不同基原白芷中香豆素类成分的差异分析Δ

林颖瑜[1*]，杨莹莹[1]，田恩伟[1,2,3#]（1.南方医科大学中医药学院，广州 510515；2.广东省中药制剂重点实验室，广州 510515；3.广东省中药制剂技术工程实验室，广州 510515）

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2023）12-1422-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.12.03

摘 要 目的 筛选两种基原白芷（杭白芷与祁白芷）的香豆素类差异成分。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用（UPLC-Q-Exactive-MS/MS）的非靶向代谢组学技术分析6批杭白芷和12批祁白芷的香豆素类成分，运用主成分分析、偏最小二乘法判别分析和正交偏最小二乘法判别分析方法筛选差异成分，再基于差异成分对样品进行聚类分析。**结果** 18批样品中共鉴定出41种香豆素类成分，有23种为差异成分，其中6种差异成分在杭白芷中含量更高，其余17种差异成分在祁白芷中含量更高。异紫花前胡内酯半乳糖苷在杭白芷中含量明显高于祁白芷。基于23种差异成分，可把杭白芷和祁白芷分别聚为一类。**结论** 筛选出的香豆素类差异成分能很好地区分杭白芷与祁白芷，其中异紫花前胡内酯半乳糖苷的贡献最大，可尝试将其用于杭白芷与祁白芷的鉴别。

关键词 白芷；非靶向代谢组学；多元统计分析；香豆素；基原鉴定

Differential analysis of coumarins in *Angelica dahurica* from different origins

LIN Yingyu[1], YANG Yingying[1], TIAN Enwei[1,2,3] (1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Guangdong Province Key Laboratory of TCM, Guangzhou 510515, China; 3. Guangdong Laboratory of TCM Preparation Technology Engineering, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To screen the differential components of coumarins in *Angelica dahurica* from two origins (*A. dahurica* cv. 'Hangbaizhi'; *A. dahurica* cv. 'Qibaizhi'). **METHODS** Non-targeted metabolomics technique of UPLC-Q-Exactive-MS/MS was used to analyze the coumarins in 6 batches of *A. dahurica* cv. 'Hangbaizhi' and 12 batches of *A. dahurica* cv. 'Qibaizhi'. The differential components were screened by principal component analysis, partial least squares discriminant analysis and orthogonal partial least squares discriminant analysis. Cluster analysis was performed on differential components. **RESULTS** A total of 41 coumarins were identified in 18 batches of samples, in which 23 coumarins were differential components. Therein, 6 differential components were higher in content in *A. dahurica* cv. 'Hangbaizhi', while 17 differential components were higher in content in *A. dahurica* cv. 'Qibaizhi'. The content of marmesin galactoside in *A. dahurica* cv. 'Hangbaizhi' was significantly higher than that in *A. dahurica* cv. 'Qibaizhi'. Based on 23 differential components, *A. dahurica* cv. 'Hangbaizhi' and *A. dahurica* cv. 'Qibaizhi' could be grouped into one category, respectively. **CONCLUSIONS** The screened differential components of coumarins can be used to distinguish *A. dahurica* cv. 'Hangbaizhi' from *A. dahurica* cv. 'Qibaizhi', especially marmesin galactoside contributed the most, which can be used to identify *A. dahurica* cv. 'Hangbaizhi' and *A. dahurica* cv. 'Qibaizhi'.

KEYWORDS *Angelica dahurica*; Non-targeted metabolomics technique; multivariate statistical analysis; coumarin; origin identification

白芷为我国大宗常用药材，来源于伞形科植物白芷*Angelica dahurica*（Fisch. ex Hoffm.）Benth. et Hook. f. 或杭白芷*A. dahurica*（Fisch. ex Hoffm.）Benth. et Hook. f. var. *formosana*（Boiss.）Shan et Yuan的干燥根[1]。白芷药性辛、温，具有解表散寒、祛风止痛之功效，临床可用于治疗偏头痛、慢性鼻窦炎、类风湿性关节炎等多种疾病[2—4]。

当前，我国药用白芷有4种商品类型：杭白芷、川白芷、祁白芷和禹白芷，其分别主产于我国浙江杭州、四川遂宁、河北安国及河南禹州[5]。《中国植物志》英文版将杭白芷和川白芷归为一类，祁白芷和禹白芷归为一类，分别来源于白芷*A. dahurica*（Fisch. ex Hoffm.）Benth. et Hook. f. 的栽培变种杭白芷*A. dahurica* cv. 'Hangbaizhi'和祁白芷*A. dahurica* cv. 'Qibaizhi'[6]。传统认为，杭白芷因其"条粗，体重，质坚，气芳香浓郁"而质优于祁白芷[7—8]。

现代药理学及药物化学研究表明，香豆素类成分为白芷的主要活性成分[9]，与其解表镇痛的功效密切相

Δ**基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.81603226）

＊**第一作者** 硕士研究生。研究方向：中药资源与鉴定。E-mail：leahlin12341234@foxmail.com

＃**通信作者** 副教授，硕士生导师，博士。研究方向：中药资源与鉴定。E-mail：tianenwei@126.com

关[10]。2020年版《中国药典》以香豆素类成分欧前胡素作为单一指标对白芷进行质量评价[1]。陈琳等[11]和吴宝成等[12]分别基于5～9种香豆素类成分的含量对不同产地的白芷质量进行了评价，但研究结果存在一定差异。目前从白芷中分离出的香豆素类成分多达50多种[9]，仅以1种或几种特定香豆素类成分作为质量评价指标不符合中药整体性的特点，也无法体现不同基原白芷的质量差异。因此，有必要对两种基原白芷的整体香豆素类成分进行系统分析。

本研究采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用（UPLC-Q-Exactive-MS/MS）的非靶向代谢组学技术分析杭白芷和祁白芷的香豆素类成分，运用主成分分析（principal component analysis，PCA）、偏最小二乘法判别分析（partial least squares discriminant analysis，PLS-DA）和正交偏最小二乘法判别分析（orthogonal partial least squares discriminant analysis，OPLS-DA）方法对得到的香豆素类成分进行鉴定并筛选差异成分，进而对不同基原的白芷进行聚类分析，寻找对两种基原白芷质量差异贡献最大的香豆素类成分，以期为白芷的来源鉴别、质量评价以及综合开发利用提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括MS105DU型电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）、Centrifuge-5424R型冷冻离心机（德国Eppendorf公司）、Wonbo-96c型高通量组织破碎仪（上海万柏生物科技有限公司）、LNG-T88型台式快速离心浓缩干燥器（太仓市华美生化仪器厂）、JXDC-20型氮气吹扫仪（上海净信实业发展有限公司）、Vanquish Horizon型UHPLC液相色谱系统和Q-Exactive型质谱仪系统（美国Thermo Fisher Scientific公司）。

1.2 主要药品与试剂

从四川、河南、河北等地采集了杭白芷*A. dahurica* cv. ‘Hangbaizhi’与祁白芷*A. dahurica* cv. ‘Qibaizhi’根部材料共18份（来源信息见表1），采集时间为2019年（杭白芷采收期为6月中下旬－7月上旬，祁白芷采收期为8－9月），将其根部材料自然风干并储存于南方医科大学中医药学院标本馆。上述样品均由南方医科大学中医药学院田恩伟副教授鉴定，均为真品。实验用试剂均购自美国Thermo Fisher Scientific公司，甲醇、乙腈为质谱纯，水为超纯水。

表1 白芷药材来源信息

样品批次	产地	采集地点经纬度	基原植物鉴定	品种编号
S1～S6	四川广元	N：31°56′38″；E：105°38′39″	杭白芷	HBZ
S7～S12	河南禹州	N：34°12′01″；E：113°34′32″	祁白芷	QBZ
S13～S18	河北安国	N：38°25′11″；E：115°19′37″	祁白芷	QBZ

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取两种基原的白芷样品粉末50 mg，放入1.5 mL离心管中，加入400 μL提取液（乙腈与甲醇的体积比为1∶1），涡旋混匀30 s后，低温超声提取30 min（5 ℃，40 kHz），静置30 min（－20 ℃），于4 ℃下以13 000×*g*离心15 min；取上清液，用氮气吹干，再用120 μL复溶液（乙腈与水的体积比为1∶1）复溶，低温超声萃取5 min（5 ℃，40 kHz），再于4 ℃下以13 000×*g*离心5 min，取上清液作为供试品溶液。

2.2 色谱条件

色谱柱为BEH C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；以水（含0.1%甲酸）为流动相A，乙腈-异丙醇溶液（体积比为1∶1，含0.1%甲酸）为流动相B进行梯度洗脱（0～3.0 min，95%A→80%A；3.0～9.0 min，80%A→5%A；9.0～13.0 min，5%A；13.0～13.1 min，5%A→95%A；13.1～16.0 min，95%A）；流速为0.40 mL/min；柱温为40 ℃；进样量为10 μL。

2.3 质谱条件

采用正负离子扫描模式，质量扫描范围（*m*/*z*）为50～1 000；离子喷雾电压中正离子电压为5 000 V，负离子电压为4 000 V，去簇电压为80 V；喷雾气压力为50 psi，辅助加热气压力为50 psi，气帘气压力为30 psi；离子源加热温度为500 ℃；循环碰撞能为20～60 V。

2.4 数据处理与统计分析

取供试品溶液适量，按“2.2”“2.3”项下色谱和质谱条件进样分析，将原始的质谱数据导入代谢组学处理软件Progenesis QI中进行基线过滤、峰识别和积分、保留时间校正、峰对齐，最终得到一个保留时间、质荷比和峰强度的数据矩阵。数据矩阵用80%规则来去除缺失值，再进行空缺值填补。为减小样品制备及仪器不稳定带来的误差，本研究将总峰归一化后取其对数值用于后续分析。将预处理后的数据矩阵导入人类代谢组数据库（the Human Metabolome Database，HMDB）化学小分子数据库（https://hmdb.ca/）进行成分鉴定分类，筛选出两种基原白芷中的香豆素类成分；将鉴定所得的数据导入SIMCA 14.1软件进行无监督的PCA和有监督的PLS-DA、OPLS-DA多元统计分析，使用200次循环交互验证来评估模型的稳定性。基于OPLS-DA模型得到的变量重要性投影（variable importance in projection，VIP）和SPSS 26.0软件进行*t*检验得到的*P*值，以VIP值＞1.0、*P*＜0.05的成分为差异成分；再根据差异成分，用SPSS 26.0软件对两种基原白芷作聚类分析，以检查所筛得差异成分的可靠性。

2.5 白芷香豆素类成分鉴定

根据HMDB化学小分子数据库的分析结果，本研究在2种基原白芷中共筛选鉴定出41种香豆素类成分，在负离子模式下有22种，在正离子模式下有19种。成分详细信息见表2。

表2 白芷香豆素类成分鉴定结果

序号	离子模式	保留时间/min	成分名称	分子式	*m/z*
1	负离子	1.311 5	异紫花前胡内酯半乳糖苷	$C_{20}H_{24}O_9$	445.092 264 715
2	正离子	1.429 4	trans-grandmarin	$C_{15}H_{16}O_6$	337.093 060 109
3	正离子	1.650 1	伞形花内酯	$C_9H_6O_3$	163.038 399 567
4	正离子	1.664 2	7-乙酰氧基-6-甲氧基香豆素	$C_{12}H_{10}O_5$	235.059 122 494
5	正离子	1.959 4	香豆素	$C_9H_6O_2$	147.043 578 095
6	负离子	2.055 6	6-甲酰基伞形花内酯	$C_{10}H_6O_4$	235.024 315 409
7	负离子	2.071 8	3″-chloro-3″-deoxytriphasiol	$C_{19}H_{23}ClO_4$	403.070 279 766
8	负离子	2.087 1	7-羟基-6-甲基-2*H*-1-苯并吡喃-2-酮	$C_{10}H_8O_3$	221.044 848 503
9	正离子	2.178 8	补骨脂素	$C_{11}H_6O_3$	187.038 362 109
10	负离子	2.179 3	apterin	$C_{20}H_{24}O_{10}$	423.129 902 456
11	负离子	2.306 2	rutaretin 9-rutinoside	$C_{26}H_{34}O_{14}$	615.193 206 653
12	负离子	2.338 1[a]	东莨菪素	$C_{10}H_8O_4$	191.034 142 591
13	负离子	2.338 1[a]	4-甲基伞形花内酯	$C_{10}H_8O_3$	221.045 012 819
14	正离子	2.360 7	洋芹素	$C_{14}H_{14}O_5$	263.090 440 453
15	负离子	2.450 7	8*H*-1,3-dioxolo[4,5-h][1]benzopyran-8-one	$C_{10}H_4O_4$	235.024 390 322
16	正离子	2.608 0	marminal	$C_{16}H_{16}O_4$	586.247 614 786
17	负离子	2.720 1	3-(1,1-二甲基烯丙基)东莨菪内酯	$C_{15}H_{16}O_4$	259.097 369 980
18	负离子	2.791 0	柠檬油素	$C_{11}H_{10}O_4$	207.064 530 373
19	负离子	2.816 6	佛手酚	$C_{11}H_6O_4$	247.024 552 649
20	负离子	2.960 4	(*R*)-异当归素3′-葡萄糖苷	$C_{23}H_{28}O_{12}$	519.145 760 433
21	负离子	3.098 1	秦皮乙素	$C_9H_6O_4$	201.017 578 356
22	负离子	3.177 0[a]	瑞香甲醚	$C_{20}H_{14}O_7$	411.075 386 129
23	负离子	3.177 0[a]	异紫花前胡内酯鼠李糖苷	$C_{20}H_{24}O_8$	437.145 806 750
24	负离子	3.392 6	9-羟基-4-甲氧基补骨脂素	$C_{12}H_8O_5$	231.029 451 941
25	负离子	3.409 1	轻叶黄素	$C_{20}H_{24}O_{10}$	423.129 827 404
26	正离子	3.429 0	mukurozidiol	$C_{17}H_{18}O_7$	669.215 743 354
27	负离子	3.655 9	尿石素A	$C_{13}H_8O_4$	229.048 714 401
28	负离子	3.711 0	7-甲氧基-5-丙炔氧基香豆素	$C_{15}H_{16}O_4$	305.103 044 645
29	负离子	3.810 4	肉桂酮	$C_{14}H_{12}O_4$	289.071 919 646
30	正离子	3.914 2	5-去邻甲基甲苯二羟酚	$C_{15}H_{16}O_5$	277.106 043 288
31	负离子	4.149 4	(*R*)-apiumetin	$C_{14}H_{12}O_4$	289.071 898 527
32	正离子	4.152 0	氧化前胡素	$C_{16}H_{14}O_5$	287.090 231 787
33	正离子	4.152 0	佛手苷内酯	$C_{12}H_8O_4$	217.048 712 834
34	负离子	4.318 5[a]	异紫花前胡内酯芸香糖苷	$C_{26}H_{34}O_{13}$	535.182 327 340
35	负离子	4.318 5[a]	9-羟基-4-甲氧基补骨脂素9-葡萄糖苷	$C_{18}H_{18}O_{10}$	431.040 862 736
36	负离子	5.330 3	aegelinol	$C_{14}H_{14}O_4$	227.070 987 400
37	正离子	5.531 3	4-hydroxy-8-methoxy-2*H*-furo[2,3-h]-1-benzopyran-2-one	$C_{12}H_8O_5$	233.043 408 687
38	正离子	5.645 5	白当归素	$C_{17}H_{18}O_7$	335.110 908 630
39	负离子	5.711 9	欧前胡素	$C_{16}H_{14}O_4$	539.171 172 133
40	正离子	5.985 6	(*R*)-pabulenol	$C_{16}H_{14}O_5$	573.173 518 191
41	正离子	8.465 5	3-羟基香豆素	$C_9H_6O_3$	163.038 395 251

a：保留时间经修约后相同

2.6 香豆素类成分的多元统计分析

PCA得分图（图1）和PLS-DA得分图（图2）的*x*轴累积解释率均大于0.5，说明两种模型拟合准确性高；图中杭白芷与祁白芷的样品点均在置信区间内，且两种基原白芷的样品点能明显分离，说明两种基原白芷的香豆素类成分存在明显差异。

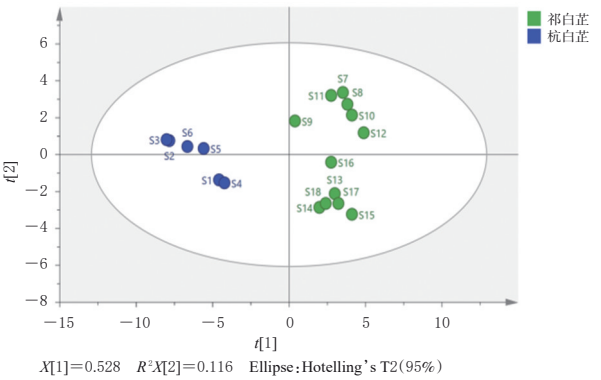


图1 杭白芷与祁白芷的香豆素类成分PCA得分图

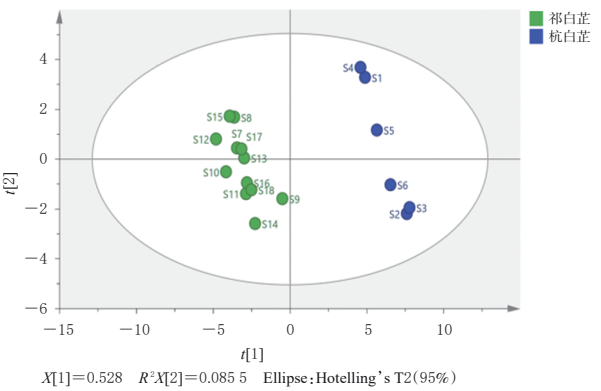


图2 杭白芷与祁白芷的香豆素类成分PLS-DA得分图

OPLS-DA得分图见图3。置换验证结果显示，累积解释率$R^2X=0.613$，$R^2Y=0.981$，$Q^2=0.957$，说明OPLS-DA模型有较好的准确性、可靠性和预测能力。

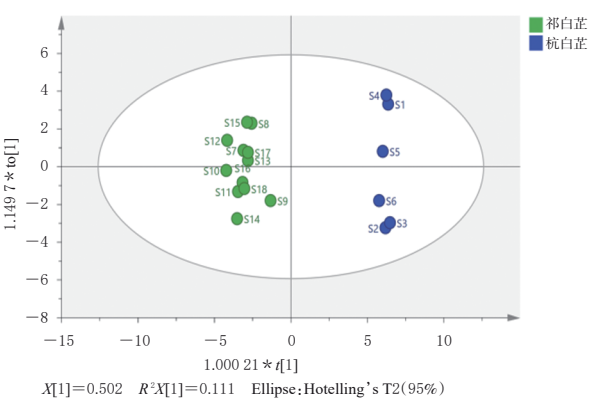


图3 杭白芷与祁白芷香豆素类成分OPLS-DA得分图

2.7 两种基原白芷的香豆素类差异成分筛选

杭白芷与祁白芷的41种香豆素类成分中共有23种为差异成分，占比56.1%，结果见表3。在23种香豆素类差异成分中，6种在杭白芷中含量更高，其余17种在祁白芷中含量更高，其中异紫花前胡内酯半乳糖苷在杭白芷中的含量显著高于祁白芷（$\log_2FC>2.0$）。

2.8 两种基原白芷的聚类分析

聚类分析结果（图4）显示，6批杭白芷（S1～S6）聚为一类，12批祁白芷（S7～S18）聚为一类。这说明筛选出的23种香豆素类差异成分具有代表性，可作为白芷品种来源的判别依据。

表3　杭白芷与祁白芷的香豆素类差异成分

序号	成分名称	*P*	VIP	$\log_2$FC
1	异紫花前胡内酯半乳糖苷	<0.001	1.268	2.974
2	3-(1,1-二甲基烯丙基)东莨菪内酯	<0.001	1.125	0.738
3	trans-grandmarin	<0.001	1.227	0.545
4	7-乙酰氧基-6-甲氧基香豆素	<0.001	1.188	0.492
5	3″-chloro-3″-deoxytriphasiol	<0.001	1.179	0.262
6	(*R*)-pabulenol	0.001	1.035	0.109
7	氧化前胡素	<0.001	1.156	−0.130
8	秦皮乙素	<0.001	1.195	−0.211
9	8*H*-1,3-dioxolo[4,5-h][1]benzopyran-8-one	<0.001	1.173	−0.275
10	东莨菪素	<0.001	1.236	−0.290
11	洋芹素	<0.001	1.265	−0.307
12	aegelinol	<0.001	1.104	−0.356
13	(*R*)-apiumetin	<0.001	1.239	−0.370
14	补骨脂素	<0.001	1.297	−0.412
15	apterin	<0.001	1.301	−0.462
16	7-甲氧基-5-丙炔氧基香豆素	<0.001	1.065	−0.517
17	异紫花前胡内酯鼠李糖苷	0.006	1.108	−0.575
18	4-甲基伞形花内酯	<0.001	1.275	−0.594
19	(*R*)-异当归素3′-葡萄糖苷	<0.001	1.228	−0.655
20	marminal	<0.001	1.162	−0.670
21	轻叶黄素	<0.001	1.270	−0.733
22	7-羟基-6-甲基-2*H*-1-苯并吡喃-2-酮	<0.001	1.275	−0.788
23	rutaretin 9-rutinoside	<0.001	1.273	−1.167

$\log_2$FC：差异倍数对数值，大于0表示该差异成分在杭白芷中含量更高，小于0表示该差异成分在祁白芷中含量更高

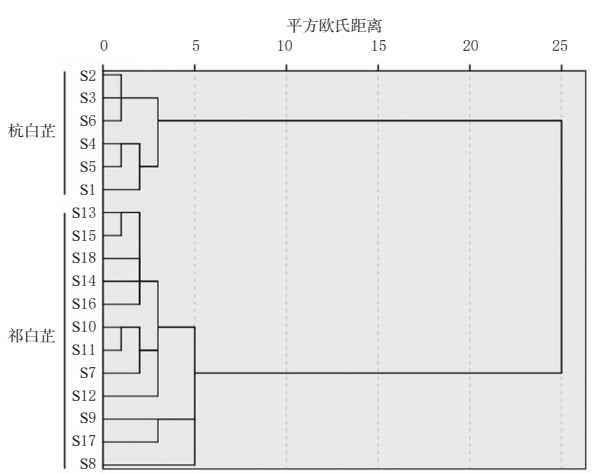


图4　杭白芷与祁白芷的聚类分析图

3　讨论

中药品种来源与药材质量密切相关，不同基原白芷的鉴别是当前白芷研究与应用中亟待解决的问题之一。《中国植物志》中虽描述了两种基原白芷根的形态差异[13]，但不同基原白芷间的典型性状特征并不稳定，有时依赖形态特征难以鉴别。黄璐琦[14]从形态解剖学的角度入手，也未发现两种基原白芷有明显的形态差异。本课题组前期通过多产地（群体）、大样本采样的方式，测定了4种商品白芷的核糖体DNA内转录间隔区序列，结果发现所有样本均为同一单倍型，采用DNA分子鉴定技术也不能很好地解决两种基原白芷的鉴别问题。但非靶向代谢组学技术可以系统地、较大限度地检测到药材中的多种代谢成分，使尽可能多的香豆素成分囊括其中。因此，本研究采用非靶向代谢组学技术结合多元统计分析方法，对杭白芷与祁白芷的香豆素类成分进行了鉴定及差异分析，结果共鉴定出41种香豆素类成分，有23种成分在两种基原白芷中存在显著差异，其中6种在杭白芷中的含量更高，其余17种在祁白芷中含量更高。前人研究发现，河北产的祁白芷中氧化前胡素含量及香豆素总量均高于浙江等产地的白芷[15]，与本研究结果一致。

本研究又基于香豆素类成分对杭白芷与祁白芷进行了聚类分析，结果发现23种香豆素类差异成分能很好地区分杭白芷与祁白芷，其中异紫花前胡内酯半乳糖苷的贡献最大，在杭白芷中的含量显著高于祁白芷，今后可尝试将其用于两种基原白芷的鉴别。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：109-110.

[2] 王济，赵永烈，王琦. 国医大师王琦教授中医体质学理论在疼痛性疾病诊疗中的临床应用[J]. 天津中医药，2020，37(3)：255-258.

[3] 李艳青，张重华，臧朝平，等. 张重华治疗慢性鼻窦炎经验[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志，2018，26(6)：469-471.

[4] 周生花，周计春，刘龙. 国医大师周仲瑛教授治疗类风湿关节炎经验[J]. 中华中医药杂志，2014，29(8)：2502-2504.

[5] 王艺涵，赵佳琛，翁倩倩，等. 经典名方中白芷的本草考证[J]. 中国现代中药，2020，22(8)：1320-1330.

[6] WU ZY，PETER HR. Flora of China[M]. Beijing and St. Louis：Science Press and Missouri Botanical Garden Press，2005：169-170.

[7] 谢宗万. 中药品种传统经验鉴别“辨状论质”论[J]. 时珍国药研究，1994，5(3)：19-21.

[8] 张庆芝. 白芷的商品规格及经验鉴别[J]. 中国民族民间医药杂志，2000，9(2)：96.

[9] 吉庆，马宇衡，张烨. 白芷的化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品与药品，2020，22(6)：509-514.

[10] 姜成. 浅谈白芷镇痛作用主要化学成分及其作用机制[J]. 产业与科技论坛，2018，17(21)：48-49.

[11] 陈琳，唐志书，宋忠兴，等. 不同产地白芷药材9个呋喃香豆素成分的含量测定及其质量评价[J]. 中国中药杂志，2019，44(14)：3002-3009.

[12] 吴宝成，冯煦，顾红梅，等. 适应江苏栽培的白芷品种评价[J]. 江苏农业科学，2014，42(7)：258-260.

[13] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志：第8卷[M]. 北京：科学出版社，2006：218.

[14] 黄璐琦. 中药白芷种质资源的系统研究[J]. 江西中医学院学报，2004，16(6)：5-7.

[15] 江宇勤，王佳琪，罗婷，等. 一测多评法测定不同产地白芷饮片中4种香豆素成分含量[J]. 时珍国医国药，2018，29(11)：2616-2619.

（收稿日期：2022-12-07　修回日期：2023-05-23）
（编辑：邹丽娟）