

[质 量]

UPLC-QQQ-MS 法同时测定片仔癀中 13 种成分

黄秋妹¹, 邵艳妮², 朱艳琳², 沈少君², 郭惠婷², 黄鸣清^{2*}

(1. 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520; 2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法 (UPLC-QQQ-MS) 同时测定片仔癀 (牛黄、麝香、三七等) 中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、牛磺酸、牛磺胆酸、胆酸、甘氨酸胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸、麝香酮的含有量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Waters CORTECS UPLC C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm); 流动相乙腈-水 (含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱; 柱温 40 ℃; 体积流量 0.25 mL/min。**结果** 13 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r > 0.998\ 5$), 平均加样回收率 91.1% ~ 105.3%, RSD 2.4% ~ 4.6%。**结论** 该方法准确、简便、灵敏、重复性好, 可用于片仔癀的质量控制。

关键词: 片仔癀; 化学成分; UPLC-QQQ-MS

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2018)01-0101-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.019

Simultaneous determination of thirteen constituents in Pientzhuang by UPLC-QQQ-MS

HUANG Qiu-mei¹, TAI Yan-ni², ZHU Yan-lin², SHEN Shao-jun², GUO Hui-ting², HUANG Ming-qing^{2*}

(1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China; 2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadruple mass spectrometry (UPLC-QQQ-MS) method for the simultaneous content determination of notoginsenoside R₁, ginsenoside Re, ginsenoside Rg₁, ginsenoside Rb₁, ginsenoside Rd, taurine, taurocholic acid, cholic acid, glycocholic acid, glycodeoxycholic acid, chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid and muscone in Pientzhuang (*Bovis Calculus*, *Moschus*, *Notoginseng Radix et Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 40 ℃ thermostatic Waters CORTECS UPLC C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.6 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-water (containing 0.1% formic acid) flowing at 0.25 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** Thirteen constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r > 0.998\ 5$), whose average recoveries were 91.1% – 105.3% with the RSDs of 2.4% – 4.6%. **CONCLUSION** This accurate, simple, sensitive and reproducible method can be used for the quality control of Pientzhuang.

KEY WORDS: Pientzhuang; chemical constituents; UPLC-QQQ-MS

片仔癀为国家一级中药保护品种, 是由牛黄、麝香、三七、蛇胆等中药经加工制成的锭剂, 具有清热解毒、凉血化瘀、消肿止痛之功效, 用于热毒

血瘀所致急慢性病毒性肝炎、痈疽疔疮、无名肿毒、跌打损伤及各种炎症^[1]。陈海滨等^[2-3]、2015 年版《中国药典》一部均采用 GC 法测定其中麝香

收稿日期: 2016-09-26

基金项目: 福建省教育厅高校新世纪优秀人才支持计划 (闽教科 [2015] 54); 福建省大学生创新创业训练项目 (201610393010)

作者简介: 黄秋妹 (1982—), 女, 硕士, 讲师, 从事中药质量标准及制剂研究。E-mail: huang1596@163.com

* 通信作者: 黄鸣清 (1980—), 男, 博士, 副教授, 从事中药药效物质基础及作用机制研究。E-mail: hmq1115@126.com

酮的含有量；赖延锦等^[4]采用 HPLC 法测定三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、麝香草酚、人参皂苷 Rb₁、牛磺胆酸钠的含有量；余丽双等^[5]采用混合胶束毛细管电动色谱法测定三七皂苷 R₁、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Rb₁、牛磺胆酸钠的含有量。但文献报道，至少需要 2 种不同方法才能对片仔癀中多种贵重药材质控指标成分（皂苷类、胆酸类、麝香酮）同时进行测定，操作前处理繁琐，耗时长，并且需要 2 种仪器才能完成。

近年来，UPLC-MS 联用具有分析速度快、分离度高、灵敏度强、准确性好等特点而被广泛应用于中药及复方的分析中^[6-13]。本实验建立了超高效液相色谱串联三重四极杆质谱（UPLC-QQQ-MS）法对片仔癀中三七皂苷 R₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、牛磺酸、牛磺胆酸、胆酸、甘氨酸、甘氨酸脱氧胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸、麝香酮的含有量同时进行测定，可为其全面质量控制提供新的技术手段。

1 仪器与试剂

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪、Xevo TQMS 三重四极杆质谱（美国 Waters 公司）；KQ-500E 台式超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）；CAP225D 分析天平（十万分之一，德国 Sartorius 公司）。乙腈、甲醇为色谱纯（德国 Merck 公司）；水为超纯水（自制）。人参皂苷 R_{g₁}（批号 0703-200119）、鹅去氧胆酸（批号 110806-201406）对照品购自中国食品药品检定研究院；人参皂苷 Rd（批号 SH0758）、人参皂苷 Re（批号 SH0759）、人参皂苷 Rb₁（批号 SH0838）、三七皂苷 R₁（批号 SH0838）、牛磺酸（批号 SH3021）、牛磺胆酸（批号 SH0523）、胆酸（批号 SH0307）、甘氨酸（批号 SH0344）、甘氨酸脱氧胆酸（批号 SH0528）、去氧胆酸（批号 SH0306）、黄芪甲苷（批号 SH0143）对照品均购自北京赛百草科技有限公司；麝香酮（批号 MUST-11091301）对照品购自成都曼思特生物科技有限公司。4 批片仔癀（批号 S1020、S3001、S3002、S8011）均购自漳州片仔癀药业股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱 Waters Cortecs UPLC C₁₈ 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.6 μm）；柱温 40℃；流动相乙腈（A）-水（含 0.1% 甲酸，B），梯度洗脱（0～3 min，27% A；3～5 min，27%～32% A；5～8 min，

32% A；8～12 min，32%～65% A；12～13 min，65%～100% A；13～14.5 min，100% A；14.5～16 min，27% A）；体积流量 0.25 mL/min；进样量 2 μL。

2.1.2 质谱 多反应监测模式（MRM）；毛细管电压 3.5 kV；脱溶剂气 N₂，体积流量 800 L/h，温度 500℃；锥孔气流 N₂，体积流量 50 L/h；碰撞气氩气；载气氮气；离子源温度 150℃；驻留时间 5 ms。所有成分均采用正离子模式检测。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量，甲醇溶解并制备贮备液，同法制备黄芪甲苷内标溶液（0.5 μg/mL）。甲醇稀释贮备液，制得分别含三七皂苷 R₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 R_{g₁}、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、牛磺酸、牛磺胆酸、胆酸、甘氨酸、甘氨酸脱氧胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸、麝香酮 25、15、50、20、40、5、50、40、10、5、5、8、10 μg/mL 的溶液。

2.2.2 供试品溶液 取片仔癀研细，精密称取约 0.10 g，置于 250 mL 具塞锥形瓶中，精密加入甲醇 100 mL，密塞，超声（80 kHz、500 W）30 min，放冷，甲醇补足减失的质量，摇匀，提取液 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，按 1：9 比例加入内标溶液，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得（测定前于 4℃下保存）。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 采用多反应监测模式（MRM），质谱参数见表 1，在“2.1”项条件下分析，UPLC-QQQ-MS 色谱图见图 1。

表 1 各成分及内标的质谱参数

Tab. 1 MS parameters of various constituents and internal standard

成分	t _R /min	母离子	子离子	锥孔电压/ V	碰撞能量/ eV
		m/z	m/z		
牛磺酸	0.75	126	108	35	15
三七皂苷 R ₁	1.01	955	775	60	45
人参皂苷 Re	1.09	969	789	60	45
人参皂苷 R _{g₁}	1.20	823	643	80	32
牛磺胆酸	4.35	538	520	60	18
人参皂苷 Rb ₁	5.01	1 131	365	70	65
甘氨酸	5.94	488	413	35	30
黄芪甲苷（内标）	6.51	807	627	80	50
人参皂苷 Rd	7.61	969	789	60	45
胆酸	9.63	391	355	45	15
甘氨酸脱氧胆酸	10.28	472	454	45	25
鹅去氧胆酸	11.31	357	161	35	25
去氧胆酸	11.47	357	161	35	25
麝香酮	14.32	239	95	35	18

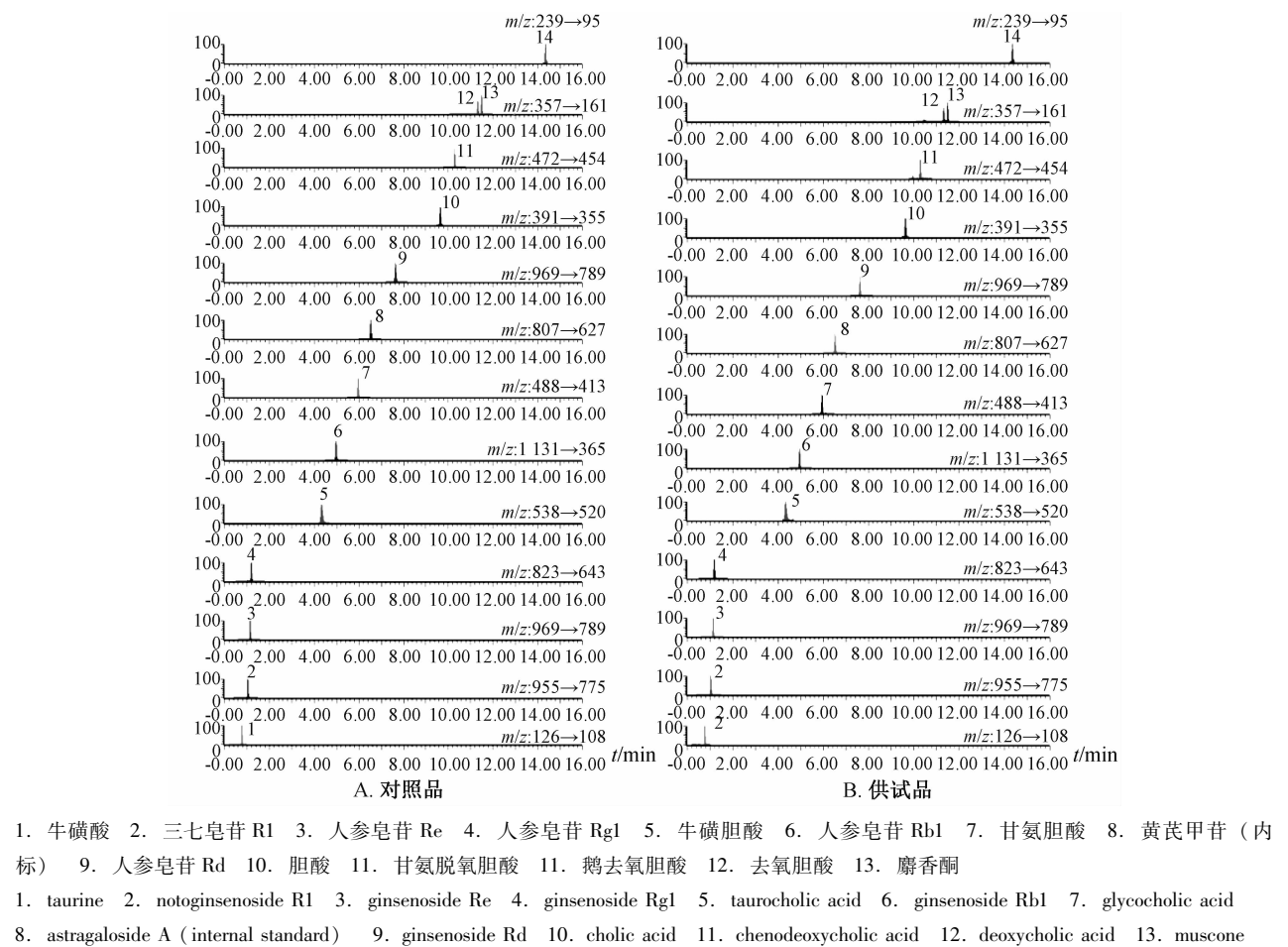


图 1 各成分 UPLC-QQQ-MS 色谱图

Fig. 1 UPLC-QQQ-MS chromatograms of various constituents

2.3.2 线性关系考察 取“2.2.1”项下对照品溶液，甲醇稀释成系列质量浓度，测定前按 1：9 比例加入内标溶液，在“2.1”项条件下测定，以成分、内标物峰面积比值（Y）对成分质量浓度（X）进行回归，再稀释混合对照品，获得近似信噪比（S/N）分别为 10 和 3 的质量浓度，作为定量限和检测限。结果见表 2。

表 2 各成分线性关系						
Tab. 2 Linear relationships of various constituents						
成分	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
牛磺酸	$Y=6.021X+0.034$	0.999 1	0.010 ~ 0.50	7.81	2.52	
三七皂苷 R ₁	$Y=58.73X+0.062$	0.999 0	0.050 ~ 2.50	0.87	0.31	
人参皂苷 Re	$Y=158.2X-0.180$	0.999 8	0.030 ~ 1.50	0.29	0.11	
人参皂苷 Rg ₁	$Y=131.6X+0.411$	0.998 5	0.100 ~ 5.00	0.39	0.15	
牛磺胆酸	$Y=5.381X+0.012$	0.998 9	0.100 ~ 5.00	48.7	15.3	
人参皂苷 Rb ₁	$Y=16.86X-0.121$	0.999 0	0.040 ~ 2.00	2.97	1.33	
甘氨酸	$Y=30.57X+0.254$	0.999 9	0.020 ~ 1.00	1.50	0.57	
人参皂苷 Rd	$Y=8.351X+0.064$	0.999 1	0.080 ~ 4.00	10.5	3.27	
胆酸	$Y=12.16X+0.103$	0.999 7	0.080 ~ 4.00	0.65	0.27	
甘氨酸脱氧胆酸	$Y=5.721X+0.064$	0.999 7	0.005 ~ 0.50	2.38	0.93	
鹅去氧胆酸	$Y=2.843X+0.085$	0.999 3	0.010 ~ 0.50	5.58	2.14	
去氧胆酸	$Y=2.956X+0.094$	0.999 1	0.016 ~ 0.80	3.95	1.61	
麝香酮	$Y=8.347X-0.074$	0.999 2	0.020 ~ 1.00	12.7	4.86	

2.3.3 精密度试验 精密吸取同一对照品内标物混合溶液，在“2.1”项条件下测定峰面积，1 d 内连续进样 6 次，同时连续测定 3 d，测得日内精密密度 RSD 为 2.1% ~ 3.8%，日间精密密度 RSD 为

2.4% ~4.9% , 表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 于 0、4、8、12、24 h 在“2.1”项条件下测定, 测得各成分对照品、内标物峰面积比值 RSD 为 2.7% ~4.2% , 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 精密称取同一批样品 (批号 S3001) 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下测定, 测得各成分含有量 RSD 为 2.7% ~4.8% , 表明该方法重复性良好。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取“2.3.5”项下含有量已知的样品粉末约 0.050 g, 共 6 份, 精密加入各对照品溶液, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下测定, 测得牛磺酸、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、牛磺胆酸、人参皂苷 Rb₁、甘氨酸胆酸、人参皂苷 Rd、胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、鹅去氧胆酸、去氧胆酸、麝香酮平均加样回收率分别为 98.4%、102.9%、98.0%、105.3%、97.8%、92.9%、91.1%、93.1%、95.3%、97.6%、98.8%、104.7%、105.0%, RSD 分别为 3.2%、4.5%、4.6%、4.5%、3.9%、2.6%、3.5%、4.3%、2.5%、3.4%、4.0%、2.4%、4.2%。

2.3.7 样品含有量测定 取 4 批样品粉末, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项条件下测定, 计算含有量, 结果见表 3。

表 3 各成分含有量测定结果 (mg/g, n=4)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (mg/g, n=4)

成分	S1020	S3001	S3002	S8011
牛磺酸	3.762	4.152	2.859	4.329
三七皂苷 R ₁	59.25	44.07	38.25	40.38
人参皂苷 Re	37.74	28.03	34.08	39.21
人参皂苷 Rg ₁	69.87	85.41	70.92	65.61
牛磺胆酸	89.55	112.4	89.91	102.6
人参皂苷 Rb ₁	42.39	39.39	44.10	32.16
甘氨酸胆酸	14.45	13.53	10.27	9.096
人参皂苷 Rd	68.97	79.47	51.87	69.25
胆酸	72.54	63.54	46.89	58.47
甘氨酸脱氧胆酸	4.989	5.286	4.602	5.673
鹅去氧胆酸	9.105	8.988	10.01	7.287
去氧胆酸	8.376	5.196	7.236	5.793
麝香酮	1.443	1.851	1.767	1.938

3 讨论

3.1 提取方法选择 比较超声、回流和索氏提取法, 发现三者提取率无显著差异, 但由于超声提取操作相对简便、耗时最短, 故选择其制备供试品溶

液。然后, 比较不同提取溶剂 (甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯、正丁醇、氯仿), 发现甲醇、乙醇、丙酮的提取率最高, 考虑到价格因素, 选择甲醇作为提取溶剂。由于质谱灵敏度高, 为了尽量降低背景基质对测定的影响, 确定供试品制备的料液比为 1:1 000, 并且用内标按照 1:9 比例稀释后, 作为最终供试品溶液。

3.2 色谱、质谱条件选择 比较色谱柱不同粒径 (1.6、1.7、1.8 μm) 对色谱分离的影响, 选择 1.6 μm; 考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-水 (含 0.1% 甲酸)、乙腈-水 (含 0.1% 甲酸) 对色谱分离和质谱检测的影响, 最终选择乙腈-水 (含 0.1% 甲酸) 作为流动相。质谱条件考察了正、负离子模式对检测的响应情况, 发现正离子模式优于负离子模式, 其中牛磺酸、牛磺胆酸、胆酸和甘氨酸脱氧胆酸最佳子离子为母离子中性丢失 H₂O 后产生的子离子峰; 甘氨酸胆酸最佳子离子为其母离子失去一分子甘氨酸 [M + Na-Gly]⁺; 鹅去氧胆酸、去氧胆酸最佳定量母离子为 [M + H-2H₂O], 而子离子为其失去 196 Da 后的子离子峰; 人参皂苷 Re、Rg₁、Rb₁、Rd、三七皂苷 R₁ 最佳量子离子为其失去糖基后的碎片离子或糖基离子; 麝香酮最佳子离子为 m/z 95 [M + Na-H₂O-9CH₂]⁺。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 670.

[2] 陈海滨, 吴春敏, 刘洪旭. 片仔癀质量标准研究 [J]. 海峡药学, 2006, 18(1): 24-28.

[3] 孙 政, 汤新兰, 黄学中, 等. 片仔癀制剂研究——组方中麝香酮含量测定 [J]. 中成药, 1990, 12(11): 4-5.

[4] 赖延锦, 陈纪鹏, 游勇基. HPLC 法测定片仔癀中 4 种成分的含量 [J]. 中国药学杂志, 2008, 43(24): 1906-1908.

[5] 余丽双, 丛日琳, 林诗瑶, 等. 混合胶束毛细管电动力学法测定片仔癀中有效成分 [J]. 分析科学学报, 2015, 31(4): 505-508.

[6] Bi H G, Hoffman K L, Pace G, et al. Mixed-mechanism ionization to enhance sensitivity in atmospheric pressure ionization LC/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2000, 22(5): 861-867.

[7] 刘 杰, 许 文, 李 煌, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定白芍饮片 10 种成分 [J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 635-643.

[8] 许 文, 傅志勤, 林 婧, 等. HPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC-QqQ-MS 的三叶青主要成分定性定量研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(22): 4365-4372.

[9] 陈佩东, 徐丹洋, 李 芳, 等. UPLC-MS 法分析黄芩炮制前后化学成分变化 [J]. 中成药, 2013, 35(4): 784-788.

- [10] 乔晓莉, 肖学风, 周大铮, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定注射用益气复脉(冻干)中 13 种成分[J]. 中草药, 2014, 45(23): 3402-3407.
- [11] 张翠英, 李振国, 徐金铃. UPLC-MS 法检测止咳平喘制剂中非法添加茶碱、醋酸波尼松、醋酸地塞米松[J]. 中成药, 2008, 30(9): 1326-1330.
- [12] 戴冬艳, 朱静毅, 闻珺毓. 液相色谱-质谱联用技术在药物分析中的应用[J]. 天津药学, 2012, 24(3): 50-53.
- [13] 苏靖, 戴荣继. 液质联用技术在中药研究中的应用[J]. 生命科学仪器, 2014, 12(2): 38-42.

LC-MS/MS 法同时测定护心口服液中 11 种成分

梁琨¹, 孙辉¹, 安 甬¹, 王新宏¹, 尤丽莎^{1*}, 蔡征宇^{2*}
(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 黄浦区中心医院, 上海 200002)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法同时测定护心口服液 (甘草、黄芪、麦冬等) 中苦参碱、氧化苦参碱、丹酚酸 B、丹参素、原儿茶醛、甘草苷、黄芪甲苷、桂皮醛、丹参酮Ⅱ_A、麦冬皂苷 D、鲁斯可皂苷元的含量。**方法** 该药物甲醇提取液的分析采用 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 100 mm, 3 μm); 流动相水-甲醇 (含 0.05% 甲酸), 梯度洗脱; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 25 ℃。**结果** 11 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 96.66% ~ 103.2%, RSD 1.4% ~ 3.4%。**结论** 该方法灵敏、可靠、准确, 可用于护心口服液的质量控制。

关键词: 护心口服液; 化学成分; LC-MS/MS

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2018)01-0105-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.01.020

Simultaneous determination of eleven constituents in Huxin Oral Liquid by LC-MS/MS

LIANG Kun¹, SUN Hui¹, AN Rui¹, WANG Xin-hong¹, YOU Li-sha^{1*}, CAI Zheng-yu^{2*}
(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Central Hospital of Huangpu District, Shanghai 200002, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the simultaneous content determination of matrine, oxymatrine, salvia acid B, tanshinol, protocatechualdehyde, liquiritin, astragaloside, cinnamaldehyde, tanshinone II_A, ophiopogonin D and ruscogenin in Huxin Oral Liquid (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Astragali Radix*, *Ophiopogonis Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of methanol extract of this drug was performed on a 25 ℃ thermostatic Ultimate XB-C₁₈ column (4.6 mm × 100 mm, 3 μm), with the mobile phase comprising of water-methanol (containing 0.05% formic acid) flowing at 0.4 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** Eleven constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r > 0.999\ 0$), whose average recoveries were 96.66% – 103.2% with the RSDs of 1.4% – 3.4%. **CONCLUSION** This sensitive, reliable and accurate method can be used for the quality control of Huxin Oral Liquid.

KEY WORDS: Huxin Oral Liquid; chemical constituents; LC-MS/MS

收稿日期: 2017-03-27

基金项目: 上海市黄浦区优秀学科带头人培养项目 ([2013] HWR/D-13)

作者简介: 梁琨 (1979—), 女, 讲师, 从事中药活性成分研究。E-mail: dolphin000000@163.com

* 通信作者: 尤丽莎 (1977—), 女, 博士, 副教授, 从事中药活性成分研究。E-mail: youlisha@126.com

蔡征宇 (1972—), 女, 副主任医师, 从事中医药防治心血管系统疾病研究。E-mail: nikicai@sina.com