

UPLC-MS/MS 同时测定双黄连片中 5 种有效成分的含量

殷爱玲, 谈瑄忠*

(南京市中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:建立同时测定双黄连片中 5 种有效成分含量的 UPLC-MS/MS 分析方法。方法:采用 BEHC₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈-0.1% 甲酸水梯度洗脱, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 采用电喷雾电离源(ESI), 多反应离子监测(MRM)扫描方式。结果:10 种被测物呈良好的线性关系($r > 0.999$); 精密度、重复性和稳定性良好; 加样回收率在 96.00% ~ 104.67%, RSD 均 < 3%。结论:所建立的方法准确、快捷, 重复性好, 可用于双黄连片中绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A、木樨草苷、芦丁 5 种有效成分的同时测定。

[关键词] 超高效液相色谱-串联质谱; 双黄连片; 绿原酸; 连翘苷; 连翘酯苷 A; 木樨草苷; 芦丁

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)19-0057-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015190057

Simultaneous Determination of Five Effective Components in Shuanghuanglian Tablet by UPLC-MS/MS YIN Ai-ling, TAN Xuan-zhong* (Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC-MS/MS method for simultaneously determining five components (chronogenic acid, phillyrin, forsythoside A, luteoloside, rutin) in Shuanghuanglian tablets. **Method:** Waters Acquity BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) was adopted and eluted with the mobile phase of acetonitrile and 0.1% formic acid/water in a gradient mode at a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹. The analytes were detected by tandem mass spectrometry with the electrospray ionization (ESI) source in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Result:** Ten compounds showed a good linear relationship ($r > 0.999$); the precisions, repeatabilities and stabilities of the method were good, and the average recoveries were between 96% and 104.67% with the relative standard deviations of no more than 3%. **Conclusion:** The established method is highly repeatable, rapid and accurate and can be used for the determination of five effective components in Shuanghuanglian tablets.

[Key words] UPLC-MS/MS; Shuanghuanglian tablets; chronogenic acid; phillyrin; forsythoside A; luteoloside; rutin

双黄连片是由黄芩、金银花、连翘通过一定传统水提醇沉工艺精制而成, 临床主要用于细菌或病毒感染引起的上呼吸道感染。前期研究表明金银花、连翘为君药, 其抗菌、抗病毒效果显著^[1-5]。绿原酸、木樨草苷、芦丁为金银花主要活性成分^[6-7], 而连翘苷、连翘酯苷 A 为连翘主要活性成分^[8-9]。因此, 有必要对双黄连中绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A、木樨草苷、芦丁 5 种有效成分进行分析。本研究采用 LC-MS/MS 联用技术, 快速测定了双黄连片中 5 种有效成分的含量, 该方法为双黄连制剂提供了一种简单易行的定量方法, 可用于该制剂的质量控制和

临床研究。

1 材料

1.1 仪器设备 超高效液相色谱-TQD 质谱联用仪 (ACQUITY 系统, 美国 Waters 公司), MassLynx V4.1 工作站。BP211D 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司), MicroCL 21R 型微量离心机 (美国赛默飞世尔科技公司), Synergy 型超纯水仪 (德国 Merck Millipore)。

1.2 药品与试剂 绿原酸 (批号 110753-200413), 连翘苷 (批号 110751-200514), 连翘酯苷 A (批号 110093-200716), 木樨草苷 (批号 110813-200712)

[收稿日期] 20140824(002)

[第一作者] 殷爱玲, 硕士, 从事药剂学研究, Tel:025-86626137-6121, E-mail:yal120_120@163.com

[通讯作者] * 谈瑄忠, 博士, 主任药师, 从事新药研究与开发, Tel:025-86626137-6121, E-mail:txzz82@sohu.com

对照品购自中国食品药品检定研究院, 芦丁(成都瑞芬斯, 批号, 供含量测定用), 双黄连片为哈药制药三厂生产(批号分别为 20121005, 20121109, 20121210)。甲醇, 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司), 其余溶剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Acquity BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相乙腈(A)-0.1% 的甲酸水(B)梯度洗脱(0 ~ 1.5 min, 90% B; 1.5 ~ 4.0 min, 90% ~ 40% B; 4.0 ~ 4.2 min, 40% ~ 10% B; 4.2 ~ 5.2 min, 10% B; 5.2 ~ 7 min, 10% ~ 90% B; 7.0 ~ 8.0 min, 90% B), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL, 柱温 40 °C。

2.2 质谱条件 Waters 三重四级杆串联质谱仪(TQD), 电喷雾离子化(ESI), 多反应监测离子扫描模式(MRM)测定; 毛细管电压 4 000 V, 锥孔电压 60 V, 脱溶剂温度 450 °C, 脱溶剂气体流速 8 000 L·h⁻¹。5 种成分离子对的选择(*m/z*): 绿原酸(ES⁺, 354.895 > 162.907), 连翘苷(ES⁺, 556.91 > 309.05), 连翘酯苷 A(ES⁻, 622.95 > 160.93), 木樨草苷(ES⁺, 448.81 > 286.95), 芦丁(ES⁺, 610.92 > 302.93)。见图 1。

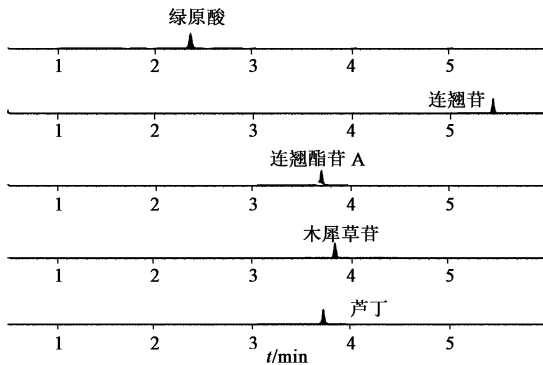


图 1 5 种成分的二级质谱

Fig.1 Total ion chromatograms of five compounds

2.3 溶液的配制

2.3.1 供试品溶液的制备 取质量差异项下的本品, 研细, 约 0.2 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇适量, 超声处理(功率 250 W, 频率 33 kHz) 20 min, 放冷, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 4 °C 保存, 备用。

2.3.2 混合对照品溶液的制备 精密称取绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A 和木樨草苷、芦丁对照品适量,

置 10 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 制得各成分质量浓度分别 5.2, 0.923, 0.976, 0.232, 0.92 mg·L⁻¹ 的混合对照品溶液, 4 °C 保存, 备用。

2.4 线性关系与定量限 分别精密量取 2.3.2 项下的混合对照品溶液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用初始流动相乙腈-0.1% 甲酸水(1:9) 稀释成系列浓度的混合对照品溶液(绿原酸 5 200, 2 600, 1 300, 650, 325, 162.5 μg·L⁻¹; 连翘苷 923, 461.5, 230.7, 115.3, 57.6, 28.8 μg·L⁻¹; 连翘酯苷 A 976, 488, 244, 122, 61, 30.5 μg·L⁻¹; 木樨草苷 232, 116, 58, 29, 14.5, 7.25 μg·L⁻¹; 芦丁: 920, 460, 230, 115, 57.5, 28.75 μg·L⁻¹)。按照 2.1, 2.2 项下的条件进样 5 μL 测定。得到各成分的回归方程、相关系数及线性范围, 以各待测组分的定量限。结果见表 1。

表 1 线性关系考察

Table 1 Liner range, regression equation and quantitation limit of 5 compounds

成分	线性范围 /μg·L ⁻¹	线性方程	相关系数	定量限 /μg·L ⁻¹
绿原酸	162.5 ~ 5 200	Y = 294.09X + 17 624	0.999 6	0.650
连翘苷	28.8 ~ 923	Y = 19.296X + 748.42	0.999 6	0.982
连翘酯苷 A	30.5 ~ 976	Y = 670.8X + 11 121	0.999 1	0.240
木樨草苷	7.25 ~ 232	Y = 490.45X + 2 938.3	0.999 0	0.290
芦丁	28.75 ~ 920	Y = 13.125X - 20.365	0.999 3	0.525

2.5 精密度考察 取供试品溶液, 重复进样 6 次测定。结果显示, 绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A 和木樨草苷、芦丁的峰面积 RSD 分别为 2.0%, 0.7%, 1.3%, 0.4%, 2.5%。结果表明该方法的精密度良好。

2.6 重复性考察 按 2.3.1 项下方法制备供试品(20131009) 6 份, 按 2.1, 2.2 条件进样分析, 测得此批号中绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A 和木樨草苷、芦丁平均质量分数分别为 11.83, 2.75, 4.32, 1.98, 3.27 mg/片, RSD 分别为 1.0%, 1.9%, 1.0%, 1.8%, 2.5%, 结果表明该方法的重复性良好。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 进样测定, 测得绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A 和木樨草苷、芦丁峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 2.4%, 2.9%, 2.6%, 2.6%。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验 精密吸取已知浓度的供试品溶液 9 份, 每 3 份为一组, 分别精密加入高、中、低 3 个浓度的混合对照品溶液后, 按 2.4.1 项下方法

制备供试品溶液进行测定。计算各成分的回收率,结果见表 2。

表 2 双黄连片中 5 种成分的加样回收率 (n=3)

Table 2 Recoveries of five components of Shuanghuanglian tablets (n=3)

成分	样品中量 /ng	加入量 /ng	测得量 /ng	回收率 /%	RSD /%
绿原酸	2 804. 16	2 243. 12	5 097. 75	99. 82	1. 5
	2 804. 16	2 804. 16	5 496. 15		
	2 804. 16	3 364. 94	6 210. 17		
连翘苷	300. 24	240. 19	535. 03	97. 31	1. 6
	300. 24	300. 24	588. 47		
	300. 24	360. 29	653. 92		
连翘酯苷 A	580. 28	464. 22	1 065. 39	99. 49	2. 0
	580. 28	580. 28	1 148. 95		
	580. 28	696. 33	1 248. 53		
木犀草苷	213. 59	170. 87	388. 31	100. 15	2. 1
	213. 59	213. 59	431. 93		
	213. 59	256. 31	459. 61		
芦丁	462. 71	370. 16	826. 40	99. 14	1. 5
	462. 71	462. 71	944. 13		
	462. 71	555. 25	990. 92		

2. 9 样品含量测定 取 3 个批号的双黄连片,按照 2. 3. 1 项下方法处理,平行制得各组待测样品溶液 3 份,进样分析,经计算得到各成分的含量,结果见表 3。

表 3 双黄连片中 5 种成分的含量测定 (n=3) mg/片

Table 3 Results of five compounds content determination (n=3) mg/tablet

批号	绿原酸	连翘苷	连翘酯苷 A	木犀草苷	芦丁
20130906	11. 053	2. 109	3. 865	1. 422	3. 082
20131209	11. 214	2. 502	3. 912	1. 602	3. 193
20140104	11. 634	2. 311	4. 012	1. 902	3. 393

3 结论

作者经过查阅文献发现,目前尚未见到用液质联用的方法同时测定双黄连片中多种成分含量的报道,本实验使用 LC-MS/MS 联用技术,对双黄连片中多种成分进行同时测定。前期实验及文献亦报道了金银花、连翘为方解双黄连君药,其抗菌、抗病毒效果显著^[1-5],黄芩苷虽为黄芩中主要成分,且在双黄连中含量较高,但其抗菌、抗病毒活性却低于以上君药成分,尤其连翘酯苷 A 等。然而其能促进连翘酯苷 A 的吸收^[12],影响其疗效,因此,后期研究将亦关注黄芩苷的检测。

本实验同时选用正负两种离子模式测定 5 种成分的含量,其中绿原酸、木犀草苷和芦丁分子离子峰为 [M+H]⁺,连翘苷分子离子峰为 [M+Na]⁺,连翘酯苷 A 分子离子峰为 [M-H]⁻,实验结果发现此分子离子峰既稳定,且灵敏度高。

本实验建立的液质联用方法,可在短时间内快速

分离检测双黄连片中绿原酸、连翘苷、连翘酯苷 A、木犀草苷、芦丁 5 种主要成分,该方法经过考察,准确、快捷,重复性好,符合中药制剂的相关分析要求,可用于双黄连片的质量控制。此外,双黄连片的体内研究相对较少,随着液质联用技术的不断普及,双黄连制剂的体内研究也将越来越多,本实验为双黄连片的质量控制提供依据的同时,也可以为该制剂的药物疗效、药代动力学等相关研究提供一定的参考。

[参考文献]

[1] Zhou W, Wang H D, Zhu X X, et al. Improvement of intestinal absorption of forsythoside A and chlorogenic acid By different carboxymethyl chitosan and chito-oligosaccharide, application to Flos Lonicerae Fructus Forsythiae Herb couple preparations [J]. PloS One, 2013, 8(5):e63348.

[2] Zhou W, Tan X B, Shan J J, et al. Study on the main components interaction from Flos Lonicerae and Fructus Forsythiae and Their Dissolution *in vitro* and intestinal absorption in rats [J]. PloS One, 2014, 9(10):e109619.

[3] Shang X F, Pan H, Li M X, et al. *Lonicera japonica* Thunb: Ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 138(1): 1-21.

[4] 曲欢欢. 连翘化学成分和生物活性研究[D]. 西安:西北大学, 2008.

[5] 夏伯候,王智民,林丽美,等. 银翘药对的药效学研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(3): 80-82.

[6] 张星海. 金银花中绿原酸提取、分离纯化工艺和活性研究[D]. 杭州:浙江大学, 2003.

[7] 田野. 金银花化学成分研究[D]. 郑州:郑州大学, 2007.

[8] 胡克杰,徐凯建,王跃红,等. 连翘酯苷体外抗病毒作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2001, 8(2):89.

[9] Kuo P C, Chen G F, Yang M L, et al. Chemical constituents from the fruits of forsythia suspensa and their antimicrobial activity [J]. Bio Med Research International, 2014;304830.

[10] 陈国宝,宋桂萍,杨弃尘. HPLC 法同时测定双黄连片中黄芩苷、绿原酸、连翘苷、连翘酯苷的含量[J]. 中国药房, 2011(48):4594-4596.

[11] 付金凤,赵芳. 高效液相色谱法测定双黄连片中连翘苷的含量[J]. 黑龙江医药, 2009, 26(3):949-950.

[12] Zhou W, Di L Q, Shan J J, et al. Intestinal absorption of forsythoside A in different compositions of Shuang-Huang-Lian[J]. Fitoterapia, 2011, 82(3):375-382.

[责任编辑 顾雪竹]