

· 化学与分析 ·

## 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的 补骨脂盐炙前后化学成分变化研究

王增绘<sup>1</sup>, 付娟<sup>1,2</sup>, 武拉斌<sup>1</sup>, 降雪<sup>3</sup>, 黄林芳<sup>1\*</sup>, 陈士林<sup>4\*</sup>

(1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193;

2. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 3. 韩国中央大学, 首尔 156-756;

4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:**探究补骨脂盐炙前后成分变化,从化学角度阐释补骨脂盐炙后缓和其“性本大燥毒”的机制。**方法:**采用超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF/MS)监测补骨脂炮制前后成分变化,结合 Markerlynx 软件分析。**结果:**补骨脂盐炙前后成分差异显著,盐炙品中补骨脂素(psoralen)、异补骨脂素(isopsoralen)、补骨脂二氢黄酮(bavachin)、补骨脂异黄酮(corylin)、异补骨脂查尔酮(isobavachalcone)、补骨脂查尔酮(bavachalcone)含量明显升高,补骨脂色酚酮(bavachromanol)、补骨脂酚(bakuchiol)含量明显下降。**结论:**补骨脂炮制前后成分变化是补骨脂盐炙后增效减毒和药性变化的物质基础。通过主成分分析法和正交偏最小二乘判别法分析盐炙前后指纹图谱的差异,得到潜在的化学标记物,鉴定为补骨脂二氢黄酮甲醚(bavachinin)、补骨脂查尔酮(bavachalcone)及补骨脂二氢黄酮(bavachin),可作为区分生品与炮制品的指标成分。本实验的研究成果对于研究补骨脂盐炙的炮制原理具有重要意义,同时也为补骨脂盐炙品药效物质基础的阐明提供了重要依据。

**[关键词]** 补骨脂; 盐炙补骨脂; 超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱; 黄酮

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0051-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160051

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140627.0947.108.html>

**[网络出版时间]** 2014-06-26 10:35

## Changes of Chemical Constituents in Psoraleae Fructus Before and After Salted Based on UPLC/Q-TOF-MS Technology

WANG Zeng-hui<sup>1</sup>, FU Juan<sup>1,2</sup>, WU La-bin<sup>1</sup>, JIANG Xue<sup>3</sup>, HUANG Lin-fang<sup>1\*</sup>, CHEN Shi-lin<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

3. Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea;

4. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** This study investigated the changes of chemical ingredient between the crude and processed Psoralea Fructus to provide scientific evidence for elucidating the reason that the toxicity of extremely dry Psoralea Fructus was alleviated after salt-processed. **Method:** Ultra-performance liquid chromatography method

**[收稿日期]** 20131025(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(81130069);国家自然科学基金面上项目(81274013);国家“重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09307-002-01);教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT1150);人事部留学人员择优项目(2009-2011)

**[第一作者]** 王增绘, 硕士, 从事药物分析研究, E-mail: zhwang1212@163.com

**[通讯作者]** \* 黄林芳, 博士, 副研究员, 从事中药资源质量评价研究, Tel: 010-57833197, E-mail: lfhuang@implad.ac.cn

\* 陈士林, 博士, 研究员, 从事生药分子鉴定研究, Tel: 010-57833197, E-mail: slchen@implad.ac.cn

(UPLC) coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry (Q-TOF/MS) was used for the analysis of the crude and the processed *Psoralea Fructus*. And the results were analyzed by Markerlynx software **Result:** There were significant differences between the crude and processed *Psoralea Fructus*. The contents of psoralen, isopsoralen, bavachin, corylin, isobavachalcone, bavachalcone showed an obvious increase, while the contents of bavachromanol and bakuchiol decreased in salt-processed *Psoralea Fructus*. This could be the material foundation for the alternation of pharmacological effects after processing. **Conclusion:** By Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA), the indicative marker, like bavachinin, bavachalcone and bavachin, could be used to identify the crude and processed *Psoralea Fructus*. The experimental results can not only be of great importance to the processing principle of salt-processed *Psoralea Fructus*, but also provide crucial basis for clarifying effective material basic of salt-processed *Psoralea Fructus*.

[**Key words**] *Psoralea Fructus*; salt-processed *Psoralea Fructus*; UPLC-Q-TOF/MS; flavone

补骨脂为豆科植物补骨脂的干燥成熟果实,性味辛、苦,温,归肾、脾经,具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的功效,外用消风祛斑。治疗肾阳不足、阳痿遗精、遗尿尿频、腰膝冷痛、肾虚作喘、五更泄泻,外用治白癜风、斑秃<sup>[1]</sup>。补骨脂中主要化学成分有香豆素、黄酮、萘酚类化合物<sup>[2-4]</sup>。补骨脂生品“性本大燥毒”,有一定燥性,有伤阴之弊端。故临床常用炮制品,盐主要成分是 NaCl,中医历代认为五味中盐欲咸,下行入肾,经盐炙药物能改变药性使其下行。补骨脂盐炙后,可缓和燥性,并可下行引药入肾,使其健脾止泻、温肾壮阳之功效更佳。中成药复方二神丸、四神丸、加味青娥丸均以盐炙补骨脂入药<sup>[5]</sup>。然而补骨脂盐炙后药性变化及增效缓燥的物质基础不清,亟待应用现代分析技术解析。

超高效液相色谱(UPLC)是近年来新兴的分析技术,有超高压、超灵敏、超高分离度的特点,在中药分析分离上具有明显优势。飞行时间串联质谱仪(Q-TOF/MS)具有高分辨率质谱,有高分辨率、高选择性、可得到精确的分子量和质谱图的特点<sup>[6]</sup>。四极杆飞行时间质谱(Q-TOF)技术可依据所测得的化合物及碎片的精确质量数对其进行确证分析,准确性较高。超高效液相色谱与质谱联用技术(UPLC-Q-TOF/MS)集高效分离能力的色谱和高分辨、高灵敏、强定性能力质谱于一体,已成为中药成分研究的最有效的分析工具之一<sup>[7]</sup>。本试验以补骨脂及其盐炙品为研究对象,结合 Markerlynx 4.1 软件进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA),探讨盐炙法对补骨脂成分的影响,试图从化学成分角度阐述盐炙补骨脂增效减毒和药性转化的科学内涵和炮制机理,为临床用药提供科学依据。

## 1 材料

Acquity UPLC-Synapt MS 色谱-质谱联用仪(包括 MassLynx V4.1 质谱工作站,美国 Waters 公司), ELGA PURELAB Classic-UVF 型纯水仪(英国)。甲醇(色谱纯, Fisher), 甲酸(色谱纯), 超纯水, 其他试剂为分析纯。

补骨脂经中国医学科学院药用植物研究所黄林芳副研究员鉴定为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实,样品保存在中国医学科学院药用植物研究所标本馆。

## 2 方法

**2.1 盐炙补骨脂制备** 将补骨脂盐水闷润(补骨脂-盐-水 25:4:10),闷润 1 h, 190 °C 烘干 35 min, 取出,冷却至室温,即得盐炙补骨脂。

**2.2 供试品溶液的制备**<sup>[1]</sup> 分别取补骨脂药材生品及盐炙品粉末(过三号筛)约 0.5 g,精密称定,置索氏提取器中,加甲醇适量,加热回流提取 2 h,放冷,转移至 100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,过滤,取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜,即得。

**2.3 超高效液相色谱条件** 采用 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温 30 °C,流速 0.25 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 2 μL,流动相 0.1% 甲酸水(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0 ~ 2 min, 95% ~ 85% A; 2 ~ 15 min, 85% ~ 0% A; 15 ~ 18 min, 0% ~ 95% A)。

**2.4 质谱条件** 采用电喷雾电离离子源(ESI),正/负离子模式检测  $m/z$  50 ~ 1 200,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 10 ~ 40 kV,离子源温度 120 °C,脱溶剂温度 450 °C,雾化气 N<sub>2</sub>,流速 60 L·h<sup>-1</sup>,脱溶剂气 N<sub>2</sub>,流速 600 L·h<sup>-1</sup>,碰撞能量(CE)30 V,质量校正质核比  $m/z$  556.0。

**2.5 数据分析** 采用 MarkerLynx 4.1 软件对正/负

离子模式下补骨脂生品和补骨脂盐炙品的质谱峰进行分析,利用主成分分析法(PCA)和正交偏最小二乘判别分析法(OPLS-DA)找出化合物谱的差异,通过分析得到潜在的化学标记物。

### 3 结果

**3.1 盐炙补骨脂及生品补骨脂总离子流图比较** 结合分析正/负离子模式下离子峰的鉴别(表1),由

补骨脂盐炙品及补骨脂生品总离子流图(图1)可见补骨脂盐炙前后化学成分变化显著。正离子模式下补骨脂盐炙品与补骨脂生品相比,盐炙品中,1,2,4,7,9,13号离子峰含量明显升高,即补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂二氢黄酮、补骨脂异黄酮、异补骨脂查尔酮、补骨脂查尔酮;5号离子峰含量明显降低,即补骨脂色酚酮。其余变化不明显。

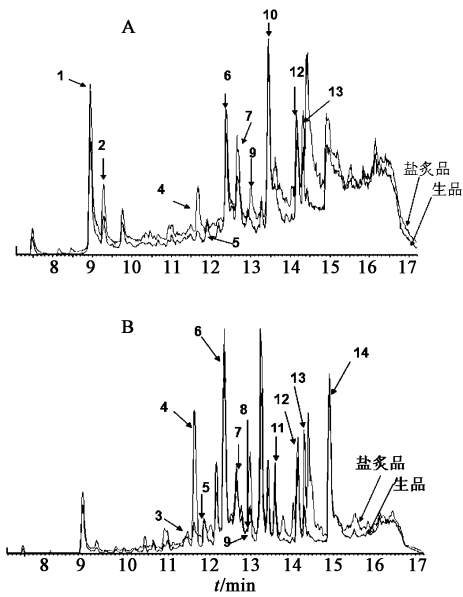
表1 正/负离子模式下离子峰鉴别

No.	$t_R$ /min	选定离子	分子式	$m/z$			化合物归属
				实际值/Da	理论值/Da	误差/ppm	
1	8.95	$[M+H]^+$	$C_{11}H_7O_3$	187.039 9	187.039 5	2.1	补骨脂素(psoralen)
2	9.28	$[M+H]^+$	$C_{11}H_7O_3$	187.040 1	187.039 5	3.2	异补骨脂素(isopsoralen)
3	11.44	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{17}O_4$	297.113 4	297.112 7	2.4	新补骨脂查尔酮(neobavachalcone)
4	11.63	$[M+H]^+$	$C_{20}H_{21}O_4$	325.145 4	325.144 0	4.3	补骨脂二氢黄酮(bavachin)
		$[M-H]^-$	$C_{20}H_{19}O_4$	323.128 7	323.128 3	1.2	
5	11.86	$[M+H]^+$	$C_{20}H_{21}O_5$	341.139 1	341.138 9	0.6	补骨脂色酚酮(bavachromanol)
		$[M-H]^-$	$C_{20}H_{19}O_5$	339.123 4	339.123 2	0.6	
6	12.35	$[M+H]^+$	$C_{20}H_{19}O_4$	323.129 1	323.128 3	2.5	补骨脂色烯查尔酮(bavachromene)
		$[M-H]^-$	$C_{20}H_{17}O_4$	321.112 8	321.112 7	0.3	
7	12.64	$[M+H]^+$	$C_{20}H_{17}O_4$	321.113 3	321.112 7	1.9	补骨脂异黄酮(corylin)
		$[M-H]^-$	$C_{20}H_{15}O_4$	319.097 6	319.097 0	1.9	
8	12.98	$[M-H]^-$	$C_{20}H_{19}O_5$	339.123 8	339.123 2	1.8	corylifol B
9	13.02	$[M+H]^+$	$C_{20}H_{21}O_4$	325.144 9	325.144 0	2.8	异补骨脂查尔酮(isobavachalcone)
		$[M-H]^-$	$C_{20}H_{19}O_4$	323.128 3	323.128 3	0	
10	13.45	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{23}O_4$	339.160 5	339.159 6	2.7	补骨脂二氢黄酮甲醚(bavachinin)
11	13.59	$[M-H]^-$	$C_{20}H_{15}O_5$	335.092 7	335.091 9	2.4	补骨脂定(psoralidin)
12	14.18	$[M+H]^+$	$C_{25}H_{27}O_4$	391.191 8	391.190 9	2.3	corylifol A
		$[M-H]^-$	$C_{25}H_{25}O_4$	389.175 4	389.175 3	0.3	
13	14.40	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{23}O_4$	339.160 9	339.159 6	3.8	补骨脂查尔酮(bavachalcone)
		$[M-H]^-$	$C_{21}H_{21}O_4$	337.144 7	337.144 0	2.1	
14	14.90	$[M-H]^-$	$C_{18}H_{23}O$	255.175 0	255.174 9	0.4	补骨脂酚(bakuchiol)

负离子模式下补骨脂盐炙品与补骨脂生品相比,盐炙品中,4,9,13号离子峰含量明显升高,即补骨脂二氢黄酮、异补骨脂查尔酮、补骨脂查尔酮;5,14号离子峰含量明显下降,即补骨脂色酚酮、补骨脂酚。其余变化不明显。

**3.2 MarkerLynx 结果分析** 主成分分析是MarkerLynx 4.1软件对补骨脂盐炙品及其生品两组数据的整体的差异性做进一步分析见图2~3。将两组样品中的化学成分峰进行正交偏最小二乘法得到散点图(图3),散点图中两组数据的差异是由炮制前后成分的含量差异造成的,由此可见盐炙前后的成分含量具有显著性差异。在S型曲线两端的数

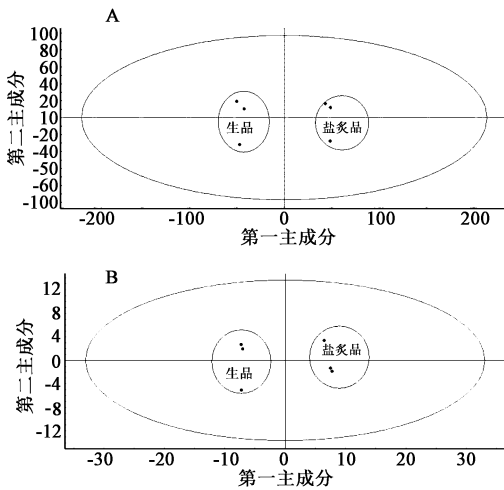
据点分别代表了样品中可置信度最高的特征化合物。右上方代表了补骨脂盐炙品中含量较高的化合物,左下方代表了补骨脂生品中含量较高的化合物。点a(13.43 min, 339.160 3), b(13.44 min, 361.141 7), c(14.17 min, 267.006 7), d(14.42 min, 339.160 1), e(15.20 min, 579.310 6), f(11.65 min, 325.144 5), g(13.81 min, 335.091 7), h(12.99 min, 339.123 5), i(13.41 min, 323.128 2), j(11.63 min, 323.128 5), k(14.02 min, 271.170 2), l(13.78 min, 271.170 2)代表了补骨脂盐炙品与生品相比差异显著的化学成分,可作为潜在的标记物,为补骨脂盐炙品与生品的鉴定提供依据。在正离子



A. 正离子流; B. 负离子流; 1~14 号峰与表 1 相对应

图 1 补骨脂及其盐炙品 UPLC-QTOF/MS 谱

模式 OPLS-DA/S-Plot 图中, a 和 d 可作为区分补骨脂盐炙品与生品最显著的标记化合物, 在负离子模式 OPLS-DA/S-Plot 图中, g 和 j 可作为区分补骨脂盐炙品与生品最显著的标记化合物。

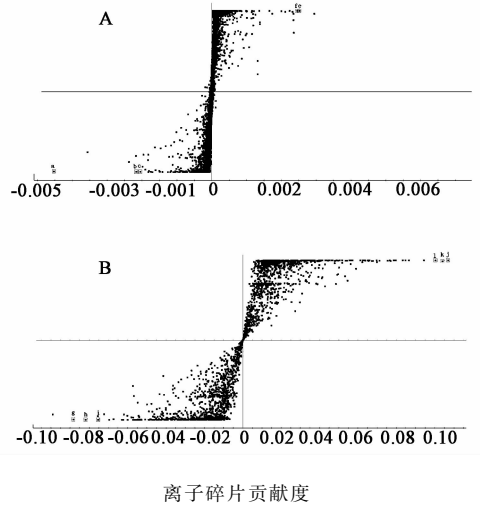


A. 正离子; B. 负离子

图 2 补骨脂生品与盐炙品正/负离子模式下正交偏最小二乘法差异成分鉴别

#### 4 讨论

中药炮制原理的核心是中药饮片炮制后其药性发生了改变, 而根源还是炮制后其内在物质基础化学成分的改变。补肾中药在传统炮制中常用盐炙, 取其咸下行入肾之意, 增强温补脾肾作用, 减低毒性, 缓和辛窜温燥之性<sup>[8]</sup>。补骨脂盐炙变化较大的成分是补骨脂素、异补骨脂素、补骨脂二氢黄酮、补



离子碎片贡献度

A. 正离子; B. 负离子

图 3 补骨脂盐炙品与炙品正交偏最小二乘法差异成分分析结果的散点图

骨脂异黄酮、异补骨脂查尔酮、补骨脂查尔酮, 主要是香豆素类和黄酮类成分, 中医指出“肾为先天之本”, 古本草记载补骨脂可补肾助阳, 这可能与现代研究补骨脂可增强免疫功能相关, 补骨脂中香豆素类和黄酮类成分结构中大多具有异戊烯基, 有抗肿瘤、抗菌、抗抑郁等多种药理作用<sup>[9]</sup>, 这可能是盐炙后燥性缓和, 温补脾肾作用增强的物质基础。

通过 PCA 和 OPLS-DA 分析结果, 区分补骨脂盐炙品与生品最显著的标记化合物为 a, d, g, j, a 是补骨脂二氢黄酮甲醚, d 是补骨脂查尔酮, j 是补骨脂二氢黄酮, 结合 UPLC-QTOF/MS 分析结果, 补骨脂查尔酮及补骨脂二氢黄酮是补骨脂盐炙后含量明显增加的成分, 可将其作为区分盐炙品与生品的指标成分。

补骨脂“性本大燥毒”最早见于《雷公炮炙论》, 现代药理学资料表明补骨脂的有效成分为补骨脂素、异补骨脂素, 有毒成分为补骨脂酚, 补骨脂酚可致肾脏病理变化, 大剂量可见进行性肾损伤。补骨脂酚在生物体内以邻位羟基桂皮酸苷的形式存在, 环合成内酯, 即有效成分补骨脂素和异补骨脂素, 炮制过程中主要关键因素是酶和高温的作用, 其中酶的作用要远远强于高温的作用。浸法可使生物体内酶活化, 把补骨脂酚酶解为补骨脂素、异补骨脂素类有效成分<sup>[10-11]</sup>。

本课题组前期对盐炙补骨脂进行了工艺优化, 建立了盐炙补骨脂新工艺(专利申请号为 2012104572674)。新工艺通过正交试验和盐炙补骨脂的炮制机制研究发现, 最佳的盐炙补骨脂的炮制

工艺为 4% 盐量,闷润 3 h,190 ℃ 下烘干 40 min。本实验同时对超高效液相色谱条件进行摸索,对流动相、体积流量、柱温、梯度相关条件进行了考察,最终确定文中的色谱条件分离度较好,基线较平稳,适合补骨脂中成分的测定。

经过 UPLC-Q-TOF/MS 分析发现,黄酮类化合物在负离子模式下检测出的峰形较好,峰的数量较多,因此建议在进行黄酮类化合物分析时,可优先选择负离子模式进行检测。

本文基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术分析了补骨脂盐炙前后化学成分变化情况,研究表明补骨脂盐炙前后成分差异显著,其成分的化学变化是盐炙后药性变化和增效的物质基础,因而可通过合理的炮制应用于临床治疗。本实验的研究成果对于研究补骨脂的炮制原理具有重要意义,也为补骨脂药效物质基础的阐明提供了重要依据,药材的主成分含量的变化也会对药效产生影响。本实验主要从盐炙后补骨脂的成分种类变化角度阐述了炮制对药效和药性的影响,进一步的主成分含量变化分析将更清晰地解释补骨脂的炮制原理。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:174.  
[2] 吉力,徐植灵. 补骨脂化学成分综述[J]. 中国中药

杂志,1995,20(2):120.  
[3] 刘桦,白焱晶,陈亚云,等. 中药补骨脂化学成分的研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(12):1410.  
[4] Ruan B, Kong L Y, Takaya Y, et al. Studies on the chemical constituents of *Psoralea corylifolia* [J]. J Asian Nat Prod Res,2007,9(1):41.  
[5] 陈杰,胡昌江,余凌英,等. 补骨脂盐炙前后对二神丸止泻作用的研究[J]. 成都中医药大学学报,2009,32(1):91.  
[6] Li S L, Lai S F, Song J Z, et al. Decocting-induced chemical transformations and global quality of Du-Shen-Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC-Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 53(4):946.  
[7] 高洋,陈海敏,徐继林,等. κ-卡拉胶寡糖的反相离子对-超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱研究[J]. 分析化学,2009,37(11):1590.  
[8] 施大文,黄德杰. 补骨脂的炮制研究-盐炙前后化学成分的比较[J]. 中成药,1989,11(2):18.  
[9] 邱蓉丽,李璘,乐巍. 补骨脂的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中药材,2010,33(10):1656.  
[10] 王淑兰. 补骨脂炮制工艺探讨[J]. 中国乡村医药杂志,2005,12(12):45.  
[11] 姚三桃,杨滨. 中药补骨脂炮制沿革的研究[J]. 基层中药杂志,1996,10(1):17.

[责任编辑 顾雪竹]

## 欢迎订阅 2015 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊(2013年扩刊版)”、“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊、美国《化学文摘》统计源期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创建于1995年10月,主要设置栏目:学术专论、综述、工艺与制剂、化学与分析、药物代谢、药理、毒理、临床、数据挖掘等。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊现为半月刊,16开本,242页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。每期定价35元,全年840元。国内外公开发行,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:SM4655,欢迎订阅。本刊编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街16号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:syfjx\_2010@188.com,网址:www.syfjxzz.com。