

基于 HS-GC-IMS 技术分析六神曲炮制前后（炒、焦）挥发性物质的变化

时海燕¹, 徐 男², 赵 霞³, 崔彦伟³, 王 平²

1. 山东第一医科大学第一附属医院（山东省千佛山医院）临床药学，山东省儿童药物临床评价与研发工程技术研究中心，山东省医药卫生临床药学重点实验室，山东 济南 250014
2. 山东省中医药研究院 中药制剂研究所，山东 济南 250014
3. 山东百味堂中药饮片有限公司 研发部，山东 济南 250108

摘要：目的 分析六神曲 *Massa Medicata Fermentata* 炮制前后（炒、焦）的挥发性有机物特征及其变化规律。方法 采用顶空-气相色谱-离子迁移质谱（headspace-gas chromatography-ion migration mass spectrometry, HS-GC-IMS）测定六神曲生品、炒品和焦品的挥发性有机物，构建 HS-GC-IMS 指纹图谱，采用 VOCal 软件对检测到的成分进行定性和定量分析，运用主成分分析（principal component analysis, PCA）、偏小二乘-判别分析（partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA）、*t* 检验等对样品进行差异性分析。结果 基于 HS-GC-IMS 技术从六神曲生品、炒品和焦品中共获得了 80 种挥发性有机物，定性鉴别出 60 种；构建了六神曲生品、炒品和焦品的 HS-GC-IMS 指纹图谱，通过 PCA、PLS-DA、*t* 检验等分析方法可将三者进行区分，己醛-D（hexanal-D）、乙醇（ethanol）2 种物质可作为六神曲生品的特征性成分；丁醛（butanal）、2-甲基-2-丙烯（2-methyl-2-propenal）、化合物 8 可作为六神曲炒品的特征性成分；糠醛-D（furfural-D）、2-丁酮（2-butanone）、5-甲基糠醛（5-methylfurfural）、丙酮（acetone）、2-乙酰呋喃-D（2-acetylfuran-D）、化合物 20 共 6 种物质可作为六神曲焦品的特征性成分。结论 HS-GC-IMS 指纹图谱可用于识别与评价六神曲生品、炒品和焦品挥发性有机物的种类和差异，为六神曲饮片的质量控制及临床应用提供参考。

关键词：六神曲；生品；炒品；焦品；顶空-气相色谱-离子迁移谱；己醛-D；乙醇；丁醛；2-甲基-2-丙烯；糠醛-D；2-丁酮；5-甲基糠醛；丙酮；2-乙酰呋喃-D

中图分类号：R283.6 文献标志码：A 文章编号：0253-2670(2023)10-3120-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.10.009

Analysis of volatile matter changes of *Massa Medicata Fermentata* before and after processing based on HS-GC-IMS technology

SHI Hai-yan¹, XU Nan², ZHAO Xia³, CUI Yan-wei³, WANG Ping²

1. Department of Clinical Pharmacy, First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University & Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Shandong Engineering and Technology Research Center for Pediatric Drug Clinical Assessment and Development, Shandong Medicine and Health Key Laboratory of Clinical Pharmacy, Jinan 250014, China
2. Institute of Chinese Medicine Preparation, Shandong Research Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China
3. R&D Department, Shandong Baiweitang Traditional Chinese Medicine Slices Co., Ltd., Jinan 250108, China

Abstract: Objective To analyze the characteristics and change rules of volatile organic compounds (fried or burnt) of Liushenqu (六神曲, *Massa Medicata Fermentata*, MMF) before and after processing. **Methods** Headspace-gas chromatography-ion migration mass spectrometry (HS-GC-IMS) was used to determine the volatile organic compounds in the raw, fried and charred products of MMF, and HS-GC-IMS fingerprint was constructed. VOCal software was used to conduct qualitative and quantitative analysis of the detected components. Principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) were used to analyze the differences of the samples. **Results** Based on HS-GC-IMS technology, 80 kinds of volatile organic compounds were obtained from raw, fried and burnt products of MMF, and 60 kinds were identified qualitatively; HS-GC-IMS fingerprints of raw MMF,

收稿日期：2022-11-21

基金项目：山东省科技型中小企业创新能力提升工程（2022TSGC1057）；济南市科技型中小企业创新能力提升工程（2022TSGC1057）；山东省中医药科技项目重点项目（2021Z048）；山东省自然科学基金重点项目（ZR2020KH017）

作者简介：时海燕，博士，主任药师，从事中药炮制化学与药代动力学研究。E-mail: shihaiyan123@163.com

fried and charred products were constructed. The three products can be distinguished by PCA, PLS-DA and *t*-test analysis methods. Hexanal-D and ethanol can be used as the characteristic components of raw MMF; Butanal, 2-methyl-2-propenal and compound **8** can be used as the characteristic components of the fried products of MMF; Six substances, including furfural-D, 2-butanone, 5-methylfurfural, acetone, 2-acetylfuran-D and compound **20**, can be used as the characteristic components of the charred products of MMF. **Conclusion** HS-GC-IMS fingerprint can be used to identify and evaluate the types and differences of volatile organic compounds in raw, fried and charred products of MMF, and provide reference for quality control and clinical application of product decoction pieces.

Key words: *Massa Medicata Fermentata*; raw products; fried products; charred products; HS-GC-IMS; hexaldehyde-D; ethanol; butanal; 2-methyl-2-propenal; furfural-D; 2-butanone; 5-methylfurfural; acetone; 2-acetofuran-D

六神曲 (*Massa Medicata Fermentata*, MMF) 始载于唐《药性论》，由面粉 (麦粉)、杏仁、赤小豆以及青蒿、苍耳、辣蓼汁或煎煮液混合均匀后发酵、切丁、干燥而成，含有酵母菌、酶类、维生素 B 复合体、麦角甾醇、挥发油、苷类等^[1-2]。历代有多种炮制方法，常用的有生品、炒品及炒焦品。其中，生品具有健脾开胃并有发散作用。炒品以醒脾和胃为主，发散作用减少。治疗小儿单纯性消化不良，疗效优于乳酸钙片、酵母片等^[3]。焦品消食化积力强，以治食积泄泻为主，常与焦山楂、焦麦芽合用治疗消化不良，疗效确切，故有“焦三仙”之称。

截至目前，《中国药典》2020 年版尚未收录六神曲，但全国各省《中药饮片炮制规范》大都有收录，质量控制标准以外观性状为主，以观察颜色、菌斑菌衣、折断面质地、纹孔和气味来辨别优劣，缺乏量化评价指标，导致产品质量差异较大，严重影响临床疗效。近年来，针对六神曲的质量标准进行了大量探索^[4]，并基于微生物产生的酶在发酵过程中的关键性作用，主张以消化酶活力作为质控指标^[5]，衡量六神曲的内在质量并用于判断制备工艺合理性。但是，有学者对比研究六神曲炮制前后消化酶的活力发现，生六神曲经炒、焦等炮制后，蛋白酶、淀粉酶活力均比生品显著降低^[6]。炒制后高温破坏了消化酶，但消食和胃的功效并没有丧失。可见，神曲中起作用的不只是酶类，神曲炒制后一定产生了其他能够直接或间接促进消化的物质。这些物质可以刺激嗅球，经中枢神经系统与胃肠道之间的双向调节通道 (脑-肠轴) 将气味信号反馈给内分泌系统，再进一步传递给肠神经系统，从而兴奋或抑制胃肠道平滑肌，调节胃肠动力^[7-8]，这可能是六神曲的炮制原理之一。

炒法是中药炮制工艺中最早被使用的基本方法之一^[9]。六神曲在炒制过程中通过一系列反应生成和消耗各种化合物，导致挥发性物质发生变化。因

此，本实验创新性提出以挥发性物质为切入点，采用顶空-气相色谱-离子迁移质谱 (headspace-gas chromatography-ion migration mass spectrometry, HS-GC-IMS) 对六神曲生品、炒品和焦品的挥发性有机化合物进行定性分析和多元统计分析，获得六神曲生品、炒神曲和焦神曲的特征性挥发性有机物，以期揭示炮制对六神曲挥发性成分的影响，为六神曲的功效物质基础挖掘和炮制工艺及质量标准研究提供参考。

1 仪器与试药

1.1 仪器

FlavourSpec[®]气相色谱-离子迁移谱联用仪，山东海能科学仪器有限公司；HZQ-B 型摇床，其林贝尔公司；KQ-250DA 型超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；RE-52 型旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂；R 移液器，美国赛默飞公司；DZF-6050 型真空干燥箱，上海精宏实验设备有限公司；AE224C 型分析天平，上海舜宇恒平科学仪器有限公司；TD5B 型低速离心机，上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

1.2 试药

10 批六神曲生品 (A1~A10) 采自山东、安徽、四川等地，具体信息见表 1，由山东省中医药研究院中药资源研究所靳光乾研究员鉴定，符合《卫生部药品标准中药成方制剂》第十九册要求。按照《中国药典》2020 年版炒法 (通则 0213) 炮制，取六神曲生品 (A1~A10)，用文火加热，炒至黄色，取出，放凉，即为炒神曲样品 (B1~B10)；炒至外表呈焦黑色，内部焦黄色，取出，略喷些清水，放凉，即为焦神曲样品 (C1~C10)。

2 方法与结果

2.1 检测条件

色谱柱为 MXT-5 (15 m×0.53 mm, 1 μm)，分析时间 40 min，柱温 60 °C，载气/漂移气 N₂，IMS

表1 六神曲生品与炒品、焦品信息

Table 1 Sample information on raw, fried and charred products of MMF

编号	名称	厂家	批号
A1	六神曲	山东百味堂有限公司	2022083001
A2	六神曲	山东百味堂有限公司	2022091503
A3	六神曲	山东百味堂有限公司	2022102706
A4	六神曲	四川千方中药股份有限公司	202202143
A5	六神曲	亳州隆泰药业有限责任公司	20220724
A6	六神曲	亳州隆泰药业有限责任公司	20221016
A7	六神曲	成都市兴沅瑞中药饮片有限责任公司	2020112601
A8	六神曲	成都市兴沅瑞中药饮片有限责任公司	2021111301
A9	六神曲	四川弘升药业有限公司	20221001
A10	六神曲	四川弘升药业有限公司	20211004

温度 45 °C。自动顶空进样单元：孵化温度 60 °C，孵化时间 15 min，进样体积 100 μL，进样针温度 85 °C，孵化转速 500 r/min。气相色谱条件：E1 漂移气体积流量 0~40 min，150 mL/min；E2 气相载气体积流量 0~2 min，2 mL/min；2~20 min，2~100 mL/min；20~40 min，100 mL/min。

2.2 样品制备

精密称取 0.5 g 六神曲生品、炒品或焦品粉末（过 5 号筛），直接置于 20 mL 顶空进样瓶中，80 °C 孵育 15 min 后按“2.1”项方法进行测定。

2.3 数据处理分析

利用 VOCal 软件查看分析谱图和数据的定性定量，采用 VOCal 软件内置 NIST 和 IMS 数据库对物质进行定性分析，谱图中获得的每 1 个点代表 1 种挥发性有机物，对其建立标准曲线后可进行定量分析；Reporter 插件对比样品之间的谱图差异（三维谱图、二维俯视图和差异谱图）；Gallery Plot 插件进行指纹图谱对比，直观且定量地比较不同样品之间的挥发性有机物差异；Dynamic PCA 插件进行动态 PCA 以及快速确定未知样品的种类。

3 结果与分析

3.1 气相离子迁移谱分析

利用 VOCal 软件内置的 Reporter 插件对所获得的六神曲生品、炒品和焦品图谱进行分析，结果见图 1，横坐标为离子迁移时间，其 1.0 处红色竖线为经归一化处理后的反应离子峰（RIP 峰），纵坐标为气相色谱的保留时间。RIP 峰 2 侧的每 1 个点代表 1 种挥发性有机物，颜色示意有机物浓度，白色表示浓度较低，红色表示浓度较高，颜色越深表示

浓度越大。由图 1 可知，六神曲生品、炒品和焦品均可检测到大量的挥发性有机物成分，且差异明显。

以六神曲生品谱图作为参比，炒品、焦品谱图扣减参比后再比较六神曲炮制前后的挥发性有机物差异，结果见图 2。图中六神曲生品、炒品和焦品测得成分一致时，扣减后为白色，红色示意六神曲炒品、焦品中所测成分浓度高于生品，蓝色示意炒品、焦品中浓度低于生品。可见与生品相比，六神曲炒品、焦品中大多数挥发性有机物含量呈现波动性变化，这可能与有机化合物在炮制过程中化学成分发生转化或降解有关。

3.2 定性鉴别分析

气相离子迁移谱分析从六神曲生品、炒品和焦品共检测出 80 种挥发性有机物。进一步与 NIST 数据库和 IMS 数据库比对后，鉴定了 60 种挥发性有机物，六神曲生品与炒品、焦品各自峰面积的平均值见表 2。

3.3 六神曲生品、炒品和焦品的 HS-GC-IMS 指纹图谱

基于 HS-GC-IMS 获得的挥发性有机物响应特征构建了六神曲生品、炒品和焦品的 HS-GC-IMS 指纹图谱，结果见图 3。图中从上往下所在行为 A1~A10、B1~B10 和 C1~C10 中所有挥发性有机物的信号峰，每一列则示意同一挥发性有机物在六神曲生品、炒品和焦品中的信号峰，颜色深浅示意响应浓度。由图 3 可知，六神曲生品、炒和焦品组内差异主要为相对含量存在差异，而六神曲炒制后挥发性有机物的数量和相对含量相比生品均呈现出显著差异。

综合表 2 和图 3 分析显示，2-戊基呋喃(2-pentyl furan)、(E)-2-庚烯醛-M [(E)-hept-2-enal-M]、庚醛-D (heptanal-D)、己醛-D (hexanal-D)、(E)-2-庚烯醛-D [(E)-hept-2-enal-D]、(E)-2-己烯醛-M [(E)-2-hexenal-M]、(E)-2-己烯醛-D [(E)-2-hexenal-D]、化合物 5、17、乙醇 (ethanol) 等 10 个物质含量在六神曲生品中表现出优势，远高于炒品和焦品；3-甲硫基丙醛-M (3-methylthiopropional-M)、3-甲硫基丙醛-D (3-methylthiopropional-D)、化合物 7~10、16、丁醛 (butanal)、3-甲基丁烷-1-醇 (3-methylbutan-1-ol)、2-甲基-2-丙烯 (2-methyl-2-propenal)、3-羟基丁烷-2-酮 (3-hydroxybutan-2-one) 等 11 个物质含量在六神曲炒品中表现出优势，远高于生品和焦品；糠醛-D (furfural-D)、香柠檬醛 (bergamal)、5-甲基

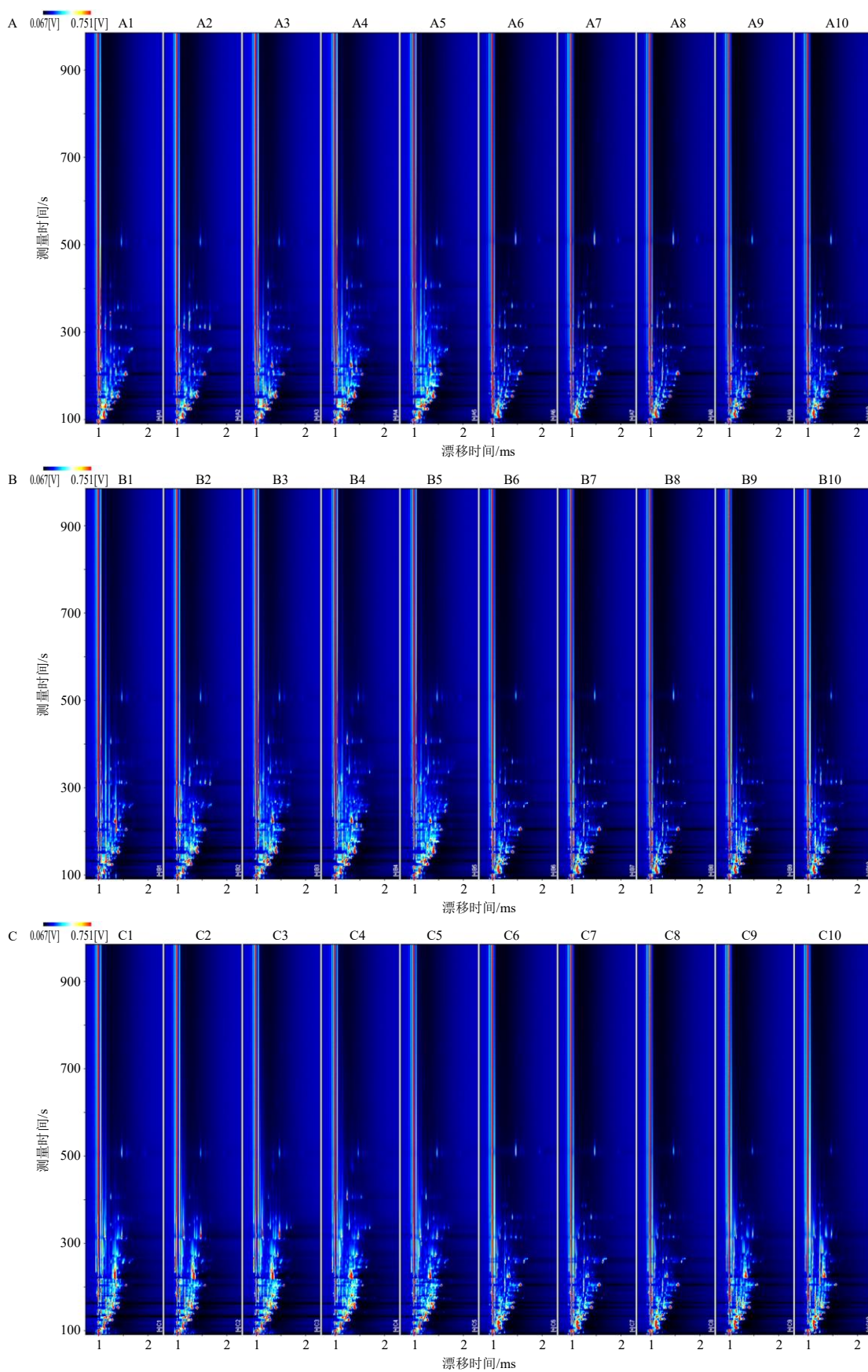


图1 六神曲生品 (A)、炒品 (B) 和焦品 (C) 气相离子迁移图

Fig. 1 HS-GC-IMS diagram plots of raw (A), fried (B) and charred (C) samples of MMF

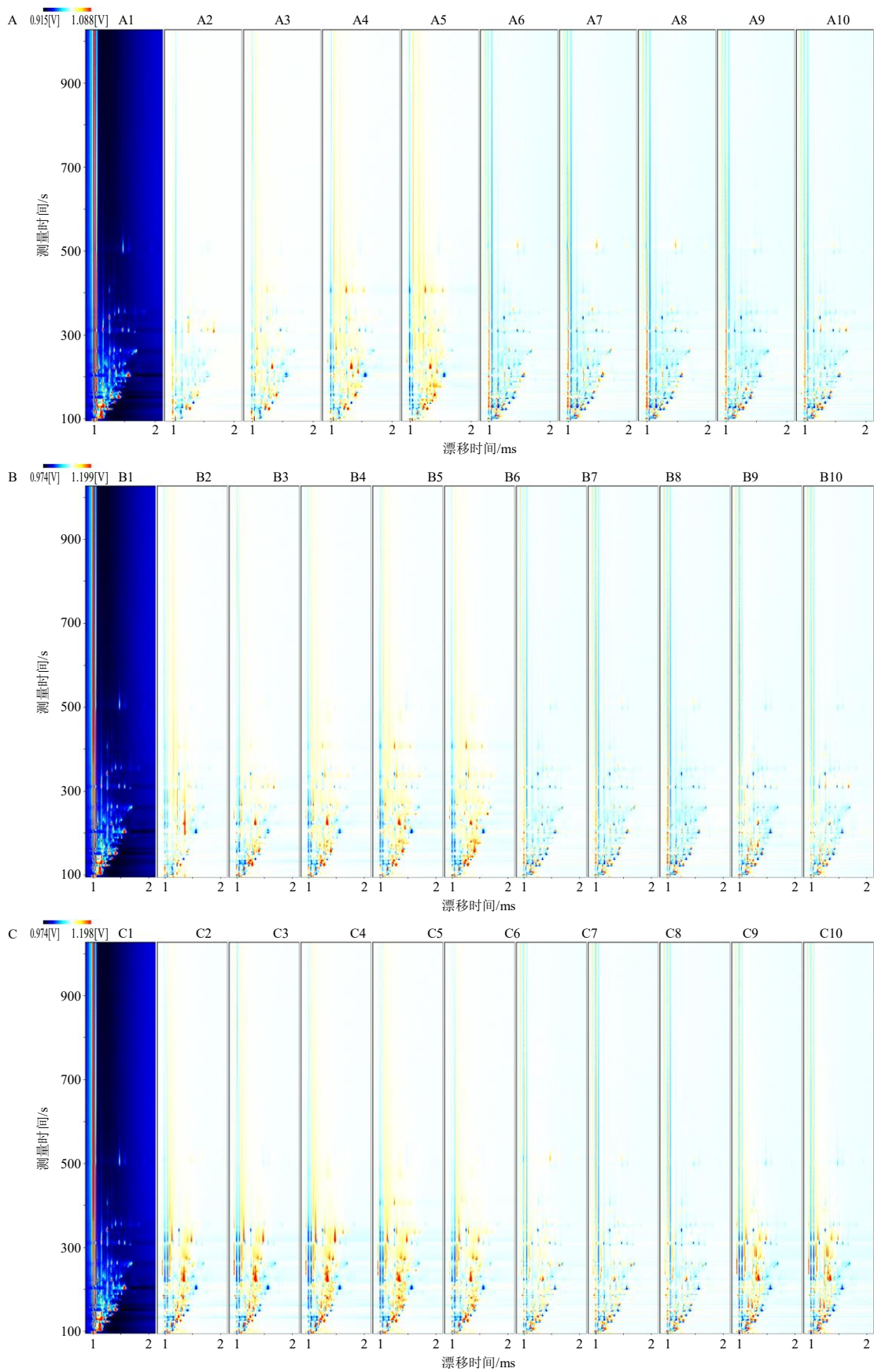


图2 六神曲生品 (A)、炒品 (B) 和焦品 (C) 样本气相色谱离子迁移谱差异图

Fig. 2 Difference HS-GC-IMS diagram plots of raw (A), fried (B) and charred (C) samples of MMF

表2 六神曲生品、炒品与焦品中挥发性有机物定性分析

Table 2 Identification of volatile organic compounds in raw, fried and charred products of MMF

序号	化合物	分子式	相对分子质量	保留指数	保留时间/s	迁移时间/ms	峰面积平均值		
							生品	炒品	焦品
1	壬醛	C ₉ H ₁₈ O	142.2	1 107.1	505.466	1.476 45	516.05	573.13	579.92
2	甲基糠醛-M	C ₈ H ₈ O	120.2	1 044.3	405.990	1.255 27	842.82	958.85	552.27
3	2-戊基呋喃	C ₉ H ₁₄ O	138.2	995.2	342.238	1.253 87	560.07	344.48	201.85
4	(E)-2-庚烯醛-M	C ₇ H ₁₂ O	112.2	956.2	307.408	1.256 63	475.93	313.43	143.49
5	苯甲醛	C ₇ H ₆ O	106.1	963.1	313.288	1.150 74	713.02	699.23	476.61
6	3-甲硫基丙醛-M	C ₄ H ₈ OS	104.2	904.0	266.248	1.088 12	281.69	400.50	271.64
7	糠醛-M	C ₅ H ₄ O ₂	96.1	833.3	224.778	1.084 70	962.79	983.58	1 006.64
8	糠醛-D	C ₅ H ₄ O ₂	96.1	829.1	222.611	1.332 92	2 331.27	3 695.11	5 275.42
9	1	/	0	845.0	230.967	1.422 87	290.29	304.44	232.25
10	庚醛-M	C ₇ H ₁₄ O	114.2	897.6	261.606	1.334 06	267.06	213.89	331.45
11	2-庚酮-M	C ₇ H ₁₄ O	114.2	892.4	257.892	1.265 74	386.02	300.65	184.51
12	辛醛	C ₈ H ₁₆ O	128.2	1 007.0	356.306	1.406 93	279.82	263.58	236.53
13	2-辛酮	C ₈ H ₁₆ O	128.2	1 001.2	349.188	1.344 31	157.61	116.84	110.23
14	庚醛-D	C ₇ H ₁₄ O	114.2	898.5	262.225	1.693 86	279.31	177.59	115.11
15	2-庚酮-D	C ₇ H ₁₄ O	114.2	887.3	254.797	1.630 10	124.33	169.29	121.48
16	己醛-M	C ₆ H ₁₂ O	100.2	792.3	204.352	1.263 47	551.53	443.73	453.67
17	己醛-D	C ₆ H ₁₂ O	100.2	791.6	204.043	1.562 92	2 438.20	1 662.25	1 087.74
18	(E)-2-庚烯醛-D	C ₇ H ₁₂ O	112.2	956.2	307.408	1.668 81	295.16	211.65	93.89
19	(E)-2-己烯醛-M	C ₆ H ₁₀ O	98.1	846.7	231.896	1.182 62	208.21	127.07	65.98
20	香柠檬醛	C ₉ H ₁₆ O	140.2	1 049.0	412.631	1.176 93	25.52	29.53	50.02
21	5-甲基糠醛	C ₆ H ₆ O ₂	110.1	971.6	320.716	1.129 11	143.13	260.55	1 333.10
22	2	/	0	989.3	336.778	1.296 00	174.43	430.49	435.53
23	3	/	0	988.4	335.918	1.710 16	52.68	195.11	173.19
24	苯乙醛-D	C ₈ H ₈ O	120.2	1 044.6	406.441	1.537 50	146.94	182.68	77.50
25	4	/	0	965.4	315.277	1.201 72	44.14	72.23	36.83
26	5-甲基-2-庚烯-4-酮	C ₈ H ₁₄ O	126.2	972.9	321.871	1.221 85	94.33	109.88	35.65
27	1-辛烯-3-酮	C ₈ H ₁₄ O	126.2	982.5	330.471	1.273 75	45.19	45.94	22.44
28	(E)-2-己烯醛-D	C ₆ H ₁₀ O	98.1	846.4	231.738	1.514 70	92.65	58.50	43.11
29	5	/	0	763.5	191.100	1.129 46	80.84	56.32	21.17
30	6	/	0	760.9	189.946	1.412 95	134.87	133.76	62.69
31	戊烷-1-醇	C ₅ H ₁₂ O	88.1	760.0	189.560	1.513 56	100.62	112.67	35.50
32	3-甲硫基丙醛-D	C ₄ H ₈ OS	104.2	904.4	266.549	1.397 21	54.59	123.05	40.91
33	7	/	0	871.5	245.615	1.226 27	115.37	178.01	71.84
34	4-甲基-3-戊烯-2-酮-M	C ₆ H ₁₀ O	98.1	811.5	213.705	1.122 22	31.55	40.29	36.95
35	4-甲基-3-戊烯-2-酮-D	C ₆ H ₁₀ O	98.1	806.2	211.063	1.448 17	244.51	231.25	77.23
36	二氢-2(3H)-呋喃酮	C ₄ H ₆ O ₂	86.1	917.5	276.305	1.300 59	57.60	44.28	71.28
37	2-乙酰呋喃-M	C ₆ H ₆ O ₂	110.1	911.3	271.630	1.117 97	8.65	41.42	143.97
38	8	/	0	872.2	246.021	1.638 23	33.69	248.83	91.14
39	9	/	0	913.2	273.053	1.250 69	77.39	123.72	42.25
40	10	/	0	913.4	273.256	1.664 77	12.56	45.19	9.92

续表 2

序号	化合物	分子式	相对分子质量	保留指数	保留时间/s	迁移时间/ms	峰面积平均值		
							生品	炒品	焦品
41	11	/	0	913.2	273.053	1.555 41	24.63	75.59	71.08
42	12	/	0	916.4	275.492	1.477 90	25.00	46.02	33.35
43	2-甲基-3-呋喃硫醇	C ₅ H ₆ OS	114.2	865.7	242.363	1.139 21	37.88	48.62	22.25
44	13	/	0	845.0	230.981	1.155 13	92.37	118.55	41.62
45	2-乙酰呋喃-D	C ₆ H ₆ O ₂	110.1	911.5	271.833	1.438 62	38.31	48.07	484.79
46	14	/	0	916.4	275.492	1.372 79	45.95	73.58	268.12
47	15	/	0	854.0	235.859	1.308 02	43.27	64.86	363.76
48	环戊酮	C ₅ H ₈ O	84.1	784.9	200.900	1.339 88	25.14	31.97	101.71
49	16	/	0	843.9	230.371	1.450 30	96.25	161.84	82.93
50	丁酸	C ₄ H ₈ O ₂	88.1	816.8	216.347	1.179 55	39.13	65.73	97.52
51	乳酸乙酯	C ₅ H ₁₀ O ₃	118.1	806.6	211.266	1.535 24	38.98	64.36	25.26
52	3-甲基丁酸	C ₅ H ₁₀ O ₂	102.1	869.7	244.598	1.493 83	65.05	143.23	114.28
53	戊醛	C ₅ H ₁₀ O	86.1	695.9	163.256	1.423 93	776.21	680.47	371.47
54	2-甲基丁醛	C ₅ H ₁₀ O	86.1	669.2	154.677	1.401 07	2 134.79	2 196.45	1 594.54
55	3-甲基丁醛	C ₅ H ₁₀ O	86.1	658.9	151.662	1.407 50	1 791.69	1 602.39	1 070.53
56	乙酸乙酯	C ₄ H ₈ O ₂	88.1	614.5	139.285	1.338 25	754.05	600.65	379.00
57	丁醛	C ₄ H ₈ O	72.1	557.7	124.940	1.282 61	2 215.44	3 024.95	2 390.11
58	17	/	0	496.6	111.135	1.177 93	218.67	155.61	78.56
59	乙醇	C ₂ H ₆ O	46.1	459.7	103.557	1.131 73	2 374.86	1 708.54	1 606.33
60	丙酮	C ₃ H ₆ O	58.1	495.3	110.865	1.113 81	2 646.50	3 258.89	4 179.70
61	2-丁酮	C ₄ H ₈ O	72.1	596.9	134.684	1.247 72	742.35	1 498.42	2 678.41
62	2-甲基-1-丙醇	C ₄ H ₁₀ O	74.1	628.9	143.167	1.365 20	126.29	129.20	28.51
63	(E)-2-戊烯醛	C ₅ H ₈ O	84.1	748.8	184.679	1.107 24	39.05	22.19	27.16
64	3-戊醇	C ₅ H ₁₂ O	88.1	711.1	169.162	1.206 31	211.88	247.60	163.95
65	醋酸	C ₂ H ₄ O ₂	60.1	582.8	131.076	1.159 63	1 118.39	889.62	940.65
66	3-甲基丁烷-1-醇	C ₅ H ₁₂ O	88.1	728.4	176.105	1.498 75	102.71	151.58	58.31
67	18	/	0	609.3	137.906	1.290 37	166.50	324.15	533.60
68	2-甲基-2-丙烯	C ₄ H ₆ O	70.1	577.7	129.807	1.220 44	717.43	1 070.65	708.86
69	乙酸甲酯	C ₃ H ₆ O ₂	74.1	526.5	117.675	1.193 20	39.81	127.48	212.62
70	(E)-2-甲基-2-丁烯醛	C ₅ H ₈ O	84.1	737.4	179.859	1.336 28	111.34	234.36	389.18
71	19	/	0	750.2	185.295	1.297 72	48.75	64.24	213.30
72	2,5-二甲基呋喃	C ₆ H ₈ O	96.1	705.5	166.976	1.030 11	36.59	27.05	103.91
73	1,4-二恶烷	C ₄ H ₈ O ₂	88.1	713.7	170.197	1.126 88	29.15	26.21	41.34
74	2-戊酮	C ₅ H ₁₀ O	86.1	689.2	160.735	1.371 05	23.88	33.52	172.17
75	20	/	0	527.3	117.857	1.155 60	225.19	441.49	809.74
76	吡咯	C ₄ H ₅ N	67.1	752.9	186.441	0.971 25	25.25	47.50	149.83
77	二甲基二硫化物	C ₂ H ₆ S ₂	94.2	738.1	180.126	0.987 91	75.66	121.81	447.80
78	(E)-3-戊烯-2-酮	C ₅ H ₈ O	84.1	739.2	180.589	1.352 32	18.72	93.60	144.61
79	1-辛烯-3-醇	C ₈ H ₁₆ O	128.2	985.3	333.072	1.157 98	36.96	37.22	14.96
80	3-羟基丁烷-2-酮	C ₄ H ₈ O ₂	88.1	710.4	168.895	1.328 02	149.98	197.05	167.35

"/" 为未检出, 1~20未鉴定, 下同

"/" represents undetected, 1—20-not identified, the same below

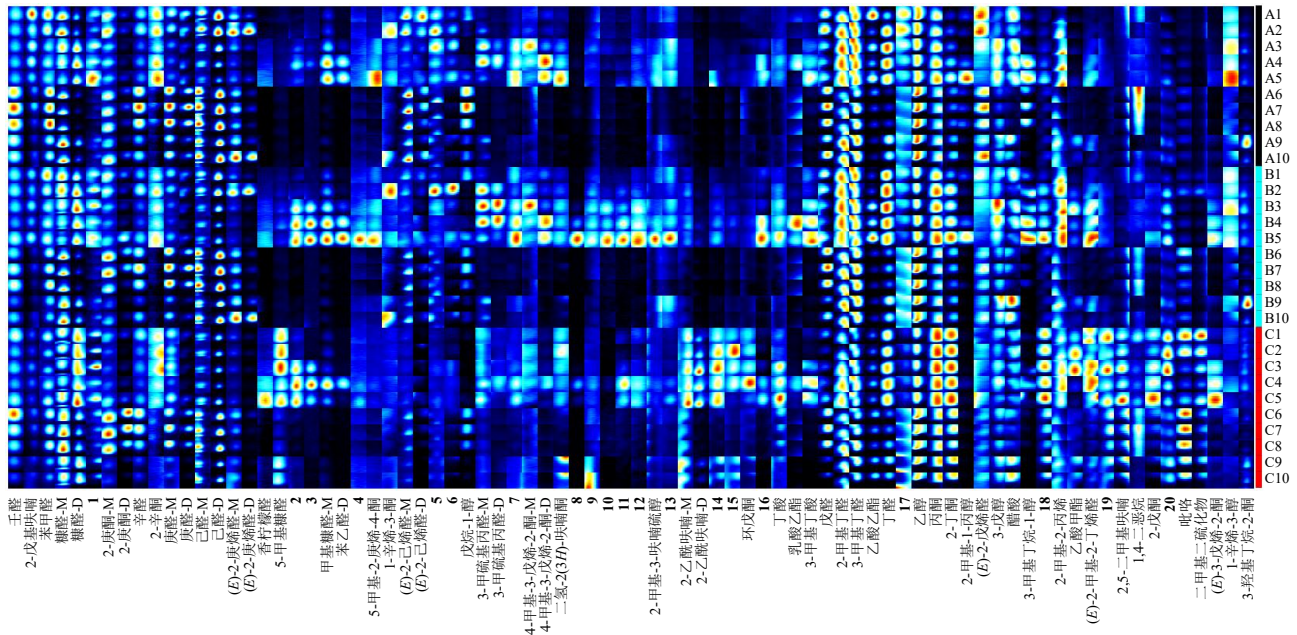


图3 六神曲生品 (A)、炒品 (B) 和焦品 (C) 样本挥发性有机物指纹图谱

Fig. 3 Comparison of fingerprints of volatile organic compounds of raw (A), fried (B) and charred (C) samples of MMF

糠醛(5-methylfurfural)、二氢-2(3H)-呋喃酮[dihydro-2(3H)-furanone]、2-乙酰呋喃-M (2-acetylfuran-M)、2-乙酰呋喃-D (2-acetylfuran-D)、化合物 14、15、环戊酮 (cyclopentanone)、丙酮 (acetone)、2-丁酮 (2-butanone)、乙酸甲酯 (methyl acetate)、(E)-2-甲基-2-丁烯醛 [(E)-2-methyl-2- butenal]、化合物 19、2,5-二甲基呋喃 (2,5- dimethylfuran)、2-戊酮 (2-pentanone)、化合物 20、二甲基二硫化物 (dimethyl disulfide) 等 18 个物质含量在六神曲焦品中表现出优势, 远高于生品和炒品。

3.4 主成分分析 (principal component analysis, PCA)

为判别六神曲生品、炒品和焦品间的差异, 利用 SIMCA-P14.0 软件对 30 批样品的 80 个挥发性有机物的峰体积结果进行 PCA, 前 2 个主成分的累积贡献率达到 79.80%, 说明前 2 个因子在反映六神曲炮制前后挥发性有机物的相互关系中起主导作用。构建六神曲生品、炒品和焦品的得分图 (图 4), 前 2 个主成分可以将六神曲焦品与生品、炒品区分开, 存在显著差异, 但不能将生品与炒品分开。由于 PCA 仅能较好的反映原始数据, 是一种无监督的模型验证方法, 其不能忽略组间差异。

3.5 偏最小二乘-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)

PLS-DA 是一种有监督的模式, 能寻找隐藏的损坏模型稳健性的特征变量, 更能突出组间差异^[10]。

为进一步判别六神曲生品、炒品和焦品间的差异, 对 30 批样品的 80 个挥发性有机物的峰体积结果归一化处理后进行 PLS-DA 得到 PLS-DA 得分图 (图 5), $Q^2=0.832>0.5$, 同时为防止模型过拟合进行交叉验证后所有点均小于原始 R^2 , 说明模型拟合较好

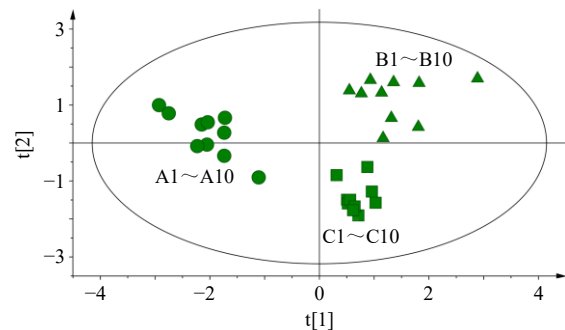


图4 六神曲生品、炒品与焦品 PCA 得分图

Fig. 4 PCA score chart of raw, fried and charred MMF

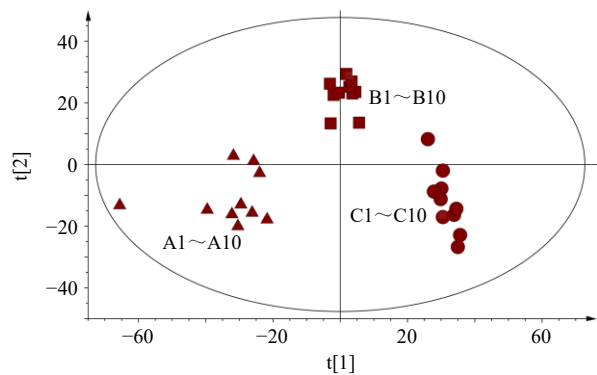


图5 六神曲生品、炒品与焦品 PLS-DA 得分图

Fig. 5 PLS-DA score map of raw, fried and charred MMF

且具有可行性。通过得分图可以看出,有监督的分析方法能较好的将六神曲生品、炒品和焦品区分开,进而得出变量权重值(variable important in

projection, VIP)。VIP值通常用来反映PLS-DA模型变量的重要性。图中柱子高度与对模型贡献值越高(图6)则表示差异越显著^[11]。

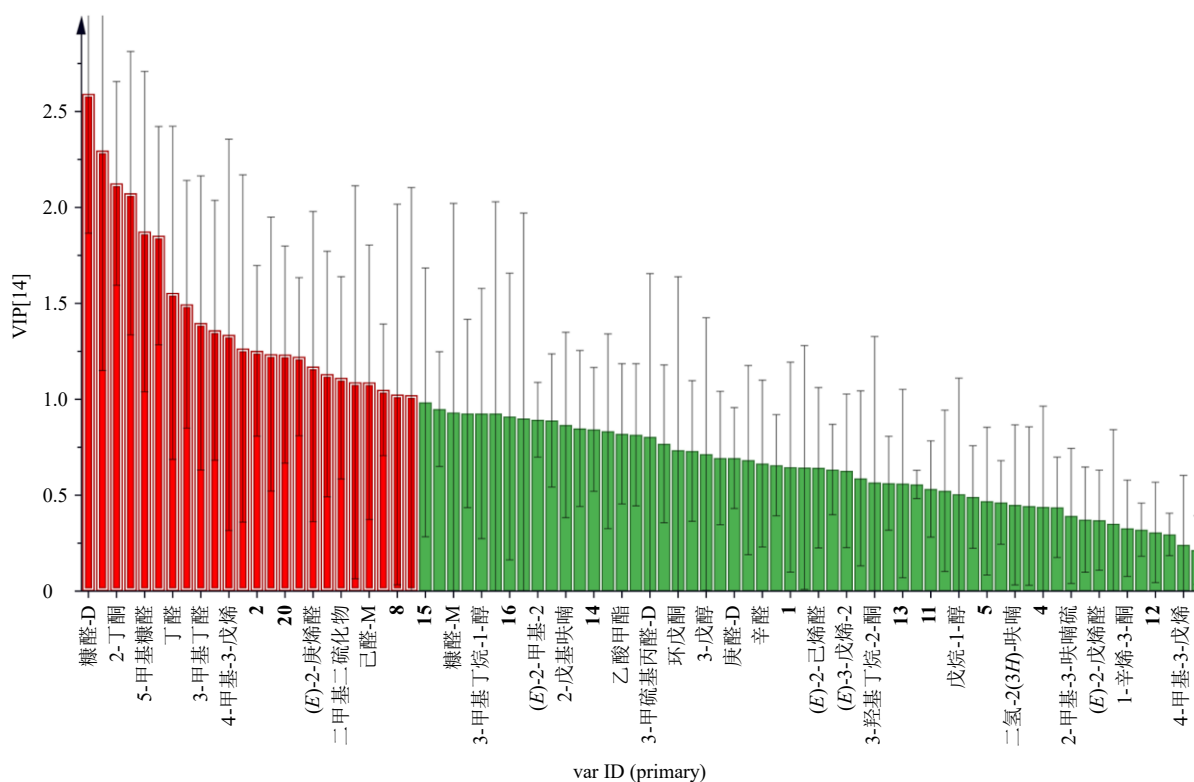


图6 六神曲生品、炒品与焦品的VIP图

Fig. 6 VIP map of raw, fried and charred MMF

3.6 差异分析

根据PLS-DA模型绘制的VIP图,选出VIP值较大的挥发性有机物。30批六神曲样本区分贡献较大(VIP>1)的挥发性成分为糠醛-D(VIP=2.5921)、己醛-D(VIP=2.2966)、2-丁酮(VIP=2.1251)、苯乙醛-M(2.0742)、5-甲基糠醛(VIP=1.8743)、丙酮(VIP=1.8529)、丁醛(VIP=1.5551)、2-甲基丁醛(VIP=1.4951)、3-甲基丁醛(VIP=1.3979)、2-乙酰呋喃-D(VIP=1.3598)、4-甲基-3-戊烯-2-酮-D(VIP=1.3360)、醋酸乙酯(VIP=1.2649)、化合物2(VIP=1.2527)、2-甲基-2-丙烯(VIP=1.2356)、化合物20(VIP=1.2331)、乙醇(VIP=1.2220)、(E)-2-庚烯醛-D(VIP=1.1703)、苯乙醛-D(VIP=1.1318)、二甲基二硫化物(VIP=1.1120)、(E)-2-庚烯醛-D(VIP=1.0889)、己醛-M(VIP=1.0885)、戊醛(VIP=1.0493)、化合物8(VIP=1.0250)、3-甲硫基丙醛-M(VIP=1.0217)等。

再利用SPSS 22.0对筛选出上述24种挥发性有

合物进行t-检验,结合2种方法(VIP>1, P<0.05)筛选出的差异成分11种,分别为4种醛类、2种酮类、1种烯类、1种呋喃类、1种醇类及2种未知化合物,结果见表3。

3.7 聚类热图分析(hierarchical cluster analysis, HCA)

根据鉴定筛选出的差异成分,利用heatmapper平台对六神曲生品、炒品、焦品进行挥发性有机物和品种2个维度的HCA,如图7所示,树形热图中横坐标代表不同产地六神曲生品、炒品和焦品,纵坐标代表差异成分,其中红色表达挥发性成分显著上调,响应蓝色代表显著下调,通过图中可以看出,六神曲生品中己醛-D、乙醇显著高于其他品种,而炒品中丁醛、2-甲基-2-丙烯、化合物8显著上调区别于生品和焦品,焦品中糠醛-D、2-丁酮、5-甲基糠醛、丙酮、2-乙酰呋喃-D、化合物20区别于其他品种,同时根据聚类热图分析可以看出,11种差异挥发性成分可以很好的将六神曲生品、炒品与焦品三者区分开。

表3 六神曲生品、炒品与焦品各挥发性成分 *t* 检验 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 3 *T* test of each index of raw, fried and charred MMF ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

成分名称	组别		
	生品	炒品	焦品
糠醛-D	2 331.27±151.45	3 695.11±845.08**	5 275.42±475.47***
己醛-D	2 438.20±200.98	1 662.25±516.14**	1 087.74±194.16***
2-丁酮	742.35±43.19	1 498.42±54.31**	2 678.41±155.87***
苯乙醛-M	842.82±47.25	958.85±43.93	552.27±68.96#
5-甲基糠醛	143.13±27.81	260.55±91.09**	1 333.10±298.45***
丙酮	2 646.50±402.70	3 258.89±433.46**	4 179.70±185.73***
丁醛	2 215.44±695.36	3 024.95±439.43**	2 390.11±348.76##
2-甲基丁醛	2 134.79±343.11	2 196.45±153.42	1 594.54±353.78***
3-甲基丁醛	1 791.69±101.51	1 602.39±127.94**	1 070.53±274.99***
2-乙酰呋喃-D	38.31±8.52	48.07±16.02	484.79±155.10***
4-甲基-3-戊烯-2-酮-D	244.51±27.01	231.25±61.82	77.23±29.23#
醋酸乙酯	754.05±45.00	600.65±33.79	379.00±58.08**
2	174.43±12.14	430.49±64.12**	435.53±58.59**
2-甲基-2-丙烯	717.43±31.04	1 070.65±177.60**	708.86±191.31##
20	225.19±62.18	441.49±130.40**	809.74±303.04***
乙醇	2 374.86±48.78	1 708.54±193.83**	1 606.33±194.06**
(<i>E</i>)-2-庚烯醛-M	475.93±27.22	313.43±30.00	143.49±30.32***
苯乙醛-D	146.94±31.28	182.68±57.95	77.50±18.81#
二甲基二硫化物	75.66±34.91	121.81±75.23	447.80±86.40***
(<i>E</i>)-2-庚烯醛-D	295.16±91.04	211.65±71.71	93.89±222.15*
己醛-M	551.53±23.47	443.73±107.15	453.67±110.68
戊醛	776.21±84.03	680.47±133.38	371.47±103.36***
8	33.69±15.12	248.83±32.57**	91.14±13.42***
3-甲硫基丙醛-M	281.69±74.63	400.50±81.47	271.64±47.27#

与生品比较: ***P*<0.01; 与炒品比较: #*P*<0.05 ##*P*<0.01

***P*<0.01 vs raw products; #*P*<0.05 ##*P*<0.01 vs fried products

4 讨论

HS-GC-IMS 技术结合了气相色谱优良的分离能力及离子迁移谱灵敏度高和响应速度快的优势,近年来已经在分析和鉴定中药材真伪^[12-13]、炮制加工^[14-15]等方面取得了一系列的研究成果。本实验针对六神曲炒制过程中挥发性物质变化的炮制特点^[6],提出以挥发性物质作为切入点,构建六神曲生品及炮制品(炒、焦)HS-GC-IMS 指纹图谱,通过观察图谱中代表化合物信息的样点大小及颜色变化快速比较六神曲生品、炒品及其焦品挥发性有机物的种类及含量,结果表明六神曲生品、炒品及焦品挥发性成分具有极高的相似度,但含量组间则差异明显。PLS-DA 发现六神曲生品及炒品、焦品可以各自聚

为一类,说明六神曲生品、炒品和焦品的化学成分存在差异,进一步证实了炮制可影响六神曲中的挥发性成分,为快速识别六神曲生品及其炮制品提供了科学依据,同时也反映了六神曲生品、炒神曲和焦神曲在临床应用中的功效差异。

六神曲经过加工炮制发生了复杂的化学变化,这些变化的化学成分正是导致炮制前后性味功能改变的重要原因,是工艺革新和制定炮制规范的重要依据^[16]。本研究在收集不同产地六神曲生品的基础上进行同批炮制(炒、焦),对六神曲生品及炮制品(炒品、焦品)的挥发性有机物进行分析,结果表明六神曲炮制(炒、焦)后的挥发性有机物种类、含量与生品相比呈现差异,共检测出 80 种挥发性有

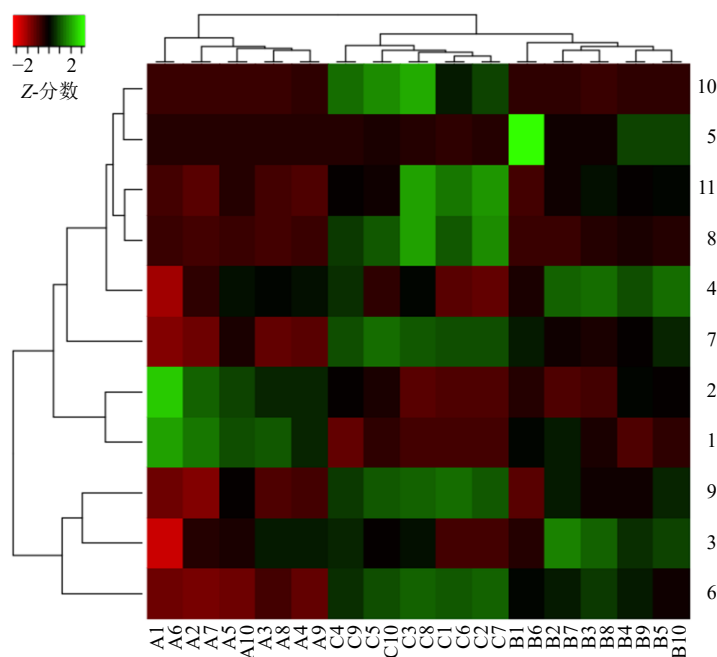


图7 差异成分聚类分析热图

Fig. 7 Cluster analysis heatmap of differential metabolites

有机物, 鉴定出其中 60 种挥发性有机物, 差异分析筛选出己醛-D、乙醇 2 种共性成分可以作为六神曲生品的标志性成分, 丁醛、2-甲基-2-丙烯可以作为炒品的标志性成分, 糠醛-D、2-丁酮、5-甲基糠醛、丙酮、2-乙酰呋喃-D 等共性成分可以作为焦品的标志性成分。其中, 己醛-D、乙醇等具有强烈刺激性的成分含量下降, 糠醛-D、2-丁酮、5-甲基糠醛、丙酮、2-乙酰呋喃-D 等可作为香料原料的成分含量增加, 分析其原因可能是六神曲本身所含有或受热后产生的成分及在发酵过程中产生的酶或糖成分发生了转变^[17-18]。这为后续六神曲发酵及炮制工艺和品质提升提供理论参考。同时, 这些差异挥发性有机物可能是六神曲“焦香醒脾”的共性物质基础, 为下一步研究六神曲经“嗅味通路-中枢神经-脑肠肽-胃肠功能”的炮制机制奠定基础, 也为临床消食导滞药的应用提供了新思路^[19-20]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 马开, 田萍, 张迪文, 等. 波长切换 HPLC 法同时测定六神曲中 9 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(3): 526-530.
- [2] 王郡瑶, 程显隆, 李明华, 等. 基于衍生化-HPLC 测定酶解葡萄糖的方法评价六神曲中糖化酶活力 [J]. 药物分析杂志, 2022, 42(1): 121-126.
- [3] 吴雪, 戴泽琦, 徐思敏, 等. 中成药治疗儿童消化系统疾病临床研究证据的概况性综述 [J]. 中国中药杂志,

2022, 47(15): 4248-4255.

- [4] 胥敏, 吴纯洁, 李欣逸, 等. 曲类中药质量标准共性问题的思考 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 16-21.
- [5] 王丽芳, 高文远, 裴香萍, 等. 鲜干品组方及不同制法六神曲中消化酶活力的动态检测及分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 20-24.
- [6] 王丽芳, 高文远. 论六神曲中微生物、消化酶动态检测及整体性研究 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(8): 1896-1898.
- [7] 贺倩, 刘翠, 曾琳琳, 等. 焦山楂消食机制的研究 [J]. 华西药学杂志, 2022, 37(1): 23-28.
- [8] 徐瑶. “焦三仙”炒焦增强消食导滞的“焦香气味”物质及其协同增效作用机理研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2018.
- [9] 王玉霞, 徐瑶, 夏满琼, 等. 炒焦类中药历史沿革及差异性分析 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 357-360.
- [10] Wang Q L, Wu X, Yang X D, *et al.* Comprehensive quality evaluation of *Lignum Caraganae* and rapid discrimination of *Caragana jubata* and *Caragana changduensis* based on characteristic compound fingerprints by HPLC-UV and HPLC-MS/MS coupled with chemometrics analysis [J]. *Phytochem Anal*, 2020, 31(6): 846-860.
- [11] Li H H, Mao Y Y, Liu Y N, *et al.* Comparative investigation of raw and processed products of *Gardeniae Fructus* and *Gardenia jasminoides* var. *radicans* using HPLC coupled with chemometric methods [J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 35(5): e5051.

- [12] Feng D, Wang J, He Y, *et al.* HS-GC-IMS detection of volatile organic compounds in *Acacia* honey powders under vacuum belt drying at different temperatures [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(8): 4085-4093.
- [13] Wang Z L, Yuan Y X, Hong B, *et al.* Characteristic volatile fingerprints of four chrysanthemum teas determined by HS-GC-IMS [J]. *Molecules*, 2021, 26(23): 7113.
- [14] 周倩, 戴衍朋, 郭威, 等. 基于顶空-气相色谱-离子迁移谱的生、炙甘草饮片挥发性有机物指纹图谱分析 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(16): 3857-3862.
- [15] Xing Y, Yu Z, Hu X, *et al.* Characterization of volatile organic compounds in *Polygonum multiflorum* and two of its processed products based on multivariate statistical analysis for processing technology monitoring [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1680: 463431.
- [16] 孙嘉辰, 李霞, 王莹, 等. 中药加工炮制过程中质量标志物的研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(10): 2593-2602.
- [17] 马高兴, 陶天艺, 裴斐, 等. 不同炒制条件对预制菜肴中双孢蘑菇风味的影响 [J]. *中国农业科学*, 2022, 55(3): 575-588.
- [18] 杨冰月, 罗瑶, 姬海月, 等. 基于 HS-GC-IMS 技术分析款冬花蜜炙前后挥发性有机物的差异性 [J]. *中草药*, 2022, 53(6): 1854-1861.
- [19] Wu C, Jeong M Y, Kim J Y, *et al.* Activation of ectopic olfactory receptor 544 induces GLP-1 secretion and regulates gut inflammation [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1987782.
- [20] Bienenstock J, Kunze W A, Forsythe P. Disruptive physiology: Olfaction and the microbiome-gut-brain axis [J]. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2018, 93(1): 390-403.

[责任编辑 郑礼胜]