

UPLC-MS/MS 法同时测定木蝴蝶中 10 个有效成分

魏 欣¹, 杨金霞^{2#}, 孙雅晴², 张 炜², 尉杰茜², 祁金龙^{2*}

1. 河北省人民医院 药学部, 河北 石家庄 050051

2. 河北医科大学 药理学教研室, 河北 石家庄 050017

摘 要: 目的 建立 UPLC-MS/MS 方法同时测定木蝴蝶中木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、黄芩苷、黄芩素、白杨素、高车前素、野黄芩素、金丝桃苷、芹菜素、槲皮素 10 种主要成分。方法 采用负离子多反应监测 (MRM) 模式, ESI 离子源, Kinetex C₁₈ 色谱柱 (100 mm×3.0 mm, 2.6 μm) 进行分离, 流动相为乙腈-甲醇-0.5% 甲酸水, 梯度洗脱, 分析时间为 7 min。结果 所测 10 种主要成分在测定浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.996 6; 精密度、重复性和稳定性良好; 平均加样回收率为 94.0%~104.5%, RSD≤3.21%。结论 首次建立可同时测定木蝴蝶中 10 种主要成分的 UPLC-MS/MS 方法, 该法操作简便, 灵敏度高, 专属性好, 分析速度快, 可用于中药材木蝴蝶的质量控制。

关键词: 木蝴蝶; UPLC 法; 木蝴蝶苷 A; 木蝴蝶苷 B; 黄芩苷; 黄芩素; 白杨素; 高车前素; 野黄芩素; 金丝桃苷; 芹菜素; 槲皮素

中图分类号: R286.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)08-2221-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.08.032

Simultaneous determination of ten components in *Oroxylum indicum* by UPLC-MS/MSWEI Xin¹, YANG Jin-xia², SUN Ya-qing², ZHANG Wei², JU Jie-xi², QI Jin-long²

1. Department of Pharmacy, Hebei People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China

2. Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: **Objective** To develop and validate an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of ten component (baicalin-7-glucoside, oroxin BCAS, baicalin, baicalein, chrysin, hispidulin, scutellarein, hyperoside, apigenin and quercetin) in *Oroxylum indicum*. **Methods** The ten components were separated within 7.0 min on a Kinetex C₁₈ column (100 mm × 3.0 mm, 2 μm) using a mobile phase consisted of methanol, acetonitrile and 0.1% formic acid water solution with gradient elution. **Results** All of the analytes showed good linearity ($r \geq 0.9966$) in the tested ranges. The precision, repeatability and stability of the method were good for the ten components. The average recoveries were in the range of 94.0%—104.5% with relative standard deviations (RSD) ≤ 3.21%. **Conclusion** A new rapid and reliable UPLC-MS/MS method was developed and validated to evaluate the quality of *O. indicum* for the first time.

Key words: *Oroxylum indicum* (L.) Vent.; UPLC; baicalin-7-glucoside; oroxin BCAS; baicalin; baicalein; chrysin; hispidulin; scutellarein; hyperoside; apigenin; quercetin

木蝴蝶为紫葳科木蝴蝶属木蝴蝶 *Oroxylum indicum* (L.) Vent. 的成熟种子, 又名千层纸、玉蝴蝶等^[1], 木蝴蝶性味苦、甘、凉, 入肺、肝、胃经, 有清肺、利咽、止咳、舒肝、和胃之功效, 主治肺热咳嗽、喉痹、音哑、肝胃气痛、疮口不

敛^[2]。现代医学研究表明, 木蝴蝶具有抗氧化^[3-4]、抗炎镇痛^[5-7]、抗癌^[8-9]、止咳^[10]、降糖^[11]等多种药理作用, 是重要的药食两用物质。木蝴蝶在我国分布范围广 (以广东、广西、贵州、云南等省的木蝴蝶资源最丰富^[4])、来源复杂, 加以其植物基原、生

收稿日期: 2019-09-26

基金项目: 河北省卫计委课题(20170287); 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZD2019054); 河北省自然科学基金面上项目(H2019206219)

作者简介: 魏 欣 (1970—), 女, 硕士, 主任药师, 研究方向为医院药学。Tel: (0311)85988004 E-mail: 956529180@qq.com

*通信作者 祁金龙 (1980—), 男, 博士, 副教授, 主要从事药动学、药效学研究工作。Tel: (0311)86266143 E-mail: jinlongqi@aliyun.com

#并列第一作者 杨金霞 (1993—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药质量控制与药动学研究。Tel: 15630191877 E-mail: 1535974309@qq.com

长环境、产地气候、采收期、储藏和炮制方法的不同,其化学成分存在很大的差异,这就势必影响其临床疗效及实验研究。《中国药典》2015 年版收录木蝴蝶的含量测定指标为木蝴蝶苷 B,然而对于有效成分不明确的中药材,仅以某一种成分存在与否或含量高低为依据往往无法进行有效的鉴别与质量评价。殷文光等^[3]在综述木蝴蝶的研究进展中对质量标准的论述十分有限,后续发表的研究则集中于黄芩苷这一非特征性成分的研究上^[12-14]。

本实验采用 UPLC 法对木蝴蝶中 10 种代表性黄酮类成分进行定性定量分析,在提高木蝴蝶药材质量控制水平的同时,揭示地域分布与药材化学成分的内在相关性,为木蝴蝶疗效的地域性特征提供理论依据。

1 仪器与材料

API 4000Q-Trap 质谱仪,配置电喷雾离子化源、Analyst 1.6 工作站(美国 AB SCIEX 公司);LC-30A 型超高效液相色谱系统,配置液相输液泵、自动进样器、柱温箱(日本岛津公司);BT125D 分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);KQ-400KDB 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XW-80A 型漩涡混合器(上海医大仪器厂)。

对照品槲皮素(批号 117-39-5)、木蝴蝶苷 A(批号 PS000698)、黄芩素(批号 I1725004)、白杨素(批号 480-40-0)、金丝桃苷(批号 1521-200202)、

黄芩苷(批号 715-200111)、芹菜素(批号 520-36-5)均购于中国食品药品检定研究院,质量分数均大于 98%;野黄芩素(批号 20140926)、高车前素(批号 20140923)购自南京春秋生物科技有限公司,质量分数均大于 98%;木蝴蝶苷 B(PS000702)按照《中国药典》2015 年版收录法自制,质量分数大于 98%。甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,水为超纯水。

所用木蝴蝶为云南(批号 180401CP365、180403CP365、160201)、广西(批号 A170501)、广东(批号 170900241)所产,由河北医科大学生药教研室赵丁教授鉴定为紫葳科木蝴蝶属木蝴蝶 *Oroxylum indicum* (L.) Vent. 的成熟种子。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱条件 Inertsustain C₁₈ 色谱柱(100 mm×3.0 mm, 2 μm),柱温 40 ℃,流动相 A 为乙腈, B 为甲醇, C 为含 0.5% 甲酸的水,梯度洗脱(0~5 min, 25% A, 5%~55% B, 70%~20% C; 5~6 min, 25% A, 55% B, 20% C; 6~7 min, 25% A, 55%~5% B, 20%~70% C);体积流量 0.5 mL/min;进样量 5 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾电离源(ESI);多反应监测(MRM)负离子模式;源喷射电压(IS): -4 500 V;离子源温度(TEM): 450 ℃;气帘气(CUR) 137.9 kPa (20 psi);雾化气(GS1) 310.3 kPa (45 psi);辅助气(GS2) 344.8 kPa (50 psi);其他质谱参数见表 1。

表 1 木蝴蝶中 10 种主要成分的保留时间和主要质谱参数

Table 1 Retention time (t_R) and main MS parameters of ten constituents in *O. indicum*

成分	t_R /min	MS m/z	MS ² m/z	DP/V	CE/eV	参考文献
黄芩苷	2.28	445.1	268.9	-81.70	-34.37	15
木蝴蝶苷 A	2.22	431.1	268.9	-94.30	-23.21	15
木蝴蝶苷 B	1.45	593.2	269.0	-113.83	-30.67	15
金丝桃苷	1.25	463.0	300.0	-120.10	-35.01	16
白杨素	4.56	252.9	63.0	-122.10	-45.96	15
黄芩素	3.70	269.0	138.9	-103.88	-42.03	17
野黄芩素	2.35	284.9	136.9	-136.90	-39.17	16
高车前素	3.48	298.9	283.9	-84.19	-26.52	17
芹菜素	3.37	268.9	116.9	-124.60	-46.08	15
槲皮素	2.81	300.9	150.9	-134.88	-30.87	15

2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取 10 种对照品适量,加甲醇定容至刻度,摇匀,即得对照品储备液。精密量取各对照品储备液适量置于同一量瓶中,定容至刻度,制得含木蝴蝶苷 A 3.0 μg/mL、木蝴蝶苷 B 3.0 μg/mL、白杨素 0.5 μg/mL、黄芩苷 1.0 μg/mL、黄芩素 3.0

μg/mL、芹菜素 0.1 μg/mL、槲皮素 0.1 μg/mL、金丝桃苷 0.1 μg/mL、高车前素 0.1 μg/mL、野黄芩素 0.1 μg/mL 的混合对照品贮备液。

2.4 供试品溶液的制备

将木蝴蝶药材剪成小块研碎,过二号筛(24 目),混匀,精密称取粉末 0.5 g 放于锥形瓶中,加

入 85%乙醇 50 mL, 称定质量, 50 ℃超声提取 120 min, 85%乙醇补足减失的质量, 12 000 r/min 离心取上清用 85%乙醇稀释 2 倍, 15%甲醇稀释 10 倍, 流动相稀释 5 倍, 12 000 r/min 离心后 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 取对照品、供试品溶液适量, 按“2.1”项色谱条件下分析, 由图 1 可见各化合物所选峰之间无干扰, 方法专属性良好。

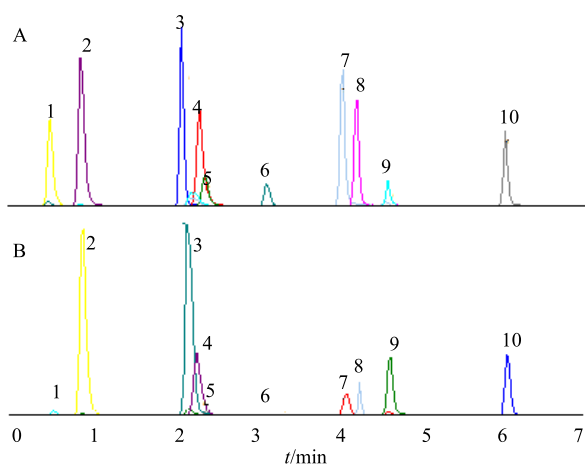
2.5.2 线性关系、检测限及定量限考察 取混合对照品溶液适量, 将其等倍数进行稀释, 得到 5 个不

同质量浓度的系列对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 以对照品进样质量浓度为横坐标 (X), 峰面积积分值为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得到各成分的线性回归方程。将混合对照品溶液逐步稀释并进行测定, 以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 时各对照品进样质量浓度分别作为检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。结果见表 2, 在各自范围内线性关系良好, 方法灵敏度较高。

2.5.3 精密度试验 取适量木蝴蝶药材, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 计算各成分峰面积 RSD, 分别为黄芩苷 4.95%、木蝴蝶苷 A 2.00%、木蝴蝶苷 B 3.01%、金丝桃苷 3.74%、白杨素 0.61%、黄芩素 1.98%、野黄芩素 4.65%、高车前素 3.00%、芹菜素 2.60%、槲皮素 2.62%, 表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取适量木蝴蝶药材 (批号 180401CP365), 按照“2.4”项下方法处理, 平行制备供试品溶液 3 份, 分别进样测定, 测得各成分质量分数的 RSD 值分别为黄芩苷 3.19%、木蝴蝶苷 A 4.57%、木蝴蝶苷 B 4.82%、金丝桃苷 2.95%、白杨素 4.24%、黄芩素 3.59%、野黄芩素 4.24%、高车前素 3.26%、芹菜素 2.32%、槲皮素 1.15%。结果表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 将供试品溶液室温下放置 0、4、8、12、18、24 h 后, 按照“2.4”的方法制备溶液分别进样, 记录峰面积, 计算各组峰面积的 RSD 值, 依次为黄芩苷 2.36%、木蝴蝶苷 A 2.84%、木蝴蝶苷 B 1.57%、金丝桃苷 3.98%、白杨素 1.49%、黄芩素 2.43%、野黄芩素 2.36%、高车前素 3.93%、芹菜素 2.28%、槲皮素 3.36%。表明供试品溶液室



1-金丝桃苷 2-木蝴蝶苷 B 3-木蝴蝶苷 A 4-黄芩苷 5-野黄芩素 6-槲皮素 7-芹菜素 8-高车前素 9-黄芩素 10-白杨素
1-hyperoside 2-oroxin BCAS 3-baicalin-7-glucoside 4-baicalin
5-scutellarein 6-quercetin 7-apigenin 8-hispidulin
9-baicalein 10-chrysin

图 1 混合对照品 (A) 和供试品 (B) 提取离子流色谱图
Fig. 1 Extract ion chromatograms of mixed reference (A) and testing sample (B)

表 2 10 种化学成分的线性回归方程、相关系数、线性范围、LOD 及 LOQ

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficient, linear range, LOD and LOQ of ten constituents

化合物	线性回归方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
黄芩苷	$Y=3\ 080\ X+13\ 900$	0.999 6	10~1 000	0.136	0.455
木蝴蝶苷 A	$Y=4\ 420\ X+101\ 000$	0.996 6	30~3 000	0.116	0.386
木蝴蝶苷 B	$Y=2\ 520\ X+9\ 940$	0.999 0	30~3 000	0.360	1.199
野黄芩素	$Y=2\ 130\ X+430$	0.998 4	9~900	0.324	1.079
白杨素	$Y=1\ 980\ X+34\ 400$	0.998 6	5~500	0.224	0.746
黄芩素	$Y=241\ X+7\ 890$	0.999 3	30~3 000	1.682	5.607
野黄芩素	$Y=8\ 110\ X+6\ 130$	0.998 8	0.15~15	0.002	0.006
高车前素	$Y=29\ 000\ X+7\ 610$	0.998 6	0.15~15	0.007	0.023
芹菜素	$Y=5\ 270\ X+3\ 140$	0.998 9	1.00~100	0.067	0.223
槲皮素	$Y=29\ 000\ X+7\ 610$	0.999 0	1.00~100	0.631	2.105

温条件下放置 24 h 稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 精密称取木蝴蝶药材(批号 180401CP365) 0.25 g, 分别精密加入与样品中等量的相应 10 种成分的对照品储备液或固体粉末, 平行操作 6 份, 按“2.4”项下方法处理得到待测供试品溶液, 按“2.1”色谱条件测得 10 个成分的质

量分数, 计算回收率, 平均加样回收率在 94.0%~104.5%, 且 $RSD \leq 3.21\%$ 。

2.6 样品测定

分别取云南、广西、广东的木蝴蝶药材, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项下色谱条件测定并计算各待测组分的量, 结果见表 3。

表 3 木蝴蝶中 10 种化学成分定量测定结果

Table 3 Content of ten chemical constituents in *O. indicum*

批次	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)									
	黄芩苷	木蝴蝶苷 A	木蝴蝶苷 B	金丝桃苷	白杨素	黄芩素	野黄芩素	高车前素	芹菜素	槲皮素
批号 180401CP365	4 378	22 213	20 333	404	9 065	19 253	83.35	5.16	54.56	579.00
批号 180403CP365	5 647	18 444	24 480	510	3 890	12 405	23.44	1.55	60.23	110.00
批号 160201	8 390	26 540	30 154	361	5 900	10 870	55.88	7.66	30.55	354.00
批号 A170501	5 112	22 420	29 487	490	8 389	21 473	98.29	2.35	25.41	70.48
批号 170900241	12 336	25 280	23 500	370	4 461	7 560	15.35	2.47	11.94	52.28

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

木蝴蝶中 10 种成分完全色谱分离较难, 分别试用了不同的流动相组合(甲醇、乙腈和水)及添加不同的电解质(甲酸及乙酸铵), 最终选择甲醇-乙腈-0.5%甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱, 10 种成分的色谱峰峰型好, 响应值稳定, 分析时间短, 且无其他干扰。黄芩苷是由黄芩素与一分子葡萄糖醛酸结合形成的苷类化合物, 样品黄芩素提取离子流在黄芩苷保留时间处可见色谱峰, 离子对选择性较差, 二者准确定量需要色谱峰完全分离。

3.2 提取方法及溶剂的考察

在制备供试品溶液时, 本实验分别尝试了浸泡、超声、索氏回流提取方法, 选择不同体积分数的乙醇作为提取溶剂。UPLC-MS/MS 的监测结果表明, 采用索氏回流提取和浸泡法, 10 种待测成分很难同时达到较好的提取效果, 浸泡法提取不完全, 索氏回流法提取温度高, 一些苷类易发生水解, 如黄芩苷和黄芩素的含量波动较大。最终选择以 85% 乙醇作为提取溶剂, 浸泡过夜, 50 °C 超声 2 h, 再进行稀释, 膜滤过, 进样即可。

3.3 实验误差及解决方案

木蝴蝶形如蝶形薄片, 种子外延伸出宽大的翅, 质地较轻。因此, 木蝴蝶样品经粉碎后质地不均匀, 称量差异大, 方法学研究时导致同批次样品实验结果 RSD 偏高, 平行性较差。本实验对粉碎过程进行了多次调整, 最终方案确定为将药材 70

°C 烘干 12 h, 剪碎、研磨、均匀平铺, 取固定面积的粉末称定质量, 再以 85% 的乙醇 100 mg/mL 溶液进行提取。

4 结论

本实验建立了同时测定木蝴蝶中木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B、金丝桃苷等 10 种成分 UPLC-MS/MS 方法, 该方法样品处理简单、分析时间短、灵敏度高、专属性好、结果准确可靠, 重现性好, 对于木蝴蝶饮片的质控研究具有重要意义。不同产地和同一产地不同批次的木蝴蝶中除木蝴蝶苷 A、木蝴蝶苷 B 和金丝桃苷外, 所测成分含量差异较为明显。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 中国药科大学. 中药辞海 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996.
- [3] 殷文光, 李曼玲, 康 琛. 木蝴蝶的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(19): 1965-1970.
- [4] 王 锐, 袁晓春, 何 帽, 等. 木蝴蝶的化学成分和药理作用 [J]. 广东农业科学, 2011, 38(22): 121-123.
- [5] 文景兵, 张庆文, 殷志琦, 等. 木蝴蝶种子中黄酮类化学成分研究 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(3): 170-173.
- [6] Lee A, Kang S, Park S, et al. Anti-allergic effect of oroxylin A from *Oroxylum indicum* using *in vivo* and *in vitro* experiments [J]. *Biomol Ther*, 2016, 24(3): 283-290.
- [7] Lalrinzuali K, Vabeiryureilai M, Jagetia G C. Investigation of the anti-inflammatory and analgesic activities of ethanol extract of stem bark of *Sonapatha oroxylum indicum* *in vivo* [J]. *Int J Inflamm*, 2016, 2016:

- 1-8.
- [8] Dinda B, Silsarma I, Dinda M, *et al.* *Oroxylum indicum* (L.) Kurz, an important Asian traditional medicine: From traditional uses to scientific data for its commercial exploitation [J]. *J Ethnopharm*, 2015, 161: 255-278.
- [9] Palasuwan A, Soogarun S, Lertlum T, *et al.* Inhibition of heinz body induction in an *in vitro* model and total antioxidant activity of medicinal Thai plants [J]. *Asian Pacific J Cancer Pre*, 2005, 6 (4): 458-463.
- [10] 杭立中. 木蝴蝶治咳妙用 [J]. 湖北中医杂志, 1997, 19(2): 35.
- [11] Sun W, Sang Y, Zhang B, *et al.* Synergistic effects of acarbose and an *Oroxylum indicum* seed extract in streptozotocin and high-fat-diet induced prediabetic mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 87: 160-170.
- [12] 刘凡何, 美 英. HPLC 法测定木蝴蝶中黄芩苷的含量 [J]. 湖南中医药导报, 2002, 12(6): 365-366.
- [13] 王克英. RP-HPLC 法测定木蝴蝶中黄芩苷 [J]. 中草药, 2005, 36(7): 128-129.
- [14] 史建玲, 张春雨, 李 琦. 高效液相色谱法测定木蝴蝶中黄芩苷含量 [J]. 中国药事, 2005, 19(5): 292-293.
- [15] 魏晓楠, 林彬彬, 谢国勇, 等. 木蝴蝶种子化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 204-207.
- [16] 吴 茵, 白万军, 魏 欣. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析木蝴蝶中化学成分 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 196-200.
- [17] 文景兵, 张庆文, 殷志琦, 等. 木蝴蝶种子中黄酮类化学成分研究 [J]. 中国药学杂志, 2011, 46(3): 170-173.