

HPLC-MS/MS 法同时测定参乌健脑胶囊中 8 种成分

张 毅¹, 周 慧^{2*}

1. 天津市环湖医院 药剂科, 天津 300060

2. 天津市临床药物关键技术重点实验室, 天津医科大学药学院, 天津 300070

摘 要: 目的 建立高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 同时测定参乌健脑胶囊 (SJC) 中 8 种成分 (葛根素、丹参酮 II_A、二苯乙烯苷、芍药苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、毛蕊异黄酮苷、黄芩苷) 的定量方法。方法 选用 YMC-Triart C₁₈ 色谱柱, 以甲醇-0.2% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 0.6 mL/min, 柱温 40 °C。质谱条件: ESI 源, 采用多反应监测模式 (MRM), 以定量离子对峰面积进行定量。结果 SJC 中葛根素、丹参酮 II_A、二苯乙烯苷、芍药苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、毛蕊异黄酮苷、黄芩苷分别在 20.31~20 310、25.66~25 660、20.45~20 450、50.79~50 790、50.57~50 570、50.38~50 380、10.32~10 320、25.74~25 740 ng/mL 内线性关系良好 ($r \geq 0.999 0$); 精密度良好, 重复性良好, RSD 均小于 2.0%; 在室温条件下 24 h 内稳定; 加样回收率为 97.98%~102.48%, RSD 小于 1.6%。所测 8 种成分在 6 批样品中的质量分数依次为葛根素 1.843~1.860 mg/g、丹参酮 II_A 1.618~1.629 mg/g、二苯乙烯苷 2.116~2.129 mg/g、芍药苷 2.537~2.547 mg/g、人参皂苷 Re 0.034~0.041 mg/g、人参皂苷 Rg₁ 0.048~0.055 mg/g、毛蕊异黄酮苷 0.551~0.564 mg/g 和黄芩苷 2.333~2.346 mg/g。结论 该方法快速、简便、重复性好, 可用于同时测定 SJC 中多种成分。

关键词: 参乌健脑胶囊; HPLC-MS/MS; 多反应监测模式; 葛根素; 丹参酮 II_A; 二苯乙烯苷; 芍药苷; 人参皂苷 Re; 人参皂苷 Rg₁; 毛蕊异黄酮苷; 黄芩苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)14-2470-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.14.013

Simultaneous determination of eight components in Shenwu Jiannao Capsules by HPLC-MS/MS

ZHANG Yi¹, ZHOU Hui²

1. Department of Pharmacy, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

2. Tianjin Key Laboratory of Clinical Medicine, School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To develop a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of eight components (puerarin, tanshinone II_A, stibene glucoside, paeoniflorin, ginsenoside Re, ginsenoside Rg₁, calycosin-7-glucoside, and baicalin) in Shenwu Jiannao Capsules (SJC). **Methods** Chromatographic column: YMC-Triart C₁₈, mobile phase: methanol-water (including 0.2% formic acid), and gradient elution, flow rate: 0.6 mL/min, column temperature: 40 °C. MS condition: electrospray ionization (ESI) and multiple reaction monitoring (MRM) were adopted, the detected peak areas of ion pairs were used for quantitative determination. **Results** There was a good linearity between the absorption peak area and the concentration for puerarin, tanshinone II_A, stibene glucoside, paeoniflorin, ginsenoside Re, ginsenoside Rg₁, calycosin-7-glucoside, and baicalin in the ranges of 20.31—20 310, 25.66—25 660, 20.45—20 450, 50.79—50 790, 50.57—50 570, 50.38—50 380, 10.32—10 320, and 25.74—25 740 ng/mL, respectively ($r \geq 0.999 0$). The precision was good and RSD was less than 2.0%. The repeatability was good and RSD was less than 2.0%. The stability was good in 24 h. The average recoveries were ranged from 97.98% to 102.48% (RSD $\leq 1.6\%$). The contents of puerarin, tanshinone II_A, stibene glucoside, paeoniflorin, ginsenoside Re, ginsenoside Rg₁, calycosin-7-glucoside, and baicalin in six batches of samples were in the ranges of 1.843—1.860, 1.618—1.629, 2.116—2.129, 2.537—2.547, 0.034—0.041, 0.048—0.055, 0.551—0.564, and 2.333—2.346 mg/g, respectively. **Conclusion** The method is rapid, simple, repeatable, and can be used to determine the multi components in different batches of SJC simultaneously.

收稿日期: 2015-11-25

作者简介: 张 毅, 男, 副主任药师, 主要研究神经内科用药的合理使用。Tel: 13920398707 E-mail: 103841540@qq.com

*通信作者 周 慧。E-mail: zhouhui@tmu.edu.cn

Key words: Shenwu Jiannao Capsules; HPLC-MS/MS; multiple reaction monitoring; puerarin; tanshinone II_A; stibene glucoside; paeoniflorin; ginsenoside Re; ginsenoside Rg₁; calycosin-7-glucoside; baicalin

参乌健脑胶囊 (SJC) 是由人参、制何首乌、白芍、丹参等 22 味药材提取制成的复方制剂, 又名抗脑衰胶囊, 收载于《中国药典》2015 年版, 具有补肾填精、益气养血、强身健脑等功能, 用于肾气不足、肝气血虚所致的精神疲惫、失眠多梦、头晕目眩、体乏无力、记忆力减退^[1]。其可显著对抗人 β 淀粉样蛋白 (A β_{25-35}) 对神经元的神经毒性作用, 提高细胞存活率^[2]。临床上可用于治疗老年慢性失眠^[3]。《中国药典》2015 年版以葛根素和二苯乙烯苷为指标对其进行定量测定。文献中多以葛根素^[4-6]为指标测定其量, 此外还以二苯乙烯苷^[6]、丹参酮 II_A^[7]、芍药苷、黄芩苷^[8]、人参皂苷^[9]、大黄素^[10]为指标进行测定, 王凤玲等^[11-12]通过 HPLC 指纹图谱的方法对其进行质量控制。本研究采用高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 法同时测定 SJC 中的葛根素、丹参酮 II_A、二苯乙烯苷、芍药苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、毛蕊异黄酮苷和黄芩苷 8 种有效成分的质量分数, 此法专属性好、灵敏度高、快速高效, 优于传统的 HPLC 法, 为 SJC 的质量控制提供了一定参考。

1 仪器与材料

LCQ 液相色谱质谱联用仪: 配有电喷雾离子源 (ESI) 及 Xcalibur1.2 数据处理系统, 美国 Finnigan 公司; 岛津 AUW-D 型电子分析天平, 日本岛津公司; KQ5200E 智能超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。对照品葛根素 (批号 110752-201514, 质量分数 95.5%)、丹参酮 II_A (批号 110766-201520, 质量分数 98.9%)、芍药苷 (批号 110736-201438, 质量分数 96.4%)、二苯乙烯苷 (批号 110844-200003, 质量分数 96.4%)、人参皂苷 Re (批号 110754-201525, 质量分数 92.3%)、毛蕊异黄酮苷 (批号 111530-201309, 质量分数 92.9%)、人参皂苷 Rg₁ (批号 110703-201529, 质量分数 95.0%)、黄芩苷 (批号 110715-201318, 质量分数 93.3%) 均购于中国食品药品检定研究院; SJC (规格: 每粒胶囊质量 0.3 g), 吉林天药本草堂制药有限公司, 批号 20150302、20150303、20150304、20150407、20150408、20150409; 河北百善药业有限公司, 批号 20160111、20160112、20160113。

甲醇为色谱纯, 天津康科德科技有限公司。其

余溶剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 YMC-Triart C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 柱温 40 $^{\circ}$ C; 流动相为甲醇-0.2%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~5 min, 10%甲醇; 5~15 min, 10%~40%甲醇; 15~35 min, 40%~70%甲醇; 35~40 min, 70%~90%甲醇; 40~50 min, 90%~10%甲醇; 体积流量 0.6 mL/min; 进样量 10 μ L。

2.2 质谱条件

LCQ 型离子阱质谱仪, 电喷雾电离源 (ESI); 多反应离子监测 (MRM) 模式, 正负离子切换扫描。鞘气 (N₂) 体积流量 0.75 L/min; 辅助气 (N₂) 体积流量 0.15 L/min; 源电压 4.5 kV; 毛细管温度 280 $^{\circ}$ C; 毛细管电压 25 V。各成分的部分质谱分析参数见表 1, 提取离子色谱图和二级质谱图见图 1。

表 1 8 种成分的部分质谱分析参数
Table 1 MS parameters of eight components

成分	分子式	t/min	离子对 (m/z)	碰撞能量/V
葛根素	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	6.11	417.0>381.1	8
毛蕊异黄酮苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	9.54	446.8>285.0	8
二苯乙烯苷	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	11.58	407.2>228.2	8
芍药苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	15.33	503.4>381.1	9
丹参酮 II _A	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	19.68	295.2>249.2	10
人参皂苷 Rg ₁	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	24.98	799.6>637.5	7
人参皂苷 Re	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	29.40	945.8>475.6	9
黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	34.83	447.3>271.1	6

2.3 供试品溶液的制备

取质量差异下的本品内容物, 研细, 取约 0.1 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加 50%甲醇 20 mL, 超声处理 (功率 160 W, 频率 40 kHz) 15 min, 放冷, 加 50%甲醇至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.4 混合对照品溶液的制备

精密称取葛根素、丹参酮 II_A、二苯乙烯苷、芍药苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、毛蕊异黄酮苷和黄芩苷对照品适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用 50%甲醇定容至刻度, 制得各成分质量浓度分别 20.31、

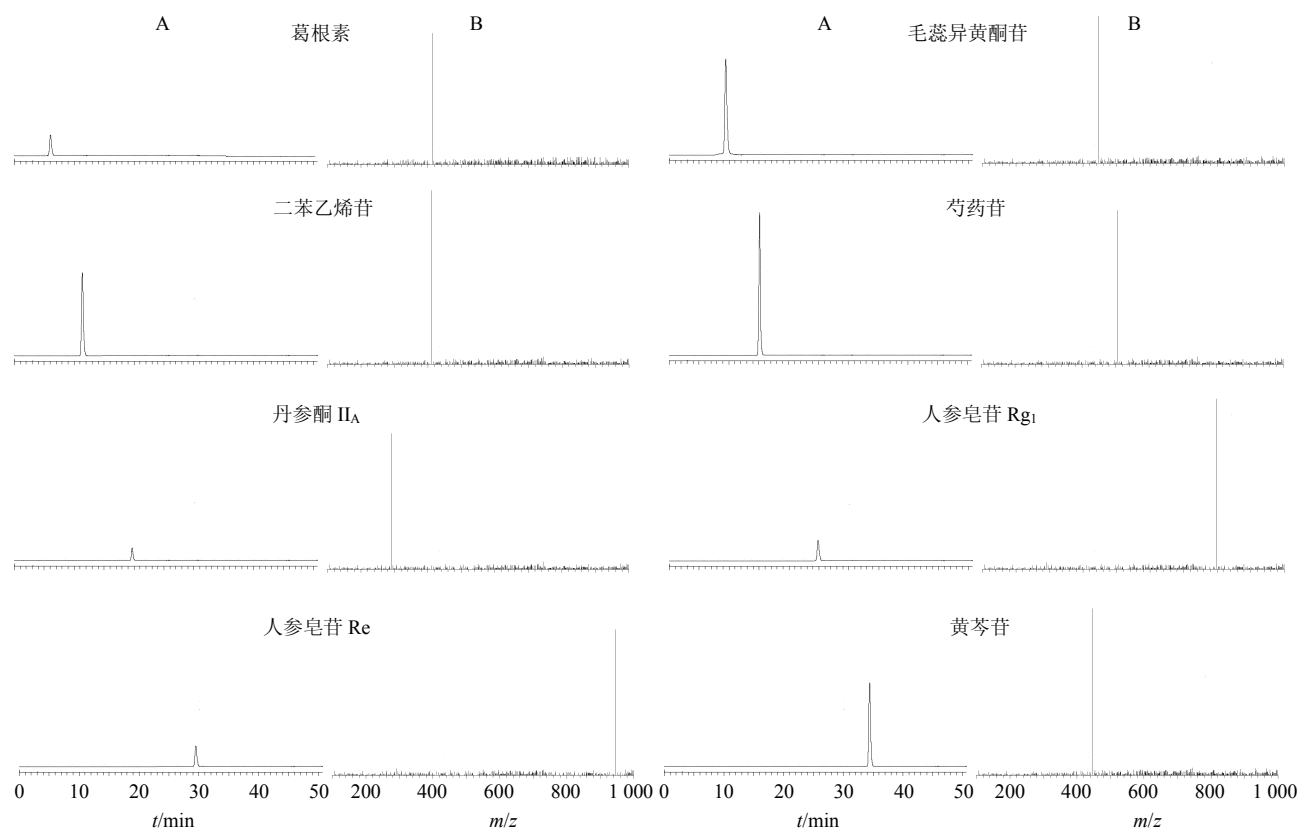


图1 8种成分的提取离子色谱图(A)和质谱图(B)

Fig. 1 Extracting ion chromatograms (A) and MS (B) of eight components

25.66、20.45、50.79、50.57、50.38、10.32、25.74 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液, 备用。

2.5 阴性对照溶液的制备

按SJC处方比例和工艺, 分别制备缺少何首乌和人参药材的阴性对照样品, 并按“2.3”项下方法分别制备各阴性对照溶液。

2.6 线性关系与定量限

分别精密量取“2.4”项下混合对照品溶液适量, 置于10 mL量瓶中, 用50%甲醇稀释成系列质量浓度的混合对照品溶液, 按照“2.1”“2.2”项下条件进样10 μL 测定。以各成分的质量浓度为横坐标(X), 以各成分的峰面积均值为纵坐标(Y)进行线性回归, 得各成分的回归方程、相关系数、线性范围及定量限, 结果分别为葛根素 $Y=346.3 X-762.1$, $r=0.9995$, 线性范围20.31~20 310 ng/mL, 定量限6.8 ng/mL; 毛蕊异黄酮苷 $Y=7.452 X-739.7$, $r=0.9992$, 线性范围10.32~10 320 ng/mL, 定量限3.4 ng/mL; 二苯乙烯苷 $Y=23.76 X+3 472.5$, $r=0.9996$, 线性范围20.45~20 450 ng/mL, 定量限5.1 ng/mL; 芍药苷 $Y=28.233 X-32.75$, $r=0.9996$, 线性范围50.79~50 790 ng/mL, 定量限8.5 ng/mL;

丹参酮 II_A $Y=2.794 X+72.99$, $r=0.9997$, 线性范围25.66~25 660 ng/mL, 定量限6.4 ng/mL; 人参皂苷 Rg₁ $Y=68.44 X+856.88$, $r=0.9991$, 线性范围50.57~50 570 ng/mL, 定量限16.9 ng/mL; 人参皂苷 Re $Y=122.7 X-6.758$, $r=0.9990$, 线性范围50.38~50 380 ng/mL, 定量限16.8 ng/mL; 黄芩苷 $Y=568.5 X-734.8$, $r=0.9995$, 线性范围25.74~25 740 ng/mL, 定量限4.3 ng/mL。结果表明, 各成分在各自的线性范围内具有良好的线性关系。

2.7 精密度试验

取供试品(批号20150302)溶液, 重复进样6次, 依法测定。结果显示, 葛根素、丹参酮 II_A、二苯乙烯苷、芍药苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、毛蕊异黄酮苷和黄芩苷峰面积的RSD值分别为1.33%、0.75%、0.86%、0.91%、1.34%、1.22%、0.60%、1.02%, 结果表明该方法的精密度良好。

2.8 重复性试验

按“2.3”项方法制备供试品溶液6份, 按“2.1”“2.2”项下条件进样分析, 测得葛根素、丹参酮 II_A、二苯乙烯苷、芍药苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、毛蕊异黄酮苷和黄芩苷平均质量分数分别为1.846、

1.621、2.116、2.543、0.039、0.048、0.564、2.333 mg/g, RSD 值分别为 1.11%、0.81%、1.08%、0.73%、1.21%、1.31%、0.66%、0.84%, 表明该方法重复性良好。

2.9 稳定性试验

取供试品 (批号 20150302) 溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 进样测定, 测得葛根素、丹参酮 II_A、二苯乙烯苷、芍药苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、毛蕊异黄酮苷和黄芩苷峰面积的 RSD 值分别为 0.67%、0.65%、0.43%、0.38%、0.62%、0.39%、0.52%、0.64%, 结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.10 加样回收率试验

精密吸取已测定的供试品 (批号 20150302) 溶

液 9 等份, 每 3 份为 1 组, 分别精密加入供试品中相应成分 150%、100%、50% 3 个水平的混合对照品溶液后, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液进行测定。计算各成分的回收率, 结果葛根素、丹参酮 II_A、二苯乙烯苷、芍药苷、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rg₁、毛蕊异黄酮苷和黄芩苷平均回收率依次为 98.87%、100.37%、99.30%、102.48%、97.98%、99.82%、100.93%、98.11%, RSD 依次为 0.64%、0.93%、0.61%、1.27%、1.32%、1.55%、0.74%、1.38%。

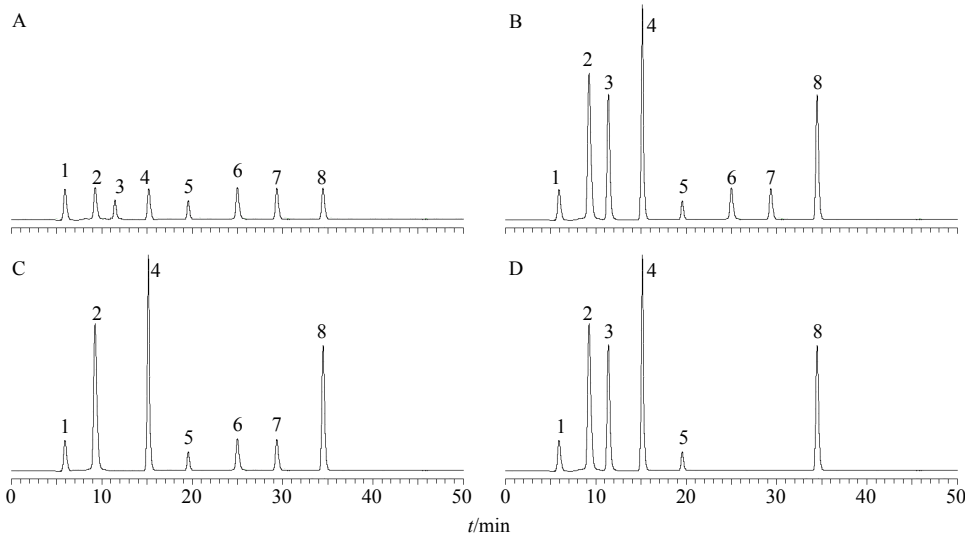
2.11 样品测定

取 9 个批号的 SJC, 按照“2.3”项下方法处理, 按照“2.1”项下色谱条件进行测定, 结果见表 2, 相关图谱见图 2。

表 2 SJC 中 8 种化学成分定量测定结果 (n = 3)

Table 2 Quantitative determination of eight constituents in in SJC (n = 3)

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)							
	葛根素	丹参酮 II _A	二苯乙烯苷	芍药苷	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rg ₁	毛蕊异黄酮苷	黄芩苷
20150302	1.846	1.621	2.116	2.543	0.039	0.048	0.564	2.333
20150303	1.856	1.625	2.121	2.541	0.034	0.053	0.554	2.342
20150304	1.852	1.618	2.124	2.537	0.041	0.049	0.561	2.337
20150407	1.843	1.629	2.128	2.539	0.037	0.055	0.558	2.346
20150408	1.860	1.622	2.120	2.547	0.040	0.052	0.551	2.340
20150409	1.847	1.627	2.129	2.545	0.038	0.051	0.555	2.338
20160111	1.895	1.654	2.115	2.532	0.044	0.058	0.561	2.358
20160112	1.888	1.651	2.130	2.565	0.035	0.063	0.575	2.348
20160113	1.876	1.669	2.141	2.521	0.048	0.049	0.577	2.330



1-葛根素 2-丹参酮 II_A 3-二苯乙烯苷 4-芍药苷 5-人参皂苷 Re 6-人参皂苷 Rg₁ 7-毛蕊异黄酮苷 8-黄芩苷
1-puerarin 2-tanshinone II_A 3-stibene glucoside 4-paeoniflorin 5-ginsenoside Re 6-ginsenoside Rg₁ 7-calycosin-7-glucoside 8-baicalin

图 2 混合对照品 (A)、SJC 样品 (B)、缺少何首乌阴性对照 (C)、缺少人参阴性对照 (D) 溶液的总离子流 (TIC) 色谱图
Fig. 2 TIC of mixed references substances (A), SJC (B), negative reference substance without *Polygona Multiflora Radix* (C), negative reference substance with *Ginseng Radix* (D)

3 讨论

关于 SJC 定量测定的文献报道很多,但基本以液相色谱法为主要测定方法,但是液质联用的方法对其进行定量却未见报道。本实验首次建立了 HPLC-MS/MS 同时测定 SJC 中 8 种成分的方法,对于 SJC 的质量控制具有参考意义。

本实验考察了乙腈-水、甲醇-水、乙腈-甲酸水、甲醇-甲酸水、乙腈-乙酸水、甲醇-乙酸水多个流动相体系,综合考虑各成分分离度,质谱响应等因素,最后确定甲醇-甲酸水体系更有利于各个成分的测定。在质谱离子模式的选择上,采用正负离子切换扫描的方式,对于负离子响应好的成分采用负离子扫描,如人参皂苷 Re 与 人参皂苷 Rg₁,其他成分采用正离子扫描的模式。从样品的测定结果看,各批样品中 8 个成分的量基本质量分数差异较小,本方法可用于该中成药的质量控制。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 王宪英,王梅. 抗脑衰胶囊对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导的神经元损伤作用的影响 [J]. 临床合理用药, 2014, 7(12): 4-5.
- [3] 郭丰义,沈玉莲,郭建峰. 参乌健脑胶囊治疗老年慢性失眠 60 例 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 230-233.
- [4] 朱宏吉,许先涛,王凤玲,等. HPLC 测定抗脑衰胶囊中葛根素的含量 [J]. 华西药学杂志, 2005, 20(6): 555-556.
- [5] 刘志胜,蒙大平,郭炎荣. 高效液相色谱法测定抗脑衰胶囊中葛根素的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(7): 620-621.
- [6] 郭炎荣,路玫. 反相高效液相色谱法同时测定抗脑衰胶囊中葛根素和 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷的含量 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(1): 110-111.
- [7] 张谦,袁博,佟乃冬,等. HPLC 法测定抗脑衰胶囊颗粒中丹参酮 II_A 含量 [J]. 天津药学, 2006, 18(5): 21-24.
- [8] 贾永亮,韩桂茹,李晓燕. 高效液相色谱法同时测定抗脑衰胶囊中 3 种成分含量 [J]. 中国药业, 2014, 23(1): 12-14.
- [9] 刘芳芳,薛起,刘岩,等. 参乌健脑胶囊中 5 种人参皂苷的定量分析 [J]. 北京农业, 2015(17): 1-2.
- [10] 李道婷,吴文珊. 高效液相色谱法测定抗脑衰胶囊中大黄素的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(7): 909-910.
- [11] 王凤玲,戚务勤,张谦,等. 抗脑衰胶囊制剂 HPLC 指纹图谱建立及质量相关性研究 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(3): 378-382.
- [12] 王凤玲,韩淑珍,王勇,等. 定量测定与特定指纹图谱分析相结合方法用于抗脑衰胶囊制剂质量评价 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 375-379.