

# 化学模式识别结合 HPLC 指纹图谱的僵蚕质量评价研究

王梅<sup>1</sup>, 万子玉<sup>1</sup>, 陈辉<sup>1</sup>, 张德林<sup>1</sup>, 喻文<sup>1</sup>, 李敏<sup>1\*</sup>, 肖禾<sup>2</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学 中药材标准化教育部重点实验室, 成都 611137; <sup>2</sup>四川广元岷江中药材种植有限责任公司, 广元 628000

**摘要:**建立 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别技术对僵蚕药材进行质量评价。采用 Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.1% 磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 检测波长 365 nm, 流速 0.8 mL/min, 进样量 10 μL, 柱温 30 °C。采用相似度评价、聚类分析、主成分分析等化学模式识别方法, 对不同来源的 20 批僵蚕药材进行质量分析和评价。建立的指纹图谱标定了 9 个共有峰, 指认了 5 个峰, 1 号峰为芦丁, 2 号峰为金丝桃苷, 4 号峰为紫云英苷, 6 号峰为槲皮素, 7 号峰为山奈酚, 并将 9 个共有峰峰面积与其性状、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物及白僵菌素含量进行相关性分析。结果表明本研究建立的僵蚕 HPLC 指纹图谱结合化学模式识别的方法可靠、易行, 方法重复性好、专属性强, 与药材性状、总灰分、浸出物及白僵菌素含量等质控指标均有一定的相关性, 为后续僵蚕药材的质量控制提供依据和参考。

**关键词:**僵蚕; HPLC; 指纹图谱; 化学模式识别; 相关性分析; 质量评价

中图分类号: R282.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)2-0203-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.2.004

## Study on quality evaluation of Bombyx Batryticatus by chemical pattern recognition combined with HPLC fingerprint

WANG Mei<sup>1</sup>, WAN Zi-yu<sup>1</sup>, CHEN Hui<sup>1</sup>, ZHANG De-Lin<sup>1</sup>, YU Wen<sup>1</sup>, LI Min<sup>1\*</sup>, XIAO He<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

<sup>2</sup>Guangyuan Min-Jiang Traditional Chinese Medicine Planting Co., Ltd., Guangyuan 628000, China

**Abstract:** HPLC fingerprint and chemical pattern recognition technology were used to evaluate the quality of Bombyx Batryticatus. Inertsil ODS-3 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used for gradient elution with acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution as mobile phase. The detection wavelength was 365 nm, and flow rate was 0.8 mL/min. The injection volume was 10 μL, and column temperature was 30 °C. Similarity evaluation, Cluster analysis (CA), and principal component analysis (PCA), etc, were used to analyze and evaluate the quality of 20 batches of samples from different areas. Nine common peaks were confirmed in the fingerprint. Five chromatographic peaks were identified, rutin, hyperin, rhodoside, quercetin and kaempferol. In addition, the correlation analysis were used between nine common peak areas and their appearance characters, total ash, acid-insoluble ash, extract and Beauverin content. The results showed that the HPLC fingerprint of Bombyx Batryticatus established in this study combined with chemical pattern recognition is simple and convenient, reliable, repeatable and specific, and has a certain correlation with the quality control indexes such as the character of medicinal materials, total ash, extract and Beauverin, which provides the basis and reference for the follow-up quality control of Bombyx Batryticatus.

**Key words:** Bombyx Batryticatus; HPLC fingerprint; chemical pattern recognition; correlation analysis; quality evaluation

僵蚕为临床常用大宗动物药之一, 主要用于治疗肝风夹痰, 惊痫抽搐, 小儿急惊, 破伤风等疾

病<sup>[1]</sup>, 其来源为蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 而致死的干燥体。化学研究表明其主要活性成分为蛋白质、氨基酸类、黄酮类等成分<sup>[2]</sup>。现代药理研究表明僵蚕富蛋白提取物具有抗癫痫<sup>[3]</sup>、免疫调节及抑制 E. G7 荷瘤小鼠的肿瘤

收稿日期: 2021-08-25 接受日期: 2021-11-29

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZ-Y-SC-41); 四川省中医药管理局中医药产业发展专项 (2018C011); 成都中医药大学“杏林学者”提升计划 (CXTD2018016)

\* 通信作者 Tel: 86-28-61800237; E-mail: 028limin@163.com

生长有增强的保护作用<sup>[4]</sup>、促进 MPTP 诱导的帕金森病小鼠的运动受损的恢复,防止多巴胺的耗竭等等。

作为食性单一的家蚕,其仅以桑为食的特点决定了家蚕体内对桑叶主要的黄酮类成分的吸收、转化和代谢的丰富多样。研究表明白僵菌感染家蚕后,在其体内对黄酮类成分进行了生物转化,例如将槲皮素和山奈酚等黄酮类物质进行 4-*O*-甲基葡萄糖苷化反应转化成槲皮素-7-*O*- $\beta$ -D-4-*O*-甲基葡萄糖苷和山奈酚-7-*O*- $\beta$ -D-4-*O*-甲基葡萄糖苷等<sup>[4]</sup>。Xing 等<sup>[5]</sup>研究发现,随着僵死时间的延长,其体内黄酮化合物的含量和转化也不同,并推测出槲皮素-7-*O*- $\beta$ -D-4-*O*-甲基葡萄糖苷和山奈酚-7-*O*- $\beta$ -D-4-*O*-甲基葡萄糖苷可作为其质量控制指标之一。由此,黄酮类化合物可作为僵蚕质量评价的重要指标。

指纹图谱结合化学模式识别是评价中药材质量的有效手段,已广泛应用于中药材、中药饮片、配方颗粒等的质量评价<sup>[6-8]</sup>。目前针对僵蚕开展的相关指纹图谱研究多样,包括紫外指纹、红外指纹<sup>[9]</sup>、HPLC<sup>[10,11]</sup>、HPCE<sup>[12]</sup>以及蛋白指纹图谱<sup>[13,14]</sup>等,其成分类别涵盖了水溶性成分、脂溶性成分、醇溶性成分等。但均存在分离效果不佳,指认峰较少的问题,难以表征其质量特征。有研究者表明川产僵蚕质较优<sup>[15]</sup>,白僵菌素含量较于广西、云南、浙江等产地高<sup>[16,17]</sup>。虽然目前针对僵蚕化学成分和质量控制已有部分研究报道,但因其成分复杂、含量较低,尚无较好的质量控制手段。因此,本研究采用高效液相色谱法建立 20 批次不同产地的僵蚕药材指纹图谱,并结合相似度分析、聚类分析、主成分分析等化

学识别模式展开区分研究,并参照《中国药典》2020 年版一部僵蚕项下要求测定其水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物,采用课题组前期方法测定有效成分白僵菌素含量,旨在综合评价不同产地药材质量,为僵蚕药材质量控制和标准完善提供科学依据,同时为其他药材的研究提供借鉴。

## 1 实验仪器与材料

### 1.1 仪器

Agilent 1200 HPLC 高效液相色谱仪;BP-121s 精密电子天平(十万分之一,浙江精密仪器有限公司);BS-200S-WEI 精密电子天平(千分之一,北京赛多利斯仪器系统有限公司);KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试剂与材料

对照品:芦丁(批号:100080-20070,中国食品药品检定研究院);金丝桃苷(批号:111521-200303,中国食品药品检定研究院);槲皮素(批号:100081-200907,中国食品药品检定研究院);山奈酚(批号:MUST-16102605,成都曼思特生物科技有限公司);紫云英苷(PS1099-0010MG,成都普斯生物科技有限公司);白僵菌素(批号:L280Q50,北京百灵威科技有限公司)纯度均大于 98%。

乙腈、磷酸均为色谱纯;甲醇为分析纯;水为超纯水。

20 批僵蚕药材信息见表 1。经成都中医药大学中药鉴定教研室李敏教授鉴定为蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4 ~ 5 龄的幼虫感染(或人工接种)白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillant 而致死的干燥体。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

编号 No.	市场/产地 Market/Produce area	收集时间 Collecting time
S1	四川广元岷江中药材种植有限公司	2017. 10. 18
S2	四川广元岷江中药材种植有限公司	2018. 06. 17
S3	四川广元岷江中药材种植有限公司	2018. 06. 17
S4	四川广元岷江中药材种植有限公司	2018. 06. 17
S5	四川省中药饮片有限责任公司	2018. 11. 05
S6	四川省中药饮片有限责任公司	2018. 11. 05
S7	四川省中药饮片有限责任公司	2018. 11. 05
S8	四川省中药饮片有限责任公司	2018. 11. 05
S9	四川省中药饮片有限责任公司	2018. 11. 05

续表 1 (Continued Tab. 1)

编号 No.	市场/产地 Market/Produce area	收集时间 Collecting time
S10	成都荷花池药材市场	2016. 12. 31
S11	成都荷花池药材市场	2016. 12. 31
S12	成都荷花池药材市场	2016. 12. 31
S13	广西玉林药材市场	2017. 02. 18
S14	广西玉林药材市场	2017. 02. 18
S15	广东清平药材市场	2017. 02. 19
S16	广东清平药材市场	2017. 02. 19
S17	河北安国药材市场	2017. 02. 18
S18	河北安国药材市场	2017. 02. 18
S19	安徽亳州药材市场	2017. 02. 20
S20	安徽亳州药材市场	2017. 02. 20

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC 指纹图谱建立

#### 2.1.1 样品制备

取僵蚕粉末(过四号筛)约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 80% 甲醇 20 mL,称定质量,超声提取(功率 250 W,频率 100 kHz)30 min,放冷,再称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤即得。

#### 2.1.2 对照品溶液制备

取芦丁、金丝桃苷、槲皮素、山奈酚对照品适量,精密称定,加甲醇制成混合对照品溶液,即得。

#### 2.1.3 色谱条件

色谱柱为 Inertsil ODS-3 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相为乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B);柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长为 365 nm;进样量 10  $\mu\text{L}$ ;流速为 0.8 mL/min;梯度洗脱程序:0~10 min(10% $\rightarrow$ 20% A);10~30 min(20% $\rightarrow$ 35% A);30~35 min(35% $\rightarrow$ 95% A);35~55 min(95% A);55~60 min(95% $\rightarrow$ 10% A)。

### 2.2 指纹图谱的方法学考察

#### 2.2.1 精密度考察

取同一份僵蚕粉末,按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,连续进样 5 次,记录液相色谱图。以芦丁为参照峰,计算主要共有色谱峰的相对保留时间的 RSD 的范围为 0.12%~1.56%,相对峰面积 RSD 范围为 0.36%~1.12%,表明仪器精密度良好。

#### 2.2.2 稳定性

取同一份僵蚕样品,按照“2.1.1”项下方法制

备供试品溶液,在室温下放置,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行检测,记录液相色谱图。结果表明,僵蚕主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 的范围为 0.23%~1.35%,共有峰的峰面积 RSD 范围为 0.61%~1.27%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

#### 2.2.3 重复性考察

取同一份僵蚕样品,按照“2.1.1”项下方法制备 6 份供试品溶液进行检测。结果表明,僵蚕主要色谱峰的相对保留时间的 RSD 的范围为 0.05%~1.12%,共有峰的峰面积 RSD 范围为 0.08%~1.45%,说明该方法重现性好。

### 2.3 指纹图谱的生成

20 批僵蚕药材按照样品制备方法制备,再按“2.1.3”项下色谱条件进样测定,记录液相色谱图。采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012 版),以 S1 为参照图谱,采用中位数法,时间窗宽度为 0.1 min,建立对照图谱,运用多点校正 Mark 峰匹配,建立 20 批僵蚕药材的指纹图谱,结果见图 1。

#### 2.3.1 共有峰的指认

从 20 批僵蚕药材中标定了 9 个共有峰,通过与对照品比对,指认出 5 个成分,分别是 1 号峰为芦丁,2 号峰为金丝桃苷,4 号峰为紫云英苷,6 号峰为槲皮素,7 号峰为山奈酚。混合对照品溶液的 HPLC 图谱见图 2。

#### 2.3.2 相似度分析

采用中药色谱指纹图谱相似度评价软件(2012 版)软件建立 20 批僵蚕药材的指纹图谱,其相似度评价结果见表 2。结果显示相较于对照指纹图谱,

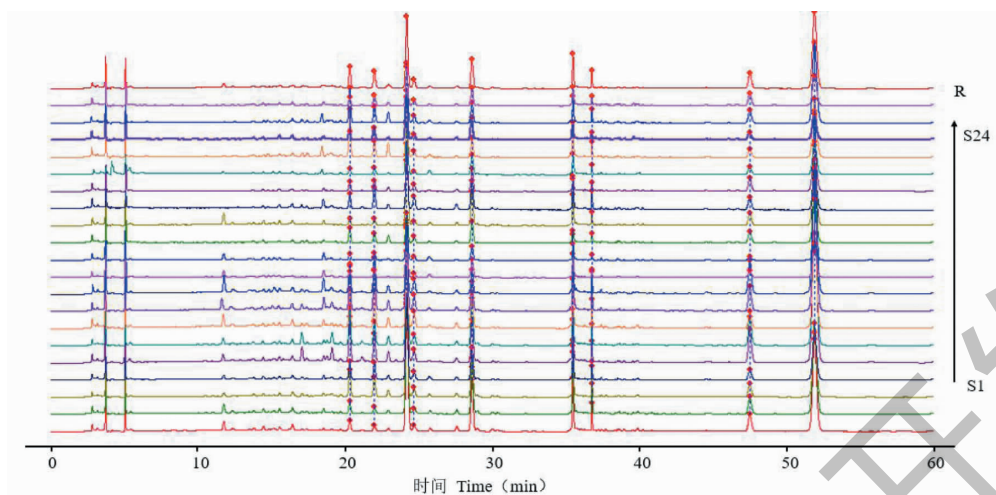


图 1 20 批僵蚕药材指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of 20 batches Bombyx Batryticatus

所有样品相似度在 0.92 ~ 0.99 之间,均大于 0.90,不同产区药材相似度均较好。

### 2.3.3 聚类分析

以 5 个指认共有峰峰面积为变量,导入 SPSS 22.0 软件,采用平均联接法,选择平方欧氏距离为测度对其进行系统聚类分析。聚类分析结果见图 3,当判别距离为 7.5 时,可将其分为 3 类。其中,来自四川广元产区的样品 S1 ~ S4 可聚为一类,来自四川省中药饮片有限责任公司的样品 S5 ~ S11 可聚为

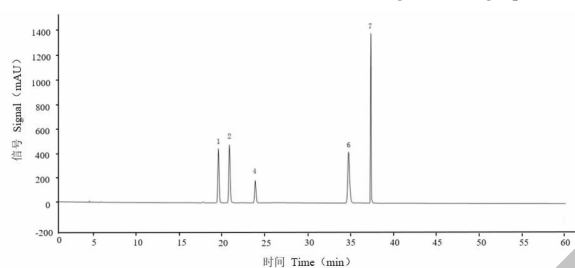


图 2 对照品指认图

Fig. 2 Reference standards identification of fingerprint

表 2 20 批僵蚕药材相似度结果

Table 2 Similarity evaluation results of 20 batches of samples

编号 No.	相似度 Similarity																				R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	
S1	1	0.999	0.99	0.984	0.935	0.959	0.962	0.937	0.973	0.985	0.959	0.95	0.954	0.998	0.963	0.995	0.976	0.981	0.976	0.973	0.985
S2	0.999	1	0.989	0.98	0.948	0.968	0.971	0.951	0.98	0.979	0.951	0.96	0.963	0.999	0.971	0.993	0.972	0.986	0.979	0.969	0.99
S3	0.99	0.989	1	0.996	0.923	0.948	0.974	0.941	0.981	0.99	0.977	0.953	0.95	0.988	0.962	0.997	0.991	0.981	0.987	0.99	0.985
S4	0.984	0.98	0.996	1	0.889	0.92	0.953	0.91	0.962	0.997	0.991	0.926	0.923	0.978	0.939	0.996	0.993	0.965	0.979	0.995	0.968
S5	0.935	0.948	0.923	0.889	1	0.997	0.976	0.992	0.975	0.874	0.822	0.983	0.984	0.953	0.982	0.919	0.893	0.968	0.935	0.879	0.975
S6	0.959	0.968	0.948	0.92	0.997	1	0.984	0.991	0.986	0.908	0.861	0.987	0.988	0.973	0.989	0.946	0.922	0.981	0.954	0.91	0.988
S7	0.962	0.971	0.974	0.953	0.976	0.984	1	0.991	0.999	0.937	0.909	0.987	0.982	0.972	0.989	0.965	0.955	0.988	0.978	0.949	0.993
S8	0.937	0.951	0.941	0.91	0.992	0.991	0.991	1	0.987	0.893	0.853	0.987	0.981	0.953	0.985	0.933	0.913	0.974	0.953	0.904	0.981
S9	0.973	0.98	0.981	0.962	0.975	0.986	0.999	0.987	1	0.948	0.92	0.987	0.983	0.981	0.99	0.974	0.963	0.992	0.981	0.956	0.997
S10	0.985	0.979	0.99	0.997	0.874	0.908	0.937	0.893	0.948	1	0.993	0.909	0.908	0.976	0.926	0.995	0.988	0.956	0.972	0.991	0.959
S11	0.959	0.951	0.977	0.991	0.822	0.861	0.909	0.853	0.92	0.993	1	0.87	0.866	0.946	0.887	0.978	0.979	0.925	0.951	0.986	0.927
S12	0.95	0.96	0.953	0.926	0.983	0.987	0.987	0.987	0.987	0.909	0.87	1	0.997	0.963	0.998	0.947	0.94	0.99	0.973	0.929	0.986
S13	0.954	0.963	0.95	0.923	0.984	0.988	0.982	0.981	0.983	0.908	0.866	0.997	1	0.967	0.997	0.946	0.936	0.99	0.966	0.925	0.985
S14	0.998	0.999	0.988	0.978	0.953	0.973	0.972	0.953	0.981	0.976	0.946	0.963	0.967	1	0.975	0.992	0.972	0.988	0.978	0.968	0.992
S15	0.963	0.971	0.962	0.939	0.982	0.989	0.989	0.985	0.99	0.926	0.887	0.998	0.997	0.975	1	0.96	0.951	0.996	0.979	0.941	0.992

续表 2 (Continued Tab. 2)

编号 No.	相似度 Similarity																				R
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	
S16	0.995	0.993	0.997	0.996	0.919	0.946	0.965	0.933	0.974	0.995	0.978	0.947	0.946	0.992	0.96	1	0.991	0.981	0.987	0.99	0.983
S17	0.976	0.972	0.991	0.993	0.893	0.922	0.955	0.913	0.963	0.988	0.979	0.94	0.936	0.972	0.951	0.991	1	0.973	0.989	0.999	0.969
S18	0.981	0.986	0.981	0.965	0.968	0.981	0.988	0.974	0.992	0.956	0.925	0.99	0.99	0.988	0.996	0.981	0.973	1	0.992	0.966	0.997
S19	0.976	0.979	0.987	0.979	0.935	0.954	0.978	0.953	0.981	0.972	0.951	0.973	0.966	0.978	0.979	0.987	0.989	0.992	1	0.986	0.986
S20	0.973	0.969	0.99	0.995	0.879	0.91	0.949	0.904	0.956	0.991	0.986	0.929	0.925	0.968	0.941	0.99	0.999	0.966	0.986	1	0.962
R	0.985	0.99	0.985	0.968	0.975	0.988	0.993	0.981	0.997	0.959	0.927	0.986	0.985	0.992	0.992	0.983	0.969	0.997	0.986	0.962	1

一类,来自不同药材市场的可聚为一类。说明不同厂家生产的药材质量有差异,且同一产区质量相对

稳定,而市场流通的僵蚕药材来源相似,可能主要为自然染病僵蚕或质量差异较大。

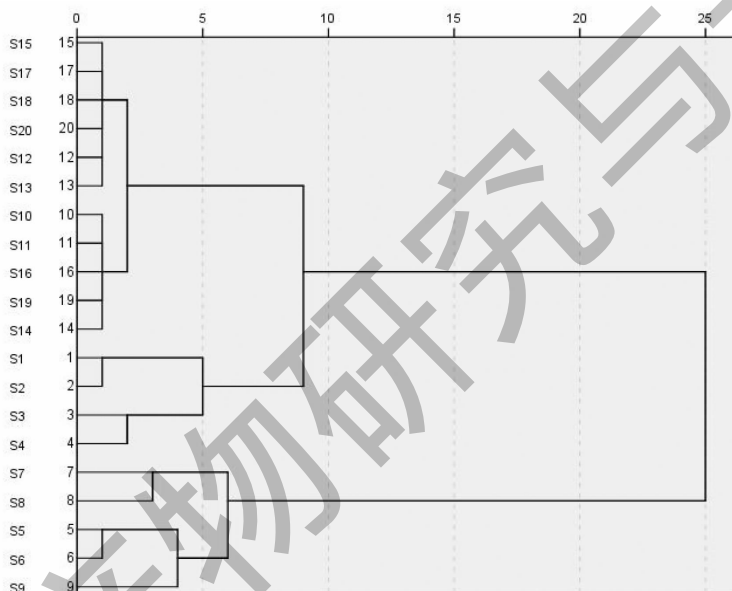


图 3 20 批僵蚕药材的聚类分析谱系图

Fig. 3 Cluster family correlationship of 20 batches of samples

2.3.4 主成分分析(PCA)

利用 SPSS 22.0 软件对数据进行主成分分析,由特征值大于 1 且贡献率大于 70% 的标准来看,前 2 个特征值均大于 1(见图 4),累计贡献率大于 85%,即提取的 2 个主成分包含了 9 个共有成分的 89.221% 的信息,符合主成分分析条件,结果见表 3。采用 SIMCA 14.1 软件,以 20 批次僵蚕样品的共有峰峰面积为数据阵,对不同产区的药材进行主成分分析,得分图如图 5 所示,与聚类分析结果一致。因此,在指纹图谱的基础上,利用聚类分析和主成分分析可以进一步对不同产区药材进行区分。

参照《中国药典》2020 年版<sup>[1]</sup>一部僵蚕项下进行测定,白僵菌素含量参照课题组前期方法<sup>[18]</sup>进行。

2.4 质量评价

僵蚕药材水分、浸出物、总灰分、酸不溶性灰分

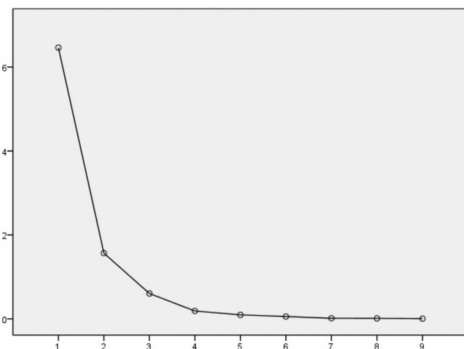


图 4 20 批僵蚕药材的主成分分析碎石图

Fig. 4 Principal component analysis of 20 batches of samples

表3 僵蚕主成分特征值及累计方差贡献率

Table 3 Principal component eigenvalues and cumulative variance contribution rate of Bombyx Batryticatus

主成分编号 Principal component number	特征值 Eigenvalue	贡献率 Contribution rate (%)	累计贡献率 Accumulative contribution rate (%)
1	6.463	71.815	71.815
2	1.567	17.406	89.221

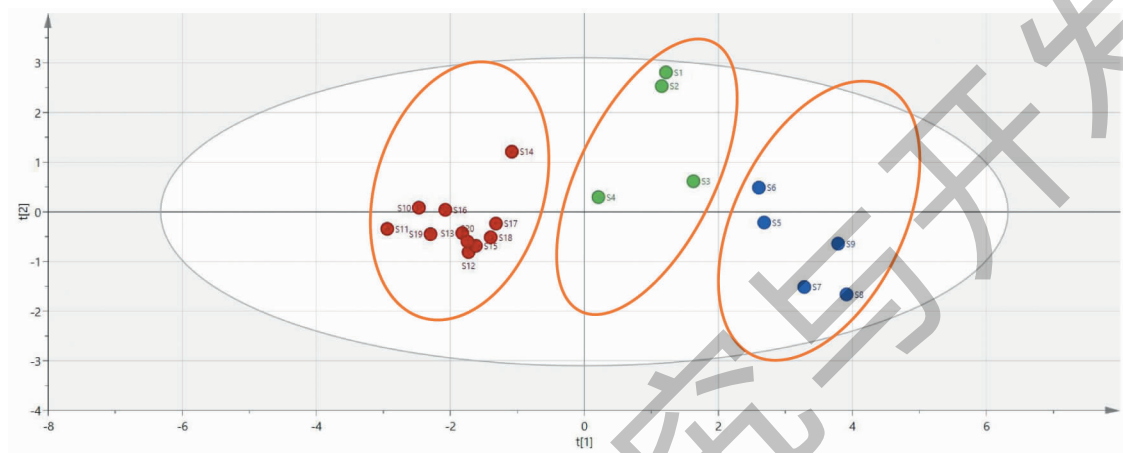


图5 20批僵蚕药材的PCA得分图

Fig. 5 PCA scores of 20 batches of samples

## 2.4.1 性状测定

参照《中国药典》2020年一部僵蚕项下性状描述对僵蚕药材的形状、表面、断面进行评分量化。评分细则如下,形状:条顺直或略弯曲、形体饱满:9~10分;条弯曲、形体饱满:7~8分;条弯曲、形体皱缩:5~6分;条弯曲皱缩、形体干瘪0~4分。断面:

亮棕色或亮黑色的丝腺环多4个:10分;亮棕色或亮黑色的丝腺环2~4个:8~9分;亮棕色或亮黑色的丝腺环2~3个:6~7分;亮棕色或亮黑色的丝腺环多2个:6分;无亮棕色或亮黑色的丝腺环:5分。20批僵蚕药材性状测定及评分结果见表4。

表4 20批僵蚕药材外观性状观测结果( $\bar{x} \pm s, n = 50$ )Table 4 Observation results of appearance characters of 20 batches of samples( $\bar{x} \pm s, n = 50$ )

编号 No.	长度 Length (cm)	直径 Diameter (cm)	形状 Shape	评分 Scores of shape
S1	3.85 ± 0.39 <sup>abcd</sup>	0.55 ± 0.04 <sup>a</sup>	条顺直,形体饱满	10
S2	3.39 ± 0.56 <sup>abcd</sup>	0.63 ± 0.10 <sup>a</sup>	条顺直,形体饱满	10
S3	3.95 ± 0.33 <sup>abc</sup>	0.56 ± 0.06 <sup>a</sup>	条顺直,形体饱满	10
S4	4.11 ± 0.15 <sup>ab</sup>	0.58 ± 0.09 <sup>a</sup>	条顺直,形体饱满	10
S5	4.16 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.07 <sup>a</sup>	条较直,形体饱满	9
S6	3.77 ± 0.25 <sup>abcd</sup>	0.56 ± 0.01 <sup>a</sup>	条顺直,形体饱满	10
S7	3.60 ± 0.46 <sup>abcd</sup>	0.59 ± 0.10 <sup>a</sup>	条略弯曲,形体饱满	9
S8	3.63 ± 0.44 <sup>abcd</sup>	0.60 ± 0.09 <sup>a</sup>	条顺直,形体饱满	10
S9	3.92 ± 0.48 <sup>abc</sup>	0.58 ± 0.08 <sup>a</sup>	条顺直,形体饱满	10
S10	2.63 ± 0.60 <sup>cd</sup>	0.56 ± 0.09 <sup>a</sup>	条略弯曲,形体饱满	9
S11	2.81 ± 0.59 <sup>bcd</sup>	0.57 ± 0.07 <sup>a</sup>	条略弯曲,形体饱满	9

续表 4(Continued Tab. 4)

编号 No.	长度 Length( cm)	直径 Diameter( cm)	形状 Shape	评分 Scores of shape
S12	3.15 ± 0.42 <sup>abcd</sup>	0.44 ± 0.06 <sup>a</sup>	条略弯曲,形体饱满	9
S13	2.17 ± 0.24 <sup>d</sup>	0.58 ± 0.07 <sup>a</sup>	条略弯曲,形体饱满	9
S14	2.74 ± 0.56 <sup>cd</sup>	0.61 ± 0.07 <sup>a</sup>	条多弯曲,形体饱满	8
S15	2.54 ± 0.64 <sup>d</sup>	0.54 ± 0.09 <sup>a</sup>	条多弯曲,形体皱缩	6
S16	3.12 ± 0.49 <sup>abcd</sup>	0.55 ± 0.07 <sup>a</sup>	条多弯曲,形体皱缩	6
S17	2.40 ± 0.68 <sup>d</sup>	0.49 ± 0.09 <sup>a</sup>	条多弯曲,形体皱缩	6
S18	3.28 ± 0.46 <sup>abcd</sup>	0.57 ± 0.07 <sup>a</sup>	条多弯曲,形体饱满	8
S19	3.02 ± 0.41 <sup>abcd</sup>	0.59 ± 0.08 <sup>a</sup>	条多弯曲,形体皱缩	6
S20	3.35 ± 0.53 <sup>abcd</sup>	0.59 ± 0.08 <sup>a</sup>	条多弯曲,形体饱满	8

编号 No.	重量 Weight( g)	表面 Surface character	断面 Fracture surface character	评分 Scores of fracture surface
S1	0.56 ± 0.13 <sup>a</sup>	灰黄色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 3~4 个	9
S2	0.59 ± 0.10 <sup>a</sup>	灰黄色、黄白色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 3~4 个	9
S3	0.64 ± 0.11 <sup>a</sup>	灰黄色,被粉霜状孢子	亮棕色丝腺环多 4 个	10
S4	0.80 ± 0.13 <sup>a</sup>	灰黄色,被粉霜状孢子	亮棕色丝腺环 3~4 个	8
S5	0.80 ± 0.09 <sup>a</sup>	灰黄色、黄白色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 3~4 个	9
S6	0.62 ± 0.07 <sup>a</sup>	灰黄色、黄白色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 2~4 个	7
S7	0.68 ± 0.10 <sup>a</sup>	灰黄色、黄白色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 3~4 个	9
S8	0.60 ± 0.12 <sup>a</sup>	灰黄色、黄白色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 3~4 个	9
S9	0.67 ± 0.04 <sup>a</sup>	灰黄色、黄白色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 3~4 个	9
S10	0.52 ± 0.11 <sup>a</sup>	灰黄色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 2~4 个	7
S11	0.52 ± 0.13 <sup>a</sup>	灰黄色、黄棕色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 3~4 个	9
S12	0.52 ± 0.13 <sup>a</sup>	灰黄色、黄棕色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 3~4 个	9
S13	0.35 ± 0.09 <sup>a</sup>	灰黄色或黄白色,少被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 2~3 个	5
S14	0.50 ± 0.11 <sup>a</sup>	灰黄色、黄棕色,少被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 2~3 个	5
S15	0.48 ± 0.15 <sup>a</sup>	灰黄色、黄棕色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 2~4 个	7
S16	0.57 ± 0.11 <sup>a</sup>	灰黄色,少被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 2~3 个	5
S17	0.42 ± 0.21 <sup>a</sup>	灰黄色或黄棕色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 2~3 个	5
S18	0.55 ± 0.10 <sup>a</sup>	灰黄色、黄棕色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 3~4 个	9
S19	0.53 ± 0.11 <sup>a</sup>	灰黄色或黄棕色,被粉霜状孢子	亮棕色或亮黑色丝腺环 2~3 个	5
S20	0.56 ± 0.11 <sup>a</sup>	灰黄色、黄棕色,被粉霜状孢子	棕色丝腺环 2~3 个	4

注:同一列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

#### 2.4.2 水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物、白僵菌素含量的测定

由表 5 可知,20 批药材的水分、酸不溶性灰分、浸出物均符合药典要求。S11、S12、S13、S16、S18 总灰分不合格,超过药典标准,说明市场药材质量参差不齐,尤以石灰包裹家蚕、死蚕等伪劣品较多,总灰分超标严重。此外,白僵菌素作为僵蚕抗惊厥的有

效成分之一,规范化生产所得药材(S1~S9)白僵菌素平均含量(0.026 7%)大于市场药材(S10~S20)白僵菌素平均含量(0.025%),不同市场的白僵菌素含量以荷花池药材市场药材大于其他药材市场,荷花池药材市场药材主要产地为四川,这与 Shi 等<sup>[15]</sup>的研究结果“四川产者较优”一致。

## 2.5 相关性分析

将 20 批药材性状(形状、长度、直径、重量、断面特征)、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物、白僵菌素含量、9 个共有峰峰面积进行相关性分析,结果如图 6 所示。所有共有峰与药材长度、表面性状、重量呈正相关,1 号峰~7 号峰均与药材断面性状正相关,

表 5 20 批僵蚕药材水分、总灰分、酸不溶性灰分、浸出物、白僵菌素含量的测定结果( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Determination results of moisture, total ash, acid-insoluble ash, extract and beauvericin of 20 batches of samples ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

编号 No.	水分 Moisture (%)	总灰分 Total ash (%)	酸不溶性灰分 Acid-insoluble ash (%)	浸出物 Extract (%)	白僵菌素 Content of beauvericin (%)
S1	9.56 ± 0.04	5.86 ± 0.03 <sup>g</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>i</sup>	21.59 ± 0.12 <sup>g</sup>	0.033 ± 0.001 <sup>c</sup>
S2	9.70 ± 0.00	6.51 ± 0.01 <sup>e</sup>	0.54 ± 0.02 <sup>cde</sup>	22.25 ± 0.40 <sup>gh</sup>	0.027 ± 0.000 <sup>d</sup>
S3	9.05 ± 0.07	6.87 ± 0.08 <sup>d</sup>	0.45 ± 0.01 <sup>fg</sup>	23.91 ± 1.04 <sup>def</sup>	0.029 ± 0.000 <sup>d</sup>
S4	8.40 ± 0.00	6.89 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.4 ± 0.01 <sup>ghi</sup>	25.50 ± 0.45 <sup>c</sup>	0.025 ± 0.001 <sup>ef</sup>
S5	11.65 ± 0.31	6.87 ± 0.08 <sup>d</sup>	0.45 ± 0.01 <sup>fg</sup>	21.66 ± 0.56 <sup>g</sup>	0.025 ± 0.000 <sup>ef</sup>
S6	11.66 ± 0.21	6.89 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.4 ± 0.01 <sup>ghi</sup>	23.74 ± 0.87 <sup>def</sup>	0.021 ± 0.000 <sup>g</sup>
S7	10.15 ± 0.21	5.79 ± 0.12 <sup>g</sup>	0.48 ± 0.01 <sup>efg</sup>	24.06 ± 0.21 <sup>cde</sup>	0.023 ± 0.000 <sup>fg</sup>
S8	10.20 ± 0.06	6.46 ± 0.02 <sup>e</sup>	0.57 ± 0.06 <sup>c</sup>	21.31 ± 0.32 <sup>g</sup>	0.034 ± 0.000 <sup>c</sup>
S9	11.23 ± 0.09	6.37 ± 0.06 <sup>e</sup>	0.49 ± 0.03 <sup>def</sup>	22.79 ± 0.23 <sup>efg</sup>	0.025 ± 0.000 <sup>ef</sup>
S10	9.92 ± 0.01	5.97 ± 0.03 <sup>g</sup>	0.39 ± 0.04 <sup>hi</sup>	25.32 ± 0.46 <sup>cd</sup>	0.04 ± 0.001 <sup>a</sup>
S11	10.02 ± 0.12	8.19 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.47 ± 0.03 <sup>efg</sup>	27.37 ± 0.59 <sup>b</sup>	0.023 ± 0.001 <sup>fg</sup>
S12	10.76 ± 0.00	9.94 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.03 <sup>b</sup>	23.78 ± 0.33 <sup>def</sup>	0.034 ± 0.000 <sup>c</sup>
S13	6.91 ± 0.04	7.99 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.12 ± 0.12 <sup>a</sup>	21.67 ± 0.53 <sup>g</sup>	0.016 ± 0.001 <sup>b</sup>
S14	10.45 ± 0.20	6.12 ± 0.09 <sup>f</sup>	0.36 ± 0.02 <sup>i</sup>	20.22 ± 1.65 <sup>h</sup>	0.011 ± 0.000 <sup>i</sup>
S15	10.05 ± 0.11	5.62 ± 0.04 <sup>h</sup>	0.36 ± 0.09 <sup>i</sup>	22.37 ± 0.32 <sup>fg</sup>	0.037 ± 0.001 <sup>b</sup>
S16	10.83 ± 0.10	7.18 ± 0.09 <sup>d</sup>	0.39 ± 0.10 <sup>hi</sup>	23.22 ± 0.35 <sup>def</sup>	0.026 ± 0.000 <sup>de</sup>
S17	9.53 ± 0.05	6.25 ± 0.00 <sup>f</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>fg</sup>	23.93 ± 0.43 <sup>fg</sup>	0.022 ± 0.001 <sup>fg</sup>
S18	9.47 ± 0.05	12.07 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.01 <sup>a</sup>	32.36 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.028 ± 0.005 <sup>de</sup>
S19	10.40 ± 0.11	6.47 ± 0.03 <sup>e</sup>	0.39 ± 0.02 <sup>hi</sup>	25.11 ± 0.32 <sup>cd</sup>	0.026 ± 0.001 <sup>de</sup>
S20	10.61 ± 0.04	6.43 ± 0.05 <sup>e</sup>	0.51 ± 0.01 <sup>cdef</sup>	25.15 ± 0.92 <sup>cd</sup>	0.015 ± 0.001 <sup>b</sup>

## 3 讨论与结论

本实验分别考察了提取方法、提取溶剂、提取时间等前处理条件,确定了提取方法(回流提取、超声提取)以超声提取最佳,提取溶剂(甲醇、80% 甲醇、乙腈和水)以 80% 甲醇最佳,提取时间(15、30、45 min)以 30 min 最优。所建立的僵蚕指纹图谱,其相似度在 0.92~0.99 之间,相似度较高,为僵蚕的质量评价提供依据。

本研究所建立的指纹图谱主要针对于僵蚕药材的黄酮类成分,Wang 等<sup>[19]</sup>采用网络药理学和分子对接技术研究结果表明槲皮素、山奈酚等成分可能为僵蚕息风止痉的主要物质基础成分。多项研

说明该指纹图谱能有效反映出药材的性状特征;3 号峰、5 号峰、6 号峰、7 号峰、8 号峰、9 号峰与药材总灰分、浸出物呈负相关,总灰分与浸出物呈正相关,且药材总灰分越高,劣质品和掺伪品比例越大,不符合药典要求。综上,本文所建立的指纹图谱能一定程度反映出药材的性状特征、质量优劣。

究<sup>[20,21]</sup>也表明槲皮素、山奈酚为治疗癫痫的主要药效成分之一,僵蚕作为息风止痉要药,其作用物质基础之一可能为黄酮类成分。此外,本研究还将各共有峰峰面积与药材的性状、浸出物、总灰分、白僵菌素含量进行了相关性分析,结果表明断面性状与表面性状、药材长度、白僵菌素含量正相关,与峰 1 号峰、2 号峰、3 号峰、4 号峰、6 号峰、7 号峰峰面积正相关,1 号峰、2 号峰、4 号峰、6 号峰、7 号峰峰经对比指认分别为芦丁、金丝桃苷、紫云英苷、槲皮素、山奈酚,均为桑叶中主要的黄酮类成分,说明僵蚕形成过程中黄酮类成分的转化与断面“玻璃体”等药材品质形成具有较强的相关性,也印证了自古以来“僵



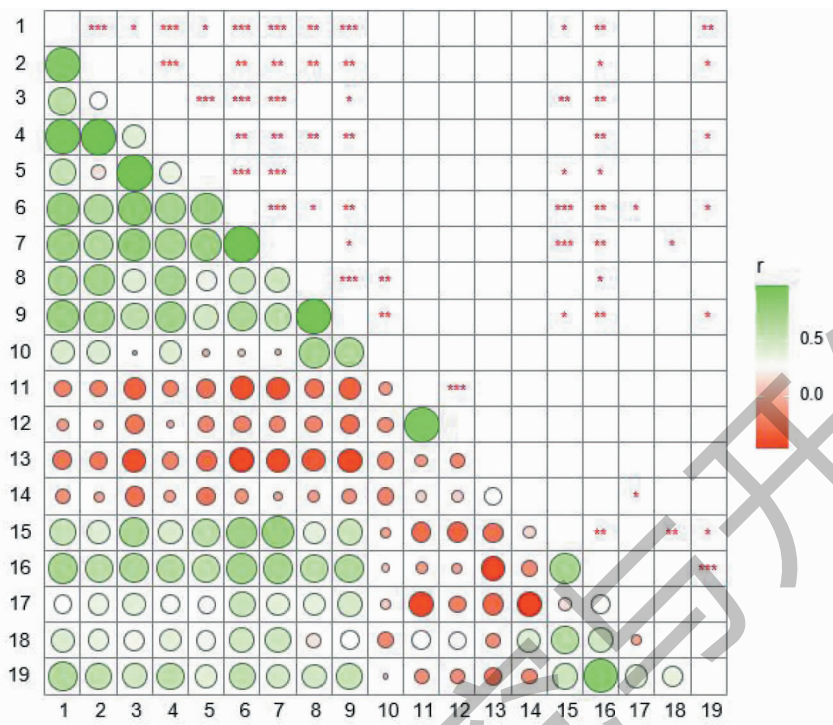


图6 相关性分析图

Fig. 6 Correlation analysis diagram

注:1~9为1~9号峰面积;10-水分;11-总灰分;12-酸不溶性灰分;13-浸出物;14-白僵菌素含量;15-形状评分;16-长度;17-直径;18-断面评分;19-重量。Note:1~9:No. 1~No. 9 peak area;10-Moisture;11-Total ash;12-Acid-insoluble ash;13-Extract;14-Beauvericin content;15-Shape score;16-Length;17-Diameter;18-Section score;19-Weight.

蚕以色白、条直、断面黑亮者为佳”的品质特征点。

综上,本文所建立的指纹图谱不仅包含了僵蚕“息风止痉”药效可能的物质基础成分,还与僵蚕药材本身质量品质指标具有一定的相关性,能综合体现僵蚕药材的质量,为僵蚕药材的质量控制提供科学依据。在对僵蚕药材的质量控制标准中,应充分考虑到其本身为“菌-虫-叶”的复合体,采用多指标综合评价其质量,建立更为科学合理的药材质量标准。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020;392.
- 2 He Q, Quality analysis and comparison of *Bombyx Batryticatus* from different producing areas [D]. Guangzhou: South China Agricultural University (华南农业大学), 2016.
- 3 Hu M, Liu Y, He L, et al. Antiepileptic effects of protein-rich extract from *Bombyx Batryticatus* on mice and its protective effects against  $H_2O_2$ -induced oxidative damage in PC12 cells

via regulating PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019;7897584.

- 4 Huang JM, Su MS, Zhang YM, et al. Research progress on transformation of phenols by *Beauveria bassiana* and 4-O-methylglucosidylation products from *Bombyx Batryticatus* [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2017, 39: 1029-1033.
- 5 Xing D, Shen G, Li Q, et al. Quality formation mechanism of stiff silkworm, *Bombyx Batryticatus* using UPLC-Q-TOF-MS-based metabolomics [J]. *Molecules*, 2019, 24: 3780-3194.
- 6 Chen L, Li X, Wei Y, et al. Study on the difference between microwave processing and traditional processing of *Glycyrrhiza uralensis* based on HPLC fingerprint and chemometrics [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2021, 33: 791-801.
- 7 Shen YJ, An Q, Ding XY, et al. Quality evaluation of Yuping-feng powder based on HPLC fingerprint and multi-component content determination combined with chemometrics [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2021, 33: 1121-1128.
- 8 Zhang YG, Zhang SJ, Wu HW, et al. Study on the correlation of HPLC fingerprints of *Scutellaria baicalensis* Georgi slices, standard decoction, intermediates and formula granules [J].

- Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 56-60.
- 9 Song HY, Han JM, Yun EH, et al. Bombyx Batryticatus protein-rich extract induces maturation of dendritic cells and Th1 polarization: a potential immunological adjuvant for cancer vaccine[J]. *Molecules*, 2021, 26: 476-479.
- 10 Wang GX. Optimization of main production conditions and fingerprint of *Beauveria bassiana*, a traditional Chinese medicine, Bombyx Batryticatus[D]. Taian: Shandong Agricultural University (山东农业大学), 2006.
- 11 Kong FL, Yue XK, Zhu T, et al. Study on Chemical components of extracts from different solvents of Bombyx Batryticatus by HPLC fingerprint combined with Principal component Analysis[J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol* (中国中医药科技), 2017, 24: 445-449.
- 12 Xing DX, Yang Q, Liao ST, et al. Evaluation of the quality of Bombyx Batryticatus sold in the market by HPLC fingerprinting[J]. *Acta Sericol Sin* (蚕业科学), 2018, 44: 810-814.
- 13 Zhang J, Mu L, Liu CL, et al. Study on fingerprint of Bombyx Batryticatus by high performance capillary electrophoresis[J]. *Chin Agr Sci Bull* (中国农学通报), 2007, 23(7): 91-94.
- 14 Wang LY, Huang JY, Zhu YL, et al. Study on optimal extraction and fingerprint of alcohol-soluble protein from Bombyx Batryticatus[J]. *Jiangsu Agr Sci* (江苏农业科学), 2020, 48(22): 196-201.
- 15 Shi L, Zhao YQ, Ou YZ, et al. Study on the commodity specification and grade standard of Bombyx Batryticatus[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2018, 29: 3015-3018.
- 16 Hu MB, Liu YJ, Xiao H, et al. Research Progress and thinking on artificial culture of Bombyx Batryticatus[J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2016, 39: 930-933.
- 17 Xia Q, Shang Q, Zhang RR, et al. Determination of beauvericin in Bombyx Batryticatus and its preparations by UHPLC-Q-TOF-MS[J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2020, 42: 2652-2655.
- 18 Chen H, He JX, Liu JL, et al. A fast and safe HPLC method for determination of beauvericin in Bombyx Batryticatus[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2018, 29: 823-825.
- 19 Wang QY, Liu Y, Shen JT, et al. Study on the molecular of anti-convulsant mechanism of Bombyx Batryticatus based on molecular docking and network pharmacology[J]. *J Jiangsu Univ: Med* (江苏大学学报:医学版), 2021, 31: 426-430.
- 20 Lu L, Lv TT, He QL, et al. Network pharmacology and molecular docking study of *Bupleurum* and *Uncaria* in the treatment of temporal lobe epilepsy[J]. *Acta Chin Med Pharmacol* (中医学报), 2021, 49(7): 37-44.
- 21 He WW, Wang D, Li T, et al. To predict the effective components and action mechanism of the combination of *Bupleurum* and *Acorus tatarinowii* in the treatment of depression based on network pharmacology[J]. *Shandong Med* (山东医药), 2021, 61(17): 33-37.