

高效液相色谱-质谱法同时测定清热解毒 口服液中的5种有效成分

许海棠¹, 黄丽涵¹, 徐远金^{1,2}

(1. 广西大学糖业工程技术研究中心, 广西 南宁 530004;

2. 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西 南宁 530004)

摘要 :建立了同时测定清热解毒口服液中的绿原酸、栀子苷、黄芩苷、连翘苷和靛玉红5种有效成分的高效液相色谱-电喷雾电离质谱(HPLC-ESI/MS)分析方法。采用Zorbax SB C₁₈色谱柱,以含0.2%甲酸的0.4 mmol/L醋酸钠(A相)、乙腈(B相)为流动相进行梯度洗脱,在ESI正离子模式下,采用选择离子监测方法进行测定,用峰面积进行定量。结果表明,绿原酸、栀子苷、黄芩苷、连翘苷和靛玉红的线性范围分别为0.050~50 mg/L, 0.020~20 mg/L, 0.005~30 mg/L, 0.010~15 mg/L和0.010~10 mg/L;检出限分别为0.010, 0.005, 0.001, 0.002和0.003 mg/L。5种成分的加样回收率为97.0%~101.7%,相对标准偏差小于2.2%。该法快捷、准确、重复性好,可用于清热解毒口服液中的5种有效成分含量的同时测定。

关键词 :高效液相色谱-质谱法;绿原酸;栀子苷;黄芩苷;连翘苷;靛玉红;清热解毒口服液

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2008)05-0599-04 栏目类别:研究论文

Simultaneous determination of five effective components in Qingrejiedu oral liquid using high performance liquid chromatography-mass spectrometry

XU Haitang¹, HUANG Lihan¹, XU Yuanjin^{1,2}

(1. Center for Sugar Technology Research, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Nanning 530004, China)

Abstract : A high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI/MS) method for the simultaneous determination of five effective components in Qingrejiedu oral liquid was developed. The HPLC separation was performed on a Zorbax SB C₁₈ column (250 mm × 3.0 mm, 5 μm) using 0.4 mmol/L sodium acetate solution containing 0.2% formic acid (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase with gradient elution (0 min, 10% B; 0→6 min, 10% B→30% B; 6→15 min, 30% B→39% B; 15→16 min, 39% B→80% B) at a flow rate of 0.35 mL/min. The analytes were detected by ESI(+)-MS under selected ion monitoring mode (0→9.7 min, *m/z* 377; 9.7→12 min, *m/z* 411; 12→14.7 min, *m/z* 447; 14.7→18 min, *m/z* 557; 18→25 min, *m/z* 263). The linear ranges were 0.050–50 mg/L, 0.020–20 mg/L, 0.005–30 mg/L, 0.010–15 mg/L and 0.010–10 mg/L with detection limits of 0.010, 0.005, 0.001, 0.002 and 0.003 mg/L for chlorogenic acid, geniposide, baicalin, forsythin and indirubin, respectively. The average recoveries ranged from 97.0% to 101.7%. The relative standard deviations were less than 2.2%. This method is rapid, accurate, and suitable for the quality control of the five effective components in Qingrejiedu oral liquid.

Key words : high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS); chlorogenic acid; geniposide; baicalin; forsythin; indirubin; Qingrejiedu oral liquid

收稿日期 2008-01-16

第一作者:许海棠, 硕士研究生.

通讯联系人:徐远金, 博士, 教授. Tel: (0771) 3272232, E-mail: yjxu@gxu.edu.cn.

基金项目:广西壮族自治区科学研究基金项目(桂科能0718009-2E).

清热解毒口服液收载于中华人民共和国药典(2005年版)中,由石膏、金银花、玄参、地黄、连翘、栀子、甜地丁、黄芩、龙胆、板蓝根、知母和麦冬等12味中药组成,有清热解毒之功效。临床上主要用于热毒壅盛所致发热面赤、烦躁口渴、咽喉肿痛等症;是治疗流行性感(流感)、上呼吸道感染及各种发热疾病的有效药物。目前,已有文献报道采用高效液相色谱(HPLC)法测定清热解毒口服液中的绿原酸^[1]、栀子苷^[2]、黄芩苷^[3]、连翘苷^[4]等有效成分,杨江平等^[5]同时测定了其中的黄芩苷、连翘苷和靛玉红3种有效成分,为快速、全面地控制清热解毒口服液中的有效成分做出了探索。但同时测定清热解毒口服液中的绿原酸、栀子苷、黄芩苷、连翘苷及靛玉红的方法尚未见报道。

随着中药质量标准要求的提高和质量控制技术的发展,所要求测定的成分也逐渐增多,尤其是复方中药,往往要求测定多个成分。HPLC已被广泛用于多组分含量的同时测定^[6-8]。近年来,电喷雾离子化质谱(ESI/MS)与高效液相色谱的联用技术也已广泛应用于中医药研究领域^[9-11]。HPLC-MS很好地解决了复杂样品分析中仅根据色谱的保留时间定性结果可靠性不高的问题^[12]。本文利用质谱检测器具有的定性准确、灵敏度高等优势,建立了同时测定清热解毒口服液中绿原酸、栀子苷、黄芩苷、连翘苷及靛玉红等5种有效成分含量的HPLC-MS方法,并成功地用于实际药品的分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1100 LC/MSD Trap SL 高效液相色谱-质谱联用仪(Agilent公司);Water Pro Plus 超纯水仪(Labconco公司);ME 215S 电子分析天平(Sartorius公司)。

乙腈为色谱纯(Fisher公司),甲酸及其他试剂均为分析纯,所有用水均为超纯水;对照品绿原酸、栀子苷、黄芩苷、连翘苷和靛玉红均购自中国药品生物制品检定所,清热解毒口服液样品为河南太龙药业股份有限公司生产,批号分别为07032013,07032312,07053014,规格为每盒10支,10 mL/支。

1.2 样品前处理

精密吸取样品0.50 mL,用甲醇稀释并定容至100 mL。用时摇匀并经0.45 μm 微孔滤膜滤过。

1.3 对照品溶液的制备

准确称取绿原酸、栀子苷、黄芩苷、连翘苷和靛玉红对照品适量,用甲醇溶解栀子苷、黄芩苷、连翘苷,用含5%甲酸的甲醇溶解绿原酸,分别配成质量

浓度为1.00 g/L的对照品储备液;用含10%氯仿的甲醇溶解靛玉红,配成质量浓度为0.050 g/L的对照品储备液。不同质量浓度的对照品溶液用对应的溶剂稀释储备液得到。

1.4 色谱条件

采用Zorbax SB C₁₈柱(250 mm × 3.0 mm, 5 μm,美国Agilent公司),以含0.2%甲酸的0.4 mmol/L 醋酸钠(A相)和乙腈(B相)为流动相进行线性梯度洗脱。洗脱程序:0 min,10% B → 6 min,10% B → 30% B,6 → 15 min,30% B → 39% B;15 → 16 min,39% B → 80% B。流速为0.35 mL/min。柱温25 °C,进样量5 μL。

1.5 质谱条件

电离源:ESI,正离子电离模式;毛细管电喷雾电压4.0 kV;雾化气(N₂)压力34.8 kPa;干燥气(N₂)流速10 L/min;离子源温度325 °C。采用选择离子监测,监测程序:0 → 9.7 min, *m/z* 377;9.7 → 12 min, *m/z* 411;12 → 14.7 min, *m/z* 447;14.7 → 18 min, *m/z* 557;18 → 25 min, *m/z* 263。

2 结果与讨论

2.1 HPLC-MS 条件的优化

对比了以甲醇-水及乙腈-水为流动相的分离效果,结果表明用乙腈-水体系作流动相时的灵敏度明显高于甲醇-水体系。在乙腈-水流动相中加入不同含量(体积分数分别为0.1%、0.2%、0.3%、0.5%)的甲酸,当流动相中甲酸含量为零时,绿原酸拖尾严重;随着甲酸含量的增加,拖尾现象得到改善;当甲酸含量大于0.2%后峰形无明显变化。故本文选择在流动相中添加0.2%的甲酸。

试验发现当流动相中不加入Na⁺时,栀子苷的质谱特征离子表现为*m/z* 411的[M + Na]⁺峰;连翘苷表现为*m/z* 557的[M + Na]⁺峰。本文对比了流动相中加入不同浓度(分别为0.1、0.2、0.4、0.6、1.0 mmol/L)的Na⁺对灵敏度的影响。结果表明在流动相中添加的醋酸钠浓度从0.2增加至1.0 mmol/L时,对连翘苷和栀子苷的检测灵敏度提高了约10倍,对绿原酸的检测灵敏度提高了约3倍,对黄芩苷和靛玉红的影响不大。考察在流动相中添加不同浓度的NH₄⁺的影响,各成分的质谱特征离子[M + NH₄]⁺峰表现均不明显,灵敏度不高。因此,选择在流动相中添加0.4 mmol/L的醋酸钠。

在选定的色谱-质谱条件下,5种成分可获得良好的分离,对照品及样品的色谱图见图1。根据峰的保留时间及质谱信息进行定性,其质谱图见图2。从图2中可以看出绿原酸主要为*m/z* 377的[M +

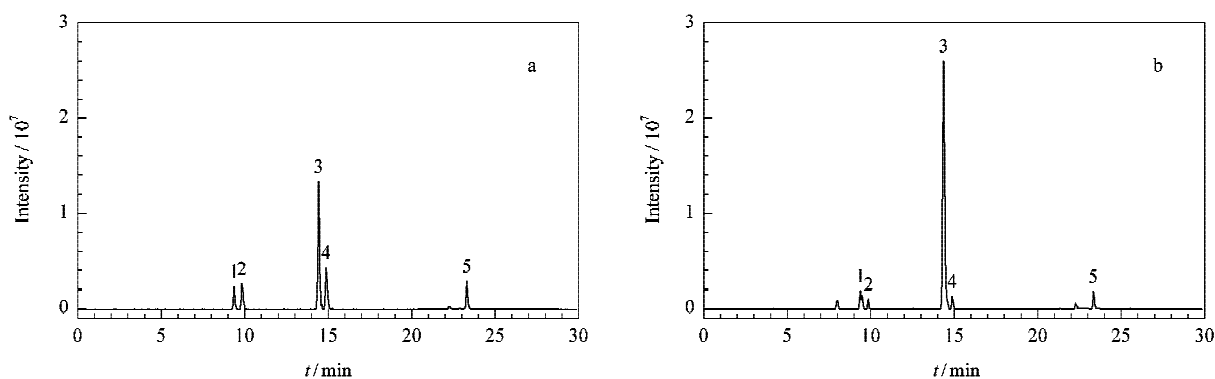


图 1 (a) 5 种对照品及 (b) 样品的 SIM 色谱图

Fig. 1 Selected ion monitoring chromatograms of (a) 5 standards and (b) a sample

1. chlorogenic acid ; 2. geniposide ; 3. baicalin ; 4. forsythin ; 5. indirubin.

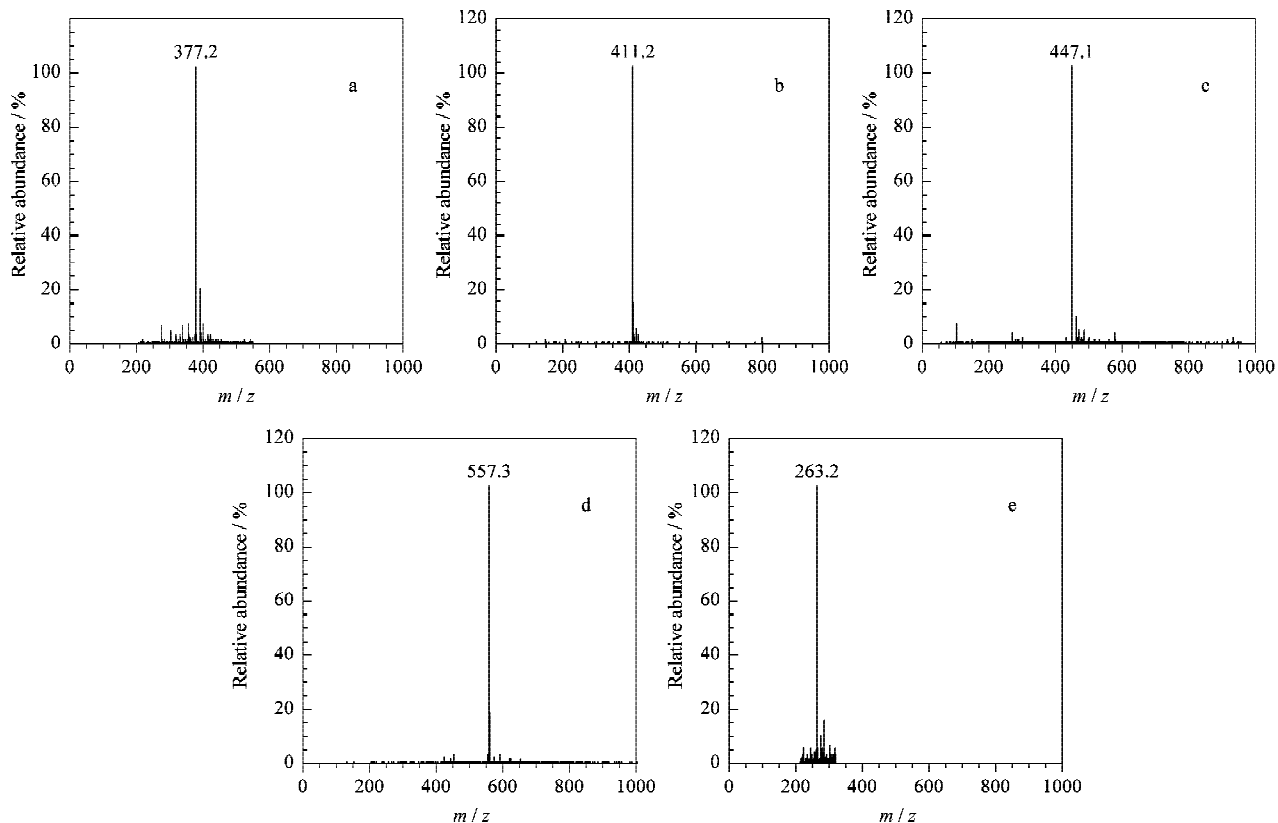


图 2 5 种对照品的一级质谱图

Fig. 2 Mass spectra of five standards

a. chlorogenic acid ; b. geniposide ; c. baicalin ; d. forsythin ; e. indirubin.

Na^+ 峰, 栀子苷主要为 m/z 为 411 的 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰, 黄芩苷主要为 m/z 447 的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰; 连翘苷主要为 m/z 557 的 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰; 靛玉红主要为 m/z 263 的 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 峰。因此, 分别选择 m/z 为 377, 411, 447, 557 和 263 的离子进行分段监测。

2.2 线性关系与检出限

分别吸取对照品储备液适量, 配制质量浓度为 0.010, 0.500, 1.00, 5.00, 10.0, 20.0, 30.0, 50.0 mg/L 的绿原酸溶液系列; 0.005, 0.020, 0.100, 0.500, 2.00, 10.0, 20.0 mg/L 的栀子苷溶液系列; 0.001, 0.005, 0.020, 0.200, 2.00, 10.0, 20.0, 30.0

mg/L 的黄芩苷溶液系列; 0.002, 0.010, 0.100, 1.00, 5.00, 10.0, 15.0 mg/L 的连翘苷溶液系列和 0.003, 0.010, 0.100, 0.500, 2.00, 5.00, 10.0 mg/L 的靛玉红溶液系列。取上述溶液各 $5 \mu\text{L}$ 进样分析, 记录各色谱峰的峰面积。以对照品的峰面积 Y (3 次平均值) 对其质量浓度 X (mg/L) 进行线性回归, 得到回归方程和相关系数 (见表 1)。以信噪比 (S/N) 为 3 计, 得到上述 5 种组分的检出限分别为 0.010, 0.005, 0.001, 0.002, 0.003 mg/L。

2.3 精密度

取同一批样品 6 份, 按所述方法制备样品溶液

并重复测定,测得绿原酸、栀子苷、黄芩苷、连翘苷和靛玉红质量浓度的相对标准偏差(RSD)分别为 2.7%、2.1%、1.8%、1.2% 和 2.3%。表明该方法的重复性良好。

表 1 5 种对照品的线性范围、线性方程及相关系数

Table 1 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients of the five compounds

Compound	Linear range/ (mg/L)	Regression equation [*]	r
Chlorogenic acid	0.050 - 50.0	$Y = 5.45 \times 10^4 X + 3.28 \times 10^4$	0.9973
Geniposide	0.020 - 20.0	$Y = 6.69 \times 10^5 X - 1.06 \times 10^4$	0.9997
Baicalin	0.005 - 30.0	$Y = 7.23 \times 10^6 X + 2.18 \times 10^5$	0.9995
Forsythin	0.010 - 15.0	$Y = 1.18 \times 10^6 X + 2.11 \times 10^5$	0.9991
Indirubin	0.010 - 10.0	$Y = 2.55 \times 10^6 X + 6.75 \times 10^5$	0.9985

* Y: peak area; X: mass concentration, mg/L.

2.4 回收率

采用加标法进行回收率的考察。精密吸取已知含量的清热解毒口服液 0.50 mL 共 9 份,3 份为一组,按低、中、高 3 个加标水平分别加入对照品溶液,定容至 100 mL 后按所建立的方法进行处理和测定,分别计算 5 种成分的平均回收率,结果见表 2。

表 2 5 种组分的加标回收率(n=3)

Table 2 Recoveries of the five compounds (n=3)

Compound	Background/ mg	Added/ mg	Found/ mg	Recovery/ %	RSD/ %
Chlorogenic acid	1.38	1.00	2.35	97.0	0.80
		1.50	2.86	98.7	0.61
		2.00	3.34	98.0	0.89
Geniposide	0.478	0.400	0.874	99.0	1.92
		0.500	0.974	99.2	1.47
		0.600	1.08	100.3	1.27
Baicalin	1.20	1.00	2.19	99.0	0.92
		1.20	2.42	101.7	0.58
		1.50	2.70	100.0	0.66
Forsythin	0.176	0.150	0.324	98.7	2.18
		0.180	0.356	100.0	1.68
		0.200	0.374	99.0	1.65
Indirubin	0.101	0.080	0.180	98.8	2.06
		0.100	0.201	100.0	1.98
		0.120	0.220	99.2	1.43

2.5 实际样品分析

分别精密吸取不同批号样品,按所建立的方法进行处理和测定。每批样品测定 6 次,计算 3 批清热解毒口服液样品中的 5 种有效成分的质量浓度,结果见表 3。

表 3 样品的测定结果(n=6)

Table 3 Determination results of samples (n=6)

Sample code	Chlorogenic acid		Geniposide		Baicalin		Forsythin		Indirubin	
	content/ (mg/mL)	RSD/%	content/ (mg/mL)	RSD/%	content/ (mg/mL)	RSD/%	content/ (mg/mL)	RSD/%	content/ (mg/mL)	RSD/%
1	2.76	2.5	0.956	2.1	2.40	1.7	0.352	2.3	0.202	2.8
2	3.02	3.4	0.924	1.9	2.68	2.2	0.382	1.9	0.268	2.5
3	2.36	3.1	1.06	2.6	2.36	2.3	0.338	3.1	0.198	3.3

3 结论

本文采用高效液相色谱-质谱法同时测定了清热解毒口服液中的 5 种有效成分。该方法简便、快速、灵敏度高、重现性好,可用于样品中的绿原酸、栀子苷、黄芩苷、连翘苷和靛玉红的同时测定。

参考文献:

[1] Ao S H, Gu P F. Herald of Medicine (敖书华, 顾鹏飞. 医药导报), 2007, 26(5): 553
 [2] Xie Z, Song J, Tan Z J. Chinese Journal of Drug Application and Monitoring (谢峥, 宋军, 谭忠军. 中国药物应用与监测), 2006, 3(2): 25
 [3] Wang S Y, Huang Y. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research (王世宇, 黄毅. 李时珍国医国药), 2007, 18(7): 1682
 [4] Huang R F, Tang C H. Journal of Jiangxi University of Tra-

ditional Chinese Medicine (黄荣发, 唐春华. 江西中医学院学报), 2006, 18(6): 11

[5] Yang J F, Yin H M. Herald of Medicine (杨江丰, 殷红妹. 医药导报), 2005, 24(9): 819
 [6] Li J Z, Ma L, Cui T. Chinese Journal of Chromatography (李建中, 马良, 崔同. 色谱), 2005, 23(1): 112
 [7] Liu L, Qin H Y, Zheng J B. Chinese Journal of Chromatography (刘琳, 秦海燕, 郑建斌. 色谱), 2006, 24(3): 247
 [8] Kong A Y, Li X Q, Ni Z Y, et al. Chinese Journal of Chromatography (孔爱英, 李小青, 倪震宇, 等. 色谱), 2004, 22(1): 89
 [9] Kim Y H, Jeong D W, Paek I B, et al. J Chromatogr B, 2006, 844(2): 261
 [10] Ran X R, Liang Q L, Luo G A, et al. J Chromatogr B, 2006, 842(1): 22
 [11] Zhu X L, Chen B, Ma M, et al. J Pharm Biomed Anal, 2004, 34(3): 695
 [12] Xu Y J, Xu G P. Chinese Journal of Chromatography (徐远金, 许桂苹. 色谱), 2005, 23(6): 633