

HPLC-MS/MS 法同时测定平卧菊三七水提取物中 9 种主要有效成分

尤娇娇¹, 彭志红^{2*}, 韩凤梅^{2*}

1. 湖北大学 中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062

2. 湖北大学 生物资源绿色转化协同创新中心, 湖北 武汉 430062

摘要: 目的 建立一种适合同时测定平卧菊三七 *Gynura procumbens* 水提取物中 9 种主要有效成分(芹菜素、槲皮素、芦丁、杨梅素、绿原酸、原儿茶酸、对香豆酸、咖啡酸、山柰酚)的 HPLC-MS/MS 方法。方法 40 mg 平卧菊三七水提取物经甲醇(每次 4 mL)超声提取 2 次, 合并提取液并定容到 10 mL。色谱分离采用 Shim-pack ODS C₁₈ (150 mm×2.0 mm, 4.6 μm) 分离柱, 甲醇-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量 0.2 mL/min。质谱检测采用负离子多反应监测模式, 并以厚朴酚为内标。结果 所测 9 种主要有效成分在测定质量浓度范围内线性关系良好, *r* 均大于 0.999 5; 精密性、重复性和稳定性良好; 平均加样回收率为 91.0%~101.3%, RSD≤3.31%。结论 建立的 HPLC-MS/MS 方法用于同时测定平卧菊三七水提取物中 9 种主要有效成分, 灵敏度高、专属性好。

关键词: HPLC-MS/MS; 平卧菊三七; 芹菜素; 槲皮素; 芦丁; 杨梅素; 绿原酸; 原儿茶酸; 对香豆酸; 咖啡酸; 山柰酚
中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)02-0294-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.02.013

Simultaneous determination of nine components in *Gynura procumbens* aqueous extract by HPLC-MS/MS

YOU Jiao-jiao¹, PENG Zhi-hong², HAN Feng-mei²

1. Hubei Province Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Traditional Medicine, Hubei University, Wuhan 430062, China

2. Hubei Collaborative Innovation Center for Green Transformation of Bio-resources, Hubei University, Wuhan 430062, China

Abstract: Objective To develop a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for simultaneous determination of nine components (apigenin, quercetin, rutin, myricetin, chlorogenic acid, protocatechuic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, and kaempferol) in *Gynura procumbens* aqueous extract. **Methods** *Gynura procumbens* aqueous extract (40 mg) was pretreated by two-step ultrasonic extraction using methanol (4 mL each time) as solvent and dissolved to 10 mL. Chromatographic separation was performed on Shim-pack ODS C₁₈ column (150 mm × 2.0 mm, 4.6 μm) at a flow rate of 0.2 mL/min by a gradient elution, using methanol-0.1% formic acid water solution as mobile phase. The MS detection for the nine tested components was performed in negative ion multiple reaction monitoring mode using honokiol as an internal standard (IS). **Results** All of the analytes showed good linearity (*r* ≥ 0.999 4) in the tested ranges. The precision, repeatability, and stability of the method were good for the nine components. The average recoveries were in the range of 91.0%—101.3% (RSD ≤ 3.31%). **Conclusion** The established HPLC-MS-MS method has been proven to be highly sensitive and effective for simultaneous determination of the nine testing components in *G. procumbens* aqueous extract.

Key words: HPLC-MS/MS; *Gynura procumbens* Lour.; apigenin; quercetin; rutin; myricetin; chlorogenic acid; protocatechuic acid; *p*-coumaric acid; caffeic acid; kaempferol

平卧菊三七 *Gynura procumbens* Lour. 为菊科 印度尼西亚和泰国, 在我国主要分布于广东、海南、植物, 主要分布于东南亚地区, 尤其是马来西亚、 贵州、云南等地。作为一种重要的药用植物, 平卧

收稿日期: 2016-07-18

基金项目: 湖北省自然科学基金重点项目 (2013CFA067)

作者简介: 尤娇娇 (1993—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物分析。Tel: 15871721830 E-mail: 1073895023@qq.com

*通信作者 彭志红, 男, 讲师, 主要从事药物设计与分析。Tel: 15549074842 E-mail: 278821452@qq.com

韩凤梅, 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药物分析。Tel: (027)88663590 E-mail: 1740952455@qq.com

菊三七具有治疗糖尿病^[1-2]、高血压^[3-5]、癌症^[6]、炎症^[7]、肾病^[8]、脂肪肝^[9]的药理活性。研究表明,平卧菊三七中含有多种有机酸如绿原酸^[9]、原儿茶酸、对香豆酸、咖啡酸等^[10-11]和黄酮类成分如芹菜素、槲皮素、芦丁、杨梅素、山柰酚等^[10-12]以及三萜类成分^[13],具有显著的抗氧化作用,可作为天然的抗氧化剂^[11]。由于平卧菊三七水提取物成分复杂,目前,我国尚未制定平卧菊三七水提取物统一的质量标准。本实验采用 HPLC-MS/MS 法^[14-16]同时检测了平卧菊三七水提取物中 4 种有机酸类成分(绿原酸、原儿茶酸、对香豆酸、咖啡酸)和 5 种黄酮类成分(芹菜素、槲皮素、芦丁、杨梅素、山柰酚),方法选择性好、灵敏度高,可用于平卧菊三七水提物的质量控制。

1 仪器与材料

岛津 LC-MS/MS 系统,包括 LC-20AD 二元泵、CTO-20A 柱温箱、SIL-20A 自动进样器、DGU-20A 3R 脱气装置,MS-8040 质谱仪,LabSolutions 工作站,日本岛津公司;5810R 型高速离心机,德国 Eppendorf 公司;BP211D 型电子天平,德国 Sartorius 公司;WH-2 微型漩涡混合仪,上海沪西分析仪器厂;Vortex-5 型漩涡震荡器,天津仪器厂;KQ-250E 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

对照品和厚朴酚(批号 110730-201614,内标)、绿原酸(批号 110753-201415)、槲皮素(批号 10081-9905)、咖啡酸(批号 110885-200102)、原儿茶酸(批号 110809-201205)均由中国食品药品检定研究院提供,质量分数均 $\geq 98\%$;对照品芹菜素(批号 D15122101)、芦丁(批号 D16021901)、杨梅素(批号 D15120601)、对香豆酸(批号 D15101801)、山柰酚(批号 D15110802)均由南京狄尔格医药科技有限公司提供,质量分数均 $\geq 98\%$ 。屈臣氏蒸馏水;色谱纯甲醇,德国 Merck 公司;色谱纯甲酸,Sigma 公司;平卧菊三七水提取物,陕西锦泰生物工程有限公司,批号 JT151124、JT160907、JT161115;规格 1 kg/袋,相当于原药材 10 kg。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Shim-pack ODS C₁₈ 柱(150 mm \times 2.0 mm, 4.6 μ m),配 Shim-pack ODS C₁₈ 保护柱(5.0 mm \times 2.0 mm, 4.6 μ m);柱温 35 $^{\circ}$ C;流动相为 0.1% 甲酸水溶液-甲醇,梯度洗脱程序:0~15 min, 20%~

85% 甲醇;15~20 min, 80%~20% 甲醇;体积流量 0.2 mL/min;进样量 5 μ L。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子化源(ESI),在负离子模式下采用多反应检测(MRM),每种化合物的子离子依据其母离子的碰撞诱导解离优化得到,用于定量分析的离子对:和厚朴酚 m/z 265.0 \rightarrow 224.2,芹菜素 m/z 269.0 \rightarrow 117.2,槲皮素 m/z 301.0 \rightarrow 151.0,芦丁 m/z 609.0 \rightarrow 300.0,杨梅素 m/z 317.0 \rightarrow 151.0,绿原酸 m/z 353.0 \rightarrow 191.1,原儿茶酸 m/z 153.0 \rightarrow 109.0,对香豆酸 m/z 163.0 \rightarrow 119.1,咖啡酸 m/z 179.0 \rightarrow 135.05,山柰酚 m/z 285.0 \rightarrow 93.2。其他质谱条件:源喷射电压-3 500 V,温度 400 $^{\circ}$ C,雾化气体积流量 3 L/min,气帘气体积流量 15 L/min。

2.3 对照品溶液的制备

精密称取咖啡酸、原儿茶酸、绿原酸、对香豆酸、芦丁、杨梅素、芹菜素、山柰酚、槲皮素对照品适量,芹菜素用二甲基亚砷制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的对照品储备液,其他均用甲醇制成 1 mg/mL 的对照品储备液;精密称取和厚朴酚(内标)对照品适量,用甲醇制成质量浓度为 1.48 mg/mL 的对照品储备液。芹菜素对照品储备液精密取 10 μ L,芦丁、山柰酚、杨梅素对照品储备液各精密取 24 μ L,咖啡酸、绿原酸、槲皮素对照品储备液各精密取 32 μ L,原儿茶酸、对香豆酸对照品储备液各精密取 80 μ L,置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度芹菜素为 0.1 μ g/mL,芦丁、山柰酚、杨梅素为 2.4 μ g/mL,咖啡酸、绿原酸、槲皮素为 3.2 μ g/mL,原儿茶酸、对香豆酸为 8 μ g/mL 的混合对照品溶液。和厚朴酚对照品储备液精密取 10 μ L,置于 10 mL 量瓶中,加入甲醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为 1.48 μ g/mL 的内标溶液。

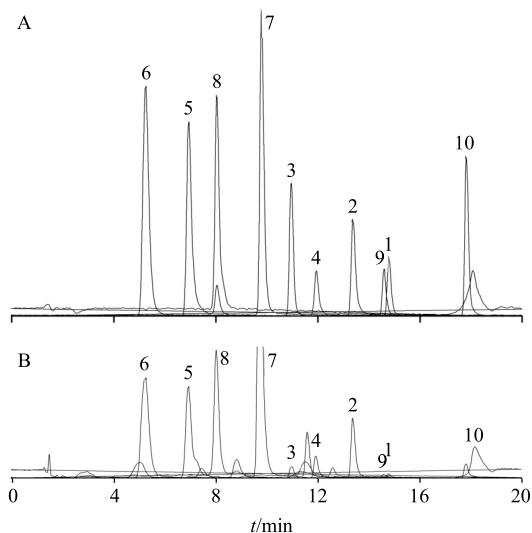
2.4 供试品溶液的制备

取平卧菊三七提取物约 40 mg,置于 10 mL Eppendorf 离心管中,加甲醇 4 mL,室温超声提取 30 min 后,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液;沉淀重复提取 1 次后,合并 2 次上清液,放至室温,用甲醇定容至 10 mL。摇匀后用 0.22 μ m 的微孔滤膜滤过,取续滤液 800 μ L 挥干,400 μ L 流动相复溶作为供试品溶液。

2.5 专属性考察

分别精密吸取混合对照品溶液、供试品溶液各

5 μL, 进样分析, 结果见图 1。各化合物所选离子对之间无干扰, 方法专属性良好。



1-芹菜素 2-槲皮素 3-芦丁 4-杨梅素 5-绿原酸 6-原儿茶酸
7-对香豆酸 8-咖啡酸 9-山柰酚 10-厚朴酚
1-apigenin 2-quercetin 3-rutin 4-myricetin 5-chlorogenic acid
6-protocatechuic acid 7-p-coumaric acid 8-caffeic acid
9-kaempferol 10-honokiol

图 1 混合对照品溶液 (A) 与平卧菊三七水提取物 (B) 的提取离子流色谱图 (EIC) (A、B 均为叠加图)

Fig. 1 EIC of mixed references solution (A) and *G. procumbens* aqueous extract (B) (A and B are superimposed figures)

2.6 线性关系及定量限考察

在“2.1”项色谱条件和“2.2”项质谱条件下测定, 以对照品进样质量浓度为横坐标 (X), 对照品色谱峰面积与内标色谱峰面积之比为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到各物质的线性回归方程。以信噪比 (S/N) 为 10 时各对照品进样质量浓度作为定量限 (LOQ), 结果见表 1。

2.7 精密度试验

按照“2.3”项下方法制备 9 种对照品低、高质量浓度质控 (QC) 样本, 分别为芹菜素 6.25、25.00 ng/mL, 槲皮素、绿原酸、咖啡酸 200、800 ng/mL, 芦丁、杨梅素、山柰酚 150、600 ng/mL, 原儿茶酸、对香豆酸 500、2 000 ng/mL, 连续重复进样 6 次, 测定对照品和内标峰面积, 代入回归方程求得实测质量浓度, 计算其 RSD 值。

结果低、高质量浓度 QC 样品的测定精密度 (RSD) 分别为芹菜素 0.93%、1.86%, 槲皮素 2.36%、1.06%, 芦丁 2.64%、1.39%, 杨梅素 2.72%、1.78%, 绿原酸 2.81%、2.88%, 原儿茶酸 0.44%、0.35%, 对香豆酸 2.23%、1.61%, 咖啡酸 2.70%、0.47%, 山柰酚 1.83%、1.38%。

2.8 稳定性试验

精密称取平卧菊三七水提物 (批号 JT151124) 40 mg, 按照“2.4”项下方法平行制备供试品溶液

表 1 9 种待测物的线性回归方程及定量限

Table 1 Linear regression equations and LOQs of nine testing constituents

化合物	线性回归方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	r	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
芹菜素	$Y=0.007\ 777\ X+0.006\ 360$	3.125~50.000	0.999 7	0.004 8
槲皮素	$Y=0.003\ 042\ X+0.103\ 6$	100~1 600	0.999 6	0.78
芦丁	$Y=0.000\ 682\ 4\ X+0.017\ 24$	75~1 200	0.999 5	0.29
杨梅素	$Y=0.001\ 423\ X-0.036\ 90$	75~1 200	0.999 9	2.34
绿原酸	$Y=0.003\ 933\ X+0.064\ 84$	100~1 600	0.999 6	1.56
原儿茶酸	$Y=0.001\ 869\ X+0.261\ 4$	250~4 000	0.999 6	7.81
对香豆酸	$Y=0.006\ 429\ 8\ X+1.087$	250~4 000	0.999 5	1.95
咖啡酸	$Y=0.006\ 659\ X+0.347\ 9$	100~1 600	0.999 6	6.25
山柰酚	$Y=0.000\ 264\ 2\ X+0.001\ 615$	75~1 200	0.999 8	2.34

6 份, 分别在室温下放置 2、6、12 h 后进样测定, 记录供试品和内标峰面积, 代入回归方程求得实测浓度, 计算其 RSD 值分别为芹菜素 2.55%、槲皮素 0.52%、芦丁 3.06%、杨梅素 2.94%、绿原酸 2.85%、原儿茶酸 1.97%、对香豆酸 1.63%、咖啡酸 2.59%、山柰酚 3.10%。

2.9 重复性试验

精密称取平卧菊三七水提物 (批号 JT151124) 6 份, 每份 40 mg, 按照“2.4”项下操作制备供试品溶液, 测定每份供试品溶液中各指标成分与内标峰面积, 代入回归方程求得实测浓度, 计算其 RSD 值分别为芹菜素 3.08%、槲皮素 0.74%、芦丁 3.06%、

杨梅素 2.55%、绿原酸 1.29%、原儿茶酸 1.23%、对香豆酸 2.06%、咖啡酸 2.74%、山柰酚 3.24%。

2.10 加样回收率试验

精密称取平卧菊三七水提物(批号 JT151124) 20 mg, 加入 9 种对照品 QC 样(质量浓度分别为芹菜素 12.5 ng/mL, 槲皮素、绿原酸、咖啡酸 400 ng/mL, 芦丁、杨梅素、山柰酚 300 ng/mL, 原儿茶酸、对香豆酸 1 000 ng/mL) 适量, 按“2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 测定每份供试品溶液中各指标成分与内标峰面积, 代入回归方程求得实测质量浓度, 考察分析方法的加样回收率。结果 9 种分析物的加样回收率分别为芹菜素 96.88%

(RSD 为 3.13%)、槲皮素 93.71% (RSD 为 3.03%)、芦丁 100.0% (RSD 为 3.31%)、杨梅素 99.90% (RSD 为 2.3%)、绿原酸 101.2% (RSD 为 1.82%)、原儿茶酸 101.3% (RSD 为 2.38%)、对香豆酸 91.03% (RSD 为 1.69%)、咖啡酸 95.85% (RSD 为 2.84%)、山柰酚 98.89% (RSD 为 2.27%)。

2.11 样品测定

取 3 批平卧菊三七水提物各 40 mg, 按“2.4”项下平行制备供试品溶液, 每个批号平行制备 6 份, 测定每份供试品溶液中各指标成分与内标峰面积, 代入回归方程求得实测质量浓度, 并计算各待测组分在平卧菊三七水提物中的质量分数, 结果见表 2。

表 2 平卧菊三七水提物中 9 种成分测定结果 (n = 6)

Table 2 Quantitative determination of nine constituents in *G. procumbens* aqueous extract (n = 6)

批号	质量分数/(mg·kg ⁻¹)								
	芹菜素	槲皮素	芦丁	杨梅素	绿原酸	原儿茶酸	对香豆酸	咖啡酸	山柰酚
JT151124	1.01	26.95	21.99	23.00	39.12	95.69	75.07	18.84	22.78
JT160907	0.52	20.77	10.92	29.25	32.71	70.04	56.64	13.22	11.31
JT161115	0.67	21.65	10.10	26.72	36.70	74.23	58.88	15.83	10.84

3 讨论

3.1 质谱与色谱条件优化

采用 MRM 负离子监测 9 种待测物时灵敏度明显优于正离子模式。不同黄酮类、酚酸类物质间结构较类似, 完全色谱分离较难。考察了不同流动相组合(包括乙腈-水、甲醇-水及添加不同电解质如甲酸、乙酸铵)对分离与检测的影响, 结果表明, 在纯水流动相中各组分峰形差、拖尾严重, 在乙腈流动相中杂质分离效果差; 在水相中添加甲酸后可明显改善各物质的峰形, 抑制拖尾现象。所以最终选择甲醇-0.1%甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱, 9 种成分及内标的色谱峰分离好, 响应值稳定, 且无其他物质干扰。此外, 柱温过高(35~40 °C)会使原儿茶酸的峰形变宽, 因此实验设定柱温为 35 °C。

3.2 样品提取方法的选择

9 种待测组分可分为黄酮类和酚酸类 2 大类, 理化性质相差较大。对比研究了纯甲醇、50%甲醇及水 3 种溶媒提取平卧菊三七水提取物中目标化合物的情况, 结果表明, 纯甲醇提取效果最好, 通过进一步考察提取次数与提取时间对目标化合物得率的影响, 最终选用纯甲醇超声提取 2 次, 每次提取 30 min。

3.3 杂峰与内标浓度

实验发现, 在 MRM 模式下, 绿原酸及咖啡酸对照品各有 1 个杂峰; 而平卧菊三七水提物供试液中绿原酸和对香豆酸各有 1 个杂峰, 咖啡酸和原儿茶酸各有 3 个杂峰。虽然这些杂峰较小, 但也说明平卧菊三七水提物中存在上述测定物质的同分异构体^[17-18]。由于杂峰与测定物分离良好, 不会影响待测物的定量。此外, 为兼顾平卧菊三七水提物供试液中 9 种待测成分响应值差距, 内标质量浓度的设置使得其响应值居于 9 种待测物响应值的中间。

目前, 平卧菊三七水提取物并没有统一的质量标准。本实验建立的 LC-MS/MS 法可以快速准确地测定 9 种待测组分的量, 为平卧菊三七水提取物的质量标准的建立提供了参考, 也为其药效学和药动学研究打下了基础。

参考文献

- [1] Hassan Z, Yam M F, Ahmad M, et al. Antidiabetic Properties and mechanism of action of *Gynura procumbens* water extract instreptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Molecules*, 2010, 15(12): 9008-9023.
- [2] Lee H W, Hakim P, Rabu A, et al. Antidiabetic effect of *Gynura procumbens* leaves extracts involve modulation of hepatic carbohydrate Metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Med Plants Res*, 2012, 6(5):

- 796-812.
- [3] Hoe S Z, Lee C N, Mok S L, *et al.* *Gynura procumbens* Merr. decreases blood pressure in rats by vasodilatation via inhibition of calcium channels [J]. *Clinics*, 2011, 66(1): 143-150.
- [4] Abrika O S S, Yam M F, Asmawi M Z, *et al.* Effects of extracts and fractions of *Gynura procumbens* on rat atrial contraction [J]. *J Acupunct Meridian Stud*, 2013, 6(4): 199-207.
- [5] 郑国栋, 钟树生, 张清峰, 等. 平卧菊三七对小鼠血糖及血脂的影响 [J]. *现代食品科技*, 2013, 29(12): 2800-2804.
- [6] Nurulita N A, Meiyanto E, Sugiyanto S, *et al.* The ethyl acetate fraction of *Gynura procumbens* sensitizes wide colon cancer cell line against 5-fluorouracil but shows antagonism with cisplatin [J]. *Int J Phytomed*, 2011, 3(3): 392-405.
- [7] Zahra A A, Kadir F A, Mahmood A A, *et al.* Acute toxicity study and wound healing potential of *Gynura procumbens* leaf extract in rats [J]. *J Med Plants Res*, 2011, 5(12): 2551-2558.
- [8] Lee H J, Lee B C, Chung J H, *et al.* Inhibitory effects of an aqueous extract of *Gynura procumbens* on human mesangial cell proliferation [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2007, 11(4): 145-148.
- [9] Li X J, Mu Y M, Li T T, *et al.* *Gynura procumbens* reverses acute and chronic ethanol-induced liver steatosis through MAPK/SREBP-1c-dependent and -independent pathways [J]. *J Agricultural Food Chem*, 2015, 63(38): 8460-8471.
- [10] Kaewseejan N, Sutthikhum V, Siriamornpun S. Potential of *Gynura procumbens* leaves as source of flavonoid-enriched fractions with enhanced antioxidant capacity [J]. *J Funct Foods*, 2015, 12: 120-128.
- [11] Kaewseejan N, Siriamornpun S. Bioactive components and properties of ethanolic extract and its fractions from *Gynura procumbens* leaves [J]. *Ind Crop Prod*, 2015, 74: 271-278.
- [12] 巩升帅, 刘艳丽, 李艳, 等. 平卧菊三七的化学成分研究 (I) [J]. *中草药*, 2016, 47(11): 1856-1860.
- [13] 叶芝红, 赵艳, 朱艳萍, 等. 响应面法优化微波辅助提取平卧菊三七三萜的工艺研究 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(2): 293-297.
- [14] 吴茵, 魏欣, 张黎媛, 等. HPLC-MS/MS法同时测定参麦注射液7种主要有效成分 [J]. *中草药*, 2014, 45(18): 2625-2630.
- [15] Ye L H, Xiao B X, Cao F R, *et al.* Identification of icaritin metabolites in rats by LC-MS/MS [J]. *Chin Herb Med*, 2015, 7(4): 296-302.
- [16] 姜新, 余霞霞, 赵慧, 等. 液相色谱-质谱联用技术鉴定甘草酸二铵肠溶片中有关物质 [J]. *中草药*, 2015, 46(3): 365-368.
- [17] Zhu P, Miao X L, Chen Y. Degradation kinetics of chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, and neochlorogenic acid at neutral and alkaline pH values [J]. *Acta Pharm Sin*, 2016, 51(1): 122-126.
- [18] Oniszczyk A, Olechba M. Optimization of ultrasound-assisted extraction and LC-ESI-MS/MS analysis of phenolic acids from *Brassica oleracea* L. var. *sabellica* [J]. *Ind Crop Prod*, 2016, 83: 359-363.