

HPLC-MS/MS 法测定不同采收期连翘叶中 9 种成分

支旭然, 苑霖, 生宁, 张志勇, 张晓旭, 贾佩佩, 张兰桐*

河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017

摘要: 目的 建立 HPLC-MS/MS 法同时测定连翘叶中连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 F、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、绿原酸、(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷的量。方法 采用 Dikma Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 ℃, 以甲醇-0.02% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 体积流量 0.8 mL/min, 进样量 10 μL; 采用电喷雾离子源进行负离子模式监测, 多反应监测模式 (MRM) 用于定量分析, 源喷射电压为-4 500 V, 离子源温度为 650 ℃。结果 9 种化学成分的面积和浓度在测定浓度范围内均具有良好的线性关系, 加样回收率为 97.20%~101.2%, 精密性 RSD 为 0.54%~1.24%。结论 本法简便快速、灵敏度高、专属性好, 可用于连翘叶中 9 种活性成分的测定。通过对结果进行分析, 连翘叶以 5 月份采收最佳。

关键词: 连翘叶; HPLC-MS; 连翘苷; 连翘酯苷; 连翘脂素

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)22-3231-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.22.024

Determination of nine components in *Forsythia Folium* collected in different periods

ZHI Xu-ran, YUAN Lin, SHENG Ning, ZHANG Zhi-yong, ZHANG Xiao-xu, JIA Pei-pei, ZHANG Lan-tong

Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-MS method for the determination of phillyrin, phillygenin, forsythiaside A, forsythiaside F, rutin, quercetin, isoquercitrin, chlorogenic acid, and (+)-epipinoresinol-4'-O-glucoside in *Forsythia Folium*. **Methods** The samples were separated on a Dikma Diamonsil C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), eluted with methanol and water containing 0.02% formic acid in a gradient elution at a flow rate of 0.8 mL/min, and the injection volume was 10 μL. The column temperature was set at 30 ℃. The multiple-reaction monitoring scanning was employed for the quantification with switching electrospray ion source polarity in negative mode. The ion spray voltage was set at -4 500 V and the turbo spray temperature was maintained at 650 ℃. **Results** The regression equations showing linear relationships between peak areas and contents of each compound were obtained. The average recoveries of the compounds ranged from 97.20% to 101.2% and the precision in terms of RSD was in the range of 0.54%—1.24%. **Conclusion** The method is sensitive and suitable for the determination of the nine components in *Forsythia Folium*. As a result, the suitable harvesting time for *Forsythia Folium* is May.

Key words: *Forsythia Folium*; HPLC-MS; phillyrin; forsythiaside; phillygenin

连翘为木犀科 Oleaceae 连翘属 *Forsythia* Vahl 植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥果实, 具有清热解毒, 散结消肿的功效^[1], 主要有挥发油类, 连翘酯苷 A、连翘酯苷 F 等苯乙醇苷类、连翘苷、连翘脂素、(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷等木脂素类, 芦丁、槲皮素、异槲皮苷等黄酮类和绿原酸等成分^[2-6]。连翘多为野生, 资源有限, 连翘叶 *Forsythia Folium* 是连翘植物的干燥叶, 具有与连翘基本相同的

化学成分^[5], 连翘叶资源丰富, 在我国河南、河北、山西、陕西等地, 认为其具有良好的医用保健价值, 民间常用连翘嫩叶经加工制成保健茶饮。现代药理研究证实, 连翘叶具有保肝、保护心脏、抗菌、抗氧化及抗衰老的作用^[6-12]。为了确定连翘叶合适的采收期, 本实验首次采用 HPLC-MS/MS 技术对 14 个不同采收期的连翘叶中 9 个主要成分进行测定, 期望对连翘叶资源的开发利用提供一定的科学依据。

收稿日期: 2013-05-23

基金项目: 河北省自然科学基金-石药集团医药联合研究基金 (优先资助项目) (H2012206079)

作者简介: 支旭然 (1988—), 女, 硕士研究生, 从事中药质量控制与药代动力学研究。Tel: 15533930409 E-mail: zhixuran@163.com

*通信作者 张兰桐 Tel: (0311)86266419 E-mail: zhanglantong@263.net

1 仪器与试剂

Agilent1200 高效液相色谱仪, 配有在线脱气机, 四元泵, 自动进样器(美国 Agilent 公司); 3200Q TRAP 型三重四级杆线性离子阱质谱仪, 配有 ESI 离子源(美国 AB 公司); Analyst 1.5.2 software 数据系统(美国 AB 公司); SCQ—200 超声波清洗器(100 W, 25 kHz)(上海声谱超声波设备厂); BP211D 型十万分之一天平(德国 Sartorius 公司)。

对照品连翘苷(批号 0821-200104)、槲皮素(批号 100081-200406)、芦丁(批号 100080-200707)均购自中国食品药品检定研究院; 连翘脂素(批号 20120925)、连翘酯苷 A(批号 20120518)、绿原酸(批号 20121117)均购自上海源叶生物科技有限公司, 质量分数大于 98%; 异槲皮苷(批号 ZL54745YHP) 购买于南京泽朗植提有限公司; 连翘酯苷 F、(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷均由北京大学药学院药学教研室提供, 质量分数大于 98%。甲醇为色谱纯(美国 J. T. Baker 公司); 水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司); 其他试剂均为分析纯; 2011 年 5 月~11 月的连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 叶均采自河北省井陘县洞阳坡, 由河北医科大学药学院生药教研室李连怀副教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱 Diamonsil™ C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇(A)-水(B)(含有 0.02%的甲酸), 梯度洗脱(0~4 min, 25%~65% A; 4~8 min, 65%~95% A; 8~10 min, 95% A), 进样前用流动相初始条件平衡 6 min; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 10 μL。对照品和样品色谱图见图 1。

2.1.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子化源(ESI); 采用多反应离子监测(MRM)进行负离子检测; 源喷射电压(IS)为-4 500 V; 雾化温度为 650 °C; 雾化气(GS1, N₂)压力为 275.8 KPa; 辅助气(GS2, N₂)压力为 344.75 KPa; 气帘气(N₂)压力为 172.375 KPa。接口加热, 全程通入氮气, MRM 模式定量。监测离子对, 解簇电压(DP)和碰撞能量(CE)见表 1。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 分别称取对照品连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 F、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、绿原酸、(+)-表松脂素-4'-O-

葡萄糖苷适量, 精密称定, 加甲醇制成对照品溶液。分别取各对照品溶液适量, 摇匀, 即得连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 F、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、绿原酸、(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷的混合对照品溶液, 质量浓度分别为 398.70、48.00、367.50、5.67、324.00、1.25、20.40、52.00、56.96 μg/mL。

2.2.2 供试品溶液的制备 将不同采收期的连翘叶自然晾干, 研细, 各精密称取 0.5 g, 置 50 mL 具塞三角瓶中, 精密加入 80%甲醇 25 mL, 称质量, 超声提取 45 min, 放冷, 再称定质量, 用 80%甲醇补足失质量, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、定量限和检测限 精密量取混合对照品溶液 300 μL, 加甲醇稀释至 1 mL。依次逐级稀释 2 倍, 定容, 制得 6 个不同浓度梯度的系列对照品溶液, 按“2.1”项下色谱和质谱条件进行分析, 记录峰面积。以对照品浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线并进行线性回归, 得标准曲线方程(表 2), 将混合对照品溶液逐步稀释, 分别以信噪比 S/N=10 和 S/N=3 时各对照品的量作为定量限(LOQ)和检测限(LOD), 结果见表 2。

2.3.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液各 10 μL, 连续进样 6 次, 记录色谱峰的峰面积。结果连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 F、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、绿原酸、(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷的 RSD 分别为 0.87%、1.02%、0.82%、0.69%、0.82%、0.54%、0.98%、1.24% 和 0.77%。

2.3.3 重复性试验 取同一采收期的连翘叶, 制备供试品溶液 6 份, 分别测定, 连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 F、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、绿原酸、(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷 6 次测定结果的 RSD 值分别为 1.14%、1.07%、0.96%、2.06%、1.78%、0.82%、1.34%、1.28% 和 0.91%, 均符合规定, 表明本方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液, 分别在室温下放置 0、4、8、12、18 和 24 h 时进行测定, 记录峰面积。结果连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 F、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、绿原酸、(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷的 RSD 分别为 0.95%、1.21%、1.09%、1.10%、0.73%、0.60%、1.33%、1.20% 和 0.88%, 表明供试品溶液室温条件下放置 24 h 稳定性良好。

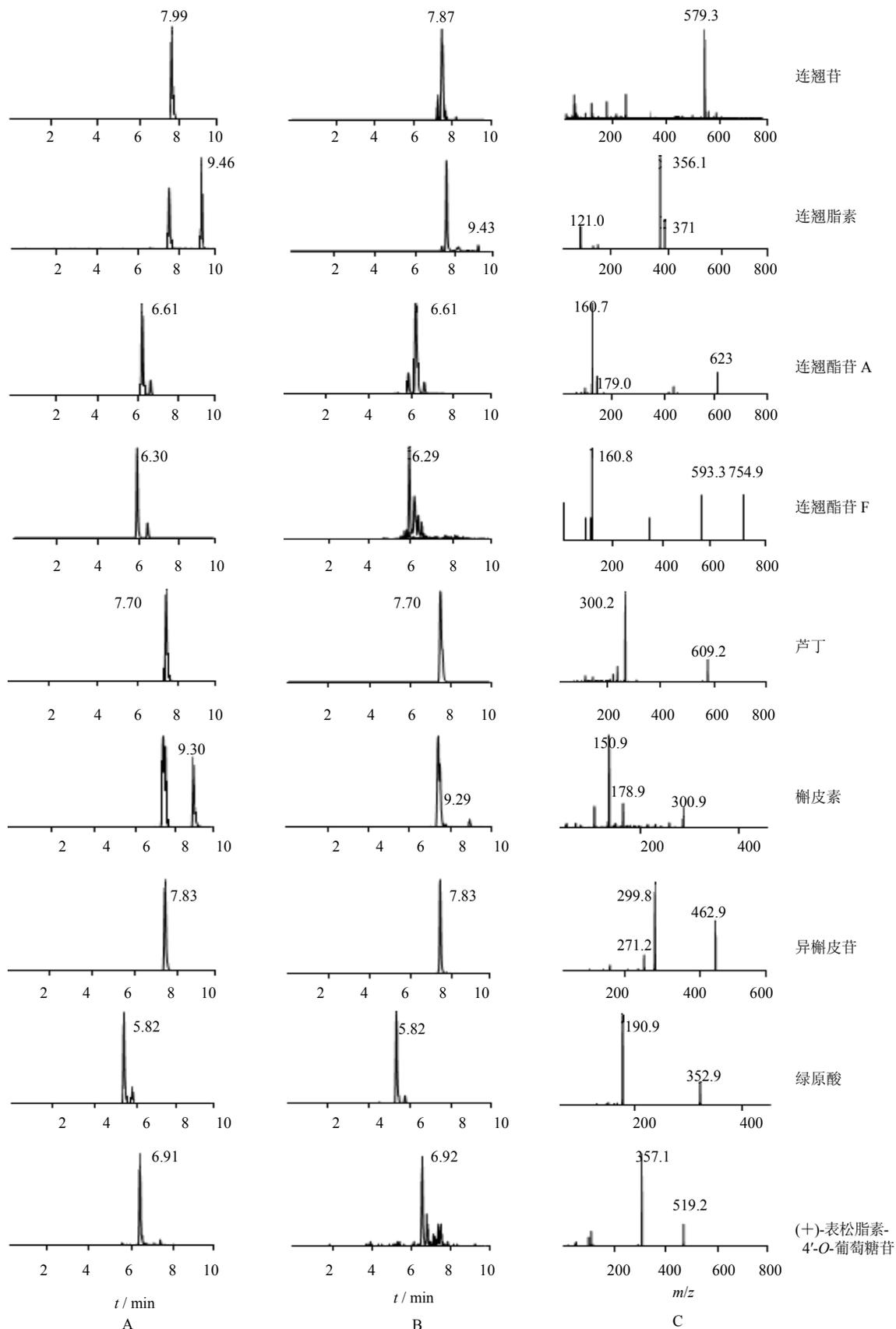


图 1 对照品 (A)、连翘叶 (B) 的多重反应监测色谱图和对照品二级质谱图(C)

Fig. 1 Multiple-reaction monitoring chromatograms of reference substances (A) and *Forsythia Folium* (B) and second mass spectrum of reference substances (C)

表 1 9 种成分的质谱数据

Table 1 HPLC-ESI-MSⁿ data of nine components

成分	保留时间 / min	MS ¹ / (m/z)	MS ² / (m/z)	DP / V	CE / eV
连翘苷	7.99	579.3	379.1	-38	-30
连翘脂素	9.46	371.3	356.2	-58	-30
连翘酯苷 A	6.61	623.3	161.0	-92	-54
连翘酯苷 F	6.30	755.3	160.8	-85	-60
芦丁	7.72	609.3	271.0	-71	-77
槲皮素	9.30	300.9	150.7	-55	-32
异槲皮苷	7.83	463.2	300.0	-72	-34
绿原酸	5.82	352.8	190.9	-31	-26
(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷	6.91	519.2	357.0	-59	-22

表 2 9 种成分的回归方程、相关系数和线性范围、定量限和检测限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, LOQs, and LODs of nine compounds

成分	标准曲线方程	<i>r</i>	线性范围 / (μg·mL ⁻¹)	LOQ / (ng·mL ⁻¹)	LOD / (ng·mL ⁻¹)
连翘苷	$Y=124.48 X+112.7.7$	0.999 6	3.788~119.6	7.576	3.788
连翘脂素	$Y=3\ 752.8 X-153.9.3$	0.999 8	0.456~14.40	4.560	1.824
连翘酯苷 A	$Y=112\ 092 X+375\ 253$	0.999 4	3.490~110.2	0.873	0.291
连翘酯苷 F	$Y=79\ 506 X-206.7.6$	0.999 5	0.054~1.701	1.080	0.432
芦丁	$Y=36\ 299 X+356.632$	0.999 6	3.078~97.20	0.770	0.257
槲皮素	$Y=313\ 174 X-253.62$	0.999 9	0.012~0.375	1.200	0.429
异槲皮苷	$Y=81\ 683 X+169.78$	0.999 8	0.194~6.120	0.969	0.323
绿原酸	$Y=35\ 852 X+612.4.2$	0.999 6	0.494~15.60	0.988	0.395
(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷	$Y=462.79 X+465.74$	0.999 6	1.082~17.09	1.800	0.720

2.3.5 加样回收率试验 精密称取已测定的连翘叶供试品 0.25 g, 分别精密加入高、中、低 3 个水平的对照品, 每个水平 3 份, 共 9 份, 按“2.2.2”项下方法操作, 制备供试品溶液, 测定 9 种化合物的峰面积, 计算回收率。连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷 A、连翘酯苷 F、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、绿原酸、(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷的平均加样回收率分别为 99.48%、99.26%、99.01%、98.98%、98.85%、99.81%、98.96%、98.47%、99.21%; RSD 分别为 1.20%、1.44%、1.44%、1.16%、1.24%、1.14%、0.84%、1.31%、0.97%。

2.4 样品测定

取各个采收期的连翘叶, 按“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下的条件进行测定, 记录色谱峰面积, 每个采收期样品测定 3 份, 将 9 个待测成分的峰面积代入相应的标准曲线方程中, 并计算其质量分数, 结果见表 3。

3 讨论

连翘叶的采集时间区间为 2011 年 5 月 1 日至 2011 年 11 月 15 日, 从连翘叶测定结果可以看出,

连翘苷、连翘酯苷 A 和芦丁在连翘叶中质量分数均较高, 连翘脂素、绿原酸和(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷质量分数相对较低, 这 6 种成分在连翘叶中的量随时间变化波动较大, 但基本符合 5 月份质量分数最高, 6、7 月份量有所下降, 在 8、9、10 月份最低, 11 月份又有所回升。其他成分连翘酯苷 F、异槲皮苷和槲皮素的量较低, 其质量分数随时间变化不大, 异槲皮素在 5 月的量较其他月份高, 连翘酯苷 F 和槲皮素 5 月份的量为中等水平。连翘花期在 3~5 月份, 每年 4~5 月份萌发生长新枝叶, 连翘叶中主要成分在这段时间量最高, 且符合叶类药材的一般采收规律; 果期 7~8 月份, 在 9~10 月份采摘的近成熟果实为“青翘”, 10 月份打落的成熟果实为“老翘”, 连翘叶中的有效成分较低。因此, 本实验测定结果与连翘的生长周期一致。综上所述, 连翘叶的最佳采收期以 5 月份最佳, 这也说明民间采集连翘叶嫩芽作为保健茶是有一定的科学依据。另外, 为避免较早采收叶子可能对果实造成的不利影响, 建议在采收连翘果实之后再采收连翘叶, 可以在 11 月份活性成分开始回升时采收连翘叶, 以

表3 不同采收期连翘叶中9种成分的质量分数

Table 3 Contents of nine compounds in *Forsythia Folium* collected in different periods

采收时间	质量分数 / %								
	连翘苷	连翘脂素	连翘酯苷 A	连翘酯苷 F	芦丁	槲皮素	异槲皮苷	绿原酸	(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷
05-01	2.110 6	0.062 1	2.252 5	0.003 0	1.743 7	0.000 4	0.030 2	0.173 1	0.162 0
05-15	1.949 5	0.033 3	2.092 1	0.003 1	1.253 2	0.000 2	0.011 1	0.137 0	0.140 5
06-01	1.397 3	0.027 6	2.079 3	0.001 8	1.162 7	0.000 2	0.009 9	0.084 7	0.126 6
06-15	1.228 5	0.050 1	2.186 0	0.003 2	1.355 4	0.000 3	0.017 4	0.091 4	0.113 3
07-01	0.999 5	0.036 8	2.116 2	0.003 0	1.220 3	0.000 4	0.010 3	0.077 3	0.119 0
07-15	1.301 9	0.041 5	2.180 1	0.003 2	1.194 0	0.000 4	0.010 2	0.088 6	0.139 1
08-01	0.728 6	0.055 7	1.451 9	0.002 4	1.124 0	0.000 3	0.007 3	0.069 6	0.111 2
08-15	0.440 8	0.028 4	1.823 7	0.002 3	0.869 3	0.000 3	0.003 5	0.054 9	0.035 7
09-01	0.715 7	0.028 0	1.443 7	0.001 6	0.816 9	0.000 9	0.008 9	0.045 6	0.066 6
09-15	0.282 1	0.000 0	1.582 0	0.003 7	0.933 7	0.000 3	0.006 5	0.066 6	0.051 1
10-01	0.162 6	0.000 0	1.463 6	0.003 7	1.062 9	0.000 3	0.009 2	0.030 1	0.103 9
10-15	0.323 0	0.000 0	1.594 4	0.003 9	0.955 9	0.000 3	0.020 7	0.015 7	0.072 5
11-01	0.447 7	0.000 0	1.634 0	0.002 3	1.240 3	0.000 5	0.025 3	0.041 3	0.112 5
11-15	0.907 5	0.024 8	1.792 8	0.002 8	1.291 1	0.000 5	0.025 3	0.086 6	0.123 8

充分利用药用资源。本实验的连翘叶材料均选用2011年样品,并且来自同一植株,生长地点、环境相同,避免了由于来源不同而导致的测定误差,可以较好的保证结果的可信性。

分别考察了流动相中加入3种不同的电解质甲酸、乙酸以及醋酸铵对化合物响应值的影响,发现加入甲酸后响应值和峰形优于乙酸和醋酸铵。对甲酸的比例进一步考察,发现0.02%甲酸能够达到最佳的分离效果和稳定的响应值,故以甲醇和0.02%甲酸水作为流动相梯度洗脱,9种被分析物在10min内全部出峰。

本研究采用HPLC-MS/MS方法对连翘叶的9个主要成分进行同时测定,方法快速、准确,并对结果进行了分析,为连翘叶最佳采收期的确定提供了科学依据和新的分析方法。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
 [2] 段文娟, 耿岩玲, 祝 贺, 等. 中药连翘化学成分和分析方法的研究进展 [J]. 山东科学, 2010, 23(2): 33-37.
 [3] 栾 兰, 王钢力, 林瑞超. 连翘水提物化学成分研究

[J]. 中草药, 2010, 41(6): 883-884.
 [4] Cui Y, Wang Q, Zhang L T, et al. Simultaneous quantification of 14 bioactive constituents in *Forsythia Suspensa* by liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 2010, 21: 253-260.
 [5] 陈 玲, 李 晓, 李 倩, 等. 连翘属植物化学成分的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 441-445.
 [6] 刘新义, 肖 娟, 张水寒, 等. 基于指纹图谱技术探索不同粒径连翘粉体中化学成分溶出规律 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(6): 439-442.
 [7] 王晓燕, 常断玲. 连翘叶和连翘果提取物指纹图谱比较研究 [J]. 齐鲁药事, 2011, 30(10): 574-575.
 [8] 杨建雄, 刘 静. 连翘叶茶保肝作用的实验研究 [J]. 陕西师范大学学报, 2005, 33(3): 82-85.
 [9] 侯改霞, 杨建雄. 连翘叶茶提取物对力竭运动及恢复期小鼠心肌抗氧化酶和 LDH 同工酶活性的影响 [J]. 中国运动医学杂志, 2006, 25(1): 90-92.
 [10] 牛新华, 邱世翠, 邸大琳, 等. 连翘体外抑菌作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2002, 13(6): 342-343.
 [11] 杨建雄, 杨 晨, 邱 娟, 等. 连翘叶黄酮的体外抗氧化作用 [J]. 天然产物研究与开发, 2007, 19: 97-100.
 [12] 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): 65-67.