

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)22-0085-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.22.018



超高效液相色谱串联质谱法同时检测更年期用中成药中 7 种雌激素及孕激素*

霍甜甜, 李宜鲜, 申二永, 王海波[△]

(河南省药品医疗器械检验院·河南省疫苗批签中心, 河南 郑州 450009)

摘要:目的 建立同时检测更年期用中成药中 7 种雌激素及孕激素(以下简称雌孕激素)的超高效液相色谱串联质谱法。方法 色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH-C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 30℃, 进样量为 5 μL。离子源为电喷雾离子源(ESI), 电离模式为 ESI⁻(己烯雌酚、雌二醇)和 ESI⁺(孕三烯酮、炔诺孕酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸氯地孕酮、黄体酮), 多反应监测模式, 毛细管电压为 3.0 kV, 离子源温度为 150℃, 脱溶剂气温度为 500℃, 脱溶剂气流量为 1 000 L/h, 锥孔气流量为 50 L/h。结果 己烯雌酚、雌二醇、孕三烯酮、炔诺孕酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸氯地孕酮、黄体酮质量浓度分别在 6.209~206.960 ng/mL、6.321~210.704 ng/mL、5.720~224.325 ng/mL、5.327~190.649 ng/mL、5.040~171.312 ng/mL、6.496~168.000 ng/mL、7.026~216.548 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.996$, $n=6$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 5.0%, 平均提取回收率分别为 104.38%, 97.29%, 98.66%, 106.33%, 92.77%, 92.25%, 90.07%, RSD 分别为 3.97%, 6.42%, 5.63%, 4.16%, 3.28%, 1.96%, 3.11% ($n=9$)。样品中均未检出 7 种雌孕激素。结论 所建方法操作简便, 结果稳定, 可用于同时检测更年期用中成药中 7 种雌孕激素。

关键词: 超高效液相色谱串联质谱法; 中成药; 雌激素; 孕激素

Simultaneous Determination of Seven Estrogens and Progestogens in Chinese Patent Medicines for Menopause - Treating by UPLC - MS / MS

HUO Tiantian, LI Yixian, SHEN Eryong, WANG Haibo

(Henan Institute for Drug and Medical Device Inspection · Henan Vaccine Issuance Center, Zhengzhou, Henan, China 450009)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

*基金项目: 河南省市场监督管理局科技计划项目[2023sj61]。

第一作者: 霍甜甜, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为中药及化妆品检验及质量标准, (电子信箱)1475560950@qq.com。

[△]通信作者: 王海波, 男, 硕士, 主任药师, 研究方向为药物质量分析, (电子信箱)haibowang99@163.com。

治疗小儿急性上呼吸道感染(风热感冒夹痰证)的多中心临床研究[J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13(36): 89-92.

[12] 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, 2020: 32, 230, 569.

[13] 李文举, 罗福龙, 王凤忠, 等. 金银花水提物改善脓毒血症的物质基础研究[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 79-89.

[14] LEE YR, CHANG CM, YEH YC, et al. Honeysuckle Aqueous Extracts Induced let-7a Suppress EV71 Replication and Pathogenesis In Vitro and In Vivo and Is Predicted to Inhibit SARS-CoV-2[J]. Viruses, 2021, 13(2): 308-311.

[15] 熊乐文, 金莹, 王彦予, 等. 金银花酚酸类化学成分、药理活性及体内代谢研究进展[J]. 中成药, 2022, 44(3): 864-871.

[16] LI M, WANG Y, JIN J, et al. Inhibitory Activity of Honeysuckle Extracts Against Influenza A Virus in vitro and in vivo[J]. Virol Sin, 2021, 36(3): 490-500.

[17] 罗进, 黄成, 周静仪, 等. 金银花的功能活性及其健康产品开发研究进展[J]. 现代食品, 2022, 28(17): 73-76.

[18] 刘倩, 卢恒, 王晓, 等. 不同加工方法对金银花茶质量的影响[J]. 食品研究与开发, 2022, 43(22): 166-173.

[19] 覃丽娜, 白桂昌, 张慧, 等. 银翘解毒颗粒中金银花掺伪检查[J]. 中国药事, 2021, 35(12): 1375-1382.

[20] 郑文燕, 李哲, 冯启宏, 等. HPLC 和 UPLC-MS/MS 法考察清热解毒口服液中金银花投料规范性[J]. 中国药师, 2022, 25(1): 189-193.

[21] 孙铭英, 苏章轩, 杨志业. 金银花配方颗粒山银花检查方法的建立[J]. 中国民族民间医药, 2021, 30(19): 38-39.

[22] 姜军华, 吴良发, 许妍, 等. 小儿咽扁颗粒中掺伪山银花检验方法研究[J]. 中国药事, 2023, 37(4): 443-449.

[23] 朱泽兵, 何世新. 银翘解毒口服液中山银花鉴别方法研究[J]. 中国药业, 2022, 31(22): 64-67.

[24] 王莹, 郝江波, 陈佳佳, 等. 基于主要化学成分差异的金银花与山银花种质资源系统评价研究[J]. 中南药学, 2020, 18(5): 825-831.

[25] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 480.

(收稿日期: 2024-04-24; 修回日期: 2025-04-16)

method for simultaneous detection of seven estrogens and progestins in Chinese patent medicines for menopause - treating.

Methods The chromatographic column was the Waters Acquity UPLC BEH - C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile - water (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL / min, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 5 μL. The electrospray ionization (ESI) source was operated, with ionization modes of ESI⁻ (diethylstilbestrol and estradiol), and ESI⁺ (gestrinone, norgestrel, medroxyprogesterone acetate, chlormadinone acetate, and progesterone). The multiple reaction monitoring (MRM) was used. The capillary voltage was 3.0 kV, the ion source temperature was 150 °C, the desolvation gas temperature was 500 °C, the desolvation gas flow was 1 000 L / h, and the cone gas flow was 50 L / h.

Results The linear ranges of diethylstilbestrol, estradiol, gestrinone, norgestrel, medroxyprogesterone acetate, chlormadinone acetate, progesterone were 6.209 - 206.960 ng / mL, 6.321 - 210.704 ng / mL, 5.720 - 224.325 ng / mL, 5.327 - 190.649 ng / mL, 5.040 - 171.312 ng / mL, 6.496 - 168.000 ng / mL, 7.026 - 216.548 ng / mL ($r \geq 0.996$, $n = 6$), respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability tests were all lower than 5.0%. The average extraction recoveries were 104.38%, 97.29%, 98.66%, 106.33%, 92.77%, 92.25%, 90.07%, with RSDs of 3.97%, 6.42%, 5.63%, 4.16%, 3.28%, 1.96%, 3.11% ($n = 9$), respectively. The analysis revealed no detection of the seven target estrogen and progestins in any of the samples. **Conclusion** The established method is simple, reliable, and suitable for the simultaneous determination of seven estrogens and progestogens in Chinese patent medicines for menopause - treating.

Key words: UPLC - MS / MS; Chinese patent medicine; estrogen; progestogen

更年期是由女性卵巢功能逐渐衰退,雌激素及孕激素(以下简称雌孕激素)水平下降而引起^[1-2]。激素替代疗法主要是通过补充雌和/或孕激素,从而改善患者激素分泌下降症状^[3-5]。与单独使用雌激素相比,雌孕激素联合使用可降低乳腺癌发生率,且对心血管有一定的保护作用。但雌孕激素的大量长期使用可能会引发多种药品不良反应,如乳腺癌、子宫内膜癌等^[6-8]。有报道,部分企业在利益驱使下,在中成药中非法添加化学药^[9-12]。为防止该情况的发生,保障消费者的用药安全,本研究中建立了同时检测更年期用中成药中7种雌孕激素的超高效液相色谱串联质谱(UPLC - MS / MS)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters Acquity 型超高效液相色谱仪、Waters ZSpray 型三重四极杆串联质谱仪(美国 Waters 公司); XP105 型电子天平(瑞士 Mettler 公司,精度为 0.1 mg); KQ - 500DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Milli - Q 超纯水处理系统(德国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

坤宝丸(A公司,批号为K1、K2;B公司,批号为K3、K4;C公司,批号为K5);更年宁(D公司,批号为G6、G7);更年安片(E公司,批号为G8、G9);对照品己烯雌酚(批号为100033 - 201308,含量99.5%),雌二醇(批号为100182 - 201205,含量96.3%),孕三烯酮(批号为100987 - 201101,含量99.7%),炔诺孕酮(批号为100028 - 199907,含量99.4%),醋酸甲羟孕酮(批号为100001 - 201305,含量99.6%),醋酸氯地孕酮(批号为100011 - 200702,供含量测定用),黄体酮(批号为100027 - 201209,含量99.7%),均购自中国食品药品

检定研究院;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH - C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相为乙腈(A) - 水(B),梯度洗脱(0 ~ 24 min 时 5%A → 85%A, 24 ~ 25 min 时 85%A → 5%A);流速为 0.3 mL / min;柱温为 30 °C;进样量为 5 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正负离子扫描,多反应监测模式(MRM),毛细管电压为 3.0 kV;离子源温度为 150 °C;脱溶剂气温度为 500 °C;脱溶剂气流量为 1 000 L / h;锥孔气流量为 50 L / h,碰撞气为氩气。

质谱条件优化:取单一对照品储备液适量,分别用乙腈稀释成质量浓度为 1 μg / mL 的单一对照品溶液,进样,优化 7 种成分的最佳锥孔电压和碰撞电压(见表 1)。

2.2 溶液制备

对照品溶液:分别取 7 种对照品各 10 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容,摇匀,制成单一对照品储备液。各吸取 10, 20, 100 μL,用乙腈定容至 100 mL,摇匀,即得混合对照品溶液 2、混合对照品溶液 1 和混合对照品溶液。详见表 2。

供试品溶液:取装量差异项下的供试品适量,研细,取 0.2 g,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加乙腈定容,超声(功率 250 W、频率 40 Hz)提取 20 min,放冷至室温,用乙腈定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取混合对照品溶液 2 适量,按 2.1 项下试验条件进样测定,记录色谱图。详见图 1。

表 1 7 种成分的质谱参数
Tab. 1 MS parameters for the seven components

待测成分	t/min	电离模式	母离子 (m/z)	定性离子 (m/z)	定量离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)
己烯雌酚	16.67	ESI ⁻	267.242	251.164	237.115	50	32
雌二醇	14.68	ESI ⁻	271.210	183.104	145.117	74	44
孕三烯酮	15.92	ESI ⁺	309.146	199.038	241.141	40	24
炔诺孕酮	17.25	ESI ⁺	313.241	91.043	109.025	36	32
醋酸甲羟孕酮	20.09	ESI ⁺	387.278	97.100	123.066	38	30
醋酸氯地孕酮	19.95	ESI ⁺	405.144	267.300	309.103	32	16
黄体酮	19.83	ESI ⁺	315.129	109.025	97.017	36	24

表 2 对照品溶液质量浓度
Tab. 2 Mass concentration of reference solutions

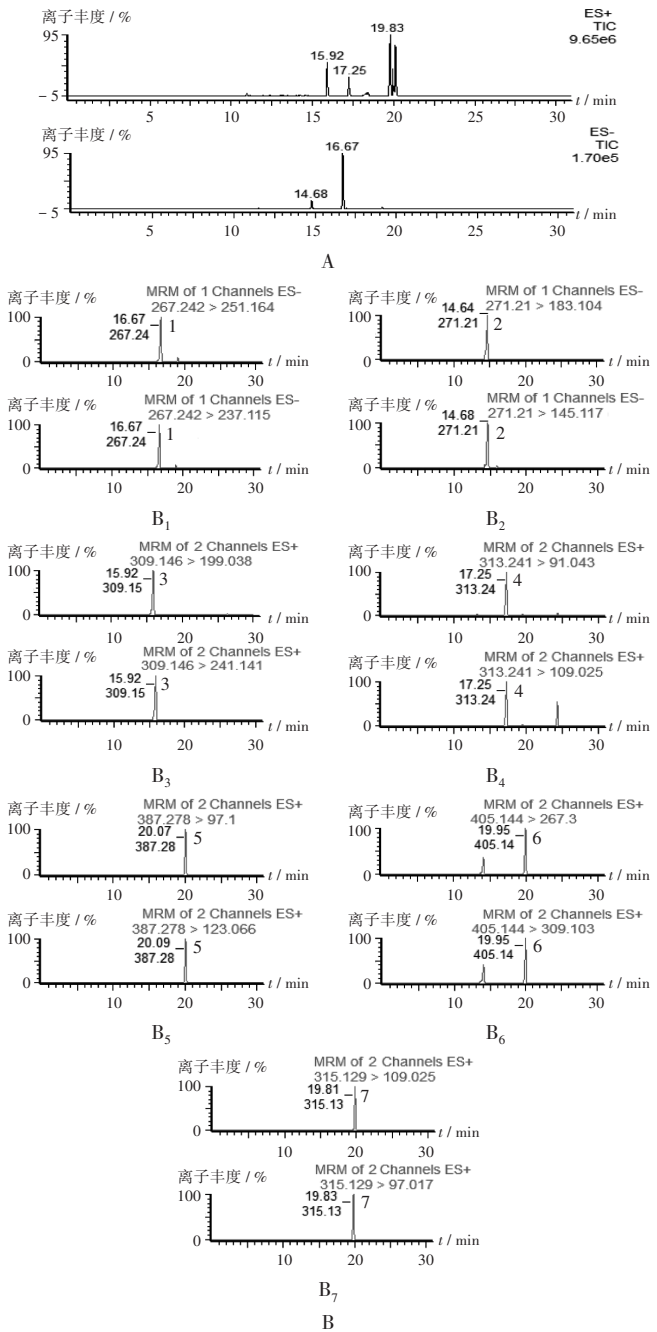
待测成分	单一对照品储备液(μg/mL)	混合对照品溶液(μg/mL)	混合对照品溶液 1(ng/mL)	混合对照品溶液 2(ng/mL)
己烯雌酚	1 034.800	1.035	206.960	103.480
雌二醇	1 053.522	1.054	210.704	105.352
孕三烯酮	1 121.625	1.122	224.325	112.163
炔诺孕酮	953.246	0.953	190.649	95.325
醋酸甲羟孕酮	856.560	0.857	171.312	85.656
醋酸氯地孕酮	840.000	0.840	168.000	84.000
黄体酮	1 082.742	1.083	216.548	108.274

线性关系考察:取 2.2 项下混合对照品溶液 2 各 3, 2, 1, 0.5 mL, 分别置于 5, 5, 10, 25 mL 量瓶中, 加乙腈定容, 摇匀, 制成质量浓度分别为 60, 40, 10, 6 ng/mL 的混合对照品溶液 3-6。取混合对照品溶液 1-6 各适量, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积。以待测成分质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 结果见表 3。

定量限与检测限考察:取混合对照品溶液 6 适量, 倍比稀释, 并按 2.1 项下试验条件进样测定, 以信噪比 10:1、3:1 时的质量浓度分别记作定量限、检测限。结果见表 3。

精密度试验:取混合对照品溶液 3 适量, 按 2.1 项下试验条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果己烯雌酚、雌二醇、孕三烯酮、炔诺孕酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸氯地孕酮、黄体酮峰面积的 RSD 分别为 2.38%, 1.40%, 3.94%, 1.76%, 4.69%, 1.38%, 2.02% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为 K1)适量, 加入混合对照品溶液 3 适量, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 分别于室温下放置 0, 2, 8, 12, 18, 24, 36 h, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积。结果己烯雌酚、雌二醇、孕三烯酮、炔诺孕酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸氯地孕酮、黄体酮峰面积的 RSD 分别为 3.55%, 3.02%, 3.54%, 4.06%, 3.89%, 4.13%, 3.76% ($n=7$), 表明供试品溶液在室温放置 36 h 内基本稳定。



1. 己烯雌酚 2. 雌二醇 3. 孕三烯酮 4. 炔诺孕酮
5. 醋酸甲羟孕酮 6. 醋酸氯地孕酮 7. 黄体酮
A. 总离子流图 B₁ - B₇. 定性(上)和定量(下)提取离子流图
图 1 离子流图

1. Diethylbesterol 2. Estradiol 3. Gestrinone 4. Norgestrel 5. Medroxy-progesterone acetate 6. Chlormadinone acetate 7. Progesterone
A. Total ion chromatogram B₁ - B₇. Extracted ion chromatograms for the qualification (up) and quantification (down) ion transitions

Fig. 1 Ion chromatograms

重复性试验:取样品(批号为 K1)适量, 共 6 份, 加入混合对照品溶液 3 适量, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果己烯雌酚、雌二醇、孕三烯酮、炔诺孕酮、醋酸甲羟孕酮、醋酸氯地孕酮、黄体酮含量的 RSD

表 3 线性关系、定量限及检测限考察结果
Tab. 3 Results of linear relationship, LOQ and LOD

待测成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围(ng/mL)	定量限(ng/mL)	检测限(ng/mL)
己烯雌酚	$Y_1 = 248 X_1 - 857$	0.997	6.209~206.960	3.725	1.242
雌二醇	$Y_2 = 39 X_2 - 30$	0.996	6.321~210.704	3.793	1.264
孕三烯酮	$Y_3 = 1\,059 X_3 + 1\,470$	0.998	5.720~224.325	1.716	0.572
炔诺孕酮	$Y_4 = 6\,534 X_4 + 9\,893$	0.996	5.327~190.649	1.864	0.533
醋酸甲羟孕酮	$Y_5 = 2\,499 X_5 + 1\,306$	0.997	5.040~171.312	2.520	0.756
醋酸氯地孕酮	$Y_6 = 1\,924 X_6 + 5\,052$	0.996	6.496~168.000	1.949	0.650
黄体酮	$Y_7 = 2\,589 X_7 + 384$	0.996	7.026~216.548	2.108	0.703

分别为 3.49%, 2.66%, 2.74%, 3.03%, 3.47%, 4.90%, 3.18% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

提取回收试验: 取乙腈适量, 共 9 份, 分别加入低、中、高质量浓度的待测成分对照品溶液, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积并计算提取回收率。结果见表 4。

表 4 提取回收试验结果 ($n = 9$)
Tab. 4 Results of the extraction recovery test ($n = 9$)

待测成分	加入量 (ng/mL)	测得量 (ng/mL)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)	待测成分	加入量 (ng/mL)	测得量 (ng/mL)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
己烯雌酚	20.70	21.43			醋酸甲羟孕酮	17.14	15.36		
	103.50	104.31	104.38	3.97		85.70	79.90	92.77	3.28
	155.25	168.93				128.55	122.74		
雌二醇	21.08	19.01			醋酸氯地孕酮	16.80	15.57		
	105.40	107.65	97.29	6.42		84.00	78.87	92.25	1.96
	158.10	157.39				126.00	113.66		
孕三烯酮	22.44	20.58			黄体酮	21.66	19.26		
	112.20	111.90	98.66	5.63		108.30	98.69	90.07	3.11
	168.30	175.96				162.45	146.46		
炔诺孕酮	19.06	19.78							
	95.30	104.26	106.33	4.16					
	142.95	105.76							

2.4 样品含量测定

取样品各适量, 分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.1 项下试验条件进样测定, 平行测定 3 次, 记录峰面积并计算样品含量, 结果均未检出 7 种雌孕激素。

3 讨论

3.1 流动相选择

色谱条件考察过程中, 分别考察了乙腈-水、乙腈(含 0.1% 甲酸)-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-乙酸铵溶液(10 mmol/L, 含 0.1% 甲酸)作为流动相时对待测成分的分离效果, 结果 7 种成分在乙腈-水和乙腈-乙酸铵溶液(10 mmol/L, 含 0.1% 甲酸)系统中均有较高的响应且均可实现分离, 出于对仪器系统的保护, 最终选择乙腈-水为流动相。

3.2 质谱条件选择

质谱条件优化过程中, 分别将 7 种待测成分在正、

负离子模式下考察各自的质谱响应度。结果雌二醇和己烯雌酚在负离子模式下响应度高, 其余 5 种成分均在正离子模式下有较高的响应强度, 同时, 对影响离子化效率的毛细管电压、锥孔电压、碰撞电压、脱溶剂气流量等条件进行了优化, 确定了最佳的质谱条件。在最终的 MRM 模式下, 醋酸甲羟孕酮、醋酸氯地孕酮和黄体酮, 虽然保留时间接近, 但其各通道间无明显干扰, 均可达到完全分离, 最终选定此质谱条件。

3.3 前处理方法确定

试验过程中, 分别考察了冰浴和常温两种超声提取温度对各成分提取率的影响。结果两种提取温度下, 各组分的提取率无显著差异, 为简化过程, 最终选择常温超声提取。由于非法添加物质的含量差异大, 在确定固液比时, 既要考虑部分企业为增加隐蔽性, 采用少量添加方式来降低浓度, 逃避检测, 也要考虑当检测的非法添加物质含量过高时, 可能造成检测仪器的残留污染情况。查阅资料显示, 在临床用药中, 己烯雌酚的单日用量较其余 6 种成分少, 而坤宝丸的常规单日用量较大, 因此以己烯雌酚(常规日用量约为 0.25 mg)和坤宝丸(常规单日用量为 10 g)为参考。当供试品固液比为 0.2 g 稀释至 10 mL 时, 可检出己烯雌酚约 500 ng/mL, 质量浓度较适中, 当检出质量浓度较大时可适量稀释至标准曲线范围内, 当非法添加物质约为常规日用量的 1% 时, 亦可检出, 因此最终选择称取 0.2 g 供试品, 稀释至 10 mL。

3.4 方法评价

本研究建立了更年期用中成药中 7 种雌孕激素的快速筛查和定量分析方法, 经方法学验证表明特异性、精密度和回收率均良好。但本研究目前仅对临床上较常用的 7 种雌孕激素进行了筛查, 后续研究还应扩大筛查范围, 以更全面控制更年期用中成药的质量, 确保患者用药安全。

参考文献

[1] 曾春燕, 叶云. 激素替代疗法治疗更年期综合征的研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(8): 1696-1699.
[2] 薛薇. 窗口期结合雌激素与不同孕激素联合应用对更年期综合征的治疗研究[D]. 北京: 北京协和医学院研究生院, 2017.
[3] 何国照, 曹霞, 蒋学英, 等. 替勃龙和克龄蒙激素补充疗法治疗围绝经期综合征及其对骨密度影响的临床观察[J]. 疑难病杂志, 2013, 12(12): 946-949.
[4] 肖枝兰. 激素替代治疗对围绝经期综合征的症状改善程度及不良反应分析[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(29): 4857-4858.
[5] 卢义函, 王应海, 李春琳, 等. 激素替代治疗与妇科恶性肿瘤的研究进展[J]. 昆明理工大学学报(自然科学版), 2016, 41(6): 86-91.
[6] 张倩. 子宫肌瘤发病孕激素相关危险因素病例对照研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2016.