

基于植物代谢组学方法的天竺黄天然品与合成品间化学成分差异研究

秦伟瀚, 阳 勇, 李 卿*, 张德利*, 花 雷
重庆市中药研究院, 重庆 400065

摘要:目的 应用超高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)研究天竺黄天然品与合成品间化学成分差异。方法 结合在线数据库、二级碎片裂解规律等进行化学成分定性分析; 并采用 PeakView 软件 Enhance Peak Find 功能进行差异性分析; 将转换后数据导入 SIMCA-P 软件, 建立 OPLS-DA 统计模型, 进行差异性次生代谢产物分析。结果 天竺黄的成分类别主要包括氨基酸、有机酸、生物碱、糖苷类等, 其中 11 个已知成分被检出, 未曾报道的化合物达 43 个; 分析鉴定出 2,5-二甲基-1,3-氧唑-4-羧酸、蔗糖等 14 个显著差异性成分及 4-(庚氧基)苯基-4-(己氧基)苯甲酸酯、N-十二烷基乙醇胺等 12 个生物标志物。结论 研究发现天竺黄天然品与合成品间化学差异明显, 甜菜碱和蔗糖可作为区分两者的鉴别指标, 为天竺黄质量控制及药效物质阐明提供新的思路和数据参考。

关键词: 天竺黄; 天然品; 合成品; 四级杆-飞行时间质谱; 化学差异; 蔗糖; 甜菜碱

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)17-4411-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.007

Chemical differences between natural and synthetic materials of *Bambusae Concretio Silicea* based on plant metabolomics

QIN Wei-han, YANG Yong, LI Qing, ZHANG De-li, HUA Lei
Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: Objective To study the chemical differences between natural and synthetic of *Bambusae Concretio Silicea* by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole tandem time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). **Methods** The qualitative analysis of chemical composition was made combined online database and secondary fragmentation cleavage rules, and difference analysis was carried out by the Enhance Peak Find function of PeakView software. Then the converted data was imported into SIMCA-P software to establish an OPLS-DA statistical model and differential secondary metabolites were analyzed. **Results** The constituents of *Bambusae Concretio Silicea* mainly included amino acids, organic acids, alkaloids, glycosides, etc. Among them, 11 components were known, while other 43 compounds were identified for the first time. A total of 14 distinct components, including 2,5-dimethyl-1,3-oxazole-4-carboxylic acid and sucrose, and 12 biomarkers, including 4-(heptyloxy)phenyl-4-(hexyloxy)benzoate, and N-lauryldiethanolamine were identified. **Conclusion** This study reveals that the chemical differences between the two herbs are obvious, while betaine and sucrose can be used as the distinguishing indicators. And it provides new ideas and data references for the quality control and clarification of medicinal substances.

Key words: *Bambusae Concretio Silicea*; natural product; synthetic; quadrupole-time-of-flight mass spectrometry; chemical difference; sucrose; betaine

天竺黄为禾本科植物青皮竹 *Bambusa textilis* McClure 或华思劳竹 *Schizostachyum chinense* Rendle 等秆内分泌液干燥后形成的块状物, 习称“广竺

黄”, 主产于广东、广西等地区^[1-2]。天竺黄为常用中药材, 始见于《蜀本草》。其味甘, 性寒。有清热豁痰、清心定惊之功效。多用于治疗热病神昏、中

收稿日期: 2020-01-22

基金项目: 国家重大新药创制项目(2017ZX09101002-002-004); 重庆市科委计划项目(cstc2018jxjl-jbky130005); 重庆市科委计划项目(cstc2017jxjl-jbky130002); 重庆市卫生计生委项目(ZY201702142); 重庆市卫生计生委项目(ZY201802046)。

作者简介: 秦伟瀚(1982—), 男, 副研究员, 研究方向为中药新药开发及药物质量标准研究。Tel: (023)89029162 E-mail: qinweihan8881@163.com

*通信作者 李 卿(1978—), 男, 副主任药师, 主要从事新药研发。Tel: (023)89029061 E-mail: qingl666@sina.com

张德利(1986—), 副研究员, 主要从事中药栽培研究。Tel: (023)89029037 E-mail: zdlizy@163.com

风痰迷、小儿痰热抽搐、夜啼等症^[3-4]。

由于天竺黄自然资源短缺，市场上大量出现外观、色泽与天然品极为相似的合成天竺黄，甚至有将白矾、方解石、石英等混入其中，消费者真假难辨，现在判断该药材真伪主要还是靠眼看、手摸、鼻闻、口尝等经验性鉴别^[5-7]。迄今对天竺黄化学成分方面研究十分滞后，只有少量文献有所记载，且多为氨基酸成分^[8-9]，研究正品与伪品间化学差异文献更是未见报道，《中国药典》2015 年版亦没有天竺黄药材含量控制方面的规定，可见对天竺黄化学成分的研究已迫在眉睫。本研究采用高分辨质谱和代谢组学方法深入探究天然品与合成品间的化学差异，为天竺黄药材的药效物质基础、质量控制、真伪鉴别等提供了科学参考。

1 材料

LC-30A 型超高效液相色谱仪(日本岛津公司);二元高压泵、自动进样器、柱温箱; Triple TOF™ 4600 型四极杆串联飞行时间高分辨质谱仪(美国 AB 公司); Analyst 1.6 工作站、PeakView 1.2.0.3 数据处理软件; BJ-100 型超高速中药粉碎机(中国德清拜杰电器有限公司); JY92-IID 型超声波细胞粉碎机(宁波新艺超声设备有限公司); Microfuge20R 型高速离心机(美国贝克曼库尔特有限公司); CPA225D 型十万分之一分析天平(德国赛多利斯公司)。

对照品蔗糖(质量分数 $\geq 99.8\%$ ，批号 111507-201303)、甜菜碱(质量分数 $\geq 99.2\%$ ，批号 110894-201604)、香草酸(质量分数 $\geq 99.8\%$ ，批号 110776-201503)、芦丁(质量分数 $\geq 92.6\%$ ，批号 100080-201409)、香豆酸(质量分数 $\geq 99.3\%$ ，批号 112037-201801)、阿魏酸(质量分数 $\geq 99.0\%$ ，批号 110773-201614)、大黄素甲醚(质量分数 $\geq 99.0\%$ ，批号 110758-201616)，均购自中国食品药品检定研究院。乙腈、水(色谱纯，德国 Merck 公司); 甲酸(色谱纯，美国 ACS 公司); 甲醇(分析纯，重庆川东化工公司)。天竺黄天然品产地为云南、广东、广西，批号分别为 20180114、170106、170504、180605、180309，经重庆市中药研究院生药研究所刘翔副研究员鉴定为天竺黄正品，符合《中国药典》2015 年版项下相关要求; 合成品产地为广东、河南，批号分别为 20180914、20180708、20180324、171201、180512，经重庆市中药研究院刘翔副研究员鉴定为合成天竺黄。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

分别取天竺黄的天然品、合成品样品适量于高速粉碎机中粉碎，过 100 目筛，精密称取粉末 0.3 g，置 5 mL 试管中，移入色谱级甲醇 2 mL，称定质量，于超声波细胞破碎仪中超声处理(功率 600 W) 60 min，取出，放冷，再次称定质量，用甲醇补足损失质量，摇匀，于高速离心机中 12 000 r/min 离心 10 min，过 0.22 μm 微孔滤膜，即得。

2.2 对照品溶液的制备

取适量蔗糖、甜菜碱、香草酸、芦丁、香豆酸、阿魏酸、大黄素甲醚对照品于 10 mL 量瓶中，加入适量色谱甲醇溶解定容至刻度，制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液，备用。

2.3 分析条件

2.3.1 色谱条件 Phenomenex Luna-C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2 mm, 3 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B)，梯度洗脱: 0~3.0 min, 6% B; 3.0~11.0 min, 6%~80% B; 11.0~12.0 min, 80% B; 12.0~12.1 min, 80%~6% B; 12.1~15.0 min, 6% B; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 2 μL 。

2.3.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(ESI)，正/负离子模式分别采集，喷雾电压(IS)+5 500 V、-4 500 V; 雾化气压力(GS1) 345 kPa; 气帘气压力(CUR) 207 kPa; 辅助气压力(GS2) 310 kPa; 离子源温度(TEMP) 600 $^{\circ}\text{C}$; 簇裂解电压(DP) 60 V; 碰撞能量(CE) 40 V; 碰撞能量滚动区间(CES) 15 V; 检测模式为信息关联采集模式(IDA)、多重质量亏损(MMDF)和动态背景扣除(DBS)为触发二级的条件，满足该条件优先进行二级扫描。

2.4 数据处理

2.4.1 定性分析数据处理方法 查阅天竺黄及竹亚科化学成分相关文献报道^[10-12]，将化合物信息输入 PeakView 软件，建立天竺黄成分筛查数据库; 采用“2.1”项方法对天然及合成天竺黄样品进行提取，并采用已建立的色谱、质谱条件对该样品数据进行采集。采集完成后，将上述数据导入 PeakView 软件，利用已建立的筛查数据库将满足质量误差小于 5×10^{-6} 、同位素分布正确且含有二级碎片的离子作为分析目标化合物，结合软件 Formula Finder、Mass Calculators 等功能、在线数据库(Human Metabolome Database、PubChem、Chemical Book、ChemSpider 等)及二级碎片裂解规律，对天竺黄样

品进行快速的定性鉴定分析。

2.4.2 差异性化合物分析方法 将天竺黄天然品及合成品的 Q-TOF 高分辨质谱数据同时导入 PeakView 软件, 采用该软件的 Enhance Peak Find 筛查功能, 将数据在 m/z 50~1 000 扫描范围内的所有离子进行逐对提取, 并以离子强度相差 10 倍以上作为差异离子筛选区间, 结合在线数据库、二级碎片裂解规律等来定性研究差异性化合物的可能结构。

2.4.3 OPLS-DA 分析数据处理方法 将天竺黄天然品及合成品采集的高分辨质谱数据导入 Notepad 软件, 该软件会自动将离子精确质荷比、保留时间、强度等信息提取出来, 并对每个离子进行编号; 再将 Notepad 软件提取的数据代入 SIMCA-P 14.1 软件进行 OPLS-DA 拟合, 最终将 S-plot 图中显著差异数据点结果代入 PeakView 软件, 对天然品、合成品的生物标志物进行定性分析鉴定。

3 结果与分析

3.1 定性鉴别分析

建立天竺黄化学成分筛查数据库, 高分辨质谱进行数据采集 (TIC 重叠图见图 1)。PeakView 软件结合在线数据库、二级碎片裂解规律进行定性分析。据文献统计, 天竺黄已报道成分仅 17 个, 包括胆碱、甜菜碱、氰苷及 14 种氨基酸。本实验从天竺黄醇提样品中共找到 31 个化合物 (表 1), 其中 20 个成分为天竺黄相关文献首次报道, 占鉴定总数的 60%, 主要包括氨基酸、有机酸、倍半萜、黄酮类等; 检

出个数最多的化合物类别为氨基酸, 共 15 个, 已报道成分有 9 个, 其中组氨酸、谷氨酰胺、瓜氨酸仅在天然品中发现, 鸟氨酸、天门冬氨酸、色氨酸仅合成品中含有; 有机酸共找到 7 种, 仅次于氨基酸类别, 包括丁二酸、羟基苯甲酸、香草酸、香豆酸等, 香草酸是香草醛生物合成途径中的前体物质^[13], 广泛存在于自然界中如香荚兰豆、香子兰荚、安息香膏等, 香豆酸主要分布在禾本科植物的茎干中^[14], 在天竺黄中检测到该物质是合理的。阿魏酸及二羟基肉桂酸仅在合成品中发现, 2 种物质均属于苯丙酸类, 其中阿魏酸在伞形科植物中大量存在^[15], 可能是由合成原料所引入; 本实验仅在合成品中鉴定出 1 种萜类物质即石竹烯, 其广泛存在于柠檬、肉豆蔻、胡椒等植物中^[16]; 芦丁和苜蓿素是检测出的 2 种黄酮类物质, 仅存在于天然品中, 芦丁广泛分布于芸香科、豆科、金丝桃科等植物^[17], 在天竺黄中发现该类物质亦有可能; 蒽醌类物质仅发现大黄素甲醚; 糖苷类仅找到甘露醇, 甘露醇亦是植物界分布广泛的一种化学成分。由上述分析结果可知, 天竺黄所含成分较多, 且天然品与合成品间有多种差异成分。

3.2 基于离子强度的差异性分析

将天竺黄天然品与合成品的高分辨质谱数据导入 PeakView 软件, 利用 Enhance Peak Find 功能对样品所有离子进行提取, 以离子强度相差 10 倍作为筛选区间, 结合在线数据库、二级碎片裂解规律共鉴定出 14 种显著差异性化学成分 (结果见表 2, 裂解规律见图 2), 包括脂肪酸酯类 (5 个)、糖苷类 (2 个)、氨基酸类 (2 个)、生物碱类 (2 个)、氨基醇类 (2 个)、酰胺类 (1 个), 均为天竺黄相关文献中首次报道。在天然品中强度较高的成分为 2,5-二甲苯-1,3-氧唑-4-羧酸、7-(α -D-吡喃葡萄糖基氧基)-2,3,4,5,6-五羟基庚酸、蔗糖、*N,N*-二甲基氨基甲酰基- α -氮杂赖氨酸、谷氨酰胺基苯丙氨酸、*N*-(1,3-苯并二恶唑-5-基甲基)-6-羟基-4-氧代-1,2-二氢-4*H*-吡咯并[3,2,1-*ij*]喹啉-5-甲酰胺、乙酰琥珀酸二乙酯、*N*-阿魏羟色胺、*N*-咖啡因色氨酸、2-甲基-2-丙烷基 [*N'*-(环己基甲基)-*N*-{[(2-甲基-2-丙酰基)氧基]羰基}氨基甲酰基] [5-(1-吡咯烷基)戊基]氨基甲酸酯、*N*-(十六烷酰基)-二氢神经酰胺、4-(庚氧基)苯基-4-(己氧基)苯甲酸酯, 在合成品中强度较高的为 crucigersterin E、cerebrodiene。合成品中离子强度为 0 的成分是谷氨酰胺基苯丙氨酸和 2-甲基-2-丙烷基

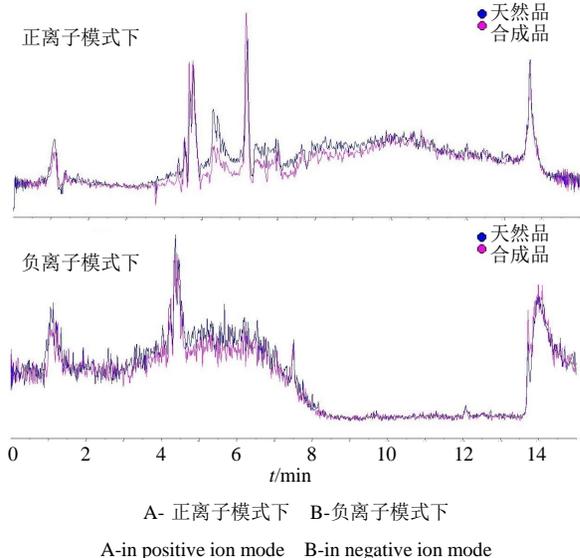


图 1 天竺黄天然品与合成品 TIC 重叠图

Fig. 1 Overlapping chart of total ions chromatogram of natural and synthetic products

表 1 天竺黄天然品与合成品定性分析结果

Table 1 Qualitative analysis results of natural and synthetic products

编号	t_R/min	离子峰归属	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	鉴定结果
1	1.02	[M+H] ⁺	147.113 10	147.112 80	2.0	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	赖氨酸
2	1.02	[M+H] ⁺	156.077 12	156.076 75	2.3	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	组氨酸*
3	1.13	[M+H] ⁺	116.070 82	116.070 61	1.9	C ₅ H ₉ NO ₂	脯氨酸
4	1.13	[M-H] ⁻	181.071 69	181.071 76	-0.4	C ₆ H ₁₄ O ₆	甘露醇
5	1.13	[M-H] ⁻	131.082 10	131.082 60	-3.8	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	鸟氨酸**
6	1.14	[M-H] ⁻	118.050 88	118.050 97	-0.8	C ₄ H ₉ NO ₃	苏氨酸
7	1.14	[M-H] ⁻	104.035 07	104.035 32	-2.4	C ₃ H ₇ NO ₃	丝氨酸
8	1.14	[M-H] ⁻	131.045 99	131.046 22	-1.7	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	天冬酰胺
9	1.15	[M-H] ⁻	146.045 48	146.045 88	-2.7	C ₅ H ₉ NO ₄	谷氨酸
10	1.17	[M+H] ⁺	118.086 61	118.086 26	3.0	C ₅ H ₁₁ NO ₂	甜菜碱
11	1.20	[M-H] ⁻	132.030 15	132.030 23	-0.6	C ₄ H ₇ NO ₄	天门冬氨酸**
12	1.36	[M+H] ⁺	132.102 08	132.101 91	1.4	C ₆ H ₁₃ NO ₂	亮氨酸
13	1.63	[M+H] ⁺	205.195 65	205.195 08	2.8	C ₁₅ H ₂₄	石竹烯**
14	1.74	[M-H] ⁻	117.019 13	117.019 33	-1.7	C ₄ H ₆ O ₄	丁二酸
15	1.79	[M+H] ⁺	247.129 57	247.128 85	2.9	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	谷氨酰胺*
16	1.90	[M+H] ⁺	166.086 72	166.086 26	2.8	C ₉ H ₁₁ NO ₂	苯丙氨酸
17	3.65	[M+H] ⁺	305.150 03	305.149 58	1.5	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₄	色氨酸**
18	3.82	[M-H] ⁻	137.024 35	137.024 42	-0.5	C ₇ H ₆ O ₃	羟基苯甲酸
19	4.00	[M-H] ⁻	167.034 92	167.034 98	-0.4	C ₈ H ₈ O ₄	香草酸
20	4.05	[M-H] ⁻	609.147 31	609.146 11	2.0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁*
21	4.52	[M-H] ⁻	163.039 78	163.040 07	-1.8	C ₉ H ₈ O ₃	香豆酸
22	4.95	[M+H] ⁺	263.237 17	263.236 94	0.9	C ₁₈ H ₃₀ O	金合欢基丙酮**
23	5.54	[M+H] ⁺	195.066 12	195.065 19	4.7	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	阿魏酸**
24	5.67	[M+H] ⁺	181.049 35	181.049 54	-1.0	C ₉ H ₈ O ₄	二羟基肉桂酸**
25	5.96	[M-H] ⁻	329.066 58	329.066 68	-0.3	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	苜蓿素*
26	6.21	[M-H] ⁻	283.059 94	283.061 20	-4.4	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	大黄素甲醚*
27	6.52	[M-H] ⁻	150.056 16	150.056 05	0.7	C ₈ H ₉ NO ₂	苯基甘氨酸
28	6.78	[M+H] ⁺	219.175 19	219.174 34	3.9	C ₁₅ H ₂₂ O	姜黄酮
29	6.96	[M+H] ⁺	176.103 39	176.102 97	2.4	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	瓜氨酸*
30	11.32	[M-H] ⁻	101.096 97	101.097 19	-2.2	C ₆ H ₁₄ O	己醇**
31	12.00	[M+H] ⁺	257.248 75	257.247 51	4.8	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	十六酸

*仅天然品中含有, **仅合成品中含有

*only containing in natural products, **only containing in synthetic products

表 2 天竺黄天然品与合成品差异性分析结果

Table 2 Analysis of chemical constituents differences between natural and synthetic products

序号	t_R/min	分子离子峰	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	鉴定结果	平均强度/cps	
								天然品	合成品
A	1.14	[M+NH ₄] ⁺	159.077 05	159.077 01	0.3	C ₆ H ₇ NO ₃	2,5-二甲基-1,3-氧唑-4-羧酸	5 622	360
B	1.15	[M-H] ⁻	387.112 59	387.112 82	-0.6	C ₁₃ H ₂₄ O ₁₃	7-(α -D-吡喃葡萄糖基氧基)-2,3,4,5,6-五羟基庚酸	30 384	836
C	1.21	[M+Cl] ⁻	377.083 78	377.083 83	-0.1	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	蔗糖	12 092	746
D	3.90	[M+Cl] ⁻	253.104 92	253.104 68	1.0	C ₈ H ₁₈ N ₄ O ₃	N,N-二甲基氨基甲酰基- α -氮杂赖氨酸	3 000	58
E	4.75	[M+Cl] ⁻	328.106 82	328.106 86	-0.1	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₄	谷氨酰胺基苯丙氨酸	3 550	0
F	4.97	[M-H] ⁻	363.097 20	363.097 06	0.4	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₅	N-(1,3-苯并二噁唑-5-基甲基)-6-羟基-4-氧代-1,2-二氢-4H-吡咯并[3,2,1-ij]喹啉-5-甲酰胺	6 063	49

续表 2

序号	t _R /min	分子离子峰	实测值 (m/z)	理论值(m/z)	偏差 (×10 ⁻⁶)	分子式	鉴定结果	平均强度/cps	
								天然品	合成品
G	5.16	[M+H] ⁺	217.107 76	217.107 65	0.5	C ₁₀ H ₁₆ O ₅	乙酰琥珀酸二乙酯	8 160	291
H	5.26	[M-H] ⁻	351.132 51	351.132 68	-0.5	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₄	N-阿魏羟色胺	7 880	50
I	6.24	[M-H-H ₂ O] ⁻	347.101 73	347.101 51	0.6	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	N-咖啡因色氨酸	2 325	64
J	9.56	[M+H] ⁺	517.371 88	517.371 63	0.5	C ₂₇ H ₅₀ N ₄ O ₄	2-甲基-2-丙烷基[N'-(环己基甲基)-N-[[2-甲基-2-丙酰基)氧基]羰基]氨基甲酰基][5-(1-吡咯烷基)戊基]氨基甲酸酯	19 360	0
K	10.10	[M+H] ⁺	280.265 69	280.264 31	4.9	C ₁₈ H ₃₃ NO	crucigasterin E	354	8 674
L	10.96	[M+H] ⁺	282.279 56	282.280 49	-3.3	C ₁₈ H ₃₃ NO	cerebrodiene	1 859	65 482
M	12.57	[M+H] ⁺	540.537 37	540.535 57	3.3	C ₃₄ H ₆₉ NO ₃	N-(十六烷酰基)-二氢神经酰胺	14 344	1 308
N	13.02	[M+H] ⁺	413.267 71	413.267 65	0.1	C ₂₆ H ₃₆ O ₄	4-(庚氧基)苯基-4-(己氧基)苯甲酸酯	167 445	8 466

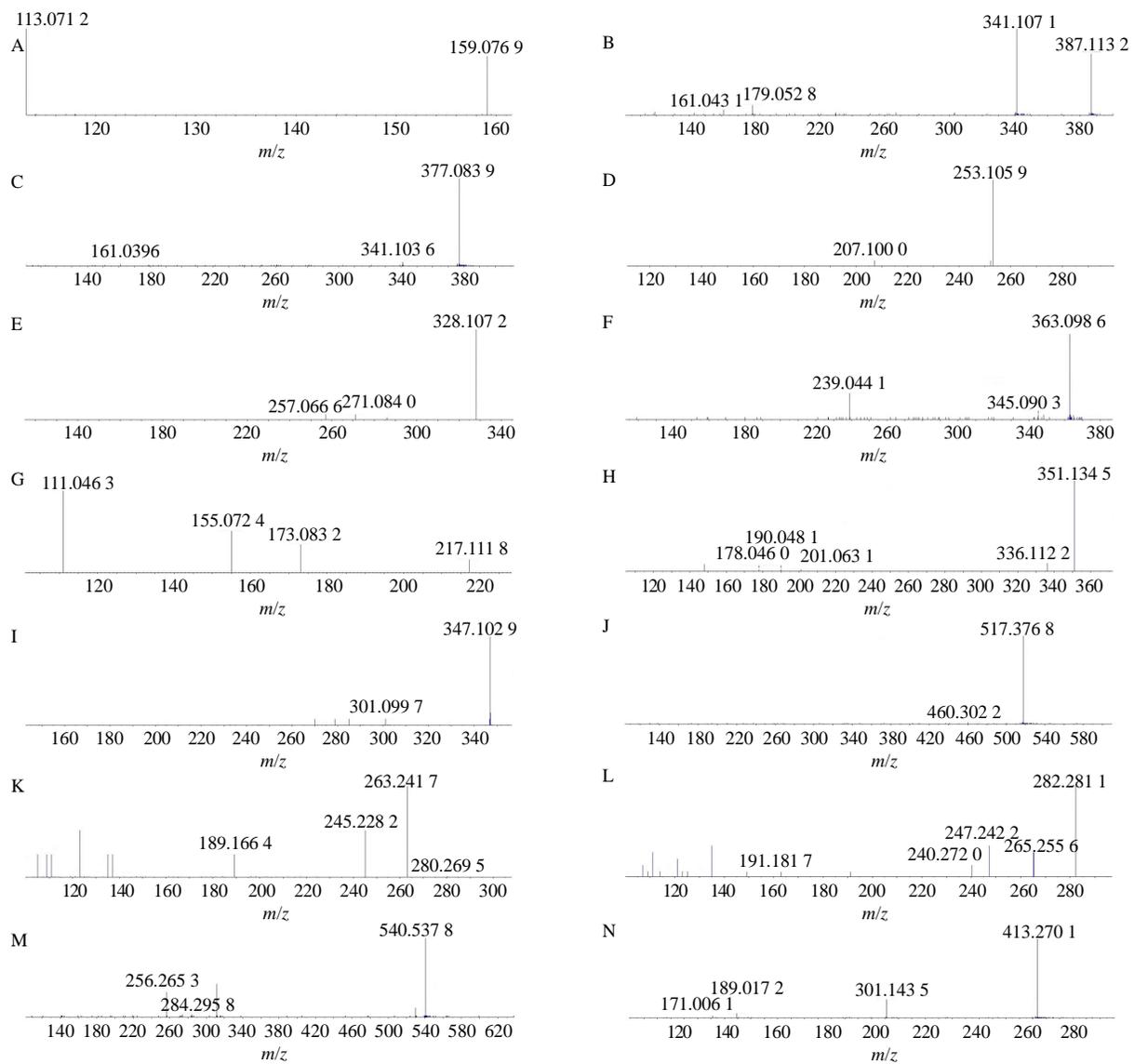


图 2 显著差异性成分裂解规律图

Fig. 2 Fragmentation rules of significant differential components by MS/MS

[N'-(环己基甲基)-N-[(2-甲基-2-丙酰基)氧基]羰基]氨基甲酰基] [5-(1-吡咯烷基)戊基]氨基甲酸酯。由差异性分析结果可知,鉴定出的 14 种物质中含氮化合物就达 10 种,此类成分广泛存在于自然界,是非常重要的化合物类别。许多有机含氮具有较强生物活性,如生物碱,有些则是生命活动不可缺少的物质,如氨基酸等,该类成分在天然品中离子强度明显高于合成品,可能与合成原料来源有关;本实验还鉴定出了 2 种糖苷类物质,即蔗糖和 7-(α -D-吡喃葡萄糖基氧基)-2,3,4,5,6-五羟基庚酸,蔗糖普遍存在于植物界的叶、花、茎、种子及果实中^[18],在天竺黄中发现该物质是合理的,而合成品中含量极微,能否将蔗糖作为区分天然品与合成品的指标性成分,有待于进一步研究确证。

3.3 OPLS-DA 分析

将高分辨质谱检测的数据结果导入 SIMCA-P 软件(版本号:14.1),建立正交偏最小二乘数学模型;由得分图(图 3)可知,天然品与合成品的数据点完全区分,表明两者存在明显化学差异。S-plot 是 SIMCA 软件在进行 OPLS-DA 分型时根据协方差和相关系数大小对变量进行的有规律展示;通常对分型贡献较小的变量会聚集在原点附近,而对分型贡献较大的变量则分散在“S”型的两端。通过 OPLS-DA 的 S-plot 模型共鉴定出 12 种差异性生物标志物(图 4 和表 3),包括醇胺类(6 个)、脂肪酸

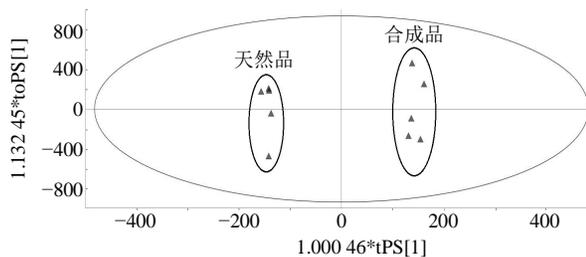
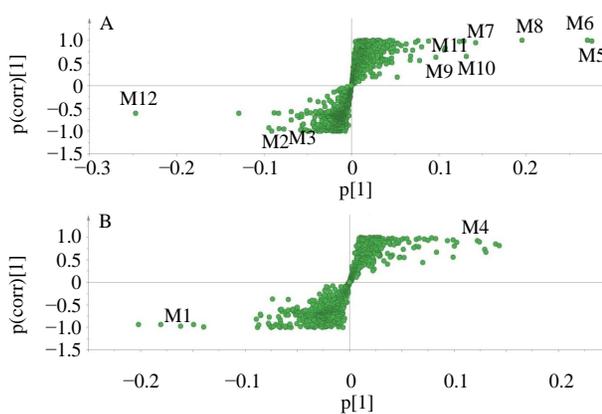


图 3 天竺黄天然品与合成品得分图

Fig. 3 Scatter plot chart of natural and synthetic products



A-正离子模式下 B-负离子模式下
A-in positive ion mode B-in negative ion mode

图 4 天竺黄天然品与合成品 S-plot 拟合图

Fig. 4 S-plot chart of natural and synthetic products

表 3 OPLS-DA 分析结果

Table 3 OPLS-DA analysis results

序号	t_R /min	分子离子峰	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	鉴定结果
M1	1.13	[M-H] ⁻	387.112 55	387.112 89	0.9	C ₂₆ H ₁₆ N ₂ O ₂	2-(2-唑啉基)-10H-茚并[1,2-g]唑啉-4-羧酸
M2	1.17	[M+H] ⁺	118.086 61	118.086 26	3.0	C ₅ H ₁₁ NO ₂	甜菜碱
M3	1.21	[M+Na] ⁺	365.106 29	365.106 34	0.1	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	蔗糖
M4	4.21	[M-H] ⁻	610.423 65	610.423 58	-0.1	C ₄₁ H ₅₇ NO ₃	4-[28-(2-氧代-1-吡咯烷基)卢帕-2,20(29)-二烯-3-基]苯甲酸
M5	6.16	[M+H] ⁺	274.274 75	274.274 96	0.8	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	N-十二烷基乙醇胺
M6	6.20	[M+H] ⁺	318.300 71	318.300 40	-0.9	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	2-{2-[2-(十二烷基氨基)乙氧基]乙氧基}乙醇
M7	6.22	[M+H] ⁺	362.326 92	362.326 93	0	C ₂₀ H ₄₃ NO ₄	3,6,9-三氧杂-12-氮杂四糖-1-醇
M8	7.02	[M+H] ⁺	270.316 61	270.316 84	0.9	C ₁₈ H ₃₉ N	十八胺
M9	7.18	[M+H] ⁺	330.337 65	330.337 47	-0.6	C ₂₀ H ₄₃ NO ₂	棕榈二乙醇胺
M10	7.67	[M+H] ⁺	358.369 00	358.369 19	0.5	C ₂₂ H ₄₇ NO ₂	2-[(2-羟乙基)氨基]-1-二十烷醇
M11	10.57	[M+H] ⁺	512.505 07	512.505 55	0.9	C ₃₂ H ₆₅ NO ₃	N-(1,1-二羟基十六烷基)十六烷酰胺
M12	13.02	[M+H] ⁺	413.267 71	413.267 65	0.1	C ₂₆ H ₃₆ O ₄	4-(庚氧基)苯基-4-(己氧基)苯甲酸酯

酯类 (3 个)、生物碱类 (1 个)、糖类 (1 个)、胺类 (1 个), 其中除甜菜碱外均为天竺黄相关文献中首次报道, 鉴定出的物质中有 10 种是含氮化合物, 仅醇胺类就占到 50%。在正离子模式下分布于 S 形两端的分别为 4-(庚氧基)苯基-4-(己氧基)苯甲酸酯、N-十二烷基乙醇胺和 2-{2-[2-(十二烷基氨基)乙氧基]乙氧基}乙醇; 在负离子模式下, 仅鉴定出 2 种化合物分别为 2-(2-喹啉基)-10H-茛并[1,2-g]喹啉-4-羧酸和 4-[28-(2-氧代-1-吡咯烷基)卢帕-2,20(29)-二烯-3-基]苯甲酸。由上述定性结果 (表 1) 可知, 甜菜碱是天竺黄中唯一找到的已知生物碱, 在差异性分析中并未检出 (表 2), 而在 OPLS-DA 分析中却被发现, 可能是该物质在伪品合成过程中被有意添加, 但添加比例与天然品有显著差异, 甜菜碱普遍存在于动植物体内, 在营养物质代谢中起着十分重要的作用^[19]。与差异性分析结果相同的是蔗糖同样

作为区分天然品与合成品的生物标志物, 进一步显示蔗糖可以作为天然品与合成品药材的鉴别指标。12 种生物标志物的裂解规律图见图 5。

4 讨论

天竺黄是我国常用且重要中药材, 为《中国药典》2015 年版所收载^[20]。由于正品资源短缺, 人工天竺黄自上世纪 60 年代以后在临床上常替代天竺黄药用, 甚至有学者认为人工合成天竺黄功效等同于天然品^[21]。本研究应用高分辨质谱采集数据, PeakView、OPLS-DA 等方法进行分析处理, 对天竺黄天然品及合成品进行了详细的对比研究, 共鉴定出 54 种化合物, 其中已知成分仅 11 种, 化合物类别包含氨基酸、有机酸、糖苷、生物碱、黄酮类等。定性分析结果显示, 仅在正品中发现了芦丁、苜蓿素、大黄素甲醚, 3 种物质在植物界中均广泛存在, 在天竺黄中检测出来亦有可能, 且质谱定性

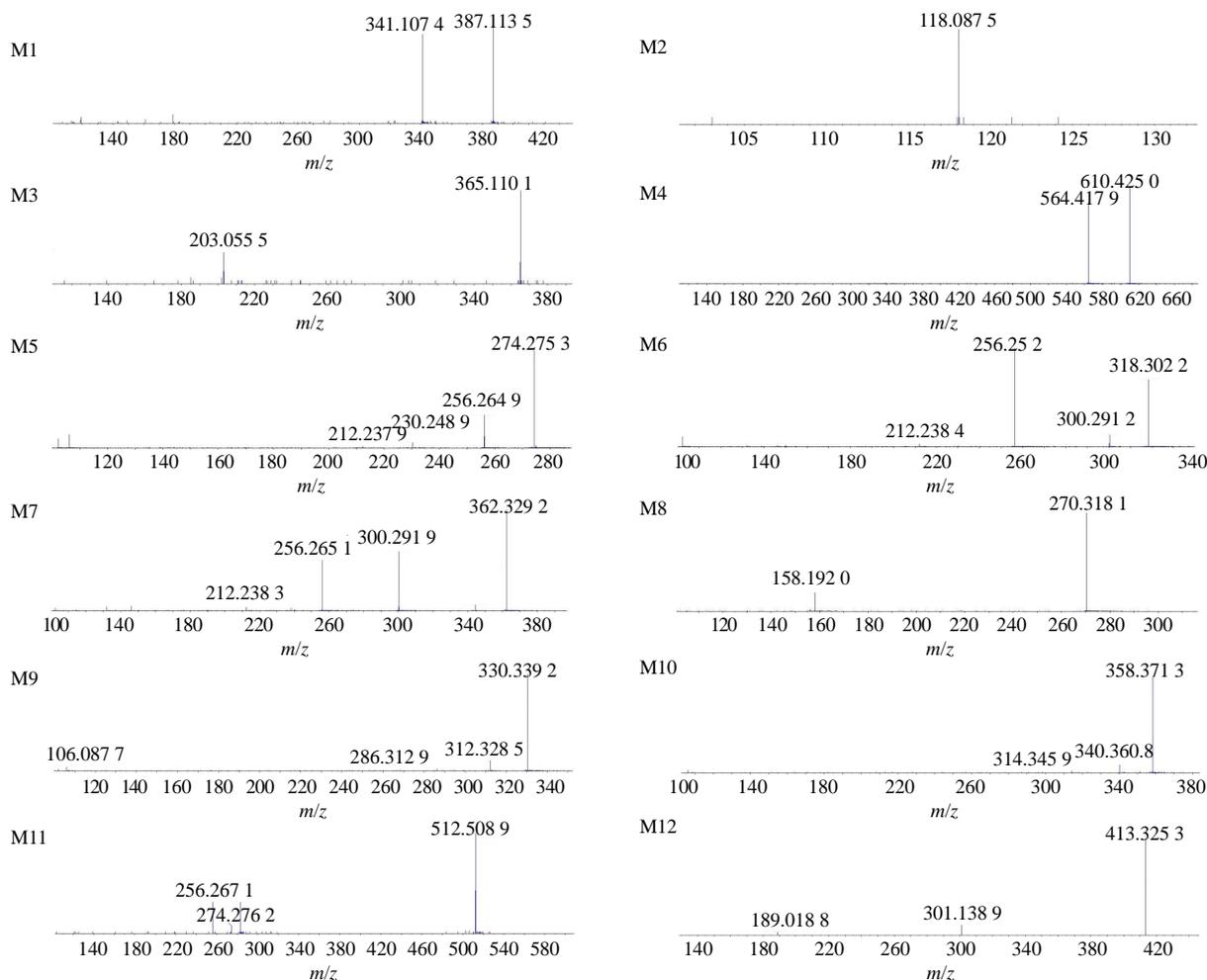


图 5 生物标志物裂解规律图

Fig. 5 Fragmentation rules of biomarkers by MS/MS

存在同分异构情况；仅在合成品中发现石竹烯、阿魏酸、二羟基肉桂酸，可能是由合成原料所引入。差异性分析共找到 14 种成分，OPLS-DA 分析共找到 12 种生物标志物，两者鉴定结果显示含氮类化合物占多数；甜菜碱是定性分析中唯一检测出的已知生物碱，在正交偏最小二乘判别分析中亦被发现，说明该成分在伪品合成时可能被有意添加，但含量比例与天然品存在较大差异；2 种差异分析方法共同检出的成分为蔗糖，是否可以将蔗糖作为区分 2 种药材的指标性成分，还有待课题组进一步研究确证。本实验对天竺黄天然品与合成品间化学差异进行了深入探究，为天竺黄的药效物质基础、质量控制、真伪鉴别等提供科学依据。

参考文献

- [1] 王春柳, 唐涛, 臧巧真, 等. 天竺黄炮制对冰片有效成分溶出的影响 [J]. 现代中药研究与实践, 2016, 30(6): 50-52.
- [2] 刘振启, 刘杰. 天竺黄不同种类的鉴别 [J]. 首都食品与医药, 2015, 22(15): 53-53.
- [3] 付秀英. 天竺黄与其混淆品的鉴别 [J]. 光明中医, 2010, 25(2): 309.
- [4] 马伟才, 邓建新, 包海鹰. 菌物药竹黄与植物药天竺黄的鉴别方法研究 [J]. 菌物研究, 2007, 5(1): 59-62.
- [5] 何报作, 李伟年, 何振华. 注意天竺黄中掺伪白矾 [J]. 中药材, 1996, 19(7): 346.
- [6] 梁俊德. 注意天竺黄中掺伪石英 [J]. 中药材, 1995, 18(2): 77.
- [7] 郑国芸. 天竺黄中掺伪方解石的鉴别 [J]. 中国药师, 1999, 2(2): 108.
- [8] 王春柳, 刘峰, 龙凯花, 等. 天竺黄中 5 种无机元素的 FAAS 测定 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 824-826.
- [9] 封秀娥. 天竺黄与人工合成竹黄的比较 [J]. 西北药学杂志, 1990, 5(1): 34-36.
- [10] Ding Y L, Fan R W, Huang J S. Development and ultrastructure of the phloem ganglion in bamboo node [J]. *Acta Bot Sin*, 2000, 42(10): 1009-1013.
- [11] Grosser D, Liese W. On the anatomy of Asian bamboos with special reference to their vascular bundles [J]. *Wood Sci Technol*, 1971, 5(4): 290-312.
- [12] Parameswaran N, Liese W. On the fine structure of bamboo fibres [J]. *Wood Sci Technol*, 1976, 10(4): 231-246.
- [13] 王明君, 郑璞, 孙志浩, 等. 微生物转化香草酸生产香草醛 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(2): 43-47.
- [14] 焦晓林, 毕晓宝, 高微微. *p*-香豆酸对西洋参的化感作用及生理机制 [J]. 生态学报, 2015, 35(9): 3006-3013.
- [15] 王惠珍, 晋玲, 张恩和. 海拔对当归中阿魏酸量的影响及关键因子分析 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 219-223.
- [16] 陈旭冰, 全诚, 陈光勇. β -石竹烯的研究进展 [J]. 山东化工, 2011, 40(7): 34-36.
- [17] 王金宏, 潘琪, 石钰桐, 等. 芦丁的提取及抑菌活性研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2018, 31(1): 22-24.
- [18] 刘洋, 林希昊, 姚艳丽, 等. 高等植物蔗糖代谢研究进展 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(6): 145-152.
- [19] 范晓光, 张通, 李杰, 等. 甜菜碱在微生物中的代谢及应用研究进展 [J]. 发酵科技通讯, 2018, 47(3): 151-156.
- [20] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [21] 王春柳, 刘峰, 龙凯花, 等. 天竺黄与合成天竺黄热分析 [J]. 陕西中医, 2014, 35(11): 1553-1554.