

2 种颜色拳参饮片 HPLC-MS 指纹图谱比较研究

董捷鸣, 崔健, 赵小梅, 赵奎君, 张萍*

(首都医科大学附属北京友谊医院, 北京 100050)

摘要 目的: 商品拳参饮片有紫红色和棕红色 2 种颜色, 建立拳参饮片 HPLC-MS 指纹图谱, 以了解 2 种不同颜色的拳参饮片中除绿原酸及没食子酸外, 所含其他成分是否异同。方法: 采用 Inertsil ODS-SP C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为 1% 甲酸水溶液 (A)-1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 检测波长 290 nm, 柱温 40 °C; 利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》软件处理分析及多元统计等方法分析, 采用高分辨质谱 (离子源电离模式: ESI[±]; 加热块温度: 200 °C; 雾化器流量: N₂, 1.5 L · min⁻¹) 对部分共有峰进行鉴定。结果: 对 2 种颜色拳参饮片的指纹图谱进行评价, 确定了 15 个共有峰, 指出其中 5 个峰分别对应为山柰酚、24(E)-亚乙基环木菠萝烷酮-3α-醇、原儿茶酸、绿原酸及没食子酸; 比较山柰酚、24(E)-亚乙基环木菠萝烷酮-3α-醇、原儿茶酸、绿原酸 4 个化学成分的色谱峰面积, 紫红色拳参饮片中 4 个成分色谱峰面积均大于棕红色饮片。结论: 本实验建立拳参饮片的 HPLC-MS 指纹图谱, 结果稳定可靠。紫红色与棕红色拳参饮片所含化学成分相似, 但主要成分含量存在明显差异。
关键词: 拳参; 紫红色拳参饮片; 棕红色拳参饮片; 山柰酚; 24(E)-亚乙基环木菠萝烷酮-3α-醇; 原儿茶酸; 绿原酸; 没食子酸; 中药材指纹图谱; 成分比较; 含量差异

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 08-1503-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.08.21

Comparative study on HPLC-MS fingerprint of Bistortae Rhizoma prepared slides in 2 different colors

DONG Jie-ming, CUI Jian, ZHAO Xiao-mei, ZHAO Kui-jun, ZHANG Ping*

(Beijing Friendship Hospital, Capital Medical, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To establish HPLC-MS fingerprints of amaranth and brownish red Bistortae Rhizoma prepared slides and to compare their chemical components including chlorogenic acid and gallic acid. **Methods:** The separation was carried out on a Inertsil ODS-SP C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column with a mobile phase consisting of acetonitrile-water (containing 1% formic acid) with gradient elution. The flow rate was 0.8 mL · min⁻¹, and the detection wavelength was 290 nm. The column temperature was 40 °C. The chromatograms were processed by "Chinese Traditional Medicine Chromatographic Fingerprint Similarity Evaluation System Edition A" and multiple statistical analysis. Part of the common peaks were identified by high resolution mass spectrum

* 通信作者 Tel: (010) 63138521; E-mail: zhangping8521@163.com

第一作者 董捷鸣 Tel: (010) 63138562; E-mail: dongjieming5428@sina.com

崔健 Tel: 15601093065; E-mail: cuijian64@139.com

(ionization method: ESI $\pm$; heat-block temperature: 200 °C; nebulizing gas: N₂, 1.5 L·min⁻¹). **Results:** The fingerprints of 2 colors of Bistortae Rhizoma prepared slides were evaluated. 15 common peaks were chosen including kaempferol, protocatechuic acid, 24(*E*)-ethylidene cycloartane keto-3 α -alcohol, chlorogenic acid and gallic acid. The peak areas of kaempferol, protocatechuic acid, 24(*E*)-ethylidene cycloartane keto-3 α -alcohol and chlorogenic acid of amaranth slides were bigger than those of brownish red slides. **Conclusion:** HPLC-MS fingerprint of Bistortae Rhizoma prepared slides was established, and the results were stable. The chemical compositions of the slides in 2 colors were similar, but there were significant differences in major chemical compositions between the amaranth and brown slides.

Keywords: Bistortae Rhizoma; amaranth Bistortae Rhizoma prepared slides; brownish red Bistortae Rhizoma prepared slides; kaempferol; 24(*E*)-ethylidene cycloartane keto-3 α -alcohol; protocatechuic acid; chlorogenic acid; gallic acid; Chinese drug fingerprint; component comparison; content difference.

拳参为蓼科植物拳参 *Polygonum bistorta* L. 的干燥根茎,具有清热解毒、消肿、止血之功效,主治赤痢热泻,肺热咳嗽,痈肿瘰癧,口舌生疮,血热吐衄,痔疮出血,蛇虫咬伤^[1]。近年研究表明,拳参具有抗炎^[2-3]、镇痛^[4]、中枢抑制^[5]、心肌保护^[6]、免疫增强^[7]等作用。商品拳参中,同一批次的拳参饮片除切面呈棕红色或浅棕红色(与各版中国药典一部所述特征一致,以下简称棕红色)外,还常见切面呈淡紫红色至紫红色(以下简称紫红色)饮片,张萍等^[8]曾对紫红色与棕红色拳参饮片中绿原酸和没食子酸进行了含量测定;付杰超等^[9]采用 HPLC 法测定拳参不同炮制品中没食子酸和绿原酸含量,黄文平等^[10]采用 RP-HPLC 测定不同产地拳参药材中没食子酸和绿原酸含量,刘瑞等^[11]采用反相高效液相色谱法测定拳参药材中没食子酸和绿原酸含量。拳参含绿原酸、没食子酸、鞣质、丁二酸、槲皮素、槲皮素-5-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、原儿茶酸、丁香苷、儿茶素、芦丁等多种化学成分^[12-16],而 2 种颜色的拳参饮片中除均含有绿原酸、没食子酸外,所含其他成分是否有差异,目前尚未见相关研究报道。本研究建立了拳参的 HPLC-MS 指纹图谱,对 4 个产地 10 批次紫红色与棕红色拳参饮片共 20 份样品进行指纹图谱分析,并采用高分辨质谱指认其成分,结合代谢组学的多元统计方法,系统分析比较 2 种不同颜色拳参饮片中的化学成分。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津公司 LCMS-IT-TOF 高效液质联用色谱仪;岛津公司 LCMSsolution 工作站;岛津公司 Inertsil ODS-SP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μ m; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶);Solarbio 公司 0.22 μ m 微孔滤膜;

Sartorius 公司 BSA224S-CW 微量分析天平($d=0.1$ mg);昆山市超声仪器有限公司 KQ5200E 型超声仪。

1.2 试剂

乙腈、甲酸均为色谱级,试验用水为娃哈哈纯净水。

对照品绿原酸(批号 327-97-9),成都普菲德生物技术有限公司;没食子酸(批号 ZGIQ-973B),中国食品药品检定研究院。

样品拳参饮片产地(见表 1),样品经首都医科大学附属北京友谊医院张萍主任药师鉴定,均为蓼科植物拳参 *Polygonum bistorta* L. 的干燥根茎。紫红色和棕红色饮片来自同一批号。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Inertsil ODS-SP C₁₈(4.6 mm×150 mm, 5 μ m) 色谱柱,流动相为 1% 甲酸水溶液(A)-1% 甲酸乙腈(B),洗脱梯度(0-8 min, 3%B; 8-10 min, 3%B→6%B; 10-15 min, 6%B→8%B; 15-20 min, 8%B→10%B; 20-28 min, 10%B→30%B; 28-30 min, 30%B→50%B; 30-45 min, 50%B→80%B; 45-70 min, 80%B→100%B),流速 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 290 nm,柱温 40 °C,进样量 8 μ L。

2.2 质谱条件

离子源检测模式:ESI $\pm$;离子源电压:4.5 kV+, 3.5 kV-;扫描范围: m/z 100~1 000;加热块温度:200 °C;雾化器流量:N₂, 1.5 L·min⁻¹;气体压力:N₂, 100 kPa;脱溶剂管温度:200 °C。

2.3 混合对照品溶液的制备

取绿原酸及没食子酸的对照品各 0.1 mg,精密称定,加 20% 乙醇制成质量浓度均为 0.1 mg·mL⁻¹ 的绿原酸和没食子酸的混合溶液,即得。

表 1 2 种颜色拳参饮片样品的产地和批号

Tab. 1 Habitats and lot numbers of Bistortae Rhizoma

prepared slides in 2 colors

样品编号 (sample No.)	产地 (habitat)	批号 (lot No.)	颜色 (color)
1	河北	13041403	紫红色 (amaranth)
2	(Hebei)		棕红色 (brownish red)
3	河北	13071702	紫红色 (amaranth)
4	(Hebei)		棕红色 (brownish red)
5	河北	14061601	紫红色 (amaranth)
6	(Hebei)		棕红色 (brownish red)
7	河北	140313	紫红色 (amaranth)
8	(Hebei)		棕红色 (brownish red)
9	山东	1401009	紫红色 (amaranth)
10	(Shandong)		棕红色 (brownish red)
11	山东	1407004	紫红色 (amaranth)
12	(Shandong)		棕红色 (brownish red)
13	山东	311051	紫红色 (amaranth)
14	(Shandong)		棕红色 (brownish red)
15	安徽	1407079	紫红色 (amaranth)
16	(Anhui)		棕红色 (brownish red)
17	湖北	109813101	紫红色 (amaranth)
18	(Hubei)		棕红色 (brownish red)
19	湖北	109814101	紫红色 (amaranth)
20	(Hubei)		棕红色 (brownish red)

2.4 供试品溶液的制备

取拳参样品粉末(过 40 目筛)约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加入 20% 乙醇 50 mL 静置,浸泡 12 h 后,超声处理(功率 200 W,频率 40 kHz)30 min,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,收集滤液,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度试验 取 3 号样品制备的供试品溶液,连续进样 5 次,记录色谱图;以绿原酸为指标求得其峰面积的 RSD 为 1.3%,表明仪器精密度良好。

2.5.2 稳定性试验 取 5 号样品制备的供试品溶液,分别在 0、2、4、6、24 h 进样,记录色谱图;以绿原酸为指标求得其峰面积的 RSD 为 2.7%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 取 6 号样品 5 份,按“2.4”项下方法制备成供试品溶液,分别进样并记录色谱图。结果显示,各主要成分色谱峰相对保留时间以及单峰面积占总峰面积 5% 以上峰面积比值均无明显变化, RSD 在 4.2% 以内,表明该方法重复性良好。

3 结果与分析

3.1 指纹图谱

取 1~20 号拳参饮片样品(表 1)按“2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,采用相似度分析软件对图谱进行分析。共生成 15 个共有指纹峰。

利用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统 A 版》软件,通过多点校正的方法,对 1~20 号拳参饮片样品进行匹配,生成参照峰 R(图 1),并计算各样品之间的相似度,各样品之间相似度均大于 0.844(表 2)。采用对照品对照的方法分别指认出没食子酸和绿原酸,对应的保留时间为 5.86 min 和 23.92 min(图 2)。

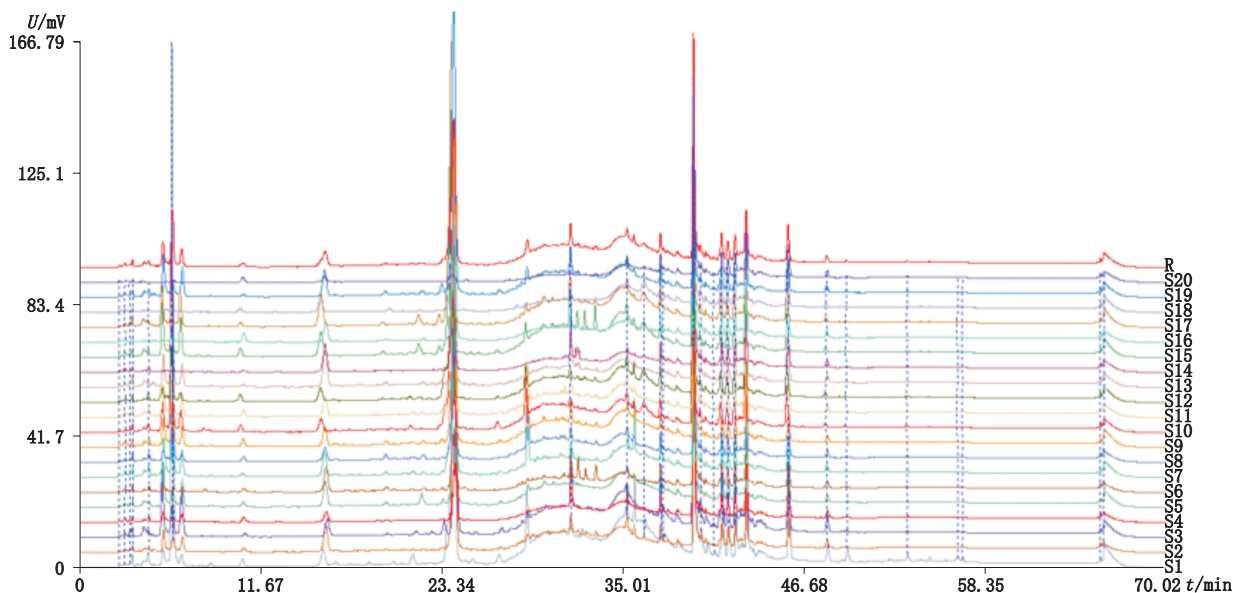


图 1 1~20 号拳参饮片样品指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of No.1~20 Bistortae Rhizoma prepared slides

表 2 1~20 号拳参饮片样品相似度分析结果

Tab. 2 Similarity of No.1~20 Bistortae Rhizoma prepared slides

样品编号 (sample No.)	相似度 (similarity)	样品编号 (sample No.)	相似度 (similarity)	样品编号 (sample No.)	相似度 (similarity)	样品编号 (sample No.)	相似度 (similarity)
1	0.853	6	0.858	11	0.872	16	0.885
2	0.859	7	0.916	12	0.858	17	0.887
3	0.844	8	0.913	13	0.863	18	0.858
4	0.849	9	0.888	14	0.882	19	0.846
5	0.876	10	0.869	15	0.856	20	0.857

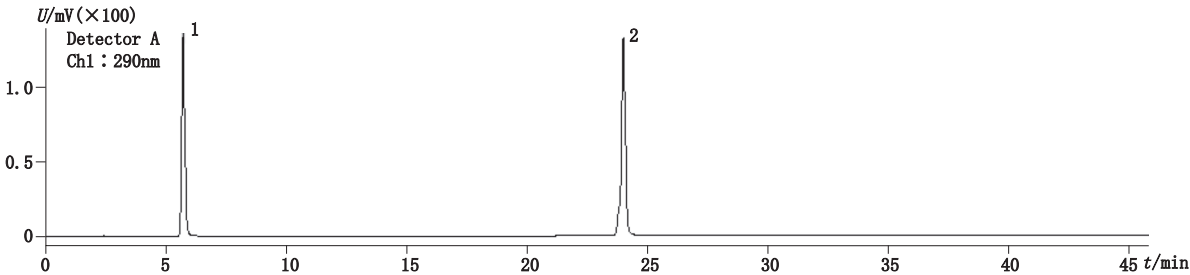


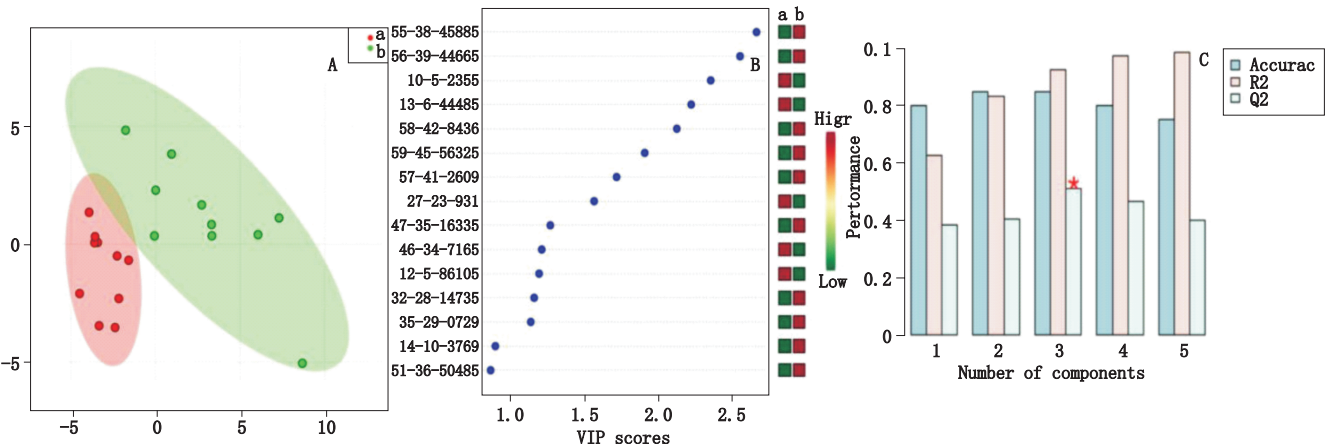
图 2 没食子酸(1)、绿原酸(2)混合对照品色谱图

Fig. 2 Chromatograms of mixed reference substances of gallic acid (1) and chlorogenic acid (2)

3.2 指纹图谱主成分分析

对 2 种不同颜色的拳参饮片进行主成分分析,使用 Metabo Analyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 网站对色谱图中 62 个色谱峰面积构成的数据矩阵 (62 × 20) 进行多元统计分析 (图 3)。由主成分分析 (PCA) 散点图可见,紫红色和棕红色拳参饮片分成了 2 组。由变量权重值结果可知,影响值大于 1.0 的化学成分

共有 13 种,由质谱可指出其中 4 个 (见表 3),分别为山柰酚、原儿茶酸、24 (E)- 亚乙基环木菠萝烷酮-3 α- 醇、绿原酸^[14],同时对这 4 种成分进行色谱峰面积比较,从图 4 中可以看出,紫红色拳参饮片中 4 个化学成分含量均大于棕红色饮片, $P < 0.05$,有统计学意义。模型有效性验证图得到的参数为 $R^2=0.924$, $Q^2=0.512$,说明主成分分析模型有效可用。



A. 主成分分析结果图 (results of principal component analysis) [红点 a 组: 紫红色拳参饮片 (amaranth Bistortae Rhizoma prepared slides); 绿点 b 组: 棕红色拳参饮片 (brownish red Bistortae Rhizoma prepared slides)] B. VIP 结果图 [result of VIP] C. 模型有效性验证图 (model validation diagram)

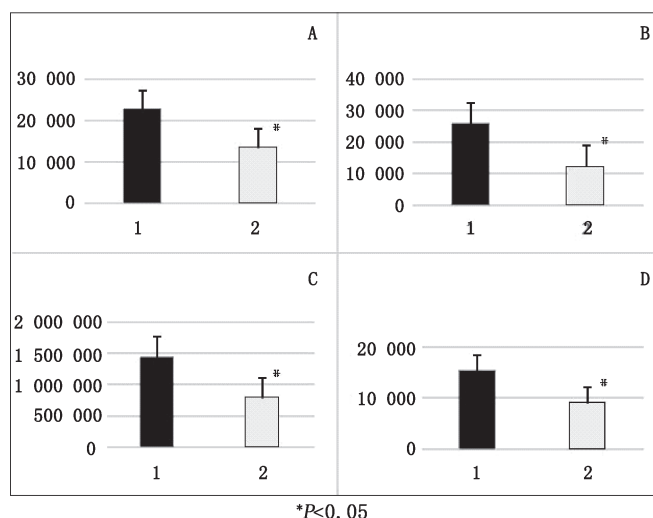
图 3 主成分分析结果图

Fig. 3 Results of principal component analysis

表 3 质谱化学成分鉴定

Tab. 3 Chemical constituents identification by MS

序号 (No.)	t_R /min	检测值 (detection value) [M+H] ⁺ /m/z	理论值 (theoretical value) [M+H] ⁺ /m/z	误差 (error) × 10 ⁻⁶	分子式 (molecular formula)	化合物鉴定 (chemical components identification)
1	18.91	155.033 1	155.033 9	5.16	C ₇ H ₆ O ₄	原儿茶酸 (protocatechuic acid)
2	33.23	454.416 3	454.417 9	3.52	C ₅₂ H ₆₄ O	24(E)-亚乙基环木菠萝烷酮-3α-醇 (24(E)-ethylidene cycloartane keto-3α-alcohol)
3	51.36	287.053 6	287.055	4.87	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	山柰酚 (kaempferol)
4	25.03	355.104 3	355.102 4	5.35	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸 (chlorogenic acid)



1. 紫红色拳参饮片 (amaranth Bistortae Rhizoma prepared slides) 2. 棕红色拳参饮片 (brownish red Bistortae Rhizoma prepared slides)

A. 山柰酚 (kaempferol) B. 原儿茶酸 (protocatechuic acid) C. 绿原酸 (chlorogenic acid) D. 24(E)-亚乙基环木菠萝烷酮-3α-醇 [24(E)-ethylidene cycloartane keto-3α-alcohol]

图 4 2 种颜色拳参饮片样品中 4 个成分色谱峰面积比较

Fig. 4 Peak area of 4 components in Bistortae Rhizoma prepared slides of 2 colors

4 讨论

4.1 提取溶剂及色谱条件的选择

提取溶剂参考文献[11]选取 20% 乙醇, 色谱条件选择时比较了甲醇-0.4% 醋酸水溶液及 1% 甲酸水溶液-1% 甲酸乙腈等度、梯度洗脱系统, 最终确定流动相为 1% 甲酸水溶液-1% 甲酸乙腈梯度洗脱方法效果最好。

4.2 2 种颜色拳参饮片指纹图谱分析及化学成分比较

本实验采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 版)对 1~20 号拳参饮片样品进行了相似度计算, 结果显示各样品之间的相似度均大于 0.844, 表明紫红色与棕红色拳参饮片主要成分的种类相似。使用 Metabo Analyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 网站对色谱图中 62 个色谱峰面积构成的数据矩阵

(62 × 20) 进行多元统计分析, PCA 散点图结果显示, 紫红色与棕红色饮片分为 2 组, 表明 2 种颜色拳参饮片主要成分的含量存在差异。

2 种颜色拳参饮片具有 15 个共有指纹峰, 其中由对照品指认绿原酸和没食子酸 2 个成分; 而由 VIP 分析结果可见, 影响值大于 1.0 的化学成分共有 13 种, 表明这 13 种化合物应是拳参主要成分。13 个成分经高分辨质谱指认出 4 个, 分别为山柰酚、24(E)-亚乙基环木菠萝烷酮-3α-醇、原儿茶酸、与绿原酸, 而在这 4 个成分的色谱峰面积进行比较, 紫红色拳参饮片的 4 个成分的含量均显著高于棕红色饮片 ($P < 0.05$), 其中紫红色拳参饮片中绿原酸含量高于棕红色饮片与文献[2]结果一致。

4.3 小结

综上所述, 2 种颜色拳参饮片所含化学成分相似, 但主要成分含量存在明显差异, 紫红色拳参饮片含量高于棕红色饮片。

参考文献

- [1] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 288
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 288
- [2] DUWIEJUA M, ZEITLIN IJ, WATERMAN PG, et al. Anti-inflammatory activity of *Polygonum bistorta*, *Guaiacum officinale* and *Hamamelis virginiana* in rats [J]. J Pharm Pharmacol, 1994, 46 (4): 286
- [3] DUWIEJUA M, ZEITLIN IJ, GRAY AI, et al. The anti-inflammatory compounds of *Polygonum bistorta*: isolation and characterization [J]. Planta Med, 1999, 65 (4): 371
- [4] 曾靖, 单热爱, 钟声, 等. 拳参水提取物镇痛作用的实验观察 [J]. 中国临床康复, 2005, 9 (6): 80
CENG J, SHAN RA, ZHONG S, et al. Experimental observation on the analgesic effect of *Polygonum bistorta* L. water extract [J]. Chin J Clin Rehabil, 2005, 9 (6): 80
- [5] 曾靖, 黄志华, 叶和, 等. 拳参正丁醇提取物中枢抑制作用的研究 [J]. 赣南医学院学报, 2003, 23 (4): 359

- ZENG J, HUANG ZH, YE HY, *et al.* A study of inhibitory effect on central nerve system of *Polygonum bistorta* L. *n*-butyl alcohol extract [J]. J Gannan Med Coll, 2003, 23(4): 359
- [6] 叶和杨,汪秀荣,黄志华,等. 拳参正丁醇提取物对心肌缺血的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(6): 907
- YE HY, WANG XR, HUANG ZH, *et al.* The protective effect of *Polygonum bistorta* L. *n*-butyl alcohol extract on myocardial ischemia [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2006, 17(6): 907
- [7] 李珂珂,王青青. 拳参提取物对小鼠免疫功能的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2180
- LI KK, WANG QQ. Effect of bistort root extract on the immune function of mice [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2011, 22(9): 2180
- [8] 张萍,朱尘琪,韩南银,等. HPLC法测定2种不同颜色拳参饮片绿原酸及没食子酸含量[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(7): 1035
- ZHANG P, ZHU CQ, HAN NY, *et al.* HPLC determination of chlorogenic acid and gallic acid in Quanshen pieces with two different colors [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(7): 1035
- [9] 付杰超,王延年,马跃平,等. 拳参饮片炮制工艺研究[J]. 中国现代中药, 2009, 11(10): 37
- FU JC, WANG YN, MA YP, *et al.* Study on the methods of the processing products of *Polygonum bistorta* L. [J]. Mod Chin Med, 2009, 11(10): 37
- [10] 黄文平,肖光清,宋永贵,等. 不同产地拳参中没食子酸和绿原酸的含量比较[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(1): 207
- HUANG WP, XIAO GQ, SONG YG, *et al.* To compare gallic acid and chlorogenic acid in *Polygonum bistorta* L. from different areas [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2015, 26(1): 207
- [11] 刘瑞,何方奕,李磊,等. 高效液相色谱法同时测定拳参药材中的没食子酸和绿原酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 390
- LIU R, HE FY, LI L, *et al.* HPLC Determination of gallic acid and chlorogenic acid in *Polygonum bistorta* L. [J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(4): 390
- [12] 中国医学科学院药物研究所. 中药志. 第二册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 177
- Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science and Peikng Union Medical College. Chinese Materia Medica. Vol II [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982: 177
- [13] 刘晓秋,陈发奎,吴立军,等. 拳参的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2004, 21(3): 187
- LIU XQ, CHEN FK, WU LJ, *et al.* Studies on the chemical constituents of *Polygonum bistorta* L. [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2004, 21(3): 187
- [14] MANOHARAN KP, BENNY TK, YANG D. Cycloartane type triterpenoids from the rhizomes of *Polygonum bistorta* [J]. Phytochemistry, 2005, 66(19): 2304
- [15] 刘晓秋,李维维,陈发奎,等. 拳参正丁醇提取物的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(1): 15
- LIU XQ, LI WW, CHEN FK, *et al.* Studies on the chemical constituents of the *n*-BuOH extract of *Polygonum bistorta* L. [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2006, 23(1): 15
- [16] 梁波,张小丽. 中药拳参化学成分及药理活性研究进展[J]. 甘肃高师学报, 2008, 13(5): 53
- LIANG B, ZHANG XL. Research advances on chemical constituents and pharmacological activities of *Polygonum bistorta* L. [J]. J Gansu Norm Coll, 2008, 13(5): 53

(本文于2016年9月20日收到)