

UPLC-MS/MS 快速测定茯苓中去氢土莫酸和茯苓酸的含量

李健康¹, 张敏², 刘校妃¹, 唐怡¹, 陈洋¹, 严志宏¹, 袁金斌^{1*}
(1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;
(2. 南昌市食品药品检验所, 南昌 330038)

[摘要] 目的:建立一种测定茯苓药材中茯苓酸和去氢土莫酸含量的 UPLC-MS/MS 方法。方法:采用 ZORBAX Eclipse plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流动相乙腈-1.0 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(80:20),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,进样量 5.0 μL。ESI 离子源,负离子模式,多反应监测模式(MRM),检测离子对分别为茯苓酸 *m/z* 527.40/465.30,去氢土莫酸 *m/z* 483.20/421.20。结果:茯苓酸和去氢土莫酸分别在 26.2~524 μg·L⁻¹ (*r*=0.999 8)和 24.2~488 μg·L⁻¹ (*r*=0.999 9)线性良好,分析时间为 6 min,平均回收率分别为 101.4% (RSD 1.2%) 和 99.8% (RSD 1.2%)。结论:该方法准确、快速、可靠、灵敏,可作为茯苓酸和去氢土莫酸的一种快速定量分析方法。

[关键词] 超高效液相色谱-质谱联用; 茯苓; 茯苓酸; 去氢土莫酸

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2017)04-0085-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040085

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161130.0910.012.html>

[网络出版时间] 2016-11-30 9:10

Rapid Determination of Dehydrotumulosic Acid and Pachymic Acid in Poria by UPLC-MS/MS

LI Jian-kang¹, ZHANG Min², LIU Xiao-fei¹, TANG Yi¹, CHEN Yang¹, YAN Zhi-hong¹, YUAN Jin-bin^{1*}
(1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;
2. Nanchang Institute for Food and Drug Control, Nanchang 330038, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a UPLC-MS/MS method for the content determination of dehydrotumulosic acid and pachymic acid in Poria. **Method:** Chromatographic separation was carried out on ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) with acetonitrile-1.0 mmol·L⁻¹ ammonium acetate (80:20) as the mobile phase. The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, and the column temperature was 40 ℃. The injection volume was 5.0 μL. Electrospray ionization (ESI⁻) under negative ion mode was used, and the quantization of dehydrotumulosic acid and pachymic acid was performed with multiple reaction monitoring (MRM) mode. The detected ion-pairs were dehydrotumulosic acid *m/z* 483.20/421.20 and pachymic acid *m/z* 527.40/465.30. **Result:** The linear range was 24.2~488 μg·L⁻¹ (*r*=0.999 9) for dehydrotumulosic acid, and 26.2~524 μg·L⁻¹ (*r*=0.999 8) for polyporenic acid. The retention time was 6 min. The average recoveries of dehydrotumulosic acid and polyporenic acid were 99.8% with RSD of 1.2% (*n*=6) and 101.4% with RSD of 1.2% (*n*=6), respectively. **Conclusion:** The proposed UPLC method is rapid, accurate, selective, sensitive, and suitable for the content determination of dehydrotumulosic acid and polyporenic acid in Poria.

[Key words] UPLC-MS/MS; Poria; polyporenic acid; dehydrotumulosic acid

[收稿日期] 20160305(003)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260605, 81560648)
[第一作者] 李健康,在读硕士,从事中药物质基础与质量控制研究,Tel:15083804522, E-mail:1127531674@qq.com
[通讯作者] *袁金斌,博士,副教授,从事中药物质基础与质量控制研究,Tel:0791-87118658, E-mail: kings2008@163.com

茯苓类球形、圆形、扁圆形或不规则团块,大小不一。外表薄而粗糙,棕褐色至黑褐色,有明显的皱缩纹理。味甘、淡,性平,具有利水渗湿,健脾,宁心的功效^[1]。茯苓中主要成分为多糖和三萜类化合物,另外含有少量脂肪酸、无机盐以及其他微量成分^[2]。茯苓总三萜类化合物具有抗肿瘤、抗惊厥、抗氧化、抑菌、利尿等药理作用^[3-4],其中,茯苓酸和去氢土莫酸是茯苓三萜中重要的有效成分^[5]。文献多采用分光光度法^[6]和高效液相色谱法^[7-8]进行含量测定,但是这些方法灵敏度不够高,检测不够快速。超高效液相色谱-串联质谱方法(UPLC-MS/MS)由于检测灵敏,快速可靠,已经被应用到中药及中药制剂中并作为中药成分的一种重要检测手段^[9-11]。本文建立了一种茯苓药材中茯苓酸和去氢土莫酸的UHPLC-MS/MS测定方法,并将其应用到不同产地茯苓中茯苓酸和去氢土莫酸的含量测定。

1 材料

UPLC Nexera X2 型高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括 DGU-20A5R 型脱气器, SIL-30AC 型自动进样器, SPD-M20A 型二极管阵列检测器, CTO-30A 型柱温箱, LC-30AD 型二元泵), AB SCIEX Triple Quad™ 4500 型 LC-MS/MS 三重四级杆质谱分析仪(美国 AB 公司), Sartorius BT25S 型 1/10 万电子天平(江西东华计量测试研究所), KQ3200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), GZX-9140MBE 型数显电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂), SL-100 型高速多功能粉碎机(浙江省永康市松青五金厂), 药典 2 号筛(浙江上虞市道墟宝民仪器设备厂)。

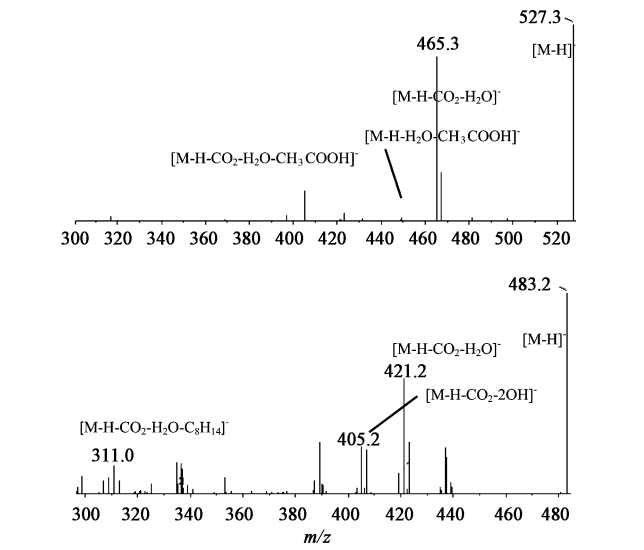
茯苓药材购自河北保定等 11 个茯苓产地,经江西中医药大学教育部重点实验室袁金斌副教授鉴定为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* 的干燥菌核;茯苓酸对照品(天津士兰科技有限公司,批号 20131215,经面积归一法测定后确认其纯度 > 98%),去氢土莫酸对照品(南昌贝塔生物科技有限公司,批号 20568-201309,经面积归一法测定后确认其纯度 > 98%),双蒸水(实验室自制),色谱甲醇(Tedia 公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 液相条件 采用 ZORBAX Eclipse plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm),流动相乙腈-1.0 mmol·L⁻¹ 乙酸铵(80:20),流速 0.3 mL·min⁻¹,柱温 40 ℃,进样量 5.0 μL。

2.2 质谱条件 ESI 离子源,负离子模式,多反应

监测(MRM),气帘气 241.325 kPa,碰撞气 62.055 kPa,电喷雾电压 -4 500 V,雾化温度 550 ℃,雾化气 379.225 kPa,辅助气 379.225 kPa,碰撞室射入电压 -10.00 V,碰撞室射出电压 -23 V。茯苓酸优化参数为母离子 *m/z* 527.40,子离子 *m/z* 465.30,去簇电压 -160 V;去氢土莫酸优化参数为母离子 *m/z* 483.20,子离子 *m/z* 421.20,去簇电压 -180 V。两个化合物的二级质谱见图 1。



A. 茯苓酸; B. 去氢土莫酸
图 1 茯苓酸和去氢土莫酸二级质谱

Fig. 1 Tandem mass spectrums of pachymic acid and dehydrotumulosic acid

2.3 对照品溶液的制备 称取减压干燥至恒重的茯苓酸和去氢土莫酸对照品适量,分别置于 25 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得 262 mg·L⁻¹ 的茯苓酸对照品溶液和 244 mg·L⁻¹ 的去氢土莫酸对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备 精密称定样品粉末(过 5 号筛,40 ℃干燥 12 h)0.2 g,置具塞锥形瓶中,精密加入 95% 乙醇 50 mL,浸泡 2 h,加热回流 1 h,过滤后再加 95% 乙醇 50 mL,继续加热回流 1 h,滤过,合并 2 次滤液挥干后加甲醇定容至 10 mL 量瓶,再用甲醇精密稀释 100 倍,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.5 线性关系考察 分别精密吸取上述对照品储备液适量,置同一 25 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得茯苓酸和去氢土莫酸质量浓度分别为 524 μg·L⁻¹ 和 488 μg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。取适量混合对照品溶液分别稀释 1,2,3,5,8,10,20 倍,得到不同质量浓度的混合对照品。按照 2.1 和 2.2 项下条件进样,记录色谱图和峰面积。以各成分峰

面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,得茯苓酸回归方程 $Y = 1.51 \times 10^3 X + 4.6 \times 10^3$ ($r = 0.999\ 8$),线性范围 $26.2 \sim 524\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限 $1\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,定量限 $4\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$;去氢土莫酸回归方程 $Y = 363X + 1.3 \times 10^3$ ($r = 0.999\ 9$),线性范围 $24.2 \sim 488\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,检测限 $0.7\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,定量限 $2\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6 精密度试验 取同一混合对照品溶液,含茯苓酸 $104.8\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,去氢土莫酸 $97.6\ \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,连续进样 6 次测定,测定峰面积,计算得茯苓酸和去氢土莫酸的峰面积的 RSD 分别为 1.9% 和 1.7%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0, 2,4,8,12,24 h 进样,测定峰面积,计算得茯苓酸和去氢土莫酸峰面积的 RSD 分别为 2.6% 和 2.0%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性。

2.8 重复性试验 平行精密称定 6 份茯苓样品 0.2 g,按照 2.4 项下方法制备供试品溶液,按照上述液相质谱条件测定分析,计算各样品中茯苓酸和去氢土莫酸的质量分数分别为 0.049%,0.093%,其中茯苓酸和去氢土莫酸质量分数的 RSD 分别为 2.9%,2.4%,表明该方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称定已知茯苓酸和去氢土莫酸含量的茯苓样品 6 份,每份约 0.1 g,再加入适量茯苓酸和去氢土莫酸对照品溶液,使茯苓酸和去氢土莫酸对照品含量约等于 0.1 g 样品中含量,按照 2.4 项下方法制备供试品溶液,按照上述液相质谱条件测定分析,计算回收率。结果见表 1。

2.10 样品测定 精密称定取 11 个产地茯苓样品各 6 份,每份约 0.2 g,按照 2.4 项下方法制备供试品溶液,按照上述液相质谱条件测定分析,其典型质谱与对照品质谱见图 2。每个样品重复进样 3 次,记录峰面积,根据所得的线性方程计算样品含量,测得样品溶液中茯苓酸和去氢土莫酸的平均含量分别为 0.49,0.93 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$,结果见表 2。

3 讨论

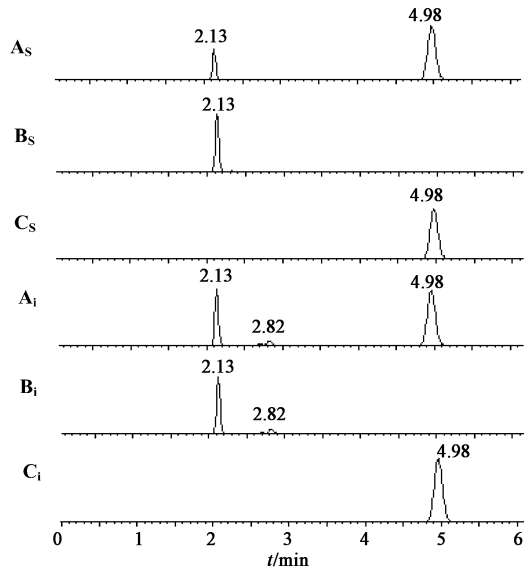
3.1 流动相的选择 依次考察了乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-1 mmol·L⁻¹ 乙酸铵 3 种流动相系统,发现使用乙腈-水时 2 种成分响应很低,而使用乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-1 mmol·L⁻¹ 乙酸铵时响应值均远高于使用乙腈-水的响应值,但乙腈-1 mmol·L⁻¹ 乙酸铵的响应值约是乙腈-0.1% 甲酸水的 2 倍,故最终确定使用乙腈-1 mmol·L⁻¹ 乙酸铵作为流动相。

3.2 提取方法优化 茯苓三萜类化合物提取常用

表 1 茯苓中茯苓酸和去氢土莫酸加样回收率试验
Table 1 Recovery test of pachymic acid and dehydrotumulosic acid of Poria

成分	取样量 /g	样品中量 /mg	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收 率/%
茯苓酸	0.102 3	0.050	0.052	0.103	99.81	101.4
	0.102 5	0.050	0.052	0.103	100.38	
	0.100 5	0.049	0.049	0.100	102.85	
	0.101 5	0.050	0.050	0.101	102.21	
	0.101 1	0.045	0.049	0.100	101.83	
	0.100 7	0.049	0.050	0.100	101.61	
去氢土莫酸	0.102 3	0.095	0.095	0.190	99.68	99.8
	0.102 5	0.095	0.095	0.189	98.11	
	0.100 5	0.094	0.093	0.187	100.21	
	0.101 5	0.094	0.095	0.188	99.05	
	0.101 1	0.094	0.094	0.189	100.96	
	0.100 7	0.094	0.094	0.189	100.96	

注:RSD 均为 1.2%。



A. 总离子流(TIC); B. 去氢土莫酸的 MRM;C. 茯苓酸的 MRM; s. 对照品; i. 样品

图 2 茯苓的典型色谱

Fig. 2 Typical chromatograms of samples

溶剂为甲醇,95% 乙醇,乙酸乙酯。提取方法多采用回流提取和超声提取法。本实验对以上提取溶剂,和提取方法进行了考察,发现甲醇和 95% 乙醇提取效果较好,回流提取法较超声提取法提取率高,最终决定使用 95% 乙醇回流提取。

3.3 离子对的选择 茯苓三萜类化合物在负模式中易形成 $[M - H]^-$ 和 $[M + HCOO]^-$ 2 种母离子,茯苓酸的平均相对分子质量为 528.38,在负模式下

表 2 不同产地茯苓中茯苓酸和去氢土莫酸质量分数
Table 2 Results of content determination of dehydrotumulosic acid and pachymic acid of different origins

No.	产地	茯苓酸	去氢土莫酸
1	河北保定	0.49	0.93
2	安徽金寨	0.52	0.79
3	安徽岳西	0.45	0.86
4	湖北罗田	0.67	0.84
5	湖北九资河	0.47	0.88
6	浙江景宁	0.44	0.71
7	云南大理	0.39	0.69
8	云南丽江	0.42	0.72
9	湖南绥宁	0.44	0.77
10	湖南靖州	0.48	0.67
11	河南商城	0.53	0.75

其一级离子为 527.37 [M - H]⁻ 和 573.34 [M + HCOO]⁻, 但 [M - H]⁻ 是明显比 [M + HCOO]⁻ 响应值高, 二级离子 465.35 [M - H - CO₂ - H₂O]⁻, 449.34 [M - H - CH₃COOH - H₂O]⁻, 405.2 [M - H - CH₃COOH - H₂O - CO₂]⁻ 3 个主要离子中 (465.35 响应最高, 所以确定 *m/z* 527.40/465.30 作为监测离子对, 响应值高且稳定, 并且 MRM 模式检测样品时没有任何杂质干扰, 见图 2。去氢土莫酸平均相对分子质量为 484.35, 一级离子为 483.34 [M - H]⁻ 和 529.33 [M + HCOO]⁻, 其中, [M - H]⁻ 响应值较高, 故选 [M - H]⁻ 为母离子。其二级离子为 421.34 [M - H - CO₂ - H₂O]⁻, 405.23 [M - H - CO₂ - 2OH]⁻, 311.00 [M - H - CO₂ - H₂O - C₈H₁₄]⁻, 其中 [M - H - CO₂ - H₂O]⁻ 在检测中比较稳定且响应值高, 可作为特征子离子, 因此去氢土莫酸以 *m/z* 483.20/421.20 为监测离子对。

UPLC-MS/MS 测定茯苓酸和去氢土莫酸具有很高的选择性, 因此大大提高了茯苓酸和去氢土莫酸含量测定的方法灵敏度, 茯苓酸的检测限达到 1 μg·L⁻¹, 定量限达到 4 μg·L⁻¹, 去氢土莫酸检测

限 0.7 μg·L⁻¹, 定量限 2 μg·L⁻¹。与文献[6-8,11]相比, 本文所开发的具有选择性好、灵敏度高、准确快速的特点, 可作为茯苓药材中茯苓酸和去氢土莫酸的一种快速定量分析方法。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 240-141.

[2] 咎俊峰. 茯苓三萜类成分抗肿瘤活性研究与茯苓药材质量分析[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2012.

[3] WANG Y, ZHANG J, ZHAO Y, et al. Mycology, cultivation, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Wolfiporia cocos* (Schwein.) Ryvarden et Gilb: A review [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147 (2): 265-276.

[4] WU Z, REN H, LAI W, et al. Sclederma of *Poria cocos* exerts its diuretic effect via suppression of renal aquaporin-2 expression in rats with chronic heart failure [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 155 (1): 563-571.

[5] 仲兆金, 许先栋. 茯苓三萜化学成分及其光谱特征研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 1997, 7 (1): 74-81.

[6] 徐榕, 许津. 紫外分光光度法测定茯苓中三萜成分[J]. 药物分析杂志, 2005, 25 (4): 449-451.

[7] 徐斌, 咎俊峰, 何丽珊, 等. 27 种菌种茯苓中茯苓酸分析比较研究[J]. 中草药, 2010, 41 (4): 647-649.

[8] 段启, 姚丽梅, 庄义修. 茯苓与茯苓皮中茯苓酸含量比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21 (6): 654-655.

[9] 杨改红, 程昊, 黄群, 等. HPLC-MS/MS 快速测定远志中远志呋酮Ⅲ和 3, 6'-二芥子酰基蔗糖的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20 (24): 39-42.

[10] 刘校妃, 张志强, 邹志琴, 等. 白参及红参中五种人参皂苷含量的 HPLC-MS/MS 法快速测定[J]. 时珍国医国药, 2015, 26 (8): 1801-1804.

[11] WANG W, DONG H, YAN R, et al. Comparative study of lanostane-type triterpene acids in different parts of *Poria cocos* (Schw.) Wolf by UHPLC-Fourier transform MS and UHPLC-triple quadruple MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 102: 203-214.

[责任编辑 顾雪竹]