

高分辨液质联用法同时测定解郁安神颗粒中 12 种成分

朱泽兵, 黎昌权, 张德伟*

1、重庆市万州食品药品检验所, 重庆 404000

2、三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室, 重庆 404100

【摘要】目的: 高分辨质谱法 (UPLC-Q-Orbitrap) 同时测定解郁安神颗粒中双去甲基姜黄素、酸枣仁皂苷 A、斯皮诺素、阿魏酸、莪术醇、莪术酮、柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、细叶远志皂苷、甘草苷、姜黄素、去甲基姜黄素 12 种有效成分的分析方法。**方法:** HPLC 采用色谱柱 Hypersil GOLD C18 色谱柱 (2.1mm×100mm, 3 μm), 流动相为乙腈-0.005mol·L⁻¹ 甲酸铵溶液, 梯度洗脱, 体积流量 0.30mL·min⁻¹, 进样量 2 μL; 质谱采用电喷雾离子源、正离子模式采集, 通过一级二级全扫描 (Full-mass) 同时对解郁安神颗粒中 12 种组分进行测定。**结果:** 解郁安神颗粒中 12 种有效成分的线性范围良好, r 均大于 0.995, 平均加样回收率分别为 94.4% ~ 107.3%, RSD 值分别为: 1.12% ~ 4.83% (n=6)。**结论:** 所建立的分析方法快速、高效、灵敏度高、专属性好, 可应用于解郁安神颗粒的质量控制。

【关键词】 UPLC-Q-Orbitrap; 解郁安神颗粒; 双去甲基姜黄素; 酸枣仁皂苷 A; 斯皮诺素; 阿魏酸; 莪术醇; 莪术酮; 柴胡皂苷 a; 柴胡皂苷 d; 细叶远志皂苷; 甘草苷; 姜黄素; 去甲基姜黄素

【中图分类号】 R286 **【文献标识码】** A **【DOI】** 10.12325/j.issn.1672-5336.2022.14.018

解郁安神颗粒由炒酸枣仁、制远志、当归、炙甘草、炒栀子等 16 味药材组成, 收载于《中国药典》2020 年版一部, 具有疏肝解郁, 安神定志的功能, 用于治疗情志不畅、肝郁气滞所致的失眠、心烦、焦虑、健忘^[1-3]。原有质量标准仅仅只对炒栀子中栀子苷进行定量分析, 而甘草、远志以及柴胡均采用薄层色谱法进行定性鉴别, 其余组分未进行鉴别, 不利于其整个质量控制。目前, 对药品中多成分进行质量控制是一种趋势, 刘昌孝院士^[4]提出了中药质量标志物 (Q-marker) 的概念, 客观评价中成药的质量是非常重要的^[5-8]。已有研究者采用新方法如一侧多评、指纹图谱、特征图谱、液相色谱质谱联用仪测定中成药的成分^[9-10]。

本研究采用 UPLC-Q-Orbitrap 高分辨质谱技术, 利用其高选择性、高灵敏度等特点, 进行一级二级质谱全扫描技术, 测定解郁安神颗粒 12 种组分。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UPLC-Q-Exactive Focus 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国), 离子源采用 ESI 源, WatersXbrige C18 色谱柱 (2.1mm×100mm, 3 μm), Xcalibur 3.0 软件 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国), 十万分之一天平、万分之一天平 (梅特勒有限公司), 超声波提取仪 (江华

超声仪器公司)。

1.2 试剂

乙腈为质谱纯 (默克公司, 美国), 超纯水机 (重庆润科设备公司), 甲酸铵为优级纯 (科隆化学品有限公司, 成都), 甲醇为分析纯 (科隆化学品有限公司, 成都), 其余试剂为分析纯。

1.3 对照品信息 (表 1)

表 1 对照品信息

| 成分 | 批号 | 含量 (%) | 来源 |
|---------|---------------|--------|-----------|
| 双去甲基姜黄素 | 112004-201501 | 95.0 | 中检院 |
| 酸枣仁皂苷 A | 110734-201914 | 96.0 | |
| 斯皮诺素 | 111869-202005 | 96.0 | |
| 阿魏酸 | 110773-201915 | 99.4 | |
| 莪术醇 | 100185-201908 | 99.9 | |
| 柴胡皂苷 a | 110777-201912 | 94.8 | |
| 柴胡皂苷 d | 110778-201912 | 96.3 | |
| 细叶远志皂苷 | 111849-201705 | 91.6 | |
| 甘草苷 | 111610-201908 | 95.0 | |
| 姜黄素 | 110823-20170 | 98.7 | |
| 去甲基姜黄素 | 112003-201501 | 98.5 | |
| 莪术酮 | SBP03073 | 99.0 | 南京森贝伽生物公司 |

1.4 样品信息

太极集团制药股份有限公司 (批号: 201122、201012)、天圣药业集团 (南川) 有限公司 (批号: 210105)

作者简介: 朱泽兵 (1982—), 男, 汉族, 重庆市奉节县, 本科, 主管中药师, 主要从事药品及化妆品质量检验工作。

*通讯作者: 张德伟 (1979—), 男, 汉族, 重庆市万州区, 本科, 副主任中药师, 研究方向: 药品质量检验。

2 方法

2.1 UPLC 检测条件

流动相: 乙腈 A-水 (含 5mmol 甲酸铵) B; 梯度洗脱: 0~5.0min 5%A; 5~10.0min, 5%~95%A; 10.0~3.0min 95%A; 13.1~15min, 95%~5%A; 流速为 0.3mL·min⁻¹; 进样量 2μL; 柱温 30℃。

2.2 MS 检测条件

离子源采用 ESI 源, 喷雾电压: 3.5kV(+), 鞘气体积流量: 40μL·min⁻¹, 离子传输管温度: 350℃; 辅助气体流量: 15μL·min⁻¹; 辅助气温度: 320℃。扫描方式 Full MS/dd-MS2 模式, 扫描 m/z 范围: 200~1200, 其中一级 Full MS 全扫描选择分辨率为 35000, dd-MS2 的二级扫描选择分辨率为 17500, 雾化气为氮气, 碰撞气为高纯氮。液相质谱图见图 1。

2.3 供试品溶液

取本品研细, 精密称取 2g, 置于具塞锥形瓶中, 加入 70% 乙醇 100ml, 称定重量, 超声提取 30min, 放冷, 再次称定重量, 用 70% 乙醇补足失重, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 1ml 置 100ml 量瓶中, 加 70% 乙醇至刻度, 摇匀, 过 0.22μm 微孔滤膜, 即得。

2.4 线性关系的考察

精密称取上述 12 种对照品适量, 置 50ml 量瓶中, 用 70% 乙醇溶解并稀释至刻度制成混合对照品储备液。将对照品储备液用 70% 乙醇逐级稀释, 配制成系列质量浓度的混合对照品工作溶液, 在“2.1”和“2.2”项下条件测定, 以质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标

(Y) 进行线性回归。结果表明, 12 种成分在相应的质量浓度范围内线性关系良好, 见表 2。

2.5 检出限和定量限

精密量取“2.4”项下的混合对照品溶液, 用 70% 乙醇稀释至刻度摇匀, 按“2.1”和“2.2”项下条件进样分析, 记录色谱图, 同时不断稀释已知质量浓度的混合对照品溶液, 以信噪比 (S/N) 为 3:1 和 10:1 分别计算检出限和定量限, 结果见表 2。

2.6 精密度试验

取批号为 210122 的样品, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 测得各成分峰面积 RSD 均小于 5%, 表明本方法的精密度良好, 结果见表 3。

表 3 各成分回收率、精密度、稳定性、重复性 (n=3)

| 成分 | 回收试验 | | 精密度 (%) | 稳定性 (%) |
|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 回收率 (%) | RSD (%) | | |
| 双去甲基姜黄素 | 97.6 | 2.7 | 3.1 | 2.7 |
| 酸枣仁苷 A | 102.9 | 2.1 | 2.7 | 2.4 |
| 斯皮诺素 | 98.1 | 2.8 | 4.5 | 2.4 |
| 阿魏酸 | 104.6 | 4.0 | 1.1 | 2.0 |
| 莪术醇 | 97.0 | 3.65 | 3.4 | 1.8 |
| 莪术酮 | 95.4 | 2.2 | 3.9 | 2.4 |
| 柴胡皂苷 a | 95.7 | 3.5 | 2.0 | 3.4 |
| 柴胡皂苷 d | 102.2 | 4.1 | 1.2 | 4.3 |
| 细叶远志皂苷 | 107.3 | 3.1 | 4.5 | 3.8 |
| 甘草苷 | 94.5 | 3.5 | 2.5 | 1.2 |
| 姜黄素 | 98.3 | 1.7 | 3.3 | 1.82 |
| 去甲基姜黄素 | 104.0 | 4.3 | 2.8 | 4.2 |

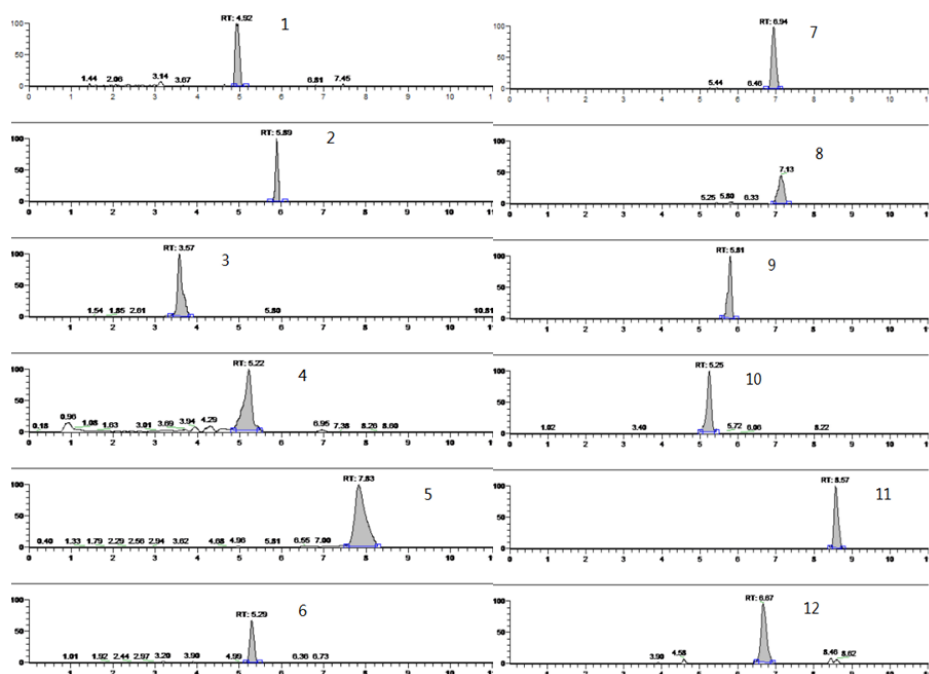


图 1 12 种成分总离子流图

注: 1- 双去甲基姜黄素、2- 酸枣仁苷 A、3- 斯皮诺素、4- 阿魏酸、5- 莪术醇、6- 莪术酮、7- 柴胡皂苷 a、8- 柴胡皂苷 d、9- 细叶远志皂苷、10- 甘草苷、11- 姜黄素 a、12- 去甲基姜黄素。

表 2 各成分线性关系、检测限和定量限

| 成分 | 回收方程 | r | 线性范围 (ng·mL ⁻¹) | 定量限 (ng·mL ⁻¹) | 检出限 (ng·mL ⁻¹) |
|---------|---|--------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 双去甲基姜黄素 | Y=3.844e ⁵ C-1.717e ⁶ | 0.9986 | 10~200 | 10 | 3 |
| 酸枣仁苷 A | Y=1.411e ⁵ C+9.857e ⁵ | 0.9991 | 20~1000 | 15 | 5 |
| 斯皮诺素 | Y=1.352e ⁵ C+6.418e ⁶ | 0.9975 | 20~2000 | 15 | 5 |
| 阿魏酸 | Y=7.633e ⁵ C+4.977e ⁵ | 0.9992 | 10~500 | 10 | 3 |
| 莪术醇 | Y=3.362e ⁵ C+2.233e ⁵ | 0.9971 | 10~1000 | 10 | 4 |
| 莪术酮 | Y=2.081e ⁴ C+2.043e ⁵ | 0.9989 | 10~500 | 10 | 5 |
| 柴胡皂苷 a | Y=2.649e ⁵ C+1.916e ⁶ | 0.9993 | 10~1000 | 10 | 4 |
| 柴胡皂苷 d | Y=2.371e ⁵ C+8.716e ⁵ | 0.9995 | 5~100 | 5 | 2 |
| 细叶远志皂苷 | Y=4.173e ⁵ C+6.321e ⁶ | 0.9990 | 10~200 | 10 | 3 |
| 甘草苷 | Y=1.699e ⁵ C-2.129e ⁵ | 0.9978 | 10~200 | 5 | 2 |
| 姜黄素 | Y=7.204e ⁴ C+3.316e ⁵ | 0.9966 | 5~500 | 3 | 1 |
| 去甲基姜黄素 | Y=1.729e ³ C+1.957e ⁵ | 0.9984 | 10~500 | 10 | 3 |

2.7 稳定性试验

取批号为 210122 的样品,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、3、6、9、18、48h 按“2.1”和“2.2”项下条件测定,记录色谱图,测得各成分峰面积 RSD 均小于 5%,表明供试品溶液在 48h 内稳定,结果见表 3。

2.8 加样回收率试验

取(批号 20210122)的样品研细,精密称取 2g,平

行 6 份,分别置锥形瓶中,分别加入同一种质量浓度的对照品储备溶液适量,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算加样回收率,结果各组平均加样回收率在 94.4%~107.3%,RSD 值为 1.2%~4.3%,结果见表 3。

2.9 样品含量测定

精密称取样品 3 批,每份 2.00g,平行 2 份,按 2.3 制备方法制成样品溶液进行测定,计算解郁安神颗粒中

表 4 各成分测定结果 (n=2, 单位: mg·g⁻¹)

| 批号 | 双去甲基姜黄素 | 酸枣仁苷 A | 斯皮诺素 | 阿魏酸 | 莪术醇 | 莪术酮 | 柴胡皂苷 a | 柴胡皂苷 d | 细叶远志皂苷 | 甘草苷 | 姜黄素 | 去甲基姜黄素 |
|--------|---------|--------|-------|------|------|------|--------|--------|--------|------|------|--------|
| 210122 | 0.90 | 6.25 | 11.22 | 1.57 | 0.79 | 0.56 | 2.69 | 0.18 | 0.11 | 0.07 | 0.51 | 0.29 |
| 201012 | 1.07 | 6.38 | 11.50 | 1.62 | 0.71 | 0.54 | 2.92 | 0.15 | 0.09 | 0.10 | 0.54 | 0.33 |
| 210105 | 1.22 | 6.54 | 11.09 | 1.74 | 0.83 | 0.61 | 2.77 | 0.20 | 0.15 | 0.09 | 0.48 | 0.36 |

12 种组分的含量,结果见表 4。

3 讨论

液质联用仪对流动相有特殊要求,我们只能选择不含或含少量容易挥发性的盐溶液,本实验考察了乙腈-0.1%乙酸水溶液、乙腈-5mmol·L⁻¹乙酸铵水溶液、乙腈-20mmol·L⁻¹甲酸铵水溶液,乙腈-5mmol·L⁻¹乙酸铵水溶液体系加梯度洗脱更加利于多种成分的分离,且各成分的质谱响应均能达到检测的要求,最终确定了“2.1”项下色谱条件法为最佳。在此基础上,优化了质谱的各项参数指标,在正负离子模式下不同的化合物的响应差异明显,最终确定正离子模式。

本实验采用液质联用技术(UPLC-Q-Orbitrap),对解郁安神颗粒中的多种成分进行了含量测定。由于中成药成分复杂,质谱检测器的高选择性和高灵敏度是非常有利于复杂成分的检测。相比普通液相色谱法,更减少了溶剂的消耗。实验结果也进一步证明,该方法灵敏度高、专属性好,重复性、精密度、回收率均满足要求,可应用于解郁安神颗粒的质量控制。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部 2020 年版)[M]. 中国医药科技出版社, 2020.
- [2] 刘季元, 乔树真, 宋芬芬, 等. 普通针刺联合乔氏解郁

安神汤治疗肝郁化火型失眠的临床效果[J]. 临床医学研究与实践, 2021,6(15):134-136.

[3] 孙洁, 梁宝, 杨巍, 等. 解郁安神颗粒联合常规西药治疗老年失眠伴抑郁症的临床研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021,19(04):670-673.

[4] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新念[J]. 中草药, 2016,47(9):1443-1457.

[5] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法[J]. 药学学报, 2019,54(2):187-196.

[6] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物(Q-marker)研究路径[J]. 中草药, 2018,49(1):35-37.

[7] 林华, 黄兴振. 解郁安神颗粒中柴胡皂苷含量测定方法研究[J]. 中国药业, 2018,27(07):14-17.

[8] 唐明悦, 邹诏君, 毛晶. 解郁安神颗粒中栀子苷的含量[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2020,54(06):602-605.

[9] 樊宝娟, 黄艳, 罗定强, 等. 高效液相色谱法同时测定解郁安神颗粒中甘草苷及甘草酸含量[J]. 中国药业, 2018,27(04):13-15.

[10] 张文明, 唐静月, 费倩倩, 等. 基于UHPLC-Q-Exactive-MS/MS的酸枣仁总皂苷对失眠大鼠血清代谢物的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2022,29(07):86-92.