

[质 量]

UHPLC-MS/MS 法同时测定蒲地蓝消炎片中 10 种成分

米建萍^{1,2}, 庞 倩^{2,3}, 徐远金^{2,3*}

(1. 北海市疾病预防控制中心, 广西 北海 536000; 2. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁 530004; 3. 广西大学化学化工学院, 广西 南宁 530004)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱 (UHPLC-MS/MS) 法同时测定蒲地蓝消炎片 (蒲公英、黄芩、苦地丁和板蓝根) 中腺苷、表告依春、咖啡酸、绿原酸、阿魏酸、紫堇灵、乙酰紫堇灵、芹菜素、黄芩素和汉黄芩素的含量。**方法** 分析采用 Eclipse Plus C₁₈ RRHD 色谱柱 (1.8 μm, 2.1 mm × 50 mm); 流动相为乙腈-0.2% 乙酸水溶液, 梯度洗脱; 体积流量为 0.3 mL/min。**结果** 10 种成分分别在 0.000 050 0 ~ 1.00、0.010 0 ~ 5.00、0.015 0 ~ 10.0、0.030 0 ~ 20.0、0.100 ~ 100、0.000 300 ~ 10.0、0.003 00 ~ 10.0、0.000 600 ~ 20.0、0.200 ~ 20.0、0.000 500 ~ 5.00 mg/L 范围内线性关系良好, 平均加样回收率在 91.4% ~ 105.0% 之间, RSD 均小于 2.0%。**结论** 该方法快速、简便、灵敏, 适用于蒲地蓝消炎片的质量控制。

关键词: 蒲地蓝消炎片; 化学成分; UHPLC-MS/MS

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2016)06-1269-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.06.014

Simultaneous determination of ten constituents in Pudilan Xiaoyan Tablets by UHPLC-MS/MS

MI Jian-ping^{1,2}, PANG Qian^{2,3}, XU Yuan-jin^{2,3*}

(1. Beihai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Beihai 536000, China; 2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Nanning 530004, China; 3. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

ABSTRACT: AIM To establish an ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of adenosine, epigotrin, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, corynoline, acetylcorynoline, apiginin, baicalein and wogonin in Pudilan Xiaoyan Tablets (*Taraxaci Herba*, *Scutellariae Radix*, *Corydalis Bungeanae Herba* and *Isatidis Radix*). **METHODS** The analysis was performed on an Eclipse Plus C₁₈ RRHD column (1.8 μm, 2.1 mm × 50 mm), with a mobile phase comprising of acetonitrile-0.2% acetic acid aqueous solution in a gradient elution manner, at a flow rate of 0.3 mL/min. **RESULTS** Ten constituents showed good linear relationships within the ranges of 0.000 050 0 – 1.00 mg/L, 0.010 0 – 5.00 mg/L, 0.015 0 – 10.0 mg/L, 0.030 0 – 20.0 mg/L, 0.100 – 100 mg/L, 0.000 300 – 10.0 mg/L, 0.003 00 – 10.0 mg/L, 0.000 600 – 20.0 mg/L, 0.200 – 20.0 mg/L and 0.000 500 – 5.00 mg/L, respectively, whose average recoveries were 91.4% – 105.0% with the RSDs of less than 2.0%. **CONCLUSION** This rapid, simple and sensitive method suits the quality control of Pudilan Xiaoyan Tablets. **KEY WORDS:** Pudilan Xiaoyan Tablets; chemical constituents; UHPLC-MS/MS

蒲地蓝消炎片由蒲公英、黄芩、苦地丁和板蓝根 4 种中药组成, 主要功效为清热解毒, 抗炎消肿, 用于治疗疖肿、咽炎、扁桃腺炎, 腮腺炎等。

方中蒲公英性寒, 味苦、甘, 有清热解毒、消肿散结、利尿通淋等功效; 黄芩有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效, 用于治疗湿温、暑湿、胸

收稿日期: 2015-08-07
基金项目: 国家自然科学基金项目 (21264003)
作者简介: 米建萍 (1972—), 女, 硕士, 副主任技师, 从事理化检验工作。Tel: 13507796184, E-mail: mjp100@sina.com
* 通信作者: 徐远金 (1964—), 男, 博士, 教授, 从事色谱分析方法研究。Tel: (0771) 3237743, E-mail: yjxu@gxu.edu.cn

闷呕恶、湿热痞满、泻痢、黄疸、肺热咳嗽、高热烦渴、血热吐衄、痈肿疮毒、胎动不安；板蓝根具有清热解毒、凉血消肿、利咽之功效，用于治疗瘟疫时毒、发热咽痛、温毒发斑、痄腮、丹毒、臃肿疮毒等；苦地丁清热解毒、消痈肿，主治流行性感冒、上呼吸道感染、扁桃体炎、传染性肝炎、肠炎、肾炎、瘰癧、腮腺炎、结膜炎、急性阑尾炎及疔疮痈肿等^[1]。

已有文献报道，黄芩中的黄酮^[2-3]、蒲公英中的酚酸和黄酮^[4-5]、苦地丁中的生物碱^[6]、板蓝根中的腺苷和表告依春^[7-8]等为主要活性物质。现行药典标准常用 HPLC 法进行中药质量控制指标的单一含量分析，没有多种有效成分同时测定的方法。蒲地蓝制剂相关文献大多集中在临床使用及疗效观察方面，鲜有成分测定的报道，胡冰^[9]采用测定了腺苷的含有量，邵礼梅等^[10]对黄芩苷和黄芩素进行了测定，汤道权等^[11]测定了黄芩苷的含有量，刘德胜等^[12]对不同制剂中咖啡酸和绿原酸的含有量进行了测定，覃华亮^[13]建立了测定紫堇灵含有量的方法，但同时测定多种成分的文獻^[14-15]较少，也尚无液相色谱-质谱联用分析方法的报道。本实验采用超高效液相色谱-串联质谱（UHPLC-MS/MS）法同时测定蒲地蓝消炎片中腺苷、表告依春、咖啡酸、绿原酸、阿魏酸、紫堇灵、乙酰紫堇灵、芹菜素、黄芩素和汉黄芩素，其简便快速，已用于实际样品的分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 Agilent 1290 Infinity LC System、Agilent 6460 Triple Quad LC/MS 仪（美国 Agilent 公司）；Synthesis A10TM 超纯水系统（美国 Millipore 公司）；ME2355、CPA2245 电子天平（德国 Sartorius 公司）；KQ2200DV 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司，100 W，40 kHz）。

腺苷（批号 110879-200202）、咖啡酸（批号 110885-200102）、阿魏酸（批号 110773-200611）对照品（中国食品药品检定研究院，含有量 $\geq 98\%$ ）；芹菜素对照品（批号 101207，四川省维克奇生物科技有限公司，含有量 $\geq 98\%$ ）；表告依春（批号 130816）、绿原酸（批号 121125）、紫堇灵（批号 130604）、乙酰紫堇灵（批号 130604）、黄芩素（批号 130119）、汉黄芩素（批号 131121）对照品（成都菲普德生物科技有限公司，含有量 $\geq 98\%$ ）。甲醇、乙腈为色谱纯（美国 Fisher 公司）；甲酸为分析纯（广东光华科技股份有限公司）；乙

酸为分析纯（上海申博化工有限公司）；实验用水为超纯水。

1.2 溶液配制

1.2.1 对照品贮备液 精密称取腺苷、表告依春、绿原酸、咖啡酸、阿魏酸、紫堇灵、乙酰紫堇灵、芹菜素、黄芩素和汉黄芩素对照品各 10.0 mg，甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中，配成 1.00 mg/mL 贮备液，4 ℃ 下保存。使用前，50% 甲醇溶液稀释至所需质量浓度。

1.2.2 样品溶液 取蒲地蓝消炎片适量，除去糖衣，取内容物研磨粉碎，混匀。精密称取 0.5 g，置于具塞锥形瓶中，加入 50 mL 50% 甲醇溶液摇匀，超声 60 min，静置，冷却后取适量上清液，12 000 r/min 离心 10 min，稀释 10 倍，0.22 μm 微孔滤膜过滤，进样测定。

1.3 色谱条件 Eclipse Plus C₁₈ RRHD 色谱柱（1.8 μm ，2.1 mm $\times$ 50 mm）；流动相乙腈（A）-0.2% 乙酸水溶液（B），梯度洗脱（0 ~ 1 min，95% B；1 ~ 5 min，95% ~ 80% B；5 ~ 9 min，80% B；9 ~ 10 min，80% ~ 75% B；10 ~ 15 min，75% ~ 60% B；15 ~ 17 min，60% ~ 0% B）；体积流量 0.3 mL/min；进样量 1 μL 。

1.4 质谱条件 离子源为电喷雾电离源（ESI），正、负离子快速切换多重反应监测模式（MRM）监测；干燥气体 N₂，温度 300 ℃，体积流量 10 L/min；雾化气体 N₂，雾化器压力 2.8×10^5 Pa；鞘气气体 N₂，温度 360 ℃，体积流量 12 L/min；毛细管电压 4 000 V。

2 结果

2.1 色谱与质谱行为 在选定的条件下，根据峰保留时间及质谱信息进行定性与定量分析。结果见图 1。

2.2 线性关系及检出限 取各对照品贮备液，精密配制不同质量浓度的混合标准溶液，于优化条件下进样测定，重复 3 次，以峰面积（Y）对质量浓度（X）进行回归，得到回归方程、相关系数和线性范围，信噪比（S/N）等于 3 时对应成分的质量浓度作为其检出限，具体见表 1，表明各成分在相应范围内线性关系良好。

2.3 精密度试验 取同一批次样品 6 份，制备样品提取液，在优化条件下测得各成分的平均含有量分别为 0.560 6、0.031 7、0.677 7、0.601 2、0.148 0、0.239 4、0.031 8、0.008 2、9.844 8、1.591 2 mg/g，RSD 为 0.33% ~ 2.0%，表明仪器

表 1 回归方程、线性范围、相关系数及检出限

Tab. 1 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients and detection limits

成分	线性方程	线性范围/(mg·L ⁻¹)	相关系数	检出限/(mg·L ⁻¹)
腺苷	$Y=6.5\times10^6X-4.49\times10^3$	0.000 050 0~1.00	0.999 9	0.000 01
表告依春	$Y=7.3\times10^5X-6.86\times10^3$	0.010 0~5.00	0.999 6	0.003 00
咖啡酸	$Y=6.1\times10^4X+7.83\times10^3$	0.015 0~10.0	0.999 4	0.005 00
绿原酸	$Y=1.2\times10^4X+2.06\times10^3$	0.030 0~20.0	0.999 5	0.010 0
阿魏酸	$Y=3.7\times10^3X-59.6$	0.100~100	0.999 9	0.030 0
紫堇灵	$Y=5.9\times10^6X+6.60\times10^4$	0.000 300~10.0	0.998 9	0.000 100
乙酰紫堇灵	$Y=5.9\times10^6X+3.70\times10^4$	0.003 00~10.0	0.999 5	0.001 00
芹菜素	$Y=2.1\times10^4X-18.4$	0.006 00~20.0	0.999 6	0.002 00
黄芩素	$Y=9.2\times10^4X-1.03\times10^4$	0.200~20.0	0.999 8	0.050 0
汉黄芩素	$Y=3.2\times10^6X+1.80\times10^4$	0.000 500~5.00	0.999 4	0.000 200

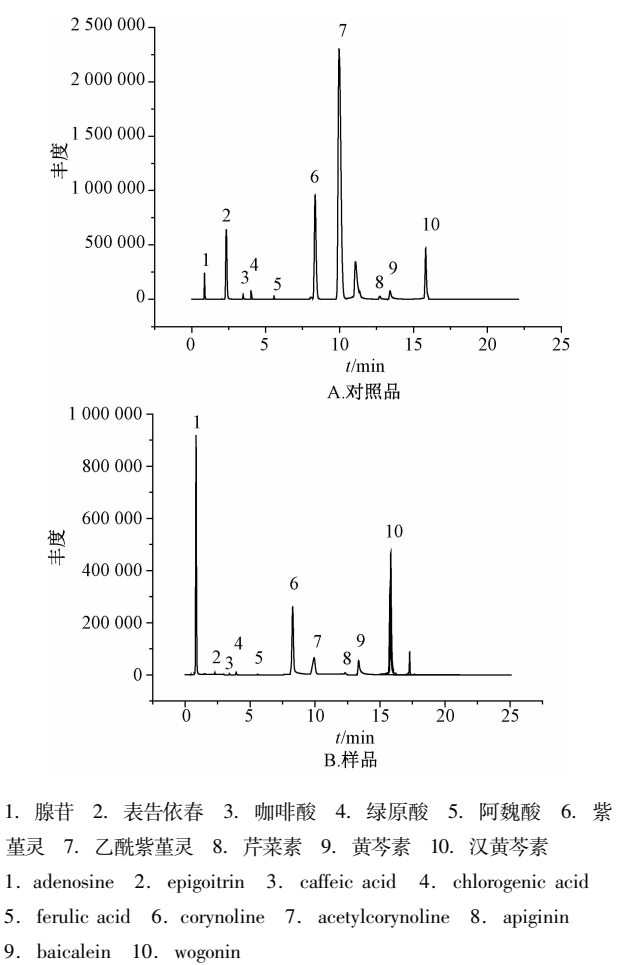


图 1 MRM 色谱图

Fig.1 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms

精密度良好。

2.4 稳定性试验 取同一批次样品，制备样品提取液，在 0、2、4、6、8、10 h 于优化条件下测得 RSD 为 0.7% ~ 2.3%，表明样品溶液在 10 h 内稳定。

2.5 回收率试验 精密称取各成分含有量已知的同批次样品 0.5 g，共 9 份，每组 3 份，按高、中、低 3 个梯度分别加入不同量的对照品，按“1.2.2”项下方法制备样品溶液并进行测定，结果见表 2。

表 2 加样回收率试验结果 (n=3)

Tab. 2 Results of recovery tests (n=3)

成分	称样量/ g	原有量/ (mg·L ⁻¹)	加入量/ (mg·L ⁻¹)	测得量/ (mg·L ⁻¹)	回收率/ %	RSD/ %
腺苷	0.500 3	0.560 6	0.400 0	0.926 1	91.4	2.8
	0.500 0	0.560 6	0.500 0	1.037 0	95.3	2.2
	0.500 4	0.560 6	0.600 0	1.183 2	103.8	2.7
表告依春	0.500 3	0.031 7	0.020 0	0.052 7	105.0	1.7
	0.500 0	0.031 7	0.030 0	0.063 2	105.0	0.88
	0.500 4	0.031 7	0.040 0	0.072 2	101.3	1.0
咖啡酸	0.500 3	0.677 7	0.500 0	1.193 8	103.2	2.8
	0.500 0	0.677 7	0.800 0	1.507 9	103.8	2.0
	0.500 4	0.677 7	1.000 0	1.669 5	99.2	0.23
绿原酸	0.500 3	0.601 2	0.500 0	1.076 6	95.1	3.0
	0.500 0	0.601 2	1.000 0	1.562 4	96.1	2.6
	0.500 4	0.601 2	1.500 0	2.107 7	100.4	1.5
阿魏酸	0.500 3	0.148 0	0.100 0	0.248 8	100.8	1.5
	0.500 0	0.148 0	0.200 0	0.351 2	101.6	1.1
	0.500 4	0.148 0	0.300 0	0.444 8	98.9	0.73
紫堇灵	0.500 3	0.239 4	0.100 0	0.340 5	101.1	1.3
	0.500 0	0.239 4	0.200 0	0.448 9	104.8	1.2
	0.500 4	0.239 4	0.300 0	0.547 7	102.8	0.75
乙酰紫堇灵	0.500 3	0.031 8	0.080 0	0.108 7	96.1	1.2
	0.500 0	0.031 8	0.100 0	0.129 3	97.5	0.70
	0.500 4	0.031 8	0.120 0	0.155 9	103.4	0.73
芹菜素	0.500 3	0.008 2	0.100 0	0.105 3	97.1	2.2
	0.500 0	0.008 2	0.500 0	0.509 9	100.3	1.1
	0.500 4	0.008 2	1.0000	1.034 1	102.6	2.0
黄芩素	0.500 3	9.846 3	2.000 0	11.876 9	101.6	1.2
	0.500 0	9.846 3	5.000 0	14.773 1	98.6	1.7
	0.500 4	9.846 3	10.000 0	19.462 2	96.2	2.6
汉黄芩素	0.500 3	1.594 0	0.500 0	2.098 6	101.5	2.6
	0.500 0	1.594 0	1.000 0	2.580 7	99.0	2.3
	0.500 4	1.594 0	2.000 0	3.517 4	96.3	2.9

2.6 含有量测定 精密称取 4 批样品，每批 3 份，按照优化的提取方法和条件计算各成分的含有量，结果见表 3。

3 讨论

3.1 色谱条件的优化 实验发现，在流动相中添加低质量浓度的有机酸有利于各成分的分离，并且峰形对称；在流动相中添加甲酸时，能大幅度提高咖啡酸和绿原酸的检测灵敏度，但降低了其他成分的灵敏度；添加乙酸时，两者灵敏度随乙酸用量增加而提高。

另外，还对常用流动相甲醇-0.2% 乙酸水溶液和乙腈-0.2% 乙酸水溶液体系进行了考察，发现使用甲醇体系时，绿原酸、咖啡酸的灵敏度明显提高，但其他成分的灵敏度有所降低。综合考虑各成分的分离效果、检测灵敏度、色谱峰峰形等因素，选择乙腈-0.2% 乙酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱。

3.2 质谱条件的优化 根据不同物质，先选择正负离子反应模式，得到二级质谱特征离子图，见图 2。再采用多重反应监测模式（MRM），分别对各对照品的母离子进行二次碎裂，对选定的子离子优化源内碎裂电压、碰撞能量和加速电压，优化结果见表 4。

3.3 样品提取方法 取蒲地蓝消炎片适量，除去糖衣，研碎，混匀，称取 0.5 g，置于不同具塞锥形瓶中，分别加入 50 mL 乙醇、50% 乙醇、乙腈、50% 乙腈、甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇、25% 甲醇、水，密闭摇匀，超声 60 min。静置，取上清液，12 000 r/min 离心 10 min，稀释 10 倍，0.22 μm 微孔滤膜过滤，进样测定。同时，还考察了 15、30、45、60、90、120 min 提取时间对提取效果的影响。最终，本实验选择 50% 甲醇，超声 60 min 提取样品。

4 结论

UHPLC-MS/MS 结合了 UHPLC 分离度高、分析速度快，以及 MS 定性能力强、灵敏度高的优点，对中药及其制剂等复杂体系和样品的分析具有明显优势，为中药成分分析、质量控制及药代动力学研究提供了高效可靠的方法，已得到广泛应用。

本实验建立了 UHPLC-MS/MS 法同时测定蒲地蓝消炎片中腺苷、表告依春、咖啡酸、绿原酸、阿魏酸、紫堇灵、乙酰紫堇灵、芹菜素、黄芩素、汉黄芩素 10 种有效成分含有量的分析方法，其简便、

快速、灵敏度高，可用于该药物的质量控制。

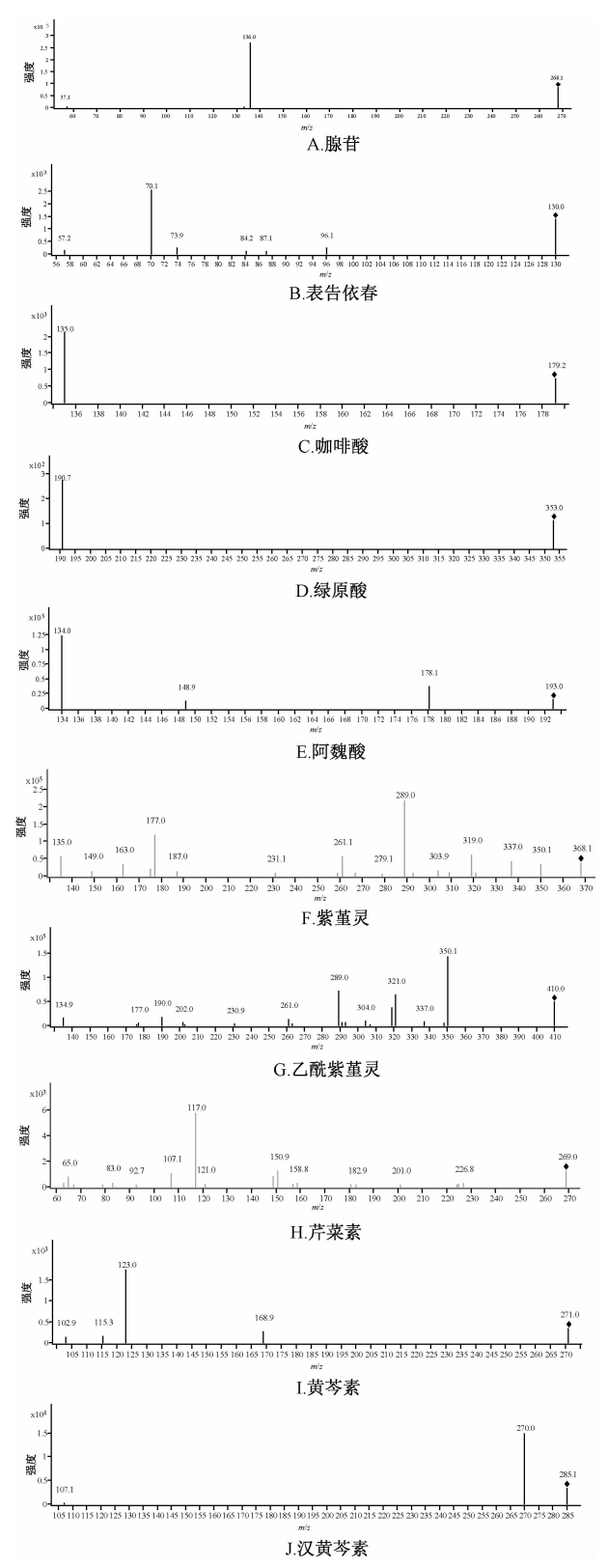


图 2 二级质谱图
Fig. 2 MS/MS spectra

表 3 含有量测定结果 (mg/g)

Tab. 3 Results of content determination (mg/g)

批号	腺苷	表告依春	咖啡酸	绿原酸	阿魏酸	紫堇灵	乙酰紫堇灵	芹菜素	黄芩素	汉黄芩素
BX1#	0.560 6	0.031 7	0.677 7	0.601 2	0.148 0	0.239 4	0.031 8	0.008 2	9.844 8	1.591 2
BY2#	0.563 0	0.038 5	0.582 3	0.504 1	0.202 8	0.254 9	0.056 5	0.008 0	6.100 8	0.689 0
XZ3#	0.270 5	0.022 3	0.069 3	0.122 4	0.119 1	0.174 1	0.143 6	0.006 8	2.912 4	0.971 6
XT4#	0.288 9	0.025 7	0.078 8	0.218 9	0.101 6	0.131 6	0.128 5	0.006 5	3.341 2	1.027 2

表 4 质谱参数

Tab. 4 MS parameters

成分	离子化模式	母离子	子离子	裂解电	碰撞能
		m/z	m/z	压/V	量/V
腺苷	ESI ⁺	268.1	136.0	110	10
表告依春	ESI ⁺	130.0	70.1	55	8
咖啡酸	ESI ⁻	179.2	135.0	90	8
绿原酸	ESI ⁻	353.0	190.7	110	3
阿魏酸	ESI ⁻	193.0	134.0	95	9
紫堇灵	ESI ⁺	368.1	289.0	135	24
乙酰紫堇灵	ESI ⁺	410.0	350.1	135	20
芹菜素	ESI ⁻	269.0	117.0	130	26
黄芩素	ESI ⁺	271.0	123.0	100	32
汉黄芩素	ESI ⁺	285.1	270.0	135	22

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.

[2] Kim J K, Kim Y S, Kim Y, *et al.* Comparative analysis of flavonoids and polar metabolites from hairy roots of *Scutellaria bicalensis* and *Scutellaria lateriflora*[J]. *World J Micorbiol Biotechnol*, 2014, 30(3): 887-892.

[3] Du L Y, Guo J M, Qian D W, *et al.* Simultaneous determination of seven active ingredients in rat plasma by UPLC-MS/MS and application in pharmacokinetic studies after oral administration of scutellaria-coptis herb couple [J]. *Med Chem Res*, 2015, 24(3): 1289-1297.

[4] Schütz K, Kammerer D R, Carle R, *et al.* Characterization of phenolic acids and flavonoids in dandelion (*Taraxacum officinale* Web. ex Wigg.) root and herb by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19(2): 179-186.

[5] 李喜凤, 郝 哲, 邱天宝, 等. 蒲公英中有机酸类成分的提取工艺研究[J]. *中成药*, 2011, 33(2): 262-265.

[6] Xiao Y, Yang C J, Zhong M L, *et al.* Chemical constituent from *Corydalis bungeana* Turcz. [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2013, 25(12): 1665-1668.

[7] Xiao P, Huang H Z, Chen J W, *et al.* *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of *Radix Isatidis* extract and bioaccessibility of six bioactive compounds after simulated gastro-intestinal digestion[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 157: 55-61.

[8] 徐小飞, 潘雪峰, 张慧晔, 等. 一测多评法同时测定板蓝根中 4 种核苷及 (R, S) -告依春[J]. *中成药*, 2014, 36(7): 1445-1449.

[9] 胡 冰. 高效液相色谱法测定蒲地蓝消炎片中腺苷的含量 [J]. *海峡药学*, 2014, 26(6): 71-73.

[10] 邵礼梅, 王云龙, 李延雪. 高效液相色谱法测定蒲地蓝消炎片中黄芩苷与黄芩素含量 [J]. *中国药业*, 2012, 21(4): 37-38.

[11] 汤道权, 张 超. HPLC 测定蒲地蓝胶囊中黄芩苷的含量 [J]. *中成药*, 2007, 29(10): 1551-1553.

[12] 刘德胜, 吕青志, 张晓帆, 等. HPLC 法对不同蒲地蓝消炎制剂中绿原酸和咖啡酸含量的测定 [J]. *滨州医学院学报*, 2012, 35(1): 51-54.

[13] 覃华亮, 韦 怡. HPLC 测定蒲地蓝消炎片中紫堇灵的含量 [J]. *中国现代中药*, 2015, 17(1): 58-60.

[14] 朱粉霞, 董自波, 舒 欣, 等. UPLC 同时测定蒲地蓝消炎口服液 8 种成分的含量 [J]. *中国药科大学学报*, 2013, 44 (1): 61-64.

[15] 董自波, 李 超, 邵建国. HPLC 同时测定蒲地蓝消炎口服液 7 个成分的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(9): 1747-1750.