

基于 RPLC/Q-TOF-MS 技术的黄柏炭制前后化学成分变化研究

李利新¹, 乔斌², 李遇伯^{1*}, 张丽媛¹, 王玉明¹, 靳晶¹, 张秀秀¹

1. 天津中医药大学中药学院 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 300193

2. 天津大学化工学院 生物化工系, 天津 300072

摘要: **目的** 分析黄柏炭制前后化学成分的变化情况, 为黄柏炭炮制原理的阐明提供依据。**方法** 按照《中国药典》2010年版方法炮制黄柏炭, 采用 RPLC/Q-TOF-MS 技术对生黄柏及黄柏炭的提取样品进行检测, 找出炮制前后具有显著性差异的物质。**结果** 共找出 21 种化学成分在炮制前后具有显著性差异, 其中炮制后新生成的物质有 5 种, 质量分数增加的物质有 8 种, 减少的物质有 8 种。**结论** 采用 RPLC/Q-TOF-MS 法进行中药炮制研究具有方法灵敏度高, 结果准确可靠的优点, 该方法能够全面地反映出中药在炮制过程中多种化学成分的变化。

关键词: 黄柏; RPLC/Q-TOF-MS; 炮制; 黄柏炭; 化学成分

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)07-1314-06

Changes of chemical constituents in *Phellodendri Chinensis Cortex* before and after charring based on RPLC/Q-TOF-MS technology

LI Li-xin¹, QIAO Bin², LI Yu-bo¹, ZHANG Li-yuan¹, WANG Yu-ming¹, JIN Jing¹, ZHANG Xiu-xiu¹

1. Tianjin Key Laboratory of Chinese Chemistry and Analysis, College of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Objective To analyze the changes of chemical constituents in *Phellodendri Chinensis Cortex* before and after charring and provide bases for clarifying the processing principles of *Phellodendri Chinensis Cortex*. **Methods** *Phellodendri Chinensis Cortex* was processed according to *Chinese Pharmacopoeia 2010* and the extracts of unprocessed and processed *Phellodendri Chinensis Cortex* were detected by using RPLC/Q-TOF-MS. The constituents with significant differences between the unprocessed and processed *Phellodendri Chinensis Cortex* were identified. **Results** The results showed that a total of 21 chemical constituents had significant differences before and after processing including five new constituents, eight constituents with content increasing, and eight constituents with content decreasing. **Conclusion** The RPLC/Q-TOF-MS method proves to have a high sensitivity and the result is accurate and reliable. The method could fully reflect the changes of multiple chemical constituents of Chinese materia medica in the course of processing.

Key words: *Phellodendri Chinensis Cortex*; RPLC/Q-TOF-MS; processing; *Phellodendri Chinensis Cortex* after charring; chemical constituents

黄柏为芸香科黄檗属植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 的干燥树皮, 习称“川黄柏”, 始载于《神农本草经》, 产于四川、安徽、湖北等地。黄柏药性苦、寒, 入肾、膀胱经, 具有清热燥湿, 泻火除蒸, 解毒疗疮的疗效^[1]。中医古籍记载的黄

柏炮制品主要有盐炙黄柏、酒炙黄柏和黄柏炭等。一直以来, 对黄柏的炮制研究都主要集中在盐酸小檗碱、盐酸巴马汀和盐酸药根碱等一种或少数几种成分质量分数的变化上^[2-4], 这些方法所得到的信息不够全面, 具有一定的局限性。本实验采用 RPLC/Q-

收稿日期: 2011-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30801540)

作者简介: 李利新 (1985—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药药物分析工作。Tel: 13820168320 E-mail: haoyoulixin@163.com

*通讯作者 李遇伯 Tel: (022)59596230 E-mail: yaowufenxi001@sina.com

网络出版时间: 2012-05-11 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120511.0853.009.html>

TOF-MS 技术对生黄柏及其炮制品黄柏炭的化学成分进行了一次全面系统的研究, 阐明了黄柏经炭制后化学成分的量变和质变情况。该方法灵敏度高, 结果准确可靠, 为中药材的炮制研究提供了新思路和新方法。

1 仪器与材料

Agilent 1200 RPLC 四元泵液相系统 (美国 Agilent 公司), Bruker micro TOF-QII 高性能的电喷雾-四级杆-飞行时间 LC/MS/MS 串联质谱仪 (德国 Bruker 公司)、Data Analysis 数据分析软件 (德国 Bruker 公司), BS124S 电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司), AS10200ADT 超声清洗器 (天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

盐酸巴马汀 (批号 110732-200506)、盐酸小檗碱 (批号 110713-200609) 对照品均购自中国药品生物制品检定所, 绿原酸 (批号 10081444) 对照品购自天津一方科技有限公司, 各对照品的质量分数用 HPLC 检测均达到 98% 以上。乙腈、甲醇均为色谱纯 (美国 Merk 公司), 甲酸为色谱纯 (瑞士 Fluka 公司), 乙醇为分析醇 (天津市江天化工有限公司), 黄柏药材于 2009 年购于四川省成都市中药材市场, 经天津中医药大学李天祥副教授鉴定为川黄柏 *Phellodendri Chinensis Cortex*。

2 方法与结果

2.1 黄柏药材的炮制^[5]

取生黄柏, 置热锅内, 用武火炒至外表焦黑色, 内部深褐色或者深黑色, 喷水灭尽火星, 取出, 晾干, 即为黄柏炭。

2.2 供试品溶液的制备

取生黄柏及黄柏炭粉末 (过 4 号筛) 各 1.0 g, 精密称定, 置 100 mL 锥形瓶中, 加入 75% 乙醇溶液 50 mL, 超声提取 1 h, 滤过后将滤液定容至 100 mL 量瓶中, 备用。进样前 0.22 μm 滤膜滤过。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取一定量的盐酸巴马汀、盐酸小檗碱和绿原酸对照品, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 得到质量浓度分别为 110、100、120 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。各取一定量置量瓶中, 配成质量浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Agilent SB-Aq (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相由 A 相 (甲酸-水 0.1:100) 和 B 相 (乙腈-水 0.1:100) 按下列程序进行梯度洗脱:

0~5 min, 10%~25% B; 5~15 min, 25% B; 15~23 min, 25%~45% B; 23~28 min, 45%~85% B; 28~35 min, 85%~90% B; 35~37 min, 90%~10% B; 37~55 min, 10% B; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μL 。

2.5 质谱条件

RPLC/Q-TOF-MS 系统使用 ESI 离子源, 分别在正、负离子模式下采集数据。正离子: 毛细管电压 4.5 kV, 干燥气温度 180 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流量 6 L/min, 辅助气压力 80 kPa; 负离子: 毛细管电压 2.6 kV, 干燥气温度 180 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流量 6 L/min, 辅助气压力 80 kPa, 每 0.02 s 采集一次谱图, 每次采集 0.1 s, 采用 HCOONa 溶液进行在线校正, 数据采集范围: m/z 100~1 000。

2.6 方法学考察

2.6.1 精密度试验 按照“2.2”项下方法制备生黄柏供试品溶液, 连续进样 6 次, 随机选取 25 个色谱峰, 经计算 25 个色谱峰峰面积的 RSD 在 1.0%~5.9%。

2.6.2 重复性试验 按照“2.2”项下方法平行制备 6 份生黄柏供试品溶液, 依次进样分析, 选取“2.6.1”项下 25 个色谱峰, 经计算各色谱峰峰面积的 RSD 在 1.1%~6.7%。

2.6.3 稳定性试验 按照“2.2”项下方法制备生黄柏供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12、18 h 进样分析, 随机选取 25 个色谱峰 (同“2.6.1”), 经计算各色谱峰峰面积的 RSD 在 0.8%~5.6%, 表明供试品溶液在 18 h 内稳定。

2.7 样品测定

在方法学考察合格的基础上, 取生黄柏及黄柏炭粉末制备供试品溶液, 进 RPLC/Q-TOF-MS 系统分析, 正负离子的基峰色谱 (BPC) 图见图 1。

2.8 结果分析

2.8.1 炮制前后化学成分变化分析 为了更加直观、准确地阐明生黄柏和黄柏炭的差异性, 本研究将所得到的质谱数据经过 Profile Analysis 软件处理后, 将数据导入 SIMCA-P 11.5 统计软件, 进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘分析 (PLS-DA), 数据分析结果见图 2、3。PLS-DA 模型参数中 R_X^2 表明组分所含有的 X 方差信息, 表征 X 变量对 Y 数据的拟合度, R_Y^2 是组分所含有的 Y 的方差信息, 表征 X 变量对 Y 数据的预测率。 Q^2 表明交叉验证的正确率, 以上参数取值范围均是 0~1。从 PLS-DA 得分分布

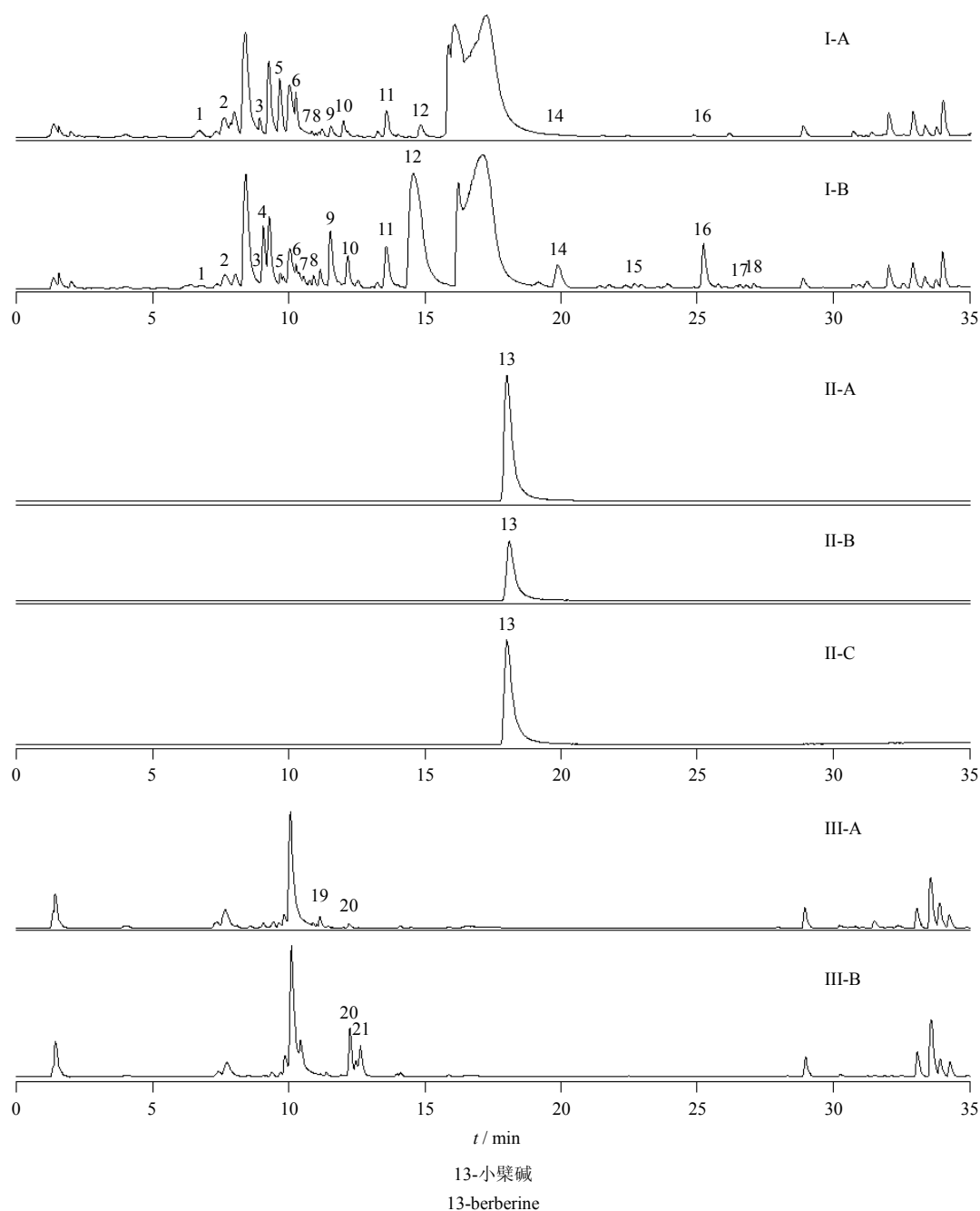


图 1 生黄柏 (A)、黄柏炭 (B) 和小檗碱对照品 (C) 的 RPLC/Q-TOF-MS 正离子 (I)、稀释 100 倍后的正离子 (II) 和负离子 (III) BPC 图

Fig. 1 BPC of positive ions (I), positive ions after diluted by 100 times (II), and negative ions (III) of unprocessed (A) and processed (B) of *Phellodendri Chinensis Cortex* and berberine reference substance (C) by RPLC/Q-TOF-MS

图可观察到生黄柏和黄柏炭无论在正离子和负离子都分布在不同区域, $R_Y^2=0.996$ 和 0.99 均大于 0 且接近 1, $Q^2=0.984$ 和 0.972 均大于 0, 表明生黄柏和黄柏炭存在着明显的差异。通过对照谱图并结合 PLS-DA 模型的 VIP 值(variable importance plot, VIP 值综合概括了模型中某一变量对于解释 X 矩阵和与分类变量 Y 矩阵相关的重要性), 本研究共发现 21

种化学成分在炮制前后具有显著性差异, 其中炮制后新生成的物质有 5 种, 质量分数增加的物质有 8 种, 减少的物质有 8 种。21 种化学成分的基本信息见表 1, 将 21 种化学成分在黄柏炭中的峰面积与生黄柏中各自峰面积的比值作为量化指标, 能够反映出黄柏在炮制前后化学成分的量变情况。

2.8.2 化学成分的鉴别分析 2、13 号峰与对照品

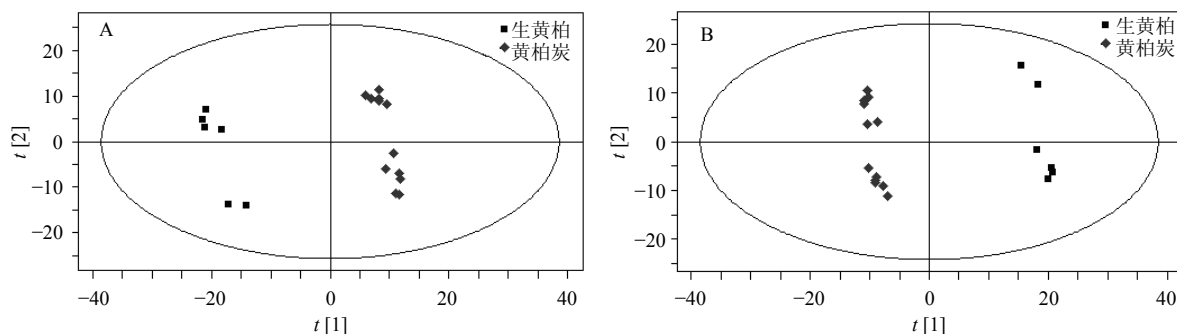


图2 生黄柏和黄柏炭样品的 RPLC/Q-TOF-MS 正离子 PCA (A, $R_X^2=0.527$, $Q^2=0.376$) 和 PLS-DA (B, $R_X^2=0.524$, $R_Y^2=0.996$, $Q^2=0.984$) 得分图

Fig. 2 Score plots of PCA (A, $R_X^2=0.527$, $Q^2=0.376$) and PLS-DA (B, $R_X^2=0.524$, $R_Y^2=0.996$, $Q^2=0.984$) for unprocessed and processed *Phellodendri Chinensis Cortex* by RPLC/Q-TOF-MS in positive ions

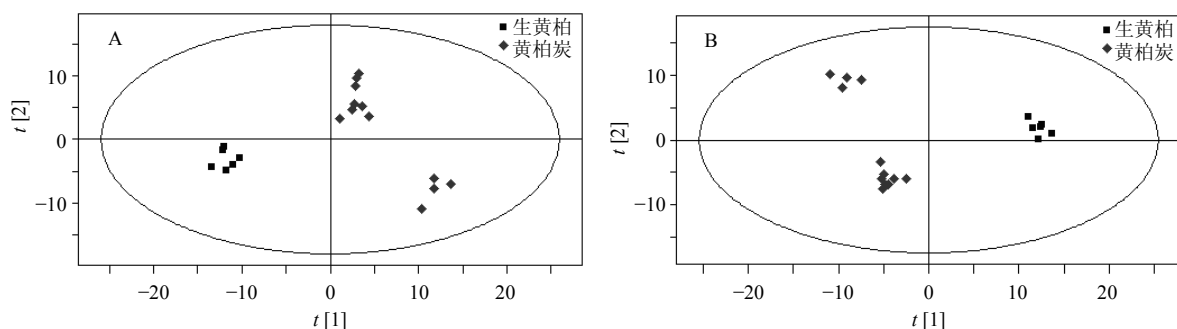


图3 生黄柏和黄柏炭样品的 RPLC/Q-TOF-MS 负离子 PCA (A, $R_X^2=0.580$, $Q^2=0.318$) 和 PLS-DA (B, $R_X^2=0.479$, $R_Y^2=0.990$, $Q^2=0.972$) 得分图

Fig. 3 Score plots of PCA (A, $R_X^2=0.580$, $Q^2=0.318$) and PLS-DA (B, $R_X^2=0.479$, $R_Y^2=0.990$, $Q^2=0.972$) for unprocessed and processed *Phellodendri Chinensis Cortex* by RPLC/Q-TOF-MS in negative ions

绿原酸与小檗碱的保留时间、一级质谱以及二级碎片离子完全一致,故2、13号峰被分别鉴定为绿原酸和小檗碱。4号峰是炭制后新生成的物质,它的一级与二级碎片信息与文献报道^[6]的黄柏碱相同,但是保留时间不同,所以推测黄柏碱在加热过程中产生了异构化,生成了其同分异构体。6号峰准分子离子 m/z 356.186 2,二级质谱主要碎片为 192.094 9、177.070 4,推测为 $[M]^+$ 失去 $-C_7H_{18}NO_3$ 得到 m/z 为 192.094 9 的碎片,然后再失去一个 $-CH_3$ 得到 m/z 为 177.070 4 的碎片,根据文献推测其为蝙蝠葛碱^[7]。9号峰经高分辨数据推测其分子式为 $C_{19}H_{17}NO_4$,准分子离子 m/z 为 324.122 9,二级碎片有 m/z 308.092 4 $[M+H-CH_4]^+$, m/z 294.076 5 $[M+H-CH_4-CH_2]^+$, m/z 280.097 1 $[M+H-CH_4-2CH_2]^+$ 等,参照有关文献推测其为四氢黄连碱^[8]。10号峰根据高分辨数据推测其分子式为 $C_{21}H_{25}NO_4$,准分子离子 m/z 为 352.117 9,二级质谱中主要碎片为 m/z 336.087 6 $[M-CH_3]^+$, m/z 308.092 6 $[M-CH_3-H-CO]^+$ 等,

经与巴马汀对照品对照,它们的碎裂情况一致,但是保留时间不同,所以推测其为巴马汀同分异构体。12号峰准分子离子 m/z 为 322.107 6,二级碎片出现 m/z 307.085 4 $[M-15]^+$ 和 m/z 279.089 8 $[M-44]^+$, 307.085 4 推测为一脱 CH_3 峰; 279.089 8 推测为去一个甲基后又去除一个 $-HCO$,通过分子量和裂解规律推测为小檗红碱。20号峰的碎片离子 193.031 9 [阿魏酸-H] 为奎尼酸衍生物的标志性碎片离子,参考有关文献推测其为 5-O-阿魏酰-奎尼酸甲酯或者 4-O-阿魏酰-奎尼酸甲酯^[8]。峰1、3、5、7~8、11、14~19、21的结构还未见有文献报道,本实验尚不能对其进行鉴别,其结构的确认还有待于进一步研究。

3 讨论

在前期工作中,对不同的提取溶剂、溶剂比例以及提取方法进行了考察,进样分析,发现75%乙醇提取的色谱峰较多,分离度好,峰面积大。在综合考虑了超声提取、回流提取、索氏提取3种方法

表 1 黄柏炭 21 种化学成分相对生黄柏的变化情况 ($n=6$)Table 1 Changes of 21 chemical constituents in processed *Phellodendri Chinensis* Cortex comparing with unprocessed samples ($n=6$)

峰号	保留时间 / min	离子模式	m/z	碎片离子	$A_{\text{黄柏炭}} / A_{\text{生黄柏}}$	变化趋势	鉴别
1	6.760	+	395.129 3	364.128 9, 232.070 2, 177.068 9	0.40	减少	—
2	7.680	+	377.084 2	286.991 1, 163.038 5, 135.045 0, 121.023 9	0.74	减少	绿原酸
3	8.952	+	592.239 1	286.142 7, 255.108 0, 178.083 5	0.11	减少	—
4	9.052	+	342.171 0	192.101 9	新物质	新生成	黄柏碱异构体
5	9.688	+	314.175 2	269.118 5, 237.092 1, 209.095 0, 192.099 8, 143.041 0	0.25	减少	—
6	10.256	+	356.186 2	192.094 9, 177.070 4	0.59	减少	蝙蝠葛碱
7	10.524	+	310.107 4	295.083 5, 267.088 9	77.26	增加	—
8	11.143	+	328.191 4	269.117 7, 237.090 9, 209.095 5, 194.073 4, 143.040 1	8.43	增加	—
9	11.527	+	324.124 1	308.092 4, 294.076 5, 280.097 1, 266.080 6	5.89	增加	四氢黄连碱
10	12.013	+	352.117 9	336.087 6, 322.073 0, 308.092 6, 294.075 9, 190.085 8	0.31	减少	巴马汀异构体
11	13.585	+	322.108 2	307.085 4, 279.088 8	7.66	增加	—
12	14.639	+	322.107 6	307.085 0, 279.089 8	27.56	增加	小檗红碱
13	18.152	+	336.111 2	320.085 7, 306.070 7, 292.091 1, 278.075 7	0.41	减少	小檗碱
14	19.958	+	350.139 2	334.108 3, 320.091 4, 306.111 3, 292.093 6	45.51	增加	—
15	22.784	+	484.175 5	334.106 7, 319.082 1, 304.058 4, 290.079 2	新物质	新生成	—
16	25.211	+	442.160 7	427.130 7, 412.108 5, 398.127 7	152.80	增加	—
17	26.549	+	528.194 8	513.153 7, 498.145 5	新物质	新生成	—
18	27.051	+	498.184 9	483.152 0, 468.136 4, 454.153 5, 437.143 6	新物质	新生成	—
19	11.126	—	679.163 4	337.078 0, 219.047 4	消失	减少	—
20	12.230	—	381.084 9	193.031 9, 175.022 1, 159.998 7, 149.043 4	129.85	增加	5(或 4)- <i>O</i> -阿魏酰-奎尼酸甲酯
21	12.616	—	349.060 1	175.021 8, 159.998 9, 132.004 5	新物质	新生成	—

$A_{\text{黄柏炭}} / A_{\text{生黄柏}}$ 为黄柏炭各峰峰面积与生黄柏各峰峰面积的比值, “—” 未鉴定

$A_{\text{黄柏炭}} / A_{\text{生黄柏}}$ means peak area ratio of processed and unprocessed *Phellodendri Chinensis* Cortex, “—” unidentified

的提取效率后, 由于超声提取操作简单, 节省时间, 因此本实验选用超声提取法制备样品。在色谱柱的选择上, 分别考察了 Agilent SB-C₁₈ 和 Agilent SB-Aq 两种色谱柱, 发现生物碱类成分在 Agilent SB-C₁₈ 上峰形拖尾, 且分离度也不好, 而在 Agilent SB-Aq 上却能很好的分离, 所以本实验选用 Agilent

SB-Aq 色谱柱。

由于黄柏中各种化学成分的质量分数差别比较大, 为保证检测到尽量多的化合物信息, 进样质量浓度应足够大, 而黄柏中小檗碱的质量分数比较大, 在本实验的进样质量浓度下, 小檗碱已严重超载, 所以将生黄柏和黄柏炭的供试品溶液在同等条件下

稀释 100 后进样, 色谱图见图 1-II, 在此条件下计算小檗碱的峰面积。

本实验采用先进的 RPLC/Q-TOF-MS 技术对黄柏炮制前后的化学成分进行了全面系统的研究, 发现黄柏经炭制后不但有已知成分量的变化, 而且更有内在成分质的改变。这些炮制后新产生的组分以及发生量变的组分极有可能是黄柏炭制后功效改变的物质基础, 但是仅靠质谱分析并不能确定这些未知物质的准确结构, 需要借助其他手段做进一步研究。

黄柏炭制后化学成分质量分数有些增加, 有些减少, 很可能是某些成分在炮制过程中发生了化学反应, 转化成了其他的成分, 在实验过程中发现随着炮制时间延长, 小檗碱质量分数逐渐减少, 而小檗红碱质量分数逐渐增加, 据此推测, 小檗碱在加热过程中可脱去一个甲基转变为小檗红碱。这与文献报道的结果相一致^[9-10]。20 号峰是一种奎尼酸酯衍生物, 在生黄柏中质量分数甚微, 但经过炭制后, 黄柏炭中这种物质增加了 100 多倍, 而生黄柏中具有质量分数很高的奎尼酸衍生物, 由此可以推测奎尼酸衍生物在高温或者加热条件下羧基端容易发生甲酯化反应生成相应的奎尼酸酯衍生物。

中医理论认为, 黄柏炒炭后可以大减苦寒, 清湿热之中并有收涩之性, 常用于崩带痔漏出血等症。本实验将先进的 RPLC/Q-TOF-MS 技术应用于黄柏炭炮制前后化学成分的研究中, 能够更加直观和准确地反映炮制前后化学成分的变化情况。本实验的研究成果对于研究黄柏炭的炮制原理具有重要意义。

义, 同时也为黄柏炭药效物质基础的阐明提供了重要依据。

参考文献

- [1] 雷载权. 中药学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001.
- [2] 时维静, 陈文成, 谭志静. HPLC 法测定黄柏不同炮制品中小檗碱的含量 [J]. 中国药事, 2009, 23(2): 134-136.
- [3] 张凡, 史辑, 赵佳丽, 等. HPLC 法测定两种黄柏及其炮制品中黄柏内酯和黄柏酮 [J]. 中成药, 2011, 33(4): 634-637.
- [4] 韦亚洁, 谢明全. 炮制对黄柏中 3 种生物碱含量的影响 [J]. 中国药房, 2010, 21(15): 1419-1420.
- [5] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [6] Li Y B, Zhang T J, Zhang X L, et al. Chemical fingerprint analysis of *Phellodendri Amurensis Cortex* by ultra performance LC/Q-TOF-MS methods combined with chemometrics [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(21): 3347-3353.
- [7] Hu Y M, Su G H, Sze S C W, et al. Quality assessment of *Cortex Phellodendri* by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(4): 438-453.
- [8] 王萌, 苏亚伦, 陈若云. 常用中药川黄柏和黄连化学成分及生物活性比较研究 [D]. 北京: 北京协和医学院中国医学科学院, 2009.
- [9] 祁东利, 贾天柱, 廉莲. 黄柏炮制后化学成分转化研究 [J]. 中成药, 2010, 32(3): 443-447.
- [10] 廉莲, 贾天柱. 黄柏炮制原理研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2008.