

高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用法 测定金银花中绿原酸和咖啡酸

李永库¹, 欧小辉², 王 芬^{*1}

(1. 沈阳农业大学理学院, 沈阳 110161; 2. 广西大学糖业工程技术研究中心, 南宁 530004)

摘 要: 建立了高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法(HPLC-ESI-ITMSn)同时测定了金银花中绿原酸和咖啡酸活性成分的分析方法。样品用体积分数 80 %乙醇回流提取, 用 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈柱分离, 以体积分数 0.5 %甲酸的乙腈-甲酸水溶液为梯度流动相, 以保留时间和质荷比对分离出的组分予以定性确证, 用峰面积进行定量。绿原酸和咖啡酸的线性范围均为 10.0~1000.0 μg/L, 检出限(以信噪比为 3 计)均为 2.0 μg/L。样品的加标平均回收率为 92.7 %~98.7 %, 相对标准偏差为 1.4 %~2.7 %。该方法适用于其它复杂体系中绿原酸和咖啡酸的分析。

关键词: 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法; 金银花; 绿原酸; 咖啡酸

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1000-0720(2008)07-094-04

金银花 (*Lonicera japonica*) 为忍冬科植物的干燥花蕾, 它是一种“药食同源”的绿色天然产物, 在我国分布广泛, 产量较大, 是一种重要的可再生资源^[1]。近年来^[2,3] 许多研究表明, 多酚类物质(主要是黄酮类和氯原酸)是金银花的主要有效成分, 是该植物中重要的生物活性成分。多酚类物质具有抗氧化、清除自由基、降血脂、降血压、预防心血管病、抗突变、抑菌解毒、消炎利胆等^[4,5] 多种药理活性功能, 多酚类物质的鉴别和含量高低已成为中药材质量控制的重要指标。

目前多酚类物质的分析方法主要有高效液相色谱法^[6,7] 和毛细管电泳法^[8,9]。高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用技术(HPLC-ESI-ITMS)可以提高方法的选择性, 改善信噪比。特别适合于复杂体系^[10,11] 中组分的定性定量分析。本文建立了金银花中绿原酸和咖啡酸两种多酚类物质的 HPLC-ESI-ITMS 方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 LC/MSD TRAP SL 高效液相色谱-

质谱联用仪(美国), Waters Pro Plus 超纯水仪(美国)。绿原酸和咖啡酸对照品均购于 Sigma-Aldrich 公司。甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher 公司); 甲酸、乙酸(分析纯), 金银花中药材购买于当地药店。其它试剂均为分析纯, 水为超纯水。

绿原酸和咖啡酸标准溶液 (1.0 mg/mL): 准确称取绿原酸和咖啡酸对照品各 10.0 mg, 用甲醇溶解并分别定容在 10 mL 容量瓶中, 于 4 °C 冰箱中保存, 使用时用 15 %乙腈溶液稀释成所需浓度。

1.2 色谱与质谱条件

色谱条件: 色谱柱 Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ 柱 (5 μm, 150 mm × 2.1 mm i. d.); 流动相 A: 水(含体积分数 0.5 %甲酸), B: 乙腈(含 0.5 %甲酸); 采用梯度洗脱程序: 0~5.0 min, 15 % B; 5.0~10.0 min, 15 %~80 % B。流速: 0.25 mL/min; 柱温: 25 °C, 进样量: 5 μL。

质谱条件: 电离源为电喷雾电离源(ESI 源)负离子模式; m/z 为 50~500 全离子扫描; 毛细管电喷雾电压: 3.5 kV; 雾化气(N₂): 170 kPa; 干燥气(N₂): 流速 8.0 L/min, 温度 325 °C。

* 收稿日期: 2007-07-10; 修订日期: 2007-10-20

作者简介: 李永库 (1979 -), 男, 助教; E-mail: liyongku1979 @126.com

1.3 样品的制备

称取 1.0 g 粉碎后过孔径 150 μm 筛的金银花样品, 加入 40 mL 80 % 的乙醇水溶液于 60 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温水浴上回流 2 h。冷却至室温后, 过滤并用 80 % 的乙醇定容到 50 mL 容量瓶。冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 下放置保存, 待分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

由于电喷雾质谱的电离是在溶液状态电离, 因此流动相的组成和添加剂不但影响目标化合物的保留时间和峰形, 还会影响到目标化合物的离子化效率, 从而影响灵敏度。本文对常用流动相甲醇-水和乙腈-水进行了考察。结果表明, 使用乙腈-水比甲醇-水作流动相时灵敏度略高。实验中研究了将 0.1 %~1.0 % 的甲酸溶液加入到流动相对灵敏度的影响, 结果表明流动相中含有 0.5 % 的甲酸时离子强度最大, 同时色谱峰的峰形较好。因此本文采用乙腈-0.5 % 的甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱。

2.2 质谱条件的优化

多酚类物质在电喷雾质谱中的准分子离子峰有 $[\text{M} + \text{H}]^{+}$ 和 $[\text{M} - \text{H}]^{-}$ ^[12,13] 两种形式。本文用流动注射泵连续进样进行了质谱条件的优化, 在正离子和负离子模式下进行了全扫描以选择适当的分子离子峰和电离方式。结果表明: 在负离子模式下, 这些化合物全扫描的分子离子 $[\text{M} - \text{H}]^{-}$ 较理想, 因此选择目标化合物的 $[\text{M} - \text{H}]^{-}$ 作为准分子离子峰。

2.3 定性分析

在选定的色谱及质谱条件下, 以上述两种组分的混合标准溶液为测试样品, 在 10 min 内得到分离度较好的总离子流色谱图(见图 1)。根据目标峰的保留时间及其一级、二级质谱信息, 并对照标准品的相应信息予以定性, 峰 1~2 对应组分依次为绿原酸和咖啡酸。

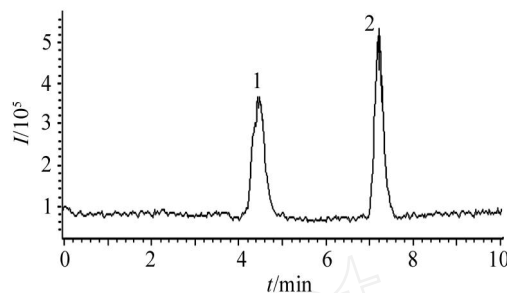


图 1 标准品总离子色谱图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of standard compounds

1 - 绿原酸; 2 - 咖啡酸

2.4 线性关系及检出限

将混合标准品配制成含绿原酸 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 $\mu\text{g/L}$; 咖啡酸 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合溶液浓度。取以上系列混合标准溶液各 5 μL 进样分析, 记录各选择离子通道所对应的色谱峰峰面积。以各标准品的峰面积(3 次平均值)对其质量浓度($\mu\text{g/L}$)进行线性回归, 得回归方程和相关系数见表 1。以信噪比等于 3 计, 得到上述两种组分的检出限列于表 1。

表 1 各标准品的回归方程、线性范围、相关系数和检出限 ($S/N = 3$)

Tab. 1 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients and detection limits ($S/N = 3$) of the two compounds

化合物	线性方程	线性范围 $\rho/(\mu\text{g/L})$	相关系数 r	检出限 $\rho/(\mu\text{g/L})$
绿原酸	$Y = 6.52 \times 10^4 \rho + 3.94 \times 10^3$	10.0~1000.0	0.9994	2.0
咖啡酸	$Y = 3.56 \times 10^4 \rho + 2.31 \times 10^3$	10.0~1000.0	0.9989	2.0

2.5 回收率与精密度

准确量取已测得含量的绿原酸和咖啡酸的金银花样品, 添加两种多酚类物质, 添加水平为 10.0 $\mu\text{g/L}$ 和 400.0 $\mu\text{g/L}$, 结果见表 2。

2.6 样品分析

取“1.4”节中金银花提取液稀释 1000 倍, 按优化的色谱-质谱方法对 4 个产区的金银花中药材进行测定, 样品 1 的色谱图见图 2, 质谱图见图 3,

折合金银花干粉后计算出绿原酸和咖啡酸量的结果见表 3。

表 2 方法的精密度和回收率 (n = 7)

Tab. 2 Precisions and recoveries of the method (n = 7)					
化合物	测定值 $\rho/(\mu\text{g/L})$	添加量 $\rho/(\mu\text{g/L})$	测得量 $\rho/(\mu\text{g/L})$	回收率 / %	RSD / %
绿原酸	410.0	10.0	419.8	98.2	1.9
		400.0	804.8	98.7	1.4
咖啡酸	286.0	10.0	295.3	92.7	2.7
		400.0	668.4	95.6	2.1

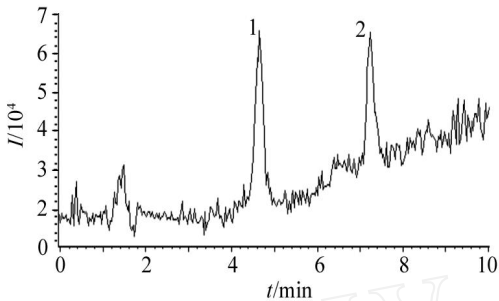


图 2 样品 1 的总离子色谱图

Fig. 2 Total ion current chromatogram of sample 1
1 - 绿原酸; 2 - 咖啡酸

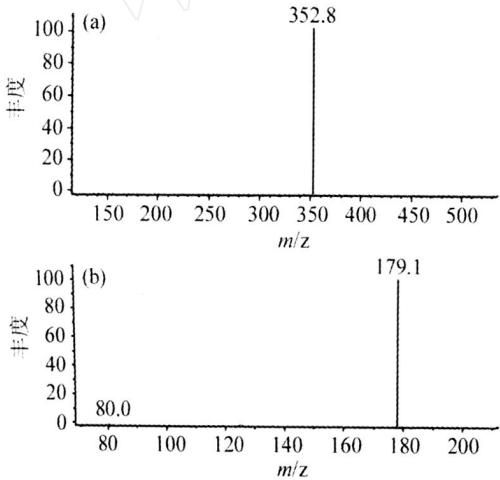


图 3 样品 1 中绿原酸(a)和咖啡酸(b)的一级质谱图

Fig. 3 MS spectra of Chlorogenic acid (a) and Caffeic acid (b) in sample 1

表 3 样品测定结果 (n = 7)

产区	w/(mg/g)	
	绿原酸	咖啡酸
样品 1	20.5	14.3
样品 2	23.4	-
样品 3	18.9	10.5
样品 4	21.8	-

“ - ”未检出

参考文献

[1] 赵国玲, 刘佳佳, 林 丹等. 中成药, 2002, 24(12): 973

[2] H W C Leung, C L Kuo, W H Yang *et al.* Europ J Pharm, 2006, 534: 12

[3] K Neeraj, S Bikram, B Pamita *et al.* Phytochem, 2005, 66: 2740

[4] M A B Angeles, Z Luisa, A G Dominico *et al.* J Chromatogr A, 2003, 1012: 31

[5] M S Fernandez-Pachón, D Villafañ, M C García-Parrila *et al.* Anal Chim Acta, 2004, 513: 113

[6] S K Yan, G A Luo, Y M Wang *et al.* J Pharm and Biom Anal, 2006, 40: 889

[7] Y Zhang, B L Bao, B Y Lu *et al.* J Chromatogr A, 2005, 1065: 177

[8] P Jác, M Polásek, M Posp šilov. J Pharm and Biom Anal, 2006, 40: 805

[9] D Mandakini, T G Gunnar, R Muhammad *et al.* Anal Biochem, 2005, 336: 316

[10] K B 'ekri, R Saint-Louis, E Pelletier. Anal Chim Acta, 2006, 578: 203

[11] P J Kalo, V Ollilainen, J M Rocha *et al.* Inter J Mass Spectr, 2006, 254: 106

[12] M A S Rosa, N Karine, F Q Emerson *et al.* J Chromatogr A, 2004, 1046: 89

[13] H Y Zhang, P Hu, G A Luo *et al.* Anal Chim Acta, 2006, 577: 190

Simultaneous determination of chlorogenic acid and caffeic acid in *Lonicera japonica* by HPLC-ESI-ITMSⁿ
LI Yong-ku¹, OU Xiao-hui² and WANG Fen^{*1} (1. School of Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; 2. Engineering Center For Sugar Cane and Cane Sugar, Guangxi University, Nanning 530004), Fenxi Shiyanshi, 2008, 27(7): 94~97

Abstract: A method for the determination of biological active components Chlorogenic acid and Caffeic acid in *Lonicera japonica* has been developed by high performance liquid chromatography-electrospray ion trap tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-ITMSⁿ). The samples were extracted circumfluently with 80 % ethanol, Chromatographic separation was performed on a Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ column using acetonitrile/water as gradient elution solvents containing 0.5 % formic acid at a flow rate of 0.25 mL/min. The two compounds were identified by retention time and *m/z* and quantified by peak area. The results demonstrated that the linear ranges were 10.0~1000.0, and 10.0~1000.0 µg/L, with detection limits of 2.0 and 2.0 µg/L, for Chlorogenic acid and Caffeic acid, respectively. The recoveries of the analyte at the spiking concentrations of 10.0 µg/L and 400.0 µg/L were 92.7 %~98.2 % and 95.6 %~98.7 %, respectively, with relative standard deviations of 1.9 %~2.7 % and 1.4 %~2.1 % (*n* = 7). The proposed method is also suitable for rapid determination of these biological active components in complex matrices.

Key words: Liquid chromatography-electrospray ion trap tandem mass spectrometry; *Lonicera japonica*; Chlorogenic acid; Caffeic acid

www.cnki.net