

基于UPLC-Q-TOF-MS的建昌帮砂仁陈皮制熟地黄 适宜炮制时间分析

雷星¹, 王小平², 张艳¹, 李凤琴¹, 高亚珍¹, 温伟接¹, 徐杨洋¹, 管彦涵¹, 杨明^{1*}, 王芳^{1*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 漳州卫生职业学院, 福建漳州 363000)

[摘要] 目的:研究建昌帮砂仁陈皮制熟地黄炮制过程中差异代谢物和苷类分解产物还原糖的相对含量变化,为揭示该特色品种的炮制原理奠定基础。方法:以建昌帮砂仁陈皮制熟地黄的0~54 h炮制过程样品为研究对象,运用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)检测其二级代谢产物,以0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~1 min, 1%~3%B; 1~10 min, 3%~9%B; 10~15 min, 9%~12%B; 15~22 min, 12%~18%B; 22~31 min, 18%~24%B; 31~35 min, 24%~100%B; 35~36 min, 100%~5%B; 36~40 min, 5%~1%B; 40~45 min, 1%B),柱温40℃,进样量3 μL,流速0.3 mL·min⁻¹;运用电喷雾离子源(ESI),在负离子模式下进行扫描并采集MS数据,扫描范围 m/z 50~1 250,利用PeakView 1.2进行数据分析,结合文献信息及化学成分数据库对砂仁陈皮制熟地黄化学成分进行鉴定;MS数据通过MarkerView 1.2归一化处理后应用多元统计分析方法找出差异代谢物,分析差异代谢物相对含量随炮制时间不同的变化规律,最后对各差异代谢物之间进行相关性分析,并结合还原糖含量变化情况,确定建昌帮砂仁陈皮制熟地黄的最适宜炮制时间。结果:从砂仁陈皮制熟地黄不同炮制时间样品中共鉴定121个化合物,通过多元统计分析筛选出梓醇、橙皮苷、异类叶升麻苷、毛蕊花糖苷、芸香柚皮苷、松果菊苷、异地黄苷、脱咖啡酰基毛蕊花糖苷、6-*O*-*E*-阿魏酰基筋骨草醇、二羟基-7-*O*-新橙皮苷、焦地黄苯乙醇苷D、地黄苦苷12个差异代谢物。随炮制时间的延长,这12个差异代谢物和还原糖的相对含量在52~54 h变化幅度较小。结论:利用UPLC-Q-TOF-MS可以全面、精确地辨识不同炮制时间砂仁陈皮制熟地黄的化学成分,根据差异代谢物和还原糖相对含量变化确定其适宜炮制时间为52~54 h,为揭示该品种炮制原理的科学内涵提供了实验依据。

[关键词] 中药炮制; 砂仁陈皮制熟地黄; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS); 差异代谢物; 化学成分; 炮制时间; 相关性分析

[中图分类号] R22;R28;R943.1;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2023)04-0134-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221048 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220922.1817.004.html>

[网络出版日期] 2022-09-26 10:59:32

Analysis of Suitable Processing Time of *Rehmanniae Radix Praeparata* Processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium* Based on UPLC-Q-TOF-MS

LEI Xing¹, WANG Xiaoping², ZHANG Yan¹, LI Fengqin¹, GAO Yazhen¹, WEN Weijie¹, XU Yangyang¹,
GUAN Yanhan¹, YANG Ming^{1*}, WANG Fang^{1*}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Zhangzhou Health Vocational College, Zhangzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the relative content changes of differential metabolites and

[收稿日期] 2022-06-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81960714);江西中医药大学校级科技创新团队发展计划项目(CXTD-22004);江西省自然科学基金项目(20212BAB216008);福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划项目(闽教科[2017]52号);漳州卫生职业学院科技创新团队项目(kjcx-5);江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC21S52)

[第一作者] 雷星,在读硕士,从事中药炮制研究,E-mail:joexing0917@163.com

[通信作者] * 杨明,博士,教授,从事中药炮制学研究,Tel:0711-87118718,E-mail:yangming16@126.com;

* 王芳,博士,副教授,从事中药炮制学研究,Tel:0711-87118645,E-mail:cat689apple@163.com

reducing sugars during the processing process of Rehmanniae Radix Praeparata (RRP) processed with Amomi Fructus (AF) and Citri Reticulatae Pericarpium (CRP), and to lay the foundation for revealing the processing principle of this characteristic variety. **Method:** The samples of the 0-54 h processing process of RRP processed with AF and CRP were taken as the research object, and their secondary metabolites were detected by ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). The 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) was used as the mobile phase for gradient elution (0-1 min, 1%-3%B; 1-10 min, 3%-9%B; 10-15 min, 9%-12%B; 15-22 min, 12%-18%B; 22-31 min, 18%-24%B; 31-35 min, 24%-100%B; 35-36 min, 100%-5%B; 36-40 min, 5%-1%B; 40-45 min, 1%B), column temperature was 40 °C, injection volume was 3 μL, flow rate was 0.3 mL·min⁻¹. Electrospray ionization (ESI) was used to scan and collect MS data in the negative ion mode, the scanning range was *m/z* 50-1 250. Data analysis was carried out using PeakView 1.2 software, and the chemical composition of RRP processed with AF and CRP was identified by combining the literature information and chemical composition databases. The MS data were normalized by MarkerView 1.2, and then the multivariate statistical analysis was applied to screen the differential metabolites, and the changes of the relative contents of the differential metabolites with different processing times was analyzed, finally, correlation analysis was performed between the differential metabolites, the change of the reducing sugar content was combined to determine the most suitable processing time of RRP processed with AF and CRP. **Result:** A total of 121 compounds were identified from RRP processed with AF and CRP at different processing times, and 12 differential metabolites were screened out by multivariate statistical analysis, including catalpol, hesperidin, isoacteoside, acteoside, narirutin, echinacoside, isomartynoside, decaffeoylacteoside, 6-*O-E*-feruloylajugol, dihydroxy-7-*O*-neohesperidin, jionoside D, and rehmapicroside. With the prolongation of processing time, the relative contents of these 12 differential metabolites and reducing sugars changed slightly at 52-54 h. **Conclusion:** UPLC-Q-TOF-MS can comprehensively and accurately identify the chemical constituents of RRP processed with AF and CRP at different processing times, and the suitable processing time of 52-54 h is determined according to the content changes of different metabolites and reducing sugars, which provides a basis for revealing the scientific connotation of the processing principle of this variety.

[Keywords] traditional Chinese medicine processing; Rehmanniae Radix Praeparata processed with Amomi Fructus and Citri Reticulatae Pericarpium; ultra performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS); differential metabolites; chemical composition; processing time; correlation analysis

地黄始载于《神农本草经》，味甘，性寒，其在2020年版《中华人民共和国药典》收录的规格有生品和熟制品，其中熟制品由生品经酒炖或蒸制而成，味甘，性微温，具有滋阴补血、益精填髓的功效，用于血虚萎黄、心悸怔忡、月经不调等^[1-2]。然而，熟地黄质厚味浓，易于助湿生痰，有碍脾胃消化吸收，用后常见胃纳欠佳、腹胀、便溏等现象，因此在一定程度上限制了其临床应用^[3]。古代医家极其重视“疏地黄之滞”，在使用时或配伍芳香行气之药，如《本草通玄》记载：“熟地性滞，需佐以砂仁、沉香二味，纳气归肾，疏地黄之滞”，或选用特殊方法炮制的熟地黄，如砂仁制、砂仁沉香制、砂仁陈皮制等^[4]，砂仁陈皮制熟地黄是建昌帮药汁制特色品种，具有

“气味纯真而独厚，补血而不凝滞”独特品质，其传统工艺为以砂仁、陈皮为辅料，放入药罐中加黄酒共同炖制，借陈皮味苦性温和砂仁香燥之性，以疏地黄之滞，健脾行滞，更好地发挥滋阴补血之功效^[5-6]。本课题组前期研究发现^[3,7]，砂仁、陈皮对熟地黄组分、药效影响显著，砂仁陈皮制熟地黄的药效优于清蒸品和酒炖品，但其炮制机制不清、标准不明，限制了临床应用和产业化生产。

陈嘉谟在《本草蒙筌》中提出“凡药制造，贵在适中，不及则功效难求，太过则气味反失”，可见只有准确掌握炮制技术和炮制程度，合理运用炮制方法，才能使饮片发挥最大疗效^[8]。目前，关于砂仁陈皮制熟地黄适宜炮制时间的研究主要是采用高效

液相色谱法测定个别指标成分含量来确定^[7],但该方法忽略了炮制前后其他成分的含量变化,不能科学地评价建昌帮砂仁陈皮制熟地黄炮制过程中次级代谢物的动态变化规律,存在一定的局限性。近年来,超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)在中药炮制领域应用日益广泛,为中药质量评价提供了新思路、新技术^[9]。基于此,本研究从整体出发,利用UPLC-Q-TOF-MS考察建昌帮砂仁陈皮制熟地黄中化学成分动态变化过程,对不同炮制时间样品进行分析,应用多元统计分析找出差异代谢物,分析差异代谢物相对含量随炮制时间变化的规律,最后对各差异代谢物进行相关性分析,并结合还原糖含量变化情况,确定砂仁陈皮制熟地黄的最适宜炮制时间,以期为该建昌帮药汁制特色品种的炮制工艺制定提供参考。

1 材料

BT224S型1/10万电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),EL104型1/1万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司),RS-FS553型多功能粉碎机(合肥荣事达小家电有限公司),C-15R型高速冷冻离心机(德国NACHT公司),Triple-TOF[®] 5600⁺型高分辨质谱仪(美国AB SCIEX公司),LC-30AD型超高效液相色谱仪(日本岛津公司),UPC-I-30T型超纯水机(四川优普超纯科技有限公司)。

地黄苷D、密力特苷、益母草苷、橙皮苷、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、京尼平苷、地黄苷C、桃叶珊瑚苷对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号分别为21011404、21012502、20122301、21060909、20122101、19092702、19101705、21071603、19122404,纯度均>98.0%),5-羟甲基糠醛、梓醇对照品(成都埃法生物科技有限公司,批号分别为21030751、20011701,纯度均>98.0%),黄酒(浙江塔牌绍兴酒有限公司,产品标准号GB/T13662,批号20170901),水为超纯水,甲酸为质谱纯,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。生地黄(江西江中中药饮片有限公司,批号190910),砂仁(亳州精草中药饮片有限公司,批号2009134),陈皮(安徽益生源中药饮片科技有限公司,批号200801-2),以上饮片均经江西中医药大学葛菲教授鉴定,分别为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* 的干燥块根,姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* 的干燥成熟果实,芸香科植物橘 *Citrus reticulata* 的干燥成熟果皮。

2 方法与结果

2.1 砂仁陈皮制熟地黄的制备 按文献^[7]记载方

法制备砂仁陈皮制熟地黄的不同炮制时间样品S1~S12,粉碎过三号筛,备用,具体见表1。

表1 砂仁陈皮制熟地黄的不同炮制时间样品信息

Table 1 Sample information of *Rehmanniae Radix Praeparata* (RRP) processed with *Amomi Fructus* (AF) and *Citri Reticulatae Pericarpium* (CRP) at different processing times

样品编号	炮制时间/h	样品编号	炮制时间/h
S1	0	S7	36
S2	6	S8	42
S3	12	S9	48
S4	18	S10	50
S5	24	S11	52
S6	30	S12	54

2.2 供试品溶液的制备 取样品S1~S12约2.0 g,精密称定,置于250 mL具塞锥形瓶中,精密加入甲醇40 mL,称定质量,浸泡1 h,超声处理1 h(500 W,40 kHz),定性滤纸过滤,将续滤液蒸干,残渣加水-乙腈(9:1)使溶解并定容至5 mL,于12 000 r·min⁻¹、4 °C离心15 min(离心半径7.55 cm),经0.22 μm微孔滤膜过滤,每份样品平行6份,待测。所有待测样品溶液各取10 μL制成质量控制(QC)样品。进样前运行2个QC样品以使仪器稳定,每进10个样品运行1次QC样品,以监测仪器的稳定性和重复性。

2.3 对照品溶液制备 取梓醇、地黄苷D、益母草苷、毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、密力特苷、京尼平苷、5-羟甲基糠醛、橙皮苷、桃叶珊瑚苷、地黄苷C对照品适量,精密称定,置于量瓶中,加50%甲醇制成质量浓度均为0.2 g·L⁻¹的混合对照品溶液。

2.4 色谱条件 Welch Ultimate UHPLC XB-C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),柱温40 °C,流速0.3 mL·min⁻¹,进样量3 μL,以0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)为流动相进行梯度洗脱(0~1 min,1%~3%B;1~10 min,3%~9%B;10~15 min,9%~12%B;15~22 min,12%~18%B;22~31 min,18%~24%B;31~35 min,24%~100%B;35~36 min,100%~5%B;36~40 min,5%~1%B;40~45 min,1%B)。

2.5 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),负离子模式下采集数据,喷雾电压-4.5 kV,脱溶剂气温度550 °C,去簇电压-60 V,碰撞能量-35 V,碰撞能量加减范围-15 V。雾化气体为氮气(N₂),雾化气流速、脱溶剂气流速均为55 mL·min⁻¹,气帘气流速为35 mL·min⁻¹,扫描范围 *m/z* 50~1 250。扫描方式为母离子触发的子离子,多重质量亏损过滤(MMDF)

和动态背景扣除(DBS)为触发二级的条件,满足该条件的优先进行二级扫描。

2.6 不同炮制时间样品的代谢物分析 为筛选砂仁陈皮制熟地黄炮制过程中的差异代谢物,将供试品溶液、对照品溶液按2.4和2.5项下条件进行检测,结果发现在0~54 h炮制过程中,砂仁陈皮制熟

地黄中的化学成分种类基本相同,但含量有所差异,总离子流图见增强出版附加材料。通过总离子流图中的保留时间(t_R)、准分子离子及碎片离子,并结合对照品、MassBank数据库、人类代谢数据库(HMDB)及文献信息^[9-15],从砂仁陈皮制熟地黄样品中共鉴定出121个成分,见表2。

表2 砂仁陈皮制熟地黄中化学成分的UPLC-Q-TOF-MS鉴定

Table 2 Identification of chemical components in RRP processed with AF and CRP by UPLC-Q-TOF-MS

化合物	t_R /min	名称	类别	分子式	δ /ppm	离子模式	准分子离子 m/z	碎片离子 m/z
1	0.90	精氨酸	氨基酸类	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	-1.3	[M-H] ⁻	173.105 0	156.078 1, 130.675 8
2	1.06	葡萄糖	糖类	C ₆ H ₁₂ O ₆	-1.4	[M-H] ⁻	179.055 7	89.026 7, 71.017 5, 59.019 1
3	1.13	水苏糖	糖类	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	0.8	[M-H] ⁻	665.220 9	383.120 2, 341.108 7, 179.054 8
4	1.17	肌苷	核苷类	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	-4.4	[M-H] ⁻	267.072 0	221.063 9, 119.034 9, 89.026 2, 59.018 2
5	1.19	甘露三糖	糖类	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	3.7	[M-H] ⁻	503.165 8	443.142 6, 383.121 3, 341.109 4, 221.065 1
6	1.26	DL-苹果酸	有机酸类	C ₄ H ₆ O ₅	3.1	[M-H] ⁻	133.013 8	115.003 9, 89.026 2, 71.017 7
7	1.35	毛蕊花糖	糖类	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	4.7	[M-H] ⁻	827.281 4	665.223 7, 485.156 1, 383.121 4, 341.108 2, 179.055 5, 113.022 8
8	1.46	5-羟甲基糠醛 ¹⁾	呋喃类	C ₆ H ₆ O ₃	0.2	[M-H] ⁻	125.022 8	97.029 1, 55.027 3
9	1.61	蔗糖	糖类	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-1.1	[M-H] ⁻	341.109 0	212.095 8, 181.074 4, 161.046 9, 113.031 5, 96.963 2
10	1.83	柠檬酸	有机酸类	C ₆ H ₈ O ₇	-0.8	[M-H] ⁻	191.020 0	173.008 1, 129.018 8, 111.008 4
11	2.43	蜜二糖	糖类	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	1.5	[M-H] ⁻	341.108 4	297.091 7, 161.044 0, 143.033 7, 119.035 7
12	2.82	对羟基肉桂酸	有机酸类	C ₉ H ₈ O ₃	-0.9	[M-H] ⁻	163.039 2	119.053 0, 99.922 6, 61.987 9
13	2.83	梓醇 ¹⁾	环烯醚萜苷类	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	-0.4	[M+COOH] ⁻	407.140 4	361.116 1, 343.112 8, 199.059 7, 181.049 4, 169.049 2, 137.023 4, 127.038 8
14	2.84	亮氨酸	氨基酸类	C ₆ H ₁₃ NO ₂	-0.7	[M-H] ⁻	130.087 8	88.040 5, 61.994 6
15	2.85	二氢梓醇	环烯醚萜苷类	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀	1.3	[M+COOH] ⁻	409.149 3	363.122 0, 201.076 7, 183.065 6, 171.064 9
16	2.90	地黄素C	环烯醚萜类	C ₉ H ₁₂ O ₅	0.1	[M-H] ⁻	199.063 7	155.033 8, 137.060 5, 109.032 0
17	2.92	果糖	糖类	C ₆ H ₁₂ O ₆	-1.1	[M-H] ⁻	179.056 1	113.023 9, 101.026 4, 95.016 1, 89.026 0
18	2.98	腺嘌呤	核苷类	C ₅ H ₅ N ₅	0.6	[M-H] ⁻	134.048 6	107.039 0, 92.035 3, 65.020 8
19	3.14	棉子糖	糖类	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	1.2	[M-H] ⁻	503.158 1	485.176 1, 383.123 4, 341.108 4, 323.109 9, 210.070 6, 179.052 7, 161.054 1
20	3.33	鸟苷	核苷类	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	0.8	[M-H] ⁻	282.084 3	238.069 6, 150.041 4, 133.014 7, 108.020 8
21	3.48	L-酪氨酸	氨基酸类	C ₉ H ₁₁ NO ₃	-0.9	[M-H] ⁻	180.065 2	163.060 8, 136.036 6, 92.967 7
22	3.75	半乳糖	糖类	C ₆ H ₁₂ O ₆	-1.1	[M-H] ⁻	179.055 7	135.046 9, 113.023 9, 89.026 0, 71.016 3
23	3.76	成分A	呋喃类	C ₁₈ H ₂₆ O ₁₃	4.4	[M-H] ⁻	449.135 2	287.077 1
24	3.78	3,5-二羟基-3-甲基戊酸	有机酸类	C ₆ H ₁₂ O ₄	-0.8	[M-H] ⁻	147.065 8	87.006 9, 75.010 7, 72.995 8, 61.990 7, 57.024 8
25	4.07	桃叶珊瑚苷 ¹⁾	环烯醚萜苷类	C ₁₅ H ₂₂ O ₉	3.0	[M+COOH] ⁻	391.154 7	345.115 4, 229.072 2, 185.080 2, 165.054 9, 149.060 5, 123.045 1
26	4.33	L-苯丙氨酸	氨基酸类	C ₉ H ₁₁ NO ₂	0.5	[M-H] ⁻	164.074 5	147.046 5, 103.058 7
27	5.23	地黄苷D ¹⁾	环烯醚萜苷类	C ₂₇ H ₄₂ O ₂₀	5.0	[M-H] ⁻	685.227 4	505.162 1, 341.111 2, 179.055 8
28	5.29	原儿茶酸	酚酸类	C ₇ H ₆ O ₄	-0.1	[M-H] ⁻	153.019 3	109.029 7, 108.021 8
29	5.44	密力特苷 ¹⁾	环烯醚萜苷类	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₅	2.2	[M-H] ⁻	523.169 1	361.106 8, 343.113 2, 179.055 0
30	5.47	成分B	环烯醚萜苷类	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₅	1.9	[M+COOH] ⁻	569.174 8	361.115 3, 343.103 9, 179.055 3
31	6.41	京尼平苷 ¹⁾	环烯醚萜苷类	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	1.8	[M-H] ⁻	387.130 5	225.075 9, 179.054 9

续表 2

化合物	t_R/min	名称	类别	分子式	δ/ppm	离子模式	准分子离子 m/z	碎片离子 m/z
32	6.46	红景天苷	苯乙醇苷类	$C_{14}H_{20}O_7$	-1.4	$[M-H]^-$	299.076 9	179.035 9
33	6.61	地黄苷 ^{C1)}	环烯醚萜苷类	$C_{21}H_{34}O_{14}$	1.4	$[M-H]^-$	509.191 2	463.107 3、179.055 2、161.043 9
34	7.10	-	-	$C_{11}H_{11}NO_5$	-0.7	$[M-H]^-$	236.055 6	192.065 4、164.071 0、67.022 7
35	7.13	对苯二酚	其他	$C_6H_6O_2$	0.8	$[M-H]^-$	109.029 6	84.913 9、41.023 4
36	7.15	苯丙氨酸	氨基酸类	$C_9H_{11}NO_2$	-0.5	$[M-H]^-$	164.064 4	118.400 5、103.000 1、92.200 7、77.100 7、42.300 2
37	7.32	原儿茶醛	酚酸类	$C_7H_6O_3$	-1.1	$[M-H]^-$	137.024 1	109.028 6
38	7.44	kankanoside F	苯乙醇苷类	$C_{26}H_{40}O_{17}$	3.3	$[M-H]^-$	623.212 7	477.165 8
39	7.56	二氢马鞭草苷	环烯醚萜苷类	$C_{17}H_{26}O_{10}$	3.9	$[M-H]^-$	389.147 4	227.091 5、167.016 2、101.024 3
40	7.66	5,7-二羟基-1(3H)-异苯并呋喃酮	其他	$C_8H_6O_4$	-1.0	$[M-H]^-$	165.018 9	121.028 7、93.035 5、65.006 6
41	7.73	水晶兰苷	环烯醚萜苷类	$C_{16}H_{22}O_{11}$	0.3	$[M-H]^-$	389.110 5	345.119 5
42	7.77	焦地黄呋喃	环烯醚萜类	$C_9H_{12}O_4$	-0.4	$[M-H]^-$	183.065 6	137.023 6、121.071 9、93.035 3
43	7.89	益母草苷 ¹⁾	环烯醚萜苷类	$C_{15}H_{24}O_9$	1.1	$[M-H]^-$	347.138 4	167.069 7
44	8.00	玉叶金花苷酸	环烯醚萜苷类	$C_{16}H_{24}O_{10}$	0.9	$[M-H]^-$	375.131 9	213.076 7、195.065 3、179.055 6、169.086 7
45	8.36	脱咖啡酰基毛蕊花糖苷	苯乙醇苷类	$C_{20}H_{30}O_{12}$	3.0	$[M-H]^-$	461.167 8	315.109 4、297.098 3、161.045 1、135.045 1
46	8.65	8-表番木鳖酸	环烯醚萜苷类	$C_{16}H_{24}O_{10}$	0.3	$[M-H]^-$	375.131 9	213.076 7、195.067 5、179.055 6、169.086 7、151.076 2
47	8.81	栀子新苷	环烯醚萜苷类	$C_{16}H_{22}O_{10}$	0.5	$[M-H]^-$	373.114 0	211.056 1、179.028 7、149.059 2、123.044 5
48	9.29	frehmaglutin A	紫罗兰酮类	$C_{15}H_{24}O_6$	0.5	$[M-H]^-$	299.150 2	183.101 8、139.111 9
49	9.45	异肉苁蓉苷 F	苯乙醇苷类	$C_{21}H_{28}O_{13}$	4.3	$[M-H]^-$	487.149 9	179.035 3、161.023 6
50	9.79	香草醛	其他	$C_8H_8O_3$	0.1	$[M-H]^-$	151.040 2	136.020 8、121.029 3、105.055 5
51	10.15	栀子酸	环烯醚萜苷类	$C_{16}H_{22}O_{10}$	-0.5	$[M-H]^-$	373.115 6	211.060 0、193.049 1、167.071 4
52	10.26	阿魏酸	苯丙素类	$C_{10}H_{10}O_4$	-1.8	$[M-H]^-$	193.054 5	178.025 3、149.063 0、133.028 9
53	10.59	肉苁蓉苷 F	苯乙醇苷类	$C_{21}H_{28}O_{13}$	1.5	$[M-H]^-$	487.148 1	325.091 6、179.035 3、161.023 6
54	10.87	香草酸	酚酸类	$C_8H_8O_4$	1.4	$[M-H]^-$	167.034 9	152.012 2、108.023 1、125.024 4
55	11.11	地黄新萜 E	紫罗兰酮类	$C_{21}H_{34}O_{10}$	3.7	$[M-H]^-$	445.212 1	265.144 6、161.045 0
56	12.61	5-羟基野菰酸	紫罗兰酮类	$C_{15}H_{24}O_5$	0.8	$[M-H]^-$	283.154 7	183.101 6、153.090 6、139.111 4
57	12.65	-	-	$C_{21}H_{28}O_{13}$	1.4	$[M-H]^-$	487.147 8	323.078 5、179.034 6、161.024 0、135.045 2、133.027 8
58	13.46	筋骨草苷	环烯醚萜苷类	$C_{17}H_{26}O_{10}$	2.8	$[M-H]^-$	389.147 4	343.118 1、321.026 5、229.039 0、197.124 6、139.039 8、116.929 2、61.987 5
59	13.72	darendoside A	苯乙醇苷类	$C_{19}H_{28}O_{11}$	0.9	$[M-H]^-$	431.158 9	293.124 3、161.039 8、137.016 5
60	14.28	4-甲氧基肉桂酸	苯丙烷类	$C_{10}H_{10}O_3$	-0.4	$[M-H]^-$	177.055 4	176.498 7、131.051 0、105.070 2
61	14.49	地黄苦苷	紫罗兰酮类	$C_{16}H_{26}O_8$	-1.0	$[M-H]^-$	345.157 8	179.055 8、165.094 1、119.034 5
62	14.52	姜黄素	黄酮类	$C_{21}H_{20}O_6$	-2.6	$[M-H]^-$	367.117 7	217.052 2、202.028 3、161.023 8、158.038 6、149.061 0、132.022 5
63	14.94	地黄新萜 F	紫罗兰酮类	$C_{21}H_{34}O_{10}$	4.8	$[M-H]^-$	445.211 0	265.144 7、235.133 2、191.141 3、113.024 2
64	15.48	地黄新苷 D	环烯醚萜苷类	$C_{23}H_{31}NO_{11}$	1.1	$[M-H]^-$	496.185 0	166.049 6、122.060 9
65	15.79	地黄新萜 B	紫罗兰酮类	$C_{15}H_{24}O_6$	-0.7	$[M-H]^-$	299.155 5	183.102 6、139.112 1
66	15.86	oxyrehmaionoside B	紫罗兰单萜类	$C_{19}H_{34}O_9$	0.1	$[M-H]^-$	405.208 1	243.161 6、213.148 1、161.039 4
67	15.89	1-羟基-2,6,6-三甲基-2-环己烯羧酸	有机酸类	$C_{10}H_{16}O_3$	0.1	$[M-H]^-$	183.101 3	137.096 9、83.049 0
68	15.93	羟基栀子苷	环烯醚萜苷类	$C_{17}H_{24}O_{11}$	0.2	$[M-H]^-$	403.124 6	371.100 9、223.060 0、165.054 7

续表 2

化合物	t_R /min	名称	类别	分子式	δ /ppm	离子模式	准分子离子 m/z	碎片离子 m/z
69	16.05	异阿魏酸	苯丙素类	$C_{10}H_{10}O_4$	-0.9	$[M-H]^-$	193.050 2	175.036 9、163.042 0、149.059 4、71.020 8
70	16.57	山柰酚-3- <i>O</i> -新橙皮糖苷	黄酮类	$C_{27}H_{30}O_{15}$	1.9	$[M-H]^-$	593.157 8	575.147 4、503.124 7、473.113 7、383.079 9、353.068 5、191.037 3
71	17.85	芦丁-2,4'-甲醚	黄酮类	$C_{28}H_{32}O_{16}$	4.9	$[M-H]^-$	623.169 6	533.136 6、503.123 9、413.089 4、383.077 8
72	18.09	柚皮素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	黄酮类	$C_{21}H_{22}O_{10}$	3.9	$[M-H]^-$	433.116 8	271.060 5、151.007 3
73	18.71	松果菊苷	苯乙醇苷类	$C_{35}H_{46}O_{20}$	4.6	$[M-H]^-$	785.262 4	623.227 6、161.02 3
74	18.89	对羟基苯甲酸	酚酸类	$C_7H_6O_3$	-1.1	$[M-H]^-$	137.024 1	136.599 3、92.028 4、75.091 0、65.006 0
75	19.34	6- <i>O</i> -香草酰基筋骨草醇	环烯醚萜类	$C_{23}H_{30}O_{12}$	0.7	$[M-H]^-$	497.171 3	167.034 2、123.045 6
76	20.10	-	-	$C_{15}H_{11}NO_4$	0.7	$[M-H]^-$	268.060 9	222.055 5、143.038 0
77	20.59	橘皮素	黄酮类	$C_{20}H_{20}O_7$	2.2	$[M-H]^-$	371.081 9	356.092 0、341.103 2、209.022 9、119.051 2
78	20.98	地黄苷 A	环烯醚萜苷类	$C_{21}H_{32}O_{15}$	1.8	$[M-H]^-$	523.171 5	361.117 5、199.060 8、181.051 6、179.055 0、161.045 2、119.034 4、101.025 8
79	21.06	地黄苷 B	环烯醚萜苷类	$C_{19}H_{34}O_8$	1.3	$[M+COOH]^-$	435.226 9	389.220 8、179.055 3、161.045 2
80	21.95	二羟基-7- <i>O</i> -新橙皮苷	黄酮类	$C_{27}H_{32}O_{15}$	4.6	$[M-H]^-$	595.173 3	287.054 7、151.003 1、135.044 4
81	22.28	6- <i>O</i> - <i>E</i> -阿魏酰基筋骨草醇	环烯醚萜类	$C_{25}H_{32}O_{12}$	1.3	$[M-H]^-$	523.183 7	361.130 1、193.049 9、175.038 3
82	22.36	川陈皮素	黄酮类	$C_{21}H_{22}O_8$	4.7	$[M-H]^-$	401.135 3	371.113 7、357.134 3、233.040 4
83	22.78	6- <i>O</i> -对羟基苯甲酰桃叶珊瑚苷	环烯醚萜苷类	$C_{22}H_{26}O_{11}$	2.4	$[M+COOH]^-$	511.148 6	465.247 7、306.924 9、238.927 0、179.055 6
84	23.15	毛蕊花糖苷 ¹⁾	苯乙醇苷类	$C_{29}H_{36}O_{15}$	2.9	$[M-H]^-$	623.206 6	461.169 7、315.110 6、161.023 8
85	23.73	柚皮素	黄酮类	$C_{15}H_{12}O_5$	0.9	$[M-H]^-$	271.076 4	117.928 9
86	24.14	6- <i>O</i> - <i>E</i> -咖啡酰基葡萄糖苷	苯乙醇苷类	$C_{24}H_{30}O_{12}$	1.3	$[M-H]^-$	509.174 5	347.112 5、179.033 0、161.023 2
87	24.34	焦地黄苯乙醇苷 B ₁	苯乙醇苷类	$C_{37}H_{50}O_{20}$	4.2	$[M-H]^-$	813.293 7	637.242 6、491.180 4、175.039 3、160.015 7
88	24.50	槲皮苷	黄酮类	$C_{21}H_{20}O_{11}$	1.0	$[M-H]^-$	447.098 2	301.037 7、271.028 1、255.029 7、178.998 3、151.004 9
89	24.61	异类叶升麻苷 ¹⁾	苯乙醇苷类	$C_{29}H_{36}O_{15}$	2.5	$[M-H]^-$	623.206 6	461.169 7、315.110 6、179.035 0、161.023 7、135.045 1
90	24.70	芸香柚皮苷	黄酮类	$C_{27}H_{32}O_{14}$	2.2	$[M-H]^-$	579.179 1	313.074 0、271.060 6、151.003 0
91	24.79	金腰乙素	黄酮类	$C_{19}H_{18}O_8$	0.9	$[M-H]^-$	373.083 2	327.148 8、271.057 4、215.065 8、145.943 5
92	25.75	橙皮苷 ¹⁾	黄酮类	$C_{28}H_{34}O_{15}$	1.5	$[M-H]^-$	609.188 2	325.070 3、301.069 6、286.047 4
93	25.81	5,7-二羟基-6,8,4'-三甲氧基黄酮	黄酮类	$C_{18}H_{16}O_7$	0.6	$[M-H]^-$	343.085 8	298.012 2、203.070 7、198.032 0、173.060 7
94	25.83	橙皮素	黄酮类	$C_{16}H_{14}O_6$	1.6	$[M-H]^-$	301.073 2	285.042 7、217.050 8、171.028 9、151.004 5
95	25.88	3- <i>O</i> -甲基槲皮素	黄酮类	$C_{16}H_{12}O_7$	0.9	$[M-H]^-$	315.047 7	300.0343、269.151 7、136.112 7
96	26.09	3',5,7-三羟基-4'-甲氧基黄酮-7-芸香糖苷	黄酮类	$C_{28}H_{32}O_{15}$	2.9	$[M-H]^-$	607.176 1	299.055 8
97	26.48	焦地黄苯乙醇苷 D	苯乙醇苷类	$C_{30}H_{38}O_{15}$	3.7	$[M-H]^-$	637.220 2	461.168 9、175.039 4、161.023 7
98	26.76	地黄新萜 D	紫罗兰酮类	$C_{21}H_{34}O_9$	0.0	$[M-H]^-$	429.215 4	267.159 3、249.149 1、231.137 8
99	26.91	6- <i>O</i> -对香酰基筋骨草醇	环烯醚萜类	$C_{24}H_{30}O_{11}$	0.7	$[M-H]^-$	493.175 1	331.120 5、163.039 2、119.049 8
100	27.33	柠檬黄素	黄酮类	$C_{17}H_{14}O_8$	-4.2	$[M-H]^-$	345.234 6	330.103 7、179.028 0、165.094 2、149.037 2、121.100 6
101	27.47	米团花苷 A	苯乙醇苷类	$C_{30}H_{38}O_{15}$	3.0	$[M-H]^-$	637.224 0	461.167 9、175.039 2
102	28.18	5-阿魏-益母草苷	环烯醚萜苷类	$C_{25}H_{32}O_{12}$	0.7	$[M-H]^-$	523.183 4	343.112 4、193.048 3、175.037 8、160.014 7、134.037 7

续表 2

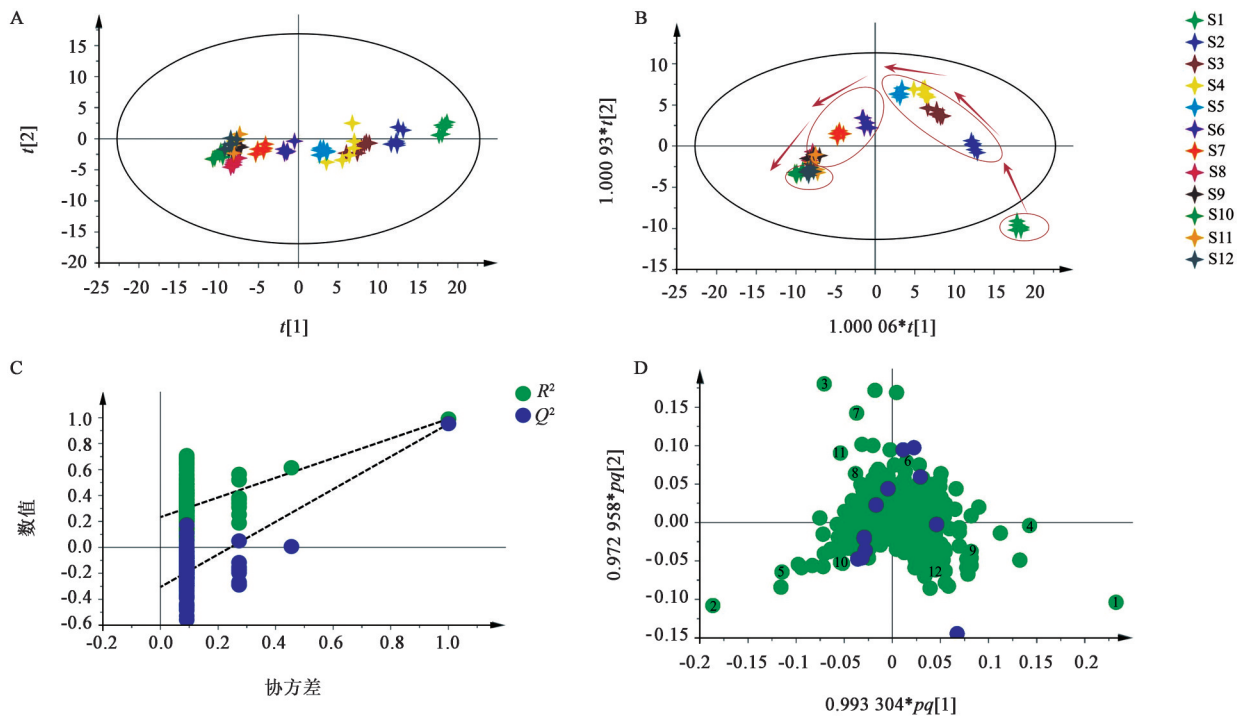
化合物	t_R/min	名称	类别	分子式	δ/ppm	离子模式	准分子离子 m/z	碎片离子 m/z
103	28.63	成分 C	环烯醚萜苷类	$C_{35}H_{44}O_{16}$	4.6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	719.264 8	523.187 2、341.103 9、193.049 9
104	30.40	地黄新苷 I	环烯醚萜苷类	$C_{36}H_{36}O_{17}$	4.7	$[\text{M}-\text{H}]^-$	759.351 5	421.207 1、347.139 0、249.149 4
105	31.24	地黄苷	苯乙醇苷类	$C_{31}H_{40}O_{15}$	0.6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	651.238 5	505.176 0、265.071 7、193.050 7、175.039 2、161.022 6
106	31.51	aegeticacid5-O- β -D-quinovoside	紫罗兰酮类	$C_{21}H_{34}O_8$	-0.5	$[\text{M}-\text{H}]^-$	413.218 9	249.158 6、223.160 2
107	32.61	枸橼苷	黄酮类	$C_{28}H_{34}O_{14}$	2.1	$[\text{M}-\text{H}]^-$	593.196 1	285.075 7
108	32.70	异樱花素	黄酮类	$C_{16}H_{14}O_5$	1.9	$[\text{M}-\text{H}]^-$	285.075 9	173.006 9、133.064 9、105.070 5、67.018 6
109	32.71	地黄新苷 H	环烯醚萜类	$C_{30}H_{46}O_{13}$	4.2	$[\text{M}-\text{H}]^-$	613.273 6	347.129 3、167.069 9、165.089 6
110	32.91	角胡麻苷	苯乙醇苷类	$C_{31}H_{40}O_{15}$	3.6	$[\text{M}-\text{H}]^-$	651.238 8	193.050 3、175.039 9、160.016 6
111	32.95	吉奥诺苷 C	苯乙醇苷类	$C_{29}H_{36}O_{13}$	2.2	$[\text{M}-\text{H}]^-$	591.215 0	429.173 8、161.023 2
112	32.98	异地黄苷	苯乙醇苷类	$C_{31}H_{40}O_{15}$	4.5	$[\text{M}-\text{H}]^-$	651.236 8	475.187 0、193.050 0、175.039 3
113	33.39	-	-	$C_{28}H_{40}O_{10}$	3.9	$[\text{M}-\text{H}]^-$	535.259 6	265.071 1、205.049 5、163.039 7、145.028 7、119.049 6
114	33.44	成分 D	其他	$C_{36}H_{53}N_7O_9$	3.3	$[\text{M}-\text{H}]^-$	726.393 7	696.337 4、590.341 6
115	33.56	地黄新萜 C	紫罗兰酮类	$C_{28}H_{40}O_{10}$	2.2	$[\text{M}-\text{H}]^-$	535.258 9	163.039 7、145.029 3
116	33.72	地黄新苷 F	环烯醚萜苷类	$C_{30}H_{46}O_{12}$	3.3	$[\text{M}-\text{H}]^-$	597.252 2	267.154 1、249.149 3、167.068 6
117	33.81	野菰酸	紫罗兰酮类	$C_{15}H_{24}O_4$	1.4	$[\text{M}-\text{H}]^-$	267.160 7	223.168 9、205.158 1、153.090 4
118	33.99	pinelliacid	脂肪酸类	$C_{18}H_{34}O_5$	4.0	$[\text{M}-\text{H}]^-$	329.233 4	311.223 4、229.145 0、211.133 8
119	34.26	柠檬苦素	三萜类	$C_{26}H_{30}O_8$	-0.1	$[\text{M}-\text{H}]^-$	469.186 7	423.162 7、199.110 3
120	34.84	组氨酸	氨基酸类	$C_6H_9N_3O_2$	4.0	$[\text{M}-\text{H}]^-$	154.059 2	137.087 4、118.067 1、109.084 6、106.039 3
121	35.65	亚油酸	脂肪酸类	$C_{18}H_{32}O_2$	1.0	$[\text{M}-\text{H}]^-$	279.232 8	161.044 0、116.927 2

注: ¹⁾ 经对照品比对; 成分 A. 5-[α -D-glucopyranosyl-(1-6)- α -D-glucopyranosyloxymethyl]-2-furancarboxaldehyde; 成分 B. 3'-O- β -D-glucopyranosyl-catalpol; 成分 C. 6-oxo-4'-(3-methoxyl-4-hydroxyphenylglycol-8'')-feruloyl-ajugol; 成分 D. 环(甘氨酸-L-丝氨酸-L-脯氨酸-L-亮氨酸-L-亮氨酸-L-脯氨酸-L-酪氨酸)

2.7 不同炮制时间样品的差异代谢物分析 通过 MarkerView 1.2 进行数据预处理, 包括去噪、峰提取、峰对齐、峰识别和峰面积归一化等, 将处理后的数据导入 SIMCA 14.1 进行多元统计分析, 见图 1。从主成分分析(PCA)得分图可知, 各炮制时间点样品组内离散性较小, 表明不同炮制时间组内均一性良好; 不同炮制时间的 12 组炮制品之间有一定的分离趋势, 说明炮制后整体化学成分发生了变化, 见图 1A。为进一步缩小组内差距, 扩大组间差距, 进行正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)处理, 得分图见图 1B。结果模型 R^2Y (Y 轴方向模型的累积解释率) 0.972, Q^2 (模型的累积预测率) 0.992, 表明该模型拟合效果良好。由图 1B 可知, 砂仁陈皮制熟地黄的炮制过程可分为 4 个阶段, 即样品 S1 (0 h, 生品)、S2~S5 (6~24 h, 未加辅料炮制地黄)、S6~S9 (30~48 h, 加入辅料砂仁、陈皮炮制地黄)、S10~S12 (50~54 h, 加入辅料砂仁、陈皮后继续加入黄酒炮制地黄), 并有一定的动态变化趋势, 说明辅料砂仁、

陈皮、黄酒在地黄炮制过程中发挥了阶段性作用; 样品 S1、S2~S5 均在 Y 轴右侧, 与在左侧的样品 S6~S9、S10~S12 有明显区分, 说明未加辅料与加辅料炮制而成的熟地黄具有明显差异性; 样品 S1 与其他不同时间段炮制品差异较大, 其他样品随着炮制时间延长依次距离生品更远, 且逐渐呈现聚集在一起的趋势, 表明地黄炮制前后化学成分具有差异性, 随着炮制时间的延长, 后期成分变化趋于稳定。为验证 OPLS-DA 模型的拟合程度, 对该模型进行 200 次置换检验, 见图 1C, 结果发现左端任何 1 次随机排列产生的 R^2 、 Q^2 均小于右端的原始值, Q^2 截距值 < 0 , 表明不存在过拟合现象, 模型稳定可靠^[16], 可进一步筛选差异代谢物。

根据变量重要性投影(VIP)值 > 3.5 及 OPLS-DA 载荷图中化合物投影点距离原点越远表明其对差异性的贡献越大的原则筛选差异代谢物, 见图 1D。结合 UPLC-Q-TOF-MS 数据, 共筛选出 12 个差异代谢物, 分别为梓醇、橙皮苷、异类叶升麻苷、毛蕊花



注:A.PCA得分图;B.OPLS-DA得分图;C.置换检验($n=200$);D.OPLS-DA载荷图;1.梓醇;2.橙皮苷;3.异类叶升麻苷;4.毛蕊花糖苷;5.芸香柚皮苷;6.松果菊苷;7.异地黄苷;8.脱咖啡酰基毛蕊花糖苷;9.6-*O-E*-阿魏酰基筋骨草醇;10.二羟基-7-*O*-新橙皮苷;11.焦地黄苯乙醇苷D;12.地黄苦苷(图2同)

图1 不同炮制时间砂仁陈皮制熟地黄的多元统计分析

Fig. 1 Multivariate statistical analysis of RRP processed with AF and CRP at different processing time

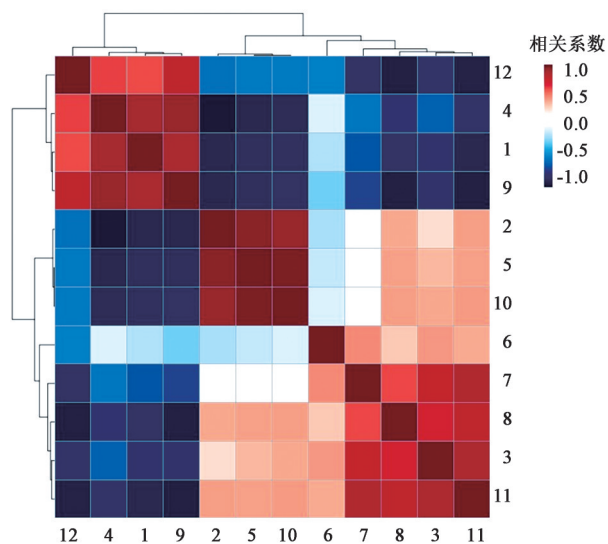
糖苷、芸香柚皮苷、松果菊苷、异地黄苷、脱咖啡酰基毛蕊花糖苷、6-*O-E*-阿魏酰基筋骨草醇、二羟基-7-*O*-新橙皮苷、焦地黄苯乙醇苷D、地黄苦苷。通过差异代谢物结合VIP值分析,发现梓醇(VIP值=11.61)和橙皮苷(VIP值=11.25)是组间差异较大的成分,但不是贡献最大的、唯一的成分,说明若以梓醇和橙皮苷的含量作为建昌帮砂仁陈皮制熟地黄炮制品质量评价指标具有一定的合理性和不充分性,应兼具多个代谢物含量评价该炮制品的质量。

2.8 不同炮制时间样品差异代谢物和还原糖含量的变化趋势 为展示各差异代谢物和还原糖随炮制时间的动态变化过程,利用峰强度来表示样品S1~S12中差异代谢物和还原糖的相对含量^[17],数据见增强出版附加材料。其中梓醇、6-*O-E*-阿魏酰基筋骨草醇在样品S1中含量最高,含量范围变化跨度大,并随炮制时间延长呈先下降后趋于平缓的趋势,紫罗兰酮类成分地黄苦苷与环烯醚萜类成分变化趋势相似,这些成分可能在煎制条件下发生断裂之后进一步发生降解反应^[9];黄酮苷类成分橙皮苷、芸香柚皮苷、二羟基-7-*O*-新橙皮苷的含量从样品S6~S9(30~48 h)含量上升,样品S10(50 h)逐渐下降,样品S11~S12(52~54 h)变化达到平台期,说明

在炮制过程中辅料引入的成分刚开始存在加速溶出作用,随着炮制时间的延长很快会发生分解、转化,使之含量降低^[18];苯乙醇苷类成分异类叶升麻苷、松果菊苷、异地黄苷、脱咖啡酰基毛蕊花糖苷、焦地黄苯乙醇苷D呈先上升后下降继而波动变化小的规律,毛蕊花糖苷于样品S1~S9呈逐渐下降趋势,随后于样品S10中含量上升,之后样品S11~S12中含量继续下降,但变化幅度小,推测炮制过程中毛蕊花糖苷受热分解失去1个咖啡酰基生成脱咖啡酰基毛蕊花糖苷,并且有小部分异构为异类叶升麻苷,随辅料黄酒的加入,导致异类叶升麻苷部分转化为毛蕊花糖苷,继而苷类分解,故毛蕊花糖苷含量降低后升高随后又降低,这也是地黄经炮制后随时间延长,毛蕊花糖苷含量未急剧降低的原因,其他成分可能随温度升高溶出增加,之后受热发生降解反应,故而含量减少^[19]。据报道,熟地黄中还原糖的含量与其炮制程度呈正相关^[20]。由增强出版附加材料中数据可知,随炮制时间的延长,还原糖含量呈逐渐增加趋势,并于52~54 h维持在相对平稳的状态。由于大多数差异代谢物和还原糖随着炮制时间的延长在样品S11~S12中的含量变化相对平缓,表明差异代谢物和还原糖经黄酒加热

炮制后在该时间段均较稳定,未出现相互转化现象,存在最适宜炮制时间,此结果与 OPLS-DA 结果、文献[21]报道一致。

2.9 砂仁陈皮制熟地黄差异代谢物之间的相关性分析 为了寻找建昌帮砂仁陈皮制熟地黄不同炮制时间样品中差异代谢物之间的相互关系,使用 MetaboAnalyst 5.0 对差异代谢物进行相关性分析,计算 Pearson 相关系数并作相关性分析聚类热图,见图 2。结果发现环烯醚萜类成分梓醇、6-*O-E*-阿魏酰基筋骨草醇聚为一类;苯乙醇苷类成分异类叶升麻苷、松果菊苷、脱咖啡酰基毛蕊花糖苷、异地黄苷、焦地黄苯乙醇苷 D 聚为一类;黄酮苷类成分橙皮苷、芸香柚皮苷、二羟基-7-*O*-新橙皮苷聚为一类;毛蕊花糖苷、紫罗兰酮类成分地黄苦苷相对含量变化趋势与环烯醚萜类成分变化趋势相似,故具有强相关性。从相关系数分析,黄酮类成分与苯乙醇苷类成分之间呈强正相关,紫罗兰酮类成分与环烯醚萜类之间呈强相关性,表明化学结构相似的成分在生物体内有较强的相关性,相关系数数据见增强出版附加材料。同时,在砂仁陈皮制熟地黄炮制过程中,地黄苦苷、梓醇、毛蕊花糖苷、6-*O-E*-阿魏酰基筋骨草醇 4 个化合物的离子响应强度呈下降趋势;另外 8 个差异代谢物的离子响应强度则随炮制时间延长基本呈现升高后降低趋势,这 12 个成分可能是建昌帮砂仁陈皮制熟地黄炮制后药效发生改变的物质基础。



注:红色代表正相关,蓝色代表负相关,颜色越深,相关性越大,反之越小

图2 不同炮制时间砂仁陈皮制熟地黄的差异代谢物的相关性分析
Fig. 2 Correlation analysis of different metabolites of RRP processed with AF and CRP at different processing time

3 讨论

中药炮制品的次级代谢产物是其发挥药理活性的主要物质基础,是中药在炮制过程中成分转化和分解、辅料引入新增成分等因素相互作用的综合结果^[22]。影响中药炮制过程中次级代谢物的主要因素包括炮制时间、炮制方式、炮制辅料等^[4]。陆艳^[23]通过对山茱萸炮制过程进行监测后发现,炮制时间与环烯醚萜苷、黄酮等成分具有显著相关性。高慧等^[24]通过比较远志与甘草制远志的化学成分差异,发现辅料甘草成分的引入与甘草苷等新增成分显著相关。本研究则发现砂仁陈皮制熟地黄的物质基础与加入辅料及炮制时间等因素有关。

本实验运用 UPLC-Q-TOF-MS 分析 0~54 h 内建昌帮砂仁陈皮制熟地黄化学成分的动态变化,并对差异代谢物和还原糖的相对含量变化进行跟踪,实现整体性评价,结果鉴定出 121 个化学成分,包括环烯醚萜类、苯乙醇苷类、黄酮类、紫罗兰酮类、糖类、有机酸类、酚酸类、脂肪酸类、三萜类等,与前人研究基本一致^[7]。整体而言,地黄经砂仁、陈皮、黄酒炮制后大部分化学成分种类不变,但含量会发生改变。由差异代谢物分析结果可知,多元统计分析揭示了砂仁陈皮制熟地黄炮制过程可分为 4 个阶段,主要与辅料砂仁、陈皮、黄酒的加入相关。自南北朝起,加入黄酒、砂仁、陈皮炮制地黄,具有“气味纯真而独厚,补血而不凝滞”之功效^[25],说明地黄炮制选择砂仁、陈皮、黄酒为辅料对熟地黄质量有一定的影响。结合化学模式识别方法分析组间差异成分,共找到差异代谢物 12 个,可作为砂仁陈皮制熟地黄的候选质量标志物。

由差异代谢物和还原糖含量的变化趋势、差异代谢物之间相关性分析可知,黄酮苷类、环烯醚萜类、苯乙醇苷类成分是砂仁陈皮制熟地黄炮制前后的主要差异成分,主要过程涉及高温作用使苷类成分的苷键断裂产生对应苷元和还原糖、美拉德反应、异构化现象等^[7]。其中环烯醚萜类成分经炮制产生苷元和糖类,糖类继而脱水生成 5-羟甲基糠醛,使熟地黄温性增强^[21];黄酮苷类成分橙皮苷、二羟基-7-*O*-新橙皮苷受高温裂解产生橙皮素,芸香柚皮苷经炮制产生苷元柚皮素,橙皮素与柚皮素可产生促胃肠动力作用,从而极大提升砂仁陈皮制熟地黄的生物利用度,更好地发挥益精填髓的功效,缓解熟地黄滋腻之性^[18];苯乙醇苷类成分毛蕊花糖苷、异类叶升麻苷、松果菊苷、异地黄苷、脱咖啡酰基毛蕊花糖苷经高温作用后会发生苷类裂解生成

咖啡酸、羟基酪醇、还原糖,以及同类物质相互转化现象,有利于发挥免疫调节作用^[26];还原糖可客观反映熟地黄在炮制过程中的变化程度,对其炮制终点有较为准确的指示作用^[20]。因此,本实验综合差异代谢物和还原糖的相对含量变化,通过对砂仁陈皮制熟地黄炮制过程样品的检测,发现随着炮制时间的延长,梓醇、橙皮苷、异类叶升麻苷等差异代谢物会生成相应的苷元、寡糖或还原糖,且差异代谢物和还原糖含量于52~54 h时几乎不再变化,维持在相对平稳的状态,推测该时间段是砂仁陈皮制熟地黄最适宜炮制时间,为揭示砂仁陈皮制熟地黄炮制原理提供了实验依据,但炮制过程中各成分间的相互作用极为复杂,后期将对这些差异代谢物的变化进行定量分析并结合药效实验进行验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:129-130.
- [2] XUE S J, FU Y, SUN X Y, et al. Changes in the chemical components of processed *Rehmanniae Radix* distillate during different steaming times [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 3382333.
- [3] 王芳,于欢,李风琴,等. 砂仁制地黄的炮制工艺分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(18):5-10.
- [4] 解杨,钟凌云,王卓,等. 地黄炮制历史沿革及现代研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(2):273-282.
- [5] 张秀芬,王思梦,白建英,等. 经典名方地黄饮子的古代文献考究[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(14):59-64.
- [6] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范[M]. 上海:上海科学技术出版社,2008:81.
- [7] 陈青垚,雷星,高亚珍,等. 基于“色如漆,甘如饴”的砂仁陈皮制熟地黄炮制过程质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(4):154-162.
- [8] 钟凌云,叶协滔,杨明,等. 中药炮制“三适”理论的研究与实践[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(10):180-185.
- [9] 陶益,蒋妍慧,唐克建,等. 地黄炮制前后化学成分的UHPLC-Q-TOF/MS比较研究[J]. 中药新药与临床药理,2016,27(1):102-106.
- [10] 陈金鹏,张克霞,刘毅,等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药,2021,52(6):1772-1784.
- [11] 周菲,林美斯,李锐,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术

- 分析百合地黄汤的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(7):15-22.
- [12] 张珂,许霞,李婷,等. 利用UHPLC-IT-TOF-MS分析陈皮的化学成分组[J]. 中国中药杂志,2020,45(4):899-909.
- [13] 周国洪,赵珍东,汪小根,等. 基于植物代谢组学的地黄蒸制前后化学成分变化研究[J]. 海峡药学,2020,32(7):34-37.
- [14] 胡媛,吴蓓,易达,等. 基于广泛靶向代谢组学技术与高通量测序技术探究广陈皮陈化机制[J]. 天然产物研究与开发,2022,34(4):553-562.
- [15] 杨彩霞. 云南产阳春砂仁与进口砂仁化学成分及主要药效学的比较研究[D]. 昆明:云南中医学院,2017.
- [16] 庞溢媛,薛立英,郑艳红,等. 基于UHPLC-MS/MS代谢组学技术的不同采收期黄芩质量比较研究[J]. 药学报,2017,52(12):1903-1909.
- [17] 邹立思,侯娅,马阳,等. 江苏地产太子参代谢物的动态积累分析[J]. 南京中医药大学学报,2019,35(1):99-103.
- [18] 祝婧,袁恩,牟俊雍,等. 基于UPLC-Q/TOF-MS分析江西特色炮制工艺对枳壳化学成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(16):142-153.
- [19] 孙钰婧,霍志鹏,王玉,等. 基于UPLC-Q-TOF/MS^E分析不同炮制时间炒车前子的化学成分变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(4):146-153.
- [20] 王中华,陈涛,王远志,等. 还原糖含量对陈皮及砂仁制熟地黄炮制终点的指示性研究[J]. 中国药师,2020,23(11):2269-2273.
- [21] 胡律江,胡志方,王小平,等. 江西建昌帮炒熟地黄的HPLC指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(23):33-36.
- [22] 柴冲冲. 基于颜色-滋味-成分-代谢的黄芩酒炙前后药性变化的科学内涵研究[D]. 北京:北京中医药大学,2020.
- [23] 陆艳. 山茱萸炮制过程监测及质量控制研究[D]. 南京:南京中医药大学,2016.
- [24] 高慧,熊晓莉,张青,等. 基于UPLC-LTQ-Orbitrap MS技术分析远志炮制前后成分变化[J]. 中药新药与临床药理,2021,32(12):1845-1854.
- [25] 黄东,易斌,乐海平,等. 江西建昌帮特色中药饮片炮制“炒法”浅析[J]. 药品评价,2021,18(24):1525-1528.
- [26] 王中华,窦志英,王洋,等. 基于毛蕊花糖苷含量分析陈皮和砂仁在熟地黄炮制中的影响性研究[J]. 天津中医药,2019,36(12):1234-1240.

[责任编辑 刘德文]