

基于 UPLC-MS/MS 快速测定中药材中 6 种鞣质类成分

毛菊华¹, 陈张金¹, 方洁², 潘俊杰², 吴查青¹, 程科军^{2*} (1.丽水市质量检验检测研究院, 浙江 丽水 323000; 2.丽水市农林科学研究院, 浙江 丽水 323000)

摘要: 目的 建立快速测定中药材中没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、鞣花酸、3,3'-O-二甲基鞣花酸、柯里拉京 6 种鞣质类成分的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)分析方法。方法 采用 Agilent RRHD Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm), 流动相为甲醇-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 0.3 mL·min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 1 μL; 三重四级杆质谱, 采用电喷雾离子源、负离子模式, 通过多重反应监测模式对 15 种中药材中 6 种鞣质类成分进行定量分析。结果 6 种成分在各自浓度范围内线性关系良好($r>0.999$), 没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、鞣花酸、3,3'-O-二甲基鞣花酸、柯里拉京的加样回收率分别为 99.8%, 98.3%, 100.1%, 100.3%, 100.7%, 99.2%, RSD 值分别为 1.11%, 2.23%, 1.07%, 1.34%, 1.64%, 1.24%。15 种中药材中均含一定量的没食子酸和没食子酸乙酯, 且以五倍子中含量最高; 鞣花酸含量以覆盆子根最高; 另外 3 种成分不均匀分布于各药材中。结论 所建立的方法稳定、快速、灵敏度高, 适用于含有上述 6 种鞣质类成分中药材的定量分析。

关键词: 中药材; 没食子酸甲酯; 没食子酸乙酯; 3,3'-O-二甲基鞣花酸; 柯里拉京; 鞣质; UPLC-MS/MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)09-1055-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.09.006

引用本文: 毛菊华, 陈张金, 方洁, 等. 基于 UPLC-MS/MS 快速测定中药材中 6 种鞣质类成分[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(9): 1055-1059.

Rapid Determination of Six Tannins in Chinese Medicinal Materials Based on UPLC-MS/MS

MAO Juhua¹, CHEN Zhangjin¹, FANG Jie², PAN Junjie², WU Chaqing¹, CHENG Kejun^{2*} (1.Lishui Institute for Quality Inspection and Testing, Lishui 323000, China; 2.Lishui Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an UPLC-MS/MS method for rapidly qualitative and quantitative determination of six tannins(gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, ellagic acid, 3,3'-Di-O-methylellagic acid, coriagin) in Chinese medicinal materials. **METHODS** An Agilent RRHD Eclipse Plus C₁₈ column(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) with a gradient elution of methanol and 0.1%formic acid in water at a flow rate of 0.3 mL·min⁻¹, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 1 μL. Triple quadrupole mass spectrometry with electrospray ion source and negative ion mode was used to quantitatively analyze 6 tannins in 15 kinds of Chinese herbal medicines by multiple reaction monitoring mode. **RESULTS** Good linear relationship($r>0.999$) were observed in the test ranges for 6 compounds, and the average recoveries of gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, ellagic acid, 3,3'-Di-O-methylellagic acid, coriagin were 99.8%(RSD=1.11%), 98.3%(RSD=2.23%), 100.1%(RSD=1.07%), 100.3%(RSD=1.34%), 100.7%(RSD=1.64%), 99.2%(RSD=1.24%), respectively. The gallic acid and ethyl gallate were detected in all 15 kinds of Chinese medicinal materials, and the content in Chinese gallnut was the maximum; the content of ellagic acid in Rubi Radix et Rhizoma was the highest; another 3 compounds were distributed in above drugs non-uniformly. **CONCLUSION** The established method is stable, rapid, sensitive, it can be used for the quantitative analysis of above six tannins in Chinese medicinal materials.

KEYWORDS: Chinese medicinal materials; methyl gallate; ethyl gallate; 3,3'-Di-O-methylellagic acid; coriagin; tannins; UPLC-MS/MS

中药的化学成分极为复杂, 主要类别有生物碱类、萜醌类、黄酮类、皂苷类、挥发油类、鞣质类、香豆素类等, 其中鞣质类是一类结构复杂的多元酚类化合物, 在植物中广泛分布, 过去通常被认为是杂质而被丢弃, 但随着现代研究的深

入, 学者们发现鞣质具有抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、抗过敏、降血糖、调血脂、止血和增加内脏功能的保护作用等多方面的生物活性^[1-2], 是常用中药如五倍子、大黄、诃子、地榆、余甘子、叶下珠、地稔等的主要药效物质基础,

基金项目: 丽水市科技计划项目(2020zdzh01, 2019GYX08); 中国民族医药学会科研项目(2017KYXM-M244-11)

作者简介: 毛菊华, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0578)2183956 E-mail: maomaotou198712@163.com *通信作者: 程科军, 男, 博士, 研究员 Tel: (0578)2028385 E-mail: chengkejun2011@126.com

具有良好的应用前景^[3-8]。当前报道较多的为可水解鞣质类,多采用 HPLC 测定,该法干扰相对较大,分析时间较长,故本研究拟建立 UPLC-MS/MS 同时测定中药材中没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、鞣花酸、3,3'-O-二甲基鞣花酸、柯里拉京 6 种常见鞣质类成分的含量,并对 15 种中药材中各成分的含量进行测定,以期含有上述 6 种成分的中药材提供快速检测方法。

1 仪器与试剂

Agilent UPLC-QQQ-MS(1290-6470)联用仪,(美国 Agilent 公司);XS105DU 型电子天平(瑞士梅特勒公司);DL-360D 型智能超声波清洗器(上海之信仪器有限公司);DK-S24 型电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)。

甲醇、甲酸为色谱纯,水为 Milli-Q 制超纯水,其他均为分析纯。对照品:没食子酸(批号:110831-201204;含量:89.9%)、柯里拉京(批号:111623-200301;含量:100.0%)、鞣花酸(批号:111959-201602;含量:89.3%)均购自中国食品药品检定研究院;没食子酸甲酯(批号:DST180116-077;含量:98.0%)、没食子酸乙酯(批号:DST180226-063;含量:98.0%)均购自成都德思特生物技术有限公司;3,3'-O-二甲基鞣花酸(Stanford Chemicals,批号:PS180519-10;含量:99.79%)。

15 种中药材中,地榆和覆盆子根样品采集于浙江省丽水市境内,为常用兽药;覆盆子、金樱子根、金樱子、五倍子、地榆、大黄、老鹳草、白芍、余甘子、诃子、毛诃子、叶下珠、珠子草样品均购自浙江维康大药房或中国食品药品检定研究院,由丽水市质量检验检测研究院副主任中药师余华丽鉴定,均为正品,各批次信息见表 1。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent RRHD Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm);流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱:0~1 min, 10%A, 1~3 min, 10%→40%A, 3~4 min, 40%→70%A, 4~6 min, 70%A;流速 0.3 mL·min⁻¹;柱温 40 °C;进样量 1 μL。

2.2 质谱条件

质谱采用电喷雾离子源;鞘气温度 250 °C,鞘气流速 11 L·min⁻¹;干燥气为 N₂,温度 300 °C,流速 5 L·min⁻¹;负离子模式,毛细管电压 3 500 V;定量分析采用多重反应监测模式,6 种鞣质类化合物的质谱参数见表 2,多重反应监测色谱图见图 1。

表 1 15 种中药材批次信息

Tab. 1 Batch information of 15 kinds of Chinese herbal medicines

样品编号	药材名称	批号
1	地榆	201806
2	覆盆子根	201811
3	覆盆子	1609184
4	金樱子根	201306
5	金樱子	201204
6	五倍子	201504
7	地榆	201703
8	大黄	201202
9	老鹳草	201102
10	白芍	201610
11	余甘子	201804
12	诃子	201605
13	毛诃子	201302
14	叶下珠	201802
15	珠子草	200301

表 2 6 种化合物的 UPLC-MS/MS 分析参数

Tab. 2 UPLC-MS/MS parameters for the 6 compounds

化合物	t _R /min	母离子/ m/z	碎片电 压/V	子离子/ m/z	碰撞能/ V
没食子酸	0.902	169.0	109	125.0, 79.1	12, 24
没食子酸甲酯	2.790	183.0	124	124.0, 78.1	20, 36
柯里拉京	3.291	633.1	210	301.1, 275.0	40, 36
没食子酸乙酯	3.681	197.0	124	124.0, 168.9	24, 16
鞣花酸	4.323	301.0	175	284.0, 229.0	32, 28
3,3'-O-二甲基 鞣花酸	4.799	329.0	129	314.0, 299.0	16, 28

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取没食子酸、没食子酸甲酯、柯里拉京、没食子酸乙酯、鞣花酸、3,3'-O-二甲基鞣花酸对照品适量,分别置 50 mL 量瓶中,加 70%甲醇溶解(其中鞣花酸和 3,3'-O-二甲基鞣花酸用二甲基亚砷溶解)并稀释至刻度,得各对照品储备液,备用;再精密量取上述储备液适量,用 70%甲醇制成质量浓度分别为 1 024.14, 10.28, 438.40, 937.66, 1 599.84, 61.47 ng·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液的制备 精密称取样品粉末(过三号筛)约 0.2 g,置具塞锥形瓶中,精密加入含 3.6%HCl 的乙醇 50 mL,称定质量,加热回流提取 2 h,放冷,用含 3.6%HCl 的乙醇补足减失的质量,滤过,精密量取适量,用 70%甲醇稀释至适宜浓度,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,

即得, 适用于样品中没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、鞣花酸和 3,3'-*O*-二甲基鞣花酸含量的测定。

精密称取样品粉末(过三号筛)约 0.2 g, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 50%乙醇 50 mL, 称定质量, 超声提取 30 min, 放冷, 用 50%乙醇补足减失的质量, 滤过, 精密量取适量, 用 70%甲醇稀释至适宜浓度, 摇匀, 用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得, 适用于样品中柯里拉京含量的测定。

2.4 线性关系考察、检测限与定量限

精密吸取“2.3.1”项下混合对照品溶液适

量, 用 70%甲醇稀释制成系列浓度对照品溶液, 分别进样测定, 以峰面积(Y)对质量浓度(X , $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)进行线性回归, 以信噪比为 3 时的浓度确定检测限, 信噪比为 10 时的浓度确定定量限, 结果见表 3。

2.5 仪器精密度试验

精密吸取同一混合对照品溶液 1 μL , 重复进样 6 次, 记录峰面积。结果显示, 没食子酸、没食子酸甲酯、柯里拉京、没食子酸乙酯、鞣花酸、3,3'-*O*-二甲基鞣花酸的峰面积 RSD 值分别为 0.85%, 0.97%, 1.02%, 1.11%, 1.20%, 1.08%, 表明仪器精密度良好。

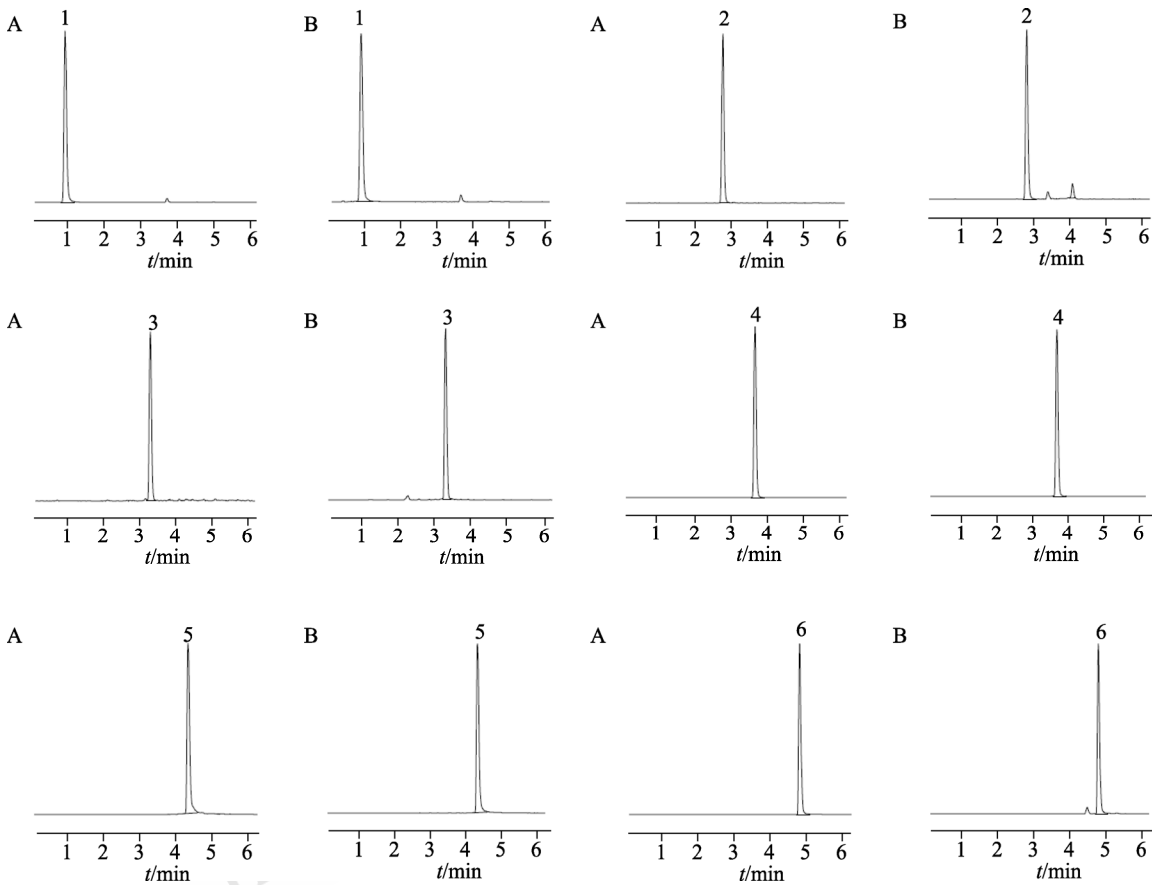


图 1 对照品(A)和供试品(B)的多重反应监测色谱图

1-没食子酸; 2-没食子酸甲酯; 3-柯里拉京; 4-没食子酸乙酯; 5-鞣花酸; 6-3,3'-*O*-二甲基鞣花酸。

Fig. 1 Multiple reaction monitoring chromatograms of reference substances(A) and sample(B)

1-gallic acid; 2-methyl gallate; 3-coriagin; 4-ethyl gallate; 5-ellagic acid; 6-3,3'-Di-O-methylellagic acid.

表 3 6 种化合物的线性方程、相关系数、线性范围、检测限和定量限

Tab. 3 Calibration curves, correlation coefficient, linear range, limit of detection and limit of quantification of 6 compounds

化合物	线性方程	r	线性范围/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	检测限/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
没食子酸	$Y=44.64X-1311.74$	0.999 6	25.60~1 024.14	0.85	1.71
没食子酸甲酯	$Y=185.48X-18.20$	0.999 7	0.26~10.28	0.06	0.13
柯里拉京	$Y=14.50X-10.40$	0.999 8	10.96~438.40	1.10	2.19
没食子酸乙酯	$Y=100.39X-1 649.68$	0.999 9	23.44~937.66	0.23	0.47
鞣花酸	$Y=5.42X+71.96$	0.999 7	40.00~1 599.84	0.40	0.80
3,3'- <i>O</i> -二甲基鞣花酸	$Y=124.73X-188.39$	0.999 7	1.54~61.47	0.31	0.61

2.6 重复性试验

取毛诃子样品(批号: 201302)约 0.2 g, 平行取样 2 个 6 份, 分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 结果显示, 没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、鞣花酸、3,3'-O-二甲基鞣花酸和柯里拉京的含量分别为 12.477, 0.021, 17.442, 8.417, 1.094, 1.306 mg·g⁻¹, RSD 分别为 1.05%, 1.52%, 0.91%, 1.01%, 1.32%, 1.09%, 表明方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验

精密吸取“2.6”项下 2 种供试品溶液各 1 μL, 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 进样测定, 结果显示没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、鞣花酸、3,3'-O-二甲基鞣花酸和柯里拉京峰面积的 RSD 分别为 0.87%, 1.01%, 0.76%, 0.97%, 1.25%, 1.41%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的毛诃子样品(批号: 201302)约 0.1 g, 平行取样 2 个 6 份, 置具塞锥形瓶中, 分别加入与各待测成分等量的对照品溶液适量, 分别按“2.3.2”项下方法制备加样回收率溶液, 进样测定, 结果显示, 没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、鞣花酸、3,3'-O-二甲基鞣花酸和柯里拉京的加样回收率分别为 99.8%, 98.3%,

100.1%, 100.3%, 100.7%, 99.2%, RSD 值分别为 1.11%, 2.23%, 1.07%, 1.34%, 1.64%, 1.24%。

2.9 样品测定结果

精密称取 15 种中药材粉末(过三号筛)约 0.2 g, 分别按“2.3.2”项下方法制备供试品溶液, 各平行制备 3 份, 进样测定, 按干燥品计, 计算样品中各成分的含量, 结果见表 4。

3 讨论

3.1 条件优选

优选样品提取条件时, 考察了含 1.8% HCl、3.6% HCl 的乙醇, 含 3.6% HCl 的 50%乙醇, 50%乙醇, 50%甲醇等溶剂对各成分的提取率, 结果显示含 3.6% HCl 的乙醇对没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、鞣花酸、3,3'-O-二甲基鞣花酸的提取率均较高, 而 50%乙醇对柯里拉京的提取率最高; 此外, 考察了提取方法、提取时间、料液比等条件。色谱-质谱条件优化时, 选用甲醇-0.1%甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱, 即可在 5 min 之内将各成分进行较好的分离, 且峰形较佳; 考察了正、负离子模式下各成分的响应, 结果各组分均在负离子模式下响应值较高, 同时对碎片电压、碰撞能、鞘气温度、鞘气流速等参数进行了考察。

表 4 15 种中药材中 6 种化学成分的定量测定结果(n=3)

Tab. 4 Quantitative determination results of 6 compounds in 15 batches of Chinese medicinal materials(n=3)

样品 编号	水分/%	含量/mg·g ⁻¹					
		没食子酸	没食子酸甲酯	没食子酸乙酯	鞣花酸	3,3'-O-二甲基 鞣花酸	柯里拉京
1	6.54	0.895	—	1.291	3.218	0.031	—
2	8.71	1.773	—	2.237	19.626	—	—
3	6.52	0.576	—	0.861	3.699	—	—
4	8.04	0.341	—	0.622	4.165	—	—
5	6.10	0.137	—	0.187	2.746	—	—
6	7.55	27.231	0.039	49.304	1	—	—
7	8.16	2.367	0.011	3.363	13.051	0.108	—
8	9.05	1.822	0.004	2.964	0.237	—	—
9	3.50	0.109	0.006	1.621	1.841	—	0.125
10	4.68	0.820	0.003	1.782	0.182	—	—
11	6.16	2.034	0.003	17.165	2.787	0.036	0.193
12	7.34	5.210	0.008	7.040	6.362	0.019	0.694
13	5.12	12.477	0.021	17.442	8.417	1.094	1.306
14	5.68	1.218	0.002	7.277	3.644	0.089	0.447
15	5.82	0.666	0.735	2.538	1.294	—	0.326

注: 水分采用烘干法在 105 °C 测定; “—”低于检测限。

Note: Water content was determined by drying in an oven at 105 °C; “—”less than LOD.

3.2 结果与分析

鞣质类成分广泛存在于中药材中,是收敛固涩类中药的主要药效物质基础,与药性“酸、涩”味相关,其含量的高低在一定程度上可反映该类中药的质量与药效。本研究选取了具有止血、敛肺、涩肠、固精、缩尿等功能的 15 种常见中药材进行分析测定。由表 4 可见,各中药材中均含有一定量的没食子酸和没食子酸乙酯,且以五倍子的含量最高;从含量分布看,各药材中没食子酸乙酯含量均高于没食子酸,而没食子酸甲酯的含量相对较低,由此初步判断没食子乙酯在药材中可能相对较稳定,多以该形式存在;鞣花酸除五倍子未检出外,其余均有检出,且以覆盆子根的含量最高,较同源中药覆盆子(果实)含量高 5 倍,该药作为常用兽药,有望成为天然鞣花酸的重要来源,值得进一步研究;3,3'-O-二甲基鞣花酸、柯里拉京 2 种成分含量相对较低,不均匀分布于各中药中,均以毛诃子中含量最高;值得关注的是余甘子、诃子、毛诃子和叶下珠 4 种中药的化学成分相对丰富,均含有上述 6 种成分,可为其近缘药用植物的化学成分研究提供参考依据。

本研究建立的 UPLC-MS/MS 方法灵敏度强,准确度高,适用于上述 15 种中药材中 6 种鞣质类成分的快速定量测定,同时,该法亦可推广至其他含有此类成分的中药材或中成药的定性定量分析。

REFERENCES

- [1] ZENG M L, ZHOU B H. Research progress in antitumor activity and mechanism of tannins[J]. Med Recapitul(医学综述), 2018, 24(15): 2975-2979.
- [2] WU L F, YUAN Y B, WANG K F, et al. Research progress on chemistry and pharmacology of hydrolyzable tannin monomer [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2014, 45(2): 290-299.
- [3] YANG H B, YANG W Q, SONG M, et al. Phenolic constituents of *Galla Chinensis* and their antiviral activities[J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2016, 47(5): 566-569.
- [4] CHEN P, ZHOU B H. Research progress in chemical components and biological activity of tannins from *Sanguisorba officinalis* L[J]. China Pharm(中国药师), 2018, 21(7): 1253-1258.
- [5] HU N F, XIONG L D, LI L. Comparison of main components of tannins and anthraquinone in *Rheum palmatum* L[J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2017, 45(19): 54-56, 67.
- [6] 张媛媛, 曾慧婷, 袁源见, 等. 藏药诃子的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国药房, 2018, 29(14): 2002-2006.
- [7] LI Z H, DONG W, CHEN M, et al. Mechanism of emodin inhibiting proliferation of colon cancer CACO-2 cells via down-regulating ILK/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Pharm Today(今日药学), 2020, 30(2): 116-120.
- [8] MAO J H, WANG W Y, FAN L, et al. Determination of tannin in traditional SHE medicine Rubi Radix et Rhizoma at different harvest time by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(3): 393-395.

收稿日期: 2020-05-28

(本文责编: 沈倩)