

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.02.016

超高效液相色谱串联质谱法同时测定走川骨刺酊中 3种乌头类生物碱含量*

庞小莲¹, 刘吉成^{2△}, 林生³, 周成忠³, 曾海清¹

(1. 广西壮族自治区玉林市食品药品检验检测中心, 广西 玉林 537000; 2. 广西壮族自治区南宁市食品药品
检验所, 广西 南宁 530007; 3. 广西实正药业有限公司, 广西 玉林 537000)

摘要:目的 建立同时测定走川骨刺酊中3种乌头类生物碱含量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法。方法 色谱柱为 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸溶液-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.25 mL/min, 柱温为 35℃, 进样量为 10 μL; 采取电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 采集方式为多反应监测(MRM)。结果 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱质量浓度分别在 0.919 8~91.980 0 ng/mL($r=0.997\ 8$, $n=7$), 1.048~104.800 ng/mL($r=0.997\ 4$, $n=7$), 1.268~126.800 ng/mL($r=0.999\ 8$, $n=7$)范围内与峰面积线性关系良好, 加样回收率分别为 104.22%, 105.05%, 104.34%, RSD 分别为 3.13%, 1.63%, 1.62% ($n=6$)。结论 该方法操作简便, 精密度高、重复性好, 专属性高, 结果准确, 可用于同时测定走川骨刺酊中3种乌头类生物碱的含量。

关键词:走川骨刺酊; 超高效液相色谱串联质谱法; 乌头碱; 次乌头碱; 新乌头碱; 含量测定

中图分类号: R932; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)02-0059-04

Content Determination of Three Kinds of Aconitine Alkaloids in the Zouchuan Guci Tincture by UPLC-MS/MS

PANG Xiaolian¹, LIU Jicheng², LIN Sheng³, ZHOU Chengzhong³, ZENG Haiqing¹

(1. Yulin Center for Food and Drug Control, Yulin, Guangxi, China 537000; 2. Nanning Food and Drug Inspection Institute, Nanning, Guangxi,
China 530007; 3. Guangxi Shizheng Pharmaceutical Co., Ltd., Yulin, Guangxi, China 537000)

Abstract: Objective To establish an ultra-performance liquid chromatography(UPLC)-MS/MS method for the content determination of three kinds of aconitine alkaloids in the Zouchuan Guci Tincture. **Methods** The chromatographic column was ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ column(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid solution-acetonitrile(gradient elution), the flow rate was 0.25 mL/min, the column temperature was 35℃, the injection volume was 10 μL, the electrospray ionization source(ESI) was adopted with positive ion mode, and the collection mode was multi-response monitoring(MRM). **Results** The linear ranges of aconitine, hypaconitine and mesaconitine were 0.919 8~91.980 0 ng/mL($r=0.997\ 8$, $n=7$), 1.048~104.800 ng/mL($r=0.997\ 4$, $n=7$) and 1.268~126.800 ng/mL($r=0.999\ 8$, $n=7$), respectively. The recoveries were 104.22%, 105.05% and 104.34%, and the RSDs were 3.13%, 1.63%, 1.62% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, has good precision, repeatability, specificity and accuracy, and can be used for the simultaneous determination of aconitine alkaloids in Zouchuan Guci Tincture.

Key words: Zouchuan Guci Tincture; UPLC-MS/MS; aconitine; hypaconitine; mesaconitine; content determination

中成药走川骨刺酊由天南星、水半夏、草乌等7味药材经渗漉法提取而成, 主要功效有活血祛瘀、通络止痛, 常用于瘀血阻滞所致骨痹(骨质增生症), 症见关节疼痛或刺痛, 痛处固定, 活动不利, 面色晦暗, 唇舌紫暗, 脉沉或细涩等。处方中主要药材草乌的主要成分为二萜类生物碱, 包括乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等, 既是有效成分又是毒性成分^[1]。产地、采收时间和炮制方法不同时, 药材毒性成分含量存在较大差异^[2-4]。成人口服纯乌头碱 0.2 mg 即可引起中毒, 3~5 mg 可致死^[5-8]。本品虽为外用, 但使用过程中若有不慎即可引起中毒。目前含有乌头类药材中成药的研究中, 多数仅规定了乌头碱

的含量限度^[9-10]。为了保证产品质量及安全, 本试验中采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法同时测定走川骨刺酊中3种乌头类成分含量, 为产品的质量评价和质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ACQUITY UPLC I-Class 型超高效液相色谱仪, Waters Xevo TQ-S 型三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司); LC/MS30-1-E 型氮气发生器(英国 Domnick Hunter 公司); 3K15 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); XS-205DU 型电子分析天平(瑞士 Mettler Toledo

*基金项目: 广西壮族自治区玉林市科学研究与技术开发计划项目[玉市科 201934034]。

第一作者: 庞小莲, 女, 主管药师, 主要从事食品药品检验检测工作, (电子信箱)41875235@qq.com。

△通信作者: 刘吉成, 男, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为食品药品分析与药品质量标准, (电子信箱)liujichenggood@126.com。

公司);KQ-500GDV 型恒温数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试药

走川骨刺酊(广西实正药业有限公司,批号分别为 201408101,201407101,201503101,201608101,201611101,201612101,201612102,201612103,201703101,201705101);乌头碱对照品(批号为 110798-201307,纯度 98.8%)、次乌头碱对照品(批号为 110720-201111,纯度 98.8%)、新乌头碱对照品(批号为 110799-201106,纯度 98.4%),均购自中国食品药品检定研究院。乙腈、甲酸均为色谱纯,氨水、甲醇、盐酸均为分析纯,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 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 柱^[11](50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为 0.1% 甲酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱,0~4 min 时 90% A→60% A,4~4.5 min 时 60% A-90% A,4.5~6 min 时 90% A^[11];流速为 0.25 mL/min^[12];进样量为 10 μL;柱温为 35℃。

质谱条件:离子源模式为电喷雾离子源(ESI)、正离子模式,扫描类型为多反应监测(MRM),毛细管电压 1.8 kV。离子源温度为 100℃,锥孔氮气流速为 150 L/h,碰撞气为氩气,脱溶剂气氮气流速为 650 L/h,脱溶剂气温度为 350℃,四极杆作为质量分析器^[13-14]。定性离子对、定量离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 1^[15]。

表 1 3 种乌头类生物碱 MRM 参数

Tab. 1 MRM parameters of three kinds of aconitum alkaloids

化合物	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碎裂电压(V)	碰撞能量(V)
乌头碱	646.42	586.4*	30	35
		105.1	30	60
新乌头碱	632.41	572.4*	30	35
		105.1	30	60
次乌头碱	616.40	556.4*	30	35
		105.2	30	60

注:*为定量离子。

Note: * is quantitative ion.

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取乌头碱对照品 9.31 mg、次乌头碱 10.65 mg,精密称定,各置 25 mL 容量瓶中,取新乌头碱 10.30 mg,精密称定,置 20 mL 容量瓶中,均用甲醇溶解并定容,得单一对照品贮备液;分别精密量取 0.125 mL,置同一 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容,即得。

供试品溶液:精密量取样品 5 mL,用 0.1 mol/L 盐酸调 pH 至 3,涡旋混匀,10 000 r/min 离心 5 min,过 MCX 柱(规格为 500 mg/6 mL,上样前用甲醇、超纯水各 5 mL 活化),上样液,先用 5 mL 0.1 mol/L 盐酸洗

脱,再分别加水、甲醇各 5 mL 洗脱,弃去洗脱液,最后用 0.5% 氯化甲醇 15 mL 洗脱,收集洗脱液置 50℃ 水浴下以氮气吹至近干,加 0.1% 甲酸溶液-乙腈(90:10, V/V) 20 mL 溶解,涡旋 1 min,超声(功率 250 W,频率 40 kHz) 10 min,转移至 50 mL 容量瓶中,用初始流动相定容,即得供试品溶液。精密量取供试品溶液 1 mL,置 50 mL 容量瓶中,用初始流动相定容,经 0.22 μm 有机滤膜滤过,即得。

阴性对照品溶液:按走川骨刺酊标准工艺,取走马胎 3.6 g,川芎 3.2 g,红杜仲、天南星、骨碎补、水半夏各 2.6 g 制备阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密量取 2.2 项下 3 种溶液,按拟订试验条件进样测定。结果乌头碱、次乌头碱、新乌头碱各峰分离良好,对照品溶液及供试品溶液目标峰保留时间一致,且阴性对照无干扰。MRM 色谱图见图 1 至图 3。

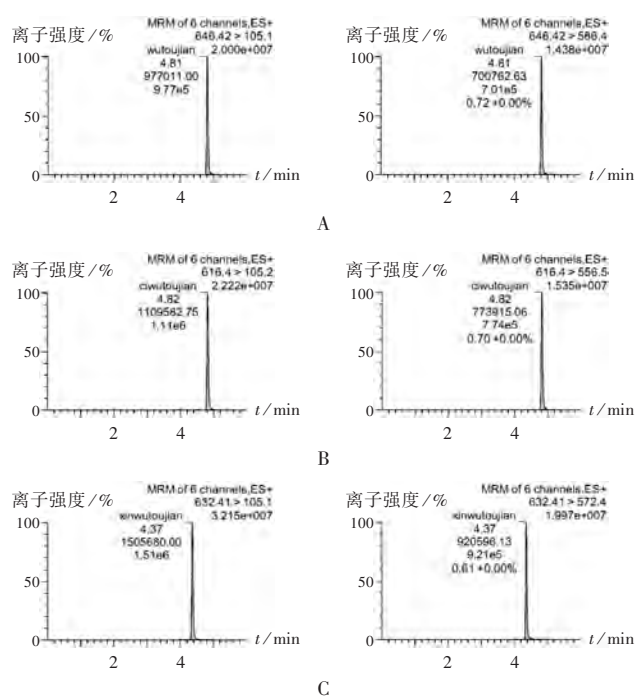
线性关系考察:分别精密量取混合对照品溶液 0.010,0.025,0.050,0.100,0.250,0.500,1.000 mL,置 10 mL 容量瓶中,分别加初始流动相定容,按拟订试验条件进样分析,以待测成分质量浓度(*X*, ng/mL)为横坐标、定量离子峰面积(*Y*)为纵坐标进行线性回归,回归方程乌头碱为 $Y_1 = 10\,523.1X_1 + 12\,880.9$, $r_1 = 0.9978$ ($n = 7$),次乌头碱为 $Y_2 = 10\,970X_2 + 10\,392.7$, $r_2 = 0.9974$ ($n = 7$),新乌头碱为 $Y_3 = 12\,118X_3 + 2\,699.81$, $r_3 = 0.9998$ ($n = 7$)。结果表明,质量浓度线性范围乌头碱为 0.919 8~91.980 0 ng/mL,次乌头碱为 1.048~104.800 ng/mL,新乌头碱为 1.268~126.800 ng/mL。

精密度试验:取混合对照品溶液适量,按拟订试验条件连续进样 6 次,记录峰面积。结果乌头碱、次乌头碱、新乌头碱峰面积的 *RSD* 分别为 0.6%, 1.1% 和 0.8% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一(批号为 201703101)批样品,依法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h,按拟订试验条件进样测定,记录峰面积。结果乌头碱、次乌头碱和新乌头碱峰面积的 *RSD* 分别为 1.2%, 0.9%, 1.2% ($n = 6$),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为 201703101)样品,依法制备供试品溶液,共 6 份,按拟订试验条件进样分析,并计算含量。结果乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的含量分别为 1.58, 25.58, 11.85 μg/mL, *RSD* 分别为 3.8%, 3.9%, 1.8% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的同一批(批号为 201703101)样品 10 瓶,混匀,精密量取 6 份样品,各

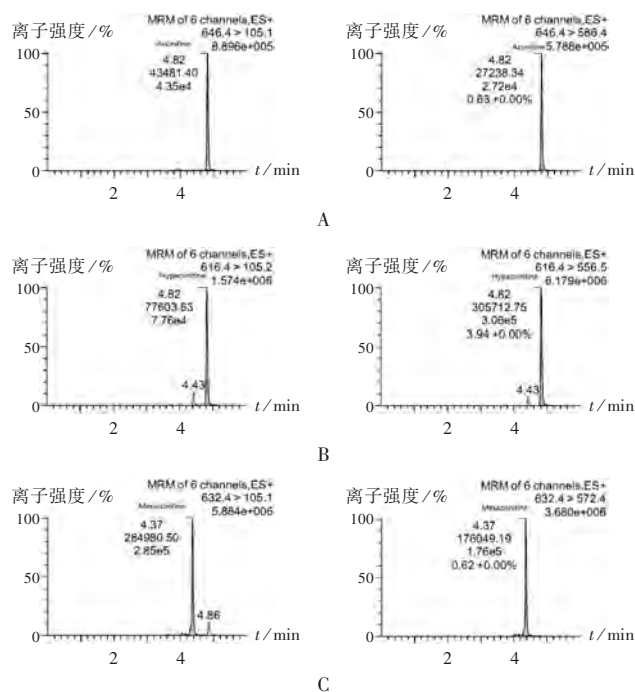


A. 乌头碱 B. 次乌头碱 C. 新乌头碱

图1 对照品溶液 MRM 色谱图

A. Aconitine B. Hypaconitine C. Mesaconitine

Fig.1 MRM chromatograms of reference solution



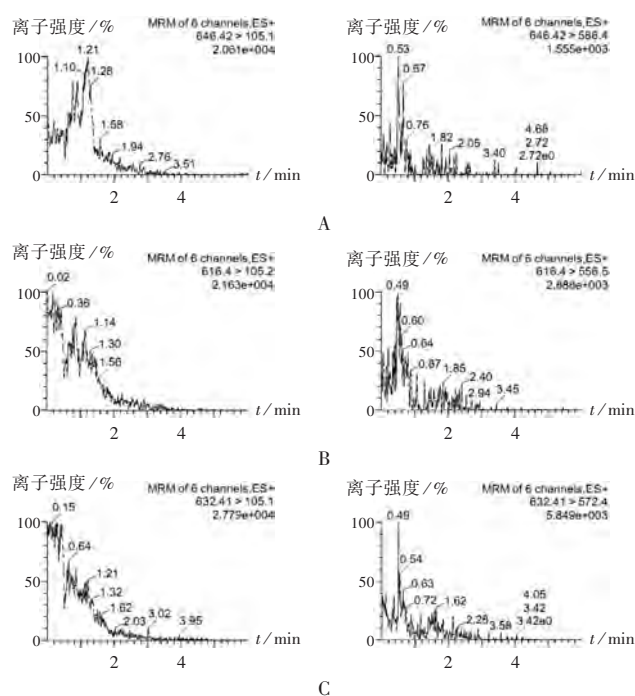
A. 乌头碱 B. 次乌头碱 C. 新乌头碱

图2 供试品溶液 MRM 色谱图

A. Aconitine B. Hypaconitine C. Mesaconitine

Fig.2 MRM chromatograms of the three kinds of aconitine alkaloids in test solution

2.5 mL,再分别精密加入乌头碱对照品溶液(质量浓度为 367.9 $\mu\text{g/mL}$)0.015 mL,次乌头碱对照品溶液(质量浓度为 419.2 $\mu\text{g/mL}$)0.160 mL,新乌头碱对照品溶液



A. 乌头碱 B. 次乌头碱 C. 新乌头碱

图3 阴性对照品溶液 MRM 色谱图

A. Aconitine B. Hypaconitine C. Mesaconitine

Fig.3 MRM chromatograms of negative test solution

(质量浓度为 507.3 $\mu\text{g/mL}$)0.065 mL,用 0.1 mol/mL 的盐酸调 pH 至 3,依法制备供试品溶液,再按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,计算含量及回收率。结果见表 2。

2.4 样品含量测定

分别精密量取各批次样品 5 mL,依法制备供试品溶液,按拟订试验条件进样测定,以外标法定量离子峰面积,计算样品含量。结果见表 3。

3 讨论

3.1 测定方法选择

预试验中曾尝试用普通高效液相色谱法测定,但由于走川骨刺酊是以渗漉法提取制成,不同产地、不同采收时间和不同的炮制方法导致所用草乌药材的乌头类生物碱含量也不一样,并且样品中含有的乌头碱、次乌头碱、新乌头碱量也较少,达不到高效液相色谱法的检出要求。具有高分离能力,高选择性、专属性强等优点的 LC-MS/MS 技术,能满足测定走川骨刺酊中 3 种乌头碱含量的条件。

3.2 样品提取方法选择

预试验中尝试样品取样量为 10 mL,氮吹干后直接用流动相定容至 50 mL,滤过,进样,但因出现平头峰无法测定;取样量为 5 mL,氮吹干后直接用流动相定容至 50 mL,再稀释 50 倍后,滤过,进样,平头峰消失;还尝试过 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋蒸蒸干、水浴锅蒸蒸干、用 0.1 mol/mL 盐酸调 pH 等 3 种方法提取,结果显示,直接调 pH 提取效果较好。

表2 加样回收试验结果($n=6$)
Tab. 2 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	取样量(mL)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
乌头碱	2.5	3.93	5.52	9.64	103.44	104.22	3.13
	2.5	3.93	5.52	9.75	105.43		
	2.5	3.93	5.52	9.80	106.34		
	2.5	3.93	5.52	9.38	98.73		
	2.5	3.93	5.52	9.63	103.26		
	2.5	3.93	5.52	9.90	108.15		
次乌头碱	2.5	63.94	67.07	135.91	107.31	105.05	1.63
	2.5	63.94	67.07	134.80	105.65		
	2.5	63.94	67.07	132.63	102.42		
	2.5	63.94	67.07	135.15	106.17		
	2.5	63.94	67.07	134.07	104.56		
	2.5	63.94	67.07	133.83	104.20		
新乌头碱	2.5	29.62	32.97	63.88	103.91	104.34	1.62
	2.5	29.62	32.97	64.03	104.37		
	2.5	29.62	32.97	63.85	103.82		
	2.5	29.62	32.97	63.64	103.18		
	2.5	29.62	32.97	65.11	107.64		
	2.5	29.62	32.97	63.61	103.09		

表3 样品含量测定结果($\mu\text{g/mL}$)

生产批号	乌头碱	次乌头碱	新乌头碱
201407101	0.66	1.79	0.36
201408101	1.11	33.30	5.61
201503101	2.14	23.13	2.44
201608101	1.55	23.63	4.38
201611101	2.56	24.10	2.66
201612101	0.68	27.69	4.08
201612102	5.52	39.96	19.52
201612103	2.60	34.30	17.83
201703101	1.57	25.58	11.85
201705101	26.38	15.52	7.74

3.3 固相萃取柱选择

样品成分较复杂,需净化。在厂家提供的样品中3种乌头碱含量均较低,需对乌头类生物碱进行痕量浓缩,而乌头类生物碱属有机碱类,MCX固相萃取柱是净化和富集碱性化合物的强有力工具,特别是有机碱类,本试验中选择了MCX固相萃取柱对样品进行净化,结果达到了试验要求。固相萃取柱在中成药检验中的应用有待进一步摸索。

3.4 小结

该方法操作简便,精密度、重复性好,专属性高,结果准确,可用于同时测定走川骨刺酊中3种乌头类生物碱的含量测定。不同批次样品中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的含量存在一定差异,可能与使用的草乌药材的部位、采收时间及炮制方法的不同有关。

参考文献

- [1] 凌珊,龚千锋. 草乌的研究进展[J]. 江西中医学院学报, 2011,23(3):91-93.
- [2] 邵财,张浩,张亚玉. 草乌适宜采收期的初步研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(2):470-472.
- [3] 林华,邓广海,龚又明. 草乌现代炮制工艺研究[J]. 中药材, 2014,37(7):1163-1166.
- [4] 张小峰,松林,图雅,等. 三种不同产地蒙药草乌炮制前后三种乌头碱含量的比较研究[J]. 中国民族医药杂志, 2016,22(2):42-44.
- [5] 于夕妍,孙卫英. 4例乌头碱中毒的护理体会[J]. 医学理论与实践,2013,26(3):111.
- [6] 孙凯,李佳,张永清. 附子生物碱分布规律研究[J]. 吉林中医药,2013,33(3):286-288.
- [7] 张迎春. 乌头类药物的临床应用及解毒措施[J]. 中国医药指南,2012,10(5):233.
- [8] 严妍,杨茂, WOLF-DIETER RAUSCH,等. 乌头碱对胎鼠中脑多巴胺能神经元细胞的神经毒性作用[J]. 江苏大学学报(医学版),2013,23(3):212-215.
- [9] 李丽敏,王欣美,王柯,等. RP-HPLC测定镇痛活络酊中3种乌头类生物碱含量[J]. 中成药,2008,30(12):1785-1789.
- [10] 晓华,张思远,海平,等. 草乌中二萜生物碱的提取工艺及化学成分研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(2):113-114.
- [11] 张盼盼,张俊贞,王朝虹,等. 参附注射液3种痕量成分乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的测定[J]. 中国中药杂志, 2013,38(10):1521-1524.
- [12] 吴成凤,李国卫,王樟根,等. LC-MS/MS法同时测定乌头汤中乌头碱型生物碱含量[J]. 中药新药与临床药理,2015, 26(6):833-837.
- [13] 刘吉成,周嵩煜. LC-MS/MS测定正骨水中3种乌头类生物碱的方法研究[J]. 中成药,2012,34(9):1716-1719.
- [14] 李继印,张瑞林,方平,等. 液相色谱-质谱法测定云南草乌中双酯型生物碱的含量[J]. 昆明医科大学学报,2015, 36(10):5-8.
- [15] 吴成凤,李国卫. LC-MS/MS法同时测定乌头汤中乌头碱型生物碱含量[J]. 中药新药与临床药理,2015,26(6): 833-837.

(收稿日期:2020-04-08;修回日期:2020-06-26)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号:78-130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真:(023) 86592565
网上投稿: <http://www.zhongguoyaoe023.com> 或 中国药业在线投稿系统