

法,检测灵敏度高,特异性强,对正常植物油脂类样品进行鉴别时有效性较高,但在判定某油样是否为地沟油时有假阴性出现,作出结论时需保持谨慎。除了在地沟油制作现场能找到纯地沟油外,其他地方售卖的可能都是已经混合了正常植物油的混合地沟油,所以如果要对市场采集的某一油样作鉴别时,要结合其他的指标来进行研判,以提高鉴别的有效性,减少误判现象的发生。

参考文献

- [1] 陈红,杨梅,朱蓉,等.超高效液相色谱三重四极杆质谱法测定火锅油、溜水油及地沟油中胆固醇含量[J].中国食品卫生杂志,2011,23(5):429-432.
- [2] 杨冬燕,李浩,杨永存,等.基于电子鼻技术的地沟油鉴别方法[J].食品科技,2014,39(6):311-315.

- [3] 金静,王龙星,陈吉平,等.非正常食用油鉴别新方法(二):特征基数碳脂肪酸的多维气相色谱-质谱检测[J].色谱,2012,30(11):1100-1107.
- [4] 金静,陈吉平,田玉增,等.内标法测定甘油酯上的十一烷酸和13-甲基十四烷酸及其在非正常油脂掺伪识别上的应用[J].色谱,2013,31(6):556-560.
- [5] 毛丽莎,仲岳桐,康莉,等.柠檬烯鉴别地沟油的有效性评估[J].中国卫生检验杂志,2014,24(10):1373-1375.
- [6] 吴才武,夏建新.地沟油的危害及其应对方法[J].食品工业,2014,35(3):237-240.
- [7] 李浩,杨冬燕,杨永存,等.“地沟油”标准物质候选物的研制[R].深圳:第十九届全国食品卫生理化检验学组交流会,2013.
- [8] 张忠,任飞,张盼,等.液液萃取-液相色谱-串联质谱法测定“地沟油”中辣椒碱类化合物及丁香酚[J].色谱,2012,30(11):1108-1112.

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定黄芪中黄芪甲苷的含量

夏义平,李建平,党亚敏,渠志华,王辰
(天津市疾病预防控制中心,天津 300011)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定黄芪中黄芪甲苷的含量。方法 黄芪经甲醇-氨水(3:1, V/V)超声提取30 min,采用多反应监测(MRM)模式,以 m/z 785.4/143.108 和 m/z 785.4/473.391 为定性离子对, m/z 785.4/143.108 为定量离子对,外标法测定黄芪甲苷。结果 黄芪甲苷在60.0~12 000 ng/ml 浓度范围内有良好的线性关系($r=0.9993$),平均回收率为91.7%,最低检测限为68.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论 该方法具有简便、快速和灵敏度高的特点,可用于黄芪中黄芪甲苷的测定。

关键词:黄芪甲苷;超高效液相色谱-串联质谱法;多反应监测;功效成分;定量分析;黄芪;检测方法
中图分类号:R155.5 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)05-0624-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.05.015

Determination of astragaloside IV in *Radix astragali* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIA Yi-ping, LI Jian-ping, DANG Ya-min, QU Zhi-hua, WANG Chen
(Tianjin Center for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China)

Abstract: Objective To establish a method for determination of astragaloside IV in *Radix astragali* by UPLC-MS/MS. **Methods** *Radix astragali* was extracted with methanol-ammonia (3:1, V/V) for 30 min by ultrasonic, the astragaloside IV was monitored via the ESI+ ionization model and quantified by multiple reaction monitoring (MRM), using m/z 785.4/143.108 and m/z 785.4/473.391 as qualitative ion pair and m/z 785.4/143.108 as quantitative ion pair. **Results** The calibration curve of astragaloside IV was in good linearity over the ranges of 60.0-12 000 ng/ml ($r=0.9993$), the average recovery was 91.7%, and the detection limit was 68.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** This method was accurate, rapid, easy to operate, and the methodology validation showed that it was suitable for the determination of astragaloside IV in *Radix astragali*.

收稿日期:2016-01-27

基金项目:天津市卫生计生委科技基金(2014KY21)

作者简介:夏义平 男 主管技师 研究方向为理化检验 E-mail:xyp_76@163.com

Key words: Astragaloside IV; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; multiple reaction monitoring; active ingredients; quantitative analysis; *Radix astragali*; detection method

黄芪甲苷是中国传统中药黄芪的主要药理活性成分之一,具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖、抗病毒、保护多脏器等作用^[1]。黄芪甲苷结构为三萜皂苷,是黄芪制剂的指标成分,在药典中被作为黄芪质量检测标志物。

目前检测黄芪甲苷含量的方法主要有薄层扫描法、分光光度法和高效液相色谱法。薄层扫描法含量测定重现性较低,操作繁琐。分光光度法存在样品的前处理复杂,要求较高,必须经提取分离纯化等处理排除对测定黄芪甲苷的干扰。同时,显色反应的影响因素较多,影响了该法的准确性和稳定性,限制了该法的应用^[2]。黄芪甲苷仅在紫外末端有吸收,测定灵敏度低、噪音大,故采用高效液相色谱-紫外法测定黄芪甲苷含量对试验条件要求较高^[3]。《中华人民共和国药典》^[4](以下简称《中国药典》)和《香港中药材标准》^[5]中测定黄芪甲苷的含量均采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)。ELSD检测器是质量通用性检测器,对所有物质均有响应,测定黄芪甲苷在方法学上具有较高的精密度和准确性,但《中国药典》方法操作繁琐复杂,影响测定准确性,且耗时长,还存在正丁醇萃取分层困难,不易回收等问题^[6]。

本研究建立的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定黄芪中黄芪甲苷含量方法,准确、快速、高效、灵敏,可应用于黄芪中黄芪甲苷的快速测定,提高了分析效率。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

ACQUITY™超高效液相色谱仪(配有 Masslynx V4.1 数据工作站)、TQD 三重四极杆质谱检测器均购自美国 Waters,电子天平。黄芪甲苷对照品

(110781-201515,中国药品生物制品检定所提供),黄芪药材(北京同仁堂天津南开店、天津达仁堂大药房),乙腈、甲醇均为色谱纯,甲酸为质谱专用,试验用水为超纯水,电阻率为 18.2 MΩ·cm。

1.2 方 法

1.2.1 溶液的制备

1.2.1.1 对照品溶液的制备

准确称取黄芪甲苷对照品 12.0 mg,以甲醇溶解,并定容到 50 ml 容量瓶中,摇匀,即得,此对照品溶液的浓度为 0.240 mg/ml。精密吸取对照品溶液 1.0 ml 用甲醇定容至 10.0 ml,配制成 24.0 μg/ml 的使用液。

1.2.1.2 黄芪制剂供试品溶液的制备

提取方法 1:取黄芪制剂 10.0 g,粉碎均质,准确称取粉末 0.5 g,置具塞锥形瓶中,加 30 ml 甲醇,浓氨水 10 ml,密塞,超声提取 2 次,每次 30 min,过滤,合并滤液,用 0.1 mol/L 盐酸调至中性,沸水浴蒸干,残渣用 5.0 ml 甲醇溶解,剩余残渣再用 5.0 ml 甲醇溶解,合并甲醇溶液并定容至 100 ml,过 0.22 μm 滤膜待测。

提取方法 2:供试品制备方法参照《中国药典》2010 版一部正文,黄芪含量测定项下黄芪甲苷含量测定方法^[4]。

1.2.2 仪器条件

色谱条件:色谱柱:Waters BEH C₁₈ 柱(4.6 mm × 100 mm,1.7 μm),流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液(60:40, V/V),流速 0.4 ml/min,柱温为室温,进样体积 2.0 μl。

质谱条件:离子源为电喷雾电离 ESI+,毛细管电压 2.5 kV,离子源温度 120 °C,脱溶剂气温度 450 °C,脱溶剂气体流量 700 L/h,锥孔反吹气流量 30 L/h,碰撞气流量 0.15 ml/h。其他质谱参数见表 1。

表 1 黄芪甲苷的定性离子对、定量离子对、锥孔电压、碰撞能量

Table 1 MRM parameters of astragaloside IV

化合物名称	定性离子对/(<i>m/z</i>)	定量离子对/(<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
黄芪甲苷	785.4/473.391	785.4/143.108	14	12
	785.4/143.108		14	10

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

分别采用电喷雾正离子模式与负离子模式对黄芪甲苷对照品溶液进行 *m/z* 100 ~ 850 范围内的质谱全扫描分析,在正离子模式下获得黄芪甲苷的分子离子峰 *m/z* 785.4,见图 1,在该模式下,对

该分子离子进一步做子离子扫描,结果见图 2, *m/z* 473.391 和 *m/z* 143.108 的峰度最高,因此以 *m/z* 785.4 为多反应监测的母离子,以 *m/z* 473.391 和 *m/z* 143.108 离子作为多反应监测的子离子。经过对锥孔电压、碰撞能量等质谱参数进一步优化,确定了黄芪甲苷的质谱分析条件,见表 1。

李晶、王锐、刘灵改等^[7-9]均在正离子模式下采用

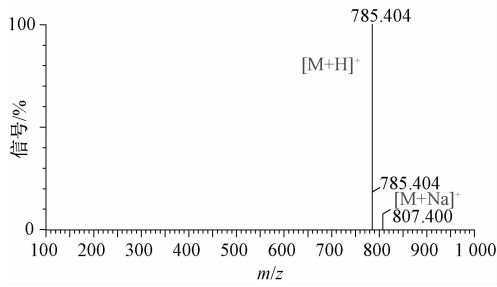
图1 黄芪甲苷 $[M+H]^+$ 离子产生的一级质谱图

Figure 1 Production mass spectra of $[M+H]^+$ ions of astragaloside IV

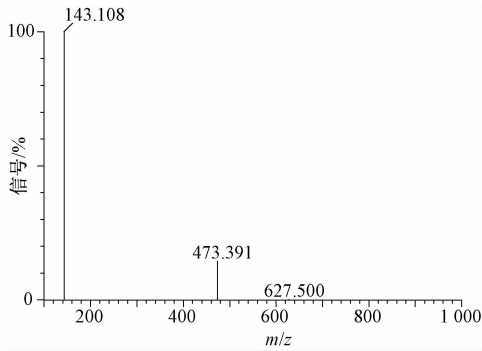
图2 黄芪甲苷 $[M+H]^+$ 产生的子离子质谱图

Figure 2 Mass spectra of daughter ions of astragaloside IV

黄芪甲苷的 $[M+Na]^+$ 峰 m/z 807.5 作为母离子,张健、龚灿等^[10-11] 在正离子模式下采用黄芪甲苷的 $[M+H]^+$ 峰 m/z 785.2 和 m/z 785.5 作为母离子也取得了理想的效果。本试验在正离子模式下监测到黄芪甲苷的 $[M+Na]^+$ 峰 m/z 807.5 强度不高,故未采用该离子,见图1。徐洁、傅俊曾等^[12-13] 在负离子模式下采用黄芪甲苷的 $[M+HCOO]^-$ 峰 m/z 829.2 作为母离子,在流动相中加入甲酸促进黄芪甲苷 $[M+HCOO]^-$ 峰形成,方法学上具有合理性。

2.2 色谱条件的优化

黄芪甲苷是酸稳定性化合物^[14],在流动相中加入酸可以增强其电离,因此考察了不同种类的酸及酸浓度对黄芪甲苷分离和电离效果的影响,在流动相中加入0.1%甲酸可以达到增加电离程度,同时又起到防止拖尾,改善峰形的作用。因此,流动相组成确定为乙腈-0.1%甲酸水溶液为(60:40, V/V)。在此条件下黄芪甲苷对照品和样品的MRM离子流图分别见图3、4。

2.3 样品前处理条件的选择

目前,黄芪甲苷的提取方法大多相似,以甲醇为提取溶剂,纯化时以水饱和和正丁醇萃取后经不同碱液振摇洗涤得供试品,或碱洗后样品再经大孔吸附树脂进行分离^[4-5,15-16],步骤繁多,而正丁醇萃取时乳化严重,不易分层,且方法耗时。黄芪中含有4种结构类似的皂苷类成分,其中主要有2种

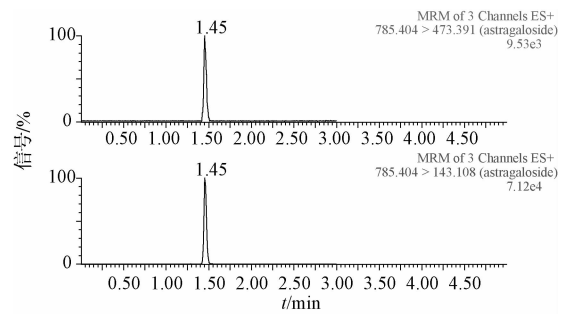


图3 黄芪甲苷对照品的MRM离子流图

Figure 3 MRM chromatogram of astragaloside IV in standard solution

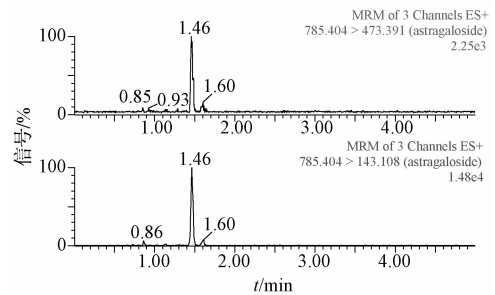


图4 黄芪样品的MRM离子流图

Figure 4 MRM chromatogram of astragaloside IV in sample

皂苷以黄芪甲苷为基本母核,其糖链上连接1~3个乙酰基,《中国药典》采用碱处理使黄芪皂苷I、II、III糖链上的乙酰基脱落,成为黄芪甲苷(黄芪皂苷IV)^[6],测定值应该是4种黄芪皂苷的总和。张健、龚灿、安军永等^[10-11,17] 直接采用甲醇超声提取的方法进行黄芪甲苷的测定,没有经过碱处理将黄芪皂苷I、II、III转变为黄芪甲苷(黄芪皂苷IV)。李效宽等^[18] 对KOH-甲醇溶液直接进行提取和传统的回流提取进行比较,结果表明,两种提取方法的目标物提取率基本一致。本试验采用甲醇氨水超声对黄芪甲苷进行提取,对甲醇氨水比例、超声时间等条件进行了考察,并与《中国药典》方法进行比较,采用SPSS 20.0软件进行单因素方差分析,结果表明两种方法的提取率差异无统计学意义($P > 0.05$),见表2。最终确定了甲醇氨水超声的提取条件为甲醇-浓氨水(3:1, V/V),超声提取2次,每次30 min,滤过,合并滤液,用0.1 mol/L盐酸调至中性,水浴蒸干,残渣用5.0 ml甲醇溶解。

2.4 方法的线性和检测限

精密吸取1.2.1.1对照品使用液,用甲醇逐级稀释成浓度为60.0、120、240、600、1 200、2 400、6 000、12 000 ng/ml的对照品溶液系列,准确吸取2.0 μ l进样分析。以质量浓度为横坐标,离子流图峰面积为纵坐标进行线性回归,计算回归方程和相关系数。在60.0~12 000 ng/ml范围内黄芪甲苷的

表2 两种方法的测定结果比较

Table 2 Comparison of Results between two different methods

方法	含量/%	平均含量/%	RSD/%
本试验方法	0.113	0.110	2.82
	0.105		
	0.110		
	0.108		
	0.111		
	0.113		
	0.109		
《中国药典》方法	0.103	0.108	3.89
	0.105		
	0.110		
	0.112		
	0.107		

线性方程为 $y = 1.984x + 9.251$; 相关系数 $r = 0.999$ 。以信噪比 $S/N = 3$ 为检测限, $S/N = 10$ 为定量限, 测得黄芪甲苷的检测限和定量限分别为 0.341 和 1.14 ng/ml。当取样量为 0.5 g 时, 检测限为 68.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 228 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.5 方法的回收率和精密度

精密称取 6 份黄芪甲苷量已知的黄芪制剂, 每份 0.5 g, 分别准确加入浓度为 0.240 mg/ml 黄芪甲苷储备液 0.5 ml, 按 1.2.1.2 下提取方法 1 制备供试品溶液, 准确吸取 2.0 μl 进样分析, 测定黄芪甲苷量, 计算回收率, 结果见表 3。由表 3 可见, 方法平均回收率为 91.7%, 表明该方法具有较好的回收率。另精密称取 6 份黄芪药材, 每份 0.5 g, 按 1.2.1.2 下提取方法 1 制备供试品溶液, 准确吸取 2.0 μl 进样分析, 进行精密度考察, 计算黄芪甲苷含量的 RSD 为 2.20%, 表明方法的精密度较好, 结果见表 4。

表3 加标回收试验结果

Table 3 Recoveries of astragaloside IV in spiked samples

本底含量 /(mg/g)	加标量 /(mg/g)	测得量 /(mg/g)	回收率 /%	平均回收 率/%
1.10	0.24	1.31	87.5	91.7
1.10	0.24	1.32	91.7	
1.10	0.24	1.32	91.7	
1.10	0.24	1.35	104.2	
1.10	0.24	1.32	91.7	
1.10	0.24	1.30	83.3	

表4 精密度试验结果

Table 4 Results of precision test

测定次序	含量/%	含量的 RSD/%
1	0.107	2.20
2	0.111	
3	0.113	
4	0.112	
5	0.108	
6	0.112	

3 小结

本试验采用多反应模式 (MRM) 对黄芪甲苷进行测定, 采用黄芪甲苷的两个碎片离子 m/z 473.391 和 m/z 143.108 对黄芪药材制剂中的黄芪甲苷进行定性、定量, 具有特异性强的特点。此外, 由于选择离子对能有效排除复杂体系中的基质对待测对象的干扰, 因此不仅能有效缩短分析时间, 而且灵敏度高, 可用于黄芪制剂的质量评价, 为黄芪药材中黄芪甲苷的快速测定提供技术支持。

参考文献

- [1] 张蕾, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有效成分药理活性的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2012, 3(21): 3203-3207.
- [2] 唐斌, 杨扬, 尚北城, 等. 黄芪制剂中黄芪甲苷测定方法比较 [J]. 西南军医, 2004, 6(2): 82-83.
- [3] 刘浩文, 刘嘉仪, 杨妙荣, 等. 黄芪药材中黄芪甲苷含量测定的两种方法的比较研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22(6): 659-662.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 283-284.
- [5] 香港中药材标准(第一册) [S]. 香港: 香港卫生署, 2005: 50-60.
- [6] 杜国军, 秦雪梅, 李震宇, 等. 山西省中药材标准道地黄芪含量测定方法的建立 [J]. 山西医科大学学报, 2013, 44(2): 134-138.
- [7] 李晶, 韦露莎, 申旭霁. HPLC-ESI-MS 法测定黄芪药材中黄芪甲苷 [J]. 中成药, 2011, 33(4): 720-724.
- [8] 王锐, 卢红波. HPLC-MS/MS 法测定兔血浆中黄芪甲苷的含量 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2010, 31(6): 774-777.
- [9] 刘灵改, 支旭然, 郭进, 等. HPLC-MS 法同时测定防芷咽喉颗粒中 6 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(5): 830-835.
- [10] 张健, 林志燕, 唐跃年, 等. UHPLC-MS/MS 法同时测定甘地胶囊中 7 个成分的含量 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(4): 622-627.
- [11] 龚灿, 钱麟, 杨红, 等. UPLC-MS 法同时测定增免抑瘤颗粒中 5 种成分 [J]. 中成药, 2014, 36(2): 301-305.
- [12] 徐洁, 谢丽艳, 居文政, 等. 液相串联质谱同时测定艾迪注射液 9 种成分 [J]. 中草药, 2013, 44(5): 556-570.
- [13] 傅俊曾, 宋生有, 姜民, 等. 液相色谱-质谱联用同时测定芪参益气滴丸中黄芪甲苷、丹参素、原儿茶醛、人参皂苷 Rg1 和 Rb1 含量 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 47(1): 61-64.
- [14] WANG D, SONG Y, LI S L, et al. Simultaneous analysis of seven astragalosides in *Radix astragali* and related preparations by liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science, 2006, 29(13): 2012-2022.
- [15] 丁如贤, 李霞, 李一珺, 等. 黄芪药材、饮片中黄芪甲苷含量测定方法的改进 [J]. 世界中医药, 2013, 8(6): 669-671.
- [16] 马雯霞, 袁红梅. 高效液相色谱法测定香菊颗粒中黄芪甲苷含量 [J]. 中国药业, 2014, 23(15): 45-46.
- [17] 安军永, 王世华, 李云鹏, 等. 参芪益气固本片中皂苷类成分的 UPLC-MS 测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2): 99-102.
- [18] 李效宽, 张艳海, 冯天辉, 等. 在线固相萃取法结合电雾式检测器测定黄芪及其复方中黄芪甲苷的含量 [J]. 分析化学, 2014, 42(12): 1791-1796.