

HPLC-MS/MS 法测定柴葛解肌汤中柴胡皂苷 a、b2 的含量

谢友良¹, 毕何锋¹, 张 捷¹, 蒋东旭^{1,2}, 赖小平^{1,2}, 杨俊标³, 高华裕³ (1. 广州中医药大学, 广东 广州 510006; 2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808; 3. 广东德鑫制药有限公司, 广东 江门 529100)

摘要: 目的 建立测定柴葛解肌汤中 I 型柴胡皂苷 a 与 II 型柴胡皂苷 b2 的 HPLC-MS/MS 方法。方法 采用 Hypersil GOLD aQ 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 3 μm), 乙腈-0.1% 甲酸溶液为流动相, 流速为 300 μL·min⁻¹, 柱温: 25 ℃, 以液相色谱分离、电喷雾离子化串联进行检测。结果 柴胡皂苷 a、b2 分别在 44.8~672 ng·mL⁻¹、47.2~708 ng·mL⁻¹ 线性关系良好 ($r=0.9992$ 、 $r=0.9993$), 平均回收率分别为 98.53% 和 99.47%, RSD 分别为 2.01% 和 2.08% ($n=6$)。结论 该方法快速简便、准确、灵敏度高, 可用于柴葛解肌汤中柴胡皂苷 a、b2 的含量测定。

关键词: 柴葛解肌汤; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 b2; HPLC-MS/MS

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)01-0071-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.01.019

Determination of Saikosaponin a and Saikosaponin b2 in *Chaige Jieji* Decoction by HPLC-MS/MS

Xie Youliang¹, BI Hefeng¹, ZHANG Jie¹, JIANG Dongxu^{1,2}, LAI Xiaoping^{1,2}, YANG Junbiao³, GAO Huayu³ (1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China; 2. Dongguan Mathematic Engineering Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 523808 Guangdong, China; 3. Guangdong Dexin Pharmaceutical Co., Ltd, Jiangmen 529100 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC-MS/MS method for the determination of saikosaponin a and saikosaponin b2 in *Chaige Jieji* decoction. **Methods** The separation was performed by using HPLC method with Hypersil GOLD aQ (150 mm × 2.1 mm, 3 μm) as chromatographic column. The mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% formic acid and the flow rate was 300 μL·min⁻¹, the column temperature was set at 25 ℃, and the detection was done by electrospray ionization mass spectrometry. **Results** The linear range was 44.8~672 ng·mL⁻¹ for saikosaponin a ($r=0.9992$), and 47.2~708 ng·mL⁻¹ for saikosaponin b2 ($r=0.9993$). The average recovery rates of saikosaponin a and saikosaponin b2 were 98.53%, 99.47%, and RSD were 2.01%, 2.08% ($n=6$), respectively. **Conclusion** The established method is simple, quick, sensitive and accurate, can be used to determine the content of saikosaponin a and saikosaponin b2 in *Chaige Jieji* decoction.

Keywords: *Chaige Jieji* decoction; Saikosaponin a; Saikosaponin b2; HPLC-MS/MS

柴葛解肌汤出自明·陶氏撰《伤寒六书》，本方由柴胡、葛根、石膏、甘草、黄芩、羌活、白芷、芍药、桔梗、生姜、大枣等 11 味中药组成。方中以葛根、柴胡解肌退热、透解阳明经之表证为主药，全方具有解肌清热的功效，主治外感温邪，内有郁热，发热头痛，不恶寒而口渴者。该方及其加减方对多种

原因引起的高热、流行性感、上呼吸道感染，以及细菌或病毒感染所导致的扁桃体炎、肺炎、脑炎、咽喉炎、流行性腮腺炎等多种疾病具有良好的治疗作用^[1-4]。

I 型原生皂苷柴胡皂苷 a、c、d 具有解热、镇痛、抗炎、免疫调节、抗肝损伤、抗肝纤维化等多

收稿日期: 2013-10-09

作者简介: 谢友良, 男, 助理研究员, 研究方向: 中药新药开发研究。Email: xieyl@gzucm.edu.cn。通讯作者: 蒋东旭, 硕士, 男, 副研究员, 从事中药新药开发研究。Email: derekking@qq.com。

基金项目: 广东省高新区发展引导项目(2011B010600045); 省部产学研结合科技创新平台(201213090600007)。

种药理活性^[5-8], 但该类成分结构不稳定, 柴胡在煎煮或炮制的过程中, 易转化为Ⅱ型柴胡皂苷 b1、b2, 降解后的次生皂苷仍具有较好的生理活性^[9-11]。柴胡皂苷的定性定量分析方法多采用 HPLC 法测定^[12-13], 利用末端吸收进行定量分析, 基线易发生漂移, 检测灵敏度低; 而采用液质联用技术, 检测灵敏度可显著提高。基于此, 本文以柴葛解肌汤中柴胡皂苷 a、b2 为研究对象, 建立了 HPLC-MS/MS 法同时测定柴葛解肌汤中柴胡皂苷 a、b2 的含量方法, 为了解复方煎煮过程中柴胡皂苷溶出规律提供了简便快速的手段, 以期为提高该制剂质量奠定基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器 Thermo Scientific 液相色谱-质谱联用仪 (triple-quadrupole mass spectrometer detector, Accela Auto Sampler, Accela 1250 Pump, TSQ Quantum Access MAX); Sartorius CP2250 电子分析天平 (d=0.01 mg, 德国 sartorius 公司)。

1.2 试药 柴胡皂苷 a, 中国药品生物制品检定所, 批号: 110777-201108, 含量: 90.5 %; 柴胡皂苷 b2, 成都曼思特生物科技有限公司, 批号: must-12041002, 含量: 99.2 %; 乙腈为色谱纯, 德国 Merck 试剂; 甲酸为色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司; 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。柴胡购自广州中医药大学采芝林神农轩药店, 经广州中医药大学赖小平教授鉴定为伞形科植物 *Bupleurum chinense* DC.(北柴胡)的干燥根, 符合 2010 年版《中国药典》标准; 葛根, 桔梗, 白芷, 白芍, 甘草, 石膏, 生姜, 羌活, 黄芩和大枣皆购自广东和翔制药有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil GOLD aQ 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 3 μm), 采用乙腈 (A)-0.1 % 甲酸 (B) 梯度洗脱 (0 min, 35 : 65; 10 min, 45 : 55), 流速为 300 μL·min⁻¹, 柱温 25 °C, 进样量为 5 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾 ESI 离子源, 负离子模式检测; 喷雾电压: 2500 V; 蒸发器温度: 200 °C; 鞘气: 35 psi; 辅助气: 10 psi; 碰撞能量为 20 V; 毛细管温度: 350 °C; 采用选择反应检测 (SRM); 柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b2 检测离子对选择 m/z 779.3-617.2。柴胡皂苷二级扫描质谱图见图 1, 供试品离子流图见图 2。

2.3 柴葛解肌汤标准水煎液制备 取柴胡 20 g、粉葛

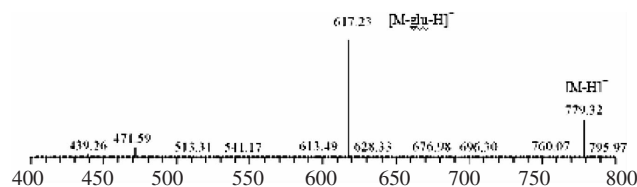


图 1 柴胡皂苷 a、b2 分子离子峰质谱图

Figure 1 Product ion mass spectra of saikosaponin a and saikosaponin b2

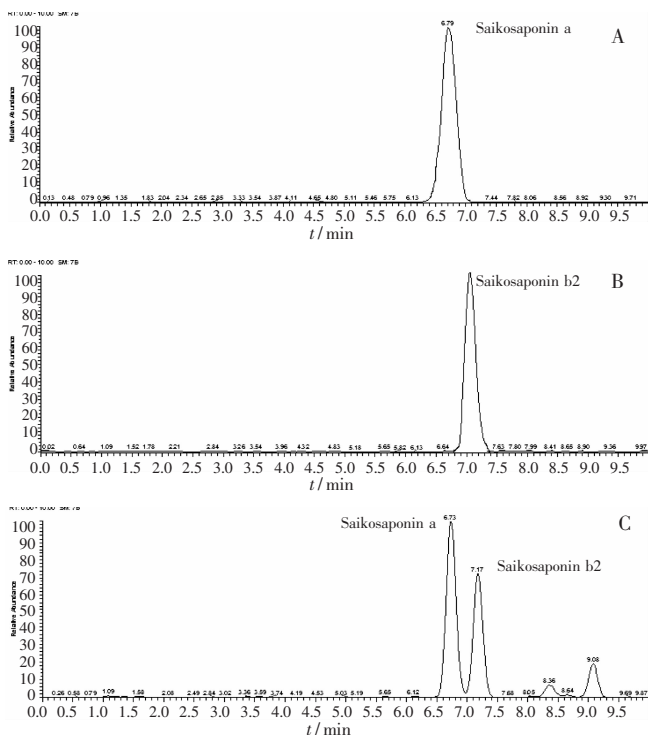


图 2 柴胡皂苷 a 对照品 (A)、柴胡皂苷 b2 对照品 (B) 和柴葛解肌汤供试品 (C) m/z 779.3-617.2 离子流图

Figure 2 HPLC-MS/MS chromatograms of Saikosaponin a reference substances (A), Saikosaponin b2 (B) and *Chaige Jieji* decoction sample (C)

20 g、黄芩 10 g、羌活 6 g、白芷 10 g、桔梗 10 g、大枣 10 g、白芍 10 g、生姜 6 g、甘草 5 g、石膏 60 g 总共 167 g, 加水 450 mL, 先浸泡 15 min, 再煎煮 15 min, 滤过; 再加水 300 mL, 煎煮 15 min, 滤过, 合并两次滤液, 60 °C 减压浓缩后定容至 500 mL 量瓶中, 备用。

2.4 供试品溶液的制备 精密量取柴葛解肌汤水煎液 5 mL, 置于 25 mL 具塞锥形瓶中, 加入乙醇 20 mL, 密塞, 超声处理 5 min, 静置过夜, 滤过, 滤液转移至 25 mL 量瓶中, 滤渣加适量乙醇洗涤, 洗涤液并入滤液中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 精密量取 10 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 静置 1 h, 精密量取 1 mL 置于 25 mL 量瓶中, 加甲醇至

刻度，摇匀，过 0.45 μm 滤膜即得。

2.5 对照品储备溶液的制备 分别精密称取柴胡皂苷 a 和 b2 对照品适量，加甲醇制成浓度分别为 22.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 23.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准品储备溶液。

2.6 线性关系考察 分别精密吸取各对照品储备液 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 2.5, 3.0 mL，置于 100 mL 量瓶中，加流动相稀释至刻度，摇匀，制得对照品混合溶液，按上述色谱和质谱条件进行检测。以进样质量浓度为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归，得回归方程如下：

柴胡皂苷 a: $Y=165.66\times103X+444.09(r=0.9992)$

柴胡皂苷 b2: $Y=212.57\times103X-58.23(r=0.9993)$

表明柴胡皂苷 a 在 44.8~672 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、柴胡皂苷 b2 在 47.2~708 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性关系良好。

2.7 精密度试验 精密吸取上述对照品溶液各 5 μL ，连续进样 6 次，按上述色谱和质谱条件测定峰面积，计算得柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b2 峰面积的 RSD 分别为 1.29 %、2.82 %，表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 5 μL ，分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样测定，计算得柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b2 峰面积 RSD 分别为 2.94 % 和 3.09 %，表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.9 重复性试验 取柴葛解肌汤水煎液，按照 2.4 项下方法制备供试品溶液，共 5 份，依次测定色谱峰面积，计算得柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 b2 含量的 RSD 分别为 4.34 % 和 3.99 %，表明本方法重复性良好。

2.10 回收率试验 取已知含量柴葛解肌汤水煎液 2.5 mL(批号：2013032701)，加入相当于其含量 100 % 的柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 b2 对照品溶液适量(8.96 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 柴胡皂苷 a 1.0 mL 和 23.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 柴胡皂苷 b2 0.25 mL)，加水定容至 5 mL 容量瓶中，共 6 份，按照 2.4 项下供试品制备方法处理，精密吸取 5 μL 进样。柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 b2 峰面积的平均回收率为 98.53 % 和 99.47 %，其 RSD 分别为 2.01 % 和 2.08 %。

2.11 样品含量测定 按照 2.3 项下柴葛解肌汤水煎液制备方法制备 3 批样品，分别按照 2.4 项下供试品制备方法制备供试品溶液，精密吸取供试品溶液 5 μL 进样，测定峰面积，按回归方程计算柴葛解肌汤中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 b2 的含量，结果见表 1。

3 讨论

3.1 检测方法的选择和样品的处理 柴葛解肌汤水煎液中柴胡皂苷含量较低，不经富集纯化，浓度小于常

表 1 柴葛解肌汤中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 b2 含量的测定 ($n=3$, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Table 1 Determination of saikosaponin a and saikosaponin b2 in Chaige Jieji decoction($n=3$, $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

批号	柴胡皂苷 a	柴胡皂苷 b2
2013032701	3.41	2.19
2013032802	3.86	2.03
2013032903	3.65	2.27

规检测器的检测限。我们曾用正丁醇萃取法，AB-8 大孔树脂吸附法富集纯化样品，回收率均难以达到要求，原因是在富集浓缩过程中，样品不可避免要受热，性质不稳定的柴胡皂苷易转化，无法真实表征该汤液中柴胡皂苷的分布情况。质谱检测器具有专属性强，检测限低的特点。运用质谱检测器，煎剂无需经过富集，避免受热转化，检测结果的准确性可以得到保障。柴胡皂苷具有醇溶性，采用分步醇沉法纯化供试品，得到样品澄清透明，可减小离子源的污染。

3.2 质谱测定条件选择 首先采用了正和负离子模式对柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 b2 进行全扫描，负离子模式下柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 b2 的响应值比正离子模式下柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 b2 的响应值强，因此，选择负离子模式。然后选择分子离子峰(779.3)进行离子扫描和碰撞电压的优化，碰撞能量为 20 V 时，产生较强的碎片离子峰(617.3)。因此，确定碰撞能量为 20 V 和 SRM(779.3-617.3)。

3.3 色谱条件优化 柴胡皂苷 a、b2 极性类似且为同分异构体，色谱保留差异较小，为实现同时、快速分离测定，在流动相的优化选择中，比较了甲醇-水、乙腈-水二元洗脱系统，最终确定以乙腈-0.1 % 甲酸溶液作为流动相，流速 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ，梯度洗脱，得到较好的峰型和分离度，且保留时间合理。

3.4 结果分析 本文采用 HPLC-MS/MS 法，色谱分离简单，特异性强，能快速准确测定柴葛解肌汤中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 b2 的含量，经方法学考察，该方法可以很好的测定柴葛解肌汤中柴胡皂苷 a 和柴胡皂苷 b2 的含量，为进一步开发研究柴葛解肌汤奠定了一定基础。

参考文献：

[1] 张玉英. 柴葛解肌汤加减治疗小儿急性上感发热疗效观察[J]. 甘肃中医学院学报, 2008, 25(3): 39-40.
[2] 侯锋. 柴葛解肌汤治疗小儿流行性腮腺炎发热 30 例[J]. 中药材, 2001, 24(9): 697.
[3] 张燕, 于兆荣. 柴葛解肌汤治疗小儿肺炎高热 60 例[J]. 中国中医

- 急症, 2003, 12(2): 179-180.
- [4] 陈可静. 柴葛解肌汤加减治疗小儿疱疹性咽峡炎28例[J]. 中国中医急症, 2003, 12 (1): 87.
- [5] 黄伟, 孙蓉. 柴胡皂苷类成分化学与药理和毒理作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(3): 71-74.
- [6] 谢东浩, 蔡宝昌, 安益强, 等. 柴胡皂苷类化学成分及药理作用研究进展[J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(1): 63-65.
- [7] 杨志刚, 陈阿琴, 孙红祥, 等. 柴胡皂苷药理作用研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(5): 27-30.
- [8] 朱兰香, 刘世增, 顾振纶. 柴胡皂苷的药理作用及抗肝纤维化的应用[J]. 中草药, 2002, 33(10): 附5-附6.
- [9] 李军, 姜华, 张延萍, 等. 柴胡汤剂中次生柴胡皂苷结构研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(20): 3078-3082.
- [10] 许磊, 田稷馨, 宋瑞, 等. 柴胡醋制前后柴胡皂苷 a、b2、c、d 的 LC-MS/MS 法测定及比较[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43 (4): 334-340.
- [11] Cheng PW, Ng LT, Chiang LC, et al. Antiviral effects of saikosaponins on human coronavirus 229E in vitro[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(7): 612.
- [12] 林东昊, 茅仁刚, 王智华, 等. 23 种国产柴胡属植物中柴胡皂苷 a、c、d 含量的 RP-HPLC 测定[J]. 药物分析杂志, 2004, 24 (5): 479-483.
- [13] 肖功胜, 杨云, 孙维英, 等. 柴胡有效成分提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(8): 1829-1831.

(编辑: 宋威)

GC 法测定克痒敏酊中薄荷脑、冰片和水杨酸甲酯的含量

曾小平¹, 陈新国², 黄俊忠²(1. 清远市食品药品检验所, 广东 清远 511517; 2. 广东省食品药品检验所, 广东 广州 510180)

摘要: **目的** 建立同步测定克痒敏酊中薄荷脑、冰片(龙脑和异龙脑)和水杨酸甲酯含量的气相色谱(GC)方法。**方法** 采用 GC 法。色谱柱为 DB-WAX 毛细管柱(30.0 m×0.25 mm, 0.25 μm); FID 检测器; 采用程序升温: 初始温度为 70 ℃, 以 7 ℃·min⁻¹ 升至 180 ℃, 保留 8 min。**结果** 薄荷脑的加样回收率为 99.9%, RSD 为 0.98%(n=6); 冰片(龙脑和异龙脑)加样回收率为 100.8%, RSD 为 1.05%(n=6); 水杨酸甲酯加样回收率为 100.9%, RSD 为 1.39%(n=6)。**结论** 本方法简便准确、重现性好、专属性强, 可用于克痒敏酊的质量控制。

关键词: 克痒敏酊; 气相色谱; 薄荷脑; 冰片(龙脑和异龙脑); 水杨酸甲酯

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)01-0074-03

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.01.020

Determination of Menthol, Borneol and Methyl Salicylate in Keyang Minxu Tincture by GC

ZENG Xiaoping¹, CHEN Xinguo², HUANG Junzhong²(1. Qingyuan Institute for Food and Drug Control, Qingyuan 511517 Guangdong, China; 2. Guangdong Institute for Food and Drug Control, Guangzhou 510180 Guangdong, China)

Abstract: Objective To establish a method for the simultaneous determination of menthol, borneol(borneol and isoborneol) and methyl salicylate in Keyang Minxu tincture. **Methods** The gas chromatography(GC) was equipped with FID detector, and a DB-WAX(30.0 m×0.25 mm, 0.25 μm)capillary column was used. The temperature program of column oven was as follows: 70 ℃, increased at a rate of 7 ℃·min⁻¹ to 180 ℃, held for 8 min. **Results** The average recovery of menthol, borneol(borneol and isoborneol) and methyl salicylate were 99.9%(RSD=0.98%), 100.8%(RSD=1.05%), 100.9%(RSD=1.39%), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and specific. It can be used for the quality control of Keyang Minxu tincture.

Keywords: Keyang Minxu tincture; Gas chromatography; Menthol; Borneol (borneol and isoborneol); Methyl salicylate

收稿日期: 2013-10-09

作者简介: 曾小平, 男, 副主任药师, 主要从事药品检验与中药标准提高。Email: 1162647974@qq.com。通讯作者: 黄俊忠, 男, 主管药师, 研究方向: 中药质量控制与标准提高。Email: 79312814@qq.com。