

远志药材 UPLC 指纹图谱及多指标性成分测定方法的建立

王丹丹^{1,2}, 闫艳¹, 张福生^{1*}, 田洪岭³, 杜晨晖⁴, 秦雪梅¹, 马存根^{4*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

3. 山西省农业科学院经济作物研究所, 山西 汾阳 032200

4. 山西中医药大学, 山西 太原 030024

摘要:目的 建立远志药材 UPLC 指纹图谱及多指标性成分测定的方法,用于不同规格等级远志药材的质量评价。方法 采用 UPLC 法,建立不同规格等级远志药材的指纹图谱,并测定远志药材中 sibiricose A₅、sibiricose A₆、lancerin、sibiricoxanthone B、glomeratose A、7-*O*-methyl mangiferin、polygalaxanthone III、3,6'-disinapoyl sucrose、tenuifolside A、tenuifolside C 10 种指标性成分的含量,同时建立综合质量评价函数。结果 建立的指纹图谱及含量测定方法符合方法学要求,指纹图谱共标定 37 个共有峰,指出其中 22 个峰;不同规格等级远志药材样品间的相似度在 0.927~0.971;10 种指标性成分含量均有不同程度的差异,综合质量评价函数表明大筒远志药材样品的整体质量优于中筒远志药材样品,野生远志药材样品的整体质量优于栽培品。结论 建立的指纹图谱结合多指标成分测定的方法可用于远志药材样品的综合质量评价。

关键词: 远志; UPLC; 指纹图谱; 含量测定; 质量评价

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)05-1150-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.05.025

Establishment for methods of fingerprint analysis and determination of index compounds on commercial *Polygala tenuifolia* by ultra performance liquid chromatography

WANG Dan-dan^{1,2}, YAN Yan¹, ZHANG Fu-sheng¹, TIAN Hong-ling³, DU Chen-hui⁴, QIN Xue-mei¹, MA Cun-gen⁴

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Institute of Industrial Crop, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Fenyang 032200, China

4. Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China

Abstract: Objective To establish a method of fingerprint analysis and determination of index compounds on commercial *Polygala tenuifolia* by ultra performance liquid chromatography, and to evaluate the quality of *P. tenuifolia* with different commodity specification grades. **Methods** UPLC was used to establish different commodity specification grade of *P. tenuifolia* and determine the contents of ten indicative compounds including sibiricose A₅, sibiricose A₆, lancerin, sibiricoxanthone B, glomeratose A, 7-*O*-methyl mangiferin, polygalaxanthone III, 3,6'-disinapoyl sucrose, tenuifolside A, and tenuifolside C, and establish comprehensive quality evaluation function at the same time. **Results** The methods for fingerprint analysis and compound determination were in agreement with methodological requirements. A total of 37 peaks were selected as the common peaks, of which 22 peaks were identified, and the similarities

收稿日期: 2017-09-30

基金项目: 国家科技支撑计划 (2011BAI07B05); 山西省重点研发计划重点项目 (201603D3111003); 山西省应用基础研究项目 (201601D011064); 国家中药标准化项目 (ZYBZH-Y-JIN-34); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设”(2060302); 山西省科技攻关项目 (20140313010-1); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室 (201605D111004); 山西省科技创新重点团队 (201605D131045-18)

作者简介: 王丹丹 (1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中草药资源评价。E-mail: wdd0311strive@163.com

***通信作者** 张福生 (1978—), 男, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中草药资源评价及次生代谢产物研究。

Tel: (0351)7019178 E-mail: ample1007@sxu.edu.cn

马存根 (1960—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为神经免疫学研究。Tel: (0351)3179809 E-mail: macungen2001@163.com

were between 0.927 and 0.971. There are differences at different degrees in the contents of ten indicative compounds. The comprehensive quality evaluation function showed that the overall quality of Datong was better than that of Zhongtong; The overall quality of wild *P. tenuifolia* was better than that of cultivated. **Conclusion** The validated UPLC fingerprint analysis and compound determination methods were successfully used in the quality control of *P. tenuifolia*.

Key words: *Polygala tenuifolia* Willd.; UPLC; fingerprint analysis; content determination; quality evaluation

远志为远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 或卵叶远志 *Polygala sibirica* L. 的干燥根, 具有安神益智、祛痰消肿等功效^[1]。传统远志药材以野生品为主, 但由于野生资源的人为破坏, 目前市场中流通的远志药材主要以山西产栽培品为主^[2], 主要划分为“远志筒”“远志肉”和“远志棍”3 种规格^[3]; 传统鉴别经验以“筒粗、肉厚、去净木心者”为佳^[4], 且认为野生远志药材质量优于栽培品, 以大筒远志的质量最优, 而中筒的质量仅次于大筒, 优于小筒。

中药材(饮片)质量的优劣与其所含主要化学成分含量高低紧密相关^[5], 指纹图谱可对不同来源中药材的相似性进行评价。通过对远志药材指纹图谱研究发现, 不同生长方式、不同规格等级以及不同部位的相似度均较高^[6-8], 仅利用指纹图谱技术无法区分不同来源远志药材质量的优劣, 而采用指纹图谱结合指标性成分含量测定分析, 可综合评价远志药材不同规格等级的质量优劣^[9]。结合本课题组前期对远志药材进行的市场及产地调研, 及对现有的《七十六种药材商品规格标准》^[10]中远志药材的标准进行修订的研究结果^[3], 本研究选取部分不同规格等级的远志药材样品进行指纹图谱分析及多指标性成分含量测定, 拟对所修订的远志药材商品规格等级标准进行补充与说明, 也为不同规格等级远志药材的质量优劣评价提供更多的科学依据。

刘筱筱等^[11]建立了远志药材 UPLC 指纹图谱, 并对 4 个糖酯类化合物(sibiricose A₅、sibiricose A₆、glomeratose A、3,6'-disinapoyl sucrose)和 2 个吡啶酮类化合物(sibiricoxanthone B、polygalaxanthone III)进行指标性成分含量测定。本研究在此研究基础上新增加 2 个吡啶酮类化合物(lancerin、7-O-methyl mangiferin)和 2 个糖酯类化合物(tenuifoliside A、tenuifoliside C)的含量测定, 并建立远志药材的指纹图谱, 同时建立商品远志药材的综合质量评价函数, 可初步实现远志药材质量的综合评价。

1 仪器与试药

1.1 仪器

超高效液相色谱系统(Waters 公司 ACQUITY

UPLC, 包括真空脱气机、二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、TUV 检测器); Thermo Fisher U3000 超高效液相色谱仪, 配置在线脱气机、四元梯度泵、柱温箱、自动进样器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Thermo Scientific™ Q Exactive™ 组合型四极杆 Orbitrap 质谱仪(Germany); 电子天平(BSA124S, 德国 Sartorius 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 超声波清洗器(KQ-500DV, 昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

对照品 polygalaxanthone III (批号 MUST-14100905)、3,6'-disinapoyl sucrose (批号 MUST-13031201)、sibiricoxanthone B (批号 MUST-16080415)、tenuifoliside C (批号 MUST-16030702)、sibiricose A₆ (批号 MUST-16080513)、7-O-methyl mangiferin (批号 MUST-16081202), 均购自成都曼思特生物科技有限公司; sibiricose A₅ (批号 P2207F23346)、lancerin (批号 P31D6F8404) 均购自上海源叶生物科技有限公司; glomeratose A (批号 15081916) 购自成都普瑞法科技开发有限公司; tenuifoliside A (批号 wkq15121102) 购自四川维克奇生物科技有限公司, 对照品质量分数均大于 98%; 乙腈(色谱纯, Fisher 公司), 甲酸(色谱纯, Fisher 公司), 超纯水(Milli-Q 制备), 甲醇(国产分析纯)。

1.3 药材样本

7 批远志药材从山西省不同产地收集, 经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为远志 *Polygala tenuifolia* Willd. 的干燥根, 留样保存于山西大学中医药现代研究中心。按照远志药材生长方式的不同, 对其进行规格的划分; 从每批样品中随机选取 30 根, 用手抽去木心得到远志筒, 并测量其直径, 依据中华中医药学会发布的远志药材规格等级征求意见稿中直径的规定, 进行等级划分: 特大筒(直径 ≥ 0.4 cm)、大筒(直径介于 0.3~0.4 cm)、中筒(直径介于 0.2~0.3 cm)、小筒(直径小于 0.2 cm), 远志药材信息见表 1。

表 1 远志药材样品信息

Table 1 Information for *P. tenuifolia*

编号	产地	规格	直径/cm	等级
1	临汾市襄汾县南贾镇南贾村	栽培	0.93±0.32	大筒
2	吕梁市石楼县小蒜村	野生	1.40±0.32	大筒
3	运城市闻喜凹底镇辛村	栽培	0.53±0.20	中筒
4	运城市夏县庙前镇中条山产地	栽培	1.03±0.28	中筒
5	忻州市定襄受禄乡上零山村	野生	1.25±0.34	大筒
6	忻州市河曲县巡镇	野生	0.62±0.27	中筒
7	阳泉市盂县西潘乡郑沟村	野生	1.10±0.35	大筒

2 方法

2.1 色谱条件

Phenomenex Kinetex C₁₈ (100 mm×2.1 mm,

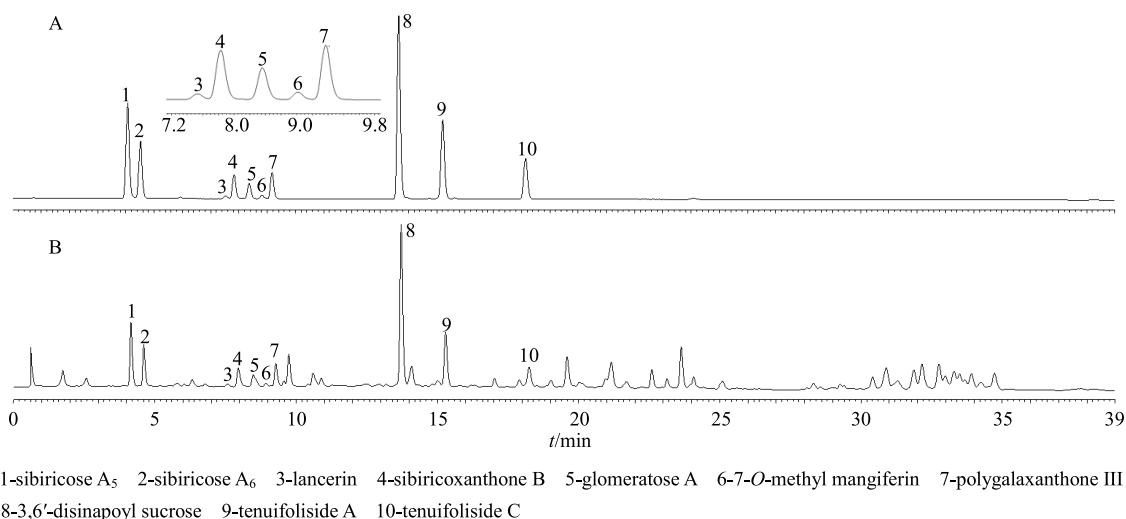


图 1 远志对照品 (A) 及远志药材样品 (B) 的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC of reference substance (A) and *P. tenuifolia* samples (B)

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源 (ESI); 扫描方式为正负离子同时扫描; 喷雾电压 3.5 kV; 鞘气体积流量 241.5 mL/s; 辅助气体流量 69.0 mL/s; 毛细管温度 320 °C; 探头加热器温度 300 °C; 最大喷雾电流 100 A; S-Lens 分辨率 55; 扫描范围 m/z 100~2 000; 质量分辨率 70 kHz。

2.3 对照品溶液制备

取对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇制备成 3.290 mg/mL sibiricose A₅、3.825 mg/mL sibiricose A₆、1.003 mg/mL lancerin、9.370 mg/mL sibiricaxanthone B、1.099 mg/mL glomeratose A、1.018 mg/mL 7-*O*-methyl mangiferin、1.018 mg/mL polygalaxanthone III、3.836 mg/mL 3,6'-disinapoyl sucrose、8.160 mg/mL tenuifolide A 和 10.510

2.6 μm) 色谱柱。流动相为乙腈 (A)-0.1% 的甲酸水溶液 (B); 洗脱梯度: 0~3 min, 5%~10% A; 3~6 min, 10%~12% A; 6~16 min, 12%~22% A; 16~17 min, 22% A; 17~22 min, 22%~27% A; 22~25 min, 27%~32% A; 25~27 min, 32%~35% A; 27~30 min, 35% A; 30~36 min, 35%~40% A; 36~37 min, 40%~100% A; 37~39 min, 100%~5% A; 体积流量 0.4 mL/min; 检测波长 320 nm; 柱温 40 °C; 进样量 2 μL。10 种指标性成分的理论塔板数均不低于 6 000, 此色谱条件检测时间短, 信息量丰富, 可用于指纹图谱及活性成分含量测定分析, 对照品及远志药材样品的 UPLC 色谱图见图 1。

mg/mL tenuifolide C 的单一对照品储备液, 各取适量, 制成混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液制备

将远志筒粉碎, 称取粉末 (过 3 号筛) 约 0.2 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 精密移取 70% 甲醇溶液 20 mL, 称定质量, 超声处理 30 min (功率 500 W, 频率 40 kHz), 放至室温, 用 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

3 指纹图谱研究结果与分析

3.1 方法学考察

3.1.1 精密度试验 按“2.4”项下方法制备 1 份 3 号样品的供试品溶液, 在“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 由于 3,6'-disinapoyl sucrose 在各批次远志中均有出现, 分离度良好且峰面积较大, 故选择 3,6'-disinapoyl sucrose (9 号峰) 作为参照峰 (S),

计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间 $RSD < 0.15\%$ ，相对峰面积 $RSD < 0.98\%$ ， RSD 均在 3% 以内，表明仪器的精密度良好。

3.1.2 稳定性试验 按“2.4”项下方法制备 3 号样品的供试品溶液，室温下放置，按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 时进样分析，以 3,6'-disinapoyl sucrose 作为参照峰 (S)，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间 $RSD < 0.42\%$ ，相对峰面积 $RSD < 1.83\%$ ， RSD 均在 3% 以内，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

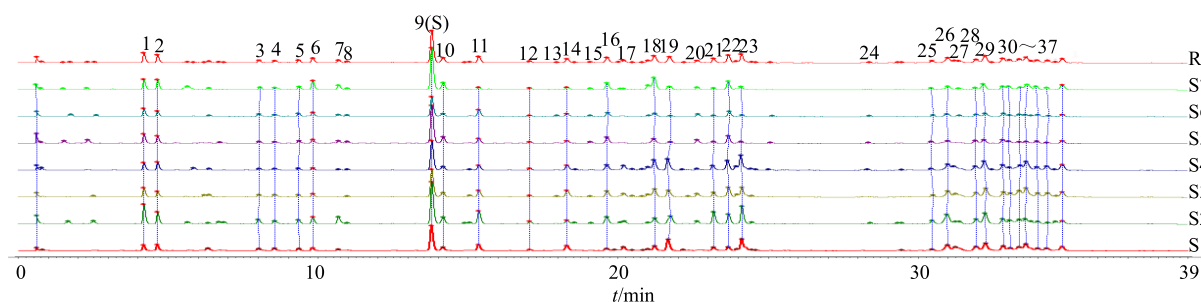
3.1.3 重复性试验 按“2.4”项下方法平行制备 6 份 3 号样品的供试品溶液，“2.1”项下色谱条件进样分析，以 3,6'-disinapoyl sucrose 作为参照峰 (S)，计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。相对保留时间 $RSD < 0.35\%$ ，相对峰面积 $RSD < 2.10\%$ ， RSD 均在 3% 以内，符合指纹图谱测定要求。

3.2 指纹图谱建立及相似度评价

采用“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”软件对 7 批远志药材 UPLC 指纹图谱进行数据处理，标定 37 个共有峰，并建立指纹图谱 (图 2)。7 批远志药材指纹图谱与对照指纹图谱对比，其相似度依次为 0.948、0.971、0.966、0.961、0.927、0.944、0.943，介于 0.927~0.971。

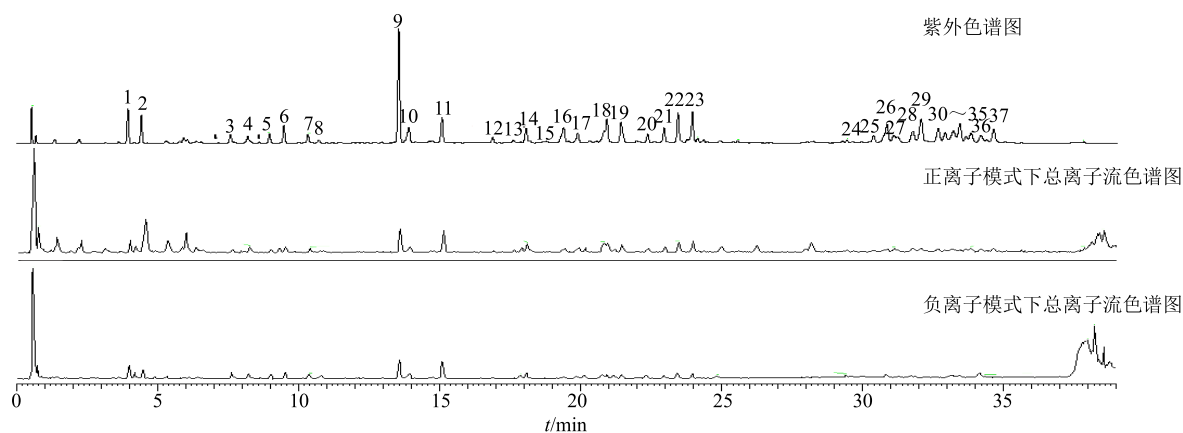
3.3 共有峰与非共有峰的归属

依据对照品色谱和质谱保留行为，并参考文献报道^[11-15]中化合物的质荷比、保留时间及特征碎片离子 (图 3)，对 37 个共有峰中的 22 个进行鉴定和推断指认 (表 2)，其中指纹图谱中 1、2、3、4、5、9、11、14 号峰分别确定为 sibiricose A₅、sibiricose A₆、sibiricaxanthone B、glomeratose A、polygalaxanthone III、3,6'-disinapoyl sucrose、tenuifolside A、tenuifolside C。22 个共有峰包括 14 个糖酯类成分



R 为对照指纹图谱 S1~S7 分别为 1~7 批远志药材样品
R-the reference fingerprint S1—S7 were *P. tenuifolia* samples

图 2 7 批远志药材的 UPLC 指纹图谱
Fig. 2 UPLC fingerprints of seven batches of *P. tenuifolia*



1-sibiricose A₅ 2-sibiricose A₆ 3-sibiricaxanthone B 4-glomeratose A 5-polygalaxanthone III 9-3,6'-disinapoyl sucrose 11-tenuifolside A
14-tenuifolside C

图 3 远志药材样品的色谱图
Fig. 3 Chromatograms of *P. tenuifolia* samples

表 2 远志指纹图谱共有峰及非共有峰的归属 (负离子模式)

Table 2 Compounds identification of *P. tenuifolia* based on fingerprint analysis (negative ion mode)

编号	峰号	分子式	化合物	t_R/min	$[M-H]^- (m/z)$		主要碎片离子 (m/z)	类型
					测量值	计算值		
1*	1	$C_{22}H_{30}O_{14}$	sibiricose A ₅	4.088	517.156 3	517.155 2	193.050 2, 175.039 5, 160.015 9, 134.036 5	糖酯类
2*	2	$C_{23}H_{32}O_{15}$	sibiricose A ₆	4.543	547.167 1	547.165 7	223.061 0, 205.050 3, 190.026 7, 175.003 0	糖酯类
3*	4	$C_{24}H_{34}O_{15}$	glomeratose A	8.295	561.183 1	561.181 4	323.098 5, 237.076 7, 113.023 5	糖酯类
4	7	$C_{30}H_{36}O_{17}$	tenuifoliside B	10.355	667.188 9	667.186 9	461.131 0, 281.067 2, 239.056 4, 205.050 5, 190.026 9, 175.003 2, 137.023 8	糖酯类
5*	9	$C_{34}H_{42}O_{19}$	3,6'-disinapoyl sucrose	13.596	753.225 2	753.223 7	547.168 3, 367.105 3, 223.060 8, 205.050 4, 190.026 8, 175.003 1	糖酯类
6	10	$C_{33}H_{40}O_{18}$	arillanin A	13.959	723.214 9	723.213 1	547.168 8, 265.072 9, 223.061 3, 205.050 5, 190.026 7, 160.016 0	糖酯类
7*	11	$C_{31}H_{38}O_{17}$	tenuifoliside A	15.113	681.203 6	681.202 5	443.118 7, 281.067 7, 239.056 4, 179.034 5, 137.023 7	糖酯类
8	12	$C_{66}H_{84}O_{38}$	tenuifoliose G	16.866	1 483.458 6	1 483.455 7	1 337.398 1, 1 296.817 8, 1 161.346 3, 1 119.342 9, 997.304 0, 753.227 9	糖酯类
9*	14	$C_{35}H_{44}O_{19}$	tenuifoliside C	18.069	767.241 0	767.239 3	529.156 6, 367.105 4, 265.071 7, 237.076 7, 223.061 0, 205.050 4, 190.026 5, 164.047 3, 149.023 8	糖酯类
10	16	$C_{67}H_{84}O_{38}$	tenuifoliose L	19.404	1 495.458 7	1 495.455 7	1 349.397 6, 1 203.372 4, 1 161.352 4, 1 039.314 2, 163.039 5, 145.028 9	糖酯类
11	18	$C_{62}H_{76}O_{35}$	tenuifoliose A	21.085	1 379.410 3	1 379.408 3	1 161.366 6, 1 069.324 0, 1 039.314 8, 731.224 3, 673.202 0, 337.093 4, 307.082 6, 175.039 6, 145.028 9	糖酯类
12	19	$C_{60}H_{74}O_{34}$	tenuifoliose B	21.445	1 337.399 9	1 337.397 8	1 161.353 3, 1 119.345 7, 1 077.319 7, 1 039.322 8, 997.304 3, 145.028 9	糖酯类
13	20	$C_{61}H_{74}O_{34}$	tenuifoliose H	22.236	1 349.400 5	1 349.397 8	1 203.361 7, 1 161.351 2, 1 143.333 4, 1 119.340 6, 1 039.314 9, 997.306 9, 163.039 5, 145.028 9	糖酯类
14	22	$C_{60}H_{74}O_{34}$	tenuifoliose D	22.954	1 337.400 2	1 337.397 8	1 161.347 7, 1 039.317 3, 731.225 3, 673.200, 307.082 6	糖酯类
15*	3	$C_{24}H_{26}O_{14}$	sibiricaxanthone B	7.697	537.125 5	537.123 9	387.072 7, 315.051 4, 285.040 7, 267.030 1, 257.045 3, 255.030 1	呋酮类
16*	5	$C_{25}H_{28}O_{15}$	polygalaxanthone III	9.000	567.136 2	567.134 4	345.061 7, 315.051 7, 297.040 6, 272.032 7, 258.016 9	呋酮类
17	6	$C_{25}H_{28}O_{15}$	polygalaxanthone VIII/XI	9.532	567.136 3	567.134 4	345.062 0, 315.051 5, 272.032 9, 259.024 5	呋酮类
18	21	$C_{64}H_{100}O_{32}$	onjisaponin TG	22.811	1 379.613 9	1 379.611 4	1 235.570 9, 455.317 1, 425.306 6	皂苷类
19	23	$C_{59}H_{94}O_{28}$	onjisaponin TF	23.060	1 249.586 8	1 249.584 8	1 025.535 9, 455.317 0, 425.306 5	皂苷类
20	34	$C_{71}H_{106}O_{33}$	onjisaponin E	33.161	1 485.656 3	1 485.653 3	455.317 3, 425.306 7, 237.076 8	皂苷类
21	35	$C_{70}H_{104}O_{32}$	onjisaponin G	33.809	1 455.645 5	1 455.642 7	455.317 2, 425.306 7, 237.076 8	皂苷类
22	37	$C_{65}H_{96}O_{28}$	onjisaponin TH	35.008	1 323.603 2	1 323.600 4	455.317 3, 425.306 6	皂苷类
23	/	$C_{65}H_{82}O_{37}$	tenuifoliose M	16.903	1 453.447 6	1 453.445 1	1 307.392 9, 1 161.352 3, 1 119.341 6, 1 077.336 3, 997.304 6, 145.028 9	糖酯类
24	/	$C_{55}H_{68}O_{31}$	tenuifoliose S	17.625	1 223.367 6	1 223.366 1	1 077.327 3, 955.292 3, 809.258 9, 631.188 9, 307.082 7, 145.028 9	糖酯类
25	/	$C_{56}H_{70}O_{32}$	tenuifoliose T	18.224	1 253.378 1	1 253.376 7	1 131.339 6, 985.312 0, 955.288 3, 929.260 4, 823.257 9, 661.198 7, 481.139 8, 319.082 8, 193.050 3, 145.028 9	糖酯类

续表 2

编号	峰号	分子式	化合物	t_R/min	$[M-H]^- (m/z)$		主要碎片离子 (m/z)	类型
					测量值	计算值		
26	/	$C_{58}H_{72}O_{33}$	tenuifoliose C	19.908	1 295.389 3	1 295.387 2	1 119.338 9, 997.305 5, 851.268 1, 145.028 9	糖酯类
27	/	$C_{63}H_{78}O_{36}$	tenuifoliose N	20.262	1 409.420 9	1 409.418 9	1 233.359 7, 1 191.365 1, 1 149.350 2, 1 069.324 0, 1 051.316 4, 703.208 6, 337.093 7, 193.050 3, 175.095 7	糖酯类
28	/	$C_{59}H_{72}O_{33}$	tenuifoliose I	20.764	1 307.389 8	1 307.387 2	1 265.371 0, 1 161.348 9, 1 119.340 5, 997.305 5, 163.039 5, 145.028 9	糖酯类
29	/	$C_{57}H_{70}O_{32}$	tenuifoliose K	20.834	1 265.378 2	1 265.376 7	1 119.342 5, 997.305 0, 163.039 5, 145.028 9	糖酯类
30	/	$C_{59}H_{72}O_{33}$	tenuifoliose J	20.941	1 307.389 7	1 307.387 2	1 119.338 9, 997.305 2, 689.215 5, 631.188 0, 307.082 4, 145.028 9	糖酯类
31	/	$C_{61}H_{76}O_{35}$	tenuifoliose O	21.984	1 367.409 9	1 367.408 3	1 191.367 1, 1 149.356 3, 1 107.347 1, 1 027.316 7, 193.050 4, 175.039 6	糖酯类
32	/	$C_{19}H_{18}O_{10}$	lancerin	6.483	405.083 1	405.081 6	315.051 6, 297.039 8, 285.040 8, 257.045 6, 243.030 3	呋酮类
33	/	$C_{24}H_{26}O_{14}$	sibiricaxanthone A	7.618	537.125 7	537.123 9	387.072 6, 327.051 5, 315.051 4, 285.040 8, 267.030 1, 257.045 3, 243.029 9	呋酮类
34	/	$C_{20}H_{20}O_{11}$	7- <i>O</i> -methyl mangiferin	8.722	435.093 5	435.092 2	345.061 7, 315.051 3, 287.020 0, 272.032 7, 259.024 4	呋酮类
35	/	$C_{15}H_{12}O_6$	1,6-dihydroxy-3,7-dimethoxyxanthone	24.136	287.055 3	287.055 0	272.032 9, 257.009 2, 229.014 2	呋酮类
36	/	$C_{13}H_8O_4$	1,7-dihydroxyxanthone	25.878	227.034 9	227.033 9	199.039 5, 183.044 9, 171.044 3, 158.978 0, 142.992 0, 130.982 9	呋酮类
37	/	$C_{16}H_{14}O_7$	6,8-dihydroxy-1,2,4-trimethoxyxanthone	28.066	317.067 0	317.065 6	302.043 6, 287.020 1, 259.024 8, 244.000 9	呋酮类
38	/	$C_{53}H_{84}O_{24}$	polygalasaponin XXVIII	18.051	1 103.528 4	1 103.526 9	455.317 0, 425.306 5	皂苷类

1~22 为指纹图谱中归属的共有峰, 其中右上角标有*的化合物为通过与对照品色谱保留行为对比及质谱裂解规律标定的化合物; 23~38 为指纹图谱中归属的非共有峰, 没有峰号

1—22 were the common peaks attributable to the fingerprint, and the compound labeled with * in the upper right were the compounds which labeled by the chromatographic retention behavior and the mass spectrometry cleavage law. 23—38 were the non-common peak attributable to the fingerprint, with no peaks

(化合物 1~14)、3 个呋酮类成分 (化合物 15~17) 以及 5 个皂苷类成分 (化合物 18~22)。通过与对照品色谱保留行为及质谱裂解规律比较, 化合物 32 和 34 分别鉴定为 lancerin 和 7-*O*-methyl mangiferin, 但由于两者含量较低, 在指纹图谱中没有这 2 个化合物的共有峰。其中, 运城闻喜县、运城夏县、忻州河曲县收集到的远志药材虽可检测到化合物 lancerin, 但含量较低, 其余 4 个产地收集到的远志药材在该检测条件下未检测到该化合物。另外, 参考文献中的质谱裂解规律^[11-15]对远志药材样品中其他 16 个非共有峰进行标定, 包括 9 个糖酯类成分 (化合物 23~31), 6 个呋酮类成分 (化合物 32~37) 以及 1 个皂苷类成分 (化合物 38)。

4 多指标性成分含量测定结果与分析

4.1 方法学考察

4.1.1 线性关系考察 精密吸取混合对照品适量, 用甲醇逐级稀释 1、2、4、8、16 和 32 倍, 摇匀。分别按“2.1”项下色谱条件进样分析, 进样量为 2

μL , 测定峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 绘制各标准曲线, 得到线性回归方程和线性范围, 结果见表 3, 10 种化合物在各浓度范围内的线性关系良好。

4.1.2 精密度试验 分别精密量取混合对照品溶液 2 μL , 按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 次, 计算 10 种化合物峰面积 RSD 值, 分别为 0.41%、0.59%、0.84%、0.61%、0.87%、0.80%、0.38%、0.70%、0.91%、0.55%, 表明仪器精密度良好。

4.1.3 稳定性试验 取同一批样品 (3 号), 按“2.4”项下方法平行制备 6 份, 室温下放置, 按“2.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、18、24 h 进样分析, 计算 10 种化合物峰面积 RSD 值, 分别为 0.86%、0.95%、1.63%、0.60%、1.50%、0.48%、0.48%、0.45%、0.84%、0.34%, 表明样品在 24 h 内稳定性良好。

4.1.4 重复性试验 取同一批样品 (3 号), 按“2.4”项下方法平行制备 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进

表 3 10 种指标性成分的标准曲线及线性范围

Table 3 Calibration curves and linear range for ten constituents

成分	线性回归方程	R^2	线性范围/(mg·L ⁻¹)
sibiricose A ₅	$Y=1.0 \times 10^7 X+54\ 664$	0.999 5	3.86~246.75
sibiricose A ₆	$Y=1.0 \times 10^7 X+22\ 829$	0.999 7	2.39~153.00
lancerin	$Y=7.0 \times 10^6 X+939.49$	0.999 6	0.16~10.03
sibiricoxanthone B	$Y=9.0 \times 10^6 X+12\ 345$	0.999 5	1.46~93.70
glomeratose A	$Y=1.0 \times 10^7 X+6\ 728.6$	0.999 7	0.77~49.46
7-O-methyl mangiferin	$Y=6.0 \times 10^6 X+795.14$	0.999 7	0.64~20.36
polygalaxanthone III	$Y=9.0 \times 10^6 X+12\ 180$	0.999 7	1.55~99.26
3,6'-disinapoyl sucrose	$Y=1.0 \times 10^7 X+9\ 1952$	0.999 6	7.04~450.73
tenuifolside A	$Y=9.0 \times 10^6 X+43\ 991$	0.999 7	4.78~306.00
tenuifolside C	$Y=2.0 \times 10^7 X+27\ 148$	0.999 5	1.64~105.10

样分析, 计算 10 种化合物质量分数的 RSD 值, 分别为 1.43%、1.22%、2.00%、0.70%、1.99%、1.67%、2.99%、1.08%、0.88%、1.22%, 表明重复性良好。

4.1.5 加样回收率试验 取已测定的 3 号样品 9 份, 每份为 0.1 g, 精密称定, 置于具塞锥形瓶中, 分别精密加入相当于样品成分量 50%、100%、150% 的各对照品溶液, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, “2.1”项下色谱条件进样分析, 计算 10 种成分的加样回收率, 平均回收率依次为 98.45%、99.17%、

95.76%、95.72%、95.44%、92.29%、91.85%、99.18%、96.11%、94.91%; RSD 分别为 0.96%、1.78%、1.68%、1.77%、1.72%、1.70%、0.82%、1.38%、1.16%、1.82%, 符合《中国药典》2015 年版中《药品质量标准分析方法验证指导原则》的要求。

4.2 样品测定

按“2.4”项下方法制备 7 批供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件分别测定 7 批远志药材样品的 10 种成分的量, 并计算每批样品 10 种成分的总量, 结果见表 4。

表 4 7 批远志药材中 10 种指标性成分的含量

Table 4 Contents of ten indicative compounds in *P. tenuifolia*

样品编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)					
	sibiricose A ₅	sibiricose A ₆	lancerin	sibiricoxanthone B	glomeratose A	7-O-methyl mangiferin
1	0.895 4*	1.155 6	/	0.666 0	0.564 4	0.081 1
2	3.227 6 [#]	1.924 5	/	1.078 8 [#]	0.713 6 [#]	0.084 0
3	1.069 7	0.644 2*	0.089 2 [#]	0.633 1	0.521 1	0.068 2
4	0.941 5	1.213 6	0.043 3	0.305 8*	0.294 8*	0.013 5*
5	1.629 9	1.355 1	/	0.526 7	0.402 9	0.098 2
6	1.432 9	0.963 9	0.033 5	0.714 4	0.481 8	0.062 8
7	1.957 2	2.057 8 [#]	/	0.726 2	0.582 1	0.159 5 [#]
RSD	0.475 4	0.351 6	1.335 1	0.325 1	0.244 5	0.500 5

样品编号	质量分数/(mg·g ⁻¹)				总质量分数/(mg·g ⁻¹)
	polygalaxanthone III	3,6'-disinapoyl sucrose	tenuifolside A	tenuifolside C	
1	0.530 0	5.036 3	1.798 1	1.076 2 [#]	11.803 1
2	0.875 5 [#]	7.160 4	3.149 1 [#]	0.662 5	18.876 0
3	0.388 0	4.037 1	1.195 4	1.005 4	9.651 4
4	0.320 9*	4.430 8	1.001 7	0.839 8	9.405 7
5	0.594 3	7.715 6	1.302 5	0.264 7	13.889 9
6	0.665 9	3.583 6*	1.910 2	0.313 1	10.162 1
7	0.811 3	9.418 8 [#]	0.437 7*	0.227 0*	16.377 6
RSD	0.317 7	0.344 3	0.518 4	0.532 9	

“/”在该测定条件下, 未检测到相应化合物的含量; “*”该化合物最低含量; “[#]”该化合物最高含量

“/”The content of the corresponding compound was not detected under the assay conditions; “*”the lowest content of the compound; “[#]”the highest content of the compound

7 批远志药材样品中 3,6'-disinapoyl sucrose 的含量最高,其质量分数变化范围为 3.583 6~9.418 8 mg/g,平均质量分数为 5.911 8 mg/g; lancerin 的含量最低,其质量分数变化范围为 0~0.089 2 mg/g,平均质量分数为 0.023 7 mg/g。polygalaxanthone III 与 3,6'-disinapoyl sucrose 是《中国药典》2015 年版中规定的远志药材质量评价的指标性成分,其中 3,6'-disinapoyl sucrose 是远志药材中含量最高的成分; polygalaxanthone III 最高质量分数为 0.875 5 mg/g,最低质量分数为 0.320 9 mg/g,平均质量分数为 0.598 0 mg/g。

由表 4 可知,同一成分在 7 批不同规格等级远志药材样品中的含量明显不同,且不同成分的变化或波动范围也明显不同,故用 RSD 值的大小来反映某一成分在不同样品中的质量分数变异范围^[16]。由 RSD 的数值可知,不同规格等级的远志药材样品中 10 种指标性成分含量均有不同程度的差异,其中以 lancerin、7-*O*-methyl mangiferin、tenuifolside A 与 tenuifolside C 的含量差异较明显。

4.3 不同规格、等级远志药材样品间的化合物含量差异分析

按照远志药材样品规格的不同,将 7 批远志药材样品分为栽培品和野生品 2 类(表 1),利用 GraphPad Prism 软件分别计算 10 种成分在野生品和栽培品之间的分布情况。结果如图 4 所示,化合物 sibiricoside A₅、sibiricoside A₆、polygalaxanthone III、3,6'-disinapoyl sucrose 4 种指标性成分在野生品中

的含量明显高于栽培品,而 tenuifolside C 在栽培品中的含量明显高于野生品。用 GraphPad Prism 分别对 10 种指标性成分的含量在栽培品和野生品间进行 *t* 检验,结果表明,化合物 sibiricoside A₅ 在野生品和栽培品间具有显著性差异 ($P<0.05$),化合物 polygalaxanthone III 及 tenuifolside C 具有极显著性差异 ($P<0.001$)。

按照远志药材样品等级的不同,将 7 批远志药材样品分为大筒和中筒 2 类,利用 GraphPad Prism 软件分别计算 10 种指标性成分在大筒和中筒之间的分布情况。结果如图 5 所示,化合物 sibiricoside A₆、glomeratose A、7-*O*-methyl mangiferin、polygalaxanthone III 和 3,6'-disinapoyl sucrose 5 种成分在大筒中的含量明显高于中筒,而 lancerin、tenuifolside C 在中筒中的含量明显高于大筒。用 GraphPad Prism 分别对 10 种指标性成分的含量在大筒和中筒间进行 *t* 检验,发现化合物 sibiricoside A₆、7-*O*-methyl mangiferin、3,6'-disinapoyl sucrose 在大筒和中筒间的含量具有显著性差异 ($P<0.05$),化合物 lancerin 具有极显著性差异 ($P<0.001$)。

4.4 不同规格等级远志药材样品的聚类分析

利用 SPSS 16.0 软件对 7 批不同规格等级远志药材样品的 10 种指标性成分的含量采用系统聚类法(HCA)进行聚类分析,结果如图 6 所示,横坐标为样品间的距离,纵坐标为远志药材样品编号(与表 1 相同)。由图 6 可知,远志样本明显分为 2 大类,其中 3、4、1、6 号聚为一类(I 组),5 号、

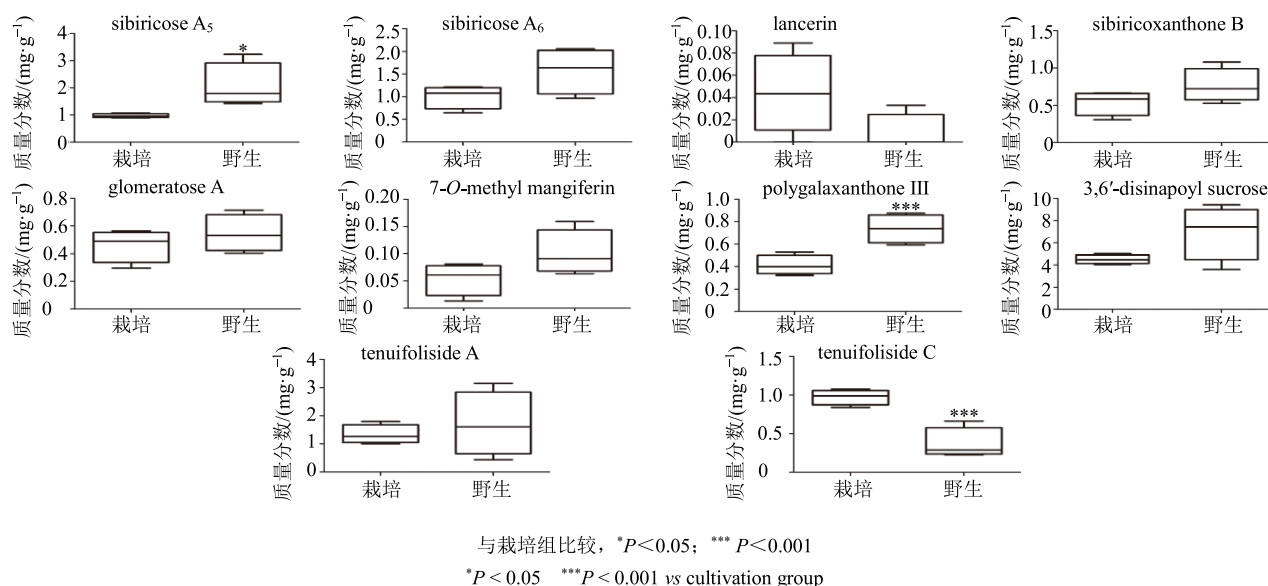


图 4 不同规格远志药材样品中 10 种指标性成分含量的量箱图

Fig. 4 Box plot contents of ten compounds in *P. tenuifolia* from different commodity specification

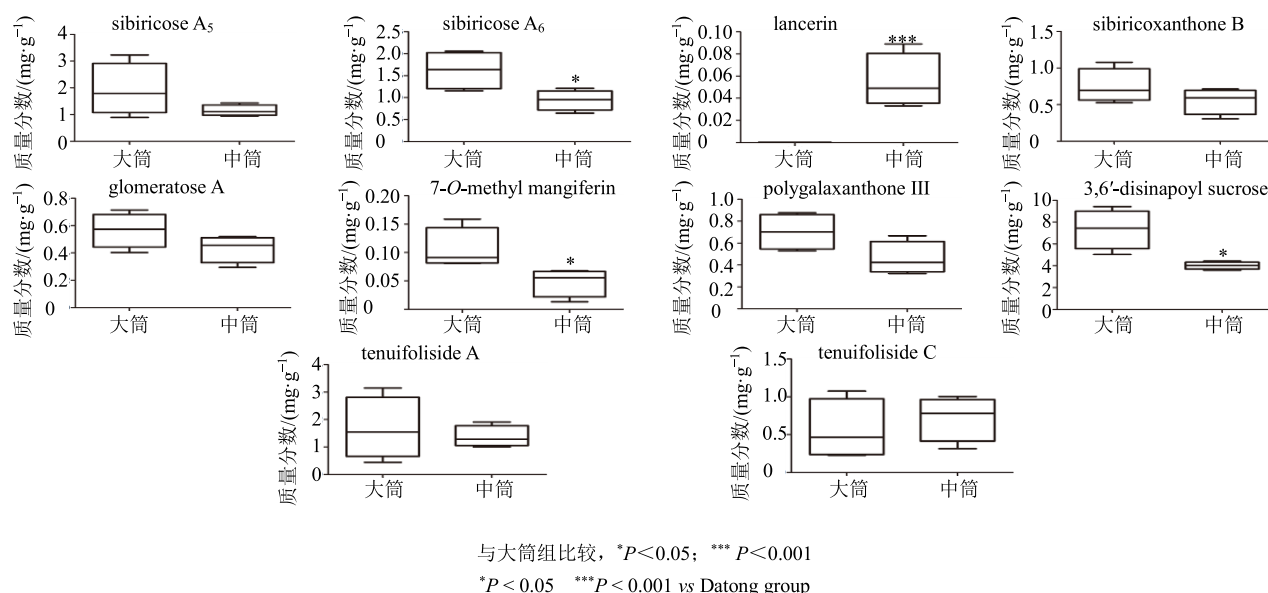


图 5 不同等级远志药材样品中 10 种指标性成分含量的量箱图

Fig. 5 Box plot contents of ten indicative compounds in *P. tenuifolia* from different grades

图 6 7 份远志药材样品 10 种指标性成分含量聚类分析

Fig. 6 Clustering plot of ten indicative compounds of seven batches of *P. tenuifolia*

7 号、2 号聚为一类 (II 组)。除 6 号样品 (野生品) 外, 所有栽培品 (3、4、1 号) 聚为一类, 所有野生品 (5、7、2 号) 聚为一类; 除 1 号样品 (大筒) 外, 所有中筒 (3、4、6 号) 聚为一类, 所有大筒 (5、7、2 号) 聚为一类。

4.5 远志药材样品的综合质量评价

采用 SPSS 16.0 软件对远志药材样品 10 种化合物的含量进行主成分分析^[17], 提取特征值 ≥ 1 的前两个主成分, 累积贡献率大, 基本能代表原始数据所反映的信息。根据特征向量, 得到 2 个主成分的线性组合表达式: $Z_1 = 0.875 X_1 + 0.862 X_2 - 0.731 X_3 + 0.796 X_4 + 0.756 X_5 + 0.747 X_6 + 0.971 X_7 + 0.788 X_8 + 0.371 X_9 - 0.526 X_{10}$; $Z_2 = 0.269 X_1 - 0.269 X_2 + 0.239 X_3 + 0.563 X_4 + 0.503 X_5 - 0.424 X_6 + 0.059 X_7 - 0.523 X_8 + 0.844 X_9 + 0.567 X_{10}$ 。其中 $X_1 \sim X_{10}$ 为远志药材样品中测得的 10 种化合物的含量, 再以每种主成分的贡献率作为权数, 构建综合评价函数: $f = 0.578 5 Z_1 + 0.226 3 Z_2$ 。

将每个样品的主成分得分代入综合评价函数, 计算 f 值, f 值越大, 说明样品的综合品质越高。7 批远志药材样品的综合质量排序为 2 号 > 7 号 > 5 号 > 1 号 > 6 号 > 3 号 > 4 号, 表明大筒远志药材样品的整体质量优于中筒远志药材样品; 野生远志的整体质量优于栽培品, 但 6 号远志药材样品是野生、中筒样品, 其质量不如 1 号栽培、大筒样品的质量, 推测可能因 6 号的生长年限相对较短, 次级代谢物积累不足所导致。

5 讨论

本研究选取不同规格等级的远志药材样品作为研究对象, 建立了 UPLC 指纹图谱及 10 种指标性成分含量测定的方法, 完成了在同一色谱条件下运用一张 UPLC 色谱图对远志药材样品进行定性及定量分析的双重目的, 同时又对前期修订的远志药材样品的商品规格等级标准进行了补充与说明。依据修订的标准对远志药材样品进行规格等级划分和定性及定量分析, 发现大筒远志药材样品的质量优于中筒, 该结果既符合远志药材质量优劣的传统评价经验, 同时也为本课题组前期修订的商品规格等级标准的完善奠定理论基础。通过本研究发现, 远志筒的直径越大, 化合物 sibiricose A₆、7-O-methyl mangiferin、3,6'-disinapoyl sucrose 的含量越高, 这也为远志药材的临床精准用药提供科学依据。

本研究在既有文献研究^[11]的基础上新增加了 2

个吡啶类化合物(lancerin 与 7-O-methyl mangiferin)和 2 个具有镇静安神作用的糖酯类化合物(tenuifoliside A 与 tenuifoliside C)的含量测定。除 7 号远志药材样品(阳泉市盂县)外,与刘筱筱等^[11]所测定的 6 个活性成分的峰面积百分比相比,本研究测定的 10 种指标性成分的峰面积百分比增加了 3.77%~6.77%(表 1),且所测定的 10 种指标性成分的峰面积百分比最高可达 33.99%。本研究所建方法测定的化合物的种类及总含量百分比比较既有文献研究^[11]结果而言,均有明显增多。

本实验通过 10 种指标性成分的含量测定,并结合多种分析方法进行数据处理,同时引入综合质量评价函数,并对每一种指标性成分设置权重系数,避免了主观因素造成的误差,同时避免了仅利用单一指标性成分或几种指标性成分简单的加和而对中药质量进行评价所造成的误差,可直观、客观地判断中药材的整体质量^[18-19]。远志药材中的化学成分比较复杂及对照品缺乏等因素的限制,本研究只对 6 个糖酯类成分和 4 个吡啶类成分进行含量测定。由于皂苷类成分大多数在紫外区无吸收或只有弱的末端吸收,且梯度洗脱条件下,容易出现基线漂移现象,在此条件下未对皂苷类成分进行定量分析。针对皂苷类成分的特点,后期可以采用总皂苷对照提取物法进行定量分析或建立 HPLC-ELSD 方法测定皂苷类化合物的含量。同时由于本研究选取的远志药材,未包含远志药材的所有规格等级,因此本实验的研究结果是否具有更广泛的代表性,还有待于后续进一步系统、深入的研究。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 蒲雅洁,王丹丹,张福生,等. 远志的本草考证 [J]. 中草药, 2017, 48(1): 211-218.
- [3] 张福生,陈彤焱,王丹丹,等. 远志药材商品规格等级与品质的关联性研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2538-2547.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 1964.
- [5] 许晓双,张艳花,王丹丹,等. 基于 UPLC/Q-TOF MS 代谢组学技术分析影响远志商品药材质量的关键因素 [J]. 山西医科大学学报, 2016, 47(3): 255-263.
- [6] 赵云生,刘秀,毛福英,等. 基于 HPLC-DAD 指纹图谱的远志质量评价研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(20): 3991-4000.
- [7] 刘艳芳,彭东艳,杨晓娟,等. 去心与不去心远志药材的化学成分和药效学比较研究 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(24): 1975-1979.
- [8] 张艳花,白璐,李震宇,等. 远志筒与根的 HPLC 指纹图谱及化学差异性分析 [J]. 中药材, 2015, 38(7): 1408-1412.
- [9] 房敏峰,付志玲,滕红梅,等. HPLC 评价远志种质资源及炮制品的质量 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(1): 50-53.
- [10] 七十六种药材商品规格标准 [S]. 1984.
- [11] 刘筱筱,夏忠庭,何毅,等. 远志 UPLC 多指标成分的测定及指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2167-2174.
- [12] Ling Y, Li Z, Chen M, et al. Analysis and detection of the chemical constituents of *Radix Polygalae* and their metabolites in rats after oral administration by ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectr [J]. *J Pharm Biomed*, 2013, 85(11): 1-13.
- [13] Zhang F S, Li X W, Li Z Y, et al. UPLC/Q-TOF MS-based metabolomics and qRT-PCR in enzyme gene screening with key role in triterpenoid saponin biosynthesis of *Polygala tenuifolia* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105765.
- [14] Liu J Y, Yang X D, He J M, et al. Structure analysis of triterpene saponins in *Polygala tenuifolia* by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry [J]. *J. Mass Spectrom*, 2007, 42: 861-873.
- [15] 薛英,李晓伟,李震宇,等. 采用 UPLC/Q-TOFMS 与 NMR 代谢组学技术研究生长年限对远志药材质量的影响 [J]. 药学报, 2015, 50(3): 340-347.
- [16] 王丹丹,白璐,许晓双,等. 从农艺性状及化学成分测定分析远志药材商品规格和良种选育的合理性 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3733-3740.
- [17] 万燕晴,李震宇,李科,等. 蒙古黄芪药材多指标综合评价研究 [J]. 山西医科大学学报, 2015, (3): 234-239.
- [18] 吴大章,卫莹芳,马鹏,等. 川党参药材质量化学成分多指标综合评价研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2009, 11(2): 274-277.
- [19] 潘雯婷,张丽艳,李燕,等. 主成分分析法对贵州石吊兰药材的综合评价研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(20): 78-80.