

骨碎补 UPLC 指纹图谱与人骨肉瘤细胞 MG63 中碱性磷酸酶活性的谱效关系研究

陈香丽,张慧敏,张紫佳*

上海中医药大学中药研究所 中药标准化教育部重点实验室,上海 201203

摘要:建立骨碎补生品和砂烫品提取物的 UPLC 指纹图谱,并研究骨碎补提取物与人骨肉瘤细胞 MG63 中碱性磷酸酶(ALP)活性之间的谱效关系。采用 UPLC 法建立骨碎补生品和烫品的指纹图谱并通过 UPLC-Q-TOF MS 法对其化学成分进行鉴别;通过测定 MG63 细胞中 ALP 活性检测骨碎补提取物对 MG63 细胞成骨分化的影响;采用灰色关联度分析、双变量相关性分析以及偏最小二乘回归分析法分析骨碎补生品和烫品的 UPLC 特征指纹峰与其促 ALP 活性之间的谱效关系。在标定的 12 个共有峰中,确定了 4、5、12 号峰与 ALP 活性呈正相关,其对应的物质依次是咖啡酸-4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、儿茶素-7-葡萄糖苷、柚皮苷,为深入研究骨碎补的促成骨分化活性物质基础提供依据。

关键词:骨碎补;UPLC 指纹图谱;碱性磷酸酶活性;谱效关系;人骨肉瘤细胞 MG63

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)2-0293-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.2.012

Study on the spectrum-effect relationship between UPLC fingerprint and alkaline phosphatase activity in osteosarcoma MG63 cell of *Drynariae Rhizoma*

CHEN Xiang-li, ZHANG Hui-min, ZHANG Zi-jia*

The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: To establish a UPLC fingerprint of the extract of *Drynariae Rhizoma* before and after processing, and to study the spectrum-effect relationship between the extract of *Drynariae Rhizoma* and alkaline phosphatase (ALP) activity in osteosarcoma MG63 cell line. Using UPLC method to establish the fingerprint of raw materials and processing slices of *Drynariae Rhizoma* and identified their chemical components by UPLC-Q-TOF MS; The ALP activity was measured to determine the effect of *Drynariae Rhizoma* extract on osteosarcoma MG63 cell line; Grey correlation analysis, bivariate correlation analysis, and partial least square regression analysis were used to analyze the spectrum-effect relationship between the UPLC characteristic fingerprint peaks and ALP activity of the raw and processed products of *Drynariae Rhizoma*. Among the 12 characteristic fingerprint peaks calibrated, it was determined that peaks 4, 5 and 12 were positively correlated with ALP activity, and the corresponding substances were caffeic acid-4-*O*- β -D-glucopyranoside, catechin-7-glucoside and naringin. It provides a reference for in-depth research on the active material basis of *Drynariae Rhizoma* in promoting osteogenic differentiation effect.

Key words: *Drynariae Rhizoma*; UPLC fingerprint; alkaline phosphatase activity; spectrum-effect relationship; osteosarcoma MG63 cell line

骨碎补是水龙骨科植物槲蕨(*Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm.)的干燥根茎,其性温、味苦,归肝、肾经。具有疗伤止痛、补肾强骨、消风祛斑的功效^[1]。

现代药理和临床研究表明,骨碎补具有抗骨质疏松、促骨折愈合、肾保护、抗炎、促进牙齿生长等作用^[2]。化学成分研究表明骨碎补中的主要活性成分为黄酮类、三萜类、苯丙素类以及酚类等^[3]。有大量研究表明,骨碎补在治疗骨骼相关疾病中具有显著疗效,且体外试验表明骨碎补可促进成骨细胞

的成骨分化能力^[4-7],但对于骨碎补中具体起作用的药效成分研究还未见报道。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)是成骨细胞分化成熟的标志物,通过 ALP 的活性水平变化可以判断成骨细胞的分化能力。因此本实验通过 UPLC 指纹图谱与人成骨肉瘤 MG63 细胞的 ALP 活性谱效关系进行分析,探讨骨碎补作用于成骨细胞的主要成分。

中药谱效相关评价模式是将化学成分指纹图谱与其药效作用相结合,使指纹图谱中化学成分体现出相应的药效,同时阐明指纹图谱特征峰与药效的相互关系,确定相应的药效物质基础,从而对中药进行质量控制和药效评价^[8,9]。

本研究建立骨碎补生品和烫品 UPLC 指纹图谱并用 UPLC-Q-TOF MS 技术对其化学成分进行鉴别,采用灰色关联度、双变量相关性分析和偏最小二乘法构建骨碎补指纹图谱和 ALP 活性的谱-效关系,为阐明骨碎补的药效物质基础和质量控制提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

1.1.1 仪器

Waters 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC HSS T3 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); Q-TOF 液质联用仪(安捷伦液相色谱-G650 系列四极杆-飞行时间质谱联用仪)。

1.1.2 试剂与材料

柚皮苷(批号:10236-47-2,纯度:大于 98%,成都植标化纯生物技术有限公司); DMEM 培养基(批号:11995081, Gibco); 碱性磷酸酶(ALP/AKP)测试盒(微板法)(批号:A0529-2-2,南京建成生物工程研究); Pierce™ BCA 蛋白定量试剂盒(批号:23227, Thermo Fisher Scientific, USA); 色谱级甲醇、甲酸(Fisher 公司); 分析级 75% 乙醇(国药集团化学试剂有限公司)。实验所用骨碎补药材购自亳州中药材市场,由上海中药标准化中心吴立宏研究员鉴定为水龙骨科植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm 的干燥根茎,标本编号为 20201001-7,保存在上海中医药大学中药研究所,骨碎补药材产地信息详见表 1,其中烫品 1~3(DRT 1~3)分别由生品 1~3 按照《中华人民共和国药典》(2020 年版一部)方法经砂烫制得。

表 1 骨碎补药材产地信息

Table 1 Origin information of *Drynariae Rhizoma*

编号 No.	产地 Producing area
生品 1(DRS 1)	湖北省黄冈市
生品 2(DRS 2)	安徽省亳州市
生品 3(DRS 3)	广东省信宜市
生品 4(DRS 4)	上海市
生品 5(DRS 5)	湖北省黄冈市
烫品 1(DRT 1)	湖北省黄冈市
烫品 2(DRT 2)	安徽省亳州市
烫品 3(DRT 3)	广东省信宜市
烫品 4(DRT 4)	河北省石家庄
烫品 5(DRT 5)	宁夏中卫市

1.2 方法

1.2.1 供试品溶液的制备

取样品粉末 0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 75% 乙醇 20 mL,称定重量,45 °C 超声提取 30 min(功率 180 W,频率 40 kHz),放冷,再称定重量,用 75% 乙醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

1.2.2 色谱分析条件

采用 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 色谱柱,甲醇(A)和 0.1% 的甲酸水(B)为流动相,在 25 °C 柱温条件下分离,流速 0.3 mL/min,进样量 5 μL。

洗脱梯度:0~8 min, 96%→92% B; 8~11 min, 92%→84% B; 11~16 min, 84%→82% B; 16~19 min, 82%→70% B; 19~22 min, 70%→65% B; 22~27 min, 65%→55% B; 27~35 min, 55%→45% B; 35~38 min, 45%→5% B。0~6.5 min 的检测波长分别为 283 nm; 6.5~13 min 的检测波长为 260 nm; 13~18 min 的检测波长为 283 nm; 18~23 min 的检测波长为 260 nm; 23~38 min 的检测波长为 283 nm。

1.2.3 质谱分析条件

质谱条件:扫描质量范围(m/z):100~1700;鞘气温度:250 °C;鞘气流速:11 L/min;喷嘴电压:500 V;雾化器压力:45 psi;毛细管电压:3.5~4.0 kV;毛细管温度:350 °C;干燥器流速:5 L/min;干燥器温度:300 °C;碰撞能量:20~50 V。

1.2.4 骨碎补提取物 ALP 活性的测定

将 10 批骨碎补 75% 乙醇提取物,分别用 DMSO 配置成 100 mg 生药/mL 的母液,0.22 μm 微孔滤膜过滤,用于后期 MG63 细胞 ALP 活性评价研究。

将 MG63 细胞以 2×10^5 个/孔的密度将细胞接种于 6 孔板中,每孔的体积为 2 mL。待细胞贴壁后给药,给药浓度为 0.01 mg 生药/mL,给药 48 h 后按 ALP 检测试剂盒说明书测定 ALP 活性。

1.3 数据分析

本实验数据的灰色关联度分析、双变量相关性及偏最小二乘回归分析采用 SPSSPRO、SPSS21.0、SIMCA-14.1 软件处理,细胞 ALP 活性用 GraphPad Prism 9.0.0 软件作图分析。

2 结果与分析

2.1 骨碎补指纹图谱的建立

2.1.1 精密度实验

取同一份骨碎补供试品溶液按“1.2.2”项下色谱条件连续进样 6 次,骨碎补各共有峰相对保留时间相对标准偏差 (RSD < 0.37%),相对峰面积 RSD < 1.11%,表明仪器精密度较好。

2.1.2 重复性实验

称取 6 份同一批号的骨碎补,制备 6 份平行样

品,依次进样分析,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积的 RSD 值。结果显示,共有峰相对保留时间 RSD < 0.05%,相对峰面积 RSD < 1.67%,表明此方法重复性良好。

2.1.3 稳定性实验

同一份供试品溶液分别在 0、2、4、8、12、24、48 h 按“1.2.2”项下色谱条件进行测定,计算各共有峰相对保留时间及相对峰面积。结果表明,相对保留时间 RSD < 0.34%,相对峰面积 RSD < 1.91%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性较好。

2.2 骨碎补 UPLC 指纹图谱的建立及相似度评价

按“1.2.1”项下方法制备 5 批骨碎补生品和 5 批骨碎补烫品的供试品溶液,再按“1.2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。将色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.1 版)》,经多点校正后,采用中位数法生成骨碎补生品和骨碎补烫品的 UPLC 叠加指纹图谱。结果显示,5 批骨碎补生品和 5 批骨碎补烫品共有 12 个共有峰(见图 1)。5 批骨碎补生品和 5 批骨碎补烫品指纹图谱的相似度均大于 0.9,表明骨碎补生品与烫品相似度高,区分不明显(见表 2)。

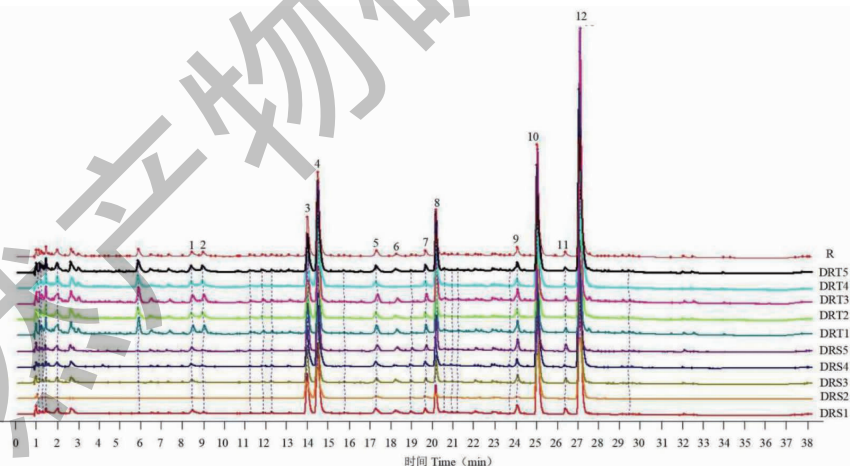


图 1 骨碎补生品和烫品叠加指纹图谱

Fig. 1 Superimposed fingerprint of raw and processed *Drynariae Rhizoma*

表 2 5 批骨碎补生品和 5 批烫品指纹图谱相似度

Table 2 Fingerprint similarity of five batches of raw and five batches of processed *Drynariae Rhizoma*

编号 No.	DRS 1	DRS 2	DRS 3	DRS 4	DRS 5	DRT 1	DRT 2	DRT 3	DRT 4	DRT 5	对照指纹 图谱 Reference fingerprint
DRS 1	1	0.999	0.871	0.999	0.959	0.976	0.982	0.98	0.982	0.979	0.989
DRS 2	0.999	1	0.873	0.999	0.96	0.976	0.984	0.982	0.984	0.981	0.99

续表 2(Continued Tab. 2)

编号 No.	DRS 1	DRS 2	DRS 3	DRS 4	DRS 5	DRT 1	DRT 2	DRT 3	DRT 4	DRT 5	对照指纹 图谱 Reference fingerprint
DRS 3	0.871	0.873	1	0.869	0.896	0.925	0.922	0.923	0.922	0.931	0.918
DRS 4	0.999	0.999	0.869	1	0.961	0.975	0.982	0.98	0.982	0.98	0.989
DRS 5	0.959	0.96	0.896	0.961	1	0.96	0.969	0.968	0.969	0.972	0.976
DRT 1	0.976	0.976	0.925	0.975	0.96	1	0.995	0.998	0.995	0.994	0.995
DRT 2	0.982	0.984	0.922	0.982	0.969	0.995	1	0.998	1	0.998	0.998
DRT 3	0.98	0.982	0.923	0.98	0.968	0.998	0.998	1	0.998	0.997	0.998
DRT 4	0.982	0.984	0.922	0.982	0.969	0.995	1	0.998	1	0.998	0.998
DRT 5	0.979	0.981	0.931	0.98	0.972	0.994	0.998	0.997	0.998	1	0.997
对照指纹 图谱 Reference fingerprint	0.989	0.99	0.918	0.989	0.976	0.995	0.998	0.998	0.998	0.997	1

2.3 UPLC-Q-TOF MS 鉴别骨碎补中的化学成分

将骨碎补生品和砂烫炮制品按“1.2.4”项下质谱条件采用 UPLC-Q-TOF MS 技术进行分析,通过 MSDIL 数据库、PubChem 数据库和相关文献比对,

鉴定骨碎补指纹图谱的共有峰,此外还从中鉴定出另外 27 个化合物。骨碎补炮制前后的总离子流图见图 2,质谱鉴别结果见表 3。

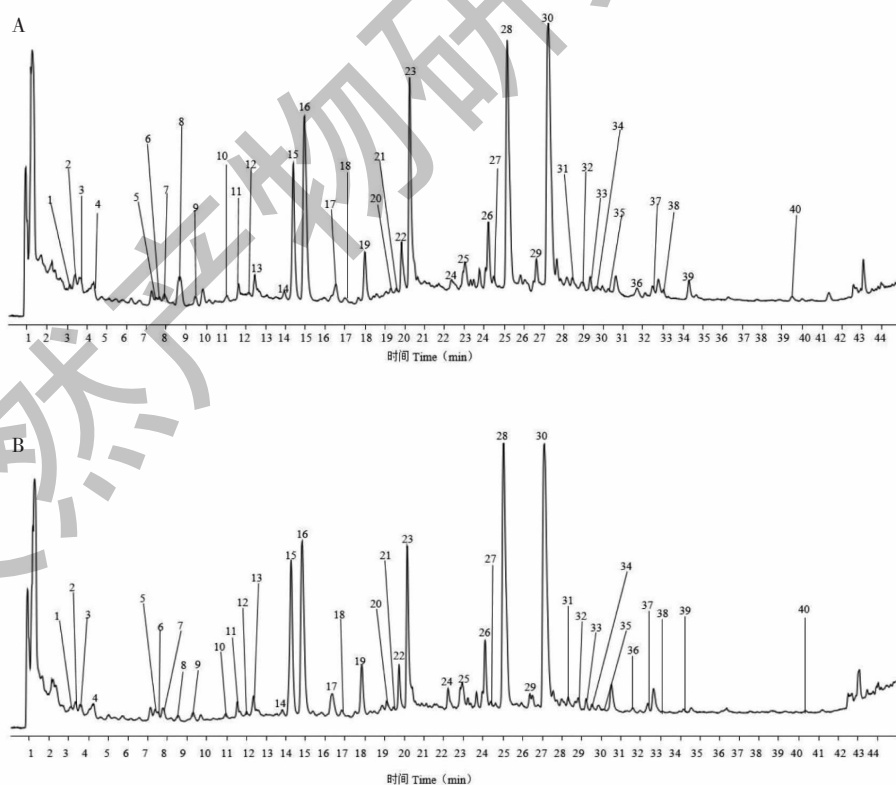


图 2 骨碎补 UPLC-Q-TOF MS 总离子流图

Fig. 2 UPLC-Q-TOF MS total ion chromatogram of Drynariae Rhizoma

注:A:骨碎补生品;B:骨碎补烫品。Note:A:Raw Drynariae Rhizoma;B:Processed Drynariae Rhizoma.

表 3 生、烫骨碎补化学成分的质谱数据及鉴定结果

Table 3 Mass spectrum data and identification results of chemical components of raw and processed *Drynariae Rhizoma*

编号 No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	m/z [M-H] ⁻		偏差 Error ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 Fragment ion
				实测值 Measured value	理论值 Theoretical value		
1	3.224	C ₂₁ H ₂₂ N ₄ O ₆ S	Ralitrexed *	457.117 1	457.118 7	-3.5	335.132 6、 243.061 0、 117.018 8、 147.029 2 429.122 8、
2	3.475	C ₁₄ H ₂₀ N ₆ O ₅ S	S-腺苷-L-同型半胱氨酸 S-Adenosyl-L-homocysteine *	383.117 7	383.117 3	1.0	333.128 8、 295.102 1、 200.055 7、 156.066 0
3	3.663	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	α -1,2-甘露二糖 2- α -Mannobiose *	341.107 2	341.107 6	-1.2	295.101 6、 265.091 2、 161.044 5
4	4.353	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	儿茶素 3-O-(1,6-二羟基-2-环己烯-1-羧酸酯) Catechin 3-O-(1,6-dihydroxy-2-cyclohexene-1-carboxylate) *	429.119 1	429.119 1	-0.02	383.117 3、 295.101 7、 186.076 3、 134.987 4
5	7.429	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	Benzoic acid + 1O, O-Hex *	299.077 6	299.077 2	1.3	279.107 3、 162.838 4、 137.024 0、 116.927 9
6	7.806	C ₁₃ H ₁₆ O ₉	Benzoic acid + 2O, O-Hex *	315.070 0	315.070 0	-0.03	279.107 3、 216.980 4、 162.838 6、 153.018 8
7	8.057	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	Secoxyloganin ^[10] *	403.971 7	403.971 6	0.2	449.127 6、 279.107 3、 167.034 3、 123.044 8
8	8.998	C ₁₅ H ₂₄ O ₉	Phyllaemblic acid B *	347.916 6	347.915 8	2.3	275.303 4、 203.013 2、 161.044 9、 116.927 9
9	9.688	C ₇ H ₆ O ₄	原儿茶酸 Protocatechuic acid ^[11]	153.019 3	153.019 3	-0.2	109.029 2
10	11.194	C ₂₁ H ₂₀ O ₄	(E)-3-[4-苯甲酰氧基-3-(3-甲基丁-2-烯基)苯基]丙-2-烯酸 (E)-3-[4-Benzoyl oxy-3-(3-methylbut-2-enyl) phenyl] prop-2-enoic acid *	335.135 1	335.135 0	0.3	299.075 8、 137.023 9、 116.092 8
11	11.822	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	Vanillic acid glucoside ^[12]	329.086 3	329.087 8	-4.3	167.034 2、 162.838 7
12	12.198	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	Aspalathin *	451.121 5	451.124 5	-6.6	351.081 7、 313.091 3、 121.039 6
13	12.700	C ₇ H ₆ O ₃	对羟基苯甲酸 p-Hydroxybenzoic acid ^[13]	137.023 9	137.024 4	-3.6	
14	14.145	C ₁₃ H ₂₄ O ₉	(2R, 3R, 4S, 5R, 6R)-3-[(2R, 3R, 4S, 5S, 6R)-3, 5-Dihydroxy-4-methoxy-6-methyloxan-2-yl]oxy-6-methyloxane-2, 4, 5-triol *	323.133 2	323.132 9	0.9	162.838 3

续表 3 (Continued Tab. 3)

编号 No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	m/z [M-H] ⁻		偏差 Error ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 Fragment ion
				实测值 Measured value	理论值 Theoretical value		
15	14.647	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	4- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖基香豆酸 4- <i>O</i> - β -D-glucopyranosylcoumaric acid ^[14,15]	325.091 4	325.091 7	-0.9	163.039 0、 151.039 7、 119.049 8
16	15.212	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	咖啡酸 4- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷 Caffeic acid-4- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside ^[11,14,15]	341.087 1	341.087 8	-2.1	683.179 1、 179.034 4、 135.044 8
17	16.718	C ₁₅ H ₂₀ O ₉	3,5-Dimethoxy-4-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxybenzoic acid *	343.101 8	343.103 4	-5.1	688.165 1、 289.107 3、 181.049 9、 134.988 0、 289.071 1、
18	17.220	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₁	儿茶素 7-葡萄糖苷 Catechin-7-glucoside *	451.124 6	451.124 6	0.06	178.977 2、 134.987 4
19	18.286	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	阿魏酸 4- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷 Ferulic acid-4- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside ^[15]	355.101 7	355.103 4	-4.8	711.209 8、 193.049 9、 134.036 8
20	19.355	C ₉ H ₈ O ₄	4-羟基苯丙酮酸 4-Hydroxyphenylpyruvic acid *	179.034 4	179.035	-3.9	135.045 0
21	19.480	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	二氢阿魏酸 4- <i>O</i> -葡萄糖苷酸 Dihydroferulic acid-4- <i>O</i> -glucuronide *	371.096 7	371.098 4	-4.6	341.087 1、 292.082 1、 177.019 1
22	19.982	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	(<i>E</i>)- <i>P</i> -松针酸- β -D-吡喃葡萄糖苷 (<i>E</i>)- <i>p</i> -Pinoic acid - β -D-glucopyranoside ^[15]	385.112 3	385.114	-4.4	223.060 9、 178.920 3
23	20.421	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₃	5,7-二羟基原酮-7- <i>O</i> -芸香糖苷 5,7-Dihydroxychromone-7- <i>O</i> -rutinoside ^[11,16]	485.128 3	485.130 1	-3.7	531.134 6、 177.019 2
24	22.555	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	Kaempferol-3- <i>O</i> - β -sophoroside *	609.142 8	609.146 1	-5.4	447.089 5、 163.039 6、 193.049 9
25	23.120	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₃	Mulberroside E *	551.174 3	551.176 2	-3.4	193.049 9
26	24.312	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	北美圣草素-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷 Eriodictyol-7- <i>O</i> - β -D-glucoside ^[17]	449.106 6	449.108 9	-5.1	287.055 2
27	24.375	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	山柰酚-3- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖-(1 \rightarrow 4)- α -L-吡喃鼠李糖苷 Kaempferol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranose-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranoside ^[18]	593.148 6	593.151 2	-4.4	118 7.307 0、 512.101 6、 449.108 3
28	25.379	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₅	新北美圣草苷 Neerioicitrin ^[11,16]	595.164 6	595.166 8	-3.7	119 1.335 4、 459.112 0
29	26.825	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	柚皮素-7- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷 Naringenin-7- <i>O</i> - β -D-glucoside ^[19]	433.112 1	433.11 4	-4.4	271.060 9
30	27.452	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	柚皮苷 Naringin ^[11,16]	579.169 6	579.171 9	-4.0	115 9.305 1、 271.061 1
31	28.582	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	5-Hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-(3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl)oxy-3-(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)oxychromen-4-one *	563.137 6	563.140 6	-5.3	427.196 6、 353.102 1
32	29.084	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	原花青素 B1 Proanthocyanidin B1 ^[19] *	577.153 1	577.156 3	-5.5	115 5.313 8、 425.180 2
33	29.523	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	原花青素 B2 Proanthocyanidin B2 ^[19] *	577.153 4	577.156 3	-5.0	425.180 1、 287.056 0

续表 3 (Continued Tab. 3)

编号 No.	t_R (min)	分子式 Molecular formula	化合物 Compound	m/z [M-H] ⁻		偏差 Error ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 Fragment ion
				实测值 Measured value	理论值 Theoretical value		
34	29.649	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	圣草酚 Eriodictyol ^[17]	287.056 1	287.056 1	-0.07	287.056 1
35	30.151	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	Luteolin-7-O-glucoside ^[20]	447.090 9	447.093 3	-5.4	285.169 2
36	31.909	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₆	3,4-dimethoxy-myricetin-3-O-dideoxyhex- osyl(1-2)-dideoxyhexoside *	637.173 9	637.177 4	-5.5	431.226 2、 171.102 2
37	32.725	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Afzelin *	431.096 1	431.098 4	-5.3	284.031 3
38	33.290	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	柚皮素 Naringenin ^[11,16]	271.061 2	271.061 2	0.04	271.061 2
39	34.545	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	Pectolarin *	621.178 8	621.182 5	-6.0	267.159 8
40	39.817	C ₂₉ H ₅₀ O	β -谷甾醇 β -sitosterol ^[11,17]	413.215 7	413.215 9	-0.5	413.215 7

注: * 化合物通过 MSDIL 或 PubChem 数据库鉴定。

Note: * The compound was identified by MSDIL or PubChem database.

2.4 骨碎补提取物指纹图谱与 ALP 活性之间的谱效关系分析

2.4.1 骨碎补提取物对 MG63 ALP 活性的影响

碱性磷酸酶(ALP)是成骨细胞分化成熟的标志物,通过 ALP 的活性水平变化可以判断成骨细胞的分化能力。将骨碎补的乙醇提取物以 0.01 mg 生药/mL 的浓度作用于 MG63 细胞,并用 10 nmol/L 雌二醇(estradiol, E₂)作为阳性对照,以不做任何处

理的 MG63 细胞作为空白对照组(control, Con),测定细胞的 ALP 活性水平(按照说明书要求,以每克蛋白在 37 °C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位,ALP 活性的单位记为:金氏单位/gprot)。结果表明同一批次骨碎补经砂烫后其提取物对 MG63 细胞的 ALP 活性的提升均比相对应的生品略高,但并无显著性差异(见图 3)。

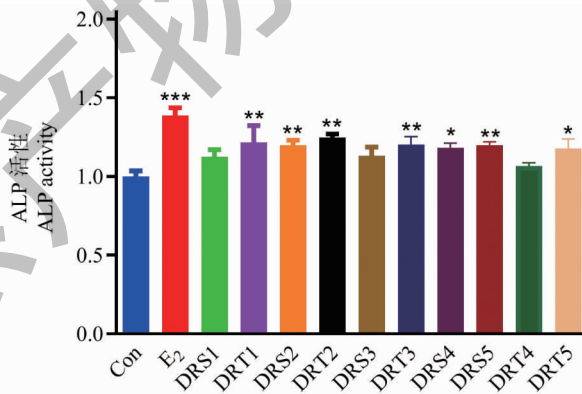


图 3 骨碎补对 MG63 细胞 ALP 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of Drynariae Rhizoma on ALP activity in MG63 cell($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

2.4.2 骨碎补 UPLC 指纹图谱共有峰与 ALP 活性的相关性分析

2.4.2.1 灰色关联度分析

根据建立的指纹图谱,将骨碎补炮制前后的指纹图谱中标定的 12 个共有峰的单位峰面积与 ALP

活性进行相关性分析。采用 SPSSPRO 在线软件,对 10 批骨碎补药材中 12 个峰的单位峰面积与 ALP 活性进行灰色关联度分析。结果显示,1、2、6、8、11 号峰的单位峰面积与 ALP 活性的灰色关联系数值在 0.8 ~ 0.9 之间,表示有相对显著影响,其余峰的单

位峰面积与 ALP 活性的关联系数均大于 0.9,表明关联度较高^[21](见表 4)。

2.4.2.2 双变量相关性分析

采用 SPSS 21.0 软件进行双变量相关性分析。结果显示,峰 4、峰 5 与峰 12 与 ALP 活性的双变量相关系数呈正相关,且均大于 0.3(见表 4)。

表 4 骨碎补中 12 个共有峰与 MG63 细胞 ALP 活性的灰色关联系数及双变量相关系数

Table 4 Grey correlation coefficient and bivariate correlation coefficient between 12 common peaks of *Drynariae Rhizoma* and ALP activity in MG63 cell

编号 No.	ALP 活性灰色关联系数 Grey correlation coefficient of ALP activity	ALP 活性双变量相关系数 Bivariate correlation coefficient of ALP activity
1	0.823	0.264
2	0.855	0.121
3	0.915	0.069
4	0.934	0.402
5	0.962	0.448
6	0.801	-0.275
7	0.911	-0.024
8	0.858	-0.305
9	0.945	-0.119
10	0.915	0.179
11	0.869	-0.254
12	0.931	0.460

2.4.2.3 偏最小二乘回归分析

利用 SIMCA-14.1 软件,采用偏最小二乘回归分析法进行谱效相关性分析,计算得到 12 个共有峰与 ALP 活性的标准化回归系数和 VIP 值(见表 5),VIP 值越大,贡献率越高,VIP 值 >1 时,自变量在解

释因变量时具有重要意义^[22]。峰 1、峰 2、峰 4、峰 5、峰 10 与峰 12 的回归相关系数为正值,说明与 ALP 活性正相关,其中,峰 4、峰 5、峰 12 的 VIP 值大于 1,表明对 ALP 活性具有重要贡献,是 ALP 活性的重要变量,与双变量相关性分析结果一致。

表 5 骨碎补中 12 个共有峰与 MG63 细胞 ALP 活性的标准化回归系数

Table 5 Standardized regression coefficients between 12 common peaks of *Drynariae Rhizoma* and ALP activity in MG63 cell

编号 No.	ALP 活性回归系数 Regression coefficient of ALP activity	ALP 活性 VIP 值 ALP activity VIP value
1	0.021	1.275
2	0.240	0.711
3	-0.091	0.997
4	0.135	1.501
5	0.286	1.332
6	-0.239	0.801
7	-0.151	0.417
8	-0.351	1.024
9	-0.059	0.379
10	0.225	0.652
11	-0.057	1.042
12	0.376	1.460

综合分析灰色关联度、双变量相关系数、偏最小二乘回归系数和 VIP 值,可知峰 4、峰 5 及峰 12 与 ALP 活性具有较高关联度,且呈正相关,对 ALP 活性的贡献度最大,是影响 ALP 活性的重要变量。由质谱分析结果确定峰 4 为咖啡酸-4- O - β -D-吡喃葡萄糖苷;峰 5 为儿茶素 7-葡糖苷;峰 12 为柚皮苷。

在这三种成分中,仅柚皮苷可购买到对照品,将 10 μ mol/L 柚皮苷作用于 MG63 细胞,并用 10 nmol/L 雌二醇(estradiol, E_2) 作为阳性对照,测定 ALP 活性,结果表明柚皮苷可显著促进 MG63 细胞中 ALP 活性(见图 4),验证了相关性分析的准确性。

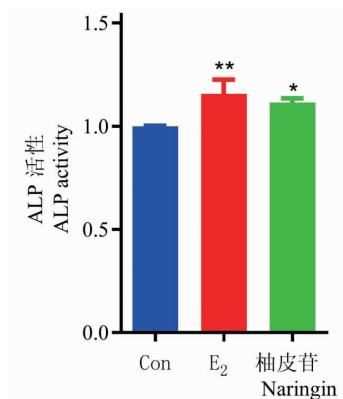


图 4 柚皮苷对 MG63 细胞 ALP 活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effect of naringin on the ALP activity in MG63 cell line($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论与结论

本研究采用 UPLC 法结合多波长检测建立了骨碎补生品和烫品的指纹图谱,不同批次的骨碎补生品和烫品有 12 个共有峰,且相似度大于 0.9,表明二者相似度高,区分不明显。ALP 是成骨细胞分化成熟的标志物,是骨形成的生化指标之一。通过 ALP 的活性水平变化可以判断成骨细胞的分化能力。已有研究表明,骨碎补可促进成骨细胞分化^[23]。本研究将骨碎补生品和烫品作用于 MG63 细胞,分析其对 ALP 活性的影响。结果表明,同一批次的骨碎补经砂烫后,可显著促进 MG63 细胞分泌 ALP。为探究骨碎补中促进 MG63 成骨分化的活性成分,将 ALP 活性与指纹图谱标定的特征峰进行谱效相关性分析。为更全面分析骨碎补指纹图谱特征峰与 ALP 活性的谱效关系,本实验综合利用灰色关联度分析、双变量相关性分析和最小偏二乘回归

分析三种方法,得出峰 4、峰 5、与峰 12 与 ALP 活性具有较高关联度,且呈正相关,对 ALP 活性的贡献度最大,是影响 ALP 活性的重要变量。

UPLC-Q-TOF/MS 技术具有选择性强、灵敏度高、样品前处理简单、高精度及高分辨率等特点,可以更全面、更快速的完成对骨碎补化学成分鉴定^[24]。本研究利用 UPLC-Q-TOF/MS 在负离子模式下鉴别出骨碎补中的 40 个成分。确定对 ALP 活性具有重要贡献的成分为峰 4 咖啡酸-4- O - β -D-吡喃葡萄糖苷;峰 5 儿茶素 7-葡糖苷;峰 12 柚皮苷并对柚皮苷的活性进行了验证。柚皮苷是一种黄酮类化合物,现代药理研究作用表明,柚皮苷可用于治疗或预防多种疾病,如抗骨质疏松、抗氧化、抗肿瘤、改善心肌损伤等^[25-27]。现有研究也表明,柚皮苷是骨碎补药材中的重要活性成分^[28]。而咖啡酸-4- O - β -D-吡喃葡萄糖苷和儿茶素 7-葡糖苷的药理活性目前还未见报道,值得进一步开展研究。本研究结果对骨碎补质量控制及药效学研究具有一定参考意义。

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: 267-268.
- 2 Zhao G, He GL, Lu CY, et al. Immunoregulation effect of Rhizoma Drynariae flavonoids on immunosuppressive mice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 438-445.
- 3 Chen SQ, Liang W, Zhang XM, et al. Research progress on chemical compositions and pharmacological action of Drynariae Rhizoma [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2021, 46: 2737-2745.
- 4 Chen X, Chen J, Xie LH, et al. Effects of Rhizoma Drynariae-Radix Dipsaci herb pair on osteogenesis/osteoclastogenesis and Hif1 α Gene [J]. Chin J Osteoporosis (中国骨质疏松杂志), 2023, 29: 64-69.
- 5 Mei XL, Zhang T, Lu N. Research progress on mechanism of Drynariae Rhizoma in treatment of traumatic fracture [J]. Drugs Clin (现代药物与临床), 2022, 37: 2386-2389.
- 6 Tong MS, Zheng Y, Ren CL, et al. Effects of Drynaria flavonoids on the osteogenic differentiation of iPS-MSCs [J]. Chin J Osteoporosis (中国骨质疏松杂志), 2022, 28: 1159-1163.
- 7 Yu DP, Sun WQ. Overview on pharmacological effects of Drynariae Rhizoma and its extracts being applied to orthopedic

- diseases[J]. *Global Chin Med* (环球中医药), 2021, 14: 761-766.
- 8 Li YC, Xu Y, Xiao PY, et al. Research progress in the spectral efficacy of traditional chinese medicine [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2017, 28: 673-675.
- 9 Li ZY, Liang YY, Lv WS, et al. Establishment of UPLC fingerprint of *Verbenae Herba* and determination of index components [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2023, 35: 551-561.
- 10 Luo J, Zhao LJ, Bao JP. Analysis of chemical compositions in *Gentiana rhodantha* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2018, 24: 89-94.
- 11 Wang FJ, Wang TT, Xu MY, et al. Chemical constituents of *Drynaria fortunei* and their protective effects on PC12 cell [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2018, 53: 1359-1365.
- 12 Baskaran XR, Geo Vigila AV, Zhang SZ, et al. A review of the use of pteridophytes for treating human ailments [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2018, 19: 85-119.
- 13 Zhang BY, Jiang ZZ, Wang YF, et al. Analysis of chemical constituents in fresh, dried and prepared *Rehmanniae Radix* by UPLC/ESI-Q-TOF MS [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2016, 30: 1104-1108.
- 14 Shang ZP, Zhao QC, Tan JJ, et al. Chemical constituents from rhizomes of *Drynaria fortunei* [J]. *Pract Pharm Clin Remed* (实用药物与临床), 2010, 13: 262-263.
- 15 Wang XL, Wang NL, Huang WX, et al. Phenylpropanoids compounds isolated from *Drynaria fortunei* and their proliferation effects on UMR106 cell [J]. *J Shenyang Pharm Unvi* (沈阳药科大学学报), 2008, 144: 24-29.
- 16 Yang ZY, Kuboyama T, Kazuma K, et al. Active constituents from *Drynaria fortunei* rhizomes on the attenuation of $A\beta$ (25-35)-induced axonal atrophy [J]. *Nat Prod*, 2015, 78: 2297-300.
- 17 Liang YH, Ye M, Han J, et al. Lignans and flavonoids from rhizome of *Drynaria fortunei* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2011, 42: 25-30.
- 18 Gao Y. Study on the chemical constituents of the anti osteoporosis active site of *Drynariae Rhizoma* [D]. Shenyang: Shenyang Pharm University (沈阳药科大学), 2008.
- 19 Wang XL, Wang NL, Zhang Y, et al. Effects of eleven flavonoids from the osteoprotective fraction of *Drynaria fortunei* (Kunze) J. SM. on osteoblastic proliferation using an osteoblast-like cell line [J]. *Chem Pharm Bull* (Tokyo), 2008, 56: 46-51.
- 20 YH, Ye M, Yang WZ, et al. Flavan-3-ols from the rhizomes of *Drynaria fortunei* [J]. *Phytochemistry*, 2011, 72: 1876-82.
- 21 Sun ZJ. Study on the correlation between fingerprint and antioxidant activity of pumpkin seeds [D]. Harbin: Heilongjiang University (黑龙江大学), 2019.
- 22 Peng LY, Liang Y, Shi JJ, et al. Relationship between HPLC fingerprint and total antioxidant activity of Dansher [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理学与临床), 2022, 38: 110-115.
- 23 Yin WZ, Zhang XL, Ye YJ, et al. Effect of *Drynariae Rhizoma* on osteoblast differentiation in co-cultured bone cells under microgravity [J]. *Acta Chin Med Pharm* (中医药学报), 2017, 45: 16-20.
- 24 Du SB, Chen XW, Dong ZQ, et al. Analysis of chemical components in alcohol extract of *Rosa sertata* \times *Rosa rugosa* based on UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2022, 34: 1129-1142.
- 25 Zhao Y, Liu S. Bioactivity of naringin and related mechanisms [J]. *Pharmazie*, 2021, 76: 359-363.
- 26 An J, Yang H, Zhang Q, et al. Natural products for treatment of osteoporosis; the effects and mechanisms on promoting osteoblast-mediated bone formation [J]. *Life Sci*, 2016, 147: 46-58.
- 27 Wei M, Yang ZL, Li P, et al. Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model [J]. *Am J Chin Med*, 2007, 35: 663-667.
- 28 Chen SQ, Liang W, Zhang XM, et al. Research progress on chemical compositions and pharmacological action of *Drynariae Rhizoma* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2021, 46: 2737-2745.