

黄连-黄芩药对 UPLC-MS/MS 指纹图谱

王钰乐, 刘文*, 杨道斌, 卿勇军, 杜平, 金阳
(贵阳中医学院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:**建立黄连-黄芩药对的 UPLC-MS/MS 指纹图谱分析方法,为其整体质量控制与评价、药效物质基础、配伍规律等研究提供科学依据。**方法:**采用 UPLC-MS/MS 法进行指纹图谱研究,使用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),以 0.2% 甲酸水-乙腈为流动相,梯度洗脱 80 min,流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,获得 12 批黄连-黄芩药对的色谱图。利用国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版对其进行相似度评价。**结果:**建立了黄连-黄芩药对 UPLC-MS/MS 指纹图谱的共有模式,确定了 16 个共有峰,通过比较对照品和参考文献,指认了 7 个共有峰分别为黄连碱、表小檗碱、盐酸药根碱、黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、汉黄芩苷,对 12 批不同产地和品种的黄连-黄芩药对相似度进行了考察,其相似度均 >0.9。**结论:**建立了黄连-黄芩药对 UPLC-MS/MS 指纹图谱分析方法,其精密度、重复性及稳定性良好(RSD < 3%),该分析方法的建立对于黄连-黄芩药对的质量控制与评价、药效物质基础、配伍规律等研究具有一定的参考价值和意义。

[关键词] 黄连-黄芩药对; 超高压液相色谱-质谱; 指纹图谱; 配伍规律; 质量控制与评价
[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)13-0080-06
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017130080
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170324.1445.078.html>
[网络出版时间] 2017-03-24 14:45

UPLC-MS/MS Fingerprint of Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix Herbal Pair

WANG Yu-le, LIU Wen*, YANG Dao-bin, QING Yong-jun, DU Ping, JIN Yang
(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To provide a scientific evidence for studying overall quality control and evaluation, pharmacodynamic material basis and compatibility regularity of Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal pair by establishing an analytical method of UPLC-MS/MS fingerprint. **Method:** The chromatograms of twelve batches of Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal medicine pairs were acquired by the method of UPLC-MS/MS. ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) was adopted and eluted with the mobile phase of water (0.2% formic acid) -acetonitrile in a gradient mode for 80 min at the speed of 0.3 mL·min⁻¹, and the column temperature was 40 ℃. The similarity was evaluated on the basis of the Similarity Evaluation System for Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (version 2004A) issued by Chinese Pharmacopoeia Commission. **Result:** The common pattern of fingerprint of Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal pair was established, and totally 16 common peaks were identified. Compared with control substances and references, seven common peaks were identified as coptisine, epiberberine, jatrorrhizine hydrochloride, baicalin, berberine hydrochloride, palmatine hydrochloride and wogonoside. The similarities of Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal pairs of 12 batches of different origins and species were investigated, all of which reached 0.9. **Conclusion:**

[收稿日期] 20170419(001)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81660666);贵州省优秀青年科技人才培养对象专项[黔科合人字(2011)28号];中药民族药药剂学专业学位论文研究生工作站项目(黔教研合 YJSZ 字[2013]05);国家苗药工程技术研究中心项目(2014FU125Q09)
[第一作者] 王钰乐,在读硕士,从事中药新技术与新制剂研究,Tel:18798018865,E-mail:907728451@qq.com
[通讯作者] * 刘文,硕士,教授,从事中药新技术与新制剂研究,Tel:0851-88233005,E-mail:642771631@qq.com

The analytical method of UPLC-MS/MS fingerprint of *Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix* herbal pair has a good accuracy, repeatability and stability (RSD < 3%). It has a certain reference value for studying overall quality control and evaluation, pharmacodynamic material basis and compatibility regularity of *Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix* herbal pair.

[**Key words**] *Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix* herbal pair; UPLC-MS/MS; fingerprint chromatogram; compatibility regularity; quality control and evaluation

黄连-黄芩药对作为清热燥湿配伍的经典药对,常相须为用,共奏清热燥湿、泻火解毒之功。在葛根芩连汤、黄连解毒汤等经方中对其整体疗效的发挥着必不可少的作用。现代药理研究表明,黄连与黄芩均具有抗菌、抗炎等药理作用^[1-4]。中药的配伍不是简单的药味加和,而是各药味中的有效成分相互作用的结果。黄连-黄芩药对作为重要的配伍组,通过对其化学成分的分析,有利于为阐明黄连-黄芩药对的配伍规律等研究奠定基础,而在该方面的文献报道相对较少。邬玉玉等^[5]研究黄连-黄芩药对在不同组方配伍中主要成分的含量变化,结果表明组方配伍不同药对中有有效成分的含量亦有不同。冯瑾^[6]在建立黄连-黄芩药对体内分析方法的基础上,研究黄连-黄芩药对主要成分间的相互作用。上述研究局限于该药对若干个成分分析而未从整体上把握黄连-黄芩药对的成分变化。中药指纹图谱是基于对中药物质群整体作用的认识,借助于波谱和色谱等技术获得中药化学成分的光谱或色谱图,其能够较充分地反映出中药复杂混合体系中各种化学成分量分布的整体状况,能够真正对中药内在质量进行有效表征、综合评价和全面控制^[7-8]。本文应用超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-MS/MS)对黄连-黄芩药对进行研究,确定了 16 个共有峰,并根据对照品及文献资料指认了 7 个共有峰,通过对数据的挖掘与分析,成功建立了黄连-黄芩药对指纹图谱,为其药效物质基础、质量控制及配伍规律等研究提供重要参考依据。

1 材料

ACQUITY 型 UPLC 超高效液相色谱仪, Xevo TQ MS 型三重四级杆质谱检测器, MassLynx™ 质谱工作站软件(美国 Waters 公司); DZF-6210 型真空干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司); SK8210HP 型超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); AUY220 型 1/1 万电子天平(日本岛津公司); AE240 型 1/10 万电子天平(上海梅特勒仪器有限公司); Eppendorf Research plus 手动移液器(5 ~ 50 μL 和 100 ~ 1 000 μL, 德国艾本德股份公司)。

对照品盐酸小檗碱(批号 110713-201212, 纯度 86.7%), 盐酸巴马汀(批号 110732-201510, 纯度 87.4%), 盐酸药根碱(批号 110733-201108, 纯度 90.3%), 黄芩苷(批号 110715-201318, 纯度 93.3%), 均购自中国食品药品检定研究院; 汉黄芩苷(批号 GZDD-0521, 纯度 98.0%, 贵州迪大科技有限责任公司)。乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯, 屈臣氏蒸馏水(北京屈臣氏蒸馏水有限公司), 其他试剂均为分析纯。

不同产地的黄连、黄芩药材信息见表 1, 经贵阳中医学院周汉华教授鉴定, 黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎, 黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* 的干燥根。

表 1 12 批不同来源的黄连和黄芩药材
Table 1 Twelve batches *Coptidis Rhizoma* and *Scutellariae Radix* from different habitats

No.	黄连		黄芩		配伍编号
	产地	批号	产地	批号	
S1	四川	150701	内蒙古	150801	160707-1
S2	四川	151201	内蒙古	151101	160707-2
S3	四川	150601	内蒙古	151001	160707-3
S4	四川	150901	内蒙古	160101	160707-4
S5	重庆	141201	甘肃	150401	160707-5
S6	重庆	160101	甘肃	151201	160707-6
S7	四川	20160301	山西	150501	160707-7
S8	四川	20160501	山西	151101	160707-8
S9	云南	150201	河北	141102	160707-9
S10	云南	151001	河北	150601	160707-10
S11	湖北	160102	吉林	150801	160707-11
S12	陕西	151101	吉林	160102	160707-12

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱、黄芩苷和汉黄芩苷对照品适量, 置于 25 mL 量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 制得各成分质量浓度分别为 0.073 6, 0.074 8,

0.104 8,0.078 4,0.072 0 g·L⁻¹的混合对照品溶液,4℃保存,备用。

2.1.2 供试品溶液的制备 按黄连-黄芩(1:1)分别称取黄连和黄芩各 18 g,加 12 倍量水,浸泡 30 min,煎煮 1 h,药渣加 10 倍量水,继续煎煮 2 次,每次 1 h,煎煮液趁热过滤,合并 3 次滤液,浓缩,50℃减压干燥成干浸膏。取黄连-黄芩药对干浸膏粉末(过 5 号筛)约 0.5 g,精密称定,置锥形瓶中,精密加入甲醇 50 mL,超声处理 30 min,放冷,补重,过滤,精密量取续滤液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得。

2.2 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),柱温 40℃,样品温度 10℃,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 1 μL,以 0.2% 甲酸水(A)-乙腈(B)为流动相,梯度洗脱,见表 2。

表 2 流动相梯度洗脱程序

Table 2 Program of flow phase gradient elution			%		
<i>t</i> /min	流动相 A	流动相 B	<i>t</i> /min	流动相 A	流动相 B
0	95.0	5.0	57	79.0	21.0
5	95.0	5.0	59	78.0	22.0
15	91.0	9.0	61	78.0	22.0
20	88.0	12.0	65	70.0	30.0
25	86.3	13.7	67	70.0	30.0
30	85.0	15.0	69	68.0	32.0
35	84.4	15.6	72	64.5	35.5
40	84.4	15.6	73	70.0	30.0
42	84.0	16.0	75	78.0	22.0
47	84.0	16.0	76	85.0	15.0
52	82.0	18.0	78	95.0	5.0
55	81.0	19.0	80	95.0	5.0

2.3 质谱条件 离子源 ESI,正离子扫描模式,毛细管电压 3.0 kV,取样锥孔电压 30 V,脱溶剂气流量 800 L·h⁻¹,脱溶剂温度 550℃,锥孔气流量 50 L·h⁻¹,离子源温度 150℃,碰撞气体氩气,扫描范围 *m/z* 200~900,采用 MS Scan 模式采集总离子流图。

2.4 方法学考察

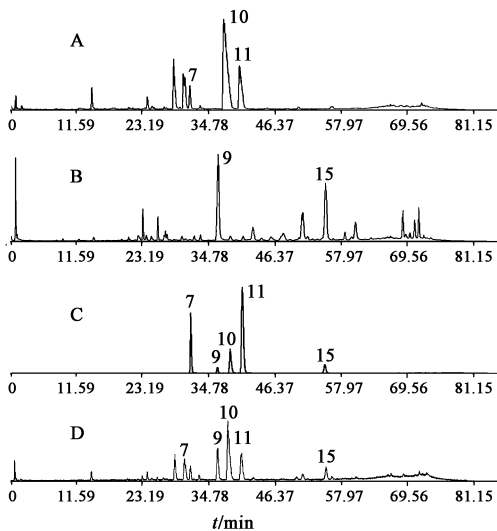
2.4.1 精密度试验 取黄连-黄芩药对(S1),按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,连续进样 6 次,结果测得各共有峰相对保留时间 RSD 0.8%~1.8%,各共有峰相对峰面积 RSD 2.3%~2.8%,说明仪器精密度良好。

2.4.2 重复性试验 取黄连-黄芩药对(S1),按 2.1.2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份,分别进行测定,结果测得各共有峰相对保留时间 RSD 0.4%~0.8%,各共有峰相对峰面积 RSD 1.5%~2.0%,说明该方法重复性良好。

2.4.3 稳定性试验 取黄连-黄芩药对(S1),按 2.1.2 项下方法制备成供试品溶液,分别于 0,2,4,6,8,12,24 h 依次进样,结果测得各共有峰相对保留时间 RSD 0.6%~0.8%,各共有峰相对峰面积 RSD 1.8%~2.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 12 批黄连-黄芩药对指纹图谱 按 2.1.2 项下方法分别制备 12 批供试品溶液,依次进行测定,获得 12 批不同产地的黄连-黄芩药对 UPLC-MS/MS 指纹图谱;根据各色谱峰的相对保留时间,确定共有峰,并选取其中 16 个共有峰作为特征指纹峰,建立了黄连-黄芩药对的对照指纹图谱。见图 1,2。



A. 黄连;B. 黄芩;C. 混合对照品;D. 黄连-黄芩药对;7. 盐酸药根碱;9. 黄芩苷;10. 盐酸小檗碱;11. 盐酸巴马汀;15. 汉黄芩苷

图 1 黄连-黄芩药对 UPLC-MS/MS 指纹谱
Fig. 1 UPLC-MS/MS reference fingerprint of Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal pair

2.5.2 共有峰的标定 通过比较 12 批黄连-黄芩药对的色谱图,确定了 16 个共有峰,其中 10 号指纹峰为盐酸小檗碱,保留时间为 38.35 min,由于其出峰时间适中,与相邻色谱峰分离度良好,峰面积及峰高比较稳定,故选择该峰作为参照峰,经计算得到各标定指纹峰相对保留时间的 RSD 0.1%~2.0%,相对峰面积的 RSD 1.0%~4.9%。结果见表 3,4。

2.5.3 不同来源黄连-黄芩药对相似度评价 将

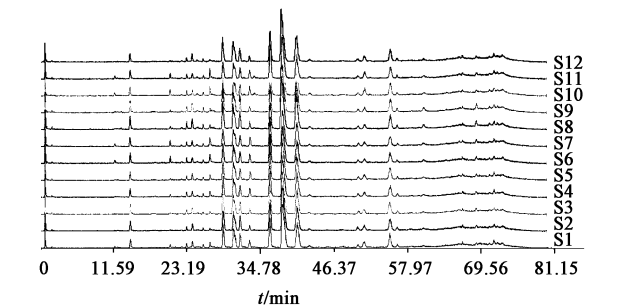


图 2 12 批黄连-黄芩药对样品的 UPLC-MS/MS 指纹谱
Fig. 2 UPLC-MS/MS fingerprint of twelve batches of Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal pair

表 3 黄连-黄芩药对 UPLC-MS/MS 共有峰相对保留时间

Table 3 Relative retention time of UPLC-MS/MS common peaks in fingerprint of Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal pair															
No.	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16
S1	0. 373	0. 603	0. 627	0. 670	0. 753	0. 798	0. 828	0. 863	0. 945	1. 058	1. 107	1. 309	1. 334	1. 439	1. 470
S2	0. 374	0. 606	0. 630	0. 674	0. 756	0. 801	0. 828	0. 866	0. 952	1. 065	1. 108	1. 314	1. 340	1. 448	1. 472
S3	0. 372	0. 607	0. 630	0. 676	0. 757	0. 801	0. 829	0. 869	0. 950	1. 065	1. 108	1. 322	1. 340	1. 448	1. 470
S4	0. 372	0. 605	0. 629	0. 701	0. 755	0. 806	0. 830	0. 865	0. 948	1. 059	1. 113	1. 315	1. 340	1. 446	1. 471
S5	0. 372	0. 606	0. 628	0. 701	0. 756	0. 800	0. 826	0. 867	0. 948	1. 063	1. 111	1. 316	1. 339	1. 445	1. 470
S6	0. 371	0. 605	0. 627	0. 702	0. 755	0. 800	0. 827	0. 865	0. 949	1. 060	1. 112	1. 315	1. 338	1. 443	1. 469
S7	0. 371	0. 606	0. 627	0. 701	0. 754	0. 800	0. 825	0. 865	0. 947	1. 060	1. 112	1. 313	1. 337	1. 444	1. 470
S8	0. 373	0. 607	0. 629	0. 675	0. 757	0. 800	0. 828	0. 868	0. 953	1. 063	1. 115	1. 314	1. 339	1. 450	1. 473
S9	0. 373	0. 605	0. 628	0. 673	0. 753	0. 796	0. 825	0. 866	0. 950	1. 056	1. 112	1. 310	1. 338	1. 442	1. 472
S10	0. 371	0. 606	0. 628	0. 674	0. 755	0. 800	0. 826	0. 867	0. 949	1. 060	1. 112	1. 310	1. 336	1. 447	1. 473
S11	0. 373	0. 606	0. 629	0. 675	0. 756	0. 799	0. 825	0. 866	0. 951	1. 061	1. 113	1. 313	1. 341	1. 448	1. 474
S12	0. 372	0. 607	0. 628	0. 674	0. 756	0. 801	0. 827	0. 868	0. 953	1. 063	1. 112	1. 314	1. 343	1. 449	1. 476

注:峰 10 均为 1.000(表 4 同)。

表 4 黄连-黄芩药对 UPLC-MS/MS 共有峰相对峰面积

Table 4 Relative peak areas of UPLC-MS/MS common peaks in fingerprint of Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal pair															
No.	峰 1	峰 2	峰 3	峰 4	峰 5	峰 6	峰 7	峰 8	峰 9	峰 11	峰 12	峰 13	峰 14	峰 15	峰 16
S1	0. 077 2	0. 043 8	0. 052 1	0. 017 0	0. 264	0. 291	0. 221	0. 151	0. 403	0. 494	0. 028 2	0. 030 1	0. 090 5	0. 208	0. 028 9
S2	0. 080 2	0. 042 2	0. 061 4	0. 016 8	0. 253	0. 290	0. 211	0. 163	0. 391	0. 484	0. 027 3	0. 028 3	0. 090 9	0. 197	0. 030 8
S3	0. 079 1	0. 043 0	0. 062 5	0. 017 3	0. 261	0. 294	0. 218	0. 160	0. 400	0. 487	0. 028 0	0. 029 6	0. 091 2	0. 198	0. 030 2
S4	0. 080 9	0. 042 8	0. 063 2	0. 017 6	0. 260	0. 289	0. 213	0. 164	0. 407	0. 503	0. 027 5	0. 029 4	0. 090 1	0. 204	0. 030 7
S5	0. 084 2	0. 043 1	0. 062 8	0. 018 1	0. 258	0. 301	0. 216	0. 167	0. 417	0. 518	0. 027 7	0. 030 0	0. 090 5	0. 224	0. 029 0
S6	0. 080 8	0. 042 6	0. 062 1	0. 017 7	0. 251	0. 309	0. 214	0. 156	0. 423	0. 512	0. 030 7	0. 030 6	0. 087 6	0. 207	0. 028 7
S7	0. 080 1	0. 043 3	0. 063 1	0. 017 9	0. 270	0. 312	0. 216	0. 162	0. 424	0. 527	0. 031 4	0. 031 4	0. 089 1	0. 211	0. 029 4
S8	0. 079 4	0. 043 7	0. 062 0	0. 017 7	0. 270	0. 306	0. 219	0. 151	0. 411	0. 533	0. 028 5	0. 030 3	0. 090 1	0. 194	0. 028 9
S9	0. 080 4	0. 042 9	0. 061 1	0. 016 9	0. 265	0. 305	0. 220	0. 154	0. 416	0. 535	0. 028 5	0. 029 1	0. 089 9	0. 196	0. 029 3
S10	0. 084 9	0. 043 0	0. 061 7	0. 017 5	0. 264	0. 307	0. 229	0. 152	0. 428	0. 495	0. 027 6	0. 030 4	0. 089 5	0. 209	0. 028 6
S11	0. 080 5	0. 0431	0. 062 3	0. 017 0	0. 255	0. 301	0. 218	0. 157	0. 415	0. 497	0. 027 9	0. 030 6	0. 090 6	0. 208	0. 030 4
S12	0. 081 5	0. 042 7	0. 061 3	0. 017 3	0. 272	0. 304	0. 208	0. 152	0. 413	0. 498	0. 027 7	0. 030 1	0. 089 3	0. 195	0. 028 6

所得 12 批不同产地黄连-黄芩药对 UPLC-MS/MS 图谱数据依次导入国家药典委员会颁布的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”2004A 版,通过指定参照图谱,多点校正和色谱峰匹配,最终生成对照图谱并获得 12 批黄连-黄芩药对相似度,见表 5。由相似度结果可知,以上样品与对照谱相比较,其相似度均达到 0.9 以上,表明黄连-黄芩药对各批次药材总体质量稳定,指纹图谱技术可用于该药对质量的评价与控制。

2.6 主要共有峰的指认 为进一步阐明黄连-黄芩药对的化学成分组成,采用电喷雾离子化(ESI)方式,

表 5 不同批次黄连-黄芩样品 UPLC-MS/MS 指纹谱相似度

Table 5 UPLC-MS/MS fingerprint similarity of different batches of Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal pair

样品	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照
S1	1.000	0.908	0.904	0.902	0.989	0.982	0.989	0.920	0.938	0.999	0.900	0.953	0.988
S2	0.908	1.000	0.936	0.914	0.929	0.955	0.937	0.998	0.994	0.904	0.986	0.900	0.923
S3	0.904	0.936	1.000	0.909	0.911	0.950	0.908	0.980	0.995	0.970	0.922	0.906	0.996
S4	0.902	0.914	0.909	1.000	0.927	0.998	0.911	0.932	0.915	0.993	0.910	0.996	0.913
S5	0.989	0.929	0.911	0.927	1.000	0.902	0.929	0.987	0.979	0.901	0.965	0.998	0.996
S6	0.982	0.955	0.950	0.998	0.902	1.000	0.937	0.972	0.915	0.903	0.997	0.934	0.924
S7	0.989	0.937	0.908	0.911	0.929	0.937	1.000	0.982	0.938	0.976	0.923	0.907	0.915
S8	0.920	0.998	0.980	0.932	0.987	0.972	0.982	1.000	0.910	0.901	0.976	0.917	0.900
S9	0.938	0.994	0.995	0.915	0.979	0.915	0.938	0.910	1.000	0.977	0.961	0.988	0.904
S10	0.999	0.904	0.970	0.993	0.901	0.903	0.976	0.901	0.977	1.000	0.920	0.996	0.973
S11	0.900	0.986	0.922	0.910	0.965	0.997	0.923	0.976	0.961	0.920	1.000	0.919	0.984
S12	0.953	0.900	0.906	0.996	0.998	0.934	0.907	0.917	0.988	0.996	0.919	1.000	0.901
对照	0.988	0.923	0.996	0.913	0.996	0.924	0.915	0.900	0.904	0.973	0.984	0.901	1.000

多反应监测模式(MRM),监测离子为正离子获得黄连-黄芩药对指纹图谱共有峰的一些结构信息,见表 6,通过对照品指认,结合参考文献及化合物质谱裂解规律,最终初步鉴定了 7 个指纹成分的化学结构,5, 6,7,9,10,11,15 号峰分别为黄连碱、表小檗碱、盐酸药根碱、黄芩苷、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、汉黄芩苷。

表 6 黄连-黄芩药对主要化学成分的鉴定信息

Table 6 Authentication information of main components in Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal pair

No.	t/min	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	化合物
5	28.86	321.14	292.14,318.22	黄连碱
6	30.59	337.20	308.14,321.99	表小檗碱
7	31.57	338.21	236.18,279.30	盐酸药根碱
9	36.25	447.20	123.00,271.12	黄芩苷
10	38.35	336.20	278.07,320.30	盐酸小檗碱
11	40.59	352.20	278.14,292.12	盐酸巴马汀
15	55.20	461.18	270.11,285.13	汉黄芩苷

5 号色谱峰的准分子离子峰 *m/z* 321.14 [M + H]⁺,相对分子质量为 320.32,经分析表明,准分子离子峰 *m/z* 321.14 [M + H]⁺能够裂解为二级离子 *m/z* 292.14,318.22,根据上述的质谱裂解规律及相关文献报道^[9-10],鉴定 5 号色谱峰为黄连碱。

6 号色谱峰的准分子离子峰 *m/z* 337.20 [M + H]⁺,相对分子质量为 336.36,经分析表明,准分子离子峰 *m/z* 337.20 [M + H]⁺能够裂解为二级离子 *m/z* 308.14,321.99,根据上述的质谱裂解规律及相关

文献报道^[9-10],鉴定 6 号色谱峰为表小檗碱。

7 号色谱峰的准分子离子峰 *m/z* 338.21 [M + H]⁺,相对分子质量为 373.83,经分析表明,准分子离子峰 *m/z* 338.21 [M + H]⁺能够裂解为二级离子 *m/z* 236.18,279.30,根据上述的质谱裂解规律及相关文献报道^[9-12],鉴定 7 号色谱峰为盐酸药根碱。

9 号色谱峰的准分子离子峰 *m/z* 447.20 [M + H]⁺,相对分子质量为 446.37,经分析表明,准分子离子峰 *m/z* 447.20 [M + H]⁺能够裂解为二级离子 *m/z* 123.00,271.12,根据上述的质谱裂解规律及相关文献报道^[11-13],鉴定 9 号色谱峰为黄芩苷。

10 号色谱峰的准分子离子峰 *m/z* 336.20 [M + H]⁺,相对分子质量为 371.00,经分析表明,准分子离子峰 *m/z* 336.20 [M + H]⁺能够裂解为二级离子 *m/z* 278.07,320.30,根据上述的质谱裂解规律及相关文献报道^[9-12],鉴定 10 号色谱峰为盐酸小檗碱。

11 号色谱峰的准分子离子峰 *m/z* 352.20 [M + H]⁺,相对分子质量为 387.86,经分析表明,准分子离子峰 *m/z* 352.20 [M + H]⁺能够裂解为二级离子 *m/z* 278.14,292.12,根据上述的质谱裂解规律及相关文献报道^[9-12],鉴定 11 号色谱峰为盐酸巴马汀。

15 号色谱峰的准分子离子峰 *m/z* 461.18 [M + H]⁺,相对分子质量为 460.39,经分析表明,准分子离子峰 *m/z* 461.18 [M + H]⁺能够裂解为二级离子 *m/z* 270.11,285.13,根据上述的质谱裂解规律及相关文献报道^[11-13],鉴定 15 号色谱峰为汉黄芩苷。

2.7 指纹图谱的聚类分析^[14] 以 UPLC-MS/MS

指纹图谱中各共有峰作为描述样品化学特征的变量,建立 12×16 阶数据矩阵,应用 SPSS 16.0 统计软件,采用系统聚类,选择组间距离作为聚类方法,指定欧式距离平方作为聚类类型,对 12 批药材样品进行聚类分析,见图 3。结果表明,当分类距离为 10 时,12 批药材样品可以细分为 4 类,即 S1~S4 及 S11 为一类,S5~S6 及 S10 为一类,S7~S9 为一类,S12 为一类,说明药材之间相似与差异共存。

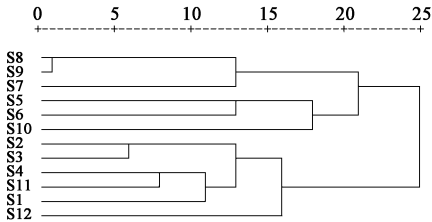


图 3 黄连-黄芩药对 12 批样品的 UPLC-MS/MS 指纹谱聚类树状关系

Fig. 3 Dendrogram of UPLC-MS/MS fingerprint of twelve batches Coptidis Rhizoma-Scutellariae Radix herbal pair

3 讨论

3.1 提取条件的优选 本实验采用单因素考察方法,分别对提取溶剂(30% 甲醇,50% 甲醇,70% 甲醇,90% 甲醇,甲醇和稀乙醇),提取方法(超声提取、回流提取、微波提取),提取时间(30,45,60 min)进行考察,以色谱峰数、峰形、分离度等色谱参数为指标,当选择甲醇作为提取溶剂,超声提取 30 min 时,按 2.2 和 2.3 项下色谱和质谱条件进行检测,获得的图谱重复性和稳定性好、出峰数多、峰形对称、分离度佳,因此确定该方法作为供试品溶液的制备方法。

3.2 色谱和质谱条件的优化 为了改善色谱峰拖尾的问题,可以通过在乙腈-水、甲醇-水等常用流动相体系中添加低浓度的有机酸来解决。本实验通过对乙腈-0.05% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-0.2% 甲酸水、甲醇-0.2% 甲酸水等流动相体系的比较,最终确定,以乙腈-0.2% 甲酸水为流动相进行梯度洗脱能够获得色谱峰峰形对称、分离效果好、基线平稳的图谱。分别对 m/z 100~900,100~1 000,200~800 和 200~900 进行比较,结果 200~900 范围内色谱峰数相对较多,信息量更丰富,响应值更高。

本实验建立了黄连-黄芩药对的 UPLC-MS/MS 指纹图谱,该方法操作简便、灵敏度高、稳定性好、出峰数多、分离效果好、信息量丰富,能够较全面地反映

黄连-黄芩药对的化学成分信息,对其质量控制、配伍规律等研究具有一定的参考价值。

[参考文献]

[1] CHANG C H, HUANG W Y, LAI C H, et al. Development of novel nanoparticles shelled with heparin for berberine delivery to treat *Helicobacter pylori*[J]. Acta Biomater, 2011,7(2):593-603.

[2] 赵保胜,刘永刚,王秀丽. 黄连解毒汤解热、抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(11):55-57.

[3] 崔蓉,孟宪丽,王平,等. 黄芩水提取物对急性肺损伤大鼠的保护作用及其与胆碱能抗炎通路的相关性研究[J]. 中草药,2012,43(2):321-326.

[4] 施高翔,邵菁,汪天明,等. 黄芩及其有效成分抗菌作用新进展[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3713-3718.

[5] 郭王玉,袁惠雅,陈晓辉,等. 黄连-黄芩药对在泻心汤和葛根芩连汤组方配伍中主要成分的含量变化[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(6):91-95.

[6] 冯瑾. 黄芩-黄连药对药代动力学及相互作用研究[D]. 上海:第二军医大学,2010.

[7] 李守信,展金祥,刘武占,等. 基于指纹图谱的金银花物质组纯化工艺研究[J]. 中草药,2015,46(1):55-60.

[8] 李强,杜思邈,张忠亮,等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望[J]. 中草药,2013,44(22):3095-3104.

[9] 张建锋,刘文,候晓杰,等. 戊己丸 UPLC-MS/MS 指纹图谱研究[J]. 中草药,2016,47(11):1897-1902.

[10] 张建锋,刘文,张石宇,等. 黄连的 UPLC-MS/MS 指纹图谱研究[J]. 中药新药与临床药理,2016,27(1):97-101.

[11] 张晓雷,周明眉,赵爱华,等. 黄连-黄芩药对化学成分的 UPLC-PDA-MS 分析[J]. 天然产物研究与开发,2012,24(1):1502-1507.

[12] AN R, WANG Y, YOU L S, et al. UPLC-MS analysis for simultaneous determination of eight components in the ‘Ge-Gen-Qin-Lian’ tablets [J]. Chromatographia, 2009, 69(9/10):969-975.

[13] 刘大伟,闫广利,方圆,等. UPLC-ESI-TOF/MS 应用于黄芩化学成分的快速分析[J]. 中医药信息,2012,29(4):20-24.

[14] 张华锋,刘炯,张杰,等. 基于聚类分析和典型相关分析的北柴胡保肝作用谱效关系研究[J]. 中草药,2013,44(19):2696-2702.

[责任编辑 顾雪竹]