

• 药剂与工艺 •

基于 UPLC 指纹图谱的菟丝子酒炙前后化学模式识别及多成分定量测定

张秀如¹, 于明¹, 崔雅晴², 焦春梅³, 管仁伟⁴, 郭瑞齐⁴, 张翠翠⁴, 林建强^{5*}, 林慧彬^{4*}

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250355

2. 山东省医药行业协会, 山东 济南 250000

3. 山东省农业广播电视学校平阴分校, 山东 济南 250499

4. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

5. 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东 青岛 266200

摘要: **目的** 建立生菟丝子 *Cuscutae Semen* 与酒菟丝子 UPLC 指纹图谱, 并结合多元统计分析和定量测定研究菟丝子酒炙前后化学成分的变化, 为菟丝子质量评价提供参考。 **方法** 采用 UPLC 法进行测定, 色谱柱为 Thermo Accucore™ C₁₈ 柱 (100 mm×4.6 mm, 2.6 μm), 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 柱温 30 ℃, 梯度洗脱, 进样体积为 2 μL, 体积流量为 0.4 mL/min, 采用分段波长, 建立 15 批酒菟丝子及 15 批生菟丝子指纹图谱。通过相似度评价、层次聚类分析 (hierarchical clustering analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA) 来对指纹图谱进行分析评价, 同时对 9 个主要成分进行定量测定, 寻找炮制前后差异成分。 **结果** 建立的 UPLC 指纹图谱中, 共匹配了 19 个共有峰, 宁夏产区与内蒙产区的生菟丝子和酒菟丝子相似度均较高, HCA 中可将酒菟丝子与生菟丝子明显区分, PCA 提取出 4 个主成分, 能够明显区分菟丝子生品及炮制品。正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 亦可将二者明显区分, 并筛选出菟丝子炮制前后的 8 个差异性成分, 根据 VIP 值排序为峰 1、10、2、5、8 (隐绿原酸)、4 (新绿原酸)、18 (槲皮素)、17 (异绿原酸 C)。含量测定结果表明, 酒炙后菟丝子中金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素、新绿原酸、隐绿原酸含量增加, 紫云英苷、山柰酚、绿原酸、异绿原酸 C 含量降低。 **结论** 建立的 UPLC 指纹图谱和含量测定结果对菟丝子及其炮制品的质量控制及整体性评价具有重要意义。

关键词: 菟丝子; 酒菟丝子; UPLC; 指纹图谱; 化学模式识别; 质量评价; 相似度评价; 层次聚类分析; 主成分分析; 正交偏最小二乘-判别分析; 金丝桃苷; 异槲皮苷; 槲皮素; 新绿原酸; 隐绿原酸; 紫云英苷; 山柰酚; 绿原酸; 异绿原酸 C
中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)09-2733-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.005

Chemical pattern recognition of *Cuscutae Semen* before and after stir-frying with wine based on UPLC fingerprint multi-component quantitative determination

ZHANG Xiu-ru¹, YU Ming¹, CUI Ya-qing², JIAO Chun-mei³, GUAN Ren-wei⁴, GUO Rui-qi⁴, ZHANG Cui-cui⁴, LIN Jian-qiang⁵, LIN Hui-bin⁴

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Shandong Pharmaceutical Industry Association, Jinan 250000, China

3. Pingyin Branch of Shandong Agricultural Radio School, Jinan 250499, China

收稿日期: 2022-11-29

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1701500); 国家重点研发计划 (2017YFC1701502); 国家重点研发计划 (2017YFC1701504); 山东省中药材及中药饮片标准研究; 中央转移支付项目“道地药材生态种植及质量保障项目”; 济南市农业应用技术创新计划 (CX202112); 山东省科技型中小企业创新能力提升工程“道地黄芩生态种植技术及产业化研究” (2022TSGC1059); 中央本级重大增减支项目 (2060303)

作者简介: 张秀如 (1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药资源与质量控制研究。E-mail: zxr15275313367@163.com

***通信作者:** 林慧彬 (1962—), 女, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药资源与质量控制研究。E-mail: linhuibin68@163.com

林建强 (1964—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事分子生物学研究。E-mail: jianqianglin@sdu.edu.cn

4. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

5. State Key Laboratory of Microbiology, Shandong University, Qingdao 266200, China

Abstract: Objective To establish UPLC fingerprints of *Cuscutae Semen* and *Cuscutae Semen* stir-frying with wine, and to study the changes of chemical constituents of *Cuscutae Semen* before and after processing by multivariate statistical analysis and quantitative determination, so as to provide reference for quality evaluation of *Cuscutae Semen*. **Methods** The fingerprints of 15 batches of *Cuscutae Semen* stir-frying with wine and 15 batches of raw *Cuscutae Semen* were established and determined by UPLC. The chromatographic column was Thermo Accucore™ C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 2.6 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid water, column temperature was 30 °C, gradient elution, the injection volume was 2 μL, and volume flow rate was 0.4 mL/min. Segmented wavelengths were used. The fingerprint was analyzed and evaluated by similarity evaluation, hierarchical cluster analysis (HCA), principal component analysis (PCA), and quantitative determination of nine main components to find the difference components before and after processing. **Results** In the established fingerprint of *Cuscutae Semen*, a total of 19 common peaks were matched. The products from Ningxia and Inner Mongolia showed a high similarity. In the cluster analysis, *Cuscutae Semen* could be clearly distinguished from *Cuscutae Semen*. The four principal components extracted by PCA can be used to distinguish raw and processed products. Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) can also be used to distinguish the eight different components of *Cuscutae Semen* before and after processing, according to VIP values, they were ranked as peaks 1, 10, 2, 5, 8 (cryptochlorogenic acid), 4 (neochlorogenic acid), 18 (quercetin), and 17 (isochlorogenic acid C). The results showed that the contents of hyperin, isoquercitrin, quercetin, neochlorogenic acid and cryptochlorogenic acid increased, while the contents of shikonin, kaempferol, chlorogenic acid and isochlorogenic acid C decreased. **Conclusion** The established UPLC fingerprint and content determination results are of great significance for the quality control and overall evaluation of *Cuscutae Semen* and its processed products.

Key words: *Cuscutae Semen*; *Cuscutae Semen* stir-frying with wine; UPLC; fingerprint; chemical pattern recognition; quality evaluation; similarity evaluation; hierarchical clustering analysis; principal component analysis; orthogonal partial least squares-discriminant analysis; hyperin; isoquercitrin; quercetin; neochlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; shikonin; kaempferol; chlorogenic acid; isochlorogenic acid C

菟丝子为旋花科菟丝子属植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R. Br.或菟丝子 *C. chinensis* Lam.的干燥成熟种子，归肝、肾、脾经^[1]。菟丝子临床应用广泛，对生殖系统^[2-3]、免疫系统^[4-5]、骨骼系统^[6-7]疾病均有显著疗效，并有保肝^[8]、降糖^[9]、抗衰^[10]作用。因其为种子类药材，种皮致密坚实，不易打碎，因此古今大多以其炮制品入药。菟丝子常用炮制品有炒菟丝子、盐菟丝子、酒菟丝子和菟丝子饼。在古代，应用最多的是其酒制品^[11]。传统炮制理论认为，酒制升提，可治疗肝肾不足导致的下陷之证，还可增强菟丝子的温补作用^[12]；现代研究也发现，酒可使药材中活性成分溶出度增加，进而提高其药效^[13]。因此，关于菟丝子酒制品的研究具有一定的临床应用意义。

菟丝子主要含有黄酮类、苯丙素类化合物^[14]，现有研究证明，菟丝子酒制品中总黄酮含量和挥发性成分含量增加^[15-16]。为明晰菟丝子酒炙前后的化学成分变化情况，本研究利用 UPLC 技术，采用分段波长，建立了菟丝子炮制前后指纹图谱，并结合相似度评价、层次聚类分析 (hierarchical clustering

analysis, HCA)、主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 对其进行综合评价，同时对菟丝子中主要的 5 种黄酮类成分 (金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、槲皮素、山柰酚)、4 种酚酸类成分 (新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 C) 进行含量测定，探求菟丝子炮制前后的差异性成分，以期酒菟丝子质量标准的制定及炮制前后药理作用的研究提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

1290 Infinity II 型超高效液相色谱仪，安捷伦科技有限公司；ME204E 型万分之一分析天平，梅特勒-托利多仪器上海有限公司；XS205DU 型十万分之一分析天平，梅特勒-托利多国际有限公司；JM-30D-40 型液晶单频超声波清洗机，深圳市洁盟清洗设备有限公司；LC-EA6S 型电陶炉，广东顺德忠臣电器有限公司；WGH201 型纯水机，Yamato 科学株式会社。

1.2 材料

1.2.1 试剂 甲醇、乙腈, 帝慈科国际贸易有限公司, 色谱纯; 磷酸, 天津市科密欧化学试剂有限公司, 色谱纯; 超纯水, 实验室自制。

1.2.2 试药 对照品金丝桃苷 (质量分数 94.3%, 批号 111521-201809)、绿原酸 (质量分数 96.6%, 批号 110753-201314)、槲皮素 (质量分数 99.1%, 批号 100081-201610)、山柰酚 (质量分数 93.2%, 批号 110861-202013), 以上对照品均购自中国食品药品检定研究院; 对照品隐绿原酸 (质量分数 98%, 批号 M06GB147634)、新绿原酸 (质量分数 98%, 批号 D23GB172337)、紫云英苷 (质量分数 98%, 批号 10319)、异绿原酸 C (质量分数 98%, 批号 ST06600120)、异槲皮苷 (质量分数 94.6%, 批号 ST11441020MG), 以上对照品均购自上海源叶生物科技有限公司。

1.2.3 样品 收集来自宁夏、内蒙古 2 个产地的生菟丝子药材 (表 1), 经山东省中医药研究院林慧彬研究员鉴定, 均为旋花科植物南方菟丝子 *C. australis* R. Br. 的干燥成熟种子。

酒炙品: 称取约 200 g 生菟丝子药材, 用 10% 黄酒闷润 6 h 后, 置于热锅内, 300 °C 下翻炒 10 min 后, 倒入托盘内, 摊开, 晾凉, 即得。

表 1 药材信息

Table 1 Information of medicinal materials

生菟丝子编号	产地	搜集时间	来源	酒菟丝子编号
S1	内蒙古	2021-09	山东禾宝药业有限公司 (批号 21081902)	JS1
S2	宁夏	2020-09	安徽亳州	JS2
S3	内蒙古	2020-09	安徽亳州	JS3
S4	内蒙古	2020-09	安徽亳州	JS4
S5	内蒙古	2020-10	河北安国	JS5
S6	内蒙古	2020-10	河北安国	JS6
S7	内蒙古	2021-10	自采	JS7
S8	内蒙古	2021-10	自采	JS8
S9	内蒙古	2017-10	自采	JS9
S10	宁夏	2017-10	自采	JS10
S11	内蒙古	2018-10	自采	JS11
S12	宁夏	2019-10	自采	JS12
S13	宁夏	2021-10	自采	JS13
S14	宁夏	2021-10	自采	JS14
S15	宁夏	2021-10	自采	JS15

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Thermo Accucore™ C₁₈ 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温 30 °C; 流动相为 0.1% 磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~22 min, 95%~85% 乙腈; 22~35 min, 85%~80% 乙腈; 35~40 min, 80%~62% 乙腈; 40~50 min, 62%~45% 乙腈; 进样体积 2 μL; 体积流量 0.4 mL/min; 检测波长: 初始波长 326 nm, 20 min 时更改波长为 256 nm, 33 min 时更改波长为 326 nm, 38 min 时更改波长 360 nm。

2.2 供试品溶液的制备

取样品粉末 (过四号筛) 约 1 g, 置 50 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇 40 mL, 超声处理 (功率 500 W、频率 40 kHz) 1 h, 放冷, 加 80% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 滤液过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得供试品溶液。

2.3 混合对照品溶液的制备

精密称定各对照品适量, 用甲醇溶解制成混合对照品溶液, 含新绿原酸 0.281 mg/mL、绿原酸 0.805 mg/mL、隐绿原酸 0.206 mg/mL、金丝桃苷 1.000 mg/mL、异槲皮苷 0.186 mg/mL、紫云英苷 0.321 mg/mL、异绿原酸 C 0.222 mg/mL、槲皮素 0.175 mg/mL、山柰酚 0.198 mg/mL。

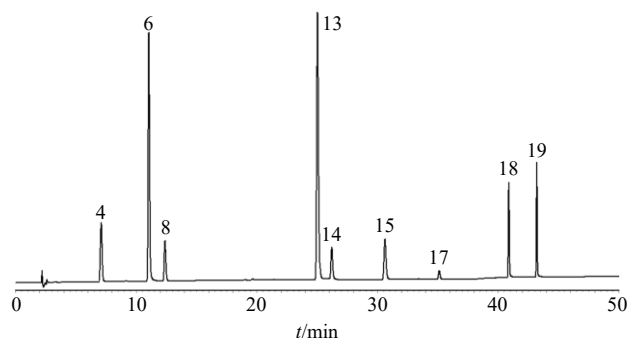
2.4 菟丝子炮制前后指纹图谱研究

2.4.1 精密度试验 精密称取 JS4 (酒菟丝子 4 号样品) 粉末 1 g, 按“2.2”项下方法制备成供试品溶液, 重复进样 6 次, 选择峰形对称且响应值较大的 13 号金丝桃苷峰为参照峰, 测得各共有峰的相对保留时间 RSD 均<2%, 相对峰面积 RSD 均<3%, 表明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 精密称取 JS4 粉末 1 g, 平行 6 份, 按“2.2”项下方法制备成供试品溶液, 进样测定, 以 13 号金丝桃苷为参照峰, 计算得到共有峰的相对保留时间 RSD 均<2%, 相对峰面积 RSD 均<3%, 表明此方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取 JS4 供试品溶液, 在 0、2、4、8、16、24 h 分别进样测定, 以 13 号金丝桃苷为参照峰, 计算各共有峰的相对保留时间 RSD 均<2%, 相对峰面积 RSD 均<3%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 UPLC 指纹图谱的建立及色谱峰的指认 取“2.3”项下混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 得到混合对照品色谱图 (图 1)。



4-新绿原酸 6-绿原酸 8-隐绿原酸 13-金丝桃苷 14-异槲皮苷
15-紫云英苷 17-异绿原酸 C 18-槲皮素 19-山柰酚, 图4同
4-neochlorogenic acid 6-chlorogenic acid 8-cryptochlorogenic acid
13-hyperin 14-isoquercetin 15-astragaloside 17-isochlorogenic
acid C 18-quercetin 19-kaempferol, same as Fig. 4

图1 混合对照品色谱图

Fig. 1 Chromatogram of mixed control samples

按“2.2”项下方法分别制备 15 批生菟丝子 (S1~S15) 和 15 批酒菟丝子 (JS1~JS15) 供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 得到 UPLC 图。将 UPLC 图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012 版)》, 分别以 S1 和 JS1 作为参照图谱, 采用中位数法和多点校正, 设置时间窗宽度为 0.1 min, 对色谱图进行匹配, 分别生成 15 批生菟丝子 (S1~S15) 指纹图谱叠加图与 15 批酒菟丝子 (JS1~JS15) 指纹图谱叠加图及各自对照特征图谱 (图 2~4), 共得到 19 个共有峰, 其中生菟丝子 15 个共有峰 (峰 3、4、6~17、19), 16 个共有峰酒菟丝子 (峰 1~9、11~19)。经对照品比对, 共指认出 4、6、8、13~15、17~19 号共有峰, 分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、异绿原酸 C、槲皮素和山柰酚。

2.4.5 相似度评价及 HCA 利用《中药色谱指纹图

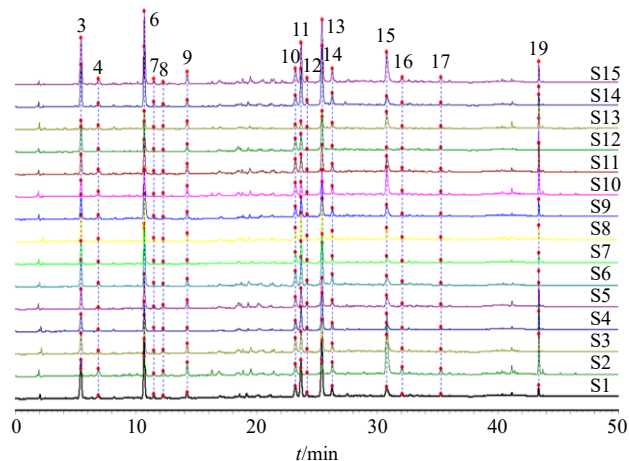


图2 生菟丝子指纹图谱

Fig. 2 Fingerprint of *Cuscuta Semen*

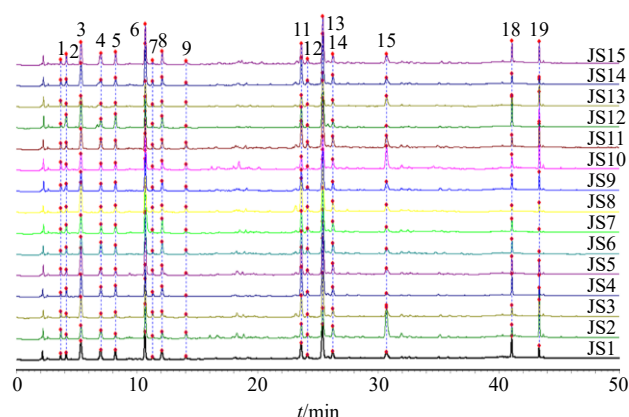


图3 酒菟丝子指纹图谱

Fig. 3 Fingerprint of *Cuscutae Semen* stir-frying with wine

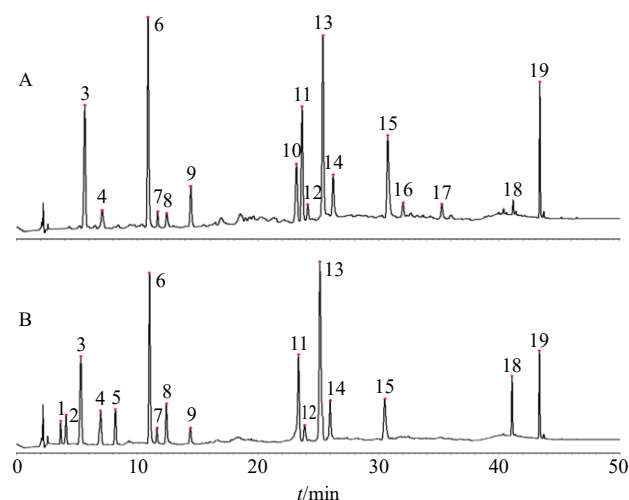


图4 生菟丝子 (A) 和酒菟丝子 (B) 对照指纹图谱

Fig. 4 Control fingerprint of *Cuscutae Semen* (A) and *Cuscutae Semen* stir-frying with wine

谱相似度评价系统 (2012 版)》, 分别计算 15 批酒菟丝子与 15 批生菟丝子的相似度, 结果 15 批生菟丝子 (S1~S15) 的相似度分别为 0.965、0.659、0.994、0.975、0.996、0.972、0.976、0.987、0.995、0.879、0.992、0.987、0.888、0.964、0.991; 15 批酒菟丝子 (JS1~JS15) 的相似度分别为 0.989、0.836、0.996、0.970、0.987、0.985、0.985、0.984、0.998、0.876、0.999、0.984、0.978、0.989、0.994。相似度结果表明, 除宁夏产区的第 2 批样品外, 其他批次生菟丝子和酒菟丝子相似度均较高。

将 30 批样品的 19 个共有峰峰面积导入 SIMCA 14.1 软件中进行 HCA, 结果 (图 5) 显示, 菟丝子的生品与酒炙品分别聚为一类, 表明菟丝子酒炙前后化学成分发生变化。

2.4.6 生菟丝子和酒菟丝子 UPLC 指纹图谱的 PCA 将 15 批生菟丝子样品和 15 批酒菟丝子样品 19 个

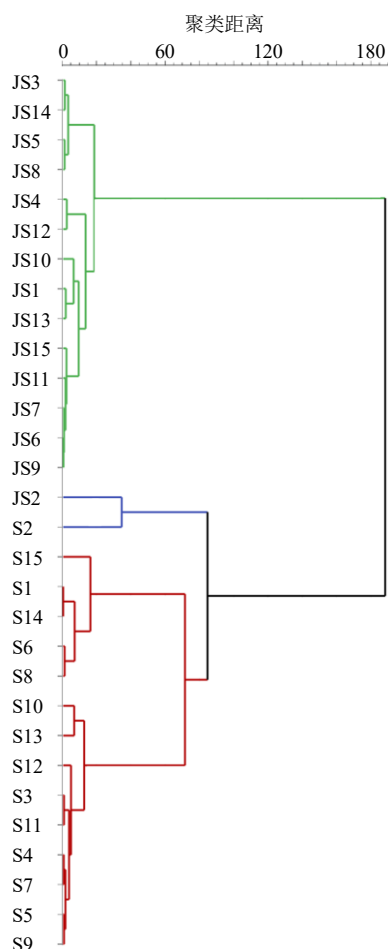


图5 菟丝子酒炙前后 HCA 结果

Fig. 5 HCA of *Cuscutae Semen* before and after processing

共有峰峰面积导入 SPSS 21 软件, 经过 KMO 和 Bartlett 检验, $KMO=0.668>0.5$, $P<0.05$, 表明符合因子分析条件, 可以进行 PCA。将共有峰标准化处理后进行 PCA, 计算主成分特征值及方差贡献率, 结果见表 2。以特征值 >1 为标准, 进行主成分提取, 提取出 4 个主成分, 累积贡献率达到 89.170%, 可代表 19 个共有峰的主要信息。

由主成分因子载荷矩阵 (表 3) 可知, 2、5、8、10、18 号峰对主成分 1 (PC1) 影响大, 3、6、11 号峰对主成分 2 (PC2) 影响较大, 14 号峰对主成分 3

表 2 主成分特征值及方差贡献率

Table 2 Eigenvalue and variance contribution rate of principal components

成分	特征值	方差贡献率/%	累积方差贡献率/%
1	7.636	40.192	40.192
2	4.954	26.074	66.265
3	3.333	17.544	83.810
4	1.019	5.361	89.170

表 3 主成分因子载荷矩阵

Table 3 Principal component factor load matrix

峰号	因子载荷			
	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4
1	0.767	-0.363	0.276	-0.237
2	0.939	-0.207	0.055	0.119
3	0.129	0.932	0.228	-0.001
4	0.717	-0.446	0.417	0.060
5	0.956	-0.188	0.023	0.116
6	0.011	0.874	0.400	-0.091
7	0.500	0.602	0.345	0.332
8	0.881	-0.293	0.170	0.131
9	-0.659	-0.061	-0.066	0.076
10	-0.870	0.410	-0.005	0.069
11	0.291	0.911	0.238	-0.076
12	0.135	-0.218	0.483	-0.810
13	0.605	0.739	0.235	0.041
14	-0.011	0.213	0.930	-0.011
15	-0.540	-0.421	0.703	0.113
16	-0.599	-0.286	0.701	0.104
17	-0.723	-0.080	0.521	0.195
18	0.848	-0.326	0.123	0.201
19	-0.379	-0.673	0.485	0.140

(PC3) 影响大, 12 号峰对主成分 4 (PC4) 影响大。利用 SIMCA 14.1 软件得到 PCA 得分图 (图 6), 可明显区分酒菟丝子及生菟丝子。其中 S2 样品游离于中心椭圆之外, 与其他样品不聚集, 说明 S2 与其他样品存在质量差异, 这与相似度结果和聚类分析结果一致。

2.4.7 生菟丝子和酒菟丝子 UPLC 指纹图谱的 OPLS-DA 在 PCA 基础上进一步利用 OPLS-DA 对 15 批酒菟丝子和 15 批生菟丝子样品进行分析, 结果如图 7 所示。所建立的模型中累积解释能力参数

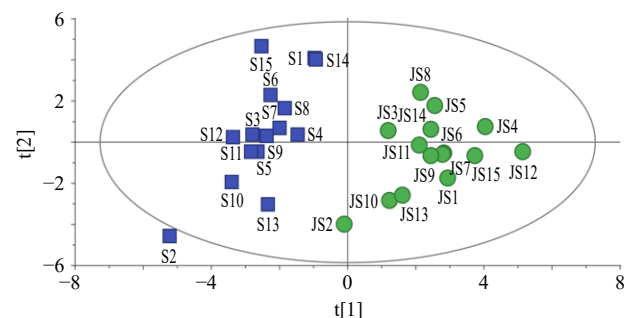


图6 菟丝子和酒菟丝子的 PCA 得分图

Fig. 6 Score scatter plot of *Cuscutae Semen* and its processed products by PCA

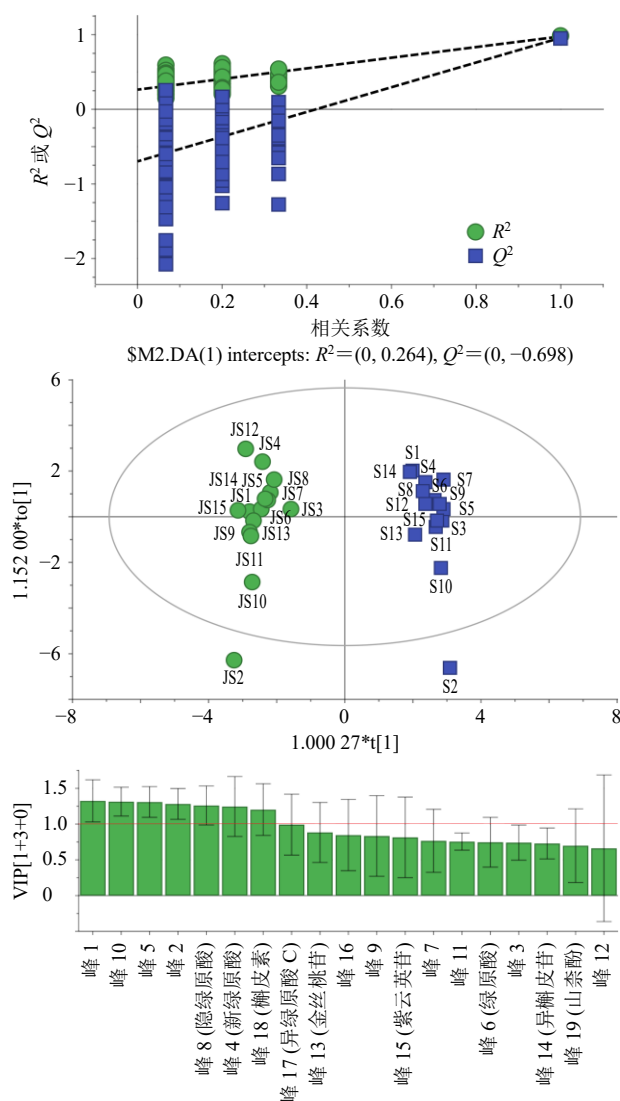


图7 OPLS-DA分析的置换图、得分图、VIP值图

Fig. 7 Permutation, score, and VIP value charts of OPLS-DA analysis

R^2_{Xcum} 为 0.868, R^2_{Ycum} 为 0.977, 预测能力参数 Q^2_{cum} 为 0.959 > 0.5, 证明此模型为有效模型。

通过置换检验 (置换次数为 200 次), R^2 和 Q^2 截距值分别为 0.259 (<0.4) 和 -0.7 (<0.05), 所有 R^2 和 Q^2 的左边的值均低于最右边, 证明没有过拟合现象。通过 OPLS-DA 分析的得分图可知, 生菟丝子与酒菟丝子可被明显区分。

以变量重要性投影值 (projection value of variable importance, VIP) > 1 为标准筛选差异性成分, 共筛选出 8 个差异标志物, 是造成酒菟丝子和生菟丝子成分差异的主要成分。影响显著性排序为峰 1 > 峰 10 > 峰 5 > 峰 2 > 峰 8 (隐绿原酸) > 峰 4 (新绿原酸) > 峰 18 (槲皮素) > 峰 17 (异绿原酸 C)。比较发现, 峰 1、2 为酒炙后新产生的成分, 生

品中没有; 峰 10 生品中含有, 酒炙后含量降低。

2.5 炮制前后 9 个化学成分定量测定

2.5.1 色谱条件 同“2.1”项。

2.5.2 供试品溶液的制备 同“2.2”项。

2.5.3 线性关系考察 精密称定新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、异绿原酸 C、槲皮素、山奈酚对照品适量, 80% 甲醇溶解, 制成质量浓度分别为 1.17、1.15、1.03、1.00、0.93、1.07、1.11、1.17、0.99 mg/mL 的单独对照品溶液。以金丝桃苷峰面积为 1, 计算其他成分峰面积与金丝桃苷峰面积的比例关系, 根据比例关系分别吸取适量各对照品溶液, 置 5 mL 量瓶中定容, 配制成质量浓度分别为 56.2、161.0、42.0、35.0、37.0、44.0、39.0、64.0、200.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品储备液, 精密量取混合对照品储备液, 用倍比稀释的方法, 以 80% 甲醇稀释制成系列对照品溶液, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以对照品溶液质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得到各成分的线性回归方程分别为新绿原酸 $Y=12.258X-1.375$, $R^2=0.9996$, 线性范围 2.808~29.765 $\mu\text{g/mL}$; 绿原酸 $Y=14.501X-3.188$, $R^2=0.9998$, 线性范围 8.050~85.330 $\mu\text{g/mL}$; 隐绿原酸 $Y=10.428X-1.782$, $R^2=0.9998$, 线性范围 2.060~21.836 $\mu\text{g/mL}$; 金丝桃苷 $Y=17.314X-27.960$, $R^2=0.9990$, 线性范围 10.000~106.000 $\mu\text{g/mL}$; 异槲皮苷 $Y=12.067X-24.178$, $R^2=0.9993$, 线性范围 6.324~24.180 $\mu\text{g/mL}$; 紫云英苷 $Y=10.145X-3.458$, $R^2=0.9994$, 线性范围 1.926~78.966 $\mu\text{g/mL}$; 异绿原酸 C $Y=11.827X+6.022$, $R^2=0.9990$, 线性范围 1.332~27.972 $\mu\text{g/mL}$; 槲皮素 $Y=13.379X-0.283$, $R^2=0.9995$, 线性范围 1.053~22.113 $\mu\text{g/mL}$; 山奈酚 $Y=14.914X-12.421$, $R^2=0.9993$, 线性范围 1.188~48.708 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5.4 精密度、重复性、稳定性考察 具体操作同“2.4.1、2.4.2、2.4.3”项。记录各待测峰的峰面积, 并计算各峰 RSD。测得各峰精密度 RSD < 1.90%, 重复性 RSD < 2.74%, 稳定性 RSD < 1.93%, 表明仪器精密度、方法重复性、样品稳定性均较好。

2.5.5 加样回收率考察 精密称定 6 份已测定 9 个指标成分含量的 JS4 样品各 0.5 g, 加入与样品含量相近的各对照品适量, 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件进样测

定并记录各色谱峰峰面积, 计算得到新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、金丝桃苷、异槲皮苷、紫云英苷、异绿原酸 C、槲皮素、山柰酚的平均加样回收率分别为 98.26%、99.50%、100.67%、99.69%、100.26%、100.34%、101.09%、99.14%、100.94%, RSD 分别为 1.46%、1.48%、1.95%、0.79%、0.33%、1.72%、

1.61%、1.68%、1.33%。

2.5.6 样品测定 按照“2.5.2”项下方法制备 15 批生菟丝子(S1~S15)及 15 批酒菟丝子(JS1~JS15)样品的供试品溶液, 按“2.5.1”项下色谱条件分别进行含量测定, 计算 9 个成分的实际含量, 含量测定结果见表 4。

表 4 样品含量测定结果

Table 4 Results of sample content determination

批号	新绿原酸/ (mg·g ⁻¹)	绿原酸/ (mg·g ⁻¹)	隐绿原酸/ (mg·g ⁻¹)	金丝桃苷/ (mg·g ⁻¹)	异槲皮苷/ (mg·g ⁻¹)	紫云英苷/ (mg·g ⁻¹)	异绿原酸 C/ (mg·g ⁻¹)	槲皮素/ (mg·g ⁻¹)	山柰酚/ (mg·g ⁻¹)
	生	酒	生	酒	生	酒	生	酒	生
1	0.273	0.687	2.665	1.357	0.250	0.698	2.667	1.767	0.811
2	0.634	0.783	1.098	1.450	0.399	0.494	1.085	1.439	0.926
3	0.325	0.441	1.827	1.649	0.314	0.413	1.579	2.122	0.644
4	0.236	0.610	1.368	1.557	0.212	0.743	1.703	2.668	0.544
5	0.137	0.471	1.580	2.448	0.359	0.605	1.335	2.427	0.502
6	0.313	0.838	2.530	1.894	0.190	0.872	1.953	2.136	0.777
7	0.197	0.687	1.828	1.826	0.178	0.941	1.438	2.071	0.509
8	0.327	0.573	2.158	2.374	0.233	0.529	1.887	2.531	0.615
9	0.320	0.776	1.786	1.748	0.232	0.679	1.630	2.062	0.567
10	0.368	0.766	1.283	1.496	0.295	0.670	1.184	1.655	0.740
11	0.421	0.779	1.614	1.834	0.257	0.674	1.336	2.190	0.569
12	0.208	0.684	1.407	1.369	0.140	0.859	1.543	2.635	0.396
13	0.303	0.787	0.771	1.064	0.252	0.521	1.209	1.311	0.481
14	0.255	0.680	2.626	1.870	0.245	0.650	2.657	2.380	0.858
15	0.420	0.842	3.342	1.735	0.204	0.896	2.928	2.448	0.920

2.5.7 统计学分析 将 9 个成分炮制前后的含量进行配对 *t* 检验, 结果(表 5)显示酚酸类成分新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 C 炮制前后具有极显著差异($P<0.001$), 绿原酸无明显差异; 黄酮类成分槲皮素具有极显著差异($P<0.001$), 紫云英苷、金丝桃苷具有显著差异($P<0.05$ 、 0.01), 异槲皮苷无明

显差异。由 *t* 值可看出, 菟丝子经酒炙后黄酮类成分金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮素含量增加, 紫云英苷和山柰酚含量降低; 酚酸类成分中, 新绿原酸、隐绿原酸含量增加, 绿原酸和异绿原酸 C 含量降低。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

通过 DAD 扫描发现绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、异绿原酸 C 在 326 nm 下有最大吸收, 金丝桃苷、紫云英苷、异槲皮苷在 256 nm 下有较大吸收、槲皮素和山柰酚在 360 nm 波长下有最大吸收, 因此, 采用分段波长进行指纹图谱研究并同时含量测定, 以期对炮制前后化学成分的变化进行针对性的研究。

3.2 炮制前后的化学模式识别及化学成分的比较

基于所建立的指纹图谱, 通过化学模式识别, 能够明显区分酒菟丝子及生菟丝子。相似度结果表明, 除第 2 批外, 各批次样品炮制前后相似度均较高; 聚类分析能够明显区分酒菟丝子和生菟丝子,

表 5 差异特征峰配对 *t* 检验

Table 5 Paired *t*-test table of different characteristic peaks

峰号	类别	成分	<i>t</i> 值	自由度	<i>P</i> 值
4	酚酸类	新绿原酸	12.010	14	<0.001
6	酚酸类	绿原酸	-0.864	14	0.402
8	酚酸类	隐绿原酸	7.826	14	<0.001
17	酚酸类	异绿原酸 C	-6.180	14	<0.001
13	黄酮类	金丝桃苷	2.549	14	<0.05
14	黄酮类	异槲皮苷	0.430	14	0.673
15	黄酮类	紫云英苷	-3.768	14	<0.01
18	黄酮类	槲皮素	6.451	14	<0.001
19	黄酮类	山柰酚	-1.983	14	0.067

但将第 2 批样本单独聚类,说明第 2 批样本与其他样本存在质量差异,这可能与第 2 批样品杂质率较高有关;通过 PCA 提取出 4 个主成分,并将生菟丝子和酒菟丝子明显区分;OPLS-DA 亦可将生菟丝子与酒菟丝子明显区分,基于 VIP 值,筛选出 8 个差异性成分,影响显著性排序顺序为峰 1>峰 10>峰 2>峰 5>峰 8(隐绿原酸)>峰 4(新绿原酸)>峰 18(槲皮素)>峰 17(异绿原酸 C)。

通过已知成分的含量测定,发现菟丝子酒炙后变化较为明显的是酚酸类成分,其中隐绿原酸、新绿原酸含量显著增加,这是因为生品中含量较高的绿原酸与异绿原酸都含有邻二酚羟基结构,炮制过程中的加热易使其氧化分解,导致含量降低,且绿原酸会分解为新绿原酸和隐绿原酸^[17]。

黄酮类成分中金丝桃苷、异槲皮苷含量增加,可能因加热和辅料黄酒的参与,从而导致溶出度增加有关。而炮制后显著增加的槲皮素,可能是含有槲皮素结构的黄酮苷类成分受热分解后产生^[18],这也与相关研究结果一致^[19]。而传统理论认为菟丝子酒制后补肾壮阳作用增强,说明酚酸类成分及黄酮类成分为菟丝子补肾壮阳作用的主要活性成分。

综上所述,本研究通过 UPLC 指纹图谱的建立,对菟丝子炮制前后的化学成分进行定性定量分析,发现菟丝子酒炙后化学成分发生明显变化,与生品存在较大差异,这与前期相关研究一致^[20-21]。而在筛选出的指标性差异成分中,峰 1、2、5、10 仍需要后续实验对其进行结构解析和对照品比对加以确定。本研究一定程度上阐述了酒菟丝子的炮制机制,为后续炮制前后药效变化研究及酒菟丝子质量标准的制定提供参考。

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: 322.
- [2] 张博, 苏杭, 任献青, 等. 基于高通量转录组测序的菟丝子黄酮改善雷公藤多苷片致大鼠生殖损伤的机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3478-3485.
- [3] 杨一博, 徐颖, 王璐, 等. 基于 Notch 信号通路探索菟丝子总黄酮配伍雷公藤多苷对生理小鼠卵巢生殖干细胞的作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 9-15.
- [4] 徐何方, 杨颂, 李莎莎, 等. 菟丝子醇提取物对肾虚证模型大鼠免疫功能的影响 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2163-2165.
- [5] 刘华, 韦炳华, 马红霞, 等. 菟丝子黄酮对流产大鼠模型母胎免疫平衡因子的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(10): 837-841.
- [6] 孙奇华, 蔡红慧, 何爱玉, 等. 菟丝子黄酮通过调控 ZBED3-AS1 影响成骨细胞凋亡 [J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(2): 306-314.
- [7] 刘映岐. 菟丝子治疗膝骨性关节炎实验及临床验证研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [8] 宋敏, 于季军, 杨丹彤, 等. 菟丝子黄酮对慢性肝损伤保护作用的研究 [J]. 湖南农业科学, 2010(23): 151-153.
- [9] 黄长盛, 谭婷婷, 邢聘婷. 菟丝子对妊娠期糖尿病患者糖脂代谢影响的临床研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(20): 2199-2201.
- [10] 何志坚, 施旻, 刘海云. 菟丝子提取物对 D-半乳糖所致衰老小鼠的抗衰老作用 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(19): 5444-5446.
- [11] 汪小莉, 张雨婷, 张影, 等. 菟丝子本草考证 [J]. 中药材, 2022, 45(2): 476-484.
- [12] 张德昌, 曹谷珍. 对药典中菟丝子炮制方法商榷 [J]. 时珍国医国药, 2001, 12(2): 177-178.
- [13] 黄继全. 菟丝子炮制工艺探讨 [J]. 江西中医学院学报, 2006, 18(1): 36.
- [14] 张新轩. 菟丝子的药学研究进展 [J]. 海峡药学, 2021, 33(3): 56-59.
- [15] 赵唯年, 潘新波, 赵丽娟, 等. 不同炮制方法对菟丝子醇提物中总黄酮、总多糖及 7 种成分的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(11): 97-103.
- [16] 刘天琪, 江汉美, 田宇, 等. 菟丝子及其炮制品中挥发性成分比较及主成分分析 [J]. 中国药房, 2022, 33(6): 729-734.
- [17] 朱鹏, 苗潇磊, 陈勇. 绿原酸、隐绿原酸和新绿原酸在中性和碱性 pH 条件下的降解动力学 [J]. 药学学报, 2016, 51(1): 122-126.
- [18] 杨青月, 张学兰, 李慧芬, 等. 菟丝子不同炮制品中 3 种黄酮类成分比较 [J]. 中成药, 2011, 33(11): 1945-1948.
- [19] 谢新年, 刘艳芳, 吕鹏, 等. 酒制对菟丝子中槲皮素含量的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 55-57.
- [20] 李秋莉, 刘艳芳, 闫梦晓, 等. 不同工艺炮制酒菟丝子时 4 种主要活性成分动态变化 [J]. 中国药师, 2016, 19(10): 1882-1884.
- [21] 肖岚, 刘塔斯, 杨梓懿, 等. 菟丝子及炮制品高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(8): 1858-1860.

[责任编辑 郑礼胜]