

参芪益气固本片中皂苷类成分的 UPLC-MS 测定

安军永, 王世华, 李云鹏, 周梦夏, 刘翠, 张晓风, 李向军*
(石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035)

[摘要] **目的:**建立了参芪益气固本片中6种有效成分的UPLC-MS定量方法。**方法:**采用C₁₈色谱柱,以乙腈-0.1%甲酸水为流动相梯度洗脱,流速0.5 mL·min⁻¹,采用负离子模式检测,源喷雾电压(IS) -5 000 V,辅助加热气温度450 °C,雾化气50 psi,辅助气40 psi,气帘气30 psi,解簇电压-55 V,采集方法TOF-MS/MS。**结果:**6种成分芍药苷,人参皂苷Re,人参皂苷Rg₁,连翘苷,人参皂苷Rb₁,黄芪甲苷在检测的范围内线性良好,*r*均大于0.999,方法回收率为98%~102%,RSD均小于4.5%。**结论:**采用本方法测定参芪益气固本中的6种成分方法准确度高、仪器精密度高,可以用于该制剂的质量控制方法,同时本文使用了UPLC-MS方法,与传统的HPLC-MS比较,具有提高分离度、降低药品的生产成本,可以为其他含有该成分的中成药制剂制定标准提供参考。

[关键词] 超高压液相色谱-质谱联用; 参芪益气固本片; 芍药苷; 人参皂苷Re; 人参皂苷Rg₁; 连翘苷; 人参皂苷Rb₁; 黄芪甲苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0099-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2015020099

Quantitative Determination of Six Active Ingredients in Shenqi Yiqi Guben Tablet by UPLC-MS

AN Jun-yong, WANG Shi-hua, LI Yun-peng, ZHOU Meng-xia, LIU Cui, ZHANG Xiao-feng, LI Xiang-jun*
(Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang 050035, China)

[Abstract] **Objective:** To established an UPLC-MS method for quantitative determination of six active ingredients in Shenqi Yiqi Guben tablet. **Method:** The UPLC separation was carried out with an Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) using gradient elution with a mobile phase consisting of acetonitrile-water (included 0.1% formic acid) at a constant flow rate of 0.5 mL·min⁻¹. The MS detector set as follows: negative ion mode detection, source spray voltage (IS) -5 000 V, auxiliary heating gas temperature 450 °C, atomization gas 50 psi, auxiliary gas 40 psi, curtain gas 30 psi, deaggregation voltage -55 V, collection methods TOF-MS/MS. **Result:** Six components: paeoniflorin, ginsenoside Re, ginsenoside Rg₁, forsythin, ginsenosides Rb₁, and astragaloside were in a good linearity, *r* greater than 0.999, recoveries were 98%-102%, RSD were less than 4.5%. **Conclusion:** The established method for the determination of the six components of Shenqi Yiqi Guben tablet is accuracy and precision that can be used for quality control of the preparation. The UPLC-MS method can increased resolution, lower production costs of drugs compared with HPLC-MS. It provides a reference to set standards for other Chinese medicine formulations containing these ingredients.

[Key words] UPLC-MS; Shenqi Yiqi Guben tablet; paeoniflorin; ginsenoside Re; ginsenoside Rg₁; forsythin; ginsenosides Rb₁; astragaloside A

参芪益气固本片是由人参、黄芪、白芍、连翘等8味制剂组成的复方中药,具有补气养血的功效。用于气血两亏所致的四肢倦怠、面色无华、耳鸣目眩。现代研究表明参芪益气固本片中活性成分多种

多样,主要包括皂苷类,黄酮类等,目前对参芪益气固本片的研究主要集中在制剂工艺、质量标准方面,而对其活性成分的定量分析研究较少。近年来,液质联用技术以其优越的灵敏度和分辨率成为现代药

[收稿日期] 20140306(006)

[第一作者] 安军永, 硕士, 副主任药师, 从事中药新药开发及质量标准研究, Tel:0311-89501748, E-mail: anjunyong@yiling.cn

[通讯作者] * 李向军, 硕士生导师, 高级工程师, 从事新药研究, Tel:0311-89501748, E-mail: lixiangjun@yiling.cn

物定量分析的有效手段^[1-7],虽然目前关于芍药苷(1),人参皂苷 Re(2),人参皂苷 Rg₁(3),连翘苷(4),人参皂苷 Rb₁(5),黄芪甲苷(6)成分的超高效液相色谱条件相关文献报道较多,但是采用超高效液相色谱同时对这 6 种成分测定的色谱条件未见相关文献报道。本研究采用 UPLC-MS 同时测定了参芪益气固本片中芍药苷,人参皂苷 Re,人参皂苷 Rg₁,连翘苷,人参皂苷 Rb₁,黄芪甲苷的含量,为参芪益气固本片的质量控制提供依据,也可以为其他含有该成分或类似成分的中成药制剂制定标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器 1290 系列超高效液相色谱系统(美国 Agilent), Triple-TOFTM 5600⁺ 型质谱仪(美国 AB SCIEX 公司,配有 ESI 源和 APCI 源), MultiquantTM Software 数据处理软件系统(美国 AB SCIEX 公司), AG-135 型分析天平(瑞士 Mettler 公司)。

1.2 试药 芍药苷,人参皂苷 Re,人参皂苷 Rg₁,连翘苷,人参皂苷 Rb₁,黄芪甲苷对照品均购自中国食

品药品检定研究院(批号分别为 110736-201337, 110754-201324, 110703-201128, 110821-201213, 110704-201223, 110781-200613)。参芪益气固本片(由石家庄以岭药业股份有限公司提供),乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯,美国 Fisher 公司),水为重蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 液相条件 ACQUITY UPLC^R BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B),梯度洗脱(0 ~ 1 min, 2% ~ 15% A, 3 ~ 4 min, 15% ~ 40% A, 4 ~ 6 min, 40% ~ 80% A, 6 ~ 7 min, 80% ~ 2% A, 7 ~ 8 min, 2% A),柱温 45 °C,流速 0.5 mL·min⁻¹,进样体积 2 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),负离子模式检测,源喷雾电压(IS) - 5 000 V,辅助加热气温度 450 °C,雾化气 50 psi,辅助气 40 psi,气帘气 30 psi,解簇电压 -55 V,采集方法 TOF-MS/MS 方法,准确质量数用自动校正系统(CDS)进行校正,6 种被测定成分质谱参数见表 1。

表 1 6 种成分的质谱参数

Table 1 MS parameters compound

成分	保留时间/min	分子式	相对分子质量	离子模式	增强子离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/eV
1	0.97	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	480.47	[M - H] ⁻	301.070 2	-40
2	1.52	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	947.15	[M + HCOO] ⁻	945.550 8	-40
3	2.18	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	801.01	[M + HCOO] ⁻	799.49 31	-45
4	2.75	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	534.55	[M + HCOO] ⁻	695.368 5	-45
5	5.09	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1 109.29	[M + HCOO] ⁻	1 107.609 6	-35
6	6.42	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	784.97	[M + HCOO] ⁻	783.463 1	-43

2.3 供试品溶液的制备 称取参芪益气固本片内容物,研细,精密称定 0.3 g,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 50 mL,称定质量,超声处理 30 min(功率 250 W,频率 40 kHz),放冷,称重,用甲醇补足减失的质量,摇匀,过 0.2 μm 滤膜即得。

2.4 对照品溶液的制备 精密称取对照品黄芪甲苷,人参皂苷 Rb₁,人参皂苷 Re,人参皂苷 Rg₁,连翘苷适量,加甲醇溶解,分别得到质量浓度约为 0.5 g·L⁻¹ 的对照品储备液。

2.5 标准曲线及线性关系考察 分别精密吸取 6 种对照品储备液适量置于同一 25 mL 量瓶中,甲醇定容至刻度,摇匀,得到混合对照品溶液,1 ~ 6 的质量浓度分别为 15.12, 18.07, 25.02, 19.28, 21.30, 16.45 mg·L⁻¹。将此混合对照品溶液逐级稀释成一系列浓度,按照 2.1 项下条件进行测定。以质量浓

度为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归分析。结果表明,6 种成分在各自线性范围内均呈现良好的线性关系,得回归方程,结果见表 2。

表 2 各化合物的线性范围、定量下限、线性方程及相关系数

Table 2 Linear range of each compound, lower limit of quantification, linear equations and correlation coefficients

成分	标准曲线	线性关系	线性范围 /μg·L ⁻¹	定量限 /μg·L ⁻¹
1	$Y = 182.35X + 128.14$	0.999 6	2.08 ~ 1 156.84	0.138 7
2	$Y = 215.84X + 87.36$	0.999 8	1.35 ~ 2 045.91	0.901 4
3	$Y = 284.27X - 50.68$	0.999 2	5.25 ~ 2 486.56	0.367 3
4	$Y = 324.54X + 256.25$	0.999 4	1.78 ~ 3 512.82	0.118 7
5	$Y = 180.07X - 172.36$	0.998 8	11.23 ~ 3 872.35	0.748 7
6	$Y = 253.09X - 95.46$	0.999 5	7.28 ~ 4 892.57	0.484 5

2.6 精密度试验 精密吸取同一浓度的混合对照品溶液 5 μL , 按 2.1 项下色谱条件连续进样 5 次, 记录峰面积。结果显示化合物 1~6 含量的 RSD 分别为 2.4%, 1.9%, 2.6%, 1.3%, 3.2%, 2.1%, 2.4%, 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验 按 2.3 项下制备供试品溶液, 在上述色谱条件下分别在 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样 5 μL , 记录峰面积。结果显示化合物 1~6 含量的 RSD 分别为 3.4%, 2.4%, 2.2%, 2.8%, 3.9%, 2.0%, 2.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

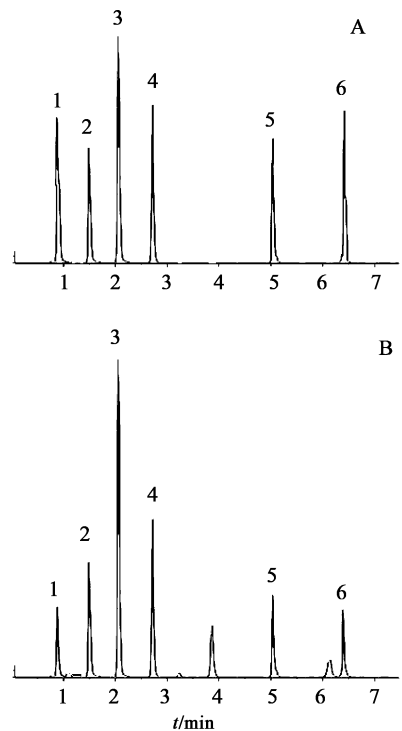
2.8 重复性试验 精密称取同一批号参芪益气固本片样品 6 份, 按照 2.3 项下制备供试品溶液 6 份, 分别在上述色谱条件下, 分别进样 5 μL , 记录峰面积, 计算含量。结果显示化合物 1~6 含量的 RSD 分别为 2.3%, 1.6%, 2.1%, 2.8%, 3.1%, 2.3%, 2.7%, 表明方法的重复性良好。

2.9 加样回收率试验 精密称取 6 份已知含量的同一批号参芪益气固本片药粉 0.15 g, 分别加入一定量的混合对照品溶液, 依照 2.3 项下制备供试品溶液, 进样 5 μL , 记录峰面积, 计算各对照品的加样回收率, 分别为 99.06%, 99.38%, 98.72%, 98.07%, 102.3%, 98.16%; RSD 分别为 2.5%, 3.3%, 4.1%, 3.5%, 2.9%, 3.6%。

2.10 样品含量的测定 取参芪益气固本片 10 批, 按 2.3 项下制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 见图 1, 分别对 10 批参芪益气固本片样品中的 6 种有效成分进行含量测定, 结果见表 3。

3 讨论

中药复方制剂中化学成分中复杂, 如何安全、有效的控制其质量成了近年来中药研究中的重点和难点, 其研究方法也由传统的系统分离过渡到以液相色谱技术为主的色谱分析, 其中液相色谱-质谱联用技术由于同时提供了高效的分离和分子量信息, 因而已成为研究复方的重要手段^[8-9]。液相色谱-质谱联用技术是一项有效的分离分析技术, 它将液相色谱对复杂样品的高分离能力, 与质谱具有高选择性、高灵敏度以及能够提供相对分子质量和结构信息的优点结合起来, 在药物分析和环境分析等领域得到了广泛的应用。超高效液相色谱技术 (ultra performance liquid chromatography) 是近些年发展起来的一种新的液相色谱技术, 该技术的分辨率和分析速度等都比常规的液相色谱有明显的提高, 也更适合体内药动力学研究和中药成分分析, 显著减少



A. 对照品; B. 参芪益气固本片; 1. 芍药苷; 2. 人参皂苷 Re; 3. 人参皂苷 Rg₁; 4. 连翘苷; 5. 人参皂苷 Rb₁; 6. 黄芪甲苷

图 1 参芪益气固本片 UPLC 色谱

Fig. 1 UPLC Chromatograms of Shenqi Yiqi solid film

表 3 10 批参芪益气固本片中 6 种成分含量测定

批号	成分					
	1	2	3	4	5	6
130801	0.11	0.22	0.64	0.37	0.27	0.17
130802	0.15	0.18	0.58	0.28	0.26	0.20
130803	0.12	0.25	0.61	0.32	0.30	0.15
130804	0.10	0.20	0.55	0.37	0.27	0.17
130805	0.11	0.24	0.49	0.41	0.25	0.22
130806	0.15	0.28	0.65	0.32	0.20	0.13
130807	0.18	0.16	0.50	0.40	0.24	0.18
130809	0.12	0.22	0.61	0.38	0.22	0.10
130810	0.13	0.25	0.67	0.34	0.42	0.23
130811	0.16	0.19	0.57	0.43	0.66	0.16

了溶剂的消耗并缩短分析时间

在试验的过程中对色谱条件进行了考察, 考察了乙腈-0.1% 甲酸水, 甲醇-0.1% 甲酸水, 乙腈-甲醇-0.1% 甲酸水不同比例流动相, 结果表明乙腈-0.1% 甲酸水为流动相时各化合物响应值较高且峰型及分离效果较好, 故选择乙腈-0.1% 甲酸水溶液

作为流动相梯度洗脱,乙腈的比例范围从 2% ~ 80%,使复方中的极性、中极性、非极性等不同性质的主要化学成分均能在色谱图中得到体现,并通过优化流动相的洗脱梯度,使制剂中的主要色谱峰均衡地分布在色谱图中,这样就使得制剂中的主要皂苷类成分能够较完整地体现在色谱图中,有利于制剂的质量控制;同时也对流速、进样体积等进行了考察,并最终确定了最佳的测定参数;在质谱条件方面:通过对各分析物对照品溶液进行 TOF-MS 一级质谱扫描,确定各目标分析物的准分子离子峰,在 TOF-MS/MS 模式下找出各化合物二级质谱中响应最高的碎片,并对其增强扫描,再对各分析物在该模式下的碰撞能进行优化,得到的各化合物的最佳检测质谱参数。

本文采用了 UPLC 对益气固本片的主要皂苷类成分进行研究,与传统的 HPLC 色谱法比较,具有以下特点:①用时短,检测完 6 种成分总共用了不到 10 min,取传统的 HPLC 方法耗时大幅度减少;②各主峰的分离度较好,且分离出更多的色谱峰,从而对样品提供的信息达到了一个新的水平,有利于找到制剂的特征图谱,为以后的质控方法提高提供参考;③与传统的 HPLC 色谱法比较,UPLC 色谱的灵敏度更高,即峰形更窄、更高,有利于准确的控制产品中各成分的含量;④提高效益,节约时间,降低了人力、物力等成本,有助于降低产品的销售成本,提高产品上市后的市场竞争力。

[参考文献]

- [1] 雷勇胜,宋丽明,蒋庆峰. 液质联用技术在药物的有关物质分析中的应用[J]. 现代仪器,2011,4(17):9-13.
- [2] 于林芳,徐杰,陈士国,等. 仿刺参皂苷类化合物的电喷雾负离子质谱裂解规律研究[J]. 质谱学报,2011,32(2):77-81.
- [3] 滕久委,李德良. 田七花提取物中 22 种皂苷类成分的液相色谱-质谱测定[J]. 分析测试学报,2008,27(8):852-855.
- [4] 陈菲,林晓兰,席海,等. UPLC-MS-MS 同时测定中药活血益气方 K LW 中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(16):156-159.
- [5] 叶茂,谢国祥,赵爱华,等. 超高效液相色谱-飞行时间质谱法测定苦参素注射液中苦参碱和氧化苦参碱[J]. 中国中药杂志,2008,33(12):1398-1401.
- [6] 邱楠楠,刘金平,苏航,等. UPLC-ESI-MS-MS 分析生晒参和紫红参中皂苷类成分[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):91-93.
- [7] 严丽娟,张洁,潘晨松,等. 超高效液相色谱-飞行时间质谱法高通量筛查乳制品中 20 种镇静剂[J]. 分析化学,2013,41(1):31-35.
- [8] 夏云,陈黎,王静蓉,等. 超高效液相色谱-飞行时间质谱联用分析柏苓清火颗粒中的化学成分(I)[J]. 中南药学,2011,9(3):166-169.
- [9] 岑卫健,范晓苏,朱平川,等. UPLC-MS/MS 法同时测定益气养血口服液中的 5 种有效成分[J]. 基因组学与应用生物学,2013,32(4):557-561.

[责任编辑 顾雪竹]