

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的陈皮醋制前后成分分析

吴建雄, 杨嵩虹, 郭怡敬, 李苏运, 龚千锋, 于欢

(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

摘要: 目的: 采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对陈皮生品及其醋制品进行成分快速鉴定和分析, 为中药炮制特色饮片的临床用药提供参考依据。方法: 采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术, 分别选择电喷雾离子源在正、负离子模式下采集多个陈皮生品及醋制品样品数据, 利用PeakView 1.2软件进行数据分析。根据各个样品中的成分保留时间和多级裂解碎片离子信息结合对照品及相关文献进行成分鉴定。此外, 对各样品质谱数据进行归一化处理, 之后利用主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)对陈皮醋制前后的差异成分进行分析。结果: 在陈皮生品及醋制品中共鉴定得到48个成分, 其中黄酮及黄酮苷成分36个、生物碱类成分2个、萜类成分3个、有机酸类成分3个、香豆素类成分2个, 其他类成分2个。PCA及OPLS-DA结果表明陈皮醋制前后化学成分含量存在差异, 根据VIP值>1.5共筛选得到川陈皮素、橘红素、橙皮素等27个主要差异成分。结论: UPLC-Q-TOF-MS/MS技术能快速和准确地鉴定陈皮的化学成分, 其炮制前后成分含量存在部分差异, 黄酮类成分的分解和转化可能是造成该差异的重要原因, 可为陈皮炮制特色品种的物质基础研究提供参考。

关键词: 陈皮; 炮制; 化学成分; 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱; 化学模式识别分析; 醋制; 差异成分

Composition analysis of raw and vinegar-processed products of Citri Reticulatae Pericarpium based on UPLC-Q-TOF-MS/MS

WU Jianxiong, YANG Songhong, GUO Yijing, LI Suyun, GONG Qianfeng, YU Huan

(School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: Objective: To use ultra-highperformance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) to quickly identify and analyze the components of Citri Reticulatae Pericarpium and its vinegar products, and to prepare special decoction pieces based on traditional Chinese medicine provide reference basis for clinical medication. Method: Using UPLC-Q-TOF-MS/MS technology, the electrospray ion source was selected to collect the data of multiple Citri Reticulatae Pericarpium and vinegar products in positive and negative ion modes, and the PeakView 1.2 software was used for data analysis. According to the retention time of the components in each sample and the information of multi-level fragment ions, the components are identified in combination with reference materials and related literature. In addition, the mass spectrum data of each sample was normalized, and then principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used for the difference components before and after the preparation of vinegar. Results: A total of 48 components were identified in Citri Reticulatae Pericarpium and vinegar products, including 36 flavonoids and flavonoid glycosides, 2 alkaloids, 3 terpenoids, 3 organic acids, 2 coumarins and 2 other ingredients. The results of PCA and OPLS-DA showed that there were significant differences in the chemical composition content before and after treatment with vinegar. According to the VIP value>1.5, a total of 27 main difference components were selected, including tangeretin, nobiletin and hesperetin, etc.. Conclusion: UPLC-Q-TOF-MS/MS technology can quickly and accurately identify the chemical components of Citri Reticulatae Pericarpium. There are some differences in the content of the components before and after processing. The decomposition and transformation of flavonoids may be an important reason for the difference. The material basis research of characteristic varieties processed by Citri Reticulatae Pericarpium provides reference.

Keywords: Citri Reticulatae Pericarpium; Processed; Chemical composition; UPLC-Q-TOF-MS/MS; Chemical pattern recognition analysis; Vinegar-processed; Difference components

基金资助: 国家中医药管理局草珊瑚等10种中药饮片标准化建设项目(No.ZYBZH-Y-JX-27)

通信作者: 龚千锋, 江西省南昌市新建区梅岭大道1688号江西中医药大学药学院, 邮编: 330004, 电话: 0791-87118852

E-mail: gongqf2002@163.com

于欢, 江西省南昌市新建区梅岭大道1688号江西中医药大学药学院, 邮编: 330004, 电话: 0791-87118852, E-mail: 416931863@qq.com

陈皮为芸香科植物橘*Citrus reticulata* Blanco及其栽培变种的干燥成熟果皮,药食两用,入药的陈皮药材可分为陈皮和广陈皮。其味辛、苦,性温。陈皮具有理气健脾、燥湿化痰的功效,临床常用于脘腹胀满、食少吐泻、咳嗽痰多的治疗^[1]。现代研究表明,陈皮具有调节胃肠平滑肌运动、控制消化液分泌、利胆保肝、祛痰平喘、松弛子宫平滑肌等多种药理作用^[2]。陈皮的炮制方法比较多样,不同炮制品有不同的药用特点,如清炒陈皮可以增强降血压的作用,炒炭可以增加止血的功效,麸炒可以缓和陈皮的燥性^[3]。醋制陈皮为众多炮制品中沿用至今的特色品种,陈皮醋制后可引药入肝,具有行气止痛的功效^[4]。《滇南本草》指出陈皮本身具有行气、消痰、降肝气的功效^[5],而陈皮醋制后也常被作为保肝药物来使用,如经典名方柴胡疏肝散即以醋制陈皮为要药^[6]。

中药经炮制后其药性、功效往往会发生改变。笔者发现,当前陈皮炮制前后成分变化的研究较少,炮制药效物质基础也不明确,故本研究基于超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱技术(ultra-highperformance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS)对陈皮醋制前后的化学成分进行快速有效检测,并结合化学模式识别方法对陈皮醋制前后成分进行比较分析,以期为进一步阐明陈皮炮制的物质基础的整体变化提供依据。

材料

1. 药材与试剂 陈皮(批号: A1612004)购自江西樟树天齐堂中药饮片有限公司,产地为江西省吉安市新干县三湖滨里自然村,经江西中医药大学龚千锋教授鉴定为芸香科植物橘*Citrus reticulata* Blanco的干燥成熟果皮。辅料醋为龙和宽牌龙门米醋(北京二商龙和食品有限公司)。

标准对照品辛弗林(批号: CHB180314)、芸香柚皮苷(批号: CHB180917)、橙皮苷(批号: CHB18023)、香木叶苷(批号: CHB180125)、枸橼苷(批号: CHB180625)、柚皮素(批号: CHB180916)、香叶木素(批号: CHB180312)、橙皮素(批号: CHB180524)、异甜橙黄酮(批号: CHB180127)、3'-去甲川陈皮素(批号: CHB180131)、甜橙黄酮(批号: CHB180126)、柠檬苦素(批号: CHB180124)、5,7,4'-三甲氧基黄酮(批号: CHB181127)、川陈皮素(批号: CHB180529)、4',5,6,7-四甲氧基黄酮(批号: CHB190106)、诺米林(批号: CHB180315)、3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone(批号: CHB180120)、橘红素(批号: CHB190125)、黄柏酮(批号: CHB190126)、去甲基川陈皮素(批号: CHB180321)、去甲基桔皮素(批号: CHB181119)均购自成都克洛玛生物科技有限公司,纯度均≥98%;甲酸、乙腈为质谱纯,购自美国TEDIA有限公司;水为自制超纯水;其他试剂均为分析纯。

2. 仪器 Triple TOF™5600型液相色谱高分辨串联质谱仪(美国AB SCIEX公司), UPLC Titank C₁₈色谱柱(广州菲罗门

科学仪器有限公司), AE240型1/10万电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司), SQP型万分之一电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], Milli-Q型超纯水净化系统(美国Millipore公司), KQ-500E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

方法与结果

1. 样品的制备

1.1 生品 取适量陈皮药材除去杂质,喷淋水,润透,切丝,干燥后粉碎,过2号筛,即得^[1]。

1.2 醋制品 取适量切制好的陈皮饮片,参照《云南省中药饮片标准》^[7]醋制陈皮的制备方法,将陈皮置容器内,加醋拌匀(1 kg陈皮饮片加米醋约200 g),闷润后用文火炒外表面呈略有焦斑,取出,晾凉,筛去碎屑,干燥后粉碎,过2号筛,即得。

2. 对照品溶液的制备 分别精密称取适量辛弗林、芸香柚皮苷、橙皮苷等21种标准品置于量瓶中,各自加甲醇配制质量浓度为50~100 g/mL对照品溶液备用。

3. 供试品溶液的制备 精密称取陈皮生品及醋制品粉末各1.0 g,置于100 mL具塞锥形瓶中,加入甲醇80 mL,称定质量,超声提取40 min(500 W,调频至25 kHz),将锥形瓶取出后放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,用滤纸滤过,滤液置100 mL容量瓶中,用少量甲醇分数次洗涤容器,洗液滤入同一容量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过0.22 μm微孔滤膜,即得。

4. LC-MS检测条件

4.1 色谱条件 UPLC Titank C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流动相: 100%乙腈溶液(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0—5 min, 5%~12%A; 5—15 min, 12%~21%A; 15—25 min, 21%~35%A; 25—26 min, 35%~45%A; 26—30 min, 45%~48%A; 30—31 min, 48%~60%A; 31—40 min, 60%~85%A; 40—41 min, 85%~95%A; 41—43 min, 95%A; 43—46 min, 95%~5%A),柱温: 40 °C,流速: 0.25 mL/min,进样量: 2 L。

4.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),分别在正负离子模式下进行扫描采集,扫描范围: m/z 50~1 000。离子源温度: 500 °C;正离子模式扫描喷雾电压: 5 500 kV;负离子模式扫描喷雾电压: 4 500 kV;碰撞能量(CE): (40±10)eV;去簇电压(DP): ±100 V;气帘气压力(CUR): 40 kPa;雾化气压力(GS1)和辅助气压力(GS2)均为50 kPa;数据采集时间: 46 min。

5. 数据采集和成分鉴定 通过在中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)和中医药百科全书数据库(Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine, ETCM)及相关文献[8-10]中收集并汇总关于陈皮所含化学成分,建立包括分子式、化合物名称和化学结构等信息的内部化学成分数据库。再将收集到的化学成分导入PeakView 1.2软件中的XIC Manager模块进行无差别筛选,同时参照所有标准对照品和相关文献中具体成分的保留时间、多级碎片等质谱信息进行分析,并结合裂解规律进行成分鉴定,共鉴定出了48个化学成分。其中辛弗林、芸

香柚皮苷、橙皮苷等21个化合物进行了标准品比对。在正、负离子模式下,共鉴定出黄酮类36个、生物碱类成分2个、萜类成分3个、有机酸类成分3个、香豆素类成分2个,其他成分2个。在这些成分中,仅在陈皮生品中检测出limocitrol-3-O-(5- α -glucosyl-HMG)- β -glucoside、5,7,8,3',4',5-hexamethoxyflavone,而柚皮素和黄柏酮也只在醋制陈皮品中有二级碎片存在,其余成分都表现为含量变化。总离子流图见图1,化合物详细信息见表1。

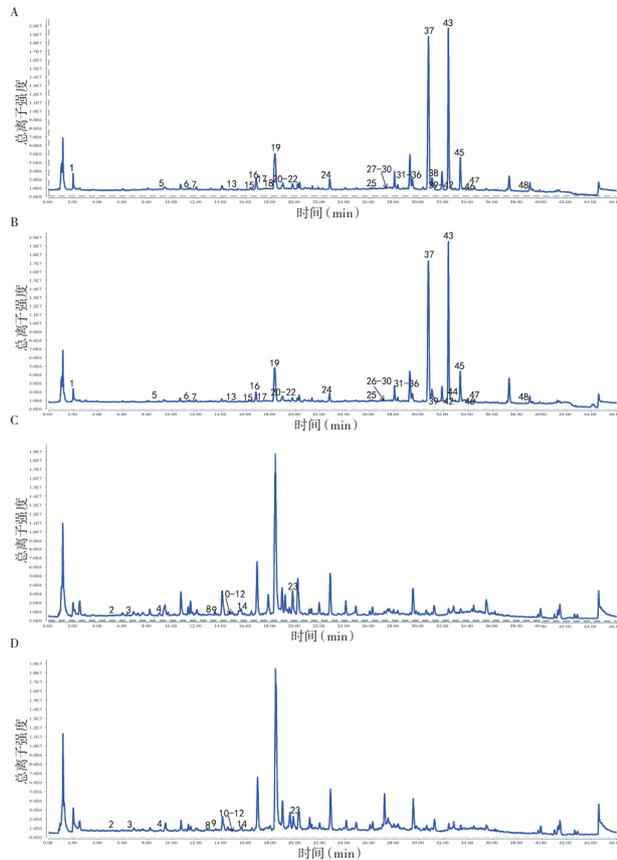


图1 陈皮醋制前后样品在正离子(A、B)和负离子(C、D)模式下的总离子流图

注: A和C. 陈皮生品; B和D. 陈皮醋制品。

6. 主要化学成分裂解分析 陈皮提取液中主要为化学成分黄酮类、香豆素类、生物碱类,此外还存在少量萜类和有机酸等其他成分。陈皮中含有大量黄酮类化合物,包括黄酮苷元和黄酮苷,黄酮苷在裂解过程中受高能碰撞容易丢失糖基而成为黄酮苷元^[11],其碎片离子中常可见苷元碎片和C环断裂产生的碎片。以橙皮苷为例,在正离子模式下其准分子离子峰为 m/z 611.1968,脱去的一个糖基为碎片 m/z 177.0545,脱去两分子糖基则变为苷元结构,产生特征碎片离子 m/z 303.0853,其苷元母核再经裂解和重排产生碎片离子 m/z 153.0175,具体裂解过程见图2A。多甲氧基黄酮类化合物在质谱高能碰撞下多表现为连续丢失 CH_3 ,如川陈皮素在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 403.1399,其二级碎片中出现明显的碎片离子 m/z 388.1134和 m/z 373.0899,推测为由连续丢失 CH_3 产生,碎片 m/z 373.0899

进一步裂解丢失由 CH_3 产生碎片离子 m/z 358.0673。此外也可能出现分子丢失 H_2O 和 CO 后母核发生重排,进而得到碎片 m/z 355.0799和 m/z 345.0957,详细裂解途径见图2B。香豆素类成分具有降血压、调节心律失常、保护心肌收缩功能等药理活性^[12],也是陈皮中重要活性成分之一。香豆素类成分可以看做是顺式邻羟基肉桂酸的内酯,一般可以通过脱去吡喃环上的 CO 或苯环侧链上的 CH_3 形成碎片,碰撞能量较高时内酯环也可能直接断裂而脱落。以滨蒿内酯为例,准分子离子 m/z 207.0656,脱去侧链上的 CH_3 产生碎片 m/z 192.0408,在此基础上再脱去吡喃环上的 CO 又产生碎片 m/z 163.0397。若内酯环断裂后碳链重排,再连续脱去 CH_3 则生成碎片离子 m/z 121.0642,具体裂解过程见图2C。生物碱类成分主要是有机胺类生物碱,以辛弗林为例,辛弗林是陈皮中比较典型的生物碱,其结构中含有氮原子,容易吸引电子,在正离子模式下可以发生裂解从而得到相应的离子碎片。准分子离子 m/z 168.1018在能量较低时,碰撞易使其脱掉一分子 H_2O 生成碎片离子 m/z 150.0916,碎片离子 m/z 150.0916再发生 α 键断裂,脱掉侧链 CH_3 生成高丰度的碎片 m/z 135.0686,随着碰撞能量的增加,碎片离子 m/z 135.0686进一步脱掉侧链上的胺基 NH_2 产生碎片离子 m/z 119.0497,也可直接脱掉侧链上的甲胺基 CH_2N ,生成碎片离子 m/z 107.0502,具体裂解过程见图2D。

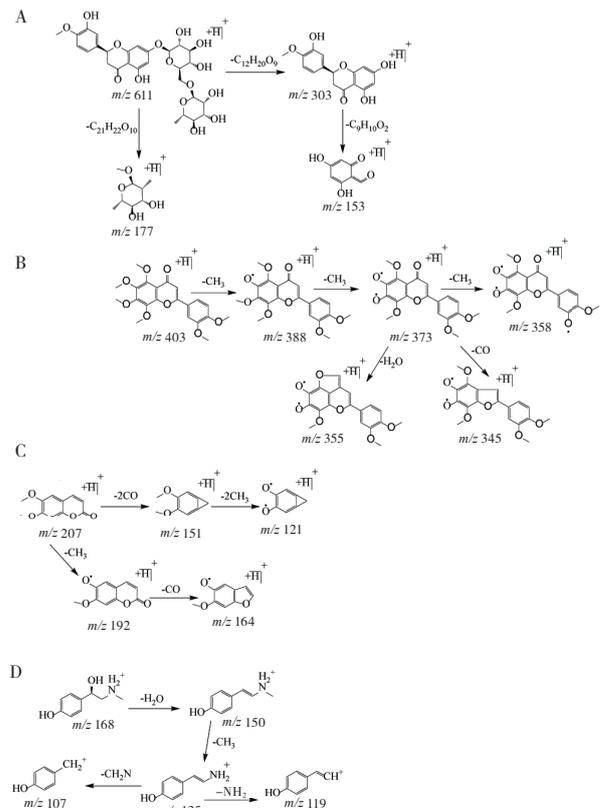


图2 化合物质谱裂解途径

注: A. 橙皮苷; B. 川陈皮素; C. 滨蒿内酯; D. 辛弗林。

7. 化学模式识别分析 将陈皮生品和醋制品经UPLC-Q-TOF-MS分析所得的MS数据导入MarkerView™ 1.2.1软件中进

表1 陈皮醋制前后化学成分的UPLC-Q-TOF-MS/MS鉴定

编号	化合物名称	分子式	一级质谱 (m/z)		δ (ppm)	R_t (min)	MS/MS	模式	分类	参考文献
			理论值	实测值						
1	辛弗林 (Synephrine)	C ₉ H ₁₃ NO ₂	168.1019	168.1018	-1.4	1.99	150.0916、135.0686、 119.0497、107.0502、 91.0563、77.0410	[M+H] ⁺	生物碱	*
2	香草酸 (vanillic acid)	C ₈ H ₈ O ₄	167.0350	167.0361	6.2	5.14	152.0127、108.0243、 80.0280、78.9539	[M-H] ⁻	有机酸	[8]
3	caffeoyl-glucose	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	341.0878	341.0881	2.5	6.30	179.0353、161.0250、 135.0458、133.0308	[M-H] ⁻	其他	[8]
4	咖啡酸 (caffeic acid)	C ₉ H ₈ O ₄	179.0350	179.0358	4.4	9.30	135.0467、134.9867、 134.0389、117.0354、 89.0423	[M-H] ⁻	有机酸	[8]
5	芦采宁-2 (lucenin-2)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.1607	611.1632	0.4	9.32	473.1076、425.0870、 395.0761、353.0662、 341.0662	[M+H] ⁺	黄酮类	[8]
6	stellarin-2	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.1763	625.1786	0.8	11.41	625.1752、607.1654、 589.1543、487.1220、 355.0814	[M+H] ⁺	黄酮类	[9]
7	lucenin-2,4'-methyl ether	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	625.1763	625.1786	0.6	11.93	487.1240、457.1137、 439.1036、409.0932、 355.0826	[M+H] ⁺	黄酮类	[9]
8	isoorientin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0933	447.0932	3.2	13.05	447.0934、357.0616、 327.0513、298.0481、 297.0406	[M-H] ⁻	黄酮类	[8]
9	orientin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.0933	447.0932	1.9	13.28	447.0932、357.0613、 327.0511、299.0563、 297.0410	[M-H] ⁻	黄酮类	[8]
10	eriocitrin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	595.1668	595.1662	2.6	14.22	595.1697、287.0560、 151.0041、135.0458	[M-H] ⁻	黄酮类	[9]
11	阿魏酸 (ferulic acid)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.0506	193.0511	4.5	14.51	178.0286、134.0388、 133.0306、132.0233	[M-H] ⁻	有机酸	[8]
12	vitexin-O-xyloside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	563.1406	563.1401	2.0	14.73	563.1451、413.0894、 341.0686、311.0563、 293.0456	[M-H] ⁻	黄酮类	[9]
13	牡荆苷 (Apigenin-8-C-glucoside)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.1129	433.1144	0.9	14.74	433.1133、397.0940、 313.0726、284.0691、 283.0620	[M+H] ⁺	黄酮类	[8]
14	phloretin-3',5'-di-C-glucoside	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₅	597.1825	597.1824	4.2	15.74	597.1849、477.1433、 417.1181、387.1095、 357.0985	[M-H] ⁻	黄酮类	[9]
15	diosmetin-6-C-glucoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	463.1235	463.1251	1.0	16.31	445.1145、427.1031、 367.0833、343.0831、 313.0722	[M+H] ⁺	黄酮类	[8]
16	芸香柚皮苷 (narirutin)	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.1865	581.1878	0.6	16.78	273.0762、195.0291、 153.0184、85.0299、 71.0515	[M+H] ⁺	黄酮类	*
17	rhoifolina	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	579.1708	579.1721	-0.2	17.83	433.1136、271.0614	[M+H] ⁺	黄酮类	[9]
18	limocitrol-3-O-(5-glucosyl-HMG)- β-glucoside	C ₃₆ H ₄₄ O ₂₃	845.2346	845.2377	-0.2	18.03	845.2422、377.0910	[M+H] ⁺	黄酮类	[9]
19	橙皮苷 (hesperidin)	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.1971	611.1968	-0.3	18.30	303.0853、195.0281、 177.0545、153.0175	[M+H] ⁺	黄酮类	*
20	香木叶苷 (diosimin)	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	609.1814	609.1837	-0.3	18.86	463.1228、301.0706	[M+H] ⁺	黄酮类	*
21	滨蒿内酯 (scoparone)	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	207.0652	207.0656	0.9	19.00	192.0408、191.0348、 163.0397、151.0761、 121.0642	[M+H] ⁺	香豆素类	[10]

(续表1)

编号	化合物名称	分子式	一级质谱 (m/z)		δ (ppm)	R_f (min)	MS/MS	模式	分类	参考文献
			理论值	实测值						
22	limocitrin-3- <i>O</i> -HMG- β -glucoside	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₇	653.1712	653.1732	-0.8	19.80	347.0774, 127.0395	[M+H] ⁺	黄酮类	[8]
23	nomilinic acid glucoside	C ₃₄ H ₄₈ O ₁₆	711.2870	711.2883	5.8	20.19	711.2900, 651.2685, 607.2771	[M-H] ⁻	其他	[9]
24	枸橼苷 (poncirin)	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	595.2021	595.2039	-0.6	22.76	287.0915, 263.0556, 195.0292, 153.0185, 85.0303	[M+H] ⁺	黄酮类	*
25	柚皮素 (naringenin)	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	273.0758	273.0758	0.8	26.03	153.0188, 147.0443, 119.0502, 91.0566	[M+H] ⁺	黄酮类	*
26	natsudaicain-3- <i>O</i> -HMG- β -glucoside	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₈	725.2287	725.2303	0.7	26.04	419.1342, 404.1108, 389.0877	[M+H] ⁺	黄酮类	[9]
27	香叶木素 (diosmetin)	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301.0707	301.0716	1.0	26.44	301.0723, 286.0487, 195.0441, 168.0054	[M+H] ⁺	黄酮类	*
28	橙皮素 (hesperetin)	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	303.0863	303.0876	0.8	27.12	177.0549, 153.0186, 149.0602, 145.0286, 117.0338	[M+H] ⁺	黄酮类	*
29	citrusin I	C ₃₄ H ₅₃ N ₇ O ₉	704.3978	704.4001	0.1	27.48	704.3989, 686.3893, 668.3764, 573.3034	[M+H] ⁺	生物碱	[8]
30	棕矢车橘素 (jaceosidin)	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	331.0812	331.0824	0.8	27.60	331.0818, 316.0589, 301.0357, 273.0404, 168.0060	[M+H] ⁺	黄酮类	[10]
31	异甜橙黄酮 (isosinensetin)	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.1282	373.1297	1.2	28.02	373.1266, 357.0951, 343.5605, 343.0799, 315.0844	[M+H] ⁺	黄酮类	*
32	3'-去甲川陈皮素 (3'-Demethylnobiletin)	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.1231	389.1247	1.0	28.29	389.1231, 359.0762, 359.5684, 344.0527, 313.0710	[M+H] ⁺	黄酮类	*
33	6-去甲氧基桔皮素 (6-Demethoxytangeretin)	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	343.1176	343.1193	2.3	29.25	313.0706, 285.0753, 181.0125, 153.0179	[M+H] ⁺	黄酮类	[10]
34	甜橙黄酮 (sinensetin)	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.1282	373.1298	0.3	29.30	373.1277, 357.0965, 343.0804, 329.1019, 312.0988	[M+H] ⁺	黄酮类	*
35	柠檬苦素 (limonin)	C ₂₆ H ₃₀ O ₈	471.2013	471.2033	1.7	29.48	471.2021, 425.1962, 213.0916, 161.0597, 95.0138	[M+H] ⁺	萜类	*
36	5,7,4'-三甲氧基黄酮 (5,7,4'-trimethoxyflavone)	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	313.1071	313.1082	1.9	30.33	313.1089, 298.0857, 297.0778, 270.0904, 269.0828	[M+H] ⁺	黄酮类	*
37	川陈皮素 (nobiletin)	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403.1387	403.1400	0.7	30.78	388.1134, 373.0899, 358.0673, 355.0799, 345.0957	[M+H] ⁺	黄酮类	*
38	5,7,8,3',4',5'-hexamethoxyflavone	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	403.1387	403.1400	0.7	31.02	374.3504, 373.0896, 358.0670, 355.0792, 327.0833	[M+H] ⁺	黄酮类	[9]
39	4',5,6,7-四甲氧基黄酮 (4',5,6,7-tetramethoxyflavone)	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	343.1176	343.1193	2.6	31.08	327.0858, 313.0697, 299.0906, 282.0875, 281.0802	[M+H] ⁺	黄酮类	*
40	诺米林 (nomilin)	C ₂₈ H ₃₄ O ₉	515.2276	515.2289	0.7	31.17	515.2291, 469.2196, 411.2173, 205.0491, 161.0600	[M+H] ⁺	萜类	*
41	猫眼草黄素 (chryso splenetin B)	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	375.1074	375.1092	2.0	31.21	375.1074, 360.0862, 345.0603, 327.0499, 197.0080	[M+H] ⁺	黄酮类	[10]
42	3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	433.1493	433.1515	2.9	31.88	433.1484, 418.1261, 417.1180, 403.1017	[M+H] ⁺	黄酮类	*

(续表1)

编号	化合物名称	分子式	一级质谱 (<i>m/z</i>)		δ (ppm)	R_f (min)	MS/MS	模式	分类	参考文献
			理论值	实测值						
43	橘红素 (tangeretin)	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	373.1282	373.1299	1.5	32.40	343.0795、297.0734、325.0688、211.0226	[M+H] ⁺	黄酮类	*
44	黄柏酮 (obacunone)	C ₂₆ H ₃₀ O ₇	455.2064	455.2077	1.1	32.56	455.2064、409.2015、315.1369、161.0600、133.0645	[M+H] ⁺	萜类	*
45	去甲基川陈皮素 (5-Demethylnobiletin)	C ₂₀ H ₂₀ O ₈	389.1231	389.1246	2.6	33.37	389.1222、373.0912、359.0748、341.0640、197.0065	[M+H] ⁺	黄酮类	*
46	3-mono-hydroxy-5,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	419.1337	419.1354	2.0	33.99	419.1336、404.1110、389.0867、371.0767、361.0928	[M+H] ⁺	黄酮类	[9]
47	去甲基桔皮素 (5-Hydroxy-4',6,7,8-tetramethoxyflavone)	C ₁₉ H ₁₈ O ₇	359.1125	359.1142	2.4	34.51	359.1124、344.0895、329.0656、311.0551、197.0082	[M+H] ⁺	黄酮类	*
48	橙皮油素 (Auraptene)	C ₁₉ H ₂₂ O ₃	299.1642	299.1646	1.4	38.41	283.0522、267.0187、250.9876、163.0388、107.0491	[M+H] ⁺	香豆素类	*

注: *表示经标准品对比确认。

行标准化处理, 并去除同位素离子峰, 再将处理后的陈皮生品 (S1~S6)、醋制品 (C1~C6) 数据导入SIMCA 14.1软件中进行主成分分析 (principal component analysis, PCA) 及正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least-squares discrimination analysis, OPLS-DA) 分析。

7.1 PCA分析 无监督模式的PCA模型稳定性和区分效果良好, 正、负离子模式下R²X分别为0.742 (A=4) 和0.888 (A=4)。如图3, 陈皮生品、醋制品各样品在图中均分布在Y轴两侧, 能够被明显区分, 说明醋制前后陈皮化学成分存在一定差异。

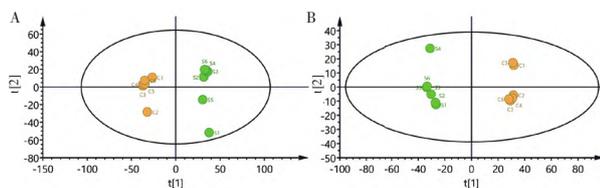


图3 陈皮生品与醋制品的PCA散点分布

注: A. 正离子模式; B. 负离子模式。下同。

7.2 OPLS-DA分析 在PCA基础上进行有监督的OPLS-DA分析, 且在正离子模式 (R²X=0.8, Q²=0.975) 和负离子模式 (R²X=0.82, Q²=0.997) 下, 陈皮生品和醋制品均有着各自的分

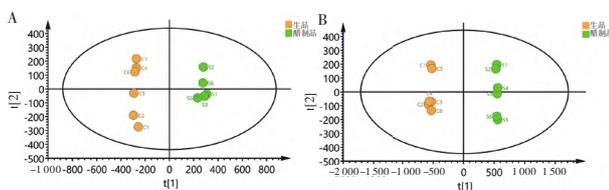


图4 陈皮生品与醋制品的OPLS-DA散点分布

布区域, 见图4。此外, 陈皮炮制前后差异成分具体变化可以通过变量重要性投影 (VIP) 值来体现, VIP值越大, 说明化合物在数据中的占比变化影响越大。根据VIP值>1.5的规则在正、负离子模式下进行筛选, 共得到27个炮制差异性成分, 主要为黄酮及黄酮苷, 这些成分响应值变化的具体结果见表2。

讨论

中药成分较为复杂, 其疗效和作用机制往往是多成分多靶点作用的结果。中药炮制是根据中医理论指导将药材加工成不同饮片时所采取的一系列传统制药技术, 对药材成分也会产生一定影响。运用现代科学技术手段对传统中医用药理论研究, 可以较好地分析中药材炮制前后化学物质基础的变化规律, 从而更好地揭示中药炮制的科学内涵。多版《中华人民共和国药典》都只记载切制法, 而对于加辅料炮制陈皮多被收录于地方炮制规范或民间使用, 关于陈皮很多炮制方法在运用频率上也逐渐降低。醋制陈皮是目前临床上仍在使用的特色炮制饮片, 也是经典方柴胡疏肝散的佐药, 具有引药入肝、活血止痛的功效^[13]。中药炮制学理论常也有“姜制发散、盐制走而软坚、酒制升提、麸制抑醋性而和胃、蜜制和中益元、醋制入肝而止痛”。

陈皮在醋制过程中药性和药效的改变可能源于化学成分含量或种类的变化。陈皮中化学成分种类多样, 此次研究共鉴定了48个化合物, 包括黄酮类、香豆素类、生物碱类、萜类、有机酸类以及其他类成分。通过对陈皮醋制前后化学成分的分析 and 比较可知, 两者在化学成分的种类上趋于一致, 而在化合物含量上却有一定差异。通过化学模式识别分析筛选得到川陈皮素、橘红素、橙皮素等27个主要差异成分。如橙皮苷和柚皮苷等黄酮苷类成分在醋制后含量下降, 而其相应的黄酮苷元橙皮素和柚皮素等成分含量明显升高, 这可能由于在炮制过程中黄

表2 陈皮生品与醋制品的差异化成分变化

化合物名称	VIP值	响应强度
猫眼草黄素 (chrysofenetin B)	2.95700	+
香木叶苷 (diosimin)	3.05455	-
4',5,6,7-四甲氧基黄酮 (4',5,6,7-tetramethoxyflavone)	2.76099	-
橙皮素 (hesperetin)	3.64743	+
去甲基川陈皮素 (5-Demethylnobiletin)	2.58519	-
辛弗林 (synephrine)	1.67084	-
滨蒿内酯 (Scoparone)	2.08737	+
stellarin-2	4.11043	-
3'-去甲川陈皮素 (3'-Demethylnobiletin)	1.97623	+
nomilinic acid glucoside	7.33618	-
甜橙黄酮 (Sinensetin)	3.23071	-
黄柏酮 (obacunone)	2.33864	+
3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone	5.73501	-
芸香柚皮苷 (narirutin)	5.66842	-
natsudaicain-3-O-HMG-β-glucoside	2.12025	+
枸橼苷 (poncirin)	5.54554	-
6-去甲氧基桔皮素 (6-Demethoxytangeretin)	4.32033	-
去甲基桔皮素 (5-Hydroxy-4',6,7,8-tetramethoxyflavone)	1.84722	+
eriocitrin	2.14978	-
川陈皮素 (nobiletin)	12.21240	-
橘红素 (tangeretin)	9.81021	-
phloretin-3',5'-di-C-glucoside	1.54786	-
阿魏酸 (ferulic acid)	1.55818	+
柠檬苦素 (limonin)	3.97704	-
异甜橙黄酮 (isosinensetin)	3.77141	-
limocitrin-3-O-HMG-β-glucoside	2.21115	+
橙皮苷 (hesperidin)	3.81182	-

注：“+”表示增加，“-”表示减少。

酮苷类成分在酸性条件下受热发生了分解和转化^[14]。而现代研究表明黄酮苷水解为苷元后更容易被人体吸收和利用,极大地提升了其生物利用度^[15]。同时,川陈皮素和橘红素等多甲氧基黄酮含量经醋制后有一定下降。阿魏酸作为一种有机酸,含量有所升高,这表明除温度影响外,辅料中引入的醋酸可能容易和一些化合物的基团发生反应导致化合物的结构发生转化。此外,在萜类成分中,陈皮醋制后柠檬苦素的含量下降而黄柏酮的含量上升。柠檬苦素是柑橘类水果呈现苦味的主要原因^[16],这意味着陈皮醋制之后在口味上可能会有适度的改善,同时也与中药炮制“矫臭矫味”的理念相符合。综上可知,陈皮醋制前后成分的具体变化规律目前尚不完全明确,这可能与陈皮中化合物本身的化学结构和性质的特殊性有很大关系,有待进一步深入研究,但这些差异成分可能作为陈皮的候选质量标志物。

本研究采用UPLC-Q-TOF-MS/MS对陈皮生品及其醋制品进行成分快速鉴定和比较分析,能够为醋制陈皮的药效物质基础和临床运用提供部分依据。但由于技术手段和分析方法仍存在一定的局限性,可能导致部分较为重要的成分未得到最终鉴定和比较。后期将对陈皮醋制前后的差异成分进行药效关联研究,以期为扩大中药特色饮片的药效研究奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部.北京:中国医药科技出版社,2015:191
- [2] 李皓翔,梅全喜,赵志敏,等.陈皮广陈皮及新会陈皮的化学成分药理作用和综合利用研究概况.时珍国医国药,2019,30(6):1460-1463
- [3] 张依欣,谭玲龙,于欢,等.陈皮的炮制研究进展.江西中医药,2018,49(7):66-69
- [4] 阮俊翔,苏志恒,梁永红,等.基于偏最小二乘判别分析法识别陈皮醋制前后化学成分的变化.中药材,2016,39(1):70-73
- [5] 兰茂.滇南本草.合肥:安徽科技出版社,2005:163
- [6] 黄星星,朱黎霞,韦园诗,等.UPLC法同时测定柴胡疏肝散水煎液冻干物中8个成分的含量.中国药房,2020,31(1):42-47
- [7] 云南省食品药品监督管理局.云南省中药饮片标准:二册.昆明:云南科技出版社,2008:110-113
- [8] Zheng Y,Zeng X,Peng W,et al.Characterisation and classification of Citri Reticulatae Pericarpium varieties based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS combined with multivariate statistical analyses. Phytochemical Analysis:PCA,2019,30(3):278-291
- [9] 张珂,许霞,李婷,等.利用UHPLC-IT-TOF-MS分析陈皮的化学成分.中国中药杂志,2020,45(4):899-909
- [10] Zheng G,Liu M,Chao Y,et al.Identification of lipophilic components in Citri Reticulatae Pericarpium cultivars by supercritical CO₂ fluid extraction with ultra-high-performance liquid chromatography-Q exactive orbitrap tandem mass spectrometry.J Sep Sci,2020,43(17):3421-3440
- [11] 尹春园,张聪,孙明谦,等.HPLC-Q-TOF MS法研究3种银杏双黄酮成分的质谱裂解途径.质谱学报,2020,41(1):57-65
- [12] 蒋虎刚,赵信科,蒯文燕,等.基于HPLC-Q-TOF-MS/MS定性分析当归中多种香豆素类成分.中国实验方剂学杂志,2019,25(13):157-162
- [13] 杨掌利.浅议中药醋制作用.光明中医,2012,27(10):2123-2124
- [14] 刘小雨,冯芳.栀子大黄汤配伍变化对枳实中总柚皮素和总橙皮素药动学的影响.中国中药杂志,2014,39(13):2553-2558
- [15] Dong P,Qiu P,Zhu Y,et al.Simultaneous determination of four 5-hydroxy polymethoxyflavones by reversed-phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection. J Chromatogr A,2010,1217(5):642-647
- [16] 高苏娟,黄钿,李南薇,等.梅州蜜柚汁脱苦方法的比较.食品工业,2020,41(9):38-41

(收稿日期:2021年12月4日)