

UFLC-MS 法同时测定木瓜饮片中 8 种有机酸

于 生, 张 丽, 单鸣秋, 钱 岩, 丁安伟*

南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心,
江苏 南京 210023

摘 要: **目的** 建立同时快速测定木瓜饮片中莽草酸、柠檬酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、肉桂酸、齐墩果酸、熊果酸 8 种有机酸的超高速液相色谱-质谱 (UFLC-MS) 分析方法。 **方法** 采用岛津 LC-20A 快速液相系统, AB Sciex Qtrap 5500 型三重四级杆线性离子阱质谱仪, Poroshell 120 色谱柱 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流动相为 0.5% 醋酸水溶液 (A)-0.5% 醋酸甲醇溶液 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 10% A; 5~13 min, 10%~30% A; 13~15 min, 30%~95% A; 15~25 min, 95% A; 分析时间 25 min; 体积流量 0.6 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 2 μL。采用电喷雾离子源进行负离子模式检测, 多反应监测模式 (MRM) 用于定量分析, 源喷射电压为-4 500 V, 离子源温度为 550 ℃。 **结果** 测定的 8 种成分在线性范围内均具有良好的线性关系 ($r \geq 0.999 2$), 平均回收率在 96.14%~101.20%。不同产地的木瓜饮片中 8 种成分的量差异较大, 其中, 柠檬酸、绿原酸、莽草酸的量较高, 咖啡酸的量最低。 **结论** 建立的测定方法重复性好, 且快速、灵敏度高, 可为木瓜饮片的质量控制提供依据以及方法学支持。

关键词: 木瓜; 有机酸; 快速液相色谱-质谱法; 莽草酸; 柠檬酸; 原儿茶酸; 绿原酸; 咖啡酸; 肉桂酸; 齐墩果酸; 熊果酸; 多反应监测

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)14-2465-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.012

Simultaneous determination of eight organic acids in *Chaenomelis Fructus* by UFLC-MS

YU Sheng, ZHANG Li, SHAN Ming-qiu, QIAN Yan, DING An-wei

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, and National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish an UFLC-MS method for simultaneous determination of eight active components (shikimic acid, citric acid, protocatechuic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, cinnamic acid, oleanolic acid, and ursolic acid). **Methods** Shimadzu LC-20A system was used, equipped with AB Sciex Qtrap 5500. The analysis was performed on a Poroshell 120 column (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm). The eight components were separated in 25 min with gradient mobile phase consisting of 0.5% CH₃COOH-H₂O (A) and 0.5% CH₃COOH-CH₃OH (B): 0—5 min, 10% A; 5—13 min, 10%—30% A; 13—15 min, 30%—95% A; 15—25 min, 95% A. The temperature of column was 30 ℃, and the injection volume was 2 μL. The multiple-reaction monitoring scanning (MRM) was employed for the quantification with switching electrospray ion source polarity in negative mode. The ion spray voltage was set at -4 500 V and the turbo spray temperature was maintained at 550 ℃. **Results** The eight components had a good linearity ($r \geq 0.999 2$) within the linear ranges. The average recoveries were 96.14%—101.20%. The contents of the eight components in *Chaenomelis Fructus* varied from the different habitats. The contents of shikimic acid, citric acid, and chlorogenic acid were high while the content of caffeic acid was low. **Conclusion** The developed UFLC-MS method is simple, sensitive, and accurate and has the good repeatability in separation, which is available for the quality control of *Chaenomelis Fructus*.

收稿日期: 2016-02-22

基金项目: 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心项目 (ZDXM-1-3); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2014); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目 (PPZY2015A070)

作者简介: 于 生 (1980—), 女, 高级实验师, 博士, 主要从事中药炮制及饮片质量标准研究。Tel: (025)85811839 E-mail: yusheng1219@163.com

***通信作者** 丁安伟 (1950—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中药炮制研究。Tel: (025)85811523 E-mail: awding105@163.com

Key words: *Chaenomeles Fructus*; organic acids; UFLC-MS; shikimic acid; citric acid; protocatechuate; chlorogenic acid; caffeic acid; cinnamic acid; oleanolic acid; ursolic acid; multiple-reaction monitoring scanning

木瓜为蔷薇科 (Rosaceae) 植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟果实, 味酸性温, 归肝、脾经, 具有舒筋活络, 和胃化湿等功效, 主要用于治疗湿痹拘挛、腰膝关节重疼痛、暑湿吐泻、转筋挛痛、脚气水肿^[1]。

传统木瓜以“味酸”者为佳^[2-3], 木瓜有机酸组成复杂、种类丰富, 如小分子脂肪酸莽草酸、柠檬酸等, 具有抗炎、抗菌、镇痛的作用^[4-5]。原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、肉桂酸等酚酸类成分具有显著的抗炎、抗氧化、抗病毒、利胆等多种生物活性^[6-11], 熊果酸、齐墩果酸等三萜酸类成分具有抗炎抑菌、降低转氨酶、防止肝硬化、镇静、降血糖等多种功效^[12-16], 《中国药典》2015 年版将熊果酸、齐墩果酸作为指标评价木瓜饮片的质量。但现有文献仅采用 HPLC-UV 法同时测定木瓜脂肪酸、酚酸 2 类有机酸^[17], 不能很好地整体评价木瓜的品质, 本研究拟建立同时测定木瓜脂肪酸 (莽草酸、柠檬酸)、酚酸 (原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、肉桂酸)、三萜酸 (齐墩果酸、熊果酸) 3 类有机酸的量的超高速液相色谱-质谱 (UFLC-MS) 方法, 以期客观、综合地评价不同产地木瓜饮片的质量, 并为其药效物质基础研究提供方法学依据。

1 仪器与材料

Shimadzu LC 20A 型快速液相色谱仪, AB Sciex Qtrap 5500 型三重四级杆线性离子阱质谱仪, 配有 ESI 离子源, Analyst 1.5.1 Software 工作站; Shimadzu Librorael-40SM 型电子分析天平 (精确到 0.01 mg)。

柠檬酸 (批号 100396-201302)、原儿茶酸 (批号 110809-201205)、绿原酸 (批号 110753-200413)、咖啡酸 (批号 110885-200102)、肉桂酸 (批号 110786-200503)、莽草酸 (批号 2014-0092), 购自南京森贝伽生物科技有限公司。上述对照品经 HPLC-UV 法检测, 归一化法计算质量分数均大于 98.0%。齐墩果酸 (批号 110709-201206, 质量分数 94.9%)、熊果酸 (批号 110742-201421, 质量分数 93.8%), 购自中国食品药品检定研究院。甲醇、水为质谱纯, 德国 Merck 公司; 其余试剂均为分析纯。

收集产地安徽 (编号 S1~S3)、湖北 (编号 S4~S6)、重庆 (编号 S7~S9) 的 9 批木瓜药材, 均经南京中医药大学吴啟南教授鉴定为蔷薇科植物贴梗

海棠 *Chaenomeles speciosa* (Sweet) Nakai 的干燥近成熟果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Poroshell 120 柱 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流动相为 0.5% 醋酸水溶液 (A)-0.5% 醋酸甲醇溶液 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 10% A; 5~13 min, 10%~30% A; 13~15 min, 30%~95% A; 15~25 min, 95% A; 分析时间 25 min; 体积流量 0.6 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 2 μL。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子化源 (ESI); 多反应监测模式 (MRM) 进行定量分析; 采用负离子检测模式; 源喷射电压 (IS) 为 -4 500 V; 离子源温度为 550 °C; 雾化气 (GS1, N₂) 压力为 379.28 kPa (55 psi); 辅助气 (GS2, N₂) 压力为 379.28 kPa (55 psi); 气帘气 (N₂) 压力为 227.568 kPa (33 psi)。接口加热, 全程通入氮气, MRM 模式定量。监测的离子对, 解簇电压 (DP) 和碰撞能量 (CE)、碰撞室出口电压 (CXP) 见表 1。MEM 质谱图见图 1。

表 1 8 个成分的质谱数据

Table 1 ESI-MSⁿ data of eight components

名称	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	DP/V	CE/eV	CXP/eV
莽草酸	173.0	93.1	-90	-21	-15
柠檬酸	190.6	85.0	-185	-30	-11
原儿茶酸	153.0	109.0	-100	-30	-14
绿原酸	352.9	191.0	-95	-24	-21
咖啡酸	178.9	135.0	-70	-20	-19
肉桂酸	147.0	103.0	-60	-14	-11
齐墩果酸	455.2	407.2	-245	-54	-33
熊果酸	455.2	407.2	-245	-54	-33

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 取各对照品适量, 加甲醇制成含莽草酸 37.41 μg/mL、柠檬酸 384.1 μg/mL、原儿茶酸 2.509 μg/mL、绿原酸 46.52 μg/mL、咖啡酸 201.8 ng/mL、肉桂酸 5.104 μg/mL、齐墩果酸 60.82 μg/mL、熊果酸 62.75 μg/mL 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备^[1] 取本品细粉约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 25 mL,

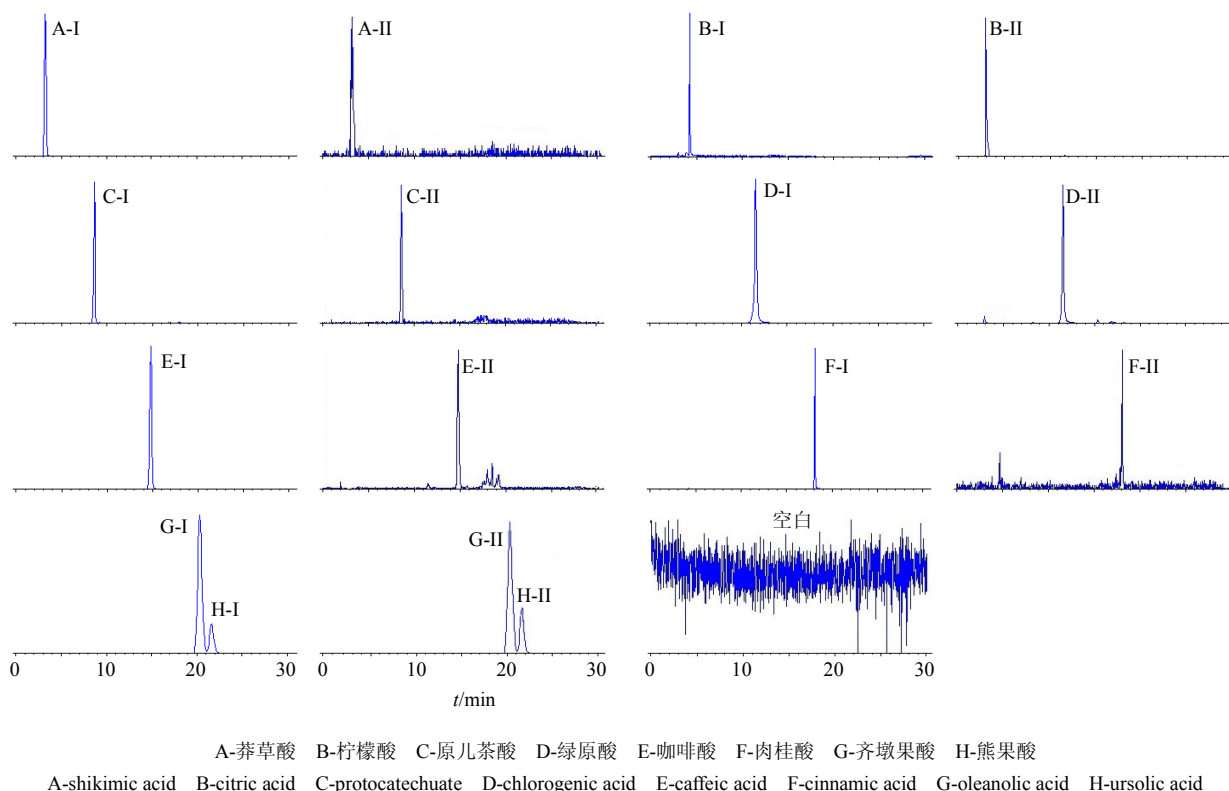


图 1 混合对照品溶液 (I) 和供试品溶液 (II) 8 个成分的 MRM 质谱图及溶剂空白质谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of eight components in mixed reference solution (I) and sample solution (II)

密塞，称定质量，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）20 min，放冷，再称定质量，用甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液 1 mL，置于 10 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，即得。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系、检测限 (LOD) 与定量限 (LOQ) 精密量取混合对照品溶液 1 mL，置于 5 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度。用倍比稀释的方法以甲醇制成系列对照品溶液，在上述色谱条件下，分别进样 2 μ L，每个质量浓度进 3 针，测定峰面积值。以峰面

积平均值与质量浓度进行线性回归。将混合对照品溶液用甲醇不断进行稀释后分析，得到 8 个成分的 LOD 值 ($S/N \approx 2 \sim 3$) 和 LOQ 值 ($S/N \approx 10$)。结果见表 2。

2.4.2 精密度试验 取 S3 样品按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液，进样 2 μ L，连续进样 6 次，依法测定，分别记录峰面积，计算 RSD，结果莽草酸、柠檬酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、肉桂酸、齐墩果酸、熊果酸峰面积的 RSD 分别为 2.27%、1.63%、3.28%、2.85%、3.01%、1.47%、0.98%、1.13%。

表 2 8 个成分的回归方程及 LOD、LOQ 值

Table 2 Regression equations and values of LOD and LOQ in eight components

化合物	回归方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	<i>r</i>	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
莽草酸	$Y=7.19 \times 10^4 X+2.69 \times 10^4$	149.6~74 820	0.999 7	3.09	9.27
柠檬酸	$Y=2.17 \times 10^5 X-1.71 \times 10^6$	1 521~760 800	0.999 7	0.32	0.96
原儿茶酸	$Y=5.85 \times 10^6 X-1.26 \times 10^5$	10.04~5 018	0.999 8	0.83	4.15
绿原酸	$Y=7.73 \times 10^6 X+4.30 \times 10^6$	186.1~93 040	0.999 8	0.29	2.04
咖啡酸	$Y=2.23 \times 10^8 X-2.76 \times 10^5$	0.807~403.6	0.999 9	0.95	4.75
肉桂酸	$Y=1.85 \times 10^5 X-1.06 \times 10^4$	20.42~10 210	0.999 8	3.85	19.25
齐墩果酸	$Y=5.73 \times 10^5 X+3.82 \times 10^5$	243.3~121 600	0.999 9	1.05	5.25
熊果酸	$Y=5.61 \times 10^4 X+2.65 \times 10^4$	251.1~125 500	0.999 2	3.76	18.80

2.4.3 稳定性试验 取 S3 样品按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,于 0、1、2、4、6、8 h 分别进样 2 μ L,依法测定,分别记录峰面积,计算 RSD,结果莽草酸、柠檬酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、肉桂酸、齐墩果酸、熊果酸峰面积的 RSD 分别为 2.42%、2.08%、1.93%、1.75%、3.18%、2.54%、1.58%、2.17%,表明供试品溶液中 8 个成分在 8 h 内稳定。

2.4.4 重复性试验 取编号为 S3 的木瓜饮片 6 份,每份 0.5 g,按“2.3.2”项方法制备供试品溶液,依法测定并计算 6 份样品中 8 个成分的平均质量分数和 RSD。结果莽草酸、柠檬酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、肉桂酸、齐墩果酸、熊果酸的平均质量分数分别为 1.174 mg/g、16.46 mg/g、56.53 μ g/g、2.224 mg/g、6.712 μ g/g、207.4 μ g/g、3.294 mg/g、1.853 mg/g, RSD 分别为 2.08%、1.97%、2.53%、2.22%、3.06%、3.65%、1.00%、1.62%。

2.4.5 加样回收率试验 取编号为 S3 的木瓜饮片 6

份,每份 0.25 g,精密称定,精密加入混合对照品溶液 25 mL (含莽草酸 18.9 μ g/mL、柠檬酸 0.205 mg/mL、原儿茶酸 0.932 μ g/mL、绿原酸 27.0 μ g/mL、咖啡酸 0.114 μ g/mL、肉桂酸 7.15 μ g/mL、齐墩果酸 31.3 μ g/mL、熊果酸 15.8 μ g/mL),按“2.3.2”项方法制备供试品溶液,依法测定并计算 6 份样品中 8 个成分的平均加样回收率和 RSD。结果莽草酸、柠檬酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸、肉桂酸、齐墩果酸、熊果酸的平均加样回收率分别为 96.77%、97.05%、97.98%、96.14%、100.9%、101.2%、100.2%、99.23%, RSD 分别为 2.59%、1.72%、2.68%、1.72%、2.71%、1.08%、2.32%、1.71%。

2.5 样品测定

取 9 批木瓜饮片,每批 3 份,按“2.3.2”项方法分别制备供试品溶液,各进样 2 μ L,依法测定并计算每批样品中 8 个成分的平均质量分数,结果见表 3。

表 3 木瓜饮片中 8 个化合物质量分数 ($n=3$)

Table 3 Contents of eight components in *Chaenomeles Fructus*

样品	质量分数/(μ g·g ⁻¹)							
	莽草酸	柠檬酸	原儿茶酸	绿原酸	咖啡酸	肉桂酸	齐墩果酸	熊果酸
S1	1 252	19 280	541.80	5 120	8.740	3 964.0	4 241	1 973
S2	2 334	17 460	36.29	1 887	11.940	1 299.0	2 300*	2 183*
S3	1 969	16 780	73.66	2 402	5.140	315.1	3 293	1 815
S4	2 434	14 780	68.99	1 451	29.160	302.3	2 460*	2 012*
S5	2 628	17 330	25.23	3 998	5.628	947.6	1 410	6 369
S6	1 934	20 210	27.13	1 613	20.790	1 004.0	1 993*	2 666*
S7	1 084	15 880	108.80	4 092	4.690	3 763.0	3 838	4 024
S8	3 315	16 980	122.80	3 102	46.760	2 824.0	1 539	5 740
S9	2 515	20 690	22.31	2 074	23.700	1 553.0	4 562	3 327

*表明齐墩果酸、熊果酸质量分数之和低于《中国药典》2015 年版规定的 0.5%

* Total contents of oleanolic acid and ursolic acid less than 0.5%, prescribed in *Chinese Pharmacopoeia* (2015 Edition)

3 讨论

实验前期采用 HPLC-PDA 分离以上 8 种有机酸,小分子脂肪酸如苹果酸、莽草酸由于极性较大,普通十八烷基键合相不保留且因紫外仅有末端吸收,导致测定莽草酸的紫外灵敏度很低。酚酸、三萜酸类有机酸对照品基线虽然实现基本分离,但样品中其他成分对待测有机酸产生干扰,不能实现基线分离,影响定量结果的准确性,故采用 UFLC-MS 法,MRM 模式检测,既可以缩短分析周期,也提高了检测灵敏度,实现待测化合物的准确定量。

遵循化合物的裂解规律,优化质谱离子源温度、辅助气和气帘气电压、子母离子的质荷比、解簇电压、碰撞电压、碰撞室出口电压,优选出最佳 MRM 测定条件。

实验结果表明,虽然熊果酸、齐墩果酸是《中国药典》2015 年版规定的指标性成分,《中国药典》2015 年版规定 2 者质量分数总和不低于 0.5%。但是柠檬酸、绿原酸、莽草酸的量均较高,尤其柠檬酸的量超出其他有机酸的量 10 倍以上。初步推断可能与产地种植品种、不同的初加工方式有关^[18]。

本实验 3 类有机酸的量测定方法的建立, 为完善木瓜质量控制提供了技术支撑, 对木瓜产地种植、初加工方法、合理贮藏起到指导作用。实验室后期拟根据临床实际, 结合药理模型, 探索上述有机酸对木瓜药效的贡献, 建立多指标的质量-效应评价体系, 为全面揭示木瓜的药效作用物质基础提供依据。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 黄立厚, 王尚全, 朱永芳. 宣木瓜采收期的选择 [J]. 中药材, 1986, 9(5): 1-3.
- [3] 靳李娜, 刘义梅, 熊永兴. 资丘木瓜的最佳采收期研究 [J]. 中药材, 2014, 37(6): 963-966.
- [4] 彭 艳, 张艳兵, 姚 明, 等. 鞘内注射氟代柠檬酸对骨癌痛大鼠的镇痛作用 [J]. 苏州大学学报, 2010, 30(4): 718-720.
- [5] 朱开梅, 顾生玖, 李美波, 等. 八角莽草酸诱导人肝癌细胞 HepG-2 凋亡及其机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(8): 154-157.
- [6] 韩 煜, 杨 沫, 谢晓梅, 等. 不同产地木瓜中绿原酸、原儿茶酸和总酚的含量测定 [J]. 中国药房, 2015, 26(24): 3399-3402.
- [7] 宋亚玲, 王红梅, 倪付勇, 等. 金银花中酚酸类成分及其抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(4): 490-495.
- [8] 刘 颖, 郭明晔, 白根本, 等. 绿原酸的研究进展 [J]. 中药材, 2012, 35(7): 1180-1185.
- [9] 李 娜, 金敬红, 姜洪芳, 等. 宣木瓜总有机酸的纯化及镇痛抗炎作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 113-119.
- [10] 朱晨晨, 程菁菁, 谢晓梅, 等. 中药木瓜水溶性总有机酸含量比较 [J]. 现代中药研究与实践, 2011, 25(3): 75-76.
- [11] 王国红, 郭直岳, 石松林, 等. 肉桂酸对人骨肉瘤 MG-63 细胞增殖和分化的影响 [J]. 中国药理学通报, 2012, 32(9): 1262-1266.
- [12] Park J H, Kwon H Y, Sohn E J, *et al.* Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling mediates ursolic acid-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells [J]. *Pharmacol Rep*, 2013, 65(6): 1366-1374.
- [13] 王晓阁, 龙全江, 周 宙, 等. 不同产地加工法对宣木瓜药材中齐墩果酸和熊果酸含量的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 11(21): 75-78.
- [14] 孟艳秋, 冯楚侨, 张良锋, 等. 齐墩果酸衍生物的合成及抗肿瘤活性研究 [J]. 药学学报, 2015, 50(4): 469-474.
- [15] 柏玉冰, 李 春, 周亚敏, 等. 夏枯草的化学成分及其三萜成分的抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3623-3629.
- [16] 钱 岩, 于 生, 单鸣秋, 等. Box-Behnken 响应面法优化宣木瓜药材、饮片一体化加工工艺 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(10): 1065-1069.
- [17] 周亚菁, 谢晓梅, 岳静怡, 等. 应用 AQ-C18 色谱柱的液相色谱法同时测定木瓜中 6 中脂肪酸和酚酸 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2117-2119.
- [18] 龙全江, 王晓阁. 宣木瓜化学成分、药理作用与采收加工技术研究 [J]. 甘肃中医学院学报, 2014, 31(1): 44-46.