

应用 LC-MS/MS 法筛选宝心艾维西木口服液质量控制中的含量测定指标

戎晓娟^{1*}, 张瑞萍², 贺金华¹, 蔡晓翠¹, 康雨彤¹, 毛艳¹, 严欢¹(1.新疆维吾尔自治区药物研究所, 乌鲁木齐 830004; 2.中国医学科学院/北京协和医学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

中图分类号 R283.61;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)23-2157-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.23.18

摘要 目的:筛选并确定维吾尔药宝心艾维西木口服液中可用于其质量控制的含量测定指标。方法:利用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法进行分析测定。色谱柱为 Waters 5C₁₈-PAQ₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.2% 乙酸水溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 ml/min,离子源为 ESI,采用正负离子扫描模式,温度为 400 °C,质量扫描范围(*m/z*)为 100~1 000。结果:共鉴定出 7 个组分,分别推测为咖啡酸、麝香草酚、山柰酚-3-*O*-*d*-(6-*O*-对羟基桂皮酰)半乳吡喃糖苷、芹菜素-7-*O*-*β*-*d*-葡萄糖、射干苷、迷迭香酸、田蓟苷;其中迷迭香酸为主要成分,故将其选定为该制剂质量控制中的含量测定指标。结论:利用 LC-MS/MS 法对维吾尔药中的复杂成分进行分析,快速获得化合物的结构信息,及时识别已知化合物,可快速筛选出合适的含量测定指标。

关键词 宝心艾维西木口服液;迷迭香酸;液相色谱-串联质谱法;含量测定;指标筛选

Index Selection of Content Determination for Quality Control of Baoxin Aiweiximu Oral Liquid by LC-MS/MS

RONG Xiao-juan¹, ZHANG Rui-ping², HE Jin-hua¹, CAI Xiao-cui¹, KANG Yu-tong¹, MAO Yan¹, YAN Huan¹(1. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830004, China; 2.State Key Lab of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To select and determine the index of content determination of quality control of Baoxin aiweiximu oral liquid. METHODS: LC-MS/MS method was used. The determination was performed on Waters 5C₁₈-PAQ(250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-acetic acid (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. ESI was applied and operated in both negative and positive modes at 400 °C, full scan (*m/z*) from 100-1000 amu. RESULTS: 7 compounds were identified, including caffeic acid, thymol, kaempferol-3-*O*-*d*-(6-*O*-*p*-hydroxy cinnamyl) galactopyranose, apigenin-7-*O*-*β*-*d*-glucose, belamcandin, rosmarinci acid and tilianin; as main component, rosmarinic acid was selected as the index for quality control of the preparation. CONCLUSIONS: LC-MS/MS is adopted to analyze the comprehensive components of Uyghur medicine to quickly obtain the information of compound structure and screen suitable content determination indexes.

KEYWORDS Baoxin aiweiximu oral liquid; Rosmarinic acid; LC-MS/MS; Content determination; Index selection

宝心艾维西木口服液主要是由蚕茧、香青兰、薰衣草、牛舌草、西红花等 10 味药材制成的维吾尔药口服制剂,具有强心益肝、镇静安神的功效,临床主要用于心慌气短、头晕目眩、食欲不振、精神衰弱等。该药收载于《中华人民共和国卫生部药品标准·维吾尔药分册》^[1],原质量控制标准较简单,无含量测定项,已不能满足对其质量的有效控制要求。为使本品的质量更安全和可控,以适应新的要求,提高标准势在必行,而建立高效、准确的含量测定方法是研究的重点内容。由于维吾尔药复方制剂的组成复杂,根据制备工艺的不同,主要成分也不尽相同,这就给质量控制研究中含量测定指标的选择带来了较大的困难。目前,应用的是高效液相色谱(HPLC)法选择含量检测指标,但此方法用于确定含量检测指标存在一定的盲目性和局限性,而液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法在此

方面体现出显著优势。LC-MS/MS 法可在化学成分达到有效分离的基础上,提供丰富的化合物结构信息,推测进而确定已知化合物,为复杂体系中主要成分的确定提供了强有力的技术支持^[2]。

本研究采用 LC-MS/MS 法初步推测宝心艾维西木口服液中的主要成分,进而与已知对照品的色谱和质谱特征进行对照,快速、准确地对多个化合物进行鉴定,并据此选择合适的指标用于含量测定,以有效控制本品的质量。

1 材料

1.1 仪器

1260 系列 HPLC 仪(美国 Agilent 公司),配备在线脱气机、二元梯度泵、自动进样器、柱温箱、紫外检测器;QTRAP 型四极杆-线性离子阱串联质谱仪(美国 Applied Biosystems/MDS SCIEX 公司),配有 TurboIonSpray (ESI) 离子源;数据采集及处理软件采用 Analyst software (Version 1.5.2);BP211D 型十万分

* 助理研究员, 硕士。研究方向: 药物分析。电话: 0991-3851865。E-mail: 109303620@qq.com

之一电子天平(德国 Sartorius 公司);SK3300H 超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司,频率:53 kHz,功率:180 W)。

1.2 药品与试剂

迷迭香酸对照品(批号:111871-201102)购自中国食品药品检定研究院;宝心艾维西木口服液(新疆维吾尔自治区药物研究所制剂室,批号:20120109);甲醇、乙腈为色谱纯(美国 Fisher 公司);乙酸为色谱纯(美国 DIKMA Technologies 公司);水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

取一定量的对照品,精密称定,加甲醇适量,制成 0.5 mg/ml 的溶液,用 0.22 μm 的滤膜滤过,即得。

2.2 供试品溶液的制备

精密量取供试品 20 ml 于 50 ml 量瓶中,加入甲醇 20 ml,超声处理 30 min,放冷,用甲醇定容,摇匀,用 0.22 μm 的滤膜滤过,即得。

2.3 HPLC 条件

色谱柱:Waters 5C₁₈-PAQ(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:A 为 0.2% 乙酸水溶液(V/V),B 为乙腈,梯度洗脱条件:0~60 min,15%~50% B;流速:1.0 ml/min;柱温:30 °C;进样量:10 μl;检测波长:352 nm;分量进样,柱后 3:1 分流(1/4 进入质谱仪)。

2.4 MS 条件

在一个质谱数据采集周期内同时进行高、低不同碰撞能量的两个 EMS 扫描。负离子扫描模式,喷雾电压:−4 500 V,解簇电压(DP):−45 V,入口电压(EP):−9 V,碰撞电压(CE):−35 V;正离子扫描模式,喷雾电压:5 500 V,DP 电压:60 V,EP 电压:10 V,CE 电压:35 V。雾化气(N₂)压力:60 arb,干燥气(N₂)压力:50 arb;离子源温度:400 °C,质量扫描范围(m/z)100~1 000。

2.5 LC-MS/MS 分析结果

取宝心艾维西木口服液,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.3”和“2.4”项下色谱条件和质谱条件进行 LC-MS/MS 分析,进样量为 10 μl,结果见图 1 和图 2。根据制剂中所含药材主要成分^[3-7]及相对分子质量推测化合物,结果见表 1。

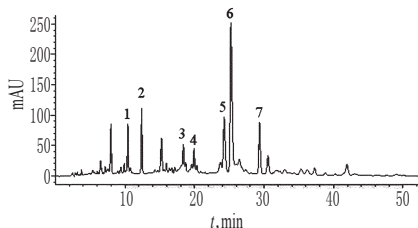


图 1 宝心艾维西木口服液的 HPLC 图

Fig 1 HPLC chromatograms of Baixin aiweiximu oral liquid

2.6 含量测定指标的选择

以上试验结果显示,本制剂的主要成分可能为迷迭香酸。为进一步确定,按以上方法对迷迭香酸对照品进行 LC-MS/MS 分析。通过对照品与供试品的 LC-MS 和 LC-MS/MS 结果比较,确认本制剂中的主药成分为迷迭香酸,结果见图 3。

3 讨论

本研究鉴别出宝心艾维西木口服液中 7 个主要化合物,分

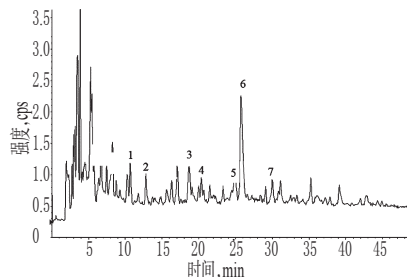


图 2 宝心艾维西木口服液的总离子流图

Fig 2 TIC of Baixin aiweiximu oral liquid

表 1 宝心艾维西木口服液中主要化合物推测结果

Tab 1 Main compounds of Baixin aiweiximu oral liquid

峰序号	t _r , min	[M-H] ⁻	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	相对分子质量	可能化合物名称
1	10.41	179	181	180	180	咖啡酸
2	12.40	149	151	150	150	麝香草酚
3	18.38	593	617	594	594	山萘酚-3-O-d-(6-O-对羟基桂皮酰)半乳吡喃糖苷
4	19.94	431	433	432	432	芹菜素-7-O-β-d-葡萄糖
5	24.27	461	463	462	462	射干苷
6	25.23	359	383	360	360	迷迭香酸
7	29.36	445	447	446	446	田蓟苷

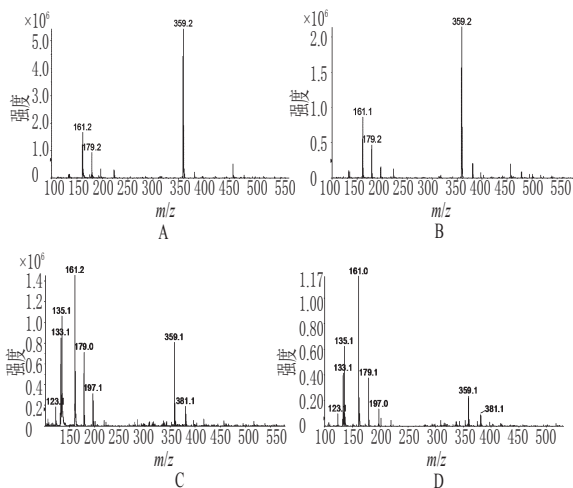


图 3 迷迭香酸的 MS 图

A. 供试品中迷迭香酸的一级质谱图; B. 迷迭香酸对照品的一级质谱图; C. 供试品中迷迭香酸的二级质谱图; D. 迷迭香酸对照品的二级质谱图

Fig 3 MS spectrums of rosmarinci acid

A. MS spectrum of rosmarinci acid in test sample; B. MS spectrum of rosmarinci acid in substance control; C. MS/MS spectrum of rosmarinci acid in test sample; D. MS/MS spectrum of rosmarinci acid

别为咖啡酸、麝香草酚、山萘酚-3-O-d-(6-O-对羟基桂皮酰)半乳吡喃糖苷、芹菜素-7-O-β-d-葡萄糖、射干苷、迷迭香酸和田蓟苷。迷迭香酸是一种多酚羟基的酸,具有抗氧化、抗炎、免疫调节及清除自由基和抗血栓生成等生物活性,对肝及心肌缺血性损伤具有明显的保护作用,还具有一定的抗焦虑和镇静安神的功效^[8-9]。这与宝心艾维西木口服液的功效基本一致,故迷迭香酸作为本制剂中的有效且主要成分可选定为含量测定指标。

当前,大多维吾尔药经临床验证具有较好的疗效,而安全

HPLC 法测定首乌润肠片中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-d-葡萄糖苷的含量

林建昌^{1*}, 郭伟魁²(1.梅州市人民医院, 广东梅州 514031; 2.梅州市食品药品监督管理局, 广东梅州 514031)

中图分类号 R283.64;R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)23-2159-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.23.19

摘要 目的:建立测定首乌润肠片中 2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-d-葡萄糖苷含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Shimadzu VP-ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(25:75, V/V), 流速为 1.0 ml/min, 柱温为 30 ℃, 检测波长为 320 nm。结果:2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-d-葡萄糖苷进样量在 0.2~5.0 μg 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9999$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2%;平均加样回收率为 96.29%, RSD=2.12%($n=6$)。结论:该方法操作简便、结果准确、专属性强,可用于首乌润肠片的质量控制。

关键词 首乌润肠片;2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-d-葡萄糖苷;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of 2,3,5,4'-Tetrahydroxy Stilbene-2-O-β-d-Glucoside in Shouwu Runchang Tablets by HPLC

LIN Jian-chang¹, WU Wei-kui²(1. Meizhou Municipal People's Hospital, Guangdong Meizhou 514031, China; 2. Meizhou Institute for Food and Drug Control, Guangdong Meizhou 514031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-β-d-glucoside in Shouwu runchang tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Shimadzu VP-ODS column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase consisted of acetonitrile-water (25:75, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 30 ℃, and detection wavelength was set at 320 nm. RESULTS: The linear range of 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-β-d-glucoside were 0.2-5.0 μg($r=0.9999$) with an average recovery of 96.29%(RSD=2.12%, $n=6$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and specific, and can be used for quality control of Shouwu runchang tablets.

KEYWORDS Shouwu runchang tablets; 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-β-d-glucoside; HPLC; Content determination

性和质量可控性有待提高,对其深入研究以提高质量标准,增加含量测定尤为重要,但首要的是选定合理的含量测定指标。过去往往是根据处方中所含药材中的已知成分来推测和确定制剂的含量测定指标,这仅从单味药材考虑,制剂中多味药材经过不同制备工艺,成分往往会发生变化,且更为复杂,故需要更科学、更简便的方法分析、鉴别制剂这一复杂体系中的主要成分。作为化合物鉴定和结构确证的重要工具,应用 LC-MS/MS 法对维吾尔药复杂成分进行分析,能够快速获得鉴定化合物的结构信息,及时识别已知化合物,有助于快速筛选出合适的含量测定指标,建立含量测定方法。将 LC-MS/MS 法应用于维吾尔药复杂体系主要成分鉴定中,可极大提高工作效率,结果更加真实可靠,并可同时获得多个成分的结构信息,可为进一步确认已知化合物和发现新化合物提供依据。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准:维吾尔药分册[S]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1998:160.

- [2] 刘祥东,梁琼麟,罗国安,等.液质联用技术在医药领域中的应用[J].药物分析杂志,2005,25(1):110.
- [3] 阮伸.新橙皮苷结构的波谱分析[J].江苏化工,1994,22(3):36.
- [4] 林丽美,许招懂,闫积彪,等.夏枯草中活性成分迷迭香酸的提取分离、结构鉴定与富集[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(8):35.
- [5] 阿衣努尔·热合曼,麦路德木·麦麦吐逊,热西旦木·托乎提.香青兰化学成分分离纯化及结构鉴定[J].新疆医科大学学报,2011,34(4):366.
- [6] 古海锋,陈若芸,孙玉华,等.香青兰化学成分的研究[J].中国中药杂志,2004,29(3):232.
- [7] 吴霞,刘净,于志斌,等.薰衣草中黄酮类化学成分的研究[J].中国中药杂志,2007,32(9):821.
- [8] 黄幼霞,黄荣桂,郑兴中.迷迭香酸药理作用的研究进展[J].海峡药学,2010,22(5):17.
- [9] 李丽,梁绪国,刘锡强,等.迷迭香酸对冠脉结扎大鼠心肌缺血损伤的保护作用[J].中国医学创新,2009,6(22):18.

(收稿日期:2013-04-08 修回日期:2013-07-15)

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0753-2131938。
E-mail:1599252661@qq.com