

基于 UPLC 特征图谱及多成分同时定量的酒女贞子炮制工艺研究

林伟雄^{1,2}, 邓李红^{1,2}, 李美洲^{1,2}, 陈仕妍^{1,2}, 钟文峰^{1,2}, 黄贵发^{1,2}, 程学仁³

(1. 广东一方制药有限公司, 广东 佛山 528244; 2. 广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 广东 佛山 528244; 3. 中国中药控股有限公司, 广东 佛山 528303)

摘要:目的 建立 UPLC 特征图谱和多成分同时定量的分析方法, 为酒女贞子炮制过程质量评价提供依据。方法 采用 ACQUITY UPLC BEH Shield RP₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 以乙腈 (A) - 水 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 柱温为 30 °C, 检测波长 0~3 min 为 284 nm, 3~25 min 为 224 nm, 进样量 1 μL。采用化学模式识别分析方法对酒女贞子炮制过程进行质量评价。结果 建立了女贞子炮制前后的 UPLC 特征图谱, 女贞子和酒女贞子分别确定了 10 个和 14 个共有峰, 指认 3、4、7、9 号峰为红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、女贞苷 G13, 炮制后新增成分 11 号峰为 5-羟甲基糠醛; 聚类分析和主成分分析 (PCA) 将酒女贞子不同炮制过程的样品分为 2 类, 结合正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA) 发现了导致不同炮制过程样品间差异的 5 个标志性化合物。定量分析了 3 个指标性成分, 红景天苷随着炮制时间的延长含量增加, 特女贞苷和女贞苷 G13 随着炮制时间的延长含量趋于稳定。结论 所建立的 UPLC 特征图谱及多成分同时定量的方法准确、重复性好, 对女贞子药材及酒女贞子炮制过程的质量控制及整体性评价具有重要意义。

关键词: 女贞子; 酒女贞子; 炮制工艺; UPLC 特征图谱; 含量测定; 化学模式识别

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2022)03-0236-11

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2022.0236

引文格式: 林伟雄, 邓李红, 李美洲, 等. 基于 UPLC 特征图谱及多成分同时定量的酒女贞子炮制工艺研究[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(3): 236-246.

Study on Processing Procedure of Wine-Processed Ligustri Lucidi Fructus Based on UPLC Characteristic Chromatogram and Multicomponent Content Determination

LIN Wei-xiong^{1,2}, DENG Li-hong^{1,2}, LI Mei-zhou^{1,2}, CHEN Shi-yan^{1,2}, ZHONG Wen-feng^{1,2}, HUANG Gui-fa^{1,2}, CHENG Xue-ren³

(1. Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula Granule, Foshan 528244, China; 3. China Traditional Chinese Medicine Holdings Co., Ltd., Foshan 528303, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) characteristic chromatogram and simultaneous quantitative analysis method were established to provide reference for the quality evaluation of wine-processed Ligustri Lucidi Fructus with different processing procedure. **METHODS** ACQUITY UPLC BEH Shield RP₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) chromatographic column was used, with acetonitrile (A) - aqueous solution (B) as flow phase by gradient elution. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, column temperature was 30 °C and detection wavelength of 0-3 min was 284 nm, 3-25 min was 224 nm, sample injection volume was 1 μL. The quality evaluation of different processing procedure of wine-processed Ligustri Lucidi Fructus was conducted by chemical pattern recognition. **RESULTS** UPLC characteristic chromatogram of Ligustri Lucidi Fructus and wine-processed Ligustri Lucidi Fructus were established, identifying 10 and 14 common peaks, respectively. No. 3, 4, 7, 9 peaks were identified as Salidroside, Echinacoside, Specnuezhenide, and Ligustroflavone G13, respectively, and the new component (No. 11 peak) were identified as 5-Hydroxymethylfurfural after processing with wine. Clustering analysis and main component analysis roughly divided the wine-processed Ligustri Lucidi Fructus samples with different processing procedures into two categories. Combined with the orthogonal partial least squares-discrimination analysis, five main marker components that caused the differences between the different processing procedure samples were found. Three index components were quantitatively analyzed, while the content of Salidroside increased with prolonged processing time, and the contents of specnuezhenide and Ligustroflavone G13 stabilized with prolonged processing time. **CONCLUSIONS** The UPLC characteristic chromatogram and simultaneous quantitative methods established in this study are accurate and repetitive, which is of great significance for the quality control and overall evaluation of Ligustri Lucidi Fructus and the processing procedure.

收稿日期: 2021-11-27

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2018B030323004)

第一作者: 林伟雄, 男, 主管中药师, E-mail: linwx2020@163.com

通信作者: 程学仁, 男, 主任中药师, 主要从事中药产品产业化关键技术研究与应用, E-mail: chengxr@126.com

ture of wine-processed *Ligustri Lucidi Fructus*.

KEYWORDS: *Ligustri Lucidi Fructus*; wine-processed *Ligustri Lucidi Fructus*; processing procedure; UPLC characteristic chromatogram; content determination; chemical pattern recognition

女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实,具有滋补肝肾,明目乌发的功效,用于眩晕耳鸣,腰膝酸软,须发早白等肝肾阴虚证^[1]。2020年版《中国药典》收录了女贞子和酒女贞子2种饮片,女贞子经酒蒸或酒炖为酒女贞子后,“形如女贞子,表面黑褐色或灰黑色,常附有白色粉霜,微有酒香气”^[1]。中医理论认为,女贞子生品性凉,以清肝明目、滋阴润燥为主,多用于肝热目眩、阴虚肠燥便秘等症;而酒能活血通络、祛风散寒,故炮制后的酒女贞子寒凉之性减弱,滋补肝肾作用增强,临床更多用于肝肾阴虚等证,现代临床亦可用于治疗慢性肝炎、高血脂等症^[2-4]。

现代研究表明,女贞子主要包含环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、黄酮类、萜类、挥发油、脂肪酸等化学成分^[5-6],其中最具活性和药用价值的属环烯醚萜苷类化合物,含量较高的有特女贞苷、女贞苷、女贞苷 G13 和橄榄苦苷等裂环环烯醚萜苷类,这类化合物具有抗氧化、增强免疫、抑制肿瘤、抗血脂等作用^[7-8];另外苯乙醇类中的红景天苷和酪醇等具有抗菌、抗炎、抗肝损伤等多种生物活性^[9-10]。女贞子经过酒蒸或酒炖等不同炮制方法以及在不同的炮制程度下,其活性成分会发生不同程度的分解与转化,与炮制品酒女贞子药性与药效的改变密切相关,进而影响其临床疗效。纪鑫等^[11]测定了女贞子中非三萜类成分,与同批次女贞子相比,酒女贞子中5-羟甲基糠醛和红景天苷的含量大幅升高,而女贞子酒蒸后环烯醚萜苷类成分的含量普遍降低,因其分子结构中的环烯醚萜部分大多通过其裂环上的酯键与红景天苷或酪醇或羟基酪醇等苯乙醇类化合物相连,在高温高湿环境下易发生裂解^[12-14]。在2020年版《中国药典》中仅规定了女贞子含量项下特女贞苷不得少于0.7%,酒女贞子中红景天苷含量不得少于0.2%的单指标含量限度要求,缺少女贞子药材及其炮制品酒女贞子的整体质量控制方法,因此有必要对酒蒸或酒炖不同炮制方法及不同炮制程度下的酒女贞子进行化学成分种类及含量变化的研究^[1]。本研究建立女贞子炮制前后 UPLC 特征图谱,同时测定红景天苷、特女贞苷及女贞苷 G13 的含量,并运用聚类分析、主成分分析(PCA)与正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)等多模式识别

方法对 UPLC 特征图谱中多指标变量进行统计分析,可有效监控女贞子不同炮制方法及不同炮制程度下的主要共性和差异性化学成分,为其药效物质基础及质量控制研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Waters H-Class 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);ME204E 型万分之一天平、XP26 百万分之一天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司);KQ-500DE 型数控超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);111B 型二两装高速中药粉碎机(浙江瑞安市永历制药机械有限公司);MiliQ Direct 8 型超纯水机(德国 Merck 公司)。

1.2 药品与试剂

5-羟甲基糠醛对照品(纯度 $\geq 98\%$,批号:wkq20041311)购自四川省维克奇生物科技有限公司;红景天苷(纯度99.4%,批号:110818-201507)、松果菊苷(纯度91.8%,批号:111670-201907)、特女贞苷(纯度95.0%,批号:111926-201906)对照品均购自中国食品药品检定研究院;女贞苷 G13 对照品(纯度95.0%,批号:8857)购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。乙腈为色谱级,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

11批女贞子药材(编号S1~S11)经广东一方制药有限公司魏梅主任药师鉴定为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实,来源信息详见表1。

表1 11批女贞子来源信息

Table 1 Source information of 11 batches of *Ligustri Lucidi Fructus*

编号	产地	编号	产地
S1	江苏徐州	S7	江苏盐城
S2	江苏徐州	S8	江苏邳州
S3	江苏徐州	S9	江苏邳州
S4	山东枣庄	S10	江苏徐州
S5	山东枣庄	S11	江苏徐州
S6	河南新乡		

2 方法与结果

2.1 酒女贞子饮片炮制

取女贞子药材,除去杂质,均分3份,1份压破,

得女贞子压破饮片,另 2 份为女贞子不压破饮片;取女贞子饮片置于容器中,用相当于黄酒质量 1 倍的饮用水稀释黄酒,每 100 kg 女贞子饮片用黄酒 20 kg,闷润 2~4 h 后,取出,女贞子压破饮片酒蒸 8.0 h,另 2 份女贞子不压破饮片分别酒蒸和酒炖 8.0 h,每隔 0.5 h 取样,于烘箱中烘干,即得不同炮制方式和不同炮制时间下的酒女贞子饮片。

2.2 特征图谱的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC BEH Shield RP₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相 A:乙腈,流动相 B:水,梯度洗脱(0~5 min,2%~10%A;5~9 min,10%~18%A;9~11 min,18%~24%A;11~24 min,24%~28%A;24~25 min,28%~2%A);检测波长:0~3 min 为 284 nm,3~25 min 为 224 nm;流速:0.3 mL·min⁻¹;柱温:30 ℃;进样量:1 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 取 5-羟甲基糠醛、红景天苷、松果菊苷、特女贞苷、女贞苷 G13 对照品适量,精密称定,加甲醇制成含量均为 0.1 mg·mL⁻¹ 的混合溶液,作为混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取样品粉末(过 3 号筛)约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,称定质量,超声(功率:500 W,频率:40 kHz)处理 60 min,放冷,再称定质量,以 70% 甲醇补足减失质量,摇匀,采用 0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 精密度试验 精密称取酒女贞子样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件重复进样 6 次,记录色谱图。以 7 号特女贞苷色谱峰为参照峰(S),计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积 *RSD* 分别为 0.01%~0.09% 和 0.10%~0.78%,表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性试验 精密称取酒女贞子样品 6 份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以 7 号特女贞苷色谱峰为参照峰(S),计算各特征峰相对保留时间和相对峰面积 *RSD* 分别为 0.01%~0.23% 和 0.19%~1.35%,表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 精密称取酒女贞子样品,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,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以 7 号特女贞苷色谱峰为参照峰(S),计算各特征峰相对保留时间和相对峰面

积 *RSD* 分别为 0.01%~0.34% 和 0.31%~2.96%,表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.2.7 女贞子 UPLC 特征图谱的建立 按“2.2.3”项下方法分别制备 11 批女贞子供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》对女贞子色谱图进行匹配,建立女贞子的特征图谱。以 S1 图谱作为参照,设置时间窗宽度为 0.1 min,通过多点校正、全谱峰匹配生成 11 批女贞子的共有特征图谱,同时采用中位数法生成对照特征图谱。11 批女贞子共有特征图谱中共标定了 10 个共有峰,女贞子共有特征图谱及对照图谱(R)详见图 1。计算 11 批次女贞子 UPLC 特征图谱及生成的共有对照特征图谱的相似度,相似度均大于 0.90,表明女贞子不同批次样品间质量一致性较好。

2.2.8 酒女贞子炮制过程的 UPLC 特征图谱评价 按“2.2.3”项下方法分别制备不同炮制工艺下的酒女贞子供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》对饮片压破后酒蒸(编号 Y1~Y16)、饮片不压破酒蒸(编号 Z1~Z16)及饮片不压破酒炖(编号 D1~D16)8.0 h,每隔 0.5 h 取样的酒女贞子样品进行特征图谱炮制过程分析。不同炮制时间下饮片压破后酒蒸、饮片不压破酒蒸及饮片不压破酒炖的特征图谱如图 2~4。通过与对照品比对(图 5),确认 3 号峰为红景天苷,4 号峰为松果菊苷,7 号峰为特女贞苷,9 号峰为女贞苷 G13,11 号峰为 5-羟甲基糠醛。

由图 2~4 可知,随着炮制时间的延长,3 号峰的峰面积呈较明显的上升趋势,10 号峰则呈较明显的下降趋势,其余各特征峰的峰面积整体趋于稳定;另外不同炮制时间下可新增 1~4 个特征峰,新增峰快慢顺序为 11 号峰>13 号峰>12 号峰>14 号峰;饮片压破后酒蒸 1.5 h(即 Y3)、饮片不压破酒蒸 2.5 h(即 Z5)、饮片不压破酒炖 8.0 h(即 D16)即完成 4 个特征峰的新增,此时炮制的酒女贞子样品均已符合《中国药典》中“形如女贞子,表面黑褐色或灰黑色,常附有白色粉霜,微有酒香气”^[1] 的性状要求,表明新增 4 个特征峰可作为不同炮制方式下酒女贞子的炮制终点判断。饮片压破后酒蒸、饮片不压破酒蒸样品在蒸制约 6 h 后易出现“伤水”状态,不建议长时间酒蒸。随着炮制时间的延长,酒女贞子颜色逐渐变深后表面呈黑褐色,推测炮制后女贞子环

烯醚萜类及苯乙醇苷类等主要活性成分发生了不同程度的分解与转化,且不同炮制方式及不同炮制时间下的分解与转化程度不同,高湿高热条件下的酒蒸方式会加快女贞子环烯醚萜类成分裂环上的酯键

断裂生成红景天苷等苯乙醇苷类结构单元,酒炖在隔绝水蒸气的条件下化学成分的分解与转化则较缓慢^[14-15]。

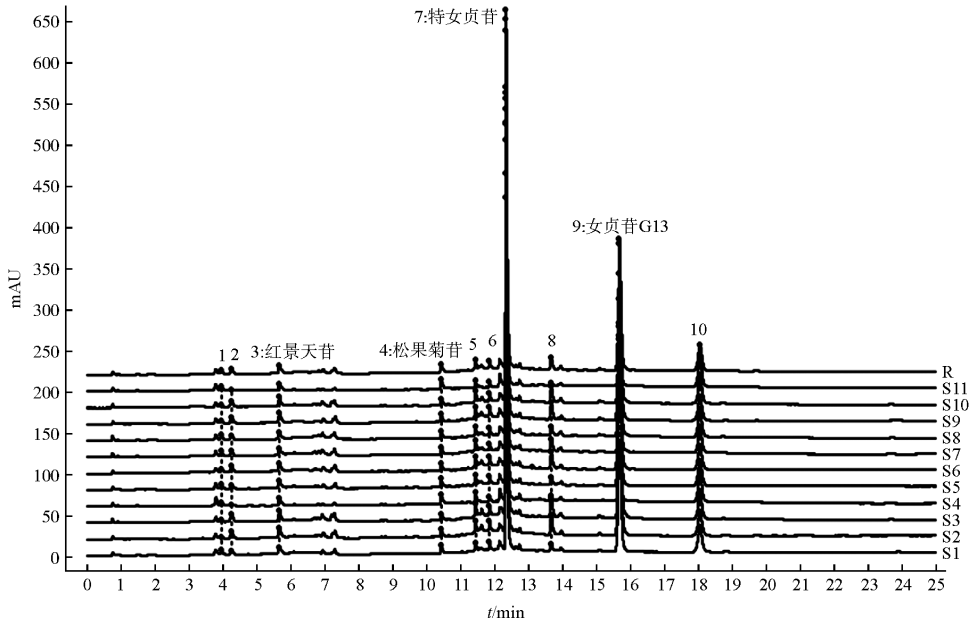


图1 女贞子的 UPLC 特征图谱及对照图谱 (R)

Fig.1 UPLC characteristic chromatogram and reference characteristic chromatogram (R) of Ligustri Lucidi Fructus

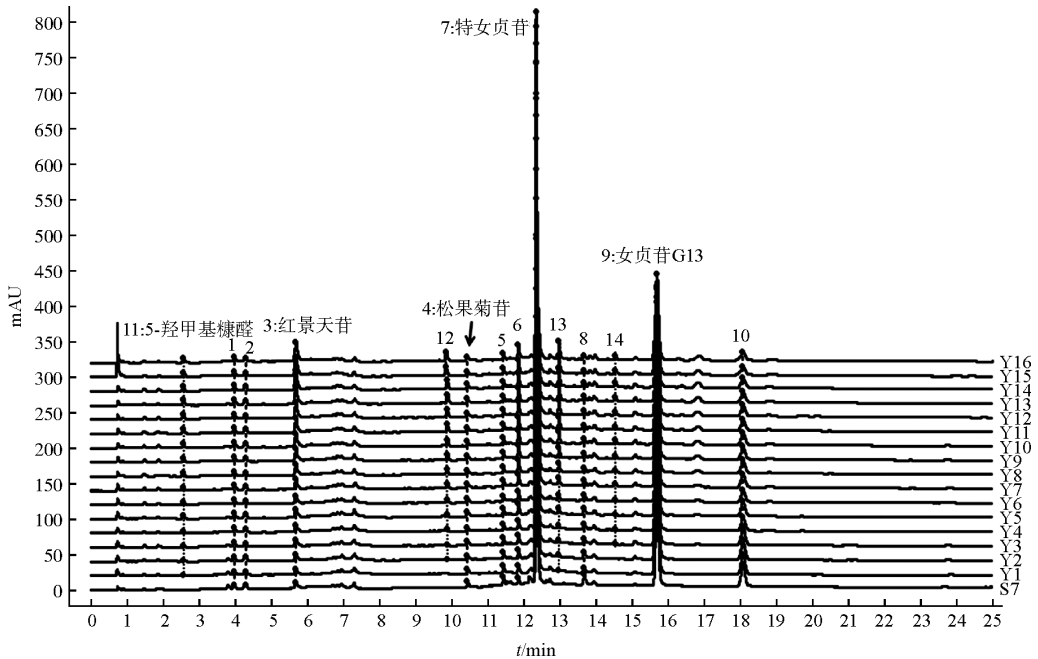


图2 女贞子压破后酒蒸炮制饮片的 UPLC 特征图谱

Fig.2 UPLC characteristic chromatogram of Ligustri Lucidi Fructus with processing procedure of wine-steaming after crushing

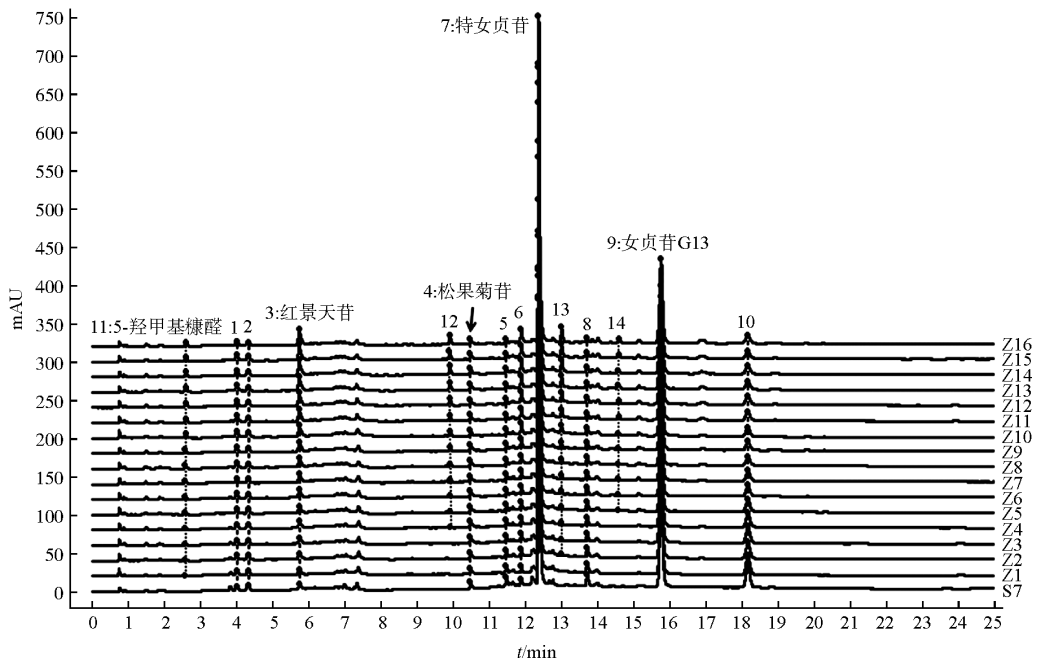


图 3 女贞子不压破酒蒸炮制饮片的 UPLC 特征图谱

Fig. 3 UPLC characteristic chromatogram of Ligustri Lucidi Fructust with processing procedure of wine-steaming without crushing

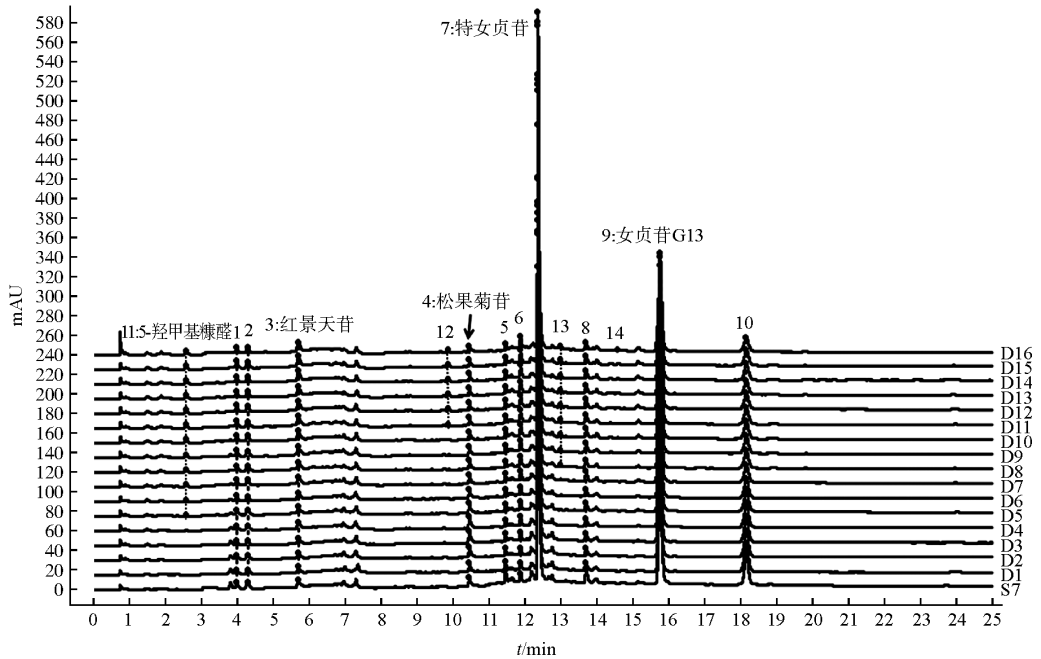


图 4 女贞子不压破酒炖炮制饮片的 UPLC 特征图谱

Fig. 4 UPLC characteristic chromatogram of Ligustri Lucidi Fructust with processing procedure of wine-stewing without crushing

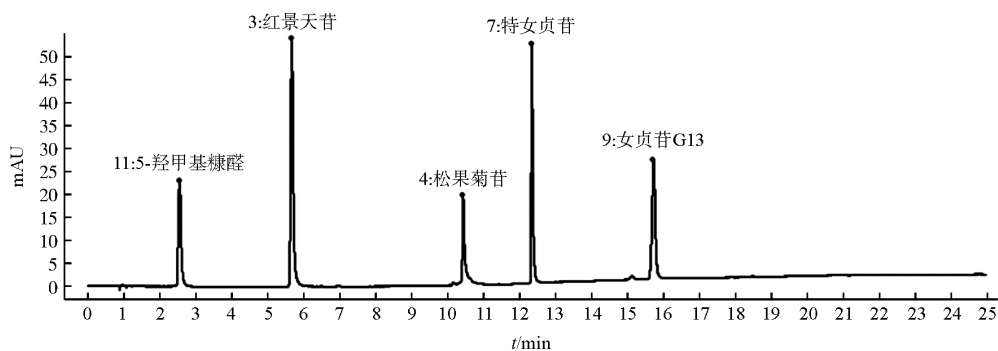


图5 混合对照品色谱图

Fig. 5 Chromatogram of mixed reference substances

2.3 化学模式识别分析

2.3.1 聚类分析 聚类分析是一种无监督模式识别方法,将酒女贞子炮制过程中各个时间点样品的单位峰面积(缺峰的记为0)输入至 SIMCA14.0 软件中进行聚类分析,得图 6。

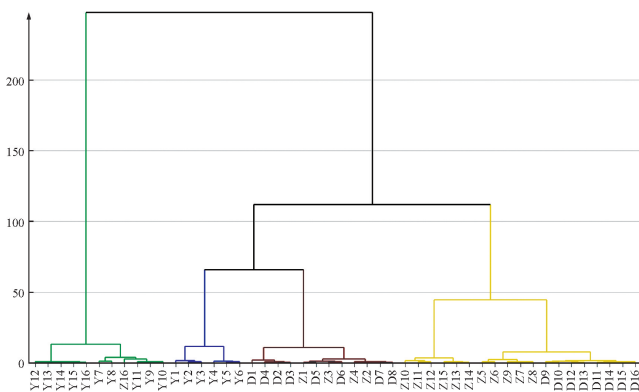


图6 酒女贞子不同炮制过程样品聚类分析树状图

Fig. 6 Dendrogram of hierarchical cluster analysis of wine-processed Ligustri Lucidi Fructust with different processing procedure

图 6 显示,聚类分析将酒女贞子炮制过程中的样品分成了 2 大类,其中女贞子压破蒸制 3.5~8.0 h 和女贞子不压破蒸制 8.0 h 归为第 I 类,其余女贞子压破酒蒸和女贞子不压破酒蒸以及酒炖样品归为第 II 类;在第 II 类下又可分为 3 小类,女贞子压破蒸制 0.5~3.0 h 归为第 II a 类,女贞子不压破酒蒸 0.5~2.0 h 和女贞子不压破酒炖 0.5~4.0 h 归为第 II b 类,女贞子不压破酒蒸 2.5~7.5 h 和女贞子不压破酒炖 4.5~8.0 h 归为第 II c 类。从归类结果可知女贞子饮片压破后蒸制对化学成分影响较大,即直接暴露在高湿高热条件下会加快女贞子环烯醚萜类及苯乙醇苷类等化学成分的分解与转化^[12-13],且随着炮制时间的延长,压破酒蒸、不压破酒蒸和不压破酒炖的样品都会发生部分交叉,即在达到一定

炮制时间点时,无论酒蒸或酒炖均可炮制出相似度高的酒女贞子样品,与 2020 年版《中国药典》酒女贞子炮制中“酒蒸或酒炖”一致,同时可将新增 4 个特征峰作为不同炮制方式下酒女贞子的炮制终点的判断。

2.3.2 PCA 与 OPLS-DA 分析 在聚类分析的基础上,进一步采用 PCA 对酒女贞子不同炮制过程样品进行比较,通过数学降维的原理,从酒女贞子不同炮制过程样品原数据中提取几个具代表的综合性指标来代替多个原始变量。PCA 分析结果中提取到 3 个特征值>1 的主成分(PC),可用于反映酒女贞子不同炮制过程样品 UPLC 特征图谱 93.91% 以上的信息,其中 PC1 贡献率为 58.8%,贡献率最大,PC2 贡献率为 22.7%。由前 2 个 PC 建立坐标系,得到酒女贞子不同炮制过程样品的 PCA 得分图(图 7)。

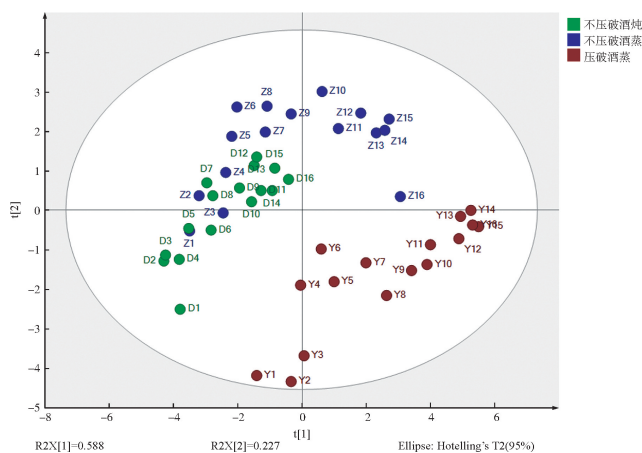


图7 酒女贞子不同炮制过程样品的 PCA 得分图

Fig. 7 PCA score scatter plot of wine-processed Ligustri Lucidi Fructust with different processing procedures

由图 7 可见,女贞子压破酒蒸的样品能够较集中地聚集在一起,与不压破酒蒸或酒炖的样品有较明显的距离,而不压破酒蒸或酒炖的样品则交叉在一起,区分不明显。推测形成这种距离的主要原因

为女贞子压破种皮后,直接暴露在高湿高热条件下,加快了环烯醚萜类及苯乙醇苷类等化学成分分解与转化的速度和程度。

为更好地观察酒女贞子不同炮制过程样品间的差异,基于 PCA 结果,采用监督模式识别法进行酒女贞子不同炮制过程样品间 OPLS-DA,绘制 OPLS-DA 模型得分图,计算出对差异贡献较大的因素,寻找酒女贞子不同炮制过程样品主要的差异成分。结果发现,女贞子压破酒蒸、女贞子不压破酒蒸和女贞子不压破酒炖样品在 OPLS-DA 得分图(图 8)中分别集中地分布在不同区域,表明聚类分析和 PCA 中交叉在一起的不同样品间的化学成分仍具有一定差异性,或体现在化学成分种类、含量或化学成分的比例关系上。OPLS-DA 模型中的拟合参数 $R_x^2 = 0.994$, $R_y^2 = 0.924$, 模型预测参数 (Q^2) = 0.889, 均大于 0.5, 表明所建模型稳定且预测能力较强。

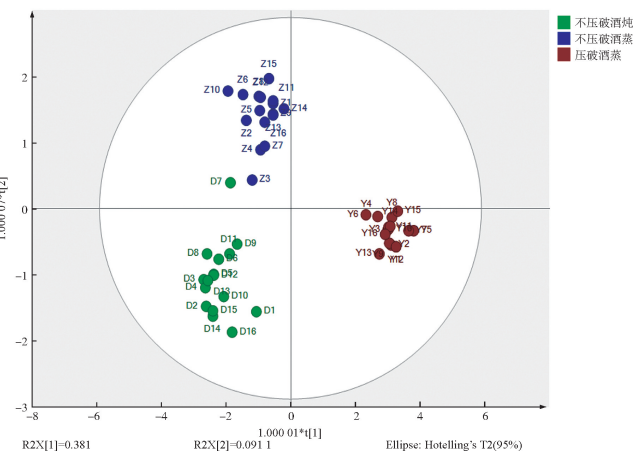


图 8 酒女贞子不同炮制过程样品的 OPLS-DA 得分图

Fig. 8 OPLS-DA score plot of wine-processed Ligustri Lucidi Fructust with different processing procedures

以模型变量投影(VIP)值为指标对引起酒女贞子不同炮制过程样品间差异的成分进行分析,筛选贡献较大的 5 个变量(以 VIP 值>1 为标准),分别为 10 号峰(VIP=1.183)、1 号峰(VIP=1.126)、9 号女贞苷 G13 峰(VIP=1.064)、7 号特女贞苷峰(VIP=1.059)和 5 号峰(VIP=1.047),提示上述 5 个成分是引起酒女贞子不同炮制过程样品间成分差异的主要标志性成分,其余峰 VIP 值<1,对样品的区分影响较小。详见图 9。

2.4 含量测定

2.4.1 色谱条件 同“2.2.1”项下。

2.4.2 对照品溶液的制备 分别取红景天苷、特女贞苷、女贞苷 G13 对照品适量,精密称定,分别加甲醇制成质量浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的红景天苷对照品溶液, $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的特女贞苷对照品溶液, $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的女贞苷 G13 对照品溶液。

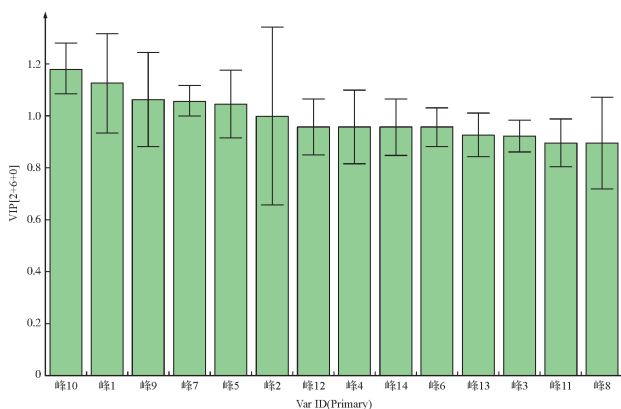


图 9 酒女贞子不同炮制过程样品 14 个共有峰的 VIP 值

Fig. 9 VIP values of 14 common peaks of wine-processed Ligustri Lucidi Fructust with different processing procedures

2.4.3 供试品溶液的制备 同“2.2.3”项。

2.4.4 专属性考察 取上述供试品溶液、阴性对照溶液(70%甲醇)和“2.4.2”项下的对照品溶液各适量,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果见图 10,女贞子供试品及对照品色谱图的基线均平稳,色谱峰分离度、对称性良好,供试品中各色谱峰与对照品各对应色谱峰的保留时间基本相同,且阴性对照无干扰。

2.4.5 线性关系考察 分别精密称取红景天苷、特女贞苷、女贞苷 G13 对照品适量,分别加甲醇制成质量浓度为 301.18 、 120.47 、 60.24 、 30.22 、 $12.13 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的红景天苷, 247.76 、 100.13 、 49.59 、 24.70 、 $9.88 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的特女贞苷, 271.13 、 101.08 、 59.28 、 27.17 、 $10.83 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的女贞苷 G13 系列对照品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析。以进样质量浓度($X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程,结果见表 2。

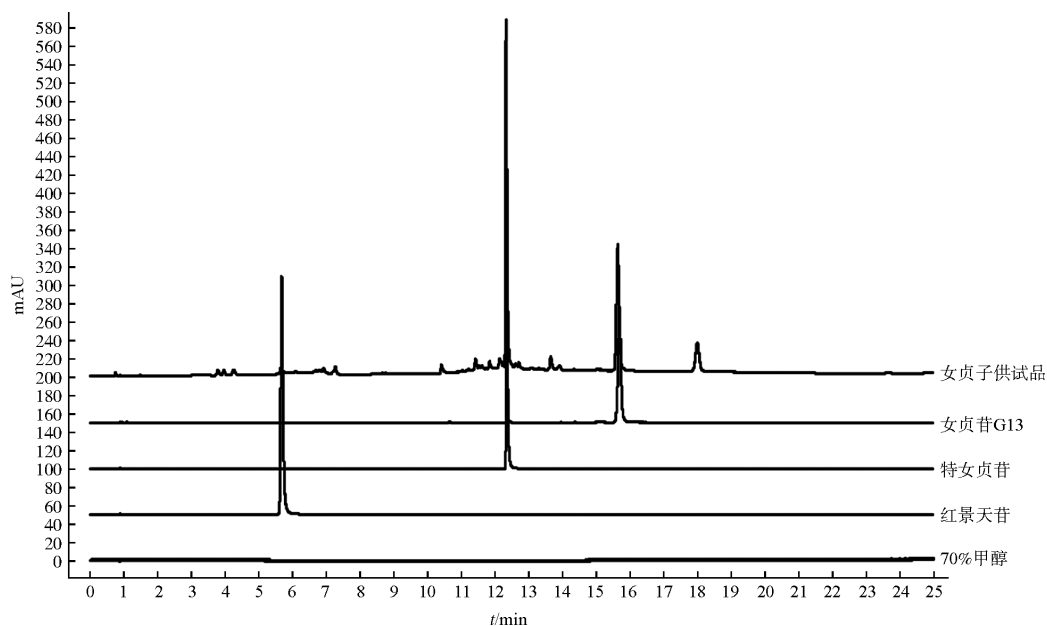


图 10 女贞子专属性考察的 UPLC 色谱图

Fig. 10 UPLC characteristic chromatogram of the exclusive investigation of Ligustri Lucidi Fructust

表 2 3 个成分的线性回归方程与线性范围

Table 2 Linear regression equations with linear ranges for the three components

成分	回归方程	相关系数 R^2	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
红景天苷	$Y=4\ 797.6X-1\ 697.5$	0.999 6	12.13~301.18
特女贞苷	$Y=4\ 794.0X-3\ 785.6$	0.999 2	9.88~247.76
女贞苷 G13	$Y=3\ 817.2X+25\ 885.8$	0.999 1	10.83~271.13

2.4.6 精密度试验 精密称取酒女贞子样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件重复进样6次,记录峰面积。红景天苷、特女贞苷、女贞苷 G13 峰面积的 RSD 分别为 0.60%、0.30%、0.23% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4.7 重复性试验 精密称取酒女贞子样品6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品中各待测成分的含量。红景天苷、特女贞苷、女贞苷 G13 含量的 RSD 分别为 0.62%、0.73%、0.76% ($n=6$),表明该方法重复性良好。

2.4.8 稳定性试验 精密称取酒女贞子样品,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,按“2.2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。红景天苷、特女贞苷、女贞苷 G13 峰面积的 RSD 分别为 4.84%、2.94%、2.43% ($n=6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4.9 加样回收率试验 精密称取含量已知的酒女贞子样品 0.15 g,置具塞锥形瓶中,按样品中红景

天苷、特女贞苷、女贞苷 G13 含量的 50%、100% 和 150% 分别加入相应的对照品,每个指标成分设计 3 组实验,每组平行 3 份。按“2.2.3”项下方法制备供试溶液,在“2.2.1”项色谱条件下进行测定,计算加样回收率,结果见表 3。

2.4.10 样品测定 取不同炮制工艺下酒女贞子样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,再按照“2.2.1”项下色谱条件进行测定,计算各成分含量,结果见图 11。由含量测定结果可知红景天苷含量随着炮制时间的延长而呈上升趋势,上升趋势快慢为女贞子压破酒蒸>女贞子不压破酒蒸>女贞子不压破酒炖,其可能与女贞子压破种皮后,直接暴露在高湿高热条件下,加快了其他化合物分解转化成红景天苷结构单元的速率有关。特女贞苷和女贞苷 G13 均为女贞子中裂环烯醚萜类的代表成分,在 8.0 h 炮制时间内,不同炮制条件下随着炮制时间的延长 2 种成分都趋于稳定;但与炮制 0 h(即女贞子药材)相比,压破酒蒸样品含量稍有升高,而不压破酒蒸和酒炖样品含量均稍有下降,可能与取样过

程中样品存在差异有关,也可能是由于未压破的女贞子在炮制过程中受到种皮的保护作用,避免了与水蒸气的直接接触,炮制初始裂环烯醚萜成分的

降解速率大于闭环环烯醚萜类物质裂解为裂环烯醚萜类成分的速率,后随着炮制时间的延长两者降解速率相近^[14]。

表 3 3 个成分的加样回收率试验结果 ($n=9$)

Table 3 Results of additional sample recovery test for three components ($n=9$)

成分	称样量/g	样品含量/mg	对照品加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD/%
红景天苷	0.1596	0.371	0.200	0.570	99.30	1.51
	0.1551	0.361	0.200	0.560	99.89	
	0.1592	0.370	0.200	0.566	98.02	
	0.1581	0.368	0.400	0.780	103.02	
	0.1577	0.367	0.400	0.767	100.00	
	0.1583	0.368	0.400	0.761	98.21	
	0.1525	0.355	0.600	0.944	98.35	
	0.1532	0.356	0.600	0.952	99.37	
	0.1527	0.355	0.600	0.951	99.40	
特女贞苷	0.1501	4.320	1.924	6.264	101.03	1.73
	0.1526	4.392	1.924	6.334	100.96	
	0.1582	4.553	1.924	6.459	99.07	
	0.1532	4.409	3.848	8.152	97.27	
	0.1549	4.458	3.848	8.230	98.02	
	0.1552	4.467	3.848	8.161	96.01	
	0.1554	4.473	5.772	10.270	100.44	
	0.1566	4.507	5.772	10.181	98.30	
	0.1527	4.395	5.772	10.075	98.41	
女贞苷 G13	0.1570	2.832	1.423	4.315	104.17	2.78
	0.1572	2.836	1.423	4.216	96.97	
	0.1568	2.828	1.423	4.250	99.90	
	0.1517	2.736	2.846	5.603	100.70	
	0.1511	2.726	2.846	5.675	103.62	
	0.1524	2.749	2.846	5.581	99.48	
	0.1596	2.879	4.269	7.204	101.29	
	0.1598	2.883	4.269	7.397	105.75	
	0.1593	2.874	4.269	7.321	104.18	

3 讨论

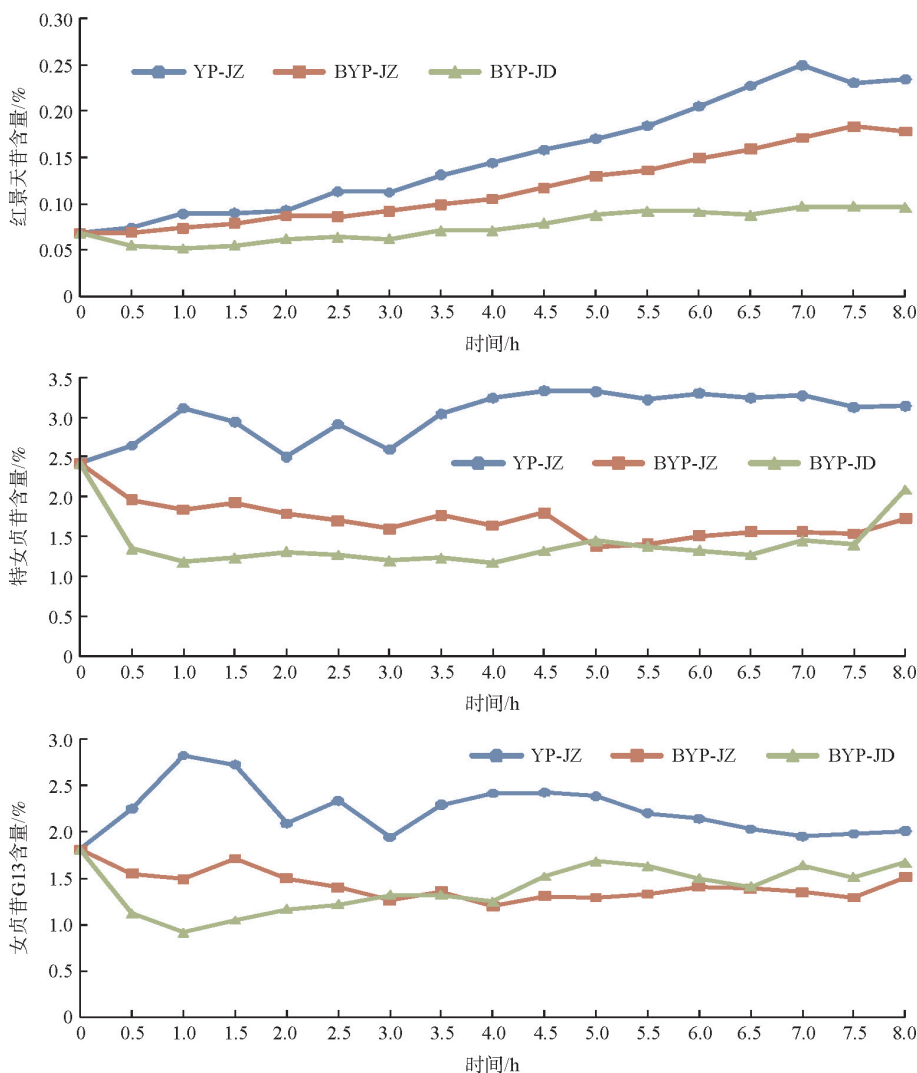
本实验考察了提取溶剂(甲醇、70%甲醇、50%甲醇、30%甲醇、50%乙醇、70%乙醇),提取方式(超声,回流),提取溶剂用量(10、25、50、75 mL),提取时间(30、45、60 min)等供试品制备条件,结果发现,选择乙醇系统作为提取溶剂时,存在 2 号峰和 11 号 5-羟甲基糠醛峰缺失的情况,以纯甲醇作为提取溶剂时 3 号红景天苷峰的峰型不对称,易变形,故优选了各色谱峰峰形对称、分离效果好且响应值高的 70%甲醇作为提取溶剂;另优选了超声提取方式、提取溶剂 25 mL 和提取时间 60 min 的供试品制备条件,得到的 UPLC 特征图谱各色谱峰能够满足分析要求。

本研究通过采用合适的 UPLC 色谱条件能够同时建立女贞子和酒女贞子的特征图谱,除标定了女

贞子特征图谱的 10 个共有峰外,还能够直观地监控酒女贞子炮制过程中新增的 1~4 个特征峰的变化情况。对酒女贞子炮制过程中的样品进行无监督模式聚类分析和 PCA,其分析结果均将女贞子压破酒蒸与女贞子不压破酒蒸、酒炖区分为 2 大类,而女贞子不压破酒蒸、酒炖样品间则随着炮制时间的不同部分交叉聚在一起。可能因为女贞子压破种皮后,直接暴露在高湿高热条件下,会加快其环烯醚萜类及苯乙醇苷类等化学成分的分解与转化的速度和程度,从而造成女贞子压破酒蒸和女贞子不压破酒蒸、酒炖样品间的差异。通过监督模式识别法进一步进行 OPLS-DA,能将原始数据 X 中与因变量 Y 中不相关的信息去除,提高类内聚集性,使类与类之间的差异性得到最大化,结果显示女贞子压破酒蒸、女贞子不压破酒蒸和女贞子不压破酒炖明显区分为 3 类,

且 1、5、7、9、10 号峰是引起酒女贞子不同炮制样品间成分差异的主要标志性成分,表明聚类分析和 PCA 中交叉聚在一起的样品,可通过 OPLS-DA 进一步区分出来,其差异或体现在化学成分种类、含量

及化学成分的比例关系上,可能是炮制后的酒女贞子滋补肝肾作用增强,寒凉之性减弱的主要原因^[16]。



注: YP-JZ. 压破后酒蒸; BYP-JZ. 不压破酒蒸; BYP-JD. 不压破酒炖

图 11 酒女贞子炮制过程中含量变化趋势图

Fig. 11 Trend chart of the changing contents of the wine-processed Ligustri Lucidi Fructust during the different processing procedure

本研究建立的 UPLC 特征图谱及主要指标成分的筛选能够对女贞子药材及其炮制品中的红景天苷、特女贞苷和女贞苷 G13 这 3 种指标成分进行定量,弥补了 2020 年版《中国药典》未能同时检测女贞子药材及其炮制品中特女贞苷含量和红景天苷含量的空白,还增加了含量较高的裂环环烯醚萜类成分女贞苷 G13 的含量测定,其含量结果表明红景天苷随着炮制时间的延长含量显著增加,提示很可能是由于女贞子中环烯醚萜类化学成分在加水、加热

的条件下,其裂环上的酯键和环烯醚萜部分的氧苷键水解断裂,生成次级苷或者苷元红景天苷等^[15]; 在 8.0 h 炮制时间内,特女贞苷和女贞苷 G13 含量则随着炮制时间的延长稍有下降,但整体趋于稳定。前人研究表明,炮制后环烯醚萜类成分含量呈下降趋势可能体现在炮制时间、温度及湿度等差异上,即炮制时间越长、温度及湿度越高,环烯醚萜类成分含量可能下降得越明显^[12,14]。本研究建立的 UPLC 特征图谱和含量测定方法能较全面地反映女

贞子药材及其不同炮制工艺下的酒女贞子质量,可为女贞子药材及酒女贞子炮制过程的质量控制提供科学的检测和鉴别方法。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:47-48.
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China: I[S]. Beijing:China medical science press, 2020: 47-48.
- [2] 吴皓,李飞. 中药炮制学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社,2016:350-351.
WU H, LI F. The Processing of Chinese Materia Medica[M]. 2nd edition. Beijing: People's medical publishing house, 2016: 350-351.
- [3] 纪鑫,刘晓谦,高陆,等. 基于女贞子和酒女贞子中主要差异性成分的体内药代动力学研究[J]. 药理学学报,2021,56(12):3518-3525.
JI X, LIU XQ, GAO L. Pharmacokinetics of the main components differing between Ligustri Lucidi Fructus and its wine-steamed product[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021,56(12):3518-3525.
- [4] 李佳阳,刘峰,林玉梅,等. 蒸制对中药化学成分的影响研究进展[J]. 中华中医药学刊,2022,40(2):128-131.
LI JY, LIU F, LIN YM. Effect of Steaming on the chemical components of traditional Chinese medicine[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022,40(2):128-131.
- [5] 刘婵娟,杨薪正,钱卫东,等. 中药女贞子的化学成分及药理作用研究进展[J]. 海峡药学,2021,33(2):37-39.
LIU CC, YANG XZ, QIAN WD. Advances in research on chemical constituents and pharmacological effects of Ligustrum lucidum[J]. Strait Pharmaceut J, 2021,33(2):37-39.
- [6] 高赛,周欣,陈华国. 女贞子化学成分及质量控制研究进展[J]. 中国中医药信息杂志,2018,25(12):133-136.
GAO S, ZHOU X, CHEN HG. Research progress in chemical components and quality control of ligustri lucidi fructus[J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2018, 25(12): 133-136.
- [7] 杨阳,易骏,马利,等. 多指标正交试验优化女贞子中环烯醚萜苷的提取工艺[J]. 中国药房,2016,27(28):3970-3973.
YANG Y, YI J, MA L, et al. Optimization of extraction process for iridoid glycosides from Ligustrum lucidum by multi-index orthogonal test[J]. China Pharm, 2016, 27(28): 3970-3973.
- [8] 陈进芳,翁育才. 3种不同炮制方法对女贞子中7种化学成分变化的影响[J]. 中国现代中药,2021,23(7):1260-1265.
CHEN JF, WENG YC. Effects of three processing methods on changes of seven chemical constituents in ligustri lucidi fructus[J]. Mod Chin Med, 2021, 23(7): 1260-1265.
- [9] 刘亭亭,王萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(14):228-234.
LIU TT, WANG M. Research progress of chemical composition and pharmacological effects of fructus ligustri lucidi[J]. Chin J Exp Tra-
- dit Med Formulae, 2014, 20(14): 228-234.
- [10] 张明发,沈雅琴. 女贞子及其活性成分防治呼吸系统疾病的药理作用研究进展[J]. 药物评价研究,2020,43(11):2349-2362.
ZHANG MF, SHEN YQ. Research progress on pharmacologic effects of Fructus Ligustri Lucidi and its active components in prophylaxis and treatment for respiratory system disease[J]. Drug Eval Res, 2020, 43(11): 2349-2362.
- [11] 纪鑫,刘晓谦,肖苏萍,等. 女贞子中非三萜类成分的定性定量研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(8):1615-1622.
JI X, LIU XQ, XIAO SP, et al. Qualitative and quantitative analysis on non-triterpenoids in Ligustri Lucidi Fructus[J]. China J Chin Mater Med, 2019, 44(8): 1615-1622.
- [12] 姜秋,蒋海强,李慧芬,等. 女贞子酒蒸过程中4种裂环环烯醚萜苷类成分的动态变化[J]. 中成药,2014,36(12):2561-2564.
JIANG Q, JIANG HQ, LI HF, et al. Contents dynamic changes of four secoiridoid glycosides under steaming time spans with wine in Ligustrum lucidum Ait[J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(12): 2561-2564.
- [13] 姜秋,蒋海强,李慧芬,等. 女贞子酒蒸过程中5种苯乙醇类成分的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(16):60-63.
JIANG Q, JIANG HQ, LI HF, et al. Contents changes of five phenylethanols under steaming time spans with wine in ligustri lucidi fructus[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2014, 20(16): 60-63.
- [14] 杜亚朋,王美,李璐遥,等. 基于化合物稳定性探讨炮制对含环烯醚萜类成分中药药性及功效影响的研究进展[J]. 中草药,2021,52(16):5039-5051.
DU YP, WANG M, LI LY, et al. Research progress on effect of processing on properties and efficacy of traditional Chinese medicine containing iridoid terpenoids based on stability of compounds[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(16): 5039-5051.
- [15] 张学兰,宋梦晗,姜秋,等. 女贞子炮制前后环烯醚萜苷类成分转化机制研究[J]. 辽宁中医杂志,2017,44(12):2602-2604.
ZHANG XL, SONG MH, JIANG Q, et al. Research on transformation mechanism of secoiridoid glycosides components in ligustrum lucidum before and after processing[J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2017, 44(12): 2602-2604.
- [16] 梁晓,吴鹏,张学兰,等. 女贞子不同炮制品 HPLC 指纹图谱色谱峰的归属与比较[J]. 中药材,2015,38(11):2288-2292.
LIANG X, WU P, ZHANG XL, et al. Identification and comparison of constituents of different processed products of ligustrum lucidum fruit by HPLC fingerprint[J]. J Chin Med Mater, 2015, 38(11): 2288-2292.

(编辑:杨巍敏)