

HPLC-MS/MS法测定桑菊感冒丸中3种成分的含量

刘世军^{1*},孙克明¹,刘宪勇¹,张敏¹,谷雨¹,王岩¹,毕文超¹,魏玮^{2#}(1.武警山东省总队医院药剂科,济南250014;2.解放军第81医院,南京210002)

中图分类号 R284 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)36-5163-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.36.33

摘要 目的:建立同时测定桑菊感冒丸中芦丁、连翘苷和桔梗皂苷D含量的方法。方法:采用高效液相色谱-串联质谱法。色谱柱为Waters Atlantis C₁₈,流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液(梯度洗脱),流速为0.2 mL/min,柱温为35℃,进样量为10 μL。离子源为电喷雾离子源,采用多反应监测扫描模式和正离子检测模式,干燥气和雾化气均为高纯氮气,干燥气温度为270℃,干燥气流量为25 L/min,鞘气流量为10 L/min,毛细管电压为4 500 V,喷嘴电压为2 000 V,扫描时间为0.1 s。结果:芦丁、连翘苷和桔梗皂苷D检测质量浓度线性范围分别为0.010 82~2.164 μg/mL($r=0.999\ 7$)、0.010 18~2.036 μg/mL($r=0.999\ 4$)、0.010 27~2.054 μg/mL($r=0.999\ 7$);定量限分别为1.250、0.260、2.720 ng/mL,检测限分别为0.380、0.078、0.820 ng/mL;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%;加样回收率分别为97.88%~99.88%(RSD=0.72%, $n=6$)、98.48%~103.13%(RSD=1.91%, $n=6$)、98.79%~101.41%(RSD=1.05%, $n=6$)。结论:该方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于桑菊感冒丸中芦丁、连翘苷和桔梗皂苷D含量的同时测定。

关键词 高效液相色谱-串联质谱法;桑菊感冒丸;芦丁;连翘苷;桔梗皂苷D;含量

Content Determination of 3 Components in Sangju Ganmao Pills by HPLC-MS/MS

LIU Shijun¹, SUN Keming¹, LIU Xianyong¹, ZHANG Min¹, GU Yu¹, WANG Yan¹, BI Wenchao¹, WEI Wei² (1. Dept. of Pharmacy, Armed Police Shandong Corps Hospital, Jinan 250014, China; 2. No. 81 Hospital of PLA, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the method for simultaneous determinations of rutin, forsythoside and platycodon D in Sangju ganmao pills. **METHODS:** HPLC-MS method was adopted. The determination was performed on Waters Atlantis C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid (gradient elution) at the flow rate of 0.2 mL/min. The column temperature was set 35℃, and sample size was 10 μL. The ionization mode was electrospray ion, and the reaction mode was multi-reaction monitoring. By positive ion detection mode, the drying gas and nebulizer gas were all high purity nitrogen. The drying gas tem-

与二氯甲烷不能有效分离,调整升温程序及载气流速分离效果均不佳;后选用HP-1色谱柱,结果乙醇与二氯甲烷分离度较好,且其他有机溶剂均分离适宜,因此选择HP-1为本试验的色谱柱。

3.2 氮气流速的选择

在方法优化过程中逐渐提升载气流速,结果显示,流速越高色谱峰越尖锐,灵敏度也越高,并且可缩短分析时间;但是流速过高,柱压增加,相邻溶剂峰分离度会变差,综合考虑,本试验选择氮气流速为4.0 mL/min。

3.3 进样口温度的选择

为了使样品更快更好地气化,综合考虑样品对热稳定的特性、溶剂二甲基亚砷的沸点(189℃)以及待测有机溶剂的沸点,最终本试验选择进样口温度为220℃。

3.4 稳定性试验

因供试品溶液浓度较高,溶剂二甲基亚砷熔点低于

20℃,在低温环境下易结冰,因此供试品溶液宜现配现用,本文亦不做稳定性试验。

综上所述,本方法灵敏度好,操作简单,适用于埃索美拉唑镁原料药中8种有机溶剂残留量的同时测定。

参考文献

[1] Koch TR, Petro A, Darrabie M, *et al.* Effects of esomeprazole magnesium on nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy[J]. *Dig Dis Sci.*, 2005, 50(1): 86-93.
[2] 陈华, 王晓蕙, 金伟华. 耐信[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(6): 478-479.
[3] 李淑丽, 韦林洪, 殷义平. 埃索美拉唑钠残留溶剂苯的测定[J]. 化学研究与应用, 2016, 28(3): 366-369.
[4] 冯光玲, 丁文娟, 冯爱国, 等. 毛细管气相色谱法测定阿莫曲坦原料药中8种有机溶剂残留量[J]. 中国药房, 2014, 25(5): 453-455.
[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 127-128.

(收稿日期: 2017-03-11 修回日期: 2017-07-14)

(编辑: 刘柳)

* 主任药师。研究方向: 临床药学及药物检定。电话: 0531-83197332。E-mail: Lsj60j@126.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 中药药理、药事管理。电话: 025-80864189。E-mail: ww864189@163.com

perature was 270 ℃.The drying gas flow rate was 25 L/min. The sheath gas flow rate was 10 L/min. The capillary voltage was 4 500 V. The nozzle voltage was 2 000 V and the scanning time was 0.1 s. RESULTS: The linear range of rutin, forsythin and platycodin D were 0.010 82-2.164 μg/mL ($r=0.999\ 7$), 0.010 18-2.036 μg/mL ($r=0.999\ 4$), 0.010 27-2.054 μg/mL ($r=0.999\ 7$), respectively. The limits of quantification were 1.250, 0.260, 2.720 ng/mL, and the limits of detection were 0.380, 0.078, 0.820 ng/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all no more than 3.0%. The recoveries were 97.88%-99.88% (RSD=0.72%, $n=6$), 98.48%-103.13% (RSD=1.91%, $n=6$), 98.79%-101.41% (RSD=1.05%, $n=6$). CONCLUSIONS: This method is simple, precise, stable and reproducible, and can be used for simultaneous determination of rutin, forsythin and platycodin D in Sangju ganmao pills.

KEYWORDS HPLC-MS/MS; Sangju ganmao pills; Rutin; Forsythin; Platycodin D; Content

桑菊感冒丸是源自清代名医吴瑭的“桑菊饮”经现代工艺加工而成的中成药制剂^[1],由桑叶、菊花、连翘、薄荷素油、苦杏仁、桔梗、甘草、芦根等八味药组成^[2-5],临床上多用于风热感冒、上呼吸道感染、流行性结膜炎、麻疹、流感等外感热病初起,邪气轻浅发热不重等症的治疗。该药疗效显著、价格实惠、副作用小,在临床应用非常广泛,因此建立一个全面的标准对其质量控制显得尤为重要。桑菊感冒丸的现行标准中,2015年版《中国药典》(一部)只对连翘苷的含量进行了控制^[6];另有文献报道采用高效液相色谱(HPLC)-紫外分光光度法(UV)^[7-10]、HPLC-蒸发光散射检测法(ELSD)^[11]等方法对类似制剂有效成分进行检测^[8-12]。但上述各方法存在灵敏度低、分离效果不佳、专属性差等缺点,用以检测成分复杂的中成药结果差异较大。近年来,HPLC-串联质谱法(HPLC-MS/MS)以其专属性强、灵敏度高等优势在中药有效成分含量测定中应用日益广泛^[13-15]。本试验采用HPLC-MS/MS法同时测定桑菊感冒丸中芦丁、连翘苷、桔梗皂苷D的含量,旨在为其全面质量评价提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪-6460型三重四极杆MS仪,包括电喷雾离子源(ESI)、B.05.00 Masshunter 色谱工作站(美国Agilent公司);BP 211D型电子分析天平(德国Satorius公司,精密度:0.01 mg);LC-600B型数控超声波仪(济宁鲁超超声设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

桑菊感冒丸(四川某药厂,批号:2016041、2016042、2016043,规格:15 g/100粒);芦丁对照品(批号:100080-201409,纯度:91.9%)、连翘苷对照品(批号:110821-201514,纯度:93.5%)、桔梗皂苷D对照品(批号:111851-201406,纯度:96.2%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Waters Atlantis C₁₈(150 mm×2.1 mm,5 μm);流动相:乙腈(A)-0.1%甲酸溶液(B),梯度洗脱(0~3 min,20% A;3~15 min,20%→60% A;

15~23 min,60% A;23~24 min,60%→20% A;24~30 min,20% A);流速:0.2 mL/min;柱温:35 ℃;进样量:10 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源:ESI;干燥气和雾化气:高纯氮气;干燥气温度:270 ℃;干燥气流量:25 L/min;鞘气流量:10 L/min;毛细管电压:4 500 V;喷嘴电压:2 000 V;扫描模式:多反应监测(MRM);检测模式:正离子;扫描时间:0.1 s。质谱参数见表1。

表1 质谱参数

Tab 1 Mass parameters

待测成分	t_R , min	监测离子对, m/z	碎裂电压, V	碰撞能量, eV
芦丁	17.39	611.5/302.4	97	46
连翘苷	20.61	534.0/341.7	105	32
桔梗皂苷D	23.42	1226.3/665.4	130	29

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密称取芦丁、连翘苷、桔梗皂苷D对照品各10 mg,分别置于10 mL量瓶中,加60%甲醇溶液溶解并定容,即得单一对照品贮备液。精密量取上述单一对照品贮备液各2 mL,置于同一100 mL量瓶中,加60%甲醇溶液稀释,摇匀,即得混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液1 mL,置于50 mL量瓶中,加60%甲醇定容,摇匀,即得。

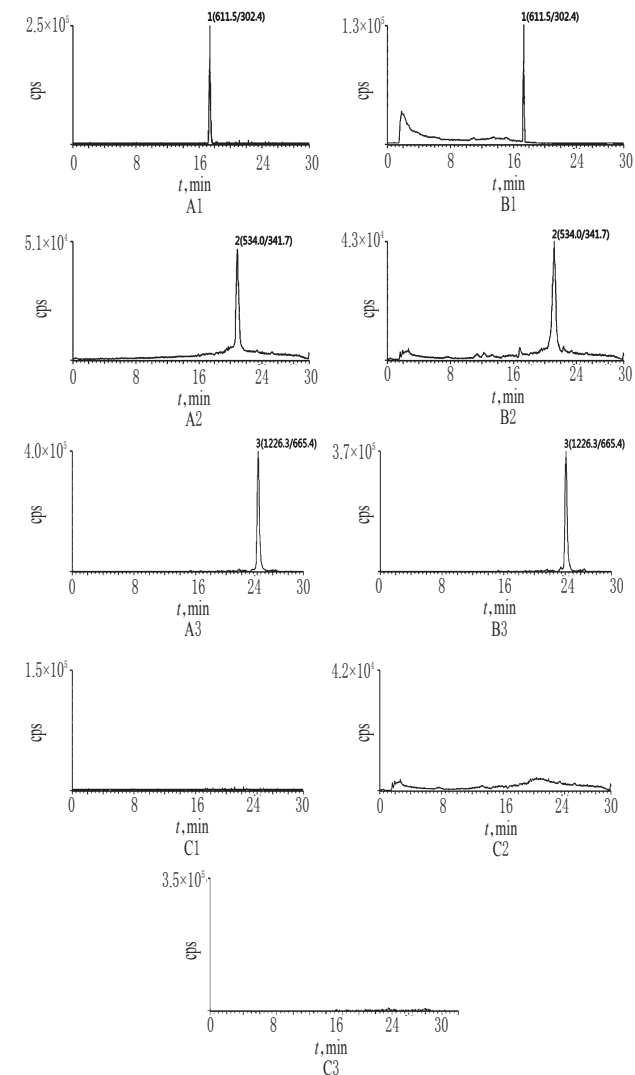
2.2.2 供试品溶液 取样品100粒,研细,精密称取细粉0.25 g,置于具塞锥形瓶中,精密加60%甲醇溶液50 mL,称定质量,超声(功率:100 W,频率:35 kHz)提取30 min,静置至室温,再次称定质量,用60%甲醇溶液补足减失的质量,摇匀,精密量取上清液10 mL,置于50 mL量瓶中,加60%甲醇溶液定容,滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按桑菊感冒丸处方和工艺制备分别缺芦丁、连翘苷和桔梗皂苷D的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下试验条件进样分析,记录提取离子流色谱图,详见图1。结果表明,3种待测成分可被同时检测,且阴性对照均未在各待测成分相应出峰位置检测到干扰成分,专属性良好。

2.4 线性关系考察



A1~A3.对照品;B1~B3.供试品;C1~C3.阴性对照;1.芦丁;2.连翘苷;3.桔梗皂苷D

A1-A3. mixed control; B1-B3. test samples; C1-C3. negative control; 1. rutin; 2. forsythin; 3. platycodin D

图1 提取离子流色谱图

Fig 1 Extraction ion chromatogram

分别精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液0.1、0.4、2、4、10、20 mL,分别置于200 mL量瓶中,加60%甲醇溶液定容,制成系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各10 μL,按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x , ng/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。回归方程与线性关系见表2。

表2 回归方程与线性关系

Tab 2 Regression equations and linear ranges

待测成分	回归方程	r	线性范围,ng/mL
芦丁	$y=520.1x-23.41$	0.999 7	0.010 82~2.164
连翘苷	$y=528.3x+15.69$	0.999 4	0.010 18~2.036
桔梗皂苷D	$y=435.2x-100.8$	0.999 7	0.010 27~2.054

2.5 定量限与检测限考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍

比稀释,并按“2.1”项下试验条件进样测定,当信噪比为10:1时,得定量限;当信噪比为3:1时,得检测限。结果,芦丁、连翘苷、桔梗皂苷D定量限分别为1.250、0.260、2.720 ng/mL,检测限分别为0.380、0.078、0.820 ng/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,芦丁、连翘苷、桔梗皂苷D峰面积的RSD分别为1.05%、0.57%、1.00% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:2016041)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12 h时按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果,芦丁、连翘苷、桔梗皂苷D峰面积的RSD分别为1.80%、2.50%、1.20% ($n=5$),表明供试品溶液室温放置12 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密称取样品(批号:2016041)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录色谱并计算含量。结果,芦丁、连翘苷、桔梗皂苷D含量平均值分别为260.5、184.8、169.3 μg/g, RSD分别为0.82%、1.10%、0.99%,表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收试验

取已知含量样品(批号:2016041)适量,共6份,分别加入一定质量的待测成分对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表3。

表3 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 3 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	取样量,g	样品含量,μg	加入量,μg	测得量,μg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
芦丁	0.126 4	32.92	30.15	63.03	99.88	98.86	0.72
	0.127 0	33.08	30.15	62.95	99.09		
	0.131 7	34.32	30.15	63.97	98.36		
	0.126 8	33.03	30.15	62.95	99.25		
	0.128 1	33.37	30.15	62.88	97.88		
	0.127 4	33.18	30.15	62.93	98.69		
	0.126 4	23.35	25.28	48.37	98.97		
	0.127 0	23.47	25.28	48.36	98.48		
连翘苷	0.131 7	24.35	25.28	49.30	98.71	100.25	1.91
	0.126 8	23.43	25.28	49.50	103.13		
	0.128 1	23.68	25.28	49.03	100.30		
	0.127 4	23.54	25.28	49.30	101.92		
	0.126 3	21.39	25.20	46.57	99.92		
	0.127 0	21.50	25.20	46.39	98.79		
	0.131 7	22.30	25.20	47.36	99.44		
	0.126 8	21.47	25.20	47.01	101.37		
桔梗皂苷D	0.128 1	21.69	25.20	47.24	101.41	100.22	1.05
	0.127 3	21.56	25.20	46.86	100.40		

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供

试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量,结果见表4。

表4 样品含量测定结果($n=3$, $\mu\text{g/g}$)

批号	芦丁	连翘苷	桔梗皂苷D
2016041	260.5	184.8	169.3
2016042	244.0	170.9	171.2
2016043	267.9	190.0	177.8

3 讨论

3.1 流动相的选择

在预试验中笔者考察了乙腈、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-10 mmol/L醋酸铵溶液为流动相时的色谱图形,结果表明,流动相为乙腈-0.1%甲酸溶液时可得较好的峰形和分离度。

3.2 提取方法的选择

笔者考察了乙醇、75%乙醇溶液、100%甲醇溶液、60%甲醇溶液、20%甲醇、水为提取溶剂时的提取效果。结果表明,60%甲醇溶液提取效果最好。同时,还比较了超声和回流提取方法的效果,结果2种方法效果相近,所以选择较为简单的超声提取法。笔者也对超声时间进行了考察,结果表明,超声30 min时效率最高,超过30 min后各成分含量趋于平稳。

3.3 质谱参数的选择

在对质谱条件进行优化时,分别考察了干燥器和鞘气的流量、毛细管电压、喷嘴电压等参数对含量测定的影响,最终确定文中试验条件为最优条件。本试验采用MRM模式对样品进行扫描,因此母离子和子离子的确定尤为重要。在确定母离子后,选择最佳的碎裂电压和碰撞能量,同时将信号响应最强最稳定的子离子作为定量离子,得到稳定提取离子流色谱图,为样品的定量提供数据支持。

综上所述,本方法操作简便,精密度、稳定性、重复性好,可用于桑菊感冒丸中芦丁、连翘苷和桔梗皂苷D含量的同时测定。

参考文献

[1] 吴瑭.温病条辨[M].北京:中国中医药出版社,2006:

90-97.

[2] 姚静,张超.桑菊感冒合剂提取工艺的研究[J].中国医药指南,2014,12(25):96-97.

[3] 杨周贇.桑菊饮化裁治疗春季感冒后咳嗽30例[J].北方药学,2013,10(7):47.

[4] 孙立艳.桑菊感冒片生产工艺改进[D].天津:天津大学,2013.

[5] 韦春燕.桑菊饮加减治疗妊娠期感冒26例[J].中国民族民间医药,2010,19(17):173.

[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:1463-1464.

[7] 袁才琼,邱海蕴,康红英.高效液相色谱法测定桑菊感冒片中绿原酸的含量[J].中国医院药学杂志,2010,30(4):348-349.

[8] 刘志武.高效液相色谱法同时测定桑菊感冒片中连翘苷和甘草苷含量[J].医药导报,2008,27(7):855-856.

[9] 张雷,何兵.HPLC测定桑菊感冒片中绿原酸的含量[J].现代医药卫生,2007,23(16):2379-2381.

[10] 李洁,吴政然.高效液相色谱法测定桑菊感冒片中连翘苷的含量[J].实用中医内科杂志,2006,20(3):250-251.

[11] 丁大勇,高菲,姚琳,等.HPLC-ELSD法测定桑菊感冒片中桔梗皂苷D的含量[J].中国中医药信息杂志,2012,19(3):54-55.

[12] 孙志,胡玉荣,左莉华,等.UPLC-MS/MS法同时测定复方血栓通胶囊中9种成分的含量[J].中国药房,2017,28(21):2959-2963.

[13] 李霄,吴茵,支旭然,等.UPLC-MS/MS法同时测定苦黄注射液中7种成分的含量[J].中国药房,2017,28(15):2108-2112.

[14] 赵振霞,王敏,王钰宁,等.UPLC-MS/MS法测定心可舒胶囊中5种皂苷类成分的含量[J].药物分析杂志,2016,36(3):494-499.

[15] 史贺,张巧月,杨浩天,等.HPLC-MS/MS法同时测定健胃消食片中8种化学成分的含量[J].药物分析杂志,2015,35(9):1606-1611.

(收稿日期:2017-03-02 修回日期:2017-06-05)

(编辑:张 静)