

文章编号:1001-6880(2015)1-0073-05

UPLC-MRM-MS 法测定头花蓼药材中 7 个指标成分

刘 跃¹,胡 杰¹,谢玉敏¹,黄 勇¹,廖尚高²,郑 林^{*}¹贵阳医学院 药学院 贵州省药物制剂重点实验室; ²贵阳医学院 民族药与中药开发利用教育部工程研究中心,贵阳 550004

摘要:建立头花蓼药材中没食子酸、原儿茶酸、陆地棉苷、槲皮苷、儿茶素、槲皮素-3-O-(2"-没食子酰基)-鼠李糖苷及槲皮素的 UPLC-MRM-MS 检测方法。色谱采用 Waters BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 色谱柱,以 0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相,梯度洗脱,质谱采用多反应离子监测 (MRM) 检测。没食子酸、原儿茶酸、陆地棉苷、槲皮苷、儿茶素、槲皮素-3-O-(2"-没食子酰基)-鼠李糖苷及槲皮素分别在 0.136 ~ 32.965、0.031 ~ 7.481、0.022 ~ 5.300、0.076 ~ 18.433、0.085 ~ 20.737、0.017 ~ 4.147、0.128 ~ 31.029 μg/mL 浓度范围线性关系良好,平均回收率为 91.23% ~ 105.33%, RSD < 3%, 精密度、重复性和稳定性良好。此方法操作简便,快速,灵敏度高,可用于头花蓼药材中主要活性成分的含量测定,并为头花蓼药材质量控制提供了新方法。

关键词:头花蓼;UPLC-MRM-MS;没食子酸;原儿茶酸;槲皮素;含量测定

中图分类号:R927.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2015.01.015

Determination of Seven Components in *Polygonum capitatum* by UPLC-MRM-MS

LIU Yue¹, HU Jie¹, XIE Yu-min¹, HUANG Yong¹, LIAO Shang-gao², ZHENG Lin^{1*}¹Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Guiyang Medical College;²Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

Abstract: To establish a UPLC-MRM-MS method for the determination of gallic acid, protocatechuic acid, que-3-O-β-D-Glc, quercitrin, catechin, que-3-O-(2"-O-galloyl)-β-D-Glc and quercetin in *Polygonum capitatum*. The analysis was achieved by BEH C₁₈ column with a mobile phase composed of 0.1% formic acid in acetonitrile and 0.1% formic acid in water using gradient elution. A TQD tandem mass spectrometry was used as detector and operated by multiple reaction monitoring (MRM) mode. Good linearity was achieved for these components in the range of 0.136-32.965, 0.031-7.481, 0.022-5.300, 0.076-18.433, 0.085-20.737, 0.017-4.147, 0.128-31.029 μg/mL, respectively. The average recoveries were 91.23% -105.33%, with RSD less than 3%. Precision, repeatability and stability were good. The developed method was simple, rapid, sensitive and suitable for the determination of the main active constituents in *P. capitatum*. It provided a new method for the quality control of *P. capitatum*.

Key words: *Polygonum capitatum*; UPLC-MRM-MS; gallic acid; protocatechuic acid; quercetin; content determination

头花蓼又名四季红、石莽草等,为蓼科植物头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don 的干燥全草或地上部分,在《苗族医药学》、《中华本草·苗药卷》、《贵州植物志》、2003 版《贵州省中药、民族药质量标准》中均有收载,现广泛用于治疗泌尿系统感染,泌尿系统结石,急、慢性尿道炎等泌尿系统疾病^[1]。目前,以头花蓼为原料药已开发并上市了热淋清颗粒、宁泌泰胶囊、四季草颗粒等各种单复

方苗药制剂。据文献报道,头花蓼的化学成分主要包括挥发油、黄酮类及酚酸类等化合物^[2-6],其药理活性研究表明,其内含有的酚酸及黄酮类具有一定的抗氧化活性,为头花蓼的主要药效成分^[7-9]。

2003 版《贵州省中药、民族药质量标准》中仅收录用高效液相法测定槲皮素这一单一成分,尽管目前已有不少学者对头花蓼当中的没食子酸、槲皮苷及槲皮素等成分进行了含量测定^[10,11],以多指标成分对头花蓼药材进行全面质量评价尚未报道。基于此,本文以没食子酸、原儿茶酸、杨梅苷、陆地棉苷、槲皮苷、槲皮素-3-O-(2"-没食子酰基)-鼠李糖苷、槲皮素及儿茶素这 7 个成分为检测指标,应用专属性

收稿日期:2014-06-20 接受日期:2014-09-16

基金项目:国家自然科学基金项目(81260688, 81160516); 国家科技支撑计划(2013BAI11B01); 贵州省国际科技合作计划(2012-7040)

* 通讯作者 Tel:86-851-6908468; E-mail: mailofzl@126.com

强,灵敏度高,快速准确的 UPLC-MRM-MS 法对头花蓼药材进行全面的含量测定,进一步为头花蓼及其相关制剂质量评价及其资源的综合开发、利用提供参考。

1 材料与仪器

1.1 材料

葛根素对照品(中国食品药品检定研究院,批号 0752-9605,纯度≥98%),没食子酸(中国固体制剂制造技术国家工程研究中心,批号 M20-101209,纯度≥98%),原儿茶酸、杨梅苷(四川省维克奇生物科技有限公司,批号 110306,111018,纯度≥98%),陆地棉苷、槲皮苷、槲皮素-3-O-(2"-没食子酰基)-鼠李糖苷、槲皮素及儿茶素实验室自制(采用¹H NMR、¹³C NMR、MS、UV、IR 波谱进行结构鉴定,用 UPLC-PDA 在多个检测波长下测定,其峰面积归一化结果均大于 98),甲醇(天津科密欧化学试剂有限公司)、乙腈(德国 Merck 公司)为色谱纯,其余溶剂均为分析纯,水为超纯水。头花蓼药材:共 6 批样品,来源于贵州施秉头花蓼 GAP 基地及贵州主要产地,由贵阳医学院龙庆德副教授鉴定为蓼科植物头花蓼 *Polygonum capitatum* Buch.-Ham. ex D. Don 的干燥全草。

1.2 仪器设备

ACQUITY 系统超高液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(美国 Waters 公司,包括二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、三重四级杆质谱分析器和 Masslynx4.1 质谱工作站)。

2 实验方法

2.1 标准溶液的配制

对照品溶液:精密称取没食子酸等 7 种对照品适量,分别置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容至刻度,摇匀。得没食子酸(1.073 mg/mL)、原儿茶酸

(0.974 mg/mL)、陆地棉苷(0.690 mg/mL)、槲皮苷(1.020 mg/mL)、儿茶素(0.902 mg/mL)、槲皮素-3-O-(2"-没食子酰基)-鼠李糖苷(0.540 mg/mL)及槲皮素(1.010 mg/mL)的对照品储备液。分别精密量取没食子酸等七种对照品储备液适量,用甲醇按梯度稀释成所需浓度,得混合系列标准溶液。置冰箱(-20 ℃)保存,备用。

内标溶液:精密称取葛根素 10.33 mg,用甲醇定容至 25 mL,获得葛根素 0.413 mg/mL 的储备液。取内标储备液适量至 5 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制成 20 μg/mL 的内标溶液,置冰箱(-20 ℃)保存,备用。

2.2 供试品溶液的制备

取本品细粉约 0.5000 g,精密称定,置 50 mL 具塞锥形瓶中,精密加入甲醇-25% 盐酸溶液(4:1)混合液 25 mL,称定重量(精确至 0.01 g),置水浴中加热回流 1 h,放冷,称重,用提取液补足减失的重量,摇匀,滤过,精密吸取续滤液 5 mL 至 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液,即得。

2.3 色谱条件

色谱柱:Waters BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 柱,保护柱:Waters Van Guard BEH C₁₈ (2.1 mm × 5 mm, 1.7 μm);流速:0.35 mL/min;柱温:45 ℃;进样体积为 1 μL;流动相:0.1% 甲酸乙腈(A)-0.1% 甲酸水(B);梯度洗脱程序如下:0~1.5 min, 5%~30% (A);1.5~3 min, 30%~90%;3~4 min, 90%;4~5 min, 90%~5%。

2.4 质谱条件

采用电喷雾电离源(ESI),毛细管电离电压 3 kV,离子源温度 120 ℃;去溶剂气 N₂,流速 650 L/h,去溶剂气温度 350 ℃;碰撞气 Ar,流速 0.16 mL/min。扫描方式为多反应离子监测(MRM),监测离子见表 2。

表 1 多反应离子检测质谱条件

Table 1 MRM analysis parameters for the 7 targeted compounds

分析物 Analyte	母离子 Parent ion (<i>m/z</i>)	子离子 Daughter ion (<i>m/z</i>)	锥孔电压 Cone voltage (v)	碰撞电压 Collision voltage (v)
1	169.0	125.0	35	15
2	152.9	109.0	35	15
3	465.2	303.0	30	15
4	449.2	303.1	20	10

5	289.1	245.1	45	15
6	601.3	299.1	30	10
7	303.2	153.1	45	40

注:分析物 1~7 分别为没食子酸、原儿茶酸、陆地棉苷、槲皮苷、儿茶素、槲皮素-3-O-(2"-没食子酰基)-鼠李糖苷及槲皮素。

Note: Analyte 1-7 are gallic acid, protocatechuic acid, que-3-O-β-D-Glc, quercitrin, catechin, que-3-O-(2"-O-galloyl)-β-D-Glc and quercetin, respectively.

3 实验结果

3.1 专属性试验

精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液适量并分别加入内标(葛根素)溶液,15000 rpm 离心 5

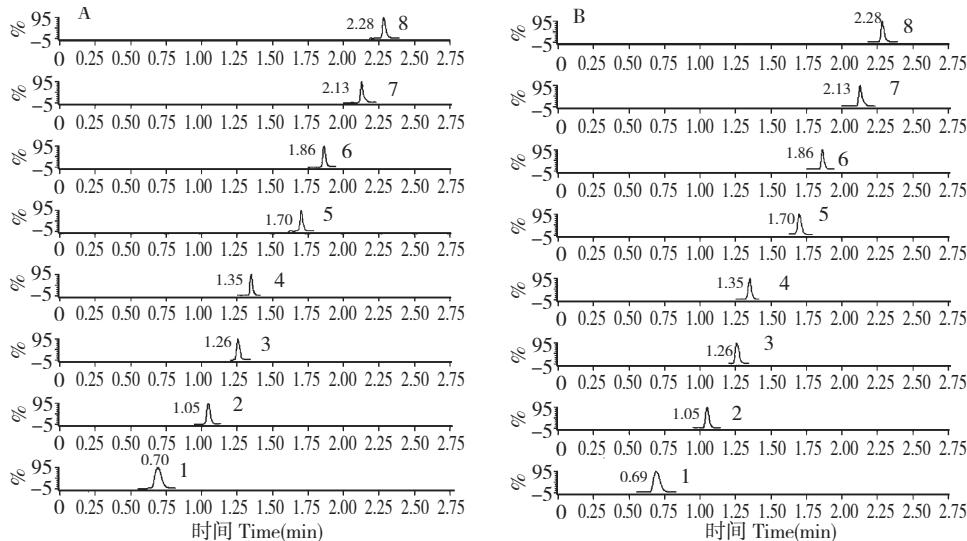


图 1 混合对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的 UPLC-MRM-MS 图谱

Fig. 1 UPLC-MRM-MS chromatogram of reference substances (A) and sample (B)

注:1. 没食子酸,2. 原儿茶酸,3. 儿茶素,4. 葛根素,5. 陆地棉苷,6. 槲皮苷,7. 槲皮素-3-O-(2"-没食子酰基)-鼠李糖苷,8. 槲皮素

Note: 1: gallic acid, 2: protocatechuic acid, 3: catechin, 4: puerarin, 5: que-3-O-β-D-Glc, 6: quercitrin, 7: que-3-O-(2"-O-galloyl)-β-D-Glc, 8: quercetin

3.2 线性试验

精密吸取“2.1”项下制备的混合对照品溶液适量,依次稀释,制得 6 个浓度的系列浓度线性工作液,分别进样测定。以待测物的峰面积与内标峰面

min, 取上清液分别进样, 结果见图 1。由此结果可看出成分间分离良好, 未见杂质干扰, 供试品溶液中被测成分与 7 个对照品的保留时间相同, 通过比较被测定成分和对照品的母离子、子离子质谱图, 两者一致, 表明本法专属性良好。

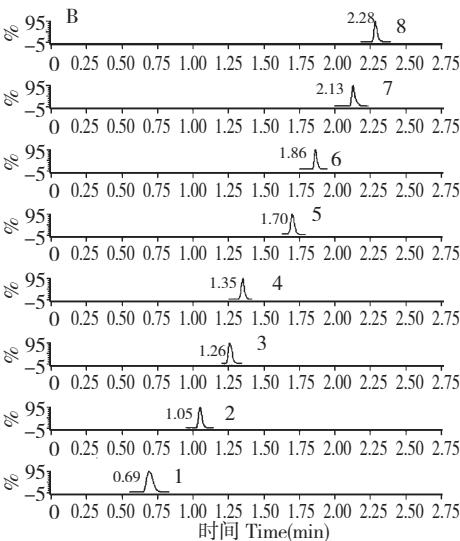


表 2 7 种成分的线性关系
Table 2 Linear relationships of 7 components

标准品 Analyte	回归方程 Regression equation	相关系数 r Correlation coefficient	线性范围 Linear range (μg/mL)
1	$Y = 0.6582X + 0.5781$	0.9968	0.136 ~ 32.965
2	$Y = 1.5825X + 0.2754$	0.9976	0.031 ~ 7.481
3	$Y = 3.9670X + 0.2816$	0.9991	0.022 ~ 5.300
4	$Y = 4.4664X + 2.0688$	0.9966	0.076 ~ 18.433
5	$Y = 0.8575X + 0.1205$	0.9979	0.028 ~ 20.737
6	$Y = 1.8269X + 0.0527$	0.9995	0.017 ~ 4.147
7	$Y = 0.7657X + 0.8232$	0.9945	0.128 ~ 31.029

3.3 重复性试验

取同批次头花蓼药材,按“2.2”项下方法平行制备6份供试品溶液,在UPLC-MRM-MS条件下分别进样测定,根据内标法计算没食子酸、原儿茶酸、陆地棉苷、槲皮苷、儿茶素、槲皮素-3-O-(2'-没食子酰基)-鼠李糖苷及槲皮素的平均含量分别为1.276、0.179、0.041、1.326、0.069、0.061及2.681 mg/g,RSD分别为1.07%、3.58%、1.43%、2.23%、2.62%、2.62%及2.59%,结果表明此方法重复性良好。

3.4 精密度试验

取同一份供试品溶液,在相同条件下连续测定3 d,每天进样6次,根据内标法计算含量,结果7种成分的日内和日间精密度($n=6$)分别为0.92%~3.49%和1.21~4.41%,表明仪器精密度良好。

3.5 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别处理后于0、2、4、8、12、18、24 h进样分析,7种成分的RSD分别为1.03%、2.66%、1.83%、0.93%、2.95%、2.73%、

3.23%,表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

3.6 加样回收率试验

精密称取6份已知含量的头花蓼样品0.5000 g,平均分为3组,分别精密加入0.5、1.0、2.0 mL混合标准溶液[没食子酸、原儿茶酸、陆地棉苷、槲皮苷、儿茶素、槲皮素-3-O-(2'-没食子酰基)-鼠李糖苷及槲皮素浓度分别为0.407、0.092、0.065、0.228、0.256、0.051、0.383 μg/mL],制成低、中、高浓度的质控样品,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按上述条件进样测定,计算加样回收率,结果低、中、高浓度水平下原儿茶酸等7种成分回收率分别为93.22%~100.32%、95.37%~102.68%、97.37%~102.11%、94.89%~103.35%、91.23%~104.35%、95.54%~103.12%、93.83%~105.33%。

3.7 样品测定

按“2.2”项下方法制备6批样品的供试品溶液,处理后分别进样测定,根据内标法计算样品中各成分的含量,结果见表3。

表3 6批样品中7个成分的含量(mg/g,n=3)

Table 3 Determination of 7 components in six batches of *P. capitatum* sample (mg/g, n = 3)

批号 Lot No.	分析物 Analyte							合计 Total content
	1	2	3	4	5	6	7	
1	1.283	0.172	0.041	1.252	0.067	0.062	2.678	5.555
2	1.992	0.106	0.049	2.135	0.058	0.071	2.061	6.472
3	0.988	0.115	0.038	1.187	0.029	0.057	1.284	3.698
4	2.243	0.208	0.051	2.486	0.072	0.091	3.126	8.277
5	2.103	0.109	0.048	2.379	0.045	0.058	2.323	7.065
6	1.532	0.124	0.033	1.393	0.038	0.066	1.674	4.860

4 讨论

2010年版《中国药典》中对热淋清颗粒的质量控制方法仅以没食子酸为指标^[12],然而不同批次间没食子酸含量略有差异,因此建立一种灵敏、快速、可靠的定量分析方法以同时测定头花蓼药材中主要活性成分的含量是极其有必要的。

本研究采用UPLC-MRM-MS系统建立了头花蓼药材中七个指标成分灵敏、快速、可靠的定量分析方法,5 min即完成样品的分析,显著提高了定量分析的重复性和可靠性。从表4的6批头花蓼药材含量测定结果可看出原儿茶酸,陆地棉苷在不同批次药材中含量较稳定,但含量较低,没食子酸、槲皮苷、槲皮素含量较高,6批药材槲皮素的含量均符合2003

版《贵州省中药、民族药质量标准》。经对不同产地的头花蓼中7种化学成分含量测定,表明本方法能达到有效分离各组分的目的,可作为头花蓼的质量控制方法;同时表明不同地域的头花蓼中3种成分的含量存在明显差异,说明生态环境、采收时间和储存条件等可能对含量产生影响。上述结果提示,为保证头花蓼相关制剂批次间质量的一致性,应加强头花蓼的质量控制,必要时固定药材的来源。

参考文献

- Editorial Office of National Chinese Herbal Medicine Collection(全国中草药汇编编写组). Collection of Chinese Herbal Medicine(全国中草药汇编). Beijing: People's Medical Publishing House, 1992. (下转第88页)