DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.02.027

基于 UHPLC－Q－Exactive HF－X 结合多元统计分析探究鲜、干冬凌草化学成分差异

张金英[1]，田硕[1,2]，郭琳[1]，茆志国[1]，胡毅龙[1]，苗明三[1,2]
（1. 河南中医药大学药学院，河南 郑州 450046；2. 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 探究鲜冬凌草与其干品（自然晒干、真空冷冻干燥）的化学成分差异。方法 利用超高效液相－四极杆－静电轨道阱高分辨质谱（Ultra－high performance liquid chromatography－quadrupole－exactive mass spectrometry，UHPLC－Q－Exactive HF－X/MS）联用技术在正、负离子模式下采集冬凌草化学成分质谱数据，并基于在线数据库、本地自建标准品数据库及文献报道对其成分进行鉴定分析；通过 SIMCA 软件对采集的数据进行主成分分析（Principal component analysis，PCA）和正交偏最小二乘法判别分析（Orthogonal partial least squares－discriminant analysis，OPLS－DA），根据获得的变量投影重要性（Variable importance in projection，VIP）和 *t* 检验筛选鲜干冬凌草间的差异化学成分；最后，根据差异成分离子峰面积进行相对定量分析。结果 共鉴定出 61 个化学成分，包括二萜类 31 个、酚酸类 12 个、黄酮类 9 个、二萜类 4 个、三萜类 4 个、其他类 5 个；PCA 图直观地显示冬凌草鲜品化学轮廓与其干品有明显的差异；通过 OPLS－DA 筛选出 VIP＞1 和 $P<0.05$ 的差异化学成分 32 个，其中差异成分冬凌草甲素、冬凌草乙素等二萜类活性成分在鲜品中相对含量显著高于其干品。结论 UHPLC－Q－Exactive HF－X/MS 结合多元统计分析可用于明确鲜干冬凌草的化学成分差异，进而为鲜干冬凌草资源的合理开发应用提供重要的数据参考。

关键词：冬凌草；鲜药；干品；UHPLC－Q－Exactive HF－X/MS；多元统计分析；差异成分
中图分类号：R284.1 **文献标志码**：A **文章编号**：1673-7717(2026)02-0148-11

Differential Compounds Between Fresh and Dry Donglingcao[*Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara] Based on UHPLC－Q－Exactive HF－X Combined with Multivariate Statistical Analysis

ZHANG Jinying[1], TIAN Shuo[1,2], GUO Lin[1], MAO Zhiguo[1], HU Yilong[1], MIAO Mingsan[1,2]
(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China;
2. Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu－Yao in Henan Province, Zhengzhou 450046, Henan, China)

Abstract: *Objective* To investigate the composition differences between the fresh Donglingcao[*Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara] (FRH) and its two dry products (natural drying and vacuum freeze－drying). *Method* Ultra－High Performance Liquid Chromatography－Quadrupole－Exactive Mass Spectrometry (UHPLC－Q－Exactive HF－X/MS) was used to collect MS data from Donglingcao[*Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara] compounds in positive and negative ion modes. The components were identified and analyzed based on the online database, local standard product database and literature. Then, principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares－discriminant analysis (OPLS－DA) were performed on the collected data through SIMCA software. The differential components between fresh and dried products were screened out based on variable importance in projection (VIP) and t－test. Finally, the relative quantitative analysis was carried out according to peak areas of differential components. *Result* A total of 61 compounds were identified, comprising 31 diterpenoids, 12 phenolic acids, 9 flavonoids, 4 triterpenes and 5 other compounds. PCA intuitively showed that the metabolic profile of FRH and its dry products were remarkably different. Thirty－two differential components with VIP＞1 and $P<0.05$ were screened out through OPLS－DA. The contents of the main active ingredients in the FRH such as oridonin and ponicidin were significantly higher in comparison to those

基金项目：国家自然科学基金面上项目（82274119）；河南省省级科技研发计划联合基金（优势学科培育类）重点项目（232301420019）；河南省重大专项（221100310400）；河南省教育厅道地宛药全产业链关键技术研究及应用项目（221100310400）
作者简介：张金英（1996－），女，河南商丘人，博士在读，研究方向：中药物质基础和药理学。
通讯作者：苗明三（1965－），男，河南新乡人，教授，博士研究生导师，博士，研究方向：中药药理教学与研究。E-mail：miaomingsan@163.com。

in the dry products. *Conclusion* In this study, UHPLC - Q - Exactive HF - X/MS combined with multivariate statistical analysis were employed to elucidate the differential components between FRH and its dry products, providing data reference for the rational development and application of *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara.

Keywords: Donglingcao[*Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara]; fresh herbs; dried products; UHPLC - Q - Exactive HF - X/MS; multivariate statistical analysis; differential compounds

中药鲜药是中医治疗疾病的一种传统药用形式[1]，我国中医古籍中早有中药鲜用的记载，如《五十二病方》："取薯蓣茎干治二升，取薯瓜汁二斗以渍之，以为浆，饮之"，治疗牝痔，是鲜药治疗疾病的最早应用[2]；《肘后备急方》中"青蒿一握，以水二升渍，绞取汁，尽服之"也是用鲜青蒿治疗疟疾[3]。很多中药的鲜品与其干品在功效上有较大差别，如清热生津以鲜石斛入药为佳[4]，现代研究表明鲜石斛中抗氧化活性优于其干品，与鲜品中多糖、甘露糖等有效成分含量明显高于干品密切相关[5-6]；此外，鲜土茯苓的抗炎活性明显高于其干品，干燥过程会影响其药效成分落新妇苷的异构化，进而引起该成分含量的变化[7]，同时也说明化学成分的变化是影响鲜、干中药功效差异的重要因素。然而，在实际应用过程中，鲜药难以储存，临床上多以其干品形式替代入药，鲜药经干燥之后虽然可以延长保存时间，但长时间阳光照射、空气接触等在一定程度上会引起化学成分的变化，进而导致药理活性的差异，如鲜干姜[8]、鲜干蒲公英[9]、鲜干马齿苋[5,10]等。因此，需要对鲜干中药化学成分进行比较分析，进而为阐释他们功效差异提供数据支撑。中药冬凌草为唇形科植物碎米桠 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的地上部分，又被称为冰凌草、破血丹、六月令等，河南省为其主要产区之一[11-12]。作为一种药食同源的中药，冬凌草具有清热解毒、活血止痛的传统功效，在河南民间多鲜食或制作成茶饮治疗咽炎、扁桃体炎、食管癌等疾病[13-15]。《抗癌中草药与验方》记载"鲜冬凌草 90 ~ 120 g，水煎代茶，顿服"，治疗食管癌[16]。现代研究表明冬凌草中含有丰富的化学成分，如二萜类、酚酸类、黄酮类、生物碱类等，具有抗癌、抗炎、抗氧化等多种药理活性，其中二萜类成分是冬凌草的主要药效成分[13]，如冬凌草甲素(oridonin)和冬凌草乙素(ponicidin)对食道癌、乳腺癌、胰腺癌等多种肿瘤细胞均具有显著的抑制活性[11,17-18]。本课题组前期药理实验表明鲜冬凌草对食管癌的治疗作用优于其干品，然而关于鲜、干冬凌草化学成分的系统比较研究尚无报道。本研究通过超高效液相 - 四极杆 - 静电轨道阱高分辨质谱仪(Ultra - high performance liquid chromatography - quadrupole - exactive mass spectrometry, UHPLC - Q - Exactive HF - X/MS)联用技术，对冬凌草化学成分进行鉴定表征，并结合多元统计 - 主成分分析(Principal component analysis, PCA)与正交偏最小二乘判别分析(Orthogonal partial least squares - discriminant analysis, OPLS - DA)寻找冬凌草鲜品与其干品的差异化学成分，并对差异成分进行热图聚类分析，以期为鲜、干冬凌草的开发应用提供数据支撑。

1 材料

1.1 仪器与试剂

Q Exactive HF - X 高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；Vanquish 超高压液相色谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)，5430R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司)；Lyovapor™ L - 200 型真空冷冻干燥机(BUCHI 公司，瑞士)，ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(Waters，2.1 mm × 100 mm，1.8 μm)；Quintix125D - 1 CN 型十万分之一电子分析天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)；乙腈(Thermo Fisher Scientific 公司，批号：A955 - 4)和甲酸(Thermo Fisher Scientific 公司，批号：A456 - 4)均为质谱级，娃哈哈纯净水。

1.2 药材

2023 年 9—10 月自主产区河南省济源市采集新鲜冬凌草，经河南中医药大学药学院戴丽萍教授鉴定为唇形科香茶属碎米桠 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 的地上部分。留样药材存放于河南中医药大学豫药全产业链研发河南省协同创新中心。

2 方法

2.1 样品制备

冬凌草的干品由常用的自然干燥法(晒干)和真空冷冻干燥法获得。将采集的 3 kg 新鲜冬凌草用超纯水洗净除去杂质，吸干表面水分，均分 3 等份，一份在液氮中冷冻 20 min 后，获得冬凌草鲜品(DLC - X)，于 - 80 ℃冰箱中保存，备用；一份在太阳下自然晒干(晒干品，DLC - S)；一份于 - 20 ℃冰箱中预冻 4 h 后，根据实验室前期建立的鲜药冻干条件，置于真空冷冻干燥机 - 45 ℃下过夜冻干(冻干品，DLC - D)，每种处理方法平行制备 4 次，共 12 个样品。同时记录鲜、干前后冬凌草的重量，分别计算冬凌草鲜品与冻干品、晒干品之间的水分折算比：DLC - X(g)/DLC - D(g)、DLC - X(g)/DLC - S(g)，经计算得冬凌草水分折算比为 3.2、2.7(即 3.2 g 的冬凌草鲜品冻干后，可得到 1 g 的冬凌草晒干品；2.7 g 的冬凌草鲜品晒干后，可得到 1 g 的冬凌草晒干品)。插页ⅩⅩⅦ图 1 为鲜冬凌草与其冻干品、晒干品。将所得样品在液氮中研磨至粉末状，并于 - 80 ℃保存，备用。

进样前，准确称量鲜药样品粉末 100 mg，根据水分折算比称取对应鲜药质量的冻干品、晒干品粉末。将样品分别置于 1.5 mL 离心管中，加入 1 mL 70% 甲醇溶液，涡旋 1.5 min 后水浴超声 90 min，使充分溶解，离心 10 min(16 000 g，4 ℃)，取上清液转移至 96 孔蛋白过滤板，正压氮气过滤，将滤液转移至 2 mL EP 管中，真空干燥，获得的干燥样品中加入 300 μL 40% 甲醇复溶，涡旋 1.5 min 混匀，离心 10 min(16 000 g，4 ℃)，取上清液，即得。吸取等量的冬凌草样本，混合均匀制成质控样本(Quality control, QC)，每进一组样本插入 1 个 QC 样品，用于监测整个分析系统和检测方法的稳定性和重复性[19]。

2.2 色谱检测条件

Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.8 μm),流动相为 0.1% 甲酸 - 水溶液(A),0.1% 甲酸乙腈溶液(B);流速:0.3 mL · min^{-1};梯度洗脱程序:0 ~ 10 min,5% ~60% B;10 ~ 15 min,60% ~85% ;15 ~ 17 min,85% ~ 98% ;17 ~ 17.2 min,98% ~5% B;17.2 ~ 20 min,5% ;柱温:35 ℃,进样量:2 μL。

2.3 质谱检测条件

电喷雾离子源(ESI),正(ESI +)、负(ESI -)两种离子模式进行一级和二级质谱数据的采集;喷雾电压分别为 3800 V (ESI +)/3500 V(ESI -),鞘气流量为 40 L · min^{-1},离子传输管温度 320 ℃,雾化温度 350 ℃;检测方式为全扫描/数据依赖二级扫描(Full - MS/dd - MS^2)模式;对 top 10 的 MS^1 离子进行二级碎裂,并获得对应的 MS/MS 谱图;碰撞能量采用阶梯归一化能级,分别为 20、40、60 eV;离子扫描范围为 m/z 90 ~ 1300。

2.4 数据分析

在正、负离子模式下采集得到的原始质谱数据经 ProteoWizard 转换成 mzXML 格式,然后采用 XCMS 软件进行峰对齐、保留时间校正和提取峰面积,并根据提取化合物的保留时间(Retention time,Rt)、m/z(误差在 10 ppm 之内)、MS/MS、碰撞能等数据信息通过本地自建标准品数据库、公共数据库:MassBank (https://massbank.eu/MassBank/Search)、PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)、HMDB(https://hmdb.ca/)及文献报道进行化学成分的鉴定,并对鉴定的主要化合物进行人工的二次核对、确认;并将归一化后的数据导入到

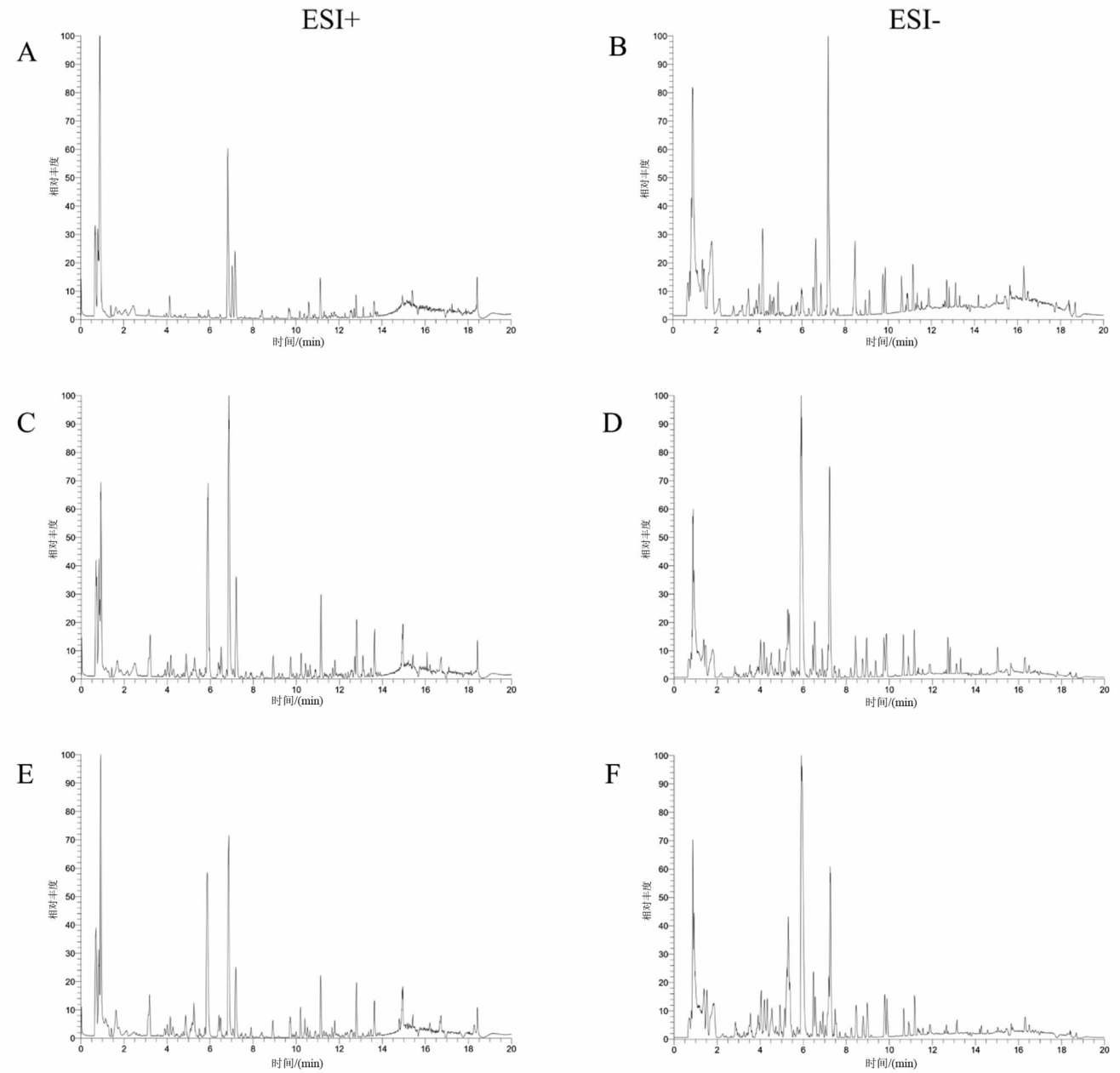


图 2 正、负离子模式下 DLC - X(A - B)、DLC - S(C - D)、DLC - D(E - F)基峰离子流图

表 1 冬凌草化学成分鉴定结果及鲜干冬凌草差异成分

分类	编号	检测 m/z	理论 m/z	保留时间/(min)	加和离子	分子式	误差/ppm	二级离子	化合物名称	差异化合物	DLC-X vs. DLC-D	DLC-X vs. DLC-S
二萜类	1	347.1858	347.1861	5.7	[M+H-H_2O]+	$C_{20}H_{28}O_6$	0.8	347.19, 329.17, 311.16, 301.18, 283.17	冬凌草甲素	√	↓**	↓**
	2	363.1803	363.1809	7.2	[M+H]+	$C_{20}H_{26}O_6$	1.6	281.15, 299.16, 327.16, 345.17, 253.16	冬凌草乙素	√	↓**	↓**
	3	329.1751	329.1753	7.5	[M+H-2H_2O]+	$C_{20}H_{28}O_6$	0.5	329.17, 283.17, 255.17, 227.14, 213.13	香茶菜萜素 A			
	4	347.1856	347.1860	5.9	[M+H-H_2O]+	$C_{20}H_{28}O_6$	1.2	347.19, 311.16, 281.15, 299.16, 329.17	疏花毛萼香茶菜素			
	5	365.1961	365.1967	6.9	[M+H]+	$C_{20}H_{28}O_6$	1.6	347.19, 301.18, 133.06, 329.17, 283.17	长叶单宁内酯			
	6	409.1869	409.1870	5.7	[M+HCOO]-	$C_{20}H_{28}O_6$	0.2	363.18, 345.17, 191.07, 327.16, 159.03	表诺多星醇			
	7	361.1659	361.1662	4.8	[M-H]-	$C_{20}H_{26}O_6$	0.8	361.17, 269.15, 331.16, 313.14, 343.16	表诺多辛			
	8	389.1938	389.1957	5.5	[M+Na]+	$C_{20}H_{30}O_6$	5.0	389.19, 371.18, 353.17, 97.29, 390.2	延命草醇			
	9	365.1973	365.1980	6.0	[M-H]-	$C_{20}H_{30}O_6$	1.8	365.2, 273.19, 255.18, 317.18, 225.13	河北冬凌草甲素 K	√	↓**	↓**
	10	363.1805	363.1809	6.0	[M+H]+	$C_{20}H_{26}O_6$	1.1	363.18, 299.16, 281.15, 345.17, 317.18	小叶香茶菜素 C	√	↓	↑
	11	345.1699	345.1701	7.2	[M+H-H_2O]+	$C_{20}H_{26}O_6$	0.5	345.17, 327.16, 281.15, 299.16, 309.15	大萼香茶菜素 B	√	↓**	↓*
	12	345.1700	345.1702	7.0	[M+H-H_2O]+	$C_{20}H_{26}O_6$	0.5	345.17, 327.16, 281.15, 299.16, 269.15	隐丹参酮类似物	√	↓	↑
	13	297.1487	297.1489	7.2	[M+H-CH_6O_3]+	$C_{20}H_{26}O_6$	0.8	297.15, 251.14, 279.14, 269.15, 145.1	小叶香茶菜素 B	√	↓**	↓*
	14	407.1711	407.1713	7.2	[M+FA-H]-	$C_{20}H_{26}O_6$	0.6	361.17, 343.16, 125.1, 211.1, 149.06	冬凌草甲素 D			
	15	331.1906	331.1906	7.1	[M+H-H_2O]+	$C_{20}H_{28}O_5$	0.1	331.19, 295.17, 313.18, 283.17, 267.17	Effusanin A	√	↓**	↓**
	16	365.1971	365.1972	4.8	[M+OH]-	$C_{20}H_{28}O_5$	0.4	365.2, 317.18, 347.19, 299.17, 329.18	香茶菜素	√	↓**	↓**
	17	331.1882	331.1905	10.8	[M+H-H_2O]+	$C_{20}H_{28}O_5$	7.0	331.19, 313.18, 332.19, 331.09, 331.28	新冬凌草甲素 I			
	18	319.2270	319.2270	7.2	[M+H]+	$C_{20}H_{30}O_3$	0.1	319.23, 283.21, 301.22, 105.07, 131.09	Inflexarabdonin J	√	↓*	↓**
	19	283.2059	283.2062	15.1	[M+H-$_2H_2O$]+	$C_{20}H_{30}O_3$	1.0	283.21, 107.09, 175.11, 91.05, 105.07	紫花山红麻素 J	√	↓	↓**
	20	403.2096	403.2101	6.2	[M+Na]+	$C_{21}H_{32}O_6$	1.3	403.21, 403.09, 385.08, 313.1, 295.09	hebeirubescensin J			
	21	410.2541	410.2549	12.5	[M+NH_4]+	$C_{22}H_{32}O_6$	2.0	315.2, 297.19, 333.21, 269.19, 287.2	hubeirubesin A	√	↓	↑
	22	457.2201	457.2207	12.8	[M+Na]+	$C_{24}H_{34}O_7$	1.4	457.22, 337.18, 397.2, 151.11, 458.22	rubescensin E			
	23	315.1959	315.1963	9.6	[M+H-2H_2O]+	$C_{20}H_{30}O_5$	1.4	315.2, 297.19, 257.15, 285.19, 105.07	Rabdoinflexin B			
	24	333.2065	333.2067	4.9	[M+H-H_2O]+	$C_{20}H_{30}O_5$	0.7	333.21, 285.18, 227.14, 269.19, 267.17	isolushinin C			
	25	303.2322	303.2325	10.5	[M+H]+	$C_{20}H_{30}O_2$	1.1	304.28, 256.26, 303.23, 285.22, 118.09	rubesanolide E			
	26	299.2009	299.2013	10.9	[M+H-H_2O]+	$C_{20}H_{28}O_3$	1.4	299.2, 253.2, 197.13, 199.15, 145.1	isolushinin A	√	↓*	↓*
	27	413.1939	413.1943	9.4	[M+Na]+	$C_{22}H_{30}O_6$	1.0	413.19, 353.17, 205.09, 189.09, 91.05	jianshirubesin K			
	28	361.1649	361.1653	8.4	[M+H-H_2O]+	$C_{20}H_{26}O_7$	1.0	343.15, 133.06, 297.15, 361.16, 315.16	长叶单宁内酯	√	↓	↑
	29	343.1544	343.1547	10.9	[M+H-H_2O]+	$C_{20}H_{24}O_6$	1.0	343.15, 99.08, 315.16, 325.14, 297.15	黄花香茶菜甲素			
	30	343.1554	343.1555	9.7	[M-H]-	$C_{20}H_{24}O_5$	0.4	343.16, 325.14, 149.06, 297.15, 315.16	泻花素 B	√	↓*	↓*
	31	343.1553	343.1554	11.1	[M-H]-	$C_{20}H_{24}O_5$	0.3	343.16, 297.15, 228.08, 343.25, 206.9	黄花香茶菜甲素			
酚酸类	32	455.3525	455.3540	14.4	[M+H]+	$C_{30}H_{46}O_3$	3.2	455.35, 189.16, 409.35, 95.09, 203.18	3,5-二-O-咖啡酰奎宁酸			
	33	473.0729	473.0731	5.1	[M-H]-	$C_{22}H_{18}O_{12}$	0.4	149.01, 179.03, 135.04, 311.04, 293.03	菊苣酸	√	↑*	↑**
	34	197.0450	197.0454	2.9	[M-H]-	$C_9H_{10}O_5$	1.8	135.04, 123.04, 179.03, 197.05, 134.04	丹参素	√	↑*	↓
	35	179.0343	179.0348	5.2	[M-H]-	$C_9H_8O_4$	2.9	135.04, 179.03, 134.99, 179.06, 91.05	咖啡酸	√	↓**	↓*
	36	361.0922	361.0925	4.2	[M+H]+	$C_{18}H_{16}O_8$	0.7	163.04, 135.04, 181.05, 145.03	迷迭香酸	√	↑*	↑*
	37	137.0234	137.0244	4.5	[M-H]-	$C_7H_6O_3$	7.0	93.03, 137.02, 93.03, 136.89, 93.02	水杨酸	√	↓**	↓**
	38	169.0482	169.0484	4.2	[M+H]+	$C_8H_8O_4$	1.0	137.02, 128.95, 169.05, 146.96, 169.1	甲基原儿茶酸酯			
	39	121.0284	121.0293	6.2	[M-H]-	$C_7H_6O_2$	7.1	121.03, 93.03, 108.02, 132.2, 92.91	4-甲醛苯酚			
	40	195.0655	195.0658	7.0	[M+H]+	$C_{10}H_{10}O_4$	1.5	177.05, 145.03, 117.03, 149.06, 163.04	阿魏酸	√	↑*	↑*
	41	355.1029	355.1034	3.7	[M+H]+	$C_{16}H_{18}O_9$	1.5	163.04, 181.05, 355.14, 135.04, 145.03	绿原酸酯			
	42	499.1219	499.1233	8.6	[M+H-H_2O]+	$C_{25}H_{24}O_{12}$	2.8	499.12, 455.13, 271.04, 251.07, 413.12	异绿原酸 b	√	↑**	↑**
	43	137.0234	137.0242	3.8	[M-H]-	$C_7H_6O_3$	5.6	137.02, 136.02, 108.02, 109.03, 93.03	原儿茶醛			
三萜类	44	439.3574	439.3577	18.0	[M+H-H_2O]+	$C_{30}H_{48}O_3$	0.7	439.36, 95.09, 325.29, 109.1, 121.1	桦木酸			
	45	455.3535	455.3546	15.5	[M-H]-	$C_{30}H_{48}O_3$	2.4	455.35, 113.83, 455.51, 113.85, 407.33	桦树脂酸			
	46	439.3575	439.3579	15.6	[M+H-H_2O]+	$C_{30}H_{48}O_3$	1.0	191.18, 203.18, 439.36, 189.16, 249.18	熊果酸			
	47	455.3525	455.3531	13.8	[M+H]+	$C_{30}H_{46}O_3$	1.4	437.34, 409.35, 205.16, 107.09, 175.15	熊果酮酸			
黄酮类	48	425.3780	425.3784	16.7	[M+H-H_2O]+	$C_{30}H_{50}O_2$	0.9	425.38, 95.09, 233.19, 107.09, 121.1	红豆蔻醇			
	49	287.0553	287.0557	7.3	[M+H]+	$C_{15}H_{10}O_6$	1.3	269.06, 241.05, 153.02, 135.04	木犀草素	√	↓	↑
	50	331.0814	331.0821	8.9	[M+H]+	$C_{17}H_{14}O_7$	2.2	331.08, 270.05, 298.05, 316.06, 136.02	黄芩素	√	↑**	↑*

续表 1 冬凌草化学成分鉴定结果及鲜干冬凌草差异成分

分类	编号	检测 m/z	理论 m/z	保留时间/(min)	加和离子	分子式	误差/ppm	二级离子	化合物名称	差异化合物	DLC-X vs. DLC-D	DLC-X vs. DLC-S
	51	361.0919	361.0922	9.7	[M+H]+	$C_{18}H_{16}O_8$	0.8	361.09, 331.04, 313.03, 197.01, 346.07	4′,5,7-三羟基-3,6,8-三甲氧基黄酮	√	↓	↓
	52	433.1135	433.1142	4.8	[M+H]+	$C_{21}H_{20}O_{10}$	1.6	283.06, 313.07, 337.07, 367.08, 397.09	异牡荆素			
	53	287.0553	287.0554	5.4	[M+H]+	$C_{15}H_{10}O_6$	0.4	287.06, 153.02, 121.03, 165.02, 213.05	山柰酚			
	54	271.0604	271.0608	8.5	[M+H]+	$C_{15}H_{10}O_5$	1.3	271.06, 271.17, 153.02, 271.21, 119.05	芹菜素	√	↓**	↓
	55	271.0613	271.0615	8.5	[M-H]-	$C_{15}H_{12}O_5$	0.6	271.06, 119.05, 151.0, 107.01, 93.03	柚皮苷	√	↓**	↓**
	56	287.0562	287.0563	6.3	[M-H]-	$C_{15}H_{12}O_6$	0.3	125.02, 259.06, 287.06, 177.05, 151.0	二氢山柰酚	√	↓**	↓**
其他类	57	282.0845	282.0847	2.1	[M-H]-	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	0.6	150.04, 282.08, 133.01, 108.02, 126.03	鸟苷	√	↓**	↓**
	58	179.0554	179.0561	0.9	[M-H]-	$C_6H_{12}O_6$	3.9	179.06, 161.04, 99.01, 117.02, 125.02	肌醇			
	59	151.0253	151.0261	1.6	[M-H]-	$C_5H_4N_4O_2$	5.4	151.03, 108.02, 151.04, 126.03, 101.02	黄嘌呤	√	↓**	↓**
	60	144.0657	144.0660	2.2	[M-H]-	$C_6H_{11}NO_3$	2.3	102.05, 100.08, 144.07, 126.05, 100.08	4-乙酰胺基丁酸酯	√	↓**	↓**
	61	113.0350	113.0353	1.6	[M+H]+	$C_4H_4N_2O_2$	2.8	113.03, 9				

注:"√"表示筛选的鲜干冬凌草间差异成分(VIP > 1,P<0.05);↓↑表示与 DLC-X 相比,差异成分在 DLC-D、DLC-S 中相对含量(峰面积)的降低或升高情况;*P<0.01,**P<0.05。

SIMCA-P 14.1 软件(Umetrics,瑞典)进行无监督的 PCA 分析,实现鲜干冬凌草代谢轮廓的可视化,并在此基础上进行 OPLS-DA 分析,得到对应的 S-plot 图;以 VIP > 1 和 t 检验 P<0.05 为标准筛选造成鲜干冬凌草差异的潜在化学成分;并通过 MeV 4.8.0 软件进行热图聚类分析,直观地显示差异成分相对定量及在各组中的分布聚类情况。

3 结果

3.1 冬凌草化学成分鉴定

将冬凌草鲜品与干品进行 UHPLC-Q-Exactive HF-X/MS 分析,获得正、负离子模式下样品的基峰离子流图(图 2),在相同离子模式下,不同冬凌草中化合物相似但峰强度有较大差异;将采集的 Rt、质荷比(m/z),二级碎片(MS/MS)等信息与数据库比对共鉴定得到 61 种化合物,包括二萜类化合物 31 个,有机酸类化合物 12 个,三萜类化合物 4 个,黄酮类化合物 9 个,其他类化合物 5 个,具体化合物信息见表 1。

3.1.1 二萜类化合物的鉴定 以化合物 1 冬凌草甲素(Oridonin)为例说明详细介绍该类化合物的鉴定过程,在正离子模式下检测到其准分子离子峰为 m/z 347.185 7 [M+H-H_2O]+,分子式为 $C_{20}H_{28}O_6$,在质谱高能作用下继续失去两分子的 H_2O 分子,产生一系列的特征碎片离子 m/z329.17[M+H-2H_2O]+、m/z 311.16[M+H-3H_2O]+、301.18[M+H-2H_2O-CO]+,然后损失一分子 H_2O 获得碎片 m/z 283.17 [M+H-3H_2O-CO]+,该化合物的质谱裂解行为与 Oridonin 一致[20],故推断该化合物为冬凌草甲素,见图 3。

3.1.2 酚酸类化合物的鉴定 这类化合物的基本结构上一般含有羧基,通常易裂解形成小分子基团生成[21]。以化合物 36 迷迭香酸(Rosmarinic acid)为例,在正离子模式下准分子离子峰为 m/z 361.092 2 [M+H]+,可脱去分子式为 $C_9H_8O_4$ 的中性分子,形成 m/z[M+H-$C_9H_8O_4$]+181.05 的咖啡酸离子碎片,然后连续脱去两分子 H_2O 分别得到碎片 m/z[M+H-$C_9H_8O_4$-H_2O]163.04 和 m/z[M+H-$C_9H_8O_4$-2H_2O]145.03,该化合物为迷迭香酸的裂解行为一致[22],见图 4。

3.1.3 三萜类化合物的鉴定 以化合物 46 熊果酸(Ursolic acid)为例,在正离子模式下准分子离子峰为 m/z[M+H-H_2O]+439.357 5,然后发生 RAD 裂解产生 m/z 249.18 和 m/z 191.18 的离子碎片,接着失去一分子 HCOOH 得到 m/z 203.18 碎片,并再次失去 CH_2,产生 m/z 189.16 的二级离子,与文献报道中熊果酸的裂解行为一致[23],见图 5。

3.1.4 黄酮化合物的鉴定 以化合物 49 木犀草素(Luteolin)为例,在正离子模式下检测到准分子离子峰 m/z 287.055 3 [M+H]+,然后损失 C_8O_2 得到碎片离子 m/z 153.02[M+

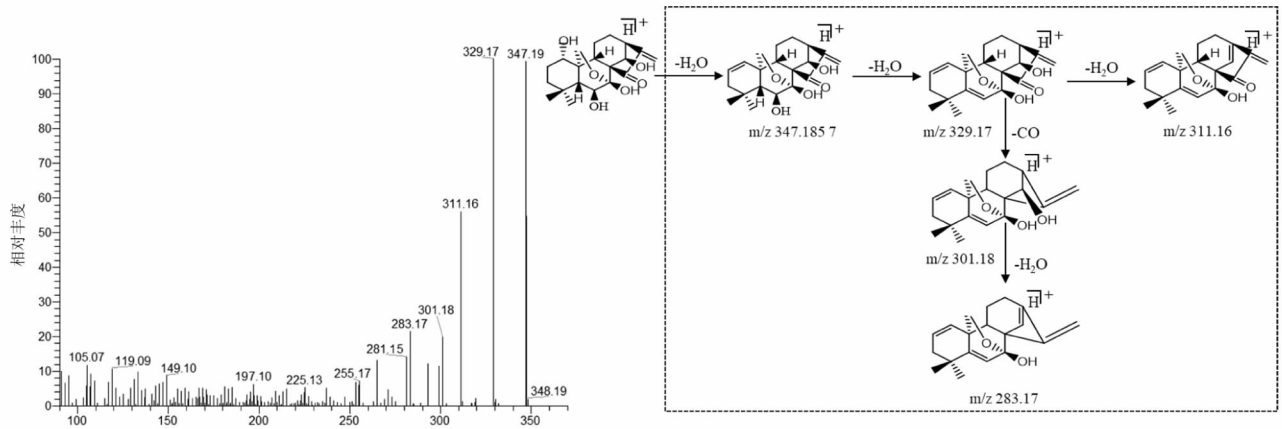


图 3 冬凌草甲素(Oridonin)的质谱图及可能的裂解途径

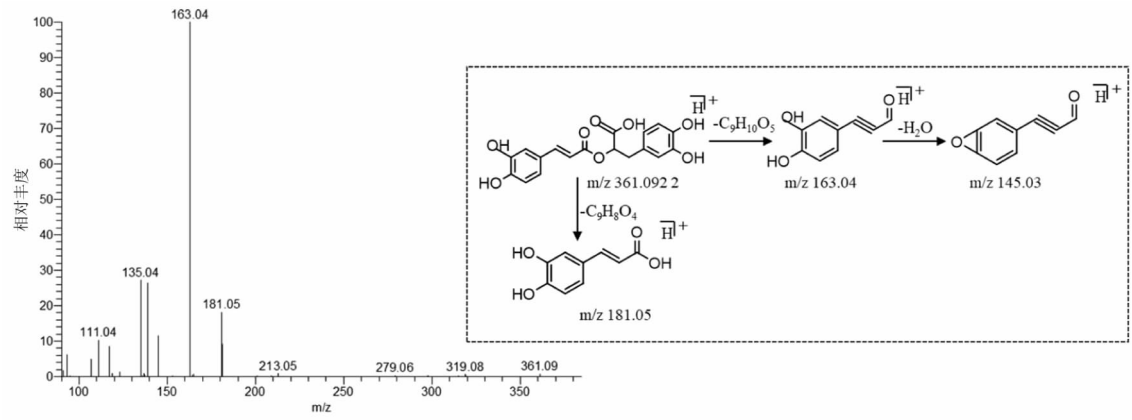


图 4 迷迭香酸(Rosmarinic acid)的质谱图及可能的裂解途径

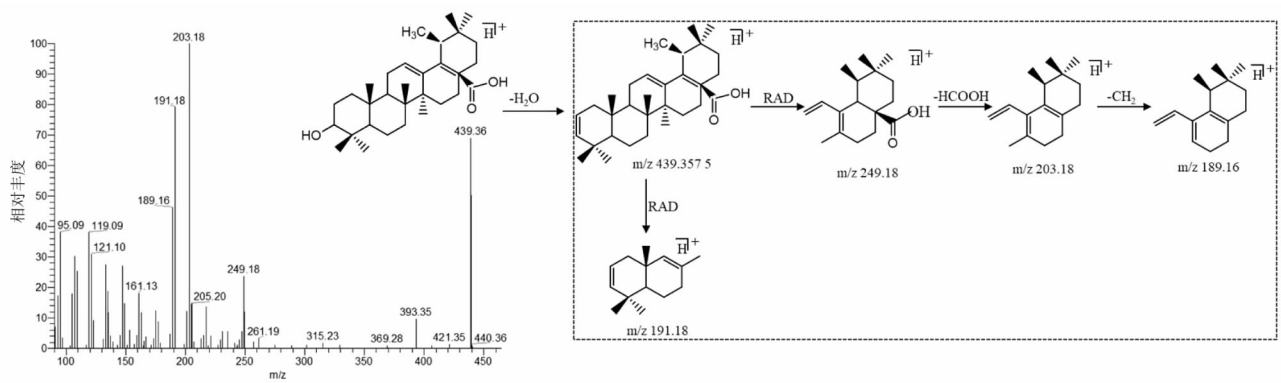


图 5 熊果酸(Ursolic acid)的质谱图及可能的裂解途径

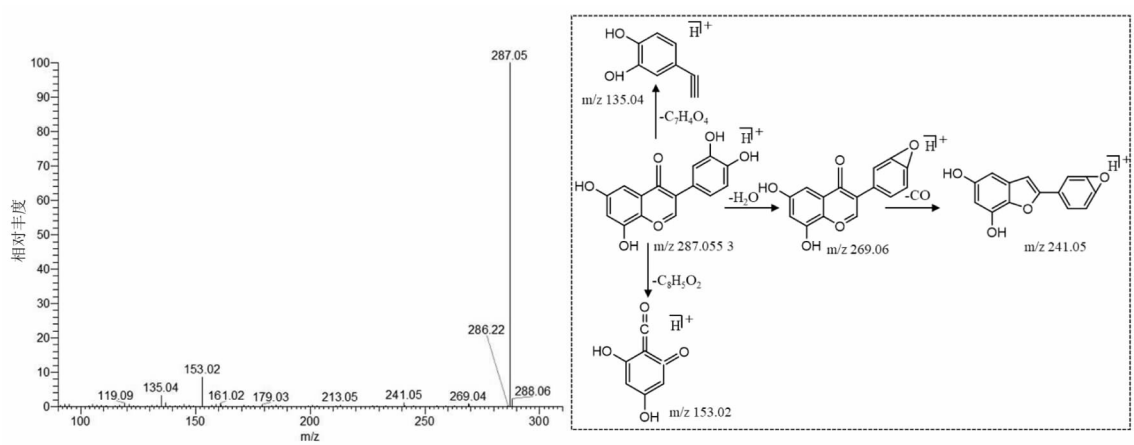


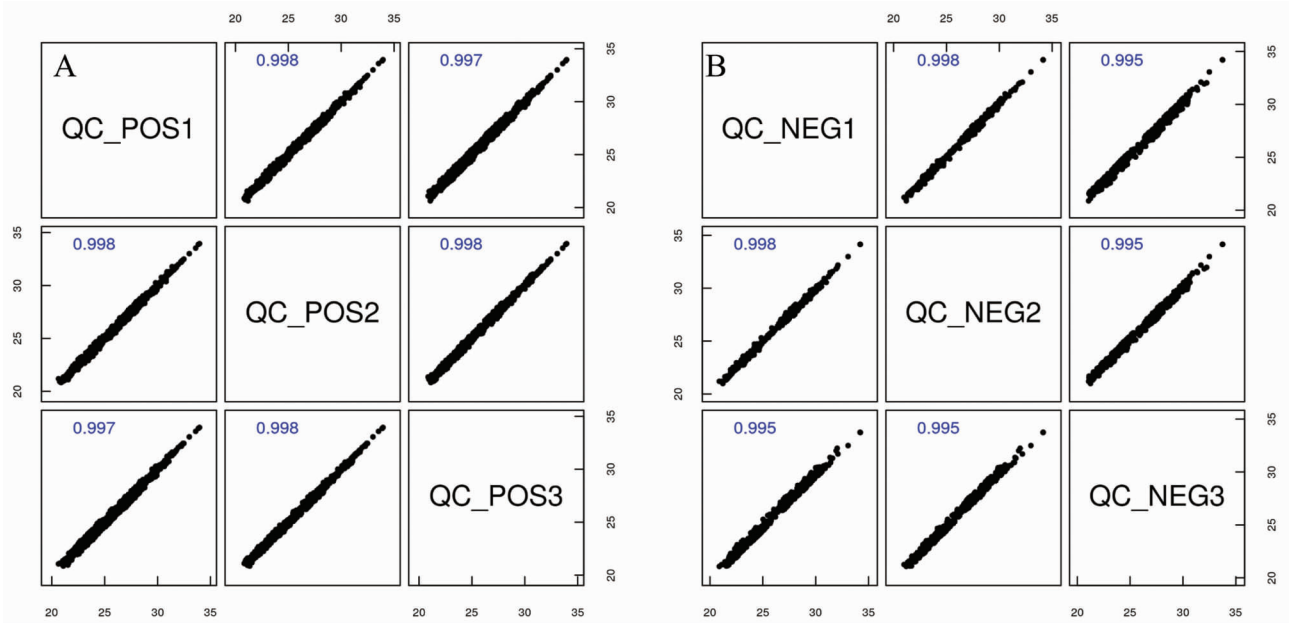
图 6 木犀草素(Luteolin)的质谱图及可能的裂解途径

$H-C_8O_2]^+$,损失一分子 H_2O 产生离子碎片 m/z 135.04[M + $H-C_8O_2-H_2O]^+$,通过与文献和数据库对比鉴定该化合物为木犀草素[24],见图 6。

3.2 多元统计分析

3.2.1 不同形式冬凌草的 PCA 分析 PCA 作为一种无监督的数据聚类方法,可实现数据的降维分析,直观地显示不同组样本间代谢轮廓的差异[7]。将质谱数据导入 SIMCA - P 14.1 软件进行 PCA 分析,获得正、负离子模式下的 PCA 得分图。由插页ⅩⅩⅧ图 7A、插页ⅩⅩⅧ图 7B 可知,QC 样本点明显紧密聚类,对其进行 Pearson 相关性分析,图 8A 和图 8B 为正、负离子模式下的相关性图谱,由图可知 QC 样本间的相关性系数 r 均在 0.9 以上,说明实验具有较好的重复性,可用于接下来的进样分析;鲜干冬凌草组各自聚为一类,且发生分离,其中两种干品相聚较近,并分别与鲜品有不同程度的远离,说明冬凌草鲜品和干品化学成分整体上有较大差异。

3.2.2 差异化学成分的筛选 OPLS - DA 是一种有监督的判别分析统计方法,可以滤除与分类信息无关的噪音,并有效地表明组间的两两差异[25],使组间差异最大化。为了进一步筛选造成鲜干冬凌草差异的化合物,在 PCA 分析的基础上分别进行 DLC - X 与 DLC - S、DLC - D 的 OPLS - DA 分析,得到



注:图中黑点代表 QC 样本提取到的离子峰,横、纵坐标代表离子峰信号强度值的对数值。

图 8 正(A)、负(B)离子模式下 QC 样本相关性图谱

正、负离子模式下的 DLC－X 与 DLC－S(5A－B)、DLC－X 与 DLC－D 间的 OPLS－DA 得分图(插页ⅩⅩⅦ图 9C、插页ⅩⅩⅦ图 9D)。经 7 次循环交互验证得到 OPLS－DA 数据模型评价参数(R^2Y,Q^2)。其中,DLC－X *vs.* DLC－S 正离子模式下 R^2Y = 0.997,Q^2 = 0.979,负离子模式 R^2Y = 0.995,Q^2 = 0.980;DLC－X *vs.* DLC－D 正离子模式 R^2Y = 0.996,Q^2 = 0.977,负离子模式 R^2Y = 0.997,Q^2 = 0.981,Q^2 均大于 0.5,表明OPLS－DA 数据模型稳定可靠,具有较好预测能力;正、负离子模式下进行 200 次置换检验得 R^2、Q^2 数值均接近 1(插页ⅩⅩⅦ图 10),说明 OPLS－DA 模型质量较好,未发生过度拟合,可用于接下来的差异分析。通常 VIP > 1,P < 0.05 的化合物对组间的差异有显著贡献,在 S－plot 图中(插页ⅩⅩⅨ图 11),红色的原点代表潜在的差异标志物,共鉴定出共有的差异成分 32 种,包括冬凌草中的主要活性成分冬凌草甲素、Ponicidin 等二萜类化合物,由于这些差异成分均来自冬凌草中的化合物,在此不再单独列出,以√在冬凌草化合物鉴定表中进行标识(表 1);以各差异成分的峰面积为相对含量在 MeV 4.8.0 软件中进行热图聚类分析,直观地显示各组样品中差异成分含量的变化,由插页ⅩⅩⅨ图 12 可知,鲜、干两种冬凌草干品 DLC－S 与 DLC－D 首先聚为一类,然后与 DLC－X 聚类,与 PCA 结果具有良好的一致性。与鲜品相比,差异成分在干品中相对含量发生了不同程度的变化,差异成分在鲜品中的含量多高于其干品。

4 讨论

我国应用鲜药的历史悠久,最早可追溯至秦汉时期,明清温热病流行,鲜药达到应用鼎盛期,是中医临床治疗疾病的一种不可或缺的药用形式[3,26]。很多中药或复方均直接以鲜品入药,如鲜马齿苋、鲜石斛、三鲜汤(鲜石斛、鲜地黄、鲜沙参或鲜大青叶、鲜薄荷、鲜青蒿)和金龙胶囊(鲜守宫、鲜金钱、白花蛇和鲜蕲蛇)等。然而目前关于鲜药的研究多集中在古文献挖掘、鲜药用药规律经验探析等理论层面[27－30],缺乏有关鲜干中药整体化学成分及药理作用临床疗效等方面系统全面的比较研究,进而阻碍了我国鲜药资源进一步的开发应用,目前对冬凌草的研究主要集中在对其干品化学成分和药理活性上,尚缺乏对其鲜干品相关的系统比较研究。前期本课题组初步的药理学研究表明冬凌草鲜品抗食管癌的功效高于其干品,本研究从化学成分的角度进一步揭示鲜干冬凌草的物质基础差异。

本研究首次通过 UHPLC－Q－Exactive HF－X/MS 技术快速全面地分析了冬凌草的化学成分,并结合多元统计分析方法寻找鲜干冬凌草间的差异成分。从冬凌草中共鉴定 61 种化学成分,其中二萜类化合物 31 个,有机酸类化合物 12 个,三萜类化合物 4 个,黄酮类化合物 9 个,其他类化合物 5 个;从中筛选出共有的差异化学成分 32 种,其中二萜类成分有 15 个,主要表现为相对含量(峰面积)上的差异,未发现化学成分种类的变化;多数差异成分的含量以鲜品中含量较高,少部分呈下降趋势;热图聚类分析直观地显示各差异成分的变化情况。化学成分是中药发挥功效的物质基础,成分或组分的改变会表现为整体药理活性的差异,中药鲜药由于未经加工炮制过程,往往能保留更完整的化学成分。冬凌草中的二萜类成分特别是冬凌草甲素、Ponicidin,是冬凌草发挥抗癌功效的主要药效成分[31－32],他们在鲜品中明显高于其干品,这可能与干燥过程对鲜品中化学成分的破坏有关,进一步与前期的冬凌草鲜品抗食管癌功效优于其干品的初步实验结果相一致。本研究为冬凌草特别是鲜冬凌草资源作为食品药品的开发和临床的合理应用提供数据基础,同时也进一步丰富和完善了冬凌草化学成分数据库。但在实验过程中也应考虑到 UHPLC－Q－Exactive HF－X/MS 技术自身的局限性,如分析样本前,需要对样本进

行粉碎提取,但是由于鲜药本身具有较大含水量,以一定浓度溶剂提取时会导致提取溶剂浓度的降低,进而导致鲜干样品提取方法的不平行,会在一定程度上影响实验结果,在未来分析可以考虑使用无损样本的质谱成像技术直观地对鲜干中药差异成分进行定性和定量分析。

参考文献

[1] 赵日开, 蒋鑫, 杨卉妍, 等. 鲜车前草的应用考证及现代临床应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(5): 159 – 169.

[2] 张瑾,李秀敏,苗明三. 基于数据挖掘的中药鲜药临床应用特点分析[J]. 中药药理与临床,2021,37(6): 181 – 185.

[3] 安一珂,彭孟凡,杨卉妍,等. 中药鲜药发展史、鲜药理论及未来展望[J]. 中草药,2024,55(3): 1046 – 1052.

[4] 黄爱红, 谭小竹, 刘海霞, 等. 鲜、干铁皮石斛营养及功效成分的含量差异研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(7): 298 – 304.

[5] GU J F, ZHENG Z Y, YUAN J R, et al. Comparison on hypoglycemic and antioxidant activities of the fresh and dried *Portulaca oleracea* L. in insulin – resistant HepG2 cells and streptozotocin – induced C57BL/6J diabetic mice[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 161: 214 – 223.

[6] HUI A L, XU W Q, WANG J H, et al. A comparative study of pectic polysaccharides from fresh and dried *Dendrobium officinale* based on their structural properties and hepatoprotection in alcoholic liver damaged mice[J]. Food Funct, 2023, 14(9): 4267 – 4279.

[7] WU Y J, HE L L, YANG Y, et al. Influence of heat processing on the anti – inflammatory activity of fresh *Smilax glabra* based on PDE4 inhibition[J]. Food Chem X, 2022, 15: 100425.

[8] LAI W J, YANG S S, LIN X, et al. *Zingiber officinale*: a systematic review of botany, phytochemistry and pharmacology of gut microbiota – related gastrointestinal benefits[J]. Am J Chin Med, 2022, 50(4): 1007 – 1042.

[9] ZHENG Y, LEI L, LIANG S, et al. Protective effect of fresh/dry dandelion extracts on APAP – overdose – induced acute liver injury [J]. Chin J Integr Med, 2022, 28(8): 683 – 692.

[10] 杨成俊,王理想,封亮. 鲜、干马齿苋药材中生物碱类成分的含量差异[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(24): 88 – 90.

[11] 高世勇,唐博琪,魏新瑞,等. 冬凌草的本草考证、化学成分、药理作用及其临床应用 中草药,2023,54(19): 6543 – 6554.

[12] 苏秀红,尹磊,陈随清. 冬凌草 1 – 脱氧木酮糖 – 5 – 磷酸还原异构酶(DXR)基因克隆与分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(12): 37 – 41.

[13] CHEN X, DAI X, LIU Y, et al. *Isodon rubescens*(hemls.)H*ara*.: a comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 766581.

[14] 鲁国荣. 冬凌草保健饮料的生产工艺研究[J]. 中国酿造,2011(11): 196 – 198.

[15] LIAN C L, ZHANG F, YANG H, et al. Multi – omics analysis of small RNA, transcriptome, and degradome to identify putative miRNAs linked to MeJA regulated and oridonin biosynthesis in *Isodon rubescens*[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 258: 129123.

[16] 连文琰. 抗癌中草药与验方 [M]. 福州:福建科学技术出版社 2002:146.

[17] CUI W Q, ZHANG J W, WU D Q, et al. Ponicidin suppresses pancreatic cancer growth by inducing ferroptosis: Insight gained by mass spectrometry – based metabolomics [J]. Phytomedicine, 2022, 98: 153943.

[18] 刘伟,张彦忠,白素平. 基于反向分子对接和网络药理学确定冬凌草甲素抗肿瘤的潜在作用机制[J]. 中国新药杂志,2019,28(17): 2148 – 2156.

[19] 赵江怡, 唐进程, 陈欣欣, 等. 基于拟靶向代谢组学的 3 种基原大黄的差异成分研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(9): 2393 – 2401.

[20] WONG L L, LIANG Z T, CHEN H B, et al. Rapid differentiation of *Xihuangcao* from the three *Isodon* species by UPLC – ESI – QTOF – MS/MS and chemometrics analysis[J]. Chin Med, 2016, 11: 48.

[21] 李雅静,王胜超,张振凌,等. 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[J]. 中华中医药学刊,2025,43(4):116 – 128,285 – 286.

[22] 郭少波, 徐露露, 蒋丽娟, 等. 迷迭香酸的大鼠体内代谢产物及代谢途径分析[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(21): 4704 – 4712.

[23] 吴丽娟,南瑞茹,王倩,等. 利用全碰撞能二级质谱区分 4 个三萜酸同分异构体[J]. 质谱学报,2025,46(1):3 – 10.

[24] 林结玲, 周熙, 赵昕, 等. 基于 UPLC – Q – TOF MS 鉴定复方香需水化学成分[J]. 分析测试学报, 2024, 43(4): 541 – 554.

[25] TANG C Y, LI X Z, WANG T, et al. Characterization of metabolite landscape distinguishes medicinal fungus *Cordyceps sinensis* and other *Cordyceps* by UHPLC – Q exactive HF – X untargeted metabolomics[J]. Molecules, 2023, 28(23): 7745.

[26] 曹利华, 赵院院, 苗晋鑫, 等. 基于 TGF – β 信号通路探讨鲜芦根抗慢性支气管炎气道炎症作用机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5887 – 5894.

[27] 孟驿佳,康乐,王泽茜,等. 中药鲜(干)品化学成分和药理作用对比分析[J]. 中华中医药杂志,2024,39(1): 342 – 346.

[28] 张亚楠, 惠香香, 秦格, 等. 基于数据挖掘的《本草纲目》中鲜药应用的规律及特点分析[J]. 中药药理与临床, 2023, 39(4): 97 – 101.

[29] 张小磊,李秀敏,苗明三. 中药临床鲜药应用特点及鲜药理论分析[J]. 中华中医药杂志,2022,37(11): 6402 – 6405.

[30] 贾晓斌, 郑智音, 黄洋, 等. 基于组分结构理论的鲜药物质基础研究思路与方法[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18): 2595 – 2598.

[31] 李晓天, 褚延乐, 吴凤娟, 等. 超滤法测定冬凌草乙素的血浆蛋白结合率[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(20): 2418 – 2422.

[32] LIU X, XU J M, ZHOU J, et al. Oridonin and its derivatives for cancer treatment and overcoming therapeutic resistance[J]. Genes Dis, 2021, 8(4): 448 – 462.