

## LC-MS/MS 法同时测定复方丹参颗粒和复方丹参滴丸中 6 种成分

洪艳<sup>1</sup>, 文晓霞<sup>2</sup>, 李莎<sup>1</sup>, 于凯<sup>1</sup>, 夏玉凤<sup>2\*</sup>

(1. 金鸿药业股份有限公司研究所, 广东 珠海 519041; 2. 中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198)

**摘要:** 目的 建立 LC-MS/MS 法同时测定复方丹参颗粒和复方丹参滴丸(丹参、三七、冰片)中丹参素钠、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、丹参酮 II<sub>A</sub> 的含有量。方法 2 种药物 75% 甲醇提取液的分析采用 Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 3.5 μm); 流动相乙腈-0.1% 甲酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min。结果 6 种成分在各自范围内线性关系良好 ( $R^2 \geq 0.9959$ ), 平均加样回收率 95.76%~105.74%, RSD 1.86%~4.88%。除丹参素钠外, 其他 5 种成分在复方丹参颗粒中的含有量均高于在复方丹参滴丸中。结论 复方丹参颗粒和复方丹参滴丸中主要成分含有量有明显差异, 可能会影响临床疗效。

**关键词:** 复方丹参颗粒; 复方丹参滴丸; 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(2019)02-0270-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.006

## Simultaneous determination of six constituents in Compound Danshen Granules and Compound Danshen Dropping Pills by LC-MS/MS

HONG Yan<sup>1</sup>, WEN Xiao-xia<sup>2</sup>, LI Sha<sup>1</sup>, YU Kai<sup>1</sup>, XIA Yu-feng<sup>2\*</sup>

(1. Research Institute of Kinohoo Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuhai 519041, China; 2. School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**ABSTRACT: AIM** To establish an LC-MS/MS method for the simultaneous content determination of sodium danshensu, notoginsenoside R<sub>1</sub>, ginsenoside Re, ginsenoside Rg<sub>1</sub>, ginsenoside Rb<sub>1</sub> and tanshinone II<sub>A</sub> in Compound Danshen Granules and Compound Danshen Dropping Pills (*Salviae miltiorrhizae Radix et Rhizoma*, *Notoginseng Radix et Rhizoma*, *Borneolum Syntheticum*). **METHODS** The analysis of 75% methanol extracts of these two drugs were performed on an Eclipse Plus C<sub>18</sub> column (3.0 mm×150 mm, 3.5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% formic acid flowing at 0.3 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** Six constituents showed good linear relationships within their own ranges ( $R^2 \geq 0.9959$ ), whose average recoveries were 95.76%–105.74% with the RSDs of 1.86%–4.88%. Except for sodium danshensu, the other five constituents in Compound Danshen Granules demonstrated higher contents than those in Compound Danshen Dropping Pills. **CONCLUSION** The obvious content difference of main components in Compound Danshen Granules and Compound Danshen Dropping Pills may affect clinical efficacy.

**KEY WORDS:** Compound Danshen Granules; Compound Danshen Dropping Pills; chemical constituents; LC-MS/MS

复方丹参方由丹参、三七、冰片配伍组成, 1977年由上海中药二厂研制成功并投入生产, 方中丹参为君药, 所含丹参酮II<sub>A</sub>、隐丹参酮等脂溶性成分具有扩张冠状动脉、提高冠脉血流、保护心肌、

广谱抑菌作用, 而丹参素、原儿茶醛、丹酚酸等水溶性成分具有抑制血小板聚集、抗血栓形成、抗氧化、保护心脏微血管内皮细胞等作用<sup>[1-4]</sup>; 三七为臣药, 主要有效成分为皂苷, 具有抗血栓形成、扩张

收稿日期: 2018-05-29

作者简介: 洪艳(1975—), 女, 执业药师, 从事中药质量控制研究工作。Tel: (0756) 6292068, E-mail: jhyhy@126.com

\* 通信作者: 夏玉凤(1967—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药及制剂分析研究工作。Tel: (025) 83271400, E-mail: yfxiacpu@126.com

血管、保护心肌等作用<sup>[5-7]</sup>；冰片为佐使药，引药入经，三药配伍，相辅相成，起到协同增效作用。

复方丹参方主要用于治疗冠心病心绞痛，在临床上因其疗效确切，不良反应少，而被开发成多种剂型，如2015版《中国药典》就收载有复方丹参丸、片、胶囊、喷雾剂（气雾剂）、颗粒、滴丸6种剂型<sup>[8]</sup>，其药物组成、功能主治均相同，但处方中各药用量、生产工艺、质量标准等有所差异，其中复方丹参滴丸因服用方便、起效迅速而成为治疗冠心病心绞痛的急救药品，其药效物质基础及作用机制值得探讨。目前，有关复方丹参片与滴丸的质量分析、药理作用等方面的报道较多<sup>[9-11]</sup>，而复方丹参颗粒是通过新型辅料及新工艺制成的颗粒剂，具有溶散时间短、释放速度快、防湿性能强、质量稳定、服用方便等特点，具有较好的市场前景，但相关研究较少。因此，本实验建立LC-MS/MS法同时测定复方丹参颗粒和复方丹参滴丸中丹参素钠、三七皂苷R<sub>1</sub>、人参皂苷Re、人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、丹参酮II<sub>A</sub>的含有量，以期为进一步比较两者作用特点提供参考依据。

### 1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 LC System、Agilent 6420 Triple Quad LC/MS（美国Agilent公司）；SB-5200DT超声波清洗机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；Sartorius BT25S电子天平；Direct-Q超纯水系统（美国Millipore公司）；TGL-16M高速台式冷冻离心机（湖南湘仪仪器有限公司）。

表1 各成分质谱参数

Tab. 1 MS parameters for various constituents

成分	离子模式	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	碎裂电压/V	碰撞电压/V
丹参素钠	负离子	197.0	135.0	85	15
三七皂苷 R <sub>1</sub>	负离子	978.0	931.6	135	15
人参皂苷 Re	负离子	946.0	475.2	300	50
人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	负离子	845.8	637.4	135	30
人参皂苷 Rb <sub>1</sub>	负离子	1 108.1	89.0	220	70
丹参酮 II <sub>A</sub>	正离子	295.1	277.2	135	20

2.3 对照品溶液制备 精密称取丹参素钠、三七皂苷R<sub>1</sub>、人参皂苷Re、人参皂苷Rg<sub>1</sub>、人参皂苷Rb<sub>1</sub>、丹参酮II<sub>A</sub>对照品适量，置于5 mL量瓶中，甲醇溶解并稀释至刻度，得贮备液。分别精密量取适量于2 mL量瓶中，甲醇-0.1%甲酸（50：50）稀释至刻度，摇匀，即得（质量浓度分别为3 335.40、2 888.00、2 922.00、1 834.56、2 793.00、183.08 ng/mL）。

2.4 供试品溶液制备 取颗粒、滴丸适量，研钵

1.2 试药 丹参素钠（批号110855-201614）、三七皂苷R<sub>1</sub>（批号110745-201619）、人参皂苷Re（批号110754-201626）、人参皂苷Rg<sub>1</sub>（批号110703-201731）、人参皂苷Rb<sub>1</sub>（批号110704-201625）、丹参酮II<sub>A</sub>（批号110766-201721）对照品均购自中国食品药品检定研究院。复方丹参颗粒（金鸿药业股份有限公司，批号170509、170506、170422）；复方丹参滴丸（天津天士力制药股份有限公司，批号170421、161115、160531）。乙腈为色谱纯（德国默克公司）；甲醇为色谱纯（江苏汉邦科技有限公司）；甲酸为色谱纯（上海克拉玛尔试剂）；其他试剂均为分析纯；水为超纯水。

### 2 方法与结果

2.1 色谱条件 Eclipse Plus C<sub>18</sub>色谱柱（3.0 mm×150 mm，3.5 μm）；流动相乙腈（A）-0.1%甲酸（B），梯度洗脱（0~1 min，10% A；1~2 min，10%~20% A；2~10 min，20%~40% A；10~15 min，40% A；15~16 min，40%~98% A；16~26 min，98% A，再运行6 min）；体积流量0.3 mL/min；进样量5 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾电离源（ESI），正、负离子快速切换多重反应监测模式（MRM）检测，0~21 min为负离子模式，21~26 min为正离子模式；干燥气体N<sub>2</sub>，温度350℃，体积流量9 L/min；雾化器压力35 psi（1 psi=6.895 kPa）；毛细管电压5 000 V（正离子模式）、4 000 V（负离子模式）。质谱参数见表1。

中充分研磨均匀，分别精密称取约10 mg，置于具塞棕色瓶中，加入25 mL 75%甲醇，称定质量，超声30 min，放冷，75%甲醇补足缺失的质量，摇匀，滤过，两者续滤液加入甲醇-0.1%甲酸（50：50）分别稀释10、2倍，12 000 r/min离心10 min，取上清液，即得。

2.5 专属性考察 吸取甲醇空白对照、对照品、供试品溶液适量，在“2.1”项色谱条件下进样测定，结果见图1。由图可知，各成分峰形良好，阴

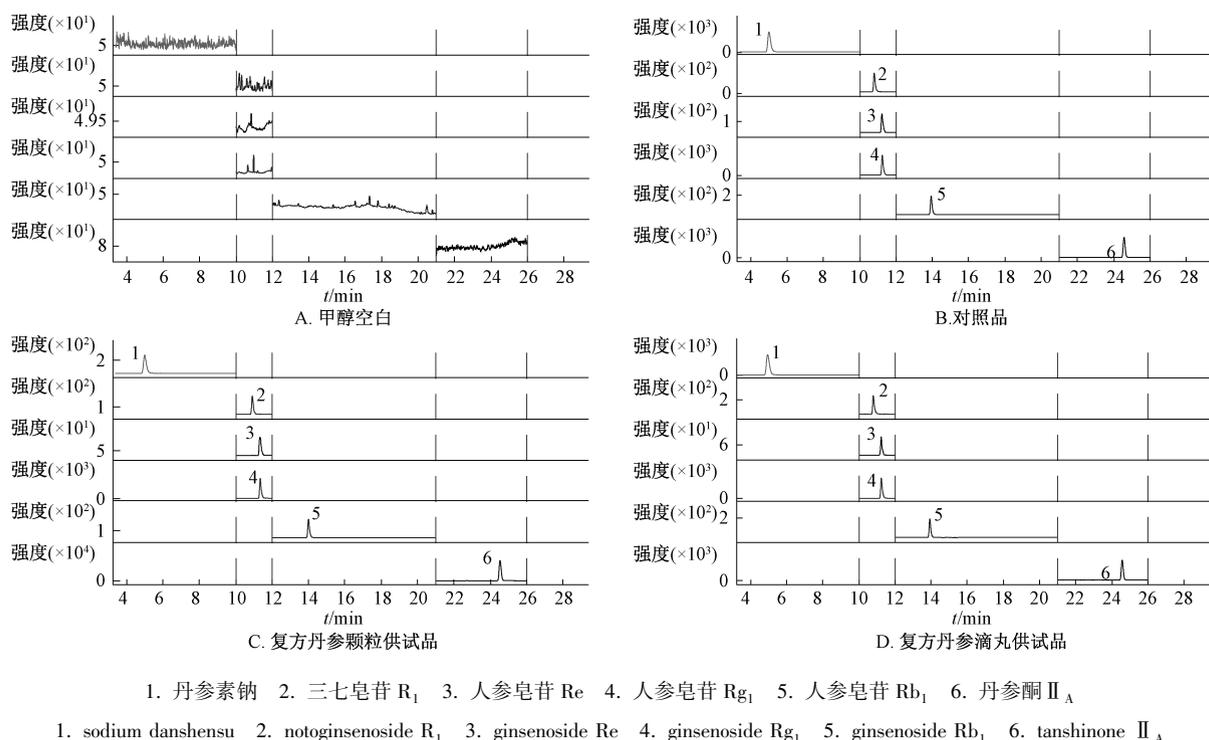


图1 各成分 LC-MS/MS 色谱图  
Fig. 1 LC-MS/MS chromatograms of various constituents

性无干扰。

2.6 线性关系考察 精密吸取“2.3”项下对照品溶液适量，甲醇-0.1%甲酸（50：50）稀释成系列质量浓度，在“2.1”和“2.2”项条件下进样测

定。以对照品质量浓度为横坐标（X），峰面积为纵坐标（Y）进行回归，再分别以信噪比 S/N = 10、S/N = 3 时的质量浓度作为定量限和检测限，结果见表 2，可知各成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/(ng·mL <sup>-1</sup> )	定量限/(ng·mL <sup>-1</sup> )	检测限/(ng·mL <sup>-1</sup> )
丹参素钠	Y=31.852 0X+335.39	0.999 5	41.69~3 335.40	7.85	2.94
三七皂苷 R <sub>1</sub>	Y=9.333 2X+47.38	0.999 8	36.10~2 888.00	13.54	6.32
人参皂苷 Re	Y=1.201 5X+0.33	0.999 9	36.53~2 922.00	14.61	7.31
人参皂苷 R <sub>g1</sub>	Y=27.340 0X+153.65	0.999 6	22.93~1 834.56	1.10	0.46
人参皂苷 R <sub>b1</sub>	Y=1.792 3X-94.60	0.995 9	34.91~2 793.00	13.97	8.38
丹参酮 II <sub>A</sub>	Y=728.440 0X+3 334.50	0.999 5	2.29~183.08	0.09	0.05

2.7 精密度试验 将同一对照品溶液在“2.1”和“2.2”项条件下进样测定 6 次，测得丹参素钠、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、丹参酮 II<sub>A</sub> 峰面积 RSD 分别为 0.41%、1.88%、2.42%、1.32%、1.76%、1.95%，表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液（颗粒批号 170509，滴丸批号 170421），于室温下放置 0、1、2、3、4、6 h 后在“2.1”和“2.2”项条件下进样测定，测得颗粒和滴丸中丹参素钠、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、丹参酮 II<sub>A</sub> 峰面积 RSD 分别为 1.52%、4.91%、

4.77%、2.56%、4.52%、1.50% 和 2.02%、4.34%、4.78%、3.39%、4.11%、2.05%，表明供试品溶液在 6 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一批颗粒（批号 170509）和滴丸（批号 170421），按“2.4”项下方法制备供试品溶液 6 份，在“2.1”和“2.2”项条件下进样测定，测得颗粒和滴丸中丹参素钠、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 R<sub>g1</sub>、人参皂苷 R<sub>b1</sub>、丹参酮 II<sub>A</sub> 含有量 RSD 分别为 2.33%、4.83%、5.00%、2.40%、4.71%、2.53% 和 1.45%、3.81%、4.83%、1.89%、5.01%、4.15%，表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取含有量已知的颗粒(批号170509)和滴丸(批号170421)各5 mg,精密加入500 μL对照品溶液,平行6份,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”和“2.2”项条件下进样测定,计算回收率。结果,颗粒中丹参素钠、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub>、丹参酮 II<sub>A</sub> 平均加样回收率分别为 96.64%、100.67%、98.79%、105.74%、99.18%、99.53%,RSD 分别

为 2.19%、4.41%、4.23%、1.86%、1.94%、4.88%;滴丸中各成分平均加样回收率分别为 95.76%、98.95%、103.10%、102.25%、101.66%、104.59%,RSD 分别为 2.18%、4.76%、3.72%、1.96%、4.45%、1.99%。

2.11 样品含有量测定 取不同批号颗粒、滴丸各3批,按“2.4”项下方法制备供试品溶液,在“2.1”和“2.2”项条件下进样测定,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=3)

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

制剂	批号	丹参酮 II <sub>A</sub>	丹参素钠	三七皂苷 R <sub>1</sub>	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rg <sub>1</sub>	人参皂苷 Rb <sub>1</sub>
复方丹参颗粒	170509	2.84	1.76	3.25	1.79	15.01	9.40
	170506	2.95	1.63	2.99	1.51	13.72	8.44
	170422	2.70	1.46	2.80	1.58	12.62	7.65
复方丹参滴丸	170421	0.05	9.79	1.09	0.57	5.03	1.68
	161115	0.02	9.67	0.94	0.48	4.59	1.54
	160531	0.02	9.83	0.89	0.42	4.52	1.30

### 3 讨论

3.1 提取溶剂选择 本实验考察了不同体积分数甲醇(25%、50%、75%、100%)对6种成分提取率的影响,发现25%、50%甲醇提取时,丹参酮 II<sub>A</sub> 提取率较低;甲醇提取时,丹参素钠提取率减少,并与75%甲醇提取时存在显著差异;75%甲醇提取时,各成分提取率均较高,故选择其作为提取溶剂。

3.2 色谱条件优化 本实验比较了不同型号、粒径的色谱柱,发现 Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 3.5 μm)分离效果较好。再考察甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸(含10 mmol/L 醋酸铵)、乙腈-0.1%甲酸等体系,发现在乙腈-0.1%甲酸条件下各成分响应更好,故选择其作为流动相。

3.3 质谱条件优化 由于各成分性质差异较大,故本实验通过离子检测模式对其进行考察,发现丹参素钠、三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg<sub>1</sub>、人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 在负离子模式下响应较好,而丹参酮 II<sub>A</sub> 在正离子模式下响应较好。为了使上述成分均有最高的灵敏度,本实验采用正负离子切换模式,从而确保它们均能在各自最佳电离模式下进行检测。

3.4 含有量分析 表3显示,除丹参素钠在复方丹参颗粒中含有量较低外,其他5种成分含有量均高于复方丹参滴丸。复方丹参颗粒和复方丹参滴丸是同一方剂衍生出的不同剂型,其功能主治相同,

均为活血化瘀、理气止痛,但两者有效成分含有量差异较大,这将影响临床疗效。中药复方发挥疗效具有多成分、多靶点协同作用的特点,是一个复杂的体内过程,故药物作用强度除了与制剂中主要有效成分含有量密切相关外,有效成分作用方式、生物利用度、不同剂型对其体内吸收的影响等因素也将影响疗效。目前,针对复方丹参滴丸体内吸收特点有一些探索性研究<sup>[12-14]</sup>,但鲜有复方丹参颗粒中有效成分药代动力学、作用机制及与剂型间关系的报道,本实验可为后期对该制剂进一步研究提供有价值的信息。

### 参考文献:

[1] 张 烨,郑 颖,王一涛.应用改进的质量评价方法考察复方丹参制剂[J].中成药,2009,31(12):1855-1860.

[2] Zhou L M, Zuo Z, Chow M S S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics and clinical use [J]. *J Clin Pharmacol*, 2005, 45(12): 1345-1359.

[3] 赵永娇,荆 鲁.复方丹参制剂的优化研究概况[J].中国中药杂志,2011,36(17):2437-2440.

[4] Su C Y, Ming Q L, Rahman K, et al. *Salvia miltiorrhiza*: Traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(3): 163-182.

[5] 马 珂,汤金土.三七皂苷的实验研究进展[J].浙江中西医结合杂志,2002,12(3):197-199.

[6] 商洪才,高秀梅,张伯礼,等.复方丹参方标本同治机制的诠释[J].中国中医基础医学杂志,2003,9(9):43-44.

[7] Zhu D, Wu L, Li C R, et al. Ginsenoside Rg1 protects rat cardiomyocyte from hypoxia/reoxygenation oxidative injury via antioxidant and intracellular calcium homeostasis [J]. *J Cell*

- Biochem*, 2009, 108(1): 117-124.
- [ 8 ] 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: 1213-1219.
- [ 9 ] 束云, 李贻奎, 李连达. 复方丹参制剂药理作用的比较研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 132-134.
- [10] 李玉珍, 陈日来, 陈晓凯, 等. 高效液相色谱法测定复方丹参片和滴丸中丹酚酸B和丹参酮II<sub>A</sub>的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(6): 523-525.
- [11] 邢俊波, 方白玉. 复方丹参制剂中活性成分的HPLC同时定量分析[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(1): 36-38.
- [12] 赵欣, 强光辉, 郭毅, 等. 复方丹参滴丸人含药血浆中三七相关代谢物的研究[J]. 质谱学报, 2007, 28(1): 23-26, 30.
- [13] Pei W J, Zhao X F, Zhu Z M, et al. Study of the determination and pharmacokinetics of Compound Danshen Dripping Pills in human serum by column switching liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 809(2): 237-242.
- [14] 裴涓静, 赵新锋, 胡震, 等. 采用柱切换色谱离子阱质谱联用法研究复方丹参滴丸中丹参素及其代谢产物[J]. 分析化学, 2005, 33(4): 505-508.

## HPLC法同时测定陈香露白露片中4种成分

胡昭君, 陈斌, 余岳林, 张少敏  
(上海市静安区食品药品检验所, 上海 200435)

**摘要:** 目的 建立HPLC法同时测定陈香露白露片(甘草、陈皮、川木香等)中4种成分的含有量。方法 该药物50%甲醇提取液的分析采用Agilent Eclipse C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相甲醇-0.1%磷酸, 梯度洗脱; 体积流量1.0 mL/min; 柱温30℃; 检测波长230 nm。结果 甘草酸铵、橙皮苷、木香炔内酯、去氢木香内酯分别在9.908~118.9、4.510~72.16、2.582~41.31、2.685~42.95 μg/mL范围内线性关系良好( $r \geq 0.9999$ ), 平均加样回收率分别为98.97%、99.33%、99.77%、100.80%, RSD分别为0.77%、1.51%、1.35%、1.06%。结论 该方法准确可靠、重复性好, 可用于陈香露白露片的质量控制。

**关键词:** 陈香露白露片; 甘草酸铵; 橙皮苷; 木香炔内酯; 去氢木香内酯; HPLC

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2019)02-0274-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.02.007

## Simultaneous determination of four constituents in Chenxianglu Bailu Tablets by HPLC

HU Zhao-jun, CHEN Bin, YU Yue-lin, ZHANG Shao-min  
(Shanghai Jing'an District Institute for Food and Drug Control, Shanghai 200435, China)

**ABSTRACT:** AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of four constituents in Chenxianglu Bailu Tablets (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*, *Citri reticulatae Pericarpium*, *Vladimiriae Radix*, etc.). **METHODS** The analysis of 50% methanol extract of this drug was performed on a 30℃ thermostatic Agilent Eclipse C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of methanol-0.1% phosphoric acid flowing at 1.0 mL/min in a gradient elution manner and the detection wavelength was set at 230 nm. **RESULTS** Ammonium glycyrrhizinate, hesperidin, costunolide and dehydrocostus lactone showed good linear relationships within the ranges of 9.908–118.9, 4.510–72.16, 2.582–41.31, 2.685–42.95 μg/mL ( $r \geq 0.9999$ ), whose average recoveries were 98.97%, 99.33%, 99.77%, 100.80% with the RSDs of 0.77%, 1.51%, 1.35%, 1.06%, respectively. **CONCLUSION** This accurate, reliable and reproducible method can be

收稿日期: 2018-04-21

作者简介: 胡昭君(1981—), 女, 硕士生, 主管药师, 从事中西药质量标准研究。Tel: (021) 66972895-8316, E-mail: kitty-hu-2008@163.com