

# 同基源何首乌和首乌藤化学成分含量分析

罗益远,刘娟秀,刘训红\*,王胜男,华愉教

南京中医药大学,南京 210023

**摘要:**分析同基源不同入药部位何首乌和首乌藤中的化学成分。以同基源不同入药部位何首乌和首乌藤为研究对象,采用 UPLC-TQ/MS 技术同时测定其中二苯乙烯类、蒽醌类、黄酮类和酚酸类 14 种成分,用 QTRAP UPLC-MS/MS 技术同时测定其中 10 种核苷类成分,用 ICP-MS 测定其中 24 种无机元素。同基源何首乌和首乌藤中化学成分差异明显。何首乌和首乌藤中二苯乙烯类成分的总量分别为 26.135、15.307 mg/g,蒽醌类成分的总量分别为 15.608、10.034 mg/g,黄酮类成分的总量分别为 0.864、17.075 mg/g,没食子酸的含量分别为 0.529、0.720 mg/g;何首乌和首乌藤中 10 种核苷的总含量分别为 140.517、197.534  $\mu\text{g/g}$ ,其中尿苷含量较高,分别为 55.688、90.273  $\mu\text{g/g}$ ;何首乌和首乌藤中无机元素中均以 K 含量较高,分别为 12.538、16.747 mg/g,何首乌中 Ca、Mg、P 的含量分别为 3.283、1.362、1.218 mg/g,首乌藤 Ca、Mg、P 的含量分别为 37.999、2.105、1.021 mg/g。基于多成分的同基源何首乌和首乌藤成分含量分析为何首乌和首乌藤资源的综合开发利用提供了科学依据。

**关键词:**何首乌;首乌藤;二苯乙烯类;蒽醌类;黄酮类;酚酸;核苷;无机元素

中图分类号:R917

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.7.009

## Determination of Chemical Constituents in *Polygoni Multiflori Radix* and *Polygoni Multiflori Caulis* from the Same Origin

LUO Yi-yuan, LIU Juan-xiu, LIU Xun-hong\*, WANG Sheng-nan, HUA Yu-jiao

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

**Abstract:** To determine the contents of different chemical constituents in *Polygoni Multiflori Radix* (PMR) and *Polygoni Multiflori Caulis* (PMC) from the same origin. The stilbenes, anthraquinones, flavonoids and phenolic acids in PMR and PMC were determined by UPLC-TQ/MS. The nucleosides were determined by QTRAP UPLC-MS/MS and the mineral elements were determined by ICP-MS. The results showed that the content of chemical constituents had large difference between PMR and PMC. In PMR and PMC, the stilbenes accounted for 26.135, 15.307 mg/g, anthraquinones with 15.608, 10.034 mg/g, flavonoids with 0.864, 17.075 mg/g and phenolic acids with 0.529, 0.720 mg/g. Furthermore, 10 nucleosides accounting for 140.517, 197.534  $\mu\text{g/g}$  in both PMR and PMC. Among those nucleosides, guanosine made up for the highest percent with 55.688, 90.273  $\mu\text{g/g}$ . In addition, K was the most abundant mineral element in PMR and PMC with 12.538, 16.747 mg/g, followed by Ca with 3.283, 37.999 mg/g, Mg with 1.362, 2.105 mg/g and P with 1.218, 1.021 mg/g. This study provided a scientific basis for the comprehensive development of *Polygoni Multiflori Radix* and *Polygoni Multiflori Caulis*.

**Key words:** *Polygoni Multiflori Radix*; *Polygoni Multiflori Caulis*; stilbenes; anthraquinones; flavonoids; phenolic acids; nucleosides and nucleobases; mineral elements

何首乌、首乌藤为同基源不同药用部位的药材,分别系蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的块根、藤茎。何首乌具解毒、消痈、截疟、润肠通便之功效,用于疮痈、瘰疬、肠燥便秘等症;首乌

藤具养血安神,祛风通络之功效,用于失眠多梦、血虚身痛、风湿痹痛、皮肤瘙痒等症<sup>[1,2]</sup>。何首乌和首乌藤的主要有效成分均为二苯乙烯类和蒽醌类化合物。二苯乙烯类是一种植物抗毒素,是何首乌中特有的生物活性成分,具有抗衰老、降低胆固醇、提高免疫力、防止动脉硬化、保护肝脏的作用<sup>[3-6]</sup>。蒽醌类化合物具有调血脂、抗菌、强心、抗癌、心肌损伤保护、润肠通便的作用<sup>[4,6]</sup>。另外何首乌中黄酮及酚酸

收稿日期:2016-02-24 接受日期:2016-05-05

基金项目:国家科技支撑计划(2011BAI13B04);江苏高校优势学科建设工程资助项目(yxk-2014)

\* 通讯作者 Tel:86-25-85811511; E-mail:liuxunh1959@sohu.com

类成分除具有抗氧化活性,还具有抗衰老、抗肿瘤、降低血糖血脂等多方面的生理活性<sup>[7]</sup>。有学者认为核苷类成分是补益中药的共同物质基础,具有抗肿瘤、抗病毒、免疫调节的作用<sup>[8]</sup>。无机元素对机体的调节具有重要作用<sup>[9]</sup>。作为传统常用药材,何首乌化学成分的研究较为深入,而首乌藤化学研究相对较少,鉴于二者的传统功效及药理作用差别较大,本实验在前期实验基础上<sup>[10-13]</sup>,采用 UPLC-TQ/MS 技术测定同基源何首乌和首乌藤中二苯乙烯类、蒽醌类、黄酮类和酚酸类成分,采用 QTRAP LC-MS/MS 技术测定同基源何首乌和首乌藤中核苷类成分,采用 ICP-MS 测定同基源何首乌和首乌藤中无机元素,系统分析同基源何首乌和首乌藤中化学成分,为何首乌和首乌藤药材内在质量的综合评价和全面控制以及资源的综合开发利用提供科学依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Acquity™ 超高效液相色谱仪、Xevo TQ 质谱系统:美国 Waters 公司产品;Masslynx V4.1 工作站;岛津液相 UPLC-20ADXR 系列(日本 Shimadzu 公司),配有溶剂脱气装置、自动进样器;四级杆-线性离子阱质谱仪(API 4000,美国 AB SCIEX 公司),配有离子喷雾接口;CentriVap 离心浓缩仪(美国 Labconco 公司);KQ-500B 超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司,超声功率 500 W、40 kHz);BSA2245 型电子分析天平(十万分之一,德国赛多利斯公司);ME36S 型电子分析天平(百万分之一,德国赛多利斯公司);HH-S 型水浴锅(巩义市英峪予华仪器厂);Optima™ 2100DV 电感耦合等离子体-质谱仪(美国 Perkin Elmer 公司);ETHOS 型微波消解系统(意大利 MILESTONE 公司);DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱。

### 1.2 试剂

对照品二苯乙烯苷(110844-200607)、大黄素(110756-200110)、芦荟大黄素(0795-9803)、大黄酸(0757-200206)、大黄素甲醚(0758-200206)、表儿茶素(10878-200102)、没食子酸(110831-200302)、槲皮素(100081-200907)、芦丁(0080-9705)、金丝桃苷(111521-200303)、槲皮素(100081-200406)紫云英苷(11092001)购自中国药品生物制品检定所,纯度均大于 98%;虎杖苷(YY90052)、白藜芦醇(YY90051)、大黄素-8-β-D-吡喃葡萄糖苷

(YY90555)购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均大于 98%;尿嘧啶(100469-200401)、鸟嘌呤(140631-200904)、尿苷(887-200202)、腺嘌呤(110886-200001)、肌苷(40669-201104)、腺苷(110879-200202)购自中国食品药品检定研究院,纯度均 > 98%;胞苷(100982718)、鸟苷(1001103046)、胸苷(1001182663)购于美国 Sigma 公司,纯度均 > 98%;2'-脱氧胞苷(YSJ-04024)购于上海远慕生物科技有限公司,纯度 > 98%。水为超纯水(由 Millipore 纯水器制备);乙腈、甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);甲酸(色谱纯,美国 ROE 公司),各元素标准溶液均为国家标准样品:含有 Al、As、Ba、Be、Bi、Cd、Co、Cr、Cu、Fe、Mg、Mn、Ni、Sb、Sn、Ti、V、Zn、Zr 的多种元素标准溶液(100 μg/mL);Fe(GBS04-1726-2004)、Al(GBS04-1713-2004)、Mg(GBS04-1735-2004)、Ca(GBS04-1720-2004)、K(GBS04-1751-2004)、Hg(GBS04-1729-2004)、Pb(GBS04-1742-2004)、Si(GBS04-1752-2004)、B(GBS04-1716-2004)、P(GBS04-1741-2004a)、Sr(GBS04-1754-2004)的单元素标准溶液(1000 μg/mL),国家有色金属及电子材料分析测试中心。65%硝酸(AR,批号 080330229),其余试剂均为分析纯。

何首乌和首乌藤样品均于 2014 年 10 月采集于南京中医药大学药苑,经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的块根和藤茎。留样凭证保存于南京中医药大学中药鉴定实验室。

## 2 实验方法

### 2.1 二苯乙烯类、蒽醌类、黄酮类及酚酸类含量分析

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱:Waters BEH C<sub>18</sub>(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:水(含 0.1% 甲酸, A 相)-乙腈(B 相);梯度洗脱:0 ~ 1 min, 10% B; 1 ~ 2 min, 10% ~ 90% B; 2 ~ 3 min, 90% B; 3 ~ 4 min, 90% ~ 10% B; 4 ~ 5 min, 10% B。柱温 35 °C, 流速 0.25 mL/min, 进样量 5 μL。

#### 2.1.2 质谱条件

Waters 三重四级杆串联质谱仪(TQD), 离子化方式:电喷雾离子化(ESI), 多反应监测离子扫描模式(MRM)测定, 主要质谱参数为:脱溶剂温度为

400 ℃,锥孔气体积流量为 50 L/h,正离子模式下毛细管电压为 3.5 kV,脱溶剂气体积流量为 800 L/h;负离子模式下毛细管电压 2.5 kV,脱溶剂气体积流量为 550 L/h。14 种成分离子对的选择( $m/z$ ):表儿茶素:( $ES^+$ , 290.90 > 138.92);芦丁:( $ES^+$ , 610.93 > 302.94);金丝桃苷:( $ES^+$ , 469.93 > 302.88);二苯乙烯苷:( $ES^-$ , 404.84 > 242.93);紫云英苷:( $ES^+$ , 448.86 > 287.01),白藜芦醇:( $ES^-$ , 226.90 > 184.95);槲皮素:( $ES^+$ , 302.840 > 152.89);没食子酸:( $ES^+$ , 170.97 > 54.93);芦荟大黄素:( $ES^+$ , 270.84 > 224.90);大黄酸:( $ES^-$ , 282.78 > 210.85);大黄素-8- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷:( $ES^+$ , 432.04 > 118.97);大黄素:( $ES^+$ , 270.84 > 114.96);虎杖苷:( $ES^+$ , 3391.03 > 148.93);大黄素甲醚:( $ES^+$ , 284.94 > 139.11)。

### 2.1.3 对照品溶液制备

精密称取表儿茶素 6.42 mg、芦丁 2.11 mg、金丝桃苷 1.50 mg、二苯乙烯苷 21.3 mg、紫云英苷 1.78 mg、白藜芦醇 2.63 mg、槲皮素 1.55 mg、没食子酸 5.49 mg、芦荟大黄素 0.27 mg、大黄酸 1.34 mg、大黄素-8- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷 25.20 mg、大黄素 14.85 mg、虎杖苷 23.8 mg、大黄素甲醚 14.60 mg 对照品,分别置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度。取各对照品母液适量,加甲醇配制成含上述对照品的混合储备液,并逐级稀释,得到一系列不同浓度的混合对照品溶液,4 ℃ 保存,备用。

### 2.1.4 样品制备

精密称定干燥恒重的样品 1.0 g(过 80 目),置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 25 mL 70% 甲醇,称重,室温下超声提取 45 min 后取出,放冷以 70% 甲醇补足失重,静止冷却,平行制得两份,保存于 4 ℃。测定时精密吸取 1 mL,置于 100 mL 量瓶中,用初始流动相乙腈-0.1% 甲酸水(1:9, v/v)定容至刻度,摇匀,1 2000 rpm 离心 10 min,取出上清液经 0.22  $\mu$ m 的微孔滤膜滤过,即得。

### 2.1.5 线性方程、检测限和定量限

精密吸取“2.1.3”项下混合对照品溶液,置于 10 mL 容量瓶中,用初始流动相乙腈-0.1% 甲酸水(1:9, v/v)逐级稀释制成一系列浓度的混合对照品溶液,按上述色谱-质谱条件进样分析,以对照品的峰面积( $Y$ )对相应的浓度( $X$ )进行线性回归,得回归方程、相关系数和线性范围;以各化合物的信噪比( $S/N$ )等于 3 时相对应的浓度确定为最低检测限

(LOD),以各化合物的信噪比( $S/N$ )等于 10 时相对应的浓度确定为最低定量限(LOQ)。

## 2.1.6 方法学考察

### 2.1.6.1 精密性、重复性、稳定性

精密吸取同一混合对照溶液分别重复进样 6 次,分别计算 14 种成分的峰面积的 RSD;取同一样品,按照样品制备方法制备供试品溶液,进样,重复测定 6 次,计算各成分的含量的 RSD;取同一样品制备供试品溶液,分别在 0、2、4、8、12、24 h 测定 14 种成分的峰面积 RSD。

### 2.1.6.2 加样回收率

取已知含量的样品 0.5 g(6 份),精密称定,置锥形瓶中,分别精密加入一定量各对照品溶液,根据“2.1.4”项下方法制备加样回收率供试品溶液,根据样品测定方法进样,计算各成分的平均回收率及 RSD。

### 2.1.7 样品测定

分别精密吸取对照品溶液与供试品溶液进行 UPLC-MS/MS 分析,计算各成分含量。

## 2.2 核苷类成分分析

### 2.2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Atlantis T<sub>3</sub>(2.1 mm  $\times$  150 mm, 3  $\mu$ m);流动相:甲醇(A相)-5 mmol/L 醋酸铵(含 0.1% 冰醋酸,B相);梯度洗脱:0~4.5 min, 3%~4% A;4.5~8 min, 4%~18% A;8~10 min, 18% A;10~10.1 min, 18%~3% A;10.1~13 min, 3% A。柱温 35 ℃,流速 0.4 mL/min,检测波长 254 nm,进样量 5  $\mu$ L。

### 2.2.2 质谱条件

离子源:Turbo V,电离模式:( $ESI^+$ );采集方式 MRM;离子化温度(TEM):650 ℃。喷雾电压:5500 V;雾化气(GS1):65 L/min;辅助气(GS2):65 L/min;气帘气(CUR):30 L/min。10 种核苷的离子对的选择( $m/z$ ):尿嘧啶:(113.0 > 96.1);胞苷:(243.9 > 112.1);鸟嘌呤:(151.8 > 135.0);尿苷:(244.7 > 113.1);腺嘌呤:(136.0 > 119.1);肌苷:(269.0 > 137.0);鸟苷:(284.3 > 152.1);胸苷:(243.1 > 127.2);腺苷:(268.1 > 136.1);2'-脱氧胞苷:(227.9 > 112.1)。

### 2.2.3 对照品溶液制备

精密称取一定量的尿嘧啶、鸟嘌呤、胞苷、尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷、2'-脱氧胞苷对照品,分别加水配制成一定浓度的对照品储备液。取

各对照品储备液适量,置 10 mL 量瓶中,加水定容,配制成尿嘧啶、鸟嘌呤、胞苷、尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷、2'-脱氧胞苷浓度分别为 10.76、10.30、7.51、10.48、9.64、10.37、9.72、8.74、10.94、9.11  $\mu\text{g/mL}$  的混合对品、照标溶液。

#### 2.2.4 样品溶液的制备

精密称定干燥恒重的样品 1.0 g(过 80 目筛),置于 25 mL 具塞锥形瓶中,加入 10 mL 水,称重,室温下超声提取 60 min 后取出,放冷以水补足失重,提取液以 13000 rpm 离心 10 min,取出上清液于 4  $^{\circ}\text{C}$  保存,使用时用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,即得。

#### 2.2.5 标准曲线、检测限和定量限

精密吸取 2.2.3 节项下混合对品照标溶液 0.05、0.1、0.5、2.0、5.0、10.0 mL,置 10 mL 量瓶中,定容摇匀。按色谱-质谱条件进样分析,以对照品的峰面积(Y)对相应的质量浓度(X)进行线性回归,得回归方程、相关系数和线性范围;以各化合物的信噪比等于 3 时相对应的质量浓度确定为最低检测限,以各化合物的信噪比等于 10 时相对应的质量浓度确定为最低定量限。

#### 2.2.6 方法学考察

##### 2.2.6.1 精密度、重复性、稳定性

精密吸取同一混合对照溶液分别重复进样 6 次,分别计算 10 种核苷类成分的峰面积的相对标准偏差;取同一样品,按照样品制备方法制备供试品溶液,进样,重复测定 6 次,计算各核苷类成分的含量相对标准偏差;取同一样品制备供试品溶液,分别在 1、2、4、8、12、24 h 测定 10 种核苷类成分的含量并计算其相对标准偏差。

##### 2.2.6.2 加样回收率

取已知含量的样品(6 份),精密称定,置锥形瓶中,分别精密加入一定量的尿嘧啶、胞苷、鸟嘌呤、2'-脱氧胞苷、尿苷、腺嘌呤、肌苷、鸟苷、胸苷、腺苷的对照品溶液,根据“2.2.4”项下方法制备加样回收率供试溶液,根据样品测定方法进样,计算各核苷类成分的平均回收率及相对标准偏差。

#### 2.2.7 样品含量测定

制备各供试品溶液,按照上述色谱-质谱条件测定,根据相应线性关系计算供试样品中 10 种核苷的含量。

### 2.3 无机元素分析

#### 2.3.1 样品制备

精密称取样品粉末(过 80 目筛)0.4 g 样品放

入聚四氟乙烯消解罐中,精确加入浓硝酸 8 mL,置于通风橱中静置 20 min,待反应不剧烈后加盖密封,装入微波消解仪中,按设定的消解程序:先经 10 min 由室温升温至 150  $^{\circ}\text{C}$ 、在 150  $^{\circ}\text{C}$  维持 2 min 消解、然后 3 min 由 150 升温至 200  $^{\circ}\text{C}$ 、在 200  $^{\circ}\text{C}$  维持 8 min 消解,消解完毕后,冷却至室温,取出消解罐,在通风橱中将酸挥尽,用去离子水定容至 100 mL 量瓶中。

#### 2.3.2 测定条件

ICP-MS 工作参数:功率 13 kW,冷却气流量 15 L/min,载气流速 0.8 L/min,辅助气流量 0.2 L/min,样品提升量为 1.5 L/min;测量条件:积分时间 10 s,延迟时间 1 s,重复次数 1 次;测量方式:标准曲线法;读数方式:峰强。

#### 2.3.3 标准曲线制备

多元素对照品溶液的配制:分别精密吸取多元素标准溶液 10  $\mu\text{L}$ ,用去离子水定容至 10 mL,配成多元素混标母液,浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$ 。精密吸取母液标准溶液 0、0.25、0.5、0.75、1.0 mL,分别准确加入浓硝酸 1.8 mL,用去离子水定容至 10 mL,配成含 As、B、Ba、Be、Cd、Co、Cr、Cu、Mn、Ni、Sb、Sn、Sr、V、Zn 等元素浓度分别为 0、0.025、0.05、0.075、0.1  $\mu\text{g/mL}$  系列浓度的混合对照品溶液。

K、Mg、Ca、P 对照品溶液的配制:分别精密移取各元素标准溶液 0、0.1、0.2、0.3、0.5 mL,准确加入浓硝酸 1.8 mL,用去离子水定容至 10 mL,配成含 K、Mg、Ca、P 浓度为 0、10、20、30、50  $\mu\text{g/mL}$  系列浓度的混合对照品溶液。

Fe、Al、Si 对照品溶液的配制:精密移取 Fe、Al、Si 单元素标准溶液 0、0.02、0.03、0.04、0.05 mL,准确加入硝酸 0.09 mL,用去离子水定容至 10 mL,配成含 Fe、Al、Si 浓度为 0、2.0、3.0、4.0、5.0  $\mu\text{g/mL}$  系列浓度的 Fe、Al、Si 对照品溶液。

Pb、Hg 对照品溶液的配制:分别精密吸取 Pb、Hg 的单元素标准溶液各 10  $\mu\text{L}$ ,用去离子水定容至 10 mL,配成 Pb、Hg 母液,浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$ 。分别精密移取 Pb、Hg 母液各 0、0.25、0.5、0.75、1.0 mL,准确加入硝酸 1.8 mL,用去离子水定容至 10 mL,配成含 Pb 浓度分别为 0、0.025、0.05、0.075、0.1  $\mu\text{g/mL}$  系列浓度的混合对照品溶液。

根据试样中待测元素的水平配制对照品溶液,依次测定 24 种无机元素的系列浓度对照品溶液,以对照品浓度 X( $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标,对照品峰强 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,得各元素对照品的回归方

程、相关系数和线性范围。

### 2.3.4 加样回收率试验

取已知含量的样品 0.2 g(6 份),精密称定,分别精密加入一定量的各元素标准溶液,依法制备样品溶液,依上述条件进样测定,计算各元素的平均回收率。

### 2.3.5 样品测定

取各样品供试品溶液,依上述条件上机测定。计算各样品的含量。

## 3 结果与讨论

### 3.1 二苯乙烯类、蒽醌类、黄酮类、酚酸类含量分析

#### 3.1.1 线性方程、检测限和定量限

以对照品的峰面积(Y)对相应的浓度(X)进行线性回归,得回归方程、相关系数和线性范围;以各化合物的信噪比(S/N)等于 3 时相对应的浓度确定为最低检测限(LOD),以各化合物的信噪比(S/N)等于 10 时相对应的浓度确定为最低定量限(LOQ)。结果见表 1。

表 1 线性关系考察

Table 1 Investigation of liner relationship

化合物 Components	回归方程 Regression equation	<i>r</i>	线性范围 Linear range(ng/mL)	检测限 LOD (ng/mL)	定量限 LOQ (ng/mL)
表儿茶素 Epicatechin	$Y = 0.5801X - 24.676$	0.9998	1.284 ~ 1284	0.137	0.781
芦丁 Rutin	$Y = 0.2439X + 1.321$	0.9985	0.422 ~ 422	0.0518	0.342
金丝桃苷 Hyperoside	$Y = 0.3418X + 1.4387$	0.9971	0.300 ~ 300	0.048	0.241
二苯乙烯苷 Stilbeneglucoside	$Y = 1.5001X - 414.61$	0.9935	4.260 ~ 4260	0.430	1.980
紫云英苷 Astragaln	$Y = 0.0481X - 2.4712$	0.9974	0.280 ~ 280	0.034	0.183
白藜芦醇 Resveratrol	$Y = 10.914X - 41.299$	0.9952	0.526 ~ 526	0.0608	0.363
槲皮素 Quercetin	$Y = 3.1646X - 3.7778$	0.9985	0.310 ~ 310	0.042	0.208
没食子酸 Gallic acid	$Y = 1.0676X - 202.44$	0.9967	1.098 ~ 1098	0.114	0.588
芦荟大黄素 Aloe-emodin	$Y = 2.4635X - 0.2661$	0.9999	0.054 ~ 54	0.0069	0.038
大黄酸 Rhein	$Y = 0.3838X + 1.260$	0.9966	0.1830 ~ 1340	0.000284	0.000884
大黄素-8-β-D-吡喃葡萄糖苷 Emodin-8-β-D-glucopyranoside	$Y = 1.0353X - 27715$	0.9994	5.040 ~ 5040	2.450	0.684
大黄素 Emodin	$Y = 0.3421X - 10.389$	0.9996	2.970 ~ 2970	0.378	1.327
虎杖苷 Polydatin	$Y = 1.0153X - 2899.2$	0.9915	4.760 ~ 4760	0.468	2.270
大黄素甲醚 Physcion	$Y = 0.2391X + 4.7536$	0.9921	2.920 ~ 2920	0.281	1.230

#### 3.1.2 方法学考察

方法学考察结果见表 2,由表 2 可得 14 种成分峰面积的 RSD 为 0.43% ~ 2.53%,符合精密实验要求,说明仪器精密度良好;14 种成分的含量的 RSD 为 0.54% ~ 2.57%,均符合实验规定,表明该方法重复性良好;14 种成分的含量在 24 h 内的 RSD

为 0.81% ~ 3.21%,表明供试品溶液在 24 h 内具有较好的稳定性。各成分的平均回收率及相对标准偏差分别为 95.85% ~ 102.13%,1.93% ~ 4.15%,结果显示该方法的准确度良好,可以满足日常样品的分析要求。

表 2 14 种目标成分的方法学考察结果

Table 2 Method validation for the determination of 14 components

化合物 Components	精密 Precision RSD(%)	重复性 Repeatability RSD(%)	稳定性 Stability RSD(%)	加样回收率 Recovery	
				平均回收率 Average recovery(%)	RSD (%)
表儿茶素 Epicatechin	0.68	2.57	3.21	98.83	2.72
芦丁 Rutin	2.02	-	-	102.13	2.07

金丝桃苷 Hyperoside	1.95	0.85	1.60	97.77	2.49
二苯乙烯苷 Stilbeneglucoside	1.06	1.16	2.32	101.32	2.84
紫云英苷 Astragalin	1.86	1.97	2.12	95.85	1.93
白藜芦醇 Resveratrol	0.77	1.77	2.67	99.04	2.89
槲皮素 Quercetin	2.53	-	-	97.15	3.22
没食子酸 Gallic acid	2.19	0.54	0.81	100.92	3.85
芦荟大黄素 Aloe-emodin	1.24	2.45	1.80	96.58	2.54
大黄酸 Rhein	0.88	1.04	2.62	99.67	2.40
大黄素-8-β-D-吡喃葡萄糖苷 Emodin-8-β-D-glucopyranoside	1.06	1.56	3.08	101.13	4.15
大黄素 Emodin	1.45	1.77	2.22	95.99	2.85
虎杖苷 Polydatin	0.43	2.13	2.89	101.26	3.55
大黄素甲醚 Physcion	1.72	2.31	3.18	99.44	1.99

### 3.1.3 样品测定结果

实验通过 UPLC-TQ/MS 同时测定同基源不同入药部位的何首乌和首乌藤中 3 种二苯乙烯(二苯乙烯苷、虎杖苷和白藜芦醇)、5 种蒽醌(芦荟大黄素、大黄酸、大黄素-8-β-D-吡喃葡萄糖苷、大黄素和大黄素甲醚)、5 种黄酮(表儿茶素、芦丁、金丝桃苷、紫云英苷和槲皮素)和 1 种酚酸(没食子酸)等 14 种目标成分的含量,14 种成分的 MRM 色谱图见图 1。各成分结果见表 3。由表 3 可以得出何首乌和首乌藤中二苯乙烯类成分的总量分别为 26.135、15.307 mg/g;蒽醌类成分的总量分别为 15.608、10.034 mg/g;黄酮类成分的总量分别为 0.864、17.075 mg/g;没食子酸的含量分别为 0.529、0.720 mg/g。何首乌和首乌藤中二苯乙烯苷、虎杖苷、大黄素、大黄素甲醚、大黄素-8-β-D-吡喃葡萄糖的含量较高。其余成分含量相对较低。在首乌藤中未检测到大黄酸,何首乌中未检测到芦丁和槲皮素。二苯乙烯苷和蒽醌中大黄素、大黄素甲醚的含量均达到《中国药典》2015 版一部中何首乌和首乌藤中的定量要求。

## 3.2 核苷类成分分析

### 3.2.1 标准曲线、检测限和定量限

以对照品的峰面积(Y)对相应的质量浓度(X)

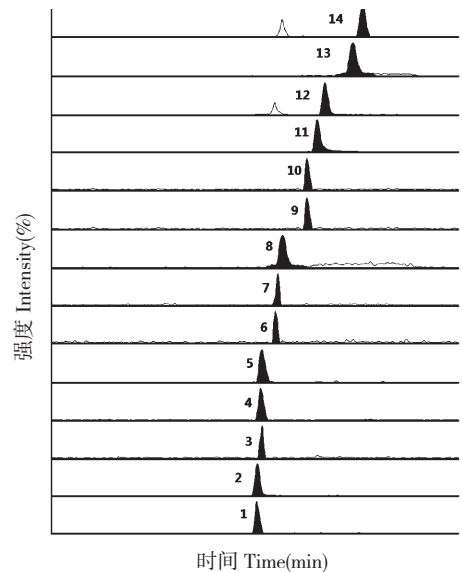


图 1 14 种成分的 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of 14 components

注:1. 表儿茶素,2. 芦丁,3. 金丝桃苷,4. 二苯乙烯苷,5. 紫云英苷,6. 白藜芦醇,7. 槲皮素,8. 没食子酸,9. 芦荟大黄素,10. 大黄酸,11. 大黄素-8-β-D-吡喃葡萄糖苷,12. 大黄素,13. 虎杖苷,14. 大黄素甲醚

Note:1. Epicatechin,2. Rutin,3. Hyperoside,4. Stilbene glucoside,5. Astragalin,6. Resveratrol,7. Quercetin,8. Gallic acid,9. Aloe-emodin,10. Rhein,11. Emodin-8-β-D-glucopyranoside,12. Emodin,13. Polydatin,14. Physcion

表 3 样品中 14 种成分的含量测定结果 (mg/g, n = 2)

Table 3 Contents of 14 components in PMR and PMC(mg/g, n = 2)

成分 Components	何首乌 PMR	首乌藤 PMC	成分 Components	何首乌 PMR	首乌藤 PMC
二苯乙烯苷 Stilbene glucoside	24.223	13.733	大黄酸 Rhein	0.0027	-
虎杖苷 Polydatin	1.902	1.565	表儿茶素 Epicatechin	0.742	5.616

白藜芦醇 Resveratrol	0.0101	0.0095	槲皮素 Quercetin	-	0.095
大黄素 Emodin	5.240	3.168	紫云英苷 Astragalinalin	0.0024	10.938
芦荟大黄素 Aloe-emodin	0.0007	0.0013	金丝桃苷 Hyperoside	0.120	0.420
大黄素甲醚 Physcion	6.209	2.481	芦丁 Rutin	-	0.101
大黄素-8-β-D-吡喃葡萄糖 Emodin-8-β-D-glucopyranoside	4.156	4.384	没食子酸 Gallic acid	0.529	0.720

注:“-”未检出。

Note:“-” not detected.

进行线性回归,得回归方程、相关系数和线性范围;  
以各化合物的信噪比等于 3 时相对应的质量浓度确

定为最低检测限,以各化合物的信噪比等于 10 时相对  
应的质量浓度确定为最低定量限。结果见表 4。

表 4 10 种核苷标准曲线、定量限和检测限

Table 4 Calibration curves, LOD and LOQ of 10 nucleosides and nucleobases

化合物 Components	回归方程 Regression equation	<i>r</i>	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOD ( $\text{ng/mL}$ )	LOQ ( $\text{ng/mL}$ )
尿嘧啶 Uracil	$Y = 112.52X + 14679.79$	0.9991	0.05380 ~ 10.76	3.47	10.85
胞苷 Cytidine	$Y = 64.21X + 4166.42$	0.9925	0.0375 ~ 7.51	6.64	17.26
鸟嘌呤 Guanine	$Y = 524.14X + 14226$	0.9993	0.05150 ~ 10.30	1.05	3.17
2'-脱氧胞苷 2'-Deoxycytidine	$Y = 317X - 29846$	0.9971	0.0455 ~ 9.11	2.29	8.49
尿苷 Uridine	$Y = 232.19X + 29740.24$	0.9995	0.05240 ~ 10.48	3.61	11.91
腺嘌呤 Adenine	$Y = 601.96X + 1.297 \times 10^5$	0.9979	0.0482 ~ 9.64	9.68	18.20
肌苷 Inosine	$Y = 1008.87X + 12608.69$	0.9955	0.05190 ~ 10.37	3.46	10.24
鸟苷 Guanosine	$Y = 1766.93X + 1.226 \times 10^5$	0.9985	0.0486 ~ 9.72	8.61	15.20
胸苷 Thymidine	$Y = 132.14X + 5144.79$	0.9909	0.0437 ~ 8.74	3.04	8.99
腺苷 Adenosine	$Y = 2.74 \times 104X + 1.023 \times 10^6$	0.9989	0.05470 ~ 10.94	3.64	9.41

### 3.2.2 方法学考察

方法学考察结果见表 5,由表 5 可得 10 种核苷类成分峰面积的 RSD 为 0.74% ~ 4.15%,符合精密  
度实验要求,说明仪器精密度良好;10 种核苷类成分  
的含量的 RSD 为 0.44% ~ 4.49%,均符合实验规  
定,表明该方法重复性良好;10 种核苷类成分的含

量在 24 h 内的 RSD 为 1.19% ~ 4.58%,表明供试  
品溶液在 24 h 内具有较好的稳定性。各核苷类成  
分的平均回收率及相对标准偏差分别为 98.80% ~  
104.54%,1.78% ~ 4.98%,结果显示该方法的准确  
度良好,可以满足日常样品的分析要求。

表 5 精密度、重复性、稳定性和加样回收率实验结果

Table 5 Precision, repeatability, stability and recovery of the 10 nucleosides and nucleobases

化合物 Components	精密度 Precision RSD(%)	重复性 Repeatability RSD(%)	稳定性 Stability RSD(%)	加样回收率 Recovery	
				平均回收率 Average recovery(%)	RSD(%)
尿嘧啶 Uracil	2.03	2.72	3.31	104.81	2.15
胞苷 Cytidine	3.74	1.79	1.19	98.86	4.98
鸟嘌呤 Guanine	4.15	3.51	1.94	100.28	2.01
2'-脱氧胞苷 2'-Deoxycytidine	3.84	1.30	1.52	101.61	1.86
尿苷 Uridine	1.84	1.59	2.55	99.71	2.45
腺嘌呤 Adenine	0.74	2.25	4.58	100.39	2.29
肌苷 Inosine	3.24	4.49	3.82	102.54	1.78

鸟苷 Guanosine	3.88	0.44	2.45	99.82	3.02
胸苷 Thymidine	1.19	3.38	1.72	100.46	2.75
腺苷 Adenosine	1.88	1.04	2.76	98.80	2.08

### 3.2.3 样品含量测定

实验通过 QTRAP UPLC-MS/MS 技术测定同基源不同入药部位的何首乌和首乌藤中 10 种核苷类成分,10 种核苷的 MRM 色谱图见图 2。测定结果见表 6。结果显示,何首乌中总核苷类成分的含量为 140.517  $\mu\text{g/g}$ ,其中尿苷的含量最高为 55.688  $\mu\text{g/g}$ ,其次为腺嘌呤、胞苷、尿嘧啶分别为 31.927、29.608、9.926  $\mu\text{g/g}$ ,其他核苷类成分的含量相对较低,其中腺苷的含量仅含有 0.155  $\mu\text{g/g}$ 。首乌藤中总核苷类成分的含量达到 197.534  $\mu\text{g/g}$ ,其中尿苷的含量最高为 90.273  $\mu\text{g/g}$ ,其次为胞苷、腺嘌呤、腺苷、鸟苷的含量分别为 38.500、29.439、16.374、15.748  $\mu\text{g/g}$ ,其他核苷类成分的含量相对较低,其中鸟嘌呤的含量仅有 1.083  $\mu\text{g/g}$ 。

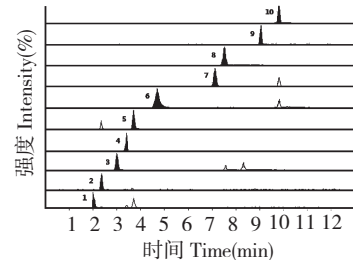


图 2 10 种核苷的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of 10 nucleosides and nucleobases

注:1. 尿嘧啶,2. 胞苷,3. 鸟嘌呤,4. 2'-脱氧胞苷,5. 尿苷,6. 腺嘌呤,7. 肌苷,8. 鸟苷,9. 胸苷,10. 腺苷

Note: 1. Uracil, 2. Cytidine, 3. Guanine, 4. 2'-deoxycytidine, 5. Uridine, 6. Adenine, 7. Inosine, 8. Guanosine, 9. Thymidine, 10. Adenosine

表 6 样品中 10 种核苷的含量测定结果 ( $\mu\text{g/g}$ ,  $n=2$ )

Table 6 Contents of 10 nucleosides in PMR and PMC ( $\mu\text{g/g}$ ,  $n=2$ )

成分 Components	何首乌 PMR	首乌藤 PMC	成分 Components	何首乌 PMR	首乌藤 PMC
尿嘧啶 Uracil	9.926	1.150	鸟苷 Guanosine	6.935	15.748
胞苷 Cytidine	29.608	38.500	胸苷 Thymidine	1.592	2.568
鸟嘌呤 Guanine	2.725	1.083	腺苷 Adenosine	0.155	16.374
尿苷 Uridine	55.688	90.273	2'-脱氧胞苷 2'-deoxycytidine	1.269	1.235
腺嘌呤 Adenine	31.927	29.439	总量 Total	140.517	197.534
肌苷 Inosine	0.691	1.165			

## 3.3 无机元素分析

### 3.3.1 标准曲线

以对照品浓度  $X$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标,对照品峰

强  $Y$  为纵坐标,绘制标准曲线,得各元素对照品的回归方程、相关系数和线性范围。结果见表 7。

表 7 24 种无机元素的标准曲线和加样回收率

Table 7 Calibration curves and average recovery of 24 mineral elements

分析元素 Elements	回归方程 Regression equation	$r$	线性范围 Linear rang ( $\mu\text{g/mL}$ )	加样回收率 Recovery (%)
Sn	$Y = 1460X + 4.5$	0.9943	0.025 ~ 0.1	101.17
As	$Y = 1255X + 6.6$	0.9856	0.025 ~ 0.1	101.41
Zn	$Y = 13490X + 32.5$	0.9964	0.025 ~ 0.1	99.48
Sb	$Y = 2460X + 1$	0.9994	0.05 ~ 0.2	97.97
P	$Y = 464.8X + 427$	0.9992	10.0 ~ 50.0	99.72
Pb	$Y = 3188X + 10.6$	0.9940	0.025 ~ 0.1	100.82



Co	$Y = 37200X - 19.1$	0.9999	0.025 ~ 0.1	99.76
Cd	$Y = 86110X + 112$	0.9996	0.025 ~ 0.1	98.09
Ni	$Y = 27680X + 47$	0.9988	0.025 ~ 0.1	102.74
Ba	$Y = 106300X + 20$	0.9997	0.025 ~ 0.1	102.03
Fe	$Y = 18160X + 448.5$	0.9997	2.0 ~ 5.0	98.86
B	$Y = 53180X + 27.8$	0.9977	0.025 ~ 0.1	98.69
Si	$Y = 39060X + 2458.2$	0.9983	0.025 ~ 0.1	99.37
Hg	$Y = 3709X + 16.5$	0.9923	0.025 ~ 0.1	98.74
Mn	$Y = 586200X + 307.7$	0.9997	0.025 ~ 0.1	97.12
Cr	$Y = 65530X - 40.1$	0.9998	0.025 ~ 0.1	100.49
Mg	$Y = 44740X + 13597.8$	0.9997	10.0 ~ 50.0	101.78
V	$Y = 47060X + 52.8$	0.9997	0.025 ~ 0.1	97.56
Be	$Y = 1321000X - 380.9$	0.9999	0.025 ~ 0.1	102.54
Ca	$Y = 13230X + 7422.2$	0.9993	10.0 ~ 50.0	98.45
Cu	$Y = 158000X - 93.8$	0.9998	0.025 ~ 0.1	100.92
Al	$Y = 187400X + 9055.8$	0.9985	2.0 ~ 5.0	101.36
Sr	$Y = 4086000X - 3254.6$	0.9997	0.025 ~ 0.1	102.13
K	$Y = 19790X + 245.2$	0.9998	10.0 ~ 50.0	99.25

### 3.3.2 加样回收率试验

加样回收率试验结果见表7。由表7可知24元素的平均回收率为97.12%~102.74%,结果显示该方法的准确度良好,可以满足日常样品的分析要求。

### 3.3.3 样含量测定

实验通过ICP-MS测定同基源不同入药部位何首乌和首乌藤中24种无机元素的含量,元素分析结果见表8。通过表8可以看出,何首乌和首乌藤中含有丰富的元素,种类较多。结果显示何首乌中宏

量元素丰富,Ca、K、Mg、P的含量均较高,分别为3.283、12.538、1.362、1.218 mg/g,微量元素种类繁多,其中Fe的含量高达8.011 mg/g、Al的含量为1.186 mg/g,其他元素的质量分数较低。首乌藤中Ca、K、Mg、P的含量分别为37.999、16.747、2.105、1.021 mg/g,Fe、Al的含量仅有0.315、0.135 mg/g。重金属元素Cu、As、Cr、Pb、Hg均检出且符合《药用植物及其制剂进出口绿色行业标准》中有关规定。Cd在何首乌和首乌藤中的含量分别为8.164、9.494  $\mu\text{g/g}$ 需要引起足够的重视。

表8 元素种类及其质量分数( $\mu\text{g/g}$ ,  $n=2$ )

Table 8 Analysis of mineral elements in PMR and PMC( $\mu\text{g/g}$ ,  $n=2$ )

元素 Element	何首乌 PMR	首乌藤 PMC	元素 Element	何首乌 PMR	首乌藤 PMC
Fe	8011.080	315.037	Mn	108.310	122.426
Si	185.999	135.283	V	49.131	24.539
Ca	3283.825	37999.803	Sb	26.494	22.702
Al	1186.263	346.448	B	5.964	21.060
K	12538.335	16747.733	Sr	3.319	38.357
Mg	1362.847	2105.788	Be	56.520	55.711
P	1218.973	1021.657	Cu	16.328	13.987
Sn	30.670	26.879	As	2.896	2.674
Zn	70.608	70.391	Cd	4.164	9.494

Co	19.339	18.721	Cr	0.546	0.550
Ni	11.288	10.233	Pb	3.271	3.901
Ba	37.357	82.043	Hg	0.074	0.012

## 4 小结

本实验系统对同基源不同入药部位的何首乌和首乌藤中二苯乙烯类、蒽醌类、黄酮类、酚酸、核苷类、无机元素等进行分析,为何首乌和首乌藤药材内在质量的综合评价和全面控制及资源综合开发提供科学依据。

### 参考文献

- Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China(中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol 1, 175-177, 265-266.
- Lin LF, Boran N, Lin HM, *et al.* Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb. : A review. *J Ethnopharmacol*, 2015, 159: 158-183.
- Guo QQ(郭倩倩), Xie YH(谢艳华), Yang Q(杨倩), *et al.* Study on the general pharmacological effect of tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2013, 28: 174-177.
- Lin LF, Boran N, Lin HM, *et al.* Simultaneous determination and pharmacokinetic study of P-hydroxybenzaldehyde, 2, 3, 5, 40-tetrahydroxystilbene-2-O- $\beta$ -glucoside, emodin-8-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, and emodin in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry after oral administration of *Polygonum multiflorum*. *Anal Meth*, 2015, 7: 244-252.
- Zhu ZW, Li J, Gao XM, *et al.* Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in Radix *Polygoni multiflori* by LC-MS/MS. *J Pharma Biom Anal*, 2012, 62: 162-166.
- He DX, Chen B, Tian QQ, *et al.* Simultaneous determination of five anthraquinones in medicinal plants and pharmaceutical preparations by HPLC with fluorescence detection. *J Pharm Biom Anal*, 2009, 49: 1123-1127.
- Song SJ(宋士军), Li FF(李芳芳), Yue H(岳华), *et al.* Study on the anti-aging effects of Radix *Polygonum multiflorum*. *J Hebei Med Univ* (河北医科大学学报), 2003, 24(2): 90-91.
- Kong DP(孔德平), Qian DW(钱大玮), Guo S(郭盛), *et al.* Determination of nucleosides compounds in nine tonic traditional Chinese medicines of fruit and seeds. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2011, 17: 98-101.
- Wang J(王健), Jia RY(贾仁勇), Li XM(黎晓敏), *et al.* Studies on the relationship between the effect of Chinese herb medicines and the content of mineral elements in them. *Studies Trace Elements Health* (微量元素与健康研究), 1996, 13(4): 29-31.
- Luo YY(罗益远), Liu JX(刘娟秀), Liu XH(刘训红), *et al.* Simultaneous determination of seven components in *Polygoni Multiflori Radix* by MEKC-DAD. *Chin Pharma J* (中国药学杂志), 2015, 40: 2565-2570.
- Luo YY(罗益远), Liu JX(刘娟秀), Hou Y(侯娅), *et al.* ICP-MS analytical studies on the inorganic elements in *Polygoni Multiflori Radix* from different areas and commercial herbs. *Chin Tradit Herbal Drugs* (中草药), 2015, 46: 1056-1064.
- Luo YY(罗益远), Liu JX(刘娟秀), Liu XH(刘训红), *et al.* GC-MS analytical studies on the volatile constituents of *Polygoni Multiflori Radix* and *Polygoni Multiflori Caulis*. *J Chin Med Mate* (中药材), 2015, 38: 2113-2116.
- Luo YY(罗益远), Liu JX(刘娟秀), Liu XH(刘训红), *et al.* Simultaneous determination of nucleosides and nucleobases of *Polygoni Multiflori Radix* from different origins by UP-LC-QTRAP-MS/MS. *J Instru Anal* (分析测试学报), 2015, 34: 519-524.