

[质 量]

UPLC-MS/MS 法同时测定贞芪扶正胶囊中 10 种成分

房桂珍¹, 刘 笑², 沈云云², 莫海莹², 刘保霞², 李瑞宏³, 祁金龙^{2*}

(1. 河北医科大学生物医学工程中心, 河北 石家庄 050017; 2. 河北医科大学药理学教研室, 河北 石家庄 050017; 3. 河北省儿童医院, 河北 石家庄 050013)

摘要: **目的** 建立 UPLC-MS/MS 法同时测定贞芪扶正胶囊(女贞子和黄芪)中腺苷、红景天苷、绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、槲皮素、芹菜素、黄芪甲苷的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Inertsustain C₁₈ 色谱柱(75 mm×3.0 mm, 2 μm); 流动相乙腈-甲醇-4 mmol/L 乙酸铵, 梯度洗脱; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 40 °C。**结果** 10 种成分在各自范围内线性关系良好($r \geq 0.996 0$), 平均加样回收率 95.1% ~ 104.3%, RSD 小于 4.20%。**结论** 该方法快速灵敏, 专属性强, 可用于贞芪扶正胶囊的质量控制。

关键词: 贞芪扶正胶囊; 化学成分; UPLC-MS/MS

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)07-1398-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.07.015

Simultaneous determination of ten constituents in Zhenqi Fuzheng Capsules by UPLC-MS/MS

FANG Gui-zhen¹, LIU Xiao², SHEN Yun-yun², MO Hai-ying², LIU Bao-xia², LI Rui-hong³, QI Jin-long^{2*}

(1. Center for Biomedical Engineering, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 3. Children's Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050013, China)

ABSTRACT: AIM To develop a UPLC-MS/MS method for the simultaneous content determination of adenosine, salidroside, chlorogenic acid, calycosin-7-O-β-D-glycoside, specnuezhenide, calycosin, formononetin, quercetin, apigenin and astragaloside IV in Zhenqi Fuzheng Capsules (*Ligustri lucidi Fructus* and *Astragali Radix*). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 40 °C thermostatic Inertsustain C₁₈ column (75 mm×3.0 mm, 2 μm), with the mobile phase comprising of methanol-acetonitrile-4 mmol/L ammonium acetate flowing at 0.5 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** Ten constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.996 0$), whose average recoveries were 95.1% - 104.3% with the RSDs of less than 4.20%. **CONCLUSION** This sensitive and specific method can be used for the rapid quality control of Zhenqi Fuzheng Capsules.

KEY WORDS: Zhenqi Fuzheng Capsules; chemical constituents; UPLC-MS/MS

贞芪扶正胶囊是由女贞子和黄芪经提取加工后制成的复方胶囊剂^[1], 可补气养阴、调节免疫功能, 用于久病虚损、气阴不足, 并且在临床恶性肿瘤治疗中配合手术、放疗、化疗时, 可促进正常功

能的恢复。黄芪主要含多糖、皂苷、黄酮类成分, 具有增强机体免疫力、抗病毒、抗应激功效等作用^[2-3], 其中黄芪甲苷还可改善二型糖尿病小鼠肾损伤及新生鼠由麻醉诱导的脑细胞凋亡, 还有益于

收稿日期: 2016-09-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21402139); 河北省教育厅优秀青年基金资助项目(YQ2013033); 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20150560); 河北省食品药品监督管理局(重点)科技项目(ZD2015023)

作者简介: 房桂珍(1966—), 女, 硕士, 主管药师, 从事新药质量分析研究。Tel: (0311) 85917896, E-mail: fanggz@163.com

* **通信作者:** 祁金龙(1980—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事 PK、PD 研究工作。Tel: (0311) 86266335, E-mail: jinlongqi@aliyun.com

脂肪代谢^[46]；女贞子中萜类和苯乙醇苷类含有量较高，也是药效活性成分，以齐墩果酸、熊果酸、特女贞苷、女贞苷、红景天苷等为代表^[7]，具有保肝、免疫调节、强心、抗炎、抗肿瘤等活性^[8]。

目前，贞芪扶正胶囊的质量控制采用薄层扫描法测定黄芪甲苷含有量，要求较低。近年来，有利用 HPLC-UV 或者 HPLC-DAD-ELSD 联用检测其中多个组分的报道^[9-11]，但其主要成分种类繁多、结构各异、紫外吸收波长不同甚至无吸收，需要多种检测器的配合使用，同时复杂多组分的分离对于 HPLC 也是巨大挑战。HPLC-MS/MS 法对复杂样本的多组分测定具有巨大技术优势，已成为中药质量控制的重要发展方向^[12]。因此，本实验采用该方法同时测定贞芪扶正胶囊中 10 种成分含有量，具有样品处理简单、选择性好、灵敏度高、分析时间短等优点，可用于该制剂的质量控制。

1 仪器与材料

API 4000Q-Trap 质谱仪，配置电喷雾离子化源、Analyst 1.6 工作站（美国 AB SCIEX 公司）；LC-30A 型超高效液相色谱系统，配置液相输液泵、自动进样器、柱温箱（日本岛津公司）；BT125D 分析天平（北京赛多利斯仪器系统有限公司）；KQ-400KDB 型高功率数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；XW-80A 型漩涡混合器（上海医大仪器厂）。

腺苷（批号 58-61-7）、毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号 20633-67-4）、特女贞苷（批号 39011-92-2）、毛蕊异黄酮（批号 20575-57-9）、槲皮素（批号 117-39-5）、芹菜素（批号 520-36-5）对照品均购于上海诗丹德生物技术有限公司；红景天苷（批号 0818-200103）、绿原酸（批号 0753-200111）、芒柄花素（批号 111703-200501）、黄芪甲苷（批号 0781-200311）对照品由中国食品药品检定研究院提供，含有量均大于 98%。女贞子（批号 121041-200302）、黄芪（批号 974-200106）为《中国药典》收录法定对照品，由中国食品药品检定研究院提供，经专家鉴定为正品。甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵均为色谱纯；水为超纯水。贞芪扶正胶囊（甘肃扶正药业科技股份有限公司，批号 J20150411、J20150146、J20140807、J20150142、J20150318，每 6 粒相当于 12.5 g 生药）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Inertsustain C₁₈ 色谱柱（75 mm × 3.0 mm，2 μm）；柱温 40 ℃；流动相 A 为乙腈，

B 为甲醇，C 为含 0.1% 甲酸的 4 mmol/L 乙酸铵，梯度洗脱（0 ~ 7 min，10% ~ 55% A，20% B，70% ~ 25% C；7 ~ 8 min，55% A，20% B，25% C）；体积流量 0.5 mL/min；进样量 5 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾电离源（ESI）；多反应离子监测（MRM）模式；正负离子切换扫描，0 ~ 1.5、3.7 ~ 6.7 min 为负离子模式，其余为正离子模式；源喷射电压 4 500/5 500 V；雾化温度 650 ℃；气帘气 137.90 kPa；雾化气 344.74 kPa；辅助加热气 379.21 kPa。参数见表 1。

表 1 各成分 MRM 参数

Tab. 1 MRM parameters of various constituents

成分	MS m/z	MS ₂ m/z	解簇电压/ V	碰撞能量/ eV	t _R /min
腺苷	266.1	134.0	-72.0	-11.6	0.71
红景天苷	299.1	118.8	-83.9	-18.7	1.09
绿原酸	353.1	191.0	-65.1	-19.4	1.17
毛蕊异黄酮苷	447.3	285.2	69.0	21.5	2.40
特女贞苷	687.4	369.1	119.1	20.8	3.00
毛蕊异黄酮	283.1	268.0	-77.4	-27.0	4.58
槲皮素	301.1	150.9	-88.9	-30.7	4.64
芹菜素	269.1	117.0	-96.0	-42.8	5.30
芒柄花素	267.1	252.0	-88.0	-28.2	5.96
黄芪甲苷	785.6	473.5	104.0	15.8	6.90

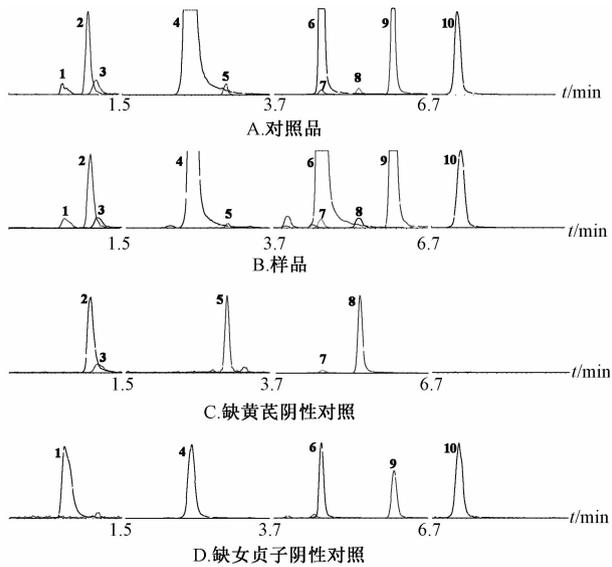
2.3 对照品溶液制备 精密称取各对照品适量，甲醇溶解定容。精密量取适量，置于 10 mL 量瓶中，50% 甲醇定容，制得含腺苷 500 ng/mL、红景天苷 5 000 ng/mL、绿原酸 40 ng/mL、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 2 500 ng/mL、特女贞苷 100 000 ng/mL、毛蕊异黄酮 500 ng/mL、芒柄花素 50 ng/mL、槲皮素 40 ng/mL、芹菜素 500 ng/mL、黄芪甲苷 5 000 ng/mL 的混合对照品贮备液。精密量取适量，置于 10 mL 量瓶中，50% 甲醇稀释，即得。

2.4 供试品溶液制备 精密称取样品内容物 0.2 g（相当于半个胶囊或 1.0 g 原药材），10 mL 甲醇溶解，称定质量，超声提取 30 min，甲醇补足减失的质量，离心，取上清，50% 甲醇稀释 10 倍，0.45 μm 微孔滤膜过滤，即得。

2.5 阴性对照溶液制备 按处方比例和工艺，分别制备缺黄芪和女贞的阴性对照样品，按“2.4”项下方法制备对应溶液。

2.6 方法学考察

2.6.1 专属性考察 取阴性对照、对照品、供试品溶液适量，在“2.1”和“2.2”项条件下分析，结果见图 1，可知各成分离子对和溶剂对组分测定无干扰，方法专属性良好。



1. 腺苷 2. 红景天苷 3. 绿原酸 4. 毛蕊异黄酮葡萄糖苷
5. 特女贞苷 6. 毛蕊异黄酮 7. 槲皮素 8. 芹菜素 9. 芒柄花素 10. 黄芪甲苷
1. adenosine 2. salidroside 3. chlorogenic acid 4. calycosin-7-*D*- β -*D*-glycoside 5. specnuezhenide 6. calycosin 7. formononetin
8. quercetin 9. apigenin 10. astragaloside IV

图1 各成分提取离子色谱图

Fig.1 Extracted ion chromatograms of various constituents

2.6.2 线性关系考察 50% 甲醇稀释对照品溶液，在“2.1”和“2.2”项条件下测定。以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归，再分别以信噪比 S/N = 10 和 S/N = 3 时各对照品的质量浓度为定量限和检测限，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

2.6.3 精密度试验 取同一对照品溶液，在“2.1”和“2.2”项条件下进样 6 次，测得峰面积 RSD 分别为腺苷 0.70%、红景天苷 1.84%、绿原酸 2.58%、毛蕊异黄酮苷 2.21%、特女贞苷 2.79%、毛蕊异黄酮 0.83%、槲皮素 3.41%、芹菜素 3.52%，芒柄花素 1.32%、黄芪甲苷 2.27%，表明仪器精密度良好。

2.6.4 重复性试验 精密称取样品内容物 (批号 J20150411) 6 份，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，测得含有量 RSD 分别为腺苷 3.41%、红景天苷 2.59%、绿原酸 4.57%、毛蕊异黄酮苷 1.82%、特女贞苷 4.65%、毛蕊异黄酮 3.07%、槲皮素 4.23%、芹菜素 3.69%、芒柄花素 3.51%、黄芪甲苷 2.71%，表明该方法重复性良好。

表 2 各成分线性关系

Tab.2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	r	LOQ/(ng·mL ⁻¹)	LOD(ng·mL ⁻¹)
腺苷	Y = 49.4X - 174	25 ~ 500	0.999 8	8.30	2.5
红景天苷	Y = 30.5X - 1 850	250 ~ 5 000	0.999 8	30.0	12.5
绿原酸	Y = 885X - 174	1 ~ 20	0.999 9	1.00	0.40
毛蕊异黄酮苷	Y = 2 610X - 158 000	125 ~ 2 500	0.996 0	0.25	0.08
特女贞苷	Y = 2.87X - 1 690	1 000 ~ 20 000	0.998 5	200.0	60.0
毛蕊异黄酮	Y = 6 120X + 33 100	25 ~ 500	0.998 8	0.10	0.05
槲皮素	Y = 904X + 396	1.5 ~ 30	0.998 4	1.25	0.53
芹菜素	Y = 1 710X + 938	1 ~ 20	0.999 5	0.69	0.15
芒柄花素	Y = 11 500X + 45 000	10 ~ 200	0.999 7	0.05	0.02
黄芪甲苷	Y = 117X + 15 200	200 ~ 4 000	0.996 3	0.33	0.10

2.6.5 稳定性试验 取供试品溶液 (批号 J20150411) 于室温下放置 0、4、8、12、18、24 h，测得峰面积 RSD 分别为腺苷 1.57%、红景天苷 1.25%、绿原酸 2.68%、毛蕊异黄酮苷 3.87%、特女贞苷 2.15%、毛蕊异黄酮 1.88%、槲皮素 2.41%、芹菜素 2.30%、芒柄花素 3.15%、黄芪甲苷 1.27%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.6 加样回收率试验 精密称取样品内容物 (批号 J20150411) 0.2 g，精密加入相当于相应成

分含有量 50%、100%、150% 的对照品溶液，平行 3 份，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”和“2.2”项条件下测定，结果见表 3。

2.7 样品含有量测定 取样品 5 批，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”和“2.2”项条件下测定，结果见表 4。

3 讨论和结论

贞芪扶正胶囊在生产中首先是药材水煮，然后水煎液经过滤、浓缩、喷雾干燥得到产品，生产工艺决定了在含有量测定时样品不需要特殊处理，只

表3 各成分加样回收率试验结果 (n=3)

Tab. 3 Results of recovery tests for various constituents (n=3)

成分	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	平均回收率/%	RSD/%
腺苷	19.4	10.0	29.0	95.6	4.10
	19.4	20.0	38.8	96.8	3.21
	19.4	30.0	47.9	95.1	2.48
红景天苷	239.1	120.0	356.6	97.9	0.98
	239.1	240.0	476.5	98.9	1.79
	239.1	360.0	585.8	96.3	1.35
绿原酸	1.10	0.50	1.58	96.0	2.85
	1.10	1.00	2.10	95.8	4.12
	1.10	1.50	2.62	101.2	3.42
毛蕊异黄酮苷	387.4	200.0	585.0	98.8	0.73
	387.4	400.0	785.0	99.4	1.05
	387.4	600.0	971.8	97.4	2.26
特女贞苷	1 717.4	900.0	2 630.9	101.5	3.12
	1 717.4	1 800.0	3 485.0	98.2	2.14
	1 717.4	2 700.0	4 395.8	99.2	1.72
毛蕊异黄酮	71.4	35.0	105.3	96.9	2.31
	71.4	70.0	139.7	97.6	2.04
	71.4	105.0	172.8	96.6	1.31
槲皮素	0.54	0.25	0.80	103.5	4.20
	0.54	0.50	1.10	102.6	3.33
	0.54	0.75	1.32	103.9	3.42
芹菜素	0.80	0.40	1.21	102.1	2.58
	0.80	0.80	1.60	104.3	2.74
	0.80	1.20	2.05	104.1	3.31
芒柄花素	18.83	10.0	28.6	97.6	3.56
	18.83	20.0	39.0	100.8	2.68
	18.83	30.0	49.3	101.5	1.25
黄芪甲苷	160.8	80.0	241.0	100.2	2.38
	160.8	160.0	318.4	98.5	1.42
	160.8	240.0	395.8	97.9	1.21

表4 各成分含有量测定结果

Tab. 4 Results of content determination of various constituents

批次	含有量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{粒}^{-1})$									
	腺苷	红景天苷	绿原酸	毛蕊异黄酮苷	特女贞苷	毛蕊异黄酮	槲皮素	芹菜素	芒柄花素	黄芪甲苷
J20150411	38.7	478.2	2.20	774.8	3 434.8	142.8	1.08	1.60	37.4	321.6
J20150146	108.8	799.0	3.72	701.4	3 749.2	75.4	0.76	0.74	17.0	303.2
J20140807	109.7	2 459.2	2.90	603.0	3 999.2	223.4	0.83	0.58	54.7	447.4
J20150142	99.2	1 322.2	1.96	536.2	4 700.6	188.6	0.98	1.00	47.6	381.4
J20150318	175.0	1 427.2	2.48	749.8	3 983.0	63.8	1.32	0.89	13.1	369.2

需超声溶解即可。本实验考察了不同体积分数的甲醇，发现纯甲醇对各成分的溶解度更好，样品处理更方便。另外，熊果酸和齐墩果酸虽然是女贞子重要成分，但在制剂中含有量很低^[13]，质控价值不大，故不予考虑。

UPLC-MS的多离子监测(MRM)模式具有高选择性、高灵敏度的特点，化合物不需要完全分离即可实现准确定量。本实验所测成分中，有一部分在正离子模式下灵敏度较好，而另一部分在负离子

模式下效果更佳，故在1个分析周期中进行3次切换，从而保证不同化合物都在最佳电离模式下进行检测。通过改变流动相的组成及比例，最终确定甲醇、乙腈、含0.1%甲酸的乙酸铵作为流动相，可满足质谱检测器离子源正负离子切换对分离度的要求，在8 min内即完成了目标化合物的分析。

综上所述，本实验建立UPLC-MS/MS法同时测定贞芪扶正胶囊中腺苷、红景天苷、绿原酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、特女贞苷、毛蕊异黄酮槲皮

素、芹菜素、芒柄花素、黄芪甲苷的含有量,该方法样品处理简单、分析时间短、灵敏度高、专属性好、结果准确可靠,重复性理想,对贞芪扶正胶囊的质量控制及黄芪或女贞子的相关研究具有重要意义。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂):第17册[S]. 1998:111.
[2] 刘德利,包华音,刘 杨. 近5年黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 食品与药品,2014,16(1):68-70.
[3] 邱勇波,刘 锦,武 飞. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国疗养医学,2011,20(5):435-436.
[4] Sun H, Wang W, Han P, et al. Astragaloside IV ameliorates renal injury in db/db mice[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32545.
[5] Sun J, Chen X L, Zheng J Y, et al. Astragaloside IV protects new born rats from anesthesia-induced apoptosis in the developing brain[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(3): 1829-1835.
[6] Wu H, Gao Y, Shi H L, et al. Astragaloside IV improves lipid metabolism in obese mice by alleviation of leptin resistance and

regulation of thermogenic network [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 30190.
[7] 程 敏,胡正海. 女贞子的生物学和化学成分研究进展[J]. 中草药,2010,41(7):1219-1221.
[8] 刘亭亭,王 萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(14):228-234.
[9] 胡芳弟,封士兰,赵健雄. RP-HPLC测定贞芪扶正制剂中两种异黄酮类成分的含量[J]. 中成药,2004,26(9):705-707.
[10] 程 伟,石晓伟,张嫡群,等. 贞芪扶正胶囊中黄芪甲苷和红景天苷的含量测定[J]. 中成药,2006,28(5):658-662.
[11] 崔 方,李 文,胡芳弟,等. 高效液相色谱法测定贞芪扶正制剂中8种生物活性化合物的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(7):1185-1189.
[12] Tao W Q, Zhou Z G, Zhao B, et al. Simultaneous determination of eight catechins and four theaflavins in green, black and oolong tea using new HPLC-MS-MS method[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 131: 140-145.
[13] 常星洁,刘汉清,邹建荣,等. 响应面法优化女贞子有效成分的提取工艺[J]. 中成药,2013,35(2):277-281.

HPLC法同时测定金嗓利咽胶囊中8种成分

陈纪龙

(铜仁职业技术学院,贵州铜仁554300)

摘要:目的 建立HPLC法同时测定金嗓利咽胶囊(厚朴、茯苓、枳实等)中和厚朴酚、厚朴酚、去氢土莫酸、土莫酸、猪苓酸C、3-表去氢土莫酸、去氢茯苓酸、茯苓酸的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用Kromasil C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm);以乙腈-0.05%磷酸为流动相,梯度洗脱;体积流量0.9 mL/min;检测波长294、241、210 nm;柱温35℃。**结果** 8种成分在各自范围内线性关系良好($r > 0.999 0$),平均加样回收率均大于96.0%,RSD均小于2.0%。**结论** 该方法快速简便,重复性好,可用于金嗓利咽胶囊的质量控制。

关键词: 金嗓利咽胶囊;化学成分;HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2017)07-1402-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.07.016

Simultaneous determination of eight constituents in Jinsang Liyan Capsules by HPLC

CHEN Ji-long

(Tongren Polytechnic College, Tongren 554300, China)

ABSTRACT: AIM To develop an HPLC method for the simultaneous content determination of honokiol, magnolol, dehydrotumulosic acid, tumulosic acid, polyporenic acid C, 3-epidehydrotumulosic acid, dehydropachymic

收稿日期: 2016-12-08

作者简介: 陈纪龙(1978—),男,讲师,从事药学相关研究教学工作。E-mail: romantichen@126.com