

UPLC-MS/MS 法分析旋覆花蜜炙前后化学成分的变化^Δ

吕渭升^{1,2*}, 位翠杰^{1,2}, 潘晓君^{1,2}, 杨文惠^{1,2}, 何民友^{1,2}, 陈向东^{1,2}, 孙冬梅^{1,2}, 魏梅^{1,2}, 李振雨^{1,2#}(1.广东一方制药有限公司, 广东佛山 528244; 2.广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东佛山 528244)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)20-2478-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.20.08



摘要 目的:比较旋覆花蜜炙前后的化学成分差异。方法:采用超高效液相色谱-串联质谱技术(UPLC-MS/MS)。色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈, 流动相为 0.1% 甲酸溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30 ℃, 进样量为 5 μL。采用电喷雾离子源, 以正离子模式扫描, 一级质谱扫描范围为 m/z 70~1 050, 二级质谱扫描范围为 m/z 50~1 050, 归一化碰撞能量为 40、60 eV, 质谱图类型为峰形图, 鞘气流速为 35 arb, 辅助气流速为 10 arb, 喷雾电压为 3.80 kV, 透镜电压为 50 V, 加热温度为 350 ℃, 毛细管温度为 350 ℃。采用 Qual Browser 4.1.39.1 软件并参考在线高分辨数据库 mzCloud、中药成分高分辨质谱本地数据库 OTcML, 同时结合相关文献对化合物进行鉴定。采用 SIMCA 14.1 软件进行主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA), 以变量重要性投影(VIP)值大于 1 为标准筛选旋覆花蜜炙前后的差异性成分。结果:从旋覆花及其蜜炙品中共鉴定出 29 个共有化学成分, 包括 1-咖啡酰奎宁酸、绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸等 5 个酚酸类成分, 槲皮素、木犀草素、狭叶依瓦菊素等 12 个黄酮类成分, 以及 1-*O*-乙酰旋覆花内酯、二大花旋覆花内酯 B、1-*O*-乙酰基-6-*O*-异丁酰基大花旋覆花内酯等 12 个倍半萜内酯类成分。PCA 结果显示, 旋覆花与蜜旋覆花分别位于得分图的两侧。OPLS-DA 结果显示, 有 7 个成分的 VIP 值大于 1, 分别为峰 19(大花旋覆花素)、峰 6(槲皮万寿菊苷)、峰 1(1-咖啡酰奎宁酸)、峰 21(紫花牡荆素)、峰 20(tomentosin)、峰 13(菠叶素)、峰 3(瑞香素)。结论:经蜜炙后, 旋覆花的化学成分含量有所改变, 且均有一定程度的降低。大花旋覆花素、槲皮万寿菊苷、1-咖啡酰奎宁酸、tomentosin、紫花牡荆素、菠叶素、瑞香素可能为旋覆花及其蜜炙品的差异性成分。

关键词 旋覆花; 蜜旋覆花; 超高效液相色谱-串联质谱法; 主成分分析; 正交偏最小二乘法-判别分析; 化学成分

Variations of Chemical Components in *Inula japonica* by UPLC-MS/MS before and after Honey-frying

LYU Weisheng^{1,2}, WEI Cuijie^{1,2}, PAN Xiaojun^{1,2}, YANG Wenhui^{1,2}, HE Minyou^{1,2}, CHEN Xiangdong^{1,2}, SUN Dongmei^{1,2}, WEI Mei^{1,2}, LI Zhenyu^{1,2} (1. Guangdong E-fong Pharmaceutical Co., Ltd., Guangdong Foshan 528244, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of TCM Formula, Guangdong Foshan 528244, China)

- 3638.
- [9] 郝翠, 赵恒强, 崔莉, 等. 黄芩配方颗粒的质量控制[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(7): 723-727.
- [10] 何军, 朱旭江, 杨平荣, 等. 中药配方颗粒的现状与发展新思路[J]. 中草药, 2018, 49(20): 4717-4725.
- [11] 国家药典委员会. 有关中药配方颗粒药品标准制定的通知[EB/OL]. (2021-02-24) [2021-05-10]. <https://www.chp.org.cn/gjydw/tz/15815.jhtml>.
- [12] 刘梦云, 江洁怡, 毕晓黎, 等. 葛花配方颗粒的 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房, 2017, 28(21): 2978-2980.
- [13] 徐玉玲, 雷燕莉, 曾立, 等. 中药配方颗粒品种统一标准的有关问题探讨[J]. 中草药, 2020, 51(20): 5389-5394.
- [14] 程斌, 周爱珍, 彭昕, 等. 浙贝母 UPLC-Q-TOF-MS/MS 指纹图谱的建立及其抗炎质量标志物的分析[J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2129-2135.
- [15] 杜伟锋, 岳显可, 朱涛, 等. 不同产地加工方法浙贝母的高效液相色谱-电喷雾-质谱指纹图谱分析[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(12): 4956-4960.
- [16] 何敏, 郭田, 杜昕, 等. 高效液相色谱法测定浙贝母配方颗粒中贝母素甲和贝母素乙的含量[J]. 医药导报, 2018, 37(4): 477-479.
- [17] 秦建平, 李家春, 吴建雄, 等. 基于 HPLC 指纹图谱的浙贝母质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(19): 34-36.
- [18] 朱广磊, 睢宁, 张春椿, 等. 不同产地浙贝母药材 HPLC-ELSD 指纹图谱的研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2017, 41(5): 352-361.
- [19] 黄华花, 张伟云, 陈景海, 等. 陈皮配方颗粒的质量标准提高研究[J]. 中国药房, 2019, 30(7): 937-941.

(收稿日期: 2021-05-27 修回日期: 2021-08-24)

(编辑: 陈宏)

^Δ 基金项目: 广东省省级科技计划项目 (No. 2018B030323004); “广东特支计划” 科技创业领军人才项目 (No. 2017TY04R197)

* 主管中药师, 硕士。研究方向: 中药饮片及中药配方颗粒。电话: 0757-85128602。E-mail: 731535332@qq.com

通信作者: 主管中药师, 硕士。研究方向: 中药饮片及中药配方颗粒。电话: 0757-85128602。E-mail: 1083656123@qq.com

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the chemical components differences of *Inula japonica* before and after honey-frying. METHODS: UPLC-MS/MS method was adopted. The determination was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 30 °C, and sample size was 5 μL. The electrospray ion source was scanned by positive ion mode. The first order mass spectrometry scanning range was *m/z* 70-1 050, the second order mass spectrometry scanning range was *m/z* 50-1 050, and the normalized collision energy was 40, 60 eV; mass spectrum type was the peak figure, the flow rate of sheath gas was 35 arb, the auxiliary airflow speed was 10 arb, the spray voltage was 3.80 kV, the S-lens voltage was 50 V, the heating temperature was 350 °C, and the capillary temperature was 350 °C. The components were identified by Qual Browser 4.1.39.1 software, referring to the online high-resolution database mzCloud and local database OTCML of high-resolution mass spectrometry of TCM, and combined with relevant literature. The principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squared-discriminant analysis (OPLS-DA) of *I. japonica* before and after honey-fried were performed by using SIMCA 14.1 statistical software, and variable importance projection (VIP) value greater than 1 was used as the standard to screen the differential components before and after honey-frying. RESULTS: A total of 29 common chemical components were identified from *I. japonica* and honey-fried *I. japonica*, including 5 phenolic acids as 1-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid and 3,5-dicaffeoylquinic acid, 12 flavonoids as quercetin, luteolin and evamectin, as well as 12 sesquiterpene lactones as 1-*O*-acetyl-inula diester, inula bicolor lactone B and 1-*O*-acetyl-6-*O*-isobutyryl inulin. The results of PCA showed that *I. japonica* and honey-fried *I. japonica* were located on both sides of the score diagram respectively. The results of OPLS-DA showed that the VIP values of 7 components were greater than 1, which were peak 19 (britanin), peak 6 (quercetagitrin), peak 1 (1-caffeoylquinic acid), peak 21 (vitexicarpin), peak 20 (tomentosin), peak 13 (spinacetin) and peak 3 (daphnetin). CONCLUSIONS: After honey-fried, the content of chemical components of *I. japonica* changed and decreased to a certain extent. Britanin, quercetagitrin, 1-caffeoylquinic acid, tomentosin, vitexicarpin, spinacetin and daphnetin may be the differential components of *I. japonica* and honey-fried *I. japonica*.

KEYWORDS *Inula japonica*; Honey-fried *Inula japonica*; UPLC-MS/MS; PCA; OPLS-DA; Chemical components

旋覆花为菊科植物旋覆花 *Inula japonica* Thunb.或欧亚旋覆花 *Inula britannica* L.的干燥头状花序,该药于夏、秋二季花开放时采收,经除去杂质、阴干或晒干后即得^[1]。旋覆花具有降气、消痰、行水、止呕的功效,主要用于治疗风寒咳嗽、痰饮蓄结、胸膈痞闷、喘咳痰多等症^[1]。现代药理研究表明,该药主要含有倍半萜内酯、酚酸、黄酮类等活性成分,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、保护神经系统等活性^[2]。蜜炙是中药饮片的传统炮制方法,不仅能增强生品润肺止咳、补中益气的功效,而且能够矫味、缓和药性和减轻副作用^[3]。旋覆花及其蜜炙品(以下简称“蜜旋覆花”)的临床功效有所不同,旋覆花以降气、化痰、止呕作用较强,多用于水饮内停、胃气上逆等症,但止咳作用较弱;而蜜旋覆花能增强生品润肺祛痰、止咳平喘的功效,多用于痰涎壅肺、咳喘痰多等症,此外其还能增强补中益气的作用,可用于治疗因脾胃气虚、痰湿上逆所致的呕吐噎气、心下痞满之症^[4]。

化学成分群是中药防治疾病的物质基础,化学成分的变化会造成临床应用的差异^[5]。近年来,旋覆花的研究多集中在其化学成分分析和药理药效方面^[6-8],但尚未有旋覆花蜜炙后物质基础变化的报道。相关研究的缺失可导致旋覆花及其蜜炙品的临床应用缺乏相应的科学依据,难以保证药物的有效性和安全性^[9-10]。由于中药的化学成分多样且复杂,因此准确把握旋覆花及其蜜炙品中各类成分的变化,才能更加全面地反映炮制前

后药效物质的差异,有利于阐释其药理活性与临床效用的不同。基于此,本研究采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术对旋覆花蜜炙后化学成分的变化进行分析,拟从化学成分的角度探讨旋覆花蜜炙后药效改变的物质基础;同时,结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)筛选旋覆花蜜炙前后的差异性成分,以期为临床合理应用提供参考,亦为进一步研究旋覆花的蜜炙理论提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有 Thermo Vanquish Flex 二元超高效液相色谱仪、Thermo Fisher Q Exactive 高分辨质谱仪及配套的中药成分高分辨质谱本地数据库 OTCML (美国 Thermo Fisher Scientific 公司),ME204E 型万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司),KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),Milli-Q Direct 超纯水系统(美国 Merck 公司)等。

1.2 药品与试剂

乙腈(色谱纯)购自美国 Merck 公司;甲酸(液质联用级)购自上海安谱实验科技股份有限公司;蜂蜜(批号 F2003001)购自广西梧州甜蜜家蜂业有限公司;其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

16 批不同产地旋覆花药材(编号 X1~X16),经广东一方制药有限公司魏梅主任中药师鉴定为旋覆花

I. japonica Thunb.的干燥头状花序。16批旋覆花药材来源信息见表1。

表1 16批旋覆花药材来源信息

Tab 1 Source information of 16 batches of *I. japonica*

药材编号	炮制品编号	采集地
X1	MX1	江苏省徐州市邳州市八义集镇
X2	MX2	江苏省徐州市邳州市八义集镇
X3	MX3	江苏省徐州市睢宁县古邳镇
X4	MX4	江苏省徐州市睢宁县王集镇
X5	MX5	江苏省徐州市睢宁县沙集镇
X6	MX6	江苏省宿迁市泗阳县爱国镇
X7	MX7	江苏省宿迁市泗阳县穿城镇
X8	MX8	江苏省宿迁市泗阳县王集镇
X9	MX9	陕西省西安市鄠邑区蒋村镇
X10	MX10	陕西省西安市蓝田县洩湖镇
X11	MX11	陕西省西安市鄠邑区石井镇
X12	MX12	陕西省西安市鄠邑区石井镇
X13	MX13	陕西省西安市鄠邑区蒋家村镇
X14	MX14	陕西省宝鸡市陈仓区县功镇
X15	MX15	河南省开封市尉氏县朱曲镇
X16	MX16	河南省开封市尉氏县水坡镇

2 方法与结果

2.1 蜜旋覆花饮片的制备

取旋覆花药材,除去梗、叶及杂质,即得旋覆花饮片。参照2020年版《中国药典》(一部)“蜜旋覆花”项下方法炮制^[1]:取蜂蜜25 g,加适量沸水稀释后,加入至旋覆花饮片(即净旋覆花)100 g中,拌匀,闷透,置于炒制容器内,用文火炒至不粘手时取出,放凉,即得16批蜜旋覆花饮片(编号MX1~MX16,详见表1)。

2.2 供试品溶液的制备

分别取旋覆花饮片及蜜旋覆花饮片样品粉末(过三号筛)各约0.5 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入80%甲醇25 mL,称定质量,超声(功率300 W,频率40 kHz)处理30 min,放冷,再次称定质量,用80%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得旋覆花及蜜旋覆花的供试品溶液。

2.3 色谱与质谱条件

2.3.1 色谱条件 以Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm)为色谱柱,以0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~60 min, 98%A→40%A;60~70 min, 40%A);流速为0.3 mL/min;柱温为30 ℃;进样量为5 μL。

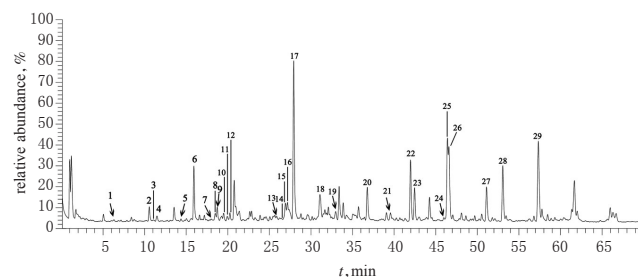
2.3.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源,检测模式为正离子模式,扫描模式为数据依赖二级扫描-未知物发现模式;一级质谱扫描范围为 m/z 70~1 050,二级质谱扫描范围为 m/z 50~1 050;归一化碰撞能量为40、60 eV;质谱图类型为峰形图;鞘气流速为35 arb;辅助气流速为10 arb;喷雾电压为3.80 kV;透镜电压为50 V;加热温度为350 ℃;毛细管温度为350 ℃。

2.4 数据处理

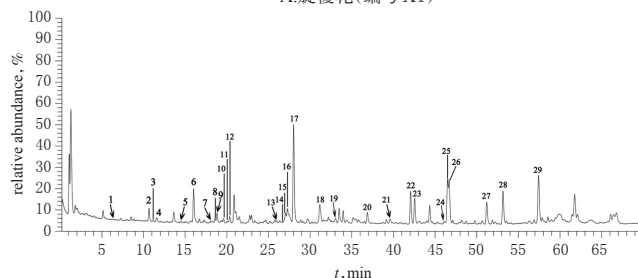
根据旋覆花不同组分色谱峰的一级和二级质谱数据,将误差(即实测值与理论值之间的差值)小于5 ppm、同位素分布丰度比一致且含有二级碎片信息的化合物作为目标成分,把目标成分离子的精确质量导入在线高分辨数据库mzCloud(<https://www.mzcloud.org>)和中药成分高分辨质谱本地数据库OTCML进行定性分析,以确定化合物归属。采用Qual Browser 4.1.39.1软件分析旋覆花及蜜旋覆花的UPLC-MS/MS数据。

2.5 化合物的鉴定

分别取“2.2”项下旋覆花及蜜旋覆花的供试品溶液,按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,得到旋覆花及蜜旋覆花的总离子流图(图1)。结果显示,旋覆花及蜜旋覆花化学成分对应色谱峰的响应强度大多发生了变化。通过各成分在质谱高能量扫描时所产生的碎片离子,明确其元素组成,同时结合碎片离子、多级质谱裂解碎片种类、相对丰度等信息以及“2.4”项下的数据库和相关文献[11-23],对目标成分进行鉴定。结果显示,从旋覆花及蜜旋覆花中共鉴定出29个共有化学成分(匹配度均不低于80%),包括1-咖啡酰奎宁酸、绿原酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸等5个酚酸类成分,槲皮素、木犀草素、狭叶依瓦菊素等12个黄酮类成分以及1-O-乙酰旋覆花内酯、二大花旋覆花内酯B、1-O-乙酰基-6-O-异丁酰基大花旋覆花内酯等12个倍半萜内酯类成分。结果见表2。



A. 旋覆花(编号X1)



B. 蜜旋覆花(编号MX1)

图1 旋覆花及蜜旋覆花的总离子流图

Fig 1 The total ion chromatograms of *I. japonica* and honey-fried *I. japonica*

2.6 化合物裂解规律及特征

2.6.1 酚酸类 本研究检测到的酚酸类成分母离子是 $[M+H]^+$ 。以保留时间6.41 min的化合物1为例:在正

表2 旋覆花及蜜旋覆花中共有化学成分的分析结果

Tab 2 Analysis of common components from *I. japonica* and honey-fried *I. japonica*

峰号	保留时间	分子式	实测分子量[M+H] ⁺	理论分子量	主要碎片离子[M+H] ⁺	误差, ppm	化合物归属
1	6.41	C ₁₆ H ₁₀ O ₉	355.101 7	354.095 1	163.039 1, 145.028 6, 135.044 2, 117.033 7	-1.59	1-咖啡酰奎宁酸
2	10.63	C ₁₆ H ₁₀ O ₉	355.101 8	354.095 1	163.039 1, 145.028 6, 135.044 2	1.46	绿原酸
3	11.12	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	179.033 8	178.026 6	133.028 6, 123.044 2	-0.55	瑞香素
4	11.53	C ₁₆ H ₁₀ O ₉	355.102 5	354.095 1	163.039 1, 145.028 6, 135.044 2	-1.00	隐绿原酸
5	14.44	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	517.133 9	516.126 8	163.039 1, 145.028 6, 135.044 2	-0.54	3,5-二咖啡酰奎宁酸
6	16.00	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	481.097 2	480.090 3	319.044 2	-1.16	槲皮万寿菊苷
7	18.11	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	305.065 2	304.058 3	231.065 0, 153.018 0, 149.023 3	-1.23	二氢槲皮素
8	18.57	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	479.081 5	478.074 7	303.049 9	-1.09	槲皮素-3-葡萄糖醛酸苷
9	18.82	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	465.102 2	464.095 5	303.050 0	-1.04	异槲皮苷
10	19.58	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	495.112 7	494.106 0	333.060 1, 318.036 7	-1.22	万寿菊苷
11	20.34	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	479.110 8	478.111 1	317.065 1, 302.041 6	-0.89	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷
12	20.85	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	517.134 5	516.126 8	163.038 8	-0.98	1,5-二咖啡酰奎宁酸
13	25.96	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	347.075 6	346.068 9	332.052 3, 314.041 7, 286.146 8	-1.23	菠叶素
14	26.83	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	303.049 3	302.042 7	285.039 5, 257.044 3, 229.049 5, 153.018 2	-1.87	槲皮素
15	27.00	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	287.054 5	286.047 8	153.018 1	-2.04	木犀草素
16	27.46	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	317.064 9	316.058 3	302.041 4	-1.56	异鼠李素
17	28.01	C ₁₇ H ₁₂ O ₅	309.169 4	308.162 4	291.054 1, 231.137 6, 203.143 1, 185.132 2, 143.085 4	-1.64	1-O-乙酰旋覆花内酯
18	31.13	C ₁₇ H ₁₂ O ₅	249.148 2	248.141 3	231.137 6, 185.132 2, 143.085 2	-1.38	2,3-dihydroaromaticin
19	33.09	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	367.174 6	366.167 8	201.127 1, 183.116 8, 173.132 8	-1.44	大花旋覆花素
20	36.85	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	249.148 2	248.141 3	231.137 6, 185.132 2, 143.085 2	-1.30	tomentosin
21	39.70	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	375.107 1	374.100 2	359.075 7, 342.073 1, 317.065 3	-0.99	紫花牡荆素
22	42.04	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	249.148 2	248.141 2	203.143 1, 185.132 2, 143.085 4	-1.39	4-表异黏性旋覆花内酯
23	42.53	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	351.179 9	350.172 9	185.132 2, 143.085 2	-0.91	二乙酰基大花旋覆花内酯
24	46.07	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	599.321 8	598.314 2	185.132 3, 157.101 1, 143.085 3	-0.70	二大花旋覆花内酯B
25	46.49	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	249.148 2	248.141 3	203.143 1, 185.132 2, 143.085 4	-1.36	狭叶依瓦菊素
26	46.66	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	597.305 1	596.298 5	211.111 2, 185.132 3, 203.143 3	-1.18	双旋覆花内酯丁
27	51.21	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	249.148 2	248.141 3	203.143 1, 185.132 2, 143.085 4	-1.25	1β-羟基-土木香内酯
28	53.14	C ₂₃ H ₂₀ O ₆	379.211 2	378.204 2	185.132 3, 157.101 1, 143.085 3	-0.79	1-O-乙酰基-6-α-O-(2-甲基丁酰)大花旋覆花内酯
29	57.41	C ₂₃ H ₂₀ O ₆	393.226 7	392.219 8	185.132 2, 143.085 2	-1.14	1-O-乙酰基-6-α-O-(2-甲基丁酰)大花旋覆花内酯

离子模式下,该成分的准分子离子为 m/z 355.101 7[M+H]⁺,该准分子离子先失去1分子 C₇H₁₂O₆ 形成咖啡酰基碎片离子 m/z 163.039 1[M+H-C₇H₁₂O₆]⁺,咖啡酰基碎片离子再失去1分子 H₂O 形成碎片离子 m/z 145.028 6[M+H-C₇H₁₂O₆-H₂O]⁺,随后再失去1分子 CO 形成碎片离子 m/z 117.033 7[M+H-C₇H₁₂O₆-H₂O-CO]⁺。根据裂解规律及特征并参考相关文献[19-20],推测化合物1为1-咖啡酰奎宁酸,其可能的裂解途径见图2。

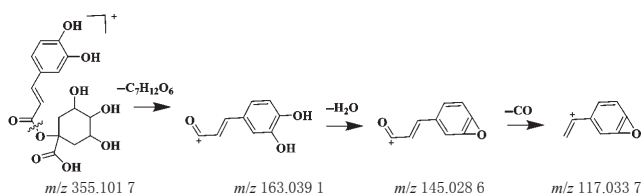


图2 1-咖啡酰奎宁酸的裂解途径

Fig 2 Fragmentation pathway of 1-vaffeoylquinic acid

2.6.2 黄酮类 本研究检测到的黄酮类成分母离子是[M+H]⁺,以保留时间26.83 min的化合物14为例:在正离子模式下,该成分的准分子离子为 m/z 303.049 3[M+H]⁺,其一,该准分子离子失去1分子 H₂O 形成碎片离子 m/z 285.039 5[M+H-H₂O]⁺;其二,该准分子离子相继失去1分子 H₂O 和1分子 CO 形成碎片离子 m/z 257.044 3

[M+H-H₂O-CO]⁺,随后再失去1分子 CO 形成碎片离子 m/z 229.049 5[M+H-H₂O-2CO]⁺;其三,该准分子离子经过逆狄尔斯-阿尔德裂解得到碎片离子 m/z 153.018 2[M+H]⁺。根据裂解规律及特征并参考相关文献[21-22],推测化合物14为槲皮素,其可能的裂解途径见图3。

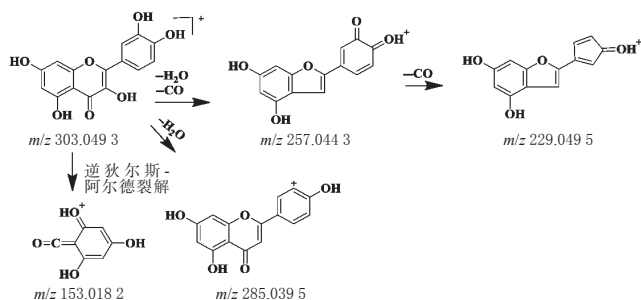


图3 槲皮素的裂解途径

Fig 3 Fragmentation pathway of quercetin

2.6.3 倍半萜内酯类 本研究检测到的倍半萜内酯类成分母离子是[M+H]⁺。以保留时间28.01 min的化合物17为例:在正离子模式下,该成分的准分子离子为 m/z 309.169 4[M+H]⁺,该准分子离子先失去1分子 H₂O 形成碎片离子 m/z 291.054 1[M+H-H₂O]⁺,随后失去1分子 C₂H₄O₂ 形成碎片离子 m/z 231.137 6[M+H-H₂O-

$C_2H_3O_2^+$,再脱去1分子CO形成碎片离子 m/z 203.143 1 $[M+H-H_2O-C_2H_3O_2-CO]^+$ 。根据裂解规律及特征并参考相关文献[23],推测化合物17为1-*O*-乙酰旋覆花内酯,其可能的裂解途径见图4。

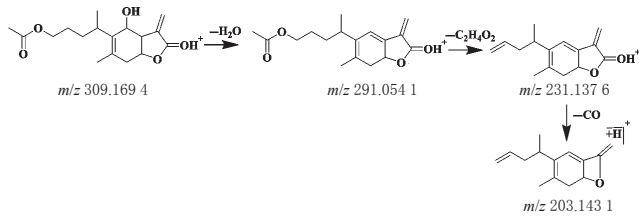


图4 1-*O*-乙酰旋覆花内酯的裂解途径

Fig 4 Fragmentation pathway of 1-*O*-acetyl britannilactone

2.7 PCA

PCA是一种通过降维的方法将多个变量转化为一组新的、互相无关的若干综合变量,且每个新的综合变量均能够反映原始变量信息的统计方法^[24-25]。由于PCA是一种无监督的分析方法,有一定的局限性,一般仅用来观察实验样品的自然分布和组别关系^[26]。

本研究以29个共有化合物的峰面积为变量,采用SIMCA 14.1软件进行PCA,结果见图5、图6。由图5可知,旋覆花与蜜旋覆花分别位于得分图的两侧,预测能力参数(Q^2)为0.717,主成分累计贡献率 $[R^2X(\text{cum})]$ 为0.809,表明所建PCA模型聚类良好^[27];旋覆花与蜜旋覆花可完全分离,提示经蜜炙后,旋覆花的化学成分发生了明显变化。图6中,每个峰代表1个变量,PCA模型的载荷图能够说明不同变量对于各个主成分的贡献大小,距离原点越远表明该成分对样品的差异贡献率越大^[27]。由图6可知,大部分成分聚集在同一区域,仅有少部分分离群,这少部分远离原点的成分是引起旋覆花与蜜旋覆花化学成分差异的物质基础。

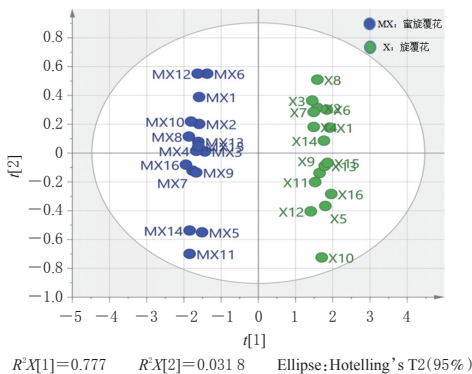


图5 旋覆花及蜜旋覆花的PCA得分图

Fig 5 PCA scatter score diagram of *I. japonica* and honey-fried *I. japonica*

2.8 OPLS-DA

由于OPLS-DA能够反映组间的最大差异,故已被广泛用于筛选差异性成分^[28]。本研究以29个共有化学

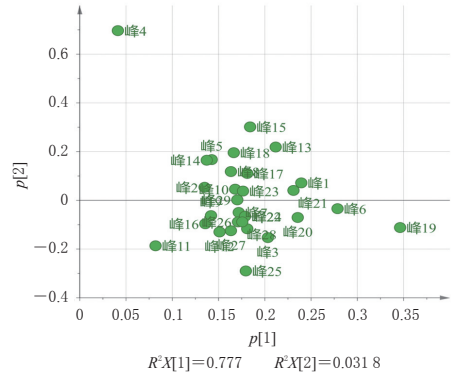


图6 29个共有化学成分的PCA载荷图

Fig 6 PCA loadings plot of 29 common chemical components

成分的峰面积为变量,采用SIMCA 14.1软件进行有监督的OPLS-DA,结果见图7。由图7可知,累积解释能力参数(R^2X)为0.799,累积解释能力参数(R^2Y)为0.994,预测能力参数(Q^2)为0.988,均大于0.5,且 Q^2 大于0.9,表明该模型的预测能力较好^[11]。

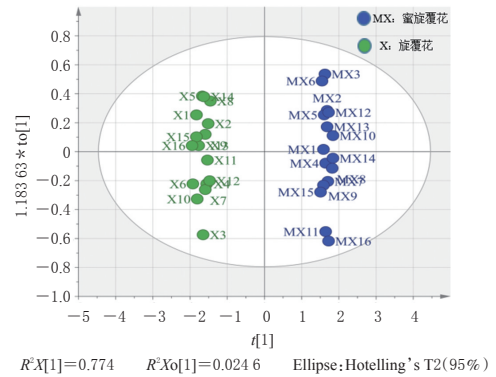


图7 旋覆花及蜜旋覆花的OPLS-DA得分图

Fig 7 OPLS-DA scatter score diagram of *I. japonica* and honey-fried *I. japonica*

有研究指出,单一变量的系数置信区间和变量重要性投影(VIP)值可衡量各个共有峰的表达模式对样本分类判别的影响强度和解释能力,且当VIP值大于1时,表示该变量对于所建模型的贡献度高于平均水平^[29-30]。从所建的OPLS-DA模型中得到29个共有化学成分的VIP值,结果见图8。由图8可知,经炮制后,29个共有化学成分的平均峰面积均降低;有7个成分的VIP值大于1,分别为峰19(大花旋覆花素)、峰6(槲皮万寿菊苷)、峰1(1-咖啡酰奎宁酸)、峰21(紫花牡荆素)、峰20(tomentosin)、峰13(菠叶素)、峰3(瑞香素),表明这7个成分为旋覆花与蜜旋覆花的差异性成分。

根据上述这7个差异性成分的峰面积绘制旋覆花及蜜旋覆花的含量(以离子峰信号强度计)对比折线图,结果见图9。由图9可知,经蜜炙后,这7个差异性成分的含量均明显降低。

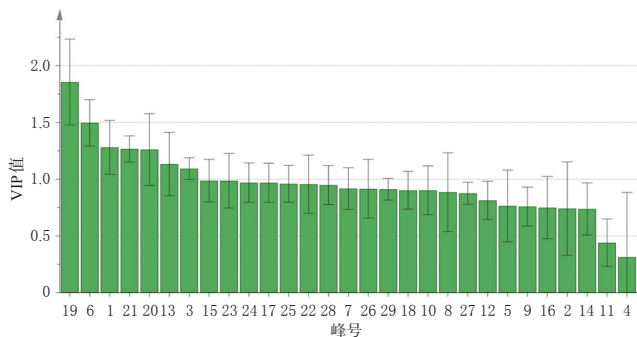


图8 OPLS-DA模型中各共有峰的VIP值

Fig 8 VIP values of common peaks in OPLS-DA model

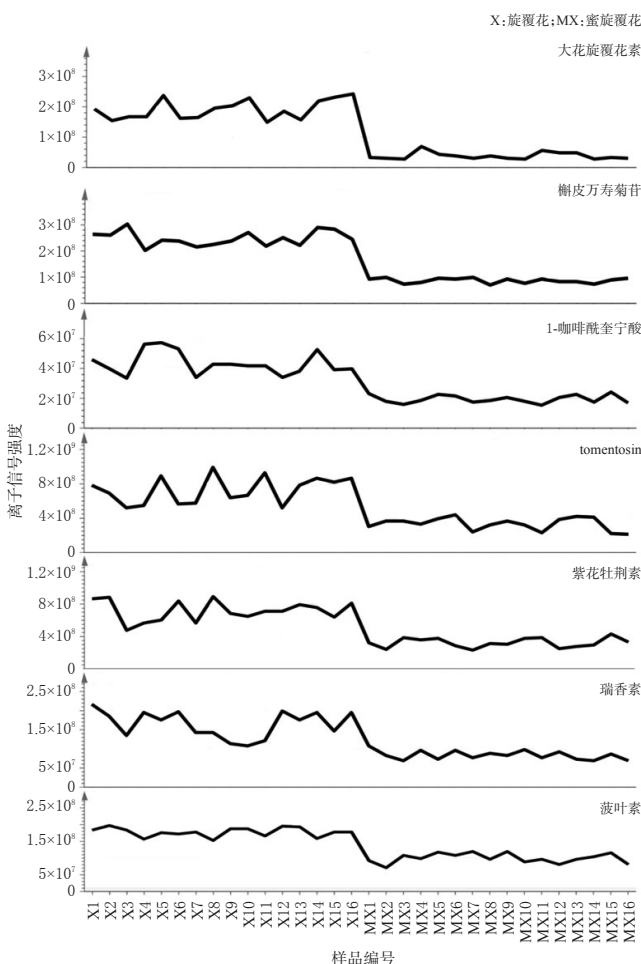


图9 旋覆花及蜜旋覆花样品中7个差异性成分的含量对比折线图

Fig 9 Broken-line graph of the contents of 7 differential components in *I. japonica* and honey-fried *I. japonica*

3 讨论

本课题组前期分别考察了甲醇-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液两种流动相体系的洗脱效果。结果发现,与相同比例的甲醇比较,乙腈洗脱所得图谱中的色谱峰更多且峰形较好,故选择乙腈为有机相。同时,本课题组又对正、负离子扫描模式进行了比较,结果发现,

在正离子模式下得到的质谱信息更多且响应较强,故选择正离子模式进行检测。

本研究结果显示,旋覆花经蜜炙后所得色谱图未见明显变化,但各色谱峰的响应强度则均有不同程度的降低。这提示经蜜炙后,旋覆花的化学成分种类基本未有变化,但成分的含量发生了改变(倍半萜内酯、黄酮、酚酸类成分含量均有不同程度的降低)。结合PCA、OPLS-DA发现,大花旋覆花素、槲皮万寿菊苷、1-咖啡酰奎宁酸、tomentosin、紫花牡荆素、瑞香素、菠叶素可能是造成旋覆花蜜炙前后含量变化的主要原因。笔者分析其原因可能为:(1)由于中药炮制过程需要不断加热,这必然会造成成分的改变^[31]。在蜜炙过程中,加热使旋覆花的成分受到了一定的破坏,鉴定得到的29个共有化学成分的平均含量均有不同程度的降低,结合VIP值结果可知,炮制对倍半萜内酯类成分的影响最大(大花旋覆花素),黄酮类(槲皮万寿菊苷)、酚酸类(1-咖啡酰奎宁酸)次之。倍半萜内酯类成分是旋覆花挥发油的主要活性成分,有研究指出,加热可使挥发油的含量降低。倍半萜内酯类成分具有化解黏液、浓痰,缓解黏膜发炎,扩张气管和支气管,缓解呼吸道阻塞、气喘等作用^[32-35],因此经蜜炙后蜜旋覆花中倍半萜内酯类成分的含量降低,使得其降气、化痰、止呕的作用随之减弱。同时,黄酮类和酚酸类成分可能受炮制加热的影响^[36-37],部分成分受到破坏,其消炎止咳、消肿作用也随之减弱^[38]。(2)加入蜂蜜可增强本品润肺止咳的作用。蜂蜜是一味常用的中药,入脾、肺、大肠经,具有补中益气、润肺止咳的功效。现代药理研究表明,蜂蜜具有抗炎、抗氧化、止咳、促进吸收等药理作用^[3]。蜜炙的过程就是入肺经中药同蜂蜜两味药配伍的过程^[39],旋覆花与蜂蜜配伍后不仅保留了旋覆花的止咳功效,还因蜂蜜的加入增加了补中益气的作用,使其药效增强,具有协同增强润肺止咳的作用。

本研究采用UPLC-MS/MS技术分析了旋覆花蜜炙后化学成分变化,从旋覆花及蜜旋覆花中共鉴定出29个共有化学成分,包括5个酚酸类成分、12个黄酮类成分、12个倍半萜内酯类成分。旋覆花及蜜旋覆花可被明显区分,提示经蜜炙后旋覆花的化学成分的含量存在明显差异。大花旋覆花素、槲皮万寿菊苷、1-咖啡酰奎宁酸、tomentosin、紫花牡荆素、瑞香素、菠叶素可能为旋覆花及蜜旋覆花的差异性成分。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:339.
- [2] 朱虹,唐生安,秦楠,等.旋覆花中化学成分及其活性研

- 究[J].中国中药杂志,2014,39(1):83-88.
- [3] 黄斌.蜂蜜在中药炮制蜜炙法中的应用[J].中国蜂业,2017,68(11):45-46.
- [4] 徐益祥.旋覆花入药宜蜜炙[J].时珍国医国药,1999,10(8):595.
- [5] 李欧.中药成分分析的重要需求:高效[J].现代养生(下半月版),2017(6):156.
- [6] 覃江江.四种旋覆花属药用植物中新型倍半萜的发现及生物活性研究[D].上海:上海交通大学,2011.
- [7] 吴一兵,王云志,查建蓬,等.欧亚旋覆花中三萜和甾体化合物的分离和结构鉴定[J].中草药,2006,37(5):666-668.
- [8] 张婷,杜冠华,陈若芸.旋覆花属植物中倍半萜类成分及生物活性的研究进展[J].中国药理学杂志,2010,45(24):1889-1894.
- [9] 韩迈仑.中药炮制是临床合理用药的前提[J].中国药业,2004,13(7):23.
- [10] 马东阳.中药临床合理用药的安全性[J].中国保健营养(下旬刊),2014,24(7):4341-4342.
- [11] 林丽,李欢欢,谢辉,等.基于HPLC指纹图谱结合化学计量学的旋覆花药材质量评价研究[J].中草药,2021,52(6):1751-1758.
- [12] 丁林芬,王扣,王海垠,等.旋覆花化学成分研究[J].中药材,2016,39(6):1296-1299.
- [13] 覃江江,朱佳娴,朱燕,等.旋覆花的化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(6):999-1001.
- [14] 黄火强,闫美娜,朴香兰,等.水朝阳旋覆花化学成分研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(14):106-110.
- [15] 花亚萍,覃江江,张飞,等.水朝阳旋覆花的倍半萜内酯类化合物[J].中国中药杂志,2012,37(11):1586-1589.
- [16] 吴一兵,张嫡群,王云志.欧亚旋覆花化学成分研究进展[J].天然产物研究与开发,2006,18(3):503-507.
- [17] 耿红梅.欧亚旋覆花化学成分的研究[J].时珍国医国药,2008,19(10):2432-2433.
- [18] 覃江江,朱佳娴,朱燕,等.旋覆花地上部分中的黄酮类化合物[J].中国天然药物,2010,8(4):257-259.
- [19] 李洁,刘子菡,董凡,等.新绿原酸的大鼠体内代谢产物的UPLC-Q-TOF MS鉴定[J].中国现代中药,2020,22(7):1048-1055,1071.
- [20] 王小俊,邓玉环,张丽萍,等. UPLC-DAD-MS定性和定量分析蕲艾中的酚酸和黄酮类成分[J].中国中药杂志,2019,44(5):983-989.
- [21] 任强.苦荞麦化学成分及其代谢产物分析和鉴定方法研究[D].北京:北京协和医学院,2013.
- [22] 冯阳,陈玉梅,辛华.金樱子黄酮类成分的UPLC-Q-TOF-MS分析[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(12):71-76.
- [23] 王云志,石晓伟,付焱,等. 1-氧-乙酰大花旋覆花内酯对照品的制备及其在欧亚旋覆花中的含量测定[J].色谱,2005,23(6):573-576.
- [24] 陈昆南,傅红燕,王长军.基于UPLC/Q-TOF MS技术对延胡索醋法炮制前后化学成分的研究[J].化学研究与应用,2019,31(9):1618-1622.
- [25] DANIEL J D. Univariate, bivariate and multivariate statistics using R: quantitative tools for data analysis and data science[M]. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2020: 281-305.
- [26] 程新,李昆太,黄林,等.前三潮茶树菇的成分差异比较研究[J].食品与发酵工业,2018,44(8):271-276.
- [27] 阿基业.代谢组学数据处理方法:主成分分析[J].中国临床药理学与治疗学,2010,15(5):481-489.
- [28] 吴蓓,彭春燕,李军茂,等.基于UFLC-Q-TOF-MS/MS技术及PCA分析的不同产地香兔耳风药材差异研究[J].中国中药杂志,2017,42(21):4165-4171.
- [29] THÉVENOT E A, ROUX A, XU Y, et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses[J]. J Proteome Res, 2015, 14(8): 3322-3335.
- [30] 郭丽,杨忠杰,于晓涛,等.南、北五味子药材的HPLC指纹图谱建立及化学模式识别分析[J].中国药房,2020,31(18):2224-2229.
- [31] 周霖,梁淑红,孙志,等.基于UPLC指纹图谱结合化学模式识别的复方血栓通胶囊质量控制研究[J].中国医院药学杂志,2019,39(1):34-38.
- [32] 赵西峰.浅析中药炮制对中药化学成分的影响[J].养生保健指南,2016(15):81-82.
- [33] 徐静,高玲,谢永慧,等.倍半萜内酯化合物药理作用[J].中国热带医学,2007,7(4):623-624.
- [34] 王玉梅.欧亚旋覆花化学成分及其生物活性的研究进展[J].西部中医药,2020,33(1):147-151.
- [35] 陈曦.旋覆花中倍半萜内酯类成分的抗炎作用及其机制研究[D].天津:天津医科大学,2016.
- [36] 高家荣,吴健,韩燕全.旋覆花水提物与醇提物的止咳化痰作用研究[J].安徽医药,2013,17(8):1282-1283.
- [37] 曹月梅.加热炮制法对中药有效成分的影响[J].时珍国医国药杂志,2006,17(12):2539-2540.
- [38] 邓飞.炮制对中药化学成分及药性的影响[J].实用中医药杂志,2017,33(3):312-315.
- [39] 羊波,应茵,陈苓丽,等.黄酮类化合物抗炎作用机制研究进展[J].中国药师,2016,19(7):1369-1373.

(收稿日期:2021-06-04 修回日期:2021-08-30)

(编辑:陈宏)