

不同淫羊藿羊脂油烘制品的HPLC指纹图谱建立、多元统计分析 及烘制工艺优化[△]

李园^{1,2*}, 李秀丽³, 王淑², 王信⁴, 曹广尚⁴, 孙萍⁴, 郭功玲^{4#}(1. 山东中医药大学附属医院生殖与遗传中心, 济南 250011; 2. 山东中医药大学第一临床医学院, 济南 250355; 3. 山东中医药大学附属医院推拿科, 济南 250011; 4. 山东中医药大学附属医院药学部, 济南 250011)

中图分类号 R283.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)12-1480-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.12.14

摘要 目的:建立不同淫羊藿羊脂油烘制品的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,并筛选最优烘制工艺。方法:采用HPLC法。以淫羊藿苷为参照,绘制22批样品的HPLC指纹图谱,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》进行相似度评价,确定共有峰。采用SIMCA 14.1统计软件进行聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),以变量投影重要性值大于1为标准,筛选影响淫羊藿羊脂油烘制品质量的差异标志物,并以其为指标经烘制动力学研究筛选烘制工艺。结果:22批样品共有18个共有峰,相似度为0.831~0.991;共指认朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、淫羊藿苷、箭藿苷A、箭藿苷B、宝藿苷I等7个共有峰。22批样品可聚为两类,S19~S22为I类,S1~S18为II类;其中II类又可聚为II a(S15~S18)、II b(S10~S14)、II c(S1~S9)等3类;PCA结果与上述结果一致。OPLS-DA结果显示,淫羊藿苷、箭藿苷B、宝藿苷I为影响淫羊藿羊脂油烘制质量的差异标志物。动力学研究结果显示,淫羊藿苷在180℃烘制25 min或190℃烘制20 min,宝藿苷I在180℃烘制30 min或190℃烘制15 min,箭藿苷B在210℃烘制18 min时含量达到最高,根据上述结果最终确定最优烘制工艺为180℃烘制25~30 min或190℃烘制15~20 min。结论:所建指纹图谱方法稳定、可靠,重复性好,多元统计分析可用于反映淫羊藿在不同烘制条件下化学成分的变化情况及初步筛选烘制工艺。

关键词 淫羊藿;羊脂油烘制;高效液相色谱法;指纹图谱;多元统计分析;烘制工艺优化

Establishment of HPLC Fingerprint, Multivariate Statistical Analysis and Processing Technology of Different Suet Oil-baked *Epimedium brevicornum*

LI Yuan^{1,2}, LI Xiuli³, WANG Shu², WANG Xin⁴, CAO Guangshang⁴, SUN Ping⁴, GUO Gongling⁴(1. Center for Reproduction and Genetics, the Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China; 2. First Clinical Medical College, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 3. Dept. of Massage, the Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China; 4. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250011, China)

学研究进展[J]. 化学研究, 2019, 30(4): 434-440.

- [21] TAN T, LOU Y, ZHONG CC, et al. Comprehensive profiling and characterization of coumarins from roots, stems, leaves, branches, and seeds of *Chimonanthus nitens* Oliv. using ultra-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry combined with modified mass defect filter[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.04.016.
- [22] 黄文平, 温芝琪, 王萌萌, 等. 山腊梅叶中8种成分含量测定及主成分分析[J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(6):

799-803.

- [23] 国家卫生计生委. 食品安全国家标准急性经口毒性试验[S]. 2014-12-24.
- [24] 周勇, 温佳颖, 林琪胜, 等. 千里光超微粉的急性毒性及其镇痛机制研究[J]. *中兽医医药杂志*, 2019, 38(4): 46-49.
- [25] 李亭, 黄诗淇. 急性经口毒性试验方法研究进展[J]. *吉林化工学院学报*, 2019, 36(1): 11-14.
- [26] 黄小秋, 杨其波, 黄小玉, 等. 四数九里香不同提取液的急性毒性试验研究[J]. *中国民族民间医药*, 2017, 26(21): 33-35.
- [27] 岳超, 高杰, 石上梅, 等. HPLC测定地黄炮制前后3种苷类物质的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(4): 71-74.

(收稿日期: 2019-12-19 修回日期: 2020-04-22)

(编辑: 段思怡)

[△] 基金项目: 山东省中医药科技发展计划项目(No. 2017-082)

* 主治医师, 博士研究生。研究方向: 补肾中药在辅助生殖中的干预机制。电话: 0531-68617803。E-mail: liyuan2067@163.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 中药炮制及中药制剂质量控制。电话: 0531-68617919。E-mail: guogongling@163.com

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish HPLC fingerprint of different products of suet oil-baked *Epimedium brevicornum*, and to screen the optimal baking technology. METHODS: HPLC method was adopted. Using icariin as reference, HPLC fingerprints of 22 batches of samples were drawn. The similarity was evaluated by using *Similarity Evaluation System of TCM Chromatographic Fingerprint* (2012 edition), and common peaks were confirmed. HCA, PCA and OPLS-DA analysis were performed by SIMCA 14.1 statistical software. Taking variable importance in the project >1 as criteria, biomarkers affecting the quality difference of suet oil-baked *E. brevicornum* were screened; using mass marker as index, the baking technology was screened by baking technology. RESULTS: There were 18 common peaks in 22 batches of samples. The similarities were between 0.831 and 0.991. Totally 7 common peaks were identified, i.e. epimedin A, epimedin B, epimedin C, icariin, sagittoside A, sagittoside B, baohuoside I. The 22 batches of samples were clustered into two categories, S19-S22 were clustered into category I and S1-S18 were clustered into category II. The category II was sub-clustered into category II a(S15-S18), category II b(S10-S14), category II c(S1-S9); the result of PCA analysis was consistent with above results. OPLS-DA showed that the biomarkers affecting the quality difference were icariin, sagittoside B and baohuoside I. The results of kinetic studies showed that the content of icariin when baked at 180 °C for 25 min or 190 °C for 20 min, that of baohuoside I when baked at 180 °C for 30 min or 190 °C for 15 min and that of epimedin B when baked at 210 °C for 18 min were the highest; according to above results, the optimal baking technology was baking at 180 °C for 25-30 min or 190 °C for 15-20 min. CONCLUSIONS: Established fingerprint is stable, reliable and reproducible. The multivariate statistical analysis can be used for the changes of chemical components in *E. brevicornum* under different baking condition and preliminary selection of baking technology.

KEYWORDS *Epimedium brevicornum*; Suet oil-based; HPLC; Fingerprint; Multivariate statistical analysis; Optimization of baking technology

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿(*Epimedium brevicornum* Maxim.)、箭叶淫羊藿[*Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.]、柔毛淫羊藿(*Epimedium pubescens* Maxim.)或朝鲜淫羊藿(*Epimedium koreanum* Nakai)的干燥叶,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效,临床主要用于治疗肾阳虚衰所致的阳痿遗精、筋骨痿软、风湿痹痛、麻木拘挛,是临床常用中药^[1]。淫羊藿含有黄酮类、多糖类、木脂素类、生物碱类等化学成分,其主要成分淫羊藿总黄酮具有抗骨质疏松、促进生殖内分泌、抗肿瘤等作用^[2]。淫羊藿羊脂油烘制品为淫羊藿的炮制品(又称为炙淫羊藿),其传统炮制方法为每100 kg淫羊藿,加羊脂油(炼油)20 kg,经文火炒至均匀有光泽^[1]。虽然,目前已有相关研究对炙淫羊藿传统炮制工艺进行规范,以淫羊藿苷、宝藿苷 I 等黄酮类成分为评价指标,明确炒制温度、炒制时间等工艺参数^[3-5]。但由于淫羊藿质地轻浮、体积蓬松,在实际炮制中存在翻动、受热不均匀,炒制火力难以控制,火候判断主观性强的问题,加之中药化学成分复杂,仅以单一或几种成分作为评价指标具有局限性,可导致不同厂家、不同批次炙淫羊藿性状、外观差别较大,质量参差不齐,使得其炮制工艺与现代化生产和质量控制要求存在较大差距。

烘制可有效地保证温度均衡,且药材受热均匀、火候易于控制^[6-7]。有学者采用烘制法对蒲黄炭、金银花、荔枝核、杜仲、甘草、红芪等药材进行了炮制研究,获得了各炮制品的具体烘制工艺参数,促进了炮制工艺的规范化^[6-11]。中药指纹图谱能系统、全面地表征中药的内在成分变化^[12],其结合多元统计学分析方法可将信息充分整合,从整体角度筛选炮制工艺参数,目前该方法已

应用于何首乌、姜炭、当归、栀子等饮片的炮制工艺筛选^[13-16]。基于此,本研究建立了不同淫羊藿羊脂油烘制品的高效液相色谱(HPLC)指纹图谱,同时借助聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)、烘制动力学等方法,筛选其最优烘制工艺,旨在为淫羊藿羊脂油烘制工艺的规范化研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪,包括自动进样器、四元泵洗脱系统、柱温箱、二极管阵列检测器、OpenLab C.01.04[35]色谱工作站(美国Agilent公司);AB135-S型十万分之一电子天平、EP214C型万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-250型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);101-E型电热鼓风干燥箱(北京市永明医疗仪器厂)。

1.2 药品与试剂

淫羊藿苷对照品(批号:110807-201306,纯度:≥98%)、宝藿苷 I 对照品(批号:110807-201306,纯度:≥98%)均购自中国食品药品检定研究院;朝藿定 A 对照品(批号:MUST-15010408,纯度:≥98%)、朝藿定 B 对照品(批号:MUST-14062312,纯度:≥98%)、朝藿定 C 对照品(批号:MUST-14022312,纯度:≥98%)均购自成都曼斯特生物技术有限公司;箭藿苷 A 对照品(批号:20140310,纯度:≥98%)、箭藿苷 B 对照品(批号:201403012,纯度:≥98%)均购自宝鸡市辰光生物科技有限公司;羊脂油(河北龙翔油脂有限公司,批号:20190216);乙腈、磷酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯,

水为纯化水。

淫羊藿饮片(批号:1901001,产地:甘肃陇南)购自安国仁德兴饮片有限公司,经山东中医药大学附属医院药学部张学顺教授鉴定为小檗科淫羊藿(*E. brevicornu Maxim.*)的干燥叶。淫羊藿羊脂油烘制品制备方法:取淫羊藿饮片300 g,加羊脂油60 g,拌匀后置于干燥箱中,以不同条件烘制,得22批淫羊藿羊脂油烘制品(编号:S1~S22),其信息见表1。

表1 样品信息

Tab 1 Information of samples

| 编号 | 烘制温度,℃ | 烘制时间,min | 编号 | 烘制温度,℃ | 烘制时间,min |
|--------|--------|----------|-----|--------|----------|
| S1(生品) | | | S12 | 150 | 30 |
| S2 | 90 | 10 | S13 | 180 | 5 |
| S3 | 90 | 20 | S14 | 180 | 10 |
| S4 | 90 | 30 | S15 | 180 | 20 |
| S5 | 120 | 5 | S16 | 180 | 30 |
| S6 | 120 | 10 | S17 | 210 | 5 |
| S7 | 120 | 20 | S18 | 210 | 10 |
| S8 | 120 | 30 | S19 | 210 | 20 |
| S9 | 150 | 5 | S20 | 240 | 5 |
| S10 | 150 | 10 | S21 | 240 | 10 |
| S11 | 150 | 20 | S22 | 240 | 15 |

2 方法与结果

2.1 指纹图谱的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B),梯度洗脱(0~3 min,20%A;3~6 min,20%A→25%A;6~20 min,25%A→30%A;20~25 min,30%A→55%A;25~30 min,55%A→80%A;30~35 min,80%A→20%A);检测波长:280 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;进样量:10 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 分别取淫羊藿苷、宝藿苷I、朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、箭藿苷A、箭藿苷B对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成上述7种成分质量浓度分别为0.101 2、0.099 6、0.100 4、0.100 8、0.101 8、0.100 2、0.099 8 mg/mL的混合对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取样品粉碎,过三号筛,取粉末约0.2 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加50%乙醇50 mL,称定质量,超声(功率:250 W,频率:50 kHz)处理60 min,放冷,再次称定质量,用50%乙醇补足减失的质量,滤过,取续滤液,即得。

2.1.4 精密度试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号:S1)适量,按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定6次,以淫羊藿苷为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,18个共有峰相对保留时间的RSD均小于2%(n=6),相对峰面积的RSD均小于3%(n=6),表明本方法精密度良好。

2.1.5 稳定性试验 取“2.1.3”项下供试品溶液(编号:S1)适量,分别于室温放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以淫羊藿苷为参照,计算各共

有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,18个共有峰相对保留时间的RSD均小于3%(n=6),相对峰面积的RSD均小于5%(n=6),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验 取样品(编号:S1)粉末约0.2 g,共6份,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以淫羊藿苷为参照,计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果,18个共有峰相对保留时间的RSD均小于3%(n=6),相对峰面积的RSD均小于4%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.1.7 HPLC 指纹图谱的生成 取22批样品(编号:S1~S22)适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)》,以S1样品的HPLC图谱为对照图谱(R),对22批样品的HPLC图谱进行分析,得HPLC叠加指纹图谱。其中,叠加指纹图谱见图1,对照指纹图谱见图2。

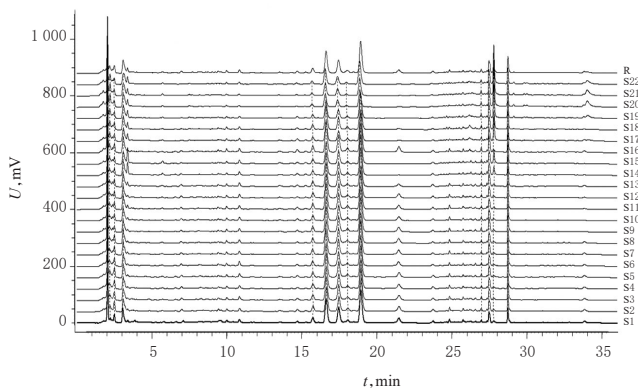


图1 22批淫羊藿羊脂油烘制品的HPLC叠加指纹图谱
Fig 1 HPLC superimposed fingerprints of 22 batches of suet oil-baked *E. brevicornum*

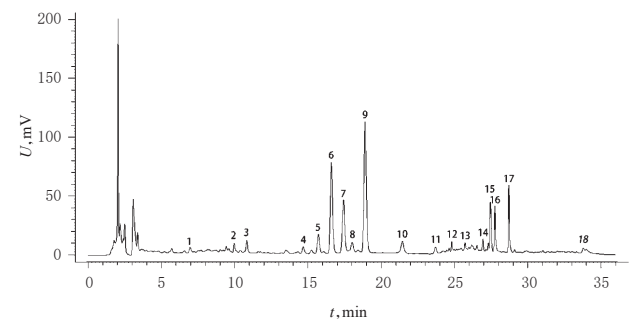
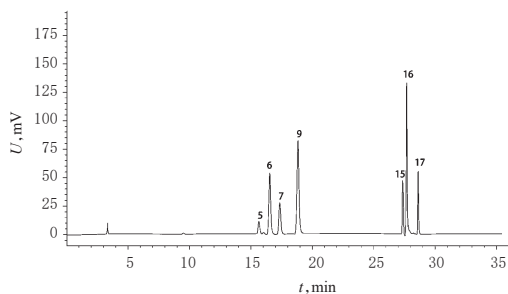


图2 淫羊藿羊脂油烘制品的HPLC对照指纹图谱
Fig 2 HPLC control fingerprint of suet oil-baked *E. brevicornum*

2.1.8 共有峰的指认 22批样品(编号:S1~S22)共有18个共有峰,通过与混合对照品溶液的HPLC图(图3)对比,指认了7个共有峰,分别为5号峰(朝藿定A)、6号峰(朝藿定B)、7号峰(朝藿定C)、9号峰(淫羊藿苷)、15号峰(箭藿苷A)、16号峰(箭藿苷B)、17号峰(宝藿苷I)。由于9号峰峰面积较大且分离度良好,故以其为参



注:5.朝藿定A;6.朝藿定B;7.朝藿定C;9.淫羊藿苷;15.箭藿苷A;
16.箭藿苷B;17.宝藿苷 I

Note: 5. epimedin A; 6. epimedin B; 7. epimedin C; 9. icariin; 15.
sagittoside A; 16. sagittoside B; 17. baohuoside I

图3 混合对照品溶液的HPLC图

Fig 3 HPLC chromatogram of mixed control solution

表2 22批淫羊藿羊脂油烘制品HPLC图谱共有峰的相对保留时间

Tab 2 Relative retention time of common peaks in HPLC chromatograms of 22 batches of suet oil-baked *E. brevicornum*

| 峰号 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | S21 | S22 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.374 | 0.369 | 0.369 | 0.369 | 0.369 | 0.368 | 0.368 | 0.367 | 0.367 | 0.368 | 0.367 | 0.367 | 0.367 | 0.368 | 0.367 | 0.367 | 0.369 | 0.369 | 0.373 | 0.378 | 0.370 | 0.373 |
| 2 | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.527 | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.528 | 0.527 | 0.527 | 0.528 | 0.528 | 0.530 | 0.529 | 0.529 |
| 3 | 0.572 | 0.572 | 0.573 | 0.573 | 0.573 | 0.573 | 0.573 | 0.572 | 0.572 | 0.573 | 0.573 | 0.573 | 0.573 | 0.573 | 0.573 | 0.572 | 0.573 | 0.573 | 0.573 | 0.573 | 0.575 | 0.574 |
| 4 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.777 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.776 | 0.777 | 0.776 | 0.777 | 0.777 | 0.779 | 0.777 |
| 5 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 | 0.831 |
| 6 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 | 0.878 |
| 7 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 | 0.922 |
| 8 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 | 0.953 |
| 9 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 10 | 1.133 | 1.133 | 1.134 | 1.134 | 1.134 | 1.133 | 1.134 | 1.134 | 1.134 | 1.134 | 1.134 | 1.134 | 1.134 | 1.134 | 1.135 | 1.134 | 1.134 | 1.134 | 1.139 | 1.138 | 1.144 | 1.140 |
| 11 | 1.253 | 1.253 | 1.254 | 1.254 | 1.254 | 1.254 | 1.254 | 1.254 | 1.254 | 1.254 | 1.254 | 1.254 | 1.254 | 1.253 | 1.254 | 1.254 | 1.257 | 1.254 | 1.255 | 1.256 | 1.257 | 1.256 |
| 12 | 1.311 | 1.311 | 1.312 | 1.312 | 1.312 | 1.313 | 1.313 | 1.313 | 1.313 | 1.312 | 1.312 | 1.312 | 1.312 | 1.313 | 1.314 | 1.312 | 1.313 | 1.313 | 1.315 | 1.317 | 1.316 | 1.318 |
| 13 | 1.359 | 1.359 | 1.360 | 1.360 | 1.362 | 1.361 | 1.362 | 1.361 | 1.362 | 1.362 | 1.360 | 1.359 | 1.360 | 1.361 | 1.361 | 1.360 | 1.361 | 1.361 | 1.364 | 1.366 | 1.365 | 1.364 |
| 14 | 1.424 | 1.423 | 1.424 | 1.424 | 1.424 | 1.426 | 1.426 | 1.425 | 1.425 | 1.424 | 1.425 | 1.424 | 1.425 | 1.425 | 1.425 | 1.424 | 1.425 | 1.426 | 1.426 | 1.429 | 1.429 | 1.430 |
| 15 | 1.451 | 1.450 | 1.451 | 1.451 | 1.451 | 1.453 | 1.452 | 1.452 | 1.452 | 1.451 | 1.452 | 1.451 | 1.452 | 1.452 | 1.452 | 1.451 | 1.452 | 1.452 | 1.452 | 1.456 | 1.456 | 1.457 |
| 16 | 1.466 | 1.465 | 1.466 | 1.466 | 1.467 | 1.468 | 1.468 | 1.468 | 1.467 | 1.467 | 1.469 | 1.466 | 1.469 | 1.469 | 1.469 | 1.466 | 1.469 | 1.470 | 1.470 | 1.473 | 1.474 | 1.474 |
| 17 | 1.517 | 1.516 | 1.518 | 1.517 | 1.518 | 1.519 | 1.519 | 1.519 | 1.519 | 1.518 | 1.518 | 1.518 | 1.518 | 1.518 | 1.518 | 1.518 | 1.519 | 1.519 | 1.519 | 1.523 | 1.523 | 1.524 |
| 18 | 1.786 | 1.785 | 1.787 | 1.786 | 1.787 | 1.788 | 1.788 | 1.788 | 1.789 | 1.787 | 1.790 | 1.787 | 1.789 | 1.788 | 1.786 | 1.787 | 1.787 | 1.789 | 1.787 | 1.791 | 1.792 | 1.792 |

表3 22批淫羊藿羊脂油烘制品HPLC图谱共有峰的相对峰面积

Tab 3 Relative peak area of common peaks in HPLC chromatograms of 22 batches of suet oil-baked *E. brevicornum*

| 峰号 | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | S21 | S22 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0.035 | 0.053 | 0.049 | 0.047 | 0.049 | 0.047 | 0.051 | 0.042 | 0.046 | 0.033 | 0.041 | 0.033 | 0.037 | 0.040 | 0.006 | 0.006 | 0.007 | 0.008 | 0.018 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | 0.067 | 0.049 | 0.048 | 0.046 | 0.050 | 0.050 | 0.049 | 0.045 | 0.049 | 0.045 | 0.045 | 0.043 | 0.047 | 0.040 | 0.033 | 0.035 | 0.039 | 0.030 | 0.022 | 0.000 | 0.000 | 0.017 |
| 3 | 0.077 | 0.077 | 0.077 | 0.075 | 0.077 | 0.085 | 0.103 | 0.071 | 0.084 | 0.074 | 0.072 | 0.069 | 0.078 | 0.072 | 0.060 | 0.063 | 0.059 | 0.052 | 0.062 | 0.013 | 0.016 | 0.027 |
| 4 | 0.059 | 0.048 | 0.051 | 0.048 | 0.038 | 0.055 | 0.051 | 0.042 | 0.046 | 0.047 | 0.051 | 0.045 | 0.033 | 0.033 | 0.035 | 0.031 | 0.048 | 0.045 | 0.022 | 0.017 | 0.016 | 0.035 |
| 5 | 0.179 | 0.162 | 0.159 | 0.152 | 0.149 | 0.147 | 0.147 | 0.146 | 0.147 | 0.142 | 0.133 | 0.132 | 0.146 | 0.123 | 0.104 | 0.103 | 0.121 | 0.089 | 0.132 | 0.117 | 0.131 | 0.188 |
| 6 | 0.756 | 0.757 | 0.743 | 0.700 | 0.698 | 0.711 | 0.695 | 0.696 | 0.698 | 0.699 | 0.656 | 0.643 | 0.677 | 0.582 | 0.524 | 0.509 | 0.607 | 0.585 | 0.715 | 0.694 | 0.685 | 0.906 |
| 7 | 0.515 | 0.517 | 0.477 | 0.481 | 0.483 | 0.478 | 0.450 | 0.437 | 0.472 | 0.441 | 0.439 | 0.411 | 0.432 | 0.349 | 0.313 | 0.313 | 0.308 | 0.293 | 0.387 | 0.377 | 0.376 | 0.484 |
| 8 | 0.120 | 0.116 | 0.125 | 0.120 | 0.118 | 0.119 | 0.115 | 0.109 | 0.126 | 0.121 | 0.109 | 0.109 | 0.112 | 0.056 | 0.065 | 0.059 | 0.063 | 0.057 | 0.079 | 0.074 | 0.072 | 0.115 |
| 9 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 10 | 0.204 | 0.206 | 0.206 | 0.202 | 0.197 | 0.201 | 0.182 | 0.178 | 0.185 | 0.162 | 0.142 | 0.123 | 0.154 | 0.079 | 0.000 | 0.000 | 0.057 | 0.044 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 11 | 0.053 | 0.057 | 0.055 | 0.050 | 0.056 | 0.053 | 0.048 | 0.046 | 0.043 | 0.045 | 0.042 | 0.039 | 0.047 | 0.048 | 0.033 | 0.033 | 0.029 | 0.017 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 12 | 0.051 | 0.048 | 0.054 | 0.052 | 0.045 | 0.048 | 0.046 | 0.045 | 0.051 | 0.044 | 0.043 | 0.040 | 0.048 | 0.034 | 0.000 | 0.000 | 0.007 | 0.017 | 0.018 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 13 | 0.034 | 0.043 | 0.036 | 0.044 | 0.043 | 0.027 | 0.029 | 0.027 | 0.047 | 0.025 | 0.022 | 0.034 | 0.027 | 0.019 | 0.000 | 0.000 | 0.027 | 0.024 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 14 | 0.051 | 0.038 | 0.042 | 0.040 | 0.038 | 0.039 | 0.036 | 0.035 | 0.036 | 0.046 | 0.041 | 0.028 | 0.035 | 0.035 | 0.030 | 0.033 | 0.038 | 0.041 | 0.090 | 0.086 | 0.075 | 0.092 |
| 15 | 0.195 | 0.216 | 0.217 | 0.218 | 0.209 | 0.036 | 0.036 | 0.031 | 0.201 | 0.228 | 0.186 | 0.151 | 0.198 | 0.190 | 0.165 | 0.177 | 0.202 | 0.215 | 0.492 | 0.460 | 0.464 | 0.508 |
| 16 | 0.035 | 0.037 | 0.036 | 0.035 | 0.034 | 0.036 | 0.036 | 0.028 | 0.036 | 0.039 | 0.033 | 0.034 | 0.036 | 0.038 | 0.109 | 0.159 | 0.239 | 0.227 | 1.156 | 1.003 | 1.222 | 1.129 |
| 17 | 0.198 | 0.223 | 0.238 | 0.240 | 0.225 | 0.220 | 0.230 | 0.208 | 0.212 | 0.240 | 0.206 | 0.171 | 0.221 | 0.218 | 0.202 | 0.218 | 0.216 | 0.207 | 0.342 | 0.333 | 0.332 | 0.419 |
| 18 | 0.062 | 0.059 | 0.060 | 0.050 | 0.064 | 0.064 | 0.058 | 0.052 | 0.056 | 0.007 | 0.000 | 0.003 | 0.004 | 0.006 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.083 | 0.065 | 0.015 | 0.063 |

照,计算其他共有峰的相对保留时间和相对峰面积,结果见表2、表3。

2.1.9 相似度评价 取22批样品(编号:S1~S22)适量,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,以平均数法,设定时间窗宽度为0.10,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012年版)》进行相似度评价。结果,S1~S18样品的相似度为0.981~0.991,表明上述各批样品的化学成分相似;S19~S22样品的相似度为0.831~0.950,表明其化学成分存在差异,提示炮制条件(210℃,20min;240℃,5~15min)对样品的化学成分有显著影响,详见表4。

2.2 HCA分析

以22批样品(编号:S1~S22)的峰面积为变量,采

表4 相似度评价结果

Tab 4 Similarity evaluation results

| 编号 | 相似度 | 编号 | 相似度 | 编号 | 相似度 | 编号 | 相似度 |
|----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|
| S1 | 0.991 | S7 | 0.987 | S13 | 0.981 | S19 | 0.950 |
| S2 | 0.990 | S8 | 0.991 | S14 | 0.984 | S20 | 0.837 |
| S3 | 0.991 | S9 | 0.988 | S15 | 0.982 | S21 | 0.831 |
| S4 | 0.990 | S10 | 0.988 | S16 | 0.991 | S22 | 0.918 |
| S5 | 0.989 | S11 | 0.988 | S17 | 0.983 | | |
| S6 | 0.991 | S12 | 0.990 | S18 | 0.990 | | |

用SIMCA 14.1统计软件进行聚类分析,详见图4。结果,22批样品可聚两类,S19~S22为I类,S1~S18为II类;其中II类又可聚为II a(S15~S18)、II b(S10~S14)、II c(S1~S9)等3类。这提示,经不同条件烘制后样品中的化学成分有所差异。

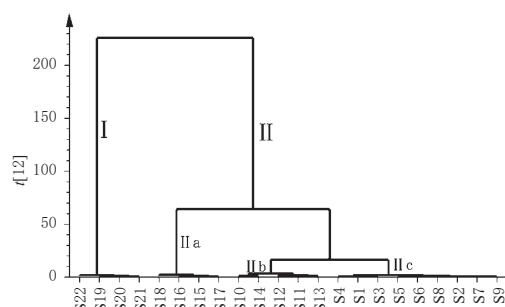


图4 22批淫羊藿羊脂油烘制样品的聚类分析树状图
Fig 4 Cluster analysis dendrogram of 22 batches of suet oil-baked *E. brevicornum*

2.3 PCA分析

以22批样品(编号:S1~S22)的峰面积为变量,采用SIMCA 14.1统计软件进行PCA分析。结果,前两个主成分特征值大于1;主成分1方差贡献率为68.1%,主成分2方差贡献率为15.3%,前2个主成分的累积方差贡献率为83.4%,表明前2个主成分能够客观地反映不同烘制条件与18个共有成分间的内在关系。结果,22批样品可分成4类,S1~S9为A类,S10~S14为B类,S15~S18为C类,S19~S22为D类。A类提示淫羊藿生品在相应烘制条件下化学成分未发生明显变化,可归属为烘制的起始阶段;B、C、D类提示淫羊藿生品在相应烘制条件下化学成分发生变化,详见图5。为了比较不同烘制品(S2~S22)与生品(S1)之间的含量变化,以S2~S22样品相对于S1生品的峰面积比值绘制变化热图,详见图6(颜色越深表示峰面积比值较大,含量越高^[17],☒表示含量不在范围内,超出范围)。结果,C类样品中淫羊藿苷、宝藿苷I含量较高,烘制火候控制较好,烘制条件为180℃,20~30 min或210℃,5~10 min,故以A、C类样品进行OPLS-DA分析。

2.4 OPLS-DA分析

为进一步区分样品,确定影响样品质量的差异标志物,本研究以A、C类样品的峰面积为变量,采用SIMCA 14.1统计软件进行OPLS-DA分析。结果,累积解释能

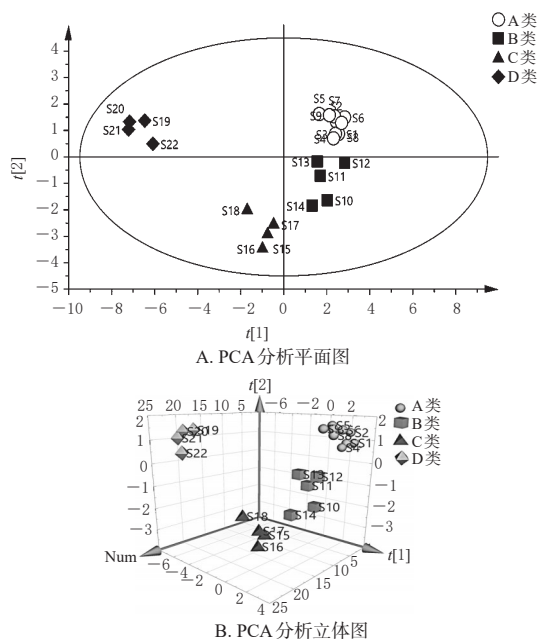


图5 22批淫羊藿羊脂油烘制品的PCA分析图
Fig 5 PCA plot of 22 batches of suet oil-baked *E. brevicornum*

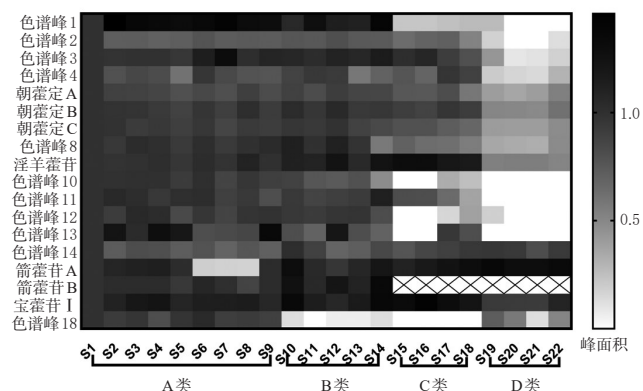
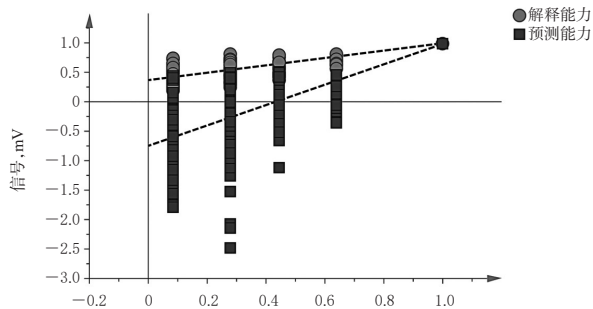


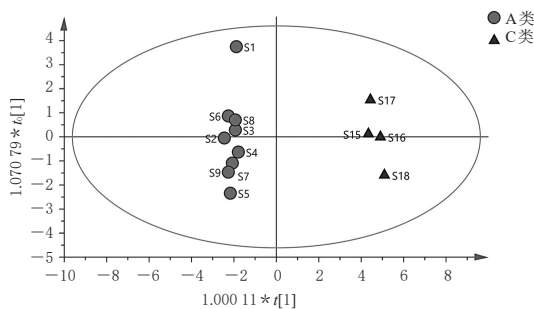
图6 22批淫羊藿羊脂油烘制品中18个共有峰的峰面积变化热图
Fig 6 Heat map of peak area change of 18 common peaks in 22 batches of suet oil-baked *E. brevicornum*

力参数(R^2X 、 R^2Y)分别为0.727、0.994,模型的预测度(Q^2)为0.982,均大于0.5,提示所建模型稳定、预测能力良好^[18],可用于区别淫羊藿与羊脂油炮制品(见图7A)。此外,A、C类样品被很好的区分(图7B),表明这两类样品化学成分含量存在明显差异,烘制过程中化学成分发生显著变化,该结果与PCA分析结果一致。进一步对A、C类样品的差异性进行整体分析,得到变量投影重要性(VIP)值(见图7C,图中深色表示VIP值>1,浅色表示VIP值<1),若VIP值>1,表示该自变量因素对解释因变量具有重要意义^[17],故选取VIP>1的化合物,共得到贡献相对较大的10个变量色谱峰,依次为色谱峰18(VIP值为1.228 34)、色谱峰1(VIP值为1.218 23)、色

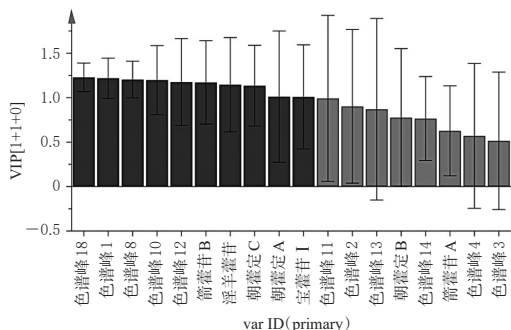
峰8(VIP值为1.203 69)、色谱峰10(VIP值为1.197 19)、色谱峰12(VIP值为1.175 92)、色谱峰16(箭藿苷B, VIP值为1.171 55)、色谱峰9(淫羊藿苷, VIP值为1.146 20)、色谱峰7(朝藿定C, VIP值为1.134 77)、色谱峰5(朝藿定A, VIP值为1.011 67)、色谱峰17(宝藿苷I, VIP值为1.008 68),同时结合各共有峰的载荷图(图7D),确定9号色谱峰(淫羊藿苷)、16号色谱峰(箭藿苷B)、17号色谱峰(宝藿苷I)为影响淫羊藿羊脂油烘制品质量的差异标志物。



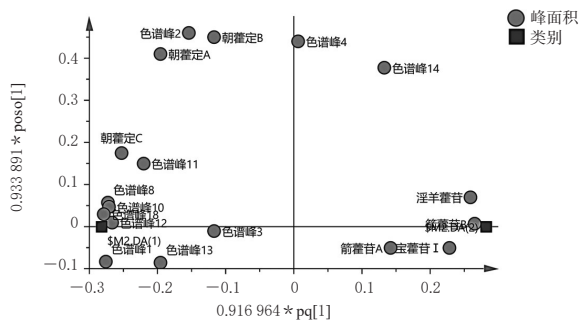
A. OPLS-DA 模型验证图



B. OPLS-DA 模型得分图



C. OPLS-DA 模型中各共有峰的VIP值



D. OPLS-DA 模型中各共有峰的载荷图

图7 OPLS-DA模型分析图

Fig 7 OPLS-DA model analysis

2.5 烘制动力学研究

在多元统计分析的基础上,本研究以淫羊藿生品与淫羊藿羊脂油烘制品中3个质量差异标志物淫羊藿苷、箭藿苷B、宝藿苷I的峰面积比值为指标,采用Graph-Pad Prism 8.0.1软件绘制烘制动力曲线,详见图8。结果,淫羊藿苷、宝藿苷I含量变化趋势一致,即随温度和时间的增加,其含量呈先升高后下降的趋势;淫羊藿苷在180℃烘制25 min或190℃烘制20 min时含量较高;宝藿苷I在180℃烘制30 min或190℃烘制15 min时含量较高;箭藿苷B在180~210℃烘制条件下,随温度和时间的增加,其含量呈上升趋势,且在210℃烘制18 min时含量最高。综合实际生产操作及各成分含量,确定淫羊藿羊脂油烘制的最优烘制工艺为180℃烘制25~30 min或190℃烘制15~20 min(含量以淫羊藿苷、宝藿苷I为主)。

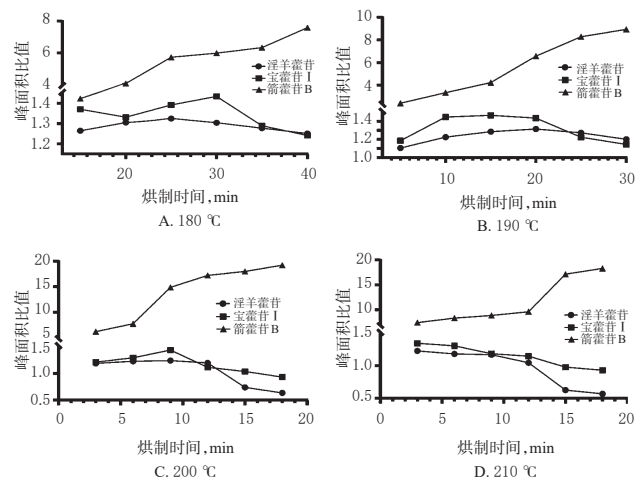


图8 4种温度下淫羊藿苷、宝藿苷I、箭藿苷B含量变化曲线

Fig 8 Change curves of icariin, baohuoside I and sagittatoside B under 4 kinds of temperatures

3 讨论

淫羊藿羊脂油烘制品的传统炮制方法是以文火炒制,但目前对文、武火的界定尚未统一,如2008年版《北京市中药饮片炮制规范》规定药温80~120℃为文火、120~150℃为中火、150~220℃为武火^[19],2012年版《福建省中药饮片炮制规范》规定锅温160~170℃为文火、190~200℃为中火、220~230℃为武火^[20]。另有学者指出,文、武火之分是相对的,温度的高低与所测定的部位、炒制容器加热面积的大小、加药量的多少以及加药前后顺序等有关,文火宜为120~250℃、中火宜为250~350℃、武火宜为350~500℃^[21-22]。本研究在前期预试验中,参考上述相关文献,设定烘制温度90~240℃,以制备淫羊藿羊脂油烘制品。

本研究采用HPLC法建立了22批样品的指纹图谱,

该方法稳定、可靠,重复性好,可用于反映淫羊藿在不同烘制条件下化学成分的变化。有研究报道,淫羊藿不同炮制品的内在成分组成和含量存在明显差异,且烘制过程中淫羊藿苷等化学成分的变化情况也有所不同^[5,23-24]。本研究以指纹图谱得到的18个共有峰的峰面积为指标进行HCA、PCA、OPLS-DA等分析,避免了单一或几种成分所造成的局限性,共筛选出淫羊藿苷、箭藿苷B、宝藿苷I等3种质量差异标志物。以上述3种成分为指标进行炮制动力学考察,最终确定最优烘制工艺为180℃烘制25~30 min或190℃烘制15~20 min,但能否最终代替传统炙法仍需要药效、毒理学研究进一步验证。

综上所述,所建指纹图谱方法稳定、可靠,重复性好,多元统计分析可用于反映淫羊藿在不同烘制条件下化学成分的变化情况及初步筛选烘制工艺。

参考文献

[1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:167,327.

[2] 袁航,曹树萍,陈抒云,等.淫羊藿的化学成分及质量控制研究进展[J].中草药,2014,45(24):3630-3640.

[3] 周一帆,胡昌江,余凌英,等.星点设计-效应面法优选淫羊藿油炙工艺[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(16):16-18.

[4] 高希梅,李飞,周玉新.温度对油炙巫山淫羊藿总黄酮和淫羊藿苷含量的影响[J].北京中医药大学学报,2005,28(3):62-64.

[5] 孙欣光,周茗,马百平,等.淫羊藿和巫山淫羊藿药材经加热处理淫羊藿苷含量变化研究[J].中国中药杂志,2019,44(9):1857-1861.

[6] 李敏洁,方新华,王鑫昱.蒲黄饮片烘法炮制过程及其质量控制的研究[J].中国中医药科技,2018,25(3):362-364,367.

[7] 李越峰,牛江涛,曹瑞,等.正交设计法优选红芪最佳蜜炙烘制工艺[J].北京中医药大学学报,2017,40(2):166-171.

[8] 崔永霞,李会,吴明侠,等.星点设计-效应面法优化金银花炭炮制工艺[J].中国医院药学杂志,2018,38(18):1931-1935.

[9] 刘飞,张林杰,叶燕莹,等. Box-Behnken效应面法优化盐

荔枝核的炮制工艺[J].中药材,2016,39(6):1279-1282.

[10] 周业超.烘制法对杜仲药效成分影响分析[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(93):186-187.

[11] 江觉民,杜薇,王春焰.蜜炙甘草烘法炮制的动力学研究[J].贵阳中医学院学报,1992,14(4):58-60.

[12] 徐妍,杨华蕊,杨永寿,等.中药指纹图谱研究现状及展望[J].世界最新医学信息文摘,2018,18(76):91-94.

[13] 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.

[14] 韩燕全,洪燕,夏伦祝,等.姜炭超高效液相色谱指纹图谱研究[J].安徽中医药大学学报,2016,35(1):86-89.

[15] 严维花,曹虹虹,郭爽,等.当归不同炮制品的UPLC指纹图谱与多成分含量测定研究[J].中国中药杂志,2019,44(12):2499-2510.

[16] 刘婧,黄潇,付小梅,等.栀子炮制过程中颜色及5种成分动态变化[J].中成药,2017,39(11):2350-2355.

[17] 袁学刚,叶羊,赵甲元,等.基于高通量测序分析连翘矾溶液发酵炮制过程中真菌菌群多样性变化[J].中草药,2018,49(18):4259-4268.

[18] 周耀中,杨涛,季雪峰,等.基于UHPLC/MS的冠心病心绞痛血瘀证患者血清代谢组学研究[J].江苏中医药,2018,50(6):25-28.

[19] 北京市药品监督管理局.北京市中药饮片炮制规范[S]. 2008年版.北京:化学工业出版社,2008:2.

[20] 《福建省中药饮片炮制规范》编写组.福建省中药饮片炮制规范[S]. 2012年版.福州:福建科学技术出版社,2012:284.

[21] 吴纯洁.中药炮制共性技术之:“火力火候”的研究思路探讨[J].中国中药杂志,2008,33(15):1926-1928.

[22] 黄春燕,黄勤挽,王建,等.中药炮制“火力”与“火候”研究现状及展望[J].世界科学技术,2006,8(5):73-75,79.

[23] 于向红.淫羊藿饮片指纹图谱的研究及炮制原理初探[D].北京:北京中医药大学,2006.

[24] 朱粉霞,赵永刚,贾晓斌,等.淫羊藿炮制前后UPLC-PDA-MS的指纹图谱研究[J].化学学报,2012,70(5):635-642.

(收稿日期:2020-01-02 修回日期:2020-05-07)

(编辑:陈宏)

《中国药房》杂志——RCCSE 中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅