

复性好, 具有分离效果好、方法重复性好等诸多优点, 为广东紫珠质量标准的完善提供理论基础。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典 (第 1 部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 43.
- [2] 陈艳华, 冯锋, 任冬春, 等. 广东紫珠地上部分的化学成分[J]. 中国天然药物, 2008, 6(2): 120-122.
- [3] 黄丽莉, 金小春, 朱培林. 不同采收期及不同部位的广东紫珠总黄酮含量分析[J]. 中国林副特产, 2009, (3): 10-12.
- [4] 王忆杭, 肖培根, 刘新民. 连翘酯苷对拟 AD 复合动物模型小鼠学习记忆的改善作用及其机制研究[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5): 423-427.
- [5] Wang HM, Wang LW, Liu XM, et al. Neuroprotective effects of forsythiaside on learning and memory deficits in senescence-accelerated mouse prone (SAMP8) mice [J]. Pharmacology Biochemistry and

- Behavior, 2013, 105: 134-141.
- [6] 高莉, 彭晓明, 霍仕霞, 等. 毛蕊花糖苷改善 D- 半乳糖致亚急性衰老小鼠脑损伤的作用[J]. 中草药, 2014, 45(1): 81-85.
- [7] Esposito E, Dal Toso R, Pressi G, et al. Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 2010, 381(1): 93-105.
- [8] 余行, 徐诗强, 马冬晴, 等. 大叶紫珠总黄酮的提取工艺优选及其抗炎、镇痛及止血作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 8-11.
- [9] Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin[J]. Planta medica, 2008, 74(14): 1667-1677.
- [10] Lin Z, Fang Y, Huang A, et al. Chemical constituents from Sedum aizoon and their hemostatic activity[J]. Pharmaceutical biology, 2014, 52(11): 1429-1434.

(编辑: 梁进权)

HPLC-MS 同时测定复方阿胶浆中的 5 种药效成分

张 淹, 王春艳, 赵婷婷, 段小波, 李士栋, 孙阳恩(东阿阿胶股份有限公司, 山东 东阿 252201)

摘要: **目的** 建立一种同时测定复方阿胶浆中绿原酸、党参炔苷、毛蕊花糖苷、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 等药效成分的定量方法。**方法** 采用 TSQ Quantum Access Max 三重四级杆质谱仪, 电喷雾负离子模式(ESI⁻); Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 以水 -0.02% 甲酸为流动相 A, 以乙腈 -0.02% 甲酸为流动相 B, 梯度洗脱, 柱温为 30 ℃。**结果** 绿原酸、党参炔苷、毛蕊花糖苷、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 分别在 2.05~51.68 μg·mL⁻¹(*r*=0.9993)、2.33~58.80 μg·mL⁻¹(*r*=0.9996)、1.13~28.99 μg·mL⁻¹(*r*=0.9995)、1.23~30.63 μg·mL⁻¹(*r*=0.9992)、2.25~56.45 μg·mL⁻¹(*r*=0.9993) 范围内线性关系良好; 加样回收率(*n*=6)均在 99.14% ~ 99.82% 之间, RSD 均小于 5%。**结论** 该方法可操作性强、稳定, 结果准确。应用该方法可对复方阿胶浆进行全面准确的质量评价。

关键词: 复方阿胶浆; HPLC-MS; 绿原酸; 党参炔苷; 毛蕊花糖苷; 人参皂苷 Rg1; 人参皂苷 Re

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)04-

doi: 10.19378/j. issn. 1003-9783. 2016. 04

Simultaneous determination of five components in Compound Ejiao Jiang ZHANG yan1, WANG Chun-yan1, ZHAO Ting-ting1, DUAN Xiao-bo, LI Shi-dong1, SUN Yang-en1* (Dong-E E-Jiao Co., Ltd)

Abstract: **Objective** To develop a HPLC-MS method for the determination of five components (chlorogenic acid, acteoside, lobetyolin, Rg1, Re) in Compound Ejiao Jiang. **Methods** The method was performed on TSQ Quantum Access Max with

收稿日期: 2015-11-02

作者简介: 张淹, 男, 硕士研究生, 副主任中药师, 研究方向: 中药新药研发和质量标准研究。Email: zhaoting1203@163.com。通讯作者: 孙阳

恩, 男, 硕士研究生, 主管中药师, 研究方向: 中药新药研发。Email: zhaott1@dongeejiao.com。

基金项目: 山东省科技发展计划项目(2014GSF119039); 山东省科技重大专项(2015ZDZX07001)。

Agilent Zorbax SB-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and column temperature 30℃. The mobile phase was 0.02% formic acid water and 0.02% formic acid acetonitrile. Results The method had good linearity in the ranges of 2.05–51.68 g·ml⁻¹ (r=0.9993) for chlorogenic acid, 2.33–58.80 g·ml⁻¹ (r=0.9996) for lobetyolin, 1.13–28.99 g·ml⁻¹ (r=0.9995) for acteoside, 1.23–30.63 g·ml⁻¹ (r=0.9992) for Rg1, 2.25–56.45 g·ml⁻¹ (r=0.9993) for Re. The average recoveries of the five active components were 99.14 %~99.82 % with RSDs of less than 5% (n=6). Conclusion This method which has a good operability is accurate and stable which can be used for the evaluation of quality exactly.

Keywords: Compound Ejiao Jiang; HPLC-MS; chlorogenic acid; lobetyolin; acteoside; Rg1; Re

复方阿胶浆由阿胶、红参、党参、熟地黄和山楂五味药材经现代工艺加工精制而成的胶类复方制剂,具有补益气血、健脾和胃、滋补肝肾的功能,临床应用广泛。目前的质量标准尚未有与功效相关的含量成分测定方法。人参皂苷 Rg1^[1-3]成分能促进血管再生、延缓和治疗造血干/祖细胞衰老、抑制动脉血栓形成、重新恢复缺血组织血供;绿原酸^[4]有保肝利胆的作用;人参皂苷 Re^[5]具有保护黑质多巴胺神经元的作用。本课题组通过前期药效学研究^[6]也发现人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re、绿原酸、党参炔苷、毛蕊花糖苷这5种成分与复方阿胶浆治疗头晕目眩、贫血等功效密切相关。目前,人参皂苷 Rg1 与 人参皂苷 Re 定量方法多采用液-质联用法^[7-9],绿原酸、党参炔苷、毛蕊花糖苷多采用液相法^[10-13]。本研究组应用 HPLC-MS 技术建立了复方阿胶浆中5种药效成分定量方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1290 高效液相色谱仪、TSQ Quantum Access Max 三重四级杆质谱仪(美国 Agilent 公司); Milli-Qplus 型超纯水制备仪(密理博公司); AL104 电子天平(0.0001~110 g, 瑞士梅特勒公司); 离心机(赛默飞世尔科技有限公司); Heidolph LABOROTA 4000-efficient 减压浓缩仪(德国海道夫公司)。

1.2 试剂及样品 甲醇,分析纯,国药集团化学试剂公司;乙腈,色谱纯,Merk 公司;绿原酸、毛蕊花糖苷,中国食品药品检定研究院,批号分别为:110753-201411, 123521-201305;党参炔苷,上海诗丹德生物技术有限公司,批号:STA-08307016;人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re,成都曼斯特生物科技有限公司,批号分别为: MUST-14070915, MUST-14062018;复方阿胶浆,东阿阿胶股份有限公司,批号: 20131201, 20140103, 20140301, 20140302,

20140303, 20140306, 20140502, 20140506, 20140513, 20140514。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 采用 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);以水-0.02%甲酸为流动相 A,以乙腈-0.02%甲酸为流动相 B,梯度洗脱,洗脱程序见表1。流速为 0.5 mL·min⁻¹,柱温为 30℃。

表1 级流动相洗脱程序

Table 1 The mobile phase elution program

t/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	70	30
15	68	32
25	63	37
45	22	78
60	70	30

2.1.2 质谱条件 碰撞气为超纯氦,鞘气和辅助气为高纯氮;电喷雾电离(ESI),检测模式为负离子模式;鞘气压力: 40 psi; 辅气压力: 20 psi; 加热器温度: 350℃; 喷雾电压: -3000 V; 使用选择离子模式(MRM)。质荷比(m/z)见表2。

表2 5种成分的质谱参数

Table 2 ESI-MS/MS parameters of five composition

成分	[M-H] ⁻	m/z	碰撞能量/eV
绿原酸	353.0	191.1	20
党参炔苷	441.2	178.9	12
毛蕊花糖苷	623.2	161.1	37
人参皂苷 Rg1	969.4	789.5	26
人参皂苷 Re	823.6	371.9	28

2.2 混合对照品溶液储备液的制备 分别取绿原酸、党参炔苷、毛蕊花糖苷、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 对照品适量,精密称定,加甲醇制成每 1 mL 分别

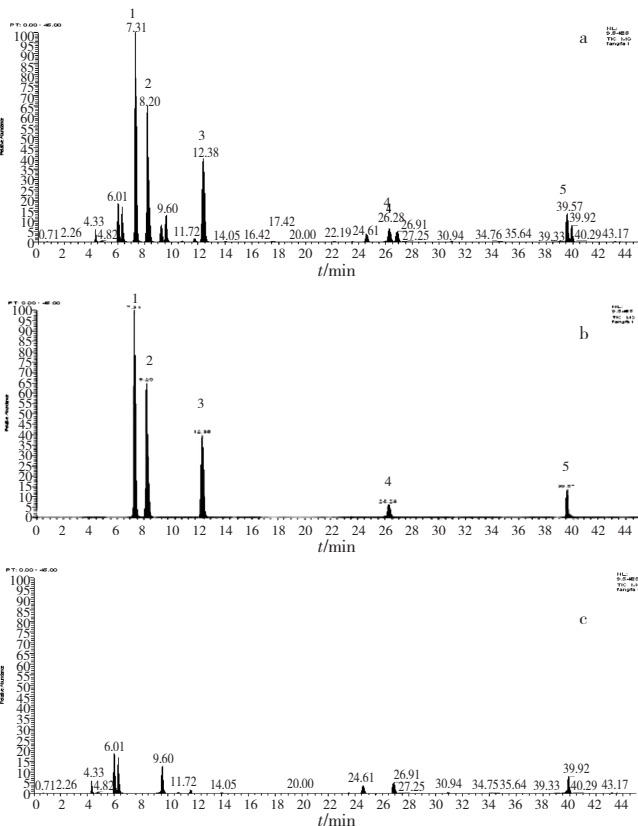
含绿原酸 103.3 μg 、党参炔苷 117.67 μg 、毛蕊花糖苷 58.02 μg 、人参皂苷 Rg1 61.34 μg 、人参皂苷 Re 112.93 μg 的混合溶液, 即得。

2.3 供试品的制备 精密吸取复方阿胶浆 2 mL, 置 50 mL 离心管中, 加 70 % 甲醇 80 μL , 振荡混匀 10 min, 加乙腈 6 mL, 振荡混匀 15 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 2 h; 离心(2500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$)20 min。精密量取上清液 2.5 mL, 于 45 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至干, 用 30 % 甲醇溶解转移至 5 mL 量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4 阴性对照品溶液的制备 精密吸取去除党参、红参、党参、熟地黄和山楂四味中药的阴性对照品溶液 2 mL, 按 2.3 项下方法制备。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验考察 分别取混合对照品溶液、供试品溶液及阴性对照品溶液各 10 μL , 按 2.1 项下色谱和质谱条件进样测定, 记录负离子模式下质谱图, 结果见图 1。阴性样品中在绿原酸、党参炔苷、毛蕊花糖苷、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 的出峰处皆无干扰, 表明其他成分对测定结果无影响。



a. 复方阿胶浆供试品; b. 对照品; c. 空白对照品; 1. 绿原酸; 2. 毛蕊花糖苷; 3. 党参炔苷; 4. 人参皂苷 Rg1; 5. 人参皂苷 Re

图 1 复方阿胶浆样品及阴性对照品的负离子质谱图

Figure 1 Negative-ion MS spectrum of compound Ejiao Jiang

2.4.2 精密度试验考察 精密量取 2.2 项下混合对照品溶液, 按 2.1 中的液质条件连续进样 6 次, 每次 20 μL 。记录峰面积并计算 RSD。结果绿原酸、党参炔苷、毛蕊花糖苷、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 的 RSD 分别为 2.0 %、1.8 %、2.2 %、2.7 %、1.6 %。表明仪器精密度良好。

2.4.3 线性关系考察 精密量取 2.2 项下混合对照品储备液, 分别稀释 2, 4, 8, 10, 20, 50 倍, 制成系列对照品溶液, 得系列浓度混合对照品溶液(绿原酸浓度为: 51.65, 25.83, 12.92, 10.33, 5.17, 2.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 党参炔苷浓度为: 58.84, 29.42, 14.71, 11.77, 5.89, 2.35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 毛蕊花糖苷浓度为: 29.01, 14.51, 7.25, 5.80, 2.90, 1.16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 人参皂苷 Rg1 浓度为: 30.67, 15.34, 7.67, 6.13, 3.07, 1.23 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 人参皂苷 Re 浓度为: 56.47, 28.23, 14.12, 11.29, 5.65, 2.26 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。取以上系列对照品, 分别进样 10 μL , 按 2.1 项下的液质条件测定。以各对照品的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 分别绘制标准曲线, 计算回归方程。将混合对照品储备液稀释 50 倍的溶液加入胶汁后稀释, 进样分析, 测定信噪比, 取信噪比(S/N)=3 的对照品浓度作为仪器的检测限, 信噪比(S/N)=10 的对照品浓度作为仪器的定量限, 结果见表 3。结果表明, 党参炔苷等 5 种成分的线性关系均良好。

表 3 复方阿胶浆中 5 种药效成分的线性关系考察结果

Table 3 Results of linear regression of 5 kinds of efficacy component from compound Ejiao Jiang

待测成分	线性方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
绿原酸	$y=1259334x-1259$	0.9993	2.05~51.68	2.06	0.51
党参炔苷	$y=215601x-32019$	0.9996	2.33~58.80	2.53	0.62
毛蕊花糖苷	$y=394254x-23315$	0.9995	1.13~28.99	1.21	0.30
人参皂苷 Rg1	$y=9084x-120$	0.9992	1.23~30.63	1.30	0.33
人参皂苷 Re	$y=70846x-14216$	0.9993	2.25~56.45	1.43	0.36

2.4.4 重复性试验 取复方阿胶浆样品(批号: 20131201), 精密量取 2 mL, 共 6 份, 按 2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下的液质条件, 各进样 20 μL , 测定。绿原酸、党参炔苷、毛蕊花糖苷、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 的峰面积 RSD 分别为 1.56 %、2.48 %、1.42 %、1.99 %、2.85 % (n=6), 说明重复性良好。

2.4.5 加样回收试验 精密量取已知各成分含量的复方阿胶浆(批号: 20131201)(绿原酸 2.93 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、党参炔苷 17.49 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、毛蕊花糖苷 2.04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、人参皂苷 Rg1 14.55 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、人参皂苷 Re 10.99 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

mL⁻¹)1 mL, 共 6 份, 分别精密加入空白胶汁 1 mL, 混匀, 精密加入 2.2 项配制的混合标准品溶液 100 μL, 按 2.3 项下供试品溶液的制备方法, 制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱和质谱条件, 进样 20 μL 测定, 计算各成分的回收率及 RSD, 结果见表 4。

表 4 加样回收试验结果(n=6)

成分	供试品含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	平均回收率 /%	RSD/%
绿原酸	2.93	10.33	13.20	99.42	4.2
党参炔苷	17.49	11.77	29.23	99.75	3.7
毛蕊花糖苷	2.04	5.80	7.79	99.14	4.6
人参皂苷 Rg1	4.55	6.13	10.66	99.67	4.9
人参皂苷 Re	10.99	11.29	22.26	99.82	3.5

2.4.6 稳定性试验 精密量取复方阿胶浆样品(批号: 20140303)2 mL, 按 2.3 项下供试品溶液的制备方法, 制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱和质谱条件, 分别于 0, 1, 2, 4, 8, 24 h 进样 20 μL 检测。结果党参炔苷、毛蕊花糖苷、绿原酸、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 峰面积 RSD 分别为 1.62 %、1.29 %、1.38 %、1.77 %、1.54 %, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.5 样品测定 取 6 批复方阿胶浆样品 (批号: 20140303, 20140306, 20140502, 20140506, 20140513, 20140514), 按 2.3 项方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱和质谱条件进样 20 μL 进行测定, 结果见表 5。

表 5 复方阿胶浆中 5 种成分的检测结果(μg·mL⁻¹)

批号	绿原酸	党参炔苷	毛蕊花糖苷	人参皂苷 Rg1	人参皂苷 Re
20140303	2.9322	17.487	2.044	4.553	10.999
20140306	3.093	15.047	2.157	4.422	12.615
20140502	2.850	18.921	2.486	4.319	13.897
20140506	3.260	20.536	2.609	4.559	14.442
20140513	2.869	20.828	2.215	3.949	12.155
20140514	2.732	19.685	2.839	7.399	14.915

3 讨论

复方阿胶浆是由阿胶、党参、红参、熟地等 5 味药材组成的胶类中药复方制剂。本研究通过使用合适的色谱分离技术将复方阿胶浆中的药效成分进行分离, 并应用质谱技术对其进行了定量分析, 为进一步提升复方阿胶浆的质控水平奠定了基础。在筛选色谱分离条件的过程中, 曾探索 HPLC-UV 法, 但因制剂成分复杂, 分离困难, 干扰多, 且绿原酸、党参炔苷等成分结构差异较大而未采用。经过进一步试验, 采

用准确度高、灵敏度高、可高通量测定组分含量的液-质联用法^[4], 对党参炔苷、毛蕊花糖苷、绿原酸、人参皂苷 Rg1、人参皂苷 Re 5 种药效成分进行了定量测定, 建立了含量测定方法。该方法的建立打破了该制剂中四味药材无指标成分控制的现状, 克服以总黄酮、总皂苷作为质量控制指标的局限性, 建立了基于药效成分的质量评价方法, 使产品的质量标准更加全面、准确, 为复方阿胶浆质量标准的提升试验及理论依据。同时也为含此 5 种成分制剂的质控提供借鉴。

参考文献:

[1] 张庆勇, 朱武飞, 罗春华. 人参皂苷 Rg1 促血管再生作用的研究进展[J]. 广东医学, 2015, 36(8): 1299-1300.

[2] 周玥, 唐艳隆, 王亚平, 等. SIRT6/NF-κB 信号轴在人参皂苷 Rg1 延缓造血干 / 祖细胞衰老中的作用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 511-515.

[3] Zhou Q, Jiang L, Xu C. Ginsenoside Rg1 inhibits platelet activation and arterial thrombosis[J]. Thrombosis Research, 2014, 133(1): 142.

[4] 张敬灵, 马琼, 高锦明, 等. 绿原酸及其类似物与生物活性[J]. 中草药, 2001, 32(2): 173-176.

[5] 徐琲琲, 刘纯青, 马涛, 等. 人参皂苷 Re 对 MPTP 致帕金森病模型小鼠多巴胺能神经元的保护作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(1): 36-43.

[6] 朱求方. 复方阿胶浆药物质基础及指纹图谱研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 页码.

[7] Liu L, Huang J, Hu X. Simultaneous determination of ginsenoside (G-Re, G-Rg1, G-Rg2, G-F1, G-Rh1) and protopanaxatriol in human plasma and urine by LC-MS/MS and its application in a pharmacokinetics study of G-Re in volunteers [J]. Journal of Chromatography, 2011, 879(22): 87.

[8] Chen F, Luo J, Kong L. Fast isolation of ginsenosides Re and Rg1 from the roots of Panax Ginseng by HSCCC-ELSD combined with MCI gel CC guided by HPLC-MS[J]. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 2012, 35(5): 11.

[9] Deng GF, Wang DL, Meng MX. Simultaneous determination of notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, Re, Rb1 and icariin in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography, 2009, 877(22): 179.

[10] 周送桂, 何珺, 肖序, 等. HPLC 法监测金英黄归汤制备过程中绿原酸和连翘酯苷 A 含量[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(1): 109-111.

[11] 陆兔林, 石上梅, 蔡宝昌, 等. 基于一测多评的中药多成分定量研究进展[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2525-2529.

[12] 贺庆, 朱恩圆, 王峥涛, 等. 党参中党参炔苷 HPLC 分析[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(1): 56-58.

[13] 边宝林, 王宏洁, 杨健. 5 种不同药材中毛蕊花糖苷的含量比较 [J]. 中国药理学杂志, 2010, 35(6): 739-740.

[14] 王松松, 马艳, 张毅, 等. UHPLC-MS/MS 快速鉴别红花中的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(3): 1347-1354.

(编辑: 梁进权)