

基于 HPLC-Q-TOF-MS 和 HPLC-DAD 的广金钱草主要活性成分分析

赖丽嫦, 林裕英, 陈丰连*, 赖小平

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 通过高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱法(HPLC-Q-TOF-MS)鉴定广金钱草中主要活性成分,通过高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)法同时测定广金钱草中7种黄酮类成分(夏佛塔苷、异夏佛塔苷、维采宁-2、异荭草苷、异牡荆苷、木犀草素、芹菜素)的量。**方法** 采用 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以甲醇(A)-0.2%甲酸水(B)为流动相梯度洗脱进行色谱分离,体积流量为1.0 mL/min,柱温40℃;Q-TOF-MS在电喷雾负离子模式下采集数据,分流比为1:1;采用HPLC-DAD法定量,检测波长为272 nm。**结果** 采用HPLC-Q-TOF-MS法鉴定了广金钱草中的41种主要活性成分,其中包括37个黄酮类成分,4个酚酸类成分。成功建立了同时测定广金钱草中7种黄酮类成分的HPLC-DAD法,各成分的线性关系良好($r>0.999\ 0$),精密度、重复性和稳定性良好,回收率在96.7%~102.4%($n=6$),RSD均小于4.94%。**结论** 通过HPLC-Q-TOF-MS联用技术,为阐明广金钱草药效物质基础提供参考;建立的HPLC-DAD法同时测定广金钱草中7种黄酮类成分的定量分析方法简便、快捷、准确,为综合评价广金钱草的质量提供参考。

关键词: 广金钱草; HPLC-Q-TOF-MS; HPLC-DAD; 夏佛塔苷; 维采宁-2; 异荭草苷; 木犀草素; 芹菜素

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)20-3578-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.20.006

Analysis of main active components in *Desmodii Styraciflilii Herba* by HPLC-Q-TOF-MS and HPLC-DAD

LAI Li-chang, LIN Yu-ying, CHEN Feng-lian, LAI Xiao-ping

School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective This study is aimed to establish a high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometric (HPLC-Q-TOF-MS) method for analyzing the main active components in *Desmodii Styraciflilii Herba*, and to establish an HPLC-DAD method for simultaneously determining its seven flavonoids compounds (schafotoside, isoschafotoside, vicenin-2, isoorientin, isovitexin, luteolin, and apigenin). **Methods** The analysis was performed on a Phenomenex Kinetex C₁₈ column with a gradient elution of methanol-0.2% aqueous formic acid at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 40℃. The Q-TOF-MS discriminant analysis was performed under negative electrospray ion mode and the split ratio was 1:1. Quantitative analysis of seven compounds in *Desmodii Styraciflilii Herba* was carried by HPLC-DAD. The determination wavelength was at 272 nm. **Results** Forty-one main active constituents were separated and identified by HPLC-Q-TOF-MS, including 37 flavonoids compounds and four phenolic acids. A HPLC-DAD method was successfully developed for determining seven flavonoids compounds. The standard curves for all seven compounds showed good linearity with correlation coefficients higher than 0.999 0 within the test ranges. The average recoveries ($n=6$) were between 96.7%—102.4%, and $RSD \leq 4.94\%$. **Conclusion** Analyzing the main active components provides a significant guidance for the substance basis research of *Desmodii Styraciflilii Herba*. The HPLC-DAD method for simultaneously determining seven flavonoids compounds is accurate, reproducible, and provides the basis for the quality control of *Desmodii Styraciflilii Herba*.

Key words: *Desmodii Styraciflilii Herba*; HPLC-Q-TOF-MS; HPLC-DAD; schafotoside; vicenin-2; isoorientin; luteolin; apigenin

广金钱草 *Desmodii Styraciflilii Herba* 来源于豆科 (Leguminosae) 植物广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osh.) Merr. 的干燥地上部分, 主要含黄酮、酚酸、生物碱、多糖类等成分^[1], 具有抗炎、

收稿日期: 2016-05-11

基金项目: 国家中医药管理局项目(201507002); 广东省科技计划项目(产学研合作专项)(2015B090901033)

作者简介: 赖丽嫦(1990—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药质量评价与开发研究。Tel: (020)39358081 E-mail: lichang_lai1007@163.com

*通信作者 陈丰连(1973—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为中药资源开发与质量研究。Tel: (020)39358081 E-mail: chenfenglian@21cn.com

抗菌、清热去湿、利水通淋、排石等功效,主治泌尿系统感染、泌尿系统结石、肾炎水肿、胆囊炎等^[2],在临床中有广泛的应用。此外,广金钱草还是抗尿石症中成药(石淋通片、尿石通丸、热淋清颗粒)的主要原材料。

中药的质量与药效息息相关,中药药效物质基础一直是中药研究的热点之一。《中国药典》2015年版通过测定夏佛塔苷的量对广金钱草进行质量控制。然而,广金钱草化学成分众多,单个成分的定量测定难以表征广金钱草的质量;若能同时对多个药效成分定量分析,则可以更好控制广金钱草的质量。研究表明,黄酮类和酚酸类化合物是广金钱草的主要活性成分。因此研究者们采用紫外分光光度法(UV)、薄层色谱法(TLC)^[3]和高效液相色谱法(HPLC)^[4-6]、液质联用(LC-MS)^[7]等方法对广金钱草的黄酮类成分进行定性定量分析。但是目前广金钱草的药效物质基础研究还不够深入,并缺乏对广金钱草中黄酮类成分全面的定量分析。近年来,高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱(HPLC-Q-TOF-MS)技术成为天然药物中活性成分的快速分离和鉴定的有力手段。本研究采用HPLC-Q-TOF-MS方法对广金钱草主要化学成分进行定性分析,进一步阐明广金钱草的药效物质基础,并在此基础上,建立同时检测广金钱草中7个黄酮类成分的HPLC-DAD方法,为广金钱草的质量控制提供技术参考。

1 仪器与材料

Triple-TOFTM 5600⁺三重四极杆飞行时间质谱(美国AB公司);LC-30AT液相色谱(日本岛津公司);LC-20AT液相色谱(日本岛津公司);BP211D Sartorius电子天平(德国Sartorius公司);0.22 μm微孔滤膜(天津市津腾实验设备有限公司);KQ-300DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);SHZ-D(III)循环水式真空泵(河南予华仪器有限公司);万能高速粉碎机(浙江红景天工贸有限公司);WP-UP-YJ-10沃特浦超纯水机(四川沃特浦水处理设备有限公司);甲醇为色谱纯(德国MERCK公司),其余试剂均为分析纯。

对照品夏佛塔苷(批号51938-32-0)、异夏佛塔苷(批号52012-29-0)、维采宁-2(批号23666-13-9)、异荛苌苷(批号4261-42-1)、异牡荊苷(批号29702-25-8)、芹菜素(批号131228)、木犀草素(批号130322)、大豆苷(批号150515)、染料木素(批号131105)均购于四川省普菲德生物技术有限公

司,质量分数均≥98%;对照品柚皮素(批号120306)、橙皮苷(批号130122),均购于四川省维克奇生物技术有限公司,质量分数均≥98%;对照品水杨酸(批号J22S6J3607)购于上海源叶生物科技有限公司,质量分数≥98%;阿魏酸(批号0773-9809)、原儿茶酸(批号0809-9201)、咖啡酸(批号110885-200102),购于中国食品药品检定研究院,质量分数均≥98%;21批广金钱草药材,其中14批购于广州各大药店,5批采于广东平远广金钱草栽培基地,2批野生品分别采于平远、阳春(均于8月份始花期采收),经广州中医药大学刘军民教授鉴定为豆科植物广金钱草 *Desmodium styracifolium* (Osbeck) Merr. 的地上部分。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.2%甲酸水(B),梯度洗脱:0~30 min, 26% A; 30~60 min, 26%~65% A; 60~75 min, 65%~95% A; 75~80 min, 95% A; 体积流量1.0 mL/min,柱温40℃,进样量5 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),负离子扫描模式;扫描范围 *m/z*: 100~1 200;雾化气压力379.23 kPa;辅助气压力379.23 kPa;气帘气压力341.33 kPa;雾化温度(TEM)550℃;源喷雾电压(ISVF)4 500 V;解簇电压(DP)100 V;碰撞能(CE)45 V;碰撞活化扫描(CES)15 V;液相按1:1分流比进入质谱,采用peakview2.1软件对质谱数据进行分析。

2.1.3 HPLC-DAD 色谱条件 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.2%甲酸水(B),梯度洗脱:0~30 min, 26% A; 30~60 min, 26%~65% A; 体积流量1.0 mL/min,柱温40℃,进样量5 μL,检测波长为272 nm。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取广金钱草药材粉碎后过60目筛,取约0.5 g,精密称定,加入80%甲醇40 mL,称定质量,超声提取(功率100 W,频率40 kHz)30 min,放冷,称定,用80%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液用0.22 μm微孔滤膜滤过,即得。

2.2.2 混合对照品的制备 分别精密称取15种对照品适量,加甲醇溶解制成对照品约0.5 mg/mL储备液。用80%甲醇分别稀释上述对照品溶液至约5

$\mu\text{g/mL}$ 用于质谱分析。精密吸取维采宁-2、异夏佛塔苷、异荭草苷、夏佛塔苷、异牡荆苷、木犀草素、芹菜素对照品储备液适量,混合并稀释成适当质量浓度的混合对照品溶液(质量浓度依次为 80、200、100、200、100、20、4 $\mu\text{g/mL}$),存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

2.3 广金钱草主要化学成分的鉴定

采用 HPLC-Q-ESI-MS 对广金钱草醇提成分进行定性分析,ESI-MS⁻的质谱总离子流图(TIC)见图 1。根据 TOF-MS 上所得到的精确相对分子质量信息,通过 peakview2.1 软件在 5×10^{-6} 的质量偏差范围内计算其精确分子式,与文献报道的化合物进行比对,结合保留时间及裂解碎片信息进行综合分析,初步推断广金钱草醇提取液中成分的结构。最

终鉴定广金钱草中 41 种成分(表 1)。以大豆苷为例说明鉴定过程。首先根据 TOF-MS 均给出峰 8、22、26、33 (C_8 、22、26、33) 分子离子峰 461.109 6,软件给出的精确分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$,与文献报道^[8]大豆苷的加甲酸峰一致,初步推测其为大豆苷或其同分异构体,结合二级碎片 m/z 415、253、223 与文献报道^[8-9]相一致,并且 C_8 经对照品比对确定为大豆苷, C_{22} 、26、33 暂时均鉴定为大豆苷同分异构体,其质谱裂解图见图 2。而峰 4、23、30、33、43、45~46 和 48~50 因为没有足够的信息来确定它们的结构或者提示可能的化合物,故尚未得以鉴定。这些化合物的保留时间、MS 离子碎片以及可能的分子式见表 2。

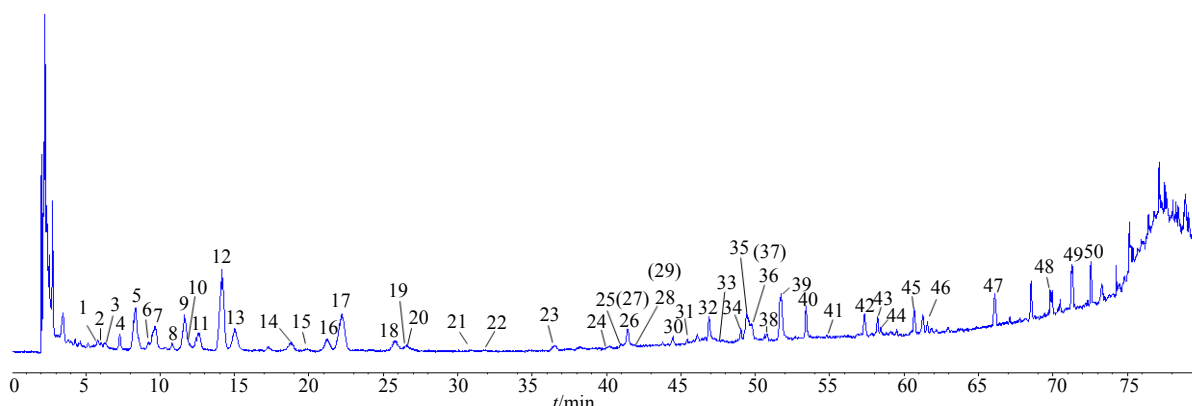


图 1 负离子模式下广金钱草 80% 甲醇提取物的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of 80% methanol extract of *Desmodii Styraciflil Herba* at negative mode

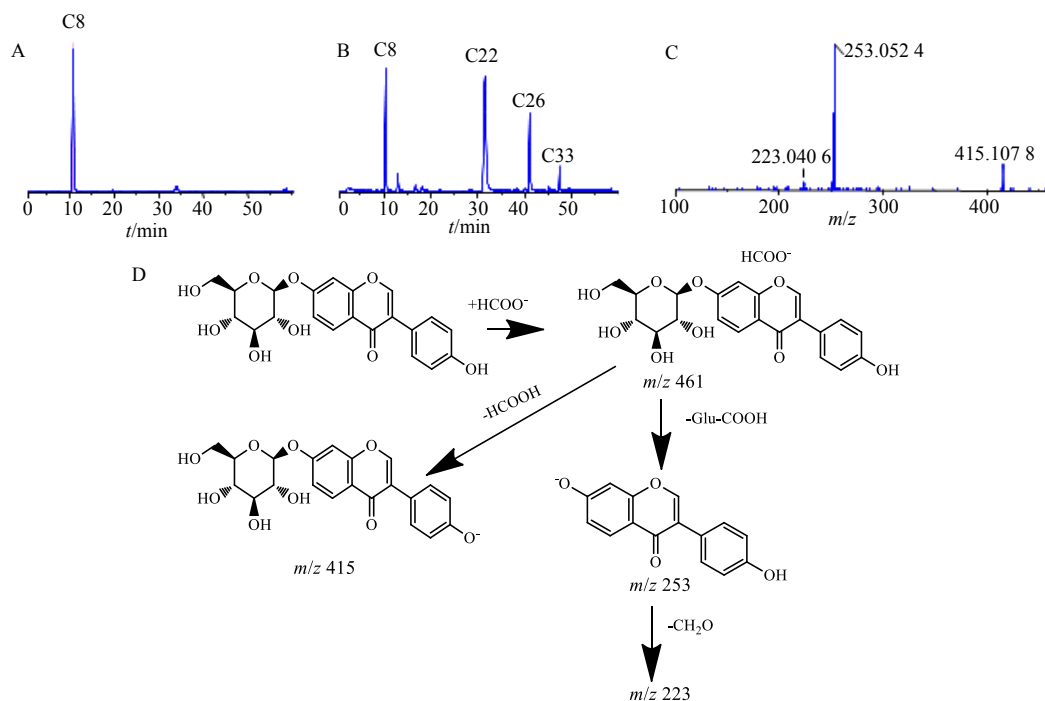
表 1 广金钱草醇提物中主要化合物的 HPLC-Q-TOF-MS 分析

Table 1 Analysis on main compounds in extract from *Desmodii Styraciflil Herba* by HPLC-Q-TOF-MS

峰号	t_R/min	化合物	MS ¹	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	MS ²
1	4.02	原儿茶酸 ^a	153.019 9 [M-H] ⁻	1.35	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$	109
2	6.38	carlinside 或同分异构体 ^[10]	579.135 9 [M-H] ⁻	0.68	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$	369, 399, 429, 459, 489, 519, 561, 339, 341
3	6.92	咖啡酸 ^a	179.035 7 [M-H] ⁻	3.81	$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$	135, 107
5	8.36	维采宁-2 ^a	593.151 7 [M-H] ⁻	0.67	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	353, 383, 473, 297, 395, 325, 413, 503
6	9.24	维采宁-1	563.142 2 [M-H] ⁻	0.17	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	353, 383, 443, 473, 395, 297, 325, 413, 503
7	9.69	carlinside 或同分异构体	579.135 9 [M-H] ⁻	0.68	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$	369, 399, 429, 459, 489, 519, 561, 339, 341
8	10.37	大豆苷 ^a	461.109 6 [M+HCOO] ⁻	0.98	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	223, 253, 415
9	11.65	维采宁-3	563.142 2 [M-H] ⁻	0.17	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	353, 383, 443, 473, 395, 297, 325, 413, 503
10	11.89	carlinside 或同分异构体	579.135 9 [M-H] ⁻	0.68	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$	369, 399, 429, 459, 489, 519, 561, 339, 341
11	12.58	carlinside 或同分异构体	579.135 9 [M-H] ⁻	0.68	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$	369, 399, 429, 459, 489, 519, 561, 339, 341
12	14.13	异夏佛塔苷 ^a	563.142 6 [M-H] ⁻	0.17	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	353, 383, 443, 473, 395, 297, 325, 413, 503
13	15.03	异荭草苷 ^a	447.093 3 [M-H] ⁻	0.50	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	327, 357, 297, 285, 299, 311, 339, 429, 133
14	18.78	异夏佛塔苷同分异构体 I	563.142 6 [M-H] ⁻	0.17	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	353, 383, 443, 473, 395, 297, 325, 413, 503
15	19.60	水杨酸 ^a	137.023 5 [M-H] ⁻	0.19	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	110, 108
16	21.12	异夏佛塔苷同分异构体 II	563.142 6 [M-H] ⁻	0.17	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	353, 383, 443, 473, 395, 297, 325, 413, 503
17	22.05	夏佛塔苷 ^a	563.142 2 [M-H] ⁻	0.17	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	353, 383, 443, 473, 395, 297, 325, 413, 503
18	25.57	异牡荆苷 ^a	431.098 5 [M-H] ⁻	1.90	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	283, 311, 117, 268, 281, 341
19	25.69	阿魏酸 ^a	193.050 9 [M-H] ⁻	1.77	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	132, 133, 134, 161
20	26.55	木犀草素-7-O- β -D-葡萄糖苷	447.093 3 [M-H] ⁻	0.49	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	151, 285, 284, 256, 212

续表 1

峰号	t_R/min	化合物	MS^1	误差 ($\times 10^{-6}$)	分子式	MS^2
21	30.54	异槲皮苷 ^[11]	463.090 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.98	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	243, 255, 271
22	31.84	大豆苷同分异构体	461.109 6 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	0.98	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	219, 197, 174, 255, 323, 161, 117, 113
24	39.79	芹菜素 8-C- α -L-吡喃阿拉伯糖苷	401.087 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-0.12	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_9$	311, 283, 281, 323, 341, 365, 192
25	40.79	橙皮苷 ^a	609.190 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$	-0.25	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$	286, 301, 343, 489, 609
26	41.05	大豆苷同分异构体	461.109 6 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	0.98	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	447, 285, 191, 212, 174, 147, 113
27	41.42	紫云英苷 ^[11]	447.093 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.50	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	285, 284, 255, 227, 183, 231
28	41.86	chrysoeriol-7-O-rutinoside	607.166 8 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.32	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	299, 284
29	41.97	2'-羟基异黄酮 ^[7]	285.040 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$	2.41	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	313, 241, 217, 133, 175, 212, 199
31	45.78	刺槐素 ^[12]	283.061 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.81	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	268, 211, 183, 151, 135, 240
32	46.95	柚皮素 ^a	271.063 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.66	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	119, 151, 187, 271
33	47.43	大豆苷同分异构体	461.109 6 $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	0.98	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	174, 191, 212, 113, 242, 269, 310, 328
34	49.46	木犀草素 ^a	285.041 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.74	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	133, 151, 107, 175, 199, 217, 241
35	49.53	染料木素 ^a	269.046 0 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.70	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	133, 107, 159, 183, 196, 201, 224
36	50.35	5,7-二羟基-2'-甲氧基-3',4'-亚甲二氧基-二氢异黄酮 ^[7]	329.066 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.77	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$	314, 299, 151, 243, 271, 125
37	50.43	异鼠李素 ^[8]	315.048 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.85	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_7$	255, 271, 300
38	50.64	香叶木素 ^[13]	299.056 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$	2.11	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	284, 227, 255, 211, 165, 199, 151, 133, 148
39	51.72	木犀草素同分异构体	285.041 2 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.73	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$	113, 175, 192, 212, 243, 285
40	53.74	芹菜素 ^a	269.046 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.70	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	107, 117, 121, 151, 201, 225
41	54.46	香叶木素同分异构体	299.056 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$	2.22	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	269, 151, 285
42	57.32	5,7-二羟基-2',3',4'-三甲氧基-二氢异黄酮 ^[7]	345.098 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.93	$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$	300, 315, 107, 177, 151, 232, 297
44	58.69	homoferreirin ^[7]	315.087 9 $[\text{M}-\text{H}]^-$	0.33	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{O}_6$	258, 177, 171, 211, 151, 327, 131, 229, 251
47	66.09	kenusanone I	369.134 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$	1.75	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_6$	193, 109, 149

^a 为经对照品比对确定的成分^a Identified by comparing with the reference standards

A-对照品提取离子色谱图 B-广金钱草样品提取离子色谱图 C-大豆苷质谱图 D-大豆苷裂解图

A-XIC of Standards B-XIC of Desmodii Styraciflii Herba sample C-mass spectrogram of Daidzein D-cracking of Daidzein

图 2 大豆苷提取离子色谱图、质谱图及裂解图

Fig. 2 Representative extract ion chromatograms (XIC), mass spectrogram, and cracking for Daidzein

表 2 广金钱草中结构未确定化合物的分子式及 MS 数据

Table 2 Formula and MS data of undetermined components in *Desmodii Styraciflil Herba*

峰号	t_R /min	MS ¹	分子式	MS ²
4	7.29	239.056 8 [M-H] ⁻	C ₁₁ H ₁₂ O ₆	103, 115, 117, 131, 133, 149, 163, 177
23	36.23	187.098 2 [M-H] ⁻	C ₉ H ₁₆ O ₄	125, 123, 126, 143
30	44.48	489.105 2 [M-H] ⁻	C ₂₄ H ₁₈ N ₄ O ₈	227, 255, 284, 285
43	58.17	327.218 7 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	171, 211, 229
45	60.63	329.234 3 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	211, 229
46	61.51	397.222 0 [M-H] ⁻	C ₁₇ H ₃₀ N ₆ O ₅	233, 211, 329
48	69.79	275.202 4 [M-H] ⁻	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	110, 139, 138, 231, 234
49	71.22	499.190 4 [M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₂ N ₂ O ₁₁	295, 317, 277, 171, 112, 363, 453
50	72.53	343.249 6 [M-H] ⁻	C ₁₉ H ₃₆ O ₅	297, 296, 279, 267, 221, 155

2.4 HPLC-DAD 法定量测定

2.4.1 专属性考察 分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各 5 μ L, 按“2.1.3”项色谱条件进样分析。在上述色谱条件下, 维采宁-2、异夏佛塔苷、异荭草苷、夏佛塔苷、异牡荆苷、木犀草素和

芹菜素的保留时间分别为 9.05、15.61、16.64、25.15、28.67、53.55 和 57.85 min。

样品中其他成分对维采宁-2、异夏佛塔苷、异荭草苷、夏佛塔苷、异牡荆苷、木犀草素和芹菜素的测定均无干扰。典型色谱图见图 3。

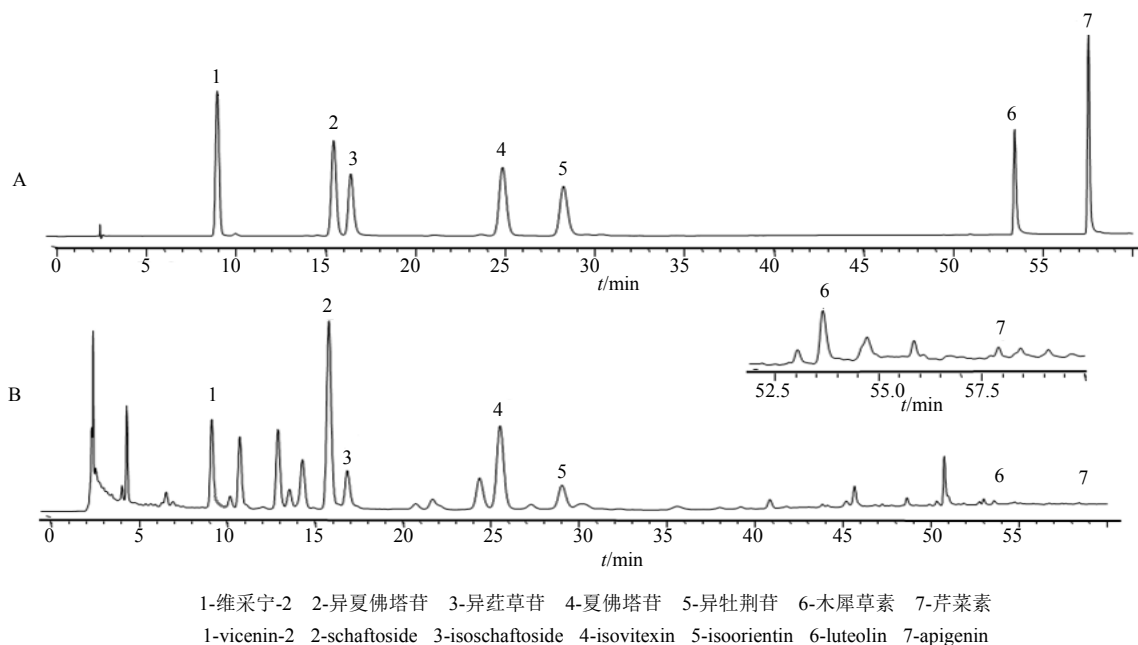


图 3 混合对照品 (A) 和广金钱草样品 (B) HPLC-DAD 色谱图

Fig. 3 HPLC-DAD chromatograms of reference (A) and *Desmodii Styraciflil Herba* sample (B)

2.4.2 线性范围考察 精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、5.0 mL, 分别置 6 个 10 mL 量瓶中, 加 80% 甲醇水溶液定容至刻度, 制成一系列质量浓度对照品混合溶液, 按“2.1.3”项下色谱条件进样 5 μ L 测定。以进样质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 计算各自的回归方程和线性范围。逐步稀释混合对照溶液, 以信噪比 S/N=10 作为最低定量下限

(LOQ), 信噪比 S/N=3 作为最低检测下限 (LOD), 分别计算维采宁-2、异夏佛塔苷、异荭草苷、夏佛塔苷、异牡荆苷、木犀草素、芹菜素的 LOQ 和 LOD。结果表明, 7 种化合物在各自线性范围内呈良好的线性关系, 灵敏度较高 (表 3)。

2.4.3 精密度试验 精密吸取同 1 份对照品混合溶液 5 μ L, 按“2.1.3”项色谱条件连续进样 6 次, 分别记录 7 种分析物的峰面积, 计算峰面积的 RSD

均小于 1.52% (表 3), 结果表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 取同一批次 (批号 150304) 样品, 共 6 份。按“2.2.1”项下制备供试品溶液, 依“2.1.3”项下色谱条件进行测定, 计算 7 种分析物的质量分数, 其质量分数 RSD 均小于 3.02% (表 3), 表明重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取同一份供试品溶液 (批号 150304), 分别于 0、2、6、10、12、24、48 h 注入 HPLC 仪, 记录 7 种分析物峰面积并计算得 RSD 均小于 3.80% (表 3), 结果表明样品在 48 h 内稳定。

2.4.6 加样回收试验 精密称取重复性试验同批样品约 0.25 g, 6 份, 精密吸取混合对照品溶液按质量近似 1:1 分别加入到 6 份样品中, 按“2.2.1”项下进行样品制备, 分析测定, 计算回收率。结果表

明, 维采宁-2、异夏佛塔苷、异荭草苷、夏佛塔苷、异牡荆苷、木犀草素、芹菜素的回收率分别为 102.4%、98.8%、96.7%、100.7%、102.4%、99.6%、101.6%, RSD 分别为 1.42%、1.05%、1.07%、0.75%、1.27%、0.89%、1.52%。

2.4.7 样品定量测定 将 21 批广金钱草样品分别按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 依次测定计算质量 (表 4), 采用 SPSS 11.0 软件包中的聚类分析程序, 以 7 种黄酮质量数据为变量, 对 21 批广金钱草样品进行聚类分组, 层次聚类分析的树形图见图 4。并将 21 批广金钱草样品根据来源分为市场流通品、平远栽培品、野生品。对 3 个不同来源的广金钱草样品中 7 种黄酮质量进行比较分析, 结果见图 5。

表 3 广金钱草中 7 种黄酮类成分线性回归方程、精密度、重复性、稳定性试验 ($n=3$)

Table 3 Linear regression, equation precision, repeatability, and stability of seven flavonoids components in *Desmodii Styraciflūi Herba* ($n=3$)

化合物	回归方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度 RSD/%	重复性		稳定性 RSD/%
							质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	RSD/%	
维采宁-2	$Y=9\,112.9X+924.18$	0.999 8	2~40	0.2	0.5	1.42	1.131	2.87	1.36
异夏佛塔苷	$Y=8\,189.9X+1\,278.8$	0.999 7	5~100	0.2	0.6	1.05	3.517	1.39	2.14
异荭草苷	$Y=11\,688X-5\,333.2$	0.999 8	2.5~50	0.2	0.8	1.07	0.506	1.77	3.80
夏佛塔苷	$Y=8\,593.2X+858.65$	0.999 6	5~100	0.2	0.9	0.75	2.014	2.88	2.03
异牡荆苷	$Y=13\,250X-2\,573.1$	0.999 7	2.5~50	0.2	0.8	1.27	0.406	2.70	0.87
木犀草素	$Y=10\,109X-5\,317.9$	0.999 0	0.5~10	0.1	0.25	0.89	0.195	2.91	1.02
芹菜素	$Y=15\,224X-22.748$	0.999 5	0.1~2	0.05	0.1	1.52	0.011	3.02	2.20

表 4 21 批广金钱草药材中 7 种黄酮成分质量分数 ($n=3$)

Table 4 Determination of seven flavonoids in *Desmodii Styraciflūi Herba* samples ($n=3$)

编号	产地	批号	质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)							总和
			维采宁-2	异夏佛塔苷	异荭草苷	夏佛塔苷	异牡荆苷	木犀草素	芹菜素	
s1	广西	YPA5A0001	0.964	3.104	0.419	1.706	0.324	0.201	0.012	6.731
s2	广西	151201	1.100	3.737	0.462	2.342	0.501	0.178	0.016	8.335
s3	广西	150201	1.150	3.972	0.420	2.276	0.442	0.195	0.014	8.470
s4	广西	20150616	0.934	3.261	0.331	1.788	0.372	0.168	0.015	6.869
s5	广西	20150617	1.160	4.021	0.434	2.223	0.447	0.186	0.016	8.487
s6	广西	20150606	0.772	2.424	0.236	1.422	0.268	0.181	0.013	5.316
s7	广东	151111	0.872	3.202	0.292	1.682	0.325	0.272	0.023	6.667
s8	广东	151211	1.166	4.022	0.403	2.287	0.491	0.174	0.013	8.555
s9	广东	150304	1.131	3.517	0.506	2.013	0.406	0.195	0.011	7.780
s10	广东	20150701	1.116	3.576	0.500	2.003	0.393	0.208	0.012	7.808
s11	广东	150401	1.017	3.375	0.360	1.855	0.374	0.177	0.013	7.171
s12	广东	20150501	1.148	3.534	0.472	2.045	0.431	0.197	0.012	7.839
s13	广东	20150701	1.035	3.298	0.485	1.911	0.396	0.182	0.018	7.315
s14	广东	20151002	1.110	3.438	0.513	2.005	0.414	0.192	0.010	7.681
s15	平远栽培品 1	—	1.917	6.695	0.936	4.208	0.793	0.134	0.012	14.697
s16	平远栽培品 2	—	1.874	5.985	1.042	3.779	0.744	0.122	0.010	13.556
s17	平远栽培品 3	—	2.362	7.104	1.213	4.480	0.901	0.108	0.012	16.180
s18	平远栽培品 4	—	1.983	6.449	1.053	4.093	0.730	0.137	0.012	14.458
s19	平远栽培品 5	—	2.192	7.602	1.193	4.577	0.879	0.145	0.017	16.605
s20	平远野生	—	1.731	5.647	0.988	3.547	0.755	0.141	0.026	12.834
s21	阳春野生	—	1.739	5.745	0.995	3.642	0.791	0.144	0.027	13.082

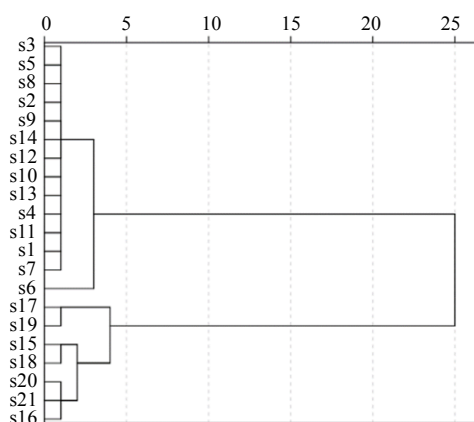


图4 以广金钱草中7种黄酮质量分数数据为变量聚类分析树形图

Fig. 4 Cluster analysis using seven kinds of flavonoids contents in *Desmodii Styraciflil Herba* as variables

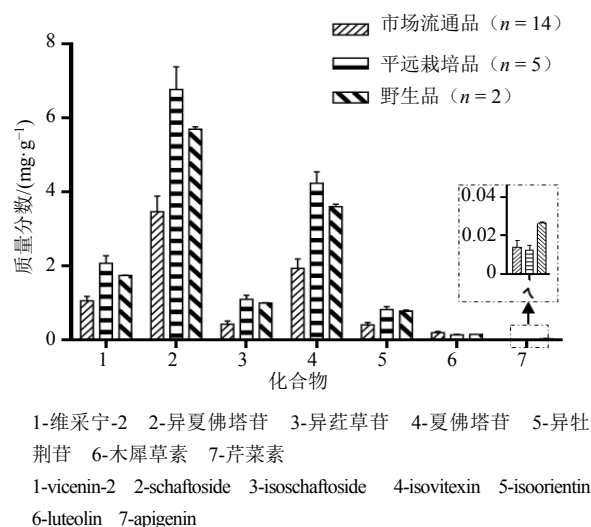


图5 不同来源广金钱草样品中7种黄酮成分质量分数对比图

Fig. 5 Multiple plots of seven flavonoids components in *Desmodii Styraciflil Herba* sample

3 讨论

3.1 HPLC-Q-TOF-MS 定性分析

比较了正离子模式和负离子模式检测,发现负离子模式下峰响应优于正离子模式,流动相中加入甲酸不仅有利于色谱峰形改善,还可以提高质谱响应。TOF-MS 鉴定过程中,一级质谱只能给出分子离子峰的精确分子式,虽然有些成分分子离子峰一致,但可以根据其二级质谱数据的差异加以区分,染料木素,芹菜素分子离子峰相同,但其二级质谱产生的碎片 133、183 和 117、151 不同而相互区分。另外结构相似的同分异构体,其不仅分子式一样,而且有类似的质谱裂解方式,如夏佛塔苷、异夏佛塔苷、

维采宁-1 和维采宁-3 是同分异构体,而且有着类似的裂解规律,区分它们需要对照品的比对来进一步确认,维采宁-1 和维采宁-3 则根据文献报道^[4]出峰的先后顺序进行推断。实验中也有部分同分异构体未与对照品比对,如夏佛塔苷同分异构体 I 和 II 其质谱裂解规律与夏佛塔苷一致,故暂时无法确定其结构。

3.2 定量成分的选择

广金钱草的药理研究表明其抗尿路结石药效物质基础为黄酮类成分^[14]。HPLC-Q-TOF-MS 定性分析结果表明广金钱草中夏佛塔苷、异夏佛塔苷、维采宁-2、异荭草苷、异牡荆苷、木犀草素、芹菜素为其主要黄酮类成分,其中夏佛塔苷、异夏佛塔苷、木犀草素、芹菜素是实验性大鼠口服广金钱草提取液的入血成分^[15]。因此,同时定量分析这7种黄酮类成分对广金钱草的质量控制有重要意义。本实验选择这7种成分进行同时定量研究,为广金钱草的质量控制提供更好的方法。

3.3 样品测定结果分析

对21批广金钱草中7种成分的质量分数进行测定,结果表明,不同批次广金钱草中7种黄酮量差异很大,其中平远栽培品中的维采宁-2、异夏佛塔苷、异荭草苷、夏佛塔苷、异牡荆苷的质量分数均明显高于市面流通品,均提高了1~3倍,达到或超过《中国药典》对广金钱草药材指标成分定量的要求。而木犀草素和芹菜素的质量分数与市面流通样品的质量分数相当。从聚类分析结果可以明显看出,s1~s14为市面上流通的广金钱草样品,聚在一类;s15~s21为平远栽培品和野生品,聚在一类,但栽培品(s15~s19)与野生品(s20~s21)又有区别。前期研究发现,广金钱草叶中的黄酮量远大于茎中的量,叶是广金钱草的主要药用部位;另外,不同采收时期采收的广金钱草黄酮量差异大,采收时期不一致导致广金钱草的质量不一,而始花期为其最佳采收期^[16-17]。分析造成栽培品和野生品中7种黄酮量明显高于市场流通品的可能原因有:①由于市面流通药材在采收和流通过程中叶子容易脱落损失,茎在药材中比例偏高,导致市面流通药材中7种黄酮的量偏低,而自行采集的广金钱草栽培品和野生品则避免了这种情况;②市面药材采收时期偏离了最佳采收期,而自行采集的样品则均在其最佳采收期采收。

本实验建立了 HPLC-Q-TOF-MS 法鉴定广金钱草主要活性成分,采用 HPLC-DAD 法同时测定其中

7种黄酮类成分的量。所建立的方法准确,数据可靠,可为综合评价广金钱草的质量提供参考。

参考文献

- [1] 李锐. 广金钱草化学成分及分析方法的研究进展[J]. 中国药业, 2009, 18(16): 86-87.
- [2] 范文昌, 梅全喜, 赖海标, 等. 广金钱草的药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(31): 2961-2963.
- [3] 王其新, 林振洪, 林海青, 等. 广金钱草栽培品与野生品的质量比较[J]. 中草药, 2000, 31(12): 946-947.
- [4] 周子力, 肖峰, 杨静, 等. RP-HPLC同时测定广金钱草中的vicenin-1、夏佛塔苷和vicenin-3[J]. 华西药学杂志, 2013, 28(6): 609-611.
- [5] 蒲晓辉, 赵辉, 袁琦, 等. RP-HPLC法同时测定广金钱草中夏佛塔苷和异夏佛塔苷[J]. 中成药, 2014, 36(9): 1909-1912.
- [6] 杨美华, 卢尧伟, 匡岩巍, 等. 高效液相色谱法测定广金钱草中vicenin-2的含量[J]. 药物分析杂志, 2004, 24(1): 95-98.
- [7] Zhou C, Luo J G, Kong L Y. Quality evaluation of *desmodium styracifolium* using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry[J]. *Phytochem Anal*, 2012, 23(3): 240-247.
- [8] 孙冬梅, 董玉娟, 胥爱丽, 等. 葛根枳椇软胶囊中黄酮类化合物的UPLC/Q-TOF-MS快速分析[J]. 中草药, 2015, 46(7): 970-976.
- [9] 孙冬梅, 董玉娟, 胥爱丽, 等. 基于UPLC/Q-TOF-MS的大豆异黄酮保健食品中异黄酮成分的快速分析[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2015, 17(1): 114-118.
- [10] Zhang Y Q, Luo J G, Han C, *et al.* Bioassay-guided preparative separation of angiotensin-converting enzyme inhibitory C-flavone glycosides from *Desmodium styracifolium* by recycling complexation high-speed counter-current chromatography[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 102: 276-281.
- [11] 许文, 傅志勤, 林婧, 等. HPLC-Q-TOF-MS和UPLC-QqQ-MS的三叶青主要成分定性定量研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4365-4372.
- [12] 任晓蕾, 霍金海, 孙国东, 等. 短瓣金莲花化学成分的UPLC-Q-TOF-MS分析[J]. 中草药, 2015, 46(23): 3475-3481.
- [13] 林彤, 段金彪, 钱大玮, 等. HPLC-MS/MS联用技术分析鉴定苏薄荷中的黄酮类成分[J]. 中国天然药物, 2006, 4(2): 111-115.
- [14] 汪茜. 广金钱草总黄酮抑制肾草酸钙结石形成的作用机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [15] Sun D, Dong L, Guo P, *et al.* Simultaneous determination of four flavonoids and one phenolic acid in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of the *Herba Desmodii Styracifolii* extract[J]. *J Chromatogr B*, 2013, 932: 66-73.
- [16] 陈丰连, 张文进, 徐鸿华. 广金钱草适宜采收期研究[J]. 中药材, 2010, 33(2): 178-180.
- [17] 陈丰连. 广金钱草规范化种植与药材质量研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.