

基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 评价不同干燥方式对粗茎秦艽中环烯醚萜类及黄酮类成分的影响

徐 燕, 李爱暖, 王 玥, 李燕芳, 曾 锐*

西南民族大学药学院, 四川 成都 610041

摘要: 目的 通过化学成分测定, 评价远红外干燥、真空干燥、冷冻干燥、阴干、烘干、“发汗”干燥对粗茎秦艽品质的影响。方法 采用 UPLC-ESI-HRMSⁿ 测定秦艽中 4 个环烯醚萜类成分(獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苷)和 4 个黄酮类成分(木犀草素、异牡荆素、芹菜素、山柰酚)质量分数。并结合单因素方差分析、聚类分析、逼近理想值排序法(TOPSIS)分析综合评价不同干燥方式所得样品的品质, 确定最佳干燥方式。结果 不同干燥方法样品的獐牙菜苦苷差异不显著, 龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苷、木犀草素、异牡荆素、芹菜素和山柰酚差异明显。其中, 4 个环烯醚萜类成分在冷冻干燥中保留最佳; 4 个黄酮类成分在“发汗”干燥中保留最佳。各成分在阴干样品中质量分数最低。聚类分析及 TOPSIS 分析表明“发汗”干燥具有与冷冻干燥相似的品质, 且品质最好, 其次是烘干干燥和远红外干燥, 阴干干燥的样品品质最差。结论 不同干燥方式对秦艽药材品质的影响值得关注。研究表明《中国药典》2015 年版收载秦艽“发汗”的干燥方法具有科学性。但传统“发汗”过程时间较长, 为了提高干燥效率, 进一步研究方向应关注“发汗”干燥结合现代干燥技术如热风干燥、冷冻干燥、真空干燥以保证秦艽药材稳定品质的基础上缩短干燥时间。

关键词: 粗茎秦艽; UPLC-ESI-HRMSⁿ; 干燥; 环烯醚萜类; 黄酮类; TOPSIS; 獐牙菜苦苷; 龙胆苦苷; 马钱苷酸; 獐牙菜苷; 木犀草素; 异牡荆素; 芹菜素; 山柰酚

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2018)04-0819-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.04.011

Effects of different drying methods on iridoids and flavonoids in *Gentiana crassicaulis* based on UPLC-ESI-HRMSⁿ

XU Yan, LI Ai-nuan, WANG Yue, LI Yan-fang, ZENG Rui

School of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Objective The effects of far infrared, vacuum, freezing, hot air, dry in the shade and “sweating” drying methods on the quality of *Gentiana crassicaulis* were evaluated through chemical component content determination. **Methods** A UPLC-ESI-HRMSⁿ method was used to determine quality score of four iridoids (swertiamarin, gentiopicroside, loganic acid, and sweroside) and four flavonoids (luteolin, isovitexin, apigenin, and kaempferol) of *G. crassicaulis*. In order to determine the best drying method, the results were combined with analysis of variance, cluster analysis and TOPSIS analysis, which could comprehensively evaluate the *G. crassicaulis* obtained with different drying methods. **Results** The contents of swertiamarin in samples dried in different methods were similar. The contents of gentiopicroside, loganic acid, sweroside, luteolin, isovitexin, apigenin, and kaempferol in samples dried in different methods were obviously different. Among them, the four iridoids were best preserved in the freezing drying samples, and the four flavonoids were best preserved in the “sweating” drying samples. All compounds significantly degraded in the sample dried in the shade. Cluster analysis and TOPSIS analysis showed that the samples of “sweating” and freezing drying methods had a similar and high quality, follow by the samples of hot air and far infrared ray. The samples dried in the shade had the worst quality. **Conclusion** It was noteworthy that the effects of different drying methods on the quality of *G. crassicaulis*. This study showed that the “sweating” drying method as official method listed in Chinese Pharmacopoeia was verified to be scientific. However, the traditional “sweating” method

收稿日期: 2017-10-10

基金项目: 科技部中医药现代化研究重点专项(2017YFC1700700); 国家留学基金资助项目(CSC201500850007); 四川省科技厅科技支撑计划(2014SZ0131); 四川省基础研究项目(2015JY0009); 中央高校重点基金项目(2018NZD18)

作者简介: 徐 燕(1994—), 硕士研究生。Tel: 13398184832 E-mail: Yanxu940504@163.com

*通信作者 曾 锐, 副教授, 主要从事药物制剂及民族药研究。Tel: (028)85522099 E-mail: rzeng@swun.edu.cn

needed a long time for drying. In order to enhance the drying efficiency, further research should focus on the combination of “sweating” method and modern drying techniques, such as hot air, freeze, vacuum drying methods, which could shorten the drying time on the basis of the stable quality of *G. crassicaulis* herbs.

Key words: *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk.; UPLC-ESI-HRMSⁿ; drying; iridoids; flavonoids; TOPSIS; swertiamarin; gentiopicroside; loganic acid; sweroside; luteolin; isovitexin; apigenin; kaempferol

秦艽原植物来自龙胆科龙胆属 *Gentiana* (Tourn.) L. 秦艽组 Sect. *Cruciata* Gaudin, 始载于《神农本草经》^[1], 《中国药典》2015 年版收载的秦艽为龙胆科植物秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall、麻花秦艽 *G. straminea* Maxim.、粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 或达乌里秦艽(小秦艽) *G. dahurica* Fisch. 的干燥根^[2]。秦艽是我国传统中药, 临床常用于治疗黄疸、肝炎、类风湿性关节炎等多种疾病^[3-4]。此外, 在《彝族毕摩经典译注》第 93 卷^[5]、《彝族医药》^[6]中描述秦艽用于治疗胀气、疼痛、断骨和痛风。现代药理研究表明, 秦艽具有抗炎镇痛、抑菌、抗氧化、保肝、调节免疫、抗肿瘤等作用, 主要含有环烯醚萜类、黄酮类、三萜类等为其药理及功效的物质基础^[7]。

秦艽为多年生草本植物, 生长于高海拔地区, 喜潮湿和冷凉气候, 耐寒, 其道地产区为甘肃、陕西、山西、四川等省区^[8]。一般在春季 3~4 月, 或幼芽萌动时, 或秋季 9~10 月叶片枯萎时进行采收, 晒至于全干入药^[9]。秦艽的产地初加工常为阴干、晒干或“发汗”。其中干燥方法按《中国药典》2015 年版规定为秦艽和麻花秦艽晒软, 堆置“发汗”至表面呈红黄色或灰黄色时, 摊开晒干, 或不经“发汗”直接晒干; 小秦艽趁鲜时搓去黑皮, 晒干。目前对秦艽的产地初加工研究较少, 仅有王秀芬等^[10]对阴干、自然晒干、发汗干燥、鼓风干燥的秦艽样品进行 5 个环烯醚萜类成分的比较, 并研究了“发汗”与样品色度的联系。产地初加工是影响药材品质的关键环节^[11]。新型干燥技术的出现也提供了除传统干燥外更多有效的选择, 如热风干燥、真空干燥、冷冻干燥等^[12]。所以对秦艽产地初加工研究很有必要。本研究以市场上产量较大的云南粗茎秦艽新鲜根为研究对象, 采用真空干燥、远红外干燥、冷冻干燥、热风干燥对比传统的阴干、“发汗”干燥。通过对有效活性成分的分析, 为秦艽干燥工艺提供理论基础, 为保证秦艽药材质量与临床疗效提供理论依据。

1 仪器与材料

UPLC-Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨

质谱, 美国赛默飞世尔科技公司; Ultimate 3000 超高效液相色谱系统, 美国戴安公司; ESJ200-4 万分之一电子天平, 沈阳龙腾电子有限公司; BT25S 十万分之一电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; KQ5200E 型超声波清洗器, 昆山超声仪器有限公司; 真空干燥箱、DHG-9240A 鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; LGJ-12N 冷冻干燥器机, 北京亚星仪科科技发展有限公司。

对照品木犀草素(批号 111520-201605)购自中国食品药品检定研究院; 对照品芹菜素(批号 MUST-14050505)购自成都曼思特生物科技有限公司; 对照品异牡荆素(批号 Y-116-160818)购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 对照品龙胆苦苷(批号 110902)、马钱苷酸(批号 121220)、獐牙菜苷(批号 130401)、獐牙菜苦苷(批号 130402)、山柰酚(批号 1509929)均购自成都普菲德生物技术有限公司; 各对照品质量分数均≥98%。甲醇为色谱纯, 美国默克公司; 色谱纯甲酸, 美国西格玛奥德里奇公司; 均为 LC-MS 级。水为纯净水, 美国 Milli-Q SP Regent Water system 制备; 甲醇为分析纯, 质量分数≥99.5%, 成都市科隆化学品有限公司。粗茎秦艽新鲜根于 2016 年 11 月 11 号采自云南省鲁甸, 经中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所黄林芳教授鉴定为粗茎秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 的根。采收后清水净制除去根部表面泥沙及表面黑皮, 得到干净新鲜根, 切制, 得到秦艽厚片。-6℃冰箱保鲜使用。

2 方法与结果

2.1 秦艽加工

取鲜秦艽片各 800 g, 平行干燥 3 份, 设置 6 种不同干燥方法。其中, “发汗”干燥因使用秦艽厚片有霉变现象, 考虑到传统“发汗”是整株堆叠, 故在这里使用新鲜秦艽根。每种干燥方法干燥至恒定质量并且轻折即断为干燥终点。干燥方法包括远红外干燥、真空干燥、冷冻干燥、阴干、烘干、“发汗”干燥。干燥方法及条件见表 1。

2.2 色谱和质谱条件

2.2.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈

表 1 不同干燥方法及条件
Table 1 Conditions of different drying methods

干燥方法	干燥条件	干燥总时间
远红外干燥	远红外灯照射下干燥, 照射 1 h 后关闭, 30 min 后再开启, 反复照射, 直到干燥, 干燥期间人工不定期翻动药材; 保持平均温度 29~30 °C	5 h
真空干燥	真空干燥箱干燥。设置真空度为-0.9 MPa, 温度 60 °C	3 d
冷冻干燥	-80 °C 冰箱预冷冻 2 h 后, 冷冻干燥器干燥	2 d
阴干干燥	在阴凉干燥通风处放置干燥	5 d
烘干干燥	60 °C 鼓风干燥箱干燥	10 h
“发汗”干燥	将 30 株鲜秦艽根先在室内晾干至 4~5 成干, 根部没有明显水分且柔软时, 理顺根条用纱布包裹, 模拟“发汗”过程, 25 °C 室内干燥 3 d 后, 取出, 解开纱布, 摊平, 继续干燥 3 d ^[13-14]	6 d

(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱程序为 0 min, 5%甲醇; 0~2 min, 5%~12%甲醇; 2~7 min, 12%~40%甲醇; 7~9 min, 40%~80%甲醇; 9~11 min, 80%甲醇; 11~12 min, 80%~5%甲醇; 12~15 min, 5%甲醇; 体积流量为 0.3 mL/min; 进样量 0.1 μL; 进样室温度 10 °C; 柱温 35 °C。

2.2.2 质谱条件 离子源为 HESI 源 (heated ESI), 辅助气体流量: 10 mL/min; 辅助气温度 350 °C; 离子传输管温度 320 °C; 正负离子检测模式: 鞘气压力 206.84 kPa; 喷雾电压 2.00 kV; 扫描模式: Full MS/dd-MS², Full MS 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500, 扫描范围 m/z 80~1 200。

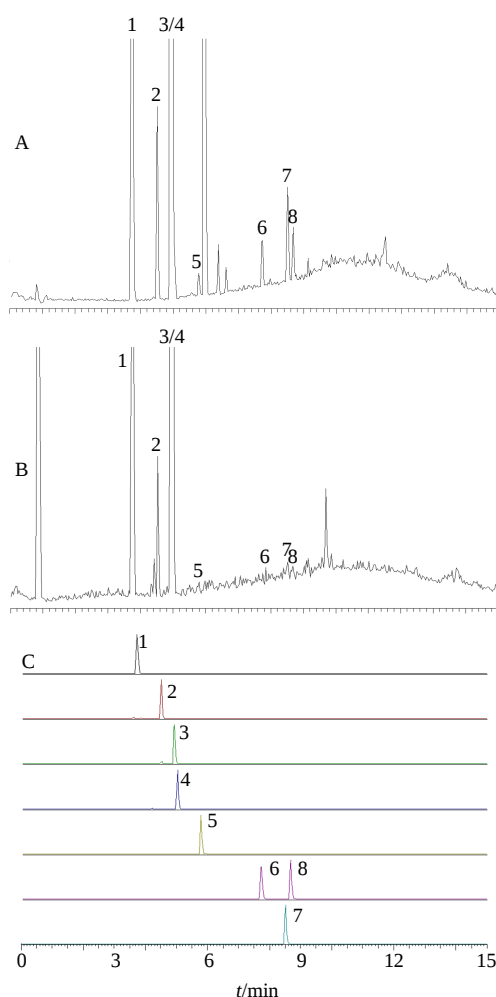
MS/MS 模式时, 所用碰撞能为阶梯能量: 30、40 eV。设定分析物的理论质量数范围的质量数窗口为 m/z 5, 混合对照品和样品的总离子色谱图 (TIC) 及 8 种待测成分提取离子色谱见图 1。

2.3 定性定量分析

使用 Xcalibur 3.0 软件(美国赛默飞科技有限公司)进行质谱数据处理, 通过高分辨率质谱信息及对照品比对进行分析和鉴别。8 种成分在负离子模式下比正离子模式下灵敏度高, 具有较高的丰度, 质谱偏差范围 $\delta \leq 5$ 。定量离子选取离子强度最高的准分子离子, 其中獐牙菜苦苷定量准分子离子 m/z 419.119 60, 龙胆苦苷定量准分子离子 m/z 401.108 89, 獐牙菜苷定量准分子离子 m/z 403.124 73 均为 $[M+HCOO]^-$ 离子, 其他成分选择 $[M-H]^-$ 离子。8 种待测成分的保留时间及质谱参数见表 2。

2.4 溶液制备

2.4.1 混合对照品溶液的制备 分别称取龙胆苦苷、马钱苷酸和獐牙菜苦苷对照品约 18.80、8.02、1.56 mg, 精密称定, 至 10 mL 量瓶中; 獐牙菜苷、



1-马钱苷酸 2-獐牙菜苦苷 3-龙胆苦苷 4-獐牙菜苷 5-异牡荊素 6-木犀草素 7-芹菜素 8-山柰酚
1-loganic acid 2-swertiamarin 3-gentiopicroside 4-sweroside
5-isovitexin 6-luteolin 7-apigenin 8-kaempferol

图 1 负离子模式下混合对照品 (A) 和样品 (B) 的总离子流图及 8 种待测成分的提取离子色谱图 (C)

Fig. 1 TIC of mixed standard solution (A), samples (B), and extracted ion chromatograms of mixed standards of eight bioactive compounds (C) at negative ion mode

表 2 8 成分保留时间及质谱参数

Table 2 Retention times and mass parameters of eight compounds

成分	分子式	t_R/min	相对分子质量 $[M-H]^-$		偏差/ ($\times 10^{-6}$)	二级质谱 (m/z)
			理论值	实测值		
马钱苷酸	$C_{16}H_{24}O_{10}$	3.73	375.128 573 3	375.129 79	1.217	375.130 04, 213.076 35, 169.086 07, 113.023 15, 89.023 05, 69.033 20, 59.012 50
獐牙菜苦苷	$C_{16}H_{22}O_{10}$	4.51	373.112 923 2	373.114 29	1.367	362.357 85, 179.055 02, 141.018 05, 119.033 61, 101.022 99, 89.022 96, 71.012 40, 59.012 44
龙胆苦苷	$C_{16}H_{20}O_9$	4.94	355.102 358 6	355.103 64	1.281	179.055 15, 149.059 57, 119.033 67, 89.023 00, 71.012 44, 59.012 48
獐牙菜苷	$C_{16}H_{22}O_9$	5.04	357.118 008 6	357.119 35	1.341	283.478 55, 262.143 22, 195.067 09, 151.074 80, 125.023 16, 119.033 89, 89.023 01, 71.012 56, 59.012 51
异牡荆素	$C_{21}H_{20}O_{10}$	5.80	431.097 273 2	431.098 54	1.207	413.086 88, 383.077 18, 341.066 71, 323.056 12, 311.056 37, 283.061 07, 231.130 77, 161.022 90, 101.022 79, 65.569 60
木犀草素	$C_{15}H_{10}O_6$	7.75	285.039 364 5	285.040 68	1.346	285.040 56, 284.033 26, 267.030 27, 257.045 29, 241.050 74, 151.002 50, 83.012 31, 65.001 86
芹菜素	$C_{15}H_{10}O_5$	8.52	269.044 449 9	269.045 87	1.270	269.045 62, 225.055 42, 201.054 73, 159.044 45, 151.002 55, 149.023 28, 117.032 82, 83.012 41, 65.001 38
山柰酚	$C_{15}H_{10}O_6$	8.68	285.039 364 5	285.040 62	1.256	285.040 56, 279.195 01, 268.038 79, 257.045 29, 241.050 29, 151.002 62, 93.033 23, 83.012 37, 65.001 73

木犀草素、异牡荆素、芹菜素、山柰酚对照品 2.78、1.69、1.68、1.77、19.40 mg 到 100 mL 量瓶中。加甲醇溶解成含龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、木犀草素、异牡荆素、芹菜素、山柰酚质量浓度分别为 1 880.0、802.0、156.0、27.8、16.9、16.8、17.7、19.4 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

再分别依次量取 8 种对照储备液各 1 mL 置于同一 10 mL 量瓶中，加甲醇溶液稀释至刻度，摇匀，即得含龙胆苦苷、马钱苷酸、獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、木犀草素、异牡荆素、芹菜素、山柰酚分别为 188、80.2、15.6、2.78、1.69、1.68、1.77、1.94 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。对照品储备液及混合对照品溶液均在 -4°C 条件下储存备用。

2.4.2 供试品溶液的制备 取样品粉末（打粉，过三号筛）0.3 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 20 mL，称定质量，超声处理（功率 500 W，频率 40 kHz）30 min，放冷，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，进样前用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，即得。

2.5 线性关系考察

精密量取“2.4.1”项下的 8 种成分混合对照品溶液，纯甲醇连续稀释 2、4、8、16、32、64、128、256、512、1024、2 048 倍，配制成不同质量浓度梯

度的混合对照品溶液。不同成分选取 5 个合适的质量浓度绘制标准曲线。其中马钱苷酸 40.100、20.050、10.025、5.012、2.506 $\mu\text{g/mL}$ ；獐牙菜苦苷 15.600、7.800、3.900、1.950、0.980 $\mu\text{g/mL}$ ；龙胆苦苷 188.000、94.000、47.000、23.500、11.750 $\mu\text{g/mL}$ ；獐牙菜苷 1.390、0.695、0.348、0.174、0.087 $\mu\text{g/mL}$ ；异牡荆素 15.16、7.58、3.79、1.90、0.95 ng/mL ；木犀草素 13.20、6.60、3.30、1.65、0.83 ng/mL ；芹菜素 13.83、6.91、3.46、1.73、0.86 ng/mL ；山柰酚 13.13、6.56、3.28、1.64、0.82 ng/mL 。在“2.2”项色谱和质谱条件下进样分析，分析得到的数据使用 Xcalibur 3.0 软件定量浏览器功能处理，得到以待测物质量浓度为横坐标（Y），峰面积为纵坐标（X）的标准曲线，得到回归方程及相关系数（ r ）。以稀释后待测物响应的信噪比（ S/N ）大于 3 的计算方法测定检测限（LOD）， S/N 大于 10 的计算方法测定定量限（LOQ），结果见表 3。结果表明，8 种待测成分在质量浓度范围内线性关系良好， $r \geq 0.999 1$ 。

2.6 精密度试验

取“2.4.1”项下的稀释 2 倍的混合对照品溶液，按“2.2”项下色谱和质谱条件连续进样 6 针。结果显示，马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异牡荆素、木犀草素、芹菜素、山柰酚峰面积

表 3 8 种成分的回归方程、相关系数、线性范围、检测限、定量限

Table 3 Liner regressions, correlation coefficients, liner ranges, LODs, and LOQs of eight compounds

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
马钱苷酸	$Y=54\,918\,300+19\,093\,800\,X$	0.999 1	2 506~40 100	0.055	0.183
獐牙菜苦苷	$Y=1\,446\,720+29\,541\,300\,X$	0.999 7	975~15 600	0.131	0.437
龙胆苦苷	$Y=356\,856\,000+20\,763\,700\,X$	0.999 1	11 750~188 000	0.093	0.311
獐牙菜苷	$Y=247\,730+49\,665\,700\,X$	0.999 2	87~1 390	0.086	0.297
异牡荆素	$Y=-13\,206.3+49\,598.6\,X$	0.999 4	0.95~15.16	0.192	0.641
木犀草素	$Y=-58\,324.2+98\,490.5\,X$	0.999 5	0.83~13.20	0.064	0.213
芹菜素	$Y=-36\,405.3+175\,939\,X$	0.999 7	0.86~13.83	0.024	0.080
山柰酚	$Y=-58\,618.3+133\,359\,X$	0.999 7	0.82~13.13	0.060	0.201

的 RSD 分别为 1.80%、2.96%、1.93%、2.30%、2.47%、2.43%、3.62%、2.07%。结果表明方法精密度良好。

2.7 重复性试验

取 6 份烘干条件下供试品溶液，分别进样测定并计算质量分数，测得马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异牡荆素、木犀草素、芹菜素、山柰酚的平均质量分数分别为 20 503.18、3 682.33、67 894.32、292.44、2.16、0.40、0.72、10.72 μg/g。RSD 分别为 1.97%、1.46%、1.63%、3.21%、3.69%、2.73%、2.57%、3.40%，表明该方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

取烘干条件下供试品溶液，分别于 0、2、6、10、12、24 h 进样分析，测得马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异牡荆素、木犀草素、芹菜素、山柰酚峰面积的 RSD 分别为 2.02%、1.33%、1.56%、3.95%、3.78%、2.54%、3.56%、2.79%，结果表明，供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验

称取烘干条件下已测得的样品粉末约 0.15 g，

共 6 份，精密称定，分别加入马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异牡荆素、木犀草素、芹菜素、山柰酚对照品适量，使加入后的各成分含量分别为样品中相应成分的 100%，按照“2.4.2”项下方法平行制备供试品溶液，滤过后进样分析。分别计算各成分的加样回收率以及 RSD 值。结果显示马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异牡荆素、木犀草素、芹菜素、山柰酚的平均回收率分别为 102.67%、101.86%、100.533%、99.34%、98.52%、98.24%、100.34%、99.60%，RSD 分别为 2.02%、2.96%、1.80%、3.59%、3.89%、3.20%、3.47%、3.51%。表明方法准确度良好，适合 8 种成分定量测定。

2.10 样品定量测定

取不同干燥条件下的粗茎秦艽粉末，按照“2.4.2”项下方法制备供试品溶液，分别在“2.2”项下色谱、质谱条件进样分析。数据使用 Xcalibur 3.0 软件定量浏览器功能处理，计算 8 种待测成分的质量分数，结果见表 4。

表 4 8 种待测成分的测定结果及方差分析 (*n* = 3)

Table 4 Determination of eight components (*n* = 3)

干燥方法	质量分数/(μg·g ⁻¹)							
	马钱苷酸	獐牙菜苦苷	龙胆苦苷	獐牙菜苷	异牡荆素	木犀草素	芹菜素	山柰酚
远红外干燥	16 883.608 ^{ab}	3 531.619 ^a	82 229.372 ^a	286.135 ^b	1.884 ^c	0.186 ^c	0.793 ^b	11.593 ^c
真空干燥	14 395.385 ^b	3 192.563 ^a	74 977.092 ^{ab}	290.572 ^b	5.653 ^a	0.197 ^c	0.925 ^b	10.747 ^c
冷冻干燥	21 188.205 ^a	3 740.106 ^a	84 651.237 ^a	334.543 ^{ab}	4.382 ^b	0.261 ^b	0.976 ^b	15.315 ^b
阴干干燥	17 944.286 ^{ab}	2 779.999 ^b	60 892.181 ^b	357.473 ^{ab}	1.029 ^d	0.155 ^c	0.521 ^c	7.864 ^d
烘干干燥	20 003.158 ^a	3 794.505 ^a	68 528.716 ^b	257.687 ^b	2.603 ^c	0.192 ^c	0.846 ^b	12.096 ^c
“发汗”干燥	12 136.824 ^b	4 160.723 ^a	78 591.956 ^{ab}	396.317 ^a	3.965 ^d	0.498 ^a	2.993 ^a	61.679 ^a
<i>P</i>	0.030	0.215	0.020	0.035	0.000	0.000	0.000	0.038

同列不同字母表示处理间差异显著 (*P* < 0.05)，同列 *P* 值表示群组之间差异

Values in the same column followed by different letters show significant different at *P* < 0.05, *P* values in the same column show the inter-group differences

结果显示 8 种成分中,不同干燥方法对马钱苷酸、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷、异牡荆素、木犀草素、芹菜素、山柰酚均有不同程度的影响。其中,以山柰酚、芹菜素、异牡荆素的含量变化最为显著,最高与最低分别相差约 8、6、6 倍。总的来说,不同干燥方法对环烯醚萜类成分的影响小于对黄酮类成分的影响。

2.11 样品方差分析

为了更科学地说明不同干燥方法对各成分的影响,采用 SPSS 22.0.0.0 统计软件,以不同干燥方法为变量,对应的各成分质量分数为因变量进行单因素方差分析,结果见表 4。根据单因素方差分析结果显示不同干燥方法对除獐牙菜苦苷的其他化学成分具有显著差异。其中阴干干燥下,除马钱苷酸和獐牙菜苷外,其他 6 种指标成分质量分数最低,具有显著差异 ($P < 0.05$);“发汗”干燥下,除龙胆苦苷、马钱苷酸、木犀草素外,其他 5 种指标成分质量分数最高,具有显著差异 ($P < 0.05$);獐牙菜苦苷在所有干燥方法下差异不显著 ($P > 0.05$),说明干燥方法对其影响不大。

2.12 样品聚类分析

采用 SPSS 22.0.0.0 统计软件对 8 种指标成分进行聚类分析。聚类分析采用组间连接法及欧式平方距离。结果见图 2。由图 2 可知,当临界值在 5~6 的时候,被分为 3 类;其中, A 类:真空干燥和“发汗”干燥被聚为一类; B 类:远红外干燥和冷冻干燥被聚为一类; C 类:阴干干燥和烘干干燥被聚为一类。当临界值大于 10, A 类和 B 类被聚到一起。真空干燥与“发汗”干燥以及远红外干燥和冷冻干

燥得到的样品在聚类分析中距离相同,说明具有类似的品质;阴干干燥和烘干干燥样品距离较远,质量分数较低,说明品质较差。

2.13 样品逼近理想值排序法 (TOPSIS) 分析

TOPSIS 是一种综合的排序统计分析。它通过将原始数据标准化计算各项指标的正理想解 (A^+) 和负理想解 (A^-),然后计算各个方案到理想解之间的加权欧式距离 (D^+ 和 D^-),从而计算各个方案到理想方案的接近程度 (f),根据 f 值进行排序而评价优劣^[15-16]。使用 Excel 进行原始数据转化,计算正负理想解,求得 f 值。结果见表 5。结果显示,传统“发汗”干燥具有最高的接近程度,排序第 1,明显优于其他干燥方法。其次是冷冻干燥及真空干燥。阴干干燥具有最低的接近度,排序最后。其结果与聚类分析类似。均可说明“发汗”干燥、真空干燥、冷冻干燥优于烘干干燥和阴干干燥。

表 5 TOPSIS 综合评价结果

Table 5 Results of TOPSIS evaluation

干燥方法	D^+	D^-	f	排序结果
远红外干燥	1.175	0.218	0.156	5.000
真空干燥	1.087	0.552	0.337	3.000
冷冻干燥	0.980	0.530	0.351	2.000
阴干干燥	1.247	0.172	0.121	6.000
烘干干燥	1.133	0.311	0.215	4.000
“发汗”干燥	0.286	1.254	0.814	1.000

3 讨论

中药材产地加工是药材在市面流通过程中保证质量的重要初始条件。传统产地干燥方法是中药材质量控制的重要环节。本实验旨在进行传统与现代干燥技术对比下,初步筛选出更加优势的加工方法。考虑到中药有效组分的复杂性,其发挥临床作用通常不是一个成分或少数成分起作用,单一指标或少量指标无法全面评价药材品质。本研究在已有的研究基础上^[17],采用 UHPLC-ESI-HRMSⁿ,在全扫描模式下对多成分进行定性和定量同时测定。其具有提取离子流模式能显著消除基质干扰,线性范围更宽(4 个数量级以上的动态范围),检测限度更低(ng 级别的检测限度)^[18]。本实验建立了一种基于高分辨质谱的快速、准确、稳定的秦艽多成分定性定量方法。

定性分析过程,正离子模式下存在龙胆苦苷特征离子碎片: $[M - \text{Glu} + 2H]^+$ 195.065 06,对阿魏酸 $[M + H]^+$ 195.065 18 定性判断容易产生影

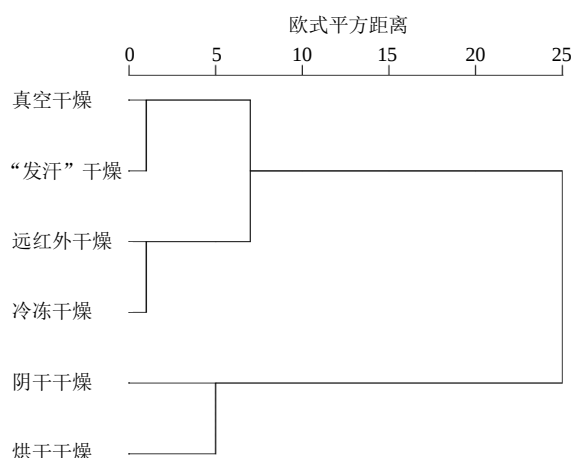


图 2 不同干燥方法的样品聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of *G. crassicaulis* by different drying methods

用高分辨质谱对成分的精准定性应该是在正负离子模式下同时进行分析。

从统计分析结果来看,不同干燥方法对粗茎秦艽化学成分影响显著。环烯醚萜类成分以“发汗”干燥、冷冻干燥样品中质量分数最高。其中,相比较而言,龙胆苦苷、马钱苷酸在“发汗”样品中质量分数低于冷冻干燥;獐牙菜苷、獐牙菜苦苷在冷冻干燥样品中低于“发汗”干燥样品。总的来说,环烯醚萜类成分在冷冻干燥样品中保留比较好。根据4种黄酮类成分含量测定结果显示,其在秦艽根含量极少,质量分数在0.16~61.68 $\mu\text{g/g}$,变化范围较宽,干燥方法对黄酮类成分的保留影响较大。在“发汗”干燥样品中具有较高的质量分数,其次是冷冻干燥。可以说明,“发汗”干燥能达到与冷冻干燥相似的药材品质。聚类分析也表现出“发汗”干燥样品和冷冻干燥样品具有类似的药材质量。TOPSIS分析表明,“发汗”干燥和冷冻干燥排序最优。有可能是干燥过程中较低的温度及湿度能较好地保存活性成分,避免成分的热分解。同时,“发汗”过程中,可能是相关酶激活,造成药材中獐牙菜苦苷、獐牙菜苷、木犀草素、芹菜素、山柰酚成分质量分数相比于其他干燥方法都高。TOPSIS分析表明,阴干干燥样品中大多数成分保留最差,其次是远红外干燥、烘干干燥,有可能是长时间和较高温度的干燥过程造成成分的损失。与聚类分析稍有差异的是,阴干干燥与烘干干燥样品被聚为一类,药材质量最差。但最终所有统计分析说明,“发汗”干燥和冷冻干燥相比于其他干燥方法具有明显优势,阴干干燥的样品品质最差。真空干燥样品品质居中,各成分质量分数均有降低。传统“发汗”干燥是中药及民族药的特色产地加工方法,《中国药典》中收载秦艽“发汗”产地加工方法^[19],本研究结果说明其具有科学性。但“发汗”时间过长,如何通过传统“发汗”结合现代干燥技术如热风干燥、真空干燥、冷冻干燥,来缩短干燥时间,提高干燥效率,得到质优稳定的药材,值得进一步研究。考虑到本研究只是从化学成分来说明不同干燥方法对秦艽内在质量造成的差异,这种差异对秦艽药效、活性方面的影响也需要进一步研究。

参考文献

[1] 杨燕梅, 马晓辉, 卢有媛, 等. UPLC法测定7种秦艽中7种指标成分的量 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1968-1973.

- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [3] 张红梅, 梁茂新, 范颖, 等. 秦艽潜在功用的考察与分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2015, 17(5): 1031-1035.
- [4] Yu F, Yu F, Li R, et al. Inhibitory effects of the *Gentiana macrophylla* (Gentianaceae) extract on rheumatoid arthritis of rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 95(1): 77-81.
- [5] 楚雄彝族自治州人民政府. 彝族毕摩经典译注 (第93卷) [M]. 昆明: 云南民族出版社, 2012.
- [6] 关祥祖. 彝族医药学 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 1993.
- [7] 聂安政, 林志健, 王雨, 等. 秦艽化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 597-608.
- [8] 郭伟娜, 魏朔南. 秦艽的生物学研究 [J]. 中国野生植物资源, 2008, 27(4): 4-8.
- [9] 于红玲. 秦艽栽培技术 [J]. 农业科技与信息, 2014, 23(8): 23.
- [10] 王秀芬, 冷晓红, 李静, 等. 秦艽不同加工品中有效成分含量与色度的相关性 [J]. 浙江农业科学, 2017, 58(6): 976-980.
- [11] 杨俊杰, 李林, 季德, 等. 中药材产地加工与炮制一体化的历史沿革与现代研究探讨 [J]. 中草药, 2016, 47(15): 2751-2757.
- [12] 吴发明, 殷莉丽, 蔡晓洋, 等. 基于化学组分特征评价不同干燥方法对麦冬品质的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(20): 3702-3706.
- [13] 赵志刚, 鄧舒蕊, 侯俊玲, 等. 不同产地加工方法对山东丹参药材质量的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1396-1400.
- [14] 何文娟. 甘南高寒冷凉区秦艽规范化栽培技术规程 [J]. 农民致富之友, 2016, 23(24): 155.
- [15] 周苏娟, 麦小梅, 赵斌, 等. TOPSIS与灰色关联分析在不同产地炒茺蔚子质量评价中的应用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(15): 40-43.
- [16] 朱邵晴, 朱振华, 郭盛, 等. 不同干燥方法对薄荷药材中多元功效成分的影响与评价 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(24): 4860-4867.
- [17] 王长生, 董红娇, 包雅婷, 等. UPLC-Q-Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析粗茎秦艽化学成分 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3175-3180.
- [18] Zhang N R, Yu S, Tiller P, et al. Quantitation of small molecules using high-resolution accurate mass spectrometers - a different approach for analysis of biological samples [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2009, 23(7): 1085-1094.
- [19] 段金彪, 宿树兰, 严辉, 等. 药材初加工“发汗”过程及其酶促反应与化学转化机制探讨 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1219-1225.