

UPLC-Q-Exactive Orbitrap 高分辨质谱定量分析 不同产地、炮制前后女贞子中 9 种成分的含量

胡雁萍^{1,2,3}, 赵迪^{1,2,3}, 李焕茹^{1,2,3}, 冯志毅^{1,2,3}, 李柯^{1,2,3}, 冯素香^{1,2,3*}

¹河南中医药大学; ²呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心; ³郑州市中药质量控制与评价重点实验室, 郑州 450046

摘要:采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS)建立了同时测定女贞子中红景天苷、芸香苷、木犀草苷、特女贞苷、橄榄苦苷、木犀草素、芹菜素、槲皮素、松果菊苷等9个成分含量的方法, 对比分析不同产地、酒炖前后女贞子含量的差异。采用 Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 3 μm), 流动相为甲醇-0.1% 甲酸水梯度洗脱, 电喷雾离子源(ESI), 负离子模式扫描, 结合化学模式识别分析不同产地、炮制前后的女贞子中9个成分的变化。结果表明9个成分在各自浓度范围内线性关系良好($r \geq 0.9996$), 平均加样回收率为97.4% ~ 101.9%。不同产地、炮制前后的女贞子中9个成分含量有明显差异, 其中特女贞苷、红景天苷、木犀草苷、木犀草素、芸香苷、橄榄苦苷、松果菊苷对产地划分的贡献程度较大; 女贞子经炮制后红景天苷、特女贞苷、橄榄苦苷的含量明显增加。本研究所建立的方法快速、准确、灵敏度高、重复性好, 可为女贞子饮片和炮制品的质量标准完善提供科学依据。

关键词:女贞子; 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 不同产地; 炮制; 含量测定

中图分类号: R282.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)8-1308-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.8.006

UPLC-Q Exactive-Orbitrap high-resolution mass spectrometry quantitative analysis of the content of nine components in *Ligustri Lucidi Fructus* from different producing areas and before and after processing

HU Yan-ping^{1,2,3}, ZHAO Di^{1,2,3}, LI Huan-ru^{1,2,3}, FENG Zhi-yi^{1,2,3}, LI Ke^{1,2,3}, FENG Su-xiang^{1,2,3*}

¹Henan University of Chinese Medicine; ²Co-construction Collaborative Innovation

Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P. R.;

³Zhengzhou Key Laboratory of Chinese Medicine for Quality Control and Evaluation, Zhengzhou 450046, China

Abstract: UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS was used to establish the determination of salidroside, rutin, luteolin-7-O-glucoside, specnuezhenide, oleuropein, luteolin, apigenin, quercetin and echinacoside in *Ligustri Lucidi Fructus* simultaneously to compare and analyze the differences in the content of *Ligustri Lucidi Fructus* from different producing areas and before and after wine stewing. The Hypersil GOLD C₁₈ reverse phase chromatography column (100 mm × 2.1 mm, 3 μm) was used with a gradient elution of 0.1% formic acid solution and acetonitrile with the condition of electrospray ionization and negative ion mode. Combining chemical pattern recognition to analyze nine components changes of *Ligustri Lucidi Fructus* from different origins and before and after processing. The nine components have a good linear relationship within their respective concentration ranges ($r \geq 0.9996$), and the average sample recovery rate is 97.4% - 101.9%. The contents of nine components in *Ligustri Lucidi Fructus* from different habitats before and after processing are obviously different, of which specnuezhenide, salidroside, luteolin-7-O-glucoside, luteolin, rutin, oleuropein and echinacoside contribute greatly to the division of habitats; After processing, the contents of salidroside, specnuezhenide, oleuropein in *Ligustri Lucidi Fructus* increased significantly. The method is fast, accurate, highly sensitive, reproducible, and can provide a scientific basis for the perfect quality standards of

Ligustri Lucidi Fructus and processed products.

Key words: Ligustri Lucidi Fructus; Q-Exactive Orbitrap MS; different producing areas; processing; content determination

女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实,味甘、苦、凉,入肝、肾经,具有滋补肝肾、明目乌发之功效;可用于肝肾阴虚、眩晕耳鸣、腰膝酸软、须发早白、目暗不明、内热消渴、骨蒸潮热等^[1]。女贞子中含有多种活性成分,如三萜类、环烯醚萜类、苯乙醇类、黄酮类、挥发油、糖类、氨基酸、甾醇类等^[2,3],具有抗糖尿病、抗肿瘤、护肝、抗氧化、抗炎、降糖、降脂、调节免疫等多种药理作用,临幊上主要用于治疗高脂血症、骨质疏松、结肠癌、肺癌、肝炎等疾病^[4-8]。女贞子中的主要活性成分为环烯醚萜类,但女贞子的药效并不靠个别成分含量决定^[9],女贞子中的苯乙醇类、黄酮类、环烯醚萜等成分因具有抗氧化、抗骨质疏松等活性也被用于女贞子的质量评价^[10,11],但仍然不够完善,通过分析与女贞子发挥药效相关的化合物群的含量才能真正评价女贞子药材的质量^[11]。因此,本研究建立了同时测定女贞子中苯乙醇类(红景天昔、松果菊昔)、黄酮类(槲皮素、芹菜素、芸香昔、木犀草昔、木犀草素)和环烯醚萜类(橄榄苦昔、特女贞昔)等多种活性成分的含量测定方法,用于评价女贞子的品质。

女贞子的炮制方法始见于宋代《疮疡》一书,女贞子传统的炮制品沿用至今的有生品、酒制品,现代还增加了净制品、蒸制品、盐制品、醋制品等,临幊上常用生品和酒制品,女贞子生品清肝明目、滋阴润燥,酒制后滋补肝肾作用显著增强^[12]。研究表明,女贞子酒制后补肝肾作用增强与女贞子中环烯醚萜类成分在炮制过程中发生水解转化密切相关^[13],女贞子经炮制后环烯醚萜类昔类成分和苯乙醇昔类成分含量降低,红景天昔和苯乙醇昔元含量升高^[14]。但是,这些研究比较零散,不具有系统性,不足以科学的评价女贞子炮制前后化学成分的变化。鉴于此,本研究采用 UPLC-Q Exactive-Orbitrap 高分辨质谱建立同时测定女贞子中红景天昔、芸香昔、木

犀草昔、特女贞昔、橄榄苦昔、木犀草素、芹菜素、槲皮素、松果菊昔的含量,分析不同产地女贞子中化学成分的分布规律,考察炮制前后女贞子中化学成分含量的变化,以期为规范女贞子饮片、炮制品的质量标准提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

超高效液相色谱-四极杆-静电轨道阱-高分辨质谱仪(Q-Exactive, 美国 Thermo Scientific 公司); Xcalibur 质谱工作站; MS105DU 型十万分之一分析天平(瑞士梅特勒仪器有限公司); AL204 型万分之一天平(梅特勒-托利多上海仪器有限公司); KH-250E 型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司); Milli-Q POD 超纯水仪(Merck 公司 德国)。

1.2 试药

红景天昔(批号: MUST-16041802, 纯度: 98.96%)、芸香昔(批号: MUST-16031712, 纯度: 98.87%)、木犀草昔(批号: MUST-14060918, 纯度 ≥ 98%)、特女贞昔(批号: MUST-16021904, 纯度: 98.01%)、橄榄苦昔(批号: MUST-16052512, 纯度: 99.72%)、木犀草素(批号: MUST-14050411, 纯度 ≥ 98%)、芹菜素(批号: MUST-14050505, 纯度 ≥ 98%)、槲皮素(批号: MUST-15042714, 纯度: 98.94%)、松果菊昔(批号: MUST-17030701, 纯度: 98.88%), 均购自成都曼思特生物科技有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯, 均购自美国 Fisher 公司; 水为超纯水; 磷酸为分析纯, 购自洛阳昊华化学试剂有限公司; 黄酒(5 年)购自浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司。

女贞子采集于不同地区, 经河南中医药大学药学科谢小龙副教授鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实。样品信息来源见表 1, 样品均为 2017 年 1 月份采收。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号 No.	来源 Origin	编号 No.	来源 Origin
S1	河南信阳	Z1	河南信阳(炮制品)
S2	河南郑州	Z2	河南郑州(炮制品)
S3	河南驻马店	Z3	河南驻马店(炮制品)
S4	湖北当阳	Z4	湖北当阳(炮制品)

续表1(Continued Tab. 1)

编号 No.	来源 Origin	编号 No.	来源 Origin
S5	河南三门峡	Z5	河南三门峡(炮制品)
S6	四川广元	Z6	四川广元(炮制品)
S7	四川彭县	Z7	四川彭县(炮制品)
S8	陕西杨凌	Z8	陕西杨凌(炮制品)
S9	河南新乡	Z9	河南新乡(炮制品)
S10	河南辉县	Z10	河南辉县(炮制品)
S11	河南焦作	Z11	河南焦作(炮制品)
S12	河南开封	Z12	河南开封(炮制品)
S13	河南南阳	Z13	河南南阳(炮制品)
S14	湖南长沙	Z14	湖南长沙(炮制品)
S15	湖南常德	Z15	湖南常德(炮制品)
S16	江苏南京	Z16	江苏南京(炮制品)
S17	山西沁水	Z17	山西沁水(炮制品)
S18	山西长治	Z18	山西长治(炮制品)
S19	安徽霍山	Z19	安徽霍山(炮制品)
S20	安徽宁国	Z20	安徽宁国(炮制品)
S21	河北保定	Z21	河北保定(炮制品)
S22	浙江金华	Z22	浙江金华(炮制品)

2 方法与结果

2.1 样品的制备

取22批不同产地女贞子药材,按“2020版《中国药典》四部通则0213 炖法”进行女贞子药材的炮制。炮制方法为:取女贞子药材约100 g,加入黄酒20 g,拌匀,密闭闷润4 h,在闷润过程中,每隔半小时搅拌一次,置于蒸锅中,密闭,蒸汽加热炖制4 h,至女贞子呈黑褐色,取出,晾干备用。

2.2 供试品溶液的制备

取女贞子样品粉末(过三号筛)约2 g,精密称定,置于50 mL具塞锥形瓶中,加80%的甲醇25 mL,称定重量,超声提取60 min(功率:700 W,频率:40 kHz),放至室温,用80%的甲醇补足减失重量,滤过,蒸干。残渣用80%的甲醇溶解并转移至25 mL量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 对照品溶液的制备

分别取红景天苷、芸香苷、木犀草苷、特女贞苷、橄榄苦苷、木犀草素、芹菜素、槲皮素、松果菊苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL各含1.92、3.63、0.69、17.23、17.98、0.61、0.23、0.60、5.18 mg的混合对照品溶液,备用。

2.4 色谱、质谱条件

2.4.1 色谱条件

采用Hypersil GOLD C₁₈反相色谱柱(100 mm ×

2.1 mm,3 μm),流动相为A:甲醇,B:0.1% (V/V)甲酸水溶液,梯度洗脱条件为:0~5 min:20% A;5~25 min:20% A→60% A,流速为0.2 mL/min,柱温为25 °C,进样量5 μL。

2.4.2 质谱条件

离子源为加热电喷雾离子化源(HESI),载气为氮气,鞘气压力3.5 MPa(35 bar),辅助气压力1.0 MPa(10 bar),喷雾电压+3.50、-2.80 kV,毛细管温度为350 °C,辅助器加热温度200 °C,分辨率为70 000,负离子模式扫描。对照品和女贞子样品的LC-MS色谱图见图1。

2.5 方法学考察

2.5.1 检测限与定量限

取各对照品溶液适量,加入甲醇溶液逐步稀释,以信噪比3:1时对应待测物浓度为检测限(LOD),以信噪比10:1时对应待测物浓度为定量限(LOQ)进行测定,结果见表2。

2.5.2 线性关系考察

精密吸取“2.3”项下混合对照品溶液,加甲醇分别稀释2、5、10、20、50、100、200、500倍,制成一系列浓度的混合对照品溶液。分别精密吸取稀释后混合对照品溶液5 μL,按照“2.4”项下条件测定,以各对照品峰面积(Y)对浓度(X)进行线性关系考察。

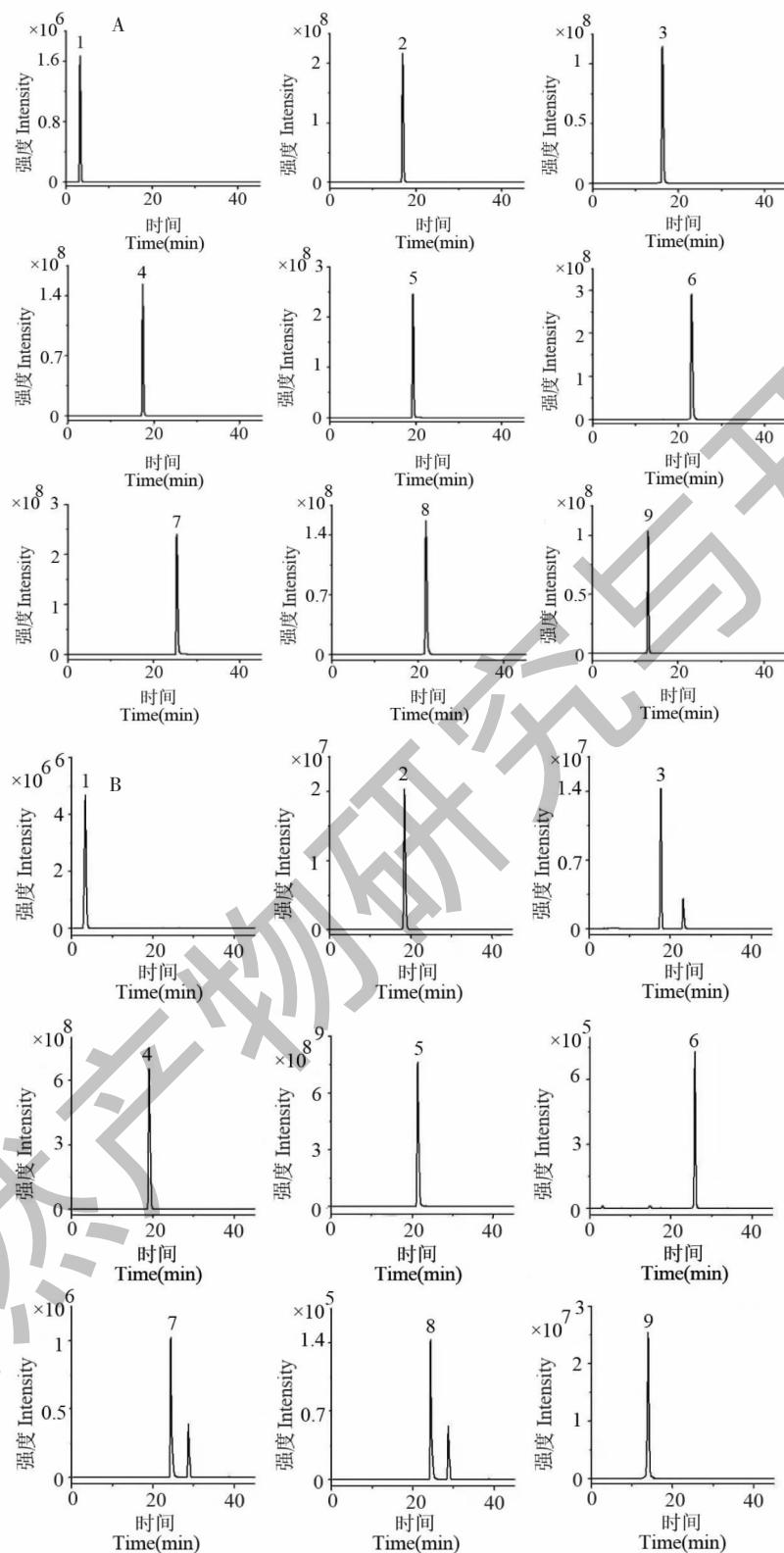


图 1 对照品(A)及女贞子样品的色谱图(B)

Fig. 1 Chromatogram of reference substance (A) and sample of *Ligustrum Lucidi Fructus* (B)

注:1. 红景天苷;2. 芸香苷;3. 木犀草苷;4. 特女贞苷;5. 橄榄苦苷;6. 木犀草素;7. 芹菜素;8. 槲皮素;9. 松果菊苷。Note: 1. Salidroside;

2. Rutin;3. luteolin-7-O-glucoside;4. Specnuezhenide;5. Oleuropein;6. Luteolin;7. Apigenin;8. Quercetin;9. Echinacoside.

各个成分的线性回归方程和线性范围结果见表 2, 结果表明 9 个成分在一定浓度范围内线性关系良好。

表 2 9 个成分线性实验结果

Table 2 Linear test results of nine components

成分 Component	回归方程 Regression equation	线性范围 Linearity range($\mu\text{g/mL}$)	r	检测限 LOD($\mu\text{g/mL}$)	定量限 LOQ($\mu\text{g/mL}$)
红景天苷 Salidroside	$y = 701.8x + 3 \times 10^6$	3.842 ~ 1 920.853	0.999 8	0.298	0.894
芸香苷 Rutin	$y = 97.3x - 2 \times 10^6$	7.256 ~ 3 628.082	0.999 6	1.949	5.850
木犀草苷 Luteolin-7-O-glucoside	$y = 1154.9x + 2 \times 10^6$	1.390 ~ 694.975	0.999 9	0.383	0.991
特女贞苷 Specnuezhenide	$y = 3829.9x + 3 \times 10^8$	34.465 ~ 17 232.609	0.999 7	0.959	2.877
橄榄苦苷 Oleuropein	$y = 2416.5x + 1 \times 10^8$	35.965 ~ 17 982.519	0.999 9	1.201	3.610
木犀草素 Luteolin	$y = 1030.9x + 2 \times 10^6$	1.217 ~ 608.473	0.999 7	0.342	0.887
芹菜素 Apigenin	$y = 6822.9x + 5 \times 10^6$	0.453 ~ 226.603	0.999 9	0.129	0.302
槲皮素 Quercetin	$y = 85.6x - 250414$	1.190 ~ 595.058	0.999 6	0.337	0.924
松果菊苷 Echinacoside	$y = 3309.3x + 7 \times 10^7$	10.356 ~ 5 178.013	0.999 6	1.053	2.757

2.5.3 精密度实验

精密吸取同一混合对照品溶液, 按照“2.4”项下色谱条件连续进样 6 次, 分别计算红景天苷、芸香苷、木犀草苷、特女贞苷、橄榄苦苷、木犀草素、芹菜素、槲皮素、松果菊苷峰面积的 RSD 值, 结果显示, 9 个成分峰面积的 RSD 值分别为: 0.89%、1.12%、0.92%、0.77%、0.42%、1.18%、1.08%、0.87%、0.78%, 表明仪器的精密度良好。

2.5.4 重复性实验

取 S2 女贞子样品 6 份, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.4”项下色谱条件测定, 计算各成分含量的 RSD 值, 测得 9 个成分含量的 RSD 值分别为: 1.83%、3.36%、1.37%、1.57%、1.05%、2.57%、1.62%、2.15%、1.14%, 表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性实验

取 S2 女贞子样品, 按照“2.2”项下方法制备供

试品溶液, 室温放置, 按照“2.4”项下色谱条件分别在 0、1、2、4、8、12、24 h 进样, 分别计算红景天苷、芸香苷、木犀草苷、特女贞苷、橄榄苦苷、木犀草素、芹菜素、槲皮素、松果菊苷峰面积的 RSD 值。结果显示, 9 个成分峰面积的 RSD 值分别为: 1.43%、1.69%、0.93%、0.70%、1.91%、1.05%、1.30%、2.08%、0.79%。表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内基本稳定。

2.5.6 加样回收率实验

取已知含量的女贞子(S2)药材粉末 6 份, 约 1 g, 精密称定, 分别按照含量比为 1:1 精密加入相应量对照品溶液, 按照“2.2”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.4”项下条件测定, 分别计算回收率及 RSD 值。实验结果见表 3, 结果显示各个成分加样回收率的 RSD 值均 < 2.5%。表明该方法准确性良好。

表 3 9 个成分加样回收率实验结果

Table 3 Test results of recovery rate of nine components

成分 Component	样品量 Sample weighing (g)	原有量 Original amount(μg)	加入量 Added amount(μg)	测得量 Found amount(μg)	回收率 Recovery rate(%)	平均回收率 Average recovery(%)	RSD (%)
红景天苷 Salidroside	1.004 0	1 279.6	1 278.3	2 565.6	100.6	100.4	0.50
	1.005 2	1 281.1	1 278.3	2 574.8	101.2		
	1.006 3	1 282.5	1 278.3	2 562.2	100.1		
	1.008 8	1 285.7	1 278.3	2 560.2	99.7		
	1.001 5	1 276.4	1 278.3	2 563.7	100.7		
	1.002 7	1 277.9	1 278.3	2 556.3	100.0		
芸香苷 Rutin	1.004 0	218.3	218.5	428.6	96.3	99.3	1.63

续表3(Continued Tab. 3)

成分 Component	样品量 Sample weighing (g)	原有量 Original amount(μg)	加入量 Added amount(μg)	测得量 Found amount(μg)	回收率 Recovery rate(%)	平均回收率 Average recovery(%)	RSD (%)
木犀草苷 Luteolin-7-O-glucoside	1.005 2	218.5	218.5	434.1	98.7		
	1.006 3	218.8	218.5	439.0	100.8		
	1.008 8	219.3	218.5	435.1	98.8		
	1.001 5	217.7	218.5	438.4	101.0		
	1.002 7	218.0	218.5	437.1	100.3		
	1.004 0	186.6	186.4	370.5	98.6	99.9	
	1.005 2	186.9	186.4	371.3	98.9		0.97
	1.006 3	187.1	186.4	375.7	101.2		
特女贞苷 Specnuezhenide	1.008 8	187.5	186.4	374.7	100.4		
	1.001 5	186.2	186.4	371.7	99.5		
	1.002 7	186.4	186.4	374.3	100.8		
	1.004 0	13 948.9	13 950.4	27 606.3	97.9	99.9	2.00
	1.005 2	13 965.6	13 950.4	28 278.6	102.6		
	1.006 3	13 980.8	13 950.4	28 154.4	101.6		
	1.008 8	14 015.6	13 950.4	27 868.3	99.3		
	1.001 5	13 914.1	13 950.4	27 990.1	100.9		
橄榄苦苷 Oleuropein	1.002 7	13 930.8	13 950.4	27 462.7	97.0		
	1.004 0	7 392.4	7 405.5	14 960.8	102.2	101.7	0.89
	1.005 2	7 401.2	7 405.5	14 910.4	101.4		
	1.006 3	7 409.3	7 405.5	15 007.4	102.6		
	1.008 8	7 427.7	7 405.5	14 848.0	100.2		
	1.001 5	7 373.9	7 405.5	14 986.8	102.8		
	1.002 7	7 382.8	7 405.5	14 869.8	101.1		
	1.004 0	28.3	28.0	56.4	100.0	99.6	0.63
木犀草素 Luteolin	1.005 2	28.4	28.0	56.1	98.9		
	1.006 3	28.4	28.0	56.2	99.2		
	1.008 8	28.5	28.0	56.5	100.1		
	1.001 5	28.2	28.0	56.0	98.8		
	1.002 7	28.3	28.0	56.4	100.4		
	1.004 0	12.5	12.4	25.2	102.6	101.9	0.84
	1.005 2	12.5	12.4	25.3	103.0		
	1.006 3	12.5	12.4	25.0	100.9		
芹菜素 Apigenin	1.008 8	12.5	12.4	25.2	102.5		
	1.001 5	12.4	12.4	25.0	101.6		
	1.002 7	12.4	12.4	24.9	100.8		
	1.004 0	31.1	31.1	61.1	96.3	97.4	2.04
	1.005 2	31.2	31.1	61.9	98.8		
	1.006 3	31.2	31.1	61.8	98.5		
	1.008 8	31.3	31.1	60.5	94.0		

续表3(Continued Tab. 3)

成分 Component	样品量 Sample weighing (g)	原有量 Original amount(μg)	加入量 Added amount(μg)	测得量 Found amount(μg)	回收率 Recovery rate(%)	平均回收率 Average recovery(%)	RSD (%)
松果菊甘 Echinacoside	1.001 5	31.1	31.1	62.2	100.1		
	1.002 7	31.1	31.1	61.2	96.7		
	1.004 0	2 547.3	2 549.6	5 040.8	97.8	99.5	0.95
	1.005 2	2 550.3	2 549.6	5 089.7	99.6		
	1.006 3	2 553.1	2 549.6	5 107.8	100.2		
	1.008 8	2 559.4	2 549.6	5 075.9	98.7		
	1.001 5	2 540.9	2 549.6	5 085.4	99.8		
	1.002 7	2 544.0	2 549.6	5 108.8	100.6		

2.6 含量测定

2.6.1 不同产地女贞子中9个成分含量测定

取不同产地的干燥女贞子样品,每个样品平行

制备3份,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.4”项下条件测定9个成分的含量,其含量测定结果见表4。

表4 不同产地女贞子中9个成分含量测定结果($n=3$)

Table 4 Determination results of nine components in Ligustri Lucidi Fructus from different habitats($n=3$)(mg/g)

样品 Sample	红景天苷 Salidroside	芸香苷 Rutin	木犀草苷 Luteolin-7-O-glucoside	特女贞苷 Specnuezhenide	橄榄苦苷 Oleuropein	木犀草素 Luteolin	芹菜素 Apigenin	槲皮素 Quercetin	松果菊苷 Echinacoside
S1	0.097 5	0.107 4	0.109 5	8.204 6	6.832 5	0.003 7	0.003 2	0.011 7	1.506 8
S2	1.274 5	0.217 4	0.185 9	13.893 3	7.362 9	0.028 2	0.012 4	0.031 0	2.537 1
S3	0.621 7	0.109 9	0.128 7	7.368 3	4.749 2	0.005 5	0.005 7	0.026 2	1.307 3
S4	1.544 0	0.223 5	0.259 7	15.849 9	8.300 1	0.056 4	0.102 6	0.038 9	2.958 7
S5	0.412 0	0.082 7	0.063 6	7.542 6	2.868 1	0.001 4	0.002 1	0.016 0	0.980 5
S6	1.332 8	0.269 0	0.287 4	17.672 6	5.465 7	0.035 8	0.013 5	0.035 7	1.906 3
S7	0.640 8	0.116 4	0.127 9	9.570 2	4.013 4	0.004 9	0.009 8	0.017 9	1.193 1
S8	1.262 4	0.299 6	0.224 6	12.850 0	9.936 1	0.030 2	0.067 4	0.038 2	1.718 6
S9	0.538 8	0.113 3	0.077 6	6.995 5	4.167 7	0.002 1	0.002 9	0.019 0	0.834 4
S10	0.204 4	0.086 9	0.148 7	6.868 0	5.224 8	0.005 8	0.000 9	0.021 7	1.344 9
S11	0.498 7	0.103 8	0.078 2	7.320 0	1.816 2	0.001 8	0.002 1	0.017 2	1.278 0
S12	0.598 8	0.121 1	0.044 8	7.573 7	3.144 2	0.004 3	0.002 3	0.063 3	0.873 5
S13	1.278 8	0.357 2	0.309 4	15.358 0	9.735 9	0.050 4	0.019 6	0.034 9	1.906 6
S14	0.986 2	0.293 4	0.198 2	18.106 6	8.970 1	0.109 2	0.136 4	0.044 8	1.655 7
S15	1.030 6	0.210 6	0.213 9	14.023 8	7.233 5	0.086 5	0.041 2	0.036 2	1.874 2
S16	0.458 3	0.286 9	0.092 6	8.714 8	5.109 7	0.001 6	0.002 7	0.009 8	0.995 7
S17	0.587 4	0.129 8	0.089 3	7.683 2	4.309 9	0.006 9	0.107 9	0.029 6	1.536 8
S18	0.704 3	0.140 7	0.108 7	7.641 0	3.220 8	0.005 2	0.010 5	0.022 5	1.109 4
S19	0.400 6	0.103 5	0.157 9	8.145 3	3.209 7	0.001 9	0.007 8	0.019 6	0.745 8
S20	0.327 9	0.098 9	0.114 6	8.709 7	2.508 6	0.002 4	0.006 3	0.017 4	0.579 2
S21	0.726 3	0.110 4	0.096 2	6.329 8	2.047 1	0.018 3	0.091 8	0.005 6	1.114 5
S22	0.491 2	0.074 6	0.127 9	7.205 6	5.610 8	0.009 7	0.134 9	0.011 9	1.009 4

注:所有实验结果均以干质量计算。

Note: All experimental results are calculated by dry mass.

2.6.2 不同产地女贞子炮制后9个成分含量测定

取不同产地女贞子样品按照“2.1”项下方法炮制,按照“2.2”项下方法制备供试品溶液,按照

“2.4”项下条件测定女贞子中9个成分的含量,其结果见表5和图2。

表5 炮制后女贞子样品9个成分含量测定的结果($n=3$)Table 5 Determination results of nine components in Ligustri Lucidi Fructus after processing ($n=3$) (mg/g)

样品 Sample	红景天苷 Salidroside	芸香苷 Rutin	木犀草苷 Luteolin- 7-O- glucoside	特女贞苷 Specnuezhenide	橄榄苦苷 Oleuropein	木犀草素 Luteolin	芹菜素 Apigenin	槲皮素 Quercetin	松果菊苷 Echinacoside
Z1	0.216 4	0.084 5	0.068 0	17.429 2	8.545 0	0.003 0	0.001 5	0.008 4	0.792 4
Z2	1.805 8	0.182 9	0.118 9	25.806 6	15.363 5	0.022 6	0.007 3	0.019 7	1.337 6
Z3	1.169 6	0.086 7	0.080 8	16.249 3	7.330 5	0.004 2	0.003 5	0.015 0	0.686 8
Z4	3.398 7	0.188 4	0.168 1	31.719 8	10.809 6	0.045 1	0.081 2	0.022 6	1.560 7
Z5	0.908 3	0.052 3	0.037 4	16.105 2	3.428 0	0.000 9	0.001 3	0.009 8	0.513 9
Z6	1.934 1	0.218 6	0.186 6	30.365 2	6.436 1	0.028 6	0.011 2	0.024 1	1.003 8
Z7	1.411 7	0.092 5	0.080 3	20.160 4	9.195 3	0.003 6	0.008 0	0.010 6	0.626 4
Z8	2.779 2	0.156 5	0.144 7	23.720 0	12.333 9	0.024 2	0.056 0	0.027 2	0.904 5
Z9	1.187 3	0.089 7	0.046 7	12.011 0	7.432 8	0.001 7	0.002 3	0.010 7	0.436 6
Z10	0.451 6	0.066 1	0.094 1	14.756 0	8.064 4	0.004 9	0.000 6	0.012 3	0.706 7
Z11	1.099 0	0.081 2	0.047 1	16.760 0	4.049 8	0.001 4	0.001 6	0.009 6	0.671 3
Z12	1.319 3	0.096 7	0.024 9	16.167 4	7.854 0	0.003 4	0.001 8	0.047 2	0.457 2
Z13	2.815 3	0.208 1	0.201 3	32.736 0	15.025 0	0.041 3	0.016 2	0.025 5	1.003 9
Z14	2.171 5	0.231 0	0.127 1	38.233 2	13.843 4	0.087 4	0.113 5	0.036 2	0.871 2
Z15	2.269 2	0.176 8	0.137 6	29.067 6	11.163 8	0.069 2	0.024 3	0.021 0	0.986 8
Z16	1.010 2	0.205 1	0.056 7	18.449 6	9.886 8	0.000 7	0.001 9	0.005 2	0.521 9
Z17	1.294 2	0.094 5	0.054 5	15.386 4	6.652 7	0.005 7	0.089 8	0.020 7	0.808 3
Z18	1.551 4	0.104 3	0.067 5	14.302 0	7.972 2	0.003 9	0.008 6	0.018 2	0.582 1
Z19	0.883 2	0.081 0	0.100 3	18.310 6	6.955 1	0.001 5	0.004 6	0.011 0	0.389 7
Z20	0.723 3	0.076 8	0.071 4	18.439 4	3.873 3	0.001 7	0.005 1	0.009 7	0.301 5
Z21	1.599 8	0.087 1	0.059 1	11.679 6	5.161 2	0.014 6	0.076 4	0.003 2	0.584 8
Z22	1.082 5	0.055 1	0.080 3	16.431 2	9.660 0	0.007 8	0.112 3	0.009 4	0.529 2

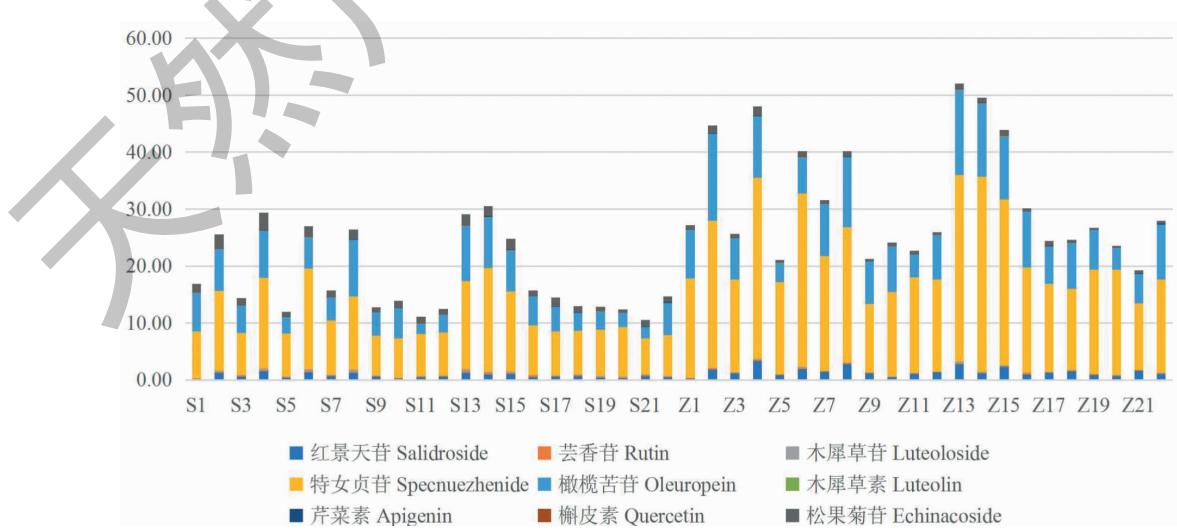
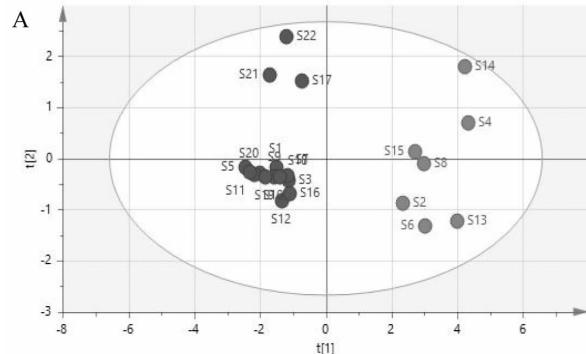


图2 女贞子炮制前后成分含量比较

Fig. 2 Comparative of components content of Ligustri Lucidi Fructus before and after processing

2.7 主成分分析

主成分分析(PCA)是一种可以将多个变量通过线性变换来选出较少个数重要变量的多元统计分析方法,可被用来考察多个变量之间的相关性。由于同一药材中很多成分结构相似且存在生源关系,所以其中成分的含量往往也存在相关性,主成分分析(PCA)则能够对具有相关性的变量进行降维^[15]。



将22批不同产地女贞子、不同产地女贞子炮制后的红景天苷、芸香苷、木犀草苷、特女贞苷、橄榄苦苷、木犀草素、芹菜素、槲皮素、松果菊苷等9种化学成分的含量数据导入SIMCA14.1数据处理系统得到主成分分析得分图(见图3),不同产地、不同产地炮制后的女贞子样品被分为2类。

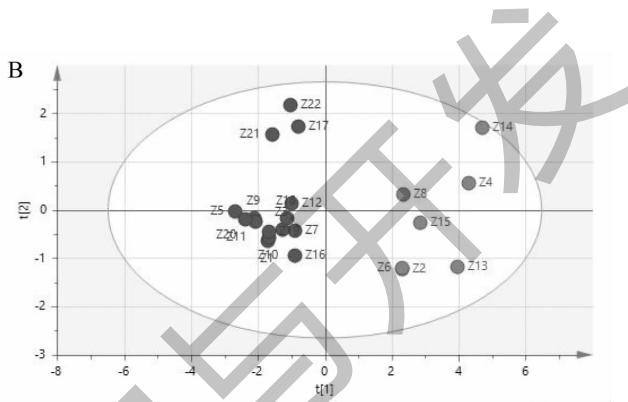
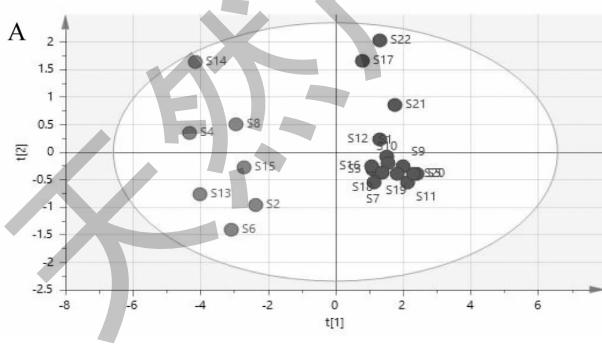


图3 不同产地(A)、不同产地炮制后(B)女贞子的PCA得分图

Fig. 3 PCA scores of *Ligustri Lucidi Fructus* from different producing areas (A) and after processing (B)

2.8 偏最小二乘法判别分析

偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)采用分类响应变量Y来提高类别间的分离,计算校正模型的数据包括校正误差方根、交叉验证误差均方根以及测定的相关系数,采用SIMCA14.1软件对22批不同产地女贞子、不同产地女贞子炮制后、不同产地女贞子炮制前后的9种化学成分的含量数据进行偏最小二乘判别分析。由图4 PLS-DA得分图可知,不同产地女贞子、不同产地女贞子炮制后的样品可以分为



2类,与主成分分析结果一致。VIP图(见图5、6)可以反映出每个成分在该模式下的贡献程度,以VIP值>1为标准可知,特女贞苷、红景天苷、木犀草苷、木犀草素、芸香苷、橄榄苦苷、松果菊苷对产地划分贡献程度较大;特女贞苷、木犀草苷、芸香苷、红景天苷、木犀草素、松果菊苷对不同产地女贞子炮制后的划分贡献程度较大。木犀草苷、木犀草素、芸香苷为不同产地女贞子炮制前后差异性的标志物。

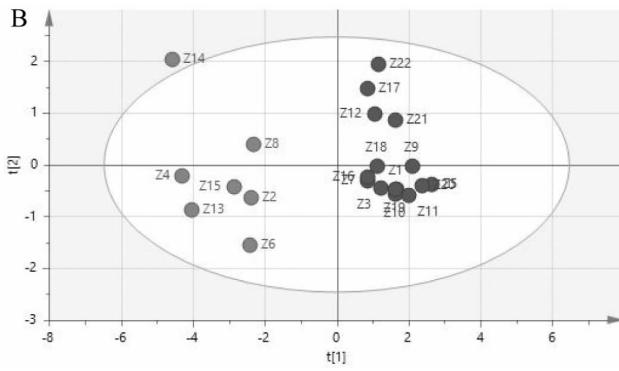


图4 不同产地(A)和不同产地炮制后(B)女贞子PLS-DA的得分图

Fig. 4 Score of PLS-DA of *Ligustri Lucidi Fructus* from different producing areas (A) and after processing (B)

3 讨论

3.1 不同产地女贞子含量测定结果分析

本研究通过建立LC-MS法测定女贞子中9个

成分含量测定方法,对不同产地的女贞子成分的含量进行测定。2020年版《中国药典》规定特女贞苷的限量不低于0.70%,在所测22批不同产地的女

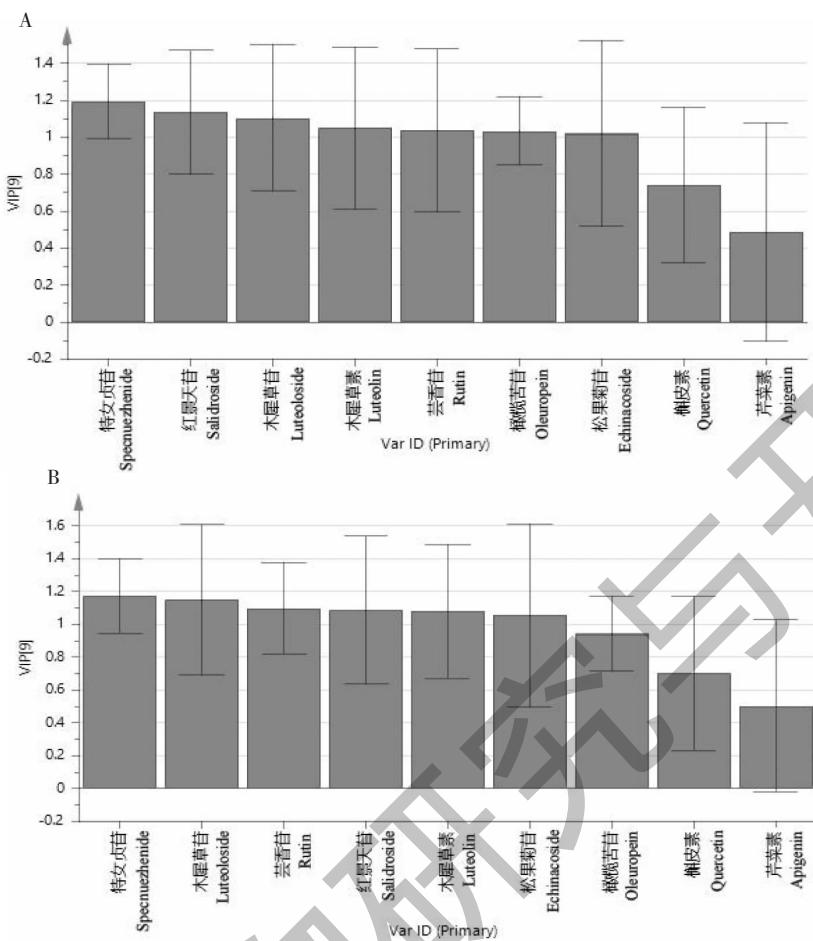


图 5 不同产地女贞子(A)、不同产地女贞子炮制后(B)女贞子中 9 种成分的 VIP 值

Fig. 5 VIP values of nine components of *Ligustrum Lucidi Fructus* from different producing areas (A) and after processing (B)

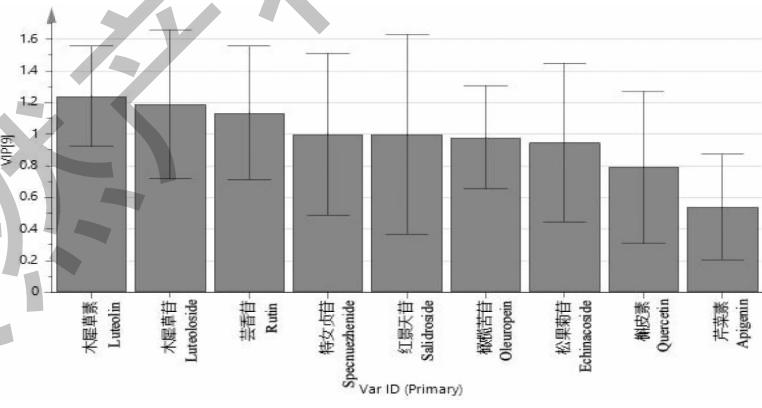


图 6 不同产地女贞子炮制前后 9 种成分的 VIP 值

Fig. 6 VIP values of nine components of *Ligustrum Lucidi Fructus* from different producing areas before and after processing

贞子药材中,有 3 个产地(河南新乡、河北保定、河南辉县)的女贞子药材中特女贞苷的含量低于 2020 年版《中国药典》含量限度,占 13.64%。其原因有待进一步研究。在不同产地中,河南郑州、湖北当阳、四川广元、陕西杨凌、河南南阳、湖南长沙、湖南

常德的红景天苷和特女贞苷的含量较高,分别为 0.986 2 ~ 1.544 0、12.850 0 ~ 18.106 6 mg/g。女贞子炮制后特女贞苷的含量明显增加,均高于 2020 年版《中国药典》含量限度。

采用 SIMCA14.1 软件对不同产地女贞子、不同

产地炮制后的女贞子进行主成分分析,可将不同产地女贞子、不同产地女贞子炮制后各分为2大类,I类包括S2、S4、S6、S8、S13、S14、S15;Z2、Z4、Z6、Z8、Z13、Z14、Z15;II类包括S1、S3、S5、S7、S9、S10、S11、S12、S16~S22;Z1、Z3、Z5、Z7、Z9、Z10、Z11、Z12、Z16~Z22。由偏最小二乘判别分析中VIP图可知,特女贞苷、木犀草苷、红景天苷对产地划分的贡献程度较大,由分析结果可知,不同产地女贞子药材质量差异较大,这可能与药材的生长环境差异有关,单纯测定1或2种成分的含量不能有效反应药材的质量,需要对女贞子的多种成分同时测定,才能全面的反映其内在质量^[16]。

3.2 女贞子炮制前、后含量测定结果分析

女贞子炮制方法有多种,其中最常用的方法为酒制,酒制又有酒炖法和酒蒸法。本研究采用了酒炖法初步探讨女贞子在炮制过程中成分含量的变化。女贞子经酒炖后红景天苷、特女贞苷、橄榄苦苷等含量明显增加。可能由于酒制后改变其组织结构或成分的理化性质,有利于成分的浸润、溶解、置换、扩散等溶出过程的进行,产生助溶作用,提高有效成分的溶出率^[17],其具体影响因素有待于进一步深究。木犀草苷、木犀草素、芸香苷对女贞子炮制前后的划分贡献较大,研究表明,女贞子炮制后,特女贞苷水解成红景天苷,炮制后的女贞子中红景天苷含量明显增加^[18]。

本研究通过超高效液相色谱质谱联用法建立了不同产地、炮制前后的女贞子中红景天苷、芸香苷、木犀草苷、特女贞苷、橄榄苦苷、木犀草素、芹菜素、槲皮素、松果菊苷9个成分含量测定的方法,相对于紫外测定,本研究方法分离能力强,灵敏度高,定性分析结果可靠,检测限低。不同产地女贞子药材质量差异较大可能与地域、气候、土壤、生长年限和采收时间等因素有关,特女贞苷、木犀草苷、红景天苷对产地划分的贡献程度较大。女贞子酒制后红景天苷、特女贞苷、橄榄苦苷的含量明显增加,可能由于酒制提高了有效成分的溶出率,具体原因有待深究。本实验方法简便、可靠,灵敏度高,为女贞子生品和炮制品的质量标准的完善和提高提供了参考。

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, 2020:47.
- 2 Liu XF, Liang JY, Sun JB, et al. Research progress of the *Ligustrum Lucidi Fructus* on the chemical compounds and pharmacological activity[J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2018, 30(1):1-8.
- 3 Wang T, Liu JW, Zhao XY. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ligustrum lucidum* [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med(黑龙江中医药), 2019, 48:352-354.
- 4 Wei HY, Wang GJ, Wang HY, et al. Research progress on the pharmacological activities of *Ligustrum Lucidi Fructus* [J]. Shanghai J Tradit Chin Med(上海中医药杂志), 2017, 51(8):106-108.
- 5 Chen J, Cui YM, Zhang N, et al. Oleanolic acid attenuated diabetic mesangial cell injury by activation of autophagy via miRNA-142-5p/PTEN signaling [J]. Cytotechnology, 2019, 71:925-933.
- 6 Xie BP, Shi LY, Li JP, et al. Oleanolic acid inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis via ER alpha/miR-503/RANK signaling pathway in RAW 264.7 cells[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117:109045.
- 7 Wu C, Zhu WF, Ji Q, et al. Effect of *Ligustrum Lucidi Fructus* on hepatic COX activity in normal rats and preliminary investigation of its DNA methylation mechanism[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42:2355-2360.
- 8 Zhang M, Zhou Y, Wu C, et al. *Ligustrum lucidum*'s effect on demethylation of HepG2 hepatocellular carcinoma related genes[J]. Jiangxi J Tradit Chin Med(江西中医药), 2017, 48(5):61-64.
- 9 Li CQ, Yao C, Zhu RY, et al. Study on the spectrum-effect relationship of antioxidant activity of *Ligustrum lucidum* based on HPPH, ABTS and FRAP[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2016, 41:1670-1677.
- 10 Zhou YZ, Zou LS, Liu Y, et al. Simultaneous determination of six index components in *Ligustrum Lucidi Fructus* by MEKC-DAD[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2014, 49:994-998.
- 11 Zhao LM, Lu GY, Yang ZJ, et al. Quality representation and correlation analysis of *Ligustrum lucidum* Ait. based on characteristic spectrum of drug system[J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med(北京中医药大学学报), 2016, 39:480-488.
- 12 Cao R, Deng C, Ma LL. Study on optimization of processing technology of steamed *Ligustrum lucidum* pieces by response surface methodology[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报), 2019, 25(19):66-70.
- 13 Zhang XL, Song MH, Jiang Q, et al. Research on transformation mechanism of secoiridoid glycosides components in *Ligustrum lucidum* [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44(10):2355-2360.

- btrum lucidum* before and after processing [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志),2017,44:2602-2604.
- 14 Ji X, Liu XQ, Li C, et al. Contents change of main components in processed Ligustri Lucidi Fructus of different processing time and their characteristic quality standard based on UPLC technology[J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志),2018,43:4862-4868.
- 15 Wang QJ, Xie WR, Tai YN, et al. Analysis of Q-Marker constituents and quality evaluation in Shuanghuanglian preparations by qualitative and quantitative methods[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2017,23(18):36-46.
- 16 Cui YW, He H, Zhang L, et al. Study on quality evaluation of *Dysosma versipellis* by HPLC fingerprint combined with multi-index content determination[J]. Nat Prod Res(天然产物研究与开发),2020,32:2051-2060.
- 17 Jiang Q, Jiang HQ, Li HF, et al. Contents changes of five phenylethanols under steaming time spans with wine in Ligustri Lucidi Fructus[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2014,20(16):60-63.
- 18 Sun L, Zhang XY, Zhang XL, et al. Effects of compatibility of different prepared products of *Ligustrum lucidum* on the contents of twelve components in Erzhi pills[J]. J Chin Med Mater(中药材),2020,43:56-60.

杨树中对羟基苯甲酰基转移酶的发现

研究植物细胞壁生物化学的科学家们发现了一种酶,可以将杨树变成生产一种主要工业化学品的来源。这项研究可能会催化一种新的可持续的方法来生产对羟基苯甲酸——一个目前从化石燃料中提取的化学成分,也存在于植物生物质中。

对羟基苯甲酸是一种多功能的化学原料。它可以作为制造液晶的构件,尼龙树脂的增塑剂,热敏纸的感光剂,以及制造对苯二酚、染料和颜料的原料。但目前制造这种重要化学品的过程依赖于石油化工产品。它的合成需要苛刻的反应条件(高温和高压),并对环境有负面影响。因此,找到一种在植物中制造对羟基苯甲酸的经济和可持续的方法,可以帮助减轻环境影响,并为新兴的生物经济做出贡献。

美国能源部布鲁克海文国家实验室刘长军课题组目前确定了一种负责对羟基苯甲酸合成和积累的关键酶——对羟基苯甲酰基转移酶,并确定了编码该蛋白对应的基因,这一发现可能使我们能够对植物进行改造,使其在细胞壁中积累更多的对羟基苯甲酸,从而有可能增加杨树中生物质的使用价值。相关研究发表在《Nature Plants》杂志上。

胡乃华编译自:<https://phys.org/news/2021-08-scientists-id-enzyme-key-industrial.html>

原文标题:Monolignol acyltransferase for lignin p-hydroxybenzoylation in *Populus*