

基于UPLC-Q-TOF-MS法分析生、炙甘草中化学成分的差异性^Δ

崔园园*,周永峰,马艳芹,房吉祥,王国强,张蓉蓉,董 旂,张 萍*(中国人民解放军总医院医疗保障中心,北京 100039)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)09-1049-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.09.06

摘要 目的:比较生、炙甘草的化学成分差异,为阐明甘草炮制前后化学成分的变化规律以及甘草生熟异用的物质基础提供参考。方法:采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术对生、炙甘草中成分进行检测,通过将所得化合物的保留时间、相对分子量等信息与METLIN、安捷伦MassHunter PCDL Manager离线成分鉴定工作站等数据库以及相关文献进行比对后,对其化学成分进行初步鉴定。采用主成分分析(PCA)法观察样本的整体分布趋势;采用正交偏最小二乘法(OPLS-DA)法对差异性化合物进行筛选[以变量投影重要度(VIP)>1.0和 $|P(\text{corr})| \geq 0.5$ 为标准],并分析差异性化合物的含量变化。结果:从生、炙甘草中初步鉴定出了31个共有化合物。PCA分析结果显示,生、炙甘草样本均能够较好地分离。OPLS-DA分析结果显示,在生、炙甘草中共筛选出了15个特征差异性化合物,包括黄酮类化合物13个、香豆素类化合物2个;甘草蜜炙后甘草黄酮A、甘草素以及光甘草定等8种黄酮类化合物的含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),甘草黄酮醇、甘草宁A等5种黄酮类化合物以及2',4'-三羟基-5-甲氧基-3-芳香豆素、红花岩黄芩香豆雌酚B等2种香豆素类化合物的含量显著降低($P < 0.01$)。结论:甘草炮制前后部分黄酮类和香豆素类化合物存在明显的差异,这些差异性化合物可能是甘草生熟异用的主要物质基础。

关键词 生甘草;炙甘草;超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱;主成分分析法;正交偏最小二乘法;差异性化合物

Differences Analysis of Chemical Composition of Raw and Fried *Glycyrrhiza uralensis* Based on UPLC-Q-TOF-MS

CUI Yuanyuan, ZHOU Yongfeng, MA Yanqin, FANG Jixiang, WANG Guoqiang, ZHANG Rongrong, DONG Yi, ZHANG Ping (Medical Supplies Center, PLA General Hospital, Beijing 100039, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the chemical composition differences of raw and fried processed *Glycyrrhiza uralensis*, and provide reference for clarifying the regularity of chemical composition change before and after processing and material basis of differential use of raw and fried *G. uralensis*. METHODS: UPLC-Q-TOF-MS technology was used to detect the composition of raw and fried *G. uralensis*. By comparing the retention time, relative molecular weight and other information of the compounds with the databases such as METLIN, Agilent MassHunter PCDL Manager off-line component identification workstation and references, the chemical compositions of the compounds were preliminarily identified. Principal component analysis (PCA) method was used to observe the overall distribution trend of samples. Orthogonal partial least square (OPLS-DA) method was used to screen differential compounds [VIP>1.0 and $|P(\text{corr})| \geq 0.5$ as criteria] and analyze the content changes of differential compounds. RESULTS: A total of 31 common compounds were preliminarily identified from the raw and fried *G. uralensis*. PCA analysis showed that raw and fried *G. uralensis* could be separated well. OPLS-DA analysis result showed that 15 characteristic differential compounds were screened out from raw and fried *G. uralensis*, including 13 flavonoids and 2 coumarins; the contents of 8 flavonoids compounds

- 中成药,2005,27(2):204-206.
- [10] 姚淞允,张开霞,马强,等.藁本内酯的临床前研究进展[J].药学服务与研究,2019,19(2):106-110.
- [11] 徐程,张利萍.气相色谱法测定香附挥发油中 α -香附酮的含量[J].中国洗涤用品工业,2014(6):55-57.
- [12] 南海军,蔡绮,谭玉彬,等.气相色谱法测定当归挥发油中藁本内酯的含量[J].海峡药学,2014,26(9):42-44.
- [13] 王世宇,李文兵,卢君蓉,等. HPLC法同时测定不同产地香附药材中香附烯酮、圆柚酮和 α -香附酮[J].中成药,2015,37(3):588-591.
- [14] 顾志荣,王亚丽,孙宇靖,等.当归中5种成分同时测定与产地质量评价[J].中成药,2014,36(10):2135-2140.
- [15] 王智民,钱忠直,张启伟,等.一测多评法建立的技术指南[J].中国中药杂志,2011,36(6):657-658.
- [16] 左雅敏,李琛,彭兴春,等. HPLC-一测多评法测定黄精及其饮片中6种成分的含量[J].中国药房,2019,30(13):1748-1754.

Δ 基金项目:国家重点研发计划项目(No.2018YFC1706502)

* 药师,硕士。研究方向:临床中药学。E-mail:1019194407@qq.com

通信作者:副主任药师。研究方向:临床中药学。E-mail:zhp1231@163.com

(收稿日期:2020-01-02 修回日期:2020-02-29)

(编辑:林 静)

such as licoflavone A, glycyrrhizin and glabridin and so on in *G. uralensis* were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the contents of 5 flavonoids components such as glycyrrhizol, glycyrin A and 2 coumarins components such as 2'-4'-trihydroxy-5-methoxy-3-coumarin and hedysarimcoumestan B were significantly decreased ($P < 0.05$) after honey-fried processing. CONCLUSIONS: Before and after processing, there are obvious differences between some flavonoids and coumarins, which may be the main material basis for differential use of raw and honey-fried *G. uralensis*.

KEYWORDS Raw *Glycyrrhiza uralensis*; Fried *Glycyrrhiza uralensis*; UPLC-Q-TOF-MS; Principal component analysis; Orthogonal partial least square method; Differential compounds

甘草为豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草(*G. inflata* Bat.)或光果甘草(*G. glabra* L.)的干燥根及根茎,始载于《神农本草经》,具有补脾益气、止咳平喘、清热解毒、缓急止痛、调和诸药之功,被列为上品^[1]。千百年来,因其在临床上使用频次较高、药效显著而被称为“药之元老”^[2]。目前,甘草的临床应用主要是生甘草和炙甘草两种,两者的区别在于甘草经蜜炙后药性由平转温,药效由清转补^[3-4]。《药性赋》记载:“甘草生则分身稍而泻火,炙则健脾胃而和中和”;《本草约言》云:“诸痈疽疮疡,红肿未溃者,宜生用。其已溃与不红肿者,宜蜜炙用”。以上记载均表明,自古以来生、炙甘草应用区别明显,不可互相代用^[5]。然而,这种差异性在临床应用上是否具有科学依据,以及其物质基础如何,尚未见相关文献报道。超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)作为一种快速而有效的多成分分析技术,具有灵敏度高、分离能力强、检测范围广等特点,已被广泛应用于中药的化学成分分析^[6-7]。因此,本研究拟采用UPLC-Q-TOF-MS技术分析生、炙甘草的化学成分差异,为阐明甘草炮制前后化学成分的变化规律以及甘草生熟异用的物质基础提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1290 Infinity 型 UPLC 仪、iFunel 6550 型 Q-TOF-LC/MS 系统、1290 型二极管阵列检测器均购自美国 Agilent 公司;KQSOODE 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

生甘草(批号:1906073)和炙甘草(同批生甘草的蜜炙品)均由北京市双桥燕京中药饮片厂提供,经解放军总医院第五医学中心中药研究所肖小河教授鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》(一部)甘草和炙甘草项下标准^[8];乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

参考文献方法^[9]制备供试品溶液。分别取生甘草和炙甘草适量,粉碎。精密称取各样品粉末 1.6 g,分别置于 50 mL 锥形瓶中,加入 50% 甲醇 20 mL 后,精密称定质量;超声(功率:250 W,频率:30 kHz)提取 30 min,冷却,再次称质量,并用 50% 甲醇补足减失的质量,摇匀;经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2 色谱条件

参考文献方法^[10]设置本研究的色谱条件。色谱柱:Agilent ZORBAX RRHD300 SB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流动相:0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~2 min, 14% B→23% B; 2~10 min, 23% B→30% B; 10~11.5 min, 30% B→34% B; 11.5~12.5 min, 34% B→42% B; 12.5~15 min, 42% B→61% B; 15~17.5 min, 61% B→70% B; 17.5~24 min, 70% B→90% B; 24~25 min, 90% B→14% B);流速:0.3 mL/min;进样量:10 μL ;扫描范围:200~600 nm 全波长扫描。

2.3 质谱条件

参考文献方法^[9]设置本研究的质谱条件。离子源:电喷雾离子源(ESI),正、负离子全扫描模式;毛细管电压:3 500 V;喷嘴电压:1 000 V;干燥气温度:200 $^{\circ}\text{C}$,干燥气体积流量:11.0 L/min;雾化气温度:350 $^{\circ}\text{C}$,雾化气体积流量:12.0 L/min;扫描质量范围:质荷比(m/z)50~1 200。

2.4 样品测定及数据处理

将“2.1”项下供试品溶液按“2.2”“2.3”项下条件进样分析,记录相关图谱数据。

2.4.1 总离子流图的建立 采用 Agilent Mass Hunter Profinder B.06.00 软件对正、负离子模式下生、炙甘草的质谱原始数据进行处理。结果显示,在正、负离子模式下,生、炙甘草中化学成分间均存在明显差异,这表明蜜炙对甘草的化学成分具有一定的影响。总离子流图见图 1。

2.4.2 化合物的鉴定 结合 METLIN、安捷伦 MassHunter PCDL Manager 离线成分鉴定工作站等数据库以及相关参考文献^[11-13],对各化合物的保留时间、相对分子量等相关信息进行识别后(数据过滤参数:质量范围为 m/z 50~1 200,校正误差为 0.100,保留时间窗口为 0.3 min),初步鉴定出了 31 个共有化合物。生、炙甘草中共有化合物鉴定结果见表 1。

2.4.3 多元统计分析 将从质谱中导出的原始数据经过 Profinder 软件处理后,共得到 2 000 个化合物的相对峰面积以及保留时间等相关数据,将处理后的数据以峰面积为变量导入 SIMCA-P 软件中进行无监督的主成分(PCA)分析。结果显示,在正、负离子模式下,生、炙甘草样本均能得到较好的分离,这表明蜜炙对甘草的化学成分产生了显著影响。生、炙甘草的 PCA 得分散点图见图 2。

表1 生、炙甘草中共有化合物鉴定结果

Tab 1 Identification results of the common compounds in raw and fried *G. uralensis*

编号	化合物	分子式	分子量	t_r, min	m/z (理论值)	m/z (实测值)	偏差, $\times 10^{-4}$
1	7,2',4'-三羟基-5-甲氧基-3-芳香豆素	$C_{16}H_{12}O_6$	300.063 4	4.60	301.070 7	301.070 6	-0.33
2	刺甘草查尔酮	$C_{16}H_{14}O_4$	270.089 2	11.00	271.096 5	271.096 2	-1.11
3	甘草查尔酮A	$C_{16}H_{14}O_4$	338.151 8	16.21	339.159 1	339.158 7	-1.18
4	甘草查尔酮B	$C_{16}H_{14}O_4$	286.084 1	6.75	287.091 4	287.091 3	-0.35
5	甘草次酸	$C_{18}H_{16}O_4$	470.339 6	14.19	471.349 6	471.346 7	-6.15
6	甘草苷	$C_{21}H_{20}O_9$	418.126 4	11.37	419.133 7	419.133 9	0.48
7	甘草黄酮A	$C_{20}H_{18}O_4$	322.120 5	8.69	323.127 8	323.127 9	0.31
8	甘草黄酮C	$C_{20}H_{18}O_5$	338.115 4	10.55	339.122 7	339.122 4	-0.88
9	甘草黄酮醇	$C_{20}H_{18}O_4$	354.110 3	16.06	355.117 6	355.117 7	0.28
10	甘草宁A	$C_{21}H_{20}O_3$	352.131 1	14.96	353.138 4	353.138 1	-0.85
11	甘草宁B	$C_{21}H_{20}O_3$	368.126 0	14.60	369.133 3	369.133 3	0.00
12	甘草宁C	$C_{20}H_{18}O_3$	338.115 4	16.52	339.122 7	339.122 3	-1.18
13	甘草宁D	$C_{21}H_{20}O_3$	384.120 9	7.27	385.128 2	385.128 4	0.52
14	甘草宁I	$C_{21}H_{20}O_3$	354.146 7	16.42	355.154 0	355.152 0	-5.63
15	甘草素	$C_{18}H_{16}O_4$	256.073 5	17.01	257.080 8	257.080 9	0.39
16	甘草酸	$C_{26}H_{40}O_{16}$	822.403 8	14.09	823.411 1	823.411 4	0.36
17	甘草异黄酮甲	$C_{21}H_{20}O_5$	438.240 6	20.74	439.247 9	439.246 5	-3.19
18	光甘草定	$C_{20}H_{20}O_4$	324.136 2	16.80	325.143 4	325.143 3	-0.31
19	红花岩黄芪香豆雌酚B	$C_{16}H_{10}O_6$	298.047 7	16.15	299.055 0	299.055 0	0.00
20	考迈斯托醇	$C_{13}H_{16}O_3$	268.037 2	16.06	269.044 4	269.044 9	1.86
21	毛蕊异黄酮	$C_{16}H_{12}O_5$	284.068 5	15.59	285.075 7	285.075 7	0.00
22	乔松素	$C_{18}H_{14}O_4$	256.073 6	23.75	257.081 8	257.081 5	-1.17
23	芹糖甘草苷	$C_{28}H_{30}O_{13}$	550.168 6	5.13	551.175 9	551.175 6	-0.54
24	芹糖异甘草苷	$C_{28}H_{30}O_{13}$	550.168 6	11.43	551.175 9	551.175 2	-1.27
25	山柰酚	$C_{15}H_{10}O_6$	286.047 7	7.39	287.055 0	287.055 9	3.14
26	维斯体素	$C_{16}H_{10}O_4$	272.104 9	6.84	273.112 1	273.112 0	-0.37
27	乌拉尔醇	$C_{20}H_{18}O_7$	370.105 3	15.91	371.112 5	371.112 6	0.27
28	夏佛塔苷	$C_{20}H_{20}O_4$	564.147 9	2.66	565.155 2	565.155 0	-0.35
29	异甘草苷	$C_{21}H_{20}O_9$	418.126 4	9.03	419.133 7	419.133 5	-0.48
30	异甘草黄酮醇	$C_{20}H_{18}O_4$	354.110 3	18.14	355.117 6	355.117 1	-1.41
31	异甘草素	$C_{18}H_{14}O_4$	256.073 6	14.31	257.080 8	257.081 1	1.17

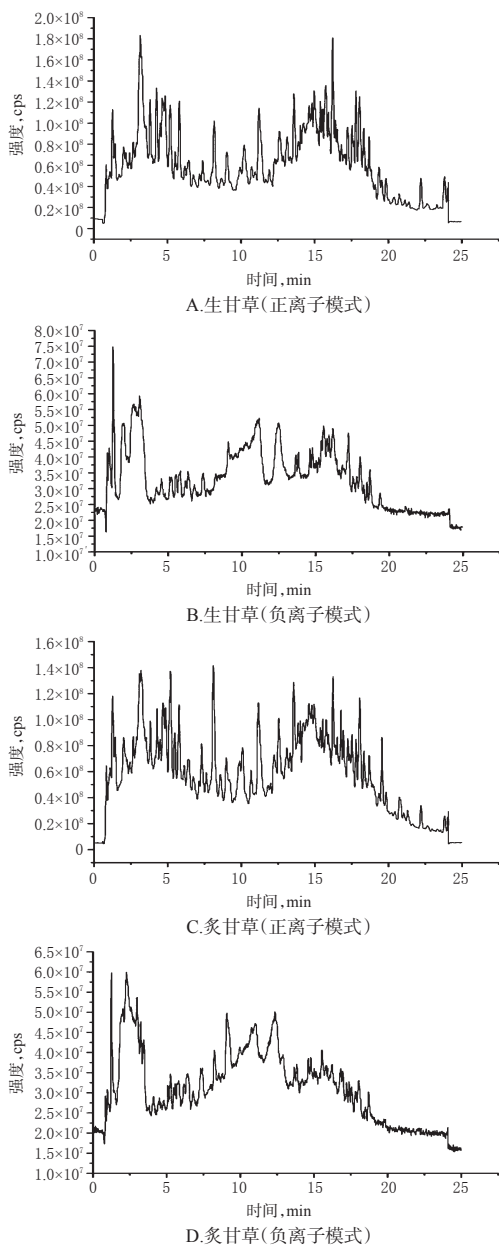


图1 生、炙甘草的总离子流图

Fig 1 TIC chromatogram of raw and processed *G. uralensis*

进一步基于有监督的正交偏最小二乘法(OPLS-DA)对甘草炮制前后的差异样本进行判别分析。以变量投影重要度(VIP)≥1.0和|P(corr)|≥0.5为筛选条件对甘草炮制前后的差异化合物进行筛选^[14],将筛选到的差异化合物与之前鉴定的化合物进行对比,确定特征差异性成分。结果,共鉴定出了15个特征差异性成分,其中黄酮类13个、香豆素类2个。生、炙甘草的OPLS-DA得分图和S-Plot图见图3。

2.4.4 特征差异性成分分析 质谱图谱的积分面积可以初步反映化合物的相对含量,因此对15个特征差异性成分的峰面积进行手动积分,比较甘草炮制前后特征差异性成分的相对含量变化。结果显示,甘草经炙后,甘草素、甘草黄酮A、甘草异黄酮甲、光甘草定、乔松素、

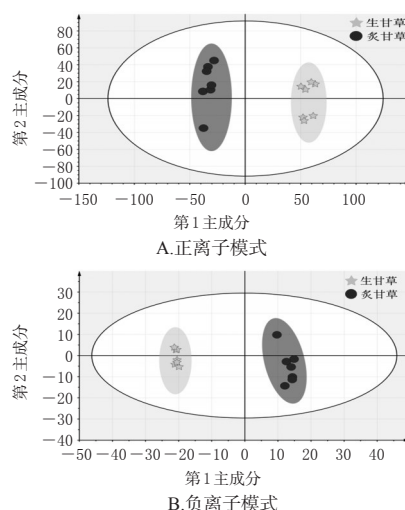


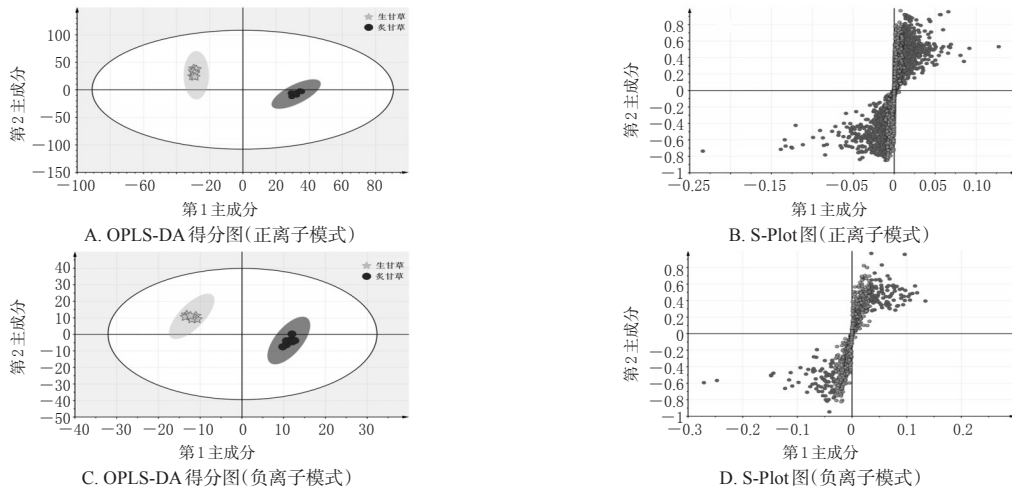
图2 生、炙甘草的PCA得分散点图

Fig 2 Scatter plot of PCA score of raw and honey-fried *G. uralensis*

芹糖甘草苷、夏佛塔苷和异甘草苷等8种黄酮类化合物的含量显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而甘草黄酮醇、甘草宁A、山柰酚、毛蕊异黄酮、甘草宁C等5种黄酮类

化合物和7, 2', 4'-三羟基-5-甲氧基-3-芳香豆素、红花岩黄茛香豆雌酚B等2种香豆素类化合物的含量则显著

降低($P < 0.01$)。生、炙甘草中特征差异性成分的含量变化情况见图4。

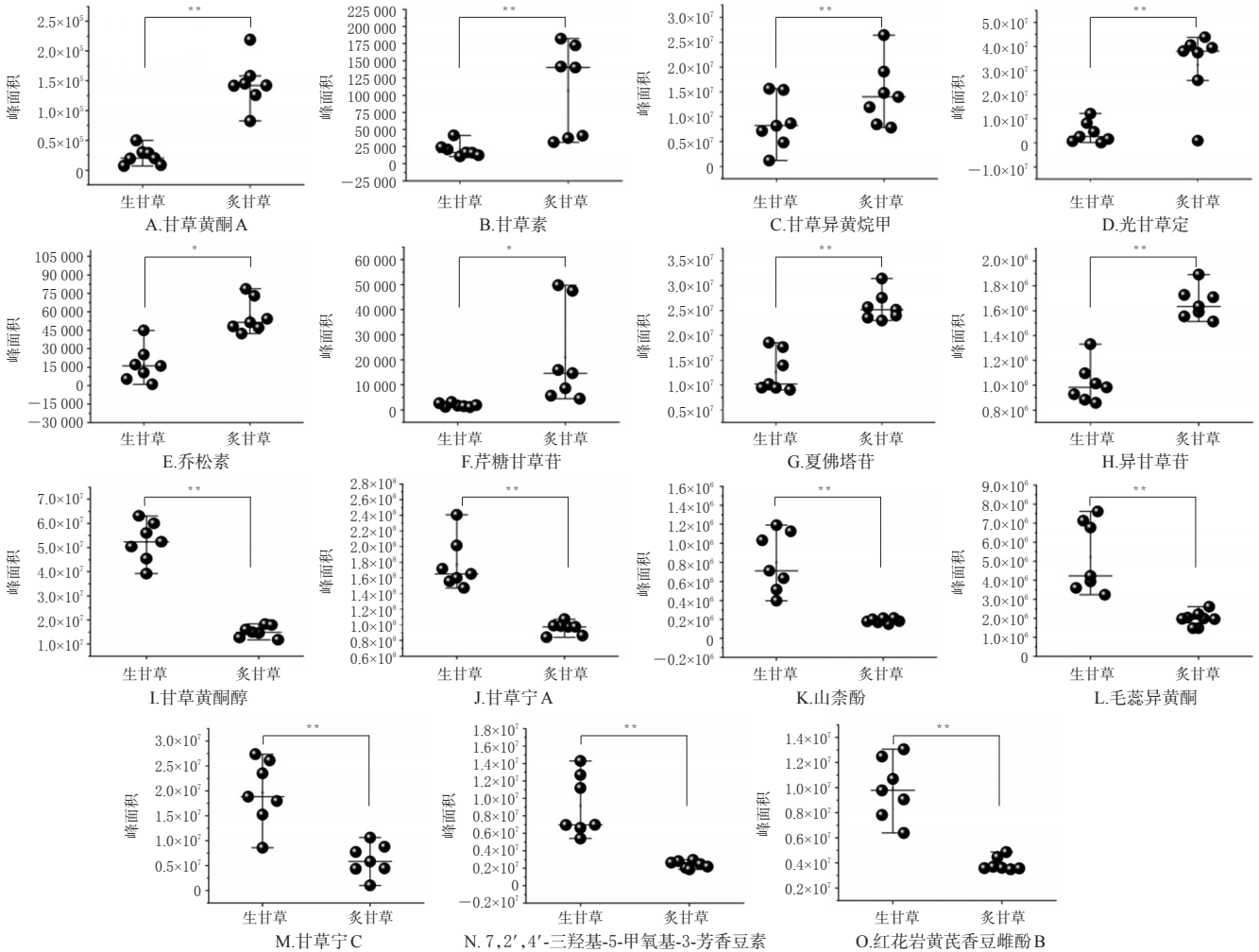


注: S-Plot图中深色标注的为VIP>1的化合物

Note: the compound marked in dark in the S-Plot graphs has VIP>1

图3 生、炙甘草的 OPLS-DA 得分图和 S-Plot 图

Fig 3 OPLS-DA and S-Plot graphs of raw and fried *G. uralensis*



注: “*”表示 $P < 0.05$; “***”表示 $P < 0.01$

Note: “*” means $P < 0.05$; “***” means $P < 0.01$

图4 生、炙甘草中特征差异性成分的含量变化

Fig 4 Content changes of characteristic differential components in raw and fried *G. uralensis*

3 讨论

炮制是中医临床应用的重要手段,能够通过引起物质基础的化学变化而导致中药药性发生变化,进而使药材本身潜在价值得到充分挖掘^[14]。明代医学家陈嘉谟指出:“凡药制造,贵在适中,不及则功效难求,太过则性味反失”,这充分说明了中药炮制对临床疗效的重要作用。炙甘草是至今为止甘草沿用最为广泛的炮制方法,被收录至2015版《中国药典》(一部)中,并单独设立条目^[8]。现代研究也证明,蜜炙后的甘草具有调和诸药、加强滋补的作用^[16-17]。

黄酮类化合物作为甘草的主要活性成分之一,是甘草属植物中分布最广的一类化合物^[18-19]。张霞等^[20]通过对甘草中黄酮类化合物的网络药理学研究发现,甘草素、光甘草定、异甘草苷等15个化合物在网络分析中的连接度较高,是甘草发挥药效的重要协同成分。本研究结果显示,甘草炮制(蜜炙)后,甘草素、甘草黄酮A以及异甘草苷等8种黄酮类化合物的含量显著升高,而甘草黄酮醇、甘草宁A以及毛蕊异黄酮等5种黄酮类化合物和7,2',4'-三羟基-5-甲氧基-3-芳香豆素、红花岩黄芪香豆雌酚B等2种香豆素类化合物的含量则显著降低,这提示上述差异性化学成分可能为甘草生熟异用的主要物质基础。结合张霞等^[20]的研究结果,推测甘草素、光甘草定、芹糖甘草苷、异甘草苷4种黄酮类成分则可能是炙甘草的主要药效成分。以上结论为甘草炮制前后的质量控制及临床应用提供了一定的借鉴和参考,亦可为下一步的细胞及动物药理学实验研究提供依据。

参考文献

[1] 宋洪伟.甘草的文献研究[D].济南:山东中医药大学,2015.

[2] 朱雅凡.仲景“炙”法原貌考证及炙甘草抗溃疡作用的研究[D].北京:北京中医药大学,2019.

[3] 蔡永敏,孙大鹏,邹杰.论甘草应分生甘草与炙甘草[J].中国中医基础医学杂志,2010,16(12):1164-1166.

[4] 张燕丽,孟凡佳,田园,等.炙甘草的化学成分与药理作用研究进展[J].化学工程师,2019,33(8):60-66.

[5] 吴又平.生炙甘草不可相互代用[J].中国医院药学杂志,

1991,1(1):45.

[6] 陈昆南,傅红燕,王长军.基于UPLC/Q-TOF MS技术对延胡索醋法炮制前后化学成分的研究[J].化学研究与应
用,2019,31(9):1618-1622.

[7] 周永峰,牛明,房吉祥,等.基于UPLC-Q-TOF-MS的五味子保肝作用代谢组学研究[J].中国中药杂志,2018,43
(18):3756-3763.

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:86-87.

[9] 赵艳敏,刘素香,张晨曦,等.基于HPLC-Q-TOF-MS技术的甘草化学成分分析[J].中草药,2016,47(12):2061-2068.

[10] 杨彬,王媛,田梦,等.基于UPLC-Q-TOF-MS/MS研究法半夏中甘草化学成分[J].中国实验方剂学杂志,2017,23
(3):45-49.

[11] 范靖然.乌拉尔甘草地上部分的化学成分与生物活性研究[D].北京:北京中医药大学,2019.

[12] 陈佩东,周习,丁安伟.炙甘草水煎液的HPLC-MS分析[J].中草药,2014,45(10):2115-2120.

[13] 包芳.甘肃栽培甘草的化学成分研究[D].兰州:兰州大学,2019.

[14] 洪庆.基于代谢组学的车叶草苷抗衰老作用评价及机制研究[D].镇江:江苏大学,2019.

[15] 钟凌云,崔美娜,杨明,等.炮制影响中药药性的现代研究[J].中国中药杂志,2019,44(23):5109-5113.

[16] 刘雅茜.蜜炙对甘草化学成分及药理作用的影响[D].沈阳:沈阳药科大学,2008.

[17] 张玉龙,王梦月,杨静玉,等.炙甘草化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药大学学报,2015,29(3):99-102.

[18] 周姗.基于CHS基因多态性的甘草黄酮类化合物生物合成分子机制研究[D].北京:北京中医药大学,2018.

[19] 张鲁,崔洁,王文全,等.甘草属植物地上部分化学成分和药理作用研究进展[J].中药材,2018,41(6):1501-1505.

[20] 张霞,张芳,赵建军,等.甘草中黄酮类化合物的网络药理学研究[J].中国药房,2019,30(11):1529-1534.

(收稿日期:2020-02-07 修回日期:2020-03-23)

(编辑:林静)

《中国药房》杂志——中文核心期刊,欢迎投稿、订阅