

基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 的不同年限陈皮入血成分分析

吴 蓓, 申梦园, 王 福, 陈鸿平, 刘友平, 陈 林*

成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137

摘要:本研究拟应用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术对不同年限广陈皮进行入血成分鉴定研究。课题组采用 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术, 以及 Compound Discover 3.0 软件进行分析, 比较广陈皮提取液、给药血浆、空白血浆的图谱差异, 将分子量、二级碎片信息、参考文献以及对照品信息进行结合, 找出口服广陈皮药液后吸收入血的原型成分和代谢产物。结果显示 2、4、8 年广陈皮鉴定出成分分别为 34、24 和 15 个, 2 年广陈皮黄酮类入血成分含量高于 4、8 年广陈皮。UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 能快速、精确、全面地分析广陈皮给药后的血中移行成分, 为后期广陈皮的药效物质基础规律研究提供参考, 为陈久者良科学内涵的研究提供新思路。

关键词:广陈皮; 陈化时间; 血清药物化学; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; 入血成分

中图分类号: S567.23; R657

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)5-0780-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.5.006

Analysis of blood components of Citri Reticulatae Pericarpium in different years based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

WU Bei, SHEN Meng-yuan, WANG Fu, CHEN Hong-ping, LIU You-ping, CHEN Lin*

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: To analyze and identify the blood components of Citri Reticulatae Pericarpium of different aging time by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS). UHPLC-Q-Orbitrap HRMS technology and Compound Discover 3.0 software were used for analysis. The spectrum differences of Citri Reticulatae Pericarpium extract, administered serum, and blank serum were compared, and molecular weight, secondary fragment information, reference literature, and reference substance information were combined to find out the prototype components and metabolites absorbed into the blood after oral administration of Citri Reticulatae Pericarpium liquid. 34, 24 and 15 components were identified in the blood of 2, 4 and 8-year-old Citri Reticulatae Pericarpium, and the content of flavonoids in the blood of 2-year-old Citri Reticulatae Pericarpium was higher than that of 4 and 8-year-old Citri Reticulatae Pericarpium. The UHPLC-Q-Orbitrap HRMS can provide a rapid, accurate and comprehensive analysis of the migrating components in blood after the administration of Citri Reticulatae Pericarpium, which can provide a reference for the later research on the pattern of the substance basis of the medicinal effects of Citri Reticulatae Pericarpium and provide new ideas for the study of the scientific connotation of the older the better of Citri Reticulatae Pericarpium.

Key words: Citri Reticulatae Pericarpium; aging time; serum pharmacology; UHPLC-Q-Orbitrap HRMS; blood component

陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮^[1], 自古认为产自广东新会的陈皮质量较优。传统上认为其有理气健脾、

燥湿化痰之功, 用于治疗脘腹胀满、食少吐泻、咳嗽痰多等症^[1]。陈皮主要含有黄酮、挥发油、生物碱、柠檬苦素等类化学成分^[2], 现代药理表明, 其有降血脂^[3]、抗氧化^[4]等作用, 并广泛应用于临床。

传统中医药理论认为陈皮应陈化后使用。但是, 对于陈皮具体陈化时间, 历代本草书籍说法不

收稿日期: 2021-11-24

接受日期: 2022-03-11

基金项目: 国家自然科学基金(8197142602)

* 通信作者 Tel: 86-018080019009; E-mail: chenlin@cdutcm.edu.cn

一,《药鉴》载有“陈皮须用隔年陈”,又称“陈皮必须年久者为美”^[5];《本草要略》云“陈皮隔年者方可用”;《日用本草》载:“陈皮多年者更妙”。即使是同一古籍,对于陈皮陈化时间尚未明确。现代对陈皮陈化年限的研究多从化学成分和药效作用比较方面,且多从体外对不同陈化时间广陈皮的化学成分进行研究。课题组前期已通过UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术对不同陈化时间的广陈皮中黄酮类成分进行分析。大多数中药仍通过口服给药方式应用,通过分析口服给药后血清中化学成分,确定中药的体内直接作用物质,成为快速、准确研究及确定中药药效物质基础的有效途径^[6]。目前,对广陈皮体内成分鲜有报道。

本研究首次采用具有高分离度、高分辨率以及高灵敏度的超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术,对不同年份广陈皮进行入血成分比较研究,为广陈皮药效物质基础及药效学研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

Q-Exactive型超高效液相色谱联用仪(美国 Thermo 公司);Agilent Extend-C₁₈色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm),十八烷基键合硅胶为填充剂(美国 Agilent 公司);电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司);ST18型台式离心机(美国 Thermo 公司);V76025型真空减压干燥器(美国 Thermo 公司)。

1.2 材料

1.2.1 药材及试剂

于广东省江门市新会区三江镇新马单村,收集陈化2、4、8年(分别于2019、2017、2013年采集)的广陈皮样品(同一环境下贮存)各1批,经成都中医药大学药学院严铸云教授鉴定为芸香科植物陈皮 *Citrus reticulata* ‘Chachi’的干燥果皮。经检验,药材质量符合《中华人民共和国药典》2020年版一部中对陈皮的质量要求。对照品橙皮苷(批号为 MUST-20031701,纯度为 98.46%)、川陈皮素(MUST-20041210, 98.86%)、橘皮素(MUST-20072310, 99.61%)购于成都曼思特生物科技有限公司;对羟基苯甲酸乙酯(批号为 2020052601)购于成都市科隆化学品有限公司;水为超纯水,甲醇、乙腈、乙酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.2.2 动物

健康雄性SD大鼠,40只,SPF级,体质量(180 ± 20)g,由四川成都达硕实验动物有限公司提供,动物许可证号为SCXK(川)2020-030。实验方案经成都中医药大学动物实验伦理委员会审批同意,伦理审查批准号为2021-11。

1.3 方法

1.3.1 广陈皮提取液的制备

分别称取2、4、8年广陈皮样品各250g,打碎置锅中,加入10倍量水浸泡1h,文火微沸煎煮30min,滤过,药渣加入8倍量水,文火微沸继续煎煮30min,再次滤过,合并两次滤液,浓缩至0.4g/mL,供灌胃用。

1.3.2 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品橙皮苷、橘皮素、川陈皮素适量,加甲醇溶解并定容至10mL量瓶中,制成质量浓度为0.159、0.126、0.147g/L的混合对照品溶液。

1.3.3 内标溶液的制备

准确称取对羟基苯甲酸乙酯25mg,加甲醇溶解,定容至25mL容量瓶中。

1.3.4 供试品溶液的制备

取1.3.1项下广陈皮提取液1mL,至EP管中,稀释十倍,在13000r/min离心10min,取上清液,供LC-MS分析用。

1.3.5 动物给药与血浆样品采集

雄性SD大鼠饲养于成都中医药大学动物实验房,室温控制在20~25℃,适应性喂养1周,自由进食及饮水。连续灌胃3天,每天早晚各一次。末次给药前禁食12h,自由饮水。空白组给予生理盐水。给药组按0.4g/mL剂量广陈皮提取物灌胃给予大鼠,为尽可能多地检测到含药血浆中的成分,选取0.5、1、1.5、2、3、4h总共6个时间点进行眼眶静脉丛取血(左、右眼交叉取血约0.3mL),将血样收集至装有肝素钠的EP管中,室温静置30min,在3000r/min离心10min,取上层血浆,储存在-20℃冰箱中,备用。

1.3.6 血浆样品处理

取给药后各时间点血浆样品等体积混合,得到600μL血浆样本,加入3倍量甲醇,并加入100μL内标溶液涡旋5min后,在4℃、13000r/min离心10min,取上清液至干净EP管中,真空干燥至干,固体残渣加100μL甲醇复溶,涡旋5min,在13000r/

min 离心 10 min 后,取上清液供 LC-MS 分析用。

1.3.7 色谱条件

Agilent Extend C₁₈ 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相为 0.5% 乙酸水溶液(A)-0.5% 乙酸乙腈溶液(B),梯度洗脱(0~10 min,8%→15% B;10~20 min,15%→20% B;20~30 min,20%→24% B;30~45 min,24%→64% B;45~60 min,64%→100% B),流速为 0.3 mL/min,柱温为 30 °C。进样量为 5 μL。

1.3.8 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子切换模式扫描,扫描范围为 m/z 100~1 500,Full MS 一级分辨率为 35 000,二级分辨率为 17 500;正、负离子喷雾电压分别为 3.5 和-3.0 kV;离子源温度为 350 °C,鞘气流速为 35 arb,辅助气流速为 10 arb,离子传输管温度为 320 °C。S 状透镜电压(S-Lens)为 50 V,碰撞能量梯度为 20、40、60 eV。

2 结果与分析

依据“1.3.7”项色谱条件及“1.3.8”项质谱条件进行分析,在正、负离子模式下采集给药后血浆的色谱图(见图 1~6)。

利用 Compound Discover 3.0 软件,将实验所得数据的分子式和分子质量与 mzcloud 和 mzvault 数据库进行匹配,设置一级及二级质量偏差 5 ppm,匹配度分值大于 80。分析大鼠灌胃广陈皮药液后的给药血浆与空白血浆、广陈皮提取液的差异,获得入血成分。对于有对照品的化合物,通过与对照品比对保留时间、特征碎片离子来确定其结构及分子式,对于没有对照品的化合物,根据文献及碎片离子信息进行成分推测鉴定。结果,鉴定出 2 年陈皮入血原型成分和代谢产物分别为 16 个和 18 个;4 年陈皮入血原型成分和代谢产物各为 12 个;8 年广陈皮入血原型成分和代谢产物分别为 7 个和 8 个(见表 1)。

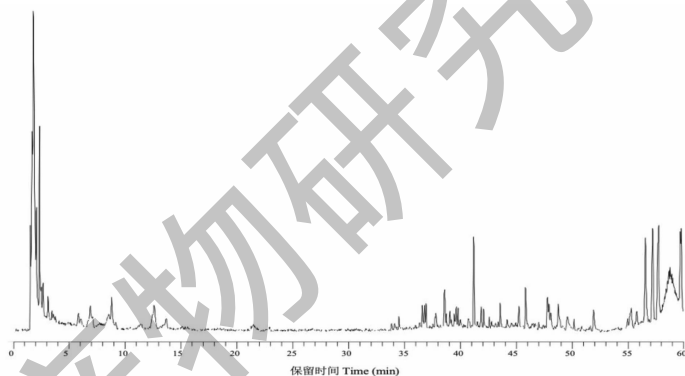


图 1 负离子模式下 2 年广陈皮血浆 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 的总离子流图

Fig. 1 TIC of blood ingredient of Citri Reticulatae Pericarpium(CRP) for 2 years under negative ions mode

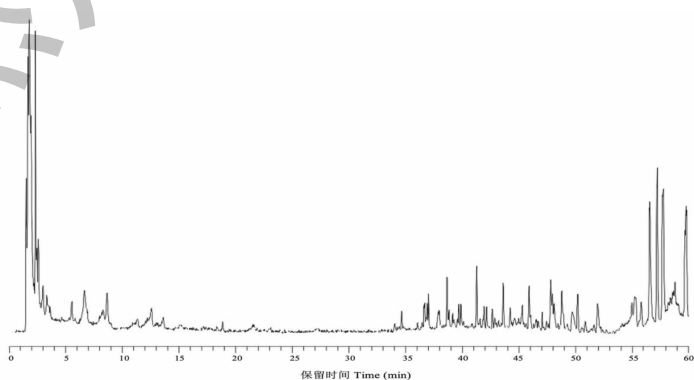


图 2 负离子模式下 4 年广陈皮血浆 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 的总离子流图

Fig. 2 TIC of blood ingredient of CRP for 4 years under negative ions mode

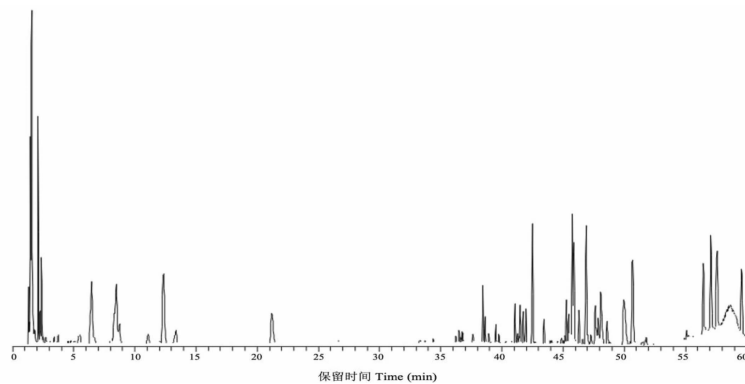


图3 负离子模式下8年广陈皮血浆 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 的总离子流图

Fig. 3 TIC of blood ingredient of CRP for 8 years under negative ions mode

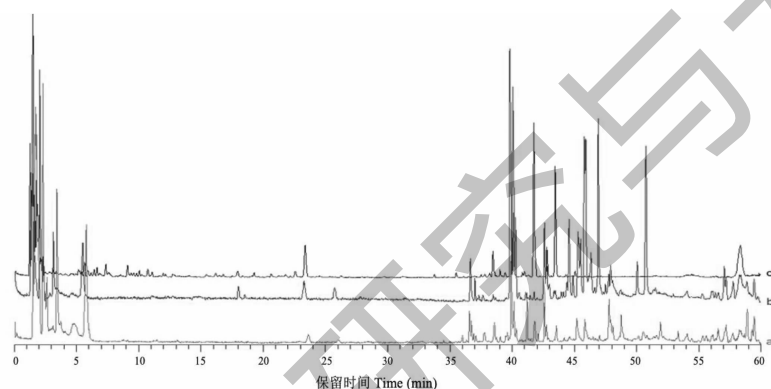


图4 正离子模式下2年广陈皮血浆(a)、空白血浆样品(b)及2年广陈皮提取液(c)的总离子流图

Fig. 4 TIC of CRP for 2 years rat plasma sample(a), blank plasma sample(b) and CRP for 2 years extract(c) in positive mode

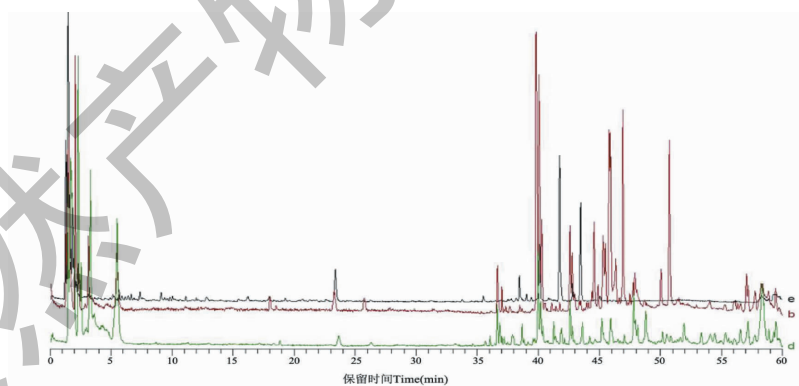


图5 正离子模式下4年广陈皮血浆(d)、空白血浆样品(b)及4年广陈皮提取液(e)的总离子流图

Fig. 5 TIC of CRP for 4 years rat plasma sample(d), blank plasma sample(b) and CRP for 4 years extract(e) in positive mode

2.1 黄酮苷元化合物鉴定

从大鼠的血浆中共鉴定出7个黄酮苷元,其中以川陈皮素为例做裂解规律分析。通过 MS^1 图谱确定其准分子离子峰为 m/z 403.1389 $[M+H]^+$, 预测分子式为 $C_{20}H_{20}O_8$; MS^2 图谱中, 碎片离子为 m/z 313.9602, 主要是由母离子脱掉6个甲氧基团

(C_6H_{18} , 90)形成, 碎片离子为 m/z 163.9899和240.0600, 主要是由母离子断裂1,2位和3,4位之间的共价键形成, 碎片离子为 m/z 196.0170, 是由 m/z 240.0600碎片离子脱去一个二氧化碳(CO_2 , 44)形成, 经过与文献^[8]比对, 其质谱数据库与川陈皮素一致, 因此鉴定化合物**31**为川陈皮素, 裂解规

律如图7所示。

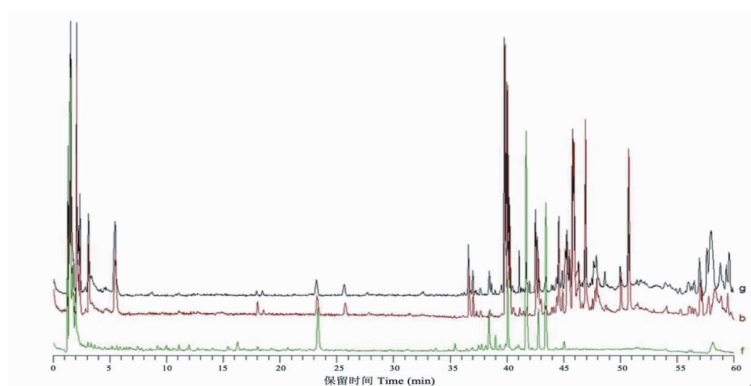


图6 正离子模式下8年广陈皮血浆(f)、空白血浆样品(b)及8年广陈皮提取液(g)的总离子流图

Fig. 6 TIC of CRP for 8 years rat plasma sample(f), blank plasma sample(b) and CRP for 8 years extract(g) in positive mode

表1 2、4、8年广陈皮入血成分

Table 1 Blood ingredient of CRP for 2,4 and 8 years

编号 No.	保留时间 t_R (min)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	离子模式 Ion mode	实测值 Measured value (m/z)	理论值 Observed value (m/z)	误差 Deviation (ppm)	碎片离子 Fragment ion (m/z)	存在年份 Year	分类 Classification
1	1.46	$C_7H_7NO_2$	盐酸葫芦巴碱 Trigonelline hydrochloride ^{[7] a}	$[M+H]^+$	137.047 7	137.047 7	0.15	120.040 7、 94.029 3、 82.065 6、 65.039 5	2	生物碱类
2	1.48	$C_7H_{12}O_6$	奎宁酸 Quinic acid ^{[8] a}	$[M-H]^-$	192.062 9	192.063 4	3.64	171.029 4、 152.239 4、 109.028 6	2,8	有机酸类
3	1.52	$C_7H_{13}NO_2$	水苏碱 <i>N,N</i> -dimethyl- <i>L</i> -proline ^{[9] a}	$[M+H]^+$	143.094 6	143.094 7	0.70	144.101 9、 102.055 3	2,4	生物碱类
4	1.73	$C_6H_6O_6$	反乌头酸 <i>trans</i> -Aconitic acid ^{[10] a}	$[M-H]^-$	174.015 9	174.016 4	2.87	173.008 7、 152.765 4、 128.877 2、 93.033 6	4	有机酸类
5	1.99	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	腺苷 Adenosine ^{[11] a}	$[M+H]^+$	267.096 8	267.096 8	0.26	136.061 8	2	核苷类
6	2.33	$C_9H_{11}NO_2$	苯丙氨酸 Phenprobamate ^{[12] b}	$[M+H]^+$	165.079 0	165.079 1	0.61	120.081 0	2,4,8	氨基酸类
7	5.61	$C_6H_6O_5S$	3,4-二羟基苯磺基 3,4-Dihydroxybenzenesulfonic acid ^b	$[M-H]^-$	189.993 6	189.993 3	1.58	166.985 4、 144.922 7、 109.028 6	2	磺基类 化合物
8	6.53	$C_6H_6O_4S$	4-酚磺基 4-Phenolsulfonic acid ^b	$[M-H]^-$	173.998 6	173.998 2	2.30	152.765 4、 128.877 2、 93.033 6	2	有机酸类
9	8.52	$C_8H_7NO_4S$	3-羟基吲哚硫酸盐钾 Potassium indol-3-yl sulphate ^{[13] b}	$[M-H]^-$	213.009 4	213.009 6	0.94	212.002 2、 212.002 1	2,4,8	吲哚类
10	9.47	$C_{24}H_{39}NO_6$	尼奥林 Neoline ^{[14] b}	$[M+H]^+$	437.277 7	437.278 0	0.69	420.274 0、 388.248 4、 362.233 6、 221.131 2、 181.101 2、 143.085 2	2	生物碱类
11	14.10	$C_9H_8O_3$	对羟基肉桂酸 <i>P</i> -hydroxy-cinnamic acid ^b	$[M-H]^-$	164.047 3	164.046 9	2.44	119.049 4、 101.859 0	2	有机酸类
12	21.47	$C_7H_6O_3$	水杨酸 Salicylic acid ^{[15] b}	$[M-H]^-$	138.031 7	138.031 1	4.49	136.861 9、 92.919 1	2,4	有机酸类

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	离子模式 Ion mode	实测值 Measured value (m/z)	理论值 Observed value (m/z)	误差 Deviation (ppm)	碎片离子 Fragment ion (m/z)	存在年份 Year	分类 Classification
14	22.62	$C_9H_{16}O_4$	壬二酸 Azelaic acid ^{[16] a}	[M-H] ⁻	188.104 9	188.104 5	2.13	187.097 2、 123.080 8	2,4	有机酸类
16	22.99	$C_{10}H_9NO_2$	吲哚-3-乙酸 Indole-3-acetic acid ^b	[M+H] ⁺	175.063 3	175.063 4	0.57	152.938 4、 130.065 1、 97.008 3	2,4	吲哚类
17	25.45	$C_{12}H_{16}O_5$	3,4,5-三甲氧基苯甲 酰基乙酸乙酯 Ethyl 3,4,5-trimethoxy- benzoylacetate ^{[17] b}	[M+H] ⁺	240.099 8	240.099 7	0.42	196.016 9、 167.012 9、 154.990 3、 139.018 0、 122.547 4	2,4,8	酯类
18	32.43	$C_{10}H_{18}O_4$	癸二酸 Sebacic acid ^b	[M-H] ⁻	202.120 5	202.120 3	0.99	183.102 1、 165.835 8、 139.112 1	2,4,8	有机酸类
19	32.63	$C_{11}H_{11}NO_2$	甲基吲哚-3-乙酸盐 Indole-3-acetic acid, methylester ^b	[M+H] ⁺	189.079 0	189.078 9	0.53	182.985 2、 172.075 7	2,8	吲哚类
20	32.99	$C_{12}H_{16}O_5$	2-2-羧乙基-4-甲基-5- 丙基-2,2,3,3,3-d5 咪 喃-3-羧酸 CMPF-d5 ^b	[M-H] ⁻	240.099 8	240.099 8	0.00	221.051 8、 195.102 3、 177.091 4、 151.112 1、 97.054 9	4,8	有机酸类
21	34.86	$C_{21}H_{30}O_5$	氢化可的松 Hydrocortisone ^b	[M+H] ⁺	362.209 3	362.209 3	0.03	345.205 9、 327.195 2、 309.184 4、 291.173 4、 267.173 9、 209.132 4、 147.080 7	2,4	甾体类
22	38.16	$C_{18}H_{34}O_5$	(15Z)-9,12,13-Trihy- droxy-15-octadecenoic acid ^a	[M-H] ⁻	330.241 0	330.240 6	1.21	229.143 1、 211.133 7、 177.102 1、 139.112 3	2,4	有机酸类
23	38.46	$C_{20}H_{20}O_7$	异橙黄酮 Isosinensetin ^{[8] a}	[M+H] ⁺	372.121 0	372.120 6	1.07	358.104 1、 343.081 0、 315.085 7	2,4	黄酮类
24	38.58	$C_{19}H_{18}O_7$	栀子黄素 B Gardenin B ^{[18] a}	[M+H] ⁺	358.105 3	358.105 1	0.56	344.088 3、 329.065 4、 301.070 4	2,4,8	黄酮类
25	39.03	$C_{20}H_{20}O_8$	艾黄素 Artemitin ^{[18] a}	[M+H] ⁺	388.115 8	388.115 4	1.03	359.075 7、 341.065 7、 313.070 1、 285.075 5	2,4	黄酮类
26	39.12	$C_{14}H_{20}O_4$	(8aR,12S,12aR)-12- Hydroxy-4-methyl-4,5, 6,7,8,8a,12,12a-octa- hydro-2H-3-benzox- ecine-2,9(1H)-dione ^b	[M+H] ⁺	252.136 2	252.136 3	0.40	235.132 6、 217.172 0、 193.122 3、 135.080 4	2	内酯类
27	39.40	$C_{20}H_{20}O_8$	去甲基川陈皮素 Demethylnobiletin ^{[18] a}	[M+H] ⁺	388.115 9	388.115 8	0.26	373.091 9、 359.075 5、 275.578 6、 211.060 4	2,4,8	黄酮类
28	40.48	$C_7H_6N_2O_5$	2,4-二硝基邻甲酚 2-Methyl-4,6-dinitro- phenol ^b	[M-H] ⁻	198.027 7	198.027 6	0.50	197.020 0、 180.017 3、 137.023 7、 109.028 6	2,4	硝基化合物

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	保留时间 t_R (min)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	离子模式 Ion mode	实测值 Measured value (m/z)	理论值 Observed value (m/z)	误差 Deviation (ppm)	碎片离子 Fragment ion (m/z)	存在年份 Year	分类 Classification
29	40.81	$C_{18}H_{30}O_2$	α -亚麻酸 Linolenic acid [12] b	$[M+H]^+$	278.224 9	278.224 6	1.08	279.093 9、 123.116 8、 137.132 6、 121.028 4	4,8	有机酸类
30	41.28	$C_{17}H_{37}NO_2$	棕榈酸甲酯 Methyl palmitate [19] b	$[M+H]^+$	287.282 4	287.282 2	0.7	315.254 1、 297.244 1、 266.986 6、 195.487 2	2,4	酯类
31	41.74	$C_{21}H_{22}O_8$	川陈皮素 Nobiletin [18] * a	$[M+H]^+$	402.131 5	402.131 4	0.25	373.091 5、 355.080 7、 327.086 0	2,4	黄酮类
32	41.84	$C_{19}H_{18}O_6$	2-(2,6-Dimethoxyphenyl)-5,6-dimethoxy-4H-chromen-4-one ^a	$[M+H]^+$	342.110 6	342.110 3	0.88	313.070 7、 285.081 0、 181.013 3	2,8	黄酮类
33	41.88	$C_{19}H_{18}O_6$	6-去甲氧基桔皮素 6-Demethoxytangeretin [18] a	$[M+H]^+$	342.110 3	342.110 1	0.58	313.070 4、 309.206 1、 285.075 5、 252.576 1、 180.044 6、 153.018 1、 358.104 1、 343.081 3、	2,4,8	黄酮类
34	43.46	$C_{20}H_{20}O_7$	橘皮素 Tangeretin [20] * a	$[M+H]^+$	372.120 9	372.121 1	0.54	300.062 6、 211.063 5、 183.028 7、 284.294 6、 266.284 2、 254.284 0、 167.185 2、 111.117 2、 60.045 0	2,4,8	黄酮类
35	44.03	$C_{18}H_{39}NO_2$	2-Amino-1,3-octadecanediol ^b	$[M+H]^+$	301.298 1	301.298 0	0.33	148.024 7、 116.052 9、 88.021 9	2	生物碱类
36	48.38	$C_{10}H_{20}N_2S_4$	双硫仑 Disulfiram ^b	$[M+H]^+$	296.050 9	296.050 8	0.34	171.006 0、 152.994 8、 78.958 0	4	磺胺化合物
37	49.35	$C_{21}H_{44}NO_7P$	Glycerophospho-N-palmitoyl ethanolamine ^b	$[M+H]^+$	453.286 0	453.285 5	1.10	212.284 5、 156.949 6、 96.959 1	2,8	磺胺化合物
38	49.57	$C_{12}H_{26}O_4S$	Dodecyl sulfate ^a	$[M-H]^-$	266.155 3	266.155 2	0.38	283.264 4、 267.993 1、 186.408 0、 135.763 0	2,8	醇类
39	54.88	$C_{18}H_{36}O_2$	Stearic acid [21] a	$[M-H]^-$	284.271 7	284.271 5	0.70	471.348 9、 453.332 9	4	有机酸类
40	59.04	$C_{30}H_{48}O_4$	山楂酸 Maslinic acid [22] b	$[M-H]^-$	472.355 3	472.355 9	1.27	102.091 8、 88.076 2	2	有机酸类
41	59.95	$C_{22}H_{45}NO$	二十二酰胺 Docosanamide [13] a	$[M+H]^+$	339.350 1	339.350 1	0.06		2	生物碱类

注: * 经过对照品比对鉴定; ^a 原型成分; ^b 代谢产物。

Note: * Identified by comparison with reference substance; ^a Prototype component; ^b Metabolite

2.2 黄酮醇类化合物

黄酮醇类化合物的裂解主要是特征的丢失 CHO。通过 MS¹ 图谱确定其准分子离子峰为 m/z 389.123 2 $[M+H]^+$, 预测分子式为 $C_{20}H_{20}O_8$; MS² 图谱中,

碎片离子为 m/z 345.097 0, 主要是由母离子脱去 (CH_3CHO , 44) 形成; 碎片离子为 m/z 317.119 1, 主要由碎片离子 m/z 345.097 0 脱去一分子 CO 形成; 碎片离子为 m/z 197.020 4 和 193.122 8 主要由 1,2

位和 3, 4 位共价键断裂形成; 碎片离子为 m/z 197.020 4 也可能由碎片离子 m/z 345.097 0 脱去碎片 ($C_9H_9O_2$ 149) 形成。与文献^[18]数据对比, 化合物 **25** 与艾黄素质谱数据一致, 因此鉴定化合物 **25** 为艾黄素, 裂解规律如图 8 所示。

2.3 不同陈化时间广陈皮中黄酮类入血成分的相对含量比较

依据内标品峰面积, 计算 2、4、8 年广陈皮黄酮类入血成分相对含量, 发现陈化 2 年广陈皮黄酮类入血成分相对含量较陈化 4、8 年广陈皮高(见表 2)。

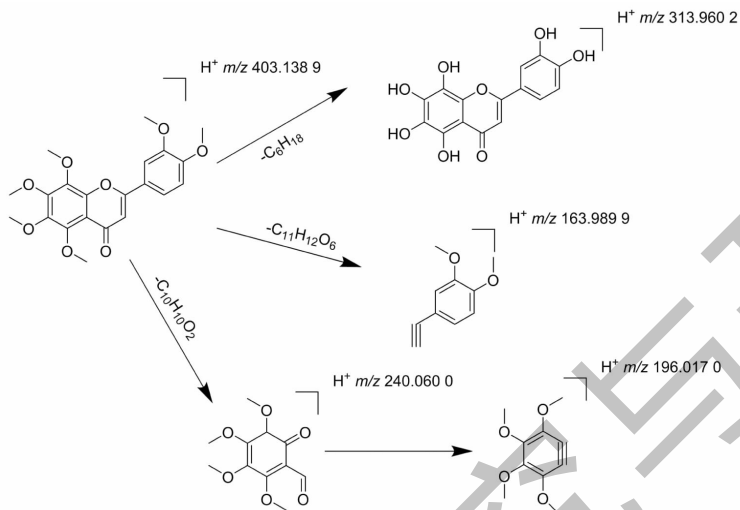


图 7 川陈皮素的裂解途径

Fig. 7 MS fragmentation pathway of nobiletin

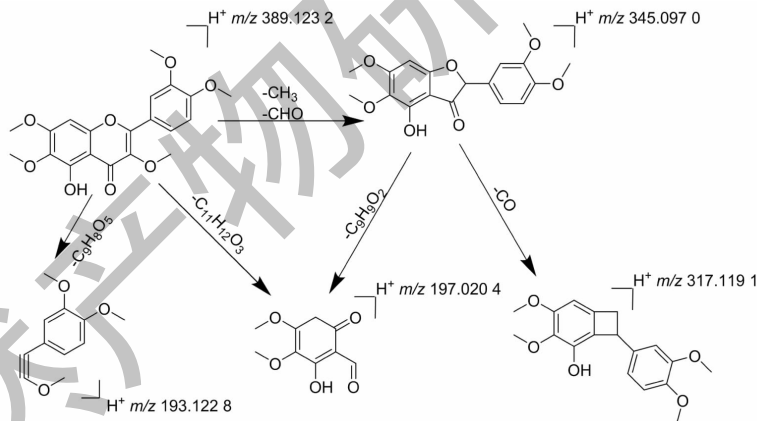


图 8 艾黄素的裂解途径

Fig. 8 MS fragmentation pathway of artemetin

表 2 不同陈化时间广陈皮黄酮类入血成分的相对含量比较 ($n=3$)

Table 2 Comparison of the relative contents of flavonoids in blood of Citri Reticulatae Pericarpium at different aging times ($n=3$)

陈化时间 Aging time	入血成分的相对含量 Relative content of blood components						
	异橙黄酮 Isosinensetin	梔子黄素 B Gardenin B	艾黄素 Artemetin	去甲基川陈皮素 Demethylnobiletin	川陈皮素 Nobiletin	6-去甲氧基桔皮素 6-Demethoxytangeretin	橘皮素 Tangeretin
2	7.25	3.00	0.90	0.21	27.96	7.50	14.79
4	4.45**	2.49*	0.50*	0.13**	14.16**	0.16**	11.55**
8	-	2.52*	-	0.09**	-	2.45**	0.96**

注: 相对含量以峰面积 ($\times 10^8$) 表示。与陈化 2 年组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: The relative content was expressed by peak area ($\times 10^8$). Compared with aged group for 2 years, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论与结论

中药陈用历史悠久,陈皮为“六陈”之首,结合历代本草著作和现代研究,陈皮的具体陈化时间问题尚未解决。课题组前期通过 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 技术对不同陈化时间的广陈皮中黄酮类成分进行分析,从体外角度已证明“陈皮须用隔年陈”具有一定合理性。

本实验基于 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 快速、精确的特点,固定采收时间、采样地点、贮藏环境等条件,首次对不同年限广陈皮进行入血成分比较分析,鉴定出陈化 2 年、4 年和 8 年广陈皮入血成分分别为 34、24 和 15 个。实验发现,3 个年份广陈皮入血成分种类大致相同,依据峰面积比较相对含量,2 年广陈皮较其他两个年份高,与前期体外实验结果较一致,证明广陈皮化学成分含量的差异会导致其入血成分含量的差异,可为“陈皮须用隔年陈”^[18]的阐释提供进一步依据。

陈皮主要成分为黄酮类化合物,陈皮中黄酮类化合物具有保护肝损伤^[23,24],降低血脂^[25]等作用。川陈皮素是神经保护的典型成分,可通过激活 p-Akt、p-CREB、BDNF 和 Bcl-2 通路及改善大鼠 BBB 通透性保护脑缺血^[26]。橘皮素可以通过线粒体 JNK/Bax pathway 对心肌细胞产生抗凋亡作用^[27]。异橙黄酮对 HL-60、A549、HO8910 和 MCF-7 四种癌症细胞显示出明显的抗增殖作用^[28]。艾黄素具有抗氧化、抗炎及抗病毒的作用^[29]。结合陈皮传统功效和现代药理研究,初步推断,川陈皮素、橘皮素等 7 个黄酮类成分可能是广陈皮潜在的药效物质基础,后期仍需进行生物活性测定和药效评价,并从中筛选能够表达与中药传统临床疗效相关活性的成分作为药效物质基础。本实验为陈皮的药效物质基础研究提供了一个新的有效的方法,后期可对不同年限广陈皮入血成分进行比较研究,且结合药效共同阐释陈皮“陈久者良”科学内涵。

对于一些同分异构体,Compound Discoverer 3.0 软件只能从其碎片信息中提取到一些母核离子的具体信息进行结构上的推测,并不能对同分异构体进行区分,还需结合核磁共振技术对这些同分异构体进行结构鉴定^[30]。

参考文献

1 Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典第一部) [M], Beijing: Chinese Medical

Science Press, 2020: 199-200.

- 2 Li SQ, Li H. Advances of main chemical components and quality control of Citri Reticulatae Pericarpium [J]. Pharm Today (今日药学), 2020, 30: 861-864.
- 3 Jain M, Parmar HS. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation [J]. Inflamm Res, 2011, 60: 483-491.
- 4 Zeng W, Luo Y, Huang KE, et al. Serum metabolomics of hyperlipidemia intervened by Citri Reticulate Chachiensis Pericarpium [J]. Tradit Chin Drug Res Pharmacol (中药新药与临床药理) 2020, 31(1): 72-79.
- 5 Du WX. Drug Evaluation (药鉴) [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Publishing House, 1993: 4.
- 6 Zhang XJ, Jiang H, Han H, et al. Analysis of problems existing in Chinese medicine research [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2011, 28(1): 120-121.
- 7 Ren Y, Ma Y, Zhang Z, et al. Total alkaloids from bamboo shoots and bamboo shoot shells of *Pleioblastus amarus* (Keng) Keng f. and their anti-inflammatory activities [J]. Molecules, 2019, 24(15): 2699.
- 8 Li GW, Qiu YJ, Suo CX, et al. Study on characteristic atlas and content determination of common traditional Chinese medicine pieces of Rutaceae based on standard decoction [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 1649-1667.
- 9 Yang L, Liu RH, He JW. Rapid analysis of the chemical compositions in *Semiliquidambar cathayensis* roots by ultra-high-performance liquid chromatography and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. Molecules, 2019, 24(22): 4098.
- 10 Zhang L, Liu XY, Tu C, et al. Components synergy between stilbenes and emodin derivatives contributes to hepatotoxicity induced by *Polygonum multiflorum* [J]. Xenobiotica, 2020, 50: 515-525.
- 11 Zheng XK, Yang YY, Zhang YL, et al. Simultaneous determination of 7 nucleosides in Rhizoma Rehmanniae decoction pieces by UPLC-MS/MS method [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2018, 41: 1142-1144.
- 12 Mao QP, He MZ, Huang XF, et al. Analysis of chemical constituents of *Perilla frutescens* by different methods of drying and freeze drying based on UHPLC-Q/TOF MS [J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2021, 37(1): 1-10.
- 13 Shi X, Yang Y, Ren H, et al. Identification of multiple components in deep eutectic solvent extract of *Acanthopanax senticosus* root by ultra-high-performance liquid chromatography with quadrupole orbitrap mass spectrometry [J]. Phytochem

- Lett,2020,35:175-185.
- 14 Yang Z, Lin Y, Gao L, et al. Circadian clock regulates metabolism and toxicity of Fuzi (lateral root of *Aconitum carmichaeli* Debx) in mice [J]. *Phytomedicine*, 2019, 67: 153161.
 - 15 Yuan YW, Li Y, Yang J. Determination of p-amino salicylic acid concentration by LC-MS/MS and its application in study of tissue distribution in rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2017, 22(3): 272-280.
 - 16 Lin H, Zhu H, Tan J, et al. Comparative analysis of chemical constituents of *Moringa oleifera* leaves from China and India by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2019, 24(5): 942.
 - 17 Wang YK, Yang XN, Zhu X, et al. Role of metabolic activation in elemicin-induced cellular toxicity [J]. *J Agr Food Chem*, 2019, 67: 8243-8252.
 - 18 Yang FQ, He LY, Yang D, et al. Analysis and identification of flavonoids in Citri Reticulatae Pericarpium with different aging time by UPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27(12): 125-132.
 - 19 Shen HL, Xiang NJ, Gao Q, et al. Analysis of fatty acids components of medlar by GC/MS [J]. *J Chin Mass Spectr Soc* (质谱学报), 2009, 30(2): 99-104.
 - 20 Tsiokanos E, Tsafantakis N, Termentzi A, et al. Phytochemical characteristics of bergamot oranges from the Ionian islands of Greece: a multi-analytical approach with emphasis in the distribution of neohesperidose flavanones [J]. *Food Chem*, 2021, 343: 128400.
 - 21 Li W, Li SM. Determination of stearic acid in cosmetic by HPLC-MS [J]. *Guangzhou Chem Ind* (广州化工), 2012, 40(22): 110-111.
 - 22 Wang X, Chen XQ, You RR, et al. Analysis on chemical constituents from *Swertia mileensis* by UPLC-ESI-Q-TOF-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2017, 48: 453-459.
 - 23 Zhang L, Zhang X. Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat [C]. *Chinese Congress of Cerebrovascular Diseases* (中国脑血管病大会), 2014.
 - 24 Lara T, Vincenzo C. Nutraceutical value of *Citrus flavanones* and their implications in cardiovascular disease [J]. *Nutrients*, 2017, 9(5): 502.
 - 25 Chen, X, Wang C, Shu K, et al. Effect of hesperidin pretreatment on the expression of apoptosis-related genes in the liver of mice with acetaminophen-induced acute liver injury [J]. *World Chin J Dig*, 2013, 21: 1278-1285.
 - 26 Chen, XM, Tait AR, Kitts DD. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities [J]. *Food Chem*, 2017, 218: 15-21.
 - 27 Lv G, Chen S, Li X. A Citri Reticulatae Pericarpium extract with hypolipidemic effect and its application [D]. Hangzhou: Zhejiang Traditional Chinese Medical University (浙江中医药大学), 2012.
 - 28 Du Q, Hui C. The methoxyflavones in *Citrus reticulata* Blanco cv. Ponkan and their antiproliferative activity against cancer cells [J]. *Food Chem*, 2010, 119: 567-572.
 - 29 Han X, He J, Chen Q, et al. Development of an LC-MS/MS-based assay to determine artemitin in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study [J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(12): 4356.
 - 30 Zheng JM, Wang HB, Zheng ML, et al. Qualitative analysis of compound Fufangteng mixture by UPLC-Q-Orbitrap HRMS mass spectrometry [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2020, 40: 889-899.