

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)20-0073-03
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.20.015



超高效液相色谱串联质谱法测定腰息痛胶囊中龙胆苦苷含量*

邓见春¹, 邓杰华², 周云峰², 黄炳泉², 王燕霞^{3△}

(1. 江西省高安市人民医院, 江西 宜春 330800; 2. 江西省宜春市检验检测中心, 江西 宜春 336000;
3. 南昌大学第四附属医院, 江西 南昌 330003)

摘要:目的 建立测定腰息痛胶囊中龙胆苦苷含量的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法。方法 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 0.1% 甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 35 °C, 进样量为 5 μL; 质谱条件, 以 m/z 401.0 → 179.0 离子对为特征离子对, 电喷雾离子源(ESI)、负离子扫描方式, 多反应监测(MRM)模式。结果 龙胆苦苷质量浓度在 0.055 1~22.022 3 μg/mL 范围内与定量离子对峰面积线性关系良好, 检测限为 6.7 ng/mL; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.1%。60 批样品中龙胆苦苷的含量范围为 27.66~3367.24 μg/g, 各生产企业间样品含量差异较显著。结论 该方法操作简便, 结果准确, 精密度、重复性好, 可用于腰息痛胶囊的质量控制。
关键词:腰息痛胶囊; 秦艽; 龙胆苦苷; 超高效液相色谱串联质谱法; 含量测定

Determination of Gentiopicroside in Yaositong Capsules by UPLC-MS/MS

DENG Jianchun¹, DENG Jiehua², ZHOU Yunfeng², HUANG Bingquan², WANG Yanxia³

(1. Gaoan People's Hospital, Yichun, Jiangxi, China 330800; 2. The Inspection and Testing Center of Yichun, Yichun, Jiangxi, China 336000;
3. The Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi, China 330003)

Abstract: Objective To establish an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for determining the content of gentiopicroside in Yaositong Capsules. **Methods** The UPLC chromatographic conditions were as follows: the chromatographic column was the Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid solution (containing 5 mmol/L ammonium acetate)-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 5 μL. The mass spectrometry conditions were as follows: the ion pair at the m/z 401.0 → 179.0 was the characteristic ion pair, the electrospray ion source (ESI) was adopted with negative ion scanning and multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The linear range of gentiopicroside was 0.055 1~22.022 3 μg/mL, the limit of detection was 6.7 ng/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.1%. The content of gentiopicroside in 60 batches of samples was in the range of 27.66~3367.24 μg/g, and that was significantly different among various manufacturing enterprises. **Conclusion** This method is easy, accurate, precise and repeatable, which can be used for the quality control of Yaositong Capsules.

Key words: Yaositong Capsules; Gentiana Macrophyllae Radix; gentiopicroside; UPLC-MS/MS; content determination

腰息痛胶囊是由牛膝、防风、桂枝、续断、赤芍、防己、草薢、秦艽等22味中药及对乙酰氨基酚组方的中药复方制剂^[1], 有舒筋活络、祛瘀止痛、活血驱风功效, 多用于风湿性关节炎、肥大性腰椎炎、肥大性胸椎炎、坐骨神经痛、腰肌劳损等的治疗。方中秦艽为龙胆科植物秦艽、麻花秦艽、粗茎秦艽或小秦艽的干燥根, 味辛、苦, 性平, 有祛风湿、清湿热、止痹痛、退虚热功效^[2-4], 龙胆苦苷为其代表性成分^[5-7]。该制剂现行质量标准未对秦艽药味进行质量控制, 可能无法保证制剂的质量。为此, 本研究中采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定腰息痛胶囊中龙胆苦苷含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: H-class / xevo TQD 型超高效液相色谱串联质谱联用仪(美国 Waters 公司); KH-250DB 型超声波清洗仪(昆山禾创超声仪器有限公司)。

试剂: 腰息痛胶囊(均来自市场监督抽样, 共60批样品, 来自11家企业, 样品信息见表1; 规格均为每粒0.3 g); 龙胆苦苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号为111846-201705, 含量99.7%); 乙腈、甲酸均为质谱级, 甲醇为色谱纯, 水为屈臣氏蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件: 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC®

*基金项目: 江西省药品监督管理局科研项目[2021KY24]。

第一作者: 邓见春, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)382231368@qq.com。

△通信作者: 王燕霞, 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为临床药师, (电子信箱)277496352@qq.com。

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

企业	批号	企业	批号	企业	批号	企业	批号
A	2211018		211112		221105		220802
	2111031		220602		220302		221008
	2210013		220403		220511		221001
B	220303	E	20221001		221016		220802
C	20221003		20221001		220810		220202
	20221102		20221101		221206		230101
	20220708	F	101220902		220610		220902
	20220903		101220603	H	30221101		220408
	20201003		101221107		30220702		221201
	20221103		101221006		30220702		230104
	20221006		101220908		30221101		220504
D	211114		101220305		30221102	J	211007
	221004	G	221110		30220701		220603
	221105		220513	I	221001	K	220510
	220604		220102		221002		221109

BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为0.1%甲酸溶液(含5 mmol/L乙酸铵,A)–乙腈(B),梯度洗脱(0~2 min时5%B,2~5 min时5%B→75%B,5~8 min时75%B,8~12 min时75%B→5%B,12~15 min时5%B);流速为0.3 mL/min;柱温为35℃;进样量为5 μL。

质谱条件:多反应监测(MRM)模式,电喷雾离子源(ESI),温度150℃,负离子扫描模式,脱溶剂气流量为1 000 L/h,锥孔气流量为50 L/h,脱溶剂气温度为600℃,龙胆苦苷检测离子对 m/z 401.0→179.0。

2.2 溶液制备

取龙胆苦苷对照品适量,加甲醇溶解,制成每1 mL含龙胆苦苷0.055 1,0.220 2,1.321 3,2.202 2,6.606 7,11.011 1,22.022 3 μg的系列对照品溶液。取样品内容物约0.3 g,置100 mL容量瓶中,加入甲醇80 mL,超声(功率200 W,频率40 kHz)处理50 min,放冷,用甲醇定容,摇匀,经0.22 μm滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按处方比例称取秦艽对照药材适量,按供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。按腰息痛胶囊处方和

工艺制成缺秦艽的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下4种溶液各5 μL,按2.1项下试验条件进样测定,记录MRM图。结果阴性对照品溶液色谱在与对照药材溶液、对照品溶液色谱保留时间相同处无干扰峰,表明专属性良好。详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下系列对照品溶液各5 μL,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。以龙胆苦苷质量浓度($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标、定量离子对的峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 848.75X + 163.02 (R^2 = 0.994\ 3, n = 7)$ 。结果表明,龙胆苦苷质量浓度在0.055 1 μg/mL~22.022 3 μg/mL范围内与定量离子对峰面积线性关系良好。

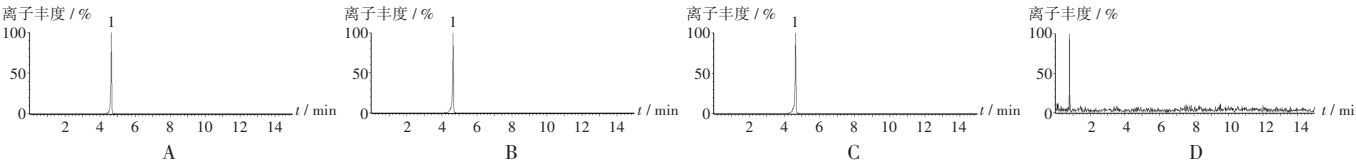
检测限:精密量取2.2项下22.022 3 μg/mL的对照品溶液适量,倍比稀释,按2.1项下试验条件进样测定,以信噪比为3:1时待测成分的质量浓度为检测限。结果为6.7 ng/mL。

精密度试验:取质量浓度为11.011 1 μg/mL的对照品溶液适量,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果龙胆苦苷峰面积的 RSD 为2.03%($n = 6$),表明仪器精密度好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液(批号221001)适量,分别于室温放置0,2,4,6,8 h时按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,结果的 RSD 为1.64%($n = 5$),表明供试品溶液在室温放置8 h内基本稳定。

重复性试验:平行称取6份样品(批号221001),每份约0.3 g,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,记录峰面积并计算含量。结果龙胆苦苷含量的 RSD 为1.21%($n = 6$),表明方法重复性较好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号221001)适量,共6份,各约0.15 g,分别加入对照品溶液(110.11 μg/mL)2 mL,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,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表2。



1. 龙胆苦苷

A. 对照品溶液 B. 对照药材溶液 C. 供试品溶液 D. 阴性对照品溶液

图1 多反应监测色谱图

1. Gentiopicroside

A. Reference solution B. Reference medicinal herb solution C. Test solution D. Negative reference solution

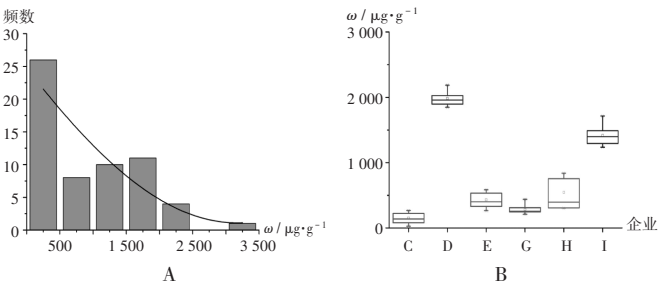
Fig.1 MRM chromatograms

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

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.153 0	223.07	220.22	433.01	95.33	98.02	2.58
0.150 7	219.72	220.22	436.44	98.41		
0.152 4	222.20	220.22	447.19	102.17		
0.150 8	219.86	220.22	434.23	97.34		
0.151 9	221.47	220.22	432.13	95.66		
0.151 2	220.45	220.22	438.93	99.21		

2.4 样品含量测定

取 60 批样品适量,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,记录峰面积并计算样品含量。结果显示,样品中龙胆苦苷含量为 27.66 ~ 3 367.24 $\mu\text{g/g}$ (主要分布于 27.66 ~ 500 $\mu\text{g/g}$),见图 2 A。各企业龙胆苦苷含量的 RSD 为 5.56% ~ 54.62%,说明部分企业的生产工艺(或秦艽原药材来源)可能不稳定。现以批次不少于 6 的企业产品观察批间含量波动情况,见图 2 B。



A. 频数分布图 B. 箱式图

图 2 龙胆苦苷含量分布图

A. Frequency distribution plot B. Box plot

Fig. 2 Content distribution of gentiopicroside

3 讨论

预试验中考察提取时间时,比较了超声 30, 40, 50, 60 min 对样品溶出度的影响,结果超声 50 min 后能提取完全,考虑龙胆苦苷易溶于甲醇^[8-10],最终确定采用甲醇超声 50 min 制备供试品溶液。流动相考察了乙腈 - 0.1% 甲酸、乙腈 - 5 mmol/L 乙酸铵、甲醇 - 0.1% 甲酸、甲醇 - 5 mmol/L 乙酸铵、乙腈 - 0.1% 甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)5 个流动相体系,通过比较龙胆苦苷保留时间、峰形、分离度、耐用性等,最终选择乙腈 - 0.1% 甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)作为流动相。采用负离子模式进行扫描^[11-13],发现龙胆苦苷的信号响应较高且稳定。

60 批次样品中龙胆苦苷含量相差大,均一性较差。分析原因,除与生产工艺有差异外,也与秦艽的药材基源较多(4 种,分别为龙胆科植物秦艽、麻花秦艽、粗茎秦艽、小秦艽)有关,含量差异范围为 0.43% ~ 17.31%^[14]。另外,市场上依然存在黑大艽(也称黑秦艽)、红秦艽、

黄秦艽或掺入党参须等冒充秦艽使用的问题,故也不能排除秦艽原料中存在掺伪问题^[15-16]。

综上所述,本研究中所建方法操作简便,结果准确,精密度高、重复性好,可用于腰息痛胶囊的质量控制。

参考文献

[1] 广东省卫生厅. 广东省药品标准(上册)[M]. 广州:广东新华印刷厂,1987:614.

[2] 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,2020:282.

[3] 江涛,陈丽斯,彭红英,等. 高效液相色谱法同时测定追风透骨丸中龙胆苦苷和芍药苷含量[J]. 中国药业,2023,32(13): 83 - 86.

[4] 孙国园,朱小玲,李斌鑫,等. HPLC 联合多元统计分析评价不同地区小秦艽花质量[J]. 中华中医药杂志,2023,38(8): 3780 - 3785.

[5] 季文静,谢晖,吴新荣,等. 基于 UPLC - LTQ - Orbitrap MS/MS 法对粗茎秦艽药材不同初加工品化学成分的分析[J]. 中草药,2023,54(14):4641 - 4648.

[6] 季文静,吴新荣,倪梁红,等. 云南丽江道地药材粗茎秦艽不同部位化学成分测定与 HPLC 指纹图谱分析[J]. 时珍国医国药,2023,34(2):424 - 428.

[7] 姜钊,张景瑜,张卫花,等. 基于 psb A - trn H 序列的秦艽分子鉴定及其药效分析[J]. 山西农业科学,2023,51(1):7 - 13.

[8] 严文利,周德勇,龚韬,等. 儿舒平颗粒制备工艺优选[J]. 中国药业,2022,31(17):50 - 54.

[9] 张丽娟,蓝献泉,郑锦坤,等. 反相高效液相色谱法同时测定鼻咽清颗粒中龙胆苦苷、迷迭香酸和蒙花苷含量[J]. 中国药业,2021,30(21):62 - 65.

[10] 陈荣,钟水生,王亚琼,等. 清热解毒颗粒剂不同制备工艺下量值传递规律研究[J]. 药物分析杂志,2023,43(9): 1574 - 1585.

[11] 熊波,桑吉东知,倪梁红,等. 基于 UPLC - ESI - Q - TOF - MS/MS 技术分析藏药粗茎秦艽的化学成分[J]. 西北药学杂志,2023,38(4):1 - 8.

[12] 李霞,何志鹏,王仕宝,等. 基于 HPLC 的秦艽药材特征指纹图谱构建及主成分分析[J]. 甘肃农业大学学报,2023,58(3):115 - 132.

[13] 何凤艳,周亚楠,戴忠,等. HPLC - MS/MS 法同时测定心脑血管片中 10 个成分的含量[J]. 药物分析杂志,2023, 43(4):564 - 572.

[14] 张泽坤,李娅琦,王梓轩,等. 4 种秦艽中化学成分的 UPLC - LTQ - Orbitrap - MS 快速分析研究[J]. 中南药学,2020, 18(1):96 - 101.

[15] 孟杰,陈兴福,宋九华,等. 龙胆属秦艽组植物分类与鉴别研究进展[J]. 中草药,2013,44(16):2330 - 2335.

[16] 郭晓晗,张萍,荆文光,等. 从 2020 年国家药品抽检专项有关问题谈中药材及中药饮片监管[J]. 中国现代中药, 2021,23(10):1679 - 1685.

(收稿日期:2023 - 10 - 25;修回日期:2024 - 06 - 21)