

UHPLC-ESI-MS/MS 同时测定心安宁胶囊中的 5 种药效成分

张婷¹, 王文彤¹, 陈玲^{2*} (1.天津市医药科学研究所, 天津 300020; 2.天津市中医药研究院附属医院, 天津 300120)

摘要: 目的 建立 UHPLC-ESI-MS/MS 同时测定心安宁胶囊中葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸的含量。方法 采用 InertSustain[®] C₁₈ 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 3.0 μm), 乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 10 μL; 质谱采用电喷雾离子源(ESI 源), 负离子扫描模式, 多重反应监测模式进行定量分析。结果 心安宁胶囊中 5 种成分在线性范围内峰面积与浓度均呈良好的线性关系, 仪器精密度 RSD<2.0%, 平均加样回收率为 99.15%~99.89%, RSD 为 0.89%~2.21%。在所设定的色谱条件下, 心安宁胶囊中葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸 5 个成分于 10 min 内完全分离。结论 建立的 UHPLC-ESI-MS/MS 方法快速简便、精密度好、灵敏度高, 可用于心安宁胶囊中多种成分的含量测定和质量控制。

关键词: 液质联用; 心安宁胶囊; 葛根素; 二苯乙烯苷; 金丝桃苷; 槲皮素; 齐墩果酸; 多重反应监测

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)14-1730-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.14.012

引用本文: 张婷, 王文彤, 陈玲. UHPLC-ESI-MS/MS 同时测定心安宁胶囊中的 5 种药效成分[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(14): 1730-1733.

Simultaneous Determination of 5 Components in Xin'anling Capsules by UHPLC-ESI-MS/MS

ZHANG Ting¹, WANG Wentong¹, CHEN Ling^{2*} (1.Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China; 2.Affiliated Hospital of Tianjin Academy of TCM, Tianjin 300120, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for simultaneous determination of puerarin, 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O-β-D-glucoside, hyperoside, quercetin and oleanolic acid in Xin'anling capsules by UHPLC-ESI-MS/MS. **METHODS** The analysis was performed with triple quadrupole mass spectrometer by electrospray ionization(ESI⁻)mode and on InertSustain[®] C₁₈ chromatographic column(3.0 mm×100 mm, 3.0 μm). The mobile phase was acetonitrile and 0.1% formic acid-water with gradient elution at a flow rate of 0.4 mL·min⁻¹, and the injection volume was 10 μL. **RESULTS** For the UHPLC-ESI-MS/MS assay, the calibration curve was linear, the precision of RSD was less than 2.0%, the average recoveries ranged from 99.15% to 99.89%, RSD ranged from 0.89% to 2.21%. And under the optimized chromatographic conditions, the complete separation of 5 target components were obtained within 10 min. **CONCLUSION** The established UHPLC-ESI-MS/MS can be served as a scientific and effective way for quality control of Xin'anling capsules.

KEYWORDS: UHPLC-ESI-MS/MS; Xin'anling capsules; puerarin, 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O-β-D-glucoside; hyperoside; quercetin; oleanolic acid; MRM

心安宁胶囊由葛根、山楂、制何首乌及珍珠粉 4 味中药材组成, 由《卫生部药品标准》所收录的心安宁片改变剂型而得, 具有养阴宁心、化痰通络、降低血脂的功效^[1]。方中葛根具有保护缺血再灌注损伤、降血压等作用, 葛根素作为葛根异黄酮的主要成分, 具有降血压, 减慢心律, 舒张血管, 降低血液黏度等药理作用^[2-3]。山楂性酸、甘、味温, 具有调脂、降压、抗动脉粥样硬化的作用, 对高血压病、冠心病、下肢动脉粥样硬化闭塞症等心脑血管疾病及外周血管疾病具有明确的疗效^[4]。山楂中所含黄酮类化合物金丝桃苷、槲皮素, 具有抗急性肝损伤、抗氧化应激和抗细胞

凋亡等作用^[5-6]; 五环三萜酸类有机酸成分齐墩果酸具有抗菌、抗炎、抗肿瘤、抗突变、抗氧化等作用^[7]。制何首乌具有补肝肾、益精血的功效, 其主要成分二苯乙烯苷具有明显降低大鼠血清中总胆固醇, 降血脂及抗动脉粥样硬化等作用^[8]。珍珠粉中发挥药理作用的主要有效成分有生物钙、氨基酸和微量元素等成分, 主要表现在保护神经元细胞、疏通微循环、提高免疫力、延缓衰老、抗炎、明显的中枢抑制等作用^[9]。

文献有心安宁相关制剂中有效成分含量测定的报道, 早期研究多为采用 HPLC 检测单指标成分(如葛根素)居多^[10-11], 但中药成分复杂, 有效成

作者简介: 张婷, 女, 硕士, 助理研究员 Tel: 13602196583
主治医师 Tel: 13752134218 E-mail: seekivy@hotmail.com

E-mail: zhangting19860511@126.com *通信作者: 陈玲, 女, 硕士,

分较多,尤其某些成分含量较小,仅对单一成分进行质量控制,不足以充分、全面、有效地评价心安宁胶囊的质量。目前,灵敏度高、专属性好的液质联用法已广泛应用于中成药的含量测定^[12-13]。本研究首次建立 UHPLC-ESI-MS/MS 同时测定心安宁胶囊中 5 种化学成分,为心安宁胶囊的质量控制提供快速、稳定的分析方法。

1 仪器与试剂

LC-30A 超高效液相色谱仪与 LCMS-8040 三重四极杆质谱仪联用系统(岛津);AB135-S 型十万分之一电子分析天平(Mettler Toledo 公司);KQ5200B 型超声波清洗器(功率 200 W,频率 40 kHz,昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, Sigma 科技有限公司);水为娃哈哈纯净水;心安宁胶囊(江苏七 O 七天然制药有限公司,规格:每粒 0.32 g;批号:180201,180401,180502);2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖糖苷(二苯乙烯苷,北京盛世康普化工技术研究院,批号:82373-94-2;含量以 98%计);槲皮素(南京奥多福尼生物公司,批号:MUST-17101104;含量以 99.35%计);金丝桃苷(批号:111521-200303;含量以 100%计)、葛根素(批号:110752-201313;含量以 95.5%计)、齐墩果酸(批号:110709-200304;含量以 100%计)均购自中国食品药品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱条件:InertSustain[®] C₁₈ 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 3.0 μ m);柱温为 35 $^{\circ}$ C,流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0~3 min, 45%A; 3~3.01 min, 45%→95%A; 3.01~9 min, 95%A; 9~9.01 min, 95%→45%A; 9.01~15 min, 45%A);流速:0.4 mL·min⁻¹;进样量:10 μ L。切换阀:在进行金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸质谱分析时,在进样后的前 4 min 切换到至废液模式。

质谱条件:ESI 离子源负离子模式,定量分析采用多重反应离子监测(MRM),加热模块温度 400 $^{\circ}$ C,DL 温度 250 $^{\circ}$ C,雾化气流速 3.0 L·min⁻¹,干燥气流速 15 L·min⁻¹,离子源电压 4.0 kV。葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸质谱分析条件参数见表 1。

按前述色谱和质谱条件对心安宁胶囊中各成分进行测定,记录色谱图。混合对照品和心安宁胶囊中 5 种目标化合物的多重反应监测色谱图见图 1。

表 1 葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸质谱分析条件

Tab. 1 MS parameters of puerarin, 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O- β -D-glucoside, hyperoside, quercetin and oleanolic acid

成分	保留时间 t_R /min	MRM	Q1 Pre Bias/V	碰撞能量 CE/V	Q3 Pre Bias/V
葛根素	3.041	415.2→267.0	28	33	25
二苯乙烯苷	3.736	405.2→243.1	27	22	23
金丝桃苷	4.725	463.1→300.0	22	30	29
槲皮素	6.720	301.0→150.9	20	23	24
齐墩果酸	8.863	455.4→455.4	16	30	28

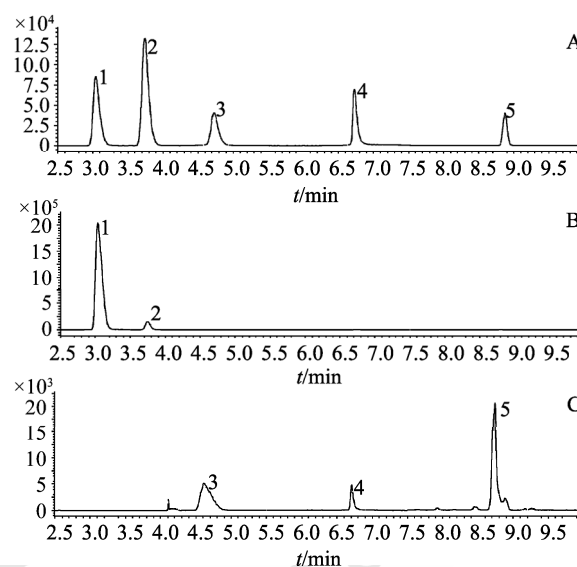


图 1 多重反应监测色谱图
A-对照品; B、C-心安宁胶囊样品; 1-葛根素; 2-二苯乙烯苷; 3-金丝桃苷; 4-槲皮素; 5-齐墩果酸。

Fig. 1 MRM chromatograms

A-reference substances; B, C-Xin'anling capsules sample; 1-puerarin; 2-2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-O- β -D-glucoside; 3-hyperoside; 4-quercetin; 5-oleanolic acid.

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的配制 分别精密称量葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸对照品适量,加甲醇溶解分别制得 0.111, 0.126, 0.130, 0.075, 0.114 mg·mL⁻¹ 的单一对照品贮备液。分别精密量取上述对照品储备液适量,置同一 10 mL 量瓶中,加甲醇即得葛根素 2.22 μ g·mL⁻¹、二苯乙烯苷 5.04 μ g·mL⁻¹、金丝桃苷 5.20 μ g·mL⁻¹、槲皮素 1.50 μ g·mL⁻¹、齐墩果酸 4.56 μ g·mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备

2.2.2.1 供试品溶液 I 取本品内容物,研细,精密称取 1.0 g,置 50 mL 量瓶中,加 50%甲醇适量,超声处理 30 min,用 50%甲醇稀释至刻度,摇匀,0.22 μ m 针芯式微孔滤膜过滤,即得,用于检测金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸。

2.2.2.2 供试品溶液Ⅱ 精密吸取供试品溶液Ⅰ 0.25 mL 置 100 mL 量瓶中, 加 50% 甲醇稀释至刻度, 0.22 μm 针芯式微孔滤膜过滤, 即得, 用于检测葛根素、二苯乙烯苷。

2.2.3 阴性样品溶液的制备 按照处方比例, 分别制备缺少葛根、山楂、制何首乌、珍珠粉药材的阴性样品, 并按“2.2.2”项下方法制备各阴性样品溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 阴性对照试验 取各阴性样品溶液, 按“2.1”项下色谱和质谱条件进行分析, 结果显示阴性对照无干扰, 结果见图 2。

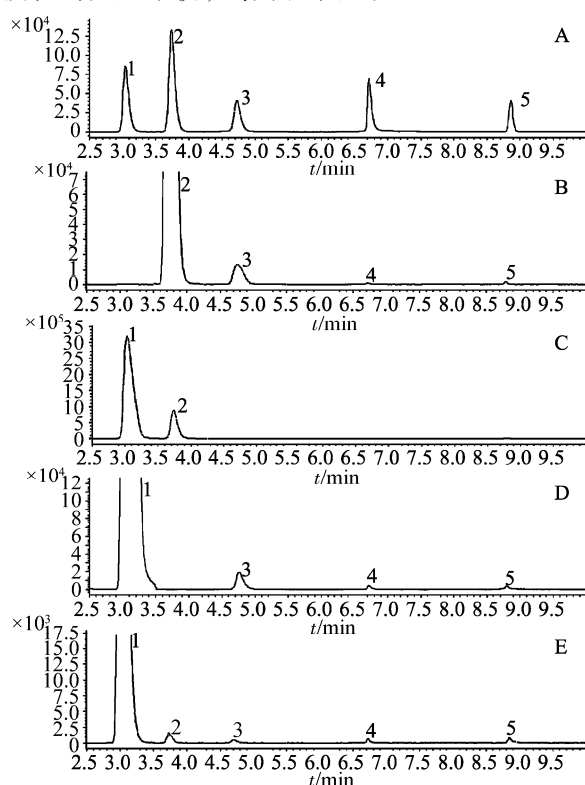


图 2 多重反应监测色谱图
A-混合对照品; B-缺葛根阴性样品; C-缺山楂阴性样品; D-缺制何首乌阴性样品; E-缺珍珠粉阴性样品; 1-葛根素; 2-二苯乙烯苷; 3-金丝桃苷; 4-槲皮素; 5-齐墩果酸。

Fig. 2 MRM chromatograms

A-mixed reference substances; B-negative sample without Puerariae Lobatae Radix; C-negative sample without Crataegi Fructus; D-negative sample without Polygoni Multiflori Radix Praeparata; E-negative sample without pearl powder; 1-puerarin; 2-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside; 3-hyperoside; 4-quercetin; 5-oleanolic acid.

2.3.2 标准曲线的制备 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“2.1”项下色谱和质谱条件进行分析, 记录色谱图和峰面积。以对照品浓度(x)为横坐标, 峰面积(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得标准曲线方程。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 5 种待测组分的质量浓度和峰面积的 $r>0.999\ 0$, 表明该方法的线性关系良好, 各组分的回归方程、线性范围、LOD 和 LOQ 见表 2。

表 2 5 种成分的线性关系和范围

Tab. 2 Linearity and range of five components

成分	线性方程	r	线性范围/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOQ/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
葛根素	$y=900.5x+2\ 936.3$	0.999 9	278~2 222	0.31	1.03
二苯乙烯苷	$y=627.12x-22\ 182$	0.999 8	252~2 520	0.42	1.40
金丝桃苷	$y=216.66x-1\ 596.8$	0.999 5	130~1 950	1.30	4.33
槲皮素	$y=650.97x+3\ 693.6$	0.999 8	75~750	0.53	1.76
齐墩果酸	$y=134.96x-745.14$	0.999 7	114~1 710	2.28	7.60

2.3.3 仪器精密度试验 按照“2.2.2”项下制备方法, 制备心安宁胶囊供试品溶液Ⅰ、Ⅱ, 10 μL 进样, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算得葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸提取离子流色谱峰面积的 RSD 分别为 0.72%, 1.02%, 1.31%, 0.97%, 1.54%, 表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 按照“2.2.2”项下制备方法, 制备心安宁胶囊供试品溶液Ⅰ、Ⅱ, 10 μL 进样, 分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 进行分析, 测定色谱峰面积, 计算得葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸提取离子流色谱峰面积的 RSD 分别为 1.09%, 1.23%, 1.50%, 1.29%, 1.17%, 表明样品稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 按照“2.2.2”项下制备方法, 制备心安宁胶囊供试品溶液Ⅰ、Ⅱ 6 份, 10 μL 进样, 依法测定, 结果葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸含量的 RSD 分别为 1.22%, 1.35%, 1.69%, 1.54%, 1.87%, 表明方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取心安宁胶囊 0.5 g, 精密加入葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸单一对照品贮备液各 13.0, 5.5, 0.5, 0.1, 1.5 mL, 按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液 6 份, 依法测定, 结果葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸的平均加样回收率分别为 99.89%, 99.82%, 99.17%, 99.15%, 99.80%, RSD 分别为 0.89%, 0.91%, 1.90%, 2.21%, 1.20%, 结果见表 3。

2.3.7 样品含量测定 精密称取 3 批心安宁胶囊样品各 3 份, 每份 1.0 g, 按照“2.2.2”项下方法制备, 依法测定, 记录色谱峰面积, 按标准曲线计算葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、

齐墩果酸含量, 结果见表 4。

表 3 心安宁胶囊中葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸的加样回收率试验结果($n=6$)

Tab. 3 Recovery result of puerarin, 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-*O*- β -D-glucoside, hyperoside, quercetin and oleanolic acid in Xin'anning capsules($n=6$)

成分	称量/ g	含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
葛 根 素	0.504 1	1.44×10^4	1.44×10^4	2.89×10^4	100.03	99.89	0.89
	0.501 5	1.44×10^4	1.44×10^4	2.90×10^4	101.47		
	0.503 2	1.44×10^4	1.44×10^4	2.88×10^4	99.32		
	0.502 8	1.44×10^4	1.44×10^4	2.87×10^4	99.32		
	0.499 8	1.43×10^4	1.44×10^4	2.88×10^4	100.16		
	0.500 2	1.43×10^4	1.44×10^4	2.86×10^4	99.02		
二 苯 乙 烯 苷	0.504 1	7.02×10^2	6.93×10^2	1.39×10^3	98.56	99.82	0.91
	0.501 5	6.99×10^2	6.93×10^2	1.40×10^3	101.21		
	0.503 2	7.01×10^2	6.93×10^2	1.39×10^3	99.46		
	0.502 8	7.00×10^2	6.93×10^2	1.39×10^3	99.70		
	0.499 8	6.96×10^2	6.93×10^2	1.39×10^3	100.42		
	0.500 2	6.97×10^2	6.93×10^2	1.39×10^3	99.56		
金 丝 桃 苷	0.504 1	6.45	6.50	12.89	99.02	99.17	1.90
	0.501 5	6.42	6.50	12.75	97.38		
	0.503 2	6.44	6.50	13.12	102.74		
	0.502 8	6.44	6.50	12.88	99.12		
	0.499 8	6.40	6.50	12.76	97.87		
	0.500 2	6.40	6.50	12.83	98.87		
槲 皮 素	0.504 1	0.75	0.75	1.51	101.83	99.15	2.21
	0.501 5	0.74	0.75	1.48	98.34		
	0.503 2	0.74	0.75	1.51	102.01		
	0.502 8	0.74	0.75	1.48	98.09		
	0.499 8	0.74	0.75	1.47	97.35		
	0.500 2	0.74	0.75	1.47	97.27		
齐 墩 果 酸	0.504 1	17.23	17.10	34.65	101.84	99.80	1.20
	0.501 5	17.15	17.10	34.25	100.03		
	0.503 2	17.20	17.10	34.31	100.04		
	0.502 8	17.19	17.10	33.99	98.24		
	0.499 8	17.09	17.10	34.04	99.14		
	0.500 2	17.10	17.10	34.12	99.52		

表 4 心安宁胶囊中葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素、齐墩果酸的含量($n=3$)

Tab. 4 Content of puerarin, 2,3,5,4'-tetrahydroxystibene-2-*O*- β -D-glucoside, hyperoside, quercetin, and oleanolic acid in Xin'anning capsules($n=3$)

批号	葛根素	二苯乙烯苷	金丝桃苷	槲皮素	齐墩果酸
180201	2.93×10^4	1.44×10^3	11.89	1.13	32.21
180401	2.90×10^4	1.46×10^3	12.09	1.16	32.44
180502	2.89×10^4	1.46×10^3	12.29	1.18	32.97

3 讨论

中药复方制剂是由多种中药组成, 化学成分种类多, 性质差异大, 某些成分含量较小, 无紫外吸收, 各成分之间还存在相互作用。因此, 在对中药复方制剂进行质量控制时, 要根据相关的文献及实验分析, 进行多种成分定量分析, 弥补传统含量测定只对单个指标性成分的测定, 以便更加全面、有效地评价中药复方制剂的质量。

液相色谱-串联质谱法具有高灵敏度、高选择性的特点, 可同时测定多种组分, 在复方制剂研究中具有明显优势。本研究采用 UHPLC-ESI-

MS/MS 技术, 结合被测成分的理化性质, 采用梯度洗脱方法, 同时测定心安宁胶囊中各指标成分的含量, 可实现制剂多种成分的良好分离。由于心安宁胶囊中葛根素和二苯乙烯苷含量远高于其他成分含量, 因此本实验中配制 2 份供试品溶液, 供试品溶液 I 用于测定含量较低的金丝桃苷、槲皮素和齐墩果酸, 供试品溶液 II 用于测定葛根素和二苯乙烯苷, 更好地进行质量控制, 弥补文献中只对葛根素单指标成分的测定。本实验对心安宁胶囊主要指标成分葛根素、二苯乙烯苷、金丝桃苷、槲皮素和齐墩果酸的同时测定, 为心安宁胶囊相关制剂的质量控制提供了一定参考和依据。

REFERENCES

- [1] LIANG H H, WANG J D. TLC identification for Radix Puerariae and Fructus Crataegi and Radix Polygoni Multiflori Preparata and the quantitative analysis of emodin by HPLC in Xin'an Ning tablets [J]. Drug Stand China(中国药品标准), 2005, 6(4): 50-53.
- [2] ZHANG H M, YANG H, ZHENG H Z. Research progress of natural flavonoids in prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2016, 35(10): 704-708.
- [3] LI X, PAN J X, CHEN S G, et al. Research progress of chemical components and pharmacological action of *Pueraria lobata* [J]. J Chin Inst Food Sci Tech(中国食品学报), 2017, 17(9): 189-195.
- [4] WU Y X, LI Y X, YE G Y, et al. The effect of Shanzhaxiaozi capsule on lipids metabolism of obese mice induced by high-fat diet [J]. Pharm Today(今日药学), 2019, 29(7): 449-452, 460.
- [5] YANG S T, WANG X Q, LIAO G H. Advances in pharmacological effects of hyperoside [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(6): 947-951.
- [6] YIN H Z, YU X M, FANG K H, et al. Research progress of quercetin loaded nano-formulations and anti-tumor effect [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2018, 37(1): 5-10.
- [7] ZHANG M F, SHEN Y Q. Research progress on vascular pharmacologic effects of oleanolic and ursolic acids [J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2017, 40(10): 1510-1519.
- [8] CHEN B B, JIANG A L, ZHANG Y. Research progress on pharmacological activities of stilbene glucoside, active component from *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学), 2016, 21(6): 710-715.
- [9] 莫明月, 林江, 韦明婵. 珍珠粉解毒生肌作用与临床应用研究进展[J]. 广西中医药大学学报, 2015, 18(3): 77-79.
- [10] GUO Q. Studies on quality standard of Xin'anning tablets [J]. Mod Chin Med(中国现代中药), 2015, 17(3): 254-256, 275.
- [11] ZHU R R, MIN J, YANG B. Determination of puerarin in Xinanning tablet by HPLC [J]. Qilu Pharm Aff(齐鲁药事), 2009, 28(6): 337-339.
- [12] DING R, HU L, ZHANG T, et al. Determination of trans δ -veniferin in rat plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetics [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2018, 27(12): 1387-1392.
- [13] ZHANG T, LIU Q H, WANG W T. Simultaneous determination of 6 components in compound Jingchuan tablets by UHPLC-ESI-MS/MS [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学杂志), 2018, 35(11): 1627-1631.

收稿日期: 2019-12-28

(本文责编: 蔡珊珊)