

狗脊升华与挥发性成分的 UPLC/Q-TOF-MS 分析

徐 钢¹, 单国顺², 鞠成国^{1,3}, 周远征¹, 张 凡¹, 贾天柱^{1,3*}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600
2. 辽宁省中医药研究院, 辽宁 沈阳 110034
3. 辽宁省中药炮制工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600

摘要: 目的 研究狗脊升华与挥发性成分, 探寻其炮制过程中产生刺激性成分的来源。方法 采用模拟砂烫、升华、水蒸气蒸馏、直接提取挥发油 4 种不同方式从狗脊中收集升华与挥发性成分, 并用 UPLC/Q-TOF-MS 法进行定性分析。结果 4 种方法共检识 34 个化合物, 得出其中 26 个化合物的推荐分子式和名称, 主要为有机酸类、有机酸酯类、生物碱类、嘌呤类、嘧啶类、小分子醛酮类、多酚类、甾体类、单萜类等化合物, 相对分子质量集中在 100~400。结论 检识的共有化合物柠檬酸、6-姜辣素、5-羟甲基糠醛等具有一定刺激性, 应该是狗脊炮制过程中产生的刺激性成分。

关键词: 狗脊; 升华与挥发性成分; UPLC/Q-TOF-MS; 炮制; 刺激性

中图分类号: R286.023 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)16-2308-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.16.023

Analysis on sublimation and volatile components of *Cibotium barometz* using UPLC/Q-TOF-MS

XU Gang¹, SHAN Guo-shun², JU Cheng-guo^{1,3}, ZHOU Yuan-zheng¹, ZHANG Fan¹, JIA Tian-zhu^{1,3}

1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China
2. Liaoning Institute of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China
3. Chinese Materia Medica Processing Engineering Center of Liaoning Province, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To research on the sublimation and volatile components of *Cibotium barometz* and to explore its irritant ingredient sources during the processing. **Methods** Using the simulation of sand iron, sublimation, steam distillation, and volatile oil extractor to collect the sublimation and volatile components from *C. barometz*, and using UPLC/Q-TOF-MS for qualitative analysis. **Results** A total of 34 compounds were checked out by the four methods and 26 out of them were recommended molecular formula and named, mainly including organic acids, organic acid esters, alkaloids, purines, pyrimidines, small molecular aldehyde ketones, polyphenols, steroids, single terpenes, etc. The molecular volume of the compounds is concentrated within 100—400 ranges. **Conclusion** Citramalic acid, 6-gingerol, and 5-methylfurfural have the irritation, which should be the produced irritant components during *C. barometz* processing.

Key words: *Cibotium barometz* (L.) J. Sm.; sublimation and volatile components; UPLC/Q-TOF-MS; processing; irritation

狗脊为蚌壳蕨科植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. 的干燥根茎, 作为传统中药, 始载于《神农本草经》, 列为草部中品。历版《中国药典》收载, 用于治疗风湿痹痛、腰膝酸软、下肢无力。狗脊在临床应用前需对其进行炮制^[1], 而在炮制过程中所产生的刺激性成分在一定程度上标志

着其炮制的程度和时间, 有必要弄清楚其成分组成。本研究在前期实验^[2-3]基础上, 根据狗脊的炮制工艺和化学成分性质, 设计了模拟砂烫、升华、水蒸气蒸馏^[4]和直接提取挥发油 4 种方法, 并收集升华与挥发性成分, 采用 UPLC/Q-TOF-MS 对其进行鉴定分析, 以探寻其中的刺激性来源。

收稿日期: 2012-10-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30973938)

作者简介: 徐 钢 (1988—), 男, 山东省蓬莱市人, 在读硕士研究生。从事中药炮制工艺及原理研究。

Tel: 15840655141 E-mail: xugang.2011@yahoo.cn

*通信作者 贾天柱 Tel: (0411)87586499 E-mail: jiatz@lnutcm.edu.cn

1 材料与仪器

1.1 材料

生品狗脊饮片购自安徽省亳州市安东药业, 经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为蚌壳蕨类科植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. 的干燥根茎。甲醇为分析纯, 乙腈为色谱纯, 水为超纯水。

1.2 仪器

Agilent 1290 UPLC-6520/Q-TOF-MS (美国 Agilent 公司), Olympus CX31RTS 型光学显微镜 (Olympus 公司), 微型高速万能试样粉碎机 (北京市永光明医疗仪器厂), ZDHW 型调温电热套 (北京市永光明医疗仪器厂), 电子万用炉 (天津泰斯特仪器有限公司), HH-4 数显恒温水浴锅 (常州国华电器有限公司), KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山是超声仪器有限公司), 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 样品的制备与收集

2.1.1 模拟砂烫法 取生狗脊饮片 (面积大小约 4 cm^2) 约 100 g, 置预先放好砂层 (厚约 2.5 cm) 的容器内, 然后将自制活性炭罩固定在容器上, 用以吸附挥发性气体^[5]。另备温度计测量砂温。先武火加热, 待温度上升到 180 °C 时, 调小火, 保持温度在 180~190 °C^[6], 收集气体 30 min, 停止加热。小心将活性炭转移至具塞锥形瓶中, 加入甲醇 20 mL, 超声 1 h, 滤过, 取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜作为供试品溶液 1 备用。

2.1.2 升华法 取生狗脊粉末 (过 3 号筛) 约 1.5 g, 平铺于瓶盖内, 瓶盖上盖一载玻片^[7], 其上置一装有冷水的小烧杯, 加热, 载玻片上出现水珠时, 迅速用脱脂棉擦尽后, 继续加热, 以温度计监测温度。温度升至 170 °C 时, 停止升温, 取下载玻片在显微镜下观察晶体颜色、形状等。之后用 2 mL 甲醇冲洗载玻片, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液 2 备用。

2.1.3 水蒸汽蒸馏法 取生狗脊粉末 (过 3 号筛) 约 200 g 放入 1 000 mL 圆底烧瓶, 加适量水, 按水蒸气蒸馏法进行蒸馏, 持续 20 min, 取收集液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液 3 备用。

2.1.4 挥发油提取法 取生狗脊粉末 (过 3 号筛) 约 200 g 装入 1 000 mL 圆底烧瓶, 加适量水, 连接挥发油测定器, 加热提取 5 h, 得淡黄色固体, 2 mL 甲醇溶解后, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液 4 备用。另收集提取器中的下层水溶液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 作为供试品溶液 5 备用。

2.2 UPLC/Q-TOF-MS 检测

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 1.8 μm), 流动相: 乙腈 (A) - 水 (B), 梯度洗脱, 供试品溶液 1、2 的洗脱条件: 0~5 min, 5%~55% A; 5~7 min, 55%~85% A; 7~15 min, 85%~100% A; 15~20 min, 100% A。供试品溶液 3~5 的洗脱条件: 0~5 min, 5%~45% A; 5~15 min, 45%~90% A; 15~20 min, 90%~100% A; 20~25 min, 100% A。检测波长 254 nm, 柱温 50 °C, 体积流量 0.5 mL/min, 进样量为 1 μL 。

2.2.2 质谱条件 采用 ESI 离子源, 正离子检测, 扫描范围 m/z 100~1 000, 脱溶剂气温度: 350 °C, 脱溶剂气体积流量: 9 L/min, 喷雾器压力: 240 kPa, 毛细管电压: 4 000 V。

2.2.3 数据分析 实验结果均采用仪器自带工作站进行解谱分析, 给出精确相对分子质量, 并根据最新 MassBank 在线液质数据库^[8-9]进行归属。

2.3 稳定性试验

精密吸取供试品溶液 1~5 各 1 μL , 各分别于 0、1、2、4、12、20 h 进样检测, 各色谱峰的保留时间的 RSD 值均小于 0.3%, 峰面积的 RSD 值均小于 3.0%。

2.4 精密度试验

精密吸取 1 μL 供试品溶液 3, 依法连续进样 6 次, 各色谱峰的保留时间的 RSD 值均小于 0.3%, 峰面积的 RSD 值均小于 3.0%。

2.5 重复性试验

按“2.1”项下各方法制备供试品溶液各 6 份, 精密吸取供试品溶液 1~5 各 1 μL , 分别依法检测, 各色谱峰的保留时间的 RSD 值均小于 0.3%, 峰面积的 RSD 值均小于 3.0%。

3 结果与分析

4 种方法制备供试品共检识化合物 34 个, 给出其中 26 个化合物的推荐分子式和名称。结果见表 1~4。色谱图见图 1。

从实验结果中看到狗脊中的升华与挥发性成分包括了有机酸类、有机酸酯类、生物碱类、嘌呤类、嘧啶类、小分子醛酮类、多酚类、甾体类、单萜类等化合物, 相对分子质量集中在 100~400。除棕榈酸、亚油酸、 β -谷甾醇等曾有报道^[1], 多数为本次新检出的化合物, 其中, 柠檬酸、6-姜辣素、5-羟甲基糠醛在模拟砂烫法等 2 种以上的样品收集方法中均有检出, 柠檬酸、6-姜辣素、月桂酸、5-羟甲基糠醛这几个化合物通过 Merck Index 检索等资料

表1 狗脊模拟砂烫样品分析结果

Table 1 Results of sand iron simulation

编号	t_R /min	离子	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差 / 10^{-6}	分子式	化合物
1	2.240	$[M]^+$	126.031 4	126.031 6	-1.6	$C_6H_6O_3$	5-羟甲基糠醛
2	6.339	$[M]^+$	200.196 1	200.195 2	4.5	$C_{12}H_{24}O_2$	月桂酸
3	7.792	$[M]^+$	228.226 9	228.226 5	1.8	$C_{14}H_{12}O_3$	白藜芦醇
4	8.551	$[M+H]^+$	303.294 2	303.293 5	2.3	$C_{17}H_{21}NO_4$	可卡因
5	9.100	$[M+H]^+$	148.019 5	148.019 7	-1.4	$C_5H_8O_5$	柠草酸
6	9.343	$[M+H]^+$	332.332 9	—	—	—	未知
7	10.715	$[M]^+$	360.355 2	360.355 0	1.4	$C_{21}H_{28}O_5$	可的松
8	12.863	$[M+H]^+$	136.108 5	136.108 8	-2.2	$C_{10}H_{16}$	柠檬烯
9	14.285	$[M]^+$	391.276 4	—	—	—	未知

表2 狗脊升华样品分析结果

Table 2 Results of sublimation sample

编号	t_R /min	离子	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差 / 10^{-6}	分子式	化合物
1	2.235	$[M]^+$	126.031 2	126.031 6	-3.2	$C_6H_6O_3$	5-羟甲基糠醛
10	2.842	$[M+H]^+$	109.057 6	109.057 8	-1.8	C_6H_7NO	氨基苯酚
11	3.827	$[M]^+$	215.087 0	215.086 8	0.9	$C_{10}H_9N_5O$	6-糠胺嘌呤
12	4.021	$[M]^+$	215.087 3	215.086 8	2.3	$C_{10}H_9N_5O$	激动素
13	4.118	$[M]^+$	141.051 8	141.051 0	5.7	$C_5H_7N_3O_2$	6-氨基-1-甲基尿嘧啶
14	4.554	$[M+H]^+$	256.097 3	256.097 4	-0.4	$C_{16}H_{32}O_2$	棕榈酸
15	5.023	$[M]^+$	208.092 6	208.092 0	2.9	$C_{12}H_{16}O_3$	戊基水杨酸酯
16	5.168	$[M]^+$	241.102 5	241.102 1	1.7	$C_{15}H_{15}NO_2$	甲灭酸
17	5.378	$[M]^+$	255.081 8	255.081 6	0.8	$C_{15}H_{13}NO_3$	氨芬酸
18	6.169	$[M+H]^+$	182.061 8	182.062 0	-1.1	$C_9H_{10}O_4$	丁香醛
19	6.411	$[M+H]^+$	248.071 6	—	—	—	未知
20	7.364	$[M+H]^+$	294.114 0	294.114 1	-0.3	$C_{17}H_{26}O_4$	6-姜辣素
21	7.542	$[M+H]^+$	264.102 5	264.102 0	1.9	$C_{15}H_{24}N_2O_2$	丁卡因
22	7.752	$[M+H]^+$	227.228 5	—	—	—	未知
5	9.108	$[M+H]^+$	148.020 4	148.019 7	4.7	$C_5H_8O_5$	柠草酸
23	9.512	$[M]^+$	332.325 9	—	—	—	未知
24	14.341	$[M+H]^+$	390.277 7	390.277 5	0.5	$C_{23}H_{34}O_5$	异羟基洋地黄毒苷元

表3 狗脊水蒸气蒸馏及挥发油提取器水层样品分析结果

Table 3 Results of steam distillation and water layer of volatile oil extractor samples

编号	t_R /min	离子	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差 / 10^{-6}	分子式	化合物
25	5.137	$[M]^+$	396.792 3	—	—	—	未知
26	13.341	$[M+H]^+$	280.166 5	280.166 4	0.4	$C_{18}H_{32}O_2$	亚油酸
5	13.615	$[M+H]^+$	148.019 8	148.091 7	0.7	$C_5H_8O_5$	柠草酸
27	13.648	$[M+H]^+$	300.134 9	300.134 3	2.0	$C_{16}H_{16}N_2O_4$	甜菜宁
28	15.198	$[M+H]^+$	340.259 6	340.259 0	1.8	$C_{22}H_{44}O_2$	山萘酸

表4 狗脊挥发油样品分析结果

Table 4 Results of volatile oil samples

编号	t_R /min	离子	测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差 / 10^{-6}	分子式	化合物
29	1.816	$[M]^+$	173.958 1	173.958 4	-1.7	$C_7H_{10}O_5$	莽草酸
30	6.964	$[M+H]^+$	347.267 2	—	—	—	未知
31	7.739	$[M]^+$	205.121 4	205.121 0	2.0	$C_{10}H_{15}N_5$	玉米素
32	12.132	$[M]^+$	267.165 9	267.165 5	1.5	$C_{17}H_{17}NO_2$	脱水吗啡
20	12.778	$[M+H]^+$	294.114 4	294.114 1	1.0	$C_{17}H_{26}O_4$	6-姜辣素
33	16.229	$[M]^+$	323.251 6	—	—	—	未知
34	19.771	$[M]^+$	414.258 3	414.258 2	0.2	$C_{29}H_{50}O$	β -谷甾醇

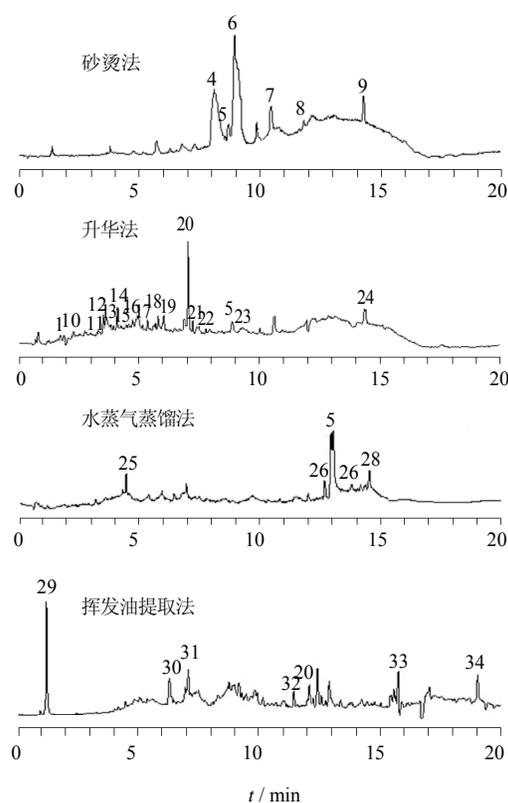


图 1 狗脊中升华与挥发性成分色谱图
Fig.1 Chromatograms of sublimation and volatile components in *C. barometz*

查阅发现其均具有一定的刺激性, 应该为狗脊炮制过程中刺激眼睛成分的主要来源, 可见炮制过程降低了狗脊本身的副作用而同时增加了有效成分^[10-13]。

4 讨论

本实验采用 UPLC/Q-TOF-MS 作为分析仪器, 其具备了高分离度、高速度、高灵敏度、精确相对分子质量等众多特点^[14], 尤其适用于中药多组分、复杂成分的分离, 定性鉴别。

本实验自创了模拟砂烫法用以收集其在烫制过程中升华与挥发性成分, 装置简易可行, 操作中要注意将生狗脊饮片均匀插入容器内, 保证其既与河砂接触受热, 又留有部分与空气充分接触, 逼真地模拟了砂烫全过程, 很好地收集了供试品成分。在升华实验中, 笔者通过显微镜观察, 发现如贾天柱^[3]、张昌禧^[16]所述淡黄色菱状针晶, 而生品粉末中并不存在, 可作为狗脊药材定性鉴别依据之一。在各方法收集的样品处理上关键是要注意不再浓缩, 以避免二次受热影响结果准确性。

狗脊炮制过程中可产生刺激性成分, 可能是一种或几种物质。其途径无非是升华或挥发, 故本实

验设计了 4 种方法, 力图全面收集炮制过程中产生的各种试样。这 4 种样品收集方法各有特点, 从不同角度对狗脊中升华与挥发性成分进行了较全面的考察, 并对各实验方法进行了观察及结果比较。

在对实验过程中气味物质比较及实验结果的分析处理过程中, 发现供试品溶液 3 和 5 的气味和图谱高度相似, 这提示水蒸气蒸馏法提取收集的水溶液与挥发油提取后的下层水溶液可能是相同的, 这一研究发现可以为简化实验装置, 合并实验方法提供参考, 即采用挥发油提取器法同时得到其油层和水层, 而不另进行水蒸气蒸馏法考察。当然, 这一发现还需要大量实验进行重复验证。

对比这 4 种方法制备的物质, 其中模拟砂烫和升华法中收集的产物主要以升华性成分为主, 而水蒸汽蒸馏和挥发油提取器提取的产物则主要以挥发性成分为主。这里的挥发性成分主要指的是液体性成分如挥发油等, 以区别于升华物。从实验结果看, 认为后 2 种方法中酚、酸类化合物检出较多, 相比之下, 前 2 种方法得到的化合物种类更为繁杂, 这可能就与实验中用到的提取溶媒水相关。狗脊炮制过程中刺激性的产生, 实际就是一个固体升华和液体挥发的过程。这其中既包括狗脊中自身具有的刺激性物质如柠檬酸、6-姜辣素、月桂酸等通过简单的物理变化受热挥散出来, 同时又存在受热过程中发生的化学反应由糖分解产生糠醛类物质如 5-羟甲基糠醛等小分子醛酮类化合物^[13], 其同样具有刺激性。

综上所述, 中药狗脊炮制过程中会产生刺激眼睛现象, 导致该现象的化学物质应该是一系列刺激性升华物与挥发性成分组成的混合组分, 其来源于自身存在及化学反应生成, 标志了炮制过程中的物质变化, 值得关注。

参考文献

- [1] 徐 钢, 鞠成国, 于海涛, 等. 中药狗脊炮制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 238-242.
- [2] 贾天柱, 李 军, 解世全, 等. 狗脊及其炮制品挥发油成分的比较研究 [J]. 中国中药杂志, 1996, 21(4): 216-217.
- [3] 贾天柱, 陈焕亮, 解世全, 等. 狗脊升华物中 5-羟甲基糠醛分析 [J]. 中成药, 2002, 24(10): 768-771.
- [4] 程 彬, 付晓霞, 谢 朋, 等. 植物挥发物的收集方法 [J]. 吉林林业科技, 2009, 38(4): 32-35.
- [5] 李 婕, 羌 宁. 活性炭吸附回收挥发性有机物的研究进展 [J]. 化工环保, 2008, 28(1): 24-28.

- [6] 李 军. 中药狗脊炮制原理研究 [D]. 大连: 辽宁中医药大学药学院, 2001.
- [7] 黄晓雪, 包海鹰, 李 玉. 僵蚕升华物的研究 [A]. // 第八届海峡两岸菌物学学术研讨会论文集 [C]. 长春: 海峡两岸菌物学学术研讨会 2007.
- [8] 蓬莱尚幸, 二瓶義人, 西岡孝明. 質量分析スペクトルデータベース MassBank における SOAP API サービスの開発 [J]. *J Comput Aided Chem*, 2011(12): 11-25.
- [9] Horai H, Arita M, Kanaya S, *et al.* MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences [J]. *J Mass Spectrom*, 2010, 45: 703-714.
- [10] 于海涛, 鞠成国, 章 琦, 等. 狗脊生、制品不同提取部位对成骨细胞的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(24): 36-39.
- [11] 许 柎, 步显坤, 鞠成国, 等. 狗脊炮制品化学成分研究 [J]. 中成药, 2009, 31(7): 1072-1074.
- [12] 许 柎, 曹 跃, 周 翎, 等. 狗脊炮制前后抗氧化活性的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(11): 2424-2426.
- [13] 许 柎, 贾天柱. 烫狗脊炮制过程的化学反应及产物研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(15): 2066-2070.
- [14] Wu H X, Yang C Y, Wang Z H, *et al.* Metabolism profile of quinocetone in swine by ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2012, 37: 141-154.
- [15] 张昌禧, 程立士, 竺耿生, 等. 192 种中药材微量升华试验 [J]. 现代应用药学, 1988(3): 18-20.