

# 何首乌配方颗粒的 UPLC 指纹图谱及化学成分归属

胥爱丽<sup>1</sup>, 董玉娟<sup>2</sup>, 江洁怡<sup>1</sup>, 李素梅<sup>1</sup>, 李养学<sup>1</sup>, 陈昭<sup>1</sup>

(1. 广东省中医药工程技术研究院 广东省中医药研究开发重点实验室, 广州 510095;  
2. 广州中医药大学, 广州 510405)

**[摘要]** **目的:**建立何首乌配方颗粒的 UPLC 指纹图谱,并对其主要的共有峰进行成分归属,为配方颗粒的快速质量评价提供方法。**方法:**采用超高效液相色谱法,以 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> RRHD (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 为色谱柱,流动相乙腈-水梯度洗脱,检测波长 254 nm,流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,同时采用飞行时间质谱法对指纹图谱中的主要化学成分进行归属。**结果:**建立了何首乌配方颗粒的 UPLC 指纹图谱,确定了 12 个共有峰,并对其中 5 个共有峰进行了指认,各何首乌配方颗粒样品指纹图谱与对照指纹图谱相似度均 > 0.9。**结论:**该方法简单、准确、快速、重复性好,能有效地对何首乌配方颗粒的质量进行快速评价。

**[关键词]** 何首乌配方颗粒; 超高效液相色谱; 指纹图谱; 成分归属

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0047-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020047

## UPLC Fingerprint Analysis and Chemical Compounds Identification of Polygoni Multiflori Radix Formula Granules

XU Ai-li<sup>1</sup>, DONG Yu-juan<sup>2</sup>, JIANG Jie-yi<sup>1</sup>, LI Su-mei<sup>1</sup>, LI Yang-xue<sup>1</sup>, CHEN Zhao<sup>1</sup>

(1. Guangdong Province Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine (TCM) Guangdong Provincial Key Laboratory of Research and Development in TCM, Guangzhou 510095, China;  
2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method of fingerprint analysis on Polygoni Multiflori Radix formula granules by UPLC, identify the main chemical compounds, and provide a scientific method for rapid quality evaluation of Polygoni Multiflori Radix formula granules. **Method:** Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) was used on the Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> RRHD (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), with acetonitrile-water as the mobile phase for gradient elution. The detective wavelength was set at 254 nm; the flow rate was 0.4 mL·min<sup>-1</sup> and the column temperature was maintained at 30 °C. Meanwhile, time of flight mass spectroscopy was used to analyze the main chemical compounds in fingerprints. **Result:** UPLC fingerprints were developed for Polygoni Multiflori Radix formula granules. 12 common peaks were determined, and 5 of them were identified. The similarity was higher than 0.9 between the fingerprints of the different samples of Polygoni Multiflori Radix formula granules and the control fingerprints. **Conclusion:** The method with good reproducibility is simple, rapid and accurate, which can be used to rapidly and effectively evaluate the quality of Polygoni Multiflori Radix formula granules.

**[Key words]** Polygoni Multiflori Radix formula granules; UPLC; fingerprints; compounds identification

**[收稿日期]** 20150112(013)

**[基金项目]** 广东省中医药局科研项目(20132078);广东省教育部科技部产学研结合项目(2012B091100183);广东省科学技术厅项目(2012A030100017);佛山市科技创新专项资金(2013GQ100032)

**[第一作者]** 胥爱丽, 硕士, 主管中药师, 从事中药质量评价研究, Tel:020-83482098, E-mail:xal555@163.com

何首乌具有解毒,消痈,截疟,润肠通便之功效。可用于治疗疮痈,瘰疬,风疹瘙痒,久疟体虚,肠燥便秘等<sup>[1]</sup>。何首乌配方颗粒为何首乌饮片经提取、浓缩、干燥、制粒等工序制成的新型饮片。何首乌主要含二苯乙烯苷类化合物、蒽醌类化合物及聚合原花青素<sup>[2-3]</sup> 3 类有效成分。目前对何首乌的指纹图谱研究主要有薄层色谱法<sup>[4]</sup>和高效液相色谱法<sup>[5]</sup>,但研究并未对其色谱峰进行指认。薄层色谱法操作简便,快速,但灵敏度低,专属性不强,高效液相色谱法灵敏度和分辨率高,但耗时稍长。近年来推出的一种新的液相色谱技术——超高效液相色谱(UPLC)法,其分析效率、灵敏度和分辨率比常规 HPLC 有了很大提高,且大大缩短分析时间,减少溶剂消耗,可弥补薄层色谱与高效液相色谱的不足。本文建立了何首乌配方颗粒的 UPLC 指纹图谱,并采用四级杆-飞行时间质谱(Q-TOF-MS)技术,结合参考文献对其主要色谱峰进行了指认,为何首乌配方颗粒的质量评价提供快速、准确、简便的科学方法。

## 1 材料

**1.1 仪器** 1290 系列液相色谱仪(在线脱气机,二元泵,高性能自动进样器和 DAD 检测器,美国 Agilent), Technologies 6540 UHD Accurate-Mass Q-TOF-LC-MS 质谱仪(Mass Hunter workstation Data Acquisition 工作站和 Mass Hunter Qualitative Analysis Software B. 06.00 质谱分析软件,美国 Agilent), KQ5200DE 型数控超声波清洗器(昆山仪器生产有限公司),XS205DU 型电子天平(瑞士 Mettler)。

**1.2 试药** 10 批何首乌配方颗粒由广东一方制药有限公司提供(S1~S10,批号分别为 1301245, 1101129, 1209007, 1101327, 1303080, 1201079, 1204783, 1107313, 1204192, 1108135)。乙腈为色谱纯,水为屈臣氏蒸馏水,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> RRHD 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~6 min, 5%~35% A; 6~12 min, 35%~95% A),检测波长 254 nm,流速 0.4 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 25 °C,进样体积 1 μL。

**2.2 供试品溶液的制备** 取何首乌配方颗粒约 0.6 g,研细,加入乙醇 25 mL,超声处理(功率 720 W,频率 50 kHz) 30 min,放冷,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 重复性试验** 取同一批号样品(1301245),

分别精密称取 6 份,按照 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别进样,以 5 号峰为参照峰,计算出 1~12 号共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3%,同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99,表明方法重复性良好。

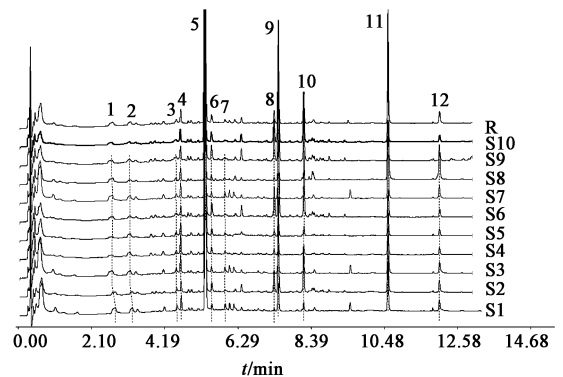
**2.3.2 精密度试验** 取重复性试验中同一供试品溶液,连续进样 5 次,以 5 号峰为参照峰,计算出 1~12 号共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 均 < 3%,同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99,表明仪器稳定,精密度良好。

**2.3.3 稳定性试验** 取重复性试验中同一供试品溶液,分别在 0, 4, 8, 12, 24 h 进样,以 5 号峰为参照峰,计算 1~12 号共有指纹峰的相对保留时间和相对峰面积, RSD 均 < 3%,同时用相似度评价软件计算各色谱指纹图谱的相似度均 > 0.99,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.4 指纹图谱的建立** 精密吸取 2.2 项下制备的供试品溶液各 1 μL,注入高效液相色谱仪,得到 10 批何首乌配方颗粒 UPLC 指纹图谱,将其导入国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2004 A 版),进行色谱峰匹配,匹配结果及所得对照指纹图谱见图 1。确定何首乌配方颗粒指纹图谱具有 12 个共有峰。10 批何首乌配方颗粒与对照指纹图谱相似度计算结果分别为 0.997, 0.996, 0.997, 0.992, 0.992, 0.993, 0.997, 0.897, 0.993, 0.993。根据相似度结果,暂定何首乌配方颗粒的 UPLC 指纹图谱与对照指纹图谱经比较其相似度不得低于 0.85。

### 2.5 UPLC-Q-TOF-MS 推测何首乌配方颗粒的化学成分

**2.5.1 质谱条件** 电喷雾负离子模式,质量扫描范



R. 对照指纹图谱; S1~S10. 10 批何首乌配方颗粒供试品

图 1 10 批何首乌配方颗粒指纹谱

Fig. 1 HPLC fingerprint of 10 batches *Polygonum multiflorum* formula granules

围  $m/z$  50 ~ 1 000; 离子源参数为干燥气温度 280 °C, 干燥气流速 10 L·min<sup>-1</sup>, 雾化气压力 30 psi, 鞘流气温度 350 °C, 鞘流气流量 12 L·min<sup>-1</sup>, 毛细管电压 3 000 V, 碎片电压 125 V, 碰撞能量 15 ~ 30 V, 离子能量 1 V, 每 0.2 S 采集 1 次图谱; 选择参比校准液甲酸盐加合物 (商品名 HP0921, 相对分子质量  $m/z$  966, C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>O<sub>8</sub>N<sub>3</sub>P<sub>3</sub>F<sub>24</sub>) 做实时质量数校正。

**2.5.2 何首乌配方颗粒主要化合物的鉴定** 在优化的色谱及质谱条件下, 对何首乌配方颗粒指纹图谱中主要的 5, 8, 9, 10, 11 号色谱峰进行了二级质谱

研究, 应用 MassHunter Qualitative Analysis software 软件对质谱图进行分子特征提取 (MFE) 分析, 得到化合物准分子离子峰的精确相对分子质量, 用分子生成器 (MFG) 计算得到可能的元素组成。将可能的元素组成与高分辨相对分子质量输入质谱数据库中查找有关的化学成分结构, 结合化合物的保留时间、裂解碎片信息以及参考文献 [6-7] 的数据进行综合分析, 初步推断何首乌配方颗粒中所含的主要化学成分。5 个化合物的准确相对分子质量、质谱数据、推测结果等见表 2, 图 2 ~ 6。

表 2 何首乌配方颗粒化学成分的 UPLC-PDA-TOF-MS 分析

Table 2 UPLC-PDA-TOF-MS analyze of *Polygonum multiflorum* formula granules

峰号	分子式	相对分子量 ( $m/z$ )	MS/MS 碎片离子信息	鉴定结果
5	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	405.121 2 [M - H] <sup>-</sup>	243 [M - H - glc] <sup>-</sup>	二苯乙烯苷
8	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	407.135 0 [M - H] <sup>-</sup>	245 [M - H - glc] <sup>-</sup>	决明柯酮-8-O-β-葡萄糖苷
9	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	431.100 0 [M - H] <sup>-</sup>	269 [M - H - glc] <sup>-</sup>	大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷
10	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	445.114 1 [M - H] <sup>-</sup>	240 [M - H - glc - CH <sub>3</sub> - CO] <sup>-</sup> , 283 [M - H - glc] <sup>-</sup>	大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷
11	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	269.046 8 [M - H] <sup>-</sup>	225 [M - H - CO <sub>2</sub> ] <sup>-</sup> , 241 [M - H - CO] <sup>-</sup>	大黄素

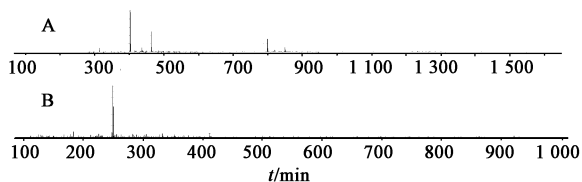


图 2 5<sup>#</sup>峰一级扫描 (A) 二级扫描 (B) 质谱

Fig. 2 5<sup>#</sup> peak MS spectrum

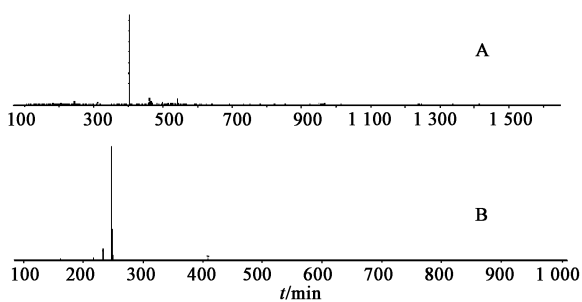


图 3 8<sup>#</sup>峰一级扫描 (A) 二级扫描 (B) 质谱峰

Fig. 3 8<sup>#</sup> peak MS spectrum

### 3 讨论

目前文献有关何首乌的 HPLC 指纹图谱方法 [8], 分析时间需要 60 min, 本文采用 UPLC 建立的何首乌配方颗粒的指纹图谱方法, 分析时间只需要 12 min, 大大减少了分析时间, 节省了试剂, 提高了工作效率。通过相似度软件计算得到 10 批何首乌配方颗粒的对照图谱及各批样品与对照图谱之间的相似度, 结果除批号为 1107313 的样品相似度为

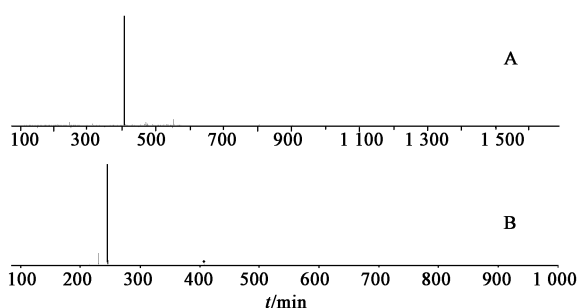


图 4 9<sup>#</sup>峰一级扫描 (A) 二级扫描 (B) 质谱峰

Fig. 4 9<sup>#</sup> peak MS spectrum

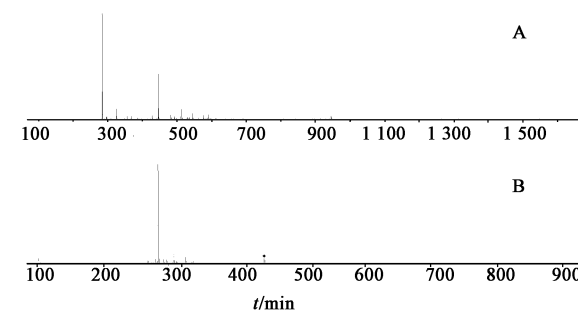


图 5 10<sup>#</sup>峰一级扫描 (A) 二级扫描 (B) 质谱峰

Fig. 5 10<sup>#</sup> peak MS spectrum

0.897 以外, 其余样品均 > 0.9, 表明各批次样品之间相关性较好。为中药配方颗粒的快速质量控制提供了科学的方法。

利用四级杆-飞行时间质谱技术采集何首乌配

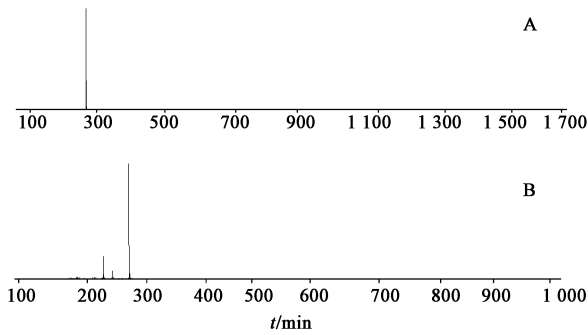


图6 11<sup>#</sup>峰一级扫描(A)二级扫描(B)质谱峰  
Fig.6 11<sup>#</sup>peak MS spectrum

方颗粒指纹图谱中主要共有峰的二级质谱数据,通过参考相关文献、结合数据库匹配和二级质谱信息,对何首乌配方颗粒的化学成分进行了推测,在缺乏对照品的情况下,实现了对其主要色谱峰的快速指认,结果共鉴定出5个主要化学成分,分别为二苯乙烯苷、决明子-8-O-β-葡萄糖苷、大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷和大黄素。何首乌药材主要含有二苯乙烯苷及蒽醌类成分,试验结果表明该成分在其配方颗粒中得以保留。

本研究对何首乌配方颗粒指纹图谱中的主要化学成分进行了归属,使何首乌配方颗粒指纹图谱的特征性更强,为其质量控制研究提供了更快速、简便、有效的方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:179.

[2] 陈庆堂,卓丽红,徐文,等. 何首乌炮制过程中5种化学成分的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):66-71.

[3] 罗瑞芝,贾伟,赵利斌,等. 何首乌研究进展[J]. 中草药,2005,36(7):1097-1100.

[4] 高晓霞,严寒静,梁从庆. 不同采集地制何首乌薄层色谱指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(5):4-7.

[5] 金嘉文,陈有军,刘梅,等. 何首乌与制何首乌补血作用及HPLC指纹图谱的比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(8):206-209.

[6] Yang Z, Chun P K, Yuan S C, et al. Quality assessment on *Polygoni Multiflori Caulis* using HPLC/UV/MS combined with principle component analysis[J]. Chem Cent J,2013, 7(1):106.

[7] Liu Z L, Liu Y Y, Wang C, et al. Comparative analyses of chromatographic fingerprints of the roots of *Polygonum multiflorum* Thunb. and their processed products using RRLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> [J]. Planta Med, 2011, 77(16): 1855-1860.

[8] 房志坚,周洪波,杨立伟,等. 何首乌的HPLC指纹图谱[J]. 华西药理学杂志,2008,23(5):513-515.

[责任编辑 顾雪竹]