

芫花药材的 HPLC 指纹图谱及 ESI-MS 分析

邓仕任, 夏林波*, 董倩, 郭晏华, 贾天柱
(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

摘要 目的: 建立芫花药材的质量评价方法。方法: 采用 HPLC-DAD 对 21 批芫花药材的指纹图谱进行比较研究, 并用 HPLC-ESI-MS 技术对部分共有峰进行了初步归属。结果: 建立了以 16 个共有峰为特征指纹信息的芫花药材的 HPLC 指纹图谱, 并通过 MS 技术初步鉴定出其中 10 个共有峰所对应的可能化学成分, 共有峰主要为黄酮苷及其苷元类成分。结论: 该方法可为芫花药材指纹图谱和质量分析方法的建立提供参考。

关键词 芫花; 高效液相色谱; 指纹图谱; ESI-MS 分析

中图分类号 R284.1 **文献标识码** A **文章编号** 1005-9903(2011)24-0032-04

HPLC Fingerprint of Flos Genkwa and Its ESI-MS Analysis

DENG Shi-ren, XIA Lin-bo*, DONG Qian, GUO Yan-hua, JIA Tian-zhu

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a reliable and useful method for assessment of the quality of Flos Genkwa from different habitats. **Method:** Flos Genkwa from different habitats were analyzed by HPLC-DAD chromatographic fingerprint, some characteristic peaks were identified preliminarily based on the MS spectra and literature data. **Results:** Sixteen main characteristic peaks were selected from the fingerprint spectrum of 21 batches of samples, ten constituents of which were preliminarily identified as flavonoids and flavonoid glycosides. **Conclusion:** The method is valuable for quality control of Flos Genkwa.

[Key words] Flos Genkwa; HPLC; fingerprint; ESI-MS analysis

芫花为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 主产于我国河南、湖北、安徽、山东等地区, 传统用于治疗水肿胀满、痰饮积聚等症^[1]。现代研究表明, 其富含黄酮、二萜原酸酯、甾体、香豆素类成分^[2], 具有镇咳、祛痰、利尿、抗生育等作用, 并在体外实验中对于多种癌细胞均表现

出较好的抑制作用^[3]。鉴于芫花药效作用广泛、成分多样等特点, 本着合理利用药材资源、有效控制药材质量的原则, 作者将 HPLC-MS 联用体系首次用于芫花药材的分析中, 以期将 HPLC 指纹图谱的高分离和高识别能力与 MS 的定性鉴别能力结合起来, 对芫花药材的质量进行比较全面的评价。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱-质谱联用仪 (LC-DAD-MS 系统, 电喷雾接口, HP Chemstation System 色谱工作站)。乙腈 (色谱纯, 美国 Tedia 公司)、醋酸 (分析纯)、甲醇 (分析纯), 水为超纯水 (Millipore 超纯水系统)。芹菜素和木犀草素对照品购于中国药品生物制品检定所 (批号 111520-200504, 111901-200802), 芫花素对照品由中国中医科学院中药研究所提供, 羟基芫花素对照品为自行制备, 4 种标准物质经 HPLC 归一化法测定, 纯度均大于 95%。

收稿日期 20110303(004)

基金项目 国家“十一五”科技支撑计划课题 (2006BA109B06-07-1); 辽宁中医药大学药学院人才基金 (yxrc0916)

第一作者 邓仕任, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究及中药质量评价研究, Tel: 0411-87586007, E-mail: dengsr@lnutcm.edu.cn

通讯作者 * 夏林波, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础研究及中药质量评价研究, Tel: 0411-87586006, E-mail: xialb@lnutcm.edu.cn

21 批芫花药材从河南等地收集,编号为 S1 ~ S21(表 1),均由辽宁中医药大学翟延君教授鉴定为瑞香科植物 *D. genkwa* Sieb. et Zucc 的干燥花蕾。

表 1 芫花药材的来源

No.	产地	No.	产地	No.	产地
S1	河南南阳	S8	湖北随州	S15	浙江磐安
S2	河南南阳	S9	湖北随州	S16	浙江磐安
S3	河南登封	S10	安徽亳州	S17	浙江磐安
S4	河南登封	S11	安徽亳州	S18	浙江杭州
S5	河南禹州	S12	安徽亳州	S19	山东临沂
S6	湖北武汉	S13	安徽滁县	S20	山东临沂
S7	湖北武汉	S14	安徽滁县	S21	山东济南

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备 将不同来源药材 50 ℃ 烘干 12 h,粉碎,过 60 目筛,取样品粉末约 0.5 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称重,75 ℃ 回流 1 h。放冷,补足减失质量,摇匀,过滤,续滤液经微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,得各供试品溶液。

2.2 对照品溶液的制备 精密称取芹菜素、木犀草素、芫花素、羟基芫花素对照品适量,分别以甲醇溶解并配成含木犀草素 114 mg·L⁻¹、芹菜素 226 mg·L⁻¹、芫花素 120 mg·L⁻¹、羟基芫花素 164 mg·L⁻¹ 的对照品溶液。

2.3 分析条件

2.3.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)(北京迪马科技有限公司);流动相 A 为 0.8% 乙酸水溶液,B 为乙腈。梯度洗脱(0 ~ 25 min,15% ~ 30% B;25 ~ 35 min,30% ~ 40% B;30 ~ 50 min,40% ~ 75% B)。柱温 30 ℃,流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 248 nm,进样量 20 μL,分析时间 55 min。

2.3.2 质谱条件 电离源 ESI,检测方式负离子模式,扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 500,干燥气(N₂)流量 9 L·min⁻¹,干燥气温度 320 ℃,毛细管电压 3 500 V。

2.4 方法学考察

2.4.1 稳定性试验 取同一供试品溶液(S6),分别在 0,4,8,12,24 h 进样 20 μL,记录指纹图谱。结果表明各主要色谱峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD 均在 5% 以内,说明供试液在 24 h 内稳定。

2.4.2 精密性试验 取同一供试品溶液(S6),连续进样 5 次,记录指纹图谱。结果表明各主要色

谱峰相对保留时间的 RSD 均 < 2%,相对峰面积的 RSD 均 < 4%,说明仪器精密性良好。

2.4.3 重复性试验 取同一批芫花药材(S6),按 2.1 项下方法制备 5 份供试品溶液,分别进样,记录指纹图谱。结果表明各主要色谱峰相对保留时间、相对峰面积的 RSD < 5%,说明所建立方法重复性良好。

2.5 芫花药材指纹图谱的建立 取 21 批样品,分别按照 2.1 项下方法制备供试样品,并测定色谱图。图谱数据表明,芫花药材所有成分的色谱峰在 50 min 内全部出现,且所有谱峰都得到了较好的分离。将各样品色谱图导入 Chromap V1.5 软件(珠海科曼中药研究有限公司),选定 S6 号样品色谱图作为参照图谱,通过多点校正法获得对照谱(CP,图 1),共检出 16 个共有峰,选定这 16 个峰位构成指纹图谱的稳定特征峰(图 2)。

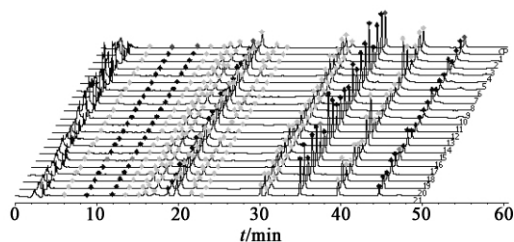


图 1 不同产地芫花药材的高效液相色谱图

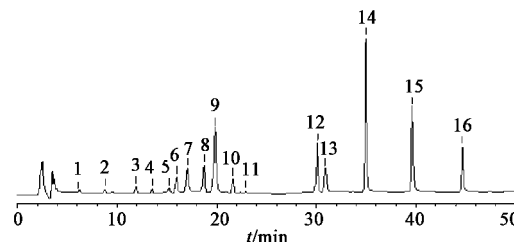


图 2 芫花药材的指纹图谱

2.6 芫花药材指纹图谱的分析

2.6.1 相似度分析 以芹菜素(峰 14,图 2)为参照峰,将各药材样品进行标准化处理后,与对照图谱 CP 比较及相互比较,由 Chromap V1.5 软件的“相似度分析模块”进行计算,可得各药材相似度(表 2)。由表中结果可知,绝大多数产地的药材相似度均在 0.92 以上,仅有 S5(0.837)和 S13(0.869)例外。该结果表明,芫花药材的化学成分与产地并无明显相关性,且不同来源的芫花药材的化学组成相对稳定。

2.6.2 主成分分析 为了对相似度分析的结果进行验证,由 Chromap V1.5 软件的“主成份分析模块”对各批药材进行了主成分分析(图 3)。

表 2 不同产地芫花药材 HPLC 指纹图谱的相似度

No.	相似度	No.	产地	No.	产地
S1	0.961	S8	0.962	S15	0.920
S2	0.984	S9	0.969	S16	0.984
S3	0.942	S10	0.967	S17	0.972
S4	0.986	S11	0.922	S18	0.946
S5	0.837	S12	0.963	S19	0.950
S6	0.990	S13	0.869	S20	0.976
S7	0.992	S14	0.989	S21	0.969

由图 3 可知,通过对 21 批药材的 16 个共有指纹峰的相关数据进行主成分分析,将经过降维处理的数据在二维平面上进行投影,结果得到代表 21 批药材的 21 个数据点,数据点之间的距离大小,可反映其对应的药材中化学成分的相似程度的大小。结果显示,除 S5 号和 S13 号样品外,其他药材均可归为一类。该结果与相似度的计算结果一致。

2.7 芫花药材 HPLC-MS 定性分析 通过 HPLC-

表 3 芫花部分指纹图谱峰的初步归属($\bar{x} \pm s, n = 12$)

峰号	质谱数据	可能结构
3	447 [M - H] ⁻ , 285 [M - Glc - H] ⁻	木犀草素 5-O-β-D-葡萄糖苷
6	431 [M - H] ⁻ , 269 [M - Glc - H] ⁻	芹菜素 5-O-β-D-葡萄糖苷
8	577 [M - H] ⁻ , 283 [M - Xyl - Glc - H] ⁻	芫花素 5-O-β-D-樱草糖苷
9	445 [M - H] ⁻ , 269 [M - Glu - H] ⁻	芹菜素 7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷
10	445 [M - H] ⁻ , 283 [M - Glc - H] ⁻	芫花素 5-O-β-D-葡萄糖苷
12	593 [M - H] ⁻ , 285 [M - Coumaroyl - Glc - H] ⁻	槲苷
13 ^a	285 [M - H] ⁻ , 257 [M - CO - H] ⁻	木犀草素
14 ^a	269 [M - H] ⁻ , 241 [M - CO - H] ⁻	芹菜素
15 ^a	299 [M - H] ⁻ , 285 [M - CH ₃] ⁻ , 271 [M - CO - H] ⁻	羟基芫花素
16 ^a	283 [M - H] ⁻ , 269 [M - CH ₃] ⁻ , 255 [M - CO - H] ⁻	芫花素

注: a 经由相关对照品确认。

其中峰 13,14,15,16 分别为木犀草素、芹菜素、羟基芫花素和芫花素等苷元结构,由于其结构上不含有糖配基,因此分子极性较小, *k* 值较大,在反相体系中保留较强,出峰顺序在黄酮苷之后。从其 MS/MS 结果上分析可见,芫花中的 4 种主要的苷元类物质分子量各不相同,很容易通过质谱检测定性鉴别。木犀草素和芹菜素可见明显的 [M - CO - H]⁻ 信号,这是黄酮类化合物丢失 4 位上羧基后的特征碎片离子;而在羟基芫花素和芫花素中,除了同样能观察到丢失羧基的信号之外,还能明显可见 [M - CH₃]⁻ 信号,这是该 2 种化合物失去 7 位甲氧基上的甲基后的特征信号。4 种苷元类化合物同时也通过与对照品比对保留时间的方法得以进一步确

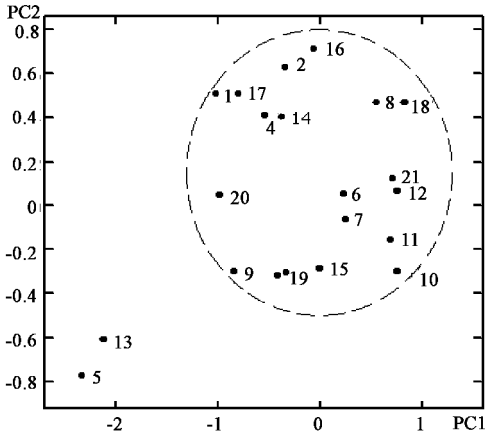


图 3 不同产地芫花药材标准化图谱的主成分投影

ESI-MS 负离子扫描获得了芫花指纹图谱的一些结构信息,对指纹图谱中的部分色谱峰进行了结构归属的初步判断,结合文献报道^[2,4],初步鉴定出 10 个指纹成分的化学结构(表 3)。

认。峰 3,6,8,9,10,12 均为 4 种苷元化合物与不同的糖基配体通过 O 苷键所形成的黄酮苷类化合物,且在其 MS 结果中均能观察到相应苷类物质的准分子离子峰和失去糖基配基后所得相应苷元的特征碎片离子峰,结合文献数据^[2,4]则可进一步推测出 6 种苷类物质的可能结构(表 3),其确切结构(如糖配基与苷元的连接位置)还需通过进一步的分离纯化和相关波谱数据进行验证。

3 讨论

比较了不同提取溶剂(如甲醇、75% 甲醇、乙醇、75% 乙醇、水、三氯甲烷、乙酸乙酯)的提取效果,结果表明纯甲醇的提取效果较好;考察了超声和回流 2 种提取方法,发现回流法得到的峰数较多,峰值较

高;最终确定提取条件为以纯甲醇为溶剂,水浴回流提取 1 h。

比较了不同型号的色谱柱,如 Waters Symmetry-C₁₈, Agilent Zorbax SB-C₁₈, Shim-pack VP-ODS 等,结果表明 Dikma Diamonsil-C₁₈ 柱在芫花化学成分的梯度洗脱中,具有柱效高、分离度好、稳定耐用等特点,比较适合芫花药材的 HPLC 分析。

考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-醋酸水溶液、乙腈-醋酸水溶液等多种流动相体系,实验表明乙腈-水比甲醇-水体系在采用梯度洗脱时,所得基线较平稳,且分离度也较高;在乙腈-水体系中加入 0.8% 醋酸后,色谱峰的拖尾现象大大改善,峰形较为理想;最终确定乙腈-0.8% 醋酸水溶液为流动相。

色谱指纹图谱技术由于其所特有的整体性和模糊性,非常适用于具有复杂成分的中药化学成分的分析,并可望为中药的质量评价提供一定的参考依据^[9]。本文通过比较 21 批芫花药材的 HPLC 图,共标定出 16 个共有峰,占峰总面积 90% 以上。进一步采用相似度评价、主成分分析全面、综合、准确地反映不同产地药材的内在联系,结果均表明,不同产地芫花药材具有较高的相似度,提示产地对芫花药材的化学成分并无显著影响。

采用了 HPLC-ESI-MS 联用技术,对芫花的指纹图谱进行进一步的深入研究,将 HPLC 对复杂样品的高分离、高识别能力与 MS 的定性鉴别能力结合起来,以对芫花药材的质量进行比较全面的评价^[9]。质谱数据表明,从指纹图谱中初步鉴定出的 10 个共有指纹峰均为黄酮和黄酮苷类化合物,文献^[7-8]报道芫花素类黄酮化合物具有镇咳、祛痰、抑制黄嘌呤氧化酶等药理活性,其与芫花药材的主治水肿、痰饮

积聚、气逆喘咳等症基本一致,提示黄酮类成分应为芫花的主要活性物质之一,对芫花中的黄酮类物质进行有效控制,应能有助于芫花药材质量的合理评价。本文所建立的 HPLC 指纹图谱及 ESI-MS 分析方法,稳定、简便、可靠,可用于芫花药材的质量评价。

参考文献

- [1] 中国药典. 一部 [S]. 2010: 148.
- [2] Park B Y, Min B S, Oh S R, et al. Isolation of flavonoids, a biscoumarin and an amide from the flower buds of *Daphne genkwa* and the evaluation of their anti-complement activity [J]. *Phytother Res*, 2006, 20: 610.
- [3] 李玲芝, 宋少江, 高品一. 芫花的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2007, 24 (9): 587.
- [4] Lin J H, Lin Y T, Huang Y J, et al. Isolation and cytotoxicity of flavonoids from *Daphnis Genkwae* Flos [J]. *J Food Drug Anal*, 2001, 9: 6.
- [5] 詹雪艳, 史新元, 段天璇, 等. 色谱指纹图谱相似度方法的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (2): 248.
- [6] 刘训红, 居文政, 蔡宝昌, 等. 太子参 HPLC-MS 指纹图谱的初步研究 [J]. *中成药*, 2008, 30 (2): 160.
- [7] 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, 2 (10): 21.
- [8] Noto T, Oda Y, Hiyase T, et al. Inhibitors of the xanthine oxidase from the flowers and buds of *Daphne genkwa* [J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, 31 (11): 3984.

责任编辑 蔡仲德