

## 基于UPLC-MS/MS技术和代谢组学方法的苦杏仁“临方捣碎”的潜在质量标志物筛选

程 遥<sup>1#</sup>, 毕玥琳<sup>2#</sup>, 冯 欣<sup>2</sup>, 王佳琪<sup>2</sup>, 徐浩然<sup>2</sup>, 张童画<sup>2</sup>, 于庚原<sup>2</sup>,  
张晨宁<sup>2</sup>, 王景红<sup>1\*</sup>, 孙毅坤<sup>2\*</sup>

(1. 中国中医科学院望京医院药学部, 北京 100102; 2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488)

**摘要:** 苦杏仁在储藏过程中容易出现走油变质等情况, 故苦杏仁在临床使用时常要求“临方捣碎”。为进一步确认苦杏仁“临方捣碎”的科学理论价值, 确定苦杏仁的最佳储存条件, 本研究采用UPLC-MS/MS技术对不同储存状态(捣碎和未捣碎)、储存时间(0、2和4周)和储存温度(25 °C和4 °C)下的苦杏仁进行化学成分比较研究。经文献比对、课题组前期工作积累及Compound Discoverer软件检索, 共从苦杏仁提取液中鉴定出58种物质。同时, 发现不同储存状态、储存时间和储存温度的苦杏仁化学成分含量具有明显的统计学差异。研究结果表明, 未捣碎储存相较于捣碎储存的苦杏仁化学成分组成稳定; 4 °C储存的相较于25 °C储存的苦杏仁化学组成更稳定; 储存时间越短, 其化学成分变化越少。苦杏仁的主要药效成分苦杏仁苷在以上三种储存条件下均表现出统计学差异, 可作为苦杏仁“临方捣碎”的潜在质量标志物。

**关键词:** 苦杏仁; 临方捣碎; UPLC-MS/MS; 差异化合物; 代谢组学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)10-3195-08

## Identification of potential Q-markers of Semen Armeniacae Amarum based on UPLC-MS/MS and metabonomics

CHENG Yao<sup>1#</sup>, BI Yue-lin<sup>2#</sup>, FENG Xin<sup>2</sup>, WANG Jia-qi<sup>2</sup>, XU Hao-ran<sup>2</sup>, ZHANG Tong-hua<sup>2</sup>,  
YU Geng-yuan<sup>2</sup>, ZHANG Chen-ning<sup>2</sup>, WANG Jing-hong<sup>1\*</sup>, SUN Yi-kun<sup>2\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, Wangjing Hospital, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102, China;  
2. College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 102488, China)

**Abstract:** Bitter almonds (Semen Armeniacae Amarum) are prone to oil deterioration during storage, so they often require mashing prior to clinical use. To confirm the medical value of bitter almonds "being mashed when used" and to determine the optimal storage conditions for bitter almonds, UPLC-MS/MS was used to perform a comparative study of the chemical composition of bitter almonds in different storage states (mashed and unmashed), storage times (0, 2 and 4 weeks), and storage temperatures (25 °C and 4 °C). A total of 58 substances were identified in bitter almond extracts through literature review, this group's previous work, and a Compound Discoverer software search. Statistically significant differences were found in the chemical composition and content of bitter almonds in different storage states, storage times, and storage temperatures. The results show that the chemical composition of bitter almonds stored unmashed was more stable than that of bitter almonds stored mashed; the chemical composition

收稿日期: 2022-05-12; 修回日期: 2022-08-02.

基金项目: 中国西藏自治区科技攻关项目 (XZ201801-GA-16).

<sup>#</sup>共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 13801091033, E-mail: wangjinghong2002@126.com;

Tel: 15010706091, E-mail: sunyk@bucm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0581

tion of bitter almonds stored at 4 °C was more stable than that of bitter almonds stored at 25 °C; and the shorter the storage time, the less the chemical composition changed. Amygdalin, the main medicinal component of bitter almonds, showed statistically significant differences in content under the above three storage conditions, which can be used as a potential quality marker for bitter almonds.

**Key words:** Semen Armeniaca Amarum; mashed when used; UPLC-MS/MS; differential compound; metabolomics

苦杏仁 (Semen Armeniaca Amarum) 为蔷薇科 (Rosaceae) 植物山杏 (*Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim.)、西伯利亚杏 (*Prunus sibirica* L.)、东北杏 (*Prunus mandshurica* Koehne.) 或杏 (*Prunus armeniaca* L.) 的干燥成熟种子<sup>[1]</sup>, 主要产于我国内蒙古、吉林、辽宁等地。苦杏仁具有降气、镇咳平喘和润肠通便的作用, 临床上常与麻黄结为药对, 用于治疗小儿哮喘及流行性感胃等疾病<sup>[2]</sup>。苦杏仁中含有大量油脂<sup>[3]</sup>, 在储藏过程中极易走油变质, 导致苦杏仁苷和苦杏仁油含量降低, 影响其临床疗效<sup>[4]</sup>。

2020版《中华人民共和国药典》规定苦杏仁在临床调剂应用时需“临方捣碎”。“临方捣碎”指中药饮片在调配制剂之前需进行捣碎处理, 使中药饮片中的有效成分溶出度更高。这种操作方法便于中药饮片的储存运输, 能在最大程度上保存药性<sup>[5]</sup>。然而, 目前对苦杏仁的研究主要集中于其药理作用及其成分鉴定上, 对其“临方捣碎”的科学研究极少。故本研究模拟临床应用中苦杏仁的储存情况, 收集不同储存状态、储存时间和储存温度下的样品, 并采用超高效液相色谱-四极杆-静电轨道场离子阱质谱仪 (UPLC-Q-exactive-orbitrap-MS) 及植物代谢组学方法筛选其差异化合物, 为苦杏仁的最佳保存方式及最佳炮制方式提供科学依据。

## 材料与方法

**仪器** Thermo Scientific Q Exactive 质谱仪、Xcalibur 工作站、Vanquish Duo UHPLC System for Dual LC Workflows 和 Pico 17 高速离心机 (美国 Thermo Scientific 公司) 液相系统; CPA225D 电子天平 (德国 Sartorius 公司); KQ5200DA 超声波清洗机 (中国昆山舒美公司); 恒温恒湿箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

**药物及主要试剂** 质谱级乙腈 (中国赛默飞世尔科技有限公司, 批号: 151902)、质谱级甲酸 (美国 ROE 公司, 批号: 214911); 色谱用水为屈臣氏饮用水 (批号: 20211222); 苦杏仁 (北京四方中药饮片有限公司, 批号: 20072304)。

**样品制备** 需捣碎储存的苦杏仁使用研钵进行手动捣碎, 并过 4 号筛, 放置于表 1 所示条件湿度为 60%

的恒温恒湿箱中至相应周数时取出并制备样品溶液; 临方捣碎的苦杏仁放置于以上相同条件的恒温恒湿箱中至相应周数时取出, 并在制备样品溶液前进行相同的捣碎处理。分别取不同储存条件下的样品精密称定 0.25 g 置于锥形瓶中, 加入 75% 甲醇 10 mL, 超声提取 30 min, 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 取上清液, 氮气干燥, 用 75% 甲醇 5 mL 复溶, 稀释 10 倍后, 13 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液即得样品溶液。

**Table 1** The storage conditions of Semen Armeniaca Amarum

Storage duration/W	Storage temperature/°C	Storage state
0	—	—
2	25	Mashed
2	4	Mashed
2	25	Unmashed
2	4	Unmashed
4	25	Mashed
4	4	Mashed
4	25	Unmashed
4	4	Unmashed

**色谱条件** Waters ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, Milford, 美国), 柱温 40 °C, 进样量 5 μL, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和乙腈 (B)。洗脱程序: 0~1 min, 5% B; 1~12 min, 5%~98% B; 12~13 min, 98% B; 13~14.5 min, 98%~5% B; 14.5~15 min, 5% B。

**质谱条件** 离子源为电喷雾离子化源 (ESI); 正负离子交替扫描; 扫描模式为: 全扫描/数据依赖的二级扫描 (Full scan/ddMS<sup>2</sup>), 扫描范围为 100~1 300 Da, 毛细管温度为 350 °C。正模式下的喷雾电压为 3 800 V, 负模式下的喷雾电压为 3 200 V, 鞘气为 35 arb, 辅助气为 15 arb, MS<sup>2</sup> 采用低、中、高的 3 种碰撞能量对母离子进行二级碎裂, 分别为 30、50 和 70 V。一级质谱分辨率为 70 000 FWHM (full width at half maximum), 二级质谱分辨率为 17 500 FWHM。

**数据处理** 通过查阅相关文献<sup>[6-12]</sup>、检索 Compound Discoverer 3.1.1.12 软件以及课题组前期工作积累构建苦杏仁化合物数据库, 并通过对比保留时间、母离子与碎片离子相对分子质量进行色谱峰的定性鉴别。使用

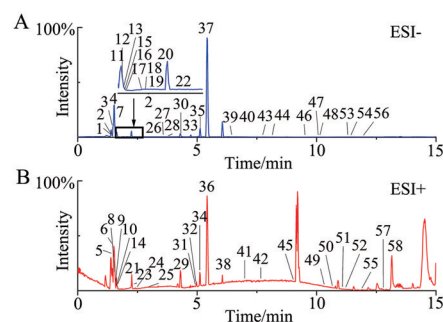
AnalysisBaseFileConverter 软件对所得数据进行格式转化, 利用MSDIAL 软件对数据进行归一化处理, 包括选择、去卷积和对齐, 主要涉及保留时间、相对分子质量和峰强度等。利用SIMCA 14.1 软件对数据进行主成分分析 (PCA) 和正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA), 并通过 200 permutation 检验评估 OPLS-DA 模型拟合的准确性。以 OPLS-DA 分析所得到的投影中变量重要性 (variable importance in projection, VIP)、进行独立样本 *t* 检验所得的 *P* 值以及差异倍数 (fold change, FC) 为判别条件筛选差异代谢物, 即为 VIP 值 > 1, *P* < 0.05, FC < 0.5 或 FC > 2。

## 结果

### 1 苦杏仁的成分鉴定

将所有样品溶液按以上方法进行 UPLC-MS/MS 分析, 得到正负离子模式下的基峰色谱图见图 1。将得到的准分子离子峰的保留时间、母离子及碎片离子

的相对分析质量等相关信息与本研究所构建的数据库进行比对, 以鉴定苦杏仁中的化合物。共鉴定出 58 个化合物, 其中糖苷类 9 个、有机酸类 8 个、氨基酸类 8 个、杂环类 8 个、黄酮类 5 个、脂肪酸类 4 个及其他种类化合物 16 个, 化合物信息见表 2。



**Figure 1** The base peak intensity (BPI) chromatographic peaks of Semen Armeniacae Amarum in negative mode (A) and positive mode (B)

**Table 2** Identification of the chromatographic peaks of Semen Armeniacae Amarum mass spectrum

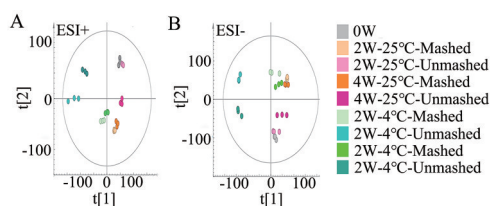
No.	<i>t<sub>r</sub></i> / min	Mode	Measured value	Theoretical value	ppm	MS/MS	Formula	Identification
1	1.43	[M-H] <sup>-</sup>	131.046 1	131.046 2	-0.76	114.019 6, 95.025 0, 88.040 3	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Asparagine
2	1.44	[M-H] <sup>-</sup>	132.030 1	132.030 2	-0.76	115.003 6, 114.019 6, 88.040 3, 71.013 8	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	Aspartic acid
3	1.44	[M-H] <sup>-</sup>	146.045 8	146.045 9	-0.55	128.035 2, 102.056 0	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	Glutamic acid
4	1.47	[M-H] <sup>-</sup>	195.050 9	195.051 0	-0.51	177.040 5, 129.019 3, 99.008 7	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Gluconic acid
5	1.49	[M+H] <sup>+</sup>	127.039 0	127.038 9	0.79	109.028 4, 99.044 0, 97.028 4	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde
6	1.50	[M+H] <sup>+</sup>	116.070 6	116.070 6	0.00	98.984 1, 70.065 2	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	D-Proline
7	1.56	[M-H] <sup>-</sup>	191.056 1	191.056 1	0.00	173.045 3, 127.040 0, 85.029 4	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Quinic acid
8	1.57	[M+H] <sup>+</sup>	112.050 5	112.050 5	0.00	95.024 0, 84.080 7, 69.044 8	C <sub>4</sub> H <sub>5</sub> N <sub>3</sub> O	Cytosine
9	1.57	[M+H] <sup>+</sup>	166.086 2	166.086 3	-0.30	120.081 0, 103.054 6, 91.054 5	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Phenylalanine
10	1.58	[M+H] <sup>+</sup>	244.092 7	244.092 8	-0.41	227.067 2, 112.050 5	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	Cytarabine
11	1.60	[M-H] <sup>-</sup>	341.108 2	341.108 9	-2.05	179.055 5, 119.034 9, 101.024 3, 89.024 3	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Trehalose
12	1.64	[M-H] <sup>-</sup>	128.035 2	128.035 3	-0.78	82.029 7	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>3</sub>	4-Oxoproline
13	1.64	[M-H] <sup>-</sup>	133.014 1	133.014 2	-0.75	115.003 5, 89.024 4, 71.013 8	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Malic acid
14	1.64	[M+H] <sup>+</sup>	130.086 3	130.086 2	0.77	84.080 7	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	Pipecolic acid
15	1.65	[M-H] <sup>-</sup>	115.003 4	115.003 7	-2.61	71.013 8	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	Fumaric acid
16	1.65	[M-H] <sup>-</sup>	155.009 5	155.009 8	-1.94	111.019 9	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Orotic acid
17	1.90	[M-H] <sup>-</sup>	312.109 6	312.108 9	2.34	161.044 8, 150.055 2, 113.023 4, 71.012 6	C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>7</sub>	Mandelic acid amide-β-glucopyranoside
18	1.95	[M-H] <sup>-</sup>	474.163 5	474.161 7	3.80	263.078 6, 245.068 0, 221.066 8, 179.055 7, 161.044 9, 150.055 2	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>12</sub>	Mandelic acid amide-β-gentiobioside
19	2.02	[M-H] <sup>-</sup>	474.161 9	474.161 0	1.90	150.055 2	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>12</sub>	Amygdalin amide
20	2.24	[M-H] <sup>-</sup>	111.008 7	111.008 8	-0.90	83.013 9, 67.018 9	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	2-Furoic acid
21	2.25	[M+H] <sup>+</sup>	268.103 5	268.104 0	-1.86	136.061 8	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	Adenosine

Continued

No.	$t_R$ /min	Mode	Measured value	Theoretical value	ppm	MS/MS	Formula	Identification
22	2.27	[M-H] <sup>-</sup>	191.019 6	191.019 7	-0.52	173.019 6, 147.029 6, 129.019 3	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Citric acid
23	2.28	[M+H] <sup>+</sup>	124.039 4	124.039 3	0.81	97.007 5, 80.049 4	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Nicotinic acid
24	2.42	[M+H] <sup>+</sup>	132.101 8	132.101 9	-0.76	86.096 4, 69.069 9	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	L-Isoleucine
25	2.88	[M+H] <sup>+</sup>	123.055 4	123.055 2	1.63	106.073 3, 96.044 3, 80.049 5	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	Nicotinamide
26	3.08	[M-H] <sup>-</sup>	475.145 5	475.145 7	-0.44	431.154 1, 161.044 8, 113.022 4, 101.023 3, 89.023 2, 71.012 6	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>13</sub>	Mandelic acid-β-gentiobioside
27	3.58	[M-H] <sup>-</sup>	431.156 3	431.155 9	0.97	269.102 9, 161.044 6, 113.022 3, 89.023 2, 71.012 6, 59.012 6	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>11</sub>	Benzyl-β-gentiobioside
28	3.69	[M-H] <sup>-</sup>	151.039 3	151.040 1	-5.03	107.049 1, 59.012 7	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Mandelic acid
29	4.21	[M+H] <sup>+</sup>	134.060 2	134.060 0	1.49	106.065 1, 79.054 2	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NO	Oxindole
30	4.32	[M-H] <sup>-</sup>	456.151 6	456.151 1	1.10	174.956 0, 161.044 9	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>11</sub>	Neomamygdalin
31	4.93	[M+H] <sup>+</sup>	188.070 7	188.070 6	0.53	170.060 0, 142.065 1, 118.065 1	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Indoleacrylic acid
32	4.95	[M+H] <sup>+</sup>	146.060 1	146.060 0	0.68	118.065 1	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> NO	4-Indolecarbaldehyde
33	4.98	[M-H] <sup>-</sup>	203.082 5	203.082 6	-0.49	186.055 6, 159.092 3, 142.066 1, 116.050 5	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Tryptophan
34	5.11	[M+H] <sup>+</sup>	433.221 3	433.222 1	-1.85	384.190 7, 369.168 4	C <sub>24</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	Schisandrin
35	5.26	[M-H] <sup>-</sup>	353.088 1	353.087 8	0.85	191.0056 1, 147.166 4	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Chlorogenic acid
36	5.42	[M+H] <sup>+</sup>	296.112 2	296.112 8	-2.03	145.049 6, 134.060 0, 116.049 4	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>6</sub>	Prunasin
37	5.43	[M-H] <sup>-</sup>	456.151 6	456.151 1	1.02	221.066 2, 203.055 8, 179.055 4, 161.044 8	C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>11</sub>	Amygdalin
38	5.94	[M+H] <sup>+</sup>	173.107 3	173.107 3	0.00	172.995 2, 171.993 0	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub>	3,5-Dimethyl-1-phenylpyrazole
39	6.46	[M-H] <sup>-</sup>	173.081 9	173.081 9	0.00	155.071 0, 111.081 5	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	Suberic acid
40	6.98	[M-H] <sup>-</sup>	221.104 4	221.104 4	0.00	165.041 6, 164.034 0	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	3-Isobutyl-1-methylxanthine
41	6.98	[M+H] <sup>+</sup>	356.185 3	356.185 6	-0.84	340.152 2, 277.047 6, 192.101 8, 165.090 9	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	Tetrahydropalmitine
42	7.65	[M+H] <sup>+</sup>	336.122 5	336.123 0	-1.49	320.091 0, 306.075 4, 278.081 5	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub>	Berberine
43	7.72	[M-H] <sup>-</sup>	253.050 9	253.050 6	1.19	224.048 5, 209.059 8	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Daidzein
44	8.13	[M-H] <sup>-</sup>	138.019 6	138.019 7	-0.72	108.021 6	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub>	4-Nitrophenol
45	9.04	[M+H] <sup>+</sup>	187.038 8	187.039 0	-1.07	143.049 2, 131.049 0, 151.054 1, 88.021 5	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Psoralen
46	9.52	[M-H] <sup>-</sup>	221.081 8	221.081 9	-0.45	177.092 3, 121.029 5	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	Monobutylphthalate
47	10.07	[M-H] <sup>-</sup>	321.113 1	321.113 2	-0.31	277.050 8, 265.050 6, 252.024 7	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	Neobavaisoflavone
48	10.11	[M-H] <sup>-</sup>	295.228 1	295.227 9	0.68	277.217 7, 181.145 8	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	Hydroxy-octadecatrienoic acid
49	10.34	[M+H] <sup>+</sup>	473.144 0	473.144 2	-0.42	193.049 4, 149.023 5	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	1,6-bis- <i>O</i> -[( <i>2E</i> )-3-(4-Hydroxyphenyl)-2-Propenoyl]- <i>B-D</i> -Glucopyranose
50	10.67	[M+H] <sup>+</sup>	295.226 9	295.226 8	0.34	277.214 7	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	( <i>9Z</i> , <i>11E</i> )-13-Oxo-octadeca-9,11-dienoic acid
51	11.07	[M+H] <sup>+</sup>	415.211 5	415.211 5	0.00	400.188 8, 119.085 5	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol
52	11.18	[M+H] <sup>+</sup>	183.080 4	183.080 4	0.00	105.033 5	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> O	Benzophenone
53	11.30	[M-H] <sup>-</sup>	269.045 4	269.045 5	-0.37	241.050 8, 225.055 4, 197.060 8	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Genistein
54	11.40	[M-H] <sup>-</sup>	255.232 6	255.232 9	-1.18	57.309 0	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Palmitic acid
55	11.86	[M+H] <sup>+</sup>	339.158 2	339.159 1	-2.65	271.095 5, 219.101 3, 147.044 0, 119.049 0	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Bavachinin
56	11.91	[M-H] <sup>-</sup>	389.176 5	389.175 8	1.80	277.050 5, 265.050 6, 252.043 0	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	3-{3-[( <i>2E</i> )-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-Yl]-4-hydroxyphenyl}-7-hydroxy-4 <i>H</i> -chromen-4-one
57	12.79	[M+H] <sup>+</sup>	262.143 4	262.143 8	-1.53	149.344 1, 121.058 7	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	MDPBP
58	12.96	[M+H] <sup>+</sup>	219.174 2	219.174 3	-0.46	177.127 0, 163.111 6, 123.080 5, 121.101 0	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O	3,5-di- <i>tert</i> -Butylbenzaldehyde

## 2 主成分分析 (PCA)

无监督的主成分分析可以通过对数据的降维处理, 展示组内的重复性与组间的差异, 并发现离群点。本研究利用 AnalysisBaseFileConverter、MSDIAL 软件对 UPLC-MS/MS 技术采集的不同储存条件下苦杏仁保留时间、准分子离子峰强度等信息进行峰校正、峰对齐、归一化处理, 通过 SIMCA 14.1 软件对数据进行无监督模式的主成分分析, 判别不同储存条件下苦杏仁的化学成分差别。如图 2 所示, 所有组分均存在于置信区间内, 同一组分样本聚集, 不同组分样本各自分离, 并未发现异常值。



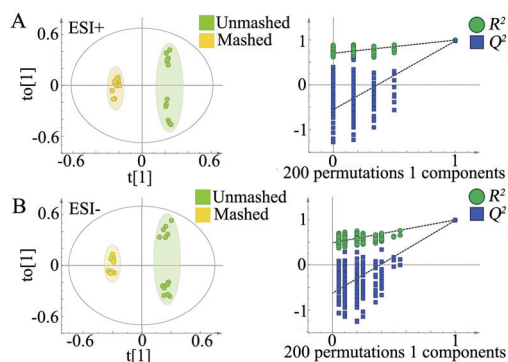
**Figure 2** PCA scores of Semen Armeniacae Amarum under different storage conditions in positive (A) and negative (B) ion modes

## 3 正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)

为更清晰地表明不同因素对苦杏仁中非挥发性成分的影响, 本研究利用有监督的 OPLS-DA 分析来进行差异化合物的筛选。OPLS-DA 分析经常被应用于代谢组学的分析, 以进行最大化组间差异并寻找其差异代谢物。本研究通过 SIMCA 14.1 软件针对三种储存条件下的苦杏仁化学成分进行了 OPLS-DA 分析, 分别进行了差异化合物的筛选, 通过构建模型所得到的  $R^2X$ 、 $R^2Y$  通常表示其对原数据矩阵的解释能力, 而  $Q^2$  则用来评价模型的预测能力,  $R^2X$ 、 $R^2Y$  和  $Q^2$  越接近 1, 则表示 OPLS-DA 模型拟合数据效果越好。

**3.1 不同储存状态对苦杏仁的影响** 将数据结果分为“捣碎储存”及“临方捣碎”两组, 建立其 OPLS-DA 模型, 如图 3。本次建模中正离子模式下  $R^2X = 0.612$ ,  $R^2Y = 0.995$ ,  $Q^2 = 0.974$ , 负离子模式下  $R^2X = 0.723$ ,  $R^2Y = 0.991$ ,  $Q^2 = 0.980$ , 其数值均大于 0.5, 说明本模型建立可靠, 可用于差异化合物的筛选。设置  $n = 200$ , 进行置换检验, 其  $R^2$ 、 $Q^2$  均随置换保留度的下降而下降, 说明模型不存在过拟合的问题, 模型稳定性较高。继而对差异化合物进行筛选, 最终筛选出 234 个差异离子, 其中通过鉴定差异离子所得的差异化合物相关数据见表 3。

**3.2 不同温度下储存对苦杏仁的影响** 以储存于 25 °C 和 4 °C 环境中为分组条件进行 OPLS-DA 分析, 其

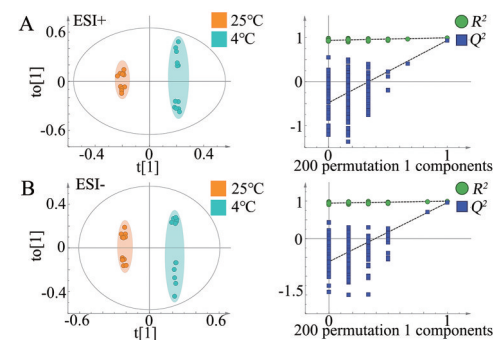


**Figure 3** OPLS-DA score chart and its replacement test chart of Semen Armeniacae Amarum with different mashing states in positive (A) and negative (B) ion modes

**Table 3** Different compounds can be identified by Semen Armeniacae Amarum with different mashing states. VIP: Variable importance in projection; FC: Fold change

Compound	VIP value	P value	FC value
Fumaric acid	1.03	3.61E-13	3.34
Asparagine	1.67	4.74E-08	2.13
Indoleacrylic acid	1.00	7.66E-08	2.10
3,5-di-tert-Butylbenzaldehyde	4.03	0.006 295	11.72
Amygdalin	2.31	0.010 183	7.16
Nicotinic acid	3.02	0.012 177	2.10
MDPBP	1.11	0.021 144	4.20
Gluconic acid	1.94	0.025 285	3.18
Glutamic acid	2.36	0.029 055	2.86
Palmitic acid	1.83	0.041 540	0.28
Nicotinamide	1.75	0.049 483	0.43

正负离子模式下所得 OPLS-DA 得分图见图 4。经 OPLS-DA 模型建立, 正离子模式下所得  $R^2X = 0.731$ ,  $R^2Y = 0.996$ ,  $Q^2 = 0.937$ , 负离子模式下所得  $R^2X = 0.872$ ,  $R^2Y = 0.997$ ,  $Q^2 = 0.960$ , 说明模型建立可靠。进行 200 permutation 检验, 其结果如图 4 所示, 右侧  $R^2$  和  $Q^2$  高于左侧的值, 且  $Q^2$  回归线与纵轴交点为负值, 可见模型不存在过拟合现象, 即进行筛选差异化合物, 最终所得差异离子共 503 个, 其中可鉴定的共 13 种, 见表 4。



**Figure 4** OPLS-DA score chart and its replacement test chart of Semen Armeniacae Amarum stored at different temperature in positive (A) and negative (B) ion modes

**Table 4** Different compounds can be identified by Semen Armeniacae Amarum with different temperature

Compound	VIP value	P value	FC value
Nicotinamide	4.12	2.08E-08	0.28
Cytarabine	1.26	3.30E-08	0.42
Tryptophan	1.36	9.03E-08	0.42
Malic acid	2.31	6.87E-07	0.41
Fumaric acid	1.53	7.68E-07	0.40
Amygdalin	1.45	2.67E-06	0.43
1,6-bis- <i>O</i> -[(2 <i>E</i> )-3-(4-hydroxy-phenyl)-2-propenoyl]- $\beta$ - <i>D</i> -Glucopyranose	1.20	3.85E-06	0.41
Glutamic acid	1.50	1.17E-05	0.28
Gluconic acid	2.13	0.000 101	0.10
Prunasin	1.27	0.000 753	0.15
Adenosine	1.69	0.010 515	5.65
Proline	2.64	0.012 215	6.48
Bavachinin	1.21	0.028 265	5.94

**3.3 储存不同时长对苦杏仁的影响** 将数据依据储存周数分组并分别进行 OPLS-DA 分析, 所得结果见图 5。经 OPLS-DA 分析, 正负离子模式下所得的  $R^2X$ 、 $R^2Y$  及  $Q^2$  值均大于 0.5, 说明模型建立良好, 可以进行差异代谢物的分析及筛选。以迭代循环 200 次为前提进行置换检验, 如图 5 所示模型中不存在过拟合现象, 模型具

有良好的稳定性。通过筛选差异化合物, 最终于 0 周与 2 周数据中筛选出 91 个差异离子, 于 2 周与 4 周数据中筛选出 26 个差异离子, 其中可鉴定的共 13 种, 见表 5 所示。

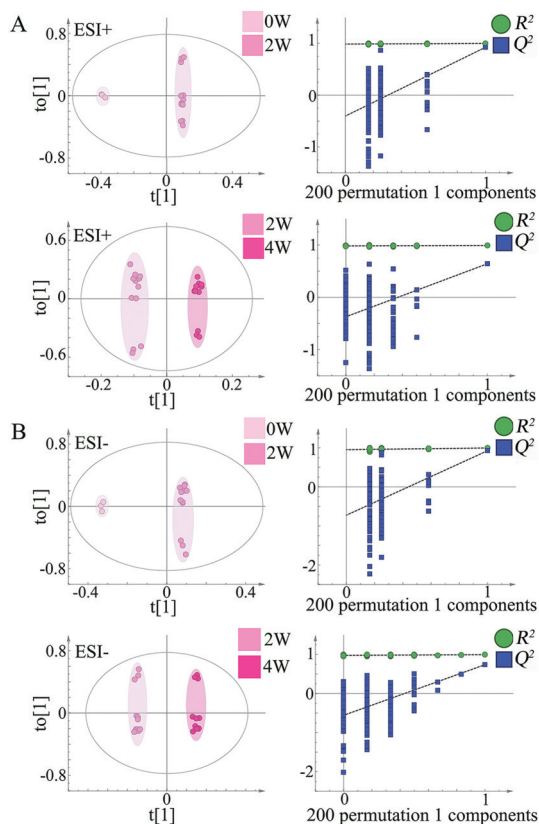
**Table 5** Different compounds can be identified by Semen Armeniacae Amarum with different storage duration

Compound	0 W vs 2 W			2 W vs 4 W		
	VIP value	P value	FC value	VIP value	P value	FC value
Prunasin	1.82	1.26E-11	3.32	1.02	0.010 102	3.07
Tryptophan	1.14	1.09E-06	4.62	1.02	0.030 633	3.67
Amygdalin	1.18	3.89E-05	5.31	1.37	0.047 550	2.25
Fumaric acid	1.22	0.000 586	2.34	1.18	0.002 866	2.07
Gluconic acid	1.27	0.001 359	2.15	1.04	0.040 550	3.28
Adenosine	2.44	0.002 163	2.89	-	-	-
Pyroglutamic acid	1.37	0.002 780	2.10	2.33	0.040 751	5.96
Bavachinin	1.10	0.004 820	0.49	-	-	-
Proline	1.30	0.017 430	2.16	-	-	-
Oxindole	1.34	0.018 239	2.10	-	-	-
Glutamic acid	2.53	0.033 580	6.88	1.22	0.042 699	8.38
Palmitic acid	1.24	0.045 508	0.30	4.29	0.034 588	0.27
Cytosine	-	-	-	1.55	0.011 431	0.33

讨论

苦杏仁是临床常用中药之一, 但其中含有苦杏仁苷、脂肪油、蛋白质及大量的游离氨基酸, 很容易走油变质<sup>[3]</sup>, 故临床应用时要求“临方捣碎”再进行调配, 以加大其成分溶出率。本研究即应用了 UPLC-MS/MS 技术对不同储存条件下的差异化合物进行了筛选和鉴定, 其中, 针对于“临方捣碎”条件共筛选出 234 个差异离子, 其中可鉴定出的差异化合物共 11 种; 在不同温度下储存的苦杏仁共筛选出 503 个差异离子, 其中可鉴定出的差异化合物共 13 种; 而储存不同时间的苦杏仁之间鉴定出的差异化合物共 13 种。

三种不同储存条件下筛选出的差异化合物均包括苦杏仁苷, 经比较三种储存条件下苦杏仁苷的 FC 值可以确定是否捣碎储存这一条件对其影响最大, 未捣碎储存的苦杏仁中苦杏仁苷的含量是捣碎储存的苦杏仁中苦杏仁苷含量的 7.16 倍。经查阅相关文献<sup>[13]</sup>, 苦杏仁苷较不稳定, 在苦杏仁苷酶及野黑樱苷酶的催化下会发生水解反应, 生成葡萄糖、苯甲醛和氢氰酸。其中, 氢氰酸为剧毒, 会造成人体呼吸困难, 甚至窒息死亡。苦杏仁苷具有良好的抗肿瘤、抗纤维化的药理功能, 随着苦杏仁苷的降低, 苦杏仁的药理作用会显著下降<sup>[14]</sup>。野黑樱苷是储存不同时长及不同储存温度条件下的差异化合物。25 °C 储存的比 4 °C 储存的苦杏仁中野黑樱苷的含量低 (FC 值为 0.28)。随着时间的推移, 野黑樱苷的含量发生了下降, 苦杏仁储存两周后野黑樱



**Figure 5** OPLS-DA score chart and its replacement test chart of Semen Armeniacae Amarum with different storage duration in positive (A) and negative (B) ion modes

苷含量下降(FC值为3.32), 储存四周后较储存两周的含量下降(FC值为3.07)。野黑樱苷具有抗纤维化的作用, 在体内可作为原型成分被吸收<sup>[15]</sup>。野黑樱苷的下降可能会影响到苦杏仁抗纤维化的药理效用。棕榈酸是在不同储存状态及不同储存时长条件下的差异化合物。临方捣碎的苦杏仁相较于捣碎储存的苦杏仁中棕榈酸含量更低。随着储存时间的增长, 棕榈酸的含量升高, 储存两周后棕榈酸含量升高3.3倍, 储存四周后棕榈酸持续升高3.7倍。棕榈酸的增多, 提示苦杏仁可能正走向走油状态, 发生酸败的概率显著上升<sup>[16]</sup>。本研究发现“临方捣碎”苦杏仁相较于储存前捣碎苦杏仁的棕榈酸含量较低, 提示“临方捣碎”可能会延缓苦杏仁发生走油现象。苦杏仁中含有多种氨基酸, 在不同储存条件下, 氨基酸的含量也发生了改变。捣碎储存的苦杏仁相对于临方捣碎的苦杏仁精氨酸和谷氨酸的含量有所下降; 25 °C储存的苦杏仁相对于4 °C储存的苦杏仁谷氨酸及色氨酸的含量有所下降; 随着储存时间的延长, 谷氨酸、焦谷氨酸及色氨酸的含量也有着不同程度的降低。

“临方捣碎”的概念最早出现在梁代《本草经集注》中所文“凡汤中用完物皆擘破”<sup>[17,18]</sup>。当前, 北京市对于需临方捣碎的中药饮片按《北京市中药饮片调剂规程》进行调剂, 其一般规定为“若用量较大, 又必需提前进行捣碎时, 其储存量不超过两周时间为宜”。而在临床应用时, 对“临方捣碎”理解不透彻的药师对饮片处理方法交代不清, 导致饮片炮制方法有误, 耽误病情的情况屡见不鲜<sup>[19]</sup>。然而当临床使用捣碎饮片量大时, 药房则会选择使用机械提前粉碎的方法对其进行处理, 如此一来, 便容易在储存条件、储存时长等方面发生问题<sup>[20]</sup>。“临方捣碎”中药饮片的质量控制因素包括捣碎粒度, 药品外包装, 储存温度及储存时间长短<sup>[21]</sup>。本实验经过对苦杏仁捣碎状态、储存温度及储存时长的差异化合物研究, 初步确定苦杏仁的最佳储存方式即为未捣碎状态, 放置于4 °C环境中, 且储存时间尽量缩短, 为苦杏仁需“临方捣碎”这一关键炮制方法提供了科学论证及理论支持。但本研究目前并未对苦杏仁的捣碎粒度及其外包装的影响进行探究, 未来可针对以上两条件进行更深入的探索, 以对苦杏仁的临床应用提供更有力的质量监管依据。

**作者贡献:** 第一作者程遥、毕玥琳负责实验部分、论文撰写; 冯欣、王佳琪、徐浩然负责样品的储存及前处理; 张童画、于庚原负责文献整理和格式校正; 张晨宁、王景红、孙毅坤负责论文修改。

**利益冲突:** 本文无利益冲突。

## References

- [1] Zhang DK, Nie JE, Qian FF. Research progress on pharmacological actions of *Armeniaca Semen Amarum* [J]. *Shandong Chem Ind* (山东化工), 2021, 50: 100-102, 105.
- [2] Qiu GH, Wang XF. Investigating the action mechanism of Mahuang-Kuxingren in treating asthma in children based on network pharmacology [J]. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2021, 13: 12-18.
- [3] Jin F, Wang J, M Regenstein J, et al. Effect of roasting temperatures on the properties of bitter apricot (*Armeniaca sibirica* L.) kernel oil [J]. *J Oleo Sci*, 2018, 67: 813-822.
- [4] Chen X, Li JP. Discussion on quality control of *Armeniaca Semen Amarum* and its preparations [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 200-205.
- [5] Li XR. Study on the value of clinical application of pounding Chinese medicinal tablets when used [J]. *J North Pharm* (北方药学), 2021, 18: 191-192.
- [6] Xu S, Xu X, Yuan S, et al. Identification and analysis of amygdalin, neoamygdalin and amygdalin amide in different processed bitter almonds by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD [J]. *Molecules*, 2017, 22: 1425.
- [7] Lee J, Zhang G, Wood E, et al. Quantification of amygdalin in nonbitter, semibitter, and bitter almonds (*Prunus dulcis*) by UHPLC-(ESI) QqQ MS/MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 7754-7759.
- [8] Zhou X, Xie B, Huang XL, et al. Study on chemical constituents differences between *Armeniaca Amarum Semen* and *Persicae Semen* based on high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal* (分析测试学报), 2021, 40: 940-946.
- [9] Li KY, Shi QH, Zhu HL, et al. Chemical compositions in bitter almond [J]. *J Northwest For Univ* (西北林学院学报), 2004, 19: 124-126.
- [10] Lin RT, Chen ZQ, Lin LZ. Molecular mechanism of *Platycodonis Radix-Armeniaca Semen Amarum* in treating lung carcinoma based on network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2020, 26: 217-224.
- [11] Liu W, Ge GB, Wang YL, et al. Chemical constituent and tissue distribution study of Qingfei Paidu decoction in mice using UHPLC-Q-orbitrap HRMS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2020, 51: 2035-2045.
- [12] Deng LC, Shu AR, Pan JM, et al. Analysis of network pharmacology and confirmation of molecular docking in the treatment of chronic bronchitis by Maxing Shigan decoction [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2021, 23: 172-181.
- [13] Duan S, Wu XT, Li B. Progress in the study of the structure of bitter amygdalin and its degradation process [J]. *Food Sci Tech* (食品科技), 2020, 45: 233-237.

- [14] Ao JQ, Zhang QA, Shao K, et al. Research progress on the bioactive function extraction and determination of amygdalin [J]. Farm Prod Process (农产品加工), 2021, (01): 64-68.
- [15] Zhang C, Zhang D, Wang Y, et al. Pharmacokinetics and anti-liver fibrosis characteristics of amygdalin: key role of the deglycosylated metabolite prunasin [J]. Phytomedicine, 2022, 99: 154018.
- [16] Gong JT, Zhao LY, Xu D, et al. Change pattern and correlation analysis of macroscopic characteristics, active components and rancidness degrees of Armeniaca Semen Amarum in deterioration process [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 3155-3160.
- [17] Liu SH, Li Q, Zhang HM, et al. The ancient and modern evolution, development status and concocting significance of "Feng zhi jie chao, jian zi jie dao" [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2022, 40: 1-13.
- [18] Xiang LM. Tao Hongjing and the collected notes on the material medica [J]. Henan Tradit Chin Med (河南中医), 2014, 34: 367.
- [19] Liu D, Yu ZX, Sang M, et al. Investigation on the use of traditional Chinese medicine pieces mashed when used in 16 public medical institutions in Jiading district [J]. Shanghai Med Pharm J (上海医药), 2021, 42: 49-52.
- [20] Xiao HJ, Huang W, Guan T. Should pay attention to the seeds and fruits of the herbs in the clinical prescription pounding work [J]. Pract Pharm Clin Remed (辽宁药物与临床), 2000, 3: 173-174.
- [21] Liu D, Yu ZX, Sang M, et al. Analysis of problems related to pre-pounding of Chinese medicinal tablets [J]. Lishizhen Med Mater Med Res (时珍国医国药), 2020, 31: 1887-1888.