离子淌度质谱法同时测定金芪降糖片中8种成分含量Δ

李应才[1*]，黄合珅[2]，杨　野[3]（1.昆明市食品药品检验所，昆明　650032；2.云南孚尔质量检验检测有限公司，昆明　650214；3.昆明理工大学生命科学与技术学院，昆明　650500）

中图分类号　R917　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）11-1354-04
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.11.13

摘　要　目的　建立离子淌度质谱法同时测定金芪降糖片中表小檗碱、小檗碱、黄连碱、巴马汀、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、3，5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4，5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿原酸的含量。**方法**　采用离子淌度质谱法进行检测。色谱柱为Waters ACQUITY UPLC HSS T3（2.1 mm×50 mm，1.8 μm），流动相为0.1%甲酸溶液-乙腈（梯度洗脱），流速为0.3 mL/min，柱温为40 ℃，进样量为5 μL。采用电喷雾离子源，在正、负离子模式下进行扫描检测，并根据各成分峰响应设置离子淌度参数，对金芪降糖片中8种成分进行含量测定。**结果**　8种成分在各自范围内线性关系良好（r≥0.999）；精密度、重复性、稳定性（24 h）试验的RSD均未超过4.0%；平均加样回收率为94.6%～101.2%，RSD为2.6%～3.9%（n=9）。3批金芪降糖片中上述8种成分的含量分别为3.060～3.545、24.50～26.74、2.795～4.149、1.437～2.501、0.204～0.242、0.950～1.281、2.272～2.828、7.314～7.960 mg/g。**结论**　所建方法灵敏度高、重复性好，可为该制剂的质量控制提供参考。

关键词　离子淌度质谱法；金芪降糖片；活性成分；含量测定

Simultaneous determination of 8 components in Jinqi jiangtang tablets by ion mobility mass spectrometry method

LI Yingcai[1], HUANG Hecheng[2], YANG Ye[3]（1. Kunming Institute of Food and Drug Control, Kunming 650032, China; 2. Yunnan Fair Quality Inspection Co., Ltd., Kunming 650214, China; 3. School of Life Sciences and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To establish the ion mobility mass spectrometry method for simultaneous determination of epiberberine, berberine, coptisine, palmatine, calycosin-7-glucoside, 3,5-*O*-dicaffeoylquinic acid, 4,5-*O*-dicaffeoylquinic acid and chlorogenic acid in Jinqi jiangtang tablets. **METHODS** Ion mobility mass spectrometry method was used. The determination was performed on Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm) with mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 5 μL. The contents of 8 components in Jinqi jiangtang tablets were determined by scanning detection under positive and negative ion modes with an electric spray ion source, and setting ion mobility mass parameters according to the peak response of each component. **RESULTS** The results showed that the linear relationship of the eight components was good within their respective ranges (r≥0.999); RSDs of precision, repeatability and stability (24 h) tests were not more than 4.0%; average recoveries were 94.6%-101.2%, RSDs were 2.6%-3.9% (n=9). The contents of the above eight components in three batches of Jinqi jiangtang tablets were 3.060-3.545, 24.50-26.74, 2.795-4.149, 1.437-2.501, 0.204-0.242, 0.950-1.281, 2.272-2.828, 7.314-7.960 mg/g, respectively. **CONCLUSIONS** The established method has high sensitivity and good reproducibility, and can provide reference for the quality control of the preparation.

KEYWORDS　ion mobility mass spectrometry method; Jinqi jiangtang tablets; active ingredient; content determination

金芪降糖片是由黄连、黄芪、金银花3味中药组成的复方制剂，临床广泛用于治疗轻、中型2型糖尿病。金芪降糖片收载于2020年版《中国药典》（一部），但其仅对黄连活性成分小檗碱进行了含量测定，未对黄芪和金银花的活性成分进行控制[1]，难以全面评价药品质量。相关研究虽然对方中兰花碱、表小檗碱、黄连碱、药根碱、巴马汀、小檗碱、绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、木犀草苷等成分采用高效液相色谱法进行了含量测定，但该方法所测成分未能同时涵盖方中3味中药，且分析时间较长[2-5]，难于全面评价制剂质量。因此，本研究以2020年版《中国药典》（一部）中黄连、黄芪、金银花标准项下所测指标成分为依据，选取黄连中的表小檗碱、小檗碱、黄连碱、巴马汀，黄芪中的毛蕊异黄酮葡萄糖苷，金银花中的3，5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4，5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿

Δ **基金项目**　云南省青年拔尖人才专项（No. YNWR-QNBJ-2019-124）

＊**第一作者**　副主任药师。研究方向：药品质量检验。电话：0871-68411662。E-mail：981042112@qq.com

原酸共8种成分同时进行检测，更加全面评价金芪降糖片的质量。

上述8种成分中，小檗碱与表小檗碱、3，5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸与4，5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸均为同分异构体，具有相同的质谱离子信息，当采用普通液相色谱质谱联用法时，仅能根据保留时间进行定性分析，无法反映出相关成分的含量。离子淌度质谱法是一种将离子淌度分离与质谱分析相结合的新型分析技术，其在质谱分析前提供了基于气相离子形状、大小、电荷数等因素的多维度分离，即使同分异构体的保留时间完全一致，也能因淌度参数（分离电压、补偿电压）的不同而实现定性定量测定[6—7]。基于此，本研究采用离子淌度质谱法同时测定金芪降糖片中上述8种成分的含量，以期为该制剂的质量控制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有5500+ QTRAP型离子淌度液相色谱质谱联用仪（美国AB SCIEX公司）、LC-40型超快速液相色谱仪（日本Shimadzu公司）、MS 105 DU型十万分之一电子分析天平[梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司]、Arium comfort Ⅱ型超纯水仪（德国Sartorius公司）、RK 255型超声波清洗器（德国Bandelin公司）。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用对照品盐酸小檗碱（批号110713-201814，纯度86.7%）、盐酸黄连碱（批号112026-201601，纯度95.1%）、盐酸巴马汀（批号110732-201913，纯度85.7%）、毛蕊异黄酮葡萄糖苷（批号111920-201606，纯度97.6%）、绿原酸（批号110753-202119，纯度96.3%）、3，5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸（批号111782-201807，纯度94.3%）、4，5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸（批号11894-202104，纯度95.1%）均购自中国食品药品检定研究院；表小檗碱（批号B20108，纯度98%）购自上海源叶生物科技有限公司；甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯，购自美国Thermo Fisher Scientific公司；3批金芪降糖片均购自天津中新药业集团股份有限公司，批准文号为国药准字Z10920027，批号分别为870179、870147、870045。

2 方法与结果

2.1 离子淌度质谱法条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱为Waters ACQUITY UPLC HSS T3（2.1 mm×50 mm，1.8 μm）；流动相为0.1%甲酸溶液（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0～1.0 min，5%B；1.0～3.0 min，5%B→95%B；3.0～5.0 min，95%B；5.0～5.1 min，95%B→5%B；5.1～7.0 min，5%B）；流速为0.3 mL/min；柱温为40 ℃；进样量为5 μL。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源（ESI），在正、负离子模式下进行扫描检测，辅助加热温度为450 ℃；喷雾电压为4.5 kV；辅助气1为55 psi，辅助气2为55 psi；气帘气为20 psi；锥孔电压、碰撞能量等参数见表1。

表1 各成分离子淌度质谱法的相关参数

成分	保留时间/min	母离子*m/z*	子离子*m/z*	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	电离模式	淌度分离电压/V	淌度补偿电压/V
表小檗碱	2.82	337.2[M+H]$^+$	*321.1[M+H-CH_4]$^+$	85	30	+	3 400	−3.20
			293.4[M+H-C_3H_8]$^+$	85	40			
小檗碱	2.91	337.2[M+H]$^+$	*321.1[M+H-CH_4]$^+$	85	30	+	3 400	−1.50
			293.4[M+H-C_3H_8]$^+$	85	40			
黄连碱	2.83	321.1[M+H]$^+$	*293.2[M+H-C_2H_4]$^+$	35	39	+	3 300	−4.50
			278.3[M+H-C_3H_7]$^+$	50	46			
巴马汀	2.88	353.3[M+H]$^+$	*337.1[M+H-CH_4]$^+$	33	37	+	3 300	−0.78
			309.3[M+H-C_3H_8]$^+$	33	40			
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	2.69	447.4[M+H]$^+$	*285.1[M+H-$C_9H_8O_3$]$^+$	87	24	+	3 300	−9.02
			253.2[M+H-$C_7H_{14}O_6$]$^+$	80	57			
3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸	2.76	515.2[M-H]$^-$	*353.1[M-H-$C_9H_8O_3$]$^-$	−80	−25	−	3 300	−0.46
			191.1[M-H-$C_{18}H_{12}O_6$]$^-$	−80	−40			
4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸	2.76	515.2[M-H]$^-$	*353.1[M-H-$C_9H_8O_3$]$^-$	−80	−25	−	3 300	−3.45
			191.1[M-H-$C_{18}H_{12}O_6$]$^-$	−80	−40			
绿原酸	2.54	353.2[M-H]$^-$	*191.1[M-H-$C_9H_8O_3$]$^-$	−80	−25	−	3 400	−13.79
			162.2[M-H-$C_7H_{12}O_6$]$^-$	−80	−5			

*：定量离子

2.1.3 离子淌度条件 修饰剂为异丙醇，淌度池温度为125 ℃，修饰剂气流速度为3.0 μL/min，增强分辨率为1.0 L/min，淌度分离电压、补偿电压等参数见表1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取表小檗碱、盐酸小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸巴马汀、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、3，5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4，5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿原酸对照品各适量，分别置于10 mL容量瓶中，以甲醇定容，摇匀，制成上述成分质量浓度分别为0.106、0.134、0.134、0.149、0.128、0.142、0.128、0.155 mg/mL的单一对照品溶液。分别精密量取上述单一对照品溶液各适量，置同一10 mL容量瓶中，加入50%甲醇溶液定容，摇匀，即得上述成分质量浓度分别为10.6、13.4、13.4、14.9、12.8、14.2、12.8、15.5 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取金芪降糖片，除去包衣，充分研磨，取粉末约10.0 mg，精密称定，置于50 mL容量瓶中，用50%甲醇溶液定容，超声溶解（频率33 kHz，功率250 W）60 min；放置冷却，摇匀，以0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下各单一对照品溶液和供试品溶液适量，按“2.1”项下条件进样测定，记录色谱图。结果显示，两种溶液中8种成分的色谱峰均响应强，峰形对称尖锐，分离良好。结果见图1。

2.4 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量，以50%甲醇溶液逐级稀释成系列浓度的混合对照品溶液，其中表小檗碱质量浓度分别为33.08、132.3、264.6、529.2、1 058、2 117 ng/mL，小檗碱质量浓度分别为168.0、336.0、

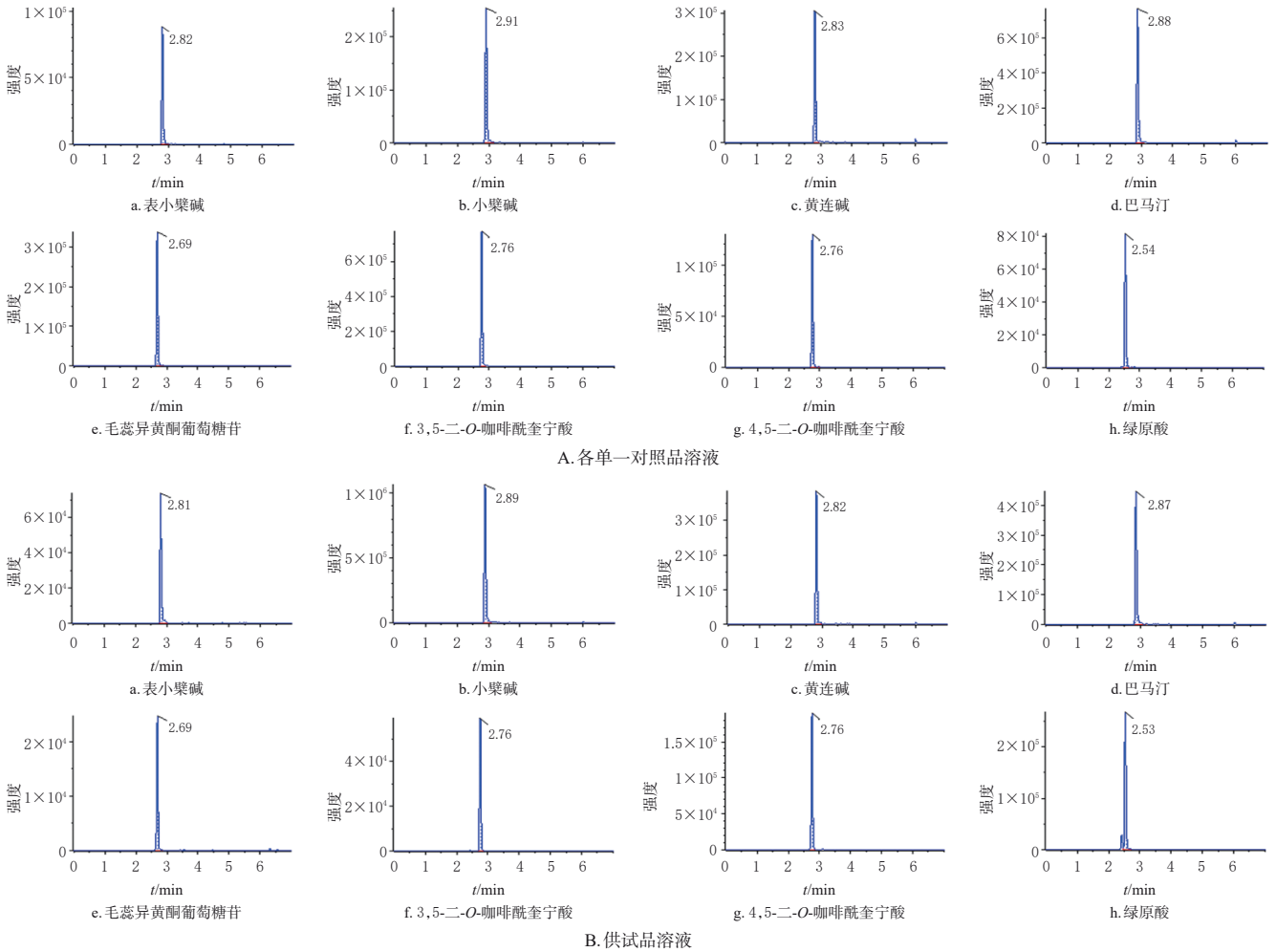


图1　系统适用性试验结果

672.0、1 344、2 688、8 064 ng/mL，黄连碱质量浓度分别为83.81、167.62、335.2、670.5、1 341、2 682 ng/mL，巴马汀质量浓度分别为93.25、186.5、373.0、746.0、1 492、2 984 ng/mL，毛蕊异黄酮葡萄糖苷质量浓度分别为2.497、9.988、19.97、39.95、79.90、159.8 ng/mL，3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸质量浓度分别为22.25、44.50、89.00、178.0、356.0、712.0 ng/mL，4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸质量浓度分别为40.00、80.00、160.0、320.0、640.0、1 280 ng/mL，绿原酸质量浓度分别为96.87、193.7、387.5、775.0、1 550、3 100 ng/mL，再按“2.1”项下条件进样测定，记录峰面积。以对照品定量离子峰面积（*Y*）对质量浓度（*X*）进行线性回归，结果见表2。

表2　线性关系考察结果

成分	回归方程	*r*	线性范围/(ng/mL)
表小檗碱	*Y*=345.6*X*+24 236	0.999 4	33.08～2 117
小檗碱	*Y*=541.7*X*+230 736	0.999 2	168.0～8 064
黄连碱	*Y*=716.4*X*+154 007	0.999 2	83.81～2 682
巴马汀	*Y*=1 798.8*X*+705 566	0.999 0	93.25～2 984
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	*Y*=833.9*X*+6 159	0.999 3	2.497～159.8
3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸	*Y*=567.3*X*+1 470	0.999 6	22.25～712.0
4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸	*Y*=427.0*X*+3 749	0.999 4	40.00～1 280
绿原酸	*Y*=525.8*X*+28 493	0.999 4	96.87～3 100

2.5　精密度试验

取同一混合对照品溶液，按“2.1”项下条件进样测定6次，记录峰面积。结果显示，表小檗碱、小檗碱、黄连碱、巴马汀、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿原酸峰面积的RSD分别为2.9%、1.6%、2.2%、2.5%、2.4%、2.1%、2.3%、2.4%（*n*=6），表明仪器精密度良好。

2.6　重复性试验

取金芪降糖片（批号870045）6份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”项下条件分别进样测定，记录峰面积，并采用外标法计算各成分含量。结果显示，表小檗碱、小檗碱、黄连碱、巴马汀、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿原酸含量的RSD分别为2.6%、1.8%、2.5%、2.4%、3.6%、3.3%、2.5%、2.4%（*n*=6），表明该方法重复性良好。

2.7　稳定性试验

取金芪降糖片（批号870045），按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，然后于室温放置0、2、4、8、12、24 h后，按“2.1”项下条件分别进样测定，记录峰面积。结果显示，

表小檗碱、小檗碱、黄连碱、巴马汀、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿原酸峰面积的RSD分别为3.3%、2.6%、3.9%、3.3%、3.7%、3.6%、2.9%、3.5%（n=6），表明供试品溶液在室温放置24 h内稳定。

2.8 加样回收率试验

取已知各成分含量的金芪降糖片（批号870045）粉末9份，每份约5.0 mg，精密称定；按对照品加入量与供试品中待测成分含量之比为1.5∶1、1∶1、0.5∶1精密加入相应对照品，再按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液各3份，按“2.1”项下条件分别进样测定，计算加样回收率。结果显示，表小檗碱、小檗碱、黄连碱、巴马汀、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿原酸的平均加样回收率分别为99.4%、101.2%、97.5%、97.8%、94.6%、95.7%、98.6%、97.2%，RSD分别为3.3%、2.6%、3.9%、3.1%、3.7%、3.9%、3.5%、3.0%（n=9）。

2.9 样品含量测定

取3批金芪降糖片样品粉末，每批3份，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，再按“2.1”项下条件进样测定，记录峰面积并按外标法计算样品含量，结果见表3。

表3 各成分的含量测定结果（mg/g，n=3）

批次	表小檗碱	小檗碱	黄连碱	巴马汀	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸	4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸	绿原酸
870179	3.060	25.32	2.795	2.194	0.242	0.950	2.272	7.314
870147	3.545	26.74	4.076	2.501	0.204	1.281	2.828	7.960
870045	3.335	24.50	4.149	1.437	0.211	1.195	2.552	7.678

3 讨论

3.1 离子淌度参数的优化

本研究综合考虑各成分的峰响应及同分异构体的淌度分离情况，优化了淌度池温度、修饰剂气流速度、增强分辨率参数，从而达到8种成分分离检测的目的。笔者优化淌度池温度时发现，随着温度升高，8种成分的峰响应均下降，当温度为300 ℃时，表小檗碱无峰响应；当温度为150 ℃时，各成分峰响应最好。优化修饰剂气流速度时发现，当选择0 μL/min时，表小檗碱、绿原酸无峰响应；当选择1.5 μL/min时，同分异构体3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸的峰无法分开；当选择3.0 μL/min时，各成分峰均能较好地响应，且两组同分异构体均能分开。优化增强分辨率时发现，当选择0 L/min时，各成分峰响应最强，但同分异构体3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸的峰无法分开；当选择1.5 L/min时，各成分峰响应均降低，其中绿原酸无峰响应。综合各成分的峰响应情况及两对同分异构体的分离情况，故选择1.0 L/min。

3.2 提取溶剂和时间的选择

本研究比较了超声提取的溶剂和时间，当提取溶剂为20%甲醇时，3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸与4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸的提取效率低，无峰响应；当提取溶剂为100%甲醇时，黄连碱、巴马汀和绿原酸的峰响应偏低；当提取溶剂为50%甲醇时，各成分峰形较好，峰响应较强，故选择50%甲醇作为提取溶剂。当超声时间小于40 min时，各成分不能完全提取出来；当超声时间为60、70 min时，各成分的含量差异较小，故选择超声提取时间为60 min。

3.3 样品含量测定的结果分析

本研究结果显示，3批金芪降糖片中表小檗碱、小檗碱、黄连碱、巴马汀、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、3,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、4,5-二-*O*-咖啡酰奎宁酸、绿原酸的含量分别为3.060～3.545、24.50～26.74、2.795～4.149、1.437～2.501、0.204～0.242、0.950～1.281、2.272～2.828、7.314～7.960 mg/g。其中，黄连碱、巴马汀的含量测定结果差异较大，这可能是由药材加工储存、制剂工艺差异、药材产地不同等原因造成的，后续可对此作进一步研究。

综上，本研究建立了同时测定金芪降糖片中8种成分含量的离子淌度质谱法，该方法灵敏度高、重复性好，可为金芪降糖片的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：60-65.

[2] 丁菲菲，邓雁如，张晓静，等. HPLC-ELSD法同时测定黄芪及金芪降糖片中5种皂苷类成分的含量[J]. 中药材，2015，38(1)：156-159.

[3] 马恒，陈靓，陈勇. HPLC同时测定金芪降糖片中小檗碱及绿原酸的含量[J]. 湖北大学学报（自然科学版），2016，38(4)：294-297.

[4] 于静，邓雁如，陈奇，等. HPLC测定金银花及金芪降糖片中6种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17(19)：57-60.

[5] 宁娜，周晶，刘芳，等. RP-HPLC同时测定黄连及金芪降糖片中3种小檗型生物碱[J]. 中成药，2009，31(4)：551-554.

[6] 王玉娜，孟宪双，刘丽娟，等. 离子淌度质谱技术及其应用研究进展[J]. 分析测试学报，2018，37(10)：1130-1138.

[7] 连显会，王春，孟宪双，等. 超高效液相色谱-差分离子淌度质谱法测定化妆品中10种卡因类禁用组分[J]. 分析化学，2019，47(5)：756-764.

（收稿日期：2023-01-16 修回日期：2023-04-23）

（编辑：唐晓莲）