

UPLC-MS-MS 同时测定双黄连粉针中 7 种活性成分

罗玲, 黄玉婵, 黄琴, 郭桃艳, 代晶*
(成都医学院药学院, 成都 610083)

[摘要] **目的:** 建立快速灵敏的超高效液相色谱-串联质谱检测注射用双黄连粉针剂中 7 种活性成分(绿原酸、咖啡酸、芦丁、木犀草苷、连翘酯苷 A、黄芩苷、连翘苷)含量的方法。**方法:** 采用 Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈-0.1% 甲酸, 梯度洗脱, 体积流量 0.40 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C。质谱条件为电喷雾离子(ESI)源, 负离子模式检测, 多重反应监测(MRM)扫描, 定量离子对为 m/z 353.0 ~ 191.1 (绿原酸), m/z 179.1 ~ 135.1 (咖啡酸), m/z 609.2 ~ 300.2 (芦丁), m/z 447.1 ~ 285.1 (木犀草苷), m/z 623.1 ~ 161.1 (连翘酯苷 A), m/z 444.8 ~ 268.8 (黄芩苷), m/z 578.8 ~ 370.8 (连翘苷)。**结果:** 7 个成分在考察的线性范围内, 进样浓度与峰面积之间线性关系良好($r > 0.9983$), 精密性 RSD < 4.2%; 重复性 RSD < 6.3%, 平均加样回收率在 92.2% ~ 102.7%。**结论:** 该方法准确、快速、重复性好, 可为双黄连粉针剂的质量控制提供参考方法。

[关键词] 超高效液相色谱-串联质谱; 双黄连粉针; 黄芩苷; 绿原酸; 连翘苷; 咖啡酸; 芦丁; 连翘酯苷 A; 木犀草苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)13-0080-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014130080

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140513.1533.019.html>

[网络出版时间] 2014-05-13 15:33

Simultaneous Determination of Seven Components in Shuanghuanglian Injection Powder by UPLC-MS-MS

LUO Ling, HUANG Yu-chan, HUANG Qin, GUO Tao-yan, DAI Jing*
(School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610083, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a quick and sensitive UPLC-MS-MS method for simultaneously determining seven components (chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, galuteolin, forsythoside A, baicalin and forsythin) in Shuanghuanglian powder injection. **Method:** The analysis was performed on an Agilent Zorbax C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm) using acetonitrile-0.1% formic acid as mobile phase, with a gradient elution at the flow rate of 0.40 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 30 °C. Then the processed sample was analyzed by tandem mass spectrometer with negative electrospray ionization (ESI) source, monitored under a multiple reaction monitoring (MRM) mode, using the transition m/z 353.0 - 191.1, m/z 179.1 - 135.1, m/z 609.2 - 300.2, m/z 447.1 - 285.1, m/z 623.1 - 161.1, m/z 444.8 - 268.8, m/z 578.8 - 370.8 for chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, galuteolin, forsythoside A, baicalin, forsythin, respectively. **Result:** The calibration curves were linear in certain ranges for seven compounds ($r > 0.9983$) respectively, all the RSDs of precision were less than 4.2%, and all the RSDs of repeatability were less than 6.3%. The average recovery ranged from 92.2% to 102.7%. **Conclusion:** This method is rapid, accurate, and suitable for the quality control

[收稿日期] 20140216(002)

[基金项目] 国家级大学生创新创业训练计划项目(201313705006); 四川省教育厅理科重点项目(12ZZA026); 成都医学院综合性设计性实验项目(ZH201209)

[第一作者] 罗玲, 从事药物分析研究, Tel: 1592895606, E-mail: 1015872511@qq.com

[通讯作者] * 代晶, 博士, 讲师, 从事药物分析与药代动力学研究, Tel: 028-62308639, E-mail: daijing320@126.com

of Shuanghuanglian injection powder.

[**Key words**] Shuanghuanglian injection powder; UPLC-MS-MS; baicalin; chlorogenic acid; forsythin; caffeic acid; rutin; forsythoside A; galuteolin

注射用双黄连粉针(冻干)(SHL)临床应用广泛,是目前治疗呼吸道感染性疾病的首选药物之一^[1]。然而SHL粉针是复杂物质组群,各成分含量差异大,很多化合物以同系物或同分异构体的形式存在,普通分析方法难以有效控制其质量。《中国药典》通过3种独立HPLC-UV法分别测定SHL粉针中绿原酸、黄芩苷和连翘苷的含量,其中连翘苷需要经过氧化铝柱等处理,整个质量控制过程较为麻烦^[2]。有学者建立了同时测定SHL制剂中多种成分的HPLC-UV方法,这些方法虽然减少了配制流动相的步骤和进样次数,样品前处理也较简单,但整个分析周期较长,通常需要60~100 min,工作效率较低^[3-7]。班丽娜等人采用HPLC-MS同时检测SHL口服液中4种成分含量^[8],此法用时较短(30 min),但其采用选择离子监测模式(SIM),只能检测母离子,干扰较多。UPLC-MS-MS具有高效、快速和高灵敏度的特点,其MRM模式通过同时监视物质的母离子和子离子,解决了复杂基质干扰问题,极大地提高了检测的选择性和灵敏度,特别适用于复杂体系中含量少而很难分离纯化的组分的分析检测。本试验以UPLC-MS-MS结合MRM模式,同时测定SHL粉针中绿原酸、咖啡、芦丁、木犀草苷、连翘酯苷A、黄芩苷、连翘苷的含量,并能同时检测连翘酯苷A的同分异构体,为SHL粉针质量控制提供有效的分析方法。

1 仪器与试剂

6410 QQQ型LC-MS系列分析系统(包括1260型液相色谱仪,6410 QQQ型三重四级杆质谱仪,Masshunter色谱工作站,美国安捷伦公司),Milipore型超纯水机(美国Milipore公司)。黄芩苷、连翘苷、咖啡酸、芦丁、木犀草苷对照品(均购于成都曼思特生物科技有限公司,纯度均 $\geq 98\%$,批号依次为MUST-11101403, MUST-11080301, MUST-10112201, MUST-11040302, MUST-12041703),绿原酸对照品(购自成都天源产物有限公司,纯度98.36%,批号CAA-111101),连翘脂苷A对照品(四川省维克奇生物科技有限公司提供,纯度 $\geq 98\%$,批号120328),注射用双黄连粉针(冻干)(哈药集团中药二厂,规格600 mg/支,批号1104210, 1103124, 1012236)。乙腈(色谱纯美国Roche公司),其他试

剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX C₁₈色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.1%甲酸(B)梯度洗脱(0~4.5 min, 5%~15% A; 4.5~5.5 min, 15%~17% A; 5.5~6.8 min, 17% A; 6.8~7.5 min, 17%~28% A; 7.5~9.0 min, 28%~37% A; 9.0~11.5 min, 37% A),流速0.4 mL·min⁻¹,柱温30℃。

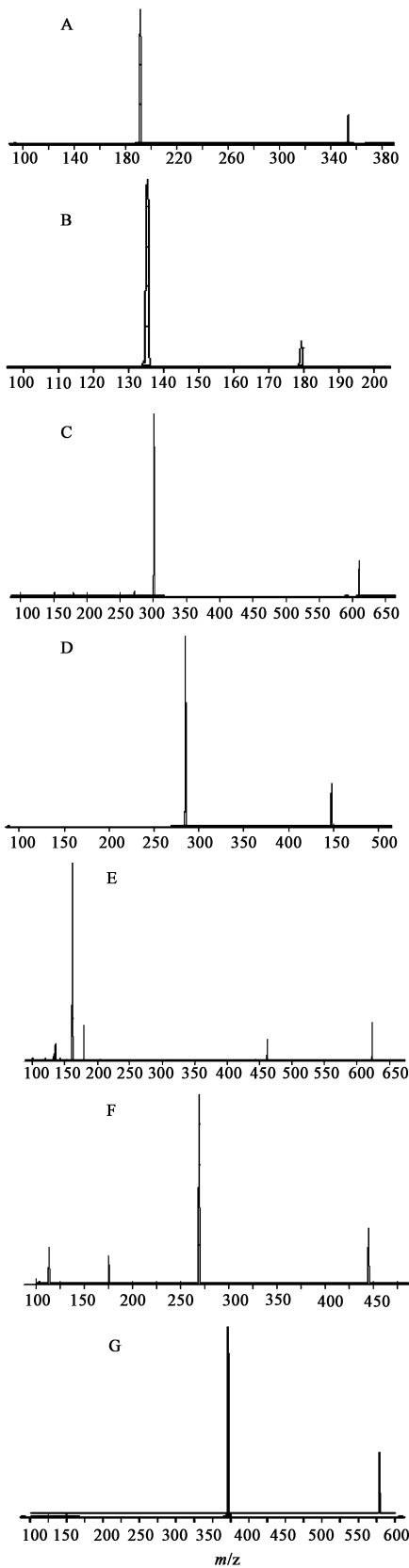
2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI源),负离子模式,MRM监测,干燥气温度350℃,干燥气体积流量11 L·min⁻¹,雾化气压力40 psi,毛细管电压4 000 V。组分的保留时间、用于定量分析的离子对、裂解电压和碰撞电压见表1,二级质谱见图1。

表1 定量分析离子对、裂解电压和碰撞电压

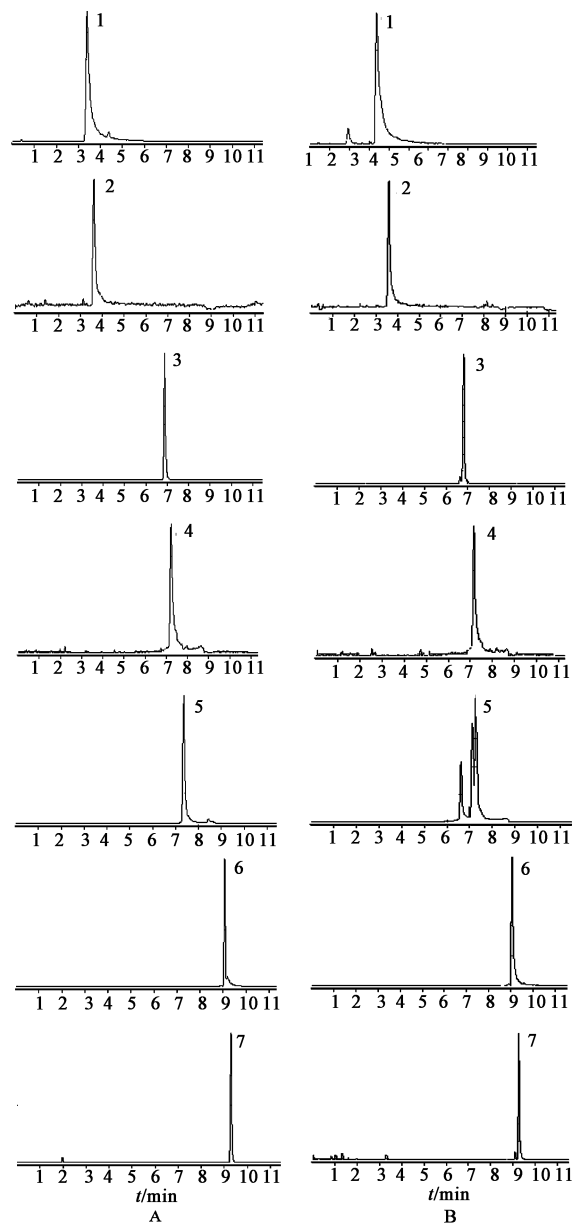
成分	t_R /min	MS ₁ /(m/z)	MS ₂ /(m/z)	裂解电压 /V	碰撞电压 /V
绿原酸	3.383	353.0	191.1	100	10
咖啡酸	3.604	179.1	135.1	110	13
芦丁	6.863	609.2	300.2	230	35
木犀草苷	7.241	447.1	285.1	205	26
连翘酯苷A	7.339	623.1	161.1	230	38
黄芩苷	9.060	444.8	268.8	125	10
连翘苷	9.277	578.8	370.8	125	14

2.3 溶液配制 精密称取各对照品适量,分别置10 mL量瓶中,用50%甲醇溶解并定容,制得对照品贮备液;取上述各对照品贮备液适量,置于同一25 mL量瓶中,加50%甲醇配制成混合对照品溶液,其中绿原酸、咖啡酸、芦丁、木犀草苷、连翘酯苷A、黄芩苷和连翘苷的质量浓度依次为20.0, 0.30, 2.0, 0.6, 30.0, 100, 6.0 mg·L⁻¹。分别吸取上述混合标准溶液0.5, 1.0, 2.0, 1.5, 3.0, 5.0 mL,置于10 mL量瓶中,50%甲醇稀释至刻度,得系列标准溶液。精密称取SHL粉针20 mg,置100 mL量瓶中,50%甲醇溶解并定容,得200 mg·L⁻¹的溶液,用0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。对照品和供试品溶液的色谱图见图2。

2.4 线性关系与定量限 吸取系列浓度的混合对照品溶液各5 μL,进样测定,记录色谱图。以对照



A. 绿原酸; B. 咖啡酸; C. 芦丁; D. 木犀草苷;
E. 连翘酯苷 A; F. 黄芩苷; G. 连翘苷
图 1 7 种成分对照品的二级质谱



1. 绿原酸; 2. 咖啡酸; 3. 芦丁; 4. 木犀草苷;
5. 连翘酯苷 A; 6. 黄芩苷; 7. 连翘苷

图 2 对照品 (A) 和 SHL 粉针样品 (B) 的提取离子色谱

品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行线性回归, 得回归方程, 同时以 $S/N = 10$ 时各对照品的浓度作为定量限。见表 2。

2.5 精密度试验 精密吸取同一供试品溶液 (批号 1104210) $5 \mu\text{L}$, 连续进样 6 次, 测得绿原酸、咖啡酸、芦丁、木犀草苷、连翘酯苷 A、黄芩苷、连翘苷峰面积的 RSD 分别为 2.4%, 2.3%, 2.9%, 3.2%, 3.7%, 4.2%, 1.8%, 表明仪器的精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批供试品溶液 (批号 1104210) 6 份, 按 2.3 项下方法制备, 分别进样 $5 \mu\text{L}$ 进行测定。结果供试品中绿原酸、咖啡酸、芦丁、木

表2 SHL粉针中7种被测成分的线性范围、回归方程、相关系数及定量限

化合物	线性范围 /mg·L ⁻¹	回归方程	相关系数 /r	定量限 /mg·L ⁻¹
绿原酸	1.0~10	$Y = 32.284X - 9702.3$	0.9992	0.05
咖啡酸	0.015~0.150	$Y = 66.172X - 329.91$	0.9989	0.015
芦丁	0.1~1.0	$Y = 43.025X + 267.99$	0.9998	0.02
木犀草苷	0.03~0.30	$Y = 40.541X - 618.16$	0.9989	0.015
连翘酯苷A	1.5~15	$Y = 22.830X - 4450.1$	0.9999	0.025
黄芩苷	5.0~50	$Y = 6.129X + 6697.5$	0.9983	0.05
连翘苷	0.3~3.0	$Y = 1.753X + 1467.6$	0.9985	0.03

犀草苷、连翘酯苷A、黄芩苷、连翘苷含量的RSD分别为4.7%、4.9%、5.7%、4.5%、5.3%、6.3%、4.6%，表明方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验 将制备好的供试品溶液(批号1104210)分别在0,2,4,8,10,12 h进样,测得绿原酸、咖啡酸、芦丁、木犀草苷、连翘酯苷A、黄芩苷、连翘苷峰面积的RSD分别为1.5%、1.9%、1.7%、1.2%、1.5%、1.8%、1.0%。结果表明供试品溶液中上述7个成分在12 h内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 精密称取SHL粉针(批号1104210)10.0 mg,置10 mL量瓶中,平行制备6份,加入对照品溶液适量,用50%甲醇稀释至刻度。取5 μL进样,测定含量,计算各成分的平均回收率。见表3。

2.9 样品测定 取SHL粉针3批,按2.3项下方法处理,进样测定,计算各成分的含量,结果见表4。

表3 SHL粉针中7种成分的回收率

化合物	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%	化合物	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
绿原酸	15.2	15.0	28.7	89.9	97.0	5.0	连翘酯苷A	23.3	22.5	46.4	102.5	97.0	4.6
	15.2	15.0	29.5	95.6				23.3	22.5	45.9	100.3		
	15.2	15.0	29.2	93.4				23.3	22.5	45.6	98.9		
	15.2	15.0	30.6	102.5				23.3	22.5	43.6	90.3		
	15.2	15.0	30.4	101.3				23.3	22.5	44.5	94.1		
	15.2	15.0	30.1	99.0				23.3	22.5	44.9	96.2		
咖啡酸	0.261	0.225	0.461	88.7	92.2	6.0	黄芩苷	203.1	200.0	416.7	106.8	102.7	6.2
	0.261	0.225	0.474	94.5				203.1	200.0	417.7	107.3		
	0.261	0.225	0.478	96.3				203.1	200.0	394.9	95.9		
	0.261	0.225	0.486	99.8				203.1	200.0	399.1	98.0		
	0.261	0.225	0.459	88.0				203.1	200.0	424.9	110.9		
	0.261	0.225	0.454	85.6				203.1	200.0	397.7	97.3		
芦丁	1.36	1.50	2.86	100.3	100.4	3.9	连翘苷	4.64	4.50	9.00	96.8	93.2	6.3
	1.36	1.50	2.82	97.5				4.64	4.50	8.68	89.7		
	1.36	1.50	2.85	99.2				4.64	4.50	8.41	83.8		
	1.36	1.50	2.79	95.6				4.64	4.50	9.04	97.8		
	1.36	1.50	2.95	106.3				4.64	4.50	9.10	99.2		
	1.36	1.50	2.91	103.5				4.64	4.50	8.77	91.8		
木犀草苷	0.483	0.450	0.966	107.4	102.7	5.4							
	0.483	0.450	0.970	108.3									
10.0	0.483	0.450	0.944	102.5									
	0.483	0.450	0.926	98.5									
	0.483	0.450	0.906	94.1									
	0.483	0.450	0.957	105.3									

注:取样量均为10 mg。

表 4 SHL 粉针中 7 个成分含量测定 ($\bar{x} \pm s$)

mg·g⁻¹

批号	绿原酸	咖啡酸	芦丁	木犀草苷	连翘酯苷 A	黄芩苷	连翘苷
1104210	15.25 ± 0.98	0.26 ± 0.01	1.36 ± 0.03	0.48 ± 0.03	23.32 ± 0.82	203.14 ± 4.58	4.64 ± 0.21
1103124	16.75 ± 0.28	0.30 ± 0.02	1.28 ± 0.04	0.60 ± 0.03	19.94 ± 0.48	216.05 ± 4.20	4.27 ± 0.17
1012236	17.30 ± 0.78	0.36 ± 0.03	1.37 ± 0.03	0.46 ± 0.01	24.12 ± 0.92	214.09 ± 3.61	5.34 ± 0.33

3 讨论

比较了乙腈和甲醇的洗脱效果以及甲酸酸度的影响。发现乙腈的洗脱能力较强,各化合物分离情况较好。流动相的酸度能影响咖啡酸和绿原酸色谱峰的拖尾因子,当甲酸浓度达到 0.1% 时峰形较理想。故试验选择乙腈-0.1% 甲酸作为流动相。

试验发现 7 种成分中除黄芩苷外,其余 6 种成分在负离子模式下响应值更高,稳定性更好。黄芩苷虽然在正离子模式响应灵敏度高,但其保留时间与连翘苷比较接近,若在短时间内切换离子监测模式,可能引起响应信号不稳定,影响这两个成分的测定。考虑到黄芩苷在 SHL 粉针中的含量较高,采用负离子模式虽然降低了检测的灵敏度,但不影响其测定的准确度和重复性,故试验整个分析周期内均采用负离子模式。在此条件下,连翘苷的准分子离子为 [M + HCOO]⁻,其余成分的准分子离子均为 [M-H]⁻。

连翘酯苷 A [2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 → 6)-4-*O*-*trans*-caffeoyl- β -*D*-glucopyranoside] 是苯乙醇苷类化合物,理论上可以存在多个同分异构体。本试验在其检测通道中发现 3 个色谱峰,通过对照品比对,认为保留时间为 7.34 min 的色谱峰为连翘酯苷 A,而其他两个为其同分异构体。有学者在不同 SHL 粉针或连翘提取物中发现了不同的连翘酯苷 A 的同分异构体,这可能跟药材来源有关。如 Han^[9] 在 SHL 粉针中发现了连翘酯苷 A 的同分异构体 acteoside,而罗奇志^[10] 除了发现 acteoside 外,还发现了一个异构体(未明确是何种化合物)。刘影^[11] 在连翘的提取物中发现连翘酯苷 A 的 2 个同分异构体,通过 NMR-LC-MS 手段分析,鉴定为新化合物 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 → 6)-2-*O*-*trans*-caffeoyl- β -*D*-glucopyranoside(连翘酯苷 H) 和 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl-*O*- α -*L*-rhamnopyranosyl-(1 → 6)-3-*O*-*trans*-caffeoyl- β -*D*-glucopyranoside(连翘酯苷 I)。

本试验建立了 UPLC-MS-MS 法结合 MRM 模式测定 SHL 粉针中 7 种活性成分的含量,该方法简单、准确、灵敏、选择性好,分析周期短。试验结果显

示这些成分含量差异较大,其中黄芩苷、连翘酯苷 A、绿原酸和连翘苷的含量较高,而木犀草苷、咖啡酸含量较低。本方法适用于 SHL 粉针中 7 种活性成分的快速测定,也可用于复杂体系中连翘酯苷 A 的同分异构体的测定。

[参考文献]

[1] 谢子任. 双黄连粉针剂的组分及药用价值[J]. 中国医药导报, 2009, 6(32): 146.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 846.

[3] 赵洪涛, 吴晓雯, 安益强, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测法同时测定双黄连片剂中的 12 种化合物[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(4): 268.

[4] 吕珊珊, 陈靖, 刘晓, 等. 双黄连软胶囊中 9 种化合物的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2012, 43(2): 126.

[5] 卞婷婷, 安益强, 汤道权, 等. HPLC 法同时测定双黄连冻干粉中 11 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 52.

[6] Yang D Z, An Y Q, Jiang X L, et al. Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional Chinese medicine preparation[J]. Talanta, 2011, 85(2): 885.

[7] 孙永慧, 李文春. HPLC 同时测定双黄连粉针剂中 5 种成分的含量[J]. 中成药, 2010, 32(1): 65.

[8] 班丽娜, 徐远金. HPLC-MS 同时测定双黄连口服液中的 4 种有效成分[J]. 中成药, 2012, 34(2): 265.

[9] Han J, Ye M, Guo H, et al. Analysis of multiple constituents in a Chinese herbal preparation Shuang-Huang-Lian oral liquid by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 44(2): 430.

[10] 罗奇志, 罗佳波, 王有志. 高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱定性分析双黄连粉针中化学成分及其药味归属[J]. 药学学报, 2009, 44(12): 1391.

[11] 刘影. 苯乙醇苷类化合物及其混合物组分群的质谱分析方法以及 LC-MS-NMR 相关谱分析方法研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2009.

[责任编辑 顾雪竹]