

HPLC-ESI-MS/MS 法测定连翘心中的 8 种化学成分

张巧月¹, 刘艳艳¹, 万昶宸¹, 付正良², 王丽芳², 张兰桐^{1*}

1. 河北医科大学药学院 药物分析教研室, 河北 石家庄 050017
2. 涉县中医院, 河北 邯郸 056400

摘要: **目的** 建立 HPLC-ESI-MS/MS 法同时测定连翘心中连翘酯苷 A、连翘苷、连翘脂素、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、阿魏酸和橙皮苷的量。**方法** 色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%甲酸水, 梯度洗脱, 体积流量 800 μL/min, 进样量 10 μL; 质谱采用电喷雾离子源 (ESI 源), 负离子模式监测, 源喷射电压-4 500 V, 离子源温度 650 °C, 定量分析采用多反应监测模式 (MRM)。**结果** 连翘心中 8 种成分在线性范围内峰面积与质量浓度均呈良好的线性关系, 加样回收率为 98.1%~101.8%, 精密度 RSD 值小于 0.84%。连翘酯苷 A、连翘苷、连翘脂素和芦丁的量较高, 平均质量分数分别为 1 609.78、80.08、86.64 和 373.86 μg/g, 槲皮素、异槲皮苷、阿魏酸和橙皮苷的量较低。**结论** 该法灵敏度高、专属性好、结果可靠, 适用于连翘心中多组分的测定。

关键词: 连翘心; 液质联用; 连翘酯苷 A; 连翘苷; 连翘脂素; 芦丁; 槲皮素; 异槲皮苷; 阿魏酸; 橙皮苷

中图分类号: R286.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)01-0192-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.027

Simultaneous quantification of eight constituents in the seed of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl by HPLC-MS/MS method

ZHANG Qiao-yue¹, LIU Yan-yan¹, WANG Chang-chen¹, FU Zheng-liang², WANG Li-fang², ZHANG Lan-tong¹

1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China
2. Shexian Traditional Chinese Medicine Hospital, Handan 056400, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of forsythoside A, phillyrin, forsythiaside, rutin, quercetin, isoquercitrin, ferulic acid, and hesperidin in the seed of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl. **Methods** Chromatographic separation was performed on a Diamonsil C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with linear gradient elution of methanol and 0.1% formic acid at a flow rate of 800 μL/min, and the injection volume was 10 μL. Multiple-reaction monitoring (MRM) was employed 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 °C. **Results** All calibration curves showed good linearity within the test ranges. The average recoveries of the compounds ranged from 98.1% to 101.8%. The precisions (RSD) for the investigated components were less than 0.84%. The contents of forsythoside A, phillyrin, forsythiaside and rutin are higher than quercetin, isoquercitrin, ferulic acid and hesperidin. And the average contents of forsythoside A, phillyrin, forsythiaside and rutin are 1 609.78, 80.08, 86.64 and 373.86 μg/g, respectively. **Conclusion** An efficient, rapid, and sensitive method is first established for the qualification and quantification of eight major components in the seed of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl. The satisfactory results demonstrate that the method could be applied as a reliable quality control method for the seed of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl.

Key words: the seed of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl; HPLC-MS/MS; forsythoside A; phillyrin; forsythiaside; rutin; quercetin; isoquercitrin; ferulic acid; hesperidin

连翘心为木犀科植物连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥成熟种子^[1-2], 主产于我国河南、山西、陕西、山东等地^[3]。连翘心长于清心热, 用于治疗邪陷心包、神昏谵语等症^[4]。连翘心主要含有苯乙醇及其苷类、木脂素及其苷类、五环三萜类、黄酮

类、挥发油类等化合物, 药理研究认为其具有抗菌、抗炎、止呃逆、抗肝损伤、抑制磷酸二酯酶、抗病毒、降血压等作用^[5]。但连翘药材常去心使用, 连翘心也尚未被《中国药典》收录, 为了更好地继承和发扬祖国医药遗产, 有必要对连翘心进行进一步地研究, 为

收稿日期: 2016-07-12

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 (H2012206079)

作者简介: 张巧月 (1990—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为中药质量控制与药动学研究。Tel: 15233656827 E-mail: 694910334@qq.com

*通信作者 张兰桐 (1955—), 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为中药质量控制与药动学研究。

Tel: (0311)86266419 E-mail: zhanglantong@263.net

其综合开发和利用提供科学依据。

中药化学成分复杂，发挥治病作用的有效成分较多，检测单一成分对药材的质量控制、评价不够充分^[6]。目前，灵敏度高、专属性好的液质联用法已广泛应用于连翘药材的测定^[7-10]，但对连翘心的研究却鲜有报道。本研究首次建立 HPLC-ESI-MS/MS 法同时测定连翘心药材中 8 种化学成分，并将其应用于 12 批不同来源的连翘心的质量分析，为连翘心药材的质量控制及开发应用提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 试剂

对照品连翘酯苷 A (批号 111810-201102)、连翘苷 (批号 110821-201213)、芦丁 (批号 100080-201408)、槲皮素 (批号 100081-200907)、阿魏酸 (批号 110773-201313) 均购自中国食品药品检定研究院；对照品连翘脂素 (批号 20120925) 购自上海源叶生物科技有限公司；对照品橙皮苷 (批号 FY11290618) 购自南通飞宇生物技术股份有限公司，对照品异槲皮苷 (批号 ZL54745YHP) 购自南京泽朗植提有限公司，质量分数均大于 98%。

甲醇为色谱纯，购于美国 J. T. Baker 公司；水为纯净水，购于杭州娃哈哈集团有限公司；甲酸为色谱纯购于美国 Dikma 公司；其他试剂均为分析纯。连翘心取自不同产地连翘 *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl 的干燥成熟种子，并由涉县中医院付正良主任中医师鉴定。不同产地样品来源见表 1。

1.2 仪器

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)；3200QTRAPTM 质谱仪，含三重四极杆线性离子阱

串联质量分析器，TurboV 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)；XW80A 型涡旋混合器 (上海医科大学仪器厂)，BP211D 型十万分之一天平 (德国 Sartorius 公司)。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)，流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 甲醇 (B)，梯度洗脱 (0~5 min, 55%~95% B; 5~8 min, 95%~95% B)，进样前按流动相初始条件平衡 6 min；体积流量 800 μL/min；进样量 10 μL。对照品和样品的色谱图见图 1。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子化源 (ESI)；定量分析采用多反应离子监测 (MRM)；检测模式为负离子；源喷射电压 (IS) -4 500 V；雾化温度 650 °C；雾化气 (GS1, N₂) 压力 413.70 kPa；辅助气 (GS2, N₂) 压力 448.18 kPa；气帘气 (N₂) 压力 206.85 kPa。接口加热，全程通入氮气。监测离子对，解簇电压 (DP) 和碰撞能量 (CE) 见表 2。8 种被测成分的二级质谱图见图 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酯苷 A、连翘苷、连翘脂素、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、阿魏酸和橙皮苷适量，精密称定，加 80% 甲醇制成对照品溶液。分别量取各对照品溶液适量，加 80% 甲醇适量，摇匀，即得连翘酯苷 A、连翘苷、连翘脂素、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、阿魏酸和橙皮苷的混合对照品溶液，质量浓度分别为 2.268 × 10³、221.6、207.9、630.0、31.350、9.450、2.375、0.375 μg/mL。

2.2.2 供试品溶液的制备 取连翘心粉末 (过 5 号筛) 约 0.5 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入 80% 甲醇 25 mL，密塞，称定质量，冰浴超声 (功率 250 W，频率 40 kHz) 45 min，放冷，再称定质量，用 80% 甲醇补足减失的质量，摇匀，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，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“2.2.1”项下混合对照品溶液适量，采用倍数稀释法分别稀释，按照上述色谱和质谱条件进行分析，记

表 1 连翘心样品

Table 1 The seed of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl samples

样品编号	代码	来源
1	邯鄹-1	邯鄹涉县偏城镇窑门口村
2	邯鄹-2	邯鄹涉县偏城镇窑门口村
3	邯鄹-3	邯鄹涉县偏城镇桑栈村
4	邯鄹-4	邯鄹涉县偏城镇桑栈村
5	邯鄹-5	邯鄹涉县偏城镇桑栈村
6	邯鄹-6	邯鄹涉县偏城镇桑栈村
7	邯鄹-7	邯鄹涉县辽城乡西泉村
8	邯鄹-8	邯鄹涉县晁兑铺
9	邯鄹-9	邯鄹涉县太行山药材实业有限公司
10	河南	河南南阳
11	山西-1	山西
12	山西-2	山西

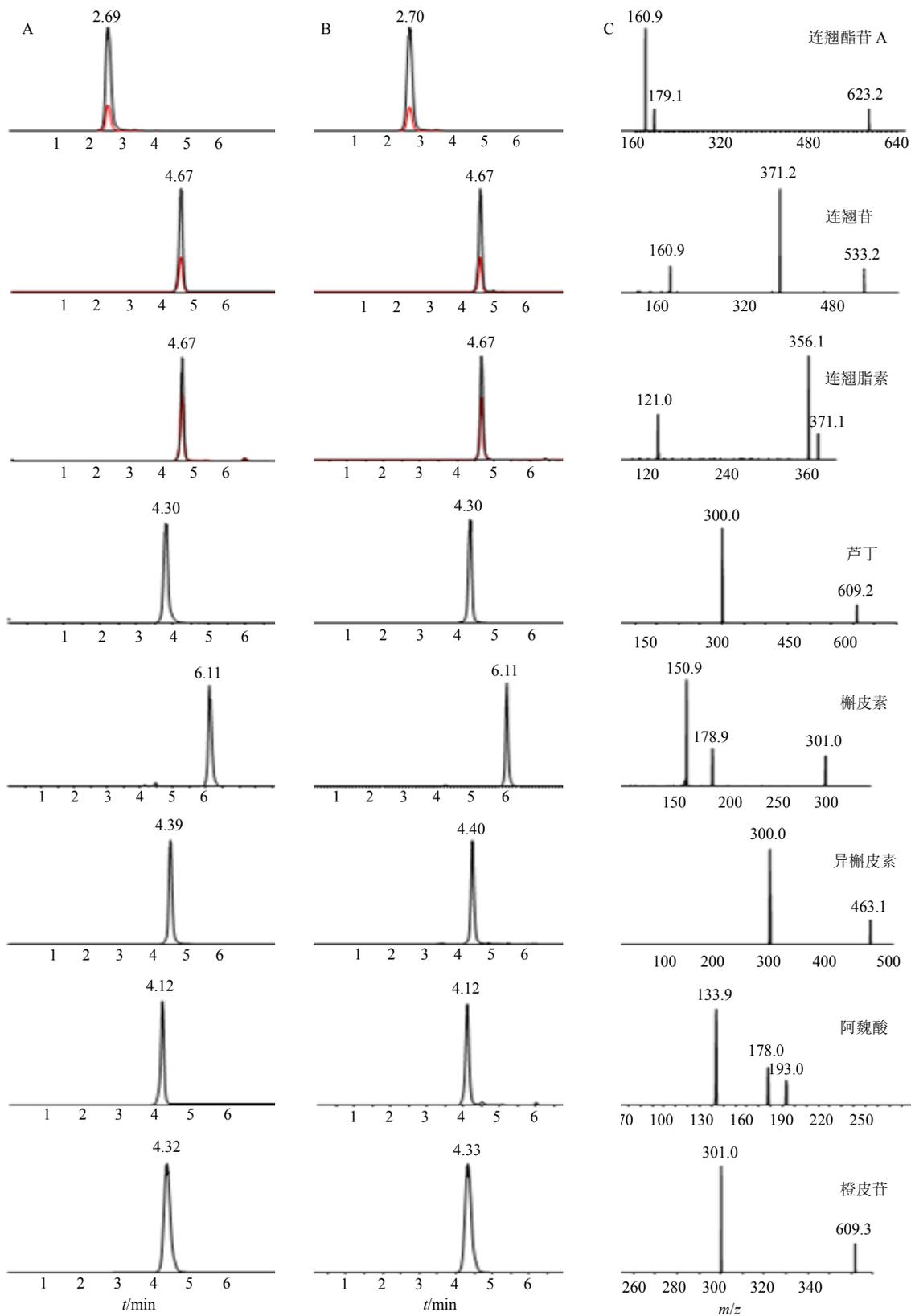


图 1 对照品 (A)、连翘心样品 (B) 的多重反应监测色谱图 and 对照品二级质谱图 (C)

Fig. 1 Multiple-reaction monitoring chromatograms of reference substances (A) and the seed of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl samples(B) and second mass spectrum of reference substances (C)

录色谱峰面积。以对照品的质量浓度 (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。将混合对照品溶液逐步稀释并进行测定, 分别以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 时各对照品的量作

为检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。结果 8 种待测组分的质量浓度和峰面积的 r 均大于 0.996 0, 表明该方法的线性关系良好, 各组分的回归方程、线性范围、检测限和定量限见表 3。

表 2 连翘心中 8 种成分的质谱数据

Table 2 HPLC-ESI-MSⁿ data of eight components from the seed of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl

成分	相对分子质量	t_R /min	MS ₁ (m/z)	MS ₂ (m/z)	DP/V	CE/eV
连翘酯苷 A	624.59	2.69	623.2	160.9	-85	-50
连翘苷	534.56	4.67	533.2	371.2	-22	-22
连翘脂素	608.54	4.67	371.1	356.1	-57	-26
芦丁	610.51	4.30	609.2	300.0	-89	-50
槲皮素	302.23	6.11	301.0	150.9	-57	-30
异槲皮苷	464.38	4.39	463.1	300.0	-79	-36
阿魏酸	194.19	4.12	193.0	133.9	-27	-24
橙皮苷	610.56	4.32	609.3	301.0	-66	-35

表 3 8 种成分的回归方程、相关系数、线性范围、LOD 和 LOQ

Table 3 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, LOD, and LOQ of eight compounds

成分	标准曲线方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOD/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	LOQ/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
连翘酯苷 A	$Y=68\ 568 X+5\times 10^7$	0.998 1	70.875~2 268	35.438	94.500
连翘苷	$Y=699.29 X+12\ 758$	0.997 8	6.927~221.6	346.328	692.656
连翘脂素	$Y=6\ 106.7 X+87\ 386$	0.996 1	6.497~207.9	32.484	64.969
芦丁	$Y=70\ 561 X+9\times 10^6$	0.996 5	19.688~630.0	19.688	39.375
槲皮素	$Y=584\ 408 X+2\times 10^6$	0.999 1	0.980~31.350	1.959	4.898
异槲皮苷	$Y=271\ 578 X+266\ 562$	0.996 0	0.295~9.450	0.591	2.953
阿魏酸	$Y=51\ 240 X+19\ 269$	0.996 1	0.074~2.375	1.484	3.711
橙皮苷	$Y=6\times 10^6 X+357\ 139$	0.996 3	0.012~0.375	0.059	0.117

2.3.2 精密度试验 精密吸取同一混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果显示精密度 RSD 值均小于 0.84%, 表明该方法精密度良好。

2.3.3 重复性试验 取同一批号连翘心样品 (邯鄯-3) 约 0.5 g, 精密称取 6 份, 按“2.2.2”项下操作, 制备供试品溶液, 在“2.1”项分析条件下记录 8 种化合物的峰面积, 计算质量分数的 RSD 值, 考察样品稳定性, 结果 8 种化合物的 RSD 值均小于 1.89%, 说明本方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液 (邯鄯-3), 分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样分析测定, 记录峰面积, 考察供试品溶液的稳定性。结果表明所有被测物峰面积的 RSD < 1.84%, 符合规定, 表明样品稳定性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取已测定的连翘心样品 (邯鄯-3) 0.25 g, 分别精密加入高、中、低 3

个水平的对照品溶液, 每个水平 3 份, 共 9 份, 按“2.2.2”项下操作, 制备供试品溶液。在“2.1”项分析条件下测定 8 个化合物的峰面积, 计算回收率及 RSD 值。结果 8 种被测成分的平均回收率范围为 98.1%~101.8%, RSD 为 0.14%~1.06%, 符合规定。

2.4 样品测定

取 12 批的连翘心样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下分析条件进行测定, 记录峰面积, 并将 8 个待测成分的峰面积代入相应的回归方程中, 计算其质量分数。不同批次的连翘心测定结果见表 4。

连翘心中连翘酯苷 A、连翘苷、连翘脂素和芦丁的量较高, 平均质量分数分别为 1 609.78、80.08、86.64 和 373.86 $\mu\text{g/g}$, 槲皮素、异槲皮苷、阿魏酸和橙皮苷的量较低。不同批次间 8 种成分的量有一定变化, 波动最大的是槲皮素、芦丁和连翘苷, 最

表 4 连翘心中 8 种成分的测定结果

Table 4 Contents of eight active components in the seed of *Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl

编号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)							
	连翘酯苷 A	连翘苷	连翘脂素	芦丁	槲皮素	异槲皮苷	阿魏酸	橙皮苷
1	1 458.26	57.03	48.01	379.78	1.95	2.01	2.02	0.24
2	1 952.51	120.42	103.93	546.55	1.98	1.61	1.81	0.35
3	1 720.82	190.30	183.92	555.51	0.21	1.81	0.79	0.31
4	1 632.93	195.12	179.62	467.54	0.56	1.48	0.52	0.37
5	1 633.12	61.60	54.56	447.76	3.08	0.86	1.61	0.26
6	1 515.50	52.99	48.31	322.86	2.26	0.58	1.30	0.23
7	1 515.47	46.70	100.66	461.62	1.06	0.54	2.53	0.33
8	1 924.27	91.09	109.77	386.68	1.32	1.45	1.05	0.24
9	1 807.99	68.17	60.45	461.90	2.60	0.89	1.47	0.37
10	1 690.50	23.84	43.40	152.95	0.27	0.84	1.30	0.10
11	979.01	26.98	50.58	53.80	0.08	0.94	0.16	0.05
12	1 486.92	26.71	56.51	249.32	0.64	0.50	0.59	0.10

高值与最低值之比依次为 38、10 和 7 倍,波动最小的为连翘酯苷 A,仅为 2 倍。综合考虑,第 11 批药材有效成分普遍偏低,第 2 批和第 3 批药材中有效成分含量较高。分析结果表明样品来源、生长环境、采摘时间以及贮存条件等因素都会引起各成分量的显著性差异。因此,快速、准确地测定药材中有效成分的量,对中药材质量控制及市场监管意义重大。

3 讨论

有效成分的量会对药材的药效产生重要影响,本研究首次建立了一种快速、灵敏、准确的 HPLC-MS/MS 分析方法,同时测定连翘心中 8 种化合物(连翘酯苷 A、连翘苷、连翘脂素、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、阿魏酸和橙皮苷)的量,并成功检测了 12 批连翘心样品,为连翘心药材的质量控制提供依据,指导中医临床用药的合理化。

提取媒介考察中,分别用 50%、80%、100% 甲醇,50%、80%、100% 乙醇提取供试品结果,表明以 80% 甲醇提取时效率较高。之后比较了超声提取及加热回流提取的效果,2 种方式提取率相近,但由于超声提取相对方便快捷,因此选择超声提取法。此外,还考察了提取时间对提取效果的影响,结果表明超声 45 min,提取效率较高。

流动相考察中,分别以甲醇-水、乙腈-水作为流动相进行梯度洗脱,结果表明以甲醇-水为流动相时 8 种待测物均有很好的分离。为改善峰形,比较了加入不同比例甲酸和乙酸对分离效果的影响,结

果表明流动相为甲醇-0.1% 甲酸水时峰形较好。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 河北省革命委员会卫生局,河北省革命委员会商业局. 河北中草药 [M]. 石家庄:河北人民出版社,1977.
- [3] 吴艳芳,王新胜,袁永亮,等. 连翘化学成分研究 [J]. 中草药,2013,44(15): 2052-2054.
- [4] 江苏新医学院. 中药大辞典 [M]. 上海:上海人民出版社,1977.
- [5] 冯雪. 连翘籽化学成分的研究 [D]. 大连:辽宁中医药大学,2008.
- [6] 杨立功,郑晓珂,张艳丽,等. 高效液相色谱法测定连翘中连翘苷、芦丁和槲皮素的含量 [J]. 中国药学杂志,2011,46(22): 1756-1758.
- [7] Ni Y, Zhuang H, Kokot S. A high performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry method for the analysis of the natural medicine, *Forsythia Suspense* [J]. *Anal Lett*, 2014, 47(1): 102-116.
- [8] Su W, Liu Q, Yang Q, et al. Separation of four compounds from *Forsythia Suspensa* by counter-current chromatography with stepwise elution [J]. *Sep Sci Technol*, 2014, 49(13): 2098-2104.
- [9] 支旭然,苑霖,生宁,等. HPLC-MS/MS 法测定不同采收期连翘叶中 9 种成分 [J]. 中草药,2013,44(22): 3231-3235.
- [10] Cui Y, Wang Q, Zhang L T, et al. Simultaneous quantification of 14 bioactive constituents in *Forsythia Suspense* by chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry [J]. *Phytochem Anal*, 2010, 21(16): 253-260.