

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.020

祛瘀生新胶囊化学成分超高效液相色谱-串联质谱法分析及含量测定*

陈娟,狄志彪,王娣,穆庆丽,郭冬[△]

(陕西省中医药研究院,陕西 西安 710003)

摘要:目的 建立定性分析祛瘀生新胶囊化学成分的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法,以及测定士的宁和黄芪甲苷的液相色谱法。方法 采用UPLC-MS/MS法定性分析祛瘀生新胶囊的特征化学成分,采用液相色谱法测定士的宁和黄芪甲苷的含量。色谱柱为Accucore AQ C₁₈柱(150 mm×2.1 mm,2.6 μm),流动相为0.1%甲酸水溶液-甲醇溶液,采用正离子全扫描模式;液相色谱柱为Welchrom C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),士的宁流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液(15:85, V/V),黄芪甲苷流动相为乙腈-水(32:68, V/V),蒸发光散射检测器检测,紫外检测器检测波长为260 nm。结果 祛瘀生新胶囊中有23个特征峰,包括士的宁、马钱苷酸、芦丁、黄芪甲苷等。士的宁、黄芪甲苷进样量分别在0.11~1.10 μg($r=0.999\ 9$)和0.49~4.90 μg($r=0.999\ 2$)范围内与峰面积线性关系良好;平均加样回收率分别为99.62%和99.44%,RSD分别为1.34%和0.90%($n=6$)。结论 该方法灵敏度高,重复性好,结果准确,专属性强,可为该制剂的质量标准及药效物质基础研究提供参考。

关键词:祛瘀生新胶囊;士的宁;黄芪甲苷;超高效液相色谱-串联质谱法;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)15-0074-05

Content Determination and Chemical Constituent Analysis for Quyushengxin Capsules by UPLC-MS/MS

CHEN Juan, DI Zhibiao, WANG Di, MU Qingli, GUO Dong

(Shaanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 710003)

Abstract: Objective To qualitatively analyze the characteristic chemical components of Quyushengxin Capsules by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS), and to determine the content of the two principal components by liquid chromatography. **Methods** The analysis was performed on an Accucore AQ C₁₈(150 mm×2.1 mm,2.6 μm) column, the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution-methanol solution, by using positive ion full scanning mode. The liquid chromatography column was Welchrom C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm), and the acetonitrile-0.2% phosphoric acid water(15:85, V/V) was strychning mobile phase, the detection wavelength of the ultraviolet detector was 260 nm; acetonitrile-water(32:68, V/V) was the mobile phase of astragaloside IV, detected by evaporative light scattering detector. **Results** Liquid quality analysis showed that there were 23 characteristic peaks in Quyushengxin Capsules, which were strychnine, loganic acid, rutin, astragaloside IV. Strychnine and astragaloside IV showed good linearity in the range of 0.11-1.10 μg($r=0.999\ 9$) and 0.49-4.90 μg($r=0.999\ 2$), respectively. The average recoveries of strychnine and astragaloside IV were 99.62% and 99.44%, the RSDs were 1.34% and 0.90%, respectively($n=6$). **Conclusion** This method has high sensitivity, good reproducibility, accurate results, and strong specificity, which can provide reference for the quality standard and basic research of the pharmacodynamic substance of the preparation.

Key words: Quyushengxin Capsules; strychnine; astragaloside IV; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; content determination

祛瘀生新胶囊为陕西省中医医院院内制剂(陕药制字Z20150050),由三棱、莪术、桂枝、黄芪、土贝母、制马钱子粉6味中药组方,具有破血行气、散结止痛功效,用于治疗风寒湿邪等多种原因引起的髌部疼痛、肿胀、屈伸活动受限、行走困难等功能障碍性疾病,临床适用于股骨头无菌性坏死(I-II期)引起的髌关节疼痛^[1-3]。该制剂中有23个化学成分,本研究中以其中的活性成分黄芪甲苷^[4]、有效成分及毒性成分士的宁^[5]为含量测定指标,建立了祛瘀生新胶囊中士的宁含量测定的高效

液相色谱(HPLC)法和黄芪甲苷含量测定的高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法,以使其质量可控。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo Scientific Q Exactive Focus 型质谱仪, Thermo Fisher U3000 型超高效液相色谱仪,均购自美国赛默飞世尔科技公司; Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); BS210S 型电子天平(精度为万分之一),

*基金项目:陕西省重点研发计划项目[2018ZDXM-SF-005]。

第一作者:陈娟,女,博士研究生,助理研究员,研究方向为中药质量标准与活性成分,(电子信箱)chenjuan_2007jie@163.com。

[△]通信作者:郭冬,女,大学本科,研究员,研究方向为中药药理学,(电子信箱)787422146@qq.com。

BT25S 型电子天平(精度为十万分之一),均购自北京赛多利斯天平有限公司;DK-98-II 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);KH-300D 型数控超声波清洗仪(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为 300 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试药

土的宁对照品(批号为 110705-200306),黄芪甲苷对照品(批号为 110746-200620),均购于中国食品药品检定研究院;祛瘀生新胶囊(陕西省中医医院自制,批号分别为 20181201,20181202,20181203,规格为每粒 0.3 g);甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)定性分析

2.1.1 色谱及质谱条件

色谱条件:色谱柱为 Accucore AQ C₁₈ 柱(150 mm × 150 mm, 2.6 μm)^[6-7];流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~10 min 时 95% A~40% A, 10~20 min 时 40% A~5% A, 20~22 min 时 5% A);流速为 0.3 mL/min;柱温为 30℃;进样量为 3 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI);喷雾电压为 3.50 kV;离子传输管温度为 320℃;鞘气流速为 40 arb;辅助气体流速为 30 arb;辅助气体温度为 350℃;扫描方式为 Full MS/dd-MS²;采集范围为质荷比(m/z)100~1500;采集模式为正离子模式^[8]。

2.1.2 溶液制备

取本品约 0.3 g,精密称定,置 100 mL 具塞锥形瓶中,加入 50 mL 75% 甲醇水溶液,超声提取 30 min(功率为 300 W,频率为 50 kHz),吸取上清液 5 mL,置 50 mL 容量瓶中,用 75% 甲醇水溶液定容,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.1.3 定性分析

采用正离子模式进行定性分析。根据各色谱峰的一级碎片离子 m/z 、保留时间、分子离子峰及主要的二级碎片离子,参照相关文献和化学专业数据库收录的化学成分,对色谱图进行了峰归属分析,初步鉴定出 23 个主要化学成分,23 个化合物成分及其相关质谱数据见表 1。祛瘀生新胶囊的质谱总离子流图见图 1。

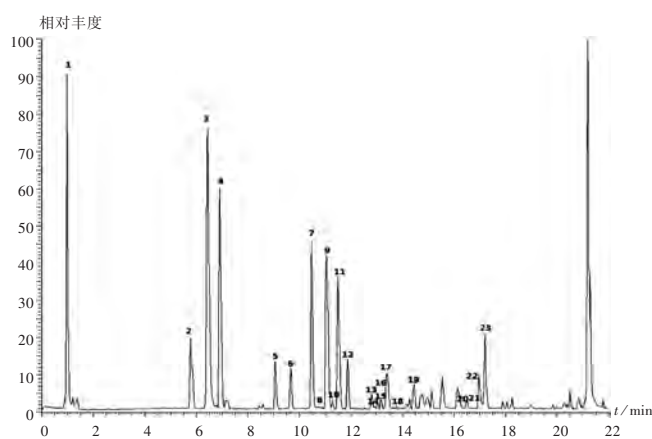


图1 祛瘀生新胶囊样品总离子流图

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

土的宁:色谱柱为 Welchrom C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.2% 磷酸水溶液(15:85, V/V);检测波长为 260 nm;柱温为 30℃;流速为 1.0 mL/min。土的宁的分离度不得低于 1.5,理论板数不得低于 5000。

黄芪甲苷:色谱柱为 Welchrom C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水(32:68, V/V);流速为 1.0 mL/min;柱温为 30℃;蒸发光散射检测器,漂移管温度为 60℃;流速为 2.2 mL/min;载气压为 0.5 MPa。黄芪甲苷的分离度不得低于 1.5,理论板数不得低于 5000。

表1 祛瘀生新胶囊主要化学成分 UPLC-MS/MS 定性分析结果

序号	化合物名称	分子式	t_R (min)	误差(ppm)	$[M+H]^+$	序号	化合物名称	分子式	t_R (min)	误差(ppm)	$[M+H]^+$
1	蔗糖	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0.99	-2.57	365.1054	13	毛蕊异黄酮苷	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	12.81	-1.53	469.1105
2	马钱苷酸	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	5.78	-2.09	399.1262	14	土贝母皂乙	C ₆₃ H ₉₈ O ₃₀	12.93	-1.52	1357.6035
3	土的宁	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₂	6.44	-2.87	335.1754	15	刺芒柄花素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	13.08	-1.80	291.0628
4	连翘酯苷 E	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	6.92	3.36	485.1630	16	莪术烯醇	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	13.18	-1.92	235.1693
5	异樱花苷	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀	9.09	-0.99	471.1262	17	5-羟基-6,7-二甲氧基黄酮	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	13.45	-1.64	321.0733
6	芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	9.62	-2.65	633.1426	18	莪术醇	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	13.86	-1.45	259.1668
7	草乌甲素	C ₃₅ H ₄₉ NO ₉	10.52	0.41	628.3480	19	土贝母皂苷甲	C ₆₃ H ₉₈ O ₂₉	14.44	-0.65	1363.6176
8	黄芪异黄酮苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₀	10.82	-1.31	487.1575	20	黄芪甲苷	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	16.51	-0.37	829.4591
9	附子宁碱	C ₂₄ H ₃₉ NO ₇	11.05	0.69	454.2799	21	黄芪皂苷Ⅲ	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	16.52	-2.04	807.4501
10	毛蕊异黄酮	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	11.27	-1.73	307.0577	22	黄芪皂苷Ⅱ	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	16.69	-1.94	849.4607
11	乌药醇	C ₁₅ H ₁₈ O ₂	11.52	-1.54	231.1380	23	丹参酮	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	17.22	-1.39	317.1148
12	羟基积雪草酸	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	11.85	1.39	522.3789						

2.2.2 溶液制备

对照品溶液:取土的宁对照品适量,精密称定,加三氯甲烷溶解并制成质量浓度为0.055 mg/mL的土的宁对照品溶液。取黄芪甲苷对照品适量,精密称定,加甲醇溶解并制成质量浓度为0.245 mg/mL的黄芪甲苷对照品溶液。

供试品溶液:取本品约0.3 g,精密称定,置圆底烧瓶中,加三氯甲烷20 mL和氨水1 mL,水浴加热回流1 h,放冷滤过,滤渣用三氯甲烷洗涤3次,每次20 mL,合并滤液和洗液,置水浴蒸干,蒸干后残渣加三氯甲烷溶解并定量转移至10 mL容量瓶中,以三氯甲烷定容,摇匀,滤过,取续滤液,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得土的宁供试品溶液。取本品约9.3 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加甲醇100 mL,超声处理45 min,滤过,滤液置水浴蒸干,加160 mL水溶解,用水饱和的正丁醇振摇提取4次,每次40 mL,合并正丁醇液,用氨试液充分洗涤2次,每次40 mL,弃去氨试液,正丁醇液水浴蒸干,残渣加甲醇溶解并转移至10 mL容量瓶中,以甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,0.45 μm微孔滤膜滤过,即得黄芪甲苷供试品溶液。

阴性对照品溶液:按处方工艺分别制备缺制马钱子和缺黄芪的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.2.3 方法学考察

专属性试验:分别吸取土的宁对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液各10 μL,注入液相色谱仪,进样分析。结果土的宁峰形良好,与相邻色谱峰能达到基线分离,阴性对照品溶液在土的宁色谱图主峰位置无对

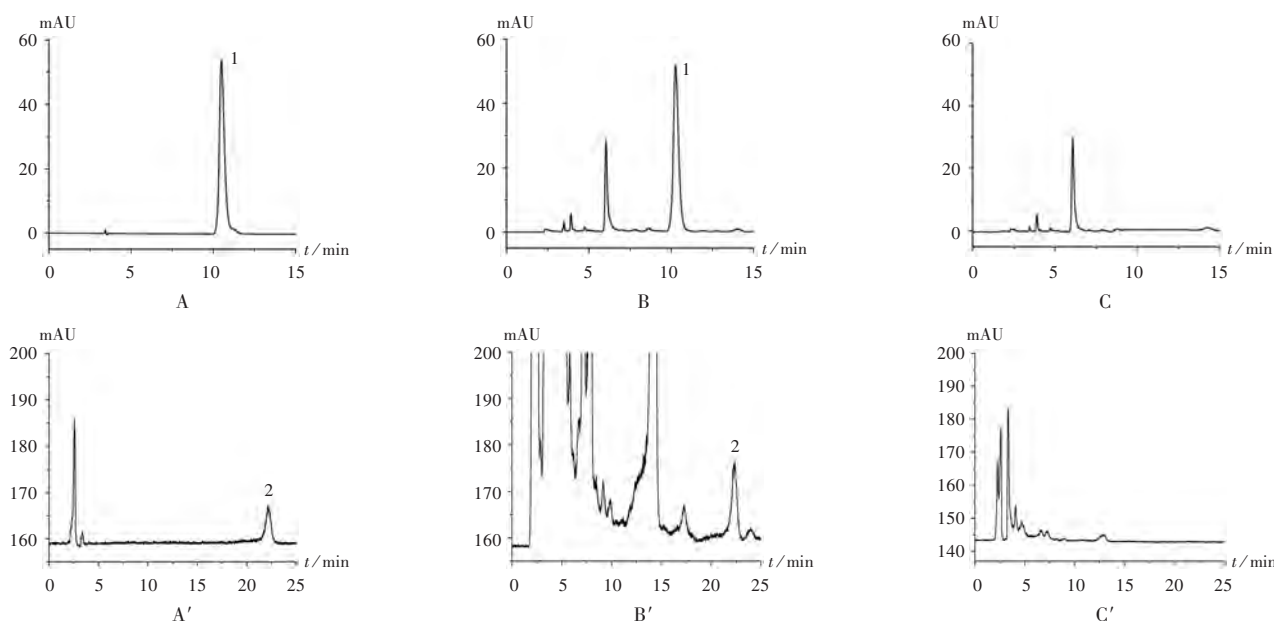
应峰出现,表明阴性对照无干扰。同法测得处方中其他成分对黄芪甲苷的含量测定无影响。色谱图见图2。

线性关系考察:分别精密吸取土的宁对照品溶液和黄芪甲苷对照品溶液各2,4,8,12,16,20 μL,按各自拟订的色谱条件进样分析,记录峰面积。以峰面积(Y)对进样量(X)进行线性回归,得土的宁回归方程 $Y = 2241.6X - 6.4992$ ($r = 0.9999$)。结果表明,土的宁进样量在0.11~1.10 μg范围内与峰面积线性关系良好。以黄芪甲苷峰面积的自然对数值(Y)对黄芪甲苷进样量的自然对数值(X)进行线性回归,得黄芪甲苷回归方程 $Y = 1.3434X + 4.4673$ ($r = 0.9992$)。结果表明,黄芪甲苷进样量在0.49~4.90 μg范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取同一土的宁对照品溶液和黄芪甲苷对照品溶液各10 μL,按各自拟订的色谱条件连续进样6次,测定峰面积。结果土的宁、黄芪甲苷峰面积的RSD分别为0.41%和0.46% ($n=6$),表明仪器的精密度良好。

重复性试验:取同一批样品(批号为20181201)6份,精密称定,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,记录峰面积,计算含量。结果土的宁的平均含量为1.4740 mg/g、RSD为1.45% ($n=6$),黄芪甲苷的平均含量为0.2443 mg/g、RSD为0.77% ($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0,2,4,6,8,10,12 h时按拟订色谱条件进样分析,记录各时间点的峰面积。结果土的宁峰面积的RSD为1.38% ($n=7$),



1. 土的宁 2. 黄芪甲苷

A, A'. 对照品溶液 B, B'. 供试品溶液 C, C'. 阴性对照品溶液

图2 高效液相色谱图

表2 加样回收试验结果($n=6$)

取样量(g)		样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.155 1	4.681 1	0.228 6	1.143 1	0.220 0	1.218 0	0.444 5	2.347 2	98.14	98.86				
0.158 4	4.689 2	0.233 5	1.145 1	0.220 0	1.218 0	0.452 9	2.354 4	99.73	99.29				
0.158 7	4.703 5	0.233 9	1.148 6	0.220 0	1.218 0	0.453 9	2.377 8	100.00	100.92				
0.158 3	4.678 4	0.233 3	1.142 5	0.220 0	1.218 0	0.454 6	2.353 8	100.59	99.45	99.62	99.44	1.34	0.90
0.156 4	4.667 1	0.230 5	1.139 7	0.220 0	1.218 0	0.446 0	2.336 8	97.95	98.28				
0.162 1	4.687 2	0.238 9	1.144 6	0.220 0	1.218 0	0.461 8	2.360 3	101.32	99.81				

注:A为士的宁,B为黄芪甲苷。

黄芪甲苷峰面积的RSD为1.25%($n=7$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

耐用性试验:取2.2.2项下供试品溶液,按拟订色谱条件(分别调整柱温、流速和色谱柱)同法测定,考察士的宁和黄芪甲苷的含量变化。结果士的宁的平均含量为1.495 0 mg/g、RSD为0.56%,黄芪甲苷的平均含量为0.244 0 mg/g、RSD为0.43%,表明方法耐用性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为20181201)0.15 g,平行取6份,精密称定,每份样品加入质量浓度为0.055 mg/mL的士的宁标准品溶液4 mL;取已知含量的样品(批号为20181201)4.65 g,平行取6份,精密称定,每份样品加入质量浓度为0.406 mg/mL的黄芪甲苷标准品溶液3 mL。分质量别依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,并计算士的宁和黄芪甲苷的加样回收率,结果见表2。

2.2.4 样品含量测定

分别取3批样品(批号分别为20181201,20181202,20181203),依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样分析,记录峰面积,计算样品中士的宁和黄芪甲苷的含量。结果见表3。

表3 样品含量测定结果(mg/g, $n=3$)

批号	士的宁	黄芪甲苷
20181201	1.503 0	0.244 2
20181202	1.490 3	0.245 0
20181203	1.463 3	0.246 6

3 讨论

3.1 测定指标选择

三棱为方中君药,能破血行气、散结止痛。采用网络药理学方法筛选制剂中的成分,从中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、美国国家生物技术信息中心(NCBI)和中医百科全书(ETCM)3个数据库中共获得551个成分。经ADME虚拟筛选,潜在活性成分为223个,通过靶点识别和疾病映射共获得活性成分136个;通过分子网络分析,筛选出关键活性成分为亚油酸、芦丁、2-甲基-N-苯基马来酰亚胺、士的宁、黄芪甲苷、二

氢丁香酚等10个成分;再次采用UPLC-MS/MS法鉴定出该制剂中有蔗糖、士的宁、马钱苷酸、芦丁、黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅲ、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪异黄芪苷等23个主要化学成分,与上述重叠的成分主要为芦丁、士的宁和黄芪甲苷。芦丁(三棱总黄酮)具有较强的抗血小板聚集、抗血栓、镇痛作用,是破血化瘀的有效活性部位^[9],其含量测定方法已制订^[10]。制马钱子可散血热、消肿止痛,也可调和诸药,士的宁是马钱子镇痛主要活性生物碱,含有毒性^[11-12],应作为质量标准中含量控制指标性成分之一。士的宁可用于偏瘫、瘫痪及因注射链霉素引起的骨骼肌松弛、弱视症等^[13],对脊髓、延髓、大脑皮质等神经系统及消化系统有一定的药理作用^[14]。黄芪可补气行气,黄芪甲苷、黄芪皂苷Ⅲ、黄芪皂苷Ⅱ、黄芪异黄芪苷均为其主要化学成分,其中黄芪甲苷为活性成分之一,具有增强机体免疫、增强机体耐缺氧及应激能力、治疗糖尿病、抗病毒等作用^[15-16]。因此,将士的宁和黄芪甲苷作为祛瘀生新胶囊的质量控制指标性成分具有可行性。

3.2 UPLC-MS/MS条件筛选

基于UPLC-MS/MS技术分析方法,对样品分别进行了正、负离子质谱扫描,结果在正离子扫描模式下化合物具有较好的响应值,而在负离子扫描模式下化合物响应较差,分析得到的化合物数量很少。因此,本研究中采用正离子扫描模式对样品进行全面分析和测定。

3.3 供试品制备方法选择

由于该制剂中的中药成分复杂,干扰成分较多,在测定士的宁时进行了超声提取和回流提取,结果回流提取的士的宁含量较高,故选择回流提取。通过对祛瘀生新胶囊前处理、对供试品制备方法的优化(包括样品的超声提取,超声时间和正丁醇提取次数和用量及氨洗次数和用量),发现本研究中的处理方法简便且优化。

3.4 方法评价

本研究中采用HPLC法和HPLC-ELSD法分别测定士的宁和黄芪甲苷的含量,灵敏度高,重复性好,结果准确,专属性强。