

## UPLC-MS/MS 方法同时测定百咳宁颗粒中 6 种主要有效成分

李瑞宏<sup>1</sup>, 房桂珍<sup>3</sup>, 安娜<sup>1</sup>, 冯超<sup>1</sup>, 祁金龙<sup>2\*</sup>, 张海林<sup>2\*</sup>

1. 河北省儿童医院, 河北 石家庄 050013

2. 河北医科大学 药理学教研室, 河北 石家庄 050017

3. 河北医科大学 生物医学工程中心, 河北 石家庄 050017

**摘要:** **目的** 建立 UPLC-MS/MS 方法同时测定百咳宁颗粒中 6 种主要有效成分 (靛玉红、贝母素甲、贝母素乙、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C)。 **方法** 百咳宁颗粒经氯仿-甲醇溶剂索氏提取后进样, 采用正负离子切换的多反应监测 (MRM) 模式同时测定百咳宁颗粒中的靛玉红, 2 种贝母素和 3 种银杏内酯类成分。色谱柱为 Inertsustain C<sub>18</sub> (75 mm×3.0 mm, 2 μm) 柱, 流动相为甲醇-乙腈-2 mmol/L 乙酸铵水溶液, 梯度洗脱, 分析时间为 6 min。 **结果** 所测 6 种主要有效成分在测定浓度范围内线性关系良好,  $r$  均大于 0.995 8; 精密度、重复性和稳定性良好; 平均加样回收率为 96.5%~105.1%, RSD≤4.2%。 **结论** 本法简单快捷、灵敏度高、专属性好, 可用于百咳宁颗粒中 6 种主要有效成分的定量控制, 除靛玉红外, 其他 5 种成分均为处方中首次测定, 百咳宁颗粒中银杏内酯类成分的量较低。

**关键词:** UPLC-MS/MS; 百咳宁颗粒; 靛玉红; 贝母素甲; 贝母素乙; 银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 银杏内酯 C

**中图分类号:** R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)01-0076-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.01.012

## Simultaneous determination of six components in Baikening Granules by UPLC-MS/MS

LI Rui-hong<sup>1</sup>, FANG Gui-zhen<sup>3</sup>, AN Na<sup>1</sup>, FENG Chao<sup>1</sup>, QI Jin-long<sup>2</sup>, ZHANG Hai-lin<sup>2</sup>

1. Children's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050013, China

2. Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

3. Center for Biomedical Engineering, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

**Abstract: Objective** To develop an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for simultaneous determination of six components (indirubin, peimine, peiminine, ginkalide A, ginkalide B, and ginkalide C) in Baikening Granules. **Methods** Preparing the samples solution by Soxhlet's extraction using methanol-chloroform as solvent, and multiple reaction monitoring (MRM) with a polarity-switching electrospray ionization (ESI) source between positive and negative modes was used for the quantification of indirubin, two peimines, and three bilobalides. The detection was performed on an Inertsustain C<sub>18</sub> column (75 mm × 3.0 mm, 2 μm) using a mobile phase consisted of methanol-acetonitrile and 2 mmol/L ammonium acetate water solution with gradient elution lasting 6 min. **Results** All of the analytes showed good linearity ( $r \geq 0.995 8$ ) in the tested ranges. The precision, repeatability, and stability of the method were good for the six components. The average recoveries were in the range of 96.5%—105.1% with relative standard deviations (RSD) ≤ 4.2%. **Conclusion** The new established polarity-switching LC-MS-MS method has been proven to be highly sensitive and effective in evaluating the quality of Baikening Granules, and peimine, peiminine, ginkalide A, ginkalide B, and ginkalide C are quantified in this drug for the first time.

**Key words:** UPLC-MS/MS; Baikening Granules; indirubin; peimine; peiminine; ginkalide A; ginkalide B; ginkalide C

收稿日期: 2015-08-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21402139); 河北省自然科学基金资助项目 (H2013206048); 河北省教育厅优秀青年基金资助项目 (YQ2013033); 河北省医学科学研究重点课题计划项目 (20150560); 河北省食品药品监督管理局 (重点) 科技项目 (ZD2015023)

作者简介: 李瑞宏, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为临床药学。Tel: (0311)85911217 E-mail: liruihong2678@163.com

\*通信作者 祁金龙 (1980—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药代动力学、药效动力学研究工作。

Tel: (0311)86266335 E-mail: jinlongqi@aliyun.com

张海林 (1960—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为分子药理学。Tel: (0311)86265562 E-mail: z.hailin@yahoo.com

百咳宁颗粒作为儿科用药, 临床用于治疗小儿百日咳, 具有清热化痰、止咳定喘之功效, 是由白果仁、青黛、平贝母 3 味药材提取制成的复方制剂<sup>[1]</sup>。其中属于萜类化合物的银杏内酯类被认为是白果仁最重要的活性成分, 是血小板活化因子 (PAF) 的强拮抗剂, 具有抗血小板聚集、抗血栓、防治动脉粥样硬化、抗炎和抗过敏等作用<sup>[2-4]</sup>; 以贝母素甲、贝母素乙为代表的生物碱则被认为是贝母类药材具有镇咳、化痰、平喘的物质基础<sup>[5-6]</sup>; 青黛的主要成分靛玉红据报道有抗肿瘤活性<sup>[7]</sup>。百咳宁颗粒国家法定标准中以 HPLC 法测定靛玉红的量作为质控标准, 作为儿科常用药, 从安全、有效、质量可控角度出发, 多组分联合测定具有重要意义。本实验选择每一味药材的代表性主要成分, 青黛的靛玉红, 平贝母的贝母素甲和贝母素乙, 白果仁的银杏内酯 A、B、C 进行多组分同时定量测定。

目前贝母素类及银杏内酯类的测定以 HPLC-ELSD 方法为主<sup>[8-11]</sup>, ELSD 检测器灵敏度相对较低, 联合测定色谱分离难度大, 分析时间长。本实验建立的正负离子切换 UPLC-MS/MS 联合测定方法, 具有简单、快速、选择性好、灵敏度高的优点, 可用于百咳宁颗粒的质量控制, 亦可以推广到其他含有该类成分的中药材或中成药的质量控制。

### 1 仪器与材料

API4000Q-Trap 质谱仪, 配有电喷雾离子化源, Analysis1.6 工作站, 美国 ABSCIEX 公司; LC-30A 液相色谱系统, 配有液相输液泵、自动进样器、柱温箱, 日本岛津公司; BT125D 型分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司; HH SY11-Ni 型电热恒温水浴锅, 北京长风仪器仪表公司。

对照品靛玉红 (批号 110717-200204) 购于中国食品药品检定研究院; 对照品贝母素甲 (批号 362/15582)、贝母素乙 (批号 368/15583)、银杏内

酯 A (批号 905/15584)、银杏内酯 B (批号 1782/15585) 和银杏内酯 C (批号 1910/15586) 购于上海丹德生物技术有限公司, 对照品质量分数均大于 98%。甲醇、乙腈、乙酸铵均为色谱纯, 水为超纯水。百咳宁颗粒, 广东世信药业有限公司, 批号 1410006001、1411006055、1411004133、1411001035、1505002157、1507001015、1507001014、1507002117; 规格 0.8 g/袋, 相当于原药材 0.48 g。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱 Inertsustain C<sub>18</sub> 柱 (75 mm×3.0 mm, 2 μm); 流动相 A 为乙腈, B 为甲醇, C 为 2 mmol/L 的乙酸铵水溶液, 梯度洗脱: 0~3 min, 15%~50% A、30% B、55%~20% C; 3~6 min, 50% A、30% B、20% C; 进样前流动相初始条件平衡 3 min; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 5 μL。

### 2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子化源 (ESI); 1~3.1 min 多反应监测 (MRM) 负离子模式, 源喷射电压 (IS) 为 -4 500 V; 3.1~6.0 min 多反应监测 (MRM) 正离子模式, 源喷射电压 (IS) 为 5 500 V; 雾化温度为 650 °C; 气帘气 (Curtain gas, N<sub>2</sub>) 压力为 172.40 kPa (25 psi), 雾化气 (GS1, N<sub>2</sub>) 压力为 379.28 kPa (55 psi), 辅助气 (GS2, 0 级空气) 压力为 379.28 kPa (55 psi); CAD: high。其他质谱参数见表 1。

### 2.3 对照品溶液的制备

分别精密称取银杏内酯 A、银杏内酯 B、银杏内酯 C、靛玉红、贝母素甲和贝母素乙对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度 (靛玉红先用少量 DMSO 溶解), 摇匀, 得到对照品储备液。精密量取各对照品储备液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 再用甲醇定容得到质量浓度分别为靛玉红 10 μg/mL、贝母素甲 1 μg/mL、贝母素乙 1 μg/mL、银杏内酯(A、

表 1 百咳宁颗粒中 6 种主要成分的保留时间和主要质谱参数

Table 1 Retention time (*t<sub>R</sub>*) and main MS parameters of six constituents in Baikening Granules

化合物	<i>t<sub>R</sub></i> /min	MS ( <i>m/z</i> )	MS <sup>2</sup> ( <i>m/z</i> )	解簇电压 (DP) /V	碰撞能 (CE) /eV
靛玉红	5.7	263.2	219.2	110.9	33.9
贝母素甲	3.5	433.0	415.5	141.8	46.3
贝母素乙	3.3	431.2	413.4	134.9	45.9
银杏内酯 A	2.7	407.1	351.4	-94.1	-18.7
银杏内酯 B	2.9	423.2	367.2	-85.0	-22.3
银杏内酯 C	1.8	438.9	383.3	-89.7	-20.3

B、C) 0.1 μg/mL 的混合对照品储备液。分别精密量取混合对照品储备液适量于 10 mL 量瓶中，以甲醇稀释成系列质量浓度的混合对照品溶液。

### 2.4 供试品溶液的制备

取本品 2 袋 (0.8 g/袋) 研成细粉，精密称取 0.5 g (相当于原药材 0.3 g) 置于索氏提取器中，甲醇-二氯甲烷 (1:1) 80 mL 混合溶剂 60 °C 水浴回流提取 8 h。提取液用甲醇定容于 100 mL 量瓶，摇匀后取 2 mL 置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容至刻度，即得供试品溶液。进样前过 0.45 μm 微孔滤膜。

### 2.5 阴性对照溶液的制备

按百咳宁颗粒处方比例和工艺，分别制备缺少青黛、平贝母和白果仁药材的阴性对照样品，并按“2.4”项下方法制备各阴性对照溶液。

### 2.6 专属性考察

取青黛阴性对照溶液、平贝母阴性对照溶液、白果仁阴性对照溶液、混合对照品溶液及供试品溶液，按“2.1”和“2.2”项方法进行分析，由图 1 可知，青黛阴性对照液没有检测到靛玉红，平贝母阴性对照液未检测到贝母素甲和贝母素乙，白果仁阴性对照液未检测到银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C。各化合物所选离子对之间无干扰。方法专属性良好。

### 2.7 线性关系、检测限及定量限考察

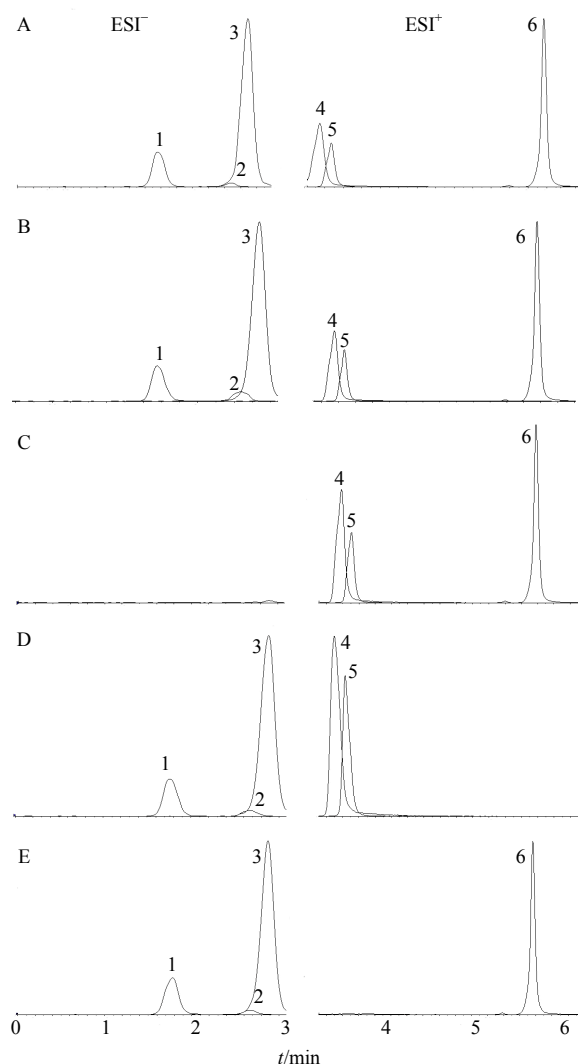
在“2.1”和“2.2”项下色谱和质谱条件测定，以对照品进样质量浓度为横坐标 (X)，峰面积积分为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，得到各物质的线性回归方程。以信噪比 (S/N) 10 和 3 时各对照品进样质量浓度分别作为定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)，结果见表 2。

### 2.8 精密度试验

取百咳宁颗粒 (批号 1410006001)，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，连续进样 6 次，计算各组峰面积的 RSD，6 个组分的 RSD 值分别为靛玉红 2.07%、贝母素甲 0.35%、贝母素乙 1.67%、银杏内酯 A 1.78%、银杏内酯 B 1.56% 和银杏内酯 C 2.27%，表明仪器精密度良好。

### 2.9 稳定性试验

取供试品溶液 (批号 1410006001)，分别在室温下放置 0、4、8、12、18、24 h 进行测定，记录峰面积。结果靛玉红、贝母素甲、贝母素乙、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 峰面积的 RSD 分别为 2.10%、0.74%、1.87%、2.68%、1.54%、2.06%，



1-银杏内酯 C 2-银杏内酯 A 3-银杏内酯 B 4-贝母素乙 5-贝母素甲 6-靛玉红  
1-ginkgolide C 2-ginkgolide A 3-ginkgolide B 4-peimine 5-peiminine 6-indirubin

图 1 混合对照品 (A)、百咳宁颗粒样品 (B)、白果仁阴性对照 (C)、青黛阴性对照 (D) 和平贝母阴性对照 (E) 溶液的提取离子流 (XIC) 色谱图

Fig. 1 XIC of mixed references solution (A), Baikening Granules (B), Semen Ginkgo negative control solution (C), Indigo Naturalis negative control solution (D), and Fritillariae Ussuriensis Bulbus negative control solution (E)

表明供试品溶液室温条件下放置 24 h 稳定性良好。

### 2.10 重复性试验

取百咳宁颗粒 (批号 1410006001)，照“2.4”项下操作，平行制备供试品溶液 6 份，测得靛玉红、贝母素甲、贝母素乙、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的质量浓度的 RSD 值分别为 2.64%、3.00%、4.31%、4.42%、2.29%、2.43%，结果表明

表 2 6 种化学成分的线性回归方程、相关系数、线性范围、LODs 及 LOQs

Table 2 Linear regression equations, LODs, and LOQs of six constituents

化合物	线性回归方程	<i>r</i>	线性范围/(ng·mL <sup>-1</sup> )	LOQ/(ng·mL <sup>-1</sup> )	LOD/(ng·mL <sup>-1</sup> )
靛玉红	$Y=658 X+2.85 \times 10^4$	0.995 8	100~2 000	10.00	3.20
贝母素甲	$Y=3 370 X+6.05 \times 10^3$	0.998 7	10~200	1.10	0.35
贝母素乙	$Y=8 380 X+3.11 \times 10^4$	0.996 8	10~200	1.11	0.40
银杏内酯 A	$Y=154 X-13.6$	0.998 7	1~20	0.49	0.11
银杏内酯 B	$Y=5 550 X-290$	0.999 2	1~20	0.80	0.25
银杏内酯 C	$Y=1 500 X+4.12$	0.997 3	1~20	0.48	0.17

该方法重复性良好。

### 2.11 回收率考察

取与重复性考察同批号的百咳宁颗粒(批号 1410006001),在索氏提取器中精密加入样品中相应成分量 50%、100%、150%的 6 种组分的对照品储备液,按“2.4”项方法操作,每个质量浓度平行操作 6 份。按“2.1”和“2.2”项下色谱和质谱条件测得靛玉红、贝母素甲、贝母素乙、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的质量浓度,计算回收率。结果靛玉红的平均回收率分别为 96.5%、97.8%、98.9%,RSD 分别为 2.4%、3.4%、1.9%;贝母素甲的平均回收率分别为 101.5%、99.0%、98.2%,RSD 分别为 1.8%、2.2%、2.3%;贝母素乙的平均回收率分别为 99.4%、99.5%、102.8%,RSD 分别为 2.5%、

0.9%、1.5%;银杏内酯 A 的平均回收率分别为 105.1%、103.3%、103.8%,RSD 分别为 4.0%、3.2%、2.4%;银杏内酯 B 的平均回收率分别为 101.2%、98.9%、103.4%,RSD 分别为 2.7%、2.6%、1.3%;银杏内酯 C 的平均回收率分别为 103.3%、102.9%、99.8%,RSD 分别为 3.3%、4.2%、1.8%;结果表明该方法的回收率良好。

### 2.12 样品测定

取 8 批百咳宁颗粒,按“2.4”项方法制备供试品溶液,在“2.1”和“2.2”项下色谱和质谱条件测定并计算各待测组分的量,结果见表 3。

## 3 讨论

### 3.1 质谱条件优化

采用 MRM 负离子监测银杏内酯 A、银杏内酯

表 3 百咳宁颗粒中 6 种成分测定结果

Table 3 Quantitative determination of six constituents in Baikening Granules

批号	质量分数/(μg·袋 <sup>-1</sup> )					
	靛玉红	贝母素甲	贝母素乙	银杏内酯 A	银杏内酯 B	银杏内酯 C
1410006001	517.4	55.0	36.9	2.85	5.44	3.50
1411006055	304.4	27.1	21.6	1.92	5.07	2.88
1411004133	342.0	26.1	24.8	3.29	7.41	2.97
1411001035	410.8	38.3	33.3	2.08	6.61	3.45
1507001015	286.3	43.5	45.1	3.33	5.25	4.21
1507001014	299.8	38.8	40.2	3.00	5.12	3.22
1505002157	440.5	61.5	42.3	4.21	6.38	2.68
1507002117	521.0	39.8	41.2	1.86	4.86	2.55

B 和银杏内酯 C 时灵敏度明显优于正离子模式,而靛玉红、贝母素甲和贝母素乙则在正离子模式获得更高的灵敏度,故本实验采用正负离子切换扫描模式。贝母素甲及贝母素乙的灵敏度高,线性范围为 0.05~50 ng/mL,且其在百咳宁颗粒中的量相对较高,为兼顾其他组分的测定,本实验分别采用了灵

敏度相对较低的离子对(理论丰度 29.2%) 433.0/415.5 和 431.2/413.1 进行测定。

### 3.2 色谱条件优化

不同贝母素及银杏内酯同系物间结构类似,完全色谱分离较难,实验过程中分别试用了不同的流动相组合(甲醇、乙腈和水)及添加不同的电解质

(甲酸、乙酸及乙酸铵), 最终选择甲醇-乙腈-2 mmol/L 乙酸铵水溶液作为流动相进行梯度洗脱时, 6 种成分的色谱峰分离好, 响应值稳定, 分析时间短, 且无其他干扰。

### 3.3 样品提取方法的选择

待测 6 种组分可分鞣玉红、贝母素类及银杏内酯类 3 大类, 理化性质相差较大。分别尝试了甲醇超声、甲醇回流等提取方法, HPLC-MS 的监测结果表明 6 种组分很难同时达到较好的提取率, 特别是溶解性较差的鞣玉红。最终选择以甲醇和三氯甲烷(1:1)的混合溶液索氏提取 8 h, 提取液用色谱甲醇稀释后直接进行测定, 即降低了提取温度, 保持了组分的稳定, 也简化了操作。

目前, 百咳宁颗粒的质量标准中仅限于 HPLC-UV 法测定鞣玉红, 未对平贝母及白果仁的有效成分进行测定。贝母素类及银杏内酯类均没有生色团, 紫外吸收差, 文献报道的 HPLC-ELSD 方法, 灵敏度差, 分离要求高, 分析时间长。HPLC-MS/MS 法不要求被测组分完全分离, 具有更高的专属性和灵敏度。百咳宁颗粒中银杏内酯类的量较低, 采用液质联用方法, 不仅有效避免了繁琐的色谱分离条件考察, 同时也大大简化了样品处理的过程, 缩短了分析时间, 提高了工作效率。

本实验建立的 HPLC-MS/MS 法可以快速、准确的测定鞣玉红、贝母素甲、贝母素乙、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 的量, 为百咳宁颗粒质量标准的提高提供了参考, 也为该制剂的药效学及药动学研究打下了基础。同时, 该方法亦可以推

广到其他含有此类成分的药材或者中成药的定量测定。

### 参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局国家药品标准 [S]. 2009.
- [2] 王 旋, 张慧灵, 顾振纶, 等. 银杏内酯药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1741-1744.
- [3] 闫 琰, 赵革新, 陈北冬, 等. 银杏内酯 B 抑制血小板 CD40Ligand 表达的分子机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2): 245-249.
- [4] 孙文佳, 孙 杰, 陈北冬, 等. 银杏内酯 B 抑制高糖诱导内皮细胞 TLR4 及炎症蛋白表达 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(5): 636-640.
- [5] 李兴斌, 高燕飞, 李吉良. 平贝母化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中医药信息, 2004, 21(4): 28-29.
- [6] 王云飞, 顾政一, 何承辉. 贝母属植物化学成分与药理活性研究进展 [J]. 西北药学杂志, 2015, 30(4): 436-440.
- [7] 吴琦玮, 葛忠良, 高 月, 等. 鞣玉红对肿瘤细胞抑制作用的研究及相关机制探讨 [J]. 天津中医药, 2008, 25(1): 55-58.
- [8] 杜伟锋, 贾永强, 张焱新, 等. HPLC-ELSD 法同时测定浙贝母饮片硫熏前后 3 种有效成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 675-678.
- [9] 唐 云, 刘汉清. HPLC-ELSD 法测定散结镇痛片中贝母素甲、贝母素乙 [J]. 中成药, 2012, 34(7): 1295-1298.
- [10] 杨青波, 靳风云, 陈 伟, 等. HPLC-ELSD 法测定银杏洋参胶囊中萜类内酯的含量 [J]. 中草药, 2014, 45(22): 3279-3283.
- [11] 伍清龙, 孙永成, 万 琴, 等. HPLC-ELSD 法测定注射用银杏二萜内酯中银杏内酯 A、B、C、K [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(3): 255-258.