

本文引用:王 珊,刘红梅,刘 兵,谭文波,童巧珍,刘湘丹. UPLC-MS/MS法同时测定杞菊地黄胶囊中7种有效成分[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(12): 1876-1880.

UPLC-MS/MS法同时测定杞菊地黄胶囊中7种有效成分

王 珊¹,刘红梅¹,刘 兵¹,谭文波¹,童巧珍²,刘湘丹²

(1.湖南中医药大学第二附属医院,湖南 长沙 410005;2.湖南中医药大学药学院,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)同时测定杞菊地黄胶囊中莫诺苷、绿原酸、马钱苷、木犀草苷、丹皮酚、23-乙酰泽泻醇 C、23-乙酰泽泻醇 B 的含量。**方法** 采用 ACQUITY UPLC[®] HSS T3(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)为色谱柱,乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相,梯度洗脱,流速为 0.3 mL·min⁻¹;采用电喷雾电离源(ESI)、多反应离子监测(MRM)模式对7种有效成分进行测定。**结果** 每粒杞菊地黄胶囊样品中莫诺苷含量为 0.28~0.35 mg,绿原酸含量为 0.08~0.11 mg,马钱苷含量为 0.30~0.48 mg,木犀草苷含量为 0.21~0.48 mg,丹皮酚含量为 0.62~0.76 mg,23-乙酰泽泻醇 C 含量为 0.04~0.08 mg,23-乙酰泽泻醇 B 含量为 0.15~0.32 mg。7种有效成分相关系数为 0.999 0~1.000 0;平均回收率($n=6$)为 97.72%~99.12%,RSD 为 0.61%~2.01%。**结论** 该方法专属性强、灵敏度高、重复性好,适用于杞菊地黄胶囊中莫诺苷、绿原酸、马钱苷、木犀草苷、丹皮酚、23-乙酰泽泻醇 C 和 23-乙酰泽泻醇 B 7种有效成分的同时测定。

[关键词] 杞菊地黄胶囊;超高效液相色谱-串联质谱;莫诺苷;绿原酸;马钱苷;木犀草苷;丹皮酚;23-乙酰泽泻醇 C;23-乙酰泽泻醇 B

[中图分类号]R284.1

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.12.011

Simultaneous Determination of Seven Effective Components in Qiju Dihuang Capsule by UPLC-MS/MS

WANG Shan¹, LIU Hongmei¹, LIU Bing¹, TAN Wenbo¹, TONG Qiaozhen², LIU Xiangdan²

(1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China;

2. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To establish an UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of seven effective components (morroneiside, chlorogenic acid, loganin, luteolin-7-O-glucoside, paeonol, 23-acetate alisol C, 23-acetate alisol B) in Qiju Dihuang Capsule. **Methods** The ACQUITY UPLC[®]HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) column was adopted with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1%-formic acid with gradient elution at the flow rate of 0.3 mL·min⁻¹. Electrospray ionization (ESI) and multiple reactive ion monitoring (MRM) modes were used to determine the seven active components. **Results** The contents of morroneiside, chlorogenic acid, loganin, luteolin-7-O-glucoside, paeonol, 23-acetate alisol C, 23-acetate alisol B in the samples per capsule were 0.28~0.35, 0.08~0.11, 0.30~0.48, 0.21~0.48, 0.62~0.76, 0.04~0.08, 0.15~0.32 mg. Correlation coefficient values of the 7 active components were among 0.999 0~1.000 0; the average recovery rates were among 97.72%~99.12% ($n=6$), and the RSD were among 0.61%~2.01%. **Conclusion** The method established is specific, sensitive and reproducible, which is suitable for the determination of seven effective components (morroneiside, chlorogenic acid, loganin, luteolin-7-O-glucoside, paeonol, 23-acetate alisol C, 23-acetate alisol B) in Qiju Dihuang Capsule.

[Keywords] Qiju Dihuang Capsule; UPLC-MS/MS; morroneiside; chlorogenic acid; loganin; luteolin-7-O-glucoside; paeonol; 23-acetate alisol C; 23-acetate alisol B

[收稿日期]2021-07-27

[基金项目]财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-21);湖南省现代农业产业技术体系建设专项。

[作者简介]王 珊,女,博士,主管药师,研究方向:中药资源质量与开发研究。

杞菊地黄胶囊收载于2020年版《中华人民共和国药典》一部,处方系由枸杞子、菊花、熟地黄、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓和盐泽泻八味药组成,其中枸杞子、菊花、熟地黄为君药,熟地黄滋阴补肾,枸杞子补肾益精、养肝明目;菊花善清利头目、宣散肝经之热。配伍山茱萸养肝涩精,山药补脾固精,两药都可协助熟地黄以充复肾中阴精,共为臣药。又配泽泻泻肾利湿,并防熟地黄之滋腻;牡丹皮清泻肝火,并制山茱萸之温涩;茯苓健脾渗湿,以助山药之补脾,共为佐药。诸药配伍,共奏滋肾养肝的功效,临床主要用于肝肾阴亏、眩晕耳鸣、羞明畏光、迎风流泪、视物昏花等症^[1]。现行标准仅对方中的枸杞子、酒萸肉、牡丹皮、山药、茯苓进行了控制,其中含量测定项分别采用不同的高效液相色谱方法对方中臣药酒萸肉和佐药牡丹皮中单个有效成分进行了定量测定,君药菊花、熟地黄以及佐药盐泽泻在现行标准中并未进行控制,故现行标准存在一定的缺陷。本文首次采用高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法同时测定君药菊花中的绿原酸和木犀草苷、臣药酒萸肉中的莫诺苷和马钱苷、佐药牡丹皮中的丹皮酚以及盐泽泻中的23-乙酰泽泻醇B和23-乙酰泽泻醇C 7种有效成分,建立的方法对杞菊地黄胶囊质量标准的完善具有十分重要的意义。

1 主要仪器与试剂

LCMS-8050 三重四级杆液相色谱质谱联用仪(日本岛津有限公司);Mettler Toledo MS105DU 电子天平(梅特勒托利多集团);AS30600B 型超声波清洗仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

莫诺苷(批号:111998-202104,纯度:96.8%)、绿原酸(批号:110753-202018,纯度:96.1%)、马钱苷(批号:111640-201808,纯度:99.0%)、木犀草苷(批号:111720-201810,纯度:93.5%)、丹皮酚(批号:110708-201908,纯度:99.8%)、23-乙酰泽泻醇C(批号:12062-202102,纯度:99.2%)、23-乙酰泽泻醇B(批号:111846-202006,纯度:98.3%)均购自中国食品药品检定研究院;杞菊地黄胶囊共5批,分别来自湖南省湘中制药有限公司(批号分别为190801、191001、191102)和通化茂祥制药有限公司(批号:分别为20201001、20201203)。

水为娃哈哈纯净水;乙腈为色谱纯,美国霍尼

韦尔公司;甲醇为分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

混合对照品溶液的制备:分别精密称取莫诺苷、绿原酸、马钱苷、木犀草苷、丹皮酚、23-乙酰泽泻醇C、23-乙酰泽泻醇B对照品适量,加70%甲醇溶解并制成浓度依次分别为0.204 2、0.200 4、0.216 8、0.212 4、0.240 8、0.200 8、0.207 0 mg·mL⁻¹的单个对照品储备液,分别精密量取对照品储备液适量,用70%甲醇稀释20、25、50、200、400、2000倍,制成系列浓度的混合对照品溶液,即得。

供试品溶液制备:精密称取本品0.3 g,置100 mL量瓶中,加70%甲醇约80 mL,超声处理30 min,放冷,加70%甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

2.2 仪器分析条件

2.2.1 液相色谱条件^[2] 色谱柱为ACQUITY UPLC® HSS T3(100 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相为0.1%甲酸水溶液-乙腈,梯度洗脱:0~12 min,乙腈由3%变至100%;12~17 min,100%乙腈;17~17.1 min,乙腈变为3%;17.1~22 min,维持3%乙腈。流速:0.3 mL/min;柱温:35 ℃。

2.2.2 质谱条件^[3-6] 离子源:电喷雾离子源(ESI);源电压4 KV;氮气流速:3 L·min⁻¹;加热气流速:10 L·min⁻¹;干燥器气流速:10 L·min⁻¹;接口温度:300 ℃;离子传输管温度:250 ℃;加热模块温度:400 ℃;各成分质谱分析参数详见表1,混合对照品溶液和供试品溶液的典型图谱见图1。

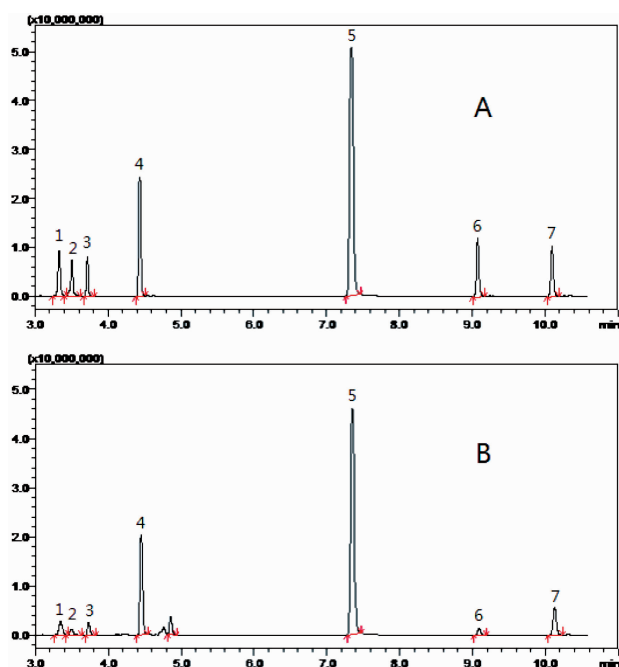
2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系 分别精密量取“2.1”项下的系列浓度混合对照品溶液3 μL,注入液质联用仪,依法测定。以定量离子的峰面积对浓度进行回归分析绘制标准曲线,回归方程和相关系数见表2。结果表明,7种有效成分在各自的线性范围内线性关系良好,相关系数 $r \geq 0.999 0$ 。

2.3.2 检出限和定量限 精密量取线性最低点的混合对照品溶液1 mL,置100 mL量瓶中,加70%甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取3 μL注入液质联用仪,记录色谱图,以3倍信噪比估算各组分的检测限,以10倍信噪比估算各组分的定量限,7种有效成分的检测限为0.23~0.52 ng·mL⁻¹,定量限

表 1 7 种有效成分的 MRM 条件

编号	成分	离子模式	母离子/(m/z)	定量		定性	
				子离子/(m/z)	碰撞能量/ev	子离子/(m/z)	碰撞能量/ev
1	莫诺苷	+	429.35	267.00	24	411.20	16
2	绿原酸	-	353.00	191.10	20	85.05	43
3	马钱苷	+	413.00	219.00	25	251.05	21
4	木犀草苷	+	448.95	286.95	24	153.05	51
5	丹皮酚	+	167.15	43.05	17	121.10	22
6	23-乙酰泽泻醇 C	+	529.50	511.35	17	451.40	20
7	23-乙酰泽泻醇 B	+	515.40	497.35	11	437.30	16



注:1.莫诺苷;2.绿原酸;3.马钱苷;4.木犀草苷;5.丹皮酚;6.23-乙酰泽泻醇 C;7.23-乙酰泽泻醇 B

图 1 7 种有效成分混合对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的 MRM 总离子流图

为 0.77~1.73 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。各成分检测限、定量限见表 2。

2.3.3 重复性试验 精密称取同一杞菊地黄胶囊样品(批号:190801)6 份,按“2.1”项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液,按“2.2”项仪器条件下进样测定,记录色谱图,按外标法以峰面积计算各组分的含

量,结果可知,莫诺苷、绿原酸、马钱苷、木犀草苷、丹皮酚、23-乙酰泽泻醇 C、23-乙酰泽泻醇 B 平均含量依次分别为 0.93、0.27、1.02、0.73、2.06、0.14、0.51 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,RSD 在 0.82%~1.93%,表明方法重复性良好。

2.3.4 精密度试验 取重复性项下的同一供试品溶液,连续进样 6 次,记录色谱图,各组分峰面积的 RSD 在 0.98%~1.87%,表明该方法精密度良好。

2.3.5 稳定性试验 取重复性项下的同一供试品溶液,在“2.2”项仪器分析条件下,分别于 0、3、5、8、12、18 h 进样测定,以各组分的峰面积为指标计算 RSD,考察供试品溶液的稳定性。结果各组分峰面积 RSD 在 0.81%~2.04%,表明供试品溶液在 18 h 内稳定。

2.3.6 加样回收率 取已知含量的供试品(批号:190801)0.15 g,精密称定,共 6 份,分别精密加入对照品贮备液适量(莫诺苷 0.70 mL、绿原酸 0.20 mL、马钱苷 0.70 mL、木犀草苷 0.50 mL、丹皮酚 1.20 mL、23-乙酰泽泻醇 C 0.10 mL、23-乙酰泽泻醇 B 0.40 mL),按“2.1”项下供试品溶液制备方法制备供试品溶液,依法测定,计算回收率,各组分的平均回收率($n=6$)在 97.72%~99.12%,RSD 在 0.61%~2.01%之间,详见表 3。

表 2 7 种有效成分线性关系、线性范围、检测限和定量限

编号	成分	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	检测限/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$	定量限/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	莫诺苷	$Y=126\ 878\ 2X+286\ 959$	0.999 5	0.102 1~10.21	0.31	1.03
2	绿原酸	$Y=424\ 986X-490\ 16$	0.999 2	0.100 2~10.02	0.38	1.27
3	马钱苷	$Y=129\ 654\ 9X+196\ 574$	0.999 9	0.108 4~10.84	0.42	1.40
4	木犀草苷	$Y=278\ 506\ 1X+102\ 575\ 6$	0.999 3	0.106 2~10.62	0.28	0.93
5	丹皮酚	$Y=117\ 858\ 24X-278\ 632\ 4$	1.000 0	0.120 4~12.04	0.23	0.77
6	23-乙酰泽泻醇 C	$Y=506\ 579X+144\ 703$	0.999 0	0.100 4~10.04	0.52	1.73
7	23-乙酰泽泻醇 B	$Y=108\ 567\ 4X-482\ 755$	0.999 6	0.103 5~10.35	0.46	1.53

表3 7种有效成分的回收率结果表

成分	取样量/g	样品中的量/ μg	测得量/ μg	加入量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
莫诺苷	0.150 2	139.686	280.931	142.940	98.81	98.87	1.00
	0.151 1	140.523	279.942	142.940	97.54		
	0.153 4	142.662	282.924	142.940	98.13		
	0.150 8	140.244	283.756	142.940	100.409		
	0.156 2	145.266	287.041	142.940	99.18		
	0.151 6	140.988	282.694	142.940	99.14		
绿原酸	0.150 2	40.554	80.035	40.080	98.512	99.12	1.03
	0.151 1	40.797	80.821	40.080	99.86		
	0.153 4	41.418	81.022	40.080	98.81		
	0.150 8	40.716	80.964	40.080	100.42		
	0.156 2	42.174	82.136	40.080	99.71		
	0.151 6	40.932	80.067	40.080	97.64		
马钱苷	0.150 2	153.204	305.325	151.760	100.24	98.47	1.34
	0.151 1	154.122	304.958	151.760	99.39		
	0.153 4	156.468	302.687	151.760	96.35		
	0.150 8	153.816	303.254	151.760	98.47		
	0.156 2	159.324	308.649	151.760	98.40		
	0.151 6	154.632	303.364	151.760	98.00		
木犀草苷	0.150 2	109.646	215.035	106.200	99.24	98.18	1.57
	0.151 1	110.303	214.628	106.200	98.23		
	0.153 4	111.982	213.967	106.200	96.03		
	0.150 8	110.084	216.654	106.200	100.35		
	0.156 2	114.026	217.032	106.200	96.99		
	0.151 6	110.668	214.987	106.200	98.23		
丹皮酚	0.150 2	309.412	598.921	288.960	100.19	99.07	1.13
	0.151 1	311.266	599.011	288.960	99.58		
	0.153 4	316.004	600.865	288.960	98.58		
	0.150 8	310.648	596.924	288.960	99.07		
	0.156 2	321.772	602.341	288.960	97.10		
	0.151 6	312.296	600.907	288.960	99.88		
23-乙酰泽泻醇 C	0.150 2	21.028	41.336	20.080	101.14	98.31	2.01
	0.151 1	21.154	40.728	20.080	97.48		
	0.153 4	21.476	41.584	20.080	100.14		
	0.150 8	21.112	40.863	20.080	98.36		
	0.156 2	21.868	41.259	20.080	96.57		
	0.151 6	21.224	40.537	20.080	96.18		
23-乙酰泽泻醇 B	0.150 2	76.602	158.035	82.800	98.35	97.72	0.61
	0.151 1	77.061	157.948	82.800	97.69		
	0.153 4	78.234	158.292	82.800	96.69		
	0.150 8	76.908	157.696	82.800	97.57		
	0.156 2	79.662	161.035	82.800	98.28		
	0.151 6	77.316	158.264	82.800	97.76		

2.4 样品测定

采用上述方法对5批杞菊地黄胶囊中的7种有效成分进行检测。结果5批样品中莫诺苷含量在0.28~0.35 $\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$,绿原酸含量在0.08~0.11 $\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$,

马钱苷含量在0.30~0.48 $\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$,木犀草苷含量在0.21~0.48 $\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$,丹皮酚含量在0.62~0.76 $\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$,23-乙酰泽泻醇 C 含量在0.04~0.08 $\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$,23-乙酰泽泻醇 B 含量在0.15~0.32 $\text{mg}\cdot\text{粒}^{-1}$ 。详见表4。

表 4 杞菊地黄胶囊中的 7 种有效成分的含量测定结果 ($n=3, \text{mg}/\text{粒}^{-1}$)

批号	莫诺苷	绿原酸	马钱苷	木犀草苷	丹皮酚	23-乙酰泽泻醇 C	23-乙酰泽泻醇 B
190801	0.28	0.08	0.31	0.22	0.62	0.04	0.15
191001	0.29	0.08	0.30	0.21	0.63	0.04	0.16
191102	0.25	0.10	0.34	0.26	0.68	0.05	0.19
20201001	0.37	0.11	0.46	0.48	0.76	0.08	0.32
20201203	0.35	0.09	0.48	0.45	0.71	0.07	0.28

3 讨论

现行法定标准并未对杞菊地黄胶囊的君药菊花及佐药盐泽泻进行质量控制,本文建立的 UPLC-MS/MS 方法同时测定了君药菊花、臣药酒萸肉、佐药牡丹皮和盐泽泻中 7 种有效成分,方法简单、快速、重复性好,符合中药制剂的相关分析要求,可用于杞菊地黄胶囊的质量控制,对现行质量标准的完善具有十分重要的意义。

本实验曾尝试将君药枸杞子中的甜菜碱、熟地黄中的地黄苷 D 纳入本系统同时测定,但因甜菜碱极性较大,在反相色谱柱中基本不保留,并且甜菜碱为小分子物质,干扰较大;而地黄苷 D 在本系统中一直未找到合适的质谱条件,参考文献报道的质谱条件^[7],对照品和样品中几乎无响应,故以上两种成分不适合在本系统中与其它成分同时测定。

有文献报道,杞菊地黄胶囊及其同系列品种中有效成分的含量测定采用的均为 HPLC 法^[8-12],并且有采用 HPLC 法同时测定杞菊地黄口服液中 12 种成分的报道^[13]。但因不同成分在紫外检测器的最大吸收波长不一致,要在同一高效液相色谱系统中同时兼顾不同成分的检测灵敏度比较困难,同时紫外检测器与质谱检测器相比灵敏度低、专属性差,不能有效区分同保留时间的不同物质。而中成药因其处方组成复杂,背景干扰较严重,因此在中成药的质量分析中灵敏度和专属性尤为重要。特别在灵敏度和专属性要求非常高的药物疗效、药动学等相关研究中紫外检测器基本不适用,而本文建立的 UPLC-MS/MS 法具有灵敏度高和专属性强的特点,不仅可以为杞菊地黄胶囊的质量控制提供技术支撑,也可以为该制剂的药物疗效、药动学等相关研究提供一定的参考。

本文建立的液质联用方法采用的三重四级杆质

谱仪作为检测器,具有灵敏度高和专属性强的特点,因此,其不仅可以为杞菊地黄胶囊的质量控制提供技术支撑,也可以为该制剂的药物疗效、药动学等相关研究提供一定的参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].北京:中国医药科技出版社,2020:1007-1008.
- [2] 程健,狄留庆,李俊松,等.UPLC-MS/MS 法同时测定通塞脉微丸中 10 种有效成分[J].中草药,2014,45(5):659-664.
- [3] 杨娜,刘丰林.LC-MS/MS 法同时测定十一味益肾降糖片中马钱苷和莫诺苷的含量[J].中国现代中药,2018,20(3):341-344.
- [4] 吕海鸿,王雪芹,刘乃强,等.HPLC-MS 法测定双黄连口服液木犀草苷和绿原酸的含量并评价二者对成品质量的影响[J].中国药房,2011,22(44):4204-4207.
- [5] 王超众,王萌萌,魏强,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蒲公英根和蒲公英叶中 4 种指标性成分的含量[J].医药导报,2020,39(10):1404-1408.
- [6] 郭延奎,吴明军,赵德璋,等.三重四级杆复合线性离子阱质谱对丹皮酚经大鼠肝微粒体体外代谢产物的分析[J].中国医院药学杂志,2013,33(24):2011-2015.
- [7] 赵新峰,李平,孙毓庆.熟地黄的高效液相色谱/电喷雾电离-质谱分析[J].药物分析杂志,2007,27(6):874-876.
- [8] 杨心刚,马冠瑞.RP-HPLC 测定杞菊地黄胶囊中马钱苷的含量[J].中成药,2008,30(2):295-296.
- [9] 李润泽,常增荣,傅欣彤,等.HPLC 法测定杞菊地黄丸中莫诺苷、马钱苷和丹皮酚的含量[J].药物分析杂志,2015,35(2):351-354.
- [10] 潘莹,郭小龙,陈勇,等.HPLC 法测定杞菊地黄丸中马钱苷、芍药苷和丹皮酚的含量[J].中国药科大学学报,2007,38(2):133-135.
- [11] 罗苑苑.RP-HPLC 测定杞菊地黄胶囊中芍药苷的含量[J].广东药学院学报,2004,20(3):251-252.
- [12] 郑凤敏,刘会艳.HPLC 法测定杞菊地黄丸(浓缩丸)中马钱苷的含量[J].北方药学,2015,12(10):5-6.
- [13] 郑艳萍,王欣玲,李伟东,等.HPLC 同时测定杞菊地黄口服液 12 种成分[J].中草药,2019,50(4):875-879.