

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.23.006

超高效液相色谱-串联质谱法测定夏枯草中4种酚酸含量*

柏玉冰¹, 李洪权², 包敏^{2△}, 林艳³

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 湖南省株洲市食品药品检验所, 湖南株洲 412000; 3. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

摘要:目的 建立同时测定夏枯草中绿原酸、阿魏酸、原儿茶酸、原儿茶醛4种酚酸类成分含量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法。方法 夏枯草以50%甲醇超声提取,色谱柱采用Welch Xtimate C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为0.1%甲酸水-乙腈(梯度洗脱),流速为0.5 mL/min,柱温为30℃,进样量为2 μL,采用电喷雾离子源(ESI)。结果 绿原酸、阿魏酸、原儿茶酸、原儿茶醛质量浓度分别在0.019 6~2.940 0 μg/mL, 0.022 5~3.375 0 μg/mL, 0.022 3~3.345 0 μg/mL, 0.027 8~4.170 0 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好;平均回收率分别为98.25%, 100.89%, 99.57%, 98.57%, RSD分别为2.29%, 1.96%, 1.59%, 2.11% (n=6);夏枯草样品中4种成分含量绿原酸为459.75~1 500.85 μg/g,阿魏酸为120.84~195.13 μg/g,原儿茶酸为204.16~669.24 μg/g,原儿茶醛为77.41~315.56 μg/g。结论 该方法快速、准确,可用于夏枯草药材中上述4种酚酸类成分含量的测定。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法;夏枯草;酚酸;绿原酸;阿魏酸;原儿茶酸;原儿茶醛

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)23-0024-04

Simultaneous Determination of Four Phenolic Acids in *Prunella Vulgaris* by UPLC-MS/MS

BAI Yubing¹, LI Hongquan², BAO Min², LIN Yan³

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, China 410007; 2. Zhuzhou Institute for Food and Drug Control, Zhuzhou, Hunan, China 412000; 3. The Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan, China 410208)

Abstract: Objective To establish a UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of four phenolic acids(chlorogenic acid, ferulic acid, protocatechuic acid, protocatechualdehyde) in *Prunella vulgaris*. Methods *Prunella vulgaris* was extracted by ultrasound with 50% methanol. The chromatographic column was Welch Xtimate C₁₈ column(150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid-acetonitrile with gradient elution, the flow rate was 0.5 mL/min, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 2 μL. The mass spectra were obtained by electron spray ionization(ESI). Results The linear ranges were 0.019 6~2.940 0 μg/mL for chlorogenic acid, 0.022 5~3.375 0 μg/mL for ferulic acid, 0.022 3~3.345 0 μg/mL for protocatechuic acid, 0.027 8~4.170 0 μg/mL for protocatechualdehyde, the average recoveries were 98.25%, 100.89%, 99.57% and 98.57%, and the RSDs were 2.29%, 1.96%, 1.59% and 2.11% (n=6), respectively. The contents of chlorogenic acid, ferulic acid, protocatechuic acid and protocatechualdehyde were 459.75~1 500.85 μg/g, 120.84~195.13 μg/g, 204.16~669.24 μg/g, 77.41~315.56 μg/g, respectively.

Conclusion The method is rapid and accurate, which can be used for the content determination of the four phenolic acids in *Prunella vulgaris*.

Key words: UPLC-MS/MS; *Prunella vulgaris*; phenolic acids; chlorogenic acid; ferulic acid; protocatechuic acid; protocatechualdehyde

夏枯草为唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗,具清火、明目、消肿、散结等功效,常用于治疗目赤肿痛、目珠夜痛、头痛眩晕、瘰癧、癭瘤、乳痛、乳癖、乳房胀痛等病症^[1]。现代药理学研究显示,夏枯草具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、延缓衰老等作用^[2],酚酸类成分为其主要功效成分^[3-5]。为此,多项研究基于酚酸类成分建立夏枯草的质量控制方法^[6-7],且这些质量评定均基于可高效、准确地测定夏枯草中酚酸类成分的含量。酚酸类成分包括阿魏酸^[8-9]、迷迭香酸^[6,9-13]、异迷迭香酸^[6,10-12]、咖啡酸^[6,9,11,13]、原儿茶酸^[6,9]、原儿茶醛^[6]、水杨酸^[8]、间羟基苯甲酸^[8]、对羟基苯甲酸^[8]、对香豆酸^[8]、丁香酸^[8]、肉桂酸^[8]、芥子酸、3-咖啡酰奎尼酸^[8]和绿原酸^[9]。但原儿茶酸和原儿茶醛响应值相对较小,不利于

准确定量^[6];阿魏酸与其他极性相似成分有重叠峰,定量准确性较差^[8];绿原酸在甲醇提取液中未检出,与其他相关报道相矛盾^[9]。进一步分析发现,这些含量测定研究均基于高效液相色谱-二极管阵列检测(HPLC-DAD)法而建立。因此,可推测这些问题的产生应为HPLC-DAD法对分离度高度依赖、检测物质含量需要达到微克级、检测物质需产生一定强度的紫外吸收等^[14]。而超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法由于其根据质荷比差异而区分,且测定低限可达纳克级等优势,故可克服上述问题^[15-16]。本研究中建立了测定夏枯草中原儿茶酸、原儿茶醛、阿魏酸和绿原酸的4种酚酸类成分含量的UPLC-MS/MS法,以期快速、准确地检测夏枯草中酚酸类成分的含量。现报道如下。

*基金项目:国家重点研发计划子课题项目[2017YFC1701903-8]。

第一作者:柏玉冰,女,硕士研究生,药师,研究方向为中药成分,(电子信箱)1024495239@qq.com。

△通信作者:包敏,女,大学本科,主管药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)27426579@qq.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1290 Infinity II 型超高效液相色谱仪(1 mV, 1 ~ 1 000 mV, 安捷伦科技有限公司); XSE 205DV 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司, 精度为 0.01 mg); QTRAP 4500 型三重四极杆质谱(质量范围为 0.10 amu, 50 ~ 1 650 amu, 上海爱博才思分析仪器有限公司); HNS-SY-150 型超声波仪(北京恒奥德仪器仪表有限公司, 功率为 400 W, 频率为 40 kHz)。

1.2 试药

夏枯草(果穗, 市售), 样品信息见表 1。经湖南省株洲市食品药品检验所包敏主管药师鉴定为正品。样本存放于株洲市食品药品检验所中药材样品室, 药材均经粉碎后过四号筛, 备用。绿原酸对照品(批号为 110753-201716, 规格为 20 mg, 纯度为 99.3%), 阿魏酸对照品(批号为 110773-201614, 规格为 50 mg, 纯度为 99.0%), 原儿茶酸对照品(批号为 110809-201205, 规格为 20 mg, 纯度为 99.9%), 原儿茶醛对照品(批号为 110810-201007, 规格为 20 mg, 纯度为 98.2%), 均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈(4 L, 纯度为 99.99%, 批号为 AH015-4HC), 甲醇(4 L, 纯度为 99.99%, 批号为 AH230-4HC), 均购自霍尼韦尔有限公司。

表 1 夏枯草药材样品信息

批号	购买药店	购买时间
SP20181021	益丰大药房	2018 年 12 月 27 日
SP20181022	国仁堂大药房	2018 年 12 月 27 日
SP20181023	仁康大药房	2018 年 12 月 27 日
SP20181024	千金大药房	2018 年 12 月 27 日
SP20181025	人民药店	2018 年 12 月 27 日
SP20181026	万仁建大药房	2018 年 12 月 27 日

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱: Welch Xtimate C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0 ~ 6 min 时 90% A → 10% A, 6 ~ 8 min 时 10% A, 8 ~ 8.5 min 时 10% A → 90% A, 8.5 ~ 10.0 min 时 90% A); 流速: 0.5 mL/min; 采集时间: 10 min; 柱温: 30 °C; 进样量: 2 μL。

2.1.2 质谱条件

质谱: 电喷雾电离源(ESI), 负离子扫描, 多反应监测(MRM); 离子源温度: 550 °C; 电喷雾电压: -4 500 V; 气帘气: 35.0 psi; 离子源气 1: 55 psi; 离子源气 2: 55 psi; 碰撞气: 氩气。各成分的质谱分析参数见表 2。

表 2 4 种酚酸类成分的保留时间及质谱分析参数

成分	离子模式	母离子	子离子	去簇电压(V)	碰撞能力(V)	保留时间(min)
绿原酸	-	353.1	191.0	-70	-20	5.75
阿魏酸	-	193.0	116.7	-50	-21	6.50
原儿茶酸	-	153.8	108.9	-62	-18	5.88
原儿茶醛	-	137.0	108.0	-70	-28	6.19

2.2 溶液制备

混合对照品溶液: 取绿原酸、阿魏酸、原儿茶酸、原儿茶醛对照品适量, 精密称定, 置 25 mL 棕色容量瓶中, 加 50% 甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得, 各对照品的质量浓度分别为 0.196, 0.225, 0.223, 0.278 mg/mL。

供试品溶液: 取夏枯草粉末(粉碎后过四号筛), 取细粉约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50% 甲醇溶液 30 mL, 称定质量, 超声(功率为 400 W, 频率为 40 kHz)提取 40 min, 静置至室温, 再称定质量, 用 50% 甲醇溶液补足减失的质量, 摇匀。提取 2 次, 合并提取液。精密量取 1 mL 置 10 mL 容量瓶内, 用 50% 甲醇溶液定容, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

空白对照品溶液: 不加入夏枯草粉末样品, 按供试品溶液制备方法制备, 即得。

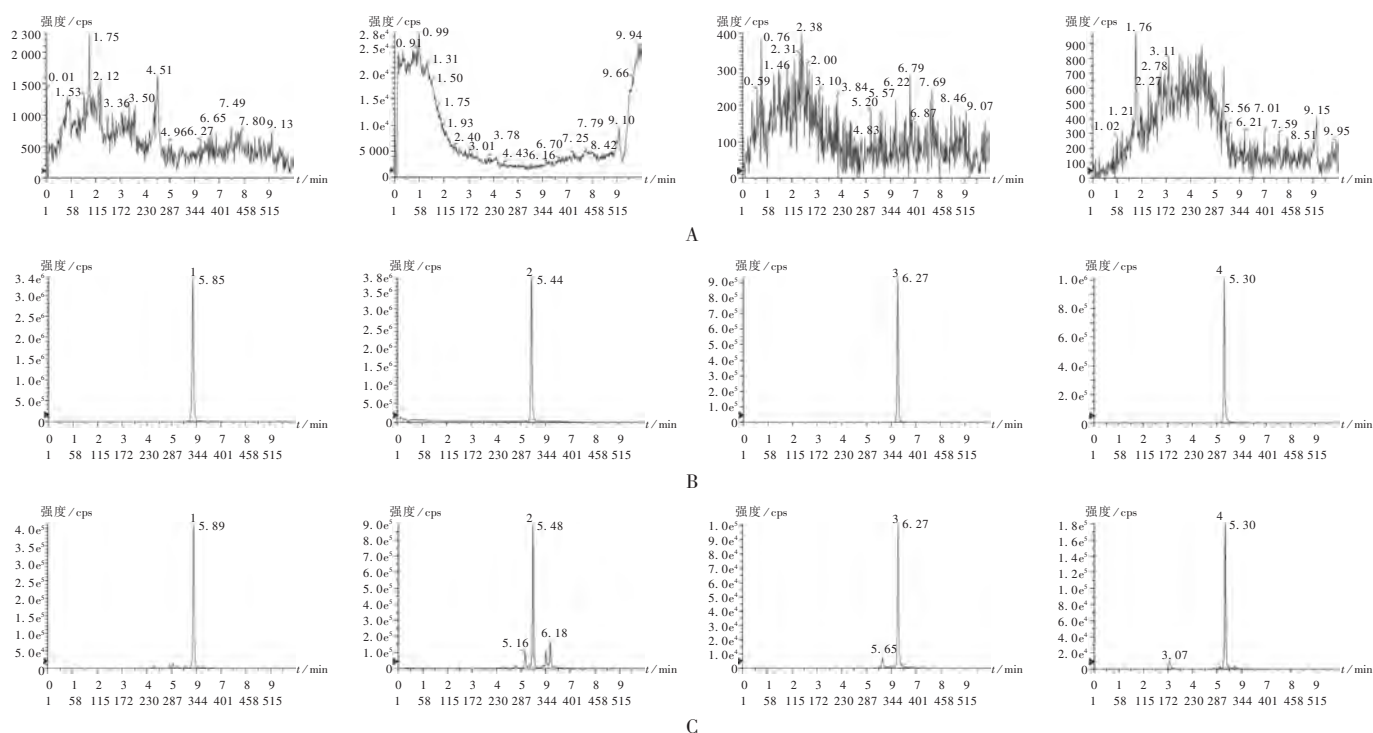
2.3 方法学考察

专属性试验: 分别取 2.2 项下 3 种溶液, 按拟订色谱-质谱条件进样分析, 记录色谱图。结果空白对照品溶液色谱图中, 与 4 种待测成分对应色谱峰位置均无杂质干扰。色谱图见图 1。

线性关系考察与定量限(LOQ)测定: 精密量取混合对照品溶液适量, 用 50% 甲醇溶液稀释得系列质量浓度的溶液(绿原酸 0.019 6, 0.098, 0.392, 1.568, 1.96, 2.94 μg/mL; 阿魏酸 0.022 5, 0.112, 0.45, 1.8, 2.25, 3.375 μg/mL; 原儿茶酸 0.022 3, 0.112, 0.446, 1.784, 2.23, 3.345 μg/mL; 原儿茶醛 0.027 8, 0.139, 0.556, 2.224, 2.78, 4.17 μg/mL)。按拟订色谱-质谱条件进行测定, 以质量浓度(C , ng/mL)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标进行线性回归, 并以信噪比(S/N)为 10 时测得的各成分的量作为 LOQ。结果见表 3, 表明 4 种成分在各自线性范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验: 取混合对照品溶液, 按拟订色谱-质谱条件分别连续进样 6 次, 记录各成分峰面积并计算相对标准偏差(RSD)。结果绿原酸、阿魏酸、原儿茶酸、原儿茶醛峰面积的 RSD 分别为 0.71%, 0.64%, 0.87%, 0.92% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 取同一批(批号为 SP20181021)样品, 称取 6 份, 依法制备供试品溶液, 进样测定, 记录各成分峰面积并计算 RSD 。结果绿原酸、阿魏酸、原儿茶酸、原儿茶醛的平均含量为 674.39, 119.75, 602.06,



1. 原儿茶醛 2. 原儿茶酸 3. 阿魏酸 4. 绿原酸
A. 空白对照品溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液
图1 高效液相色谱-串联质谱图

表3 4种成分线性关系及定量限检测结果($n=6$)

成分	回归方程	r	定量限(ng/mL)
绿原酸	$Y = 2.12199e^5 X - 27.52$	0.9996	0.0196
阿魏酸	$Y = 1.73109e^5 X + 54.91$	0.9997	0.0225
原儿茶酸	$Y = 1.78917e^6 X - 103.9$	0.9994	0.0223
原儿茶醛	$Y = 2.08613e^6 X - 99.10$	0.9995	0.0278

280.35 $\mu\text{g/g}$, RSD 分别为 1.52%, 1.40%, 1.17%, 1.29% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取同一批(批号为 SP181201)样品供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 时进样分析, 记录各成分峰面积并计算 RSD 。结果各成分峰面积的 RSD 分别为 2.01%, 1.85%, 1.69%, 2.31% ($n=5$), 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

加样回收试验: 取已知含量的样品(批号为 SP181201)6 份, 每份约 0.25 g, 精密称定, 分别加入绝对含量接近 0.25 g 药材所含的对照品, 依法分别制备供试品溶液, 进样分析, 并计算加样回收率。结果见表 4。

2.4 样品含量测定

取 6 批样品, 各 2 份, 精密称定, 依法分别制备供试品溶液, 按拟订色谱-质谱条件进样测定, 带入线性回归方程计算 4 种成分的含量。结果见表 5。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备条件优化

提取溶剂: 比较了不同提取溶剂(水、30% 甲醇、

表4 夏枯草中 4 种成分加样回收试验结果($n=6$)

成分	取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
绿原酸	0.2503	171.29	175.0	343.45	98.38	98.25	2.29
	0.2502	171.22	175.0	340.52	96.74		
	0.2505	171.42	175.0	350.47	102.31		
	0.2504	171.36	175.0	344.56	98.97		
	0.2506	171.49	175.0	340.87	96.79		
	0.2502	171.22	175.0	339.75	96.30		
阿魏酸	0.2504	30.26	30.0	61.18	103.07	100.89	1.96
	0.2504	30.26	30.0	60.04	99.27		
	0.2506	30.28	30.0	61.34	103.53		
	0.2508	30.31	30.0	60.58	100.90		
	0.2507	30.29	30.0	60.18	99.63		
	0.2507	30.29	30.0	59.98	98.97		
原儿茶酸	0.2502	153.06	150.0	299.45	97.59	99.57	1.59
	0.2504	153.18	150.0	300.45	98.18		
	0.2505	153.24	150.0	302.25	99.34		
	0.2506	153.30	150.0	304.87	101.05		
	0.2507	153.37	150.0	305.87	101.67		
	0.2502	153.06	150.0	302.45	99.59		
原儿茶醛	0.2503	68.65	70.0	139.98	101.90	98.57	2.11
	0.2505	68.70	70.0	136.68	97.11		
	0.2508	68.78	70.0	136.74	97.09		
	0.2506	68.73	70.0	137.65	98.46		
	0.2508	68.78	70.0	136.45	96.67		
	0.2507	68.76	70.0	138.87	100.16		

表5 6批次样品的4种酚酸类成分的含量测定结果($\mu\text{g/g}$, $n=2$)

样品批号	绿原酸	阿魏酸	原儿茶酸	原儿茶醛
SP20181021	684.33	120.84	611.75	274.26
SP20181022	1500.85	156.72	669.24	315.56
SP20181023	1443.72	140.09	204.16	77.41
SP20181024	459.75	127.34	389.76	186.72
SP20181025	1323.19	154.86	469.59	165.34
SP20181026	563.06	195.13	531.63	240.42

50% 甲醇、70% 甲醇、90% 甲醇、100% 甲醇)的提取效果,以4种成分的峰面积大小为判断依据,确定最佳提取溶剂。结果当甲醇浓度为50%时,4种酚酸类成分的峰面积均达到最大值,故以50% 甲醇为最佳。

提取时间:比较了不同提取时间(10, 20, 30, 40, 50 min)的提取效果,以4种成分的峰面积不再增加为判断依据,确定最佳提取时间。结果4种成分均在提取40 min时达到最大值,故以40 min为最佳。

提取体积:比较了不同提取体积(10, 20, 30, 40, 50 mL)的提取效果,以4种成分的绝对含量最大为判断依据,确定最佳提取体积。结果提取体积为30 mL时,其峰面积的绝对值达到上限,故以30 mL为最佳。

提取次数:比较了不同提取次数(1, 2, 3, 4, 5次)的提取效果,以4种成分的峰面积为判断依据,确定最佳提取次数。结果第2次提取时,4种成分的峰面积已占5次峰面积总和的95%以上,故以2次为最佳。

3.2 色谱条件优化

色谱柱:比较了3款不同的色谱柱,包括 Agela Venusil AS-TC₁₈ 柱, Welch Xtimate C₁₈ 柱, Acclaim 120 C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),以4种成分的分子离子峰的保留性和峰形为判断依据。结果使用 Agela Venusil AS-TC₁₈ 柱时,出峰时间较快,4种成分均在3 min内全部出峰,但4种成分均有拖尾现象,尤其是原儿茶醛和绿原酸;当使用 Acclaim 120 C₁₈ 柱时,出峰时间为5~7 min,但4种成分均有严重拖尾,尤其是原儿茶醛;而当使用 Welch Xtimate C₁₈ 色谱柱时,出峰时间为5~7 min,出峰时间较 Agela Venusil AS-TC₁₈ 柱晚,但峰形均较好,故 Welch Xtimate C₁₈ 柱为合适色谱柱。

流动相:比较了2种不同的流动相系统(乙腈-0.1% 甲酸水溶液和乙腈-含5 mmol/L 的乙酸铵0.1% 甲酸水溶液),以4种成分的峰面积大小为判断依据。结果,随着乙酸铵的加入,4种成分的峰面积均缩小,表明乙酸铵对酚酸类成分的离子化具有抑制作用,故乙腈-0.1% 甲酸水溶液为合适流动相系统。

流速和进样体积:比较了不同的流速(0.4, 0.5, 0.6 mL/min),以4种成分的峰形为判断依据。发现不同流速情况下出峰时间相差不大,且峰型均较好,故推测小范围内不同流速对于峰形并无明显影响。同样的条

件下考察了不同的进样体积(1, 2, 3 μL),以4种成分的峰形为判断依据。与不同流速情况类似,不同流速对于峰形无明显影响。故选择0.5 mL/min 和2 μL 为本次的试验条件。

3.3 方法评价

本研究中首次建立了夏枯草中绿原酸、阿魏酸、原儿茶酸和原儿茶醛4种酚酸类成分的UPLC-MS/MS法,可同时简单、快速和高效地得出夏枯草中多种酚酸类成分的含量,为进一步研究夏枯草酚酸类成分的量效关系、质量控制等奠定了基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 280.
- [2] 肖培根. 新编中药志[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 763.
- [3] BAI Y, XIA B, XIE W, et al. Phytochemistry and pharmacological activities of the genus *Prunella*[J]. Food Chemistry, 2016, 204: 483-496.
- [4] 张金华, 邱俊娜, 王 路, 等. 夏枯草化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药, 2018, 49(14): 3432-3440.
- [5] 贾晓斌, 刘光敏, 陈 彦, 等. 基于中药组分结构理论的夏枯草属药材防治肺癌物质基础研究[J]. 中药材, 2010, 33(7): 1105-1109.
- [6] 冯伟红, 李 春, 信伟梅, 等. 生物测定法用于中药质量评价的探索研究——以夏枯草抗氧化活性与总酚酸含量相关性研究为例[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(14): 2660-2668.
- [7] 皮胜玲, 胡玉珍, 彭 曦, 等. 野生与栽培夏枯草 HPLC 指纹图谱研究及模式识别分析[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(5): 367-371.
- [8] 余其昌. HPLC-DAD 法测定4种夏枯草中的9种酚酸类物质[J]. 食品工业, 2017, 38(7): 295-298.
- [9] SAHIN S, DEMIR C, MALYER H. Determination of phenolic compounds in *Prunella* L. by liquid chromatography-diode array detection[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 2011, 55(5): 1227-1230.
- [10] XIA B, YAN D, BAI Y, et al. Determination of phenolic acids in *Prunella vulgaris* L.: a safe and green extraction method using alcohol-based deep eutectic solvents[J]. Analytical Methods, 2015, 7(21): 9354-9364.
- [11] 皮胜玲, 张凯强, 胡玉珍, 等. 野生与栽培夏枯草5种活性成分的HPLC测定[J]. 中草药, 2017, 48(8): 1666-1670.
- [12] 林丽美, 许招懂, 姚江雄, 等. 夏枯草中异迷迭香酸和迷迭香酸的含量测定[J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(15): 1204-1207.
- [13] 刘光敏, 贾晓斌, 陈 彦, 等. HPLC 法比较不同产地夏枯草属药材中成分组成的差异性[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1384-1386.
- [14] 刘 颖, 周建良, 李 萍. 快速高效液相色谱分离技术在中药分析中的应用[J]. 色谱, 2009, 27(5): 682-689.
- [15] 吴文杰, 赵中辉, 张 元, 等. 药食同源植物 LC-MS 技术分析的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(19): 366-371.
- [16] 孔静静. 新型化学计量学模型在荧光和液质联用定量分析中的应用[D]. 长沙: 湖南大学, 2016.

(收稿日期: 2020-03-27; 修回日期: 2020-05-24)