

HPLC-DAD 指纹图谱结合 HPLC-Q-TOF-MS/MS 成分表征 评价胡桃楸枝的质量

刘宏, 鞠晓畅, 石丰硕, 邸学, 肖洪贺, 张慧, 翟延君, 王添敏*
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600)

[摘要] 目的:建立胡桃楸枝的高效液相色谱法(HPLC)指纹图谱,并对不同产地、不同采收期的胡桃楸枝样品进行质量分析。方法:采用 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm),流动相 0.2% 甲酸水溶液(A)-0.2% 甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 5%~10%B; 5~25 min, 10%~16%B; 25~40 min, 16%~22%B; 40~45 min, 22%~45%B; 45~50 min, 45%~65%B; 50~52 min, 65%~100%B; 52~55 min, 100%B),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 270 nm。采用相似度评价、聚类分析、主成分分析和偏最小二乘法-判别分析对指纹图谱数据进行统计分析。采用 HPLC 串联四极杆飞行时间质谱法(HPLC-Q-TOF-MS/MS)表征胡桃楸枝中的化学成分,选择电喷雾离子源(ESI),在负离子检测模式下进行质谱采集,MS 扫描范围 *m/z* 100~1 700,MS/MS 扫描范围 *m/z* 50~1 700。结果:40 批胡桃楸枝样品中确定了 19 个共有峰,其相似度处于 0.430~0.995,其中春冬季节(4月,5月,12月)采收样品相似度均>0.90,大部分夏季(7~9月)采收样品相似度较低。多元统计分析后发现样品根据采收季节分为两类,而不同产地样品无明显分类规律,说明采收期是影响胡桃楸枝样品质量的主要因素之一。春冬季节采收样品中大部分化学成分的含量高于夏季采收的样品,与夏季采收样品相比,春冬季采收样品质量较好。22 个色谱峰是造成不同季节采收样品差异性的主要成分。通过 HPLC-Q-TOF-MS/MS 表征了胡桃楸枝中的 83 个化学成分,其中鞣质类成分 49 个,有机酸类成分 7 个,萜生物 14 个,黄酮类成分 1 个,萜生物 6 个,木脂素类成分 2 个,二芳基庚烷类成分 3 个,糖类成分 1 个。鉴别了 13 个共有峰和 19 个不同季节采收样品的差异峰,多为鞣质类化合物。结论:建立的 HPLC 指纹图谱可用于胡桃楸枝的质量分析,鞣质是胡桃楸枝中的主要成分。采收期对胡桃楸枝质量影响较大。

[关键词] 胡桃楸枝; 质量评价; 指纹图谱; 高效液相色谱法(HPLC); 液相色谱串联质谱法(LC-MS); 物质基础; 采收期

[中图分类号] R22;R931;R28;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)09-0137-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202448

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201019.1635.003.html>

[网络出版日期] 2020-10-20 11:24

Quality Evaluation of Branches of *Juglans mandshurica* by HPLC-DAD Fingerprint Combined with HPLC-Q-TOF-MS/MS Characterization of Constituents

LIU Hong, JU Xiao-chang, SHI Feng-shuo, DI Xue, XIAO Hong-he,
ZHANG Hui, ZHAI Yan-jun, WANG Tian-min*

(School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint of branches of *Juglans mandshurica* and to evaluate the quality of the samples from different producing areas and in different harvest periods. **Method:** Chromatographic separation was performed on an Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm) for gradient elution with mobile phase of 0.2% formic acid solution

[收稿日期] 20200805(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703658);辽宁省自然科学基金项目(2019-MS-223);沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目(RC190083)

[第一作者] 刘宏,在读硕士,从事中药品质评价与药效物质基础研究,E-mail:2427882232@qq.com

[通信作者] *王添敏,博士,副教授,硕士生导师,从事中药品质评价与药效物质基础研究,E-mail:wang_tm@163.com

(A)-0.2% formic acid acetonitrile solution (B) (0-5 min, 5%-10%B; 5-25 min, 10%-16%B; 25-40 min, 16%-22%B; 40-45 min, 22%-45%B; 45-50 min, 45%-65%B; 50-52 min, 65%-100%B; 52-55 min, 100%B) at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. The column temperature was 30 °C and the detection wavelength was 270 nm. The quality of branches of *Juglans mandshurica* was evaluated by similarity evaluation, cluster analysis, principal component analysis and partial least squares-discriminant analysis. The chemical constituents of the samples were identified by HPLC coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS). The mass spectrometry was conducted in negative ion mode with electrospray ionization (ESI). Data were acquired over a range of m/z 100-1 700 for MS and m/z 50-1 700 for MS/MS. **Result:** A total of 19 common peaks were confirmed in 40 batches of samples, and the similarity ranged from 0.430 to 0.995, of which the similarity of samples collected in spring and winter seasons (April, May and December) was greater than 0.90, while the similarity of most samples collected in summer (July to September) was low. Multivariate statistical analysis showed that the samples were divided into two groups according to the harvest time, but there was no obvious classification rule for the samples from different producing areas. The contents of most constituents in the samples collected in spring and winter were higher than those collected in summer. The result illustrated that different harvest periods had great influence on the quality of branches of *J. mandshurica*. Compared with the samples collected in summer, the quality of samples collected in spring and winter was better. A total of 22 peaks were proved to be the main constituents that contributed to the difference between samples collected in different seasons. A total of 83 chemical components were identified by HPLC-Q-TOF-MS/MS, including 49 tannins, 7 organic acids, 14 naphthalene derivatives, 1 flavonoid, 6 anthracene derivatives, 2 lignans, 3 diarylheptanoids and 1 saccharide. Totally 13 common peaks were identified. Of the peaks that contributed to discriminate samples collected in different season, 19 peaks were identified and most of them were tannins. **Conclusion:** The established HPLC fingerprint can provide useful information for the quality evaluation of branches of *J. mandshurica*. Tannin is the main constituents in the samples. Harvest period has great influence on the quality of branches of *J. mandshurica*.

[Key words] branches of *Juglans mandshurica*; quality evaluation; fingerprint; high performance liquid chromatography (HPLC); liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC-MS); material basis; harvest periods

胡桃楸为胡桃科胡桃属植物,又名核桃楸,主要分布于我国东北、河北、山西及朝鲜北部^[1]。在民间,常用胡桃楸枝、树皮和果皮与鸡蛋同煮治疗各种肿瘤;在临床上,复方青龙衣制剂单独或联合用药可用于食管癌、肺癌、胃癌和肝癌等肿瘤的治疗^[2-4];体内外实验研究表明,胡桃楸的不同部位均具有抗肿瘤作用^[5-10]。胡桃楸中化学成分有萜醌、鞣质、有机酸、黄酮和二芳基庚烷等^[10-13],其中萜醌和鞣质为主要活性成分。

目前,胡桃楸未被收录在2020年版《中华人民共和国药典》,但2009年版《辽宁省中药材标准》收录了胡桃楸皮,且对其没食子酸的含量进行了测定^[14]。然而,总体而言,关于胡桃楸质量标准和质量评价研究仍不完善。本课题组前期对胡桃楸不同部位中总鞣质和胡桃醌的含量进行了测定^[15-16],并采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱

法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)鉴定了胡桃楸根、枝和叶的化学成分^[17];同时,本课题组研究表明胡桃楸枝也具有较好的抗肿瘤作用^[8],并且资源丰富易得。因此,本研究以胡桃楸枝为研究对象,收集了40批不同产地、不同采收期的胡桃楸枝样品进行指纹图谱研究,采用相似度评价、聚类分析和偏最小二乘法-判别分析研究胡桃楸枝质量与产地、采收期之间的相关性;同时,利用高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(HPLC-Q-TOF-MS/MS)表征胡桃楸枝指纹图谱中的主要化学成分,为胡桃楸的质量评价及质量标准研究提供依据。

1 材料

1260型高效液相色谱仪和6550型四级杆飞行时间质谱仪(美国安捷伦公司),JA21002型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),TDZ4-WS型台式低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限

公司)。

1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖,1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖和1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖对照品(自制,经HPLC峰面积归一化法测定,纯度均>96%);没食子酸、逆没食子酸对照品[Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司,批号分

别为410860050,117710025,纯度均>98%],水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。40批胡桃楸枝均为产地收集,各样品的采集地和采收日期见表1,所有样品均经辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为胡桃科植物胡桃楸 *Juglans mandshurica* 的枝。

表1 胡桃楸枝的样品信息及相似度评价

Table 1 Sample information and similarity evaluation of 40 batches of branches of *J. mandshurica*

编号	采集地	采收日期	相似度	编号	采集地	采收日期	相似度
S1	辽宁省铁岭市西丰县	2018-08	0.952	S21	辽宁省营口市盖州市	2018-08	0.987
S2	辽宁省铁岭市横道河子乡	2018-08	0.668	S22	辽宁省抚顺市清原县南口前镇	2018-08	0.789
S3	辽宁省铁岭市鸡冠山乡	2018-08	0.670	S23	辽宁省抚顺市清原县红透山镇	2018-08	0.920
S4	辽宁省本溪市小市镇	2018-08	0.896	S24	辽宁省抚顺市新宾县上夹河镇	2018-04	0.915
S5	辽宁省本溪市桓仁县	2018-05	0.979	S25	辽宁省抚顺市新宾县木奇镇	2018-04	0.981
S6	辽宁省本溪市东营坊乡	2018-04	0.985	S26	辽宁省抚顺市新宾县南杂木镇	2018-04	0.981
S7	辽宁省鞍山市岫岩县	2018-07	0.953	S27	辽宁省抚顺市抚顺县兰山乡	2018-04	0.987
S8	辽宁省鞍山市岫岩县	2018-08	0.847	S28	辽宁省抚顺市新抚区	2018-08	0.814
S9	辽宁省鞍山市千山区	2018-09	0.844	S29	辽宁省抚顺市抚顺县上马乡	2018-04	0.989
S10	辽宁省鞍山市千山区	2018-07	0.927	S30	辽宁省抚顺市抚顺县哈达镇	2018-04	0.981
S11	辽宁省辽阳市辽阳县	2018-08	0.601	S31	辽宁省抚顺市抚顺县石文镇	2018-04	0.954
S12	吉林省吉林市龙潭区	2018-07	0.974	S32	辽宁省抚顺市抚顺县救兵乡	2018-05	0.986
S13	吉林省吉林市蛟河市	2018-07	0.972	S33	辽宁省抚顺市抚顺县峡河乡	2018-08	0.967
S14	内蒙古自治区赤峰市热水镇	2018-04	0.977	S34	辽宁省抚顺市望花区	2018-04	0.983
S15	辽宁省丹东市五龙背镇	2018-04	0.991	S35	辽宁省营口市盖州市	2017-07	0.517
S16	辽宁省丹东市东港市	2018-04	0.995	S36	辽宁省丹东市东港市	2016-12	0.982
S17	辽宁省丹东市振兴区	2018-07	0.911	S37	辽宁省鞍山市岫岩县	2016-12	0.981
S18	辽宁省丹东市东港市	2018-08	0.687	S38	黑龙江省伊春市小兴安岭	2016-12	0.988
S19	辽宁省丹东市东港市	2018-08	0.430	S39	吉林省珲春市	2016-12	0.989
S20	辽宁省营口市盖州市	2018-08	0.762	S40	黑龙江省黑河市嫩江市	2016-12	0.991

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 采用Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)和Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ 预柱(2.1 mm×5 mm, 2.7 μm)进行分离,柱温30℃,流动相0.2%甲酸水溶液(A)-0.2%甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 5%~10%B; 5~25 min, 10%~16%B; 25~40 min, 16%~22%B; 40~45 min, 22%~45%B; 45~50 min, 45%~65%B; 50~52 min, 65%~100%B; 52~55 min, 100%B),流速0.3 mL·min⁻¹,后运行时间10 min,检测波长270 nm,进样量5 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),在负离子模式下进行质谱采集,每个循环选择4个最大的色

谱峰进行二级质谱扫描,采集速率1 spectra·s⁻¹,MS扫描范围设定m/z 100~1 700,MS/MS扫描范围m/z 50~1 700。干燥气温度200℃,流速11 L·min⁻¹;鞘气温度350℃,流速8 L·min⁻¹;雾化器压力设定0.24 MPa;毛细管电压3.5 kV,喷嘴电压1 kV;碰撞电压75 V,碰撞能量30 eV。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称取没食子酸,1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖,1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖,1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖对照品适量,加一定量50%甲醇(含0.5%甲酸)使溶解,前两者配制成质量浓度为0.3 g·L⁻¹,后两者配制成质量浓度为1.0 g·L⁻¹的对照品储备液。精密称取逆没食子酸约0.5 mg,置于10 mL量瓶中,

加二甲基亚砜 0.5 mL 使溶解,加 50% 甲醇(含 0.5% 甲酸)稀释至刻度,得 0.05 g·L⁻¹对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液 采集的新鲜胡桃楸枝阴干,切片,粉碎。取粗粉约 0.2 g,精密称定,置具塞离心管中,精密加入 50% 甲醇(含 0.5% 甲酸)10 mL,称定质量,超声(200 W, 50 kHz)处理 30 min,放冷,用提取溶剂补足减失的质量,4 000 r·min⁻¹离心 5 min(离心半径 12 cm),取上清滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 精密度试验 精密称取样品 S16 0.2 g,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下条件连续进样 6 次,以 1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖的色谱峰作为参照峰,结果发现各主要色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明仪器精密度良好。

2.3.2 重复性试验 精密称取样品 S16 0.2 g,平行 6 份,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下条件测定,计算各主要色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 5.0%,表明该方法重复性良好。

2.3.3 稳定性试验 精密称取样品 S16 0.2 g,按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 8, 10, 12 h 按 2.1.1 项下条件测定,计算各主要色谱峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 均 < 3.0%,表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.4 指纹图谱的建立及相似度评价 40 批不同产地、不同采收期胡桃楸枝样品按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下条件测定,记录色谱图,见图 1。将 40 批胡桃楸枝样品 HPLC 指纹图谱以 AIA 格式导入国家药典委员会研制的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012 版)软件,以样品 S1 图谱为参照,经多点校正、峰匹配生成对照指纹图谱,见图 2,标定共有峰 19 个。以生成的胡桃楸枝对照指纹图谱为标准,计算相似度,见表 1。结果 40 批药材相似度处于 0.430~0.995,说明不同产地、不同采收期胡桃楸枝样品指纹图谱差异较大。其中所有春冬季节(4 月,5 月,12 月)采收样品(19 批)的相似度均较高,均 > 0.90;样品 S2~S4, S8, S9, S11, S18~S20, S22, S28 和 S35 相似度均 < 0.90,这些样品均采自夏季(7~9 月);仍有部分夏季采收样品 S1, S7, S10, S12, S13, S17, S21, S23, S33 的相似度 > 0.90。上述相似度评价结果说明采收时间对胡桃楸枝中所含的化学成分影响较大,其中春冬季节采收的样品差异较小、质量较稳定,而夏季采收样品差异较大、质

量不稳定。

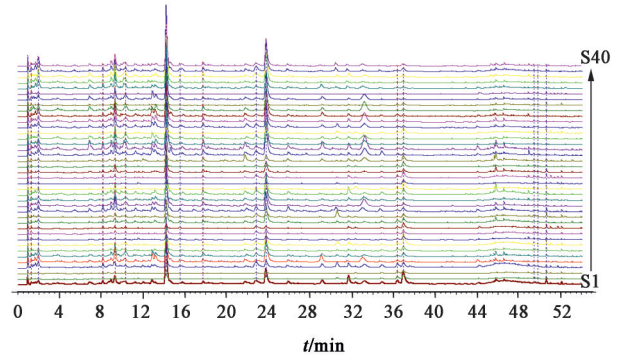
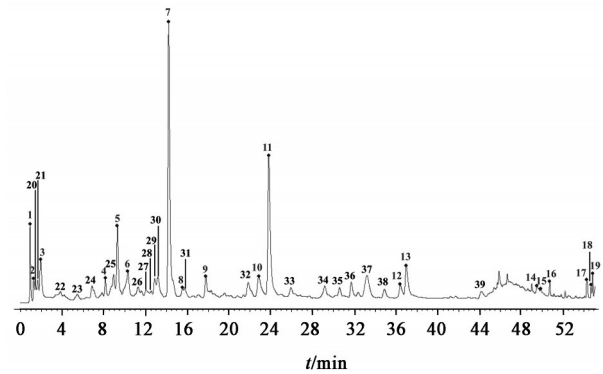


图 1 40 批胡桃楸枝样品的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC fingerprints of 40 batches of branches of *J. mandshurica*



1~19. 共有峰;20~39. 其他主要色谱峰

图 2 40 批胡桃楸枝样品的 HPLC 对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC reference fingerprint of 40 batches of branches of *J. mandshurica*

通过对比春冬季(4 月,5 月,12 月)和夏季(7~9 月)采收样品的对照指纹图谱发现两者差异较大,见图 3,主要体现在各色谱峰的峰面积有所不同。一方面,春冬季节采收的样品中大部分成分含量明显高于夏季采收的样品,以 9.4 min[色谱峰 5(P5), 1,6-二-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖], 14.2 min(P7, 1,2,6-三-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖)和 23.9 min(P11, 1,2,3,6-四-*O*-没食子酰基- β -*D*-葡萄糖)色谱峰的峰面积为例,上述三者在春冬季节采收样品中的平均峰面积分别为 763.3, 3 298.9, 2 212.9,而三者在夏季采收样品中的平均峰面积分别为 174.2, 856.6, 613.7,夏季采收样品中上述 3 个成分的含量仅为春冬季节采收的 30% 左右。另一方面,春冬季节采收样品中仍有个别成分含量低于夏季采收的样品,最明显的是 P13(juglanthracenoside A),在夏季样品中平均峰面积为 543.0,而在春冬季节样品中平均峰面积为 227.0。

2.5 聚类分析 为了更全面地分析不同产地、不同

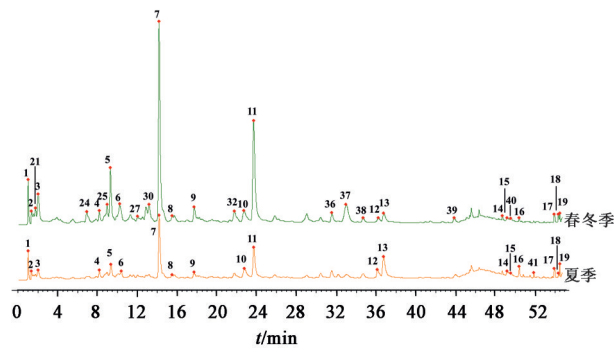


图3 春冬季和夏季采收胡桃楸枝样品的HPLC对照指纹谱
Fig. 3 HPLC reference fingerprints of branches of *J. mandshurica* collected in spring/winter and summer

采收期对胡桃楸枝样品质量的影响,以19个共有峰的峰面积为指标,通过SPSS 24.0软件计算样品间欧氏距离,采用组间平均联接法对40批胡桃楸枝样品进行系统聚类分析,见图4。结果发现当欧氏距离为6时,可将胡桃楸枝样品划分为三类,第一类为采自抚顺新宾木奇镇的样品S25,第二类包括S1, S5, S6, S14~S16, S24, S26, S27, S29~S32, S34, S36~S40共19批样品;第三类包括S2~S4, S7~S13, S17~S23, S28, S33, S35共20批样品。表明胡桃楸枝的指纹图谱不以产地聚类,提示产地对胡桃楸枝质量的影响并无明显规律。进一步分析各类样品的采收时间,第一类样品S25的采收时间为春季(4月);除样品S1(8月)外,第二类样品的采收时间均为春冬季(4月,5月及12月);第三类样品的采收时间均为夏季(7~9月)。说明采收时间是影响胡桃楸枝质量的主要因素之一。

春冬季采收样品S25中19个共有峰的峰面积(16 765.6)显著高于其他春冬季采收样品的平均峰面积8 952.1,因此,其在聚类分析中被单独聚为一类;但其P13的峰面积272.7,接近春冬季采收样品中该峰的平均峰面积227.0,而显著低于夏季采收样品中该峰平均峰面积543.0。在相似度分析中,样品S25与对照图谱的相似度0.981,与其他春冬季采收样品的相似度接近。故而样品S25虽被单独聚为一类,但其指纹图谱有典型春冬季采收样品的特点。夏季采收样品S1中19个共有峰的峰面积(9 367.2)显著高于其他夏季采收样品的平均峰面积3 404.2,而与春冬季采收样品的平均峰面积8 952.1更为接近,使其与春冬季采收样品聚为一类;但其P13的峰面积较高(1 301.7),符合夏季采收样品的特征。

2.6 主成分分析(PCA)及偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA) 由于同一药材中很多成分结构相似且

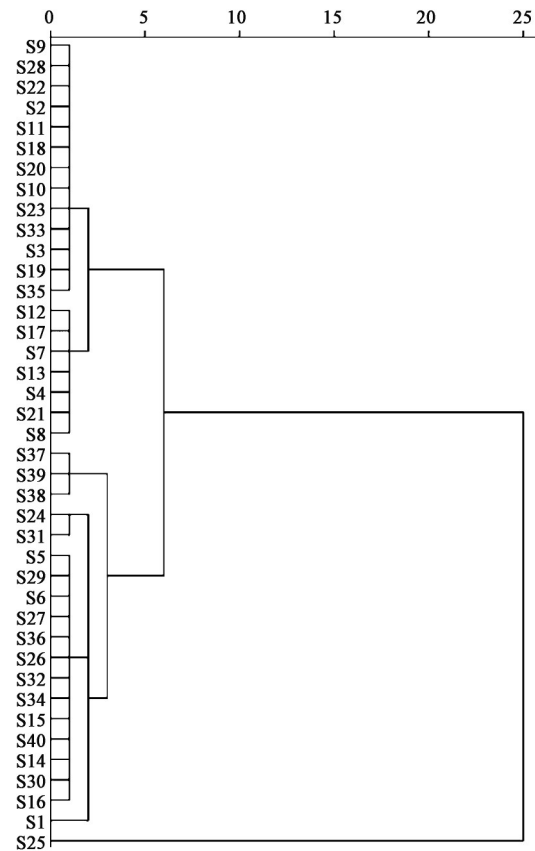


图4 胡桃楸枝样品的系统聚类分析
Fig. 4 Cluster analysis of branches of *J. mandshurica*

存在生源关系^[18],所以其中成分的含量往往也存在相关性,PCA则能够对具有相关性的变量进行降维。并且除19个共有峰,胡桃楸枝中还检测到了较多其他色谱峰。因此,以图2中的39个主要色谱峰的峰面积为变量,对胡桃楸枝样品进行PCA处理,进一步明确所收集胡桃楸枝样品的分类规律。由40批样品39个主要色谱峰的峰面积得到40×39阶数据矩阵,导入SIMCA-P 12.0软件进行PCA处理,得前4个主成分的特征值均>1,其累积贡献率72.1%,代表了胡桃楸枝指纹图谱中39个色谱峰70%以上的信息,具有较好代表性。提取主成分1和主成分2构建40批胡桃楸枝样品的得分图,见图5。结果发现夏季采收样品与春冬季采收样品区分明显、无重叠,夏季采收样品多位于得分图的左侧,春冬季采收样品多位于得分图的右侧,说明不同采收期的胡桃楸枝样品指纹图谱差异较大。样品S1和S25因各色谱峰的峰面积较大而与其他样品差异较大,位于95%置信区间外。上述结果与聚类分析结果一致。

在此基础上,用PLS-DA筛选对胡桃楸枝样品按采收期分类贡献较大的成分。以40批胡桃楸枝

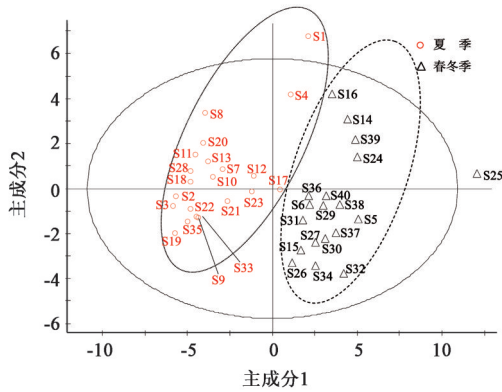


图5 不同胡桃楸枝样品的PCA得分
Fig. 5 Score plots of PCA from branches of *J. mandshurica*

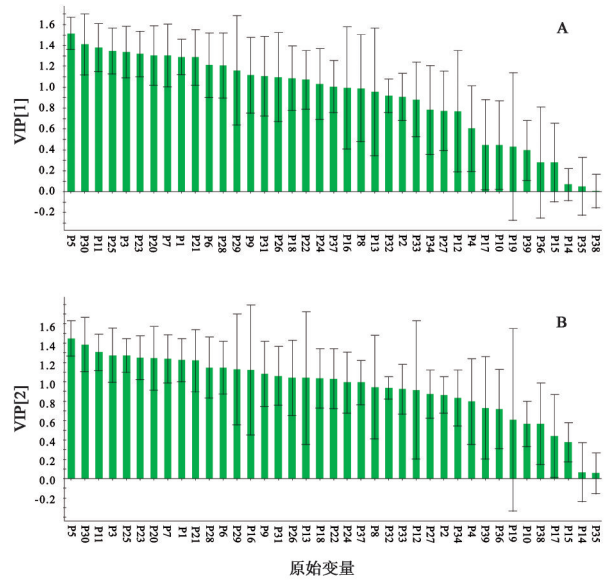
样品的39个主要色谱峰的峰面积为变量,得到40×39阶数据矩阵,导入SIMCA-P 12.0进行拟合,当选取2个主成分时,模型的累积 R^2X (表示模型对 X 矩阵的解释率)=0.577,累积 R^2Y (表示模型对 Y 矩阵的解释率)=0.864,累积 Q^2 (表示模型的预测能力)=0.769,均>0.5,说明该模型可靠。根据39个原始变量的变量重要性投影(VIP)值,选择在主成分1的VIP[1]或在主成分2的VIP[2]大于1的变量22个,包括P5, 30, 11, 25, 3, 23, 20, 7, 1, 21, 6, 28, 29, 9, 31, 26, 18, 22, 24, 37, 16, 13, 即不同采收期胡桃楸枝之间差异较大的色谱峰,见图6。

2.7 化学成分表征 为了明确相似度分析和多元统计分析中确定的共有峰和差异色谱峰的结构,采用HPLC-Q-TOF-MS/MS表征胡桃楸枝中的化学成分。根据本课题组前期的研究结果^[19],选择负离子检测模式,应用MassHunter Qualitative Analysis (version B.04.00)软件处理数据获得各离子峰的精确相对分子质量及二级质谱特征,通过与对照品及文献报道的精确相对分子质量、保留时间、二级质谱等参数进行比对,结果从胡桃楸枝样品中鉴定了83个化学成分,与前期研究结果一致^[17,19]。

表2 胡桃楸枝中化学成分的HPLC-Q-TOF-MS/MS鉴定

Table 2 Identification of chemical constituents in branches of *J. mandshurica* by HPLC-Q-TOF-MS/MS

化合物	t_R /min	[M-H] ⁻			分子式	主要碎片	结构类型	名称
		测定值	理论值	δ /ppm				
1	0.959	341.108 2	341.108 4	-0.59	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	179.056 0, 161.045 4	糖	二聚六碳糖
2	0.987	191.020 0	191.019 2	4.19	C ₆ H ₈ O ₇	111.008 0, 85.029 6, 57.034 8	有机酸	柠檬酸
3	1.014	133.014 3	133.013 7	4.51	C ₄ H ₆ O ₅	100.924 4, 72.991 6, 71.014 2, 59.013 9	有机酸	苹果酸
4	1.042	331.067 6	331.066 5	3.32	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	211.025 4, 169.013 9, 125.023 5	鞣质	单-O-没食子酰基-葡萄糖
5	1.042	481.063 0	481.061 8	2.49	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₄	300.998 1, 275.019 1, 257.008 6, 169.013 8, 125.025 0	鞣质	单-O-六羟基苯基甲酰基(HHDP)-葡萄糖
6	1.350	481.062 9	481.061 8	2.29	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₄	331.069 4, 301.001 1, 275.020 6, 169.014 3, 119.047 5	鞣质	单-O-HHDP-葡萄糖



A. 主成分1(VIP[1]); B. 主成分2(VIP[2])

图6 不同采收期胡桃楸枝样品PLS-DA的VIP值分析

Fig. 6 VIP values based on PLS-DA of branches of *J. mandshurica* collected at different harvest periods

图7为胡桃楸枝样品S16的总离子流图。表征的化学成分包括共有峰1~13, 依次为化合物4, 6, 9, 23, 26, 28, 45, 46, 50, 62, 63, 76, 77, 其中共有峰3, 5, 7, 10和11是通过与对照品比对后鉴定, 但仍有6个共有峰(14~19)未能鉴定其结构。具体信息见表2。

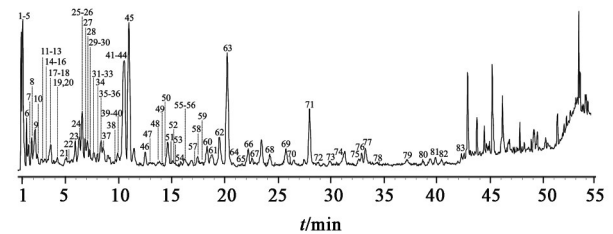


图7 胡桃楸枝样品S16的HPLC-Q-TOF-MS/MS总离子流

Fig. 7 TIC of sample 16 of branches of *J. mandshurica* by HPLC-Q-TOF-MS/MS

续表 2

化合物	t_R/min	[M-H] ⁻			分子式	主要碎片	结构类型	名称
		测定值	理论值	δ/ppm				
7	1.587	331.067 5	331.066 5	3.02	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	211.022 4, 169.013 8, 125.023 6, 59.013 9	鞣质	单-O-没食子酰基-葡萄糖
8	1.853	331.067 4	331.066 5	2.72	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	211.024 3, 169.012 5, 125.023 9, 59.013 8	鞣质	单-O-没食子酰基-葡萄糖
9	2.095	169.014 5	169.013 7	4.73	C ₇ H ₆ O ₅	125.024 7, 79.019 3, 51.023 9	有机酸	没食子酸
10	2.241	483.078 0	483.077 5	1.04	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	313.049 6, 211.019 9, 169.015 3, 125.024 7	鞣质	二-O-没食子酰基-葡萄糖
11	2.755	633.072 8	633.072 8	0	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	543.029 7, 491.164 3, 300.999 5, 275.018 1, 249.039 7, 169.571 2, 92.926 1	鞣质	单-O-没食子酰基-单-O-HHDP-葡萄糖
12	2.932	783.067 4	783.068 1	-0.89	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	481.057 3, 300.997 4, 275.025 0, 231.031 4, 145.027 7	鞣质	二-O-HHDP-葡萄糖
13	3.024	153.019 2	153.018 8	2.61	C ₇ H ₆ O ₄	124.017 1, 96.920 0, 79.958 1, 51.023 6	有机酸	原儿茶酸
14	3.146	287.040 2	287.040 3	-0.35	C ₁₁ H ₁₂ O ₉	242.936 1, 135.029 8, 125.023 1, 108.015 5, 92.926 7, 75.008 6, 61.988 2	鞣质	没食子酰基-蔗糖酸
15	3.175	315.071 6	315.071 6	0	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	152.010 6, 136.921 9, 121.941 2, 108.021 1, 77.098 3,	鞣质	单-O-原儿茶酰基-葡萄糖
16	3.335	329.087 2	329.087 3	-0.30	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	167.033 8, 152.012 2, 125.025 3, 108.020 8, 59.014 1, 51.022 8	鞣质	单-O-香草酰基-葡萄糖
17	3.534	783.067 4	783.068 1	-0.89	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	481.055 4, 300.999 1, 275.018 7, 53.020 7	鞣质	二-O-HHDP-葡萄糖
18	3.694	483.078 0	483.077 5	1.04	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	211.024 0, 169.013 6, 125.023 5	鞣质	二-O-没食子酰基-葡萄糖
19	4.248	483.078 0	483.077 5	1.04	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	271.043 8, 211.022 6, 169.014 0, 125.023 2, 61.988 0	鞣质	二-O-没食子酰基-葡萄糖
20	4.717	633.072 8	633.072 8	0	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₈	448.999 4, 300.997 5, 275.021 1, 169.012 9	鞣质	单-O-没食子酰基-单-O-HHDP-葡萄糖
21	5.063	359.098 7	359.097 8	2.51	C ₁₃ H ₂₀ O ₁₀	182.017 7, 138.029 3, 89.023 6, 59.013 9	鞣质	单-O-丁香酰基-葡萄糖
22	5.368	783.067 4	783.068 1	-0.89	C ₃₄ H ₂₄ O ₂₂	633.071 5, 300.996 3, 275.019 5	鞣质	二-O-HHDP-葡萄糖
23	5.921	359.098 7	359.097 8	2.51	C ₁₃ H ₂₀ O ₁₀	197.046 0, 152.047 6, 89.023 6, 59.013 3	鞣质	单-O-丁香酰基-葡萄糖
24	6.304	483.078 0	483.077 5	1.04	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	313.053 3, 271.044 7, 211.023 9, 169.013 8, 125.021 7	鞣质	二-O-没食子酰基-葡萄糖
25	6.546	289.071 4	289.071 2	0.69	C ₁₃ H ₁₄ O ₆	164.009 6, 151.035 6, 137.023 9, 123.044 4, 109.030 2, 97.0286	黄酮	儿茶素
26	6.663	483.077 3	483.077 5	-0.41	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	313.055 3, 271.045 1, 211.024 6, 169.013 3, 125.021 4,	鞣质	1,6-二-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖
27	6.893	359.098 9	359.097 8	3.06	C ₁₃ H ₂₀ O ₁₀	300.083 3, 239.052 6, 181.014 8, 121.028 4, 59.014 1	鞣质	单-O-丁香酰基-葡萄糖
28	7.064	483.078 4	483.077 5	1.86	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	313.056 0, 169.013 5, 125.023 5, 59.011 7	鞣质	二-O-没食子酰基-葡萄糖
29	7.242	533.151 1	533.150 6	0.94	[C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃ +COOH] ⁺	193.050 0, 175.038 9, 169.012 8	萜衍生物	三羟基-tetralone-戊糖基-己糖苷
30	7.352	635.088 8	635.088 4	0.63	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	465.063 7, 313.059 6, 169.014 0, 125.024 9, 94.925 0	鞣质	三-O-没食子酰基-葡萄糖
31	7.479	453.103 9	453.103 3	1.32	C ₂₀ H ₂₂ O ₁₂	313.054 5, 169.013 7, 151.001 8, 125.026 9, 89.023 7, 59.013 6	鞣质	4-羟基-3-甲氧基苯基-6-O-没食子酰基-葡萄糖苷
32	7.600	325.092 3	325.092 3	0	C ₁₃ H ₁₈ O ₈	225.870 8, 183.001 9, 145.029 2, 119.048 2, 59.012 7	鞣质	单-O-香豆酰基-葡萄糖
33	7.662	401.108 7	401.108 4	0.75	[C ₁₆ H ₂₀ O ₉ +COOH] ⁺	208.985 4, 193.050 1, 175.038 9	萜衍生物	二羟基-tetralone-己糖苷
34	7.925	281.066 5	281.066 1	1.42	C ₁₃ H ₁₄ O ₇	163.039 0, 135.028 9, 119.050 4, 75.008 5, 59.014 5	鞣质	香豆酰基-蔗糖酸
35	8.192	533.151 1	533.150 6	0.94	[C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃ +COOH] ⁺	193.050 2, 175.040 5	萜衍生物	三羟基-tetralone-戊糖基-己糖苷
36	8.309	177.056 0	177.055 2	4.52	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	159.014 3, 131.049 1, 115.055 2	萜衍生物	二羟基-tetralone

续表 2

化合物	t_R/min	[M-H] ⁻			分子式	主要碎片	结构类型	名称
		测定值	理论值	δ/ppm				
37	8.505	635.088 8	635.088 4	0.63	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	465.065 1, 313.054 9, 169.013 9, 125.021 7	鞣质	三-O-没食子酰基-葡萄糖
38	9.328	355.102 9	355.102 9	0	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	191.072 3, 175.040 0, 135.039 1, 92.926 2, 59.014 0	萜衍生物	三羟基-tetralone-己糖苷
39	9.831	481.098 5	481.098 2	0.62	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₃	313.056 1, 169.014 6, 152.011 2, 125.023 0, 113.023 3	鞣质	单-O-香草酰基-单-O-没食子酰基-葡萄糖
40	9.946	337.092 9	337.092 3	1.78	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	175.040 7, 131.049 7	萜衍生物	三羟基-萜烷-己糖苷
41	10.122	193.050 7	193.050 1	3.11	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	191.032 7, 174.031 3, 158.042 1, 129.034 6, 108.021 3	萜衍生物	三羟基-tetralone
42	10.302	469.135 5	469.134 6	1.92	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₂	175.039 5	萜衍生物	三羟基-萜烷-戊糖基-己糖苷
43	10.304	467.083 3	467.082 6	1.50	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₃	313.057 2, 175.040 0, 153.017 5, 108.020 9, 89.023 9, 59.014 9	鞣质	二羟基苯甲酸-O-没食子酰基-葡萄糖苷
44	10.575	337.092 9	337.092 3	1.78	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	175.040 1	萜衍生物	三羟基-萜烷-己糖苷
45	10.729	635.088 8	635.088 4	0.63	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	465.065 8, 313.051 9, 169.013 6, 125.020 9	鞣质	1,2,6-三-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖
46	12.570	635.088 8	635.088 4	0.63	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	483.076 7, 313.058 4, 169.014 2, 125.024 2	鞣质	三-O-没食子酰基-葡萄糖
47	13.041	281.066 5	281.066 1	1.42	C ₁₃ H ₁₄ O ₇	163.047 5, 135.028 2, 119.048 0, 75.009 0	鞣质	香豆酰基-蔗糖酸
48	13.884	531.171 0	531.171 4	-0.75	[C ₂₂ H ₃₀ O ₁₂ +COOH] ⁻	485.166 2, 339.108 6, 286.829 5, 159.045 1,	萜衍生物	二羟基-tetralone-戊糖基-己糖苷
49	14.236	509.129 3	509.129 5	-0.39	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₃	313.053 9, 271.044 0, 211.024 4, 169.014 2, 163.037 7, 124.016 4	鞣质	单-O-香草酰基-单-O-丁香酰基-葡萄糖
50	14.504	935.078 1	935.079 1	-1.07	C ₄₁ H ₂₈ O ₂₆	783.054 9, 633.072 8, 300.999 6	鞣质	单-O-没食子酰基-二-O-HHDP-葡萄糖
51	14.909	649.103 8	649.104 1	-0.46	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₈	479.083 1, 313.055 7, 271.042 4, 183.029 1, 169.012 9, 125.025 1	鞣质	甲基没食子酰基-二-O-没食子酰基-葡萄糖
52	14.973	635.088 8	635.088 4	0.63	C ₂₇ H ₂₄ O ₁₈	465.065 3, 313.052 8, 169.014 0, 125.021 9	鞣质	三-O-没食子酰基-葡萄糖
53	15.209	787.098 9	787.099 4	-0.64	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	617.0079 7, 465.070 8, 169.012 3, 125.023 1	鞣质	四-O-没食子酰基-葡萄糖
54	15.892	539.140 1	539.140 1	0	C ₂₄ H ₂₈ O ₁₄	327.068 2, 212.067 1, 197.045 9, 153.054 8, 124.014 6	鞣质	二-O-丁香酰基-葡萄糖
55	16.202	481.134 3	481.134 6	-0.62	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₂	297.057 8, 189.018 7, 153.019 4, 137.995 1, 108.012 1	鞣质	羟基-甲氧基苯基-单-O-丁香酰基-葡萄糖苷
56	16.228	511.145 2	511.145 2	0	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₃	341.084 8, 197.043 4, 183.029 7, 169.044 8, 153.018 5, 125.025 3, 107.012 4	鞣质	羟基-二甲氧基苯酚-单-O-丁香酰基-葡萄糖苷
57	17.147	649.103 8	649.104 1	-0.46	C ₂₈ H ₂₆ O ₁₈	465.069 9, 295.039 6, 169.015 2, 125.023 1	鞣质	甲基没食子酰基-二-O-没食子酰基-葡萄糖
58	17.276	507.114 6	507.113 9	1.38	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃	313.053 6, 193.049 4, 175.037 9, 169.013 5, 151.001 3, 125.024 7	萜衍生物	三羟基-tetralone-单-O-没食子酰基-葡萄糖苷
59	17.772	511.108 7	511.108 8	-0.20	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₄	297.035 3, 285.065 4, 239.056 0, 211.061 5, 197.046 2, 182.020 0, 169.014 7, 151.002 7, 137.023 8, 125.022 2	鞣质	单-O-丁香酰基-单-O-没食子酰基-葡萄糖
60	18.268	937.093 9	937.094 7	-0.85	C ₄₁ H ₃₀ O ₂₆	767.073 2, 466.072 4, 300.998 2, 169.012 3	鞣质	三-O-没食子酰基-单-O-HHDP-葡萄糖
61	18.725	787.098 9	787.099 4	-0.64	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	635.084 7, 465.058 2, 313.050 7, 295.035 9, 169.013 5, 124.026 3	鞣质	四-O-没食子酰基-葡萄糖
62	19.694	300.998 2	300.998 4	-0.66	C ₁₄ H ₆ O ₈	283.992 1, 271.997 5, 257.011 8, 245.067 5, 161.062 1, 129.034 4	有机酸	逆没食子酸
63	20.390	787.098 9	787.099 4	-0.64	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	617.075 7, 465.064 4, 295.044 3, 169.013 3, 125.021 1	鞣质	1,2,3,6-四-O-没食子酰基-β-D-葡萄糖

续表 2

化合物	t_R/min	[M-H] ⁻			分子式	主要碎片	结构类型	名称
		测定值	理论值	δ/ppm				
64	20.526	475.124 0	475.124 0	0	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	313.055 1, 284.030 3, 169.013 9, 151.001 9, 125.022 6	萜衍生物	羟基-tetralone-单-O-没食子酰基-葡萄糖苷
65	22.003	511.108 7	511.108 8	-0.20	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₄	331.064 1, 169.013 9, 168.007 0, 131.048 5, 125.024 7	鞣质	单-O-丁香酰基-单-O-没食子酰基-葡萄糖
66	22.034	787.098 9	787.099 4	-0.64	C ₃₄ H ₂₈ O ₂₂	635.083 8, 617.074 8, 465.060 1, 169.012 9, 124.009 1	鞣质	四-O-没食子酰基-葡萄糖
67	22.590	433.077 2	433.077 1	0.23	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	369.162 9, 163.038 7, 145.028 4, 135.030 1, 75.009 9, 61.988 1	鞣质	香豆酰基-没食子酰基-苏糖酸
68	24.180	361.165 6	361.165 1	1.38	C ₂₀ H ₂₆ O ₆	179.073 1, 121.026 0, 107.049 8	木脂素	开环异落叶松脂素
69	25.777	489.103 3	489.103 3	0	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	313.056 7, 271.044 2, 187.038 2, 175.038 5, 169.012 9, 151.002 7	萜衍生物	三羟基-萜烷-单-O-没食子酰基-葡萄糖苷
70	26.145	391.175 5	391.175 7	-0.51	C ₂₁ H ₂₈ O ₇	175.079 2, 160.056 9, 137.079 2, 135.045 6	二芳基 庚烷	juglanol B
71	27.792	939.108 6	939.110 4	-1.92	C ₄₁ H ₃₂ O ₂₆	787.094 7, 769.087 2, 635.069 9, 617.073 5, 599.062 9, 465.066 0, 169.013 5, 124.014 7	鞣质	五-O-没食子酰基葡萄糖
72	28.703	649.139 4	649.140 5	-1.69	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₇	325.033 2	萜衍生物	五羟基-氧杂苯并[α]萜酮-二己糖苷
73	29.654	315.014 2	315.014 1	0.32	C ₁₅ H ₈ O ₈	299.990 3, 216.003 7, 132.020 6	有机酸	甲基逆没食子酸
74	30.968	619.130 0	619.129 9	0.16	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₆	325.033 0	萜衍生物	五羟基-氧杂苯并[α]萜酮-戊糖基-己糖苷
75	32.520	619.130 6	619.129 9	1.13	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₆	325.034 7, 307.020 3	萜衍生物	五羟基-氧杂苯并[α]萜酮-戊糖基-己糖苷
76	32.837	535.145 0	535.145 2	-0.37	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₃	341.088 9, 315.065 6, 193.051 0, 175.038 1, 137.023 0	萜衍生物	三羟基-tetralone-单-O-丁香酰基-葡萄糖苷
77	33.113	487.088 1	487.087 7	0.82	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₂	325.035 2, 308.020 3, 296.034 1, 239.029 2	萜衍生物	juglanthracenoside A
78	33.817	639.098 2	639.098 6	-0.63	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₆	487.086 3, 325.034 1	萜衍生物	五羟基-氧杂苯并[α]萜酮-没食子酰基-葡萄糖苷
79	37.022	551.212 5	551.212 9	-0.73	[C ₂₆ H ₃₄ O ₁₀ + COOH] ⁻	501.080 4, 343.151 2, 325.145 1	二芳基 庚烷	jugcathayenoside
80	38.591	549.196 9	549.197 2	-0.55	[C ₂₆ H ₃₂ O ₁₀ + COOH] ⁻	341.139 9, 323.126 7, 210.837 5,	二芳基 庚烷	juglaside A
81	39.728	329.030 1	329.029 7	1.22	C ₁₆ H ₁₀ O ₈	298.982 6, 285.007 0, 270.986 2, 242.992 2, 159.238 1, 61.987 8	有机酸	二甲基-逆没食子酸
82	40.331	667.128 9	667.129 9	-1.50	C ₃₂ H ₂₈ O ₁₆	625.886 0, 325.034 2, 197.043 5, 189.015 3, 169.018 5	萜衍生物	五羟基-氧杂苯并[α]萜酮-单-O-丁香酰基-己糖苷
83	42.122	343.155 0	343.154 5	1.46	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	179.068 3, 121.029 4	木脂素	去氢开环异落叶松脂素

除共有峰外,表征了胡桃楸枝指纹图谱中其他16个色谱峰的化学结构,分别为化合物7(P20),化合物8(P21),化合物17和18(P22),化合物19和20(P23),化合物21和22(P24),化合物24(P25),化合物35和36(P26),化合物39(P28),化合物42(P29),化合物44(P30),化合物60(P32),化合物66(P33),化合物68(P34),化合物69(P35),化合物70(P36),化合物71(P37),未能鉴定P27, P31, P38和P39的结构。根据PLS-DA结果,不同采收期样品的差异峰

共22个,表征了其中19个色谱峰(1, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 37)的结构,有3个色谱峰(16, 18, 31)的结构未能鉴定。

3 讨论

3.1 提取条件考察 本文对不同提取溶剂及其用量进行了考察,结果发现选择50%甲醇和70%甲醇提取时,待测峰的峰面积较大,且两者接近,但50%甲醇提取时色谱峰峰形较对称,故选择50%甲醇。因胡桃楸中多为含酚羟基的成分,酸化有机溶剂对

各成分的提取效果明显增高,加入0.5%甲酸和1%甲酸对待测峰峰面积影响不大,故选择在提取溶剂中加入0.5%甲酸。溶剂用量为10 mL与20 mL时,待测峰的峰面积无显著差异,均较溶剂用量4 mL的峰面积高,故选择提取溶剂为含0.5%甲酸的50%甲醇,用量10 mL(样品量的50倍)。

3.2 产地、采收期对胡桃楸枝样品的影响 本文研究发现,样品依据采收时间聚类 and 分组,而不以产地进行聚类。说明采收期是影响胡桃楸枝质量的重要因素之一,而在我国东北范围内,产地对胡桃楸枝质量影响较小且无明显规律。2个采收时间段样品中各成分含量差异较大,夏季采收样品中大部分成分含量明显低于春冬季节采收的样品。夏季采收样品相似度较低,成分总体含量较低,这一结果可能与胡桃楸各部位的的生长状态有关,春冬季节叶未萌发,此时枝中累积的成分较多;夏季叶已经萌发,此时枝中累积的成分较少。这也与枝类药材的传统采收规律一致,茎木类药材一般在秋冬季节叶枯萎后或春初叶萌发前采收,此时药用部位中累积的有效成分较多,药材质量较好。

3.3 化学成分表征 本文从胡桃楸枝共鉴定出了83个化合物(包含同分异构体)。这些化合物可分为八类,分别为鞣质类化合物49个,多为没食子酰基和逆没食子酰基葡萄糖,仍有少数丁香酰基、香草酰基和香豆酰基葡萄糖;有机酸类化合物7个;萜衍生物14个,主要为四氢萜酮类化合物;黄酮类化合物共1个;萜衍生物6个;木脂素类化合物2个;二芳基庚烷类化合物3个;糖类化合物1个。表征的13个共有峰包括9个鞣质,2个有机酸,1个萜衍生物和1个萜衍生物。表征不同采收期胡桃楸枝样品19个差异峰代表的23个化合物,包括17个鞣质,1个有机酸,4个萜衍生物和1个萜衍生物。可见鞣质为胡桃楸枝的主要成分,其含量易随采收期的不同发生变化,后续将深入研究胡桃楸药效成分的动态变化规律及其原因。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1982:33.
[2] 张洪娟,桑树荣. 高奎滨用青龙衣制剂治疗肿瘤用药经验[J]. 黑龙江中医药,2000(2):62.
[3] 朱蕴娟,钱卫星. 东方云芝胶囊联合复方木鸡冲剂治疗Ⅱ期原发性肝癌32例临床报告[J]. 上海中医药杂志,1994(10):43.

[4] 曹颖林,金和筠,王玉坤,等. 复方木鸡口服液抑瘤作用的研究[J]. 中成药,1996,18(8):30-32.
[5] 李英春. 核桃楸叶的化学成分及其抗肿瘤活性的研究[D]. 长春:吉林大学,2007.
[6] 王少东,脱朝伟. 核桃楸青果皮抗肿瘤作用的药理研究[J]. 辽宁中医杂志,1990(11):37-39.
[7] 姚大雷,姜丽君,周薇,等. 胡桃楸根氯仿提取物对小鼠S180肉瘤抑制作用的研究[J]. 中药材,2009,32(4):595-596.
[8] 王添敏,俞文婕,付莹,等. 胡桃楸茎枝含药鸡蛋对小鼠H22肝癌实体瘤的抑制作用[J]. 现代药物与临床,2017,32(3):365-369.
[9] 古乐,曹秀格,李岩. 胡桃楸树皮抗肿瘤有效成分对H₂荷瘤小鼠T细胞亚群的影响[J]. 科技导报,2016,34(11):37-41.
[10] 孙冬雪,郭雄飞,阿拉腾图雅,等. 青龙衣中化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(11):2278-2282.
[11] 张宇驰,葛鹏玲,陈家红,等. 青龙衣萜类化学成分及其抗癌活性研究进展[J]. 中草药,2019,50(9):2251-2256.
[12] 孙国东,霍金海,程团,等. 基于UPLC-Q-TOF/MS技术的胡桃楸叶化学成分分析[J]. 中药材,2017,40(5):1123-1129.
[13] 刘国如,徐康平,申健,等. 胡桃楸根化学成分研究[J]. 中南药学,2009,7(9):644-646.
[14] 辽宁省食品药品监督管理局. 辽宁省中药材标准:第1册[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2009:144.
[15] 王添敏,孙晓丽,彭雪,等. 胡桃楸的根、茎枝、叶和果皮中总鞣质的含量测定[J]. 中国中药杂志,2011,36(1):32-36.
[16] 王添敏,翟延君,徐士钊,等. 胡桃楸茎枝中胡桃醌含量的动态变化[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(15):1166-1168.
[17] WANG T M, LIU J, YI T, et al. Multiconstituent identification in root, branch, and leaf extracts of *Juglans mandshurica* using ultra high performance liquid chromatography with quadrupole time of flight mass spectrometry[J]. J Sep Sci, 2017, 40(17):3440-3452.
[18] 王琼璐,谢伟容,邵艳妮,等. 基于Q-Marker成分定性与定量的双黄连制剂质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(18):36-46.
[19] WANG T M, FU Y, YU W J, et al. Identification of polar constituents in the decoction of *Juglans mandshurica* and in the medicated egg prepared with the decoction by HPLC-Q-TOF MS² [J]. Molecules, 2017, 22(9):1452.

[责任编辑 刘德文]