

地耳草黄酮类成分 UPLC-MS 分析

陆黎¹, 韩乐², 邹立思², 刘训红^{2*}

(1. 南京中医药大学附属南京市中医院, 江苏 南京 210001; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-质谱仪联用技术(UPLC-MS)对地耳草中黄酮类成分分析的方法。方法 采用 Alltima C₁₈ 色谱柱(5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm, i. d.), 以乙腈-0.8% 醋酸为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 $^{\circ}$ C。在电喷雾负离子模式下监测采集数据。结果 初步鉴定 8 种黄酮类化合物, 并同时测定其中 6 种黄酮的含量。6 种黄酮类化合物的浓度与峰面积的线性关系良好($r^2 > 0.998\ 2$); 加样回收率为 97.6%~99.7%。结论 该方法准确可靠, 重现性好, 可作为地耳草内在质量评价的依据。

关键词: UPLC-MS; 地耳草; 黄酮类

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2013)05-0482-04

Analytical Study on the Flavonoids Constituents in *Herba Hyperici Japonici* by UPLC-MS

LU-li¹, HAN Le², ZOU Li-si², LIU Xun-hong^{2*}

(1. Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210001, China; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish an Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC-MS) method to analyze the flavonoids constituents in *Herba Hyperici Japonici*. **METHODS** The analysis was performed on an Alltima C₁₈ chromatographic column with a gradient solvent system of acetonitrile-0.8% acetic acid at a flow rate of 0.8 mL/min. The detection wavelength was 254 nm and the column temperature was 30 $^{\circ}$ C. The data was collected under the negative electrospray ion mode. **RESULTS** 8 flavonoids constituents being separated and identified, six of them were detected simultaneously. The result shows the detected flavonoids constituents have good linearity between concentration and peak area ($r^2 > 0.998\ 2$), and the average recoveries of the method were between 97.6%~99.7%. **CONCLUSION** Being simple, accurate and reproducible, UPLC-MS can be used for evaluating the quality of *Herba Hyperici Japonici*.

KEY WORDS: UPLC-MS; *Herba Hyperici Japonici*; flavonoids constituents

地耳草系藤黄科植物地耳草 *Hypericum japonicum* Thunb. 干燥全草, 具清热利湿、解毒消肿之功效, 主治湿热黄疸、泄泻、痢疾、疮痈肿痛、急性肾炎、血吸虫病等症, 其注射液已广泛用于临床, 治疗急、慢性肝炎, 效果均显著^[1]。

目前对地耳草的质量控制, 多用 HPLC 法同时测定地耳草中黄酮类成分的含量或进行指纹图谱评价^[2-3]。但有关采用 UPLC-MS 联用技术对地耳草的研究未见报道。本文采用 UPLC-MS 联用技术对不同产地、不同采收期地耳草进行分析, 测定其总离子流图谱, 并对部分色谱峰进行了初步归属, 通过与对照品及相关质谱数据比较分析, 初步鉴定其中 8

种黄酮类化合物, 并用 UPLC-DAD 法对 6 种黄酮类化合物的含量同时测定。该方法准确可靠, 重现性好, 可作为地耳草内在质量评价的依据。

1 材料

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱系统(包含二元高压泵, 自动进样器, 柱温箱, 二极管阵列检测器); SYNAPT 质谱系统和 Masslynx 4.1 质谱工作站(美国 Waters 公司)。

山柰酚对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号: 110861-200303); 槲皮素对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号: 10081-9905); 芦丁对照品(中国药品生物制品检定所提供, 批号: 0080-9705);

收稿日期: 2013-06-10; 修稿日期: 2013-07-04

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程资助(ysxk-2010)

作者简介: 陆黎(1976-), 女, 江苏南京人, 南京中医药大学附属南京市中医院主管中药师。* 通信作者: liuxunh1959@sohu.com

异槲皮苷对照品(上海博蕴生物科技有限公司,批号:21637-25-2);槲皮苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号:111538-200302);金丝桃苷对照品(中国药品生物制品检定所提供,批号:111521-200303)。

乙腈(Merck KgaA 试剂公司,HPLC 级,批号:11-20/21/22-36);甲醇(江苏汉邦科技有限公司,色谱纯,批号:200703102);甲醇(上海实意化学试剂有限公司奥佳化工有限公司,批号:20071018);无水乙醇(国药集团化试有限公司,批号:20070412);蒸馏水自制。其余所有试剂均为分析纯。

地耳草各产地样品实地采集或由当地药材公司提供,不同商品由南京各医院门诊部中药房提供,编号为:S1-河北,S2-江苏,S3-安徽,S4-广西,S5-福建,S6-湖南,S7-江西,S8-南京市中医院,S9-南中医大国医堂,S10-南中医大百草堂,S11-南京市传统中医门诊部。地耳草不同采收期(S12-080513,S13-080523,S14-080603,S15-080613,S16-080623,S17-080703,S18-080713,S19-080723)样品均采自福建省尤溪县台溪乡台溪村第二洋。均经南京中医药大学中药鉴定教研室刘训红教授鉴定为藤黄科植物地耳草 *Hypericum japonicum* Thunb. 干燥全草。留样凭证存放于南京中医药大学中药鉴定实验室。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

Alltima C₁₈ (250×4.6 mm id, 5 μm);柱温 30℃;流动相:A-0.8%醋酸,B-乙腈;梯度洗脱:0~10 min,A:B 为 89:11,18 min,A:B 线性改变到 84:16,18~30 min,A:B 为 84:16,35 min,A:B 线性改变到 77:23,35~40 min 为 77:23,55 min,A:B 线性改变到 60:40,65 min,A:B 线性改变到 89:11;65~70 min,A:B 为 89:11;流速:0.8 mL/min;检测器:DAD;检测波长:254 nm;进样量:10 μL。

离子化模式:电喷雾离子化(负离子模式),毛细管电压:3 000 V,锥孔电压:30 V,碰撞能电压:6 eV,MSE 碰撞电压:10~50 eV,离子源温度:120℃,除溶剂温度:350℃;除溶剂气体:600 L/h 氮气;采集范围:m/z 100~1000,碰撞气体为氦气。

2.2 对照品溶液制备

精密称取芦丁对照品 9.28 mg、槲皮素对照品 8.84 mg 和山奈酚对照品 5.69 mg,分别置于 50 mL

量瓶中,用 80%甲醇溶解并定容。精密称取异槲皮苷对照品 7.29 mg、槲皮苷对照品 8.70 mg、金丝桃苷对照品 6.48 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,用 80%甲醇溶解并定容。制得浓度分别为芦丁 0.185 5 mg/mL、金丝桃苷 0.648 mg/mL、异槲皮苷 0.729 mg/mL、槲皮苷 0.87 mg/mL、槲皮素 0.176 7 mg/mL 和山奈酚 0.113 7 mg/mL 的对照品储备液。精密吸取芦丁、槲皮素、山奈酚储备液 6 mL、异槲皮苷储备液 5 mL、槲皮苷储备液 8 mL、金丝桃苷储备液 0.6 mL,溶于 50 mL 量瓶中,则配成混合对照品液。逐级稀释,使芦丁浓度依次为:1.113、4.452、6.678、8.904、11.130、22.260 μg/mL,金丝桃苷的浓度依次为:0.388 8、1.555 2、2.332 8、3.110 4、3.888、7.776 μg/mL,异槲皮苷的浓度依次为:3.648、14.590、21.886、29.181、36.476、72.952 μg/mL,槲皮苷的浓度依次为:6.963、27.850、41.775、55.700、69.63、139.251 μg/mL,槲皮素的浓度依次为:1.060、4.242、6.362、8.483、10.604、21.208 μg/mL,山奈酚的浓度依次为 0.682、2.730、4.095、5.460、6.824、13.649 μg/mL。

2.3 供试品溶液制备

精密称取样品粉末(过 3 号筛)1.0 g,加入 80%甲醇 50 mL,回流 270 min,过滤,滤液用 80%甲醇定容至 100 mL 量瓶中,过 0.45 μm 微孔滤膜,作为供试品溶液。

2.4 标准曲线、检测限与定量限

精密吸取上述不同浓度的混合对照品溶液各 10.00 μL,进样作 HPLC 分析,以对照品的峰面积(Y)对相应的浓度(X)进行线性回归,得回归方程、相关系数及线性范围;以各化合物的信噪比等于 3(S/N=3)时的相应浓度确定最低检测限(LOD);以各化合物的信噪比等于 10(S/N=10)时的相应浓度确定最低定量限(LOQ)。结果见表 1。

2.5 方法学考察

精密度试验:在 1 d 内取一定浓度的混合对照品液,重复进样 6 次,得日内精密度,各对照品平均峰面积的 RSD 分别为 1.51%、1.96%、1.47%、1.23%、0.82%、1.90%;连续 3 d 取一定浓度的混合对照品液,重复进样,得日间精密度,芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、山奈酚的平均峰面积 RSD 分别为 2.11%、2.43%、1.84%、2.01%、1.46%、2.72%。

表 1 6 种黄酮化合物的标准曲线、检测限与定量限

化合物	标准曲线	r^2	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
芦丁	$Y=37\,452X+4\,321.5$	0.998 8	1.11~22.26	0.10	0.34
金丝桃苷	$Y=23\,167X+2\,716.7$	0.998 6	0.39~7.78	0.05	0.12
异槲皮苷	$Y=156\,278X+27\,835$	0.998 4	3.65~72.95	0.32	1.11
槲皮苷	$Y=402\,107X+53\,211$	0.999 2	6.96~139.25	0.64	2.11
槲皮素	$Y=68\,329X+12\,837$	0.998 6	1.06~21.21	0.11	0.34
山奈酚	$Y=30\,481X+3\,761.6$	0.998 2	0.68~13.65	0.06	0.22

稳定性试验:取地耳草(S9)样品供试液,分别在 1、2、4、8、16、24 h 进样 6 次,6 种黄酮平均峰面积的 *RSD* 分别为 1.75%、2.46%、1.03%、1.72%、1.65%、2.02%。

重复性试验:精密称取地耳草(S9)样品 6 份,每份 1.0 g,分别按供试品液制备方法制成供试液,进样测定,6 种黄酮类成分平均迁移时间、峰面积的 *RSD* 分别为 1.78%、2.58%、1.33%、0.92%、0.77%、1.42%。

加样回收率试验:取已知含量的地耳草(S9)样品 5 份,每份 0.5 g,精密称定,分别精密加入不同量

的芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素及山奈酚对照品,按供试品溶液制备方法制备加样回收供试品溶液,并按样品测定方法进行测定,计算回收率。各对照品的平均回收率分别为 99.5%、98.5%、99.7%、99.1%、98.9%、97.6%。*RSD* 分别为 1.42%、1.63%、1.43%、1.21%、2.37%、2.31%。

2.6 样品测定

精密吸取供试品溶液 10.00 μL ,注入超高效液相色谱仪,进行测定。根据相应线性关系计算样品含量。结果见表 2,图 1。

表 2 不同产地、不同商品及不同采收期地耳草中 6 种黄酮含量测定结果($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, $n=2$)

NO.	芦丁	金丝桃苷	异槲皮苷	槲皮苷	槲皮素	山奈酚	总量
S1	—	0.042 7	4.222 1	8.082 4	1.846 4	0.264 8	14.458 4
S2	—	0.048 1	7.231 1	8.785 1	2.103 7	0.266 8	18.434 8
S3	—	—	1.620 8	3.047 1	1.638 1	0.165 3	6.471 3
S4	0.157 2	0.104 1	4.138 1	5.288 6	1.556 1	0.180 9	11.425
S5	0.123 8	—	3.562 5	8.511 2	1.519 6	0.236 1	13.953 2
S6	—	—	4.011 8	5.119 0	0.544 5	0.084 8	9.760 1
S7	—	—	2.441 6	4.057 9	1.680 3	0.203 0	8.382 8
S8	1.305 0	0.767 8	1.627 8	2.059 7	1.840 8	0.086 6	7.687 7
S9	1.251 5	0.728 2	1.493 2	1.885 4	1.830 0	0.096 1	7.284 4
S10	0.905 3	0.736 0	3.032 8	4.529 4	1.328 2	0.163 0	10.694 7
S11	—	0.043 1	4.789 6	7.300 8	1.201 9	0.285 6	13.621 0
S12	0.073 9	—	4.798 3	7.299 0	1.206 2	0.295 4	13.672 8
S13	0.198 8	0.532 6	7.947 1	3.291 0	2.820 1	0.317 4	15.107 0
S14	—	0.052 5	3.924 4	8.481 1	2.154 4	0.364 9	14.977 3
S15	0.105 2	0.211 0	3.100 5	8.203 3	2.432 0	0.530 1	14.582 1
S16	—	—	6.272 6	12.901 0	2.792 0	0.935 1	22.900 7
S17	—	—	6.340 1	12.677 0	1.584 0	0.299 8	20.900 9
S18	—	—	6.219 2	9.455 3	0.853 4	0.155 7	16.683 6
S19	—	0.030 4	6.996 5	8.239 1	0.727 3	0.943 8	16.937 1

注:“—”表示未检出。

2.7 黄酮类成分鉴别

样品通过 UPLC-MS/ESI 负离子模式扫描获得地耳草图谱中的一些结构信息,因为黄酮类成分在负离子模式扫描灵敏度较高。通过色谱图、UV

吸收和 ESI-MS 质谱比较,结合对照品及相关文献分析,初步鉴定出其中 8 个黄酮类成分(见表 3,图 1)。

1. 二氢槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷;2. 芦丁;3. 金丝桃苷;4. 异槲皮苷;
5. 槲皮苷;6. 槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷;7. 槲皮素;8. 山奈酚

图 1 混合对照品液(A)和样品液(B)的 UPLC 色谱图

3 讨论

1)色谱条件的优化 提取方法的选择:以芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、山奈酚的总含量为指标,比较回流法与超声提取法,试验结果表明,回流法提取的总含量高于超声提取法的含量,故选择直接回流法制备供试品。

表 3 地耳草黄酮类化合物鉴别

峰号	R_f (min)	MS(m/z)	MS ² (m/z)	鉴别
1	22.01	449[M-H] ⁻	303[M-H-Rhamnose] ⁻	二氢槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷
2	25.46	609[M-H] ⁻	301[M-H-Glucose] ⁻	芦丁
3	26.84	463[M-H] ⁻	301[M-H-Glucose] ⁻	金丝桃苷
4	28.35	463[M-H] ⁻	301[M-H-Galactose] ⁻	异槲皮苷
5	37.51	447[M-H] ⁻	301[M-H-Rhamnose] ⁻	槲皮苷
6	44.73	447[M-H] ⁻	301[M-H-Rhamnose] ⁻	槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷
7	51.26	301[M-H] ⁻ 273[M-H-CO] ⁻ , 151[M-H-C ₈ O ₃ H ₆] ⁻		槲皮素
8	58.05	285[M-H] ⁻	151[M-H-C ₈ O ₂ H ₆] ⁻	山奈酚

2)实验结果表明,不同产地及不同商品地耳草黄酮类成分的含量具有一定差异。6 种黄酮总量以 S2 的药材含量较高,11 个样品中 6 种黄酮总量的范围是 6.47~18.43 mg/g。地耳草中 6 种黄酮类成分以槲皮苷和异槲皮苷的含量较高,芦丁和金丝桃苷含量很少,有的样品也不含芦丁或金丝桃苷,槲皮素以 S2 的药材中含量较高,槲皮苷与异槲皮苷均以 S2、S5 的药材中含量较高。

3)不同采收期地耳草黄酮类成分分析结果显示,6 种黄酮总量以 S16 的药材含量较高,不同采收期样品中 6 种黄酮总量的范围是 13.67~22.90 mg/g。异槲皮苷以 7 月下旬含量较高,槲皮苷与槲皮素以 6、7 月含量较高,山奈酚含量以 6 月下旬较高,芦丁与金丝桃苷含量极低,动态变化不明显;异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素及山奈酚的总量以 6 月下旬至 7 月上旬较高。

综上所述,地耳草商品药材或不同产地药材,由于产区生态环境、药材采收加工或贮存等不同,导致黄酮类成分含量具有一定差异,使药材品质参差不齐;不同采收期地耳草中黄酮类成分呈现积累动态

提取溶剂的选择:以芦丁、金丝桃苷、异槲皮苷、槲皮苷、槲皮素、山奈酚的总含量为指标,比较 60% 甲醇、70% 甲醇、80% 甲醇、95% 甲醇等不同提取溶剂,试验结果表明,以 80% 甲醇提取,4 种黄酮总含量最高,确定 80% 甲醇为提取溶剂。

提取条件的优选:选择溶剂用量、提取时间、提取次数 3 个因素,每个因素选择 3 个水平,设定因素水平表,进行正交试验,确定上述提取条件。

变化。本文建立了 UPLC-MS 分析地耳草中黄酮类成分的方法,为地耳草药材内在质量评价,确定其适宜采收期提供科学依据。

参考文献:

[1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:2208.
State Administration of Traditional Chinese Medicine; Editorial Board of Chinese materia medica. *Chinese materia medica* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers; 1999: 2208.

[2] 熊丽,陈晓辉,梁健. RP-HPLC 法同时测定田基黄中 4 种黄酮成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2010, 8(8):639-642,668.
Xiong L, Chen XH, Liang J. Simultaneous determination on the 4 kinds of flavonoids constituents in *Hypericum japonicum* Thunb by RP-HPLC method[J]. J Shenyang Pharm Univ, 2010, 8(8): 639-642,668.

[3] Yang LW, Wu DH, Tang X, et al. Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection[J]. J Chromatogr A, 2005, 1070(1/2): 35-42.

(编辑:李伟东)