

芫花与黄芫花特征图谱以及主要化学成分含量的比较研究

程晓叶, 史贺, 廖曼, 刁新鹏, 梁彩娟, 张兰桐*

(河北医科大学药学院药物分析教研室, 石家庄 050017)

摘要 **目的:** 建立芫花和黄芫花的特征图谱, 并对芫花和黄芫花中主要化学成分进行定量研究。**方法:** 采用 HPLC-UV 法建立芫花和黄芫花的特征图谱, 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以乙腈 (A)-0.1% 甲酸水 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.7 mL · min⁻¹, 检测波长 350 nm, 进样量 20 μL。采用 LC-MS/MS 法同时测定不同产地芫花和黄芫花中的主要化学成分含量, 使用 Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇 (A)-0.1% 甲酸水 (B), 梯度洗脱, 流速 0.8 mL · min⁻¹, 进样量 10 μL, 以电喷雾离子源进行负离子模式扫描, 多反应离子监测 (MRM) 进行定量分析。**结果:** 采用 HPLC-UV 法分别建立了不同产地芫花和黄芫花药材的特征图谱, 其中标定了 6 个共有峰作为芫花药材的特征峰, 4 个共有峰作为黄芫花药材的特征峰。采用 HPLC-MS 法同时测定了不同产地的 11 批芫花与 16 批黄芫花中的 13 种黄酮和 3 种酚酸类成分的含量, 含量分析和聚类分析结果都表明芫花和黄芫花 2 种药材中主要成分存在显著性差异。**结论:** 该法为芫花和黄芫花的鉴别和质量控制提供了科学依据, 为临床用药的安全性提供了保障。**关键词:** 芫花; 黄芫花; 特征图谱; 含量测定; HPLC; HPLC-MS; 黄酮; 酚酸

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2018) 02-0241-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.02.07

Comparative study on the characteristic fingerprints and major chemical components between Flos Genkwa and Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis

CHENG Xiao-ye, SHI He, LIAO Man, DIAO Xin-peng,
LIANG Cai-juan, ZHANG Lan-tong*

(Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract Objective: To establish the characteristic fingerprints of Flos Genkwa and Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis, and simultaneously perform quantitative analysis of major chemical components in Flos Genkwa and Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis. **Methods:** HPLC-UV was used to establish the characteristic fingerprints. The analysis was performed on a Diamonsil C₁₈ chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase for gradient elution was acetonitrile (A) and 0.1% formic acid (B); the flow rate was 0.7 mL · min⁻¹; the detection wavelength

* 通信作者 Tel: (0311) 86266419; E-mail: zhanglantong@263.net

第一作者 程晓叶 Tel: 18232150476; E-mail: 2213599876@qq.com

史贺 Tel: 18033897801; E-mail: 414175030@qq.com

was set at 350 nm, and the injection volume was 20 μL . Quantitative analysis of major chemical components of Flos Genkwa and Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis from different regions was performed on LC-MS/MS. Chromatographic separation was performed on an Agilent Zorbax SB C₁₈ column (150 mm \times 4.6 mm, 5 μm) eluted with methanol (A) and 0.1% formic acid (B) in a gradient elution at a flow rate of 0.8 mL \cdot min⁻¹, and the injection volume was 10 μL . Electrospray ionization (ESI) in the negative ion mode and multiple-reaction monitoring (MRM) were applied for quantitative analysis. **Results:** The characteristic fingerprints of Flos Genkwa and Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis were generated by HPLC-UV. There were six characteristic peaks for Flos Genkwa and four characteristic peaks for Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis. The contents of 13 kinds of flavonoids and 3 kinds of phenolic acids in 11 batches of Flos Genkwa and 16 batches of Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis were determined by HPLC-MS. The results of quantitative analysis and clustering analysis showed that there were significant differences in the main components between Flos Genkwa and Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis. **Conclusion:** The established method can provide the scientific basis for the identification and quality control of Flos Genkwa and Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis, and guarantee the safety of clinical medication.

Keywords: Flos Genkwa; Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis; characteristic fingerprint; quantification; HPLC; HPLC-MS; flavonoids; phenolic acids

芫花为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 别名南芫花、芫花条、药鱼草等, 主产于安徽、江苏、浙江、四川、山东、福建和湖北等地。中国药典(2015年版一部)中记载芫花为常用中药, 具泻水逐饮、解毒功效, 用于治疗水肿胀满、胸腹积水、痰饮积聚、气逆咳喘、二便不利等病症^[1]; 黄芫花为瑞香科芫花属植物河朔芫花 *Wikstroemia chamaedaphne* Meisn. 的干燥花蕾, 与芫花相似而略小, 是芫花的伪品, 分布于陕西、甘肃、河南以及河北等地, 具泻下逐水、通便功效^[2], 近年来多用于治疗传染性肝炎、精神病、癫痫等, 还可用于引产^[3]。文献记载, 黄芫花与芫花中均含有二萜原酸酯、黄酮、木质素、甾醇等成分^[4-9]。市场上有用黄芫花作芫花药用, 由于两者功效不尽相同, 不能混淆使用。因此, 寻找芫花和黄芫花的差异性, 提高用药安全性显得尤为重要。

中药特征图谱能鉴别中药材真伪并且可反映中药的质量, 目前已成为中药质量评价和控制研究的有效手段, 与多组分含量测定相结合的方法和模式已成为中药质量评价与控制的主要发展方向^[10-13]。中国药典(2015年版一部)未收载黄芫花, 也未列出芫花特征图谱标准。本研究采用 HPLC-UV 法建立芫花和黄芫花的特征图谱, 可用于两者的鉴别; 应用 LC-MS/MS 方法同时测定不同产地的 11 批芫花与 16 批黄芫花中的 13 种黄酮和 3 种酚酸类成分的含量, 比

较芫花与黄芫花化学成分和含量的差异, 以期为芫花和黄芫花药材的质量控制提供技术支持, 进而为临床应用提供科学依据^[14-16]。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

DIONEX UltiMate 3000 高效液相色谱仪; Agilent 1200 高效液相色谱仪, 配有在线脱气机、四元泵、自动进样器 (Agilent 公司); 3200QTRAP™ 三重四极杆线性离子阱质谱仪, 配有 ESI 离子源 (美国 AB 公司); Analyst 1.5.2 software 数据系统 (AB 公司); SCQ-200 超声波清洗器 (100 W, 25 kHz; 上海声谱超声波设备厂); BP211D 型十万分之一电子天平 (Sartorius 公司)。HPLC 色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱 (十八烷基硅烷键合硅胶, 4.6 mm \times 250 mm, 5 μm ; 北京迪马科技有限公司); HPLC-MS 色谱柱: Agilent Zorbax SB C₁₈ 柱 (十八烷基硅烷键合硅胶, 150 mm \times 4.6 mm, 5 μm ; Agilent 公司)。

1.2 试剂

对照品: 原儿茶酸 (批号 15011309)、咖啡酸 (批号 15062510)、牡荆素 (批号 16012213)、异牡荆素 (批号 15081627)、木犀草苷 (批号 15091317)、槲皮苷 (批号 15052816) 均购自上海士峰生物科技有限公司; 芹菜素 (批号 101129)、柚皮素 (批号 FY11290618)、木犀草素 (批号 101127) 均购自上海融禾医药科技有限公司; 芫花素 (批号 121638) 购

自北京白灵威科技有限公司;山柰酚(批号 100861-200405)、槲皮素(批号 100080-200707)、芦丁(批号 100080-200707)均购自中国食品药品检定研究院;羟基芫花素(批号 201507092)购自上海展舒化学科技有限公司;绿原酸(批号 20121117)购自上海源叶生物科技有限公司;橙皮苷(批号 FY11290618)购自南通飞宇生物有限公司。所有对照品的纯度均大于 98%。

甲醇、乙腈为色谱纯(J.T. Baker 公司);水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司);甲酸为色谱纯

(Dikma 公司);乙醇为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

不同产地芫花和黄芫花样品来源见表 1,所有药材由河北省邯郸市药品检验所孔增科主任药师鉴定。1~16 号样品为黄芫花药材,17~27 号样品为芫花药材[16 号药材为黄芫花对照药材(批号 121321-201203),27 号药材为芫花条(批号 1085-9901),对照药材均购于中国食品药品检定研究院,其他药材购自安徽亳州及河北安国药材市场]。

表 1 黄芫花与芫花药材样品来源

Tab. 1 Sources of Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis and Flos Genkwa

编号 (No.)	批号 (batch No.)	产地 (habitat)	编号 (No.)	批号 (batch No.)	产地 (habitat)
1	HYH-HD-001	河北邯郸-1(Handan-1, Hebei)	15	HYH-NM-002	内蒙古-2(Neimenggu-2)
2	HYH-HD-002	河北邯郸-2(Handan-2, Hebei)	16	121321-201203	中国食品药品检定研究院(NIFDC)
3	HYH-HD-003	河北邯郸-3(Handan-3, Hebei)	17	YH-AH-001	安徽-1(Anhui-1)
4	HYH-HD-004	河北邯郸-4(Handan-4, Hebei)	18	YH-AH-002	安徽-2(Anhui-2)
5	HYH-HD-005	河北邯郸-5(Handan-5, Hebei)	19	YH-AH-003	安徽-3(Anhui-3)
6	HYH-HB-001	河北-1(Hebei-1)	20	YH-AH-004	安徽-4(Anhui-4)
7	HYH-HB-002	河北-2(Hebei-2)	21	YH-FJ-001	福建-1(Fujian-1)
8	HYH-SX-001	山西-1(Shanxi-1)	22	YH-SN-001	陕西-1(Shaanxi-1)
9	HYH-HUB-001	湖北-1(Hubei-1)	23	YH-JS-001	江苏-1(Jiangsu-1)
10	HYH-SC-001	四川-1(Sichuan-1)	24	YH-HN-001	河南-1(Henan-1)
11	HYH-SC-002	四川-2(Sichuan-2)	25	YH-HN-002	河南-2(Henan-2)
12	HYH-SN-001	陕西-1(Shaanxi-1)	26	YH-HN-003	河南-3(Henan-3)
13	HYH-SN-002	陕西-2(Shaanxi-2)	27	1085-9901	中国食品药品检定研究院(NIFDC)
14	HYH-NMG-001	内蒙古-1(Neimenggu-1)			

2 方法与结果

2.1 特征图谱

2.1.1 HPLC 条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B), 梯度洗脱(0~10 min, 20%A → 25%A; 10~11 min, 25%A → 40%A; 11~32 min, 40%A → 60%A, 32~34 min, 60%A); 流速: 0.7 mL · min⁻¹; 检测波长: 350 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 取木犀草素、芹菜素、羟基芫花素和芫花素的对照品适量,加甲醇配成一定浓度的混合对照品溶液,作为芫花特征图谱的对照品溶液。取木犀草苷、木犀草素的对照品适量,加

甲醇配成一定浓度的混合对照品溶液,作为黄芫花特征图谱的对照品溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取药材粉末(过 3 号筛)约 1 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 乙醇 25 mL,密塞,摇匀,超声(100 W, 25 kHz) 30 min,过滤。摇匀,0.22 μm 微孔滤膜滤过,收集续滤液,作为供试品溶液。

2.1.4 精密度考察 取同一批号(YH-SX-001)芫花供试品溶液和同一批号(HYH-HB-002)黄芫花供试品溶液,分别按“2.1.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录色谱图。芫花以峰 4(芹菜素)为参照峰,计算各特征峰相对保留时间的

RSD 范围为 0.05%~0.20%，相对峰面积的 RSD 范围为 2.3%~3.8%。黄芩花以峰 1(木犀草苷)为参照峰，计算各特征峰相对保留时间的 RSD 范围为 0.06%~0.17%，相对峰面积的 RSD 范围为 1.75%~2.63%。结果表明，该方法的精密度良好。

2.1.5 稳定性考察 取同一批号(YH-SX-001)芩花供试品溶液和同一批号(HYH-HB-002)黄芩花供试品溶液，分别按“2.1.1”项下色谱条件于 0、2、4、8、12 和 24 h 进样。芩花以峰 4(芹菜素)为参照峰，计算各特征峰相对保留时间的 RSD 范围为 0.08%~0.31%，相对峰面积的 RSD 范围为 2.9%~4.0%。黄芩花以峰 1(木犀草苷)为参照峰，计算各特征峰相对保留时间的 RSD 范围为 0.09%~0.56%，相对峰面积的 RSD 范围为 2.3%~2.5%。结果表明，供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性考察 取同一批号(YH-SX-001)芩花药材和同一批号(HYH-HB-002)黄芩花药材各 6 份，分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，记录色谱图。芩花以峰 4(芹菜素)为参照峰，计算各特征峰相对保留时间的 RSD 范围为 0.07%~0.24%，相对峰面积的 RSD 范围为 0.64%~3.3%。黄芩花以峰 1(木犀草

苷)为参照峰，计算各特征峰相对保留时间的 RSD 范围为 0.16%~0.86%，相对峰面积的 RSD 范围为 2.2%~3.9%。结果表明，该方法的重复性良好。

2.1.7 特征图谱的建立 取 10 批芩花和 13 批黄芩花的供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。选择不同批次样品共有的且响应较高的峰作为特征指纹峰，最终选择了 6 个峰作为芩花药材的特征峰，选择了 4 个峰作为黄芩花药材的特征峰。其中木犀草素峰为芩花和黄芩花特征图谱的共有峰。芩花以峰 4(芹菜素)为 S 峰，计算其余 5 个峰的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的 $\pm 5\%$ 之内^[17]，规定值为 0.74(峰 1)、0.80(峰 2)、0.87(峰 3)、1.20(峰 5)、1.46(峰 6)；黄芩花以峰 1(木犀草苷)为 S 峰，计算峰 2~4 的相对保留时间，其相对保留时间应在规定值的 $\pm 5\%$ 之内，规定值为 1.27(峰 2)、1.35(峰 3)、1.60(峰 4)。

2.1.8 特征图谱测定结果 对 10 批芩花进行特征图谱测定，相对保留时间和相对峰面积测定结果见表 2。13 批黄芩花特征图谱的相对保留时间和相对峰面积测定结果见表 3。特征峰相对保留时间未见明显偏差，均符合规定限度。芩花的特征图谱和对照品溶液的色谱图见图 1，黄芩花的特征图谱和对照品溶液的色谱图见图 2。

表 2 10 批芩花样品特征图谱测定结果

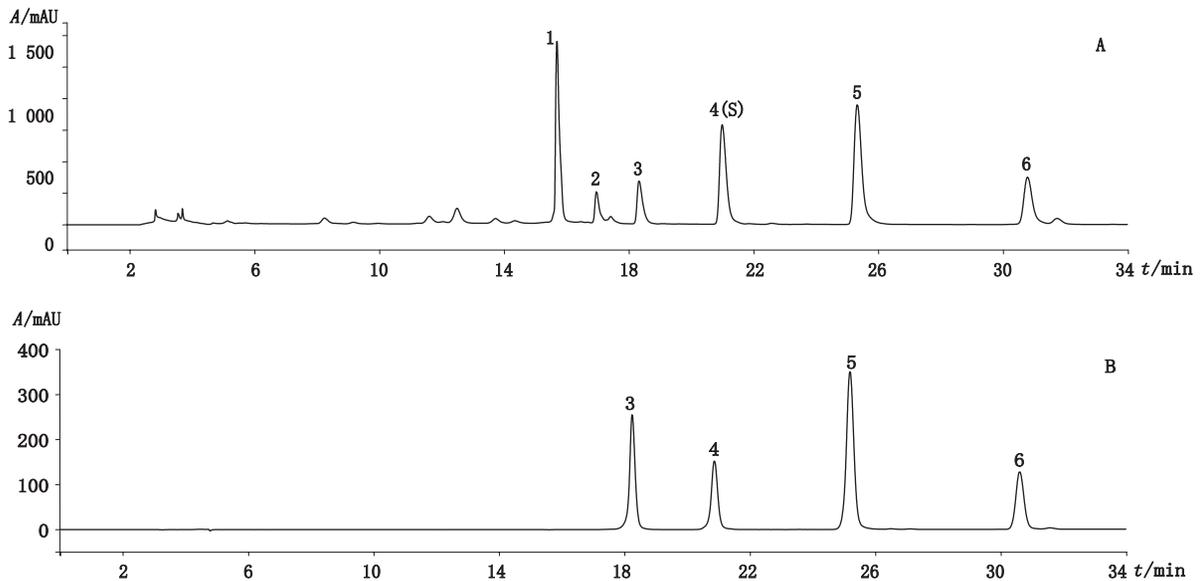
Tab. 2 The determination results of characteristic peaks for 10 batches of Flos Genkwa

批号 (batch No.)	相对保留时间 (relative retention time)						相对峰面积 (relative peak area)					
	峰 1 (peak 1)	峰 2 (peak 2)	峰 3 (peak 3)	峰 4 (peak 4)	峰 5 (peak 5)	峰 6 (peak 6)	峰 1 (peak 1)	峰 2 (peak 2)	峰 3 (peak 3)	峰 4 (peak 4)	峰 5 (peak 5)	峰 6 (peak 6)
YH-AH-001	0.74	0.81	0.87	1.00	1.20	1.47	1.37	0.14	0.06	1.00	0.21	0.59
YH-AH-002	0.74	0.80	0.87	1.00	1.20	1.46	1.16	0.14	0.06	1.00	0.19	0.58
YH-AH-003	0.74	0.80	0.87	1.00	1.20	1.46	1.18	0.13	0.07	1.00	0.21	0.55
YH-AH-004	0.74	0.80	0.87	1.00	1.20	1.46	0.76	0.13	0.08	1.00	0.25	0.42
YH-FJ-001	0.74	0.80	0.87	1.00	1.20	1.46	2.76	0.23	0.14	1.00	0.62	0.73
YH-SN-001	0.75	0.81	0.87	1.00	1.21	1.47	1.39	0.13	0.08	1.00	0.32	0.62
YH-JS-001	0.74	0.80	0.87	1.00	1.20	1.46	1.37	0.17	0.25	1.00	1.10	0.66
YH-HN-001	0.74	0.80	0.87	1.00	1.20	1.46	1.23	0.12	0.12	1.00	0.45	0.71
YH-HN-002	0.74	0.80	0.87	1.00	1.20	1.46	1.10	0.16	0.30	1.00	1.16	0.68
YH-HN-003	0.75	0.81	0.87	1.00	1.21	1.47	1.08	0.18	0.35	1.00	1.39	0.58
\bar{x}	0.74	0.80	0.87	1.00	1.20	1.46	1.34	0.15	0.15	1.00	0.59	0.61

表 3 13 批黄芩花样品特征图谱测定结果

Tab. 3 The determination results of characteristic peaks for 13 batches of Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis

批号 (batch No.)	相对保留时间 (relative retention time)				相对峰面积 (relative peak area)			
	峰 1 (peak 1)	峰 2 (peak 2)	峰 3 (peak 3)	峰 4 (peak 4)	峰 1 (peak 1)	峰 2 (peak 2)	峰 3 (peak 3)	峰 4 (peak 4)
HYH-HD-001	1.00	1.26	1.34	1.58	1.00	0.25	1.70	0.13
HYH-HD-002	1.00	1.26	1.34	1.58	1.00	0.33	1.51	0.05
HYH-HD-003	1.00	1.27	1.36	1.61	1.00	0.26	1.55	0.06
HYH-HD-005	1.00	1.27	1.37	1.61	1.00	0.43	1.72	0.09
HYH-HB-001	1.00	1.26	1.35	1.59	1.00	0.48	1.85	0.57
HYH-HB-002	1.00	1.26	1.34	1.59	1.00	0.39	1.79	0.54
HYH-HUB-001	1.00	1.26	1.35	1.59	1.00	0.20	1.73	0.09
HYH-SC-001	1.00	1.26	1.35	1.59	1.00	0.34	2.23	0.61
HYH-SC-002	1.00	1.27	1.35	1.60	1.00	0.22	1.68	0.21
HYH-SN-001	1.00	1.27	1.37	1.61	1.00	0.48	1.93	0.60
HYH-SN-002	1.00	1.27	1.36	1.60	1.00	0.45	1.91	0.58
HYH-NMG-001	1.00	1.27	1.36	1.60	1.00	0.42	2.35	0.82
HYH-NMG-002	1.00	1.27	1.35	1.60	1.00	0.40	2.35	0.72
\bar{X}	1.00	1.27	1.35	1.60	1.00	0.36	1.87	0.39



3. 木犀草素 (luteolin) 4. 芹菜素 (apigenin) 5. 羟基芩花素 (hydroxygenkwanin) 6. 芩花素 (genkwanin)

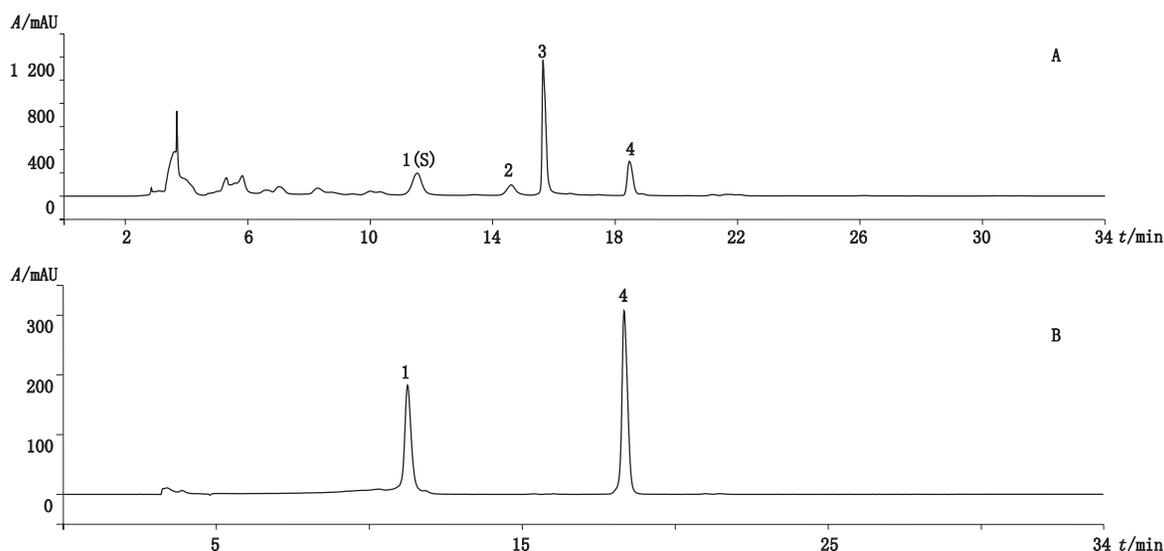
图 1 芩花 HPLC 特征图谱 (A) 和对照品色谱图 (B)

Fig. 1 HPLC characteristic chromatogram of Flos Genkwa (A) and chromatogram of reference substances (B)

2.2 芩花和黄芩花中 16 种成分的含量测定

2.2.1 HPLC-MS 条件 色谱柱: Agilent C₁₈ 柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇 (A) - 0.1% 甲酸水 (B), 梯度洗脱 (0~7 min, 30%A → 70%A; 7~13 min, 70%A → 90%A; 13~15 min, 90%A); 流速: 0.8 mL · min⁻¹; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

离子源: 电喷雾离子化源 (ESI⁻); 采用多反应离子监测 (MRM) 进行定量分析; 检测模式: 负离子模式; 源喷射电压 (IS): -4.5 kV; 雾化温度: 650 °C; 雾化气 (GS1, N₂) 压力: 414 kPa; 辅助气 (GS2, N₂) 压力: 448 kPa; 气帘气 (N₂) 压力: 207 kPa。接口加热, 全程通入氮气, MRM 模式定量。



1. 木犀草苷 (luteoloside) 4. 木犀草素 (luteolin)

图2 黄芩花 HPLC 特征图谱 (A) 和对照品色谱图 (B)

Fig. 2 HPLC characteristic chromatogram of Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis (A) and chromatogram of reference substances (B)

2.2.2 混合对照品溶液的制备 分别精密称取原儿茶酸、咖啡酸、芹菜素、柚皮素、芫花素、木犀草素、山柰酚、羟基芫花素、槲皮素、绿原酸、牡荆素、异牡荆素、木犀草苷、槲皮苷、芦丁和橙皮苷共 16 种对照品适量, 加甲醇溶解并配制成一定浓度的储备液。分别精密吸取上述储备液适量, 用甲醇配制成混合对照品溶液; 其中各对照品浓度分别为原儿茶酸 $9.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 咖啡酸 $11.90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 芹菜素 $10.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 柚皮素 $0.63 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 芫花素 $3.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 木犀草素 $57.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 山柰酚 $4.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 羟基芫花素 $1.15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 槲皮素 $9.44 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 绿原酸 $118.80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 牡荆素 $11.40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 异牡荆素 $14.85 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 木犀草苷 $47.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 槲皮苷 $0.65 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 芦丁 $1.92 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 橙皮苷 $0.68 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.3 供试品溶液的制备 将 16 批芫花与 11 批黄芩花药材粉碎, 过 50 目筛, 备用。取药材粉末约 1.0 g, 精密称定, 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙醇 30 mL, 超声提取 30 min; 取出, 放冷, 用 70% 乙醇补足缺失的量, 振摇, 混匀, 静置; 用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 取续滤液即得。

2.2.4 线性关系、定量限和检测限 精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 采用倍数稀释法, 用甲醇分别逐级稀释得到不同浓度梯度的系列标准溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进行分析, 记录峰面积。以浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标, 绘制标准曲线, 并进行线性回归, 得回归方程。将混

合对照品溶液逐步稀释并进行测定, 分别以信噪比 $S/N=10$ 和 $S/N=3$ 时各对照品的浓度作为定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)。实验结果表明 16 种待测组分线性关系良好, $r \geq 0.9976$ 。各被测组分回归方程、线性范围、定量限及检测限见表 4。

2.2.5 精密度 仪器精密度: 精密吸取“2.2.2”项下混合对照品溶液 $10 \mu\text{L}$, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 测定各组分峰面积, RSD 均小于 2.63%。

日内精密度: 取同一批 (HYH-SX-001) 样品粉末 6 份, 精密称定, 按“2.2.3”项下方法平行制备供试品溶液, 在“2.2.1”项下色谱条件下测定 16 种成分含量, RSD 均小于 3.4%。

日间精密度: 按日内精密度的测定方法连续测定 3 d, RSD 均小于 4.4%。

实验结果表明本法精密度良好。

2.2.6 稳定性 精密吸取同一批 (HYH-SX-001) 样品的供试品溶液 $10 \mu\text{L}$, 按“2.2.1”项下色谱条件, 分别于 0、4、8、12、24 h 进样测定, 测定各被测组分峰面积。实验结果显示, 原儿茶酸、咖啡酸、芹菜素、柚皮素、芫花素、木犀草素、山柰酚、羟基芫花素、槲皮素、绿原酸、牡荆素、异牡荆素、木犀草苷、槲皮苷、芦丁、橙皮苷峰面积的 RSD 分别为 3.4%、2.2%、1.2%、1.5%、2.1%、2.6%、3.2%、4.2%、3.2%、2.0%、3.7%、4.1%、2.8%、1.5%、2.4%、3.4%, 均小于 4.2%, 表明供试品溶液在室温下放置 24 h 稳定性良好。

表 4 16 种成分的质谱数据、回归方程、相关系数、线性范围、定量限和检测限
Tab. 4 HPLC-ESI-MSⁿ data, regression equations, correlation coefficients, linear ranges, LODs and LOQs of the sixteen components

成分 (component)	t_R / min	MS ¹ m/z	MS ² m/z	DP/ V	CE/ eV	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
原儿茶酸 (protocatechuic acid)	3.97	152.9	109.0	-50	-30	$Y=1.0672 \times 10^5 X+14581$	0.9995	0.03788~4.500	4.735	2.368
咖啡酸 (caffeic acid)	5.46	179.1	134.9	-37	-24	$Y=6.5751 \times 10^4 X+5476$	0.9995	0.04648~5.950	23.24	11.62
芹菜素 (apigenin)	9.72	269.0	116.9	-80	-51	$Y=2.0000 \times 10^6 X-74417$	0.9976	0.01054~1.350	0.6592	0.3296
柚皮素 (naringenin)	8.74	271.1	150.9	-67	-26	$Y=7.8511 \times 10^5 X+465.16$	0.9996	0.002469~0.1580	2.469	1.235
芫花素 (genkwanin)	11.60	283.0	268.0	-41	-25	$Y=3.0000 \times 10^6 X+36078$	0.9991	0.0003784~0.04844	0.3784	0.1692
木犀草素 (luteolin)	9.09	285.0	132.9	-80	-48	$Y=1.0000 \times 10^6 X+125043$	0.9996	0.05565~7.125	1.739	0.8697
山柰酚 (kaempferol)	9.42	285.0	117.0	-92	-82	$Y=3.9403 \times 10^4 X+245.73$	0.9996	0.03516~2.250	35.16	17.58
羟基芫花素 (hydroxygenkwanin)	10.67	299.0	284.0	-131	-49	$Y=1.0000 \times 10^6 X-7194.5$	0.9994	0.002246~0.2875	0.1404	0.07018
槲皮素 (quercetin)	8.59	301.0	150.9	-71	-26	$Y=2.3884 \times 10^5 X+14581$	0.9996	0.01844~2.360	1.152	0.5762
绿原酸 (chlorogenic acid)	4.62	353.0	190.9	-71	-26	$Y=6.5751 \times 10^4 X+5046.1$	0.9993	0.2320~29.70	14.5	7.251
牡荆素 (vitexin)	6.52	431.1	311.0	-57	-32	$Y=3.2927 \times 10^5 X-9581.2$	0.9997	0.04453~5.700	3.711	2.783
异牡荆素 (isovitexin)	6.79	431.1	311.0	-50	-30	$Y=1.0961 \times 10^5 X+12354$	0.9994	0.029~3.7123	7.25	1.813
木犀草苷 (cynaroside)	6.92	447.1	285.0	-55	-37	$Y=8.0053 \times 10^5 X+66333$	0.9998	0.0459~5.875	1.434	0.7172
槲皮苷 (quercitrin)	7.64	447.2	300.0	-68	-36	$Y=4.6350 \times 10^5 X-4176.4$	0.9993	0.005078~0.6500	2.539	1.27
芦丁 (rutin)	7.08	609.3	299.9	-75	-50	$Y=3.6489 \times 10^5 X-2955$	0.9998	0.007500~1.920	1.875	0.9375
橙皮苷 (hesperidin)	7.04	609.7	301.2	-74	-36	$Y=2.8276 \times 10^5 X+1048$	0.9996	0.005297~0.6780	2.649	1.324

2.2.7 加样回收率 精密称取同一批 (HYH-SX-001) 样品粉末 9 份, 每份约 0.5 g, 分别加入低、中、高 3 种浓度的混合对照品溶液, 每个浓度按“2.2.3”项下方法平行制备供试溶液 3 份, 在“2.2.1”项色谱条件下测定被测成分的量并计算其回收率。平均加样回收率为 94.2%~103.8%, RSD 为 0.96%~4.5%, 表明该方法准确、可靠。

2.2.8 样品测定结果 取 11 批芫花与 16 批黄芩花样品, 按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 采用标准曲线

法计算样品中 13 种黄酮和 3 种酚酸的含量。结果见表 5。所测 16 种成分中, 芫花中没有检测出橙皮苷, 其余成分在 2 种药材中均含有, 但除木犀草素和山柰酚外, 其余成分含量差异较大。利用 SPSS 中的非参数秩和检验, 发现 2 种药材中有 13 个成分有显著性差异 ($P<0.05$); 除橙皮苷外, 差异最大的是羟基芫花素, 两者含量相差 468 倍, 芫花素次之, 为 288 倍, 其次是异牡荆素、木犀草苷、槲皮素、柚皮素、芹菜素、牡荆素、槲皮苷、原儿茶酸、绿原酸和咖啡酸。



表 5 16 种化学成分在样品中的含量($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Tab. 5 Contents of the 16 chemical components in samples

编号 (No.)	原儿茶酸 (protocatechuic acid)	咖啡酸 (caffeic acid)	芹菜素 (apigenin)	柚皮素 (naringenin)	芫花素 (genkwanin)	木犀草素 (luteolin)	山柰酚 (kaempferol)	羟基芫花素 (hydroxygenkwanin)	槲皮素 (quercetin)	绿原酸 (chlorogenic acid)	牡荆素 (vitexin)	异牡荆素 (isovitexin)	木犀草苷 (cynaroside)	槲皮苷 (quercitrin)	芦丁 (rutin)	橙皮苷 (hesperidin)
1	9.36	26.56	2.20	0.09	0.02	110.08	3.66	1.84	7.67	2 915.07	60.94	105.90	99.50	0.36	0.89	0.52
2	1.41	6.03	2.34	0.16	nd	58.95	2.17	tr	7.52	3 910.54	94.72	117.59	126.05	0.39	0.84	tr
3	4.78	22.16	4.35	0.41	0.02	211.44	8.63	0.30	25.47	2 856.64	101.90	140.98	217.28	1.39	4.19	1.44
4	33.72	35.37	5.67	0.32	0.02	228.43	11.94	0.07	20.76	3 768.83	86.53	114.94	200.95	0.70	0.54	0.36
5	16.33	30.70	4.86	0.32	0.01	176.80	7.78	tr	23.81	3 839.54	76.98	117.90	193.50	1.01	0.38	0.33
6	74.67	125.34	9.83	0.47	0.04	412.01	38.06	0.10	139.63	2 737.31	59.19	92.41	138.75	2.02	12.40	2.79
7	76.81	137.39	9.41	0.47	0.04	406.99	31.30	tr	119.74	2 585.55	59.80	62.89	133.60	1.85	17.00	4.35
8	42.48	99.05	21.77	0.86	0.21	523.20	38.79	5.71	94.26	3 270.84	147.27	171.98	170.31	0.64	1.60	0.42
9	24.20	29.00	5.03	0.15	nd	200.65	8.07	tr	20.76	3 302.16	143.34	250.69	202.44	0.78	1.22	0.61
10	71.02	143.53	15.10	0.63	0.03	426.97	23.72	nd	80.27	2 484.81	102.61	136.34	160.42	1.82	3.29	0.81
11	32.76	36.91	7.95	0.44	0.03	332.58	12.61	nd	38.85	3 660.93	156.83	217.43	211.71	1.72	30.20	6.28
12	63.52	120.91	8.28	0.50	0.02	364.52	29.82	tr	75.83	2 183.98	45.97	61.09	117.95	1.27	1.39	0.41
13	54.44	98.36	8.52	0.47	0.02	347.12	24.71	nd	75.93	2 143.73	55.68	79.11	121.96	1.48	2.21	0.37
14	90.83	185.20	17.70	0.79	0.02	429.53	34.01	nd	59.42	2 570.62	129.73	159.37	155.78	1.07	5.37	1.22
15	64.17	125.54	16.19	0.64	0.03	429.10	23.90	0.22	78.48	2 341.26	116.00	153.22	147.05	1.13	3.11	0.80
16	33.65	63.28	6.69	0.41	0.02	312.37	18.50	nd	66.42	1 870.39	23.87	32.82	81.72	0.66	0.74	0.16
17	2.89	28.70	236.14	7.84	9.57	227.99	19.11	213.26	1.62	338.85	8.50	3.15	2.31	0.45	0.28	nd
18	9.28	61.01	247.13	15.90	9.50	272.41	37.27	218.97	3.05	1 000.87	10.11	2.98	1.48	0.50	0.32	nd
19	8.51	67.43	257.83	15.19	9.14	300.74	35.56	228.14	nd	970.37	6.74	2.57	1.48	0.40	0.93	tr
20	11.45	17.45	251.11	7.38	8.77	322.60	19.11	241.10	2.21	169.50	5.87	0.89	2.31	6.61	0.56	tr
21	8.69	121.24	179.08	14.08	7.27	276.22	30.85	231.29	6.32	1 403.67	5.46	3.91	13.33	0.41	0.51	nd
22	6.93	94.32	238.35	17.31	9.13	280.33	43.09	248.43	5.16	815.21	7.62	3.71	4.00	0.34	0.38	tr
23	2.36	10.87	201.31	2.82	8.42	453.43	9.36	334.45	1.35	86.30	3.42	nd	8.27	2.47	0.34	tr
24	9.29	54.88	227.16	16.11	9.24	367.51	26.17	262.06	3.20	604.25	6.26	2.03	3.84	0.34	0.51	nd
25	7.65	20.90	187.31	5.45	7.50	437.19	13.19	315.58	3.03	173.69	3.77	nd	11.23	0.89	0.53	tr
26	6.39	18.42	193.84	5.35	7.19	468.38	13.23	337.43	2.57	155.29	3.63	nd	11.71	0.44	0.50	tr
27	11.28	104.57	7.49	17.19	22.34	11.89	6.95	35.23	0.80	506.42	1.41	nd	nd	0.50	0.39	nd

注 (note): nd. 未检出 (not detected); tr. 低于定量限 (trace, below the LOQ)

2.2.9 聚类分析 为了直观地区分黄芩花及芫花,本研究利用聚类分析中的组间平均距离,采用SPSS中的Hierarchical Cluster过程,基于测定的16种成分,对27批药材进行聚类分析。聚类分析结果见图3。27批药材被分为2类,黄芩花(样品1~16)为A类,芫花(样品17~27)为B类。由此可见,聚类分析能将芫花和黄芩花准确地区分^[18]。

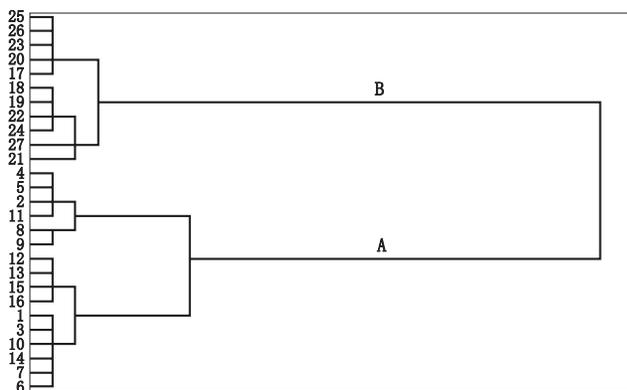


图3 组间连接法对27批黄芩花(A)与芫花(B)样品的聚类分析
Fig. 3 Clustering analysis of 27 batches of Flos Wikstroemiae Chamaedaphnis (A) and Flos Genkwa (B) using the "average linkage between groups" method

3 讨论

3.1 特征图谱液相色谱相条件的优化

3.1.1 不同流速考察 取同一批(HYH-SX-001)药材,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,分别考察0.7、0.8和0.9 mL·min⁻¹ 3种流速。结果表明,在0.7 mL·min⁻¹的流速下样品中共有峰的分离度较好。

3.1.2 不同流动相pH考察 取同一批(HYH-SX-001)药材,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,按“2.1.1”项下色谱条件进样测定,分别考察乙腈-0.05%甲酸水、乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.2%甲酸水3种不同的流动相。结果表明,分别采用3种流动相,样品中共有峰分离效果均良好,出于对色谱柱的保护,选择乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。

3.2 含量测定提取条件的优化

提取溶剂的考察: 分别以50%甲醇、70%甲醇、100%甲醇以及50%乙醇、70%乙醇和无水乙醇为提取媒介,制备供试品溶液,结果表明70%乙醇提取效率良好。

提取时间的考察: 考察了提取时间为20、30、45和60 min对待测成分的提取效果,结果表明超声提

取30 min时提取效率最高,故选择超声提取30 min。

3.3 含量测定液相色谱条件的优化

试验中考察了不同种类流动相(甲醇-水,乙腈-水)及不同型号的色谱柱[Diamonsil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Zorbax SB C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)和Sapphire C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)]。同时分别考察了电解质(如甲酸、乙酸等)对测定结果的影响。结果表明“2.2.1”项下的液相色谱条件效果最佳。

试验中发现含原酸的样品和对照品溶液均出现2个色谱峰,与文献[19]报道一致,由于化学结构中有双键,存在着顺反异构,当在紫外灯或空气中放置较长时间,顺反异构体彼此相互转化,最终达到一定的平衡。因此,绿原酸的峰面积应该是2个色谱峰面积的和。

4 小结

本研究建立的特征图谱可鉴别区分芫花和黄芩花药材,通过特征图谱整体图形、共有特征峰、相对保留时间等参数,可对药材进行定性鉴定,有利于全面控制药材品质^[20]。此外,HPLC-MS法同时测定不同产地的11批芫花与16批黄芩花中的13种黄酮和3种酚酸类成分的含量,并通过聚类分析看出不同来源的芫花和黄芩花的所含成分基本相同,但各成分含量差异较大。特征图谱和含量测定方法的建立为全面控制芫花和黄芩花的质量提供了科学依据^[21]。

参考文献

- [1] 中国药典 2015年版。一部[S]. 2015: 159
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 159
- [2] 李慧博,徐丽霞,刘来正,等. 黄芩花药材标准修订的基础研究[J]. 山西中医学院学报, 2013, 14(4): 67
LI HB, XU LX, LIU LZ, et al. Basic study on revision of medical material quality of standard of Wikstroemiae Chamaedaphnis Flos [J]. J Shanxi Univ Tradit Chin Med, 2013, 14(4): 67
- [3] 中国药典 1977年版。一部[S]. 1977: 514
ChP 1977. Vol I [S]. 1977: 514
- [4] 孙倩,武洁,李菲菲,等. 芫花化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(2): 94
SUN Q, WU J, LI FF, et al. Isolation and identification of chemical constituents from *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2014, 31(2): 94
- [5] 郭洁如. 两种芫花属药用植物化学成分和生物活性研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012
GUO JR. Study on the Chemical Constituents and Biological

- Activities of Two Wikstroemia Medicinal Plants [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012
- [6] 邵泽艳, 赵娜夏, 夏广萍, 等. 芫花醋酸乙酯部位的化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 44(4): 397
SHAO ZY, ZHAO NX, XIA GP, *et al.* Chemical constituents in ethyl acetate fraction from *Daphne genkwa* [J]. *Drugs Clin*, 2013, 44(4): 397
- [7] 羨冀, 徐扬, 罗显峰, 等. 芫花花蕾中甾醇类化合物的分离与鉴定 [J]. 沈阳药科大学学报, 2014, 31(5): 347
XIAN J, XU Y, LUO XF, *et al.* Isolation and identification of the sterols from the flower buds of *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2014, 31(5): 347
- [8] 康少文, 于永芳, 魏清波, 等. 黄芩花中期引产有效成分的研究 [J]. 中草药, 1984, 1(4): 5
KANG SW, YU YF, WEI QB, *et al.* Study on the effective components on *Wikstroemia chamaedaphne* in induction of labor in second trimester [J]. *China Tradit Herb Drugs*, 1984, 1(4): 5
- [9] ZHAN ZJ, FAN CQ, DING J, *et al.* Novel diterpenoids with potent inhibitory activity against endothelium cell HMEC and cytotoxic activities from a well-known TCM plant *Daphne genkwa* [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2005, 13(1): 645
- [10] 罗云, 郝伟伟, 王洁, 等. 高效液相色谱法测定六味地黄浓缩丸特征图谱及4种主要成分的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(10): 748
LUO Y, HAO WW, WANG J, *et al.* Simultaneous determination of specific chromatogram and four main components of Liuwei Dihuang concentrated pills by HPLC [J]. *Chin Hosp Pharm J*, 2012, 32(10): 748
- [11] SHU ZH, LI XQ, RAHMAN K, *et al.* Chemical fingerprint and quantitative analysis for the quality evaluation of *Vitex negundo* seeds by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with hierarchical clustering analysis [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39: 279
- [12] LI YR, YANG K, SHI QY, *et al.* Development of a method using high-performance liquid chromatographic fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for the quality control of Yangxinshi tablets [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38: 2989
- [13] 胡晓茹, 杨思广, 戴忠, 等. 葛根芩连片特征图谱及含量测定方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9): 1590
HU XR, YANG SG, DAI Z, *et al.* Study on characteristic fingerprints and quantitative analysis of Gegen Qinlian tablets [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(9): 1590
- [14] 车晓彦, 伍丕娥, 周娟, 等. 麦冬药材 TLC 及 HPLC 特征图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(12): 2262
CHE XY, WU PE, ZHOU J, *et al.* Studies on TLC and HPLC characteristic chromatograms of *Ophiopogon Radix* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(12): 2262
- [15] 王二兵. 祖师麻药材 HPLC 特征图谱 [J]. 化工时刊, 2014, 28(11): 1
WANG EB. Characteristic spectrum of Zushima by HPLC [J]. *Chem Ind Times*, 2014, 28(11): 1
- [16] 许玲玲, 安睿, 王新宏, 等. 液质联用技术在中药分析中的应用 [J]. 中成药, 2006, 28(2): 239
XU LL, AN R, WANG XH, *et al.* The applicaiton of liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry techonlogy on analysis of Chinese herbs [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2006, 28(2): 239
- [17] 颜美秋, 陈素红, 吕圭源, 等. 铁皮石斛 HPLC 特征图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(4): 516
YAN MQ, CHEN SH, LÜ GY, *et al.* HPLC specific chromatogram of *Dendrobium officinale* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2013, 38(4): 516
- [18] 马培, 许利嘉, 刘延泽, 等. 虎杖药材 UPLC 特征图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 72
MA P, XU LJ, LIU YZ, *et al.* Studies on the UPLC fingerprint and quality evaluation of crude drug of *Polygonum cuspidatum* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2012, 18(2): 72
- [19] CLIFFORD MN, KIRKPATRICK J, KUHNERT N, *et al.* LC-MSⁿ analysis of the cisisomers of chlorogenic acids [J]. *Food Chem*, 2008, 106: 479
- [20] 陈志辉, 罗明, 魏刚, 等. 不同产地金钗石斛 HPLC 特征图谱的比较 [J]. 广东药学院学报, 2014, 30(6): 1
CHEN ZH, LUO M, WEI G, *et al.* Comparative study on the HPLC characteristic spectrum of *Dendrobium nobile* Lindl. from different regions [J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2014, 30(6): 1
- [21] QIAO CF, HAN QB, SONG JZ, *et al.* Chemical fingerprint and quantitative analysis of *Fructus Psoraleae* by high-performance liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2007, 30: 813

(本文于2017年4月1日收到)