

基于UPLC指纹图谱与色度值的桑白皮生品和炮制品的鉴别及炮制终点研究^Δ

黄梦婷*,潘 玲,邓李红,谢明晏,马永富,魏 梅,程学仁,徐 杰[#](广东一方制药有限公司/广东省中药配方颗粒企业重点实验室,广东佛山 528244)

中图分类号 R283 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)01-0056-08
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.11

摘 要 目的:为桑白皮生品和其炮制品(蜜桑白皮)的鉴别及蜜桑白皮炮制终点的确定提供参考。方法:采用超高效液相色谱(UPLC)法进行测定。色谱柱为 Waters BEH Shield RP C₁₈;流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱);流速为 0.30 mL/min;柱温为 30 ℃;程序波长为 280 nm(0~4 min)、320 nm(4~35 min)。使用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012 版)分别建立 13 批桑白皮和蜜桑白皮的 UPLC 指纹图谱以及进行相似度评价,并结合对照品图谱对色谱峰进行指认。测定 13 批桑白皮和蜜桑白皮粉末的色度值(L 、 a 、 b)并计算其平均总色度值(E),结合偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)法和聚类分析法分析桑白皮炮制前后指纹图谱和色度值的差异性;同时分析不同炮制时间下蜜桑白皮指纹图谱和色度值的动态变化规律,以确定其炮制终点。结果:桑白皮炮制前后指纹图谱存在明显差异,13 批桑白皮和蜜桑白皮样品的相似度均在 0.9 以上。桑白皮、蜜桑白皮图谱中分别共标定了 21、23 个共有峰,其中峰 1、峰 2 是桑白皮经蜜炙后新产生的化合物;同时,指认了峰 2、峰 7、峰 14、峰 19 分别为 5-羟甲基糠醛、桑皮苷 A、氧化白藜芦醇、桑黄酮 G。OPLS-DA 分析结果显示,峰 1、峰 2、峰 18、峰 20 的峰面积/称样量比值以及色度值(L 、 a 、 b)是影响蜜桑白皮炮制前后差异最主要的因素;以 E 范围 75.84~80.88 作为蜜桑白皮的炮制终点,确定炮制时间为 22~34 min。结论:所建立的 UPLC 指纹图谱和色度值的测定方法可用于桑白皮生品和炮制品的鉴别以及蜜桑白皮炮制终点的确定。
关键词 桑白皮;蜜桑白皮;色度值;超高效液相色谱;指纹图谱;最小偏二乘法判别分析;聚类分析

Identification and Study on Processing End-point of Raw and Processed Products of *Morus alba* Based on UPLC Fingerprint and Chromaticity

HUANG Mengting, PAN Ling, DENG Lihong, XIE Mingyan, MA Yongfu, WEI Mei, CHENG Xueren, XU Jie (Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd./Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Guangdong Foshan 528244, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for the identification and processing end-point determination of raw *Morus alba* and its processed products (honey-processed *M. alba*). METHODS: UPLC method was adopted. The determination was performed on Waters BEH Shield RP C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 0.30 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃. The program wavelengths were set at 280 nm (0-4 min) and 320 nm (4-35 min). *Similarity Evaluation System for Chromatogram Fingerprint of TCM* (2012 edition) was used to establish UPLC fingerprint and carry out similarity evaluation of 13 batches of *M. alba* and honey-processed *M. alba*. The chromatographic peaks were identified with reference substance fingerprint. The colorimetric value (L , a , b) of 13 batches of *M. alba* and honey-processed *M. alba* powder were determined, and average total colorimetric value (E) was calculated. OPLS-DA and cluster analysis were adopted to analyze the differences in fingerprints and colorimetric values of *M. alba* before and after processing. At the same time, the dynamic change rule of fingerprint and colorimetric value of honey-processed *M. alba* at different processing time points were analyzed to determine the processing end-point. RESULTS: There were obvious differences in fingerprints before and after processing, and the similarity of 13 batches of *M. alba* and honey-processed *M. alba* were all higher than 0.9. Totally 21 common peaks were calibrated for *M. alba*, and 23 common peaks for honey-processed *M. alba*; peak 1 and peak 2 were newly produced compounds of honey-processed *M. alba*. Peak 2, peak 7, peak 14 and peak 19 were identified as 5-hydroxymethylfurfural, mulberry glucoside A, oxidized resveratrol, mulberry flavonoids G. Results of OPLS-DA showed that the peak area-sample quantity ratio of peak 1, peak 2, peak 18, peak 20 and the chromaticity values (L , a , b) were the most important factors affecting the difference of raw and processed products of *M. alba*. When the E ranged 75.84-80.88 as the processing end-point of honey-processed *M. alba*, the processing time was determined as 22-34 min. CONCLUSIONS: The established UPLC fingerprint and colorimetric value determination method can be used to identify the raw and processed products of *M. alba* as

^Δ 基金项目:广东省科技计划项目(No.2018B030323004);广东特支计划科技创业领军人才项目(No.2017TY04R197)
* 中药师。研究方向:中药及中药配方颗粒质量标准。电话:0757-85128604。E-mail:1515183125@qq.com
[#] 通信作者:主管中药师,硕士。研究方向:中药及中药配方颗粒质量标准。电话:0757-85128604。E-mail:935394848@qq.com

well as determine the processing end-point of honey-processed *M. alba*.

KEYWORDS *Morus alba*; Honey-processed *Morus alba*; Chromaticity; UPLC; Fingerprint; OPLS-DA; Cluster analysis

桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* L.的干燥根皮,性寒、味甘,归肺经,具有泻肺平喘、利水消肿的功效^[1]。桑白皮的主要化学成分包含黄酮类、酚酸类、生物碱类等,具有降血糖、降血压、利尿等多种药理作用^[2]。2015年版《中国药典》(一部)(后文简称“药典”)收载的桑白皮饮片包括生品(桑白皮)和蜜炙品(蜜桑白皮)^[1]。桑白皮生品性寒,泻肺行水之力较强;用蜜炙法炮制后可减轻其寒泻之性,防止伤肺泻气,同时兼有润肺止咳的功效,适用于肺虚咳嗽^[3]。然而,药典仅在蜜桑白皮饮片鉴别项下作了简单的外观性状描述,并未明确规定蜜桑白皮的炒制时间,亦未规定指标成分的含量检测项,导致市面上蜜桑白皮饮片质量参差不齐,严重影响了其临床用药的安全性和有效性。

外观性状是评价中药材炮制品质量的重要依据之一,不同分析人员对外观颜色的分辨存在较大的主观性^[4]。色度分析是利用国际照明委员会(CIE)色度空间系统对颜色进行客观表达,利用反映色度值的指标(*L*、*a*、*b*值)指示颜色在几何坐标轴中的位置,可用于中药炮制过程中饮片颜色的快速在线检测^[5]。中药指纹图谱是对中药整体性化学特征的表达和反映^[6]。目前,中药指纹图谱结合色度值测定在栀子、党参生品与其炮制品的鉴别、质量评价以及炮制过程控制等方面应用广泛^[7-8]。鉴于此,本研究建立蜜桑白皮炮制前后的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,同时采用测定色度值的方法对蜜桑白皮饮片粉末的颜色进行量化,通过考察不同炒制时间蜜桑白皮饮片指纹图谱和色度值的动态变化,为桑白皮生品和炮制品的鉴别以及蜜桑白皮炮制终点的确定提供理论依据和技术参考。

1 材料

1.1 仪器

H-class 型 UPLC 仪(美国 Waters 公司); Milli-QDirect 型超纯水系统(德国 Merck 股份有限公司); KQ-700DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ME204E 型万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); DHG-9147A 型电热恒温干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); C21-WK2102 型多功能电磁炉(美的集团有限公司)。

1.2 药品与试剂

桑皮苷 A、氧化白藜芦醇对照品(成都普菲德生物科技有限公司,批号:18052901、15112017,纯度均为 98.0%); 5-羟甲基糠醛对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111626-201902,纯度:99.2%); 桑黄酮 G 对照品(四川省维克奇生物科技有限公司,批号:wkq20060105,

纯度:97.0%); 甲醇、乙腈(德国 Merck 股份有限公司,色谱级); 磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,色谱级); 其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

本研究共收集 13 批桑白皮药材,经广东一方制药有限公司魏梅主任药师鉴定均为桑科植物桑 *M. alba* L.的干燥根皮,具体来源信息详见表 1。

表 1 桑白皮药材的来源信息
Tab 1 Origin information of *M. alba*

生品编号	产地	采集时间
S1	云南省曲靖市	2017 年 2 月
S2	云南省曲靖市	2017 年 2 月
S3	广西壮族自治区南宁市	2017 年 5 月
S4	广西壮族自治区南宁市	2017 年 5 月
S5	四川省凉山彝族自治州	2017 年 6 月
S6	四川省凉山彝族自治州	2017 年 6 月
S7	四川省凉山彝族自治州	2017 年 6 月
S8	四川省西昌市	2018 年 3 月
S9	四川省西昌市	2018 年 3 月
S10	四川省西昌市	2018 年 3 月
S11	四川省西昌市	2018 年 3 月
S12	四川省南充市	2017 年 5 月
S13	广西壮族自治区来宾市	2018 年 1 月

2 方法与结果

2.1 蜜桑白皮样品的制备

分别取编号为 S1~S13 的桑白皮药材,按照 2015 年版《中国药典》(四部)通则 0213 蜜炙法^[9]制备蜜桑白皮饮片,对应的饮片编号依次为 M1~M13。

2.2 桑白皮和蜜桑白皮 UPLC 指纹图谱的建立及分析

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Waters BEH Shield RP C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~2 min, 2% A; 2~12 min, 2% A→20% A; 12~14 min, 20% A→30% A; 14~18 min, 30% A→48% A; 18~22 min, 48% A→53% A; 22~27 min, 53% A→60% A; 27~30 min, 60% A→87% A; 30~30.01 min, 87% A→2% A; 30.01~35 min, 2% A); 流速: 0.30 mL/min; 柱温: 30 ℃; 程序检测波长: 280 nm(0~4 min)、320 nm(4~35 min); 进样量: 1 μL。

2.2.2 混合对照品溶液和阴性对照溶液的制备 分别精密称取 5-羟甲基糠醛、桑皮苷 A、氧化白藜芦醇、桑黄酮 G 对照品各适量,置于同一量瓶中,加甲醇溶解制成质量浓度分别为 75.392 0、63.994 0、129.203 2、78.919 2 μg/mL 的混合对照品溶液。另取甲醇溶液,作为阴性对照溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取桑白皮、蜜桑白皮粉末(过三号筛,下同)各 0.5 g,分别置于具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,称定质量,加热回流 30 min; 取

出,放冷,再称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,用0.22 μm的微孔滤膜滤过,收集续滤液,即得。

2.2.4 精密度试验 取蜜桑白皮(编号:M14)粉末适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.2.1”项下色谱条件连续进样6次,记录色谱图。以桑皮苷A的色谱峰作为参照峰(S),计算得到各特征峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性考察 取蜜桑白皮(编号:M14)粉末适量,共6份,分别按“2.2.3”项下方法平行制备供试品溶液后,然后按“2.2.1”项下色谱条件测定,记录色谱图。以桑皮苷A的色谱峰作为参照峰(S),计算得到各特征峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%(n=6),表明该方法重复性较好。

2.2.6 稳定性考察 取蜜桑白皮(编号:M14)粉末适量,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置0、2、4、8、12、24 h时,然后按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以桑皮苷A的色谱峰作为参照峰(S),计算得到各特征峰相对保留时间和相对峰面积的RSD均小于3.0%(n=6),表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

2.2.7 桑白皮与蜜桑白皮UPLC指纹图谱的建立及共有峰的确定 取13批桑白皮和蜜桑白皮粉末适量,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.2.1”项下色

谱条件进行测定,记录色谱图和各特征峰的“峰面积/称样量比值”。分别将13批桑白皮和蜜桑白皮的色谱图导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)中,分别以编号为S1的桑白皮和编号为M1的蜜桑白皮的图谱作为参照图谱,进行共有峰匹配,设置时间窗宽度为0.1 min,采用中位数法结合多点校正分别生成桑白皮对照图谱R和蜜桑白皮对照图谱MR,并进行各样本色谱图与各自对照图谱的相似度评价。结果显示,13批桑白皮和蜜桑白皮的UPLC指纹图谱中分别共标定了21、23个共有峰。13批桑白皮与其对照图谱R的相似度依次为0.993、0.989、0.933、0.996、0.999、0.984、0.998、0.993、0.998、0.994、0.998、0.997、0.997,13批蜜桑白皮与其对照图谱MR的相似度依次为0.992、0.998、0.906、0.995、0.998、0.985、0.996、0.998、0.994、0.993、0.999、0.991、0.998,相似度均在0.9以上,符合指纹图谱的研究要求。13批桑白皮和蜜桑白皮的共有峰的峰面积/称样量比值见表2,UPLC指纹图谱叠加图见图1。

2.2.8 色谱峰的指认 分别吸取“2.2.2”项下制备的混合对照品溶液和阴性对照溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图,并分别与桑白皮对照图谱R和蜜桑白皮对照图谱MR进行比对,进行色谱峰的指认,结果见图2。结果,共指认了其中4个色谱峰,分别为峰2(5-羟甲基糠醛)、峰7(桑皮苷A)、峰14(氧化白藜芦醇)、峰19(桑黄酮G)。

表2 13批桑白皮和蜜桑白皮共有峰的峰面积/称样量比值

Tab 2	Peak area-sample quantity ratio of common peaks of 13 batches of <i>M. alba</i> and honey-processed <i>M. alba</i>																							
样品	编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13	峰14	峰15	峰16	峰17	峰18	峰19	峰20	峰21	峰22	峰23
桑白皮	S1	0	0	24 141	24 471	44 694	190 571	6 190 386	26 999	13103	13 373	47 074	38 302	5 990	8 697	8 860	14 204	21 044	15 457	38 608	25 147	88 707	15 674	7 220
桑白皮	S2	0	0	22 378	17 801	36 112	136 982	4 462 807	16 201	9 450	11 568	35 570	40 110	4 996	12 275	5 082	16 825	23 908	19 084	51 359	36 430	154 841	24 038	9 034
桑白皮	S3	0	0	110 410	129 089	91 851	294 206	5 250 472	233 957	24 587	32 226	1 517 954	448 340	115 019	3 393 903	518 563	26 256	28 667	52 279	688 147	49 271	154 176	372 495	41 893
桑白皮	S4	0	0	45 929	71 579	67 032	223 199	5 161 185	224 492	23 817	22 972	256 429	133 050	184 119	197 806	153 685	1 411	4 666	10 324	75 967	1 645	9 083	18 889	11 493
桑白皮	S5	0	0	23 284	53 554	67 747	176 822	5 361 297	208 834	33 686	29 747	394 043	271 205	139 723	97 296	169 008	10 781	6 952	14 401	53 359	7 661	40 897	15 585	11 130
桑白皮	S6	0	0	24 700	49 578	44 671	167 955	3 479 887	81 304	18 067	18 839	138 889	229 586	71 051	122 514	90 161	32 976	61 853	40 981	138 391	71 079	102 299	18 077	35 037
桑白皮	S7	0	0	16 485	59 653	80 471	289 434	6 434 804	246 429	32 331	36 764	355 294	267 817	175 174	138 901	169 025	6 544	7 051	10 764	104 672	3 394	31 141	12 369	34 955
桑白皮	S8	0	0	13 681	24 224	34 566	175 352	4 662 386	23 976	21 506	18 667	62 987	102 575	26 912	72 840	52 022	9 068	10 684	11 934	51 319	4 334	13 752	8 253	4 609
桑白皮	S9	0	0	26 107	87 201	89 679	380 990	13 362 385	130 791	56 754	55 328	63 116	74 140	10 307	53 776	11 144	39 681	59 195	50 379	170 984	60 317	69 992	35 533	26 015
桑白皮	S10	0	0	33 467	84 740	65 833	427 448	12 274 742	185 647	56 679	64 448	106 531	70 002	9 486	45 178	21 457	27 122	29 388	36 747	185 915	49 367	102 994	30 382	54 584
桑白皮	S11	0	0	23 481	40 006	52 693	289 964	6 911 432	158 180	22 890	28 695	178 425	159 865	35 746	584 119	76 537	15 224	15 527	16 789	174 264	12 557	13 286	24 222	13 109
桑白皮	S12	0	0	28 250	127 459	113 384	271 271	6 747 737	358 517	37 170	38 818	550 374	301 034	187 111	1 039 186	450 976	6 127	8 549	17 077	114 919	13 786	18 057	63 061	18 901
桑白皮	S13	0	0	75 003	66 328	78 367	250 891	8 939 230	46 885	24 923	22 936	75 192	44 834	23 889	8 972	6 618	7 368	7 084	11 995	217 685	10 364	21 942	101 607	10 465
蜜桑白皮	M1	303 657	1 012 010	13 899	27 132	35 773	150 099	3 664 255	27 545	8 512	8 270	49 424	39 555	12 855	11 555	21 551	10 703	14 344	1 045	28 049	8 125	70 141	7 473	4 102
蜜桑白皮	M2	330 083	1 158 609	19 727	32 512	53 899	263 253	7 329 799	31 371	15 873	15 547	73 234	76 869	17 386	25 382	36 033	18 558	11 633	2 114	25 153	5 203	63 185	7 545	3 991
蜜桑白皮	M3	240 925	852 220	77 389	99 808	72 014	253 948	4 760 435	281 242	19 369	26 014	1 468 312	425 847	125 075	2 087 893	530 240	147 786	15 875	5 857	407 421	31 625	98 661	235 181	27 111
蜜桑白皮	M4	324 365	853 335	43 215	69 780	59 966	194 511	3 669 139	194 426	18 094	16 938	176 849	110 366	162 251	110 913	139 341	124 410	3 620	19 602	65 960	3 068	27 286	17 858	28 205
蜜桑白皮	M5	308 287	959 890	13 262	44 330	59 273	175 272	4 763 355	188 942	26 545	26 559	385 479	200 610	112 293	102 353	181 702	38 440	6 155	9 645	50 602	5 828	32 608	8 643	14 409
蜜桑白皮	M6	296 932	1 425 806	13 537	46 707	43 529	190 578	4 164 468	84 403	20 053	20 702	124 502	106 684	51 805	79 337	63 535	16 751	22 334	1 866	72 436	12 894	32 227	8 722	14 705
蜜桑白皮	M7	224 290	1 130 301	13 497	48 727	55 223	205 534	4 837 560	195 034	24 353	25 987	332 541	230 189	172 936	125 137	183 543	66 385	4 859	20 010	66 524	5 054	10 953	22 555	17 176
蜜桑白皮	M8	282 212	861 500	10 333	31 112	46 529	217 278	5 268 609	17 100	22 920	22 492	44 710	62 866	14 127	38 355	18 006	5 029	6 291	3 641	18 095	1 766	5 497	2 704	2 854
蜜桑白皮	M9	222 375	1 015 142	14 571	60 735	88 153	399 804	12 594 430	54 751	52 377	51 219	69 546	66 305	6 523	70 438	11 901	3 084	27 907	5 952	67 952	16 549	33 566	15 669	11 039
蜜桑白皮	M10	147 568	644 301	14 385	65 879	72 669	427 385	9 802 611	201 867	42 877	44 612	151 283	72 707	20 465	61 797	54 778	29 537	8 310	4 311	49 926	3 505	16 593	12 296	7 004
蜜桑白皮	M11	268 437	1 017 291	13 153	47 942	51 828	258 845	5 519 941	105 795	26 136	23 288	103 452	155 466	30 509	204 193	64 171	25 686	12 515	9 770	59 335	20 335	29 455	9 849	13 931
蜜桑白皮	M12	179 928	605 805	12 523	113 946	112 605	250 100	5 583 817	121 970	36 963	39 405	472 503	286 651	113 298	742 428	524 231	204 921	6 689	32 141	85 883	7 114	12 905	31 208	14 245
蜜桑白皮	M13	373 453	1 613 160	54 961	58 823	98 319	310 065	8 530 801	96 963	29 497	27 952	120 563	98 535	33 114	51 588	23 762	15 972	5 037	4 087	106 775	1 310	11 655	43 124	6 551

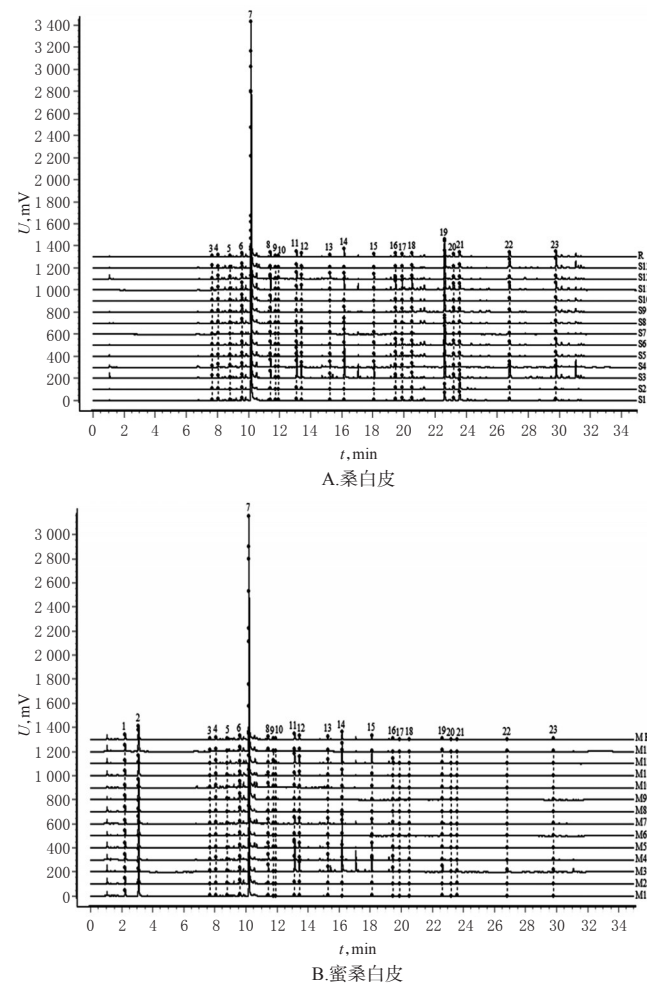
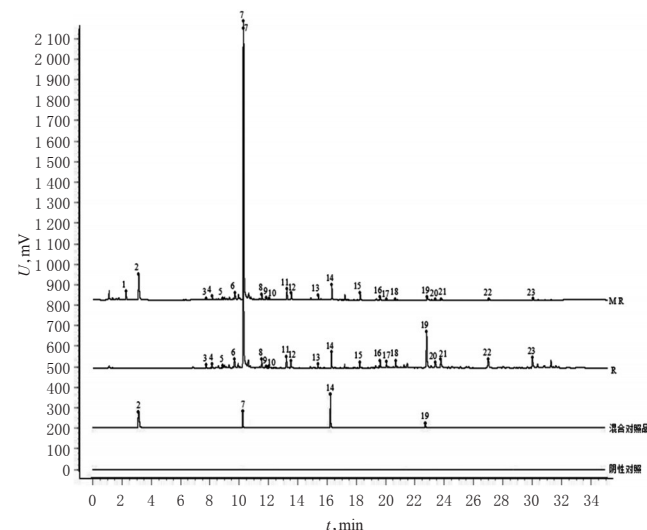


图1 13批桑白皮和蜜桑白皮的UPLC指纹图谱叠加图
Fig 1 Overlapped UPLC fingerprint of 13 batches of *M. alba* and honey-processed *M. alba*



注: 2. 5-羟甲基糠醛; 7. 桑皮苷 A; 14. 氧化白藜芦醇; 19. 桑黄酮 G
Note: 2. 5-hydroxymethylfurfural; 7. mulberry glucoside A; 14. oxidized resveratrol; 19. mulberry flavonoids G

图2 桑白皮及蜜桑白皮共有峰的指认
Fig 2 Identification of common peak of *M. alba* and honey-processed *M. alba*

2.3 桑白皮和蜜桑白皮色度值测定

分别取13批桑白皮和蜜桑白皮粉末,每份约2 g,压制厚度约为1 mm左右的薄片,以国际照明委员会认可的D65光源作为光源^[6],以白色作为背景,对粉末图像进行色彩采集,并进行肉眼观察,采集样本见图3。然后,将采集好的图像导入Adobe Photoshop 6.0软件中,颜色模型选择“Lab型”,直接读取13批桑白皮和蜜桑白皮的色度值(L 、 a 、 b 值),并计算平均总色度值(E)。色彩系统中 L 代表明亮度, L 越大则明亮度越大,反之则明亮度越小; a 代表红绿色度, $+a$ 为红色方向,反之则为绿色方向, $+a$ 值越大则颜色越红,反之则颜色越绿; b 代表黄蓝色度, $+b$ 为黄色方向,反之则为蓝色方向, $+b$ 值越大则颜色越黄,反之则颜色越蓝; E 为颜色的平均总色度值, $E=(L^2+a^2+b^2)^{1/2}$ ^[10]。平行3次测定,取平均值。采用SPSS 20.0统计软件对13批桑白皮和蜜桑白皮的色度值(L 、 a 、 b 、 E)进行单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。13批桑白皮和蜜桑白皮的色度值测定结果见表3。

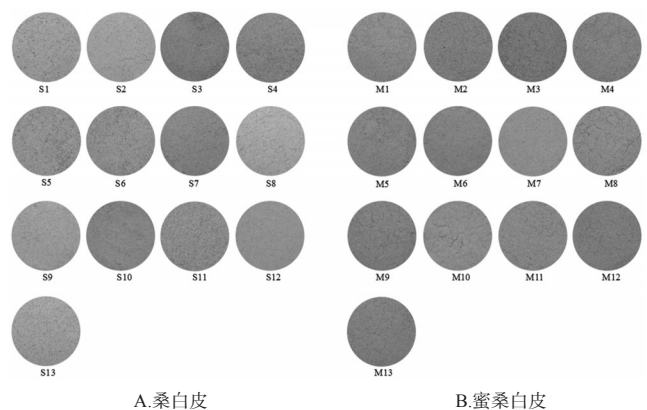


图3 13批桑白皮和蜜桑白皮饮片粉末的色彩采集图
Fig 3 Color collection map of decoction piece powder of 13 batches of *M. alba* and honey-processed *M. alba*

结果显示,若单纯凭借肉眼看,并不能以粉末外观颜色很好地区分桑白皮生品和炮制品。但根据建立的色度值评价法,通过 L 、 a 、 b 值计算出总平均色度值 E 后能客观地将两者区分开来。除部分批次样品(编号为S5、S6、S9、S13)外,桑白皮生品的 E 值均显著高于对应批次的蜜桑白皮($P<0.05$)。因此,本研究建立的色度值评价方法是鉴别桑白皮生品与炮制品的有效手段。

2.4 桑白皮和蜜桑白皮差异标志物分析

采用偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)法对桑白皮炮制前后的差异标记物进行分析。分别将13批桑白皮和蜜桑白皮样品各色谱峰的峰面积/称样量比值及色度值(L 、 a 、 b)导入SIMCA 14.0软件中,得到的模型见图4、图5。由OPLS-DA得分图可知,13批桑白皮和蜜桑白皮呈现出明显的分类聚集现象。根据模型中变量权重的重要性(VIP)预测值来筛选具有统计学意义的差异标志

表3 13批桑白皮和蜜桑白皮的色度值测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Chromaticity values of 13 batches of *M. alba* and honey-processed *M. alba* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品编号	L		a		b		E	
	桑白皮	蜜桑白皮	桑白皮	蜜桑白皮	桑白皮	蜜桑白皮	桑白皮	蜜桑白皮
S1/M1	75.67±2.31	65.00±3.61 [*]	7.00±0.00	8.00±1.00	22.33±0.58	25.00±1.73 [*]	79.21±2.30	70.14±2.82 [*]
S2/M2	79.00±1.73	64.33±4.51 [*]	5.67±0.58	5.67±1.53	14.67±0.58	19.33±1.15 [*]	80.55±1.71	67.44±4.29 [*]
S3/M3	64.67±1.15	73.00±4.00 [*]	8.67±1.53	6.33±1.15 [*]	21.33±1.15	22.67±1.15	68.66±1.12	76.73±3.51 [*]
S4/M4	66.33±4.51	76.33±1.53 [*]	10.00±2.00	6.33±0.58 [*]	23.00±2.65	23.67±1.15	71.02±3.15	80.18±1.20 [*]
S5/M5	66.00±2.00	70.33±1.15	12.00±2.65	7.33±0.58 [*]	26.33±1.53	24.00±1.00 [*]	72.12±1.59	74.68±0.76
S6/M6	75.00±1.00	69.00±6.08 [*]	6.67±2.08	7.67±0.58	14.33±0.58	23.67±0.58 [*]	76.67±0.80	73.37±5.79
S7/M7	74.67±1.15	66.00±2.65 [*]	5.33±1.15	6.67±1.15	14.67±0.58	23.67±1.15 [*]	76.29±1.06	70.44±2.82 [*]
S8/M8	73.67±1.15	63.33±4.04 [*]	8.67±1.15	8.33±0.58	21.67±0.58	25.67±0.58 [*]	77.28±1.32	68.87±3.48 [*]
S9/M9	62.67±1.53	65.33±3.06	12.33±1.53	9.33±0.58 [*]	31.00±1.73	28.67±0.58 [*]	71.02±1.16	71.97±2.62
S10/M10	69.67±1.15	64.33±2.08 [*]	10.00±0.00	6.67±0.58 [*]	27.00±1.00	23.33±0.58 [*]	75.39±0.78	68.77±1.71 [*]
S11/M11	70.67±2.08	65.33±2.52 [*]	9.67±1.15	7.67±0.58 [*]	25.00±1.00	26.00±1.00	75.59±2.10	70.75±2.14 [*]
S12/M12	62.00±1.73	68.67±2.89 [*]	9.00±1.00	6.67±0.58 [*]	21.33±0.58	24.00±1.00 [*]	66.19±1.70	73.05±2.69 [*]
S13/M13	71.00±1.00	71.33±1.53	8.00±1.00	6.00±1.00 [*]	19.67±0.58	24.67±0.58 [*]	74.11±1.03	75.72±1.47

注:与桑白皮比较, **P*<0.05

Note:vs. *M. alba*, **P*<0.05

物;在95%置信区间的前提下,选出VIP>1.0的因素作为差异性标志物^[11]。其中,峰1的峰面积/称样量比值、峰2(5-羟甲基糠醛)的峰面积/称样量比值、*L*值、*a*值、*b*值、峰18的峰面积/称样量比值、峰20的峰面积/称样量比值的VIP值分别为1.805、1.776、1.581、1.498、1.368、1.134、1.081,均大于1。因此,上述因素是导致桑白皮与蜜桑白皮差异最主要的因素。

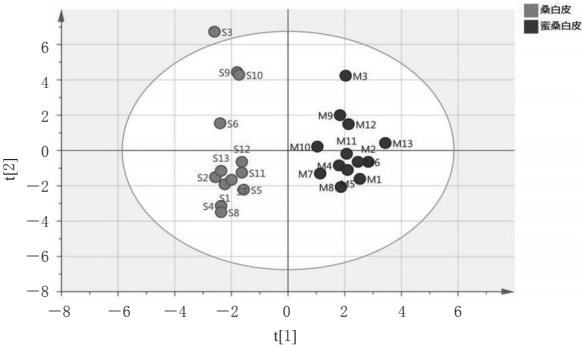


图4 桑白皮和蜜桑白皮的OPLS-DA得分图

Fig 4 OPLS-DA score diagram of *M. alba* and honey-processed *M. alba*

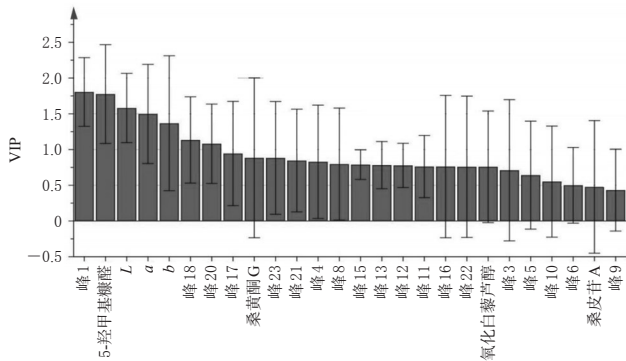


图5 桑白皮和蜜桑白皮各指标的VIP值

Fig 5 VIP of indicators of *M. alba* and honey-processed *M. alba*

2.5 13批桑白皮和蜜桑白皮的聚类分析

将OPLS-DA分析得到的VIP值大于1的各项指标数据导入SPSS 20.0软件中进行聚类分析,聚类方法选择Ward法,测量区间选择平方Euclidean距离,得到聚类结果见图6。结果显示,桑白皮聚为一类,蜜桑白皮聚为另一类,该结果与OPLS-DA分析所得的结果一致,表明峰1、峰2(5-羟甲基糠醛)、峰18、峰20的峰面积/称样量比值以及色度值(*L*、*a*、*b*)均可以作为区分桑白皮与蜜桑白皮的关键指标。

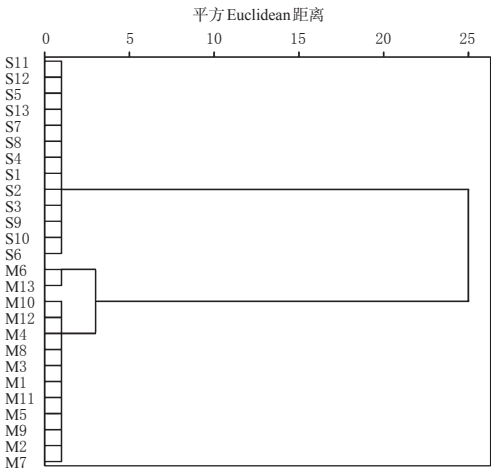


图6 13批桑白皮和蜜桑白皮的聚类图

Fig 6 Cluster analysis diagram of 13 batches of *M. alba* and honey-processed *M. alba*

2.6 蜜桑白皮炮制过程中UPLC指纹图谱和色度值的动态变化考察

2.6.1 蜜桑白皮饮片的炮制和取样 取桑白皮饮片,按100 g饮片:25 g炼蜜的比例加入相当于0.75倍炼蜜质量的水稀释的炼蜜,拌匀后闷润至饮片完全润透。当入锅温度为100 ℃左右时,投入编号为S1的桑白皮饮片,开始计时,在炒制10 min时开始取样,之后每隔3 min取样

1次,共计得到15个时间点的炮制样品(共炮制52 min),分别记为MSBP1~MSBP15,同时记录出锅温度。平行操作3次。蜜桑白皮炮制过程工艺参数见表4。

表4 蜜桑白皮炮制过程工艺参数

Tab 4 Process technology parameters of honey-processed *M. alba*

样品编号	工艺序号	炮制时间,min	出锅温度($\bar{x}\pm s,n=3$),℃
MSBP1	1	10	83±2.31
MSBP2	2	13	94±2.00
MSBP3	3	16	104±1.73
MSBP4	4	19	109±3.79
MSBP5	5	22	117±6.81
MSBP6	6	25	113±6.66
MSBP7	7	28	120±3.79
MSBP8	8	31	125±3.21
MSBP9	9	34	127±6.56
MSBP10	10	37	140±2.08
MSBP11	11	40	139±1.53
MSBP12	12	43	154±2.08
MSBP13	13	46	154±3.46
MSBP14	14	49	156±3.61
MSBP15	15	52	156±7.00

2.6.2 不同炮制时间蜜桑白皮样品的UPLC指纹图谱采集 取不同炮制时间的15批蜜桑白皮粉末,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,然后按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图并计算各特征峰的峰面积/称样量比值,结果见表5。将所有图谱导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2012版)中,以样品编号为MSBP1的蜜桑白皮饮片粉末的图谱为参照图谱,进行共有峰匹配,设置时间窗宽度为0.1 min,采用中位数法结合多点校正生成蜜桑白皮对照图谱R,并进行各样品色谱图与对照图谱的相似度评价,不同炮制时间蜜桑白皮饮片的UPLC指纹图谱叠加图见图7。表5结果显示,随着炮制时间的延长,峰1的峰面积/称样量比值呈现出先增大后

减小的趋势;与炮制10 min的样品相比,炮制34 min后峰1的峰面积/称样量比值增大了3.54倍;继续延长炮制时间至52 min,峰1的峰面积/称样量比值减小了1.15倍。峰2(5-羟甲基糠醛)的峰面积/称样量比值在炮制10~43 min内一直增大。峰3、峰18、峰20的峰面积/称样量比值总体呈现随炮制时间延长而逐渐下降的趋势。峰7的峰面积/称样量比值在炒制10~19 min内基本不变;炒制19 min之后,该比值开始逐渐下降;炒制34~37 min内,该比值下降较为明显。不同炮制时间的蜜桑白皮(MSBP1~MSBP15)与其对照图谱R的相似度依次为0.932、0.942、0.950、0.951、0.989、0.991、0.999、0.999、0.991、0.972、0.960、0.956、0.978、0.991、0.916,均在0.9以上,符合指纹图谱的研究要求。

2.6.3 不同炮制时间蜜桑白皮样品粉末的色度值测定 取编号为MSBP1~MSBP15的样品,按“2.3”项下方法对15批蜜桑白皮饮片粉末样品的色度值进行测定,根据公计算各样品的平均总色度值 E_{MSBP} ,绘制炮制时间-色度值变化趋势图,详见图8、图9。结果显示,随着炮制时间的延长,蜜桑白皮粉末的颜色逐渐加深;编号为MSBP1~MSBP4的样品偏黄白色,编号为MSBP11~MSBP15的样品偏棕色至深棕色,均不符合药典对蜜桑白皮的性状要求。编号为MSBP5~MSBP10的样品(即炮制22~37 min者)处在深黄色至棕黄色之间,符合药典中蜜桑白皮饮片鉴别项下要求。色度值的动态变化结果显示, E_{MSBP} 在炮制10~22 min内基本不变,在炮制22~28 min内呈现下降趋势,在炮制28~37 min内保持稳定,之后随炮制时间的延长而逐渐下降。由此可见, E_{MSBP} 的变化基本可以直观反映蜜桑白皮整个炮制过程中颜色的变化规律:炮制10~22 min内,饮片粉末颜色变化不大,呈现黄白色, E_{MSBP} 在80.88~83.76之间;炮制

表5 不同炮制时间蜜桑白皮共有峰的峰面积/称样量比值

Tab 5 Peak area-sample quantity ratio of common peak in the fingerprint of honey-processed *M. alba* after different processing time

样品编号	炮制时间,min	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8	峰9	峰10	峰11	峰12	峰13	峰14	峰15	峰16	峰17	峰18	峰19	峰20	峰21	峰22	峰23
MSBP1	10	113 664	377 820	20 658	29 687	54 444	208 474	4 958 104	71 296	21 983	19 956	169 521	145 532	46 231	78 153	70 561	36 854	8 470	4 119	64 105	8 139	42 433	10 571	13 792
MSBP2	13	146 463	515 210	12 694	26 217	53 201	205 396	4 932 844	37 368	21 005	18 791	77 396	80 841	28 383	82 634	42 934	19 426	9 077	10 060	59 688	20 250	33 549	11 882	10 316
MSBP3	16	225 781	625 525	16 783	30 165	50 571	185 983	4 882 128	43 073	20 982	19 346	114 036	111 914	32 540	151 811	132 042	23 552	8 628	4 538	60 280	16 875	29 604	20 199	9 459
MSBP4	19	217 928	677 918	13 048	30 805	63 980	225 963	5 124 388	53 226	22 370	19 770	92 645	84 759	37 728	57 127	49 139	36 002	6 516	5 517	38 784	9 480	18 576	9 635	7 795
MSBP5	22	397 774	1 328 448	11 379	25 995	51 552	194 389	4 359 175	26 629	18 396	17 075	79 159	121 187	30 297	60 564	65 784	22 136	9 253	4 646	45 977	6 242	23 455	6 812	9 253
MSBP6	25	473 526	1 492 970	9 520	25 341	55 747	196 382	4 629 299	20 940	18 944	18 100	70 789	127 410	26 237	103 520	66 100	17 892	6 116	8 753	39 030	2 092	10 956	5 124	4 809
MSBP7	28	466 343	1 825 504	10 893	20 673	56 429	180 899	3 873 827	39 823	15 163	14 825	97 450	79 444	40 238	58 508	107 734	33 351	6 389	1 542	43 974	7 494	16 444	13 698	6 851
MSBP8	31	495 508	1 831 360	10 507	17 765	53 860	175 147	4 201 810	36 621	17 278	16 316	74 319	57 047	26 089	40 826	28 510	12 596	6 483	2 283	39 314	7 804	12 693	6 757	11 841
MSBP9	34	515 734	2 831 916	8 961	26 154	67 677	211 400	4 327 968	34 098	17 646	18 169	111 193	173 514	33 559	86 909	81 383	22 834	5 272	1 861	33 638	5 017	7 859	6 968	6 073
MSBP10	37	508 800	3 252 685	7 697	23 998	55 778	190 074	4 008 234	39 461	15 772	16 854	96 152	128 271	27 477	52 982	46 301	18 770	5 012	5 754	29 447	3 529	6 166	6 058	4 461
MSBP11	40	460 609	3 314 359	8 232	33 037	57 302	182 121	3 706 434	37 043	14 607	16 024	133 504	162 531	34 977	108 555	99 257	48 630	4 735	4 666	32 085	4 971	8 614	7 556	7 126
MSBP12	43	455 754	3 546 818	7 310	34 074	55 404	178 517	3 873 194	53 663	14 431	16 162	95 437	139 043	27 682	68 870	73 285	16 245	4 657	2 727	24 774	2 950	4 712	3 909	2 609
MSBP13	46	370 855	2 940 275	6 469	22 604	61 236	175 109	3 813 986	29 805	15 011	17 069	110 696	122 150	35 561	33 256	59 324	30 140	3 503	3 797	18 818	2 871	7 302	3 141	1 974
MSBP14	49	288 773	2 418 263	5 838	27 018	65 110	181 729	3 748 422	64 222	14 848	17 369	199 412	187 325	58 999	80 195	109 404	34 045	5 826	3 159	35 862	4 499	5 700	4 238	15 417
MSBP15	52	239 816	3 004 294	3 979	15 578	45 588	110 391	2 596 637	26 262	9 026	11 883	138 747	157 864	30 111	52 954	48 834	18 087	2 446	4 400	15 017	2 839	4 080	2 624	2 075

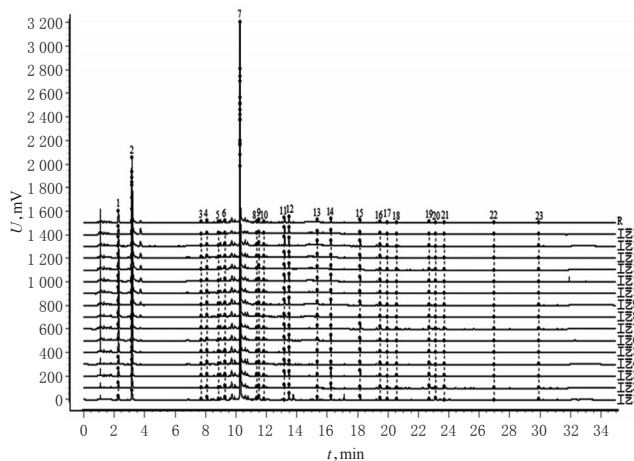


图7 不同炮制时间蜜桑白皮的UPLC指纹图谱叠加图
Fig 7 Overlapped UPLC fingerprint of honey-processed *M. alba* after different processing time

22~28 min时,饮片粉末颜色开始发生明显变化,由黄白色向深黄色转变, E_{MSBP} 由80.88下降至75.62;炮制28~37 min时,饮片粉末颜色由深黄色缓慢转变至棕黄色, E_{MSBP} 在75.19~75.62之间,变化不大;当炮制时间超过37 min后,饮片粉末颜色明显加深,逐渐转变为棕色至深棕色, E_{MSBP} 由75.19下降至63.22。因此,当 E_{MSBP} 处在75.19~80.88之间时(即炮制22~37 min者),蜜桑白皮的饮片颜色基本可以达到药典的要求。

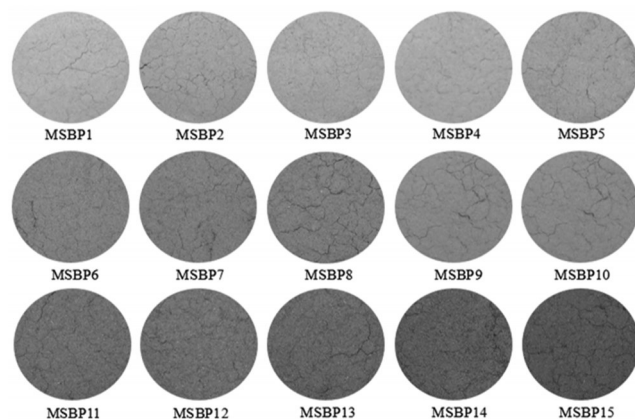


图8 不同炮制时间的蜜桑白皮饮片粉末的色彩采集图
Fig 8 Color collection map of decoction piece powder of honey-processed *M. alba* after different processing time

3 讨论

3.1 炼蜜稀释倍数考察

本研究考察了蜜桑白皮炮制前炼蜜的稀释方法,分别为不加水 and 加0.3、0.5、0.75、1.0倍水稀释,均闷润3.0 h,观察炼蜜的流动性、饮片的闷润情况。结果,当加0.75倍量水稀释后炼蜜的流动性好,可完全润透饮片。

3.2 桑白皮生品与蜜桑白皮的鉴别

炮制时间是影响蜜桑白皮饮片质量的重要因素,而

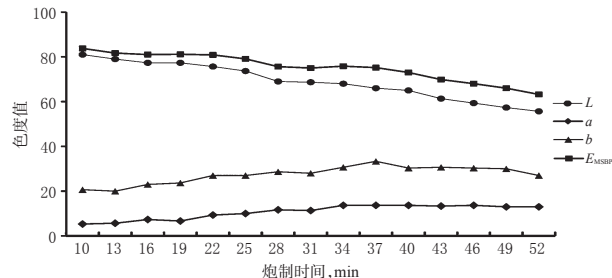


图9 蜜桑白皮炮制时间-色度值的动态变化曲线
Fig 9 Dynamic change curves of processing time-chroma value of *M. alba*

传统的外观颜色鉴别存在主观性,炮制临界点的控制较为模糊。不同批次、不同产地的桑白皮饮片颜色有深浅之别,不同炮制程度的蜜桑白皮饮片外观性状差别凭肉眼难以区分;而且桑白皮生品与炮制品物质成分的种类差异不大,简单的薄层色谱难以有效鉴别。本研究采用UPLC法建立了桑白皮炮制前后的指纹图谱,其中桑白皮标定了21个共有峰,蜜桑白皮标定了23个共有峰,13批生品中均未检测到峰1和峰2(5-羟甲基糠醛),可判定其为桑白皮炮制过程中新产生的成分。因此,峰1、峰2可以作为区分桑白皮生品和炮制品的特征性指标。同时,5-羟甲基糠醛(峰2)具有神经毒性,如过量则可能与人体蛋白质结合产生积蓄中毒,对人体横纹肌及内脏造成损害^[11],故应作为蜜桑白皮饮片及其制剂的质量评价指标之一,对其进行限量控制可保证临床用药的安全性。此外,峰18、峰20的峰面积/称样量比值以及饮片粉末色度值(L 、 a 、 b)是通过OPLS-DA分析筛选出的导致蜜桑白皮生品与炮制品差异的关键因素,可作为蜜桑白皮饮片质量评价、炮制工艺考察等的重要指标。

3.3 蜜桑白皮炮制终点的确定

通过对桑白皮炮制前后样品指纹图谱的OPLS-DA分析结果可知,峰1、峰2、峰18、峰20的峰面积/称样量比值是反映桑白皮生品和炮制品差异的重要指标。因此,笔者重点关注桑白皮炮制过程中峰1、峰2、峰18、峰20的峰面积/称样量比值的变化规律后发现:随着炮制时间的延长,峰1的峰面积/称样量比值呈现出先增大后减小的趋势,在炮制34 min时该比值达到较高水平,说明炮制34 min是峰1代表的化学成分含量变化的关键节点,若炮制时间控制在34 min左右,可有效保留峰1化合物的含量;峰2(5-羟甲基糠醛)的峰面积/称样量比值在炮制10~43 min内一直增大,这可能与炼蜜或药物在加热炒制的过程中单糖发生脱水有关^[12]。相关研究表明,5-羟甲基糠醛具有双向药理作用,既有抗氧化损伤^[11]、抑制癌细胞扩散^[13]、抗组织缺氧^[14]等有利的药理作用,又有致敏性^[15]、遗传毒性^[16]等副作用,故在蜜桑白皮饮片性状达到要求的前提下,炒制时间不宜过长,避免5-羟甲基

糠醛的累积而产生毒副作用。随着炮制时间的延长,峰18、峰20的峰面积/称样量比值总体呈现逐渐下降的趋势。此外,峰3的峰面积/称样量比值也随着炒制时间的延长而逐渐下降。峰7(桑皮苷A)是蜜桑白皮最主要的化学成分,其峰面积占总峰面积的65%以上。相关研究表明,桑皮苷A具有抗炎、镇痛、止咳、抗肿瘤、抗病毒、保护大脑等多种生物活性,是桑白皮的主要药效成分之一^[17]。本研究结果显示,桑皮苷A的峰面积/称样量比值在炮制10~19 min内基本不变;炮制19 min之后,该比值开始逐渐下降;炮制34~37 min内,该比值下降较为明显。可知,当炒制时间超过34 min时不利于桑皮苷A的保留。

结合蜜桑白皮炮制过程中饮片指纹图谱各共有峰的峰面积/称样量比值和色度值的动态变化规律,为保证蜜桑白皮既符合药典的外观性状要求,同时避免炮制时间过长导致峰1、峰3、桑皮苷A(峰7)、峰18、峰20等成分含量的下降,以及防止5-羟甲基糠醛(峰2)的过度累积,笔者认为蜜桑白皮炮制结束时的 E_{MSBP} 范围应在75.84~80.88之间,即炒制时间控制在22~34 min为宜。但由于不同批次桑白皮生品颜色存在差异,本研究以“ E_{MSBP} 在75.84~80.88”作为蜜桑白皮的炮制终点是否具有广泛的代表性,有待扩大样本进行深入研究。

综上,本研究建立了桑白皮炮制前后的UPLC指纹图谱,同时采用色度值对蜜桑白皮粉末的颜色进行量化,筛选出了鉴别桑白皮生品和炮制品的关键指标;同时根据不同炒制时间下蜜桑白皮饮片指纹图谱和色度值的动态变化,初步确定了蜜桑白皮的炮制终点。本研究结果可为桑白皮生品和炮制品的鉴别、质量评价以及蜜桑白皮炮制工艺的优化提供有益参考。

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,2015:298.
- [2] 王瑾,张会敏,石俊英.桑白皮黄酮类化学成分研究进展[J].药学研究,2012,31(7):420-422.
- [3] 李群,张会敏.桑白皮蜜炙前后水提液指纹图谱对比研究[J].时珍国医国药,2014,25(6):1380-1382.
- [4] 刘红亮,晏仁义,郭健,等.厚朴“发汗”前后药材颜色及气味差异的数值化研究[J].中国中药杂志,2013,38(1):45-48.
- [5] 刘得鹏,王云,王国有,等.焦栀子炮制过程中饮片色泽变化与美拉德反应的相关性分析[J].中国中药杂志,2020,45(10):2382-2388.
- [6] 刘娟汝,刘晓梅,刘雨诗,等.基于色度分析原理的青黛有效成分含量与其色度值的相关性分析[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(23):165-170.
- [7] 王清浩,王云,张雪,等.基于“表里关联”的米炒党参炮制过程质量传递规律研究[J].中草药,2019,50(12):2848-2855.
- [8] 李晓庆,王云,张雪,等.基于表里关联的栀子饮片炮制过程中表观颜色变化与其内在成分含量的相关性分析[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(13):1-5.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:31.
- [10] 柴冲冲,毛民,袁金凤,等.不同方法软化切制后的黄芩饮片颜色与5种黄酮类成分含量的相关性研究[J].中国中药杂志,2019,44(20):4467-4475.
- [11] LI W, QU XN, HAN Y, et al. Ameliorative effects of 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) from Schisandra chinensis on alcoholic liver oxidative injury in mice[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(2):2446-2457.
- [12] 周倩,孙立立.蜜炙对甘草化学成分影响研究[J].中国药理学杂志,2013,48(10):768-772.
- [13] 梅国栋,赵玲,陈建平,等.5-HMF抑制A375细胞增殖的信号转导通路[J].中国科技论文,2014,9(9):1005-1008.
- [14] HE YL, LI MM, WU LY, et al. Enhanced hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α stability induced by 5-hydroxymethyl-2-furfural (5-HMF) contributes to protection against hypoxia[J]. Mol Med, 2015, 20(1):590-600.
- [15] YAMADA P, NEMOTO M, SHIGEMORI H, et al. Isolation of 5- (hydroxymethyl) furfural from Lycium chinense and its inhibitory effect on the chemical mediator release by basophilic cells[J]. Planta Med, 2011, 77(5):434-440.
- [16] ZHU J, CHEN L, DONG Y, et al. Spectroscopic and molecular modeling methods to investigate the interaction between 5-hydroxymethyl-2-furfural and calf thymus DNA using ethidium bromide as a probe[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2014, 124(7):78-83.
- [17] 伍春.桑枝中桑皮苷A的分离纯化工艺及其活性研究[D].重庆:西南大学,2012.

(收稿日期:2020-10-12 修回日期:2020-11-27)

(编辑:林 静)