

## 基于 UFLC-IT-TOF/MS 技术分析不同产地黄芪的化学成分

胡诗浩<sup>1</sup>, 于心悦<sup>2</sup>, 李瑞婷<sup>2</sup>, 吴晓霞<sup>1</sup>, 杨旭萍<sup>2</sup>, 韩昭迪<sup>2</sup>, 黄寅<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>海口市人民医院药学部, 海口 570208; <sup>2</sup>中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009)

**摘要** 为研究不同产地黄芪的化学成分差异, 制备了甘肃和内蒙古 2 个产地共 15 批黄芪药材的水煎液, 利用超快速液相色谱-离子阱飞行时间质谱仪(UFLC-IT-TOF/MS)采集 15 批黄芪药材水煎液化学成分的指纹图谱, 进而运用偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)和(非)参数检验对数据进行模式识别和统计分析, 以变量投影重要性大于 1、统计学差异小于 0.05 以及倍数变化大于 1.5 为阈值, 筛选并鉴定其差异成分。结果发现, 不同产地的黄芪水煎液中毛蕊异黄酮、芒柄花素、亚油酸等 7 个化学成分的含量有明显差异, 涉及木脂素、黄酮、脂肪酸等 4 种类别。本研究为黄芪药材的全面质量控制、准确区分产地以及合理种植栽培提供了重要依据。

**关键词** 黄芪; 产地; UFLC-IT-TOF/MS; 化学成分; 质量标志物

**中图分类号** R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2019)01-0059-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190108

**引用本文** 胡诗浩, 于心悦, 李瑞婷, 等. 基于 UFLC-IT-TOF/MS 技术分析不同产地黄芪的化学成分[J]. 中国药科大学学报, 2019, 50(1): 59–65.

**Cite this article as:** HU Shihao, YU Xinyue, LI Ruiting, et al. Analysis of the differential compounds in *Astragalus membranaceus* from different geographical origins by UFLC-IT-TOF/MS[J]. *J China Pharm Univ*, 2019, 50(1): 59–65.

## Analysis of the differential compounds in *Astragalus membranaceus* from different geographical origins by UFLC-IT-TOF/MS

HU Shihao<sup>1</sup>, YU Xinyue<sup>2</sup>, LI Ruiting<sup>2</sup>, WU Xiaoxia<sup>1</sup>, YANG Xuping<sup>2</sup>, HAN Zhaodi<sup>2</sup>, HUANG Yin<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmacy Department, Haikou People's Hospital, Haikou, 570208; <sup>2</sup>Ministry of Education Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, China Pharmaceutical University, Nanjing, 210009, China

**Abstract** To uncover the differences in material basis of *Astragalus membranaceus* from different origins, ultra-fast liquid chromatography-ion trap time-of-flight mass spectrometry (UFLC-IT-TOF/MS) was applied to characterize chemical features of 15 batches of water decoction of *Astragalus membranaceus* from Gansu Province and Inner Mongolia Autonomous Region. Pattern recognition and statistical analysis were performed using partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) and (non) parametric tests, respectively. The differential compounds with variable importance in projection (VIP) > 1, adjusted  $P < 0.05$ , and fold change (FC) > 1.5 were screened out and further identified. It was found that 7 different substances such as calycosin, formononetin and linoleic acid could be used as quality markers to distinguish the origin of *Astragalus membranaceus*. Our findings provided new potential quality markers for the accurate differentiation of geographical origins of *Astragalus membranaceus* as well as its comprehensive quality control.

**Key words** astragalus; origin; UFLC-IT-TOF/MS; chemical constituents; quality marker

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81773861, No. 81403181); and the Open Project Program of MOE Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (No. DQCP2017MS02)

**收稿日期** 2018-12-27 \* **通信作者** Tel: 025-83271185 E-mail: huangyin@cpu.edu.cn

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(No. 81773861, No. 81403181); 药物质量与安全预警教育部重点实验室开放课题资助项目(No. DQCP2017MS02)

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根,具有补气升阳、固表止汗、利水消肿、生津养血等功效<sup>[1-2]</sup>。现代药理学研究表明,黄芪主要含有皂苷、黄酮、氨基酸以及多糖等多种活性成分,具有免疫调节、抗肿瘤、降血压、降血糖、保护肝肾等药理作用<sup>[3-6]</sup>。黄芪的主产区位于我国甘肃、内蒙古等地,由于各地区海拔、土壤、光照等环境因素的不同,各地区黄芪的化学成分亦有所差别。

目前,有研究利用高效液相色谱法、紫外分光光度法等手段,分析比较了内蒙古、甘肃、山西和吉林等产地黄芪的化学成分,初步证实在各地的黄芪中总皂苷、总黄酮等成分的含量有所不同<sup>[7-9]</sup>。这些研究为不同产地黄芪的质量评价和控制提供了一定的科学依据。然而,由于技术手段和研究思路的限制,前期研究大多只分析测定了黄芪的几个成分或某一类总提物,未能全面比较不同产地黄芪的化学成分的差异性,所得结果具有一定片面性。对此,本文以甘肃和内蒙古产区的黄芪为研究对象,引入基于超快速液相色谱-离子阱飞行时间质谱联用(UFLC-IT-TOF/MS)的代谢组学方法,采集不同产地黄芪水煎液的 LC-MS 指纹图谱,运用偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)、(非)参数检验等数据挖掘方法,全面分析甘肃和内蒙古黄芪的化学成分差异,为准确鉴定黄芪药材的产地提供潜在的质控标志物(Q-marker)。

## 1 材料

### 1.1 药品与试剂

黄芪药材购自亳州药材市场,其中甘肃(GS)9个批次,内蒙古(NM)6个批次,由安徽中医药大学彭灿副教授鉴定为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。对照品黄芪甲苷(批号 110781-201717)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 111920-201606)、芒柄花素(批号 111703-201504)等均购自中国药品生物制品检定所;毛蕊异黄酮(批号 DST171108-012,成都德思特生物技术有限公司);亚油酸(批号 L-1376-500MG,美国 Sigma-Aldrich 公司)。HPLC 级甲醇和乙腈(德国 Merck 公司);甲酸(分析纯,南京化学试剂有限公司);超纯水(实

验用自制)。

### 1.2 仪器

超快速液相色谱-离子阱飞行时间质谱仪(UFLC-IT-TOF/MS,日本 Shimadzu 公司); Milli-Q 超纯水制备系统(美国 Milipore 公司);冻干机(德国 Labconco 公司); 5430R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

## 2 方法

### 2.1 样品制备

将 15 批药材样品粉碎后过 40 目筛,称取 10 g 药粉,加超纯水 100 mL,煎煮 2 h 后,收集滤液;滤渣再加超纯水 100 mL,再次煎煮 2 h,收集滤液;合并两次滤液冻干成粉。取冻干粉适量(相当于生药 0.1 g),精密称定,加入 70% 甲醇 1.0 mL,涡旋(1 min)、超声(10 min)、离心(16 000 r/min, 10 min),取上清液,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后进样分析。

### 2.2 色谱条件

选用 Waters X Select HSS T3 XP (2.1 mm  $\times$  100 mm, 2.5  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱,以甲醇(A)和 0.1% 甲酸的水溶液(B)为流动相进行梯度洗脱,具体梯度如下: 0~6 min, 1% A; 6~7 min, 1%~35% A; 7~13 min, 35% A; 13~15 min, 35%~50% A; 15~17 min, 50% A; 17~18 min, 50%~75% A; 18~21 min, 75% A; 21~22 min, 75%~100% A; 22~26 min, 100% A; 26~27 min, 100%~1% A; 27~30 min, 1% A。流速: 0.25 mL/min; 柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 5  $\mu\text{L}$ 。

### 2.3 质谱条件

离子源为电喷雾(ESI)源,采用正、负离子切换同时检测模式;雾化气流速: 1.5 L/min; 干燥气气压: 104 kPa; 检测电压: 1.8 kV, 离子源入口电压: 正极 4.5 kV, 负极 -3.5 kV。曲线脱溶剂管温度和加热模块温度均为 200  $^{\circ}\text{C}$ ; 离子积聚时间: 20 ms; 扫描范围:  $m/z$  100~1 000。

### 2.4 数据处理与统计分析

采用 Profiling Solution 软件(日本 Shimadzu 公司)对 UFLC-IT-TOF/MS 采集的原始谱图进行峰提取和峰匹配,所得数据矩阵依次进行扣减空白、填补缺失值、面积归一化处理。所得结果导入 Mathematica 软件(Ver 11.3, Wolfram, USA)进行统计分析,首先利用主成分分析(PCA)和偏最小二乘法判

别分析(PLS-DA)对样品进行模式识别,以变量投影重要性(VIP)反映各个离子对分组的贡献大小。除多元统计分析外,还进行单变量分析,根据每个变量(即离子)是否成正态分布,采用 Student's T Test 或 Mann-Whitney U Test 检验其组间差异的显著性。此外,计算每个离子在两组间的倍数变化(FC)。最终以  $VIP > 1$ 、调整  $P$  值( $\text{adjusted } P$ )  $< 0.05$  以及  $|FC| > 1.5$  为阈值,筛选与不同产地相关的差异离子。

## 2.5 化学成分鉴定

将差异离子的质荷比、多级碎片等信息与 TC-MSP ([lsp.nwu.edu.cn](http://lsp.nwu.edu.cn))、GNPS ([gnps.ucsd.edu](http://gnps.ucsd.edu)) 等中药化学成分数据库以及文献中黄芪的化学成分信息进行比对,初步鉴定其化学结构;进而购买标准品,通过比对保留时间、准确质量数以及碎片离子,确定差异变量的归属。

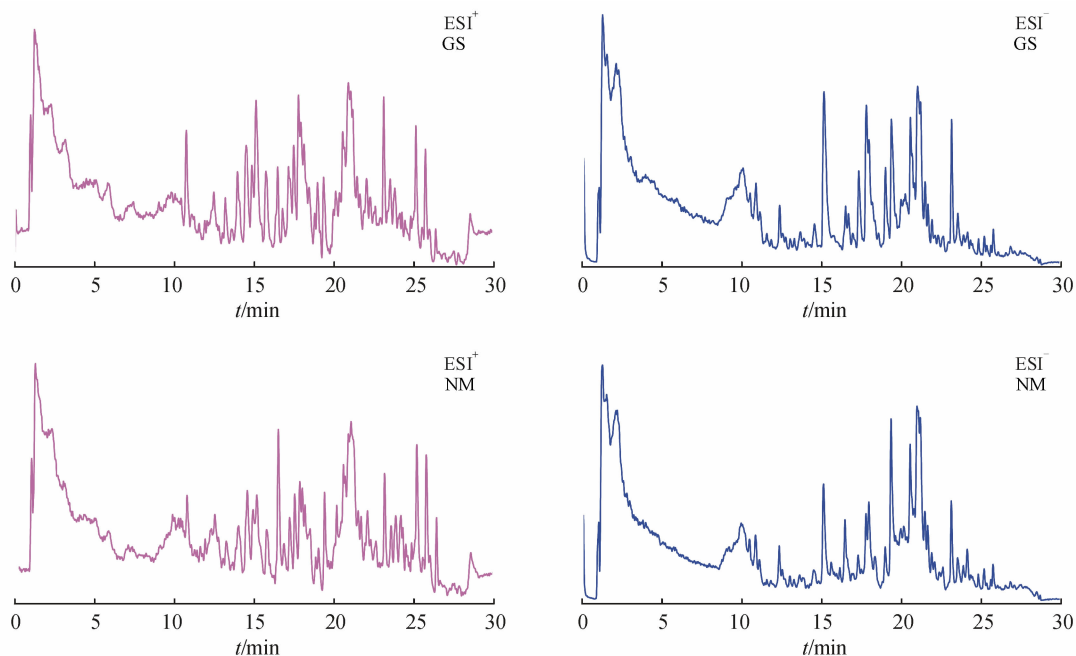
## 2.6 质控样本

为保障方法的可靠性,从 15 批药材的粉末中各取适量,充分混合后拆分成 4 份质控(QC)样本,穿插于药材样品中进行样品前处理和仪器分析。

## 3 结果

### 3.1 分析方法可靠性

甘肃和内蒙古黄芪的代表性 LC-MS 指纹图谱如图 1 所示。从正、负离子流图可以看出,不同产地的黄芪水煎液的指纹谱整体轮廓较为相似,但个别物质的含量(峰高)有明显区别。原始谱图经 Profiling Solution 软件进行峰提取和峰匹配,在正、负离子模式下分别识别出 622 和 549 个离子,经扣减空白和“80% 规则”筛选,分别剩余 397 和 380 个离子,整合而成一个  $19 \times 777$  的数据矩阵。



**Figure 1** Typical ion chromatogram of the water decoctions of *Astragalus membranaceus* in Gansu Province (GS) and Inner Mongolia Autonomous Region (NM)

为保障数据的可靠性,采用无监督的模式识别方法——主成分分析(PCA)研究了 4 份 QC 样本的分布情况,结果如图 2-A 所示,所有 QC 样本均得以良好聚集。此外,进一步分析从 QC 样本中提取出的每一个离子信息的变异情况,发现所有离子的质量精度偏差小于 5 mD,保留时间偏移小于 0.10 min,峰面积的相对标准偏差(RSD)均低于 20%(图 2-B)。以上结果表明本研究采用的样品

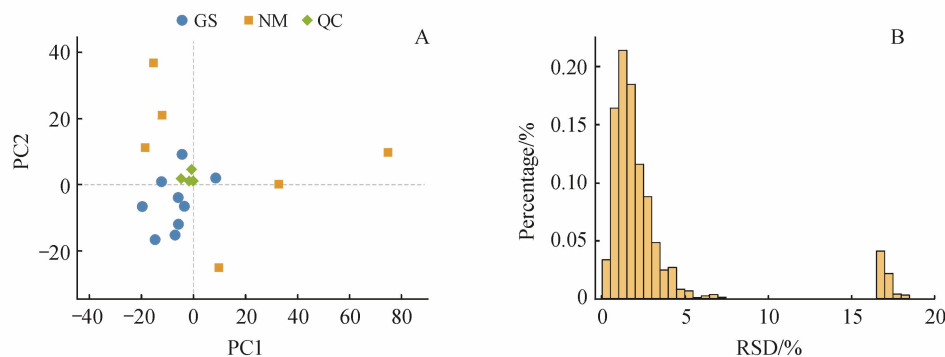
前处理和仪器分析方法稳定、可靠,所得数据可用于进一步分析。

### 3.2 模式识别与统计分析

通过 PCA 得分图,除了展现 QC 样本的分布之外,还能观察到不同产地黄芪药材的聚集情况。本研究中,甘肃产的药材聚集度较高,而内蒙古产的药材分布较为离散,以至于两组之间有一定交叠,这可能是由于 PCA 是一种无监督的模式识别方

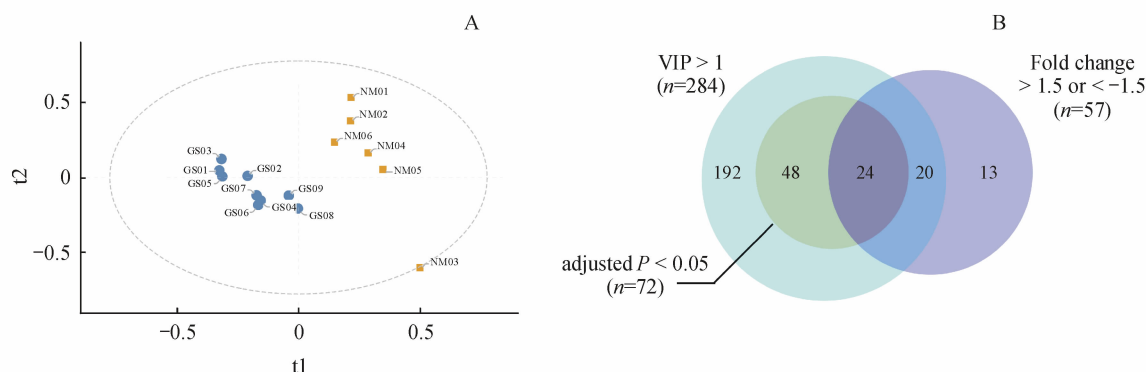
法,没有利用到各样本的分组信息。因而,进一步采用有监督的 PLS-DA 方法分析数据,所得模型参数为  $R^2Y(cum) = 0.996$ ,  $Q^2(cum) = 0.605$ 。PLS-DA 得分图如图 3-A 所示,除一个离群点外,甘肃产黄芪与内蒙古产黄芪各自能较好的聚为一类,且两组之间有清晰的分界,说明同一产区的黄芪化

学成分较为相似,而不同产地则有明显区别。接着,计算了每个离子的变量投影重要性(VIP)、组间统计学差异以及倍数变化,发现符合  $VIP > 1$ 、 $adjusted P < 0.05$  和  $|FC| > 1.5$  的离子个数分别为 284、72 和 57,最后利用 Venn 图(图 3-B)筛选出 24 个差异离子同时满足上述 3 个条件。



**Figure 2** Data quality assessment by quality control (QC) samples

A: PCA score plot shows the clustering for all 15 *Astragalus membranaceus* samples and 4 QC samples; B: Distribution of peak area variations of the extracted ions in QC samples



**Figure 3** Differential features screening between GS and NM groups

A: PLS-DA score plot shows classification of 15 samples; B: Venn diagram of VIP, adjusted  $P$ , and fold-change results

### 3.3 差异化学成分鉴定

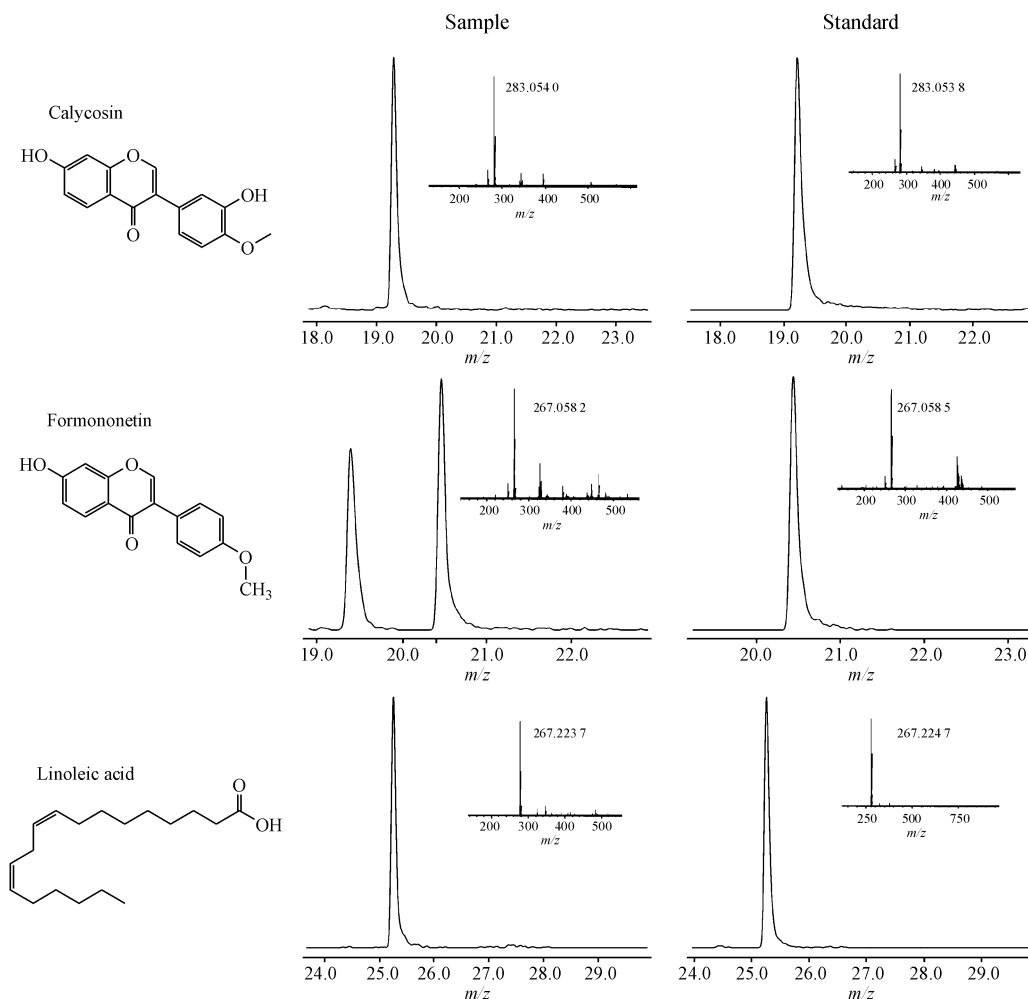
通过查询数据库、参阅文献<sup>[2,10-11]</sup>,鉴定出落叶松脂醇、丁香树脂酚、7,3'-二羟基-2',4'-二甲氧基黄烷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、黄芪甲苷 IV、维生

素 B2 和亚油酸共计 7 个差异成分(表 1),分属于木脂素、黄酮、维生素和脂肪酸等 4 大类。在此基础上,本课题组购买标准品,确证了毛蕊异黄酮、芒柄花素和亚油酸的结构,结果如图 4 所示。

**Table 1** List of 7 differential compounds identified between GS and NM groups

No	Compd.	$m/z$	$t_R/min$	+/- <sup>a</sup>	VIP <sup>b</sup>	Adj. $P$ <sup>c</sup>	FC <sup>d</sup>	Category
1	Lariciresinol	359.088 7	11.0	-	1.70	0.012 5	1.75	Lignans
2	Syringaresinol	417.129 0	13.5	-	1.70	0.012 8	1.78	Lignans
3	Mucronulatol	303.122 3	18.9	+	2.01	0.001 4	1.57	Flavonoids
4	Calycosin *	283.054 0	19.3	-	1.48	0.035 9	0.622	Flavonoids
5	Formononetin *	267.058 2	20.5	-	1.49	0.029 0	0.564	Flavonoids
6	Flavaxin	377.266 6	24.9	+	1.34	0.047 7	1.87	Vitamins
7	Linoleic acid *	279.223 7	25.3	-	1.63	0.012 7	1.72	Fatty acids

\* Confirmed by commercial standards. <sup>a</sup>Positive (+) or negative (-) ionization mode; <sup>b</sup>Variable importance in projection; <sup>c</sup>The Benjamini-Hochberg procedure was used to control the FDR at 0.05; <sup>d</sup>The fold change was calculated by dividing the mean value of normalized ion intensity in GS group by that of NM group



**Figure 4** Identification of calycosin, formononetin and linoleic acid in *Astragalus membranaceus* samples by comparing the extract ion chromatograms and mass spectra with commercial standards

#### 4 讨论

中药材有效成分的形成、转化与积累除受本身的遗传特性决定外,还与环境因素密切相关。甘肃和内蒙古作为黄芪的两个主要产区,其地理位置与气候特征等环境因素不尽相同。目前,甘肃地区黄芪栽培主要集中在陇西县、岷县等地,位于甘肃省东南部,属黄土高原地区,具有海拔高(1 420 ~ 3 941 m)、日照充足、昼夜温差大、年降水量少等特点<sup>[12]</sup>。内蒙古地区黄芪栽培主要集中在赤峰、包头、呼和浩特等地,平均海拔高度 1 000 m 左右,土壤形成过程中钙积化强烈,有机质积累较多,其气候特征与甘肃相似,具有昼夜温差大、日照充足、降水变率大等特点<sup>[13]</sup>。本研究发现,甘肃与内蒙古种植环境的不同确实造成了黄芪中部分化学成分含量的差异,如图 5 所示,有 5 种成分在甘肃黄芪

中含量较高,包括落叶松树脂醇、丁香树脂酚、7, 3'-二羟基-2',4'-二甲氧基黄酮、维生素 B2 和亚油酸,而内蒙古黄芪则含有更多的毛蕊异黄酮和芒柄花素。

本研究鉴定出的 7 个差异性化学成分,均被现代药学研究证明具有重要的药理作用<sup>[14-20]</sup>。例如,毛蕊异黄酮具有抗纤维化和保护内皮细胞等作用,可能通过抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的内皮细胞转分化防治糖尿病肾病<sup>[15-16]</sup>;芒柄花素具有降血压、调节雌激素、调节代谢等活性,而且对女性生殖系恶性肿瘤、泌尿系肿瘤等多种恶性肿瘤的抗肿瘤效应具有广泛性,有望开发为新型广谱抗肿瘤药物<sup>[17-18]</sup>;维生素 B2 是体内多种氧化酶系统不可缺少的辅酶,对维持人体正常物质代谢和某些特殊生理功能是不可缺少的<sup>[19]</sup>;亚油酸则是人体必需的脂肪酸,具有抗氧化、降低血液中的胆固醇、减少冠心病的

发生等作用<sup>[20–21]</sup>。黄芪作为一味中药,其临床疗效的发挥有赖于多种成分药效作用的叠加<sup>[2,22]</sup>,那么由于产地环境不同所引起的物质基础差异很可

能会反映在黄芪的功效作用上。因此,在临床应用中应充分考虑产地因素对黄芪药材的影响,根据具体药材调整剂量、提高疗效。

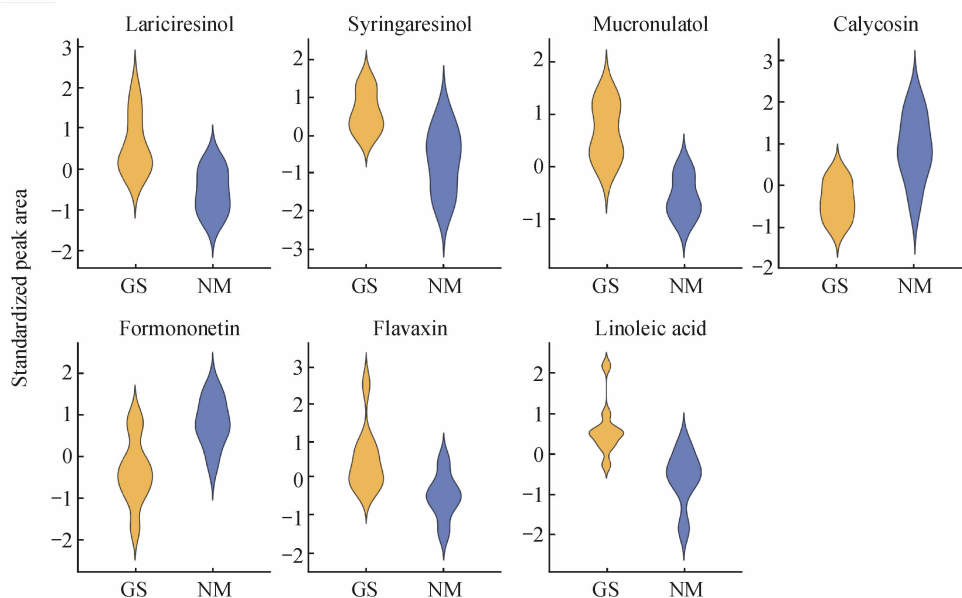


Figure 5 Distribution charts of 7 differential compounds in *Astragalus membranaceus* samples from GS and NM

值得注意的是,黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷被 2015 版《中华人民共和国药典》规定为黄芪药材的含量测定项<sup>[1]</sup>,作为黄芪的主要活性成分,它们已被证实具有降血糖、抗凋亡、抗氧化、抗肿瘤、抗炎症等多种药理作用<sup>[2,23]</sup>。在本实验中通过与标准品比对确证检测到这两种成分(保留时间分别为 23.5 min 和 15.1 min),但是在甘肃和内蒙古产的黄芪中其含量并未见显著差异,说明仅以黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷为指标不能有效区分不同产地的黄芪。与之相比,本研究发现的 7 个差异性化学成分则可以提供更多维度的信息,更有利于全面表征药材的质量。

## 5 结 论

本研究利用 UFLC-IT-TOF/MS 技术和模式识别方法,比较分析了甘肃与内蒙古产区黄芪水煎液的化学指纹图谱,发现毛蕊异黄酮、芒柄花素、亚油酸等 7 个差异性化学成分。初步证实产地的不同会影响黄芪的化学成分,但对于土壤、光照等环境因素如何改变黄芪的化学成分,尚需要进一步研究。本实验为黄芪药材的全面质量评价、科学区分产地以及合理种植栽培提供理论参考。

## 参 考 文 献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China; part 1* (中华人民共和国药典:一部) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 302–303.
- [2] Fu J, Wang Z, Huang L, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi) [J]. *Phytother Res*, 2014, **28**(9): 1275–1283.
- [3] Jin M, Zhao K, Huang Q, et al. Structural features and biological activities of the polysaccharides from *Astragalus membranaceus* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, **64**: 257–266.
- [4] Li M, Wang W, Xue J, et al. Meta-analysis of the clinical value of *Astragalus membranaceus* in diabetic nephropathy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, **133**(2): 412–419.
- [5] Jiao J, Gai QY, Niu LL, et al. Enhanced production of two bioactive isoflavone aglycones in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures by combining deglycosylation and elicitation of immobilized edible *Aspergillus niger* [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, **65**(41): 9078–9086.
- [6] Shahzad M, Shabbir A, Wojcikowski K, et al. The antioxidant effects of *Radix Astragali* (*Astragalus membranaceus* and related species) in protecting tissues from injury and disease [J]. *Curr Drug Tar*, 2016, **17**(12): 1331–1340.
- [7] Liao XF, Bi XL, Xu AL, et al. Fingerprint and three constituents' quantitative determination for *Astragali Radix* from different regions by HPLC-DAD-ELSD [J]. *J Guangdong Pharm Univ* (广

- 东药科大学学报),2018,**34**(5):558-563.
- [8] Tian D, Li ZY, Fan SC, *et al.* NMR-based analysis of water soluble extracts of different *Astragali Radix*[J]. *Acta Pharm Sin*(药学报),2014,**49**(1):89-94.
- [9] He JX, Mou QQ, Zhang JQ, *et al.* Rapid identification of *Astragali Radix* from different origins by UPLC combined with chemometrics methods [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*(中草药),2017,**48**(1):179-184.
- [10] Lai PK, Chan JY, Cheng L, *et al.* Isolation of anti-inflammatory fractions and compounds from the root of *Astragalus membranaceus*[J]. *Phytother Res*,2013,**27**(4):581-587.
- [11] Li J, Li F, Xu Y, *et al.* Chemical composition and synergistic antioxidant activities of essential oils from *Atractylodes macrocephala* and *Astragalus membranaceus*[J]. *Nat Prod Commun*,2013,**8**(9):1321-1324.
- [12] Guan QX, Li CD. Screening test study on seedling pattern of *Astragalus membranaceus* in different climate regions of Longxi (陇西不同气候区域黄芪育苗模式筛选试验研究)[J]. *J Chin Med Mate*(中药材),2016,**39**(3):490-492.
- [13] Liu DW, Gu CM, Yang QZ, *et al.* Resource surveys and suitability of origin for genuine medicinal materials, *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* in Inner Mongolia, China[J]. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报),2016,**27**(3):838-844.
- [14] Kai Z, Michela P, Antonio P and Annamaria P. Biological active ingredients of traditional Chinese herb *Astragalus membranaceus* on treatment of diabetes; a systematic review[J]. *Mini-Rev Med Chem*,2015,**15**(4):315-329.
- [15] Zhang LJ, Liu HK, Hsiao PC, *et al.* New isoflavonoid glycosides and related constituents from astragali radix (*Astragalus membranaceus*) and their inhibitory activity on nitric oxide production [J]. *J Agric Food Chem*,2011,**59**(4):1131-1137.
- [16] Nie Y, Li S, Yi Y, *et al.* Effects of astragalus injection on the TGF $\beta$ /Smad pathway in the kidney in type 2 diabetic mice[J]. *BMC Complem Altern Med*,2014,**14**(1):148.
- [17] Li W, Sun YN, Yan XT, *et al.* Flavonoids from *Astragalus membranaceus* and their inhibitory effects on LPS-stimulated pro-inflammatory cytokine production in bone marrow-derived dendritic cells[J]. *Arch Pharm Res*,2014,**37**(2):186-192.
- [18] Zhou R, Xu L, Ye M, *et al.* Formononetin inhibits migration and invasion of MDA-MB-231 and 4T1 breast cancer cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 through PI3K/AKT signaling pathways[J]. *Horm Metab Res*,2014,**46**(11):753-760.
- [19] Capozzi V, Menga V, Digesu AM, *et al.* Biotechnological production of vitamin B2-enriched bread and pasta[J]. *J Agric Food Chem*,2011,**59**(14):8013-8020.
- [20] Yang B, Chen H, Stanton C, *et al.* Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease[J]. *J Funct Foods*,2015,**15**:314-325.
- [21] Villacorta L, Minarrieta L, Salvatore SR, *et al.* *In situ* generation, metabolism and immunomodulatory signaling actions of nitro-conjugated linoleic acid in a murine model of inflammation[J]. *Redox Bio*,2018,**15**:522-531.
- [22] Wang Y, Fan X, Qu H, *et al.* Strategies and techniques for multi-component drug design from medicinal herbs and traditional Chinese medicine[J]. *Curr Top Med Chem*,2012,**12**(12):1356-1362.
- [23] Fu S, Gu Y, Jiang JQ, *et al.* Calycosin-7-O- $\beta$ -d-glucoside regulates nitric oxide/caveolin-1/matrix metalloproteinases pathway and protects blood-brain barrier integrity in experimental cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, **155**(1):692-701.