

# 基于非靶向代谢组学技术分析正品及伪品防风药材的化合物差异性

林丽娜<sup>1</sup> 高军<sup>2</sup> 陈昕<sup>3</sup> 程东岩<sup>\*</sup> 王隶书<sup>2</sup> 王超楠<sup>3</sup>

(1.华润三九医药股份有限公司, 深圳 518110; 2.吉林省中医药科学院, 长春 130012; 3.长春中医药大学长春 130117)

**摘要:** 目的对防风药材正品及伪品进行非靶向代谢组学研究。方法基于超高效液相高分辨质谱联用技术(UHPLC-HRMS/MS)分析防风药材正品及伪品化学组分的差异性, 采用正交偏小二乘法(OPLS-DA)判别分析, 筛选差异代谢产物。结果通过数据库鉴定, 在正离子模式下, 鉴定出代谢物566个, 负离子模式下, 鉴定出代谢物438个。根据VIP值分析筛选其差异代谢物, 筛选出与正、伪品相关的潜在代谢标志物106个, 其中影响较大的成分15个(正离子模式下6个, 负离子模式下9个)。结论通过分析, 确定了与防风正、伪品药材相关的差异代谢物, 从而为防风药材真伪鉴别及其物质基础研究提供参考依据。

**关键词:** 防风; UHPLC-HRMS/MS; 非靶向代谢组学; OPLS-DA; 差异代谢物

防风为伞形科植物防风 *Saposhnikovia divaricata*(Trucz.) Schischk. 的干燥根, 具有祛风解表、胜湿止痛、止痉的功效, 主要用于感冒头痛、风湿痹痛、风疹瘙痒、破伤风等症。目前, 防风药材品质差异较大, 主要体现在规范化种植防风面积较小以及地方习用品的混入, 造成主流市场真伪混杂、质量良莠不齐。防风药材正品及伪品在外观上辨识度不高, 无法准确区分。本研究通过收集多批次防风药材正品及其伪品, 运用非靶向代谢组学技术筛选其差异代谢物, 以期对防风药材真伪鉴别及其物质基础研究提供参考依据。

## 1. 仪器与试剂

超高效液相色谱仪(Thermo Fisher Scientific); Q-Exactive HF 高分辨质谱; 甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯。正品防风药材20批及伪品防风药材10批, 均由长春中医药大学姜大成教授进行鉴定。

## 2. 方法与结果

### 2.1 色谱条件与质谱条件

#### 2.1.1 色谱条件

Zorbax Eclipse C<sub>18</sub> 色谱柱(1.8 μm\*2.1\*100mm); 流动相: 乙腈(A) -0.1%甲酸水溶液(B) 梯度洗脱, 0~2min, 5%A, 2~6min, 5%~30%A, 6~7 min, 30%A, 7~12min, 30%~78%A, 12~14min, 78%A, 14~17min, 78%~95%A, 17~20min, 95%A, 20~21min, 95%~5%A, 21~25min, 5%A; 柱温 30 °C; 流速 0.3ml·min<sup>-1</sup>; 进样量 2 μl。

#### 2.1.2 质谱条件

高分辨 Q-Exactive HF 质谱, 分别采用电喷雾电离(ESI)正离子和负离子模式进行检测。加热电喷雾离子源(HESI); 质谱扫描范围在 100 至 1500 m/z, 扫描速度为 1000 Da/s。喷雾电压 3.50 kV; 毛细管温度 330 °C; 加热器温度 325 °C。鞘气、辅助气体和吹扫气体分别 50.0、12.0 和 1.0 arb。一级 MS 扫描的分辨率设置为 120000, 二级 MS/MS 扫描的分辨率为 60000。

### 2.2 样品提取

分别称取混合均匀的样品 100 mg 置于 2 ml 离心管中, 加入 1 ml 70% 甲醇和 3 mm 规格钢珠, 用全自动样品快速研磨仪(JXFSTPRP-48, 70Hz)震荡破碎 3 分钟, 冷却后低温超声(40K Hz) 10 分钟, 4 °C 低温下 12000 rpm 离心 10 分钟, 取上层清液稀释 2~100 倍, 加入内标, 过 0.22 μm PTFE 滤头上机检测。

## 2.3 结果

### 2.3.1 代谢物定性

使用 Compound Discover 3.2 进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等工作, 同时利用 Thermo mzCloud 在线数据库, Thermo mzValut 本地数据库, ChemSpider 数据库等进行物质鉴定。在正离子模式下, 共检出代谢物 566 个, 负离子模式下, 检出代谢物 438 个。

### 2.3.2 差异分组的正交偏小二乘法判别分析

利用 SIMCA 软件进行 OPLS-DA 模型计算, R<sup>2</sup><sub>x</sub>、R<sup>2</sup><sub>y</sub>、Q<sup>2</sup> 值均大于 0.8, 均为有效模型, 样本区分非常显著, 样本基本全部处于 95% 置信区间内。

### 2.3.3 差异代谢物筛选

采取将差异倍数(Fold Change)和 P 值相结合的方法来筛选差异代谢物。根据上述原则, 防风正品及其伪品在正负离子模式共筛选到差异代谢物 106 个, 其中影响较大的成分有 15 个(VIP>4), 正离子模式下影响较大的成分有 6 个(升麻素苷、N,N-二甲基-3,3-二苯基-1-丙胺等), 负离子模式下影响较大的成分有 9 个(亥茅酚苷、芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸苷等)。

## 3. 讨论

非靶标代谢组学主要定性或半定量分析细胞内外整体代谢产物, 是获得细胞内外全面代谢产物信息的主要技术手段。本研究通过液质联用技术可快速、有效地对防风药材正品及其伪品中化学成分进行分析, 从中得到影响较大的差异代谢物, 从而为防风药材真伪鉴别及其物质基础研究提供参考依据。

## 参考文献

- [1]胡贞贞, 黄伟展, 卢昌华, 等. 不同产地广藿香非靶向代谢组学研究[J]. 中药材, 2019, 42(2): 271-278
- [2]霍金海, 刘亚娟, 任晓蕾, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的防风质量差异标志物初步研究 [J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(1): 112-118
- [3]李萌萌, 王一凯, 盛艳华, 等. UPLC-QTOF-MS非靶向代谢组学技术在人参和西洋参药性差异作用机制研究中的应用[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5930-5935

基金项目: 国家重点研发计划(项目编号: 2019YFC1711405)  
通信作者: 程东岩