

HPLC-UV 技术用于川木香煨制前后代谢物轮廓差异研究

高飞¹, 傅超美¹, 胡慧玲^{1*}, 王战², 傅舒¹, 毛茜¹, 盛菲亚¹

1. 成都中医药大学药学院 中药材标准化教育部重点实验室中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 四川 成都 611137
2. 四川大学生命科学院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 比较川木香煨制前后代谢物轮廓 (metabolic profiling) 差异, 筛选出导致差异的特征性化学成分。方法 经 HPLC-UV 分析获得川木香生品、煨品的色谱图数据集; 采用主成分分析 (principal component analysis, PCA)、偏最小二乘法-判别分析 (partial least square-discriminant analysis, PLS-DA)、聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA) 等多变量统计分析方法比较川木香生品、煨品的代谢物轮廓差异及筛选导致差异的特征性化学成分。结果 川木香生品和煨品代谢物轮廓明显不同, 导致差异的特征性化学成分有 7 个 (包含木香烯内酯和去氢木香内酯)。结论 从代谢物轮廓角度, 川木香煨制前后具有显著差异。

关键词: HPLC-UV; 代谢组学; 代谢物轮廓; 川木香; 煨制

中图分类号: R283.1; R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)05-0000-00

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.000

Study on the differentiates of metabolic profiling of *Vladimiriae Radix* before and after processing using HPLC-UV

GAO Fei¹, FU Chao-mei¹, HU Hui-ling¹, WANG Zhan-guo², FU Shu¹, MAO Qian¹, SHENG Fei-ya¹

1. Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine; State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Chengdu 611137, China
2. College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective Comparing the metabolic profiling differences of *Vladimiriae Radix* before and after processing, screen out the discrepant constituents. **Methods** Acquiring the chromatogram information from the processed and unprocessed *Vladimiriae Radix* by UV-HPLC analysis. Then comparing the metabolic profiling differences of *Vladimiriae Radix* before and after processing by PCA, PLS-DA, HCA, and screen out the discrepant constituents which lead up to these differences. **Results** The metabolic profilings between processed and unprocessed *Vladimiriae Radix* are apparent different, data showed 7 peaks of them mainly make the quality difference, include active constituents costunolide and dehydrocostus lactone. **Conclusion** Based on the metabolic profiling can be used to study the processing mechanism of *Vladimiriae Radix*.

Key words: HPLC-UV; metabonomics; metabolic profiling; *Vladimiriae Radix*; processed

川木香 *Vladimiriae Radix* 是中医、藏医、羌医、蒙医等临床常用药材之一, 为四川道地药材, 主要用于消化道疾病的临床治疗。《中国药典》2010 年版一部川木香饮片的炮制项下将其分列为“川木香”和“煨川木香”两种^[1]。课题组从有效成分角度, 开展了川木香煨制工艺、煨制前后化学成分(木

香烯内酯、去氢木香内酯) 变化与药理作用差异的相关性初步研究^[2-3]。前期研究从有效成分角度阐述川木香煨制机制是不全面的, 存在局限性^[4]。鉴于中医药整体观与代谢组学系统性的相通属性, 代谢组学技术已广泛应用于中药配伍规律、质量评价、炮制机制、药效学与作用机制、安全性和毒性评价

收稿日期: 2012-08-31

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81001638)

作者简介: 高飞 (1987—), 男, 四川西昌人, 在读硕士, 从事中药炮制与制剂学研究。E-mail: feigao207@yeah.net

*通信作者 胡慧玲 E-mail: hhlmedicine@126.com

等研究领域^[5-6]。从代谢物轮廓角度,学者已开展了不同产地人参^[7]、人参属不同药材^[8]、三七的不同药用部位^[9]及其不同炮制品^[10-11]的对比分析研究。然而上述研究,大多依赖 NMR、UPLC-MS、LC-MS 等昂贵仪器,在一定程度上限制了其应用。鉴于此,课题组前期尝试采用常规 HPLC-UV 技术进行中药“全成分”质量评价研究,如:醋柳黄酮^[12-13]、银杏叶片^[14]、红景天提取物^[15]等的质量控制研究。结合代谢组学理念,拟采用 HPLC-UV 技术进行川木香煨制前后代谢物轮廓差异比较研究,期望从代谢物轮廓差异角度,为川木香煨制机制、煨制前后产品的质量评价提供数据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 高效液相色谱仪包括四元梯度泵单元、自动脱气单元、自动控温进样单元、VWD 可变波长检测器单元和 Chem Station 色谱工作站等 (Agilent Technologies, USA); CP225D 和 BS210S 电子天平 (Sartorius, Germany); KH-300DB 型数控超声仪 (昆山禾创超声仪器有限公司, 中国); TGL-16C 台式高速离心机 (上海市安亭科技仪器厂, 中国); WSD-UP-III-10 精密型纯水机 (成都威思达智能科技有限公司, 中国)。

木香烯内酯 (批号 111524-201107)、去氢木香内酯 (批号 111525-201105) 对照品购于中国药品生物制品检定所; 甲醇为色谱纯 (美国 Fisher 公司); 其他试剂均为分析纯。

川木香样品采集于四川省阿坝州茂县雅都乡, 经成都中医药大学中药鉴定教研室卫莹芳教授鉴定为菊科川木香属植物灰毛川木香 *Vladimiria souliei* (Franch.) Ling var. *cinerea* Ling 的干燥根。根据采集地点和时间的不同, 样品被分成 9 个批次 (表 1)。

表 1 川木香采集信息

Table 1 Collection information of *Vladimiria Radix*

批次	采集地点	采集时间
1	阿坝州茂县雅都乡雅都村	2010.10.10
2	阿坝州茂县雅都乡雅都村	2010.10.11
3	阿坝州茂县雅都乡雅都村	2010.10.13
4	阿坝州茂县雅都乡雅都村	2010.10.14
5	阿坝州茂县雅都乡雅都村	2010.10.15
6	阿坝州茂县雅都乡俄俄村	2011.11.03
7	阿坝州茂县雅都乡俄俄村	2011.11.05
8	阿坝州茂县雅都乡俄俄村	2011.11.06
9	阿坝州茂县雅都乡俄俄村	2011.11.08

2 方法与结果

2.1 样品制备

川木香生品供试液的制备: 分别称取 9 批川木香生品药材粉末 (过四号筛) 约 0.2 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 放置过夜, 超声处理 (功率 250 W, 频率 50 kHz) 30 min, 放冷后, 再称定质量, 分别用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得川木香生品供试液 (S1~S9)。

川木香煨品供试液的制备: 按《中国药典》2010 年版一部“煨川木香”项下规定, 结合课题组前期工作基础^[16], 取 9 个批次的川木香生品药材, 加适量的水浸泡, 闷润 6 h 后, 切成 10 cm 左右的薄片, 低温干燥后, 一层草纸一层川木香, 间隔平铺 3~4 层, 120 °C 煨制 2 h, 取出, 放凉, 得川木香 9 批煨品药材。按“川木香生品供试液的制备”项同法制备, 即得川木香煨品供试液 (W1~W9)。

质量控制 (quality control, QC) 样品供试液的制备: 分别精密量取上述供试液 (S1~S9、W1~W9) 各 1 mL, 合并, 混匀, 滤过, 取续滤液作为 QC 样品, 用于评价仪器和方法的漂移程度^[17-20]。

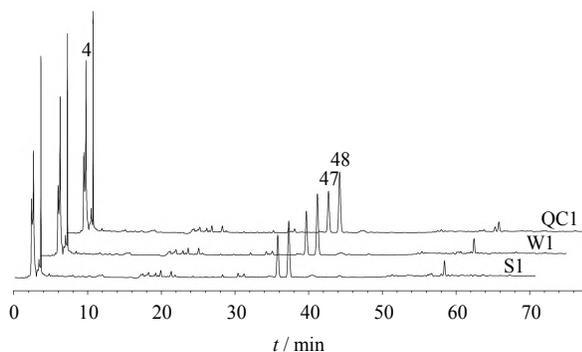
2.2 色谱条件

色谱柱为 Amethyst C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水, 采用二元梯度洗脱, 洗脱程序: 0~12 min, 20%乙腈; 12~15 min, 20%~40%乙腈; 15~30 min, 40%~60%乙腈; 30~45 min, 60%乙腈; 45~50 min, 60%~80%乙腈; 50~60 min, 80%~90%乙腈; 60~70 min, 90%乙腈; 柱温为 30 °C; 体积流量为 1.0 mL/min; 检测波长为 238 nm; 进样量为 20 μL。

为评价仪器和方法的漂移程度, 样品分析前, 连续进样 QC 样品 3 次, 并与分析批次间每 3~4 测试样品进样 QC 样品 1 次。川木香生品、煨品供试液及质量控制样品供试液的典型色谱图见图 1。

2.3 数据采集与数据处理

选择峰 4 (未知成分) 和峰 47 (木香烯内酯) 为参照对齐样品中各色谱峰的保留时间, 样品积分保留时间范围为 2~70 min, 斜率灵敏度为 1, 最小积分峰面积为 5, 最小积分峰高分别为 0.3, 共检测到 59 个色谱峰 (Agilent Chem Station), 形成样品数据集 (包括样品编号、色谱峰编号、保留时间与峰面积)。参考文献^[12-15]方法, 将数据导入 SIMPCA-P 12.0 软件 (Umetrics, Umeå, Sweden)



4-未知成分 47-木香烃内酯 48-去氢木香内酯
4-unknown composition 47-costunolide 48-dehydrocostus lactone

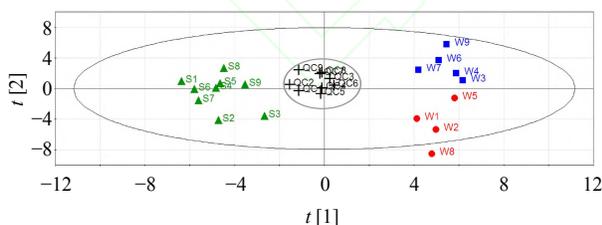
图1 川木香生品 (S1)、煨品 (W1) 及质量控制样品 (QC1) 供试液 HPLC-UV 色谱图

Fig. 1 HPLC-UV chromatograms of *Vladimiriae Radix* (S1), its processed sample (W1), and QC sample (QC1)

中进行包括主成分分析 (principal component analysis, PCA), 偏最小二乘法-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 和聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA) 等多变量数据分析。

2.4 HPLC 分析方法的验证

为保障川木香 9 批生品和煨品数据的可靠性, 参考文献^[17-20]方法, 采用 QC 样品对仪器和方法的漂移程度进行了评价。所有分析样品包括 QC 样品的 PCA 结果见图 2。结果表明, 整个分析过程中的所有 QC 样品 (QC1~QC9) 均较好地聚成 1 类, 显示仪器和分析方法学的重现性和精密度均较好, 试验中 9 批川木香生品和煨品数据是可靠的, 可纳入后期的数据处理。



1. 图2 样品包括 QC 样品的 PCA 图

Fig. 2 PCA plot of data of samples including QC sample

2.5 川木香煨制前后代谢物轮廓差异分析

2.5.1 川木香煨制前后代谢物轮廓差异 样品数据集中扣除 QC 样品的 PCA 打分图见图 3, 图中 10 批次川木香样品被清晰地分为 3 大类, 说明样品间存在质量差异。

为评价样品批间质量差异的程度, 采用 HCA 对 PCA 进行聚类分析柱状绘图, 结果见图 4。在权

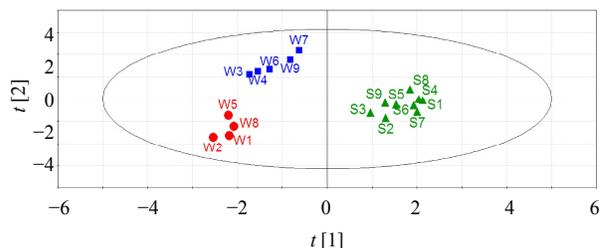


图3 川木香样品的 PCA 打分图

Fig. 3 PCA scores plot of *Vladimiriae Radix* samples

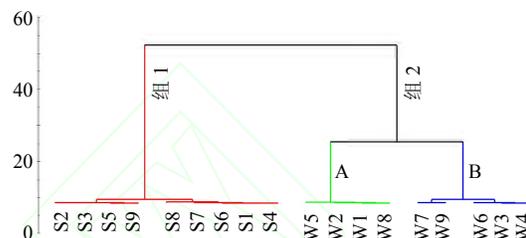


图4 川木香样品的 PCA 打分图的 HCA 分析柱状图

Fig. 4 HCA of PCA scores plot of *Vladimiriae Radix* samples

重为 50 的条件下, 10 批次川木香样品被清晰地聚集为 2 类, 其中生品被聚成 1 类 (组 1: S1~S9), 煨品被聚成另 1 类 (组 2: W1~W9)。然而, 在权重为 25 时, 煨品再被分为 A 组 (W1、W2、W5、W8) 和 B 组 (W3、W4、W6、W7) 两组。结果显示, 从化学成分组的角度, 该实验可以将川木香生品与煨品分开, 且不同煨品批次之间存在差异。

2.5.2 反映川木香煨制前后质量差异的化学成分分析 为确认导致质量差异的显著性化学成分, 在 PCA 和 HCA 分析的基础上, 经 PLS-DA 分析, 其 PLS-DA 分类情况与 PCA 结果非常吻合。通过对 PLS-DA 打分图的载荷图 (loading score) 进行分析, 结果见图 5。从图中, 选择权重 $W^*C [1]$ ($-0.20 \sim 0.20$), $W^*C [2]$ ($-0.20 \sim 0.20$) 画出阴影区域见图 5, 在此区域之外的化学成分信息被定为影响质量差异的化学成分, 包括 7 个成分即: 峰 4、峰 5、峰 6、峰 13、峰 18、峰 47、峰 48。

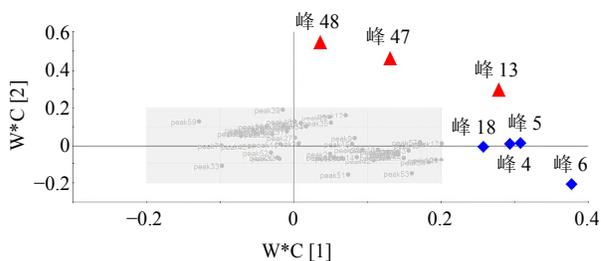


图5 川木香样品的 PLS-DA 载荷图

Fig. 5 PLS-DA plot of *radix vladimiriae* samples

通过对样品煨制前后 7 种成分峰面积进行统计分析, 结果见表 2, 其中峰 6、峰 18、峰 4、峰 5、峰 13 对应成分的量在炮制前后出现显著性差异 ($P < 0.01$), 且呈现下降趋势; 峰 47、峰 48 分别为川木香的主要成分木香烃内酯和去氢木香内酯, 二者的峰面积之和占其所有成分峰面积总量的 25%, 分析结果亦将二者选作影响药材质量差异的化学成分。由此可知, 川木香经煨制后并没出现新的化学成分, 不存在质的变化, 存在显著地量的变化。

表 2 显著影响川木香生品及煨品质量差异成分的相对量比较

Table 2 Relative quantification of compounds in *Vladimiriae Radix* before and after processing

成分	峰面积		变化趋势
	生品	煨品	
peak4	534.4 ± 3.4	498.5 ± 18.2**	↓
peak5	230.5 ± 9.4	192.6 ± 14.1**	↓
peak6	713.1 ± 14.2	655.7 ± 11.2**	↓
peak13	537.3 ± 18.1	498.7 ± 34.4*	↓
peak18	48.1 ± 8.6	21.3 ± 8.7**	↓
peak47	494.9 ± 8.6	481.6 ± 35.0	↓
peak48	777.0 ± 12.4	777.1 ± 35.9	—

与生品相比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs comparing with raw *Vladimiriae Radix*

3 讨论

3.1 从代谢物轮廓角度进行川木香煨制前后化学成分变化研究符合中药的系统属性要求

课题组前期研究表明川木香煨制前后抗炎、镇痛、解痉、止泻等作用发生了改变^[3,21-22], 猜测与两种指标性成分即木香烃内酯、去氢木香内酯的变化有关, 然而研究表明煨制前后二者量的变化并不显著。鉴于此, 本实验通过比较川木香煨制前后代谢物轮廓差异, 筛选出了导致差异的 7 个特征性化学成分, 由此可从化学成分和药效的相关性角度猜测, 此 7 个特征性成分可能与川木香“生用理气、煨熟止泻”的炮制机制有关。同时, 纵观整个实验研究思路和方法, 不难发现从代谢物轮廓角度进行川木香煨制前后化学成分变化研究符合中药的系统属性要求。

3.2 基于 HPLC-UV 技术从代谢物轮廓差异性角度可对中药炮制机制进行初步研究

本研究提供了一种基于 HPLC-UV 技术从代谢物轮廓差异性角度对中药炮制机制进行初步研究的

方法。此方法有别于依赖 NMR、LC-MS 等先进仪器的常规代谢物轮廓差异性研究方法, 而是利用简单的 HPLC-UV 技术对不同中药炮制品进行综合质量差异的区分, 并自动地筛选出对此综合差异贡献较大的中药成分, 进而为不同炮制品的中药炮制机制的化学成分初步研究或质量评价提供综合指标, 可作为一种较为初步的、相对经济的研究方法, 具有操作简便、仪器设备需求低与数据处理自动化等明显优点。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 胡慧玲, 付超美, 王战, 等. 川木香煨制前后挥发油成分的研究 [J]. 华西药学杂志, 2010, 25(1): 37-39.
- [3] 瞿燕, 付超美, 胡慧玲, 等. 川木香及其煨制品对小鼠胃排空及肠推进的影响 [J]. 华西药学杂志, 2010, 25(3): 269-271.
- [4] 张铁军. 中药质量认识与质量评价 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 1-9.
- [5] 范刚, 周林, 赖先荣, 等. 基于代谢组学技术的中药质量控制研究思路探讨 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2010, 12(6): 870-875.
- [6] 李春雨, 王平, 王张, 等. 基于代谢组学技术的大黄治疗慢性肾功能衰竭的作用机制研究 [J]. 中草药, 2012, 43(2): 312-315.
- [7] Kang J, Lee S, Kang S, et al. NMR-based metabolomics approach for the differentiation of ginseng (*Panax ginseng*) roots from different origins [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(3): 330-336.
- [8] Xie G, Plumb R, Su M, et al. Ultra-performance LC/TOF MS analysis of medicinal *Panax* herbs for metabolomic research [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(6/7): 1015-1026.
- [9] Dan M, Su M, Gao X, et al. Metabolite profiling of *Panax notoginseng* using UPLC-ESI-MS [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(11): 2237-2244.
- [10] Chan E C, Yap S L, Lau A J, et al. Ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics of raw and steamed *Panax notoginseng* [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(4): 519-528.
- [11] Toh D F, New L S, Koh H L, et al. Ultra-high performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (UHPLC/TOFMS) for time-dependent profiling of raw and steamed *Panax notoginseng* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(1): 43-50.
- [12] 张艳, 王战, 兰轲. 一种简便的用于中药质量评价的代谢组学方法 [OL]. 中国科技论文在线: <http://www.paper.edu.cn/index.php/default/releasepaper/c>

- ontent/201006-21.
- [13] Lan K, Zhang Y, Yang J Y, *et al.* Simple quality assessment approach for herbal extracts using high performance liquid chromatography-UV based metabolomics platform [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(8): 1414-1418.
- [14] 王安齐, 王战国, 杨俊毅, 等. 代谢组学技术在银杏叶片质量评价中的应用初探 [OL]. 中国科技论文在线: <http://www.paper.edu.cn/index.php/default/releasepaper/content/201108-70>.
- [15] Wang Z, Hu H, Chen F, *et al.* Metabolic profiling assisted quality assessment of *Rhodiola rosea* extracts by high-performance liquid chromatography [J]. *Planta med*, 2012, 78(7): 740-746.
- [16] 贾东艳. 川木香煨制工艺及质量标准的研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.
- [17] Sangster T, Major H, Plumb R, *et al.* A pragmatic and readily implemented quality control strategy for HPLC-MS and GC-MS-based metabonomic analysis [J]. *Analyst*, 2006, 131(10): 1075-1078.
- [18] Gika H G, Macpherson E, Theodoridis G A, *et al.* Evaluation of the repeatability of ultra-performance liquid chromatography-TOF-MS for global metabolic profiling of human urine samples [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2008, 871(2): 299-305.
- [19] Michopoulos F, Lai L, Gika H, *et al.* UPLC-MS-based analysis of human plasma for metabonomics using solvent precipitation or solid phase extraction [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(4): 2114-2121.
- [20] Zelena E, Dunn W B, Broadhurst D, *et al.* Development of a robust and repeatable UPLC-MS method for the long-term metabolomic study of human serum [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(4): 1357-1364.
- [21] 瞿燕, 胡慧玲, 傅超美, 等. 川木香煨制前后抗炎与镇痛作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 21(6): 1442-1443.
- [22] 徐丽佳, 章津铭, 瞿燕, 等. 川木香醇提物利胆镇痛作用的实验研究 [J]. 江苏中医药, 2010, 42(9): 76-77.