

UPLC 指纹图谱结合多元统计分析的 吴茱萸与制吴茱萸成分变化研究

杨文惠^{1,2}, 吕渭升^{1,2}, 孙冬梅^{1,3},
罗文汇^{1,2}, 杨洁^{1,2}, 何民友^{1,2}, 潘礼业^{1,2}, 李振雨^{1,2*}

¹广东一方制药有限公司; ²广东省中药配方颗粒企业重点实验室, 佛山 528244;

³江西一方天江药业有限公司, 南昌 330000

摘要: 建立吴茱萸及制吴茱萸指纹图谱, 并结合多元统计分析吴茱萸与制吴茱萸中化学成分的变化。采用超高效液相色谱(UPLC)技术。色谱柱为 YMC Triart C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm), 流动相为乙腈-0.1% 磷酸水(梯度洗脱), 流速为 0.30 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 254 nm, 进样量为 1 μL。建立吴茱萸与制吴茱萸 UPLC 指纹图谱, 并采用相似度计算和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)对指纹图谱进行分析评价, 以变量重要性投影(VIP)值大于 1 为标准筛选吴茱萸炮制前后的差异性成分。以平均峰面积为变量, 对吴茱萸和制吴茱萸差异成分色谱峰的平均峰面积进行配对 *t* 检验。吴茱萸指纹图谱共标识出 27 个共有指纹峰, 指认了其中 8 个化学成分, 分别为新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、金丝桃苷、去氢吴茱萸碱、吴茱萸碱和吴茱萸次碱。制吴茱萸经炮制后指纹图谱新增甘草酸色谱峰。相似度结果显示, 江西产区相似度较低; 湖南产区次之; 广西产区较高。正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)共找到 6 个差异性标志物, 差异显著性排序分别为甘草酸 > 吴茱萸碱 > 峰 3 > 峰 1 > 绿原酸 > 峰 2。除甘草酸为新增成分外, 吴茱萸炮制后其余 5 种化学成分的含量均有一定程度降低。吴茱萸炮制后, 峰 21(吴茱萸碱)平均峰面积明显降低, *P* < 0.05, 峰 28(甘草酸)为新增成分, 其余 5 个差异性化学成分的平均峰面积均有不同程度的降低, 但无明显统计学意义。本分析方法专属性强, 重复性好, 初步探讨了吴茱萸与制吴茱萸药理作用与化学成分的相关性, 一定程度上阐释了吴茱萸炮制前后药理作用改变与化学成分变化之间的联系, 可为吴茱萸和制吴茱萸质量及炮制研究提供数据参考。

关键词: 吴茱萸; 制吴茱萸; UPLC 指纹图谱; 相似度; 正交偏最小二乘判别分析

中图分类号: R282.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)8-1301-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.8.004

Study on the changes of components in *Euodiae Fructus* and prepared *Euodiae Fructus* by UPLC fingerprint combined with multivariate statistical analysis

YANG Wen-hui^{1,2}, LYU Wei-sheng^{1,2}, SUN Dong-mei^{1,3},
LUO Wen-hui^{1,2}, YANG Jie^{1,2}, HE Min-you^{1,2}, PAN Li-ye^{1,2}, LI Zhen-yu^{1,2*}

¹Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd. China;

²Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Formula, Foshan 528244, China;

³Jiangxi Yifang Tianjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Nanchang 330000, China

Abstract: To establish the fingerprints of *Euodiae Fructus* and prepared *Euodiae Fructus*, the changes of chemical components in *Euodiae Fructus* and its preparation were analyzed by multivariate statistics. Using ultra high performance liquid chromatography (UPLC) technology. Chromatographic column was YMC Triart C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm). The mobile phase

收稿日期: 2021-12-07 接受日期: 2022-06-01

基金项目: 江西省中医药标准化项目(2020A10); 湖南省自然科学基金-科药联合基金(2021JJ80057)

* 通信作者 E-mail: lzy1083656123@126.com

consisted of acetonitrile-0.1% phosphoric acid water (gradient elution), the flow rate was 0.30 mL/min, the column temperature was 30 °C, the detection wavelength was 254 nm, the injection volume was 1 μL. The UPLC fingerprints of *Euodiae Fructus* and its preparation were established, and the similarity calculation and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) were used to analyze and evaluate the fingerprints, the variable importance projection (VIP) value greater than 1 was used as the criterion to screen the differential components before and after processing. Taking the average peak area as the variable, the average peak area of the chromatographic peaks of different components of *Euodiae Fructus* and prepared *Euodiae Fructus* was tested by paired *t*-test. A total of 27 common fingerprint peaks were identified in the fingerprint of *Euodiae Fructus*, Eight chemical components were identified as neocrotonic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, caffeic acid, hyperin, dehydroevotaine, rutaecarpine and rutaecarpine. Glycyrrhizic acid chromatographic peak was added to the fingerprint of processed *Euodiae Fructus*. The results of similarity degree showed that the similarity degree of Jiangxi production area was low. Hunan production area was lower. Guangxi production area was relatively high. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) found six markers of difference, and the order of significance of difference was glycyrrhizic acid > evocorin > peak 3 > peak 1 > chlorogenic acid > peak 2. Except that glycyrrhizic acid is a new component, the contents of the other five chemical components of *Euodiae Fructus* after processing are reduced to a certain extent. After the processing of *Euodiae Fructus*, the average peak area of peak 21 (evodiamine) decreased significantly ($P < 0.05$), peak 28 (glycyrrhizic acid) was a new component, and the average peak areas of the other five differential chemical components decreased in varying degrees, but there was no significant statistical significance. This analysis method has strong specificity and good repeatability. It preliminarily discusses the correlation between the pharmacological effects and chemical components of *Euodiae Fructus* and prepared *Euodiae Fructus*, and explains the relationship between the changes of pharmacological effects and chemical components before and after *Euodiae Fructus* processing to a certain extent, which can provide data reference for the quality and processing research of *Euodiae Fructus* and prepared *Euodiae Fructus*.

Key words: *Euodiae Fructus*; prepared *Euodiae Fructus*; UPLC fingerprint; similarity; orthogonal partial least squares discriminant analysis

吴茱萸,始载于《神农本草经》,被列为中品。吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实^[1]。8~11月果实尚未开裂时,剪下果枝,晒干或低温干燥,除去枝、叶、果梗等杂质^[1]。吴茱萸具有散寒止痛,降逆止呕,助阳止泻的作用,临床用于厥阴头痛,寒疝腹痛,寒湿脚气,经行腹痛,脘腹胀痛,呕吐吞酸,五更泄泻^[1]。现代研究表明,吴茱萸具有舒张血管、抗炎、镇痛、抗菌、中枢保护、止吐止呕等多种药理作用^[2-5]。吴茱萸与其甘草汁炮制品(以下简称“制吴茱萸”)的药理作用有所不同,其原因可能与吴茱萸炮制前后化学成分的变化有关。吴茱萸经甘草汁炮制后,能降低吴茱萸毒性,缓和燥性^[6]。

吴茱萸中的化学成分众多,药理活性复杂。其主要的化学成分包括生物碱、苦味素、黄酮和挥发油等^[7]。由于中药中化学成分的多样性及复杂性,单一成分定量的化学成分质量控制模式不仅缺乏专属性,而且难以反映中药的内在质量属性。因此,需要

准确阐述吴茱萸及制吴茱萸中各类成分的变化,总结炮制前后药效成分变化的规律,才能更全面地解释其药理活性与临床作用的不同。近年来,新仪器、新技术的大量涌现,使得指纹图谱以及化学模式识别成为中药材质量研究的主流,指纹图谱结合化学计量学分析方法对中药的整体质量控制提供了一种新的思路^[8,9]。

本研究采用超高效液相色谱(UPLC)技术,建立吴茱萸及制吴茱萸指纹图谱,结合相似度评价和多元统计分析方法聚类分析(CA)、正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)进行综合评价,从多角度分析吴茱萸炮制前后的差异性成分,初步探讨了吴茱萸与制吴茱萸药理作用与化学成分的相关性,一定程度上阐释了吴茱萸炮制前后药理作用改变与化学成分变化之间的联系,可以为吴茱萸的质量及炮制研究提供数据参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

超高效液相色谱仪(Waters H-Class,沃特世公司);YMC Triart C₁₈色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm);万分之一分析天平(ME204E,梅特勒-托利多

公司);百万分之一分析天平(XP26,梅特勒-托利多公司);百分之一天平(JJ600,常熟市双杰测试仪器厂);数控超声波清洗器(KQ500D,昆山市超声仪器有限公司);超纯水系统(默克股份有限公司,Milli-Q Direct)。

1.2 材料

试剂:乙醇(天津市富宇精细化工有限公司,分析纯);甲醇(天津市富宇精细化工有限公司,分析纯);磷酸(天津市富宇精细化工有限公司,色谱纯);乙腈(默克股份有限公司,色谱纯);水为超纯水(实验室自制)。

试药:柠檬苦素(四川维克奇生物科技有限公司,批号:wkq16030802,含量98%);吴茱萸碱(中国食品药品检定研究院,批号:110802-201710,含量99.6%);吴茱萸次碱(中国食品药品检定研究院,批号:110801-201608,含量99.7%);去氢吴茱萸碱

(上海同田生物技术有限公司,批号:17052721,含量98%);金丝桃苷(中国食品药品检定研究院,批号:111521-201809,含量94.90%);绿原酸(中国食品药品检定研究院,批号:110753-202018,含量96.10%);新绿原酸(四川省维克奇生物科技有限公司,批号:wkq19021413,含量99.90%);隐绿原酸(成都普菲德生物技术有限公司,批号:15121701,含量98%);咖啡酸(中国食品药品检定研究院,批号:110885-201703,含量99.70%)。

14批吴茱萸药材经广东一方制药有限公司魏梅主任中药师鉴定均为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实,经检验,均符合2020年版《中国药典》吴茱萸药材项下的规定,药材来源信息见表1(其中以S代表吴茱萸,ZS代表制吴茱萸)。

表1 14批吴茱萸来源信息表

Table 1 Source information of 14 batches of *Euodiae Fructus*

吴茱萸编号 Euodiae fructus number	制吴茱萸编号 Prepared Euodiae Fructus number	产地 Origin
S1	ZS1	江西省宜春市樟树市
S2	ZS2	江西省宜春市樟树市
S3	ZS3	江西省宜春市樟树市
S4	ZS4	广西省柳州市柳城县
S5	ZS5	广西省柳州市柳城县
S6	ZS6	湖南省益阳市沅江市
S7	ZS7	湖南省益阳市沅江市
S8	ZS8	湖南省益阳市沅江市
S9	ZS9	江西省吉安市新干县
S10	ZS10	广西省玉林市玉州区
S11	ZS11	广西省玉林市玉州区
S12	ZS12	广西省玉林市玉州区
S13	ZS13	湖南省邵阳市邵东县
S14	ZS14	湖南省邵阳市武冈市

2 方法与结果

2.1 制吴茱萸饮片的炮制

取吴茱萸药材,除去枝、叶、果梗等杂质,即得吴茱萸饮片。参照2020版《中国药典》“制吴茱萸”项下方法进行炮制^[1]:取6g甘草捣碎,加适量水,煎汤,去渣,加入100g吴茱萸饮片(即净吴茱萸),闷润吸尽后,炒至微干,取出,干燥,即得14批制吴茱

萸饮片(编号ZS1~ZS14,详见表1)。

2.2 指纹图谱的建立

2.2.1 色谱条件

色谱柱:YMC Triart C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.9 μm)色谱柱;流动相为乙腈(A)-0.1%磷酸水溶液(B);梯度洗脱(0~9 min,8% A;9~18 min,8%→30% A;18~28 min,30%→80% A;28~33 min,80%

→100% A);流速为 0.30 mL/min;检测波长为 254 nm;柱温为 30 ℃;进样量为 1 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备

取甘草酸对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成每 1 mL 含 50 μg 甘草酸对照品溶液;取去氢吴茱萸碱、吴茱萸次碱对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成每 1 mL 含去氢吴茱萸碱 50 μg、吴茱萸碱 50 μg、吴茱萸次碱 20 μg 的混合对照品溶液 I;取金丝桃苷、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸对照品适量,精密称定,加甲醇溶解,制成每 1 mL 各含金丝桃苷、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸 30 μg 的混合对照品溶液 II。

2.2.3 供试品溶液的制备

取吴茱萸或制吴茱萸样品粉末(过三号筛)各约 0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 50 mL,称定重量,超声处理(功率 300 W,频率 40 kHz)40 min,放冷,再称定重量,用 70% 甲醇补足减失的重量,摇匀,过滤,取续滤液,即得供试品溶液。

2.2.4 指纹图谱方法学考察

2.2.4.1 精密度试验

取“2.2.3”项下吴茱萸供试品溶液(编号 S5),按“2.2.1”项下确定的色谱条件连续进样 6 次,测定指纹图谱,以去氢吴茱萸碱峰为参照峰 S,计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值。结果显示,各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值均小于 0.16%;相对峰面积 RSD 值均小于 0.88%,表明仪器精密度良好。

2.2.4.2 重复性试验

取同一批次的吴茱萸药材粉末(编号 S5),按“2.2.3”项下确定的供试品溶液制备方法制备 6 份供试品溶液,分别进样测定,以去氢吴茱萸碱峰为参照峰 S,计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值。结果显示,各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值均小于 0.48%;相对峰面积 RSD 值均小于 1.51%,表明该方法重复性良好。

2.2.4.3 稳定性试验

取“2.2.3”项下吴茱萸供试品溶液(编号 S5),按“2.2.1”项下确定的色谱条件分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进样分析,以去氢吴茱萸碱峰为参照峰 S,计算各共有峰与 S 峰的相对保留时间和相对峰面积 RSD 值。结果显示,各共有峰与 S 峰的相对保留时间 RSD 值均小于 0.47%;相对峰面积 RSD 值均小于 1.74%,说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.5 吴茱萸及制吴茱萸指纹图谱的建立

取 14 批吴茱萸和制吴茱萸样品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别按“2.2.1”项下色谱条件进行测定,记录各样品指纹图谱的色谱图。导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》,以编号为 S1 样品的指纹图谱为参照图谱,进行全峰匹配,14 批吴茱萸及制吴茱萸指纹图谱叠加如图 1、图 2,以平均数法生成吴茱萸及制吴茱萸对照指纹图谱(见图 3)。去氢吴茱萸碱为吴茱萸的主要有效成分之一,色谱峰位置居中,且响应较高,与相邻的色谱峰分离效果较好,因此选择去氢吴茱萸碱色谱峰为

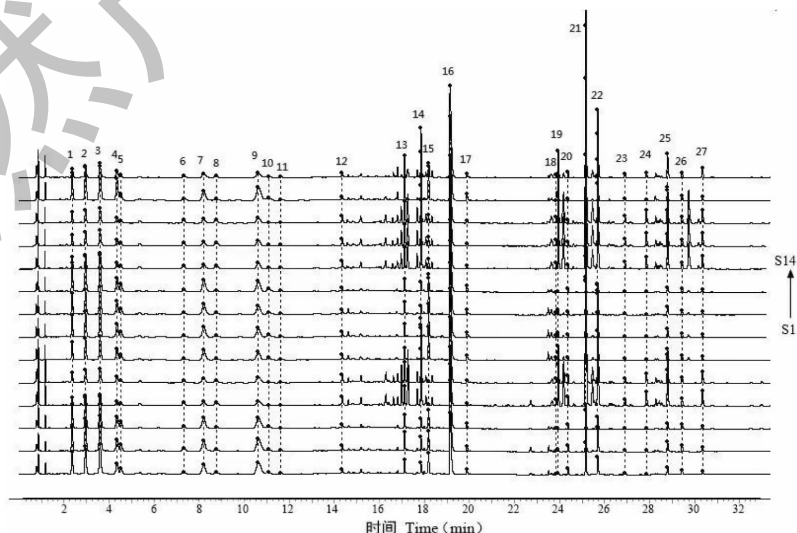


图 1 14 批吴茱萸指纹图谱叠加图

Fig. 1 Fingerprint overlay of 14 batches of Euodiae Fructus

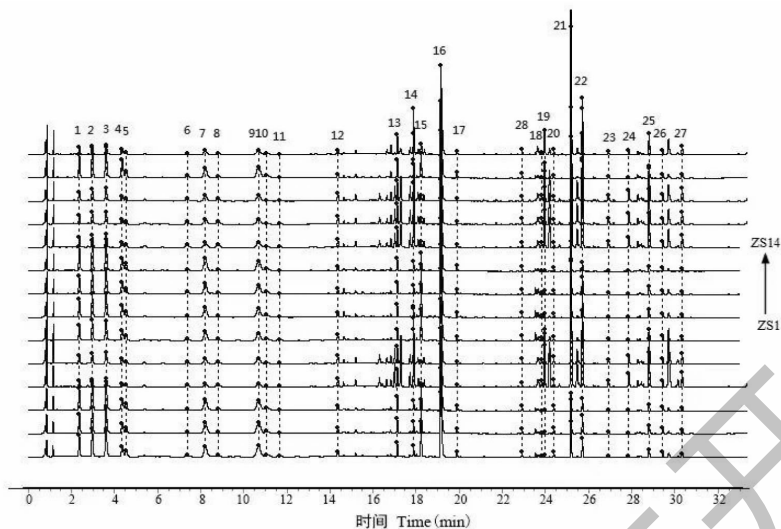
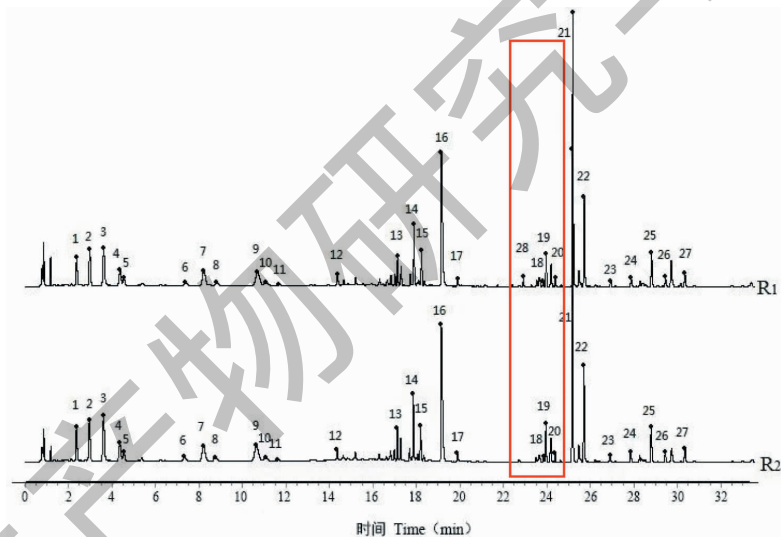


图 2 14 批制吴茱萸指纹图谱叠加图

Fig. 2 Fingerprint overlay of 14 batches of prepared Euodiae Fructus

图 3 吴茱萸(R_1)和制吴茱萸(R_2)指纹图谱共有模式图Fig. 3 Fingerprint common models of Euodiae Fructus (R_1) and prepared Euodiae Fructus (R_2)

参照峰 S, 在吴茱萸指纹图谱中标识出 27 个共有指纹峰, 制吴茱萸指纹图谱标识出 28 个共有峰, 在保留时间 23 min 左右, 制吴茱萸比吴茱萸多了 28 号色谱峰, 如图 3 所示。经与对照品比对, 28 号色谱峰确定为甘草酸, 为制吴茱萸炮制后产生。

2.2.6 吴茱萸及制吴茱萸指纹图谱色谱峰的指认

取混合对照品溶液 I、II 及吴茱萸、制吴茱萸供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行测定, 结果见图 4。经与对照品保留时间及紫外吸收光谱比对, 确定峰 4 为新绿原酸; 峰 9 为绿原酸; 峰 10 为隐

绿原酸; 峰 11 为咖啡酸; 峰 13 为金丝桃苷; 峰 16 为去氢吴茱萸碱; 峰 21 为吴茱萸碱; 峰 22 为吴茱萸次碱; 峰 28 为甘草酸。

2.2.7 相似度评价

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》计算 14 批吴茱萸及制吴茱萸指纹图谱的相似度(见表 2、表 3), 结果显示, 14 批吴茱萸的相似度在 0.680~0.963 范围内; 14 批制吴茱萸的相似度在 0.724~0.962 范围内, 来自江西产区(编号 S1、S2、S3、S9、ZS1、ZS2、ZS3、ZS9)的吴茱萸及制吴茱萸的

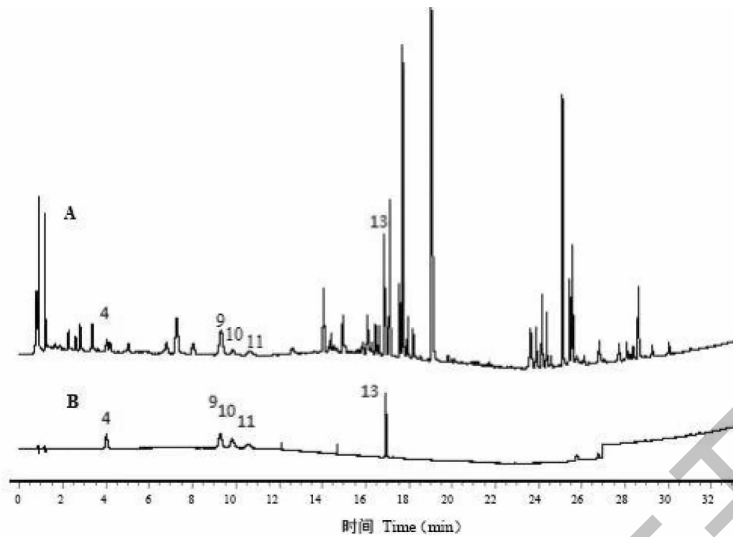


图4 吴茱萸及制吴茱萸指纹图谱色谱峰指认

Fig. 4 Identification of the chromatographic peaks of Euodiae Fructus and prepared Euodiae Fructus

注:A、D:吴茱萸指纹图谱;B:混合对照品Ⅱ;C:混合对照品Ⅰ;E:甘草酸对照品;F:制吴茱萸指纹图谱。4:新绿原酸;9:绿原酸;10:隐绿原酸;11:咖啡酸;13:金丝桃苷;16:去氢吴茱萸碱;21:吴茱萸碱;22:吴茱萸次碱;28:甘草酸。Note:A、D:Fingerprints of Euodiae Fructus;B: Mixed reference substance Ⅱ;C: Mixed reference substance Ⅰ;E: Glycyrrhizic acid;F: Fingerprint of prepared Euodiae Fructus. 4: Neochlorogenic acid;9: Chlorogenic acid;10: Cryptochlorogenic acid;11: Caffeic acid;13: Hyperin;16: Dehydroevodogine;21: Rutaine;22: Rucordinine;28: Glycyrrhizic acid.

相似度较低;来自湖南、广西产区(编号S4~S8、S10、S11、S12、S14、ZS4~ZS8、ZS10、ZS11、ZS12、ZS14)的吴茱萸及制吴茱萸的相似度较高;说明江西产区的吴茱萸及制吴茱萸质量与广西、湖南两个产区的吴茱萸及制吴茱萸质量存在一定差异。广

西、湖南两个产区的吴茱萸及制吴茱萸虽然也存在一定的差异,但与江西产区相比,差异较小。另外1批湖南产区(编号S13和ZS13)的吴茱萸和制吴茱萸相似度也较低,可能与药材的采收时间、产地加工方式的差异有关。

表2 14批吴茱萸指纹图谱相似度评价表

Table 2 Evaluation table of fingerprint similarity of 14 batches of Euodiae Fructus

No.	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	对照 Reference
S1	1.000	0.996	0.991	0.435	0.540	0.935	0.972	0.972	0.978	0.529	0.521	0.508	0.989	0.746	0.790
S2	0.996	1.000	0.985	0.489	0.591	0.955	0.983	0.982	0.970	0.580	0.573	0.560	0.990	0.789	0.828
S3	0.991	0.985	1.000	0.341	0.453	0.903	0.955	0.954	0.997	0.441	0.433	0.419	0.983	0.693	0.727
S4	0.435	0.489	0.341	1.000	0.991	0.682	0.569	0.567	0.279	0.992	0.993	0.995	0.452	0.841	0.890
S5	0.540	0.591	0.453	0.991	1.000	0.766	0.665	0.663	0.395	0.999	0.998	0.998	0.558	0.901	0.940
S6	0.935	0.955	0.903	0.682	0.766	1.000	0.988	0.988	0.873	0.758	0.752	0.741	0.951	0.917	0.937
S7	0.972	0.983	0.955	0.569	0.665	0.988	1.000	1.000	0.934	0.656	0.649	0.637	0.984	0.860	0.879
S8	0.972	0.982	0.954	0.567	0.663	0.988	1.000	1.000	0.933	0.654	0.647	0.634	0.984	0.859	0.877
S9	0.978	0.970	0.997	0.279	0.395	0.873	0.934	0.933	1.000	0.383	0.374	0.360	0.971	0.652	0.680
S10	0.529	0.580	0.441	0.992	0.999	0.758	0.656	0.654	0.383	1.000	1.000	1.000	0.549	0.892	0.936
S11	0.521	0.573	0.433	0.993	0.998	0.752	0.649	0.647	0.374	1.000	1.000	1.000	0.541	0.888	0.932
S12	0.508	0.560	0.419	0.995	0.998	0.741	0.637	0.634	0.360	1.000	1.000	1.000	0.527	0.881	0.926
S13	0.989	0.990	0.983	0.452	0.558	0.951	0.984	0.984	0.971	0.549	0.541	0.527	1.000	0.784	0.806
S14	0.746	0.789	0.693	0.841	0.901	0.917	0.860	0.859	0.652	0.892	0.888	0.881	0.784	1.000	0.963
对照 Reference	0.790	0.828	0.727	0.890	0.940	0.937	0.879	0.877	0.680	0.936	0.932	0.926	0.806	0.963	1.000

表 3 14 批制吴茱萸指纹图谱相似度评价表

Table 3 Evaluation table of fingerprint similarity of 14 batches of prepared Euodiae Fructus

No.	ZS1	ZS2	ZS3	ZS4	ZS5	ZS6	ZS7	ZS8	ZS9	ZS10	ZS11	ZS12	ZS13	ZS14	对照 Reference
ZS1	1.000	0.999	0.989	0.452	0.584	0.943	0.981	0.981	0.975	0.572	0.580	0.569	0.991	0.783	0.824
ZS2	0.999	1.000	0.990	0.444	0.579	0.942	0.981	0.980	0.977	0.566	0.575	0.563	0.990	0.782	0.820
ZS3	0.989	0.990	1.000	0.338	0.484	0.902	0.959	0.963	0.996	0.468	0.477	0.464	0.986	0.723	0.751
ZS4	0.452	0.444	0.338	1.000	0.984	0.686	0.563	0.543	0.299	0.988	0.985	0.988	0.456	0.811	0.872
ZS5	0.584	0.579	0.484	0.984	1.000	0.793	0.688	0.672	0.451	0.999	0.999	0.999	0.593	0.896	0.940
ZS6	0.943	0.942	0.902	0.686	0.793	1.000	0.986	0.982	0.882	0.782	0.789	0.781	0.948	0.932	0.951
ZS7	0.981	0.981	0.959	0.563	0.688	0.986	1.000	0.999	0.945	0.674	0.683	0.672	0.986	0.875	0.894
ZS8	0.981	0.980	0.963	0.543	0.672	0.982	0.999	1.000	0.952	0.657	0.666	0.655	0.987	0.872	0.883
ZS9	0.975	0.977	0.996	0.299	0.451	0.882	0.945	0.952	1.000	0.432	0.442	0.429	0.978	0.707	0.724
ZS10	0.572	0.566	0.468	0.988	0.999	0.782	0.674	0.657	0.432	1.000	0.999	1.000	0.578	0.884	0.934
ZS11	0.580	0.575	0.477	0.985	0.999	0.789	0.683	0.666	0.442	0.999	1.000	1.000	0.587	0.893	0.938
ZS12	0.569	0.563	0.464	0.988	0.999	0.781	0.672	0.655	0.429	1.000	1.000	1.000	0.575	0.885	0.933
ZS13	0.991	0.990	0.986	0.456	0.593	0.948	0.986	0.987	0.978	0.578	0.587	0.575	1.000	0.809	0.830
ZS14	0.783	0.782	0.723	0.811	0.896	0.932	0.875	0.872	0.707	0.884	0.893	0.885	0.809	1.000	0.962
对照 Reference	0.824	0.820	0.751	0.872	0.940	0.951	0.894	0.883	0.724	0.934	0.938	0.933	0.830	0.962	1.000

2.2.8 吴茱萸和制吴茱萸 UPLC 指纹图谱的 OPLS-DA 分析

正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)是一种多因变量对多自变量的回归建模方法,其最大特点是能够去除自变量 X 中与分类变量 Y 无关的数据变异,使分类信息主要集中在一个主成分中,从而让模型变得简单和易于解释,其判别效果及主成分得分图的可视化效果更加明显。采用正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)可以进行有监督的模式识别,显示样本间差异主要由哪些变量引起,寻找差异性标志物^[9],已广泛应用于中药材产地、基原、炮制、真伪鉴别等方面^[10]。

本研究运用 IBM SPSS Statistics 20.0 统计软件以 27 个共有峰及制吴茱萸新增的 28 号峰峰面积为变量对吴茱萸和制吴茱萸进行 OPLS-DA 分析,通过 OPLS-DA 的 Scores 图(见图 5)可知,吴茱萸和制吴茱萸明显分为 2 类;所建立的模型中累积解释能力参数 $R^2X(\text{cum})$ 为 0.995,累积解释能力参数 $R^2Y(\text{cum})$ 为 0.996,预测能力参数 $Q^2(\text{cum})$ 为 0.967,这三个参数值均接近于 1,表明该模型的拟合准确性好,具有较强的解释和预测能力;运用统计软件修

改假设检验的次数为 200 次,结果见 OPLS-DA 的 Permutation 图(见图 6)。由图 6 可知, R^2 和 Q^2 截距值分别为 0.488 和 -1.61,所有 R^2 和 Q^2 的左边的点都低于最右边的点,说明建立的 OPLS-DA 模型没有出现过拟合现象,可以用于吴茱萸及制吴茱萸的模式识别。通过 OPLS-DA 的 S-plot 图(见图 7)结合 VIP 图(见图 8)可知,以 VIP 大于 1 为显著影响,共找到 6 个差异标志物,对其影响显著性排序,分别为甘草酸 > 吴茱萸碱 > 峰 3 > 峰 1 > 绿原酸 > 峰 2,提示这几个化学成分对于区分吴茱萸和制吴茱萸的贡献较大,表明这 6 个化学成分为吴茱萸与制吴茱萸的差异性成分。

2.2.9 统计学分析

以平均峰面积为变量,对 14 批吴茱萸和制吴茱萸 6 个差异成分色谱峰的平均峰面积进行配对 t 检验,绘制出 t 检验图(见图 9), $P < 0.05$,表示差异具有统计学意义,结果显示,吴茱萸炮制后,峰 21(吴茱萸碱)平均峰面积明显降低, $P < 0.05$,峰 28(甘草酸)为新增成分,其余 5 个差异性化学成分的平均峰面积均有不同程度的降低,但无明显统计学意义。

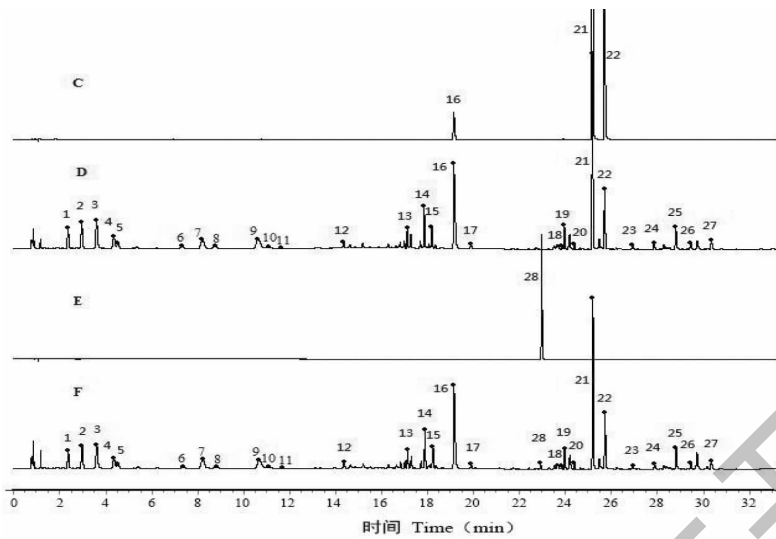


图5 OPLS-DA 分析的 Score 图

Fig. 5 Score plot of OPLS-DA analysis

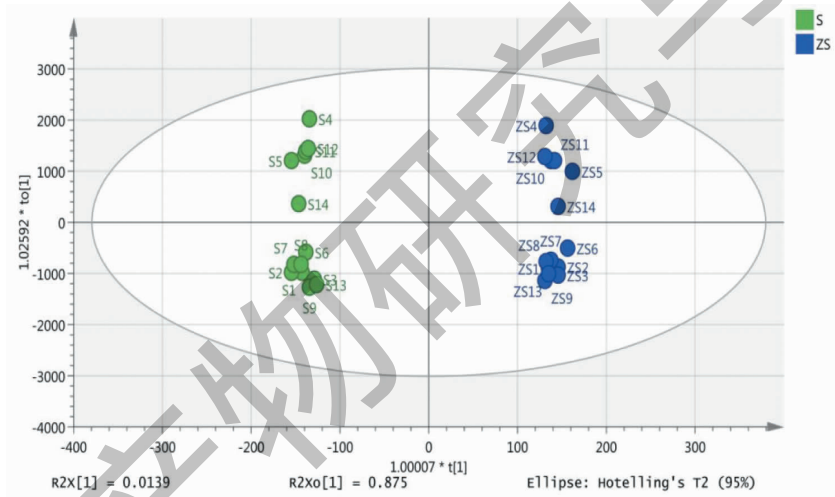


图6 OPLS-DA 分析的 Permutation 图

Fig. 6 Permutation plot of OPLS-DA analysis

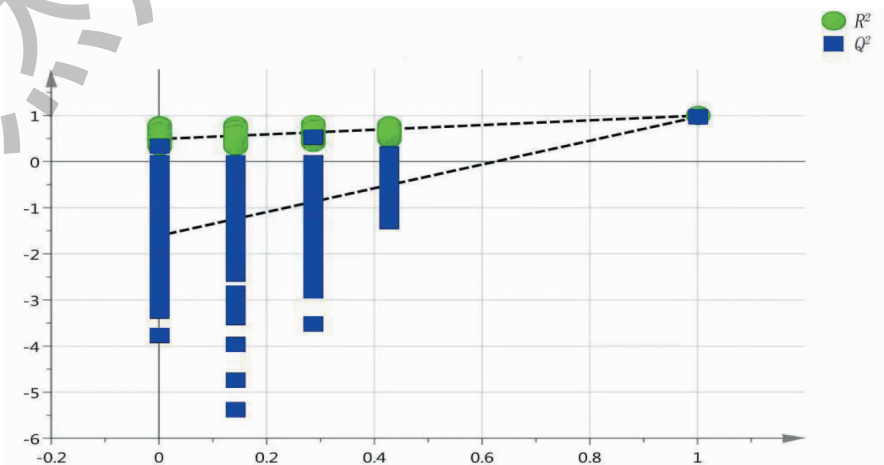


图7 OPLS-DA 分析 S-plot 图

Fig. 7 S-plot chart of OPLS-DA analysis

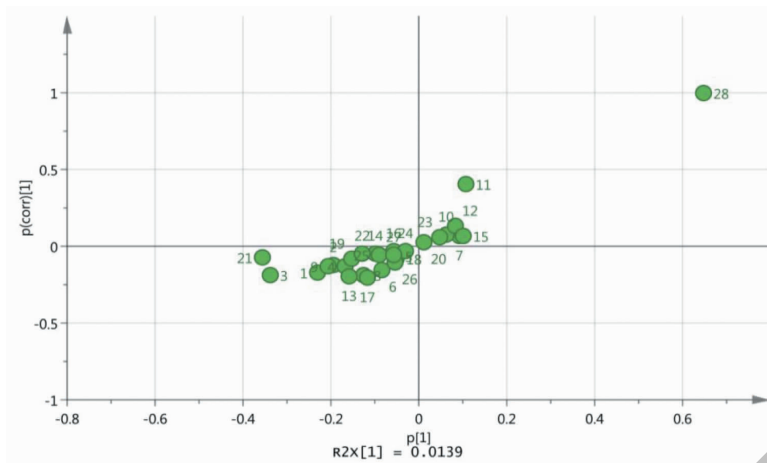
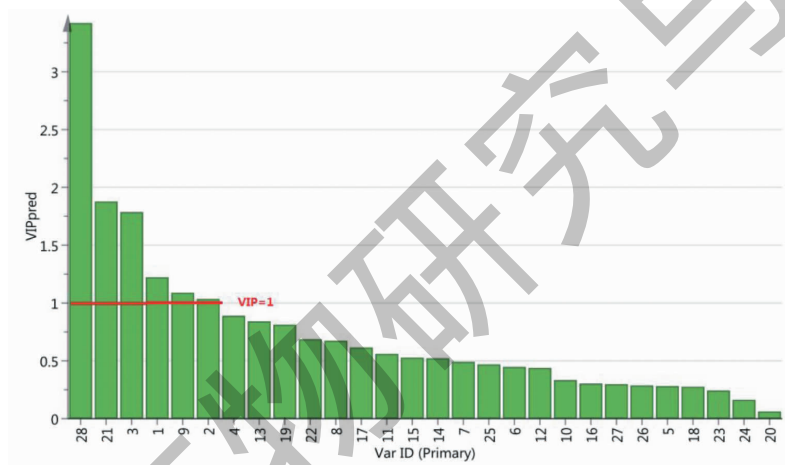


图 8 OPLS-DA 分析 VIP 图

Fig. 8 VIP chart of OPLS-DA analysis

图 9 6 个差异性成分平均峰面积 t 检验图Fig. 9 t -Test diagram of average peak area of six different components

3 讨论与结论

吴茱萸指纹图谱的建立,一方面可以对不同产区的吴茱萸质量进行初步的评价,另一方面也能够明显区分出吴茱萸与制吴茱萸,吴茱萸指纹图谱共标识出 27 个共有色谱峰,制吴茱萸新增共有色谱峰 28,为甘草酸,由制吴茱萸炮制后产生,利用此峰可以明显区分吴茱萸生品和炮制品。相似度评价结果显示,除 4 批江西产区的样品外,其余产地吴茱萸指纹图谱相似度较高。其中湖南产区出现 1 批相似度异常,可能与采收时间、产地加工方式的不同有关。通过正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)找到 6 个差异标志物,对其影响显著性排序,分别为甘草酸 > 吴茱萸碱 > 峰 3 > 峰 1 > 绿原酸 > 峰 2。

中医理论认为,中药吴茱萸性热苦寒,有散热止

痛、降逆止呕之功,用于治疗肝胃虚寒、阴浊上逆所致的头痛或胃脘疼痛等症。而甘草性平,味甘,具有补脾益气,缓急止痛,调和诸药的作用。因此,吴茱萸经甘草汁炙后,一定程度能降低毒性、缓和燥性,适用于脾胃虚弱者。吴茱萸经甘草汁炮制后除增加甘草酸外,其余 5 个差异标志物,平均峰面积均呈下降趋势,有报道指出吴茱萸碱、吴茱萸次碱、柠檬苦素对人胚肾细胞有一定的毒性作用^[11],因此,吴茱萸炮制后吴茱萸碱等化学成分含量的降低,是制吴茱萸炮制后毒性降低的原因之一。也有研究表明,吴茱萸不同组分均具有毒性,强度为挥发油 > 全组分 > 醇提组分 > 水提组分^[12],因此,制吴茱萸在炮制过程中,由于受热,挥发油含量降低,使得其毒性减弱,同时,绿原酸等酚酸类成分因热不稳定,含量

降低,也使吴茱萸药效更加缓和。

本研究采用超高效液相色谱(UPLC)法建立吴茱萸与制吴茱萸指纹图谱,该方法专属性强,重复性好,初步探讨了吴茱萸与制吴茱萸药理作用与化学成分的相关性,一定程度上阐释了吴茱萸炮制前后药理作用改变与化学成分变化之间的联系,可以为吴茱萸的质量及炮制研究提供数据参考。

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, 2020:178.
- 2 Zhang XL, Jing YK, Peng SW, et al. Study on chemical constituents of *Evodia rutaecarpa* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 470-474.
- 3 Chen Y, Wei GB, Liang J, et al. Spectrum-effect relationship of analgesic effect of *Euodiae Fructus* based on OPLS analysis [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2019, 34: 781-786.
- 4 Han ZF, Liu SM, Liu XQ, et al. The effect of *Evodia* on the protection of AD mice and the regulation of learning and memory ability [J]. Res Pract Chin Med (现代中药研究与实践), 2018, 32(6): 28-30.
- 5 Chen Y, Liang J, Dong W, et al. Preliminary study of antiemetic components in *Evodia rutaecarpa* based on spectrum-effect correlation analysis [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2017, 52: 1737-1742.
- 6 Xiao Y, Duan JF, Liu Y, et al. Historic successive changes of *Euodiae Fructus* in processing methods and functions [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2017, 23(3): 223-228.
- 7 Gao ZL. Progress of studies on constituents and pharmacological effect of *Evodia rutaecarpa* [J]. Sci Technol Innov (科学技术创新), 2020(13): 53-54.
- 8 Liu DF, Zhao LN, Li YF, et al. Research progress and application in fingerprint technology on Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 4085-4094.
- 9 Yu Y, Li J, Li BG. Application of stoichiometry in quality control of traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Pat Med (中成药), 2018, 40: 1139-1142.
- 10 Sun LL, Wang M, Ren XL. Application progress on chemical pattern recognition in quality control of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2017, 48: 4339-4345.
- 11 Zhou Q, Jin RM, Yao GT. Preliminary study on nephrocytes toxicity induced by four traditional Chinese medicine monomers in *Evodia rutaecarpa* [J]. Chin J Pharmacov (中国药物警戒), 2013, 10(1): 1-5.
- 12 Huang W, Zhao Y, Sun R. Experimental comparison study on mice's acute toxicity of different composition in *Evodia fructus* [J]. Chin J Pharmacov (中国药物警戒), 2010, 7(3): 129-134.