

· 质量分析研究 ·

基于 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术分析远志炮制前后成分变化

高慧¹, 熊晓莉¹, 张青², 崔家泉², 叶喜德¹, 彭玲珍³ (1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 建昌帮药业有限公司, 江西 抚州 344000; 3. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006)

摘要: 目的 比较远志生品、“建昌帮”炆远志与药典法甘草制远志的成分差异。方法 运用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱联用(UPLC-LTQ-Orbitrap MS)技术, 在负离子模式下采集样品数据, 根据相对分子质量及碎片离子等质谱信息, 结合对照品与文献信息鉴定化学成分, 并以各成分炮制前后离子峰面积比为炮制前后变化指数进行比较。利用 SIMCA 软件进行主成分分析(PCA)与偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA), 根据变量重要性投影(VIP)值对炮制前后差异成分进行筛选。结果 共鉴定出 51 个化合物, 其中 42 个成分来源于远志, 9 个为炮制辅料甘草引入的成分。PCA 分析表明生远志与炆远志、制远志具有明显差异, OPLS-DA 筛选得生远志与炆远志差异成分 27 个; 生远志与制远志差异成分 25 个; 炆远志与制远志差异成分 23 个。结论 远志炮制前后成分种类与成分含量均发生了明显变化, 炮制过程中皂苷类、寡糖酯类等同类成分间的转化以及辅料甘草成分的引入是产生该差异的主要原因, 且炆远志与制远志两种炮制品也存在着明显差异。

关键词: 远志; 炆远志; 建昌帮; 炮制; UPLC-LTQ-Orbitrap MS; 化学成分; 差异

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)12-1845-10

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.12.015

Analysis of Composition Changes of Polygalae Radix before and after Processing Based on UPLC-LTQ-Orbitrap MS

GAO Hui¹, XIONG Xiaoli¹, ZHANG Qing², CUI Jiaquan², YE Xide¹, PENG Lingzhen³ (1. Jiangxi University of Tradition Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China; 2. Jianchangbang Pharmaceutical Co., Ltd, Fuzhou 344000 Jiangxi, China; 3. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006 Jiangxi, China)

Abstract: **Objective** Comparing the difference in composition of different processed products such as Polygalae radix, liquorice-simmered Polygalae radix with *Jianchangang* and liquorice-boiled Polygalae radix with Chinese Pharmacopoeia method. **Methods** UPLC-LTQ-Orbitrap MS technology was used to collect the sample data under negative ion mode. According to mass spectrometry information such as relative molecular mass and fragment ions, the chemical components were identified by combining reference materials and literature information. The ratio of the ion peak areas of each component before and after processing is employed as the index of change before and after processing for comparison. SIMCA software was used to perform principal component analysis(PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis(OPLS-DA), and the different components before and after the processing were screened according to the variable importance projection(VIP) values. **Results** A total of 51 components were identified, 42 of which were derived from Polygalae radix, and 9 components were the ingredients introduced by the processing adjuvant licorice. PCA analysis showed that the Polygalae radix, liquorice-simmered Polygalae radix, and liquorice-boiled Polygalae radix had obvious differences. OPLS-DA resulted 27 different components between

收稿日期: 2021-05-28

作者简介: 高慧, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药炮制研究。Email: 1761636614@qq.com。通信作者: 叶喜德, 男, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药炮制研究。Email: 552376722@qq.com。彭玲珍, 女, 主治医师, 研究方向: 中医研究。Email: 150214626@qq.com。

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ190637); 江西省中医药管理局科技计划项目(2019A077); 江西省中医中药中青年骨干人才(第一批)培养计划(赣中医院科教学[2020]2号)。

Polygalae radix and liquorice-simmered Polygalae radix; 25 different components between Polygalae radix and liquorice-boiled Polygalae radix; and 23 different components between liquorice-simmered Polygalae radix and liquorice-boiled Polygalae radix. **Conclusion** The ingredient types and contents of Polygalae radix before and after processing have changed significantly. The conversion of saponins, oligosaccharide esters and other similar components during the processing and the introduction of licorice components as auxiliary materials are the main reasons for this difference. There are also obvious differences between the two processed products of Polygalae radix.

Keywords: Polygalae radix; liquorice-simmered Polygalae radix; *Jianchangbang*; processing; UPLC-LTQ-Orbitrap MS; chemical compositions; difference

远志来源于远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *P. sibirica* L. 干燥根, 主要含皂苷类、寡糖酯类、吡啶类成分, 具益智安神、祛痰、消肿等作用, 常用于心悸、健忘、失眠多梦、咳痰等证^[1]。远志生用有“服之令人闷”“戟人咽喉”的副作用, 长期使用可产生胃肠毒性。炮制是中药材减毒增效的有效途径之一, 故临床常使用其炮制品^[2-3]。甘草制远志为《中国药典》炮制饮片(简称“制远志”)。炆远志是江西建昌帮特色炮制饮片, 二者均以甘草为炮制辅料, 但炮制方法不一。炆远志收载于 2008 年版《江西省中药饮片炮制规范》, 认为“炆远志缓和燥性, 消除麻味, 以安神益智为主”^[4], 但目前远志炆制前后化学成分变化研究相对缺乏, 其减毒增效的物质基础与炮制机理尚不明确。同时, 建昌帮炆制的特色炮制方法的科学内涵尚未明确阐释。超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱质谱联用(UPLC-LTQ Orbitrap MS)技术具分辨率高、灵敏度高、分离效率高等特点。本研究以建昌帮炆远志为研究对象, 并与制远志作比较, 利用 UPLC-LTQ Orbitrap MS 技术对生远志、炆远志、制远志成分进行分析, 并结合化学模式识别法对远志炮制前后差异成分进行筛选, 为阐释炆远志炮制的科学内涵提供数据支撑, 便于其临床应用与推广。

1 材料

1.1 仪器 Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 UPLC Plus Focused 超高效液相色谱系统、LTQ-Orbitrap Elite 线性离子阱-串联静电场轨道阱质谱仪(配备电喷雾离子源 ESI 与 Xcalibur 2.1 化学工作站, 美国 Thermo Scientific 公司); FA1004N 万分之一电子天平(上海精密科学仪器有限公司); AE240 十万分之一

电子天平(美国 Mettler-Toledo 公司); YF-111B 高速中药粉碎机(瑞安市永历制药机械有限公司); KQ-500E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药与试剂 远志购于山西汉广中药材加工有限公司, 产地为山西运城; 甘草购于安徽汇仁堂中药饮片有限公司, 经江西中医药大学龚千峰教授鉴定, 分别为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 干燥根和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。对照品细叶远志皂苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖、远志皂苷 B、阿魏酸、甘草苷、甘草酸(四川维克奇生物科技有限公司, 批号分别为 wkq19010709、wkq19031208、wkq20062202、wkq20022103、wkq20022701、wkq20022509); 远志吡啶Ⅲ(成都曼斯特生物科技有限公司, 批号: MUST19092310); 远志寡糖 C(成都克洛玛生物科技有限公司, 批号: CHB180912), 对照品纯度均 $\geq 98\%$; 水为屈臣氏纯净水, 乙腈、甲酸为质谱纯, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 炮制品制备 生远志与制远志均按 2020 年版《中国药典》^[1]炮制方法制备。炆远志按 2008 年版《江西省中药饮片炮制规范》^[4]炮制方法制备: 取净甘草, 切段, 与净远志搅匀, 置炆药坛内, 加适量 40℃温水(以平药面为度); 坛四周堆适量谷糠, 点火, 液面保持沸腾炆制 5 h, 起坛, 捡去甘草, 干燥。每 100 kg 远志用甘草 6 kg。

2.2 供试品溶液的制备 精密称取生远志、炆远志及制远志粉末(过 3 号筛)各 0.5 mg, 加入 50% 甲醇 25 mL, 超声提取 45 min(500 W, 40 kHz), 放冷后补足并过滤, 过 0.22 μm 微孔滤膜即得。

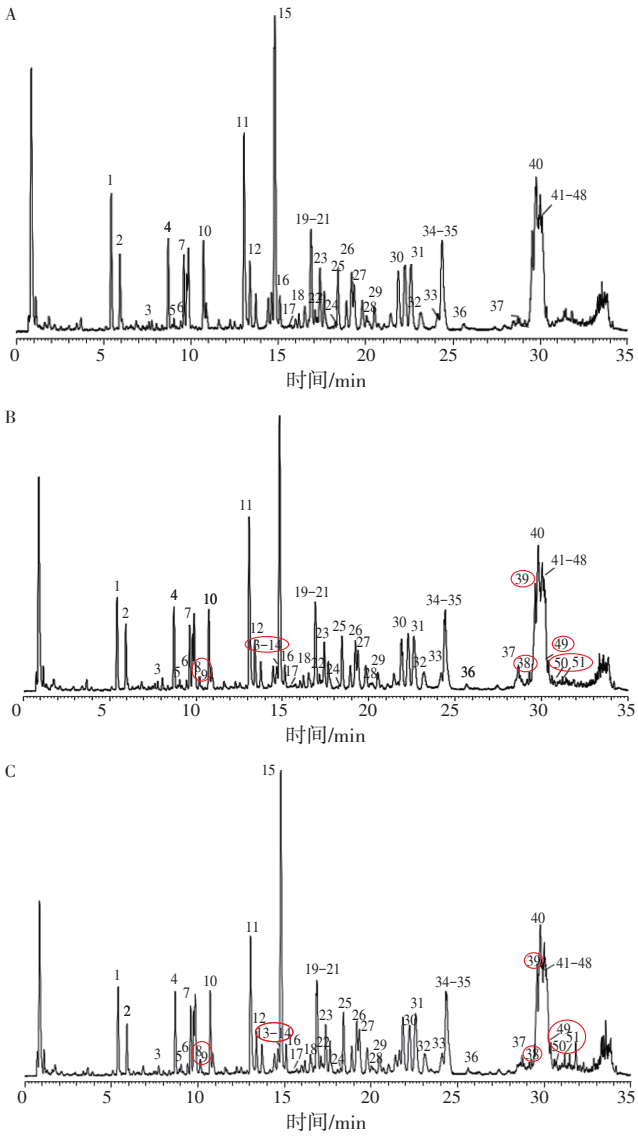
2.3 对照品溶液的制备 精密称取细叶远志皂苷、

3,6'-二芥子酰基蔗糖、远志皂苷 B、阿魏酸、甘草苷、甘草酸、远志呔酮Ⅲ、远志寡糖 C 适量, 分别移至 5 mL 容量瓶, 加甲醇溶解并定容, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得各对照品溶液。精密吸取对照品溶液各 100 μL , 混匀, 即得混合对照品溶液。

2.4 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm); 以 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈(B)为流动相, 梯度洗脱(0~15 min, 5%~25% B; 15~21 min, 25%~25% B; 21~26 min, 25%~27% B; 26~32 min, 27~100% B; 32~32.10 min, 100%~5%B; 32.10~35 min, 5%B); 流速: 0.3 mL $\cdot$ min $^{-1}$; 进样量: 2 μL ; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5 质谱条件 预试对样品进行正负离子模式扫描, 发现负离子模式下远志样品的离子化效果优于正离子模式, 故本研究选择负离子模式进行检测。电喷雾离子源 (ESI), 毛细管温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 鞘气流速 35 L $\cdot$ h $^{-1}$, 辅助气流速 10 L $\cdot$ h $^{-1}$, 喷雾电压 3.6 V, 离子传输管温度 320 $^{\circ}\text{C}$, 质量扫描范围(m/z)为 100~2 000。

2.6 化学成分鉴定 利用 Xcalibur 2.1 工作站进行质谱数据处理, 通过比对化合物的保留时间、质荷比与二级碎片离子以及裂解规律等质谱信息, 并结合细叶远志皂苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖等 8 个对照品质谱信息和相关文献数据^[5-12]对化学成分进行鉴定。在负离子模式下, 从生远志鉴定出 42 个化学成分, 从炆远志和制远志均鉴定出 51 个化合物。其中 42 个源于远志, 包括 14 个皂苷类、22 个寡糖酯类、4 个呔酮类、2 个有机酸类成分; 9 个是由辅料甘草引入的成分, 黄酮类 7 个、三萜皂苷类 2 个。远志各炮制品总离子流图与化学成分见图 1、表 1。



注: A. 生远志; B. 炆远志; C. 制远志
图 1 远志不同炮制品的总离子流图 (负离子模式)
Figure 1 Total ion chromatograms of different processed products of Polygalae radix(negative ion mode)

表 1 远志不同炮制品的化学成分鉴定与炮制前后的峰面积变化指数

Table 1 Identification of components in different processed products of Polygalae radix and Change indexes of ion peak area before and after processing

化合物	化学成分鉴定						峰面积变化指数				
	t_{R}/min	分子式	理论值	实测值 [M-H] ⁻	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	化合物	来源	炆远志	制远志	炆远志/ 制远志
1	5.39	C ₂₂ H ₃₀ O ₁₄	517.156 3	517.155 5	-1.5	337.095 4, 295.093 0, 193.030 6, 175.023 5, 159.997 4	Sibiricoside A5	S, W, G	0.78	0.95	-
2	5.87	C ₂₃ H ₃₂ O ₁₅	547.166 8	547.165 6	-2.2	367.112 8, 223.032 6, 205.034 5, 190.011 6, 174.996 7	Sibiricoside A6	S, W, G	0.85	0.96	-
3	7.75	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₀	405.082 7	405.082 1	-1.5	315.069 9, 307.128 2, 285.021 1, 257.070 2	Lancerin	S, W, G	0.96	0.71	-
4	8.69	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₄	537.125 0	537.123 8	-2.2	417.069 0, 387.063 7, 315.070 7, 285.072 8, 267.035 9	Sibiricaxanthone A	S, W, G	0.76	1.04	-
5	8.88	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193.050 6	193.050 5	-0.5	178.026 2, 149.057 8, 134.051 8	ferulic acid(阿魏酸)*	S, W, G	1.70	1.23	-

(续表 1)

化合物	化学成分鉴定						峰面积变化指数				
	t_R/min	分子式	理论值	实测值 [M-H] ⁺	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	化合物	来源	炆远志	制远志	炆远志/ 制远志
6	9.41	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₁	435.093 3	435.092 1	-2.8	345.092 5, 315.085 4, 272.038 1, 257.002 0	7-O-Methylmangiferin	S, W, G	1.55	0.92	-
7	9.60	C ₂₅ H ₃₈ O ₁₅	567.135 5	567.134 3	-2.1	435.075 7, 345.065 2, 315.053 8, 272.037 9	Polygalaxanthone III (远志呔酮 III)*	S, W, G	0.83	1.03	-
8	9.91	C ₂₁ H ₃₂ O ₉	417.119 1	417.118 8	-0.7	255.093 0, 135.002 0	Liquiritin (甘草苷)*	W, G	辅料引入	辅料引入	0.41
9	10.15	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₃	549.161 4	549.160 5	-1.6	417.127 3, 255.083 6	Liquiritin apioside (芹糖甘草苷)或其同分异构体	W, G	辅料引入	辅料引入	0.55
10	10.70	C ₃₀ H ₃₀ O ₁₇	667.188 0	667.187 1	-1.3	461.139 6, 281.070 3, 239.031 2, 205.026 3	Tenuifolioside B	S, W, G	0.88	0.94	-
11	13.05	C ₃₄ H ₄₂ O ₁₉	753.224 8	753.223 4	-1.9	631.255 6, 547.181 2, 529.175 8, 367.108 4, 223.038 8	3,6'-Disinapoyl sucrose (3,6'-二芥子酰基蔗糖)*	S, W, G	0.66	0.96	-
12	13.38	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₈	723.214 2	723.212 1	-2.9	547.176 6, 529.171 6, 499.150 0, 405.112 3, 265.082 3, 223.086 8, 205.104 3	arillanin A	S, W, G	0.58	0.90	-
13	14.46	C ₂₁ H ₃₂ O ₉	417.119 1	417.118 6	-1.2	255.016 1, 134.960 1	Isoliquiritin (异甘草苷)	W, G	辅料引入	辅料引入	0.53
14	14.69	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	255.066 3	255.065 9	-1.6	135.008 9, 119.506, 91.081 8	Liquiritigenin (甘草素)	W, G	辅料引入	辅料引入	2.37
15	14.79	C ₃₁ H ₃₈ O ₁₇	681.203 6	681.202 0	-2.3	635.267 5, 443.151 9, 281.074 2, 223.066 7, 239.081 2	Tenuifolioside A	S, W, G	0.94	1.14	-
16	15.12	C ₆₆ H ₈₄ O ₃₈	1 483.456 8	1 483.454 5	-1.6	1 337.387 8, 1 295.401 7, 1 191.379 7, 1 161.371 1, 1 039.335 3, 753.146 3	Tenuifoliose G	S, W, G	0.83	0.90	-
17	15.50	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	237.076 8	237.076 4	-1.7	193.011 6, 133.031 5, 103.070 6	3, 4, 5- Trimethoxycinnamic acid (3, 4, 5- 三甲氧基肉桂酸)	S, W, G	1.97	1.26	-
18	16.56	C ₆₅ H ₈₂ O ₃₇	1 453.446 2	1 453.442 7	-2.4	1 307.435 7, 1 161.416 4, 1 119.393 3, 1 039.391 1, 997.203 2	Tenuifoliose M	S, W, G	0.65	0.92	-
19	16.84	C ₆₈ H ₈₆ O ₃₉	1 525.467 3	1 525.465 1	-1.4	1 337.236 4, 1 257.447 5, 1 203.451 4, 1 161.428 5, 1 143.434 3, 455.378 6	Tenuifoliose F	S, W, G	0.71	0.90	-
20	16.87	C ₆₇ H ₈₄ O ₃₈	1 495.456 8	1 495.456 1	-0.5	1 349.215 7, 1 307.201 8, 1 227.214 7, 1 203.189 6, 1 161.190 3, 1 143.212 3, 1 081.268 0, 795.182 4	Tenuifoliose L	S, W, G	0.68	0.97	-
21	16.90	C ₃₅ H ₄₄ O ₁₉	767.240 4	767.239 3	-1.4	529.187 4, 367.117 0,	Tenuifolioside C*	S, W, G	0.73	1.03	-
22	17.10	C ₅₇ H ₇₀ O ₃₂	1 265.377 7	1 265.375 1	-2.1	1 119.137 3, 997.145 3, 425.233 4	Tenuifoliose K	S, W, G	0.71	0.83	-
23	17.42	C ₅₆ H ₇₀ O ₃₂	1 253.377 7	1 253.372 8	-3.9	1 131.381 0, 1 077.374 2, 985.356 7, 955.153 4, 823.298 0, 661.251 3	Tenuifoliose T	S, W, G	0.60	0.83	-
24	18.26	C ₅₉ H ₇₄ O ₃₄	1 325.398 9	1 325.393 4	-4.1	1 203.445 7, 1 119.442 5, 1 077.399 8, 977.203 3, 753.142 3	Tenuifoliose P	S, W, G	0.65	0.88	-
25	18.42	C ₅₉ H ₇₂ O ₃₃	1 307.394 2	1 307.391 0	-2.4	1 265.184 7, 1 247.183 9, 1 161.205 6, 1 143.172 8, 1 119.211 6, 1 101.217 8, 1 039.209 8, 997.169 3	Tenuifoliose I	S, W, G	0.79	0.80	-
26	19.19	C ₆₀ H ₇₄ O ₃₄	1 337.398 9	1 337.397 0	-1.4	1 295.222 5, 1 161.206 2, 1 119.217 5, 997.201 6	Tenuifoliose B	S, W, G	0.65	0.82	-
27	19.32	C ₅₈ H ₇₂ O ₃₃	1 295.388 3	1 295.385 3	-2.3	1 173.367 0, 1 119.351 5, 1 101.341 8, 997.322 3, 851.266 9	Tenuifoliose C	S, W, G	0.73	0.90	-
28	20.07	C ₆₁ H ₇₆ O ₃₅	1 367.409 4	1 367.407 4	-1.5	1 325.176 1, 1 245.159 4, 1 191.174 5, 1 173.144 3, 1 149.171 7, 997.237 3	Tenuifoliose O	S, W, G	0.89	0.77	-
29	20.49	C ₅₉ H ₇₂ O ₃₃	1 307.394 2	1 307.390 4	-2.9	1 265.184 7, 1 247.183 9, 1 161.205 6, 1 143.172 8, 1 119.211 6, 1 101.217 8, 1 039.209 8, 997.169 3	Tenuifoliose J	S, W, G	0.79	0.80	-
30	22.26	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₄	1 103.528 0	1 103.526 2	-1.6	1 073.317 0, 455.1 976, 425.189 5	Polygalasaponin XXVIII	S, W, G	0.51	0.77	-
31	22.58	C ₆₁ H ₇₄ O ₃₄	1 349.398 9	1 349.396 4	-1.9	1 203.212 2, 1 161.218 2, 1 143.192 6, 1 081.244 2, 1 039.234 0	Tenuifoliose H	S, W, G	0.82	0.87	-
32	23.12	C ₆₄ H ₁₀₀ O ₃₂	1 379.612 5	1 379.609 4	-2.2	1 235.356 2, 455.318 9	Onjisaponin TG	S, W, G	0.47	0.81	-

(续表 1)

化合物	化学成分鉴定						峰面积变化指数				
	t_R/min	分子式	理论值	实测值 [M-H] ⁻	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子	化合物	来源	炆远志	制远志	炆远志/ 制远志
33	24.14	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₈	1 249.590 0	1 249.588 6	-1.1	1 219.404 9, 1 025.385 3, 995.429 4, 455.220 8, 425.223 9	Onjisaponin TF	S, W, G	1.13	1.20	-
34	24.40	C ₆₂ H ₇₆ O ₃₅	1 379.409 4	1 379.408 1	-0.9	1 203.420 7, 1 116 1.415 1, 1 143.208 2, 1 039.396 4	Tenuifoliose A	S, W, G	0.78	0.79	-
35	24.57	C ₇₀ H ₁₁₀ O ₃₆	1 525.670 4	1 525.669 7	-0.5	1 423.435 4, 1 381.463 1, 1 351.452 9, 1 157.440 5, 455.219 4, 425.269 1	Onjisaponin TE	S, W, G	0.83	0.48	-
36	25.63	C ₆₃ H ₇₈ O ₃₆	1 409.420 0	1 409.419 4	-0.4	1 233.2301, 1 191.240 3, 1 111.2379, 1 069.142 3	Tenuifoliose N	S, W, G	0.76	0.90	-
37	28.63	C ₃₆ H ₅₆ O ₁₂	679.369 9	679.369 4	-0.7	455.352 4, 425.369 5	Tenuifolin(细叶远志皂苷)*	S, W, G	9.98	5.28	-
38	29.27	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₇	837.391 4	837.390 1	-1.6	775.439 9, 661.382 9, 485.363 8, 351.046 7	Licoricesaponin G2(甘草皂苷 G2)	W, G	辅料引入	辅料引入	1.38
39	29.6	C ₄₂ H ₆₂ O ₁₆	821.396 5	821.393 5	-3.7	645.347 8, 469.342 0	Glycyrrhizic acid(甘草酸)*	W, G	辅料引入	辅料引入	1.78
40	29.85	C ₇₅ H ₁₁₂ O ₃₅	1 571.691 1	1 571.687 4	-2.4	1 317.608 6, 455.259 2	Onjisaponin B(远志皂苷 B)*	S, W, G	0.71	0.94	-
41	29.92	C ₈₂ H ₁₂₂ O ₄₁	1 761.738 9	1 761.738 6	-0.2	1 617.749 1, 1 587.732 9, 537.272 8	Onjisaponin V	S, W, G	0.16	0.94	-
42	29.94	C ₇₉ H ₁₁₈ O ₃₈	1 673.722 8	1 673.721 9	-0.5	1 643.752 7, 1 449.711 4, 1 287.640 1, 669.232 4, 537.165 2	Polygalasaponin XXXII	S, W, G	0.51	0.77	-
43	29.96	C ₈₀ H ₁₁₈ O ₃₈	1 685.722 8	1 685.718 5	-2.6	1 541.433 1, 1 317.423, 537.152 7	Onjisaponin Ng	S, W, G	1.67	0.75	-
44	30.03	C ₇₁ H ₁₀₆ O ₃₃	1 485.654 4	1 485.651 5	-2.0	1 455.479 5, 675.282 5, 455.370 3, 425.363 8	Onjisaponin E	S, W, G	0.28	0.94	-
45	30.09	C ₇₀ H ₁₀₄ O ₃₂	1 455.643 8	1 455.640 6	-2.2	1 425.687 6, 455.255 5, 425.205 9	Onjisaponin G	S, W, G	1.65	0.83	-
46	30.13	C ₈₁ H ₁₂₀ O ₄₀	1 731.728 3	1 731.724 6	-2.1	1 587.743 5, 1 557.775 0, 669.268 4, 537.198 0	Onjisaponin W	S, W, G	0.54	0.95	-
47	30.15	C ₇₆ H ₁₁₂ O ₃₆	1 599.686 1	1 599.683 2	-1.8	1 497.737 5, 1 455.744 3, 1 425.716 3, 1 155.411 2, 537.077 6, 455.273 0	Onjisaponin Gg	S, W, G	1.44	0.78	-
48	30.22	C ₆₅ H ₉₆ O ₂₈	1 323.601 5	1 323.598 9	-2.0	1 293.411 8, 675.332 3, 455.216 9, 425.219 1	Onjisaponin TH	S, W, G	2.11	0.74	-
49	30.56	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	353.103 1	353.102 1	-2.8	308.106 8, 284.124 6, 266.140 8, 125.081 6	Licoflavonol(甘草黄酮醇)或其同分异构体	W, G	辅料引入	辅料引入	0.97
50	30.75	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	337.108 1	337.107 3	-2.4	318.904 4, 282.035 5, 243.131 7, 157.028 2, 96.970 3	Gancaonin C(甘草黄酮 C)	W, G	辅料引入	辅料引入	1.53
51	31.19	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	351.087 4	351.086 9	-1.4	321.050 1, 283.106 5, 265.106 8	Licoisoflavone B(甘草异黄酮 B)或其同分异构体	W, G	辅料引入	辅料引入	1.36

注: *表示与对照品对比。来源: S 为生远志, W 为炆远志, G 为制远志。峰面积变化指数为 6 份样品峰面积的均值计算得到的结果

2.7 化合物裂解规律分析

2.7.1 远志皂苷类成分 远志皂苷类成分为五环三萜类皂苷, 其基本母核为齐墩果酸型, C-3 位被单糖(葡萄糖)取代, C-28 位被酰基取代基(通常是肉酰基或乙酰基)取代。在负离子模式下具有共同的裂解途径: (1)齐墩果皂苷元 C-23 位的羧基与 C-3 位的葡萄糖发生偶联断裂, 丢失 CO₂ 和葡萄糖生成碎片; (2)C-28 位酯键断裂产生碎片; (3)C-14 位的 CH₂OH 断裂, 脱去 CH₂O 而形成碎片。其中碎片离子 m/z 425 和 m/z 455 为远志三萜皂苷类化合物的特征碎片离子。

以细叶远志皂苷和远志皂苷 B 为例进行分析。在负离子模式下, 细叶远志皂苷产生准分子离子峰

m/z 679.369 4[M-H]⁻, C-3 位的葡萄糖与 C-23 位的羧基在偶联下发生断裂, 脱去一分子葡萄糖和 H₂O、CO₂, 得特征碎片离子 m/z 455.352 4 [M-H-Glc-H₂O-CO₂]⁻; 在此基础上, C-14 位的 CH₂OH 发生断裂, 脱去 CH₂O, 得特征碎片离子 m/z 425.369 5[M-H-Glc-H₂O-CO₂-CH₂O]⁻。远志皂苷 B 准分子离子峰 m/z 1 571.687 4[M-H]⁻, C-3 位的葡萄糖与 C-23 位的羧基在偶联下发生断裂, 得到碎片离子 m/z 1 347.608 6 [M-H-Glc-H₂O-CO₂]⁻; C-28 位酯键断裂, 得到特征碎片离子 m/z 455.259 2[M-H-Glc-H₂O-CO₂-Fuc-2Rha-Xyl-Glc-MC]⁻。具体裂解途径见图 2。

2.7.2 寡糖酯类成分 寡糖酯类化合物主要以蔗糖为基本母核, 以不同的糖苷键连接葡萄糖, 少数连

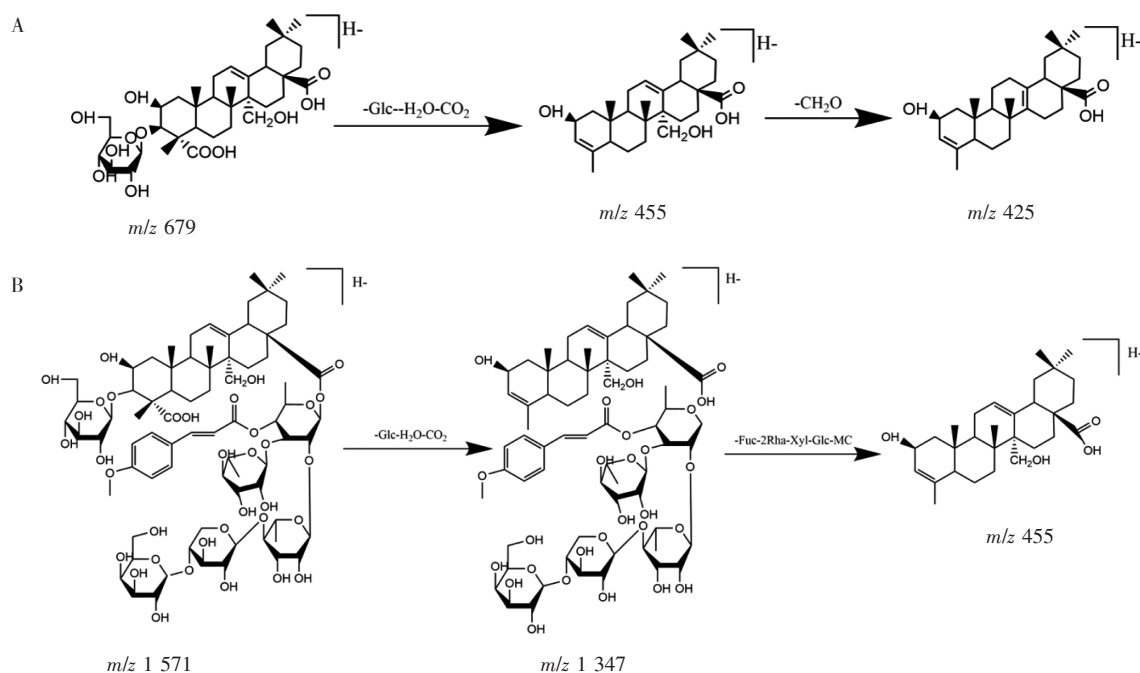


图2 细叶远志皂苷(A)与远志皂苷B(B)的裂解途径

Figure 2 The fragmentation pathways of tenuifolin(A) and onjisaponin B(B)

接鼠李糖后成为寡糖,寡糖与有机酸(乙酸、苯甲酸类和苯丙烯酸类)形成酯。远志寡糖酯类化合物主要可分为蔗糖酯和低聚糖多酯两大类,在高能量碰撞下,连接酰基(乙酰基、阿魏酰基和苯氧基肉桂酰基)残基上的酯键易发生断裂,从而产生碎片离子。

从样品中共鉴定出22种寡糖酯类化合物,以远志寡糖C和Tenuifolioside B为例作分析。远志寡糖C为蔗糖酯类化合物,在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 767.239 3[M-H]⁻,经高能量轰击,得碎片离子 m/z 529.187 4[M-H-C₁₂H₁₄O₅]⁻、367.117 0[M-H-C₁₂H₁₄O₅-C₆H₁₂O₅]⁻。Tenuifolioside B为低聚糖多酯类成分,在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 1337.397 0[M-H]⁻,丢失中性碎片 C₂H₂O,连接阿魏酰基的酯键发生断裂,得到碎片离子 m/z 1295.222 5[M-H-C₂H₂O]⁻、1161.206 2[M-H-C₁₀H₈O₃]⁻; m/z 1161.206 2再丢失 C₂H₂O、对羟基肉桂酰残基断裂,得 m/z 1119.217 5[M-H-C₁₀H₈O₃-C₂H₂O]⁻、997.201 6[M-H-C₁₀H₈O₃-C₉H₈O₃]⁻。裂解途径见图3。

2.7.3 远志呋喃酮类成分 呋喃酮基本母核由苯环与色原酮的2,3位耦合而成,属于一种特殊类型的黄酮类化合物,从样品中共鉴定出4个呋喃酮类成分。以远志呋喃酮Ⅲ为例,在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 567.134 3[M-H]⁻,经高能量轰击,糖链断裂,且

糖链内部发生交叉环裂解,分别丢失中性碎片 C₃H₆O₃和 C₄H₈O₄,得到碎片离子 m/z 435.020 3[M-H-C₃H₆O₃]⁻、345.065 2[M-H-C₃H₆O₃-C₄H₈O₄]⁻、315.053 8[M-H-C₃H₆O₃-C₄H₈O₄]⁻、272.037 9[M-H-C₃H₆O₃-C₆H₁₁O₅]⁻。裂解途径见图4-A。

2.7.4 有机酸成分 有机酸类成分经高能量碰撞下通常丢失 H₂O、CO₂、CO产生碎片离子峰。在样品中鉴定得到2个有机酸成分,分别为阿魏酸、3,4,5-三甲氧基肉桂酸。以阿魏酸为例,在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 193.050 5[M-H]⁻,丢失一分子 CH₃,得到碎片离子 m/z 178.026 2[M-H-CH₃]⁻;或丢失一分子 CO₂和 CH₃,得到碎片离子 m/z 149.057 8[M-H-CO₂]⁻、134.051 8[M-H-CO₂-CH₃]⁻。裂解途径见图4-B。

2.7.5 甘草引入的成分 在远志与制远志中鉴定出甘草苷、甘草酸等9个甘草成分。以甘草苷、甘草酸为例进行分析。甘草苷为甘草黄酮类成分,在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 417.118 8[M-H]⁻,丢失一分子葡萄糖,B环断裂,C环裂解重排,得到碎片离子 m/z 255.093 0[M-H-Glc]⁻、135.002 0[M-H-Glc-C₈H₈O]⁻。甘草酸为三萜皂苷类成分,在负离子模式下产生准分子离子峰 m/z 821.393 5[M-H]⁻,经高能量碰撞先后丢失一分子葡萄糖醛酸(GluA),分别得到碎片离子 m/z 645.347 8[M-H-GluA]⁻、469.342 0

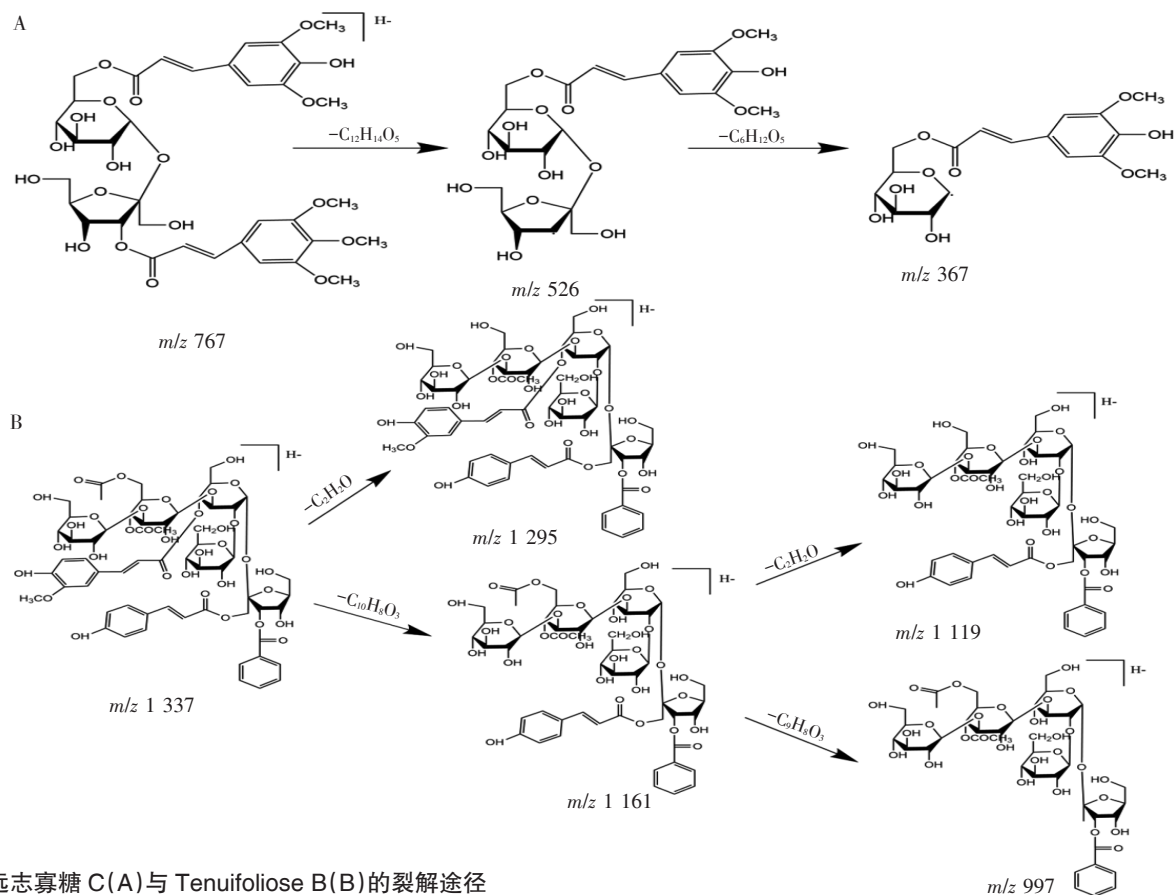


图 3 远志寡糖 C(A)与 Tenuifolioside B(B)的裂解途径

Figure 3 The fragmentation pathways of tenuifoliside C(A) and tenuifolioside B(B)

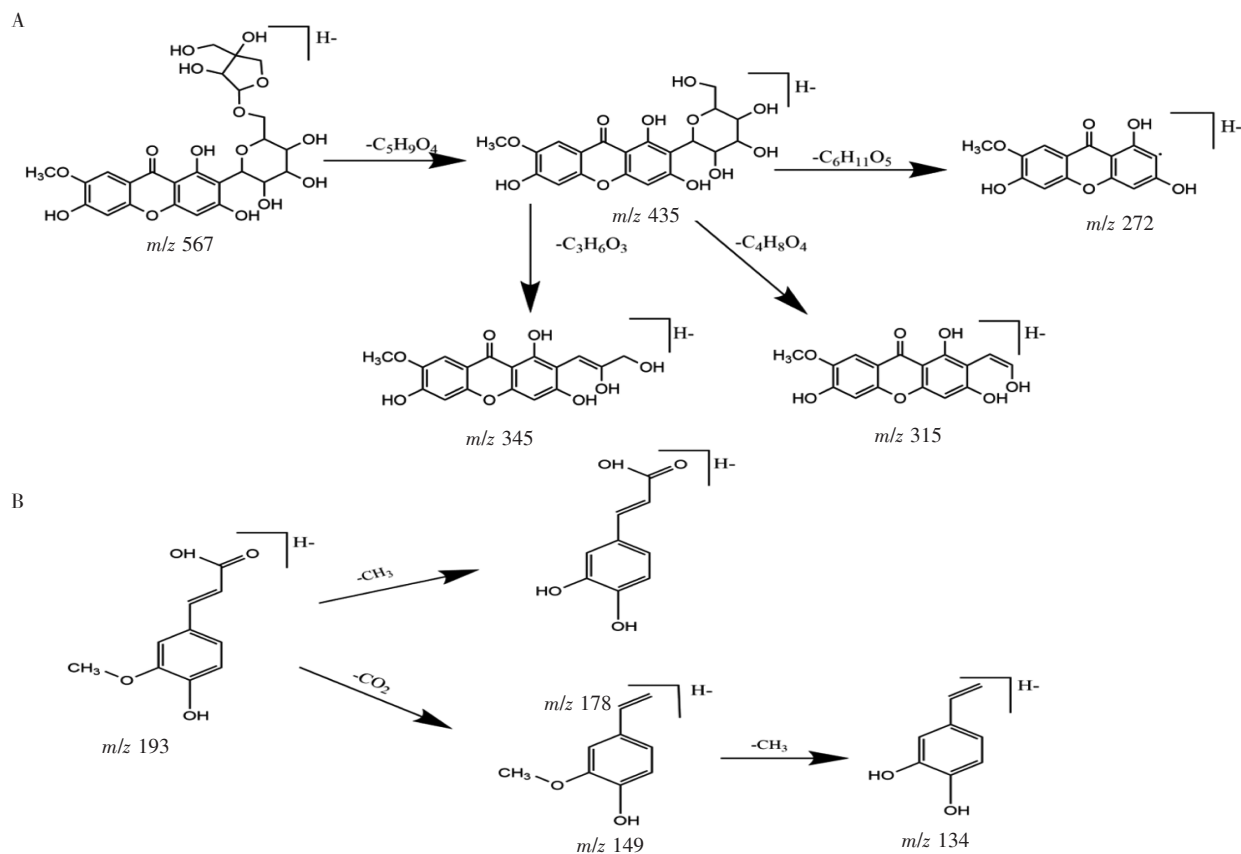


图 4 远志呋酮Ⅲ(A)与阿魏酸(B)的裂解途径

Figure 4 The fragmentation pathways of Polygalaxanthone III(A) and ferulic acid(B)

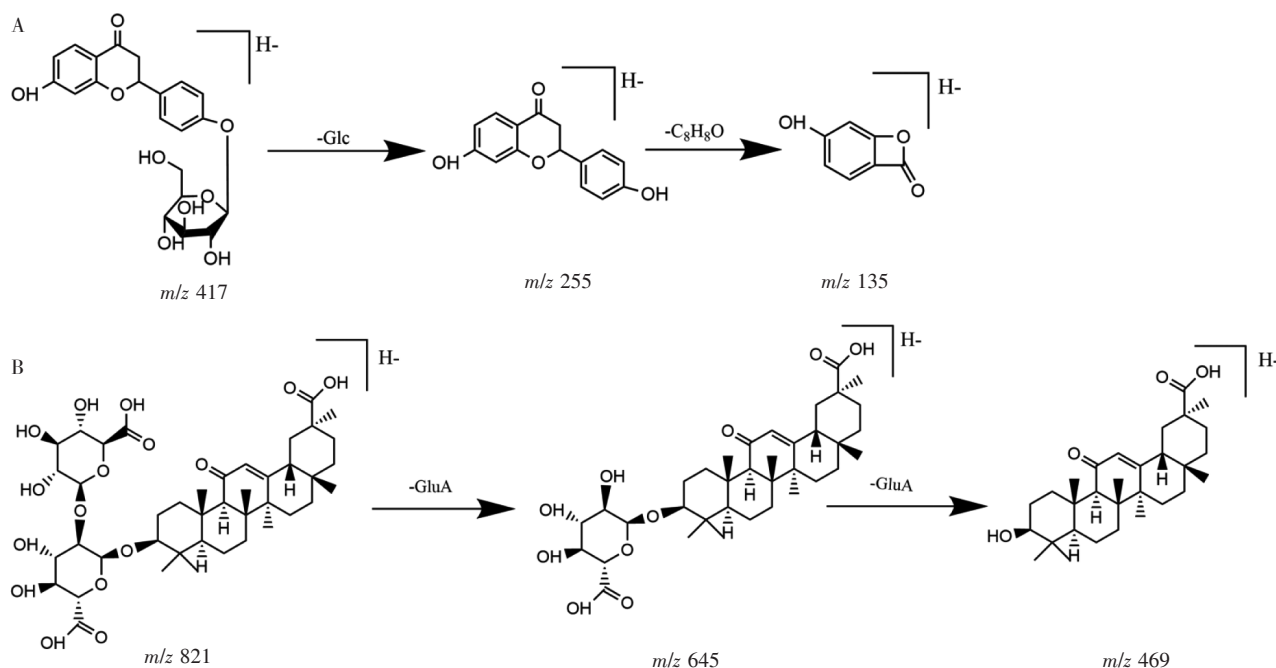


图5 甘草苷(A)与甘草酸(B)的裂解途径

Figure 5 The fragmentation pathways of liquiritin(A) and glycyrrhizic acid(B)

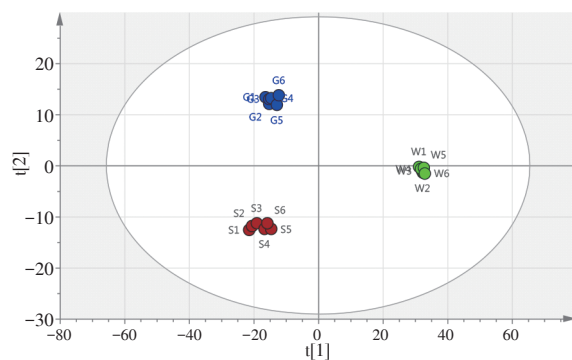
[M-H-GluA-GluA]⁻。裂解途径见图5。

2.8 远志炮制前后的化学成分含量变化 以峰面积变化指数比较远志各炮制品成分含量。峰面积变化指数为炮制品离子峰面积与对应保留时间的生品离子峰面积比值。变化指数>1表示炮制后该成分含量增加,变化指数<1表示炮制后该成分含量降低,变化指数=1表示炮制后该成分含量无变化^[13]。由于远志经煅制与甘草制后均有新增成分,为比较两种炮制品新增成分的含量变化,故新增成分的变化指数为煅远志离子峰面积/制远志离子峰面积。结果见表1。远志经煅制后,远志中的阿魏酸、7-O-Methylmangiferin、细叶远志皂苷等9种成分含量增加,而其他成分普遍降低;经甘草制后,除Sibiricaxanthone A、远志呋酮Ⅲ、Tenuifolside A、细叶远志皂苷等8种成分含量增加外,其他成分含量也普遍下降。另外,煅远志与制远志经加辅料甘草炮制后,均增加了甘草苷、甘草酸、甘草素等9个甘草成分。与制远志比较,煅远志中的部分皂苷类成分和寡糖酯、远志呋酮类成分含量下降更明显,但细叶远志皂苷、甘草素、甘草皂苷G2、甘草酸、甘草黄酮C含量增加更明显。

2.9 化学模式识别方法

2.9.1 主成分分析(PCA) 将分析所得的生远志、煅远志和制远志的保留时间、质荷比、峰面积等液质数据导入Sieve v2.1(×64)软件进行前处理,再利用

SIMCA 13.0软件进行PCA分析,PCA得分图见图6。在负离子模式下,远志生品、煅远志、制远志各自聚在同一区域,各炮制品之间可明显区分,表明远志经不同方法炮制后其化学成分具有明显变化。



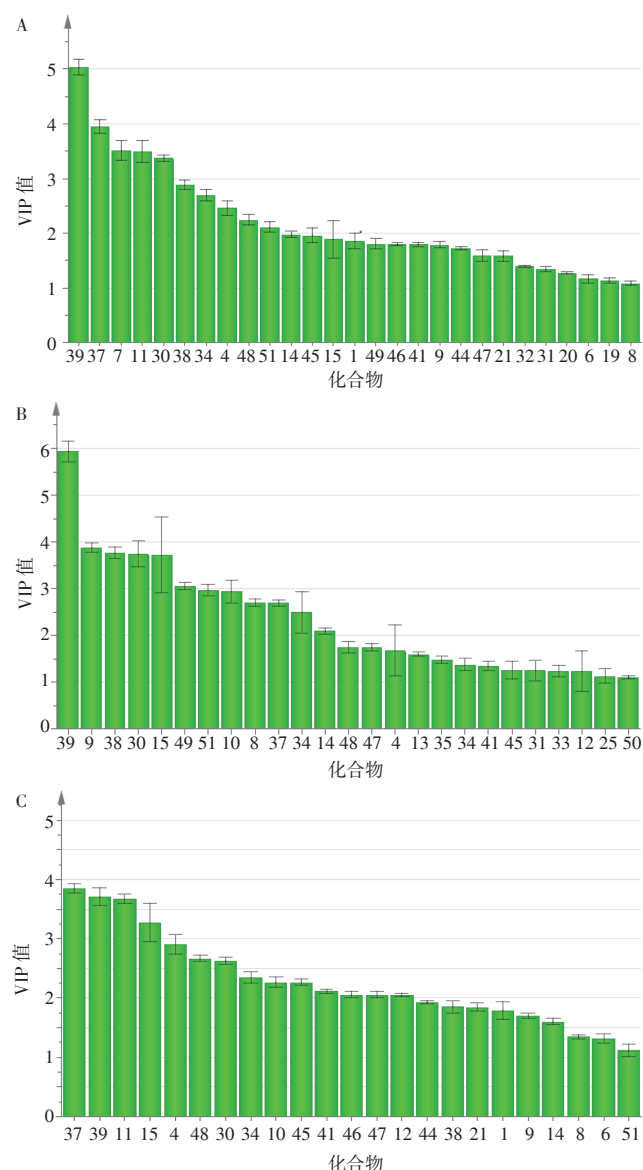
注: S1~S6 生远志; W1~W6 煅远志; G1~G6 制远志

图6 生远志与煅远志、制远志的PCA得分图

Figure 6 PCA scores of raw Polygalae radix, liquorice-simmered Polygalae radix and liquorice-boiled Polygalae radix

2.9.2 正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA) 为进一步筛选远志各炮制品间的差异成分,进行有监督的OPLS-DA分析。变量重要性(VIP)值越大表明该变量对模型越重要,故通过筛选VIP>1的变量可有效筛选炮制前后差异成分^[14]。对各样品进行两两比较,结果显示在负离子模式下,煅制前后的差异成分有27个,主要为远志皂苷类和寡糖酯类成分,其中甘草成分8个;甘草制前后的差异成分有25个,

其中甘草成分 9 个；炆远志与制远志的差异成分 23 个，其中甘草成分 6 个。结果见图 7。



注：A. 生远志与炆远志；B. 生远志与制远志；C. 炆远志与制远志

图 7 远志各炮制品 OPLS-DA 模型中差异成分的 VIP 值

Figure 7 VIP values of different components in the OPLS-DA model of Polygalae radix processed products

3 讨论

本研究运用 UPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术对远志炮制前后的化学成分进行分析，结合对照品质谱信息及相关文献，共鉴定出 51 个化合物，包括远志成分 42 个，辅料甘草成分 9 个。远志经炆制和甘草制后，增加了炮制辅料引入的成分，其所含的远志成分的种类基本一致，但各成分含量发生了明显变化。经 PCA 与 OPLS-DA 分析，筛选得细叶远志皂苷、甘草苷、甘草酸等 27 个化合物为炆制前后的差

异成分，甘草制前后的差异成分有 25 个，另外，炆远志与制远志的差异成分 23 个。

远志皂苷类、寡糖酯类与辅料成分是远志炮制前后的主要差异成分，炮制过程中同类成分间发生了不同程度的转化。对于皂苷类差异成分，炮制后其含量多呈现下降的趋势，少部分成分含量上升。研究^[15]表明，远志中部分皂苷类成分性质不稳定，在加水加热炮制过程中易发生水解，且不同皂苷成分之间易发生转化，细叶远志皂苷即为其主要水解产物之一，故推测此为细叶远志皂苷含量上升的原因。寡糖酯类成分基本呈下降趋势，该类成分性质不稳定，在加水、加热条件下易水解，其水解易生成阿魏酸、肉桂酸、芥子酸等有机酸小分子^[16]，但本研究中只检测到阿魏酸、3,4,5-三甲氧基肉桂酸，其他有机酸成分未能有效鉴定，推测是检测方法或响应值低等原因所致。与制远志相比，炆制后多数皂苷类、寡糖酯类成分含量下降更明显，但细叶远志皂苷、阿魏酸、3,4,5-三甲氧基肉桂酸等水解产物的含量增加明显，推测该差异可能是由于炆制过程中糠火慢煮，加水加热时间较制远志长引起。

远志经炮制后，化学成分在种类、含量上均发生了较明显变化，这势必也会影响到其药效。皂苷类成分是其发挥安神益智作用的主要有效成分，如细叶远志皂苷^[17]、远志皂苷 B^[18]等，同时也可能是引起载人咽喉和胃肠毒性的物质基础^[19-20]。经炆制后，细叶远志皂苷的含量增加，且明显高于制远志。部分皂苷类成分虽因水解呈降低趋势，但水解增加的细叶远志皂苷等水解物具有明显的改善认知障碍的药理作用，且水解物毒性低于原皂苷^[21]。寡糖酯类成分的水解产物阿魏酸^[22]、3,4,5-三甲氧基肉桂酸^[23]同样具有改善记忆缺陷，增强脑保护的作用，且该类小分子物质更利于肠胃吸收。甘草可降低毒性、缓和药性，其甘草酸是甘草解毒的主要有效成分；且甘草具有明显的神经保护、改善学习记忆及抗抑郁等功效^[24]，远志炆制后引入的甘草酸、甘草苷、甘草素等成分均为药效活性物质^[25-27]，且部分成分含量增加较制远志明显。

综上所述，远志经炆制后，各类成分发生一定程度的水解和转化，成分含量也发生变化，同时还引入了辅料甘草的成分，故推测远志炮制后上述成分的变化可能是其减毒增效的原因之一。此外，炮制方法不同，其成分含量变化也不同，炆远志与制远志比较，有相似也有差异。基于此，后续将以炆远志为研

研究对象, 并与制远志比较, 针对远志炮制后缓和燥性、消除麻味, 增强安神益智作用等相关药效进行研究, 进行成分-药效关联分析, 从而阐释其减毒增效机制, 为阐明远志炮制科学的内涵提供数据支撑。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 163-164.
- [2] 武云. 生远志与蜜远志的毒理及其对胃肠运动影响的实验研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2005.
- [3] 高慧, 黄雯, 熊之琦, 等. 远志的炮制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(23): 209-218.
- [4] 江西省食品药品监督管理局. 江西省中药饮片炮制规范[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2008: 81.
- [5] LING Y, LI Z X, CHEN M C, et al. Analysis and detection of the chemical constituents of Radix Polygalae and their metabolites in rats after oral administration by ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2013, 85(11): 1-13.
- [6] 王丹丹, 闫艳, 张福生, 等. 远志药材 UPLC 指纹图谱及多指标性成分测定方法的建立[J]. 中草药, 2018, 49(5): 1150-1159.
- [7] 薛英, 李晓伟, 李震宇, 等. 采用 UPLC/Q-TOF MS 与 NMR 代谢组学技术研究生长年限对远志药材质量的影响[J]. 药学学报, 2015, 50(3): 340-347.
- [8] JIANG Y, ZHANG W, TU P, et al. Xanthone glycosides from Polygala tenuifolia and their conformational analyses[J]. Nat Prod, 2005, 68(6): 875-879.
- [9] 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.
- [10] 梁键谋. 远志总皂苷及 3,6'-二芥子酰基蔗糖酯在大鼠体内代谢的初步研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2009.
- [11] LIU J Y, YANG X D, HE J M, et al. Structure analysis of triterpene saponins in Polygala tenuifolia by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom, 2007, 42(7): 861-873.
- [12] 王青, 苗文娟, 向诚, 等. 乌拉尔甘草中黄酮类化学成分的研究[J]. 中草药, 2014, 45(1): 31-36.
- [13] 张栋健, 李薇, 何庆文. UHPLC-Q-TOF-MS 分析枳壳炮制前后成分变化[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 2070-2080.
- [14] 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.
- [15] 曲丛丛, 吴鹏, 张学兰, 等. HPLC-TOF/MS 法研究远志炮制过程中寡糖酯和皂苷类成分的转化机制[J]. 中药材, 2018, 41(3): 576-580.
- [16] 徐保鑫, 刁家藏, 张学兰, 等. 远志炮制过程中 6 种寡糖酯类成分转化机制[J]. 中成药, 2018, 40(8): 1790-1794.
- [17] PENG F, LU L Y, WEI F, et al. The onjisaponin B metabolite tenuifolin ameliorates dopaminergic neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease[J]. Neuroreport, 2020, 13(6): 456-465.
- [18] LI G W, YU J M, ZHANG L, et al. Onjisaponin B prevents cognitive impairment in a rat model of D-galactose-induced aging[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2018, 99(1): 113-120.
- [19] 田徽. 生远志的胃肠毒性物质基础及蜜炙减毒部分机理研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2006.
- [20] WEN L, XIA N, TANG P P. The gastrointestinal irritation of Polygala saponins and its potential mechanism in vitro and in vivo[J]. BioMed Research International, 2015, doi: 10.1155/2015/918048.
- [21] XU S P, YANG Y Y, XUE D, et al. Cognitive-enhancing effects of polygalasaponin hydrolysate in A β 25-35 induced amnesic mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2011, doi: 10.1155/2011/839720.
- [22] MORI T, KOYAMA N, TAN J, et al. Combination therapy with octyl gallate and ferulic acid improves cognition and neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Biol Chem, 2017, 292(27): 11310-11325.
- [23] LEE C, HAN J, HONG J T, et al. 3,4,5-Trimethoxycinnamic acid(TMCA), one of the constituents of Polygalae radix enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABA A ergic systems in mice[J]. Archives of Pharmacol Research, 2013, 36(10): 1244-1251.
- [24] 姜懿纳, 罗林明, 陈乃宏. 甘草与神经退行性疾病的相关研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(3): 455-460.
- [25] 刘丹平. 甘草酸的神经保护作用的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [26] CHEM Z A, WANG J L, LIU R T, et al. Liquiritin potentiate neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells[J]. Cytotechnology, 2009, 60: 125-132.
- [27] ZHAN C, YANG J. Protective effects of isoliquiritigenin in transient middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats[J]. Pharmacol Res, 2006, 53(3): 303-309.

(编辑: 梁进权)