

HPLC-MS 测定芫花炮制前后 5 种成分含量变化

李林^{1*}, 关洪月¹, 殷放宙¹, 陆兔林¹, 林家红², 蔡宝昌¹

(1. 南京中医药大学国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210029;
2. 南京海辰药业有限公司, 南京 210046)

[摘要] 目的: 建立 HPLC-MS 同时测定芫花中木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素以及芫花酯甲 5 种化学成分含量的方法, 分析炮制前后含量的变化。方法: 采用液质联用法, 质谱采用大气压电喷雾离子源, 选择性负离子模式监测。色谱柱为 Agilent Zorbax C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.05% 甲酸乙腈(A)-0.05% 甲酸水(B), 流速 0.6 mL·min⁻¹, 柱温 30 ℃, 进样量 2 μL。结果: 芫花炮制后 5 种毒效成分均发生了一定程度的变化。3 种黄酮类有效成分木犀草素、羟基芫花素以及芫花素炮制后含量升高, 二萜原酸酯甲代表成分芫花酯甲炮制后含量降低, 黄酮类成分芹菜素经炮制后含量也发生了下降。结论: 该方法简单、灵敏、准确, 为芫花及其炮制品的质量评价提供了有效的方法。

[关键词] 芫花; 含量; 炮制; 液质联用

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0066-05

[doi] 10.11653/syfy2013240066

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131011.1518.009.html>

[网络出版时间] 2013-10-11 15:18

Content Determination of 5 Compositions of Genkwa Flos before and after Processed

LI Lin^{1*}, GUAN Hong-yue¹, YIN Fang-zhou¹, LU Tu-lin¹, LIN Jia-hong², CAI Bao-chang¹

(1. Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
2. Nanjing Hicin Pharmaceutical Co. Ltd., Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC-MS method for the simultaneous quantitation of luteolin, apigenin, 3'-hydroxy-genkwanin, genkwanin and yuanhuacine in Genkwa Flos, and to analyze the content change before and after processing. **Method:** HPLC-MS was used for quantification in negative ion mode under ESI. Chromatography was performed on Agilent Zorbax C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) column by gradient elution using 0.05% formic acid in acetonitrile-0.05% formic acid in water at the flow rate of 0.6 mL·min⁻¹. The column temperature was kept at 30 ℃ and the inject volume was 2 μL. **Result:** The content of five toxic and active compounds was all changed after processed. The content of the luteolin, 3'-hydroxy-genkwanin, genkwanin was higher and the apigenin and yuanhuacine were lower than the raw ones. **Conclusion:** The new developed LC-MS method is simple, sensitive and accurate. It can be used for the quality evaluation of crude and processed Genkwa Flos.

[Key words] Genkwa Flos; content; processed; LC-MS

[收稿日期] 20120422(003)

[基金项目] 国家科技部重大专项(2009ZX09308-004); 江苏高校优势学科建设工程项目(2011zyx2-009)

[通讯作者] * 李林, 博士, 讲师, 从事中药质量评价研究, Tel: 025-85811513, E-mail: lilin_med@163.com

芫花为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 收载于《中国药典》2010 年版, 性味苦、辛, 温, 有毒, 归肺、脾、肾经, 内服泻水逐饮, 外用杀虫疗疮^[1]。现代研究表明芫花具有镇静、镇痛、镇咳祛痰、抗炎、抗肿瘤活性作用, 用于治疗白血

病、肝炎、慢性支气管炎、冻疮等^[2]。

芫花中含有黄酮类、二萜原酸酯类、香豆素类和木脂素类等成分,其中黄酮类成分是芫花中含量较高的一类成分,是镇咳祛痰、杀虫的有效成分;而二萜原酸酯类成分是其毒性成分^[2],同时又是其发挥泻下的物质基础。因此对芫花中黄酮类成分和二萜原酸酯类成分进行含量测定对于控制芫花饮片质量是十分必要的。目前文献报道的多为芫花生品中芫花素、羟基芫花素、芫花酯甲等单一成分的含量测定或是黄酮类几个指标性成分的同时含量测定^[3-5],同时,由于黄酮类成分和二萜原酸酯类成分的最大吸收波长不同,黄酮类成分的最大吸收在332 nm左右,而二萜原酸酯类成分的最大紫外吸收波长在232 nm左右,导致用液相同时测定两种类型的成分比较困难。有学者尝试用切换波长法同时测定芫花中芫花素和芫花酯甲的含量^[6],但是芫花酯甲在芫花中含量较低,据文献报道在十万分之几到万分之几之间^[7-8],炮制后含量更低,低于检测限则无法被液相检出。液相色谱-质谱(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)联用技术既具备液相色谱较强的分离能力,又具有质谱的高灵敏、高选择性,经常用于测定一些微量成分。故本实验采用HPLC-MS法建立了同时测定芫花生品和炮制品中芫花素、羟基芫花素、木犀草素、芹菜素4个黄酮类成分以及二萜原酸酯类代表成分芫花酯甲的含量方法,初步探讨炮制前后5种毒效成分的含量变化,以期为提高芫花饮片的质量控制水平提供数据。

1 材料

Agilent 6120 Quadrupole 型 LC/MS(美国 Agilent 公司),配备电喷雾离子源,单四级杆质谱检测器。

乙腈(美国天地试剂公司,HPLC级),甲醇(江苏汉邦科技有限公司,分析纯),甲酸(成都市科龙化工试剂厂,分析纯),恒顺陈醋(江苏恒顺调味食品有限公司),美的电磁炉(美的集团有限公司);木犀草素购于中国药品生物制品检定所(批号111520-200504),芹菜素购于上海源叶生物科技有限公司(批号20100301),羟基芫花素购于上海展舒化学科技有限公司(批号20100334),芫花素购于天津一方科技有限公司(批号10133112),芫花酯甲为实验室自制分离,经IR,MS,¹H-NMR,¹³C-NMR进行结构确证,并通过HPLC-DAD,HPLC-MS法面积归一化法测定,纯度>98%,水为市售娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈集团),其余试剂均为分

析纯。

芫花购于各药材市场,经南京中医药大学中药鉴定教研室刘训红教授鉴定为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾。其样品编号及来源见表1。

表1 芫花样品编号及来源

No.	来源	No.	来源
1	湖南	6	安徽1
2	山东	7	安徽2
3	湖北1	8	河南
4	湖北2	9	四川
5	湖北3	10	浙江

2 方法与结果

2.1 醋芫花饮片的炮制 按药典方法炮制:取芫花药材,除去杂质后,称取100 g,加30 mL醋拌匀,闷0.5 h至醋被吸尽,置炒制容器内,文火炒干。取出,放凉。

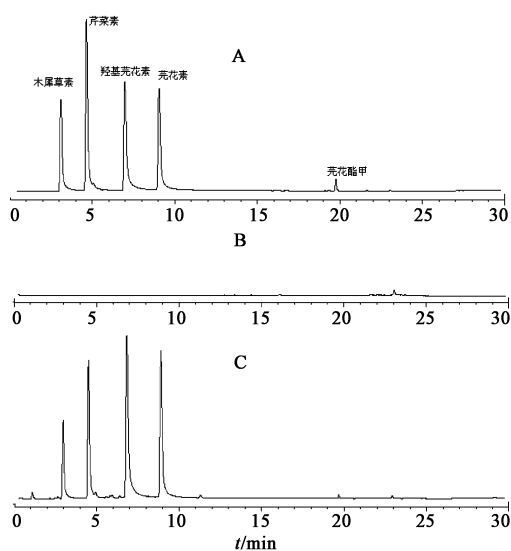
2.2 色谱-质谱条件 Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm,1.8 μm),流动相0.05%甲酸乙腈(A)-0.05%甲酸水(B),梯度洗脱(0~10 min,20%~40% A;10~20 min,40%~80% A;20~25 min,80%~100% A;25~30 min,100% A),流速0.6 mL·min⁻¹,柱温30℃,检测波长232 nm,进样量2 μL,采样时间30 min。

质谱条件,离子源ESI,毛细管电压3 500 V,干燥气流速10.0 L·min⁻¹,干燥气温度350℃,裂解电压140 V,质量分析器为四级杆,采用选择负离子模式检测,离子监控通道 *m/z* 285.0(木犀草素),*m/z* 269.0(芹菜素),*m/z* 299.0(羟基芫花),*m/z* 283.0(芫花素),*m/z* 647.3(芫花酯甲)。

结果表明,在此色谱质谱条件下,芫花中的5个成分能够完全分离,样品以及对照品质谱图见图1。

2.3 混合对照品溶液的制备 精密称取木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素、芫花酯甲适量,置10 mL量瓶中,加甲醇定容,摇匀,得到0.124,0.328,0.22,0.245,0.010 g·L⁻¹的对照品储备液。将上述混合对照品溶液逐级稀释2,4,8,16,32倍备用。

2.4 供试品溶液的制备 将芫花生品以及醋制品(过60目)置60℃烘箱中干燥1 h,精密称定0.5 g置圆底烧瓶中,精密量取50 mL甲醇,密塞,置75℃水浴锅中加热回流2 h,取出放冷,过滤,蒸干,甲醇定容至25 mL量瓶中,摇匀,样品过0.45 μm滤膜,滤液备用。



A. 混合对照品溶液; B. 空白溶液; C. 样品供试品溶液

图 1 芫花质谱总离子流(负离子模式检测)

2.5 线性关系考察 精密吸取上述各对照品溶液 2 μL 进液质分析,以各对照品的分子离子峰的峰面积/10 000 为纵坐标,以质量浓度($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标,绘制标准曲线并进行回归计算,得到 5 种成分的标准曲线回归方程($n=6$)。木犀草素在 0.077 50 ~ 0.248 0 μg 线性关系良好,回归方程为 $Y=3\ 786.3X+19.466$ ($R^2=0.999\ 2$); 芹菜素在 0.020 50 ~ 0.656 0 μg 线性关系良好,回归方程为 $Y=239\ 0.6X+104.71$ ($R^2=0.999\ 5$); 羟基芫花素在 0.013 75 ~ 0.440 0 μg 线性关系良好,回归方程为 $Y=571\ 0.2X+4.236$ ($R^2=0.999\ 2$); 芫花素在 0.015 31 ~ 0.490 0 μg 线性关系良好,回归方程为 $Y=3\ 243.8X+114.73$ ($R^2=0.999\ 2$); 芫花酯甲在 0.000 637 6 ~ 0.020 40 μg 线性关系良好,回归方程为 $Y=36\ 017X+1.028$ ($R^2=0.999\ 2$)。

2.6 检测限和定量限 以信噪比为 3:1 确定木犀草素、芹菜素、羟基芫花素、芫花素、芫花酯甲的检测限(LOD)分别为 0.000 205 2, 0.000 255 6, 0.000 122 3, 0.000 328 6, 0.000 066 92 μg 。以信噪比 10:1 确定 5 个化合物的定量限(LOQ)分别为 0.000 684, 0.000 851 8, 0.000 407 8, 0.001 095, 0.000 223 0 μg 。

2.7 精密度试验 取 2.3 项下配好的对照品混合溶液,按照 2.2 项下分析条件,重复进样 6 次,进样量 2 μL ,测得其峰面积和保留时间,分别计算其 RSD。木犀草素保留时间和峰面积 RSD 分别为 0.256%, 0.329%, 芹菜素分别为 0.074%,

0.343%, 羟基芫花素分别为 0.056%, 1.375%, 芫花素分别为 0.060%, 0.224%, 芫花酯甲分别为 0.022%, 1.222%, 各化合物 RSD 均 < 3%, 符合要求。表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验 取同一批芫花药材(10 号生品),平行称定 6 份,按照 2.4 项制备供试品溶液,按 2.2 项下分析条件进样,记录各样品数据,分别计算其 RSD。木犀草素保留时间和含量 RSD 分别为 0.279%, 1.443%, 芹菜素分别为 0.087%, 0.471%, 羟基芫花素分别为 0.047%, 1.307%, 芫花素分别为 0.015%, 0.668%, 芫花酯甲分别为 0.007%, 2.339%, 各化合物 RSD 均 < 3%, 符合要求。表明方法重复性良好。

2.9 稳定性试验 取新制备的供试品溶液(10 号生品),按 2.2 项下分析条件分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样,测定并记录数据,分别计算其 RSD。木犀草素保留时间和峰面积 RSD 分别为 0.466%, 2.184%, 芹菜素分别为 0.172%, 0.641%, 羟基芫花素分别为 0.125%, 0.883%, 芫花素分别为 0.081%, 0.632%, 芫花酯甲分别为 0.040%, 0.787%, 各化合物 RSD 均 < 3%, 符合要求。

2.10 加样回收率试验 取已知含量的芫花饮片(7 号生品)粉末 6 份,每份约 0.25 g,置 250 mL 圆底烧瓶中,精密加入甲醇 50 mL,分别精密加入 0.25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 木犀草素 1.0 mL, 0.50 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 芹菜素 2 mL, 0.704 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 羟基芫花素 1 mL, 0.392 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 芫花素 2 mL, 0.062 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 芫花酯甲 1 mL,按照 2.4 项制备供试品溶液,按 2.1 项下分析条件进样,记录各样品数据,分别计算其回收率,见表 2~6。

表 2 木犀草素加样回收率试验

取样量 /mg	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
250.43	0.265 7	0.523 7	103.200 0	100.426 7	1.990 7
250.32	0.265 6	0.513 2	99.0400		
250.40	0.265 6	0.518 5	101.160 0		
250.45	0.265 7	0.511 2	98.200 0		
250.12	0.265 3	0.512 6	98.920 0		
250.67	0.266 0	0.521 1	102.040 0		

注:加入量均为 0.250 0 mg。

2.11 样品含量测定 分别精密称取 10 批芫花生品和 10 批炮制品各 0.5 g,按照供试品溶液方法操作,在上述分析条件下进样,结果见表 7。

表3 芹菜素加样回收率试验

取样量 /mg	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
250.43	0.959 6	2.001 2	104.160 0	101.755 0	1.957 6
250.32	0.959 2	1.948 7	98.9500		
250.40	0.959 5	1.967 3	100.780 0		
250.45	0.9597	1.9845	102.4800		
250.12	0.958 5	1.964 3	100.580 0		
250.67	0.960 6	1.996 4	103.580 0		

注:加入量均为1.000 mg。

表4 羟基芫花素加样回收率试验

取样量 /mg	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
250.43	0.753 3	1.431 8	96.377 8	99.486 3	2.274 5
250.32	0.753 0	1.443 7	98.110 8		
250.40	0.753 2	1.449 4	98.892 0		
250.45	0.753 4	1.462 1	100.667 6		
250.12	0.752 4	1.477 3	102.968 8		
250.67	0.754 0	1.457 3	99.900 6		

注:加入量均为0.704 0 mg。

表5 芫花素加样回收率试验

取样量 /mg	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
250.43	0.780 8	1.551 2	98.265 3	98.762 8	2.073 2
250.32	0.780 5	1.583 7	102.449 0		
250.40	0.780 7	1.558 1	99.158 2		
250.45	0.780 9	1.543 7	97.295 9		
250.12	0.779 9	1.554 8	98.839 3		
250.67	0.781 6	1.538 7	96.568 9		

注:加入量均为0.784 0 mg。

表6 芫花酯甲加样回收率试验

取样量 /mg	样品含量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%	
250.43	0.065 86	0.127 0	98.532 3	99.860 2	2.297 3	
250.32	0.065 83	0.126 2	97.371 0			
250.40	0.065 86	0.126 9	98.419 4			
250.45	0.065 87	0.128 9	101.596 8			
250.12	0.065 78	0.06 20	0.127 6			99.741 9
250.67	0.065 93	0.130 1	103.500 0			

注:加入量均为0.062 0 mg。

表7 各批次5种化合物的百分含量

No.	木犀草素	芹菜素	羟基芫花素	芫花素	芫花酯甲
S1	0.134 1	0.641 7	0.236 1	0.352 6	0.001 8
S2	0.097 1	0.268 6	0.273 9	0.295 4	0.005 4
S3	0.132 6	0.315 6	0.307 2	0.334 2	0.006 0
S4	0.059 4	0.327 3	0.246 4	0.316 7	0.008 7
S5	0.099 3	0.348 4	0.261 1	0.234 0	0.006 5
S6	0.077 0	0.268 0	0.279 9	0.328 8	0.010 1
S7	0.106 1	0.383 2	0.300 8	0.311 8	0.026 4
S8	0.107 3	0.396 9	0.287 6	0.305 5	0.026 0
S9	0.069 3	0.485 0	0.209 3	0.367 5	0.006 1
S10	0.090 4	0.355 6	0.243 4	0.321 4	0.004 9
C1	0.134 3	0.467 3	0.270 0	0.357 3	0.001 5
C2	0.114 7	0.262 5	0.278 7	0.299 6	0.003 6
C3	0.165 3	0.303 8	0.346 8	0.361 5	0.005 1
C4	0.086 8	0.264 3	0.300 0	0.329 3	0.005 4
C5	0.154 4	0.170 7	0.324 8	0.379 5	0.004 9
C6	0.078 1	0.255 5	0.286 4	0.360 5	0.007 6
C7	0.125 1	0.339 5	0.330 5	0.337 9	0.017 9
C8	0.117 8	0.371 8	0.312 3	0.323 3	0.016 8
C9	0.138 8	0.362 8	0.312 2	0.395 7	0.003 6
C10	0.146 6	0.290 1	0.323 1	0.388 8	0.003 9

3 讨论

3.1 芫花生品中不同产地5种成分含量比较 各产地5个成分的含量从高到低依次为芹菜素、芫花素、羟基芫花素、木犀草素、芫花酯甲。其中芫花酯甲含量差异最大,含量上相差15倍,而芫花作为有毒中药,对毒性成分即以芫花酯甲为代表的二萜原酸酯类成分的含量控制显得尤为重要。

3.2 不同批次芫花炮制前后5种成分含量变化比较

木犀草素、羟基芫花素以及芫花素经炮制后含量均呈升高,各批次升高幅度不一,这可能是芫花在炮制过程中受醋酸和加热的影响,黄酮中的苷水解生成相应的苷元,从而使木犀草素、羟基芫花素以及芫花素含量升高;芫花酯甲经炮制后含量降低,这与传统炮制理论“醋制减毒”一致。有文献报道芫花醋制后乙酰化物含量升高,推测可能是由于辅料醋与芫花酯甲发生了乙酰基取代反应导致芫花酯甲含量降低,但含量降低之后对其泻下作用有无影响还需要药理研究进一步的说明;芹菜素炮制后含量也下降,可能是炮制加热过程中发生了某些反应所致,但具体还有待进一步的研究。

鸡血藤药材及其不同部位缩合鞣质的含量测定

林惠贞¹, 刘浩文¹, 韦玮¹, 周盈利¹, 陈建萍^{2*}, 王冬梅^{1*}

(1. 中山大学药学院, 广州 510006; 2. 香港大学中医药学院, 香港)

[摘要] 目的: 建立鸡血藤药材中缩合鞣质的含量测定方法, 并对不同批次鸡血藤药材及其不同部位中缩合鞣质的含量进行测定。方法: 优化并建立了采用香草醛-硫酸显色体系测定鸡血藤药材中缩合鞣质含量的方法, 反应条件为 3 mL 3% 香草醛, 3 mL 40% 浓硫酸, 常温反应 20 min, 测定波长为 500 nm。结果: 5 个批次鸡血藤药材中缩合鞣质含量为 3.99% ~ 8.63%; 其中 3 个批次药材不同部位的缩合鞣质含量测定结果显示, 树脂状分泌物中含量最高, 为 8.14% ~ 11.51%, 木质部 (5.39% ~ 7.92%) 和韧皮部 (3.65% ~ 6.90%) 含量相对较少。结论: 香草醛-硫酸显色法快速、简便、准确、重复性好, 可用于测定鸡血藤药材中缩合鞣质的含量; 缩合鞣质在树脂状分泌物中的含量比其他部位高, 为传统的鸡血藤药材质量的判断方法提供了科学依据。

[关键词] 鸡血藤; 密花豆属密花豆; 缩合鞣质; 香草醛-硫酸显色法; 质量控制; 树脂状分泌物

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0070-05

[doi] 10.11653/syjf2013240070

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131011.1506.006.html>

[网络出版时间] 2013-10-11 15:06

Determination of Condensed Tannins in *Spatholobi Caulis*

LIN Hui-zhen¹, LIU Hao-wen¹, WEI Wei¹, ZHOU Ying-li¹, CHEN Jian-ping^{2*}, WANG Dong-mei^{1*}

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

[收稿日期] 20121025(016)

[基金项目] 广东省科技计划国际合作项目(2012B050300014); 香港创新科技基金(ITF)(ITS/073/HFP); 2011 年中山大学实验室开放基金项目(KF201142)

[第一作者] 林惠贞, 从事中草药质量标准化与分析研究, Tel: 18998490809, E-mail: dmwang99@foxmail.com

[通讯作者] * 王冬梅, 副教授, 硕士生导师, 从事天然药物化学与中草药质量标准化研究, Tel: 020-39943042, E-mail: lsswdm@mail.sysu.edu.cn; * 陈建萍, 副教授, 博士生导师, 从事中药药理学(心脑血管药理学、肿瘤药理学)研究, Tel: 00852-95147068, E-mail: jppchen@yahoo.com

本实验采用 HPLC-MS 同时测定芫花中黄酮类成分和二萜原酸酯类成分, 既避免了紫外检测器下不能同时最大程度的测定各个成分问题, 同时检测限也明显低于文献报道的芫花素 0.229 mg·L⁻¹ 芫花酯甲 36.70 mg·L⁻¹, 方法简便、可靠、重复性好, 可用于芫花的质量控制。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 148.
[2] 张保献, 原思通, 张静修, 等. 芫花的现代研究概况[J]. 中国中医药信息杂志, 1995, 10(2): 21.
[3] 张保献, 原思通, 夏坤. HPLC 法测定芫花中芫花素的

含量[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(4): 237.
[4] 朱永安. 高效液相色谱法测定芫花中芫花素含量[J]. 海峡药学, 2006, 18(5): 103.
[5] 黄兰岚, 李尧尧, 原思通, 等. 不同产地芫花药材中芫花酯甲含量比较[J]. 中成药, 2008, 30(10): 附 10.
[6] 韩伟, 徐子芳, 宋小妹, 等. 芫花药材物质基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 46.
[7] 张保献, 原思通, 夏坤, 等. HPLC 法测定芫花中芫花酯甲的含量[J]. 中国中药杂志, 1994, 19(9): 551, 552.
[8] 宋丽丽, 王丽峰, 郭茂娟. RP-HPLC 法同时测定芫花中芹菜素、羟基芫花素、芫花素的含量[J]. 北京中医药, 2010, 29(6): 461, 475.

[责任编辑 顾雪竹]