

· 药学基础 ·

基于含量测定和指纹图谱的不同基原地骨皮药材异同点考察

李宝鑫, 郝丽霞, 代云桃*, 李西文, 邬兰
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的:通过比较2020年版《中华人民共和国药典》收录的不同基原地骨皮药材主要化学组成的异同点,判定2种基原的地骨皮是否具有化学一致性。方法:收集有代表性的30批地骨皮药材,采用超高效液相色谱-光电二极管阵列检测器法(UPLC-PDA)建立含量测定方法及指纹图谱分析方法,分别以乙腈(A)-0.15%三氟乙酸水溶液(B)和乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)作为流动相进行梯度洗脱(0~4 min, 5%~12%A; 4~8 min, 12%A; 8~12 min, 12%~14%A; 12~15 min, 14%~30%A; 15~17 min, 30%~40%A; 17~18 min, 40%~90%A),检测波长280 nm。结合多元统计分析,评价不同基原地骨皮的异同点。结果:建立的含量测定及指纹图谱方法具有良好的精密性、稳定性和重复性。30批地骨皮的指纹图谱与对照指纹图谱的相似度均>0.9,且宁夏枸杞地骨皮和枸杞地骨皮指纹图谱中的8个相同共有峰均为酚酰胺类成分,分别为地骨皮乙素、*N*-(4,9,13-triazatridecan-1-yl)-3,4-dihydroxybenzenepropanamide、阿魏酰基-1,4-丁二胺、*N*₁,*N*₅-bis(dihydrocaffeoyl)spermidine或*N*₅,*N*₁₀-bis(dihydrocaffeoyl)spermidine、*N*₅-caffeoyl-*N*₁₀-dihydrocaffeoylspermidine、*N*₅-dihydrocaffeoyl-*N*₁₀-caffeoylspermidine、*N*₁,*N*₅-bis(caffeoyl)spermidine和枸杞素A。其中地骨皮乙素在宁夏枸杞地骨皮、枸杞地骨皮中的质量分数范围分别为2.52%~12.24%、1.22%~8.18%。结论:建立的UPLC分析方法可用于地骨皮药材的含量测定和指纹图谱分析。宁夏枸杞地骨皮与枸杞地骨皮的化学轮廓相似,地骨皮乙素含量差异无统计学意义,二者化学组成基本一致。

[关键词] 地骨皮; 药材基原; 超高效液相色谱法(UPLC); 指纹图谱; 地骨皮乙素; 化学一致性评价; 经典名方

[中图分类号] R22;R28;R931;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0179-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220461 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220429.1421.010.html>

[网络出版日期] 2022-05-05 9:03

Chemical Consistency of Lycii Cortex from Different Origins Based on Component Contents and Fingerprint

LI Baoxin, HAO Lixia, DAI Yuntao*, LI Xiwen, WU Lan

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** In this study, the two different origins of Lycii Cortex in the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia* were determined to analyze their chemical consistency by comparing their main chemical composition. **Method:** Thirty representative batches of Lycii Cortex were collected, content determination and fingerprint analysis methods were established by ultra performance liquid chromatography-photodiode array detector (UPLC-PDA) combining with multivariate statistical analysis to evaluate the similarities and differences between two origins of Lycii Cortex. Respectively by the mobile phase of acetonitrile (A)-0.15% trifluoroacetic acid aqueous solution (B) and the mobile phase of acetonitrile (A)-0.1% formic acid aqueous solution (B) for gradient elution (0-4 min, 5%-12%A; 4-8 min, 12%A; 8-12 min, 12%-14%A; 12-15 min, 14%-30%A; 15-17 min, 30%-40%A; 17-18 min, 40%-90%A), and the detection wavelength was set at 280 nm. **Result:** This established content determination and fingerprint methods had good precision, stability

[收稿日期] 2022-03-08

[基金项目] 中国中医科学院中药研究所古代经典名方的开发研究项目(H2018026)

[第一作者] 李宝鑫,在读硕士,从事中药质量分析研究,E-mail:15028430845@139.com

[通信作者] *代云桃,博士,研究员,硕士生导师,从事中药药效物质基础和质量标准研究,E-mail:ytdai@icmm.ac.cn

and repeatability. The similarities of 30 batches of Lycii Cortex were above 0.90 by comparing with the control fingerprint, and the eight common peaks in fingerprints of Lycii Cortex from *Lycium barbarum* and *L. chinense* were all phenolic amides, which were kukoamine B, *N*-(4, 9, 13-triazatridecan-1-yl)-3, 4-dihydroxybenzenepropanamide, feruloylputrescine, *N*₁, *N*₅-bis (dihydrocaffeoyl) spermidine or *N*₅, *N*₁₀-bis (dihydrocaffeoyl) spermidine, *N*₅-caffeoyl-*N*₁₀-dihydrocaffeoylspermidine, *N*₅-dihydrocaffeoyl-*N*₁₀-caffeoylspermidine, *N*₁, *N*₅-bis (caffeoyl) spermidine and lyciumin A. Among them, the content ranges of kukoamine B in Lycii Cortex from *L. chinense* and *L. barbarum* were 1.22%-8.18%, 2.52%-12.24%, respectively. **Conclusion:** The established UPLC analysis method can be used for the content determination and fingerprint analysis of Lycii Cortex. This study indicates that chemical contour of Lycii Cortex from *L. barbarum* and *L. chinense* are similar, there are no significant differences in kukoamine B content, and they have consistency in the chemical composition.

[Keywords] Lycii Cortex; medicinal material origin; ultra performance liquid chromatography (UPLC); fingerprint; kukoamine B; chemical consistency evaluation; famous classical formulas

地骨皮为茄科植物枸杞 *Lycium chinense* 或宁夏枸杞 *L. barbarum* 的干燥根皮,其味甘,性寒,归肺、肝、肾经,具有凉血除蒸、清肺降火等功效,主要用于阴虚潮热、骨蒸盗汗、肺热咳嗽、咯血、衄血、内热消渴等证^[1]。现代药理研究表明,地骨皮具有降血压、降血糖、降血脂、抑菌、抗炎、解热镇痛、免疫调节等生物活性^[2-4],也是治疗骨质疏松症的良好天然候选药物^[5]。《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)在1985年版之前地骨皮项下只收录了枸杞 *L. chinense* 的干燥根皮。1985年开始,宁夏枸杞 *L. barbarum* 的干燥根皮也被列入地骨皮基原。且随着宁夏枸杞需求量的增加,目前市场上源于宁夏枸杞根皮的地骨皮逐渐增多,由于不同基原地骨皮无外观差异,致使多混淆使用。《古代经典名方目录(第一批)》^[6]中含地骨皮的方剂共5首,基原考证结果认为历代经典名方中的地骨皮主要为枸杞的根皮^[7-8]。因此,宁夏枸杞的根皮能否替代枸杞的根皮制备经典名方是亟待解决的一个重要问题。

传统的性状鉴别和显微鉴别无法区分源于枸杞和宁夏枸杞的地骨皮。已有文献报道二者具有相同类别的化学成分^[9-11],但二者特有的且与活性相关的化学成分组成轮廓是否一致尚未见报道。已有文献虽进行了不同基原地骨皮的指纹图谱和含量测定研究,但并未进行共有峰指认,并且所采用的液相分析方法时间较长^[12]。鉴于目前缺乏2种基原地骨皮的系统对比研究,且2020年版《中国药典》(一部)“地骨皮”项下缺少含量测定和指纹图谱项,故本实验分别收集枸杞根皮和宁夏枸杞根皮各15批,拟采用超高效液相色谱法(UPLC)建立两类地骨皮的指纹图谱分析方法,并对其共有峰进行定

性鉴别,同时建立地骨皮指标成分地骨皮乙素的含量测定方法,结合多元统计分析,从化学轮廓和指标成分含量方面评价2个基原地骨皮化学组成的异同点。

1 材料

ACQUITY UPLC H-Class 型超高效液相系统[配有光电二极管阵列检测器(PDA)]和ACQUITY UPLC H-Class 型超高效液相系统串联ACQUITY Vion IMS QTOF 型质谱仪(美国 Waters 公司),ME204/02 型1/10万电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],HC-3018 型高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),C1000 Touch™ 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)。

DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号 DP320-03],地骨皮乙素对照品(成都植标化纯生物技术有限公司,批号 PCS1524,纯度>98%),水为纯净水,乙腈、甲醇、甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。地骨皮药材信息见表1,经中国中医科学院中药研究所代云桃研究员鉴定。

2 方法与结果

2.1 基原鉴定

2.1.1 DNA 提取^[13] 取地骨皮药材0.1~0.3 g,按照植物基因组DNA提取试剂盒方法进行提取,所得DNA提取液于-20℃保存,备用。

2.1.2 PCR 扩增及测序 用于本文PCR研究的核糖体DNA内部转录间隔区2(ITS2)引物序列为2F: 5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'位于5.8S上,引物长度为20 bp;3R: 5'-GACGCTTCTCCAGAC TACAAT-3'位于28S上,引物长度为21 bp;反应体系为2×Taq PCR MasterMix 12.5 μL,引物 ITS2-2F、

表1 地骨皮药材产地、基原及指标成分含量

Table 1 Producing area, origin and index composition content of Lycii Cortex

编号	产地	基原	地骨皮乙素质量分数/%	编号	产地	基原	地骨皮乙素质量分数/%
G1	河南新密	<i>L. chinense</i>	4.91	N1	山西	<i>L. barbarum</i>	3.56
G2	河南新密	<i>L. chinense</i>	1.46	N2	宁夏	<i>L. barbarum</i>	3.06
G3	河南新密	<i>L. chinense</i>	1.22	N3	山西襄汾	<i>L. barbarum</i>	5.93
G4	河南新密	<i>L. chinense</i>	1.84	N4	山西襄汾	<i>L. barbarum</i>	8.85
G5	河南新密	<i>L. chinense</i>	1.81	N5	山西襄汾	<i>L. barbarum</i>	7.65
G6	甘肃庄浪	<i>L. chinense</i>	1.38	N6	山西襄汾	<i>L. barbarum</i>	2.64
G7	甘肃庄浪	<i>L. chinense</i>	2.80	N7	山西襄汾	<i>L. barbarum</i>	12.24
G8	甘肃庄浪	<i>L. chinense</i>	4.59	N8	甘肃广河	<i>L. barbarum</i>	4.86
G9	甘肃庄浪	<i>L. chinense</i>	4.56	N9	甘肃广河	<i>L. barbarum</i>	6.50
G10	山西运城	<i>L. chinense</i>	2.41	N10	甘肃广河	<i>L. barbarum</i>	3.73
G11	山西运城	<i>L. chinense</i>	6.25	N11	宁夏吴忠	<i>L. barbarum</i>	4.87
G12	山西运城	<i>L. chinense</i>	8.18	N12	宁夏吴忠	<i>L. barbarum</i>	7.93
G13	山西运城	<i>L. chinense</i>	6.28	N13	宁夏吴忠	<i>L. barbarum</i>	5.11
G14	山西运城	<i>L. chinense</i>	5.77	N14	宁夏吴忠	<i>L. barbarum</i>	2.52
G15	河北	<i>L. chinense</i>	5.99	N15	宁夏吴忠	<i>L. barbarum</i>	3.54

ITS2-3R(2.5 μmol·L⁻¹)各1.0 μL,总DNA 2 μL,加双蒸水 8.5 μL;扩增程序为94 °C预变性5 min;94 °C变性30 s,56 °C退火30 s,72 °C延伸45 s,30个循环;72 °C延伸7 min^[14]。PCR扩增产物由北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。

2.1.3 数据处理 测序获得的 reads 采用 CondonCode Aligner 9.0.2 进行处理,将拼接所得序列在美国国立生物技术信息中心(NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站进行 Blast 比对鉴定。经鉴定,30批地骨皮药材包括15批枸杞地骨皮(编号G1~G15)及15批宁夏枸杞地骨皮(编号N1~N15),见表1。

2.2 指纹图谱分析

2.2.1 供试品溶液的制备 取地骨皮粉末(过三号筛)0.2 g,置于50 mL离心管中,加入50%甲醇-0.5%乙酸(1:1)混合液20 mL,超声处理30 min(350 W,40 kHz),离心(13 000 r·min⁻¹,10 min,离心半径5.79 cm,下同),过0.22 μm微孔滤膜,即得^[15]。

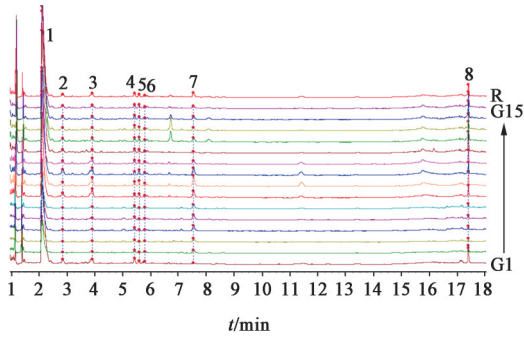
2.2.2 检测条件 色谱条件设定为 ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相选择乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)进行梯度洗脱(0~4 min,5%~12%A;4~8 min,12%A;8~12 min,12%~14%A;12~15 min,14%~30%A;15~17 min,30%~40%A;17~18 min,40%~90%A),流速0.2 mL·min⁻¹,柱温40 °C,检测波长

280 nm,进样量2 μL。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正离子模式扫描,扫描范围 *m/z* 50~1 500,离子源温度110 °C,锥孔电压40 V,毛细管电压2 kV,脱溶剂气温度500 °C,去溶剂化气体流量700 L·h⁻¹,锥孔气流速50 L·h⁻¹,数据采集时间19 min。

2.2.3 方法学考察 取同一供试品溶液(样品G7)适量,按2.2.2项下色谱条件连续进样6次,以地骨皮乙素为参照,计算各共有峰相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为<0.1%、<3.0%,表明仪器精密度良好。取样品G7供试品溶液适量,放置0、2、4、8、12、24 h后按2.2.2项下色谱条件测定,以地骨皮乙素为参照,计算各共有峰相对保留时间RSD均<0.1%,相对峰面积RSD均<3.0%,说明供试品溶液在24 h内有较好的稳定性,符合指纹图谱的检测要求。取同一批枸杞地骨皮粉末6份(样品G7),按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.2.2项下色谱条件测定,以地骨皮乙素为参照,计算各共有峰相对保留时间的RSD均<2.0%,相对峰面积的RSD均<3.0%,表明该方法重复性良好。

2.2.4 指纹图谱的采集和相似度评价 精密吸取30批地骨皮的供试品溶液各2 μL,按2.2.2项下色谱条件测定,记录色谱图。分别将样品G1~G15、N1~N15的UPLC色谱图导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)进行色谱峰匹配,枸杞地骨皮参照图谱为样品G7,宁夏枸杞地骨皮参照图谱

为样品N9,对照图谱生成方法为平均数,时间窗宽度0.10 min,多点校正,自动匹配,生成对照指纹图谱,见图1和图2。计算相似度,结果发现样品G1~G15与其对照指纹图谱的相似度均 ≥ 0.996 ,样品N1~N15与其对照指纹图谱的相似度均 ≥ 0.997 ,提示2个基原药材的整体相似性较好。



注:R.对照指纹图谱(图2同)

图1 15批枸杞地骨皮的UPLC指纹谱

Fig. 1 UPLC fingerprint of 15 batches of Lycii Cortex from *L. chinense*

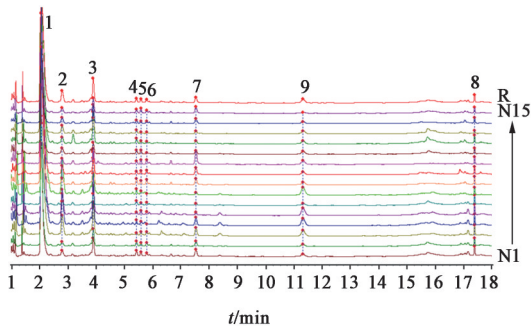


图2 15批宁夏枸杞地骨皮的UPLC指纹谱

Fig. 2 UPLC fingerprint of 15 batches of Lycii Cortex from *L. barbarum*

2.2.5 对照指纹图谱共有峰的标定 在枸杞地骨皮和宁夏枸杞地骨皮的指纹图谱中,地骨皮乙素色谱峰的分离度良好且是所有样品共有峰,故以地骨皮乙素(1号峰)为参照峰标定其他共有峰。样品G1~G15标定共有峰8个,样品N1~N15标定共有峰9个。计算各共有峰的保留时间、相对保留时间、相对峰面积及峰面积百分比,见表2。结果发现枸杞地骨皮和宁夏枸杞地骨皮有8个共有峰的保留时间较为一致,推测这8个峰可能是30批地骨皮的共有峰;同时,在宁夏枸杞地骨皮另有1个共有峰(峰9),但该峰在部分枸杞地骨皮(如样品G7~G10)中也存在,说明该色谱峰不能作为宁夏枸杞地骨皮的特有峰,且宁夏枸杞地骨皮和枸杞地骨皮所有样品以全色谱峰匹配的相似度 > 0.9 ,提示峰9对不同基原地

骨皮的主要化学组成无明显影响。

表2 枸杞地骨皮、宁夏枸杞地骨皮UPLC指纹图谱中共有峰的色谱参数

Table 2 Chromatographic parameters of common peaks in fingerprint of Lycii Cortex from *L. chinense* and *L. barbarum*

共有峰	宁夏枸杞地骨皮				枸杞地骨皮			
	t_R /min	RRT	RPA	PA/%	t_R /min	RRT	RPA	PA/%
1(S)	2.07	1.00	1.00	73.47	2.05	1.00	1.00	80.00
2	2.76	1.33	0.05	3.88	2.83	1.38	0.03	2.74
3	3.87	1.87	0.15	11.09	3.83	1.87	0.07	5.42
4	5.40	2.61	0.03	1.88	5.40	2.63	0.02	1.45
5	5.54	2.68	0.02	1.37	5.56	2.71	0.02	1.58
6	5.76	2.78	0.03	2.08	5.77	2.82	0.01	0.98
7	7.51	3.63	0.03	2.57	7.53	3.67	0.06	4.89
8	17.39	8.40	0.02	1.41	17.38	8.48	0.04	2.94
9	11.28	5.45	0.03	2.25				

注: t_R .保留时间;RRT.相对保留时间;RPA.相对峰面积;PA.峰面积百分比

2.2.6 共有峰成分指认 通过UPLC-四极杆飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)对地骨皮共有峰进行鉴定,根据质量数和多级质谱碎片裂解信息,结合对照品、PubChem数据库及相关文献报道,最终推断9个共有峰对应的化学成分,见表3。

2.3 化学模式识别分析

2.3.1 数据预处理 在上述地骨皮指纹图谱共有峰的标定中,仅将主要色谱峰作为地骨皮共有峰进行标定。为显示地骨皮指纹图谱中所有检测到的成分对整体化学轮廓的影响,将地骨皮中所有色谱峰的峰面积组成数据集进行多元统计分析。因宁夏枸杞地骨皮中色谱峰数量较枸杞地骨皮中多,且枸杞地骨皮指纹图谱中所有色谱峰在宁夏枸杞地骨皮样品中均有检测到,故以宁夏枸杞地骨皮所有峰的峰面积列数据集,共19个色谱峰。对于宁夏枸杞地骨皮中存在但枸杞地骨皮中不存在的色谱峰,在枸杞地骨皮中以0计。

2.3.2 聚类分析 使用SPSS 26.0,以上述19个色谱峰的峰面积为变量,采用Z得分法进行数据标准化处理,以组间联接法进行系统聚类,见增强出版附加材料。结果发现30批地骨皮样品被分为两大类,其中枸杞地骨皮G1~G15和宁夏枸杞地骨皮N1~N3、N6、N8~N11、N13~N15归为一类,且宁夏枸杞地骨皮N1~N2、N10~N11、N15与枸杞地骨皮G7~G8、G10、G12~G15无差异、宁夏枸杞地骨皮N6、N14与枸杞地骨皮G6、G9没有差异、宁夏枸杞

表3 地骨皮药材共有峰的UPLC-Q-TOF-MS鉴定

Table 3 UPLC-Q-TOF-MS identification of common peaks in Lycii Cortex

No.	化合物	分子式	准分子离子 m/z		δ/ppm	碎片离子 m/z
			实测值	理论值		
1	地骨皮乙素 ¹⁾	C ₂₈ H ₄₂ N ₄ O ₆	531.316 6	531.317 7	-1.1	367.269 7, 293.185 2, 257.648 6, 222.111 4
2	<i>N</i> -(4, 9, 13-triazatridecan-1-yl)-3, 4-dihydroxybenzenepropanamide ^[16]	C ₁₉ H ₃₄ N ₄ O ₃	367.269 0	367.270 3	-1.3	294.188 1, 256.640 7, 222.111 3
3	阿魏酰基-1, 4-丁二胺 ^[9]	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	265.153 8	265.154 6	-3.4	248.128 1, 239.069 3, 222.112 0, 177.053 9, 72.079 5
4	<i>N</i> ₁ , <i>N</i> ₅ -bis(dihydrocaffeoyl)spermidine 或 <i>N</i> ₅ , <i>N</i> ₁₀ -bis(dihydrocaffeoyl)spermidine ^[9]	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₆	474.259 4	474.259 8	-0.9	457.243 5, 264.088 7, 222.111 1, 165.053 3
5	<i>N</i> ₁ , <i>N</i> ₅ -bis(caffeoyl)spermidine ^[9]	C ₂₅ H ₃₁ N ₃ O ₆	470.228 0	470.228 6	-1.2	453.020 6, 162.053 7
6	枸杞素 A ^[9, 17]	C ₄₂ H ₅₁ N ₉ O ₁₂	874.543 2	874.376 4	1.6	856.365 7, 787.343 5, 666.311 4, 486.198 6, 468.222 8, 442.202 5, 389.181 4, 136.074 4
7	<i>N</i> ₅ -caffeoyl- <i>N</i> ₁₀ -dihydrocaffeoylspermidine ^[9]	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₆	472.243 1	472.244 2	-2.7	455.217 5, 310.211 8, 220.195 5, 163.037 8
8	<i>N</i> ₅ -dihydrocaffeoyl- <i>N</i> ₁₀ -caffeoylspermidine ^[9]	C ₂₅ H ₃₃ N ₃ O ₆	472.243 5	472.244 2	-1.5	455.219 3, 336.189 8, 310.211 2, 220.095 2, 163.037 4
9	<i>N</i> ₁ , <i>N</i> ₅ , <i>N</i> ₁₀ -tri(dihydrocaffeoyl)spermine ^[9]	C ₃₇ H ₅₀ N ₄ O ₉	695.364 6	695.365 0	-0.6	531.317 7, 367.269 6, 293.184 7, 266.161 6, 222.111 0

注: ¹⁾经对照品比对鉴定的化合物

地骨皮 N3、N8、N9、N13 与枸杞地骨皮 G11 没有差异, 剩余 4 批宁夏枸杞地骨皮 N4、N5、N7、N12 归为一类。从组间差异来看, G1~G5 同为河南新密产地地骨皮聚为一类, G10、G12~G14 为山西运城产地地骨皮聚为一类, N4、N5、N7 为山西襄汾产地地骨皮聚为一类。该结果说明 2 个基原地骨皮化学组成接近, 地骨皮药材受产地影响可能较基原影响大。

2.3.3 主成分分析(PCA) 将上述 19 个色谱峰的峰面积值导入 SIMCA 13.0 软件, 数据采用无监督模式识别法 PCA 进行分析(采用软件默认模式 UV), 分别从基原和产地 2 个角度对 30 批地骨皮化学轮廓进行颜色区分显示和分析, 生成按基原显示的地骨皮药材 PCA 得分图及按产地显示的 PCA 得分图, 见增强出版附加材料。结果基原得分图显示, 不同基原地骨皮聚集在一起, 仅有少数样本较为分散; 产地得分图显示, 偏离整体的样本来源于山西和宁夏, 其中偏离整体的枸杞地骨皮 G10~G14 来源于山西运城, 5 批宁夏枸杞地骨皮中 4 批 N3~N5、N7 来源于山西襄汾。产地得分图分析结果表明, 来源于山西运城和山西襄汾这 2 个产地的地骨皮与其余产地样本有一定的差异性, 而来源于宁夏吴忠的 1 批宁夏枸杞地骨皮 N12 由于 *N*₁, *N*₅-bis(dihydrocaffeoyl)spermidine 或 *N*₅, *N*₁₀-bis(dihydrocaffeoyl)spermidine 成分含量高, 故未与其同产地样品聚集。综合来看, 可以推断引起两类地骨皮差异的主要因素为产地而非基原。

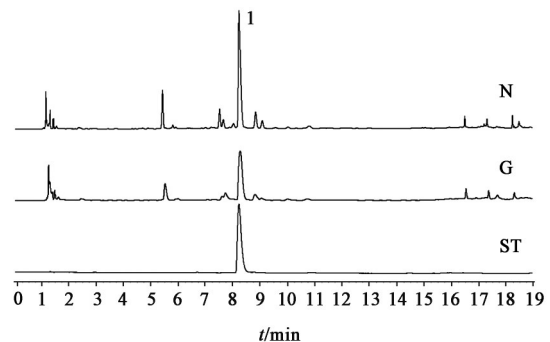
2.4 指标成分的含量测定

2.4.1 对照品溶液的制备 取地骨皮乙素对照品

适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度为 2.0 g·L⁻¹ 的溶液, 作为对照品储备液。

2.4.2 供试品溶液的制备 精密称取地骨皮粉末(过三号筛)0.2 g, 置 50 mL 离心管中, 加 50% 甲醇-0.5% 乙酸(1:1)混合液 7 mL, 超声提取 30 min, 离心, 取上清液转移于 25 mL 量瓶中; 离心管中的药材粉末加 50% 甲醇-0.5% 乙酸(1:1)混合液 7 mL 超声提取 30 min, 合并 2 次提取液。经过 2 次超声后的残渣用过量(5~10 mL)50% 甲醇-0.5% 乙酸(1:1)混合液洗涤, 静置 3 min 取上清液, 将上清液与提取液合并, 加 50% 甲醇-0.5% 乙酸(1:1)混合液稀释至刻度, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得^[15]。

2.4.3 色谱条件 除了流动相为乙腈(A)-0.15% 三氟乙酸水溶液(B)外, 其余条件同 2.2.2 项下。见图 3。



注: ST. 对照品; G. 枸杞地骨皮; N. 宁夏枸杞地骨皮; 1. 地骨皮乙素

图3 地骨皮的UPLC

Fig. 3 UPLC of Lycii Cortex

2.4.4 方法学考察 精密吸取 2.4.1 项下对照品储备液适量,加甲醇稀释成质量浓度分别为 1.8、1.5、1.2、0.9、0.6、0.3、0.1 g·L⁻¹ 的对照品溶液,按 2.4.3 项下色谱条件测定,以峰面积为纵坐标、质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,得到地骨皮乙素的回归方程 $Y=194.95X-4.9471$ ($r=0.9997$),线性范围 0.1~1.8 g·L⁻¹。精密吸取样品 G7 的供试品溶液适量,按 2.4.3 项下色谱条件连续进样 6 次,计算地骨皮乙素峰面积的 RSD 0.2%,表明仪器精密度良好。取样品 G7 的供试品溶液适量,放置 0、2、4、8、12、24 h 后按 2.4.3 项下色谱条件测定,计算地骨皮乙素峰面积的 RSD 0.7%,说明供试品溶液在 24 h 内有较好的稳定性。取样品 G7 粉末 6 份,按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.3 项下色谱条件测定,计算地骨皮乙素平均质量分数 4.57%,RSD 0.2%,表明该方法重复性良好。取已知地骨皮乙素含量的样品 G7 粉末,精密称定,平行 6 份,加入等量对照品,按 2.4.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.4.3 项下色谱条件测定,计算加样回收率,见表 4。结果平均加样回收率 100.63%,RSD 1.6%,说明该方法准确可靠。

表 4 地骨皮中地骨皮乙素含量测定的加样回收试验

Table 4 Recovery test for determination of kukoamine B in Lycii Cortex

称样量/g	样品中量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均值/%	RSD/%
0.100 12	4.57	9.10	100.66	100.63	1.6
0.100 11	4.57	9.05	99.55		
0.100 09	4.57	8.98	98.00		
0.100 31	4.58	9.20	102.66		
0.100 22	4.58	9.15	101.55		
0.100 13	4.57	9.13	101.33		

注:对照品加入量均为 4.50 mg

2.4.5 样品测定 分别精密吸取 30 批地骨皮样品的供试品溶液,按 2.4.3 项下色谱条件测定,计算地骨皮乙素含量,见表 1。结果发现地骨皮乙素在样品 G1~G15、N1~N15 的质量分数范围分别为 1.22%~8.18%、2.52%~12.24%。地骨皮乙素含量变化幅度虽然较大,但地骨皮乙素含量在 2 种基原样品中的差异并无统计学意义。

3 讨论与总结

3.1 基原分析 枸杞的应用历史悠久,其根皮入药最早记载于 2 000 余年前的《五十二病方》中,其曰:“取杞本长尺,大如指,削,春木臼中,煮以酒。”杞本即是地骨皮^[18]。自 1985 年版《中国药典》开始,枸杞

子的来源虽只有宁夏枸杞 1 种,但地骨皮的来源却改为宁夏枸杞和枸杞的干燥根皮,将宁夏枸杞根皮作为地骨皮收载可能是受枸杞来源的影响。枸杞 *L. chinense* 和宁夏枸杞 *L. barbarum* 是茄科枸杞属项下的不同种,两者又各自有不同的变种,枸杞的变种为北方枸杞,宁夏枸杞的变种为黄果枸杞^[19]。中国枸杞属可供药用的枸杞种类有 6 种 2 变种,分别为宁夏枸杞、枸杞、新疆枸杞、黑果枸杞、截萼枸杞、云南枸杞、黄果枸杞和北方枸杞。其中,枸杞和宁夏枸杞是我国传统医药中最广泛利用的 2 个种^[20]。虽然两者属于枸杞属下不同种,但两者的根皮在形态上却较难区分,目前尚未发现区分两者根皮的性状鉴别方法。本研究采用 DNA 条形码鉴别方法,确保了该研究选取的地骨皮均属于 2020 年版《中国药典》规定品种,不同地骨皮基原分类可靠。

3.2 化学轮廓分析 关于地骨皮的已有化学成分研究多以枸杞地骨皮为主,枸杞地骨皮含有生物碱、有机酸、蒽醌、黄酮等化合物^[21]。宁夏枸杞地骨皮化学成分同样包括生物碱、有机酸、苷类、黄酮、苯丙素等^[11,22-23]。以上化学成分均有紫外吸收,因此液相-紫外指纹图谱分析是显示地骨皮化学轮廓的有效且实用的分析方法。在地骨皮所含化学成分中,酰胺类成分是地骨皮的特征成分,具有广泛的生理活性及潜在的治疗作用。本研究建立的指纹图谱中检测到的枸杞地骨皮与宁夏枸杞地骨皮的共有峰均为酰胺类成分,且在其他波长下未检出多余的色谱峰。在 UPLC 分析方法优化过程中,分别考察了不同流动相系统(0.15% 甲酸-甲醇、0.15% 磷酸-甲醇、0.15% 三氟乙酸-甲醇、0.1% 甲酸-乙腈、0.15% 三氟乙酸-乙腈)、不同梯度洗脱程序、不同流速(0.2、0.3、0.4 mL·min⁻¹),根据峰形及色谱峰分离效果,最终确定选用本研究中所用条件,该方法能在 18 min 内对地骨皮进行指纹图谱分析。因此,说明本文建立的指纹图谱方法能反映地骨皮的整体化学轮廓,显示的酰胺类成分特征峰对评价地骨皮的质量具有代表性。通过指纹图谱相似度分析,两类基原地骨皮指纹图谱相似度可达 0.9 以上。刘伟等^[24]在研究野生与栽培的地骨皮药材时,采收了枸杞和宁夏枸杞 2 种基原的地骨皮,从指纹图谱可以看出两者主要化学成分种类一致。本研究不仅通过聚类分析和 PCA 得到 2 种基原地骨皮的化学轮廓基本一致,还从地骨皮特有酰胺类成分对 2 类基原进行了相似性分析。

3.3 含量测定 地骨皮的主要活性成分是生物碱

类化合物,且以地骨皮乙素为主^[25]。地骨皮乙素作为地骨皮主要活性成分之一,具有抑菌、抗炎、降血压、降血糖等药理作用^[26],有望成为地骨皮质量控制的标志物,故本研究主要测定了2个基原样品中地骨皮乙素的含量。结果发现枸杞地骨皮和宁夏枸杞地骨皮中地骨皮乙素的含量波动较大,不同产地样品中地骨皮乙素含量差异明显,但2个基原样品之间差异不明显,说明地骨皮乙素的含量受产地影响较大,而与基原无直接关系。赵晓玲等^[25]研究发现2个基原的地骨皮中地骨皮乙素含量差异不具有统计学意义。该结果与本文研究结果一致,均表明不同基原地骨皮中地骨皮乙素含量无明显差异。

3.4 总结 药材基原是经典名方开发的关键之一,药材的使用在“遵古”的同时又不可避免地会受到市场需求的影响。由于地骨皮市场基原混淆,且外观鉴定困难、基原鉴定繁琐,故研究宁夏枸杞的根皮能否替代枸杞的根皮具有重要意义,以利于含地骨皮经典名方的开发。本研究从特有化学组成和含量两方面比较了2种基原的地骨皮,可为经典名方中地骨皮的基原选择提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[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,2020:128-129.

[2] 陈靖枝,卢星,胡运琪,等. 传统中药地骨皮化学成分和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志,2021,46(12):3066-3075.

[3] 袁媛. 中药地骨皮化学成分、含量测定及药理活性研究进展[J]. 中医药临床杂志,2018,30(11):2131-2134.

[4] 宁娜,韩建军. 地骨皮的化学成分与药理作用[J]. 现代药物与临床,2010,25(3):172-176.

[5] PARK E, JIN H S, CHO D Y, et al. The effect of *Lycii Radicis Cortex* extract on bone formation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Molecules*, 2014, 19(12):19594-19609.

[6] 国家中医药管理局. 关于发布《古代经典名方目录(第一批)》的通知[EB/OL]. (2018-04-16)[2021-03-08]. <http://kjs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2018-04-16/7107.html>.

[7] 李新蕊,司明东,温子帅,等. 地骨皮的基原产地变迁及采收加工的本草考证[J]. 中国现代中药,2020,22(6):948-954.

[8] 赵佳琛,金艳,闫亚美,等. 经典名方中枸杞及地骨皮的本草考证[J]. 中国现代中药,2020,22(8):1269-1286.

[9] 陈晓鹤,苏磊,蒋丽娟,等. 基于UPLC-LTQ-Orbitrap高分辨质谱的地骨皮化学成分分析[J]. 中国中药杂

志,2019,44(20):4486-4494.

[10] 张久旭,王晶娟. 枸杞化学成分研究进展[C]//中国商品学会. 中国商品学会第五届全国中药商品学术大会论文集,2017年卷. 哈尔滨:中国商品学会,2017:6.

[11] 兰婷. 宁夏枸杞根和茎部化学成分研究[D]. 广州:暨南大学,2019.

[12] 赵晓玲. 中药材地骨皮的质量评价方法研究[D]. 北京:北京协和医学院,2013.

[13] 罗凌龙,张弛,邓博,等. 基于DNA条形码技术的俄罗斯特色药用植物资源调查[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(2):175-180.

[14] 张景景,祁晓婷,张超,等. ITS2序列鉴定大蓟、小蓟药材及其近缘混伪品[J]. 世界中医药,2016,11(10):2126-2129.

[15] 香港特别行政区政府卫生署中医药事务部. 香港中药材标准:第六册[M]. 香港:香港特别行政区政府卫生署,2013:523-533.

[16] NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem compound summary for CID 44317653[EB/OL]. (2009-11-19)[2022-03-08]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44317653>.

[17] 张静娴. 中药地骨皮的化学成分与质量控制方法研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2013.

[18] 李玉丽,蒋屏,杨恬,等. 地骨皮的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(5):192-201.

[19] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:第67卷[M]. 北京:科学出版社,1978:53,55-56.

[20] 姚霞. 中国枸杞属植物不同种质资源的研究及紫花地丁的化学成分研究[D]. 北京:中国协和医科大学,2010.

[21] 徐鹤然,赵乐,张晓娜,等. 地骨皮化学成分及其生物学功效研究进展[J]. 日用化学工业,2021,51(5):450-456,467.

[22] 江志波,陈靖枝,田小霞,等. 宁夏枸杞根皮的化学成分研究[J]. 中药材,2021,44(2):350-354.

[23] 兰婷,黄远鹏,梁秋萍,等. 宁夏枸杞根和茎的化学成分及抗炎活性研究[J]. 天然产物研究与开发,2019,31(9):1491-1497.

[24] 刘伟,郭蕾,崔永霞,等. 野生与栽培地骨皮药材HPLC指纹图谱的研究[J]. 中成药,2010,32(12):2032-2035.

[25] 赵晓玲,张鑫瑶,何春年,等. 不同来源地骨皮药材中地骨皮甲素和乙素及阿魏酸的含量测定分析[J]. 中国药业,2014,23(12):58-61.

[26] 马天宇,王磊,金铃,等. 地骨皮化学成分及生物活性研究[J]. 中国果菜,2018,38(5):9-13.

[责任编辑 刘德文]