

基于 HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS 技术分析 不同剂型太子参的差异化学成分

华愉教, 谢 芬, 周少丹*, 王敏伟, 仰晓云, 陆元杰

江南大学附属医院药学部, 无锡 214000

摘要:为探讨不同剂型对太子参代谢物合成积累的影响, 采用高效液相色谱-串联四级杆轨道阱质谱(HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS)结合多元统计分析技术对太子参传统中药饮片和配方颗粒的差异化学成分进行研究。基于 HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS 代谢组学技术, 结合软件数据库搜索进行成分鉴定。采用主成分分析(PCA), 偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)和正交最小二乘法判别分析(OPLS-DA)等方法筛选和鉴定差异化学成分。结果显示, 太子参传统中药饮片和配方颗粒样品中化学成分能够显著区分, 在正、负离子模式下分别找到 98 个和 52 个差异化学成分, 这些差异化学成分主要集中在黄酮、有机酸、脂肪酸、氨基酸类化合物中且呈现不同的变化规律, 主要涉及异喹啉生物碱生物合成代谢。该结果可为揭示不同剂型对太子参代谢物合成积累的影响规律提供基础资料。

关键词:太子参; 高效液相色谱-串联四级杆静电场轨道阱质谱(HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS); 差异化学成分; 传统中药饮片; 中药配方颗粒

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)2-0257-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.2.010

Difference of chemical compositions in *Pseudostellariae Radix* with different dosage form by HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS

HUA Yu-jiao, XIE Fen, ZHOU Shao-dan*, WANG Min-wei, YANG Xiao-yun, LU Yuan-jie

Department of Clinical Pharmacy, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214000, China

Abstract: In order to explore the influence of different dosage forms on the synthesis and accumulation of metabolites of *Pseudostellariae Radix* (PR), HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS method combined with multivariate statistical analysis was used to analyze the different chemical components in traditional PR Chinese medicine decoction pieces and PR formula particles. Based on the metabolomics technology of HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS, the components were identified by software database search. Principal component analysis (PCA), partial least square discriminant analysis (PLS-DA) and orthogonal least square discriminant analysis (OPLS-DA) were used to select and identify the different chemical components. Results showed that the traditional PR Chinese medicine decoction pieces and PR formula particles can significantly distinguish, 98 differential chemical compositions were found in positive ion mode, while 52 differential chemical compositions were found in negative ion mode. The differential chemical compositions are mainly concentrated in flavonoids, organic acids, fatty acids, and amino acids compounds, and present different change rules, mainly involved in the isoquinoline alkaloid biosynthesis metabolic pathways. The study can provide basic information for revealing the influence law of different dosage forms on the synthesis and accumulation of metabolites in PR.

Key words: *Pseudostellariae Radix*; HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS; differential chemical compositions; traditional Chinese medicine decoction pieces; traditional Chinese medicine formula particles

太子参为大宗常用中药材, 系石竹科假繁缕属

Pseudostellaria rupestris (Turcz.) Pax 植物孩儿参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax ex Pax et Hoffm. 的干燥块根^[1], 具益气健脾、润肺生津之传统功效及促进免疫、止咳、抗肿瘤、抗菌抗氧化、保护心肌功能等药理作用, 临床上用于脾虚体倦、食欲不

收稿日期: 2019-09-16

接受日期: 2019-12-13

基金项目: 江南大学附属医院(无锡市第四人民医院)梯队人才计划(2018-21)

* 通信作者 Tel: 86-510-88682999; E-mail: zhoushaodan1016@163.com

com

振、病后虚弱、气阴不足、自汗口渴、肺燥干咳等症,是治疗小儿脾虚而食欲不佳之要药,疗效确切,临床用量大^[2]。目前医院中药房使用的太子参主要有两种形式:传统中药饮片和中药配方颗粒,其中中药配方颗粒由单味中药饮片经过水提、浓缩、干燥、制粒而成,在中医临床配方后,供患者冲服使用的一种颗粒制剂,是一种新的饮片使用形式^[3]。两种剂型各有优劣^[4],但是剂型不同势必会对太子参有效成分的积累产生影响,因而无法保证临床使用的有效性,并且目前尚未对两者有效成分进行过深入研究。为了更加全面地了解不同剂型对太子参代谢物合成积累的影响以及太子参饮片和颗粒品质的差异,有必要建立基于不同剂型太子参整体化学成分的质量分析方法。

植物代谢组学技术是对植物提取物中代谢组进行高通量、无偏差的全面分析技术,特别适用于中药多组分复杂体系的分析^[5]。高效液相色谱-串联四级杆静电场轨道阱质谱(HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS)采用高效液相色谱对复杂混合物进行快速分离,结合高性能四级杆的母离子选择性与高分辨的准确质量数 Orbitrap 检测技术实现对复杂样品的定性和定量分析,具有灵敏度高、准确度高、检测效率高等特点。目前已广泛用于多种中药材,如赤芍、人参、宣木瓜等^[6-8]。本研究借鉴植物代谢组学的研究思路和方法,采用 HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS 技术分析太子参饮片和颗粒化学成分的差异性,并通过多元统计和信号通路分析找出差异化学成分和主要代谢通路,探究其变化规律,从而为揭示不同剂型对太子参代谢产物合成积累的影响规律及探讨太子参传统中药饮片和配方颗粒品质形成机制提供基础资料。

1 材料

1.1 仪器

Ultimate 3000 HPLC 高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Q-Exactive Orbitrap/MS 四级杆轨道阱质谱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Compound Discoverer 处理软件(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SIMCA-P 13.0 多元统计分析软件(瑞典 Umetrics 公司);Anke TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器公司);BSA224S 电子天平(德国 Sartorius 公司);KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

乙腈、甲醇、超纯水(德国 Merck 公司);甲酸、L-

2-氯苯丙胺酸(美国 Sigma-Aldrich 公司)。收集太子参传统中药饮片(苏州天灵中药饮片有限公司)(批号:190730010)和太子参颗粒(江阴天江药业有限公司)(批号:19042031)样品各 5 份。所有样品均由南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定为各自种属药材,留样凭证保存于江南大学附属医院中药房。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备

太子参中药饮片:精密称取饮片 10 g,加 8 倍量的蒸馏水浸泡 30 min,武火煮沸后改文火再煎 20 min,趁热滤出药液,药渣再加相当药材量 6 倍量的蒸馏水,煮沸后文火再煎煮 30 min,滤过,合并滤液,蒸干。残渣加入 800 μ L 甲醇和 10 μ L 内标(2.8 mg/mL,二氯苯丙氨酸),置于组织研磨仪中 65 Hz 研磨 90 s,随后 40 KHz 冰浴超声 30 min,在 -20 $^{\circ}$ C 下静置 1 h,以 12 000 rpm 离心 15 min(置于 4 $^{\circ}$ C 离心机中),取上清液,过 0.22 μ m 微孔滤膜,即得。太子参配方颗粒:精密称取配方颗粒 10 g,加适量沸水溶解后稀释至与太子参饮片水煎液相同体积,之后制备方法同上。

2.2 测定条件

色谱条件:色谱柱:Hyper gold C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm \times 1.9 μ m);流动相:水 + 5% 乙腈 + 0.1% 甲酸(A)和乙腈 + 0.1% 甲酸(B);梯度洗脱程序:0 ~ 1.5 min(100% ~ 80% A),1.5 ~ 9.5 min(80% ~ 0% A),9.5 ~ 14.5 min(0% ~ 0% A),14.5 ~ 14.6 min(0% ~ 100% A),14.6 ~ 18 min(100% ~ 100% A);流速 0.35 mL/min;柱温 40 $^{\circ}$ C;进样量 10 μ L。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),在正离子模式下数据采集范围 m/z 50 ~ 1 000,加热器温度 300 $^{\circ}$ C;鞘气流速:45 arb;辅助气流速:15 arb;尾气流速:1 arb;电喷雾电压:3.0 kV;毛细管温度:350 $^{\circ}$ C;S-Lens RF Level,30%。在负离子模式下数据采集范围 m/z 50 ~ 1 100,加热器温度 300 $^{\circ}$ C;鞘气流速:45 arb;辅助气流速:15 arb;尾气流速:1 arb;电喷雾电压:3.2 kV;毛细管温度:350 $^{\circ}$ C;S-Lens RF Level,60%。

2.3 数据处理与统计分析

采用 Compound Discoverer 软件对 LC/MS 检测数据进行提取和预处理,并在 Excel 2010 中对数据进行归一化及后期编辑,最后整理成二维数据矩阵形式,包含保留时间、分子量、峰强度等信息。将编辑后的数据矩阵导入 SIMCA-P 13.0 软件进行多元统计分析。采用 PCA 分析通过初步观察各样品的

聚集情况,直观地表达不同剂型太子参之间的化学组成差异;随后采用 PLS-DA 和 OPLS-DA 进一步对样品进行分类,其中判别模型质量好坏的主要参数为 R^2Y (该值为模型的解释率) 及 Q^2 值 (该值为模型的预测率), R^2Y 越接近 1, 表示模型越稳定, $Q^2 > 0.5$ 表示预测率高。根据 OPLS-DA 模型的常用变量载荷评价参数 (VIP) ($VIP > 1$), 并结合 t -test 的 P 值 ($P < 0.05$) 来寻找差异性表达代谢物^[9]。

2.4 差异化学成分的鉴定及其代谢通路分析

通过一级质谱确定精确的相对分子质量, 二级质谱获得裂解信息, 结合 METLIN (<http://metlin.scripps.edu/>), 比较质谱的质荷比 m/z 或者精确分子量 (mass) 数据库在线搜索定性差异化学成分, 将得到的差异化学成分导入 MetaboAnalyst 3.0 中, 获得其所在代谢通路。

3 结果

3.1 总离子流色谱图

本实验供试品溶液制备分别考察了 100% 甲醇、70% 甲醇、50% 甲醇、30% 甲醇 4 种溶剂对实验结果的影响, 同时考察了 15、30、45、60、75 min 超声提取时间, 结果表明, 以 100% 甲醇作为溶剂的色谱峰形最优且超声提取 30min 的相对峰面积最大。因此, 最终选择这种样品处理方法。流动相的选择分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈 + 0.1% 甲酸水-乙腈 + 0.1% 甲酸、5% 乙腈 + 0.1% 甲酸水-乙腈 + 0.1% 甲酸, 结果表明 5% 乙腈 + 0.1% 甲酸水-乙腈 + 0.1% 甲酸的峰形较好且分离度较高, 因此将其确定为流动相。太子参传统中药饮片和配方颗粒样品在正负离子模式下的 HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS 总离子流色谱图 (TIC) 示于图 1。

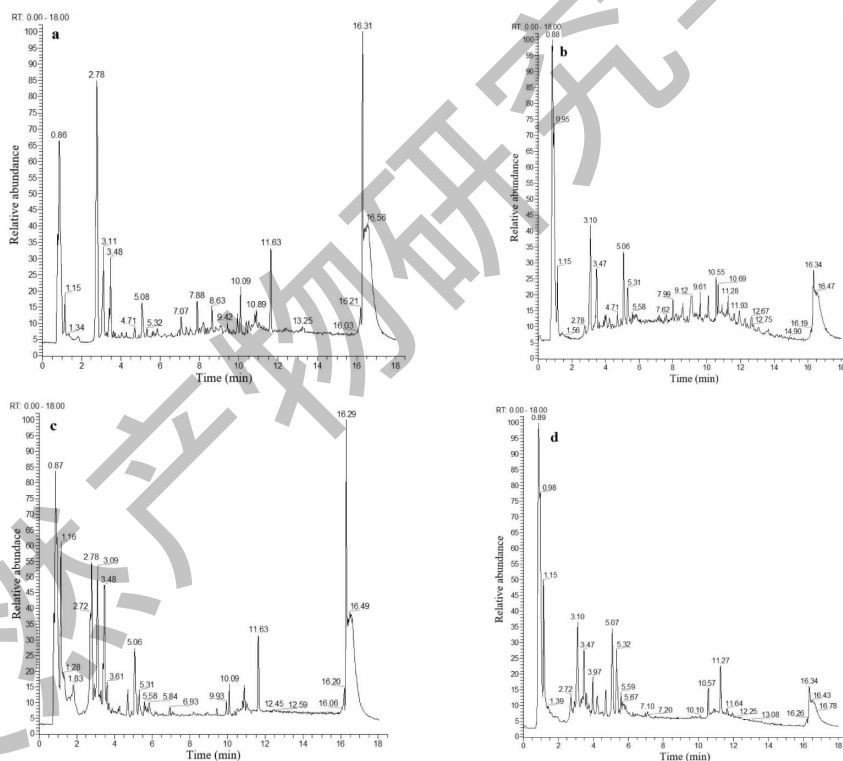


图 1 总离子流图

Fig. 1 Total ion flow diagram

注: a, c 为正极离子模式; b, d 为负极离子模式; a, b 为太子参传统中药饮片; c, d 为太子参配方颗粒。Note: a and c represent the positive mode; b and d represent the negative mode; a and b represent traditional Pseudostellariae Radix (PR) Chinese medicine decoction pieces; c and d represent PR formula particles.

3.2 多元统计分析

3.2.1 PCA 分析

采用的 PCA 多变量模式识别方法对不同剂型太子参进行降维分析, 图 2 为其 PCA 得分散点图,

(正极离子模式下, $R^2X = 0.805$, $Q^2 = 0.686$; 负极离子模式下, $R^2X = 0.886$, $Q^2 = 0.654$)。结果显示在正、负极离子模式下, 不同剂型太子参之间均具有很好的区分度, 这表明太子参传统中药饮片和配方颗粒的化

学成分存在明显差异。

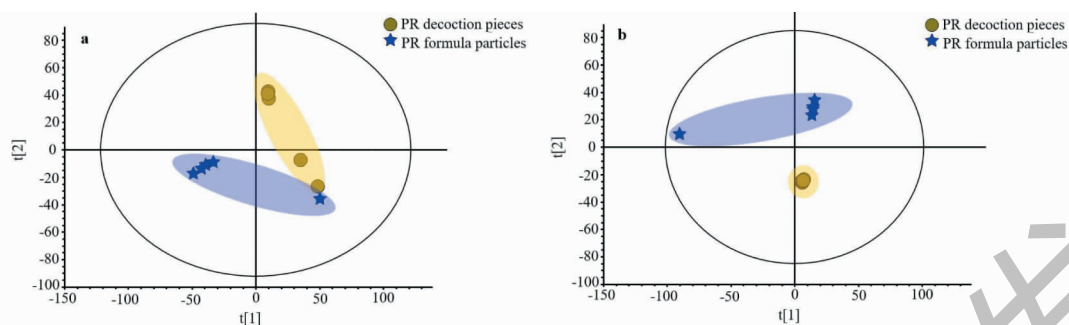


图2 PCA 得分散点图

Fig. 2 Scatter plot of PCA

注:a 为正离子模式;b 为负离子模式。Note:a represents the positive mode;b represents the negative mode.

3.2.2 PLS-DA 分析

PCA 是无监督的分析方法,在确定差异成分时无法忽略组内误差和随机误差。因此采用有监督模式识别的方法 PLS-DA 来确定不同剂型太子参之间差异化学成分^[10]。图 3a 和 3c 为不同剂型太子参在质谱正、负离子模式下 PLS-DA 得分散点图(在正离子模式下, $R^2X = 0.799$, $R^2Y = 0.84$, $Q^2 = 0.452$;在负离子模式下, $R^2X = 0.884$, $R^2Y = 0.993$, $Q^2 = 0.885$),可以看出两类太子参样品明显分开,

化学成分差异明显。排列实验是一种外部模型验证方法,主要用于验证 PLS-DA 模型的拟合程度^[11]。通过排列试验随机多次($n = 200$)改变分类变量 y 的排列顺序得到相应不同的随机。从图 3b 和 3d 可见,PLS-DA 模型排列实验中左端随机排列产生的 R^2 和 Q^2 值均小于右端的原始值,表明原始模型的预测能力大于随机排列 y 变量的预测能力,即模型有效,可以进行后续的差异成分分析^[12]。

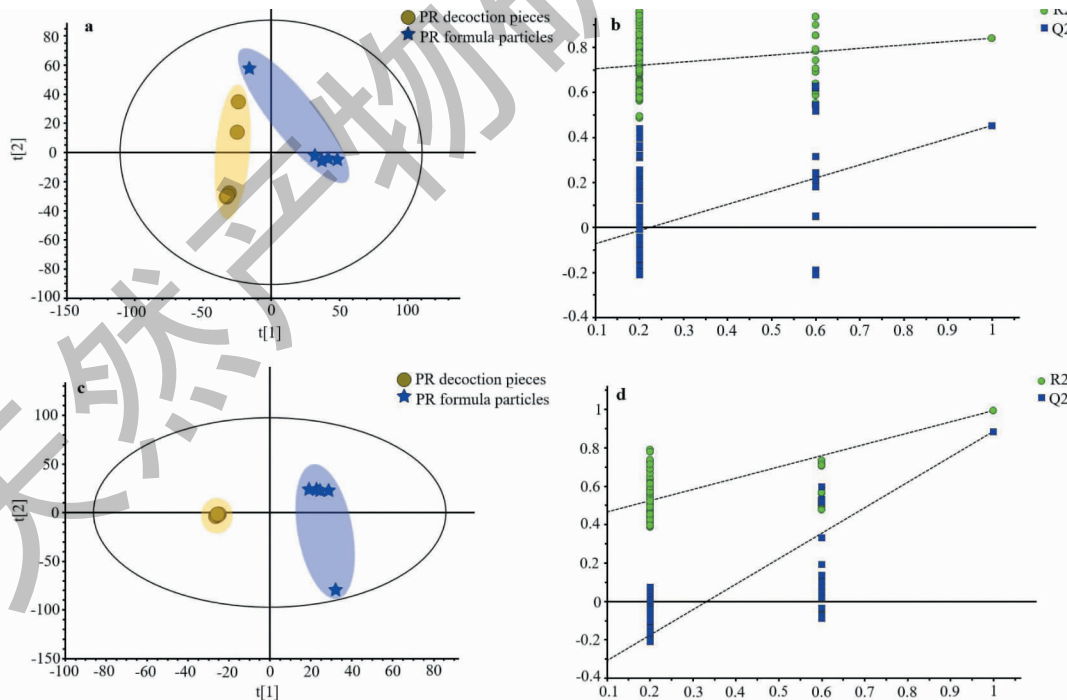


图3 PLS-DA 得分散点图(a,c)和200个排列模型验证(b,d)

Fig. 3 Scatter plot of PLS-DA (a,c) and 200 permutation test model validation plot (b,d)

注:a,b 为正离子模式;c,d 为负离子模式。Note:a and b represent the positive mode;c and d represent the negative mode.

3.2.3 OPLS-DA 分析

OPLS-DA 是以 PLS 模型的通过验证为基础,用于寻找差异化学成分的一种有监督式的分析方法^[13]。图 4 为太子参饮片和颗粒 OPLS-DA 散点图(在正离子模式下, $R^2X = 0.933$, $R^2Y = 1$, $Q^2 = 0.673$;在负离子模式下, $R^2X = 0.884$, $R^2Y = 0.993$, $Q^2 = 0.984$),可以看出两种不同剂型太子参可以显

著分开,且分类效果优于 PCA 分析,组内差异降低,更有利于准确地确定组间差异。图 4c 和 4d 是基于 OPLS-DA 分析,正负离子模式下的 S-Plot,距离中心区域越远代表代谢物就是组间分离贡献越大的代谢物。使用常用 VIP 值描述变量的贡献程度,当 $VIP > 1$ 时,认为存在潜在的差异化学成分。

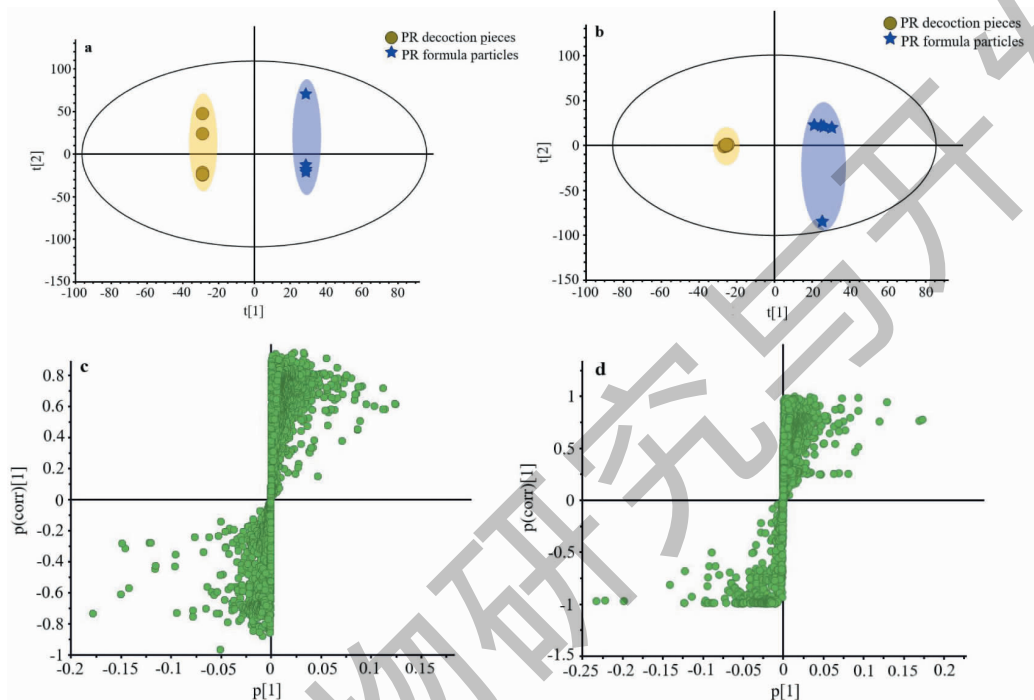


图 4 OPLS-DA 得分散点图 (a,b) 和 S-Plot 分析 (c,d)

Fig. 4 Scatter plot of OPLS-DA (a,b) and analysis of S-Plot (c,d)

注:a,c 为正离子模式;b,d 为负离子模式。Note:a and c represent the positive mode;b and d represent the negative mode.

3.3 差异化学成分的鉴定及其相对含量分析

采用 OPLS-DA 模型的 $VIP > 1$,并结合 t 检验 ($P < 0.05$) 来寻找差异性表达代谢物。通过 MET-LIN 数据库在线搜索差异化学成分的精准质荷比,

进而鉴定差异化学成分。在正离子模式下共找到 98 个差异化学成分,负离子模式下共找到 52 个差异化学成分,具体见表 1 和表 2。

表 1 正离子模式下鉴定出的不同剂型太子参差异化学成分 ($P < 0.05$)

Table 1 Components identified with significant differences from Pseudostellariae Radix with different dosage form in positive ion mode ($P < 0.05$)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	相对分子质量 m/z	差异倍数 Fold change
黄酮类化合物 Flavanoids					
1	5.418	Isoformononetin	$C_{16}H_{12}O_4$	268.074 4	4.25
2	4.155	Formononetin	$C_{16}H_{12}O_4$	268.074 6	1.39
3	7.070	Sophoraflavanone B	$C_{20}H_{20}O_5$	340.132 4	0.78
4	4.919	Glutinone	$C_{30}H_{48}O$	424.372 1	7.73
5	3.662	Diosmin	$C_{28}H_{32}O_{15}$	608.176 7	2.44

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	相对分子质量 m/z	差异倍数 Fold change
6	4.436	Formononetin 7-(6''-malonylglucoside)	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.129 0	5.64
7	7.095	Sophoraflavanone A	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	370.143 2	0.60
8	3.730	Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	610.192 1	-0.43
9	3.575	Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	272.069 4	-1.70
10	4.314	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.048 7	-1.39
11	3.731	Cirsilineol	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	344.090 8	-2.78
12	5.086	Isokaempferide	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	300.064 5	-2.41
13	6.000	Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.058 8	-4.81
14	4.863	Malvidin	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	330.075 1	-4.05
15	4.989	Glycitein	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.069 5	-4.41
16	4.110	Tangeritin	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372.122 1	-4.06
17	3.576	Naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	580.181 7	-0.77
18	3.695	Luteone 7-glucoside	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	516.165 4	-1.69
19	3.386	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.043 9	-0.72
20	3.576	Naringenin-7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	434.123 1	-1.02
21	6.117	Liquiritigenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.074 6	-1.69
22	3.384	Genistin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432.107 6	-2.71
23	3.562	Gentisin	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	258.054 0	-0.69
有机酸类化合物 Organic acids					
24	3.270	Puerarin	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	416.113 1	-2.44
25	10.543	Camellenodiol	C ₂₉ H ₄₆ O ₃	442.346 1	9.72
26	10.572	Pfaffic acid	C ₂₉ H ₄₄ O ₃	440.330 5	7.76
27	8.221	Spinolic acid A	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.357 3	2.92
28	2.716	Indoleacrylic acid	C ₁₁ H ₉ NO ₂	187.064 0	-2.33
29	3.560	Sinapic acid	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224.069 3	-1.34
30	3.527	p-Hydroxyphenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₃	152.047 9	-2.57
31	5.708	(-)-Jasmonic acid	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	210.126 3	-1.72
32	3.703	Tropic acid	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.063 6	-3.05
33	1.816	Cinnamic acid	C ₉ H ₈ O ₂	148.053 1	-2.27
34	1.327	Epinephrine	C ₉ H ₁₃ NO ₃	183.090 3	-3.35
35	2.893	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.058 8	-1.28
36	1.259	Niacin	C ₆ H ₅ NO ₂	123.032 6	-2.71
37	3.532	Anthranilic acid	C ₇ H ₇ NO ₂	137.048 3	-5.05
38	2.892	Salicylic acid	C ₇ H ₆ O ₃	138.032 3	-1.71
39	1.154	DL-pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129.079 6	-2.31
40	1.930	3-Indoleacetic acid	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175.064 1	-5.27
41	3.487	Phenylacetic acid	C ₈ H ₈ O ₂	136.053 1	-3.41
42	1.161	Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	122.037 5	-1.50
43	3.139	p-Coumaroyl quinic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338.102 0	-1.05

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	相对分子质量 m/z	差异倍数 Fold change
44	1.393	2-Furoic acid	$C_5H_4O_3$	112.016 8	-1.82
氨基酸类化合物 Amino acids					
45	1.036	Valeric acid	$C_5H_{10}O_2$	102.068 9	-2.07
46	5.157	S-adenosylhomocysteine	$C_{14}H_{20}N_6O_5S$	384.122 3	-0.88
47	2.608	L-tryptophan	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	204.090 4	-2.54
48	1.672	L-phenylalanine	$C_9H_{11}NO_2$	165.079 6	-2.57
49	0.996	L-tyrosine	$C_9H_{11}NO_3$	181.074 6	-2.08
50	2.726	L-glutamine	$C_5H_{10}N_2O_3$	146.069 6	-1.82
51	1.005	L-methionine	$C_5H_{11}NO_2S$	149.051 6	-2.95
52	1.305	L-leucine	$C_6H_{13}NO_2$	131.095 2	-2.17
53	0.973	L-proline	$C_5H_9NO_2$	115.063 9	-1.79
54	1.157	Pyroglutamic acid	$C_5H_7NO_3$	129.043 2	-3.15
55	0.949	L-asparagine	$C_4H_8N_2O_3$	132.054 1	-1.73
56	1.159	L-valine	$C_5H_{11}NO_2$	117.079 5	-1.41
57	0.922	L-histidine	$C_6H_9N_3O_2$	155.070 1	-1.93
脂肪酸类化合物 Fatty acids					
58	1.130	α -Ketoisovaleric acid	$C_5H_8O_3$	116.048 1	-2.15
59	7.416	Phytosphingosine	$C_{18}H_{39}NO_3$	317.294 1	5.60
60	8.324	LysoPE (0:0/16:0)	$C_{21}H_{44}NO_7P$	453.287 3	4.68
61	9.515	Sphingosine	$C_{18}H_{37}NO_2$	299.283 4	4.49
62	7.920	Sphinganine	$C_{18}H_{39}NO_2$	301.299 2	6.27
63	16.271	Phosphocholine	$C_5H_{14}NO_4P$	183.066 7	1.96
64	8.562	LysoPC (16:0)	$C_{24}H_{50}NO_7P$	495.334 5	4.30
65	0.852	Choline	$C_5H_{14}NO$	103.099 2	1.51
核苷类化合物 Nucleosides					
66	5.853	Jasmolone	$C_{11}H_{16}O_2$	180.115 7	-1.27
67	0.880	Guanosine	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	283.091 7	2.32
68	1.155	Adenosine	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.097 6	-2.33
69	2.673	5'-Methylthioadenosine	$C_{11}H_{16}N_5O_7PS$	297.090 7	-3.52
70	1.154	Adenine	$C_5H_5N_5$	135.055 0	-2.07
71	1.157	Guanine	$C_5H_5N_5O$	151.050 0	-1.59
72	3.038	Hydrouracil	$C_4H_6N_2O_2$	128.059 1	-5.01
73	1.155	5'-Deoxyadenosine	$C_{10}H_{13}N_5O_3$	251.103 3	-2.72
维生素类化合物 Vitamins					
74	0.996	Uracil	$C_4H_4N_2O_2$	112.028 1	-0.57
75	10.769	Vitamin D2	$C_{28}H_{44}O$	396.340 5	7.77
76	2.037	Pantothenic acid	$C_9H_{17}NO_5$	219.111 5	-3.33
77	1.694	Pyridoxamine	$C_8H_{12}N_2O_2$	168.090 5	-2.08
78	1.157	Pyridoxal	$C_8H_9NO_3$	167.059 0	-4.49

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	相对分子质量 m/z	差异倍数 Fold change
萜类化合物 Terpenoids					
79	1.154	Niacinamide	C ₆ H ₆ N ₂ O	122.048 7	-3.94
80	3.405	Plaunol B	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	356.123 1	3.55
81	3.456	Genipin	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	226.085 0	-4.04
82	6.161	Glutinosone	C ₁₄ H ₂₀ O ₂	220.147 1	-1.91
酚类化合物 Phenols					
83	5.360	Glabrolide	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	468.326 0	-0.58
84	10.15	α -Tocotrienol	C ₂₉ H ₄₄ O ₂	424.335 2	6.13
85	5.323	Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	150.104 9	-2.10
生物碱类化合物 Alkaloids					
86	6.131	6-Gingerol	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	294.184 1	-2.61
87	8.043	Terminaline	C ₂₃ H ₄₁ NO ₂	363.315 2	4.99
88	0.892	Trigonelline	C ₇ H ₇ NO ₂	137.048 3	-1.60
儿茶酚胺类化合物 Catecholamines					
89	1.151	L-nicotine	C ₁₀ H ₁₄ N ₂	162.116 4	-1.85
90	1.163	Norepinephrine	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169.074 5	-3.19
91	1.010	L-dopa	C ₉ H ₁₁ NO ₄	197.069 5	-1.93
胺类化合物 Amines					
92	3.719	Dopamine	C ₈ H ₁₁ NO ₂	153.079 5	-3.69
93	1.164	Histamine	C ₅ H ₉ N ₃	111.080 3	-2.85
甾体类化合物 Steroids					
95	2.907	Caprolactam	C ₆ H ₁₁ NO	113.084 8	-2.95
香豆素类化合物 Coumarins					
96	4.033	Soyasapogenol C	C ₃₀ H ₄₈ O ₂	440.367 1	9.24
酮类化合物 Ketones					
96	2.979	Coumarin	C ₉ H ₆ O ₂	146.037 3	-2.23
醛类化合物 Aldehydes					
97	5.300	Cis-jasmone	C ₁₁ H ₁₆ O	164.120 6	-3.91
98	3.311	4-Hydroxybenzaldehyde	C ₇ H ₆ O ₂	122.037 5	-3.54

表 2 负离子模式下鉴定出的不同剂型太子参差异化学成分 ($P < 0.05$)Table 2 Components identified with significant differences from Pseudostellariae Radix with different dosage form in negative ion mode ($P < 0.05$)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	相对分子质量 m/z	差异倍数 Fold change
黄酮类化合物 Flavonoids					
1	3.017	Apiin	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	564.145 7	1.06
2	4.151	Hesperetin 7-O-glucuronide	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	476.129 5	2.15
3	5.409	Isoformononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.072 4	4.88

续表 2 (Continued Tab. 2)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	相对分子质量 m/z	差异倍数 Fold change
4	3.652	Diosmin	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅	608.170 5	3.17
5	4.435	Formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268.072 1	6.62
6	4.306	Tangeritin	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	372.119 6	-2.89
7	4.094	Taxifolin	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	304.056 8	-2.21
8	4.312	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.046 2	-3.36
9	3.785	Naringenin-7- <i>O</i> -glucoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	434.119 1	-2.46
10	3.625	Astragalin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.098 3	-1.23
11	3.589	3'',4''-Diacetylcosmosiin	C ₂₅ H ₂₇ NO ₁₁	516.123 7	-3.37
12	4.979	Glycitein	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.066 8	-1.05
13	6.114	Liquiritigenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.072 1	-1.46
14	5.997	Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.056 4	-3.77
15	6.934	Genistein	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.051 3	-2.91
16	4.852	Malvidin	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	330.072 1	-4.38
17	4.070	Daidzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.056 5	-3.62
18	3.064	Gallocatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306.075 6	-3.31
19	4.541	Hesperetin	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.077 0	-3.23
20	3.064	Keioside	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	624.165 2	-0.62
有机酸类化合物 Organic acids					
21	4.494	Eriodictyol	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288.061 6	-2.77
22	0.904	Succinic acid	C ₄ H ₆ O ₄	118.026 0	0.47
23	0.906	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇	192.025 2	3.37
24	0.983	D-glucarate	C ₆ H ₁₀ O ₈	210.035 6	2.49
25	5.620	(-)-Jasmonic acid	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	210.123 6	1.83
26	5.447	Auxin a	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	328.223 7	-1.21
27	3.631	Tropic acid	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.062 4	-1.94
28	2.863	p-Coumaroyl quinic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	338.098 8	-3.19
29	0.890	Glutaric acid	C ₅ H ₈ O ₄	132.041 6	-2.92
30	3.760	Sebacic acid	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	202.119 4	-1.55
31	5.850	Hexadecanedioic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₄	286.212 8	-1.30
32	0.904	Citramalic acid	C ₅ H ₈ O ₅	148.036 2	-0.44
33	0.956	Quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	192.062 2	-2.72
脂肪酸类化合物 Fatty acids					
34	3.965	Nonanedioic acid	C ₉ H ₁₆ O ₄	188.103 1	-0.97
35	9.063	LPA(0:0/16:0)	C ₁₉ H ₃₉ O ₇ P	410.241 8	4.49
36	3.261	6''-Malonylapiin	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₇	650.146 1	5.43
37	8.322	LysoPE(0:0/16:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	453.283 4	4.97
38	10.105	Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.238 5	3.80
糖类化合物 Carbohydrates					
39	5.287	Traumatic acid	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	228.134 6	-3.00

续表 2(Continued Tab. 2)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	化合物 Compound	分子式 Formula	相对分子质量 m/z	差异倍数 Fold change
40	0.842	Sucrose	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.114 6	1.04
41	0.827	Raffinose	$C_{18}H_{32}O_{16}$	504.166 7	1.09
42	0.892	3'-Sialyllactose	$C_{23}H_{39}NO_{19}$	633.208 7	-1.81
维生素类化合物 Vitamins					
43	0.912	α -D-glucose	$C_6H_{12}O_6$	180.061 6	-1.13
44	0.876	L-ascorbic acid	$C_6H_8O_6$	176.031 4	0.31
45	2.037	Pantothenic acid	$C_9H_{17}NO_5$	219.109 2	-1.85
核苷类化合物 Nucleosides					
46	2.751	Riboflavin	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	376.135 1	-2.27
47	0.915	Thymidine	$C_{10}H_{14}N_2O_5$	242.089 0	0.73
氨基酸类化合物 Amino acids					
48	1.158	Uridine	$C_9H_{12}N_2O_6$	244.068 1	0.52
苯丙素类化合物 Phenylpropanoids					
49	0.833	L-glutamate	$C_5H_7NO_4$	147.052 3	1.35
儿茶酚胺类化合物 Catecholamines					
50	2.491	Chlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	354.093 4	-0.83
萜类化合物 Terpenoids					
51	1.156	L-dopa	$C_9H_{11}NO_4$	197.067 4	-1.85
52	4.461	Abscisic acid	$C_{15}H_{20}O_4$	264.134 5	-1.52

3.4 差异化学成分的相对含量分析

正离子模式下太子参饮片(TY)相对含量 > 太子参颗粒(TK)相对含量的有 23 个, TY < TK 的有 75 个; 负离子模式下 TY > TK 的有 19 个, TY < TK 的有 33 个(fold change > 0, 表明 TY 相对含量 > TK 相对含量; fold change < 0, 则 TY 相对含量 < TK 相对含量)。由图 5a 和 5b 可知, 在正离子模式下, TY 相对含量 > TK 相对含量的差异化学成分分布于 9 类化合物中, 其中黄酮和脂肪酸类化合物占比最高, 均为 31%。TY 相对含量 < TK 相对含量的差异化学成分分布于 14 类化合物中, 其中有机酸类化合物最多(18 个, 24%), 其次为黄酮类(17 个, 23%)、第三为氨基酸类(13 个, 17%)。图 5c 和 5d 中显示, 在负离子模式下, TY 相对含量 > TK 相对含量的差异化学成分归属于 7 类化合物, 其中最主要的是黄酮类化合物(5 个, 26%), 其次为有机酸类(4 个, 21%)和脂肪酸类(4 个, 21%)。TY 相对含量 < TK 相对含量的差异化学成分归属于 8 类化合物, 其中黄酮类成分占比最高(16 个, 49%), 其次为有机酸类(9 个, 27%)。由此可见, 不同剂型太子参的差异

化学成分主要集中在黄酮、有机酸、脂肪酸、氨基酸类化合物上。此外, 由图 5 可知, 无论是在正离子或负离子模式下, 太子参颗粒中相对含量较高的差异化学成分的数量和种类均多于太子参饮片, 如: 具有抗肿瘤作用的黄酮类化合物, 包括 chrysin(白杨素)、naringin(川陈皮素)、luteolin(木犀草素)、genistin(染料木苷)等; 具有抗菌抗氧化的有机酸类化合物, 包括 cinnamic acid(肉桂酸)、ferulic acid(阿魏酸)、salicylic acid(水杨酸)等; 具有促进免疫作用的氨基酸类化合物, 包括 L-tryptophan(色氨酸)、L-phenylalanine(苯丙氨酸)、L-tyrosine(酪氨酸)等。

3.5 代谢通路分析

通过 MetaboAnalyst 网站构建代谢通路分析, 将上述鉴定的化合物的 KEGG 导入 MetaboAnalyst 进行通路分析。利用拓扑 Fenix, 代谢通路影响的临界值(Impact 值)设置为 0.6, 大于这个值将被选择作为潜在的关键代谢通路。如图 6 所示, 圆点的半径大小代表代谢通路的 Impact 值, Impact 值越大, 半径越大; 圆点的颜色代表代谢通路的 P 值, P 值越小, 颜色越红。综上, 共富集到异喹啉生物碱生物合

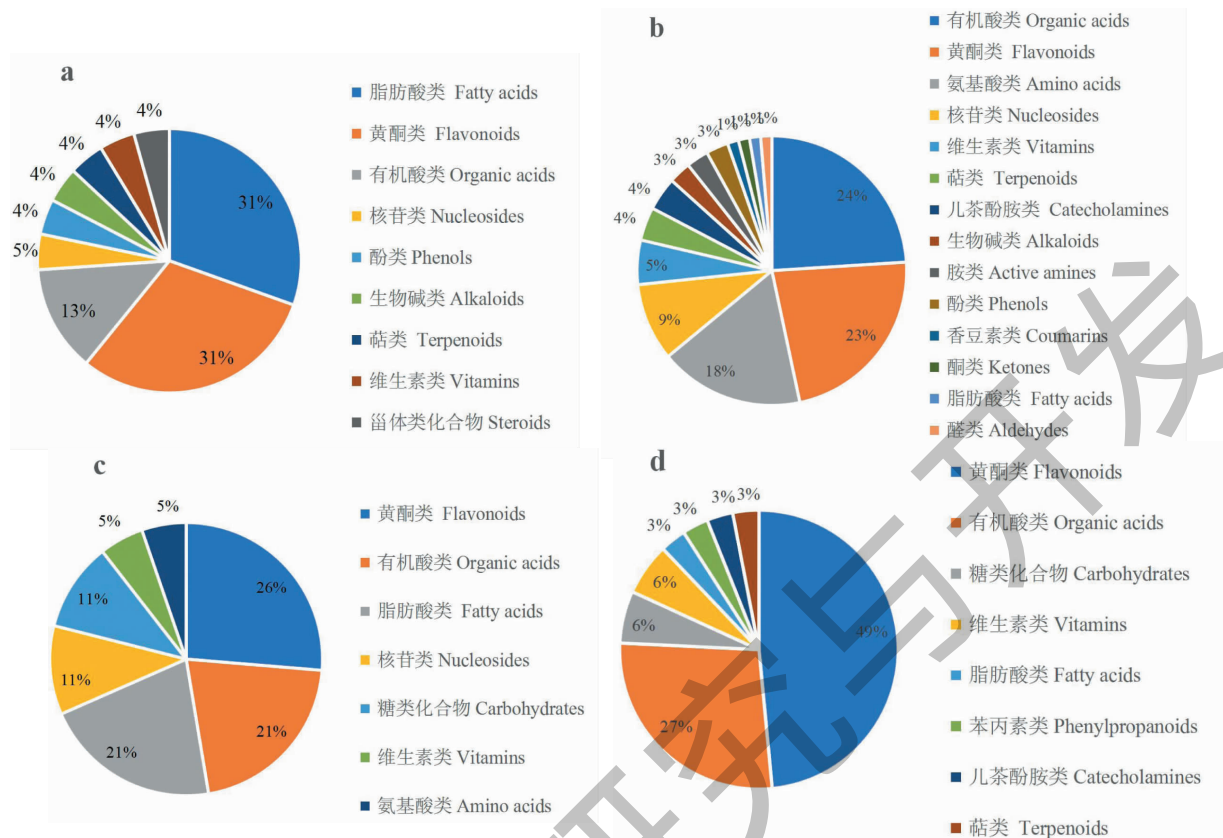


图 5 正负离子模式下不同剂型太子参差异化学成分的含量对比分析

Fig. 5 Comparative analysis of contents of different chemical components in *Pseudostellariae Radix* with different dosage forms under positive and negative ions mode

注:a 为正离子模式 TY 相对含量 > TK 相对含量的差异化学成分;b 为正离子模式 TY 相对含量 < TK 相对含量的差异化学成分;c 为负离子模式 TY 相对含量 > TK 相对含量的差异化学成分;d 为负离子模式 TY 相对含量 < TK 相对含量的差异化学成分。Note:a represents The relative contents of differential chemical compositions in PR decoction pieces > PR formula granules in ESI⁺; b represents The relative contents of differential chemical compositions in PR decoction pieces < PR formula granules in ESI⁺; c represents The relative contents of differential chemical compositions in PR decoction pieces > PR formula granules in ESI⁻; d represents The relative contents of differential chemical compositions in PR decoction pieces < PR formula granules in ESI⁻.

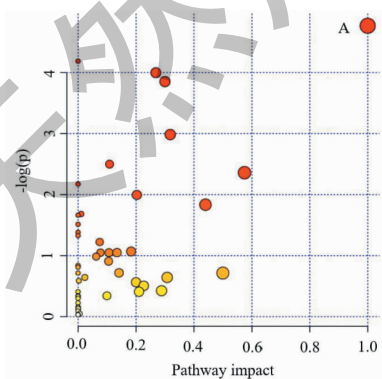


图 6 信号通路分析

Fig. 6 Analysis of pathway impact

注:A 为异喹啉生物碱生物合成。Note:A represents isoquinoline alkaloid biosynthesis.

成(A)1 条重要的代谢通路,主要涉及的差异化学成分是 L-tyrosine(酪氨酸)、L-dopa(左旋多巴)、dopamine(多巴胺)。

4 结论

本实验建立了基于 HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS 结合多元统计分析技术的不同剂型太子参差异化学成分的分析方法,并从样品制备、色谱图分析、数据处理、代谢通路分析等方面进行探讨,找出累计差异显著的化学成分,探索其变化规律。实验结果表明,HPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS 可以准确获得化合物的分子质量和裂解碎片质量信息,快速鉴定化合物的结构。经多元统计分析发现不同剂型太子参样品中化学成分存在明显差异,并在正、负离子模式下分别找到 98 个和 52 个差异化学成分,这些成

分主要集中在黄酮、有机酸、脂肪酸、氨基酸类化合物中,主要涉及类异喹啉生物碱生物合成代谢。此外,无论是在正离子或负离子模式下,太子参颗粒中相对含量较高的差异化学成分的数量和种类均多于太子参饮片,包括具有抗肿瘤作用的黄酮类化合物、含有抗菌抗氧化作用的有机酸类化合物、具有促进免疫作用的氨基酸类化合物等。

该结果可为揭示不同剂型对太子参代谢产物合成积累的影响规律以及不同剂型太子参品质形成机制提供基础资料,为复杂体系样品分析、差异化学成分的鉴定提供一种可靠和准确的参考方法。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China; Vol I(中华人民共和国药典:第一部)[M]. Beijing:China Medical Science Press, 2015: 68.
- 2 Fu XS, Liu XH, Xu H, et al. Research status and trends of *Pseudostellariae Radix*[J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志) 2012, 21: 757-760.
- 3 Li YH, Wu ZF, Li YN, et al. Analysis on relativity of drying process of extract and pelleting quality of Chinese materia medica formula granule based on powder properties[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2017, 48: 1930-1935.
- 4 Han J. Comparison and analysis of free-fried Chinese herbal formula granules and traditional Chinese herbal pieces[J]. Chin Cont Med Edu(中国继续医学教育), 2018, 10: 142-144.
- 5 Luo YY, Liu JX, Liu XH, et al. Difference of chemical compositions in *Polygoni multifori* radix from different habitats by UPLC-Triple TOF MS/MS[J]. J Chin Mass Spectr Soc(质谱学报), 2017, 38: 678-689.
- 6 Li JH, Kuang G, Chen XH, et al. Identification of chemical composition of leaves and flowers from *Paeonia rockii* by UH-PLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS [J]. Molecules, 2016, 21: 947-955.
- 7 Li LL, Wang Y, Xiu Y, et al. Chemical differentiation and quantitative analysis of different types of *Panax* genus stem-leaf based on a UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS combined with multivariate statistical analysis approach [J]. J Anal Methods Chem, 2018, 2018: 9598672.
- 8 Sheng YJ, Zhou HL, Zhou Q, et al. Analysis on chemical constituents of fruit of *Chaenomeles speciosa* by UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2018, 49: 4773-4779.
- 9 Zhou YF, Niu M, Fang JX, et al. Metabonomics study on hepatoprotective effect of *Schisandrae chinensis* fructus based on UPLC-Q/TOF-MS[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2018, 43: 3756-3763.
- 10 Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabolomics[J]. J Proteome Res, 2007, 6: 469-479.
- 11 Tian D, Li ZY, Fan SC, et al. NMR-based analysis of water soluble extracts of different *Astragali Radix*[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2014, 49: 89-94.
- 12 Li ZY, Fan ML, Qin XM. Comparison of chemical composition between raw and vinegar-baked *Paeoniae Radix Alba* using NMR based metabolomic approach[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2015, 50: 211-217.
- 13 Hua YJ, Hou Y, Wang SN, et al. Analysis of chemical compositions in *Pseudostellariae Radix* from traditional field and cultivated fields by ¹H NMR-based metabolomics [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2016, 28: 1510-1516.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社