

基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术分析何首乌代谢物积累的动态变化

罗益远¹, 刘娟秀¹, 王 锋², 刘训红^{1*}, 王胜男¹, 华愉教¹, 兰才武³, 邢清清¹

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 徐州生物工程职业技术学院, 江苏 徐州 221006

3. 贵州昌昊中药发展有限公司, 贵州 凯里 556000

摘要: **目的** 分析不同采收时间何首乌 *Polygonum multiflorum* 代谢产物积累的动态变化。**方法** 采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间高分辨质谱 (UPLC-Triple TOF-MS/MS) 技术对不同采收时间何首乌 15 批样品进行测定, 通过多级串联质谱分析, 对其质谱数据进行峰匹配、峰对齐、滤噪处理等进行特征峰提取; 采用主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 进行数据处理; 通过一级质谱精确质荷比和二级质谱碎片信息, 结合软件数据库搜索及相关文献进行成分鉴别。**结果** 不同采收时间何首乌样品间的化学组成得到明显区分; 初步筛选出不同采收时间何首乌样品间 25 种差异显著的化学成分并鉴定出 24 个成分, 其中共有 9 种差异化学成分呈现不同的变化规律。**结论** 为揭示不同采收时间何首乌中代谢物积累动态规律及确定其药材合理采收期提供基础资料。

关键词: 何首乌; 超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间高分辨质谱; 代谢产物; 积累动态; 主成分分析; 偏最小二乘法-判别分析

中图分类号: R286.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)10-2105-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.10.028

Dynamic changes of metabolite accumulation of *Polygoni Multifori Radix* based on UPLC-Triple TOF-MS/MS

LUO Yi-yuan¹, LIU Juan-xiu¹, WANG Feng², LIU Xun-hong¹, WANG Sheng-nan¹, HUA Yu-jiao¹, LAN Cai-wu³, XING Qing-qing¹

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Xuzhou Vocational College of Bioengineering, Xuzhou 221006, China

3. Guizhou Chang Hao Chinese Medicine Co., Ltd., Kaili 556000, China

Abstract: **Objective** To analyze the change of chemical constituents of *Polygoni Multifori Radix* from different harvest time. **Methods** Fifteen batches of *Polygoni Multifori Radix* samples from different harvest time were determined by UPLC-Triple TOF-MS/MS. Through the analysis of the multistage tandem mass spectrometry, the characteristic peaks were extracted with mass spectrometry data peak matching, peak alignment, and noise filtering. Principal component analysis (PCA) and partial least-squares discriminant analysis (PLS-DA) were used for data processing. The components were identified according to a mass spectrometry accurate mass and two mass spectrometry fragmentation information, combined with the software of database search and literature. **Results** The chemical composition in *Polygoni Multifori Radix* samples from different harvest time are clearly distinguished. Twenty-four kinds of differential chemical constituents were identified. Among them, there are nine kinds of common differential constituents which presented different changing laws. **Conclusion** This study provides the basic data for revealing the dynamic change law of metabolite accumulation of *Polygoni Multifori Radix* and confirms its optimal harvest period.

Key words: *Polygoni Multifori Radix*; UPLC-Triple TOF-MS/MS; metabolites; dynamic accumulation; PCA; PLS-DA

何首乌 *Polygoni Multifori Radix* 为常用中药材, (Polygonaceae) 植物何首乌 *Polygonum multiflorum* 历代本草和历版药典均有记载和收载, 系蓼科 Thunb. 的干燥块根, 具消痈、解毒、截疟、润肠通

收稿日期: 2016-12-13

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

作者简介: 罗益远 (1989—), 男, 福建连城人, 硕士, 主要从事中药品质评价研究。E-mail: luoyiyuan0012@sohu.com

*通信作者 刘训红 (1959—), 男, 教授, 主要从事中药鉴定与品质评价研究。Tel: (025)85811511 E-mail: liuxunh1959@sohu.com

便的功效,主要用于疮痈、瘰癧、久疟体虚,肠燥便秘^[1]。何首乌主产于我国贵州、广东、四川、广西等省。现代研究表明,何首乌具有抗衰老、增强免疫力、抗肿瘤、保肝、止痛抗菌等作用^[2-3],其药效成分主要为二苯乙烯苷类^[4-6]、蒽醌类^[6]、磷脂类^[7]等。关于何首乌的采收时间研究,多以 HPLC 法测定二苯乙烯苷类、蒽醌类等单一或单类成分的动态变化为考察指标^[8-9],亦有用胶束电动毛细管色谱法同时测定二苯乙烯苷、蒽醌类、儿茶素等多元成分的动态变化为综合考察指标^[10],而对不同采收时间何首乌代谢产物的整体积累动态或动态变化显著的化学成分研究尚未见报道。

植物代谢组学技术是对植物提取物中代谢组进行高通量、无偏差全面分析的技术,特别适合于中药中多组分复杂体系的分析^[11],使中药研究更符合祖国医学的整体观念。本实验在前期研究基础上^[10,12-16],借鉴植物代谢组学的研究思路和方法,采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间高分辨质谱(UPLC-Triple TOF-MS/MS)技术分析不同采收时间何首乌代谢产物的动态积累,并通过多元统计分析找出积累差异显著的化学成分及其动态变化规律,为揭示不同采收时间何首乌中代谢产物积累动态规律及确定其药材的适宜采收时间提供依据,同时为探讨何首乌药材的品质形成机制提供基础资料。

1 仪器与材料

Aquity™ UPLC 超高效液相色谱仪(美国 WATERS 公司); Triple TOF™ 5600 System-MS/MS 电喷雾飞行时间高分辨质谱仪、Peakview 1.2 数据处理工作站(美国 AB Sciex 公司); SIMCA-P 13.0 数据处理软件(瑞士 Umetrics 公司); Anke TGL-16B 离心机(上海安亭科学仪器厂); BSA224S 电子天平(德国赛多利斯公司); KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,超声功率 500 W, 40 kHz)。甲醇及甲酸(色谱纯,德国 Merck 公司); 甲醇为化学纯(南京化学试剂有限公司),水为超纯水(由 Millipore 纯水器制备)。

何首乌不同采收时间样品采自贵州省赫章县平山乡中山村栽培基地(2 年生植株),采收时间分别为 2013 年 9 月 5 日(S1~S3)、2013 年 10 月 17 日(S4~S6)、2013 年 11 月 6 日(S7~S9)、2013 年 12 月 6 日(S10~S12)、2014 年 1 月 7 日(S13~S15),所有样品均经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定为何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb.

的块根。留样凭证保存于南京中医药大学中药鉴定实验室。

2 方法与结果

2.1 超高效液相色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇(A)-0.1% 甲酸的水溶液(B), 梯度洗脱: 0~3 min, 20%~35% A; 3~10 min, 35%~45% A; 10~15 min, 45%~60% A; 15~20 min, 60%~80% A; 20~30 min, 80%~100% A。体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL; 检测波长 254 nm。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)负离子模式; 质量扫描范围 m/z 50~1 000; 喷雾电压 5.0 kV; 气帘气 30 L/min; 雾化气 55 L/min; 辅助气 55 L/min; 离子源温度 500 ℃; 碰撞室射出电压(CXP) 9 V; 去簇电压(DP) 100 V。

2.2 供试品溶液制备

取干燥恒定质量何首乌样品粉末(过 80 目筛),精密称取样品粉末 1.0 g,置于 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 25 mL 甲醇,称定质量,室温下超声提取 45 min 后取出,放冷以甲醇补足减失质量,静置冷却,4 ℃保存,12 000 r/min 离心 10 min,取出上清液经 0.22 μm 的微孔滤膜滤过,即得。

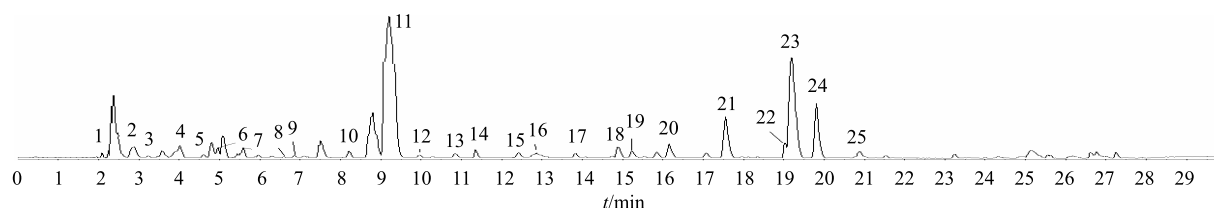
2.3 样品分析

根据设定的色谱-质谱条件,取供试品溶液进样分析,所得提取离子流(BPI)色谱图见图 1。

2.4 多元统计分析

将原始质谱数据和色谱图导入 Peakview 1.2 进行峰匹配、峰对齐、滤噪处理等,结果保存为文本格式。将文本文件(调整格式后)导入 SIMCA-P 13.0 进行分析。采用主成分分析(PCA),通过初步观察各样品的聚集情况,直观地表达不同采收时间何首乌的化学组成差异;随后以偏最小二乘判别分析(PLS-DA)分别对各样品进行分类,其中 R^2_X 、 R^2_Y 越接近 1 表示模型越稳定, $Q^2>0.5$ 表示预测率高。根据 PLS-DA 模型得到的变量权重值(VIP)>1 找到潜在的差异化学成分。采用 t 检验,验证多维统计中找到的差异化学成分是否在单维统计中具有显著性差异,其中 $P<0.05$ 有显著性差异。

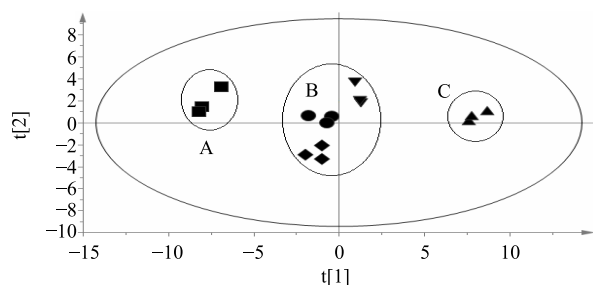
2.4.1 PCA 分析 采用 PCA 多变量模式识别方法对 5 个不同采收时间何首乌样品进行降维分析。图 2 为 5 个采收时间何首乌 PCA 分析的散点图($t[1]$: 35.8%; $t[2]$: 15.8%),从图 2 中可以看出,不同采



- 1-异丹叶大黄素 2-奎尼酸 3-莲花掌苷 4-原矢车菊素 B5 5-未知物 6-原矢车菊素 B-7-3-O-没食子酰 7-N-L-谷氨酰-L-亮氨酸 8-决明酮-8-O-(6'-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷 9-二苯乙烯-O-二己糖苷 10-白皮杉醇-3,4'-O-β-D-二葡萄糖苷 11-二苯乙烯苷 12-白藜芦醇-4'-O-β-D-(6"-O-没食子酰)-吡喃葡萄糖苷 13-山奈酚-3-β-D-葡萄糖苷 14-2',4',5,5',7-五羟基黄酮 15-反式-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-(6"-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷 16-大黄素-8-O-β-D-(6'-O-没食子酰基)-葡萄糖苷 17-2,4,10-三羟基-7-羟甲基-9-蒽酮-5-O-葡萄糖苷 18-二苯乙烯-葡萄糖苷 19-柚皮素-7-O-β-D-葡萄糖苷 20-大黄素-1-O-葡萄糖苷 21-决明柯酮-O-葡萄糖苷 22-决明柯酮-O-乙酰基-葡萄糖苷 23-大黄素-8-O-葡萄糖苷 24-大黄素-8-O-(6'-O-丙二酰)-葡萄糖苷 25-大黄素甲醚-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷
- 1-rhapontigenin 2-kinic acid 3-lindleyin 4-procyanidin B5 5-unknown 6-pocyanidin B-7-3-O-gallate 7-N-L-glutamine-L-leucine 8-trachrysone-8-O-(6'-O-acetyl)-β-D-glucopyranoside 9-stilbene-O-dihexoside 10-piceatannol-3,4'-O-β-D-glucopyranoside 11-stilbene glucoside 12-resveratrol-4'-O-β-D-(6"-O-galloyl)-glucopyranoside 13-kaempferpl-3-β-D-glucopyranoside 14-2',4',5,5',7-pentahydroxyflavone 15-trans-2,3,5,4'-trrahydroxystilbene-2-O-(6"-O-acetyl)-β-D-glucopyranoside 16-chrysophanol-8-O-β-D-(6'-O-galloyl)-β-D-glucopyranoside 17-2,4,10-trihydroxy-7-methylol-9-anthrone-5-O-glucopyranoside 18-stilbene-glucuronide 19-naringenin-7-O-β-D-glucuronide 20-emdin-1-O-glucopyranoside 21-torachryson-O-glucopyranoside 22-torachryson-O-acetyl-glucopyranoside 23-emdin-8-O-glucopyranoside 24-emdin-8-O-(6'-O-malonyl)- glucopyranoside 25-physcion-8-O-β-D-glucopyranoside

图 1 何首乌样品提取离子流 (BPI) 色谱图

Fig. 1 UPLC-Triple TOF-MS/MS base peak intensity (BPI) chromatogram of *Polygoni Multiflori Radix*



■ S1~S3 ◆ S4~S6 ● S7~S9 ▼ S10~S12 ▲ S13~S15

A-传统采收期前 B-传统采收期 C-传统采收期后, 下同

A-Before Traditional harvest time B-Traditional harvest time C-After traditional harvest time, same as below

图 2 不同采收时间何首乌在负离子模式下 PCA 得分图

Fig. 2 PCA chromatogram of *Polygoni Multiflori Radix* from different harvest time in negative ion mode

收时间何首乌的代谢组在 PCA 轴上呈逐步变化的趋势, 可以看出 10、11、12 月采集的何首乌样品距离较近, 而 9 月和次年 1 月的何首乌样品则相距较远, 说明其代谢物组成与 10~12 月的样品明显不同。根据《中国药典》2015 年版^[1]中有关说明, 将 10~12 月作为何首乌的传统采收期, 与传统采收期前期的 9 月和传统采收期后期的次年 1 月的何首乌样品进行 PLS-DA 分析, 寻找潜在的差异化学成分。

2.4.2 PLS-DA 分析 PLS-DA 分析是一种有监督的模式识别方法, 本实验中用于确定不同采收时间何首乌之间的差异变量, 即差异化学成分。首先对传统采

收期前期的样品与传统采收期的何首乌样品进行了 PLS-DA 分析, 如图 3-a 所示。2 个动态的样品沿着 PC1 轴明显分开, 模型验证结果 ($R^2_Y=0.996$, $Q^2=0.929$) 显示模型可靠, 有效对应的载荷图 (图 3-b) 显示, 对 2 组分类贡献较大的差异性成分为原矢车菊素、未知物、决明酮-8-O-(6'-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷、二苯乙烯苷、白藜芦醇-4'-O-β-D-(6"-O-没食子酰)-吡喃葡萄糖苷、山奈酚-3-β-D-葡萄糖苷、2,4,10-三羟基-7-羟甲基-9-蒽酮-5-O-葡萄糖苷、柚皮素-7-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素-1-O-葡萄糖苷、决明柯酮-O-乙酰基-葡萄糖苷、大黄素-8-O-葡萄糖苷。其次对传统采收期与传统采收期后期的何首乌样品进行 PLS-DA 分析, 在其散点图中二者可以明显区分 (图 3-c)。模型验证显示其有效可靠 ($R^2_Y=0.992$, $Q^2=0.973$)。载荷图 (图 3-d) 显示, 异丹叶大黄素、奎尼酸、莲花掌苷、未知物、原矢车菊素 B-7-3-O-没食子酰、N-L-谷氨酰-L-亮氨酸、决明酮-8-O-(6'-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷、二苯乙烯-O-二己糖苷、白皮杉醇-3,4'-O-β-D-二葡萄糖苷、二苯乙烯苷、2',4',5,5',7-五羟基黄酮、反式-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-(6"-O-乙酰基)-β-D-吡喃葡萄糖苷、大黄酒-8-O-β-D-(6'-O-没食子酰基)-葡萄糖苷、二苯乙烯-葡萄糖苷、柚皮素-7-O-β-D-葡萄糖苷、大黄素-1-O-葡萄糖苷、决明柯酮-O-葡萄糖苷、决明柯酮-O-乙酰基-葡萄糖苷、大黄素-8-O-葡萄糖苷、大黄素-8-

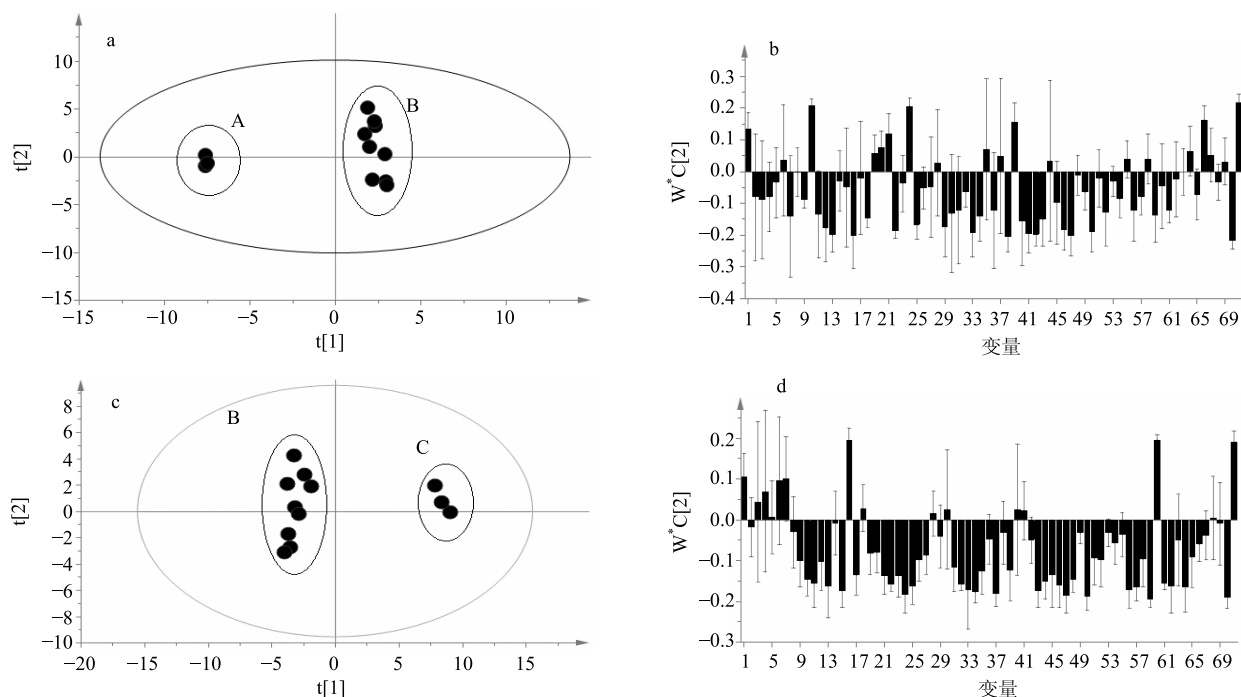


图 3 不同采收时间何首乌样品的 PLS-DA 得分图 (a、c) 和载荷图 (b、d)

Fig. 3 PLS-DA scores plot (a and c) and loading plot (b and d) of *Polygoni Multifori Radix* samples from different harvest time

O-(6'-*O*-丙二酰)-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷为对 2 组分类贡献较大的差异性成分。

2.5 差异化学成分鉴定及相对量变化分析

通过一级质谱确定精确相对分子质量, 二级质谱获得裂解信息, 结合 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 和 METLIN (<http://metlin.Scripps.edu/>) 数据库搜索及文献报道数据^[17-23]对 VIP>1 且 $P<0.05$ 的 25 个差异化学成分进行结构分析鉴定, 结果见表 1。初步鉴定出 24 个化学成分, 其中 9 个为共有的差异化学成分, 分别为决明酮-8-*O*-(6'-*O*-乙酰基)-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、白皮杉醇-3,4'-*O*-β-*D*-二葡萄糖苷、二苯乙烯苷、二苯乙烯-葡萄糖苷酸、柚皮素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷酸、决明柯酮-*O*-乙酰基-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、未知物 (5 号峰)。提取差异成分在各组间对应的峰面积代表其相对量, 对不同采收时间何首乌样品间同一物峰面积的平均值进行计算, 能够得出 9 个差异成分在不同组间的变化。9 个共有差异成分中, 决明酮-8-*O*-(6'-*O*-乙酰基)-β-*D*-吡喃葡萄糖苷、二苯乙烯苷、二苯乙烯-葡萄糖苷酸、决明柯酮-*O*-乙酰基-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*-β-*D*-吡喃葡萄糖苷在传统采收期采集的样品中的量明显高于传统采收期前期和后期采集的样品, 而 5 号峰代表的未知物、白皮杉醇-3,4'-*O*-β-*D*-二葡萄糖苷、柚皮素-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷酸

的相对量在传统采收期后期的何首乌样品中较高。

3 讨论

3.1 样品处理方法优化

供试品溶液的制备中分别考察了 100%、70%、50% 甲醇 3 种溶剂, 结果表明 100% 甲醇为溶剂的色谱峰峰形优于其他 2 种溶剂。又考察超声提取 15、30、45 min, 结果表明超声提取 45 min 明显比其他 2 个时间的峰面积值高。

3.2 色谱条件优选

流动相的选择分别考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水及梯度洗脱条件下对样品中各峰分离度的影响, 结果发现, 采用甲醇-0.1% 甲酸水溶液梯度洗脱时, 峰形较好且有良好的分离效果。

3.3 采收时间与成分变化

采收期是影响药材质量的重要环节, 药用植物的生长发育期不同, 其药用部位中次生代谢产物差异积累较大, 植物的次生代谢产物通常是药材中的有效成分, 是药材品质的物质基础, 建立基于药效物质基础积累规律的适宜采收期, 可有效控制和保证药材质量。本实验借鉴植物代谢组学研究方法, 探究不同采收时间何首乌代谢产物积累的动态变化规律, 分析结果显示, 5 个采收时间之间组内均一性较好, 而组间差异明显, 传统采收期的 10、11、

表 1 不同采收时间何首乌中差异显著化学成分的鉴定及相对量变化

Table 1 Identification of different chemical constituents in *Polygoni Multifori Radix* samples from different harvest time

峰号 t_R /min	化合物	分子式	相对分子质量	质谱数据 (m/z)	相对量变化
1 2.083	异丹叶大黄素	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	257.061 6	173.103 6, 131.082 5	B>C
2 2.854	奎尼酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	191.046 6	129.017 9, 111.009 4, 87.010 8	C>B
3 3.231	莲花掌苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477.113 0	193.013 3, 169.013 1, 151.002 9, 125.024 1	C>B
4 4.007	原矢车菊素 B5	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₅	577.137 2	451.103 6, 407.076 2, 339.086 2, 289.069 9, 245.079 3, 161.023 3, 125.023 7	B>A
5 4.604	未知物	—	246.988 4	167.033 5, 152.010 6, 108.022 6	C>A>B
6 4.959	原矢车菊素 B-7-3- <i>O</i> -没食子酰	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₆	729.125 6	577.136 3, 559.126 0, 451.104 1, 425.088 0, 407.077 0, 289.070 3, 125.024 1	C>B
7 5.960	<i>N</i> - <i>L</i> -谷氨酰- <i>L</i> -亮氨酸	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅	259.126 2	197.128 0, 130.087 6, 128.035 3	C>B
8 6.593	决明酮-8- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -乙酰基)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₆ O ₁₀	449.098 0	245.060 5, 230.056	B>A>C
9 6.857	二苯乙烯- <i>O</i> -二己糖苷	C ₂₇ H ₃₃ O ₁₆	613.160 8	405.120 6, 243.065 3	C>B
10 8.206	白皮杉醇-3,4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -二葡萄糖苷	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₄	567.157 0	243.065 3	C>A>B
11 9.196	二苯乙烯苷	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	405.108 8	243.062 7, 173.057 4, 137.021 9	B>C>A
12 9.937	白藜芦醇-4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -(6''- <i>O</i> -没食子酰)-吡喃葡萄糖苷	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₂	541.120 4	313.055 9, 227.070 3, 169.013 2, 151.002 4	B>A
13 10.850	山柰酚-3- β - <i>D</i> -葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.117 6	285.039 4, 243.064 8	B>A
14 11.409	2',4',5,5',7'-五羟基黄酮	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.029 3	257.044 3, 213.054 6, 167.049 4, 147.043 5	B>C
15 12.134	反式-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -乙酰基)- β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	447.127 7	433.115 4, 270.052 9, 242.050 9	C>B
16 12.902	大黄酚-8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -(6'- <i>O</i> -没食子酰基)-葡萄糖苷	C ₂₈ H ₂₅ O ₁₃	567.135 2	405.120 9, 243.065 7, 161.023 7	B>A
17 14.034	2,4,10-三羟基-7-羟甲基-9-蒽酮-5- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	449.133 9	431.137 4, 287.091 9, 269.081 4	C>B
18 14.895	二苯乙烯-葡萄糖苷酸	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₅	581.149 0	419.114 2, 405.119 1, 243.065 0, 174.038 9	B>C>A
19 15.279	柚皮素-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷酸	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447.081 5	303.051 1, 285.046 0, 125.024 6	C>B>A
20 16.161	大黄素-1- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	431.087 0	243.098 0, 269.043 7, 240.040 8, 225.053 7	C>B
21 17.558	决明柯酮- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₀ H ₂₃ O ₉	407.124 9	269.043 7, 240.040 8, 225.057 3	B>A
22 19.037	决明柯酮- <i>O</i> -乙酰基-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₅ O ₁₀	449.133 4	245.080 7, 230.057 0	B>C>A
23 19.200	大黄素-8- <i>O</i> -葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	431.088 3	269.042 9, 225.051 4, 240.039 0, 197.057 0	B>C>A
24 19.814	大黄素-8- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -丙二酰)-葡萄糖苷	C ₂₄ H ₂₂ O ₁₃	518.087 6	474.113 4, 270.046 9, 226.056 9	C>B
25 20.881	大黄素甲醚-8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	446.108 6	431.099 4, 283.060 3, 269.044 7, 240.041 5	B>A>C

12 月采集的何首乌样品间差异较小, 与传统采收期前的 9 月和传统采收期后的次年 1 月采集的何首乌样品差异较大, 说明何首乌传统采收期 3 组样品与非传统采收期 2 组样品的化学成分组成差异较大。初步筛选出 25 个潜在的差异化学成分, 鉴定了其中 24 个差异成分, 且呈现动态变化。9 个共有差异成分中, 决明酮-8-*O*-(6'-*O*-乙酰基)- β -*D*-吡喃葡萄糖苷、二苯乙烯苷、二苯乙烯-葡萄糖苷酸、决明柯酮-*O*-乙酰基-葡萄糖苷、大黄素-8-*O*-葡萄糖苷及大黄素甲醚-8-*O*- β -*D*-吡喃葡萄糖苷的量以传统采收期采集的样品明显高于传

统采收期前、后采集的样品, 未知物、白皮杉醇-3,4'-*O*- β -*D*-二葡萄糖苷及柚皮素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷酸的量以传统采收期后期采集的样品较高。该结果与前期指标成分的定量测定结果^[10,24-25]基本一致, 表明《中国药典》2015 年版规定的“秋、冬”二期采收是合理的。

本实验建立了基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 结合多元统计分析技术的何首乌代谢产物动态积累的分析方法, 找出积累差异显著的化学成分及其动态变化规律, 为探讨何首乌药材的品质形成机制及确定其适宜采收期提供基础资料。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Lin L F, Ni B, Lin H M, *et al.* Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb.: A review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 159(1): 158-183.
- [3] 杨红莉, 葛珍珍, 孙震晓. 何首乌药理研究新进展 [J]. 中药材, 2013, 36(10): 1713-1717.
- [4] Li S G, Chen L L, Huang X J, *et al.* Five new stilbene glycosides from the roots of *Polygonum multiflorum* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(11): 1145-1151.
- [5] Tian K, Zhang H G, Chen X G, *et al.* Determination of five anthraquinones in medicinal plants by capillary zone electrophoresis with beta-cyclodextrin addition [J]. *J Chromatography A*, 2006, 1123(1): 134-137.
- [6] Xu L Y, Dong Q, Hu F Z, *et al.* Simultaneous quantitative determination of eight active components in *Polygonum multiflorum* Thunb. by RP-HPLC [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2009, 18(4): 358-361.
- [7] 万益群, 吴世芳. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法分析何首乌中磷脂类化合物 [J]. 分析科学学报, 2008, 24(4): 417-420.
- [8] 李帅锋, 郑传柱, 张 丽, 等. 不同产地何首乌 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2015, 46(14): 2149-2154.
- [9] 续艳丽, 董 琦, 肖远灿, 等. RP-HPLC 测定不同采收期栽培何首乌蒽醌类成分 [J]. 分析试验室, 2009, 28(5): 327-329.
- [10] 罗益远, 刘娟秀, 刘训红, 等. 不同采收期何首乌中多元功效物质的动态积累分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2565-2570.
- [11] 李春雨, 王 张, 王 平, 等. 基于代谢组学技术的中药效应物质基础及作用机制研究 [J]. 中草药, 2013, 44(7): 918-922.
- [12] 罗益远, 刘娟秀, 侯 娅, 等. 何首乌不同产地及商品药材中无机元素的 ICP-MS 分析 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1056-1064.
- [13] 罗益远, 刘娟秀, 刘训红, 等. 不同加工方法何首乌中多元功效物质的测定及主成分分析 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 318-323.
- [14] 罗益远, 刘娟秀, 刘训红, 等. 何首乌和首乌藤的挥发性成分 GC-MS 分析 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2113-2116.
- [15] 罗益远, 刘娟秀, 刘训红, 等. 胶束电动毛细管电泳同时测定何首乌中 7 种指标成分含量的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(9): 802-807.
- [16] 罗益远, 刘娟秀, 刘训红, 等. 超高液相色谱-四级杆/线性离子阱质谱法同时测定不同产地何首乌中 10 种核苷类成分 [J]. 分析测试学报, 2015, 34(5): 519-524.
- [17] 潘智然, 梁海龙, 梁朝晖, 等. 基于诊断离子策略的超高压液相色谱-线性离子阱-轨道离子阱质谱联用技术解析中药虎杖的化学成分 [J]. 色谱, 2015, 33(1): 22-28.
- [18] Xu W, Zhang J, Huang Z H, *et al.* Identification of new dianthrone glycosides from *Polygonum multiflorum* Thunb. using high-performance liquid chromatography coupled with LTQ-Orbitrap mass spectrometry detection: a strategy for the rapid detection of new low abundant metabolites from traditional Chinese medicines [J]. *Anal Methods*, 2012, 4(6): 1806-1812.
- [19] 董 静, 王 弘, 万乐人, 等. 高效液相色谱/电喷雾-离子阱-飞行时间质谱分析鉴定中药虎杖中的主要化学成分 [J]. 色谱, 2009, 27(4): 425-430.
- [20] 颜世伦. 制何首乌的化学成分研究 [D]. 天津: 天津大学, 2014.
- [21] 孙晋苓, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 液相色谱/离子阱质谱法研究何首乌中糖苷类化合物 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(5): 806-812.
- [22] 徐 文. 液质联用技术在两种中药成分分析中的应用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [23] 高亮亮. 唐古特大黄、药用大黄和掌叶大黄的化学成分和生物活性研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.
- [24] 罗益远, 刘娟秀, 刘训红, 等. UPLC-QTRAP-MS/MS 测定不同采收期何首乌核苷类成分动态变化 [J]. 中药材, 2015, 38(5): 919-922.
- [25] 罗益远, 刘娟秀, 刘训红, 等. 何首乌无机元素动态积累的 ICP-MS 分析 [J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(22): 1978-1982.