

• 实验研究 •

## UPLC-MS/MS 法同时测定补中益气丸(水丸)中 6 种化合物含量

田小权<sup>1</sup>, 张加稳<sup>2\*</sup>, 王 葳<sup>3</sup>

(1. 昆明市药品不良反应与药物滥用监测中心, 云南 昆明 650000;  
2. 昆明市食品药品检验所, 云南 昆明 650000; 3. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

**摘要:** **目的** 建立 UPLC-MS/MS 法同时测定补中益气丸(水丸)中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮苷、橙皮苷、阿魏酸、甘草酸和甘草苷的含量。**方法** 采用 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 5 mmol/L 乙酸铵溶液-甲醇(含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱; 质谱离子化方式为电喷雾源(ESI), 采用多级反应离子监测模式(MRM)定量分析。**结果** 各化合物在相应浓度范围内线性关系均良好,  $r^2$  值为 0.994~0.999, 加标回收率范围为 86.7%~103.5%, 相应的 RSD 为 3.8%~7.6%。**结论** 本方法定性和定量准确可靠, 重复性好、基质干扰小、灵敏度高, 满足补中益气丸(水丸)中 6 种化合物含量的测定要求。

**关键词:** 补中益气丸(水丸); 超高效液相色谱-串联质谱法; 毛蕊异黄酮苷; 黄芪甲苷; 阿魏酸; 橙皮苷; 甘草苷; 甘草酸

中图分类号: R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2023)05-0049-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.05.010

## Simultaneous Determination of Six Components in Buzhong Yiqi Pills (Water Pills) by UPLC-MS/MS

TIAN Xiaoquan<sup>1</sup>, ZHANG Jiawen<sup>2</sup>, WANG Wei<sup>3</sup>

(1. Kunming Center for ADR and Drug Abuse Monitoring, Kunming 650000, China;  
2. Kunming Food and Drug Inspection Institute, Kunming 650000, China;  
3. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of astragaloside IV, verbascoside, hesperidin, ferulic acid, glycyrrhizic acid, and liquiritin in Buzhong Yiqi Pills (water pills). **Methods** Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) was used, and the mobile phase was 5 mmol/L ammonium acetate solution-acetonitrile (containing 0.1% formic acid), gradient elution; the ionization mode of mass spectrometry was electrospray source (ESI), and the quantitative analysis was carried out by using multiple reactive ion monitoring mode (MRM). **Results** Each compound had a good linear relationship in the corresponding concentration range, the  $r^2$  was between 0.994~0.999, the recovery rate of standard addition ranged from 86.7% to 103.5%, and the corresponding RSD was 3.8% to 7.6%. **Conclusion** This method is accurate and reliable qualitatively and quantitatively, with good repeatability, small matrix interference and high sensitivity, which meets the requirements of measuring the content of 6 components in Buzhong Yiqi Pills (water pills).

**KEY WORDS:** Buzhong Yiqi Pills (water pills); ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; astragaloside IV; verbascoside; ferulic acid; hesperidin; liquiritin; glycyrrhizic acid

补中益气丸是由李东垣精心钻研的《脾胃论》中 白术、党参、当归、陈皮、柴胡和升麻等组成, 主要功效  
的名方补中益气汤制成的丸剂, 由炙黄芪、炙甘草、炒 为补中益气、升阳举陷<sup>[1-3]</sup>。研究表明, 补中益气丸中

基金项目: 云南中医药大学研究生优质课程建设项目-天然药物质量评价技术

作者简介: 田小权(1976-), 男, 副主任药师, E-mail: 546092900@qq.com

\* 通信作者: 张加稳(1989-), 男, 工程师, 研究方向: 食品药品质量安全检验, E-mail: 1098541655@qq.com

有效成分很多,主要包含黄酮类、皂苷类、挥发油、氨基酸及多糖类等<sup>[4]</sup>,具有抗氧化、抗炎、心血管和神经保护等生理活性<sup>[5-6]</sup>。中药的药理作用是多个组分在药效上的协同作用,强调药物之间的整体作用,故中药质量评价应对处方中多个有效组分的含量进行定量分析考察。目前,2020 版《中国药典》第一部收录了补中益气丸(水丸)的质量标准,对制剂中的甘草、当归、陈皮进行薄层色谱定性分析,对黄芪甲苷单组分含量测定做了质量控制以及对炙黄芪、炙甘草、炒白术、陈皮、党参、升麻和柴胡进行显微鉴别,对其药效质量的分析评价存在局限性<sup>[7-8]</sup>。

现有文献报道多是采用高效液相色谱(high-performance liquid chromatography-tandem, HPLC)法测定补中益气丸中的活性成分含量<sup>[9]</sup>,该法同时测定多种化合物时常遇到基质干扰大、易出现假阳性、分离效果差,以及耗时较长等问题。近年来,超高效液相色谱-串联质谱法(Ultra-high-performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, UPLC-MS/MS)法已发展成为测定药物中多组分有机物微量分析的重要方法<sup>[10]</sup>。鉴于对补中益气丸(水丸)中多种活性成分含量同时测定的文献报道较少,本文建立 UPLC-MS/MS 法同时测定黄芪甲苷、毛蕊异黄酮苷、橙皮苷、阿魏酸、甘草酸和甘草苷等 6 种化合物组分含量,旨在为该制剂的药效质量分析评价提供理论指导。

## 1 仪器与材料

超高效液相-串联质谱联用仪(EXION-QTRAP 4500,美国 AB 公司),超声提取仪(SK8210HP,上海科导公司),十万分之一电子天平(MS205DU 型,梅特勒-托利多 Mettler Toledo 公司),Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱(填料:十八烷基硅烷键合硅胶 2.1×100 mm,1.8 μm,美国 Agilent 公司);PES 滤膜(0.22 μm,天津津腾有限公司)。黄芪甲苷(批号:110781-202118)、毛蕊异黄酮苷(111920-201606)、橙皮苷(批号:110721-202019)、阿魏酸(批号:110773-201915)、甘草酸(100551-202003)、甘草苷(批号:111610-201908)对照品均由中国食品药品检定研究院提供。补中益气丸(水丸)由同药集团大同制药有限公司制作,批号:171002。甲酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),乙腈(色谱纯,默克股份

两合公司)。

## 2 方法与结果

### 2.1 仪器条件

2.1.1 液相色谱条件 流速:0.35 mL/min;柱温:40 ℃;进样量:10 μL;流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液,流动相 B 为甲醇(含 0.1%甲酸)。洗脱梯度见表 1。

表 1 洗脱梯度

时间/min	流动相 A	流动相 B
0.0	90.0%	10.0%
1.0	50.0%	50.0%
2.0	2.0%	98.0%
4.0	2.0%	98.0%
4.1	90.0%	10.0%
6.0	90.0%	10.0%

2.1.2 质谱条件 正、负离子扫描;MRM 多反应监测;气帘气、离子源雾化气、离子源辅助加热气分别设定为 38 psi、55 psi 及 55 psi,喷雾电压为 5 500 V,加热器温度为 550℃;优化后的监测离子对(m/z)、去簇电压(DP)、碰撞电压(CE)等结果参数见表 2。

表 2 6 种化合物的 MRM 质谱参数<sup>[11]</sup>

目标物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压 DP(V)	碰撞能量 CE(V)
黄芪甲苷	785.4	473.4	60	14
橙皮苷	609.2	300.9	-100	-31
毛蕊异黄酮苷	447.1	285.0	85	23
甘草苷	417.1	255.0	-90	-25
甘草酸	821.3	350.9	-80	-52
阿魏酸	192.9	134.0	-50	-18

### 2.2 溶液制备

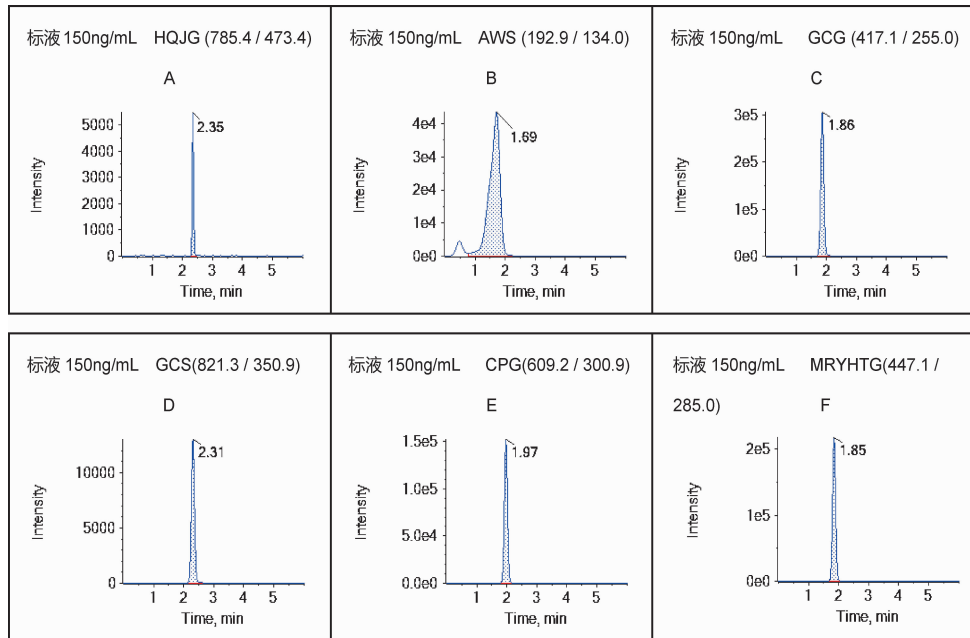
2.2.1 对照品溶液 精密称取各标准品约 10 mg,用甲醇溶解并定容,制成质量浓度均为 1.0 mg/mL 混合标准储备液;分别精密量取适量储备液混合置容量瓶中,以 70%甲醇溶液稀释,制得标准品系列溶液,避光 4 ℃保存备用。

2.2.2 供试品溶液 取本品适量,研细至粉末状,精密称取 0.5 g,将其置于具塞锥形瓶中,精密加入 70%甲醇 25 mL,紧密封塞,摇匀,称定重量,将超声仪温度调至 30 ℃,超声 45 min,待锥形瓶冷却至室温后,

补足重量,摇匀,过滤,精密量取 25 mL,置 100 mL 容量瓶中,70%甲醇定容至刻度线,即得供试品溶液。

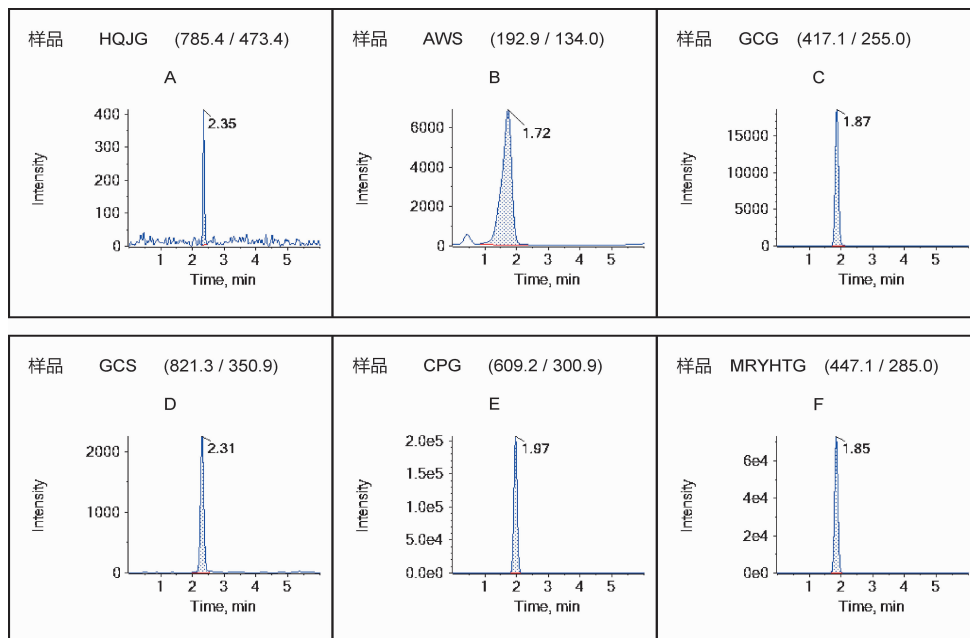
2.3 线性关系考察 所测成分的定量下限(LLOQ)要求信噪比 S/N>10,6 次进样,计算平均峰面积精密密度 RSD≤10%。根据样品含量预实验测定,选择 6 个浓度的混合对照品溶液重复进样(n=2),以目标物定

量离子对的平均峰面积计算进样质量浓度(ng/mL)得线性回归方程。6 种化合物的标准混合液和样品液的 MRM 离子图分别见图 1 和图 2,回归方程线性范围、相关系数( $r^2$ )及 LLOQ 见表 3。结果显示,在相应浓度范围内各化合物线性关系良好( $r^2$  为 0.994~0.999)。



注:A.黄芪甲苷;B.阿魏酸;C.甘草苷;D.橙皮苷;E.甘草酸;F.毛蕊异黄酮苷。

图 1 6 种化合物标准液的 MRM 质谱图



注:A.黄芪甲苷;B.阿魏酸;C.甘草苷;D.橙皮苷;E.甘草酸;F.毛蕊异黄酮苷。

图 2 样品液中 6 种化合物的 MRM 质谱图

表 3 6 种化合物的线性范围、 $r^2$  和定量下限

目标物	线性范围/(ng·mL <sup>-1</sup> )	$r^2$	LLOQ/(ng·mL <sup>-1</sup> )
黄芪甲苷	10~500	0.995	20
橙皮苷	10~500	0.998	25
毛蕊异黄酮苷	10~500	0.999	15
甘草苷	10~500	0.998	10
甘草酸	10~500	0.994	25
阿魏酸	10~500	0.996	30

2.4 精密度试验 取质量浓度为 50 ng/mL(中浓度)的混合对照品溶液,连续进样 6 次,测定黄芪甲苷、毛蕊异黄酮苷、橙皮苷、阿魏酸、甘草酸和甘草苷 6 种化合物的平均峰面积,依次为 2 189、5 616、3 471、3 187、3 288、7 364,计算得 6 种化合物平均峰面积的 RSD 分别为 1.7%、2.3%、4.1%、5.6%、4.7%、3.8%。

2.5 重复性试验 按照“2.2.2”项下方法制备 6 份供试品溶液,分别测定得到样品中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮苷、橙皮苷、阿魏酸、甘草酸和甘草苷 6 种化合物含量的 RSD 分别为 5.3%、7.5%、6.7%、8.3%、6.0%、4.2%,结果呈现良好的方法重复性。

2.6 稳定性试验 取浓度为 100 ng/mL 的混合标准品溶液,依次进样测定存放第 0、2、4、8、12、24、48 h 的溶液中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮苷、橙皮苷、阿魏酸、甘草酸和甘草苷峰面积的 RSD,结果分别为 1.2%、2.5%、1.8%、3.2%、1.5%、0.9%,表明总体稳定性良好,但阿魏酸稳定性略偏低,可能是试样前处理时被氧化。

2.7 加样回收试验 称取已测定的补中益气丸约 0.5 g,精密加入低、中、高 3 种质量浓度的储备混合液适量,每组平行 6 份,按照“2.2.2”项下方法制备,依次测定各组分含量,计算回收率。结果显示黄芪甲苷、毛蕊异黄酮苷、橙皮苷、阿魏酸、甘草酸和甘草苷的平均回收率分别为 98.4%、101.7%、101.4%、86.7%、103.5%、93.7%,对应的 RSD 在 3.8%~7.6% 之间。

2.8 样品含量测定 称取补中益气丸(水丸)供试品约 0.5 g,按“2.2.2”项方法制备 6 份供试液,分别分析供试品中黄芪甲苷、毛蕊异黄酮苷、橙皮苷、阿魏酸、甘草酸和甘草苷的平均含量。结果见表 4。

表 4 供试品中 6 种组分的含量测定结果

化合物	批号(171002)						平均含量 RSD	
	供试品 6 次平行测定含量/(mg·g <sup>-1</sup> )						/(mg·g <sup>-1</sup> ) /%	
黄芪甲苷	0.261	0.283	0.275	0.305	0.268	0.293	0.281	5.3
毛蕊异黄酮苷	1.117	1.025	1.183	0.987	1.227	1.134	1.112	7.5
橙皮苷	1.578	1.781	1.487	1.612	1.668	1.468	1.599	6.7
甘草苷	0.648	0.689	0.764	0.691	0.582	0.718	0.682	8.3
甘草酸	1.158	1.389	1.286	1.481	1.304	1.262	1.297	6.0
阿魏酸	0.684	0.589	0.617	0.554	0.517	0.661	0.644	4.2

### 3 讨论

3.1 供试品溶液制备 根据补中益气丸(水丸)中 6 种化合物组分的提取效率,对提取方法作了优化研究:比较了 30% 甲醇、50% 甲醇、70% 甲醇、纯甲醇对供试液中 6 种化合物提取效率的高低,结果表明 70% 甲醇更高,且峰形更好,原因可能是各化合物极性与该比例提取溶剂相近,流动相洗脱效率更高;比较了对供试液超声 10 min、20 min、30 min、45 min、60 min,结果表明超声 45 min 和 60 min 提取效率明显更高,但两者无明显差异,故选择超声时间为 45 min。

3.2 色谱条件优化 依据化合物性质和色谱条件,研究对比了乙腈-水、甲醇-水、甲醇-乙酸铵-水、甲醇-甲酸-水、含 0.1% 甲酸的甲醇-乙酸铵-水组成的流动相体系的洗脱效果。结果表明,经优化后含 0.1% 甲酸的甲醇-乙酸铵-水混合体系对 6 种化合物的洗脱效果更好,峰形对称、分离度高。对超高效液相色谱柱 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18、MAbPac SCX-10 和 ProPac Elite WCX 进行分析,比较色谱峰形和分离度,结果显示经 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 洗脱峰形更好,且出峰时间最短。

### 4 结论

本文建立了同时测定补中益气丸(水丸)中 6 种生物活性成分的 UPLC-MS/MS 定量分析方法,其操作简单、快速,6 种化合物的平均回收率均在 86.7%~103.5%,相对标准偏差均小于 10%,表明该方法准确度高、重复性好。本实验为补中益气丸(水丸)中多组分定量检测的质量分析评价提供了参考。

## 参考文献:

- [1] 薛薇,毛菊华,王志芳. HPLC法同时测定补中益气丸中3种活性成分的含量[J]. 中国药房,2014,25(16):1524-1526.
- [2] 李东垣. 脾胃论[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:33-35.
- [3] 冶占才. 补中益气汤加减联合温针灸治疗脾胃虚寒型胃痛的效果分析[J]. 青海医药杂志,2021,51(9):46-49.
- [4] 毕建路,陈洁瑜,程静茹,等. 补中益气丸干预气虚质的临床观察[J]. 云南中医学院学报,2016,39(6):62-65.
- [5] 刘心悦,崔洁,贺超,等. 基于网络药理学的补中益气丸抗疲劳机制研究[J]. 世界中医药,2021,16(23):3446-3453.
- [6] 叶蓉,唐春风,刘道光,等. 金匮肾气丸与补中益气丸联用对自然衰老 C57 小鼠运动及代谢的影响[J]. 中国老年学杂志,2021,41(3):600-603.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:1064-1065.
- [8] 张永昕. 一测多评法对补中益气丸中多种成分含量测定研究[D]. 广州:广州中医药大学,2017.
- [9] 李军,刘丽,范颖. HPLC法同时测定补中益气丸中阿魏酸、橙皮苷和甘草酸的含量[J]. 广州化工,2016,44(16):139-141,172.
- [10] YAN Z, CHEN C, XIE X, et al. Rapid screening and quantification of sulfonate derivatives in white peony root by UHPLC-MS-MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402(6):2173-2182.
- [11] 董乙文,李天雪,褚朝森,等. UPLC-MS/MS法同时定量测定补中益气丸中的15种化合物[J]. 药物分析杂志,2017,37(7):1228-1233.
- (收稿日期:2022-12-23)
- 
- (上接第48页)
- [1] 胡有谷. 腰椎间盘突出症[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2011:369-385.
- [2] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准[S]. 北京:中国医药科技出版社,2012:214-215.
- [3] 陈栋,钟健,罗良平,等. 陈氏挑针与牵旋法治疗腰椎间盘突出症[J]. 世界中医药杂志,2015,10(增刊):103-108.
- [4] 陈栋,钟健,洪衍波,等. 针挑与牵旋手法对椎动脉型颈椎病血流的影响及机制研究[J]. 针刺研究,2009,5(34):344-348.
- [5] 黄丽妮. 手法推拿按摩联合中药湿热外敷对腰椎间盘突出症患者康复效果的影响[J]. 内科,2016,11(6):919-920,962.
- [6] 日本整形外科学会. 腰痛疾患治疗成绩制定基准[J]. 日本会志,1986(60):391-393.
- [7] 张建玲,王新宴,刘城炫,等. 108例腰椎间盘突出症患者行肌电图检查结果分析[J]. 空军医学杂志,2012,28(2):76-80.
- [10] INOUE M, INOUE S, IKEMOTO T, et al. The efficacy of a multidisciplinary group program for patients with refractory chronic pain[J]. Pain Res Manag, 2014, 19(6):302-308.
- [11] LIN Y W, WANG L C. Animal training and acupuncture in a bengal tiger (*panthera tigris tigris*) with hind limb paraparesis[J]. J Zoo Wildl Med, 2018, 49(2):493.
- [12] KELLY J, CHENG J. Case studies in pain management: discogenic pain in the setting of lumbar spondylosis[J]. Ecological Modelling, 2014, 187(187):1.
- [13] GIBSON J A, NG C Y. Is surgery more effective than nonsurgical treatment for the management of patients with degenerative spondylolisthesis? [J]. Nature Clinical Practice Rheumatology, 2008, 4(2):68-69.
- [14] 张阳,曹江鹏,蔡兴慧,等. 针刺通过调节神经营养因子修复神经损伤研究进展[J]. 安徽中医药大学学报,2014,6(33):90-94.
- [15] 李晓声,任乃刚,周江南. 腰椎间盘突出症与血液流变学的关系[J]. 中国临床康复,2003,7(20):2826-2827.
- (收稿日期:2023-08-08)