

UHPLC-MS/MS 法同时测定杏香兔耳风 13 种成分的含量

吴 蓓¹, 李军茂^{2,3}, 黄小方², 姚 闽⁴, 欧阳辉^{2,3}, 何明珍², 饶怡菲², 冯育林^{2,3*}, 杨世林^{2,3}

1. 南昌市食品药品检验所 南昌市中成药质量控制与安全性评价重点实验室, 江西 南昌 330038

2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

3. 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 江西 南昌 330006

4. 江西省药品检验检测研究院, 江西 南昌 330029

摘要: 目的 建立一种快速同时测定杏香兔耳风药材中 13 种成分含量的 UHPLC-MS/MS 方法。方法 采用超高效液相色谱-三重四级杆质谱技术检测, 色谱柱为 UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 柱温为 40 ℃, 流动相为 5 mmol 甲酸铵和 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱, 体积流量 0.25 mL/min, ESI 负离子采集, 雾化器和辅助气均为 344.5 kPa, 气帘气为 206.7 kPa, 喷雾电压为 -4 500 V, 离子化温度为 500 ℃, 13 种成分均采用多级反应监测模式 (MRM)。结果 在优化的液相-质谱条件下, 原儿茶酸、咖啡酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、木犀草苷、芹菜素的检测质量浓度线性范围分别为 1.099~274.800、1.006~100.600、1.080~1 080.000、83.12~8 312.00、19.92~996.00、1.076~269.000、5.555~555.500、4.420~4 420.000、44.76~17 904.00、48.00~9 600.00、2.108~210.800、4.136~413.600、1.070~107.000 ng/mL, 且线性关系良好 ($r \geq 0.9958$), 平均加样回收率 ($n=6$) 为 96.54%~99.75%, RSD 为 0.48%~0.96%, 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 3.90%。结论 该方法重复性和专属性好, 稳定可控, 可用于杏香兔耳风药材及其制剂的质量控制。

关键词: 杏香兔耳风; 质量控制; UHPLC-MS/MS; 木犀草素; 木犀草苷; 芹菜素; 原儿茶酸; 咖啡酸; 绿原酸

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)15-4025-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.15.023

Simultaneous determination of thirteen components in *Ainsliaea fragrans* by UHPLC-MS/MS

WU Bei¹, LI Jun-mao^{2,3}, HUANG Xiao-fang², YAO Min⁴, OUYANG Hui^{2,3}, HE Ming-zhen², RAO Yi-fei², FENG Yu-lin^{2,3}, YANG Shi-lin^{2,3}

1. Nanchang Key Laboratory of Quality and Safety Evaluation of Traditional Chinese Medicine, Nanchang Institute for Food and Drug Control, Nanchang 330038, China

2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

3. State Key Laboratory of Innovative Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Nanchang 330006, China

4. Jiangxi Institute for Drug Control, Nanchang 330029, China

Abstract: Objective To establish an UHPLC-MS/MS method for rapid and simultaneous determination of the content of 13 components in *Ainsliaea fragrans*. **Methods** The UHPLC-MS/MS method was performed on UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with acetonitrile-water (containing 0.1% formic acid and 5 mmol ammonium formate) as mobile phase for gradient elution. Flow rate was 0.25 mL/min and column temperature was 40 ℃. A triple quadrupole mass spectrometer equipped with electrospray ionization source (ESI) was applied in negative ion mode with the following parameters: ion spray, -4 500 V, ion source temperature, 500 ℃, curtain gas, 344.5 kPa, nebulizer (GS1), 344.5 kPa, heater gas (GS2), 206.7 kPa, and multiple reaction monitoring (MRM) was performed for quantitative analysis of these compounds. **Results** Under the optimized MS/MS condition, the linearity ranges of protocatechuic acid, caffeic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, 1,3-dicaffeoylquinic acid, 1,5-dicaffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid, luteolin, luteoloside and

收稿日期: 2020-01-06

基金项目: 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项 (2019YFC1712300); 国家自然科学基金资助项目 (81760702); 国家自然科学基金资助项目 (81560636); 江西省卫生厅项目 (2016A142); 江西省教育厅科技项目 (GJJ191640); 江西中医药大学校级研究生创新专项资金项目 (JZYC19)

作者简介: 吴 蓓, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药物分析。E-mail: wubei8@163.com

***通信作者:** 冯育林, 博士, 教授, 研究方向为中药活性成分。Tel: (0791)87119623 E-mail: fengyulin2003@126.com

apigenin were 1.099—274.800 ng/mL, 1.006—100.600 ng/mL, 1.080—1 080.000 ng/mL, 83.12—8 312.00 ng/mL, 19.92—996.00 ng/mL, 1.076—269.000 ng/mL, 5.555—555.500 ng/mL, 4.420—4 420.000 ng/mL, 44.76—17 904.00 ng/mL, 48.00—9 600.00 ng/mL, 2.108—210.800 ng/mL, 4.136—413.600 ng/mL, 1.070—107.000 ng/mL ($r \geq 0.9958$), respectively, with good linearity. The average recovery rate of thirteen compounds in the samples were in the range of 96.54%—99.75%, and the RSD range was from 0.48% to 0.96%. The RSD values of precision, stability and repeatability test were all less than 3.90%. **Conclusion** The method had good repeatability, high specificity, stability and controllability, and could be used for quality control of *A. fragrans* and its preparations.

Key words: *Ainsliaea fragrans* Champ.; quality control; UHPLC-MS/MS; luteolin; luteoloside; apigenin; protocatechuic acid; caffeic acid; chlorogenic acids

杏香兔耳风是江西省特色优势药材,为菊科兔耳风属植物杏香兔耳风 *Ainsliaea fragrans* Champ.,以全草入药。其具有清热、消积散结、止咳、凉血、解毒的功效,用于慢性宫颈炎,子宫内膜炎,盆腔炎,白带过多和色黄稠黏等疾病^[1-2]。研究结果表明,杏香兔耳风具有抗菌、抗炎、止血、抗病毒、保肝、细胞毒等药理学作用^[3]。其单方制剂杏香兔耳风片和复方杏香兔耳风颗粒具有清热解毒、祛瘀生新作用,用于湿热下注之带下病,表现为慢性宫颈炎、子宫内膜炎、盆腔炎、白带过多和色黄稠黏,具有显著的临床效果。因此杏香兔耳风片和复方杏香兔耳风颗粒广泛应用于临床治疗妇科疾病。

杏香兔耳风中包含了酚酸类、黄酮类、倍半萜内酯类等化学成分^[4-10]。相关研究发现酚酸类和黄酮类为主要活性成分,具有抗菌、抗炎等药理活性,同时也是该药材在临床上发挥疗效的物质基础。目前,杏香兔耳风药材质量标准分别收载在《江西省中药材标准》和《上海市药材标准》,其质量控制水平相对落后,且没有含量测定项^[11]。但也有部分研究仅以木犀草素、木犀草苷和绿原酸等成分作为评价杏香兔耳风质量标准,仍存在一定的局限性^[12-16]。本课题组前期对杏香兔耳风的化学成分及不同产地差异性化学成分进行了研究,共鉴定木犀草苷、木犀草素、芹菜素、原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸等 112 个化合物^[4,17]。因此,本研究采用超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱方法对不同产地的杏香兔耳风药材中木犀草苷、木犀草素、芹菜素、原儿茶酸、咖啡酸、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸 13 种成分的含量测定进行测定,为杏香兔耳风的质量控制提供依据。

1 材料与仪器

1.1 药材

药材采收于江西省修水县黄坳镇、江西省修水县庙岭镇和江西省南昌市梅岭镇(35批),见表1,经江西省南昌市食品药品检验所副主任药师吴蓓鉴定为菊科兔耳风属植物杏香兔耳风 *Ainsliaea fragrans* Champ. 全草。

1.2 试剂

对照品木犀草苷(批号 111720-201408)、木犀草素(批号 111520-201414)、芹菜素(批号 111901-201603)、原儿茶酸(批号 110809-201205)、咖啡酸(批号 110885-200102)、绿原酸(批号 110753-201415)均购买于中国食品药品检定研究院,质量分数均 $\geq 98\%$;新绿原酸(批号 130526)、隐绿原酸(批号 MUST-13013002)、1,3-二咖啡酰奎宁酸(批号 MUST-13063005)、1,5-二咖啡酰奎宁酸(批号 120926)、4,5-二咖啡酰奎宁酸(批号 D100624)、3,4-二咖啡酰奎宁酸(批号 D100624)、3,5-二咖啡酰奎宁酸(批号 D1100623)均购买于成都普菲德生物技术有限公司,质量分数均 $\geq 98\%$;甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, 美国);甲酸、甲酸铵(色谱纯, Sigma-Aldrich Co. Ltd, St Louis, MO, 美国);蒸馏水(屈臣氏集团),其余试剂为分析纯。

1.3 仪器

AB Tripie 4500 高分辨质谱仪(美国 Sciex 公司);Analyst TF 1.6 数据处理系统(美国 Sciex 公司);LC-30A 超高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括 LC-30AD 高压输液泵, CBM-20A 系统控制器, SIL-30AC 自动进样器, DUG-20A5 在线脱气机, CTO-30A 柱箱; KQ250DB 型数控超声清洗器(巩义市予华仪器有限公司);AL204 型电子分析天平 [Mettler Toledo 仪器(上海)有限公司]; HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);MCE 微孔滤膜 [孔径 0.22 μm , 岛津技术(上海)商贸有限公司]。

表 1 杏香兔耳风药材来源
Table 1 Sources of *A. fragrans*

来源	药材编号	来源	药材编号	来源	药材编号
江西南昌	N16501	江西修水黄坳	H16501	江西修水庙岭	M16601
江西南昌	N16502	江西修水黄坳	H16502	江西修水庙岭	M16602
江西南昌	N16503	江西修水黄坳	H16503	江西修水庙岭	M16603
江西南昌	N16504	江西修水黄坳	H16504	江西修水庙岭	M16604
江西南昌	N16505	江西修水黄坳	H16505	江西修水庙岭	M16605
江西南昌	N16506	江西修水黄坳	H16506	江西修水庙岭	M16606
江西南昌	N16507	江西修水黄坳	H16507	江西修水庙岭	M16607
江西南昌	N16508	江西修水黄坳	H16508	江西修水庙岭	M16608
江西南昌	N16509	江西修水黄坳	H16509	江西修水庙岭	M16609
江西南昌	N16510	江西修水黄坳	H16510	江西修水庙岭	M16610
江西南昌	N16511	江西修水黄坳	H16511	江西修水庙岭	M16611
江西南昌	N16512	江西修水黄坳	H16512		

2 方法与结果

2.1 液质条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱, 流动相为 5 mmol 甲酸铵和 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B); 梯度洗脱, 0 min, 8% B; 5 min, 15% B; 5.10 min, 11% B; 9 min, 17% B; 12 min, 17% B; 15 min, 95% B; 最后 5 min 平衡柱子。体积流量 0.25 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 1 μL。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子化源 (ESI); 扫描方式为多级反应监测模式 (MRM), 检测离子 (见表 2); 喷雾电压 (ISVF) -4 500 V; 雾化气温度 (TEM) 500 °C; 雾化器 (GS1) 和辅助气 (GS2) 均为 344.5 kPa, 气帘气为 206.7 kPa。13 个指标成分的质谱参数见表 2。

2.2 供试品溶液的制备

取杏香兔耳风药材粉末 (过 4 号药筛) 1.0 g 置于 50 mL 锥形瓶, 加入 70% 甲醇 30 mL, 称定质量, 超声提取 45 min 后, 放冷至室温, 用 70% 甲醇溶液补足至原来的质量, 摇匀, 冷却取上清液, 12 000 r/min 离心 10 min, 稀释 40 倍, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取对照品 1,3-二咖啡酰奎宁酸 (11.11 mg)、咖啡酸 (10.02 mg)、绿原酸 (10.39 mg)、3,5-二咖啡酰奎宁酸 (11.05 mg)、木犀草素 (10.34 mg)、新绿原酸 (10.80 mg)、木犀草苷 (10.54 mg)、

表 2 优化的条件参数

Table 2 Optimized conditional parameters

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
原儿茶酸	153.02	109.03	-100	-25
咖啡酸	179.03	135.04	-100	-25
新绿原酸	353.08	191.05	-100	-28
绿原酸	353.08	191.05	-100	-28
隐绿原酸	353.08	191.05	-100	-28
1,3-二咖啡酰奎宁酸	515.11	353.08	-100	-28
1,5-二咖啡酰奎宁酸	515.11	353.08	-100	-28
3,4-二咖啡酰奎宁酸	515.11	353.08	-100	-28
3,5-二咖啡酰奎宁酸	515.11	353.08	-100	-28
4,5-二咖啡酰奎宁酸	515.11	353.08	-100	-28
木犀草素	285.04	133.09	-100	-40
木犀草苷	477.09	285.04	-100	-30
芹菜素	269.04	117.03	-100	-35

隐绿原酸 (9.96 mg)、原儿茶酸 (10.99 mg)、1,5-二咖啡酰奎宁酸 (11.19 mg)、3,4-二咖啡酰奎宁酸 (11.05 mg)、芹菜素 (10.70 mg) 和 4,5-二咖啡酰奎宁酸 (10.76 mg), 分别置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并定容, 配制 1.00 mg/mL 的储备液, 4 °C 保存。使用前, 70% 甲醇溶液稀释到所需的质量浓度。

2.4 专属性考察

分别精密吸取混合对照品溶液和杏香兔耳风供试品溶液各 2 μL, 按“2.1”项下液相-质谱条件进样分析。杏香兔耳风药材溶液中被测定成分与 13 种对照品的保留时间相同。被测定成分分离效果良好, 无其他干扰, 比较各测定成分和对照品的质谱图, 见图 1, 两者一致, 表明本法专属性良好。

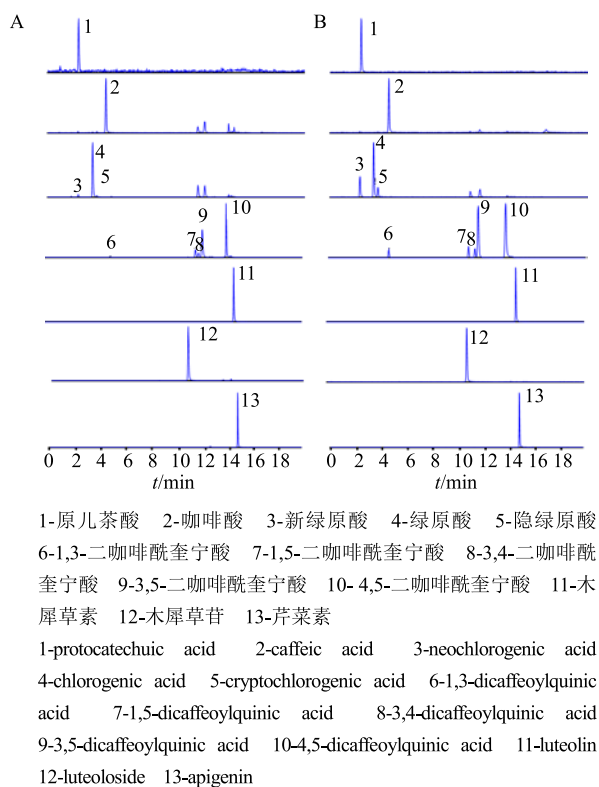


图 1 供试品溶液 (A) 和对照品溶液 (B) 的 UHPLC-MS/MS 图谱

Fig. 1 UHPLC-MS/MS chromatograms of sample (A) and reference substances (B)

2.5 线性关系考察

精密吸取“2.3”项下制备的混合对照品溶液适量,依次稀释,制得 6 个不同质量浓度线性工作液,制备 2 份工作曲线。按“2.1”项下液相-质谱条件进样分析。以峰面积为纵坐标 (Y),对照品质量浓度为横坐标 (X),进行线性回归,得到回归方程,见表 3。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.3”项下制备的混合对照品储备液适量,分别用 70% 甲醇稀释所需浓度的混合对照品溶液。按“2.1”项下液相-质谱条件进样分析,分别连续进样 6 次,测得原儿茶酸、咖啡酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、木犀草苷、芹菜素峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 1.82%、0.65%、1.70%、1.54%、2.18%、1.32%、1.24%、2.38%、0.83%、1.66%、1.96%、1.53%、1.64%,表明该仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一批次(H16511)杏香兔耳风药材,按“2.2”

表 3 回归方程、线性范围考察结果

Table 3 Results of regression equations and linear ranges

化合物	回归方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	r
原儿茶酸	$Y=1\ 805\ X+469.1$	1.099~274.800	0.999 7
咖啡酸	$Y=8\ 967\ X+289.8$	1.006~100.6.000	0.998 9
新绿原酸	$Y=2\ 427\ X+206.5$	1.080~1 080.000	0.999 1
绿原酸	$Y=626.48\ X+8\ 331$	83.120~8 312.000	0.997 5
隐绿原酸	$Y=597.51\ X+1\ 416.1$	19.920~996.000	0.998 7
1,3-二咖啡酰奎宁酸	$Y=2\ 946.7\ X+912.5$	1.076~269.000	0.999 4
1,5-二咖啡酰奎宁酸	$Y=2\ 954.3\ X+464.8$	5.555~555.500	0.997 4
3,4-二咖啡酰奎宁酸	$Y=1\ 425.1\ X+759.8$	4.420~4 420.000	0.998 3
3,5-二咖啡酰奎宁酸	$Y=1\ 916.1\ X+5\ 852.4$	44.760~17 904.000	0.996 5
4,5-二咖啡酰奎宁酸	$Y=2\ 013.2\ X+6\ 430.8$	48.000~9 600.000	0.991 5
木犀草素	$Y=10\ 275\ X+12\ 746$	2.108~210.800	0.993 0
木犀草苷	$Y=2\ 133.2\ X+450.2$	4.136~413.600	0.998 2
芹菜素	$Y=5\ 116\ X+1\ 514.8$	1.070~107.000	0.998 0

项下方法平行制备供试品溶液,分别于样品制备后 0、2、4、8、12、24 h 按“2.1”项下液相-质谱条件进样分析,测定峰面积,结果显示原儿茶酸、咖啡酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、木犀草苷、芹菜素峰面积的 RSD ($n=6$) 分别为 2.39%、3.53%、2.33%、2.21%、2.04%、3.45%、2.41%、2.31%、3.06%、1.19%、1.81%、2.95%、1.53%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取同批次(H16511)杏香兔耳风药材,按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按“2.1”项下液相-质谱条件进样分析,测定峰面积,计算原儿茶酸、咖啡酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、木犀草苷、芹菜素质量分数的 RSD ($n=6$) 分别为 3.68%、2.46%、1.80%、0.86%、3.06%、3.88%、1.86%、1.61%、1.29%、3.30%、2.76%、1.02%、2.08%。表明所建立的方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的同一批(H16511)杏香兔耳风药材粉末 6 份,每份取约 1.0 g,精密称定,精密加入混合对照品溶液适量,按“2.2”项下方法制备供试

品溶液,测定,计算加样回收率,结果原儿茶酸、咖啡酸、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸、木犀草素、木犀草苷、芹菜素平均加样回收率分别为 97.64%、96.54%、98.15%、97.25%、97.18%、97.32%、99.27%、98.24%、99.18%、97.67%、99.75%、96.63%、97.16%,RSD 分别为 0.52%、0.54%、0.89%、0.53%、0.61%、0.57%、0.94%、0.48%、0.62%、0.70%、0.89%、0.55%、0.96%。

2.10 各个产地杏香兔耳风药材中 13 种成分的含量测定结果

取各批药材样品适量,按“2.2”项下方法制备

供试品溶液,按“2.1”项下液相-质谱条件进样分析,平行测定 3 次,测定每种指标性成分峰面积,计算 13 种成分的含量,江西省南昌市梅岭镇、江西省修水县黄坳镇和江西省修水县庙岭镇的结果分别见表 4~6。结果表明,不同产地 13 种成分的含量差异性很大,而同一产地的杏香兔耳风药材中 13 种成分的含量存在差异性。江西南昌产地、江西修水黄坳产地和江西修水庙岭产地杏香兔耳风药材中 13 种成分的含量测定结果可知:咖啡酸、木犀草素和芹菜素含量较低,难以反映杏香兔耳风内在质量,因此,测定其含量意义不大,建议不作为质量控制成分;单咖啡酰奎宁酸和二咖啡酰奎宁酸在江西南昌产地、江西修水黄坳产地和江西修水庙

表 4 12 批南昌产地杏香兔耳风测定结果

Table 4 Content determination of 12 batches of *A. fragrans* from Nanchang

编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)												
	原儿茶酸	咖啡酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	1,3-二咖啡酰奎宁酸	1,5-二咖啡酰奎宁酸	3,4-二咖啡酰奎宁酸	3,5-二咖啡酰奎宁酸	4,5-二咖啡酰奎宁酸	木犀草素	木犀草苷	芹菜素
N16501	16.510	5.141	205.80	14 876	823.3	8.86	311.0	631.8	11 858	1991.0	3.249	59.660	—
N16502	7.361	3.385	85.39	8 777	503.5	5.18	228.9	426.8	9 554	1432.0	2.066	—	—
N16503	—	4.598	127.90	12 365	637.5	7.40	551.3	277.0	7 863	1284.0	2.271	225.400	—
N16504	14.050	6.162	169.90	10 947	533.3	24.28	385.7	566.8	7 803	1480.0	2.908	27.990	—
N16505	14.130	4.403	88.52	11 201	545.8	51.05	259.2	318.9	7 284	1390.0	3.511	28.020	—
N16506	5.004	2.594	80.35	7 696	356.9	50.27	265.3	180.6	3 022	949.7	1.764	—	—
N16507	8.778	4.756	256.10	16 759	1 011.0	14.58	169.4	330.7	6 382	1043.0	2.564	46.600	—
N16508	22.240	2.071	142.70	18 295	887.5	18.32	212.9	357.7	7 240	972.6	2.399	69.300	—
N16509	22.950	3.129	162.50	11 703	576.4	27.53	185.6	262.4	5 708	968.6	1.920	39.000	—
N16510	22.950	3.891	96.98	14 356	562.5	29.70	226.5	204.1	4 656	480.4	2.421	88.420	—
N16511	5.324	5.597	176.40	13 115	646.5	36.36	235.6	201.1	6 162	791.1	2.713	77.810	—
N16512	5.229	2.850	67.72	9 596	384.9	24.08	201.4	193.6	6 038	663.4	1.488	132.700	—

“—”为痕量,低于定量限,下同

“—” is a trace amount, below the limit of quantification, the same below

表 5 12 批黄坳产地杏香兔耳风测定结果

Table 5 Content determination of 12 batches of *A. fragrans* from Huangao

编号	质量分数/(μg·g ⁻¹)												
	原儿茶酸	咖啡酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	1,3-二咖啡酰奎宁酸	1,5-二咖啡酰奎宁酸	3,4-二咖啡酰奎宁酸	3,5-二咖啡酰奎宁酸	4,5-二咖啡酰奎宁酸	木犀草素	木犀草苷	芹菜素
H16501	42.78	4.947	102.5	9 627	477.5	20.51	270.5	373.5	4 201	1 147.0	5.035	146.900	4.331
H16502	26.81	3.965	53.8	2 992	157.2	8.55	87.8	167.8	2 041	814.3	3.852	455.200	9.773
H16503	71.95	5.608	131.9	11 827	614.9	15.15	223.7	282.5	6 869	1 162.0	4.057	146.800	6.863
H16504	19.29	4.208	100.9	10 547	485.4	39.39	98.5	214.9	4 201	757.4	4.694	95.800	1.907
H16505	26.15	4.936	113.4	9 519	457.4	115.90	327.4	395.5	5 030	1 190.0	5.297	78.800	2.799
H16506	21.87	3.380	93.8	7 254	388.6	50.13	221.4	249.9	3 664	1 048.0	3.550	68.100	2.389
H16507	31.38	3.638	67.0	9 050	440.4	100.80	256.5	186.0	2 817	839.6	4.350	146.300	2.701
H16508	16.68	3.911	116.1	14 710	793.5	26.90	170.4	161.6	4 625	650.6	4.185	253.500	1.614
H16509	35.16	17.930	103.1	13 245	697.5	—	67.5	156.3	3 555	727.2	3.706	185.400	9.628
H16510	29.96	2.254	26.4	2 514	93.3	83.10	136.2	93.0	1 022	544.1	4.207	149.100	3.717
H16511	40.18	4.489	105.9	9 121	362.1	23.10	290.5	203.4	3 726	830.5	4.499	236.600	6.520
H16512	32.32	7.207	79.2	8 354	376.3	—	70.2	228.6	3 694	834.5	3.274	263.900	6.165

表 6 11 批庙岭产地杏香兔耳风测定结果

Table 6 Content determination of 11 batches of *A. fragrans* from Miaoling

编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)										木犀草素	木犀草苷	芹菜素
	原儿茶酸	咖啡酸	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	1,3-二咖啡 酰奎宁酸	1,5-二咖啡 酰奎宁酸	3,4-二咖啡 酰奎宁酸	3,5-二咖啡 酰奎宁酸	4,5-二咖啡 酰奎宁酸			
M16501	9.33	1.803	21.43	1 433	453.9	5.58	56.3	68.2	1 007.0	327.9	10.010	37.500	13.530
M16502	11.73	2.503	77.79	8 005	303.9	—	63.6	139.6	3 887.0	662.5	17.680	90.100	1.914
M16503	8.04	1.978	79.18	11 321	474.3	29.72	107.8	138.6	3 319.0	546.8	8.630	193.600	—
M16504	14.70	5.849	97.75	10 320	419.6	66.45	104.4	217.0	4 324.0	1 010.0	5.310	308.900	2.190
M16505	19.16	6.677	97.70	10 390	426.9	22.11	82.55	199.2	5 249.0	884.8	6.940	83.480	2.445
M16506	24.66	2.530	83.12	7 480	345.8	10.82	216.3	226.3	3 026.0	852.2	5.570	130.800	3.511
M16507	17.45	3.023	78.54	7 258	290.9	12.70	234.9	206.4	3 089.0	912.6	6.940	123.700	3.030
M16508	50.15	12.27	89.18	7 583	280.2	—	127.3	186.5	3 264.0	755.1	10.230	78.300	7.141
M16509	26.35	4.095	20.68	1 158	26.4	—	31.7	43.2	459.2	168.2	39.280	325.900	6.517
M16510	20.35	3.973	100.2	8 796	362.6	27.73	327.6	259.3	2 985.0	904.1	4.106	182.900	4.024
M16511	18.29	3.209	86.06	8 649	318.9	18.39	64.3	112.8	2 712.0	577.9	15.880	—	2.268
M16501	9.33	1.803	21.43	1 433	453.9	5.576	56.3	68.2	1 007.0	327.9	10.010	37.500	13.530

岭产地杏香兔耳风药材中含量较高,而黄酮含量相对比较低;绿原酸在单咖啡酰奎宁酸中含量最高,3,5-二咖啡酰奎宁酸在二咖啡酰奎宁酸中含量最高,木犀草苷在黄酮中含量最高。因此,它们可以作为杏香兔耳风药材质量控制的指标。3个产地比较,江西修水黄坳产地中的原儿茶酸、咖啡酸、木犀草素和芹菜素含量相对比较高。不同产地13种成分的含量差异性很大,而同一产地的杏香兔耳风药材中13种成分的含量存在差异性。药材市场以野外采收的杏香兔耳风药材为主,根据上述测定结果可知,其质量不一,难以控制其质量标准。可能影响其含量差异的因素与其生长环境如光照、湿度、海拔,经纬度等有关,为了更好地控制杏香兔耳风药材在市场中的质量,建议人工规范化种植,从而为杏香兔耳风片剂及胶囊提供质量可靠的药材,同时为其制剂临床应用提供强有力的保障。

3 讨论

基于化合物的峰形,本实验对甲醇-水和乙腈-水作为流动相进行考察,结果表明甲醇-水作为流动相时显示拖尾峰,而乙腈-水作为流动相拖尾峰明显改善;基于化合物的质谱响应及同分异构体的分离效果,对乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水和乙腈-0.1%甲酸和5 mmol/L 甲酸铵水作为流动相进行考察,结果表明水相添加甲酸容易使化合物离子化,从而提高化合物的质谱响应,添加甲酸铵的目的是提高化合物的分离度。基于待测化合物存在很多同分异构,且难于分离,本实验过程对不同色谱柱分离效果进行考察:Waters XTerra C₁₈ (50 mm×2.1 mm,

5 μm)、Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)和Welch UHPLC C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),结果表明仅有Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱能够满足分离度要求。因此,根据上述考察结果,本实验选择乙腈-0.1%甲酸和5 mmol/L 甲酸铵水作为流动相,Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱作为分离系统。

本研究建立的同时测定杏香兔耳风中木犀草苷、原儿茶酸、绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、1,3-二咖啡酰奎宁酸、1,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、4,5-二咖啡酰奎宁酸含量的UHPLC-MS/MS方法,该方法操作简便,精密度高,专属性、重复性和稳定性好,为全面控制杏香兔耳风药材及其制剂的质量提供依据,并具有指导意义。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海: 上海人民出版社, 1977.
- [2] 江西省中药材标准 [S]. 1996.
- [3] 徐希科, 柳润辉, 李慧梁, 等. 兔耳风属植物的化学和药理研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2009, 27(4): 245-247.
- [4] Ou Y H, Li J, Wu B, et al. A robust platform based on ultra-high performance liquid chromatography Quadrupole time of flight tandem mass spectrometry with a two-step data mining strategy in the investigation, classification, and identification of chlorogenic acids in *Ainsliaea fragrans* Champ. [J]. *J Chromatogr A*, 2017,

- 1502: 38-50.
- [5] 邢春秀, 谢 宁, 杨念云. 杏香兔耳风的化学成分 [J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(2): 107-109.
- [6] 刘 戈, 汪 豪, 吴 婷, 等. 菊科植物杏香兔耳风的化学成分 [J]. 中国天然药物, 2007, 5(4): 266-268.
- [7] 张 锐, 曾宪仪, 张正行. 杏香兔耳风的化学成分研究 (II) [J]. 中草药, 2006, 37(3): 347-348.
- [8] Wang Y, Liu B. Preparative isolation and purification of dicaffeoylquinic acids from the *Ainsliaea fragrans* Champ. by high-speed counter-current chromatography [J]. *Phytochem Anal*, 2007, 18(5): 436-440.
- [9] Bohlmann F, Zhong L C. Guaianolides from *Ainsliaea fragrans* [J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(8): 2120-2122.
- [10] Feng F, Chen M H, Xing C X, *et al.* Two novel sesquiterpenoids from *Ainsliaea fragrans* Champ. [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(10): 856-860.
- [11] 上海市中药材标准 [S]. 1994.
- [12] 郭浩杰, 邹盛勤. HPLC 法测定不同产地杏香兔耳风中绿原酸和木犀草素的含量 [J]. 中国药师, 2014, 17(6): 929-931.
- [13] 王英锋, 谢亮亮, 刘锁兰, 等. HPLC 法测定杏香兔耳风中绿原酸和 3,5-*O*-二咖啡酰基奎宁酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(3): 430-432.
- [14] 冯育林, 张武岗, 孙丽仁, 等. HPLC 法测定杏香兔耳风中绿原酸, 3,5-二咖啡酰奎宁酸和木犀草素 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 513-514.
- [15] 黄 骏, 苏 丹, 宋永贵, 等. 不同产地杏香兔耳风酚酸类成分含量比较 [J]. 中药材, 2014, 37(8): 1340-1342.
- [16] 曲伟欣, 张 璐, 汪 豪, 等. HPLC-ELSD 法测定杏香兔耳风 3 个倍半萜内酯的含量 [J]. 药学与临床研究, 2009(3): 207-209.
- [17] 吴 蓓, 彭春燕, 李军茂, 等. 基于 UFLC-Q-TOF-MS/MS 技术及 PCA 分析的不同产地杏香兔耳风药材差异研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4165-4171.