

“发汗”对龙脑樟中右旋龙脑和其他成分变化的影响及其 GC-MS 指纹图谱相关性研究

邵长柳^{1,2}, 唐漫群², 刘炳楠², 钟文蔚^{2*}, 庞玉新^{1,3*}

1. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 广东药科大学中药资源学院, 广东 云浮 527300

3. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室云浮分中心, 广东 云浮 527300

摘要: 目的 建立龙脑樟 *Cinnamomum camphora* chvar. *borneol* “发汗”处理 GC-MS 指纹图谱与“发汗”前后龙脑樟粗提取物中主成分含量测定方法, 优选得到最佳“发汗”工艺; 结合 GC-MS 代谢组学探究“发汗”前后龙脑樟的成分差异, 为其进一步研究提供依据。方法 采用直接堆积的方法对新鲜龙脑樟枝叶进行“发汗”处理; 基于 GC-MS 建立“发汗”前后龙脑樟中 *d*-龙脑的含量测定方法; 运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)结合 NIST17.L 标准质谱库构建“发汗”前后龙脑樟指纹图谱并进行相似度和共有峰定性分析; 通过 SPSS 19.0 软件、Origin 2021 软件及 SIMCA 14.1 等软件对“发汗”前后龙脑樟成分进行多元数据分析。结果 “发汗”4 d, 15 °C, RH 60% (S5 组)为最佳工艺, 该条件下的 *d*-龙脑含量显著高于“未发汗”S10 组含量; “发汗”组与“未发汗”组、不同“发汗”组之间, 化合物的种类和含量均有不同程度差异; 构建的指纹图谱共标定 9 个共有峰, 分别是 α -蒎烯、蒎烯、 α -水芹烯、桉叶油素、樟脑、*d*-龙脑、 β -石竹烯、 α -葑草烯、丁香烯, 10 批样品相似度均 ≥ 0.982 ; 龙脑樟“发汗”前后差异代谢物共计 10 种, *d*-龙脑和樟脑上调, α -thujene、 γ -松油烯、4-异丙基甲苯、4-萜烯醇下调。结论 “发汗”可以提高 *d*-龙脑含量, 一定程度缓和天然冰片产量低的问题, 缓解其资源短缺现状, 为解决天然冰片产业化难题提供了一个新思路; 建立的 GC-MS 指纹图谱和 *d*-龙脑含量测定方法便捷可行、重复性好, 且仪器精密度高。

关键词: 龙脑樟; 发汗; GC-MS; 指纹图谱; 天然冰片; 正交偏最小二乘-判别分析; 聚类分析; 主成分分析; *d*-龙脑; 樟脑; α -thujene; γ -松油烯; 4-异丙基甲苯; 4-萜烯醇

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)17-5580-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.17.012

Effects of “sweating” in *Cinnamomum camphora* chvar. *borneol* on *d*-borneol and change in composition and its correlation with GC-MS fingerprint

SHAO Chang-liu^{1,2}, TANG Man-qun², LIU Bing-nan², ZHONG Wen-wei², PANG Yu-xin^{1,3}

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. School of Chinese Materia Medicinal Resource, Guangdong Pharmaceutical University, Yunfu 527300, China

3. Yunfu Sub-center of Lingnan Modern Agricultural Science and Technology Laboratory of Guangdong Province, Yunfu 527300, China

Abstract: Objective To establish a GC-MS fingerprint of “sweating” treatment and determination method of main components in Longnaozhang (*Cinnamomum camphora* chvar. *borneol*) before and after the “sweating” treatment. To optimize the best “weating” conditions and evaluate quality of *C. camphora* chvar. *borneol* before and after “sweating” treatment with GC-MS metabolomics, which provides the basis for further research. **Methods** The method of “sweating” was applied to the leaves and branches of the fresh *C. camphora* chvar. *borneol* by direct stacking. A method for the content determination of *d*-borneol in *C. camphora* chvar. *borneol* before and after “sweating” was established based on GC-MS. *Chinese Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation*

收稿日期: 2023-03-02

基金项目: 广东省科研机构重点领域研发计划(省级实验室分中心)(2021B0707010008)

作者简介: 邵长柳(1998—), 男, 硕士, 专业方向为中药资源开发与品质评价。E-mail: shaochangliu178@163.com

*通信作者: 钟文蔚, 女, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为基于膜过程的中药绿色制造。E-mail: wenwei.rachel.zhong@hotmail.com

庞玉新, 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药民族药研究与开发。E-mail: pyxmarx@126.com

System (2012 edition) and NIST17.L standard mass spectrometer library were used to construct “sweating” fingerprint and conduct qualitative analysis of similarity of common peak. Multivariate data analysis was performed on the components of *C. camphora* chvar. *borneol* before and after “sweating” by SPSS 19.0 software, Origin 2021 and SIMCA 14.1 software. **Results** The “sweating” 4 d, 15 °C, RH 60% (S5 group) was confirmed as the optimal condition. The content of *d*-borneol was significantly higher than that in “non-sweating” S10 group. The types and contents of compounds were different between “sweating” and “non-sweating” groups, and between different “sweating” groups. A total of 9 common peaks were identified, namely α -pinene, camphene, α -phellandrene, eucalyptol, camphor, *d*-borneol, β -caryophyllene, α -humulene, γ -himachalene. The similarity of 10 batches of samples was greater than 0.982. Altogether 10 metabolites differed before and after “sweating”, with up-regulated *d*-borneol and camphor, down-regulated terpinen-4-ol and other compounds. **Conclusion** “Sweating” can increase the content of *d*-borneol, which can solve the problem that has low production of *Borneolum* to alleviate the current shortage of resources. The established GC-MS fingerprint and method of determining content of *d*-borneol are convenient and feasible, with good reproducibility, and high precision of the instrument.

Key words: *Cinnamomum camphora* chvar. *borneol*; sweating; GC-MS; fingerprint; *Borneolum*; orthogonal partial least squares-discrimination analysis; cluster analysis; principal analysis; *d*-borneol; camphor; α -thujene; γ -terpinene; 4-isopropyltoluene; terpinen-4-ol

龙脑樟 *Cinnamomum camphora* chvar. *borneol* 是提取天然冰片 (*d*-龙脑) 的主要原料之一, 具有开窍醒神、清热止痛之功效, 主治热病神昏、目赤、口疮、咽喉肿痛、耳道流脓等病症^[1-2]。新鲜龙脑樟枝叶经水蒸气提取得到粗提物, 再经精制得到天然冰片。天然冰片广泛应用于多个领域, 然而, 我国天然冰片资源缺乏, 还需进口, 通过一种低成本方法提高天然冰片产量尤为必要^[3-4]。

“发汗”作为一种中药材产地初加工的传统炮制方法, 是将净制后的新鲜药材或经加热处理的药材堆积闷汗, 使药材所含水分挥至表面。这种民间长期生产生活总结出来的传统炮制方式, 早在《千金翼方》^[5]便有论述: “夫药所取, 不依阴干、爆干, 虽有药名, 终无药实。”后经过近代应用与发展, 常被用于茯苓、川续断、白术、地黄等非挥发性中药材及广藿香等挥发性中药材的加工处理。

中药材在“发汗”过程中其化学成分会发生一定程度改变, 可通过影响前体化合物使中药材中的无效成分和有效成分相互转化。如王婷等^[6]对“发汗”与“未发汗”丹参中 10 种活性成分进行含量测定, 结果表明其主要活性成分有不同程度的提高; Cao 等^[7]基于 UPLC/MS 非靶向代谢组学进一步研究丹参在“发汗”处理过程中的代谢物变化, 表明丹参“发汗”处理后主要活性成分的综合评分更高。相似的研究有基于多种分析方法, 对广藿香、玄参、杜仲、天麻“发汗”前后的主要活性成分含量进行检测, 结果均表明各中药材主要活性物质有不同程度的升高^[8-11]。“发汗”可以改变某些中药材的活性成分, 但主要机制尚未明确。有相关研究表明, “发汗”可引起部分中药材中多种氧化还原酶、水解酶、

酪氨酸酶等酶活性, 进而引起中药材性状变化^[12-13]; 也有研究表明部分中药材在“发汗”过程中, 微生物菌群处于动态变化的状态, 优势菌群通过代谢产生新化合物或前体化合物转化为新化合物, 从而使药材中化学成分发生改变^[14-15]。

目前, 极少有关于龙脑樟“发汗”的研究, 本研究通过堆积“发汗”, 利用指纹图谱并结合多元数据分析, 探究“发汗”前后龙脑樟各成分变化以及初步探讨“发汗”对龙脑樟成分变化的机制; 通过 GC-MS 指纹图谱技术确定了“发汗”处理能显著提高龙脑樟中冰片含量, 为天然冰片大规模产业化生产产量高低的难题提供了一个新思路。

1 仪器和材料

1.1 仪器

Agilent 8890-5977B 型气相色谱质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; 色谱柱 Agilent J&W HP-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μ m); SB-5200DT 型超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TC-15 型套式电热恒温器, 新华医疗器械厂; GR-200 型分析天平, 日本 A&D 有限公司; LRH-250-S 型恒温恒湿培养箱, 广东泰宏君科学仪器股份有限公司。

1.2 试剂

d-龙脑对照品, 批号 CN211003, 质量分数 \geq 98, 购买于广州安捷汇贸易有限公司; 醋酸乙酯, 批号 2022020114, 色谱纯, 购买于上海穗试公司; 无水硫酸钠, 批号 2022010108, 分析纯, 购买于上海穗试公司; 0.22 μ m 微孔滤膜, 批号 1840623, 天津腾腾实验设备有限公司。

1.3 样品

龙脑樟新鲜样品采自湖南省怀化市新晃侗族自治县

治县 (N27°23'15", E109°18'60") 波洲镇龙脑樟基地, 经贵州中医药大学庞玉新研究员鉴定, 为樟科樟属植物龙脑樟 *C. camphora* chvar. *borneol* 的新鲜枝叶。

2 方法与结果

2.1 粗提物的制备

天然冰片粗提物为龙脑樟经水蒸气蒸馏后, 得到的油固混合物, 这部分天然冰片粗品可经进一步的精制得到天然冰片。新鲜龙脑樟枝叶按照不同温度、不同湿度、不同堆放时间进行直接堆积“发汗”, 每批 1 kg。依据当地采收月份的气候条件, 设计 $L_9(3^4)$ 正交试验, 因素水平及设计方案见表 1。

表 1 龙脑樟“发汗” $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平、实验设计与结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Orthogonal experiment factor levels, experimental design and results for “sweating” of *C. camphora* chvar. *borneol* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

编号	温度/℃	湿度/%	时间/d	空白	<i>d</i> -龙脑/%
S1	10 (1)	40 (1)	2 (1)	(1)	0.586±0.025
S2	10 (1)	60 (2)	4 (2)	(2)	0.675±0.040
S3	10 (1)	80 (3)	6 (3)	(3)	0.721±0.061*#
S4	15 (2)	40 (1)	4 (2)	(3)	0.646±0.030
S5	15 (2)	60 (2)	6 (3)	(1)	0.758±0.048*##
S6	15 (2)	80 (3)	2 (1)	(2)	0.654±0.046
S7	20 (3)	40 (1)	6 (3)	(2)	0.679±0.027
S8	20 (3)	60 (2)	2 (1)	(3)	0.654±0.041
S9	20 (3)	80 (3)	4 (2)	(1)	0.675±0.026
S10	-	-	-	-	0.604±0.025

S1~S9 为“发汗”组, S10 为“未发汗”组; 与空白对照组比较:

* $P < 0.05$; 与 S1 比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

S1—S9 are the “sweating” group, S10 is “non-sweating” group; * $P < 0.05$ vs blank control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs S1

将“发汗”后的龙脑樟枝叶清洗后阴干, 剪碎, 精密称取 40.00 g 龙脑樟叶, 放入 1000 mL 圆底烧瓶中, 水蒸气蒸馏法加热回流 2 h, 收集得到龙脑樟粗提物。将粗提物用无水 Na_2SO_4 干燥后密封, 4 °C 保存备用。

2.2 供试品溶液的配制

不同批次的样本经“2.1”项下提取方法可得到粗提物, 其由少量挥发油、大量天然冰片固体组成。将粗提物用醋酸乙酯溶解, 无水 Na_2SO_4 除水后, 置于 25 mg/mL 量瓶中定容。取 1 mL 溶液, 醋酸乙酯稀释 20 倍, 过 0.22 μm 滤膜, 即得。放入冰箱中 4 °C 保存备用。

2.3 对照品溶液的配制

精密称取 20.00 mg *d*-龙脑对照品置于 10 mL 量瓶中, 加入醋酸乙酯定容至刻度, 配成质量浓度为 2.00 mg/mL 的对照品母液。加入醋酸乙酯将母液依次稀释成 2.000、1.000、0.500、0.250、0.125、0.063、0.031 mg/mL 质量浓度梯度的 *d*-龙脑对照品溶液。

2.4 *d*-龙脑含量的测定

2.4.1 GC-MS 条件

(1) GC 条件: 色谱柱为 Agilent J&W HP-5MS (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 载气为高纯度氦气, 色谱柱流量 1 mL/min, 进样量 1 μL ; 进样口温度 250 °C, 分流比 20:1; 柱箱起始温度 60 °C, 保持 1 min, 按照 10 °C/min 升至 250 °C, 保持 6 min。对照品溶液与 S5 供试品溶液的总离子流图见图 1。

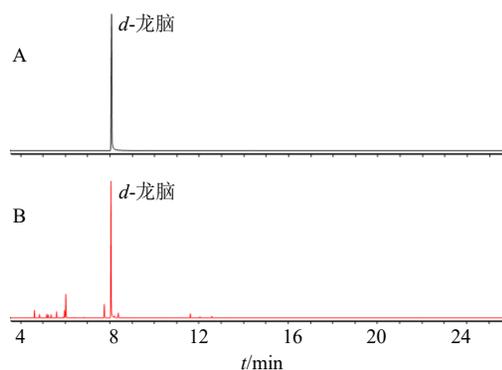


图 1 *d*-龙脑对照品 (A) 和 S5 供试品 (B) 的 GC 图

Fig. 1 GC diagram of *d*-borneol control (A) and S5 test product solution (B)

(2) 质谱条件: 进样口温度 250 °C, 离子源温度 230 °C; 溶剂延迟 3.5 min, 质谱扫描范围 m/z 40~400, 电子能量 70 eV。

2.4.2 线性关系考察 分别精密吸取“2.3”项下各梯度质量浓度溶液, 按照“2.4.1”项下方法进样测定, 进样量为 1 μL 。以 *d*-龙脑质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制 *d*-龙脑的标准曲线, 进行线性回归, 得到回归方程为 $Y = 1.4 \times 10^6 X - 8.8 \times 10^4$, $R^2 = 0.9992$, 表明 *d*-龙脑在 0.031~2.000 mg/mL 线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 精密吸取“2.3”项下对照品母液 1 μL , 按照“2.4.1”项下方法连续进样 6 次, 测定 *d*-龙脑峰面积, 计算其 RSD 值, 测得 *d*-龙脑峰面积的 RSD 为 1.53%, 表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验 取“2.2”项下制备的 S5 粗提物供试品溶液, 分别于 2、4、6、8、10、12 h 按照“2.4.1”项方法进样 1 μL , 测定 *d*-龙脑峰面积, 测

得 *d*-龙脑峰面积的 RSD 为 2.07%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4.5 重复性试验 取 S5 粗提物 6 份，按照“2.2”项下方法分别配制成 6 份供试品溶液。按照“2.4.1”项下方法进样 1 μ L，测定 *d*-龙脑含量，计算得 *d*-龙脑质量分数的 RSD 为 0.40%，且目标峰分离度大于 1.5，表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 平行取 S5 中已知含量的龙脑樟样品，共 9 份，每份约 40 g。分别按照 80%、100%、120%精密加入 *d*-龙脑对照品，混合样品经“2.1”项下方法水蒸气回馏提取得到粗提物，按照“2.2”项下方法分别配制成供试品溶液。依照“2.4.1”项下方法进样 1 μ L，计算 *d*-龙脑平均加样回收率为 100.37%，RSD 为 2.19%，表明该方法回收率良好。

2.4.7 含量测定与统计学分析 取“发汗”后的 9 批（S1~S9）龙脑樟和“未发汗”（S10）龙脑樟样本，按照“2.1”项下方法提取粗提物，再按照“2.2”项下方法配制供试品溶液后，根据“2.4.1”项下方法测定 10 批样本（ $n=3$ ），计算 *d*-龙脑平均含量，结果见表 1。使用 SPSS 19.0 软件对“发汗”与“未发汗”处理组数据进行单因素方差分析（ANOVA），结果表明，S1 组与“未发汗”组 *d*-龙脑含量相近。除 S1 组外，“发汗”龙脑樟中 *d*-龙脑含量较“未发汗”均有不同程度增加。与“未发汗”组相比，“发汗”组中 S3 和 S5 中 *d*-龙脑含量差异性显著，其中 S5 组可提高 *d*-龙脑含量 27.08%。结合表 1 中 *d*-龙脑含量，4 d，15 $^{\circ}$ C，RH 60%（S5）为最佳“发汗”条件。

2.4.8 “发汗”工艺验证 平行称取龙脑樟 3 份，每份 1 kg。3 批样本在 15 $^{\circ}$ C、RH 60%的条件下“发汗”6 d。每批样本取 40 g，水蒸气回流提取粗提物。按照“2.2”项下方法配制供试品溶液，“2.4.1”项下方法进样测定，测得 3 批样本 *d*-龙脑平均质量浓度为 0.673 mg/mL，RSD 为 1.43%。表明优选出的“发汗”工艺重复性较高且稳定可行。

2.5 “发汗”龙脑樟 GC 指纹图谱研究

2.5.1 精密度试验 取 S2 供试品溶液，按照“2.4.1”项下方法连续进样 6 次，测定共有峰峰面积，计算 RSD 值。计算各共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.17%，峰面积 RSD 值均小于 2.77%，表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取 S2 供试品溶液，按照“2.4.1”项下方法分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12 h 进样，测定共有峰峰面积，计算其 RSD 值。各共有峰

相对保留时间 RSD 值均小于 0.02%，峰面积 RSD 值均小于 2.25%，表明该方法稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 取 S2 粗提物，按照“2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份，分别进样测定共有峰峰面积，计算其 RSD 值。各共有峰相对保留时间 RSD 值均小于 0.19%，峰面积 RSD 值均小于 2.83%，表明该方法重复性良好。

2.5.4 指纹图谱构建与共有峰识别 分别按照“2.1”项下方法提取 S1~S9“发汗”前后 10 批龙脑樟样本，根据“2.2”项下方法配制供试品溶液后进样分析，得到色谱图。运用中药色谱指纹图谱相似度评价系统（2012 年版）建立 GC-MS 指纹图谱。以 S1 为参照图谱，得到对照图谱（R，共有模式图）。10 批“发汗”前后龙脑樟 GC-MS 叠加图谱及对照图谱，见图 2-A、B。通过 NIST17.L 标准质谱库，以

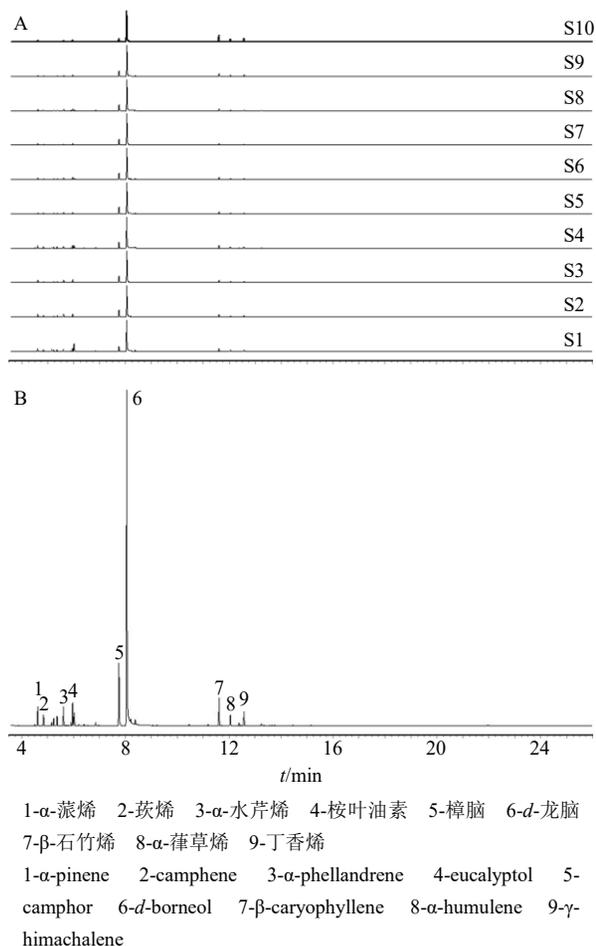


图 2 “发汗”与“未发汗”龙脑樟 GC-MS 叠加图谱 (A) 及“发汗”龙脑樟 GC-MS 对照图谱 (B)

Fig. 2 GC-MS superimposed spectrum of “sweating” *C. camphora* chvar. *borneol* (A) and GC-MS control spectrum of “sweating” and “non-sweating” *C. camphora* chvar. *borneol* (B)

化合物相似度 $\geq 75\%$ 作为判断依据,结合对照品及相关文献报道^[16-19],对“发汗”龙脑樟的共有峰进行定性分析。共鉴定出9个化合物,分别为 α -蒎烯、蒎烯、 α -水芹烯、桉叶油素、樟脑、*d*-龙脑、 β -石竹烯、 α -葑草烯、丁香烯。除此之外,还鉴定出芳樟醇、月桂烯、 β -蒎烯、柠檬烯、 α -松油醇等非共有化合物。通过面积归一化法计算上述共有化合物的相对含量。结果见表2。

2.5.5 相似度分析 使用中药色谱指纹图谱相似度评价系统对“发汗”前后龙脑樟中10批样本图谱和

共有模式图谱(R)进行比对,采用中位数法计算相似度,相似度详见表3。结果显示,建立的“发汗”龙脑樟指纹图谱相似度均大于0.982,表明10批处理组主要成分相近,且S1~S9“发汗”工艺稳定,符合指纹图谱要求。结合图3分析,S6和S8含有 β -长叶蒎烯,其他组无;S1、S4含有桉烯,其他组无;S1~S3含有异松油烯,其他组无;只有S2、S3及S5不含有 α -松油醇,且只有S9不含有月桂烯。这些差异表明“发汗”工艺整体虽稳定,但存在成分差异。

表2 共有峰化合物及相对含量

Table 2 Compounds and relative contents of common peak

峰号	<i>t</i> /min	化合物	分子式	相对含量/%								
				S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
1	4.60	α -蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	3.73	4.02	3.29	3.94	1.76	2.65	2.69	1.95	1.42
2	4.84	蒎烯	C ₁₀ H ₁₆	1.92	2.56	2.19	2.02	1.23	1.62	1.71	1.30	1.05
3	5.60	α -水芹烯	C ₁₀ H ₁₆	3.03	4.00	3.86	3.06	1.97	2.94	2.32	2.34	1.60
4	6.02	桉叶油素	C ₁₀ H ₁₈ O	11.03	4.82	4.78	3.88	2.61	3.55	2.93	2.87	2.12
5	7.75	樟脑	C ₁₀ H ₁₆ O	7.77	12.13	11.87	10.95	14.00	12.18	11.61	12.43	12.00
6	8.06	<i>d</i> -龙脑	C ₁₀ H ₁₈ O	52.09	58.13	60.43	57.65	68.36	62.32	68.16	67.68	69.80
7	11.61	β -石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	3.48	3.49	3.63	3.74	3.55	3.86	2.91	3.13	5.63
8	12.04	α -葑草烯	C ₁₅ H ₂₄	1.60	1.55	1.61	1.59	1.42	1.57	1.19	1.29	2.21
9	12.57	丁香烯	C ₁₅ H ₂₄	2.17	2.37	2.34	2.06	2.16	2.17	1.45	1.73	3.04

表3 S1~S10组 GC-MS 指纹图谱相似度

Table 3 Similarity of GC-MS fingerprints of S1—S10 groups

编号	相似度										
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.982	0.997	0.999	0.982	0.998	0.998	0.997	0.997	0.989	0.999
S2	0.982	1.000	1.000	0.998	0.998	0.998	0.997	0.997	0.982	0.982	0.998
S3	0.997	1.000	1.000	0.998	0.998	0.999	0.998	0.998	0.998	0.984	0.999
S4	0.999	0.998	0.998	1.000	0.998	1.000	0.999	0.998	0.997	0.986	0.999
S5	0.982	0.998	0.998	0.998	1.000	0.999	0.999	1.000	0.999	0.983	0.999
S6	0.998	0.998	0.999	1.000	0.999	1.000	0.999	0.999	0.999	0.986	1.000
S7	0.998	0.997	0.998	0.999	0.999	0.999	1.000	1.000	0.999	0.983	0.999
S8	0.997	0.997	0.998	0.998	1.000	0.999	1.000	1.000	0.999	0.983	0.999
S9	0.997	0.982	0.998	0.997	0.999	0.999	0.999	0.999	1.000	0.989	0.999
S10	0.989	0.982	0.984	0.986	0.983	0.986	0.983	0.983	0.989	1.000	0.988
R	0.999	0.998	0.999	0.999	0.999	1.000	0.999	0.999	0.999	0.988	1.000

2.6 多元数据分析

2.6.1 层次聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 将“发汗”和“未发汗”龙脑樟共有峰峰面积导入 SPSS 19.0 软件中,采用组间联接法和平

方欧式距法进行 HCA 系统聚类分析,结果见图3。当平方欧式距为4时,HCA 聚类分析将“发汗”龙脑樟分为5类,S2、S3为一类,S6、S4、S7、S8、S9为一类,S1、S10、S5各为一类。

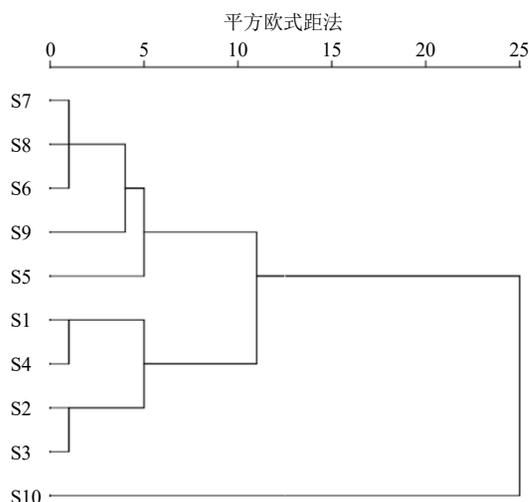


图3 10批样本聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis of 10 batches of samples

2.6.2 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 将“未发汗”组 S10、“发汗”组 S1~S9 中 9 个共有峰峰面积导入到 SPSS 19.0 软件中进行变量标准化处理。以成分特征值 > 1 为条件进行 PCA, 提取得到 3 个主成分因子, 方差贡献率分别为 44.53%、41.35%、12.18%, 累积方差贡献率为 98.06%, 如表 4 所示。图 4 碎石图显示, 特征值 > 1 的主成分因子有 3 个, 且第 3 个成分因子后有明显拐点, 表明上述 3 个主成分因子可以涵盖 S1~S10 样本异同。以 3 个主成分因子为坐标轴, 绘制因子载荷图 (图 5)。因子载荷分析表明, 峰 1 (α -

表 4 特征值及方差贡献率

Table 4 Eigenvalues and variance contribution rate

主成分	初始特征值			提取平方和载入		
	合计	方差/%	累积方差/%	合计	方差/%	累积方差/%
1	4.008	44.530	44.530	4.008	44.530	44.530
2	3.722	41.350	85.880	3.722	41.350	85.880
3	1.096	12.180	98.060	1.096	12.180	98.060

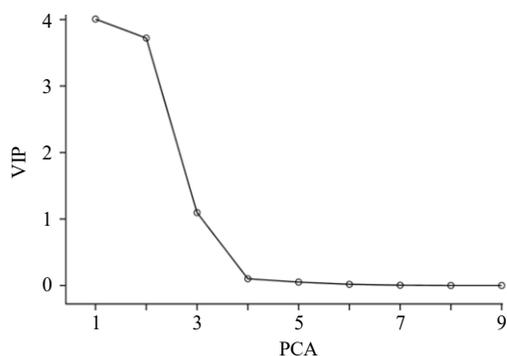


图4 主成分因子碎石图

Fig. 4 Scree plot of principal component factor

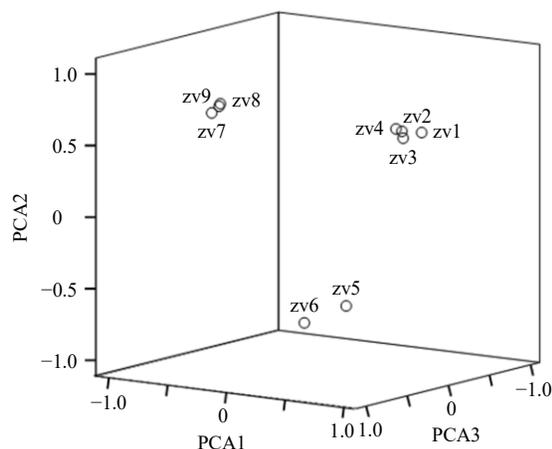


图5 主成分因子载荷图

Fig. 5 Loading plot of principal component factor

蒎烯)、2 (苈烯)、3 (α -水芹烯)、4 (桉叶油素) 对第 1 主成分的贡献率最大, 可以反映第 1 主成分信息; 峰 7 (β -石竹烯)、8 (α -葎草烯)、9 (丁香烯) 对第 2 主成分贡献率最大, 可以反映第 2 主成分信息; 峰 5 (樟脑)、6 (*d*-龙脑) 对第 3 主成分贡献率最大, 可以反映第 3 主成分信息。

根据“2.6.2”项下提取的 3 个主成分方差贡献率、特征值及每个因素权重值分别计算“发汗”前后 S1~S10 的主成分得分和综合得分, 得到线性模型, 主成分因子得分见图 6。其中, $y_1 \sim y_3$ 、 y 为各主成分因子与综合得分线性模型, $zv_1 \sim zv_9$ 为峰 1~9 峰面积的标准值。由主成分因子得分图可知, “未发汗”组与各“发汗”组存在一定差异。此外, 10 批“发汗”前后样本被分成 5 类, 其中 S4、S6~S9 为一类, S2、S3 为一类, S1、S5、S10 各为一类, 结果与“2.6.1”项下聚类分析一致。

$$y_1 = 0.375 zv_1 + 0.378 zv_2 + 0.392 zv_3 + 0.367 zv_4 + 0.313$$

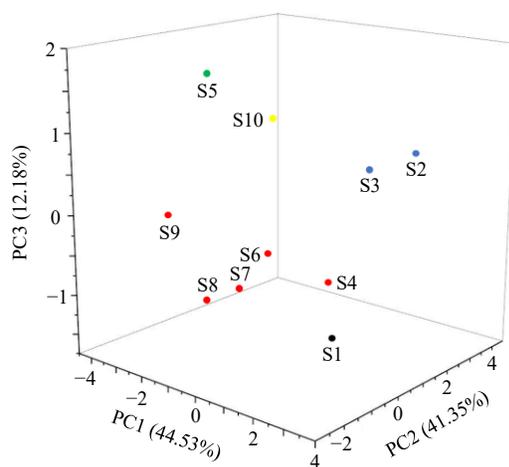


图6 PCA得分图

Fig. 6 Score of PCA

$$zV_5 + 0.170 zV_6 - 0.345 zV_7 - 0.315 zV_8 - 0.288 zV_9$$

$$y_2 = 0.307 zV_1 + 0.330 zV_2 + 0.309 zV_3 + 0.341 zV_4 - 0.272$$

$$zV_5 - 0.341 zV_6 + 0.339 zV_7 + 0.374 zV_8 + 0.375 zV_9$$

$$y_3 = -0.181 zV_1 + 0.056 zV_2 + 0.079 zV_3 + 0.096 zV_4 + 0.525$$

$$zV_5 + 0.620 zV_6 + 0.288 zV_7 + 0.272 zV_8 + 0.361 zV_9$$

$$y = 0.445 3 y_1 + 0.413 5 y_2 + 0.121 8 y_3$$

2.7 堆积“发汗”GC-MS代谢组学分析

2.7.1 样品处理与数据预处理 实验样本同“1.3”项。本实验基于S5中最佳“发汗”条件，探究最优“发汗”组与“未发汗”组代谢物差异。为提高数据可靠性，“发汗”处理组分别在3、6、9 d平行取样3次，分别编号为ZJT-1、ZJT-2、ZJT-3、ZJS-1、ZJS-2、ZJS-3、ZJN-1、ZJN-2、ZJN-3。未发汗组取样编号依次对应为XY-1、XY-2、XY-3。粗提物样品提取同“2.1”项，供试品溶液配置同“2.2”项。按“2.4.1”项GC-MS方法进样后，将原始数据进行峰提取、对齐、积分等操作，处理后的峰面积值导入IBM SPSS Statistics 19.0软件中进行数据标准化处理。

2.7.2 “发汗”与“未发汗”组PCA与HCA 龙脑樟堆积“发汗”与“未发汗”代谢物数据通过SIMCA 14.1软件进行PCA，分析得到2个主成分因子 ($R_X^2=0.998$, $Q^2=0.982$)，2个模型参数均大于0.5，表明PCA结果稳定可靠，各组样品聚集良好，所得差异物能反映龙脑樟堆积“发汗”与“未发汗”组的生物学差异。PCA可将龙脑樟“发汗”与“未发汗”样本分为3类，如图7所示，ZJT-1、ZJT-2、ZJT-3、ZJS-1、ZJS-2、ZJS-3聚为一类，XY-1、XY-2、XY-3聚为一类，ZJN-1、ZJN-2、ZJN-3聚为一类。由此可见，“未发汗”组与堆积“发汗”组的代谢产物有差异。在堆积“发汗”组内，3、6、9 d的代谢产物各组均存在差异。将标准化处理后的“发汗”各组数据导入TBtools软件中，结合NIST17.

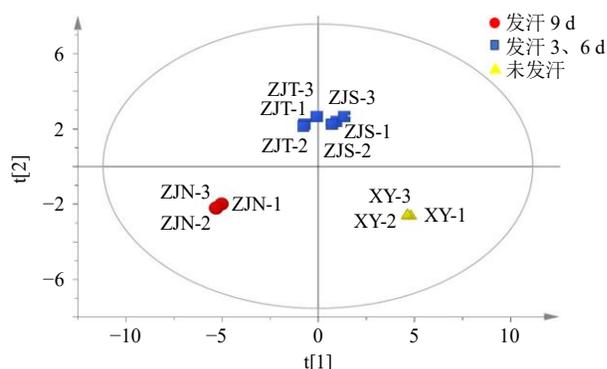


图7 “发汗”前后PCA

Fig. 7 PCA before and after “sweating”

L标准质谱库检索各“发汗”组化合物绘制热图，结果见图8。依据不同“发汗”处理组代谢物差异，可将“发汗”与“未发汗”组分为3类，3类样本可以明显被区分，且各组区分效果良好。聚类热图显示的结果与PCA中的结果相符合。

2.7.3 “发汗”与“未发汗”组正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 将龙脑樟堆积“发汗”与“未发汗”代谢物数据导入SIMCA 14.1软件进行OPLS-DA。OPLS-DA得分图见图9，各组数据被分为3组，其组间差异性良好，可以实现龙脑樟堆积“发汗”与“未发汗”样本间的有效区分。本次拟合的模型中， $R_X^2=0.875$, $R_Y^2=0.989$, $Q^2=0.984$ ，3者均大于0.5表明拟合效果较好。经过200次随机置换检验， $Q^2=-0.669$ ，小于0，且最右边 Q^2 大于最左边 Q^2 表明模型不存在过拟合，可用于龙脑樟堆积“发汗”与“未发汗”代谢物差异性分析。OPLS-DA将“未发汗”分为一类，堆积“发汗”3 d分为一类，6 d和9 d分为一类，与上述PCA结果一致。

2.7.4 发汗与未发汗组单变量统计分析 OPLS-DA分析结果中堆积“发汗”组与“未发汗”组的分离效果显著。在此基础上，根据变量投影重要性指标 (variable importance in projection, VIP值) 与P值筛选差异化合物 ($VIP>1$, $P<0.05$)，结果见表5。将2组峰面积数据导入MetaboAnalyst网站中 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 进行单因素统计分析，峰面积归一化法计算P值，结合OPLS-DA所得VIP值筛选差异出10个化合物，通过NIST17.L标准质谱库检索分别为 α -thujene、 γ -松油烯、桉烯、4-异丙基甲苯、萜品油烯、反式-橙花叔醇、右旋樟脑、*d*-龙脑、4-萜烯醇及(*E*)- γ -atlantone。

2.7.5 差异代谢物KEGG分析 本研究中，龙脑樟“发汗”前后差异代谢物共计10种，将这部分化合物进行KEGG通路富集分析。筛选得到的“发汗”差异代谢物中，*d*-龙脑、 α -thujene、 γ -松油烯、4-异丙基甲苯、4-萜烯醇及樟脑被注释到萜类骨架生物合成和单萜生物合成通路中。其中，*d*-龙脑和樟脑上调， α -thujene、 γ -松油烯、4-异丙基甲苯、4-萜烯醇下调。

3 讨论

天然冰片具有抗菌消炎、抗氧化等作用，被广泛应用于医药、日化用品等领域。然而，国家药品监督管理局、欧美地区相关部门已经明确禁止人工

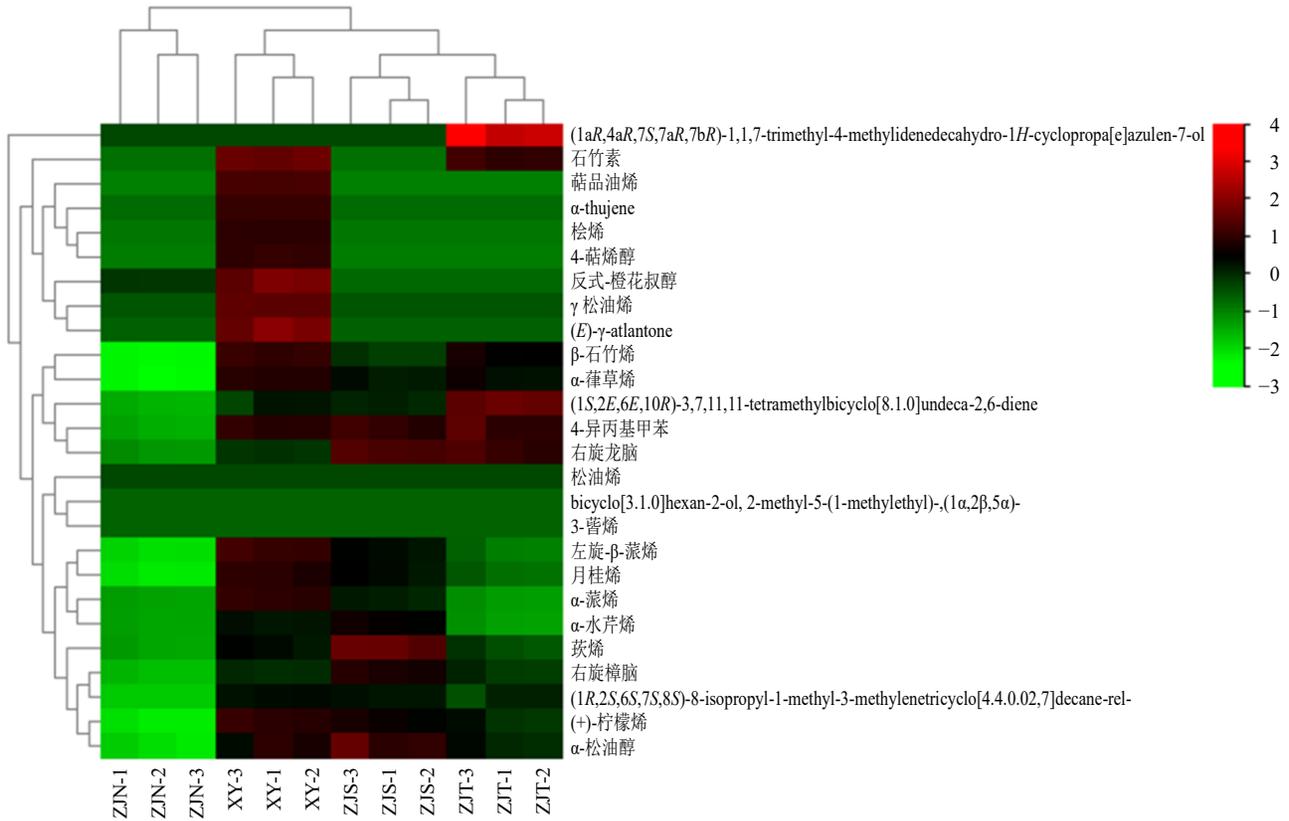


图8 “发汗”前后聚类分析

Fig. 8 Cluster analysis before and after “sweating”

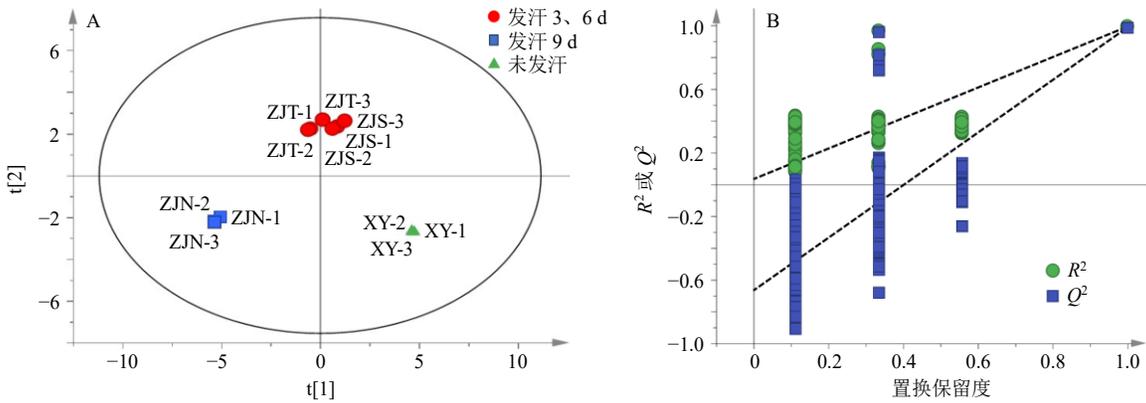


图9 “发汗”前后 OPLS-DA 得分 (A)、置换检验得分 (B)

Fig. 9 OPLS-DA score (A) and permutation test score (B) before and after “sweating”

表5 “发汗”与“未发汗”组差异代谢物

Table 5 Differential metabolites of “sweating” and “non-sweating” group

化合物	P 值	主成分特征值	化合物	P 值	主成分特征值	化合物	P 值	主成分特征值
α -thujene	0	1.095	蒎品油烯	0	1.095	反式-橙花叔醇	0	1.158
桉烯	0	1.095	右旋樟脑	0.004	1.054	(E)- γ -atlantone	0	1.092
4-异丙基甲苯	0	1.056	右旋龙脑	0	1.054			
γ -松油烯	0	1.095	4-萜烯醇	0	1.095			

合成冰片在医药、食品等相关产品的添加，使得天然冰片的使用需求将会大大增加，市场前景也极为

可观。因此，通过某种方法提高龙脑樟中天然冰片产量尤为重要。

本实验以 *d*-龙脑含量为指标, 对比研究“发汗”是否可用于龙脑樟原材料前处理。通过对分流比、升温程序、色谱柱流量等条件优化, 得到“2.4.1”项下 GC-MS 条件, 并应用于 *d*-龙脑含量测定和指纹图谱构建中。结果表明, “发汗”组 S5 组的 *d*-龙脑含量显著增加。除 S1 外, “发汗”组较“未发汗”组 *d*-龙脑含量整体升高。结合多元数据分析的结果, 表明在相关参数范围内, 本实验所涉及的“堆积发汗”工艺稳定可行, 但不同“发汗”组别的共有成分有一定差异。从实验结果看, S1~S10 只是成分上发生改变, 未产生新化合物。GC-MS 代谢组学进一步探究龙脑樟“发汗”前后挥发性化合物的变化规律。

上述结果产生的原因主要集中在 2 方面, 分别为生物酶活性、微生物菌群变化。从前者角度看, 龙脑樟在“发汗”过程中, “发汗”组 S5 较“未发汗”组 S10 枝叶颜色更深, 各组成分也存在差异。结合文献报道和本实验中不同活性成分的多元数据分析, 笔者认为本研究中“发汗”龙脑樟颜色、成分变化和多酚氧化酶、过氧化物酶多种酶的生物活性有关^[12]。需要注意的是, S5 较 S10 中 *d*-龙脑含量显著增加。造成其含量增加的原因可能是“发汗”提高了单萜相关基因的表达上调。天然冰片的合成和 3 个单萜合酶基因 PS14-like1、TPS14-like2 及 TPS14-like3 有关^[20], 上述 3 个基因表达上调使天然冰片的含量增加。龙脑樟中焦磷酸合成酶 (bornyl pyrophosphate synthetase, BPPS) 将单萜前体牻牛儿基焦磷酸 (geranylpyrophosphate, GPP) 转化为焦磷酸冰片 (bornyl pyrophosphate, BPP), 随后水解得到天然冰片^[21]。甲羟戊酸 (mevalonate acid, MVA) 途径中的 AACT-like 基因和 2-*C*-甲基-*D*-赤藓糖醇-4-磷酸 (2-*C*-methyl-*D*-erythritol 4-phosphate, MEP) 途径中的 DXS-like 基因可调控萜类化合物前体物质的产生^[22-24]。推测上述 2 个基因的差异性表达可以解释 S1~S10 中芳樟醇、月桂烯、 α -水芹烯、 α -蒎烯等其他单萜类成分的含量变化。

本实验中, 龙脑樟粗提取物大多为单萜类化合物, 这类化合物大多由 MVA 和 MEP 途径合成^[25]。前者发生于细胞质中, 后者发生于质体中, 2 种途径分别在异戊烯基磷酸激酶、二磷酸丙戊酸脱羧酶及 4-羟基-3-甲基丁-2-烯-1-基二磷酸还原酶等酶的作用下生成异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 及二甲基丙烯焦磷酸 (dimethylallyl

pyrophosphate, DMAPP), 2 种萜类化合物前体物质经二甲基烯丙基转移酶合成 GPP, 最后经相关的酶合成转换成 *d*-龙脑、柠檬烯、 α -松油醇及樟脑等不同次生代谢产物^[26-27]。

此外, 在单萜合成通路的中, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 合酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, HMGS) 起着重要作用, 有研究基于实时荧光定量 PCR 技术, 克隆得到陆英、山茱萸 HMGS 基因的全长 cDNA 序列, 进一步揭示萜类化合物合成的分子机制^[28-29]。本研究中, 不同“发汗”组下龙脑樟的次生代谢物均有不同程度的差异, 而代谢差异物集中在单萜类, 因此笔者猜测, 不同环境条件可能改变相关萜类成分合成酶的活性, 进而导致不同“发汗”组别活性成分的差异。

从微生物菌群角度看, 优势菌群的动态变化可以通过代谢或结合中药材中的前体分子产生新的活性分子。如魏担等^[4]发现“发汗”可以改变厚朴中曲霉属 *Aspergillus Micheli* 和假丝酵母菌属 *Candida Berkhout* 等微生物群落的代谢, 使其颜色改变。龙脑樟中优势菌落主要为青霉属和曲霉属, 然而不同部位的优势真菌存在差异。龙脑樟的不同“发汗”时期, 优势菌种处于动态变化的过程, 可能导致不同时期的活性成分差异化。

本研究通过“发汗”显著提高了 *d*-龙脑含量, 确定本实验中的最优“发汗”工艺为 4 d, 15 °C, RH 60% (S5 组)。优化得到的“发汗”工艺可一定程度缓和天然冰片资源短缺的现状, 为阐明龙脑樟“发汗”机制提供数据支撑, 同时为天然冰片的工业提取提供新思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈新强, 连辉明, 陈杰连, 等. 龙脑型阴香叶片精油得率影响因素研究 [J]. 林业与环境科学, 2020, 36(3): 18-23.
- [2] 齐菲, 史亚军, 崔春利, 等. 共水蒸馏法提取香附-艾叶挥发油的工艺优化及与隔水蒸馏法提取的 GC-MS 比较 [J]. 华西药学杂志, 2018, 33(5): 529-534.
- [3] 欧阳少林, 龙光远, 黄璐琦, 等. 天然冰片的新资源 [J]. 江西林业科技, 2005, 33(5): 38.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 61.
- [5] 唐·孙思邈著. 苏凤琴等校注. 千金翼方 [M]. 山西: 山西科学技术出版社, 2011: 1.
- [6] 王婷, 于凡, 李国转, 等. “发汗”与非“发汗”丹参中 10 种活性成分含量测定及其质量的主成分分析 [J].

- 安徽中医药大学学报, 2019, 38(1): 75-79.
- [7] Cao M Y, Liu Y Y, Jiang W M, *et al.* UPLC/MS-based untargeted metabolomics reveals the changes of metabolites profile of *Salvia miltiorrhiza* Bunge during sweating processing [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 19524.
- [8] 吴婕, 潘超美, 苏家贤, 等. 广藿香“发汗”对有效成分含量的影响及“发汗”工艺优化 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(5): 1116-1119.
- [9] Wang S N, Hua Y J, Xu L, *et al.* Quality evaluation of *Scrophulariae Radix* processed by different ‘sweating’ methods based on simultaneous determination of multiple bioactive constituents combined with grey relational analysis [J]. *Molecules*, 2016, 21(7): 850.
- [10] 蒋杰, 李雪营, 魏学军. 杜仲不同“发汗”加工方法制品中绿原酸含量的比较 [J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(1): 28-30.
- [11] 唐文文, 孟艳林, 陈垣. 基于多指标成分优化天麻产地“发汗”加工工艺 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7185-7191.
- [12] 朱兴龙, 卢丽洁, 吴清华, 等. 基于成分变化研究厚朴“发汗”过程中颜色与酶促反应的关系 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5): 1262-1272.
- [13] Guo X H, Meng X X, Li Y, *et al.* Comparative proteomics reveals biochemical changes in *Salvia miltiorrhiza* Bunge during sweating processing [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 293: 115329.
- [14] 魏担, 吴清华, 刘钰萍, 等. 基于高通量测序研究厚朴“发汗”过程中微生物群落多样性及其特征 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(24): 5405-5412.
- [15] 王胜男. 玄参药材的品质评价研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [16] 陈小兰, 曾红高, 谢正平, 等. 龙脑樟叶部精油在不同蒸馏时段的出油率和化学成分 [J]. 江西林业科技, 2011, 39(3): 1-2.
- [17] 张宇思, 王成章, 周昊, 等. 不同产地龙脑樟叶挥发油成分的 GC-MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 57-61.
- [18] 谢丽娟. 龙脑樟叶鉴定学特征及化学成分的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [19] Poudel D K, Rokaya A, Ojha P K, *et al.* The chemical profiling of essential oils from different tissues of *Cinnamomum camphora* L. and their antimicrobial activities [J]. *Molecules*, 2021, 26(17): 5132.
- [20] Hou J X, Zhang J, Zhang B H, *et al.* Transcriptional analysis of metabolic pathways and regulatory mechanisms of essential oil biosynthesis in the leaves of *Cinnamomum camphora* (L.) Presl [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 598714.
- [21] Chen C H, Zheng Y J, Zhong Y D, *et al.* Transcriptome analysis and identification of genes related to terpenoid biosynthesis in *Cinnamomum camphora* [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 550.
- [22] 曾韦珊, 黄林旺, 冯志恒, 等. 火炬松 MVA 和 MEP 途径及萜烯合成酶基因的表达分析 [J]. 分子植物育种, 2023, 21(4): 1138-1144.
- [23] 聂梦云. 烟草萜类代谢途径相关基因的克隆及功能分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2016.
- [24] 陈美兰. 药用植物樟化学型形成机理的基础研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2007.
- [25] 吴旻晖, 梁书利, 林影. 大肠杆菌分泌表达烟酰胺单核苷酸合成途径酶及催化体系优化 [J]. 现代食品科技, 2023, 39(3): 75-86.
- [26] 刘少华, 赵希胜, 杨晴, 等. 烟草单萜合酶基因 NtTPS2 的克隆及功能鉴定 [J]. 生物技术通报, 2021, 37(9): 132-141.
- [27] 李相怡, 潘秋红. 葡萄果实单萜生物合成与调控的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(9): 2899-2906.
- [28] 姚元枝, 黎晓英, 郭文博, 等. 陆英 HMGS 基因 cDNA 克隆、不同器官中的差异表达及生物信息学分析 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1578-1582.
- [29] 侯典云, 王瑶瑶, 刘晓冉, 等. 山茱萸萜类甲羟戊酸合成途径关键酶 *CoHMGS* 基因的克隆与分析 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5716-5721.

[责任编辑 郑礼胜]