

HPLC-MS/MS 法测定山药中尿囊素的量

张亚锋, 舒蕊华, 王苑桃, 李 卓

西安市食品药品检验所, 陕西 西安 710054

摘要: 目的 建立高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定山药中尿囊素的量。方法 采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(100 mm×4.6 mm, 3.5 μm), 以乙腈-水(90:10)为流动相, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温为 30 °C; 采用电喷雾负模式电离(ESI⁻), 多反应监测扫描模式(MRM)进行定量分析, 选定的母离子是 m/z 156.9, 定量离子是 m/z 96.7。结果 尿囊素在 0.12~6.0 μg/mL 范围内线性关系良好($r=0.998\ 5$), 平均加标回收率为 101% ($n=6$), RSD 为 3.2%。结论 本方法灵敏、准确、专属性强, 能准确有效地测定出山药中尿囊素的量。

关键词: 尿囊素; 高效液相色谱-串联质谱法; 山药; 电喷雾负模式电离; 多反应监测扫描模式

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)24-3627-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.24.023

Determination of allantoin in *Dioscoreae Rhizoma* by LC-MS/MS

ZHANG Ya-feng, SHU Rui-hua, WANG Yuan-tao, LI Zhuo

Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an 710054, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-MS/MS method for determination of allantoin in *Dioscoreae Rhizoma*. **Methods** Determination of LC system used Agilent Eclipse Plus C₁₈ (100 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) column and acetonitrile-water (90:10) as mobile phase in linear gradient condition. The flow rate was 0.3 mL/min. The mass spectrometer was operated under the negative ion mode with ESI source. MRM (precursor ion of m/z 156.9 and product ion of m/z 96.7) was used to qualify allantoin. **Results** The linear range of the component was 0.12—6.0 μg/mL, $r=0.998\ 5$; The average recovery was 101%, and the RSD was 3.2%. **Conclusion** The method is sensitive, reliable, and accurate, and can be applied in the quality control of *Dioscoreae Rhizoma*.

Key words: allantoin; HPLC-MS/MS; *Dioscoreae Rhizoma*; ESI⁻; MRM

山药为薯蓣科植物薯蓣 *Dioscorea opposita* Thunb. 的干燥块茎, 具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的功能, 主治脾虚泄泻、食少浮肿、肺虚咳嗽、消渴、肾虚尿频、遗精、带下等症^[1]。尿囊素是山药中活性成分之一, 具有生肌作用, 能修复上皮组织, 促进皮肤溃疡和伤口愈合, 可用于胃及十二指肠溃疡^[2]。《中国药典》2010 年版一部尚未收载山药及其饮片的质量控制方法。目前文献报道尿囊素定量测定的方法有薄层扫描法, 紫外分光光度法^[3], 毛细管电泳法^[4]和高效液相色谱法^[5-7]。但由于尿囊素属咪唑类杂环化合物, 紫外吸收较弱, 在溶液中存在酮式与烯醇式平衡^[8], 且极性很大, 在色谱柱中相对保留时间短, 难以保证与其他相似极性成分达到分离, 采用现有方法均难以有效解决上述问题。高效液相色谱-串联质谱技术(HPLC-MS/MS)

具有高灵敏度、高选择性和高准确性等特点, 可用于中药化学成分的分析, 应用此方法测定山药中尿囊素的量尚未见有报道。本实验应用 HPLC-MS/MS 技术研究了尿囊素质谱裂解规律, 并测定了山药中尿囊素的量, 方法简便快捷, 结果令人满意, 为山药及其制剂的质量控制提供了一种新方法。

1 仪器与材料

Agilent 1200 液相色谱仪, Agilent 6410B Triple Quad LC/MS 三重串联四极杆质谱仪, 配 ESI 离子源及 MassHunter 数据处理软件(美国 Agilent 公司); KQ—300VDB 双频数控型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司); 水为娃哈哈纯净水; 其他试剂均为分析纯。

收稿日期: 2014-09-12

作者简介: 张亚锋(1978—), 男, 硕士, 主要从事药品及食品质量分析。Tel: (029)85513291 E-mail: yafeng@163.com

尿囊素对照品(批号 1501-200001)购自中国食品药品检定研究院。山药饮片来自西安市场抽检样品,经西安市食品药品监督管理局谢志民主任中药师鉴定为薯蓣 *Dioscorea Opposite* Thunb. 的干燥块茎,质量均符合《中国药典》2010 年版一部要求,见表 1。

表 1 样品信息

Table 1 Information of samples

编号	产地	编号	产地
1	河南	9	河南
2	河南	10	河南
3	广西	11	河南
4	河南	12	河南
5	陕西	13	河南
6	未知	14	河南(炒山药)
7	未知(炒山药)	15	河南
8	河南	16	河南

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取干燥至恒定质量的尿囊素对照品 5 mg,置 100 mL 量瓶中,加入 90%乙腈溶解,定容,制得含尿囊素 0.05 mg/mL 的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 取山药样品粉末约 50 mg,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 90%乙腈 50 mL,称定质量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz) 30 min,冷却至室温,加 90%乙腈补足减失质量,0.45 μ m 微孔滤膜滤过即得。

2.2 色谱和质谱条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 3.5 μ m);流动相为乙腈-水(9:1),体积流量 0.3 mL/min;柱温 30 $^{\circ}$ C;进样量 5 μ L。

2.2.2 质谱条件 质谱仪采用大气压电喷雾电离源(ESI),干燥气温度设定为 350 $^{\circ}$ C,干燥气流量为 12 L/min,雾化器压力为 276 kPa,离子源电压为 4 kV;碎裂电压为 80 V。选择负离子扫描方式,采用全扫描、选择离子扫描及二级全扫描,全扫描质量范围 m/z 20~200,碰撞能量 10 eV,裂解电压 135。测定采用多反应监测模式(MRM),母离子 m/z 156.9,定性离子 m/z 113.7,定量离子 m/z 96.7,具体质谱图和色谱图见图 1~3。

2.3 尿囊素裂解规律

按照“2.2”项下的条件测得尿囊素的母离子为

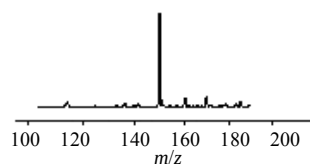


图 1 尿囊素全扫描质谱图

Fig. 1 Full scan MS/MS spectra of allantoin

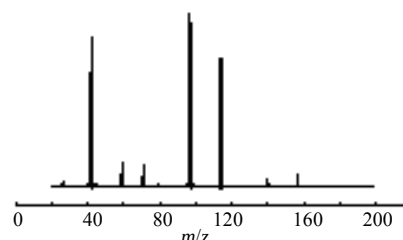


图 2 尿囊素子离子扫描质谱图

Fig. 2 Product ion scan MS/MS spectra of allantoin

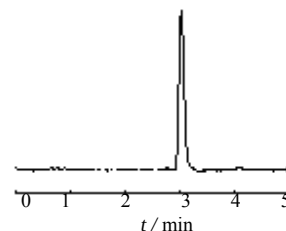


图 3 多反应监测模式下尿囊素色谱图

Fig. 3 Chromatogram of allantoin by MRM scan mode

m/z 157,推测可能是尿囊素失去 1 个氢,形成 $[M-H]^{-}$ 碎片离子 m/z 157,主要的子离子 m/z 为 97、114、42。

2.4 线性关系考察

精密量取适量对照品储备液,用 90%乙腈稀释成质量浓度依次为 0.12、0.30、0.60、1.50、3.00、6.00 μ g/mL 的系列对照品溶液。将上述系列浓度的对照品溶液按“2.2”项下色谱条件依次进样测定。以对照品质量浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,得线性方程为 $Y=0.399 X-6.058$, $r=0.998 5$ 。

2.5 精密度试验

取 1 号样品的供试品溶液,连续进样 6 次,测定尿囊素定量离子峰面积,计算 RSD 为 2.2%。

2.6 稳定性试验

取 1 号样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,每隔 2 小时进行 HPLC-MS/MS 检测,以尿囊素定量离子峰面积计算 RSD 为 3.2%,说明供试

品溶液在 24 h 内稳定。

2.7 重复性试验

取 1 号样品, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 平行 6 份, 计算尿囊素的 RSD 为 3.8%。

2.8 加样回收率试验

取 1 号样品粉末约 0.05g 共 6 份, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入对照品适量, 按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 进样分析, 计算加标回收率。结果尿囊素平均回收率为 101%, RSD 为 3.2%。

2.9 样品测定

取 16 批不同山药饮片按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液, 测定尿囊素定量离子峰面积, 根据回归方程计算各样品中尿囊素的质量分数, 结果见表 2。结果表明, 标注产地为河南产(编号 8~16)山药饮片中尿囊素的质量分数总体高于其他产地, 山药经炒制后, 其尿囊素的量低于未炒制的生山药饮片。结果可见, 河南为山药道地药材产地, 尿囊素的测定结果也从另外一方面说明道地药材品质优良。

表 2 山药中尿囊素的量

Table 2 Contents of allantoinin in *Dioscoreae Rhizoma*

编号	质量分数 / %	编号	质量分数 / %
1	0.10	9	0.67
2	0.03	10	0.37
3	0.10	11	1.00
4	0.04	12	0.58
5	0.01	13	0.37
6	0.12	14	0.19
7	0.07	15	0.71
8	0.30	16	0.50

3 讨论

3.1 色谱-质谱条件的确定

分别考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-5 mmol/L 乙酸铵溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液等流动相系统。结果发现加入盐的流动相和加入酸的流动相, 离子响应较低, 分析其原因是酸的加入会抑制尿囊素的电

离, 致使离子响应低, 故本实验采用乙腈-水作为流动相。在质谱条件的选择中, 为使各准分子离子峰信号达到最强, 以正、负离子模式分别进行检测, 并进行二级质谱扫描。结果发现选择负离子模式检测时, 离子峰强度较高。

3.2 样品提取方法的选择

结合尿囊素的极性, 分别考察了水、20%、50%、90%、20%、50%、90%乙腈作为提取溶剂, 结果表明以 90%乙腈作为提取溶剂时提取率最高, 且能有效去除样品中的蛋白质, 减少对离子源的污染, 故将 90%乙腈作为提取溶剂。

本研究利用 HPLC-MS/MS 测定山药中尿囊素的量, 由于质谱采用 MRM 扫描模式, 样品中其他成分不会对待测成分产生干扰, 方法简单、灵敏、准确。本方法可为含山药药材、饮片及其制剂质量控制标准的制定提供参考。

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: 上海科技出版社, 1996.
- [2] 顾文珍, 秦万章. 尿囊素的作用及其临床应用 [J]. 新药与临床, 1990, 9(4): 232-234.
- [3] 徐学山, 韩爱琴, 黄志芳. 差示分光光度法测定胃肠宁片中尿囊素含量 [J]. 中国医院药学杂志, 1996, 16(2): 71-72.
- [4] 赵新峰, 孙毓庆. 毛细管电泳法测定山药中尿囊素的含量 [J]. 中草药, 2002, 33(11): 1038-1040.
- [5] 王海波, 蔡宝昌. 反相高效液相色谱法测定不同产地山药中尿囊素的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3): 190-192.
- [6] 张 军, 秦雪梅, 薛黎明, 等. HPLC-ELSD 法测定山药中尿囊素含量的研究 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(10): 1648-1650.
- [7] 白 雁, 朱凤云, 王 东, 等. HPLC 法测定不同产地山药中尿囊素的含量 [J]. 中草药, 2003, 34(2): 179-180.
- [8] 章 茹, 万义玲, 张定亨. 尿囊素的性质与应用 [J]. 南昌大学学报, 1997, 19(2): 81-87.