

UPLC-MS/MS 法同时测定舒肝宁注射液中 6 个成分的含量*

支旭然, 王觅, 宋浩静, 董占军**

(河北省人民医院药学部, 石家庄 050000)

摘要 目的: 建立一种 UPLC-MS/MS 法同时测定舒肝宁注射液中 6 个成分(绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春)的含量。**方法:** 采用 XBridge® BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.5 μm), 以乙腈(A)-0.05% 甲酸水(B)溶液为流动相进行梯度洗脱(0~3 min, 25%A → 90%A; 3~5 min, 90%A → 90%A), 流速 0.3 mL · min⁻¹, 进样量 5 μL; 柱温为 30 °C; 采用电喷雾离子源进行正负离子同时监测, 多反应监测模式(MRM)用于定量分析。**结果:** 在 5 min 内, 舒肝宁注射液的 6 个成分(绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春)被完全分离, 峰面积与浓度有良好的线性关系, 相关系数(*r*)均大于 0.999 6。试验精密度、重复性和稳定性良好; 平均加样回收率为 95.1%~100.1%。5 批样品中绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春含量测定结果分别为 50.32~52.16、526.1~555.6、18 401~19 594、205.9~262.1、115.1~122.5、28.38~30.95 ng · mL⁻¹。**结论:** 本方法快速准确灵敏, 重复性好, 可用于舒肝宁注射液中 6 个成分的定量测定。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 舒肝宁注射液; 绿原酸; 栀子苷; 黄芩苷; 黄芩素; 野黄芩苷; 表告依春

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2018)12-2194-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.12.20

Simultaneous determination of 6 components in Shuganning injection by UPLC-MS/MS*

ZHI Xu-ran, WANG Mi, SONG Hao-jing, DONG Zhan-jun**

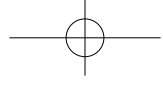
(Department of Pharmacy, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract Objective: To develop a method for the simultaneous determination of the chlorogenic acid, geniposide, baicalin, baicalein, scutellarin and epigallocatechin gallate in Shuganning injection by UPLC-MS/MS. **Methods:** The samples were separated on an XBridge® BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 2.5 μm). The mobile phase composed of acetonitrile (A) and 0.05% aqueous formic acid (B) with gradient elution (0~3 min, 25%A → 90%A; 3~5 min, 90%A → 90%A). The injection volume was 5 μL and the flow rate was 0.3 mL · min⁻¹. The column temperature was 30 °C. Multiple-reaction monitoring (MRM) scanning was employed for quantification with switching electrospray

* 2015 年政府资助省级临床医学优秀人才项目

** 通信作者 Tel: (0311) 85988604; E-mail: 510349303@qq.com

第一作者 Tel: 17798093054; E-mail: zhixuran@163.com



ion source polarity in positive and negative ions. **Results:** The six components in Shuganning injection (chlorogenic acid, geniposide, baicalin, baicalein, scutellarin, epigallocatechin gallate) were completely separated in 5 minutes. The regression equations showed linear relationships between the peak area and concentration of each component. The correlation coefficients (r) were above 0.999 6. The precision, repeatability, and stability of the method were good for all six components. The average recoveries ranged from 95.1% to 100.1%. The contents of chlorogenic acid, geniposide, baicalin, baicalein, scutellarin and epigallocatechin gallate in 5 batches of samples were 50.32–52.16, 526.1–555.6, 1 8401–19 594, 205.9–262.1, 115.1–122.5 and 28.38–30.95 ng · mL⁻¹, respectively. **Conclusion:** The method is rapid, accurate and sensitive with good reproducibility and can be used for the determination of 6 compounds in Shuganning injection.

Keywords: UPLC-MS/MS; Shuganning injection; chlorogenic acid; geniposide; baicalin; baicalein; scutellarin; epigallocatechin gallate

舒肝宁注射液是由茵陈、栀子、黄芩、板蓝根和灵芝提取物制备而成的中药注射剂^[1-2],具有清热解毒、利湿退黄、益气扶正和保肝护肝的功效,在临床已广泛使用,主要用于治疗黄疸和急、慢性病毒性肝炎^[3-5]。在临床使用过程中,舒肝宁注射液的不良反应发生率较高,轻者为皮疹、瘙痒、畏寒、发热,严重的可致过敏性休克^[6-7]。目前对舒肝宁药物的质量研究仅限于其中 1~2 个成分的含量测定,未见对舒肝宁注射液中多个有效成分的研究,难以全面控制其质量。而且已有文献多采用 HPLC-UV 法对舒肝宁注射液进行测定^[8-11]。UPLC-MS/MS 由于测定时间短,分离度好,尤其适用于复杂样品的定性和定量,在中药多组分的测定中明显优于传统的 HPLC-UV 法^[12]。本研究采用 UPLC-MS/MS 法同时测定舒肝宁注射液中的绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春的含量,具有快速、灵敏、准确、特异性强等特点,可以较好地消除有效成分之间的干扰。

1 仪器与材料

1.1 仪器

超高效液相色谱系统(Shimadzu 30A UPLC system, Kyoto),配有二元高压梯度泵(Shimadzu 30AD),柱温箱(Shimadzu CTO30A)和自动进样器(Shimadzu SIL30AC);AB Sciex Triple QuadTM 5500 型串联四极杆线性离子阱质谱仪(Applied Biosystems 公司),含有 Turbo V 离子源和三重四极杆线性离子阱串联质量分析器。数据采集软件:Analyst 1.6。BP211D 型分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司),

雷勃尔 LG16-B 高速离心机(北京雷勃尔离心机有限公司)。

1.2 试剂

对照品绿原酸(批号 LYS2015041901)、栀子苷(批号 ZZG2016052501)、黄芩苷(批号 HQG2016031211)、黄芩素(批号 HQS2016061601)、野黄芩苷(批号 YHQG2016042501)、表告依春(批号 BGYC2015061110)均购自南京春秋生物工程有限公司,纯度均大于 98%;甲醇、甲酸为色谱纯(赛默飞世尔(中国)有限公司);水为纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件 采用 XBridge® BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.5 μm),流动相 A 为乙腈(色谱纯),流动相 B 为含 0.05% 甲酸水。梯度洗脱:0~3 min, 25%A → 90%A; 3~5 min, 90%A → 90%A。每针进样前平衡 5 min;流速:0.3 mL · min⁻¹;柱温:30 °C;进样量:5 μL。对照品和样品色谱图见图 1。

2.1.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源(ESI 源),离子源温度为 600 °C,正负离子同时监测模式, Turbo V 离子源。源喷射电压为正离子模式 5.5 kV,负离子模式 -4.5 kV;雾化气(gas 1)和加热气(gas 2)分别为 414、448 kPa,帘气为 172 kPa,接口处加热,多反应监测模式(MRM)。绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春的 MS 参数见表 1。二级质谱图见图 1。

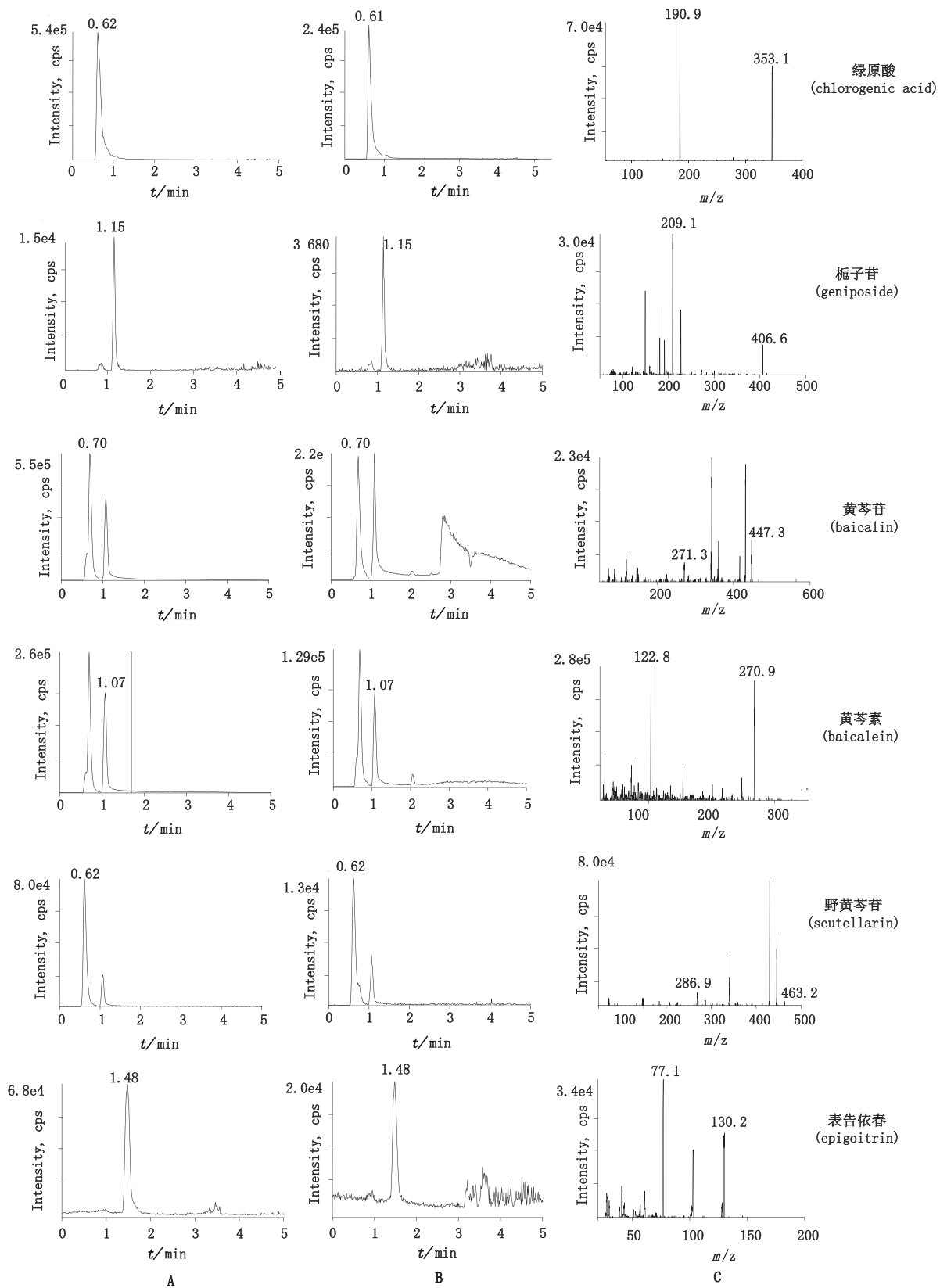


图 1 对照品 (A)、舒肝宁注射液 (B) 的多重反应监测色谱图 and 对照品二级质谱图 (C)

Fig. 1 Multiple-reaction monitoring chromatograms of reference substances (A), sample (B) and tandem mass spectra (C) of reference substances

表 1 舒肝宁注射液中 6 个成分的保留时间和主要质谱参数

Tab. 1 Retention time (t_R) and main mass parameters of 6 components in Shuganning injection

| 成分 (component) | t_R /min | MS_1/mz | MS_2/mz | DP/V | CE/eV |
|---------------------------|------------|-----------|-----------|------|-------|
| 绿原酸 (chlorogenic acid) | 0.62 | 353.1 | 190.9 | -100 | -25 |
| 栀子苷 (geniposide) | 1.15 | 406.6 | 209.1 | 100 | 20 |
| 黄芩苷 (baicalin) | 0.70 | 447.3 | 271.3 | 100 | 15 |
| 黄芩素 (baicalein) | 1.07 | 270.9 | 122.8 | 100 | 43 |
| 野黄芩苷 (scutellarin) | 0.62 | 463.2 | 286.9 | 100 | 47 |
| 表告依春 (epigointrin) | 1.48 | 130.2 | 77.1 | 100 | 15 |

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密称量绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春对照品适量,加

甲醇分别制成对照品溶液。分别取各对照品溶液适量,加甲醇制成绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春质量浓度分别为 48.00、140.0、4 000、550.0、122.4 和 96.00 $ng \cdot mL^{-1}$ 的混合对照品溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液 分别精密量取不同批次舒肝宁注射液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度;再精密量取该溶液 1 mL,置另一个 100 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度。用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取澄清的续滤液作为供试品溶液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、定量下限和检测下限 精密量取上述混合对照品溶液适量,采用倍数稀释法,用甲醇分别稀释制得不同质量浓度梯度的系列标准溶液,按“2.1”项下色谱和质谱条件进行分析,记录各个成分的峰面积。以浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线。回归方程、相关系数及线性范围见表 2。将混合对照品溶液逐步稀释,分别以信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 时各对照品的浓度作为检测下限和定量下限,结果见表 2。

表 2 6 个成分的回归方程、相关系数和线性范围、定量下限和检测下限

Tab. 2 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges, LOQs and LODs of 6 components

| 成分 (component) | 回归方程 (regression equation) | r | 线性范围 (linear range)/ ($ng \cdot mL^{-1}$) | LOQ/ ($ng \cdot mL^{-1}$) | LOD/ ($ng \cdot mL^{-1}$) |
|------------------------|---|---------|---|--------------------------------|--------------------------------|
| 绿原酸 (chlorogenic acid) | $Y=8.684 \times 10^4 X+4.600 \times 10^4$ | 0.999 6 | 0.750 0~48.00 | 0.375 0 | 0.187 5 |
| 栀子苷 (geniposide) | $Y=1.492 \times 10^3 X+415.1$ | 0.999 8 | 2.188~140.0 | 1.094 | 0.547 0 |
| 黄芩苷 (baicalin) | $Y=2.208 \times 10^3 X+7.200 \times 10^4$ | 0.999 9 | 31.25~400 0 | 6.250 | 3.125 |
| 黄芩素 (baicalein) | $Y=1.263 \times 10^3 X+1.579 \times 10^4$ | 0.999 6 | 8.594~550.0 | 4.297 | 1.432 |
| 野黄芩苷 (scutellarin) | $Y=4.379 \times 10^3 X+7.782 \times 10^3$ | 0.999 8 | 1.912~122.4 | 0.956 0 | 0.478 0 |
| 表告依春 (epigointrin) | $Y=1.671 \times 10^3 X+1.968 \times 10^3$ | 0.999 6 | 1.500~96.00 | 1.000 | 0.750 0 |

2.3.2 精密度、稳定性和重复性试验 精密吸取同一混合对照品溶液,连续进样 6 次,计算各成分峰面积的 RSD,6 个成分的 RSD 分别为绿原酸 2.1%、栀子苷 2.0%、黄芩苷 1.2%、黄芩素 2.4%、野黄芩苷 2.6%、表告依春 1.8%,表明仪器精密度良好。

将样品(批号 20161024)的供试品溶液在室温下放置 0、2、4、6、8、12 h 后分别进样,记录峰面积,计算各成分峰面积的 RSD,依次为绿原酸 1.5%、栀子苷 1.9%、黄芩苷 2.2%、黄芩素 2.2%、野黄芩苷

1.9%、表告依春 2.2%,表明供试品溶液室温放置 12 h 稳定。

按“2.2.2”项下方法制备样品(批号 20161024)的供试品溶液,共 6 份,进样分析,测得绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春的平均含量分别为 51.25、552.3、192.14、225.1、123.7、30.98 $\mu g \cdot mL^{-1}$,RSD 分别为 1.2%、1.0%、2.1%、0.97%、1.8%、2.2%,结果表明该方法重复性良好。

2.3.3 回收率考察 精密量取 6 份同一批供试品 (批号 20161024) 溶液 500 μL , 置于 100 mL 量瓶中, 将 6 个成分对照品储备液适量分别精密加入到各量

瓶中, 并用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 按“2.2.2”项下方法操作, 制备供试品溶液进样测定, 计算平均回收率, 结果见表 3。

表 3 舒肝宁注射液中 6 个成分回收率测定结果 ($n=6$)

Tab. 3 Recovery results of six components in Shuganning injection

| 成分 (component) | 供试品含量 (original)/ng | 加入量 (added)/ng | 测得量 (found)/ng | 平均回收率 (average)/% | RSD/% |
|------------------------|---------------------|----------------|----------------|-------------------|-------|
| 绿原酸 (chlorogenic acid) | 25.68 | 25.26 | 50.97 | 100.1 | 1.3 |
| 栀子苷 (geniposide) | 277.8 | 280.0 | 548.9 | 96.8 | 0.61 |
| 黄芩苷 (baicalin) | 9 598 | 10 000 | 19 252 | 96.6 | 1.5 |
| 黄芩素 (baicalein) | 113.2 | 110.00 | 221.1 | 98.1 | 2.9 |
| 野黄芩苷 (scutellarin) | 61.25 | 61.20 | 121.2 | 97.9 | 1.1 |
| 表告依春 (epigoitrin) | 15.48 | 15.00 | 29.74 | 95.1 | 2.8 |

2.4 样品测定

取 5 批不同批号的舒肝宁注射液药品各 3 份, 按照“2.2.2”项下的方法制备供试品溶液, 按照“2.1”项下的色谱-质谱条件进样分析测定, 记录 6 个被

测物的色谱峰面积, 代入各成分相应的标准曲线, 分别计算绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春的含量, 结果见表 4。

表 4 舒肝宁注射液 6 个成分的含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $n=3$, $\text{RSD}<2.3\%$)

Tab. 4 The contents of the 6 components in Shuganning injection

| 批号 (lot No.) | 绿原酸 (chlorogenic acid) | 栀子苷 (geniposide) | 黄芩苷 (baicalin) | 黄芩素 (baicalein) | 野黄芩苷 (scutellarin) | 表告依春 (epigoitrin) |
|--------------|------------------------|------------------|----------------|-----------------|--------------------|-------------------|
| 20161024 | 51.36 | 555.6 | 19 196 | 226.5 | 122.5 | 30.95 |
| 20161107 | 52.16 | 546.3 | 18 865 | 262.1 | 116.7 | 29.46 |
| 20161209 | 50.32 | 528.8 | 19 461 | 205.9 | 121.8 | 28.38 |
| 20170106 | 50.43 | 526.1 | 18 401 | 256.6 | 115.1 | 29.04 |
| 20170118 | 51.59 | 550.3 | 19 594 | 215.4 | 117.0 | 30.11 |

3 讨论

《伤寒论》方茵陈蒿汤由茵陈蒿、栀子及大黄三味药组成^[13], 舒肝宁为中药制剂, 其组方为“茵陈蒿汤”加减而来。舒肝宁在茵陈蒿汤基础上加入板蓝根及灵芝, 同时改大黄为黄芪。板蓝根具有清热、解毒、凉血、利咽的功效, 可提高慢性肝炎患者免疫力^[14]; 黄芪性温味甘, 具有益气升阳、固表止汗功效, 主治一切气虚血亏之证, 调节机体免疫力^[15]; 灵芝味淡性温, 具有补中益气的功效^[16], 与黄芪合用有助于提升慢性乙型肝炎患者由于长期病情迁延不愈所致抵抗力低下。

在试验过程中, 为了选择最佳的化合物离子进行 MRM 模式的定量分析, 分别配制纳克级的对照品溶

液注入质谱仪, 在离子扫描中, 栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春化合物在正离子模式下的响应值明显高于负离子模式下的响应值, 而绿原酸只在负离子模式下的响应比较好, 因此选择用正负离子同时监测模式进行检测。每个化合物离子对的最优 DP/CE 见表 1。

将不同的电解质 (甲酸、乙酸以及醋酸铵) 加入流动相以考察对各化合物峰形及响应值变化的影响, 结果显示, 甲酸优于乙酸和醋酸铵。进一步对甲酸在流动相中的比例进行考察, 发现 0.05% 甲酸水溶液能使被测成分达到稳定的响应值和最佳的分离效果。同时对甲醇和乙腈进行了对比, 结果发现使用乙腈时的峰形和分离度较好, 所以选择乙腈和 0.05% 甲酸

水溶液作为流动相进行梯度洗脱。

《中华人民共和国药典》2015年版目前还没有舒肝宁注射液的质量标准,为全面有效控制舒肝宁注射液的质量,本文采用UPLC-MS技术建立有效成分定量测定的方法,可在短时间内(5 min)准确、快速地分析测定舒肝宁注射液中6个成分,包括绿原酸、栀子苷、黄芩苷、黄芩素、野黄芩苷、表告依春,可为进一步完善舒肝宁注射液的质量标准提供参考,保证该制剂在临床应用中的安全性和有效性。

参考文献

- [1] 张响,张艳萍,何峰.舒肝宁注射液 HPLC 指纹图谱研究[J].中国现代应用药学,2015,32(7):824
ZHANG Y, ZHANG YP, HE F. Fingerprint chromatography of Shuganning injection by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2015, 32(7): 824
- [2] 张瑾.舒肝宁注射液对顺铂中毒小鼠肝脏损伤的保护作用[J].中国药房,2016,27(7):920
ZHANG J. Protective effect of Shuganning injection against liver injury induced by cisplatin in mice[J]. Chin Pharm, 2016, 27(7): 920
- [3] 关妮.舒肝宁注射液临床应用进展[J].医学理论与实践,2014,27(10):1291
GUAN N. Progress of clinical application of Shuganning injection[J]. J Med Theor Pract, 2014, 27(10): 1291
- [4] 张斌,赵巍,王立蓉.舒肝宁注射液对慢性乙型病毒性肝炎高胆红素血症患者肝功能及胆红素的影响[J].中医药导报,2014,20(16):71
ZHANG B, ZHAO W, WANG LR. Effects of Shuganning injection on liver function and bilirubin in patients with chronic hepatitis B with hyperbilirubinemia[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2014, 20(16): 71
- [5] 梁海雄,黎丽群.舒肝宁注射液治疗慢性乙型病毒性肝炎临床研究 Meta 分析[J].世界中西医结合杂志,2016,11(8):1057
LIANG HX, LI LQ. Meta analysis in the clinical study of chronic viral hepatitis B treated with Shuganning injection[J]. World J Integr Tradit West Med, 2016, 11(8): 1057
- [6] 梁岩,耿传信,周学峰.舒肝宁注射液致严重过敏反应 1 例[J].中国药物警戒,2012,9(1):60
LIANG Y, GENG CX, ZHOU XF. Severe allergic reaction caused by Shuganning injection in 1 cases[J]. Chin J Pharmacovigil, 2012, 9(1): 60
- [7] 饶双超,陈密,姜卫中.舒肝宁注射液致过敏反应典型案例分析[J].中南药学,2014,12(9):943
RAO SC, CHEN M, JIANG WZ. Analysis of typical cases of allergic reaction induced by Shuganning injection[J]. Centr South Pharm, 2014, 12(9): 943
- [8] 龙琳,张响,黄顺菊.HPLC测定舒肝宁注射液中黄芩苷含量[J].中成药,2003,25(12):1025
LONG L, ZHANG Y, HUANG SJ. Determination of baicalin in Shuganning injection by HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med, 2003, 25(12): 1025
- [9] 曲彩虹,孟小斌,罗宇燕.HPLC测定舒肝宁注射液中绿原酸的含量[J].中药材,2013,36(6):1014
QU CH, MENG XB, LUO YY. Determination of chlorogenic acid in Shuganning injection by HPLC[J]. Chin Med Mat, 2013, 36(6): 1014
- [10] 龙琳,张响,黄顺菊.HPLC测定舒肝宁注射液中栀子苷含量[J].中成药,2003,25(10):852
LONG L, ZHANG Y, HUANG SJ. Determination of geniposide in Shuganning injection HPLC[J]. Chin Tradit Pat Med, 2003, 25(10): 852
- [11] 何峰,张响.HPLC法同时测定舒肝宁注射液中表告依春和腺苷的含量[J].贵阳医学院学报,2015,40(12):1338
HE F, ZHANG Y. Simultaneous determination of goitrine and adenosine in Shuganning injection by HPLC[J]. J Guiyang Med Coll, 2015, 40(12): 1338
- [12] 支旭然,刘洪涛,吴茵,等.UPLC-MS/MS法同时测定肾康注射液中7个有效成分[J].药物分析杂志,2017,37(1):37
ZHI XR, LIU HT, WU Y, et al. Simultaneous determination of 7 active constituents in Shenkang injection by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(1): 37
- [13] 闫喜英,王威,牛志多,等.茵陈蒿汤临床应用进展[J].中药材,2001,24(3):217
YAN XY, WANG W, NIU ZD, et al. Progress in clinical application of Yinchenhao decoction[J]. Chin Med Mat, 2001, 24(3): 217
- [14] 林丽君,聂黎行,戴忠,等.板蓝根的研究概况[J].中国药业,2015,24(21):1
LIN LJ, NIE LX, DAI Z, et al. Research review on Radix Isatidis[J]. Chin Pharm, 2015, 24(21): 1
- [15] 赵月然,李军,刘晓庆,等.不同来源、不同等级黄芪饮片黄芪甲苷的含量分析[J].药物分析杂志,2014,34(7):1256
ZHAO YR, LI J, LIU XQ, et al. Quantitative analysis of astragaloside IV in medicinal slices of Radix Astragali from different sources and grades[J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(7): 1256
- [16] 兰宁宁,马青云,黄圣卓,等.大青山灵芝的化学成分研究[J].中草药,2017,48(3):437
LAN NN, MA QY, HUANG SZ, et al. Chemical constituents from fruiting bodies of *Ganoderma daiqingshanense*[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2017, 48(3): 437

(本文于2018年6月25日修改回)