

[质 量]

LC-MS-MS 法同时测定黄芪注射液和黄芪口服液中 5 种成分

储继红, 李长印, 戴国梁, 居文政*

(南京中医药大学附属医院临床药理科, 江苏 南京 210029)

摘要: 目的 建立 LC-MS-MS 法同时测定黄芪注射液和黄芪口服液中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素 5 种有效成分的含有量。**方法** 黄芪注射液和黄芪口服液甲醇稀释液在 Agilent ZORBAX SB C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) 色谱柱上分离, 流动相为甲醇-水 (含 0.1% 甲酸, 70 : 30, V/V); 体积流量为 300 μL/min。MS 采用电喷雾离子源, 多反应监测方式进行正离子扫描。**结果** 5 种成分在测定浓度范围内均具有良好的线性关系, 在黄芪注射液和黄芪口服液中的平均回收率分别为 96.8% ~ 102.3% 和 95.9% ~ 101.5%。**结论** 本法测得结果准确、可靠、灵敏度高, 可用于黄芪注射液和黄芪口服液的质量控制。

关键词: 黄芪注射液; 黄芪口服液; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮葡萄糖苷; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花黄素; LC-MS-MS

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2015)12-2647-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2015.12.016

Simultaneous determination of five components in Astragalus Injection and Astragalus Oral Liquid by LC-MS-MS

CHU Ji-hong, LI Chang-yin, DAI Guo-liang, JU Wen-zheng*

(Office of Clinical Pharmacology, Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an LC-MS-MS method for simultaneously determining the contents of astragaloside, calycosin-7-glucosid, ononin, calycosin and formononetin in Astragalus Injection and Astragalus Oral Liquid (*Astragalus membranaceus*). **METHODS** The determination of aforementioned components in Astragalus Injection and Astragalus Oral Liquid methanol diluents were performed on an Agilent ZORBAX SB C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of methanol and water (containing 0.1% formic acid, 70 : 30, V/V) delivered at a flow rate of 300 μL/min. Electrospray ionization (ESI) interface and multiple reaction monitoring (MRM) were applied to the positive ion mode. **RESULTS** The five constituents demonstrated good linear relationships with their recoveries kept within the ranges of 96.9% - 102.3% for Astragalus Injection and 95.9% - 101.5% for Astragalus Oral Liquid. **CONCLUSION** This method is accurate, reliable and sensitive, and can be used for the quality control of Astragalus Injection and Astragalus Oral solution.

KEY WORDS: Astragalus Injection; Astragalus Oral Liquid; astragaloside, calycosin-7-glucosid, ononin, calycosin, formononetin; LC-MS-MS

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. 的干燥根, 主要含皂苷类、黄酮类、多糖类及氨基

酸类等成分, 性温, 味甘, 归肝、脾、肺、肾经, 具有补气固表、利水退肿、托毒排脓、抗疮生肌等功效^[1-3]。现代药学工艺的发展, 使传统中药以新的剂型问世, 黄芪注射液和黄芪口服液便是从黄芪

收稿日期: 2015-04-16

基金项目: 江苏省自然科学基金(青年基金)项目(BK20131035); 江苏省中医领军人才项目(LJ200906); 国家科技部“重大新药创制”项目(2012ZX09303009-002)

作者简介: 储继红, 女, 助理研究员, 研究方向为临床药代动力学。Tel: (025) 86617141-50521, E-mail: cjh124@sina.com.cn

* 通信作者: 居文政, 男, 主任药师, 研究方向为中药临床药代动力学。Tel: (025) 86617141-50518, E-mail: juwz333@hotmail.com

中提取有效成分制成的制剂,可增强心肌收缩力,扩张冠状动脉,保护心肌细胞,改善心脏功能;增加超氧化歧化酶活性,清除自由基;抑制血小板凝聚,降低血液黏稠度,改善微循环;增强肾上腺素皮质功能,改善肾脏功能;防止肝糖原减少,保护肝脏,在临床有广泛的应用^[4-6]。

在黄芪制剂的质量控制方面,测定黄芪甲苷的方法比较多^[3,7-13]。为了更全面的评价制剂质量,本实验采用 LC-MS-MS 法同时测定制剂中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素的含有量,为黄芪注射液和黄芪口服液质量标准的提高提供依据,也更符合中医药多组分、多靶点作用模式和整体性理论。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 6430 Triple Quad LC/MS (美国 Agilent 公司, MassHunter Workstation Software, Version B. 05.00), 配有 ESI 源、1200 型二元梯度泵和自动进样器;梅特勒 MT-5 电子天平;Biofuge PrimoR 冷冻高速离心机;Driect-Q5 超纯水机。

1.2 试剂 黄芪甲苷(批号 0781-200311)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号 111920-201102)和内标异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷(批号 110860-200204),购自中国药品生物制品检定所;芒柄花苷(批号 120810)和毛蕊异黄酮(批号 120716),购自鼎瑞化工(上海)有限公司;芒柄花黄素(批号 MUST-11050801),购自北京恒元启天化工技术研究院。黄芪口服液为江苏省中医院院内制剂(10 mL/支);黄芪注射液由正大青春宝药业有限公司生产(10 mL/支);甲醇为色谱纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 液相条件 Agilent ZORBAX SB C₁₈ (2.1 mm×150 mm, 5 μm) 色谱柱;流动相为甲醇-水(含 0.1% 甲酸, 70 : 30, V/V);体积流量 300 μL/min;进样量 2 μL;柱温 35 ℃。

2.2 质谱条件 ESI 源,正离子模式检测;毛细管电压 4 000 V;源温 350 ℃;干燥气 10 L/min;雾化气 20 psi (1 psi = 6.895 kPa);扫描方式为多反应监测(MRM)。用于定量分析的离子对分别为黄芪甲苷, [M + Na]⁺, *m/z* 807.5→807.5 (fragmentor 220 V, collision energy 20 V);毛蕊异黄酮葡萄糖苷, [M + H]⁺, *m/z* 447.1→285.1 (fragmentor 110 V, collision energy 20 V);芒柄花苷, [M + H]⁺, *m/z* 431.2→269.0 (fragmentor 110 V, collision energy 20 V);毛蕊异黄酮, [M + H]⁺,

m/z 285.1→213.1 (fragmentor 170 V, collision energy 40 V);芒柄花黄素, [M + H]⁺, *m/z* 269.1→197.1 (fragmentor 170 V, collision energy 40 V);内标异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷, [M + H]⁺, *m/z* 647.3→331.3 (fragmentor 130 V, collision energy 30 V)。

2.3 对照品溶液的配制 称取黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素适量,分别置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,作为对照品贮备液,4 ℃ 冰箱保存。

分别取上述对照品贮备液适量,置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,制成每 1 mL 含黄芪甲苷 10.16 μg、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 1.872 μg、芒柄花苷 1.044 μg、毛蕊异黄酮 0.661 4 μg、芒柄花黄素 0.251 6 μg 的混合对照品母液。

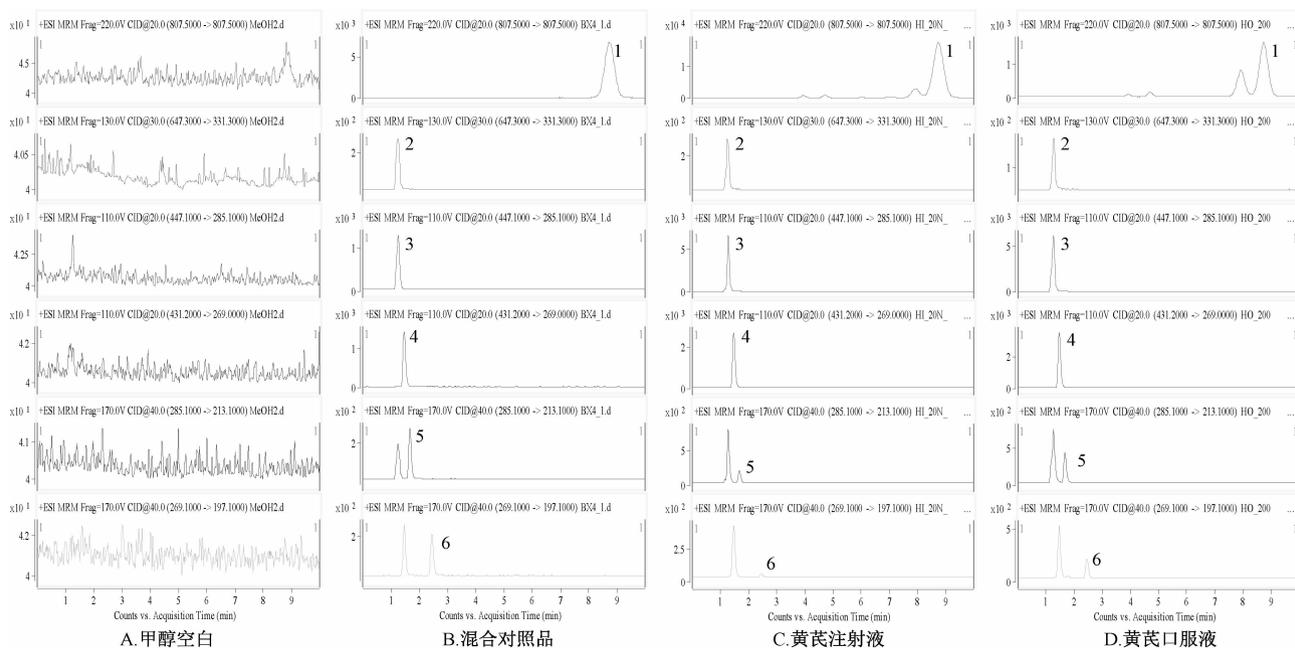
另称取异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷适量,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,作为内标贮备液,并用甲醇稀释至 0.904 0 μg/mL。

2.4 供试品溶液的配制 取黄芪注射液 0.1 mL,用甲醇稀释 20 倍,即得。取黄芪口服液 0.1 mL,用甲醇稀释 200 倍,取 1 mL 稀释液于 1.5 mL 塑料离心管中,13 800 × *g* 离心 5 min,取上清液,即得。

各样品进样分析前,与 0.904 0 μg/mL 内标异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷甲醇溶液按体积比 1 : 1 涡旋混合 30 s,在“2.1”和“2.2”项条件下分析。

2.5 专属性试验 在本实验条件下,所测 5 种有效成分峰型良好无干扰,见图 1。从图中可看出,毛蕊异黄酮(峰 5)的左侧有一个与毛蕊异黄酮葡萄糖苷(峰 3)保留时间一致的色谱峰,此峰是由毛蕊异黄酮葡萄糖苷产生,因为毛蕊异黄酮葡萄糖苷可先形成 285.1 的碎片离子,继而形成 213.1 的碎片离子。同样,芒柄花黄素(峰 6)左侧与芒柄花苷(峰 4)保留时间一致的色谱峰是由芒柄花苷产生的。

2.6 线性关系考察 精密吸取“2.3”项下混合对照品母液适量,用甲醇稀释成系列浓度混合对照品溶液,与 0.904 0 μg/mL 内标异鼠李素-3-*O*-新橙皮苷甲醇溶液按体积比 1 : 1 涡旋混合 30 s,在“2.1”和“2.2”项条件下分析,以对照品质量浓度(*X*)为横坐标,待测物峰面积 *A_s* 与内标峰面积 *A_{is}* 的比值(*Y*)为纵坐标,作加权线性回归计算。结果表明,各成分在相应的线性范围内线性关系良好,各成分线性范围为黄芪甲苷 0.079 4 ~



1. 黄芪甲苷 2. 异鼠李素-3-O-新橙皮苷 (内标) 3. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 4. 芒柄花苷 5. 毛蕊异黄酮 6. 芒柄花黄素
1. astragaloside 2. isorhamnetin (internal standard) 3. calycosin-7-glucosid 4. ononin 5. calycosin 6. formononetin

图1 甲醇空白、混合对照品、黄芪注射液、黄芪口服液的 LC-MS-MS 图

Fig. 1 LC-MS-MS chromatograms of methanol, mixed reference substances, Astragalus Injection and Astragalus Oral Liquid

5.080 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9979$); 毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.0292 ~ 1.872 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9980$); 芒柄花苷 0.0082 ~ 0.5220 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9992$); 毛蕊异黄酮 0.0052 ~ 0.3307 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9996$); 芒柄花黄素 0.0020 ~ 0.1258 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9997$)。

2.7 精密度试验 取“2.3”项下混合对照品母液适量,用甲醇稀释为含黄芪甲苷 0.6350 $\mu\text{g/mL}$,毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.1170 $\mu\text{g/mL}$,芒柄花苷 0.0652 $\mu\text{g/mL}$,毛蕊异黄酮 0.0413 $\mu\text{g/mL}$,芒柄花黄素 0.0157 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,在“2.1”和“2.2”项条件下连续进样5次,将峰面积比值代入当天标准曲线计算浓度,求得精密度。结果表明,仪器精密度良好,黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素的 RSD 值分别为 3.1%、2.1%、3.4%、4.1%和 4.5%。

2.8 重复性试验 分别取同一批号黄芪注射液(批号为 1212053)和黄芪口服液(批号为 1304003),按“2.4”项下方法制备供试品溶液5份,分别在“2.1”和“2.2”项条件下分析,测定各化合物的含量。结果,黄芪注射液和黄芪口服液中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花

苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素的 RSD 值分别为 3.3%和 4.8%、3.8%和 2.7%、4.7%和 2.4%、4.9%和 3.0%、4.2%和 3.9%,表明方法重复性良好。

2.9 稳定性试验 分别取同一批号黄芪注射液(批号为 1212053)和黄芪口服液(批号为 1304003),按“2.4”项下方法制备供试品溶液5份,在室温下放置 0、2、4、8、12 h,在“2.1”和“2.2”项条件下分别进样分析,代入当天标准曲线计算浓度。黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素的 RSD 值分别为 3.3%和 2.9%、2.6%和 3.9%、2.9%和 4.1%、4.2%和 3.3%、3.5%和 4.0%,表明样品溶液在 12 h 内稳定。

2.10 回收率试验 取成分含有量已知的同一批号黄芪注射液(批号为 1212053) 0.1 mL,加入适当浓度混合对照品溶液 0.1 mL,混匀,用甲醇稀释 20 倍。另取成分含有量已知的同一批号黄芪口服液(批号为 1304003) 0.1 mL,加入适当浓度混合对照品溶液 0.1 mL,混匀,用甲醇稀释 200 倍,取 1 mL 稀释液于 1.5 mL 塑料离心管中,13 800 \times g 离心 5 min,取上清液,分别平行制备 5 份。再

按体积比1:1加入0.904 0 μg/mL内标异鼠李素-3-O-新橙皮苷甲醇溶液涡旋混合30 s,在“2.1”和“2.2”项条件下分析,结果见表1、表2。

表1 黄芪注射液加样回收试验结果(n=5)

Tab.1 Results of recovery tests for Astragalus Injection (n=5)

成分名称	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均值/% (RSD/%)	
黄芪甲苷	12.74	10.16	22.89	99.9	102.3	
	12.74	10.16	23.40	104.9	(3.1)	
	12.74	10.16	22.97	100.7		
	12.74	10.16	22.85	99.5		
	12.74	10.16	23.54	106.3		
毛蕊异黄酮	2.260	1.872	4.061	96.2	96.8	
	葡萄糖苷	2.260	1.872	4.113	99.0	(2.4)
		2.260	1.872	4.057	96.0	
		2.260	1.872	4.015	93.8	
芒柄花苷	0.657 0	0.522 0	1.160 2	96.4	97.5	
	0.657 0	0.522 0	1.150 3	94.5	(3.0)	
	0.657 0	0.522 0	1.1700	98.3		
	0.657 0	0.522 0	1.158 5	96.1		
	0.657 0	0.522 0	1.189 6	102.0		
毛蕊异黄酮	0.154 0	0.158 8	0.315 6	101.8	96.9	
	0.154 0	0.158 8	0.313 4	100.4	(4.3)	
	0.154 0	0.158 8	0.302 6	93.6		
	0.154 0	0.158 8	0.300 5	92.3		
	0.154 0	0.158 8	0.306 9	96.3		
芒柄花黄素	0.011 6	0.012 6	0.023 5	94.4	98.1	
	0.011 6	0.012 6	0.024 4	101.6	(3.7)	
	0.011 6	0.012 6	0.023 6	95.2		
	0.011 6	0.012 6	0.024 5	102.4		
	0.011 6	0.012 6	0.023 8	96.8		

表2 黄芪口服液加样回收试验结果(n=5)

Tab.2 Results of recovery tests for Astragalus Oral Liquid (n=5)

成分名称	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均值/% (RSD/%)	
黄芪甲苷	11.22	10.16	21.26	98.8	99.9	
	11.22	10.16	21.85	104.6	(3.8)	
	11.22	10.16	21.24	98.6		
	11.22	10.16	21.65	102.7		
	11.22	10.16	20.87	95.0		
毛蕊异黄酮	52.57	46.80	100.2	101.8	98.3	
	葡萄糖苷	52.57	46.80	97.15	95.3	(3.2)
		52.57	46.80	98.61	98.4	
		52.57	46.80	96.99	94.9	
芒柄花苷	52.57	46.80	99.83	101.0		
	16.78	13.05	29.41	96.8	95.9	
	16.78	13.05	28.98	93.5	(2.8)	
	16.78	13.05	28.96	93.3		
	16.78	13.05	29.82	99.9		
毛蕊异黄酮	16.78	13.05	29.29	95.9		
	7.064	9.920	17.18	102.0	97.6	
	7.064	9.920	16.59	96.0	(3.6)	
	7.064	9.920	16.94	99.6		
	7.064	9.920	16.27	92.8		
芒柄花黄素	7.064	9.920	16.73	97.4		
	1.837	1.573	3.350	96.2	101.5	
	1.837	1.573	3.431	101.3	(4.2)	
	1.837	1.573	3.389	98.7		
	1.837	1.573	3.508	106.2		
1.837	1.573	3.493	105.3			

2.11 样品测定 分别吸取3个批次的黄芪注射液和黄芪口服液,按“2.4”项下方法处理,在“2.1”和“2.2”项条件下分析测定,以内标法计算各成分的含有量,结果见表3。

表3 样品测定结果(μg, n=3)

Tab.3 Results of the determination of samples (μg, n=3)

制剂	批号	黄芪甲苷	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	芒柄花苷	毛蕊异黄酮	芒柄花黄素
黄芪注射液	1212053	1 274	226.0	65.70	15.40	1.156
	1212093	1 305	231.9	68.44	16.61	1.284
	1302036	1 259	220.8	66.92	14.33	1.195
黄芪口服液	1304003	1 122	5 257	1 678	706.4	183.7
	1306002	1 108	5 135	1 652	684.9	172.2
	1307004	1 098	5 190	1 602	671.8	163.5

3 讨论

据以往文献报道,对黄芪注射液和黄芪口服液的质量控制大多采用高效液相色谱法测定其中的黄芪甲苷^[5-6,8]。由于中药是复杂体系,经多成分多途径协同作用发挥药效,因此建立多组分同时定量的分析方法,对全面控制中药制剂的质量具有重要意义。本实验采用LC-MS-MS法,对黄芪甲苷、毛

蕊异黄酮、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花黄素、芒柄花苷进行同时定量分析。由于黄芪甲苷[M+H]⁺响应较差,故选择[M+Na]⁺模式,因[M+Na]⁺峰在二级质谱很难产生碎片离子,所以采用m/z 807.5→807.5进行检测。其他4个化合物[M+H]⁺响应较好,二级质谱均有碎片离子。该方法专属性强,灵敏度高,分离效果理想,精密

度、重复性、稳定性、回收率均符合测定要求，有利于进一步完善黄芪注射液和黄芪口服液的质量控制及相关研究。

参考文献:

[1] 李效宽, 张艳海, 冯天辉, 等. 在线固相萃取法结合电雾式检测器测定黄芪及其复方中黄芪甲苷的含量[J]. 分析化学, 2014, 42(12): 1791-1796.
[2] 高维娟. 黄芪注射液临床应用研究进展[J]. 承德医学院学报, 2014, 31(2): 129-131.
[3] 鄢立新, 唐卫文, 付铁军, 等. 不同厂家产黄芪注射液中黄芪甲苷的含量考察[J]. 中成药, 2004, 26(8): 626-628.
[4] 张翠荣, 杨玉恒, 张敬伟, 等. 黄芪注射液治疗围产期心脏病的疗效观察[J]. 河北医药, 2014, 36(22): 3475-3476.
[5] 张建英, 李艳丽. 黄芪注射液的临床应用进展[J]. 中国社区医师, 2012, 14(22): 34-35.
[6] 刘红健, 吴国珍, 练 文. 血栓通加黄芪注射液联合治疗

脑梗塞的临床观察[J]. 中成药, 2005, 27(9): 附 16-18.
[7] 高 建, 李德林, 赵 萍, 等. HPLC-ELSD 法同时测定玉屏风总苷中黄芪皂苷 II 及黄芪甲苷[J]. 中成药, 2014, 36(8): 1767-1770.
[8] 孟 楣, 魏良兵, 王 芳, 等. UPLC-ELSD 法测定芪白平肺胶囊中黄芪甲苷[J]. 中成药, 2013, 35(12): 2634-2637.
[9] 白新涛, 霍宝军, 张 博. 近红外光谱法快速检测黄芪注射液中黄芪甲苷和总固体量[J]. 中草药, 2012, 43(11): 2189-2193.
[10] 简龙海, 闻宏亮, 夏 晶, 等. 黄芪注射液定性定量方法的改进[J]. 中成药, 2011, 33(11): 2018-2020.
[11] 邵晓霞, 王国团, 方一清. 高效液相色谱法测定黄芪注射液中黄芪甲苷含量[J]. 新疆医学, 2009, 39(6): 129-130.
[12] 王 辰, 侯连兵, 刘 婵. HPLC-ELSD 法测定黄芪注射液中黄芪甲苷的含量[J]. 中药材, 2006, 29(6): 618-619.
[13] 王 俐. HPLC-ELSD 法测定黄芪口服液中黄芪甲苷的含量[J]. 药学进展, 2005, 29(2): 82-84.

HPLC 法同时测定活血通脉片中 4 种成分

赵培敬, 张桂平

(南阳市食品药品检验所, 河南 南阳 473061)

摘要: 目的 建立同时测定活血通脉片(鸡血藤、丹参、赤芍、红花等)中 4 种活性成分丹酚酸 B、芍药苷、羟基红花黄色素 A 及橙皮苷的 HPLC 法。方法 活血通脉片 70% 甲醇提取液的分析采用 Welchrom C₁₈ 色谱柱; 乙腈-0.1% 磷酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长为 230 nm。结果 丹酚酸 B、芍药苷、羟基红花黄色素 A、橙皮苷的线性范围分别为 23.91 ~ 143.46 μg/mL ($r = 0.999\ 8$)、5.62 ~ 33.75 μg/mL ($r = 0.999\ 4$)、2.61 ~ 15.66 μg/mL ($r = 0.999\ 1$)、19.10 ~ 114.60 μg/mL ($r = 0.999\ 7$), 平均回收率分别为 98.5%、98.8%、97.9%、99.2%, RSD 分别为 1.2%、1.4%、1.0%、0.92%。结论 本法对方中 4 味主药的特征性成分同时进行测定, 简便实用, 灵敏准确, 重复性好。

关键词: 活血通脉片; 丹酚酸 B; 芍药苷; 羟基红花黄色素 A; 橙皮苷; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2015)12-2651-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2015.12.017

Simultaneous determination of four active constituents in Huoxue Tongmai Tablets by HPLC

ZHAO Pei-jing, ZHANG Gui-ping

(Nanyang Institute for Food and Drug Control, Nanyang 473061, China)

ABSTRACT: AIM To develop an HPLC method for the simultaneous determination of the contents of four active constituents (salvianolic acid B, paeoniflorin, hydroxysafflor yellow A and hesperidin) in Huoxue Tongmai Tablets (*Jixuezheng Radix et Caulis*, *Salviae miltiorrhizae Radix*, *Paeoniae rubrae Radix*, *Carthami flos*, etc.).

收稿日期: 2015-03-18

作者简介: 赵培敬(1975—), 男, 副主任药师, 研究方向为中药质量标准与提高。Tel: 13938993643, E-mail: peijingzhao@126.com