

基于指纹图谱及化学模式识别研究盐制对五子衍宗丸化学成分的影响

廖宇娇, 敖明月, 彭 颖, 胡昌江*, 陈志敏*, 许润春

成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 建立不同炮制品组方五子衍宗丸(Wuzi Yanzong Pills, WYP)的 HPLC 指纹图谱, 研究盐制对 WYP 化学成分的影响。方法 采用 HPLC 法建立不同炮制品组方 WYP 的指纹图谱, 并进行相似度评价, 采用方差分析、聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)与偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)对结果进行评价。结果 WYP 全生品组、药典组、盐制组指纹图谱相似度均大于 0.9, 标定了 18 个共有峰, 利用对照品指认出绿原酸(5 号峰)、鞣花酸(10 号峰)、金丝桃苷(11 号峰)、异槲皮苷(12 号峰)、毛蕊花糖苷(13 号峰)、紫云英苷(14 号峰)、槲皮素(15 号峰)、山柰酚(17 号峰)、五味子醇甲(18 号峰)9 个成分, 归属性分析表明峰 2 来源于枸杞子, 峰 3、5、7、9、11、12、14、15、17 来源于菟丝子, 峰 6、8、10、16 来源于覆盆子, 峰 13 来源于车前子, 峰 18 来源于五味子, 峰 1 是覆盆子和五味子共有成分, 峰 4 是枸杞子和覆盆子共有成分。药物炮制后组方 WYP 未出现色谱峰的增加, 但峰面积发生变化。通过 CA 将 WYP 全生品组、药典组、盐制组聚为 3 类, PCA 筛选出 4 个主成分, PLS-DA 标记出峰 1、13(毛蕊花糖苷)、10(鞣花酸)、7、4、11(金丝桃苷)、12(异槲皮苷)、3、5(绿原酸)共 9 个差异性成分; 绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷、异槲皮苷、山柰酚、五味子醇甲及峰 1、3、4、7、8 共 11 个成分可能是不同炮制品组方 WYP 的差异标志物。结论 建立的指纹图谱测定方法稳定、可靠, 炮制后组方 WYP 的化学成分发生变化, 结果可为 WYP 中如何选用药物炮制品提供一定的依据。

关键词: 五子衍宗丸; 盐制; 指纹图谱; 化学模式识别; 聚类分析; 主成分分析; 偏最小二乘法-判别分析; 绿原酸; 鞣花酸; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 毛蕊花糖苷; 紫云英苷; 槲皮素; 山柰酚; 五味子醇甲; 枸杞子; 菟丝子; 覆盆子; 车前子; 五味子

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)11-3224-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.009

Based on fingerprint and chemical pattern recognition to study the effect of salt-water processing on the chemical components of Wuzi Yanzong Pills

LIAO Yu-jiao, AO Ming-yue, PENG Ying, HU Chang-jiang, CHEN Zhi-min, XU Run-chun

Medicine Institute, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective HPLC fingerprints of different processed products of Wuzi Yanzong Pills (WYP, 五子衍宗丸) were established to study the effect of that processed with salt-water on the chemical components. **Methods** HPLC method was used to establish the fingerprint of different processed products of WYP, and similarity evaluation was carried out. The results were evaluated by analysis of variance, cluster analysis (CA), principal component analysis (PCA) and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). **Results** The similarity of the fingerprints of whole-raw product group, pharmacopoeia group, and salt-water processing group was greater than 0.9, 18 common peaks were calibrated, and with the help of reference substance identified nine ingredients including chlorogenic acid (peak 5), ellagic acid (peak 10), hyperoside (peak 11), isoquercitrin (peak 12), verbascoside (peak 13), astragalin (peak 14), quercetin (peak 15), kaempferol (peak 17), and schisandrin (peak 18). Belonging analysis showed that the peak 2 was derived from *Lycii Fructus*, peaks 3, 5, 7, 9, 11, 12, 14, 15, 17 were derived from *Cuscutae Semen*, peaks 6, 8, 10, 16 were derived from *Rubi Fructus*, peak 13 was derived from *Plantaginis Semen*, peak 18 was derived from *Schisandrae Chinensis Fructus*, peak 1 was a common ingredient of *Rubi Fructus* and *Schisandrae Chinensis Fructus*, peak 4 was a common ingredient of *Lycii*

收稿日期: 2021-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81773899); 成都中医药大学杏林学者学科人才科研提升计划(BSH20191026); 成都中医药大学西南特色中药资源国家重点实验室开放研究基金资助项目(2020BSH012)

作者简介: 廖宇娇(1995—), 女, 在读硕士, 从事中药药剂学研究。Tel: 13364446975 E-mail: 602843904@qq.com

***通信作者:** 胡昌江(1952—), 男, 教授, 从事中药炮制研究。E-mail: hhccjj@hotmail.com

陈志敏(1990—), 男, 讲师, 从事中药炮制研究。E-mail: chenzhimin@cdutcm.edu.cn

Fructus and *Rubi Fructus*. The chromatographic peak of WYP was not increased after processing, but the peak area was changed. Through CA, WYP whole-raw product group, pharmacopoeia group and salt-water processed group were divided into three groups. PCA screened out four principal components, and PLS-DA labeled nine different components of peak 1, 13 (verbascoside), 10 (ellagic acid), 7, 4, 11 (hyperoside), 12 (isoquercitrin), 3, 5 (chlorogenic acid). Chlorogenic acid, ellagic acid, hyperoside, isoquercitrin, kaempferol, schisandrin, and peak 1, 3, 4, 7, 8 may be the markers of the difference of different processed products of WYP. **Conclusion** The established method that determining fingerprint is stable and reliable, and the chemical components of WYP changes after processing. The results can provide a certain basis for how to choose processed products in WYP.

Key words: Wuzi Yanzong Pills; salt-water processing; fingerprint; chemical pattern recognition; CA; PCA; PLS-DA; chlorogenic acid; ellagic acid; hyperoside; isoquercitrin; verbascoside; astragalus; quercetin; kaempferol; schisandrin; *Lycii Fructus*; *Cuscutae Semen*; *Rubi Fructus*; *Plantaginis Semen*; *Schisandrae Chinensis Fructus*

男性不育是困扰当代夫妇的一大难题,已成为全球社会性疾病^[1]。据欧洲生殖学会统计,育龄夫妇 1 年内不能怀孕的占 25%,其中男方因素占 50%^[2]。西医在治疗男性不育上缺乏特异性^[3-4];而中医药在治疗男性不育方面理论基础丰富,具有独特的优势,针对不同病因病机的不育主要从益肾填精、健脾益气、养血活血等方面进行诊治^[5]。近年来,中医及中西医结合在治疗男性不育方面愈发受重视。

五子衍宗丸(Wuzi Yanzong Pills, WYP)是中医补肾益精的经典名方,有“古今第一种子方”的美誉。现代研究表明,WYP 对生殖系统^[6-8]、免疫系统^[9]、神经系统^[10-12]均有较好的保护作用;临床也多用 WYP 及其加减方治疗不育、少弱精子、性功能障碍等男性生殖系统疾病^[13-16],并且取得良好疗效。《中国药典》2020 年版中 WYP 由枸杞子、炒菟丝子、覆盆子、盐车前子、蒸五味子组成^[17],中药炮制理论认为“盐,性味咸寒,盐制可引药下行,增强补肝肾作用”。《中药炮制学辞典》^[18]指出菟丝子盐制后可去其温燥之性,平补肝肾,并可增强补肾固涩之功;在《中药制剂手册》^[19]收录的 WYP 中菟丝子要求盐炙,以补肾填精;《得配本草》^[20]中也要求菟丝子“淡盐水拌炒”。现代研究表明覆盆子盐制更适合于补肾益精^[21],《外科证治全生集》^[22]和《时方妙用·时方歌括》^[23]中分别有五味子“盐水拌蒸”“盐水浸炒”的记载。另外,根据计算,此 3 味药盐制后组成 WYP 其盐含量也不会给肾脏带来负担。WYP 中菟丝子、覆盆子、五味子是否也应该采用盐制,值得探讨。

本课题组在前期工作中已分别进行了处方中几味药盐制前后药效差异研究,结果显示盐覆盆子鞣花酸含量增加,对肾阳虚多尿大鼠的醛固酮、尿量和肾脏指数的改善作用优于生品^[21];盐五味子在改

善肾精亏虚大鼠卵泡刺激素、促黄体生成素等方面优于生五味子、蒸五味子;对比研究枸杞子生品及盐制品对肾阴虚大鼠的作用,差异不显著,故枸杞子仍使用生品;此外,以复方为研究对象,研究显示 WYP 中药物盐制后组方可增强复方补肾生精的疗效^[24-25]。在此基础上,本研究从指纹图谱变化入手,通过建立 WYP 全生品组(5 味药均为生品)、药典组(按药典规定方法进行炮制)、盐制组(除枸杞子外,其余 4 味药用盐水炮制)指纹图谱,对比分析不同组化学成分差异,以期 WYP 中如何选择用药物炮制品提供一定的参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 高效液相色谱仪, Thermo Fisher Scientific 公司; BP110S 十万分之一分析天平,德国 Sartorius 公司; KQ-300E 超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司; TW-2000W 可控调温电炉,郫县永信电器厂。

1.2 药物及试剂

枸杞子(四川国强中药饮片有限公司,批号 19030105;四川新荷花中药饮片有限公司,批号 1907125、2008077)、菟丝子(四川新荷花中药饮片有限公司,批号 1808099、1907075、D2007005)、覆盆子(成都市都江堰春盛中药饮片股份有限公司,批号 170401;四川国强中药饮片有限公司,批号 19030101、18070103)、车前子(四川国强中药饮片有限公司,批号 18080104;四川新荷花中药饮片有限公司,批号 1909008、2002042)、五味子(四川新荷花中药饮片有限公司,批号 1810092、1907085、2008093),以上药材均经成都中医药大学胡昌江教授鉴定,分别为茄科枸杞属植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实、旋花科菟丝子属植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R. Br. 的干燥成熟种

子、蔷薇科悬钩子属植物华东覆盆子 *Rubus chingii* Hu 的干燥果实、车前科车前属植物车前 *Plantago asiatica* L. 的干燥成熟种子、木兰科五味子属植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实。

对照品绿原酸(批号 110753-202018, 质量分数 $\geq 96.1\%$)、金丝桃苷(批号 111521-201809, 质量分数 $\geq 94.9\%$)、五味子醇甲(批号 110857-201815, 质量分数 $\geq 99.7\%$)、山柰酚(批号 110861-202013, 质量分数 $\geq 93.2\%$)、毛蕊花糖苷(批号 111530-201914, 质量分数 $\geq 95.2\%$)、异槲皮苷(批号 111809-201804, 质量分数 $\geq 97.2\%$)均购于中国食品药品检定研究院;对照品鞣花酸(批号 CHB-R-039, 质量分数 $\geq 98\%$)、紫云英苷(批号 CHB-Z-050, 质量分数 $\geq 98\%$)均购于成都克洛玛生物科技有限公司。乙腈, 色谱纯, Fisher Scientific 公司;甲醇, 色谱纯, Sigma Aldrich 公司;甲醇、磷酸, 分析纯, 购于成都市科隆化工试剂厂。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[26]

Agilent 5TC-C₁₈(2) 色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相乙腈-0.4%磷酸水溶液, 梯度洗脱:0~5 min, 5%~15%乙腈;5~10 min, 15%~17%乙腈;10~25 min, 17%乙腈;25~35 min, 17%~26%乙腈;35~60 min, 26%~56%乙腈;柱温 40 $^{\circ}$ C;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 254 nm;进样 5 μ L。

2.2 药物的炮制

菟丝子、覆盆子、车前子、五味子的炮制均按照文献方法进行^[26]。

2.2.1 炒菟丝子 取净菟丝子, 文火炒至微黄, 取出, 放凉。

2.2.2 盐菟丝子 取净菟丝子, 加入盐水拌匀, 待盐水吸尽后, 至炒制容器内, 文火炒至微鼓起, 取出, 放凉。每 100 克菟丝子, 用食盐 2 g。

2.2.3 盐覆盆子 取净覆盆子, 加入盐水拌匀, 闷润, 待盐水吸尽后, 至蒸制容器内蒸至透心, 取出, 干燥。每 100 克菟丝子, 用食盐 2 g。

2.2.4 盐车前子 取净车前子, 置炒制容器内, 文火炒至起爆裂声时, 喷洒盐水, 炒干, 取出, 放凉。每 100 克菟丝子, 用食盐 2 g。

2.2.5 蒸五味子 取净五味子, 至蒸锅内, 用蒸汽加热至黑色, 取出, 干燥。

2.2.6 盐五味子 取净五味子, 加入盐水拌匀, 闷

润, 待盐水吸尽后, 置炒制容器内, 文火炒干, 取出, 放凉。每 100 克菟丝子, 用食盐 2 g。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 分别精密称取绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷、异槲皮苷、毛蕊花糖苷、紫云英苷、槲皮素、山柰酚、五味子醇甲对照品适量于 5 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解定容, 摇匀, 即得质量浓度分别为 0.410、0.436、0.480、0.400、0.458、0.412、0.526、0.408、0.432 mg/mL 对照品储备液。分别吸取上述对照品储备液 240、300、240、80、240、130、50、80、80 μ L 至 5 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液。

2.3.2 WYP 供试品溶液的制备 将不同批号的 5 味药材随机组合成 15 个不同批次的 WYP(全生品组、药典组、盐制组同一批次为同一批号药物不同炮制品的组合), WYP 各组药物炮制情况及 15 个批次的药物批号信息分别见表 1、2。将枸杞子、菟丝子、覆盆子、车前子、五味子粉碎成细粉, 过 80 目筛, 按 8:8:4:2:1 的比例混匀, 备用;取 2 g, 精密称定, 置干燥洁净的具塞锥形瓶中, 加入 70%

表 1 各组 WYP 中药味炮制情况

Table 1 Processing of WYP in each group

组别	枸杞子	菟丝子	覆盆子	车前子	五味子
全生品	生	生	生	生	生
药典	生	炒	生	盐	蒸
盐制	生	盐	盐	盐	盐

表 2 15 批 WYP 中药味组成批号信息

Table 2 Batch number information of 15 batches of WYP

批次	枸杞子	菟丝子	覆盆子	车前子	五味子
S1	19030105	1808099	170401	18080104	1810092
S2	19030105	1907075	19030101	1909008	1907085
S3	19030105	D2007005	18070103	2002042	2008093
S4	1907125	1808099	170401	1909008	1907085
S5	1907125	D2007005	170401	1909008	2008093
S6	1907125	D2007005	18070103	18080104	1810092
S7	2008077	1808099	19030101	18080104	2008093
S8	2008077	1907075	18070103	1909008	1810092
S9	2008077	D2007005	170401	2002042	1907085
S10	19030105	1808099	18070103	2002042	1907085
S11	19030105	1907075	170401	18080104	2008093
S12	19030105	D2007005	19030101	1909008	1810092
S13	1907125	1808099	19030101	2002042	1810092
S14	1907125	1907075	18070103	18080104	1907085
S15	1907125	D2007005	170401	1909008	2008093

甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 回流提取 60 min, 取出, 冷却至室温, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 续滤液经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得 WYP 全生品组供试品溶液, 记为 S1~S15。同法制得 15 个批次药典组 (记为 YD1~YD15)、盐制组 (记为 YZ1~YD15) 供试品溶液。

2.3.3 WYP 中单味药材及各缺药材阴性样品供试品溶液的制备 分别称取“2.3.2”项下比例的各单味药材以及缺药材阴性样品, 置不同干燥洁净的具塞锥形瓶中, 按“2.3.2”项下方法制备单味药材供试品溶液及缺药材阴性样品供试品溶液。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取同一 WYP (S1) 供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 每次进样 5 μL , 连续进样 6 次, 记录 HPLC 图, 以金丝桃苷为参照峰 (为君药菟丝子中成分, 且保留时间适中, 峰面积较大, 分离度良好), 计算得到各共有色谱峰相对保留时间的 RSD 值为 0.011%~0.052%, 相对峰面积的 RSD 值为 1.02%~2.79%, 表明该仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 按“2.3.2”项下方法平行制备 WYP (S1) 供试品溶液 6 份, 按“2.1”项下色谱条件, 分别进样 5 μL , 记录 HPLC 图, 以金丝桃苷为参照峰, 计算得到各共有色谱峰相对保留时间的 RSD 值为 0.016%~0.100%, 相对峰面积的 RSD 值为 0.45%~2.70%, 表明该方法重复性良好。

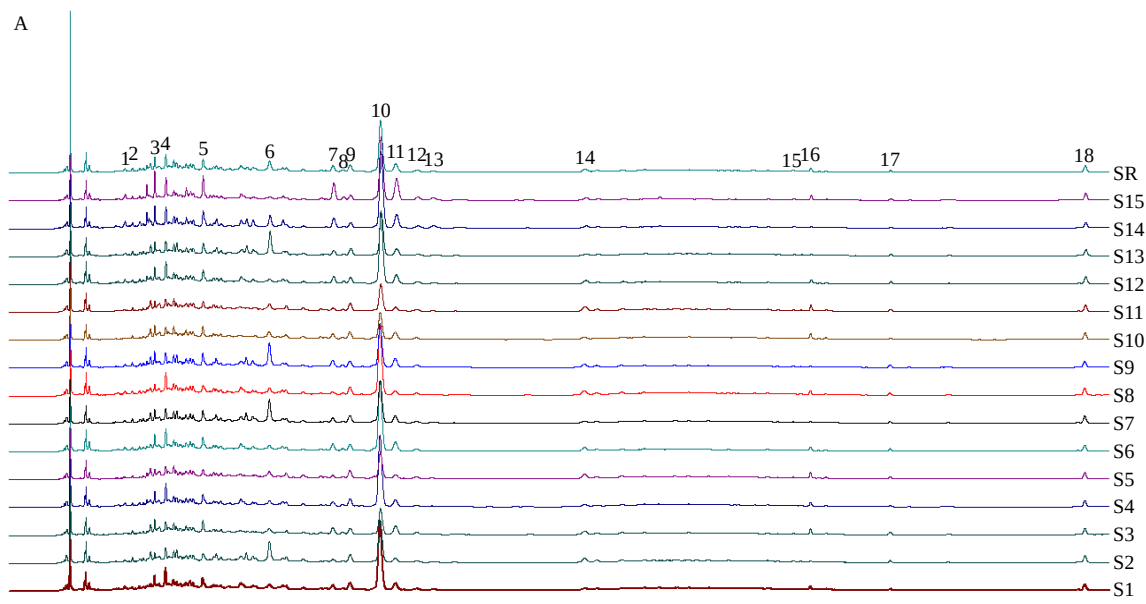
2.4.3 稳定性试验 取同一 WYP (S1) 供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 依次于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样 5 μL , 记录 HPLC 图, 以金丝

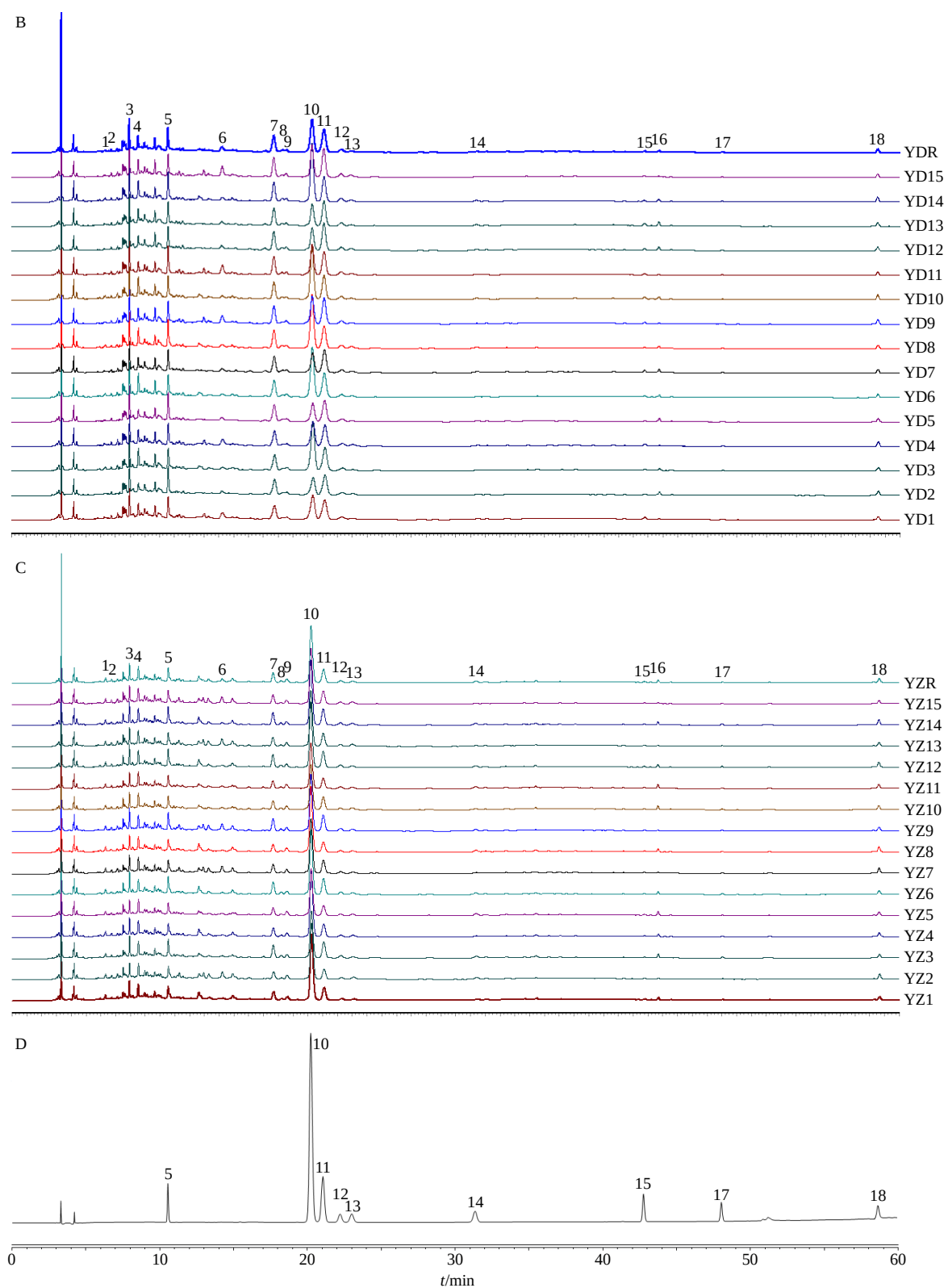
桃苷为参照峰, 计算得到各共有色谱峰相对保留时间的 RSD 值为 0.008%~0.024%, 相对峰面积的 RSD 值为 0.31%~2.70%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 WYP 中药物盐制前后组方的 HPLC 指纹图谱的建立

2.5.1 HPLC 指纹图谱的建立 取“2.3.2”项下 15 个批次的全生品组、药典组、盐制组的 WYP, 按“2.1”项下色谱条件, 分别进样 5 μL , 得到 HPLC 图, 将所得图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012.130723 版) 软件, 以 S1 图谱为参照图谱, 时间窗宽度设置为 0.1 s, 采用中位数生成方法, 进行多点校正和全谱峰匹配, 生成 WYP 全生品组、药典组、盐制组指纹图谱及相应的对照图谱, 共确定了 18 个共有峰, 见图 1。

以对照指纹图谱为参照, 计算得到 15 批全生品组的 WYP 样品指纹图谱相似度分别为 0.959、0.949、0.972、0.963、0.936、0.966、0.939、0.962、0.956、0.954、0.943、0.954、0.910、0.963、0.950; 15 批药典组的 WYP 样品指纹图谱相似度分别为 0.987、0.963、0.969、0.985、0.964、0.975、0.966、0.967、0.989、0.965、0.988、0.948、0.963、0.970、0.985; 15 批盐制组的 WYP 样品指纹图谱相似度分别为 0.993、0.992、0.989、0.996、0.990、0.993、0.994、0.990、0.993、0.992、0.989、0.995、0.994、0.995、0.994; 各组指纹图谱相似度均大于 0.9, 相似度高, 表明所建立的 WYP 全生品组、药典组、盐制组指纹图谱质量稳定, 可以反映其基本特征。





5-绿原酸 10-鞣花酸 11-金丝桃苷 12-异槲皮苷 13-毛蕊花糖苷 14-紫云英苷 15-槲皮素 17-山柰酚 18-五味子醇甲, 图2同
 5-chlorogenic acid 10-ellagic acid 11-hyperoside 12-isoquercitrin 13-verbascoside 14-astragalin 15-quercetin 17-kaempferol
 18-schisandrin, same as fig. 2

图1 WYP全生品组(A)、药典组(B)、盐制组(C)指纹图谱及混合对照品色谱图(D)

Fig. 1 Fingerprints of WYP of whole-raw group (A), pharmacopoeia group (B), salt-water processing group (C) and HPLC chart of mixed reference substances (D)

经对照品比较指认了其中9个共有色谱峰,分别是绿原酸(5号峰)、鞣花酸(10号峰)、金丝桃苷(11号峰)、异槲皮苷(12号峰)、毛蕊花糖苷(13号峰)、紫云英苷(14号峰)、槲皮素(15号峰)、山柰酚(17号峰)、五味子醇甲(18号峰)。

2.5.2 共有色谱峰的指认与归属性分析 取“2.3.3”项下枸杞子、菟丝子、覆盆子、车前子、五味子单味药以及各缺药材阴性样品供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别进样5 μ L,得到HPLC图,

WYP样品、单味药材及缺药材阴性样品HPLC图见图2。通过与WYP全方HPLC图进行比对,其中2号峰归属于枸杞子,3、5(绿原酸)、7、9、11(金丝桃苷)、12(异槲皮苷)、14(紫云英苷)、15(槲皮素)、17(山柰酚)号峰归属于菟丝子,4、6、8、10(鞣花酸)、16号峰归属于覆盆子,13(毛蕊花糖苷)号峰归属于车前子,18(五味子醇甲)号峰归属于五味子,1号峰归属于覆盆子和五味子,4号峰归属于枸杞子和覆盆子。

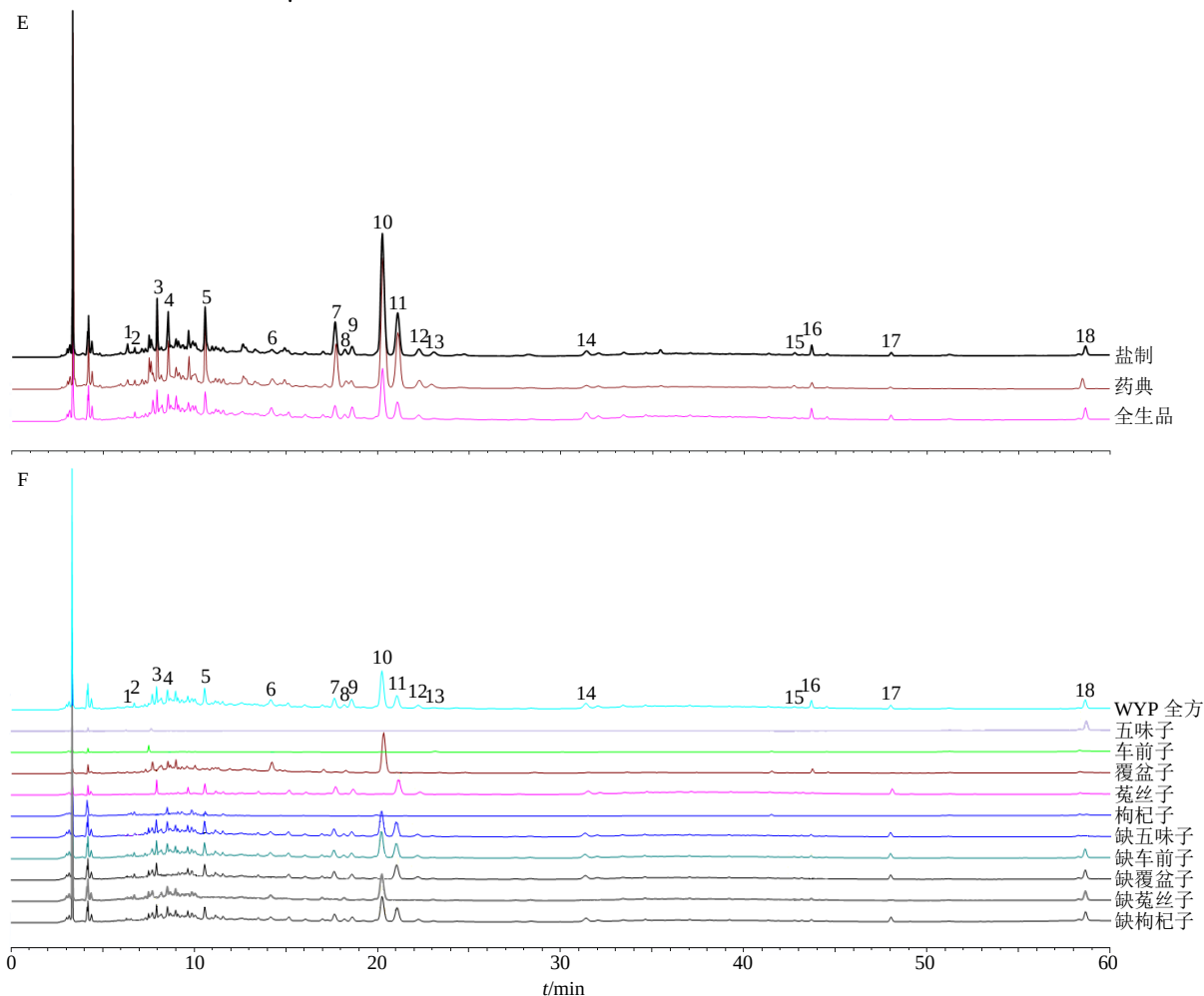


图2 WYP全生品组、药典组、盐制组样品(E)和各单味药及阴性样品(F)的HPLC图

Fig. 2 HPLC chart of WYP sample of whole-raw product group, pharmacopoeia group, salt-water processing group (E) and each single herb and negative samples of WYP (F)

2.6 化学模式分析

2.6.1 方差分析 将15批全生品组、药典组、盐制组WYP样品18个共有峰峰面积导入SPSS 19.0数据分析软件,进行单因素方差分析^[27],结果见表3。分析发现,药物炮制后组方WYP大部分共有峰峰面积发生变化,其中药物盐制后组方变化更加明显;与全生品组比较,药典组除峰1、4、6、10、16外

均有显著性差异,盐制组除峰16外均有显著性差异;与药典组比较,盐制组除峰2、4、13、14、16外均发生明显改变;综合比较,药物炮制前后组方WYP峰3、5、7~9、11、12、17、18差异较大。

2.6.2 聚类分析 采用SPSS 19.0数据分析软件,以15批全生品组、药典组、盐制组WYP样品18个共有峰峰面积为变量,采用组间连接法,以平方

表3 15批不同炮制品组方WYP中18个共有峰峰面积方差分析结果 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)Table 3 Results of variance analysis of common peak area shared by 15 batches of different processed products of WYP ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

共有峰	共有峰峰面积/(mAU·min ⁻¹)			共有峰	共有峰峰面积/(mAU·min ⁻¹)		
	全生品组	药典组	盐制组		全生品组	药典组	盐制组
1	0.48±0.24	0.59±0.33	1.33±0.18**▲▲	10	24.02±9.55	20.89±4.91	38.36±5.65**▲▲
2	0.88±0.21	1.18±0.29*	1.21±0.38**	11	3.65±1.04	18.18±0.94**	9.65±1.74**▲▲
3	2.63±0.36	6.35±0.56**	4.53±0.53**▲▲	12	1.31±0.29	3.04±0.21**	1.85±0.31**▲▲
4	4.48±0.71	5.36±1.30	5.49±0.31**	13	0.64±0.20	1.77±0.26**	1.85±0.36**
5	4.28±0.89	7.37±0.82**	5.07±0.62**▲▲	14	2.11±0.71	1.17±0.26**	1.34±0.34**
6	5.80±3.31	4.84±1.38	3.04±1.68*▲	15	0.31±0.27	0.86±0.36**	0.39±0.02*▲▲
7	2.54±0.58	10.87±0.47**	5.85±1.24**▲▲	16	0.89±0.46	0.94±0.48	0.85±0.40
8	0.94±0.26	1.82±0.30**	1.17±0.33*▲▲	17	0.69±0.13	0.27±0.03**	0.43±0.09**▲▲
9	3.48±0.51	2.09±0.25**	2.45±0.41**▲	18	2.61±0.14	1.87±0.28**	2.33±0.30*▲▲

与全生品组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与药典组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs whole-raw product group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs pharmacopoeia group

欧氏距离为测度进行系统聚类, 聚类结果见图3。从聚类结果来看, 平方欧式距离为15时, 15批全生品组样品(S1~S15)聚为一类, 15批药典组样品(YD1~YD15)聚为一类, 15批盐制组样品(YZ1~YZ15)聚为一类, 表明不同炮制品组方WYP在化学成分含量上差异较大。

2.6.3 主成分分析(PCA) 以15批全生品组、药典组、盐制组WYP样品18个共有峰峰面积为原始数据, 采用SPSS 19.0数据分析软件对共有峰峰面积进行标准化处理, 再进行PCA, 分析结果见表4、5和图4。以特征值大于1为提取原则, 共提取到4个主成分, 累积贡献率为83.51%, 表明这4个主成分包含了18个共有成分83.51%的信息, 可以反映样品的主要特征, 具有较好的代表性, 见表4。由表4、5可知, 主成分1特征值为8.911, 方差贡献率为49.508%, 对应峰3、5(绿原酸)、7、8、11(金丝桃苷)、12(异槲皮苷)、17(山柰酚)、18(五味子醇甲)有较高载荷, 说明这8个成分对第1主成分的影响较大; 主成分2特征值为3.199, 方差贡献率为17.770%, 对应峰1、10(鞣花酸)、4有较高载荷, 说明这2个成分对第2主成分的影响较大; 主成分3特征值1.695, 方差贡献率为9.418%, 对应峰16有较高载荷; 主成分4特征值1.227, 方差贡献率为6.814%, 对应峰2有较高载荷。将15批全生品组、药典组、盐制组WYP样品18个共有峰峰面积导入SIMCA 14.1软件, 绘制主成分得分图, 见图4, 其分类结果与聚类分析结果一致。

2.6.4 偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA) 以15

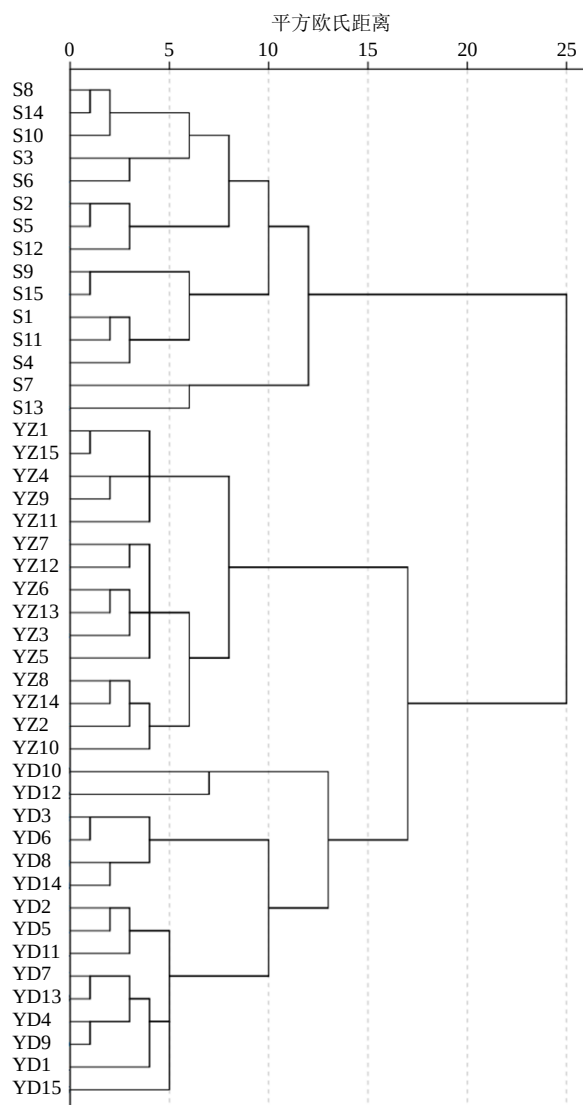


图3 WYP样品的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis chart of samples of WYP sample

表 4 特征值及方差贡献率

Table 4 Eigenvalues and contribution rates of cumulative variance

主成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	8.911	49.508	49.508
2	3.199	17.770	67.277
3	1.695	9.418	76.695
4	1.227	6.814	83.510

表 5 初始因子载荷矩阵

Table 5 Initial factor loading matrix

初始因子	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4
1	0.177	0.924	-0.157	0.209
2	0.446	0.287	-0.433	0.658
3	0.973	0.021	0.078	0.010
4	0.414	0.642	0.355	-0.098
5	0.830	-0.370	-0.022	0.025
6	-0.182	-0.573	-0.661	0.085
7	0.973	-0.163	0.041	-0.009
8	0.803	-0.243	0.100	0.411
9	-0.784	-0.168	-0.078	0.465
10	0.097	0.930	0.018	-0.014
11	0.970	-0.153	0.048	-0.116
12	0.920	-0.279	0.039	0.170
13	0.777	0.333	-0.227	0.075
14	-0.659	-0.244	0.366	0.305
15	0.629	-0.319	0.271	-0.127
16	0.084	-0.063	0.748	0.418
17	-0.869	-0.079	0.263	0.120
18	-0.801	0.149	-0.057	0.017

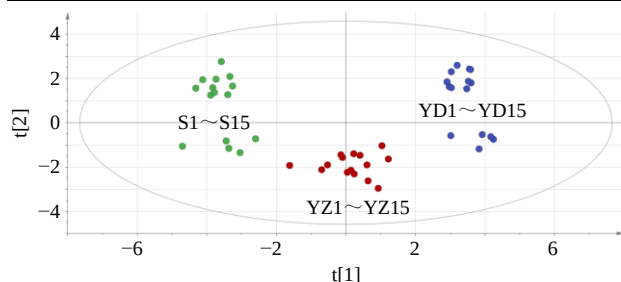


图 4 WYP 样品的主成分得分图

Fig. 4 Principal component score chart of samples of WYP
批全生品组、药典组、盐制组 WYP 样品 18 个共有峰峰面积为变量, 导入 SIMCA 14.1 软件, 运行 PLS-DA 程序。结果发现累积解释能力参数 (R^2_X 、 R^2_Y) 分别为 0.714、0.898, 预测能力参数 (Q^2) 为 0.836, 均大于 0.5, 表明所建立的模型稳定可靠、预测能力强, 可用于区分不同炮制品组方的 WYP; 从图 5

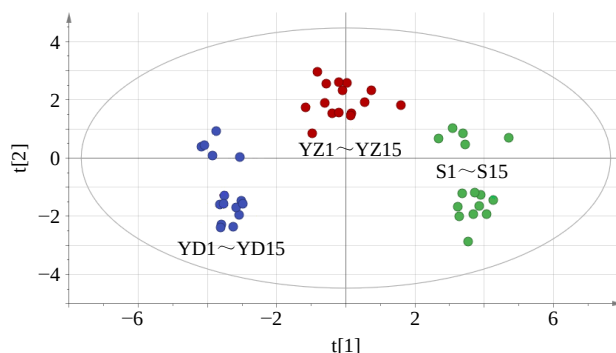


图 5 WYP 样品的 PLS-DA 得分图

Fig. 5 PLS-DA score plot chart of samples of WYP

可以看出 15 批全生品组、药典组、盐制组 WYP 样品中, 18 个共有峰峰面积数据点均落在 95% 置信区间内, 根据分布可分为 3 类, 与聚类分析、PCA 结果一致。

对建立的 PLS-DA 模型进行 200 次置换检验, 结果见图 6。从图中可以看出, 右边的 R^2 和 Q^2 值均大于 0.9, 均高于左边的值, Q^2 回归线的截距为负值, 表明所构建的 PLS-DA 模型未出现过拟合, 预测能力较好, 可以用来判别分析不同炮制品组方的 WYP。根据变量重要性投影 (variable importance in projection, VIP) 值筛选影响药物炮制前后组方 WYP 化学成分差异的标志性成分, 结果见图 7, 在 95% 置信区间内, VIP 值越大, 差异越显著, 对区别不同炮制品组方 WYP 的贡献越大。以 $VIP > 1$ 为标准, 筛选出了 9 个影响样品分组的关键成分, 根据 VIP 值大小依次为峰 1、13 (毛蕊花糖苷)、10 (鞣花酸)、7、4、11 (金丝桃苷)、12 (异槲皮苷)、3、5 (绿原酸), 说明这 9 个成分对炮制前后组方的 WYP 分类具有显著影响, 可作为 WYP 炮制前后分别组方差异的主要潜在标志物。

3 讨论

在实验条件摸索过程中, 分别考察了提取溶剂

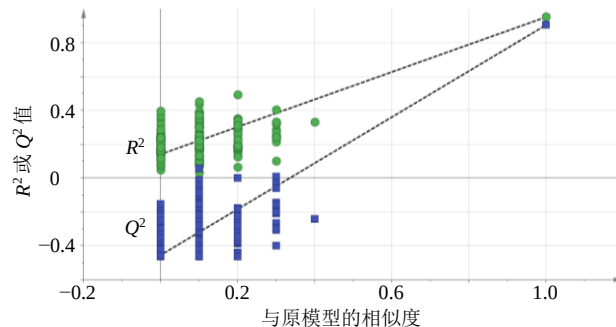


图 6 置换检验图

Fig. 6 Chart of permutation test

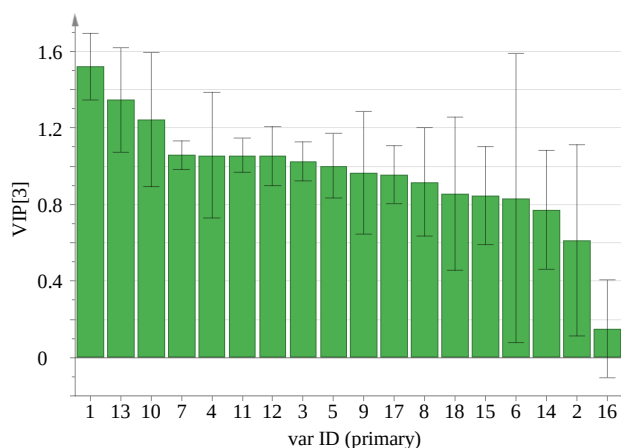


图7 WYP样品的VIP值图

Fig. 7 VIP values of samples of WYP

(甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、70%乙醇、50%乙醇)、提取方法(超声法和回流提取法)对供试品色谱峰数量、峰形、分离度、峰面积的影响,最终确定70%甲醇回流提取1.0 h效果最佳。考察不同流动相(甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.2%磷酸水溶液、乙腈-0.3%磷酸水溶液、乙腈-0.4%磷酸水溶液)、不同柱温(25、30、35、40℃)、不同体积流量(0.6、0.8、1.0 mL/min)对分离效果的影响,发现采用乙腈-0.4%磷酸水溶液、柱温40℃、体积流量为1.0 mL/min时,分离效果更好。采用DAD检测器对样品进行全波长扫描,并结合《中国药典》2020年版^[17]波长条件,考察了样品在波长210、254、280、320、360 nm下HPLC图色谱峰分离度、峰形等的影响,最终检测波长选择254 nm。

本实验在现有文献研究的基础上,对实验方法进行了改良,建立了WYP全生品组、药典组、盐制组指纹图谱,通过相似度评价得到相似度均大于0.9,表明各批次WYP间整体质量较稳定,标记了18个共有峰,通过对照品指认了其中9个;比较全生品组、药典组、盐制组色谱峰数量及峰面积差异,未发现新的化学成分,但峰面积发生变化。结合课题组前期药理实验结果^[24-25],提示药物炮制后组方WYP可能通过改变复方中化学成分含量而增强补肾生精效果。

化学计量学在对大量样本进行处理时可快速、全面地鉴别归类,广泛应用于中药鉴别、中药炮制、组效关系等研究^[28-31]。本实验对不同批次不同炮制品组方的WYP指纹图谱共有峰峰面积进行方差分析,发现不同炮制品组方的WYP在峰3、5、7~9、11、12、17、18上差异较大;聚类分析发现WYP

全生品组、药典组、盐制组各自聚为一类,说明不同炮制品组方的WYP化学成分含量上差异较大,可初步推断WYP中药物炮制后组方可影响复方的化学成分含量;PCA筛选得到影响样品分类的4个主成分,从载荷值可以看出,峰1、3~5、7、8、10~12、17、18是影响不同炮制品组方WYP分类的主要成分;PLS-DA从18个共有峰中筛选出9个差异标志物,为峰1、3~5、7、10~13。综合实验结果,峰1、3~5、7、8、10~12、17、18共11个成分可能是影响不同炮制品组方WYP的差异性成分,明确了绿原酸、鞣花酸、金丝桃苷、异槲皮苷、山柰酚、五味子醇甲6个成分,其余5个成分还需要进一步借助LC-MS/MS、LC-Q-TOF-MS、NMR等技术进行鉴别。

现代研究表明,金丝桃苷对精子活力有促进作用^[32],鞣花酸可减轻睾丸损伤,提高精子质量^[33-35],本研究提示鞣花酸、金丝桃苷是产生不同炮制品组方WYP差异的标志成分,从指纹图谱看,WYP药典组金丝桃苷峰面积增加,鞣花酸峰面积减少,盐制组鞣花酸、金丝桃苷峰面积均增加,且盐制组毛蕊花糖苷、紫云英苷、山柰酚、五味子醇甲的峰面积高于药典组,推测WYP中药物炮制后组方可能通过促进复方化学成分的溶出,增强复方补肾益精作用,盐制对WYP中化学成分的影响更大,盐制组可能更有优势。

综上,本研究建立了不同炮制品组方WYP指纹图谱,通过化学识别初步分析了影响炮制前后组方化学成分的差异标志成分,实验结果能够较为全面地探讨炮制对WYP化学成分的影响。但复方化学成分复杂,本研究仅对炮制前后共有峰进行了分析,不够深入,后期可加强对WYP中化学成分的研究,对筛选出的11个差异标志物进行含量测定,并跟踪这些成分的体内过程,通过比较WYP中药物炮制前后组方有效成分血中移行量、组织分布、代谢排泄等情况,探讨炮制对复方化学成分体内体外的影响,以期对中药炮制理论“盐制入肾,肾主生殖”提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ahmadi M H, Mirsalehian A, Gilani M A S, et al. Improvement of semen parameters after antibiotic therapy in asymptomatic infertile men infected with *Mycoplasma genitalium* [J]. *Infection*, 2018, 46(1): 31-38.

- [2] Katz D J, Teloken P, Shoshany O. Male infertility-The other side of the equation [J]. *Aust Fam Physician*, 2017, 46(9): 641-646.
- [3] 鲍丙豪, 王彬, 王继升, 等. 基于数据挖掘的中医药治疗少弱精子症用药规律分析 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(11): 1366-1370.
- [4] Ko E Y, Siddiqi K, Brannigan R E, et al. Empirical medical therapy for idiopathic male infertility: A survey of the American Urological Association [J]. *J Urol*, 2012, 187(3): 973-978.
- [5] 周丽, 王明凯, 王定国, 等. 基于数据挖掘《中医方剂大辞典》治疗不育症用药规律探讨 [J]. 中国性科学, 2020, 29(2): 92-96.
- [6] Hu H X, Sun J, Gao Y J, et al. Effect of modified Wuzi Yanzong Pill (五子衍宗丸) on Tip60-mediated apoptosis in testis of male rats after microwave radiation [J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(5): 342-347.
- [7] 张晨曦, 王永辉, 许凯霞, 等. 不同补益方剂对老龄小鼠生精细胞凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(8): 148-153.
- [8] 胡素芹, 李悦, 曹龔, 等. 五子衍宗丸对幼年大鼠睾丸支持细胞增殖的影响及机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(11): 917-922.
- [9] 杨卓, 张希, 陈志敏, 等. 五子衍宗丸中药物盐制后对肾精亏虚大鼠免疫功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2134-2137.
- [10] 曾克武, 万彦军, 廖理曦, 等. 加味五子衍宗丸神经保护作用靶点群的鉴定与功能分析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3656-3660.
- [11] 张若楠, 柴智, 樊慧杰, 等. 五子衍宗丸对实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠防治作用及其机制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(4): 1316-1319.
- [12] 李瑞雪, 樊慧杰, 柴智, 等. 五子衍宗丸对神经管畸形细胞模型凋亡途径的影响 [J]. 中医杂志, 2019, 60(13): 1134-1141.
- [13] 邱海明. 五子衍宗丸在治疗男性不孕不育中的应用效果 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(49): 171.
- [14] 王志强, 梁兵, 黄耀全. 五子衍宗丸治疗男性不育少弱精子症的疗效观察 [J]. 广西医科大学学报, 2010, 27(2): 291-292.
- [15] 叶广华, 郭颖梅, 黄自平. 五子衍宗丸合四君子汤加味治疗少弱精子症临床分析 [J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(7): 789-790.
- [16] 杨铁戈, 周波. 周波教授治疗早泄临床经验总结 [J]. 亚太传统医药, 2017, 13(17): 105-106.
- [17] 中国药典 [S]. 三部. 2020: 611.
- [18] 叶定江, 原思通. 中药炮制学辞典 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 372.
- [19] 中医研究院中药研究所. 中药制剂手册 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1975: 77.
- [20] 清·严洁, 施雯, 洪炜纂. 郑金生整理. 得配本草 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 136.
- [21] 张希, 廖宇娇, 杨卓, 等. 覆盆子盐制前后化学成分及药效学变化研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 82-84.
- [22] 清·王维德撰. 外科证治全生集 [M]. 海口: 海南国际新闻出版社, 1995: 5458.
- [23] 清·陈修园撰. 俞宜年, 俞白帆, 黄大理校注. 时方妙用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 133.
- [24] 张希, 杨卓, 陈志敏, 等. 五子衍宗丸中药物盐制前后的药效分析 [J]. 中成药, 2019, 41(11): 2706-2710.
- [25] 胡麟, 吴珊珊, 吴文辉, 等. 五子衍宗丸中药物盐制对补肾生精作用的影响 [J]. 中医药导报, 2016, 22(19): 23-25.
- [26] 廖宇娇, 张希, 敖明月, 等. 五子衍宗丸中所含药物盐制后组方对大鼠生精细胞凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10): 1-7.
- [27] 张志鹏, 梁丽金, 徐杰, 等. 巴戟天及根皮与木心 UPLC 特征指纹图谱与化学模式识别方法研究 [J]. 中草药, 2020, 51(13): 3554-3560.
- [28] 于洋, 李军, 李宝国. 化学计量学在中药质量控制研究中的应用 [J]. 中成药, 2018, 40(5): 1139-1142.
- [29] 孙立丽, 王萌, 任晓亮. 化学模式识别方法在中药质量控制研究中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(20): 4339-4345.
- [30] Zhou X D, Tang L Y, Wu H W, et al. Chemometric analyses for the characterization of raw and processed seeds of *Descurainia sophia* (L.) based on HPLC fingerprints [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 111: 1-6.
- [31] 孙立丽, 任晓亮, 张慧杰, 等. 基于超高效液相色谱指纹图谱和化学计量学相结合的首乌炮制研究 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(5): 2194-2197.
- [32] 郭蕊蕊. 菟丝子中黄酮类成分对人精子细胞活力的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
- [33] Arab H H, Gad A M, Fikry E M, et al. Ellagic acid attenuates testicular disruption in rheumatoid arthritis via targeting inflammatory signals, oxidative perturbations and apoptosis [J]. *Life Sci*, 2019, 239: 117012.
- [34] Guvvala P R, Ravindra J P, Selvaraju S, et al. Ellagic and ferulic acids protect arsenic-induced male reproductive toxicity via regulating Nfe2l2, Ppargc1a and StAR expressions in testis [J]. *Toxicology*, 2019, 413: 1-12.
- [35] Georgy G S, Maher O W. Ellagic acid and rosmarinic acid attenuate doxorubicin-induced testicular injury in rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, 31(9): doi: 10.1002/jbt.21937.

[责任编辑 郑礼胜]