采用 FT-IR 及 HPLC 法分析钩藤 - 灵芝菌双向固体发酵前后的成分差异

杨英兰[1]，易圣婕[1]，曾雪峰[2]，李慧馨[1,3]，孙宜春[1,3]*

（1. 贵州中医药大学，贵州贵阳 550025；2. 贵州大学生命科学学院，贵州贵阳 550025；3. 国药集团同济堂（贵州）制药有限公司，贵州贵阳 550009）

摘要：采用 FT-IR、主成分分析、聚类分析及正交偏最小二乘法 - 判别分析，结合超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱（UPLC-QTOF-MS），对钩藤 - 灵芝菌双向固体发酵 15 d 前后的整体成分差异进行表征；通过 HPLC 法比较钩藤碱与异钩藤碱的含量变化。钩藤经灵芝菌发酵后，上述 2 种主要成分的含量分别增加了 4.46 和 8.90 倍。FT-IR 分析表明，发酵后多糖特征吸收峰（1 053 cm^{-1} 附近）的强度减弱，且在 1 660 ～ 1 575 cm^{-1} 区间形成腐殖酸类的宽化吸收带，表明在发酵过程中钩藤的结构多糖被降解，并生成了腐殖化产物。化学计量学分析表明，发酵前后的样本能实现完全分离（Q^2=0.871），证实发酵前后钩藤的化学组成差异显著。根据化合物的保留时间、准分子离子峰和二级质谱信息，并结合对照品及文献报道，共鉴定出 64 个化学成分。综上所述，灵芝菌发酵可显著提高钩藤中主要生物碱的含量、改变其化学组成，为钩藤定向炮制与活性强化提供依据。

关键词：钩藤；灵芝菌；双向固体发酵；FT-IR；HPLC；UPLC-QTOF-MS；成分差异

中图分类号：R283.6；R927.1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)07-0805-12

引用：杨英兰, 易圣婕, 曾雪峰, 等. 采用FT-IR及HPLC法分析钩藤-灵芝菌双向固体发酵前后的成分差异[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(7): 805-816. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.07.009

Analysis of Component Differences in before and after Bidirectional Solid Fermentation of *Uncaria rhynchophylla* with *Ganoderma lucidum* by FT-IR and HPLC

YANG Yinglan[1], YI Shengjie[1], ZENG Xuefeng[2], LI Huixin[1,3], SUN Yichun[1,3]*

(*1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025; 2. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025; 3. China National Pharmaceutical Group (Guizhou) Tongjitang Pharmaceutical Co., Ltd., Guiyang 550009*)

ABSTRACT: FT-IR, principal component analysis, cluster analysis, and orthogonal partial least squares-discriminant analysis were used, combined with ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS), were adopted to characterize the overall component differences in *Uncaria rhynchophylla* before and after a bidirectional solid fermentation with *Ganoderma lucidum* for 15 days. The content changes of the two main components, rhynchophylline and isorhynchophylline, were compared by HPLC. After fermentation of *Uncaria rhynchophylla* with *Ganoderma lucidum*, the contents of rhynchophylline and isorhynchophylline increased by 4.46- and 8.90-fold, respectively. FT-IR analysis showed that the intensity of the characteristic absorption peak of polysaccharides near 1 053 cm^{-1} decreased after fermentation, and a broadened absorption band of humic acids was formed in the range of 1 660 − 1 575 cm^{-1}, suggesting that the structural polysaccharides in *Uncaria rhynchophylla* were degraded during fermentation, accompanied by the generation of humic products. Chemometric analysis revealed that samples before and after fermentation could be completely separated (Q^2=0.871), confirming that the chemical composition of *Uncaria rhynchophylla* differed significantly before and after fermentation. Based on the retention time, quasi-molecular ion peaks and tandem mass spectrometry information of the compounds, combined with reference standards and literature reports, a total of 64 chemical constituents were identified. In summary, fermentation with *Ganoderma lucidum* can significantly increase the contents of the main alkaloids in *Uncaria rhynchophylla* and modify its chemical composition, providing a

scientific basis for the targeted processing and activity enhancement of *Uncaria rhynchophylla*.

Key Words: *Uncaria rhynchophylla*; *Ganoderma lucidum*; bidirectional solid fermentation; FT-IR; HPLC; UPLC-QTOF-MS; component difference

钩藤为茜草科钩藤属植物钩藤［*Uncaria rhynchophylla*（Miq.）Miq. ex Havil.］、大叶钩藤（*Uncaria macrophylla* Wall.）、毛钩藤（*Uncaria hirsuta* Havil.）、华钩藤［*Uncaria sinensis*（Oliv.）Havil.］或白钩藤（*Uncaria sessilifructus* Roxb.）的干燥带钩茎枝，能息风定惊、清热平肝[1]，临床常用于治疗小儿惊厥、头痛眩晕。吲哚类单萜生物碱钩藤碱（rhynchophylline，**1**）与异钩藤碱（isorhynchophylline，**2**）（图 1）在钩藤总生物碱中的占比超过 40%，是决定钩藤质量与临床疗效的关键指标性成分[2]。药理研究表明，**1** 可通过抑制中枢神经系统、阻断钙通道及舒张血管，发挥降压、抗惊厥及镇静安神作用[3]。**1** 还能保护神经细胞，靶向调控偏头痛、焦虑及心脑血管眩晕[4]。**2** 的降压活性更强，兼具抗血小板聚集、抗炎、抗氧化及心肌保护的作用[5]。二者协同，是发挥钩藤功效的现代药理学基础[6]。

当前钩藤产业存在种质混杂、产地来源不一及加工差异较大等问题，导致有效成分含量不均、品质参差不齐[7]；传统炮制方法难以实现活性成分定向富集，制约了钩藤药用价值的提升与产业可持续发展[8]。此外，钩藤性凉，长期大量服用易刺激胃肠道并存在潜在肝毒性[9-10]。微生物发酵技术可以通过酶解与生物转化，优化中药的物质基础，是中药炮制改性的重要手段[11-12]。灵芝作为药食同源真菌，基原主要包括多孔菌科真菌赤芝［*Ganoderma lucidum*（Leyss. ex Fr.）Karst.］或紫芝（*Ganoderma sinense* J.D. Zhao, L.W. Hsu & X.Q. Zhang）的干燥子实体。本研究所用发酵菌株为赤芝菌株［*Ganoderma lucidum*（Curtis）P. Karst.，以下称为“灵芝菌”］。它是典型的木腐生真菌。其菌丝体可以通过自身的代谢活动将基质中的大分子组分转化为可供自身生长利用的营养物质，是天然活性物质的来源[13]；其分泌的多酶体系还可以破坏植物细胞壁，促进成分溶出与转化[14]，进而实现 **1** 和 **2** 的高效富集。

双向固体发酵是一种以中药材作为药性基质、药用真菌作为发酵菌种的发酵方法。中药材能为药用真菌生长提供营养底物，而真菌依靠自身特有酶系改造药材原有化学成分的结构。该方法可借助真菌与药材的双向相互作用，实现药效提升[15]。本研究采用 FT-IR 法结合化学计量学，分析双向固体发酵前后钩藤化学成分的差异；并用 HPLC 法测定 **1** 和 **2** 的含量变化；结合超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱（ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry，UPLC-QTOF-MS）分析发酵后钩藤的化学成分，从而探究发酵对钩藤化学成分的影响，为新药开发提供依据。

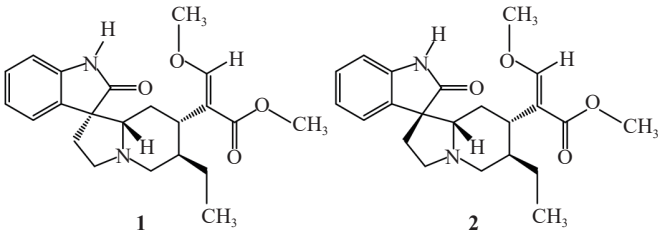


图 1　1、2 的化学结构式

Fig.1　Chemical Structures of **1** and **2**

1　仪器与试药

Spectrum Two 型傅里叶变换红外光谱分析仪（美国 Perkin Elmer 公司）；Q Exactive 型高分辨质谱仪和 UltiMate 3000 型液相色谱系统（美国 Thermo Fisher 公司）；1290 Ⅱ型超高液相色谱仪（美国 Agilent 公司）；XA6.5YM 型电子天平（用于对照品称量）和 ML24/02 型电子天平（用于药材称量）（瑞士 Mettler Toledo 公司）；DGL-100G 型高压灭菌锅［卓的仪器设备（上海）有限公司］；SPX-250 型恒温培

收稿日期：2025-12-30

作者简介：杨英兰，硕士研究生，专业方向：中药药效物质基础及中药新药开发。

通信作者：孙宜春，主任药师，从事中药药效物质基础研究及中药新药开发工作。

养箱（北京科伟永兴仪器有限公司）。

钩藤药材（贵州同济堂饮片厂，批号20181001，试验中分为8份，发酵前记为GN1～GN8，发酵后记为GF1～GF8），经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为茜草科钩藤属植物钩藤的干燥带钩茎枝；马铃薯葡萄糖琼脂试管斜面培养基（potato dextrose agar，PDA，上海麦克林生化科技股份有限公司，批号P774284）；**1**对照品（含量98%，批号DSTDG001502）、**2**对照品（含量98%，批号DSTDM00901）、育亨宾对照品（含量98%，批号DST260116-1112）、毛钩藤碱对照品（含量98%，批号DSTDM000901）、异去氢钩藤碱对照品（含量98%，批号DSTDY001801）、去氢毛钩藤碱对照品（含量98%，批号DSTDQ001301）均购自成都乐美天医药科技有限公司；灵芝菌（武胜县八一乡岷源食用菌种植厂），保藏号CBS 139793），经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定为多孔菌科真菌赤芝；L-色氨酸（北京酷来博公司，含量98%，批号CT35141810）；溴化钾（上海麦克林生化科技有限公司，含量99%，批号P816700）；食用石灰（乐陵市盛发腾达食品有限公司，食品级，批号GZ250324）；聚丙烯袋（12 cm×24 cm×4 cm）；60目筛（孔径1.25 mm）；乙腈为色谱级，磷酸、无水乙醇为分析级，试验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 钩藤-灵芝菌双向固体发酵物的制备

将购买的灵芝菌（CBS 139793）母种转管在PDA培养基上，4 ℃冰箱保存，每月传代1次，使用前进行菌种活化，接种到PDA培养基上，置26 ℃恒温培养箱中，避光、静置培养7 d，备用。

将钩藤药材适当粉碎，以钩藤药材粉末为发酵基质，按干物质量补加水，控制含水量约为60%。随后加入食用石灰调至pH 9～10，并加入L-色氨酸（钩藤和L-色氨酸的质量比为100∶9），搅匀后装在聚丙烯袋内，用塑套圈封口，于121 ℃灭菌20 min，冷却后在发酵基质中央接入2～3块（1 cm×1 cm）从活化菌种上切下的菌丝，在26 ℃恒温培养箱中进行固态发酵。于D0、D15（菌丝铺满培养基时）、D20（菌丝铺满培养基后）、D25取样，干燥、粉碎、过60目筛，即得发酵后钩藤样品。另取发酵前钩藤样品干燥、粉碎、过60目筛，作为空白对照。

2.2 HPLC法测定**1**和**2**的含量

2.2.1 色谱条件

色谱柱ACQUITY UPLC® CSHTM C_{18}柱（2.1 mm×150 mm，1.7 μm）；流动相A为0.1%磷酸水溶液，B为乙腈，梯度洗脱（0—10 min，B 8%—14%；10—25 min，B 14%；25—26 min，B 14%—90%；26—31 min，B 90%；31—32 min，B 90%—8%）；流速0.3 mL/min；柱温35 ℃；检测波长254 nm；进样量1 μL。

2.2.2 溶液制备

空白溶液：70%乙醇溶液。

混合对照品溶液①：分别称取**1**和**2**的对照品适量，置同一50 mL量瓶中，加入空白溶液溶解并定容，制成质量浓度分别为0.30、0.74 mg/mL的混合对照品溶液①，于4 ℃冷藏，备用。

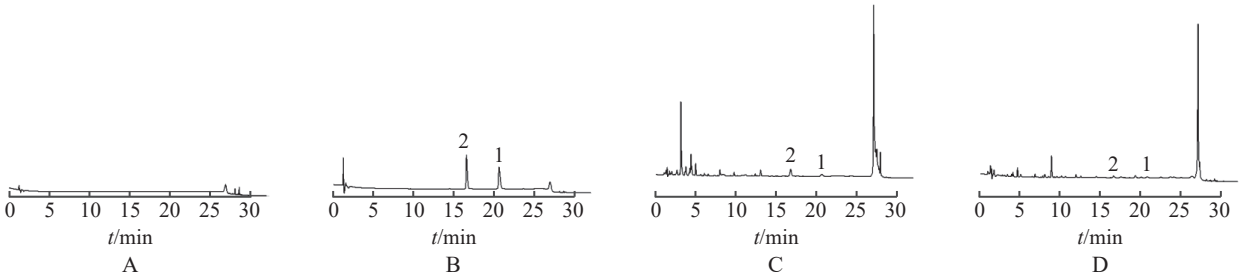
混合对照品溶液②：分别称取**1**和**2**的对照品适量，置同一50 mL量瓶中，加入空白溶液溶解并定容，制成质量浓度分别为78.40、157.80 μg/mL的混合对照品溶液②，于4 ℃冷藏，备用。

供试品溶液：分别称取钩藤发酵前样品（GN1）及发酵后样品（GF1）各1 g，精密称定，分别置具塞锥形瓶中，精密加入空白溶液30 mL，加热回流提取45 min，放冷至室温。以空白溶液补足减失的质量，摇匀，过滤，取续滤液分别作为发酵前与发酵后钩藤的供试品溶液。

2.2.3 专属性考察

选取“**2.2.2**”项下的混合对照品溶液①、供试品溶液、空白溶液，分别按“**2.2.1**”项下条件进样测定。结果（图2）显示，**1**与**2**的色谱峰与相邻峰的分离度均大于1.5，且空白溶液未对目标成分测定产生干扰，此方法的专属性良好。

发酵前钩藤样品（图2D）与发酵后钩藤样品（图2C）的HPLC图谱差异显著，共识别出多处差异峰。GF1样品图谱中3～5 min处出现了新紫外吸收峰，初步判定其为生物碱类衍生物及小分子代谢产物；GN1样品图谱中8～10 min处特征峰的峰强在发酵后明显减弱，提示这些成分在发酵过程中发生了降解或结构转化；部分共有峰的峰面积差异显著，表明发酵对钩藤成分的含量有调控作用。



A—空白溶液；B—混合对照品溶液①；C—GF1 供试品溶液；D—GN1 供试品溶液。

1—**1**；2—**2**。

图 2　典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatograms

2.2.4　线性关系考察

取“**2.2.2**”项下制备的混合对照品溶液②，用空白溶液梯度稀释成系列混合对照品溶液，按“**2.2.1**”项下条件进样测定。以对照品质量浓度（*c*）为横坐标，峰面积（*A*）为纵坐标，绘制标准曲线。结果（表 1）表明，2 种待测成分的质量浓度在相应范围内与峰面积的线性关系良好。

表 1　线性试验结果

Tab.1　Results of Linear Tests

成分	回归方程	线性范围 /（μg·mL^{-1}）	*r*
1	*A* = 7.62*c* - 0.05	7.84 ～ 39.20	0.999 8
2	*A* = 7.22*c*+1.67	15.78 ～ 78.90	0.999 8

2.2.5　精密度、稳定性和重复性试验

精密吸取“**2.2.2**”项下供试品溶液，按“**2.2.1**”项下条件重复测定 6 次，记录色谱图。结果显示，**1**、**2** 峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 0.21%、0.27%，均小于 2%，表明仪器精密度良好。

取“**2.2.2**”项下发酵后钩藤的供试品溶液，室温放置。分别于 0、2、4、8、12、24 h 时取样，按“**2.2.1**”项下条件进样测定。计算得 **1**、**2** 峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 0.68%、0.86%，表明供试品溶液在室温放置 24 h 内稳定性良好。

取同一份钩藤样品（GF1）6 份，精密称定，按“**2.2.2**”项下方法平行制备供试品溶液，按“**2.2.1**”项下条件进样测定，记录色谱图，按外标法计算得 **1**、**2** 的平均质量分数分别为 0.61、1.57 mg/g，RSD（*n*=6）分别为 0.51%、0.50%，均小于 2%，表明该方法重复性良好。

2.2.6　加样回收率测定

取已知含量的发酵后钩藤样品（GF1，**1**、**2** 含量分别为 0.61、1.58 mg/g）粉末 0.5 g，精密称定，共 9 份，分别加入待测成分含量 80%、100%、120% 的 **1**、**2** 对照品，每个浓度平行制备 3 份，按“**2.2.2**”项下方法制备供试品溶液，参照“**2.2.1**”项下条件进样测定，记录色谱图，计算 **1**、**2** 的平均加样回收率及 RSD。在低、中、高 3 个水平下，测得的 **1**、**2** 的平均回收率及 RSD 如表 2 所示，结果表明，本方法准确度良好。

2.3　不同发酵时间对 **1**、**2** 含量的影响

1、**2** 的含量在菌丝铺满时（D15）达到峰值。这表明此前阶段，灵芝菌对钩藤的转化作用以释放活性物质为主导；发酵 15 d 后，灵芝菌持续分泌酶类降解钩藤活性成分以供自身生长，且酸化环境加剧了钩藤活性成分的破坏，导致随着发酵天数增加，**1**、**2** 含量反而逐步降低（图 3）。

2.4　FT-IR 对比分析

将发酵前后的样品与干燥的溴化钾（质量比 1 ∶ 100）混合并压制成片剂，采用 FT-IR 仪检测，设置频率范围 [16] 为 4 000 ～ 400 cm^{-1}，温度为 25 ℃。

发酵前钩藤样品在 3 410 cm^{-1} 附近出现宽且强的吸收峰，归属于多糖羟基与生物碱酚羟基的 O—H 伸缩振动；2 921 cm^{-1} 处的吸收峰对应甲基（—CH_3）与亚甲基（—CH_2）的 C—H 伸缩振动 [17]；1 635 cm^{-1}

表 2 加样回收率试验结果

Tab.2 Results of Spike Recovery Tests

编号	样品含量 /mg	加标量 /mg	平均回收率 /% ($\bar{x}$±s, n=3)	RSD/%
1	0.34	0.27	99.91±0.72	0.89
	0.34	0.27		
	0.34	0.27		
	0.34	0.34	100.45±0.55	0.67
	0.34	0.34		
	0.34	0.34		
	0.34	0.40	99.36±0.55	0.68
	0.34	0.40		
	0.34	0.40		
2	0.79	0.63	99.83±0.47	0.58
	0.79	0.63		
	0.79	0.63		
	0.79	0.79	99.05±0.21	0.25
	0.79	0.79		
	0.79	0.79		
	0.79	0.95	99.98±0.19	0.23
	0.79	0.95		
	0.79	0.95		

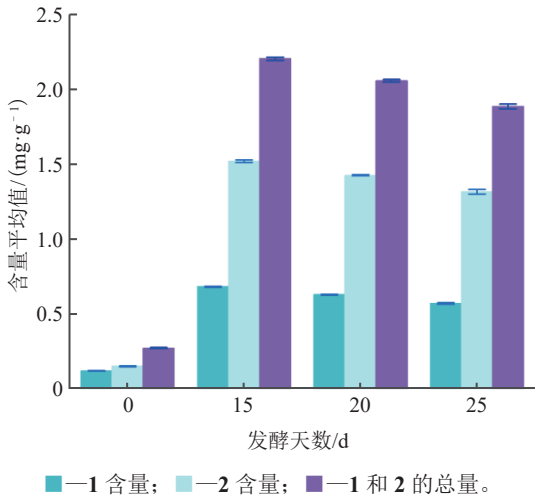


图 3 钩藤发酵不同天数 1、2 的含量（n=8）

Fig.3 Contents of **1** and **2** in *Uncaria rhynchophylla* Fermented for Different Days (n=8)

处为羰基（C=O）的伸缩振动峰[18]；1 532 cm^{-1} 处的特征峰可归属为芳香仲胺 N—H 面内振动峰或酰卤 C=O 伸缩振动峰；1 250 cm^{-1} 处吸收峰为 C—O 伸缩振动峰；1 053 cm^{-1} 附近的吸收峰则对应 O—H 弯曲振动峰或 C—O 伸缩振动峰[19]。

与发酵前钩藤样品相比，发酵后钩藤样品在 3 425 cm^{-1} 处的吸收峰（对应 O—H/N—H 伸缩振动峰）发生了轻微位移且峰形宽化，可能与发酵过程中产生的菌体蛋白及微生物多糖相关；2 921 cm^{-1} 处的 C—H 伸缩振动峰峰强度有所降低，说明钩藤中脂肪族侧链与长链烷烃等结构可能被微生物作为碳源降解并利用；1 635 cm^{-1} 处的吸收峰消失，且在 1 660 ～ 1 575 cm^{-1} 区间形成宽幅吸收带，可能是因为钩藤发酵生成了腐殖酸类物质；1 251 cm^{-1} 处的吸收峰基本保持不变，归属于 C—O 的伸缩振动峰；1 053 cm^{-1} 附近的吸收峰无明显偏移，为 O—H 弯曲振动峰或 C—O 伸缩振动峰，但峰强度显著降低，推测是钩藤的结构多糖被灵芝菌分泌的酶系有效降解，并为菌体生长提供碳源（图 4）。

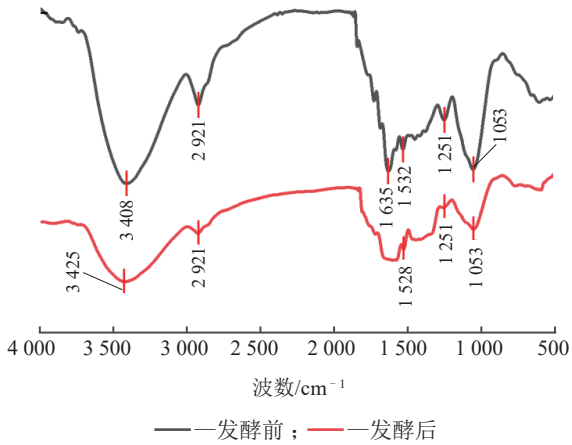


图 4 发酵前后钩藤的平均红外光谱图

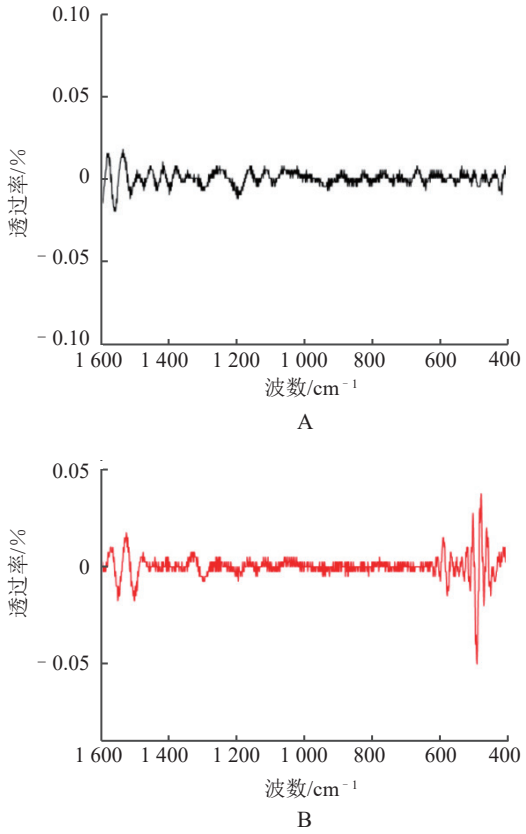
Fig.4 Average Infrared Spectra of *Uncaria rhynchophylla* before and after Fermentation

2.5 钩藤发酵前后二阶导数红外光谱分析

二阶导数红外光谱可显著提升分辨率，清晰地呈现光谱轮廓变化，并有效消除基线漂移与背景干扰。钩藤发酵前后在 400 ～ 600 cm^{-1} 区间的锯齿状吸收峰，在峰数量与吸收强度上均存在显著差异（图 5）。

2.6 聚类分析

对发酵前后 16 份样品（GN1 ～ GN8 和 GF1 ～ GF8）的原始谱图进行二阶导数预处理，采用欧氏距离开展聚类分析（图 6）。在距离系数为 55 时，样品明显分为 2 类：发酵前样品（GN1 ～ GN8）与发酵后样品（GF1 ～ GF8）各自聚为一类，表明发酵前



A—发酵前；B—发酵后。

图 5　发酵前后钩藤的二阶导数红外光谱

Fig.5　The Second-derivative Infrared Spectra of *Uncaria rhynchophylla* before and after Fermentation

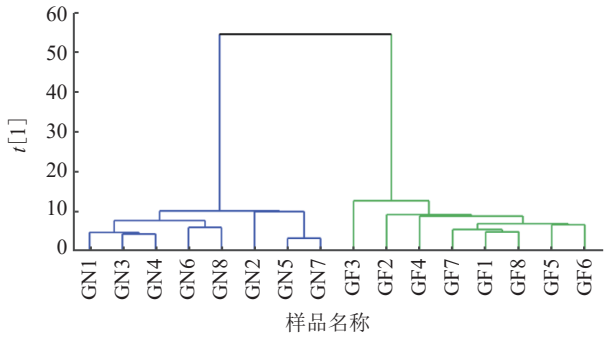


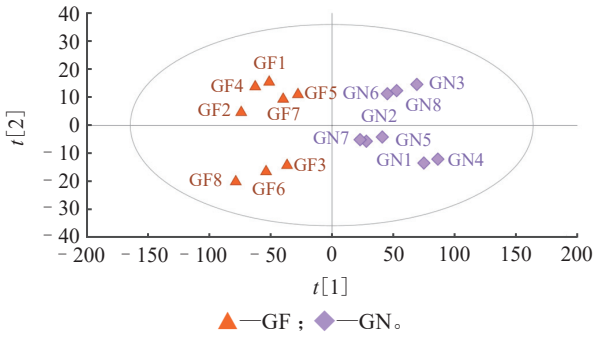
图 6　发酵前后 16 份钩藤样品的聚类分析图

Fig.6　Cluster Analysis Plot of 16 Batches of *Uncaria rhynchophylla* Samples before and after Fermentation

后钩藤中的化学成分差异显著；各批次指纹图谱一致性较好，表明其质量与固体发酵工艺密切相关。

2.7　主成分分析

对 16 份样品的预处理数据进行主成分分析（principal component analysis，PCA），所得模型累计方差贡献率（R^2）为 0.996、预测能力（Q^2）为 0.994，均大于 0.5，可信度良好（图 7）；16 份样品在得分图上明显分为发酵前与发酵后 2 类，表明发酵前后钩藤的主要活性组分差异显著。



▲—GF；◆—GN。

图 7　16 份发酵前后钩藤样品的 PCA 得分图

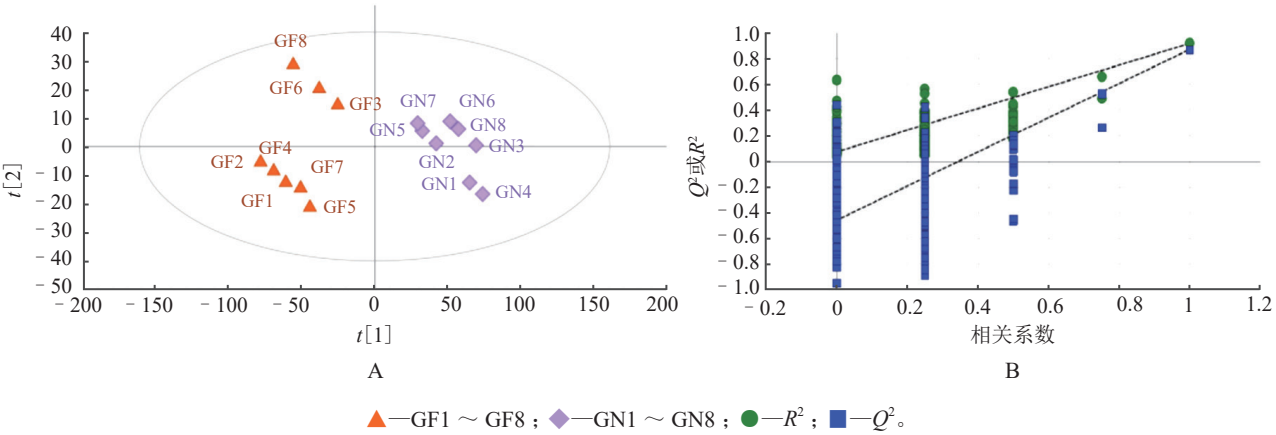
Fig.7　PCA Score Plot of 16 Batches of *Uncaria rhynchophylla* Samples before and after Fermentation

2.8　正交偏最小二乘法 - 判别分析

为进一步验证分析结果的可靠性，对 16 份发酵前后的钩藤红外光谱数据开展正交偏最小二乘法 - 判别分析（orthogonal partial least squares-discriminant analysis，OPLS-DA）[20]。该预测模型 R^2 为 0.957，Q^2 为 0.871，均大于 0.5，表明模型稳定可靠、预测能力强（图 8A）。对该模型进行验证，设定检验次数为 200 次，Q^2 回归线的截距小于 0，表明未产生过分拟合，模型可靠（图 8B）。发酵前和发酵后钩藤样品各自聚为一簇，表明能有效区分发酵前后的钩藤样品。

2.9　样品含量测定

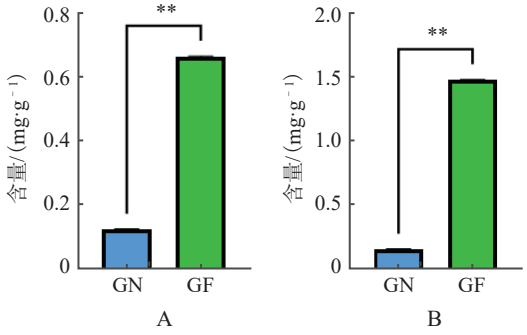
取适量发酵前与发酵后的钩藤样品，按“**2.2.2**”项下制备供试品溶液，按“**2.2.1**”项下条件进样测定，记录色谱图，并根据回归方程计算各组分具体含量。对两组样品进行独立样本 *t* 检验，根据峰面积计算钩藤发酵前后 **1**、**2** 的含量，并进行正态分布检验（P>0.05）。钩藤发酵前后 **1**、**2** 成分有显著差异（P<0.01），说明发酵对钩藤中 **1**、**2** 两种关键活性成分的积累具有促进作用（图 9）。以发酵前钩藤样品中各成分含量为 100%计，计算发酵后钩藤中各成



▲—GF1 ～ GF8；◆—GN1 ～ GN8；●—R^2；■—Q^2。

图 8　16 份钩藤发酵前后 OPLS-DA 图（A）及模型验证（B）

Fig.8　OPLS-DA Plot (A) and Model Validation (B) of 16 Batches of *Uncaria rhynchophylla* before and after Fermentation



A—**1**；B—**2**。

GN—发酵前（GN1 ～ GF8）钩藤样品；

GF—发酵后（GF1 ～ GF8）钩藤样品。

** 表示两组间 P<0.01。

图 9　发酵前钩藤样品与发酵后钩藤样品的成分分析（n=3）

Fig.9　Component Analysis of *Uncaria rhynchophylla* samples before and after Fermentation (n=3)

分的变化率。结果表明，发酵后 **1**、**2** 的含量较发酵前分别增加 4.46 倍、8.90 倍。

2.10　UPLC-QTOF-MS 分析

2.10.1　色谱质谱条件

色谱条件：色谱柱 ACQUITY UPLC® CSHTM C_{18} 柱（2.1 mm×150 mm，1.7 μm）；流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液，B 为乙腈，梯度洗脱（0—10.00 min，B 8 % —14 %；10.00—25.00 min，B 14 %；25.00—55.00 min，B 14 % —28 %，55.00—55.01 min，B 28%—8%）；流速 0.3 mL/min；柱温 35 ℃；检测波长 254 nm；进样量 1 μL。

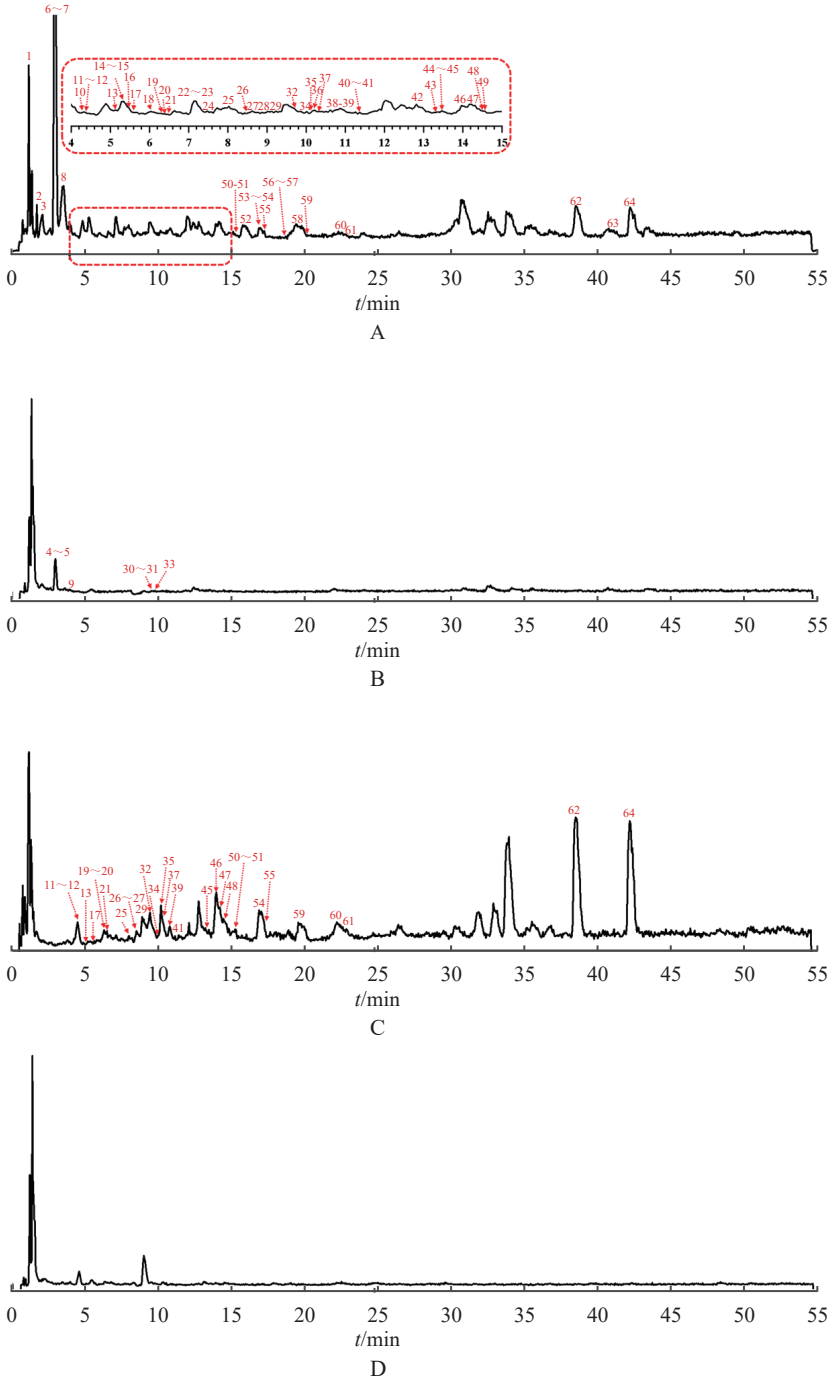
质谱条件：离子源 电喷雾离子源，正离子模式 +4.5 kV、负离子模式 －3.5 kV；流速 鞘气（N_2）40 L/min，辅助气（N_2）10 L/min；毛细管温度 320 ℃；辅助气加热温度 350 ℃；S 型离子透镜水平 50%。质量分析器全扫描分辨率 70 000，扫描范围 m/z 100 ～ m/z 1 500。

2.10.2　化学成分分析

取发酵前（GN2）与发酵后（GF2）钩藤样品，按“**2.2.1**”项下方法配制供试品溶液，按“**2.10.1**”项下条件进样测定，得到正负离子模式下的基峰色谱图（图 10）。通过 Xcalibur 4.8 软件采集质谱数据，提取各个色谱峰的准分子离子峰、碎片峰信息，对化合物进行分析和鉴定。

2.10.3　化学成分鉴别

通过准分子离子峰确定分子式，根据二级碎片信息、结合对照品及相关文献数据分析化合物，使用 Xcalibur 4.8 软件进行分析，得到保留时间、质荷比和峰强度，共鉴定了 64 个化学成分（表 3）。经确认，色谱图（图 2C）中的目标峰分别为 **1**（相对分子质量为 385.212 2）、**2**（相对分子质量为 385.212 2），二者均完成定性验证且含量显著富集；发酵过程中生物碱类成分的变化较为显著，同时检测到高丰度的色氨酸代谢产物（吲哚乙酸、褪黑素、5- 羟基色氨酸等），表明外源性色氨酸可能参与吲哚类生物碱



A—发酵后钩藤样品，正离子模式；B—发酵后钩藤样品，负离子模式；C—发酵前钩藤样品，正离子模式；D—发酵前钩藤样品，负离子模式。

注：图中编号与表 3 中的峰号对应。

图 10　钩藤发酵前后质谱图

Fig.10　Mass Spectra of *Uncaria rhynchophylla* Samples before and after Fermentation

的生物合成途径。同时，灵芝菌对钩藤中的单萜吲哚生物碱进行了广泛地生物转化，主要表现为 *N*- 氧化反应（生成异帽柱木碱 *N*- 氧化物）、去甲基化（生成 *O*- 去甲基钩藤碱）及羟基化修饰（生成 14- 羟基帽柱木碱）。此外，还观察到去氢产物（去氢钩藤碱）及乙基化衍生物的生成。结果表明，色氨酸的添加

表 3　发酵后钩藤的 UPLC-QTOF-MS 化学成分鉴别结果

Tab.3　Identification of Chemical Constituents in *Uncaria rhynchophylla* after Fermentation by UPLC-QTOF-MS

峰号	保留时间 /min	加合离子	分子式	真实值（*m/z*）	试验值（*m/z*）	相对误差	化合物名称 [1)]	主要离子碎片
1	1.41	$[M+H]^+$	$C_{11}H_{12}N_2O_3$	221.092 0	221.091 7	－1.31	L-5- 羟基色氨酸	221.091 8
2	1.88	$[M+H]^+$	$C_{10}H_9NO_2$	176.070 6	176.070 5	－0.26	吲哚乙酸	171.117 0、158.925 4
3	1.93	$[M+NH_4]^+$	$C_{10}H_{12}N_2O_3$	209.092 0	209.091 8	－0.86	L- 犬尿氨酸	197.070 6、130.064 8
4	2.97	$[M-H]^-$	$C_{11}H_{12}N_2O_3$	219.077 5	219.077 0	－2.03	5- 羟基色氨酸	229.096 8
5	2.98	$[M+FA-H]^-$	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	203.082 6	203.081 8	－3.65	DL- 色氨酸	198.917 3、155.060 5
6	2.99	$[M+H]^+$	$C_{10}H_8N_2$	157.076 0	157.075 8	－0.99	3- 吲哚乙腈	156.064 2
7	2.99	$[M+H-NH_3]^+$	C_9H_9N	115.054 1	115.054 3	2.26	粪臭素	131.036 4
8	3.50	$[M+H]^+$	$C_{11}H_8N_2$	169.076 0	169.075 7	－1.57	去甲哈尔满	171.092 2
9	3.98	$[M-H]^-$	$C_7H_6O_4$	153.019 3	153.018 4	－5.76	2,3- 二羟基苯甲酸	155.901 8
10	4.30	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{10}N_2O_2$	191.081 5	191.081 4	－0.49	2-[（1*S*）-1- 羟乙基]-4（1*H*）- 喹唑啉酮	192.077 7、181.087 8
11	4.39	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_5$	385.175 8	385.175 7	－0.26	钩藤碱 EN	353.185 5
12	4.44	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	355.165 2	355.165 1	－0.38	异帽叶碱	337.154 1、285.009 4、263.117 6
13	5.14	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_5$	385.175 8	385.175 6	－0.51	钩藤碱 EN	353.185 5
14	5.30	$[M+NH_4]^+$	$C_{10}H_9N$	144.080 7	144.080 6	－0.60	2- 萘胺	146.961 4、85.028 8
15	5.30	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{12}N_2O_2$	217.097 1	217.096 7	－1.82	2,3,4,9- 四氢 1*H*-*β*- 咔啉 -3- 羧酸	213.064 8
16	5.46	$[M+H]^+$	$C_{12}H_{10}N_2O_2$	215.081 5	215.081 2	－1.04	2- 甲基 -4- 苯基 -5- 嘧啶羧酸	216.928 1
17	5.60	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_5$	385.175 8	385.175 6	－0.51	异帽柱木碱 *N*- 氧化物	353.185 5
18	6.08	$[M+H]^+$	$C_8H_6N_2O_2$	163.050 2	163.050 1	－0.21	喹唑啉 -2,4- 二醇	167.060 2
19	6.33	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	369.180 9	369.180 8	－0.23	钩藤碱 E	351.169 9、267.148 8、210.102 0、160.075 6
20	6.40	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_5$	385.175 8	385.175 6	－0.51	钩藤碱 EN	353.185 5
21	6.51	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{22}N_2O_4$	355.165 2	355.165 2	－0.09	异帽柱木非灵	337.154 1、227.114 5
22	7.14	$[M+H]^+$	$C_{10}H_{11}NO_2$	178.086 2	178.086 0	－1.43	D-1,2,3,4- 四氢异喹啉 -3- 羧酸	172.075 4
23	7.15	$[M+H]^+$	C_9H_9N	132.080 7	132.080 7	－0.42	6- 甲基吲哚	132.044 2
24	7.53	$[M+H]^+$	$C_{13}H_{16}N_2O_2$	233.128 4	233.128 4	－0.23	褪黑激素	232.092 2
25	8.02	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_5$	385.175 8	385.175 6	－0.51	钩藤碱 EN	353.185 5
26	8.52	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	355.201 6	355.201 3	－0.76	育亨宾 *	341.262 1、322.248 3、209.164 4
27	8.61	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	369.180 9	369.180 8	－0.23	四氢鸭脚木碱 *N*- 氧化物及其异构体	351.169 1、267.148 7、210.112 1、160.075 5
28	8.84	$[M+H]^+$	$C_{13}H_{10}N_2O_3$	243.076 4	243.076 4	0.05	2-（4- 羟基苯偶氮）苯甲酸	243.076 4
29	9.25	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_5$	385.175 8	385.175 6	－0.51	帽柱木碱 *N*- 氧化物	353.185 5
30	9.68	$[M-H]^-$	$C_{17}H_{27}N_3O_{17}P_2$	606.074 2	606.075 3	1.79	尿苷二磷酸 -*N*- 乙酰葡糖胺	605.720 9、585.758 0
31	9.68	$[M-H]^-$	$C_{15}H_{24}N_2O_{17}P_2$	565.047 7	565.048 5	1.37	尿苷 5'- 二磷酸半乳糖	565.770 3、558.203 2
32	9.80	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_5$	385.175 8	385.175 6	－0.51	14- 羟基帽柱木碱	353.185 5
33	9.91	$[M-H]^-$	$C_{10}H_9NO_3$	190.050 9	190.050 4	－2.88	5- 羟基吲哚 -3- 乙酸	191.922 5、169.075 8
34	9.99	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	369.180 9	369.180 9	0.04	*O*- 去甲基钩藤碱（或 *O*- 去甲基柯诺辛）	210.112 1、160.075 5

（续表 3）

峰号	保留时间 /min	加合离子	分子式	真实值（*m/z*）	试验值（*m/z*）	相对误差	化合物名称 [1)]	主要离子碎片
35	10.14	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	369.180 9	369.180 9	0.04	帽柱木碱	351.169 1、267.148 7、
36	10.24	$[M+H]^+$	C_8H_7NO	134.060 0	134.060 0	0.37	2- 羟吲哚	133.974 5
37	10.29	$[M+H]^+$	$C_{27}H_{34}N_2O_{10}$	547.228 6	547.228 6	- 0.04	二氢卡丹宾碱异构体	529.216 1、385.175 1、367.164 7
38	10.78	$[M+H]^+$	$C_{11}H_{11}NO_3$	206.081 1	206.081 1	- 0.19	吲哚 -3- 乳酸	206.081 1
39	10.79	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_5$	385.175 8	385.175 6	- 0.51	*N*- 羟基钩藤碱 B 或其异构体	353.185 5
40	11.38	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{26}N_2O_5$	399.191 4	399.191 2	- 0.62	*O*- 乙基异帽柱木碱 *N*- 氧化物	309.122 3、160.075 6
41	11.38	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	369.180 9	369.180 9	0.04	帽柱木碱	351.169 1、267.148 7、210.112 1、160.075 5
42	12.81	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	383.196 5	383.196 2	- 0.87	*O*- 乙基钩藤碱 E	267.148 7
43	13.29	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{10}N_2O_2$	263.081 5	263.081 4	- 0.09	靛玉红	447.818 6、314.905 9
44	13.51	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	383.196 5	383.196 3	- 0.61	*O*- 乙基帽柱木碱	201.102 0
45	13.51	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	383.196 5	383.196 3	- 0.61	去氢钩藤碱	160.075 6
46	14.01	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{26}N_2O_4$	383.196 5	383.196 0	- 1.39	异去氢钩藤碱 *	267.148 7、201.102 0
47	14.26	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{28}N_2O_4$	385.212 2	385.211 3	- 2.29	钩藤碱 *	353.185 5、215.117 8、160.075 6、265.133 4
48	14.51	$[M+H]^+$	$C_{27}H_{34}N_2O_9$	531.233 7	531.233 6	- 0.20	异胡豆苷	514.206 6、369.180 2
49	14.57	$[M+H]^+$	$C_9H_8N_2O$	161.070 9	161.070 9	- 0.12	3- 甲基 -2- 喹喔啉醇	250.866 2
50	15.26	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	355.201 6	355.201 3	- 0.90	*α*- 育亨宾或其立体异构体	212.127 7、224.127 0
51	15.26	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	369.180 9	369.180 8	- 0.23	异帽柱木碱	351.169 1
52	15.88	$[M+H]^+$	C_9H_7NO	146.060 0	146.059 9	- 0.62	4- 吲哚甲醛	520.332 5
53	16.94	$[M+H]^+$	$C_9H_7NO_2$	162.054 9	162.054 8	- 0.52	1,5- 异喹啉二醇	159.055 5
54	16.96	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{28}N_2O_4$	385.212 2	385.211 8	- 1.00	异钩藤碱 *	353.185 5、215.117 8、160.075 6、265.133 4
55	17.26	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	355.201 6	355.201 5	- 0.34	鸭脚木碱	212.127 7、144.080 6、224.127 0
56	18.84	$[M+H]^+$	$C_6H_{15}O_4P$	183.078 0	183.078 1	0.21	磷酸三乙酯	146.059 9
57	18.84	$[M+H]^+$	$C_4H_{11}O_4P$	155.046 7	155.046 7	- 0.14	磷酸二乙酯	159.723 7
58	19.44	$[M+H-H_2O]^+$	$C_{10}H_{11}NO$	144.081 0	144.080 7	- 2.08	3-（2- 羟乙基）吲哚	549.307 1、447.818 5
59	20.16	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	369.180 9	369.180 8	- 0.23	钩藤碱 C	351.169 1、267.148 7、210.112 1、160.075 5
60	22.21	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_3$	353.186 0	353.185 7	- 0.76	阿枯米精碱	144.080 6、210.112 2、
61	23.00	$[M+H]^+$	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	369.180 9	369.180 8	- 0.23	钩藤碱 A	351.169 1、160.075 5
62	38.56	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{28}N_2O_3$	367.201 6	367.201 1	- 1.41	去氢毛钩藤碱 *	350.175 2、335.175 8、236.127 6、224.127 4、144.080 6
63	41.10	$[M+H-NH_3]^+$	$C_{11}H_9NO_2$	188.070 2	188.070 5	1.65	吲哚 -3- 丙烯酸	180.937 9、156.887 9
64	42.29	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{28}N_2O_3$	369.217 3	369.216 5	- 2.08	毛钩藤碱 *	352.191 0、337.190 7、298.143 2、226.143 4、144.080 7

注：[1)]* 表示经对照品比对鉴定。

丰富了发酵产物的化学多样性，也促进了灵芝菌对钩藤活性成分的定向修饰。

3 讨论

本研究通过 FT-IR 结合化学计量学、HPLC 及 UPLC-QTOF-MS 技术，分析了双向固体发酵对 **1**、**2** 含量的影响。研究确定 15 d 为最佳发酵终点，推测在该阶段灵芝菌分泌的纤维素酶与糖苷酶有效降解了钩藤细胞壁结构，促进了结合型生物碱的释放；同时，外源性 L- 色氨酸作为关键前体，通过“底物诱导效应”推动了吲哚类生物碱的生物转化与积累，使 **1**、**2** 含量分别提升了 4.46 倍和 8.90 倍。尽管 HPLC 定量分析结果表明，目标生物碱已被富集，但 FT-IR 图谱中并未出现与之对应的特异性吸收峰增强，仅在 1 660 ～ 1 575 cm^{-1} 区间出现腐殖化宽峰。这主要归因于以下 2 点：① **1**、**2** 在复杂的基质中占比较低（<1%），其信号被灵芝菌体蛋白及多糖的强吸收掩盖 [21]；②二者结构高度相似，特征峰重叠度高，常规红外难以分辨微量单体变化 [22]。这提示在发酵中药的质量评价中，单纯依赖整体宏观表征（如 FT-IR 法）可能存在盲区，需与靶向定量（如 HPLC 法）相结合，才能准确反映药效物质基础的变化。此外，PCA 作为一种无监督多元统计方法，其样本聚类与分离主要反映整体化学轮廓的全局差异，而非单一成分绝对值的变化。钩藤经发酵后，除组分 **1**、**2** 的相对含量升高外，还伴随多种新代谢物的生成及原有成分的降解。这种全局性的化学组成重塑是 PCA 得分图呈现明显分组（R^2=0.996，Q^2=0.994）的主要驱动因素。PCA 所揭示的钩藤发酵前后整体化学差异的趋势，与 HPLC 靶向定量所得 **1**、**2** 含量升高的趋势相吻合，二者互为补充，尽管发酵体系中引入培养基及菌丝体组分，但其在 PCA 得分图上未掩盖或逆转核心活性成分的变化趋势，未对主要结论判断造成明显干扰。

UPLC-QTOF-MS 分析共鉴定出 64 个化学成分，除生物碱含量的变化外，发酵产物中高丰度的色氨酸代谢产物及 *N*- 氧化、去甲基化修饰产物的出现，证实了灵芝菌对钩藤活性成分具有一定的生物转化能力。这种转化不仅丰富了化学多样性，也可能改变生物碱的极性及代谢途径。然而，本研究尚存在一定局限性：首先，对于发酵产生的 *N*- 氧化物等新成分，仅通过高分辨质谱（HR-MS/MS）结合文献进行推定，未进行核磁共振绝对构型确证；其次，虽然明确了化学成分的变化，但尚未通过细胞或动物模型验证发酵后钩藤在降压、神经保护等方面的活性是否同步增强。未来的研究将聚焦于新产物的分离纯化、结构鉴定及药理活性的相关性分析，以进一步阐明“成分变化 - 药效提升”的内在联系。

综上所述，灵芝菌 - 钩藤固体发酵是一种有效的活性成分定向富集策略。本研究建立的 FT-IR 整体表征与 HPLC 定量技术和 UPLC-Q-TOF-MS 技术体系，可为发酵中药成分分析及质量评价提供参考，为中药微生物发酵技术的推广提供依据。

参考文献：

[1] 崔晓燕, 郑晓明, 郭树垚, 等. 基于网络药理学、分子对接与实验验证探究钩藤治疗热性惊厥的作用机制[J]. 中草药, 2024, **55**(15): 5154-5165.

[2] 张晓娟, 左冬冬, 于孙婉琪. 钩藤化学成分和药理作用研究进展[J]. 中医药信息, 2024, **41**(2): 81-86.

[3] 张雯昕, 张春霞, 韩凌飞, 等. 钩藤网络药理学多靶点效应价值研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2025, **56**(3): 376-381.

[4] 段建平, 张杰, 王旭, 等. 天麻钩藤饮治疗神经系统疾病研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, **30**(11): 255-264.

[5] 那丽莎, 陈毅超, 张凯, 等. 异钩藤碱对急性脑梗死大鼠认知障碍的影响及机制研究[J]. 中国脑血管病杂志, 2024, **21**(7): 444-454.

[6] 闫壁松. 钩藤碱与异钩藤碱代谢的立体作用机制研究进展[J]. 中国医药导刊, 2024, **26**(4): 374-377.

[7] 何雨晴, 陈盛君, 周海琴, 等. 钩藤药材的特征图谱建立、化学模式识别分析及其与不同基原、混伪品的鉴别[J]. 中国药房, 2024, **35**(5): 566-571.

[8] 赵佳柱, 王丽红, 向友, 等. 钩藤人工栽培技术优化与推广[J]. 农业与技术, 2025, **45**(14): 58-61.

[9] 王晓聪, 刘方敏. 钩藤总碱对大鼠肝脏及肝功能的影响[J]. 云南中医中药杂志, 2019, **40**(10): 58-60.

[10] 胡岚岚, 张惠静, 张乐, 等. 钩藤碱小鼠急性毒性试验及评价[J]. 中国药学(英文版), 2021, **30**(8): 657-665.

[11] 杨金梅, 李冠文, 王辉敏, 等. 微生物发酵技术对粉葛化学成分的影响[J]. 食品工业科技, 2022, **43**(23): 153-160.
[12] 张化朋, 李凤娟, 陈常霞, 等. 乳酸菌发酵对牡丹花总多酚及抗氧化功能的影响[J]. 中国食品添加剂, 2023, **34**(7): 117-124.
[13] Wen L R, Sheng Z L, Wang J P, *et al*. Structure of water-soluble polysaccharides in spore of *Ganoderma lucidum* and their anti-inflammatory activity [J]. *Food Chem*, 2022, **373**: 131374.
[14] 李秋月, 林连兵, 杨雪娇, 等. 微生物发酵中草药的研究现状[J]. 微生物学通报, 2021, **48**(6): 2232-2244.
[15] 李莉, 马佳荣, 王玉辉, 等. 双向固体发酵应用于中药的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2024, **39**(4): 483-487.
[16] Liang W, Zhao W Q, Lin Q, *et al*. Deciphering the structure-function-quality improvement role of starch gels by wheat bran insoluble dietary fibers obtained from different fermentation patterns and its potential mechanisms [J]. *Food Chem*, 2024, **460**: 140641.
[17] 唐云丽, 王丽, 梁臣艳, 等. 古钩藤红外指纹图谱研究[J]. 中国民族民间医药, 2018, **27**(19): 30-33.
[18] Cen Q, Fan J, Zhang R, *et al*. Impact of *Ganoderma lucidumfermentation* on the nutritional composition, structural characterization, metabolites, and antioxidant activity of soybean, sweet potato and Zanthoxylum pericarpiumresidues [J]. *Food Chem: X*, 2024, **21**: 101078.
[19] 栾翠荣, 温南华, 李致瑜, 等. 马尾藻多糖超声波辅助提取、结构表征及抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2025, **51**(7): 259-267.
[20] 张正, 王瑜婷, 陈灶树, 等. 基于化学模式识别结合熵权TOPSIS法的桂枝不同部位的差异分析[J]. 中国医药工业杂志, 2024, **55**(4): 557-564.
[21] Khadiga M K, Mamdouh R R, Hany H M, *et al*. FTIR combined with chemometric tools (fingerprinting spectroscopy) in comparison to HPLC: which strategy offers more opportunities as a green analytical chemistry technique for pharmaceutical analysis [J]. *Analytical Methods*, 2020, **12**: 5893-5907.
[22] 李雨昕, 邢娜, 张志宏, 等. 基于高效液相色谱和红外光谱的生三七及其炮制品的鉴别[J]. 中国药房, 2021, **32**(18): 2194-2202.

广告索引

封二：《中国医药工业杂志》征订信息
封底：中国医药工业信息中心
封三：鲁南厚普制药有限公司
755 页：公益广告