

- [D]. 广州: 广州中医药大学, 2013.
- [17] 任默莲, 白芍的化学成分与生物活性研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [18] 金传山, 李素亮, 吴德玲, 等. 白芍饮片趁鲜切制产业化生产工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(24): 3444-3447.

## UPLC-Q-TOF/MS 法分析对叶百部蜜炙前后化学成分的变化

董巍<sup>1</sup>, 郝修洁<sup>2</sup>, 王超众<sup>2</sup>, 郭丽娜<sup>1</sup>, 潘虹<sup>1</sup>, 林宇<sup>1</sup>, 李晓明<sup>1</sup>, 崔涛<sup>1</sup>

(1. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔市食品药品检验检测中心, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

**摘要:** 目的 采用超高效液相-飞行时间质谱联用技术 (UPLC-Q-TOF/MS) 法分析对叶百部 *Stemona tuberosa* Lour. 蜜炙前后化学成分的变化。方法 分析采用 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱; 以 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸乙腈为流动相, 梯度洗脱; 正离子模式下采集数据。主成分分析 (PCA) 法和正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 法进行数据处理。结果 蜜炙后, 百部宁、oxystemoninine、百部碱、*N*-氧-对叶百部碱及其同分异构体、对叶百部碱 H 含量减少。结论 对叶百部蜜炙前后化学成分差异显著, 可能是该植物增效减毒的物质基础。

**关键词:** 对叶百部; 蜜炙; UPLC-Q-TOF/MS; PCA; OPLS-DA

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2016)08-1792-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.08.027

## Variations of chemical constituents in *Stemona tuberosa* before and after stir-frying with honey by UPLC/Q-TOF/MS

DONG Wei<sup>1</sup>, HAO Xiu-jie<sup>2</sup>, WANG Chao-zhong<sup>2</sup>, GUO Li-na<sup>1</sup>, PAN Hong<sup>1</sup>, LIN Yu<sup>1</sup>, LI Xiao-ming<sup>1</sup>, CUI Tao<sup>1</sup>

(1. Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China; 2. Qiqihaer Municipal Institute for Food and Drug Control, Qiqihar 161006, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To analyze the variations of chemical constituents in *Stemona tuberosa* Lour. before and after stir-frying with honey by ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC/Q-TOF/MS). **METHODS** The analysis was performed on an Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column, mobile phase was 0.1% formic acid in H<sub>2</sub>O-0.1% formic acid in acetonitrile for gradient elution, and data were collected in positive ion mode. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least-squared discriminant analysis (OPLS-DA) were adopted in the data processing. **RESULTS** After stir-frying with honey, the contents of stemnine, oxystemoninine, stemonine, *N*-oxytuberostemonine (including its isomer) and tuberostemonine H were decreased. **CONCLUSION** There are significant differences in chemical constituents in *S. tuberosa* before and after stir-frying with honey, which may be the material base for efficacy enhancing and toxicity reducing functions of this plant.

**KEY WORDS:** *Stemona tuberosa* Lour.; stir-frying with honey; UPLC-Q-TOF/MS; PCA; OPLS-DA

百部为百部科植物直立百部 *Stemona sessilifolia* (Miq.) Miq.、蔓生百部 *Stemona japonica* (BL.)

Miq.、对叶百部 *Stemona tuberosa* Lour. 的干燥块根<sup>[1]</sup>, 具有润肺下气止咳, 杀虫的功效, 其炮制

收稿日期: 2015-12-24

基金项目: 黑龙江省教育厅面上项目 (12541925)

作者简介: 董巍 (1983—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0452) 2663381, E-mail: pingguoweimeiwei@

历史悠久,始载于晋朝葛洪《肘后备急方》。传统上认为,百部生品有小毒,对胃有一定刺激性,而蜜炙可缓和其药性,增强润肺止咳功效。研究表明,对叶百部镇咳作用最强<sup>[2]</sup>,而且对叶百部碱和新对叶百部碱为其主要活性物质,具有代表性。故本研究采用UPLC-Q-TOF/MS法分析该植物生品及蜜炙品,采用主成分分析和正交偏最小二乘判别分析法寻找潜在的差异性成分,旨在从化学成分角度探讨蜜炙增强止咳作用的原理,为深入阐释该植物蜜炙机制提供科学依据。

### 1 实验材料

Acquity Ultra Performance LC<sup>TM</sup>超高效液相色谱仪、Synapt HD-Q/TOF-MS质谱仪、电喷雾离子源、MassLynx 4.1数据处理软件(美国Waters公司);KDC-160 HR高速低温离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司);KQ-500DB超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AG135分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

对叶百部饮片购自河北省安国市昌达中药材饮片有限公司,由齐齐哈尔医学院郭丽娜教授鉴定为对叶百部 *Stemona tuberosa* Lour. 的干燥根。对叶百部碱购自成都维克科技有限公司(批号6879-1-2);新对叶百部碱为实验室自制(含有量>90%)。乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯(美国默克公司);蒸馏水(中国广州屈臣氏食品饮料有限公司)。

### 2 实验方法

2.1 蜜炙对叶百部的制备 取炼蜜25 g,少量开水稀释,淋入100 g对叶百部饮片内,拌匀,闷润,置于预热适度的炒制容器中,文火炒至规定程度时取出,放凉,即得<sup>[3]</sup>。

2.2 对照品溶液的制备 分别取对叶百部碱、新对叶百部碱对照品适量,加甲醇制成每1 mL含0.02 mg对叶百部碱和0.03 mg新对叶百部碱的对照品溶液。进样前,甲醇稀释20倍,0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.3 供试品溶液的制备 精密称取对叶百部生品、蜜炙品粉末(过4号筛)2.0 g,置于具塞锥形瓶中,精密加入75%乙醇200 mL,密塞,称定质量,回流1 h,放冷,75%乙醇补足减失的质量,摇匀,0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.4 色谱和质谱条件

2.4.1 色谱条件 Waters Acquity BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm);柱温45 °C;体

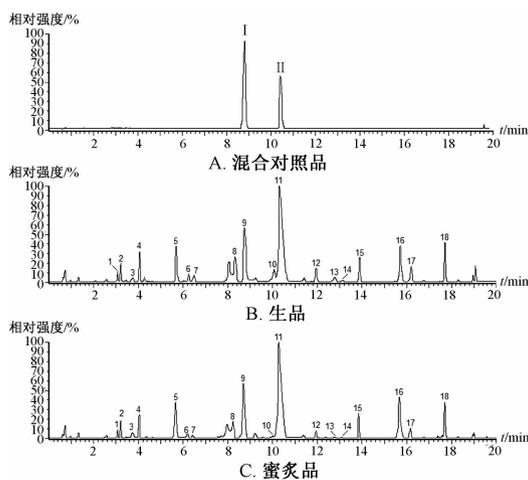
积流量0.40 mL/min;流动相0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B),梯度洗脱(0~2 min, 99%~90% A; 2~5 min, 90% A; 5~15 min, 90%~85% A; 15~18 min, 85%~70% A; 18~20 min, 70%~35% A);进样量5 μL。

2.4.2 质谱条件 正离子模式检测;电喷雾电离ESI,离子源温度110 °C;毛细管电压2.8 kV;锥孔电压35 V;脱溶剂温度350 °C;雾化气(N<sub>2</sub>)体积流量60 L/h;脱溶剂气(N<sub>2</sub>)体积流量550 L/h;碰撞能量30 V;质量校正质核比 *m/z* 556.277 1;质量扫描范围 *m/z* 50~1 000。

2.5 数据分析 采用MassLynx 4.1软件分别对对叶百部生品及蜜炙品正离子模式的UPLC-Q-TOF/MS原始数据进行峰检测,结合各峰Mass值、相对保留时间和分子式匹配软件Elemental composition<sup>TM</sup>对各主要分子离子峰进行归属。然后,进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA),找出化合物谱的差异,寻找潜在的化学标记物。其中,强度阈值50,质量窗口0.05,保留时间窗口0.2,数据标准化方法为Pareto。

### 3 结果

3.1 生品及蜜炙品总离子流图 由图1可知,各化合物分离度高,峰型较好,可知对叶百部蜜炙后,化学成分大多发生了明显的变化。



I. 新对叶百部碱 II. 对叶百部碱  
I. neotuberostemonine II. tuberostemonine

图1 UPLC-Q-TOF/MS 色谱图

Fig. 1 UPLC-Q-TOF/MS chromatograms

3.2 结构分析与鉴定 通过与对照品比对,鉴定峰9和峰11分别为新对叶百部碱和对叶百部碱。其他色谱峰则根据低能量通道中一级质谱图分析,

找出化合物的分子离子峰, 利用 MassLynx 4.1 软件中的“Elemental Composition”计算工具, 确定各色谱峰对应化合物的可能分子式, 通过高能量扫描

时产生的碎片离子明确其元素组成, 结合碎片峰信息, 并参考文献 [4], 推测其可能的化学结构, 各峰的离子质谱数据及鉴定结果见表 1。

表 1 结构分析结果

Tab. 1 Results of structure analysis

编号	$t_R/\text{min}$	相对分子质量	分子式	误差	碎片 $m/z$	成分
1	3.11	337.188 9	$C_{18}H_{27}NO_5$	-1.4	$264[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $236[M + H - C_5H_{10}O_2]^+$ , $162[M + H - C_3H_6O_2 - C_5H_{10}O_2]^+$	异滇百部碱
2	3.21	337.188 9	$C_{18}H_{27}NO_5$	0.1	$264[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $236[M + H - C_5H_{10}O_2]^+$ , $162[M + H - C_3H_6O_2 - C_5H_{10}O_2]^+$	滇百部碱
3	3.84	339.194 0	$C_{18}H_{29}NO_5$	1.1	$322[M + H - H_2O]^+$ , $248[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $174[M + H - C_3H_6O_2 - C_3H_6O_2]^+$ , $162[M + H - C_3H_6O_2 - C_5H_{10}O_2]^+$ , $148[M + H - C_4H_8O - C_5H_{10}O_2]^+$	hydroxycroomine
4	4.08	321.194 0	$C_{18}H_{27}NO_4$	0.9	$248[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $174[M + H - C_3H_6O_2 - C_3H_6O_2]^+$ , $162[M + H - C_3H_6O - C_5H_{10}O_2]^+$ , $148[M + H - C_4H_8O - C_5H_{10}O_2]^+$	金刚大碱
5	5.69	277.204 2	$C_{17}H_{27}NO_2$	2.2	$204[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $190[M + H - C_3H_6O_2 - CH_2]^+$ , $176[M + H - C_3H_6O_2 - CH_2 - CH_2]^+$	新斯替宁碱
6	6.25	277.204 2	$C_{17}H_{27}NO_2$	1.0	$204[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $190[M + H - C_3H_6O_2 - CH_2]^+$ , $176[M + H - C_3H_6O_2 - CH_2 - CH_2]^+$	百部次碱
7	6.50	407.500 5	$C_{22}H_{33}NO_6$	2.4	$392[M + H - O]^+$ , $362[M + H - O - 2CH_3]^+$ , $320[M + H - CH_2 - C_4H_{10}O]^+$	oxystemonimine
8	8.32	389.485 2	$C_{22}H_{31}NO_5$	1.3	$376[M + H - CH_2]^+$ , $316[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $246[M + H - C_5H_{10}O_2 - CH_2 - O]^+$	百部新碱
9	8.73	375.241 0	$C_{22}H_{33}NO_4$	-0.1	$302[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $276[M + H - C_5H_8O_2]^+$ , $206[M + H - C_5H_8O_2 - C_3H_2O_2]^+$	新对叶百部碱
10	10.06	389.485 2	$C_{22}H_{31}NO_5$	-2.5	$376[M + H - CH_2]^+$ , $316[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $246[M + H - C_5H_{10}O_2 - CH_2 - O]^+$	百部碱
11	10.29	375.241 0	$C_{22}H_{33}NO_4$	0.6	$302[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $276[M + H - C_5H_8O_2]^+$ , $206[M + H - C_5H_8O_2 - C_3H_2O_2]^+$	对叶百部碱
12	11.94	391.235 9	$C_{22}H_{33}NO_5$	0.7	$376[M + H - O]^+$ , $318[M + H - C_4H_{10}O]^+$ , $302[M + H - C_3H_6O_2 - O]^+$ , $276[M + H - C_5H_8O_2 - O]^+$	N-氧-对叶百部碱
13	12.78	391.235 9	$C_{22}H_{33}NO_5$	0.7	$376[M + H - O]^+$ , $318[M + H - C_4H_{10}O]^+$ , $302[M + H - C_3H_6O_2 - O]^+$ , $276[M + H - C_5H_8O_2 - O]^+$	N-氧-对叶百部碱
14	13.09	391.235 9	$C_{22}H_{33}NO_5$	0.1	$376[M + H - O]^+$ , $318[M + H - C_4H_{10}O]^+$ , $302[M + H - C_3H_6O_2 - O]^+$ , $276[M + H - C_5H_8O_2 - O]^+$	N-氧-对叶百部碱
15	13.89	375.241 0	$C_{22}H_{33}NO_4$	-0.2	$302[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $276[M + H - C_5H_8O_2]^+$ , $206[M + H - C_5H_8O_2 - C_3H_2O_2]^+$	异对叶百部碱
16	15.70	375.241 0	$C_{22}H_{33}NO_4$	-0.3	$302[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $276[M + H - C_5H_8O_2]^+$ , $206[M + H - C_5H_8O_2 - C_3H_2O_2]^+$	对叶百部碱 J
17	16.20	375.241 0	$C_{22}H_{33}NO_4$	-0.4	$302[M + H - C_3H_6O_2]^+$ , $276[M + H - C_5H_8O_2]^+$ , $206[M + H - C_5H_8O_2 - C_3H_2O_2]^+$	对叶百部碱 H
18	17.70	421.570 2	$C_{24}H_{39}NO_5$	0.8	$404[M + H - H_2O]^+$ , $376[M + H - H_2O - CO]^+$ , $302[M + H - H_2O - CO - C_3H_6O_2]^+$	royleimine

以 Peak4 为例, 正离子模式检测中给出  $322.202 7 [M + H]^+$  的准分子离子数据, 选取 C、H、O、N 4 种元素进行组成分析, 结合同位素峰相对丰度比与分子式理论值的拟合程度, 即 i-FIT

(Norm) 小于 1.0 的原则, 确定分子式为  $C_{18}H_{27}NO_4$ 。分析二级离子信息发现, 百部类生物碱因含有  $\alpha$ -甲基- $\gamma$ -内酯环<sup>[5-6]</sup>, 故电喷雾电离质谱能得到  $[M + H - 74]^+$  的特征离子<sup>[7]</sup>, 二级离子  $248 [M +$

$H-C_3H_6O_2]^+$ 、 $174 [M + H-C_3H_6O_2-C_3H_6O_2]^+$  均为百部属生物碱的特征离子碎片。最终确定, Peak4 为 croomine, 裂解过程见图 2。对色谱图中 18 个峰进行了结构鉴定与表征, 其中峰 12 ~ 14 具有完全相同的分子式和碎片离子, 鉴定为 *N*-氧-对叶百部碱及其同分异构体。

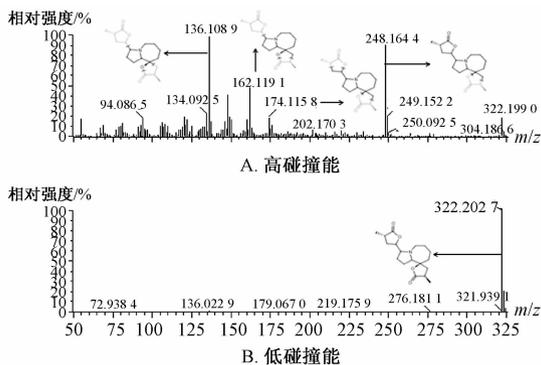
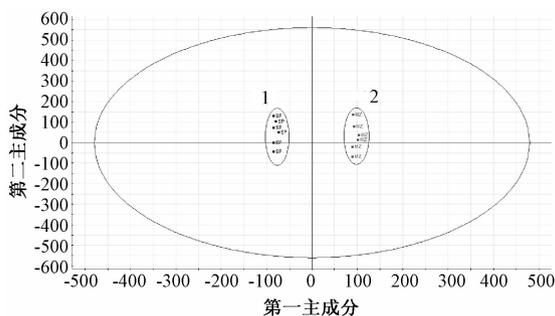


图 2 Peak4 裂解图

Fig. 2 Fragment images of Peak 4

3.3 主成分分析和正交偏最小二乘判别分析 采用主成分分析法对生品及蜜炙品进行整体分析, 结果见图 3。由图可知, 样品可被分成两组, 提示对叶百部经蜜炙后化学成分存在显著差异。



注: SP 为生品, MZ 为蜜炙品

1. 生品 2. 蜜炙品

1. raw product 2. honey-processed product

图 3 主成分分析图

Fig. 3 Principal component analysis image

主成分分析是反映数据原始状态的无监督分析方法, 只能用来观察实验样品的自然分布和组别关系。为了进一步明确生品与蜜炙的整体差异性, 寻找蜜炙前后化学成分变化的特征性指标, 本研究采用有监督的 OPLS-DA 对数据作进一步分析, 结果图 4。

由图可知, 靠近 S 型曲线两侧的部分为差异较大的成分, 而靠近中间部分差异较小, 故以两侧部

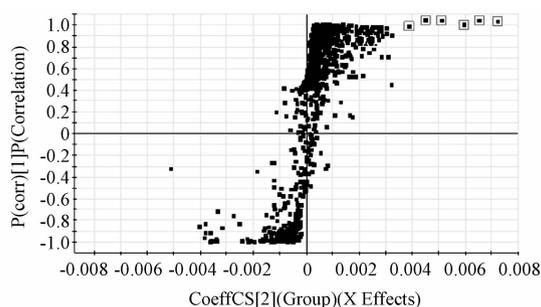
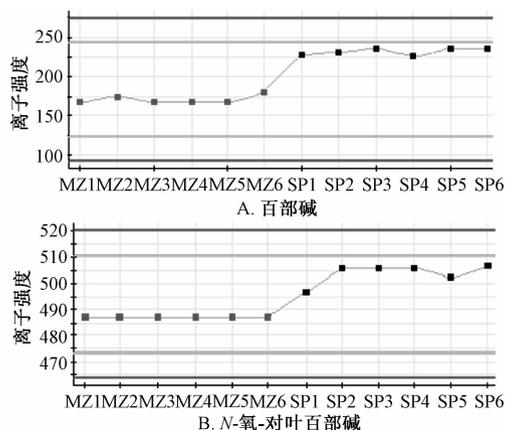


图 4 OPLS-DA 图

Fig. 4 OPLS-DA image

分为研究对象。根据每一变量的系数置信区间和变量权重 VIP 值, 选择有意义的差异变量 (系数不含 0, 而且 VIP 值大于 1), 即特异性的化学成分标志物。结果, 峰 6 (百部宁)、峰 7 (oxystemoninine)、峰 10 (百部碱)、峰 13 和峰 14 (*N*-氧-对叶百部碱及其异构体)、峰 17 (对叶百部碱 H) 可作为区分生品与蜜炙品的标记物, 经蜜炙后其含有量均降低。其中, 百部碱、*N*-氧-对叶百部碱的离子强度变化趋势见图 5, 可知蜜炙后其含有量降低。



注: MZ1 ~ 6 为蜜炙品 1 ~ 6, SP1 ~ 6 为生品 1 ~ 6

图 5 离子强度变化趋势图

Fig. 5 Trend plots of ion intensity changes

## 4 讨论

4.1 样品处理方法的优化 供试品溶液的制备方法分别考察了甲醇、乙醇、75% 乙醇, 发现以 75% 乙醇为溶剂提取时, 色谱峰峰形最理想。同时, 考察了回流提取 30、45 和 60 min, 发现 60 min 下峰面积值最高。

4.2 分析条件的优选 分别考察了甲醇-水和乙腈-水两种流动相系统, 发现乙腈的洗脱效果明显优于甲醇, 故选择乙腈作为有机相。同时, 考察流

动相中不同甲酸比例对质谱响应的影响,发现0.1%甲酸的质谱响应比较好,而且有良好的分离效果,故选择0.1%甲酸-水溶液作为水相,0.1%甲酸-乙腈溶液作为有机相。质谱扫描模式比较了正、负离子,发现生物碱类成分在正离子模式下质谱响应更强,故最终选择在正离子模式下进行分析。

## 5 结论

百部中主要含有生物碱、非生物碱等化学成分,其中生物碱为发挥镇咳作用的主要成分<sup>[5,8]</sup>,现代研究也表明百部蜜炙品中生物碱的止咳活性强于生品<sup>[9]</sup>,但其活性物质基础尚不明确,缺乏质量控制依据。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,广泛应用于中药中活性成分的快速分离和鉴定<sup>[10-13]</sup>。本研究采用该技术结合 OPLS-DA 法,对对叶百部生品和蜜炙品进行分析,发现蜜炙后百部宁、oxystemoninine、百部碱、N-氧-对叶百部碱及其同分异构体、对叶百部碱 H 的含有量明显减少,可能是由于这些生物碱在高温条件下不稳定,受热易遭破坏或分解。

综上所述,对叶百部蜜炙前后化学成分的变化可能成为蜜炙增效减毒的物质基础,本实验可为研究该植物的炮制原理及其药效物质基础提供依据。

## 参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 123-124.  
[2] 胡君萍, 张 囡, 毛一脚, 等. 《中国药典》3种百部的止

咳作用比较[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(23): 3096-3104.  
[3] 蔡宝昌. 中药炮制学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 210.  
[4] Ren W J, Po M H, Yan T X, et al. Isolation and chemotaxonomic significance of tuberostemospirone-type alkaloids from *Stemona tuberosa*[J]. *Phytochemistry*, 2006, 67(1): 52-57.  
[5] Pilli R A, Rosso G B, De Oliveira Mda C. The stemona alkaloids[J]. *Alkaloids Chem Biol*, 2005, 62(30): 77-173.  
[6] Kaltenecker E, Brem B, Mereiter K, et al. Insecticidal pyrido [1, 2-a] azepine alkaloids and related derivatives from *Stemona* species[J]. *Phytochemistry*, 2003, 63(7): 803-816.  
[7] Hu J, Zhang N, Mao Y, et al. Antitussive activity comparison of three kinds of *Stemona Radix* in Chinese Pharmacopoeia [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2009, 34(23): 3096-3104.  
[8] Pilli R A, Ferreira de Oliveira M C. Recent progress in the chemistry of the *Stemona* alkaloids[J]. *Nat Prod Rep*, 2000, 17(1): 117-127.  
[9] 陈晓霞, 魏熙婷, 贾天柱. 生、炙百部生物碱止咳作用比较及蜜炙百部止咳药效学研究 [C] // 中华中医药学会中药炮制分会 2011 年学术年会论文集. 北京: 中华中医药学会中药炮制分会, 2011.  
[10] 单 锋, 袁 媛, 康利平, 等. 基于 UPLC-ESI/Q-TOF-MS/MS 技术分析荷梗中的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(16): 3233-3288.  
[11] 孙冬梅, 董玉娟, 胥爱丽, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法快速筛查银杏磷脂软胶囊中 12 种黄酮类化合物[J]. 中成药, 2015, 37(2): 320-324.  
[12] 蔡 博, 董林毅, 王 静, 等. 超高效液相色谱质谱联用技术同时测定小金丸中 7 种成分的含量[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(8): 718-721.  
[13] 禹奇男, 熊永爱, 杨荣平, 等. UPLC 法测定地榆乙酸乙酯部位中 4 个鞣质类成分[J]. 中成药, 2015, 37(3): 574-577.