

## 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 代谢组学技术筛选不同基原小檗皮品种鉴别的指标性成分

徐鑫梅<sup>1</sup>, 杜欢<sup>1</sup>, 易欢<sup>1</sup>, 武鑫玥<sup>1</sup>, 冯图<sup>2\*</sup>, 蒋桂华<sup>1</sup>, 范刚<sup>3\*</sup>

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137
2. 贵州工程应用技术学院生态工程学院, 贵州 毕节 551700
3. 成都中医药大学民族医药学院, 四川 成都 611137

**摘要:** 目的 研究不同基原小檗皮药材(甘肃小檗 *Berberidis kansuensis* Schneid.、鲜黄小檗 *B. diaphana* Maxim.、匙叶小檗 *B. verna* Schneid.和刺红珠 *B. dictyophylla* Franch.) 的整体化学成分差异, 筛选品种鉴别的指标性成分。方法 采用超高效液相色谱-串联四级杆静电场轨道阱质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)代谢组学技术, 分析不同基原小檗皮药材的整体化学成分, 结合主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(partial least-squares discrimination analysis, PLS-DA)和方差分析筛选不同基原鉴别的化学标志物。**结果** 共鉴定了 47 个化学成分, 包括 24 个生物碱类、12 个有机酸类及其衍生物、5 个糖类及其衍生物, 以及 6 个其他类成分。筛选出药根碱、四氢巴马汀、蟾毒色胺内盐等 12 个化学标志物。**结论** UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 代谢组学技术结合化学计量学方法, 可有效阐明小檗皮不同基原药材的化学成分差异, 为其品种鉴别和质量控制提供了参考依据。

**关键词:** 小檗皮; 甘肃小檗; 鲜黄小檗; 匙叶小檗; 刺红珠; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; 代谢组学; 品种鉴定; 化学标志物; 药根碱; 四氢巴马汀; 蟾毒色胺内盐

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)23-7524-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.23.024

## Selection of indicative components for identification of different species of *Berberidis Cortex* based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS metabolomics

XU Xin-mei<sup>1</sup>, DU Huan<sup>1</sup>, YI Huan<sup>1</sup>, WU Xin-yue<sup>1</sup>, FENG Tu<sup>2</sup>, JIANG Gui-hua<sup>1</sup>, FAN Gang<sup>3</sup>

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China
2. School of Ecological Engineering, Guizhou University of Engineering Science, Bijie 551700, China
3. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

**Abstract: Objective** To study the differences in the overall chemical composition of different species of *Berberidis Cortex* (*Berberidis kansuensis*, *B. diaphana*, *B. verna*, and *B. dictyophylla*), and to select the chemical markers for species identification.

**Methods** Ultra high performance liquid chromatography-Q-exactive orbitrap-mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS) metabolomics was used to analyze the overall chemical composition of different species of *Berberidis Cortex*, combined with principal component analysis (PCA), partial least square discriminant analysis (PLS-DA) and variance analysis to select chemical markers for identification. **Results** A total of 47 chemical components were identified, including 24 alkaloids, 12 organic acids and their derivatives, 5 sugars and their derivatives, and 6 other components. Twelve chemical markers, such as jatrorrhizine, tetrahydropalmatine and bufotenidine, were screened out. **Conclusion** UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS metabolomics combined with chemometric methods can effectively clarify the chemical composition differences of different species of *Berberidis Cortex*, and provide a reference for the identification and the quality control of *Berberidis Cortex*.

**Key words:** *Berberidis Cortex*; *Berberis kansuensis* Schneid.; *Berberis diaphana* Maxim.; *Berberis verna* Schneid.; *Berberis dictyophylla* Franch.; UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS; metabolomics; species identification; indicative components; jatrorrhizine; tetrahydropalmatine; bufotenidine

收稿日期: 2022-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(81874370); 四川省重点研发项目(2022YFS0434); 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2021]一般 090); 贵州省教育厅科技拔尖人才支持计划项目(黔教合 KY 字[2018] 072)

作者简介: 徐鑫梅, 硕士, 主要从事中药品种、品质与资源开发研究。Tel: (028)61800160 E-mail: 1483773389@qq.com

\*通信作者: 范刚, 教授, 主要从事民族药质量控制及药效物质基础研究。Tel: (028)61800160 E-mail: fangang1111@163.com

冯图, 教授, 主要从事药用植物学研究。Tel: (0857)8330068 E-mail: 58689136@qq.com

小檗皮为小檗科植物甘肃小檗 *Berberis kansuensis* Schneid. 及其同属多种植物的干燥茎皮或根皮<sup>[1]</sup>, 是藏医治疗糖尿病及其并发症的常用药材。小檗皮为典型的多基原藏药材, 同属多种植物均能入药, 课题组前期调查发现目前各藏医院及药材市场上使用的小檗皮主流品种为甘肃小檗 *B. kansuensis* Schneid.、鲜黄小檗 *B. diaphana* Maxim.、匙叶小檗 *B. verna* Schneid. 和刺红珠 *B. dictyophylla* Franch.<sup>[2]</sup>。小檗皮基原的多样性和混淆使用不利于市场监管, 也影响其质量稳定性和可控性。因此, 采用现代科学技术筛选可鉴别小檗皮不同基原品种的化学标志物, 对于其品种鉴定和质量控制具有重要的意义。

近年来, 代谢组学技术已广泛运用于植物药材的整体成分分析、品种鉴别和质量评价等研究中。超高效液相色谱-串联四级杆静电场轨道阱质谱 (UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS) 具有高分辨率、高灵敏度的方法学优势, 特别适用于植物药材多成分复杂体系的分析<sup>[3]</sup>。小檗皮药材主要含有小檗碱、木兰花碱、蟾毒色胺内盐等成分, 课题组前期采用 HPLC 和 <sup>1</sup>H-NMR 技术定性定量分析了小檗皮药材中的部分化学成分<sup>[4-5]</sup>, 但仍然缺乏全面的定性表征。因此, 本研究采用基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 的代谢组学技术, 从整体上对小檗皮不同基原药材的化学成分进行定性分析, 并结合主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析 (partial least-squares discrimination analysis, PLS-DA) 和方差分析, 筛选可鉴别不同基原小檗皮的化学标志物, 以期小檗皮药材的品种鉴别和质量评价提供科学依据。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

Q-Exactive™ Orbitrap 高分辨质谱仪、Vanquish™ 超高效液相色谱仪、Compound Discoverer 3.0 工作站、Xcalibur 2.1 工作站 (美国 Thermo-Fisher 公司); CQ-250 型超声波清洗器 (上海必能信有限公司); Sartorius BP121s 型电子天平 (北京赛多利斯科学仪器公司)。

### 1.2 试剂

对照品蟾毒色胺内盐、阿魏酸 4-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷为本课题组自制, HPLC 检测质量分数均 > 99%; 对照品木兰花碱 (批号 M-026-181122)、小檗红碱 (批号 X-061-181129) 和去亚甲基小檗碱 (批

号 Y-126-180426) 均购自成都瑞芬思生物科技有限公司, 质量分数均 > 98%; 对照品药根碱 (批号 Y-023-141201)、巴马汀 (批号 H-015-150808) 和小檗碱 (批号 Y-035-150818) 均购自四川赛因斯特生物科技有限公司, 质量分数均 > 98%; 色谱纯甲醇、甲酸购自美国 Thermo-Fisher 公司; 分析纯甲醇购自成都市科隆化学品有限公司; 蒸馏水购自广州屈臣氏食品饮料有限公司。

本研究共收集 21 批小檗皮药材, 采用植物分类学及课题组前期建立的 DNA 条形码方法<sup>[2]</sup>, 经成都中医药大学范刚教授鉴定为小檗科植物刺红珠 *B. dictyophylla* Franch.、甘肃小檗 *B. kansuensis* Schneid.、匙叶小檗 *B. verna* Schneid. 和鲜黄小檗 *B. diaphana* Maxim., 具体信息见表 1。

表 1 小檗皮样品信息

Table 1 Source information of *Berberidis Cortex*

编号	基原	批号	收集地
S1	刺红珠	CHZ052301	云南省迪庆州藏医院
S2	刺红珠	CHZ052402	四川省甘孜州得荣县中藏医院
S3	刺红珠	CHZ052503	西藏自治区甘露藏药厂
S4	甘肃小檗	GS061001	四川省成都荷花池中药材专业市场
S5	甘肃小檗	GS061502	西藏自治区山南雅布拉克藏药厂
S6	甘肃小檗	GS072203	甘肃省卓尼县
S7	甘肃小檗	GS072204	甘肃省临潭县木布乡
S8	甘肃小檗	GS072205	青海省同仁县曲库乎乡
S9	甘肃小檗	GS073006	西藏自治区食品药品检验所
S10	匙叶小檗	SY072101	青海省大通县
S11	匙叶小檗	SY072202	甘肃省卓尼县地利村
S12	匙叶小檗	SY072203	甘肃省卓尼县刀告乡
S13	匙叶小檗	SY072404	甘肃省夏河县王格尔塘镇
S14	匙叶小檗	SY072605	青海省黄南州藏医院
S15	匙叶小檗	SY072606	青海亚朗中藏药材批发部
S16	鲜黄小檗	XH061201	四川省康定县雅加埂
S17	鲜黄小檗	XH061402	四川省甘孜州康定折多山二台子
S18	鲜黄小檗	XH072203	甘肃省合作市
S19	鲜黄小檗	XH072804	西藏自治区藏药厂
S20	鲜黄小檗	XH072105	青海省西宁市药材市场
S21	鲜黄小檗	XH072806	西藏藏药集团股份有限公司

## 2 方法

### 2.1 供试品溶液的制备

取小檗皮粉末 (过 3 号筛) 0.1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 20 mL 甲醇, 称定质量, 密塞, 超声 (250 W、40 kHz) 处理 30 min, 放冷, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀滤过, 取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

### 2.2 对照品溶液的制备

取对照品蟾毒色胺内盐、阿魏酸 4-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、木兰花碱、药根碱、巴马汀、小檗红碱、小檗碱、去亚甲基小檗碱对照品适量, 精密称定, 分别制成质量浓度为 0.41、0.47、0.62、0.62、0.55、

0.44、0.48、0.51  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的对照品溶液, 即得。

### 2.3 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 柱 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ); 流动相为甲醇 (A)-0.1%甲酸溶液 (B); 梯度洗脱: 0~20 min, 5%~80% A; 20~30 min, 80%~95% A; 30~35 min, 95%~95% A; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量 2  $\mu\text{L}$ 。

### 2.4 质谱条件

参照课题组前期建立的质谱条件<sup>[6]</sup>。采用 HESI 离子源, 正离子检测模式, 电喷雾电压为 +3000 V; 负离子检测模式, 电喷雾电压为 -3000 V; 鞘气体积流量为 35 arb; 辅助气体积流量为 10 arb; 毛细管温度为 320  $^{\circ}\text{C}$ ; 二级质谱采用 Full MS/dd-MS<sup>2</sup> 扫描模式, Full MS 分辨率为 70 000, dd-MS<sup>2</sup> 分辨率为 17 500, 扫描范围  $m/z$  100~1500。

### 2.5 数据处理与分析

将质谱原始数据导入 Compound Discoverer 3.0 软件中, 对其进行谱峰提取、保留时间校正、峰对齐及噪音信号去除等预处理。预处理后的质谱数据信息与 mzClond 和 mzVault 数据库进行匹配, 通过数据库中精准的相对分子质量以及二级质谱碎片离子对化合物进行归属和鉴定。同时查阅 ChemSpider、Pubchem、Scifinder 等在线数据库并结合相关文献报道检索化合物可能的化学结构式和

裂解碎片, 对鉴定的成分进行比对和验证, 进一步排除假阳性结果。将预处理的数据矩阵导入 SIMCA-P 14.1 软件, 对不同基原小檗皮进行 PCA 以及 PLS-DA 分析, 并采用单因素方差分析进行验证。同时, 运用 MetaboAnalyst 5.0 软件对化学标志物进行聚类热图分析, 观察差异成分在不同基原小檗皮药材中的分布情况。

## 3 结果与分析

### 3.1 小檗皮化学成分的鉴定

根据“2.1”项下方法制备供试品溶液, 按照建立的 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 方法对 21 批小檗皮样品进行分析。将质谱数据信息预处理后, 检索数据库进行匹配, 并与文献报道中的碎片离子信息进行比对验证, 共鉴别了 47 个化学成分。小檗皮中主要含有氨基酸、有机酸、糖类、糖类等初级代谢产物, 以及生物碱等次级代谢产物。其中包含 24 个生物碱类成分, 主要为异喹啉类生物碱, 如小檗碱、巴马汀、药根碱、小檗红碱、去亚甲基小檗碱等; 12 个有机酸类成分及其衍生物, 如奎宁酸、哌啶酸、苹果酸等; 5 个糖类及其衍生物, 包括 *D*-葡萄糖胺、葡萄糖酸、果糖、蔗糖和海藻糖, 其他类成分 6 个, 包括焦谷氨酸、脯氨酸、腺嘌呤、鸟苷、刺五加苷 E 和 larciresinol 4-*O*-glucoside。鉴定的化合物具体质谱裂解信息见表 2。

表 2 小檗皮化学成分质谱鉴定结果

Table 2 MS identification results of chemical constituents of *Berberidis Cortex*

序号	$t_R/\text{min}$	分子式	模式	理论值 ( $m/z$ )	测定值 ( $m/z$ )	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	MS/MS 碎片 (峰强度值) ( $m/z$ )	鉴定结果
1	3.181	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	180.086 6	180.086 4	-1.11	180.086 4 (8), 162.075 9 (100), 144.065 3 (33), 84.044 8 (80), 72.044 9 (73), 60.045 0 (50)	<i>D</i> -葡萄糖胺
2	3.394	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	130.049 9	130.049 7	-1.54	130.049 7 (24), 85.028 8 (4), 84.044 8 (100)	<i>L</i> -焦谷氨酸
3	3.475	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	195.049 9	195.050 4	-3.08	195.050 4 (70), 129.018 3 (40), 99.007 9 (10), 96.959 1 (40), 87.007 7 (12), 75.007 7 (100), 71.012 8 (10), 59.012 8 (18)	葡萄糖酸
4	3.481	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	179.055 0	179.055 5	2.79	179.055 5 (82), 161.044 8 (59), 134.987 0 (5), 131.033 7 (5), 89.023 4 (8), 85.028 5 (25), 71.012 8 (81), 59.012 8 (100)	果糖
5	3.518	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	118.086 3	118.086 2	-0.85	118.086 2 (100), 59.073 5 (12), 58.065 7 (9)	甜菜碱
6	3.609	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	341.107 8	341.108 7	-0.59	341.108 7 (33), 179.055 6 (27), 119.034 0 (26), 113.023 5 (19), 101.023 5 (27), 89.023 4 (93), 71.012 8 (58), 59.012 8 (100)	蔗糖
7	3.668	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	138.055 0	138.054 7	-2.17	138.054 7 (100), 110.060 2 (6), 96.044 7 (1), 94.065 4 (7)	葫芦巴碱
8	3.682	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	116.070 6	116.070 6	0.00	116.070 6 (27), 70.065 6 (100)	脯氨酸
9	3.744	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	191.055 0	191.055 3	1.57	191.055 5 (100), 173.044 9 (2), 127.039 2 (4), 102.947 9 (1), 93.033 5 (7), 87.007 8 (4), 85.028 5 (21), 59.012 8 (3)	奎宁酸
10	3.750	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	341.108 9	341.108 7	-0.59	341.108 7 (44), 179.055 3 (30), 161.044 8 (7), 119.034 0 (35), 113.023 5 (24), 101.023 6 (29), 89.023 4 (95), 85.028 3 (10), 71.012 8 (57), 59.004 9 (100)	海藻糖
11	3.754	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	130.086 2	130.086 2	0	130.086 2 (46), 84.081 2 (100), 82.065 6 (1), 67.667 5 (1)	哌啶酸
12	4.397	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	133.013 1	133.013 4	2.26	133.013 4 (31), 132.866 9 (20), 115.002 7 (100), 89.023 3 (9), 72.992 0 (15), 71.012 8 (68), 59.012 8 (2)	苹果酸
13	4.768	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	136.061 8	136.061 6	-1.47	136.061 6 (100), 119.035 3 (3), 94.040 4 (1), 91.054 6 (1)	腺嘌呤
14	5.917	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	191.018 6	191.019 3	-2.09	191.019 3 (13), 146.937 8 (22), 111.007 8 (100), 102.947 8 (89), 87.007 7 (55), 85.028 5 (35), 57.033 5 (7)	柠檬酸
15	7.351	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	284.098 9	284.098 2	-2.46	284.098 2 (1), 152.056 5 (100), 135.029 7 (2), 110.034 8 (1)	鸟苷

续表 2

序号	<i>t<sub>R</sub></i> /min	分子式	模式	理论值 ( <i>m/z</i> )	测定值 ( <i>m/z</i> )	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	MS/MS 碎片 (峰强度值) ( <i>m/z</i> )	鉴定结果
16	7.379	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	219.149 2	219.148 8	-1.83	219.148 8 (11), 160.075 4 (100), 132.080 6 (5), 117.057 3 (1), 115.054 2 (2), 60.081 4 (7)	蟾毒色胺内盐*
17	7.660	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	205.133 5	205.133 3	-0.97	205.133 3 (10), 160.075 4 (66), 132.080 6 (4), 58.065 7 (100)	蟾毒色胺 <sup>[7]</sup>
18	10.175	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	272.128 1	272.127 6	-1.84	272.127 6 (65), 255.101 0 (31), 164.070 6 (2), 161.059 4 (19), 143.048 9 (9), 107.049 3 (100)	去甲乌药碱 <sup>[8]</sup>
19	10.355	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	201.102 2	201.101 9	-1.49	201.101 9 (100), 186.078 3 (3), 170.059 7 (5), 160.075 6 (1)	去甲骆驼蓬碱 <sup>[9]</sup>
20	10.671	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	153.018 2	153.018 5	1.96	153.018 5 (17), 152.894 2 (1), 109.028 5 (100), 108.987 7 (2), 108.020 (7), 81.033 6 (2)	2,3-二羟基苯甲酸
21	11.213	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>5</sub>	[M] <sup>+</sup>	354.133 6	354.132 9	-1.98	354.132 9 (100), 339.109 5 (51), 324.085 4 (6), 321.098 7 (16), 320.090 (2), 310.106 6 (3), 306.075 6 (9), 296.091 3 (16), 268.096 5 (8)	413-羟基药根碱 <sup>[10]</sup>
22	11.635	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	328.153 8	328.153 6	-0.61	328.153 6 (100), 313.130 1 (32), 312.122 3 (42), 298.106 7 (5), 297.099 8 (4), 151.075 2 (6)	去甲异紫堇定 <sup>[11]</sup>
23	11.865	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	195.065 2	195.065 1	-0.51	195.065 1 (2), 177.054 3 (100), 149.059 5 (17), 145.028 2 (69), 117.033 5 (32), 89.038 9 (14)	阿魏酸
24	11.868	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	355.102 4	355.102 4	0	355.102 4 (3), 193.050 0 (100), 178.026 4 (20), 149.060 0 (31), 137.023 (3), 134.036 4 (83)	3阿魏酸 4-O-β-D 吡喃葡萄糖苷*
25	11.868	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	209.080 8	209.079 9	-4.30	209.079 9 (1), 177.054 3 (100), 149.059 5 (13), 145.028 2 (63), 117.03 (30), 89.038 9 (11)	35阿魏酸甲酯
26	11.937	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>4</sub>	[M] <sup>+</sup>	342.170 0	342.169 2	-2.34	342.169 2 (100), 297.111 5 (36), 282.088 0 (12), 265.085 4 (29), 237.090 5 (9), 58.065 7 (75)	木兰花碱*
27	12.586	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	330.170 0	330.170 1	0.30	330.170 1 (70), 299.127 1 (5), 284.128 0 (10), 192.101 5 (100), 177.078 (13), 175.075 1 (17), 143.048 9 (21), 137.059 5 (42)	2牛心果碱 <sup>[10]</sup>
28	12.694	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	223.060 1	223.060 7	2.69	223.060 7 (60), 208.037 2 (100), 193.013 6 (96), 164.047 1 (37), 163.039 5 (19), 152.010 7 (21), 149.023 6 (75), 121.028 4 (36)	芥子酸
29	12.980	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>3</sub>	[M] <sup>+</sup>	314.175 1	314.174 3	-2.55	314.174 3 (100), 269.116 6 (10), 237.090 5 (4), 209.095 5 (4), 192.102 (3), 175.075 1 (4), 145.064 4 (4), 143.049 0 (6), 137.059 3 (4), 121.065 0 (4), 107.049 3 (42), 58.065 7 (27)	1oblongine <sup>[12]</sup>
30	13.091	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	328.154 3	328.153 4	-2.74	328.153 4 (47), 297.111 5 (75), 265.085 3 (100), 237.090 4 (23), 233.059 2 (20), 205.064 4 (20), 58.065 7 (10)	波尔定碱 <sup>[13]</sup>
31	13.170	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>4</sub>	[M] <sup>+</sup>	356.185 6	356.184 9	-1.97	356.184 9 (100), 311.126 9 (20), 296.104 0 (9), 279.101 1 (33), 264.075 5 (16), 251.106 5 (8), 248.082 7 (12), 236.082 8 (11), 58.065 7 (75)	蝙蝠葛任碱 <sup>[10]</sup>
32	13.356	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	521.201 7	521.202 8	2.11	521.202 8 (3), 359.149 7 (100), 344.126 3 (39), 313.107 3 (15), 299.092 (10), 255.066 0 (11), 241.050 1 (14), 109.028 5 (16)	1Iariciresinol 4-O-glucoside
33	13.828	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	179.035 0	179.034 3	-3.91	179.034 3 (19), 135.044 2 (100)	咖啡酸
34	14.008	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	356.185 6	356.184 9	-1.97	356.184 9 (58), 341.164 0 (1), 192.101 6 (100), 190.086 1 (2), 177.078 (20), 165.091 0 (1), 148.075 5 (1)	2四氢巴马汀 <sup>[12]</sup>
35	14.382	C <sub>34</sub> H <sub>46</sub> O <sub>18</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	741.261 1	741.261 7	0.81	417.155 3 (100), 387.108 9 (16), 181.049 9 (85), 166.026 3 (53)	刺五加苷 E <sup>[14]</sup>
36	14.413	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>5</sub>	[M] <sup>+</sup>	352.118 5	352.117 1	-3.98	352.117 1 (100), 337.093 8 (22), 336.085 8 (37), 334.070 8 (2), 322.070 (11), 320.090 7 (8), 308.091 0 (28), 294.075 4 (10)	113-羟基小檗碱 <sup>[8]</sup>
37	14.954	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub>	[M] <sup>+</sup>	324.123 0	324.122 2	-2.47	324.122 2 (100), 309.098 8 (44), 308.091 0 (36), 294.075 3 (20), 280.096 2 (28), 266.080 8 (12)	去亚甲基小檗碱*
38	15.075	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>4</sub>	[M] <sup>+</sup>	370.201 2	370.200 4	-2.16	370.200 4 (60), 206.117 1 (100), 191.093 5 (9), 190.085 9 (10), 176.075 4 (1), 165.090 7 (1), 150.067 2 (1)	N-甲基四氢巴马汀 <sup>[14]</sup>
39	15.839	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub>	[M] <sup>+</sup>	322.107 4	322.106 4	-3.10	322.106 4 (100), 320.091 5 (3), 307.083 1 (91), 306.075 4 (2), 305.067 (3), 279.088 2 (14), 278.079 8 (5)	1芬式唐松草定碱 <sup>[12]</sup>
40	15.857	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub>	[M] <sup>+</sup>	338.139 2	338.137 8	-4.14	338.137 8 (100), 323.114 6 (32), 322.106 7 (42), 308.090 9 (17), 294.111 8 (28), 280.096 2 (15), 279.088 5 (13)	药根碱*
41	15.872	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	163.039 0	163.039 3	1.84	163.039 3 (7), 163.000 6 (1), 162.838 1 (1), 142.991 3 (1), 119.049 3 (100), 92.994 7 (2), 61.987 2 (1)	3-香豆酸
42	16.483	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>4</sub>	[M] <sup>+</sup>	322.107 4	322.106 6	-2.48	322.106 6 (100), 307.083 3 (43), 306.075 3 (37), 292.059 8 (21), 279.088 9 (2), 278.080 6 (24), 264.065 2 (15)	小檗红碱*
43	16.513	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub>	[M] <sup>+</sup>	336.123 0	336.122 3	-2.08	336.122 3 (100), 321.098 9 (27), 320.091 0 (52), 306.075 3 (15), 304.096 3 (11), 292.096 2 (42), 278.080 7 (16)	小檗碱*
44	16.568	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>4</sub>	[M] <sup>+</sup>	352.154 3	352.153 7	-1.70	352.153 7 (100), 337.130 4 (24), 336.122 4 (42), 322.106 7 (14), 308.127 9 (24), 294.112 0 (13), 292.096 2 (7)	巴马汀*
45	17.257	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>4</sub>	[M] <sup>+</sup>	350.138 7	350.138 0	-2.00	350.138 0 (100), 335.114 4 (13), 334.106 6 (7), 320.091 2 (38), 318.112 1 (5), 306.112 1 (11), 292.096 1 (20)	13-甲基小檗碱 <sup>[11]</sup>
46	22.714	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	327.216 6	327.217 6	3.06	327.217 6 (100), 291.195 7 (4), 242.986 9 (3), 229.144 3 (19), 211.133 6 (30), 171.101 9 (11), 97.065 0 (6)	corchorifatty acid F
47	25.004	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	352.117 9	352.117 2	-1.99	352.117 2 (100), 337.093 8 (51), 336.087 0 (2), 322.070 4 (73), 320.092 7 (3), 319.084 1 (3), 308.090 8 (6), 294.075 6 (21), 279.052 9 (1)	8-氧化小檗碱 <sup>[12]</sup>

\*表示与对照品比对鉴定

\*It indicates the comparison and identification with the references

### 3.2 不同基原小檗皮的图谱比较

取不同基原小檗皮样品, 根据“2.1”项下方法制备供试品溶液, 在“2.3”“2.4”项下色谱质谱条件进行测定, 得到不同基原小檗皮药材在正、负离子模式下全扫描总离子流图, 见图 1。通过直观分析, 可以看出 4 个基原品种小檗皮药材的整体化学成分轮廓大致相同, 但其部分信号峰的强度不同, 表明不同基原小檗皮的化学成分虽然相似, 但成分在含量上有一定差异。

### 3.3 基于模式识别比较小檗皮不同基原药材的化学成分差异

将原始质谱数据通过 Compound Discoverer 3.0

预处理后, 将数据矩阵导入 SIMCA-P 软件进行 PCA 分析, 选择标度化方法为帕累托法, 其 PCA 得分图如图 2-A 所示。结果显示, 匙叶小檗和甘肃小檗在  $t[2]$  轴上呈现明显分离, 刺红珠、鲜黄小檗和甘肃小檗较为接近, 3 组散点交互存在, 有部分重叠, 没有达到明显分离。

为了消除样品组内差异的影响, 进一步采用 PLS-DA 方法进行判别分析。由二维得分图 (图 2-B) 可以看出, 匙叶小檗和刺红珠、甘肃小檗、鲜黄小檗得到明显分离, 而刺红珠、甘肃小檗和鲜黄小檗仍存在少量重叠, 不能得到明显区分。此外, 三维得分图 (图 2-C) 展示了 21 个样本的

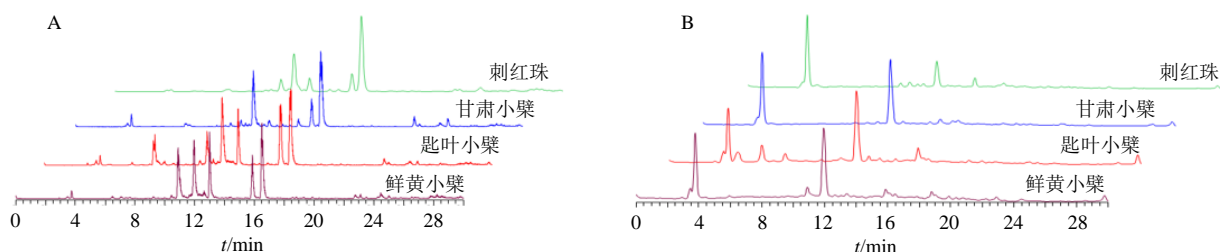


图 1 小檗皮 4 种基原的正 (A)、负 (B) 离子模式总离子流图

Fig. 1 Positive ion (A) and negative ion (B) current chromatogram of four species of *Berberidis Cortex*

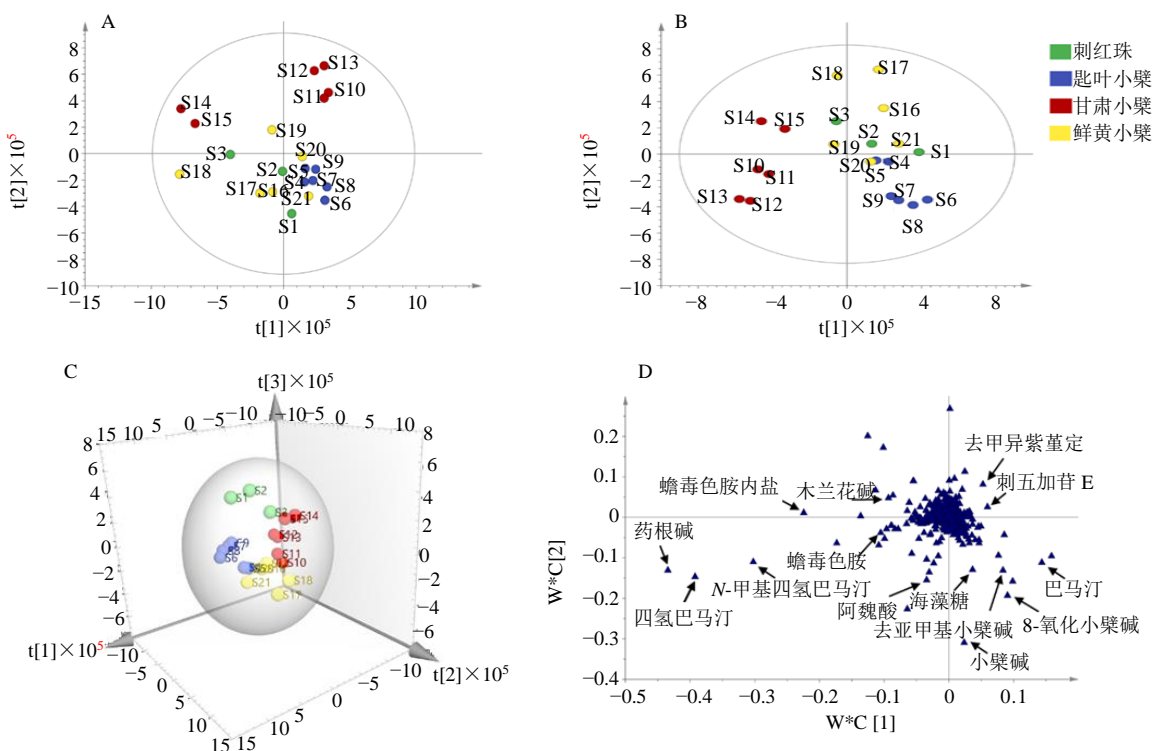


图 2 不同基原小檗皮 PCA 得分图 (A)、PLS-DA 二维得分图 (B)、三维得分图 (C) 和 PLS-DA 载荷图 (D)

Fig. 2 PCA Score plot (A), 2D (B) and 3D (C) Score plot of PLS-DA, PLS-DA loading plot of different species of *Berberidis Cortex*

空间分布情况,不同基原小檗皮明显聚集为4类,小檗皮4种基原药材在三维图谱中得到了较为明显分离,表明小檗皮不同品种间的化学成分存在一定的差异。

### 3.4 可鉴别小檗皮不同基原品种的指标性成分筛选

为了筛选可鉴别小檗皮4种基原的化学标志物,进一步创建小檗皮的PLS-DA载荷图(图2-D)。由载荷图可以看出,药根碱、小檗碱、四氢巴马汀、*N*-甲基四氢巴马汀、蟾毒色胺内盐、8-氧化小檗碱等成分可能是引起小檗皮不同品种间差异的主要成分。此外,采用预测变量重要性VIP对成分进行表征。VIP值较大的被认为是区分4种基原小檗皮的主要潜在化学标志物。根据变量重要性筛选出VIP>3的变量共16个,包括药根碱、四氢巴

马汀、*N*-甲基四氢巴马汀、小檗碱、蟾毒色胺内盐、8-氧化小檗碱、巴马汀、刺五加苷E、木兰花碱、阿魏酸、去亚甲基小檗碱、oblongine、蟾毒色胺、海藻糖、去甲异紫堇定和阿魏酸4-*O*- $\beta$ -D吡喃葡萄糖苷。

由于PLS-DA无法确定观察到的差异成分是否具有统计学意义,因此需要采用方差分析进一步验证。以各成分的归一化峰面积为指标,采用单因素方差分析评价这些成分在小檗皮4种基原间的差异是否具有显著性。结果显示,小檗皮4种基原药材中药根碱、四氢巴马汀、*N*-甲基四氢巴马汀、蟾毒色胺内盐、8-氧化小檗碱、巴马汀等12种成分存在显著性差异(图3)。因此,这12种成分为化学标志物,可为小檗皮药材的品种鉴别以及质量控制提供参考。

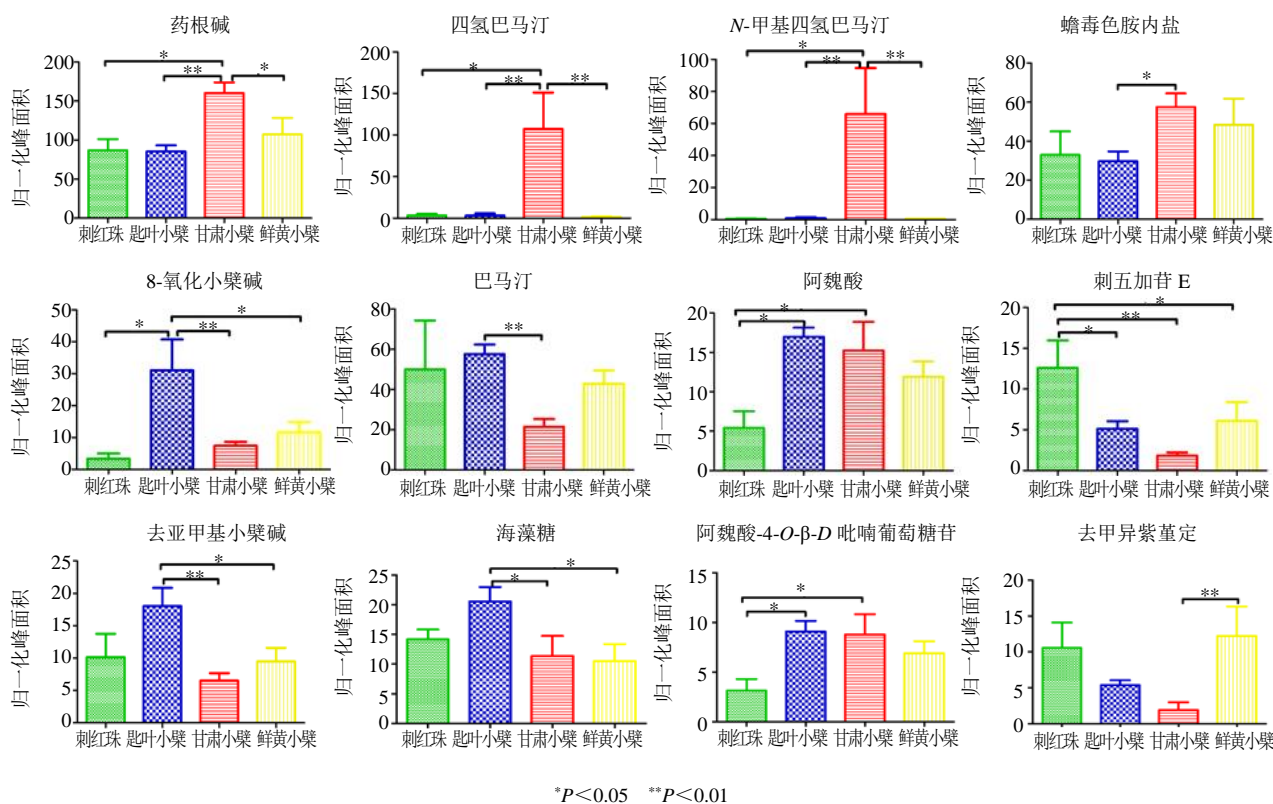


图3 方差分析结果

Fig. 3 Result of variance analysis

### 3.5 指标性成分的热图分析

为了更直观观察12个化学标志物在小檗皮4种基原药材中的分布情况,采用MetaboAnalyst 5.0对12个差异成分进行聚类热图分析,结果见图4。图中深红棕色到深蓝色颜色的变化反映了差异成分在小檗皮不同基原药材中的分布情况,其中红棕色越深代表该成分的相对含量越高,相反蓝色越深则

表示该成分的相对含量越低。结果表明,热图分析与方差分析结果呈现基本一致。从图中可以看出匙叶小檗含有更多的药根碱、四氢巴马汀、*N*-甲基四氢巴马汀、蟾毒色胺内盐、阿魏酸和阿魏酸4-*O*- $\beta$ -D吡喃葡萄糖苷;甘肃小檗药材中去亚甲基小檗碱、8-氧化小檗碱、海藻糖、巴马汀和阿魏酸和阿魏酸4-*O*- $\beta$ -D吡喃葡萄糖苷相对较多;刺红珠药材中的



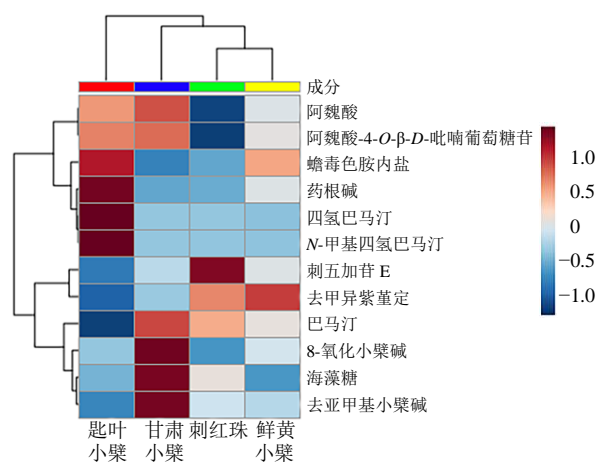


图 4 小檗皮 4 种基原差异成分的热图分析

Fig. 4 Hetmap of different components of four species of *Berberidis Cortex*

刺五加苷 E、去甲异紫堇定和巴马汀较多，而阿魏酸和阿魏酸 4-O-β-D 吡喃葡萄糖苷较少；鲜黄小檗药材中去甲异紫堇定和蟾毒色胺内盐较多。

#### 4 讨论

近年来，高分辨质谱技术已被广泛应用于药材的分析研究中，UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 代谢组学技术以其高灵敏度、高分辨率、质量范围宽、动态范围广<sup>[3]</sup>等特点，可以准确获得微量化合物的质谱信息，快速鉴定化合物结构，尤其适用于对照品缺乏的化学成分筛查，在药材的品种鉴别和质量控制等方面展现出独特的优势。本研究从整体代谢物角度出发，建立了快速鉴定小檗皮药材化学成分的方法，较为全面地反映整体代谢成分，结合模式识别分析方法筛选出不同基原小檗皮的化学标志物，为小檗皮不同品种鉴别和质量评价提供一种可靠准确的参考方法。尽管基于高分辨质谱的代谢组学技术已得到快速发展，但未知代谢成分的鉴定策略仍极具挑战。药材中存在许多同分异构体的化合物，其二级碎片离子、裂解规律都极为相似，若缺乏文献的核实以及对照品的比对，很难将其进行区分鉴定。在今后的研究中还需进一步对小檗皮中的成分进行分离鉴定，不断健全完善小檗皮的化学成分数据库。

本研究采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 代谢组学技术对小檗皮 4 种基原药材的整体化学成分进行快速全面检测分析，共鉴定了 47 种化学成分，主要包括氨基酸、核苷酸、有机酸、糖类等初级代谢产物，以及生物碱等次级代谢产物。同时，采用

PCA、PLS-DA 等模式识别方法，发现小檗皮不同基原之间的化学成分存在一定差异，结合方差分析，进一步筛选出药根碱、四氢巴马汀、蟾毒色胺内盐等 12 个化学标志物，这些研究结果对于小檗皮 4 种不同基原品种的鉴定、质量控制与评价等研究都具有十分重要的意义。

热图分析结果显示，12 个化学标志物在小檗皮不同基原药材中分布不均。与鲜黄小檗和刺红珠比较，匙叶小檗和甘肃小檗药材中含有更多的药根碱、四氢巴马汀等成分。现代研究表明，药根碱具有降血糖、调血脂、抗炎等作用<sup>[15-16]</sup>，四氢巴马汀具有明显的降糖、抗心律失常等生物活性<sup>[17]</sup>。因此，由于这些有效成分的相对含量不同，小檗皮不同基原药材的质量很可能存在差异，表明这 4 个品种在临床上作为同一药材使用可能并不合理，今后应进行进一步的质量评价研究，为小檗皮不同基原品种的临床合理应用提供参考依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 1995: 340.
- [2] 李艳. 藏药小檗皮 DNA 条形码鉴定及质量控制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [3] 曾彬, 刘红梅, 刘晓梅, 等. UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术在中药分析中的应用 [J]. 中药材, 2020, 43(9): 2312-2318.
- [4] 徐鑫梅, 武鑫玥, 易欢, 等. 一测多评法测定藏药小檗皮中 6 种成分的含量 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(24): 2852-2858.
- [5] 范刚, 李琪, 徐鑫梅, 等. 基于 <sup>1</sup>H-NMR 代谢组学和抗糖尿病活性的小檗皮不同基原品种质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(19): 4677-4685.
- [6] 杜欢. 基于肠道菌群介导的藏药小檗皮治疗 2 型糖尿病的药效学物质基础研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2020.
- [7] Zhang Y, Yuan B, Takagi N, *et al.* Comparative analysis of hydrophilic ingredients in toad skin and toad venom using the UHPLC-HR-MS/MS and UPLC-QqQ-MS/MS methods together with the anti-inflammatory evaluation of indolealkylamines [J]. *Molecules*, 2018, 24(1): E86.
- [8] Liu Q X, Qiu S Y, Yu H, *et al.* Selective separation of structure-related alkaloids in *Rhizoma coptidis* with “click” binaphthyl stationary phase and their structural elucidation with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Analyst*, 2011, 136(20): 4357-4365.
- [9] Zhang L, Teng L, Gong C, *et al.* Simultaneous

- determination of harmine, harmaline and their metabolites harmol and harmalol in beagle dog plasma by UPLC-ESI-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 85: 162-168.
- [10] Zhang Y F, Shi Q R, Shi P Y, *et al.* Characterization of isoquinoline alkaloids, diterpenoids and steroids in the Chinese herb Jin-Guo-Lan (*Tinospora sagittata* and *Tinospora capillipes*) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization with multistage mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(15): 2328-2342.
- [11] Tian P P, Zhang X X, Wang H P, *et al.* Rapid analysis of components in *Coptis chinensis* franch by ultra-performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Pharmacogn Mag*, 2017, 13(49): 175-179.
- [12] Singh A, Bajpai V, Kumar S, *et al.* Analysis of isoquinoline alkaloids from *Mahonia Leschenaultia* and *Mahonia napaulensis* roots using UHPLC-Orbitrap-MS n and UHPLC-QqQ LIT-MS/MS [J]. *J Pharm Anal*, 2017, 7(2): 77-86.
- [13] 江斯炜, 郑作亮, 徐方方, 等. UPLC-QqQ-MS/MS 同时测定香槟方中 4 个生物碱成分 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(17): 152-159.
- [14] Yuan L, Yin J, Tian M, *et al.* The classification and identification of complex chemical compositions based on UPLC-Q-TOF/MS using yanhusuo herb as an example [J]. *Anal Methods*, 2016, 8(10): 2274-2281.
- [15] Fu Y, Hu B R, Tang Q, *et al.* Hypoglycemic activity of jatrorrhizine [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2005, 25(5): 491-493.
- [16] Cho Y J. Anti-inflammatory effect of jatrorrhizine from *Phellodendron amurense* in lipopolysaccharide-stimulated Raw264.7 cells [J]. *J Appl Biol Chem*, 2011, 54(2): 114-119.
- [17] 关秀锋, 王锐, 曲秀芬, 等. 延胡索的化学成分与药理作用研究进展 [J]. *化学工程师*, 2020, 34(3): 57-60.

[责任编辑 时圣明]