

# UPLC-MS/MS 同时测定滋肾清肝代平方中 18 个成分含量

薄海美<sup>1</sup>, 田春雨<sup>1</sup>, 薄建柱<sup>1</sup>, 李建民<sup>1</sup>, 郭兰<sup>1</sup>, 曹岩<sup>2</sup>

(1. 华北理工大学, 河北 唐山 063000; 2. 唐山市中医医院, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的:采用 UPLC-ESI-MS/MS 同时测定滋肾清肝代平方中 18 个成分的含量。方法:采用 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相 0.1% 甲酸-水-乙腈梯度洗脱, 柱温 50 °C, 进样量 5 μL, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 采用电喷雾离子源进行正负离子模式监测, 多反应监测模式(MRM)用于定量分析。结果:在 16 min 内, 滋肾清肝代平方中 18 个成分(苹果酸、枸橼酸、没食子酸、齐墩果酸、熊果酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、1-脱氧野尻霉素、决明子苷、红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 B、白藜芦醇、大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷、橙黄决明素、甲基钝叶决明素、钝叶素、大黄素、大黄酚、淫羊藿素)完全分离, 峰面积与浓度有良好的线性关系, 平均加样回收率为 98.81% ~ 100.80%, 精密度 RSD 0.09% ~ 2.9%。结论:该方法经方法学验证可用于滋肾清肝代平方中 18 种成分的含量测定和质量控制。

**[关键词]** 滋肾清肝代平方; 超高液相色谱-质谱联用; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0052-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140052

## Simultaneous Determination of 18 Constituents in Zishen Qinggan Daiping Formula by UPLC-MS/MS

**Method** BO Hai-mei<sup>1</sup>, TIAN Chun-yu<sup>1</sup>, BO Jian-zhu<sup>1</sup>, LI Jian-min<sup>1</sup>, GUO Lan<sup>1</sup>, CAO Yan<sup>2</sup> (1. North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 2. Tangshan Traditional Chinese Medicine Hospital, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 18 constituents in Zishen Qinggan Daiping formula. **Method:** The samples were separated on a Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) by a gradient elution with the mobile phase of 0.1% formic acid-water and acetonitrile at a flow rate of 0.3 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature was 50 °C. The sample size was 5 μL. The electrospray ion source was adopted to monitor in the polarity in positive and negative mode. The multiple-reaction monitoring (MRM) was applied in the quantitative analysis. **Result:** Within 16 min, the 18 constituents (malic acid, citrate acid, gallic acid, oleanolic acid, ursolic acid, 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucopyranoside, l-deoxyojirimycin, cassiaside, rubrofusarin gentiobioside, cassiaside B, resveratrol, physcion-8-O-β-D-glucopyranoside, auranthio-obtusin, chryso-obtusin, obtusifolin, emodin, chrysophanol, icaritin) in Zishen Qinggan Daiping formula were completely separated. The regression equations showed a good linear relationship between the peak area and the concentration of each compound. The average recoveries ranged from 98.81% to 100.80%, and the precision ranged between 0.09% and 2.9%. **Conclusion:** The methodology validation shows that the method can be used for the content determination and quality control of 18 constituents in Zishen Qinggan Daiping formula.

**[Key words]** Zishen Qinggan Daiping formula; UPLC-MS/MS method; content determination

中医认为 2 型糖尿病属于“消渴病”的范畴,其基本病机为“阴虚为本、燥热为标”,该病有耗气伤

**[收稿日期]** 20141006(006)

**[基金项目]** 河北省卫生厅医学科学研究重点课题(20130058);河北省中医药管理局科研计划项目(2013070)

**[第一作者]** 薄海美, 讲师, 硕士, 从事糖尿病防治研究, E-mail: bohaimai@sina.com, Tel: 13722533361

阴的特性,气虚、阴虚、气阴两虚是渐进性的,患者随着病程的不断延续会均逐渐出现肝肾阴虚、阳热偏亢证候,我们临床上针对肝肾阴虚、阳热偏亢的证候采用滋肾清肝的治疗方法,拟定滋肾清肝方获得了较好的疗效。滋肾清肝代平方由制何首乌-桑椹-桑叶-决明子(3:2:2:1)组成,制何首乌能补肝肾、益精血,为君药。桑椹,可补肝、益肾、滋液,为臣药。桑叶,滋燥凉血,止消渴,决明子具有清肝明目、润肠通便的作用,二药为佐使药。实验研究表明滋肾清肝代平方可改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗,调节糖脂代谢<sup>[1-3]</sup>。本实验对该方的主要化学成分采用 UPLC-ESI-MS/MS 方法进行分析及含量测定,为进一步对其药代动力学及药效物质研究奠定基础。

## 1 材料

UPLC-MS/MS 系统: Acquity Ultra Performance LC(包括紫外检测器,自动进样器,二元泵,在线脱气机),Quattro Premier XE 质谱仪(电喷雾离子源 ESI,MassLynx V4.1 工作站美国, Waters);TB-215D 型电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),D-37520 型台式冷冻离心机(德国 Thermo 公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司),其余试剂均为分析纯。制何首乌、桑椹、桑叶、决明子药材购于唐山市同仁堂药店,经华北理工大学田春雨老师鉴定均符合 2010 年版《中国药典》规定。

苹果酸(批号 190013-201001),枸橼酸(批号 100396-201302),没食子酸(批号 110831-201204),齐墩果酸(批号 110709-201206),熊果酸(批号 110742-201220),2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷(批号 110844-201310),白藜芦醇(批号 111535-200502),橙黄决明素(批号 111900-201303),大黄素(批号 110795-201308),大黄酚(批号 110796-201319)对照品均购自中国食品药品检定研究院;1-脱氧野尻霉素(批号 20110405)对照品,上海源叶生物科技有限公司;红镰霉素龙胆二糖苷(批号 20120614)对照品,上海永恒生物科技有限公司;决明子苷、决明子苷 B、淫羊藿苷、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、甲基钝叶决明素、钝叶素对照品由本实验室自制,结构经波谱鉴定,用 HPLC 法测定纯度均 >98%。

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液制备** 滋肾清肝代平方按制何首乌-桑椹-桑叶-决明子(3:2:2:1)称取药材,用 10 倍量的 80% 乙醇热回流提取 3 次,每次 2 h,滤过,合

并提取液,回收乙醇,得醇提物;药材再加 8 倍量水加热提取 2 次,每次 2 h,滤过,得水提物,与醇提物混合经喷雾干燥制得颗粒,精密称取颗粒 0.2 g,以 75% 甲醇 25 mL 超声处理 30 min,取适量提取液 15 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,取上清液备用,进样前经过 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤。

**2.2 对照品溶液制备** 精密称取苹果酸、枸橼酸、没食子酸、齐墩果酸、熊果酸、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、1-脱氧野尻霉素、决明子苷、红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 B、白藜芦醇、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、橙黄决明素、甲基钝叶决明素、钝叶素、大黄素、大黄酚、淫羊藿素对照品适量分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并定容,得对照品混合溶液。18 种对照品在混合溶液中的质量浓度分别为 8.392, 6.101, 5.363, 37.712, 0.975, 279.608, 257.296, 30.120, 82.280, 4.973, 7.991, 4.989, 13.256, 7.119, 5.020, 4.812, 4.450, 2.736 mg·L<sup>-1</sup>。

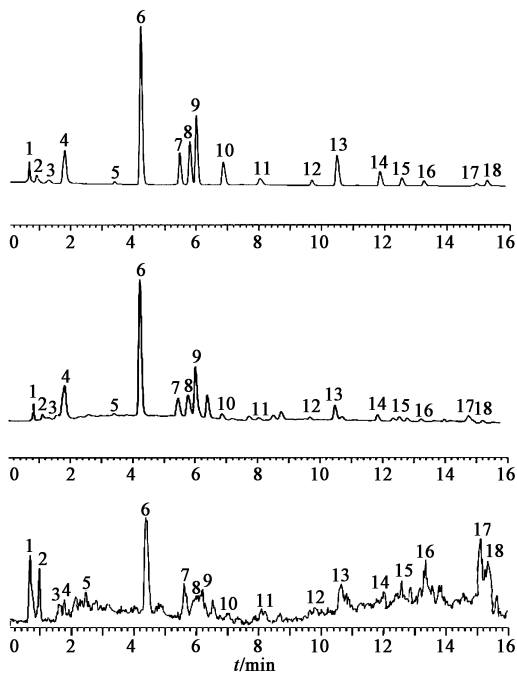
## 2.3 色谱与质谱条件

**2.3.1 色谱条件** Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7  $\mu$ m);流动相 0.1% 甲酸-水(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~2 min,1%~5% B;2~5 min,6%~15% B;5~7 min,16%~25% B;7~13.5 min,26% B;13.5~14.5 min,30%~60% B;14.5~16 min,70% B),柱温 50  $^{\circ}$ C,进样量 5  $\mu$ L,流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,波长(0~1.5 min,400 nm;1.5~3.5 min,210 nm;3.5~4.5 min,320 nm;4.5~5.5 min,203 nm;5.5~7.0 min,278 nm;7.0~9.0 min,306 nm;9.0~11.0 min,285 nm;11.0~16.0 min,280 nm<sup>[4-8]</sup>)。对照品溶液和样品液 UPLC 色谱图见图 1。

**2.3.2 质谱条件** 采用 ESI 离子源,正离子模式,毛细管电压 3.2 KV;负离子模式,毛细管电压 -2.8 KV;离子源温度 110  $^{\circ}$ C,脱溶剂气温度 350  $^{\circ}$ C,脱溶剂气流量 600 L·h<sup>-1</sup>,锥孔气流量 50 L·h<sup>-1</sup>,离子检测方式正离子和负离子全扫描,离子对扫描范围 *m/z* 50~1 000。样品总离子流图见图 1。

## 2.4 方法学验证

**2.4.1 线性关系与检测限** 分别吸取 6 个浓度梯度(原液及稀释 2,4,8,16,32 倍)的对照品混合溶液,在上述色谱条件下,进样 5  $\mu$ L,记录峰面积。以各成分色谱峰峰面积(*Y*)为纵坐标,各对照品溶液的浓度(*X*)为横坐标,计算各成分的线性回归方程。以信噪比 *S/N*  $\geq$  3,计算各成分的最低检测限



1. 苹果酸; 2. 枸橼酸; 3. 没食子酸; 4. 齐墩果酸; 5. 熊果酸; 6. 2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷; 7. 1-脱氧野尻霉素; 8. 决明子苷; 9. 红镰霉素龙胆二糖苷; 10. 决明子苷 B; 11. 白藜芦醇; 12. 大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷; 13. 橙黄决明素; 14. 甲基钝叶决明素; 15. 钝叶素; 16. 大黄素; 17. 大黄酚; 18. 淫羊藿素; A. 对照品 UPLC; B. 样品 UPLC; C. 样品总离子流

图 1 滋肾清肝代平方样品 UPLC 和总离子流

Fig. 1 Typical UPLC-UV-ESI-MS<sup>2</sup> analysis and total ion current profile of Zishenqingandaiping formula

(LOD), 以信噪比  $S/N \geq 10$ , 计算各成分的最低定量限 (LOQ), 18 种对照品线性回归方程、线性范围、相关系数、LOD 与 LOQ 值见表 1, 18 种对照品在相应的线性范围内呈现良好的线性关系。

**2.4.2 精密度试验** 精密称取本品粉末 0.2 g, 按上述色谱条件连续进样 6 次, 计算各成分质量浓度, 结果苹果酸、枸橼酸、没食子酸、齐墩果酸、熊果酸、2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、1-脱氧野尻霉素、决明子苷、红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 B、白藜芦醇、大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷、橙黄决明素、甲基钝叶决明素、钝叶素、大黄素、大黄酚、淫羊藿素的 RSD 分别为 0.5%, 0.2%, 1.1%, 0.09%, 1.0%, 0.09%, 0.2%, 0.3%, 0.2%, 0.2%, 0.2%, 0.7%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.3%, 0.3%, 0.3%, 表明仪器精密度良好。

**2.4.3 稳定性试验** 取同一供试品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h 测定 18 种成分的含量, 18 种成分含量的 RSD 分别为 1.5%, 0.2%, 2.5%, 2.2%, 2.8%, 2.9%, 2.6%, 3.7%, 3.0%, 2.7%,

表 1 18 种成分的线性回归方程、线性范围、相关系数、LOD 及 LOQ

Table 1 Linear ranger, regression equation, correlation coefficients,  $R^2$ , LOQ and LOD of seventeen chemical references

No.	线性回归方程	$R^2$	线性范围 /mg·L <sup>-1</sup>	LOD /mg·L <sup>-1</sup>	LOQ /mg·L <sup>-1</sup>
1	$Y = 150.07X - 52.783$	0.999 7	0.550 ~ 8.792	0.165	0.550
2	$Y = 584.06X + 78.897$	0.999 1	0.253 ~ 7.682	0.083	0.156
3	$Y = 615.01X + 83.938$	0.999 2	0.168 ~ 5.363	0.050	0.168
4	$Y = 1 975.4X + 336.65$	0.999 8	1.179 ~ 37.712	0.007	0.024
5	$Y = 1 979.4X - 1.109 4$	0.999 9	0.030 ~ 0.975	0.009	0.030
6	$Y = 928.58X + 1 196.6$	0.999 5	8.738 ~ 209.706	0.026	0.087
7	$Y = 209.55X - 113.36$	0.999 9	8.041 ~ 257.296	0.048	0.161
8	$Y = 616.9X - 46.453$	0.999 9	0.941 ~ 30.120	0.028	0.094
9	$Y = 1 343X - 101.46$	0.999 9	2.571 ~ 82.280	0.015	0.051
10	$Y = 4 419.6X - 87.329$	0.999 9	0.155 ~ 4.973	0.002	0.008
11	$Y = 933.17X - 35.741$	0.999 8	0.250 ~ 7.991	0.075	0.250
12	$Y = 881.75X - 29.944$	0.999 8	0.156 ~ 4.989	0.047	0.156
13	$Y = 2 317.4X - 279.55$	0.999 7	0.414 ~ 13.256	0.006	0.021
14	$Y = 1 919.5X - 77.446$	0.999 9	0.222 ~ 7.119	0.007	0.022
15	$Y = 1 572.3X - 95.814$	0.999 6	0.157 ~ 5.020	0.009	0.031
16	$Y = 1 069.5X - 200.51$	0.994 9	0.150 ~ 4.812	0.045	0.150
17	$Y = 637.62X - 125.16$	0.996 4	0.139 ~ 4.450	0.042	0.139
18	$Y = 276.3X - 22.353$	0.980 2	0.086 ~ 1.368	0.026	0.086

注: 表中 1 ~ 18 个成分分别为苹果酸、枸橼酸、没食子酸、齐墩果酸、熊果酸、2, 3, 5, 4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷、1-脱氧野尻霉素、决明子苷、红镰霉素龙胆二糖苷、决明子苷 B、白藜芦醇、大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷、橙黄决明素、甲基钝叶决明素、钝叶素、大黄素、大黄酚、淫羊藿素 (表 2 ~ 3 同)。

2.3%, 2.1%, 0.5%, 1.4%, 1.1%, 2.4%, 0.1%, 2.9%, 表明供试品溶液在室温条件下放置 24 h 稳定性良好。

**2.4.4 重复性试验** 精密称取同一批滋肾清肝代平方粉末 0.2 g, 共 6 份, 按照 2.2 项下方法制备样品溶液, 分别测定 18 种成分的含量, 结果 18 种成分的 RSD 分别为 2.6%, 0.2%, 4.3%, 0.3%, 1.4%, 0.8%, 0.8%, 0.9%, 0.8%, 0.8%, 0.8%, 0.6%, 0.5%, 0.5%, 0.6%, 2.6%, 1.2%, 2.2%, 表明测定方法的重复性良好。

**2.4.5 加样回收率试验** 精密称取滋肾清肝代平方 0.1 g, 共 6 份, 分别精密加入 18 种对照品, 按 2.2 项下方法制备样品溶液, 测定 18 种成分的含量, 计算回收率, 见表 2。

**2.5 样品测定** 精密称取 3 批自制滋肾清肝代平

方粉末 0.2 g,按照 2.2 项下方法制备样品溶液,按 2.3 项下色谱条件测定,结果 3 批自制样品中 18 种成分的含量见表 3。

表 2 滋肾清肝代平方中 18 种成分的加样回收率 (n=6)

Table 2 Recovery result of 18 compositions of Zishenqinggandaiping formula (n=6)

成分	样品中量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	RSD/%
1	53.95	108.90	162.19	99.40	0.8
2	28.46	50.25	78.64	99.86	1.8
3	10.26	6.44	16.72	100.31	1.4
4	119.52	117.85	237.22	99.87	0.8
5	2.22	1.69	3.89	98.81	1.7
6	837.85	848.81	1686.71	100.01	0.8
7	593.57	89.06	682.67	100.04	1.3
8	8.19	74.59	82.72	99.91	0.3
9	214.86	226.27	441.17	100.02	0.8
10	229.35	22.09	251.38	99.73	1.2
11	19.71	21.31	41.11	100.42	0.6
12	16.00	15.96	31.88	99.50	2.3
13	38.79	42.42	81.55	100.80	0.9
14	19.74	20.34	40.11	100.15	1.9
15	15.99	16.06	32.01	99.71	1.0
16	17.65	19.25	36.78	99.38	1.4
17	14.08	17.80	31.66	98.76	2.0
18	5.35	7.66	12.98	99.61	1.4

表 3 滋肾清肝代平方中 18 种成分的含量 (n=3)

Table 3 Contents of 18 compositions in Zishenqinggandaiping formula (n=3)

成分	质量分数 $/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	百分比 $/\%$	成分	质量分数 $/\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	百分比 $/\%$
1	0.306 7	0.031	10	0.082 0	0.008
2	0.276 7	0.027	11	0.160 8	0.016
3	0.074 2	0.007	12	0.134 8	0.013
4	0.633 4	0.063	13	0.345 2	0.035
5	0.023 1	0.002	14	0.167 5	0.017
6	10.819 6	1.082	15	0.136 9	0.014
7	5.415 6	0.542	16	0.113 0	0.011
8	2.010 2	0.201	17	0.080 6	0.008
9	1.968 3	0.197	18	0.035 6	0.004

### 3 讨论

由于中药复方化学成分复杂,采用梯度洗脱分离被测化合物,试验中考察了乙腈-水、甲醇-水系统,发现乙腈-水可使复方中色谱峰得到较好分离,且离子响应较高,加入甲酸以优化峰形;质谱的检测灵敏度取决于被测化合物的离子化程度,而在流动相中加入甲酸有助于化合物的离子化,提高质谱响应,有助于复方中含量极少化合物的检测。

为了达到检测灵敏度高、干扰小的目的,需考虑各化合物最大吸收波长,本实验根据待测化合物的最大吸收波长采用多波长切换的方法进行相应波长的切换,已达到准确测定各成分含量的目的。

滋肾清肝代平方化学成分复杂,本实验采用 UPLC-MS/MS 技术,对其 18 种成分进行了定性及含量测定,为进一步对其药代动力学及药效物质研究奠定基础。

#### [参考文献]

- [1] 田春雨,薄海美. 滋肾清肝方对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠糖脂代谢的影响[J]. 山东医药, 2014, 54(1): 18-19.
- [2] Li J A, Han S Y, Tian C Y, et al. The effects of DAIPING granule on Gilcolipid metabolism and PTB1B expression in liver of type 2 diabetes[J]. New Medicine, 2012, 14(1): 21-24.
- [3] 田春雨,薄海美,李继安. 桑椹多糖对实验性 2 型糖尿病大鼠血糖及血脂的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 158-160.
- [4] 徐义龙,唐力英,周喜丹,等. HPLC 测定决明子中 3 种蒽醌吡喃酮苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5): 54-56.
- [5] 赵艳丽,黄亦琦,胡珊梅,等. HPLC 测定家蚕中 1-脱氧野尻霉素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22): 124-126.
- [6] 韩伟立,刘利,张晓琦,等. 蒙桑叶化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(8): 695-698.
- [7] 陈万生,杨根金,张卫东,等. 制首乌中两个新化合物[J]. 药学学报, 2000, 35(4): 273-276.
- [8] 白永花,宋启示. 马比木根的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(2): 197-201.

[责任编辑 顾雪竹]