DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.04.019

基于 UHPLC－Q－Orbitrap HRMS 法分析曼地亚红豆杉炮制前后差异性化学成分

李雅静[1,2],王胜超[1,2],张振凌[1,2,3,4,5],朱建光[1,2],院军[1,2],吴亚宁[1,2],郭幸[1,2],张帅[1,2]
(1. 河南中医药大学药学院,河南 郑州 450046;2. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心,河南 郑州 450046;
3. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心,河南 郑州 450046;4. 河南省中药饮片炮制中医药重点实验室,河南 郑州 450046;5. 豫药全产业链研发河南省协同创新中心,河南 郑州 450046)

摘要:目的 为探究曼地亚红豆杉炮制前后差异性化学成分。方法 采用超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC－Q－Orbitrap HRMS)对曼地亚红豆杉中化学成分进行鉴定,根据高分辨质谱精确分子量及碎片离子信息、对照品、文献、在线数据库等对化学成分进行鉴定,并以炮制前后各成分的离子峰面积比作为炮制前后的变化指数进行对比;利用 SIMCA 软件建立曼地亚红豆杉不同炮制品的主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS－DA)模型,获得 PCA 图、OPLS－DA 图和变量重要性投影(VIP)值,筛选曼地亚红豆杉炮制前后的差异性成分。结果 共鉴定出74个成分,曼地亚红豆杉生品74个成分、酒炙品70个成分、酒浸品70个成分、酒洗品71个成分、酒蒸品71个成分、醋浸品71个成分、醋炒品71个成分、醋蒸品71个成分、蜜炙品72个成分、姜炙品70个成分。其中,18个成分通过与对照品比对鉴定。经 PCA,发现不同炮制方法对曼地亚红豆杉的化学成分具有明显的差异,OPLS－DA 筛选出 VIP 值>1 的38个化学成分作为不同炮制方法的主要差异性成分。结论 方法快速准确,可用于测定曼地亚红豆杉炮制前后的化学成分差异,通过比较化学成分差异可为临床疗效研究提供重要参考。

关键词:曼地亚红豆杉;炮制;UHPLC－Q－Orbitrap HRMS;化学成分;多元统计分析
中图分类号:R282.71 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)04-0116-15

Analysis of Composition of Raw and Processed Mandiya Hongdoushan (*Taxus media* Rehd) by UHPLC－Q－Orbitrap HRMS

LI Yajing[1,2], WANG Shengchao[1,2], ZHANG Zhenling[1,2,3,4,5], ZHU Jianguang[1,2], YUAN Jun[1,2], WU Yaning[1,2], GUO Xing[1,2], ZHANG Shuai[1,2]
(1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China;
2. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China;
3. Co－construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry of P. R, Zhengzhou 450046, Henan, China;
4. Henan Provincial Key Laboratory of TCM Decoction Processing, Zhengzhou 450046, Henan, China;
5. Collaborative Innovation Center of Research and Development on The Whole Industry Chain of Yu－Yao, Henan Province, Zhengzhou 450046, Henan, China)

Abstract: *Objective* In order to study the different chemical constituents of Mandiya Hongdoushan (*Taxus media* Rehd) before and after processing. *Method* The chemical components were identified by ultra－high performance liquid chromatography (UHPLC－Q－Orbitrap HRMS) in Mandiya Hongdoushan (*Taxus media* Rehd) with quadrupole electrostatic field orbital well

基金项目:国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室开放课题项目(KF202106);河南省药品监督管理局科技计划项目(2020DB224);河南中医药大学科技协同创新专项(2023XTCX041);河南中医药大学研究生科研创新项目(2022KYCX006)
作者简介:李雅静(1996－),女,河南周口人,硕士在读,研究方向:中药饮片质量及炮制作用机制。
通讯作者:张振凌(1957－),女,河南商丘人,教授,博士研究生导师,学士,研究方向:中药饮片质量及炮制作用机制。E-mail:zhangzl6758@163.com。
朱建光(1974－),男,河南开封人,教授,博士研究生导师,学士,研究方向:中药饮片质量及炮制作用机制。E-mail:13503859285@139.com。

high resolution mass spectrometry, and the chemical components were identified according to the precise molecular weight and fragment ion information, reference products, literature, online database, etc. The ionic peak area ratio of each component before and after processing was used as the change index. Principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS - DA) models of different processed Mandiya Hongdoushan (*Taxus media* Rehd) were established by SIMCA software. The values of PCA, OPLS - DA and variable importance in the projection (VIP) were obtained to screen the different components of Mandiya Hongdoushan (*Taxus media* Rehd) before and after processing. *Result* A total of 74 components were identified in the experiment, including 74 components of Mandiya Hongdoushan (*Taxus media* Rehd) raw products, 70 components of wine processing products, 70 components of wine soaking products, 71 components of wine washing products, 71 wine steaming products, 71 components of vinegar processing products, 71 components of vinegar soaking products, 71 components of vinegar steaming products, 72 components of honey - prepared products and 70 components of ginger stir - fried products. Among them, 18 compounds were identified by comparison with control substances. PCA showed that the chemical composition of Mandiya Hongdoushan (*Taxus media* Rehd) was significantly different in different processing methods. OPLS - DA screened 38 chemical components with VIP value > 1 as the main difference components of different processing methods. *Conclusion* The results show that the method is rapid and accurate, and can be used to determine the chemical composition difference of Mandiya Hongdoushan (*Taxus media* Rehd) before and after processing, which can provide important reference for clinical efficacy study.

Keywords: Mandiya Hongdoushan (*Taxus media* Rehd); processing; UHPLC - Q - Orbitrap HRMS; chemical composition; multivariate statistical analysis

曼地亚红豆杉 *Taxus media* Rehd. 为红豆杉科红豆杉属植物，是以欧洲红豆杉 *Taxus baccata* L. 为父本，东北红豆杉 *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. 为母本天然杂交而成，因其枝叶具有再生性，被认为是工业提取紫杉醇最理想和最可靠的来源。除紫杉醇外，红豆杉属植物还含有多种活性物质，如黄酮类、多糖类、甾体类，有机酸类等，具有抗肿瘤、抗炎等多种药理作用[1]。有关红豆杉的质量标准研究较少，尚无国家药典标准[2]，地方药材标准可见紫杉[3]、喜马拉雅红豆杉[4]、南方红豆杉[5-10]为主收录，其采收加工炮制方法、质量控制标准尚不完善且不统一，无法体现出炮制特色，因此有必要找出炮制特征性成分，创新红豆杉的炮制方法，扩大临床应用范围，提高生产效率。

目前关于红豆杉的炮制方法均为净制或切制，加液体辅料炮制（黄酒、米醋、蜂蜜、生姜）红豆杉的报道研究尚未报道，为了能够全面反映不同炮制条件下曼地亚红豆杉中的化学成分，本研究运用超高效液相色谱 - 四极杆/静电轨道阱高分辨质谱（UHPLC - Q - Orbitrap HRMS）的特性，将高性能四级杆的母离子选择能力与高分辨轨道阱的精确质量数结合起来，同时采集母离子与二级质谱碎片的信息，最终得到准确质量数和离子碎片信息，建立了曼地亚红豆杉饮片的化学成分分析方法，并用 Thermo Xcalibur Qual Browser 质谱工作站、Compound Discoverer、Mass Frontier 软件及 mzCloud 网络数据库比对，对结构进行鉴定，并运用化学计量学分析曼地亚红豆杉炮制过程中差异性化学成分，以期阐明曼地亚红豆杉炮制的科学内涵，为曼地亚红豆杉优势炮制方法提供理论依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Ultimate 3000 - Orbitrap Exploris™240 液质联用仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、Multifuge X1R 型高速冷冻离心机（赛默飞世尔科技有限公司）、BT25S 型 1/10 万电子天平和 BSA224S - CW 型 1/1 万电子天平（北京赛多利斯科学仪器有限公司）、DHZT - 9070A 电热恒温鼓风干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）、KQ - 500DV 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）、DFT - 200 手提式高速中药粉碎机（温岭市林大机械有限公司）。

1.2 试剂

对照品：对羟基苯甲醛（批号 Y02J7C15574）、阿魏酸（批号 G13S11L124423）、芦丁（批号 M09HB177693）、花旗松素（批号 C15J11Q107526）、10 - 脱乙酰基巴卡亭 Ⅲ（10 - DAB，批号 H11S9X70008）、槲皮素（批号 C28J11Y116820）、柚皮素（批号 YJ0603HA13）、芹菜素（批号 M29GB150104）、10 - 脱乙酰基紫杉醇（10 - DAT，批号 H22M10X88906）、三尖杉宁碱（批号 J09J12T136339）、紫杉醇（批号 J04S11H123510）、山柰酚（批号 F11A11X108412）、7 - 表紫杉醇（批号 H07A8D41177）、银杏双黄酮（批号 AF22032002）、金松双黄酮（批号 P20N10F103774）、穗花杉双黄酮（批号 G01D11L132895）均购自上海源叶生物科技有限公司，纯度均≥98.0%，儿茶素（批号 F1960049）、β - 蜕皮甾酮（批号 2S000094）购自成都普思生物科技股份有限公司，纯度均≥98.0%，黄酒（浙江古越龙山绍兴酒股份有限公司，执行标准 GB/T 13662）、米醋（浙江海天醋酒营销有限公司，执行标准 GB/T 18187）、生姜（经河南中医药大学张振凌教授鉴定为姜科植物姜 *Zingiber* officinale 的新鲜根茎）、蜂蜜（江西中赢食品有限公司，执行标准 GB14963）均购于超市，甲醇、乙腈购自安徽天地高纯溶剂有限公司，均为色谱纯，其余试剂均为分析纯：甲酸（天津市大茂化学试剂厂）、水为超纯水。

1.3 药材

曼地亚红豆杉药材于 2022 年三月份采摘于河南省平顶山市红豆杉种植基地，经河南中医药大学张振凌教授鉴定为红豆杉科红豆杉属植物曼地亚红豆杉 *Taxus media* Rehd. 的干燥细枝及叶。

2 方法与结果

2.1 炮制品制备

本研究所采用的曼地亚红豆杉炮制方法主要参考 2020 年版《中华人民共和国药典》炮制通则[4]及 2018 年版《上海市中药饮片炮制规范》[7],生品及不同炮制品样品信息见表 1,具体操作如下。

2.1.1 生品 取原药材,除去杂质,筛去碎屑,即得。

2.1.2 酒炙品 取曼地亚红豆杉药材 100 g,加入 15 g 黄酒并充分混合,闷润,待黄酒完全被吸干后,放入热锅中不断翻炒,用文火加热,直至颜色加深,有香气溢出时,取出放凉,即得。

2.1.3 酒浸品 取曼地亚红豆杉药材 100 g,加入 15 g 黄酒混合均匀,闷润,浸泡或浸渍药物一定时间,使其得以充分吸收,60 ℃下干燥,即得。

2.1.4 酒洗品 取曼地亚红豆杉药材 100 g,喷洒黄酒 15 g,拌匀,使之吸尽,60 ℃下干燥,即得。

2.1.5 酒蒸品 取曼地亚红豆杉药材 100 g,加入 15 g 黄酒混合均匀,闷润,置于蒸制容器中,用蒸汽加热 30 min,取出,60 ℃下干燥,即得。

2.1.6 醋炙品 取曼地亚红豆杉药材 100 g,加 15 g 米醋拌匀,闷润,待米醋吸干后,放入热锅中不断翻炒,文火加热,直至颜色加深,有香气溢出时,取出放凉,即得。

2.1.7 醋浸品 取曼地亚红豆杉药材 100 g,加入 15 g 米醋混合均匀,浸泡或浸渍药物一定时间,使其得以充分吸收,60 ℃下干燥,即得。

2.1.8 醋蒸品 取曼地亚红豆杉药材 100 g,加入 15 g 米醋混合均匀,稍闷润,置于蒸制容器中,用蒸汽加热 30 min,取出,60 ℃下干燥,即得。

2.1.9 蜜炙品 取炼蜜(116 ~ 118 ℃)25 g,用沸水按 1∶1 比例稀释后,加入 100 g 曼地亚红豆杉药材,拌匀,闷润,放入热锅中不断翻炒,文火加热,直至颜色加深,变得松软且不会粘手,取出晾凉,即得。

2.1.10 姜炙品 姜汁的制备:取鲜姜洗净,切成碎块,榨汁,3 层脱脂纱布滤过,姜渣加水适量,搅拌均匀后,再次滤过,合并姜汁,加水适量,即得。鲜姜与姜汁的比例为 1∶1。

姜炙品:取曼地亚红豆杉药材 100 g,加 25 g 姜汁,闷润。将其置于热锅中用文火加热,颜色加深有香气溢出时,取出放凉,即得。

2.2 供试品的制备

精密称定过 5 号筛的曼地亚红豆杉炮制品 1 g,加入甲醇 50 mL 后超声(功率 500 W,频率 40 kHz)30 min,反复两次,合并滤液,水浴挥干,残渣加甲醇定容至 10 mL 容量瓶中,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得[6]。

2.3 混合对照品溶液的制备

分别精密称取儿茶素、对羟基苯甲醛、β - 蜕皮甾酮、阿魏酸、芦丁、花旗松素、10 - DAB、槲皮素、柚皮素、芹菜素、10 - DAT、三尖杉宁碱、紫杉醇、山柰酚、7 - 表紫杉醇、银杏双黄酮、金松双黄酮,穗花杉双黄酮适量,加甲醇制成浓度分别为 0.27、0.33、0.60、0.30、0.22、0.23、0.24、0.23、0.28、0.49、0.27、0.18、0.21、0.55、0.26、0.40、0.20、0.27 mg/mL 的混合对照品溶液。

表 1 生品及不同炮制品样品信息

编号	样品名	批号	编号	样品名	批号
S1	生品 1	20230701 - 1	S16	醋炙品 1	20230706 - 1
S2	生品 2	20230701 - 2	S17	醋炙品 2	20230706 - 2
S3	生品 3	20230701 - 3	S18	醋炙品 3	20230706 - 3
S4	酒炙品 1	20230702 - 1	S19	醋蒸品 1	20230707 - 1
S5	酒炙品 2	20230702 - 2	S20	醋蒸品 2	20230707 - 2
S6	酒炙品 3	20230702 - 3	S21	醋蒸品 3	20230707 - 3
S7	酒浸品 1	20230703 - 1	S22	醋浸品 1	20230708 - 1
S8	酒浸品 2	20230703 - 2	S23	醋浸品 2	20230708 - 2
S9	酒浸品 3	20230703 - 3	S24	醋浸品 3	20230708 - 3
S10	酒洗品 1	20230704 - 1	S25	蜜炙品 1	20230709 - 1
S11	酒洗品 2	20230704 - 2	S26	蜜炙品 2	20230709 - 2
S12	酒洗品 3	20230704 - 3	S27	蜜炙品 3	20230709 - 3
S13	酒蒸品 1	20230705 - 1	S28	姜炙品 1	20230710 - 1
S14	酒蒸品 2	20230705 - 2	S29	姜炙品 2	20230710 - 2
S15	酒蒸品 3	20230705 - 3	S30	姜炙品 3	20230710 - 3

2.4 色谱条件

Hypersil GOLD 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.9 μm),流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为乙腈,梯度洗脱(0 ~ 0.5 min,95% →95% A;0.5 ~ 8 min,95% →75% A;8 ~ 24 min,75% →50% A;24 ~ 38 min,50% →5% A;40 ~ 40.1 min,5% →95% A;40.1 ~ 43 min,95% →95% A);柱温 30 ℃,流速 0.2 mL/min,进样量 2 μL。

2.5 质谱条件

Thermo Scientific Q Exactive™组合型四极杆 - Orbitrap Exploris™240 质谱仪,离子源为电喷雾离子源(ESI),正、负离子扫描采集模式,喷雾电压为 + 3.5、- 3.0 kV,鞘气压力为 25 arb,辅助气压力为 10 arb,扫气压力为 1 arb,离子传输管温度为 350 ℃,辅助气加热温度为 350 ℃,扫描模式:Full MS/dd - MS2,Full MS 分辨率为 60 000,dd - MS2 分辨率为 15 000,扫描范围为 m/z 100 ~ 1200,HCD 碰撞能量为 30、50、70 eV。

3 结果与分析

采用与对照品比对、自建曼地亚红豆杉数据库检索、与文献比对等方法,对采集的正、负离子模式曼地亚红豆杉药材及不同炮制品高分辨质谱数据进行解析。共鉴定 74 个成分,其中包括 38 个黄酮类、14 个紫杉烷类、15 个有机酸类化合物、2 个醛类化合物、2 个甾体类及 3 个其他类。曼地亚红豆杉生品鉴定出 74 个成分、酒炙品鉴定出 70 个成分、酒浸品鉴定出 70 个成分、酒洗品鉴定出 71 个成分、酒蒸品鉴定出 71 个成分、醋浸品鉴定出 771 个成分、醋炒品鉴定出 71 个成分、醋蒸品鉴定出 71 个成分、蜜炙品鉴定出 72 个成分、姜炙品鉴定出 70 个成分。其中,18 个化合物通过对照品比对鉴定。鉴定信息见表 2,不同离子模式下样品总离子流图见插页 XXⅦ图 1,混合对照品总离子流图见图 2。

3.1 黄酮类化合物的鉴定

本实验共鉴定出 38 个黄酮类化合物,黄酮类成分母核为 2 - 苯基色原酮,常与糖结合成糖苷或糖苷元的形式存在。该

表 2 曼地亚红豆杉不同炮制品中化学成分的 UHPLC – LTQ – Orbitrap MS 鉴定

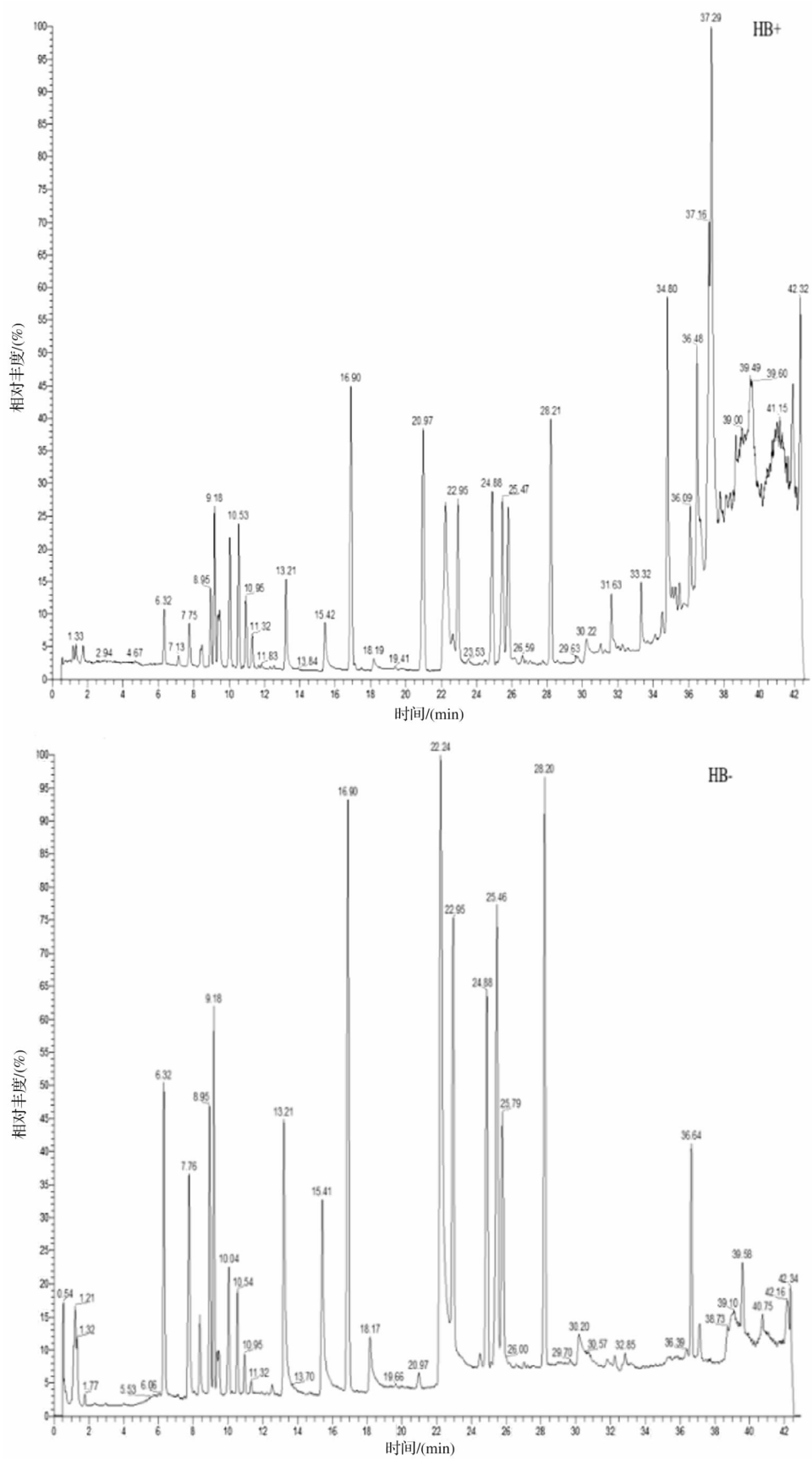
序号	化合物	Rt/(min)	分子式	模式	m/z 实测值	m/z 理论值	ppm	碎片离子	类别	归属	参考文献
1	焦谷氨酸	1.77	$C_5H_7NO_3$	$[M+H]^+$	130.049 9	130.049 8	0.010	84.044 4	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[11]
2	酪氨酸	1.79	$C_9H_{11}NO_3$	$[M+H]^+$	182.081 1	182.081 1	−0.020	165.054 6	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[11]
3	苯丙氨酸	1.92	$C_9H_{11}NO_2$	$[M+H]^+$	166.086 2	166.086 2	−0.025	103.054 0	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[11]
4	9 – 氨基 – 1,3,9 – 壬烷二羧酸	2.01	$C_{12}H_{21}NO_6$	$[M+H]^+$	276.143 6	276.143 6	−0.509	132.101 7	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[11]
5	D – (–) – 奎宁酸	2.67	$C_7H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	191.056 1	191.056 1	−0.242	173.044 8	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[12]
6	菊苣酸	4.06	$C_{22}H_{18}O_{12}$	$[M-H]^-$	473.073 1	473.072 5	−0.237	85.029 5	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[13]
7	原儿茶酸	4.44	$C_7H_6O_4$	$[M-H]^-$	153.019 4	153.019 3	−0.213	109.029 5	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[14]
8	香草醛	5.27	$C_8H_8O_3$	$[M-H]^-$	151.040 2	151.040 0	1.239	123.045 3、95.050 0	醛类	SP、JC、JJ 等	[14]
9	反式 – 3 – 吲哚丙烯酸	5.42	$C_{11}H_9NO_2$	$[M+H]^+$	188.070 6	188.070 6	−0.005	170.060 0、146.060 1	其他类	SP、JC、JJ 等	[12]
10	三羟基 – tetralone – 己糖苷	6.2	$C_{16}H_{20}O_9$	$[M-H]^-$	355.103 3	355.103 4	−0.366	134.038 1	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[15]
11	儿茶素 *	6.24	$C_{15}H_{14}O_7$	$[M-H]^-$	305.066 6	305.003 1	−0.046	205.050 2	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[16]
12	对羟基苯甲酸	6.27	$C_7H_6O_3$	$[M-H]^-$	137.024 4	137.024 4	1.109	93.034 5、109.029 5、137.024 4	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[17]
13	花旗松素 *	6.29	$C_{15}H_{12}O_7$	$[M-H]^-$	303.051 0	303.051 0	−0.237	303.051 0、285.040 8	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[16]
14	表儿茶素	6.37	$C_{15}H_{14}O_6$	$[M-H]^-$	289.071 7	289.071 8	−0.282	289.071 7、245.081 9	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[16]
15	咖啡酸	7.16	$C_9H_8O_4$	$[M-H]^-$	179.034 9	179.034 9	−0.343	135.045 1、134.037 3	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[12]
16	香豆素	7.39	$C_9H_6O_2$	$[M+H]^+$	147.044	147.044 0	−0.096	119.049 0	黄酮类	SP、JC、JJ、JX、JZ	[18]
17	Naringetol hexoside	7.68	$C_{21}H_{22}O_{11}$	$[M+H]^+$		451.123 4	0.125	153.018 2、243.065 1	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[19]
18	对羟基苯甲醛 *	7.70	$C_7H_6O_2$	$[M-H]^-$	121.029 5	121.029 5	1.064	121.029 5	醛类	SP、JC、JJ 等	[20]
19	白麻苷	8.20	$C_{27}H_{30}O_{17}$	$[M-H]^-$	625.140 7	625.140 5	0.580	271.024 7、255.300 0	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[11]
20	槲皮素 – 3 – O – (2″ – β – D – 木糖基) – β – D – 半乳糖苷	8.46	$C_{26}H_{28}O_{16}$	$[M-H]^-$	595.130 1	595.130 4	−0.568	300.027 5、271.024 8、255.030 0、178.998 7、151.003 6	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[21]
21	β – 蜕皮甾酮 *	9.13	$C_{27}H_{44}O_7$	$[M+H]^+$	481.315 9	481.315 9	−0.055	481.315 9、225.294 8	甾体类	SP、JC、JJ 等	[22]
22	山柰酚 – 3 – O – 戊糖基 – 己糖苷	9.20	$C_{26}H_{28}O_{15}$	$[M-H]^-$	579.135 0	579.135 5	0.564	255.029 9、227.035 0	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[21]
23	金丝桃苷	9.29	$C_{21}H_{20}O_{12}$	$[M-H]^-$	463.088 1	463.088 1	−0.310	300.027 6、271.024 8、255.030 6、178.998 6、163.003 8、151.003 7	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[21]
24	芦丁 *	9.41	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M-H]^-$	609.146 1	609.146 1		609.145 6、300.027 4、271.024 8、151.003 8	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[16]
25	4 – 香豆素酸	9.61	$C_9H_8O_3$	$[M-H]^-$	163.040 1	163.040 0	1.129	119.050 2、93.034 5	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[13]
26	阿魏酸 *	9.72	$C_{10}H_{10}O_4$	$[M-H]^-$	193.050 6	193.050 7	−0.263	193.050 6、178.027 1、134.037 3、149.060 9	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[16]
27	山柰酚 – 3 – O – 芸香糖苷	9.75	$C_{27}H_{30}O_{15}$	$[M+H]^+$	595.165 8	595.165 7	0.083	135.044 1	黄酮类	SP	[23]
28	异鼠李素 – 3 – O – 葡萄糖苷	9.78	$C_{28}H_{32}O_{16}$	$[M-H]^-$	623.161 3	623.161 7	0.664	271.024 8、151.003 8	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[24]
29	异鼠李素 – 3 – O – β – D – 芸香糖苷	9.78	$C_{28}H_{32}O_{16}$	$[M-H]^-$	623.161 3	623.161 7	0.664	315.051 1	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[13]
30	紫云英苷	10.08	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^-$	447.093 2	447.093 2	−0.325	255.030 0、227.035 1、284.032 8	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[25]
31	木犀草素 – 7 – O – 吡喃葡萄糖苷	10.16	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	449.107 8	449.107 8	−0.021	287.054 9	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[12]
32	槲皮苷	10.18	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M-H]^-$	447.092 9	447.093 2	−0.595	227.034 9	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[13]
33	D,L – 樟脑	10.18	$C_{10}H_{16}O$	$[M+H]^+$	153.127 3	153.127 3	−0.042	135.116 7、107.085 5、97.064 8	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[12]
34	异鼠李素 – 3 – O – 己糖苷	10.23	$C_{22}H_{22}O_{12}$	$[M-H]^-$	477.103 6	477.103 8	−0.510	357.061 3、314.043 4、285.040 6、271.024 8、257.045 6、243.029 9、151.003 8	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[21]
35	4′ – 甲氧基 – 异槲皮苷	10.23	$C_{22}H_{22}O_{12}$	$[M-H]^-$	477.103 6	477.103 8	−0.510	324.043 4、285.040 6、243.029 9、151.003 8	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[21]
36	橙皮苷	10.57	$C_{28}H_{34}O_{15}$	$[M-H]^-$	609.183 5	609.182 4	−0.542	301.071 7	黄酮类	SP、JC、JJ、JX、JZ、CJ、CC、CZ、MZZ	[13]
37	圣草酚	11.08	$C_{15}H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	287.056 2	287.056 1	−0.172	151.003 7、135.045 2、134.037 5、107.013 8、65.003 3	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[13]
38	圣草素	11.13	$C_{15}H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	287.056 1	287.056 1	−0.232	125.024 4、213.055 5	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[13]
39	3,5 – DMOP	11.36	$C_8H_{10}O_3$	$[M+H]^+$	155.070 2	155.070 2	−0.091	112.051 8、95.049 1	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[15]
40	香橙素	11.95	$C_{15}H_{12}O_6$	$[M+H]^+$	289.070 8	289.070 6	0.165	139.039 0	黄酮类	SP、CJ、CC、CZ、MZ、JZZ	[17]
41	槲皮素 *	12.10	$C_{15}H_{10}O_7$	$[M-H]^-$	301.030 0	301.035 3	−0.237	301.035 3、179.002 1、151.003 7	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[19]
42	阿福豆素	12.21	$C_{15}H_{14}O_5$	$[M+H]^+$	275.091 8	275.091 4	0.370	107.049 1	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[16]

续表 2 曼地亚红豆杉不同炮制品中化学成分的 UHPLC－LTQ－Orbitrap MS 鉴定

序号	化合物	Rt/(min)	分子式	模式	m/z 实测值	m/z 理论值	ppm	碎片离子	类别	归属	参考文献
43	山柰酚*	13.20	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M-H]^-$	285.040 5	285.040 6	-0.172	229.050 8	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[23]
44	Ecdysone	14.46	$C_{27}H_{44}O_6$	$[M+H]^+$	465.320 9	465.321 0	-0.200	447.310 3、429.299 9	甾体类	SP、JC、JJ 等	[13]
45	芹菜素*	15.36	$C_{15}H_{10}O_5$	$[M-H]^-$	269.045 5	269.045 5	-0.287	269.045 5	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[19]
46	5－去桂皮酰基紫杉欧吉酚	15.37	$C_{28}H_{38}O_{12}$	$[M+NA]^+$	589.225 6	589.225 6	0.322	589.225 6	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[16]
47	柚皮素*	15.39	$C_{15}H_{12}O_5$	$[M-H]^-$	271.051 2	271.060 9	0.498	271.059 9、151.003 7	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[26]
48	高车前素	15.82	$C_{16}H_{12}O_6$	$[M-H]^-$	299.056 2	299.056 1	-0.172	284.032 7	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[16]
49	穗花杉双黄酮*	18.05	$C_{30}H_{18}O_{10}$	$[M-H]^-$	537.082 2	537.082 7	0.527	537.082 2、443.038 4、417.062 0、375.050 8、331.061 2	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[25]
50	5－去桂皮酰基紫杉素 J	22.10	$C_{30}H_{42}O_{11}$	$[M+NA]^+$	601.264 6	601.261 9	-1.534	601.264 6	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[27]
51	10－DAT*	22.87	$C_{45}H_{49}NO_{13}$	$[M+H]^+$	812.327 6	812.327 6	0.013	812.327 6、286.107 4、240.102 1、120.060 0	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[26]
52	7－去甲基银杏双黄酮	23.07	$C_{31}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	551.098 4	551.098 3	1.042	431.076 6、121.028 4	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[10]
53	白果黄素	23.22	$C_{31}H_{20}O_{10}$	$[M-H]^-$	551.098 0	551.098 3	0.692	343.059 8、371.055 9、413.066 8、431.077 1	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[19]
54	10－DAB*	23.52	$C_{26}H_{40}O_{12}$	$[M+NA]^+$	567.242 2	567.241 1	-0.005	567.242 2	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[17]
55	10－去乙酰基－10β 羟基丁酸酯 基紫杉醇	24.49	$C_{49}H_{55}NO_{15}$	$[M+NA]^+$	920.346 9	920.346 9	-0.016	920.346 9	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[26]
56	7－表紫杉醇*	24.78	$C_{47}H_{51}NO_{14}$	$[M+H]^+$	854.336 9	854.336 8	-0.011	286.104 9	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[26]
57	三尖杉宁碱*	24.89	$C_{45}H_{53}NO_{14}$	$[M+H]^+$	832.353 7	832.353 7	0.021	264.123 1、569.238 2、509.217 1、753.322 5	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[17]
58	5－桂皮酰基－9－乙酰基红豆杉素 I	25.15	$C_{31}H_{38}O_8$	$[M+NA]^+$	561.245 5	561.245 5	-0.069	561.245 5	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[28]
59	异银杏双黄酮	25.66	$C_{32}H_{22}O_{10}$	$[M+H]^+$	567.128 5	567.128 3	0.562	431.076 1、121.028 3	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[26]
60	紫杉醇*	25.67	$C_{47}H_{51}NO_{14}$	$[M+H]^+$	854.335 3	854.338 2	0.025	105.033 3、240.102 0、122.059 9、309.148 7	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[19]
61	紫杉基酚	28.30	$C_{37}H_{44}O_{13}$	$[M+NA]^+$	719.267 4	719.267 4	0.386	719.267 0	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[26]
62	科里奥利酸	28.78	$C_{18}H_{30}O_3$	$[M-H]^-$	293.212 2	293.212 2	0.293	235.170 6	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[26]
63	金松双黄酮*	30.11	$C_{33}H_{24}O_{10}$	$[M-H]^-$	579.129 4	579.129 6	-1.028	579.129 4、547.103 5、165.019 3、388.058 9、415.046 0	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[13]
64	东北红豆杉素	30.81	$C_{44}H_{48}O_{15}$	$[M+NA]^+$	839.288 5	839.288 5	0.326	839.288 5	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[29]
65	紫杉宁	31.37	$C_{35}H_{42}O_9$	$[M+NA]^+$	629.271 9	629.272 1	-1.824	629.271 9	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[26]
66	紫杉宁 B	32.19	$C_{37}H_{44}O_{11}$	$[M+NA]^+$	687.277 1	687.277 5	3.820	687.277 5	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[26]
67	2－去乙酰氧基紫杉宁	33.55	$C_{37}H_{46}O_{10}$	$[M+NA]^+$	673.297 5	673.298 3	-2.399	673.297 5	紫杉烷类	SP、JC、JJ 等	[26]
68	16－羟基十六烷酸	34.62	$C_{16}H_{32}O_3$	$[M-H]^-$	271.228 0	271.227 8	1.229	225.221 8	有机酸类	SP、JC、JJ、JX、JZ、MZZ	[26]
69	银杏双黄酮*	36.16	$C_{32}H_{22}O_{10}$	$[M-H]^-$	565.113 5	565.114 0	-1.238	565.113 5、483.272 9	黄酮类	SP、JC、JJ 等	[12]
70	2－甲氧基桂皮醛	36.30	$C_{10}H_{10}O_3$	$[M+H]^+$	179.070 4	179.070 2	0.119	162.059 7	醛类	SP	[19]
71	10,12－十八烷二酸	36.40	$C_{18}H_{28}O_2$	$[M+H]^+$	277.216 2	277.216 2	0.043	259.205 9	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[17]
72	十六酰胺	36.68	$C_{16}H_{33}NO$	$[M+H]^+$	256.263 6	256.263 4	0.089	130.122 7、116.106 9、102.091 3	其他类	SP、JC、JJ 等	[11]
73	油酰胺	37.18	$C_{18}H_{35}NO$	$[M+H]^+$	282.279 1	282.279 1	-0.001	177.163 6、163.148 3、149.132 3	其他类	SP、CJ、CC、CZ、MZ、JZZ	[12]
74	8,11,14 二十碳三烯酸	38.17	$C_{20}H_{34}O_2$	$[M+H]^+$	307.263 2	307.263 1	0.023	289.252 2	有机酸类	SP、JC、JJ 等	[15]

注：SP. 生品；JC. 酒炙品；JJ. 酒浸品；JX. 酒洗品；JZ. 酒蒸品；CC. 醋炙品；CJ. 醋浸品；CZ. 醋蒸品；MZ. 蜜炙品；JZZ. 姜炙品；* 表示与对照品比对；SP、JC、JJ 等代表生品、酒炙品、酒浸品、酒洗品、酒蒸品、醋炙品、醋浸品、醋蒸品、蜜炙品、姜炙品共 10 个归属。

类化合物容易发生去糖基化、脱水或 C 环发生反狄尔斯－阿德尔（RDA）裂解形成碎片[29]。以化合物 63 金松双黄酮为例，在负离子模式下离子峰[M－H]⁻为 m/z 579.129 5。在优质区，金松双黄酮失去 1 分子 CH_3OH 形成最强的碎片离子 m/z 547.102 8，并继续损失 1 分子 CO 获得碎片离子 m/z 519.026 3。m/z 547.102 8 在Ⅰ－A 环断裂获得碎片离子 m/z 503.014 9，且 m/z 547.095 1 进一步断裂获得碎片离子 m/z 533.028 4。在 RDA_1 裂解过程中，Ⅰ－C 环发生 1,3 键断裂，分别形成Ⅰ－$A^{1,3-}$和Ⅰ－$B^{1,3-}$两部分，得到 m/z 165.055 8，进一步断裂得到 m/z 151.040 1；在 RDA_2 裂解过程之中，Ⅱ－C 环发生 0,4 键断裂，形成的碎片离子分别为Ⅱ－$A^{0,4-}$和Ⅱ－$B^{0,4-}$两部分，得到 m/z 403.189 0，再损失 1 分子 CH_3 得到 m/z 389.005 2；在 RDA_3 裂解过程中，Ⅱ－C 环发生 1,3 键断裂，形成的碎片离子分别为Ⅱ－$A^{1,3-}$和Ⅱ－$B^{1,3-}$两部分，继续损失 1 分子 CH_3OH 得到 m/z 415.248 8，损失 2 个 H 得到 m/z 445.259 2。通过与文献裂解方式和对照品比对[30]，鉴定该化



注：HB^+：混合对照品正离子模式；HB^-：混合对照品负离子模式。

图 2 混合对照品总离子流图

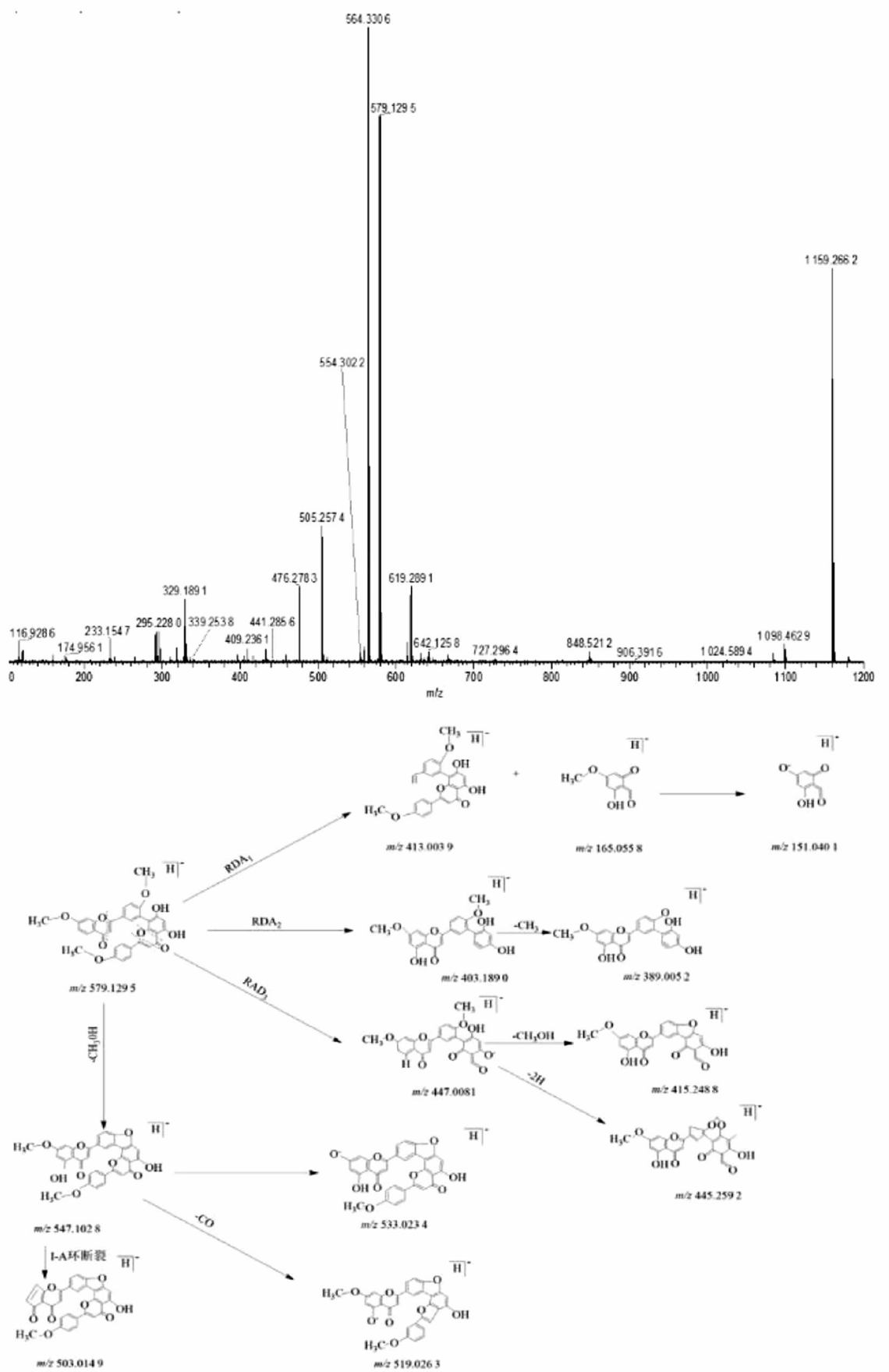


图 3 金松双黄酮的质谱图及裂解途径

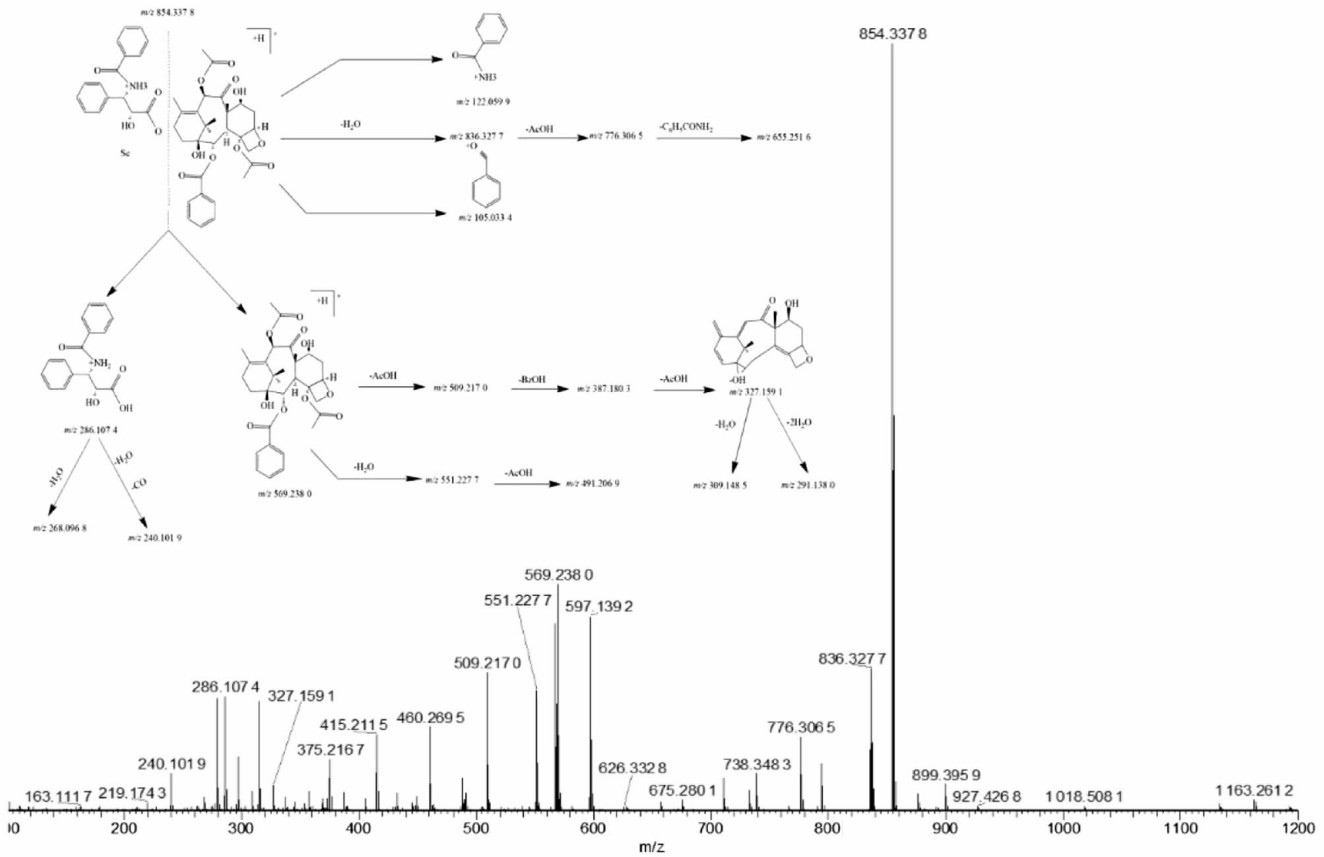


图 4 紫杉醇的质谱图及裂解途径

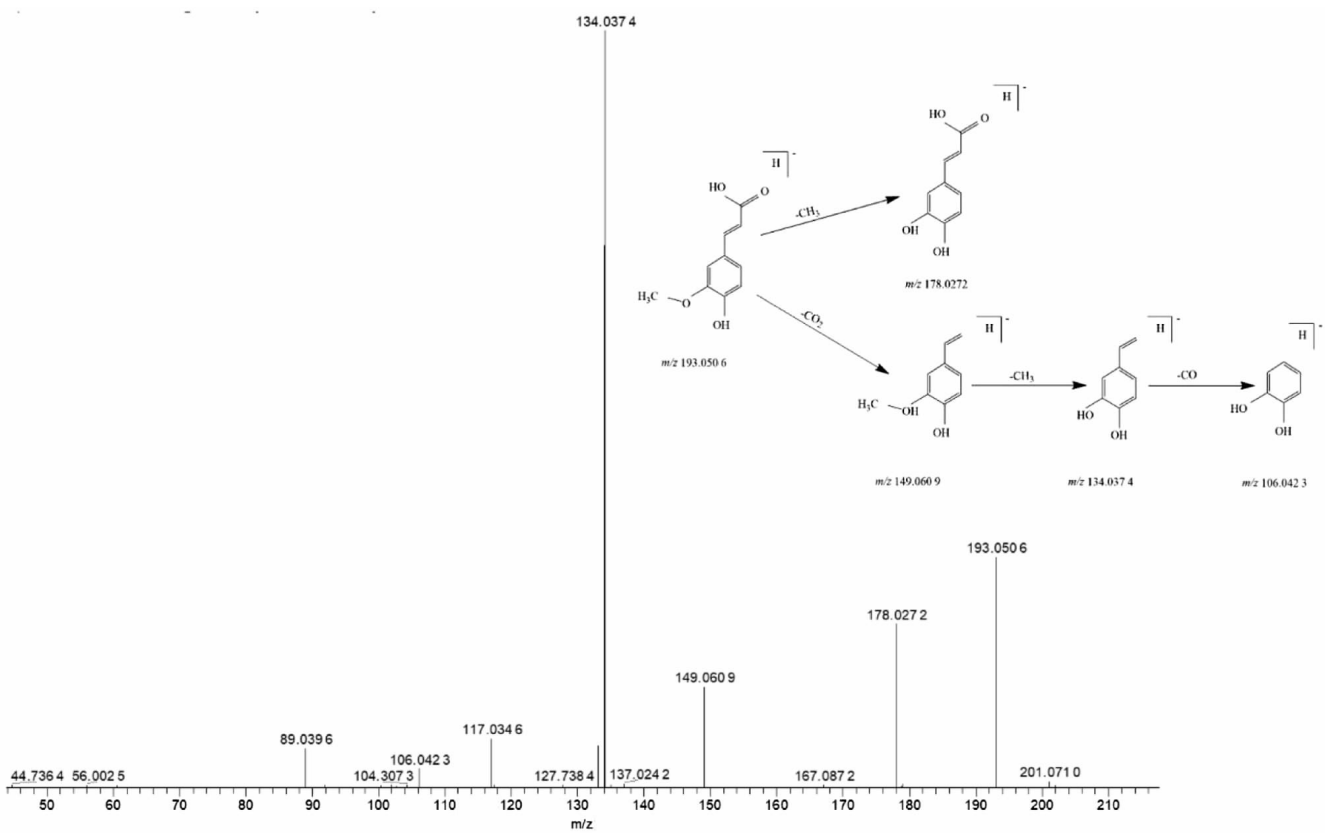


图 5 阿魏酸的质谱图其裂解途径

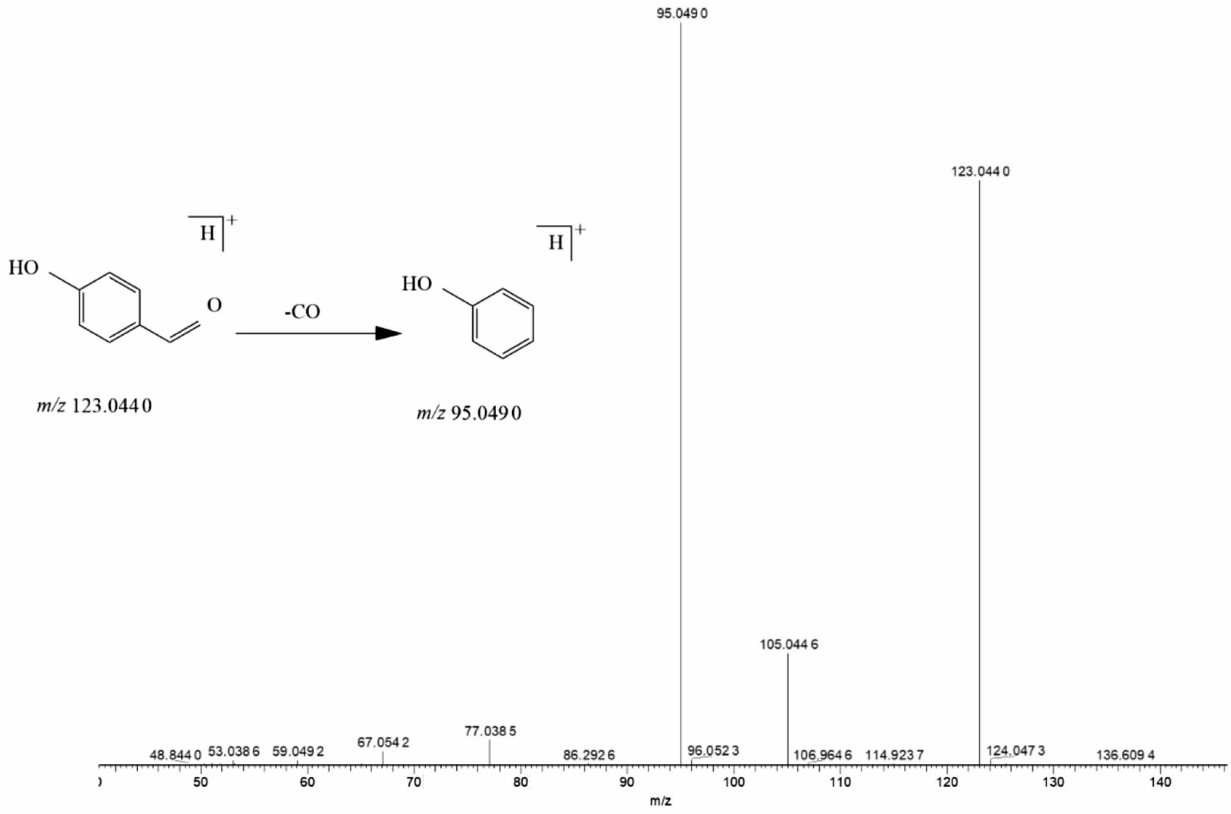


图 6 对羟基苯甲醛的质谱图及裂解途径

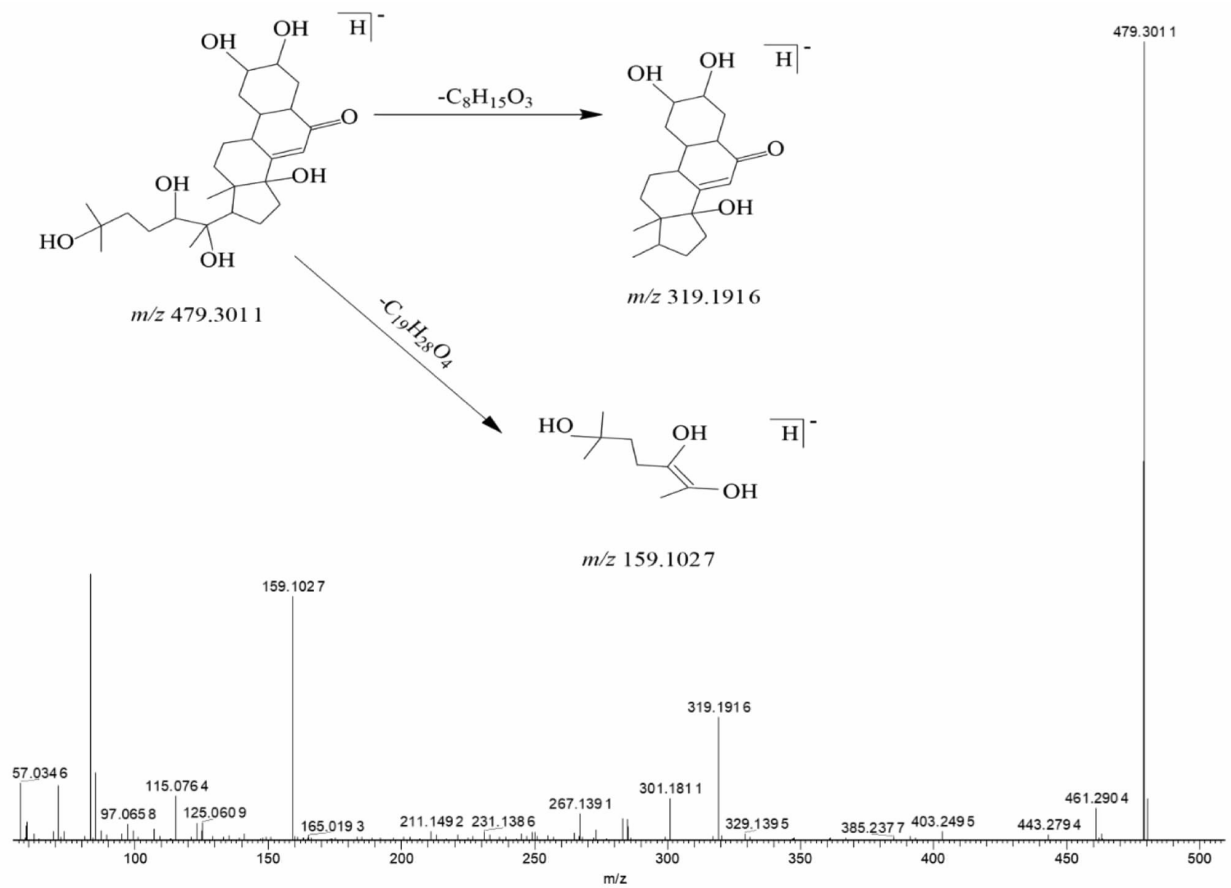


图 7 β－蜕皮甾酮的质谱图及裂解途径

合物为金松双黄酮。见图 3。

3.2 紫杉烷类化合物的鉴定

本实验共鉴定出 14 个紫杉烷类化合物，有研究表明[31]，在自然界中，母核的 6－8－6－4 环二萜骨架上酰基和生物碱的不同取代，可形成一系列不同的紫杉烷类化合物，可分为 C－13 位上无侧链结构和 C－13 位上带侧链结构。以化合物 60 紫杉醇为例，在正离子模式下准分子离子峰为[M＋H]$^+$ m/z 864.337 8，当 C－13 位侧链存在时，不易发生苯甲酰基失去的裂解反应，即紫杉醇 C－13 位侧链的失去优先于苯甲酰基的断裂，在 C－13 位形成侧链离子[ScH＋H]$^+$，得到 m/z 286.107 4，失去侧链离子得到 m/z 569.238 0。此时，m/z 776.306 5 和 m/z 655.251 6 离子消失；m/z 569.238 0 进一步损失一分子苯甲酸（BzOH）和两分子 AcOH（乙酸）形成 m/z 327.159 1；并且还出现了苯甲酰基离子（m/z 105.033 4）和苯甲酰胺离子（m/z 122.059 9）；m/z 286.107 4 离子损失 H_2O 和 H_2O＋CO 也可生成 m/z 268.096 8 和 m/z 240.101 9。通过与文献裂解方式和对照品比对[32]，鉴定该化合物为紫杉醇。见图 4。

3.3 有机酸类化合物的鉴定

本实验共鉴定出 15 个有机酸类化合物。芳香酸或脂肪酸由于其分子的基本结构含有羧基，通常易断裂生成小分子基团，如[M－H－H_2O]$^-$、[M－H－CO_2]$^-$、[M－H－CO]$^-$。以化合物 26 阿魏酸为例，在负离子模式下准分子离子峰为[M－H]$^+$ m/z 193.050 6，去除 1 分子 CH_3 形成 m/z 178.027 2，去除 1 分子 CO_2，形成 m/z 149.060 9，再去除 1 分子 CH_3 形成 m/z 134.037 4，最后除去 1 分子的 CO，形成 m/z 106.042 3。通过与文献裂解方式和对照品比对[33]，鉴定该化合物为阿魏酸。见图 5。

3.4 醛类化合物的鉴定

本实验共鉴定出 2 个醛类化合物。二级质谱裂解的主要特征是损失一分子 CO。以化合物 18 对羟基苯甲醛为例，在正离子模式下准分子离子峰为[M＋H]$^+$ m/z 123.045 2，损失一分子 CO 获得碎片离子 m/z 95.013 9。通过与文献裂解方式和对照品比对[34]，鉴定该化合物为对羟基苯甲醛。见图 6。

3.5 甾体类化合物的鉴定

本实验共鉴定出 2 个甾体类化合物。以化合物 21 β－蜕皮甾酮为例，在负离子模式下准分子离子峰为[M－H]$^-$ m/z 479.301 1，损失一分子的 $C_8H_{15}O_3$，产生碎片离子 m/z 319.191 6，损失一分子的 $C_{19}H_{28}O_4$，形成碎片离子 m/z 159.102 7。通过与文献裂解方式和对照品比[14]，鉴定该化合物为 β－蜕皮甾酮。见图 7。

3.6 曼地亚红豆杉炮制前后化学成分变化

由于曼地亚红豆杉各炮制品中各色谱峰的保留时间、准离子峰和二级碎片信息基本一致，可利用色谱峰面积的变化指数反映对应化合物的含量变化趋势[35]。当变化指数＞1 时，表示该化合物的含量升高，当变化指数＜1 时，表示该化合物含量降低；变化指数等于 1 时，表示该化合物含量无变化。变化指数＝各炮制品中各化合物离子峰的峰面积/生品相对应离子峰的峰面积。结果发现，与生品比较，各个炮制品中未发现新增化合物，且不同炮制方法对曼地亚红豆杉化合物的峰面积变化影响不同。经酒炙后有 53 个化合物峰面积增高，17 个化合物峰面积降低；酒浸后有 48 个化合物峰面积增高，22 个化合物峰面积降低；经酒洗后有 41 个化合物峰面积增高，29 个化合物峰面积降低；经酒蒸后有 57 个化合物峰面积增高，13 个化合物峰面积降低；经醋炙后有 32 个化合物峰面积增高，38 个化合物峰面积降低；经醋浸后有 50 个化合物峰面积增高，20 个化合物峰面积降低；经醋蒸后有 60 个化合物峰面积增高，10 个化合物峰面积降低；经蜜炙后有 56 个化合物峰面积增高，14 个化合物峰面积降低；经姜炙后有 47 个化合物峰面积增高，22 个化合物峰面积降低，曼地亚红豆杉及其不同炮制品的离子峰面积及变化指数见表 3。

根据各组化合物丰度的相似性对样品进行系统聚类分析，将曼地亚红豆杉不同炮制品离子峰面积的炮制前后变化指数导入微生信平台，不同聚类结果见插页ⅩⅩⅧ图 8A，酒洗、酒浸、醋浸聚为一类；醋炙、姜炙、酒炙聚为一类；酒蒸、醋蒸，蜜炙聚为一类；说明不同的炮制方法对曼地亚红豆杉化学成分差异明显。

3.7 炮制前后差异性化学成分的筛选

3.7.1 主成分分析（PCA） 根据质谱鉴定结果，不同饮片之间存在一定的相似性和差异性，为进一步分析不同炮制方法对曼地亚红豆杉中成分差异，对结果采用 SIMCA－P14.1 软件进行 PCA 分析，其模型积累解释率 R^2X 为 1，模型预测能力 Q^2 为 0.999。见插页ⅩⅩⅧ图 8B。由插页ⅩⅩⅧ图 8B 知生品、酒洗、酒浸、醋浸聚为一类；醋炙、姜炙、酒炙聚为一类；酒蒸、醋蒸，蜜炙聚为一类；说明不同炮制方法对其化学成分种类和相对含量的影响具有显著性的差异。

3.7.2 正交偏最小二乘法－判别分析（OPLS－DA） 在 PCA 的基础上，采用 OPLS－DA 对数据进行监督模式处理，见插页ⅩⅩⅧ图 9A。曼地亚红豆杉生品、酒炙品、酒浸品、酒洗品、酒蒸品、醋炙品、醋浸品、醋蒸品、蜜炙品、姜炙品均各自聚集，分为明显的 3 类，且各个炮制样品的分布与系统聚类分析和 PCA 结果相同，再次论证了曼地亚红豆杉经过不同炮制方法炮制后，其化学成分发生明显的变化，且不同炮制方法对其化学成分的影响具有明显差异。为了找到曼地亚红豆杉不同炮制品间的主要差异，考察变量重要性投影（VIP）值，VIP 值＞1 通常被视为模型的重要标志物，筛选出 38 个差异性标志性成分，包括 9 个紫杉烷类、22 个黄酮类、4 个有机酸类、2 个甾体类，1 个其他类，见插页ⅩⅩⅧ图 9B。该模型置换检验结果表明，右侧原始值大于左侧的，随机排列得到的 R^2 和 Q^2，Q^2 的蓝色回归线与左侧纵坐标相交小于 0，见插页ⅩⅩⅧ图 9C，说明该模型稳定有效。

4 讨论

除少数需要鲜用的中药外，所采收的中药材在除去泥沙杂质及非药用部位后，均需要经过软化、干燥等炮制加工，形成饮片的药性和品质[36]。为阐明上述加工炮制技术的科学内涵，本研究运用 UHPLC－Q－Orbitrap HRMS 法考察不同液体辅料对曼地亚红豆杉中化学成分的影响。分别以正、负离子模式对曼地亚红豆杉生品及各炮制品进行序列测定，分析成分变化出现的特征峰，结合碎片离子、裂变轨迹、保留时间、对照品信息

表 3 曼地亚红豆杉及不同炮制品离子峰面积的炮制前后变化指数

编号	Rt/(min)	化合物名称	炮制前后变化指数								
			JC/SP	JJ/SP	JX/SP	JZ/SP	CC/SP	CJ/SP	CZ/SP	MZ/SP	JZZ/SP
1	1.77	焦谷氨酸	1.58	9.73	3.59	1.57	4.10	1.81	1.23	3.74	2.76
2	1.79	酪氨酸	8.70	1.01	1.22	4.83	4.04	1.12	7.50	5.87	7.20
3	1.92	苯丙氨酸	5.71	1.29	0.75	0.97	3.81	1.04	1.34	4.43	1.55
4	2.01	9-氨基-1,3,9-壬烷二羧酸	0.34	1.83	1.88	5.24	1.00	2.72	2.22	3.63	1.17
5	2.67	D-(-)-奎宁酸	1.06	5.47	1.00	5.12	2.81	6.73	1.93	1.06	0.97
6	4.06	菊苣酸	0.77	1.32	0.51	1.34	0.51	0.58	1.26	1.09	0.55
7	4.44	原儿茶酸	1.70	1.10	1.13	4.28	1.59	5.24	1.95	6.33	1.27
8	5.27	香草醛	5.22	1.02	2.11	7.67	5.04	2.23	6.58	6.94	3.79
9	5.42	反式-3-吲哚丙烯酸	0.53	0.94	1.15	2.25	0.17	1.71	1.13	2.27	1.49
10	6.20	三羟基-tetralone -己糖苷	1.17	2.85	4.67	6.30	0.86	3.85	5.76	5.43	1.03
11	6.24	儿茶素	1.61	5.29	0.99	5.96	0.69	5.59	1.10	0.92	0.90
12	6.27	对羟基苯甲酸	1.08	0.90	1.60	4.70	0.04	1.66	4.77	3.18	0.05
13	6.29	花旗松素	2.53	2.15	1.20	0.50	0.02	2.07	0.99	0.28	0.62
14	6.37	表儿茶素	4.29	0.28	2.37	5.83	6.77	0.57	6.40	8.47	4.97
15	7.16	咖啡酸	4.91	1.45	0.62	4.48	2.02	1.19	3.34	1.75	2.25
16	7.39	香豆素	0.29	0.88	0.21	0.56	-	-	-	-	-
17	7.68	Naringetol hexoside	1.07	0.26	5.34	1.58	0.64	0.09	0.18	1.85	1.31
18	7.70	对羟基苯甲醛	0.81	0.58	0.47	1.47	0.47	1.51	1.58	2.62	0.35
19	8.20	白麻苷	0.71	0.93	0.47	2.79	2.07	1.23	1.27	2.49	2.12
20	8.46	槲皮素-3-O-(2″-β-D-木糖基)-β-D-半乳糖苷	0.52	1.55	1.42	9.23	1.20	2.56	4.11	9.66	0.90
21	9.13	蜕皮甾酮	5.07	3.73	4.04	1.62	0.90	0.54	1.13	2.25	2.26
22	9.20	山柰酚-3-O-戊糖基-己糖苷	4.01	3.31	2.99	3.78	0.80	4.52	0.36	2.41	2.55
23	9.29	金丝桃苷	1.09	0.47	1.50	0.41	0.62	0.46	1.08	0.34	0.76
24	9.41	阿魏酸	5.27	0.49	0.15	4.03	2.93	1.26	4.08	5.84	3.48
25	9.61	芦丁	4.52	1.25	1.98	5.37	5.24	1.61	1.24	4.82	4.87
26	9.72	4-香豆素酸	0.70	0.27	0.19	0.04	0.72	0.45	0.17	0.18	0.75
27	9.75	山柰酚-3-O-芸香糖苷	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	9.78	异鼠李素-3-O-葡萄糖苷	1.37	4.70	6.45	5.92	0.83	4.10	3.85	5.37	6.09
29	9.78	异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷	7.17	5.51	7.67	3.82	1.02	1.46	7.15	0.85	5.01
30	10.08	紫云英苷	3.88	1.42	0.98	3.50	1.39	2.68	1.83	6.55	3.19
31	10.16	木犀草素-7-O-吡喃葡萄糖苷	5.18	1.12	3.04	6.42	0.59	1.23	6.16	1.37	7.20
32	10.18	槲皮苷	2.04	1.39	1.39	7.84	2.92	3.24	6.34	3.95	2.03
33	10.18	D,L-樟脑	0.28	3.00	0.72	5.25	0.54	2.80	2.48	2.47	0.52
34	10.23	异鼠李素-3-O-己糖苷	1.15	2.20	3.72	2.72	1.59	4.27	2.84	1.44	1.51
35	10.23	4′-甲氧基-异槲皮苷	0.28	3.53	4.03	3.33	0.63	6.74	1.31	2.30	1.14
36	10.57	橙皮苷	2.01	1.86	1.21	8.55	2.54	4.59	8.30	5.60	-
37	11.08	圣草酚	9.31	1.05	6.95	7.48	6.69	7.65	8.24	2.17	1.25
38	11.13	圣草素	3.36	1.30	0.47	1.08	0.35	0.60	1.91	2.78	0.55
39	11.36	3,5-DMOP	4.61	0.55	0.16	4.64	2.66	0.86	2.14	5.89	3.21
40	11.95	香橙素	-	-	-	-	4.06	1.13	1.50	0.40	1.15
41	12.10	槲皮素	3.74	0.79	0.49	2.13	0.59	1.34	3.51	1.72	4.20
42	12.21	阿福豆素	0.58	0.26	0.92	1.16	0.29	1.26	1.36	1.47	0.56
43	13.20	山柰酚	2.06	1.36	0.34	2.30	0.72	1.33	0.90	1.01	1.48
44	14.46	Ecdysone	1.77	4.35	0.96	2.34	6.57	5.15	2.52	0.46	3.86
45	15.36	芹菜素	1.18	0.52	0.20	0.77	0.76	1.16	1.06	1.17	1.26
46	15.37	5-去桂皮酰基紫杉欧吉酚	1.28	0.33	0.27	2.63	0.41	0.33	1.87	3.17	1.34
47	15.39	柚皮素	2.48	1.43	0.86	1.07	1.26	1.97	1.57	1.29	1.37
48	15.82	高车前素	3.35	5.06	3.74	4.47	0.30	1.19	0.37	0.38	2.71
49	18.05	穗花杉双黄酮	3.76	1.04	1.15	0.22	0.22	0.60	1.24	1.13	0.12
50	22.10	5-去桂皮酰基紫杉素 J	0.19	0.32	0.59	0.17	0.42	0.60	0.33	0.19	0.28
51	22.87	10-DAT	2.67	5.21	4.21	1.71	2.57	2.78	1.20	4.70	2.92
52	23.07	7-去甲基银杏双黄酮	1.67	3.74	2.37	4.87	0.56	0.73	5.51	3.38	3.22
53	23.22	白果黄素	0.65	1.23	0.47	2.20	1.68	1.31	3.31	2.41	2.95

续表 3 曼地亚红豆杉及不同炮制品离子峰面积的炮制前后变化指数

编号	Rt/(min)	化合物名称	炮制前后变化指数								
			JC/SP	JJ/SP	JX/SP	JZ/SP	CC/SP	CJ/SP	CZ/SP	MZ/SP	JZZ/SP
54	23.52	10-DAB	1.30	1.10	0.63	0.69	0.87	0.77	2.83	2.89	1.03
55	24.49	10-去乙酰基-10β羟基丁酸酯基紫杉醇	2.23	0.62	0.15	0.71	0.43	0.21	0.45	0.74	0.25
56	24.78	三尖杉宁碱	2.72	5.83	4.30	4.28	1.99	8.25	4.32	7.96	5.10
57	24.89	7-表紫杉醇	0.10	0.33	0.88	1.20	0.65	0.26	0.66	0.46	0.35
58	25.15	5-桂皮酰基-9-乙酰基红豆杉素 I	1.35	5.18	7.31	0.93	3.40	4.06	3.15	7.28	0.97
59	25.66	异银杏双黄酮	4.38	1.78	2.17	1.42	4.62	1.32	1.28	2.02	1.38
60	25.67	紫杉醇	3.75	3.67	1.04	1.43	1.22	2.36	4.95	1.09	3.59
61	28.30	紫杉基酚	0.32	1.68	5.33	1.32	0.23	0.74	7.97	7.24	4.39
62	28.78	科里奥利酸	1.04	1.72	0.86	1.38	0.65	0.43	2.05	1.98	0.38
63	30.11	金松双黄酮	2.23	2.08	1.50	1.76	4.82	5.46	6.49	3.31	7.18
64	30.81	东北红豆杉素	1.92	1.71	0.49	4.72	0.74	0.71	3.89	1.99	0.66
65	31.37	紫杉宁	2.30	2.01	4.39	5.60	0.33	3.24	1.15	1.86	1.70
66	32.19	紫杉宁 B	1.94	0.66	1.53	3.31	3.77	1.69	5.14	1.01	5.07
67	33.55	2-去乙酰氧基紫杉宁	1.35	0.39	1.45	2.00	1.12	1.58	1.60	0.95	1.76
68	34.62	16-羟基十六烷酸	1.66	2.63	2.35	5.25	-	-	-	-	-
69	36.16	银杏双黄酮	0.33	0.19	0.13	0.17	0.18	0.53	1.01	0.27	0.21
70	36.30	2-甲氧基桂皮醛	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	36.40	10,12-十八烷二酸	0.12	0.27	0.04	0.41	0.06	0.11	0.79	0.68	0.14
72	36.68	十六酰胺	2.12	2.50	1.29	4.89	0.82	1.37	5.51	2.88	1.97
73	37.18	油酰胺	-	-	-	-	0.87	2.23	1.03	1.93	3.57
74	38.17	8,11,14 二十碳三烯酸	1.22	1.51	1.13	1.62	0.60	1.22	1.74	1.23	0.53

注:“-”表示未检测出。

以及文献资料,共鉴定出 74 个化合物,包括 38 个黄酮类,14 个紫杉烷类,15 个有机酸类,2 个醛类,2 个甾体类,3 个其他类。整体而言,曼地亚红豆杉经不同的炮制方法炮制后大多数化学成分种类不会发生改变,但含量会发生变化。由 PCA 和 OPLS-DA 可知筛选出 38 个炮制前后差异性标志物,分别为圣草酚、Ecdysone、10-DAT、金松双黄酮、山柰酚-3-O-芸香糖苷、5-桂皮酰基-9-乙酰基红豆杉素 I、2-去乙酰氧基紫杉宁、银杏双黄酮、高车前素、Naringetol hexoside、油酰胺、7-表紫杉醇、紫杉醇、异鼠李素-3-O-β-D-芸香糖苷、异鼠李素-3-O-己糖苷、芹菜素、香橙素、金丝桃苷、阿福豆素、异银杏双黄酮、三尖杉宁碱、紫杉基酚、柚皮素、山柰酚、10,12-十八烷二酸、D-(-)-奎宁酸、蜕皮甾酮、菊苣酸、山柰酚-3-O-戊糖基-己糖苷、花旗松素、紫杉宁 B、异鼠李素-3-O-葡萄糖苷、香豆素、木犀草素-7-O-吡喃葡萄糖苷、10-去乙酰基-10β 羟基丁酸酯基紫杉醇、槲皮素、芦丁,科里奥利酸。

课题组前期通过网络药理学和指纹图谱方法结合质量标志物的核心理论,最终筛选出紫杉醇、10-DAB、三尖杉宁碱,10-DAT 为曼地亚红豆杉的质量标志物。结合本实验结果,这 4 个化学成分在曼地亚红豆杉炮制前后的贡献存在明显差异,可以作为曼地亚红豆杉特征性成分。紫杉醇类化合物是高效、低毒、广谱抗癌药物之一,是第一个在临床试验中获得批准的药物,被称为“晚期癌症的最后一道防线”[37]。紫杉烷类化合物 10-DAB、三尖杉宁碱、10-DAT 与紫杉醇结构相似,可通过结构改造修饰成紫杉醇[38]。有研究表明红豆杉中总黄酮与紫杉醇配伍可防止 4T1、A549、MCF-7 细胞的扩散,并减少体内的不良反应,达到增效减毒的目的[39]。从曼地亚红豆杉不同炮制品筛选出的 38 个差异性成分中,黄酮类化合物占比 55.26%,生品中以金松双黄酮含量最高,经过不同炮制方法含量亦呈不同程度的增加,有研究表明金松双黄酮和紫杉醇联用可显著上调 Bax mRNA 表达,下调 Bcl-2mRNA 的表达,继而进一步激活 Caspase-3,促进癌细胞的凋亡[40]。而 5-桂皮酰基-9-乙酰基红豆杉素 I、2-去乙酰氧基紫杉宁、Naringetol hexoside、油酰胺、紫杉基酚、10,12-十八烷二酸、紫杉宁 B、10-去乙酰基-10β 羟基丁酸酯基紫杉醇,由于缺乏标准品和文献研究,是否与曼地亚红豆杉药效相关待进一步研究。

本研究通过 UHPLC-Q-Orbitrap HRMS 法结合多元统计分析技术对曼地亚红豆杉炮制前后差异性成分进行分析。系统聚类分析的结果显示,酒洗、酒浸、醋浸聚为一类;醋炙、姜炙、酒炙聚为一类;酒蒸、醋蒸,蜜炙聚为一类,与 PCA 和 OPLS-DA 结果一致,分类效果较为理想;分析发现,炮制温度对曼地亚红豆杉中化学成分的影响较为明显,推测原因可能是在炮制辅料预处理时温度对曼地亚红豆杉化学成分影响较大,炙和蒸曼地亚红豆杉在炮制过程中加热时间较长,而其余炮制品在炮制过程中几乎不加热,因此炙曼地亚红豆杉和蒸曼地亚红豆杉明显区分于其他炮制品。蜜炙后 14 个化合物的含量降低,可能是蜜炙后药性缓和的原因,但需进一步研究证明。根据曼地亚红豆杉炮制前后差异性特征成分的分析结果,可以为其炮制前后化学成分的物质基础研究提供科学依据,同时也为规范曼地亚红豆杉炮制质量相关标准提供了理论依据。

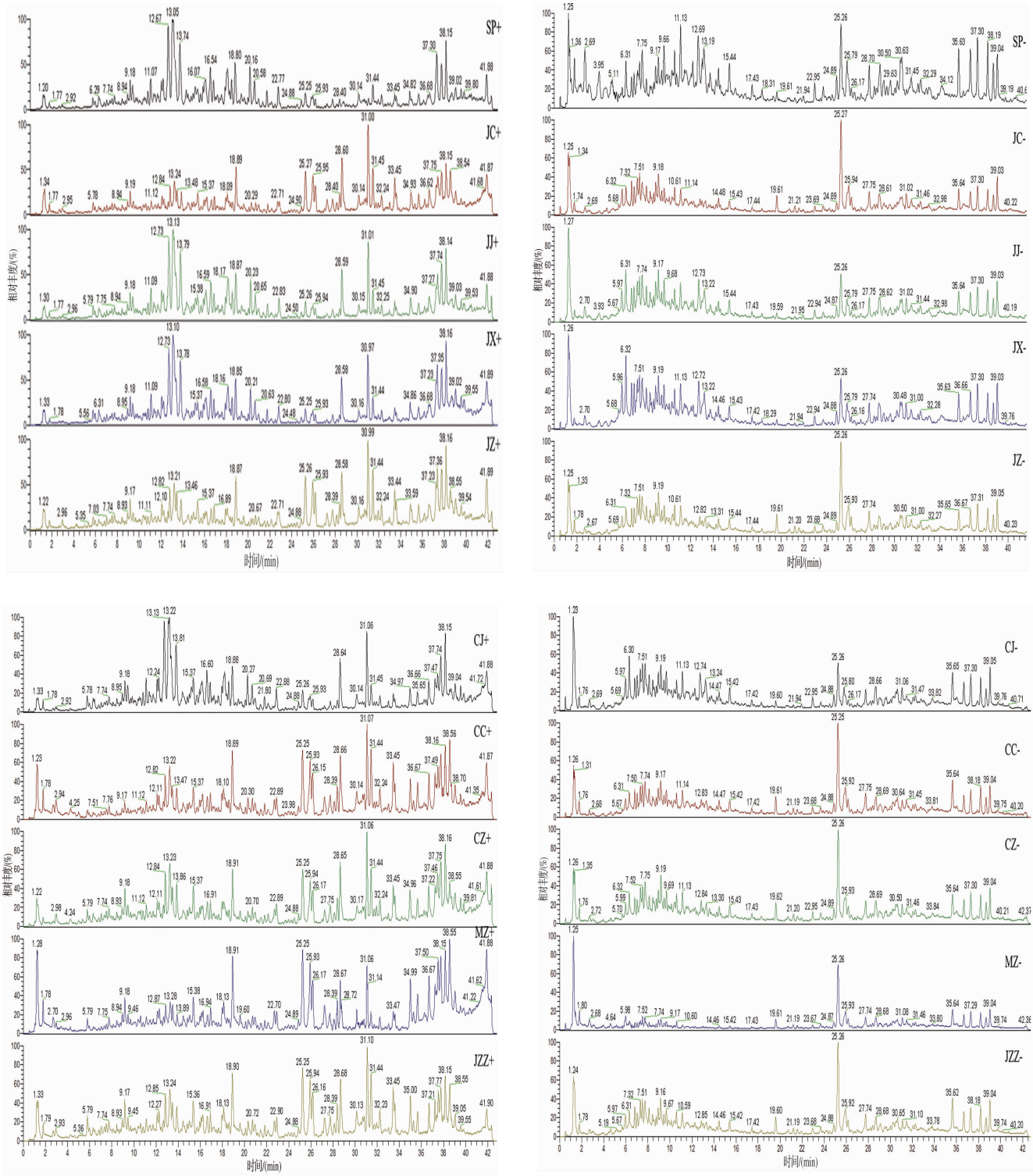
参考文献

[1] 王楷婷,李春英,倪玉娇,等. 红豆杉的化学成分、药理作用和临床应用[J]. 黑龙江医药,2017,30(6):1196-1199.

[2] 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.
[3] 黑龙江省药品监督管理局. 黑龙江省中药材标准[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社,2001:232 -234.
[4] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(维药分册)[S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999: 32.
[5] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2016: 24 -25.
[6] 江苏省药学会. 江苏省中药饮片炮制规范[M]. 南京: 江苏凤凰科学技术出版社,2020:283 -288.
[7] 上海市药品监督管理局. 上海市中药饮片炮制规范[M]. 上海: 上海科学技术出版社,2019: 491 -492.
[8] 广东省药品监督管理局. 广东省中药材标准 -第三册[M]. 广州: 广东科技出版社,2018: 24 -25.
[9] 湖北省药品监督管理局. 湖北省中药材质量标准[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2019: 161 -162.
[10] 安徽省药品监督管理局. 安徽省中药饮片炮制规范[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社,2020: 212 -213.
[11] 张清清,冯媛,李春花,等. 基于 UPLC -Q -TOF/MS 技术快速鉴定当归中苯酞类和有机酸类成分[J]. 中国药房,2022,33(5): 579 -585,591.
[12] 张忠立,李淑琪,左月明. 酸橙花和甜橙花的 UPLC -Q -TOF -MS/MS 定性分析及 HPLC 含量测定[J]. 中南药学,2022,20(11): 2480 -2489.
[13] 温荣,郭文欣,席琳图雅,等. 蒙古族药紫花高乌头总黄酮含量测定及其黄酮类化合物的 UPLC -Q -Exactive MS 定性分析[J]. 中国现代中药,2023,25(1):38 -46.
[14] 刘宏,陈晨,邸学,等. 基于 U PLC -Q -TOF -MS/MS 分析技术的胡桃楸根 HPLC 指纹图谱分析[J]. 中国现代中药,2020,22(6): 862 -870,878.
[15] 员荣,孙丽丽,管淑玉,等. 小叶榕干浸膏及咳特灵胶囊的 HPLC 指纹图谱研究及 LC -Q -TOF -MS 成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(3): 57 -62.
[16] 李胜男,李君,解红娟,等. HPLC -Q -Exactive -Orbitrap -MS 法鉴定森登 -4 味涂剂中化学成分[J]. 现代药物与临床,2023,38(4): 811 -819.
[17] 陈章捷. 高效液相色谱 -串联质谱法测定白酒中紫杉醇和三尖杉宁碱[J]. 理化检验 -化学分册,2020,56(10): 1067 -1072.
[18] 汤书婉,李新亮,马莉,等. 基于 HPLC 指纹图谱和 LC -Q -TOF/MS 的加味黄芪桂枝五物汤化学成分研究[J]. 中草药,2023,54(3):711 -721.
[19] LI N,PAN Z,ZHANG D,et al. Chemical components,biological activities,and toxicological evaluation of the fruit (aril) of two precious plant species from genus *Taxus*[J]. Chem Biodivers,2017,14(12):14598.
[20] 赵永琪,张宏伟,张振凌,等. 基于 UHPLC -Q -Orbitrap HRMS 比较古今不同加工方法对百合煎液化学成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(7): 177 -184.
[21] 杨杰,王艳林,杨迪,等. 基于 UPLC -Q -TOF -MS 和 HPLC -DAD 的三七黄酮类成分定性与定量研究[J]. 中国中药杂志,2023,48(13): 3462 -3471.
[22] 李思洁,王雪宁,胡军华,等. 基于 UPLC -Q -TOF -MS/MS 技术解析玉女颗粒化学成分[J]. 中草药,2023,54(23): 7730 -7741.
[23] 韩美欣,张晨阳,佟红娜,等. HPLC 指纹图谱和 UPLC -Q -TOF -MS 方法对芪冬颐心口服液中成分研究[J]. 中草药,2022,53(24): 7679 -7685.
[24] 袁洁,古丽斯坦·阿不来提,布比阿加尔·哈依拉提,等. 液相色谱 -静电场轨道阱高分辨质谱法鉴定阿尔泰金雀花中 21 种黄酮类化合物[J]. 理化检验 -化学分册,2022,58(4): 373 -380.
[25] 张薇,李楚源,王德勤,等. 心脉安的 UHPLC -Q -Exactive -Orbitrap -MS 定性分析和 UHPLC -QTRAP -MS/MS 含量测定[J]. 中草药,2023,54(6): 1743 -1756.
[26] 张娜. 栽培曼地亚红豆杉针叶的化学成分研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学,2009.
[27] 邹瑾,周金彩,龙红萍,等. UPLC -ESI -Q -TOF -MS 法分析兖州卷柏化学成分[J]. 中成药,2018,40(10): 2334 -2337.
[28] 尹春园,张聪,孙明谦,等. HPLC -Q -TOF MS 法研究 3 种银杏双黄酮成分的质谱裂解途径[J]. 质谱学报,2020,41(1): 57 -65.
[29] 朱赟斐,谭善忠,王洪兰,等. 基于 UPLC -Q -TOF -MS/MS 技术的益气健脾颗粒化学成分分析[J]. 中草药,2022,53(12): 3601 -3613.
[30] 孙胜斌,丁艳谱,冯玉康,等. 基于黄酮类特征图谱和总黄酮醇苷含量优化 AB -8 大孔树脂制备银杏叶提取物工艺[J]. 中华中医药学刊,2017,35(5): 1134 -1138.
[31] 李宫,李东浩,马标. 电喷雾三重四极杆串联质谱研究天然物中紫杉烷类物质的裂解规律[J]. 延边大学学报(自然科学版),2016,42(3): 212 -216.
[32] 马文晓,王浩,王婷婷,等. 电喷雾四极杆飞行时间质谱研究紫杉醇类药物的裂解规律[J]. 药学学报,2013,48(12): 1812 -1816.
[33] 贾志鑫,丛诗语,潘明霞,等. 基于 UPLC -Q -TOF -MS 的速效救心丸化学成分定性分析[J]. 药物评价研究,2023,46(2): 330 -341.
[34] 胡瀚文,赵永艳,杨天龙,等. 基于 UPLC -Q -Orbitrap HRMS 的川佛手化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(7): 148 -155.
[35] 祝婧,袁恩,牟俊雍,等. 基于 UPLC -Q/TOF -MS 分析江西特色炮制工艺对枳壳化学成分的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(16): 142 -153.
[36] 赵润怀,段金廒,高振江,等. 中药材产地加工过程传统与现代干燥技术方法的分析评价[J]. 中国现代中药,2013,15(12): 1026 -1035.
[37] 刘先芳,梁敬钰,孙建博. 紫杉醇:具有里程碑意义的天然抗癌药物[J]. 世界科学技术 -中医药现代化,2017,19(6): 941 -949.
[38] 匡雪君,王彩霞,邹丽秋,等. 紫杉醇生物合成途径及合成生物学研究进展[J]. 中国中药杂志,2016,41(22): 4144 -4149.
[39] 蔡伟,夏苗芬,熊耀康. 南方红豆杉总黄酮、总多糖与紫杉醇配伍增效减毒作用研究[J]. 世界科学技术 -中医药现代化,2015,17(3):556 -562.
[40] 赵学梅,张宏莲,孔寰宇,等. 金松双黄酮联用紫杉醇对 A549 细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(19): 1949 -1951.

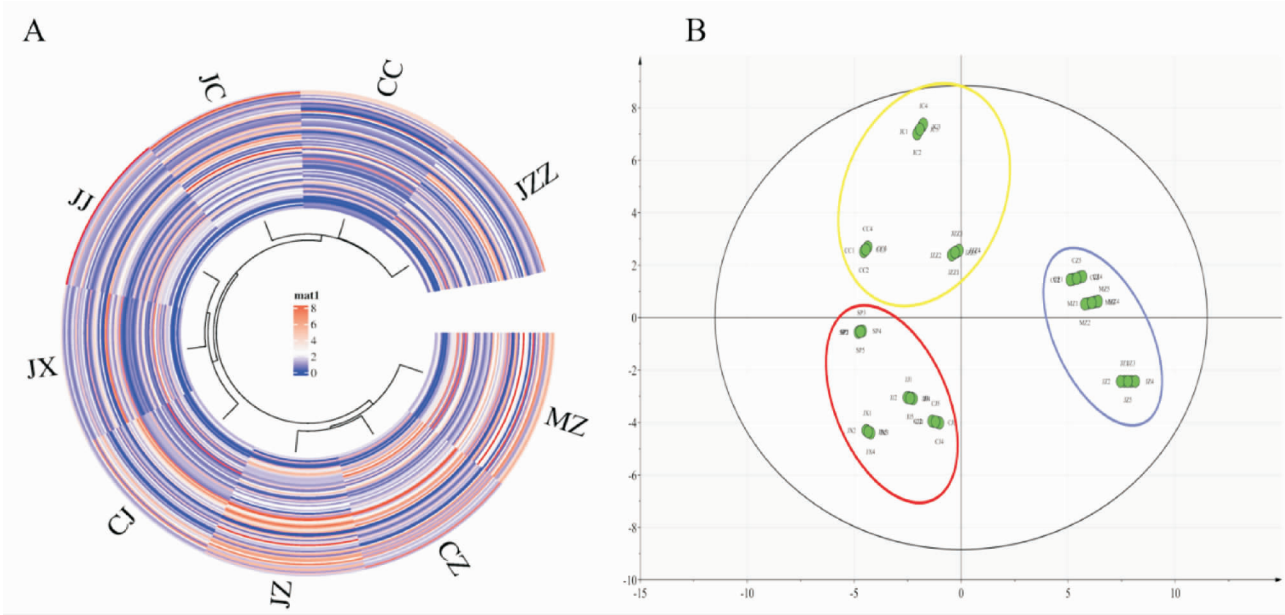
基于 UHPLC－Q－Orbitrap HRMS 法分析曼地亚红豆杉炮制前后差异性化学成分

（正文见 116－128 页）



注：SP. 生品；JC. 酒炙品；JJ. 酒浸品；JX. 酒洗品；JZ. 酒蒸品；CC. 醋炙品；CJ. 醋浸品；CZ. 醋蒸品；MZ. 蜜炙品；JZZ. 姜炙品；－. 负离子模式；+. 正离子模式。

图 1 曼地亚红豆杉生品及不同炮制品的总离子流图



注：JC. 酒炙品；JJ. 酒浸品；JX. 酒洗品；JZ. 酒蒸品；CC. 醋炙品；CJ. 醋浸品；CZ. 醋蒸品；MZ. 蜜炙品；JZZ. 姜炙品；－. 负离子模式；＋. 正离子模式。

图 8 曼地亚红豆杉炮制前后样品的系统聚类分析图（A）及 PCA 得分图（B）

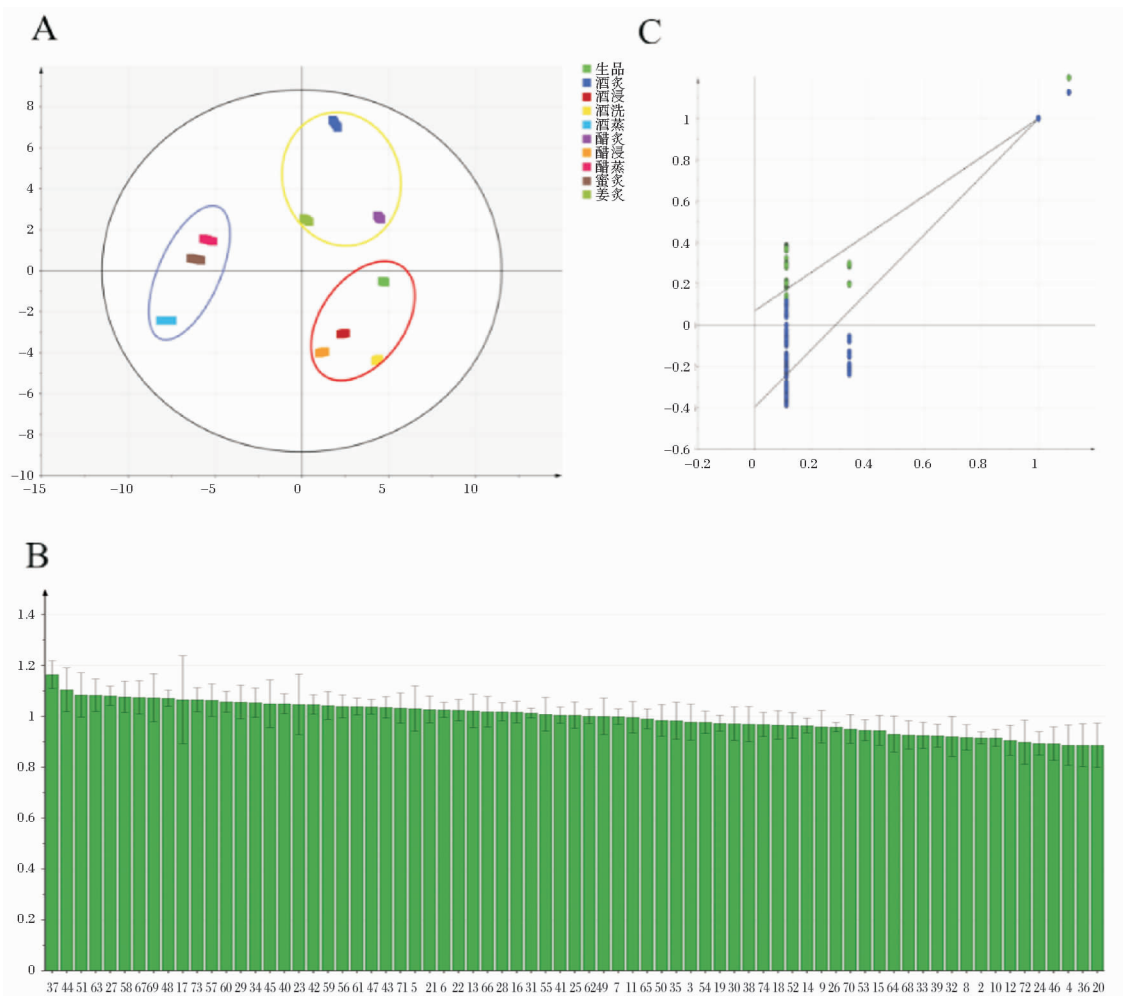


图 9 曼地亚红豆杉各炮制品 OPLS－DA 得分图（A）、差异成分的 VIP 值（B）和置换检验（C）