

- [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

心血管疾病严重威胁人类健康，而心律失常是其中最常见的病症之一。护心口服液为中医治疗心律失常的经验方剂，强调从益心气、养心阴、活血化瘀、养心安神角度入手治疗心律失常，具有较好的临床使用基础，全方由甘草、黄芪、麦冬、丹参、苦参、毛冬青、桂枝 7 味药材组成。

目前，有多种方法用于检测方中各药材的有效成分，如薄层色谱法测定丹参中丹参酮Ⅱ_A^[1-2]、甘草中甘草酸含有量^[3]；高效液相-蒸发光散射检测法测定麦冬中麦冬皂苷 D^[4-5]、黄芪中黄芪甲苷^[6]含有量；高效液相-紫外检测法测定苦参中苦参碱、氧化苦参碱含有量^[7]，以及甘草中甘草苷、甘草酸含有量^[8]等，但这些方法由于分辨率低、灵敏度差或某些成分（如皂苷类化合物）紫外吸收弱等条件的限制，导致同时检测时存在困难。高效液相色谱质谱联用技术（HPLC-MS/MS）因灵敏度高、专属性好、分析周期短等优势，被越来越广泛地应用于中药复方活性成分的分析，特别适用于组分中含有量较低的成分。

本实验建立 HPLC-MS/MS 法同时测定护心口服液中苦参碱、氧化苦参碱、甘草苷、丹参酮Ⅱ_A、丹酚酸 B、原儿茶醛、桂皮醛、鲁斯可皂苷元、丹参素、麦冬皂苷 D、黄芪甲苷 11 种成分的含有量，并采用电喷雾电离源（ESI）、正负离子扫描方式，以及多反应监测（MRM）模式，可为该制剂质量控制提供借鉴。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1290 高效液相色谱仪、Agilent 6460 Triple Quad LC/MS 质谱仪（美国 Agilent 公司），配置 Agilent MassHunter 数据处理软件、ESI 离子源；QT-1 涡旋混合器（上海琪特分析仪器有限公司）；AL104 电子天平（瑞士梅特勒-托利多公司）。

1.2 试剂 护心口服液（上海黄浦区中心医院提供，批号 20150421、20150629、20151117，规格 10 mL）。苦参碱（批号 0805-9804）、氧化苦参碱（批号 780-9402）、原儿茶醛（批号 110810-200506）、黄芪甲苷（批号 0781-200311）、桂皮醛（批号 110710-201418）、丹参酮Ⅱ_A（批号 0766-200011）对照品均购自中国食品药品检定研究院；丹酚酸 B（批号 150311）、麦冬皂苷 D（批号 150310）、鲁斯可皂苷元（批号 150127）对照品均购自上海融禾医药科技有限公司；丹参素（批号 15011411）、甘草苷（批号 20130815）对照品均购

自上海源叶生物科技有限公司；内标芬布芬（批号 100415-201102）购自中国食品药品检定研究院；盐酸伪麻黄碱（批号 1337-9601）购自中国麻醉品实验室。甲醇、甲酸均为色谱纯；水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱（4.6 mm × 100 mm，3 μm）；体积流量 0.4 mL/min；柱温 25 ℃；流动相水（A）-甲醇（B）（均含 0.05% 甲酸），梯度洗脱（0 ~ 3.0 min，40% ~ 80% B；3.0 ~ 3.1 min，80% ~ 95% B；3.1 ~ 10 min，95% B；10 ~ 10.1 min，95% ~ 40% B；10.1 ~ 11 min，40% B）；进样量 5 μL。

2.2 质谱条件 ESI 电离源，MRM 模式，正负离子扫描；干燥气温度 350 ℃，体积流量 10 L/min；雾化器压力 275.8 kPa；毛细管电压 7 kV。其他参数见表 1。

表 1 各成分及内标质谱参数

Tab. 1 MS parameters of various constituents and internal standard

成分	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	碎裂电压/ mV	碰撞能/ mV	电离 模式
苦参碱	249.2	147.9	140	36	+
氧化苦参碱	265.2	136.0	170	37	+
盐酸伪麻黄碱	166.1	133.0	80	18	+
黄芪甲苷	807.4	807.4	370	0	+
桂皮醛	149.0	65.2	135	24	+
丹参酮Ⅱ _A	295.1	249.1	132	20	+
麦冬皂苷 D	877.2	447.0	354	56	+
鲁斯可皂苷元	431.2	287.2	136	12	+
丹酚酸 B	716.9	320.7	133	27	-
丹参素	196.9	122.8	120	14	-
原儿茶醛	136.9	107.8	20	7	-
甘草苷	416.8	254.9	150	14	-
芬布芬	252.7	209.0	75	2	-

2.3 对照品、内标溶液制备 精密称取苦参碱、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、鲁斯可皂苷元对照品（五氧化二磷干燥 48 h）适量，甲醇配制成 239、137、211、135、199、136、140、103.5、102、158、261 μg/mL 混标，再进一步稀释成 9.56、4.11、18.99、5.40、1.59、8.16、2.80、8.28、0.816、0.63、5.22 μg/mL，即得对照品溶液。精密称取盐酸伪麻黄碱、芬布芬对照品适量，甲醇配制成 400、200 μg/mL 混标，再进一

步稀释成 4.00、2.00 μg/mL，即得内标溶液。

2.4 供试品溶液制备 精密吸取口服液 1.00 mL，置于 10 mL 量瓶中，甲醇定容，摇匀，精密移取 1.0 mL 至 10 mL 量瓶中，精密加入 1.00 mL 内标溶液，甲醇定容，摇匀，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性试验 在本实验所用色谱和质谱条件下，各成分及内标峰形良好，无干扰色谱峰，表明该方法专属性强。总离子流图及 MRM 色谱图见图 1~3。

2.5.2 线性关系考察 精密量取等倍稀释的对照品溶液，置于 10 mL 量瓶中，精密加入 1.00 mL 内

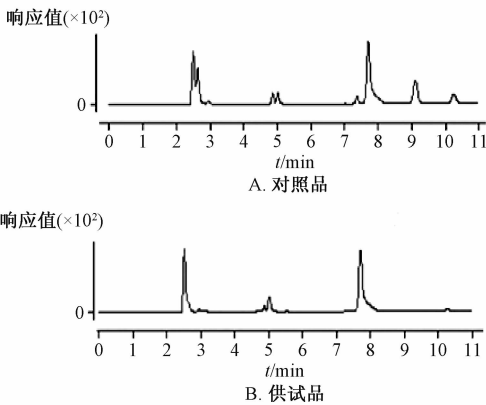


图 1 各成分总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of various constituents

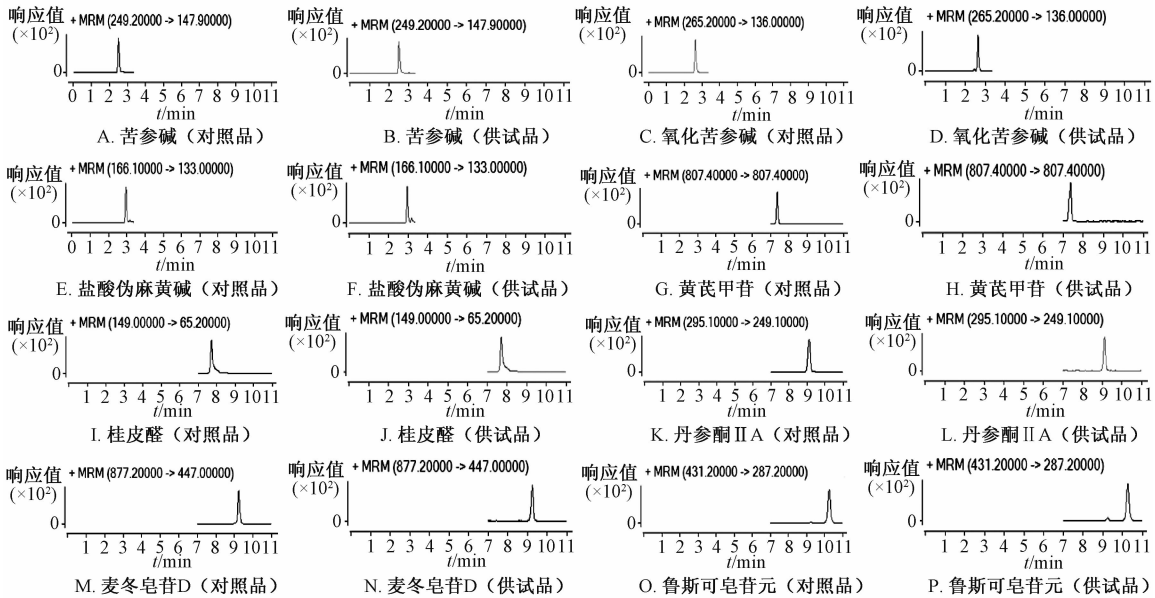


图 2 各成分 MRM 色谱图 (正离子)

Fig. 2 MRM chromatograms of various constituents (positive ion)

标溶液，甲醇定容，摇匀，即得系列质量浓度溶液，0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，在“2.1”、“2.2”项条件下测定。以对照品、相应内

标峰面积比值为纵坐标 (Y)，质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

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/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)	检测限/(ng·mL ⁻¹)
苦参碱	Y=0.002 050X+3.563	0.999 9	95.60~7 648	1.912	0.478 0
氧化苦参碱	Y=0.003 302X+1.503	0.999 7	41.10~3 288	1.644	0.411 0
丹酚酸 B	Y=2.243X-168.4	0.999 8	189.9~15 190	3.798	0.949 5
丹参素	Y=0.142 3X+3.692	0.999 5	54.00~4 320	4.320	1.080
原儿茶醛	Y=0.002 095X+0.024 14	0.999 9	15.90~1 272	4.268	1.067
甘草苷	Y=0.015 94X+1.047	0.999 6	81.60~6 528	1.632	0.408 0
黄芪甲苷	Y=0.003 098X-0.283 9	0.999 1	28.00~2 240	2.800	1.400
桂皮醛	Y=0.001 352X+1.327	0.999 0	82.80~6 624	4.140	1.035
丹参酮 II _A	Y=0.007 064X+2.709 9	0.999 9	8.160~652.8	2.040	0.510 0
麦冬皂苷 D	Y=0.003 721X-0.352 6	0.999 2	6.300~504.0	2.520	0.630 0
鲁斯可皂苷元	Y=1.069 9X-0.002 433	0.999 0	52.20~4 176	2.088	1.044

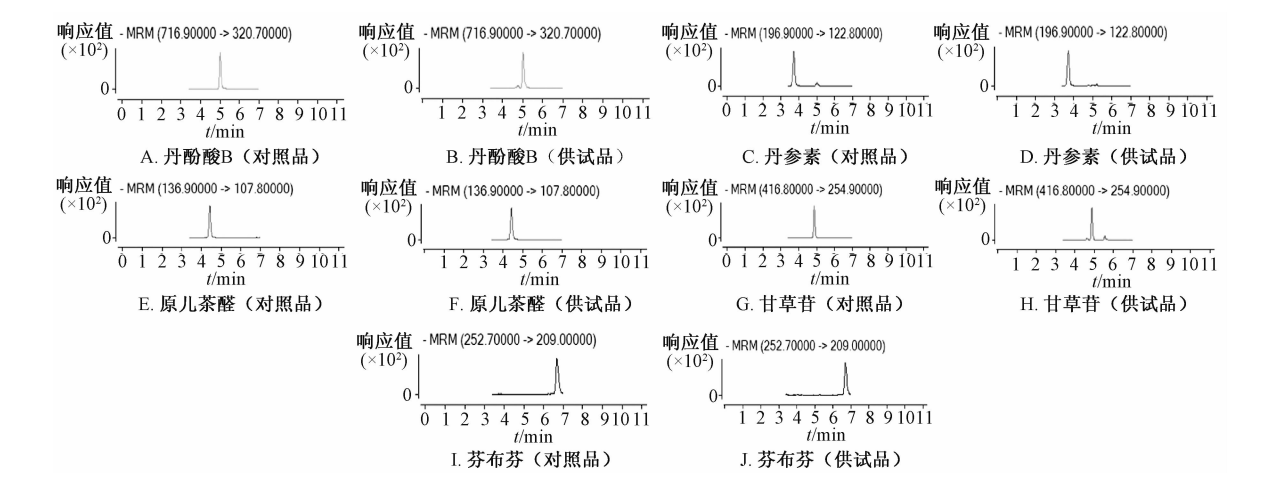


图 3 各成分 MRM 色谱图 (负离子)

Fig. 3 MRM chromatograms of various constituents (negative ion)

2.5.3 精密度试验 取“2.5.2”项下中间质量浓度的对照品溶液，在“2.1”、“2.2”项条件下连续进样 6 次，测得各成分峰面积 RSD 分别为苦参碱 1.5%、氧化苦参碱 1.3%、丹酚酸 B 1.6%、丹参素 2.6%、原儿茶醛 1.8%、甘草苷 1.3%、黄芪甲苷 1.7%、桂皮醛 2.6%、丹参酮Ⅱ_A 1.7%、麦冬皂苷 D 1.6%、鲁斯可皂苷元 0.93%，表明仪器精密度良好。

2.5.4 重复性试验 取批号 20150421 的样品，共 6 份，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”、“2.2”项条件下测定，测得各成分含有量 RSD 分别为苦参碱 1.7%、氧化苦参碱 2.3%、丹酚酸 B 1.0%、丹参素 2.6%、原儿茶醛 2.8%、甘草苷 1.1%、黄芪甲苷 2.7%、桂皮醛 4.1%、丹参酮Ⅱ_A 0.75%、麦冬皂苷 D 3.6%、鲁斯可皂苷元 0.74%，表明该方法重复性良好。

2.5.5 稳定性试验 取批号 20150421 的样品，于 1、2、4、8、16、24 h 在“2.1”、“2.2”项条件下测定，测得各成分含有量 RSD 分别为苦参碱 2.2%、氧化苦参碱 1.8%、丹酚酸 B 1.1%、丹参素 3.1%、原儿茶醛 2.2%、甘草苷 0.87%、黄芪甲苷 0.91%、桂皮醛 3.5%、丹参酮Ⅱ_A 1.5%、麦冬皂苷 D 3.3%、鲁斯可皂苷元 2.7%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.6 加样回收率试验 精密移取批号 20150421 的样品 0.50 mL，加入对照品溶液 0.50 mL（每 1 mL 含苦参碱 0.412 mg、氧化苦参碱 0.028 0 mg、丹酚酸 B 1.34 mg、丹参素 0.266 mg、原儿茶醛 0.037 4 mg、甘草苷 0.076 2 mg、黄芪甲苷 0.014 8 mg、桂皮醛 0.312 mg、丹参酮Ⅱ_A 0.005 38 mg、麦冬皂苷 D

0.002 96 mg、鲁斯可皂苷元 0.048 4 mg），按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”、“2.2”项条件下测定，计算回收率。结果，各成分平均加样回收率分别为苦参碱 102.0%、氧化苦参碱 103.2%、丹酚酸 B 98.51%、丹参素 97.49%、原儿茶醛 98.12%、甘草苷 101.4%、黄芪甲苷 99.12%、桂皮醛 97.97%、丹参酮Ⅱ_A 96.66%、麦冬皂苷 D 100.8%、鲁斯可皂苷元 97.59%，RSD 分别为苦参碱 2.4%、氧化苦参碱 1.4%、丹酚酸 B 2.9%、丹参素 2.2%、原儿茶醛 2.8%、甘草苷 1.7%、黄芪甲苷 2.5%、桂皮醛 3.4%、丹参酮Ⅱ_A 1.7%、麦冬皂苷 D 3.4%、鲁斯可皂苷元 2.1%。

2.6 样品含有量测定 按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”、“2.2”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/mL, n = 3)

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

成分	20150421	20150629	20151117	平均值
苦参碱	0.408	0.408	0.405	0.407
氧化苦参碱	0.026 2	0.025 7	0.023 8	0.025 2
丹酚酸 B	1.27	1.26	1.30	1.28
丹参素	0.271	0.273	0.274	0.272
原儿茶醛	0.037 8	0.037 0	0.035 1	0.036 6
甘草苷	0.071 7	0.071 8	0.071 8	0.071 8
黄芪甲苷	0.015 3	0.014 9	0.015 1	0.015 1
桂皮醛	0.288	0.275	0.292	0.285
丹参酮Ⅱ _A	0.005 45	0.005 21	0.005 18	0.005 28
麦冬皂苷 D	0.002 72	0.002 52	0.002 68	0.002 64
鲁斯可皂苷元	0.049 8	0.049 5	0.050 3	0.049 9

3 讨论

3.1 测定方法选择 护心口服液由多味药材组成，有效成分复杂，包括生物碱、挥发油、皂苷、酚酸等。方中生物碱类成分在常规 C₁₈ 色谱柱上难以实现基线分离^[9]，需使用氨基柱；黄芪甲苷、麦冬皂苷类成分紫外响应较低，而且为末端吸收，故无法实现多种成分同时测定。多反应监测（MRM）模式具有灵敏、准确、特异性高等特点，可有针对性地选择数据采集质谱信号，通过两级离子选择排除干扰离子，广泛应用于化学小分子的定量分析，避免了常规色谱分离中分离度差、紫外吸收弱等缺陷，从而实现了护心口服液中 11 种成分含有量的同时测定。

在探索离子扫描模式时发现，生物碱类成分在正离子扫描模式下响应较好；黄芪甲苷和麦冬皂苷 D 虽在负离子扫描模式下^[10]的响应略高于正离子，但考虑到正负离子模式切换，最终采用后者；桂皮醛、丹参酮Ⅱ_A 和鲁斯可皂苷元在正离子扫描模式下的响应优于负离子，故采用前者，盐酸伪麻黄碱^[11]作为内标；甘草苷、丹酚酸 B、原儿茶醛、丹参素在负离子扫描模式下的响应较好，采用芬布芬^[12]作为内标。

3.2 流动相选择 本实验考察了乙腈和甲醇作为流动相时的洗脱情况，发现前者洗脱能力过强，导致个别成分分离不理想，故采用甲醇-水流动相。同时，为了提高离子响应并改善峰型，又在流动相中分别添加甲酸和甲酸铵，发现后者会使苦参碱、氧化苦参碱色谱峰出现分裂情况；前者体积分数为 0.05% 时，可达到提高灵敏度、改善峰型的作用。

4 结论

本实验所建立的 HPLC-MS/MS 法准确、灵敏，色谱、质谱条件经优化后，可在 11 min 内实现护心口服液中 11 种成分含有量的同时测定。因此，

该方法可用于护心口服液的质量控制与评价，并为其物质基础研究提供可靠的手段。

参考文献：

[1] 董小平, 刘舞霞, 蒋晓青. 薄层扫描法测定复方丹参口服液中丹参酮Ⅱ_A 的含量[J]. 江苏药学与临床研究, 2000, 8(2): 15-16.

[2] 杨远荣, 高逢喜. 双波长薄层色谱扫描法测定头痛安片中丹参酮Ⅱ_A 含量[J]. 医药导报, 2005, 24(1): 70-71.

[3] 张 继, 杨永利, 王 莱. 双波长薄层扫描法测定乌拉尔甘草中甘草酸的含量[J]. 西北师范大学学报(自然科学版), 1998, 34(1): 66-68.

[4] 贾 诚, 叶正良, 姜秀晶, 等. ELSD-HPLC 法测定麦冬药材中麦冬皂苷 D、D' 含量[J]. 现代中药研究与实践, 2012, 26(3): 79-81.

[5] 俞建平, 马月光, 邵建峰, 等. ELSD-HPLC 法测定浙麦冬、川麦冬中麦冬皂苷 D 含量的方法研究[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(4): 253-255, 272.

[6] 白 娟, 张 洁, 李成网. HPLC-ELSD 测定玉屏风软胶囊中黄芪甲苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 102-104.

[7] 汪文来, 赵红霞, 贾海骅, 等. HPLC 法测定不同产地苦参中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(10): 799-800.

[8] 段天璇, 于密密, 刘春生, 等. HPLC 法同时测定甘草指纹图谱暨甘草苷、甘草酸含量[J]. 中成药, 2006, 28(2): 161-165.

[9] 田 娟, 王维皓, 高慧敏, 等. HPLC 测定复方苦参注射液中苦参碱、槐定碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(3): 222-224.

[10] 张 蕾, 王志伟, 廉建伟, 等. HPLC-MS 法同时测定大鼠血浆中苦参碱、氧化苦参碱和氧化槐果碱的浓度及其药代动力学[J]. 药学报, 2008, 43(8): 843-847.

[11] 徐小芳, 刘 敏, 安 靓, 等. LC-MS/MS 法同时测定复方附子口服液中 10 种成分含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(5): 798-803.

[12] 徐 洁, 谢丽艳, 居文政, 等. 液相串联质谱同时测定艾迪注射液 9 种成分[J]. 中草药, 2013, 44(5): 566-570.