

基于UPLC-Q-TOF/MS^E分析不同炮制时间炒车前子的 化学成分变化规律

孙钰婧^{1,2,3}, 霍志鹏^{2,3,4}, 王玉^{2,3,5}, 李瑞明^{1,2,3}, 秦民坚^{1*}, 何毅^{2,3*}

(1. 中国药科大学 中药学院, 南京 210009;

2. 天士力控股集团有限公司研究院 现代中药开发中心, 天津 300410;

3. 天士力医药集团股份有限公司 创新中药关键技术国家重点实验室, 天津 300410;

4. 天津中医药大学 中药学院, 天津 301617; 5. 天津大学 药物科学与技术学院, 天津 300072)

[摘要] 目的:为探究不同炮制时间炒车前子化学成分变化情况,采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF/MS^E)对不同炮制时间炒车前子中差异成分进行快速鉴定和半定量分析。方法:色谱条件采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~1 min, 5%~10%B; 1~2 min, 10%~15%B; 2~10 min, 15%~20%B; 10~12 min, 20%~40%B; 12~13 min, 40%~100%B; 13~14 min, 100%~5%B; 14~15 min, 5%B),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 40 °C,进样量 3 μL。质谱分析使用电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式检测,扫描范围为 *m/z* 50~1 500。采用 MarkerLynx 4.1 软件挖掘差异化合物,比较不同炮制时间样品各离子峰的离子响应强度,研究化学成分含量变化情况。结果:共找到具有潜在的显著性差异成分 20 个,其中 17 个成分已鉴定,3 个成分未知,主要包括苯乙醇苷类、环烯醚萜苷类、生物碱类等。炮制后蔗糖、京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、车前素 A 等 7 个成分峰强度降低;orobanchoside, dianthoside 和车前草苷 D 峰强度在炒制过程中先升高后降低;去咖啡酰基毛蕊花糖苷,木通苯乙醇苷 A,异毛蕊花糖苷等 10 个成分峰强度升高,其中 9 个为新生成成分。结论:炒制后,炒车前子化学成分的含量和组成均发生了显著变化,这可能与车前子炒制后通便作用减弱、止泻利尿活性增强有关。

[关键词] 车前子; 炒制品; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF/MS^E); 苯乙醇苷; 环烯醚萜苷; 生物碱; 半定量分析

[中图分类号] R22;R28;R943.1;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)04-0146-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211761 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210610.1312.003.html>

[网络出版日期] 2021-06-11 11:59

Analysis of Chemical Composition Variations in Plantaginis Semen at Different Frying Time Based on UPLC-Q-TOF/MS^E

SUN Yu-jing^{1,2,3}, HUO Zhi-peng^{2,3,4}, WANG Yu^{2,3,5}, LI Rui-ming^{1,2,3}, QIN Min-jian^{1*}, HE Yi^{2,3*}

(1. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Development Center of Modern Chinese Medicine, Research Institute of Tasly Holding Group Co. Ltd.,

Tianjin 300410, China; 3. State Key Laboratory of Critical Technology in Innovative Chinese Medicine,

Tasly Pharmaceutical Group Co. Ltd., Tianjin 300410, China; 4. School of Chinese Materia Medica,

Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China;

5. School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

[收稿日期] 20210403(009)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301005)

[第一作者] 孙钰婧, 硕士, 从事中药创新药物开发研究, E-mail: 1822020515@stu. cpu. edu. cn

[通信作者] * 秦民坚, 教授, 从事中药资源开发和利用研究, Tel: 025-86185130, E-mail: minjianqin@163. com;

* 何毅, 研究员, 从事中药新药开发与研究, Tel: 022-86343860, E-mail: heyi@tasly. com

[Abstract] **Objective:** In order to explore the changes of chemical constituents in Plantaginis Semen before and after stir-frying, ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS^E) was used to rapidly identify and semi-quantitatively analyze the differential components in Plantaginis Semen processed at different stir-frying time. **Method:** Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was employed with the mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) for gradient elution (0-1 min, 5%-10%B; 1-2 min, 10%-15%B; 2-10 min, 15%-20%B; 10-12 min, 20%-40%B; 12-13 min, 40%-100%B; 13-14 min, 100%-5%B; 14-15 min, 5%B), the flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 3 μL. Electrospray ionization (ESI) was applied for mass spectrometric analysis under positive and negative ion modes, and the scanning range was *m/z* 50-1 500. MarkerLynx 4.1 software was used to find the differential compounds, and the intensity of each ion peak in samples with different stir-frying time was compared to study the content variations of these compounds. **Result:** A total of 20 components with potential significant differences were found, among which 17 were identified and 3 were unknown, mainly including phenylethanoid glycosides, iridoid glycosides, alkaloids and others. After processing, the peak intensities of 7 compounds, such as sucrose, geniposidic acid, verbascoside and plantagoganidinic acid A, in Plantaginis Semen decreased. The peak intensities of orobanchoside, dianthoside and plantain D increased first and then decreased during the stir-frying process. The peak intensities of 10 compounds (decaffeoylacteoside, calceolarioside A, isoacteoside, etc.) increased, and 9 of them were newly generated components. **Conclusion:** The content and composition of the chemical components in Plantaginis Semen changed significantly after stir-frying, which may be related to the reduction of laxative effect and the enhancement of antidiarrheal and diuretic activities of Plantaginis Semen after stir-frying.

[Keywords] Plantaginis Semen; fried products; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS^E); phenylethanoid glycosides; iridoid glycosides; alkaloids; semi-quantitative analysis

车前子具有清热利尿通淋、渗湿止泻、明目、祛痰的功效^[1],药食同源,古代时用作金疮药止血、补肾益精或治疗妇人难产,《神农本草经》将其列为上品。临床常用于治疗慢性功能性便秘、尿潴留、高血压、老年慢性阻塞性肺疾病、痛风性关节炎疼痛等^[2-6]。国内外学者对其化学成分和药理作用进行广泛研究,发现其主要成分包括多糖类、苯乙醇苷类、环烯醚萜苷类、黄酮类、生物碱类、三萜类等,具有利尿、通便、降压、抗炎、调节免疫、降血糖、保肝、祛痰镇咳等作用^[7]。作为种子药材的代表药物,车前子在炮制时延续“逢子必炒”理论,以清炒法和盐水炙法为主进行炮制。炒车前子为车前子清炒后炮制品,炮制历史悠久可追溯至汉代,清炒后车前子止泻、利尿作用增强^[8-9],这与其炒制后化学成分的变化有关。目前关于炒车前子的研究主要集中在炮制工艺的优选,多采用正交试验、响应面法等方法,以炮制温度、时间、翻炒次数等作为考察因素,京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、车前子多糖、浸出物含量和膨胀度作为评价指标优选炒车前子的炮制

工艺^[10-12];而关于车前子炒制前后整体化学成分变化的研究较少,且常采用指纹图谱分析炮制品特征,未能识别特征成分。

中药炮制后成分变化极为复杂,包括量变和质变,炮制后含量变化较大的成分或新生成成分均可能是炮制品的药效成分,故探究炮制品的物质基础对阐明其药效作用机制具有重要意义。基于此,本实验拟采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF/MS^E)和多元统计学方法对清炒前后车前子化学成分进行比较和鉴定,以探究炒制前后车前子化学成分的变化,从化学成分角度分析炒车前子炮制的科学内涵,为炒车前子的临床用药和质量标准建立提供依据。

1 材料

ACQUITY UPLC型超高效液相色谱仪[包括二极管阵列检测器(PDA)和Empower 2色谱工作站]和SYNAPT G2 Q-TOF型质谱仪(美国Waters公司),FW100型高效万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),ST16R型高速冷冻离心机(德国

Thermo Fisher公司), XS 205DU型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

车前子药材(批号20200701,产地安徽)由天士力医药集团股份有限公司天士力研究院现代中药开发中心提供,经天士力医药集团股份有限公司天士力研究院李瑞明高级工程师鉴定为车前科植物车前 *Plantago asiatica* 的干燥成熟种子;异毛蕊花糖苷对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号wkq20050603,纯度 $\geq 98\%$),京尼平苷酸、毛蕊花糖苷对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为111828-201403,111530-201512,纯度分别为94.6%,96.7%),车前素A对照品[自制,经高效液相色谱法(HPLC)测定,纯度 $>95\%$],水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙酸为色谱纯,乙腈、甲酸为质谱纯,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 炒车前子的制备^[13] 取车前子药材50 g,于预热的电磁炉120℃恒温炒制5,10,15 min^[14-15],得不同炒制时间的炒车前子,各制备3批样品。

2.2 指标成分的含量测定^[1]

2.2.1 色谱条件 ZORBAX Eclipse XDB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm,5 μ m),流动相选择甲醇(A)-0.5%乙酸水溶液(B)梯度洗脱(0~1 min,95%B;1~40 min,95%~40%B;40~50 min,95%B),检测波长254 nm,进样量10 μ L,柱温30℃,流速1 mL $\cdot$ min⁻¹。

2.2.2 供试品溶液的制备 取2.1项下不同炮制时间炒车前子粗粉约1.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密称定,精密加入60%甲醇50 mL,称定质量,加热回流2 h,放冷,再称定质量,用60%甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.22 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 对照品溶液的制备 分别取京尼平苷酸、毛蕊花糖苷对照品适量,精密称定,置于10 mL量瓶中,加入60%甲醇超声使溶解,冷却至室温后加60%甲醇定容至刻度,摇匀,制成各成分质量浓度均为0.1 g $\cdot$ L⁻¹的混合对照品溶液。

2.3 炒车前子的UPLC-Q-TOF/MS^E分析

2.3.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,1.8 μ m),流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~1 min,5%~10%B;1~2 min,10%~15%B;2~10 min,15%~20%B;10~12 min,20%~40%B;12~13 min,40%~100%B;13~14 min,100%~5%B;14~15 min,5%B),流速设定0.3 mL $\cdot$ min⁻¹,柱温40℃,PDA于200~400 nm扫

描,进样量3 μ L。

2.3.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正、负离子模式下扫描,扫描范围 m/z 50~1 500,质谱数据以MS^E模式采集,采用亮氨酸-脑啡肽(leucine-enkephalin,在正、负离子模式下准确质量数分别为 m/z 556.277 1 [$M+H$]⁺和 m/z 554.261 5 [$M-H$]⁻),并进行实时校正,流速10 μ L $\cdot$ min⁻¹,校正液质量浓度2 mg $\cdot$ L⁻¹。毛细管电压2.3 kV,锥孔电压40 V,雾化气氮气(N₂)流速50 L $\cdot$ h⁻¹,脱溶剂气流速800 L $\cdot$ h⁻¹,脱溶剂温度350℃,离子源温度110℃,低能量扫描无碰撞能电压,高能量MS^E模式扫描碰撞能为20~60 eV,碰撞气为氩气(Ar)。利用MassLynx 4.1软件采集处理数据。

2.3.3 样品溶液的制备 取不同时间点炒车前子粗粉各2份,每份约1.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密称定,精密加入60%甲醇50 mL,称定质量,超声处理30 min(500 W,40 kHz,下同),用60%甲醇补足减失的质量,摇匀,经0.22 μ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3.4 对照品溶液的制备 分别取京尼平苷酸、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、车前素A对照品适量,精密称定,置于10 mL量瓶中,加入60%甲醇超声使溶解,冷却至室温后加60%甲醇定容至刻度,摇匀,得0.2 g $\cdot$ L⁻¹对照品储备液;分别精密量取各对照品储备液适量,加60%甲醇稀释,制成各对照品质量浓度均为20 mg $\cdot$ L⁻¹的混合对照品溶液。

2.4 差异化合物的挖掘 采用MarkerLynx 4.1分析不同炒制程度的炒车前子总离子流图,数据采集时间0.5~13 min,检测范围 m/z 50~1 500,质量误差20 mDa,保留时间(t_R)误差0.5 min,响应强度阈值为1 000,通过离子峰提取、匹配及归一化分析,将质谱数据转换成包含 t_R ,精确相对分子质量和峰强度的多元数据矩阵。将矩阵导入SIMCA-P 13.0软件中进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),根据变量投影重要性(VIP)值筛选组间差异成分;利用单因素方差分析法考察显著性,筛选 $P<0.05$ 的成分作为差异成分。

3 结果

3.1 指标成分的含量测定 参照2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)方法对炒制前后车前子中京尼平苷酸和毛蕊花糖苷含量进行测定,见表1。按照2020年版《中国药典》的要求^[1],车前子药材中两指标成分质量分数分别不得少于0.50%和0.40%;盐车前子中两指标成分质量

分数分别不得少于0.40%和0.30%。炒车前子炒制5 min时京尼平苷酸含量有升高趋势,之后又降低,炒制15 min后京尼平苷酸质量分数仍>0.50%;而炒制后毛蕊花糖苷含量明显降低,炒制时间15 min时,其质量分数已降至0.234 6%。

表1 车前子炒制前后样品中京尼平苷酸和毛蕊花糖苷的质量分数($\bar{x} \pm s, n=6$)

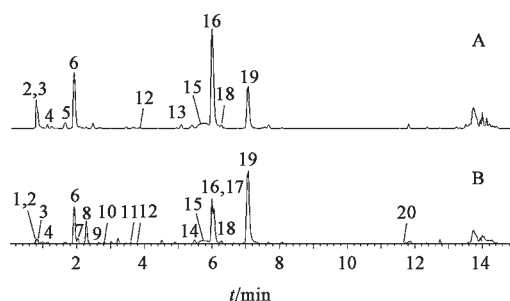
Table 1 Contents of geniposidic acid and acteoside in Plantaginis Semen before and after stir-frying ($\bar{x} \pm s, n=6$) %

样品	京尼平苷酸	毛蕊花糖苷
生品	1.060 8±0.018 5	0.816 0±0.011 9
炒制5 min	1.119 0±0.010 2	0.726 8±0.000 3
炒制10 min	0.727 3±0.006 3	0.285 0±0.001 3
炒制15 min	0.666 1±0.001 7	0.234 6±0.002 2

3.2 差异成分的筛选 车前子生品和炒车前子(15 min)的基峰离子色谱图(BPI)见图1,2。PCA的模型参数 R^2X (X 轴方向模型的解释率)为0.955,表明模型稳定性良好,车前子药材及不同炒制时间炒车前子处于不同区域,见图3,说明炒制后饮片化学成分发生了明显变化。通过OPLS-DA强化组间差异,模型参数 $R^2X=0.971$, R^2Y (Y 轴方向模型的解释率)=0.991, Q^2 (模型的预测率)=0.964,模型预测结果良好,样品分为4个离散群,其中生品组和炒制5 min组分布于图像右侧且分别位于 X 轴两侧,炒制10 min组和炒制15 min组分布于图像左侧,提示不同炒制时间样品各组间也存在差异。以缩放系数Coeffcs为横坐标,VIP值为纵坐标绘制火山图,见图4(散点越偏离中心,与分组的相关性越大;越靠近图像顶部,对拟合模型贡献越大),分析OPLS-DA模型中VIP值>0.9的差异成分(通常认为VIP值>1的变量有意义,经分别比较药材与不同炒制时间饮片间VIP值>1的差异成分,综合分析后确定以VIP值>0.9为标准),再根据单因素方差分析筛选组间差异具有统计学意义的成分($P<0.05$)^[7-19],见表2。结果得到20个在炒制过程中发生显著变化的差异成分,其中17个成分已鉴定,3个成分未知。

3.3 炮制差异成分的鉴定

3.3.1 环烯醚萜苷类 环烯醚萜苷类成分是车前属植物的主要有效成分之一,化合物6在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 373.113 2 [$M-H$]⁻,在MS^E质谱图中,准分子离子脱去一分子葡萄糖(162 Da)产生碎片离子 m/z 211.060 1 [$M-H-Glu$]⁻,脱水碎片 m/z 193.052 5 [$M-H-Glu-H_2O$]⁻,脱羧碎片 m/z



A. 生品;B. 炒制品(15 min)(图2同)

图1 车前子及炒车前子在负离子模式下的BPI

Fig. 1 BPI chromatograms of Plantaginis Semen and its processed products under negative ion mode

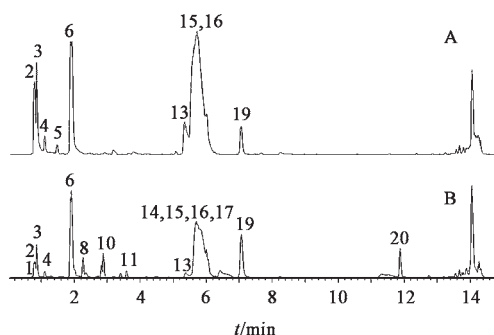
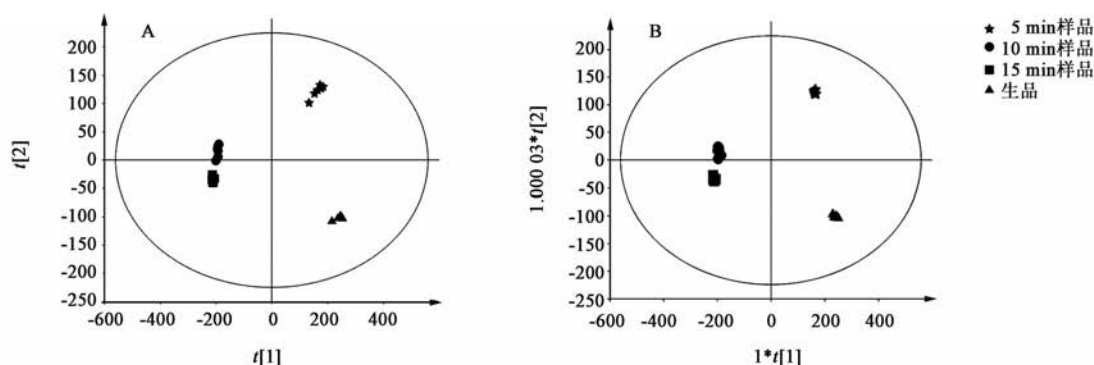


图2 车前子及炒车前子在正离子模式下的BPI

Fig. 2 BPI chromatograms of Plantaginis Semen and its processed products under positive ion mode

167.069 4 [$M-H-Glu-CO_2$]⁻和 m/z 123.046 1 [$M-H-Glu-2CO_2$]⁻,以及脱水、脱羧碎片 m/z 149.060 0 [$M-H-Glu-CO_2-H_2O$]⁻,对照品在对应 t_R 可见具有相同裂解规律的质谱峰,鉴定化合物6为京尼平苷酸。化合物11在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 415.122 7 [$M-H$]⁻,推测其分子式为 $C_{18}H_{24}O_{11}$,MS^E质谱图中可见 m/z 483.110 4 [$M-2H+Na+HCOOH$]⁻, m/z 437.104 6 [$M-2H+Na$]⁻,准分子离子脱去一分子 C_2H_2O 得碎片离子 m/z 373.113 5 [$M-H-C_2H_2O$]⁻,继续脱水得碎片离子 m/z 355.105 0 [$M-H-C_2H_2O-H_2O$]⁻,继续脱葡萄糖得到碎片离子 m/z 193.050 2 [$M-H-C_2H_2O-H_2O-Glu$]⁻,鉴定其为环烯醚萜苷类化合物alpinoside,但碎片离子中未见准分子离子脱葡萄糖峰,可能与14号位上-CH₃COO的取代有关。

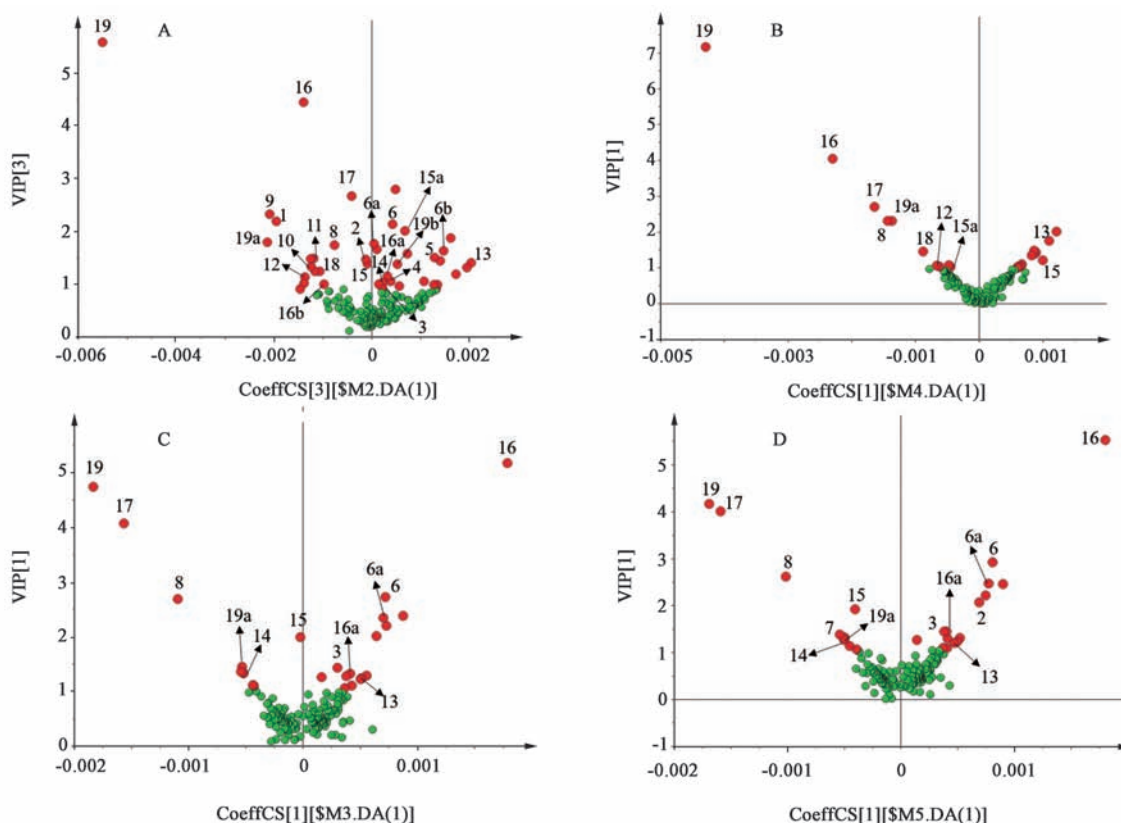
3.3.2 苯乙醇苷类 除环烯醚萜苷类成分外,苯乙醇苷类成分也是车前子中一类主要的药效成分,此类成分裂解过程中易脱去末端咖啡酸,多具有特征性咖啡酸碎片离子179和161。化合物16在负离子模式下准分子离子峰为623.198 5 [$M-H$]⁻,推测其分子式为 $C_{29}H_{36}O_{15}$ 。MS^E质谱图中,可见该离子失去一分子咖啡酸(162 Da)形成的碎片离子 m/z



A. PCA; B. OPLS-DA

图3 车前子及炒车前子不同方法处理的得分

Fig. 3 Score charts of Plantaginis Semen samples before and after stir-frying



A. 4组样品差异成分; B. 生品与炒制5 min样品; C. 生品与炒制10 min样品; D. 生品与炒制15 min样品; 6a. 6的[2M-H]⁻峰; 6b. 6的[2M-H+SH]⁻峰; 15a. C₈H₁₄O₂, 15的碎片; 16a. 16的[M-2H+Na]⁻峰; 16b. 16的[2M-H]⁻峰; 19a. 19的[M-2H+Na]⁻峰; 19b. 19的[2M-H]⁻峰

图4 车前子与炒车前子差异成分的火山分析

Fig. 4 Volcano plots of differential components in Plantaginis Semen before and after stir-frying

461.165 5 [M-H-caffeoyl]⁻,再分别脱去一分子鼠李糖(146 Da)和葡萄糖(162 Da)生成碎片离子 m/z 315.109 0 [M-H-caffeoyl-Rha]⁻和 m/z 153.054 6 [M-H-caffeoyl-Rha-Glu]⁻,脱水碎片 m/z 135.043 1 [M-H-caffeoyl-Rha-Glu-H₂O]⁻及特征性咖啡酸碎片离子,对照品在对应 t_R 可见具有相同裂解规律的质谱峰,故鉴定其为毛蕊花糖苷。化合物19在负离子模式下准分子离子峰为623.197 3 [M-H]⁻,推测

其分子式为C₂₉H₃₆O₁₅,MS^E质谱图中,可见与化合物16裂解规律相同的质谱峰,根据二者在反向柱上的出峰顺序,鉴定化合物19为异毛蕊花糖苷。化合物8在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 461.165 3 [M-H]⁻,推测其分子式为C₂₀H₃₀O₁₂,MS^E质谱图中可见脱鼠李糖碎片 m/z 315.103 1 [M-H-Rha]⁻,脱葡萄糖碎片 m/z 153.049 7 [M-H-Rha-Glu]⁻,以及脱水碎片 m/z 297.092 8 [M-H-Rha-H₂O]⁻和 m/z

表2 车前子与炒车前子的差异成分分析

Table 2 Analysis of differential components in Plantaginis Semen before and after stir-frying

化合物	t_R /min	名称	分子式	m/z 实测值(δ /ppm)	MS^E	VIP 值	P	类型
1	0.84	未知	$C_{11}H_8O_5$ ^[16]	241.012 6 [M-2H+Na] ⁻ (3.1)	195, 179	2.2	1.30×10^{-28}	未知
2	0.84	未知	$C_{23}H_{26}O_{12}$	539.137 8 [M+HCOO] ⁻ (-5.3)	377	1.5	9.30×10^{-29}	未知
3	0.85	蔗糖	$C_{12}H_{22}O_{11}$	341.107 9 [M-H] ⁻ (-3.0)	-	0.9	3.00×10^{-20}	糖类
4	1.05	柠檬酸	$C_6H_8O_7$	191.019 3 [M-H] ⁻ (-2.2)	111	1.1	5.16×10^{-3}	有机酸
5	1.73	dianthoside	$C_{12}H_{16}O_8$	287.075 2 [M-H] ⁻ (-7.1)	-	1.5	3.20×10^{-4}	吡喃酮苷
6	1.93	京尼平苷酸 ¹⁾	$C_{16}H_{22}O_{10}$	373.113 2 [M-H] ⁻ (-1.9)	1 154, 747, 211, 193, 167, 149, 123	2.1	6.91×10^{-20}	环烯醚萜苷
7	2.04	3,4-dimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside	$C_{14}H_{20}O_8$	315.107 1 [M-H] ⁻ (-4.6)	-	1.4	5.63×10^{-31}	酚类
8	2.28	去咖啡酰基毛蕊花糖苷 ^[17]	$C_{20}H_{30}O_{12}$	461.165 3 [M-H] ⁻ (-2.5)	315, 297, 153, 135	1.7	9.79×10^{-31}	苯乙醇苷
9	2.59	未知	$C_{12}H_{26}O_8$	297.155 2 [M-H] ⁻ (-1.0)	-	2.3	4.21×10^{-19}	未知
10	2.87	plantadeprate A	$C_{11}H_{19}O_3N_3$	240.134 5 [M-H] ⁻ (-3.6)	163	1.3	3.72×10^{-3}	生物碱
11	3.59	alpinoside ^[18]	$C_{18}H_{24}O_{11}$	415.122 7 [M-H] ⁻ (-4.6)	483, 437, 373, 355, 193, 146	1.5	6.79×10^{-7}	环烯醚萜苷
12	3.89	orobanchoside ^[18-19]	$C_{29}H_{34}O_{15}$	621.180 5 [M-H] ⁻ (-3.2)	179	1.1	1.52×10^{-24}	苯乙醇苷
13	5.30	haploperoside E ^[16]	$C_{28}H_{38}O_{17}$	667.186 1 [M-2H+Na] ⁻ (0.8)	-	1.4	7.93×10^{-29}	香豆素
14	5.48	木通苯乙醇苷 A ^[7]	$C_{23}H_{26}O_{11}$	477.139 2 [M-H] ⁻ (-2.2)	179, 161	1.0	2.03×10^{-31}	苯乙醇苷
15	5.75	车前素 A ¹⁾	$C_{11}H_{19}N_3O_2$	224.139 5 [M-H] ⁻ (-4.2)	141	1.4	1.73×10^{-3}	生物碱
16	6.02	毛蕊花糖苷 ¹⁾	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623.198 5 [M-H] ⁻ (0.6)	1 247, 645, 461, 315, 179, 161, 153, 135	4.4	2.43×10^{-24}	苯乙醇苷
17	6.05	木通苯乙醇苷 B ^[19]	$C_{23}H_{26}O_{11}$	477.139 4 [M-H] ⁻ (-1.8)	179, 161	2.7	6.29×10^{-31}	苯乙醇苷
18	6.28	车前草苷 D ^[18]	$C_{29}H_{36}O_{16}$	639.191 4 [M-H] ⁻ (-2.6)	477, 161	1.2	2.48×10^{-22}	苯乙醇苷
19	7.07	异毛蕊花糖苷 ¹⁾	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623.197 3 [M-H] ⁻ (-1.4)	1 247, 645, 461, 315, 179, 161, 153, 135	5.6	4.01×10^{-20}	苯乙醇苷
20	11.71	2-乙酰基毛蕊花糖苷 ^[7]	$C_{31}H_{38}O_{16}$	665.206 1 [M-H] ⁻ (-3.9)	623, 461, 179, 161	1.0	1.16×10^{-8}	苯乙醇苷

注: ¹⁾对照品比对后确定。

135.042 8 [M-H-Rha-Glu-H₂O]⁻,符合苯乙醇苷类成分的裂解规律^[20],但未见咖啡酸特征碎片,推断化合物 8 为毛蕊花糖苷失去咖啡酰基而得,鉴定其为去咖啡酰基毛蕊花糖苷。化合物 18 准分子离子峰为 639.191 4 [M-H]⁻,推测其分子式为 $C_{29}H_{36}O_{16}$, MS^E 质谱图中,可见脱咖啡酸碎片 m/z 477.150 6 [M-H-caffeoyl]⁻及咖啡酸特征碎片 m/z 161.023 9,鉴定其为车前草苷 D。化合物 20 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 665.206 1 [M-H]⁻,推测其分子式为 $C_{31}H_{38}O_{16}$,比毛蕊花糖苷多 1 个乙酰基(C_2H_2O , 42 Da), MS^E 质谱图中可见脱乙酰基碎片离子 m/z 623.198 8 [M-H-acetyl]⁻,脱咖啡酸碎片 m/z 461.153 7 [M-H-acetyl-caffeoyl]⁻及咖啡酸特征碎片,根据质谱信息鉴定其为 2-乙酰基毛蕊花糖苷。

3.4 差异成分的变化趋势分析 差异成分在 4 组样品中相对离子响应强度的归一化热图见图 5。结

果显示,在车前子炒制过程中,共有 7 个化合物离子响应强度呈下降趋势,即化合物 2,蔗糖,柠檬酸,京尼平苷酸, haploperoside E 和车前素 A 离子响应强度随炒制时间延长而显著降低;毛蕊花糖苷在炒制 5 min 时离子响应强度稍有增加,后显著降低。离子响应强度随炒制时间延长而显著升高的化合物共 10 个,异毛蕊花糖苷在炒制时间为 15 min 时离子响应强度稍有下降,但整体呈上升趋势,其他 9 个化合物(化合物 9,化合物 1, plantadeprate A, alpinoside, 2-乙酰基毛蕊花糖苷, 3, 4-dimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside, 木通苯乙醇苷 A, 木通苯乙醇苷 B, 去咖啡酰基毛蕊花糖苷)均为新生成化合物,其中前 4 个化合物在炒制 15 min 时生成;此外,有 3 个化合物(orobanchoside, dianthoside, 车前草苷 D)离子响应强度在炒制过程中先升高后降低。京尼平苷酸和毛蕊花糖苷的离子响应强度变化情况与含量

测定结果具有相同变化趋势。这些差异成分可能是车前子炒制后药效发生改变的物质基础。

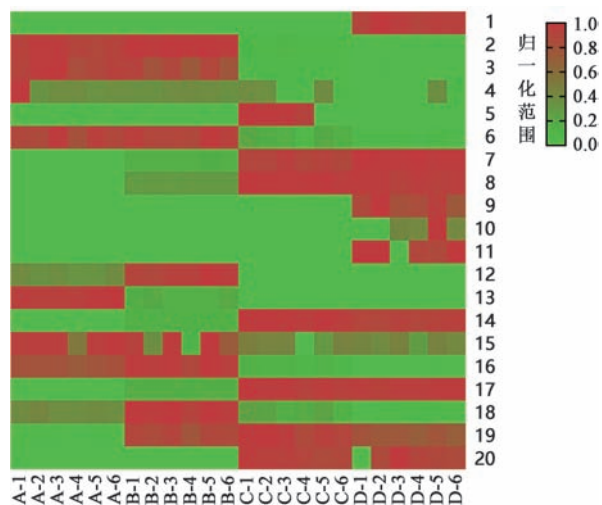


图5 差异成分在车前子和炒车前子中离子响应强度热分析

Fig. 5 Heat map of ion response intensity of differential components in Plantaginis Semen and its processed products

3.5 差异成分对药效变化的探讨 车前子具有清热利尿通淋和渗湿止泻等功效,但关于车前子炮制品对蓖麻油所致小鼠腹泻的研究证实,车前子经炮制后止泻作用增强,作用强弱依次为炒制品>酒制品>盐制品,即炒车前子止泻作用最为显著,而车前子生品则会进一步加重小鼠腹泻^[9];另有研究表明,车前子生品治疗慢性功能性便秘总有效率高于炒车前子^[21],即车前子功效偏向于通便,而炒车前子功效更偏向于止泻,二者的功效差异可能与炮制前后化学成分变化有关。环烯醚萜苷类成分具有保肝、降血糖、抗炎、调节免疫、促进胃肠道排空的作用^[22],可能是车前子保肝、治疗慢性功能性便秘的活性成分。京尼平苷酸是环烯醚萜苷类成分的典型代表,也是2020年版《中国药典》车前子药材及饮片的含量测定指标之一^[1]。但经炒制后,炒车前子中京尼平苷酸含量显著降低,提示京尼平苷酸结构受热易发生分解,这可能是炒车前子润肠通便功能减弱、止泻作用增强的原因之一,但不同结构类型的环烯醚萜苷热稳定性不同^[23],且取代基团可能会影响其结构的裂解,因此,环烯醚萜苷类成分的热分解规律还需进一步探索。

苯乙醇苷类成分具有保肝、抗氧化和调节免疫活性^[24]等作用,清炒5 min时毛蕊花糖苷含量稍有增加,随后呈降低趋势,推测炮制初期其他苯乙醇

苷类成分可能转化为毛蕊花糖苷,而随着炮制时间延长,毛蕊花糖苷结构发生异构,多转化为异毛蕊花糖苷,少量结合乙酰基生成2-乙酰基毛蕊花糖苷,或受热分解分别脱去咖啡酰基和鼠李糖转化为去咖啡酰基毛蕊花糖苷、木通苯乙醇苷A和木通苯乙醇苷B等。相关研究表明,毛蕊花糖苷和异毛蕊花糖苷均有类细胞因子作用,单独使用均可明显刺激骨髓源性树突状细胞(BM-DCs)增殖^[25],自由基清除能力排序为异毛蕊花糖苷>毛蕊花糖苷>维生素C^[26];木通苯乙醇苷B抗氧化活性同样强于维生素C^[27];木通苯乙醇苷A能够有效抑制小鼠脾细胞中免疫球蛋白E(IgE)和白细胞介素-2(IL-2)的产生,是潜在的免疫抑制剂^[28];提示炒制过程中毛蕊花糖苷大量转化为其他苯乙醇苷类成分后,炒车前子的抗氧化能力和免疫活性可能发生变化。除化学成分种类的变化外,炒制可破碎种皮,利于粉碎和溶媒的进入,促进有效成分的溶出,灭活酶类,减少有效成分的自身代谢分解,从而保证药效。但炒制过程中车前子各成分间的相互作用复杂,仅根据成分含量变化来推测的药效变化,其结论可能互相矛盾;另外,炒制后产生了新化合物,提示车前子炒制后可能会产生新的药效,需进一步实验验证。

4 讨论

预试验时发现,在120℃恒温炒制条件下,车前子炒制5 min时开始出现爆裂声,炒制过程中饮片逐渐膨胀焦化,炒制15 min时无爆裂声,饮片基本焦化并伴有轻烟,故选择炒制5, 10, 15 min饮片作为研究对象。在质谱解析的样品溶液制备时,对提取溶剂的种类、用量和提取方式进行了优化,考察了车前子粉末1.0 g分别在20 mL甲醇(超声处理), 50 mL甲醇(超声处理), 20 mL 60% 甲醇(超声处理), 50 mL 60% 甲醇(超声处理), 50 mL 60% 甲醇(回流2 h)时的峰强度,发现甲醇作为提取溶剂时,拖尾严重,而60% 甲醇提取时峰形较好,溶剂效应小,故选择60% 甲醇为提取溶剂;当溶剂量为20 mL时,质谱响应过高,考虑到仪器的养护,选择提取溶剂用量为50 mL;经比较,超声30 min和回流2 h两种方式提取效果相差不大,故选择超声提取方式。

为探究清炒对车前子成分的影响,本研究采用UPLC-Q-TOF/MS^E技术检测不同炒制时间炒车前子样品,结合化学模式识别方法分析组间差异成分,共找到差异成分20个,可作为车前子炒制的质量标志物。车前子性寒,可分清降浊而止泻,利小便以实大便,主要用来治疗湿热或暑湿所致的腹泻^[29],

炮制后寒性稍减,炮制品药效各有偏向,炒品用于渗湿止泻,盐制品用于补肝肾、明目^[30]。本研究发现在车前子炒制过程中,多种成分含量发生变化,符合“逢子必炒”缓和药效、降低不良反应的理论。此外,车前素A(plantagoganidinic acid A)是车前子特征成分,具有治疗糖尿病、调节胰岛素抗性、降血压等功效^[31],可能是车前子降压、抗糖的主要活性成分之一,其含量随炮制时间延长而减少,提示应建立合适标准,以控制车前子的过度炒制,可为车前子炒制工艺优化和炒车前子质量研究提供参考。

〔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,2020:69-70.
- [2] 刘川玉,周劲刚,何洁,等. 车前子不同炮制品对慢性功能性便秘的疗效[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):259-261.
- [3] 晏建立,程繁荣,王新建,等. 乐尔膏穴位贴敷加车前子茶治疗痛风性关节炎疼痛临床观察[J]. 中医正骨,2000,12(6):10-11,63-64.
- [4] 陶玉杰. 车前子不同炮制品治疗慢性功能性便秘的临床疗效对比观察[J]. 中国实用医药,2017,12(31):127-128.
- [5] 赵丽娟. 车前子降血压临床效果观察(附1例报告)[J]. 医学研究与教育,2002,19(2):10.
- [6] 张露. 基于“肺与大肠相表里”理论观察车前子粗多糖胶囊干预老年COPD稳定期的临床研究[D]. 兰州:甘肃中医药大学,2020.
- [7] 李冲冲,龚苏晓,许浚,等. 车前子化学成分与药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药,2018,49(6):1233-1246.
- [8] 吴秋焱,马瀚林,张震宇,等. 车前子的利尿作用研究及发现[J]. 山东化工,2019,48(4):108-110.
- [9] 张丹,何颖,周洁,等. 车前子不同炮制品的止泻作用及星点设计-效应面优化法优选车前子炒制工艺的研究[J]. 中草药,2014,45(3):355-361.
- [10] 刘鑫,赫一鸣,蔡广知,等. 多指标综合评分优选炒车前子工艺研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2018,20(10):78-81.
- [11] 李潮,于欢,温柔,等. 基于AHP-CRITIC混合加权法和响应面法的盐车前子炮制工艺优选及其利尿作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(20):124-131.
- [12] 王宇. 车前子盐炙工艺与质量标准研究[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2018.
- [13] 冉懋雄,郭建民. 现代中药炮制手册[M]. 北京:中国

- 中医药出版社,2002.
- [14] 殷丹. 车前子炮制前后脂肪油成分研究[J]. 临床医药文献电子杂志,2018,5(73):177-178.
 - [15] 北京市药品监督管理局. 北京市中药饮片炮制规范[M]. 北京:化学工业出版社,2010.
 - [16] KRUIVE A, KAUPMEES K, LIIGAND J, et al. Negative electrospray ionization via deprotonation: predicting the ionization efficiency[J]. Anal Chem, 2014,86(10):4822-4830.
 - [17] 曾金祥,毕莹,许兵兵,等. 车前子化学成分研究[J]. 中药材,2015,38(5):985-987.
 - [18] 郑秀棉,杨莉,王峥涛. 车前子的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中药材,2013,36(7):1190-1196.
 - [19] 张雪芹,曲玮,梁敬钰. 车前草化学成分和药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2013,25(11):1-8.
 - [20] 孙钰婧,霍志鹏,王玉,等. 结肠炎奇效颗粒中化学成分的UPLC-Q-TOF/MS^E分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(9):157-167.
 - [21] 张志梅. 不同炮制方法用于车前子对治疗慢性便秘的影响对比分析[J]. 临床医药文献电子杂志,2020,7(40):158.
 - [22] 张慧娟,李菊,马晓慧,等. 裂环烯醚萜苷类化合物的药理作用研究进展[J]. 药学研究,2018,37(11):659-663.
 - [23] 赵晔. 桃叶珊瑚苷和龙胆苦苷的热性能与生物代谢研究[D]. 西安:西北大学,2008.
 - [24] 吴培培,闫明,霍仕霞. 苯乙醇苷类化合物的研究进展[J]. 医药导报,2011,30(10):1316-1319.
 - [25] 唐永富,黄丹菲,谢明勇,等. 毛蕊花苷和异毛蕊花苷对树突状细胞增殖的影响[J]. 中国药理学杂志,2008,43(23):1785-1787.
 - [26] 万茵. 车前子多糖、黄酮和苯乙醇苷类的纯化、结构解析及其活性功能研究[D]. 南昌:南昌大学,2007.
 - [27] ZHAO J, GUO J, ZHANG Y, et al. Chemical constituents from the roots and stems of *Stauntonia brachyanthera* Hand-Mazz and their bioactivities[J]. J Funct Foods, 2015,14:374-383.
 - [28] CHEN Y J, XUE G, LIU F Z, et al. Immunosuppressive effect of extracts from leaves of *Fraxinus mandshurica* Rupr. [J]. Bioengineered, 2017,8(3):212-216.
 - [29] 张博. 中药车前子及其活性成分对鼠伤寒沙门氏菌的治疗作用及机制研究[D]. 长春:长春中医药大学,2018.
 - [30] 唐建红. 车前子不同炮制品对慢性功能性便秘的疗效研究[D]. 桂林:桂林医学院,2013.
 - [31] 王峥涛,耿放,孙虔,等. 甾类衍生物及制备、药物组合及制备治疗代谢综合征药物的用途:中国, CN102050787A[P]. 2011-05-11.

〔责任编辑 刘德文〕