

基于HPLC法及UPLC-MS法测定芫花饮片炮制前后7种成分的含量变化

张萍¹, 米宏英², 严华¹, 魏锋^{1*}, 高慧媛², 马双成¹, 陆兔林³ (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 沈阳药科大学中药学院, 沈阳 110016; 3. 南京中医药大学, 南京 210023)

摘要 目的: 建立HPLC法及UPLC-MS法测定芫花中银槲苷、木犀草素、芹菜素、绿原酸、羟基芫花素、芫花素及芫花酯甲7种化学成分含量的方法, 分析芫花炮制前后化学成分的变化。方法: 采用HPLC法, 测定银槲苷、木犀草素、芹菜素、绿原酸、羟基芫花素和芫花素6种成分的含量, 色谱柱为Agilent Eclipse Plus C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸(B)梯度洗脱, 流速为1.0 mL·min⁻¹, 进样量10 μL。同时采用UPLC-MS方法测定芫花酯甲的含量, 色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3 C18 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸(B)梯度洗脱, 流速0.3 mL·min⁻¹, 柱温35 °C, 进样量1 μL。结果: 7种成分的含量由高到低依次为芫花素>绿原酸>银槲苷>芹菜素>羟基芫花素>木犀草素>芫花酯甲。芫花炮制后7种成分的含量均发生一定程度的变化, 其中绿原酸成分在炮制后含量有升高有降低, 变化不明显; 对于银槲苷和芹菜素成分, 炮制后含量降低; 对于木犀草素、羟基芫花素和芫花素3个成分, 炮制后含量升高; 对于芫花酯甲成分, 炮制后含量降低。结论: 该方法简便、灵敏、高效, 为考察芫花饮片炮制前后的质量变化提供了技术支持。

关键词: 芫花; 炮制; 化学成分; 含量测定; 液相色谱; 液质联用色谱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2024)05-0575-013

doi:10.16153/j.1002-7777.2024.05.010

Content Changes of 7 Components in *Daphne genkwa* Decoction Pieces Before and After Processing Determined by HPLC and UPLC-MS Method

Zhang Ping¹, Mi Hongying², Yan Hua¹, Wei Feng^{1*}, Gao Huiyuan², Ma Shuangcheng¹, Lu Tulin³ (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

Abstract Objective: To establish HPLC method and UPLC-MS method for the determination of tiliroside, luteolin, apigenin, chlorogenic acid, hydroxy genkwanin, genkwanin and yuanhuacine in *Daphne genkwa*. To analyze the contents change of 7 chemical components before and after processing. **Methods:** The contents of tiliroside, luteolin, apigenin, chlorogenic acid, hydroxy genkwanin and genkwanin were determined by HPLC. The chromatographic column was Agilent Eclipse Plus C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase gradient

基金项目: 国家中医药现代化研究专项 (编号 2018YFC1707003)

作者简介: 张萍 Tel: (010) 53852099; E-mail: zhangping@nifdc.org.cn

通信作者: 魏锋 Tel: (010) 53852020; E-mail: weifeng@nifdc.org.cn

elution of acetonitrile (A)-0.1% formic acid (B). The flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and the injection volume was $10 \mu\text{L}$. The content of yuanhuacine was analyzed by UPLC-MS. The chromatography was performed on ACQUITY UPLC HSS T3 C18 column ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$) with gradient elution of acetonitrile (A)-0.1% formic acid (B) as mobile phase at the flow rate of $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The column temperature was $35 \text{ }^\circ\text{C}$ and the injection volume was $1 \mu\text{L}$. **Results:** The contents of the 7 components in the order of high to low were genkwanin > chlorogenic acid > tiliroside > apigenin > hydroxy genkwanin > luteolin > yuanhuacine. The contents of 7 components in *Daphne genkwa* were changed to a certain extent after processing, and the content of chlorogenic acid was increased and decreased after processing, while the change was not obvious. The contents of tiliroside and apigenin were decreased after processing. The contents of luteolin, hydroxy genkwanin and genkwanin were increased after processing. For yuanhuacine, its content was tended to decrease after processing. **Conclusion:** The method is simple, sensitive and efficient, and provides technical support for investigating the quality changes of *Daphne genkwa* decoction slices before and after processing.

Keywords: *Daphne genkwa*; processing; chemical components; content determination; liquid chromatography; liquid mass chromatography

芫花为瑞香科植物芫花 *Daphne genkwa* Sieb. et Zucc. 的干燥花蕾, 又名头痛花、闷头花、鱼毒等, 在我国资源丰富, 主要分布于长江、黄河流域^[1], 是一个广布种, 产地包括河北、山西、甘肃、江苏、安徽、浙江、陕西、台湾等10余省市。其味苦、辛, 温, 有毒, 归肺、肾经, 具有泻水逐饮、杀虫疗疮的功效, 临床上用于水肿胀满、胸腹积水、痰饮积聚、气逆咳喘、二便不利及外治疥癣秃疮、痈肿、冻疮等^[2]。

药用芫花一般在春季花未开放时采收花蕾, 干燥后使用, 生品多外用治疥癣秃疮、冻疮等, 作为内服一般需炮制后入药。芫花炮制方法最早记载于汉代张仲景《金匱玉函经》, 此后的历代文献中记载有醋炒、酒炒、炒制、醋煮、醋浸与巴豆共制等近20种方法, 其中主要以醋炙(炒制)法、醋煮法为主^[3-4], 在全国各地炮制规范中均有收载^[5]。芫花炮制后, 其毒性降低, 泻下作用缓和, 药效增强^[6-7], 而这一减毒增效的作用变化与其内在成分的变化密不可分。芫花主要成分包括黄酮类、木脂素类、香豆素类、二萜类、甾醇类和挥发油等, 其中黄酮类成分是镇咳祛痰、抗炎的主要药效成分^[8-10], 二萜酯类成分是毒效成分, 在抗肿瘤、抗病毒、泻下利尿等方面也有较强的活性^[11-14]。本文针对这两类成分分别建立了7种化学成分的含量测定方法, 以考察芫花炮制前后化学成分的变化规律, 为修订完善芫花饮片的质

量标准打下基础, 为阐明炮制机理提供技术支持。

1 仪器与试剂

Waters e2690-2695 高效液相色谱仪, 包括 e2695 Separations Module、2998 PDA Detector、Empower 色谱工作站; Waters UPLC-Xevo-TQ 质谱仪(美国 Waters 公司); METTLER TOLEDO XPE105 分析天平(梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司); KQ-300DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)超声仪。

绿原酸(批号 110753-202018)、木犀草素(批号 111520-202006)、芹菜素(批号 111901-202004)、芫花素(批号 111899-201202)对照品由中国食品药品检定研究院提供, 银假苷、羟基芫花素、芫花酯甲对照品均购自上海源叶生物科技有限公司, 纯度均 > 98%, 供含量测定用。

甲醇为分析纯(购自北京化学试剂公司), 乙腈为质谱级[购自西格玛奥德里齐(上海)贸易有限公司], 甲酸为质谱级[购自霍尼韦尔(上海)有限公司], 水为 Millipore 二次超纯水, 微孔滤膜 $0.22 \mu\text{m}$ (购自上海陆纳生物科技有限公司), 辅料龙门米醋(购自北京龙门醋业有限公司, 批号 6904800、168189)。

芫花药材由企业提供, 经中国食品药品检定研究院张萍研究员鉴定为芫花(*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.) 的干燥花蕾, 样品来源详见表1。

表1 芫花饮片来源一览表

编号	样品名称	规格批次	规格批次	批号产地
1	芫花	生品 1	醋制品 1	河南平顶山
2	芫花	生品 2	醋制品 2	安徽
3	芫花	生品 3	醋制品 3	河南
4	芫花	生品 4	醋制品 4	河北
5	芫花	生品 5	醋制品 5	/
6	芫花	生品 6	醋制品 6	/
7	芫花	生品 7	醋制品 7	湖北罗田
8	芫花	生品 8	醋制品 8	江西樟树
9	芫花	生品 9	醋制品 9	浙江德清
10	芫花	生品 10	醋制品 10	湖北大悟
11	芫花	生品 11	醋制品 11	安徽金寨
12	芫花	生品 12	醋制品 12	湖北孝感
13	芫花	生品 13	醋制品 13	河南南阳
14	芫花	生品 14	醋制品 14	湖北大悟
15	芫花	生品 15	醋制品 15	河南正阳
16	芫花	生品 16	醋制品 16	湖北枣阳

2 方法与结果

2.1 醋芫花饮片炮制

按《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2020年版四部炮制通则醋炙法炮制:取芫花药材,除去杂质,称取500 g,加入米醋150 mL,拌匀,闷至醋液吸尽,置炒制容器内,文火炒干,取出,放凉,待用。

2.2 HPLC法测定6种成分含量

2.2.1 色谱条件

色谱柱为Agilent Eclipse Plus C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相:乙腈(A)–0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱程序为0~4 min, 8% A~15% A; 4~26 min, 15% A~23% A; 26~30 min, 23% A; 30~40 min, 23% A~60% A; 40~50 min, 60% A~95% A。流速为1 mL·min⁻¹,检测波长为254 nm,柱温为35 ℃,进样量为10 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备

分别取绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、芫花素、羟基芫花素对照品适量,精密称定,加70%甲醇使溶解并定容至100 mL的量瓶中,制成每1 mL各含绿原酸25 μg、木犀草素5 μg、银椴苷25 μg、芹菜素50 μg、芫花素50 μg和羟基芫花素50 μg的对照品溶液,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液的制备

取本品粉末(过四号筛)约1.0 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入70%甲醇50 mL,称定重量,超声处理50 min,放冷,再称定重量,用70%甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.2”项下各对照品溶液2 μL、5 μL、10 μL、15 μL、20 μL、25 μL,

注入高效液相色谱仪,按“2.2.1”项下色谱条件进行测定。以各对照品进样量(μg)为横坐标 X ,峰面积(A)为纵坐标 Y ,绘制各对照品标准曲

线,计算线性回归方程。同时按 $S/N=10$ 稀释各对照品溶液,测定6种成分的定量限,结果详见表2。

表2 6种成分线性关系考察结果

化合物	线性回归方程	线性范围/ μg	r	定量限/ μg
绿原酸(Chlorogenic Acid)	$Y = 1.02 \times 10^6 X - 2.69 \times 10^4$	0.052~0.65	0.9997	0.0184
木犀草素(Luteolin)	$Y = 3.41 \times 10^6 X - 9.34 \times 10^4$	0.011~0.1375	1.0000	0.0108
银椴苷(Tiliroside)	$Y = 1.67 \times 10^6 X - 1.79 \times 10^5$	0.051~0.6375	1.0000	0.1619
芹菜素(Apigenin)	$Y = 2.70 \times 10^6 X - 3.71 \times 10^5$	0.104~1.3	1.0000	0.0078
羟基芫花素(Hydroxy Genkwanin)	$Y = 1.17 \times 10^6 X - 2.81 \times 10^5$	0.102~1.275	1.0000	0.0061
芫花素(Genkwanin)	$Y = 7.41 \times 10^6 X - 3.24 \times 10^5$	0.101~1.2625	1.0000	0.0084

2.2.5 精密度考察

精密吸取“2.2.3”项下供试品溶液 $10\ \mu\text{L}$,按上述色谱条件连续进样6次,测定各成分色谱峰的峰面积,计算绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素的峰面积的RSD($n=6$)分别为0.19%、3.23%、2.36%、0.33%、0.16%、0.10%,表明仪器性能良好。

2.2.6 重复性考察

取同一份芫花样品粉末 $1.0\ \text{g}$,精密称定,共6份,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,各进样 $10\ \mu\text{L}$ 测定,记录各成分色谱峰的峰面积,计算绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素的含量均值分别为0.19%、0.03%、0.14%、0.16%、0.13%、0.17%;RSD分别为0.64%、3.66%、1.55%、0.71%、0.55%、2.57%,表明方法重复性较好。

2.2.7 稳定性考察

取同一样品的供试品溶液,分别在0、2、4、

8、12、24 h各进样 $10\ \mu\text{L}$,测定各成分色谱峰的峰面积,计算绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素峰面积的RSD分别为1.42%、0.74%、0.06%、0.07%、0.16%、1.12%,表明供试品溶液在24 h内稳定性较好。

2.2.8 加标回收率考察

取已知绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素含量的药材粉末 $0.5\ \text{g}$,共6份,精密称定,分别精密加入上述6个浓度为 $0.97\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.13\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.73\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.87\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.67\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.90\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液各 $1\ \text{mL}$,按照“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,进样 $10\ \mu\text{L}$,记录峰面积,计算含量。结果绿原酸、木犀草素、银椴苷、芹菜素、羟基芫花素、芫花素的平均回收率($n=6$)分别为98.34%、100.25%、98.46%、102.32%、95.48%、103.30%,RSD分别为0.67%、0.64%、1.07%、0.62%、0.45%、0.57%,详见表3。

表 3 芫花中 6 种成分加标回收试验

成分	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	加标回收率 /%	平均加样回收率 /%	RSD/%
绿原酸 (Chlorogenic Acid)	0.9664	0.9706	1.9145	97.68	98.34	0.67
	0.9664	0.9706	1.9241	98.67		
	0.9656	0.9706	1.9233	99.31		
	0.9656	0.9706	1.9313	97.94		
	0.9737	0.9706	1.9376	98.73		
	0.9737	0.9706	1.9334	97.71		
木犀草素 (Luteolin)	0.1349	0.1347	0.2670	99.88	100.25	0.64
	0.1348	0.1347	0.2648	99.81		
	0.1360	0.1347	0.2669	100.70		
	0.1369	0.1347	0.2648	101.39		
	0.1350	0.1347	0.2641	99.96		
	0.1348	0.1347	0.2636	99.81		
银假苷 (Tiliroside)	0.7388	0.7370	1.4539	97.02	98.46	1.07
	0.7383	0.7370	1.4637	98.92		
	0.7444	0.7370	1.4662	97.93		
	0.7496	0.7370	1.4755	98.49		
	0.7393	0.7370	1.4776	100.18		
	0.7380	0.7370	1.4620	98.24		
芹菜素 (Apigenin)	0.8772	0.8727	1.7650	101.73	102.32	0.62
	0.8765	0.8727	1.7723	102.65		
	0.8838	0.8727	1.7740	102.20		
	0.8899	0.8727	1.7817	102.19		
	0.8777	0.8727	1.7804	103.44		
	0.8761	0.8727	1.7655	101.91		
羟基芫花素 (Hydroxy Genkwanin)	0.6692	0.6693	1.3055	95.07	95.48	0.45
	0.6687	0.6693	1.3082	95.55		
	0.6743	0.6693	1.3105	95.05		
	0.6790	0.6693	1.3167	95.29		
	0.6696	0.6693	1.3108	95.80		
	0.6684	0.6693	1.3119	96.15		
芫花素 (Genkwanin)	0.9132	0.9082	1.8408	102.14	103.30	0.57
	0.9124	0.9082	1.8550	103.78		
	0.9201	0.9082	1.8596	103.45		
	0.9265	0.9082	1.8650	103.34		
	0.9137	0.9082	1.8549	103.63		
	0.9121	0.9082	1.8515	103.44		

2.3 UPLC-MS法测定芫花酯甲成分的含量

2.3.1 色谱质谱条件

色谱条件: ACQUITY UPLC HSS T3 C18色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 流动相: 乙腈 (A) -0.1%甲酸 (B), 梯度洗脱程序为0 ~ 5 min, 10%A ~ 30%A; 5 ~ 15 min, 30%A ~ 60%A; 15 ~ 25 min, 60%A ~ 90%A; 25 ~ 30 min, 90%A。流速 0.3 mL · min⁻¹, 柱温35 °C, 样品盘温度10 °C, 进样量1 μL。

质谱条件: 质量分析器为三重四级杆, 采用多反应监测模式 (Multiple Reaction Monitoring, MRM), 离子源为ESI源, 正离子模式检测, 锥孔电压3.00 kV, 离子源温度120 °C, 脱溶剂气温度350 °C, 锥孔气流速50 L · h⁻¹, 脱溶剂气流速650 L · h⁻¹, 锥孔电压24 V, 碰撞能量20 V和38 V。

2.3.2 对照品溶液的制备

取芫花酯甲对照品适量, 精密称定, 加甲醇使溶解并制成每1 mL含4 μg的溶液, 摇匀即得芫花酯甲对照品溶液。

2.3.3 供试品溶液的制备

取本品粉末 (过四号筛) 约0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入70%甲醇50 mL, 称定重量, 超声处理50 min, 放冷, 再称定重量, 用70%甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3.4 线性关系考察

精密吸取“2.3.2”项下对照品溶液0.25 μL、0.5 μL、1 μL、1.5 μL、2 μL, 注入液质联用

仪, 按“2.3.1”项下色谱质谱条件进行测定。以对照品进样量 (μg) 为横坐标 X , 峰面积 (A) 为纵坐标 Y , 绘制标准曲线, 计算芫花酯甲对照品的线性回归方程为 $Y = 6.84 \times 10^8 X + 1.02 \times 10^5$, $r = 0.9993$, 线性范围为0.001 ~ 0.008 μg。

2.3.5 精密度考察

精密吸取“2.3.3”项下供试品溶液1 μL, 按上述色谱质谱条件连续进样6次, 测定色谱峰的峰面积, 计算芫花酯甲峰面积的RSD ($n=6$) 为0.01%, 表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性考察

取同一份芫花样品粉末0.5 g, 精密称定, 共6份, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 各进样1 μL测定, 记录色谱峰的峰面积, 计算芫花酯甲的含量为0.012%, RSD为2.30%, 表明该方法重复性较好。

2.3.7 稳定性考察

取同一样品的供试品溶液, 分别在0、2、4、8、12、24 h各进样1 μL, 测定色谱峰的峰面积, 计算芫花酯甲峰面积的RSD为0.03%, 表明供试品溶液在24 h内稳定性较好。

2.3.8 加标回收率考察

取已知芫花酯甲含量的样品粉末0.25 g, 共6份, 精密称定, 精密加入“2.3.2”项下对照品溶液8.5 mL, 按照“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 进样1 μL, 记录峰面积, 计算含量。结果芫花酯甲的平均回收率 ($n=6$) 为107.35%, RSD为1.90%, 详见表4。

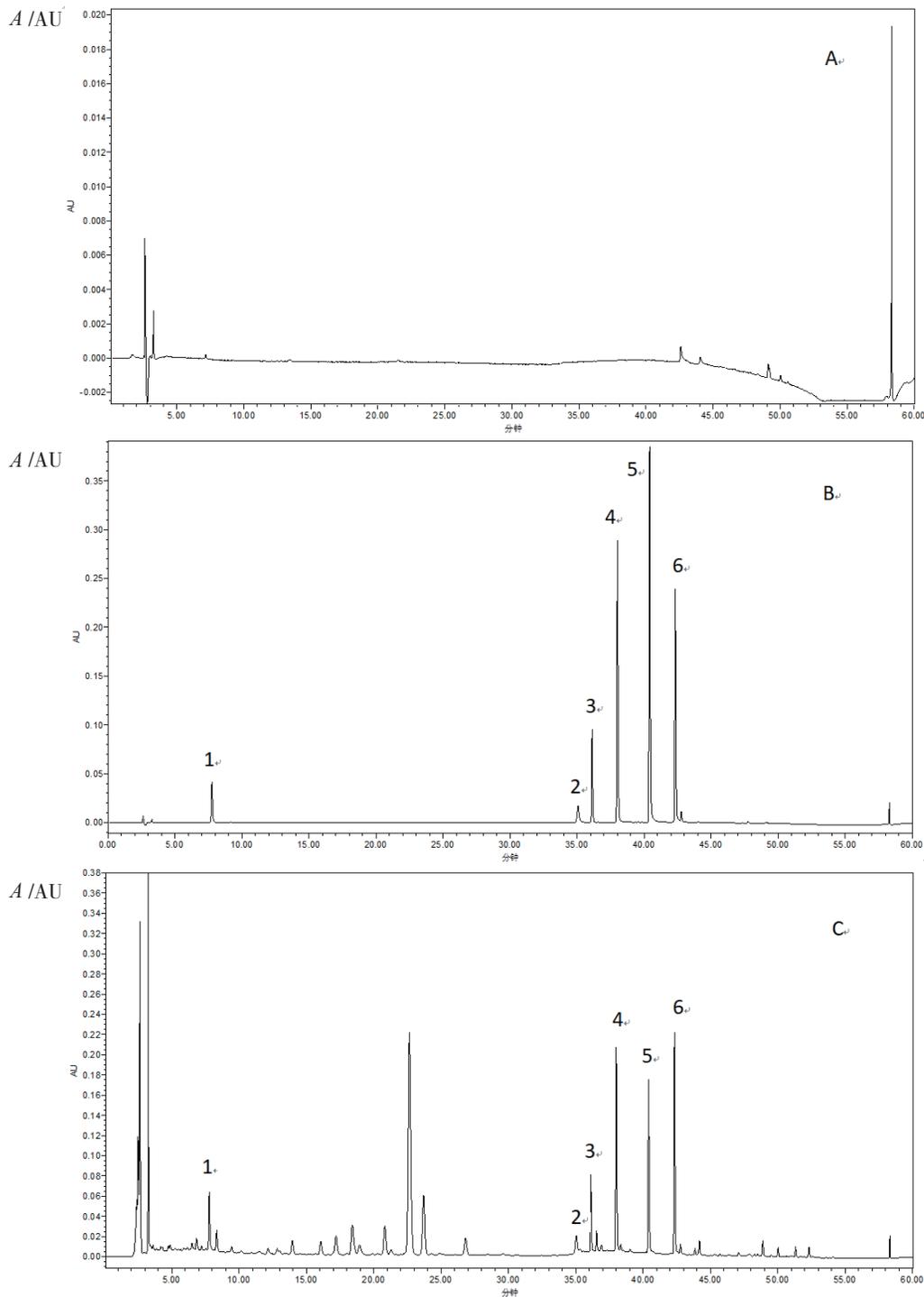
表4 加标回收率考察结果

编号	样品含量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	0.0304	0.034	0.0676	109.41	107.35	1.90
2	0.0305	0.034	0.0667	106.47		
3	0.0305	0.034	0.0664	105.59		
4	0.0306	0.034	0.0678	109.41		
5	0.0306	0.034	0.0675	108.53		
6	0.0305	0.034	0.0661	104.71		

2.4 样品含量测定

采用高效液相色谱法测定样品中绿原酸、木犀草素、银假甘、芹菜素、羟基芫花素和芫花素的含量,结果表明,在上述“2.2.1”色谱条件下,6个成分能够完全分离,对照品及样品色谱图见图1。同时采用液质联用仪测定样品中芫花

酯甲的含量,在上述“2.3.1”色谱质谱条件下检测,采用多反应监测模式采集,检测离子对为 m/z 649.03 \rightarrow m/z 151.15和 m/z 649.03 \rightarrow m/z 95.09,对照品及样品质谱图见图2,所有样品的7个成分含量测定结果见表5。



1. 绿原酸; 2. 木犀草素; 3. 银假甘; 4. 芹菜素; 5. 羟基芫花素; 6. 芫花素。

图1 空白溶液(A)、混合对照品溶液(B)及芫花样品溶液(C)液相色谱图

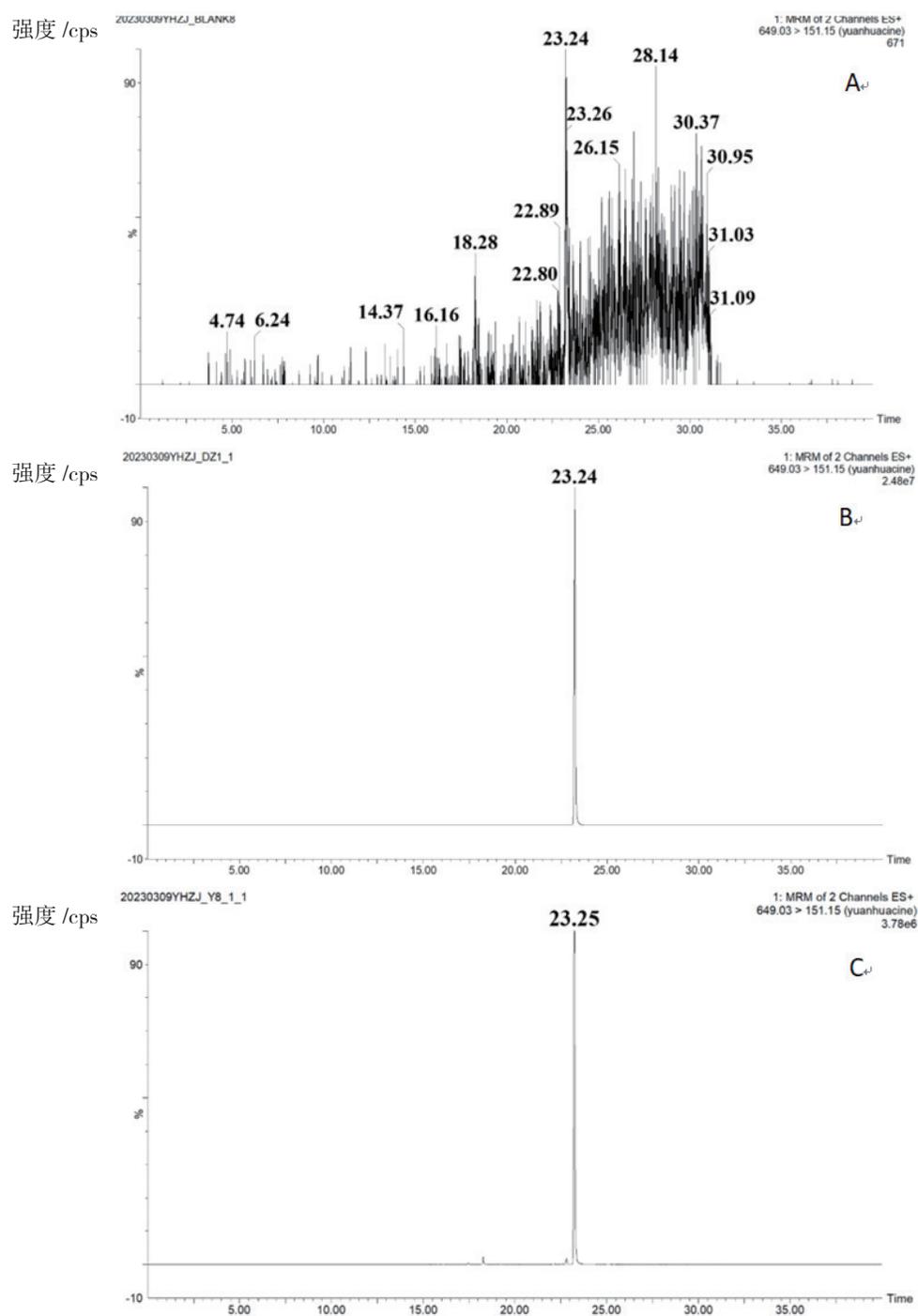


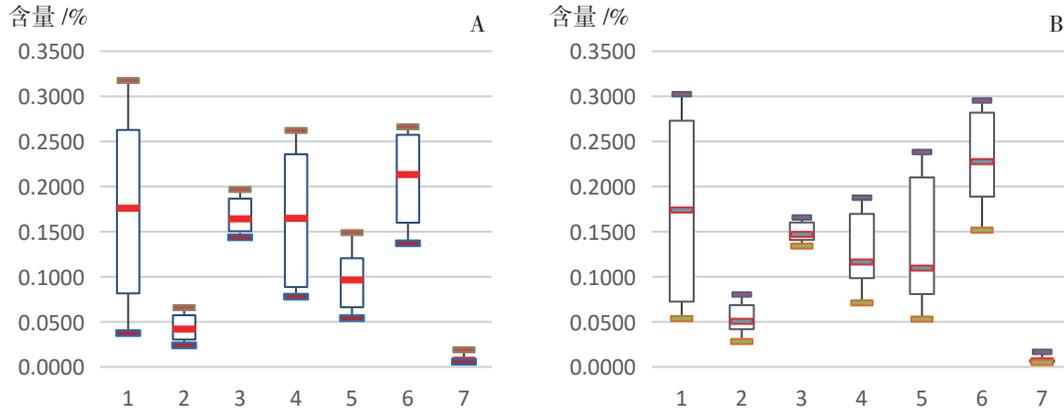
图 2 空白溶液总离子流图 (A)、芫花酯甲对照品总离子流图 (B) 及芫花样品溶液 (C) 提取离子质谱图

表 5 所有样品含量测定结果

编号	绿原酸 /%	木犀草素 /%	银椴苷 /%	芹菜素 /%	羟基芫花素 /%	芫花素 /%	芫花酯甲 /%
生品 1	0.0383	0.0657	0.1967	0.2622	0.1229	0.2591	0.0074
醋制品 1	0.0729	0.0760	0.1340	0.1681	0.2190	0.2888	0.0065
生品 2	0.1168	0.0478	0.1762	0.2229	0.1059	0.2522	0.0135
醋制品 2	0.0969	0.0695	0.1415	0.1719	0.1874	0.2954	0.0124
生品 3	0.0375	0.0598	0.1888	0.2594	0.1133	0.2471	0.0070
醋制品 3	0.0669	0.0643	0.1405	0.1658	0.1806	0.2780	0.0068
生品 4	0.0565	0.0651	0.1889	0.2462	0.1348	0.2599	0.0074
醋制品 4	0.0706	0.0768	0.1367	0.1689	0.2177	0.2832	0.0069
生品 5	0.2144	0.0574	0.1487	0.1820	0.1489	0.2647	0.0190
醋制品 5	0.0723	0.0803	0.1376	0.1742	0.2271	0.2647	0.0167
生品 6	0.0698	0.0571	0.1944	0.2324	0.1229	0.2662	0.0086
醋制品 6	0.0536	0.0598	0.1484	0.1876	0.2383	0.2927	0.0071
生品 7	0.3176	0.0239	0.1630	0.0816	0.0541	0.1371	0.0061
醋制品 7	0.3022	0.0282	0.1613	0.0710	0.0530	0.1534	0.0051
生品 8	0.2591	0.0383	0.1622	0.1474	0.0691	0.2069	0.0061
醋制品 8	0.2752	0.0401	0.1453	0.1053	0.0663	0.1914	0.0052
生品 9	0.2640	0.0301	0.1491	0.1108	0.0652	0.1643	0.0067
醋制品 9	0.2664	0.0515	0.1417	0.0879	0.0916	0.2023	0.0054
生品 10	0.3000	0.0283	0.1513	0.1005	0.0588	0.1526	0.0066
醋制品 10	0.2752	0.0426	0.1518	0.0829	0.0802	0.1879	0.0054
生品 11	0.1566	0.0310	0.1437	0.1173	0.0837	0.2129	0.0086
醋制品 11	0.1629	0.0423	0.1657	0.1026	0.0999	0.2356	0.0075
生品 12	0.1805	0.0402	0.1643	0.0810	0.0967	0.1584	0.0103
醋制品 12	0.1891	0.0654	0.1617	0.1092	0.1373	0.1983	0.0078
生品 13	0.1540	0.0377	0.1683	0.1255	0.0962	0.2137	0.0096
醋制品 13	0.1713	0.0497	0.1602	0.1042	0.1173	0.2277	0.0076
生品 14	0.1714	0.0437	0.1641	0.0779	0.1001	0.1646	0.0091
醋制品 14	0.1767	0.0418	0.1601	0.0784	0.1019	0.1644	0.0066
生品 15	0.2519	0.0476	0.1798	0.1925	0.0746	0.2486	0.0057
醋制品 15	0.2539	0.0487	0.1483	0.1235	0.0826	0.2276	0.0049
生品 16	0.2871	0.0287	0.1501	0.0910	0.0596	0.1463	0.0065
醋制品 16	0.3024	0.0332	0.1455	0.0858	0.0611	0.1517	0.0053

由表5可见, 生品和醋制品芫花样品中, 7种成分含量的均值由高到低依次为芫花素>绿原酸>银椴苷>芹菜素>羟基芫花素>木犀草素>芫花酯甲, 其中绿原酸含量在生品和醋制品中分布范围较大, 分别为0.038%~0.318%和0.054%~0.302%,

生品中芹菜素和芫花素的含量分布范围较大, 分别为0.078%~0.262%和0.137%~0.266%, 醋制品中羟基芫花素含量分布范围较大, 为0.053%~0.238%, 在生品和醋制品中芫花酯甲含量均为最低, 详见图3。

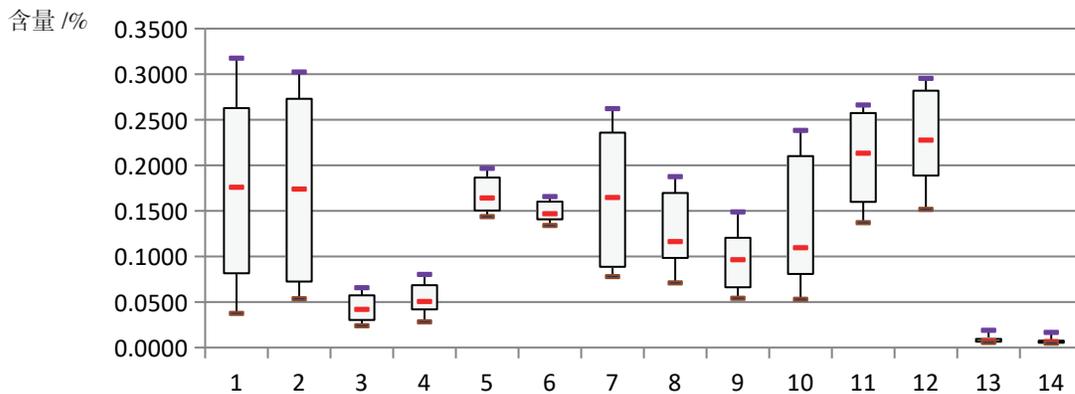


1. 绿原酸含量; 2. 木犀草素含量; 3. 银椴苷含量; 4. 芹菜素含量; 5. 羟基芫花素含量; 6. 芫花素含量; 7. 芫花酯甲含量。

图3 生品(A)与醋制品(B)芫花中7种成分含量分布图

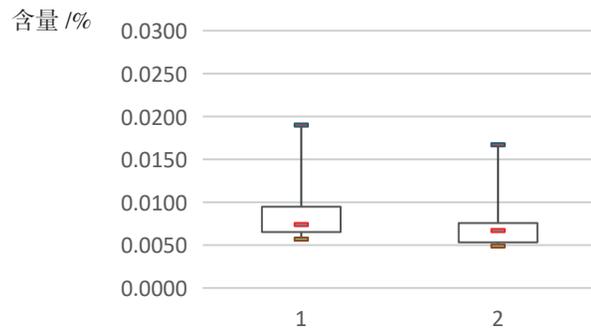
对于同批次的生品和醋制品而言, 此7种化学成分的含量变化是不同的, 其中绿原酸成分在炮制前后含量变化不明显, 对于银椴苷和芹菜素成

分, 炮制后含量降低, 对于木犀草素、羟基芫花素和芫花素3个成分, 炮制后含量升高, 对于芫花酯甲成分, 炮制后含量趋于降低, 详见图4~图6。



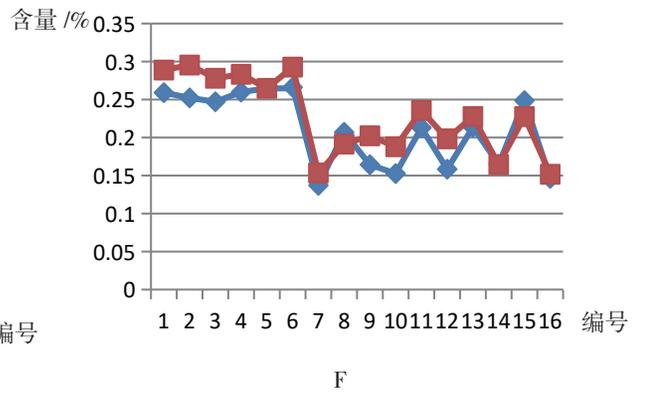
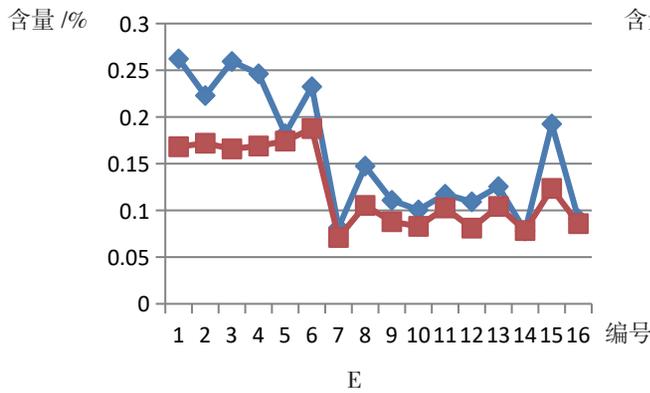
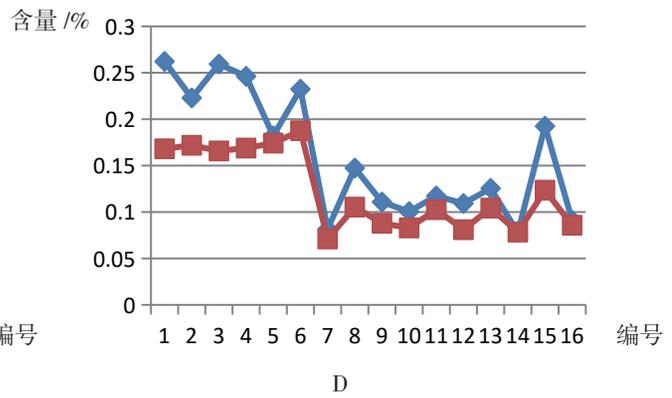
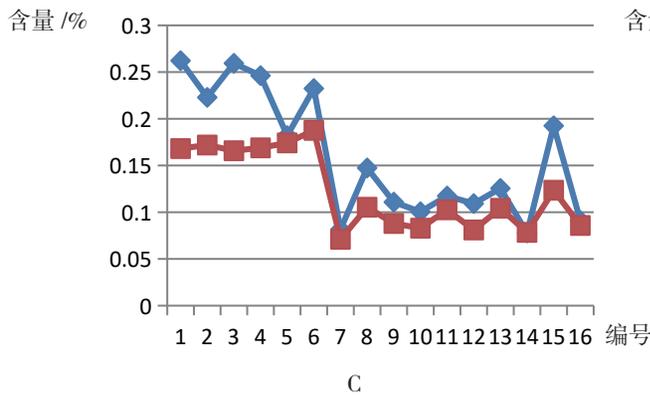
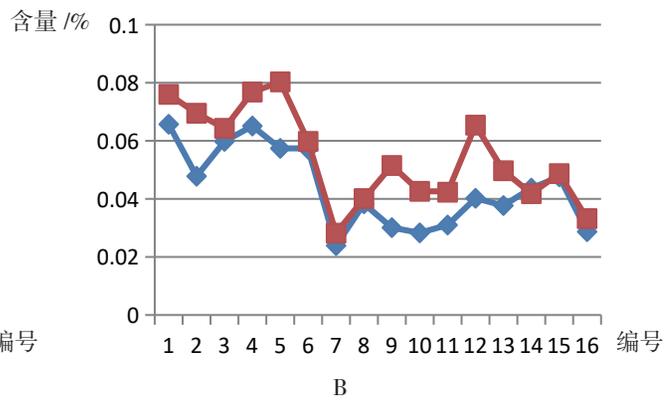
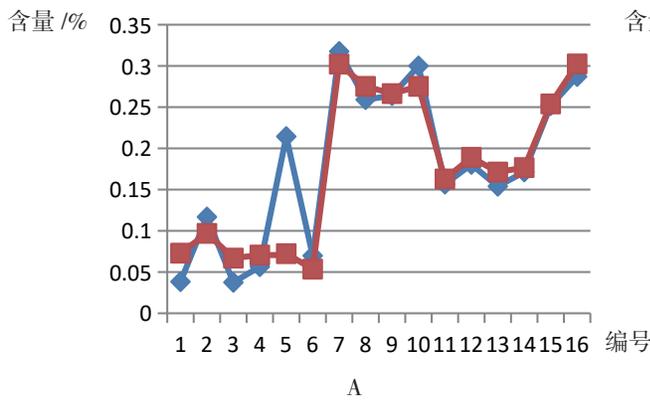
1、2: 生品和醋制品中绿原酸含量; 3、4: 生品和醋制品中木犀草素含量; 5、6: 生品和醋制品中银椴苷含量; 7、8: 生品和醋制品中芹菜素含量; 9、10: 生品和醋制品中羟基芫花素含量; 11、12: 生品和醋制品中芫花素含量; 13、14: 生品和醋制品中芫花酯甲含量。

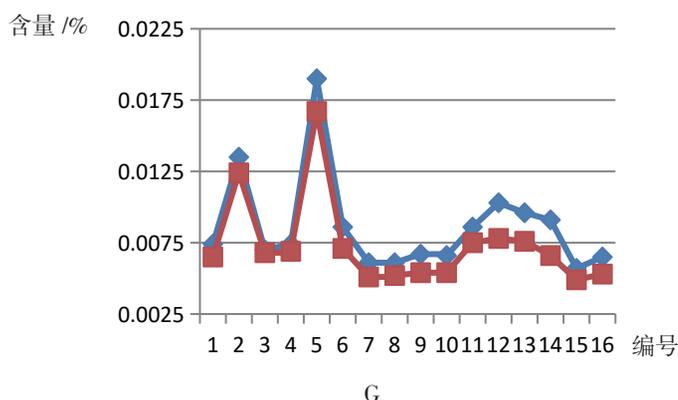
图4 生品与醋制品芫花样品中7种成分含量比较图



1. 生品; 2. 醋制品。

图5 生品与醋制品芫花中芫花酯甲含量分布图





蓝色为生品中各成分含量, 红色为醋制品中各成分含量; A. 绿原酸含量分布; B. 木犀草素含量分布; C. 银椴苷含量分布; D. 芹菜素含量分布; E. 羟基芫花素含量分布; F. 芫花素含量分布; G. 芫花酯甲含量分布。

图6 芫花炮制前后各成分含量对比图

3 讨论

3.1 检测方法的选择

芫花中主要含黄酮类、木脂素类、香豆素类、二萜原酸酯类等化合物^[15], 本文针对芫花中的黄酮类及二萜原酸酯类7个化学成分开展研究, 考察芫花炮制前后主要化学成分的变化。考虑到芫花样品中的6个成分含量范围及检测仪器的灵敏度和适用范围, 采用高效液相色谱法测定此6个成分的含量, 即保证方法操作简便, 又兼顾方法的可及性。而芫花中的毒效成分芫花酯甲含量极低, 更适宜选择灵敏度较高且专属性较强的液相色谱-质谱联用仪, 采用MRM模式采集进行测定。

3.2 检测波长的选择

采用高效液相色谱法测定6个成分的含量, 考虑到各成分的最大紫外吸收波长, 最终选择254 nm作为检测波长测定各成分含量, 方法专属性较好。

3.3 由内在成分变化探讨炮制机理

由含量测定结果可见, 芫花经过醋炙后, 木犀草素、羟基芫花素和芫花素成分含量升高, 而银椴苷和芹菜素成分含量降低, 可能是芫花在炮制过程中受醋酸和加热过程的影响, 芫花中的苷类成分发生部分水解, 失去糖基生成苷元类成分, 使得苷元类含量增加, 提高了芫花镇咳、祛痰、抗肿瘤、抗炎的作用^[16-17], 一定程度上解释了炮制增效的作用机制。芫花中的芫花酯甲成分被认为是具有抗肿瘤作用的毒效成分^[18-21], 在芫花中的含量较低, 经醋制后含量降低, 可能是该二萜酯类成分在加热和醋酸的作用下发生部分水解, 使得芫花酯甲含

量降低, 一定程度上解释了炮制减毒的作用机制。绿原酸成分虽具有抗菌抗炎作用, 但其分布较广, 存在于多种科属植物(药材)中, 在加热和酸的作用下, 易形成多种绿原酸异构体, 或者木脂素类成分降解产生绿原酸, 在芫花样品炮制后的含量有升高, 也有降低, 变化不十分明显。这一炮制前后成分变化的趋势与前期试验结果是一致的^[22]。

3.4 炮制工艺有待优化

按《中国药典》2020年版四部炮制通则的醋炙法炮制芫花样品时发现, 辅料醋的用量不同会影响醋芫花的质量, 用文火炒温度无法控制, 敞开的容器还是密闭的容器炒制也会影响炒制时间, 炒制的终点判断无依据。建议对影响炮制过程的各个因素例如醋用量、炒制温度、炒制时间等开展优化研究, 量化影响炮制的关键技术参数, 将炮制工艺规范化、标准化、可控化。

3.5 需结合指纹图谱技术综合评价芫花饮片质量

芫花饮片经炮制后, 其内在成分发生了变化, 对于炮制后含量升高的组分, 可以作为指标成分控制醋制品的质量, 而对于炮制后含量降低的组分, 可以作为指标成分控制生品的质量。除了上述控制成分, 尚需结合指纹图谱技术从整体上控制芫花生品和醋制品的质量, 建立毒性饮片整体与专属的质量控制方法。

参考文献:

- [1] 肖培根. 新编中药志: Volume II [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 697.

- [2] 中华人民共和国药典：一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：166.
- [3] 原思通，张保献，王祝举，等. 中药芫花炮制历史沿革研究[J]. 中国中药杂志，1996，21（5）：311-313.
- [4] 李菲菲，彭纓，宋少江. 芫花炮制研究概况[J]. 沈阳药科大学学报，2012，29（3）：247-250.
- [5] 于江泳，张村. 全国中药饮片炮制规范辑要[M]. 北京：人民卫生出版社，2016：844-845.
- [6] 原思通，张保献，王祝举，等. HPLC法分析炮制对芫花中芫花素的影响[J]. 中国中药杂志，1996，21（12）：728-729.
- [7] 米宏英，张萍，高慧媛，等. 炮制工艺对芫花化学成分、药理毒理及药材质量影响的研究进展[J]. 中国药理学杂志，2023，58（10）：865-874.
- [8] 彭华民，项思远，毕昭庆. 白毛夏枯草的有效成分—木犀草素对咳嗽喘药理学作用的研究[J]. 中国药理学杂志，1981（2）：11-13.
- [9] 郑维发，石枫，王莉，等. 芫花根醇提物弱极性组分化学成分及抗炎活性研究[J]. 解放军药理学学报，2004（1）：18-21.
- [10] 宗明月，张庆然，王璐琼，等. 基于网络药理学和分子对接法研究芫花抗炎作用机制[J]. 烟台大学学报（自然科学与工程版），2021，34（2）：178-185.
- [11] 邵泽艳，商倩，赵娜夏，等. 芫花中瑞香烷型二萜原酸酯类化合物及其肿瘤细胞毒活性[J]. 中草药，2013，44（2）：128-132.
- [12] Li SM, Chou GX, Hseu YC, et al. Isolation of Anticancer Constituents from Flos Genkwa (*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.) Through Bioassay-guided Procedures[J]. Springer International Publishing, 2013, 7（1）：159-167.
- [13] Du WJ, Yang XL, Song ZJ, et al. Antitumor Activity of Total Flavonoids from *Daphne Genkwa* in Colorectal Cancer[J]. Phytotherapy Research, 2016, 30（2）：323-330.
- [14] Zhang SX, Li XN, Zhang FH, et al. Preparation of Yuanhuacine And Relative Daphne Diterpene Esters from *Daphne genkwa* and Structure-activity Relationship of Potent Inhibitory Activity Against DNA Topoisomerase I[J]. Bioorg Med Chem, 2006, 14（11）：3888-3895.
- [15] 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）：46-49.
- [16] 石枫，郑维发. 芫花根的酚类成分及其免疫调节活性[J]. 徐州师范大学学报（自然科学版），2004，22（4）：34-40.
- [17] 中国人民解放军南京军区防治慢性气管炎协作组. 芫花治疗慢性气管炎药化药理学的初步研究及疗效观察[J]. 中草药通讯，1973（5）：7-23.
- [18] 王玉珏，尚新悦，姚国栋. 芫花酯甲的药理作用与临床应用[J]. 中国临床药理学与治疗学，2020，25（10）：1188-1194.
- [19] 施洁瑕，马宏跃，段金廛，等. 应用代谢组学探讨芫花酯甲对人肝细胞L02的毒性作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2013，27（4）：704-709.
- [20] 张德昌. 芫花酯甲抗黑色素瘤的作用及其机理的初步研究[D]. 北京：中国协和医科大学基础医学院，2007.
- [21] Zhang SX, Gao XJ, Shen KS, et al. Evaluation of Poly (D, L-lactide-co-glycolide) Microspheres for the Lung-targeting of Yuanhuacine, A Novel DNA Topoisomerase I Inhibitor[J]. Journal of Drug Targeting, 2009, 17（4）：286-293.
- [22] Mi HY, Zhang P, Yao LW, et al. Identification of *Daphne genkwa* and Its Vinegar-Processed Products by Ultra Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry and Chemometrics[J]. Molecules, 2023, 28（10）：3990.

（收稿日期 2023年12月4日 编辑 李亚微）