UPLC-Q-TOF-MS 法同时测定平消片中 7 种成分

李明潺[1]，王玉丽[1]，郭春宏[1]，董林毅[2*]，李博乐[3]，段宏泉[2]，刘昌孝[2, 4]

1. 天津医科大学总医院，天津 300052
2. 天津医科大学药学院，天津 300070
3. 天津医科大学附属肿瘤医院，天津 300060
4. 天津药物研究院，天津 300193

摘 要：目的 建立同时测定平消片中 7 种成分（柚皮苷、橙皮苷、士的宁、马钱子碱、仙鹤草酚 B、汉黄芩素和原儿茶酸）的超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱联用（UPLC-Q-TOF-MS）的检测方法。**方法** 采用 Waters Acquity BEH C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）色谱柱，流动相为乙腈-甲酸-水体系梯度洗脱，体积流量 0.45 mL/min，质谱负离子模式扫描，进样量 2.0 μL。**结果** 7 种成分在一定范围内均呈现良好线性关系，r 均大于 0.999 6；精密度、重复性和稳定性良好；加样回收率在 99%～101%。**结论** 所建立的方法简便、准确、快速，重复性好，可用于平消片中柚皮苷、橙皮苷、士的宁、马钱子碱、仙鹤草酚 B、汉黄芩素和原儿茶酸 7 种有效成分的定量测定。

关键词：平消片；UPLC-Q-TOF-MS；柚皮苷；橙皮苷；士的宁；马钱子碱；仙鹤草酚 B；汉黄芩素；原儿茶酸

中图分类号：R286.02 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2015)11 - 1625 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.11.011

Simultaneous determination of seven components in Pingxiao Tables by UPLC-Q-TOF-MS

LI Ming-chan[1], WANG Yu-li[1], GUO Chun-hong[1], DONG Lin-yi[2], LI Bo-le[3], DUAN Hong-quan[2], LIU Chang-xiao[2, 4]

1. General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
2. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China
3. Tumor Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China
4. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To develop an UPLC-Q-TOF-MS method for the determination of seven components (naringin, hesperidin, strychnine, brucine, agrimol B, wogonin, and protocatechuic acid) in Pingxiao Tablets. **Methods** The analysis was performed on a Waters Acquity BEH C_{18} column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with the mixture of acetonitrile-water-formic acid as mobile phase, and the flow rate was 0.45 mL/min; MS scanning mode: negativion; Sample volume: 2.0 μL. **Results** The linear relationship between the concentration and peak areas of the seven compounds were all linear (r > 0.999 6). The average recoveries (n = 6) were between 99%—101%. **Conclusion** This method is simple, accurate, and reliable to determine the seven contents in Pingxiao Tablets for the quality control.

Key words: Pingxiao Tablets; UPLC-Q-TOF-MS; naringin; hesperidin; strychnine; brucine; agrimol B; wogonin; protocatechuic acid

中成药平消片是经临床证明疗效较好的抗胆管癌药物，由郁金、仙鹤草、五灵脂、白矾、硝石、制干漆、麸炒枳壳、马钱子粉共 8 味药材组成，《中国药典》2010 年版收载[1]。其具有活血化瘀、散结消肿、解毒止痛的功效。对毒瘀内结所致的肿瘤患者具有缓解症状，缩小瘤体，提高机体免疫力，延长患者生存时间的作用[2]。有关平消片质量标准的报道，主要集中于 HPLC 法测定马钱子粉中毒性成分士的宁[3]以及测定马钱子碱和仙鹤草酚[4]。近年来，随着现代分析技术的发展，液质联用技术成为天然药物复杂体系中活性成分快速分离和鉴定的有力手段。为了保证平消片临床用药质量，对平消片

收稿日期：2015-01-13

基金项目：国家自然科学基金青年项目（81303267）；中国博士后基金一等资助项目（2014M550149）；天津市中医药管理局科研专项（13142）

作者简介：李明潺（1980—），女，博士，主管药师，研究方向为中药学。

***通信作者** 董林毅，男，博士后在站，讲师，研究方向为复方中药分析。Tel/Fax: (022)83336675 E-mail: donglinyi@tijmu.edu.cn

中方中君药枳壳中橙皮苷和柚皮苷、马钱子中马钱子碱和毒性药效成分士的宁、臣药仙鹤草中仙鹤草酚 B 和汉黄芩素、活血药五灵脂中原儿茶酸 7 种成分的量同时进行超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱联用（UPLC-Q-TOF-MS）测定研究，为平消片多成分的质量控制提供了一种简单可行的定量方法，为提高检测速度及更好地控制生产过程质量提供了参考依据。

1 仪器与试剂

Waters Acquity^{TM} 超高效液相色谱系统，配置真空脱气机、自动进样器、柱温箱、PDA 检测器、Masslynx 色谱工作站，美国 Waters 公司；Waters Q-TOF Premier 质谱仪，Waters MS Technologies，Manchester；Acquity BEH C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm，Waters）；HU3120B 超声波仪，天津市恒奥科技发展有限公司；AB54、XS205 分析天平，Mettler 公司；Milli-Q 超纯水仪，美国 Millipore 公司。

对照品柚皮苷（批号 110722-201309）、橙皮苷（批号 110721-201210）、马钱子碱（批号 110706-201007）、士的宁（批号 110705-201308），购自中国食品药品检定研究院，供定量测定用，HPLC 法测定质量分数均≥98%；仙鹤草酚 B（批号 00966-201403）、汉黄芩素（批号 00313-201410）、原儿茶酸（批号 00870-201408）购自天津一方科技有限公司，HPLC 法测定质量分数均≥98%。乙腈、甲醇，色谱纯，美国 Fisher 公司；甲酸，色谱纯，美国 Acros 公司；磷酸，色谱纯，天津市光复精细化工研究厂；亮氨酸-脑啡肽乙酸盐（LEA），美国 Sigma 公司；超纯水由 Milli-Q 制备；平消片（每片 0.23 g）由西安正大制药有限公司生产，批号 130816、131116、131224、140316、140506、140618。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

2.1.1 液相色谱条件 采用 Waters Acquity BEH C_{18}（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）色谱柱；柱温 30 ℃；体积流量 0.45 mL/min；进样量 2.0 μL；流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液，梯度洗脱程序：0～3 min，2%～18%乙腈；3～5 min，18%～55%乙腈；5～8 min，55%～85%乙腈；8～10 min，85%～100%乙腈；10～11 min，100%乙腈；11～12 min，100%～2%乙腈。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源；V 模式；毛细管电压 3.5 kV；锥孔电压 45 V；离子源温度 100 ℃；脱溶剂气温度 300 ℃；脱溶剂氮气流量 600 L/h；锥孔气流量 50 L/h；采样频率 0.1 s，间隔 0.02 s；记录范围 *m*/*z* 50～2 000。负离子模式：实时校正锁定质量模式（lock mass），采用 LEA（$[M-H]^+$ 553.277 5）。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备 采用 70%甲醇水溶液分别配制各对照品储备液，质量浓度依次为原儿茶酸 15.372 mg/mL、柚皮苷 48.134 mg/mL、橙皮苷 47.214 mg/mL、马钱子碱 6.256 mg/mL、士的宁 7.448 mg/mL、汉黄芩素 35.862 mg/mL 和仙鹤草酚 B 29.524 mg/mL。然后各取储备液 1 mL，置 10 mL 量瓶中，加 70%甲醇水溶液 3 mL 超声 5 min 混合均匀，冷却后加 70%甲醇水溶液稀释至刻度，摇匀，得到混合对照品溶液，各对照品质量浓度依次为 1.537、4.813、4.721、0.626、0.745、3.586、2.952 mg/mL。

2.2.2 供试品溶液的制备 取平消片 20 片，除去糖衣，研细，精密称定，取约 500 mg，置于 10 mL 量瓶内，加入 70%甲醇水溶液约 8 mL，超声（120 W，60 Hz）处理 15 min 使溶解，放冷至室温后用 70%甲醇水溶液定容至刻度，摇匀，过 0.22 μm 微孔滤膜，取上清液进行分析。

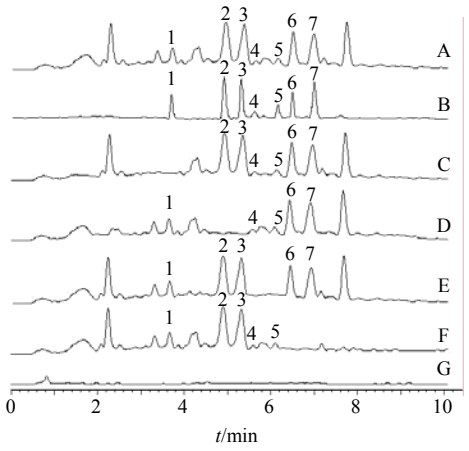
2.2.3 阴性样品溶液的制备 按处方工艺分别制备不含枳壳、不含五灵脂、不含仙鹤草等浸膏及不含马钱子粉的阴性样品，按“2.2.2”项下方法操作，即得。

2.3 专属性实验

分别取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性样品溶液各 2 μL，按“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱和质谱条件进样 2 μL，记录正离子扫描模式质谱图，结果见图 1。阴性样品在原儿茶酸、柚皮苷、橙皮苷、马钱子碱、士的宁、汉黄芩素和仙鹤草酚 B 出峰处无干扰，表明处方中的其他成分对测定结果无影响。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品溶液 0.1、0.2、0.4、0.5、0.8、1.0、2.0 mL，分别置 7 个 10 mL 量瓶中，加 70%甲醇水溶液定容至刻度，制成系列质量浓度对照品混合溶液，按“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱和质谱条件进样 2 μL 测定。以进样质量浓度为横坐标（*X*），峰面积为纵坐标（*Y*）绘制标准曲线，计算各自的回归方程和线性范围。以最低定量



1-原儿茶酸 2-柚皮苷 3-橙皮苷 4-马钱子碱 5-士的宁 6-汉黄芩素 7-仙鹤草酚 B

1-protocatechuic acid 2-naringin 3-hesperidin 4-brucine 5-strychnine 6-wogonin 7-agrimol B

图 1 平消片供试品 (A)、混合对照品 (B) 及缺五灵脂浸膏 (C)、缺枳壳浸膏 (D)、缺马钱子粉 (E)、缺仙鹤草浸膏 (F) 阴性样品和空白辅料样品 (G) 的负离子 BPI 质谱图

Fig. 1 Neg-MS BPI of sample (A), mixed reference substances (B), negative sample without *Trogopterpri Faeces* (C), negative sample without *Aurantii Fructus* (D), negative sample without *Strychnos* powder (E), negative sample without *Agrimoniae Herba* (F), and blank accessories sample (G)

限信噪比 S/N＝3 和 S/N＝10 为原则，分别计算原儿茶酸、柚皮苷、橙皮苷、马钱子碱、士的宁、汉黄芩素和仙鹤草酚 B 的检测限（LOD）和定量限（LOQ）（表 1）。结果表明，7 种物质在各自线性范围内呈良好的线性关系，灵敏度较高。

2.5 精密度考察

取混合对照品溶液 2 μL，重复进样 6 次，依法测定，计算原儿茶酸、柚皮苷、橙皮苷、马钱子碱、士的宁、汉黄芩素、仙鹤草酚 B 的峰面积的 RSD 分别为 2.54%、1.38%、0.85%、1.26%、2.18%、1.96%、1.74%。结果表明精密度良好。

2.6 重复性考察

取同一批次（批号 140506）样品，共 6 份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，依“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱、质谱条件进行测定，测得原儿茶酸、柚皮苷、橙皮苷、马钱子碱、士的宁、汉黄芩素和仙鹤草酚 B 的质量分数平均值分别为 2.102、8.704、8.486、0.692、0.989、4.454、4.096 mg/g，RSD 分别为 1.87%、1.26%、1.78%、1.68%、1.94%、2.02%、1.38%，表明重复性良好。

2.7 稳定性试验

取同一份供试品溶液（批号 140506）2 μL，分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定。原儿茶酸、柚皮苷、橙皮苷、马钱子碱、士的宁、汉黄芩素和仙鹤草酚 B 的峰面积的 RSD 分别为 2.22%、2.04%、2.08%、1.96%、1.54%、0.84%、1.32%，表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

表 1 标准曲线、LOD 和 LOQ 检测结果

Table 1 Results of linear regression, LOD, and LOQ of investigated compounds

待测成分	线性方程	r	线性范围/(μg·mL^{-1})	LOD/(ng·mL^{-1})	LOQ/(ng·mL^{-1})
原儿茶酸	Y＝70 457 X＋84.44	0.999 8	15.37～307.42	81.28	256.45
柚皮苷	Y＝16 332 X－4 711	0.999 7	48.13～962.61	30.76	82.21
橙皮苷	Y＝23 119 X－3 443	0.999 8	47.21～944.20	18.65	52.19
马钱子碱	Y＝38 425 X＋35.15	0.999 8	6.26～125.18	120.26	304.44
士的宁	Y＝47 678 X－15.58	0.999 9	7.45～149.08	89.64	224.66
汉黄芩素	Y＝71 228 X＋202.5	0.999 7	35.86～717.16	66.62	155.44
仙鹤草酚 B	Y＝36 908 X－3 985	0.999 6	29.52～590.38	28.32	74.92

2.8 加样回收率试验

将已测定的平消片（批号 140506）10 片，去除糖衣，研细，精密称取 200 mg，共 6 份，加入 70% 甲醇水溶液约 4 mL，超声使溶解，冷却后分别精密加入“2.2.1”项下方法制备混合对照品溶液 0.5 mL，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别进样测定，结果原儿茶酸、柚皮苷、橙皮苷、马钱子碱、士的宁、汉黄芩素、仙鹤草酚 B 的平均回收率分别为 99.83%、100.18%、100.13%、100.25%、100.41%、99.98%、100.06%，RSD 分别为 0.62%、0.32%、0.31%、1.13%、1.82%、0.37%、0.33%。结果表明，7 种成分回收率在 99%～101%。

2.9 样品测定

分别取平消片 6 批样品，按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液，按“2.1.1”和“2.1.2”项下色谱、质谱条件分别平行测定 3 份，计算平均质量分数，结果见表 2。

表 2 平消片中 7 种成分测定结果 (n = 3)

Table 2 Determination of seven components in Pingxiao Tablets (n = 3)

批号	质量分数/(mg·g^{-1})						
	原儿茶酸	柚皮苷	橙皮苷	马钱子碱	士的宁	汉黄芩素	仙鹤草酚 B
130816	2.088	8.648	8.612	0.725	1.042	4.372	4.124
131116	2.092	8.832	8.338	0.702	1.111	4.426	4.068
131224	2.143	8.811	8.228	0.686	1.040	4.438	3.988
140316	2.214	8.698	9.544	0.694	0.992	4.224	4.022
140506	2.102	8.704	8.486	0.692	0.989	4.454	4.096
140618	2.084	8.708	8.470	0.714	0.984	4.386	3.958

3 讨论

3.1 测定成分的选择

本实验采用的方法增加了对平消片中强毒性吲哚型马钱子生物碱（马钱子碱、士的宁）的考察，而且大大提高了该物质的 LOD，较《中国药典》2010 年版只采用 HPLC 法测定毒性成分士的宁的限量方法[1]，更能有效地控制平消片中该毒性药效成分的量；原儿茶酸（五灵脂）[5]、柚皮苷（枳壳）[6]、橙皮苷（枳壳）[7]、仙鹤草酚 B（仙鹤草）[8]和汉黄芩素（仙鹤草）[9]都是来源饮片的主要药效成分，将多种药效成分同时进行 LC-MS 定量测定的方法正是中药复方质量控制最有效的手段。但方中郁金、干漆、五灵脂药物中均含有挥发性成分，建议采用 GC-MS 进行测定，对 LC-MS 方法进行合理的补充。

3.2 测定方法的选择

经文献查阅，笔者发现目前尚未见用液相、质谱联用的方法同时测定中成药平消片及相关成分的其他类型制剂中原儿茶酸、柚皮苷、橙皮苷、马钱子碱、士的宁、汉黄芩素、仙鹤草酚 B 等多种主要有效成分的报道，并且所建立的定量测定方法与《中国药典》2010 年版收载的 HPLC 法[1]相比较，具有准确、快速、样品用量少、精密度高等优点；与文献所报道的测定含有单一饮片的制剂定量测定方法[3]相比较，具有样品处理方法简便、重现性好和切实可行等特点；并且 Q-TOF-MS 是高分辨串联质谱，其显著特点是灵敏度高和选择性强，在本实验中可以得到数据完整且品质较高的负离子模式的离子流图，可以通过提取对照品的准确相对分子质量，直接对复杂样品的质谱峰进行准确积分，因此对弱紫外吸收及分离较差的成分分析及定量测定提供有效的测定手段，并且这些优势可将定量测定的结果与复方中药指纹图谱建立及体内代谢物检测的结果很好地衔接[10]。因而此方法为药品生产中质量控制提供了重要的参考依据。

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.

[2] 程嘉艺, 阎醒予, 刘守义, 等. 平消片主要药效学研究 [J]. 中成药, 2008, 30(3): 350-352.

[3] 李 明, 张 弦, 潘 扬. RP-HPLC 法测定平消片中马钱子碱和士的宁的含量 [J]. 中国中医药信息杂志, 2007, 14(1): 47-48.

[4] 周大祥, 刘仁华. HPLC 测定平消胶囊中马钱子碱和仙鹤草酚的含量 [J]. 重庆三峡学院学报, 2009, 25(3): 89-92.

[5] Tsao S M, Hsia T C, Yin M C. Protocatechuic acid inhibits lung cancer cells by modulating FAK, MAPK, and NF-κB pathways [J]. *Nutr Cancer*, 2014, 66(8): 1331-1341.

[6] Ding S, Hu J, Yang J, *et al*. The inactivation of JAK2/STAT3 signaling and desensitization of M1 mAChR in minimal hepatic encephalopathy (MHE) and the protection of naringin against MHE [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(6): 1933-1950.

[7] Febriansah R, Putri D D, Sarmoko S, *et al*. Hesperidin as a preventive resistance agent in MCF-7 breast cancer cells line resistance to doxorubicin [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2014, 4(3): 228-233.

[8] 贺 成, 秦文杰, 唐晓晶, 等. 仙鹤草地上部分仙鹤草酚 B 的分离与鉴定 [J]. 中草药, 2011, 42(2): 255-256.

[9] Xu X, Zhang Y, Li W, *et al*. Wogonin reverses multi-drug resistance of human myelogenous leukemia K562/A02 cells via downregulation of MRP1 expression by inhibiting Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 92(2): 220-234.

[10] 杨义芳. 超高效/高分离度快速/超快速液相色谱在中药及其制剂研究中的应用 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1259-1263.