

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.11.021

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定痤疮消炎洗剂中8种化学成分含量*

张蓬华^{1,2}, 卢伟^{1,2}, 陈黎^{1,2△}, 叶方^{1,2}

(1. 湖北省十堰市太和医院·湖北医药学院附属医院, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 建立同时测定痤疮消炎洗剂中8种化学成分含量的超高效液相色谱-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 0.1% 甲酸溶液-甲醇(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 45 °C, 进样量为 5 μL; 采用电喷雾离子源, 正负离子扫描方式, 多反应监测模式, 脱溶剂温度为 400 °C, 脱溶剂气流速为 800 L/h。结果 黄芩苷、蒙花苷、连翘苷、大黄素、大黄酸、小檗碱、黄柏碱、甘草酸的质量浓度分别在 30.05~1 202.00 ng/mL、45.12~1 805.00 ng/mL、25.10~1 004.00 ng/mL、12.68~507.40 ng/mL、15.07~603.00 ng/mL、50.10~2 004.00 ng/mL、22.61~904.20 ng/mL、35.10~1 404.00 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9991$, $n=6$); 定量限分别为 1.50, 2.25, 2.51, 1.27, 1.51, 2.50, 1.13, 1.75 ng/mL($n=6$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 4.50%; 平均加样回收率分别为 99.42%, 99.07%, 99.73%, 101.07%, 100.30%, 99.45%, 98.89%, 102.04%, RSD 分别为 0.15%, 1.15%, 0.21%, 1.03%, 1.53%, 1.41%, 0.87%, 2.69%($n=9$)。结论 该方法操作简便、结果准确、重复性好, 可用于同时测定痤疮消炎洗剂中8种化学成分的含量。

关键词: 痤疮消炎洗剂; 超高效液相色谱-串联质谱法; 含量测定

中图分类号: R986; R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)11-0082-04

Simultaneous Determination of Eight Chemical Components in Cuochuang Xiaoyan Lotion by UPLC-MS/MS

ZHANG Penghua^{1,2}, LU Wei^{1,2}, CHEN Li^{1,2}, YE Fang^{1,2}

(1. Taihe Hospital · Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000; 2. Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei, China 442000)

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

*基金项目: 湖北省十堰市2021年度引导性科研项目[21Y15]。

第一作者: 张蓬华, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)zph0507@163.com。

△通信作者: 陈黎, 女, 博士, 主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)thyslw@163.com。

理论板数也不断增加。综合考虑分离效果、检测灵敏度及分析时间, 最终选择乙腈-水(70:30, V/V)为流动相。

3.2 CAD 参数选择

本研究中分别考察了 35 °C 和 55 °C 两档雾化器温度对检测结果的影响, 结果发现, 样品检测灵敏度会随着雾化温度的增加而升高, 故选择 55 °C 作为雾化器温度。雾化率是 CAD 检测器特有的线性校正参数, 不同的化合物具有不同的最优雾化率。本研究中分别考察了不同的雾化率(0.9, 1.0, 1.1)对甘露醇线性关系的影响, 结果发现, 随着雾化率的增大, 其线性回归的相关系数也不断增大, 但甘露醇色谱峰的响应也在不断下降。综合考虑线性关系和响应的影响, 雾化率最终选定 1.0。

3.3 方法评价

本研究中所建立的 HPLC-CAD 法操作简便、快速、灵敏、准确, 可用于甘露醇及其制剂中甘露醇的含量测定及质量控制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 临床用药须知·化学药和生物制品卷(2010年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2011: 452-454.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:

中国医药科技出版社, 2020: 140-141.

- [3] 李晶晶, 潘广文. 离子色谱法测定甘露醇原料及注射液的含量和有关物质[J]. 中国药品标准, 2014, 15(3): 194-195.
- [4] 陈先媛, 朱兴年, 刘晓健. 旋光法测定甘露醇注射液的含量[J]. 海峡药学, 2013, 25(12): 132-133.
- [5] 谷华, 丁孝良, 孙宝军. HPLC 法测定玉屏风颗粒中黄芪甲苷及甘露醇的含量[J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 839-843.
- [6] 杨学军, 傅黎春, 李金兰, 等. HPLC-ELSD 法测定注射用灯盏花素中甘露醇的含量[J]. 北方药学, 2012, 9(8): 16-17.
- [7] 宋更中, 裴丽娟, 庞文哲, 等. 高效液相色谱法测定甘露醇注射液的含量[J]. 解放军药学学报, 2011, 27(3): 246-247.
- [8] 李心怡, 蒋运斌, 马逾英. 电喷雾检测器在药物 HPLC 分析中的优势及应用进展[J]. 中国药房, 2017, 28(15): 2152-2156.
- [9] 赵慧. HPLC-CAD 法测定阿卡波糖胶囊含量[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(5): 910-915.
- [10] 赵恂, 范青峰, 陈蕾, 等. 尿素及其有关物质含量的 HPLC-CAD 分析研究[J]. 中国药品标准, 2018, 19(6): 453-458.
- [11] 耿银银, 许丽晓, 欧定莲, 等. 亲水作用色谱法测定阿卡波糖含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(5): 818-825.

(收稿日期: 2021-09-13; 修回日期: 2021-12-15)

method for the simultaneous determination of eight chemical components in Cuochuang Xiaoyan Lotion. **Methods** The chromatographic column was Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid – methanol (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 45 °C and the injection volume was 5 μL. The electrospray ion (ESI) source, positive and negative ions scanning method were adopted with multiple reaction monitoring (MRM) mode. The desolvation temperature was 400 °C, and the desolvation gas flow rate was 800 L/h. **Results** The linear ranges of baicalin, linarin, phillyrin, emodin, rhein, berberine, phellodendrine and glycyrrhizic acid were 30.05 – 1 202.00 ng/mL, 45.12 – 1 805.00 ng/mL, 25.10 – 1 004.00 ng/mL, 12.68 – 507.40 ng/mL, 15.07 – 603.00 ng/mL, 50.10 – 2 004.00 ng/mL, 22.61 – 904.20 ng/mL and 35.10 – 1 404.00 ng/mL ($r \geq 0.999 1, n = 6$). The limits of quantitation (LOQ) were 1.50, 2.25, 2.51, 1.27, 1.51, 2.50, 1.13 and 1.75 ng/mL ($n = 6$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 4.50%. The average recoveries of the above components were 99.42%, 99.07%, 99.73%, 101.07%, 100.30%, 99.45%, 98.89% and 102.04% with RSDs of 0.15%, 1.15%, 0.21%, 1.03%, 1.53%, 1.41%, 0.87% and 2.69% ($n = 9$), respectively. **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the simultaneous determination of eight chemical components in Cuochuang Xiaoyan Lotion.

Key words: Cuochuang Xiaoyan Lotion; UPLC – MS/MS; content determination

中医药治疗痤疮历史悠久,形式多样,临床疗效确切。中药外治法包括中药面膜法、中药熏蒸法、湿敷法、搽剂法和涂剂法,具有操作简便、不良反应少等特点^[1]。痤疮消炎洗剂为医院中药复方自制制剂,由黄芩、大黄、黄连、黄柏、野菊花、连翘、甘草7味中药组方,临床治疗面部粉刺、丘疹、脓疱、结节等效果良好^[2]。其质量控制标准为性状描述和单一薄层色谱鉴别试验。郑江萍等^[3]采用高效液相色谱(HPLC)法建立了痤疮消炎洗剂的质量标准,将黄芩苷、蒙花苷、大黄酸3种化学成分作为质量控制指标,并建立了其HPLC指纹图谱,发现有16个含量较高的共有峰^[4]。本研究中选择痤疮消炎洗剂7味中药中含量较高的8种质量控制指标成分为研究对象,建立了快速测定其含量的超高效液相色谱 – 串联质谱(UPLC – MS/MS)法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters Acquity 型超高效液相色谱仪(沃特世科技<上海>有限公司),配有XEVO TQ型串联质谱仪;GWAUN1型纯水仪(北京普析通用仪器有限责任公司);AUW120D型分析天平(岛津<上海>实验器材有限公司,精度为十万分之一)。

1.2 试药

痤疮消炎洗剂(医院制剂,批号分别为20201127, 20210129, 20210311, 规格为每瓶200 mL);黄芩苷对照品(批号为110715 – 201318, 纯度为93.3%),蒙花苷对照品(批号为111528 – 201107, 纯度为86.7%),大黄酸对照品(批号为110757 – 200206, 纯度为99.3%),大黄素对照品(批号为110756 – 201711, 纯度为99.5%),连翘苷对照品(批号为110821 – 201213, 纯度为95.3%),盐酸小檗碱对照品(批号为110713 – 200609, 纯度为100%),黄柏碱对照品(批号为111895201504, 纯度为

94.9%),甘草酸铵对照品(批号为110731 – 201418, 纯度为93.10%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇(色谱纯,德国Merck KGaA公司);甲酸(色谱纯,北京迈瑞达科技有限公司);水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

1) 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相: 0.1% 甲酸溶液(A) – 甲醇(B), 梯度洗脱(0 ~ 0.3 min 时 10%B, 0.3 ~ 0.8 min 时 10%B ~ 50%B, 0.8 ~ 3.0 min 时 50%B ~ 90%B, 3.0 ~ 4.2 min 时 90%B, 4.2 ~ 4.5 min 时 90%B ~ 10%B, 4.5 ~ 5.0 min 时 10%B);流速: 0.3 mL/min;柱温: 45 °C;进样量: 5 μL。

2) 质谱条件

采用电喷雾离子源, 正负离子扫描方式, 多反应监测模式;脱溶剂温度: 400 °C;脱溶剂气流速: 800 L/h;毛细管电压: 3.2 kV。质谱检测参数见表1。

表1 8种化学成分的质谱检测参数

Tab. 1 Mass spectrometry detection parameters of eight chemical components			
化学成分	离子对(m/z)	锥孔电压(V)	碰撞电压(V)
黄芩苷	449.90 / 271.0	16	24
蒙花苷	591.20 / 283.2	-26	-25
连翘苷	533.40 / 371.1	-30	-16
大黄素	269.15 / 225.1	-42	-26
大黄酸	283.20 / 239.1	-20	-14
小檗碱	336.20 / 320.2	40	30
黄柏碱	342.20 / 192.1	30	20
甘草酸	821.30 / 350.9	-70	-46

注: m/z 为质荷比。

Note: m/z refers to mass-to-charge ratio.

2.2 样品与溶液制备

痤疮消炎洗剂:分别取大黄、野菊花、连翘、黄柏各10 g,黄芩、黄连、甘草各5 g,加水煎煮2次,第1次25 min,第2次20 min,滤过,合并滤液,浓缩至400 mL,每瓶装200 mL,100℃流通蒸汽灭菌30 min,包装,即得。

混合对照品溶液:取各对照品适量,精密称定,分别置10 mL容量瓶中,加甲醇超声溶解并定容(必要时加热溶解),摇匀,得黄芩苷、蒙花苷、连翘苷、大黄素、大黄酸、小檗碱、黄柏碱和甘草酸(根据分子量将盐酸小檗碱和甘草酸铵进行换算)质量浓度分别为6.01, 9.03, 5.02, 2.54, 3.02, 10.02, 4.52, 7.02 mg/mL的对照品贮备液;分别精密量取各对照品贮备液1 mL,置100 mL容量瓶中,用甲醇稀释并定容,摇匀,即得。

供试品溶液:取样品,摇匀,精密量取5 mL,置100 mL容量瓶中,加甲醇定容,超声(功率为240 W,频率为40 kHz)10 min,放至室温,用甲醇定容,滤过,精密量取续滤液5 mL,置100 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得。

2.3 方法学考察

线性关系考察与定量限确定:取2.2项下混合对照品溶液适量,用0.1%甲酸溶液-甲醇(90:10, V/V)分别稀释50倍、100倍、200倍、500倍、1 000倍、2 000倍,制得系列对照品梯度溶液,按2.1项下试验条件进样测定,以对照品溶液质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、待测物峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表2。可见,各成分质量浓度在相应范围内与峰面积线性关系良好。取系列对照品梯度溶液,用初始流动相倍比稀释,按2.1项下试验条件进样测定,以信噪比(S/N)为10的质量浓度为定量限。结果见表2。

精密度试验:取线性关系考察项下稀释100倍的混合对照品溶液,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果见表2,表明方法精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为20210311)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0, 2, 4, 8, 12 h时按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果见表2,表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为20210311)适量,按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果见表2,表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密吸取样品(批号为20210311)2 mL,共9份,分别加入2.2项下混合对照品溶液1, 2, 5 mL,各3份,混匀,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,计算回收率。结果见表3。

2.4 样品含量测定

精密吸取样品(批号分别为20201127, 20210129, 20210311)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,计算8种化学成分的含量。结果见表4。

3 讨论

3.1 含量测定指标成分选择

中药外治法是将药物直接用于皮肤、黏膜,从而发挥局部用药作用,给药方便,不良反应少^[4]。痤疮消炎洗剂具有清热解毒、去脂控油、杀菌消炎之功效,主要用于治疗痤疮的各种临床症状,无激素治疗后遗留色素沉着、持久性红斑、凹陷性或增厚型瘢痕等不良反应。内服或外敷黄芩、金银花、连翘、半夏等中药,治疗痤疮疗效较好^[5-7]。连翘、虎杖、黄柏、大黄、黄连、黄芩、金银花等能有效抑制痤疮丙酸杆菌的增殖^[8-9],对表皮增厚、角化、毛囊扩张、毛囊内角化物质、真皮层炎性细胞浸润等有明显抑制作用^[10],同时能通过抑制炎症反应而延缓痤疮的发病过程^[11]。本研究选取的8种化学成分均为处方药材的主要活性成分,能全面反映痤疮消炎洗剂的质量。

表2 方法学考察结果

Tab. 2 Results of the methodology investigation

化学成分	回归方程	线性范围(ng/mL)	r	定量限 (ng/mL)	RSD(%)		重复性试验	
					精密度试验	稳定性试验	含量(μ g/mL)	RSD(%)
黄芩苷	$Y = 771.29X + 14\,995.00$	30.05~1 202.00	0.999 5	1.50	3.79	1.89	91.27	1.93
蒙花苷	$Y = 59.00X + 521.61$	45.12~1 805.00	0.999 6	2.25	3.41	1.48	71.87	2.27
连翘苷	$Y = 3.96X + 4.83$	25.10~1 004.00	0.999 5	2.51	3.52	2.12	128.41	1.95
大黄素	$Y = 283.16X + 643.16$	12.68~507.40	0.999 4	1.27	1.52	1.89	16.63	3.64
大黄酸	$Y = 205.05X + 223.19$	15.07~603.00	0.999 6	1.51	0.97	1.58	27.40	4.41
小檗碱	$Y = 2\,424.80X + 56\,293.00$	50.10~2 004.00	0.999 1	2.50	2.00	2.01	351.86	2.39
黄柏碱	$Y = 6\,398.30X + 41\,783.00$	22.61~904.20	0.999 8	1.13	3.53	1.87	49.67	1.97
甘草酸	$Y = 11.58X + 213.04$	35.10~1 404.00	0.999 4	1.75	2.27	1.77	87.43	2.77

表3 加样回收试验结果($n=9$)
Tab. 3 Results of the recovery test ($n=9$)

化学成分	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
黄芩苷	178.98	60.10	238.67	99.32	99.42	0.15
	178.98	120.20	298.40	99.35		
	178.98	300.50	478.23	99.59		
连翘苷	259.80	50.20	309.98	99.96	99.73	0.21
	259.80	100.40	359.77	99.57		
	259.80	251.00	509.93	99.65		
蒙花苷	139.96	90.25	228.91	98.56	99.07	1.15
	139.96	180.50	321.14	100.38		
	139.96	451.25	583.43	98.28		
大黄素	65.64	25.37	91.01	100.00	101.07	1.03
	65.64	50.74	116.96	101.14		
	65.64	126.85	195.13	102.07		
大黄酸	71.72	30.15	101.66	99.30	100.30	1.53
	71.72	60.30	133.27	102.07		
	71.72	150.75	221.78	99.54		
小檗碱	624.78	100.20	725.93	100.95	99.45	1.41
	624.78	200.40	823.64	99.23		
	624.78	501.00	1116.65	98.18		
黄柏碱	96.42	45.21	140.68	97.90	98.89	0.87
	96.42	90.42	186.25	99.35		
	96.42	226.05	321.19	99.43		
甘草酸	170.66	70.20	244.52	105.21	102.04	2.69
	170.66	140.40	311.48	100.30		
	170.66	351.00	523.83	100.62		

表4 样品中8种化学成分含量测定结果($\mu\text{g}/\text{mL}$)

Tab. 4 Results of content determination of eight chemical components in samples ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

化学成分	批号			$\bar{X}$
	20201127	20210129	20210311	
黄芩苷	89.49	93.21	91.27	91.32
连翘苷	129.90	131.21	128.41	129.84
蒙花苷	69.98	73.01	71.87	71.62
大黄素	32.82	31.35	30.63	31.60
大黄酸	35.86	36.78	37.40	36.68
小檗碱	312.39	313.12	309.86	311.79
黄柏碱	48.21	50.33	49.67	49.40
甘草酸	85.33	90.65	87.43	87.80

3.2 检测方法选择

本研究中采用UPLC-MS/MS法测定痤疮消炎洗剂中黄芩苷、小檗碱、黄柏碱、大黄素、大黄酚、连翘苷、蒙花苷和甘草酸的含量,在质谱扫描模式下,样品中其

他物质不会对待测成分产生干扰,检测不受色谱分离度的影响,在短时间内即可达到有效分离。而上述成分的紫外最大吸收波长不同,且含量差异大,相同样品浓度在紫外检测器上的响应不同,故采用UPLC-MS/MS法可实现同时快速、准确地检测样品中的多种成分。

3.3 流动相选择

分别考察了甲醇-水、甲醇-醋酸铵溶液(2 mmol/L)、0.1%甲酸溶液-甲醇、乙腈-水、0.1%甲酸溶液-乙腈等流动相,发现加入醋酸铵后,负离子检测模式下化合物的响应增加,但正离子检测模式下化合物的响应显著降低;加入甲酸后,蒽醌类化合物离子的响应一定程度上会降低。分析其原因为蒽醌类物质在电喷雾电离条件下易失去 H^+ 带负电荷,而酸的加入会抑制其电离,致使离子响应降低,但加入甲酸的流动相能使正离子检测模式化合物的响应显著增加^[12]。综合对不同化合物信号响应的影响,最终采用0.1%甲酸溶液-甲醇为流动相。

参考文献

[1] 靳培英. 痤疮的分型论治[J]. 中华皮肤科杂志, 2002, 35(1): 67-69.

[2] 郑江萍, 梁俊, 张幼林, 等. 痤疮消炎洗剂的制备和质量标准研究[J]. 儿科药学杂志, 2017, 23(4): 47-51.

[3] 郑江萍, 张幼林, 黄良永. 痤疮消炎洗剂 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药师, 2016, 19(7): 1276-1279.

[4] 童晓岚, 周曼佳, 何祥玉, 等. 中医药治疗痤疮的研究进展[J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(10): 186-188.

[5] 黄卿弟, 贺红桃. 三黄洗剂加味治疗寻常痤疮 150 例[J]. 河南中医, 2013, 33(5): 724-725.

[6] 辛卫平. 丹白面膜外敷治疗寻常型痤疮 30 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2011, 27(2): 6-8.

[7] 张静萍. 中药湿敷联合倒膜治疗痤疮疗效观察[J]. 慢性病学杂志, 2010, 12(9): 1024.

[8] 朱亚芳, 赵浩如. 中药体外抑制痤疮丙酸杆菌的活性测定[J]. 药学与临床研究, 2009, 17(3): 224-226.

[9] 夏明静, 曹煜, 杨捷, 等. 22 种抗菌消炎中药有效成分对痤疮丙酸杆菌的抑制作用[J]. 中华皮肤科杂志, 2001, 34(6): 435-436.

[10] 刘雁, 蔡建伟. 中医药治疗痤疮作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(4): 81-82.

[11] 张虹亚, 吕晓英, 龙子江, 等. 消炎去脂片治疗寻常痤疮的临床与实验研究[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2003, 17(5): 316-317.

[12] 张艺竹, 安毅, 陈辉, 等. LC-MS/MS 同时测定一清胶囊 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(7): 1197-1201.

(收稿日期: 2021-10-25; 修回日期: 2021-12-20)