

基于多元统计分析的酒制前后女贞子成分差异分析

李焕茹, 冯志毅, 赵迪, 胡雁萍, 李柯, 冯素香*

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:为探究酒制对女贞子化学成分的影响,采用 UPLC-Orbitrap-MS 技术结合多元统计分析对生女贞子、酒女贞子差异性化学成分进行研究。基于分子网络技术、主成分分析 (PCA) 模型和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 模型筛选女贞子酒制前后出现差异的主要化学成分。共鉴定出 42 种化学成分,结果显示 PCA, OPLS-DA 可将女贞子与酒女贞子完全区分开来, OPLS-DA 筛选出 VIP>1 的 22 个酒制前后出现差异的主要化学成分。本研究建立了一种新的数据处理策略,以系统识别生女贞子和酒女贞子的化学成分,筛选女贞子酒制前后的差异性成分,为进一步研究女贞子酒制增效物质基础及原理提供坚实的基础。

关键词: 女贞子; UPLC-Orbitrap-MS; 化学成分; 酒制; 分子网络

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

Analysis of components of raw and wine-processed Ligustri Lucidi Fructus based on multivariate statistical analysis

LI Huan-ru, FENG Zhi-yi, ZHAO Di, HU Yan-ping, LI Ke, FENG Su-xiang

¹Henan University of Chinese Medicine; ²Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases Co-constructed by Henan province & Education Ministry of P.R. China; ³Zhengzhou Key Laboratory of Chinese Medicine for Quality Control and Evaluation, Zhengzhou 450046, China

Abstract: In order to explore the effect of wine processing on the chemical components of Ligustri Lucidi Fructus, UPLC-Orbitrap-MS technology combined with multivariate statistical analysis was used to study the differential chemical components of raw Ligustri Lucidi Fructus (RLLF) and wine-processed Ligustri Lucidi Fructus (WLLF). The molecular network technology, principal component analysis (PCA) model and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) model were used to select the main chemical components that showed differences before and after the wine processing of Ligustri Lucidi Fructus. A total of 42 compounds were identified, and the results showed that there were obvious distinction between RLLF and WLLF. 22 chemical components showing differences before and after wine processing were selected out by OPLS-DA with VIP>1 before and after wine processing. In this study, a new data processing strategy was established to systematically identify the chemical components of RLLF and WLLF, and to select the different components before and after wine processing of RLLF, which provided a solid foundation for further study on the material basis and principle of enhancing the efficiency of wine processing of RLLF.

Key words: Ligustri Lucidi Fructus; UPLC-Orbitrap-MS; chemical constituents; wine-processed; molecular network

女贞子为木犀科植物女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait.) 的干燥成熟果实, 女贞子的炮制基本继承了古代炮制方法, 以净制后生用、酒蒸和酒炖为主^[1]。生女贞子在补肝肾的同时更倾向于清肝明目、滋阴润燥, 而酒制不仅缓解了女贞子的凉滑之性, 还增强了女贞子补肝肾的作用。女贞子功效发生变化的根本原因可能是女贞子酒制过程中化学成分的变化。女贞子的

质量控制和评价大多基于指纹图谱^[2-4]、集中于几个已知的成分的变化^[5-8]、对炮制品进行化学成分鉴别^[9]、采用成分鉴别结合多变量统计分析女贞子化学成分^[10-12]。缺乏一种全面、快速的分析方法对女贞子酒制前后的化学成分进行系统分析。

基于质谱的分子网络是一种新的可用于鉴别中药的化学成分的方法。化学结构相似的化合物具有相似的质谱碎片，在 GNPS 中通过数据处理这些质谱碎片可以自动聚集成分子网络，以快速识别化合物的不同类别。并且，通过设置组别，产地、药用部位及炮制方法不同的中药样品间的化学成分特征可以在分子网络的饼图上可视化。因此，该技术可用于鉴别中药不同炮制品的化学成分^[13,14]。多元统计分析是一种广泛应用于中药差异化学成分识别的分析方法^[15]。多元统计分析与分子网络联合应用来鉴别中药化学成分，筛选差异性化学成分，可以得到更直观和准确的结果。

本研究综合了 UPLC-Orbitrap-MS 技术、分子网络技术并结合主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 对女贞子酒制前后的化学成分进行分析，探究酒制对女贞子化学成分的影响，是鉴别生女贞子、酒女贞子中化学成分和筛选差异性化学成分的一种新的合理策略，为女贞子及其炮制品的物质基础研究提供了参考。

1 材料

Vanquish 高效液相色谱仪 (Accucore C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 2.6 μm) 色谱柱, Thermo Scientific); Orbitrap Fusion 超高分辨质谱仪 (Thermo Scientific); ME204E 分析天平 (梅特勒-托利多上海仪器有限公司); KQ-700DE 超声波清洗器 (江苏省昆山市超声仪器有限公司); Milli-QPOD 超纯水仪 (德国 Merck 公司)。

羟基酪醇 (批号 MUST-15040805, 纯度≥98%)、红景天苷 (批号 MUST-16041802, 纯度 98.96%)、芸香苷 (批号 MUST-16031712, 纯度 98.87%)、木犀草苷 (批号 MUST-14060918, 纯度≥98%)、特女贞苷 (批号 MUST-16021904, 纯度 98.01%)、橄榄苦苷 (批号 MUST-16052512, 纯度 99.72%)、松果菊苷 (批号 MUST-17030701, 纯度 98.88%)，均购于成都曼思特生物科技有限公司。甲醇、乙腈 (美国 TEDIA 公司); 甲酸为色谱纯，购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 超纯水 (自制)。女贞子样品经河南中医药大学陈随清教授鉴定为木犀科植物女贞 (*Ligustrum lucidum* Ait.) 的干燥成熟果实 (见表 1)。

表 1 女贞子样品信息

Table 1 Sample number of Ligustri Lucidi Fructus

名称 Name	编号 No.	产地 Origin	名称 Name	编号 No.	产地 Origin
女贞子	R1	河南省郑州市	酒女贞子	W1	河南省郑州市
	R2	河南省三门峡市		W2	河南省三门峡市
	R3	河南省新乡市		W3	河南省新乡市
	R4	河南省焦作市		W4	河南省焦作市

2 方法

2.1 酒女贞子的制备

取女贞子饮片，按《中国药典》2020年版通则 0213 炖法进行酒女贞子的炮制，按女贞子-黄酒 5:1 比例混入黄酒中，拌匀，密闭闷润 4 h，在闷润过程中，每隔 0.5 h 搅拌 1 次，置于蒸锅中水蒸汽炖 4 h，至女贞子呈黑褐色，取出，晾干备用，得到酒女贞子。

2.2 混合对照品溶液的制备

分别取羟基酪醇、红景天苷、芸香苷、木犀草苷、特女贞苷、橄榄苦苷、松果菊苷对照品适量，精密称定，加甲醇制成一定质量浓度的混合对照品储备液。置 4 °C 冰箱保存备用。

2.3 供试品溶液的制备

取女贞子粉末约 2 g，精密称定，分别置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 80% 的甲醇 25 mL，称定重量，超声提取（功率：700 W，频率：40 kHz）1 h，放冷，用 80% 的甲醇补足减失重量，摇匀，过滤，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

取黄酒 2 g，精密称定，置于 50 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，离心，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.4 色谱、质谱条件

Accucore C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 2.6 μm) 色谱柱；流动相为乙腈 (A) -0.1% 甲酸水 (B)；梯度洗脱 (0~8 min, 20%A→30%A；8~18 min, 30%A→37%A；18~22 min, 37%A→38%A；22~24 min, 38%A→79%A；24~37 min, 79%A→100%A；37~39 min, 100%A→5%A；39~42 min, 5%A→20%A)；流速 0.2 mL/min，进样量 5 μL，柱温 25 °C。

电喷雾离子化源 (ESI)，正、负离子扫描；喷雾电压 +3.50、-2.50 kV，毛细管温度 300 °C，载气为氮气，鞘气压力 3.5 Mpa，辅助气压力 1.0 Mpa，辅助器加热温度 275 °C，分辨率 120 000，扫描范围 *m/z* 150~1500。

2.5 数据处理与统计分析

Compound Discoverer 3.1、Cytoscape 3.8.0、GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) 和 SIMCA 14.1 均用于数据分析。

GNPS 参数如下：质量误差小于 0.2 Da，匹配峰大于 6，余弦得分大于 0.50。形成生女贞子及酒女贞子的分子网络，下载可视化集群网络图，以便基于 Cytoscape 3.8.0 进行进一步分析。

采用 Compound Discoverer 3.1 软件对 LC/MS 检测数据进行提取和预处理，并在 Excel 2019 中对数据进行编辑，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 14.1 软件进行多元统计分析。采用 PCA 分析初步观察各样品的聚集情况；随后，采用 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 模型得到的变量权重值 (VIP>1) 寻找潜在的化学标志物。

$$\text{定义变化指数} = \frac{\text{NL(WLLF)}}{\text{NL(RLLF)}}$$

式中，NL 为离子强度。

3 结果与分析

3.1 生女贞子及酒女贞子提取物的分子网络

同一类的化合物更容易聚集在同一分子网络中，因为化学结构相似的化合物也具有相似的二级质谱片段。因此，在本研究中，基于它们的质谱相似性，获得了生女贞子和酒女贞子提取物的分子网络，局部见图 1。分子网络中共包含 12 450 个前体离子，包括 1 323 个簇（节点 ≥ 2 ）和 5 448 个单节点。更多详细信息可以在公开网站 GNPS 上获得（https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/result.jsp?task=404f44ed69a04c5cabd803b452f28c43&view=view_all_clusters_withID_beta）。另外，由于处理方法相同，分子网络中每个节点的面积可以代表女贞子酒制前后相对含量的变化。

从图 1 可以明显观察到炮制前后女贞子的化学成分在种类和含量上发生了很大变化。通过生女贞子、酒女贞子在圆中的占比，饼图中，红色部分占比大于蓝色部分，表明炮制后化学成分含量降低；反之，表明炮制后化学成分含量升高。圆全部为红色，表明该成分为生女贞子中含有的成分，而酒女贞子中未检测到该成分。圆全部为蓝色，表明该成分为炮制后新增成分，生女贞子中未检测到该成分。

3.2 总离子流色谱图

生女贞子和酒女贞子的正、负离子模式下的总离子流图见图 2。黄酒中未检测出与女贞子中相同的化学成分。

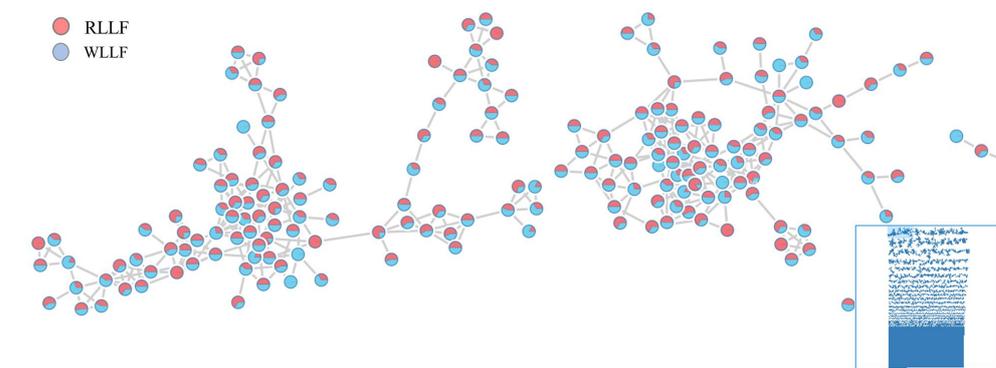


图 1 生女贞子和酒女贞子的分子网络

Fig. 1 Molecular network of RLLF and WLLF

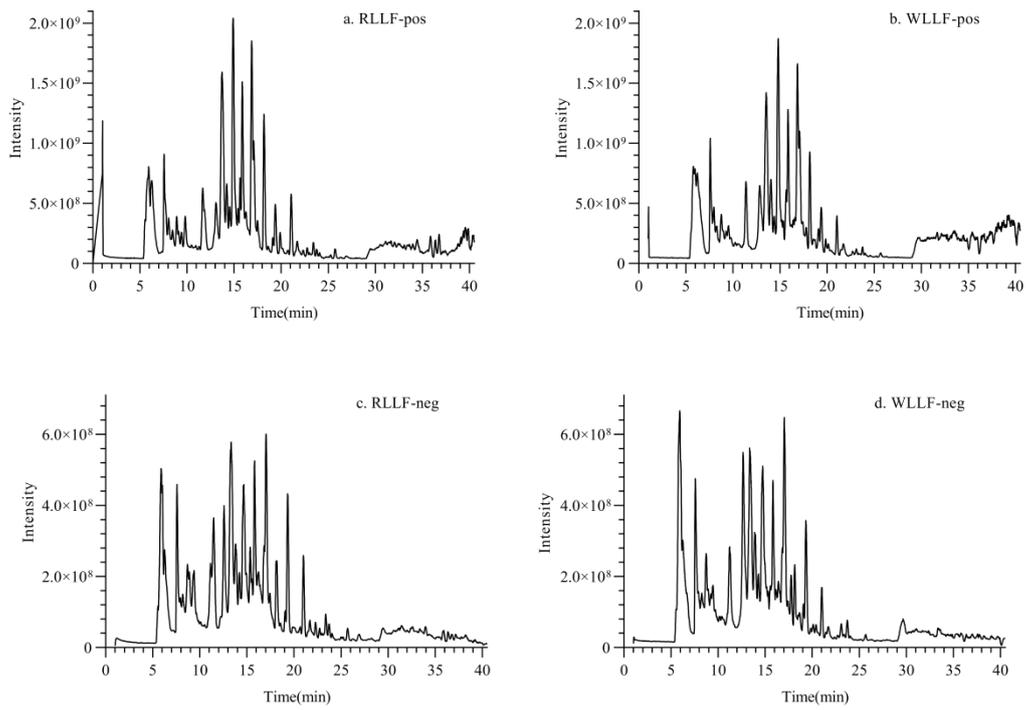


图 2 总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms

注：a、b 为正离子模式；c、d 为负离子模式；a、c 为生女贞子；b、d 为酒女贞子。

Note: a and b represent the positive mode; c and d represent the negative mode; a and c represent raw Ligustri Lucidi Fructus (RLLF); c and d represent and wine-processed Ligustri Lucidi Fructus(WLLF).

表 2 化合物的二级质谱信息及特征碎片离子

Table 2 Mass spectrometric information and characteristic fragment ions of compounds

编号 No.	分子式 Formula	化合物 Compound	t_R (min)	测量值 Calculated	Error ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 Fragment ions	变化指数 Variability index	参考文献 Ref.
环烯醚萜苷类 Iridoids								
1	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	马钱苷酸 Loganate	6.26	377.144 52[M+H] ⁺	0.787	197.080 46、181.085 86、179.069 82	0.64	10
2	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	马钱苷 Loganin	9.39	391.160 11[M+H] ⁺	0.605	211.096 24、193.080 52、181.085 54、179.069 95、161.059 55	1.01	16
3	C ₁₁ H ₁₆ O ₅	马钱苷元 Loganetin	9.40	229.107 11[M+H] ⁺	0.261	197.080 35、193.085 25、169.085 74、151.075 12	—	16
4	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	10-羟基女贞苷 10-Hydroxynuezhenoside	11.39	541.190 74[M+H] ⁺	-1.529	295.080 69、253.070 68、225.075 41、211.059 84、179.070 08、 165.054 40、137.059 62	0.78	17
5	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₄	10-羟基橄榄苦苷 10-Hydroxyoleuropein	11.78	557.185 94[M+H] ⁺	-0.973	259.080 54、241.069 92、227.044 05、223.060 26、209.044 05、 181.048 66、153.053 83、151.038 22、137.059 53	1.27	20
6	C ₂₅ H ₃₀ O ₁₅	橄榄苦苷酸 Oleuropeinic acid	14.39	571.165 25[M+H] ⁺	-0.869	257.066 01、239.054 76、225.039 14、181.049 56、137.059 60	0.61	9
7	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	女贞苷 Ligustroside	14.83	525.197 14[M+H] ⁺	0.928	433.148 38、337.090 82、331.118 07、295.080 60、225.075 21、 211.059 42、193.049 27、183.064 86、165.054 44	0.93	19
8	C ₃₁ H ₄₂ O ₁₇	特女贞苷 Specnuezhenide	16.45	687.250 04[M+H] ⁺	0.821	285.096 07、225.074 92、211.060 07、193.049 06、165.054 32、 145.048 71、137.059 43	6.31	9
9	C ₄₈ H ₆₄ O ₂₇	Oleonuezhenide	16.81	1073.370 87[M+H] ⁺	0.091	225.075 27、207.065 17、183.064 55、165.054 34、137.058 93、 135.043 14、127.038 62、119.048 74	0.91	21
10	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₃	橄榄苦苷 Oleuropein	20.91	541.190 83[M+H] ⁺	-0.363	225.075 42、181.049 10、151.037 99、137.059 48、127.038 71	0.78	9
苯乙醇类 Phenylethanoids								
11	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	Phlinoside A	6.31	785.250 97[M-H] ⁻	3.412	221.065 79、181.050 29、179.034 43、161.023 73、153.055 04	0.83	—

12	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	红景天苷 Salidroside	7.60	299.113 78[M-H] ⁻	1.251	137.060 04、119.034 98、113.024 42	1.36	9
13	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	松果菊苷 Echinacoside	7.65	787.264 85[M+H] ⁺	-0.851	325.091 28、197.080 84、181.049 54、163.038 97、155.070 27、 153.054 62、151.039 08	0.43	9
14	C ₈ H ₁₀ O ₃	羟基酪醇 Hydroxytyrosol	7.95	153.055 37[M-H] ⁻	4.896	153.055 83、123.045 06、122.037 83、109.029 62、93.034 50	2.61	9
15	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	毛蕊花糖苷 Acteoside	12.85	625.212 30[M+H] ⁺	-0.625	325.091 12、307.081 12、181.049 29、165.054 20、163.038 80	0.91	9
16	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	木通苯乙醇苷 B Calceolarioside B	12.91	479.154 93[M+H] ⁺	0.296	325.091 64、195.065 09、191.069 72、181.049 06、163.038 73	0.94	22
黄酮类 Flavonoids								
17	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	花旗松素 Taxifolin	9.69	305.065 51[M+H] ⁺	0.227	287.054 35、259.059 54、231.064 65	0.05	9
18	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芸香苷 Rutin	11.20	609.146 33[M-H] ⁻	4.179	301.035 40、300.027 86、273.041 26、151.003 57	0.20	10
19	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	木犀草素-7-O-芸香糖苷 Luteolin 7-O-rutinoside	11.45	595.164 85[M+H] ⁺	-1.506	287.054 17、129.054 06、111.043 10	0.86	10
20	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷 Hyperoside	13.60	463.088 63[M-H] ⁻	3.299	463.088 59、301.035 25、300.027 86	0.98	12
21	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	异槲皮苷 Isoquercitrin	13.72	465.103 25[M+H] ⁺	1.070	303.049 07、151.039 34、109.027 92	1.13	12
22	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	槲皮素 Quercetin	13.78	303.049 80[M+H] ⁺	-0.426	303.049 10、257.043 46、229.048 72、167.033 63、165.017 82、 153.017 44、139.038 16、137.058 82	0.42	9
23	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	槲皮苷 Quercitrin	13.83	449.107 93[M+H] ⁺	0.205	303.049 12、287.054 26	0.86	22
24	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	圣草酚-7-O-葡萄糖苷 Eriodictyol-7-O-glucoside	14.26	449.109 57[M-H] ⁻	3.857	287.054 26、151.003 46	0.75	23
25	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	圣草酚 Eriodictyol	14.38	289.070 69[M+H] ⁺	0.088	179.033 54、163.038 70、153.017 99、135.044 14、123.043 67	0.70	9
26	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	圣草次苷 Eriocitrin	15.05	597.180 82[M+H] ⁺	-0.966	523.143 74、319.081 64、301.070 40、151.038 74	0.57	23
27	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	芹菜素-7-O-芸香糖苷 Apigenin-7-O-rutinoside	15.09	579.171 37[M+H] ⁺	0.929	271.059 48	0.86	20
28	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	芹菜素-7-O-葡萄糖苷 apigenin-7-O-glucoside	15.99	433.113 35[M+H] ⁺	0.985	271.059 45	1.21	20

29	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	高车前苷 Homoplantaginin	16.15	463.124 04[M+H] ⁺	1.192	301.069 82、300.063 20	0.91	—	
30	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	柚皮素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	16.34	435.128 54[M+H] ⁺	-0.077	273.075 10、153.017 96	0.67	—	
		Naringenin-7- <i>O</i> -glucoside		433.114 49[M-H] ⁻		3.617			271.061 62、151.003 54
31	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素 Naringenin	16.35	273.075 90[M+H] ⁺	0.549	273.075 41、153.018 02、123.043 94、121.064 30、119.048 98	0.68	23	
32	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	木犀草苷 Luteoloside	16.58	449.107 91[M+H] ⁺	0.161	449.107 84、329.065 00、303.048 98、287.054 29、286.047 67、 153.018 43、127.038 78、109.027 49	0.89	10	
33	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素 Luteolin	22.01	287.054 97[M+H] ⁺	-0.155	287.054 26、269.044 46、259.059 81、179.033 77、161.022 58、 151.038 19	0.92	20	
34	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	芹菜素 Apigenin	25.42	271.060 21[M+H] ⁺	0.406	271.059 39、153.017 91、145.028 29、119.048 97	0.99	9	
三萜类 Triterpenes									
35	C ₃₀ H ₄₈ O ₅	委陵菜酸 Tormentic acid	31.84	489.358 80[M+H] ⁺	2.757	453.335 48、425.340 61、407.330 47、353.284 06、249.185 29、 219.174 07、207.174 04	0.96	20	
36	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	齐墩果酸 Oleanolic acid	32.75	457.367 81[M+H] ⁺	0.411	439.320 19、191.178 65、163.147 84、109.101 19	1.33	4	
37	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	熊果酸 Ursolic acid	34.01	457.367 98[M+H] ⁺	0.783	439.356 84、411.362 30、393.351 59、257.168 88、217.194 31、 163.147 83	1.49	4	
38	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	18- β -甘草次酸	35.42	471.346 67[M+H] ⁺	-0.459	453.336 46、425.340 58、407.330 26、317.210 33、271.205 14、 235.171 89、189.163 30	1.29	24	
		18- β -Glycyrrhetic acid							
39	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	2 α -羟基熊果酸	36.12	473.362 37[M+H] ⁺	-0.352	249.184 16、235.168 52、233.189 62、231.173 83、207.173 90、 179.142 82、153.090 88	0.96	9,20	
		2 α - Hydroxyursolic acid							
40	C ₃₉ H ₅₄ O ₆	3 β - <i>O</i> -反式-对香豆酰基山楂酸	36.94	619.399 92[M+H] ⁺	0.975	217.194 64、203.179 06、165.054 43	0.96	20	
41	C ₃₉ H ₅₄ O ₆	3 β - <i>O</i> -顺式-对香豆酰基山楂酸 3 β - <i>O</i> - <i>cis</i> - <i>p</i> -Coumaroylmaslinic acid	37.63	619.399 81[M+H] ⁺	0.798	233.152 83、217.194 64、203.179 06、165.054 43	0.89	20	

42	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	白桦酯醇 Betulin	38.59	443.388 49[M+H] ⁺	0.299	425.378 33、407.367 74、235.205 26、207.173 37	1.19	4
----	--	--------------	-------	------------------------------	-------	---	------	---

3.2.1 环烯醚萜苷类

女贞子中的环烯醚萜苷类成分从结构上可以分为环烯醚萜类和裂环烯醚萜类两种, 该类化合物母核中具有半缩醛结构, 较为活泼, 易导致母核发生断裂, 形成一些特征离子碎片, 从女贞子中共鉴定出 10 个环烯醚萜苷成分 (见表 2)。

化合物 **1** 和 **2** 在正离子模式下准分子离子峰分别为 m/z 377.144 52 $[M+H]^+$ 、391.160 11 $[M+H]^+$, 丢失一分子葡萄糖形成碎片 m/z 197.080 46、211.096 24, 该碎片继续丢失一分子水后形成的碎片 m/z 179.069 82、193.080 52。化合物 **2** 碎片 m/z 211.096 24 丢失一分子甲氧基后形成碎片 m/z 179.069 95, 该碎片继续脱水后形成碎片 m/z 161.059 55, 见图 3、4, 该裂解特征与文献^[16]基本一致, 推测化合物 **2** 为马钱苷。化合物 **1** 比化合物 **2** 少一分子 CH_2 , 推测化合物 **1** 为马钱苷酸, 在女贞子中已有报道^[10]。化合物 **3** 在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 229.107 11 $[M+H]^+$, 丢失一分子甲氧基形成碎片 m/z 197.080 35, 继续丢失一分子 CO 形成碎片 m/z 169.085 74, 再丢失一分子水形成碎片 m/z 151.075 12。此外, 还检测到母离子丢失两分子水形成的碎片 m/z 193.080 52, 初步推测化合物 **3** 为马钱苷元。

化合物 **4~10** 为裂环环烯醚萜苷, 除化合物 **5**、**6** 外, 均检测到 m/z 225 的特征碎片离子。化合物 **4** 和 **10** 为一对同分异构体, 化合物 **10** 通过与标准品的保留时间进行比较, 鉴定为橄榄苦苷。已有报道女贞子中含有橄榄苦苷和 10-羟基女贞苷^[17], 化合物 **4** 初步推测为 10-羟基女贞苷。化合物 **5** 比化合物 **10** 多一个羟基, 初步推测为 10-羟基橄榄苦苷, 在女贞子中已有报道^[20]。化合物 **6** 初步推测为橄榄苦苷酸, 在女贞子中已有报道^[9]。化合物 **7** 在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 525.197 14 $[M+H]^+$, 初步推测为女贞苷, 在女贞子中已有报道^[19]。化合物 **8** 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 687.250 04 $[M+H]^+$, 其二级碎片离子主要有酯苷键断裂并丢失葡萄糖残基形成的碎片 m/z 285.096 07 $[M+H-C_4H_8O_4-C_{14}H_{18}O_6]^+$ 及该碎片继续丢失甲氧基和糖苷键断裂形成的碎片 m/z 211.060 07, 继续丢失一分子水形成的碎片 m/z 193.049 06, 还检测到酯苷键断裂与糖苷键断裂并丢失红景天苷片段及一分子葡萄糖形成的特征碎片离子 m/z 225.074 92、苯乙醇苷元特征离子碎片 m/z 137.059 43 和糖裂解碎片 m/z 145.048 71 等, 该裂解特征与文献^[9]基本一致, 通过与标准品保留时间进行对比, 确定化合物 **8** 为特女贞苷。化合物 **9** 推测为 oleonuezhenide, 在女贞子中已经有报道^[21]。

马钱苷元为酒制后女贞子中新增成分, 可能是由于炮制过程中, 马钱苷酸与马钱苷丢失葡萄糖基转化为马钱苷元。一般认为特女贞苷酒制后含量降低, 红景天苷含量升高, 并且认为这与酒制过程中特女贞苷转化为红景天苷有关。然而, 本实验中特女贞苷酒制后含量升高, 推测是由于炮制过程中, oleonuezhenide 及其异构体分解造成的。

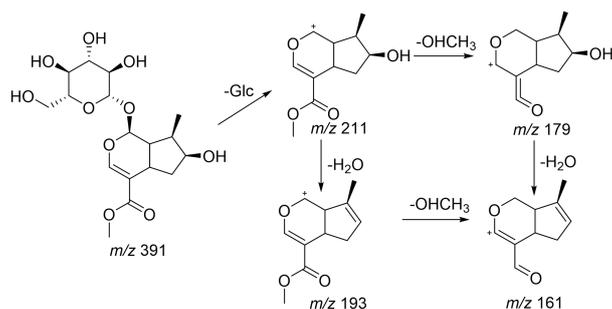


图 3 马钱苷主要碎片离子裂解途径

Fig. 3 Ion cleavage pathway of main fragment of loganin

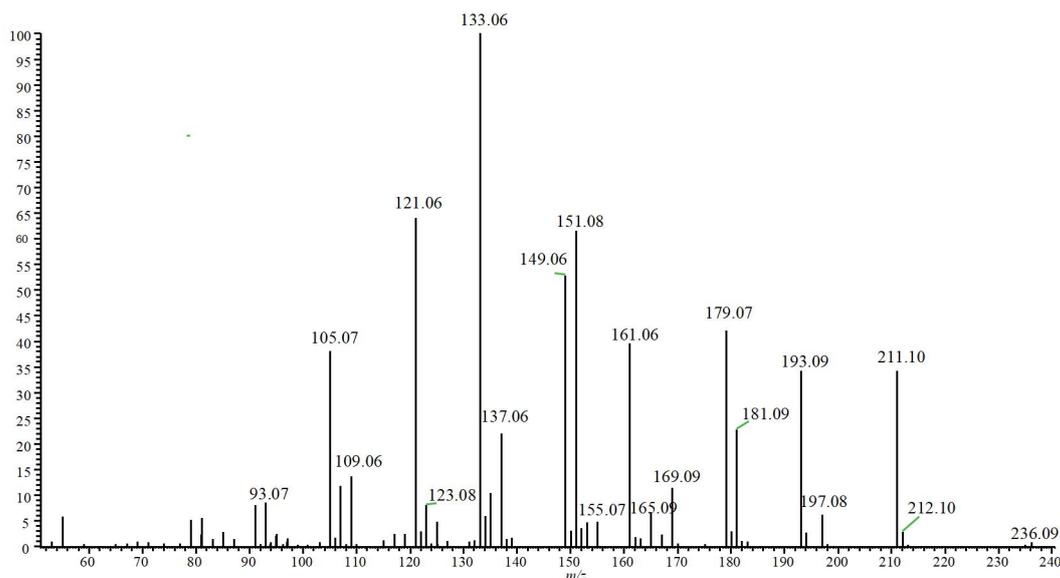


图 4 马钱苷二级质谱图

Fig. 4 Secondary mass spectrometry of loganin

3.2.2 苯乙醇类

女贞子中苯乙醇类成分通常与环烯醚萜类共同存在。在质谱条件下经过能量碰撞，容易丢失中性碎片(咖啡酰基)和分子中的端基糖，或苯乙醇苷元等，这些特征离子碎片的丢失为有效鉴别苯乙醇苷类化合物提供了重要的结构信息，从女贞子中共鉴定出 6 个苯乙醇类成分（见表 2）。

化合物 **12** 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 299.113 78[M-H]⁻，二级质谱碎片离子主要有丢失葡萄糖残基形成的碎片 m/z 137.060 04[M-H-C₆H₁₀O₅]⁻、及糖裂解碎片 m/z 113.024 42，通过与标准品保留时间进行比对，确认化合物 **12** 为红景天苷。化合物 **14** 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 153.055 37[M-H]⁻，二级质谱碎片离子主要有 m/z 123.045 06[M-H-CH₂OH]⁻的碎片离子，通过与标准品保留时间进行比对，确认化合物 **14** 为羟基酪醇。

化合物 **11** 与化合物 **13** 为同分异构体，化合物 **13** 可以通过与标准品的保留时间进行比较，准确地鉴定为松果菊苷。化合物 **13** 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 787.264 85[M+H]⁺，二级质谱碎片离子主要有 m/z 325.091 28[M+H-C₂₀H₃₀O₁₂]⁺、181.049 54[Caffeic acid+H]⁺，咖啡酸部分脱水形成的碎片 m/z 163.038 97[Caffeic acid-H₂O]⁺，以及糖苷键断裂形

成的苯乙醇苷碎片 m/z 155.070 27、153.054 62、151.039 08 等，见图 5、6。化合物 **15** 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 625.212 30[M+H]⁺，二级质谱信息与化合物 **13** 相似，主要有 m/z 325、181、163 的特征碎片离子，与文献^[9]基本一致，推测化合物 **15** 为毛蕊花糖苷。化合物 **16** 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 479.154 93 [M+H]⁺，二级质谱主要有 m/z 181、163 的特征碎片离子，与文献^[22]基本一致，推测化合物 **16** 为木通苯乙醇苷 B。

酒制后，红景天苷、羟基酪醇含量升高，推测是由于炮制过程中，含有红景天苷片段及羟基酪醇片段的苯乙醇苷类及环烯醚萜苷类成分分解造成的。

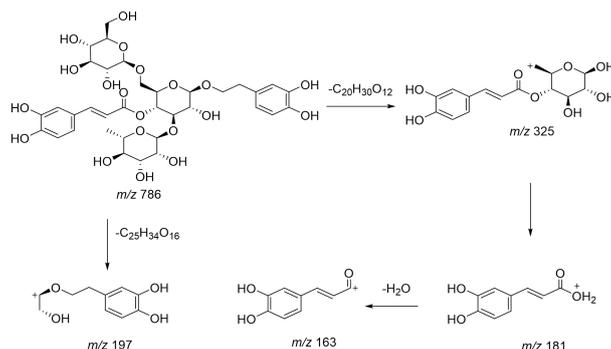


图 5 松果菊苷主要碎片离子裂解途径

Fig. 5 Ion cleavage pathway of main fragment of of echinacoside



图 6 松果菊苷所在分子网络

Fig. 6 Molecular network of echinacoside

图 6 显示，化合物 **13**、**15**、**16** 聚集在同一分子网络中，这可能是由于它们具有相同的质谱碎片 m/z 325、163，该碎片为苯乙醇苷特征离子。化合物 **13** 圆中红色占比明显多于蓝色，表明炮制后含量明显减少，与变化指数 0.43 相对应。

3.2.3 黄酮类

黄酮苷类化合物主要的裂解方式是糖苷键断裂，产生糖基碎片及黄酮苷元；黄酮类化合物主要裂解方式是 C 环的 RDA 裂解，从而产生两个碎片离子，在质谱条件下经能量碰撞会失去 H₂O、CO₂、CO 等一系列中性小分子。从女贞子中共鉴定出 18 个黄酮类成分（见表 2）。女贞子中黄酮类化合物分子网络，见图 7。

化合物 **17** 在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 305.065 51[M+H]⁺，二级质谱碎片离子主要有丢失一分子水形成的碎片 m/z 287.054 35[M+H-H₂O]⁺、继续丢失 CO 形成的碎片

m/z 259.059 54[M+H-H₂O-CO]⁺、231.064 65[M+H-H₂O-2CO]⁺，推测化合物 **17** 为花旗松素，花旗松素在女贞子中已有报道。女贞子酒制后，花旗松素含量明显降低。

化合物 **18** 在负离子模式下准分子离子峰为 m/z 609.146 33[M-H]⁻，二级质谱碎片离子主要有 m/z 301.035 40、300.027 86，该裂解特征与文献^[9]基本一致，通过与标准品的保留时间进行比较，推测化合物 **18** 为芸香苷。化合物 **20**、**21** 为一对同分异构体，化合物 **20** 在负离子模式下的准分子离子峰 m/z 463.088 63[M-H]⁻，二级质谱检测到 m/z 301.035 25、300.027 86 的碎片离子，初步推测化合物 **20** 为金丝桃苷。化合物 **21** 在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 465.103 25[M+H]⁺，并且检测到 m/z 303 的离子峰对应槲皮素，初步推测化合物 **21** 为异槲皮苷，在女贞子中已有报道可能含有金丝桃苷及其异构体^[12]，尚需进一步采用对照品进行比对。化合物 **22** 在正离子模式下的准分子离子峰 m/z 303.049 80[M+H]⁺，推测为槲皮素，在女贞子中已有报道^[9]。化合物 **23** 在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 449.107 93[M+H]⁺，检测到 m/z 303 的离子峰对应槲皮素，推测化合物 **23** 为槲皮苷，在女贞子中已有报道^[9]。

化合物 **24** 在负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 449.109 578[M-H]⁻，并且检测到 m/z 287 的离子峰对应圣草酚，推测化合物 **24** 为圣草酚-7-*O*-葡萄糖苷。化合物 **25** 在正离子模式下的准分子离子峰 m/z 289.070 69[M+H]⁺，二级质谱检测到 m/z 153.017 99、135.044 14 的离子峰，这是典型的 RDA 裂解的过程，推测化合物 **25** 为圣草酚，女贞子中已有报道^[9]。化合物 **26** 在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 597.180 82[M+H]⁺，推测化合物 **26** 为圣草次苷。

化合物 **29** 在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 463.124 04[M+H]⁺，并且检测到丢失葡萄糖基形成的 m/z 301.069 82 的离子峰，推测化合物 **29** 为高车前苷。

化合物 **30** 在正、负离子模式下的准分子离子峰为 m/z 435.128 54[M+H]⁺、 m/z 433.114 49[M-H]⁻，正、负离子下分别检测到 m/z 273、271 的离子峰对应柚皮素，推测化合物 **30** 为柚皮素-7-*O*-葡萄糖苷。化合物 **31** 检测到 m/z 273.075 90[M+H]⁺ 的准分子离子峰和 m/z 153.018 02、121.064 30 的离子峰，这是典型的 RDA 裂解的过程，推测化合物 **31** 为柚皮素。

化合物 **33** 通过与标准品保留时间进行对比，鉴定为木犀草素。化合物 **19**、**32** 的二级质谱中检测到 m/z 287 的离子峰对应木犀草素，推测化合物 **19**、**32** 分别为木犀草素-7-*O*-芸香糖苷、木犀草苷，女贞子中已有报道含有这三种化合物^[20]。

化合物 **34** 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 271.060 21[M+H]⁺，在质谱能量碰撞下，化合物 **34** 发生了 C 环的 RDA 裂解得到特征离子碎片 m/z 153.017 91、145.02829、119.048 97，该裂解特征与文献^[9]基本一致，推测化合物 **34** 为芹菜素。化合物 **27**、**28** 的二级质谱中检测到 m/z 271 的离子峰对应芹菜素，推测化合物 **27**、**28** 分别为芹菜素-7-*O*-芸香糖苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖苷。女贞子已有报道含有这三种化合物^[20]。

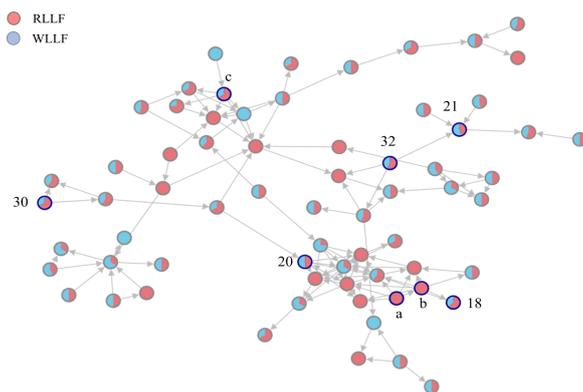


图 7 黄酮类化合物分子网络

Fig. 7 Molecular network of flavonoids

图 7 显示，化合物 18、20、21、30、32 聚集在同一分子网络中，这可能是由于它们具有相同的质谱碎片 m/z 153 或 m/z 151，该碎片为黄酮苷元发生 RDA 裂解形成的特征碎片离子。其中，化合物 18、20 两者均含有 m/z 301、300 的碎片离子，且两者结构极为相似，化合物 18 仅比化合物 20 多一分子鼠李糖。化合物 a、b 为生女贞子中独有成分，化合物 a 可能为槲皮素-3-*O* 丙二酰葡萄糖苷，化合物 b 可能为槲皮素-3-*O*- α -L-吡喃阿拉伯糖苷，与芸香苷、金丝桃苷在具有相同的黄酮苷元。化合物 c 可能为山奈酚-7-*O*-葡萄糖苷，经鉴定化合物 c 的保留时间处为木犀草苷，提示分子网络存在一定的假阳性结果，应与质谱数据处理软件相结合，综合鉴别中药含有的化合物。化合物 18、30、32 圆中红色占比明显多于蓝色，表明炮制后含量明显降低，与变化指数相对应。

3.2.4 三萜类

三萜类化合物在质谱条件下经过能量碰撞，当环内具有双键时一般都有较特征的 RDA 裂解；若无环内双键，常从 C 环断裂为两个碎片，有时也会同时发生上述两种裂解，女贞子中鉴定出 8 个三萜皂苷类成分（见表 2）。

化合物 37 在正离子模式下一级质谱提供的准分子离子峰为 m/z 457.367 98[M+H]⁺，二级质谱碎片离子主要有丢失一分子水形成的碎片 m/z 439.356 84[M+H-H₂O]⁺、丢失一分子 COOH 形成的碎片 m/z 411.362 30[M+H-COOH]⁺ 及再丢失一分子水形成的碎片 m/z 393.351 59[M+H-COOH-H₂O]⁺，熊果酸中环内含有双键，经过质谱能量的碰撞，发生较为特征的 RDA 裂解，C 环发生断裂，形成具有共轭双烯或烯炔的特征离子碎片 m/z 257.168 88、217.194 31、163.147 83 等，见图 8、9，推测化合物 37 为熊果酸。化合物 36 与化合物 37 为同分异构体，文献报道齐墩果酸和熊果酸为女贞子中含有的两个同分异构体，推测化合物 36 为齐墩果酸。化合物 35 和 39 初步鉴定为委陵菜酸和 2 α -羟基熊果酸，这两种三萜皂苷在女贞子中已有报道^[20]。

化合物 38 在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 471.346 67[M+H]⁺，二级质谱碎片离子主要有丢失一分子水形成的碎片 m/z 453.336 46[M+H-H₂O]⁺，丢失一分子 COOH 形成的碎片 m/z 425.340 58[M+H-COOH]⁺ 及再丢失一分子水形成的碎片 m/z 407.330

36[M+H-COOH-H₂O]⁺, 推测化合物 **38** 为 18-β-甘草次酸。化合物 **40**、**41** 为一对同分异构体, 初步鉴定为 3β-O-反式-对香豆酰基山楂酸、3β-O-顺式-对香豆酰基山楂酸, 在女贞子中已有报道^[20]。化合物 **42** 初步鉴定为白桦酯醇, 在女贞子中已有报道^[4]。

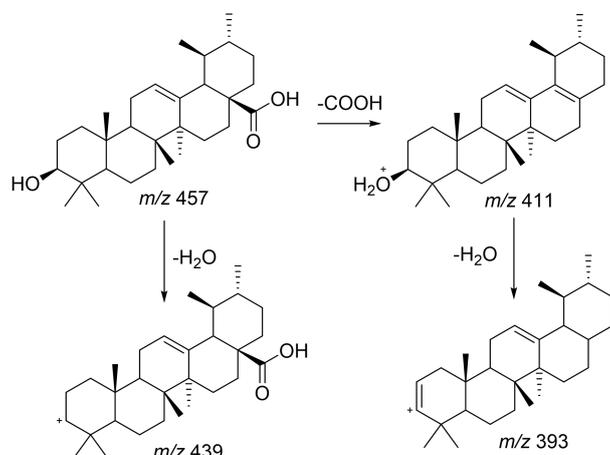


图 8 熊果酸主要碎片离子裂解途径

Fig. 8 Ion cleavage pathway of main fragment of ursolic acid

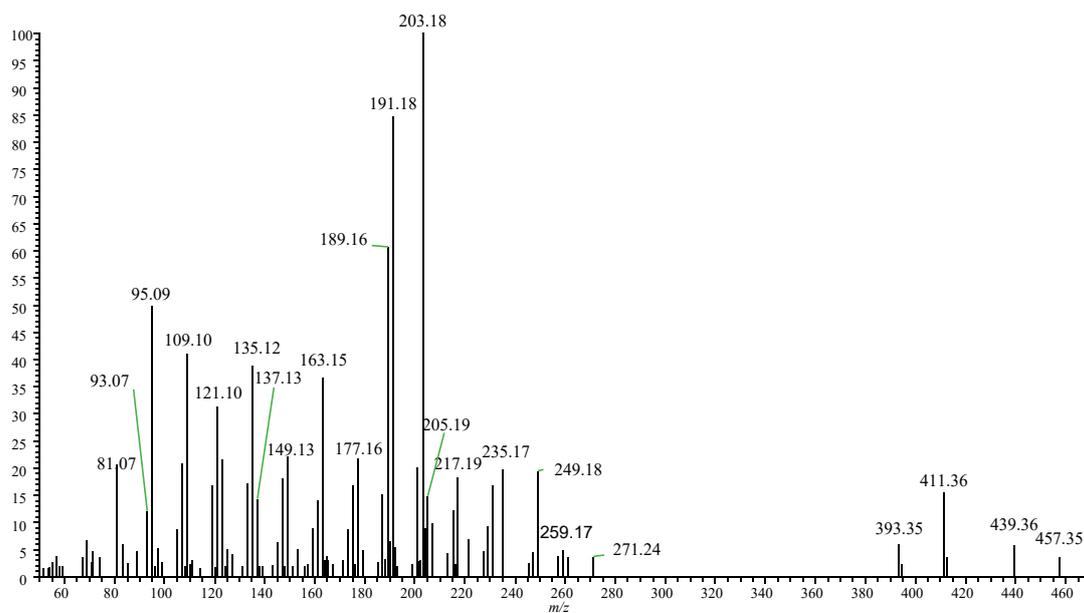


图 9 熊果酸二级质谱图

Fig. 9 Secondary mass spectrometry of ursolic acid

3.3 主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA)

为进一步分析验证分子网络分析生女贞子及酒女贞子差异性化学成分的准确性, 使用 SIMCA 14.1 软件进行多元统计分析。采用的 PCA 多变量模式识别方法对生女贞子、酒女贞子进行降维分析, 图 10 为其 PCA 得分散点图, ($R^2X=0.982$, $Q^2=0.763$)。生女贞子、酒女贞子可以明显分开, 并各自聚为一类, 说明女贞子酒制前后的化学成分存在差异。进一步采用 OPLS-DA 研究女贞子酒制前后的差异化学成分, 其得分图见图 11, 结果发现生女贞子与酒女贞子可明显分开, 模型验证结果 ($R^2Y=0.999$, $Q^2=0.968$) 表明, 该模型有效可靠。

采用常用的变量重要性投影 (VIP) 值对组间质量差异标志物进行筛选, 共有 22 个特征峰的 VIP 值大于 1, 分别为特女贞苷、女贞苷、红景天苷、毛蕊花糖苷、橄榄苦苷、芸香苷、柚皮素-7-O-葡萄糖苷、2 α -羟基熊果酸、圣草酚、柚皮素、羟基酪醇、木犀草苷、马钱苷、马钱苷酸、木通苯乙醇苷 B、10-羟基女贞苷、oleonuezhenide、槲皮苷、芹菜素、圣草次苷、松果菊苷、槲皮素、10-羟基橄榄苦苷 (见图 12)。

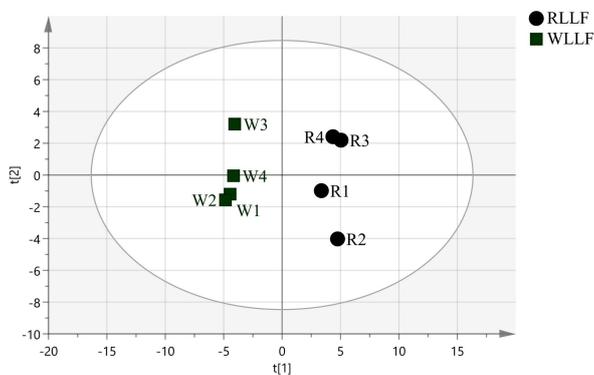


图 10 生女贞子、酒女贞子数据的 PCA 得分图

Fig. 10 PCA score chart of RLLF and WLLF data

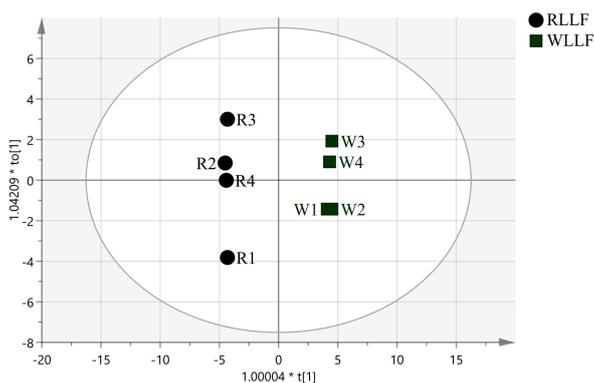


图 11 生女贞子、酒女贞子数据的 OPLS-DA 得分图

Fig. 11 OPLS-DA score chart of RLLF and WLLF data

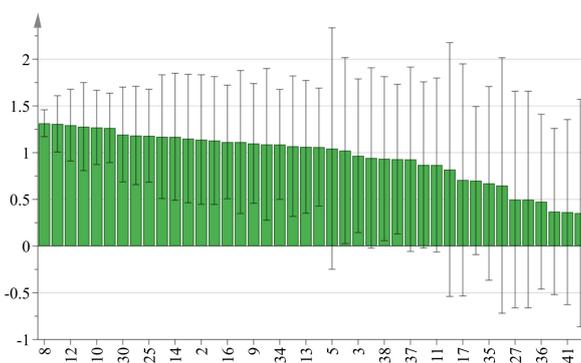


图 12 VIP 值图

Fig. 12 VIP value diagram

4 结论

本研究建立了一种基于 UPLC-Orbitrap-MS 技术、质谱分子网络技术结合多元统计分析技术的综合分析方法,用于鉴别生女贞子、酒女贞子的化学成分,寻找差异性化学成分,探究女贞子酒制前后物质基础的改变。共鉴定出 42 种化学成分,包括环烯醚萜苷、苯乙醇苷、黄酮、三萜类化合物。经分子网络结合多元统计分析发现生女贞子、酒女贞子样品中化学成分存在明显差异,筛选出的差异性成分有特女贞苷、女贞苷、红景天苷、芸香苷、橄榄苦苷等。

分子网络技术与高分辨质谱定性分析相结合与传统单一质谱定性方法相比,具有一定的优势。传统的定性分析只能与数据库中已知的化合物的信息进行比对,给出可能的质谱信息,得到单一的化合物的信息,难以对未知化合物进行分析。分子网络技术可以根据质谱信息,将具有相同碎片的可能的同一类型类化合物聚集到同一网络中,并且根据分子网络中的饼图的占比可以直观地显示出中药生品与炮制品之间的化学成分的差别。将分子网络技术与多元统计分析技术相结合,可以准确筛选生制品之间的化学标记物。

本研究的结果为中药女贞子生品和炮制品的质量评价和质量控制提供理论依据,并为明确女贞子酒制前后药效发生变化的物质基础提供参考。此外,本研究建立的研究女贞子化学成分的综合分析方法,可为快速鉴别其他炮制品及中药复方的化学成分提供一种新的分析策略。

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.
- 2 Zhu XL, Zhang DW, Xie CX, et al. Analysis of chemical quality characteristics of *Ligustri Lucidi Fructus* from different producing areas[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2019, 31: 1498-1505.
- 3 Zhang HJ, Li HR, Feng ZY, et al. Comparative study on HPLC fingerprints between crude and processed *Ligustri Lucidi Fructus*[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2020, 45: 3871-3876.
- 4 Ji X, Liu XQ, Gao L, et al. Qualitative and quantitative analysis on triterpenoids in *Ligustri Lucidi Fructus*[J]. *Chin J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2021, 46: 1168-1178.
- 5 Li MM, Liu Y. Effects of different processing methods on the contents of chemical components in *Ligustri Lucidi Fructus*[J]. *Integr Tradit Chin West Med*(中西医结合研究), 2020, 12(3): 165-167.
- 6 Ji X, Liu XQ, Li C, et al. Content change of main components in processed *Ligustrum lucidum* fruits of different processing time and their characteristic quality standard based on UPLC technology [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2018, 43: 4862-4868.
- 7 Hu YP, Zhao D, Li HR, et al. UPLC-Q Exactive-Orbitrap high-resolution mass spectrometry quantitative analysis of the content of 9 components in *Ligustri Lucidi Fructus* from different producing areas and before and after processing[J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2021, 33: 1308-1319.
- 8 Huo YJ, Yue L, Liu Y, et al. Effect of processing with wine on content of main chemical components in *Ligustri Lucidi Fructus* decoction pieces[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(1): 26-30.

- 9 Xiao X,Xu SM,Gao YM,et al.Study on chemical constituents of Ligustri Lucidi Fructus by UPLC-Q/TOF MS[J].Mod Food Sci Technol(现代食品科技),2019,35(10):253-260.
- 10 Zhang DJ,Sun LL,Mao BB,et al.Analysis of chemical variations between raw and wine-processed Ligustri Lucidi Fructus by ultra-high-performance liquid chromatography-Q-Exactive Orbitrap-MS combined with multivariate statistical analysis approach[J].Biomed Chromatogr,2020,35(4):e5025.
- 11 Li MR,Wang XY,Han LF,et al.Integration of multicomponent characterization, untargeted metabolomics and mass spectrometry imaging to unveil the holistic chemical transformations and key markers associated with wine steaming of Ligustri Lucidi Fructus[J].J Chromatogr A,2020:461228.
- 12 Shang ZP,Xu LL,Zhang YQ,et al.An integrated approach to reveal the chemical changes of Ligustri Lucidi Fructus during wine steaming processing[J].J Pharma Biomed Anal,2021,193:113667.
- 13 Lei HB,Zhang YH,J Y,et al.A comprehensive quality evaluation of Fuzi and its processed product through integration of UPLC-QTOF/MS combined MS/MS-based mass spectral molecular networking with multivariate statistical analysis and HPLC-MS/MS[J].J Ethnopharmacol,2021,266:113455.
- 14 Lei HB,Zhang YH,Zu XP,et al.Comprehensive profiling of the chemical components and potential markers in raw and processed *Cistanche tubulosa* by combining ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry and MS/MS-based molecular networking[J].Anal Bioanal Chem,2020,413(1):129-139.
- 15 Li GW,Suo CX,Wu WP,et al.Multi-indicative component ananalysis of different species of *Terminalia* L. based on multivariate statistical analysis[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021,33(1):23-33.
- 16 Wang YF,Jin ML,Li S,et al.Identification of loganin metabolites in rats by UPLC-Q-TOF-MS/MS[J].Chin J Inf Tradit Chin Med(中国中医药信息杂志),2014,21(10):77-79.
- 17 Zhai YY,Li X,Gao MT,et al.Screening of active ingredients in Erzhi pill for osteoporosis based on molecular docking technology and verification[J].Acta Pharm Sin(药学报),2020,55:1222-1228.
- 18 Liu XF,Liang JY,Sun JB,et al.Research progress of the fructus ligustri lucidi on the chemical compounds and pharmacological activity [J].Strait Pharm J(海峡药学),2018,30(1):1-8.
- 19 Xu SN,Zhuang L,Zhai YY,et al.Material basis and mechanism of erzhi pill for preventing osteoporosis based on network pharmacology[J].Chin Pharm J(中国药理学杂志),2018,53:1913-1920.
- 20 Liu MH,Li SL,Zhang L,et al.Review on research progress of chemical constituents and pharmacological activities of *Ligustrum*[J].Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2020,51:3337-3348.
- 21 Ji X,Liu XQ,Xiao SP,et al.Qualitative and quantitative analysis on non-triterpenoids in Ligustri Lucidi Fructus[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2019,44:1615-1622.
- 22 He HH,Yao JB,Chang WQ,et al.Analysis of chemical material basis of compound Yuxingcao mixture based on HPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS technology[J].Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药),2020,16(8):37-44.
- 23 Zhu J,Yuan E,Mou JY,et al.Analysis of influence of Jiangxi characteristic processing technology on chemical compositions of aurantii fructus based on UPLC-Q/TOF-MS[J].Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志),2020,26(16):142-153.
- 24 Chen HY,Luo ML,Zhang XX,et al.Determination of glycyrrhetic acid in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic evaluation[J].J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报),2019,36:404-409.

收稿日期: 2021-04-13 接受日期:

基金项目: 河南省科技攻关项目 (142102310280)

*通信作者 Tel: 13526403080; E-mail: fengsx221@163.com