

文章编号:1001-6880(2016)8-1233-05

UPLC-MS/MS 同时测定白及中 6 个指标成分的含量

梅朝叶^{1,4},向文英¹,杨武¹,黄勇^{1,2},王永林^{1,2},王爱民^{1,3*}¹贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室; ²贵州医科大学药学院; ³贵州医科大学民族药与中药开发应用教育部工程研究中心; ⁴国家苗药工程技术研究中心,贵阳 550004

摘要:建立 UPLC-MS/MS 同时测定白及药材中的 α -异丁基苹果酸(B6)、4-(葡萄糖氧基)-肉桂酸葡萄糖氧基苄酯(B12)、1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯(B14)、1-[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸(B17)、二氢菲 1(B19)和 1,4-二[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸酯-2-[4-O-肉桂酰基-6-O-乙酰基]葡萄糖苷(B23)含量的分析方法,采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱,采用电喷雾离子源(ESI),多反应离子监测(MRM)模式进行正负离子同步监测。各指标成分之间分离度良好,在选定的浓度范围内线性关系良好($r \geq 0.9974$),平均加样回收率为 98.07% ~ 103.19%, RSD < 3.04% 为,重复性、精密度和稳定性良好。此方法操作简便,快速,灵敏度高,可用于白及药材中主要活性成分的含量测定,并为白及药材的质量控制提供了新方法。

关键词:白及;UPLC-MS/MS;多反应离子监测模式;含量测定

中图分类号:R927.2

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.8.011

Simultaneous Determination of Six Components in *Bletilla striata* by UPLC-MS/MS

MEI Chao-ye^{1,4}, XIANG Wen-ying¹, YANG Wu¹, HUANG Yong^{1,2}, WANG Yong-lin^{1,2}, WANG Ai-min^{1,3*}

¹Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmacy; ²School of Pharmacy, Guizhou Medical University; ³Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM (Ministry of Education), Guizhou Medical University; ⁴National Engineering Research Center of Miao's Medicines, Guiyang 550004, China

Abstract: To establish an UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of α -isobutylmalic acid (B6), bletsostaside (B12), militarine (B14), gymnosides V (B17), dihydrophenanthrenes 1 (B19) and gymnosides IX (B23) in *Bletilla striata*. An Acquity UPLC BEH C₁₈ column(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) was used with the mobile phase of 0.1% formic acid in acetonitrile-0.1% formic acid in water by gradient elution. Multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for the detection by electro-spray ionization (ESI) source. The results showed that six components can be well resolved and that in the selected linear range, all calibration curves of the six components showed good linearity ($r \geq 0.9974$). The average recoveries were 98.07%-103.19%, with RSDs < 3.04%. Repeatability, precision and stability were good. The developed method was simple, rapid, sensitive and suitable for the determination of the main active constituents in *B. striata*. It provided a new method for the quality control of *B. striata*.

Key words: *Bletilla striata*; UPLC-MS/MS; multiple reaction monitoring; content determination

白及为兰科植物白及 [*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.] 的干燥块茎,味苦、甘、涩、微寒,归肺、肝、胃经,具有收敛止血,消肿生肌作用,用于咯血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂等病症^[1]。据文献报到,白及的化学成分主要包括联苄葡萄糖苷类、菲

并吡喃类、联菲醚类、联苄类、菲类、芪类、联菲类、菲并螺甾内酯类以及甾体、三萜和花色素苷类等化合物近 50 种^[2,3]。现代药理研究表明,白及药用功能广泛,药用价值高,具有止血、抗菌、抗肿瘤及促进血管内皮细胞生长等药理作用。且有研究发现白及正逐渐成为我国现代医药工业的重要原材料^[4]。

《中国药典》2015 年版一部白及质量标准中仅收载了性状、薄层色谱鉴别等,国内外对白及的质量控制方法研究主要为总酚大类成分、单一成分(1,4-

收稿日期:2016-01-18 接受日期:2016-04-15

基金项目:国家自然科学基金(81460630;81360636);贵州省研究生卓越人才计划(黔教研合 ZYRC 字[2014]012);贵州省中药现代化专项(黔科合重 G 字[2013]4001)

* 通讯作者 Tel:86-851-6908468;E-mail:gywam100@mail.com

二[4-(葡萄糖氧)苯基]-2-异丁基苹果酸酯)、多糖或某一类成分的分析报道^[5-9]。介于此本实验王爱民等^[10]建立了 UPLC 测定白及药材中 9 种指标成分含量的方法,并主要对贵州产地的野生和人工种植白及药材进行分析。除重庆外的其他省份白及药材的含量测定尚未报到。在此实验基础上本文以不同省份的白及药材检测 B6、B12、B14、B17、B19、B23 这 6 个指标成分,且应用专属性强,灵敏度高,快速准确的 UPLC-MS/MS 法对白及药材进行全面的含量测定,进一步为白及质量控制和评价提供参考依据。

1 仪器与材料

ACQUITY 系统超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪,包括二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、三

重四级杆质量分析器和 Masslynx4.1 质谱工作站(美国 Waters 公司)。

白及药材由贵阳医学院药学院药用植物学与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为兰科植物白及 *B. striata* 的干燥块茎。B6(1)、B12(2)、B14(3)、B17(4)、B19(5) 和 B23(6) 由本实验室从白及药材中分离得到,经¹H、¹³C NMR、MS、UV 和 IR 鉴定, TLC 纯度检查显示单一斑点,UPLC-PDA 在多个波长检测,峰面积归一化含量均大于 98%^[10];葛根素对照品(7)(购自中国食品药品检定研究院,批号为 0752-9605,纯度≥98%),乙腈、甲酸为色谱纯,甲醇为分析纯。

白及药材来源见表 1,由本院药用植物学与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为兰科植物白及 *Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f. 的干燥块茎。

表 1 白及药材来源表

Table 1 Source of *Bletilla striata*

产地 Source	编号 Serial number	批号 Lot number
云南 Yunnan	Y1	20120713
贵州务川 Guizhou Wuchuan	Y2	20130909
贵州正安 Guizhou Zhengan	Y3	20130820
重庆 Chongqing	Y4	20130927
广西 Guangxi	Y5	20120912
贵州正安 Guizhou Zhengan	Y6	20121007
甘肃 Gansu	Y7	20110213
安徽 Anhui	Y8	20100211
四川 Sichuan	Y9	20100217
贵州织金 Guizhou Zhijin	Y10	20150721

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流动相 0.1% 甲酸乙腈溶液(A)-0.1% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~1.0 min, 10%~30% A; 1.1~2.0 min, 30%~35% A; 2.1~3.0 min, 35%~38% A; 3.1~4.0 min, 38%~90% A; 4.1~5.0 min, 90%~10% A);流速 0.35 mL/min;柱温 45 °C;进样量 2 μL。

2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),毛细管电压 3 KV,离

子源温度 120 °C,去溶剂气(氮气)650 L/h,去溶剂气温度 350 °C,碰撞气(氩气)0.18 mL/min;多反应离子监测(MRM)模式进行正负离子同步监测;B6 等六种成分用于定量分析的监测离子见表 2。

2.3 溶液配制

2.3.1 供试品溶液的制备

白及药材经 60 °C 干燥,粉碎过 40 目筛,取约 1 g,精密称定,置圆底烧瓶中,精密加入 50% 甲醇 25 mL,称定重量,水浴加热回流提取 2 h,放置室温,再称定重量,用 50% 甲醇补足失重,摇匀,滤过,取续滤液 2 mL 置 100 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇定容至刻度。离心(15000 rpm)10 min,即得。

表 2 多反应离子检测质谱条件

Table 2 MRM analysis parameters for the 6 targeted components

化合物 Compounds	母离子 Parent ion (m/z)	子离子 Daughter ion (m/z)	锥孔电压 Cone voltage (v)	碰撞电压 Collision voltage (v)
B6(1)	189	129	30	15
B12(2)	593.2	431.1	35	15
B14(3)	725.3	457.2	40	20
B17(4)	457.2	285.1	35	15
B19(5)	347.1	332.1	50	25
B23(6)	1059.3	791.3	45	25

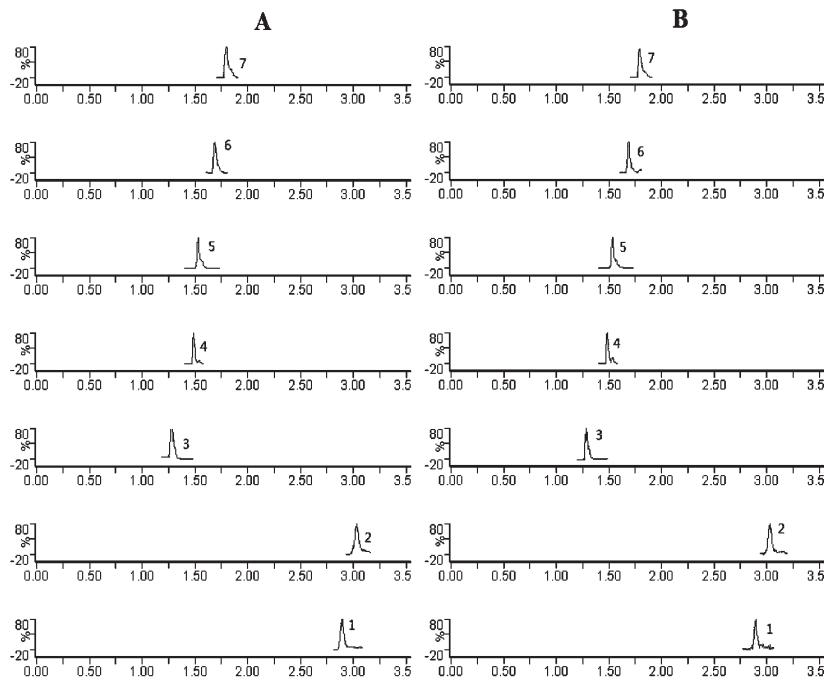
2.3.2 混合对照品溶液的制备

分别取 1~6 种对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解。摇匀, 配制成质量浓度分别为 11.6(B6)、8.4(B12)、41.9(B14)、5.5(B17)、5.2(B19)、6 μg/mL(B23) 的混合对照品储备液。

2.4 专属性试验

分别精密称取 1~6 对照品以及葛根素内标

(7) 适量, 制成 1~7 浓度分别为 2.90、2.10、10.47、1.37、1.30、1.50 和 19.84 μg/mL 的混合对照品溶液。精密吸取混合对照品溶液和白及药材溶液各 2 μL, 分别进样, 结果见图 1。供试品溶液中被测定化合物与 7 个对照品的保留时间相同。比较被测定成分和对照品的质谱图, 两者一致, 表明本法专属性良好。



1:B19, 2:B23, 3:葛根素, 4:B12, 5:B6, 6:B17, 7:B14

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

Fig. 1 UPLC MRM chromatograms of reference substances (A) and sample (B)

2.5 线性试验

精密称取“2.3.2”项下制备的混合对照品溶液适量, 逐级稀释, 再分别加入一定量的葛根素内标, 制得 6 个浓度的系列浓度线性工作液, 分别进样测

定。以对照品浓度 $c(X)$ 为横坐标, 色谱峰面积与内标峰面积比值 $A_s/A_i(Y)$ 为纵坐标, 进行线性回归, 权重系数为 $1/X$, 求得直线方程, 即为标准曲线。回归方程见表 3。

表3 6种成分的线性关系

Table 3 Linear relationships of six components

化合物 Compounds	回归方程 Regression equation	相关系数 r Correlation coefficient	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
B6(1)	$Y = 1.9551X + 0.0153$	0.9998	0.363 ~ 11.600
B12(2)	$Y = 0.3669X + 0.0716$	0.9997	0.263 ~ 8.400
B14(3)	$Y = 0.7428X + 1.7364$	0.9982	1.309 ~ 41.900
B17(4)	$Y = 1.2333X + 0.2958$	0.9974	0.172 ~ 5.500
B19(5)	$Y = 1.667X - 0.1272$	0.9998	0.162 ~ 5.200
B23(6)	$Y = 0.4513X - 0.0456$	0.9995	0.187 ~ 6.000

2.6 重复性试验

取同批白及药材,按“2.3.1”项下方法平行制备6份供试品溶液,分别进样测定。计算1~6的RSD分别为4.03%、3.81%、4.65%、5.35%、2.58%和2.93%,表明本方法重复性良好。

2.7 精密度试验

取同批的供试品溶液,连续测定3 d,每天进样6次,测定峰面积并计算含量,结果1~6的日内和日间RSD(%,n=6)分别为2.21%~4.28%和2.31%~6.30%,表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液,分别于处理后0、2、4、8、12

h进样分析,1~6含量的RSD分别为3.82%、2.51%、2.95%、5.41%、3.91%和2.22%,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.9 回收率试验

精密称取9份已知含量的白及样品适量,平均分为3组,分别精密吸取200 μL 的混合对照品溶液(1~6的浓度分别为5.80、4.20、20.95、2.75、2.60、3.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$,2.90、2.10、10.48、1.38、1.30、1.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,1.45、1.05、5.24、0.69、0.65、0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加入,制成低、中、高浓度的质控样品,按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,分别进样测定,结果见表4。

表4 回收率试验结果(% ,n=3)

Table 4 Testing results of recovery (% ,n=3)

化合物 Compounds	低浓度 Low concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	中浓度 Middle concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	高浓度 High concentrations ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
B6(1)	101.36 ± 1.0	98.12 ± 1.9	100.87 ± 1.9
B12(2)	98.46 ± 2.2	102.56 ± 2.7	100.61 ± 1.3
B14(3)	100.23 ± 1.3	102.08 ± 1.3	103.19 ± 0.7
B17(4)	99.52 ± 2.0	100.90 ± 2.1	98.07 ± 0.6
B19(5)	98.83 ± 0.4	101.07 ± 1.9	101.85 ± 0.7
B23(6)	100.30 ± 2.3	100.75 ± 1.3	101.19 ± 1.9

2.10 样品测定

按“2.3.1”项下方法制备10批样品的供试品溶液,分别进样测定,计算得样品中6个指标成分的含量。分别进样测定,计算得样品中1~6的含量,结果见表5。

3 讨论与结论

中药作为一种多疗效多靶点的复杂天然药物,单一成分的含量并不能体现其真实药效^[11,12]。随

着色谱技术的发展和仪器性能的提高,多成分含量测定方法已成为中药现代化质量控制的手段和趋势^[13]。因此建立一种灵敏、快速、可靠的定量分析方法以同时测定白及药材中主要活性成分的含量是极其有必要的。

本实验室的前期实验^[10]运用UPLC-PDA同时测定白及药材中多种成分的含量,本实验在前期实验的基础上进一步完成了对异丁基苹果酸(B6)、1-[4-(葡萄糖氧)苄基]-2-异丁基苹果酸(B17)成分

表 5 10 批白及药材中 6 个成分的含量 (mg/g, n=2)

Table 5 Determination of six components from ten batches of *B. striata* sample (mg/g, n=2)

Serial No.	B6(1)	B12(2)	B14(3)	B17(4)	B19(5)	B23(6)	Total
Y1	5.638	2.147	23.722	2.086	0.213	0.141	33.947
Y2	2.322	1.403	25.348	2.206	0.233	1.817	33.329
Y3	2.049	0.893	19.752	1.638	0.247	1.583	26.162
Y4	2.390	1.086	21.280	1.908	0.242	2.681	29.587
Y5	0.815	3.047	36.348	0.385	0.262	0.150	41.007
Y6	2.067	1.409	32.207	1.625	0.264	3.227	40.797
Y7	0.673	0.115	4.092	*	0.150	0.590	5.62
Y8	0.499	3.674	37.160	0.136	0.211	1.795	43.475
Y9	0.010	*	*	*	0.119	0.143	0.272
Y10	0.762	2.091	38.694	0.362	0.233	3.349	45.491

注: * 为痕量, 低于定量限。

Note: * indicated amount lower than quantification limit.

的含量测定,且首次建立了应用 UPLC-MS/MS 同时测定白及药材中 6 个指标成分的方法。该方法专属性强、灵敏度高、稳定性好,实验用 BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) 的色谱柱,白及的 6 种成分能够得到较好的分离,且分析速度较快,分析时间仅为 5 min,较大地提高了分析效率,可用于大批量样品的分析。从各样品含量测定结果可见, Y7 和 Y8 的总含量最低, Y10 中的 militarine (B14) 含量最高,且 6 个指标成分综合含量也最高,表明这批药材质量相对较好。本实验建立的 UPLC-MS/MS 方法为白及药材的质量控制提供了一种更高效的方法。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2015. Vol I, 103.
- 2 Ren ZH(任华忠), He YM(何毓敏), Yang L(杨丽). 白及化学成分及药理活性研究进展. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药) 2009, 5:134-140.
- 3 Han GX(韩广轩), Wang LX(王立新), Zhang WD(张卫东), et al. Studies on chemical constituents of *Bletilla striata* II. *Acad J Sec Mil Med Univ* (第二军医大学学报), 2002, 23:1029-1031.
- 4 Li WP(李伟平), He LY(何良艳), Ding ZS(丁志山). Application and resources current situation of common *Bletilla* tuber. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中华中医药刊), 2012, 30:158-160.
- 5 He X(何迅), Wang AM(王爱民), Li YJ(李勇军), et al. Determination of militarine in Rhizoma Bletillae by HPLC. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, 34:2076-2078.
- 6 Wang AM(王爱民), Wang YL(王永林), Zheng L(郑林), et al. Determination the content of polysaccharide in *Bletilla striata*. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, 34:2963-2965.
- 7 Zhou YK(周云凯), Li WP(李伟平), Tian SS(田莎莎), et al. Determination of total polyphenol content in different parts of Rhizoma Bletillae Striatae. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2012, 18:161-164.
- 8 Ma XP(麻秀萍), Yang QQ(杨清秋), Jiang CH(蒋朝晖), et al. Determination of cinnamic acid in *Bletilla striata* by HPLC. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2011, 33:1631-1633.
- 9 Han GX(韩广轩), Huang ZD(黄尊动), Wang ML(王麦莉), et al. Content comparison of two phenanthrenes in *Bletilla striata* from eight different habitats. *China Pharm* (中国药师), 2011, 14:1744-1745.
- 10 Wang AM(王爱民), Yan Y(鄢艳), Lan P(兰波), et al. Simultaneous determination of nine chemical markers of *Bletillae Rhizoma* by UPLC. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2014, 39:2051-2054.
- 11 Ji LX(冀兰鑫), Huang H(黄浩), Li CZ(李长志), et al. Review in research of *Radix Paeoniae Rubra*. *Drug Eval Re* (药物评价研究), 2010, 33:233-236.
- 12 Hu J(胡杰), Li YT(李月婷), Hou JY(侯靖宇), et al. Simultaneous determination of five main index compounds in *Radix Paeoniae Rubra* by UPLC-MS. *Nat Prod Dev Res* (天然产物研究与开发), 2015, 27:282-285.
- 13 Zhuang L(庄丽), Liu W(刘威), Zhang ZQ(张振秋), et al. Simultaneous determination of eight components in radix scutellariae, radix paeoniae alba medicine to extract by UPLC-MS/MS. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2012, 21: 1422-2840.