

基于 HPLC 特征图谱、UPLC-Q-TOF/MS 定性及多成分定量的黄芩酒炙前后化学成分变化研究

柴冲冲¹, 曹妍², 毛民³, 尹贻慧¹, 王靖越¹, 刘娜¹, 李欣欣¹, 张凯¹, 魏龙吟¹, 陈冬玲¹, 李飞^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院 中药炮制系, 北京 102488

2. 北京中医药大学中药学院 中药现代研究中心, 北京 100029

3. 北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 北京 100079

摘要:目的 比较黄芩酒炙前后化学成分变化, 为建立全面的黄芩饮片质量评价方法提供参考。方法 HPLC 法建立黄芩片、酒黄芩的特征图谱, 并生成对照特征图谱, 标定共有峰并进行相似度评价。采用 UPLC-Q-TOF/MS 定性分析黄芩酒炙前后化学成分, 利用 UPLC-TQMS 对 2 种饮片中 11 种黄酮类成分(黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A、千层纸苷、野黄芩苷、芹菜素、高车前素、木犀草苷、白杨素)进行定量分析, 并以含量为变量进行多元统计分析。结果 建立了黄芩片、酒黄芩的特征图谱, 标定 9 个共有峰, 2 种饮片相似度均在 0.947 以上。在黄芩饮片中, 共发现 50 种成分, 通过多级质谱数据分析, 保留时间匹配, 并结合对照品及数据库检索, 鉴定了其中 44 种成分。UPLC-TQMS 定量结果显示酒炙后黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷等黄酮苷类成分含量略有下降, 黄芩素、汉黄芩素等黄酮苷元类成分含量稍有增加。经多元统计学分析, 2 种饮片有明显的分离趋势, 载荷图结果表明黄芩苷、汉黄芩苷、千层纸苷的含量差异可能是引起黄芩酒炙前后化学成分变化的主要因素。结论 黄芩酒炙后没有新增或消失成分, 但成分含量有所变化。所建立黄芩饮片的定性、定量方法重现性好, 分析快速、准确, 可用于黄芩饮片酒炙前后的质量评价。

关键词:黄芩; 酒黄芩; HPLC; 特征图谱; UPLC-Q-TOF/MS; UPLC-TQMS; 化学成分组; 多元统计学分析; 质量评价; 相似度评价; 黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩苷; 汉黄芩素; 千层纸素 A; 千层纸苷; 野黄芩苷; 芹菜素; 高车前素; 木犀草苷; 白杨素

中图分类号: R283.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)09-2436-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.019

Comparison of chemical compositions before and after wine-frying of *Scutellaria baicalensis* based on HPLC characteristic chromatogram, UPLC-Q-TOF/MS qualitative and multi-component quantitative analysis

CHAI Chong-chong¹, CAO Yan², MAO Min³, YIN Yi-hui¹, WANG Jing-yue¹, LIU Na¹, LI Xin-xin¹, ZHANG Kai¹, WEI Long-yin¹, CHEN Dong-ling¹, LI Fei¹

1. Department of Chinese Materia Medica Processing, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Pharmaceutical Factory, Beijing Tongrentang Science and Technology Co., Ltd., Beijing 100079, China

Abstract: Objective To compare the chemical compositions of *Scutellariae Radix* (SR) before and after wine-frying, and provide a reference for establishing a comprehensive quality evaluation method for SR decoction pieces. **Methods** Characteristic chromatogram of SR and wine-processed *Scutellariae Radix* (wpSR) were established using HPLC, the control characteristic chromatogram maps were generated, the common peaks were calibrated and the similarity was evaluated. Chemical compositions of

收稿日期: 2019-11-18

基金项目: 北京市中药炮制技术传承基地建设项目

作者简介: 柴冲冲, 硕士研究生, 研究方向为中药炮制理论与原理研究。E-mail: cccbcm@163.com

*通信作者 李飞, 教授, 硕士生导师。Tel: 13601291660 E-mail: lf668@sina.com

SR and wpSR were identified by UPLC-Q-TOF/MS. The content profiles of 11 flavonoids (baicalin, baicalein, wogonoside, wogonin, oroxylin A, oroxyloside, scutellarin, apigenin, hispidulin, luteoloside and chrysin) of SR and wpSR was determined by UPLC-TQMS, and PCA was used to analysis the content of 11 flavonoids. **Results** The characteristic chromatogram of SR and wpSR were established, and nine common peaks were calibrated. The similarity of two pieces were all greater than 0.947. Through the analysis of the multistage tandem mass spectrometry, retention time matching combined with the software of database search and literatures, 50 compositions were found and 44 compositions were identified in two pieces. The quantitative results showed that the content of flavonoid glycosides such as baicalin and wogonoside decreased slightly, while the content of flavonoid aglycones such as baicalein and wogonin increased slightly. After multivariate statistical analysis, two pieces were divided into two types. The differences of the content of baicalin, wogonoside and oroxyloside may be the main factors causing the change of chemical compositions of wine-frying of SR. **Conclusion** Chemical profiles did not change after wine-frying of SR, but the content profiles of some compositions were changed. The established method can provide reproducible, efficient, as well as accurate analysis for Chinese medicinal materials. And it should be an eligible tool for the quality evaluation of SR.

Key words: *Scutellariae Radix*; wine-processed *Scutellariae Radix*; HPLC; characteristic chromatogram; UPLC-Q-TOF/MS; UPLC-TQMS; chemical compositions; multivariate statistical analysis; quality evaluation; similarity evaluation; baicalin; baicalein; wogonoside; wogonin; oroxylin A; oroxyloside; scutellarin; apigenin; hispidulin; luteoloside; chrysin

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根。味苦，性寒，具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎的功效，常用于治疗湿温、暑湿、胸闷呕恶、湿热痞满和胎动不安等症^[1]。《中国药典》2015 年版中收载黄芩片、酒黄芩 2 种炮制品，黄芩生用苦寒，清热泻火解毒力强，酒炙后可缓和其苦寒之性，同时引药上行，用于上焦肺热及四肢肌表之湿热。黄芩是中医临床和制剂中最为常用的中药之一，在《中药部颁标准》^[2]中有 477 个成药含有黄芩。

现代研究表明黄芩中的主要活性成分以黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等黄酮类成分为主^[3]，同时含有挥发油、多糖、萜类等成分，具有抗炎、抗菌、抗过敏、抗肿瘤、镇痛、保肝等作用^[4-7]。目前对黄芩酒炙前后化学成分变化的研究大多集中在总黄酮、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷等相对含量较高的黄酮类成分，相关研究表明黄芩酒炙后总黄酮、黄芩苷、汉黄芩苷、野黄芩苷、千层纸素 A 含量略有下降，黄芩素、汉黄芩素、多糖含量稍微升高^[8-11]，但对黄芩酒炙前后整体质量差异研究还不够深入，酒炙后是否有成分的消失或新增，如芹菜素、高车前素等相对含量较低但又具有一定药效的成分含量如何变化尚不明确。研究黄芩及酒黄芩的整体质量差异对揭示黄芩酒炙前后药性变化的科学内涵，建立专属性的饮片质量标准，保证黄芩及酒黄芩的临床用药安全性、有效性具有重要意义。

特征图谱和指纹图谱是国际公认的整体评价中药质量的方法^[12-14]，但难以对各共有峰进行归属和绝对定量分析。超高效液相色谱串联四极杆飞行时

间质谱法 (UPLC-Q-TOF/MS) 为目前快速分离、鉴定中药成分的主要方法之一^[15]，可用于特征图谱、指纹图谱共有峰成分鉴定，结合多元统计方法，可找出积累差异显著的化学成分^[16]，超高效液相色谱串联三重四级杆质谱 (UPLC-TQ/MS) 中多反应监测模式 (MRM) 的高灵敏度特性可对药材及饮片的化学成分进行高灵敏度、高选择性、快速的定量分析^[17]。相关学者已对黄芩的指纹图谱、化学成分进行了分析^[18-23]，但结合 3 种方法对黄芩酒炙前后化学成分的定性、定量分析未见报道。本实验在课题组前期研究基础上，以 10 批次黄芩药材为研究对象，制备黄芩片及酒黄芩，建立黄芩片及酒黄芩的 HPLC 特征图谱，进行相似度考察，同时采用 UPLC-Q-TOF/MS、UPLC-TQ/MS 对黄芩酒炙前后进行定性及 11 种黄酮类成分定量分析，完善黄芩及其酒炙品的质量评价方法，并且进一步探讨酒炙黄芩的科学内涵。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪，2695 四元梯度泵，在线脱气机，自动进样器，柱温箱，2489 紫外检测器，Empower 色谱工作站，美国 Waters 公司；Waters Acquity UPLC™ 型液相色谱仪，配有四元高压泵，自动进样器，柱温箱，连接 Waters Synapt G2-S QTOF 质谱仪，配备电喷雾离子源以及 MassLynx v4.1 质谱工作站，美国 Waters 公司；Waters Acquity UPLC™ 型液相色谱仪，包括四元泵溶剂系统，在线脱气机和自动进样器，美国 Waters 公司，连接 Xevo TQ 质谱仪，配备 Xevo TQ 检测器，Mass Lynx

v4.2 质谱工作站, 美国 Waters 公司; DSX-280A 不锈钢手提式压力蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; ZGBJ-550Z 数控蒸煮锅, 杭州海善制药设备股份有限公司; ZQRAZG-300BC 智能化直线往复式切药机, 杭州海善制药设备股份有限公司; MS-DC-10 豪华型商用炒货机, 常州市金坛迈斯机械有限公司; SB25-12 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; BSA224S 电子天平, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; DHG-9123A 电热鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 试药与试剂

黄芩药材和黄酒为北京同仁堂科技发展有限公司制药厂提供, 药材批号 1812088-1、1812070-1、1812104-1、1811009-1、1810118-1、1807022-1、1810021-1、1801131-2、1901059-1、1807022-2, 分别编号 S1~S10, 经北京中医药大学杨瑶珺教授鉴定为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根; 黄酒, 批号 20180912, 酒精度 15%, 古越龙山绍兴花雕; 对照品黄芩苷(批号 P20A9F59353)、黄芩素(批号 C20M8Y31962)、汉黄芩苷(批号 P09J8F28374)、汉黄芩素(批号 P11M9F61014)、千层纸素 A(批号 Y31M9H62597)、野黄芩苷(批号 Z17O7X22900)、芹菜素(批号 Y27A6C1)、白杨素(批号 X24O6C4947)、千层纸苷(批号 6805)、高车前素(批号 6683)、木犀草苷(批号 5735)、内标物芦丁(批号 5981), 均购于上海源叶生物科技有限公司, 所有对照品及内标物均经 HPLC-DAD 检测, 质量分数均大于 98%; LC-MS 级乙腈(批号 186272)、甲酸(批号 186260)均购自美国 Thermo-Fisher 公司; 水为屈臣氏纯净水; 其余试剂为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 黄芩炮制品的制备

黄芩片: 参照《中国药典》2015 年版黄芩项下蒸法及北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂蒸制工序操作规程(黄芩)制备: 取各批次黄芩净药材(S1~S10) 200 g, 置数控蒸煮锅中蒸 0.5 h, 取出, 趁热用直线往复式切药机切成 1.5 mm 薄片, 于鼓风干燥器中 60 °C 干燥 4 h, 取出, 晾凉, 即得, 分别记作 P1~P10。

酒黄芩: 参照《中国药典》2015 年版酒炙法(通则 0213)及北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂酒炙工序操作规程(黄芩)制备: 取制得的各批

次黄芩片 100 g, 加 15 g 黄酒拌匀, 闷润至黄酒被吸尽, 用商用炒货机 140 °C 炒 5 min, 倒出, 晾凉, 即得, 分别记作 J1~J10。

每批次黄芩片和酒黄芩平行操作 3 次, 各批次得到的饮片混合, 备用。

2.2 黄芩片、酒黄芩 HPLC 特征图谱的建立

色谱条件、对照品溶液及供试品溶液的制备均参照本课题组前期研究成果^[24]。

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Extend-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~20 min, 10%~20%乙腈; 20~30 min, 20%~25%乙腈; 30~60 min, 25%~45%乙腈; 60~70 min, 45%~60%乙腈; 检测波长 274 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μL。在该色谱条件下, 理论塔板数以黄芩苷计不低于 2 500。

2.2.2 对照品溶液的制备 取黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素、千层纸素 A 对照品适量, 精密称定, 加甲醇分别制成质量浓度为 146.0、11.0、77.5、9.1、1.9 μg/mL 的混合对照品溶液, 即得, 4 °C 条件下保存, 备用。

2.2.3 供试品溶液的制备 取“2.1”项下各黄芩炮制品中粉约 0.3 g, 精密称定, 加 70%乙醇 50 mL, 超声处理(功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷, 滤过, 滤液置 100 mL 量瓶中, 用少量 70%乙醇分次洗涤容器和残渣, 洗液滤入同一量瓶中, 加 70%乙醇至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 吸取 1 mL 过 0.45 μm 滤膜, 取续滤液即得供试品溶液, 备用。

2.2.4 精密度试验 精密吸取 P1 供试品溶液, 按上述色谱条件连续进样 6 次, 记录色谱图, 以黄芩苷为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果各特征峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 1%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 3%, 结果表明仪器精密度良好。

2.2.5 重复性实验 取 P1 样品粉末 6 份, 精密称定, 按上述方法制备供试品溶液, 精密吸取 10 μL 进样, 记录色谱图。以黄芩苷为参照峰, 计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积, 结果各特征峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 1%, 相对峰面积的 RSD 值均小于 3%, 结果表明该方法重复性良好。

2.2.6 稳定性试验 取 P1 供试品溶液, 分别于 0、4、8、12、18、24 h 按上述色谱条件进样, 记录色

谱图。以黄芩苷为参照峰,计算特征峰的相对保留时间及相对峰面积,结果各特征峰的相对保留时间的 RSD 值均小于 1%,相对峰面积的 RSD 值均小于 3%,结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 特征图谱的建立 分别精密吸取 P1~P10, J1~J10 供试品溶液 10 μ L 注入 Waters2695 高效液相色谱仪测定,将各样品的特征图谱以 CDF 格式依次导入国家药典委员会颁布的《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)》,分别以 P1、J1 为参照图谱,使用平均数法进行自动匹配,加以多点校正,生成黄芩片、酒黄芩的对照特征图谱,标定共有峰 9 个,经与对照品对照,确定其中 2 号峰为野黄芩苷,3 号峰为黄芩苷,6 号峰为汉黄芩苷,7 号峰为黄芩素,8 号峰为汉黄芩素,9 号峰为千层纸素 A,结果见图 1。

采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件(2012 版)》对各批次黄芩片、酒黄芩进行相似度评价。P1~P10 结果为 0.976、0.994、0.994、0.978、0.951、0.959、0.947、0.994、0.952、0.994; J1~J10 结果为 0.996、0.998、0.998、0.997、0.998、0.997、0.995、0.996、0.997、0.997。2 种饮片各批次相似度均在 0.947 以上,相似度相差不大,说明各批次

质量比较稳定。从相似度角度分析,不同批次黄芩酒炙前后化学成分的差异性并不显著,但酒炙黄芩的相似度更高。

2.3 质谱定性分析

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱:0~1 min, 2%~10%乙腈;1~7 min, 10%~60%乙腈;7~9 min, 60%~98%乙腈;9~10 min, 98%~2%乙腈;10~12 min, 2%乙腈;柱温 40 $^{\circ}$ C;体积流量 0.4 mL/min;进样量 2 μ L。

2.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),负离子模式检测;雾化气体为氮气。毛细管电压 3.2 kV,锥孔电压 40 kV,离子源温度 120 $^{\circ}$ C,脱溶剂气温度 400 $^{\circ}$ C,反向锥孔气流 50 L/h,脱溶剂气 795~800 L/h。离子扫描时间 0.03 s、扫描时间间隔 0.02 s、数据采集范围: m/z 50~1 500。

2.3.3 对照品溶液的制备 取各对照品适量,精密称定,分别溶于 DMSO 中,配成 4.0 mg/mL 的对照品储备液。精密吸取各对照品储备液适量,分别用 50%甲醇水溶液稀释成质量浓度为 50 μ g/mL 的对照品溶液,待用。

2.3.4 供试品溶液的制备 精密称取 P1、J1 中粉 0.3 g,加入 70%甲醇 50 mL,超声提取 30 min,取混悬液 2 mL 置于干净离心管中,12 000 r/min 离心 10 min,上清液 1 mL 过 0.22 μ m 滤膜,取续滤液即得供试品溶液,待用。

2.3.5 样品检测与数据处理 精密吸取 P1、J1 供试品溶液及混合对照品溶液各 2 μ L,注入 UPLC-Q-TOF/MS 系统测定,利用 MassLynx V4.1 软件采集数据,提取总离子流图,见图 2。根据准分子离子[M-H] $^{-}$ 判断并得到的一级质谱精确相对分子质量,并根据产生的二级质谱碎片离子信息,通过与对照品或文献数据比对,结合软件中 Elemental composition parameters 功能对成分化学式预测,最终对 2 种饮片各成分鉴定,结果发现 2 种饮片含有成分基本一致,结果见表 1。

2.3.6 结构分析与鉴定 根据准分子离子[M-H] $^{-}$ 信息判断和得到的一级质谱精确相对分子质量,以及产生的二级质谱碎片离子信息,通过与对照品或文献数据比对,鉴定出黄芩片及酒黄芩中 44 个成分,多为黄酮苷及黄酮苷元类成分。黄酮苷类化合物主要包括碳苷类和氧苷类,碳苷类化合物在质谱

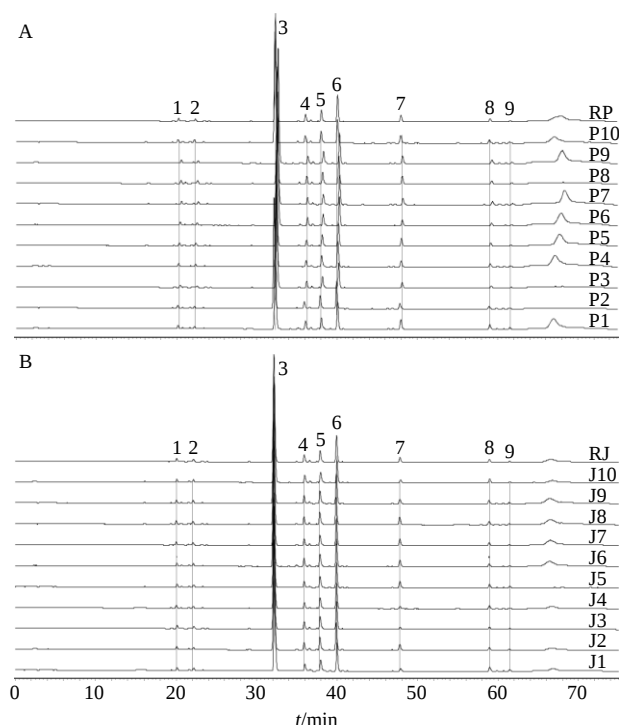
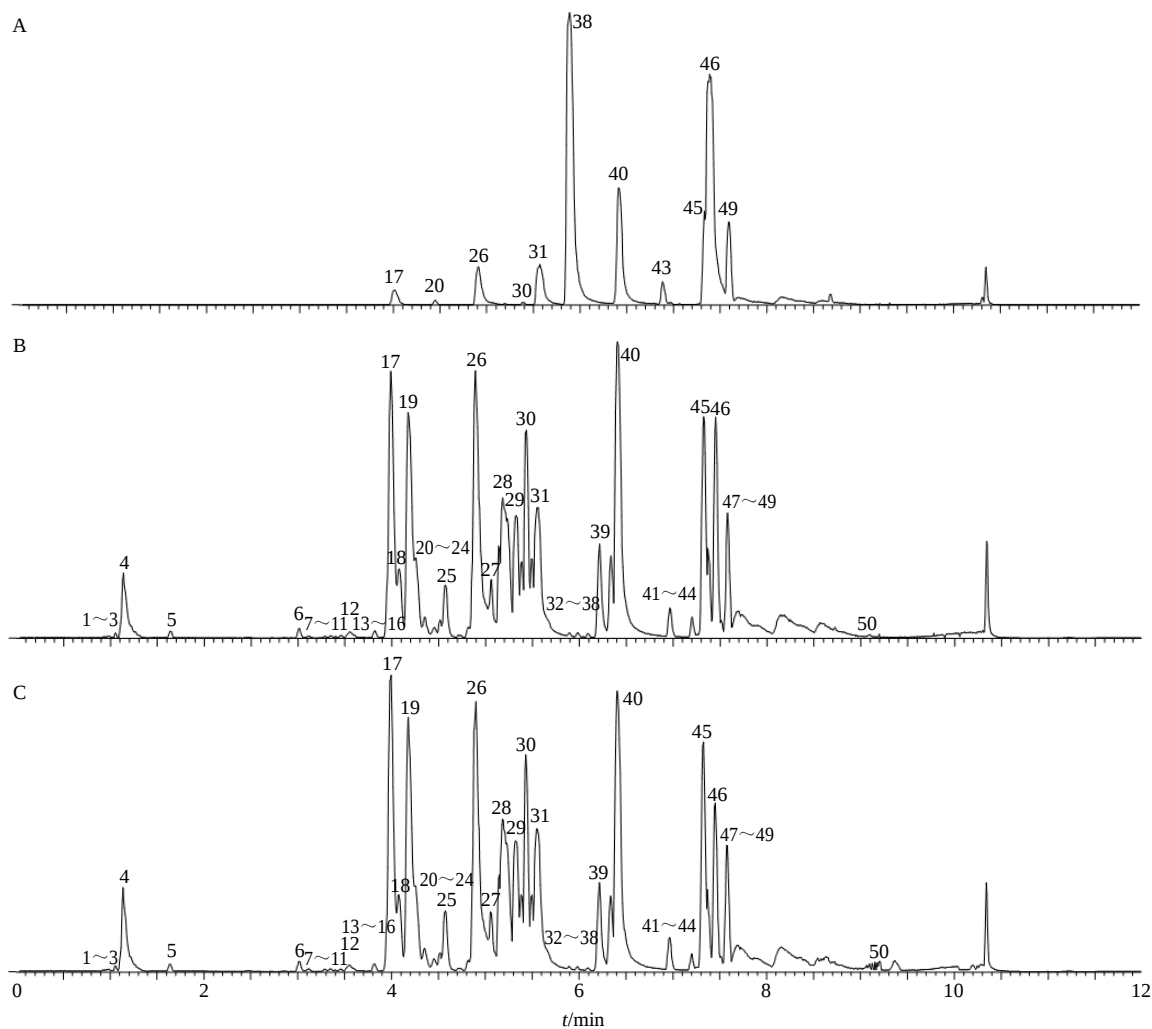


图 1 黄芩片 (A)、酒黄芩 (B) 的 HPLC 特征图谱及对照特征图谱 (R)

Fig. 1 HPLC characteristic chromatogram of SR (A) and wpSR (B) and reference characteristic chromatogram (R)



17-野黄芩苷 20-千层纸苷 26-黄芩苷 30-木犀草苷 31-汉黄芩苷 38-芹菜素 40-黄芩素 43-高车前素 45-千层纸素 A 46-白杨素 49-汉黄芩素, 图 3 同

17-scutellarin 20-oroxylloside 26-baicalin 30-luteoloside 31-wogonoside 38-apigenin 40-baicalein 43-hispidulin 45-oroxylin A 46-chrysin 49-baicalin, same as figure 3

图 2 混合对照品 (A)、黄芩片 (B)、酒黄芩 (C) 总离子流图 (负离子模式)

Fig. 2 Base peak intensity (BPI) of mixed reference substances (A), SR (B) and wpSR (C) (negative ion mode)

表 1 黄芩片和酒黄芩中化学成分的鉴定

Table 1 Components identification of SR and wpSR

峰号	t_R/min	分子式	相对分子质量	偏差/($\times 10^{-6}$)	MS/MS 离子信息	化合物
1	0.845	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_8$	333.060 2	-2.4	302.786 2, 168.890 4, 151.886 2, 136.906 5	未知物 1
2	0.880	$\text{C}_{26}\text{H}_{14}\text{O}_6$	421.071 9	1.7	194.927 1, 168.890 4, 150.977 5, 96.959 2	未知物 2
3	0.966	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	593.149 5	-7.9	383.118 6, 355.078 0, 285.042 5, 193.043 5	木犀草素-7-O-芸香糖苷
4	1.129	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_6$	341.106 2	10.8	179.055 5, 161.045 4, 143.031 8, 133.013 3, 119.034 4, 113.024 6	蔗糖
5	1.657	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	191.018 3	-4.7	173.009 3, 111.008 4	柠檬酸
6	2.915	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	431.155 5	0.5	353.030 9, 269.037 2, 182.964 6, 168.952 9, 151.004 4, 121.030 6	芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖苷
7	2.979	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$	431.155 5	0.5	353.030 9, 299.034 4, 232.993 9, 191.060 6, 161.023 2, 149.024 3	darendoside A

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	相对分子质量	偏差/ ($\times 10^{-6}$)	MS/MS 离子信息	化合物
8	3.011	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	465.104 5	2.6	300.971 8, 283.061 6, 271.069 2, 241.052 4, 177.020 8, 125.023 9	花旗松素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷
9	3.235	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	463.090 1	5.2	461.145 8, 301.032 4, 283.024 8, 193.052 7	2',3,5,6',7-四羟基黄酮-2'- <i>O</i> -葡萄糖苷
10	3.385	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	463.070 8	12.5	287.074 8, 269.037 2, 166.987 6, 151.004 4	红花素 7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷
11	3.427	$\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_{12}$	475.184 6	6.3	353.063 7, 175.038 2	未知物 3
12	3.591	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	563.141 3	5.9	473.148 6, 443.095 0, 415.139 6, 413.947 5, 383.075 8, 353.063 7	夏佛塔苷
13	3.698	$\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_5$	267.027 1	-8.5	175.015 1	未知物 4
14	3.740	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	577.154 7	-1.7	563.143 4, 523.223 1, 507.106 2, 479.078 6, 443.058 2, 425.017 2, 341.106 2, 295.118 3	8-葡萄糖基-6-糖基-5,7-二羟基黄酮
15	3.832	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_7$	303.052 3	5.9	217.049 6, 177.015 0, 125.023 9	2',3,5,5',7-五羟基黄酮
16	3.911	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	547.145 6	0.7	529.134 6, 511.029 8, 487.126 5, 457.116 0, 427.110 6, 409.090 2, 397.089 9, 367.083 3, 349.068 6, 337.075 2	8-阿拉伯糖基-6-葡萄糖基-5,7-二羟基黄酮
17	4.030	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$	461.070 7	-2.8	285.042 5, 267.291 4, 255.788 3, 239.062 0, 163.941 6, 151.042 0, 138.995 2, 136.054 1	野黄芩苷*
18	4.196	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	547.145 6	0.7	547.145 6, 529.134 6, 511.049 6, 487.126 5, 457.116 0, 427.110 6, 367.083 3, 337.075 2	6-阿拉伯糖基-8-葡萄糖基-5,7-二羟基黄酮
19	4.267	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{13}$	547.145 6	0.7	547.145 6, 529.134 6, 511.049 6, 487.126 5, 457.116 0, 427.110 6, 367.083 3, 337.075 2	6-阿拉伯糖基-8-葡萄糖基-5,7-二羟基黄酮异构体
20	4.280	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	431.101 1	1.1	459.093 2, 283.061 6, 268.034 8, 175.020 8	千层纸苷 A
21	4.316	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$	415.104 0	2.6	299.057 0, 267.062 8, 175.020 8	8-葡萄糖基 5,7-二羟基黄酮
22	4.379	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	475.089 4	3.6	299.057 0, 284.032 8, 255.027 1, 175.026 6, 113.024 6	scutevulin-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucutonide
23	4.444	$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$	521.134 5	5.0	399.959 7, 359.074 2, 344.058 0, 329.029 0, 269.044 4, 211.072 5, 201.019 4	2',5,6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮-2'- <i>O</i> -葡萄糖苷
24	4.529	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_{21}$	607.135 7	-0.2	269.044 4	4',5,7-三羟基黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖苷
25	4.614	$\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_{13}$	505.101 0	5.5	329.069 3, 314.042 5, 299.019 3, 269.044 4	2,5,6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮-2'- <i>O</i> -葡萄糖醛酸
26	4.850	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	445.074 7	1.1	269.044 4, 175.026 6	黄芩苷*
27	4.935	$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_7$	345.063 8	8.1	315.011 1, 269.044 4, 169.066 5, 149.024 3	dihydro rivularin
28	5.041	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.095 7	6.7	445.074 7, 285.042 5, 271.062 0, 269.044 4, 253.049 3, 243.064 5, 181.066 5, 175.026 6	5,7,8-三羟基黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖苷
29	5.184	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	445.074 7	1.1	269.044 4, 197.062 0, 171.043 6	黄芩苷异构体
30	5.319	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.095 7	6.7	427.118 6, 285.035 1, 269.044 4, 175.038 2	木犀草苷*
31	5.461	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	459.093 2	1.1	283.061 6, 268.034 8, 175.020 8	汉黄芩苷*
32	5.532	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	475.089 4	3.6	299.057 0, 284.032 8, 255.027 1, 239.035 0, 175.020 8, 113.024 6	粗毛豚草素-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖醛酸苷
33	5.651	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$	445.074 7	1.1	269.044 4, 171.043 6, 151.052 7, 113.024 6	芹菜素-7- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖醛酸苷
34	5.660	$\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	459.093 2	1.1	459.093 2, 283.061 6, 268.034 8, 175.020 8	5,7-二羟基-6-甲氧基黄酮-7- <i>O</i> -葡萄糖醛酸苷

续表 1

峰号	t_R/min	分子式	相对分子质量	偏差/ $(\times 10^{-6})$	MS/MS 离子信息	化合物
35	5.767	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	299.057 0	4.7	284.038 2, 269.044 4, 239.035 0, 212.044 9, 136.988 7, 117.037 2	4'-羟基汉黄芩素
36	5.859	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	299.057 0	4.7	284.038 2, 269.044 4, 239.035 0, 212.044 9, 136.988 7, 117.037 2	4'-羟基汉黄芩素异构体
37	6.059	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$	359.074 2	-7.0	347.047 0, 269.044 4, 197.062 0, 179.968 7	5-羟基-2',6',7,8-四甲氧基黄酮
38	6.173	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	269.044 4	-2.2	269.044 4, 225.052 7, 195.043 0, 183.011 9, 151.052 7, 117.035 9	芹菜素*
39	6.200	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	299.057 0	4.7	284.038 2, 269.044 4, 239.035 0, 136.988 7, 117.037 2	高车前素异构体
40	6.372	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$	269.044 4	-2.2	269.044 4, 225.052 7, 195.043 0, 183.011 9, 151.052 7, 117.035 9	黄芩素*
41	6.414	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$	271.062 0	5.2	269.044 4, 253.049 3, 197.062 0	5,7,8-三羟基黄酮
42	6.862	$\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$	537.084 2	3.7	391.044 4, 373.034 2, 345.039 4, 317.046 2, 245.009 8, 217.011 0	未知物 5
43	6.919	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	299.057 0	4.7	284.038 2, 269.044 4, 239.035 0, 136.988 7	高车前素*
44	7.168	$\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$	343.078 1	-10.8	313.036 7, 285.042 5, 269.044 4	5,7-二羟基-2',6',8-三甲氧基黄酮
45	7.382	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	283.061 6	3.5	268.034 8, 239.035 0, 184.053 7, 165.990 0, 163.002 9, 135.006 2	千层纸素 A*
46	7.532	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$	253.049 3	-3.2	209.065 0, 183.011 9, 143.047 5, 107.007 8	白杨素*
47	7.517	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$	373.093 3	2.7	358.064 8, 343.045 7, 328.023 8, 300.025 0, 285.005 6, 169.026 7	5,7-二羟基-2',3',6,8-四甲氧基黄酮
48	7.574	$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{O}_6$	313.067 7	-11.2	283.024 8, 269.044 4, 183.011 9	2',5-二羟基-7,8-二甲氧基黄酮
49	7.631	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$	283.061 6	3.5	268.034 8, 239.035 0, 184.053 7, 165.990 0, 163.002 9, 135.006 2	汉黄芩素*
50	9.094	$\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_4$	409.240 5	6.4	339.196 4, 325.181 4, 269.044 4, 255.229 5, 183.011 9, 152.997 5	未知物 6

*经对照品指认

*Confirmed with authentic compounds

裂解过程中主要发生糖环裂解, 出现 $[\text{M}-\text{H}-60]^-$, $[\text{M}-\text{H}-90]^-$ 和 $[\text{M}-\text{H}-120]^-$ 等一系列特征性碎片离子。化合物 **18** 的分子离子峰为 m/z 547.145 6 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 在 ESI⁻ 模式下, 依次出现 m/z 487.126 5、 m/z 457.116 0、 m/z 427.110 6 等黄酮碳苷类化合物的碎片离子, 对比文献确定为 6-C-阿拉伯糖基-8-C-葡萄糖基白杨素^[19-21]。化合物 **26**, 在 ESI⁻ 模式下的准分子离子为 m/z 445.074 7 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 其碎片离子 m/z 269.008 6 比准分子离子少 176, 是由于准分子离子丢失 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 后形成的碎片, 与对照品对比, 所得的一级及二级全扫描质谱及保留时间与化合物 **26** 相同, 由此确认其为黄芩苷。

2.4 11 种黄酮类成分定量分析

2.4.1 液相色谱条件 色谱柱及流动相同 “2.3.1”

项下, 梯度洗脱: 0~7 min, 22%~50%乙腈; 7~9 min, 50%~95%乙腈; 9~9.5 min, 95%乙腈; 9.5~11 min, 95%~22%乙腈; 11~12 min, 22%乙腈; 柱温 40 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 2 μL 。

2.4.2 质谱条件 质谱检测模式为多反应检测 (MRM), 毛细管电压 0.5 kV; 离子源温度 97 °C; 脱溶剂气温度 500 °C; 脱溶剂气流量 1 000 L/h; 锥孔气流量 50 L/h; 取样锥孔电压及碰撞能量见表 2。除高车前素、木犀草苷、白杨素外, 每个成分采用 2 对离子对进行分析, 在进一步优化后, 选择响应更好、灵敏度更高的第 1 对离子对作为定量离子对。对照品及供试品 MRM 色谱图见图 3。

2.4.3 对照品溶液的制备 取各对照品适量, 精密称定, 分别溶于 DMSO 中分别制成质量浓度分别为

表 2 黄芩、酒黄芩 11 种黄酮类化合物及内标物的主要质谱检测参数

Table 2 Main mass spectrometry parameters of 11 flavonoids from SR and wpSR and internal standard

化合物	<i>t_R</i> /min	多反应监测离子对信息	去簇电压/V	碰撞能量/eV	离子模式
黄芩苷	3.28	445.116 8→268.999 1, 445.116 8→112.891 2	4	16	ES ⁻
黄芩素	3.07	269.084 7→150.932 6, 269.084 7→116.925 5	74	26	ES ⁻
汉黄芩苷	4.39	459.196 4→283.062 2, 459.196 4→268.042 4	34	16	ES ⁻
汉黄芩素	7.46	283.164 2→268.004 3, 283.164 2→109.909 4	64	16	ES ⁻
千层纸素 A	7.93	283.164 2→268.004 0, 285.100 4→270.072 3	50	16	ES ⁻
千层纸苷	4.01	459.196 3→283.062 2, 459.196 3→268.040 7	22	14	ES ⁻
野黄芩苷	2.00	461.000 0→284.600 0, 463.303 2→307.281 4	45	15	ES ⁻
芹菜素	4.87	269.084 8→116.925 5, 269.084 8→150.936 0	76	32	ES ⁻
高车前素	5.06	299.095 3→284.003 5	30	18	ES ⁻
木犀草苷	2.58	447.196 3→284.867 4	86	40	ES ⁻
白杨素	8.73	255.188 3→98.916 3	42	24	ES ⁺
芦丁	1.74	609.185 3→300.131 1	90	34	ES ⁻

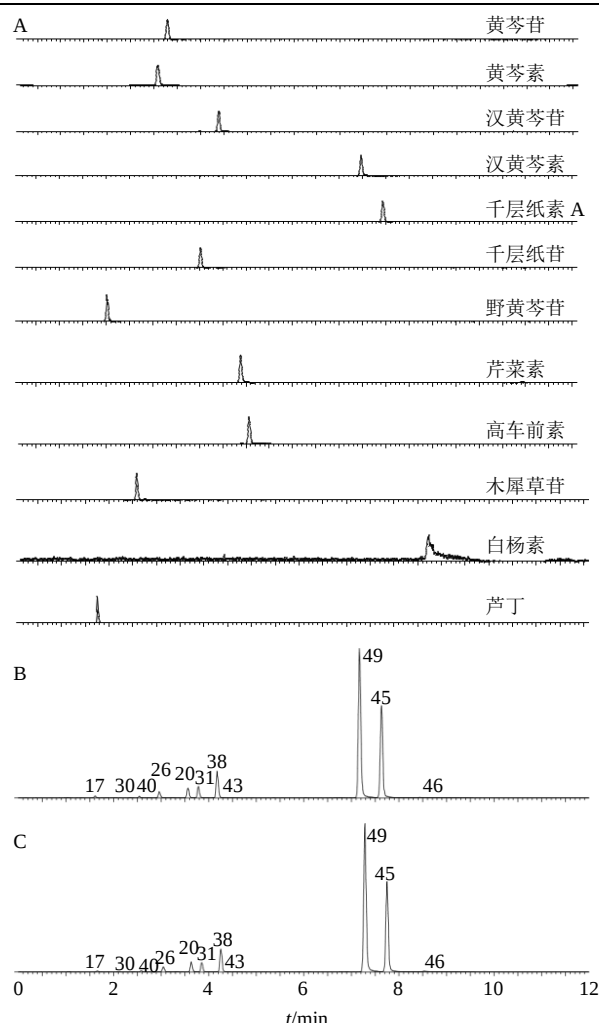


图 3 各对照品 (A) 及黄芩片 (B)、酒黄芩 (C) 的 UPLC-TQ/MS-MRM 色谱图

Fig. 3 UPLC-TQ/MS-MRM chromatogram of reference ion (A), SR (B) and wpSR (C)

2.51、2.56、2.47、2.62、2.54、2.00、2.52、2.50、2.56、2.50、2.54 mg/mL 的对照品储备液，加 50% 甲醇-水溶液稀释成各对照品质量浓度为 0.251、1.280、1.235、1.310、0.100、1.000、0.252、0.026、0.026、0.025、1.270 mg/mL 的混合对照品溶液。所有对照品溶液均在 4 ℃ 条件下贮藏。

精密称取内标物芦丁适量，溶于 DMSO 中制成质量浓度为 2.59 mg/mL 的内标储备液，用 50% 甲醇-水溶液稀释成含芦丁质量浓度为 518 ng/mL 的内标溶液，备用。

2.4.4 供试品溶液的制备 精密称取各批次黄芩片、酒黄芩中粉 0.3 g，加入 70% 甲醇 50 mL，超声提取 30 min，取混悬液 2 mL 置于离心管中，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液 980 μL，加入 20 μL 内标溶液，涡旋混合 3 min 后过 0.22 μm 滤膜，取续滤液即得供试品溶液，待用。

2.4.5 线性范围与定量限 (LOQ)、检测限 (LOD) 考察 取混合对照品溶液，加 50% 甲醇-水溶液逐级稀释 10、50、100、500、1 000 倍，配成 6 个不同质量浓度的混合对照品溶液。精密吸取各混合对照品溶液 980 μL，加入 20 μL 内标溶液混匀，按“2.4.1”项下色谱条件测定，分别以对照品质量浓度为横坐标 (X)，以对照品峰面积与内标峰面积比值为纵坐标 (Y) 进行线性回归分析，得回归方程，计算相关系数 (r)。LOD 和 LOQ 分别在信号对噪音比值 (S/N) 为 3 和 10 时测定。结果见表 3。

2.4.6 精密度实验 精密吸取“2.4.3”项下混合对照品溶液，按上述液相与质谱条件连续进样 6 次，

表 3 11 种黄酮类成分的线性回归方程及定量限考察结果

Table 3 Linear regression equation and quantitative limit of 11 flavonoids

化合物	线性方程	<i>r</i>	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
黄芩苷	$Y=3.258\ 96\ X+52.338\ 5$	0.999 0	251~251 000	14.89	35.61
黄芩素	$Y=0.852\ 334\ X-1.265\ 41$	0.999 3	1 280~1 280 000	8.25	21.75
汉黄芩苷	$Y=1.526\ 83\ X+19.204\ 8$	0.999 2	1 235~1 235 000	8.51	25.41
汉黄芩素	$Y=2.212\ 87\ X+12.916\ 7$	0.999 6	1 310~1 310 000	6.23	18.69
千层纸素 A	$Y=0.081\ 258\ 4\ X-1.852\ 61$	0.999 1	100~100 000	3.28	15.84
千层纸苷	$Y=0.132\ 141\ X+16.273\ 9$	0.999 2	1 000~1 000 000	1.57	12.77
野黄芩苷	$Y=0.094\ 275\ 4\ X+0.185\ 337$	0.999 3	252~252 000	6.12	19.52
芹菜素	$Y=0.003\ 224\ 75\ X-0.080\ 992\ 3$	0.999 2	25.6~25 600	0.84	18.94
高车前素	$Y=0.054\ 603\ 3\ X-0.941\ 296$	0.999 5	25.5~25 500	6.84	20.88
木犀草苷	$Y=0.014\ 400\ 8\ X+0.728\ 321$	0.999 2	25~25 000	1.23	4.71
白杨素	$Y=0.001\ 258\ 32\ X+0.975\ 288$	0.999 3	1 270~1 270 000	10.36	16.58

每次进样 2 μL, 记录 11 种黄酮类成分的峰面积, 计算 RSD 值, 结果见表 4。表明仪器精密度良好。

2.4.7 重复性实验 精密称取 P1 样品中粉 0.3 g, 按“2.4.4”项下方法平行制备供试品溶液 6 份, 分别进样, 每次进样 2 μL, 记录 11 种黄酮类成分的峰面积, 代入回归方程计算 6 次测定的各成分的平均含量和 RSD 值, RSD 值结果见表 4。表明该方法重复性良好。

2.4.8 稳定性实验 取供试品溶液 (P1), 分别于制备后的 0、2、4、8、12、16、24 h 进样 2 μL 测定, 记录 11 种黄酮类成分的峰面积, 计算 RSD 值, 结果见表 4。表明该供试品溶液在 24 h 内稳定。

表 4 11 种黄酮类成分的精密密度、重复性、稳定性和加样回收率试验考察结果 (*n* = 6)Table 4 Precision, repeatability, stability and recovery of 11 flavonoids (*n* = 6)

化合物	精密密度	重复性	稳定性	回收率/%	
	RSD/%	RSD/%	RSD/%	平均值	RSD
黄芩苷	2.76	2.62	2.56	98.90	1.14
黄芩素	4.57	4.94	1.59	95.34	3.13
汉黄芩苷	2.46	2.78	3.16	103.67	5.28
汉黄芩素	3.18	3.53	4.86	100.60	4.19
千层纸素 A	3.55	3.20	4.15	99.14	3.66
千层纸苷	3.17	3.21	4.52	103.78	3.39
野黄芩苷	3.95	4.30	2.01	103.97	4.03
芹菜素	2.65	4.86	4.30	101.19	5.23
高车前素	1.14	2.12	4.51	99.72	3.71
木犀草苷	4.66	4.93	4.14	101.73	5.02
白杨素	4.05	4.39	4.62	99.00	4.96

2.4.9 加样回收率试验 精密称取 P1 样品中粉 6 份, 每份 0.15 g, 分别精密加入对照品适量, 按“2.4.4”项下方法制备, 根据测得量和加入量计算 11 种黄酮类成分的平均加样回收率和 RSD 值, 结果见表 4。

2.4.10 各样品中 11 种黄酮类成分含量的测定 分别称取各黄芩片、酒黄芩样品粉末, 按“2.4.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.4.1”“2.4.2”项条件进行分析, 记录 11 种黄酮类成分峰面积, 代入回归方程计算样品中各成分的含量, 结果见表 5。

由表 5 可知, 黄芩酒炙后部分成分质量分数发生变化, 黄芩苷、汉黄芩苷等黄酮苷类成分质量分数呈不同程度的下降趋势, 其中黄芩苷、汉黄芩苷、千层纸苷质量分数下降率分别在 4.54%~9.91%、9.20%~14.55%、8.20%~13.96%, 黄芩素、汉黄芩素质量分数增加率分别在 0.67%~7.57%、0.65%~5.85%, 其余成分质量分数变化率在 0.41%~6.71%。

2.4.11 黄芩片、酒黄芩中 11 种黄酮类成分含量的 PCA 分析 将各批次黄芩片、酒黄芩中 11 种黄酮类成分含量导入 SIMCA-P 软件, 以无监督模式识别 PCA 结合前 2 个主成分进行区分。分析结果显示, 前 2 个主成分累积贡献率超过 0.8, 表明前 2 个主成分能够充分体现出各共有峰的基本特征和主要信息。因此, 以前 2 个主成分为坐标轴构建主成分平面各批次样品经过 PCA 分析后得分图 (score plot) 和载荷图 (loading scatter plot) 处理分析后如图 4 所示。

得分图显示, 以黄芩酒炙前后 11 种黄酮类成分含量为变量, 2 种饮片有明显的分离趋势。黄芩片

表 5 黄芩片和酒黄芩中 11 种黄酮类成分含量测定结果 ($n = 3$)

Table 5 Determination of 11 flavonoids of SR and wpSR ($n = 3$)

样品	质量分数/(mg·g ⁻¹)										
	黄芩苷	黄芩素	汉黄芩苷	汉黄芩素	千层纸素 A	千层纸苷	野黄芩苷	高车前素	白杨素	木犀草苷	芹菜素
P1	86.725 3	11.418 7	23.120 8	3.735 6	2.678 3	11.202 2	3.310 7	0.256 2	1.073 2	0.276 8	0.369 7
P2	87.663 9	12.456 6	26.854 5	3.781 5	2.553 4	10.335 8	3.592 0	0.286 3	0.986 1	0.312 5	0.448 9
P3	89.374 6	12.982 5	26.330 1	3.625 0	2.863 8	11.985 6	2.998 6	0.259 3	0.832 4	0.560 3	0.407 2
P4	90.643 8	10.780 3	19.702 6	2.505 7	2.445 7	12.504 8	2.675 5	0.288 4	1.550 8	0.405 6	0.459 4
P5	83.845 9	12.743 0	27.994 3	4.686 4	3.582 2	11.880 3	2.183 7	0.350 7	0.993 4	0.539 1	0.513 3
P6	109.023 5	10.266 8	20.887 0	2.976 6	2.409 8	13.586 9	3.106 4	0.334 1	0.918 7	0.402 9	0.460 5
P7	105.223 8	10.705 5	30.339 4	4.011 3	2.663 9	14.993 1	2.223 7	0.313 3	0.968 5	0.883 4	0.496 7
P8	98.523 3	16.015 1	17.853 2	3.694 5	3.339 1	12.110 5	3.315 2	0.336 5	1.291 6	0.427 6	0.553 0
P9	87.962 7	12.716 1	17.450 8	4.893 3	2.908 8	11.239 8	1.956 8	0.376 6	1.015 2	0.897 5	0.577 9
P10	98.664 2	11.634 3	19.913 6	3.589 6	3.033 0	12.814 3	2.514 4	0.366 0	1.396 2	0.650 8	0.588 4
J1	80.371 9	12.004 9	20.013 3	3.944 9	2.867 3	10.196 0	3.352 0	0.249 8	1.001 2	0.280 6	0.389 4
J2	83.683 1	13.183 4	24.383 5	3.602 8	2.700 1	10.692 3	3.412 5	0.269 3	0.996 8	0.336 5	0.417 0
J3	82.457 6	12.895 9	22.778 6	3.413 1	2.979 3	10.503 2	3.011 6	0.248 1	0.851 1	0.520 9	0.386 5
J4	85.112 8	11.596 8	27.205 8	2.701 3	1.550 8	11.463 8	2.589 1	0.276 1	1.490 3	0.439 6	0.489 9
J5	80.266 8	13.721 1	24.315 3	4.414 9	3.732 6	10.623 9	2.304 5	0.349 1	0.951 1	0.541 3	0.499 3
J6	98.214 9	10.394 6	17.883 5	3.003 1	2.523 6	11.689 9	3.088 3	0.320 5	0.908 2	0.423 7	0.452 3
J7	99.310 7	10.982 3	26.513 9	3.985 1	2.874 9	13.702 0	2.351 6	0.306 9	0.983 7	0.876 9	0.481 1
J8	91.157 3	16.861 8	15.334 1	3.593 3	3.508 5	10.889 3	0.322 9	1.210 3	1.110 3	0.447 5	0.556 7
J9	83.012 4	13.443 5	15.418 2	4.779 7	3.123 8	10.013 8	2.003 3	0.361 2	1.003 8	0.884 7	0.581 3
J10	92.015 9	12.373 3	17.015 7	3.550 3	3.279 1	10.780 1	2.600 1	0.358 6	1.296 5	0.631 9	0.557 4

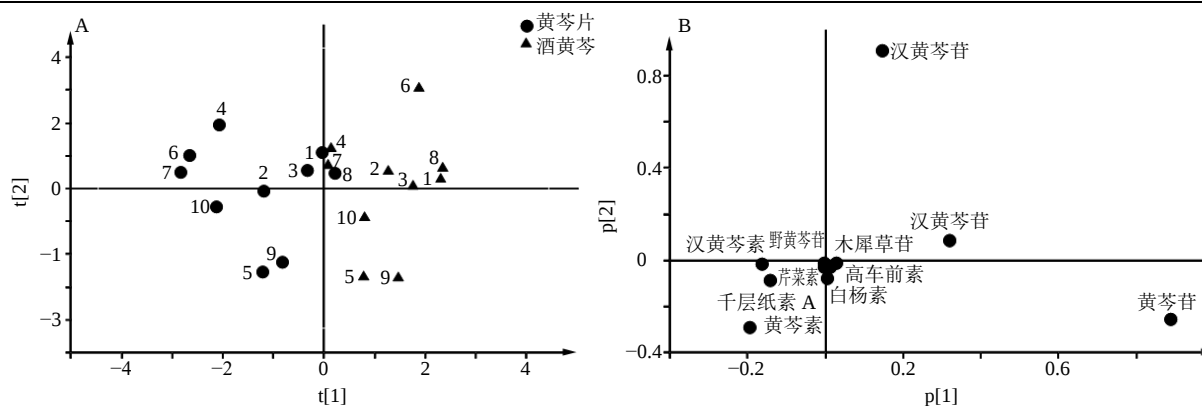


图 4 11 种黄酮类成分含量的 PCA 得分图 (A) 和载荷图 (B)

Fig. 4 Score scattering (A) and loading scattering plots (B) for 11 kinds of flavonoids

基本分布在第 2、3 象限，酒黄芩分布在第 1、4 象限。载荷图中显示，黄芩苷、汉黄芩苷、千层纸苷距原点较远，即代表黄芩苷、汉黄芩苷、千层纸苷的质量分数不同是引起黄芩酒炙前后成分差异的主要因素，与“2.4.10”项下结果一致，将这 3 种成分含量作为黄芩饮片质量控制的重点指标性成分较为合理。

3 讨论

3.1 提取条件的考察

对提取条件如提取方式（回流、超声）、提取溶剂（甲醇、95%乙醇）、提取溶剂体积分数（50%、70%、90%）、提取时间（15、30、45 min）等进行了考察。综合考虑各个因素，最终确定质谱定性及定量的提取方式均为超声，提取溶剂为 70% 甲醇，

提取时间为 30 min。

在配制对照品溶液时, 部分黄酮苷类成分难溶于甲醇, 如野黄芩苷; 部分黄酮苷元难溶于水, 如白杨素, 所以先将各对照品溶于 DMSO 中制成对照品储备液, 精准吸取各对照品储备液适量配成混合对照品, 再经 50% 甲醇水溶液稀释, 即可溶解各对照品, 又可减少溶液中 DMSO 的量, 降低对质谱的影响。

3.2 色谱、质谱条件的考察

在 Waters Acquity UPLC BEH 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 条件下, 考察了乙腈-水和甲醇-水 2 种流动相体系对黄芩的检测, 结果发现, 乙腈-水系统分离得到对称性较佳的色谱峰, 具有更好的分离效果。同时, 采用梯度洗脱, 考察了不同配比的流动相对黄芩中各化学成分的分离情况。另外, 分别对色谱条件如柱温 (30、35、40、43 °C)、体积流量 (0.2、0.3、0.4 mL/min) 等进行了考察。综合考虑各个因素, 确定了最终的色谱条件。

用针泵以 10 μL/min 的恒定体积流量注射黄芩苷对照品, 在 UPLC-Q-TOF/MS 模式下, 逐个微调毛细管电压, 锥孔电压, 离子源温度, 脱溶剂气温度, 反向锥孔气流, 脱溶剂气等离子源参数, 以使总离子流的响应值达到最佳。在 UPLC-TQ/MS 模式下, 对毛细管电压; 离子源温度; 脱溶剂气温度; 脱溶剂气流量; 锥孔气流量参数及各对照品主要质谱参数进行优化, 以使各成分达到定量分离度, MRM 响应值达到最佳。在定量模式的优化中, 白杨素在正离子模式下的响应值比负离子模式下响应值高出很多, 最终选择以正离子模式对白杨素进行定量分析。

3.3 小结

本研究采用中药特征图谱对黄芩片及酒黄芩进行整体质量分析, 共标定了 9 个共有峰, 经与对照品对照, 确定其中 6 个黄酮类成分。相似度评价结果 2 种饮片均在 0.947 以上, 表明本研究中 10 批次黄芩饮片质量较稳定, 酒黄芩的相似度均在 0.99 以上, 表明酒炙后质量趋于一致。利用 UPLC-Q-TOF/MS 法对黄芩片、酒黄芩进行了定性分析, 鉴定出 44 种成分, 主要为黄酮类成分, 结果表明黄芩酒炙前后并没有引起化学成分的增加及消失。UPLC-TQ/MS 定量结果表明, 黄芩苷、汉黄芩苷等黄酮苷类成分含量略有下降, 黄芩素、汉黄芩素等黄酮苷元类成分含量稍有增高。以成分含量为

变量进行 PCA 分析, 结果将 2 种饮片分成 2 类, 表明 2 种饮片在成分含量上具有差异性, 黄芩苷、汉黄芩苷、千层纸苷的含量是引起黄芩酒炙前后成分差异的主要因素。

本研究建立的特征图谱、UPLC-Q-TOF/MS 法、UPLC-TQ/MS 法稳定可靠, 重复性好, 可以为更全面评价黄芩质量提供参考。在进一步的研究中, 将以量-效思维对黄芩酒炙前后的饮片进行考察, 以期建立黄芩专属性饮片整体质量评价体系, 为阐明其药性变化的科学内涵提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 卫生部部颁标准中药成方制剂 (第二十册) [S]. 1998.
- [3] Shen J, Li P, He C N, et al. Simultaneous determination of 15 flavonoids from different parts of *Scutellaria baicalensis* and its chemometrics analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(1): 20-27.
- [4] 罗燕子. 中药黄芩的化学成分及药理作用的相关研究进展 [J]. *临床合理用药*, 2018, 10(11): 180-181.
- [5] 刘仁伟, 刘冰. 黄芩苷胶囊联合胸腺法新治疗慢性乙型肝炎的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(12): 3312-3316.
- [6] 龙宇, 向燕, 谭裕君, 等. 黄芩苷药理作用及新剂型的研究进展 [J]. *中草药*, 2019, 50(24): 6142-6148.
- [7] 李倩楠, 葛晓群. 黄芩苷的解热作用及对细胞因子的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(8): 1068-1072.
- [8] 吴婷, 周军挺, 王丽, 等. 黄芩炮制前后主要成分的比较研究 [J]. *浙江中医杂志*, 2015, 50(4): 303-304.
- [9] 杨欣文, 吴德康, 李俊松, 等. 黄芩炮制前后 6 种黄酮类成分含量的比较 [J]. *广东药学院学报*, 2012, 28(3): 282-286.
- [10] 李秀贤. 从化学成分变化及检测看黄芩炮制的质量控制 [J]. *广州化工*, 2017, 45(20): 22-24.
- [11] 杨武德, 石平宝, 王建科. 黄芩生品及不同炮制品中多糖和总糖的含量分析 [J]. *贵阳中医学院学报*, 2009, 31(4): 81-83.
- [12] 尹艳微, 姚广哲, 马文娟, 等. 疏血通注射液游离氨基酸的 UPLC 指纹图谱研究 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(7): 1350-1354.
- [13] 曹睿, 窦志华, 倪丽丽, 等. HPLC 指纹图谱、Q-TOF/MS 定性及多成分定量相结合的大黄饮片质量评价研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(5): 1100-1110.
- [14] 陈林伟, 秦昆明, 徐雪松, 等. 中药指纹图谱数据库的研究现状及展望 [J]. *中草药*, 2014, 45(21): 3041-3047.
- [15] 游飞翔, 袁雪海, 许浚, 等. 基于 HPLC-Q-TOF/MS 的六经头痛片化学成分分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(20):

- 4157-4166.
- [16] 罗益远, 刘娟秀, 王 峰, 等. 基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术分析何首乌代谢物积累的动态变化 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2105-2110.
- [17] 曹 妍, 李 婷, 许 霞, 等. 利用反相色谱-亲水作用色谱-预测多反应监测方法快速鉴定中药茵陈的化学成分组成 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(13): 2667-2674.
- [18] 赵建军, 高晓娟, 王英华, 等. 栽培黄芩与其对照药材的 HPLC 指纹图谱及近红外图谱比较研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4104-4109.
- [19] Xu J Y, Yu Y L, Shi R Y, *et al.* Organ-specific metabolic shifts of flavonoids in *Scutellaria baicalensis* at different growth and development stages [J]. *Molecules*, 2018, 23(2): 428-450.
- [20] He L L, Zhang Z F, Lu L Y, *et al.* Rapid identification and quantitative analysis of the chemical constituents in *Scutellaria indica* L. by UHPLC-QTOF-MS and UHPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 17(1): 125-139.
- [21] Wang H L, Cao J, Xu S Q, *et al.* Depletion of high-abundance flavonoids by metal complexation and identification of low-abundance flavonoids in *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 9(52): 107-117.
- [22] 刘大伟, 闫广利, 方 圆, 等. UPLC-ESI-TOF/MS 应用于黄芩化学成分的快速分析 [J]. 中医药信息, 2012, 29(4): 20-24.
- [23] 褚衍涛, 魏文峰, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析芩百清肺浓缩丸中的化学成分 [J]. 中成药, 2016, 38(6): 1303-1310.
- [24] 柴冲冲, 毛 民, 袁金凤, 等. 不同方法软化切制后的黄芩饮片颜色与 5 种黄酮类成分含量的相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(20): 4467-4475.