

菟丝子雌激素样作用质量标志物的筛选及含量测定

孙向明¹, 宋 辉², 阎新佳¹, 胡 扬¹, 徐蓓蕾¹, 赵丽珠¹, 李文兰^{1,2*}

1. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 哈尔滨商业大学药学院, 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: **目的** 初步筛选黑龙江产小粒菟丝子雌激素样作用的质量标志物, 为后续实验研究及质量控制提供参考依据。**方法** 采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱(UPLC-Q-TOFMS/MS)技术对菟丝子提取物进行定性分析, 并建立菟丝子不同极性部位的指纹图谱。以小鼠子宫系数、子宫内膜厚度和血清雌激素水平评价不同极性部位的雌激素样活性, 通过双变量相关分析和灰色关联度分析构建化学物质组与雌激素效应的组-效相关性, 筛选质量标志物, 并建立其中5个质量标志物的含量测定方法。**结果** 在正、负离子扫描模式下共发现10个与菟丝子雌激素样作用相关的指标成分, 分别为金丝桃苷、紫云英苷、豆甾醇、新菟丝子苷C、芹菜素、山柰酚、6-*O*-反式-对香豆酰基-呋喃果糖-(2→1)-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素和2,6-十八碳二炔酸。对其中5个质量标志物进行了含量测定, 质量分数分别为金丝桃苷(2.753 ± 0.097) mg/g、槲皮素(1.139 ± 0.107) mg/g、芹菜素(1.104 ± 0.047) mg/g、山柰酚(1.144 ± 0.079) mg/g、异鼠李素(0.697 ± 0.074) mg/g。**结论** 基于组-效关联思路可初步发现黑龙江产小粒菟丝子的质量标志物, 所建立的质量标志物含量测定方法准确、稳定。

关键词: 菟丝子; 雌激素样作用; 超高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱; 质量标志物; 金丝桃苷; 紫云英苷; 豆甾醇; 新菟丝子苷C; 芹菜素; 山柰酚; 6-*O*-反式-对香豆酰基-呋喃果糖-(2→1)-吡喃葡萄糖苷; 槲皮素; 异鼠李素; 2,6-十八碳二炔酸

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)10-2671-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.10.010

Screening and determination of estrogen-like quality markers of *Cuscuta chinensis*

SUN Xiang-ming¹, SONG Hui², YAN Xin-jia¹, HU Yang¹, XU Bei-lei¹, ZHAO Li-zhu¹, LI Wen-lan^{1,2}

1. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Research Center of Pharmaceutical Engineering Technology, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: **Objective** To preliminarily screen out the estrogen-like quality markers of small grain *Cuscuta chinensis* from Heilongjiang Province, so as to provide reference for its subsequent experimental research and quality control. **Methods** UPLC-Q-TOFMS/MS was used to qualitatively analyze the extract of *C. chinensis* and the fingerprints of different polar fractions were established. The estrogenic activity of different polar fractions was evaluated with uterine coefficient, endometrial thickness and serum estrogen level of mice. The bivariate correlation analysis and gray relational analysis were used to construct the composition-activity relationship between chemicals and the effects of estrogen for screening quality markers. And the content determination methods of the five quality markers were established. **Results** A total of 10 quality markers related to the estrogenic effect from *C. chinensis* were found in the positive and negative ion scanning modes. They were hyperoside, astragaloside, stigmastanol, neocuscutoside C, apigenin, kaempferol, 6-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl- β -D-fructofuranosyl-(2→1)- α -D-glucopyranoside, quercetin, isorhamnetin, and 2,6-octadecadiynoic acid. The contents of the five quality markers were determined as follows: hyperoside (2.753 ± 0.097) mg/g, quercetin (1.139 ± 0.107) mg/g, apigenin (1.104 ± 0.047) mg/g, kaempferol (1.144 ± 0.079) mg/g and isorhamnetin (0.697 ± 0.074) mg/g. **Conclusion** The quality markers of small grain *C. chinensis* from Heilongjiang Province can be screened out according to the composition-activity relationship, and the method for the detect the concentrations of the quality markers is accurate and stable.

Key words: *Cuscuta chinensis* Lam.; estrogenic activity; UPLC-Q-TOFMS/MS; quality marker; hyperoside; astragaloside; stigmastanol; neocuscutoside C; apigenin; kaempferol; 6-*O*-(*E*)-*p*-coumaroyl- β -D-fructofuranosyl-(2→1)- α -D-glucopyranoside; quercetin; isorhamnetin; 2,6-octadecadiynoic acid

收稿日期: 2019-12-07

基金项目: 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSCT-2018135); 哈尔滨商业大学博士科研启动基金(2019DS115)

作者简介: 孙向明(1984—), 女, 博士, 讲师, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: 13339400715 E-mail: sunxiangming2002@163.com

*通信作者 李文兰(1967—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础。Tel: (0451)84605022 E-mail: lwldzd@163.com

菟丝子为旋花科植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R. Br. 或菟丝子 *C. chinensis* Lam. 的干燥成熟种子^[1], 始载于《神农本草经》, 具有补肝肾、益精壮阳及止泻等功效, 主要含黄酮类、多糖类、生物碱类、甾醇类、香豆素类、挥发油类、氨基酸类、微量元素等化学成分^[2]。菟丝子作为我国北药资源的代表品种之一, 被广泛种植于东北三省等大豆主产区, 有研究表明, 我国古代通常所使用的菟丝子分为大粒菟丝子(金灯藤 *C. japonica* Choisy) 和小粒菟丝子 *C. chinensis* Lam.^[3], 黑龙江省是我国小粒菟丝子的主要产区之一, 本研究所用的菟丝子即为黑龙江省所产的小粒菟丝子。

植物雌激素是一种来源于植物的化合物, 近年来, 存在于植物中的非甾体类植物雌激素引起了人们极大的兴趣, 被认为是一种更安全、更有前途的雌激素替代品。部分黄酮类化合物已被证实具有雌激素样作用^[4-7]。现代药理研究表明菟丝子具有改善内分泌、抗炎、抗衰老、免疫调节及雌激素样作用^[8-13]。

课题组前期实验表明小粒菟丝子具有雌激素样作用, 且95%乙醇提取部位作用较强^[14]。但其质量标志物尚不清楚, 缺乏有效、可控的质量控制方法。因此, 本研究以黑龙江产小粒菟丝子为研究对象, 根据质量标志物的确定原则^[15-16], 基于组-效关联分析的研究思路, 深入挖掘小粒菟丝子发挥雌激素样作用的成分群, 初步筛选黑龙江产小粒菟丝子的质量标志物, 并建立含量测定方法。

1 材料

1.1 动物

SPF级雌性未成年昆明种小鼠, 体质量(10 ± 2) g, 购自哈尔滨医科大学实验动物学部, 实验动物许可证号SCXK(黑)2013-011。

1.2 药材

菟丝子药材(产地黑龙江省)为本地药材供应商提供, 经哈尔滨商业大学药学院曲中原教授鉴定为旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子。

1.3 药品与试剂

对照品绿原酸、金丝桃苷、山柰酚、槲皮素、异鼠李素、豆甾醇、芹菜素、槲皮苷(中国食品药品检定研究院, 质量分数均 $>98\%$, 批号分别为20160312、20140713、20130621、20151225、20160615、20170726、20170224、20150813); 己烯雌酚(批号20160226, 质量分数 $\geq 98\%$, 合肥久联

制药有限公司); 苏木素染液、伊红染液(北京索莱宝生物科技有限公司); 小鼠雌二醇(E_2)、卵泡生成激素(FSH)、促黄体生成素(LH)检测试剂盒(批号20180812, 北京诚林生物科技有限公司); 甲醇、乙腈为质谱纯, 甲酸为色谱纯, 乙醇、醋酸乙酯、正丁醇、石油醚、二甲苯、甲醛为分析纯。

1.4 仪器

Acquity UPLC 色谱仪、Xevo G2 Q TOF(美国Waters公司); 电子分析天平AR1140(美国奥豪斯国际有限公司); pH酸度计(上海今迈仪器仪表公司); Neofuge 13R 高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司); KD-P型展片机(北京世纪科信科学仪器有限公司); 生物组织包埋机(深圳市永年科技有限公司)。

2 方法

2.1 样品的制备

2.1.1 菟丝子提取物的制备 称取小粒菟丝子药材100 g, 粉碎, 过4号筛, 用800 mL体积分数为95%的乙醇浸泡过夜, $88 \sim 92\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热回流提取3次, 每次3 h, 滤过, 合并滤液, 将提取液减压浓缩, 得到浸膏备用。

2.1.2 不同极性部位的制备 将“2.1.1”项下获得的菟丝子提取物, 利用预处理后的大孔吸附树脂, 分别经体积分数为30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%的乙醇溶液洗脱, 得到不同洗脱部位的洗脱液, 分别记为S1~S8。将各洗脱液浓缩至浸膏, 备用。将“2.1.1”项下获得的菟丝子提取物, 分别经醋酸乙酯、正丁醇、石油醚萃取, 取有机相层获得不同萃取部位的萃取物, 分别记为S9~S11, 将各萃取物浓缩至浸膏, 备用。

2.1.3 供试品溶液的制备 分别称取菟丝子不同极性部位浸膏适量, 以体积分数为40%乙腈溶液为溶剂, 制成质量浓度为0.02 g/mL(以生药计)的供试品溶液(S1~S11), 过0.22 μm 滤膜备用。

2.1.4 定性对照品溶液的制备 分别取对照品绿原酸、金丝桃苷、山柰酚、槲皮素、槲皮苷、异鼠李素、芹菜素、豆甾醇适量, 以甲醇溶解, 定容于10 mL量瓶中, 过0.22 μm 滤膜得到混合对照品溶液。

2.1.5 定量对照品溶液的制备 用甲醇配制每毫升含有金丝桃苷0.90 mg、槲皮素1.30 mg、芹菜素1.20 mg、山柰酚0.66 mg、异鼠李素1.16 mg的混合对照品溶液, 过0.22 μm 滤膜备用。

2.1.6 阳性对照药的制备 取己烯雌酚适量, 用蒸

馏水配制成 20 $\mu\text{g/mL}$ 的混悬液, 备用。

2.2 色谱条件与质谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm), 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 1 μL , 检测波长 355 nm, 流动相为乙腈 (A)-0.1%甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相的梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedures of mobile phase

t/min	A/%	B/%
0	10	90
2	19	81
5	19	81
6	44	56
14	60	40
19	95	5
20	100	0

2.2.2 质谱条件 质谱系统为 VION, 电压 2.0/3.0 kV, 离子源为 ESI 源, 离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 去溶剂气温度 500 $^{\circ}\text{C}$, 去溶剂气体积流量 1 000 L/h, 锥孔气体积流量 50 L/h, 采集模式为 MSE。选择正、负离子扫描方式, 扫描范围 m/z 50~1 000, 碰撞能 20~45 mV。

2.3 菟丝子不同极性部位指纹图谱的建立

2.3.1 样品的测定 采用 UPLC-Q-TOF MS/MS 技术对供试品溶液 S1~S11 及定性对照品溶液进行成分分析, 分别在正、负 2 种离子模式下进行数据扫描, 所述数据扫描后利用 Waters Masslynx 4.1 和 UNIFI 1.7 软件进行数据分析, 数据收集时, 方法参数为: 保留时间 0~18 min, 保留时间误差限 0.01 min, 质量误差限 0.01。

2.3.2 指纹图谱方法学考察 选择指纹图谱中峰面积大、出峰时间适中的色谱峰为参照峰, 以重现性好、稳定吸收的色谱峰为共有峰。以参照峰的保留时间和峰面积为 1, 计算其他共有峰与参照峰的相对保留时间及相对峰面积, 通过分别比较保留时间与峰面积的 RSD 值进行方法学考察。

2.4 动物实验

2.4.1 分组与给药 雌性未成年昆明种小鼠随机分为 13 组, 每组 10 只, 即对照组、阳性对照组 [己烯雌酚 0.35 mg/(kg·d)] 和 11 个菟丝子不同极性部位 (S1~S11) 给药组, 共 13 组, 菟丝子不同极性部位给药组按 16 g/(kg·d) (以菟丝子生药计, 约为人

临床给药剂量的 8 倍) ig 给药, 连续 4 d, 每日 2 次。

2.4.2 小鼠取材及雌激素指标检测 末次给药前, 小鼠禁食不禁水 12 h, 末次给药后 1 h 称质量, 摘眼球取血, 放在室温下使血液自然凝固, 等待 30 min, 5 000 r/min 离心 15 min, 仔细收集上清液, 得到小鼠血清。用试剂盒同时测定小鼠血清中 E_2 、FSH、LH 水平, 具体方法参照试剂盒说明书。小鼠脱颈处死, 子宫立即被取下并称质量, 计算小鼠子宫系数。取小鼠子宫组织进行常规 HE 染色处理, 显微镜下观察小鼠子宫上皮组织特征, 测量子宫内膜厚度。

子宫系数=子宫质量/体质量

2.4.3 统计分析 用 SPSS 19.0 软件进行数据处理, 数据统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行统计学分析。

2.5 谱效相关性分析

2.5.1 双变量相关分析 以菟丝子的 11 个不同极性部位指纹图谱中共有峰的相对峰面积与小鼠子宫系数、小鼠子宫内膜厚度及小鼠血清中 E_2 、LH、FSH 水平为变量, 采用均值化法对原始数据进行无量纲化处理, SPSS 21.0 统计分析软件进行双变量相关分析, 计算各变量之间的 Pearson 相关系数。

2.5.2 灰色关联度分析 采用均值化法对原始数据进行无量纲化处理, 以指纹图谱共有峰的相对峰面积为子序列, 以小鼠子宫系数、小鼠子宫内膜厚度及小鼠血清中 E_2 、LH、FSH 水平为母序列, 灰色关联度分析使用 DPS 数据分析系统, 将子序列对相同母序列的关联度按从大到小的顺序排序。

2.6 质量标志物的含量测定

2.6.1 线性关系考察 分别精密吸取 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL 对照品溶液, 置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇定容, 摇匀, 在“2.2.1”项色谱条件下进样 1 μL 。以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积值为纵坐标 (Y), 计算回归方程。

2.6.2 精密度试验 精密吸取“2.6.1”项下标准曲线中间质量浓度的对照品溶液 1 μL , 连续进样 6 次, 测定各对照品的峰面积。

2.6.3 稳定性试验 按“2.1.3”项下方法制备菟丝子供试品溶液, 每隔 2 h 进样 1 μL , 连续进样 6 次, 测定供试品溶液中 5 种对照品峰面积。

2.6.4 重复性试验 精密称取菟丝子提取物, 按“2.1.3”项下供试品溶液制备方法, 平行制备 6 份, 测定各峰面积, 计算样品中 5 种对照品的含量。

2.6.5 加样回收率试验 精密称取已测得金丝桃苷、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素 5 种质量标志物含量的菟丝子粉末 1.0 g, 置 50 mL 量瓶中, 加入与待测物含量相当的对照品适量, 按“2.1.3”项下供试品溶液制备方法制备, 进样并测定峰面积, 计算加样回收率。

2.6.6 样品测定 精密称取菟丝子提取物适量, 按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液 3 份, 分别精密吸取 1 μ L, 进样, 记录 5 种待测成分的峰面积, 并计算其含量。

3 结果

3.1 不同极性部位的菟丝子指纹图谱及对照图谱

将供试品溶液 S1~S11 分别在正、负离子模式下扫描, 得到的图谱导入相似度评价系统, 选择谱图中峰面积大、出峰时间适中的色谱峰为参照峰, 以

重现好、稳定吸收的色谱峰为共有峰, 进行色谱峰匹配, 并生成对照图谱 (R)。得到正、负离子模式下黑龙江产小粒菟丝子 11 个不同极性部位的叠加指纹图谱, 如图 1 所示, 正离子模式下共标记了 28 个共有峰, 负离子模式下标记了 27 个共有峰。由于正离子模式下, 样本 S6 的成分信息较完整, 且 12 号峰保留时间适中并且稳定, 负离子模式下样本 S7 的成分信息较完整, 且 11 号峰保留时间适中并且稳定, 故正离子模式选取样本 S6 以 12 号峰作为参照峰, 负离子模式选取样本 S7 以 11 号峰作为参照峰, 进行指纹图谱的方法学考察。结果表明正、负离子模式下, 精密密度试验、重复性试验和 24 h 稳定性试验各共有峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值均小于 3%, 表明仪器的精密密度较好, 方法的重复性较好, 样品在 24 h 内稳定。

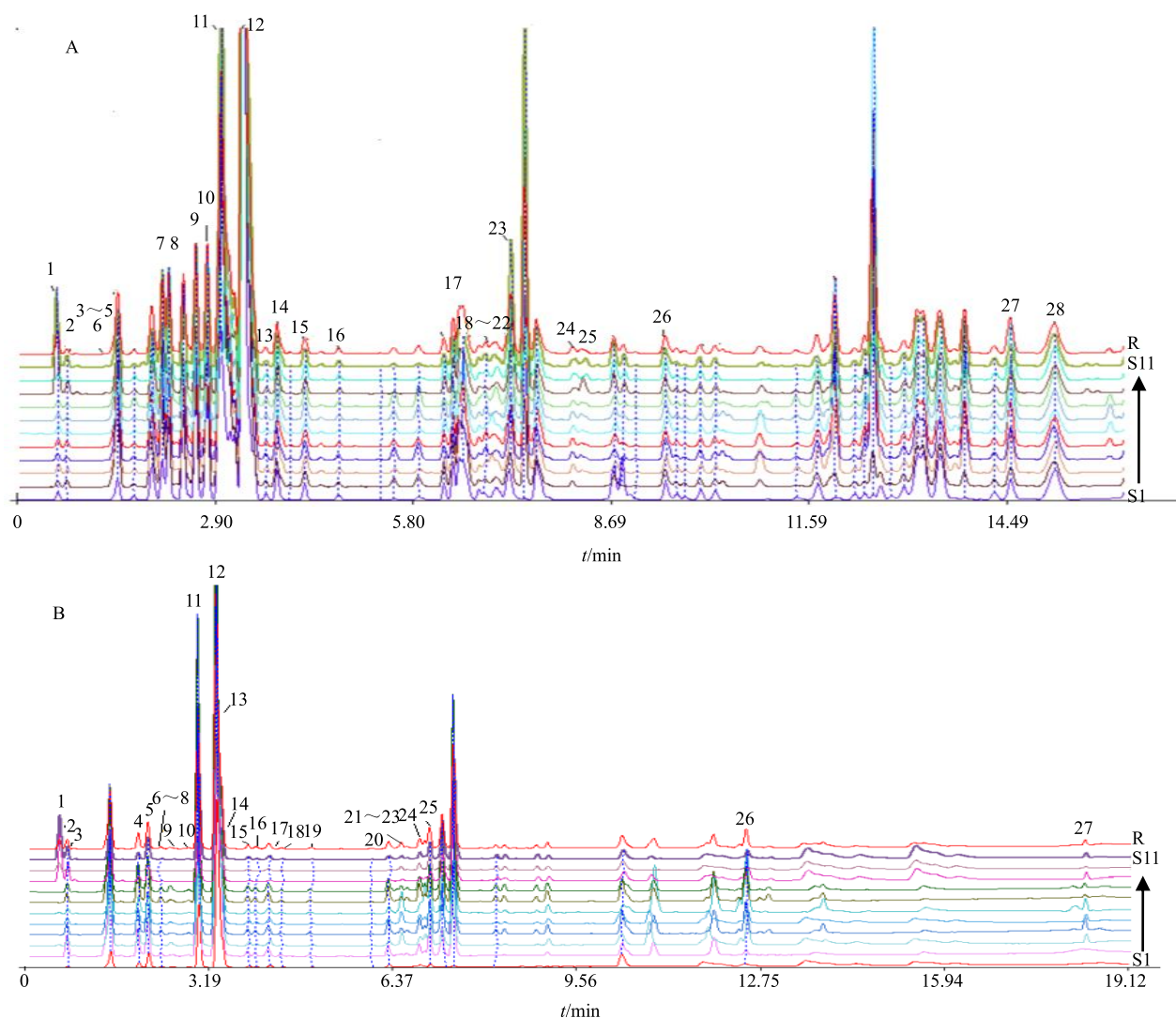


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下不同极性部位菟丝子指纹图谱及对照图谱 (R)

Fig. 1 Fingerprints of control atlas (R) and different polar parts of *C. chinensis* in positive (A) and negative (B) ion mode

3.2 菟丝子不同极性部位的雌激素样作用

按照“2.4.2”项下方法,分别测得小鼠子宫系数、子宫内膜厚度和血清雌激素水平,见表 2。由表 2 可知,与对照组比较,S2、S3、S5、S7、S10、S11 部位 ig 给药后,小鼠的子宫系数显著增大 ($P<0.05$);S2 和 S10 组小鼠的子宫内膜显著增厚 ($P<0.05$),由各组子宫内膜切片 HE 染色结果(图 2)可知,对照组小鼠子宫内膜上皮、腺体及内膜间质未见增生,己烯雌酚组小鼠子宫内膜明显增厚,S2

和 S10 给药组小鼠子宫内膜增厚,突入子宫腔内,内膜间质疏松,上皮由低柱状变为高柱状。与对照组比较,各给药组小鼠血清中 E_2 、FSH、LH 激素水平总体呈升高趋势,其中 S2 组 3 种激素水平均显著升高 ($P<0.05$),可知菟丝子不同提取部位具有一定的雌激素样作用,以 S2 和 S10 部位的雌激素样活性最为显著。

3.3 谱效相关性分析

3.3.1 双变量相关分析 采用双变量相关分析法进

表 2 菟丝子不同极性部位对性未成熟小鼠子宫系数、子宫内膜厚度及激素水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of different polar parts of *C. chinensis* on uterine coefficient, endometrial thickness and hormone level of immature mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	子宫系数/%	子宫内膜厚度/ μ m	E_2 /(ng·L ⁻¹)	FSH/(ng·L ⁻¹)	LH/(ng·L ⁻¹)
对照	—	0.086 $\pm$ 0.013	59.796 $\pm$ 15.709	4.462 $\pm$ 0.262	4.086 $\pm$ 0.122	4.450 $\pm$ 0.277
己烯雌酚	3.5 $\times$ 10 ⁻⁴	0.889 $\pm$ 0.013**	105.450 $\pm$ 6.953**	7.428 $\pm$ 0.856**	6.643 $\pm$ 0.365*	5.575 $\pm$ 0.233*
S1	16	0.172 $\pm$ 0.019	49.197 $\pm$ 6.032	4.848 $\pm$ 0.333	4.488 $\pm$ 0.172	4.281 $\pm$ 0.151
S2	16	0.306 $\pm$ 0.010*	83.967 $\pm$ 8.173*	5.966 $\pm$ 0.417*	5.346 $\pm$ 0.317*	5.395 $\pm$ 0.122*
S3	16	0.286 $\pm$ 0.011*	73.113 $\pm$ 16.278	5.436 $\pm$ 0.373*	4.492 $\pm$ 0.235	5.258 $\pm$ 0.775*
S4	16	0.169 $\pm$ 0.011	56.298 $\pm$ 8.445	4.810 $\pm$ 0.243	4.497 $\pm$ 0.243	5.238 $\pm$ 0.625*
S5	16	0.233 $\pm$ 0.013*	74.321 $\pm$ 13.998	4.935 $\pm$ 0.232*	4.245 $\pm$ 0.287	4.635 $\pm$ 0.246
S6	16	0.164 $\pm$ 0.001	68.651 $\pm$ 14.081	4.816 $\pm$ 0.116	4.304 $\pm$ 0.393	4.723 $\pm$ 0.346
S7	16	0.185 $\pm$ 0.019*	58.390 $\pm$ 2.371	4.710 $\pm$ 0.178	4.713 $\pm$ 0.694*	4.310 $\pm$ 0.164
S8	16	0.127 $\pm$ 0.013	58.874 $\pm$ 14.018	5.020 $\pm$ 0.346*	4.190 $\pm$ 0.327	4.986 $\pm$ 0.345
S9	16	0.171 $\pm$ 0.013	49.905 $\pm$ 6.584	4.706 $\pm$ 0.183	3.972 $\pm$ 0.536	5.022 $\pm$ 0.214
S10	16	0.200 $\pm$ 0.012*	91.148 $\pm$ 7.521*	4.858 $\pm$ 0.192	4.371 $\pm$ 0.373	4.780 $\pm$ 0.326
S11	16	0.225 $\pm$ 0.029*	71.604 $\pm$ 15.384	4.584 $\pm$ 0.132	4.401 $\pm$ 0.246	4.624 $\pm$ 0.113

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

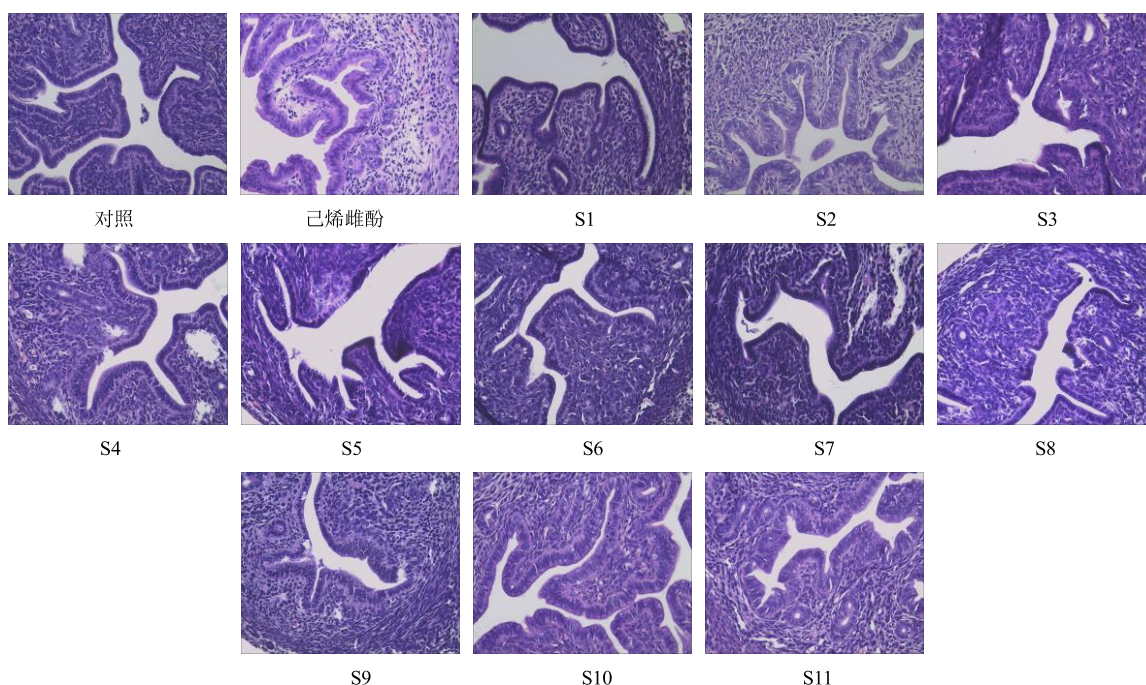


图 2 子宫内膜切片 HE 染色 (×200)

Fig. 2 HE staining of endometrial sections (× 200)

行数据处理, 相关系数越大, 表明 2 个变量之间的线性相关性越强, 本研究认为相关系数大于 0.6 时, 2 个变量显著相关, 即 $P < 0.05$ 。据此, 在正离子模式下的指纹图谱中, 共有 7 个峰所代表的化学成分与菟丝子雌激素样作用相关, 分别为 12、14、15、17、18、20、21 号峰。在负离子模式下的指纹图谱中, 7、12、16、22、24~26 号峰所代表的 7 个化学成分与菟丝子雌激素样作用相关。

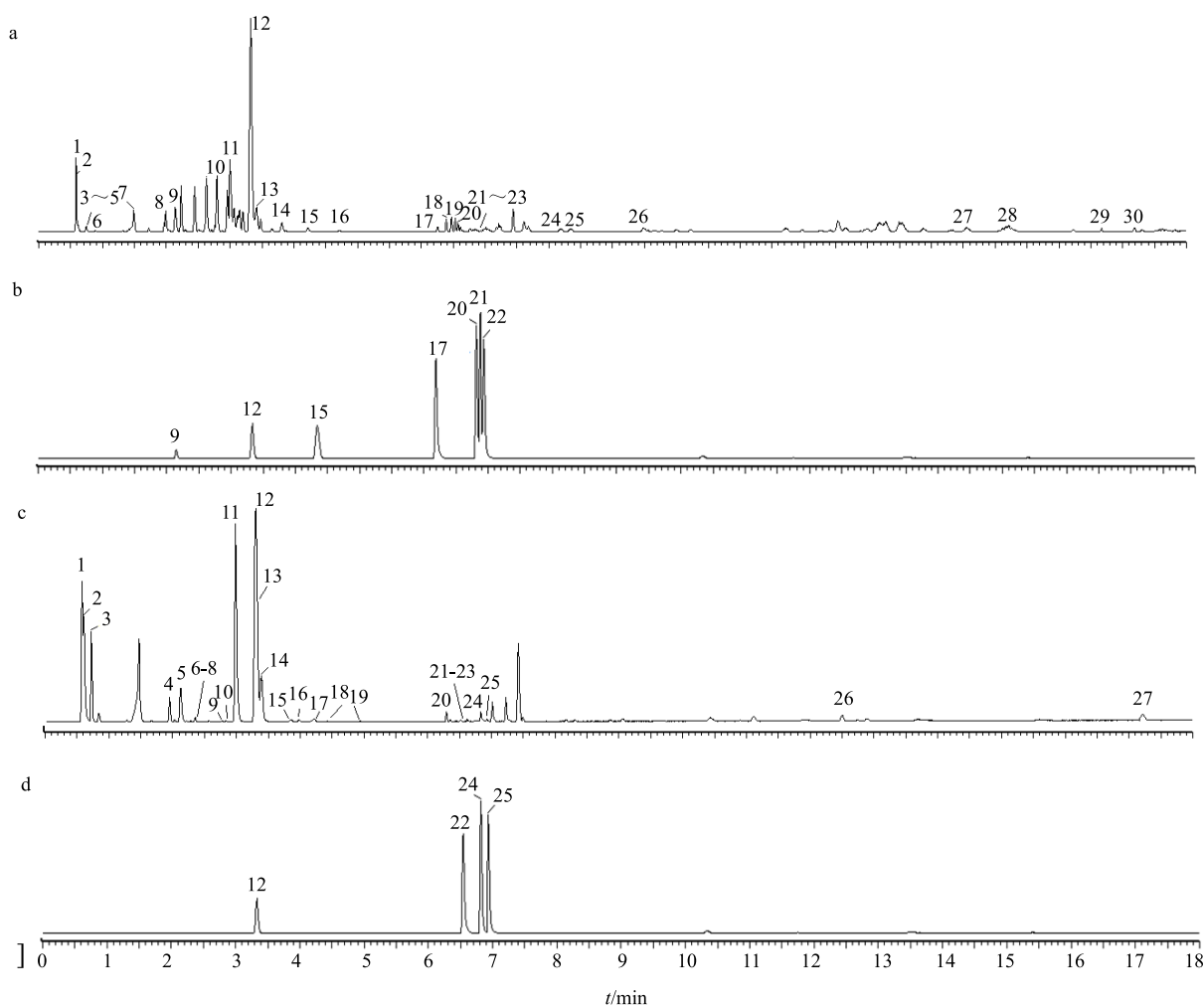
3.3.2 灰色关联度分析 通常情况下, 关联度 > 0.5 时便认为子序列与母序列之间有着一定的关联性, 关联度的数值越高, 说明关联性越强。因此, 本研究选择与雌激素指标关联度 > 0.5 的共有峰作为候选成分, 在正离子模式下的指纹图谱中, 共有 19 个峰与菟丝

子雌激素样作用关联性较强, 分别为峰 7~9、11、12、14、16~28。在负离子模式下的指纹图谱中, 14 个共有峰与菟丝子雌激素样作用关联性较强, 分别为峰 4、6、7、10~12、16、19、21~26。

结合正离子模式与负离子模式下的双变量相关分析和灰色关联度分析结果, 正离子模式下的 12、14、17、18、20、21 号峰及负离子模式下 7、12、16、22、24~26 号峰所代表的化学成分与黑龙江产小粒菟丝子的雌激素样作用高度相关。

3.4 化学成分表征

通过 Waters Masslynx 4.1 软件对正、负离子模式下的菟丝子提取物及对照品溶液的总离子流图(图 3)进行分析。根据精确的准分子离子峰的质荷



a、c-正、负离子模式下的提取物 b-正离子模式下的对照品(9-绿原酸、12-金丝桃苷、15-槲皮苷、17-豆甾醇、20-芹菜素、21-山柰酚、22-异鼠李素) d-负离子模式下的对照品(12-金丝桃苷、22-槲皮素、24-山柰酚、25-异鼠李素)

a, c-extract in positive and negative ion mode b-control in positive ion mode (9-chlorogenic acid, 12-hyperoside, 15-quercitrin, 17-stigmasterol, 20-apigenin, 21-kaempferol, 22-isorhamnetin) d-control in negative ion mode (12-hyperoside, 22-quercetin, 24-kaempferol, 25-isorhamnetin)

图 3 菟丝子提取物及对照品溶液的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of *C. chinensis* extract and standard solution

比 (m/z) 可以初步判断化合物的相对分子质量、元素组成和分子式, 并与对照品的质谱信息及 UNIFI 1.7 软件数据库的已知化合物进行匹配, 参考化合物裂解规律由碎片离子做进一步验证。根据上述解析原则, 结合已有文献报道对筛选到的正、负离子模式下与雌激素作用高度相关的色谱峰进行成分结构表征^[17-19], 其质谱信息及成分识别见表 3。

由表 3 的色谱峰成分识别结果可知, 在黑龙江产小粒菟丝子中初步发现 10 个与雌激素样作用高度相关 (取谱效分析 2 种方法所得化合物的交集) 的成分, 分别是金丝桃苷、紫云英苷、豆甾醇、新菟丝子苷 C、芹菜素、山柰酚、6-*O*-反式-对香豆酰基-呋喃果糖-(2→1)-吡喃葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素和 2,6-十八碳二炔酸, 即黑龙江产小粒菟丝子

表 3 各色谱峰化学成分识别

Table 3 Identification of chemical composition of peaks

峰号	t/min	准分子离子峰	二级碎片	相对分子质量	分子式	化合物推测	离子模式
12	3.326	465.101 4	303.045 6	464.095 5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷 (hyperoside)	+
14	3.878	449.106 6	153.019 5	448.100 6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	紫云英苷 (astragalin)	+
			287.052 3				
17	6.262	413.376 8	147.933 9	412.370 5	C ₂₉ H ₄₈ O	豆甾醇 (stigmasterol)	+
18	6.316	695.215 9	185.058 1	694.210 9	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₇	新菟丝子苷 (cneodrugside C)	+
			339.093 7				
20	6.833	271.061 6	241.172 1	270.052 8	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	芹菜素 (apigenin)	+
21	6.880	287.054 3	241.142 3	286.047 7	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	山柰酚 (kaempferol)	+
7	2.359	487.143 6	145.034 0, 163.045 6	488.153 0	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₃	6- <i>O</i> -反式-对香豆酰基-呋喃果糖-(2→1)-吡喃葡萄糖苷 [6- <i>O</i> -(<i>E</i>)- <i>p</i> -coumaroyl)-β- <i>D</i> -fructofuranosyl-(2→1)-α- <i>D</i> -glucopyranoside]	-
12	3.327	463.087 0	300.036 7	464.095 5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	金丝桃苷 (hyperoside)	-
16	3.877	447.090 9	227.041 1, 284.040 9	448.100 6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	紫云英苷 (astragalin)	-
22	6.531	301.034 1	145.034 0	302.042 7	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	槲皮素 (quercetin)	-
24	6.878	285.038 0	697.393 7	286.047 7	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	山柰酚 (kaempferol)	-
25	6.923	315.051 4	300.036 7	316.058 3	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	异鼠李素 (isorhamnetin)	-
26	11.180	275.202 8	243.204 1	276.208 9	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	2,6-十八碳二炔酸 (2,6-octadecadiynoic acid)	-

雌激素样作用的质量标志物。

3.5 质量标志物的含量测定

3.5.1 方法学考察结果 实验共发现 10 个与菟丝子雌激素样作用相关的质量标志物, 其中豆甾醇是末端吸收, 紫外检测条件比较苛刻, 紫云英苷、新菟丝子苷 C、6-*O*-反式-对香豆酰基-呋喃果糖-(2→1)-吡喃葡萄糖苷和 2,6-十八碳二炔酸未获得对照品, 因此选择含量较高 (大于 10 个成分总峰面积的 75%)、较易获得对照品的 5 个成分 (金丝桃苷、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素) 进行了含量测定。5 个对照品的回归方程和线性范围见表 4。金丝桃苷、槲皮素、芹菜素、山柰酚、异鼠李素的精密度和稳定性试验的峰面积 RSD 值分别为 1.55%、1.50%、0.41%、1.39%、1.18%和 1.42%、1.95%、1.21%、2.04%、2.47%, 结果表明仪器的精密度良好, 且供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。5 种成分

的重复性试验结果 RSD 值分别为 2.12%、2.17%、2.03%、2.38%、2.24%, 均小于 3.0%, 表明实验方法的重复性良好。加样回收率实验结果显示 5 种待测成分的平均加样回收率分别为 97.35%、98.12%、97.58%、96.58%、96.43%, 均大于 95%, 且 RSD 值小于 2%, 结果表明方法准确、可靠。

3.5.2 样品测定结果 黑龙江产小粒菟丝子的质量标志物含量测定结果见表 5。

4 讨论

判断药物的雌激素样活性水平, 首先要对其进行生物技术检测, 一般是根据其在体内的作用机制和产生的生物效应, 从体内和体外 2 个角度进行实验, 实验动物一般选用未成年或者去除卵巢的雌性动物, 以消除内源性雌激素对雌激素样活性评价结果产生的影响。因此, 本研究以刚断乳的性未成熟小鼠作为雌激素缺乏的动物模型, 以子宫脏器系数

表 4 5 种对照品的回归方程和线性范围

Table 4 Linear regression equations and linear relationship and ranges of five reference substances

化学成分	回归方程	相关系数	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)
金丝桃苷	$Y=2\times 10^6 X-5\ 401.3$	0.999 5	0.009 0~0.180 0
槲皮素	$Y=3\times 10^6 X-26\ 545$	0.999 1	0.013 0~0.260 0
芹菜素	$Y=3\times 10^6 X-5\ 705.1$	0.999 8	0.012 0~0.240 0
山柰酚	$Y=3\times 10^6 X-9\ 252$	0.999 7	0.006 6~0.132 0
异鼠李素	$Y=2\times 10^6 X+7\ 992.8$	0.999 6	0.011 6~0.232 0

表 5 黑龙江产小粒菟丝子质量标志物的含量测定结果

Table 5 Content determination of quality markers in *C. chinensis* from Heilongjiang

样品	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	金丝桃苷	槲皮素	芹菜素	山柰酚	异鼠李素
1	2.850	1.154	1.070	1.125	0.750
2	2.662	1.232	1.145	1.214	0.719
3	2.747	1.032	1.098	1.092	0.621
平均	2.753 ± 0.097	1.139 ± 0.107	1.104 ± 0.047	1.144 ± 0.079	0.697 ± 0.074

和子宫内膜厚度评价受试药物的雌激素活性。该方法省时、经济、操作简易、灵敏度高,不受外界因素干扰,直接反映药物进入体内后对动物雌激素水平的影响。其原理是具有雌激素样活性的药物与子宫内的雌激素受体结合,诱导子宫细胞内的雌激素诱导蛋白(IPs)高表达,表现为子宫组织的增生^[20-21]。此外,血清 E_2 、FSH、LH 是女性常见的性激素,能很好地反映体内雌激素水平^[22],可通过检测给药后雌激素缺乏动物血清中 E_2 、FSH、LH 水平的变化,评估药物产生的雌激素样活性。本研究将上述 3 个血清激素水平与子宫系数、子宫内膜厚度一并列为菟丝子雌激素样作用的评价指标,以期为雌激素作用的揭示提供更全面的数据支持。

本研究采用双变量相关分析以及灰色关联度分析 2 种方法进行组效相关性研究。前者是通过相关系数来研究变量之间相关性的变化和变化方向,相关系数绝对值越大说明变量间的相关性越强,该方法受样本量多少的影响较大,并且对变量间的其他关系无从考究;后者通过比较数据列之间几何形状的相似度来衡量因素之间发展趋势的相似程度,从而判断因素之间的联系是否紧密,然而关联度也只具有相对意义,采用不同处理方法对原始数据进行处理,得到的关联度值也有所不同,但是一般关联度的顺序不变。2 种分析方法各有优势,相辅相成,共同揭示黑龙江产小粒菟丝子的质量标志物,为后续研究与质量控制提供了参考依据。

在初步筛选出黑龙江产小粒菟丝子的 10 个质量标志物的基础上,为进一步考察质量标志物的代表性,课题组采用超高效液相色谱法以 10 个质量标志物的色谱峰为特征峰,建立了 10 批次黑龙江产小粒菟丝子的特征图谱,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统进行相似度评价。结果显示,以本研究筛选到的质量标志物为特征峰的 10 批黑龙江产小粒菟丝子特征图谱与对照图谱之间相似度均在 0.9 以上,表明所选质量标志物能够反映黑龙江产小粒菟丝子的质量稳定性,可作为质量控制指标,结合本研究的含量测定方法,定性定量地评价黑龙江产小粒菟丝子的质量。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Guo C, Wang Y J, Zhang J P. Studies on chemical constituents and pharmacological activities of *Cuscuta chinensis* [J]. *Mod Med Heal*, 2005, 16(10): 1035-1036.
- [3] 郭澄, 张芝玉, 郑汉臣, 等. 中药菟丝子的本草考证和原植物调查 [J]. *中国中药杂志*, 1990, 15(3): 10-12.
- [4] Li F, Du B W, Lu D F, et al. Flavonoid glycosides isolated from *Epimedium brevicornum* and their estrogen biosynthesis-promoting effects [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-08203-7.
- [5] Chen H, Li Y J, Li X F, et al. Homoisoflavanones with estrogenic activity from the rhizomes of *Polygonatum sibiricum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2018, 20(1): 92-100.
- [6] 王永霞, 马娜, 钟兴明, 等. 菟丝子总黄酮对卵巢早

- 衰大鼠卵巢功能的作用研究 [J]. 医学综述, 2019, 25(13): 2695-2699.
- [7] 赵素霞, 刘会丽, 江红. 菟丝子黄酮通过调节 Wnt/ β -catenin 信号通路干预去卵巢大鼠骨代谢的机制研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(1): 25-28.
- [8] Donnapee S, Li J, Yang X, *et al.* *Cuscuta chinensis* Lam.: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional herbal medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, doi: 10.1016/j.jep.2014.09.032.
- [9] Lin M K, Lee M S, Huang H C, *et al.* *Cuscuta chinensis* and *C. campestris* attenuate scopolamine-induced memory deficit and oxidative damage in mice [J]. *Molecules*, 2018, doi: 10.3390/molecules23123060.
- [10] Sun S L, Guo L, Ren Y C, *et al.* Anti-apoptosis effect of polysaccharide isolated from the seeds of *Cuscuta chinensis* Lam on cardiomyocytes in aging rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(9): 6117-6124.
- [11] Kang S Y, Jung H W, Lee M Y, *et al.* Effect of the semen extract of *Cuscuta chinensis* on inflammatory responses in LPS-stimulated BV-2 microglia [J]. *Chin J Nat Med*, 2014, 12(8): 573-581.
- [12] Kim H J, Yang H, Jung D H, *et al.* Ameliorating effects of *Cuscuta chinensis* Lamak extract on hind-limb ischemia, and angiogenic- or inflammatory associated factors in ovariectomized mice [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(4): 3321-3329.
- [13] 赵丕文, 王大伟, 牛建昭, 等. 红花等 10 种中药的植物雌激素活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(5): 436-439.
- [14] 李文兰, 丁晶鑫, 藏宝珊, 等. 基于 HPLC-Q TOF-MS/MS 技术分析纯化后菟丝子拟雌激素活性成分 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(20): 1791-1795.
- [15] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学学报, 2019, 54(2): 187-196.
- [16] Zhang T, Bai G, Han Y, *et al.* The method of quality marker research and quality evaluation of traditional Chinese medicine based on drug properties and effect characteristics [J]. *Phytomedicine*, 2018, doi: 10.1016/j.phymed.2018.02.009.
- [17] 金晓, 李家实, 阎文玫. 菟丝子黄酮类成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1992, 17(5): 292-294.
- [18] 王展, 何直昇. 菟丝子化学成分的研究 [J]. 中草药, 1998, 29(9): 577-579.
- [19] 叶敏, 阎玉凝, 乔梁, 等. 中药菟丝子化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2002, 27(2): 115-117.
- [20] 赵丕文, 王大伟, 王玲巧, 等. 用小鼠子宫增重法筛选淫羊藿等 10 种中药雌激素样作用的实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(10): 686-689.
- [21] 管庆霞, 杨婧, 黄琦景, 等. 丹参提取新工艺的研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报 (自然科学版), 2013, 29(3): 262-264.
- [22] 蔡艳悦, 黄筱紘. 激素替代疗法治疗围绝经期综合征患者效果及对血清雌二醇、卵泡刺激素、黄体生成素的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2015, 30(31): 5396-5398.