

· 中药工业 ·

巴戟天盐炙前后寡聚糖类与环烯醚萜类指纹图谱差异[△]

丁青, 刘晓霞, 魏梅*, 霍文杰, 陈芳, 王利伟, 陈向东, 孙冬梅

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

[摘要] 目的: 对比巴戟天盐炙前后寡聚糖类与环烯醚萜类指纹图谱的差异, 为巴戟天与盐巴戟天的质量评价提供参考。方法: 采用超高效液相色谱仪串联电雾式检测器(UPLC-CAD), 以乙腈为流动相 A, 以水为流动相 B, 梯度洗脱, 柱温为 35 ℃, 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 建立寡聚糖类指纹图谱; 采用超高效液相色谱仪串联二极管阵列检测器(UPLC-DAD), 以甲醇为流动相 A, 以 0.1% 磷酸溶液为流动相 B, 梯度洗脱, 柱温为 35 ℃, 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 检测波长为 235 nm, 建立环烯醚萜类指纹图谱。结果: 巴戟天盐炙前后具有相同的指纹峰, 寡聚糖类指纹图谱具有 15 个共有峰, 环烯醚萜类指纹图谱具有 7 个共有峰; 通过主成分分析(PCA), 寡聚糖类指纹图谱中确定了 1 个主成分因子, 累积方差贡献率达到 90.3%, 炮制前后平均综合得分差异较大; 环烯醚萜类指纹图谱中确定了 3 个主成分因子, 累积方差贡献率达到 87.7%, 炮制前后平均综合得分差异较大。结论: 建立了巴戟天的寡聚糖、环烯醚萜类指纹图谱, 该分析方法对巴戟天质量评价具有一定意义, 并对比巴戟天盐炙前后指纹图谱的区别, 为建立盐巴戟天饮片质量标准提供参考。

[关键词] 巴戟天; 盐炙; 寡聚糖类; 环烯醚萜类; 指纹图谱

[中图分类号] R282.71; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)03-0512-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20191119004

Difference of Fingerprints of Oligosaccharides and Iridoids in *Morinda officinalis* Before and After Stir-frying with Salt-water

DING Qing, LIU Xiao-xia, WEI Mei*, HUO Wen-jie, CHEN Fang, WANG Li-wei, CHEN Xiang-dong, SUN Dong-mei
Guangdong Yifang Pharmaceutical Co., Ltd., Foshan 528244, China

[Abstract] **Objective:** To compare the differences of oligosaccharide fingerprints and iridoids fingerprints of *Morinda officinalis* before and after stir-frying with salt-water, so as to provide reference for their quality evaluation. **Methods:** UPLC-CAD was used to establish oligosaccharide fingerprints with the condition of a detection column temperature of 35 ℃, a flow rate at 0.4 mL·min⁻¹ and acetonitrile-water as the mobile phase gradient elution. And UPLC-DAD was used to establish iridoids fingerprints with the condition of a detection column temperature of 35 ℃, the flow rate of 0.4 mL·min⁻¹, wave length at 235 nm and methanol-0.1% phosphoric acid as the mobile phase gradient elution. **Results:** The fingerprints of *M. officinalis* had the same peaks before and after stir-frying with salt-water, the oligosaccharides fingerprints had 15 common peaks, and the iridoids fingerprints had 7 common peaks. Through principal component analysis, oligosaccharide fingerprints identified a principal component factor, and the cumulative variance contribution rate reached 90.3%. The average comprehensive score had an obvious difference before and after processing. Through principal component analysis, iridoids fingerprints identified three principal components, and the cumulative variance contribution rate was 87.7%. The average comprehensive scores before and after processing were quite different. **Conclusion:** The oligosaccharide fingerprints and iridoids fingerprints in *M. officinalis* were established. The method has certain significance in quality evaluation of *M. officinalis*, and the differences of fingerprints before and after stir-frying with salt-water was compared to provide a reference for establishing the quality standard of *M. officinalis* after stir-frying with salt-water.

[Keywords] *Morinda officinalis* How; stir-frying with salt-water; oligosaccharides; iridoids; fingerprints

[△] [基金项目] 广东省省级科技计划项目(2018B030323004); 2017 佛山市重大科技项目(2016AG100912)

* [通信作者] 魏梅, 主任中药师, 研究方向: 中药配方颗粒开发与质量管理; E-mail: 1083289014@qq.com

巴戟天为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥根^[1], 味甘、辛, 性微温, 归肾、肝经, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效, 临床用于治疗阳痿遗精、宫冷不孕、月经不调、少腹冷痛、风湿痹痛、筋骨痿软等症状。巴戟天与槟榔、益智仁、砂仁并称为我国四大南药, 主产于福建、广东、广西等地^[2]。其主要成分为糖类、环烯醚萜类、蒽醌类、有机酸类^[3-4]等。据文献报道, 巴戟天中寡聚糖类成分具有抗抑郁、延缓衰老、增强免疫力等作用, 环烯醚萜类成分具有抗炎镇痛、抗肿瘤等功效, 在《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 2015年版巴戟天项下已建立耐斯糖含量测定方法, 而在质量标准中并没有体现环烯醚萜类成分。本研究分别建立了巴戟天的寡聚糖、环烯醚萜类成分指纹图谱分析方法, 并对比了巴戟天盐炙前后的指纹图谱的区别, 为完善巴戟天及盐巴戟天饮片质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Vanquish 超高效液相色谱仪、Thermo Scientific™ Vanquish 电喷雾化学检测器(CAD)、Thermo 二级管阵列检测器(DAD); Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), YMC Triart C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm); ME204E 型万分之一天平、XP26 型百万分之一天平(梅特勒-托利多公司); HWS-28 型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司); KQ-500DE 型超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

乙腈、甲醇(默克股份有限公司, 色谱纯); Milli-Q 超纯水(实验室自制); 乙醇、甲醇(西陇科学股份有限公司, 分析纯); 耐斯糖(中国食品药品检定研究院, 纯度: 92.2%, 批号: 111891-201704); 蔗果三糖(上海诗丹德标准技术服务有限公司, 纯度: 98%, 批号: 470-69-9); 蔗糖(中国食品药品检定研究院, 纯度: 100%, 批号: 111507-201704); 巴戟天寡糖 5 聚糖(中国食品药品检定研究院, 纯度: 94.2%, 批号: 111965-201501); 水晶兰苷(中国食品药品检定研究院, 纯度: 95.3%, 批号: 111870-201303); 去乙酰基车叶草苷酸(四川维克奇生物科技有限公司, 纯度: 96%, 批号: wkq18051706)。

10 批巴戟天药材, 产地为广东省肇庆市, 编号为 BJT01 ~ BJT10, 经广东一方制药有限公司质量中心魏梅主任中药师鉴定, 均为茜草科植物巴戟天 *Morinda officinalis* How 的干燥根, 炮制后的相对应的盐巴戟天编号分别为 YBJT01 ~ YBJT10。

2 方法与结果

2.1 样品的制备

巴戟天、盐巴戟天均按照《中国药典》2015年版规定进行炮制。

巴戟天: 取巴戟天原药材, 除去杂质及残留须根, 即得。

盐巴戟天: 取净巴戟天, 照盐蒸法(《中国药典》2015年版通则 0213)蒸透, 趁热除去木心, 切段, 干燥。具体炮制方法: 取巴戟天, 除去杂质后, 加盐水拌匀(按每 100 kg 净巴戟天用食盐 2 kg; 食盐加 20% 水溶解, 滤过, 备用), 闷润约 1 h, 直至盐水吸尽, 置蒸锅内, 用蒸气加热约 1 h, 取出, 趁热剥离木心, 切段(约 1 cm), 晾凉, 置电热恒温鼓风干燥箱中约 50 °C 烘干。

2.2 色谱条件

寡聚糖类指纹图谱色谱条件: 以 ACQUITY UPLC BEH Amide(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 为色谱柱; 流动相为乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0 ~ 1 min, 90% ~ 81% A, 1 ~ 7 min, 81% ~ 76% A, 7 ~ 13 min, 76% ~ 67% A, 13 ~ 30 min, 67% ~ 49% A); 电喷雾化学检测器检测, 流速为 0.4 mL·min⁻¹; 柱温为 35 °C; 进样体积为 1 μL。

环烯醚萜类指纹图谱色谱条件: 色谱柱为 YMC Triart C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm); 流动相甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0 ~ 1 min, 3% A, 1 ~ 6 min, 3% ~ 10% A, 6 ~ 14 min, 10% ~ 41% A); 检测波长为 235 nm; 流速为 0.4 mL·min⁻¹; 进样体积为 1 μL。

2.3 对照品溶液的制备

混合对照品溶液(a): 精密称取对照品蔗糖 4.635 mg、蔗果三糖 2.265 mg、耐斯糖 2.133 mg、巴戟天寡糖 5 聚糖 2.135 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 3% 甲醇制成含蔗糖 185.400 μg·mL⁻¹、蔗果三糖 88.788 μg·mL⁻¹、耐斯糖 78.665 μg·mL⁻¹、巴戟天寡糖 5 聚糖 80.447 μg·mL⁻¹ 的混合溶液, 即得。

混合对照品溶液(b): 精密称取对照品水晶兰苷

2.068 mg、去乙酰基车叶草苷酸 3.081 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 10% 甲醇制成含水晶兰苷 $78.832 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、去乙酰基车叶草苷酸 $118.31 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合溶液, 即得。

2.4 供试品溶液的制备

寡聚糖类指纹图谱供试品溶液: 取巴戟天及盐巴戟天粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 3% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率: 250 W, 频率: 45 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用 3% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

环烯醚萜类指纹图谱供试品溶液: 取巴戟天及盐巴戟天粉末(过三号筛)约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 10% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率: 250 W, 频率: 45 kHz) 30 min, 取出, 放冷, 再称定质量, 用 10% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.5 寡聚糖类指纹图谱方法学验证

2.5.1 精密度试验 取同一份供试品(批号: BJT01)溶液, 连续进样 6 次, 按寡聚糖类指纹图谱色谱条件进样测定, 以耐斯糖为参照峰 S, 计算各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积, 并计算 RSD。结果显示, 相对保留时间 RSD 为 0.01% ~ 0.02%, 相对峰面积 RSD 为 0.35% ~ 1.82%, 表明仪器精密度良好。

2.5.2 重复性试验 取同一批次巴戟天药材(批号: BJT01)粉末(过三号筛), 重复制备 6 份供试品溶液, 按寡聚糖类指纹图谱色谱条件进样测定, 以耐斯糖为参照峰 S, 计算各色谱峰的相对保留时间与相对峰面积, 并计算 RSD。结果显示, 重复制备的 6 份供试品溶液的相对保留时间 RSD 为 0.02% ~ 0.05%, 相对峰面积 RSD 为 0.48% ~ 2.30%, 表明分析方法重复性良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一份巴戟天寡聚糖类指纹图谱供试品溶液, 于室温下放置, 分别在 0、3、7、12、18、24 h 后进样测定, 以耐斯糖为参照峰 S, 计算各色谱峰相对保留时间及相对峰面积, 并计算 RSD。结果显示, 24 h 内供试品溶液中各色谱峰相对保留时间 RSD 为 0.02% ~ 0.16%, 相对峰面积 RSD 为 0.43% ~ 3.83%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

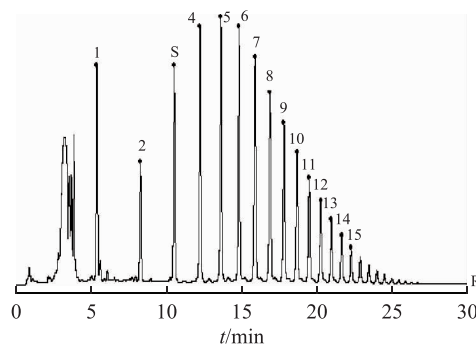
2.5.4 耐用性试验 1) 柱温耐用性试验: 取同一份巴戟天寡聚糖类指纹图谱供试品溶液, 分别在柱温为 32、35、38 °C 时, 进样测定, 以耐斯糖为参照峰

S, 计算各色谱峰相对保留时间及相对峰面积, 并计算 RSD。结果显示, 当柱温为 (35 ± 3) °C 时, 相对保留时间 RSD 为 0.28% ~ 1.01%, 相对峰面积 RSD 为 0.37% ~ 2.87%, 表明柱温微小的变动不影响巴戟天寡聚糖类指纹图谱的整体轮廓。

2) 流速耐用性试验: 取同一份巴戟天寡聚糖类指纹图谱供试品溶液, 分别在流速为 0.38、0.40、0.42 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, 进样测定, 以耐斯糖为参照峰 S, 计算各色谱峰相对保留时间及相对峰面积, 并计算 RSD。结果显示, 当流速为 (0.40 ± 0.02) $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, 相对保留时间 RSD 为 0.47% ~ 1.32%, 相对峰面积 RSD 为 0.41% ~ 11.22%, 其中峰 5 的相对峰面积受流速影响较大, 当流速增大时, 峰 5 前面的杂质峰与峰 5 的分离度增加, 影响积分结果。因此, 导致峰 5 的相对峰面积 RSD 为 11.22%。但不同流速下特征图谱整体轮廓不变, 相对保留时间一致。

2.6 样品测定

将 10 批巴戟天、盐巴戟天按 2.1、2.4 项下方法, 制备供试品溶液, 进样测定, 以耐斯糖为参照峰 S, 选择峰响应较高、分离度较好、峰形对称的色谱峰为共有峰, 并采用“中药色谱指纹图谱相似度软件评价系统(2012 版)”进行共有峰匹配, 生成对照指纹图谱, 见图 1 ~ 2, 并计算相似度。结果显示, 巴戟天与盐巴戟天寡聚糖类指纹图谱均具有 15 个共有峰, 其中采用对照品指认了峰 1 为蔗糖, 峰 2 为蔗果三糖, 峰 S 为耐斯糖, 峰 4 为巴戟天寡糖 5 聚糖。10 批巴戟天寡聚糖类指纹图谱相对保留时间 RSD 为 0.01% ~ 0.03%, 相对峰面积 RSD 为 2.90% ~ 22.37%; 10 批盐巴戟天寡聚糖类指纹图谱相对保留时间 RSD 为 0.02% ~ 0.04%, 相对峰面积 RSD 为 2.16% ~ 26.86%。



注: 1. 蔗糖; 2. 蔗果三糖; S. 耐斯糖; 4. 巴戟天寡糖 5 聚糖; 下同。

图 1 巴戟天寡聚糖类对照指纹图谱

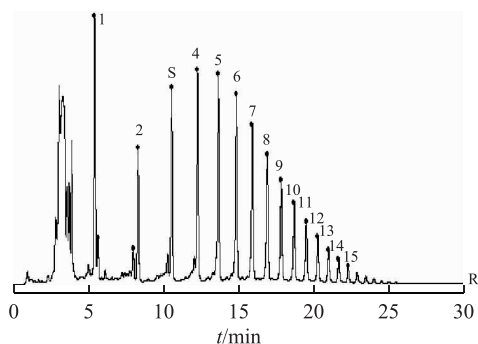


图 2 盐巴戟天寡聚糖类对照指纹图谱

2.7 炮制前后寡聚糖类指纹图谱对比

2.7.1 相似度分析 对 20 批巴戟天、盐巴戟天寡聚糖类指纹图谱 CDF 文件格式原始数据导入“中药色谱指纹图谱相似度软件评价系统(2012 版)”,以 S1(批号:BJT01)为参考图谱,自动匹配 20 批指纹图谱,计算批间相似度,结果显示,巴戟天与盐巴戟天寡聚糖类指纹图谱相似度 >0.90 。

2.7.2 主成分分析(PCA) 采用 SPSS 20.0 软件,因子分析法,以 15 个指纹峰的相对峰面积为变量,计算主成分特征值、累积贡献率及主成分得分。

根据 SPSS 20.0 软件统计结果,以特征值 >1 为标准,得到 1 个主成分因子,见图 3。主成分因子 1 特征值为 12.640,累积方差贡献率为 90.287%,表明该因子在反映巴戟天、盐巴戟天寡聚糖类指纹的差异中起主导作用。根据成分矩阵分析结果,主成分 1 主要反映了峰 4(巴戟天寡糖 5 聚糖)、峰 5、峰 6、峰 7 的色谱峰信息。

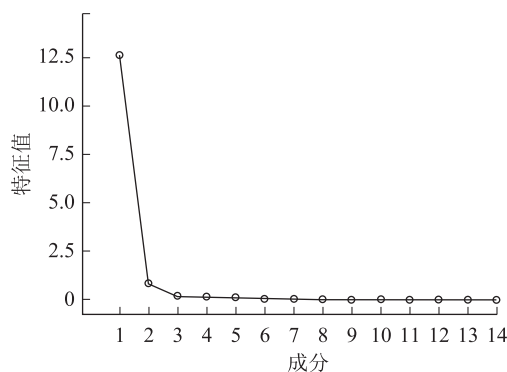


图 3 巴戟天与盐巴戟天寡聚糖类指纹图谱 PCA 碎石图

提取该主成分因子,并对 20 批巴戟天、盐巴戟天指纹图谱各特征峰相对峰面积测定结果进行评分,计算各批样品的综合得分,对综合得分进行排序。根据综合评分及排序结果,10 批巴戟天评价综合得分为

3.021, 10 批盐巴戟天平综合得分为 -3.021,表明巴戟天与盐巴戟天在寡聚糖类成分的组成比例存在较大差异,其中峰 4~7 为主要差异性成分,巴戟天寡聚糖类成分指纹图谱中峰 4 的相对峰面积为 1.159~1.250,峰 5 的相对峰面积为 1.119~1.295,峰 6 的相对峰面积为 1.062~1.238,峰 7 的相对峰面积为 0.950~1.147;盐巴戟天寡聚糖类成分指纹图谱中峰 4 的相对峰面积为 0.968~1.035,峰 5 的相对峰面积为 1.072~1.200,峰 6 的相对峰面积为 0.943~1.059,峰 7 相对峰面积为 0.801~0.939。此 4 种差异性成分的相对峰面积范围可暂时作为巴戟天与盐巴戟天的区别方法,但后期研究中应对此 4 种成分建立相应的定量测定方法,完善质量控制。

2.8 环烯醚萜类指纹图谱方法学验证

2.8.1 精密度试验 取同一份供试品(批号:BJT01)溶液,连续进样 6 次,按环烯醚萜类指纹图谱色谱条件进样测定,以水晶兰苷为参照峰 S,计算各色谱峰的相对保留时间及相对峰面积,并计算 RSD。结果显示,相对保留时间 RSD 为 0.10%~0.14%,相对峰面积 RSD 为 0.05%~1.96%,表明仪器精密度良好。

2.8.2 重复性试验 取同一批次巴戟天药材(批号:BJT01)粉末(过三号筛),重复制备 6 份供试品溶液,按环烯醚萜类指纹图谱色谱条件进样测定,以水晶兰苷为参照峰 S,计算各色谱峰的相对保留时间与相对峰面积,并计算 RSD。结果显示,重复制备的 6 份供试品溶液的相对保留时间 RSD 为 0.11%~0.20%,相对峰面积 RSD 为 0.16%~2.01%,表明分析方法重复性良好。

2.8.3 稳定性试验 取同一份巴戟天环烯醚萜类指纹图谱供试品溶液,于室温下放置,分别在 0、2、5、8、18、24 h 后进样测定,以水晶兰苷为参照峰 S,计算各色谱峰相对保留时间及相对峰面积,并计算 RSD。结果显示,24 h 内供试品溶液中各色谱峰相对保留时间 RSD 为 0.04%~0.36%,相对峰面积 RSD 为 0.16%~2.13%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

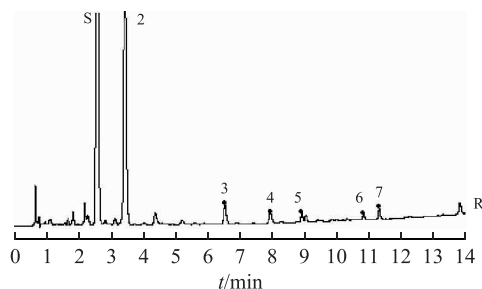
2.8.4 耐用性试验 1) 柱温耐用性试验:取同一份巴戟天环烯醚萜类指纹图谱供试品溶液,分别在柱温为 33、35、38℃时,进样测定,以水晶兰苷为参照峰 S,计算各色谱峰相对保留时间及相对峰面积,并计算 RSD。结果显示,当柱温为 33~38℃时,相对保留时间 RSD 为 0.25%~1.59%,相对峰面积 RSD 为 0.27%~1.59%,表明柱温微小的变动

不影响巴戟天环烯醚萜类指纹图谱的整体轮廓。

2) 流速耐用性试验: 取同一份巴戟天环烯醚萜类指纹图谱供试品溶液, 分别在流速为 0.38、0.40、0.42 mL·min⁻¹ 时, 进样测定, 以水晶兰苷为参照峰 S, 计算各色谱峰相对保留时间及相对峰面积, 并计算 RSD。结果显示, 当流速为 (0.40 ± 0.02) mL·min⁻¹ 时, 相对保留时间 RSD 为 0.45% ~ 2.85%, 相对峰面积 RSD 为 0.21% ~ 2.44%, 其表明流速微小的变动不影响巴戟天环烯醚萜类指纹图谱的整体轮廓。

2.9 样品测定

将 10 批巴戟天、盐巴戟天按 2.1、2.4 项下方法, 制备供试品溶液, 进样测定, 以水晶兰苷为参照峰 S, 选择峰响应较高、分离度较好、峰形对称、峰纯度在阈值范围内的色谱峰为共有峰, 并采用“中药色谱指纹图谱相似度软件评价系统(2012 版)”进行共有峰匹配, 生成对照指纹图谱, 见图 4~5, 并计算相似度。结果显示, 巴戟天与盐巴戟天寡聚糖类指纹图谱均具有 7 个共有峰, 其中采用对照品指认了峰 S 为水晶兰苷, 峰 2 为去乙酰基车叶草苷酸。10 批巴戟天环烯醚萜类指纹图谱相对保留时间 RSD 为 0.11% ~ 0.51%, 相对峰面积 RSD 为 14.04% ~ 54.96%; 10 批盐巴戟天寡聚糖类指纹图谱相对保留时间 RSD 为 0.13% ~ 1.09%, 相对峰面积 RSD 为 13.34% ~ 57.08%。



注: S. 水晶兰苷; 2. 去乙酰基车叶草苷酸; 下同。

图4 巴戟天环烯醚萜类对照指纹图谱

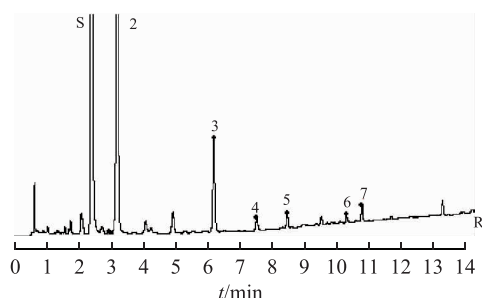


图5 盐巴戟天环烯醚萜类对照指纹图谱

2.10 炮制前后环烯醚萜类指纹图谱对比

2.10.1 相似度分析 对 20 批巴戟天、盐巴戟天环烯醚萜类指纹图谱 CDF 文件格式原始数据导入“中药色谱指纹图谱相似度软件评价系统(2012 版)”, 以 S1 为参考图谱, 自动匹配 20 批指纹图谱, 计算批间相似度, 结果显示, 巴戟天与盐巴戟天环烯醚萜类指纹图谱相似度 > 0.90。

2.10.2 PCA 采用 SPSS 20.0 软件, 采用因子分析法, 以 7 个指纹峰的相对峰面积为变量, 计算主成分特征值、累积贡献率及主成分得分。

根据 SPSS 20.0 软件统计结果, 以特征值 > 1 为标准, 得到 3 个因子, 见图 6。因子 1 特征值为 2.728, 累积方差贡献率为 45.466%, 因子 2 特征值为 1.509, 累积方差贡献率为 70.617%, 因子 3 特征值为 1.024, 累积方差贡献率为 87.675%, 表明这个 3 个因子在反映巴戟天、盐巴戟天环烯醚萜类指纹图谱的差异中起主导作用。提取前 3 个因子为主成分, 主成分 1 主要反映了峰 2、峰 4、峰 6 的色谱峰信息, 主成分 2 主要反映了峰 2~5 的色谱峰信息, 主成分 3 主要反映了峰 2~7 的色谱峰信息, 其中峰 2(去乙酰基车叶草苷酸)、峰 4 分布于 3 个不同的主成分内。以主成分的变量得到载荷矩阵图(图 7)。由载荷图可知, 距离原点较远的几个点就是主成分 1 中权重较大的成分, 表明其在判断巴戟天炮制前后的质量差异上起重要作用。

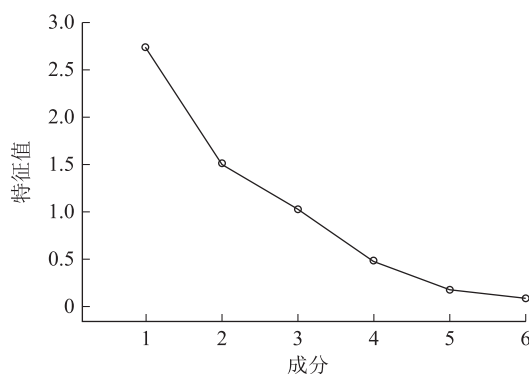


图6 巴戟天与盐巴戟天环烯醚萜类指纹图谱主成分分析碎石图

用 3 个主成分对 20 批巴戟天、盐巴戟天环烯醚萜类指纹图谱进行综合评价, 计算各批样品的综合得分, 并对综合得分进行排序。根据综合评分及排序结果, 10 批巴戟天的平均综合得分为 -0.155 3, 10 批盐巴戟天的平均综合得分为 0.155 3, 表明盐制

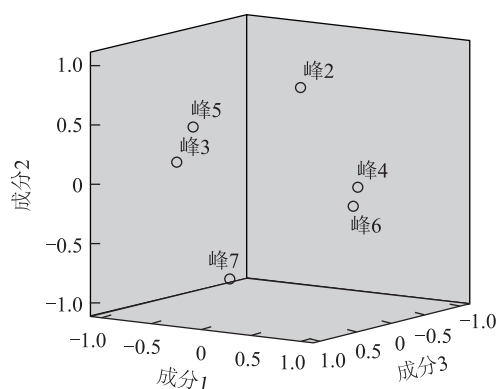


图7 巴戟天与盐巴戟天环烯醚萜类指纹图谱因子载荷图

前后巴戟天中环烯醚萜类成分组成比例发生了较大的变化, 峰2~7均为差异性成分, 巴戟天环烯醚萜类成分指纹图谱中峰2的相对峰面积为0.292~0.834, 峰3的相对峰面积为0.021~0.032, 峰4的相对峰面积为0.014~0.024, 峰5的相对峰面积为0.004~0.016, 峰6的相对峰面积为0.006~0.011, 峰7的相对峰面积为0.004~0.019; 盐巴戟天寡聚糖类成分指纹图谱中峰2的相对峰面积为0.342~0.618, 峰3的相对峰面积为0.079~0.143, 峰4的相对峰面积为0.013~0.019, 峰5的相对峰面积为0.007~0.029, 峰6的相对峰面积为0.006~0.009, 峰7的相对峰面积为0.006~0.018; 峰3的相对峰面积在盐制前后具有明显不同的范围, 峰3的相对峰面积范围可暂时作为巴戟天与盐巴戟天的区别方法。因此, 在后期研究中建议增加峰2(水晶兰苷)、峰3所代表化合物的定量测定方法, 完善质量控制。

3 结论

本研究采用相似度分析、PCA方法对比了巴戟天盐炙前后寡聚糖类与环烯醚萜类指纹图谱, 结果显示, 炮制前后寡聚糖类指纹图谱与环烯醚萜类指纹图谱相似度均大于0.90, 表明巴戟天盐炙前后化学成分一致, 指纹图谱共有峰一致。但是, 根据PCA结果显示, 在寡聚糖类指纹图谱中, 主成分因子的累积方差贡献率达到90.287%, 炮制前后平均综合得分差异较大; 在环烯醚萜类指纹图谱中, 3个主成分因子的累积方差贡献率达到87.675%, 炮制前后平均综合得分差异较大, 表明巴戟天在盐制后, 无论是寡聚糖类成分还是环烯醚萜类成分均产生了

较大的变化。

4 讨论

4.1 供试品溶液制备方法的优化

本研究采用超高效液相色谱仪串联电雾式检测器(UPLC-CAD)建立巴戟天寡聚糖类指纹图谱, 采用超高效液相色谱仪串联二极管阵列检测器(UPLC-DAD)建立了环烯醚萜类指纹图谱, 并且在本实验前期研究中也对比了不同提取溶剂、提取方式、提取时间对2类成分指纹图谱的影响, 最终优选出相应的供试品溶液制备方法。

4.2 色谱条件的优化

寡聚糖类指纹图谱采用CAD, 因此, 流动相必须具有挥发性, 对比甲醇-水与乙腈-水2种流动相系统, 发现乙腈-水的分离能力更优, 因此, 寡聚糖指纹图谱的流动相为乙腈-水; 环烯醚萜类指纹图谱采用DAD, 对比甲醇-0.1%磷酸溶液与乙腈-0.1%磷酸溶液2种流动相系统, 发现甲醇-0.1%磷酸溶液的分离效果更好, 峰形更为对称, 因此, 环烯醚萜类指纹图谱的流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液; 根据190~400 nm的全波长扫描结果, 发现在235 nm下, 各色谱峰相应更高, 峰容量较大, 整体分布较好。

4.3 炮制对成分的影响

结合对照指纹图谱的峰高, 盐炙后蔗糖、蔗果三糖及环烯醚萜类指纹图谱中峰3的峰面积有明显的增加, 可知盐炙后蔗糖、蔗果三糖及环烯醚萜类指纹图谱中峰3所对应的化学成分均有明显的增加。可能是由于盐炙后, 药材质地发生变化, 结构更为疏松, 部分有效成分易于煎出, 表明盐炙具有一定科学依据, 与文献报道一致^[5]。根据赵祥升等^[6]的研究巴戟天中环烯醚萜类成分主要有水晶兰苷、去乙酰基车叶草苷酸、车叶草苷酸、车叶草苷, 根据化合物极性大小、出峰顺序, 推测环烯醚萜成分指纹图谱中峰3可能为车叶草苷酸。

根据实验测定结果、PCA结果, 建议在后期研究中对寡聚糖类成分指纹图谱中峰4~7及环烯醚萜类指纹图谱中峰2、峰3的未知化合物采用液相色谱

(下转第547页)

- [3] 朱慧慧,白岩. 栀子花中栀子苷的提取与测定[J]. 浙江中医杂志,2018,53(7):543-544.
- [4] 林梦,蒋斌,张华峰,等. 高效液相色谱法测定大黄滴眼液中黄芩苷含量[J]. 中国药业,2008,27(22):37-39.
- [5] 叶锦雄,苏佳瑜,郑丽萍,等. 青蛤散质量控制研究[J]. 中国药师,2016,21(4):733-735.
- [6] 陈杨,倪健,豆浩然,等. 大豆黄卷总黄酮测定方法及水提取动力学模型的建立[J]. 中华中医药学刊,2014,32(12):2904-2906.
- [7] 邵长森,张国青,韩真真,等. HPLC法同时测定温经汤中10种活性成分的含量[J]. 中国药房,2018,29(19):2640-2643.
- [8] 卿大双,罗维早,孙建彬,等. 一测多评测定黄连及炮制品中6种生物碱[J]. 中草药,2016,47(2):324-329.
- [9] 宋佳,段树卿,李云霞. HPLC法同时测定心宁片中栀子苷和甘草苷的含量[J]. 中国药房,2015,26(27):3862-3864.
- [10] 李丽莉,吕轶峰,朱雪妍. 葛根芩连片多成分含量测定的研究[J]. 药物分析杂志,2017,37(9):1607-1614.
- [11] 邱红梅,杨林,何丹. HPLC法同时测定复方鱼腥草片中绿原酸、黄芩苷和槲皮素的含量[J]. 中国药房,2015,28(27):3846-3848.
- [12] 黄湘杰,朱芹. 反相离子对色谱法同时测定黄柏八味片中盐酸黄柏碱和盐酸小檗碱含量[J]. 中国药业,2016,25(3):52-54.
- [13] 张晓娟,李紫涵,黎春彤,等. HPLC法同时测定肝血管瘤活血胶囊中4个成分含量[J]. 中国药师,2018,21(8):1485-1487.
- [14] 黄传俊,梅勇,杨莉,等. HPLC法同时测定金蝉止痒胶囊中盐酸小檗碱、黄芩苷和蛇床子素的含量[J]. 中国药房,2018,29(12):1621-1624.
- [15] 陈庆文,郝自新. HPLC同时测定龙胆泻肝丸(浓缩丸)中龙胆苦苷、栀子苷和黄芩苷的含量[J]. 北方药学,2018,15(3):1-3.

(收稿日期:2020-03-01 编辑:王笑辉)

(上接第517页)

串联质谱(LC-MS)等技术进行指认,可对差异性成分建立相应的定量测定方法,分别完善生品与炮制品的质量控制标准。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:81-82.
- [2] 杨欣,李咏梅,黎行山,等. 广东道地药材巴戟天中17种氨基酸含量分析研究[J]. 中医药导报,2018,24(22):45-48.
- [3] 林美珍,郑松,田惠桥. 巴戟天研究现状与展望[J]. 亚热带植物科学,2010,39(4):74-78.
- [4] 徐吉银,楚桐丽,丁平. 巴戟天属植物环烯醚萜类化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2006,23(3):268-271.
- [5] 景海漪,史辑,崔妮,等. 巴戟天炮制前后寡糖类成分HPLC-CAD指纹图谱研究[J]. 中草药,2014,45(10):1412-1417.
- [6] 赵祥升,弓宝,周亚奎,等. UPLC-MS/MS同时测定巴戟天中4个环烯醚萜苷的含量[J]. 药物分析杂志,2018,38(9):1490-1495.

(收稿日期:2019-11-19 编辑:王笑辉)