doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.24.019

超高效液相色谱串联质谱法同时测定肠疡消丸中绿原酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量*

张煜帆,余洁真,池浩波,陆湘桦,佘溢彬

(广东省潮州市药品检验所,广东 潮州 521000)

摘要:目的 建立同时测定肠疡消丸中绿原酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的超高效液相色谱串联质谱(UHPLC－MS/MS)法。**方法** 采用超声辅助提取,纯化得提取液。色谱柱为Thermos Hypersil GOLD柱(150 mm×3 mm,3 μm),流动相为0.3%甲酸溶液－乙腈(梯度洗脱),流速为0.2 mL/min,柱温为40 ℃,进样量为1 μL。质谱检测器(MS)选择电喷雾离子源(ESI),采用多反应监测模式进行正离子扫描分析。**结果** 绿原酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量浓度分别在1.208～60.400 μg/mL、0.025 7～1.285 0 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好(R^2=0.999 9,n=5),精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于3.5%;平均回收率分别为96.19%和83.94%,*RSD*分别为6.26%和6.85%(n=6)。**结论** 所建立的方法操作简单,能快速、准确、高效地测定肠疡消丸中绿原酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量,可为评价制剂质量提供参考。

关键词:肠疡消丸;超高效液相色谱串联质谱法;绿原酸;毛蕊异黄酮葡萄糖苷;含量测定

中图分类号:R927.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)24－0074－05

Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Calycosin－7－Glucoside in Changyangxiao Pills by UHPLC－MS/MS

ZHANG Yufan, YU Jiezhen, CHI Haobo, LU Xianghua, SHE Yibin

(*Chaozhou Institute for Drug Control, Chaozhou, Guangdong, China 521000*)

Abstract: Objective To establish an ultra－high－performance liquid chromatography－tandem mass spectrometry(UHPLC－MS/MS) method for simultaneous determination of chlorogenic acid and calycosin－7－glucoside in Changyangxiao Pills. **Methods** Ultrasonic－assisted extraction was used to obtain the extract after purification. The chromatographic column was Thermos Hypersil GOLD column (150 mm × 3 mm, 3 μm), the mobile phase was 0.3% formic acid solution－acetonitrile with gradient elution, the flow rate was 0.2 mL/min, the column temperature was 40 ℃, the injection volume was 1 μL. Mass spectrometry (MS) was adopted with electrospray ion source (ESI), and multiple reaction monitoring(MRM) mode was used for positive ion scanning analysis. **Results** The linear ranges of chlorogenic acid and calycosin－7－glucoside were 1.208－60.400 μg/mL and 0.025 7－1.285 0 μg/mL (R^2=0.999 9, n=5), respectively. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 3.5%. The average recoveries of chlorogenic acid and calycosin－7－glucoside were 96.19% and 83.94% with *RSD*s of 6.26% and 6.85% (n=6), respectively. **Conclusion** The established method is simple, rapid, accurate and efficient for simultaneous determination of chlorogenic acid and calycosin－7－glucoside, which can provide a reference for the quality evaluation of the preparation.

Key words: Changyangxiao Pills; UHPLC－MS/MS; chlorogenic acid; calycosin－7－glucoside; content determination

肠疡消丸为潮州市中医院的医院制剂,由黄芪、黄连、金银花等16味中药组方,主要功效为疏肝健脾、理气止痛、利湿止泻、收敛生肌,治疗慢性溃疡性结肠炎等的疗效显著。其原有质量标准起草时间早,尚未建立有效成分的含量测定方法,质量控制缺少重要依据,有必要加以改进。黄芪和金银花作为方剂中的君药和臣药,其活性成分毛蕊异黄酮葡萄糖苷和绿原酸具有一定抗炎作用[1－2]。毛蕊异黄酮葡萄糖苷属黄酮类化合物,有抗病毒、调节免疫系统等作用[3－4],可抑制溃疡性结肠炎模型小鼠大肠组织中炎性因子mRNA的表达及炎性因子水平的升高,对溃疡性结肠炎疗效明确[5－6]。绿原酸为金银花的主要活性成分,有抗菌、抗氧化、强化机体免疫功能等作用[7－8],能较好地缓解三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的结肠炎大鼠的肠黏膜损伤,保护肠道的屏障作用[9]。肠疡消丸的成分繁多,普通高效液相色谱(HPLC)法对复杂样品多组分的分离有局限性,极性相似的组分易相互干扰,不易分离,影响定性定量的准确性。超高效液相色谱串联质谱(UHPLC－MS/MS)法通过对母离子和子离子的质量筛选,能很好地对目标组分进行定性和定量分析,可获得更准确的结果[10－11]。本研究中建立了同时测定肠疡消丸中绿原酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量的UHPLC－MS/MS法,现报道如下。

*基金项目:广东省潮州市科技计划项目[2018GY41]。

第一作者:张煜帆,男,大学本科,主管药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)110577212@qq.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Triple Quad 3500 型三重四极杆超高效液相色谱－质谱联用仪(美国 AB SCIEX 公司);XS205DU 型十万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);Fotector－04HT 型固相萃取仪(睿科仪器有限公司);PS－80A 型超声波清洗器(东莞市洁康超声波设备有限公司)。

1.2 试药

肠疡消丸(潮州市中医院,批号分别为 20180612,20181209,20190325);绿原酸对照品(批号为 110753－201716,含量为 99.3%),毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品(批号为 111920－201907,含量为 96.8%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、甲酸均为分析纯,乙腈为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件:ThermosHypersilGOLD色谱柱(150mm×3mm,3 μm);固相萃取小柱[Waters Oasis HLB 3cc(60 mg)];流动相:0.3% 甲酸溶液(A)－乙腈(B),梯度洗脱(0～3 min 时 5% B,3～7 min 时 100% B,7～9 min 时 5% B);流速:0.2 mL/min;柱温:40 ℃;进样量:1 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI);多反应监测模式的参数见表 1;正离子扫描;离子源电压:4 500 V;雾化器温度:500 ℃;气帘气:40 psi;碰撞气:9 psi;喷雾气 30 psi;辅助加热气:20 psi。

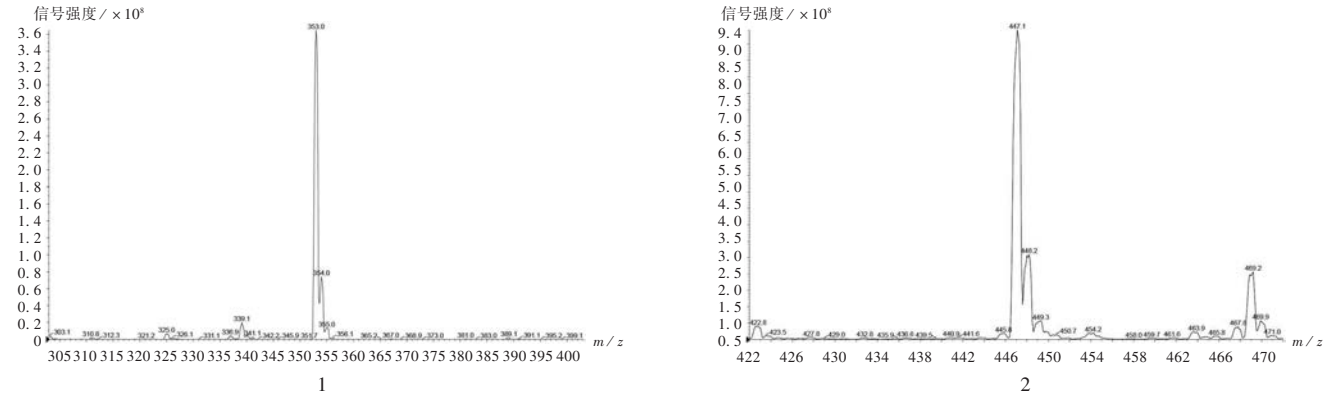
表 1 主要成分多反应监测参数

Tab. 1 MRM parameters of main components

成分	定量离子对		去簇电压	碰撞电压	保留时间
	母离子(m/z)	子离子(m/z)	(eV)	(eV)	(min)
绿原酸	355	163	27	81	5.76
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	447	284	44	70	5.84

2.2 溶液制备

供试品溶液:取样品粉末约 0.5 g,精密称定,置 100 mL 锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,超声(功率 480 W,频率 40 kHz)提取 30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,12 500 r/min 离心 15 min,



1,3. 绿原酸 2,4. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷

A. 一级质谱 B. 二级质谱

图 1 对照品多反应监测质谱图

1,3. chlorogenic acid 2,4. calycosin－7－glucoside

A. Primary mass spectrometry B. Secondary mass spectrometry

Fig. 1 MRM chromatograms of reference substance

取上清液，即得供试品溶液（纯化前）。精密量取20 mL，经自动固相萃取仪（主要参数见表2），用HLB固相萃取小柱纯化收集，浓缩并定容至5 mL；即得供试品溶液（纯化后）。

表2 固相萃取仪主要参数

Tab. 2 Main parameters of solid phase extractor

步骤	溶剂	排出	流速（mL/min）	体积（mL）	时间（min）
活化	甲醇	有机废液	5	5	1.4
活化	水	有机废液	5	10	2.6
上样		有机废液	2	30	16.8
淋洗	水	有机废液	2	10	5.6
气推		有机废液	2	5	3.1
洗脱	甲醇	收集液	1	5	5.4
气推		收集液	1	3	3.5

对照品溶液：取绿原酸对照品适量，精密称定，以甲醇溶解，制成质量浓度为120.8 μg/mL的对照品贮备液A。取毛蕊异黄酮葡萄糖苷对照品适量，精密称定，以甲醇溶解，制成质量浓度为2.570 μg/mL的对照品贮备液B。各精密量取适量置容量瓶中，用甲醇稀释，得绿原酸质量浓度为1.208，2.416，4.832，12.080，24.160，60.400 μg/mL，毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量浓度为0.025 7，0.051 4，0.102 8，0.257 0，0.513 9，1.285 0 μg/mL的混合对照品溶液（记为S1，S2，S3，S4，S5，S6）。

空白对照溶液：以甲醇作为空白对照溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验：取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液（纯化前、纯化后）、空白对照溶液各适量，按2.1项下试验条件进样，记录信号强度（见图2）。结果显示，供试品溶液与混合对照品溶液在相同时间处有相应峰，阴性对照无干扰，且纯化后的供试品溶液杂质显著减少。

线性关系考察：取2.2项下混合对照品溶液，按2.1项下试验条件进样测定，以绿原酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量浓度为横坐标、信号强度为纵坐标进行线性回归。结果见表3。

表3 各组分线性关系考察结果（$n=5$）

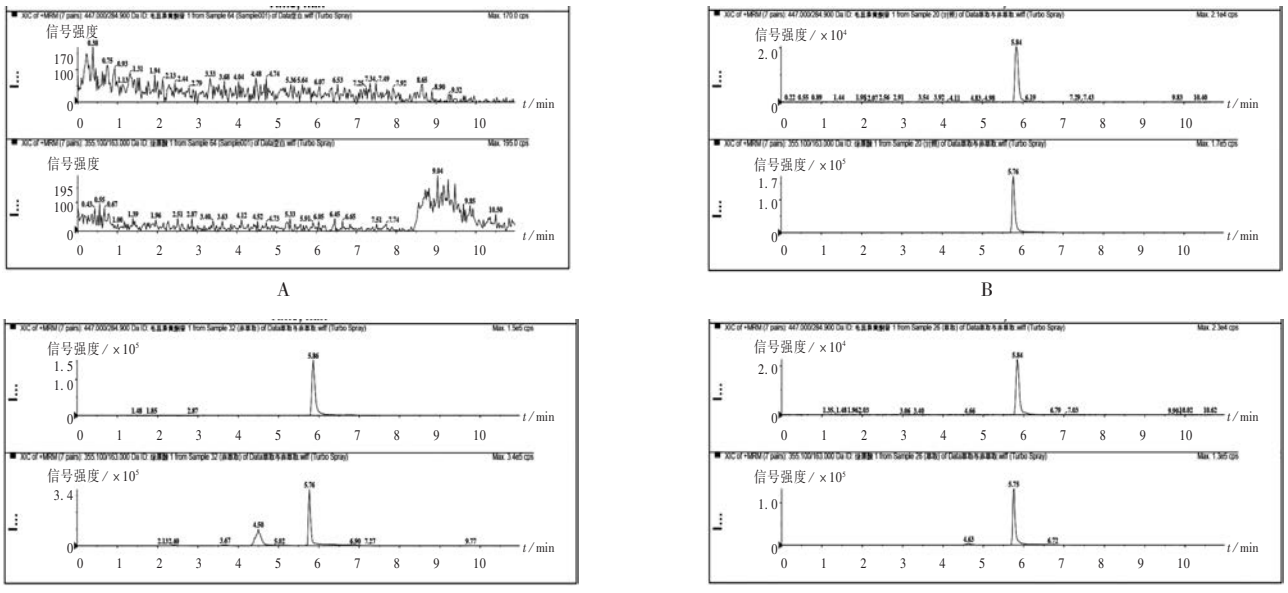
Tab. 3 Results of the linear relation test of each component（$n=5$）

成分	回归方程	R^2	线性范围（μg/mL）
绿原酸	$Y_1=54\,738X_1+32\,141$	0.999 9	1.208～60.400
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$Y_2=1.288\times10^6X_2-27\,630$	0.999 9	0.025 7～1.285 0

精密度试验：取2.2项下混合对照品溶液S4，按2.1项下试验条件连续进样测定6次，记录毛蕊异黄酮葡萄糖苷、绿原酸信号强度。结果的*RSD*分别为1.91%，2.79%（$n=6$），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取样品粉末（批号为20180612）适量，精密称定，按2.2项下方法制备供试品溶液，室温下放置0，2，4，6，8，12，24 h时按2.1项下试验条件进样测定，记录毛蕊异黄酮葡萄糖苷、绿原酸信号强度。结果的*RSD*分别小于1.80%和2.30%（$n=7$），表明室温下供试品溶液放置24 h内稳定。

重复性试验：取同一批（批号20180612）样品，按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份，按2.1项下试



A. 空白对照溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液（纯化前） D. 供试品溶液（纯化后）

图2 UHPLC－MS/MS图

A. Blank reference solution B. Mixed reference solution C. Test solution (before purification) D. Test solution (after purification)

Fig 2 UHPLC－MS/MS chromatograms

表 4 加样回收试验结果（$n=6$）

Tab. 4 Results of the recovery test（$n=6$）

取样量	样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$(%)		RSD(%)	
(g)	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.584	121.2	3.115	120.8	2.570	229.2	5.342	89.40	86.65				
0.614	127.4	3.275	120.8	2.570	238.1	5.667	91.64	93.07				
0.585	121.4	3.120	120.8	2.570	248.7	5.162	105.38	79.46	96.19	83.94	6.26	6.85
0.587	121.8	3.131	120.8	2.570	236.0	5.155	94.54	78.75				
0.609	126.4	3.248	120.8	2.570	248.7	5.286	101.24	79.30				
0.588	122.0	3.136	120.8	2.570	236.7	5.357	94.95	86.42				

注：A 为绿原酸，B 为毛蕊异黄酮葡萄糖苷。

Note: A is chlorogenic acid, and B is calycosin－7－glucoside.

验条件进样测定，记录信号强度并计算毛蕊异黄酮葡萄糖苷和绿原酸含量。结果的 *RSD* 分别为 3.48% 和 2.89%（$n=6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取同一批（20190325）样品约 6 g（1 次服用量），粉碎，平行称取药品粉末 6 份，精密称定，分别加入 2.2 项下对照品贮备液 A 和对照品贮备液 B 各 1 mL，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下试验条件进样测定，记录信号强度，并计算加样回收率。结果见表 4。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，每个样品平行进样 2 次，记录信号强度，并计算绿原酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量。结果见表 5。

表 5 样品中绿原酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量测定结果（μg/g，n=2）

Tab. 5 Results of content determination of chlorogenic acid and calycosin－7－glucoside in the sample（μg/g，$n=2$）

批号	绿原酸	毛蕊异黄酮葡萄糖苷
20180612	193.9	5.478
20181209	191.5	5.406
20190325	207.5	5.334

3 讨论

3.1 检测方法

毛蕊异黄酮葡萄糖苷和绿原酸均易溶于甲醇，故以甲醇作为溶剂有助于提高目标成分的提取率。上述成分的化学结构均存在共轭双键，对紫外光谱有一定吸收，预试验中曾选择 HPLC 法进行测定[12－14]。肠疡消丸的处方中含有十几味药材，用甲醇提取的供试液成分较复杂，通过 SPE 小柱萃取能有效减少供试品中的杂质。但由于紫外检测器选择性不高，各成分的色谱峰互相干扰严重，无法有效对目标成分进行分离。故本方法采用选择性高的 UHPLC－MS/MS 法，通过对母离子和子离子的筛选，建立离子对，同时对 2 个目标成分进行更准确的定量分析。

3.2 测试条件

有文献报道，测定毛蕊异黄酮葡萄糖苷含量时正负离子模式可能与不同品牌的仪器有关[15－16]。预试验中分别尝试正负 2 种模式对目标成分的测量条件进行优化，在负离子模式下，毛蕊异黄酮葡萄糖苷的响应较正离子模式弱。选择$[M+H]^+$的正离子模式时，毛蕊异黄酮葡萄糖苷和绿原酸的母离子和子离子均有较好的响应值，灵敏度较高，专属性强，杂质干扰小，对色谱柱的分离要求相对较低，故选择正离子扫描模式。

3.3 方法评价

本研究中成功建立了 UHPLC－MS/MS 法同时测定肠疡消丸中的绿原酸和毛蕊异黄酮葡萄糖苷的含量，其操作方法简便、快捷，分析时间短，分离效果好，灵敏度高，有利于控制和分析制剂质量。

参考文献

[1] 聂 娟，谢丽华，马港圆，等. 中药黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 湖南中医杂志，2018，34(7)：228－230.
[2] 王玲丽，丰华玲，杨 柯，等. 黄芪生物学及化学成分研究进展[J]. 基因组学与应用生物学，2017，36(6)：2581－2585.
[3] 张冬青，王海宝，王淑芳，等. 毛蕊异黄酮生物活性的研究进展[J]. 中国中药杂志，2015，40(22)：4339－4345.
[4] 于 玲，王知斌，王秋红，等. 黄芪中黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 中医药信息，2018，35(2)：104－108.
[5] 张祷晴，魏 玮，苏晓兰，等. 中药有效成分在溃疡性结肠炎相关信号转导通路中的作用研究进展[J]. 医学综述，2020，26(4)：743－747.
[6] 刘 超. 毛蕊异黄酮对溃疡性结肠炎小鼠的治疗作用及其机制研究[D]. 郑州：郑州大学，2017.
[7] 王庆华，杜婷婷，张智慧，等. 绿原酸的药理作用及机制研究进展[J]. 药学学报，2020，55(10)：2273－2280.
[8] 李 云，周明眉，邢丽娜，等. 绿原酸的肠道菌群代谢研究进展[J]. 中草药，2015，46(4)：610－614.
[9] 米书梅. 绿原酸缓解溃疡性结肠炎大鼠肠道屏障损伤[D]. 南昌：南昌大学，2014.
[10] 王伟丽. 高效液相色谱－质谱联用技术在药物分析中的应用[J]. 中国药业，2009，18(14)：83－84.