

超高效液相色谱-串联质谱法测定金红片中川楝素的含量

李伟^{1*}, 郝晶晶^{1#}, 梅升辉², 赵志刚²(1. 北京卫生职业学院药学系, 北京 101101; 2. 首都医科大学附属北京天坛医院药学部, 北京 100070)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)09-1081-03

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.09.015

摘要 目的:建立超高效液相色谱-串联质谱法测定金红片中川楝素含量的方法。方法:采用 Phenomenex Kinetex XB C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm),水和乙腈作为流动相梯度洗脱,流速为 0.5 ml/min,离子源为电喷雾离子源负离子模式(ESI⁻),采用多反应监测扫描方式检测金红片中川楝素的含量。结果:川楝素在 0.01~200 μg/L 范围内线性关系良好($r=0.9979$),定量限为 0.01 μg/L。方法重复性和精密度良好,低、中及高 3 个水平下的加样回收率为 96.9%~105.8%,RSD 为 1.88%~3.21%。稳定性试验结果表明供试品溶液在室温(25℃)放置 48 h 内稳定。结论:本方法线性范围大,线性关系好,精密度高,分析时间短,可用于金红片中川楝素的质量控制。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱法;金红片;川楝素;含量测定

Content Determination of Toosendanin in Jinhong Tablets by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Wei¹, HAO Jingjing¹, MEI Shenghui², ZHAO Zhigang²(1. Dept. of Pharmacy, Beijing Health Vocational College, Beijing 101101, China; 2. Dept. of Pharmacy, Beijing Tiantan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100070, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method of ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the content determination of toosendanin in Jinhong tablets. METHODS: Chromatographic column of Phenomenex Kinetex XB C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm) was adopted, water and acetonitrile were used as mobile phases in a gradient elution at a flow rate of 0.5 ml/min, with the ion source was ESI⁻, which was detected by multiple reaction detection scan. RESULTS: The linearity was good in the range of 0.01-200 μg/L ($r=0.9979$), with the limit of quantification was 0.01 μg/L. This method had good repeatability and precision, with the recoveries of 96.9%-105.8% and the RSD of 1.88%-3.21% at the three levels of low, medium and high. Results of stability test showed that the test solution was stable within 48 h at room temperature (25℃). CONCLUSIONS: This method has a large linear range, good linearity, high precision and short analysis time, which can be used for the quality control of toosendanin in Jinhong tablets.

KEYWORDS UHPLC-MS/MS; Jinhong tablets; Toosendanin; Content determination

金红片是由川楝子、延胡索(醋制)、红花八角叶和木香组成的复方制剂,可用于慢性浅表性胃炎、肝胃不和证等^[1-2]。目前金红片的检测方法中仅对延胡索乙素进行控制,而川楝子作为君药却没有任何体现。川楝子的主要成分为川楝素,具有丰富的药理作用^[3-4],如抑制胃癌细胞增殖作用^[5-7]等,与金红片的药效非常相关。对于川楝素的定量分析可使用高效液相色谱法^[8-12]或液-质联用法^[13-20],但均存在前处理复杂、分离度差和分析时间长等问题。目前,液相色谱-质谱联用方法用于金红片中川楝素的检测未见文献报道。本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱方法,此方法前处理简单,分离时间

短,灵敏度高,为金红片的质量标准升级提供了技术基础。

1 材料

1.1 仪器

Exion LC AD 型高效液相色谱仪(美国 AB Sciex 公司); QTRAP 6500+ 型质谱仪(美国 AB Sciex 公司); Mettler NewClassic MS 型电子天平(瑞士 Mettler 公司)。

1.2 药品与试剂

金红片(批号为 180401、190303 及 190401,购自金鹤年堂大药房,均为市售产品);川楝素对照品(批号为 111842-201804,纯度为 96.9%,购自中国食品药品检定研究院);甲醇、乙腈和蒸馏水(均为色谱纯,购自 Fisher 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件:使用 Exion LC AD 超高效液相色谱仪,

* 副教授。研究方向:药物分析。E-mail: lijing_0317001@163.com

通信作者:教授。研究方向:药物制剂新技术与质量控制研究。E-mail: haojingjing@sina.com

QTRAP 6500+质谱仪。采用 Phenomenex Kinetex XB-C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm), 流动相为水(A)和乙腈(B), 流速为 0.5 ml/min, 柱温为 40 °C, 进样量为 10 μl。梯度洗脱程序: 0 min, 70% A; 0~3 min, 70%~50% A; 3~3.5 min, 50%~5% A; 3.5~4.0 min, 5%~5% A; 4.0~4.1 min, 5%~70% A; 4.1~5.0 min, 70%~70% A。

2.1.2 质谱条件: 质谱离子化方式为电喷雾离子源负离子模式(ESI⁻), 川楝素在多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下的定量离子对为 m/z 573.3→531.3, 碰撞电压为 -26 V, 去簇电压为 -95 V, 质谱图见图 1。

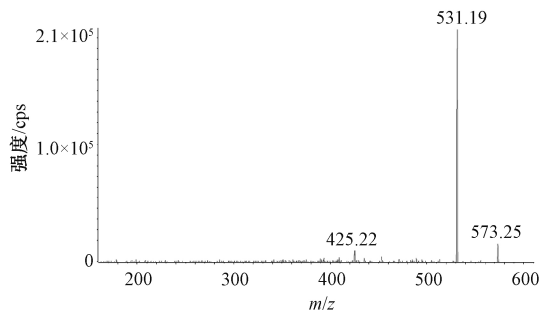


图 1 川楝素的质谱图

Fig 1 Mass spectrum of toosendanin

2.2 溶液的制备

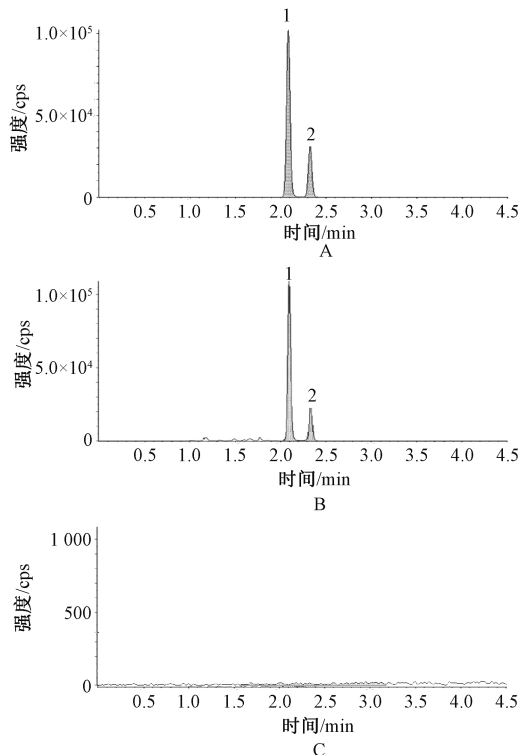
2.2.1 对照品溶液的制备: 取川楝素对照品适量精密称定, 加入甲醇制成每 1 ml 含 1 mg 的对照品储备液, 用 70% 甲醇水溶液稀释成质量浓度分别为 200、20、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.02 及 0.01 μg/L 的工作液(S10—S1)。按“2.1”项下条件检测, 结果见图 2(A)。

2.2.2 供试品溶液的制备: 取样品片 5 片, 精密称定, 研细, 精密称取样品粉末 10 mg, 置于 10 ml 容量瓶中, 加入甲醇振摇 2 min, 超声 20 min 萃取, 以 12 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液加入 70% 甲醇水溶液稀释 10 倍即得。按“2.1”项下条件检测, 结果见图 2(B)。

2.2.3 阴性对照溶液的制备: 用 70% 甲醇水溶液作为阴性对照溶液。

2.3 线性范围考察与定量测定

取川楝素对照品工作液 S1—S10 各 10 μl, 分别进样, 川楝素有 2 个互变异构体, 出现 2 个峰, 与文献报道一致^[13-17]。以川



A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 阴性对照溶液; 图中峰 1、2 为川楝素异构体(toosendanin isomer)

A. control solution; B. test solution; C. negative control solution; peaks 1 and 2 in the figure indicates toosendanin isomer

图 2 超高效液相色谱图

Fig 2 Ultra-high performance liquid chromatography diagram

楝素对照品工作液的浓度为横坐标, 2 个峰面积之和为纵坐标绘制标准曲线, 并进行线性回归。检测限为 0.005 μg/L, 定量限为 0.01 μg/L。川楝素在 0.01~200 μg/L 范围内线性关系良好。回归方程为 $Y=318.74694X+680.96367$ ($r=0.9979$)。

2.4 精密度试验

取“2.2.1”项下的对照品溶液 S5, 连续进样 10 次, 计算峰面积的 RSD 为 1.39%, 表明仪器精密度良好, 见表 1。

2.5 重复性试验

取供试品金红片(批号为 180401), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 测定含量。结果显示, 川楝素含量的平均值为 61.35 μg/g, RSD 为 0.99%, 表明重复性良好, 见表 2。

表 1 精密度试验结果

Tab 1 Results of precision test

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
峰面积/×10 ⁶	1.629	1.648	1.579	1.657	1.641	1.637	1.651	1.658	1.649	1.643
RSD/%	1.39									

表 2 重复性试验结果

Tab 2 Results of repeatability test

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
峰面积/×10 ⁶	1.979	1.973	1.932	1.946	1.974	1.973	1.964	1.937	1.928	1.955
含量/(μg/g)	62.08	61.89	60.58	61.02	61.92	61.87	61.58	60.75	60.45	61.31
平均含量/(μg/g)	61.35									
RSD/%	0.99									

2.6 加样回收率试验

取已知含量的金红片样品,精密称定,3份1组,分别精密加入低、中及高3个浓度(相当于川楝素含量有量80%、100%及120%)的川楝素对照品溶液适量,按照“2.2.2”项下方法操作,测定结果见表3,表明样品提取效率稳定。

表3 加样回收率试验结果

Tab 3 Results of recovery test

编号	样品中含量/ng	加入量/ng	测得量/ng	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
1	6.33	5	11.36	100.6	96.9	2.06
2	6.22	5	10.91	93.8		
3	6.28	5	11.10	96.4		
4	6.33	6	12.35	100.3	105.8	1.88
5	6.22	6	12.77	109.2		
6	6.28	6	12.75	107.8		
7	6.33	7.5	14.34	106.8	101.5	3.21
8	6.22	7.5	13.45	96.4		
9	6.28	7.5	13.88	101.3		

2.7 稳定性试验

取同一批金红片(批号为190303)供试品溶液,室温(25℃)放置,分别于0、2、4、6、8、12、24及48h按上述条件测定,测得川楝素峰面积的RSD(n=7)为4.3%,表明供试品溶液在室温放置48h内稳定。

2.8 样品含量测定

取3个批次的金红片,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,测定含量,结果见表4。

表4 金红片中川楝素的含量测定结果

Tab 4 Content determination of toosendanin in Jinhong tablets

批号	含量/($\mu\text{g/g}$)	RSD/%
180401	62.76	0.86
190303	73.77	1.88
190401	48.06	1.30

3 讨论

3.1 质谱条件的优化

根据川楝素的结构,选择ESI⁻模式采集,定量离子对为m/z 573.3→531.3(母离子为川楝素丢失1个氢原子,子离子为川楝素的酯键出现 α 断裂后,丢失 $\text{CH}_3-\text{C}\equiv\text{O}$ 碎片^[17])。检测方式为MRM模式。经过优化,选择气帘气172 kPa,离子化温度450℃,喷雾电压-4 500 V,离子源气体GS1 207 kPa、GS2 414 kPa,碰撞电压-26 V,去簇电压-95 V。

3.2 色谱方法的优化

流动相选择方面,分别尝试了甲醇和乙腈作为有机相,发现甲醇作为流动相时,川楝素的2个异构体分离效果较差;而乙腈作为流动相时,峰形较好,且异构体能达到基线分离。在水相选择中,分别尝试了水^[8]和0.01%甲酸溶液^[14-20],对比发现,甲酸溶液作为水相信号下降了约1倍,这可能是在负离子检测模式下,需要化合物减去氢,而甲酸是氢的供体,因此加入甲酸后信号出现了下降。最终本研究选择乙腈和水作为流动相进行梯度洗脱,缩短了检测时间,提高了灵敏度,达到了2个异构体峰基线分离的效果。

综上所述,本研究建立了金红片中川楝素含量的超高效液

相色谱-串联质谱测定方法,线性范围宽,线性关系好,精密度高,分析时间短,前处理简单,回收率、精密度和稳定性都能满足定量分析的要求,可作为金红片质量控制标准的参考。

参考文献

- [1] 陈峰. 金红片联合雷尼替丁治疗慢性浅表性胃炎临床观察[J]. 临床合理用药, 2010, 3(20): 69.
- [2] 张俊巍, 宋洁云, 张连富, 等. 金红片治疗肝胃不和型慢性浅表性胃炎325例疗效观察[J]. 中国中医药科技, 1998(4): 251.
- [3] 骆玮玮, 陆金健, 陈修平, 等. 川楝素的药理作用及机制研究进展[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(4): 161-164.
- [4] 杨建宇, 李杨, 范竹雯, 等. 地道药材川楝子的研究近况[J]. 光明中医, 2020, 35(2): 294-296.
- [5] 苗长久. 川楝素对人胃癌SGC-7901细胞增殖的影响[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(7): 3197-3202.
- [6] 陈雯, 张伟伟, 潘阳, 等. 川楝素对人胃癌细胞MKN-45中CTPS细胞蛇形成的影响及其机制[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(6): 633-636, 647, 后插1-后插2.
- [7] 张靖. 川楝素通过下调环状RNAcircDLST对胃癌细胞BGC-823的抑制作用[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2020, 40(9): 1202-1206.
- [8] 郭灿, 曾莉. 不同炮制方法对川楝子中川楝素和异川楝素含量的影响[J]. 西部中医药, 2016, 29(11): 30-32.
- [9] 李梅丽, 邵志宇, 李碧艳. HPLC法测定杀虫丸中木香烯内酯、去氢木香内酯、川楝素和香兰素的含量[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 25(4): 226-229.
- [10] 宋信莉, 涂元红, 汪云霞, 等. 金铃子复方胃漂浮缓释剂成型前处理研究[J]. 贵州科学, 2019, 37(6): 14-21.
- [11] 陈彬, 翁金月, 金利思, 等. 3种炮制方法对川楝子中6种成分变化的影响考察[J]. 中国药师, 2020, 23(10): 2061-2064.
- [12] 王蕾, 李果果, 韩旭. UPLC法同时测定乙肝宁颗粒中的10种指标成分[J]. 中草药, 2020, 51(22): 5754-5759.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 44.
- [14] 马永青, 刘晓明, 刘永利. UPLC-MS/MS法测定舒肝丸中川楝素的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(3): 545-549.
- [15] 朱艳红, 王明新. HPLC-MS/MS法测定蒙药珠苏木丸中川楝素的含量[J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(16): 20-21, 31.
- [16] 王艳楠, 孔德娟. HPLC-MS/MS法测定蒙古古固乐丸中川楝素的含量[J]. 中国民族民间药, 2020, 29(21): 29-30, 34.
- [17] 郝刚, 王亚琼, 俞蕴莉, 等. UPLC-MS/MS法测定苦楝皮、川楝子及其制品中川楝素含量[J]. 中国现代中药, 2015, 17(12): 1280-1283.
- [18] 于娇妍, 王庆伟, 石磊, 等. 川楝子提取物中川楝素在大鼠体内的药代动力学研究[J]. 中国医药导报, 2019, 16(30): 21-25.
- [19] 苏杭, 薛倩倩, 费程浩, 等. 基于含量测定与药效活性相结合的川楝子质量评价[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(3): 414-418.
- [20] 王思雨, 崔日新, 张景珍, 等. 基于嫡权法探讨不同比例川楝子与甘草配伍对化学成分溶出和肝细胞毒性影响[J]. 中南药学, 2020, 18(1): 38-43.

(收稿日期: 2021-03-26)