

# UPLC-MS/MS法同时测定裸花紫珠干浸膏中5种有效成分的含量

郑培\*, 汤兵力, 林艳珠, 冯春艳, 刑征宇(海南省食品药品检验所海口分所, 海口 570216)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)21-2997-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.21.33

**摘要** 目的: 建立同时测定裸花紫珠干浸膏中5种有效成分含量的方法。方法: 采用超高效液相色谱-串联质谱法。色谱条件: 色谱柱为Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub>, 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为0.3 mL/min, 柱温为40 ℃, 进样量为2 μL; 质谱条件: 多反应监测离子扫描模式, 干燥气/雾化气为氮气, 干燥气温度为325 ℃, 干燥气流量为6 L/min, 雾化气压力为45 psi, 鞘流气温度为350 ℃, 鞘流气流量为12 L/min, 毛细管电压为4 000 V(+), 3 500 V(-), 喷嘴电压为500 V。结果: 木犀草苷、毛蕊花糖苷、槲皮素、木犀草素、芦丁检测质量浓度线性范围分别为0.504 8~252.4 ng/mL( $r=0.999\ 9$ )、0.712 4~356.2 ng/mL( $r=0.999\ 0$ )、0.509 4~254.7 ng/mL( $r=0.996\ 2$ )、0.303 0~151.5 ng/mL( $r=0.999\ 8$ )、0.602 2~301.1 ng/mL( $r=0.999\ 6$ ); 精密性、稳定性、重复性试验的RSD<3.0%; 定量限分别为0.42、0.87、0.33、0.12、0.76 ng/mL; 加样回收率分别为97.99%~101.20%(RSD=1.3%,  $n=6$ )、96.50%~101.20%(RSD=1.7%,  $n=6$ )、94.81%~99.34%(RSD=1.7%,  $n=6$ )、97.54%~100.51%(RSD=1.2%,  $n=6$ )、93.37%~98.70%(RSD=1.9%,  $n=6$ )。结论: 该方法操作简便, 精密性、稳定性、重复性好, 可用于裸花紫珠干浸膏中5种有效成分含量的同时测定。

**关键词** 超高效液相色谱-串联质谱法; 裸花紫珠干浸膏; 木犀草苷; 毛蕊花糖苷; 槲皮素; 木犀草素; 芦丁

## Simultaneous Determination of 5 Effective Components in Luohua Zizhu Dry Extract by UPLC-MS/MS

ZHENG Pei, TANG Bingli, LIN Yanzhu, FENG Chunyan, XING Zhengyu (Haikou Branch, Hainan Institute for Food and Drug Control, Haikou 570216, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 5 effective components in Luohua zizhu dry extract. METHODS: UPLC-MS/MS was conducted. The separation was performed on an Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> column with mobile phase of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 40 ℃ and sample size was 2 μL. The analytes were detected in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Nitrogen was used as drying gas and atomized gas. The temperature and flow rate of drying gas were 325 ℃ and 6 L/min. The pressure of atomized gas was 45 psi. The temperature and flow rate of sheath gas were 350 ℃ and 12 L/min. The voltage of capillary were 4 000 V(+) and 3 500 V(-). The voltage of nozzle was 500 V. RESULTS: The linear ranges of luteoloside, acteoside, quercetin, luteolin and rutin were 0.504 8-252.4 ng/mL( $r=0.999\ 9$ ), 0.712 4-356.2 ng/mL( $r=0.999\ 0$ ), 0.509 4-254.7 ng/mL( $r=0.996\ 2$ ), 0.303 0-151.5 ng/mL( $r=0.999\ 8$ ) and 0.602 2-301.1 ng/mL( $r=0.999\ 6$ ), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all less than 3.0%. The limit of quantitation were 0.42, 0.87, 0.33, 0.12, 0.76 ng/mL. The recoveries were 97.99%-101.20% (RSD=1.3%,  $n=6$ ), 96.50%-101.20% (RSD=1.7%,  $n=6$ ), 94.81%-99.34% (RSD=1.7%,  $n=6$ ), 97.54%-100.51% (RSD=1.2%,  $n=6$ ), 93.37%-98.70% (RSD=1.9%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, precise, stable and reproducible, and can be used for simultaneous determination of 5 effective components in Luohua zizhu dry extract.

**KEYWORDS** UPLC-MS/MS; Luohua zizhu dry extract; Luteoloside; Acteoside; Quercetin; Luteolin; Rutin

裸花紫珠干浸膏是由单味裸花紫珠制成浸膏的中成药; 裸花紫珠具有清热解毒、收敛止血、散瘀消肿的功效, 在临床上主要用于治疗术后、外伤后、药物流产后、呼吸道和消化道出血后止血, 对化脓性炎症、烧伤或烫伤的治疗效果尤其显著<sup>[1-3]</sup>。裸花紫珠主要活性成分为黄酮类, 包括木犀草苷、毛蕊花糖苷、槲皮素、木犀草素、芦丁等<sup>[4-5]</sup>。本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)建立了快速测定裸花紫珠干浸膏中5种活性成分含量的方法, 以期为其质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1290-6460型UPLC-MS/MS仪(美国Agilent公司); PL-1001L型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司); 3-18K型高速离心机(德国Sigma公司); KQ-600TDE型超声波清洗机(东莞市科桥超声波设备有限公司, 频率: 80 kHz, 功率: 700 W)。

### 1.2 试剂

裸花紫珠干浸膏(海南九芝堂药业有限公司, 批号: 20160101、20160201、20160301, 规格: 每1 g干浸膏相当于原药材5 g); 木犀草苷对照品(批号:

\* 主管药师。研究方向: 药品检验。E-mail: 12123089@qq.com

111720-201408)、毛蕊花糖苷对照品(批号:111530-201411)、槲皮素对照品(批号:100081-201509)木犀草素对照品(批号:111520-200504)、芦丁对照品(批号:100080-201409)均购自中国食品药品检定研究院,纯度均>98%;甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,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: Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~9.5 min, 20% A; 9.5~10.0 min, 20%→80% A; 10~14 min, 80% A; 14~15 min, 80%→20% A; 15~27 min, 20% A);流速:0.3 mL/min;柱温:40 ℃;进样量:2 μL。

2.1.2 质谱条件 扫描模式:多反应监测离子扫描模式;干燥气/雾化气:氮气;干燥气温度:325 ℃;干燥气流量:6 L/min;雾化气压力:45 psi;鞘流气温度:350 ℃;鞘流气流量:12 L/min;毛细管电压:4 000 V(+)、3 500 V(-);喷嘴电压:500 V。标准谱库信息见表1;总离子流(TIC)、提取离子流(EIC)色谱见图1。

表1 标准谱库信息

Tab 1 Standard library information

待测成分	保留时间,min	母离子m/z	子离子m/z	碎裂电压,V	碰撞能,V	电离模式
木犀草苷	8.805	447.1	285.1	180	30	-
毛蕊花糖苷	7.917	623.2	161.0	210	42	-
槲皮素	11.251	301.0	151.0	150	30	-
木犀草素	11.998	285.0	133.0	180	34	-
芦丁	7.446	609.1	300.0	210	42	-

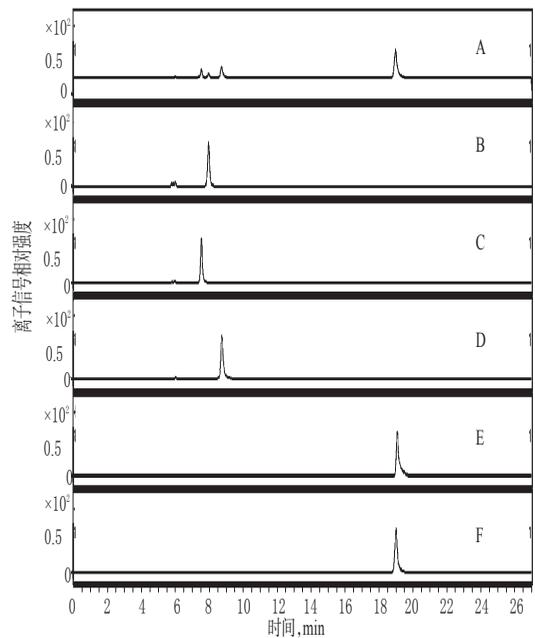
### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取待测成分对照品适量,精密称定,分别置于50 mL量瓶中,加70%甲醇溶液定容,制成木犀草苷、毛蕊花糖苷、槲皮素、木犀草素、芦丁质量浓度分别为2.524、3.562、2.547、1.515、3.011 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,研细,取约1.0 g,精密称定,置于100 mL量瓶中,加70%甲醇溶液适量,超声处理20 min,放冷,加70%甲醇溶液定容,摇匀;以离心半径为8.5 cm、10 000 r/min离心20 min,滤过,精密量取续滤液5 mL,置于50 mL量瓶中,加70%甲醇溶液定容,摇匀;精密量取2 mL,置于200 mL量瓶中,加70%甲醇溶液定容,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取滤液,即得。

### 2.3 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,制成木犀草苷质量浓度分别为252.400 0、25.240 0、10.096 0、5.048 0、1.009 6、0.504 8 ng/mL,毛蕊花糖苷质量浓度分别为356.200 0、35.620 0、14.248 0、7.124 0、1.424 8、0.712 4 ng/mL,槲皮素质量浓度分别为254.700 0、25.470 0、10.188 0、5.094 0、1.018 8、0.509 4



A.TIC;B.木犀草苷的EIC;C.毛蕊花糖苷的EIC;D.槲皮素的EIC;E.木犀草素的EIC;F.芦丁的EIC

A.TIC; B.EIC of luteoloside; C.EIC of verbascoside; D.EIC of quercetin; E.EIC of luteolin; F.EIC of rutin

图1 TIC和EIC色谱图

Fig 1 TIC and EIC chromatograms

ng/mL,木犀草素的质量浓度分别为151.500 0、15.150 0、6.060 0、3.030 0、0.606 0、0.303 0 ng/mL,芦丁的质量浓度分别为301.100 0、30.110 0、12.044 0、6.022 0、1.204 4、0.602 2 ng/mL的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,回归方程与线性范围见表2。

表2 回归方程、线性范围与定量限

Tab 2 Regression equations, linear ranges and LOQs

待测成分	线性方程	r	线性范围, ng/mL	定量限, ng/mL
木犀草苷	y=264.369 2x-3.517 6	0.999 9	0.504 8~252.4	0.42
毛蕊花糖苷	y=74.465 7x-73.023 4	0.999 0	0.712 4~356.2	0.87
槲皮素	y=265.216 6x-630.812 7	0.996 2	0.509 4~254.7	0.33
木犀草素	y=817.166 4x-94.723 0	0.999 8	0.303 0~151.5	0.12
芦丁	y=76.726 7x-38.576 0	0.999 6	0.602 2~301.1	0.76

### 2.4 定量限考察

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,详见表2。

### 2.5 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,木犀草苷、毛蕊花糖苷、槲皮素、木犀草素、芦丁峰面积的RSD为0.8%、1.9%、0.7%、0.6%、1.1%(n=6),表明仪器精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20160101)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8、10、12、24 h时按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果,木犀草苷、毛蕊花糖苷、槲皮素、木犀草素、芦丁峰面积的RSD分别为1.6%、2.1%、1.4%、1.2%、1.5%( $n=8$ ),表明供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

## 2.7 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20160101)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,记录峰面积并计算样品含量。结果,木犀草苷、毛蕊花糖苷、槲皮素、木犀草素、芦丁含量的平均值分别为2.41、21.37、1.41、1.95、1.64 mg/g, RSD分别为0.9%、2.2%、1.1%、1.4%、1.2%( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:20160101)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, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
木犀草苷	1.043 6	0.252	0.255	0.502	98.04	99.01	1.3
	1.011 4	0.244	0.251	0.495	100.00		
	1.004 9	0.242	0.249	0.486	97.99		
	1.078 1	0.260	0.252	0.507	98.02		
	1.000 3	0.241	0.251	0.495	101.20		
	1.056 6	0.255	0.252	0.504	98.81		
毛蕊花糖苷	1.043 6	2.230	2.012	4.223	99.06	99.10	1.7
	1.011 4	2.161	2.004	4.189	101.20		
	1.004 9	2.147	2.035	4.195	100.64		
	1.078 1	2.304	2.022	4.299	98.66		
	1.000 3	2.138	2.029	4.096	96.50		
	1.056 6	2.258	2.017	4.245	98.51		
槲皮素	1.043 6	0.147	0.151	0.297	99.34	96.93	1.7
	1.011 4	0.143	0.153	0.292	97.39		
	1.004 9	0.142	0.148	0.287	97.97		
	1.078 1	0.152	0.152	0.298	96.05		
	1.000 3	0.141	0.151	0.286	96.03		
	1.056 6	0.149	0.154	0.295	94.81		
木犀草素	1.043 6	0.204	0.206	0.406	98.06	98.78	1.2
	1.011 4	0.197	0.198	0.396	100.51		
	1.004 9	0.196	0.203	0.394	97.54		
	1.078 1	0.210	0.204	0.411	98.53		
	1.000 3	0.195	0.215	0.410	100.00		
	1.056 6	0.206	0.203	0.405	98.03		
芦丁	1.043 6	0.171	0.154	0.323	98.70	96.36	1.9
	1.011 4	0.166	0.156	0.318	97.44		
	1.004 9	0.165	0.159	0.319	96.86		
	1.078 1	0.177	0.162	0.333	96.30		
	1.000 3	0.164	0.155	0.312	95.48		
	1.056 6	0.173	0.166	0.328	93.37		

## 2.9 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( $n=3$ , mg/g)

Tab 4 Results of contents determination of samples ( $n=3$ , mg/g)

样品批号	木犀草苷	毛蕊花糖苷	槲皮素	木犀草素	芦丁
20160101	2.41	21.37	1.41	1.95	1.64
20160201	2.35	20.76	1.27	1.89	1.71
20160301	2.27	21.18	1.36	1.9	1.66

## 3 讨论

采用UPLC-MS/MS技术测定中药中多种有效成分的含量,在试验操作过程、分析时间、方法专属性和检测灵敏度等方面均优于高效液相色谱法,可有效地提高检测效率<sup>[6]</sup>。笔者查阅文献发现,目前尚未见采用UPLC-M/MS法同时测定裸花紫珠干浸膏中多种有效成分含量的报道。

笔者在试验过程中,在干燥气温度、干燥气流量、雾化器压力、鞘流气温度、鞘流气流量、碎裂电压、碰撞能量、电离模式等方面对质谱检测参数进行了优化<sup>[7-8]</sup>。同时,通过变换色谱柱品牌、型号,流动相种类、比例、流速以及梯度洗脱程序等优化了色谱分离的条件。

综上所述,本方法简单、快速、准确度及灵敏度高、专属性好,可用于裸花紫珠干浸膏和裸花紫珠制剂的质量控制,同时亦为裸花紫珠中药材的开发提供了质量控制的技术方法和依据。

## 参考文献

- [1] 苏凤珍. 裸花紫珠胶囊联合妇科炎症胶囊治疗阴道出血30例疗效观察[J]. 实用中西医结合临床, 2014, 14(3): 85.
- [2] 蔡金平, 董琳, 关薇薇, 等. 裸花紫珠的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 60-64.
- [3] 马燕春, 张旻, 徐文彤, 等. 裸花紫珠化学成分及细胞毒活性研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(16): 3094-3097.
- [4] 高飞鹏, 汪豪, 叶文才, 等. 裸花紫珠叶的化学成分[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(2): 120-123.
- [5] 潘争红, 颜冬兰, 宁德生, 等. 裸花紫珠黄酮苷类化合物的分离与结构鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(24): 26-29.
- [6] 苏靖, 戴荣继. 液质联用技术在中药研究中的应用[J]. 生命科学仪器, 2014, 12(2): 40-42.
- [7] 吴茵, 王蕊, 任炳楠, 等. UPLC-MS/MS法同时测定沙参麦冬汤中9种成分的含量[J]. 中国药房, 2016, 27(9): 1240-1242.
- [8] 解军波, 张彦青, 吴国娇, 等. LC-MS/MS法测定独一味中木犀草素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 64-66.

(收稿日期:2016-11-11 修回日期:2017-01-13)

(编辑:张静)