

文章编号: 1006-2858(2011)12-0963-06

# HPLC-ESI-MS 法同时测定虎杖 提取物中的 17 种成分

于 澎<sup>1</sup>, 张 虹<sup>2</sup>

(1. 长春中医药大学 药学院, 吉林 长春 130117; 2. 东北制药集团股份有限公司, 辽宁 沈阳 110026)

**摘要:** 目的 采用 HPLC 和电喷雾质谱联用技术并结合核磁共振和紫外光谱技术分析测定虎杖复合酶提取物中的化学成分。方法 液相色谱条件为色谱柱: Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 流动相: 质量分数为 0.2% 的醋酸溶液(A)-乙腈(B) 进行梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 254 nm, 以 Thermo-LCQ-FLEET 多级离子阱质谱仪进行检测。结果 采用 HPLC-ESI-MS 法检测了中药虎杖中 17 个化学成分, 分别为芦丁(rutin)、大黄酚(chrysophanol)、6-OH-大黄素(6-OH-emodin)、大黄素(emodin)、金丝桃苷(hyperoside)、异槲皮素(isoquercetin)、三叶豆苷(trifolin)、紫云英苷(astragaloside)、何首乌乙素(polygonumitinin B)、大黄酚(chrysophanol)、大黄素-8-葡萄糖苷(emodin-8-glucoside)、新芒果苷(neomangiferin)、芒果苷(mangiferin)、槲皮素(quercetin)、山奈酚(kaempferol)、I3-I18 双芹菜苷元(I3-I18-biapigenin)和芹菜素(apigenin)。结论 HPLC-ESI-MS 法可用于虎杖提取物中的 17 种成分的含量测定。

**关键词:** 复合酶; 虎杖; 液相色谱-质谱联用技术; 芒果苷; 新芒果苷

中图分类号: R 917 文献标志码: A

中药虎杖(*Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc.) 是蓼科植物虎杖的干燥根茎及根<sup>[1]</sup>, 其化学成分主要为游离蒽醌及其苷<sup>[2]</sup>, 临床常用于抗血栓、降脂<sup>[3]</sup>, 且具有治疗白细胞减少<sup>[4]</sup>, 抗抑郁<sup>[5]</sup>等功效。传统的提取方式包括回流法和超声波提取法<sup>[6-7]</sup>等, 传统的提取方法由于受植物细胞壁的阻碍, 使提取效率低。复合酶法提取天然药物是最近发展起来的一种新型提取方法<sup>[8-9]</sup>, 可以通过酶解植物细胞壁使有效成分最大程度地溶出, 从而达到增加提取效率的目的。液相色谱-电喷雾质谱联用技术(HPLC-ESI-MS) 同时具备液相色谱的高度分离性能及电喷雾质谱的高敏感性和检测能力, 在天然药物化学的分析研究中具有独特的优势<sup>[10-11]</sup>。本文作者采用 HPLC-ESI-MS 方法并结合紫外光谱(UV) 和核磁共振技术(NMR) 对复合酶法提取虎杖得到的提取物进行了分析检测, 建立了“虎杖复合酶法提取-液相色谱电喷雾质谱联用技术”的系统的分析研究方法。

## 1 仪器与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪, 配备 2996

二极管阵列监测器(DAD, 美国 Waters 公司), LCQ<sup>TM</sup> 电喷雾质谱仪(美国 Thermo-Finnigan 公司)。

乙腈和醋酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司), 其他所用试剂均为分析纯(北京化工厂), 水为超纯水(18.2 MΩ·cm), Viscozyme L 酶制剂(丹麦 Novozymes 公司), D101 型大孔树脂(天津南开大学化工厂)。

虎杖(产地: 江苏, 购自北京同仁堂), 大黄酸、6-OH-大黄素、大黄素、何首乌乙素、大黄酚、大黄素-8-葡萄糖苷、芦丁、槲皮素、山奈酚、金丝桃苷等对照品(中国药品生物制品检定所), 紫云英苷、三叶豆苷、异槲皮素、I3-I18-双芹菜苷元和芹菜素(上海西格玛公司)。

## 2 方法

### 2.1 样品、对照品溶液的制备

样品溶液的制备: 常规提取 精确称取虎杖粉末 10.00 g, 置 500 mL 回流瓶中, 均加入 200 mL 体积分数为 70% 的乙醇溶液, 回流提取 1 h, 滤过, 同法提取 2 次, 合并滤液, 浓缩至干, 用 20 mL

收稿日期: 2011-06-07

作者简介: 于澎(1978-) 男(汉族) 吉林通化人, 讲师, 主要从事中药学研究, Tel. 0431-86172209, E-mail yupeng777@yahoo.com.cn.

水溶解,上 D101 型大孔树脂柱,先用 5 倍柱体积水洗脱,弃去,再用 5 倍柱体积的体积分数为 60% 的乙醇溶液洗脱,收集并浓缩至干,残渣用甲醇定容至 50 mL 量瓶中,试验前分别取 10 mL 经 0.45  $\mu\text{m}$  膜滤过,即得。

复合酶法提取:精确称取虎杖粉末 10.00 g,置 500 mL 烧杯中,加入 200 mL 水,用 HCl 调节 pH 值至 4.8,添加 Viscozyme L 酶制剂 1.001 g,50  $^{\circ}\text{C}$  水浴酶解 90 min,反应后将提取液煮沸 2 min,使酶灭活,滤过,滤液减压浓缩至 20 mL,上 D101 型大孔树脂柱,先用 5 倍柱体积水洗脱,弃去,再用 5 倍柱体积的体积分数为 60% 的乙醇溶液洗脱,收集并浓缩至干,残渣用甲醇定容至 50 mL 量瓶中,试验前分别取 10 mL 经 0.45  $\mu\text{m}$  膜滤过,即得。

对照品溶液的制备:分别精确称取大黄素(emodin)、大黄酚(chrysophanol)、大黄酸(rhein)、何首乌乙素(polygonimitin B)、没食子酸(gallic acid)、新芒果苷(neomangiferin)和芒果苷(mangiferin)对照品约 2 mg,精密称定,用甲

醇定容至 2 mL 量瓶中,得约 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  对照品溶液备用。

## 2.2 液相色谱与电喷雾质谱联用分析条件

采用 Waters2695 高效液相色谱仪,配备 2996 二极管阵列监测器(DAD,美国 Waters 公司);Agilent C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm  $\times$  4.6 mm,5  $\mu\text{m}$ ,美国 Agilent 公司);柱温为 28  $^{\circ}\text{C}$ ;二元线性梯度洗脱:流动相为体积分数为 0.2% 的醋酸溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~20 min:18% ( $\varphi$ ) B;20~50 min:18~50% ( $\varphi$ ) B;50~90 min:50~80% ( $\varphi$ ) B);流速为 0.8  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;样品进样量为 10  $\mu\text{L}$ ;检测波长为 254 nm。电喷雾质谱分析条件:LCQTM 电喷雾质谱仪(美国 Thermo-Finnigan 公司),负离子模式,扫描范围:  $m/z$  50~1000,离子阱的条件:喷雾电压 5.0 kV,壳气( $\text{N}_2$ ) 60 units;辅助气( $\text{N}_2$ ) 10 units,金属加热毛细管温度 100  $^{\circ}\text{C}$ ,毛细管电压 20 V。

## 3 结果与讨论

实验所得虎杖各成分的结构式见图 1。

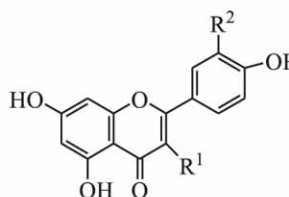
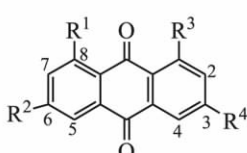
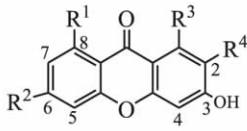
	Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>		
	Rutin	O-Rutiose	OH		
	Isoquercetin	O-Glucose	OH		
	Hyperoside	O-Galactose	OH		
	Austragalin	O-Glucose	H		
	Triflin	O-Galactose	H		
	Quercetin	OH	OH		
	Kaempferol	OH	H		
	Biapigenin	Quercetin	H		
	Amentoflavone	H	Quercetin		
	Emodin	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>
	Chrysophanol	OH	OH	OH	OH
	Rhein	OH	OH	OH	CH <sub>3</sub>
	6-OH-emodin	OH	OH	OH	COOH
	Emodin-8-glucoside	Glucose	Glucose	OH	OH
		Polygonimitin B	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
Neomangiferin		CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Glucose	H
Mangiferin		Glucose	OH	H	O-Glucose
		Glucose	OH	H	OH

Fig. 1 Major compounds in *Giant knotweed R*

### 3.1 常规方法与复合酶法提取虎杖的 HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> 分析

虎杖的常规提取方法和复合酶法提取虎杖的 HPLC-DAD 如图 2 所示,各化学成分

的保留时间( $t_R$ )、紫外最大吸收波长  $\lambda_{\text{max}}$ 、负离子模式下质谱信息及 ESI-MS<sup>n</sup> 产生的主要碎片离子如表 1 所示,将主要成分的色谱行为和质谱信息与对照品进行比对并依据相关文献鉴定了 17 个成分。

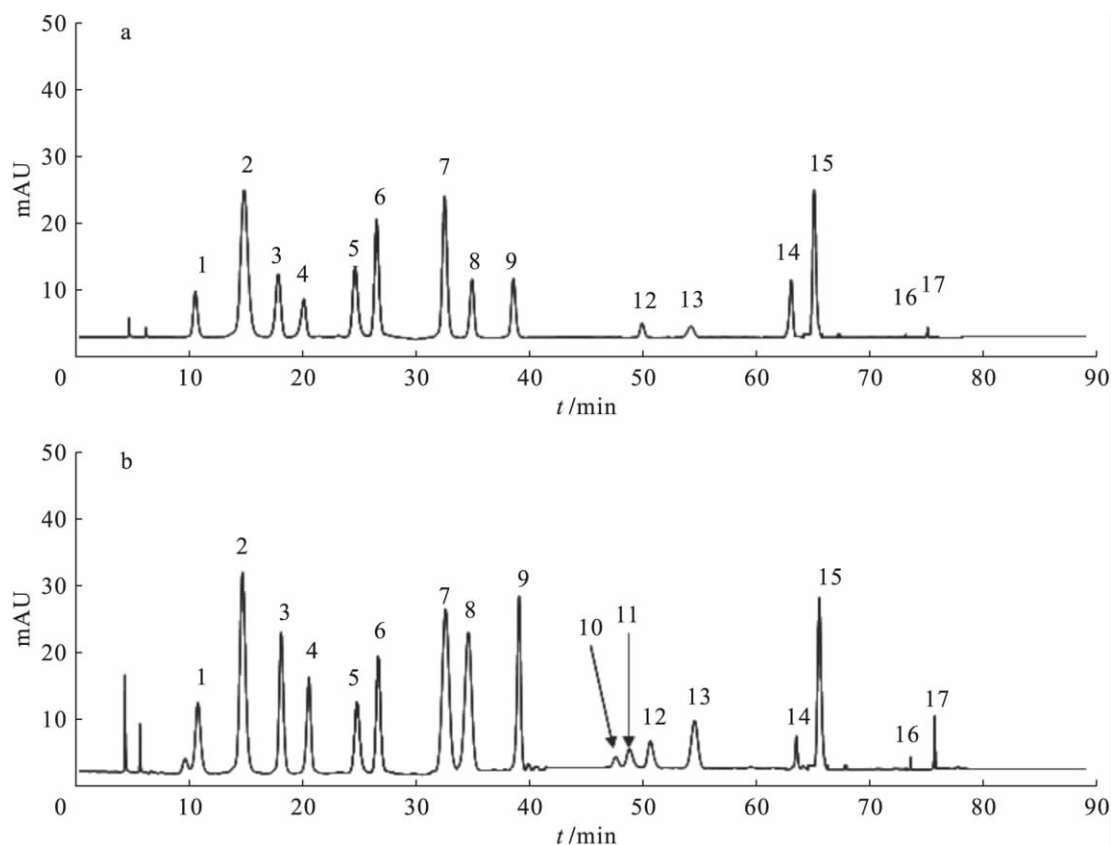


Fig. 2 HPLC chromatogram of the extract by reflux  $\lambda = 254 \text{ nm}$  (a); HPLC chromatogram of the extract by complex enzyme (b) from *G. knotweed*

从图 2 看出,复合酶法提取虎杖的 HPLC/DAD 色谱图中化合物的含量和数量均高于回流法提取。对主要成分进行分析,虎杖中的成分主要为黄酮和蒽醌及其相应的苷类。分析数据如表 1 所示。

化合物 1 在紫外光谱 228、265、360 nm 处有最大吸收,准分子离子峰  $[M-H]^-$  为  $m/z$  609 离子,二级质谱得到  $MS^2$   $[M-H]^-$   $m/z$  301.5 离子(表 1)表明该化合物为黄酮,且黄酮苷的苷元为槲皮素,在黄酮苷元上连接了双糖,通过与对照品的保留时间和紫外光谱进行比对,并结合质谱数据证明化合物 1 为芦丁(rutin)。

化合物 5 和 6 的保留时间分别为 25.68 min 和 27.54 min,准分子离子峰均为  $[M-H]^-$   $m/z$ : 463 离子,二级质谱均产生  $m/z$  301 离子,表明裂解掉相对分子质量为 162 的碎片,通过与对照品进行比对证明二者分别为金丝桃苷(hyperoside)和异槲皮素(isoquercetin)。化合物 7 和 8 的保留时间分别为 33.25 和 35.87 min,准分子离子峰均为  $[M-H]^-$   $m/z$  447 离子,证明二者相对分子质量为 448,二级质谱得到  $m/z$  285 离子,证明裂解掉相对分子质量为 162 的碎片,且二者的黄酮苷

元均为山奈酚,通过对照品证明二者分别为三叶豆苷(trifolin)和紫云英苷(astragalin)。化合物 14 和 15 的保留时间分别为 64.09 和 66.02 min,准分子离子峰分别为  $[M-H]^-$   $m/z$  301 和 285,经过与对照品进行比对证明二者分别为槲皮素(quercetin)和山奈酚(kaempferol),以上化合物均通过与对照品进行紫外光谱、色谱保留时间和质谱裂解信息而确认。

化合物 16 和 17 色谱的保留时间分别为 74.05 和 76.34 min,在质谱的负离子模式下准分子离子峰分别为:  $[M-H]^-$   $m/z$  537 离子和  $m/z$  269,表明二者相对分子质量分别为 538 和 270,化合物 16 产生的碎片离子包括: 433 ( $[M-C_7H_5O-H]^-$ ), 385 ( $[M-C_7H_4O_4-H]^-$ ), 417, 151 ( $[M-C_{23}H_{14}O_6-H]^-$ ), 化合物产生的碎片离子为 151 ( $^{1,3}A-H^-$ ), 通过与对照品进行比对并结合文献[12-13],证明二者分别为 I3-II8-双芹菜素(I3-II8-biapigenin)和芹菜素(apigenin)。

化合物 2、3、4 和 12 的液相色谱保留时间分别为 15.73、19.02、21.75 和 51.56 min,在紫外光谱的 220~240 nm 处有强吸收峰,在 270~

**Table 1** The HPLC-ESI-MS data in the negative ion mode of the extract by complex enzyme from *G. knotweed*

Peak No.	$t_R$ /min	$\lambda_{max}$ /nm	$m/z$	ESI-MS <sup>a</sup>	Compound
1	11.81	228 265 360	609	301 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>-</sup>	Rutin
2	15.73	230 272	283	255 [M-CO-H] <sup>-</sup> 227 [M-C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -H] <sup>-</sup>	Rhein
3	19.02	240 281	285	257 [M-CO-H] <sup>-</sup> 259 [M-C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -H] <sup>-</sup>	6-OH-emodin
4	21.75	223 274	269	241 [M-CO-H] <sup>-</sup> 213 [M-C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -H] <sup>-</sup>	Emodin
5	25.68	228 254 356	463	301 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>-</sup> , 179 [1 <sup>2</sup> A-H] <sup>-</sup> , 255 [M-H <sub>2</sub> O-CO-H] <sup>-</sup>	Hyperoside
6	27.54	228 254 346	463	301 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>-</sup> , 179 [1 <sup>2</sup> A-H] <sup>-</sup> , 255 [M-H <sub>2</sub> O-CO-H] <sup>-</sup>	Isoquercetin
7	33.25	235 265 350	447	284 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>-</sup> , 151 [1 <sup>3</sup> A-H] <sup>-</sup> , 179 [1 <sup>2</sup> A-H] <sup>-</sup>	Trifolin
8	35.87	235 265 350	447	284 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>-</sup> , 151 [1 <sup>3</sup> A-H] <sup>-</sup> , 179 [1 <sup>2</sup> A-H] <sup>-</sup>	Astragalgin
9	39.79	224 259	417	255 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>-</sup>	Polygonimitin B
10	48.25	245 251 335	583	421 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>-</sup> , 259 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> - C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>-</sup>	Neomangiferin
11	49.16	240 257 319	421	259 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>-</sup>	Mangiferin
12	51.56	227 274	255	227 [M-CO-H] <sup>-</sup> , 199 [M-C <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -H] <sup>-</sup>	Chrysophanol
13	55.17	254 360	431	269 [M-C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> -H] <sup>-</sup>	Emodin-8-glucoside
14	64.09	254 368	301	271 [M-CH <sub>2</sub> O] <sup>-</sup> , 255 [M-H <sub>2</sub> O-CO-H] <sup>-</sup> , 151 [1 <sup>3</sup> A] <sup>-</sup> , 179 [1 <sup>2</sup> A-H] <sup>-</sup>	Quercetin
15	66.02	254 365	285	255( [M-H <sub>2</sub> O-CO-H] <sup>-</sup> ), 151( 1 <sup>3</sup> A <sup>-</sup> ), 179( [1 <sup>2</sup> A-H] <sup>-</sup> )	Kaempferol
16	74.05	268 333	537	443, 385 [M-C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> -H] <sup>-</sup> , 417, 151 [M- C <sub>23</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> -H] <sup>-</sup>	I3-I8-biapigenin
17	76.34	264 349	269	151( 1 <sup>3</sup> A-H <sup>-</sup> )	Apigenin

280 nm处也有较强吸收,但吸收强度较220~240 nm处弱,表明该4个化合物为蒽醌类化合物。4者在质谱的负离子模式下的准分子离子峰分别为:[M-H]<sup>-</sup>  $m/z$ : 283、285、269和255离子,表明4者相对分子质量分别为284、286、270和256。4者的二级质谱裂解掉的碎片离子相同,其相对分子质量均为28和56,表明裂解掉1个或者2个羰基基团,通过与对照品进行比对,证明4者分别为大黄酸(rhein)、6-OH-大黄素(6-OH-emodin)、大黄素(emodin)和大黄酚(chrysophanol)。

化合物9和13的液相色谱保留时间分别为39.79 min和55.17 min,在紫外光谱224、259 nm处和254、360 nm处有最大吸收,表明2者为蒽醌类化合物。2者在质谱负离子模式下的准分子离子峰分别为[M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  417和431离子,表明2者相对分子质量分别为418和432。2者的二级质谱裂解掉的碎片离子相同,均为162,表明裂解掉1个六碳糖基团,通过与对照品进行比对,证明2

者分别为大黄酸何首乌乙素(polygonimitin)和大黄素-8-葡萄糖苷(emodin-8-glucoside)。

化合物10的准分子离子峰为[M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  583离子,表明相对分子质量为584,二级质谱得到 $m/z$  421和259离子,表明裂解掉1个或2个相对分子质量为162的基团。化合物11的准分子离子峰均为[M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  421离子,表明相对分子质量为422,二级质谱得 $m/z$  259离子,如图3所示,表明裂解掉相对分子质量为162的基团,将二者用制备型高效液相色谱分离后进行核磁共振技术检测,核磁数据如下所示。

化合物10: <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 6.37 (1H, s, H-4)、6.93 (1H, s, H-5)、7.69 (1H, s, H-8)、4.57 (1H, d, 2-Glu, H-1',  $J = 9.2$  Hz)、4.87 (1H, d, 7-Glu, H-1',  $J = 7.6$  Hz); <sup>13</sup>C-NMR (400 MHz, DMSO)  $\delta$ : 162.5 (C-1)、108.3 (C-2)、164.5 (C-3)、94.0 (C-4)、103.3 (C-5)、156.9 (C-6)、144.4 (C-7)、112.4 (C-8)、179.8 (C-9)、154.7 (C-4a)、151.5 (C-4b)、108.8

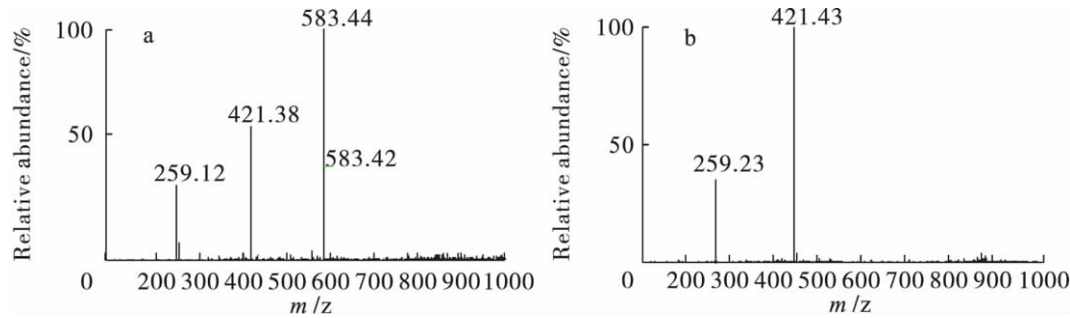


Fig. 3 ESI-MS/MS (–) spectral of neomangiferin (a) and mangiferin (b)

( C-8a) 、102.0( C-8b) ; 2-Glu: 73.8( C-1′) 、71.3( C-2′) 、79.7( C-3′) 、71.0( C-4′) 、82.2( C-5′) 、61.4( C-6′) ; 7-Glu: 103.4( C-1′) 、73.5( C-2′) 、76.1( C-3′) 、69.6( C-4′) 、77.3( C-5′) 、60.7( C-6′) 。

化合物 11:  $^1\text{H-NMR}$  ( 400 MHz ,DMSO)  $\delta$ : 6.34( 1H  $s$  ,H-4) 、6.84( 1H  $s$  ,H-5) 、7.35( 1H  $s$  ,H-8) 、4.56( 1H  $d$  ,H-1′ , $J$  = 9.6 Hz) ;  $^{13}\text{C-NMR}$  ( 400 MHz ,DMSO)  $\delta$ : 162.5( C-1) 、108.3( C-2) 、164.5( C-3) 、93.8( C-4) 、103.3( C-5) 、154.7( C-6) 、144.4( C-7) 、108.8( C-8) 、179.8( C-9) 、156.9( C-4a) 、151.5( C-4b) 、112.4( C-8a) 、102.0( C-8b) ; 2-Glu: 82.3( C-1′) 、73.8( C-2′) 、71.3( C-3′) 、70.9( C-4′) 、79.7( C-5′) 、62.2( C-6′) 。

通过与文献[14 – 15]比对证明化合物 10 为新芒果苷( neomangiferin) ,化合物 11 为芒果苷( mangiferin) 。该 2 种化合物均首次在虎杖中发现。

### 3.2 回流法及复合酶法提取虎杖的 HPLC-ESI-MS 分析及共有成分含量的比较分析

从回流法及复合酶法提取虎杖的 HPLC-DAD 看出 ,复合酶法提取物中含有含量更高的 6-OH-大黄素 ,大黄素 ,紫云英苷 ,何首乌乙素 ,大黄酚 ,大黄素-8-葡萄糖苷和双芹菜素 ,并且检测到了常规提取方法所不能得到的新芒果苷和芒果苷。对两种提取方法得到的色谱图中各色谱峰面积进行总结并比较 ,结果见表 2。

## 4 结论

利用液相色谱-质谱串联技术并结合核磁共振技术对虎杖提取物进行了分析 ,结果表明 ,虎杖的乙醇提取物主要包括黄酮和蒽醌类化合物 ,共鉴定了 17 个化合物 ,分别为芦丁、大黄酚、6-OH-大黄素、大黄素、金丝桃苷、异槲皮素、三叶豆苷、紫云英苷、何首乌乙素、大黄酚、大黄素-8-葡萄糖苷、新芒果苷、芒果苷、槲皮素、山奈酚、13-118

Table 2 The common compounds HPLC peak area of *G. knotweed* by different extract method

Peak No.	$A( \times 10^6)$		Increased range of HPLC peak area/%
	Reflux extration	Complex enzyme extraction	
1	1.028	1.535	49.31
2	2.551	3.509	37.55
3	1.129	2.646	134.40
4	0.825	1.830	121.80
5	1.161	1.365	17.57
6	2.041	2.152	5.43
7	2.645	3.165	19.66
8	1.201	2.759	129.70
9	1.206	3.189	164.40
10	–	0.147	–
11	–	0.218	–
12	0.136	0.275	102.20
13	0.345	0.758	119.70
14	0.896	0.782	–12.72
15	2.415	3.130	29.61
16	0.042	0.083	97.60
17	0.274	0.451	64.60

双芹菜苷元和芹菜素。此外 ,用复合酶提取与常规方法提取虎杖相比 ,可以显著地提高提取物中的 6-OH-大黄素、大黄素、紫云英苷、何首乌乙素、大黄酚、大黄素-8-葡萄糖苷和双芹菜素的含量 ,并且检测到了常规提取方法所不能得到的新芒果苷和芒果苷。新芒果苷和芒果苷均首次在虎杖中发现。

### 参考文献:

- [1] 聂媛 ,李梦青 ,张洁 ,等. 虎杖中白藜芦醇、白藜芦醇苷、大黄素等有效成分的提取[J]. 河北工业大学学报 2008 37(2) : 60 – 65.
- [2] 肖凯 ,宣利江 ,徐来明. 虎杖的化学成分研究[J]. 中国药理学杂志 2003 38(1) : 12 – 14.
- [3] KIMURA Y ,KOZAWA M ,BABA K ,et al. New constit-

- uents of roots of polygonum cuspidatum [J]. *Planta Medica* ,1983 ,48: 164 - 168.
- [4] 廖兴媛,朱国婧. 虎杖的药理作用研究进展[J]. *中国医药学杂志* ,1988 ,8(5): 214 - 216.
- [5] RAYMOND F S ,CHUAY K C J ,RAMESH B ,et al. Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus [J]. *Antiviral Research* ,1990 ,13: 265 - 272.
- [6] 杨秀贤,王昕,吴寿金. 从虎杖中提取大黄素的生产工艺[J]. *中草药* ,1996 ,27(2): 87 - 88.
- [7] 伍晓春,陆豫,张振辉. 虎杖总蒽醌的超声波法提取[J]. *南昌大学学报(理科版)* ,2005 ,29(3): 282 - 285.
- [8] 吴鹏,陈龙,郭峰,等. 生物复合酶在植物提取中的应用研究[J]. *中国现代中药* ,2008 ,10(1): 30 - 32.
- [9] 王芸芸,李莉,李香玉,等. 复合酶法提取甘草渣中总黄酮[J]. *化学与生物工程* ,2008 ,25(8): 49 - 51.
- [10] 李丽,刘春明,吴巍,等. 高效液相色谱-电喷雾质谱联用法测定人参和西洋参的皂苷类成分[J]. *分析化学* ,2005 ,33(8): 1087 - 1091.
- [11] 袁军,付平,王野. 南五味子种子中木酯素类成分的高效液相色谱-电喷雾电离-质谱分析[J]. *药物分析杂志* ,2005 ,25(5): 565 - 569.
- [12] PELLATI F ,BENVERNUTI S ,MELEGARI M. Chromatographic performance of a new polar poly(ethylene glycol) bonded phase for the phytochemical analysis of *Hypericum perforatum* L [J]. *Journal of Chromatography A* ,2005 ,1088: 205 - 217.
- [13] ZHANG Yu-chi ,LIU Chun-ming ,ZHANG Zheng-kun , et al. Comprehensive separation and identification of chemical constituents from *apocynum venetum* leaves by high-performance counter-current chromatography and high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B* ,2010 ,878: 3149 - 3155.
- [14] 洪永福,韩公羽,郭学敏. 西陵知母中新芒果苷的分离与结构鉴定[J]. *药学报* ,1997 ,32(6): 473 - 475.
- [15] SUN Qing-hua ,SUN Ai-ling ,LIU Ren-min. Preparative isolation and purification of four compounds from the Chinese medicinal herb *Rhizoma Anemarrhenae* by high-speed counter-current chromatography [J]. *Journal of Chromatography A* ,2006 ,1104: 69 - 74.

## Simultaneous analysis of 17 compounds from the extract of *Giant knotweed* R. by HPLC-ESI-MS

YU Peng<sup>1</sup> ,ZHANG Hong<sup>2</sup>

(1. *Pharmaceutical College ,Changchun University of Chinese Medicine ,Changchun 130117 ,China;*  
2. *Northeast Pharmaceutical Group Co. LTD. ,Shenyang 110026 ,China*)

**Abstract:** **Objective** To apply HPLC-ESI-MS combining with NMR and UV technique for the analysis of the major constituents of the extract of *Giant knotweed* R. **Methods** The separation was performed on the Agilent C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm 5 μm) column. The mobile phase was composed of 0.2% (w) acetic acid in aqueous solution (A) and acetonitrile (B) and the flow rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup>. The wavelength of the UV detector was set at 254 nm. The MS spectrometer was Thermo LCQ Fleet mass spectrometer. **Results** Seventeen compounds including of rutin ,chrysohanol ,6-OH-emodin ,emodin ,hyperoside ,isoquercetin ,trifolin ,austragalin ,polygonimitin B ,chrysohanol ,emodin-8-O-glucoside ,neomangiferin ,mangiferin ,quercetin ,kaempferol 13-H-8-biapigenin and apigenin from *Giant knotweed* R. were detected by HPLC-MS. **Conclusions** The method of complex enzyme extraction combined with the analysis by HPLC-ESI-MS has been proved to be effective ,sensitive and intuitionistic. It can be used to analyze the micro constituent in *G. knotweed*. This method can provide the reference for the analysis and study of other Chinese medicine.

**Key words:** complex enzyme; *Giant knotweed* R. ; HPLC-ESI-MS; mangiferin; neomangiferin