

基于指纹图谱结合化学计量学的吴茱萸-甘草配伍减毒化学成分研究

栗焕焕, 张国琴, 邱紫莹, 李 丽, 任晓亮, 刘亚男*, 窦志英

天津中医药大学中药学院, 天津 301617

摘要: 目的 研究吴茱萸与甘草配伍后发挥减毒作用的化学成分变化。方法 采用 HPLC 指纹图谱结合化学计量学的方法, 研究甘草配伍对吴茱萸化学成分的影响, 采用层次递进法进一步研究甘草中 3 种主要成分配伍对吴茱萸中化学成分的影响。结果 化学计量学结果表明, 吴茱萸单煎液和吴茱萸-甘草药对各自聚为一类, 配伍后吴茱萸中多数化学成分的含量显著降低 ($P < 0.05$), 实现了吴茱萸配伍甘草前后成分的差异性分析, 获取了影响差异的重要化学成分; 甘草组分配伍对吴茱萸中化学成分的影响显示, 甘草 3 种主要成分均有不同程度的影响, 其中甘草多糖、甘草酸的作用明显, 甘草苷对吴茱萸中化学成分的作用较小。结论 所建立的指纹图谱结合化学计量学方法能够实现吴茱萸配伍甘草前后的区分, 探讨了吴茱萸-甘草配伍减毒的物质基础, 为研究吴茱萸-甘草配伍的合理性提供了参考。

关键词: 吴茱萸; 甘草; 配伍; 减毒; 指纹图谱; 化学计量学; 甘草多糖; 甘草苷; 甘草酸

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)06-1730-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.015

Study on attenuating chemical compositions of *Euodiae Fructus*-*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* compatibility based on fingerprints coupled with chemometrics

LI Huan-huan, ZHANG Guo-qin, QIU Zi-ying, LI Li, REN Xiao-liang, LIU Ya-nan, DOU Zhi-ying

School of Chinese Materia Medica, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To study the changes in chemical composition of reducing toxicity of Wuzhuyu (*Euodiae Fructus*, EF) through compatibility with Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, GRR). **Methods** HPLC fingerprint combined with chemometric methods were used to study the effects of GRR compatibility on the chemical components of EF, then the hierarchical progressive method was used to further study the influence of the three main components of GRR on the chemical composition of EF. **Results** The stoichiometric results showed that the single decoction of EF and the decoction of EF-GRR were clustered into one group respectively. The content of most chemical components in EF was significantly reduced after compatibility ($P < 0.05$), which realized the difference analysis before and after the compatibility of EF with GRR and obtained the important chemical components that affect the difference. The effect of the three main components of GRR on the chemical components of EF showed that they had different degrees of influence, among which glycyrrhiza polysaccharide and glycyrrhizic acid had obvious effects, while glycyrrhizin had little effect. **Conclusion** The established fingerprint combined with chemometric methods can realize the differentiation before and after the compatibility of EF with GRR, discuss the material basis of the EF-GRR compatibility, and provide reference for studying the rationality of the EF-GRR compatibility.

Key words: *Euodiae Fructus*; *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*; compatibility; detoxification; fingerprint; chemometrics; glycyrrhiza polysaccharide; glycyrrhizin; glycyrrhizic acid

吴茱萸 *Euodiae Fructus* (EF) 为芸香科吴茱萸属植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var.

bodinieri (Dode) Huang 的干燥近成熟果实^[1], 具有良好的镇痛、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性^[2-4], 生物碱和苦味素类为其主要有效成分^[5-8]。文献记载吴茱萸有小毒, 近年来临床上关于吴茱萸不良反应的

收稿日期: 2021-09-14

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81803955)

作者简介: 栗焕焕 (1990—), 女, 博士, 研究方向为中药分析。Tel: 18526063647 E-mail: lihuanhuan9282@163.com

*通信作者: 刘亚男, 硕士生导师, 主要从事中药炮制及中药分析研究。E-mail: tianyanan2007@163.com

报道日益增多,而生物碱类成分如吴茱萸碱、吴茱萸次碱是潜在的毒性成分^[9-10]。甘味中药能降低吴茱萸的毒性,甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* (GRR) 为临床处方中使用频率最高的药物之一,前期研究结果显示甘草对吴茱萸具有“减毒存效”的作用^[11-14]。目前,以“甘缓”为切入点,系统研究甘味中药对吴茱萸减毒作用的文献极少,本研究采用中药指纹图谱与化学计量学相结合的方法^[15-18],以吴茱萸-甘草药对为研究对象,研究甘草配伍对吴茱萸中化学成分的影响,探究甘草对吴茱萸发挥减毒作用的物质基础,并采用层次递进的方法研究甘草组分配伍对吴茱萸中化学成分的影响,获取配伍过程中对吴茱萸化学成分影响显著的甘草成分,以期对甘味中药的减毒作用研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪,美国 Agilent 公司; Mili-Q Advantage A10 超纯水仪,美国 Milipore 公司; DV215CD 型十万分之一天平,奥豪斯仪器(常州)有限公司; Multiskan FC 酶标仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司; FA2004 型万分之一天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司; KDM 型调温电热套,北京永兴精佳仪器有限公司; XD-3200DTD 型超声清洗仪,南京先欧仪器制造有限公司; H2016D 型高速离心机,上海知信实验仪器技术有限公司。

1.2 药品与试剂

收集市售吴茱萸 9 批,经天津中医药大学中药专业马琳教授鉴定为芸香科吴茱萸属植物吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实,分别来自安徽、广西、江西、四川、贵州,产地代码为 AH1、AH2、GX1、GX2、JX1、JX2、SC1、GZ1、GZ2,分别编号为 S1~S9; 甘草购自北京同仁堂药店,经鉴定为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎。对照品吴茱萸碱(批号 A1629030,质量分数 $\geq 99\%$)、吴茱萸次碱(批号 B0605AS,质量分数 $> 98\%$)、柠檬苦素(批号 D1216AS,质量分数 $> 98\%$)购自大连美仑生物技术有限公司;对照品新绿原酸(批号 DST190124-015,质量分数 $\geq 98\%$)、隐绿原酸(批号 DST190824-035,质量分数 $\geq 98\%$)、咖啡酸(批号 DST190517-013,质量分数 $\geq 98\%$)购自成都德思特生物技术有限公司;对照品绿原酸(批号 129Q-9GGW,质量分数 96.8%)购自中国食品药品检定研究院;对照品

金丝桃苷(批号 ZP0034,质量分数 $\geq 98\%$)、去氢吴茱萸碱(批号 WP20382,质量分数 $\geq 98\%$)购自天津万象恒远科技有限公司;对照品甘草多糖(批号 C13A9Y58599,质量分数为 95%)、甘草酸(批号 C10199020,质量分数为 93%)购自上海源叶生物科技有限公司;对照品甘草酸铵盐(批号 wkq19041108,质量分数 $\geq 98\%$)、甘草苷(批号 wkq19030708,质量分数 $\geq 98\%$)购自四川省维克奇生物科技有限公司;色谱纯级甲醇、乙腈购自美国 Sigma 公司;色谱纯级甲酸购自天津科密欧化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 甘草配伍对吴茱萸中化学成分的影响

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Waters X Select[®] HSS T3 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液;梯度洗脱,上清液: 0~20 min, 7%~11%乙腈; 20~23 min, 11%~12%乙腈; 23~35 min, 12%~25%乙腈; 35~40 min, 25%乙腈; 40~45 min, 25%~40%乙腈; 沉淀物: 0~5 min, 20%~30%乙腈; 5~8 min, 30%~52%乙腈; 8~23 min, 52%乙腈; 23~30 min, 52%~100%乙腈; 全波长扫描确定最佳检测波长: 327 nm(上清液)、215 nm(沉淀物); 柱温 35 $^{\circ}$ C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L。

2.1.2 对照品溶液的制备 分别称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、柠檬苦素、吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品适量,精密称定,置于量瓶中,甲醇溶解,配制成质量浓度分别为 1.58、1.54、1.59、0.27、0.47、0.81、2.68、1.15、0.83 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备

(1) 单味中药供试品溶液的制备: 称取吴茱萸药材约 2 g, 料液比为 1:10, 加水浸泡 30 min, 加热回流提取 1 h, 滤过, 4 $^{\circ}$ C 冰箱环境中静置 24 h, 8000 r/min 离心 15 min, 上清液过 0.22 μ m 滤膜, 取续滤液作为上清液层备用; 取下层沉淀物, 加 2 mL 乙醇超声 20 min 溶解, 过 0.22 μ m 滤膜, 取续滤液作为沉淀物层备用。

(2) 配伍药对供试品溶液的制备: 称取吴茱萸和甘草药材各约 2 g, 料液比为 1:10 (另加甘草的吸水量 3 mL), 浸泡 30 min, 加热回流 1 h, 滤过, 4 $^{\circ}$ C 冰箱环境中静置 24 h, 8000 r/min 离心 15 min, 上清液过 0.22 μ m 滤膜, 取续滤液作为上清液层备用; 取下层沉淀物, 加 2 mL 乙醇超声 20 min 溶解,

过 0.22 μm 滤膜, 取续滤液作为沉淀物层, 备用。

2.1.4 方法学考察

(1) 精密度实验: 取吴茱萸样本 JX1 作为供试品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下连续进样 6 次, 记录色谱图, 以分离度好、且信号响应较高的 9 个成分峰(上清液中 6、13、14、16、21 号峰, 沉淀物中 26、29、32、34 号峰)为指标, 计算保留时间和峰面积的 RSD 值。结果各成分峰保留时间的 RSD% $<2.0\%$, 峰面积 RSD% $<4.0\%$, 表明仪器精密度良好。

(2) 重复性实验: 取吴茱萸样本 JX1, 按“2.1.3”项下供试品溶液的制备方法平行制备 6 份, 按“2.1.1”项下色谱条件分析并记录色谱图。以分离度好、且信号响应较高的 9 个成分峰(上清液中 6、13、14、16、21 号峰, 沉淀物中 26、29、32、34 号峰)为指标, 计算保留时间和峰面积的 RSD 值。结果各成分峰保留时间的 RSD $<1.0\%$, 峰面积 RSD $<$

3.0%, 表明该方法重复性良好。

(3) 稳定性试验: 取吴茱萸样本 JX1 作为供试品溶液, 室温条件下放置, 按“2.1.1”项下色谱条件, 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样, 分析并记录色谱图, 以分离度好、且信号响应较高的 9 个成分峰(上清液中 6、13、14、16、21 号峰, 沉淀物中 26、29、32、34 号峰)为指标, 计算保留时间和峰面积的 RSD 值。结果发现各成分峰保留时间的 RSD $<1.0\%$, 峰面积 RSD $<2.0\%$, 表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.1.5 甘草配伍对吴茱萸中化学成分的影响 将 9 批吴茱萸及吴茱萸-甘草药对按“2.1.1”项下色谱条件分别检测上清液及沉淀物中成分, 得到吸收强、特征明显且稳定性好的 34 个色谱峰作为共有峰, 并对色谱峰进行指认。吴茱萸-甘草药对供试品溶液和混合对照品溶液 HPLC 色谱图如图 1 所示, 9 批不同产地吴茱萸样品的指纹图谱如图 2 所示。

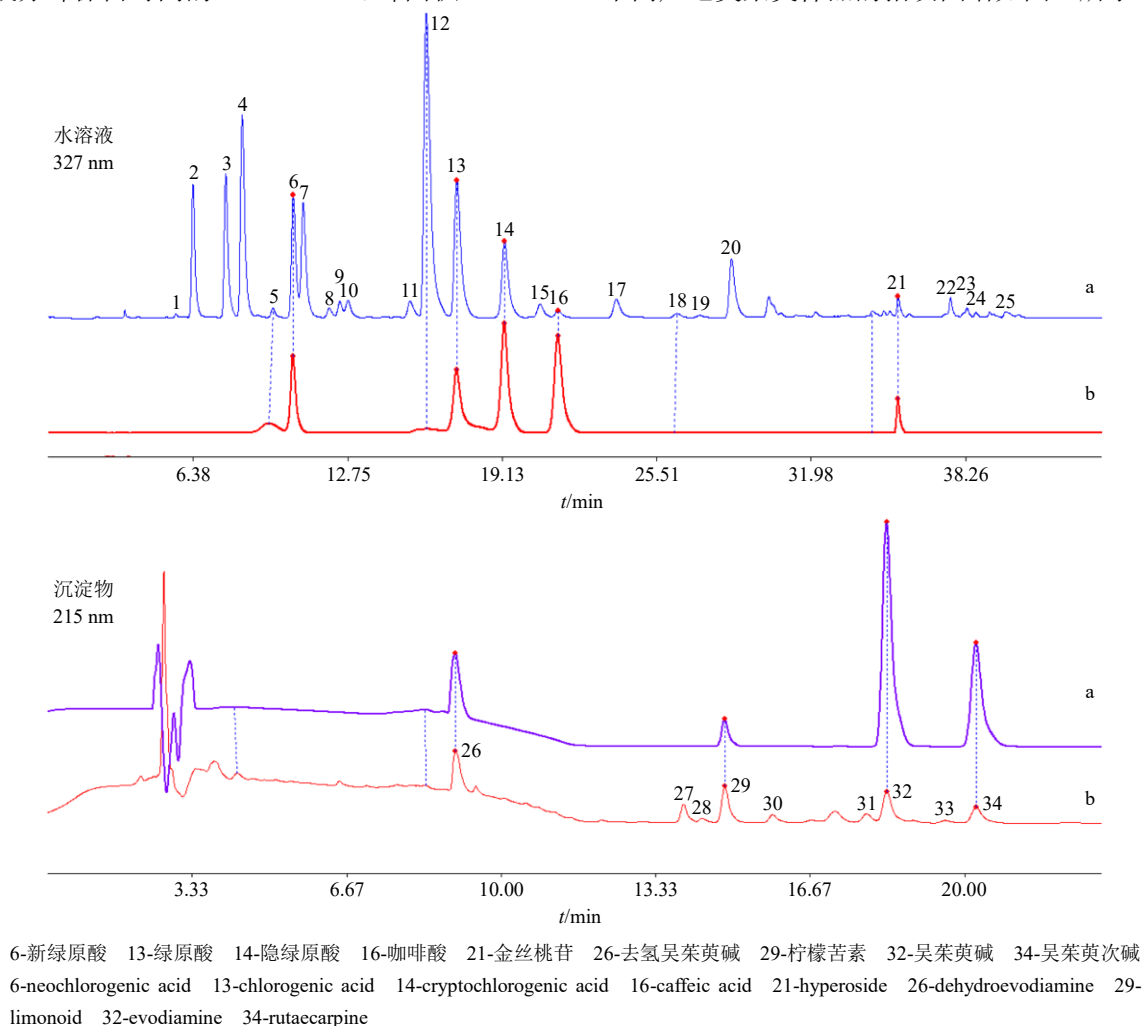


图 1 吴茱萸-甘草样品 (a) 及混合对照品 (b) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of EF-GRR sample (a) and mixed reference substances (b)

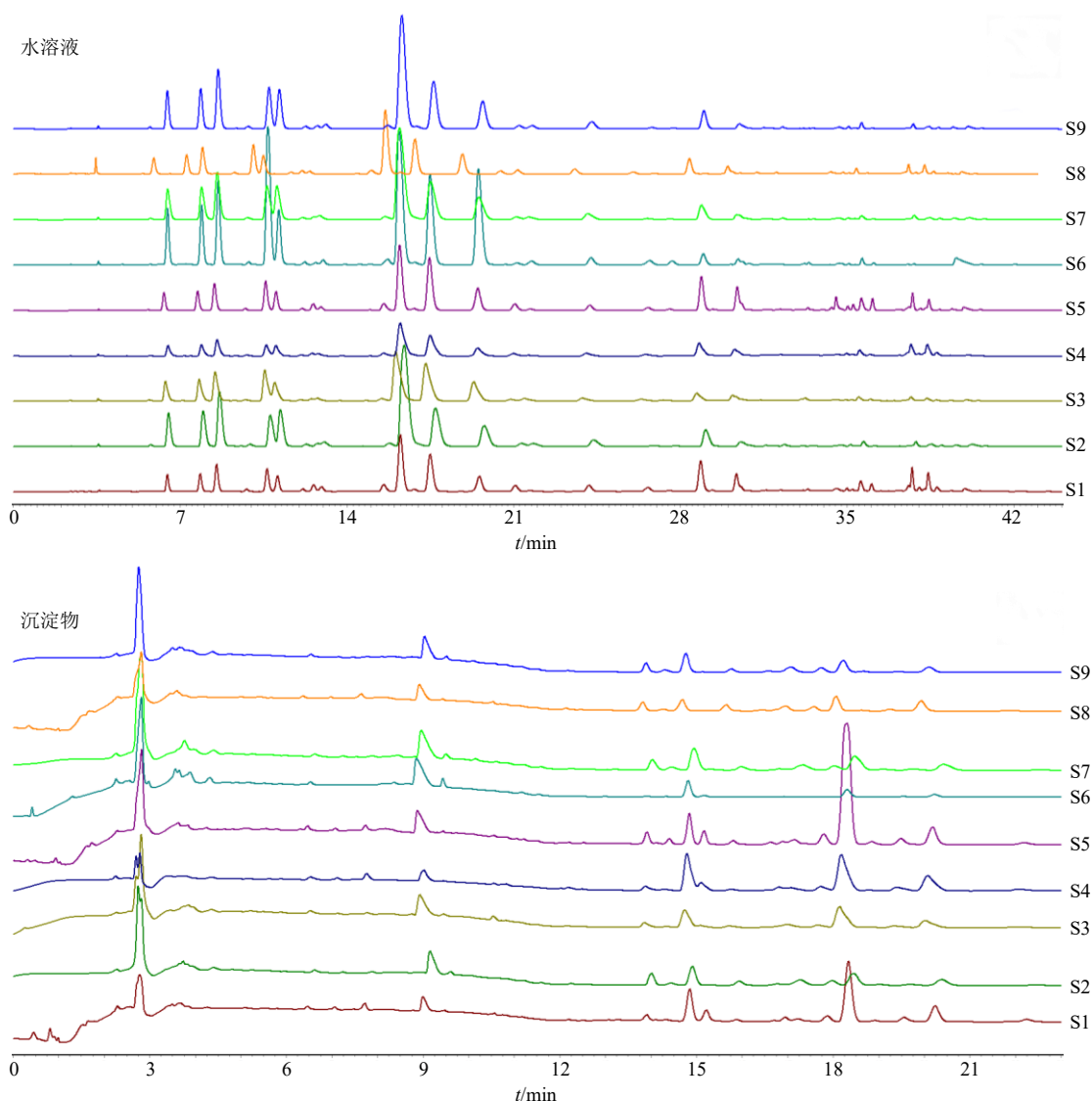


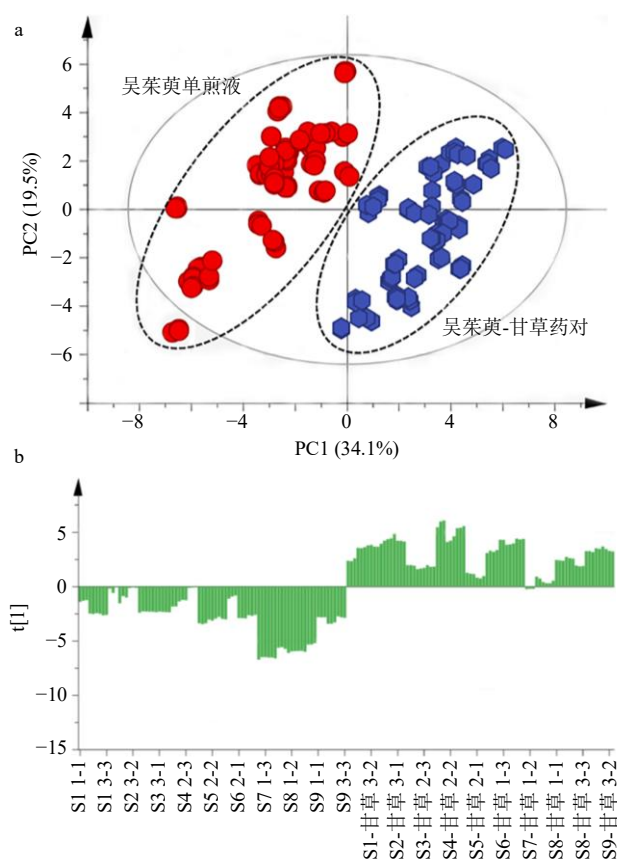
图 2 9 批不同产地吴茱萸样品 HPLC 指纹图谱

Fig. 2 HPLC fingerprints of nine batches of EF samples from different origins

以共有峰的峰面积作为分析变量，采用主成分分析 (principal component analysis, PCA) 对 9 批吴茱萸及吴茱萸-甘草药对进行分类分析，评价配伍前后吴茱萸中成分变化，结果如图 3 所示。提取 6 个主成分建立 PCA 模型，累积贡献率 R^2_{Xcum} 为 0.881， Q^2_{cum} 为 0.783，说明模型性能良好，能够反映大部分特征峰的信息，其中前 2 个主成分的解释能力分别为 34.1% 和 19.6%。由 PCA 得分图可知，吴茱萸单煎液样品相互靠近，为一类；吴茱萸-甘草药对样品相互靠近，为另一类；图 3-b 表明吴茱萸单煎液与 PC1 呈负相关，吴茱萸-甘草药对样品与 PC1 呈正相关，表明 2 组间样本的差异明显，配伍前后吴茱萸中化学成分的含量发生了明显变化。

以相对峰面积标示含量，对吴茱萸所含化合物

在单煎液与药对提取物中的含量进行 t 检验比较分析，计算 P 值。分别以含量显著增加 ($P < 0.05$)、无显著性变化 ($P > 0.05$) 以及显著降低 ($P < 0.05$) 的成分数量与所测成分的总个数的百分比进行统计，结果见表 1。火山图 (volcano plot) 是一种在分子生物学研究中用以分析两样本间显著差异的散点图，以变量变化倍数 (fold change) 的对数 [$\log_2(\text{fold change})$] 为横坐标，以 t 检验显著性检验 P 值的负对数 ($-\lg P$) 为纵坐标。为了更直观地反映每个化合物的含量变化，绘制吴茱萸中各成分含量的火山图，结果见图 4。以 $P = 0.05$ 和 $\log_2(\text{fold change}) = 0$ 为界，该图被分为 3 个模块， $P < 0.05$ 且 $\log_2(\text{fold change}) < 0$ 即红色的点，代表该成分在药对提取液中的含量显著降低； $P < 0.05$ 且 $\log_2(\text{fold change}) > 0$



S 代表吴茱萸生品的不同批次, 共 9 批, 每批平行制备 3 个样品, 每个样品重复进样 3 次

S stands for different batches of raw products of EF, 9 batches in total, 3 samples were prepared in parallel for each batch, and each sample was repeated for 3 times

图 3 吴茱萸配伍前后样品的 PCA2D 得分图 (a) 和样品在 PC1 上的载荷图 (b)

Fig. 3 PCA 2D score graph (a) and Load graph on PC1 (b) of EF before and after compatibility

表 1 吴茱萸配伍前后化学成分含量变化情况

Table 1 Changes of chemical components in EF before and after compatibility

样品	占比/%		
	变小 ($P < 0.05$)	不变 ($P > 0.05$)	变大 ($P < 0.05$)
S1	44.12	38.24	17.65
S2	44.12	35.29	20.59
S3	41.18	41.18	17.65
S4	35.29	32.35	32.35
S5	47.06	23.53	29.41
S6	55.88	26.47	17.65
S7	44.12	38.24	17.65
S8	44.12	20.59	35.29
S9	35.29	29.41	35.29

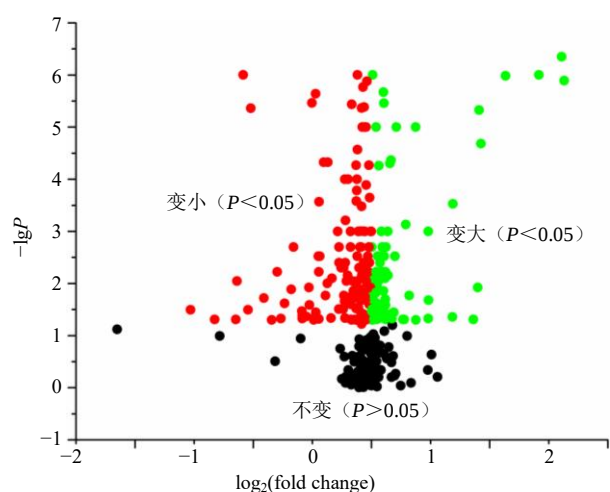


图 4 吴茱萸化学成分含量火山图

Fig. 4 Volcanic graph of chemical composition content in EF

即绿色的点, 代表该成分在药对提取液中的含量显著增加, 无显著性变化 ($P > 0.05$) 为黑色的点。结果显示了配伍前后吴茱萸的化学成分含量变化情况, 表明多数化合物在药对配伍提取物中的含量与吴茱萸单煎液相比呈显著降低的现象。

为进一步考察甘草配伍对吴茱萸中化学成分的变化情况, 以相对峰面积标示含量, 将 9 批吴茱萸单煎液及吴茱萸-甘草药对的 34 个单体成分分别计算平均含量, 并绘制散点图, 如图 5 所示。图中展示了 9 批吴茱萸中 34 个单体成分在配伍前后的变化情况, 每组数据中的不同点代表 1 个化学成分的平均含量, 彼此之间的距离越近说明样品间差距越小, 由图可知化学成分 4、6 (新绿原酸)、7、12、

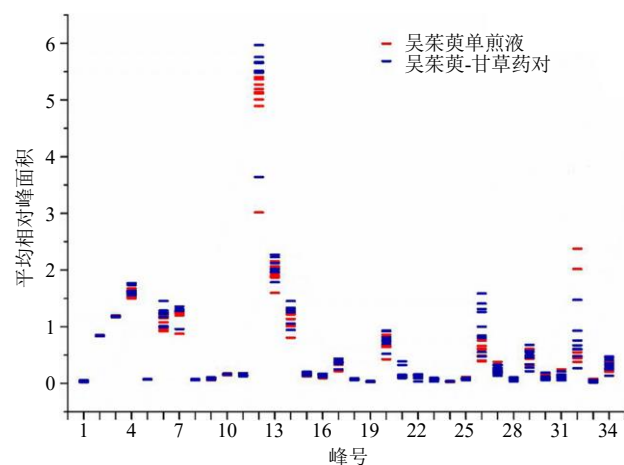


图 5 吴茱萸配伍前后化学成分平均含量分布散点图 ($n = 9$)

Fig. 5 Scatter diagram of average content distribution of chemical components in EF before and after compatibility ($n = 9$)

13 (绿原酸)、14 (隐绿原酸)、20、26 (去氢吴茱萸碱)、32 (吴茱萸碱) 和 34 (吴茱萸次碱) 在配伍前后表现出较大的变化, 说明配伍过程中甘草对其影响较大, 其中吴茱萸碱和吴茱萸次碱与甘草配伍后呈含量降低的趋势。

2.2 甘草中甘草多糖、甘草酸、甘草苷的含量测定

2.2.1 甘草中甘草多糖的测定

(1) 硫酸-蒽酮试剂的制备: 取蒽酮 0.02 g, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加入浓硫酸溶解并定容, 即得硫酸-蒽酮试剂溶液, 临用前配制。

(2) 甘草多糖的检测条件: 取 0.1 mL 供试品溶液, 置于离心管中, 冰水浴中缓缓滴入 0.25 mL 硫酸-蒽酮溶液, 摇匀, 置于沸水浴 15 min, 冰水浴冷却, 用蒸馏水作空白对照, 630 nm (全波长扫描后确定最佳检测波长) 下测得吸光度 (A), 计算甘草多糖含量。

(3) 供试品溶液的制备: 取甘草粉末 (过 3 号筛) 约 1.0 g, 精密称定, 置于 50 mL 锥形瓶中, 加无水乙醇 20 mL, 超声 30 min, 滤过, 弃去滤液, 挥干溶剂, 回收滤渣, 加水 50 mL, 超声提取 40 min, 补足减失的质量, 滤过得滤液, 取 1 mL 溶液稀释至 5 mL 量瓶, 即得甘草多糖供试品溶液。

(4) 对照品溶液的制备: 取无水葡萄糖对照品 50 mg, 精密称定, 置于 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解并定容, 摇匀, 即得 1 mg/mL 的葡萄糖参考储备液。

(5) 葡萄糖标准曲线的绘制: 分别精密量取葡萄糖参考溶液 0、2、3、4、6、8、10 mL 置于 10 mL 量瓶中, 分别加蒸馏水定容至刻度。按照“2.2.1”项下甘草多糖的检测条件操作。以葡萄糖溶液质量浓度为横坐标 (X), A 值为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得到回归方程和相关系数分别为 $Y=0.783 4 X+0.029 4$, $r=0.996 2$, 线性范围为 0.203~1.016 mg/mL。

2.2.2 甘草中甘草苷、甘草酸的测定

(1) 色谱条件: 色谱柱为 Waters X Select® HSS T3 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-0.05% 磷酸水溶液; 梯度洗脱: 0~10 min, 22% 乙腈; 10~13 min, 22%~48% 乙腈; 13~20 min, 48%~54% 乙腈; 全波长扫描确定最佳检测波长: 237 nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μ L。色谱图见图 6。

(2) 供试品溶液的制备: 取过 3 号筛的甘草粉

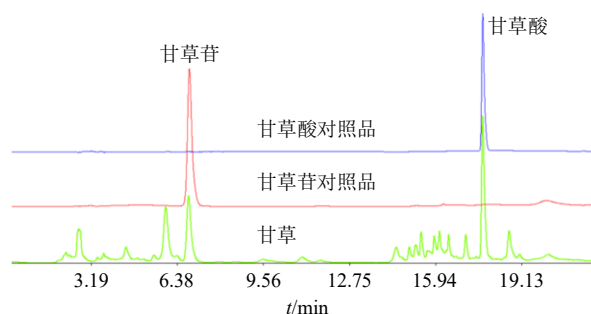


图 6 甘草及甘草苷、甘草酸对照品 HPLC 图

Fig. 6 HPLC of GRR, and glycyrrhizin and glycyrrhizic acid reference substance

末约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 为最大限度地提取甘草中的甘草苷和甘草酸, 使用 70% 乙醇作为提取溶剂, 精密加入 70% 乙醇 25 mL, 密塞, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 70% 乙醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

(3) 对照品溶液的制备: 取甘草苷和甘草酸铵对照品适量, 精密称定, 加 70% 乙醇, 制成质量浓度分别为 0.265、0.255 mg/mL 的对照品溶液 (甘草酸质量=甘草酸铵质量/1.020 7)。

2.2.3 含量测定 分别参照“2.2.1”“2.2.2”项下方法测定甘草中甘草多糖、甘草苷和甘草酸的含量, 结果分别为 (188.88 ± 9.52) 、 (6.08 ± 0.06) 、 (21.23 ± 0.37) mg/g ($n=6$)。

基于甘草中 3 种主要成分的含量测定结果, 开展吴茱萸与甘草中 3 种主要成分的配伍研究。

2.3 吴茱萸与甘草中 3 种主要成分的配伍研究

2.3.1 色谱条件 色谱条件及方法学考察参照“2.1.1”及“2.1.4”项下相关操作。

2.3.2 溶液的制备 单味中药供试品溶液的制备参照“2.1.3”项下相关操作。

(1) 吴茱萸与甘草多糖配伍溶液的制备: 称取吴茱萸药材约 2 g, 甘草多糖约 400 mg (以“2.2.3”项下甘草多糖的测定结果为参考), 料液比为 1:10, 按“2.1.3”项下制备供试品溶液。

(2) 吴茱萸与甘草苷配伍溶液的制备: 称取吴茱萸药材约 2 g, 甘草苷约 13 mg (以“2.2.3”项下甘草苷的测定结果为参考), 料液比为 1:10, 按“2.1.3”项下制备供试品溶液。

(3) 吴茱萸与甘草酸配伍溶液的制备: 称取吴茱萸药材约 2 g, 甘草酸约 45 mg (以“2.2.3”项下甘草酸的测定结果为参考), 料液比为 1:10, 按“2.1.3”项下制备供试品溶液。

2.3.3 吴茱萸-甘草多糖配伍研究 本实验从 9 批吴茱萸中随机抽取 2 批 (S1、S3) 作为样本分别与甘草多糖进行配伍, 每批样品平行 9 份。以共有峰的峰面积作为分析变量, 采用 PCA 评价甘草多糖配伍对吴茱萸中化学成分的影响, 结果如图 7 所示。提取 7 个主成分建立 PCA 模型, R^2_{Xcum} 为 0.933, Q^2_{cum} 为 0.689, 吴茱萸单煎液与吴茱萸-甘草多糖溶液可得到明显区分, 表明甘草多糖配伍吴茱萸对吴茱萸中化学成分具有显著作用。

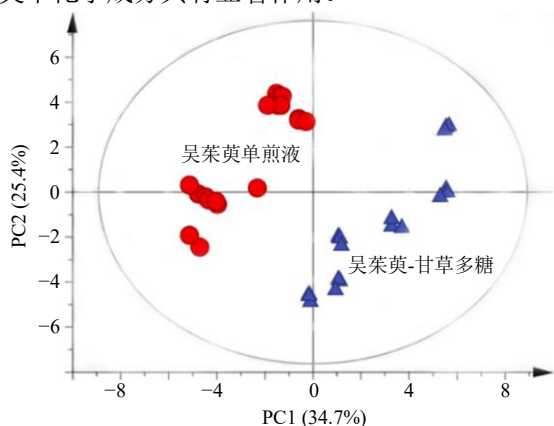


图 7 吴茱萸及吴茱萸-甘草多糖 PCA 2D 得分图

Fig. 7 PCA 2D score map of EF and EF-glycyrrhiza polysaccharide

正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA) 是在 PLS-DA 基础上发展的一种算法, 用于建立表达量与样品类别间的关系模型。与 PLS-DA 相比, OPLS-DA 利用正交信号矫正过滤原理, 滤过掉不相关信息, 从正交预测变量中收集出对预测有用的变量, 更好地区分组间差异并寻找差异性化合物, 提高模型的预测结果^[19-21]。

根据 PCA 聚类结果, 按照配伍与否将吴茱萸样本分为 2 类, 建立 OPLS-DA 模型。在 OPLS-DA 模型中, 1 个预测主成分和 2 个正交主成分对模型解释能力贡献率为 69.2%, R^2_{Ycum} 为 0.987, Q^2_{cum} 为 0.979, 说明所建立模型性能良好。图 8-a 为第 1 主成分 (t[1])、第 1 正交主成分 (to[1]) 和第 2 正交主成分 (to[2]) 的三维得分图, 分别解释变量的 31%、27.2% 和 10.9%。36 个吴茱萸样本可分为 2 类, 与 PCA 分析结果一致, 模型可靠。为寻找分类过程中的潜在化学标记物, 对 34 个变量进行分析并生成 VIP 图和 Loadings 图。图 8-b 选取 VIP 值大于 1 的变量作为潜在化学标记物, 可得到变量 1~3、5、4、26 (去氢吴茱萸碱)、10、8、28、24、18、32 (吴

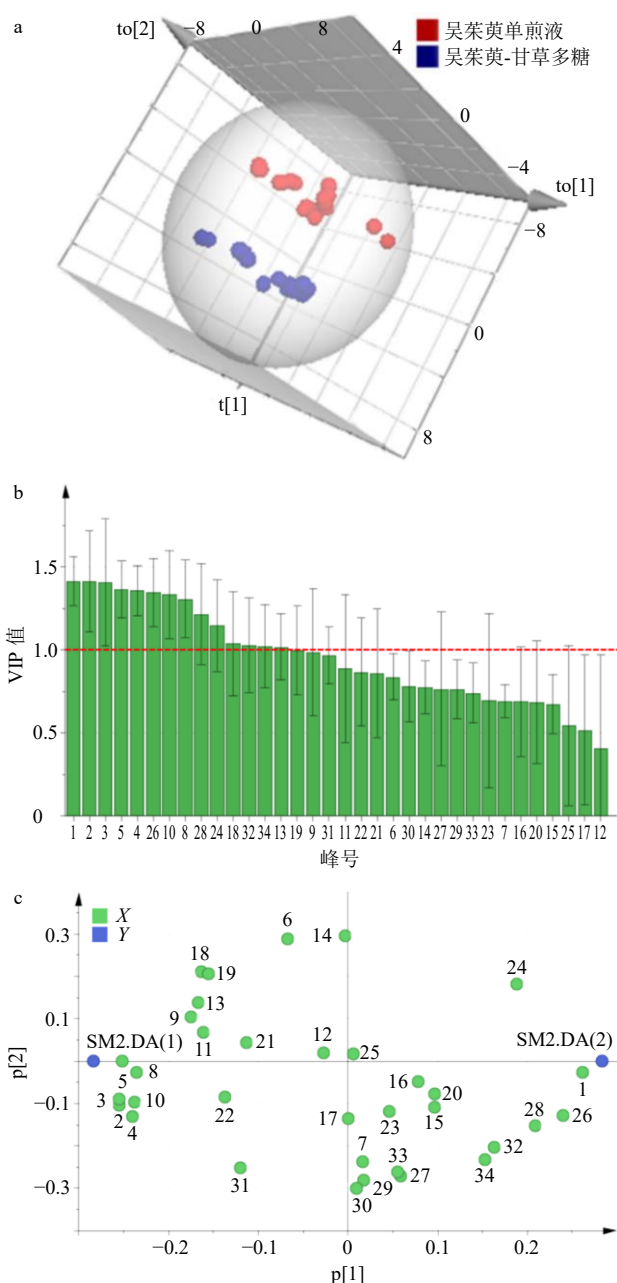


图 8 吴茱萸单煎液及吴茱萸-甘草多糖配伍提取液的 OPLS-DA 3D 得分图 (a)、VIP 图 (b) 和 Loadings 图 (c)

Fig. 8 OPLS-DA 3D score chart (a), VIP diagram (b), and Loadings diagram (c) of single decoction of EF and mixed extract of EF-glycyrrhiza polysaccharide

茱萸碱)、34 (吴茱萸次碱)、13, 说明这些变量在吴茱萸与甘草的配伍过程中变化明显, 对吴茱萸的分类起主要作用。图 8-c 中每个 X 代表 1 个变量, 虚拟变量 Y 代表样品组别, 图中 SM2.DA(1) 为吴茱萸单煎液样品组, SM2.DA(2) 为吴茱萸-甘草多糖样品组, 靠近虚拟变量 Y 并且距离载荷图原点的变量, 对于分类过程中的累积贡献率越大, 在分类中起的作用越大。变量 5、8、3、2、10、4 靠近

SM2.DA(1)且远离原点,说明这些变量在吴茱萸单煎液样品组中具有重要影响;变量 1、26(去氢吴茱萸碱)、28、24、32(吴茱萸碱)、34(吴茱萸次碱)靠近 SM2.DA(2)且远离远点,说明这些变量在吴茱萸-甘草多糖样品组中具有重要影响。综上,在配伍过程中甘草多糖主要影响吴茱萸中变量 1、26(去氢吴茱萸碱)、28、24、32(吴茱萸碱)、34(吴茱萸次碱)。

2.3.4 吴茱萸-甘草酸配伍研究 以共有峰的峰面积作为分析变量,采用 PCA 对 2 批吴茱萸单煎液及吴茱萸-甘草酸提取液中化学成分进行分析,评价甘草酸配伍对吴茱萸中化学成分的影响,结果如图 9 所示。提取 5 个主成分建立 PCA 模型, $R^2_{Xcum}=0.887$, $Q^2_{cum}=0.710$, 吴茱萸单煎液与吴茱萸-甘草酸配伍提取液可得到明显地区分,表明甘草酸配伍吴茱萸对吴茱萸中化学成分具有显著影响。

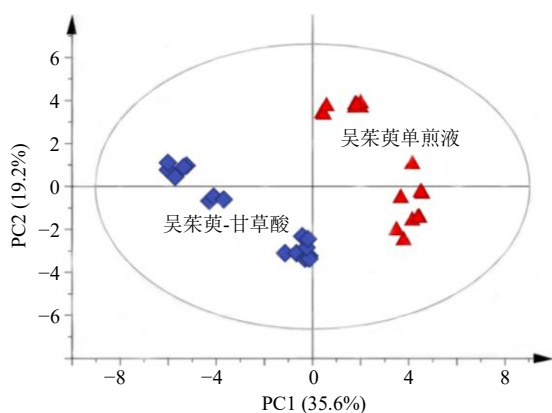


图 9 吴茱萸及吴茱萸-甘草酸 PCA 2D 得分图

Fig. 9 PCA 2D score chart of EF and EF-glycyrrhizic acid

根据 PCA 聚类结果,按照配伍与否将吴茱萸样本分为 2 类,建立 OPLS-DA 模型。在 OPLS-DA 模型中,1 个预测主成分和 2 个正交主成分对模型解释能力贡献率为 64.2%, R^2_{Ycum} 为 0.981, Q^2_{cum} 为 0.967,说明所建立模型性能良好。图 10-a 为第 1 主成分([t1])、第 1 正交主成分([to1])和第 2 正交主成分([to2])的三维得分图,分别解释变量的 29.6%、24.2%和 10.4%。36 个吴茱萸样本在空间模型中可分为 2 类。为寻找分类过程中的潜在化学标记物,对 34 个变量进行分析并生成 VIP 图和 Loadings 图。图 10-b 为 VIP 图,选取 VIP 值大于 1 的变量作为分类过程中的重要化学标记物,可得到变量 3、2、4、20、12、26(去氢吴茱萸碱)、17、25、16(咖啡酸)、11、5、28、1,说明这些变量在吴茱萸甘草酸的配伍过程中变化明显,对分类起主

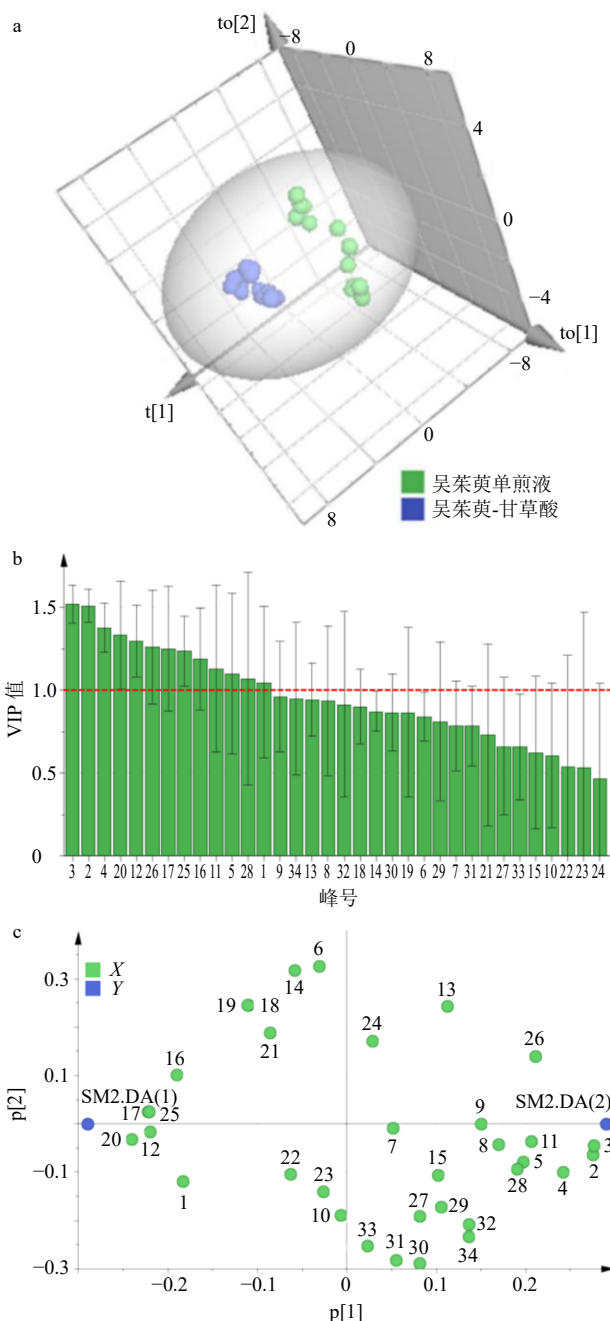


图 10 吴茱萸单煎液及吴茱萸-甘草酸配伍提取液的 OPLS-DA 3D 得分图 (a)、VIP 图 (b) 和 Loadings 图 (c)

Fig. 10 OPLS-DA 3D score chart (a), VIP diagram (b) and Loadings diagram (c) of single decoction of EF and mixed extract of EF-glycyrrhizic acid

要作用。图 10-c 为 Loadings 图,图中 SM2.DA(1)为吴茱萸单煎液样品组,SM2.DA(2)为吴茱萸-甘草酸样品组,变量 20、12、17、25 靠近 SM2.DA(1)且远离原点,说明这些变量在吴茱萸单煎液样品组中具有重要影响;变量 3、2、4、26(去氢吴茱萸碱)、11 靠近 SM2.DA(2)且远离原点,说明这些变量在吴茱萸-甘草酸样品组中具有重要影响。

2.3.5 吴茱萸-甘草苷配伍研究 以共有峰的峰面积作为分析变量,采用 PCA 对 2 批吴茱萸及吴茱萸-甘草苷样品进行分析,评价配伍前后吴茱萸的成分变化,结果如图 11 所示。虽然吴茱萸单煎液样品组和吴茱萸-甘草苷样品组存在着差异,但是吴茱萸样品之间的差异明显大于配伍前后的差异。结果表明,甘草苷在配伍过程中对吴茱萸的影响较小。

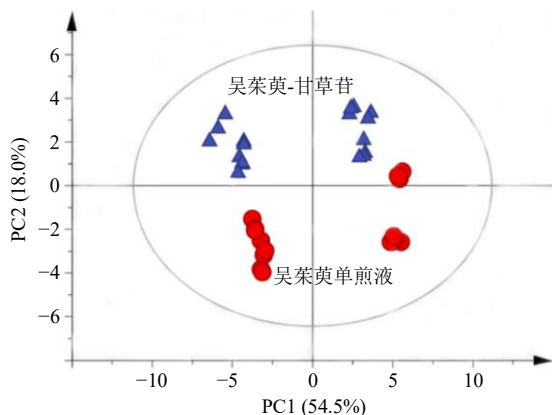


图 11 吴茱萸及吴茱萸-甘草苷 PCA 2D 得分图

Fig. 11 PCA 2D score chart of EF and EF-glycyrrhizin

综上所述,甘草中 3 种主要成分配伍吴茱萸,均可对吴茱萸中化学成分产生不同程度的影响,其中甘草多糖、甘草酸对吴茱萸中化学成分的作用较显著。

3 讨论

本实验采用 HPLC 指纹图谱结合化学计量学分析,研究吴茱萸甘草配伍减毒的物质基础,实现了配伍前后的差异性分析,获取了影响差异的重要化学成分。结果表明,吴茱萸中活性成分吴茱萸碱和吴茱萸次碱与甘草配伍后呈含量降低的趋势。进一步采用层次递进法,基于对甘草中甘草多糖、甘草酸和甘草苷 3 种主要有效成分的定量结果,研究甘草组分配伍对吴茱萸中化学成分的影响,结果显示,甘草中 3 种主要成分对吴茱萸的化学成分均具有不同程度的影响,其中发挥主要作用的主要甘草组分为甘草多糖、甘草酸;甘草苷对吴茱萸中化学成分的作用较小。

甘草多糖^[22-23]主要由葡萄糖、阿拉伯糖和半乳糖组成,至少有 3 种主要的核心结构,分别是以葡萄糖为主链,完全由 D-葡萄糖单位通过 α -(1,4)键连接的单一葡萄糖结构;以 β -1,3-D-半乳糖组成 1 个主链,支链由 β -1,6-D-半乳糖残基组成的结构;由 β -1,3-D-半乳糖组成 1 个主链,在主链所有半乳糖单元的 6 位带有 1 个由 α -1,5-连接的 L-阿拉伯糖残基

侧链的结构。甘草酸^[17]属于齐五环三萜的酸性皂苷,是由苷元上 C₃-OH 与吡喃糖醛酸的端基 C 原子缩合而成,结构上具有两亲性。甘草苷是甘草中含量较高的黄酮类成分之一。推测可能是吴茱萸中的生物碱与甘草化学成分中的羟基等极性基团结合,缓和了吴茱萸的毒性,进而发挥“甘”缓之性以达到减毒的作用。本实验从配伍方面探讨了甘草对吴茱萸的作用规律,初步探讨了甘味中药缓急、佐制的作用,但具体的作用机制还需进一步加以验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 178.
- [2] 龚慕辛, 王智民, 张启伟, 等. 吴茱萸有效成分的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(2): 183-187.
- [3] 战光绪, 吴大正, 胡之璧. 吴茱萸有效成分的药理研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(2): 62-64.
- [4] Zhang T, Qu S N, Shi Q, *et al.* Evodiamine induces apoptosis and enhances TRAIL-induced apoptosis in human bladder cancer cells through mTOR/S6K1-mediated downregulation of Mcl-1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2): 3154-3171.
- [5] 龙明立, 张毅民, 贺丽平, 等. 吴茱萸次碱的药理学研究进展 [J]. 解放军药学报, 2008, 24(6): 528-531.
- [6] 黄伟, 赵燕, 孙蓉. 吴茱萸不同组分对小鼠急性毒性试验比较研究 [J]. 中国药物警戒, 2010, 7(3): 129-134.
- [7] 罗丹, 颜行. 吴茱萸次碱: 一种多靶点天然化合物的药理学作用研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2018, 30(12): 2207-2213.
- [8] 余奇, 郭澄, 程泽能. 吴茱萸次碱的研究进展 [J]. 药实践杂志, 2007, 25(6): 353-357.
- [9] 蔡雪映, 孟楠, 杨冰. 服用吴茱萸过量致中毒 1 例分析 [J]. 北京中医, 2006, 25(3): 171-172.
- [10] Wen B, Roongta V, Liu L L, *et al.* Metabolic activation of the indoloquinazoline alkaloids evodiamine and rutaecarpine by human liver microsomes: Dehydrogenation and inactivation of cytochrome P450 3A4 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42(6): 1044-1054.
- [11] 张智华, 韩晗, 吴晓丰, 等. 吴茱萸常用药对及其配伍增效减毒 [J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20(3): 51-54.
- [12] 姜雪, 孙森凤, 王悦, 等. 甘草药理作用研究进展 [J]. 化工时刊, 2017, 31(7): 25-28.
- [13] 李媛媛, 司国民, 曲夷. 经方中吴茱萸配伍应用规律探析 [J]. 吉林中医药, 2019, 39(9): 1229-1232.
- [14] 孙子洲, 曹兰秀. 吴茱萸常用药对配伍探析 [J]. 环球

- 中医药, 2020, 13(1): 64-66.
- [15] 赵娟, 谢世静, 赵兴华, 等. 中药指纹图谱质控方法研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2020, 41(1): 82-86.
- [16] 张雪, 杨雨婷, 董艳红, 等. 中药配伍减毒增效的研究概况 [J]. 中国民族民间医药, 2015, 24(21): 19-20.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 吴胜鸿, 黄圆圆, 周欣, 等. 痔疮消炎颗粒 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(1): 90-95.
- [20] 周欣, 张琳, 毛婵, 等. 基于化学计量学方法结合正交偏最小二乘判别分析的陈皮饮片 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2019, 50(9): 2194-2200.
- [21] Máquina A D V, Siteo B V, de Oliveira Cruz W, *et al.* Analysis of ¹H NMR spectra of diesel and *Crambe* biodiesel mixtures using chemometrics tools to evaluate the authenticity of a Brazilian standard biodiesel blend [J]. *Talanta*, 2020, 209: 120590.
- [22] 马鸿雁, 邓雨娇, 马倩, 等. 甘草的研究概况 [J]. 中药与临床, 2018, 9(1): 59-62.
- [23] 孙琛. 甘草的化学成分研究进展 [J]. 科技资讯, 2020, 18(2): 64-65.

[责任编辑 郑礼胜]