

中图分类号:R932;R283

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2025)11-0047-07

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.11.011



基于指纹图谱和含量测定的蜜远志炮制研究*

严慕贤,蓝义琨,谭有珍,周雅亮[△]

(广州中医药大学第八临床医学院·广东省佛山市中医院,广东 佛山 528000)

摘要:目的 建立蜜远志的超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱及含量测定方法,探讨蜜远志炮制前后的化学成分变化规律。方法 建立蜜远志的 UPLC 指纹图谱,确定共有峰,采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)评价其相似度,通过高分辨质谱对特征峰进行指认;结合化学计量学分析,采用偏最小二乘判别分析(PLS-DA)对化学成分进行聚类分析;采用 UPLC 法测定细叶远志皂苷、远志吡啶酮Ⅲ和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的含量。结果 蜜远志的指纹图谱共标定了 9 个共有峰,分别指认为西伯利亚远志糖 A5、西伯利亚远志糖 A6、远志吡啶酮Ⅲ、3,6'-二芥子酰基蔗糖、黄花远志素 A、细叶远志皂苷 A、远志寡糖 H、远志寡糖 A、1,2,3,7-四甲氧基咕吨酮;PLS-DA 可将远志与蜜远志分为 2 类,峰 8(远志寡糖 A)、峰 9(1,2,3,7-四甲氧基咕吨酮)为炮制前后的主要差异成分。含量测定结果显示,远志炮制前的细叶远志皂苷、3,6'-二芥子酰基蔗糖、远志吡啶酮Ⅲ的含量分别为 21.06,6.09,0.97 mg/g,分别显著高于炮制后的 17.63,5.47,0.78 mg/g($P < 0.05$)。结论 建立的蜜远志的 UPLC 指纹图谱及含量测定方法准确、高效、专属性强,可为蜜远志的炮制工艺优化及质量评价提供参考。

关键词:远志;蜜远志;超高效液相色谱指纹图谱;含量测定;化学成分;质量评价

Processing of Polygalae Radix Praeparata Cum Melle Based on Fingerprints and Content Determination

YAN Muxian, LAN Yikun, TAN Youzhen, ZHOU Yaliang

(The Eighth Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine · Traditional Chinese Medical Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong, China 528000)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) fingerprints and content determination method for Polygalae Radix Praeparata Cum Melle, and to investigate the change rule in chemical components of Polygalae Radix Praeparata Cum Melle before and after processing. **Methods** The UPLC fingerprint of Polygalae Radix Praeparata Cum Melle was established, the common peaks were identified, and the similarity was evaluated by the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprinting of Traditional Chinese Medicine (2012 Version), and characteristic peaks were identified through high-resolution mass spectrometry. Combining chemometric analysis, partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was used for clustering analysis of chemical components; the content determination of tenuifolin, polygalaxanthone III and 3,6'-disinapoyl sucrose were determined by the UPLC method. **Results** Nine common peaks were determined in the fingerprint of Polygalae Radix Praeparata Cum Melle, namely sibiricose A5, sibiricose A6, polygalaxanthone III, 3,6'-disinapoyl sucrose, arilalanin A, tenuifolin A, tenuifolioside H, tenuifolioside A and 1,2,3,7-tetramethoxyxanthone. PLS-DA could classify Polygalae Radix and Polygalae Radix Praeparata Cum Melle into two categories and the main differential components were peak 8 (tenuifolioside A) and peak 9 (1,2,3,7-tetramethoxyxanthone). The content determination results showed that the contents of tenuifolin, 3,6'-diferuloyl sucrose, and polygalaxanthone III in Polygalae Radix before processing were 21.06, 6.09, and 0.97 mg/g, which were significantly higher than 17.63, 5.47, and 0.78 mg/g after processing ($P < 0.05$). **Conclusion** The established UPLC fingerprints and content determination method for Polygalae Radix Praeparata Cum Melle are accurate, efficient, and highly specific, which can provide a reference for the optimization of processing technology and quality evaluation of Polygalae Radix Praeparata Cum Melle.

Key words: Polygalae Radix; Polygalae Radix Praeparata Cum Melle; UPLC fingerprints; content determination; chemical components; 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^[1],其药用历史悠久,具有良好的镇静催眠、抗惊厥、抗衰老、抗痴呆、护脑、祛咳镇痰、抗抑郁、抗菌、抗癌等功效^[2]。远志的化学成分主要有三萜皂苷类、酮类、寡糖酯类、生物

碱类、苯丙素类、内酯类等,其中三萜皂苷类、酮类、寡糖酯类化合物是该植物的主要活性成分^[2]。古人认为生远志“戟人咽喉”,2020年版《中国药典(一部)》也有“嚼之有刺喉感”描述,且有一定胃肠毒性,为保证用药安全,临床常用其炮制品,其中蜜远志为临床常用炮制

*基金项目:广东省佛山市卫生和计生局医学科研课题[20190095]。

第一作者:严慕贤,女,硕士,主管中药师,研究方向为中药学与中药质量标准,(电子信箱)414263621@qq.com。

[△]通信作者:周雅亮,女,大学本科,副主任中药师,研究方向为中药学,(电子信箱)zhajun_2008@yeah.net。

品^[3]。2020 年版《中国药典(一部)》收录了制远志的炮制方法,但并未收录蜜远志的炮制方法,其炮制主要以地方炮制规范进行,质量标准相对简单,不能体现蜜远志炮制后的特点^[4-7]。近年来对蜜远志炮制工艺及质量评价的研究较多,但对蜜远志炮制前后化学成分的变化研究较少^[8-13]。中药指纹图谱与化学模式识别结合是目前分析中药的常用手段,可对中药材的成分进行综合分析,全面反映中药材的质量变化^[14-17]。本研究中采集 21 批远志药材样品,在实验室炮制,并建立超高效液相色谱(UPLC)指纹图谱,结合多组分含量测定及化学计量学分析,探讨蜜远志炮制前后的化学成分变化规律,为完善其质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

QE Focus 型高分辨液质联用仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Acquity H-Class 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);1290 II 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);AP224W 型电子天平(精度为万分之一),XBR36 型电子天平(精度为百万分之一),均购自美国 Mettler Toledo 公司;2700TM 型数控超声波清洗器(上海安谱实验科技股份有限公司,功率为 250 W,频率为 40 kHz);J-HH-6A 型电热恒温水浴锅(上海胜卫电子科技有限公司);Comfort 1 型超纯水系统(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂

细叶远志皂苷对照品(批号为 111849-201705,含量为 91.6%),远志呋喃Ⅲ对照品(批号为 111850-202207,含量为 95.8%),3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品(批号为 111848-202006,含量为 96.5%),均购自中国食品药品检定研究院;西伯利亚远志糖 A6(上海诗丹德生物技术有限公司,批号为 9886,含量为 95%);样品制备用甲醇、正丁醇均为分析纯,分析用甲醇、乙腈、磷酸、甲酸均为色谱纯,水为超纯水;21 批远志药材样品经广东省佛山市中医院梁盛副主任中药师鉴定为正品,样品信息见表 1。蜜远志炮制方法:按《广东省中药饮片炮制规范(第一册)》蜜远志饮片项下规定,取炼蜜,加适量开水稀释,加净远志,拌匀,闷至蜜被吸尽,置锅内,用文火炒至深棕黄色、不粘手时取出,放凉。每 100 kg 远志用炼蜜 25 kg^[18]。

2 方法与结果

2.1 指纹图谱建立

2.1.1 试验条件

1) 色谱条件

色谱柱:Waters Cortecs T₃ 柱(150 mm×2.1 mm, 1.6 μm);流动相:乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~3 min 时 10%A→15%A, 3~8 min 时 15%A, 8~10 min

表 1 远志药材样品信息

Tab. 1 Information of Polygalae Radix samples

远志样品编号	蜜远志样品编号	产地
YZ1	MYZ1	山西省临汾市洪洞县曲亭镇
YZ2	MYZ2	山西省临汾市襄汾县赵康镇
YZ3	MYZ3	山西省临汾市洪洞县
YZ4	MYZ4	山西省临汾市古县
YZ5	MYZ5	山西省长治市平顺县
YZ6	MYZ6	山西省长治市平顺县
YZ7	MYZ7	山西省长治市平顺县
YZ8	MYZ8	山西省运城市闻喜县薛店镇
YZ9	MYZ9	山西省运城市新绛县
YZ10	MYZ10	山西省运城市芮城
YZ11	MYZ11	山西省运城市闻喜县
YZ12	MYZ12	山西省运城市芮城永乐镇蔡村
YZ13	MYZ13	陕西省渭南市澄城县雷家洼乡堡城村
YZ14	MYZ14	陕西省渭南市澄城县安里镇
YZ15	MYZ15	陕西省渭南市合阳县皇甫庄镇
YZ16	MYZ16	陕西省渭南市合阳县坊镇南渤海村
YZ17	MYZ17	陕西榆林市靖边县小河镇
YZ18	MYZ18	山西省运城市新绛县东柳泉村
YZ19	MYZ19	山西省运城市闻喜县薛店镇
YZ20	MYZ20	山西省运城市闻喜县东镇
YZ21	MYZ21	山西省侯马市曲沃县马庄村

时 15%A→22%A, 10~23 min 时 22%A→28%A, 23~25 min 时 28%A→37%A, 25~33 min 时 37%A→42%A, 33~38 min 时 42%A→50%A);流速:0.3 mL/min;柱温:30℃;检测波长:320 nm;进样量:1 μL。

2) 质谱条件

电喷雾离子源正离子模式:ESI⁺;喷雾电压:3.30 kV;毛细管温度:320℃;质谱扫描模式:全扫描;扫描范围:100.0~1500.0 质荷比(*m/z*)。

2.1.2 溶液制备

混合对照品溶液:取西伯利亚远志糖 A6、远志呋喃Ⅲ和 3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品各适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 分别含西伯利亚远志糖 A6 160 μg、远志呋喃Ⅲ 120 μg 和 3,6'-二芥子酰基蔗糖 100 μg 的混合溶液,即得。

供试品溶液:取样品粉末(过 3 号筛)0.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加 70% 甲醇 25 mL,称定质量,超声处理(功率为 250 W,频率为 40 kHz)30 min,取出,放冷,补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.1.3 方法学考察

精密度试验:取远志样品粉末(编号为 YZ8,过 3 号筛),按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次。以 3,6'-二芥子酰基蔗糖

色谱峰(4号峰)为参照峰(S),计算得各共有峰相对保留时间的 RSD 为 $0.01\% \sim 0.15\%$ ($n=6$),相对峰面积的 RSD 为 $0.10\% \sim 1.97\%$ ($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取远志样品粉末(编号为YZ8,过3号筛)6份,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定。以3,6'-二芥子酰基蔗糖色谱峰(4号峰)为参照峰(S),计算得各色谱峰相对保留时间的 RSD 为 $0.03\% \sim 0.12\%$ ($n=6$),相对峰面积的 RSD 为 $0.16\% \sim 2.42\%$ ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取远志样品粉末(编号为YZ8,过3号筛),按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件分别于0,2,4,8,12,24 h时进样测定。以3,6'-二芥子酰基蔗糖色谱峰(4号峰)为参照峰(S),计算得各色谱峰相对保留时间的 RSD 为 $0.03\% \sim 0.57\%$ ($n=6$),相对峰面积的 RSD 为 $0.67\% \sim 3.57\%$ ($n=6$),表明供试品溶液放置24 h内稳定性良好。

2.1.4 指纹图谱建立与相似度评价

指纹图谱建立:取21批远志药材及其蜜远志样品,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,将色谱峰数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版),以编号为YZ1号样品的色谱图为参照图谱,采用平均数法,经多点校正,生成叠加指纹图谱和对照指纹图谱(R),共标定9个共有峰。详见图1。

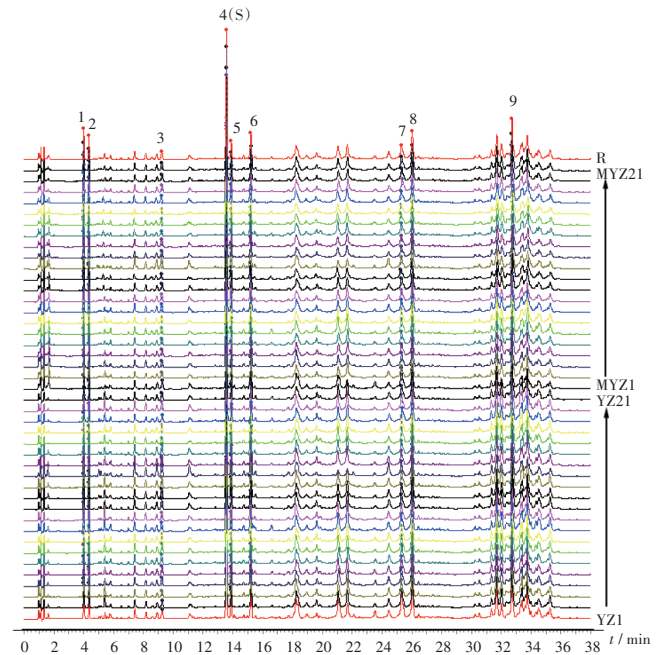


图1 超高效液相色谱叠加指纹图谱与对照指纹图谱(R)

Fig. 1 UPLC superimposed fingerprints and reference fingerprint (R)

相似度评价:结果见表2。可见,21批远志样品和21批蜜远志样品指纹图谱与对照图谱(R)的相似度均 >0.990 ,表明21批样品的化学成分种类一致性较好,主要差异表现在各特征峰所代表的化学成分的含量上。

表2 相似度评价结果

Tab. 2 Results of the similarity evaluation

编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度	编号	相似度
YZ1	0.992	YZ12	0.999	MYZ1	0.992	MYZ12	0.988
YZ2	0.996	YZ13	0.999	MYZ2	0.996	MYZ13	1.000
YZ3	0.998	YZ14	0.977	MYZ3	0.998	MYZ14	0.997
YZ4	0.996	YZ15	0.999	MYZ4	1.000	MYZ15	0.999
YZ5	0.996	YZ16	0.999	MYZ5	0.998	MYZ16	0.999
YZ6	0.996	YZ17	0.998	MYZ6	0.996	MYZ17	0.997
YZ7	0.999	YZ18	0.999	MYZ7	0.998	MYZ18	0.997
YZ8	0.997	YZ19	0.994	MYZ8	0.999	MYZ19	0.999
YZ9	0.998	YZ20	0.999	MYZ9	0.998	MYZ20	1.000
YZ10	0.998	YZ21	0.996	MYZ10	0.997	MYZ21	1.000
YZ11	0.999			MYZ11	0.999		

2.1.5 共有峰指认

通过高分辨质谱对特征峰进行指认,结果共指认了9个峰,其对应成分分别为峰1(西伯利亚远志糖A5)、峰2(西伯利亚远志糖A6)、峰3(远志吡啶酮Ⅲ)、峰4(3,6'-二芥子酰基蔗糖)、峰5(黄花远志素A)、峰6(细叶远志皂苷A)、峰7(远志寡精H)、峰8(远志寡糖A)、峰9(1,2,3,7-四甲氧基咕吨酮)。详见表3。并通过与混合对照品溶液保留时间及紫外全波长3D扫描曲线图比较,确认了其中的3个成分,分别为峰2(西伯利亚远志糖A6)、峰3(远志吡啶酮Ⅲ)、峰4(3,6'-二芥子酰基蔗糖)。详见图2。以3,6'-二芥子酰基蔗糖色谱峰(4号峰)为参照峰(S),计算得21批样品中9个共有峰相对保留时间的 RSD 为 $0.03\% \sim 0.23\%$,相对峰面积的 RSD 为 $7.34\% \sim 22.18\%$,表明9个共有峰的峰面积差异较大。

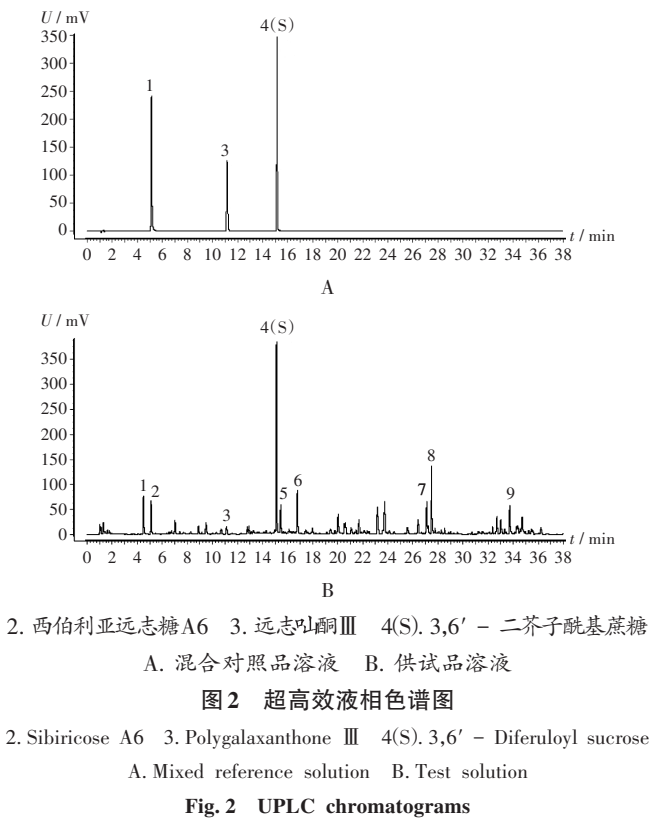
2.2 偏最小二乘判别分析(PLS-DA)

以21批远志样品与21批蜜远志样品中的9个特征峰峰面积为变量,通过SIMCA 14.1软件进行判别分析,共得到3个主成分,其模型解释率参数 R^2X 为0.864, R^2Y 为0.804,预测值(Q^2)为0.74,表明模型的预测能力较好。通过20折置换检验,得 R^2 拟合 Y 坐标的截距为0.090,小于0.3,表明模型拟合较好; Q^2 拟合 Y 坐标的截距为-0.253,小于0.05,表明模型未过度拟合。详见图3。对21批样品进行PLS-DA发现,远志样品与蜜远志样品的分布能明显区分为2类。详见图4。对主要影响的变量重要性投影(VIP)值进行分析,以VIP值大于1为限度,得到2个贡献度高的差异性化合物,分别为峰9、峰8,表明上述2种成分可能在炮制过程中有明显变化。详见图5。

表 3 远志化学成分分析结果

Tab. 3 Results of chemical components analysis of Polygalae Radix

峰号	t_R (min)	分子式	分子量	ppm ($\times 10^{-6}$)	质荷比(m/z)		化合物
					母离子	子离子	
1	4.03	$C_{22}H_{30}O_{14}$	518.160 8	-0.06	517.153 0	160.014 7, 175.038 1	西伯利亚远志糖 A5
2	4.30	$C_{22}H_{30}O_{15}$	548.170 6	-0.69	547.163 7	190.025 3, 299.811 5	西伯利亚远志糖 A6
3	8.46	$C_{25}H_{28}O_{15}$	568.139 8	4.00	567.132 6	272.031 3, 254.019 9	远志吡酮Ⅲ
4	13.05	$C_{34}H_{42}O_{19}$	754.227 8	3.00	753.220 9	411.106 2, 383.111 2	3,6'-二芥子酰基蔗糖
5	13.39	$C_{33}H_{40}O_{18}$	724.505 8	2.51	723.210 1	565.839 7, 160.014 7	黄花远志素 A
6	14.43	$C_{31}H_{38}O_{17}$	682.207 1	-1.59	681.199 5	137.022 4, 93.032 7	细叶远志皂苷 A
7	22.70	$C_{61}H_{74}O_{34}$	1 350.399 1	-0.17	1 349.392 4	1 204.364 8, 145.027 5	远志寡精 H
8	23.45	$C_{62}H_{76}O_{35}$	1 296.390 9	0.72	1 295.382 9	1 119.377 2, 175.038 3	远志寡糖 A
9	30.85	$C_{17}H_{16}O_6$	316.093 4	-4.08	317.102 1	287.054 2, 259.059 3	1,2,3,7-四甲氧基咕吨酮



2.3 含量测定

2.3.1 细叶远志皂苷含量测定

1) 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 甲醇(A) - 0.05% 磷酸溶液(B), 梯度洗脱(0~1 min 时 64%A, 1~5 min 时 64%A $\rightarrow$ 75%A); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}C$; 检测波长: 210 nm; 进样量: 1 μL 。

2) 溶液制备

供试品溶液: 取蜜远志样品粉末(编号为 MYZ2, 过 3 号筛) 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入

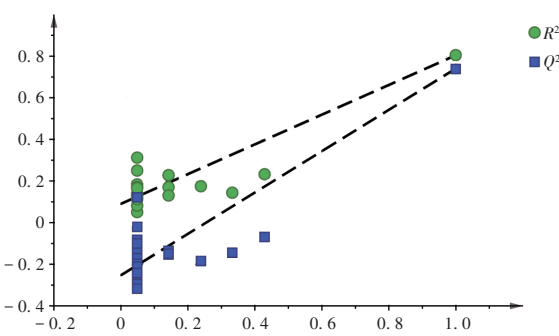


图 3 置换验证图

Fig. 3 Permutation verification graph

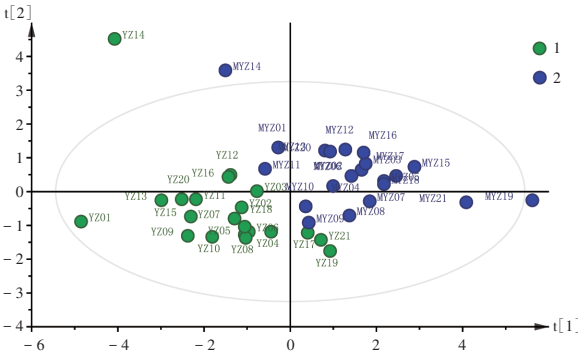


图 4 PLS-DA 得分图

Fig. 4 PLS-DA score plot

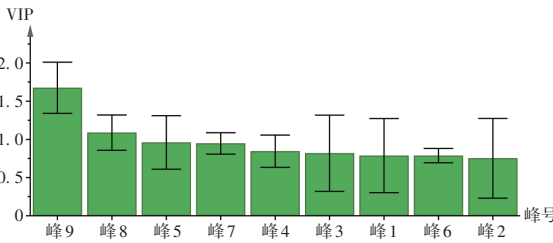


图 5 PLS-DA VIP 值图

Fig. 5 PLS-DA VIP value plot

70% 甲醇 50 mL, 称定质量, 超声处理(功率为 250 W, 频率为 40 kHz) 1 h, 放冷, 补足减失的质量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 置圆底烧瓶中, 蒸干, 残渣加

50 mL 10% 氢氧化钠溶液,加热回流 2 h,放冷,用盐酸调 pH 至 4~5,用水饱和的正丁醇振摇提取 3 次,每次 50 mL,合并正丁醇液,回收溶剂至干,残渣加甲醇使溶解,转移至 25 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

对照品溶液:取细叶远志皂苷对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含 0.5 mg 细叶远志皂苷的溶液,即得。

3) 方法学考察

线性关系考察:取细叶远志皂苷对照品适量,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并定容,配制成质量浓度为 2 601.704 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的细叶远志皂苷对照品贮备液。分别精密量取上述细叶远志皂苷对照品贮备液 0.1、0.2、0.3、1.2、2.5、3.5 mL,分别置 5 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,分别制成每 1 mL 含细叶远志皂苷 52.034、104.068、156.102、624.409、1 300.852、1 821.193 μg 的系列对照品溶液。分别精密吸取上述系列对照品溶液及对照品贮备液,按拟订色谱条件依次进样测定,记录峰面积,以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 897.972X + 13\,407.328$ ($R^2 = 0.999, n = 7$)。结果表明,细叶远志皂苷的质量浓度在 52.034~2 601.704 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取供试品溶液(编号为 MYZ2)适量,按拟订色谱条件重复进样测定 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.11% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取供试品溶液(编号为 MYZ2)适量,分别于配制后 0、2、4、8、12、24 h 时按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.50% ($n = 6$),表明供试品溶液放置 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:取蜜远志样品粉末(编号为 MYZ3,过 3 号筛)适量,依法平行制备供试品溶液 6 份,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果的 RSD 为 1.27% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品粉末(编号为 MYZ2,过 3 号筛)0.5 g,精密称定,平行 9 份,按细叶远志皂苷对照品与样品含量比例为 1:0.5、1:1、1:1.5 加入细叶远志皂苷对照品,依法制备供试品溶液,平行 6 份,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算细叶远志皂苷的回收率。结果见表 4,表明方法准确度良好。

2.3.2 远志呋喃 III 和 3,6'-二芥子酰基蔗糖含量测定

1) 色谱条件

色谱柱:Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)-0.05% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min 时 16%A, 5~5.1 min 时 16%A $\rightarrow$ 18%A, 5.1~12 min 时 18%A, 12~12.1 min 时

表 4 细叶远志皂苷加样回收试验结果 ($n = 9$)

Tab. 4 Results of the recovery test of tenuifolin ($n = 9$)

取样量(mg)	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
0.514	12.925	6.531	19.191	95.93		
0.514	12.930	6.531	19.355	98.36		
0.515	12.936	6.531	19.253	96.73		
0.514	12.930	12.914	24.944	93.02		
0.514	12.930	12.914	25.026	93.66	96.58	2.81
0.515	12.938	12.914	25.002	93.42		
0.515	12.948	19.303	31.977	98.58		
0.516	12.961	19.303	32.196	99.64		
0.516	12.967	19.303	32.242	99.85		

18%A $\rightarrow$ 60%A, 12.1~14 min 时 60%A);流速:0.3 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:320 nm;进样量:1 μL 。

2) 溶液制备

供试品溶液:取蜜远志样品粉末(编号为 MYZ2,过 3 号筛)1 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL,称定质量,加热回流 1.5 h,放冷,补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

混合对照品溶液:取远志呋喃 III 对照品和 3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品各适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 含远志呋喃 III 25 μg 、3,6'-二芥子酰基蔗糖 110 μg 的混合溶液,即得。

3) 方法学考察

线性关系考察:取远志呋喃 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品各适量,精密称定,置 25 mL 容量瓶中,加 70% 甲醇定容,制成每 1 mL 含远志呋喃 III 对照品 231.759 μg 、3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品 2 343.406 μg 的混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液 0.1 mL,置 10 mL 容量瓶中,或取 2.5、5.0、7.5 mL,置 50 mL 容量瓶中,或取 0.5、1.0 mL,置 2 mL 容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,分别制成每 1 mL 含远志呋喃 III 2.318、11.588、23.176、34.764、57.940、115.880 μg 的系列对照品溶液,以及每 1 mL 含 3,6'-二芥子酰基蔗糖 23.434、117.170、234.341、351.511、585.852、1 171.703 μg 的系列对照品溶液。分别精密吸取上述系列对照品溶液及对照品贮备液各适量,按拟订色谱条件依次进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标进行线性回归,得远志呋喃 III、3,6'-二芥子酰基蔗糖的回归方程分别为 $Y = 5\,137.355X + 1\,801.054$ ($R^2 = 0.999, n = 7$) 和 $Y = 8\,451.726X + 59\,053.226$ ($R^2 = 0.999, n = 7$)。结果表明,其质量浓度分别在 2.318~231.759 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 23.434~2 343.406 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取供试品溶液(编号为 MYZ2)

表 5 远志吡酮Ⅲ与 3,6'-二芥子酰基蔗糖加样回收试验结果 (n = 9)

Tab.5 Results of the recovery test of polygalaxanthone Ⅲ and 3,6'- diferuloyl sucrose (n = 9)

取样量(mg)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.495	0.509	2 912.682	284.765	1 464.629	144.850	4 386.060	432.370	100.60	101.90				
0.496	0.509	2 913.844	284.879	1 464.629	144.850	4 356.227	433.827	98.48	102.83				
0.496	0.509	2 915.007	284.992	1 464.629	144.850	4 320.588	432.062	95.97	101.53				
0.496	0.509	2 913.844	284.879	2 929.258	289.699	5 737.658	561.265	96.40	95.40				
0.496	0.509	2 913.844	284.879	2 929.258	289.699	5 732.908	568.370	96.24	97.86	97.24	98.55	1.49	2.93
0.496	0.509	2 915.588	285.049	2 929.258	289.699	5 745.618	559.304	96.61	94.67				
0.496	0.509	2 917.912	285.277	4 393.886	434.549	7 185.391	709.884	97.12	97.71				
0.497	0.510	2 920.818	285.561	4 393.886	434.549	7 181.350	708.371	96.96	97.30				
0.497	0.510	2 921.980	285.674	4 393.886	434.549	7 174.837	710.472	96.79	97.76				

注:A 为 3,6'-二芥子酰基蔗糖,B 为远志吡酮Ⅲ。
Note:A refers to polygalaxanthone Ⅲ,while B refers to 3,6'- diferuloyl sucrose.

适量,按拟订色谱条件重复进样测定 6 次,记录峰面积。结果远志吡酮Ⅲ、3,6'-二芥子酰基蔗糖的 RSD 分别为 0.18%,0.33%(n = 6),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密吸取供试品溶液(编号为 MYZ2)适量,分别于配制后 0,2,4,8,12,24 h 时按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。结果远志吡酮Ⅲ和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的 RSD 分别为 0.15%,0.33%(n = 6),表明供试品溶液放置 24 h 内稳定性良好。

重复性试验:取样品粉末(编号为 MYZ2,过 3 号筛),依法平行制备供试品溶液 6 份,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果远志吡酮Ⅲ和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的 RSD 分别为 0.18%,0.19%(n = 6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品粉末(编号为 MYZ2,过 3 号筛)0.5 g,精密称定,平行 3 组,每组 3 份,按远志吡酮Ⅲ、3,6'-二芥子酰基蔗糖对照品与样品含量比例为 1:0.5,1:1,1:1.5 分别加入对照品,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 5,表明方法准确度良好。

2.3.3 样品含量测定

取 21 批远志与蜜远志样品,分别按 2.3.1 和 2.3.2 项下方法测定细叶远志皂苷、远志吡酮Ⅲ和 3,6'-二芥子酰基蔗糖的含量,结果见表 6。采用 SPSS 20.0 统计学软件分析远志与蜜远志指标性成分的差异,以细叶远志皂苷、远志吡酮Ⅲ和 3,6'-二芥子酰基蔗糖含量为检验变量,以远志和蜜远志为分组变量,进行配对样品 t 检验。分析结果显示,生品中细叶远志皂苷的平均含量为 21.06 mg / g,显著高于蜜制品中的 17.63 mg / g (t = 2.484,P = 0.017);生品中 3,6'-二芥子酰基蔗糖的平均含量为 6.09 mg / g,显著高于蜜制品中的 5.47 mg / g

表 6 样品含量测定结果(mg / g)

Tab.6 Results of the content determination of three chemical components in samples

编号	细叶远志皂苷	3,6'-二芥子酰基蔗糖	远志吡酮Ⅲ	编号	细叶远志皂苷	3,6'-二芥子酰基蔗糖	远志吡酮Ⅲ
YZ1	13.13	7.13	1.06	MYZ1	10.05	5.82	0.88
YZ2	23.33	7.14	0.75	MYZ2	25.14	5.88	0.56
YZ3	23.48	6.37	0.72	MYZ3	16.95	5.79	0.62
YZ4	13.63	6.37	1.12	MYZ4	13.44	5.74	0.75
YZ5	20.06	5.31	0.94	MYZ5	24.89	5.21	0.70
YZ6	13.95	5.30	0.97	MYZ6	20.76	5.92	0.79
YZ7	15.17	5.77	0.92	MYZ7	22.29	4.87	0.65
YZ8	21.77	5.44	0.79	MYZ8	18.04	4.93	0.65
YZ9	23.27	6.02	0.83	MYZ9	16.09	5.34	0.61
YZ10	19.13	5.77	0.77	MYZ10	18.32	5.59	0.64
YZ11	22.08	6.24	1.08	MYZ11	21.50	5.81	0.87
YZ12	13.49	6.40	1.04	MYZ12	21.17	5.71	0.92
YZ13	17.83	6.92	1.03	MYZ13	11.11	5.91	0.80
YZ14	24.32	7.20	2.27	MYZ14	15.47	5.73	1.43
YZ15	26.63	6.23	1.03	MYZ15	14.15	5.40	0.89
YZ16	24.87	6.53	1.11	MYZ16	20.11	5.84	0.99
YZ17	25.27	5.47	0.64	MYZ17	17.14	5.28	0.63
YZ18	24.87	5.90	0.88	MYZ18	17.54	5.13	0.79
YZ19	24.84	4.81	0.74	MYZ19	13.42	4.35	0.71
YZ20	29.27	6.71	0.95	MYZ20	15.35	6.24	0.84
YZ21	21.93	4.76	0.74	MYZ21	17.40	4.41	0.61
$\bar{X}$	21.06	6.09	0.97	$\bar{X}$	17.63*	5.47*	0.78*

注:与远志药材样品中同种成分比较,*P < 0.05。
Note: Compared with the content of the same component in Polygalae Radix samples,*P < 0.05.

(t = 2.317,P < 0.027);生品中远志吡酮Ⅲ的平均含量为 0.97 mg / g,显著高于蜜制品中的 0.78 mg / g (t =

3.164, $P = 0.003$)。可见,远志的生品和蜜制品的成分含量差异明显。

3 讨论

2020年版《中国药典(一部)》远志项下收录了细叶远志皂苷、远志呋喃Ⅲ和3,6'-二芥子酰基蔗糖3种物质的含量测定方法,远志呋喃Ⅲ中包含杂质成分且无法完全分离,考虑到远志呋喃Ⅲ与远志呋喃Ⅺ为同分异构体,较难分离,故本研究中采用UPLC法对其进行分离,并对方法进行了验证;同时建立了细叶远志皂苷的UPLC含量测定方法,大大缩短了分析时间^[19]。另外,建立了蜜远志的UPLC指纹图谱,并通过高分辨质谱确认了9个主要特征成分,通过指纹图谱与多组分定量测定结合,更全面、准确地反映了远志炮制前后的成分差异。

本研究中发现,远志炮制前后的化学成分发生了变化,采用PLS-DA可将两者分类,同时发现在炮制过程中,峰8、峰9 2个成分发生了明显变化。采用配对样品 t 检验对细叶远志皂苷、远志呋喃Ⅲ和3,6'-二芥子酰基蔗糖3个成分的含量进行对比分析发现,炮制后细叶远志皂苷、远志呋喃Ⅲ和3,6'-二芥子酰基蔗糖的含量均有降低趋势。关于炮制前后的变化情况研究,有学者认为,远志炮制后的细叶远志皂苷含量变化不大;也有研究发现,炮制后细叶远志皂苷含量会升高,是由炮制过程中其他皂苷类成分水解为细叶远志皂苷导致^[20-21]。但本研究中其含量整体呈下降趋势,且不同样品间呈现的规律不一致,部分样品呈升高状态,部分样品变化不大,可能是因其在炮制过程中水解的程度不一致导致,故建议严格控制蜜远志的炮制方法。3,6'-二芥子酰基蔗糖受热会分解为西伯利亚远志糖A6、黄花远志素C、芥子酸,在炮制过程中不稳定,这可能是其炮制后含量降低的机制^[22]。目前对远志呋喃Ⅲ炮制后的变化情况报道各不相同,有学者认为其炮制后含量增加,也有学者认为其炮制后含量降低,推测其差异主要与炮制方法相关。本研究中远志呋喃Ⅲ经炮制后含量下降,与文献^[11,23]报道的蜜远志炮制规律一致。

本研究在建立UPLC指纹图谱的基础上,结合UPLC法对蜜远志的多个成分进行含量测定,从定性定量2个角度对蜜远志炮制前后的成分进行了探讨,为蜜远志炮制工艺的优化及质量评价提供了参考。

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,2020:163.
[2] 姚辛敏,周晓洁,周妍妍,等. 远志化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医药学报,2022,50(2):103-107.
[3] 李振岚,吴红旗. 远志炮制减毒增效作用的研究进展[J]. 实用临床医药杂志,2023,27(8):135-138.

[4] 山东省食品药品监督管理局. 山东省中药炮制规范(2012版)[M]. 济南:山东科学技术出版社,2012:300-302.
[5] 湖北省药品监督管理局. 湖北省中药饮片炮制规范(2018版)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2018:50-52.
[6] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药饮片炮制规范(2015年版)[M]. 成都:四川科学技术出版社,2016:36.
[7] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药炮制规范(2015年版)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2016:25.
[8] 许丽丽,汪冰,任榕霞,等. 基于指纹图谱和多指标含量测定的蜜远志质量评价[J]. 中草药,2023,54(19):6461-6468.
[9] 鲁文慧,于波,崔兰冲,等. 远志蜜制工艺及质量标准研究[J]. 时珍国医国药,2022,33(3):622-625.
[10] 袁蒙蒙,阴美华,唐志书,等. Box-Behnken响应面法优化制远志与蜜远志的炮制工艺[J]. 中南药学,2021,19(7):1310-1315.
[11] 王勃,宁晨旭,苏晓娟,等. 蜜远志的炮制工艺研究[J]. 中药材,2020,43(8):1872-1876.
[12] 白钢钢,袁斐,叶慧,等. 不同蜜炙方法对远志化学成分的影响[J]. 中药材,2018,41(9):2097-2100.
[13] 陈静静. 蜜远志的质量控制及其与生远志的成分差异研究[D]. 太原:山西省中医药研究院,2016.
[14] 严玉晶,李玲,麦贵敏,等. UPLC指纹图谱结合化学模式识别评价不同产地五灵脂药材质量[J]. 中国现代中药,2023,25(10):2072-2077.
[15] 王强雄,郭盛,李会伟,等. 不同产地蒙古黄芪茎叶UPLC指纹图谱建立及化学模式识别研究[J]. 中草药,2023,54(13):4312-4320.
[16] 邓李红,陈仕妍,王寿富,等. 桑枝不同部位超高效液相特征图谱建立及化学模式识别研究[J]. 广东药科大学学报,2023,39(1):44-50.
[17] 吴杭莎,吕悦,韦飞扬,等. HPLC指纹图谱和化学模式识别的杜仲盐炙前后对比[J]. 中成药,2022,44(12):4072-4076.
[18] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药饮片炮制规范(第一册)[M]. 广州:广东科学技术出版社,2016:170-173.
[19] 谢元彪,李涵明,詹常森. 远志中远志酮Ⅲ和3,6'-二芥子酰基蔗糖含量测定方法的改进[J]. 中国药品标准,2023,24(5):488-497.
[20] 何梦娇,庄梓鸣,邢玥,等. 基于模拟炮制技术探究远志炮制前后皂苷类成分转化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(24):169-176.
[21] 梁晓,张学兰,李慧芬,等. 甘草汁蒸制远志对远志皂苷B和细叶远志皂苷含有量的影响[J]. 中成药,2015,37(4):824-827.
[22] 徐保鑫,刁家威,张学兰,等. 远志炮制过程中6种寡糖酯类成分转化机制[J]. 中成药,2018,40(8):1790-1794.
[23] 高慧,熊晓莉,张青,等. 基于UPLC-LTQ-Orbitrap MS技术分析远志炮制前后成分变化[J]. 中药新药与临床药理,2021,32(12):1845-1854.

(收稿日期:2024-02-05;修回日期:2024-11-09)