

## UPLC-MS/MS 同时测定金牡感冒片中 15 个成分\*

黄秋妹<sup>1</sup>, 许舒瑜<sup>2</sup>, 邵艳妮<sup>2</sup>, 沈少君<sup>2</sup>, 郭慧婷<sup>2</sup>, 黄鸣清<sup>2\*\*</sup>

(1. 广东食品药品职业学院, 广州 510520; 2. 福建中医药大学药学院, 福州 350122)

**摘要 目的:** 建立超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC-MS/MS 法) 同时测定金牡感冒片中 15 个化学成分 (新绿原酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、隐绿原酸、獐牙菜苷、夏佛塔苷、穗花牡荆苷、异夏佛塔苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C) 的含量。**方法:** 采用 UPLC-MS/MS 法, 正负离子切换的多反应监测 (MRM) 模式进行含量测定。色谱条件: 使用 CORTECS UPLC C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水 - 乙腈, 梯度洗脱, 流速为 0.25 mL · min<sup>-1</sup>。**结果:** 15 个成分在各自考察的浓度范围内线性关系良好, 相关系数 (*r*) 均大于 0.994 0; 加样回收率在 96.8%~104.5%, RSD 为 3.8%~4.6%; 12 批样品中新绿原酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、隐绿原酸、獐牙菜苷、夏佛塔苷、穗花牡荆苷、异夏佛塔苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆苷、木犀草苷、异绿原酸 A、B、C 的含量分别为 0.300~0.630、0.013~0.031、0.053~0.133、2.319~4.290、0.442~0.792、0.345~0.715、0.476~0.945、0.164~0.283、0.068~0.162、0.004~0.006、0.006~0.013、0.064~0.100、0.974~1.682、0.423~0.690、0.799~1.636 mg · g<sup>-1</sup>。**结论:** 本研究所建立的 UPLC-MS/MS 定量分析方法可作为金牡感冒片中 15 个成分同时测定的方法。

**关键词:** 金牡感冒片; 新绿原酸; 原儿茶酸; 对羟基苯甲酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 獐牙菜苷; 夏佛塔苷; 穗花牡荆苷; 异夏佛塔苷; 牡荆素鼠李糖苷; 牡荆苷; 木犀草苷; 异绿原酸; 黄酮; 酚酸; 环烯醚萜苷; 含量测定; 超高效液相色谱串联质谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 08-1453-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.08.14

## Simultaneous determination of fifteen components in Jinmu Ganmao tablets by UPLC-MS/MS\*

HUANG Qiu-mei<sup>1</sup>, XU Shu-yu<sup>2</sup>, TAI Yan-ni<sup>2</sup>, SHEN Shao-jun<sup>2</sup>,  
GUO Hui-ting<sup>2</sup>, HUANG Ming-qing<sup>2\*\*</sup>

(1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China;

2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**Abstract Objective:** To establish an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of 15 components (neochlorogenic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenin acid, sweroside, schaftoside,

\* 福建省教育厅高校新世纪优秀人才支持计划 (闽教科 (2015) 54 号); 福建省大学生创新创业训练项目 (201610393010)

\*\* 通信作者 Tel: (0591) 22861135; E-mail: hmq1115@126.com

第一作者 Tel: (020) 28854884; E-mail: huang1596@163.com

agnuside, isoschaftoside, vitexin-2-*O*-rhamnoside, vitexin, luteolin, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid A and isochlorogenic acid C) in Jinmu Ganmao tablets. **Methods:** The separation was performed on a CORTECS UPLC C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm). Acetonitrile and water (containing 0.1% formic acid) were adopted as the mobile phase by gradient elution at a flow rate of 0.25 mL · min<sup>-1</sup>. MS detection was performed with multiple reaction monitoring mode. **Results:** The developed method showed good linearity ( $r > 0.9940$ ) for all the analytes within the test ranges. The overall average recovery rates were in the range of 96.8%–104.5% with RSD of 3.8%–4.6%. The contents of neochlorogenic acid, protocatechuic acid, 4-hydroxybenzoic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, sweroside, schaftoside, agnuside, isoschaftoside, vitexin-2-*O*-rhamnoside, vitexin, luteolin, isochlorogenic acid A, B and C in twelve samples were 0.300–0.630 mg · g<sup>-1</sup>, 0.013–0.031 mg · g<sup>-1</sup>, 0.053–0.133 mg · g<sup>-1</sup>, 2.319–4.290 mg · g<sup>-1</sup>, 0.442–0.792 mg · g<sup>-1</sup>, 0.345–0.715 mg · g<sup>-1</sup>, 0.476–0.945 mg · g<sup>-1</sup>, 0.164–0.283 mg · g<sup>-1</sup>, 0.068–0.162 mg · g<sup>-1</sup>, 0.004–0.006 mg · g<sup>-1</sup>, 0.006–0.013 mg · g<sup>-1</sup>, 0.064–0.100 mg · g<sup>-1</sup>, 0.974–1.682 mg · g<sup>-1</sup>, 0.423–0.690 mg · g<sup>-1</sup> and 0.799–1.636 mg · g<sup>-1</sup>, respectively. **Conclusion:** The UPLC-MS/MS method could be used for the quality control of Jinmu Ganmao tablets.

**Key words:** Jinmu Ganmao tablets; neochlorogenic acid; protocatechuic acid; 4-hydroxybenzoic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; sweroside; schaftoside; agnuside; isoschaftoside; vitexin-2-*O*-rhamnoside; vitexin; luteolin; isochlorogenic acid; flavonoids; phenolic acids; iridoid glycosides; quantitative analysis; UPLC-MS/MS

金牡感冒片由金银花、牡荆根、贯众、葫芦茶、三叉苦、山甘草、薄荷油共7味中药组成,具有疏风解表、清热解毒之功效,临床上用于外感风热、发热恶寒、头痛咳嗽和咽喉肿痛<sup>[1]</sup>。目前,金牡感冒片的含量测定主要是采用HPLC法测定绿原酸等成分的含量<sup>[2-3]</sup>,测定指标较单一,难以对金牡感冒片进行综合评价。课题组前期采用HPLC-DAD-Q-TOF-MS对金牡感冒片化学成分进行鉴定研究<sup>[4]</sup>,表明该复方中含有黄酮、酚酸及环烯醚萜苷三大类成分,其中酚酸类有效活性成分主要包括绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸B、异绿原酸A、异绿原酸C、原儿茶酸、对羟基苯甲酸;黄酮类有效成分主要包括木犀草苷、夏佛塔苷、异夏佛塔苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆苷;环烯醚萜苷类则主要是獐牙菜苷和穗花牡荆苷。据报道<sup>[5-10]</sup>,黄酮、酚酸及环烯醚萜类化合物为金银花的主要药效成分;黄酮类化合物牡荆苷为牡荆根的主要活性成分。基于此,为了对金牡感冒片进行更为全面的质量评价,本研究将针对上述15个主要活性成分进行定量研究。

查阅文献,中药复方多成分含量测定采用HPLC法往往分析时间过长<sup>[11-12]</sup>,甚至需要1h以上。随着近年来分析技术、分析仪器的发展而产生的超高效液相色谱(UPLC)与传统的HPLC相比,极大地改善了色谱分离度,缩短了分析时间,同时将UPLC与MS

联用,更提高了该技术的分析灵敏度及精确度<sup>[13-15]</sup>。因此,本研究建立UPLC-MS/MS法同时对金牡感冒片中绿原酸、原儿茶酸、异绿原酸A、B、C等15个成分的定量分析,为金牡感冒片的质量控制提供了一种分析速度快、选择性强、灵敏度高、准确度高的检测方法。

## 1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪(Waters公司);Xevo TQMS 三重四极杆质谱(Waters公司);Waters Cortecs UPLC C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶;Waters公司);CAP225D 型十万分之一分析天平(Sartorius公司);KQ-500E 台式超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

乙腈、甲醇均为色谱纯,Mili-Q 超纯水。

新绿原酸(批号SH906332)、原儿茶酸(批号SH99503)、对羟基苯甲酸(批号SH99967)、绿原酸(批号SH327979)、隐绿原酸(批号SH905997)、木犀草苷(批号5373115)、芍药内酯苷(批号SH39011900)、甘草苷(批号SH551155)和2-羟基肉桂酸(批号SH614608)购自北京赛百草科技有限公司;獐牙菜苷(批号A0392)、夏佛塔苷(批号A0792)、穗花牡荆苷(批号A6810)购自成都曼思特生物科技有限公司;异绿原酸A、B、C(批号分别为E-0449、E-0450、E-0451)购自上海同田生物技术股份有限公司;异夏佛塔苷(批号B21563)、牡荆素鼠

李糖苷(批号 B20878)、牡荆苷(批号 B20875)购自上海源叶生物科技有限公司,所有对照品质量分数均 ≥ 98%。12 批金牡感冒片样品均来自漳州片仔癀药业股份有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱-质谱条件

**2.1.1 色谱条件** 采用 Waters Cortecs UPLC C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm),柱温 45 °C;以乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~2 min, 5%A; 2~4 min, 5%A → 10%A; 4~6 min, 10%A → 16%A; 6~8 min, 16%A → 23%A; 8~8.5 min, 23%A → 58%A; 8.5~9.5 min, 58%A → 90%A; 9.5~10 min, 90%A → 5%A; 10~12 min, 5%A),流速为 0.25 mL · min<sup>-1</sup>;进样量为 2 μL。

**2.1.2 质谱条件** 采用正负切换的质谱多反应监测模式(MRM),正离子模式毛细管电压 3.0 kV,负离子模式毛细管电压 2.5 kV;脱溶剂气流 N<sub>2</sub> 800 L · h<sup>-1</sup>,脱溶剂温度 500 °C,锥孔气流 N<sub>2</sub> 50 L · h<sup>-1</sup>,氩气作为碰撞气体;氮气为载气;离子源温度 150 °C;停留时间 5 ms。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照品储备液及内标储备液** 取新绿原酸、原

儿茶酸、对羟基苯甲酸、绿原酸、隐绿原酸、獐牙菜苷、夏佛塔苷、穗花牡荆苷、异夏佛塔苷、牡荆素鼠李糖苷、牡荆苷、木犀草苷、异绿原酸 B、异绿原酸 A、异绿原酸 C 的对照品适量,精密称定,分别加 70% 甲醇水溶液溶解并制备成质量浓度均为 1 mg · mL<sup>-1</sup> 的单一对照品储备液。以同样的方法制备甘草苷、芍药内酯苷、2-羟基肉桂酸 3 种内标储备液,质量浓度分别为 0.32、0.25、0.81 μg · mL<sup>-1</sup>。

**2.2.2 供试品溶液** 取金牡感冒片磨细并混合均匀,取 0.20 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 70% 甲醇水溶液 100 mL,密塞,称量,超声处理(频率 40 kHz,功率 500 W)30 min,放冷,再称量,用 70% 甲醇水溶液补足减失的量,摇匀,提取液于 15 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液按 1:1(500 μL:500 μL)加入内标储备液,摇匀,0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液进行测定。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 质谱测定方法** 采用正负切换的多反应监测模式(MRM),15 个成分及内标的质谱分析条件参数见表 1,金牡感冒片和混合对照品在“2.1”项色谱和质谱条件下分析得到 UPLC-MS/MS 色谱图,见图 1。15 个成分及内标均分离度良好,符合定量分析要求。

表 1 15 个成分及 3 个内标物(IS)的质谱测定条件

Tab. 1 MS parameters for 15 analytes and 3 internal standards

成分 (component)	分子式 (molecular formula)	t <sub>R</sub> / min	前体离子 (precursor ion)/ m/z	子代离子 (product ion)/ m/z	锥孔电压 (cone voltage)/ V	碰撞能量 (collision energy)/ eV	离子模式 (polarity)
新绿原酸 (neochlorogenic acid)	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	3.07	355	163	20	18	+
原儿茶酸 (protocatechuic acid)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	3.85	155	93	25	15	+
对羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid)	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	4.25	139	121	15	10	+
绿原酸 (chlorogenic acid)	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	5.15	355	163	20	18	+
隐绿原酸 (cryptochlorogenin acid)	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	5.61	355	163	20	18	+
獐牙菜苷 (sweroside)	C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>	6.82	403	179	25	12	-
夏佛塔苷 (schaftoside)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	7.60	563	443	30	28	-
穗花牡荆苷 (agnuside)	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	7.93	465	285	50	22	-
异夏佛塔苷 (isoschaftoside)	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	7.97	563	443	30	28	-
牡荆素鼠李糖苷 (vitexin-2-O-rhamnoside)	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	8.28	577	413	40	25	-

表 1(续)

成分 (component)	分子式 (molecular formula)	$t_R$ / min	前体离子 (precursor ion)/ $m/z$	子代离子 (product ion)/ $m/z$	锥孔电压 (cone voltage)/ V	碰撞能量 (collision energy)/ eV	离子模式 (polarity)
牡荆苷 (vitexin)	$C_{21}H_{20}O_{10}$	8.35	431	311	45	20	-
木犀草苷 (luteoloside)	$C_{21}H_{20}O_{11}$	8.58	447	285	50	28	-
异绿原酸 B (isochlorogenic acid B)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	8.88	517	163	20	22	+
异绿原酸 A (isochlorogenic acid A)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	9.04	517	163	20	22	+
异绿原酸 C (isochlorogenic acid C)	$C_{25}H_{24}O_{12}$	9.26	517	163	20	22	+
芍药内酯苷 (IS1) [albiflorin (IS1)]	$C_{23}H_{28}O_{11}$	6.85	525	121	25	25	-
甘草苷 (IS2) [liquiritin (IS2)]	$C_{21}H_{22}O_9$	8.28	417	255	25	20	-
2-羟基肉桂酸 (IS3) [3-(2-hydroxyphenyl) acrylic acid (IS3)]	$C_9H_8O_3$	9.22	165	123	15	12	+

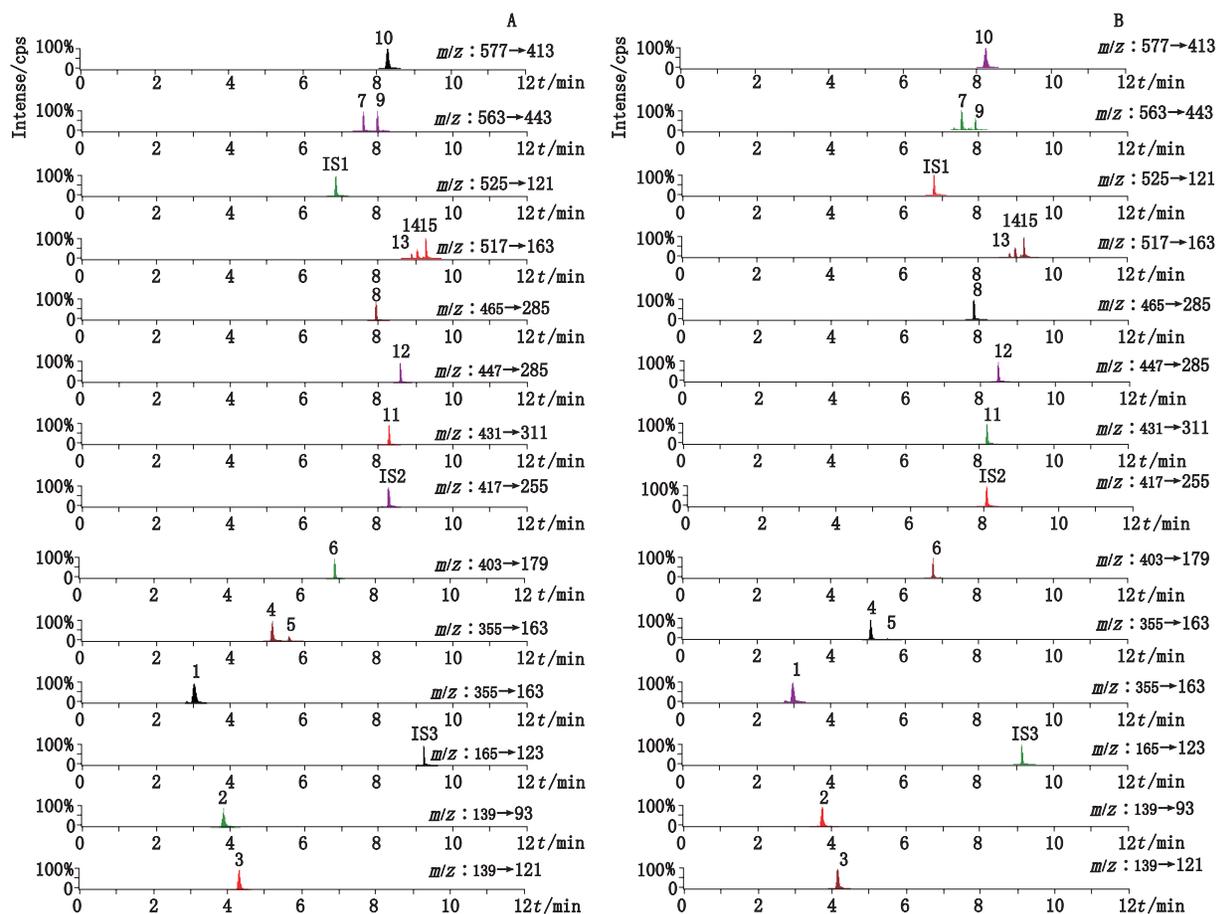


图 1 对照品 (A) 和金牡感冒片样品 (B) 的 UPLC-MS/MS MRM 色谱图

Fig. 1 UPLC-MS/MS chromatograms of reference substances (A) and Jinmu Ganmao tablets (B) in multiple reaction monitoring (MRM) mode

**2.3.2 线性关系考察** 取“2.2.1”项下方法制备的对照品储备液适量,混合,再用 70% 甲醇水溶液稀释配制 7 个系列梯度浓度的混合对照品溶液,并按照 1:1 (500  $\mu\text{L}$ :500  $\mu\text{L}$ ) 加入内标储备液。在“2.1”项下色谱-质谱条件下进样测定峰面积,以各成分峰面

积与内标物峰面积比值 ( $Y$ ) 为纵坐标,以各成分质量浓度 ( $X$ ) 为横坐标进行线性回归,绘制标准曲线,得到各成分的回归方程、相关系数及线性范围,结果见表 2。以信噪比 ( $S/N$ )=10 确定各成分的定量限,以信噪比 ( $S/N$ )=3 确定各成分的检测限,结果见表 2。

表 2 金牡感冒片中 15 个成分的回归方程、线性范围、检测限、定量限

Tab. 2 Regression equations, linear range, LOQ and LOD of 15 analytes

成分 (compound)	回归方程 (regression equation)	线性范围 (linear range)/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	$r$	检测限 (LOD)/ ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	定量限 (LOQ)/ ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
新绿原酸 (neochlorogenic) acid	$Y=3.037X-0.0013$	0.050~1.001	0.9949	0.72	2.20
原儿茶酸 (protocatechuic acid)	$Y=2.022X-0.0023$	0.010~0.496	0.9981	1.19	5.84
对羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic) acid	$Y=1.334X-0.0025$	0.010~0.965	0.9952	5.49	18.36
绿原酸 (chlorogenic acid)	$Y=7.356X-0.0131$	0.050~5.073	0.9984	0.37	1.84
隐绿原酸 (cryptochlorogenin) acid	$Y=6.773X-0.0142$	0.050~1.491	0.9970	0.61	2.43
獐牙菜苷 (sweroside)	$Y=1.212X+0.0107$	0.050~0.991	0.9979	0.95	4.85
夏佛塔苷 (schaftoside)	$Y=1.257X-0.0144$	0.050~2.078	0.9997	0.66	1.56
穗花牡荆苷 (agnuside)	$Y=3.678X+0.0026$	0.020~0.974	0.9999	0.09	0.68
异夏佛塔苷 (isoschaftoside)	$Y=1.288X+0.0087$	0.020~0.497	0.9987	0.32	1.10
牡荆素鼠李糖苷 (vitexin-2-O-rhamnoside)	$Y=2.814X-0.0034$	0.001~0.293	0.9981	0.15	0.81
牡荆苷 (vitexin)	$Y=10.27X-0.0167$	0.001~0.299	0.9971	0.06	0.30
木犀草苷 (luteoloside)	$Y=9.635X+0.0459$	0.020~0.489	0.9966	0.17	0.56
异绿原酸 B (isochlorogenic acid B)	$Y=6.165X-0.0036$	0.050~1.965	0.9979	3.45	1.81
异绿原酸 A (isochlorogenic acid A)	$Y=5.868X-0.0044$	0.050~2.915	0.9986	0.35	1.58
异绿原酸 C (isochlorogenic acid C)	$Y=5.316X-0.0027$	0.050~2.877	0.9990	0.28	1.69

**2.3.3 精密度试验** 取同一份对照品的混合溶液,并按照 1:1 (500  $\mu\text{L}$ :500  $\mu\text{L}$ ) 加入内标储备液,在“2.1”项下色谱-质谱条件下进样测定峰面积,1 d 内连续进样 6 次测定日内精密度,连续测定 3 d,每天

进样 3 次测定日间精密度,分别计算各对照品与内标物的峰面积比值及比值的 RSD,结果见表 3,表明仪器精密度良好。

表 3 精密度、稳定性、重复性结果

Tab. 3 Precision, stability and repeatability

成分 (compound)	精密度 (precision)		稳定性 (stability)	重复性 (repeatability)
	日内 (intra-day), RSD/% (n=6)	日间 (inter-day), RSD/% (n=9)	RSD/% (n=5)	RSD/% (n=6)
新绿原酸 (neochlorogenic acid)	2.3	3.3	2.2	2.3
原儿茶酸 (protocatechuic acid)	2.5	3.7	3.1	1.9
对羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid)	2.6	2.7	3.1	3.1
绿原酸 (chlorogenic acid)	1.7	2.6	2.2	2.4
隐绿原酸 (cryptochlorogenin acid)	3.1	3.6	3.2	2.8
獐牙菜苷 (sweroside)	2.1	3.0	3.6	2.6
夏佛塔苷 (schafotoside)	3.4	4.1	3.8	3.7
穗花牡荆苷 (agnuside)	3.0	3.5	2.1	2.0
异夏佛塔苷 (isoschafotoside)	2.2	1.6	2.5	2.7
牡荆素鼠李糖苷 (vitexin-2-O-rhamnoside)	2.3	2.5	2.7	3.2
牡荆苷 (vitexin)	2.9	2.7	2.3	2.6
木犀草苷 luteoloside	3.4	3.4	4.3	3.6
异绿原酸 B (isochlorogenic acid B)	2.4	3.6	3.8	1.8
异绿原酸 A (isochlorogenic acid A)	2.4	4.0	4.2	3.1
异绿原酸 C (isochlorogenic acid C)	3.3	4.1	3.7	3.0

**2.3.4 稳定性试验** 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、4、8、12、24 h 按“2.1”项下色谱-质谱条件下进样进行测定,根据标准曲线计算各成分的含量及其 RSD,结果见表 3,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

**2.3.5 重复性试验** 精密称取同一批金牡感冒片(批号 S0010)6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品

溶液,按“2.1”项下色谱-质谱条件下进样测定峰面积,根据标准曲线计算 15 个成分的含量及其 RSD,结果见表 3,表明方法重复性良好。

**2.3.6 回收率试验** 精密称取“2.3.5”项下已测知含量的金牡感冒片粉末 6 份,约 0.10 g,分别精密加入 15 个对照品的混合溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,按“2.1”项下色谱-质谱条件下进样测定峰面积,根据标准曲线计算各成分的含量,并计算回收率,结果见表 4。

**2.4 样品的含量测定**

取不同批号的金牡感冒片粉末,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱-质谱条件下进样测定峰面积,根据标准曲线计算各成分的含量,结果见表 5。

**3 讨论**

**3.1 供试品溶液制备方法的选择**

通过比较索氏、超声波和回流提取法,结果显示待测成分超声提取率最高,索氏提取法最低,因此选择超声提取法制备供试品溶液。在此基础上,比较了 30%、50%、70% 和 90% 甲醇溶液提取率,结果表明 70% 甲醇溶液提取率最高;接着考察了料液比 1:50、1:100、1:500、1:1 000,结果表明 1:500 和 1:1 000 最佳;最后分别考察超声提取时间 15、30、45、60 min,结果表明 30 min 后即可达到最大提取率。因此,最终确定供试品溶液制备方法:0.20 g 样品加 70% 甲醇 100 mL,超声波处理 30 min 即可。

**3.2 色谱-质谱条件的选择**

色谱条件:通过比较超高效液相色谱柱不同粒径(1.6、1.7、1.8 μm)对色谱分离的影响,由于测定的绿原酸类成分及其聚合体异绿原酸类成分多个成分互为同分异构体,质谱行为相似,为了使其基线分离,最终选择 1.6 μm 的色谱柱;同时考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-0.1% 甲酸水等流动相对色谱分离和质谱检测的影响,最终选择乙腈-0.1% 甲酸水作为流动相;质谱条件考察了正、负离子模式对检测的响应情况,结果发现酚酸类成分正离子模式优于负离子模式,而环烯醚萜苷类和黄酮类则相反,负离子模式优于正离子模式。因此,最终选择正负离子切换模式,并且对每一个测试化合物进行 MRM 条件的优化,优选最佳的母离子和检测子离子,其中酚酸类绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸是一分子咖啡酰基奎宁酸同分异构体,质谱最佳灵敏度的子

表 4 金牡感冒片中 15 个成分的回收率试验 (n=6)

Tab. 4 Recoveries of 15 compounds in Jinmu Ganmao tablets

编号 (No.)	成分 (compound)	原含量 (original content)/ $\mu\text{g}$	添加量 (added content)/ $\mu\text{g}$	测得量 (detected content)/ $\mu\text{g}$	回收率 (recovery)/%	RSD/%
1	新绿原酸 (neochlorogenic acid)	51.26	50	102.40 $\pm$ 2.10	102.3	4.2
2	原儿茶酸 (protocatechuic acid)	1.88	2	3.95 $\pm$ 0.081	103.5	4.1
3	对羟基苯甲酸 (4-hydroxybenzoic acid)	12.6	10	22.27 $\pm$ 0.457	96.8	4.6
4	绿原酸 (chlorogenic acid)	300.8	300	591.7 $\pm$ 12.1	97.0	4.0
5	隐绿原酸 (cryptochlorogenin acid)	71.48	70	141.4 $\pm$ 2.95	100.0	4.2
6	獐牙菜苷 (sweroside)	66.62	70	135.5 $\pm$ 2.78	98.5	4.0
7	夏佛塔苷 (schafoside)	94.52	100	197.1 $\pm$ 4.07	102.6	4.0
8	穗花牡荆苷 (agnuside)	28.34	25	52.75 $\pm$ 1.03	97.7	4.3
9	异夏佛塔苷 (isoschafoside)	16.2	20	36.24 $\pm$ 0.74	100.2	3.7
10	牡荆素鼠李糖苷 (vitexin-2-O-rhamnoside)	0.404	0.5	0.927 $\pm$ 0.019	104.5	3.8
11	牡荆苷 (vitexin)	1.32	1.5	2.869 $\pm$ 0.059	103.3	3.9
12	木犀草苷 (luteoloside)	7.75	8	15.74 $\pm$ 0.323	99.9	4.0
13	异绿原酸 B (isochlorogenic acid B)	56.87	60	119.1 $\pm$ 2.447	103.8	4.1
14	异绿原酸 A (isochlorogenic acid A)	97.4	100	198.8 $\pm$ 4.083	101.5	4.1
15	异绿原酸 C (isochlorogenic acid C)	118.1	120	237.6 $\pm$ 4.879	99.6	4.1

表 5 金牡感冒片中 15 个成分的含量 ( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ , n=3)

Tab. 5 Contents of 15 compounds Jinmu Ganmao tablets

批号 (lot No.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
S0010	0.513	0.019	0.126	3.008	0.715	0.666	0.945	0.283	0.162	0.004	0.013	0.078	0.569	0.974	1.181
S1013	0.424	0.022	0.068	3.749	0.528	0.543	0.480	0.194	0.091	0.004	0.008	0.075	0.445	1.499	1.167
S1014	0.587	0.027	0.080	4.168	0.725	0.715	0.507	0.227	0.106	0.005	0.008	0.096	0.623	1.586	1.636
S1015	0.300	0.013	0.062	2.319	0.442	0.345	0.673	0.247	0.134	0.004	0.008	0.064	0.423	1.322	0.799
S2015	0.583	0.021	0.057	4.290	0.792	0.639	0.611	0.233	0.079	0.005	0.006	0.087	0.690	1.682	1.239
S2016	0.612	0.023	0.080	3.878	0.743	0.622	0.589	0.213	0.086	0.006	0.008	0.100	0.535	1.607	1.213
S2017	0.630	0.028	0.077	4.280	0.779	0.623	0.525	0.211	0.108	0.006	0.008	0.082	0.674	1.652	1.282
S2018	0.562	0.019	0.058	3.739	0.786	0.650	0.479	0.223	0.068	0.004	0.009	0.076	0.523	1.505	1.112
S4010	0.556	0.031	0.078	3.714	0.660	0.683	0.532	0.186	0.093	0.004	0.007	0.083	0.502	1.485	1.151
S4023	0.550	0.017	0.053	4.021	0.646	0.648	0.476	0.234	0.074	0.004	0.007	0.087	0.649	1.529	1.250
S4024	0.545	0.018	0.133	3.895	0.770	0.476	0.860	0.164	0.144	0.006	0.009	0.074	0.609	1.509	0.967
S4025	0.458	0.017	0.102	3.014	0.623	0.497	0.600	0.263	0.088	0.004	0.008	0.066	0.524	1.045	0.835

注 (note): 1~15 同表 4 (1~15 same as Tab.4)

离子是分子离子峰失去奎宁酸基团的 $[M+H-\text{quinic acid}]^+(m/z 163)$ , 异绿原酸 A、B、C 是两分子咖啡酰基奎宁酸同分异构体, 同样其最佳子离子也是为 $[\text{quinic acid}+H-H_2O]^+(m/z 163)$ ; 原儿茶酸则是母离子中性丢失  $H_2O$  和  $CO_2$  产生的 $[M+H-H_2O-CO_2]^+(m/z 93)$ ; 对羟基苯甲酸则是母离子失去一分子  $H_2O$  产生的 $[M+H-H_2O]^+(m/z 121)$ ; 环烯醚萜苷类獐牙菜苷最佳子离子是其脱葡萄糖基 $[\text{glucose}-H]^- (m/z 179)$ ; 穗花牡荆苷则是失去一分子水和葡萄糖基产生的 $[M-H-\text{Glc}-H_2O]^- (m/z 285)$ ; 黄酮类成分木犀草苷最佳定量离子是其分子离子峰失去葡萄糖基产生的 $[M-H-\text{Glc}]^- (m/z 285)$ ; 牡荆素鼠李糖苷失去鼠李糖基产生灵敏度最高的 $[M-H-\text{Rha}]^- (m/z 413)$  子离子; 夏佛塔苷、异夏佛塔苷和牡荆苷是 C- 苷类黄酮, 其最佳定量离子都是 $[M-H-C_4H_8O_4]^-$  子离子。同时, 为了确保 3 类成分测定的准确性, 本研究采用内标法进行测定, 选择 2- 羟基肉桂酸作为有机酸类成分检测的内标, 选择黄酮苷甘草苷作为黄酮类成分检测的内标, 采用单萜苷芍药内酯苷作为环烯醚萜苷检测的内标。

综上, 本文采用 UPLC-MS/MS 法同时测定 12 批次金牡感冒片中 8 个酚酸类、5 个黄酮类、2 个环烯醚萜苷类成分共计 15 个成分, 该方法简便, 快捷, 准确, 为综合评价金牡感冒片提供参考。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂. 第十册[S]. 1998: 91  
The Chinese Herbal Medicine Product Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China. Vol 10[S]. 1998: 91
- [2] 魏尊喜. HPLC 法测定金牡感冒片中绿原酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(8): 1359  
WEI ZX. HPLC determination of chlorogenic acid in Jinmu Ganmao tablets[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29(8): 1359
- [3] 许舒瑜, 彭军, 陈小玲, 等. 金牡感冒片的质量标准研究[J]. 中国药房, 2014, 25(39): 3682  
XU SY, PENG J, CHEN XL, et al. Study on quality standard of Jinmu Ganmao tablets[J]. *China Pharm*, 2014, 25(39): 3682
- [4] HUANG MQ, XU SY, XU W, et al. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Jin-Mu-Gan-Mao tablets by high-performance liquid chromatography with diode-array detection and quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2014, 37(23): 3497
- [5] PARK SH, ROH E, KIM HS, et al. Inhibition of IRAK-4 activity for rescuing endotoxin LPS-induced septic mortality in mice by *loniceræ flos extract*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 442(3-4): 183
- [6] LIAO Y, DONG S, KIYAMA R, et al. Flos *Lonicerae* extracts and chlorogenic acid protect human umbilical vein endothelial cells from the toxic damage of perfluorooctane sulphonate[J]. *Inflammation*, 2013, 36(3): 767
- [7] WU L, ZHANG ZJ, ZHANG ZS. Characterization of antioxidant activity of extracts from Flos *Lonicerae*[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2007, 33(8): 841
- [8] LING TJ, LING WW, CHEN YJ. Antiseptic activity and phenolic constituents of the aerial parts of *Vitex negundo* var. *cannabifolia*[J]. *Molecules*, 2010, 15(11): 8469
- [9] QI LW, CHEN CY, LI P. Structural characterization and identification of iridoid glycosides, saponins, phenolic acids and flavonoids in Flos *Lonicerae Japonicae* by a fast liquid chromatography method with diode-array detection and time-of-flight mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(19): 3227
- [10] GAUTAM K, KUMAR P, POONIA S. Larvicidal activity and GC-MS analysis of flavonoids of *Vitex negundo* and *Andrographis paniculata* against two vector mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*[J]. *J Vector Borne Dis*, 2013, 50(3): 171
- [11] 向青, 王小花, 林慧, 等. HPLC-DAD-Q-TOF-MS / MS 法的银黄颗粒主要成分定性定量研究[J]. 中成药, 2015, 37(1): 105  
XIANG Q, WANG XH, LIN H, et al. Qualitative and quantitative analysis of major constituents in Yinhuang granules by HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2015, 37(1): 105
- [12] 许文, 林婧, 丘建芳, 等. 双波长 HPLC-DAD 法测定闽产泽泻三萜类含量[J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(5): 23  
XU W, LIN J, QIU JF, et al. Determination of triterpenoid isolated from *Rhizoma Alismatis* in Fujian by dualwavelength HPLC-DAD method[J]. *J Fujian Univ TCM*, 2013, 23(5): 23
- [13] 许文, 傅志勤, 林婧, 等. HPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC-QqQ-MS 的三叶青主要成分定性定量研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4365  
XU W, FU ZQ, LIN H, et al. Qualitative and quantitative analysis of major constituents in *Tetragium hemsleyanum* by HPLC-Q-TOF-MS and UPLC-QqQ-MS[J]. *China J Chin Mater Med*, 2014, 39(22): 4365
- [14] 许文, 傅志勤, 林婧, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定三叶青中 10 种黄酮类成分[J]. 药学报, 2014, 49(12): 1711  
XU W, FU ZQ, LIN J, et al. Rapid simultaneous determination of ten major flavonoids in *Tetragium hemsleyanum* by UPLC-MS/MS[J]. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(12): 1711
- [15] 罗益远, 刘娟秀, 刘廷, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定何首乌中二苯乙烯、蒽醌、黄酮及酚酸类成分[J]. 质谱学报, 2016, 37(4): 327  
LUO YY, LIU JX, LIU T, et al. Simultaneous determination of stilbenes, anthraquinones, flavonoids and phenolic acids in *Polygoni Multiflori Radix* by UPLC-MS/MS[J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2016, 37(4): 327

(本文于 2016 年 8 月 16 日收到)