

基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS比较古今不同加工方法对百合煎液化学成分的影响

赵永琪, 张宏伟, 张振凌*, 王一鸣, 李德华, 孙梦梅, 张亚柯
(河南中医药大学药学院, 河南省中药特色炮制技术工程研究中心,
河南省中药生产一体化工程技术研究中心, 郑州 450046)

[摘要] 目的:比较古今不同加工方法对百合煎液化学成分的影响,为该药材的产地加工、饮片炮制及临床应用提供依据。方法:采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS),利用准分子离子、特征碎片离子等信息,并参考相关文献和数据库信息进行化合物结构鉴定;利用主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)筛选主要差异成分,通过高效液相色谱法对差异成分进行定量研究,比较百合不同加工品煎液中化学成分种类和含量的区别。结果:从百合不同加工品煎液及鲜百合水浸液、烫煮液中共鉴别出24个成分,其中17个酚类、5个皂苷类、2个生物碱类;与鲜百合煎液比较,烫煮干百合煎液中王百合苷A、对香豆酸、秋水仙碱等成分含量减少,蒸制干百合煎液中王百合苷C含量降低,水浸鲜百合煎液中王百合苷A、王百合苷C成分含量减少;与烫煮干百合煎液比较,鲜百合煎液与水浸鲜百合煎液中成分的整体含量要高,蒸制干百合煎液除王百合苷C的含量略低外,其他成分含量要高于烫煮干百合煎液。结论:不同加工过程会对百合煎液化学成分的种类及含量产生一定影响,烫煮法加工鲜百合有利于百合的保存,但会造成百合有效成分流失;相较于烫煮法,蒸制法高温处理可防止百合褐变,还能降低其有效成分流失;张仲景提出水浸一宿后去沫的加工方法可能更有利于治疗百合病等温热病,可为百合不同加工品的临床合理应用及作用机制研究提供参考。

[关键词] 百合;超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS);主成分分析(PCA);正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA);中药炮制;产地加工;饮片

[中图分类号] R22;R28;R931;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0177-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220752 **[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.20220803.1516.001.html>

[网络出版日期] 2022-08-03 16:55:34

Comparison of Effect of Ancient and Modern Processing Methods on Chemical Components of Lili Bulbus Decoction Based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

ZHAO Yongqi, ZHANG Hongwei, ZHANG Zhenling*, WANG Yiming, LI Dehua,
SUN Mengmei, ZHANG Yake

(School of Pharmacy, Henan Engineering Research Center of Chinese Traditional Medicine
Special Processing Technology, Henan Engineering Technology Research Center for Integrated Production of
Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the effects of different processing methods in ancient and modern times on the chemical components of Lili Bulbus decoction, and to provide experimental support for the origin processing, decoction piece processing and clinical application of this herb. **Method:** Ultra high performance liquid chromatography tandem quadrupole electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry(UHPLC-

[收稿日期] 2022-04-07

[基金项目] 2022年度河南省中医药科研研究专项(2022ZY2059);国家公益性行业专项——中药炮制技术传承基地建设项目(38103021-2022);河南中医药大学2021年度研究生科研创新类立项项目(2021KYCX054)

[第一作者] 赵永琪,在读硕士,从事中药饮片质量及炮制作用机制研究,E-mail:1290970508@qq.com

[通信作者] *张振凌,教授,从事中药饮片质量及炮制作用机制研究,E-mail:zhangzl6758@163.com

Q-Orbitrap HRMS) was used for structural identification of the compounds using excimer ions, secondary MS and characteristic fragment ions, and referring to relevant literature and database information. Principal component analysis(PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis(OPLS-DA) were used to screen the main differential components, the differential components were quantitatively studied by high performance liquid chromatography (HPLC), in order to compare the types and contents of chemical components in the decoction of different processing products of Lili Bulbus. **Result:** A total of 24 chemical components were identified from the decoction of different processed products of Lili Bulbus, water extract and scalding liquid of fresh Lili Bulbus, including 17 phenols, 5 saponins and 2 alkaloids. Compared with the fresh Lili Bulbus decoction, the contents of regaloside A, *p*-coumaric acid, colchicine and other components in the decoction of dry Lili Bulbus processed by scalding method decreased, the content of regaloside C in the decoction of dry Lili Bulbus processed by steaming method decreased, and the contents of regaloside A and regaloside C in the decoction of fresh Lili Bulbus processed by water immersion also decreased. Compared with the decoction of dry Lili Bulbus processed by scalding method, the overall content of components in the fresh Lili Bulbus decoction and the decoction of fresh Lili Bulbus processed by water immersion was higher, the contents of components in the decoction of dry Lili Bulbus processed by steaming method was higher, except for the slightly lower content of regaloside C. **Conclusion:** Different processing processes have a certain effect on the types and contents of chemical components in Lili Bulbus decoction. Scalding process is beneficial to the preservation of Lili Bulbus, but can cause the loss of effective components. Compared with scalding method, steaming method can prevent browning of Lili Bulbus and reduce the loss of its active ingredients. The processing method of removing foam after overnight immersion proposed by ZHANG Zhongjing may be more conducive to the treatment of Baihe disease, which can provide reference for the clinical rational application and mechanism research of different processed products of Lili Bulbus.

[Keywords] Lili Bulbus; ultra high performance liquid chromatography tandem quadrupole electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS); principal component analysis (PCA); orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA); traditional Chinese medicine processing; origin processing; decoction pieces

百合性寒,味甘,归心、肺经,具有养阴润肺、清心安神的功效^[1],首载于《神农本草经》^[2],被列为中品,用于治疗阴虚燥咳、劳嗽咳血、虚烦惊悸、失眠多梦、精神恍惚等。百合化学成分丰富,包括多糖类、酚类、生物碱类、甾体皂苷类、黄酮类及氨基酸类等,具有调节免疫、抗氧化、抗抑郁、抗炎、抗肿瘤及降血糖等药理作用^[3]。

2020年版《中华人民共和国药典》^[1](以下简称《中国药典》)记载的鲜百合加工方法为秋季采挖,洗净,剥取鳞叶,置沸水中略烫,干燥。而《金匱要略》^[4]记载鲜百合的加工方法为“上以水洗百合,渍一宿,当白沫出,去其水”后煎汤使用,《伤寒总病论》^[5]、《女科百问》^[6]和《医学纲目》^[7]等也有类似的记载。此外,还有将鲜百合蒸制的加工方法,如《本草经集注》^[8]言:“百合,人亦蒸煮食之。”《济生方》^[9]记载将鲜百合“蒸或蒸焙”后煎汤或作散用。综上所述可知,鲜百合加工应用方法多样,但研究不同加工

方法对其化学成分影响的报道较少,这在一定程度上制约了不同百合加工品的临床合理应用。基于此,本实验拟采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)对不同百合加工品煎液及其水浸液、烫煮液中化学成分进行分析,根据色谱保留时间(t_R)、精确相对分子质量、分子离子峰等信息,结合相关文献报道,对主要化学成分进行鉴定,并通过多成分含量测定方法比较不同加工品煎液中指标成分含量的差异^[10],为探索百合不同加工品的临床合理应用提供参考。

1 材料

Vanquish™ Flex UHPLC型超高效液相色谱系统及Orbitrap Exploris™ 120型高分辨率质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司,配置SPD-M20A型检测器),GTR16-2型高速冷冻离心机(北京时代北利离心机有限公司),HOC-ZH45AF型真空烘箱(上海

恒黔电子科技有限公司),GZX-9070型数显鼓风干燥箱(上海博迅实业有限公司),BT25S型1/10万电子天平和BSA224S-CW型1/1万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]。

王百合苷C对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号19071103,纯度 $\geq 98\%$),王百合苷A、王百合苷B、秋水仙碱对照品(成都德思特生物技术有限公司,批号分别为DSTDW010701、DSTDW007201、DST200711-052,纯度均 $\geq 98\%$),绿原酸、对香豆酸对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为B20782、B20335,纯度均 $\geq 98\%$),水为屈臣氏饮用水和实验室自制超纯水,甲醇、乙腈、甲酸均为质谱纯,磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。鲜百合药材均购自湖北恩施来凤县卷丹百合种植基地,批号分别为20211115、20211117、20211206、20211211、20211225,经河南中医药大学张振凌教授鉴定为百合科植物卷丹 *Lilium lancifolium* 的新鲜肉质鳞叶。

2 方法与结果

2.1 百合不同加工品及其煎液的制备

2.1.1 鲜百合水浸液及水浸鲜百合煎液 鲜百合浸后煎煮这一加工方法最早出现在治疗百合病的系列组方中^[4]。根据古代药物剂量进行转化^[11],称取鲜百合120 g,加5倍量水浸泡10 h,6层纱布过滤,即得水浸鲜百合,滤液为鲜百合水浸液;取水浸鲜百合,加水400 mL,煎煮至200 mL,6层纱布过滤,即得水浸鲜百合煎液。

2.1.2 鲜百合煎液 取鲜百合120 g,加水400 mL,直接煎煮至200 mL,6层纱布过滤,即得。

2.1.3 鲜百合烫煮液及烫煮干百合煎液 称取鲜百合120 g,置沸水中烫煮10 min^[12],取出烫煮后的百合,置烘箱中60℃烘干,即得烫煮干百合;烫煮后剩余溶液为鲜百合烫煮液。取烫煮干百合,加水400 mL,煎煮至200 mL,6层纱布过滤,得烫煮干百合煎液。

2.1.4 蒸制干百合煎液 称取鲜百合120 g,置蒸锅中蒸制12 min^[13],取出,置烘箱中60℃烘干,即得蒸制干百合。取蒸制干百合,加水400 mL,煎煮至200 mL,6层纱布过滤,即得蒸制干百合煎液。

2.2 百合不同加工品煎液的UHPLC-Q-Orbitrap HRMS分析

2.2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流速0.3 mL·min⁻¹,柱温35℃,流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~2 min,3%~10%A;2~10 min,10%~

15%A;10~15 min,15%A;15~24 min,15%~25%A;24~26 min,25%~30%A;26~28 min,30%~40%A;28~30 min,40%~95%A;30~32 min,95%A),进样量5 μL。

2.2.2 质谱条件 使用Xcalibur 3.0软件,采集2~28 min的MS和MS/MS数据,使用电喷雾离子源(ESI),正、负离子检测模式,扫描范围 *m/z* 100~1 000,正、负离子喷雾电压分别为3.5 kV和-2.5 kV,鞘气流速45 arb,辅助气流速15 arb,辅助气温度350℃,离子传输管温度320℃。

2.2.3 供试品溶液的制备 取2.1项下制备的各加工品煎液及鲜百合水浸液、烫煮液,60℃旋转蒸发仪中浓缩,取浓缩液减压真空干燥为干浸膏,取干浸膏适量,加70%甲醇配成质量浓度约0.5 g·L⁻¹的溶液,10 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径10 cm),取上清液,过0.22 μm微孔滤膜,即得。

2.2.4 对照品溶液的制备 取王百合苷C、绿原酸、王百合苷A、对香豆酸、王百合苷B、秋水仙碱对照品适量,精密称定,分别加70%甲醇稀释,配成质量浓度约50 μg·L⁻¹的对照品溶液,用0.22 μm微孔滤膜滤过,备用。

2.3 化学成分分析 百合不同加工品煎液、鲜百合水浸液和烫煮液的总离子流图(TIC)见增强出版附加材料。使用Xcalibur 3.0对原始质谱数据进行处理,通过化合物准确相对分子质量、准分子离子峰得到化学式,利用MS/MS图谱、特征碎片离子及其他碎片离子等信息,参考文献[14-22]报道,初步定性分析了24个成分,其中包括17个酚类、5个皂苷类、2个生物碱类成分,见表1。

2.3.1 酚类化合物鉴定 根据MS信息,鉴定最多的化合物是酚类,其在负离子模式下响应较好,共检测到17个酚类化合物,其中包括12个酚酸甘油酯类化合物和5个单聚酚酸类化合物。化合物7和15通过对照品比对分别鉴定为王百合苷A、王百合苷B;化合物3在负离子模式下通过Xcalibur 3.0推测的化学式为C₁₈H₂₄O₁₁,碎片离子有 *m/z* 179.034 9 [M-Glc-C₃H₆O₂-H]⁻和161.023 9 [M-Glc-C₃H₆O₂-H₂O-H]⁻,结合文献[14]鉴定其为王百合苷K;化合物6的碎片离子有 *m/z* 237.078 2 [M-Glc-H]⁻、163.039 6 [M-Glc-C₃H₆O₂-H]⁻、145.029 2 [M-Glc-C₃H₆O₂-H₂O-H]⁻、119.050 1 [M-Glc-C₃H₆O₂-CO₂-H]⁻,结合文献[15]和 *t_R* 鉴定其为王百合苷D。酚类化合物除酚酸甘油酯类还有单聚酚酸类,化合物2通过软件推测和对照品比对鉴定为对香豆酸;化

表1 百合不同加工品煎液、鲜百合水浸液和烫煮液的UHPLC-Q-Orbitrap HRMS分析

Table 1 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS analysis of decoction of different processing products of Lili Bulbus, water extract and scalding liquid of fresh Lili Bulbus

化合物	名称	t_R /min	分子式	模式	m/z 实测值	m/z 理论值	δ /ppm	碎片离子	归属
1	咖啡酸	3.47	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.033 4	179.034 3	-5.0	134.987 6	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
2	对香豆酸	4.97	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	163.039 6	163.039 4	1.2	119.050 0	GJ、XZ、XJ、ZJ、SJ
3	王百合苷K	5.57	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	415.123 3	415.124 8	-3.6	179.034 9、161.023 9	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
4	王百合苷C	6.59	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₁	[M-H] ⁻	415.123 2	415.124 8	-3.9	235.060 7、179.034 3、161.024 0	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
5	王百合苷H	7.32	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	399.128 4	399.129 1	-1.8	237.077 1、163.039 5、145.029 1、119.049 9	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
6	王百合苷D	7.92	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	399.128 3	399.129 1	-2.0	237.078 2、163.039 6、145.029 2、119.050 1	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
7	王百合苷A	8.77	C ₁₈ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	399.129 6	399.129 1	1.3	237.078 0、163.039 5、145.029 0、119.050 0	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
8	对羟基苯甲醛	8.93	C ₇ H ₆ O ₂	[M-H] ⁻	121.029 3	121.029 0	2.5	121.029 1	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
9	王百合苷F	9.34	C ₁₉ H ₂₆ O ₁₁	[M-H] ⁻	429.138 7	429.139 7	-2.3	414.118 7、307.010 6、267.085 0、193.050 9、175.040 1	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
10	1-O-对香豆酰基甘油	10.09	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	[M-H] ⁻	237.075 8	237.076 3	-2.1	163.039 5、145.029 2、119.049 8	XZ、ZJ、SJ、TZ
11	1-O-阿魏酰甘油酯	10.77	C ₁₃ H ₁₆ O ₆	[M-H] ⁻	267.089 8	267.089 6	-0.7	252.062 7、193.050 6、175.040 0	GJ、SJ、TZ
12	王百合苷E	11.94	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₂	[M-H] ⁻	457.134 2	457.134 6	-0.8	397.113 1、253.071 3、179.034 3、161.023 9	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
13	绿原酸	12.06	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.085 3	353.087 2	-5.4	191.053 7、173.041 8	GJ、XZ
14	4-乙酰王百合苷D	15.15	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₁	[M-H] ⁻	441.139 2	441.139 7	-1.1	399.123 4、381.118 0、163.039 5、145.029 2、119.049 8	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
15	王百合苷B	17.39	C ₂₀ H ₂₆ O ₁₁	[M-H] ⁻	441.138 9	441.139 7	-1.8	399.129 4、381.118 7、163.039 6、145.029 3、119.049 9	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
16	阿魏酸	18.67	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 0	193.050 1	-0.5	178.027 0、149.060 3、134.036 9	XZ、ZJ、SJ
17	秋水仙碱	21.97	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	[M+H] ⁺	400.174 2	400.176 1	-4.7	358.163 3、310.117 5	GJ、XZ、XJ、ZJ
18	a	22.19	C ₃₉ H ₆₄ O ₁₅	[M+Na] ⁺	795.401 9	795.408 4	-8.2	755.418 2、593.366 9、449.254 3、431.313 9、413.309 6、287.201 0、269.198 4、251.180 1	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
19	3,6'-O-二阿魏酰基蔗糖或同分异构体	23.38	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₇	[M-H] ⁻	693.201 5	693.203 1	-2.3	517.157 3、499.141 9、337.089 3、193.050 1、175.039 6	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
20	b	24.07	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₈	[M+Na] ⁺	927.490 3	927.492 9	-2.8	887.500 1、725.448 5、581.331 6、435.275 4、417.335 1、399.325 9、273.221 3、255.212 4	GJ、XZ、XJ等 ¹⁾
21	β_2 -澳洲茄边碱	26.69	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₆	[M+H] ⁺	884.744 1	884.741 4	3.1	738.445 3、576.389 4、414.339 1	GJ、XZ、XJ、SJ、TZ
22	卷丹皂苷A	27.17	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	855.481 1	855.474 3	7.9	723.428 2、579.322 1、415.316 6	GJ、XZ、XJ、ZJ
23	c	27.81	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈	[M+Na] ⁺	925.476 1	925.477 3	-1.3	723.427 8、579.317 1、415.318 5、397.309 6、271.204 4、253.196 4	XZ、XJ、SJ、TZ
24	麦冬皂苷D	27.94	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₆	[M+H] ⁺	855.465 7	855.466 4	-0.8	725.444 8、581.330 7、417.335 2、255.210 0	GJ、XZ、XJ、ZJ

注:a.(25R)-呋甾烷-5-烯-1 β ,3 α ,22 α ,26-四醇-3,26-O- β -D-吡喃葡萄糖苷;b.(25R)-26-O- β -D-吡喃葡萄糖-5 α -呋甾烷-3 β ,20 α ,26-三醇-3-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷;c.(25R)-26-O- β -D-吡喃葡萄糖-呋甾烷-5-烯-3 β ,20 α ,26-三醇-3-O- α -L-吡喃鼠李糖(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷;XZ.鲜百合煎液;XJ.水浸鲜百合煎液;GJ.烫煮干百合煎液;ZJ.蒸制干百合煎液;TZ.鲜百合烫煮液;SJ.鲜百合水浸液;¹⁾包括GJ、ZJ、XZ、XJ、SJ、TZ共6个归属

物13为绿原酸,其在负离子模式下推测化学式为C₁₆H₁₈O₉,MS/MS碎片离子有 m/z 191.053 7,该碎片

离子为绿原酸经过高能碰撞酯键断裂得到一分子奎尼酸,随后奎尼酸脱去一分子H₂O形成碎片离子

m/z 173.041 8^[16]; 化合物 16 在负离子模式下准分子离子为 m/z 193.050 0, 其脱去 CH_3 形成碎片离子 m/z 178.027 0, 再脱去一分子 CO_2 形成碎片离子 m/z 134.036 9, 根据裂解特征鉴定其为阿魏酸; 在负离子模式下推测化合物 10 化学式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$, 结合文献[17]及其碎片离子 m/z 163.039 5 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2-\text{H}]^-$ 、145.029 2 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$ 、119.049 8 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2-\text{CO}_2-\text{H}]^-$, 推测该化合物为 1-*O*-对香豆酰基甘油。

2.3.2 生物碱类化合物鉴定 百合中生物碱种类主要为甾体类^[3], 生物碱类成分在正离子检测模式下响应较好。化合物 17 为秋水仙碱, 其在正离子模式下准分子离子为 m/z 400.174 2, 碎片离子有 m/z 358.163 3、310.117 5, 结合文献[18]鉴别其为秋水仙碱。化合物 21 的准分子离子为 m/z 884.744 1, 其脱去一分子鼠李糖和一分子葡萄糖形成碎片离子 m/z 738.445 3、576.389 4, 再脱掉一分子葡萄糖形成碎片离子 m/z 414.339 1, 通过与文献[19]对比鉴定为 β_2 -澳洲茄边碱。

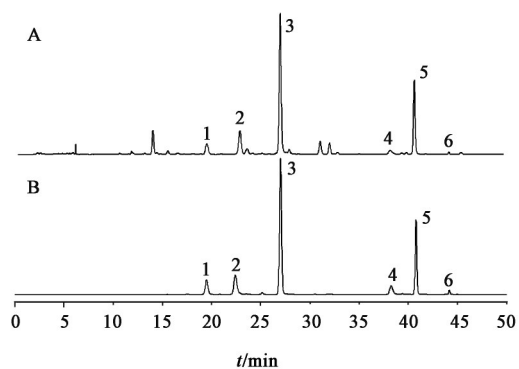
2.3.3 皂苷类化合物鉴定 甾体皂苷是百合皂苷类化合物的主要成分, 主要有呋甾烷醇型皂苷和螺甾烷醇型皂苷等类型^[20]。呋甾烷醇型皂苷因 C-22 位羟基性质活泼易丢失, 在正离子检测模式下多出现 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 的信号, 而不出现 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰^[21]。如化合物 23 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 925.476 1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 碎片离子 m/z 723.427 8 为该化合物在 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 模式下 (m/z 903.486 4) 失去了一分子 H_2O 、一分子葡萄糖后形成的碎片峰, 接着脱去一分子葡萄糖和一分子鼠李糖形成碎片峰 m/z 415.318 5, 然后中性丢失 $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$ 后形成碎片峰 m/z 271.204 4, 再失去一分子 H_2O 形成碎片峰 m/z 253.196 4, 结合文献[17], 初步鉴定化合物 23 为 (25*R*)-26-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖-呋甾烷-5-烯-3 β , 20 α , 26-三醇-3-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖(1 \rightarrow 2)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷。化合物 22、24 在正离子模式下准分子离子为 m/z 855.481 1 和 m/z 855.465 7, 通过与文献[22]比对, 鉴定二者分别为卷丹皂苷 A 和麦冬皂苷 D。

2.4 主成分分析(PCA) 平行制备鲜百合煎液、水浸鲜百合煎液、烫煮干百合煎液及蒸制干百合煎液各 5 批, 按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.2.2 项下条件测定, 采用 SIMCA 14.1 软件对鲜百合及其加工品煎液成分峰面积进行 PCA 处理, 共提取 4 个主成分, 其累积解释率 $R^2X(\text{cum})=0.973$, 预测能力 $Q^2(\text{cum})=0.905$ ^[23], 得分图见增强出版附加材料。

2.5 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA) 在 PCA 基础上, 采用 SIMCA 14.1 软件, 以 OPLS-DA 建模分析, 通过 S-plot 图确定鲜百合及其不同加工品煎液的主要差异成分, S-plot 图上每个点代表 1 个成分变量, 距离原点越远, 表明权重值越大, 对样本的区分能力也越强^[24], 得分图与 S-plot 图见增强出版附加材料。结果鲜百合煎液与水浸鲜百合煎液 OPLS-DA 模型的 $R^2X(\text{cum})=0.992$, $Q^2(\text{cum})=1.000$; 鲜百合煎液与烫煮干百合煎液 OPLS-DA 模型的 $R^2X(\text{cum})=0.993$, $Q^2(\text{cum})=1.000$; 鲜百合煎液与蒸制干百合煎液 OPLS-DA 模型的 $R^2X(\text{cum})=0.992$, $Q^2(\text{cum})=0.999$, 证明该 OPLS-DA 模型良好, 可概括解释成分差异。S-plot 图显示的差异成分主要有王百合苷 A、王百合苷 C、王百合苷 B、对香豆酸、绿原酸及秋水仙碱等成分, 皂苷类成分(25*R*)-呋甾烷-5-烯-1 β , 3 α , 22 α , 26-四醇-3, 26-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、麦冬皂苷 D 等也相对重要, 但因色谱条件限制, 故针对部分差异成分建立百合煎液多成分含量测定方法。

2.6 不同百合煎液多成分含量测定方法的建立

2.6.1 色谱条件 采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 检测波长 315 nm, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 柱温 30 $^\circ\text{C}$, 流动相选择乙腈(A)-0.1% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱 (0~5 min, 5%~12%A; 5~15 min, 12%A; 15~20 min, 12%~16%A; 20~26 min, 16%~19%A; 26~30 min, 19%A; 30~33 min, 19%~22%A; 33~45 min, 22%~36%A), 进样量 10 μL 。见图 1。



注: 1. 王百合苷 C; 2. 绿原酸; 3. 王百合苷 A; 4. 对香豆酸; 5. 王百合苷 B; 6. 秋水仙碱

图 1 鲜百合煎液(A)及混合对照品(B)的 HPLC

Fig. 1 HPLC of fresh Lili Bulbus decoction (A) and mixed reference (B)

2.6.2 对照品溶液的制备 取王百合苷 C、绿原酸、王百合苷 A、对香豆酸、王百合苷 B、秋水仙碱对照

品适量,精密称定,加甲醇使溶解,配制质量浓度分别为1.168、0.736、0.990、0.698、0.766、0.418 g·L⁻¹的对照品母液,精密吸取各对照品母液适量,加甲醇配成质量浓度分别为0.087 6、0.110 4、0.396 0、0.017 5、0.191 5、0.020 9 g·L⁻¹的混合对照品溶液,经0.22 μm微孔滤膜滤过,备用。

2.6.3 供试品溶液的制备 精密量取不同百合加工品煎液各5 mL,水浴锅80 °C挥干,用初始比例流动相[乙腈-0.1%磷酸水溶液(5:95)]溶解并定容至5 mL量瓶中,经0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.6.4 线性关系考察 精密吸取2.6.2项下混合对照品溶液1、4、6、8、10、12 μL,按2.6.1项下色谱条件测定,以进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,见表2。

表2 不同百合加工品煎液中指标成分含量测定的线性关系考察
Table 2 Study on linear relationship for determination of index components in decoction of different processing products of Lili Bulbus

成分	回归方程	r	线性范围/μg
王百合苷C	$Y=2\ 125\ 714.56X+6\ 551.09$	0.999 8	0.087 6~1.051 2
绿原酸	$Y=2\ 650\ 347.28X+15\ 286.17$	0.999 9	0.110 4~1.324 8
王百合苷A	$Y=3\ 080\ 635.84X+211\ 786.59$	0.999 7	0.396 0~4.752 0
对香豆酸	$Y=7\ 943\ 813.07X-11\ 185.18$	0.999 3	0.017 5~0.209 4
王百合苷B	$Y=2\ 941\ 485.21X+53\ 773.97$	0.999 8	0.191 5~2.298 0
秋水仙碱	$Y=1\ 381\ 962.41X+432.07$	0.999 8	0.020 9~0.250 8

2.6.5 精密度试验 取同一批鲜百合煎液的供试品溶液,按2.6.1项下色谱条件连续进样6次,计算王百合苷C、绿原酸、王百合苷A、对香豆酸、王百合苷B、秋水仙碱峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为0.1%、0.6%、0.2%、1.4%、0.1%、0.8%,表明仪器精密度良好。

2.6.6 稳定性试验 取同一批鲜百合煎液的供试品溶液,分别于制备后0、2、4、8、12、24 h按2.6.1项下色谱条件进样,计算王百合苷C、绿原酸、王百合苷A、对香豆酸、王百合苷B、秋水仙碱峰面积的RSD分别为0.3%、0.3%、1.5%、0.7%、0.1%、2.7%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

2.6.7 重复性试验 取同一批鲜百合煎液适量,按2.6.3项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.6.1项下色谱条件测定,计算王百合苷C、绿原酸、王百合苷A、对香豆酸、王百合苷B、秋水仙碱的平均质量分数分别为0.10、0.13、0.51、0.01、0.18、0.01 mg·g⁻¹(以生药量计),RSD分别为0.5%、0.2%、1.2%、

2.3%、0.2%、2.8%,表明该方法重复性良好。

2.6.8 加样回收试验 精密吸取已知指标成分含量的鲜百合煎液6份,每份2.5 mL^[24],分别加入与各成分等量的对照品溶液适量,按2.6.3项下方法制备供试品溶液,按2.6.1项下色谱条件测定,计算加样回收率,结果王百合苷C、绿原酸、王百合苷A、对香豆酸、王百合苷B、秋水仙碱的平均加样回收率分别为98.14%、100.54%、100.26%、97.72%、100.41%、100.73%,RSD依次为1.6%、1.2%、0.7%、1.8%、0.9%、1.3%,详细数据见增强出版附加材料。

2.7 样品测定 平行制备5份鲜百合煎液、水浸鲜百合煎液、烫煮干百合煎液、蒸制干百合煎液,按2.6.3项下方法制备供试品溶液,按2.6.1项下色谱条件测定,见表3。使用SPSS 25软件将各平行样品的6种成分含量平均化,再将数据进行Z-score标准化处理,以标准化后的结果为纵坐标,不同百合加工品煎液为横坐标进行热图分析^[25],见增强出版附加材料。结果发现与百合的其他加工品煎液相比,烫煮干百合煎液中绿原酸、王百合苷A、对香豆酸、王百合苷B、秋水仙碱的含量均有所降低,说明在烫煮过程中成分损失较多;与烫煮干百合煎液比较,蒸制干百合煎液中绿原酸、王百合苷A、王百合苷B等成分含量要高,因为没有在水中烫煮,成分损失大大减少;与鲜百合煎液比较,水浸鲜百合煎液中王百合苷C、王百合苷A、绿原酸含量减少,可能是冷水浸泡导致这些成分有所流失。

3 讨论

本实验利用UHPLC-Q-Orbitrap HRMS对百合不同加工品煎液及鲜百合水浸液、烫煮液进行成分分析,共鉴别出24种成分,主要为酚类、皂苷类和生物碱类。然后对鲜百合及其不同加工品成分进行PCA和OPLS-DA处理,以筛选出主要差异成分,而鲜百合水浸液和烫煮液为加工过程产物,其成分种类和含量与各加工品相差较大,测定的主要目的是为了与鲜百合加工后的成分变化相验证,故未对二者进行PCA和OPLS-DA处理。最后针对主要差异成分进行多成分含量测定,以比较不同加工方法对百合煎液中化学成分含量的影响。

《金匱要略》^[4]记载鲜百合水浸加工方法为“上以水洗百合,渍一宿,当白沫出,去其水”,通过对鲜百合水浸液成分进行分析,发现其主含酚类和皂苷类成分;进一步对水浸鲜百合煎液成分进行定量分析,发现与鲜百合煎液比较,水浸鲜百合煎液中酚酸类和生物碱类成分含量降低。百合含有皂苷类

表3 百合不同加工品煎液中指标成分的含量测定

Table 3 Determination of index components in decoction of different processing products of Lili Bulbus mg·g⁻¹

样品	王百合苷 C	绿原酸	王百合苷 A	对香豆酸	王百合苷 B	秋水仙碱
鲜百合煎液	0.101 5	0.130 1	0.514 0	0.005 1	0.184 4	0.012 2
	0.101 0	0.129 2	0.513 5	0.005 1	0.182 3	0.011 9
	0.100 8	0.129 1	0.513 1	0.005 1	0.181 9	0.011 7
	0.100 9	0.128 4	0.516 1	0.005 1	0.187 8	0.011 8
	0.101 5	0.128 6	0.515 1	0.005 1	0.199 7	0.010 7
水浸鲜百合煎液	0.056 7	0.110 9	0.390 3	0.007 7	0.182 5	0.012 8
	0.055 6	0.107 4	0.375 8	0.007 4	0.185 5	0.011 2
	0.056 5	0.106 8	0.412 2	0.008 6	0.193 2	0.011 2
	0.056 0	0.109 8	0.374 2	0.007 5	0.181 0	0.011 6
	0.056 6	0.109 1	0.397 8	0.008 3	0.186 0	0.011 5
烫煮干百合煎液	0.058 7	0.065 9	0.241 0	0.003 9	0.151 2	0.008 4
	0.058 7	0.065 9	0.242 2	0.004 0	0.151 1	0.008 0
	0.057 9	0.065 1	0.241 1	0.004 0	0.150 3	0.009 4
	0.057 2	0.062 9	0.239 7	0.004 0	0.151 9	0.009 3
	0.058 1	0.064 8	0.241 7	0.004 0	0.151 0	0.009 2
蒸制干百合煎液	0.049 9	0.113 9	0.446 2	0.005 4	0.225 5	0.010 7
	0.049 3	0.113 1	0.442 8	0.005 3	0.225 9	0.011 0
	0.051 0	0.114 6	0.467 8	0.005 1	0.230 1	0.010 8
	0.050 6	0.114 0	0.465 0	0.005 2	0.228 0	0.010 7
	0.050 7	0.113 5	0.458 4	0.005 3	0.229 3	0.010 6

成分,其中甾体皂苷溶于水中经振摇后会产生大量持久性的似肥皂水泡沫的溶液^[26],这可能与鲜百合浸泡至“白沫出,去其水”中的白沫现象有关。百合皂苷类成分具有抗抑郁、降血糖、抗肿瘤等作用^[27-28],寒性药表现“苦寒之性”的化学成分多源自生物碱类和苷类成分^[29]。与烫煮干百合煎液比较,水浸鲜百合煎液中皂苷类成分和生物碱类成分含量较高,推测其抗抑郁能力和寒凉之性较强,这可能是治疗百合病^[30]等温病时多用水浸鲜百合而少用烫煮干百合的原因所在。

2020年版《中国药典》所载干百合的加工方法是将鲜百合经过沸水中略烫后干燥,按该法所制加工品颜色为淡黄色或淡黄棕色。然而,笔者在前期研究中发现,鲜百合若不经高温加工直接干燥,其颜色会变为棕色或棕褐色,煎液中化学成分含量也会大大降低,尤其酚类成分。在对鲜百合烫煮液的分析中发现,其含有大量酚类及生物碱类成分,说明在烫煮过程中百合有效成分损失较大,而酚类成分具有较强的抗氧化、抗菌、抗炎等作用^[31-32],提示鲜百合经过烫煮可能会导致这些药理作用减弱。

蒸制干百合是将鲜百合经过高温蒸制后干燥,其性状与2020年版《中国药典》所载干百合相差不大,但蒸制法没有在水中烫煮,成分损失要小于烫煮法;百合不经高温处理会发生褐变的原因可能是黄酮类及酚类成分被氧化,或者相关酶促反应的发生^[33],鲜百合直接干燥后酚类成分含量降低可能与此有关,相较于烫煮法,蒸制法加工鲜百合既能达到高温处理的目的,也能减少有效成分的损失。

为研究不同加工方法对百合化学成分的影响,本文结合古方直接应用水煎煮提取方法,避免了鲜百合直接烘干造成的成分变化。百合鲜用历史悠久,水浸鲜百合临床应用广泛^[4],其清心安神力强,寒凉之性强于干品,故在治疗百合病等温热病时多用水浸鲜百合^[34];与鲜百合比较,烫煮干百合寒凉之性降低,补中益气能力增强,长于治疗耳聋耳痛、百合病腹痛等^[35];与鲜百合比较,蒸制干百合寒性略减,润肺止咳力强,长于治疗肺热咳嗽,痰中有血等^[35]。中药需要经过炮制才可临床使用,然而古代加工和炮制界限并不十分严明,张仲景将鲜百合水浸后再煎煮,而不直接应用鲜百合,可能其在水浸

过程中会产生不利于治疗百合病的成分,但这尚需对浸出成分药理作用进行研究。

[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,2020:137-138.
- [2] 佚名. 神农本草经[M]. 顾观光,辑. 杨鹏举,校注. 北京:学苑出版社,2002:148.
- [3] 胡兆东,田硕,苗艳艳,等. 百合的现代化学、药理及临床应用研究进展[J]. 中药药理与临床,2022,38(4):241-246.
- [4] 张仲景. 金匱要略[M]. 于志贤,张智基,点校. 北京:中医古籍出版社,1997:62.
- [5] 庞安时. 伤寒总病论[M]. 邹德琛,刘华生,点校. 北京:人民卫生出版社,1989:212.
- [6] 齐仲甫. 女科百问[M]. 北京:中国书店,1986:111.
- [7] 楼英. 医学纲目[M]. 北京:中国中医药出版社,1996:931.
- [8] 陶弘景. 本草经集注[M]. 尚志钧,辑校. 芜湖:芜湖医学专科学校,1963:272.
- [9] 严用和. 济生方[M]. 北京:人民卫生出版社,1956:151.
- [10] 罗思妮,彭致铖,范倩,等. 经典名方小承气汤中化学成分的上PLC-Q-Orbitrap-MS分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(23):1-10.
- [11] 朱建平,陈侯祯,高萌萌,等. 基于UPLC-Q-TOF/MS法对鲜、干百合地黄汤化学成分的比较研究[J]. 湖南中医药大学学报,2021,41(11):1698-1704.
- [12] 曲伟红,周日宝,童巧珍,等. 百合产地加工方法对百合质量影响的研究[J]. 湖南中医杂志,2004,20(4):73-75.
- [13] 张正,陈江平,钟霞,等. 基于UPLC特征图谱及主要成分含量测定的百合药材初加工方法研究[J]. 亚太传统医药,2021,17(8):33-38.
- [14] 袁志鹰,罗林明,陈乃宏,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS法分析百合珠芽化学成分及其薯蓣皂苷元抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(5):808-813.
- [15] MUNAFO J P, GIANFAGNA T J. Quantitative analysis of phenylpropanoid glycerol glucosides in different organs of easter lily (*Lilium longiflorum* Thunb.) [J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(19):4836-4842.
- [16] 向锋,周宜,廖小娟,等. 基于UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS的湖南新冠2号方的化学成分研究[J]. 湖南中医药大学学报,2021,41(9):1313-1320.
- [17] 林美好,袁志鹰,曾琪,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS^E的百合化学成分分析[J]. 湖南中医药大学学报,2020,40(8):964-973.
- [18] 林伟坚,康海宁,吴凤琪,等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定化妆品中秋水仙碱、秋水仙胺和秋水仙碱苷[J]. 分析试验室,2022,41(7):783-788.
- [19] 张焯,邓琦,魏敏,等. 黄连花茎化学成分的UPLC-Q-Orbitrap HRMS 鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(15):91-99.
- [20] 栗倩,吴萍,夏伯候,等. 百合化学成分及药理活性研究进展[J]. 中国药理学杂志,2021,56(11):875-882.
- [21] 郭信东,梁军,宫凤秋,等. 知母呋甾烷醇型皂苷的质谱裂解行为研究[J]. 中医学报,2016,44(5):11-14.
- [22] 丁腾,孙宇宏,杜霞,等. 经典名方百合地黄汤的化学成分与网络药理学研究[J]. 中草药,2019,50(8):1848-1856.
- [23] 郑旭亚,孙菲菲,杜莉杰,等. 基于HS-SPME-GC-MS比较壁虎炮制前后挥发性成分变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(15):145-152.
- [24] 张越,陈健,李洋,等. 经典名方温经汤标准汤剂HPLC指纹图谱建立及9种成分含量测定[J]. 中草药,2020,51(18):4664-4672.
- [25] 康希,郝慧汇,穆成林,等. 蓟蕈不同提取物对高尿酸血症小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(17):132-138.
- [26] 匡海学. 中药化学[M]. 北京:中国中医药出版社,2003:441.
- [27] 王瑛. 百合皂苷的提取工艺与抗抑郁作用研究[J]. 中国药房,2014,25(7):602-604.
- [28] 林星长,刘晟,张海涛. 百合总皂苷经VEGF/Akt信号通路调节人前列腺癌LNCaP细胞增殖及侵袭的机制研究[J]. 中国药师,2020,23(6):1048-1052.
- [29] 徐宏喜. 中药药理学[M]. 3版. 上海:上海科学技术出版社,2019:11.
- [30] 尤怡. 金匱要略心典[M]. 太原:山西科学技术出版社,2008:08.
- [31] 李玲,刘湘丹,詹济华,等. 卷丹百合化学成分抗肿瘤活性研究[J]. 湖南中医药大学学报,2018,38(10):1133-1136.
- [32] 林鹏飞,贾小舟,祁燕,等. 酚酸类化合物研究进展[J]. 广东化工,2017,44(1):50-52.
- [33] 李瑞琦,马玉翠,吴翠,等. 百合采后加工包装贮藏环节的调查[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(23):151-155.
- [34] 宋如珺,韩赞,胡芳,等. 温病医著中鲜药的应用规律研究[J]. 北京中医药,2022,41(1):54-57.
- [35] 唐林,李莉,孙贤庆,等. 百合炮制历史沿革考证及可视化分析[J]. 时珍国医国药,2021,32(11):2668-2672.

[责任编辑 刘德文]