

UPLC-Q-TOF/MS法分析款冬花蜜炙前后的化学成分变化^Δ

李红军^{1*},王增绘²,李文涛²,王冬梅²,郑司号²,黄林芳^{2#}(1.甘肃岷县农村经济经营管理站,甘肃岷县 748400; 2.中国医学科学院药用植物研究所,北京 100193)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0792-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.24

摘要 目的:考察款冬花蜜炙前后的化学成分变化,为研究其药理作用机制提供依据。方法:采用超高效液相色谱-飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF/MS)技术进行分析鉴定,并运用MarkerLynx 4.1软件,通过主成分分析法和正交偏最小二乘判别法分析蜜炙前后款冬花化学成分的含量变化。结果:款冬花蜜炙后,其蔗糖、葡萄糖、芦丁、反式阿魏酸、棕榈酸、款冬酮的含量升高,绿原酸、芹菜素、亚麻酸、亚油酸的含量降低,肝毒吡咯里西啶生物碱成分(克氏千里光碱)含量下降。款冬花蜜炙前后指纹图谱的差异结果显示,蔗糖、芦丁、绿原酸可作为区分款冬花生品与炮制品的指标性成分。结论:款冬花蜜炙前后成分差异显著,其成分的化学变化是蜜炙后增效减毒的物质基础。

关键词 款冬花;蜜炙;超高效液相色谱-飞行时间质谱联用技术;指纹图谱;克氏千里光碱

Analysis of the Variation of Chemical Composition of *Tussilago farfara* by UPLC-Q-TOF/MS before and after Fried with Honey

LI Hong-jun¹, WANG Zeng-hui², LI Wen-tao², WANG Dong-mei², ZHENG Si-hao², HUANG Lin-fang²(1.Minxian County Management Station for Rural Economy and Management of Gansu Province, Gansu Minxian 748400, China; 2.Institute of Medicinal Plant Research, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the variation of chemical composition of *Tussilago farfara* before and after fried with honey, and to provide reference for analyzing pharmacological action of *T. farfara* before and after fried with honey. METHODS: Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry (Q-TOF/MS) was adopted to analyze and identify chemical composition. By using MarkerLynx 4.1 software, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squared discriminant analysis (OPLS-DA) were used to distinguish the contents variation of chemical composition before and after fried with honey. RESULTS: After fried with honey, the contents of sucrose, glucose, rutin, isoferulic acid, palmitic acid and tussilagone were increased, and the contents of chlorogenic acid, apigenin, linolenic acid and linoleic acid were decreased. Meanwhile, the content of senkirkin, which was hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids, also became less. The difference of fingerprints for *T. farfara* before and after fried with honey indicated that sucrose, rutin and chlorogenic acid could be regarded as indicator component for identifying crude drug and processed product. CONCLUSIONS: There are great differences in chemical composition of *T. farfara* before and after fried with honey, and the variation of chemical composition lays material foundation for the change of drug property after fried with honey.

KEYWORDS *Tussilago farfara*; Fried with honey; UPLC-Q-TOF/MS; Fingerprint; Senkirkin

究[J].当代医学,2010,16(33):7.

[12] 李天鸿,李英华.卡维地洛、美托洛尔治疗慢性心力衰竭疗效比较[J].中国心血管病研究杂志,2004,2(12):966.

[13] 杨凯.美托洛尔与卡维地洛对慢性心力衰竭患者心功能及B型利钠肽的影响[J].实用心脑血管病杂志,2010,18(12):1799.

[14] 杨锋,张宇雷,程小伟.卡维地洛与美托洛尔对慢性心力

衰竭的疗效比较[J].临床医学,2007,27(10):26.

[15] 马国富.卡维地洛和美托洛尔治疗慢性心力衰竭疗效观察[J].中国实用医刊,2012,39(12):104.

[16] 陈胤结.卡维地洛对慢性心力衰竭的近期疗效观察[J].中国医疗前沿,2007,2(22):1.

[17] 董蔚,任艺虹,智光,等.3种β受体阻滞药在慢性心力衰竭治疗中对糖脂代谢影响的比较[J].中国综合临床,2007,23(2):100.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81274013)

* 农艺师。研究方向:中药材栽培。E-mail:zhwang1212@163.com

通信作者:副研究员。研究方向:中药资源学。电话:010-57833197。E-mail:lfhuang@implad.acn.cn

(收稿日期:2014-10-21 修回日期:2015-01-04)

(编辑:申琳琳)

款冬花为菊科植物款冬 *Tussilago farfara* 的干燥花蕾, 分布于我国陕西、甘肃、山西等地^[1-2]。其味辛、微苦, 性温, 归肺经, 具有润肺下气、止咳化痰之功效, 临床主治新久咳嗽、喘咳痰多、劳嗽咳血等症^[3-4]。目前, 市面上以款冬花为原料的止咳化痰类中成药已有千余种, 如款冬止咳糖浆、川贝雪梨膏等^[5]。传统中药炮制理论认为, 蜜炙能甘缓益中^[6], 明代《本草通玄》记载: “款冬花蜜水拌微火炒”^[7]。蜂蜜具有润肺镇咳作用, 蜜炙款冬花能协同止咳化痰, 增强润肺下气作用, 一直沿用至今^[8]。临床常以炮制品蜜炙款冬花入药, 为治疗咳嗽的首选药物。

超高效液相色谱-飞行时间质谱联用(UPLC-Q-TOF/MS)技术具有高分辨、高灵敏、强定性能力的特点, 目前在中药分析工具中占有绝对优势, 已成为中药成分研究最有效的分析工具之一^[9-10]。款冬花的主要化学成分包括黄酮类、萜类、酚酸类、生物碱及挥发油等^[11]。本研究采用UPLC-Q-TOF/MS联用技术进行分析鉴定, 并对分析结果进行主成分分析和正交偏最小二乘判别分析, 以研究款冬花及其蜜炙品, 旨在从化学成分角度探讨蜜炙款冬花增效减毒的炮制机制, 为临床用药提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Acquity™ 型 UPLC-Q-TOF/MS 联用仪, 配有 Mass-Lynx V.4.1 MS 工作站(美国 Waters 公司); PURELAB Classic-UVF 纯水仪(英国 ELGA 公司); KL3000 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂

乙腈、甲酸为色谱纯, 水为超纯水。

1.3 药材

款冬花于2012年11月采自甘肃渭源县, 经中国医学科学院药用植物研究所黄林芳副研究员鉴定为菊科植物款冬 *T. farfara* 的干燥花蕾, 样品保存在中国医学科学院药用植物研究所标本馆。

2 方法

2.1 蜜炙款冬花的制备

取炼蜜适量, 加适量沸水稀释后, 加入款冬花药材中拌匀(每100 kg 款冬花用炼蜜25 kg), 闷透, 置炒制容器内, 用文火炒至规定程度时, 取出, 放凉, 即得^[1]。

2.2 供试品溶液的制备

分别取款冬花药材粉末和相当于生药量的蜜炙品粉末(过4号筛)各约1 g, 精密称定, 分别精密加入乙醇20 ml, 称定质量, 超声(功率: 200 W, 频率: 40 kHz) 处理1 h, 放冷, 再次精密称定, 用乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 分别得款冬花生品和蜜炙品的供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱: Acquity UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B), 梯度洗脱(0~2 min, 5%→34% B; 2~4 min, 34%→57% B; 4~5 min, 57%→65% B; 5~8 min, 65%→81% B; 8~14 min, 81% B; 14~15 min, 81%→5% B; 15~18 min, 5% B); 流速: 0.40 ml/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 3 μl。

2.4 MS 条件

采用正离子检测模式; 离子源: 电喷雾电离(ESI); 质量扫描范围(m/z): 50~1 200; 毛细管电压: 3.0 kV; 锥孔电压: 35 V; 离子源温度: 120 °C; 脱溶剂温度: 450 °C; 雾化气(N_2) 流速:

60 L/h; 脱溶剂气(N_2) 流速: 600 L/h; 碰撞能量(CE): 30 V; 质量校正质核比(m/z): 556.266 4。

2.5 数据分析方法

采用 MarkerLynx 4.1 软件对款冬花生品和蜜炙品的 MS 峰进行分析, 采用主成分分析和正交偏最小二乘判别法分析, 找出化合物谱的差异, 经过分析得到潜在的化学标记物。

3 结果与分析

3.1 款冬花生品和蜜炙品的总离子流图比较

按上述方法进行操作, 得到碎片离子峰的鉴别数据和款冬花生品及蜜炙品的总离子流图, 分别见表1、图1。

表1 离子峰鉴别数据

Tab 1 Ion peak identification in positive ion mode							
编号	保留时间, min	分子离子	分子式	实际值	理论值	误差	化合物归属
1	0.757	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	343.124 0	342.3	1.2	蔗糖
2	0.829	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₂ O ₆	181.071 2	180.0	3.1	葡萄糖
3	2.315	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	355.087 3	354.3	0.5	绿原酸
4	3.852	[M+H] ⁺	C ₇ H ₃₀ O ₈	465.094 5	464.4	1.7	金丝桃苷
5	4.791	[M+Na] ⁺	C ₂₁ H ₃₉ O ₂	633.482 3	610.5	0.2	芦丁
6	5.134	[M+H] ⁺	C ₈ H ₂ NO ₆	366.191 7	365.4	1.1	克氏千里光碱
7	5.808	[M+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₆ O ₇	303.048 6	302.2	0.9	槲皮素
8	7.591	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	195.106 4	194.2	0.8	反式阿魏酸
9	9.075	[M+H] ⁺	C ₁₂ H ₂₀ O ₆	267.987 0	266.3	0.4	未定
10	9.572	[M+H] ⁺	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	271.228 9	270.2	0.3	芹菜素
11	11.336	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₃₄ O ₇	391.232 8	390.5	0.7	款冬酮
12	12.187	[M+Na] ⁺	C ₁₃ H ₁₈ O ₇	301.141 2	278.4	2.3	亚麻酸
13	12.636	[M+H] ⁺	C ₂₃ H ₃₂ O ₇	341.226 7	340.5	1.8	未定
14	13.191	[M+Na] ⁺	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	303.195 4	280.4	0.3	亚油酸
15	14.591	[M-H ₂ O] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	239.237 5	256.4	1.5	棕榈酸

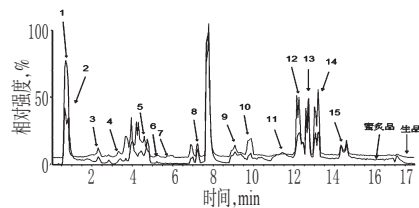


图1 款冬花生品与蜜炙品的UPLC-Q-TOF/MS图谱

Fig 1 UPLC-Q-TOF/MS chromatograms of *T. farfara* and honey-fried *T. farfara*

由表1、图1可见, 正离子模式下, 与款冬花生品比较, 其蜜炙品中1、2、5、8、13号离子峰的含量升高, 即蔗糖($t_R=0.757$ min, $m/z=343.124$ 0)、葡萄糖($t_R=0.829$ min, $m/z=181.071$ 2)、芦丁($t_R=4.791$ min, $m/z=633.482$ 3)、反式阿魏酸($t_R=7.591$ min, $m/z=195.106$ 4)、棕榈酸($t_R=14.591$ min, $m/z=239.237$ 5)含量升高; 而3、9、11、12号离子峰含量降低, 即绿原酸($t_R=2.315$ min, $m/z=355.087$ 3)、芹菜素($t_R=9.572$ min, $m/z=271.228$ 9)、亚麻酸($t_R=12.187$ min, $m/z=301.141$ 2)、亚油酸($t_R=13.191$ min, $m/z=303.195$ 4)含量降低^[1]。

3.2 主成分分析和正交偏最小二乘判别分析

主成分分析是对款冬花生品及其蜜炙品两组数据的整体差异性所作的进一步分析, 其结果显示蜜炙品与生品能够明显区分, 详见图2; 正交偏最小二乘判别散点图见图3。由图3可见, 蜜炙前后款冬花的成分含量具有显著性差异, 图3中的纵坐标绝对值越大, 表示其可信度越高; 横坐标绝对值越大, 表示化合物的含量越高。因此, 图3中的点a($t_R=0.661$ min, $m/z=343.124$ 0)、c($t_R=4.814$ min, $m/z=633.482$ 3)、e($t_R=0.759$ min, $m/z=181.071$ 2)代表了款冬花蜜炙品中含量较高

的化合物；b($t_R=2.315$ min, $m/z=353.087$ 3)、d($t_R=12.288$ min, $m/z=301.141$ 2)、f($t_R=13.129$ min, $m/z=303.195$ 4) 代表了款冬花生品中含量较高的化合物。这6个化合物可作为区分款冬花蜜炙品与生品的标记化合物,即a(蔗糖)、c(芦丁)、e(葡萄糖)、b(亚麻酸)、d(亚油酸)、f(绿原酸)。蔗糖、芦丁、葡萄糖为蜜炙后增加的成分,亚麻酸、亚油酸、绿原酸为蜜炙后减少的成分。蔗糖、亚麻酸和芦丁可作为区分蜜炙品与生品的指标性成分。

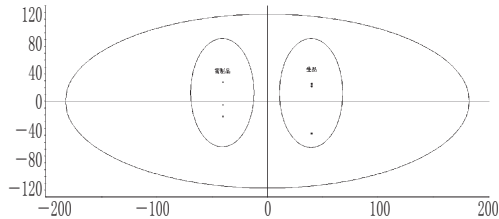


图2 款冬花生品与蜜炙品主成分分析

Fig 2 PCA of *T. farfara* and honey-fried *T. farfara*

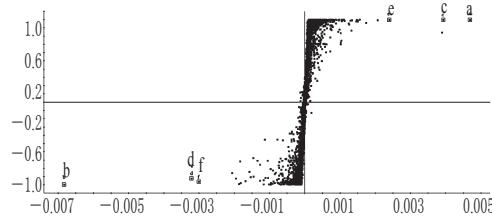


图3 款冬花生品与蜜炙品正交偏最小二乘法差异成分分析结果的散点图

Fig 3 OPLS-DA of *T. farfara* and honey-fried *T. farfara*

离子碎片中两种主要活性成分的离子强度变化趋势见图4。由图4可知,蜜炙后,毒性成分克氏千里光碱的含量减少,而药典规定成分款冬酮含量升高。

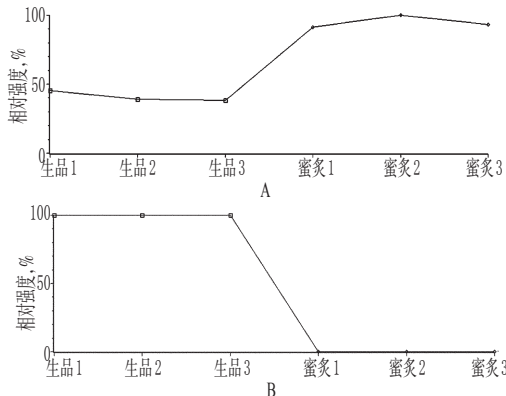


图4 款冬花蜜炙前后两种主要成分的离子强度变化趋势

A. 款冬酮; B. 克氏千里光碱

Fig 4 Selected ion intensity trend plots of 2 ingredients in *T. farfara* and honey-fried *T. farfara*

A. tussilagone; B. senkirkine

4 讨论

根据传统中药炮制理论,款冬花蜜炙后能增强润肺止咳化痰之功。本研究采用UPLC-Q-TOF/MS技术对款冬花生品和蜜炙品进行化学成分分析,结果表明,蜜炙款冬花中蔗糖、葡萄糖含量明显升高(此类成分属于多糖,具有抗病毒、抗肿瘤及提高免疫力等多方面药理作用),黄酮类成分芦丁含量亦

显著升高(该类成分具有抗菌消炎作用),有机酸类成分绿原酸、亚麻酸和亚油酸含量降低(此类成分大多能溶于水,在炮制时水量过多可能导致有机酸含量损失)。此外,款冬花中含有肝毒性的吡咯里西啶生物碱(HPAs)成分——克氏千里光碱,该类生物碱为中药中最主要的内源性有害物质,能引起肝脏毒性。因服用含HPAs的中草药而引起的中毒死亡现象常有发生,已经引起学术界的普遍关注,世界卫生组织曾专门制定了关于HPAs的安全使用指南^[12]。本研究首次发现款冬花经蜜炙后,毒性成分减少,可能是由于该类生物碱在高温条件下不稳定,受热遭破坏或分解,从而使其成分减少或消失。

预试验中,笔者曾比较了在正、负离子模式检测下样品的出峰情况。结果显示,正离子出峰数量较多,峰形较好;又由于甲酸水溶液-甲醇为流动相,有助于形成正离子,对负离子有一定的抑制作用,响应值较负离子高,故本研究采用正离子模式进行检测。

综上所述,本研究采用UPLC-Q-TOF/MS技术分析了款冬花蜜炙前后化学成分的变化情况,结果表明,款冬花蜜炙前后成分差异显著,其成分的化学变化是蜜炙后增效减毒的物质基础。本研究结果为研究款冬花的炮制原理及其药效物质基础的阐明提供了依据,同时也对临床用药具有指导作用。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 312.
- [2] 薛冰玉, 王雪洁, 孙海峰, 等. 基于气质联用的款冬花蕾动态发育代谢组学特征分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(19): 2863.
- [3] 陈雪园, 张如松, 杨苏蓓. 款冬花化学成分及药理毒理研究进展[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(1): 173.
- [4] 张琳, 张善文, 赵鹏. 款冬花多糖硫酸化修饰条件的优化[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(5): 475.
- [5] 丁立威. 款冬花走势分析[J]. 中国现代中药, 2010, 12(12): 44.
- [6] 张瑞环, 安徽薇, 王慧. 浅析中药炮制对药物毒性的影响[J]. 齐鲁药事, 2006, 25(6): 355.
- [7] 刘毅, 王允, 万德光, 等. 款冬花本草考证[J]. 中药材, 2010, 33(4): 634.
- [8] 张柄鑫. 中药古今炮制演变评述[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 184-185.
- [9] Li SL, Lai SF, Song JZ, et al. Decocting-induced chemical transformations and global quality of Du-Shen-Tang, the decoction of ginseng evaluated by UPLC-Q-TOF-MS/MS based chemical profiling approach[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(4): 946.
- [10] 高洋, 陈海敏, 徐继林, 等. κ -卡拉胶寡糖的反相离子对-超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱研究[J]. 分析化学, 2009, 37(11): 1590.
- [11] 刘玉峰, 杨秀伟, 武滨. 款冬花化学成分的研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(22): 2378.
- [12] 回连强, 高双容, 刘婷, 等. 款冬花及其总生物碱的肝脏毒性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 238.

(收稿日期: 2014-03-17 修回日期: 2014-09-15)

(编辑: 孙冰)