

超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法同时测定 劲酒中 8 种活性成分含量

汤丽昌*

(北海市食品药品检验所, 北海 536000)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)法同时测定中国劲酒中 8 种活性成分含量的分析方法。**方法** 采用 Agilent EC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×50 mm, 1.8 μm), 以 0.1%甲酸水-0.1%甲酸甲醇为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.2 mL/min。采用电喷雾离子源进行正离子模式监测, 多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)用于定量分析。**结果** 中国劲酒中的 8 种活性成分在考察的浓度范围内具有良好的线性关系($r>0.9981$); 回收率($n=6$)在 96.7%~103.3%内, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 4.38%; 3 批次间 8 个成分的含量差异较大。**结论** 该方法简便快速、专属性强、灵敏度高, 可用于中国劲酒的质量控制。**关键词:** 中国劲酒; 超高效液相色谱-串联质谱法; 活性成分

Simultaneous determination of 8 kinds of active ingredients in Chinese Jing liqueur by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

TANG Li-Chang*

(Beihai Food & Drug Inspection and Testing Institute, Beihai 536000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 8 kinds of active ingredients in Chinese Jing liqueur by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The chromatographic separations were obtained on a Agilent EC-C₁₈ (4.6 mm×50 mm, 1.8 μm) with a gradient elution using the mixture of 0.1% formic acid methanol and 0.1% formic acid water solution as mobile phase. The flow rate was 0.2 mL/min. The multiple-reaction monitoring (MRM) scanning was employed for the quantification with switching electrospray ion source polarity in positive mode. **Results** All calibration curves of 8 components were linear ($r>0.9981$) over the tested ranges. The recoveries ($n=6$) ranged from 96.7% to 103.3%, and the RSD was less than 4.38%. Among 3 batches, the content of 8 components varied greatly. **Conclusions** This method is convenient, rapid, and it has good selectivity and high sensitivity, which can be used for the quality control of Chinese Jing liqueur.

KEY WORDS: Chinese Jing liqueur; ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; active ingredients

*通讯作者: 汤丽昌, 主管药师, 高级技师, 主要研究方向为食品安全与质量检测。E-mail: wangkongxing@139.com

*Corresponding author: TANG Li-Chang, Pharmacist, Senior Technician, Beihai Food & Drug Inspection and Testing Institute, Beihai 536000, China. E-mail: wangkongxing@139.com

1 引言

中国劲酒是由用优质白酒以及淮山药、仙茅、当归、肉苁蓉、枸杞子、黄芪、淫羊藿、肉桂及丁香等 9 味药材等配制而成, 是国内外知名保健品, 具有抗疲劳、免疫调节等保健功能, 能有效改善肾虚阳证患者的主要症状^[1-3]。在质量控制研究方面, 梁国华^[4,5]采用了高液相色谱法和高效液相色谱—串联质谱法分别测定了中国劲酒中的桂皮醛和甜菜碱; 张亚楠等^[6,7]采用气相色谱-质谱联用仪(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)法分析了中国劲酒的挥发性成分; 陈志元等^[8]采用近红外光谱结合偏最小二乘法在线预测了劲酒中药材提取液的密度。但由于中国劲酒属于复方制剂, 成分相对复杂, 从目前所报道的质量控制检测方法研究来看, 未对该产品活性成分进行含量测定, 存在不全面、分析时间较长、专属性不强等缺点。超高效液相色谱分离分析时间短, 电喷雾三重串联四级杆质谱灵敏度高, 其优越的高选择性和良好的抗基质效应使得定量更加准确。多指标的含量测定可以较全面的分析产品质量, 从而指导产品生产时原料的投入量, 以期保证各批次间产品质量稳定。因此, 本研究在检索对准山药^[9]、仙茅^[10]、当归^[11]、肉苁蓉^[12]、枸杞子^[13]、黄芪^[14]、丁香^[15]等组方药材的研究基础上, 建立超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定中国劲酒中甜菜碱、腺苷、香草酸、芦丁、阿魏酸、香草醛、黄芩苷、黄芪甲苷 8 种活性成分的含量, 以期为中国劲酒的质量控制提供依据。

2 材料与方法

2.1 仪器

1290 型高效液相色谱仪、G6460 型三重串联四级杆质谱仪(配有电喷雾离子源)(美国 Agilent 公司); XA205DU 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler 公司); R200/205 型旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司)。

2.2 对照品与试剂

甜菜碱对照品(批号: 110894-200503, 纯度: 100.0%)、腺苷对照品(批号: 879-200202, 纯度: 100.0%)、香草醛对照品(批号: 100093-200804, 纯度: 100.0%)(中国药品生物制品检定所); 黄芪甲苷对照品(批号: 110781-201616, 纯度: 97.4%)、芦丁对照品(批号: 100080-201610, 纯度: 91.9%)、黄芩苷对照品(批号: 110715-201619, 纯度: 93.5%); 香草酸对照品(批号: 110776-200402, 纯度: 100.0%)、阿魏酸对照品(批号: 110773-201012, 纯度: 99.6%)(中国食品药品检定研究院); 甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸(色谱纯,

美国 Tedia 公司)。

实验室用水为 Mili-Q 超纯水(德国 Merck 公司); 3 批中国劲酒(批号: 20191014、20190118、20191205, 劲牌有限公司)。

2.3 混合对照品溶液制备

精密称取甜菜碱、腺苷、香草酸、芦丁、阿魏酸、香草醛、黄芩苷、黄芪甲苷对照品适量, 加 50%甲醇分别制成 0.7750、0.2540、1.037、0.995、1.054、1.981、1.370、0.3170 mg/mL 贮备液。分别取各对照品溶液适量, 置于同一 100 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得甜菜碱、腺苷、香草酸、芦丁、阿魏酸、香草醛、黄芩苷、黄芪甲苷的混合对照品溶液, 质量浓度分别为 15.50、0.2540、20.74、4.975、21.08、1.981、13.70、3.170 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 供试品溶液制备

精密量取中国劲酒 20 mL, 置旋转蒸发仪上 45 $^{\circ}\text{C}$ 减压浓缩至近干, 用约 50%甲醇溶解转移至 10 mL 容量瓶中, 用 50%甲醇稀释至刻度, 摇匀, 经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.5 空白样品溶液

取白酒 20 mL, 按“2.4”项下方法制备空白样品溶液。

2.6 液相色谱条件

Agilent EC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 50 mm, 1.8 μm); 流动相: 0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸甲醇(B), 梯度洗脱(0~3 min, 10%B; 3~5 min, 10% \rightarrow 30%B; 5~7 min, 30% \rightarrow 50%B; 7~10 min, 50% \rightarrow 70%B; 10~11 min, 70%B; 12~13 min, 70% \rightarrow 90%B; 13~15 min, 90% \rightarrow 10%B), 流速为 0.2 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL 。

2.7 质谱条件

采用电喷雾正电离源模式(electronic spray ion, ESI+), 扫描方式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 雾化气压力: 30 psi; 干燥气温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; 干燥气流速: 9 L/min; 毛细管电压: 4000 V。MRM 模式定量。监测的离子对, 毛细管出口电压(fragmentor)和碰撞能量(collision energy, CE)见表 1。

3 结果与分析

3.1 质谱条件及色谱条件优化

3.1.1 质谱条件的优化

本研究对 8 种目标化合物的质谱条件进行优化发现, ESI 正离子扫描模式下响应情况较优, 因此在 ESI 正离子扫描模式下确定了各成分母离子及其毛细管出口电压, 后对各母离子施加碰撞能, 找出特定子离子, 优化得到最佳碰撞能, 最后在 MRM 模式下优化各成分的质谱参数, 结果见表 1。

表 1 各成分质谱参
Table 1 MS parameters for various constituents

成分	M_r	$MS_1(m/z)$	$MS_2(m/z)$	电压/V	CE/eV
甜菜碱	117.15	118.1	59.1(58.1)	130	15(30)
腺苷	267.24	268.1	135.9(267.9)	135	15(5)
香草酸	168.15	169.2	93.0(125.2)	100	10(5)
芦丁	610.51	611.2	303.1(465.1)	135	15(10)
阿魏酸	194.19	195.2	176.9(144.9)	65	5(20)
香草醛	152.14	152.9	65.0(93.0)	110	25(10)
黄芩苷	446.35	447.1	271.1	115	15
黄芪甲苷	784.97	785.6	143.1(473.2)	75	20(15)

注: 括号中子离子 $MS_2(m/z)$ 为定性离子及其相应的碰撞能量 (CE)。

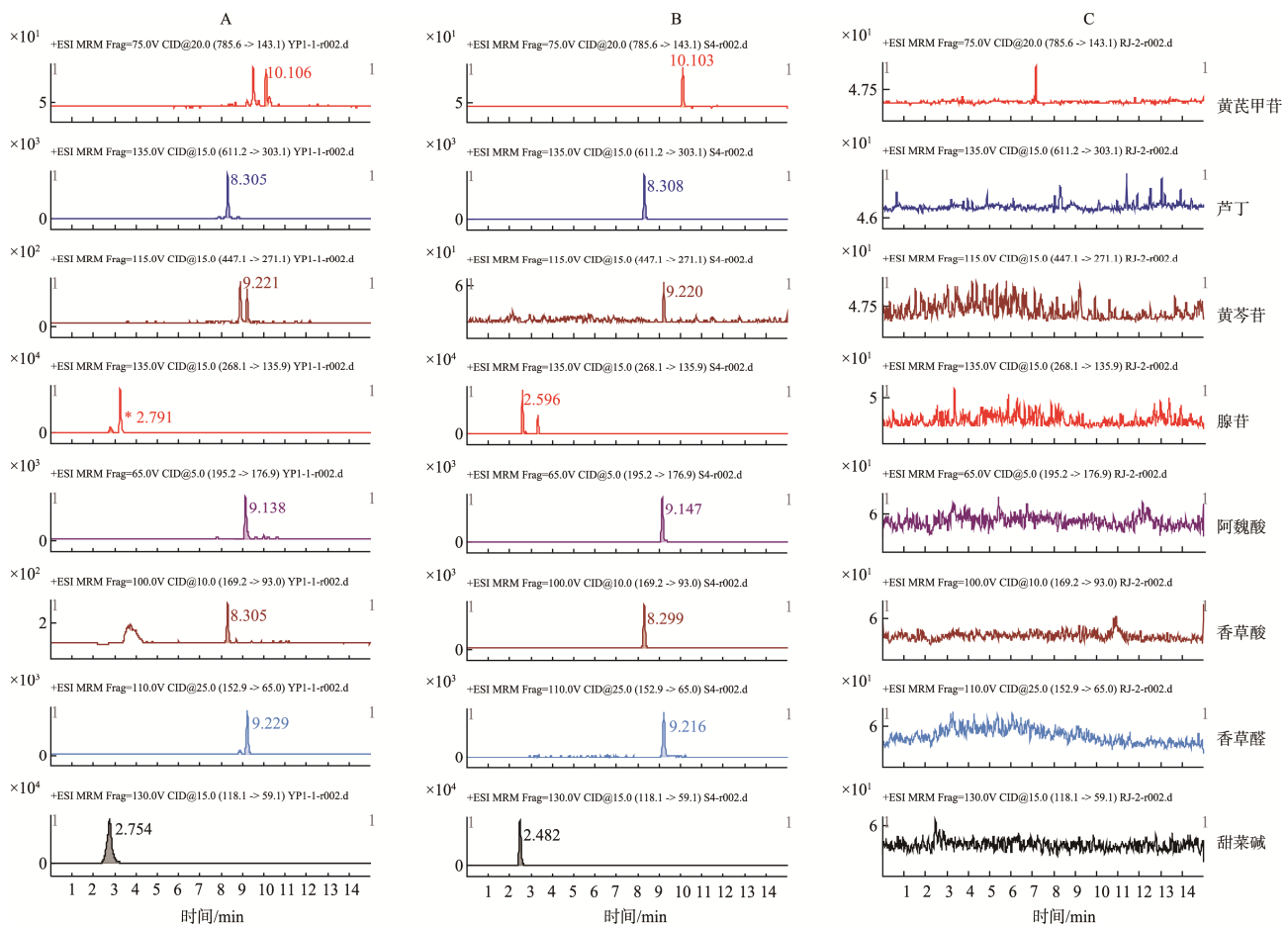
3.1.2 色谱条件的选择

由于成分较复杂, 为保证所测组分能得到有效分离,

且不受空白样品溶液的干扰, 本研究分别试用了 Agilent SB-C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)、Atlantis®T3(2.1 mm×150 mm, 3 μm)、Agilent EC-C₁₈(4.6 mm×50 mm, 1.8 μm)等色谱柱, 发现 Agilent EC-C₁₈(4.6 mm×50 mm, 1.8 μm)色谱柱在 15 min 内可对 8 种成分得到较好的分离, 峰型良好、且基质无干扰。提取离子流图结果见图 1。故选择 Agilent EC-C₁₈ 色谱柱。

3.2 标准工作曲线、定量限和检测限

精密量取“2.3”项下混合对照品溶液适量, 采用倍数稀释法, 用 50% 甲醇分别稀释 4、10、20、40、100、200 倍, 制得 6 个不同浓度梯度的系列溶液, 按“2.6”“2.7”项条件下分别进样测定 3 次, 记录峰面积。以对照品待测液浓度(X)为横坐标, 峰面积平均值(Y)为纵坐标, 进行回归, 再将混合对照品溶液逐步稀释, 分别以信噪比 $S/N=10$ 、 $S/N=3$ 时的质量浓度作为定量限和检出限, 结果见表 2, 表明各成分在各自范围内线性关系良好。由检出限和定量限结果可以看出, 本方法灵敏度较高。



注: A 供试品; B 对照品; C 空白样品

图 1 提取离子流图

Fig.1 Extracted ion chromatogram

表 2 8 种成分的回归方程、线性范围、相关系数、LOQ 和 LOD
Table 2 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients, LODs, and LOQs of 8 constituents

成分	回归方程	线性范围/($\mu\text{g/L}$)	r	定量限/($\mu\text{g/L}$)	检出限/($\mu\text{g/L}$)
甜菜碱	$Y=2052.55X+82323.55$	38.75~1938	0.9991	0.10	0.03
腺苷	$Y=20982.23X+21281.56$	0.6350~31.75	0.9981	0.04	0.01
香草酸	$Y=17.35X-31.48$	527.0~2592	0.9996	1.58	0.53
芦丁	$Y=123.64X-342.76$	12.44~621.8	0.9999	0.82	0.25
阿魏酸	$Y=79.25X-86.42$	52.70~2635	0.9993	3.48	1.05
香草醛	$Y=452.20X+59.64$	4.952~247.6	0.9998	0.30	0.10
黄芩苷	$Y=791.55X+66.44$	34.25~1712	0.9995	0.09	0.03
黄芪甲苷	$Y=2.72X-11.48$	7.925~396.2	0.9987	3.27	0.99

3.3 方法精密度及加样回收率

精密量取含有量已知的中国劲酒(批号 20191014)样品 6 份, 每份 20 mL, 分别精密加入 0.2 mL 混合对照品溶液, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 在“2.6”“2.7”项条件下进样测定 6 次, 计算回收率及精密度。结果平均回收率分别为甜菜碱 99.4%、腺苷 97.3%、香草酸 99.8%、芦丁 103.3%、阿魏酸 102.6%、香草醛 98.2%、黄芩苷 97.9%、黄芪甲苷 96.7%, 结果均在 96.7%~103.3%; 相对标准偏差(RSD, $n=6$)分别为 1.37%、2.92%、1.51%、1.85%、3.14%、2.72%、4.38%, 均在 1.37%~4.38% 范围内。结果表明准确性及精密度良好, 测定结果可靠。

3.4 样品含有量测定

取不同批号中国劲酒 3 批, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 在“2.6”和“2.7”项条件下进样测定, 计算含有量。所测 3 批中国劲酒中, 黄芩苷含量最高, 其次是甜菜碱和阿魏酸, 各批次间 8 个成分的含量差异较大。结果见表 3。

表 3 样品测定结果($\mu\text{g/L}$, $n=3$)
Table 3 Results of sample determination ($\mu\text{g/L}$, $n=3$)

批号	20191014	20190118	20191205	RSD/%
甜菜碱	193.3	230.2	164.4	13.31
腺苷	2.342	2.501	2.259	4.75
香草酸	103.3	92.41	101.2	7.78
芦丁	116.2	92.7	106.9	15.79
阿魏酸	180.9	162.2	193.3	7.40
香草醛	26.01	20.29	29.55	16.00
黄芩苷	229.8	283.1	215.9	15.51
黄芪甲苷	77.92	70.49	110.7	6.08

4 结 论

本研究为完善中国劲酒的质量控制, 通过对色谱、质

谱条件的优化, 建立了 UPLC-MS/MS 法同时测定中国劲酒中甜菜碱、腺苷、香草酸、芦丁、阿魏酸、香草醛、黄芩苷、黄芪甲苷的含量, 该方法简便快速、专属性强、灵敏度高, 且较全面, 可为中国劲酒质量控制提供新的参考, 为生产投料、保证质量稳定提供科学依据。

参考文献

- 陆世广, 冯声宝, 李静, 等. 中国劲酒对疲劳亚健康患者疲劳程度的缓解作用[J]. 西部中医药, 2017, 30(2): 82-84.
Lu SG, Feng SB, Li J, et al. The effects of Chinese Jing liqueur in relieving the fatigue of the patients with fatigued sub-health status [J]. West J Tradit Chin Med, 2017, 30(2): 82-84.
- 陆世广, 李静, 张亚方, 等. 中国劲酒缓解肾虚阳虚证患者主要症状的临床观察[J]. 中成药, 2018, 40(3): 562-570.
Lu SG, Li J, Zhang YF, et al. Clinical observation of main symptoms relief by Chinese Jing liqueur in patients with deficiency of kidney yang [J]. Chin Tradit Pat Med, 2018, 40(3): 562-570.
- 单义民, 周慧, 陈默思, 等. 中国劲酒抗疲劳、调节免疫力及增强性功能作用的研究[J]. 中成药, 2018, 40(7): 1600-1603.
Shan YM, Zhou H, Chen MS, et al. Study on anti-fatigue, regulating immunity and enhancing sexual function of Chinese Jing liqueur [J]. Chin Tradit Pat Med, 2018, 40(7): 1600-1603.
- 梁国华. 高效液相色谱法测定中国劲酒中桂皮醛的含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(8): 3103-3107.
Liang GH. Determination of cinnamaldehyde in Chinese Jing liqueur by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(8): 3103-3107.
- 梁国华. 高效液相色谱-串联质谱法测定中国劲酒中甜菜碱含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(9): 2805-2809.
Liang GH. Determination of betaine in Chinese Jing wine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(9): 2805-2809.
- 张亚楠, 孙宝国, 孙金沅, 等. 11 种保健酒中挥发性成分的分析[J]. 食品科学, 2016, 37(16): 106-111.
Zhang YN, Sun BG, Sun JY, et al. Analysis of volatile compounds in 11 kinds of health wines [J]. Food Sci, 2016, 37(16): 106-111.
- 刘胜华, 李红君, 孙细珍, 等. 中国劲酒挥发性风味物质 GC-MS 分析

- [J]. 酿酒科技, 2018, (5): 80–86.
- Liu SH, Li HJ, Sun XZ, *et al.* Analysis of volatile flavoring compounds in Chinese Jing liqueur by GC–MS [J]. *Eur Food Res–Technol*, 2018, (5): 80–86.
- [8] 陈志元, 闪媛媛, 袁咏红, 等. 劲酒药材提取液密度的近红外透射模型研究[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(11): 2819–2820.
- Chen ZY, Shan YY, Yuan YH, *et al.* Study on the near-infrared transmission model for the density of the extract of Chinese Jing liqueur [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2014, 25 (11): 2819–2820.
- [9] 白冰, 刘绣华, 王勇, 等. 怀山药化学成分研究(II)[J]. *化学研究*, 2008, 19(3): 67–69.
- Bai B, Liu XH, Wang Y, *et al.* Studies on chemical constituents from *Dioscorea opposita* Thunb(II) [J]. *Chem Res*, 2008, 19(3): 67–69.
- [10] 蒋璐璐. 仙茅的化学成分提取分离及其抗肿瘤活性筛选[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- Jiang LL. Extraction separation of chemical constituents of *Curculigo*, and screening of its antitumor activity [D]. Shenyang: China Medical University, 2018.
- [11] 陶益, 陈西, 李伟东, 等. 当归炮制品 9 种化学成分的比较研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(1): 88–92.
- Tao Y, Chen X, Li WD, *et al.* Comparative analysis of 9 constituents in processed products of *Radix angelicae sinensis* [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2017, 28(1): 88–92.
- [12] 徐文豪, 邱声祥, 赵继红, 等. 肉苁蓉化学成分的研究[J]. *中草药*, 1994, 25(10): 509–513, 558.
- Xu WH, Qiu SX, Zhao JH, *et al.* Studies on the chemical constituents of *Desertliving cistanche* [J]. *China Tradit Herb Drugs*, 1994, 25(10): 509–513, 558.
- [13] 谢忱, 徐丽珍, 李宪铭, 等. 枸杞子化学成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 2001, 25(5): 323–324.
- Xie C, Xu LZ, Li XM, *et al.* Studies on chemical constituents in fruit of *Lycium barbarum* L. [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2001, 25(5): 323–324.
- [14] 程亮. 黄芪主要化学成分制备及含量测定方法研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2009.
- Chen L. Study on preparation and quantitative analysis of main chemical compositions in *Astragalus membranaceus* [D]. Shenyang: China Medical University, 2019.
- [15] 但春, 焦威. 丁香的化学成分研究[J]. *中药材*, 2018, 41(5): 1108–1113.
- Dan C, Jiao C. Chemical constituents of *Caryophylli Flos* [J]. *J Chin Med Mater*, 2018, 41(5): 1108–1113.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



汤丽昌, 硕士, 主管药师, 高级技师,
主要研究方向为食品安全与质量检测。
E-mail: 363471255@qq.com