

西藏木瓜 HPLC 指纹图谱研究及多成分测定

赵志国¹, 井 凤¹, 张敏敏¹, 刘 伟¹, 李圣波², 耿岩玲¹, 王 晓¹, 赵恒强^{1*}

1. 齐鲁工业大学 (山东省科学院), 山东省分析测试中心, 山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东 济南 250014

2. 山东亚特生态技术股份有限公司, 山东 临沂 266071

摘 要: 目的 建立西藏木瓜的 HPLC 多指标定量指纹图谱, 为西藏木瓜的质量控制和真伪鉴别提供方法和技术支持。方法 采用高剪切分散乳化 (HSDE) 法提取木瓜鲜样, 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱, 乙腈-0.5%冰乙酸+10 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相, 进行梯度洗脱, 体积流量为 0.8 mL/min, 柱温为 25 °C, 检测波长为 280 nm。利用 ESI-TOF/MS 法对西藏木瓜提取物中多种化合物进行鉴别, 在对多指标活性成分进行定量测定的基础上, 建立西藏木瓜的 HPLC 指纹图谱。结果 西藏木瓜 HPLC 指纹图谱共有 30 个共有峰, 指认了其中 9 个峰, 分别为绿原酸、香草酸、咖啡酸、藜芦酸、芸香苷、槲皮苷、金丝桃苷、齐墩果酸和熊果酸, 并对其进行了定量测定。指纹图谱中相似度分析表明, 10 批西藏木瓜的相似度较为接近, 而西藏木瓜与其他品种木瓜的相似度差别较大。结论 HSDE-HPLC-DAD-ESI-TOF/MS 法可以用于木瓜鲜样的快速提取和分析, 在此基础上建立的指纹图谱结合相似度分析可用于其质量评价, 为提高西藏木瓜的质量控制水平提供了方法和技术支持。

关键词: 西藏木瓜; 高剪切分散乳化技术; 高效液相色谱; 电喷雾飞行时间质谱; 多指标定量指纹图谱

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)10-2454-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.10.030

Multi-components determination and fingerprints analysis by HPLC in *Chaenomeles thibetica*

ZHAO Zhi-guo¹, JING Feng¹, ZHANG Min-min¹, LIU Wei¹, LI Sheng-bo², GENG Yan-ling¹, WANG Xiao¹, ZHAO Heng-qiang¹

1. Shandong Key Laboratory of TCM Quality Control Technology, Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China

2. Shandong Yate Ecological Technology Co., Ltd., Linyi 266071, China

Abstract: Objective To establish a HSDE-HPLC-DAD-ESI-TOF/MS method for the rapid identification of chemical ingredients for *Chaenomeles thibetica*, and establish the multi-component quantitative fingerprint to evaluate its quality. **Methods** The separation was developed via an Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) with a gradient elution at a temperature of 25 °C, the acetonitrile was used as the mobile phase A and 0.5% glacial acetic acid and 10 mM ammonium acetate solution was used as the mobile phase B with a flow rate of 0.8 mL/min, and the detection wavelength was 280 nm. ESI-TOF/MS was used for the identification of chemical ingredients in *C. thibetica*. The fingerprint of *C. thibetica* was established based on the quantitative detection of multi-components. **Results** The HPLC fingerprint of *C. thibetica* has 30 common peaks, nine ingredients (chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, veratric acid, rutin, quercitrin, hyperin, oleanolic acid, and uosolic acid) of *C. thibetica* were identified, and the contents of them were determined. Similarity analysis shows that the similarity of 10 batches of *C. thibetica* is relatively close, while the similarity between *C. thibetica* and other varieties' is quite different. **Conclusion** HSDE-HPLC-DAD-ESI-TOF/MS method can be used for the rapid extraction and analysis of *C. thibetica* fresh samples. On this basis, the fingerprint analysis combined with similarity analysis can be used for quality evaluation of *C. thibetica*.

Key words: *Chaenomeles thibetica* Yu; HSDE; HPLC; ESI-TOF/MS; multi-index quantitative fingerprint

收稿日期: 2017-11-04

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2013HL029, ZR2017LH071); 山东省科技发展计划 (2016GSF202014); 山东省泰山学者岗位资助项目; 山东省科学院先导专项

作者简介: 赵志国, 助理工程师, 主要从事中药质量控制研究。

*通信作者 赵恒强, 博士, 副研究员, 主要从事中药分析与质量控制研究。Tel: (0531)82605319 E-mail: hqzhao2007@163.com

西藏木瓜 *Chaenomeles thibetica* Yu 为蔷薇科木瓜属植物, 主要分布在西藏、四川等省区, 具有舒经活络、和胃化湿、健胃之功效, 用于治疗腰腿酸软、麻木、吐泻腹痛、腓肠肌痉挛、四肢抽搐等, 藏医将其果实用做木瓜(藏药名赛亚)入药^[1-4]。《中国藏药》第一卷收录西藏木瓜, 但有关其质量标准仅有性状、显微和理化等鉴别方法^[5]。《中国药典》2015 年版中仅采用皱皮木瓜 *C. speciosa* (Sweet) Nakai 作为木瓜药材的主要来源, 木瓜的质量控制也仅对其中齐墩果酸和熊果酸进行了含量测定^[6-9], 有关西藏木瓜的药用情况没有表述。而近年来的研究表明, 木瓜果实中含有多种化学成分, 包括黄酮、有机酸、糖类、三萜类、皂苷类等, 具有抗肿瘤、保肝、抗炎、镇痛、祛风湿以及抗菌、抗氧化、调血脂等多种活性^[10-11]。故采用单一的指标成分难以反映中药多成分、多靶点的特点。有关西藏木瓜活性成分的分析测定和质量控制对于安全合理利用西藏木瓜资源具有重要意义。然而至今为止, 西藏木瓜的质量控制仍然停留在性状鉴别和少数主要活性成分含量测定, 缺乏系统的研究报道。

多指标定量指纹图谱技术指纹图谱技术与药效活性成分多指标定量相结合, 可以更加全面地控制中药的质量^[12-13]。近年来, 多指标定量指纹图谱技术在中药质量控制研究中发挥了重要作用, 并且越来越多地被用于中药材及中成药的质量控制研究中^[14-16]。为了提高西藏木瓜的质量控制和真伪鉴别水平, 以便于更好地开发利用西藏木瓜资源, 本研究采用高效液相色谱-二极管阵列检测器-电喷雾飞行时间质谱(HPLC-DAD-ESI-TOF/MS)联用技术对木瓜中多种化学成分进行快速分析鉴别, 在对已知多指标成分进行含量测定的基础上, 建立了其多指标定量指纹图谱, 以期为提高西藏木瓜质量控制水平提供方法和技术支持。

1 仪器与材料

安捷伦 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); G6520 型四级杆串联飞行时间质谱仪, 配有电喷雾离子源(美国 Agilent 公司); 万分之一电子分析天平(Sartorius, BSA 公司); SB-5200D 型高功率数控超声波仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); THZ-8 恒温水浴锅(浙江嘉兴电热仪器厂)。色谱柱: XSELECT™ HSS T3 (150 mm×3.0 mm, 3.5 μm), 美国 Agilent Kromasil 100-5 C₁₈ E103491 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 美国 Agilent Zorbax

SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)。

对照品绿原酸(批号 327-97-9)、香草酸(批号 121-34-6)、咖啡酸(批号 331-39-5)、藜芦酸(批号 93-07-2)、芸香苷(批号 153-18-4)、槲皮苷(批号 522-12-3)、金丝桃苷(批号 482-36-0)、齐墩果酸(批号 508-02-1)、熊果酸(批号 77-52-1), 质量分数≥98%, 均购于上海源叶生物科技有限公司。乙腈(色谱纯, 美国 Fisher Scientific); 甲醇(色谱纯, 山东禹王实业有限公司化工分公司); 冰乙酸(色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 无水乙醇(分析纯, 天津市广成化学试剂有限公司); 实验用水为娃哈哈纯净水。样品经山东省分析测试中心王晓研究员鉴定为西藏木瓜 *C. thibetica* Yu、毛叶木瓜 *C. cathayensis* Schneid、皱皮木瓜 *C. speciosa* (Sweet) Nakai、光皮木瓜 *C. sinensis* (Thouin) Koehne, 来源见表 1。

表 1 样品来源

Table 1 Source of samples

序号	样品名称	样品来源	时间
S1	西藏木瓜	西藏拉萨东久西沟 01	2015-11-09
S2	西藏木瓜	西藏拉萨东久西沟 02	2015-11-09
S3	西藏木瓜	西藏拉萨东久西沟 03	2015-11-09
S4	西藏木瓜	西藏拉萨东久西沟 04	2015-11-09
S5	西藏木瓜	西藏拉萨拉月村 01	2015-11-09
S6	西藏木瓜	西藏拉萨拉月村 02	2015-11-09
S7	西藏木瓜	西藏拉萨拉月村 03	2015-11-09
S8	西藏木瓜	西藏拉萨拉月村 04	2015-11-09
S9	西藏木瓜	西藏拉萨拉月村 05	2015-11-09
S10	西藏木瓜	西藏拉萨拉月村 06	2015-11-09
S11	皱皮木瓜	山东临沂	2015-11-12
S12	毛叶木瓜	山东临沂	2015-11-12
S13	光皮木瓜	山东临沂	2015-11-12

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

分别精密称取 1.0 mg 的绿原酸、香草酸、咖啡酸、藜芦酸、芸香苷、槲皮苷、金丝桃苷、齐墩果酸、熊果酸对照品, 各置于 1 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配成各化合物质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取木瓜鲜药材 5.0 g, 切碎后置于 50 mL EP 管中, 加入 10 mL 甲醇, 于 60 ℃水浴锅中水浴 10 min (灭酶活性), 再加入 5 mL 水, 利用高剪切分

散乳化技术 (13 000 r/min, 1 min) 提取, 滤液过 0.22 μm 微孔滤膜后作为供试品溶液。

2.3 色谱分离条件

Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0 μm), 流动相为乙腈 (A) -0.5%冰乙酸+10 mmol/L 乙酸铵水溶液 (B); 梯度洗脱 (0~20 min, 7%~8% A; 20~30 min, 8%~10% A; 30~50 min, 10%~

11% A; 50~65 min, 11%~13% A; 65~90 min, 13%~15% A; 90~110 min, 15%~20% A; 110~115 min, 20% A; 115~140 min, 20%~45% A; 140~150 min, 45% A; 151~156 min, 90%~100% A; 156~165 min, 100% A); 体积流量为 0.8 mL/min; 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 280 nm; 进样量为 10 μL 。样品色谱图见图 1。

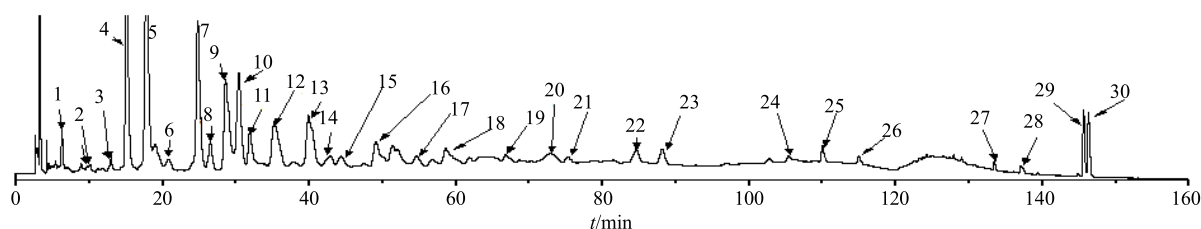


图 1 西藏木瓜样品的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC chromatogram of *C. tibetica* sample

2.4 质谱检测条件

电喷雾正、负离子全扫描检测; 全扫描范围 m/z 100~1 000; 锥孔电压 60 V; 毛细管电压 5.0 kV; 裂解电压 100 V; 喷雾气压 310 kPa; 干燥气体积流量 11.0 L/min; 干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.5 ESI-TOF/MS 鉴别

在优化的色谱条件下, 采用电喷雾飞行时间质谱技术, 对色谱图中的主要组分进行高分辨质谱鉴别, 根据获得的化合物的精确相对分子质量信息, DAD 检测器获得的紫外吸收信息, 并参考相关文献及中国科学院上海有机化学研究所化学专业数据库, 对各化合物进行鉴别, 结果见表 2。

2.6 方法学考察

2.6.1 线性关系的考察 配制不同质量浓度的混合对照品溶液, 按“2.3”项下的色谱条件进样分析,

测定各化合物的峰面积, 以各化合物质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 并求得回归方程。将对照品溶液稀释至低质量浓度进样, 以 3 倍信噪比计算各成分的检测限, 以 10 倍信噪比计算定量限, 结果见表 3。

2.6.2 精密度试验 精密称取 S1 号木瓜样品, 按“2.2”项下方法制成供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件连续进样 6 次, 分别测得其中绿原酸、香草酸、咖啡酸、藜芦酸、芸香苷、槲皮苷、金丝桃苷、齐墩果酸、熊果酸的保留时间和峰面积, 分别计算其 RSD 值, 其保留时间 RSD 依次是 0.31%、0.24%、0.25%、0.17%、0.12%、0.15%、0.22%、0.27%、0.24%, 均小于 1%, 峰面积 RSD 依次是 0.80%、0.20%、1.35%、3.45%、1.98%、3.38%、1.09%、1.23%、1.14%, 均小于 5%, 说明所使用的仪器性能良好, 随机误

表 2 9 个化合物的 HPLC-ESI-TOF/MS 精确相对分子质量测量结果

Table 2 HPLC-ESI-TOF/MS accurate molecular weight measurements of nine compounds

峰号	保留时间/min	化合物	分子式	$[\text{M}+\text{H}]^+$	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	$[\text{M}-\text{H}]^-$
4	17.95	绿原酸	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$		353.061 4	353.061 4
7	27.28	香草酸	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$	169.052 3		167.034 9
9	31.32	咖啡酸	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$			179.034 9
18	63.04	藜芦酸	$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$			181.051 8
22	88.79	芸香苷	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	539.249 9		
25	107.24	槲皮苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$			447.095 6
26	112.59	金丝桃苷	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	465.103 2	487.084 3	
29	145.62	齐墩果酸	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$			455.353 0
30	146.29	熊果酸	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$			455.353 0

表 3 9 个化合物的回归方程、线性范围及检出限、定量限

Table 3 Regressive equations, linear ranges, LOD, and LOQ of nine compounds

化合物	回归方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	r^2	检出限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
绿原酸	$Y=23.701 X+40.579$	2.50~150.00	0.999 8	0.084	0.281
香草酸	$Y=24.867 X-14.176$	2.50~150.00	0.999 2	0.068	0.227
咖啡酸	$Y=43.141 X-31.010$	1.25~50.00	0.999 6	0.044	0.147
藜芦酸	$Y=20.019 X+3.028$	2.50~50.00	0.999 8	0.125	0.417
芸香苷	$Y=11.280 X+0.453$	2.50~50.00	0.999 9	0.208	0.694
槲皮苷	$Y=0.255 X+1.937$	25.00~400.00	0.999 5	0.776	2.586
金丝桃苷	$Y=32.739 X-2.240$	1.25~25.00	0.999 9	0.047	0.156
齐墩果酸	$Y=20.701 X+3.520$	1.25~25.00	0.999 2	0.053	0.177
熊果酸	$Y=42.512 X-18.341$	1.25~25.00	0.999 1	0.060	0.200

差小, 所采用的色谱分析方法适宜。

2.6.3 重复性试验 准确称取 S1 号木瓜样品 6 份, 按“2.2”项下处理方法制成供试品溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样分析, 测得 9 个化合物的保留时间和峰面积, 并计算其 RSD。结果绿原酸、香草酸、咖啡酸、藜芦酸、芸香苷、槲皮苷、金丝桃苷、齐墩果酸、熊果酸的保留时间 RSD 依次是 0.48%、0.43%、0.40%、0.26%、0.54%、0.65%、0.34%、0.51%、0.48%, 均小于 1%, 质量分数 RSD 依次是 1.63%、3.04%、1.93%、3.64%、2.86%、3.60%、3.34%、1.78%、2.01%, 均小于 5%, 结果表明方法重复性良好。

2.6.4 稳定性试验 取 S1 号木瓜供试品溶液, 按照“2.3”项下色谱条件, 分别在 0、3、6、12、18、24 h 进样分析, 记录色谱图。结果绿原酸、香草酸、咖啡酸、藜芦酸、芸香苷、槲皮苷、金丝桃苷、齐墩果酸、熊果酸的保留时间 RSD 依次是 0.35%、0.45%、0.44%、0.33%、0.18%、0.29%、0.34%、0.32%、0.29%, 均小于 1%, 峰面积 RSD 依次是 2.87%、3.36%、1.35%、3.45%、2.33%、3.58%、1.08%、2.45%、2.51%, 均小于 5%, 表明样品在 24 h 内化学性质稳定。

2.6.5 加标回收率试验 精密称取已知各目标化合物含量的木瓜样品 2.50 g, 分别准确加入绿原酸、香草酸、咖啡酸、藜芦酸、芸香苷、槲皮苷、金丝桃苷、齐墩果酸、熊果酸对照品适量, 按照供试品溶液制备方法处理 6 份, 按“2.3”项色谱条件进样分析, 测定各目标化合物峰面积, 计算平均加样回收率分别为 96.87%、98.80%、99.57%、97.74%、97.94%、96.94%、99.04%、97.70%、98.40%, RSD 分别为 3.28%、2.32%、2.15%、3.35%、1.45%、2.25%、

1.19%、2.30%、3.27%。从实验结果可知, 本方法的回收率良好。

2.7 样品测定

按“2.2”项下的供试品溶液制备方法制备 10 批样品溶液, 采用“2.3”项下色谱条件分别进样分析, 得到 10 批西藏木瓜和 3 批不同品种木瓜样品中 9 个化合物的色谱峰面积, 将测得结果带入表 3 线性回归方程中, 得出木瓜样品中 9 个化合物的含量。从表 4 可以看出, 西藏木瓜 9 个活性成分中槲皮苷的平均含量相对最高, 其平均值为 556.14 $\mu\text{g/g}$; 金丝桃苷的含量相对最低, 其平均值为 9.87 $\mu\text{g/g}$; 9 个活性成分的加和平均值为 1 250.15 $\mu\text{g/g}$ 。相比之下, 皱皮木瓜、毛叶木瓜和光皮木瓜中 9 个活性成分的加和平均值相对较低, 分别为 1 016.14、573.44、732.36 $\mu\text{g/g}$ 。

2.8 指纹图谱的建立

将这 10 批不同批次的西藏木瓜样品, 按“2.2”项下的处理方法将其制备成供试品溶液, 各取 10 μL 分别进样, 按“2.3”项下的色谱条件进样分析, 建立西藏木瓜的 HPLC 特征指纹图谱, 见图 2。在本研究所建立的分析系统下, 特征性明显的主要有 30 个色谱峰, 这 30 个色谱峰即构成西藏木瓜 HPLC 指纹图谱的特征峰。结果表明, 各色谱峰相对保留时间的 RSD% 均在 1% 以内, 而相对峰面积的 RSD% 均在 5% 以内。

采用本实验建立的方法对西藏木瓜、皱皮木瓜、毛叶木瓜和光皮木瓜进行 HPLC 分析, 所得色谱图如图 3 所示。从图 3 可以看出, 西藏木瓜与其他 3 种不同类型木瓜 HPLC 图存在明显不同, 说明本研究建立的西藏木瓜 HPLC 指纹图谱可以反映西藏木瓜的特有属性。

表 4 样品中 9 个化合物的测定结果

Table 4 Contents of nine compounds in samples

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)									总和
	绿原酸	香草酸	咖啡酸	藜芦酸	芸香苷	槲皮苷	金丝桃苷	齐墩果酸	熊果酸	
S1	215.73	129.16	38.49	23.65	20.44	557.60	9.67	142.75	120.56	1 258.05
S2	211.62	120.22	37.03	23.90	19.58	595.70	9.32	144.84	115.52	1 277.73
S3	220.54	126.30	38.35	24.37	19.58	543.16	9.89	139.45	121.41	1 243.05
S4	210.38	130.55	39.28	25.58	20.79	539.65	10.29	150.56	125.50	1 252.58
S5	214.82	126.46	38.76	25.87	19.69	576.43	9.97	141.45	114.51	1 267.96
S6	213.61	122.69	37.83	25.17	20.72	563.89	9.90	150.43	121.31	1 265.55
S7	204.79	129.80	38.71	25.06	19.22	522.96	10.13	148.84	118.61	1 218.12
S8	206.87	121.32	35.66	23.65	21.07	565.59	9.97	139.90	114.32	1 238.35
S9	217.48	123.17	38.52	23.93	21.33	543.96	9.54	135.90	112.40	1 226.23
S10	214.84	138.09	37.05	25.02	19.64	552.50	10.01	145.29	111.41	1 253.85
S11	121.33	41.15	12.24	1.61	17.20	814.06	5.97	0.52	2.06	1 016.14
S12	87.92	26.28	15.55	2.19	7.93	420.48	7.19	2.79	3.11	573.44
S13	35.30	32.91	15.37	2.18	26.13	602.00	7.54	5.56	5.37	732.36

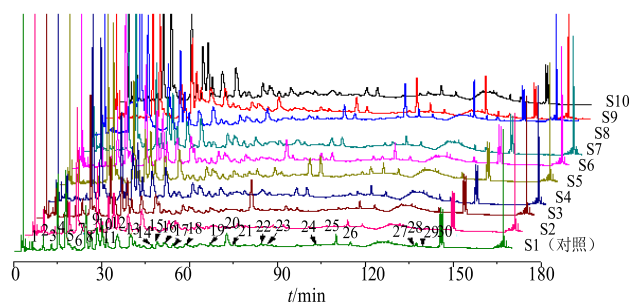


图 2 西藏木瓜的 HPLC 特征指纹图谱

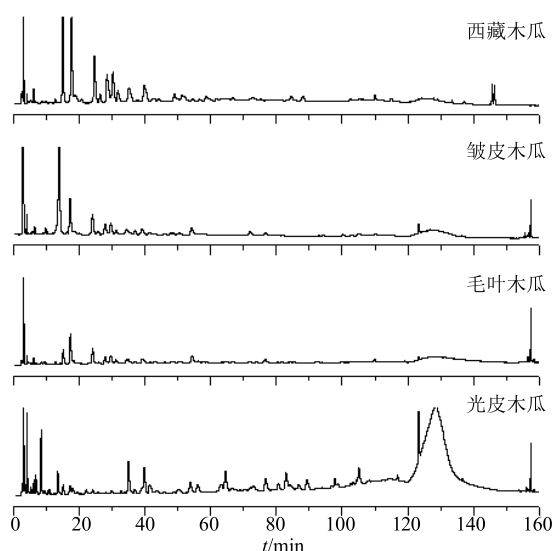
Fig. 2 HPLC fingerprints of *C. thibetica*

图 3 特征图谱对比

Fig. 3 Comparison of specific chromatograms

2.9 相似度评价

通过“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(《国家药典委员会》2004 A 版)对 10 批西藏木瓜样品的指纹图谱进行相似度分析。将色谱工作站数据导入中药指纹图谱相似度计算软件,选定上述 30 个共有峰进行谱峰匹配,以 S1 号样品所标注的图谱作为对照指纹图谱,用于 10 批西藏木瓜和 3 批其他品种木瓜样品的相似度评价,采用夹角余弦法用于其相似度计算,结果见表 5。从表 5 可以看出,不同批次西藏木瓜的相似度较为接近,说明其质量差别不大,而西藏木瓜与其他品种木瓜的相似度差别较大,所得结果与多指标含量测定结果一致。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法优化

高剪切分散乳化技术(HSDE)是指将适当溶媒加入到新鲜的生物组织中,在匀浆搅拌刀的强力作用下,细胞液中的活性成分迅速溶出到溶媒中的过程。其具有操作简单、提取率高、能耗低、温度低、

表 5 相似度评价结果

Table 5 Similarity evaluation

样品	相似度	样品	相似度
S1	1.000 0	S8	0.999 8
S2	0.999 7	S9	0.999 8
S3	0.999 9	S10	0.999 6
S4	0.999 9	S11	0.407 5
S5	0.999 9	S12	0.331 1
S6	0.999 4	S13	0.236 7
S7	0.999 5		

速度快等优点,物料破碎和有效成分的提取同步进行,是一种对植物有效成分提取速度快、强度高的方法^[17-20]。实验采用 HSDE 法用于木瓜样品的提取,考察不同提取溶剂(水、50%、70%、100%甲醇)、不同转速(11 000、12 000、13 000、14 000 r/min)、不同提取时间(0.5、1、2、3 min)时的提取效果,所得提取液按照“2.2”项下的色谱条件进行分析,结果表明,当采用 70%甲醇水、13 000 r/min、1 min 作为提取条件时,色谱峰较多,峰强度较好。

3.2 色谱条件优化

选择了 3 根不同的反相色谱柱 XSELECTTM HSS T3 (150 mm×3.0 mm, 3.5 μm)、Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)、Agilent Kromasil 100-5C₁₈ E103491 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm),按上述色谱条件进样分析,结果表明,当采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱时木瓜提取物中各化合物分离效果较好。木瓜果实中含有多种有机酸、黄酮、三萜等化学成分,采用等度洗脱难以实现其分离,因此采用梯度洗脱用于其分离研究。考察了甲醇-水和乙腈-水作为洗脱溶剂时的效果,结果表明,采用乙腈-水作为流动相时各峰分离度较好、分布均匀,因此选择乙腈-水用于木瓜提取物的分离研究。由于木瓜提取物中含有大量有机酸和黄酮成分,易与色谱柱填料残留羟基发生作用,造成谱峰拖尾现象,故进一步考察了流动相中加入不同比例弱酸(0.3%冰乙酸、0.5%冰乙酸、0.7%冰乙酸)及缓冲盐对色谱分离的影响,结果表明,水相中加入 0.5%冰乙酸+10 mmol/L 乙酸铵时各色谱峰对称性较好、峰形尖锐。为选取最佳的检测波长作为西藏木瓜指纹图谱的特征波长,经二极管阵列检测器考察木瓜在不同波长(190~400 nm)下的色谱图,结果表明,当检测波长为 280 nm 时西藏木瓜样品 HPLC 色谱峰较多、峰面积大、峰形对称性较好且基线较平,因此,选择 280 nm 作为西藏木瓜样品指纹图谱的检测波长。

4 结论

本研究采用 HSDE 法对木瓜鲜样进行直接提取,建立了 HPLC-ESI-TOF/MS 分析测定西藏木瓜中活性成分的方法,在对多批次样品分析基础上,建立了西藏木瓜药材的多指标定量指纹图谱,结合相似度分析,可以实现西藏木瓜与其他品种木瓜的正确区分。该研究结果对合理利用西藏木瓜药材提

供了质量评价方法和技术支持。

参考文献

- [1] 欧 洋,马 静,张朝阳,等. 西藏木瓜的鉴别及其齐墩果酸、熊果酸的测定 [J]. 华西药学杂志, 2014, 29(6): 670-672.
- [2] 倪志诚. 西藏经济植物志 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1990.
- [3] 龚复俊,卢笑丛,陈 玲,等. 西藏木瓜挥发油化学成分研究 [J]. 中草药, 2006, 37(11): 1634-1635.
- [4] 宋双双,王 晓,刘 峰,等. 西藏木瓜体外抗氧化活性研究 [J]. 食品科技, 2014, 39(10): 245-248.
- [5] 青海省药品检验所. 中国藏药 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [7] 李 东,何 伶. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定木瓜中齐墩果酸和熊果酸含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(3): 259-261.
- [8] 王志芳,汪芳安,彭光华,等. 木瓜中齐墩果酸和熊果酸提取工艺的研究 [J]. 食品科学, 2006, 47(7): 134-137.
- [9] 张 玲,谢晓梅,彭华胜,等. 不同产地木瓜药材中齐墩果酸和熊果酸的比较研究 [J]. 中药材, 2009, 32(5): 673-676.
- [10] 孙连娜,洪永福. 简述中药木瓜的化学、药理与临床应用研究 [J]. 药学实践杂志, 1999, 17(5): 281-284.
- [11] 郭学敏,洪水福,章 玲,等. 皱皮木瓜成分的研究 [J]. 中草药, 1997, 28(10): 584-585.
- [12] 刘荣霞,叶 敏,果德安. 中药质量控制研究的思路与方法 [J]. 中国天然药物, 2006, 4(5): 332-337.
- [13] 邓少伟,贺 强. 中药质量标准检测方法的研究进展和建议 [J]. 中国药事, 2006, 20(9): 566-568.
- [14] 谢培山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用 [J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 6532-6551.
- [15] 徐今宁,龙 卿,秦秀丽. 中药指纹图谱技术的研究现状及应用 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(11): 2311-2313.
- [16] 易延遂,陈志良,邓虹珠. 中药指纹图谱的研究评析 [J]. 中成药, 2006, 28(8): 1192-1197.
- [17] 杨 磊,贾 佳,祖元刚. 蓝莓总花色苷匀浆的提取条件优化及抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2009, 30(20): 27-32.
- [18] 张 琳,杨 磊,贾 佳,等. 匀浆法提取长春花中长春碱、文多灵和长春质碱 [J]. 高校化学工程学报, 2008, 29(5): 768-773.
- [19] 杨 磊,李家磊,祖元刚,等. 印楝种子中印楝素 A 的匀浆提取工艺 [J]. 东北林业大学学报, 2008, 36(9): 65-67.
- [20] 祖元刚,史伟国,赵春建,等. 喜树果中喜树碱和 10-羟基喜树碱的匀浆提取工艺 [J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(6): 1088-1090.