

UPLC-MS/MS 法同时测定降脂活血片中 5 种成分

张晨宁¹, 陈 林¹, 杨久云², 杨光义^{1*}, 许 娜³, 马卫东¹, 魏晋宝¹, 张永红¹
(1. 十堰市太和医院, 湖北 十堰 442000; 2. 恩施州中心医院, 湖北 恩施 445000; 3. 湖北医药学院药学院, 湖北 十堰 442000)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法同时测定降脂活血片 (何首乌、黄芪、川芎等) 中 5 种成分的含有量。**方法** 该药物 50% 甲醇提取液的分析采用 Restek Ultra BiPh 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 5 μm); 以乙腈 (含 0.1% 甲酸) -0.1% 甲酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 40 ℃。**结果** 二苯乙炔苷、丹参酮Ⅱ_A、大黄素、阿魏酸、葛根素分别在 4.01~1 027、0.73~187、1.48~380、3.98~1 020、4.285~1 097 ng/mL 范围内线性关系良好 ($r>0.994\ 0$), 平均加样回收率 98.57%~101.0%, RSD ($n=6$) 均小于 4.79%。**结论** 该方法专属性强, 灵敏度高, 可用于降脂活血片的质量控制。

关键词: 降脂活血片; 二苯乙炔苷; 丹参酮Ⅱ_A; 大黄素; 阿魏酸; 葛根素; UPLC-MS/MS

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)04-0741-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.04.016

Simultaneous determination of five constituents in Jiangzhi Huoxue Tablets by UPLC-MS/MS

ZHANG Chen-ning¹, CHEN Lin¹, YANG Jiu-yun², YANG Guang-yi^{1*}, XU Na³, MA Wei-dong¹, WEI Jin-bao¹, ZHANG Yong-hong¹

(1. Taihe Hospital, Shiyan 442000, China; 2. The Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Enshi 445000, China; 3. School of Pharmacy, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish an ultra-performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous content determination of five constituents in Jiangzhi Huoxue Tablets (*Polygoni multiflori Radix*, *Astragali Radix*, *Chuanxiong Rhizoma*, etc.). **METHODS** The 50% methanol extract of this drug was performed on a 40 ℃ thermostatic Restek Ultra BiPh column (100 mm×2.1 mm, 5 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile (containing 0.1% formic acid) -0.1% formic acid flowing at 0.4 mL/min in a gradient elution manner. **RESULTS** Stilbene glycoside, tanshinoneⅡ_A, emodin, ferulic acid and puerarin showed good linear relationships within the ranges of 4.01–1 027, 0.7–187, 1.48–380, 3.98–1 020 and 4.285–1 097 ng/mL ($r>0.994\ 0$), whose average recoveries were 98.57%–101.0% with the RSDs ($n=6$) of less than 4.79%. **CONCLUSION** This specific and sensitive method can be used for the quality control of Jiangzhi Huoxue Tablets.

KEY WORDS: Jiangzhi Huoxue Tablets; stilbene glycoside; tanshinoneⅡ_A; emodin; ferulic acid; puerarin; UPLC-MS/MS

降脂活血片是湖北省恩施自治州中心医院历经多年研究的复方制剂, 依据中医辨证施治、整体用药理论, 采用何首乌、黄芪、川芎、山楂、决明子、红花、枸杞子、葛根、竹节参、盐泽泻、丹

收稿日期: 2016-08-07
基金项目: 湖北省 2014 年中青年创新团队项目 (T201414); 湖北省卫生和计划生育委员会 2017~2018 年度科研项目 (WJ2017F079)
作者简介: 张晨宁 (1988—), 男, 硕士, 药师, 从事中药药代动力学研究。Tel: (0719) 8801393, E-mail: 851692700@qq.com
* 通信作者: 杨光义 (1975—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药代动力学研究。Tel: (0719) 8801393, E-mail: ygy996@163.com

参、茵陈 12 味中药材提炼加工而成，具有补益肝肾、活血降脂功效，临床上主要治疗高黏血症、高脂血症、脂肪肝、冠心病、肥胖症等疾病^[1-3]。

迄今，对降脂活血片的质量控制仅对葛根素含有量进行测定^[4]。超高效液相色谱-质谱联用仪 (UPLC-MS/MS) 具有 HPLC 所不及的高灵敏度、高选择性、高准确性等特点，能对中药复方中绝大多数化学成分同时进行准确的定量分析^[5-9]。为全面控制降脂活血片质量，本实验拟采用该方法同时测定二苯乙烯苷、丹参酮Ⅱ_A、大黄素、阿魏酸、葛根素的含有量，以期为评价和控制该药物的质量提供依据，并为建立其质量标准奠定基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Waters ACQUITY UPLC 液相色谱仪 (配置 Waters 三重四级杆串联质谱仪)、Masslynx 4.1 数据处理软件 (美国 Waters 公司); KM-410C 超声波清洗器 (广州市科洁盟实验仪器有限公司); VORTEX-6 微型涡旋混合仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.2 试剂 降脂活血片 (湖北省恩施自治州中心医院制剂室, 批号 2015090、2015100、2015110)。葛根素、丹参酮Ⅱ_A、二苯乙烯苷、大黄素、阿魏酸对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司。甲醇、乙腈为色谱纯 (德国默克公司); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件 Restek Ultra BiPh 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相乙腈 (含 0.1% 甲酸, A) -0.1% 甲酸(B), 梯度洗脱 (程序见表 1); 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 40 ℃; 进样量 5 μL。

表 1 梯度洗脱程序
Tab. 1 Gradient elution programs

时间/min	A 乙腈/%	B 0.1% 甲酸/%
0	5	95
0.5	5	95
4.5	95	5
5.5	95	5
6.5	5	95

2.1.2 质谱条件 Waters 三重四级杆串联质谱仪, 配置电喷雾离子源 (ESI)、MassLynxV4.1 工作站; 毛细管电压 3.8 kV; 离子源温度 150 ℃; 脱溶剂气温度 500 ℃; 喷雾气 N₂, 体积流量 1 000 L/h; 碰撞气 Ar, 体积流量 0.16 mL/min; 扫描方式多反应正负离子同时监测模式 (MRM)。见表 2 和图 1。

表 2 质谱参数

Tab. 2 MS parameters

成分	二苯乙烯苷	丹参酮Ⅱ _A	大黄素	阿魏酸	葛根素
母离子 <i>m/z</i>	405.22	295.10	269.02	192.96	417.50
子离子 <i>m/z</i>	243.01	249.30	240.91	133.95	297.60
驻留时间/s	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
锥孔电压/V	-26	40	-45	-24	30
碰撞电压/V	-28	25	-25	-15	30

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量，置于 10 mL 量瓶中，甲醇溶解并定容至刻度，制得分别含二苯乙烯苷、丹参酮Ⅱ_A、大黄素、阿魏酸、葛根素 1.027、0.187、0.38、1.02、1.097 mg/mL 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品 10 片，研细，过 4 号筛，精密称取 2.500 g，置于带塞锥形瓶中，加入 50% 甲醇 25 mL，称定质量，超声 30 min (250 W、40 kHz)，冷却至室温，50% 甲醇补足减失的质量，摇匀，吸取 2 mL，15 000 r/min 离心 10 min，取上清液，0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液，即得。

2.3 线性关系考察 乙腈稀释得到系列质量浓度各成分对照品溶液，在“2.1”项色谱条件下测定，以溶液质量浓度 (X) 对峰面积 (Y) 进行线性回归，结果见表 3，表明各成分在各自范围内线性关系良好。

表 3 5 种成分的线性关系

Tab. 3 Linear relationships of five constituents

化合物	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)	检测限/ (ng·mL ⁻¹)
二苯乙烯苷	$Y = 7.7387X - 25.26$	0.9999	4.01 ~ 1 027	0.08
丹参酮Ⅱ _A	$Y = 1420.1X + 4314.8$	0.9989	0.73 ~ 187	0.01
大黄素	$Y = 46.94X + 2398.2$	0.9989	1.48 ~ 380	0.3
阿魏酸	$Y = 32.196X + 598.77$	0.9989	3.98 ~ 1 020	0.5
葛根素	$Y = 140.35X + 4779.3$	0.9949	4.285 ~ 1 097	0.7

2.4 精密度试验 取同一供试品溶液，在“2.1.1”项色谱条件下连续测定 6 次，测得峰面积 RSD 分别为二苯乙烯苷 2.82%、丹参酮Ⅱ_A 2.11%、大黄素 4.38%、阿魏酸 3.59%、葛根素 3.1%，表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验 精密称取样品 (过 4 号筛) 6 份，每份 2.500 g，按“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液，进样 5 μL，测得峰面积 RSD 分别为二苯乙烯苷 3.79%、丹参酮Ⅱ_A 2.79%、大黄素 2.31%、阿魏酸 2.49%、葛根素 3.02%，表明该方法重复性良好。

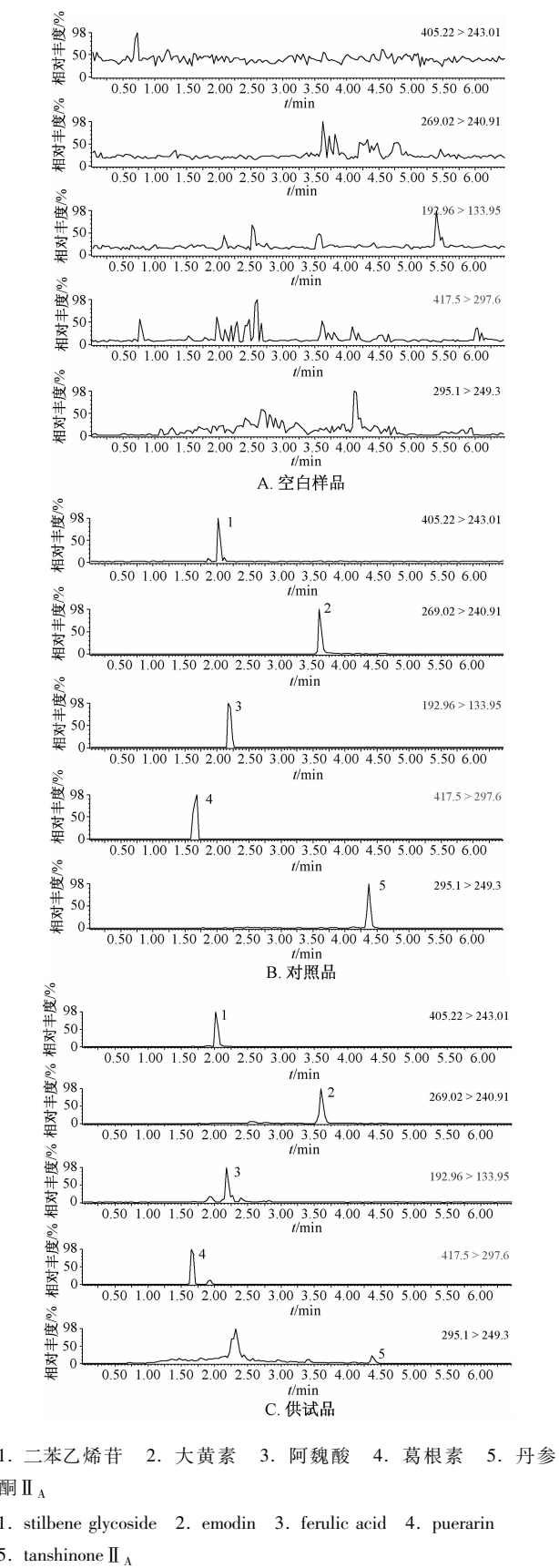


图 1 5 种成分 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig.1 UPLC-MS/MS chromatograms of five constituents

2.6 稳定性试验 精密称取样品（过 4 号筛）2.500 g，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，于 0、2、4、8、12 h 进样 5 μL，测得峰面积 RSD 分别为二苯乙烯苷 3.54%、丹参酮 II_A 2.68%、大黄素 4.92%、阿魏酸 1.98%、葛根素 2.73%，表明供试品溶液于 12 h 内稳定性良好。

2.7 加样回收率试验 精密称取含有量已知（每 1 g 粉末中含二苯乙烯苷 0.708 μg、丹参酮 II_A 0.144 μg、大黄素 3.810 μg、阿魏酸 0.960 μg、葛根素 0.942 μg）的样品（批号 2015090）6 份，每份 1.0 g，精密加入各对照品适量，摇匀，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样测定，计算回收率，结果见表 4。

表 4 加样回收率试验结果 (n=6)							
Tab. 4 Results of recovery tests (n=6)							
成分	称样量/ g	原有量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回收 率/%	RSD/ %
二苯乙烯苷	1.008	0.708	0.700	1.415	101.0	101.0	1.85
	1.004	0.708	0.700	1.400	98.86		
	1.009	0.708	0.700	1.425	102.4		
	1.010	0.708	0.700	1.415	101.0		
	1.000	0.708	0.700	1.434	103.7		
丹参酮 II _A	1.008	0.144	0.150	0.303	106.0	100.8	3.80
	1.004	0.144	0.150	0.300	104.0		
	1.009	0.144	0.150	0.294	100.0		
	1.010	0.144	0.150	0.290	97.33		
	1.000	0.144	0.150	0.288	96.00		
大黄素	1.008	3.810	3.957	7.827	101.5	98.57	2.41
	1.004	3.810	3.957	7.687	97.98		
	1.009	3.810	3.957	7.547	94.44		
	1.010	3.810	3.957	7.727	98.99		
	1.000	3.810	3.957	7.707	98.48		
阿魏酸	1.008	0.960	0.924	1.924	104.3	100.0	4.79
	1.004	0.960	0.924	1.864	97.84		
	1.009	0.960	0.924	1.954	107.6		
	1.010	0.960	0.924	1.854	96.75		
	1.000	0.960	0.924	1.844	95.67		
葛根素	1.008	0.960	0.924	1.864	97.84	100.2	3.47
	1.008	0.942	0.955	1.905	100.8		
	1.004	0.942	0.955	1.924	102.8		
	1.009	0.942	0.955	1.856	95.71		
	1.010	0.942	0.955	1.947	105.2		
	1.000	0.942	0.955	1.887	98.95		
	1.008	0.942	0.955	1.874	97.59		

2.8 样品含有量测定 取 3 批样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，进样 5 μL，测定含有量，结果见表 5。

表 5 5 种成分含有量测定结果 (μg/片, n=3)

Tab. 5 Results of content determination of five constituents (μg/tablet, n=3)

批号	二苯乙烯苷	丹参酮Ⅱ _A	大黄素	阿魏酸	葛根素
2015090	0.118	0.024	0.635	0.160	0.157
2015100	0.122	0.034	0.618	0.147	0.166
2015110	0.114	0.019	0.624	0.169	0.152
平均值	0.118	0.026	0.626	0.159	0.158

3 讨论

3.1 检测方法选择 本实验曾采用 HPLC-UV 法测定,但由于部分成分的含有量较低,而且复杂多样,该方法的灵敏度和选择性都不足以同时定量分析。故在查阅文献 [10-13] 的基础上,采用 UP-LC-MS/MS 法进行测定,由于质谱采用特定离子对扫描模式,样品中杂质不会对待测成分产生干扰,并且克服了液相色谱分离度差的问题,在短时间内既可达到有效分离,又能保证待测成分快速检测。

3.2 色谱、质谱条件选择 本实验考察了甲醇-水、乙腈-水、0.1% 甲酸-乙腈、0.1% 甲酸-90% 乙腈,发现采用乙腈 (含 0.1% 甲酸)-0.1% 甲酸为流动相时,各成分均显示出较高的检测灵敏度和较好的峰形。同时,采用梯度洗脱程序可大大提高分离速度和效率,在 4.5 min 内即可实现 5 种成分的有效分离。

4 结论

本实验采用 UPLC-MS/MS 法同时对降脂活血片中 5 种成分的含有量进行测定,该方法简单、快速、灵敏,可为该药物的质量控制提供有效的检测手段,并为其质量标准的建立奠定基础,同时能为进一步的药动力学研究提供依据。

参考文献:

[1] 吴献华,贺建华,邵永春,等. 降脂活血片治疗高脂血症

的临床疗效[J]. 中国康复, 2006, 21(6): 374-375.

[2] 姚 斌,彭绪坤. 降脂活血片治疗脂肪肝 130 例临床观察[J]. 中国医药导报, 2006, 3(29): 131-132.

[3] 肖昌玉. 降脂活血片治疗肥胖症 98 例[J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(1): 21.

[4] 杨久云,张思波. HPLC 测定降脂活血片中葛根素的含量[J]. 中国药师, 2007, 10(12): 1258-1259.

[5] Sun D X, Dong L H, Guo P P, et al. Simultaneous detection of flavonoids and phenolic acids in *Herba Lysimachiae* and *Herba Desmodii Styracifolii* using liquid chromatography tandem spectrometry[J]. *Food Chem*, 2013, 138(1): 139-147.

[6] Wang Q, Shi R, Ma Y M, et al. Content determination of the major constituents of Yinchenzhufu decoction via ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 77: 88-93.

[7] Li X, Xiong Z, Ying X, et al. A rapid ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the qualitative and quantitative analysis of the constituents of the flower of *Trollius ledibourii* Reichb [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 580(2): 170-180.

[8] 孙俊杰. 高效液相色谱-质谱联用在药物分析中的应用 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2010.

[9] 王 莹,杜 静. 液质联用技术在中药复方研究中的应用 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2015, 25(8): 799-800.

[10] 林 佩,陆建美,张光远,等. 何首乌活性成分在肝 L-02 细胞中吸收及代谢产物的 LC-MS/MS 定性分析[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(12): 1048-1053.

[11] 刘自华,安 骛,张艺竹,等. HPLC-MS/MS 测定葛根芩连汤对大鼠肝脏细胞色素 P450 酶的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(15): 3072-3080.

[12] 王晓明,张 帆,刘 莹,等. LC-MS/MS 法测定升麻中咖啡酸、阿魏酸、异阿魏酸含量的研究[J]. 天津中医药, 2014, 31(11): 686-689.

[13] 刘胜敏,杨志宏,孙晓波,等. LC-MS/MS 测定 6 种丹参主要有效成分及其脑靶向分布研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1704-1708.