HPLC-Q-TOF-MS 技术在预知子配方颗粒指纹图谱建立和化学成分归属中的应用

邓俊杰，贺晶晶，马汉玉(绍兴市食品药品检验研究院，浙江 绍兴 312000)

摘要：目的 建立预知子配方颗粒的 HPLC 指纹图谱，并使用 Q-TOF-MS 技术鉴定共有峰成分。**方法** 采用 Agilent Poroshell 120 EC-C_{18} 色谱柱(4.6 mm×50 mm，2.7 μm)，以乙腈-0.05%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱，检测波长 210 nm，柱温 30 ℃，流速 0.5 mL·min^{-1}。采用相似度分析软件对指纹图谱进行分析。以标准物质和文献数据为参照，使用 Q-TOF-MS 负离子检测模式对特征峰进行质谱分析并指认。**结果** 建立了预知子配方颗粒的 HPLC 指纹图谱，以 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸峰为参照峰，标定了 14 个共有峰，样品间相似度范围为 0.943~0.994，样品与对照指纹图谱相似度范围为 0.976~0.988。使用 Q-TOF-MS 对共有峰进行了指认，确定了 8 个峰成分，分别为新绿原酸、绿原酸、木通苯乙醇苷 B、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、川续断皂苷Ⅵ、α-常春藤皂苷。**结论** 该方法灵敏、准确、可靠，可用于预知子配方颗粒的质量评价。

关键词：预知子配方颗粒；HPLC-Q-TOF-MS；指纹图谱；4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸

中图分类号：R927.11 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2021)06-0715-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.06.014

引用本文：邓俊杰，贺晶晶，马汉玉. HPLC-Q-TOF-MS 技术在预知子配方颗粒指纹图谱建立和化学成分归属中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 715-720.

Establishment of Fingerprint and Identification of the Components in Akebiae Fructus Formula Granule by HPLC-Q-TOF-MS

DENG Junjie, HE Jingjing, MA Hanyu(*Shaoxing Institute for Food and Drug Control, Shaoxing 312000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the HPLC fingerprint of Akebiae Fructus formula granule and identify common peak components by Q-TOF-MS technique. **METHODS** Acetonitrile-0.05% formic acid solution was used as a mobile phase to gradient elute Agilent Poroshell 120 EC-C_{18} chromatographic column(4.6 mm×50 mm, 2.7 μm). The detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 30 ℃, and the flow rate was 0.5 mL·min^{-1}. At the same time, similarity analysis software was used to analyze the fingerprint. In addition, the characteristic peaks were analyzed and identified by mass spectrometry using Q-TOF-MS anion detection mode with reference substances and literature data. **RESULTS** The HPLC fingerprint of Akebiae Fructus formula granule has been established. Based on the 4,5-*O*-Dicaffeoylquinic acid peak as the standard peak, 14 common peaks were identified. Specifically, the similarity range between samples and the similarity range between samples and reference fingerprint were 0.943–0.994 and 0.976–0.988, respectively. Furthermore, high resolution Q-TOF-MS was used to identify common peaks. It was indicated that a total of 8 peak components were identified, including neochlorogenic acid, chlorogenic acid, calceolarioside B, 3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, Asperosaponin VI and α-Hederin. **CONCLUSION** This method is sensitive, accurate and reliable, and can be used to predict the quality evaluation of Akebiae Fructus formula granule.

KEYWORDS: Akebiae Fructus formula granule; HPLC-Q-TOF-MS; fingerprint; 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid

预知子配方颗粒是以预知子饮片为原料，经水煎煮、过滤、浓缩、添加辅料、喷雾干燥、制粒、包装等工艺制备而成。其原料为木通科植物三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz 干燥近成熟果实的炮制品[1]。其资源分布以湖北、浙江、陕西、贵州等省份为主[2]。性苦、寒，疏肝理气、活血止痛、散结利尿，现代药理学研究表明，预知子对多种肝癌细胞恶性增殖有抑制作用，是中药临床预防肝癌行气活血治法中的常用药物[3-4]。

目前对预知子成分的研究以药材及饮片为主[5-6]，尚无预知子配方颗粒的研究和质量标准。结合国家药典委员会发布的《关于中药配方颗粒品种试点统一标准的公示》，并参考已有文献中配方颗粒指纹图谱的研究[7-10]，本研究以 HPLC 建立预知子配方颗粒的指纹图谱，确定共有峰，并对 Q-TOF-MS 质谱归属的特征成分进行定量检测，为

作者简介：邓俊杰，男，硕士，主管药师 Tel: (0575)88338271 E-mail: 79761822@qq.com

预知子配方颗粒质量标准的制定提供数据基础。

1 材料

1.1 仪器

1260 高效液相色谱仪(二元泵、DAD 检测器、自动进样器)、6530 四极杆-飞行时间串联质谱仪(MassHunter 工作站)均来自 Agilent 公司；XPE26 百万分之一电子天平(梅特勒-托利多公司)；FESCO17 微量离心机(Termo 赛默飞世尔科技公司)；KQ-300DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司)；Advantage A10 超纯水器(美国密理博 Millipore 公司)。

1.2 试药

对照品：绿原酸(批号：110753-201817；含量：96.8%)、木通苯乙醇苷 B(批号：111910-201303；含量：96.0%)、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(批号：111782-201405；含量：92.0%)、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(批号：111894- 201102；含量：94.1%)、川续断皂苷Ⅵ(批号：111685-201305；含量：91.3%)、α-常春藤皂苷(批号：111880-201703；含量：97.0%)、预知子(批号：121492-201102)均购自中国食品药品检定研究院；新绿原酸(批号：ST06230120；含量≥98.0%)、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(批号：ST06590120；含量≥98.0%)均购于上海诗丹德公司。乙腈、甲酸(质谱级)均购自 CNW；甲醇(TEDIA，色谱级)；超纯水。

1.3 药材

预知子采购自浙江丽水，湖北襄阳、随州、宜昌等地，经绍兴市食品药品检验研究院蒋永海主任中药师鉴定，均为三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.干燥果实的炮制品，具体信息见表 1。

表 1 预知子药材信息

Tab.1 Information of Akebiae Fructus

编号	产地	采购日期
S1	浙江省丽水市	2018 年 8 月
S2	湖北省随州市	2018 年 8 月
S3	湖北省随州市	2018 年 8 月
S4	浙江省丽水市	2019 年 5 月
S5	湖北省宜昌市	2019 年 5 月
S6	湖北省宜昌市	2019 年 5 月
S7	浙江省丽水市	2019 年 8 月
S8	浙江省丽水市	2019 年 8 月
S9	湖北省襄阳市	2019 年 8 月
S10	浙江省丽水市	2019 年 9 月
S11	湖北省襄阳市	2019 年 10 月
S12	浙江省丽水市	2019 年 10 月

2 方法与结果

2.1 液相色谱-质谱条件

液相条件：Agilent Poroshell 120 EC-C_{18} 色谱柱(4.6 mm×50 mm，2.7 μm)，流动相：乙腈(A)-0.05%甲酸溶液(B)，梯度洗脱，0~20 min，10%→30%A，20~40 min，30%→60%A，柱温 30 ℃，流速 0.5 $mL·min^{-1}$，检测波长 210 nm。

质谱条件：电喷雾离子化源(ESI)，采集模式为负离子模式，干燥气温度 300 ℃，干燥气流速 5 $L·min^{-1}$，雾化器压力 35 psi，鞘气温度 350 ℃，鞘气流速 11 $L·min^{-1}$，毛细管电压 3 500 V(负)，喷嘴电压 500 V。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取新绿原酸 4.921 mg、绿原酸 4.540 mg、木通苯乙醇苷 B 5.711 mg、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 5.546 mg、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 5.223 mg、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 5.675 mg、川续断皂苷Ⅵ10.217 mg、α-常春藤皂苷 5.120 mg，加 75%甲醇适量，制得混合对照品溶液。各组分浓度分别为新绿原酸 9.65 $μg·mL^{-1}$、绿原酸 14.06 $μg·mL^{-1}$、木通苯乙醇苷 B 10.97 $μg·mL^{-1}$、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 10.87 $μg·mL^{-1}$、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 9.61 $μg·mL^{-1}$、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 10.68 $μg·mL^{-1}$、川续断皂苷Ⅵ 186.56 $μg·mL^{-1}$、α-常春藤皂苷 29.80 $μg·mL^{-1}$。

2.2.2 对照药材溶液的制备 精密称取预知子对照药材 2 g，置具塞锥形瓶中，加水 30 mL，煎煮 30 min，放冷，过滤，取续滤液蒸干，精密加入 75%甲醇 20 mL，称定重量，超声处理 30 min，放冷，再称定重量，用 75%甲醇补足减失的重量，摇匀，超高速离心，取上清液，即得。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品粉末约 1 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 75%甲醇 50 mL，称定重量，超声处理 30 min，放冷，再称定重量，用 75%甲醇补足减失的重量，摇匀，超高速离心，取上清液，即得。

2.2.4 阴性供试品溶液的制备 取本品辅料粉末约 1 g，按“2.2.3”项下方法制备得阴性供试品溶液。

2.3 HPLC 指纹图谱的建立

将 12 批预知子配方颗粒按“2.2.3”项下方法制备成供试品溶液，分别进样，按“2.1”项下色

谱条件分析，记录各批次预知子配方颗粒的 HPLC 色谱图，将测得的色谱数据导入《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012 版)》软件进行分析，以平均数法生成对照，评价各样品的相似度，以 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸为参照峰，选取了 14 个相对保留时间稳定的共有峰。4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对照色谱图、指纹图谱叠加图见图 1~2，平均相对保留时间统计表、指纹图谱相似度分析见表 2~3。

2.4 HPLC 指纹图谱的方法学考察

2.4.1 精密度试验 取 S12 号供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次，以 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸为参照峰，计算共有峰相对保留时间的 RSD，结果均<2.0%，相对峰面积 RSD 均<3.0%，符合指纹图谱的精密度要求。

2.4.2 重复性试验 取 S12 号样品粉末 6 份，以供试品溶液制备法制备，按“2.1”项下色谱条件测定，以 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸为参照峰(S)，计算共有峰相对保留时间的 RSD，结果均<2.0%，相对峰面积 RSD 均<3.0%，符合指纹图谱的重复性要求。

2.4.3 稳定性试验 取 S12 号供试品溶液，分别在 0，8，12，24，48 h，按“2.1”项下色谱条件测定，以 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸为参照峰，计算共有峰相对保留时间的 RSD，结果均<2.0%，相对峰面积 RSD 均<3.0%，符合指纹图谱的稳定性要求。

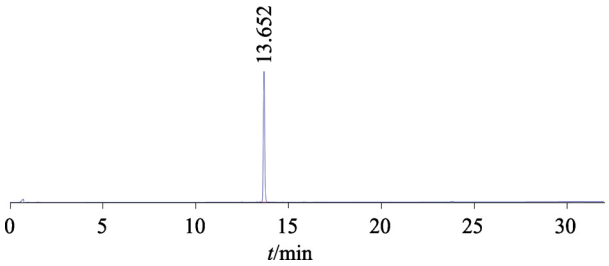

图 1 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸对照品的液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of 4,5-*O*-Dicaffeoylquinic acid

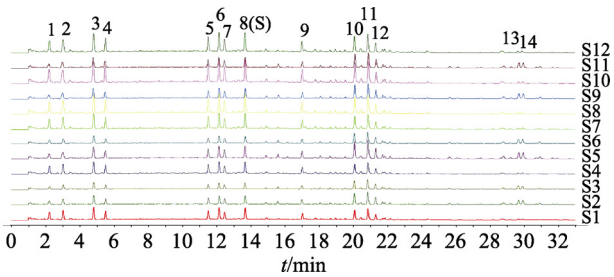

图 2 预知子配方颗粒指纹图谱

2–新绿原酸；3–绿原酸；5–木通苯乙醇苷 B；6–3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸；7–3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸；8–4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸；12–川续断皂苷Ⅵ；14–α-常春藤皂苷。

Fig. 2 Fingerprint of Akebiae Fructus formula granule

2–neochlorogenic acid; 3–chlorogenic acid; 5–calceolarioside B; 6–3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid; 7–3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid; 8–4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid; 12–asperosaponin Ⅵ; 14–α-hederin.

表 2 预知子配方颗粒中共有峰的平均相对保留时间(n=12)

Tab. 2 Average relative retention time of the common components in Akebiae Fructus formula granule(n=12)

编号	化合物名称	平均保留时间/min	平均相对保留时间	RSD/%	编号	化合物名称	平均保留时间/min	平均相对保留时间	RSD/%
1	未知	2.229	0.163	0.4	8	4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸(S)	13.686	1.000	0
2	新绿原酸	3.031	0.221	0.5	9	未知	17.025	1.244	0.3
3	绿原酸	4.818	0.352	0.3	10	未知	20.090	1.468	0.1
4	未知	5.513	0.403	0.2	11	未知	20.878	1.526	0.2
5	木通苯乙醇苷 B	11.525	0.842	0.1	12	川续断皂苷Ⅵ	21.335	1.559	0.1
6	3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸	12.159	0.888	0.1	13	未知	29.678	2.169	0.1
7	3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸	12.480	0.912	0.1	14	α-常春藤皂苷	29.923	2.187	0.3

表 3 预知子配方颗粒的指纹图谱相似度分析(n=12)

Tab. 3 Similarity analysis of the fingerprints in Akebiae Fructus formula granule(n=12)

编号	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	对照
S1	1.000	0.958	0.955	0.990	0.943	0.949	0.985	0.988	0.956	0.986	0.951	0.981	0.983
S2	0.958	1.000	0.990	0.951	0.979	0.981	0.955	0.954	0.989	0.957	0.992	0.952	0.988
S3	0.955	0.990	1.000	0.956	0.985	0.976	0.954	0.953	0.992	0.955	0.989	0.957	0.979
S4	0.990	0.951	0.956	1.000	0.947	0.943	0.993	0.989	0.957	0.991	0.957	0.990	0.981
S5	0.943	0.979	0.985	0.947	1.000	0.991	0.956	0.944	0.979	0.943	0.980	0.943	0.976
S6	0.949	0.981	0.976	0.943	0.991	1.000	0.949	0.948	0.976	0.949	0.975	0.945	0.983
S7	0.985	0.955	0.954	0.993	0.956	0.949	1.000	0.993	0.958	0.994	0.957	0.991	0.982
S8	0.988	0.954	0.953	0.989	0.944	0.948	0.993	1.000	0.959	0.989	0.959	0.990	0.985
S9	0.956	0.989	0.992	0.957	0.979	0.976	0.958	0.959	1.000	0.955	0.989	0.956	0.979
S10	0.986	0.957	0.955	0.991	0.943	0.949	0.994	0.989	0.954	1.000	0.954	0.992	0.985
S11	0.951	0.992	0.989	0.957	0.980	0.975	0.957	0.959	0.992	0.954	1.000	0.958	0.976
S12	0.981	0.952	0.957	0.990	0.943	0.945	0.991	0.990	0.985	0.992	0.958	1.000	0.980
对照	0.983	0.988	0.979	0.981	0.976	0.983	0.982	0.985	0.976	0.985	0.976	0.980	1.000

2.4.4 耐用性试验　取 S12 号供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，分别使用 Agilent Poroshell 120 EC-C_{18} 柱(4.6 mm×50 mm，2.7 μm)、Welch Boltimate C_{18} 柱(4.6 mm×50 mm，2.7μm)、Waters XBridge BEH C_{18} 柱(4.6 mm×50 mm，2.5μm)进行测定，以 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸为参照峰，计算不同色谱柱之间共有峰相对保留时间的 RSD，结果均<5.0%，符合指纹图谱的耐用性要求。

2.4.5 专属性考察　分别取混合对照品、对照药材、供试品和阴性供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件测定，记录液相色谱图。结果对照品、对照药材和供试品溶液在 8 个特征峰位置显相同的色谱峰，阴性供试品溶液则无色谱峰，说明辅料无干扰，符合指纹图谱的专属性要求，见图 3。

2.5 指纹图谱共有峰的质谱鉴定

经对供试品紫外色谱图和负离子模式下质谱总离子流图的分析、比较，选定 14 个共有峰作为指纹图谱特征峰，具有一定的代表性。对 14 个共有峰的质谱结果分析发现，负离子模式下主要产生$[M-H]^-$和$[M+COOH]^-$的离子峰。根据 Q-TOF-MS 高分辨质谱的精确质荷比结果，计算各个共有峰的元素组成，并结合对照品和参考文献[11-15]，确定了 8 个共有峰的结构，Q-TOF-MS 分析数据见表 4。

2.6 供试品特征峰的含量测定

取 12 批预知子配方颗粒，按供试品溶液制备法制备，精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，按上述色谱条件测定，以外标法计算，结果见表 5。

2.7 含量测定方法学考察

2.7.1 精密度试验　取 S12 号供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件，连续进样 6 次。结果新绿原酸、绿原酸、木通苯乙醇苷 B、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、川续断皂苷 VI、α-常春藤皂苷测得峰面积的 RSD 分别为 0.2%，0.3%，0.1%，0.2%，0.2%，0.4%，0.1%，0.1%，表明精密度良好。

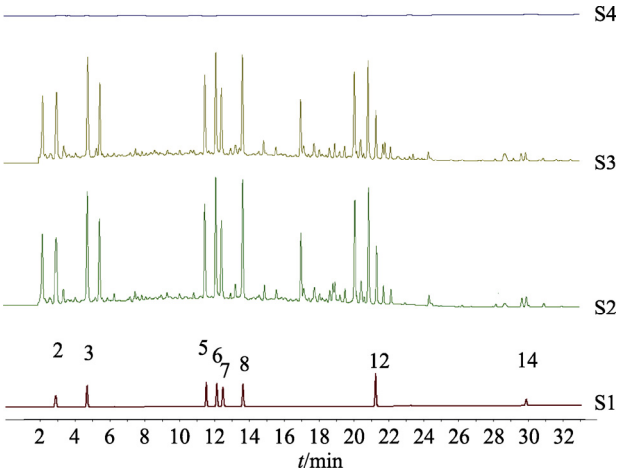

图 3 混合对照品(S1)、对照药材(S2)、供试品(S3)和阴性供试品(S4)的液相色谱图

2–新绿原酸；3–绿原酸；5–木通苯乙醇苷 B；6–3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸；7–3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸；8–4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸；12–川续断皂苷Ⅵ；14–α-常春藤皂苷。

Fig. 3 HPLC chromatograms of mixed reference substances(S1), Akebiae Fructus substance(S2), sample(S3), negative sample without Akebiae Fructus(S4)

2–neochlorogenic acid; 3–chlorogenic acid; 5–calceolarioside B; 6–3,4-*O*-dicaffeoylquinic acid; 7–3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid; 8–4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid; 12–asperosaponin Ⅵ; 14–α-hederin.

2.7.2 重复性试验　取 S12 号供试品粉末 6 份，以供试品溶液制备法制备，按“2.1”项下色谱条件测定。结果新绿原酸、绿原酸、木通苯乙醇苷 B、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、川续断皂苷 VI、α-常春藤皂苷测得含量的 RSD 分别为 0.3%，0.1%，0.4%，0.5%，0.3%，0.4%，0.1%，0.2%，表明重复性良好。

表 4 预知子配方颗粒中共有峰的 Q-TOF-MS 分析数据

Tab. 4 Q-TOF-MS analysis result of the common components in Akebiae Fructus formula granule

编号	保留时间/min	名称	分子式	选择离子	一级碎片离子		二级碎片离子
					测得值(*m/z*)	理论值(*m/z*)	
1	3.355	新绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.084 5	353.087 8	191.063 5，179.042 3
2	5.208	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	353.090 9	353.087 8	191.063 5
3	11.901	木通苯乙醇苷 B	$C_{23}H_{26}O_{11}$	$[M-H]^-$	477.140 2	477.140 2	315.118 5，161.032 0
4	12.557	3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.117 2	515.119 5	353.102 2，191.067 0，179.045 6
5	12.830	3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.115 9	515.119 5	353.102 2，191.067 0，179.045 6
6	14.026	4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸	$C_{25}H_{24}O_{12}$	$[M-H]^-$	515.118 3	515.119 5	353.102 2，191.067 0，179.045 6
7	26.404	川续断皂苷Ⅵ	$C_{47}H_{76}O_{18}$	$[M+COOH]^-$	973.502 7	973.501 4	632.394 3，471.349 3
8	29.116	α-常春藤皂苷	$C_{41}H_{66}O_{12}$	$[M+COOH]^-$	795.454 7	795.453 6	603.405 1，471.361 8，423.340 6

表 5 样品含量测定结果(n=12)

Tab. 5 Results of sample determination(n=12) mg·g^{-1}

批号	新绿原酸	绿原酸	木通苯乙醇苷B	3,4-*O*-二咖啡酰奎宁酸	3,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸	4,5-*O*-二咖啡酰奎宁酸	川续断皂苷Ⅵ	α-常春藤皂苷
S1	1.77	2.08	1.32	1.62	1.08	1.90	8.00	1.52
S2	1.14	1.52	0.94	1.15	0.82	1.20	10.01	6.16
S3	0.86	1.08	0.71	0.87	0.61	0.79	7.57	4.64
S4	1.76	1.99	1.35	1.58	1.05	1.98	7.50	1.60
S5	1.68	2.19	1.53	1.73	1.22	1.58	14.95	9.25
S6	1.11	1.58	0.90	1.21	0.74	1.09	10.15	6.02
S7	2.34	2.74	1.83	2.15	1.44	2.53	10.59	2.03
S8	2.92	3.43	2.30	2.69	1.81	3.16	13.27	2.56
S9	1.41	1.79	1.28	1.44	1.02	1.37	12.50	7.71
S10	3.48	4.05	2.63	3.23	2.17	3.82	15.86	3.06
S11	1.38	1.76	1.34	1.40	0.97	1.44	12.31	7.84
S12	3.06	3.30	2.42	2.56	1.77	3.20	12.78	2.26

2.7.3 稳定性试验 取 S12 号供试品溶液，分别在 0，8，12，24，48 h，按“2.1”项下色谱条件测定。结果新绿原酸、绿原酸、木通苯乙醇苷 B、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、川续断皂苷 VI、α-常春藤皂苷在不同时间点测得峰面积的 RSD 分别为 0.1%，0.1%，0.2%，0.1%，0.3%，0.3%，0.4%，0.6%，表明稳定性良好。

2.7.4 线性关系考察 分别取对照品溶液 2，4，8，12，16，20 μL，按“2.1”项下色谱条件测定。以峰面积为纵坐标(Y)，进样量为横坐标(X)绘制标准曲线，计算得线性回归方程，结果见表 6。

表 6 各成分线性回归方程与线性范围

Tab. 6 Linear regression equation and linear range of each component

成分	线性方程	r	线性范围/ng
新绿原酸	Y=1.885 46X+0.969 54	0.999 58	19.30~193.0
绿原酸	Y=1.902 76X+0.166 09	0.999 99	28.12~281.2
木通苯乙醇苷 B	Y=2.309 91X−0.073 07	1.000 00	21.94~219.4
3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸	Y=2.427 12X+0.340 30	0.999 71	21.74~217.4
3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸	Y=2.475 67X−0.352 85	1.000 00	19.22~192.2
4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸	Y=2.547 69X+0.117 81	0.999 99	21.36~213.6
川续断皂苷Ⅵ	Y=0.203 09X−1.277 38	0.999 87	373.12~3 731.2
α-常春藤皂苷	Y=0.294 48X+0.005 19	1.000 00	59.60~596.0

2.7.5 加样回收率试验 取 9 份 S12 号供试品粉末，每份约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，3 份为一组，分别精密加入约相当于供试品含量 50%，100%，150%的对照品，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液并测定，结果新绿原酸、绿原酸、木通苯乙醇苷 B、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、川续断皂苷Ⅵ、α-常春藤皂苷的平均回收率分别为 98.5%，98.2%，99.0%，98.3%，98.6%，98.4%，97.7%，98.7%，RSD 分别为 0.5%，0.6%，0.4%，0.3%，0.3%，0.5%，0.6%，0.4%，表明回收率良好。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

分别取新绿原酸、绿原酸、木通苯乙醇苷 B、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、川续断皂苷Ⅵ、α-常春藤皂苷对照品适量，加 75%甲醇溶解后，在 190~400 nm 波长范围内测定 DAD 紫外光谱，结果各组分的最大吸收波长分别为新绿原酸 326，218 nm，绿原酸 326，218 nm，木通苯乙醇苷 B 198，330 nm，3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 326，190 nm，3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 326，190 nm，4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸 326，190 nm，川续断皂苷Ⅵ 190 nm，α-常春藤皂苷 190 nm。其中川续断皂苷Ⅵ与 α-常春藤皂苷在 230~400 nm 几乎无吸收，考虑乙腈的截止波长为 190 nm，故选 210 nm 作为检测波长。

3.2 提取溶剂的选择

分别用甲醇、75%甲醇、50%甲醇提取供试品，结果 75%甲醇提取液的特征峰峰数、峰形、峰面积最优，提取最为充分，故选 75%甲醇作为提取溶剂。

3.3 提取时间的考察

比较了超声时间 10，30，60 min 对结果的影响，超声 10 min 时，各组分含量偏低，超声时间超过 30 min 后，各组分含量基本不变，故选 30 min 作为提取时间。

3.4 流动相的选择

比较甲醇-水、甲醇-0.05%甲酸水溶液、乙腈-水、乙腈-0.05%甲酸水溶液 4 种流动相的分析效果，结果用乙腈-0.05%甲酸水溶液梯度洗脱时，各共有峰峰形最好，分离度最高，故选乙腈-0.05%甲酸水溶液作为流动相。

3.5 参照峰的选择

在指纹图谱的 14 个共有峰中，选择 4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸作为参照峰，主要基于 4 个方面原因。第一，经质谱和标准物质比对，鉴定为构

型明确的已知化合物；第二，保留时间稳定且居中，与其他共有峰的相对保留时间较合理；第三，色谱峰的面积大，在相识度评价中影响因子占比较高；第四，标准物质可在中国食品药品检定研究院购买，获取便捷，质量稳定，法定有效。

3.6 指纹图谱结果分析

12 批供试品间指纹图谱相似度为 0.943~0.994，不同省份供试品间相似度为 0.943~0.958，差异性显著，湖北产供试品间相似度为 0.979~0.992，较为接近。反映出不同省份药材对配方颗粒的指纹图谱存在影响，建议生产企业固定药材来源，确保配方颗粒质量的稳定可控。

3.7 含量测定指标的制定

中国药典 2020 年版以 α-常春藤皂苷作为预知子的质控指标，存在 2 个方面缺陷。一方面，α-常春藤皂苷紫外吸收系数低，液相色谱峰面积小，仪器误差引入的不确定度对结果影响较大；另一方面，供试品之间 α-常春藤皂苷的含量差异显著，基于中药材成分复杂的特点，单一成分的含量评价并不能全面反映整体质量。本研究在 HPLC 指纹图谱的基础上，对质谱确证的 8 种成分进行了含量测定，结果更全面，专属性更强，重现性良好。但由于供试品数量少，未能制定各成分的限度值，后续将进一步研究补充。

本研究使用 HPLC-Q-TOF-MS 技术对 12 批预知子配方颗粒进行了检测，首次建立了预知子配方颗粒的 HPLC 指纹图谱，确定了 14 个共有峰，并用高分辨质谱鉴定了 8 个成分，可用于考察生产工艺的稳定性及批间一致性评价。建立了多指标成分含量测定方法，同时测定新绿原酸、绿原酸、木通苯乙醇苷 B、3,4-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、4,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸、川续断皂苷Ⅵ、α-常春藤皂苷 8 种成分的含量。将模糊鉴别与精准定量有机结合，能够快速而全面的控制产品质量，为中药配方颗粒法定标准的起草提供了依据。

REFERENCES

[1] 中国药典. 一部[S]. 2020: 310.

[2] ZHOU L, LI C, CAO F J, et al. Anti-cancer Chinese medicine-Akebiae Fructus or Yanfu: The historical nomenclature and the distribution across China[J]. Clin J Tradit Chin Med(中医药临床杂志), 2019, 31(5): 799-803.

[3] WANG X Y, LU T, LIANG C, et al. Regulation effect of Akebiae Fructus seed extract on inhibiting malignant proliferation in HepG2 hepatoma cells[J]. Chin J Cancer Prev Treat(中华肿瘤防治杂志), 2019, 26(16): 1156-1162.

[4] LU W L, SONG Q J, PAN Z Q, et al. Effect of *Akebia trifoliate* Koidz seed extract on the proliferation of HepG2 hepatocellular carcinoma cells and protein expression of $SEPP_1$[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis(中西医结合肝病杂志), 2017, 27(6): 356-359, 389.

[5] JIANG D, LU Q, XU F M, et al. Chemical constituents from the fruits of *Akebiae quinata*[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2015, 50(19): 1670-1672.

[6] JIN H G, LIU K Y, QU W H, et al. Isolation and structure identification of chemical constituents from the fruits of *Akebiae quinata*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31(12): 2077-2081, 2064.

[7] ZHOU Y M, FENG C, SHI Y H, et al. Study on fingerprint of licorice extract and the content determination of its multi-indicator[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(9): 1046-1051.

[8] SHI Z Q, MENG H, CHEN G S, et al. HPLC fingerprint analysis of wine-fried Ligustri Lucidi Fructus formula granules based on standard decoction[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(15): 1882-1886.

[9] HUANG Y, YAO J B, LAI Y F, et al. Study on HPLC specific chromatogram of bran-processed Atractylodes formula granule and determination of atractylenolide Ⅲ[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(9): 1243-1247.

[10] NONG X W, LIANG B L, LI Y, et al. Quantitative analysis of Zhuang medicine Ilex pubescens formula granules by QAMS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(8): 1118-1121.

[11] XIANG Q, WANG X H, LIN H, et al. Qualitative and quantitative analysis of major constituents in Yinhuang Granules by HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2015, 37(1): 105-112.

[12] ZHANG Y, YANG J, ZHAN Z L, et al. Determination of seven kinds of phenylethanol glycosides in Gesneriaceae species from Guilin habitats by UPLC-MS/MS[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2017, 40(4): 869-872.

[13] YANG L J, XIE Y Y, LI Z F, et al. Analysis on chemical constituents in *Hedera nepalensis* by UPLC/Q-TOF-MS/MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(4): 566-572.

[14] QIN J P, LANG Y, LI J C, et al. Quality assessment of Shuangyu Granules based on simultaneous determination by HPLC fingerprint and multi-components[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47(19): 3426-3431.

[15] TANG J, WU D, CHEN S Y, et al. Identification of chemical compositions in *Laportea bulbifera* by UPLC-ESI-Q-TOF-MS[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2018, 24(24): 67-72.

收稿日期：2020-03-02

(本文责编：沈倩)