

UPLC-QQQ-MS/MS 法同时测定风湿安泰片中 12 种成分

陈玉华¹, 卢 松^{2*}

(1. 湖北理工学院医学院, 湖北 黄石 435000; 2. 黄石市中医医院康复科, 湖北 黄石 435003)

摘要: **目的** 建立 UPLC-QQQ-MS/MS 法同时测定风湿安泰片(马钱子、羌活、麻黄等)中麻黄碱、伪麻黄碱、土的宁、马钱子碱、绿原酸、小檗碱、柚皮苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1、淫羊藿苷、人参皂苷 Rb1、异欧前胡素的含量。**方法** 该药物 70% 甲醇提取液的分析采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相水(含 0.1% 乙酸)-甲醇, 梯度洗脱; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 40 ℃; ESI 离子源正离子模式, 多反应监测。**结果** 12 种成分在各自范围内线性关系良好($r>0.998\ 3$), 平均加样回收率 93.5%~103.2%, RSD 0.9%~1.9%。**结论** 该方法简单灵敏, 专属性强, 可用于风湿安泰片的质量控制。

关键词: 风湿安泰片; 化学成分; UPLC-QQQ-MS/MS

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2021)03-0596-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.006

Simultaneous determination of twelve constituents in Fengshi Antai Tablets by UPLC-QQQ-MS/MS

CHEN Yu-hua¹, LU Song^{2*}

(1. College of Medicine, Hubei Polytechnic University, Huangshi 435000, China; 2. Department of Rehabilitation, Huangshi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Huangshi 435003, China)

ABSTRACT: **AIM** To establish a UPLC-QQQ-MS/MS method for the simultaneous content determination of ephedrine, pseudoephedrine, strychnine, brucine, chlorogenic acid, berberine, naringin, ginsenoside Re, ginsenoside Rg1, icariin, ginsenoside Rb1 and isoimperatorin in Fengshi Antai Tablets (*Strychni Semen*, *Notopterygii Rhizoma et Radix*, *Ephedrae Herba*, etc.). **METHODS** The analysis of 70% methanol extract of this drug was performed on a 40 ℃ thermostatic Agilent Zorbax SB-C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), with the mobile phase comprising of water (containing 0.1% acetic acid)-methanol flowing at 0.2 mL/min in a gradient elution manner, and ESI source was adopted in positive mode with multiple-reaction monitoring. **RESULTS** Twelve constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r>0.9983$), whose average recoveries were 93.5%–103.2% with the RSDs of 0.9%–1.9%. **CONCLUSION** This simple, sensitive and specific method can be used for the quality control of Fengshi Antai Tablets.

KEY WORDS: Fengshi Antai Tablets; chemical constituents; UPLC-QQQ-MS/MS

风湿安泰片是由马钱子(制)、羌活、麻黄、红花、红参、金银花、黄柏、淫羊藿等 25 味药材组成的纯中药制剂, 具有舒筋活血、祛风镇痛作用, 临床上用于治疗腰腿疼痛、风湿性关节炎等^[1-2], 方中马钱子(制)属于毒性药材, 主要有效成分为马钱子碱、土的宁, 毒性较大, 安全范围较窄^[3]。2020 年版《中国药典》一部规定, 风湿

安泰片中羌活、麻黄、金银花、黄柏、淫羊藿、红参的有效成分分别为异欧前胡素、麻黄碱和伪麻黄碱、绿原酸、小檗碱、柚皮苷和淫羊藿苷、人参皂苷(Rg1、Rb1、Re), 但其现行标准^[4]质量控制水平落后, 未对其有效成分进行含量测定。目前, 风湿安泰片中指标成分含量测定有少量报道^[5-7], 但尚未涉及 3 种以上。

收稿日期: 2020-11-23

作者简介: 陈玉华(1979—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为中医康复、中医学、中药学。Tel: 18772298896, E-mail: 2712742511@qq.com

* 通信作者: 卢 松(1979—), 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向为针灸推拿康复。E-mail: 2712742511@qq.com

UPLC-MS/MS 具有高灵敏度、高专属性特点,可简化复杂混合物的分离纯化过程^[8],近年来被广泛应用于中成药中多成分的定量测定^[9-17]。因此,本实验采用该方法同时测定风湿安泰片中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、土的宁、马钱子碱、绿原酸、盐酸小檗碱、柚皮苷、淫羊藿苷、异欧前胡素、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re 的含量,以期为评价该制剂的质量特征提供依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1290 超高压液相色谱系统,配置 6460 QQQ 三重四级杆质谱仪(美国 Agilent 公司);KS-9983-2 双频台式超声波清洗机(45 kHz、500 W,郑州万博仪器设备有限公司);XD205DU 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 试剂与药物 盐酸麻黄碱(批号 171241-201809,纯度 100%)、盐酸伪麻黄碱(批号 171237-201510,纯度 99.8%)、土的宁(批号 100240-200701,纯度 100%)、马钱子碱(批号 110706-200505,纯度 95.9%)、绿原酸(批号 110753-202018,纯度 96.8%)、盐酸小檗碱(批号 110713-201814,纯度 86.7%)、柚皮苷(批号 110722-201815,纯度 91.7%)、淫羊藿苷(批号 110737-201516,纯度 94.2%)、异欧前胡素(批号 110827-201812,纯度 99.6%)、人参皂苷 Rg1(批号 110703-201933,纯度 93.4%)、人参皂苷 Rb1(批号 110704-202028,纯度 93.1%)、和人参皂苷 Re(批号 110754-202028,纯度 93.9%)对照品均购自中国食品药品检定研究院。风湿安泰片(通化茂祥制药有限公司,批号 180401、180402;山西仁源堂药业有限公司,批号 20191102;河南辅仁堂制药有限公司,批号 191101、190604;通药制药集团股份有限公司,批号 191114)。甲醇、乙腈、乙酸为色谱纯(德国 Merck 公司);超纯水由

Milli-Q 超纯水仪制备。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱、土的宁、马钱子碱、绿原酸、盐酸小檗碱、柚皮苷、淫羊藿苷、异欧前胡素、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Rb1、人参皂苷 Re 对照品各 10 mg,置于 10 mL 量瓶中,70% 甲醇稀释至刻度,制得 1 mg/mL 贮备液。分别精密量取 0.02、0.02、0.5、0.5、2.0、1.0、2.0、1.0、0.2、0.1、0.1、0.2 mL,置于同一 50 mL 量瓶中,70% 甲醇稀释至刻度,摇匀,制得各成分质量浓度分别为 0.42、0.47、13.14、12.04、39.08、21.09、40.02、4.28、2.00、20.35、2.27、4.12 μg/mL 的贮备液,各精密量取 1 mL 至 50 mL 量瓶中,70% 甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2 供试品溶液制备 取片剂 10 片,研成细粉,精密称取 0.4 g,置于 50 mL 量瓶中,70% 甲醇超声处理 20 min 溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 UPLC 条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm);流动相 0.1% 乙酸(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~7 min, 5% B; 7~15 min, 5%~70% B; 15~22 min, 70%~100% B; 22~23 min, 100%~5% B; 23~30 min, 5% B; 30~35 min, 5% B);体积流量 0.2 mL/min;柱温 40 ℃;进样量 1 μL。

2.4 MS 条件 电喷雾离子源,正离子模式(ESI⁺),多反应监测(MRM),温度 350 ℃;雾化器压力 40 psi(1 psi=0.133 kPa);干燥气体积流量 12 L/min,温度 250 ℃。分别对每种成分进行二级质谱扫描,选择响应值最大的碎片离子作为定量离子对,第二大者作为定性离子对,离子对检测参数见表 1。

表 1 离子对检测参数

Tab. 1 Detection parameters for ion pairs

成分	t _R /min	定量离子对 m/z	定性离子对 m/z	裂解电压/V	碰撞能/eV
麻黄碱	6.457	166.0~148.1	166.0~91.1	65	8/36
伪麻黄碱	7.645	166.0~148.1	166.0~115.1	70	8/28
土的宁	12.008	335.2~183.9	335.2~155.9	210	40/50
马钱子碱	12.326	395.2~324.0	395.2~367.1	135	30/30
绿原酸	12.700	355.0~163.1	355.0~89.1	70	10/60
小檗碱	14.300	336.0~320.1	336.0~292.1	150	30/30
柚皮苷	14.834	581.5~419.1	581.5~272.9	70	8/28
人参皂苷 Re	16.479	969.5~789.3	969.5~202.8	300	50/50
人参皂苷 Rg1	16.597	823.5~643.2	823.5~203.1	192	40/5
淫羊藿苷	17.017	677.6~369.0	677.6~531.0	80	10/30
人参皂苷 Rb1	19.375	1131.5~365.1	1131.5~198.3	135	70/60
异欧前胡素	20.027	271.1~203.1	271.1~147.1	60	10/31

2.5 系统适用性试验 取对照品、供试品溶液，在“2.3”“2.4”项条件下进样测定，各成分总离子流图见图 1。由此可知，麻黄碱、伪麻黄碱虽然有相同定

量离子对，但通过调整流动相比比例能使两者有效分离，并且对照品定位可对其进行有效定性定量；各成分响应值虽然有所差异，但均对测定无干扰。

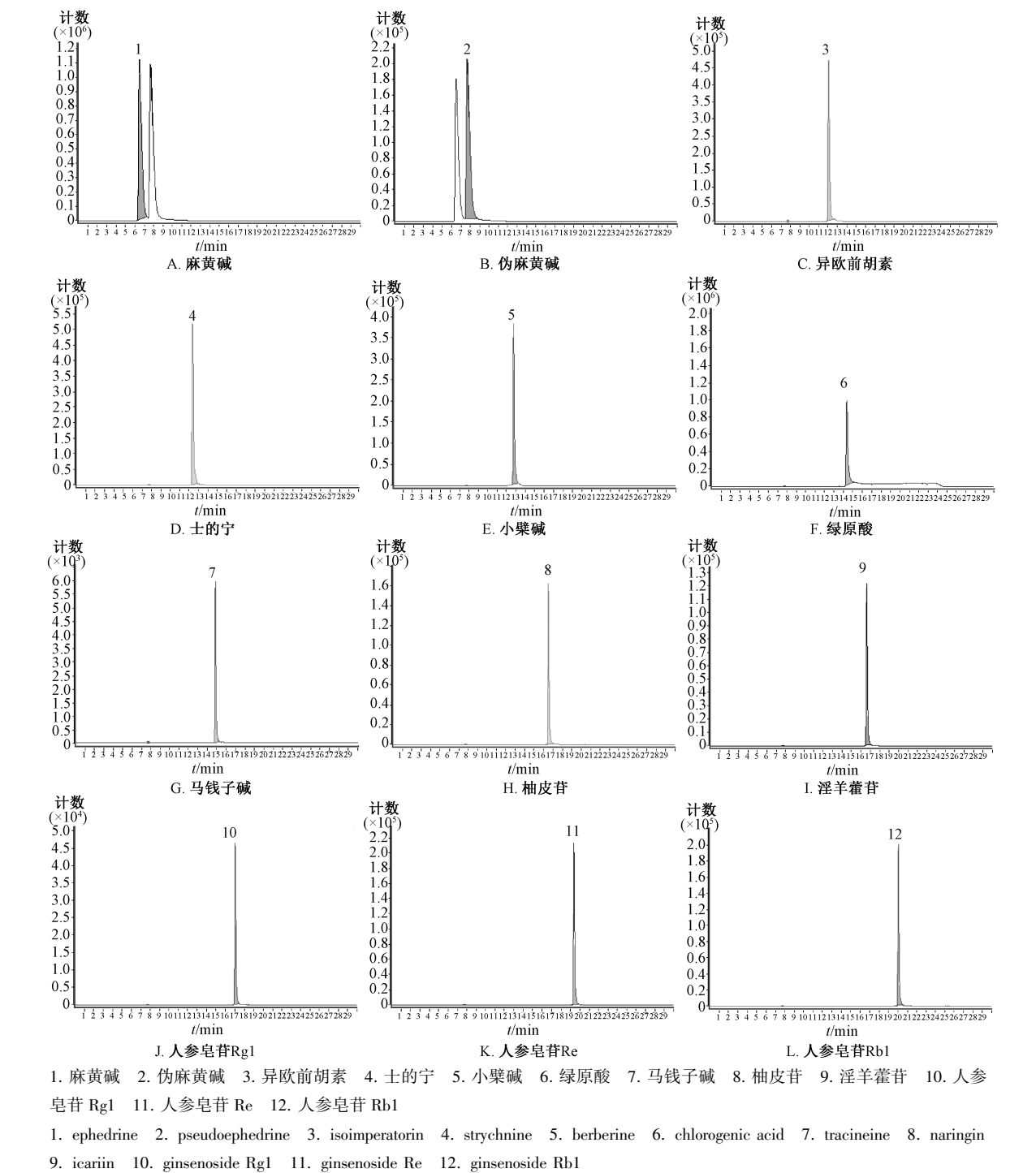


图 1 各成分总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of various constituents

2.6 线性关系考察 精密吸取“2.1”项下贮备液 1.0、0.5、0.2、0.1、0.05、0.02 mL，置于 10 mL 量瓶中，70% 甲醇制成系列质量浓度，在“2.3”“2.4”项条件下进样测定。以峰面积为纵

坐标 (Y)，各成分质量浓度为横坐标 (X) 进行回归，并分别以 S/N = 3、S/N = 10 为检测限 (LOD)、定量限 (LOQ)，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	<i>r</i>	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	检出限/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
麻黄碱	<i>Y</i> = 18 817.27 <i>X</i> - 505.57	0.999 4	0.93~93.44	0.02	0.08
伪麻黄碱	<i>Y</i> = 20 568.73 <i>X</i> + 868.32	0.998 9	0.85~84.95	0.21	0.72
土的宁	<i>Y</i> = 473.44 <i>X</i> - 247.33	0.999 7	26.29~2 628.80	0.79	2.62
马钱子碱	<i>Y</i> = 423.91 <i>X</i> + 781.96	0.999 8	24.07~2 407.09	0.79	2.62
绿原酸	<i>Y</i> = 124.79 <i>X</i> + 254.50	0.999 5	79.07~7 960.83	13.75	45.83
小檗碱	<i>Y</i> = 14 279.75 <i>X</i> + 2 364.11	0.999 6	42.17~4 217.09	0.57	1.89
柚皮苷	<i>Y</i> = 13.87 <i>X</i> - 213.38	0.998 3	80.04~8 003.58	10.43	34.77
人参皂苷 Re	<i>Y</i> = 251.72 <i>X</i> - 159.83	0.999 3	8.563 4~856.34	0.22	0.75
人参皂苷 Rg1	<i>Y</i> = 358.03 <i>X</i> - 56.39	0.999 4	4.00~399.54	0.11	0.38
淫羊藿苷	<i>Y</i> = 42.17 <i>X</i> - 48.30	0.999 6	40.69~4 069.44	9.20	30.67
人参皂苷 Rb1	<i>Y</i> = 394.24 <i>X</i> + 668.24	0.998 7	4.54~454.40	0.15	0.49
异欧前胡素	<i>Y</i> = 163.69 <i>X</i> + 322.07	0.999 4	40.69~4 069.44	2.05	6.82

2.7 精密度试验 精密吸取“2.1”项下对照品溶液 1 μL, 在“2.3”“2.4”项条件下进样测定 6 次, 测得麻黄碱、伪麻黄碱、土的宁、马钱子碱、绿原酸、小檗碱、柚皮苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1、淫羊藿苷、人参皂苷 Rb1、异欧前胡素峰面积 RSD 分别为 0.9%、1.1%、0.7%、0.6%、1.0%、1.1%、0.8%、0.6%、0.7%、0.5%、0.2%、1.0%, 表明仪器精密度良好。

2.8 重复性试验 取同一批片剂(批号 180401), 按“2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 在“2.3”“2.4”项条件下进样测定, 测得麻黄碱、伪麻黄碱、土的宁、马钱子碱、绿原酸、小檗碱、柚皮苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1、淫羊藿苷、人参皂苷 Rb1、异欧前胡素含量 RSD 分别为 0.4%、0.5%、0.8%、0.4%、0.5%、0.3%、0.9%、1.0%、0.7%、0.9%、1.0%、0.2%, 表明该方法重复性良好。

2.9 稳定性试验 取同一批片剂(批号 180401), 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 于 0、1、2、4、8、16、24 h 在“2.3”“2.4”项条件下进样测定, 测得麻黄碱、伪麻黄碱、土的宁、马钱子碱、绿原酸、小檗碱、柚皮苷、人参皂苷 Re、人参皂

苷 Rg1、淫羊藿苷、人参皂苷 Rb1、异欧前胡素峰面积 RSD 分别为 1.1%、1.0%、0.9%、1.2%、0.6%、1.2%、1.2%、1.1%、1.5%、0.8%、0.8%、1.2%, 表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10 加样回收率试验 取各成分含量已知的片剂(批号 180401) 10 片, 研成细粉, 精密称取 9 份, 每份 0.2 g, 置于 50 mL 量瓶中, 精密加入“2.1”项下贮备液 0.8、1.0、1.2 mL, 每个水平平行 3 份, 70% 甲醇超声处理 20 min 并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 在“2.3”“2.4”项条件下进样测定, 计算回收率。结果, 麻黄碱、伪麻黄碱、土的宁、马钱子碱、绿原酸、小檗碱、柚皮苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg1、淫羊藿苷、人参皂苷 Rb1、异欧前胡素平均加样回收率分别为 93.51%、101.6%、99.6%、97.1%、96.5%、101.2%、102.3%、95.3%, 103.2%、100.2%、98.7%、99.3%, RSD 分别为 0.9%、1.9%、1.7%、0.8%、0.8%、1.1%、1.2%、1.1%、0.9%、1.2%、1.1%、1.2%。

2.11 样品含量测定 取 4 个生产厂家 6 批片剂, 按“2.2”项下方法制备供试品溶液, 每批平行 2 份, 在“2.3”“2.4”项条件下进样测定, 外标法计算含量, 结果见表 3。

表 3 各成分含量测定结果 (*n* = 2)
Tab. 3 Results of content determination of various constituents (*n* = 2)

批号	含量/(μg·g ⁻¹)											
	麻黄碱	伪麻黄碱	土的宁	马钱子碱	绿原酸	小檗碱	柚皮苷	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rg1	淫羊藿苷	人参皂苷 Rb1	异欧前胡素
180401	6.27	5.87	230.65	237.34	383.89	27.18	14.82	4.89	1.45	6.36	1.56	9.01
180402	5.51	6.29	206.73	225.29	398.82	9.03	16.30	5.14	2.86	10.98	1.04	10.15
20191102	1.77	7.74	256.05	278.35	329.29	14.85	26.68	5.57	6.16	10.17	3.90	15.24
191101	2.83	5.31	209.14	136.43	645.56	16.22	13.68	11.64	9.01	14.96	5.54	14.34
190604	7.59	4.58	114.66	93.78	351.34	14.69	42.39	8.79	2.81	10.01	4.66	11.05
191114	3.45	8.88	84.44	166.07	301.21	17.59	13.87	6.93	3.76	6.25	3.14	12.56

3 讨论

盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱属于同分异构体，具有相同的定量离子对，需要通过对照品定位进行定性。当有机相比比例为 5% 时，两者能有效分离，而且甲醇分离度优于乙腈。

本实验以水-甲醇、水（含 0.1% 甲酸）-甲醇、水（含 0.1% 乙酸）-甲醇、水（含 10 mmol/L 甲酸铵）-甲醇为流动相，考察各成分分离度及响应值，发现水相中加入乙酸后更容易使化合物离子化，从而提高各成分响应值，而盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱在水（含 0.1% 乙酸）-甲醇中的分离度最好。然后，考察了提取溶剂（水、50% 甲醇、70% 甲醇、甲醇）、提取时间（10、20、30、40 min），发现 70% 甲醇提取出的成分最多；超声处理 20 min 后各成分提取完全。最终确定，供试品溶液制备方法为 70% 甲醇超声提取 20 min。

在 6 批风湿安泰安片中，各成分含量差异较大，以绿原酸最明显（301.21~645.56 μg/g），其次是土的宁（84.44~256.05 μg/g）、马钱子碱（93.78~278.35 μg/g），差异最小的为人参皂苷 Rb1（1.04~5.54 μg/g）。虽然结果均在设计的曲线范围内，但相关生产厂家也应加以关注。

参考文献：

[1] 马晨光, 朱 蕾, 佟丽华. 风湿安泰片质量标准的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(4): 910-911.

[2] 张韻慧, 吴亚男, 李志耕, 等. HPLC 测定风湿安泰片中乌头碱的含量[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(18): 1416-1418.

[3] 段存贤, 郭承军. HPLC 法测定神农丸中土的宁与马钱子碱的含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(2): 331-335.

[4] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂 第二十册) [S]. 1998.

[5] 李 强. 高效液相法测定风湿安泰片中绿原酸的含量[J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(4): 54-55.

[6] 孙 杰, 谷学新, 赵新颖, 等. HPLC 测定风湿安泰片中马钱子碱和土的宁的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 757-759.

[7] 杨立志. 双波长高效液相色谱法同时测定风湿安泰片中柚皮苷、淫羊藿苷含量[J]. 中国药业, 2016, 25(23): 71-73.

[8] 李丹凤, 朱健萍, 卢日刚. 药物杂质结构鉴定的研究进展[J]. 广西科学院学报, 2019, 35(4): 281-287.

[9] 梁 琨, 孙 辉, 安 骛, 等. LC-MS/MS 法同时测定护心口服液中 11 种成分[J]. 中成药, 2018, 40(1): 105-109.

[10] 房桂珍, 刘 笑, 沈云云, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定贞芪扶正胶囊中 10 种成分[J]. 中成药, 2017, 39(7): 1398-1402.

[11] 郭亚卿, 王晓明, 潘桂湘, 等. LC-MS/MS 法同时测定养血清脑颗粒中 14 种成分[J]. 中成药, 2017, 39(8): 1616-1620.

[12] 洪 艳, 文晓霞, 李 莎, 等. 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[J]. 中成药, 2019, 41(2): 270-274.

[13] 余 琰, 郭 玫, 邵 晶, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定六味调更片中 4 种成分[J]. 中成药, 2020, 42(7): 1718-1720.

[14] 储继红, 李长印, 戴国梁, 等. LC-MS-MS 法同时测定黄芪注射液和黄芪口服液中 5 种成分[J]. 中成药, 2015, 37(12): 2647-2651.

[15] 梁 颖, 许文佳, 符策奕, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定枫蓼肠胃康合剂、胶囊中 10 种成分[J]. 中成药, 2019, 41(5): 983-987.

[16] 赵小勤, 许 莉, 文永盛, 等. UPLC-QQQ-MS/MS 法同时测定不同产地知母中 10 种成分[J]. 中成药, 2020, 42(4): 980-985.

[17] 王知斌, 李 凯, 高 岩, 等. UPLC-ESI-MS/MS 法同时测定胡黄连中 4 种环烯醚萜[J]. 中成药, 2019, 41(9): 2144-2148.