

· 中(蒙)医药论坛 ·

基于HPLC-MS/MS的藤丹胶囊中14个成分的定量分析

张晓东¹, 张海龙², 苏佳³, 刘洋⁴, 杜晓鹏^{2*}

(1. 内蒙古自治区药品检验研究院, 内蒙古 呼和浩特 010010;

2. 内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特 010059;

3. 内蒙古国际蒙医医院, 内蒙古 呼和浩特 010013;

4. 呼和浩特市药品检验所, 内蒙古 呼和浩特 010020)

【摘要】目的 通过HPLC-MS/MS方法对藤丹胶囊治疗高血压疾病的部分活性成分进行定性定量研究。方法 采用Waters XTerra MS C18色谱柱(2.1×100 mm, 3.5 μm), 以0.1%乙酸-乙腈(0.1%乙酸)为流动相梯度洗脱, 采用电喷雾离子源(ESI源), 以多反应监测(MRM)扫描模式正负离子同时检测的方法测定藤丹胶囊中14种化学成分的含量。结果 14种化合物在测定浓度范围内线性关系良好, 相关系数均>0.995, 平均加样回收率为87.3%~100.9%, 回收率的RSD≤7.7%, 样品中14种成分的含量范围介于12.35μg/g~3089.83μg/g。结论 本研究为中成药藤丹胶囊的质量控制和开发利用奠定了一定基础。

【关键词】 HPLC-MS/MS; 藤丹胶囊; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R367.5

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2023)04-0350-04

中药治疗高血压的方剂研究是中国中西医结合研究中最活跃的领域^[1]。中医药治疗高血压病的原则主要是补虚泻实, 适其阴阳, 现有的抗高血压中成药主要以清热泻火、平肝潜阳、活血化瘀、滋补肝肾等治法为主^[2]。采用多成分、多途径、多靶点的治疗原则, 纠正代谢异常, 维持机体平衡^[3], 从而在有效控制血压的同时, 保护高血压所造成的靶器官损伤。课题组前期采用蛋白质组学和传统药理学方法, 系统评价了陕西步长高新制药有限公司生产的藤丹胶囊(TDC, 国药准字Z20133012)对高血压性心肾损伤的保护作用及分子作用机制^[4], 并结合HPLC及网络药理学研究, 分析其药效物质基础, 为寻找以保护心肾靶器官损伤为原则治疗高血压的新疗法和新靶点提供科学依据^[5]。本研究借助HPLC-MS/MS法对藤丹胶囊中14种活性成分进行定量研究, 以期建立更为合理的藤丹胶囊质量控制标准并进一步探索该多组分中药的药效物质基础提供依据。

1 仪器与试剂

5500+ Triple Quad 质谱仪(SCIEX公司, Analyst 1.7.1 软件)、AE-163 电子天平(METTLER TOLED 公司)、KS-500 超声波清洗器(昆山洁力美超声仪器有限公司)、MILLT-Q 超纯水纯化系统(Millipore 公司)。

藤丹胶囊(药品批准文号: Z20133012; 生产批号: 231101101)由陕西步长高新制药有限公司提供。

对照品: 黄芪甲苷(批号 110781-202118, 纯度 96.8%)、表儿茶素(批号 110878-201703, 纯度 99.7%)、隐丹参酮(批号 110852-201807, 纯度 99.0%)、防己诺林碱(批号 110793-201807, 纯度 98.3%)、丹参酮 IIA(批号 110766-202022, 纯度 98.9%)、迷迭香酸(批号 111871-202007, 纯度 98.1%)、丹参酮 I(批号 110867-201607, 纯度 100%)、藁本内酯(批号 111737-201910, 纯度

收稿日期: 2023-04-18; 修回日期: 2023-07-22

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金面上项目(2020MS08133); 内蒙古自治区卫健委医疗卫生科技计划项目(202201185); 内蒙古医科大学面上项目(YKD2021MS002)

第一作者: 张晓东(1978—), 男, 本科, 副主任药师。研究方向: 药品、化妆品质量标准研究。E-mail: nmmc2006@163.com

*通信作者: 杜晓鹏, 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师。研究方向: 复方中药、蒙药作用机理解析和系统药理学技术在创新中药研发中的应用。E-mail: 48121567@qq.com

100%)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷(批号111920-201907,纯度96.8%)、阿魏酸(批号110773-201915,纯度99.4%)、异鼠李素(批号110860-202012,纯度99.1%)、山柰酚(批号110861-201812,纯度93.8%)、橙皮苷(批号110721-202019,纯度95.3%)、黄芩苷(批号110715-202122,纯度94.2%),均来源于中国食品药品检定研究院。

试剂:甲醇、乙腈(优级纯, sigma公司),甲酸(优级纯, mreda公司)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

精密称取黄芪甲苷、表儿茶素、隐丹参酮、防己诺林碱、丹参酮IIA、迷迭香酸、丹参酮I、藜蘆内酯、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、异鼠李素、山柰酚、橙皮苷对照品各适量,加甲醇制成各成分质量浓度约为 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备液。精密称取黄芩苷对照品适量,加甲醇制成质量浓度约为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.2 供试品溶液的制备

精密称取藤丹胶囊内容物0.5 g,置具塞锥形瓶中,精密量取75%甲醇25 mL至锥形瓶中并密塞,称重,超声处理(功率250 W,频率40 kHz)30 min,放冷,再次称重,缺失的重量以75%甲醇补足,摇匀,过滤,取续滤液,稀释即得。

2.3 色谱条件

Waters XTerra MS C18 色谱柱($2.1\times 100\ \text{mm}$, $3.5\ \mu\text{m}$);0.1%乙酸(A)-含0.1%乙酸的乙腈(B)为流动相,梯度洗脱(0~24 min, 5%~85% B; 24~26 min, 85% B; 26~27 min, 85%~5% B; 27~35 min, 5% B);流速为0.2 mL/min,进样量为5 μL 。

2.4 质谱条件

采用多反应离子监测(MRM)扫描模式,正负离子同时扫描,电喷雾离子源(ESI),离子化电压(IS)5 500 V(正离子)和-4 500 V(负离子),离子源温度为550 $^{\circ}\text{C}$,喷雾气:50PSI,辅助气:50PSI,气帘气:20PSI,离子对滞留时间(dweltime)为25 ms。

2.5 线性关系

精密吸取“2.1”项下的混合对照品储备液,加甲醇稀释,制得各成分浓度约为2、5、10、50、100、200 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列混合对照品溶液。精密吸取“2.1”项下黄芩苷对照品储备液,加甲醇稀释,制得黄芩苷浓度约为50、100、200、400、800、1000 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 系列对照品溶液。将上述系列混合对照品溶液和系列黄芩苷对照品溶液按“2.3、2.4”项下色谱、质谱条件进样分析。以质量浓度X为横坐标,峰面积Y为纵坐标,绘制标准曲线。通过逐级稀释对照品溶液至信噪比分别为10:1和3:1,此时的对照品溶液浓度分别为定量限和检出限。相关检测结果见表1。结果表明,在各自浓度范围内14个成分线性关系良好,相关系数 $r > 0.995$,该方法具有较高的灵敏度。混合标准溶液、藤丹胶囊样品溶液总离子流图见图1。

表1 14个化合物的回归方程、线性范围、检出限及定量限

成分	回归方程	r	线性范围 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检出限 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
表儿茶素	$y = 8.53\cdot e3x - 4.56\cdot e3$	0.9995	2.006~200.6	0.7	2.5
黄芪甲苷	$y = 9.49\cdot e3x - 5.78\cdot e3$	0.9980	1.970~197.0	0.2	0.7
防己诺林碱	$y = 7.9\cdot e3x - 4.73\cdot e3$	0.9987	2.048~204.8	0.2	0.7
隐丹参酮	$y = 2.18\cdot e4x - 8.17\cdot e3$	0.9994	2.178~217.8	0.3	1.0
丹参酮IIA	$y = 1.39\cdot e4x + 703$	0.9952	2.182~218.2	0.5	1.8
迷迭香酸	$y = 1.38\cdot e3x + 1.5\cdot e3$	0.9960	2.011~201.1	2.0	7.0
丹参酮I	$y = 1.31\cdot e4x + 1.65\cdot e4$	0.9953	2.188~218.8	0.3	1.0
毛蕊异黄酮葡萄糖苷	$y = 1.99\cdot e4x - 8.25\cdot e3$	0.9994	1.981~198.1	0.07	0.3
藜蘆内酯	$y = 1.67\cdot e4x + 5.67\cdot e3$	0.9986	2.136~213.6	1.0	3.5
阿魏酸	$y = 3.87\cdot e4x + 1.04\cdot e5$	0.9997	2.088~208.8	0.4	1.5
山柰酚	$y = 7.49\cdot e3x - 4.82\cdot e3$	0.9985	1.944~194.4	0.7	2.5
异鼠李素	$y = 6.74\cdot e3x - 4.21\cdot e3$	0.9971	2.016~201.6	0.7	2.5
黄芩苷	$y = 88.7x - 2.69\cdot e3$	0.9963	49.40~988.0	25	85
橙皮苷	$y = 5.31\cdot e3x - 2.34\cdot e3$	0.9991	2.144~214.4	0.3	1.0

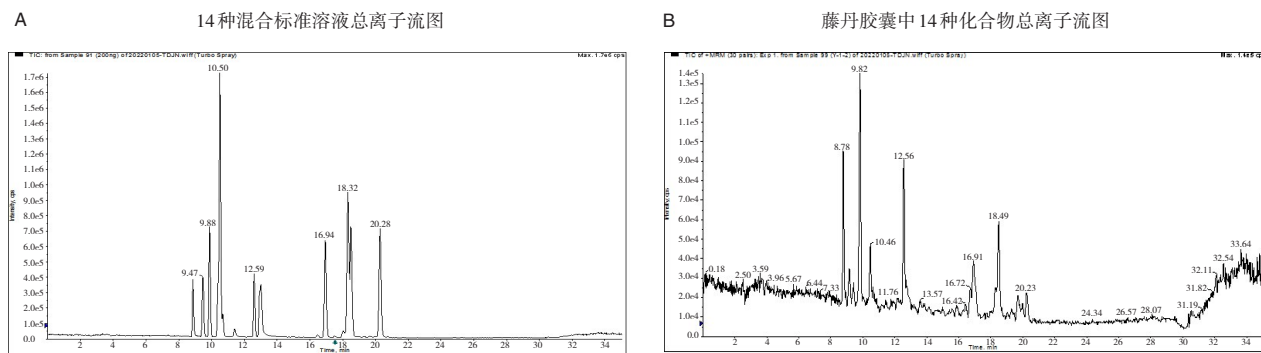


图1 14种混合标准溶液、藤丹胶囊中14种化合物总离子流图

2.6 精密度试验

分别取“2.5”项下 200 ng·mL⁻¹的混合对照品溶液和黄芩苷对照品溶液,按“2.3、2.4”项下色谱、质谱条件连续进样测定6次,记录各自峰面积并计算RSD,结果显示,各成分峰面积RSD < 3.0%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

将4℃条件下保存的100 ng·mL⁻¹混合对照品溶液和黄芩苷对照品溶液,按“2.3、2.4”项下色谱、质谱条件,分别于0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h各测定1次,记录各组分峰面积。结果显示,各组分峰面积的RSD% < 5.0%,表明14种组分在72 h内稳定。

2.8 加样回收率考察

选取空白基质样品,按照样品含量的50%、100%和150%水平进行加标回收实验,每个添加水平平行测定6个样品,计算平均回收率及相对标准偏差RSD。结果显示,14种组分的平均回收率在87.3%~100.9%之间,RSD ≤ 7.7%。表明本研究所建立的含量测定方法准确度良好。

2.9 样品含量测定

分别精密称取3批藤丹胶囊内容物,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3、2.4”项下液相色谱和质谱条件进样分析,测定样品中各组分含量,计算批样品种的平均含量和RSD值。结果见表2。

表2 藤丹胶囊样品中14个成分的含量

成分	平均含量 (μg·g ⁻¹)	RSD (%)	成分	平均含量 (μg·g ⁻¹)	RSD (%)
表儿茶素	12.35	7.7	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	104.42	2.5
黄芪甲苷	88.89	3.4	藜本内酯	39.30	5.0
防己诺林碱	125.79	4.2	阿魏酸	81.69	2.7
隐丹参酮	156.54	3.1	山柰酚	/	/
丹参酮IIA	323.07	1.1	异鼠李素	/	/
迷迭香酸	3089.83	1.7	黄芩苷	/	/
丹参酮I	42.16	7.3	橙皮苷	254.86	4.2

3 讨论

藤丹胶囊由桑寄生、车前子、钩藤、猪胆膏、粉防己、三七、丹参、黄芪、川芎、夏枯草10味药材组成,临床上广泛用于治疗轻、中度高血压患者。目前收载于《中华人民共和国药典》(2020年版)^[6],但仅对三七中三七皂苷R1、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1和丹参中丹酚酸的有效成分进行了含量测定^[7],目前还未见通过液相色谱质谱联用方法对多成分

进行分析的有效质量控制方法。据文献报道^[8-10],丹参提取物中丹参酮IIA和隐丹参酮分别为sEH的强效混合型抑制剂,其具有抗炎和保护心血管作用。丹参中的多酚酸盐能够保护内皮细胞、增强细胞功能和促进血管内皮细胞的增殖、迁移、分化的作用,从而来促进血管内皮的修复^[11]。研究表明^[12]氧化应激引起炎症反应、血管壁和血管平滑肌细胞结构的改变和功能的障碍,使得血压升高,而丹参丹酚酸能阻止脂质被过氧化,清除活性氧,使得脂质中的

过氧化物分泌减少,从而促进SOD产生,最终阻止氧化应激反应^[13,14]。黄芪总黄酮通过抑制 apoE /小鼠的脂质紊乱和炎症降低了动脉粥样硬化病变的大小,增强了斑块的稳定性,有效改善动脉粥样硬化^[15]。黄芪具有很多药理活性,如消除氧自由基、缓解炎症症状的作用^[16];黄芪通过增强单核吞噬细胞的系统功能,提升机体体液免疫及红细胞免疫系统,以抵抗机体炎症反应,还能保护血管内膜,降低纤维细胞活性^[17-19]。

本实验藤丹胶囊中成分的有效分离对后期各成分的精确定性和定量尤为重要,因此在流动相的考察过程中,通过参考文献,根据液相色谱质谱联用仪的特点,分别采用了水-甲醇、水(0.1%乙酸)-甲醇、水(5 mmol 乙酸铵)-甲醇、水(0.1%乙酸)-甲醇(0.1%乙酸)、水-乙腈、水(0.1%乙酸)-乙腈、水(5 mmol 乙酸铵)-乙腈水、(0.1%乙酸)-乙腈(0.1%甲酸)8种流动相体系进行分离条件的考察。结果表明,采用水(0.1%乙酸)-乙腈(0.1%甲酸)流动相体系,可以使各组分更好地分离,乙腈能够将极性不同的化合物进行洗脱,而乙酸也能够提高质谱响应能力,从而使得各组分更便于定性和定量分析。因为本次研究中14个成分极性差异大,所以使用的分析方法为梯度洗脱,这种方法既缩短了分析时间,也达到了满意的分离效果,同时还使得各成分的响应强度增强。

14个成分通过质谱针泵进样的方式对其进行母离子、子离子的选择,并且使得各个成分的DP和CE得到优化。在负离子模式下迷迭香酸响应较好,在正离子模式下剩余13个成分响应较好,因此本实验采用多重反应监测(MRM)的扫描方式对正负离子进行全扫描,实现1次进样同时对14个成分进行定性、定量的分析。

本研究采用HPLC-MS/MS分析方法同时测定藤丹胶囊中14个成分的含量,所建立的含量测定方法分析时间短、灵敏度高、专属性强、准确度高,是藤丹胶囊定性、定量分析的有效手段,也可为其它传统复方制剂定性、定量分析提供可行性的研究方法和思路^[20]。

参考文献

- [1]吕圭源,苏洁,陈素红.中药抗高血压药理学研究现状与展望[J].中国药理学与毒理学杂志,2016,30(12):1301-1311
[2]张硕,陈霖,唐于平.中医药辨治高血压的认识与发展[J].

- 世界科学技术-中医药现代化,2020,22(12):4139-4146
[3]张兰凤.高血压中医诊疗指南[J].中国中医药现代远程教育,2011,9(23):108-109
[4]Du X, Tao Q, Du H, et al. Tengdan capsule prevents hypertensive kidney damage in SHR by inhibiting periostin mediated renal fibrosis[J]. Frontiers in pharmacology, 2021(12):638298
[5]杜晓鹏,朱琳,赵震邦,等.藤丹胶囊通过介导芳香烃受体信号通路对原发性高血压大鼠血管内皮功能的影响[J].中华中医药杂志,2021,36(5):2664-2669
[6]国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020:1876-1877
[7]李青,吾金卓玛,戴涌,等.藤丹胶囊质量标准方法的改进[J].中国医药科学,2018,8(15):47-54
[8]Xu M, Hao H, Jiang L, et al. In vitro inhibitory effects of ethanol extract of Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) and its components on the catalytic activity of soluble epoxide hydrolase[J]. Phytomedicine, 2015(22): 444-451
[9]刘文艳.丹参酮II A 磺酸钠靶向恢复BMP2信号通路抑制肺动脉高压的分子机制[D].呼和浩特:内蒙古医科大学,2019
[10]陈路.药对丹参-红花对脑缺血再灌注损伤大鼠脑保护作用的研究[D].呼和浩特:内蒙古医科大学,2016
[11]秦袖平,许梦习,郝荣荣,等.丹参多酚酸对心肌缺血大鼠血清及心脏组织炎症因子的保护作用[J].中国临床药理学杂志, 2017,33(9): 794-797
[12]王娟,柳伟,赵英强.中药对高血压大鼠降压机制的实验研究进展[J].河南中医,2015,35(2):254-256
[13]王朝晖,谢滨,张鹏飞,等.丹参注射液辅助治疗慢性阻塞性肺疾病的临床观察[J].广西中医药,2015,38(5):36-37
[14]张林武.依那普利联合丹参酮治疗肺心病的疗效观察[J].当代医学,2015,21(33):133-134
[15]Ma C, Zhang J, Yang S, et al. Astragalus flavone ameliorates atherosclerosis and hepatic steatosis via inhibiting lipid-disorder and inflammation in apoE Mice[J]. Frontiers in pharmacology, 2020(11): 610550
[16]褚星霞,陈丽君.黄芪注射液对慢性阻塞性肺疾病患者肺功能的影响[J].中药药理与临床,2016,32(3):156-159
[17]俞茹云,胡瑶,陈宝华,等.黄芪对慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者细胞因子的影响[J].重庆医学,2018,47(28):3713-3714+3716
[18]谢昭敏,柯继雄,庄旭煌.黄芪注射液联合加味补肺纳气汤治疗肺脾气虚证 COPD 疗效观察[J].江西医药,2018,5(7):716-718
[19]熊海东.丹参酮II A 磺酸钠药在治疗肺心病疗效观察[J].当代医学,2016,22(6):143-144
[20]范帅帅,高乐,田伟,等.UPLC-MS/MS法同时测定养胃汤中26个成分的含量[J].药物分析杂志,2021,41(11):1875-1884