

LC-MS/MS法同时测定连翘叶中4种成分的含量

高淑丽^{1*}, 刘丽华¹, 张阳¹, 刘敏彦²(1.石家庄市第四医院, 石家庄 050017; 2.石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-1026-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.24

摘要 目的: 建立同时测定连翘叶中异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素4种成分含量的方法。方法: 采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)联用技术。色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(含1 mmol/L 乙酸铵和0.15% 乙酸)梯度洗脱, 离子源为电喷雾电离源, 采用负离子多反应监测模式。结果: 异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素的质量浓度分别在0.23~4.51、0.17~3.34、0.29~5.82、0.10~2.02 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好线性关系(r 分别为0.999 8、0.999 1、0.999 2、0.999 6); 平均加样回收率分别为94.7%、96.8%、107.2%、95.1%, RSD分别为1.5%、2.4%、4.6%、2.6% (n 均为6)。结论: 该方法专属性好、精密度高, 可用于连翘叶中异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素的同时检测。

关键词 连翘叶; 液相色谱-串联质谱联用技术; 负离子多反应监测模式; 异槲皮苷; 金丝桃苷; 绿原酸; 槲皮素; 含量测定

Simultaneous Determination of 4 Ingredients in the Leaves of *Forsythia suspense* by LC-MS/MS

GAO Shu-li¹, LIU Li-hua¹, ZHANG Yang¹, LIU Min-yan²(1. The Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050017, China; 2. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop the method for the simultaneous determination of isoquercitrin, hyperin, chlorogenic acid and quercetin in the leaves of *Forsythia suspense*. METHODS: LC-MS/MS was adopted. The separation was performed on Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (containing 1 mmol/L ammonium acetate and 0.15% acetic acid, gradient elution). Electrospray ionization source (ESI) was applied and operated in negative ionization multiple reaction monitoring model. RESULTS: The linear ranges of isoquercitrin, hyperin, chlorogenic acid and quercetin were 0.23-4.51 μg/ml($r=0.999$ 8), 0.17-3.34 μg/ml($r=0.999$ 1), 0.29-5.82 μg/ml($r=0.999$ 2) and 0.10-2.02 μg/ml($r=0.999$ 6); the average recoveries were 94.7%, 96.8%, 107.2% and 95.1%, and RSDs were 1.5%, 2.4%, 4.6% and 2.6%, respectively($n=6$). CONCLUSION: The method is specific and precise, and can be used for the determination of isoquercitrin, hyperin, chlorogenic acid and quercetin in the leaves of *F. suspense*.

KEY WORDS Leaves of *Forsythia suspense*; LC-MS/MS; Negative ionization-MRM; Isoquercitrin; Hyperin; Chlorogenic acid; Quercetin; Content determination

连翘叶为木犀科植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥叶, 主要含有木脂素类、黄酮类、苯乙醇及其苷类、C₆~C₂天然醇、三萜类、单萜类等化学成分^[1]。在我国河北、河南、山西、陕西等地, 民间常采集连翘嫩叶, 经加工制成保健茶饮, 认为其有较好的保健价值。现代药理研究发现, 连翘叶提取物有抗菌、抗氧化、抗衰老、抗疲劳等作用^[2-7]。目前, 文献多集中在连翘叶中芦丁、连翘苷、连翘酯苷的高效液相色谱(HPLC)测定上^[8-10]。液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)联用技术具有灵敏度高、专属性好、快速、高效的特点, 已逐渐成为中药微量成分定量分析的有效手段。本研究采用LC-MS/MS负离子多反应监测(MRM)扫描模式, 同时测定了连翘叶中异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素4种成分的含量, 以期为开发利用连翘叶这一天然资源提供参考。

1 材料

1.1 仪器

QTrap 3200 三重四级杆MS/MS仪、Analyst 1.4.2 分析软件(美国AB公司); 1200 LC仪, 配有G1311A四元梯度洗脱泵、G1329A自动进样器、G1322A在线脱气仪(美国Agilent公司); KQ-250B超声波清洗器(功率: 250 W, 频率: 40 kHz, 昆山市超

声仪器有限公司)。

1.2 试剂

异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素对照品(中国食品药品检定研究院, 批号分别为111809-201001、111521-200303、110753-200413、100081-200406); 乙腈(色谱纯, 美国Fisher公司); 水为重蒸馏水, 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

连翘叶采集于河北井径县洞阳坡村, 经河北省食品药品检验院孙宝惠主任中药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 LC-MS条件

2.1.1 LC条件 色谱柱: Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 25 °C; 流动相: 乙腈-水(含1 mmol/L 乙酸铵和0.15% 乙酸), 梯度洗脱(0~<15 min, 15%→40% A; 15~<23 min, 40%→60% A; 23~23.1 min, 60%→15% A); 流速: 0.7 ml/min; 进样量: 20 μl; 每针进样前平衡6 min。

2.1.2 MS条件 离子源: 电喷雾电离源(ESI); 源喷射电压: -4 500 V; 监测模式: 负离子MRM模式; 雾化温度: 600 °C; 气帘气压力: 25 psi; 雾化气压力: 60 psi; 辅助气压力: 65 psi。4种成分的MS参数见表1。

2.2 溶液的制备

* 主任药师。研究方向: 中药新制剂的开发。E-mail: gsl1881@163.com

表1 4种成分的MS参数

Tab 1 MS parameters of 4 ingredients

成分	分子式	保留时间, min	监测离子对(m/z)	碰撞电压, V	解簇能量, eV
异槲皮苷	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	12.05	462.9/299.9	-72	-33
金丝桃苷	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₂	10.83			
绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₆	7.28	353.1/191.1	-30	-42
槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	18.48	301.1/151.0	-50	-30

2.2.1 混合对照品溶液 取异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素对照品各适量,精密称定,置同一10 ml量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,作为混合对照品贮备液。精密量取混合对照品贮备液适量,置10 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,得异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素的质量浓度分别为45.1、33.4、58.2、20.2 μg/ml的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取连翘叶样品,粉碎成细粉,取约0.25 g,精密称定,置25 ml量瓶中,加入甲醇20 ml,超声提取(功率:250 W,频率:40 kHz)40 min,放冷,用甲醇定容,摇匀,静置,以0.45 μm微孔滤膜滤过,即得。

4种成分的HPLC图见图1。

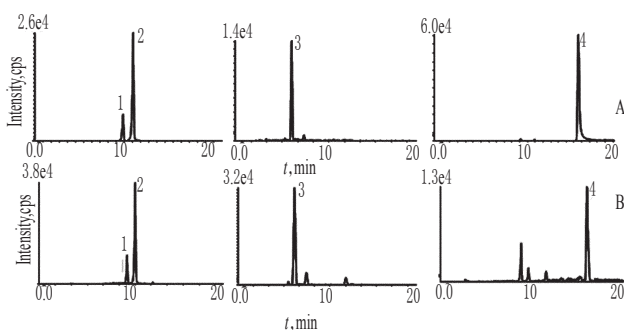


图1 4种成分的HPLC图

A.对照品;B.供试品;1.金丝桃苷;2.异槲皮苷;3.绿原酸;4.槲皮素

Fig 1 HPLC chromatograms of 4 ingredients

A. substance control; B. test samples; 1. hyperin; 2. isoquercitrin; 3. chlorogenic acid; 4. quercetin

2.3 线性关系考察

精密量取不同体积的混合对照品溶液,用甲醇定量稀释,制得7个不同质量浓度的混合对照品溶液,按上述LC-MS条件进样测定,记录色谱图。以对照品质量浓度(x)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性关系考察,结果见表2。

表2 4种成分的线性关系考察结果(n=7)

Tab 2 Linear relations of 4 compounds(n=7)

成分	标准曲线	r	线性范围, μg/ml
异槲皮苷	$y=6.21 \times 10^4 x + 1.45 \times 10^5$	0.999 8	0.23~4.51
金丝桃苷	$y=2.78 \times 10^4 x + 3.12 \times 10^5$	0.999 1	0.17~3.34
绿原酸	$y=3.94 \times 10^4 x + 3.83 \times 10^5$	0.999 2	0.29~5.82
槲皮素	$y=3.39 \times 10^4 x + 1.08 \times 10^5$	0.999 6	0.10~2.02

2.4 精密度试验

精密吸取同一混合对照品溶液适量,按上述LC-MS条件连续进样5次,测定峰面积。结果,异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素的RSD分别为1.1%、1.2%、0.96%、1.8%(n均为5),表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12 h进样测定峰面积。结果,异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素的RSD分别为4.3%、2.2%、3.1%、2.8%(n均为5),

表明供试品溶液在室温放置12 h内基本稳定。

2.6 重复性试验

取同一份连翘叶样品0.25 g,共6份,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述LC-MS条件进样测定,计算各成分的含量。结果,每1 g样品中平均含异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素分别为118、43.5、195、34.8 μg, RSD分别为4.2%、3.0%、3.5%、2.5%(n均为6),表明本方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取同一连翘叶样品0.125 g,共6份,分别精密加入一定量的混合对照品贮备液,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述LC-MS条件进样测定,计算加样回收率,结果见表3。

表3 4种成分的加样回收率试验结果(n=6)

Tab 3 Results of recovery tests of 4 ingredients(n=6)

成分	取样量, g	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	\bar{x} , %	RSD, %
异槲皮苷	0.125 3	14.785 4	14.500 0	28.543 7	94.88		
	0.124 6	14.702 8	14.500 0	28.473 0	94.97		
	0.126 1	14.879 8	14.500 0	28.635 2	94.86	94.7	1.5
	0.125 7	14.832 6	14.500 0	28.837 4	96.58		
	0.124 7	14.714 6	14.500 0	28.112 8	92.40		
	0.125 5	14.809 0	14.500 0	28.463 8	94.17		
金丝桃苷	0.125 3	5.450 6	5.460 0	10.637 4	95.00		
	0.124 6	5.420 1	5.460 0	10.762 1	97.84		
	0.126 1	5.485 4	5.460 0	10.893 9	99.06	96.8	2.4
	0.125 7	5.468 0	5.460 0	10.738 2	96.52		
	0.124 7	5.424 5	5.460 0	10.837 4	99.14		
	0.125 5	5.459 3	5.460 0	10.564 2	93.50		
绿原酸	0.125 3	24.433 5	24.360 0	48.893 4	100.41		
	0.124 6	24.297 0	24.360 0	49.632 3	104.00		
	0.126 1	24.589 5	24.360 0	50.238 8	105.29	107.2	4.6
	0.125 7	24.511 5	24.360 0	52.248 5	113.86		
	0.124 7	24.316 5	24.360 0	50.939 4	109.29		
	0.125 5	24.472 5	24.360 0	51.347 2	110.32		
槲皮素	0.125 3	4.360 4	4.410 0	8.715 9	98.76		
	0.124 6	4.336 1	4.410 0	8.529 3	95.08		
	0.126 1	4.388 3	4.410 0	8.539 3	94.13	95.1	2.6
	0.125 7	4.374 4	4.410 0	8.637 2	96.66		
	0.124 7	4.339 6	4.410 0	8.479 3	93.87		
	0.125 5	4.367 4	4.410 0	8.421 2	91.92		

2.8 样品含量测定

取不同批次的连翘叶样品,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,照上述LC-MS条件进样测定,记录峰面积,分别计算样品中异槲皮苷、金丝桃苷、绿原酸、槲皮素的含量,结果见表4。

3 讨论

在一级全扫描MS图中发现,异槲皮苷在正离子模式下产生[M+Na]⁺峰且不稳定,而在负离子模式下易产生[M-H]⁻峰且响应值较高;金丝桃苷在正、负离子模式下均易产生[M+H]⁺和[M-H]⁻峰,但[M-H]⁻峰的响应值远高于[M+H]⁺峰的响应值;绿原酸和槲皮素均在负离子模式下易产生[M-H]⁻峰。因此,以上4种化合物均选择负离子扫描模式进行检测。

试验中发现,在流动相中加入适量的乙酸铵有助于化合物的离子化,故对乙酸铵的用量进行了考察,发现当乙酸铵的浓度为1 mmol/L时,化合物的响应值明显增高,但峰形较差,因此在含有乙酸铵的流动相中添加适量的乙酸以改善峰形。结果显示,当0.15%乙酸加入1 mmol/L的乙酸铵溶液时,各化

分光光度法测定巴豆油聚乳酸羟基乙酸微球中总油的含量

李云霄^{1*}, 黄宝群², 孙洪胜^{3#}(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东电力中心医院, 济南 250001; 3. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)11-1028-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.11.25

摘要 目的: 建立测定巴豆油聚乳酸羟基乙酸微球(简称巴豆油微球)中总油含量的方法。方法: 巴豆油微球经碱液-超声破解后, 应用异构化反应将其主成分亚油酸转变为共轭亚油酸, 采用紫外分光光度法测定其吸光度, 通过换算系数(单位质量浓度共轭亚油酸与巴豆油的吸光度比值)代入回归方程求得巴豆油微球中总油的含量。结果: 共轭亚油酸的质量浓度在 1.571~9.427 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内与吸光度呈良好线性关系($r=0.9999$); 平均加样回收率为 100.45%, $\text{RSD}=0.60\%$ ($n=6$); 换算系数 $K=2.201 \pm 0.043$ 。结论: 本方法准确、简便, 可以作为巴豆油微球中总油的含量测定方法。

关键词 巴豆油; 微球; 分光光度法; 异构化; 共轭亚油酸; 含量测定

Determination of Total Oil Content in Croton Oil PLGA Microspheres by Spectrophotometry

LI Yun-xiao¹, HUANG Bao-qun², SUN Hong-sheng³(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Central Hospital of Shandong Electric Power, Jinan 250001, China; 3. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study a method for the determination of total oil content in Croton oil (poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA) microspheres. METHODS: Croton oil microspheres broken by lye-ultrasonic, and main ingredient linoleic acid turned into conjugated linoleic acid through isomerization reaction. UV spectrophotometry was used to determine the absorbance, and total oil content of Croton oil microspheres was calculated by substituting conversion factor (ratio of unit concentration of conjugated linoleic acid to absorbance of croton oil) into standard curve equation. RESULTS: The linear range of conjugated linoleic acid was 1.571-9.427 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($r=0.9999$) with average recovery of 100.45% ($\text{RSD}=0.60\%$, $n=6$); conversion factor K was equal to 2.201 ± 0.043 . CONCLUSION: The method is accurate and simple, and it can be used for the determination of total oil content in Croton oil PLGA microspheres.

KEY WORDS Croton oil; Microspheres; Spectrophotometry; Isomerization; Conjugated linoleic acid; Content determination

表 4 不同批次连翘叶中 4 种成分的含量测定结果 ($\mu\text{g}/\text{g}$)
Tab 4 Results of content determination of 4 ingredients in different batches of the leaves of *F. suspensa* ($\mu\text{g}/\text{g}$)

批号	异瓣皮苷	金丝桃苷	绿原酸	鞣皮素
100601	118	43.5	195	34.8
100602	106	39.7	225	33.4
100603	95	35.8	206	30.7
110601	143	50.2	188	38.4
110701	128	45.8	193	41.3
110702	130	46.2	228	37.2

合物峰形较好, 且响应值稳定。最终确定以乙腈-水(含 1 mmol/L 乙酸铵和 0.15% 甲酸)为流动相, 进行梯度洗脱。

参考文献

- [1] 丁冈, 刘延泽. 中药连翘及其同属植物的研究近况[J]. 中药材, 1994, 17(10): 42.
- [2] 段飞, 张双民, 杨建雄, 等. 连翘叶提取物抑菌作用的研究[J]. 西北药学杂志, 2005, 20(2): 66.

* 硕士研究生。研究方向: 中药制剂新剂型、新技术。E-mail: yiliner2100@163.com

通信作者: 主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 药物新剂型、新技术与新药研发。电话: 0531-82929059。E-mail: shs7777@163.com

- [3] 杨建雄, 朱淑云, 李发荣. 连翘叶茶的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2002, 23(12): 120.
- [4] 柴渭莉, 刘静, 杨建雄, 等. 连翘叶提取物对油脂抗氧化作用的研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2004, 32(9): 187.
- [5] 杨建雄, 刘静, 李发荣, 等. 连翘叶茶抗氧化抗衰老作用的实验研究[J]. 营养学报, 2004, 26(1): 65.
- [6] 黄亚亚, 杨建雄, 赵咏梅. 连翘叶黄酮对力竭游泳恢复小鼠的抗疲劳作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(6): 1019.
- [7] 柴渭莉, 杨建雄, 周俊芳, 等. 连翘叶苷类成分对力竭游泳小鼠心肌和骨骼肌超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量及超微结构的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2007, 26(5): 609.
- [8] 张杲, 李发荣, 段飞, 等. 不同采收期连翘叶中连翘苷、连翘酯苷和金丝桃苷的含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 790.
- [9] 张淑蓉, 裴香萍, 闫艳, 等. 不同采收期青翘和连翘叶中活性成分的含量比较[J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2940.
- [10] 朱凤云, 陈志红, 王春雷, 等. 连翘叶采收期探讨[J]. 中药材, 2002, 25(8): 547.

(收稿日期: 2012-04-06 修回日期: 2012-07-09)