

基于指纹图谱及化学计量学研究不同发酵程度建曲中成分变化

孙梦梅^{1,2}, 王瑞生^{1,2*}, 张振凌^{1,2,3,4*}, 陈祎甜⁵, 李德华^{1,2}

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450008
2. 河南省中药特色炮制技术工程研究中心, 河南 郑州 450008
3. 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450008
4. 河南省中药饮片炮制中医药重点实验室, 河南 郑州 450008
5. 焦作工贸职业学院, 河南 焦作 454550

摘要: **目的** 采用指纹图谱技术结合化学计量学分析方法, 探究不同发酵程度建曲中化学成分的差异性, 筛选差异性标志物, 为规范建曲炮制工艺、建立饮片质量标准提供参考。**方法** 采用 Waters SunFire C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1%乙酸水溶液为流动相梯度洗脱, 体积流量 1.0 mL/min, 检测波长 280 nm, 柱温 30 ℃, 进样体积 10 μL, 建立不同发酵时间建曲 HPLC 指纹图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件 (2004A 版) 进行相似度评价, 标定共有峰并进行指认及归属; 以共有峰峰面积为指标, 利用层次聚类分析法 (hierarchical cluster analysis, HCA) 对不同发酵时间建曲进行区分, 再借助正交偏最小二乘-判别分析法 (orthogonal partial least square-discriminant analysis, OPLS-DA) 筛选出不同发酵程度建曲间差异性标志物; 建立多指标成分含量测定方法, 对多个差异性标志物进行定量分析。**结果** 不同发酵时间建曲指纹图谱相似度大于 0.900, 共标定 46 个共有峰, 指认并归属 21 个成分; HCA 结果显示 9 个不同发酵时间建曲可聚类为 4 个发酵阶段; OPLS-DA 结果表明不同发酵阶段建曲间差异性标志物略有不同, 芹菜素、新橙皮苷、峰 28、柚皮苷、橙皮苷和木犀草素为不同发酵程度建曲的主要差异性标志物; 对 5 个已知差异性标志物进行定量研究, 发酵过程中, 柚皮苷、新橙皮苷质量分数呈下降趋势, 分别从 0.048 5%、0.046 4% 下降至 0.014 8%、0.001 8%, 芹菜素、木犀草素质量分数呈上升趋势, 由 0.007 8%、0.029 3% 上升至 0.019 8%、0.085 2%, 橙皮苷质量分数在 0.307 9%~0.341 6% 波动; 以 5 个差异性标志物含量为指标, 进行热图聚类分析, 结果与 HCA 结果一致。**结论** 建立的方法可有效区分不同发酵时间建曲, 为建曲的质量控制及评价提供参考。

关键词: 建曲; 发酵; 指纹图谱; 化学计量学; 质量标志物; 层次聚类分析; 正交偏最小二乘法; 芹菜素; 新橙皮苷; 柚皮苷; 橙皮苷; 木犀草素

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)14-4340-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.14.014

Study on changes of components in Jianqu with different degrees of fermentation based on fingerprint and chemometrics

SUN Meng-mei^{1,2}, WANG Rui-sheng^{1,2}, ZHANG Zhen-ling^{1,2,3,4}, CHEN Yi-tian⁵, LI De-hua^{1,2}

1. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China
2. Henan Research Center for Special Processing Technology of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China
3. Co-construction Collaborative Innovation Center for Chinese Medicine and Respiratory Diseases by Henan & Education Ministry, Zhengzhou 450008, China
4. Henan Provincial Key Laboratory of TCM Decoction Processing, Zhengzhou 450008, China
5. Jiaozuo industry and Trade Vocational College, Jiaozuo 454550, China

Abstract: Objective Fingerprint technology combined with chemometrics analysis method was used to study the changes of chemical components and screen the differential markers in Jianqu with different degrees of fermentation, so as to lay a foundation

收稿日期: 2022-01-24

基金项目: 中药建曲发酵工艺优化及质量标准提升研究 (22B360004); 河南中医药大学博士基金项目 (RSBSJJ2019-09)

作者简介: 孙梦梅, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制技术研究。E-mail: mengmei9856@163.com

*通信作者: 张振凌, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为中药炮制机制及饮片标准化研究。Tel: (0371)65680970 E-mail: zhangzhenling@163.com
王瑞生, 讲师, 主要研究方向为中药炮制机制及饮片标准化研究。Tel: (0371)65676656 E-mail: wrsh900226@163.com

for standardizing processing technology and establishing the quality standard of Jianqu. **Methods** The fingerprint of jianqu fermented in different times was established by a Waters SunFire C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) by gradient elution, and the mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% acetic acid solution, the flow rate was 1.0 mL/min, the wavelength was 280 nm and the column temperature was 30 °C. Similarity evaluation was carried out using the traditional Chinese medicine chromatographic fingerprint similarity evaluation system (2004A version), the common peaks identification and attribution were carried out. The common peaks area was used as indicators, and hierarchical cluster analysis (HCA) was used to distinguish Jianqu fermented in different times, and then orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) was used to screen the differential markers in Jianqu fermentation. The content of differential markers was determined by HPLC. **Results** The similarity of fingerprint of Jianqu fermented in different times was greater than 0.900, 46 common peaks were calibrated, and 21 components were identified and attributed; HCA clustered Jianqu fermented in nine different times into Jianqu fermented in four different stages. The results of OPLS-DA showed that there were slight differences in the differential markers between Jianqu fermented in different stages; Apigenin, neohesperidin, peak 28, naringin, hesperidin and luteolin were the main differential markers in Jianqu with different degrees of fermentation; The contents of 5 differential markers were determined, and the contents of naringin and neohesperidin showed a decreasing trend from 0.048 5% and 0.046 4% to 0.014 8% and 0.001 8%, respectively; the contents of apigenin and luteolin increased from 0.007 8% and 0.029 3% to 0.019 8% and 0.085 2%, respectively; The content of hesperidin fluctuated between 0.307 9% and 0.341 6%. The content of five differential markers was used as indicators to conduct heat map cluster analysis which can also effectively distinguish Jianqu fermented in different times. **Conclusion** The method established in this study can effectively distinguish Jianqu fermented in different times and provide reference for quality control and evaluation of Jianqu.

Key words: Jianqu; fermentation; fingerprint; chemometrics analysis; quality marker; hierarchical cluster analysis; orthogonal partial least squares; apigenin; neohesperidin; naringin; hesperidin; luteolin

当前说的建曲多指四川产建曲，收录于《卫生部药品标准中药成方制剂》(第 17 册)(下文简称为《部颁标准》)，由辣蓼、苍耳草、青蒿及苦杏仁等 23 味中药混合发酵而成，具有解表和中的功效^[1]。建曲的原料药味丰富，成分复杂，自然发酵过程不可控、质量标准不完善已成为影响建曲质量的关键因素^[2]。

目前，建曲研究主要集中于质量控制及标准完善方面，有关建曲发酵机制、药效物质基础及质量评价等方面的研究匮乏。建曲作为一味发酵类中药，不同发酵程度建曲的物质基础不同，相应的药效品质也存有差异，因此，有效区分不同发酵程度建曲是建曲质量评价及控制的关键因素。对于发酵过程不易控制的传统发酵类中药，有必要结合现代技术，建立全面、有效的区分及评价方法，明确不同发酵程度成品间的差异，为发酵类中药的质量控制及临床疗效提供保证。

基于此，本实验拟建立不同发酵时间建曲 HPLC 指纹图谱，结合化学计量学对不同发酵时间建曲进行区分并筛选不同发酵阶段建曲的差异性标志物，并对多个差异性标志物进行定量分析，以便相对全面、客观地对建曲发酵过程中化学成分的变化情况进行初步探究^[3]，为后续建曲发酵机制、质量控制及临床应用等研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

BSA224S-CW 型万分之一电子天平、BT25S 型十万分之一电子天平，北京赛多利斯天平有限公司；KQ-500DV 型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；DHG-9077A 型电热恒温干燥箱，上海精宏实验设备有限公司；Waters2489UV/Visible 型半自动高效液相色谱仪，美国 Waters 公司；UPT-II-10T 型超纯水器，成都现超纯科技有限公司；HWS-250 型恒温恒湿培养箱，天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司；DK-98-11 型电热恒温水浴锅，上海比朗仪器有限公司。

1.2 试剂

甲醇、无水乙醇，天津市富宇精细化工有限公司，批号依次为 20190522、20190115，分析纯；甲醇、乙腈，美国 Tedia 公司，色谱纯；磷酸，天津市科密欧化学试剂有限公司，色谱纯；冰醋酸、甲酸，天津市大茂化学试剂厂，批号依次为 20181803、20190517，色谱纯。对照品隐绿原酸、木犀草素、槲皮苷、咖啡酸、芹菜素、香草酸、阿魏酸、滨蒿内酯、橙皮苷、广藿香酮、厚朴酚、木香烃内酯、和厚朴酚、欧前胡素、柚皮苷、东莨菪内酯、新橙皮苷、α-香附酮，成都普思生物科技股份有限公司，批号依次为 PS14011403、PS10320025、PS010791、

PS010522、PS000755、PS010559、PS000097、PS020012、PS011588、PS000401、PS010353、PS012275、50-99-7、6363-53-7、PS011061、PS010561、PS012062、PS011029、PS010413、PS010757, 质量分数均 $\geq 98\%$; 对照品甘草酸, 四川省维克奇生物科技有限公司, 批号 150823, 质量分数 $\geq 98.0\%$; 对照品山柰素, 成都曼斯特生物科技有限公司, 批号 MVST-16041502, 质量分数 $\geq 98.0\%$; 对照品桂皮醛, 中国食品药品检定研究院, 批号 110710-201217, 质量分数 $\geq 99.5\%$ 。

1.3 药材

辣蓼(批号 20190221)、苍耳草(批号 20181225), 安国市光明饮片有限公司; 青蒿、苦杏仁、赤小豆、麦芽、山楂(炒)、陈皮、广藿香、苍术、厚朴、川木香、白芷、槟榔、枳壳(麸炒)、紫苏叶、薄荷、谷芽、肉桂、香附、甘草原料均购自河南郑州张仲景大药房, 由河南中医药大学张振凌教授鉴定, 辣蓼为蓼科蓼属植物辣蓼 *Polygonum hydropiper* L. 的干燥全草, 苍耳草为菊科苍耳属植物苍耳 *Xanthium sibiricum* Patr. ex Widder 的干燥地上部分, 青蒿为菊科蒿属植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分, 苦杏仁为蔷薇科杏属植物杏 *Prunus armeniaca* L. 的干燥成熟种子, 赤小豆为豆科豇豆属植物赤小豆 *Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi et Ohashi 的干燥成熟种子, 麦芽为禾本科大麦属植物大麦 *Hordeum vulgare* L. 的成熟果实经发芽干燥的炮制加工品, 山楂为蔷薇科山楂属植物山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实, 陈皮为芸香科柑橘属植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 的干燥成熟果皮, 广藿香为唇形科藿香属植物广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 的干燥地上部分, 苍术为菊科苍术属植物北苍术 *Atractylodes chinensis* (DC.) Koidz. 的干燥根茎, 厚朴为木兰科木兰属植物厚朴 *Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. 的干燥干皮及枝皮, 川木香为菊科川木香属植物川木香 *Vladimiria souliei* (Franch.) Ling 的干燥根, 白芷为伞形科当归属植物白芷 *Angelica dahurica* (Fisch. ex Hoffm.) Benth. et Hook. f. 的干燥根, 槟榔为棕榈科棕榈属植物槟榔 *Areca catechu* L. 的干燥成熟种子, 枳壳为芸香科柑橘属植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实, 紫苏叶为唇形科紫苏属植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥叶, 薄荷为唇形科薄荷属植物薄荷 *Mentha haplocalyx*

Briq. 的干燥地上部分, 谷芽为禾本科狗尾草属植物粟 *Setaria italica* (L.) Beauv. 的成熟果实经发芽干燥的炮制加工品, 肉桂为樟科樟属植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl 的干燥树皮, 香附为莎草科莎草属植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎, 甘草为豆科甘草属植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎; 麦麸、面粉为实验室留存。

2 方法与结果

2.1 样品制备

除麦麸、面粉外, 将辣蓼、苍耳草、青蒿等 21 味中药饮片分别粉碎(过五号筛), 按处方量称取各中药细粉, 与麦麸混匀, 再将面粉加适量蒸馏水加热制成稀糊, 趁热与上述药粉揉和均匀, 以手捏成团, 掷之即散为宜, 捏制成立方块^[1], 置于 30℃、75%湿度的恒温恒湿发酵箱内发酵^[4], 从发酵 0 h 起, 每 12 h 取样 1 次, 除取样外, 发酵箱门保持密闭。样品于 60℃烘干即得。结果见表 1 和图 1。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Waters SunFire C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%乙酸水溶液, 梯度洗脱: 0~25 min, 5%~12%乙腈; 25~55 min, 12%~25%乙腈; 55~100 min, 25%~60%乙腈; 100~110 min, 60%~80%乙腈; 110~120 min, 80%~5%乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 280 nm; 柱温 30℃; 进样量 10 μL。

2.3 供试品溶液制备

精密称取各建曲样品粉末 2.0 g, 置于 150 mL

表 1 不同发酵时间建曲外观性状

Table 1 Appearance characteristics of Jianqu fermented in different times

编号	发酵时间/h	外观性状
J1	0	块状, 棕褐色, 软硬适中
J2	12	块状, 棕褐色, 无白霉
J3	24	块状, 棕褐色, 无白霉
J4	36	块状, 棕褐色, 有极少量白霉
J5	48	块状, 棕褐色, 有少量白霉, 酒香气微
J6	60	块状, 遍布白霉, 覆盖整个表面, 有酒香气
J7	72	块状, 遍布白霉, 泛黄, 有少量黑色孢子, 微有霉味
J8	84	块状, 遍布白霉, 黑色孢子增多, 有霉味
J9	96	块状, 遍布白霉, 泛黑, 黑色孢子覆盖整个表面, 有霉味

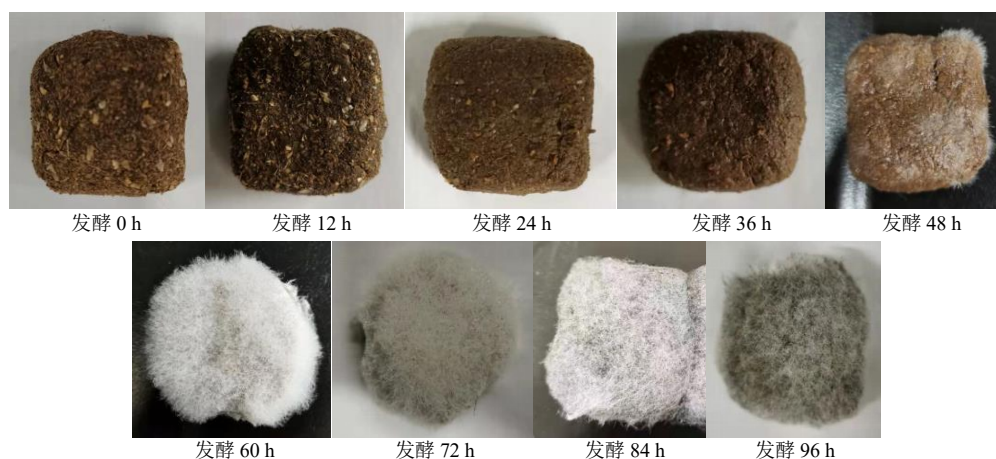


图 1 不同发酵时间建曲外观性状差异

Fig. 1 Difference of appearance characteristics of Jianqu fermented in different times

锥形瓶中，加入甲醇 25 mL，称定质量，超声处理 30 min，放冷，再次称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀滤过，滤液于 70 °C 水浴挥干，残渣加甲醇溶解定容至 10 mL 量瓶中，混匀，过 0.22 μm 滤膜，即得供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 精密度试验 精密吸取同一建曲供试品溶液 10 μL，按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次，记录色谱图。以 38 号峰为参照峰，计算各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.06%~0.22%，相对峰面积的 RSD 为 0.54%~4.32%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取同一建曲样品，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，按“2.2”项下色谱条件进样，记录色谱图。以 38 号峰为参照峰，计算各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.08%~

0.37%，相对峰面积的 RSD 为 0.69%~3.47%，表明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 精密吸取同一建曲供试品溶液 10 μL，按“2.2”项下色谱条件于 0、2、4、6、8、10、12 h 进样，记录色谱图。以 38 号峰为参照峰，计算各共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.04%~0.51%，相对峰面积的 RSD 为 0.98%~3.81%，表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.5 不同发酵时间建曲指纹图谱建立及相似度评价

按“2.3”项下方法制备不同发酵时间建曲样品的供试品溶液，再按“2.2”项下色谱条件进样，记录色谱图（图 2）。将各色谱图分别导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”，以 S1（J1-1 样品色谱图）为参照图谱，时间窗为 0.10 min，平均数法生成对照指纹图谱（R，图 3），

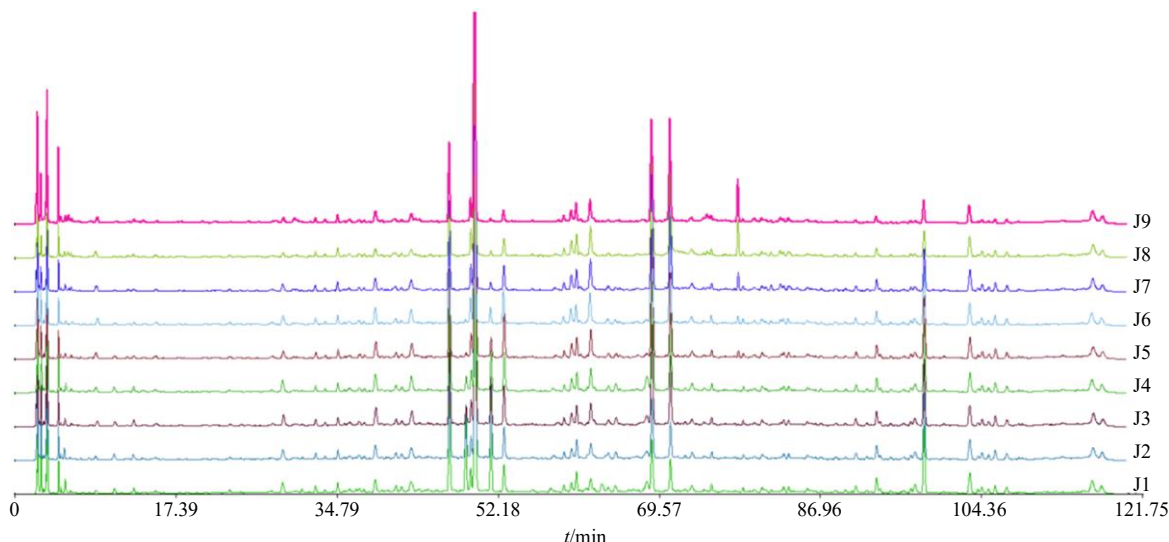
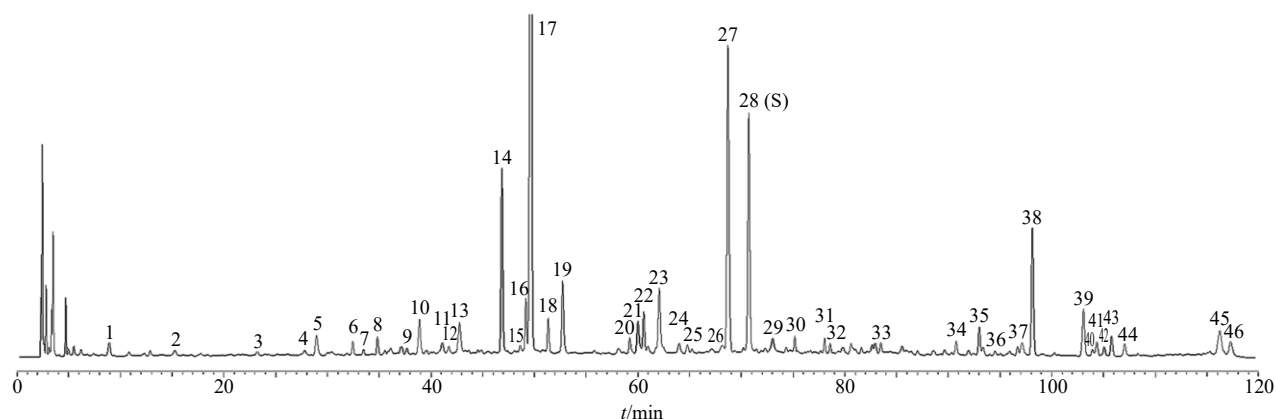


图 2 不同发酵时间建曲 HPLC 指纹图谱叠加图

Fig. 2 HPLC chromatogram fingerprint of Jianqu fermented in different times



4-香草酸 5-咖啡酸 9-隐绿原酸 11-东莨菪内酯 13-阿魏酸 15-柚皮苷 16-槲皮苷 17-橙皮苷 18-新橙皮苷 19-滨蒿内酯 23-木犀草素 26-桂皮醛 27-芹菜素 33-山柰素 34-欧前胡素 35-和厚朴酚 36-木香烃内酯 37-广藿香酮 38-厚朴酚 40- α -香附酮 43-甘草酸
4-vanillic acid 5-caffeic acid 9-cryptochlorogenic acid 11-scopoletin 13-ferulic acid 15-naringin 16-quercetin 17-hesperidin 18-neohesperidin 19-scoparone 23-luteolin 26-cinnamaldehyde 27-apigenin 33-kaempferol 34-imperatorin 35-honokiol 36-costunolide 37-patchoulone 38-magnolol 40- α -cyperone 43-glycyrrhizic acid

图 3 对照指纹图谱

Fig. 3 HPLC chromatograms

进行多点校正及 Mark 峰匹配, 并计算相似度, 结果见表 2。共标定了 46 个共有峰, 不同发酵时间建曲样品指纹图谱相似度均大于 0.900, 说明利用指纹图谱不能有效区分不同发酵时间建曲。

表 2 不同发酵时间建曲指纹图谱相似度评价结果

Table 2 HPLC chromatograms similarity evaluation results of Jianqu fermented in different times

样品	相似度									
	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	R
J1	1.000	0.997	0.972	0.979	0.969	0.950	0.949	0.956	0.946	0.978
J2	0.997	1.000	0.978	0.988	0.978	0.960	0.958	0.966	0.954	0.985
J3	0.972	0.978	1.000	0.984	0.983	0.992	0.983	0.977	0.987	0.994
J4	0.979	0.988	0.984	1.000	0.996	0.983	0.980	0.985	0.969	0.995
J5	0.969	0.978	0.983	0.996	1.000	0.989	0.990	0.992	0.974	0.996
J6	0.950	0.960	0.992	0.983	0.989	1.000	0.995	0.988	0.988	0.993
J7	0.949	0.958	0.983	0.980	0.990	0.995	1.000	0.994	0.984	0.992
J8	0.956	0.966	0.977	0.985	0.992	0.988	0.994	1.000	0.982	0.992
J9	0.946	0.954	0.987	0.969	0.974	0.988	0.984	0.982	1.000	0.986
R	0.978	0.985	0.994	0.995	0.996	0.993	0.992	0.992	0.986	1.000

2.6 共有峰指认及归属

精密称取上述各对照品适量, 用甲醇制成适宜浓度的对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行检测, 记录各对照品色谱图。以色谱峰相对保留时间为参照, 与不同发酵时间建曲指纹图谱对比, 指认了 21 个共有峰, 分别为峰 4 (香草酸)、5 (咖啡酸)、9 (隐绿原酸)、11 (东莨菪内酯)、13 (阿魏酸)、

15 (柚皮苷)、16 (槲皮苷)、17 (橙皮苷)、18 (新橙皮苷)、19 (滨蒿内酯)、23 (木犀草素)、26 (桂皮醛)、27 (芹菜素)、33 (山柰素)、34 (欧前胡素)、35 (和厚朴酚)、36 (木香烃内酯)、37 (广藿香酮)、38 (厚朴酚)、40 (α -香附酮)、43 (甘草酸)。

按“2.3”项下方法制备各原料药供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件进行测定, 记录各单味药色谱图。以色谱峰相对保留时间为参照, 对比不同发酵时间建曲指纹图谱, 对指认出的 21 个成分进行归属, 结果见表 3。

2.7 化学计量学分析

2.7.1 层次聚类分析法 (hierarchical cluster analysis, HCA) 将不同发酵时间建曲共有峰面积数据导入 Origin Pro 2021b 软件进行系统聚类分析, 选择离差平方和法聚类, 欧氏距离法测距, 输出垂直方向谱系图, 如图 4 所示, 不同发酵时间建曲可各自聚为一类, 当相似度为 80% 时, 9 个不同发酵时间建曲被很好地分为 4 类, 结合各类建曲发酵时间及外观性状, 可分别定义为 4 个不同发酵程度建曲, 发酵 0 h 及 12 h 为建曲发酵的初期阶段, 外观性状无明显变化; 发酵 24 h 及 36 h 为建曲发酵的未成熟阶段, 表面始有少量白霉; 发酵 48 h 及 60 h 为建曲发酵的适度阶段, 逐渐达到“遍布白霉, 有酒香气”状态, 发酵 72、84、96 h 为建曲发酵的过度阶段, 白霉变黑, 有霉味。

2.7.2 正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least square-discriminant analysis, OPLS-DA) 基

表 3 建曲指纹图谱成分归属
Table 3 Compositional attribution of Jianqu

峰号 (成分)	相对保留时间	成分归属	原药材相对保留时间
峰 4 (香草酸)	0.593	广藿香、紫苏	0.594、0.593
峰 5 (咖啡酸)	0.618	陈皮、厚朴、川木香、槟榔、官桂	0.617、0.616、0.619、0.617、0.618
峰 9 (隐绿原酸)	0.804	辣蓼、青蒿、苦杏仁、官桂、甘草	0.804、0.803、0.804、0.803、0.803
峰 11 (东莨菪内酯)	0.877	青蒿、陈皮、厚朴、川木香、麸炒枳壳	0.877、0.879、0.877、0.879、0.879
峰 13 (阿魏酸)	0.913	辣蓼、青蒿、陈皮、苍术、川木香、槟榔	0.913、0.912、0.915、0.914、0.913、0.913
峰 15 (柚皮苷)	1.038	辣蓼、青蒿、厚朴、麸炒枳壳、官桂	1.039、1.039、1.038、1.039、1.040
峰 16 (槲皮苷)	1.050	辣蓼、青蒿、麦芽、广藿香、薄荷、谷芽	1.050、1.049、1.051、1.051、1.052、1.048
峰 17 (橙皮苷)	1.059	辣蓼、麦芽、炒山楂、陈皮、广藿香、苍术、麸炒枳壳、薄荷、甘草	1.059、1.061、1.060、1.061、1.061、1.061、1.061、1.061、1.059
峰 18 (新橙皮苷)	1.096	陈皮、麸炒枳壳	1.096、1.097
峰 19 (滨蒿内酯)	1.126	青蒿、陈皮、麸炒枳壳	1.125、1.128、1.127
峰 23 (木犀草素)	1.325	苍耳草、白芷、麸炒枳壳、紫苏、甘草	1.326、1.324、1.327、1.326、1.325
峰 26 (桂皮醛)	1.454	辣蓼、青蒿、苦杏仁、炒山楂、广藿香、厚朴、槟榔、紫苏、薄荷、官桂、香附	1.456、1.456、1.456、1.456、1.456、1.456、1.456、1.456、1.456、1.456
峰 27 (芹菜素)	1.466	辣蓼、陈皮、广藿香、麸炒枳壳、谷芽	1.467、1.467、1.468、1.467、1.465
峰 33 (山柰素)	1.782	辣蓼、陈皮、苍术、麸炒枳壳	1.783、1.782、1.782、1.782
峰 34 (欧前胡素)	1.937	辣蓼、陈皮、白芷	1.938、1.938、1.937
峰 35 (和厚朴酚)	1.985	辣蓼、厚朴	1.986、1.985
峰 36 (木香烃内酯)	2.017	青蒿、广藿香、川木香	2.018、2.018、2.017
峰 37 (广藿香酮)	2.073	苦杏仁、炒山楂、陈皮、广藿香、苍术、厚朴、甘草	2.073、2.073、2.073、2.073、2.073、2.073、2.073
峰 38 (厚朴酚)	2.094	广藿香、厚朴、川木香	2.094、2.093、2.094
峰 40 (α -香附酮)	2.218	辣蓼、苍术	2.219、2.218
峰 43 (甘草酸)	2.258	辣蓼、苍术、谷芽、官桂、麦芽	2.258、2.259、2.258、2.258、2.257

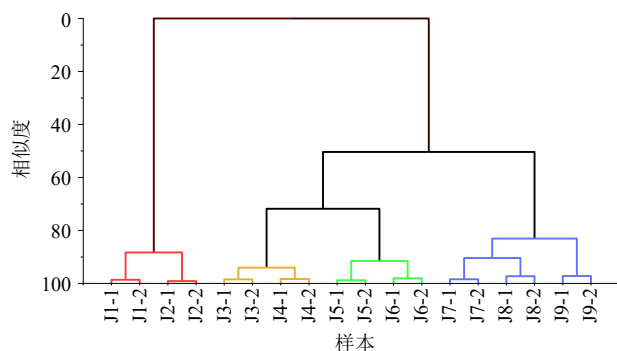


图 4 不同发酵时间建曲样品聚类树状图

Fig. 4 Cluster analysis plot of Jianqu fermented in different times

于 HCA 结果, 首先将 4 个发酵阶段建曲共有峰面积数据一起导入 SIMCA 14.1 软件, 建立 M1 模型, 以筛选不同发酵程度建曲间的差异性成分; 然后将相邻 2 个发酵阶段建曲共有峰面积数据分别导入 SIMCA 14.1 软件, 建立模型 M2、M3 和 M4, 以筛

选建曲发酵程度控制的关键指标; 由表 4 可知, 4 个 OPLS-DA 模型的 R^2_X 、 R^2_Y 及 Q^2 都接近于 1, 并进行 200 次置换检验评价各模型, 均没有过拟合的现象, 说明 4 个模型都稳定、有效、可行, 具有良好的解释及预测能力。在各模型得分图中, 不同发酵阶段建曲分别位于两侧, 说明不同发酵阶段建曲差异明显, 可被区分。由各模型 VIP 图 (图 5) 可知, 第 1~4 阶段建曲主要差异性成分依次为芹菜素、新橙皮苷、峰 28、柚皮苷、橙皮苷、厚朴酚、

表 4 OPLS-DA 模型信息
Table 4 OPLS-DA model information

模型编号	发酵阶段	R^2_X	R^2_Y	Q^2
M1	第 1 至第 4 阶段	0.976	0.972	0.870
M2	第 1 和第 2 阶段	0.884	0.996	0.984
M3	第 2 和第 3 阶段	0.844	0.996	0.983
M4	第 3 和第 4 阶段	0.825	0.928	0.860

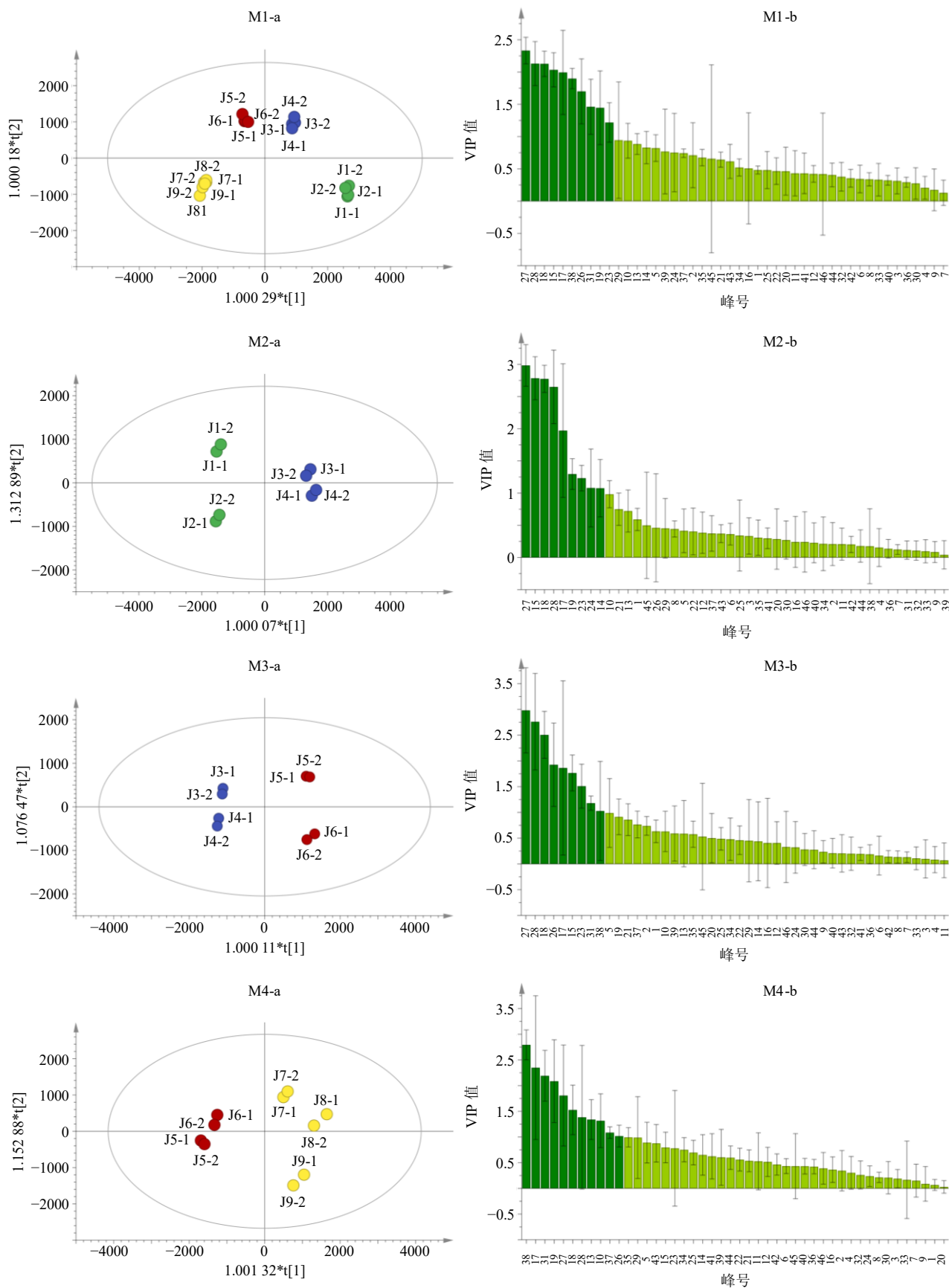


图 5 OPLS-DA 得分图 (a) 及 VIP 值 (b)

Fig. 5 OPLS-DA scoring plots (a) and VIP values (b)

桂皮醛、滨蒿内酯、峰 31 和木犀草素；第 1 与第 2 阶段建曲主要差异性成分为芹菜素、柚皮苷、新橙皮苷、峰 28、橙皮苷、滨蒿内酯及木犀草素等；第 2 与第 3 阶段建曲主要差异成分为芹菜素、峰 28、新橙皮苷、桂皮醛、橙皮苷、柚皮苷及木犀草素等；第 3 与第 4 阶段建曲主要差异性成分为厚朴酚、橙皮苷、峰 31、滨蒿内酯、芹菜素、新橙皮苷、峰 28、阿魏酸及峰 10 等。

2.8 差异性标志物含量测定

2.8.1 色谱条件 色谱柱为 Waters SunFire C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-0.1%乙酸水溶液，梯度洗脱：0~15 min, 20%~25%乙腈；15~40 min, 25%~55%乙腈；40~45 min, 55%~20%乙腈；体积流量 1.0 mL/min；检测波长 280 nm；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。色谱图见图 6。

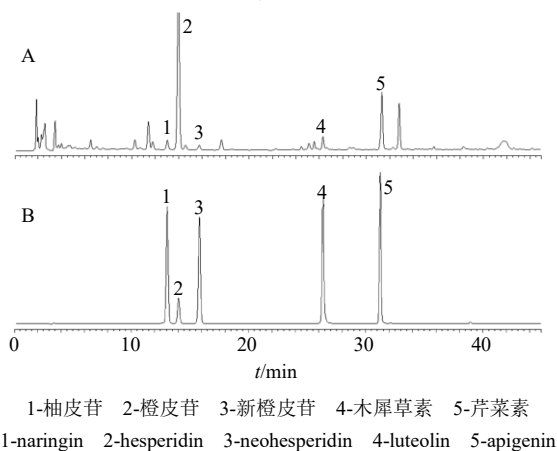


图 6 建曲样品 (A) 及混合对照品 (B) 的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC of Jianqu sample (A) and mixed reference substances (B)

2.8.2 对照品溶液制备 分别精密称取柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、芹菜素适量，加甲醇配制成单一对照品溶液，精密移取适量单一对照品溶液，配制成混合对照品溶液，质量浓度分别为 90.4、568.5、64.8、33.3、88.2 μg/mL。

2.8.3 供试品溶液制备 精密称取不同发酵时间样品粉末 1.0 g，参照“2.3”项下方法制备供试品溶液。

2.8.4 线性关系考察 精密吸取“2.8.2”项下混合对照品溶液，采用倍比稀释法，制成系列对照品溶液，按“2.8.1”项下色谱条件进样测定，以进样量为横坐标 (x)，峰面积为纵坐标 (y)，进行线性回归，得各成分回归方程、相关系数 (r) 及线性范围分别为柚皮苷 $y=1\,777\,120.590x-6\,902.098$, $R^2=1.000$, 线性范围 0.011 3~0.723 2 μg；橙皮苷 $y=1\,529\,123.153x-48\,807.224$, $R^2=1.000$, 线性范围 0.568 5~6.821 8 μg；新橙皮苷 $y=1\,875\,185.081x-16\,185.075$, $R^2=0.999$, 线性范围 0.008 1~0.777 6 μg；木犀草素 $y=1\,733\,238.192x-5\,275.340$, $R^2=1.000$, 线性范围 0.008 5~0.199 7 μg；芹菜素 $y=1\,799\,382.435x-12\,156.713$, $R^2=1.000$, 线性范围 0.044 1~1.058 4 μg。

2.8.5 精密度试验 精密吸取“2.8.2”项下混合对照品溶液 10 μL，按“2.8.1”项下色谱条件连续进样 6 次，计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、芹菜素峰面积 RSD 分别为 1.49%、1.98%、1.99%、0.55%、2.29%，表明仪器精密度良好。

2.8.6 重复性试验 精密称取 J6 样品 6 份，按“2.8.2”项下方法制成供试品溶液，按“2.8.1”项下色谱条件测定，计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、芹菜素质量分数 RSD 分别为 0.64%、0.38%、1.21%、0.70%、0.30%，表明该方法重复性良好。

2.8.7 稳定性试验 精密称取 J6 样品适量，按“2.8.3”项下方法制成供试品溶液，按“2.8.1”项下色谱条件，分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样测定，计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、芹菜素峰面积 RSD 分别为 1.18%、0.74%、1.19%、1.01%、0.83%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8.8 加样回收率试验 精密称取 J6 样品 6 份，每份 0.5 g，加入混合对照品适量，按照“2.8.3”项下方法制备供试品溶液，按照“2.8.1”项下色谱条件测定，计算柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素、芹菜素的平均加样回收率分别为 96.96%、103.68%、97.99%、97.33%、102.16%，RSD 分别为 1.42%、0.97%、1.91%、2.27%、1.04%。

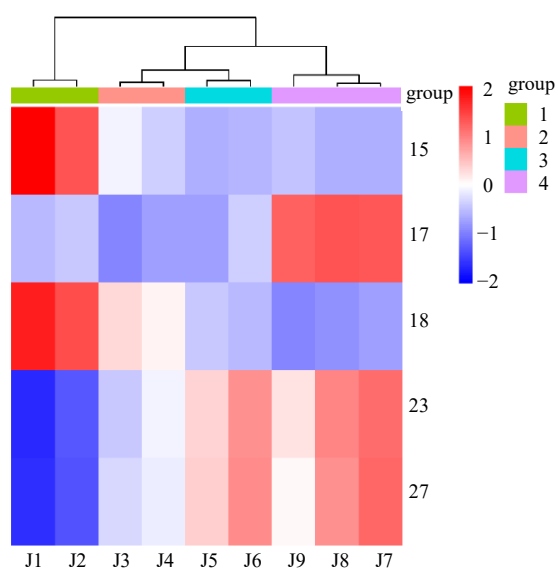
2.8.9 样品含量测定 取不同发酵时间建曲样品，按“2.8.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.8.1”项下色谱条件进样测定，计算各成分含量，结果见表 5。5 种成分含量随发酵过程的变化趋势不同，柚皮苷及橙皮苷含量在 0~48 h 内分别由 0.048 5%、0.311 2%持续降低至 0.014 8%、0.307 9%，48~96 h 内，含量又持续分别升高至 0.017 1%、0.339 6%；新橙皮苷含量随着发酵过程持续降低；木犀草素及芹菜素含量在 0~72 h 内分别由 0.007 8%、0.029 3%持续升高至 0.019 8%、0.085 2%，72~96 h 内，又分别下降至 0.015 8%、0.062 8%。各成分含量及变化趋势存有差异，难以直观评价，故将测定结果导

入微生物在线平台, 绘制聚类热图, 见图 7。结果表明, 以 5 个黄酮类差异性标志物平均含量为指标, 仍可将不同发酵阶段建曲区分为 4 个不同发酵阶段建曲, 分类结果与 HCA 结果一致。

表 5 不同发酵时间建曲 5 种成分含量测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Results of five components determination of Jianqu fermented in different times ($\bar{x} \pm s, n=3$)

发酵时间/h	质量分数/%				
	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	木犀草素	芹菜素
0	0.048 5	0.311 2	0.046 4	0.007 8	0.029 3
12	0.040 3	0.313 1	0.040 9	0.009 4	0.034 9
24	0.021 6	0.304 7	0.022 9	0.013 1	0.055 9
36	0.018 2	0.308 0	0.019 0	0.014 5	0.059 1
48	0.014 8	0.307 9	0.010 8	0.016 4	0.069 4
60	0.015 3	0.313 7	0.008 8	0.018 6	0.079 7
72	0.015 1	0.341 4	0.005 0	0.019 8	0.085 2
84	0.015 1	0.341 6	0.003 0	0.018 9	0.079 1
96	0.017 1	0.339 6	0.001 8	0.015 8	0.062 8



15、17、18、23 及 27 为柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、木犀草素及芹菜素色谱峰编号

15, 17, 18, 23 and 27 were the chromatographic peak numbers of naringin, hesperidin, neohesperidin, luteolin and apigenin

图 7 不同发酵时间建曲 5 个黄酮类差异性标志物含量聚类热图

Fig. 7 Cluster thermal map of five flavonoid differential markers in Jianqu fermented in different times

3 讨论

本实验首次建立了不同发酵时间建曲的指纹图谱, 并首次指认了建曲中的 21 个成分, 又借助化学计量学分析筛选出了不同发酵时间建曲间的多个差

异性标志物, 可作为区分不同发酵时间建曲的关键指标, 为建曲发酵工艺优化及质量标准建立提供参考。实验过程中, 为了确保建立的指纹图谱可对不同发酵时间建曲中的成分进行较全面地分析, 以色谱图出峰多、峰形好、峰面积及分离度高为条件, 分别对 9 种提取溶剂 (水、甲醇、75%甲醇、50%甲醇、无水乙醇、95%乙醇、75%乙醇、55%乙醇、稀乙醇)、2 种提取方式 (超声、回流)、4 种检测波长 (254、280、300、320 nm)、3 种流动相 (乙腈-0.1%磷酸水溶液、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸水溶液) 及多种不同梯度洗脱条件进行了优化。为了更好地展示指纹图谱各色谱峰, 本实验仅展示了 1 个批次 9 个不同发酵时间建曲的 HPLC 指纹图谱, 并对橙皮苷色谱峰进行了截取。本实验参照建曲各原料药所含主要成分选用对照品, 对指纹图谱共有峰进行指认, 并尝试用槲皮素、木犀草苷、川陈皮素等对峰 14 和峰 28 进行比对分析, 但均未能指认出其所代表的成分, 后期将采用成分分离及结构鉴定等相关技术对 2 个成分进一步研究。

不同发酵时间建曲指纹图谱相似度均大于 0.900, 不能根据指纹图谱相似度对不同发酵时间建曲进行区分。因此, 本实验首先引入无监督模式的 HCA, 将不同发酵时间建曲很好地划分为 4 类, 又借助有监督模式的 OPLS-DA 对相邻发酵程度建曲间的差异性成分分别进行筛选, 重复出现的差异性成分主要为芹菜素、新橙皮苷、橙皮苷、峰 28、柚皮苷和木犀草素。芹菜素主要来源于辣蓼, 具有抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、抗炎等作用^[5]; 柚皮苷和新橙皮苷主要来源于枳壳, 是枳壳中含量最高的 2 个黄酮类物质, 分别具有调血脂^[6]、保肝^[7]、抗抑郁^[8]和调节胃肠运动^[9]的药理作用; 橙皮苷主要来源于陈皮、枳壳、薄荷等, 具有抗氧化、抗炎、促胃动力等作用^[10]; 木犀草素主要来源于枳壳和紫苏, 具有抗炎、抗氧化等活性^[11]。因此, 对芹菜素、新橙皮苷、橙皮苷、柚皮苷和木犀草素进行定量分析, 分析结果与 HCA 结果一致, 进一步证实了选择 5 种黄酮类成分作为差异性标志物的合理性。其中辣蓼、麸炒枳壳和陈皮等原料药可能是建曲质量控制的关键。

在建曲发酵前期及中期, 木犀草素和芹菜素含量均逐渐升高, 可能与发酵前期植物本身存在的纤维素酶及微生物生长代谢过程产生的纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶和果胶酶等具有降解植物细胞壁, 促进

活性成分的溶出有关^[12]；发酵后期，二者含量又呈下降趋势，可能与发酵后期微生物生长环境改变，相关微生物活性降低有关。发酵 0~48 h，柚皮苷、橙皮苷含量先降低，可能是部分微生物在发酵环境下产生降解柚皮苷和橙皮苷的酶，使两者成分进行分解生成代谢产物以供微生物自身生长需求。有研究表明，菌株 *Aspergillus niger* TC-01 可以将柚皮苷去糖基化生成柚皮素，转化高达 96%^[13]；黑曲霉菌种转化产生橙皮苷酶及柚苷酶的能力较强，能够转化橙皮苷产生橙皮素和橙皮素-7-O-葡萄糖苷^[14]，可极大提升其生物利用度，更易于体内吸收^[15]。而发酵 48~96 h，柚皮苷、橙皮苷含量再次升高，可能是部分微生物对 2 种成分的降解达到饱和，柚皮苷和橙皮苷的含量在这一阶段进行富集，因此表现为含量增加^[16]。但有关建曲发酵过程中，微生物的种群、生长代谢特性及其对建曲物质基础的转化机理均不明确^[17]，仍有待进一步深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂第十七册 [S]. 1998: 142.
- [2] 李翠萍. 川产建曲的质变因素与解决措施 [J]. 中国西部科技, 2005, 4(21): 8.
- [3] 郑艳萍, 朱红军, 秦昆明, 等. 川产建曲中 5 种成分含量的测定及 HPLC 指纹图谱的初步建立 [J]. 中药材, 2018, 41(5): 1138-1141.
- [4] 胥敏, 刘玉杰, 解达帅, 等. 建曲发酵过程的最佳“火候” [J]. 中成药, 2017, 39(1): 136-142.
- [5] 卢慧颖, 王天阳, 王浩泽, 等. 芹菜素联合其它药物在疾病治疗中药理作用及机制的研究进展 [J]. 中国药房, 2021, 32(4): 502-507.
- [6] 杨新荣, 窦霞, 李国峰, 等. 柚皮苷药理作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3226-3240.
- [7] Akamo A J, Rotimi S O, Akinloye D I, et al. Naringin prevents cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats by attenuating oxidative stress, fibrosis, and inflammation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 153: 112266.
- [8] Zhang X H, Han L R, Liu J, et al. Pharmacokinetic study of 7 compounds following oral administration of *Fructus Aurantii* to depressive rats [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 131.
- [9] Wang Y K, Zhou Z M, Dai M Y, et al. Discovery and validation of quality markers of *Fructus Aurantii* against acetylcholinesterase using metabolomics and bioactivity assays [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(11): 2189-2205.
- [10] 董自亮, 李红亮, 原欢欢, 等. UPLC 测定经典名方金水六君煎中 11 种成分 [J]. 中草药, 2021, 52(3): 711-717.
- [11] 韩宁馨, 孙雅丽, 盛帅, 等. 木犀草素对氧化应激和炎症的调控机制 [J]. 动物营养学报, 2022, 34(5): 2856-2861.
- [12] 江曙, 刘培, 段金殿, 等. 基于微生物转化的中药废弃物利用价值提升策略探讨 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(6): 1210-1216.
- [13] 邓媛, 毛勇, 王燕, 等. 黑曲霉 TC-01 产柚苷酶对柚皮苷酶解作用的研究 [J]. 中国食品添加剂, 2012(3): 108-111.
- [14] 申丽静, 汪钊, 章银军, 等. 橙皮苷酶高产菌株的选育及其酶学性质的研究 [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(5): 109-112.
- [15] 张风亭, 胡坦, 潘思轶. 橙皮苷生物学活性及其改性技术的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 442-449.
- [16] 刘丽娜. 基于微生物代谢对陈皮陈化活性物质转化机制的研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019.
- [17] 张欢, 高胜美, 王跃飞, 等. 中药“曲剂”发酵的物质和功能变化及机制研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2473-2479.

[责任编辑 郑礼胜]