

黄芩药材 UPLC-MS 特征指纹图谱研究

闫广利,方圆,刘树民*,范振群,祖金祥
(黑龙江中医药大学中医药研究院,哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:建立黄芩药材 UPLC-MS 特征指纹图谱分析方法,为黄芩药材的整体质量控制提供更为有效的评价方法。方法:采用 70% 甲醇和甲醇两步提取的方法制备黄芩药材供试品溶液,应用 UPLC-ESI-TOF/MS 联用技术进行检测,采集 10 个产地黄芩药材的色谱图,根据保留时间和分子离子 m/z 确定共有峰,创建提取离子色谱图用以计算峰面积,利用相关系数法和夹角余弦法计算相对峰面积的相似度。结果:确定了黄芩药材的 23 个共有峰,建立了这 23 个共有峰为特征指纹信息的黄芩药材 UPLC-MS 指纹图谱,10 个产地样品的指纹图谱整体相似度 >0.9 ,各产地黄芩药材之间相似度良好。结论:该方法准确可靠,重复性好,可用于黄芩药材的整体质量评价。

[关键词] 黄芩; 指纹图谱; UPLC-MS; 质量评价

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0089-05

Studies on UPLC-MS Characteristic Fingerprint of *Scutellaria baicalensis*

YAN Guang-li, FANG Yuan, LIU Shu-min*, FAN Zhen-qun, ZU Jin-xiang
(Academics of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the analytical method for characteristic fingerprint of *Scutellaria baicalensis* by UPLC-MS, which can be used as a more effective method for its quality assessment. **Method:** Samples from 10 habitats were extracted in turn by 70% methanol and 100% methanol, and the combined solution was analyzed by UPL-ESI-TOF/MS to acquire their chromatograms. The common peaks were selected according to the retention time and the m/z value of molecular ion, and the peak area was calculated in the corresponding extracted ion chromatogram. Finally the similarity of the relative peak area was calculated by the correlation coefficient and the cosine value of vectorial angle. **Result:** Twenty three common peaks were selected to establish the UPLC-MS characteristic fingerprint of *S. baicalensis*. The samples of *S. baicalensis* from 10 habitats had a good similarity more than 0.9. **Conclusion:** The UPLC-MS characteristic fingerprint of *S. baicalensis* is accuracy and reproducible, and the method can be applied to the quality assessment of *S. baicalensis*.

[Key words] *Scutellaria baicalensis*; fingerprint; UPLC-MS; quality assessment

黄芩为唇形科植物黄芩的干燥根,具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效。黄芩药材主产于

河北、山西、内蒙古和东北等地,药用成分主要为黄酮类化合物,其中含量较高的成分有黄芩苷、汉黄芩苷、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖醛酸苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素等^[1]。2010 年版《中国药典》“黄芩”和“黄芩提取物”项下对其所含的黄芩苷进行了含量测定和控制,也有对黄芩药材的 HPLC-UV 指纹图谱研究^[2-4]。超高效液相色谱(UPLC)是在 HPLC 的基础上发展起来的,它通过在色谱柱上使用小颗粒填料以及其他部件的改进,最终实现了与传统 HPLC 相比具有更高的分离度、更快的分析速度和更大的峰容量等优点^[5]。UPLC 与质谱(MS)相串联,集优越的色谱分离能和质谱高灵敏度、高分

[收稿日期] 20120104(016)

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划(2007CB512608);哈尔滨市科技创新人才研究专项(2008RFXXS042);黑龙江省博士后经费资助项目(LBH-Z11020)

[第一作者] 闫广利,副研究员,在站博士后,从事中药血清药物化学和质量标准研究, E-mail: gancaosuan@163.com

[通讯作者] * 刘树民, Tel/Fax: 0451-87266988, E-mail: lsm@hljucm.net

辨定性能力于一体,在中草药复杂化学体系的分离鉴定中已经展示其优越的分析性能^[6]。本实验采用 UPLC-MS 建立了黄芩药材化学成分的指纹图谱,为黄芩药材的全面质量控制提供更加有效的分析方法。

1 材料

1.1 仪器 液相色谱仪为美国 Waters 公司 Acquity UPLC 系统,包括二元高压梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器。质谱仪为美国 Waters 公司 LCT Premier XE 系统,包括电喷雾离子源、Lock-spray 在线校正系统、注射器针泵。工作站为 Waters Masslynx V4.1。

1.2 试药 黄芩药材购自哈尔滨三棵树药材市场,产地分别为黑龙江、吉林、辽宁、河北、山西、陕西、内蒙古、安徽、甘肃,共 10 批样品,其中黑龙江产地 2 批。经黑龙江中医药大学王连芝副研究员鉴定均为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,并按 2010 年版《中国药典》检验均符合规定。黄芩苷对照品,购自中国药品生物制品检定所,批号 110715-201016。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 检测条件 色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC® HSS T₃ 柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),流动相为 0.1% 甲酸乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B),梯度洗脱(0 min,16 % A;3 min,20% A;11 min,24% A;13 min,38% A;18 min,40% A;20 min,100% A),流速 0.4 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,进样量 2 μL。

质谱条件:电喷雾电离源,正离子扫描模式,毛细管电压 1 800 V,锥孔电压 60 V,脱溶剂气温度 350 ℃,源温度 110 ℃,脱溶剂气体流速 700 L·h⁻¹,锥孔气体流速 20 L·h⁻¹,亮氨酸-脑啡汰溶液在线校正,扫描质量范围 *m/z* 100 ~ 1 000,扫描方式为全扫描。

2.2 供试品溶液的制备 称取黄芩药材粉末 0.10 g,精密称定,置于锥形瓶中,用 70% 甲醇 20 mL 超声提取 30 min,放至室温,过滤,滤液置于 50 mL 量瓶中;残渣再用甲醇 20 mL 超声提取 30 min,过滤,残渣用少量甲醇洗涤,滤液并入 50 mL 量瓶中,定容,

摇匀,13 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,吸取上清液,作为供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备 精密称取黄芩苷对照品 1.45 mg,置于 50 mL 量瓶中,用甲醇溶解,定容至刻度,摇匀,得 0.029 g·L⁻¹ 的黄芩苷对照品溶液。

2.4 指纹图谱测定与评价方法 吸取 10 批黄芩药材的供试品溶液,进样测定,记录 UPLC-MS 色谱图,确定共有峰。设定各共有峰的质核比(*m/z*),建立各峰的提取离子色谱图,以黄芩苷峰面积为参考,计算各峰峰面积的相对比值,通过相关系数法和夹角余弦法进行相似度评价^[7]。

3 结果

3.1 精密度试验 取同一份供试品溶液,按拟定的检测条件进行检测,重复进样 5 次,记录各共有峰的峰面积。以黄芩苷峰面积为参照,计算各共有峰相对峰面积的一致性,结果相对峰面积的 RSD 均 <3%。

3.2 稳定性试验 取同一份供试品溶液,分别在 0,2,4,8,12,24 h 按拟定的检测条件进行检测,记录各共有峰的峰面积。以黄芩苷峰面积为参照,计算各共有峰相对峰面积的一致性,结果相对峰面积的 RSD 均 <3%。结果表明,黄芩药材供试品溶液在 24 h 内稳定。

3.3 重复性试验 取同一批号的供试品 5 份,按供试品溶液制备方法制备成供试品溶液,按拟定的检测条件进行检测,记录各共有峰的峰面积。以黄芩苷峰面积为参照,计算各共有峰相对峰面积的一致性,结果相对峰面积的 RSD 均 <3%。

3.4 指纹图谱的测定 取 10 个产地的黄芩药材,按 2.2 项下方法制备成供试品溶液,按 2.1 项下方法进行检测,记录 UPLC-MS 色谱图,见图 1。通过比较各峰的保留时间和 *m/z*,确定了 23 个共有峰。为获得各峰的准确峰面积,根据各峰的 *m/z* 创建它们的提取离子色谱图,计算各峰的峰面积。产地黑龙江的黄芩药材 23 个共有峰的提取离子色谱图见图 2。21 和 22 号峰完全重叠,通过创建它们的提取离子色谱图,可以实现它们峰面积的准确测定;一些峰面积较小的峰,如 1 号和 3 号峰,在它们的提取离子色谱图中也可以准确计算峰面积。经对照品比

表 1 10 个产地黄芩药材 UPLC-MS 指纹图谱相对峰面积的相似度分析

产地	黑龙江	吉林	辽宁	甘肃	安徽	陕西	内蒙古	河北	山西	黑龙江
相关系数	0.991	0.907	0.975	0.961	0.991	0.918	0.950	0.970	0.971	0.985
夹角余弦	0.993	0.937	0.983	0.970	0.994	0.945	0.966	0.979	0.979	0.989

对,8号峰为黄芩苷峰,以此作为参考,计算各峰的相对峰面积,按照相关系数法和夹角余弦法进行相似度评价,结果10个产地黄芩药材的相似度均>0.9,表明各产地黄芩药材之间相似度良好,见表1。

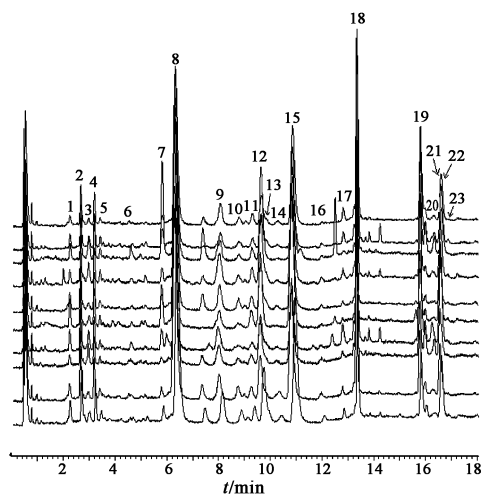


图1 10个产地黄芩药材的UPLC-MS总离子流色谱

3.5 共有峰的特征 飞行时间质谱为高分辨质谱,可以测得偏差 $<5 \times 10^{-6}$ 的离子质量,同时结合同位素模式拟合度分析,可以准确计算所测化合物的分子式。为充分利用质谱检测器所提供的化合物分子量信息,本实验利用Masslynx V4.1软件的Elemental Composition分析工具计算了各共有峰的分子式,相关信息见表2。明确各共有峰的分子式,能够保证在色谱参数或仪器设备发生变化而导致保留时间发生漂移时,仍可通过分子离子 m/z 值搜索而对该峰进行准确定位,从而保证指纹图谱的良好重复性。

4 讨论和结论

本研究采用UPLC来建立黄芩药材的指纹图谱,分析时间上缩短至18 min,仅为以往研究的1/3,峰容量也优于以往的研究。而且,紫外光谱检测所得的指纹图谱中往往存在色谱峰分离度差和峰重叠的现象,使峰面积测得不准确^[8],本文利用质谱进行检测,通过创建提取离子色谱图对各共有峰进行定性定量表征,避免了峰重叠对峰面积测定带来的干扰,并且可在保留时间发生漂移时通过创建提取离子色谱图进行准确定位,保证了实验室间的重复性。

分别考察了正负离子检测模式下黄芩的指纹图谱。由于流动相中添加了甲酸,故在负离子检测模式下,各峰的质谱图中存在较高的 $[M + HCOO]^-$ 离

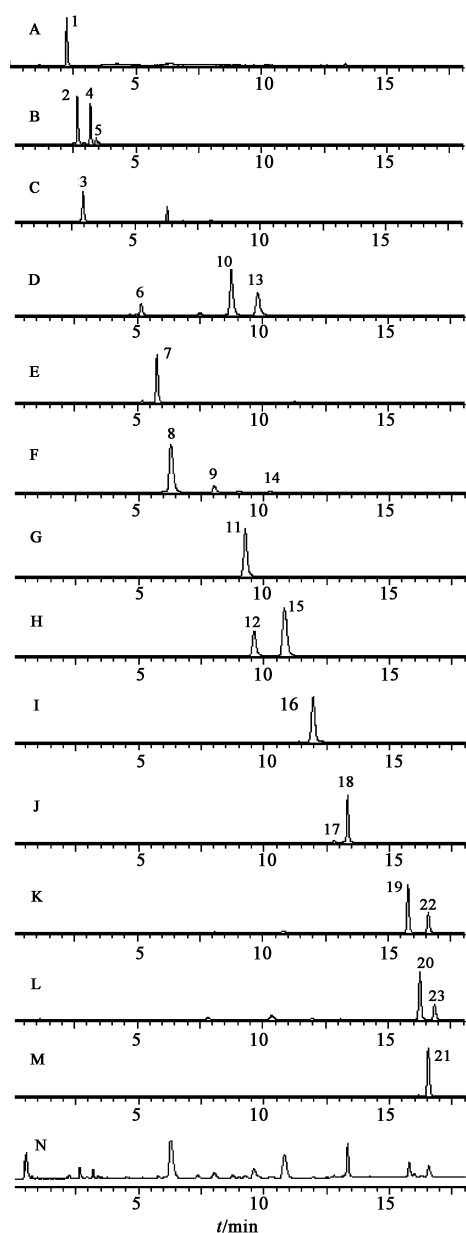


图2 黑龙江产地黄芩药材的UPLC-MS总离子色谱(N)和23个共有峰的提取离子色谱(A~M)

子,影响提取离子色谱图的建立;而在正离子模式下,各峰以 $[M + H]^+$ 离子存在,创建的提取离子色谱图能反映各峰的真实强度。另外,负离子模式下检测的各峰均能在正离子模式下被检测,而且各峰的质谱响应值差别不大,因此选择正离子检测模式来建立黄芩的UPLC-MS指纹图谱。

黄芩的活性成分主要包括以黄芩苷为代表的黄酮苷类和以黄芩素为代表的黄酮苷元类^[9],因此,在提取方法上选择用《中国药典》规定70%甲醇提取黄酮苷类成分,用甲醇提取黄酮苷元类成分,合并后进样进行同时测定。

表 2 黄芩指纹图谱各共有峰飞行时间质谱测定和计算

No.	t_R /min	质量/(m/z)		偏差	同位素拟合度 /i-FIT(Norm)	分子式
		测定值	理论值			
1	2. 24	305. 066 3	305. 066 1	0. 7	0. 2	C ₁₅ H ₁₂ O ₇
2	2. 66	549. 159 2	549. 160 8	- 2. 0	0. 6	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃
3	2. 93	463. 087 5	463. 087 7	- 0. 4	0. 7	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂
4	3. 18	549. 162 5	549. 160 8	3. 1	0. 1	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃
5	3. 41	549. 160 8	549. 160 8	0. 0	0. 5	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃
6	5. 17	477. 102 4	477. 103 3	- 1. 9	0. 8	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂
7	5. 79	347. 078 2	347. 076 7	- 1. 1	0. 2	C ₁₇ H ₁₄ O ₈
8	6. 29	447. 092 2	447. 092 7	- 1. 0	0. 8	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁
9	8. 02	447. 093 8	447. 092 7	2. 5	0. 6	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁
10	8. 80	477. 104 3	477. 103 3	2. 1	0. 1	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂
11	9. 26	431. 098 4	431. 097 8	1. 4	0. 5	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀
12	9. 61	461. 108 9	461. 108 4	1. 1	0. 6	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁
13	9. 80	477. 104 8	477. 103 3	3. 1	0. 6	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂
14	10. 23	447. 094 0	447. 092 7	2. 9	0. 7	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁
15	10. 82	461. 107 9	461. 108 4	- 1. 1	0. 3	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁
16	11. 96	491. 119 1	491. 119 0	0. 2	0. 5	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂
17	12. 79	271. 061 5	271. 060 6	3. 3	0. 1	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
18	13. 33	271. 060 6	271. 060 6	0. 0	0. 4	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
19	15. 79	285. 077 1	285. 076 3	2. 8	0. 2	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
20	16. 26	315. 088 0	315. 086 9	3. 5	0. 5	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
21	16. 55	375. 107 6	375. 108 0	- 1. 1	0. 6	C ₁₉ H ₁₈ O ₈
22	16. 59	285. 077 1	285. 076 3	2. 8	0. 1	C ₁₆ H ₁₂ O ₅
23	16. 85	315. 086 5	315. 086 9	- 1. 3	0. 5	C ₁₇ H ₁₄ O ₆

选用的 10 批黄芩药材来源于 9 个省区,存在一些微量成分之间的差异,这在 UPLC-MS 色谱图中已体现出来(图 1)。文献报道了不同来源黄芩药材 HPLC 指纹图谱的研究,所确定的 9 个共有峰在黄芩正品药材中差异较小^[10],这与本文有一定的共同之处,但本文采用了 UPLC-TOF/MS 技术,能检测的更多的成分,而且还能发现来源于不同产地的黄芩药材存在一些成分的差异(可能是生长环境、气候、土壤等地理因素的不同而产生的),在其他药材特征指纹图谱研究中也发现有发现^[11],这些微量的差异成分对于黄芩药材产地鉴别及道地性评价可能是重要的。但本文旨在揭示黄芩药材的共性成分特征,下一步有待于采集各产地较多的样品进行分析,确定黄芩药材产地特征指纹图谱。

利用超 UPLC-MS 来建立黄芩化学成分指纹图谱,提高了分析效率和方法重复性,并增强了共有峰定性、分子离子 m/z 定位和提取离子色谱峰定量的功能,为黄芩药材的质量控制提供了新的评价方法,也为其他中药指纹图谱的研究提供了更为有效的方法。

[参考文献]

[1] 周锡钦,梁鸿,路新华,等. 中药黄芩主要黄酮类成分及其生物活性研究[J]. 北京大学学报:医学版, 2009,41(5):578.
[2] 张晨,毛新亮,翟旭峰,等. 黄芩药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 武警医学院学报,2011,20(11):876.
[3] 张家辉,杨蕊,邓洪平. 缙云黄芩 HPLC 指纹图谱的建立及其不同部位活性成分含量研究[J]. 中国中药杂

- 志,2009,34(19):21.
- [4] 宋双红,王喆之,张媛,等. 黄芩药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国药学杂志,2006,41(6):413.
- [5] Dao T T Nguyen, Davy Guillaume, Serge Rudaz, et al. Chromatographic behaviour and comparison of column packed with sub-2 μm stationary phases in liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2006,1128 (1/2):105.
- [6] 倪书茂,钱大玮,尚尔鑫,等. 大川芎方化学成分的超高效液相色谱-电喷雾-四极杆飞行时间质谱分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(1):39.
- [7] 苗爱东,孙殿甲. Excel 2002 在中药指纹谱相似度计算中的应用[J]. 药学进展,2003,27(1):51.
- [8] 刘卉,姚卫峰,张丽,等. 基于超高效液相色谱指纹图谱轮廓的香丹注射液相似度快速评价[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):48.
- [9] 徐丹洋,陈佩东,张丽,等. 黄芩的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):78.
- [10] 肖丽和,王红燕,李发美,等. 不同来源黄芩药材 HPLC 指纹图谱比较[J]. 沈阳药科大学学报,2004,21(1):29.
- [11] 张明昶,彭小冰,苗旭辉,等. 中药虎杖特征指纹图谱研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(1):53.
- [责任编辑 顾雪竹]

欢迎订阅 2013 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。本刊立足于行业报道的前沿,关注相关的政策动态,跟踪报道中医药重大课题,及时分析报道中医药的新政策、新技术、新发明、新成果、新疗法,努力使信息的选择与表达方式能够充分体现中医药发展水平,为广大读者提供一流的信息服务。

《中国中医药信息杂志》1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已被波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等国际检索系统收录。

《中国中医药信息杂志》是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、中医药发展论坛、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、研究与进展、论著、实验研究、流行病学调查、质量标准研究、制剂与工艺、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学等。

《中国中医药信息杂志》为月刊,大 16 开国际开本,112 页,国内外公开发行,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部 邮编:100700 电话:010-64014411-3278 E-mail:Lxx@mail.cintcm.ac.cn