

UHPLC-MS/MS

11

崔莉莉^{1,2}, 陈 勇¹, 张蒙伟^{1,2}, 鄢红霞^{1,3}, 高守红¹, 陈万生¹ (1. 上海长征医院药学部, 上海 200000; 2. 宜春学院, 江西 宜春 336000; 3. 云南中医药大学, 云南 昆明 650000)

[摘要] 目的 建立测定寒湿郁肺汤中 11 个主成分含量的方法。方法 采用超高效液相色谱串联质谱法(UHPLC-MS/MS), 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈(3.5 μm, 2.1 mm×150 mm), 流动相为 0.2% 甲酸-10 mmol/L 醋酸铵水溶液(A)-乙腈(B), 梯度洗脱(0~0.6 min, 80%~40%A; 0.6~1 min, 40%~30%A; 1~4.3 min, 30%~5%A), 流速 0.3 ml/min, 柱温 40 ℃。以利血平为检测内标, 采用多反应监测模式同时测定香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷 11 个化学主成分的含量。结果 寒湿郁肺汤中 11 个主成分在各自浓度范围内线性关系良好($r>0.98$), 平均回收率在 93.11%~111.73%。结论 该实验所建立的方法操作简便、重复性好, 为寒湿郁肺汤的质量控制提供了实验室依据。

[关键词] 超高效液相色谱串联质谱法; 含量测定; 新型冠状病毒肺炎; 寒湿郁肺汤

[中图分类号] R917

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)02-0148-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202012017

Determination of 11 main components in Hanshi Yufei decoction, a COVID-19 empirical prescription by UHPLC-MS/MS

CUI Lili^{1,2}, CHEN Yong¹, ZHANG Mengwei^{1,2}, YAN Hongxia^{1,3}, GAO Shouhong¹, CHEN Wansheng¹ (1. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Navel Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Yichun University, Yichun 336000, China; 3. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method to determine 11 main components in Hanshi yufei decoction. **Methods** The method adopted UHPLC-MS/MS with an Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (3.5 μm, 2.1 mm×150 mm) column. The mobile phase was consisted of 0.2% formic acid plus 10 mmol/L ammonium acetate aqueous solution(A) - acetonitrile(B) and gradient elution (0–0.6 min, 80%–40%A; 0.6–1 min, 40%–30%A; 1–4.3 min, 30%–5%A) at 0.3 ml/min. The column temperature was 40 ℃ and 11 main components including vanillic acid, magnolol, honokiol, wogonin, sophorin, 6-gingerol, citrinin, qianguo alcohol, nobiletin, nodakenin, and hesperidin were quantified in a multiple reaction monitoring mode. The reserpine was the standard. **Results** The 11 main components in Hanshi Yufei decoction had a good linear relationship within their concentration range ($r>0.98$), and the average recovery was 93.11%~111.73%. **Conclusion** The UHPLC-MS/MS method established in this experiment is easy to operate and has good reproducibility, which provides a laboratory basis for the quality control of Hanshi Yufei decoction.

[Key words] UHPLC-MS/MS; content determination; COVID-19; Hanshi Yufei decoction

新型冠状病毒肺炎(简称新冠肺炎, COVID-19), 具有较强的人际传播能力, 传播速度快^[1-3]。COVID-19 患者会出现与流感类似的症状, 包括发烧、咳嗽、乏力、腹泻等, 重症患者出现呼吸困难或低氧血症, 可发展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、多器官功能衰竭等导致死亡^[4]。中医药早期

干预可有效预防病情向重、危重方向恶化^[5]。目前, 中医药控制 COVID-19 的疗效普遍受到重视^[6], 业界提倡结合不同疾病阶段使用不同的处方^[2]。寒湿郁肺汤为武汉火神山医院依据国家卫健委印发的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》所引进的四种肺炎诊疗中药汤剂处方之一, 用于新型冠状病毒初期治疗, 该汤剂由苍术、陈皮、厚朴、藿香、草果、生麻黄、羌活、生姜共八味中药组方而成。

UHPLC-MS/MS 因具有分离能力强, 检测限低, 高灵敏度, 高选择性等特点, 易于开发为临床检测项目的参考方法^[7]。本研究应用 UHPLC-MS/MS 法, 依照 2015 版中国药典对寒湿郁肺汤中 11 种主

[] 上海市临床药学重点专科建设项目(2016-40044-002); 上海市卫生计生系统重要薄弱学科建设项目(2016ZB0303)

[] 崔莉莉, 硕士生, 研究方向: 药物分析与临床药学, Email: CuiLiLi1993@126.com

[] 高守红, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药物分析与临床药学, Email: gaoshouhong@smmu.edu.cn

成分进行含量测定,为后续的质量研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1290 超高效液相色谱仪(包括 G4220A 二元高压泵、G4226A 自动进样器、G1330B 控温箱、G1316C 柱温箱)、Agilent G6460A 型三重四极杆串联质谱仪、电喷雾离子源、Mass Hunter 化学工作站 B.06.00(美国 Agilent 公司);BSA124S-CW 型天平、CPA225D 型天平(德国 Sartorius 公司);Mini spin 型离心机、移液枪(德国 Eppendorf 公司);Labnet VX-200 型定时可调速涡旋混合器(美国 Labnet 公司);SK7200H 型超声仪(上海科导超声仪器有限公司);UNIVERSAL32R 型台式冷冻离心机(德国 Hettich 公司)。

1.2 试剂和药品

香草酸(批号: H11J9Z65318)、厚朴酚(批号: Y27J10C91584)、和厚朴酚(批号: T28O6B5149)、汉黄芩素(批号: T11J11R108209)、刺槐素(批号: C12O8Q45551)、6-姜酚(批号: P29O10F101611)、桔皮素(批号: H24F11K108893)、羌活醇(批号: R28M9F57295)、川陈皮素(批号: N10J10R90249)、紫花前胡苷(批号: W07A10Z94862)、利血平(批号: Y02M11Y17235)、橙皮苷(批号: P06D9F77001)均为对照品,纯度均 $\geq 97\%$,购于上海源叶生物科技有限公司;甲醇(批号: 10951907818,质谱级)、乙腈(批号: JA075930,质谱级)购自德国默克公司;甲酸(批号: 17033D,分析纯)、乙酸铵(批号: H1709024,色谱纯)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;水为屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司),其余试剂均为分析纯。

1.3 样品

寒湿郁肺汤中苍术(批号: 20092108)、陈皮(批号: 20010181)、厚朴(批号: 20061903)、藿香(批号: 20031708)、草果(批号: 19092902)、生麻黄(批号: 20200301)、羌活(批号: 20070709)等中药材均由上海长征医院药材科提供,生姜(批号: 19062404)购于广西壮族自治区。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液

分别取各对照品适量,精密称定,用甲醇配制成含 1.01 mg/ml 香草酸、0.99 mg/ml 厚朴酚、1.03 mg/ml 和厚朴酚、1.00 mg/ml 汉黄芩素、1.00 mg/ml 刺槐

素、1.01 mg/ml 6-姜酚、1.02 mg/ml 桔皮素、1.01 mg/ml 羌活醇、1.03 mg/ml 川陈皮素、1.00 mg/ml 紫花前胡苷、1.00 mg/ml 利血平(IS)和 1.00 mg/ml 橙皮苷的对照品溶液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用。

2.1.2 供试品溶液

取寒湿郁肺汤中苍术 15 g、陈皮 10 g、厚朴 10 g、藿香 10 g、草果 6 g、生麻黄 6 g、羌活 10 g、生姜 10 g,精密称定,置锅中,加水 500 ml,浸泡 30 min,加热至煮沸后调至文火煎 20 min,取药液;第二次加水 300 ml,加热至煮沸后调至文火煎 20 min,取药液,与第一次药液混匀,取出,放冷。精密量取药液 1 ml,加入 1 $\mu\text{g/ml}$ 的利血平 10 μl ,涡旋 3 min,14 500 r/min 离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,续滤液即为供试品溶液。

2.2 色谱与质谱条件

2.2.1 色谱条件

Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(3.5 μm , 2.1 mm \times 150 mm),流动相为 0.2% 甲酸水-10 mmol/L 醋酸铵溶液(A)-乙腈(B);梯度洗脱: 0~0.6 min, 80%~40% A; 0.6~1 min, 40%~30% A; 1~4.3 min, 30%~5% A;流速: 0.3 ml/min;柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量: 10 μl ,每个样品的分析周期为 4.3 min。

2.2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI)和多反应监测模式(MRM)。正负离子同时扫描;氮气作为雾化气和干燥气;高纯氮气为碰撞气,毛细管电压为 4 000 V;碰撞气压为 40 psi;鞘流气温为 350 $^{\circ}\text{C}$,干燥气温为 325 $^{\circ}\text{C}$,干燥气流速为 12 L/min;将一定浓度的标准溶液和内标溶液进样,在 ESI 电离方式下进行产物离子全扫描分析(见图 1),定量分析质荷比详见表 1。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察

分别精密吸取空白溶剂、对照品溶液和供试品溶液各 10 μl ,按“2.1.2”项下方法制样,再按照“2.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录图谱。结果显示,专属性符合相关要求(图 2)。

2.3.2 线性关系的考察

精密量取对照品溶液适量,浓度稀释为如下的混合对照品溶液:香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、桔皮素、羌活醇、紫花前胡苷的线性浓度为 20、50、100、200、500、1 000、1 500、2 000 ng/ml;6-姜酚、川陈皮素、橙皮苷的线性浓度为 200、500、1 000、2 000、5 000、10 000、15 000、20 000 ng/ml。采用内标定量法按“2.2”项下色谱与

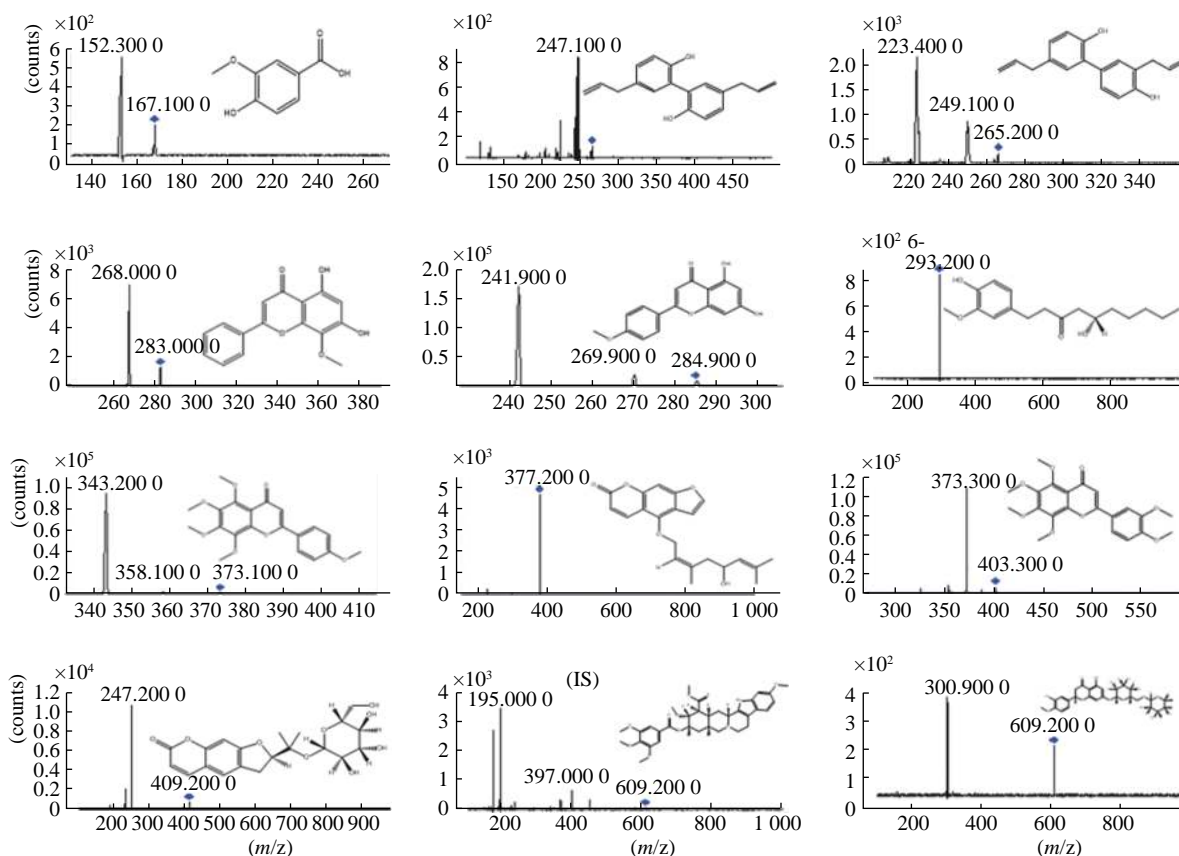


图1 寒湿郁肺汤中11个主成分及内标的二级产物离子图

表1 寒湿郁肺汤中11个主成分及内标的质谱检测参数

测定成分	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	裂解电压 (V)	碰撞能量 (V)	ESI 模式
香草酸	167.1	152.3	70	10	-
厚朴酚	265.1	247	148	29	-
和厚朴酚	265.2	223.4	135	29	-
汉黄芩素	283.1	268.1	105	13	-
刺槐素	284.9	241.9	140	34	-
6-姜酚	293.2	293.2	130	0	-
桔皮素	373.1	343.2	135	28	+
羌活醇	377.3	377.3	130	0	+
川陈皮素	403.3	373.3	130	26	+
紫花前胡苷	409.2	247.2	95	11	+
利血平(IS)	609.2	195	240	35	-
橙皮苷	609.2	300.9	135	15	-

质谱条件进行测定,并记录色谱峰面积。以峰面积为纵坐标(Y),对照品质量浓度为横坐标(C),绘制标准曲线,并进行线性回归,结果见表2。

2.3.3 精密度试验

将母液稀释10倍,按“2.2”项下色谱与质谱条件进行测定,连续进样6次,记录峰面积,计算RSD。结果显示,香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄

芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷11种成分的峰面积RSD分别为1.83%、5.57%、4.39%、3.14%、4.25%、4.01%、1.26%、1.40%、1.75%、3.29%、2.55%,表明该方法精密度良好。

2.3.4 重复性试验

取同一份寒湿郁肺汤供试品溶液,按“2.1.2”项下方法平行制备6份,按“2.2”项下色谱与质谱条件进行测定,记录峰面积,计算RSD。结果显示,香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷11种化学成分峰面积RSD分别为4.78%、8.40%、5.55%、3.27%、1.51%、3.30%、1.30%、3.37%、1.21%、1.98%、2.46%,表明该方法重复性良好。

2.3.5 稳定性试验

取同一份供试品溶液,按“2.1.2”项下方法制备,室温放置,按“2.2”项下色谱与质谱条件,分别于0、2、4、6、12、16、24h进样测定,记录峰面积,计算RSD。结果显示,香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷11种化学成分在4h内的峰面积RSD分别为5.81%、4.68%、3.17%、13.09%、13.20%、8.99%、6.19%、5.19%、4.18%、5.55%、

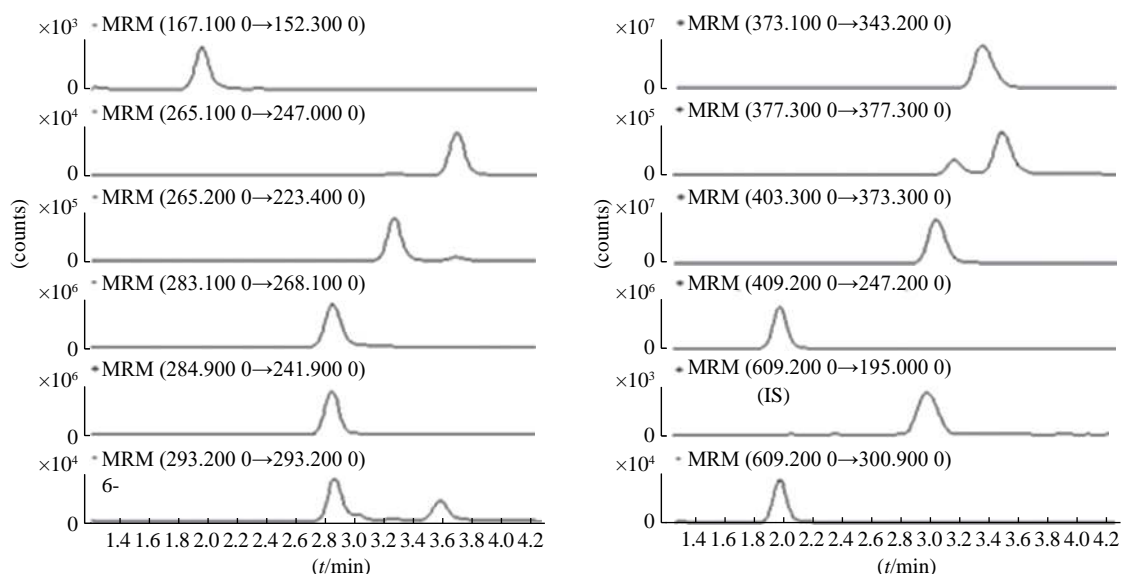


图2 寒湿郁肺汤中11个主成分及内标的MRM色谱图

表2 寒湿郁肺汤中11种成分的线性考察

测定成分	回归方程	r	线性范围(μg/ml)
香草酸	$Y=9.023C-1.345$	0.99	0.02~2.00
厚朴酚	$Y=0.023C+0.002$	0.99	0.02~2.00
和厚朴酚	$Y=0.028C-0.060$	0.98	0.02~2.00
汉黄芩素	$Y=0.701C+1.802$	0.98	0.02~2.00
刺槐素	$Y=0.488C+0.205$	0.99	0.02~2.00
6-姜酚	$Y=0.003C+1.510$	0.99	0.20~20.00
桔皮素	$Y=4.291C+70.573$	0.99	0.02~2.00
羌活醇	$Y=0.173C+3.849$	0.98	0.02~2.00
川陈皮素	$Y=0.576C+277.012$	0.99	0.20~20.00
紫花前胡苷	$Y=0.362C-0.081$	0.99	0.02~2.00
橙皮苷	$Y=0.011C+0.061$	0.99	0.20~20.00

9.47%，表明供试品溶液在室温放置4 h内稳定性良好。

2.3.6 加样回收率试验

精密称取已知含量的寒湿郁肺汤样品，加入各对照品适量，平行制备6份，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱与质谱条件进样测定，进行UHPLC-MS/MS分析，计算各待测物的平均回收率及其RSD。11种待测物：香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷的平均加样回收率分别为111.73%、102.96%、108.94%、102.90%、99.36%、104.83%、100.55%、100.27%、105.49%、96.92%、93.11%，RSD分别为2.44%、2.37%、4.44%、1.92%、4.60%、2.57%、1.79%、2.36%、4.99%、3.08%、3.59%，表明该方法的准确度良好。

2.3.7 样品含量测定

取9批寒湿郁肺汤药材，按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.2”项下色谱与质谱条件进行测定，计算寒湿郁肺汤9批样本中11种成分：香草酸、厚朴酚、和厚朴酚、汉黄芩素、刺槐素、6-姜酚、桔皮素、羌活醇、川陈皮素、紫花前胡苷、橙皮苷的含量，测定结果为香草酸0.07~0.09 μg/ml、厚朴酚0.06~0.07 μg/ml、和厚朴酚0.26~0.57 μg/ml、汉黄芩素0.07~0.09 μg/ml、刺槐素0.27~0.29 μg/ml、6-姜酚0.55~0.58 μg/ml、桔皮素0.31~0.33 μg/ml、羌活醇0.54~0.58 μg/ml、川陈皮素3.78~3.81 μg/ml、紫花前胡苷0.31~0.33 μg/ml、橙皮苷1.58~1.61 μg/ml。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

在预实验中分别考察了Agilent ZORBAX SB-C₁₈(3.5 μm, 2.1 mm×100 mm)、Agilent ZORBAX SB-C₁₈(3.5 μm, 2.1 mm×150 mm)、Waters Xbridge® HILIC(3.5 μm, 2.1 mm×100 mm)、Waters Atlantis® T3(3 μm, 2.1 mm×100 mm)、Agilent Eclipse XDB-C₁₈(3.5 μm, 2.1 mm×150 mm)等色谱柱对11个待测成分含量测定的影响，结果显示，当色谱柱为Agilent ZORBAX SB-C₁₈(3.5 μm, 2.1 mm×150 mm)时，11个待测成分及内标的峰形最佳。

3.2 流动相的优化

实验中分别考察了水-乙腈、0.1%甲酸水-乙腈、0.15%甲酸水-乙腈、0.2%甲酸水-乙腈、5 mmol/L醋酸铵溶液-乙腈、10 mmol/L醋酸铵水-乙腈、0.2%甲酸-10 mmol/L醋酸铵水溶液-甲醇、

1263-1266.

[2] AMRUTIYA N, MADAN M, BAJAJ A. Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous estimation of prednicarbate, mupirocin and ketoconazole in topical dosage forms[J]. *J Anal Chem*, 2010, 65(11): 1148-1154.

[3] 王爱平, 李若瑜. 2%酮康唑乳膏在皮肤科疾病中的应用[J]. *中国真菌学杂志*, 2010, 5(3): 179-183.

[4] 陆雪华, 陆艳萍, 覃美玲, 等. 复方酮康唑莫匹罗星联合治疗真菌性皮肤溃疡疗效观察[J]. *基层医学论坛*, 2018, 22(2): 158-160.

[5] 中国中西医结合学会皮肤性病学会环境与职业性皮肤病学组. 糠酸莫米松乳膏临床应用专家共识[J]. *中国中西医结合皮肤性病学期刊*, 2017, 16(1): 88-90.

[6] 孟甄, 金建玲, 刘玉庆, 等. 细菌耐药性的诱导与消除[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(9): 1047-1051.

[7] 谢阳, 万苗坚. 皮肤科常用糖皮质激素类药物的类型及适应证[J]. *中国医学文摘(皮肤科学)*, 2015, 32(3): 283-288.

[8] 刘淮, 刘景桢. 外用糖皮质激素的适应症与副作用[J]. *皮肤病与性病*, 2016, 38(1): 19-20.

[9] 李文仕. RP-HPLC法测定复方中风康复片中盐酸麻黄碱的含量[J]. *中国药事*, 2012, 26(5): 494-496.

[10] 颜苗, 张金娇, 李焕德, 等. RP-HPLC法同时测定甘草酸制剂中18 α -、18 β -甘草酸的含量[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(2): 301-304, 309.

[11] ABDELWAHAB N S, ALI N W, ABDELKAWY M, et al. Validated RP-HPLC and TLC-densitometric methods for analysis of ternary mixture of cetylpyridinium chloride, chlorocresol and lidocaine in oral antiseptic formulation[J]. *J Chromatogr Sci*, 2016, 54(3): 318-325.

[12] WAN F Y, LI A H. Determination of three constituents in compound ketoconazole liniment by RP-HPLC[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(7): 1263-1266.

[13] SHEHNAZ H, HAIDER A, SAEED ARAYNE M, et al. Carboxyterfenadine antacid interaction monitoring by UV spectrophotometry and RP-HPLC techniques[J]. *Arab J Chem*, 2014, 7(5): 839-845.

[14] VENISHETTY V K, PARIKH N, SISTLA R, et al. Application of validated RP-HPLC method for simultaneous determination of docetaxel and ketoconazole in solid lipid nanoparticles[J]. *J Chromatogr Sci*, 2011, 49(2): 136-141.

[15] AHMMED S M, MUKHERJEE P K, BAHADUR S, et al. CYP450 mediated inhibition potential of *Swertia chirata*: an herb from Indian traditional medicine[J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 178: 34-39.

[16] STAUB I, FLORES L, GOSMANN G, et al. Photostability studies of ketoconazole: isolation and structural elucidation of the main photodegradation products[J]. *Lat Am J Pharm*, 2010, 29(7): 1100-1106.

[] 2020-06-20 [] 2021-03-13
[] 陈盛新

(151)

0.2% 甲酸-10 mmol/L 醋酸铵水溶液-乙腈等流动相对 11 个成分含量测定的影响, 结果显示, 此 11 个待测成分在 0.2% 甲酸-10 mmol/L 醋酸铵水溶液-乙腈中, 采用梯度洗脱, 响应与峰形均佳。

3.3 内标与化学成分的选择

在预实验中分别考察了培美曲塞、利血平、卡马西平三个标准品作为内标时的响应和出峰时间, 最终选用了出峰时间居中、响应好、稳定性高的利血平作为内标。本实验中所选取的化学成分以药典为基础, 结合文献调研, 舍弃挥发油类成分及违禁成分, 最终选取了 11 个能代表药材的化学成分进行研究。

6 结论

本研究基于 UHPLC-MS/MS 同时测定寒湿郁肺汤中 11 个成分含量的方法, 经色谱柱、流动相的优化和全面的方法学考察, 成功应用于样品中寒湿郁肺汤 11 种成分的测定。该法简便可靠, 可为寒湿郁肺汤中的成分检测提供一定的方法参考, 也为寒湿郁肺汤的质量控制及质量标准研究奠定了基础。

【 】

[1] LUO H, TANG Q L, SHANG Y X, et al. Can Chinese medicine be used for prevention of *Corona* virus disease 2019 (COVID-19)? A review of historical classics, research evidence and current prevention programs[J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(4): 243-250.

[2] LI Y X, LIU X B, GUO L X, et al. Traditional Chinese herbal medicine for treating novel coronavirus (COVID-19) pneumonia: protocol for a systematic review and meta-analysis[J]. *Syst Rev*, 2020, 9(1): 75.

[3] ZHU F C, LI Y H, GUAN X H, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial[J]. *Lancet*, 2020, 395(10240): 1845-1854.

[4] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL]. [2020-12-01]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-03/04/content_5486705.htm

[5] REN J L, ZHANG A H, WANG X J. Traditional Chinese medicine for COVID-19 treatment[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 155: 104743.

[6] YANG Y, ISLAM M S, WANG J, et al. Traditional Chinese medicine in the treatment of patients infected with 2019-new coronavirus (SARS-CoV-2): a review and perspective[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(10): 1708-1717.

[7] 中华医学会检验医学分会, 卫生计生委临床检验中心. 液相色谱-质谱临床应用建议[J]. *中华检验医学杂志*, 2017, 40(10): 770-779.

[] 2020-12-05 [] 2021-03-13
[] 陈盛新