

基于拟靶标代谢组学考察不同煎煮方式对大黄功效组分煎出的影响

周文卷, 高德岷, 耿馨悦, 吕姝静, 蒋宇航, 高晓燕*

北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: **目的** 采用拟靶标代谢组学的研究方法揭示不同煎煮时间和不同煎煮温度对大黄煎出的蒽醌类、蒽酮类及鞣质类等化学成分的影响, 为大黄临床用药提供依据。 **方法** 利用线性离子阱-静电场轨道阱质谱 (LTQ-Orbitrap MSⁿ) 准确挖掘大黄各类化学成分的特征离子, 通过特征离子确定尽量多的化学成分离子对, 利用三重四级杆-质谱 (QQQ-MS) 的多反应监测 (MRM) 模式获取各种成分的峰面积, 采用多元统计分析结合配对 *t* 检验比较不同煎煮方式对大黄煎出化学成分的影响。 **结果** 煎煮时间和煎煮温度对大黄煎出化学成分均有影响, 短时间煎煮 (15 min) 有利于双蒽酮苷类和蒽醌苷类成分煎出, 长时间煎煮 (60 min) 则利于鞣质类成分煎出; 与沸水浸泡相比, 沸水煎煮有利于蒽醌类、鞣质类成分煎出。 **结论** 采用拟靶标代谢组学的方法, 明确指出了短时间煎煮或浸泡利于大黄泻下功效的发挥, 长时间沸水煎煮利于清热解毒功效的发挥, 为大黄的临床应用提供了参考。

关键词: 大黄; 煎煮方式; 拟靶标代谢组学; 化学成分; 功效; LTQ-Orbitrap-MSⁿ; QQQ-MS; MRM; 多元统计分析; 双蒽酮苷类成分; 蒽醌苷类成分; 鞣质类成分; 泻下攻积; 清热解毒

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)10-2755-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.017

Effects of different decoction methods on functional components of rhubarb based on pseudo-targeted metabolomics

ZHOU Wen-juan, GAO De-min, GENG Xin-yue, LV Shu-jing, JIANG Yu-hang, GAO Xiao-yan

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: **Objective** The effects of different decoction time and different decoction temperature on its chemical constituents of anthraquinones, anthrone, and tannins were revealed by pseudo-targeted metabolomics, which provided the basis for clinical use of rhubarb. **Methods** Using LTQ-Orbitrap-MSⁿ to accurately excavate the characteristic ions of various chemical components of rhubarb, the ion pairs of chemical components were determined as much as possible by characteristic ions to obtain the peak area of various components by using the MRM mode of QQQ-MS. The effects of different decoction methods on the chemical components of rhubarb was compared by multivariate statistical analysis combined with paired *t* test. **Results** Both decoction time and decoction temperature have impacts on the chemical components of rhubarb decoction. Short-term decocting for 15 min was beneficial to the dissolution of dianthrone glycosides and anthraquinone glycosides, while long-term decocting for 60 min was beneficial to the dissolution of tannins; Compared with boiling water maceration, boiling water decoction was more favorable for the dissolution of anthraquinones and tannins. **Conclusion** This paper adopts the method of pseudo-targeted metabolomics, and clearly points out that short-term decocting or maceration is conducive to exerting the laxative effect of rhubarb, and long-time boiling decocting is conducive to exerting clearing heat and detoxifying efficacy, which provides a reference for the clinical application of rhubarb.

Key words: rhubarb; different decoction methods; pseudo-targeted metabolomics; chemical components; efficacy; LTQ-Orbitrap-MSⁿ; QQQ-MS; MRM; multivariate statistical analysis; dianthrone glycosides; anthraquinone glycosides; tannins; purgation; clearing heat and detoxification

收稿日期: 2020-02-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673562); 国家自然科学基金资助项目 (81973467); 北京中医药大学 2020 年度基本科研业务费重点攻关项目 (2020-JYB-ZDGG-033)

作者简介: 周文卷 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: zhouwenjuan5113@163.com

*通信作者 高晓燕 (1967—), 博士, 教授, 主要从事中药分析及药效物质研究。Tel: (010)84738618 E-mail: gaomiaoyan@bucm.edu.cn

大黄是传统的大宗中药, 俗称“将军”, 其性寒、味苦, 具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经、利湿退黄等功效, 是诸多传统方剂的重要组成部分。据统计, 含有大黄的古方有 7 000 多首^[1], 不同方剂中大黄的煎煮方式不尽相同, 主要有先煎、同煎、后下、不煎等^[2]。研究发现, 大黄发挥不同功效与其煎煮方式密切相关^[3], 如大黄在“大陷胸汤”中“先煎”, 发挥泻热逐水破结的功效^[2]; 在“桃核承气汤”中大黄与其他药味“同煎”, 可入血分并助瘀血下行^[4]; 在“大承气汤”中大黄“后下”, 用于峻烈泻下^[5]; 在“大黄黄连泻心汤”中大黄“不煎”, 而是短时间浸泡, 取大黄清泄中焦虚热消痞之功^[6]。以上方剂中大黄的不同煎煮方法说明大黄煎煮方式与其功效有关, 而功效又基于化学物质基础, 因此, 从传统煎煮方式与功效之间的关系为切入点, 揭示成分与功效之间的相关性, 对于指导临床含有大黄的方剂煎煮、保证和提高疗效及其质量标准提升具有重要意义。

对于中药而言, 其有效成分多数为不同类型的多种小分子次生代谢产物, 有限的指标成分的含量测定不足以客观反映中药的质量状况, 同时, 不同指标之间的比较也无法反映中药质量的整体性。拟靶标代谢组学, 作为一种应用于多指标之间进行整体性比较的方法, 综合了非靶向代谢组学的高通量、无偏倚检测与靶向代谢组学的高特异性、准确定量的特点, 具有稳定性好、线性范围广、灵敏度高、数据集简单、覆盖面广等优点^[7]。最重要的是, 拟靶标代谢组学克服了植物药中某些对照品不易获得的难题, 在化合物的选择及定量的准确性方面具有明显优势, 有助于对中药中的化学成分进行全面检测与定量比较。对于植物代谢组学而言, 样品选择的代表性至关重要。研究发现, 为了保证样品足够的代表性, 某些差异指标的组内差异会大于组间差异, 即样本的代表性淹没了某些差异。因此, 本研究采用拟靶标代谢组学的数据采集方法, 利用多元统计分析与配对 *t* 检验相结合的数据处理策略, 进行大黄多成分整体性比较和具体差异化合物不同煎煮方式的比较, 既实现了对大黄中化学成分整体性差异的评价, 又能客观地反映出因样品代表性导致的被淹没掉的差异。

本实验首先利用高效液相色谱串联线性离子阱-静电场轨道阱质谱 (HPLC-LTQ-Orbitrap-MSⁿ) 准确挖掘大黄中各类化合物的特征离子及对应的离子

对, 之后利用超高效液相色谱串联三重四级杆质谱 (UPLC-QQQ-MS) 中的多反应监测 (MRM) 模式检测大黄样品中所有离子对的峰面积, 将这些离子对的峰面积拟合到一个色谱图上, 采用正交偏最小二乘-判别分析 (OPLS-DA) 和配对 *t* 检验进行数据处理, 寻找差异成分, 明确大黄煎煮方式对化学成分的影响。基于本研究, 参照大黄成分与功效的关系, 指导临床用药, 以期提高临床疗效。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Milli-Q 超纯水系统, 美国 Millipore 公司; Accela 型高效液相色谱仪, 美国 Agilent 公司; 线性离子阱-静电场轨道阱组合式高分辨质谱仪 (Thermo-Fisher LTQ-Orbitrap XL), 美国 Thermo-Fisher 公司; Waters UPLC-Xevo TQ-S 三重四级杆液质联用仪, 美国 Waters 公司; Sartorius BT25S 型电子分析天平, 北京赛多利斯仪器有限公司; KQ-500E 数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; ZNHW-100 数显恒温电热套, 北京中仪泓瑞科技发展有限公司。

1.2 试剂

对照品番泻苷 A (批号 180623, 质量分数 ≥ 98%), 购自北京四面体生物科技有限公司; 对照品番泻苷 B (批号 r0112, 质量分数 ≥ 98%), 购自美国 BioRuler 公司; 对照品大黄酸 (批号 110757-201607)、芦荟大黄素 (批号 110795-201710)、大黄素 (批号 110756-201913)、大黄酚 (批号 110796-201621)、大黄素甲醚 (批号 110758-201616), 质量分数均 ≥ 98%; 对照品原儿茶酸 (批号 110809-201906, 质量分数 ≥ 97.7%); 对照品芦荟大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 (批号 15061306)、大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷 (批号 15061308), 质量分数均 ≥ 98%, 购自中国食品药品检定研究院; 对照品没食子酸 (批号 15051616)、儿茶素 (批号 15051506)、表儿茶素 (批号 15051602)、表儿茶素没食子酸酯 (批号 15050602), 质量分数均 ≥ 98%, 购自成都普瑞法科技发展有限公司。甲醇、乙腈、甲酸, 质谱级, 赛默飞世尔科技有限公司; 屈臣氏蒸馏水, 广州屈臣氏食品饮料有限公司。

本实验所用大黄饮片, 均经北京中医药大学中药学院屠鹏飞教授鉴定为蓼科大黄属植物唐古特大黄 *Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf. 的干燥根及根茎经加工后制成的饮片。生大黄饮片详细信息见表 1。

表 1 生大黄饮片样品信息
Table 1 Rhubarb pieces sample information

编号	产地	批号	厂家	加工方式
S1	四川	171202	广州至信中药饮片有限公司	净制, 浸润, 切制为 2~4 mm 厚片, 75~80 °C 热风干燥
S2	四川	16122105	盛实百草药业有限公司	净制, 浸润, 切制为 2~4 mm 厚片, <60 °C 自然+电能干燥
S3	青海德令哈	2018010652	上海德华国药制品有限公司	净制, 软润, 切制为 2~4 mm 厚片,
S4	青海果洛州	2018010656	上海德华国药制品有限公司	<80 °C 蒸气干燥
S5	甘肃	2018010657	上海德华国药制品有限公司	
S6	青海互助	ZYBZH-大黄-02-002	兰州佛慈制药股份有限公司	净制, 浸润, 切制为 3 mm 厚片, 70~80 °C / 60~70 °C 烘箱/红外干燥

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 考察煎煮时间的样品制备 取以上 6 个来源的大黄片, 粉碎, 过 1 号筛 (10 目, 粗粉), 每个来源的样品分为 2 组, 分别用冷水煎煮 60 min (I 组) 和 15 min (II 组)。取各样品粉末约 5 g, 精密称定, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 加入 10 倍量水, 称定质量, 加热回流, I 组煮沸 60 min, II 组煮沸 15 min, 分别取下放冷, 补足损失质量。6 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 200 μ L, 用 50% 甲醇稀释至 1 mL, 混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 备用。

2.1.2 考察煎煮温度的样品制备 取以上 6 个来源的大黄片, 粉碎, 过 1 号筛 (10 目, 粗粉), 每个来源的样品分为 2 组, 取各样品粉末约 5 g, 精密称定, 分别沸水煎煮 15 min (III 组) 和沸水浸泡 15 min (IV 组)。取 10 倍量水, 置于 100 mL 圆底烧瓶中, 称定质量, 加热回流至沸腾, 2 组同时加入大黄粉末, III 组加热回流 15 min, IV 组于沸水中浸泡 15 min, 分别取下放冷, 补足损失质量。6 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 200 μ L, 用 50% 甲醇稀释至 1 mL, 混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 备用。

2.1.3 质控样品制备 (QC) 取上述制备的各样品溶液各 200 μ L, 共 4.8 mL, 混合均匀, 即得质量浓度为 0.1 g/mL (以样品称定质量计) 的 QC 样本溶液, 用于方法的建立和考察。

2.1.4 对照品溶液制备 精密称取番泻苷 A 1.05 mg、番泻苷 B 1.03 mg、芦荟大黄素 1.07 mg、大黄酸 1.02 mg、大黄素 1.21 mg、大黄酚 1.18 mg、大

黄素甲醚 1.26 mg、原儿茶酸 1.05 mg、芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 1.09 mg、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷 1.10 mg、没食子酸 1.24 mg、儿茶素 1.14 mg、表儿茶素 1.16 mg、表儿茶素没食子酸酯 1.22 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液, 密封, 4 °C 保存, 备用。

2.2 测定条件

2.2.1 色谱条件 HPLC-LTQ-Orbitrap-MSⁿ 分析的色谱条件: 采用 Agilent SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 2%~11% 乙腈; 10~20 min, 11%~13% 乙腈; 20~35 min, 13%~16% 乙腈; 35~55 min, 16~20% 乙腈; 55~85 min, 20%~33% 乙腈; 85~100 min, 33%~60% 乙腈; 100~120 min, 60% 乙腈; 柱温为 40 °C; 体积流量为 1 mL/min; 进样量为 10 μ L。

UPLC-QQQ-MS 分析的色谱条件: 采用 Waters AcquityTM BEH C₁₈ (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0~1 min, 2% 乙腈; 1~6 min, 2%~25% 乙腈; 6~7 min, 25%~100% 乙腈; 7~8 min, 100% 乙腈; 8~8.5 min, 100%~2% 乙腈; 8.5~10 min, 2% 乙腈; 柱温为 40 °C; 体积流量为 0.3 mL/min; 进样量为 2 μ L。

2.2.2 质谱条件 利用 HPLC-LTQ-Orbitrap-MSⁿ 对样品进行定性数据的全面采集。负离子模式, ESI 电喷雾离子源, 毛细管温度 350 °C, 鞘气体积流量 30 arb, 辅助气体流量 10 arb, 喷雾电压 3 kV, 毛细管电压-35 V, 管透镜电压-110 V, 质量扫描范围 *m/z* 100~1 200, 高分辨的全扫描模式 (Full scan,

FS), 一级质谱分辨率 R 设置为 30 000, 二级质谱数据采用数据依赖性扫描 (DDA), FT 的分辨率为 15 000, CID 碰撞能量为 35%。

利用 UPLC-QQQ-MS 进行样品的拟靶标代谢组学数据采集, 电喷雾离子源 (ESI), 负离子模式, 多反应监测 (MRM) 扫描方式, 碰撞气为氩气。毛细管电压 2 kV, 锥孔电压 40 V, 源温度 150 °C。脱溶剂气为氮气, 体积流量 1 000 L/h, 温度 500 °C。

2.3 数据处理和分析

利用 Qual Browser of Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, USA) 软件进行数据处理, Target Lynx™ (美国 Waters 公司) 软件对 MRM 模式下测定的各化合物峰面积进行积分处理。SPSS 25.0 统计软件 (IBM, USA) 进行 t 检验, SIMCA version 14.1 (Umea, Sweden) 进行正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA)。

2.4 离子对的确定

大黄的主要成分包括双蒽酮苷类、蒽醌类及鞣质类。本课题组在前期研究中已从大黄中鉴定出 270 多种化合物, 推断了各大类成分的裂解规律, 并总结了双蒽酮苷类、蒽醌类和鞣质类成分的特征离子^[8-10]。根据对大黄各类成分的质谱裂解规律分析发现, 这 3 类成分在裂解过程中可保持基本母核不变, 只断裂连接基团, 具有特征离子碎片。因此, 离子对即为各化合物的母离子与特征离子的组合。在此基础上, 本实验确定了用于 MRM 模式数据采集的离子对。

以双蒽酮苷类成分为例进行说明, m/z 699.131 9 [$M-Glc-H$]⁻、 m/z 537.080 8 [$M-Glc-Glc-H$]⁻、 m/z 903.194 4 [$M-H-CO_2$]⁻、 m/z 493.091 7 [$M-H-2Glc-CO_2/M-H-CO_2$]⁻ 等均可作为双蒽酮苷类成分的特征离子。此外, 双蒽酮苷类成分 $C_{10} \rightarrow C_{10}'$ 也较易断裂, 形成特征离子 m/z 386.099 0 [(10 $\rightarrow$ 10') 断裂]。双蒽酮苷类成分可能的质谱裂解途径和确定的特征离子以番泻苷 A/B 和准分子离子峰为 m/z 933.208 7 [$M-H$]⁻ 的化合物为例进行表示 (图 1)。

同理, 用相同的方法确定了蒽醌类及鞣质类成分的特征离子。之后, 将各类化合物的母离子连同各自对应的特征离子, 最终在负离子模式下确定了 94 个大黄中主要成分双蒽酮苷类、蒽醌类及鞣质类化合物的离子对 (表 2), 各类成分所对应的碰撞能分别为 60 V、20 V、10 V, 锥孔电压均为 30 V。

2.5 大黄不同煎煮方式样品的拟靶标代谢组学方法学考察

基于 HPLC-LTQ-Orbitrap-MSⁿ 方法测定的大黄样品的色谱图如 2-A 所示, 基于 UPLC-QQQ-MS 的动态 MRM 模式拟靶标离子对拟合的大黄样品色谱图如 2-B 所示。

2.5.1 线性关系考察 利用 QC 样本对线性关系进行考察。分别精密量取 “2.1.3” 项下的 QC 样本 20、50、100、200、400、1 000 μ L, 用 50% 甲醇稀释至 1 mL, 混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得 6 个不同质量浓度的 QC 样本溶液, 分别吸取上述溶液 2 μ L, 按 “2.2” 项下条件进行测定。以各离子对峰面积 (Y) 对 QC 样本质量浓度 (X) 进行 Pearson 相关系数测定, 用于评价线性。采用拟靶标代谢组学的方法, 65.22% 和 83.7% 离子对的 Pearson 相关系数大于 0.9 和 0.8 (图 3-A), 表明拟靶标代谢组学方法具有良好的线性。

2.5.2 重复性考察 进样测定 “2.1.3” 项下平行制备的 6 份 QC 样本, 记录各离子对的峰面积, 计算其 RSD 值。结果表明, 采用拟靶标代谢组学方法的 90.22% 的峰 (占总峰面积的 99.1%) 的 RSD 值小于 20% (图 3-B), 说明拟靶标代谢组学方法的重复性良好。

2.5.3 精密度考察 用 RSD 对测定的离子对进行精密度评价。日内精密度: 1 d 内平行进样测定 “2.1.3” 项下 6 针 QC 样本的各离子对的峰面积, 计算 RSD; 日间精密度: 连续 3 d 进样测定 “2.1.3” 项下 6 针 QC 样本各离子对的峰面积, 计算 RSD。结果表明, RSD 值小于 20% 的日内精密度的累计峰数百分比和累积峰面积百分比分别为 92.39% 和 99.25% (图 3-C), RSD 值小于 20% 的日间精密度的累计峰数百分比和累积峰面积百分比分别为 92.93% 和 99.90% (图 3-D), 表明拟靶标代谢组学方法精密度良好。

2.6 煎煮时间对大黄煎出化学成分的影响

2.6.1 基于整体化学成分的差异物质分析 对冷水煎煮 60 min (I) 组和冷水煎煮 15 min (II) 组建立 OPLS-DA 模型, 模型参数 R_Y^2 为 0.998, Q^2 为 0.95, 得分图如图 4-A 所示, 结果显示, I 组和 II 组分布在 2 个不同的区域, 提示 2 组之间存在明显差异。为了分析鉴定导致差异产生的贡献较大的化学成分, 根据重要变量的投影评分值 $VIP > 1$ 和 t 检验中 $P < 0.05$ (图 4-B) 找到了不同煎煮时间对整体化学

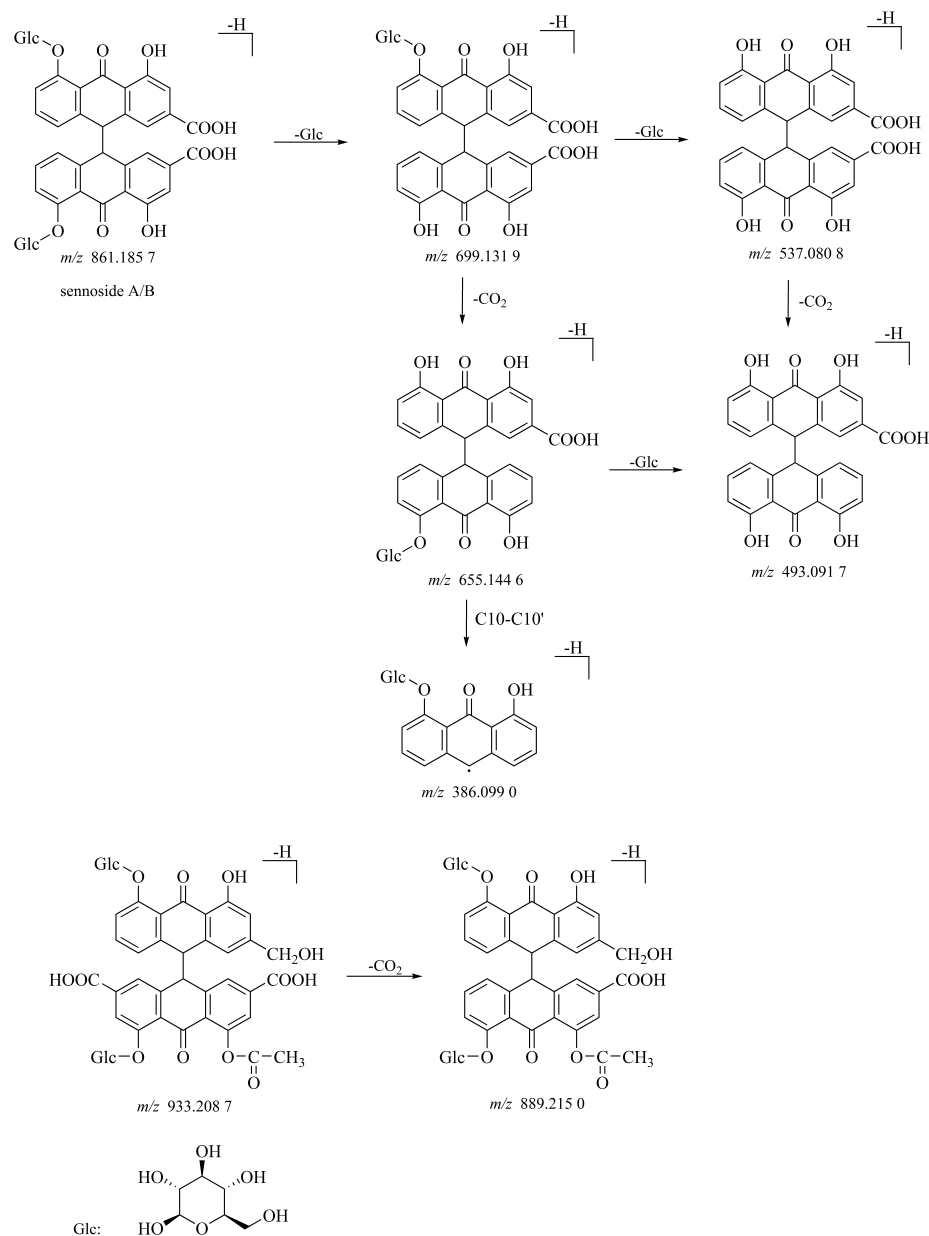


图 1 以番泻苷 A/B 和准分子离子峰为 m/z 933.208 7 的化合物为代表的双蒽酮苷类成分可能的质谱裂解途径和确定的特征离子

Fig. 1 Proposed mass spectrometry fragmentation pathways and identified characteristic ions of dianthrone glycosides represented by compounds of sennoside A/B and excimer ion peak of m/z 933.208 7

表 2 负离子模式下 MRM 扫描检测大黄样品中基于特征离子的主要化合物离子对

Table 2 Detection of ion pairs of major compounds based on characteristic ions in rhubarb samples by MRM scanning under negative ion mode

化合物类别	编号	离子对 (m/z)	t_R /min	化合物名称
双蒽酮苷类	1	699.132 4→537.080 8	7.24	rhein (10→10') rhein type aglycone
	2	831.214 4→669.158 3	7.14	chrysophanol (10→10') rhein type aglycone
	3	847.209 0→386.099 0	5.81	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone
	4	847.209 0→386.099 0	6.02	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone
	5	847.209 0→386.099 0	6.73	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone
	6	847.209 0→685.152 2	7.12	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone

续表 2

化合物类别	编号	离子对 (m/z)	t_R/min	化合物名称
双蒽酮苷类	7	861.185 9→699.131 9	5.78	sennoside B ^a
	8	861.185 9→699.132 0	6.36	sennoside A ^a
	9	861.225 7→699.169 1	6.17	physcion (10→10') rhein type aglycone
	10	861.225 7→699.169 0	7.14	physcion (10→10') rhein type aglycone
	11	933.208 7→889.215 0	6.45	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone/Emodin (10→10') rhein type aglycone
	12	933.208 7→889.215 0	6.77	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone/Emodin (10→10') rhein type aglycone
	13	933.208 7→889.215 0	7.16	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone/emodin (10→10') rhein type aglycone
	14	947.188 6→903.194 4	6.12	rhein (10→10') rhein type aglycone
	15	947.188 6→903.194 4	6.32	rhein (10→10') rhein type aglycone
	16	947.188 6→903.194 4	6.42	rhein (10→10') rhein type aglycone
	17	947.188 6→903.194 4	6.72	rhein (10→10') rhein type aglycone
	18	947.224 4→903.231 2	6.90	physcion (10→10') rhein type aglycone
	19	947.224 4→903.231 2	7.20	physcion (10→10') rhein type aglycone
	20	537.082 3→493.091 7	4.32	rhein (10→10') rhein type aglycone
	21	537.082 3→493.091 7	4.19	rhein (10→10') rhein type aglycone
	22	861.185 9→493.091 7	7.42	rhein (10→10') rhein type aglycone
	23	917.214 0→873.220 8	7.18	chrysophanol (10→10') rhein type aglycone
蒽醌类	1	269.045 1→240.041 9	7.62	aloe-emodin ^a
	2	283.060 7→240.042 0	8.16	physcion ^a
	3	253.050 2→225.054 9	8.10	chrysophanol ^a
	4	269.045 1→225.055 0	7.85	emodin ^a
	5	283.023 6→239.034 2	7.66	rhein ^a
	6	311.055 5→268.037 0	7.58	acetyl-emodin
	7	487.088 1→239.034 4	7.17	rhein <i>O</i> -acetyl-glucose
	8	431.098 1→269.044 7	5.86	aloe-emodin 8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside ^a
	9	431.098 1→269.045 0	6.15	emodin <i>O</i> -glucose
	10	431.098 1→269.045 0	6.83	emodin <i>O</i> -glucose
	11	431.098 1→269.045 0	7.08	emodin <i>O</i> -glucose
	12	431.098 1→269.045 0	7.27	emodin 8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside ^a
	13	473.109 1→269.044 5	6.45	emodin <i>O</i> -acetyl-glucose
	14	473.109 1→269.045 0	6.55	emodin <i>O</i> -acetyl-glucose
	15	473.109 1→269.045 0	6.70	emodin <i>O</i> -acetyl-glucose
	16	517.098 0→269.044 7	7.20	emodin <i>O</i> -malonyl-glucose
	17	431.098 1→225.055 0	7.18	emodin <i>O</i> -glucose
	18	473.109 1→311.055 1	7.03	aloe-emodin <i>O</i> -acetyl-glucopyranoside
	19	473.109 1→311.055 0	7.26	aloe-emodin <i>O</i> -acetyl-glucopyranoside
	20	457.114 0→253.049 5	7.47	chrysophanol 8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -(6'- <i>O</i> -acetyl)-glucopyranoside
	21	459.093 0→253.049 6	5.36	carboxyl-chrysophanol <i>O</i> -glucoside
	22	459.093 0→253.050 0	6.64	carboxyl-chrysophanol <i>O</i> -glucoside
	23	459.093 0→253.050 0	7.18	carboxyl-chrysophanol <i>O</i> -glucoside
	24	487.088 1→283.024 3	6.58	rhein <i>O</i> -acetyl-glucose
	25	487.088 1→283.024 0	6.69	rhein <i>O</i> -acetyl-glucose
	26	487.088 1→283.024 0	6.81	rhein <i>O</i> -acetyl-glucose
	27	487.088 1→283.024 0	7.55	rhein <i>O</i> -acetyl-glucose
	28	517.098 0→473.108 1	6.49	carboxyl-emodin 8- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -acetyl)-glucose

续表 2

化合物类别	编号	离子对 (<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> /min	化合物名称
蒽醌类	29	517.098 0→473.108 0	7.31	carboxyl-emodin 8- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -acetyl)-glucose
	30	597.088 0→313.055 2	6.54	rhein <i>O</i> -galloyl- <i>O</i> -glucose
	31	473.109 1→268.037 0	7.44	emodin <i>O</i> -acetyl-glucose
鞣质类	1	441.081 9→289.071 3	5.33	(-)-epicatechin- <i>O</i> -gallate
	2	441.081 9→289.071 0	5.97	(-)-epicatechin-3- <i>O</i> -gallate ^a
	3	451.124 1→289.071 0	3.50	(+)-catechin <i>O</i> -glucose
	4	451.124 1→289.071 0	3.69	(+)-catechin <i>O</i> -glucose
	5	451.124 1→289.071 0	3.88	(+)-catechin <i>O</i> -glucose
	6	451.124 1→289.071 0	4.06	(+)-catechin <i>O</i> -glucose
	7	729.145 3→407.076 7	5.26	procyanidin B- <i>O</i> -gallate
	8	729.145 3→407.077 0	6.59	procyanidin B- <i>O</i> -gallate
	9	483.077 6→169.013 9	3.33	di-galloyl- <i>O</i> -glucose
	10	483.077 6→169.014 0	3.52	di-galloyl- <i>O</i> -glucose
	11	451.124 1→331.066 0	3.30	(+)-catechin <i>O</i> -glucose
	12	493.119 2→331.065 9	2.20	glucopyranosyl-galloyl-glucose
	13	483.077 6→313.055 5	4.21	gallic acid- <i>O</i> -galloyl-glucopyranoside
	14	483.077 6→313.055 0	4.42	gallic acid- <i>O</i> -galloyl-glucopyranoside
	15	493.119 2→313.055 0	2.78	glucopyranosyl-galloyl-glucose
	16	493.119 2→313.055 2	2.94	glucopyranosyl-galloyl-glucose
	17	635.087 6→465.065 9	4.71	tri- <i>O</i> -galloyl-glucose
	18	635.087 6→465.067 0	4.82	tri- <i>O</i> -galloyl-glucose
	19	729.145 3→577.132 9	4.93	procyanidin B- <i>O</i> -gallate
	20	729.145 3→577.132 9	5.57	procyanidin B- <i>O</i> -gallate
	21	729.145 3→577.132 9	6.00	procyanidin B- <i>O</i> -gallate
	22	881.155 7→729.142 8	5.70	procyanidin B 2 3, 3'-di- <i>O</i> -gallate/procyanidin B 5 3,3'-di- <i>O</i> -gallate
	23	881.155 7→729.143 0	6.44	procyanidin B 2 3, 3'-di- <i>O</i> -gallate/procyanidin B 5 3,3'-di- <i>O</i> -gallate
	24	881.155 7→729.143 0	6.93	procyanidin B 2 3, 3'-di- <i>O</i> -gallate/procyanidin B 5 3,3'-di- <i>O</i> -gallate
	25	881.155 7→729.143 0	5.97	procyanidin B 2 3, 3'-di- <i>O</i> -gallate/procyanidin B 5 3,3'-di- <i>O</i> -gallate
	26	603.134 3→559.145 2	6.96	(+)-catechin <i>O</i> -gallate- <i>O</i> -glucose
	27	483.077 6→439.087 5	4.38	gallic acid- <i>O</i> -galloyl-glucopyranoside
	28	483.077 6→271.045 2	4.07	gallic acid- <i>O</i> -galloyl-glucopyranoside
	29	577.134 5→289.070 9	3.96	procyanidin B
	30	577.134 5→289.071 0	4.10	procyanidin B
	31	577.134 5→289.071 0	4.60	procyanidin B
	32	577.134 5→289.071 0	4.90	procyanidin B
	33	577.134 5→289.071 0	5.25	procyanidin B
	34	577.134 5→289.071 0	5.46	procyanidin B
	35	577.134 5→287.056 0	4.29	procyanidin B
	36	865.197 5→577.132 9	4.30	procyanidin trimer
	37	153.017 9→109.029 0	3.26	protocatechuic acid ^a
	38	169.013 7→125.023 9	1.90	gallic acid ^a
	39	289.071 1→245.081 5	4.29	(+)-catechin ^a
	40	289.071 1→245.081 5	4.90	(-)-epicatechin ^a

^a 为对照品验证, 表 3、4 同^a Identified with reference substance, same as Table 3 and Table 4

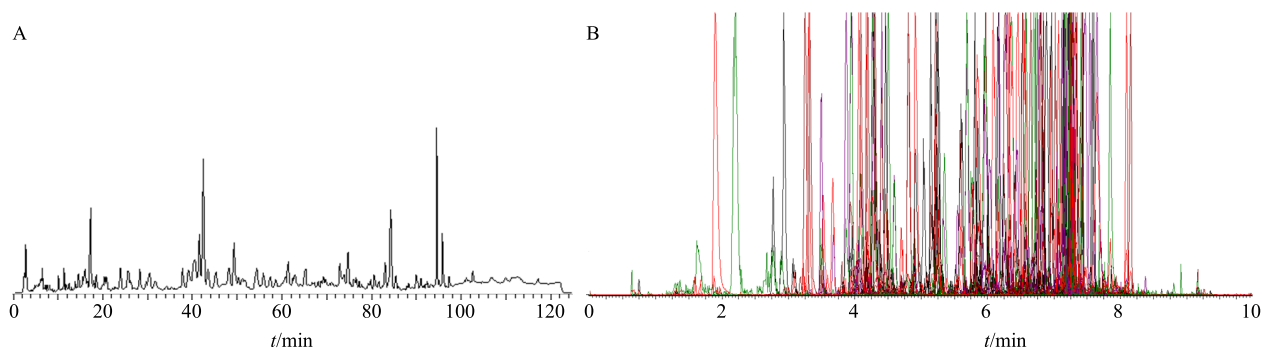


图 2 负离子模式下基于 HPLC-LTQ-Orbitrap-MSⁿ 方法的 TIC 图 (A) 和基于 UPLC-QQQ-MS 的动态 MRM 模式拟靶标离子对拟合的色谱图 (B)

Fig. 2 TIC based on HPLC-LTQ-Orbitrap-MSⁿ (A) and pseudo-targeted ion-pair chromatogram based on UPLC-QQQ-MS in dynamic MRM (B) in negative mode

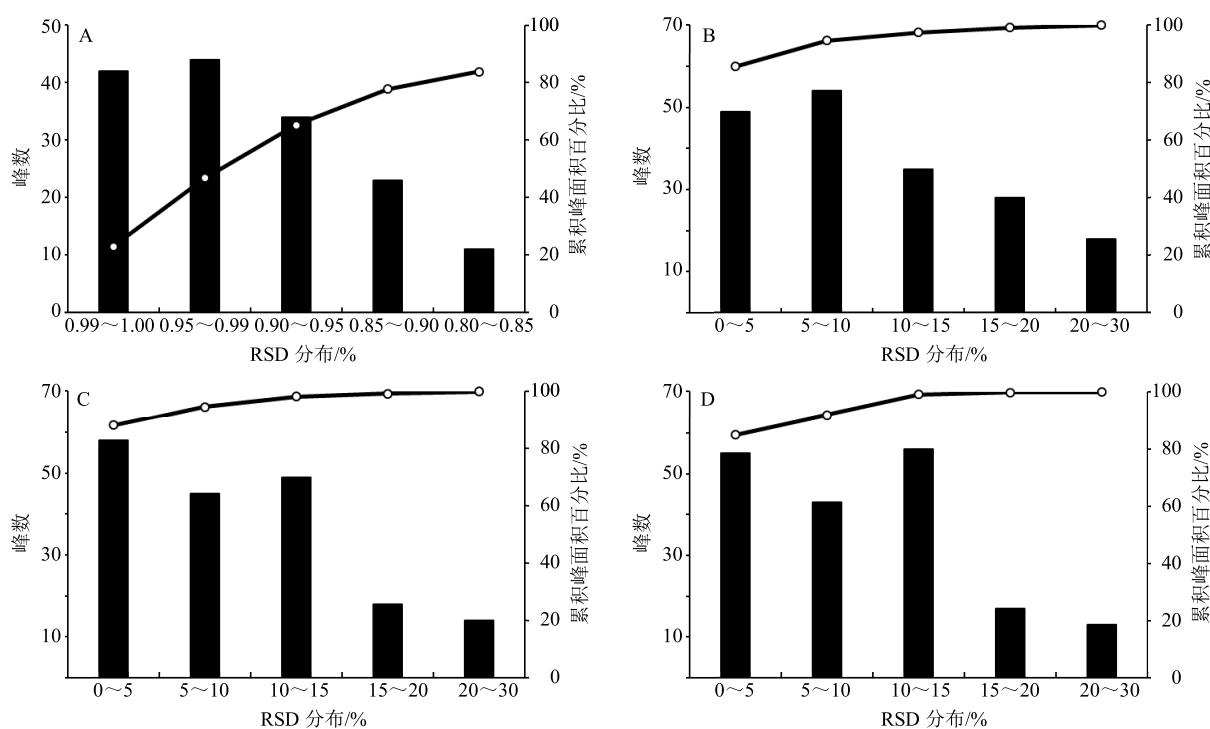


图 3 拟靶标代谢组学方法检测的离子对峰面积的线性关系考察 (A)、重复性考察 (B)、日内精密性 (C) 和日间精密性 (D) 考察

Fig. 3 Validation of pseudo-targeted metabolomics method of linearity (A), repeatability (B), intra-day (C) and inter-day precision (D) of ion-pair peaks

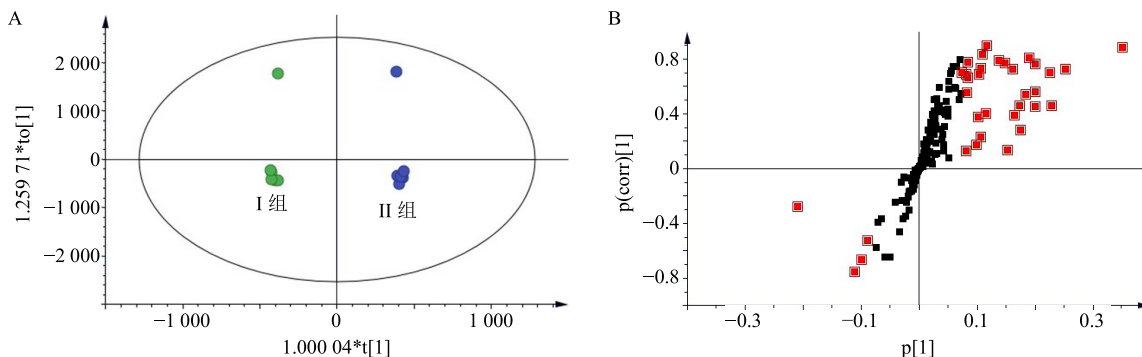


图 4 冷水煎煮 60 min 组 (I) 和冷水煎煮 15 min 组 (II) 的 OPLS-DA 得分图 (A) 和 S-plot 图 (B)

Fig. 4 OPLS-DA score plot (A) of 60 min cold water decoction group (I) and 15 min group (II) and S-plot (B)

成分有显著影响的差异成分。

2.6.2 基于配对 t 检验的差异化合物分析 对于组内差异大于组间差异的物质,如双蒽酮苷类离子对(847.209 0→386.099 0、831.214 4→669.158 3)所对应的成分未能在基于整体找到的差异成分中被发现,因此,本实验又针对具体的化合物采用配对 t 检验的方法进行分析,进一步找到了 I 组和 II 组之间更多具有显著差异的成分。通过基于整体的多元统计分析找出包括双蒽酮苷类、蒽醌类、鞣质类化合物共 11 个显著差异成分,而通过配对 t 检验进一步找到了 24 个,共 35 个具有显著差异的化合物(表 3)。综合以上 2 种数据处理方法得出的结果表明,煎煮时间长短对大黄中的活性成分具有显著影响,短时间(15 min)煎煮有利于双蒽酮苷类和蒽醌苷类成分的煎出,而长时间(60 min)煎煮利于鞣质类如没食子酸、表儿茶素、原花青素等成分的煎出。

2.7 煎煮温度对大黄煎出化学成分的影响

2.7.1 基于整体化学成分的差异物质分析 对沸水

煎煮 15 min (III) 组和沸水浸泡 15 min (IV) 组建立 OPLS-DA 模型,模型参数 R_Y^2 为 0.963, Q^2 为 0.635,得分图如图 5-A 所示,结果显示,III 组和 IV 组之间也存在差异。根据重要变量的投影评分值 $VIP>1$ 和 t 检验中 $P<0.05$ (图 5-B) 从整体上筛选了煎煮温度显著影响的差异成分。

2.7.2 基于配对 t 检验的差异物质分析 同样,对于组内差异大于组间差异的物质,采用配对 t 检验的方法,进一步找到了不同煎煮温度之间更多标志性成分。通过基于整体的多元统计分析找出包括双蒽酮苷类、蒽醌类、鞣质类化合物共 19 个显著差异成分,而通过配对 t 检验进一步找到了 8 个,共 27 个具有显著差异的化合物(表 4)。综合以上 2 种数据处理方法得出的结果表明,与沸水浸泡相比,沸水煎煮有利于蒽醌类、鞣质类成分的煎出,而有些双蒽酮苷类成分在沸水煎煮下容易被破坏,含量降低。

3 讨论

本实验利用拟靶标代谢组学的数据采集方法对

表 3 I 组和 II 组基于整体多元统计分析和配对 t 检验找到的显著差异化合物

Table 3 Significantly different compounds found in group I and group II based on overall multivariate statistical analysis and paired t test

化合物类别	序号	离子对 (m/z)	t_R/min	化合物	VIP 值	趋势	多元统计分析	配对 t 检验
双蒽酮苷类	1	861.185 9→699.132 0	6.36	sennoside A ^a	1.886	↓**	+	
	2	861.185 9→699.131 9	5.78	sennoside B ^a	1.159	↓**	+	
	3	947.188 6→903.194 4	6.72	rhein (10→10') rhein type aglycone	1.499	↓**	+	
	4	917.214 0→873.220 8	7.18	chrysophanol (10→10') rhein type aglycone	2.187	↓**	+	
	5	831.214 4→669.158 3	7.14	chrysophanol (10→10') rhein type aglycone	0.395	↓**		+
	6	847.209 0→386.099 0	5.81	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone	0.573	↓**		+
	7	847.209 0→386.099 0	6.02	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone	0.682	↓***		+
	8	847.209 0→386.099 0	6.73	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone	0.770	↓**		+
	9	933.208 7→889.215 0	6.45	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone/ emodin (10→10') rhein type aglycone	0.860	↓**		+
	10	933.208 7→889.215 0	7.16	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone/ emodin (10→10') rhein type aglycone	0.693	↓***		+
蒽醌类	11	947.188 6→903.194 4	6.12	rhein (10→10') rhein type aglycone	0.803	↓**		+
	12	537.082 3→493.091 7	4.32	rhein (10→10') rhein type aglycone	0.444	↓**		+
	1	517.098 0→473.108 0	7.31	carboxyl-emodin 8- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -acetyl)-glucose	1.475	↓**	+	
	2	473.109 1→269.045 0	6.70	emodin <i>O</i> -acetyl-glucose	2.720	↓***	+	
	3	269.045 1→225.055 0	7.85	emodin ^a	0.543	↑*		+
	4	487.088 1→239.034 4	7.17	rhein <i>O</i> -acetyl-glucose	0.946	↓**		+
	5	431.098 1→269.045 0	6.15	emodin <i>O</i> -glucose	0.668	↓*		+
	6	473.109 1→269.045 0	6.55	emodin <i>O</i> -acetyl-glucose	0.436	↓**		+
	7	487.088 1→283.024 0	7.55	rhein <i>O</i> -acetyl-glucose	0.280	↓*		+

续表 3

化合物类别	序号	离子对/ <i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	化合物	VIP 值	趋势	多元统计分析	配对 <i>t</i> 检验
鞣质类	1	169.013 7→125.023 9	1.90	gallic acid ^a	2.834	↑ *	+	
	2	289.071 1→245.081 5	4.90	(-)-epicatechin ^a	1.495	↑ ***	+	
	3	635.087 6→465.067 0	4.82	tri- <i>O</i> -galloyl-glucose	3.126	↓ ***	+	
	4	483.077 6→169.013 9	3.33	di-galloyl- <i>O</i> -glucose	2.746	↓ **	+	
	5	729.145 3→577.132 9	5.57	procyanidin B- <i>O</i> -gallate	1.353	↑ **	+	
	6	441.081 9→289.071 3	5.33	(-)-epicatechin- <i>O</i> -gallate	0.333	↓ *		+
	7	451.124 1→289.071 0	3.88	(+)-catechin <i>O</i> -glucose	0.592	↓ *		+
	8	451.124 1→289.071 0	4.06	(+)-catechin <i>O</i> -glucose	0.995	↓ *		+
	9	729.145 3→407.077 0	6.59	procyanidin B- <i>O</i> -gallate	0.600	↑ *		+
	10	483.077 6→313.055 5	4.21	gallic acid- <i>O</i> -galloyl-glucopyranoside	0.368	↓ *		+
	11	635.087 6→465.065 9	4.71	tri- <i>O</i> -galloyl-glucose	0.601	↓ *		+
	12	881.155 7→729.142 8	5.70	procyanidin B 2 3,3'-di- <i>O</i> -gallate/procyanidin B 5 3,3'-di- <i>O</i> -gallate	0.575	↓ *		+
	13	881.155 7→729.143 0	6.93	procyanidin B 2 3,3'-di- <i>O</i> -gallate/procyanidin B 5 3,3'-di- <i>O</i> -gallate	0.369	↓ *		+
	14	603.134 3→559.145 2	6.96	(+)-catechin <i>O</i> -gallate- <i>O</i> -glucose	0.333	↓ **		+
	15	577.134 5→289.071 0	4.90	procyanidin B	0.290	↑ *		+
	16	577.134 5→289.071 0	5.25	procyanidin B	0.980	↑ **		+

与 II 组比较 (以峰面积为指标): ↑ 升高, ↓ 降低, **P* < 0.05 ***P* < 0.01 ****P* < 0.001; “+” 表示找到该成分的分析方法

↑ increase and ↓ decrease, **P* < 0.05 ***P* < 0.01 ****P* < 0.001 vs group II (peak area as indicator); “+” indicates the analysis method to find the component

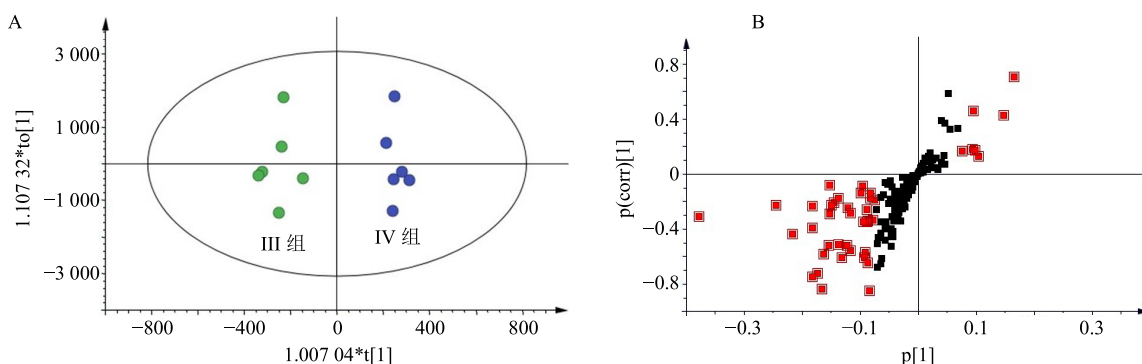


图 5 沸水煎煮 15 min 组 (III) 和沸水浸泡 15 min 组 (IV) OPLS-DA 得分图 (A) 和 S-plot (B)

Fig. 5 OPLS-DA score plot (A) of boiling water decocting 15 min group (III) and immersing 15 min group (IV) and S-plot (B)

大黄中的化学成分进行了全面的检测。利用特征离子追踪其所对应的化合物离子对,并基于 QQQ-MS 的 MRM 模式对其峰面积进行准确的测定,比较了不同煎煮方式对各类化合物的影响。采用 OPLS-DA 结合 *t* 检验从整体上判断了大黄不同煎煮方式化学成分的差异,找到了对整体化学成分具有影响的差异指标,同时采用配对 *t* 检验挖掘同一样本处理前后的差异指标成分。综合 2 种数据处理方法研究了大黄不同煎煮方式对其化学成分的影响,并分析了

各组差异功效组分的变化情况,初步明确了大黄发挥不同功效的适宜煎煮方式。

双蒽酮苷及蒽醌苷类被认为是大黄泻下功效的主要活性成分^[11-12],《中国药典》2015 年版中规定大黄用于泻下时不宜久煎。本实验研究结果表明临床上在使用大黄发挥其泻下功效时,为了最大限度地减少泻下活性成分的转化与分解,应避免长时间煎煮,选择短时间煎煮或沸水浸泡即可。大黄清热解毒的功效与现代医学中的解热、镇痛、抗炎的药

表 4 III 组和 IV 组基于整体多元统计分析和配对 *t* 检验找到的显著差异化合物Table 4 Significantly different compounds found in group III and group IV based on overall multivariate statistical analysis and paired *t* test

化合物类别	序号	离子对(<i>m/z</i>)	<i>t_R</i> /min	化合物	VIP 值	趋势	多元统计分析	配对 <i>t</i> 检验
双蒽酮苷类	1	917.214 0→873.220 8	7.18	chrysophanol (10→10') rhein type aglycone	2.036	↓ *	+	
	2	699.132 4→537.080 8	7.24	rhein (10→10') rhein type aglycone	0.226	↓ *		+
	3	847.209 0→386.099 0	6.73	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone	0.770	↓ *		+
	4	847.209 0→685.152 2	7.12	aloe-emodin (10→10') rhein type aglycone	0.109	↓ *		+
蒽醌类	1	283.023 6→239.034 2	7.66	rhein ^a	3.226	↑ **	+	
	2	253.050 2→225.054 9	8.10	chrysophanol ^a	2.425	↑ **	+	
	3	283.060 7→240.042 0	8.16	physcion ^a	2.349	↑ **	+	
	4	269.045 1→225.055 0	7.85	emodin ^a	1.899	↑ **	+	
	5	431.098 1→269.044 7	5.86	aloe-emodin 8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside ^a	2.482	↑ *	+	
	6	431.098 1→269.045 0	7.27	emodin 8- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranoside ^a	2.148	↑ **	+	
	7	473.109 1→269.045 0	6.55	emodin <i>O</i> -acetyl-glucose	0.436	↑ ***		+
	8	473.109 1→268.037 0	7.44	emodin <i>O</i> -acetyl-glucose	0.379	↑ *		+
鞣质类	1	729.145 3→577.132 9	4.93	procyanidin B- <i>O</i> -gallate	2.438	↑ *	+	
	2	729.145 3→577.132 9	5.57	procyanidin B- <i>O</i> -gallate	2.314	↑ **	+	
	3	451.124 1→289.071 0	3.88	(+)-catechin <i>O</i> -glucose	1.811	↑ *	+	
	4	441.081 9→289.071 0	5.97	(-)-epicatechin-3- <i>O</i> -gallate ^a	1.806	↑ *	+	
	5	483.077 6→271.045 2	4.07	gallic acid- <i>O</i> -galloyl-glucopyranoside	1.645	↑ *	+	
	6	451.124 1→289.071 0	3.50	(+)-catechin <i>O</i> -glucose	1.602	↑ **	+	
	7	451.124 1→289.071 0	4.06	(+)-catechin <i>O</i> -glucose	1.572	↑ **	+	
	8	451.124 1→289.071 0	3.69	(+)-catechin <i>O</i> -glucose	1.041	↑ *	+	
	9	169.013 7→125.023 9	1.90	gallic acid ^a	5.211	↑ **	+	
	10	289.071 1→245.081 5	4.90	(-)-epicatechin ^a	1.787	↑ **	+	
	11	289.071 1→245.081 5	4.29	(+)-catechin ^a	1.653	↑ *	+	
	12	153.017 9→109.029 0	3.26	protocatechuic acid ^a	1.293	↑ **	+	
	13	451.124 1→331.066 0	3.30	(+)-catechin <i>O</i> -glucose	0.095	↑ *		+
	14	483.077 6→313.055 5	4.21	gallic acid- <i>O</i> -galloyl-glucopyranoside	0.368	↑ *		+
	15	577.134 5→289.071 0	4.90	procyanidin B	0.290	↑ **		+

与 IV 组比较 (以峰面积为指标): ↑ 升高, ↓ 降低, **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001; “+” 表示找到该成分的分析方法↑ increase and ↓ decrease, **P*<0.05 ***P*<0.01 ****P*<0.001 vs group IV (peak area as indicator); “+” indicates the analysis method to find the component

理作用密切相关^[13-14], 研究发现游离蒽醌类和鞣质类成分具有抗菌、抗炎、退热等活性^[15-22]。本实验研究结果提示临床上使用大黄发挥其清热解毒功效时, 为了使发挥药效的稳定活性成分能够充分煎出, 应选择长时间沸水煎煮。

参考文献

- [1] 陈嘉倩, 陈艳琰, 唐于平, 等. 大黄不同功效的古今用药规律分析 [J]. 中草药, 2019, 50(6): 1485-1492.
- [2] 洪秀芳, 陈滨海, 叶真. 从仲景方看大黄的煎煮方法 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2010, 20(7): 412-413.

- [3] 刘斌江, 徐月英. 张仲景对大黄的配伍运用及煎服炮制 [J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(10): 26-27.
- [4] 赵书锋. 《伤寒论》临证活用大黄浅议 [J]. 陕西中医, 2009, 30(11): 1503-1504.
- [5] 聂安政, 高梅梅, 朱春胜, 等. 中药特殊煎法的探讨与思考 (二): 后下 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3153-3161.
- [6] 崔晓春, 赵鸣芳, 凌云. 《伤寒论》五泻心汤煎煮法探析 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(1): 116-117.
- [7] Wang L C, Su B Z, Zeng Z D, et al. Ion-pair selection method for pseudotargeted metabolomics based on

- SWATH MS acquisition and its application in differential metabolite discovery of type 2 diabetes [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(19): 11401-11408.
- [8] Xu Y, Zhang L, Wang Q, *et al.* An integrated strategy based on characteristic fragment filter supplemented by multivariate statistical analysis in multi-stage mass spectrometry chromatograms for the large-scale detection and identification of natural plant-derived components in rat: The rhubarb case [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 174: 89-103.
- [9] Huang Z H, Xu Y, Wang Q, *et al.* Metabolism and mutual biotransformations of anthraquinones and anthrones in rhubarb by human intestinal flora using UPLC-Q-TOF/MS [J]. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1104: 59-66.
- [10] Xu Y, Wang Q, Yin Z H, *et al.* On-line incubation and real-time detection by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapidly analyzing metabolites of anthraquinones in rat liver microsomes [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1571: 94-106.
- [11] 李 锋, 王胜春, 王 新, 等. 大黄泻下效应的药理学新解释 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(4): 481-484.
- [12] Kon R, Ikarashi N, Nagoya C, *et al.* Rheinanthrone, a metabolite of sennoside A, triggers macrophage activation to decrease aquaporin-3 expression in the colon, causing the laxative effect of rhubarb extract [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 152(1): 190-200.
- [13] Kozak W, Kluger M J, Soszynski D, *et al.* IL-6 and IL-1 β in fever: Studies using cytokine-deficient (knockout) mice [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 856(1): 33-47.
- [14] 杨 威, 张学进, 郭 勇. 热毒血瘀证与炎症相关性研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(10): 2168-2171.
- [15] Hu B Y, Zhang H, Meng X L, *et al.* Aloe-emodin from rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 846-853.
- [16] Meng G Q, Liu Y Y, Lou C C, *et al.* Emodin suppresses lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses and NF- κ B activation by disrupting lipid rafts in CD14-negative endothelial cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(7): 1628-1644.
- [17] Wang J, Zhao H, Kong W, *et al.* Microcalorimetric assay on the antimicrobial property of five hydroxyanthraquinone derivatives in rhubarb (*Rheum palmatum* L.) to *Bifidobacterium adolescentis* [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(8/9): 684-689.
- [18] Shahid A, Ali R, Ali N, *et al.* Modulatory effects of catechin hydrate against genotoxicity, oxidative stress, inflammation and apoptosis induced by benzo (a) pyrene in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 92: 64-74.
- [19] Tang L Q, Wei W, Wang X Y. Effects and mechanisms of catechin for adjuvant arthritis in rats [J]. *Adv Ther*, 2007, 24(3): 679-690.
- [20] Chang E H, Huang J, Lin Z X, *et al.* Catechin-mediated restructuring of a bacterial toxin inhibits activity [J]. *BBA-Gen Subjects*, 2019, 1863(1): 191-198.
- [21] Terra X, Valls J, Vitrac X, *et al.* Grape-seed procyanidins act as anti-inflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NF- κ B signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(11): 4357-4365.
- [22] 王 玉, 杨 雪, 夏鹏飞, 等. 大黄化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4821-4837.