

## UPLC-MS/MS 法测定不同产地多穗金粟兰中绿原酸、异嗪皮啶-7-O-β-D-葡萄糖苷、异嗪皮定、4-O-β-D-吡喃糖迷迭香酸和迷迭香酸

胡国辉, 陈焯平, 谭丽盈

广州中医药大学第一附属医院 药学部, 广东 广州 510405

**摘要:** 目的 建立超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法测定不同产地多穗金粟兰中绿原酸、异嗪皮啶-7-O-β-D-葡萄糖苷、异嗪皮定、4-O-β-D-吡喃糖迷迭香酸和迷迭香酸。方法 采用 Waters UPLC HSS T3 C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 以乙腈-0.1%甲酸为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 2 μL。质谱采用电喷雾负离子模式采集, 采集方式: 多反应检测和多通道分段采集。结果 绿原酸、异嗪皮啶-7-O-β-D-葡萄糖苷、异嗪皮定、4-O-β-D-吡喃糖迷迭香酸和迷迭香酸分别在 0.48~15.36、0.20~6.50、0.24~7.84、0.38~12.26、0.92~29.44 μg/mL 线性关系良好; 平均回收率分别为 95.19%、93.77%、92.50%、99.51%、96.96%。10 批不同产地多穗金粟兰中 5 种成分含量差异较大。结论 方法灵敏度高、准确度高、分析速度快, 可为提高多穗金粟兰药材质量标准提供参考。

**关键词:** 多穗金粟兰; 绿原酸; 异嗪皮啶-7-O-β-D-葡萄糖苷; 异嗪皮定; 4-O-β-D-吡喃糖迷迭香酸; 迷迭香酸; 超高效液相色谱串联质谱

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2026)04-0993-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.04.015

## Determination of chlorogenic acid, isofraxidin-7-O-β-D-glucoside, isofraxidin, 4-O-β-D-glucopyranosyl-rosmarinic acid and rosmarinic acid in *Chloranthus multistachys* from different origins by UPLC-MS/MS method

HU Guohui, CHEN Zhuoping, TAN Liying

Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

**Abstract: Objective** To develop a UPLC-MS/MS method for the quantification of chlorogenic acid, isofraxidin-7-O-β-D-glucoside, isofraxidin, 4-O-β-D-glucopyranosyl-rosmarinic acid, and rosmarinic acid in *Chloranthus multistachys* from different origins. **Methods** Waters HSS T3 C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) was used, with acetonitrile - 0.1% formic acid as the mobile phase, employing gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min, column temperature of 40 °C, and an injection volume of 2 μL. Mass spectrometry was performed in negative ESI mode, with data acquisition methods including MRM and segmented multi-channel collection. **Results** The calibration curves were linear in the ranges of 0.48 — 15.36, 0.20 — 6.50, 0.24 — 7.84, 0.38 — 12.26, and 0.92 — 29.44 μg/mL for chlorogenic acid, isofraxidin-7-O-β-D-glucoside, isofraxidin, 4-O-β-D-glucopyranosyl-rosmarinic acid, and rosmarinic acid, and their average recoveries were 95.19%, 93.77%, 92.50%, 99.51% and 96.96%, respectively. The content of five constituents was obviously different in *C. multistachys* from different origins. **Conclusion** The method is high sensitive, accurate, and rapidly, which can provide the reference for the quality standard of *C. multistachys*.

**Key words:** *Chloranthus multistachys* S. J. Pei; chlorogenic acid; isofraxidin-7-O-β-D-glucoside; isofraxidin; 4-O-β-D-glucopyranosyl-rosmarinic acid; rosmarinic acid; UPLC-MS/MS

金粟兰属植物在我国分布较广, 且同属植物较多, 有多穗金粟兰、丝穗金粟兰、宽叶金粟兰等, 其中多穗金粟兰产于河南、江苏、浙江、陕西等地, 又名四大天王、四块瓦<sup>[1-2]</sup>, 具有活性祛瘀、消肿止

痛的功效, 主要用于跌打损伤、骨折、毒蛇咬伤等症<sup>[3-4]</sup>。金粟兰属植物富含挥发油、黄酮、酚酸类成分<sup>[5-7]</sup>, 具有抗炎、抗氧化、镇痛等多种药理活性<sup>[8]</sup>。多穗金粟兰尚未收载于《中国药典》, 仅收载于地方

收稿日期: 2025-10-14

作者简介: 胡国辉 (1986—), 男, 广东广州人, 主管药师, 本科, 从事中药制剂分析研究。E-mail: huguohui368@163.com

药材标准中,其市场流动药材质量参差不齐,并且针对多穗金粟兰的质量评价研究较少,缺乏系统的定性定量数据,仅有关于其部分化学成分、绿原酸等测定的报道<sup>[9-10]</sup>,因此亟需建立科学、准确和高效的定量分析方法。笔者在前期的预实验中采用高分辨质谱对多穗金粟兰中化学成分分析时,发现其含有迷迭香酸-4-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、迷迭香酸、异嗪皮啶-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷等,且迷迭香酸、迷迭香酸-4-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷的含量较高。液质联用在多成分测定中具有较高的优势,通过筛选特定离子对进行测定,干扰较少、专属性强、分析速度快,适用于复杂中药成分测定<sup>[11]</sup>。为了全面地控制多穗金粟兰质量,本研究采用超高效液相色谱串联质谱法测定多穗金粟兰中绿原酸、异嗪皮啶-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、异嗪皮啶、4-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃糖迷迭香酸和迷迭香酸 5 种成分,方法灵敏度高、准确度高、分析速度快,可为提高多穗金粟兰药材质量标准提供参考。

### 1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪,三重四级杆质谱仪, Waters Iclass, Waters Xevo TQS(美国 Waters 公司); Masslynx 4.1 工作站, BT124S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司)。Milli-Q Advantage 超纯水机, KQ-500DE 型数控超声波清洗器(苏州昆山超声波仪器有限公司), Genius1025 氮气发生器(PE 公司)。

绿原酸(批号 110753-202119,质量分数以 96.3%计)、异嗪皮啶(批号 110834-202310,质量分数以 99.8%计)、迷迭香酸(批号 111871-202007,质量分数以 98.1%计)对照品均购自中国食品药品检定研究院,迷迭香酸-4-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷(批号 220801,质量分数以 98.0%计)、异嗪皮啶-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷(批号 221102,质量分数以 98.0%计)对照品购自四川维克奇生物科技有限公司。甲酸为质谱级(天津科密欧试剂公司),乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司),水为超纯水(密理博超纯水机制备),其他试剂均为分析纯。

10 批多穗金粟兰药材采集于陕西、江西、四川和浙江等地,所有药材均经广州中医药大学第一附属医院药学部梁文能副主任药师鉴定为金粟兰科多穗金粟兰 *Chloranthus multistachys* S. J. Pei 的根和根茎,相关信息见表 1。

## 2 方法与结果

### 2.1 混合对照品溶液的制备

精密称取绿原酸 7.68 mg、迷迭香酸 14.72 mg

表 1 多穗金粟兰药材信息

批号	产地	采集时间
20221001	江西吉安井冈山	2022-01
20221102	江西吉安井冈山	2022-11
20221205	江西吉安泰和县	2022-12
20230102	陕西商洛柞水县	2023-01
20230203	陕西商洛镇安县	2023-02
20230204	陕西商洛镇安县	2023-02
20240201	四川苍溪县	2024-02
20240302	四川青川县	2024-03
20240303	浙江金华市	2024-03
20240501	浙江湖州市	2024-05

置同一个 25 mL 量瓶中,加 50%甲醇溶解稀释至刻度,作为对照品储备溶液 I;另精密称取异嗪皮啶 7.84 mg、迷迭香酸-4-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷 12.26 mg、异嗪皮啶-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷 6.50 mg 置同一个 50 mL 量瓶中,加 50%甲醇溶解稀释至刻度,作为对照品储备溶液 II;然后分别精密吸取对照品储备溶液 I、II 各 1 mL 置同一个 20 mL 量瓶中,加 50%甲醇稀释至刻度,摇匀,作为混合对照品溶液(含绿原酸、迷迭香酸、异嗪皮啶、迷迭香酸-4-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、异嗪皮啶-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷 14.79、28.8、87.82、12.01、6.37  $\mu$ g/mL)。

### 2.2 供试品溶液的制备

取多穗金粟兰粉末 0.5 g,精密称定,加 50%甲醇 50 mL,称重,超声处理 30 min,冷却,用 50%甲醇补足减失的质量,摇匀,用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

### 2.3 色谱条件

Waters UPLC HSS T3 C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu$ m),以乙腈(A)-0.1%甲酸(B)为流动相,梯度洗脱(0~2 min, 20% A; 2~8 min, 20% $\rightarrow$ 50% A; 8~10 min, 50% $\rightarrow$ 60% A),体积流量 0.3 mL/min,柱温 40  $^{\circ}$ C,进样量 2  $\mu$ L。

### 2.4 质谱条件

电离方式:电喷雾(ESI)负离子模式采集,采集方式:多反应检测(MRM)和多通道分段采集,离子源温度 150  $^{\circ}$ C,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 40 V,去溶剂气温度 400  $^{\circ}$ C,去溶剂气流量 850 L/h,5 种成分 MRM 测定的参数见表 2。记录色谱图,见图 1。

表 2 5 个成分的质谱参数

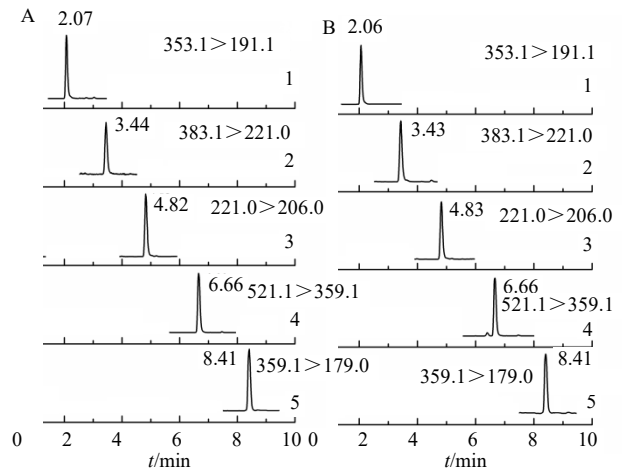
名称	母离子	子离子	碰撞电压/V
绿原酸	353.1	191.1*, 179.2	28、35
异嗪皮啶-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	383.1	221.0*, 197.1	15、20
异嗪皮啶	221.0	206.0*, 191.0	10、20
迷迭香酸-4- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	521.1	359.1*, 197.0	22、35
迷迭香酸	359.1	197.0*, 161.0	20、30

\* -定量离子。

\* -quantitative ions.

## 2.5 线性关系考察

取混合对照品溶液作为线性系列溶液的 6 号溶液，然后精密吸取 6 号溶液 5 mL 置 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇稀释至刻度，作为 5 号溶液；精密吸取 5 号溶液 5 mL 置 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇稀释至刻度，作为 4 号溶液；精密吸取 4 号溶液 5 mL 置 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇稀释至刻度，作为 3 号溶液；精密吸取 3 号溶液 5 mL 置 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇稀释至刻度，作为 2 号溶液；精密吸取 2 号溶液 5 mL 置 10 mL 量瓶中，加 50% 甲醇稀释



1-绿原酸, 2-异嗪皮啶-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷, 3-异嗪皮啶, 4-迷迭香酸-4-*O*-β-*D*-葡萄糖苷, 5-迷迭香酸。

1-chlorogenic acid, 2-isofraxidin-7-*O*-β-*D*-glucoside, 3-isofraxidin, 4-4-*O*-β-*D*-glucopyranosyl-rosmarinic acid, 5-rosmarinic acid.

图 1 对照品 (A) 和多穗金粟兰 (B) 的 MRM 色谱图  
Fig. 1 MRM chromatogram of reference substances (A) and *C. multistachys* (B)

至刻度，作为 1 号溶液；作为 6 个不同质量浓度的线性考察系列溶液，然后进样测定。以进样量的质量浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，进行线性考察，结果见表 3。

表 3 5 种成分的线性方程、相关系数和线性范围

Table 3 Result of linear equation, correlation coefficient and linear range

名称	方程	$r^2$	线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
绿原酸	$Y=837.07 X+179.00$	0.998 5	0.48~15.36
异嗪皮啶-7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	$Y=1 896.1. X+116.16$	0.999 5	0.20~6.50
异嗪皮啶	$Y=2 004.4. X+146.09$	0.998 9	0.24~7.84
迷迭香酸-4- <i>O</i> -β- <i>D</i> -葡萄糖苷	$Y=1 766.5. X+446.00$	0.999 0	0.38~12.26
迷迭香酸	$Y=408.85 X+88.86$	0.999 2	0.92~29.44

## 2.6 精密度试验

取 4 号对照品溶液 (含绿原酸、异嗪皮啶-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、异嗪皮啶、迷迭香酸-4-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、迷迭香酸 3.84、1.625、1.960、3.065、7.36  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，连续进样 6 次，记录峰面积，结果显示绿原酸、异嗪皮啶-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、异嗪皮啶、迷迭香酸-4-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、迷迭香酸峰面积的 RSD 值分别为 1.75%、0.82%、1.86%、1.07%、2.20%。

## 2.7 重复性试验

取批号 221001 多穗金粟兰粉末 0.5 g，精密称定，平行取样 6 份，制备供试品溶液，测定，结果

绿原酸、异嗪皮啶-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、异嗪皮啶、迷迭香酸-4-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、迷迭香酸的平均质量分数分别为 0.625、0.120、0.091、3.15、2.028 mg/g，RSD 值分别为 0.96%、0.88%、1.25%、1.02%、1.65%。

## 2.8 稳定性试验

取批号 221001 多穗金粟兰制备的供试品溶液，分别在 0、1、2、4、8、12、16、24 h 进行测定，结果绿原酸、异嗪皮啶-7-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、异嗪皮啶、迷迭香酸-4-*O*-β-*D*-葡萄糖苷和迷迭香酸峰面积的 RSD 值分别为 2.22%、2.65%、3.12%、1.97%、2.08%，结果表明该供试品溶液在 24 h 内的稳定性良好。

## 2.9 回收率试验

精密称取绿原酸 7.58 mg, 置 5 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 作为对照品溶液 I。精密称取异嗪皮啶-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷 6.02 mg、异嗪皮啶 4.63 mg 置同一 20 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 作为对照品溶液 II; 然后精密称取迷迭香酸-4-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷 7.87 mg、迷迭香酸 5.06 mg 置同一 10 mL 量瓶中。精密吸取对照品溶液 I、II 各 1 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 作为加样用对照品溶液。精密称取批号 221001 多穗金粟兰粉末 0.25 g, 平行取样 6 份, 每份分别精密加入加样用对照品溶液 1 mL, 制成供试品溶液, 进行测定, 计算得绿原酸、异嗪皮啶-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、异嗪皮啶、迷迭香酸-4-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、迷迭香酸的平均回收率分别为 95.19%、93.77%、92.50%、99.51%、96.96%, RSD 值分别为 1.67%、2.00%、3.58%、1.74%、0.97%。

## 2.10 样品测定

取不同产地的 10 批多穗金粟兰, 制备供试品溶液, 进行测定, 采用外标法计算绿原酸、异嗪皮啶-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、异嗪皮啶、迷迭香酸-4-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、迷迭香酸的质量分数, 结果见表 4。可看出不同产地多穗金粟兰中 5 种成分含量差异较大, 其中陕西商洛柞水县产的多穗金粟兰中各成分均较高, 江西吉安井冈山的含量最低。

表 4 多穗金粟兰中绿原酸、异嗪皮啶-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、异嗪皮啶、4-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃糖迷迭香酸和迷迭香酸样品测定结果 ( $n = 3$ )

Table 4 Results of chlorogenic acid, isofraxidin-7-*O*- $\beta$ -*D*-glucoside, isofraxidin, 4-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranosyl-rosmarinic acid and rosmarinic acid in *C. multistachys* ( $n = 3$ )

批号	质量分数/(mg·g <sup>-1</sup> )				
	绿原酸	异嗪皮啶-7- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷	异嗪皮啶	迷迭香酸-4- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷	迷迭香酸
20221001	0.504	0.085	0.062	2.031	1.618
20221102	0.611	0.076	0.077	2.257	1.712
20221205	0.423	0.069	0.069	2.319	1.591
20230102	1.797	0.415	0.186	6.025	5.536
20230203	1.512	0.326	0.125	5.786	5.105
20230204	1.206	0.308	0.137	5.813	5.158
20240201	0.866	0.164	0.102	3.865	1.965
20240302	0.797	0.134	0.106	4.011	2.017
20240303	0.689	0.155	0.123	3.558	1.972
20240501	0.625	0.120	0.091	3.150	2.028

## 3 讨论

### 3.1 指标成分的选择

金粟兰属植物种类较多, 多穗金粟兰是其中一种, 目前对其的研究较少, 尤其对其质量控制的报道更少, 多数报道均是化合物的提取纯化分离, 很少有对其中成分的定量研究。本研究通过查阅文献和前期预实验发现多穗金粟兰含有酚酸类迷迭香酸及其糖苷、香豆素类异嗪皮啶及其糖苷和有机酸类成分, 且绿原酸具有抗氧化和清除自由基的能力, 缓解关节滑膜炎<sup>[12]</sup>; 迷迭香酸及其糖苷可以强力抑制 COX-2、5-LOX、NF- $\kappa$ B, 减少前列腺素与白三烯生成, 同时增强局部血流, 加速瘀血吸收, 产生镇痛、消肿效果<sup>[13]</sup>; 异嗪皮啶及其糖苷具有抗炎、镇痛、抗氧化、调节免疫作用<sup>[10]</sup>。上述成分与多穗金粟兰活血祛瘀、接骨续筋、消肿解毒的功效一致, 因此有必要对其进行控制, 保证其临床疗效, 故本实验建立多穗金粟兰中上述 5 种成分的定量研究, 为其药理活性和质量标准提供定量依据。

### 3.2 色谱、质谱条件的优化

实验中发现当采用甲醇作为溶剂时, 绿原酸、迷迭香酸的峰形分叉, 峰形不对称, 通过调整锥孔电压、碰撞电压、去溶剂气流速、去溶剂气温度等参数, 每个化合物至少选择 2 个响应较高的离子对, 作为定量和定性的依据, 进而建立 MRM 定量方法, 然后通过调整流动相比比例, 柱温, 并通过考察 0.1% 甲酸和 0.1% 乙酸, 结果发现绿原酸采用 50% 甲醇作为溶剂时, 流动相采用 0.1% 甲酸溶液与乙腈时峰形较好, 最后对体积流量、柱温等参数进行了考察, 选择 40 °C, 体积流量 0.3 mL/min 时, 各色谱峰形均良好, 符合定量要求。

本实验建立了金粟兰属植物多穗金粟兰中 5 种成分绿原酸、异嗪皮啶-7-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、异嗪皮啶、迷迭香酸-4-*O*- $\beta$ -*D*-葡萄糖苷、迷迭香酸的测定方法, 该方法准确度高、分析速度快, 且采用液质联用方法专属性强, 灵敏度高, 通过对 5 种成分的测定, 发现不同产地的多穗金粟兰药材含量具有一定的差异性, 可以反映多穗金粟兰的药材状况, 同时由于本实验所收集的样品较少, 且成分均是采用高分辨质谱解析后并通过对照品确认, 部分成分是首次从该植物中报道, 故未对其各成分做限度规定, 后续将会收集更多的不同来源药材进行测定, 从而全面反映多穗金粟兰中指标成分的含量, 进而设定各成分的限度, 然后用于多穗金粟兰药材的质

量控制,同时为其研究药理药效和质量标准提高提供方法依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 杨秀伟. 金粟兰属药用植物的物质基础 [J]. 中国现代中药, 2017, 19(4): 459-481.
- [2] 冉新辉. 多穗金粟兰的化学成分研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [3] 朱成光, 武子敬, 晏晨. 多穗金粟兰乙酸乙酯部分的抗氧化及抗炎活性研究 [J]. 人参研究, 2023, 35(1): 18-19.
- [4] 陈超, 曾慧婷, 何小群, 等. 基于本草学理论的金粟兰科植物选药科学性探讨 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 3036-3040.
- [5] 朱成光, 张卫青, 张丽萍, 等. 多穗金粟兰的化学成分及其抗肿瘤活性 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(2): 242-249.
- [6] 黄伟明. 多穗金粟兰中萜类化学成分研究 [D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- [7] 林凤祥, 李宏焘, 张丽, 等. 多穗金粟兰的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(12): 2273-2279.
- [8] 邓伟麟, 吴莹莹, 毕丹, 等. 肿节风药材的 HPLC 指纹图谱研究及其异嗪皮啶与迷迭香酸的含量测定 [J]. 中国药房, 2013, 24(47): 4472-4474.
- [9] 罗杠, 马兴霞, 罗永明, 等. HPLC 同时测定金粟兰植物中香豆素及倍半萜内酯类有效成分的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 47-50.
- [10] 章蕊, 王珊, 戢太阳, 等. HPLC-DAD 法测定多穗金粟兰不同部位中异嗪皮啶和党参内酯的含量 [J]. 中国药师, 2020, 23(11): 2291-2294.
- [11] 程晓敏, 熊莺, 刘英发, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定肿节风中 8 种化学成分含量 [J]. 亚太传统医药, 2024, 20(9): 33-37.
- [12] 王庆华, 杜婷婷, 张智慧, 等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展 [J]. 药学学报, 2020, 55(10): 2273-2280.
- [13] 曹雯, 张文娟, 潘金凤, 等. 迷迭香酸药理作用的研究进展 [J]. 广西中医药, 2019, 42(1): 54-58.

【责任编辑 解学星】