

超高效液相色谱-串联质谱同时测定加味左金丸中的 9 种有效成分

覃 莎^{1,2}, 王 锦², 徐远金^{1,2*}

(1. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学, 广西 南宁 530004;
2. 广西大学化学化工学院, 广西 南宁 530004)

摘要:建立了同时测定加味左金丸中 9 种药效成分含量的超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 分析方法。采用 Zorbax RRHD Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱,以含 0.2% 甲酸的水-甲醇为流动相进行梯度洗脱,流速 0.4 mL/min,在电喷雾电离 (ESI) 正离子模式下,采用多重反应监测模式进行检测。结果表明,芍药苷、延胡索乙素、药根碱、小檗碱、巴马汀、吴茱萸碱、柴胡皂苷 C、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 的线性范围分别为 0.025 ~ 5.0 mg/L、0.001 0 ~ 2.0 mg/L、0.002 3 ~ 7.2 mg/L、0.002 7 ~ 28.9 mg/L、0.002 3 ~ 9.1 mg/L、0.005 0 ~ 1.0 mg/L、0.050 ~ 10 mg/L、0.005 ~ 1.0 mg/L、0.007 5 ~ 1.5 mg/L;检出限分别为 5.0、0.20、0.45、0.54、0.45、1.0、10、1.0、1.5 μg/L。9 种成分的加样回收率为 99.3% ~ 105%,相对标准偏差均不大于 2.6%。该法快捷、准确、重复性好,已成功用于实际样品的分析。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS);有效成分;加味左金丸;中成药
中图分类号:O658 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8713(2012)11-1153-06

Simultaneous determination of nine effective components in Jiaweizuojin Pills by ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry

QIN Sha^{1,2}, WANG Jin², XU Yuanjin^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangxi University, Nanning 530004, China;
2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Abstract: A method for the simultaneous determination of paeoniflorin, tetrahydropalmatine, jatrorrhizine, berberine, palmatine, evodiamine, saikosaponin C, saikosaponin A and saikosaponin D in Jiaweizuojin Pills was established by ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The UPLC separation was performed on a Zorbax RRHD Eclipse Plus C₁₈ column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) by using 0.2% (v/v) formic acid aqueous solution and methanol as mobile phases with the gradient elution at a flow rate of 0.4 mL/min. The analytes were detected by tandem mass spectrometry under the positive ion mode with the electrospray ionization (ESI) source and in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. Under the optimized conditions, the calibration curves were linear in the ranges of 0.025 – 5.0 mg/L for paeoniflorin, 0.001 0 – 2.0 mg/L for tetrahydropalmatine, 0.002 3 – 7.2 mg/L for jatrorrhizine, 0.002 7 – 28.9 mg/L for berberine, 0.002 3 – 9.1 mg/L for palmatine, 0.005 0 – 1.0 mg/L for evodiamine, 0.050 – 10 mg/L for saikosaponin C, 0.005 0 – 1.0 mg/L for saikosaponin A and 0.007 5 – 1.5 mg/L for saikosaponin D with the detection limits of 5.0, 0.20, 0.45, 0.54, 0.45, 1.0, 10, 1.0, 1.5 μg/L, respectively. The average recoveries of the nine effective components were between 99.3% and 105% with the relative standard deviations not

* 通讯联系人:徐远金,博士,教授,研究方向为色谱、质谱分析. Tel: (0771)3237743, E-mail: yjxu@gxu.edu.cn.
基金项目:广西自然科学基金项目(桂科自 0832034).
收稿日期:2012-06-28

more than 2.6%. The developed method is simple, rapid and accurate, and suitable for the quality control of the nine effective components in Jiaweizuojin Pills.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); effective components; Jiaweizuojin Pills; Chinese patent drug

加味左金丸是由姜黄连、制吴茱萸、黄芩、柴胡、木香、醋香附、郁金、白芍、醋青皮、麸炒枳壳、陈皮、醋延胡索、当归和甘草 15 味中药材研制而成的复方制剂,具有平肝降逆,疏郁止痛之功效,用于肝郁化火、肝胃不和引起的胸脘痞闷、急躁易怒、暖气吞酸、胃痛少食等症^[1]。已有文献报道采用毛细管电泳法^[2-5]、高效液相色谱法(HPLC)^[6-10]、紫外分光光度法^[11-13]和薄层色谱扫描法^[14]测定白芍中芍药苷,延胡索中延胡索乙素,黄连中盐酸药根碱、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀的含量,采用毛细管电泳法^[5]、HPLC^[9]测定吴茱萸中吴茱萸碱的含量,采用毛细管电泳法^[15]、HPLC^[16,17]和薄层色谱扫描法^[16]研究柴胡中的柴胡皂苷,也有文献^[18]报道采用 HPLC 测定加味左金丸中的盐酸小檗碱和吴茱萸次碱的含量,但采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定加味左金丸中的药效成分含量和同时测定芍药苷、延胡索乙素、药根碱、小檗碱、巴马汀、吴茱萸碱、柴胡皂苷 C、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D 含量的分析方法尚未见有报道。

液相色谱-质谱联用技术具有专属、灵敏、快速等特点,是中药成分分析中定性和定量分析的有力工具。UPLC 是近几年推出的一种新的液相色谱技术,分析速度和分辨率较常规 HPLC 有了较大的提高,更适合药物复方制剂复杂样品的分析,显著缩短分析时间并减少溶剂消耗^[19];结合三重四极杆串联质谱的多重反应监测模式(MRM),通过特征母离子和子离子的一一对应使之抗干扰能力强,可以很好地解决成分复杂样品分析时仅靠组分保留时间进行定性时可能出现的结果可靠性差的问题^[20]。本文建立了同时测定加味左金丸中芍药苷、延胡索乙素、药根碱、小檗碱、巴马汀、吴茱萸碱、柴胡皂苷 C、柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 9 种有效成分含量的 UPLC-MS/MS 联用分析方法,方法准确、简便、快速,已成功地用于实际样品的分析。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1290 Infinity LC System, Agilent 6460 Triple Quad LC/MS(美国,Agilent 公司);Eppendorf Centrifuge 5810R 台式高速冷冻离心机(德国,

Eppendorf 公司);Synthesis A10™超纯水系统(美国,Millipore 公司);ME 215S 电子天平(德国,Sartorius 公司);KQ2200DV 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯,Fisher 公司);甲酸(分析纯,广东光华化学厂有限公司);对照品芍药苷、延胡索乙素、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱、吴茱萸碱(纯度为 98%,中国药品生物制品检定所),柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 C、柴胡皂苷 D(纯度为 98%,四川省维克奇生物科技有限公司);实验用水为超纯水。

样品加味左金丸(北京同仁堂制药有限公司),批号分别为 1083038、2083012、2083051。

1.2 溶液配制

对照品储备液:准确称取 9 种对照品各 10.0 mg,分别用甲醇溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,配成质量浓度均为 1.00 g/L 的各对照品储备液,于 4 ℃下保存,使用前用甲醇稀释到所需的浓度。

供试样品溶液:取加味左金丸数粒,研碎,混匀,精密称取 0.4 g 后置于具塞锥形瓶中,加 40 mL 甲醇超声 30 min,静置,放冷,以 4 000 r/min 于 -4 ℃离心 15 min 后将上层清液转移至 100 mL 容量瓶中,剩余残渣再用 40 mL 甲醇超声处理 20 min,离心后将上层清液转移至同一 100 mL 容量瓶中并用甲醇定容至刻度。经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后作为供试样品溶液。

1.3 色谱条件

采用 Agilent Zorbax RRHD Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm);以含 0.2% 甲酸的水(A)-甲醇(B)为流动相,梯度洗脱程序:0~9 min, 25% B~33% B; 9.1~15 min, 55% B; 15.1~17 min, 80% B。流速为 0.4 mL/min;进样量为 1 μL。

1.4 质谱条件

离子源为电喷雾电离源(ESI),采用正离子检测模式。干燥气:N₂,温度为 350 ℃,流速为 10 L/min;雾化气:N₂,雾化器压力为 2.8×10⁵ Pa;鞘气:N₂,温度为 360 ℃,流速为 12 L/min。毛细管电压为 4 000 V,喷嘴电压为 0 V。采用多重反应监测模式,9 种目标组分的其他质谱分析参数见表 1。

表 1 9 种组分的部分质谱分析参数

Compound	Ion pair (<i>m/z</i>)	Fragmentor/ V	Collision energy/V
Paeoniflorin	503.1→219.0	135	25
Tetrahydropalmatine	356.1→192.1	135	30
Jatrorrhizine	338.0→322.1	135	35
Berberine	336.1→320.1	135	35
Palmatine	352.1→308.1	135	33
Evodiamine	304.0→134.0	105	26
Saikosaponin C	949.4→364.9	135	92
Saikosaponin A	803.3→203.0	135	78
Saikosaponin D	803.3→203.1	135	78

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

对常用流动相甲醇-水和乙腈-水进行了考察,实验结果表明使用甲醇-水体系作流动相时灵敏度高于乙腈-水体系,色谱峰形对称,且分离效果更好。流动相中不添加甲酸时,药根碱、小檗碱和巴马汀 3 个物质色谱峰严重拖尾,未能达到基线分离,且同时发现添加的甲酸的量会影响各组分的检测灵敏度,见图 1。随着流动相中甲酸浓度的增大,延胡索乙素、药根碱、小檗碱、巴马汀、吴茱萸碱、柴胡皂苷 C 的峰强度变化不大,芍药苷和柴胡皂苷 D 的峰强度有所增强,而柴胡皂苷 A 的峰强度则有所减弱。本方法采用在流动相中加入 0.2% 甲酸的甲醇-水为流动相进行梯度洗脱。

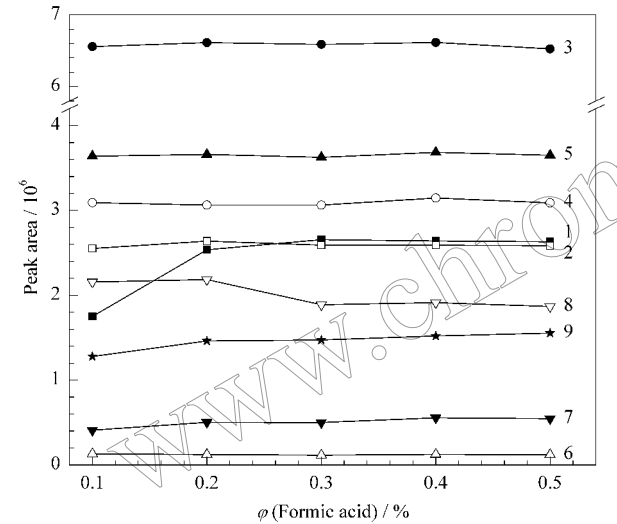


图 1 流动相中甲酸的体积分数对 9 种组分峰面积的影响
Fig. 1 Effects of the volume fraction of formic acid in mobile phase on peak areas of the nine components
1. paeoniflorin; 2. tetrahydropalmatine; 3. jatrorrhizine; 4. berberine; 5. palmatine; 6. evodiamine; 7. saikosaponin C; 8. saikosaponin A; 9. saikosaponin D.

2.2 质谱条件的优化

分别对比了正离子和负离子检测模式,发现在实验条件下采用正离子模式检测各物质的检测灵敏度较高。采用 MRM 模式,以不同的碰撞能量将待测物的准分子离子打碎,以子离子响应最强时的参数来确定碰撞能量和源内碎裂电压。

2.3 色谱与质谱行为

在选定的色谱-质谱条件下,被测组分间可获得良好的分离,色谱图见图 2。根据峰的保留时间及质谱信息进行定性,二级质谱特征离子图谱见图 3。从图 3 中可以看出芍药苷、柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 C、柴胡皂苷 D 的准分子离子峰为 $[M + Na]^+$; 延胡索乙素、吴茱萸碱的准分子离子峰为 $[M + H]^+$; 药根碱、小檗碱、巴马汀的分子离子峰为 $[M]^+$ 峰。从图 3 中选出各物质响应最强且稳定的子离子作为定量离子进行多重反应监测,各定量离子如下:芍药苷 m/z 219.0,延胡索乙素 m/z 192.1,药根碱 m/z 322.1,小檗碱 m/z 320.1,巴马汀 m/z 308.1,吴茱萸碱 m/z 134.0,柴胡皂苷 C m/z 364.9,柴胡皂苷 A m/z 203.0,柴胡皂苷 D m/z 203.1。

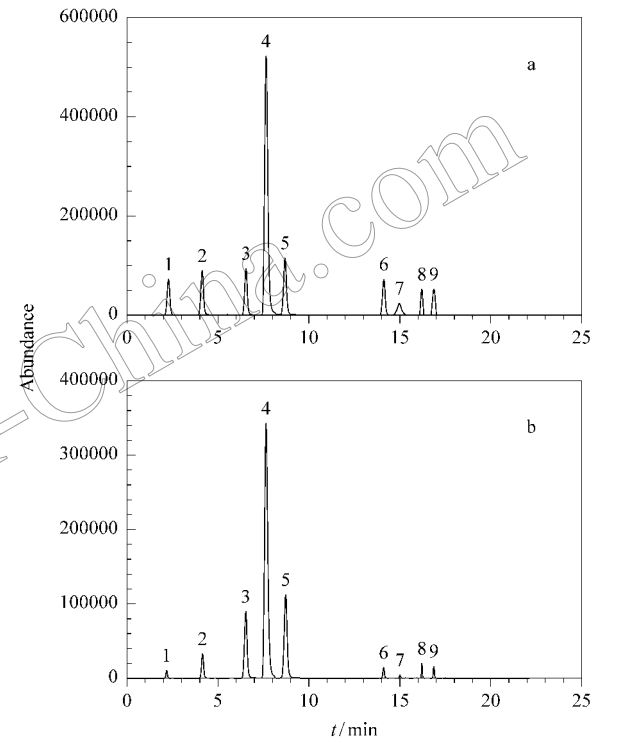


图 2 (a) 对照品和 (b) 样品的 MRM 色谱图
Fig. 2 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of (a) the nine standards and (b) a sample
Numbers denoted are the same as those in Fig. 1.
Mobile phases: A, 0.2% formic acid aqueous solution; B, methanol; gradient elution programs: 0 – 9 min, 25% B – 33% B; 9.1 – 15 min, 55% B; 15.1 – 17 min, 80% B. Flow rate: 0.4 mL/min. Injection volume: 1 μ L.

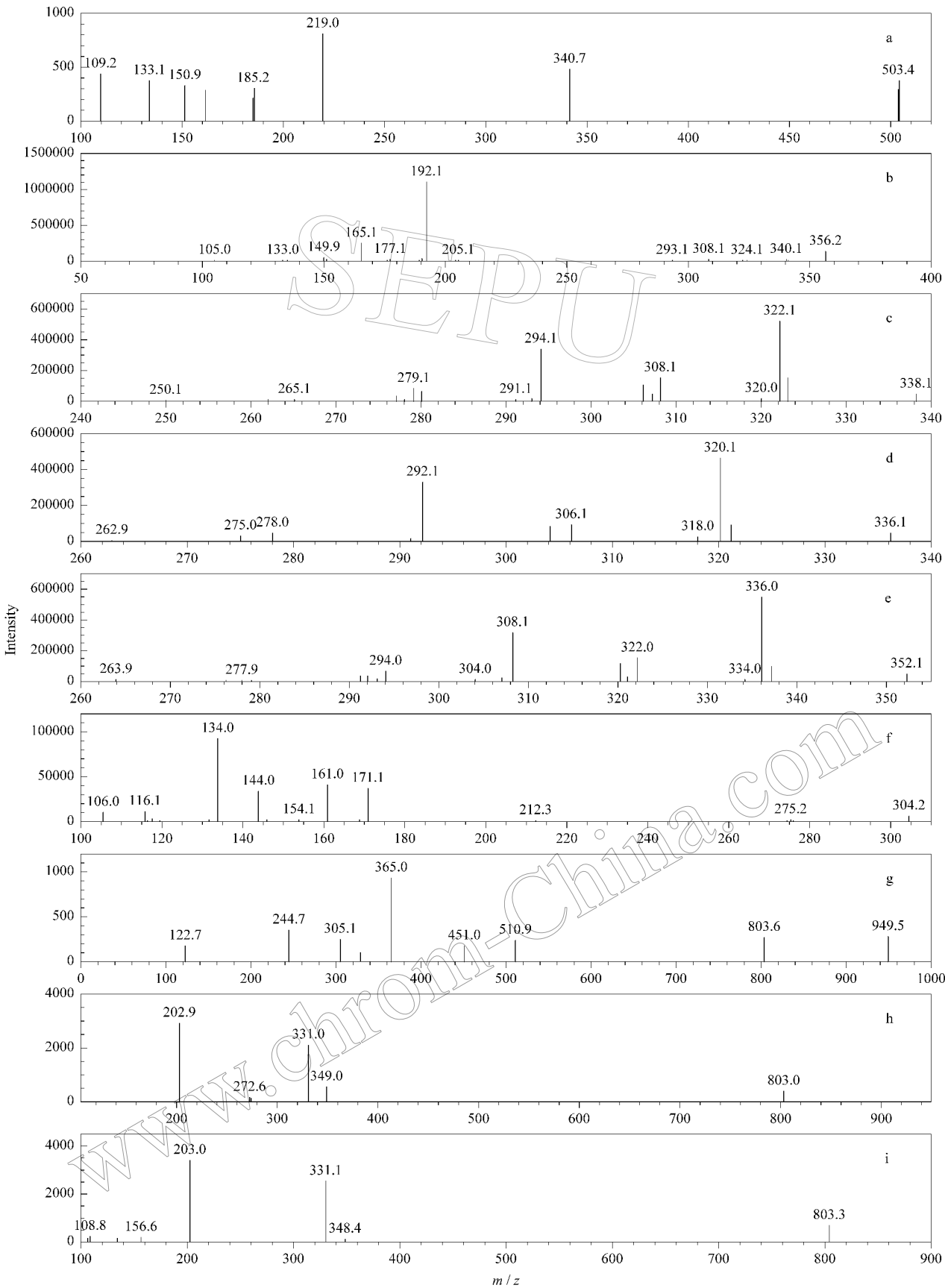


图 3 9 种标准品的二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectra of the nine standards

a. paeoniflorin; b. tetrahydropalmatine; c. jatrorrhizine; d. berberine; e. palmatine; f. evodiamine; g. saikosaponin C; h. saikosaponin A; i. saikosaponin D.

2.4 线性关系及检出限

取各对照品储备液,精确配制一系列不同质量浓度的混合标准溶液,于优化后的条件下分别进样测定,重复 3 次,以各物质特征碎片离子(定量离

子)峰面积的平均值(Y)对被测组分的质量浓度(X , mg/L)进行线性回归,得到回归方程、相关系数和线性范围;以信噪比(S/N)为 3 确定 9 种待测组分的检出限;结果见表 2。

表 2 9 种组分的线性方程、线性范围、相关系数及检出限
Table 2 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients (r^2) and detection limits of the nine compounds

Compound	Regression equation	Linear range/(mg/L)	r^2	Detection limit/($\mu\text{g/L}$)
Paeoniflorin	$Y = 23781X + 695.71$	0.025 – 5.0	0.9995	5.0
Tetrahydropalmatine	$Y = 1408139X + 22759$	0.0010 – 2.0	0.9990	0.20
Jatrorrhizine	$Y = 388958X + 28590$	0.0023 – 7.2	0.9992	0.45
Berberine	$Y = 491745X + 90037$	0.0027 – 28.9	0.9991	0.54
Palmatine	$Y = 360399X + 22725$	0.0023 – 9.1	0.9997	0.45
Evodiamine	$Y = 696282X + 3509.7$	0.0050 – 1.0	0.9992	1.0
Saikosaponin C	$Y = 8890X - 638.35$	0.050 – 10	0.9996	10
Saikosaponin A	$Y = 186093X - 717.49$	0.0050 – 1.0	0.9997	1.0
Saikosaponin D	$Y = 95618X - 931.66$	0.0075 – 1.5	0.9997	1.5

Y : peak area of the quantitative ion; X : mass concentration of the analyte, mg/L.

2.5 精密度和稳定性

取同一批次样品 6 份,按 1.2 节供试样品溶液的制备方法制备样品溶液,在优化的实验条件下测定,结果显示芍药苷、延胡索乙素、药根碱、小檗碱、巴马汀、吴茱萸碱、柴胡皂苷 C、柴胡皂苷 A 和柴胡皂苷 D 的平均含量分别为 0.153、0.020 3、0.373、2.15、0.598、0.019 1、0.097 0、0.021 4、0.040 6 mg/g,相对标准偏差(RSD)为 0.34%~1.6%,表明该方法有较好的精密度的。

取同一批次样品,按 1.2 节下供试样品溶液的方法制备样品溶液,在优化后的实验条件下,分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样测定,结果显示这 9 种组分的平均含量的 RSD 为 0.20%~2.0%,表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

2.6 加样回收率试验

精密称取已知这 9 种组分含量的同批加味左金丸样品 0.400 g 共 9 份,3 份为一组,分别加入精密称定的低、中、高 3 个质量的混合标准品。按 1.2 节下供试样品溶液的方法制备样品溶液进行测定,分别计算 9 种成分的平均回收率,结果见表 3。本方法在 3 个浓度添加水平下,9 种成分的加标回收率为 99.3%~105%,RSD 均小于或等于 2.6%,能满足加味左金丸中这 9 种有效成分的测定要求。

2.7 样品分析

分别精密称取不同批号的样品,按 1.2 节下供试样品溶液的方法制备样品溶液,按上述优化好的条件进行样品测定,把各组分峰面积代入回归方程计算得到样品中 9 种组分的含量,结果见表 4。实验结果表明,该方法可用于加味左金丸中这 9 种有

效成分含量的同时测定。

表 3 9 种组分在样品中的加标回收率($n=3$)
Table 3 Recoveries of the nine compounds in a sample ($n=3$)

Compound	Original/ (mg/L)	Added/ (mg/L)	Found/ (mg/L)	Recovery/ %	RSD/ %
Paeoniflorin	0.612	0.300	0.927	105	2.1
		0.600	1.21	99.3	1.9
		0.900	1.51	100	1.2
Tetrahydropalmatine	0.0796	0.0400	1.21	103	1.4
		0.0800	0.160	100	0.39
		0.120	0.199	99.3	0.58
Jatrorrhizine	1.49	0.900	2.45	107	0.68
		1.35	2.84	100	0.38
		2.71	4.29	103	0.44
Berberine	8.59	4.52	13.1	99.8	0.87
		9.04	17.7	101	0.30
		13.6	22.5	102	0.52
Palmatine	2.03	0.908	2.94	100	1.1
		2.27	4.40	104	0.62
		3.63	5.67	100	0.28
Evodiamine	0.0765	0.0400	0.117	101	2.6
		0.0800	0.158	102	2.0
		0.120	0.199	102	1.8
Saikosaponin C	0.388	0.200	0.587	99.7	0.60
		0.400	0.795	102	0.30
		0.600	0.989	100	0.52
Saikosaponin A	0.0854	0.0400	0.126	101	1.0
		0.0800	0.169	104	0.95
		0.120	0.210	104	1.3
Saikosaponin D	0.162	0.100	0.266	104	1.6
		0.150	0.313	101	1.2
		0.300	0.463	100	1.1

