合物**1,2,4,8,18**为炮制后麦麸和枳实共有,化合物**6,11,14,16**为炮制后麦麸和麸炒枳实共有,推测炮制后麦麸携带的化学成分能够体现枳实炮制前后化学成分的差异。但对于炮制后麦麸携带的化学成分结果,还需要大量的重复性试验进行验证和分析。另外,通过对炮制后麦麸与生制枳实相同成分响应面积的结果进行分析,挥发油类成分含量和种类的差异比较明显,从

表2 炮制后麦麸的化学成分分析

Table 2 Chemical composition analysis of wheat bran after processing

化合物	t_R/min	名称	分子式	[M+H] ⁺ m/z			典型碎片	参考文献
				理论值	实测值	δ/ppm		
1	0.98	1,3,5-trihydroxy-10-methyl-2-(3-methyl-2-buten-1-yl)-9H-acridinone	C ₁₉ H ₁₉ NO ₄	326.131 4	326.130 5	-2.8	295.010 6, 257.018 7	-
2	1.02	cis-head-to-head-limettin dimer	C ₂₂ H ₂₀ O ₈	413.115 8	413.114 7	-2.7	347.042 9, 110.037 0	[10]
3	3.43	胡椒酮 piperitone	C ₁₀ H ₁₆ O	153.120 1	153.120 5	2.3	138.122 7, 110.014 9, 96.051 1	[29]
4	4.68	aurapten	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	299.156 8	299.156 9	4.7	204.071 2, 164.033 4, 136.085 2, 108.054 2	[11]
5	7.08	左旋7-去羟基巴里尼定 ribalinine	C ₁₅ H ₁₇ NO ₃	260.120 8	260.121 3	1.7	244.141 0, 154.033 4, 92.052 0, 86.031 0	-
6	7.28	(E)-ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	195.057 9	195.057 9	0.2	164.131 9, 124.093 3	[13]
7	7.53	decanoic acid	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	173.146 3	173.146 9	3.1	158.074 5, 128.071 2	-
8	9.52	3,5,6-trihydroxy-3',4',7'-trimethoxyflavone	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	361.084 5	361.083 2	-3.6	346.072 2, 345.102 0, 317.069 2, 287.058 9	-
9	10.65	邻苯二甲酸二丁酯 di-isobutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	279.151 8	279.153 2	4.7	178.026 4, 151.048 8	-
10	11.44	α -蒾烯 α -cubebene	C ₁₅ H ₂₄	205.187 8	205.187 5	-1.5	190.081 2, 163.132 2	[30]
11	12.35	4',5,6,7-tetramethoxyflavanone	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	345.125 9	345.125 9	-1.4	314.115 1, 238.038 2	[16]
12	16.74	6',7'-二羟基佛手素 6',7'-dihydroxy bergamottin	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	373.157 2	373.157 6	0.7	318.113 9, 255.110 7	-
13	17.24	氧化丁香烯 caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	221.182 7	221.182 1	-2.6	191.104 4, 119.071 4	[31]
14	20.20	β -daucosterol	C ₃₅ H ₆₀ O ₆	577.438 9	577.438 2	-1.4	445.051 6, 420.256 8, 166.100 3, 149.035 3	[20]
15	20.43	β -谷甾醇 β -sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	415.386 1	415.386 7	1.3	330.041 2, 274.151 3, 114.094 1	[15,21]
16	20.67	hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	257.240 2	257.241 1	3.5	242.063 3, 212.092 8	[21]
17	21.05	didymin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	595.194 8	595.195 3	0.6	434.152 1, 288.091 9, 162.063 3, 154.011 8, 134.064 5	[32]
18	21.18	3,8-di-C-glucosyldiosmetin	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.169 0	625.168 0	-1.6	373.091 0, 355.088 6	-

炮制后成分的响应面积值来看,辅料会携带较多枳实中的挥发油类成分,推测其为缓解胃肠道平滑肌抑制作用的主要原因;酚酸性成分在炮制后含量由高到低顺序为炮制后麦麸>麸炒枳实>枳实,分析其含量差异原因一方面来自炮制对枳实自身成分含量的影响,另一方面是麦麸本身含有的多种酚酸性成分在与中药共制时被枳实携带。在清炒麦麸中同样检测到3种酚酸性成分,其中含量较高的为阿魏酸,有研究表明随着麦麸炒制程度的加大,阿魏酸含量呈下降趋势^[33];另外,皂苷类成分 β -谷甾醇也在清炒麦麸中含有,有文献报道该成分具有保护胃黏膜、抗炎、抑制病毒和结肠癌细胞生长等作用^[34-36]。由此可见,麸炒后,麦麸会吸附较多枳实中的挥发性成分,对部分黄酮类、香豆素类和生物碱类成分也有较低程度的携带,但麦麸本身含有的酚酸性成分和皂苷类成分在炮制过程中与枳实存在

的相互作用问题尚需进一步研究。

4 讨论

中药经辅料炮制后原有成分的组成和比例会发生不同程度的改变,从而使药理药效发生变化,这些变化可在辅料携带的成分种类和含量上得到适当体现。在本研究中,枳实与麦麸在炮制过程中存在成分互相携带现象。例如,在炮制后麦麸中检测到枳实中含有的挥发性成分和黄酮类成分等,在麸炒枳实中检测到麦麸同样含有的酚酸性成分和皂苷类成分。因此,在中药炮制实验研究中,不仅需重视炮制前后中药的化学成分变化,辅料对药材成分和药效的变化也需要深入研究。对于麸炒的研究,崔小兵^[37]提出“中药麸炒炮制中产生的焦香味物质是基于梅拉德反应形成”的观点,以麦麸炒制药物,在一定炒制温度下,麦麸中的糖和氨基酸等成分可产生梅拉德反应,经过缩合形成的产物有

表3 枳实、麸炒枳实与炮制后麦麸相同成分的响应面积比较
Table 3 Comparison of response areas of common compositions in wheat bran after processing, raw or bran-fried products of Aurantii Fructus Immaturus

种类	化合物	响应面积		
		枳实	麸炒枳实	炮制后麦麸
挥发油	di-isobutyl phthalate	47 586	8 559	2 260
	α -cubebene	—	—	3 125
	caryophyllene oxide	—	—	16 201
	piperitone	8 398	1 044	2 824
黄酮	3,5,6-trihydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone	3 460	—	3 211
	3,8-di-C-glucosyldiosmetin	1 486	—	1 696
	4',5,6,7-tetramethoxyflavanone	—	36 072	2 248
	didymnin	276 938	5 805	1 940
生物碱	ribalinine	1 604	14 070	2 191
	1,3,5-trihydroxy-10-methyl-2-(3-methyl-2-buten-1-yl)-9(10H)-acridinone	3 533	—	1 977
酚酸	(E)-ferulic acid	—	5 581	4 124
	hexadecanoic acid	—	7 336	12 353
	decanoic acid	—	—	3 266
香豆素	aurapten	19 816	—	1 483
	cis-head-to-head-limettin dimer	207 545	—	2 692
	6',7'-dihydroxy bergamottin	2 422	8 922	18 669
皂苷	β -daucosterol	—	4 481	4 928
	β -sitosterol	22 254	5 105	1 694

焦香味,具有一定的健脾作用;岳岭等^[38]发现炒焦麦麸健脾作用可能与增强小肠的蠕动功能有关,并研究了炒焦麦麸水提液对家兔离体小肠收缩的影响,认为其发挥收缩作用的有效成分主要位于乙酸乙酯部位,这可能是麦麸健脾作用的物质基础。从这些研究结果可知,麸炒可能会增加部分中药的健脾作用,这为寻找麸炒枳实健脾作用的物质基础研究提供了新思路。

本实验采用UPLC-Q-TOF-MS^E技术采集样品数据,根据高分辨质谱数据和UNIFI数据库快速识别枳实炮制前后以及辅料麦麸的差异性化学成分,共鉴定出枳实麸炒前后19种差异性化学成分,主要为挥发油、黄酮类、酚酸类和香豆素类化合物,并初步鉴定出炮制后麦麸的18种化学成分,为挥发油、黄酮类、生物碱类、酚酸类、香豆素类和皂苷类化合物。从枳实炮制前后差异性成分的结果来看,麸炒和清炒对枳实化学成分种类的影响较小,而对部分成分的含量影响比较明显,2种炮制方法均能不同程度地减缓枳实的峻烈之性,麸炒法由于辅料麦麸的吸附作用,减缓效果强于清炒。从炮制后麦麸的化学成分结果来看,麦麸携带的部分成分能够反映

枳实与麸炒枳实差异性成分的种类和含量变化,从而间接解释了枳实的炮制机制,并证实了麸炒法的合理性。此外,本实验结合辅料成分研究对枳实麸炒前后物质基础差异进行的分析,可为枳实的炮制机制研究提供较为全面的理论依据,同时也为麸炒枳实健脾作用等药效的物质基础研究提供了参考。

[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,2015:247.
[2] 顾雪竹,毛淑杰,李先端. 麦麸的现代研究概况[A]. 中华中医药学会中药炮制分会2008年学术研讨会论文集[C]. 樟树:出版社不详,2008:4.
[3] 张霄潇,李正勇,马玉玲,等. 中药枳实的研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(2):185-190.
[4] 于国华,杨洪军,李俊芳,等. 基于UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS技术分析枳实中的化学成分[J]. 中国中药杂志,2016,41(18):3371-3378.
[5] 晏仁义,马凤霞,余河水,等. UPLC-Q-TOF-MS^E结合相对保留时间在线快速鉴定麦冬中甾体皂苷类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(24):43-50.
[6] DENG L, SHI A M, LIU H Z, et al. Identification of

- chemical ingredients of peanut stems and leaves extracts using UPLC-QTOF-MS coupled with novel informatics UNIFI platform [J]. *J Mass Spectrom*, 2016, 51(12): 1157-1167.
- [7] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2013: 125-126.
- [8] 赵天一, 王振洲, 张楠淇, 等. UPLC-Q-TOF-MS^E技术结合 UNIFI 数据库快速分析桑黄化学成分[J]. 特产研究, 2018, 40(1): 20-25.
- [9] 刘娟秀, 罗益远, 刘训红, 等. 基于 UPLC-Triple TOF MS/MS 技术分析苍耳子炒制前后的差异化学成分[J]. 质谱学报, 2017, 38(1): 157-168.
- [10] 何海音, 凌罗庆, 周敏华. 从中药佛手中分离鉴定两个柠檬素二聚体[J]. 有机化学, 1987(3): 193-196.
- [11] 杨武亮, 陈海芳, 余宝金, 等. 枳壳活性化学成分研究[J]. 中药材, 2008, 31(12): 1812-1815.
- [12] 封家福, 赵琦, 卫秀敏, 等. 千金子中 6, 7-二羟基香豆素的分离鉴定及抗氧化活性研究[J]. 粮油食品科技, 2015, 23(3): 32-35.
- [13] 杨丹, 程忠泉, 丁中涛, 等. 兜唇石斛的酚类化学成分研究[J]. 中草药, 2017, 48(14): 2839-2842.
- [14] 郑梅琴, 魏燕霞, 林瑞余. 不同紫苏挥发油化学成分分析[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(24): 143-146.
- [15] 李敏. 枳壳化学成分的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [16] 王燕, 李晓波, 李俊杰, 等. 5, 6, 7, 4'-四羟基黄酮和 5, 6, 7, 4'-四甲氧基黄酮高分辨电喷雾串联质谱裂解规律对比研究[J]. 质谱学报, 2016, 37(5): 385-392.
- [17] 邓可众, 苕美燕, 宗琪, 等. 枳实药材乙醇提取物的化学成分研究[J]. 中国药房, 2018, 29(4): 458-460.
- [18] 张姣, 德吉, 朱孟夏, 等. 刺柏属 6 种植物枝叶和果实中挥发性成分分析[J]. 中成药, 2019, 41(5): 1172-1176.
- [19] 张清清, 陈静文, 马一婷, 等. 华泽兰根部化学成分研究[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4798-4802.
- [20] 马盼, 莫惠雯, 林坤河, 等. 柚花的化学成分研究[J]. 广西中医药, 2017, 40(1): 77-79.
- [21] 龚凌霄, 曹文燕, 张英, 等. 青稞麸皮提取物抑制 α -葡萄糖苷酶活性研究及成分分析[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 179-184.
- [22] 邓可众, 杨堃, 邓敏芝, 等. HPLC 法同时分析酸橙果实类药材中黄酮和香豆素类成分[J]. 中药材, 2016, 39(3): 575-578.
- [23] 林桂梅, 张国锋, 张建军. 枳实与麸炒品中 4 个黄酮类成分表观油水分配系数的比较研究[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1417-1419.
- [24] KANG G D, KIM D H. Poncirin and its metabolite ponciretin attenuate colitis in mice by inhibiting LPS binding on TLR4 of macrophages and correcting Th17/Treg imbalance [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 189: 175-185.
- [25] 尹志娜. 小麦麸皮固态发酵过程中活性成分释放的机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- [26] 房龙梅. 反式阿魏酸对大鼠离体冠状动脉的舒张作用及机制探讨[D]. 太原: 山西医科大学, 2016.
- [27] 胡源祥, 谭舒舒, 陈海芳, 等. HPLC 法同时测定绿衣枳壳中水合橘皮内酯、橘皮内酯、马尔敏和葡萄内酯的含量[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(10): 1200-1203.
- [28] 骆利平, 陈海芳, 罗小泉, 等. 葡萄内酯对小鼠离体小肠的作用机制研究[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(12): 1404-1407.
- [29] 田祎颖, 姚婷, 黄光文, 等. 湖南永州薄荷挥发油化学成分 GC-MS 分析[J]. 山东化工, 2018, 47(15): 96-97.
- [30] 陈伟鸿, 张媛燕, 卢丽平, 等. 山橘果皮及叶片挥发油成分的分析比较[J]. 福建师范大学学报: 自然科学版, 2016, 32(2): 69-75.
- [31] 徐晓卫, 林观样, 林崇良. 气相色谱-质谱法分析积雪草化学成分[J]. 海峡药学, 2011, 23(3): 67-68.
- [32] 迟海东, 路金才, 李永梅. 风车草的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(12): 771-773, 796.
- [33] 李力, 杨柳, 张义生, 等. 不同炮制方法对麦麸中化学成分的影响[J]. 中国药师, 2017, 20(7): 1214-1217.
- [34] 曹玫, 欧阳露. 植物甾醇的抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. 实用药物与临床, 2015, 18(9): 1104-1107.
- [35] PRINSEN P, GURIÉRREZ A, FAULDS C B, et al. Comprehensive study of valuable lipophilic phytochemicals in wheat bran [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(7): 1664-1673.
- [36] 肖志彬, 刘小雷, 成日青, 等. β -谷甾醇对阿司匹林致胃黏膜损伤副作用及其药理作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 148-152.
- [37] 崔小兵. 基于 Maillard 反应研究麸炒增加“焦香健脾”作用的共性物质[D]. 南京: 南京中医药大学, 2013.
- [38] 岳岭, 华永庆, 崔小兵, 等. 炒焦麦麸健脾有效部位初探[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 388-389.

[责任编辑 刘德文]