

# LC-MS/MS法同时测定不同产地半枝莲中野黄芩苷和芹菜素含量

焦燕, 王英锋\*, 刘锁兰

(首都师范大学分析测试中心, 北京 100048)

**摘要** 目的: 采用液相色谱-二级质谱联用法(LC-MS/MS)对不同产地半枝莲药材中的野黄芩苷和芹菜素进行含量测定。方法: 采用 Discovery C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.1%醋酸, 梯度洗脱, 流速 1 mL·min<sup>-1</sup>, 测定波长 335 nm, 采用电喷雾负模式电离(ESI), 选定的母离子和子离子分别为野黄芩苷 *m/z* 461/285, 芹菜素 *m/z* 269/117。结果: 野黄芩苷浓度在 2.6~72.7 mg·L<sup>-1</sup>, 芹菜素浓度在 2.3~63.8 mg·L<sup>-1</sup>范围内线性关系良好; 所测 12个产地半枝莲中, 野黄芩苷和芹菜素的含量范围分别为 0.03%~0.39%和 0.02%~0.30%; 平均回收率(*n*=5)分别为 99.1%和 97.3%, RSD分别为 1.4%和 0.7%。结论: 本方法简单准确, 适合于半枝莲中野黄芩苷和芹菜素的含量测定。

**关键词:** 半枝莲; 野黄芩苷; 芹菜素; 液相色谱-二级质谱联用法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1451-03

## LC-MS/MS simultaneous determination of scutellarin and apigenin of *Herba Scutellariae Barbatae* produced in different districts

JIAO Yan, WANG Ying-feng\*, LIU Suo-lan

(Analysis and Testing Center of Capital Normal University, Beijing 100048, China)

**Abstract Objective** To detect and quantify scutellarin and apigenin in *Herba Scutellariae Barbatae* of different districts by LC-MS/MS. **Methods** Determination of LC system consisted of a Discovery C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile and water (0.1% acetic acid) in linear gradient condition. The flow rate was 1 mL·min<sup>-1</sup> and the wavelength of detection was 335 nm. The mass spectrometer was operated under the negative ion mode with the ESI source. The transition of *m/z* 461/285 and *m/z* 269/117 was used to qualify scutellarin and apigenin, respectively. **Results** The linear ranges of calibration curve of scutellarin and apigenin were 2.6~72.7 mg·L<sup>-1</sup> and 2.3~63.8 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. By using the established LC-MS/MS methods, 12 samples of *Herba Scutellariae Barbatae* in different districts were analyzed. The results showed that the contents of scutellarin and apigenin were 0.03%~0.39% and 0.02%~0.30%, respectively. The average recoveries (*n*=5) of scutellarin and apigenin were 99.1% and 97.3%, and the RSDs were 1.4% and 0.7%, respectively. **Conclusion** The proposed method is simple and the result is accurate. It can be used for determination of scutellarin and apigenin in *Herba Scutellariae Barbatae*.

**Key words** *Herba Scutellariae Barbatae*; scutellarin; apigenin; LC-MS/MS

半枝莲为唇形科植物半枝莲 (*Scutellaria barbata* D. Don) 的干燥全草, 有清热解毒、化瘀利尿的功效。半枝莲的主要成分为黄酮类化合物, 如野黄芩苷 (scutellarin) 和芹菜素 (apigenin) 等, 此外还有生物碱、二萜类、有机酸类等成分。半枝莲的药理作用广泛, 主要表现在抗肿瘤、抑菌、抗病毒和免疫调节等方面, 野黄芩苷和芹菜素都是其中的抗肿瘤成

分<sup>[1]</sup>。目前对这 2 种物质的含量测定多采用高效液相色谱法, 因为这 2 种物质极性的差别, 尚未有用 1 个流动相体系同时测定的方法<sup>[2]</sup>。半枝莲中黄酮类成分种类甚多, 有些极性非常相近, 文献报道的前处理方法复杂, 无法避免一些物质峰重叠形成的含量增大效应。本实验避免了用 LC 法测定芹菜素含量时, 一个黄酮类化合物 ([M-H]<sup>-</sup> *m/z* 为 299) 与

\* 通讯作者 Tel: (010) 68902687-806; E-mail: feng\_yw@263.net

芹菜素极性非常相近而叠加在一起形成的增大效应。LC-MS/MS方法由于用质谱分离完善了色谱分离,大大地简化了样品的前处理过程,在提高了选择性的同时,缩短了分析时间<sup>[3]</sup>。为了更加准确地测定半枝莲中野黄芩苷和芹菜素的含量,本实验建立了LC-MS/MS对这2种抗肿瘤成分的含量测定方法,并对收集到的12个产地的药材进行了分析。

### 1 仪器、药品与试剂

仪器: Waters 2695液相色谱-Micromass Q-Tof micro<sup>TM</sup>质谱联用仪及MassLynx V4.0工作站; PURELAB<sup>TM</sup> Plus超纯水器; Sartorius电子天平; KQ-500DB型数控超声波清洗器。对照品:野黄芩苷购自中国药品生物制品检定所,纯度为97.12%,批号为110842-200403;芹菜素购自陕西西旭植物科技发展有限公司,纯度为98%。试剂:甲醇、醋酸为分析纯,乙腈为色谱纯,水为二次去离子水。12个产地的半枝莲药材,6个购自安徽省亳州市聚仁中药材种植有限责任公司,2个购自河北省安国市义全中药材有限公司,4个购自药店,由北京中医药大学刘春生老师鉴定为唇形科植物半枝莲(*Scutellaria barbata* D. Don)的干燥全草。

### 2 方法与结果

#### 2.1 试验条件

**2.1.1 色谱条件** Discovery C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%醋酸,线性梯度洗脱[0 min时,乙腈-0.1%醋酸(15:85);22 min时,乙腈-0.1%醋酸(46:54);30 min时,乙腈-0.1%醋酸(15:85)];流速:1 mL·min<sup>-1</sup>;测定波长:335 nm<sup>[2]</sup>;柱温:25℃;进样量:10 μL。

**2.1.2 质谱条件** 电喷雾负模式电离(ESI);选定的母离子和子离子分别为野黄芩苷 *m/z* 461/285,扫描范围 *m/z* 100~500;芹菜素 *m/z* 269/117,扫描范围 *m/z* 100~300;干燥气为N<sub>2</sub>,干燥气温度为300℃,干燥气流速为500 L·h<sup>-1</sup>;碰撞能量:5~15 min为30 V,16~21 min为40 V;毛细管电压:3.5 kV;锥孔电压:40 V。

**2.2 对照品储备液的配制** 精密称取对照品野黄芩苷5.35 mg,芹菜素4.65 mg,分别置10 mL量瓶中,加甲醇超声溶解,配制芹菜素溶液时加入2滴冰醋酸<sup>[4]</sup>,以甲醇稀释至刻度,即得对照品储备液。

**2.3 供试品溶液的制备**<sup>[5]</sup> 将半枝莲药材粉末过50目筛,精密称取约0.4 g置于100 mL具塞锥形瓶中,加入甲醇50 mL,超声(500 W, 40 kHz)1.5 h,冷却后过滤,于80℃水浴上挥干,用甲醇超声溶

解,转移至25 mL量瓶中,以甲醇稀释至刻度,摇匀,过0.45 μm滤膜,即得。

**2.4 线性关系考察** 精密量取野黄芩苷、芹菜素对照品储备液各0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL,一一对应分别置于10 mL量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品溶液系列。过0.45 μm滤膜,LC-MS/MS检测,野黄芩苷和芹菜素的保留时间分别为9.32 min和18.67 min(图1),野黄芩苷和芹菜素的子离子出峰时间分别为9.39 min和18.73 min(图2图3)。以进样浓度(mg·L<sup>-1</sup>)为横坐标,子离子峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,计算得野黄芩苷、芹菜素回归方程分别为:

$$Y = 3.567X + 54.96 \quad r = 0.9953$$

$$Y = 4.469X + 34.54 \quad r = 0.9951$$

结果表明,野黄芩苷进样浓度在2.6~72.7 mg·L<sup>-1</sup>,芹菜素进样浓度在2.3~63.8 mg·L<sup>-1</sup>范围内线性关系良好。

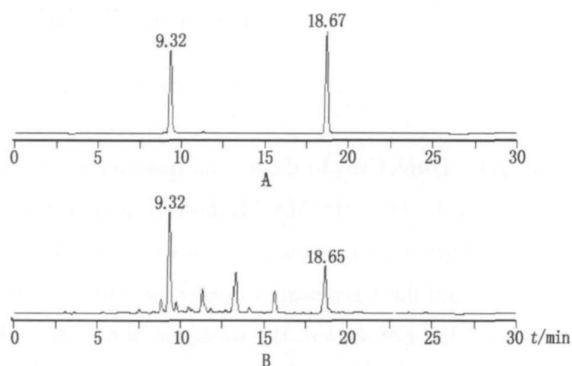


图1 对照品(A)和6号样品(B)的液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of reference substances (A) and sample No. 6 (B)

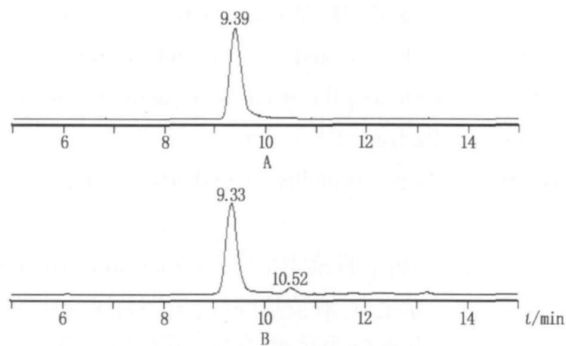


图2 对照品(A)和6号样品(B)提取的野黄芩苷子离子流图

Fig 2 Ion chromatograms of scutellarin in reference substance (A) and sample No. 6 (B)

**2.5 精密度试验** 取6号药材的供试品溶液,连续进样6次,测定野黄芩苷、芹菜素子离子峰面积,计算RSD( $n=6$ )分别为1.1%和2.4%。

**2.6 重复性试验** 取6号药材,按“2.3”项下方法

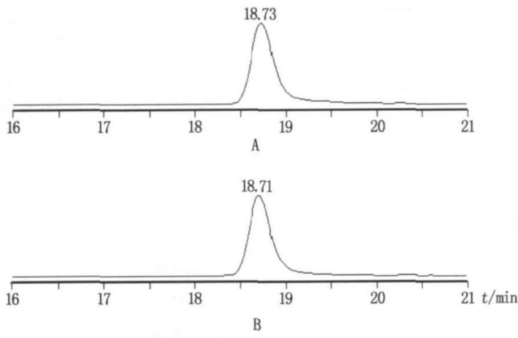


图 3 对照品(A)和 6号样品(B)提取的芹菜素离子流图

Fig 3 Ion chromatograms of apigenin in reference substance (A) and sample No. 6 (B)

制备供试品溶液, 平行 6 份, 计算野黄芩苷、芹菜素含量的平均值 ( $n=6$ ) 分别为 0.21% 和 0.03%, RSD 分别为 2.4% 和 3.1%。

**2.7 稳定性试验** 取 6 号药材, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 每隔 2 h 进行 LC-MS/MS 检测, 以野黄芩苷、芹菜素离子峰面积计算 RSD, 结果 ( $n=6$ ) 分别为 4.2% 和 3.3%, 说明供试品溶液在 10 h 内稳定。

**2.8 加样回收率试验** 取 6 号药材, 粉末过 50 目筛, 精密称取约 0.2 g 加入野黄芩苷浓度为  $0.535 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、芹菜素浓度为  $0.465 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合对照品溶液 0.6 mL, 平行 5 份, 按“2.3”项下方法平行操作, 进样测定, 计算加样回收率。结果野黄芩苷及芹菜素平均回收率 ( $n=5$ ) 分别为 99.1% 和 97.3%, RSD 分别为 1.4% 和 0.7%。

**2.9 样品含量测定** 取 12 个不同产地药材按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 每份溶液进样 3 次, 测定野黄芩苷、芹菜素离子峰面积, 根据回归方程计算各样品中野黄芩苷、芹菜素的含量, 结果见表 1。

表 1 不同产区半枝莲中野黄芩苷、芹菜素的含量 (%)

Tab 1 The contents of scutellarin and apigenin of *Herba Scutellariae Barbatae* in different districts

样品号 (sample No.)	产区 (producing area)	野黄芩苷 (scutellarin)	芹菜素 (apigenin)
1	河北 (Hebei)	0.34	0.07
2	安徽 (Anhui)	0.39	0.02
3	河南 (Henan)	0.23	0.04
4	广西 (Guangxi)	0.28	0.30
5	江西 (Jiangxi)	0.03	0.20
6	新疆 (Xinjiang)	0.21	0.03
7	湖南 (Hunan)	0.31	0.02
8	山西 (Shanxi)	0.21	0.11
9	山东 (Shandong)	0.25	0.10
10	湖北 (Hubei)	0.19	0.08
11	四川 (Sichuan)	0.29	0.18
12	陕西 (Shaanxi)	0.26	0.03

### 3 讨论

**3.1** 在质谱参数选择中, 曾以干燥气温度、干燥气流速、碰撞能量做了三因素二水平的正交实验, 综合考虑野黄芩苷、芹菜素离子峰面积, 最后确认了实验中的参数如下: 干燥气温度为  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 干燥气流速为  $500 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ; 碰撞能量: 5~15 min 为 30 V, 16~21 min 为 40 V。

**3.2** 在供试品溶液的制备和流动相选择中, 因为 LC-MS/MS 法提取子离子的优势, 参考文献选择了简单的提取方法<sup>[5]</sup>和流动相<sup>[2]</sup>, 梯度洗脱时间也很短, 并且实现了对野黄芩苷和芹菜素的同时检测, 大大简化了制备方法, 缩短了分析时间。更重要的是, 采用 LC-MS/MS 提取子离子的方法来进行野黄芩苷和芹菜素的含量测定, 避免了用 LC 法测定芹菜素含量时, 一个黄酮类化合物 ( $[\text{M}-\text{H}]^{-}$   $m/z$  为 299) 与芹菜素极性非常相近而叠加在一起形成的增大效应。

**3.3** 含量测定结果表明, 产地不同, 野黄芩苷和芹菜素的含量差异较大, 可能与各地的土质和日照不同有关, 药物研究和生产中固定药源很有必要。

### 参考文献

- Havsteen BH. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids *Pharmacol Ther*, 2002, 40: 607
- QIAO Chun-feng (乔春峰), HAN Quan-bin (韩全斌), SONG Jing-zheng (宋景政), et al Determination of four main flavonoids in *Herba Scutellariae Barbatae* by HPLC (RP-HPLC 测定半枝莲药材中 4 种主要黄酮类成分的含量). *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2006, 41(17): 1342
- ZHOU Xin (周欣), ZHANG Xue-qin (张雪琴), YUAN Mu (袁牧), et al Quantitative determination of ginkgolides by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry (液相色谱-电喷雾质谱定量测定银杏内酯的研究). *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30(24): 1915
- ZHU Hua (朱华), ZOU Deng-feng (邹登峰), HUANG Hai-bin (黄海滨), et al Determination of apigenin in *Marchantia convoluta* (拳卷地钱中芹菜素的测定). *Technol Dev Chem Ind* (化工技术与开发), 2005, 34(2): 30
- WANG Hui-bin (王慧彬), WANG Ying-feng (王英锋), LU Suo-lan (刘锁兰). Studies on HPLC fingerprint of *Ban zhi lian* (半枝莲)的 HPLC 指纹图谱研究). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, 27(6): 847

(本文于 2009 年 1 月 12 日修改回)