

基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术分析不同加工方法对太子参化学成分的影响

侯 娅¹, 马 阳¹, 邹立思¹, 刘 晓¹, 刘训红^{1*}, 罗益远¹, 刘娟秀¹, 兰才武², 袁济端³

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 贵州昌昊中药发展有限公司, 贵州 凯里 556000

3. 柘荣县药业发展局, 福建 柘荣 355300

摘 要: **目的** 分析不同加工方法对太子参 *Pseudostellariae Radix* 中化学成分的影响。**方法** 采用 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术对 20 批样品进行测定, 通过多级串联质谱分析, 结合 Mass 数据、软件数据库及相关文献对总离子流图主要分子离子峰进行归属, 数据处理用 SIMCA-P 软件进行多元统计分析。**结果** 鉴定出 11 种化合物; 主成分得分图显示, 不同加工方法太子参样品间的差异得到明显区分, 通过载荷图筛选出差异显著的 11 种标志物, 且这 11 种标志物呈现出不同的变化规律。**结论** 为揭示不同加工方法对太子参代谢产物差异性的影响规律提供科学依据。

关键词: 太子参; UPLC-Triple TOF-MS/MS; 不同加工方法; 植物代谢组学; 主成分分析

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)19-2850-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.19.023

Changes of chemical composition of *Pseudostellariae Radix* using different processing methods by UPLC-Triple TOF-MS/MS

HOU Ya¹, MA Yang¹, ZOU Li-si¹, LIU Xiao¹, LIU Xun-hong¹, LUO Yi-yuan¹, LIU Juan-xiu¹, LAN Cai-wu², YUAN Ji-duan³

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Guizhou Changhao Chinese Medicine Co., Ltd., Kaili 556000, China

3. Zherong Pharmaceutical Development Bureau, Zherong 355300, China

Abstract: **Objective** To analyze the changes of chemical composition of *Pseudostellariae Radix* using different processing methods. **Methods** To determine 20 batches of samples by UPLC-Triple TOF-MS/MS and tandem mass spectrometry and by combining Mass data, database, and related software for total ion current literature major molecular ion peaks attributable. Data processing was carried out using SIMCA-P software to study multivariate statistical analysis. **Results** Thirteen compounds were identified, and the differences of PCA between samples of *Pseudostellariae Radix* using different processing methods were distinguishable, and 11 kinds of markers were picked from loading chart by significant differences. The 11 kinds of markers presented different changing laws. **Conclusion** The research provides experimental data for revealing the laws of different processing methods on metabolites of *Pseudostellariae Radix*.

Key words: *Pseudostellaria Radix*; UPLC-Triple TOF-MS/MS; different progressing methods; plant metabolomics; principal component analysis

太子参为大宗常用中药材, 系石竹科植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm 的块根^[1], 具益气健脾、润肺生津之传统功效及保护心肌功能、促进免疫、抗应激、治疗糖尿

病、止咳等药理作用, 临床上用于脾虚体倦、食欲不振、病后虚弱、气阴不足、自汗口渴、肺燥干咳等症, 是治疗小儿脾虚而食欲不佳之要药, 疗效确切, 临床用量大^[2]。由于太子参野生资源日渐减少,

收稿日期: 2014-04-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(81274016); 国家科技支撑计划项目(2011BAI13B04); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2014)

作者简介: 侯 娅(1989—), 女, 山西太原人, 在读硕士研究生, 主要从事中药品质评价研究。E-mail: YP0317@163.com

*通信作者 刘训红(1959—), 教授, 主要从事中药鉴定与品质评价研究。Tel: 13951976286 E-mail: liuxunh1959@sohu.com

而原药材市场需求量又逐年加大,全国现已在福建、贵州、安徽等地建立了大规模种植基地。由于药材加工方法的不同,造成太子参有效成分的变化,药材质量参差不齐,难以实现商品药材标准化及保证其临床使用有效性。如何筛选适宜的加工方法已成为太子参生产过程中的重要问题。

代谢组学是关于生物体系受刺激或扰动(如将某个特定的基因变异或环境变化)后其代谢产物(内源代谢物质)种类、数量及其变化规律的科学。它研究的是生物整体、系统或器官的内源性代谢物质的代谢途径及其所受内在或外在因素的影响^[3]。本研究借鉴植物代谢组学的研究思路,采用超高效液相-串联四极杆飞行时间高分辨质谱(UPLC-Triple TOF-MS/MS)技术分析不同加工方法对太子参代谢物差异性的影响,并通过多元统计分析找出差异变化显著的标志物及其变化规律,旨在探究加工方法对太子参化学成分的影响,从而为深入研究太子参药材的品质形成机制提供基础资料。

1 仪器与材料

Aquity UPLC™ 超高效液相色谱仪、Triple TOF™ 5600 System-MS/MS 电喷雾飞行时间高分辨质谱仪、Peakview 1.2 数据处理工作站,美国 AB Sciex 公司;SIMCA-P11.5 数据处理软件,瑞典 Umetrics;Anke TGL—16B 离心机,上海安亭科学仪器厂;BSA224S 电子天平,德国赛多利斯公司;R—210 旋转蒸发仪,瑞士步琦公司;HH—S 型水浴锅,巩义市英峪予华仪器厂;KQ—500B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司,超声功率 500 W。乙腈及甲酸,色谱纯,德国 Merck 公司;甲醇为化学纯,批号 081110865,南京化学试剂有限公司;水为超纯水,由 Millipore 纯水器制备。

实验样品实地采集于贵州施秉太子参规范化种植基地,用不同加工方法对药材进行处理。样品编号:S1~S4 为晒干(置阳光下晾晒),S5~S8 为晒搓(置阳光下晾晒至半干后搓去须根),S9~S12 为 40℃ 烘干,S13~S16 为 50℃ 烘干,S17~S20 为 60℃ 烘干。各样品均经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定,为石竹科孩儿参属太子参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根。留样保存于南京中医药大学中药鉴定实验室。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液制备

取太子参药材样品粉碎,过 80 目筛。精密称取

1.0 g 粉末置于 150 mL 锥形瓶中,加 50 mL 甲醇,超声处理(功率 250 W,频率 30 kHz)45 min 后冷却滤过。滤液用旋转蒸发仪浓缩至干,残渣加甲醇溶解并转移至 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀即得。

2.2 超高效液相色谱条件

色谱柱为 ODS C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相为 0.1%甲酸水溶液-乙腈,梯度洗脱:0~6 min, 15%~40%乙腈;6~10 min, 40%~50%乙腈;11~20 min, 50%~15%乙腈;体积流量 0.3 mL/min;柱温 35℃;进样量 10 μL;检测波长 203 nm。

2.3 质谱条件

电喷雾离子源(ESI)正离子模式;质量扫描范围 m/z 100~1 000;喷雾电压 4.5 kV;气帘气 35 L/min;雾化气 55 L/min;辅助气 55 L/min;离子源温度 400℃;碰撞电压 30 V;射入电压 10 V。

2.4 太子参化学成分的分离与鉴定

根据设定的液相色谱及质谱条件,取供试品溶液进样分析。太子参醇提液总离子流图见图 1。将原始数据导入 Peakview 1.2 进行峰识别、峰对齐、基线校正和峰面积归一化法预处理。对图 1 的正离子模式总离子流图中主要峰进行标记(峰 1~83)。在电喷雾一级谱中获得标记峰的相对分子质量信息,通过多级串联质谱分析并结合保留时间及相关文献对各主要分子离子峰进行归属^[4-12],最终确定其中 11 种化合物对应峰的相关信息,误差均小于 5×10^{-6} ,见表 1。

2.5 不同加工方法太子参的差异标志物识别

通过对 5 种不同加工方法的太子参主成分差异性进行分析,在本实验中采用主成分分析(principal component analysis, PCA)模型区别各组化学成分差异,通过在随机化 X 变量模型下对数据的解释程度值(R^2_X)和在随机化 Y 变量模型下对模型的预测能力参数值(Q^2)评价模型质量,其中 R^2_X 越接近 1 表示模型越稳定, $Q^2 > 0.5$ 表示预测率高。得到主成分分析的 PCA 得分图,见图 2。对其进行整体性的差异性分析,以平均值为中心,可以看出采用同一加工方法的 4 个太子参样本之间差异较小,而 5 种不同加工方法药材之间的差异则得到明显区分。进一步对造成不同加工方法太子参间差异成分进行识别,从而得到的各组成成分分布的载荷图,见图 3。离中心较远的点为影响不同种质间差异变化的化合

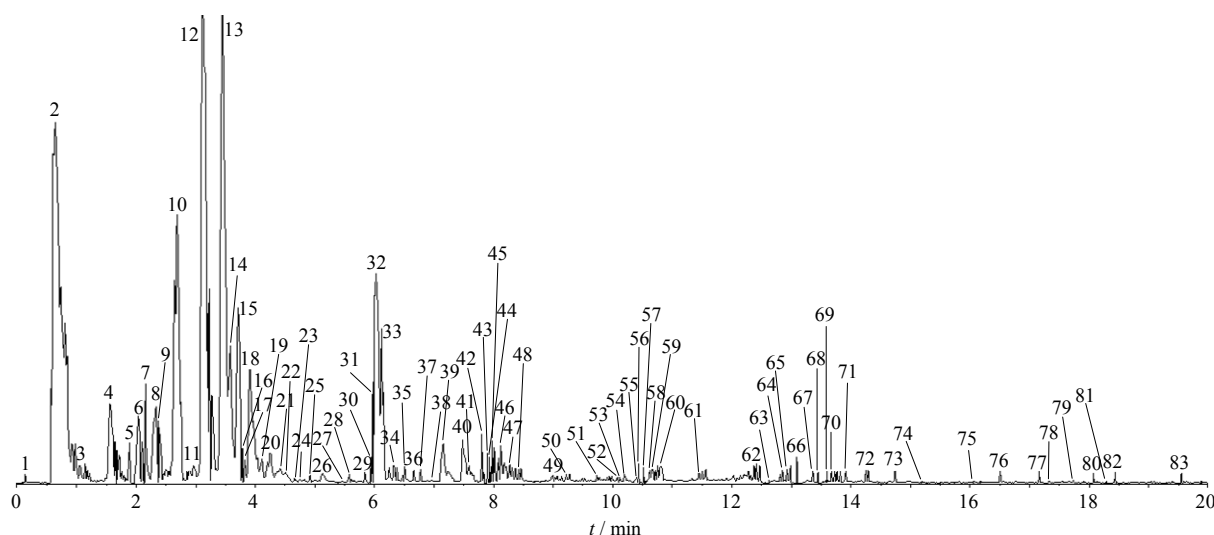


图 1 太子参 UPLC-Triple TOF-MS/MS 总离子流图 (S1)

Fig. 1 Total ion current chromatogram of *Pseudostellariae Radix* by UPLC-Triple TOF-MS/MS (S1)

表 1 太子参中主要化学成分分子离子峰鉴别

Table 1 Molecular ion peaks of components identified from *Pseudostellariae Radix*

峰号	t_R / min	分子式	[M+H] ⁺			成分鉴定	质谱数据 (m/z)
			测量值	理论值	误差 / $\times 10^{-6}$		
4	1.69	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	257.247 1	257.247 5	-0.6	棕榈酸	74.244 6、227.102 3、239.784 3、270.130 6
20	4.31	C ₂₅ H ₃₅ N ₅ O ₆	502.265 1	502.267 5	-4.8	pseudostellarin A	261.124 1、318.144 7、389.182 0
25	4.99	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	281.249 8	281.247 6	+4.6	亚油酸	67.038 3、81.465 5、199.347 6、213.118 7
26	5.29	C ₃₃ H ₄₆ N ₈ O ₈	683.351 6	683.351 1	+0.7	pseudostellarin B	302.150 9、399.204 1、513.249 2、570.270 3
31	6.02	C ₄₀ H ₅₈ N ₈ O ₈	779.445 9	779.445 0	+1.2	heterophyllin B	377.255 7、569.308 7、751.452 9
35	6.57	C ₃₈ H ₅₇ N ₈ O ₁₀	785.419 5	785.419 2	+0.4	pseudostellarin F	308.176 6、395.225 8、452.320 7、509.401 3、672.419 7
39	7.17	C ₃₇ H ₅₇ N ₇ O ₈	728.436 9	728.434 1	+3.8	heterophyllin A	197.129 5、310.213 8、457.220 4、514.306 0、627.385 1
40	7.49	C ₄₂ H ₅₆ N ₈ O ₉	817.424 9	817.424 3	+0.7	pseudostellarin G	245.127 6、332.162 7、536.249 8、746.391 5
42	7.85	C ₄₅ H ₆₇ N ₉ O ₉	878.512 9	878.513 5	-0.7	pseudostellarin E	252.140 7、365.217 7、618.358 9、765.348 9
49	8.99	C ₃₅ H ₄₈ N ₆ O ₇	665.367 6	665.365 7	+2.9	heterophyllin D	330.195 4、387.204 8、534.269 4、647.359 0
77	17.17	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	299.294 2	299.294 5	-1.0	十八碳酸	43.057 8、55.212 7、74.265 4、87.0156、101.122 6、143.565 3、255.523 1

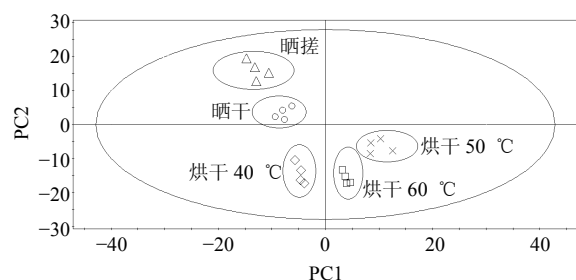


图 2 不同加工方法太子参在正离子模式下 PCA 图

Fig. 2 PCA chromatogram of *Pseudostellariae Radix* with different progressing methods in positive ion mode

物, 靠近中心的则是各种质间相应成分量基本不变的化合物。对上述差异点进行识别, 筛选出差异显著的 11 种标志物: 棕榈酸、heterophyllin D、pseudostellarin E、heterophyllin B、pseudostellarin G、heterophyllin A、pseudostellarin A、未知物 1 (峰 8, t_R 3.07 min)、未知物 2 (峰 7, t_R 2.70 min)、未知物 3 (峰 9, t_R 3.48 min) 和未知物 4 (峰 23, t_R 7.82 min)。

2.6 不同加工方法太子参差异标志物的量变化

提取差异成分在各组间对应的峰强度数值以代

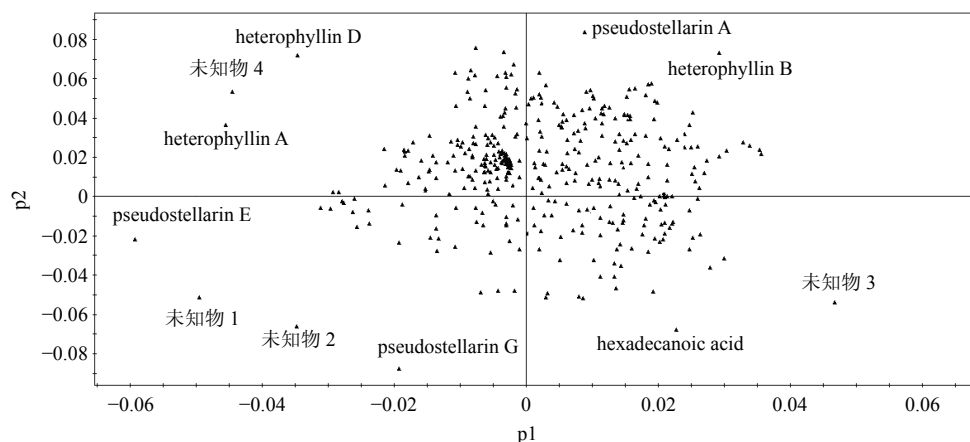


图 3 不同加工方法太子参在正离子模式下载荷图

Fig. 3 Loading chromatogram of *Pseudostellariae Radix* with different progressing methods in positive ion mode

表其量，对每一种加工方法太子参样品间同一物质峰强度的平均值和标准差进行计算和作图，能够得到 11 种差异成分在不同组间的质量分数变化^[13]，见图 4。总体趋势是：heterophyllin D 和未知物 4 的

量在 5 种不同加工方法太子参中基本一致；在 60 °C 烘干时，heterophyllin A、棕榈酸和 pseudostellarin A 的量相对较高，40 °C 烘干时，未知物 1 的量相对较高；经过晒搓的太子参中，pseudostellarin G、

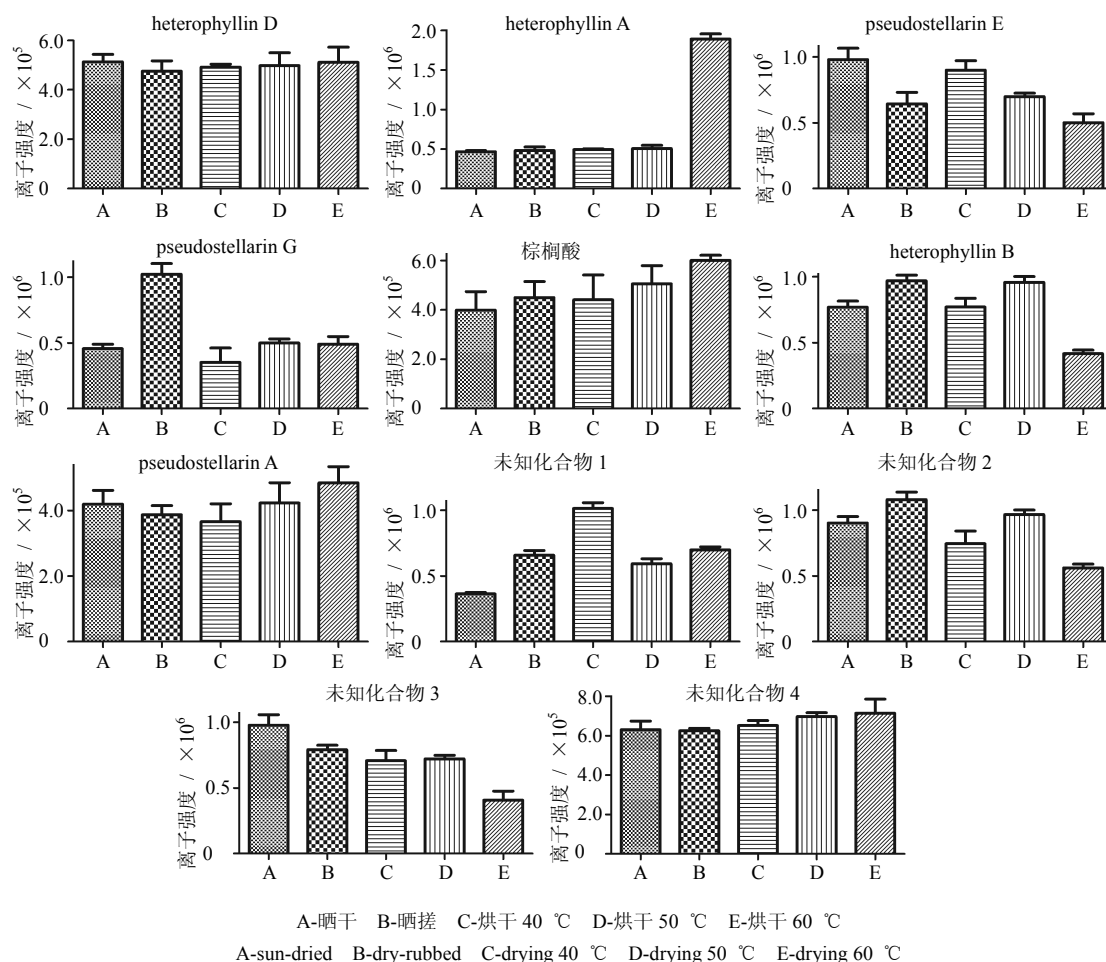


图 4 差异显著的标志物在不同加工方法的太子参中量变化趋势图

Fig. 4 Trend chart of marker contents in *Pseudostellariae Radix* with different processing methods

heterophyllin B 和未知物 2 的量相对较高;而未知物 3 和太子参环肽 E 的量在晒干的太子参中相对较高。

3 讨论

本实验供试品溶液制备中分别考察了甲醇、70%甲醇、水 3 种溶剂,结果表明甲醇为溶剂的色谱峰峰形优于其他 2 种溶剂。又考察超声提取 15、30、45 min,结果表明超声提取 45 min 明显比其他 2 个时间的峰面积值高。流动相的选择分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液,结果表明乙腈-水和乙腈-0.1%甲酸水溶液体系峰型类似,考虑到乙腈-0.1%甲酸水溶液分离度较好,最终确定了最佳的色谱条件。

建立不同加工方法太子参 UPLC-Triple TOF-MS/MS 植物代谢组学分析方法,结合多元统计分析对不同加工方法太子参中化学成分进行差异性分析。结果显示,经 3 种不同温度烘干的太子参药材中化学成分相对接近,且与其他 2 种加工方法太子参药材区别较大,提示烘干与晒干使太子参化学成分产生明显差异。不同加工太子参样品中标志物呈现出不同的变化规律, pseudostellarin E、pseudostellarin G、heterophyllin B、未知物 2 及未知物 3 的量在晒干或晒搓的样品中相对较高,而烘干的样品中棕榈酸、pseudostellarin A 及未知物 1 的量较高。由于药材本身含有分解代谢物的相关酶,不同加工方法可能对相关酶的失活程度有不同影响,因而造成代谢物质、量的差异。根据不同加工太子参中化学成分的差异性分析结果,结合民间实际加工方法,建议太子参加工以晒干或晒搓较为适宜。本实验结果为太子参药材加工方法的优选以及太子参药材品质形成机制的探讨提供基础资料。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

- [2] 彭华胜, 刘文哲, 胡正海. 太子参的生物学与化学成分的研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(3): 470-473.
- [3] 李春雨, 王 张, 王 平, 等. 基于代谢组学技术的中药效应物质基础及作用机制研究 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 918-922.
- [4] 傅兴圣, 邹立思, 刘训红, 等. UPLC-ESI-TOF MS/MS 分析太子参中环肽类成分 [J]. 质谱学报, 2013, 34(3): 179-184.
- [5] 秦民坚, 余永邦, 黄文哲. 江苏栽培太子参的化学成分研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(1): 38-40.
- [6] 王喆星, 徐绥绪, 邱 峰, 等. 太子参的化学成分研究 (II) [J]. 沈阳药学院学报, 1993, 10(1): 63-64.
- [7] Tan N H, Zhou J, Chen C X, *et al.* Cyclopeptides from the roots of *Pseudostellaria heterophylla* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(5): 1327-1330.
- [8] 丁中涛, 周 俊, 谭宁华, 等. 石竹科植物环肽研究进展 [J]. 化学研究与应用, 1999, 11(5): 492-494.
- [9] Morita H, Kayashita T, Takeya K, *et al.* Conformational analysis of a tyrosinase inhibitory cyclic peptide, pseudostellarin A, from *Pseudostellaria heterophylla* [J]. *Tetrahedron*, 1994, 50(40): 12599-12606.
- [10] Morita H, Kayashita T, Takeya K, *et al.* Pseudostellarins A-C, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla* [J]. *Tetrahedron*, 1994, 50(23): 6797-6804.
- [11] Morita H, Kayashita T, Kobata H, *et al.* Pseudostellarins D-F, new tyrosinase inhibitory cyclic peptides from *Pseudostellaria heterophylla* [J]. *Tetrahedron*, 1994, 50(33): 9975-9982.
- [12] Morita H, Kobata H, Kayashita T, *et al.* Pseudostellarin G, a new tyrosinase inhibitory cyclic octapeptide from *Pseudostellaria heterophylla* [J]. *Tetrahedron*, 1994, 35(21): 3563-3564.
- [13] 李 飞, 王宇光, 杨 亮, 等. UPLC-Q-TOF/MS 分析不同比例丹参配伍藜芦毒性生物碱变化规律 [J]. 化学学报, 2012, 70(21): 2257-2264.