

基于 UPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS 法对粗茎秦艽药材不同初加工品化学成分的分析

季文静¹, 谢 晖², 吴新荣¹, 倪梁红^{1*}, 赵志礼^{1*}

1. 上海中医药大学, 上海 201203

2. 复旦大学, 上海 200433

摘要: 目的 基于代谢组学方法研究不同加工方法下粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* 药材次生代谢化合物的差异, 为优化粗茎秦艽药材的加工及干燥方法提供科学依据。方法 收集云南丽江产粗茎秦艽药材, 分别进行产地和药厂加工, 加工方式包括切片、原个子(不切片), 干燥方式包括烘干、晒干和“发汗”。采用超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱(UPLC-LTQ-Orbitrap-MS)技术, 结合多元统计分析方法, 对各样品的次生代谢产物进行分析, 筛查其差异性的特征化合物。结果 共鉴定出 44 个化学成分。主成分分析(principal component analysis, PCA)结果表明, 根与芦头(根茎)的化学成分存在较大的差异, 根的切片组、原个子组有明显区分。正交偏最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)表明, 三年生药材质量优于二年生药材, 根的质量优于芦头, 切片组优于原个子组, 不同干燥方法中晒干组药材的质量较优, 药厂加工药材质量均优于产地加工药材, 并分析得到各组间主要差异化合物。结论 粗茎秦艽药材加工时, 建议选用三年生药材, 去除芦头部位, 并进行趁鲜切片及晒干处理。可为粗茎秦艽药材初加工工艺、质量控制与合理应用提供科学资料。

关键词: 粗茎秦艽; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS; 代谢组学; 加工方法; 干燥方式; 龙胆苦苷; 马钱苷酸; 獐牙菜苷; 獐牙菜苦苷; 6'-O- β -D 葡萄糖基龙胆苦苷

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)14-4641-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.14.025

Chemical constituents of underground part of *Gentiana crassicaulis* with different processing methods based on UPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS

Ji Wen-jing¹, Xie Hui², Wu Jin-rong¹, Ni Liang-hong¹, Zhao Zhi-li¹

1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To study the differences of secondary metabolites in underground part of *Gentiana crassicaulis* processed in different ways based on metabolomics, so as to provide scientific basis for optimizing its processing and drying methods. **Methods** *G. crassicaulis*, collected from Lijiang of Yunnan Province, was processed in the locality and pharmaceutical factory, respectively. The processing methods included slicing and whole roots (not slicing), and the drying methods included stoving, air drying and sweating. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS technology and multivariate statistical analysis were used to analyze the secondary metabolites of each sample to screen the characteristic compounds with differences. **Results** A total of 44 chemical components were identified by analysis of all samples. The results of principal component analysis (PCA) showed that there were significant differences in the chemical composition between rhizomes and roots, and there were obvious differences between sliced roots and whole roots. The results of orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) showed the quality of triennial materials was superior to that of biennial materials, the quality of roots was better than that of rhizomes, the quality of sliced roots was better than that of whole roots. The quality of materials by air drying was the best, and the quality of materials processed in pharmaceutical factory was better than that processed in the locality. The main differential compounds among different groups were also analyzed. **Conclusion** It is suggested to select triennial materials, remove the rhizomes and slice the roots when *G. crassicaulis* is processed.

收稿日期: 2023-01-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82073959); 国家自然科学基金面上项目(81173654); 上海市卫生健康委员会中医药传承和科技创新项目(2022QN030)

作者简介: 季文静, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与品种鉴定。E-mail: 1147221058@qq.com

*通信作者: 倪梁红, 男, 副教授。E-mail: nlhtcm@126.com

赵志礼, 男, 教授。E-mail: zhilzhao@sohu.com

The results could provide the basis for the primary processing technology, quality control and rational application of *G. crassicaulis*.

Key words: *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.; UPLC-LTQ-Orbitrap-MS; metabonomics; processing method; drying method; gentiopicroside; loganic acid; sweroside; swertiamarin; 6'-O- β -D-glucosyl-gentiopicroside

粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 为龙胆科龙胆属 *Gentiana* (Tourn.) L. 秦艽组 Sect. *Cruciata* Gaudin 植物, 是《中国药典》2020 年版收载的秦艽基原植物之一, 根入药, 具有祛风湿、清湿热、止痹痛、退虚热的功效^[1]。粗茎秦艽主要含有环烯醚萜类、黄酮类、三萜类药效成分, 具有抗炎镇痛、抑菌、抗氧化、调节免疫、抗肿瘤等药理作用^[2]。

中药的质量受生长环境、栽培条件、采收加工等多种因素的影响^[3-4]。中药材经过加工炮制以后, 会发生复杂的化学变化, 将中药“质量标志物”的研究与加工炮制相结合, 阐明中药加工过程中化学成分发生的变化, 对中药质量控制具有指导意义^[5]。切片和干燥是中药材初加工过程中不可或缺的关键操作。在干燥过程中, 常涉及温度变化, 易引起药材中有效成分和生物活性的变化, 进而影响到中药材的药用价值和经济价值。如有研究趁鲜切制干燥对三七药材外观品质和内在成分的影响^[6], 以及考察干燥温度对党参药材品质的影响, 优化产地加工工艺^[7]。《中国药典》2020 年版对粗茎秦艽的加工炮制方法较为笼统: “鲜原药材-去泥沙-发汗或否-晒干; 干燥原药材洗净-润透-切厚片-干燥^[1]”。有研究表明, 不同干燥方式对秦艽药材中主要有效成分的含量有一定影响^[8-9], 但目前对秦艽初加工方法的系统性研究还较少。云南丽江为粗茎秦艽的传统道地产区, 其加工炮制工艺具有代表性。课题组前期应用 HPLC 含量测定、指纹图谱分析方法对该地区不同加工方式的粗茎秦艽栽培药材进行化学成分比较分析, 得出不同初加工方法对药材品质具有较为明显的影响^[10]。

超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱组合式高分辨质谱 (UPLC-LTQ-Orbitrap-MS) 是基于 LTQ 的多级质谱功能及 Orbitrap 高分辨能力的一种分析方法。前者 (LTQ) 富集样品离子并产生碎片, 通过 C-Trap 注射入后者 (Orbitrap) 进行高分辨扫描。LTQ-Orbitrap 质谱灵敏度不受分辨率影响, 低分子量不影响分析时质量准确度, 能够承载高浓度样品, 动态范围大。这些特点使 LTQ-Orbitrap 质谱适合复杂混合物体系和较宽的浓度范围样品分析^[11-12], 已广泛应用于中药复杂化学成分的分析^[13-15]。

本研究采用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 质谱数据采集

模式, 结合代谢组学多元统计技术, 在前期工作的基础上, 进一步对丽江产粗茎秦艽进行初加工方法评价, 识别并区分不同工艺、干燥方式处理后的差异性成分, 以为优化粗茎秦艽药材初加工方法提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

液质联用系统: Ultimate 3000 超高效液相色谱仪、LTQ Orbitrap 质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BSA124S-CW 型电子天平 (北京赛多利斯仪器系统有限公司); Milli-Q 型超纯水机 (美国 Millipore 公司); 5810R 型台式离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 试药

龙胆苦苷 (批号 Y30J9Q66926)、马钱苷酸 (批号 J22S6J3607)、獐牙菜苷 (批号 Y09J8C28349)、獐牙菜苦苷 (批号 Z05M10X87215)、6'-O- β -D 葡萄糖基龙胆苦苷 (批号 X25F10X81442) 购自上海研谨生物科技有限公司; 槲皮素 (批号 100081-201610)、阿魏酸 (批号 110773-201915) 购自中国食品药品检定研究所; 山柰酚 (批号 C26J8Y38642, 上海源叶生物科技有限公司); 木犀草素 (批号 111520-200201, 中国药品生物制品检定所); 芦丁 (批号 MUST-20011302, 成都曼思特生物科技有限公司); 对照品质量分数均大于 98.0%。乙腈、甲醇 (美国 Supelco 公司), 甲酸 (上海安谱实验科技股份有限公司), 均为色谱级。

1.3 材料

2020 年 12 月 3 日, 于云南省丽江市鲁甸乡试验样地 (E 99° 29' 12.8", N 27° 9' 24") 采挖三年生粗茎秦艽的根, 同时取适量二年生粗茎秦艽的根。凭证标本均经上海中医药大学赵志礼教授鉴定为粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk., 存放于上海中医药大学中药学院药用植物标本室。

药材分别于产地、药厂进行加工处理。产地加工时, 不除去芦头 (根茎); 药厂加工时, 除去芦头, 将芦头单独设为一实验组。炮制加工方法: ①切片, 或不切片 (原个子); ②干燥方式: 产地分为晒干、烘干; 药厂分为晒干、烘干、“发汗”处理。实验样品共分为 12 组, 编号 A~L。详见表 1。

表 1 粗茎秦艽药材不同加工样品

Table 1 Information of sample processing

加工地点	干燥方法	加工方法	编号
产地加工	烘干组（三年生）	原个子	A
		切片	B
	晒干组（三年生）	原个子	C
		切片	D
药厂加工	烘干组（二年生）	原个子	E
	烘干组（三年生）	原个子	F
		切片	G
	“发汗”组（三年生）	原个子	H
		切片	I
	晒干组（三年生）	原个子	J
		切片	K
	芦头（三年生）	不加工	L

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

药材粉碎过三号筛，分别取样品粉末 0.5 g，精密称定，置于 50 mL 锥形瓶中，精密加入色谱级甲醇溶液 20 mL。在 35 ℃ 条件下，超声提取 30 min（400 W、40 kHz），取出，冷却至室温，补足减失的质量。5000 r/min 离心 10 min，取上清液经 0.22 μm 滤膜滤过，即得。

2.2 对照品溶液的制备

分别取马钱苷酸、龙胆苦苷、6'-O-β-D 葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和獐牙菜苷 5 种对照品适量，置 10 mL 量瓶中，加入甲醇定容，分别制成质量浓度为 1.142、1.606、0.618、0.456、0.200 4 mg/mL 的混合对照品溶液 A；分别取山柰酚、槲皮素、阿魏酸对照品适量，置 10 mL 量瓶中，加入甲醇定容，分别制成质量浓度为 0.097 60、0.236 00、0.010 63 mg/mL 的混合对照品溶液 B；分别取木犀草素、芦丁对照品适量，置 10 mL 量瓶中，加入甲醇定容，分别制成质量浓度为 0.010 68、0.003 60 mg/mL 的混合对照品溶液 C。置于 4 ℃ 冰箱中避光保存备用，进样前用 0.22 μm 微孔滤膜滤过。

2.3 分析方法

2.3.1 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）。流动相由 0.1% 甲酸水溶液（A）和乙腈（B）组成。梯度洗脱：0~2 min，5% B；2~5 min，5%~12% B；5~15 min，12%~40% B；15~18 min，40% B；18~25 min，40%~95% B；25~35 min，95% B；35~40 min，95%~5% B。体积流量为 0.3 mL/min，自动进样器温度为 4 ℃，柱温箱温度为 40 ℃，进样量为 2 μL。

2.3.2 质谱条件 正负离子模式下喷雾电压分别为 3.8 kV 和 -4.0 kV；离子源温度和毛细管温度分别为 350 ℃ 和 350 ℃。鞘气和辅助气的流量分别为 40 arb 和 20 arb。离子传输透镜 S-RFlens 为 30%。MS1 以 fullMS 扫描模式检测成分，检测范围为 m/z 50~1200，分辨率为 60 000。多级质谱（MS2、MS3）均采用数据依赖性扫描模式（data-dependentscanmode）进行分析，分辨率为 30 000 Hz。在质谱扫描事件中，选择响应最高的离子为母离子进行裂解。裂解方式选择碰撞诱导离解（collisioninduced-dissociation），归一化碰撞能量设置为 35%，间隔宽度为 2.0 m/z 。激活 Q（activation Q）为 0.250，激活时间为 10 ms。

2.3.3 进样规则 按“2.1”项所述方法，每组粗茎秦艽样品分别平行制备 3 份供试液，共得 36 份供试液，按照生成的随机数乱序放置进样室内，同时每隔 6 份样品溶液插入 1 份 QC 样品，共计进样 42 份。

2.4 数据处理

采用 Thermo Xcalibur Qual Browser 2.2 软件进行数据分析和处理。将所得数据导入 Simca-p14.1 软件进行无监督的主成分分析（principal component analysis，PCA），初步观察 12 批样品的聚集情况，再结合正交偏最小二乘法判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis）模型的 Loading plot 图、S-plot 图与 VIP 值寻找不同比较组间的差异成分，从整体到部分全面分析粗茎秦艽不同加工方式（切片与不切片）、不同干燥方法的组份差异。

3 结果与分析

3.1 质谱成分指认

正、负离子模式下混合样品的总离子流图见图 1。将 11 个对照品图谱的保留时间和碎片离子信息比对，检索 Compound Discovery 软件数据库和相应的文献，结合 Massfrontier7.0 软件比较分析化合物的质谱信息，对其主要成分组成峰进行鉴定。共推测鉴定出 44 个化合物。其中环烯醚萜类 14 个、黄酮类 12 个、三萜类 6 个、糖类 3 个、有机酸类 3 个、苯丙素类 1 个、香豆素类 1 个、其他类 4 个；另有 1 个未知化合物。各化合物的保留时间、精确相对分子质量、二级质谱数据等见表 2。

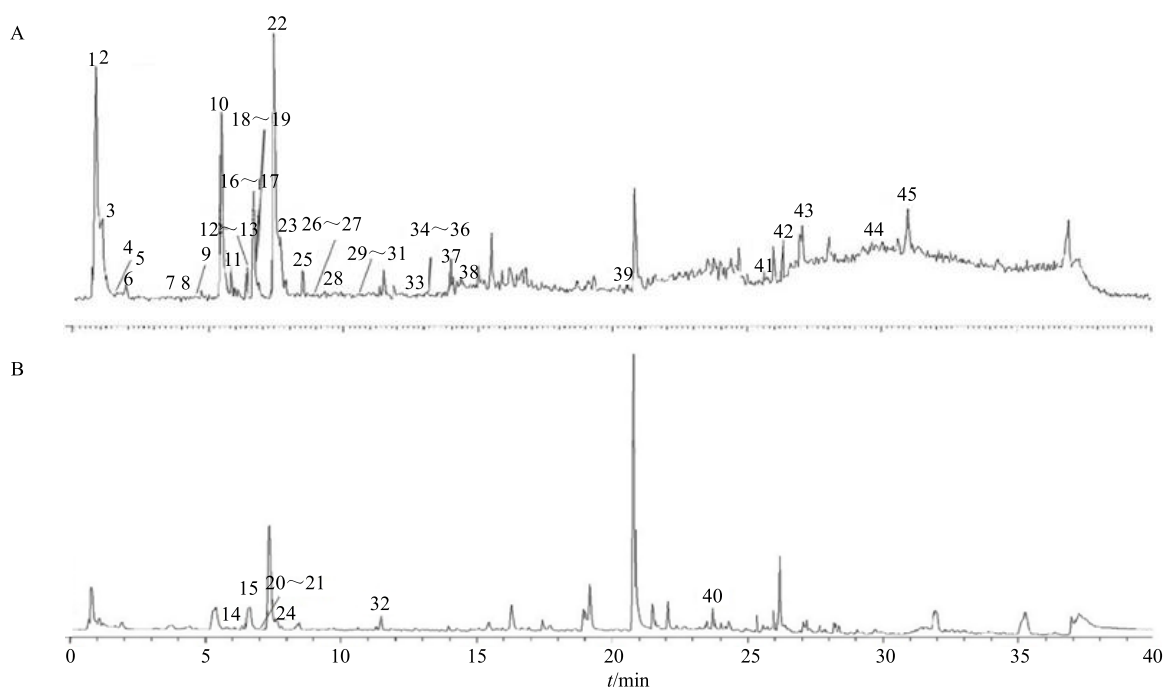


图 1 粗茎秦艽 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的负离子 (A) 和正离子 (B) 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of *G. crassicaulis* at negative ion mode (A) and positive ion mode (B) of UPLC-LTQ-Orbitrap-MS

表 2 粗茎秦艽化学成分保留时间及质谱参数

Table 2 Retention time and mass parameters of compounds of *G. crassicaulis*

编号	t_R/min	分子式	实测值 (m/z)	碎片离子 (m/z)	化合物	偏差/($\times 10^{-6}$)
1	0.80	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	341.107 57 $[\text{M}-\text{H}]^-$	179.056 2, 161.045 8, 119.035 2, 89.024 6	蔗糖	-2.657
2	0.82	$\text{C}_{13}\text{H}_{34}\text{O}_{13}$	387.112 64 $[\text{M}-\text{H}]^-$	341.107 5, 179.055 8, 119.036 0, 89.024 5	未知	-3.166
3	0.86	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	503.160 03 $[\text{M}-\text{H}]^-$	503.160 0, 341.108 6, 179.056 0	棉籽糖	-5.510
4	1.11	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	191.019 24 $[\text{M}-\text{H}]^-$	191.019 4, 129.019 4, 111.008 8, 87.008 8	柠檬酸	0.275
5	1.59	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	391.122 59 $[\text{M}-\text{H}]^-$	391.122 8, 229.071 2, 185.081 5	山梗苣	-2.854
6	2.26	$\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_3$	169.086 70 $[\text{M}-\text{H}]^-$	125.097 4, 123.061 3, 121.031 4	isoboonein	-2.854
7	2.96	$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_9$	315.070 62 $[\text{M}-\text{H}]^-$	216.928 4, 153.019 3, 109.029 3	5-(β -D-glucopyranosyl)-2-hydroxybenzoic acid	-2.180
8	4.04	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$	405.138 34 $[\text{M}-\text{H}]^-$	179.056 0, 161.045 3, 119.035 1, 89.024 5	山梗苣甲酯	-3.323
9	4.41	$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$	405.138 43 $[\text{M}-\text{H}]^-$	179.056 2, 119.035 3, 89.025 6	莫诺苣	-3.175
10*	5.41	$\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	375.128 02 $[\text{M}-\text{H}]^-$	213.076 4, 169.087 0, 113.024 6, 89.024 5	马钱苷酸	-2.697
11	5.60	$\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	537.179 69 $[\text{M}-\text{H}]^-$	375.128 7, 357.117 2, 213.076 4, 169.086 8	loganic acid 11-O- β -glucopyranosylester	-3.974
12	6.42	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	389.107 15 $[\text{M}-\text{H}]^-$	389.107 5, 345.118 2, 183.066 1, 121.066 0	四乙酰开联番木鳖苣	-3.254
13	6.44	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_9$	345.117 71 $[\text{M}-\text{H}]^-$	213.076 4, 183.066 1, 165.055 6, 89.024 6	swertiajaposide B	-2.280
14	6.51	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$	387.128 05 $[\text{M}-\text{H}]^-$	225.076 4, 179.056 0, 89.024 5	马鞭草苣	-1.584
15*	6.58	$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	517.154 17 $[\text{M}-\text{H}]^-$	179.056 0, 149.060 9, 119.035 1, 89.024 5	6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苣	-3.249
16*	6.60	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	419.117 03 $[\text{M}-\text{H}]^-$	373.110 7, 179.055 9, 141.019 4, 89.024 5	獐牙菜苦苣	-2.148
17	6.63	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	179.034 62 $[\text{M}-\text{H}]^-$	179.034 6, 135.045 2	5-乙酰基水杨酸	-0.420
18	6.87	$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	519.169 25 $[\text{M}-\text{H}]^-$	519.169 8, 195.065 9, 125.024 5	紫药苦苣	-3.757
19*	6.88	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	609.142 40 $[\text{M}-\text{H}]^-$	609.143 6, 447.091 8, 357.060 8, 327.050 2	芦丁	-5.920
20	6.99	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_5$	209.044 65 $[\text{M}+\text{H}]^+$	191.034 1, 163.039 3, 135.044 2	秦皮素	2.090
21	7.01	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	593.148 32 $[\text{M}-\text{H}]^-$	575.138 4, 503.118 0, 473.107 6, 311.052 6	皂草黄苣	-5.560
22*	7.30	$\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_9$	355.102 26 $[\text{M}-\text{H}]^-$	355.112 9, 149.056 6, 119.035 2, 89.024 6	龙胆苣	-1.906
23	7.35	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$	531.147 16 $[\text{M}-\text{H}]^-$	235.060 6, 193.050 3, 149.060 8	gentiamicoside	-3.410
24*	7.63	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_9$	403.122 50 $[\text{M}+\text{HCOOH}-\text{H}]^-$	357.118 3, 195.066 1, 179.056 0, 125.024 6	獐牙菜苣	-2.288
25	8.43	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.090 82 $[\text{M}-\text{H}]^-$	429.080 9, 357.060 5, 327.050 1	异荛素	-4.650
26	8.90	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	431.096 31 $[\text{M}-\text{H}]^-$	413.086 7, 341.065 6, 311.055 0,	牡荆素	-4.624
27*	8.91	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	193.048 69 $[\text{M}-\text{H}]^-$	178.026 8, 149.060 8, 134.037 5	阿魏酸	-1.426

续表 2

编号	t_R/min	分子式	实测值 (m/z)	碎片离子 (m/z)	化合物	偏差/%
28	9.31	$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	431.096 19 $[\text{M}-\text{H}]^-$	413.086 7, 341.065 6, 311.055 6	异牡荆素	-4.850
29	10.26	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_{14}$	579.167 72 $[\text{M}-\text{H}]^-$	459.112 8, 313.070 6, 271.060 2, 151.003 6	柚皮苷	-5.470
30	10.38	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	519.184 69 $[\text{M}-\text{H}]^-$	357.133 1, 342.107 5, 151.040 0	6'- O - β - D -葡萄糖基獐牙菜苷	-2.096
31	10.51	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	609.179 14 $[\text{M}-\text{H}]^-$	609.179 4, 325.070 7, 301.070 6	橙皮苷	-5.400
32	11.46	$\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$	557.184 63 $[\text{M}-\text{H}]^-$	323.097 9, 233.081 5, 189.092 0, 119.035 2	大叶苷 D	-2.767
33	12.81	$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	491.154 21 $[\text{M}-\text{H}]^-$	191.055 7, 149.045 5, 89.024 4	大叶苷 A	-1.177
34*	12.91	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	285.038 76 $[\text{M}-\text{H}]^-$	257.044 5, 241.049 7, 177.019 0,	木犀草素	-3.970
35*	12.93	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$	301.033 87 $[\text{M}-\text{H}]^-$	301.034 3, 193.013 8, 151.003 7,	槲皮素	-1.957
36	13.94	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	269.044 46 $[\text{M}-\text{H}]^-$	269.044 7, 247.437 0, 117.029 0	芹菜素	-3.650
37*	14.24	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	285.039 22 $[\text{M}-\text{H}]^-$	285.093 4, 257.044 5, 151.003 6	山柰酚	0.335
38	14.50	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_6$	273.039 28 $[\text{M}-\text{H}]^-$	273.039 4, 229.049 8, 137.024 4	当药宁	-4.140
39	20.49	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_6$	503.335 50 $[\text{M}-\text{H}]^-$	503.335 6, 326.540 1, 125.954 7	arjungenin	-5.040
40	23.86	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$	471.345 67 $[\text{M}-\text{H}]^-$	471.346 1, 430.897 6, 314.059 2	科罗素酸	-2.581
41	25.71	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	455.350 80 $[\text{M}+\text{H}]^+$	455.351 3, 142.306 7, 136.725 8	熊果酸	-4.680
42	26.82	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	255.232 18 $[\text{M}-\text{H}]^-$	255.232 3, 114.934 2	棕榈酸	-3.470
43	27.36	$\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{O}_2$	423.324 83 $[\text{M}-\text{H}]^-$	423.324 7, 394.900 1, 205.159 4	vaticinone	-4.720
44	29.16	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$	455.351 07 $[\text{M}+\text{H}]^+$	455.350 8, 397.309 5, 95.834 4	齐墩果酸	-4.260
45	30.97	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$	457.366 97 $[\text{M}+\text{HCOOH}-\text{H}]^-$	457.366 7, 441.330 5	β -谷甾醇	-2.278

*通过对照品对比确认

*identified by comparing with reference standards

3.2 粗茎秦艽化学成分的主成分分析

利用 Simca14.1 软件对在负离子模式下采集的所有样本数据进行 PCA, 其中 9 个主成分的特征值 >1 , 占总方差的 74%。6 份 QC 样品在 PCA 分析图中分布集中, 表明方法稳定性高, 数据质量可靠。粗茎秦艽所有加工组成分的 PCA 得分图见图 2, 根聚为一簇, 根茎(芦头)为单独一类, 表明不同部位间差异明显。同时, 根的切片组样品、原个子组样品也分别各自聚在一起, 表明药材切片与否对样品化学成分的变化存在一定影响。

3.3 不同年限与不同部位的粗茎秦艽化学成分的主成分分析

OPLS-DA 是一种有监督的分析方法, 可用于确定 2 组间的代谢差异物^[16]。对不同年限(二年生、三年生)粗茎秦艽药材的化学成分进行 OPLS-DA 分

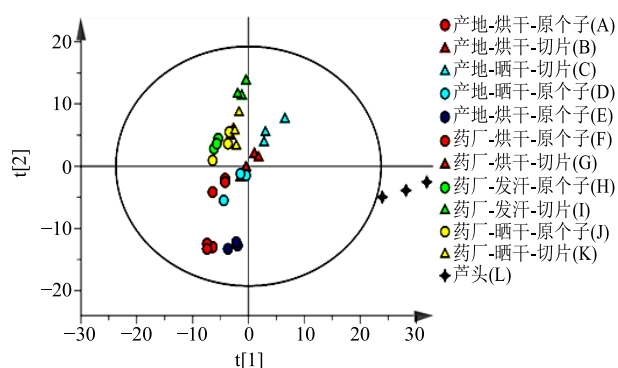


图 2 粗茎秦艽样品 PCA 得分图

Fig. 2 PCA score plot of *G. crassicaulis*

析, 交叉验证参数 R^2X 、 R^2Y 、 Q^2 分别为 0.901、1.000、0.992, 均远大于 0.5, 提示模型具有很好的稳定性和预测能力。以 $\text{VIP}>3$ 、 t 检验的 $P<0.05$, 同时存在于各样品中并且含量具有明显差异为标准(下同), 共鉴定出 6 个差异明显的化合物(图 3), 分别为龙胆苦苷、马钱苷酸、6'- O - β - D -葡萄糖基龙胆苦苷、柠檬酸、十四烷基硫酸酯和十八烷基-3-[(2, 6-二异丙基苯)氨基酯]-3-氧代丙酸乙酯。差异化合物含量由利用 Compound Discovery 软件匹配得到的数据矩阵中的化合物的峰面积表示。根据差异化合物含量高低, 得出三年生药材质量优于二年生药材。

对不同部位(根、芦头)粗茎秦艽药材的化学成分进行 OPLS-DA 分析, 交叉验证参数 R^2X 、 R^2Y 、 Q^2 分别为 0.634、0.992、0.958。共鉴定出 3 个差异明显的化合物(图 4), 分别为龙胆苦苷、6'- O - β - D -葡萄糖基龙胆苦苷、4-十一烷基苯磺酸。根据差异化合物含量高低, 得出根的质量明显优于芦头。

3.4 不同干燥方法下粗茎秦艽的差异化合物筛查

为进一步明确不同干燥方法下粗茎秦艽药材的组间差异性, 寻找样品间化学成分变化的特征性指标, 采用 OPLS-DA 分别对产地、药厂不同干燥方法的数据作进一步分析(均用三年生根平行比较)。表 3 为不同干燥方法下样品的 OPLS-DA 分析结果。

各组别的交叉验证参数 R^2X 、 R^2Y 、 Q^2 均大于 0.5。不同组别的干燥方法间共鉴定出 11 种差异化合物,

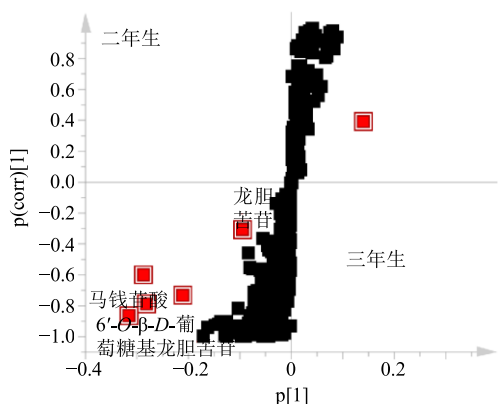


图 3 二年生和三年生样品的 OPLS-DA S-plot 图

Fig. 3 OPLS-DA S-plot of biennial and triennial samples

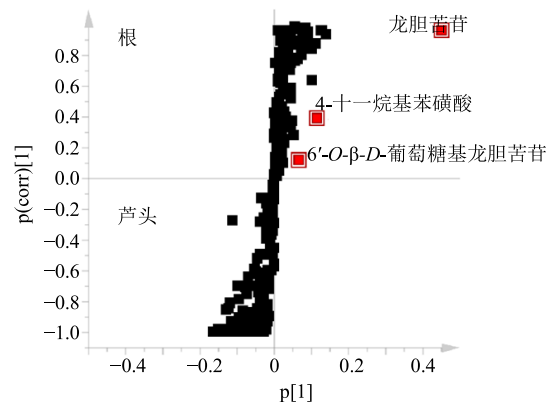


图 4 芦头和根的 OPLS-DA S-plot 图

Fig. 4 OPLS-DA S-plot of rhizomes and roots

表 3 不同干燥方法组 OPLS-DA 结果

Table 3 OPLS-DA results of different drying groups

比较组别	R^2_X	R^2_Y	Q^2	差异化合物
烘干 vs 晒干 (产地加工)	0.798	0.999	0.586	2-羟基苯乙酸、龙胆苦苷、马钱苷酸、柠檬酸、葡萄糖酸、十八烷基-3-[(2,6-二异丙基苯)氨基]酯-3-氧代丙酸乙酯、十四烷基硫酸酯、獐牙菜苦苷
烘干 vs 晒干 (药厂加工)	0.739	0.997	0.686	4-十一烷基苯磺酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、龙胆苦苷、柠檬酸、十八烷基-3-[(2,6-二异丙基苯)氨基]酯-3-氧代丙酸乙酯、十四烷基硫酸酯、獐牙菜苦苷
烘干 vs 发汗 (药厂加工)	0.706	0.997	0.888	6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、龙胆苦苷、马钱苷酸、柠檬酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苦苷
晒干 vs 发汗 (药厂加工)	0.837	1.000	0.870	4-十一烷基苯磺酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、龙胆苦苷、柠檬酸、葡萄糖酸、十八烷基-3-[(2,6-二异丙基苯)氨基]酯-3-氧代丙酸乙酯、十四烷基硫酸酯、獐牙菜苦苷、獐牙菜苦苷

其中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷和柠檬酸为各组别间共有的差异化合物。根据差异化合物含量高低，可以得出产地加工药材中，晒干组优于烘干组；药厂加工药材中，晒干组质量最优，其次为“发汗”组，最后为烘干组。

产地加工条件下，晒干组中龙胆苦苷、马钱苷酸、柠檬酸和葡萄糖酸含量远高于烘干组。药厂加工条件下，晒干组中 6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、柠檬酸、4-十一烷基苯磺酸、葡萄糖酸和十四烷基硫酸酯的含量较“发汗”组高，獐牙菜苦苷、柠檬酸、4-十一烷基苯磺酸以及十四烷基硫酸酯高于烘干组；“发汗”组中，龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苦苷和獐牙菜苦苷的含量较烘干组、晒干组高。

3.5 不同加工方法粗茎秦艽的差异化合物筛查

为了明确切片和原个子样品间的差异，采用

OPLS-DA 分别对产地和药厂加工中的 2 种加工方式进行比较分析（均用三年生根平行比较），分析结果见表 4。

不同加工方法间共鉴定出 10 种差异化合物，其中龙胆苦苷、马钱苷酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、十八烷基-3-[(2,6-二异丙基苯)氨基]酯-3-氧代丙酸乙酯、十四烷基硫酸酯和柠檬酸为共有的差异化合物。根据差异化合物含量高低，可以得出，无论是产地或药厂加工，切片组药材的主要差异化合物含量普遍高于原个子组。产地切片组药材中，马钱苷酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、柠檬酸、十八烷基-3-[(2,6-二异丙基苯)氨基]酯-3-氧代丙酸乙酯和十四烷基硫酸酯等成分含量高于原个子组；药厂切片组的龙胆苦苷、马钱苷酸和獐牙菜苦苷等环烯醚萜类化合物含量远高于原个子组。

表 4 不同加工方法组 OPLS-DA 结果

Table 4 OPLS-DA results of sliced roots and whole roots

比较组别	R^2_X	R^2_Y	Q^2	差异化合物
切片 vs 原个子 (产地加工)	0.847	1.000	0.984	6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、5-乙基环己烷-1,3-二酮、龙胆苦苷、马钱苷酸、柠檬酸、十八烷基-3-[(2,6-二异丙基苯)氨基]酯-3-氧代丙酸乙酯、十四烷基硫酸酯、獐牙菜苦苷
切片 vs 原个子 (药厂加工)	0.518	0.989	0.583	4-十一烷基苯磺酸、6'-O-β-D-葡萄糖基龙胆苦苷、龙胆苦苷、马钱苷酸、柠檬酸、十八烷基-3-[(2,6-二异丙基苯)氨基]酯-3-氧代丙酸乙酯、十四烷基硫酸酯、獐牙菜苦苷

3.6 药厂加工与产地加工的粗茎秦艽化学成分的主成分分析

平行选取三年生烘干及晒干样品, 分别对药厂、产地加工药材的化学成分进行 PCA 和 OPLS-DA 分析 (图 5)。使用 PCA 对数据进行处理, 其中 8 个主成分的特征值 > 1, 占总方差的 77%, 由得分图可以看出, 产地加工样品、药厂

加工样品各自聚在一起, 能够明显区分; OPLS-DA 的交叉验证参数 R^2X 、 R^2Y 、 Q^2 为 0.693、0.992、0.770, 共鉴定出 5 个差异明显的化合物, 分别为龙胆苦苷、马钱苷酸、十四烷基硫酸酯、4-十一烷基苯磺酸和 5,7-二羟基-4-丙基香豆素。根据差异化合物含量高低, 药厂加工药材质量优于产地加工药材。

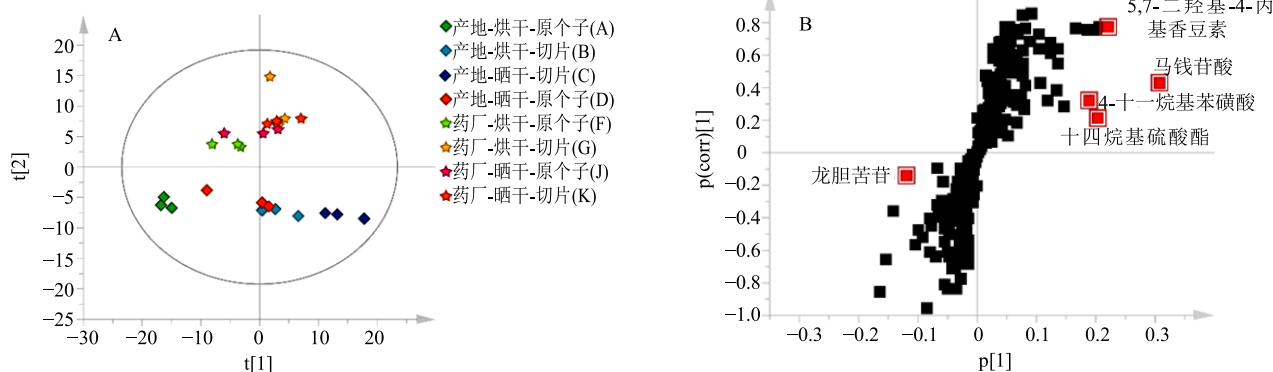


图 5 产地与药厂加工样品的 PCA 得分图 (A) 及 OPLS-DA 的 S-plot 图 (B)

Fig. 5 PCA score plot (A) and OPLS-DA S-plot (B) of samples processed in locality and pharmaceutical factory

4 讨论

本实验对粗茎秦艽药材不同初加工样品进行较为系统的化学成分比较分析, 显示芦头与根之间存在较大的差异; 切片与原个及不同干燥方法间也有明显区分, 表明药材的部位及加工方式对化学成分具有一定影响, 与前期 HPLC 分析方法评价基本结果一致^[10]。同时, 药厂加工样品均优于产地加工样品, 分析可能有以下因素: 首先是药材本身, 产地加工的样品不除去芦头, 而药厂加工的样品去除芦头; 其次为干燥方式, 产地烘干为传统的炭火烘烤, 药厂加工则使用烘箱烘干, 晒干方式上, 药厂有药材专用的晒干场地, 规范且统一。

UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱采用全扫描模式, 分别测定正、负离子模式下的总离子流图, 裂解方式采用了 CID 方式, 绝大部分的化合物在此方式下均能产生更多的碎片信息, 在保证预测化合物分子式的准确性前提下, 更全面地鉴定粗茎秦艽中的化学成分。本研究运用 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术, 对不同加工方法下粗茎秦艽药材中的化学成分进行表征分析, 基于化合物相关数据库、对照品指认和多级质谱碎片离子等信息, 并结合相关文献报道, 共鉴定出 44 个化合物, 包括环烯醚萜苷类、黄酮类、三萜类、糖类、有机酸类、苯丙素类、香豆素类和其他类化合物, 其中以环烯醚萜苷类、黄

酮类化合物居多。环烯醚萜苷类成分在负离子模式下倾向于丢失环烯醚萜母核、 H_2O 和发生逆 RDA 反应在环烯醚萜骨架; 黄酮类成分在负离子模式下倾向于通过 RDA 反应在 C 环上产生 m/z 151 的特征离子。同时, 粗茎秦艽药材化学成分中有较多的同分异构体, 如山柰酚和木犀草素, 在制备混合对照品溶液时, 同分异构体需分开配制。

对不同加工方法、不同干燥方式下粗茎秦艽药材中差异性标志物的分析表明, 共有差异性成分主要为环烯醚萜类和有机酸类, 提示加工方式对粗茎秦艽药材中这 2 大类成分的富集影响较大。不同初加工粗茎秦艽药材中化学成分的类型没有明显变化, 但是主要化学成分的含量发生了变化。根据差异性成分分析结果, 粗茎秦艽趁鲜切片样品的质量高于原个样品, 切片药材中龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷等药效成分的含量均普遍高于原个组。同时, 药材趁鲜切片也可极大缩短干燥时间^[6]。关于粗茎秦艽药材切片的方式、厚度等, 需要进一步探讨。“发汗”是中药的特色加工方法^[17], 可增加药材的香味或减少刺激性, 有利于干燥。本实验分析结果显示, 不同干燥方式中, 晒干组药材主要差异性成分的含量比“发汗”组高, 与大叶秦艽药材的研究结果一致^[18], 同时, “发汗”组药材中龙胆苦苷、马钱苷酸等指标性成分含量较高。考虑到

“发汗”干燥法耗时长,操作繁杂,粗茎秦艽药材是否需要“发汗”,可根据实际情况加以选择。

综上,粗茎秦艽药材初加工时,建议选用三年生药材,并去除芦头部位,以提升药材品质。在加工过程中,药效成分的含量受到多方面因素的影响,包括是否切片、干燥方法等。在实际应用中,根据粗茎秦艽药材特征、成分特点,建议趁鲜切片,可选用便捷的晒干方式。

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. 2020: 282.
- [2] 聂安政,林志健,王雨,等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 597-608.
- [3] 杜真辉,张岩荣,董诚明,等. 不同栽培模式下铁棍山药的质量评价 [J]. 中医学报, 2017, 32(9): 1694-1696.
- [4] 赵小勤,黄晓婧,罗霄,等. 不同部位和不同产地加工方法的知母质量评价研究 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6990-6997.
- [5] 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.
- [6] 刘勇,陈骏飞,徐娜,等. 趁鲜切制加工对三七药材干燥速率和质量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(7): 1381-1391.
- [7] 黄朝润,吴发明,姚秋阳,等. 产地加工过程中干燥温度对党参药材性状特征及内在质量的影响 [J]. 中药材, 2017, 40(10): 2325-2330.
- [8] 张润,陈千良,胡河荷. 干燥方法对秦艽药材中有效成分含量的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1348-1351.
- [9] 徐燕,李爱暖,王玥,等. 基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 评价不同干燥方式对粗茎秦艽中环烯醚萜类及黄酮类成分的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 819-825.
- [10] 季文静,张玉萱,赵志礼,等. 云南丽江产粗茎秦艽溯源及道地药材初加工方法评价 [J]. 药学报, 2022, 57(2): 507-513.
- [11] 王勇为. LTQ-Orbitrap Velos 双分压线性阱和静电场轨道阱组合式高分辨质谱性能及应用 [J]. 现代仪器, 2010, 16(5): 15-19.
- [12] Eliuk S, Makarov A. Evolution of orbitrap mass spectrometry instrumentation [J]. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 2015, 8: 61-80.
- [13] 肖治均,杨欣欣,梅矩铭,等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分析刺果番荔枝叶的化学成分 [J]. 环球中医药, 2020, 13(4): 583-591.
- [14] Tu J J, Li Q L, Zhou B H. The tannins from *Sanguisorba officinalis* L. (Rosaceae): A systematic study on the metabolites of rats based on HPLC-LTQ-orbitrap MS² analysis [J]. *Molecules*, 2021, 26(13): 4053.
- [15] Li D X, Liu D H, Shao D Y, *et al.* Wide identification of the compounds in licorice and exploration of the mechanism for prostatitis treatment by combining UHPLC-LTQ-orbitrap MS with network pharmacology [J]. *ChemistrySelect*, 2019, 4(11): 3011-3017.
- [16] 姚玲玲,柯昌强,刘佳,等. 不同炮制程度中药饮片蜜炙甘草的次生代谢化学成分组学研究 [J]. 药学报, 2021, 56(5): 1444-1452.
- [17] 段金彪,宿树兰,严辉,等. 药材初加工“发汗”过程及其酶促反应与化学转化机制探讨 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1219-1225.
- [18] Chen Q, Shi Z, Wang Y, *et al.* Study on effects of sweating treatment and different drying methods on the quality of *Gentianae Macrophyllae Radix* [J]. *Sci Reports*, 2021(11): 9717.

[责任编辑 时圣明]