

doi: 10.19969/j.fxcsxb.21092306

# 基于超高效液相色谱 – 串联质谱的不同加工干燥方法下的杜仲代谢组学分析

李泽娜, 刘畅, 吴乾峰, 王福, 陈鸿平, 刘友平\*

(成都中医药大学 药学院, 四川 成都 611130)

**摘要:** 考察了不同加工干燥方法对杜仲整体代谢产物的影响。分别制备新鲜杜仲、堆置“发汗”、烫泡“发汗”和阴干杜仲样品, 进行超高效液相色谱 – 串联质谱代谢组学分析。通过主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS – DA)等多元统计分析方法, 筛选出不同加工干燥方法下杜仲的差异代谢物, 比较其相对含量。结果显示, 4个组的杜仲样品在PCA得分图中可明显区分。与新鲜杜仲相比, 杜仲加工干燥后有170种以上的代谢物发生显著变化, 其中超过80%的代谢物表达上调。3种加工干燥方法之间, 堆置“发汗”杜仲的上调代谢物数量较多, 且有利于木脂素和香豆素类、环烯醚萜类、醌类成分的合成; 阴干有利于酚酸类成分的保留, 烫泡“发汗”则有利于黄酮类成分的保留。通过比较不同加工干燥方法下杜仲的差异代谢物, 为探究杜仲药材的品质形成机制及优选其加工方法提供了科学依据。

**关键词:** 杜仲; 超高效液相色谱 – 串联质谱法(UPLC – MS/MS); “发汗”; 加工方法; 代谢组学

**中图分类号:** O657.7; R283 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2022)07-0998-09

## Metabolomics Analysis of Eucommiae Cortex Obtained by Different Processing and Drying Methods Based on Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

LI Ze-na, LIU Chang, WU Qian-feng, WANG Fu, CHEN Hong-ping, LIU You-ping\*

(School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** The effects of different processing and drying methods on overall metabolites of Eucommiae Cortex were investigated. First of all, the rough skin on the surface of fresh Eucommiae Cortexes were scraped off, some of them were stored in the refrigerator at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and the rest were treated with three kinds of different processing and drying methods, including stacking “sweating”, scalding “sweating” and drying in the shade. Secondly, three kinds of processed and dried Eucommiae Cortex, including fresh Eucommiae Cortex samples, were freeze-dried, crushed and then extracted with 70% methanol. The metabolites of Eucommiae Cortex were analyzed by ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS) with electrospray ionization (ESI) ion source, and positive or negative ion mode was used for data collection. The collected data were processed in a series of ways, including peak extraction, peak integration, normalization, etc. After that, the molecular weights of metabolites were obtained according to the first-order mass spectrometry information. And the characteristic ion fragments of metabolites were obtained with the second-order mass spectrometry information, so as to realize the structural analysis of modern metabolites. By searching Metware database (MWDB), human metabolome database (HMDB), MassBank and other databases, the qualitative analysis of metabolites in Eucommiae Cortex was carried out. Finally, the metabolite data were analyzed by principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS – DA) and other multivariate statistical analysis. On the basis of variable importance in the projection (VIP) obtained by OPLS – DA model and fold change (FC), the different metabolites in Eucommiae Cortex obtained by different processing and drying methods were selected. The relative contents of metabolites were characterized by relative peak area, and the rela-

收稿日期: 2021 – 09 – 23; 修回日期: 2021 – 11 – 12

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目(2019YFS0527); 西南特色中药资源重点实验室开放研究基金资助项目(2020QNJ002); 成都中医药大学·双一流·中药质量保障提升创新科研团队项目(030041011)

\* 通讯作者: 刘友平, 博士, 研究员, 研究方向: 中药标准化及药效物质基础研究, E – mail: youpingliu@cdutcm.edu.cn

tive contents of different metabolites were compared. Results showed that the Eucommiae Cortex samples of the four groups could be clearly distinguished in the PCA score diagram. More than 170 metabolites in Eucommiae Cortex obtained by three kinds of processing and drying methods changed significantly, compared with those in fresh Eucommiae Cortex. And more than 80% of the metabolites were up-regulated. Among the Eucommiae Cortexes obtained by three kinds of processing and drying methods, the number of up-regulated metabolites of stacking “sweating” Eucommiae Cortex was higher, followed by that of drying in the shade. In addition, stacking “sweating” was conducive to the retention of lignans, coumarins, iridoids and quinones, drying in the shade was conducive to the retention of phenolic acids, and scalding “sweating” was conducive to the retention of flavonoids. By comparing the different metabolites of Eucommiae Cortex with different processing and drying methods, a scientific basis was obtained for exploring the quality formation mechanism of Eucommiae Cortex and optimizing its processing methods.

**Key words:** Eucommiae Cortex; ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS); “sweating”; processing method; metabolomics

杜仲为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 始载于《神农本草经》, 列为上品, 有补肝肾、强筋骨、安胎之效<sup>[1]</sup>, 被誉为“植物黄金”。有研究表明, 杜仲的药效成分主要为木脂素类、环烯醚萜类、酚酸类、黄酮类及多糖等, 具有降压、降糖、降脂、抗骨质疏松、抗病毒等多种药理作用<sup>[2]</sup>, 是临床上治疗高血压的良药。

产地加工方法是保证中药材质量的重要环节。杜仲传统产地加工方法为堆置“发汗”<sup>[1]</sup>;《本草经集注》<sup>[3]</sup>记载“杜仲采后阴干”;《中华本草》<sup>[4]</sup>中要求杜仲须经沸水烫泡, 再堆置“发汗”。杜仲“发汗”后的化学成分、药效会发生改变。由于部分产地选择阴干处理, 且杜仲加工方法多样, 导致药材质量参差不齐, 可能影响其临床疗效。杜仲所含化学成分丰富, 已分离鉴定的化学成分有200多种, 然而关于杜仲产地加工方法的研究主要为靶向性研究, 仅关注某一个或某一类成分<sup>[5-7]</sup>, 如松脂醇二葡萄糖苷、绿原酸、桃叶珊瑚苷、总黄酮。对杜仲干燥前后以及不同加工干燥方法下整体成分的比较研究鲜有报道。

目前, 文献常用液相色谱、液相色谱-质谱联用等技术对杜仲及相关制剂化学成分进行定性定量研究<sup>[8-9]</sup>, 但检测到的成分较少, 难以全面反映杜仲的整体代谢产物。代谢组学是一门新学科, 主要研究生物体或细胞受外界环境干扰后低分子量代谢产物种类和数量的变化<sup>[10]</sup>。近年来, 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)代谢组学技术不断发展, 可对样本中所有代谢物进行全面覆盖检测, 相比于传统色谱技术, 在灵敏度、选择性、动态范围等方面具有显著优势<sup>[11]</sup>。目前尚未见不同加工干燥方法下杜仲整体代谢产物的差异分析报道。本研究以新鲜杜仲、堆置“发汗”、烫泡“发汗”、阴干杜仲为研究对象, 采用UPLC-MS/MS代谢组学技术, 对杜仲的代谢产物进行全面分析, 并采用主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)筛选差异代谢物, 考察其在不同加工干燥方法杜仲中的相对含量, 为深入研究杜仲药材的品质形成机制及确定杜仲适宜的产地加工方法提供实验依据。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与样品

Nexera X2型超高效液相色谱(日本 Shimadzu)和4500 QTRAP型串联质谱(美国 Applied Biosystem); LGJ-22型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司); ME04E电子分析天平(捷久计量衡器(上海)有限公司); MM 400型研磨仪(德国 Retsch); 5427R型离心机、Research plus单道移液枪(德国 Eppendorf)。甲醇、乙腈(色谱级, Merck); 甲酸(色谱级, Aladdin)。

实验所用样品购自四川省广元市旺苍县正源乡深溪村, 采集时间为2021年5月24日, 采用环剥技术剥皮后, 趁鲜货运至成都中医药大学, 经成都中医药大学中药鉴定系严铸云教授鉴定为杜仲科植物杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)。

### 1.2 样品处理

取新鲜杜仲分别进行以下处理:(1)新鲜杜仲: 取杜仲新鲜树皮, 刮去外表面粗皮, 于-80℃冰箱中保存, 编号XP。(2)堆置“发汗”: 取杜仲新鲜树皮, 使内表面层相对, 层层堆叠, 堆置高度为

80 cm, “发汗”至内表面呈紫褐色(7 d), 取出晒干即得, 编号DP。(3)烫泡“发汗”: 取杜仲新鲜树皮, 于沸水中烫泡2 min, 使内表面层相对, 层层堆叠, 堆置高度为80 cm, “发汗”至内表面呈紫褐色(7 d), 取出晒干即得, 编号TP。(4)阴干: 取杜仲新鲜树皮, 使内表面朝上, 于阴凉通风处晾干即得, 编号YP。

### 1.3 供试品溶液的制备

将杜仲药材置于冷冻干燥机中干燥, 研磨至粉末状。取100 mg粉末, 加1.2 mL 70%甲醇溶解, 经6次涡旋提取后置于4 °C冰箱, 过夜后取样品溶液于12 000 r/min离心10 min, 取上清液过0.22 μm微孔滤膜, 用于进样分析。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 色谱条件** Agilent SB-C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相为0.1%甲酸水(A) - 0.1%甲酸乙腈(B), 梯度洗脱: 0~9 min, 5%~95% B; 9~10 min, 95% B; 10~11 min, 95%~5% B; 11~14 min, 5% B。柱温40 °C, 进样量4 μL, 流速0.35 mL/min。

**1.4.2 质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI), 温度为550 °C, 正负离子切换模式扫描, 离子源电压分别为5 500、4 500 V, 离子源气体 I (GS I)、气体 II (GS II)和帘气(CUR)分别为 $3.45 \times 10^5$ 、 $4.14 \times 10^5$ 、 $1.72 \times 10^5$  Pa, 碰撞诱导电离参数设置为高。采用MRM模式, 通过进一步优化去簇电压(DP)和碰撞能(CE)进行检测。

### 1.5 定性定量分析

基于色谱-串联质谱检测得到的一级、二级质谱数据, 结合自建数据库Metware Database (MWDB)和公共数据库Human Metabolome Database (HMDB)、MassBank、KNAPSACk、METLIN、MoTo DB中代谢物信息, 实现定性分析。过程中排除了同位素信号, 含K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>以及大分子物质的碎片离子重复信号的干扰。

基于三重四极杆质谱多反应监测模式(MRM)对样本中的所有色谱峰进行峰面积积分, 并对不同样本中的相同代谢物进行峰面积积分校正, 实现定量分析。

### 1.6 多元统计分析

将代谢物原始数据导入Analyst 1.6.3 (AB Sciex)软件中对色谱峰进行峰提取、峰对齐、峰积分、归一化等处理, 采用R软件对处理后的数据进行PCA和OPLS-DA分析。根据单变量差异倍数(FC) ≥ 2或 ≤ 0.5, 即 $\log_2 FC \geq 1$ 或 ≤ -1, 结合OPLS-DA获得的变量重要性投影值(VIP) ≥ 1筛选差异代谢物。

## 2 结果与讨论

### 2.1 数据质控样本的适用性评价

质控样本(QC)由实验样本的提取液等量混合制得, 是进行高质量代谢组学研究的基础。以负离子模式为例, 质控样品质谱检测TIC重叠图和样品MRM代谢物检测多峰图如图1A、1B所示, 结果表明仪器检测及代谢物提取具有良好的稳定性和可靠性。

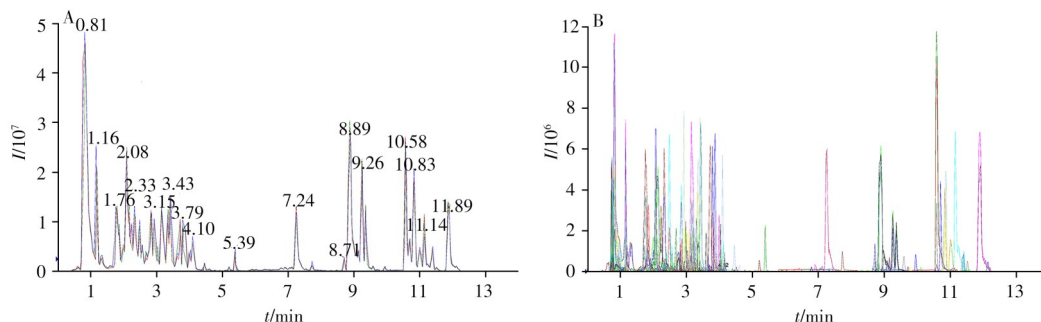


图1 QC样品质谱检测TIC重叠图(A)和MRM模式下代谢物的多峰图(B)

Fig. 1 TIC overlap mass spectrometry of QC sample(A) and multi peak diagram of metabolite detected in MRM mode(B)

## 2.2 PCA及OPLS-DA分析

PCA是代谢组学数据中的常用方法，主要通过降维手段将相关变量重新组合成一系列不相关的变量，以方差大、残差小的主成分反映原变量的信息<sup>[12]</sup>。基于UPLC-MS/MS检测平台和自建数据库，在正、负离子模式下共检测到420个代谢物，采用无监督模式识别的PCA进行分析，结果见图2。PCA共筛选到3个主成分PC1、PC2、PC3，方差贡献率分别为31.75%、22.52%和13.01%，累计方差贡献率达67.28%。由图可见，DP、TP、YP和XP4个组可明显区分，且无相互交叉重叠现象，说明DP、TP、YP和XP4个组的代谢物有显著差异。

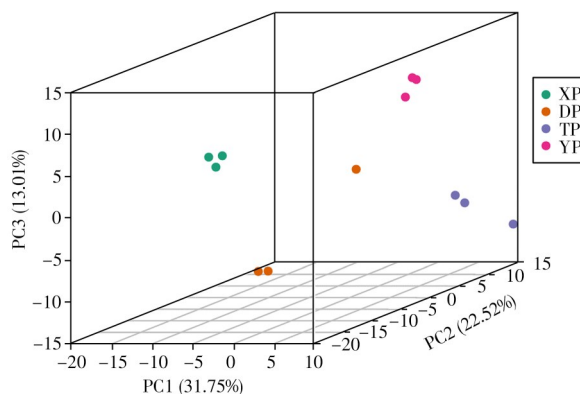


图2 不同加工干燥方法杜仲代谢物PCA图  
Fig. 2 PCA diagram of Eucommiae Cortex metabolites with different processing and drying methods

OPLS-DA是一种有监督模式识别的分析方法，可去除不相关变量的影响，实现不同组间差异代谢物的筛选<sup>[13]</sup>。 $Q^2$ 是评价OPLS-DA模型的参数，反映模型的预测能力，通常以 $Q^2 > 0.5$ 为宜，越接近1效果越佳。本研究通过建立成对比较组OPLS-DA模型筛选差异代谢物，相关参数见表1。结果显示各比较组的 $Q^2$ 值均大于0.5，说明模型具有一定的可靠性，预测信度良好，可用于差异代谢物的分析。

表1 OPLS-DA模型相关参数

Table 1 Relevant parameters of OPLS-DA model

Comparison group	$R^2X$	$R^2Y$	$Q^2$
DP vs XP	0.549	0.998	0.934
TP vs XP	0.568	0.991	0.934
YP vs XP	0.572	0.998	0.954
DP vs TP	0.445	0.949	0.827
DP vs YP	0.398	0.950	0.776
YP vs TP	0.410	0.968	0.828

## 2.3 差异代谢物的筛选

**2.3.1 新鲜杜仲与不同加工干燥方法杜仲的比较研究** 采用VIP值和 $\log_2FC$ 值对新鲜杜仲与分别采用3种方法干燥的杜仲的数据进行分析，结果见图3。图中一个点表示一个代谢物，红色的点表示 $\log_2FC \geq 1$ 且 $VIP \geq 1$ ，即上调(Up)；绿色的点表示 $\log_2FC \leq -1$ 且 $VIP \geq 1$ ，即下调(Down)；灰色点表示差异不明显的代谢物(Insignificant)。火山图显示，在DP与XP之间有173种差异代谢物(149种上调，24种下调；图3A)，TP与XP之间有171种(130种上调，41种下调；图3B)，在YP与XP之间有175种(152种上调，23种下调；图3C)。结果说明杜仲在加工干燥过程中超过80%的代谢物均呈上调表达趋势。研究表明，加工干燥过程中的温度、含水量变化会打破药用植物内正常代谢及生理生化过程的稳态，诱导与次生代谢产物合成相关酶的表达，从而促进次生代谢产物的生成<sup>[14]</sup>。

取DP与XP组、TP与XP组、YP与XP组的差异代谢物，绘制韦恩图，如图3D所示，共得到127种共有差异代谢物，说明DP、TP、YP与XP相比，代谢物差异较大，与PCA分析结果一致。

**2.3.2 不同加工干燥方法杜仲的比较研究** 对3种不同加工方法进行两两成对比较，绘制火山图。在DP与TP之间有118种差异代谢物(75种上调，43种下调；图4A)，DP与YP之间有86种(48种上调，38种下调；图4B)，YP与TP之间有80种(50种上调，30种下调；图4C)。在DP与TP组，DP与YP组，YP与TP组中上调代谢物数量均高于下调代谢物，说明堆置“发汗”过程有利于杜仲中次生代谢产物的积累。取DP与TP组、DP与YP组、YP与TP组差异代谢物的交集(图4D)，仅筛选到9种共有差异代谢物，说明DP、TP、YP代谢物差异较大。

**2.3.3 部分代谢物的相对含量分析** 本研究表明，不同加工干燥方法对杜仲次生代谢产物具有显著影响。表2为相对含量变化显著的部分代谢物，其相对含量结果以均值表示( $n = 3$ )。

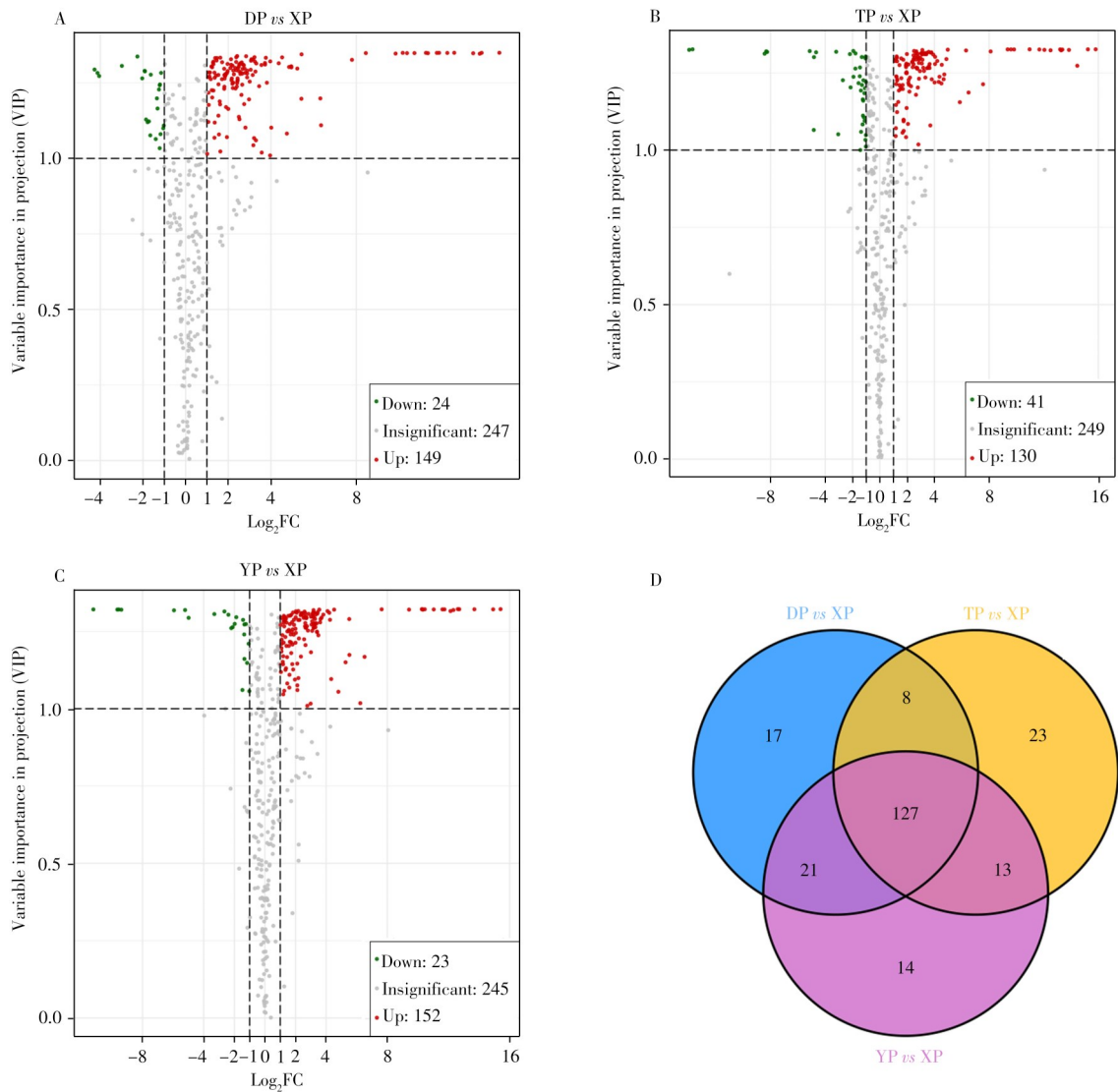


图3 新鲜杜仲与不同加工干燥方法杜仲的火山图(A~C)与韦恩图(D)

Fig. 3 Volcano diagrams(A~C) and Venn diagram (D) of fresh *Eucommiae Cortex* and *Eucommiae Cortex* with different processing and drying methods

木脂素和香豆素是一类含有一个或几个  $C_6 \sim C_3$  单位的天然化合物，是杜仲的主要活性成分。表2的9种木脂素和香豆素类成分中，丁香树脂酚-4'-O-(6''-乙酰)葡萄糖苷在TP组含量较低，原因可能与沸水烫泡过程影响该成分转化所需酶活性及其溶解性有关；其余8种代谢物含量均在XP组最低，说明杜仲加工干燥后大部分木脂素和香豆素类均发生转化，含量增加，推测其为杜仲采后加工干燥胁迫诱导的产物<sup>[14]</sup>。在TP、YP与DP组之间，除7-羟基香豆素外，其余8种代谢物相对含量均以DP组最高，究其原因，可能是堆置过程使植物组织中的细胞呼吸加快，温度升高，促进了酶促或非酶促反应的发生，有利于成分的合成<sup>[15]</sup>。而7-羟基香豆素作为香豆素类成分的基本母核，在酶的作用下会生成其它香豆素类，表明其含量会受下游产物的影响，在3种加工干燥方法之间，堆置“发汗”的温湿度更适宜酶的生存<sup>[16]</sup>，故DP组的7-羟基香豆素转化较多，造成含量偏低。研究表明，香豆素和木脂素同为苯丙素类化合物，其生物合成途径及前体物质基本一致<sup>[17]</sup>，DP组的木脂素类成分含量较高，相对的，其香豆素类成分含量则有所降低。这也是引起DP组7-羟基香豆素含量偏低的原因之一。

酚酸是一类含有酚羟基和羧基的次生代谢产物，其结构不稳定，极易发生分解转化。不同干燥方法对丹参<sup>[18]</sup>、益母草<sup>[19]</sup>、金银花<sup>[20]</sup>中酚酸的影响结果均表明温度和氧气是影响酚酸类成分变化的重要原因，温度越低，氧分压越低，越有利于酚酸类成分的保留。但本研究中XP组的酚酸类成分含量较低，推测是由于新鲜杜仲中酚酸积累较少，在干燥脱水的过程中，随着水分的散失，细胞受到胁迫，

酚酸在某种机制作用下转变成游离态或大量积累，但具体机制有待进一步研究<sup>[21]</sup>。在3种加工干燥方法中有17种变化明显的酚酸类，其中3-O-对香豆酰奎宁酸等9种在YP组最高，提示阴干可促进酚酸类成分含量的提升。阴干是在自然环境中干燥，相较于其他2种方法，温度相对更低，故能有效地保留酚酸类成分。但脱氢双松柏醇、丁香酸等5种成分含量在DP组最高，3,4,5-三咖啡酰奎宁酸等3种成分含量在TP组最高。可能是因为堆置过程激活了多酚氧化酶、过氧化物酶活性，导致酚酸类成分发生氧化；也可能是温度引起酚酸类成分发生分解、脱羟基反应等<sup>[22]</sup>。

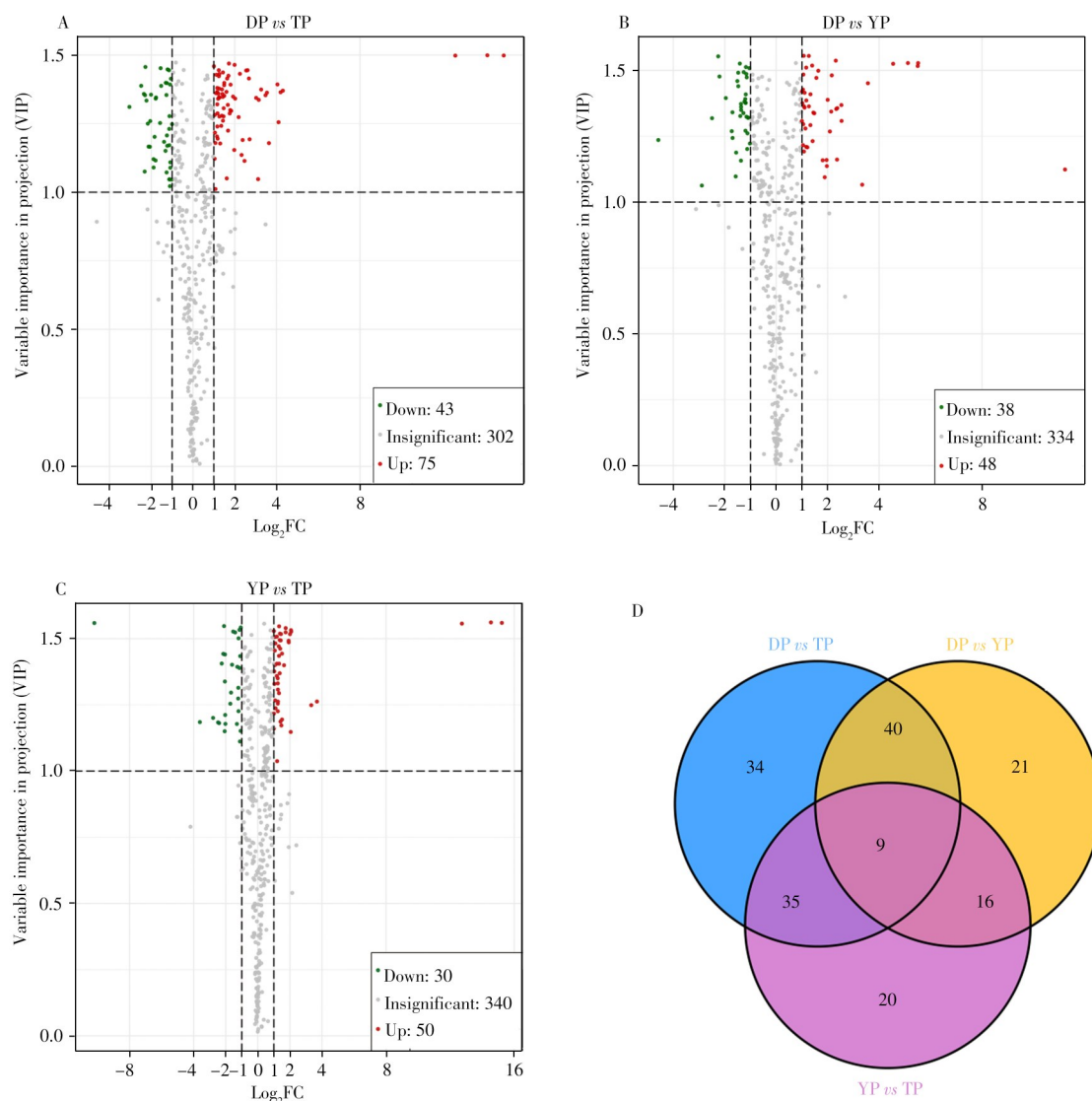


图4 不同加工干燥方法杜仲的火山图(A~C)与韦恩图(D)

Fig. 4 Volcano diagrams (A–C) and Venn diagram (D) of *Eucommiae Cortex* with different processing and drying methods

环烯醚萜类是臭蚁二醛的缩醛衍生物，性质活泼，易受温度、酶、pH值的影响，发生氧化、开环、聚合、转化等反应。表2展示了12种差异明显的环烯醚萜类代谢物，其中有1种环烯醚萜类在XP组较高，7种在DP组较高，1种在YP组较高，3种在TP组较高，提示堆置“发汗”有利于环烯醚萜类成分的保留。分析原因，可能是阴干时可与氧气充分接触，使得萜类成分发生氧化作用造成含量降低<sup>[23]</sup>，而沸水高温会破坏成分结构和酶活性，且后期“发汗”导致微生物重新滋生，引起萜类成分反应<sup>[24]</sup>。

杜仲中的主要活性成分有木脂素类、酚酸类、萜类，本研究仅对这3大类成分的变化规律进行了探讨。结果发现除3类主要成分外，在加工过程中还伴随生物碱、黄酮及醌类等成分的变化，如表2所示，筛选的1个黄酮类成分在TP组中含量较高，说明烫泡“发汗”有利于黄酮类成分的积累；筛选的

1个醌类成分在DP组中含量较高,说明堆置“发汗”有利于醌类成分的积累;而筛选的7个生物碱类成分中有5个在XP组中含量较高,说明绝大多数生物碱在杜仲鲜皮中含量较高。

表2 不同加工干燥方法杜仲的部分代谢物信息( $n=3$ )Table 2 Partial metabolites information of Eucommiae Cortex with different processing and drying methods( $n=3$ )

Type	Metabolite name	Molecular formula	Q1 /Da	Q3 /Da	Relative amount( $\times 10^4$ )			
					XP	DP	TP	YP
Lignans and coumarins(木脂素和香豆素类)	7-Hydroxycoumarin(7-羟基香豆素)	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	161.02	133.03	30.36	157.49	378.46	356.07
	5, 7-Dimethoxy-8-hydroxycoumarin(5, 7-二甲氧基-8-羟基香豆素)	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	223.05	190.02	0.07	1.05	0.21	0.28
	Olivil(橄榄树脂素)	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	375.14	360.12	0.52	4.08	1.04	0.96
	Medioresinol(杜仲树脂酚)	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	387.14	181.05	2.17	62.60	13.74	14.23
	Lirioresinol A(鹅掌楸树脂醇A)	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	417.15	181.04	12.41	468.09	52.68	80.91
	Syringaresinol(丁香树脂酚)	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	417.16	402.10	3.12	97.12	11.91	18.75
	1-Hydroxypinoresinol-4'-O-glucoside(1-羟基松脂醇-4'-O-葡萄糖苷)	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	535.18	373.13	151.87	584.40	247.11	277.08
	1-Hydroxypinoresinol-1-O-glucoside(1-羟基松脂醇-1-O-葡萄糖苷)	C <sub>26</sub> H <sub>32</sub> O <sub>12</sub>	535.18	373.13	188.77	846.62	264.38	385.41
	Syringaresinol-4'-O-(6''-acetyl)glucoside(丁香树脂酚-4'-O-(6''-乙酰)葡萄糖苷)	C <sub>30</sub> H <sub>38</sub> O <sub>14</sub>	621.22	417.16	3.12	17.63	1.51	5.04
	Phenolic acids(酚酸类)	4-Hydroxybenzaldehyde(对羟基苯甲醛)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	111.05	69.00	7.44	38.55	81.87
Syringic acid(丁香酸)		C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	197.05	123.00	9.02	279.54	91.09	55.52
4-O-Glucosyl-4-hydroxybenzoic acid(4-O-葡萄糖基-4-羟基苯甲酸)		C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	299.08	137.02	277.85	218.88	482.02	499.63
1-O-Salicyl-D-glucose(1-O-水杨酰-D-葡萄糖)		C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	299.08	137.02	245.50	190.86	448.40	461.69
Salicylic acid-2-O-glucoside(水杨酸-2-O-葡萄糖苷)		C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	299.10	137.10	97.35	112.30	40.56	22.57
4-Hydroxybenzoic acid-4-O-glucoside(4-羟基苯甲酸-4-O-葡萄糖苷)		C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	299.08	137.02	206.84	196.29	430.74	437.68
3-Methoxy-5-hydroxy-1-O-β-D-glucopyranoside(3-甲氧基-5-羟基-1-O-β-D-吡喃葡萄糖苷)		C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	301.09	139.04	2.11	1.49	3.30	3.83
5-O-p-Coumaroylquinic acid(5-O-对香豆酰奎宁酸)		C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	337.09	191.05	66.37	118.89	254.60	548.10
3-O-p-Coumaroylquinic acid(3-O-对香豆酰奎宁酸)		C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	337.09	191.05	65.19	119.88	285.08	571.86
Syringaldehyde-4-O-glucoside(丁香醛-4-O-葡萄糖苷)		C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	343.11	181.05	18.28	28.97	8.93	13.47
Dehydrodiconiferyl alcohol(脱氢双松柏醇)		C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	359.15	131.05	17.23	202.62	66.75	68.70
5-O-Feruloylquinic acid(5-O-阿魏酰奎宁酸)		C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	375.22	367.11	0.06	0.98	3.49	5.50
Chlorogenic acid methyl ester(绿原酸甲酯)		C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	367.10	190.90	14.32	15.85	0.00	34.37
Isochlorogenic acid C(异绿原酸C)		C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	517.13	163.04	265.42	1160.56	2497.97	2397.53
Rosmarinic acid-3'-O-glucoside(迷迭香酸-3'-O-葡萄糖苷)		C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>	521.13	359.08	18.99	14.56	60.19	37.61
Acteoside(毛蕊花糖苷)		C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>15</sub>	623.20	461.17	1.26	2.45	0.28	1.09
3, 4, 5-Tricaffeoylquinic acid(3, 4, 5-三咖啡酰奎宁酸)	C <sub>34</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	677.17	515.14	1.65	5.09	42.04	10.34	
Iridoids(环烯醚萜类)	6, 9-Dihydroxy-7-megastigmen-3-one(6, 9-二羟基-7-巨豆烯-3-酮)	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	227.16	121.10	605.70	292.93	586.73	814.75
	11-Keto-ursolic acid(11-酮基-熊果酸)	C <sub>30</sub> H <sub>46</sub> O <sub>4</sub>	471.35	453.34	2.98	10.45	2.20	5.22
	Paeoniflorin(芍药苷)	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub>	479.16	121.03	3.40	12.51	3.15	5.19
	3, 11-Dioxo-19α-hydroxyurs-12-en-28-oic acid(3, 11-二羰基-19α-羟基熊果-12-烯-28-酸)	C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>5</sub>	485.33	233.15	0.49	0.75	0.24	0.36
	p-Coumaroyl euscaphic acid(对香豆酰蔷薇酸)	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	619.40	437.34	1.09	3.21	0.62	0.55
	2α-Hydroxy-3β-trans-p-hydroxycinnamoyloxy oleanolic acid(2α-羟基-3β-反式对羟基肉桂酰氧基齐墩果酸)	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>6</sub>	619.39	437.34	0.52	1.12	0.17	0.11
	Caffeoylhawthorn acid(咖啡酰山楂酸)	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>7</sub>	635.39	435.32	9.05	2.50	12.77	8.27
	2α-Hydroxypyracrenic acid(2α-羟基圆齿火棘酸)	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>7</sub>	635.39	453.33	52.97	15.38	72.15	49.81
	3-O-trans-Feruloyl euscaphic acid(3-O-反式阿魏酰蔷薇酸)	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>8</sub>	665.40	177.05	196.75	59.67	293.80	175.56
	Ixoroside(龙船花苷)	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>	361.15	199.10	51.76	57.44	23.93	21.80
	Asperulosidic acid(车叶草苷酸)	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	431.12	269.10	65.28	16.23	6.81	7.23
	Deacetylasperulosidic acid(去乙酰车叶草苷酸)	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	389.11	119.00	65.28	154.57	69.15	74.38
	Galloylisorhamnetin(没食子酰鼠李素)	C <sub>23</sub> H <sub>16</sub> O <sub>11</sub>	469.13	317.08	3.18	4.78	14.26	12.36
	Flavonoids(黄酮类)	Rhein-8-O-glucoside(大黄酸-8-O-葡萄糖苷)	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	445.08	283.00	28.74	138.16	44.45

(续表2)

Type	Metabolite name	Molecular formula	Q1 /Da	Q3 /Da	Relative amount(×10 <sup>4</sup> )			
					XP	DP	TP	YP
Alkaloids (生物碱类)	N-Benzylmethylene isomethylamine (N-苯亚甲基异甲胺)	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N	120.08	103.05	66.01	25.00	2.60	1.07
	N-(2-Hydroxy-4-methoxyphenyl)acetamide (N-(2-羟基-4-甲氧基苯基)乙酰胺)	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	182.08	91.05	327.87	104.00	9.34	8.79
	4-Hydroxy-5-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)benzoic acid (4-羟基-5-(2-氧-1-吡咯烷基)苯甲酸)	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	182.08	136.08	142.44	63.06	15.54	27.22
	3-Indoleacrylic acid(3-吲哚丙烯酸)	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	188.07	118.07	740.15	44.54	2.43	0.98
	3-Amino-2-naphthoic acid(3-氨基-2-萘甲酸)	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> O <sub>2</sub> N	188.07	118.06	795.81	41.21	2.49	1.19
	1-Methoxy-indole-3-acetamide (1-甲氧基-吲哚-3-乙酰胺)	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	205.10	146.06	1855.67	105.84	5.36	2.31
	Lochneridine(洛柯定碱)	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	341.19	309.15	7.20	38.41	14.47	18.70

### 3 结 论

本文建立了UPLC-MS/MS代谢组学分析方法,对不同加工干燥方法下杜仲的差异代谢物及其变化规律进行比较研究。结果显示,新鲜杜仲经加工干燥后,代谢物含量显著增加,不同加工干燥方法对杜仲代谢物的影响规律不同。整体而言,堆置“发汗”上调代谢物数量较多;对不同类别代谢物而言,堆置“发汗”有利于木脂素和香豆素类、环烯醚萜类、醌类成分的保留,阴干有利于酚酸类成分的保留,烫泡“发汗”有利于黄酮类成分的保留。研究结果表明,杜仲加工方法以堆置“发汗”较为适宜。本实验结果为杜仲加工方法的确定及杜仲品质形成机制研究提供了依据。酶活性差异是引起代谢物含量变化的主要原因,后续将考虑研究“发汗”过程中的关键酶,探讨代谢物变化与酶活性的相关性,以期阐释杜仲的“发汗”机制。

#### 参考文献:

- [1] Pharmacopoeia Commission of People's Republic of China. *Pharmacopoeia of People's Republic of China. Part I*. Beijing: China Medical Science Press(中国国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部. 北京: 中国医药科技出版社), 2020: 172.
- [2] Liu C, Guo F F, Xiao J P, Wei J Y, Tang L Y, Yang H J. *Chin. J. Chin. Mater. Med.* (刘聪, 郭非非, 肖军平, 卫军营, 唐力英, 杨洪军. 中国中药杂志), 2020, 45(3): 497-512.
- [3] Tao H J. *Collection of Herbal Classics*. Beijing: People's Medical Publishing House(陶弘景. 本草经集注. 北京: 人民卫生出版社), 1994: 218.
- [4] Song L R. *Chinese Materia Medica. Volume II*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press(宋立人. 中华本草. 第二卷. 上海: 上海科学技术出版社), 1999: 458.
- [5] Yan Y, Cai H, Zhao H, Chen C H, Zou L S, Liu X H, Chai C, Wang S N, Hua Y J. *J. Sep. Sci.*, 2018, 41(5): 1050-1062.
- [6] Li X Y, Lin X Y, Sun X H, Zhao H B, Wei X J. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.* (李雪营, 林先燕, 孙晓惠, 赵鸿宾, 魏学军. 时珍国医国药), 2019, 30(3): 91-93.
- [7] Zhao H B, Wei X J, Sun X H, He X, Liu H L. *Lishizhen Med. Mater. Med. Res.* (赵鸿宾, 魏学军, 孙晓惠, 何鑫, 刘汇丽. 时珍国医国药), 2016, 27(5): 1113-1115.
- [8] Ma Y Q, Wang L, Liu Y, Li X X, Liu Y L. *J. Instrum. Anal.* (马永青, 王璐, 刘颖, 李欣欣, 刘永利. 分析测试学报), 2019, 38(7): 817-822.
- [9] Yan Y, Zhao H, Zou L S, Liu X H, Chai C, Wang S N, Hua Y J. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (严颖, 赵慧, 邹立思, 刘训红, 柴川, 王胜男, 华愉教. 质谱学报), 2018, 39(1): 101-111.
- [10] Li L L, Li Y, Lu H, Wang X. *J. Instrum. Anal.* (李丽丽, 李月, 卢恒, 王晓. 分析测试学报), 2020, 39(12): 1501-1507.
- [11] Xu T R, Liu X Y, Xu G W. *J. Instrum. Anal.* (徐天润, 刘心昱, 许国旺. 分析测试学报), 2020, 39(1): 10-18.
- [12] A J Y, He J, Sun R B. *Acta Pharm. Sin.* (阿基业, 何骏, 孙润彬. 药学学报), 2018, 53(6): 929-937.
- [13] Li F Q, Wang F, Yang F Q, Chen S W, Xiong S Q, Chen H P, Liu Y P, Li X C. *Nat. Prod. Res. Dev.* (李峰庆, 王福, 杨放晴, 陈仕伟, 熊素琴, 陈鸿平, 刘友平, 李小川. 天然产物研究与开发), 2020, 32(8): 1324-1330.
- [14] Su X Y, Wu Y J, Li Y, Huang Y F, Liu Y, Luo P, Zhang Z F. *Molecules*, 2019, 24(17): 3188.

- [15] Cai Y Y, Chen X X, Gu F L, Xu F. *Chin. J. Trop. Crops* (蔡莹莹, 陈星星, 谷凤林, 徐飞. 热带作物学报), **2019**, 40(7): 1325 – 1335.
- [16] Wei D, Wu Q H, Liu Y P, Tang X M, Ren C X, Chen J, Pei J. *Chin. J. Chin. Mater. Med.* (魏担, 吴清华, 刘钰萍, 唐雪梅, 任超翔, 陈江, 裴瑾. 中国中药杂志), **2019**, 44(24): 5405 – 5412.
- [17] Li Y M. *Chemistry of Traditional Chinese Medicine. 2nd Ed.* Shanghai: Shanghai Science and Technology Press (李医明. 中药化学. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社), **2018**: 14 – 16.
- [18] Ao Q X, Jiang Y Y, Xu K, Feng X H, Zhao M J, Zhang L. *Chin. Tradit. Pat. Med.* (敖青霞, 姜媛媛, 许轲, 丰先红, 赵茂俊, 张利. 中成药), **2020**, 42(11): 2959 – 2964.
- [19] Tan Y J, Pu Z J, Tang Y P, Yan H, Guo S, Zhu Z H, Le S J, Chen Y Y, Peng G P, Huang S L, Zhou G S, Duan J A. *Chin. Tradit. Herb. Drugs*(谭亚杰, 濮宗进, 唐于平, 严辉, 郭盛, 朱振华, 乐世俊, 陈艳琰, 彭国平, 黄胜良, 周桂生, 段金廛. 中草药), **2019**, 50(7): 1576 – 1586.
- [20] Jiang S, Ma Q L, Zhang K H, Zhang F, Dai L, Gao P. *China Feed* (姜珊, 马青琳, 张康华, 张芳, 代龙, 高鹏. 中国饲料), **2020**, (11): 20 – 26.
- [21] Zhou T, Luo C M, Zhang S L, Huang Z F, Tang Y N, Liu Y H, Liu Y H, Chen Y, Li Q M, Yi J H. *Chin. J. Chin. Mater. Med.* (周涛, 罗春梅, 张松林, 黄志芳, 汤依娜, 刘玉红, 刘云华, 陈燕, 李青苗, 易进海. 中国中药杂志), **2019**, 44(21): 4634 – 4640.
- [22] Yu F, Wan N, Li Y H, Wang X C, Wu Z F, Liu Z F, Yang M. *Chin. Tradit. Herb. Drugs*(喻芬, 万娜, 李远辉, 王学成, 伍振峰, 刘振峰, 杨明. 中草药), **2021**, 52(7): 2144 – 2153.
- [23] Xu Y, Li A N, Wang Y, Li Y F, Zeng R. *Chin. Tradit. Herb. Drugs*(徐燕, 李爱暖, 王玥, 李燕芳, 曾锐. 中草药), **2018**, 49(4): 819 – 825.
- [24] Gong Y L, Liu D L, Deng C F, Long Y W, Lei Y, Chen C. *Hunan J. Tradit. Chin. Med.* (龚友兰, 刘东亮, 邓长凤, 龙奕文, 雷洋, 陈橙. 湖南中医杂志), **2019**, 35(12): 112 – 114.

(责任编辑: 盛文彦)