中图分类号：R932；R284.1；R286.0　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2023)13－0068－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2023.13.015

超高效液相色谱串联质谱法同时测定养阴清肺合剂中3种成分含量*

李应才[1]，黄合琤[1]，马文思[1]，杨　野[2]

（1. 云南省昆明市食品药品检验所，云南 昆明　650032；　2. 昆明理工大学，云南 昆明　650500）

摘要：目的　建立同时测定养阴清肺合剂中活性成分地黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷含量的超高效液相色谱串联质谱（UPLC－MS/MS）法。**方法**　色谱柱为Agilent Poroshell 120 EC C_{18}柱（50 mm×2.1 mm，1.7 μm），流动相为含0.1%甲酸溶液的5 mmoL/L乙酸铵－甲醇（梯度洗脱），流速为0.2 mL/min，柱温为35 ℃，进样量为5 μL；采用电喷雾离子源（ESI），正负离子模式扫描，多反应监测（MRM）。**结果**　地黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷质量浓度分别在23.79～465.60 ng/mL，24.69～948.15 ng/mL，24.07～426.39 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好（r=0.999 4，0.999 6，0.999 1，n=6）；精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于3.0%；平均加样回收率分别为94.40%，104.82%，96.23%，*RSD*分别为2.84%，2.19%，1.08%（n=9）。**结论**　所建立的方法操作简便、分析速度快、重复性好、准确度高，可用于养阴清肺合剂中3种活性成分的含量测定。

关键词：超高效液相色谱串联质谱法；养阴清肺合剂；地黄苷D；哈巴苷；哈巴俄苷；含量测定

Simultaneous Determination of Three Components in Yangyin Qingfei Mixture by UPLC－MS/MS

LI Yingcai[1], *HUANG Hecheng*[1], *MA Wensi*[1], *YANG Ye*[2]

(1. Kunming Institute of Food and Drug Control, Kunming, Yunnan, China　650032;　2. Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan, China　650500)

Abstract: Objective　To establish an ultra－high performance liquid chromatography－tandem mass spectrometry (UPLC－MS/MS) method for the simultaneous determination of three active components (rehmanin D, harpagoside, and harpagos) in Yangyin Qingfei Mixture. **Methods**　The chromatographic column was Agilent Poroshell 120 EC C_{18} column (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 5 mmoL/L ammonium acetate containing 0.1% formic acid solution－methanol (gradient elution), the flow rate was 0.2 mL/min, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 5 μL. Electrospray ionization (ESI) source was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode by using positive and negative electrospray ionization. **Results**　The linear ranges of rehmanin D, harpagoside, and harpagos were 23.79－465.60 ng/mL, 24.69－948.15 ng/mL, and 24.07－426.39 ng/mL (r=0.999 4, 0.999 6, 0.999 1, n=6), respectively. The *RSD*s of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 3.0% (n=6). The average recoveries of rehmanin D, harpagoside, and harpagos were 94.40%, 104.82%, and 96.23% with *RSD*s of 2.84%, 2.19%, and 1.08% (n=9), respectively. **Conclusion**　The established method is simple, rapid, and reproducible with high accuracy, which can be used for the content determination of three active components in Yangyin Qingfei Mixture.

Key words: UPLC－MS/MS; Yangyin Qingfei Mixture; rehmanin D; harpagoside; harpagos; content determination

养阴清肺合剂由地黄、麦冬、玄参、川贝母、牡丹皮等8味中药组方，具有养阴润燥、清肺利咽等功效，用于治疗阴虚肺燥、咽喉干痛、干咳少痰或痰中带血[1]。地黄的主要化学成分包括梓醇、地黄苷D和地黄苷A，具有降血糖和调节免疫活性作用[2－4]。玄参中主要含有哈巴苷和哈巴俄苷环烯醚萜苷类化合物，具有降血压、镇痛、解痉、抗乙肝病毒、增强免疫等作用[5－9]。但现行标准中仅载有薄层鉴别，未对各有效成分进行含量测定[1]，尚不能全面反映药品质量。已有研究采用高效液相色谱法单独测定各药材中的相关成分[10－17]。《中药新药质量标准研究技术指导原则（试行）》中明确提出，复方制剂鼓励建立多个含量测定指标，并规定含量范围[18]。超高效液相色谱串联质谱（UPLC－MS/MS）法同时具备超快速液相色谱分离和高灵敏度质谱检测功能，能实现目标物快速、准确定性定量研究[19－23]。本研究中建立了同时测定养阴清肺合剂中地黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷3种活性成分含量的UPLC－MS/MS法，为其质量标准的提升提供参考。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

5500＋QTRAP型质谱仪（AB SCIEX公司）；LC－40型超快速液相色谱仪（日本岛津公司）；AL104型电子分

*基金项目：云南省科技厅云南省青年拔尖人才专项［YNWR－QNBJ－2019－124］。

第一作者：李应才，男，大学本科，副主任药师，研究方向为药品质量检验，（电话）0871－68411662（电子信箱）981042112@qq.com。

析天平(梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司,精度为万分之一);Arium comfort Ⅱ型超纯水仪(Sartorius公司);SONOREXRK 255型超声波清洗器(德国Bandelin公司,功率为250 W,频率为33 kHz)。

1.2 试药

地黄苷D对照品(批号112063-202103,纯度94.2%),哈巴苷对照品(批号111729-201707,纯度96.8%),哈巴俄苷对照品(批号111730-202110,纯度96.8%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(Thermo Fisher公司,色谱纯);养阴清肺合剂(广州白云山潘高寿药业股份有限公司,批号分别为2203008,2111029A,2203003)。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Poroshell 120 EC C_{18}柱(50 mm×2.1 mm,1.7 μm);流动相:含0.1%甲酸溶液的5 mmoL/L乙酸铵(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~1.00 min时95%A,2.00~5.00 min时5%A,5.10~6.00 min时95%A);流速:0.2 mL/min;柱温:35 ℃;进样量:5 μL。

2.1.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源;离子源温度:550 ℃;监测模式:正负离子模式;离子源电压:4.5 kV;喷雾气(Gas_1):50 Psi;辅助加热气(Gas_2):50 Psi;气帘气:20 Psi;监测模式:多反应监测(MRM)。地黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷的质谱参数见表1。

表1 各成分质谱参数

Tab. 1 MS parameters for each component

成分	质荷比(m/z)		去簇电压	碰撞能量
	母离子	子离子	(V)	(eV)
地黄苷D	709.3	365.1*,203.1	198	50.0,47.0
哈巴苷	363.2	182.8*,200.9	-93	-21.0,-19.0
哈巴俄苷	517.3	369.1*,203.2	215	29.0,37.0

注:*为定量离子。

Note:* refers to the quantitative ion.

2.2 溶液制备

对照品溶液:取地黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷对照品各适量,精密称定,分别置10 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,摇匀,即得地黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷质量浓度分别为117.75,120.03,106.45 μg/mL的对照品溶液。分别精密量取上述对照品溶液各适量,置同一10 mL容量瓶中,加40%甲醇定容,摇匀,即得黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷质量浓度分别为1.177 5,1.200 3,1.064 5 μg/mL的混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品0.20 mL,置50 mL容量瓶中,加40%甲醇适量,超声处理(功率为250 W,频率为33 kHz)30 min,放冷,加40%甲醇定容,摇匀,0.22 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按处方[1],取除地黄外的其他7味药材作为阴性样品1,取除玄参外的其他7味药材作为阴性样品2,分别加水煎煮2 h,放冷,滤过,加水定容至500 mL,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液,按2.1项下试验条件分别进样测定,采用MRM模式对目标离子进行监测,能有效排除基质干扰。供试品溶液和对照品溶液色谱中,各成分峰保留时间一致,峰形良好,且杂质及阴性样品对检测无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,用40%甲醇逐级稀释成系列质量浓度的对照品混合溶液,按2.1项下试验条件测定,以各成分质量浓度(X,ng/mL)为横坐标、定量离子对峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表2。

表2 各成分线性关系考察结果($n=6$)

Tab. 2 Results of the linear relation test of each component ($n=6$)

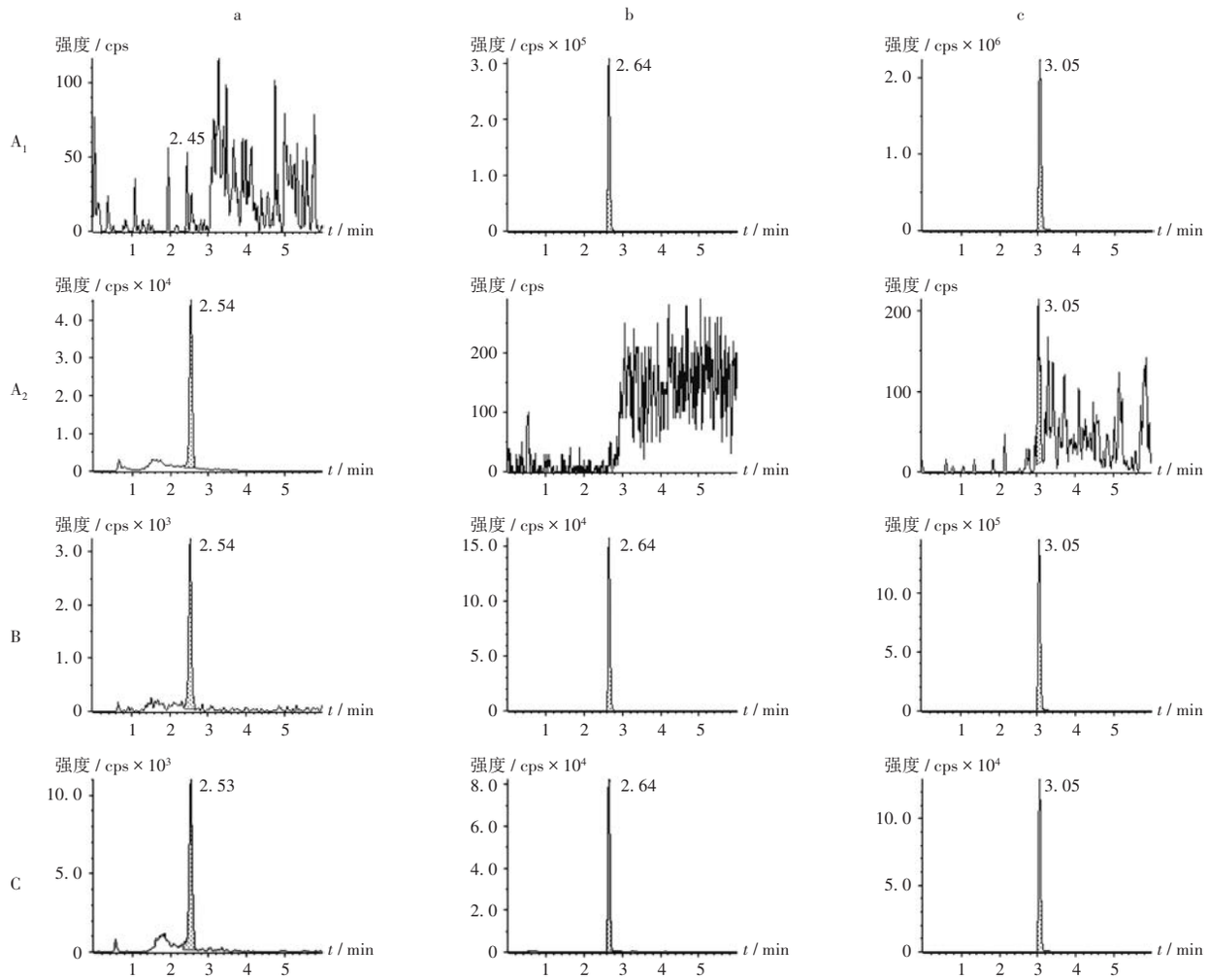
成分	回归方程	r	线性范围(ng/mL)
地黄苷D	$Y=475.33X+2\,962.46$	0.999 4	23.79~465.60
哈巴苷	$Y=1\,454.99X+8\,666.10$	0.999 6	24.69~948.15
哈巴俄苷	$Y=14\,779.75X+101\,431.00$	0.999 1	24.07~426.39

定量限与检测限确定:精密吸取2.2项下混合对照品溶液,用40%甲醇逐级稀释,按2.1项下试验条件测定。分别以信噪比(S/N)为10和3时的质量浓度为定量限和检测限。结果地黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷的定量限分别为2.32,1.00,0.06 ng/mL,检测限分别为0.70,0.30,0.02 ng/mL。

精密度试验:取线性关系考察项下地黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷质量浓度分别为235.45,240.61,212.92 ng/mL的混合对照品溶液,按2.1项下试验条件连续进样测定6次。结果地黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷峰面积的RSD分别为0.61%,1.01%,1.22%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为2203008),依法制备供试品溶液,在室温下分别于0,2,4,6,8,12,24 h时按2.1项下试验条件进样测定。结果地黄苷D、哈巴苷、哈巴俄苷峰面积的RSD分别为1.86%,0.47%,2.15%($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置24 h稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为2203008)6份,每份0.20 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,计算待测成分的含量。结果地黄苷D、



a. 地黄苷D b. 哈巴苷 c. 哈巴俄苷

A_1, A_2. 阴性对照品溶液(分别缺地黄、玄参) B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 MRM色谱图

a. Rehmanin D b. Harpagoside c. Harpagos

A_1, A_2. Negative reference solution (lacking Rehmanniae Radix and Scrophulariae Radix, respectively) B. Reference solution C. Test solution

Fig. 1 MRM chromatograms

哈巴苷、哈巴俄苷含量的*RSD*分别为1.30%, 0.62%, 0.97%(n = 6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为2203008)9份,每份0.20 mL,精密加入低、中、高质量浓度的混合对照品溶液,依法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,计算加样回收率。结果见表3。

表3 加样回收试验结果(n = 9)

Tab. 3 Results of the recovery test (n = 9)

成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
地黄苷D	6.798	2.355	9.051	95.67		
	6.798	4.710	11.330	96.22	94.40	2.84
	6.798	7.065	13.250	91.32		
哈巴苷	11.450	6.001	17.620	102.81		
	11.450	12.000	23.970	104.33	104.82	2.19
	11.450	18.000	30.770	107.33		
哈巴俄苷	5.316	2.128	7.340	95.11		
	5.316	4.257	9.420	96.41	96.23	1.08
	5.316	6.384	11.520	97.18		

2.4 样品含量测定

取3批样品(批号分别为2203008, 2111029A, 2203003),按2.2项下方法制备供试品溶液,取样0.20 mL,按2.1项下试验条件进样测定2次,代入回归方程计算待测成分的含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 流动相优化

本研究中采用正负离子模式扫描,故优化了流动相,选择含0.1%甲酸溶液的5 mmoL/L乙酸铵作为水相,甲醇作为有机相,梯度洗脱分离,分离效果良好。

3.2 质谱条件优化

负离子模式下,哈巴苷主要形成m/z 363.2$[M-H]^-$

表 4 各成分含量测定结果（μg / mL，n = 2）

Tab. 4 Results of the content determination of each component in samples (μg / mL, n = 2)

样品批号	地黄苷 D	哈巴苷	哈巴俄苷
2203008	31. 04	52. 31	24. 23
2111029A	22. 82	33. 64	20. 93
2203003	36. 10	90. 24	28. 95

准分子离子，哈巴俄苷主要形成 m/z 493. 3[M - H]$^-$ 准分子离子；正离子模式下，哈巴苷主要形成 m/z 387. 2[M + Na]$^+$ 准分子离子，哈巴俄苷主要形成 m/z 517. 2[M + Na]$^+$ 准分子离子。哈巴苷负离子模式下的响应值更高，哈巴俄苷正离子模式下的响应值更高，地黄苷 D 正离子模式下能形成稳定的离子。综合考虑，选择正负离子扫描模式。

3. 3 提取溶剂、超声提取时间选择

比较不同体积分数甲醇（10%，20%，30%，40%，50%，60%，80%，100%）对提取效果的影响，甲醇为提取溶剂时，地黄苷 D 出现双峰，考虑为纯甲醇造成的溶剂效应；甲醇体积分数低于 30% 时，哈巴俄苷易形成肩峰；甲醇体积分数为 40% 时，各化合物峰形较好，响应较高。故选择 40% 甲醇作为提取溶剂。比较不同超声提取时间（15，20，30，40，60 min）对提取效果的影响，超声处理 20 min 时，待测成分不能提取完全；超声 30，40，60 min 时，待测成分的含量差异较小。故选择超声提取时间为 30 min。

3. 4 样品含量测定

玄参中哈巴苷含量是评价药品的重要指标。对同一厂家不同批号的 3 批次样品进行检测，结果哈巴苷的含量差异较大（33. 6 ~ 90. 2 μg / mL），可能是由于工艺原因或药材质量问题导致哈巴苷的含量差异，需进一步研究。

3. 5 方法评价

本研究中建立的方法灵敏度高、重复性好、分析时间短、取样量小，可为养阴清肺合剂的质量控制提供参考。

参考文献

[1] WS_3 - B - 3896 - 98，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].

[2] 王 敏，刘欢欢，张 婷，等. 基于化学特征和核心功效的经典名方清胃散中地黄炮制品研究[J]. 中草药，2022，53（13）：3940 - 3952.

[3] 孔媛芳，杨 彬，胡玉龙，等. 环烯醚萜类化合物的结构及构效关系研究进展[J]. 天然产物研究与开发，2021，33（7）：1236 - 1250.

[4] 张振凌，吴若男，于文娜，等. 生地黄产地加工炮制一体化工艺研究[J]. 中草药，2018，49（20）：4767 - 4772.

[5] 许洪波，高春晖，蔡兴航，等. 玄参饮片标准汤剂制备及质量标准研究[J]. 中国中药杂志，2019，44（12）：2493 - 2498.

[6] 蒋丽娟，刘 慧，姜艳艳，等. 玄参中哈巴苷的制备方法研究[J]. 中国现代应用药学，2018，35（4）：514 - 518.

[7] 李 媛，宋宝安，杨 松，等. 中草药玄参化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发，2012，24：47 - 51.

[8] 李翎熙，陈迪路，周小江. 玄参化学成分、药理活性研究进展及其质量标志物分析预测[J]. 中成药，2020，42（9）：2417 - 2426.

[9] 杨 帆，蒋丽娟，陈晓鹤，等. 玄参对照提取物研究及其在玄参药材质量控制中的应用[J]. 中国中药杂志，2021，46（9）：2207 - 2214.

[10] 王 悦，周 巧，张学兰，等. HPLC 法同时测定地黄及不同炮制品中 8 种成分的含量[J]. 中药材，2022，44（1）：64 - 68.

[11] 刘 炯，张 杰，张华锋，等. HPLC 测定不同品种怀地黄中地黄苷 A、D 的含量[J]. 药物分析杂志，2014，34（2）：335 - 339.

[12] 岳 超，高 杰，石上梅，等. HPLC 测定地黄炮制前后 3 种苷类物质的含量[J]. 中国实验方剂学杂志，2015，21（4）：71 - 74.

[13] 张留记，王建霞，屠万倩，等. 生地黄与熟地黄中 5 个苷类成分和总多糖的含量比较[J]. 天然产物研究与开发，2019，31：566 - 571.

[14] 江建丽. 高效液相色谱多波长法同时测定中风合剂中梓醇、哈巴苷、绿原酸和芍药苷含量[J]. 中国药业，2019，28（15）：23 - 25.

[15] 张勇纯，刘彦玲，王铭爽，等. 基于内在成分含量差异辨别玄参药材品质优劣可行性研究[J]. 中草药，2022，53（2）：544 - 556.

[16] 向采芹，李 希，冯建安，等. HPLC 双波长切换同时测定玄参药材中哈巴苷和哈巴俄苷的含量[J]. 中药与临床，2017，8（6）：10 - 12.

[17] 任 丹，齐方圆，黄紫妍，等. 15 个产地玄参中哈巴苷与哈巴俄苷含量测定[J]. 药学实践杂志，2021，39（4）：313 - 316.

[18] 国家药品监督管理局药品审评中心. 中药新药质量标准研究技术指导原则（试行）[EB / OL]. （2020 - 10 - 12）[2022 - 06 - 01]. https: // www. cde. org. cn / zdyz / domesticinfopage? zdyzIdCODE = b30261779e4848579b15cf34608a06e7.

[19] 陈 沛，金红宇，孙 磊，等. 对照提取物在中药整体质量控制中的应用[J]. 药物分析杂志，2016，36（2）：185 - 195.

[20] 燕 攀，贾帅龙，李 森，等. 基于液质联用技术的中药植化成分研究方法与策略[J]. 药学学报，2022，55（7）：1494 - 1503.

[21] 王 迪，俞 佳，詹 固，等. 液质联用技术在中药研究中的应用进展[J]. 中华中医药学刊，2022，40（2）：68 - 71.

[22] 汪小莉，刘 晓，韩燕全，等. 中药药效物质基础主要研究方法概述[J]. 中草药，2018，49（4）：941 - 947.

[23] 张黎媛. 液质联用技术在中药质量控制中的应用[J]. 世界中医药，2018，13（2）：513 - 521.

（收稿日期：2022 - 09 - 19；修回日期：2022 - 12 - 25）