

UPLC-QQQ/MS法检测驴胶补血颗粒中的阿胶^Δ

陈鸿玉^{1,2*},李劲平^{2#},李文莉^{1,2},丁野¹,孙辉¹,杨清¹,黄晓燕¹(1.湖南省药品检验研究院,长沙 410001; 2.中南大学药学院,长沙 410013)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)15-2101-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.15.24

摘要 目的:建立驴胶补血颗粒中阿胶的检测方法。方法:采用胰蛋白酶对制剂中阿胶进行酶解,并采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法检测制剂中阿胶成分。色谱条件:色谱柱为 Hypersil GOLD C₁₈,流动相为 0.1% 甲酸溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为 0.3 mL/min,柱温为 30 ℃,进样量为 5 μL。质谱条件:离子源为电喷雾离子源,离子化模式为电喷雾正离子化模式(多反应监测),检测离子对为阿胶特征分子离子峰 m/z 539.8(双电荷)→612.4和 m/z 539.8(双电荷)→923.8,喷雾电压为 3 100 V,鞘气压为 20 Arb,辅助气压为 8 Arb,离子传热管温度为 350 ℃,蒸发温度为 350 ℃,扫描模式为单离子检测扫描,碰撞气体为高纯氩气。结果:阿胶成分检测质量浓度线性范围为 20.24~2 024 μg/mL($r=0.997 8$);检测限为 1%;精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<6.0%。27 批样品中均检出阿胶特征分子离子峰。结论:该方法专属性强,可用于驴胶补血颗粒中阿胶的检测。

关键词 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法;驴胶补血颗粒;阿胶;特征分子离子峰

Determination of Donkey-hide Gelatin in Lujiao Buxue Granules by UPLC-QQQ/MS

CHEN Hongyu^{1,2}, LI Jinping², LI Wenli^{1,2}, DING Ye¹, SUN Hui¹, YANG Qing¹, HUANG Xiaoyan¹(1.Hunan Provincial Institute for Drug Control, Changsha 410001, China; 2.School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of donkey-hide gelatin in Lujiao buxue granules. METHODS: Trypsin was used for enzymatic hydrolysis of donkey-hide gelatin. UPLC-QQQ/MS was adopted for the determination of donkey-hide gelatin in the preparation: Hypersil GOLD C₁₈ column was used with mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and sample size was 5 μL. Mass chromatography condition was that ion source was electrospray ion source; ionization mode was ESI⁺; multiple response monitoring was adopted, and characteristic molecular ion peaks of donkey-hide gelatin with mass-to-charge ratio of m/z 539.8 (double charge) → 612.4 and m/z 539.8 (double charge) → 923.8 were used as detection ion pair. Spray voltage was 3 100 V; sheath gas was 20 Arb; auxiliary gas was 8 Arb; ion transfer tube temperature was 350 ℃; evaporation temperature was 350 ℃; scan mode was SRM. Collision gas was high purity argon. RESULTS: The sample size of donkey-hide gelatin ranged 20.24-2 024 μg/mL($r=0.997 8$). The detection limit was 1%. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 6.0%. The characteristic molecular ion peaks of donkey-hide gelatin could be detected in 27 batches of samples. CONCLUSIONS: The method is specific and can be used for the determination of donkey-hide gelatin in Lujiao buxue granules.

KEYWORDS UPLC-QQQ/MS; Lujiao buxue granules; Donkey-hide gelatin; Characteristic molecular ion peak

驴胶补血颗粒为由阿胶、黄芪、党参、熟地黄、白术、当归 6 味药材组方而成,具有补气养血之功效,临床用于久病气血两虚所致的倦怠乏力、面黄肌瘦、头晕目眩等症的治疗^[1]。方中阿胶为君药,阿胶是由马科动物驴的皮熬制而成的胶,具有滋阴补血之功效,为治疗血虚之首选药^[2-3]。随着阿胶的需求量日益增大及资源萎缩,致使该药材掺伪造假问题严重,存在使用其他劣质皮类替代驴皮熬制阿胶的违法行为^[4-5]。近年来,相关研究针对

阿胶药材掺伪造假的问题建立了以特征肽段为指标的专属性检测方法,该方法有效地应用于打击阿胶药材掺伪造假违法行为^[6-9]。然而,对于一些阿胶成药掺伪造假的情况仍缺乏专属性检测方法。本课题组研究的驴胶补血颗粒为 2015 年版《中国药典》(一部)收录的含阿胶中成药,但现行质量标准中无与阿胶药材相关的检测项目^[2]。为了提高该制剂质量标准的专属性 and 可控性,本课题组采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法(UPLC-QQQ/MS)建立了其中阿胶的专属性检测方法,并进行了方法学验证。

1 材料

1.1 仪器

Dionex UltiMate 3000 型 UPLC 仪,包括 TSQ Endura QQQ/MS 系统(美国 Thermo Scientific 公司);

Δ 基金项目:国家科技重大专项课题(No.2014ZX09304307);湖南省食品药品监督管理局食品药品安全科技项目(No.湘食药科 R201504)

* 主管药师。研究方向:药物分析与质量标准。E-mail: 649409690@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师。研究方向:药物分析与质量标准。电话:0731-82650340。E-mail: pjingli@163.com

CG-300型超声波清洗仪(广州比朗仪器有限公司,功率:300 W,频率:25 kHz);AE240型电子分析天平、XSE205DU型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

驴胶补血颗粒(湖南时代阳光药业股份有限公司,批号:20120410、20120510、20120901、20120921、20121006、20121015、20130145、20130209、20130409、20130507、20130910、20131129、20140312、20140508、20140803、20150215、20150301、20150310,规格:20 g/袋;九芝堂股份有限公司,批号:201306013、201309058、201310033、201312006、201403032、201404019、201405025、201411086、201412014,规格:20 g/袋);阿胶对照药材(批号:121274-201202)、黄明胶对照药材(批号:121695-201301)、鹿角胶对照药材(批号:121694-201301)均购自中国食品药品检定研究院;猪皮胶对照药材(笔者自制);胰蛋白酶为质谱级,甲酸、乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Hypersil GOLD C₁₈(75 mm×2.1 mm,1.8 μm);流动相:0.1%甲酸溶液-乙腈,梯度洗脱(0~6 min,95%→93%A;6~8 min,93%→10%A;8~9 min,10%A;9~9.5 min,10%→95%A;9.5~12 min,95%A);流速:0.3 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:5 μL。

2.1.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源;离子化模式:电喷雾正离子化模式,进行多反应监测;检测离子对:阿胶特征分子离子峰 m/z 539.8(双电荷)→612.4和 m/z 539.8(双电荷)→923.8;喷雾电压:3 100 V;鞘气压:20 Arb;辅助气压:8 Arb;离子传热管温度:350 ℃;蒸发温度:350 ℃;扫描模式:单离子检测扫描[m/z 539.8(双电荷)→612.4,碰撞能量:16 V; m/z 539.8(双电荷)→923.8,碰撞能量:20 V];碰撞气体:高纯氦气。

2.2 溶液的制备

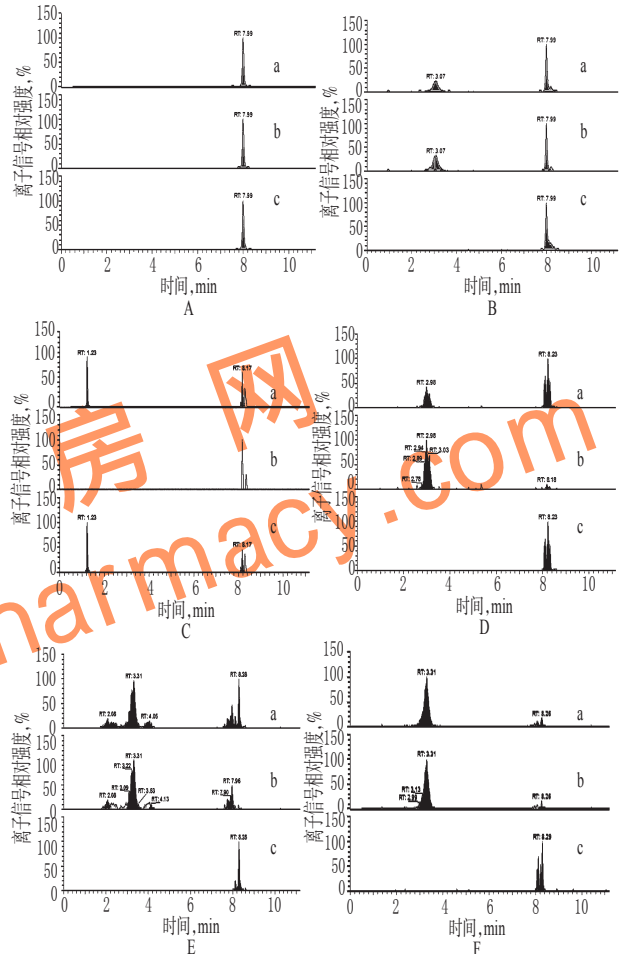
2.2.1 对照药材溶液 称取阿胶对照药材0.1 g,置于350 mL量瓶中,加1%碳酸氢钠溶液40 mL,超声处理30 min,加1%碳酸氢钠溶液定容,摇匀,用0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液100 μL,加胰蛋白酶溶液(取胰蛋白酶,加1%碳酸氢钠溶液使溶解,制成质量浓度为2 μg/μL的溶液,临用新配,下同)15 μL,摇匀,37 ℃下恒温酶解8 h,制成阿胶对照药材溶液。同法制成黄明胶、猪皮胶、鹿角胶对照药材溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,研细,称取1 g(约相当于含阿胶0.1 g),置于50 mL量瓶中,加1%碳酸氢钠溶液40 mL,超声处理30 min,加1%碳酸氢钠溶液定容,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,取续滤液100 μL,加胰蛋白酶溶液15 μL,摇匀,37 ℃下恒温酶解8 h,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按驴胶补血颗粒处方和工艺制备缺阿胶的阴性样品,并按“2.2.2”项下方法制成阴性对照溶液。

2.3 专属性试验

分别取“2.2”项下对照药材溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按“2.1”项下试验条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果,阴性对照色谱图中,在与阿胶对照药材和供试品相应位置上无相应色谱峰,表明阴性对照对阿胶成分检测无干扰,方法专属性良好。



A. 阿胶对照药材; B. 供试品; C. 阴性对照; D. 黄明胶对照药材; E. 猪皮胶对照药材; F. 鹿角胶对照药材; a. 总离子流图; b. m/z 539.8(双电荷)→923.8; c. m/z 539.8(双电荷)→612.4

A. donkey-hide gelatin reference substance; B. test samples; C. negative control; D. oxhide gelatin reference substance; E. pig skin gelatin reference substance; F. deerhorn gelatin reference substance; a. TIC; b. m/z 539.8(double charge)→923.8; c. m/z 539.8(double charge)→612.4

图1 特征分子离子峰色谱图

Fig 1 Characteristic molecular ion peak chromatograms

2.4 线性关系考察

精密称取阿胶对照药材0.1012 g,置于50 mL量瓶中,加1%碳酸氢钠溶液40 mL,超声处理30 min,加1%碳酸氢钠溶液定容,摇匀,作为溶液A。精密量取溶液A 1、2、5、10、20 mL,分别置于100 mL量瓶中,加1%碳

酸氢钠溶液定容,摇匀,经0.22 μm微孔滤膜滤过,精密量取续滤液100 μL,置于10 mL量瓶中,加胰蛋白酶溶液15 μL,摇匀,37℃下恒温酶解8 h,制成系列阿胶对照药材溶液。精密量取上述系列阿胶对照药材溶液各5 μL,按“2.1”项下试验条件进样测定,记录离子信号相对强度。以阿胶对照药材溶液质量浓度(x , μg/mL)为横坐标、离子信号相对强度(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $y=42\ 810x-5\ 053.3$ ($r=0.997\ 8$)。结果表明,阿胶对照药材溶液检测质量浓度线性范围为20.24~2 024 μg/mL。

2.5 检测限考察

精密量取“2.2.1”项下阿胶对照药材溶液适量,倍比稀释,并按“2.1”项下试验条件进样测定。当信噪比为3:1时,得检测限为1%。

2.6 精密度试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20150310)适量,按“2.1”项下试验条件连续进样测定6次,记录离子信号相对强度。结果, m/z 539.8(双电荷)→612.4、923.8提取离子流峰保留时间的RSD=0($n=6$); m/z 539.8(双电荷)→923.8、 m/z 539.8(双电荷)→612.4提取离子流峰离子信号相对强度的RSD分别为4.53%、3.47%($n=6$),表明本方法精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20150310)适量,分别于室温下放置0、3、6、9、15、24 h时按“2.1”项下试验条件进样测定,记录离子信号相对强度。结果, m/z 539.8(双电荷)→612.4、923.8提取离子流峰保留时间的RSD=0.10%($n=6$); m/z 539.8(双电荷)→923.8、 m/z 539.8(双电荷)→612.4提取离子流峰离子信号相对强度的RSD分别为2.97%、5.64%($n=6$),表明供试品溶液室温下放置24 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20150310)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录离子信号相对强度。结果, m/z 539.8(双电荷)→612.4、923.8提取离子流峰保留时间的RSD=0($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 样品检测

取27批样品各适量,分别按“2.2.2”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,记录离子信号相对强度。结果,27批样品中均检出阿胶特征分子离子峰。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

在流动相方面,笔者主要考察了乙腈-0.1%甲酸溶液(梯度洗脱)、甲醇-水(梯度洗脱)、乙腈-水(梯度洗脱)、0.1%甲酸-乙腈溶液(梯度洗脱),结果表明,乙腈-0.1%甲酸溶液(梯度洗脱)的分离效果和峰形较好。

在柱温方面,笔者考察了柱温为25、30、35℃对色谱分离效果的影响,结果表明,柱温对分离效果和峰形影响不大,本试验选择柱温为30℃。在色谱柱方面,笔者考察了2个品牌的色谱柱,分别是Hypersil GOLD C₁₈(75 mm×2.1 mm,1.8 μm)和ACQUITY UPLC BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm,1.7 μm),结果前者分离效果较好。

3.2 酶解时间、酶量和酶解温度的考察

笔者参照2015年版《中国药典》(四部)“通则3405 肽检查法”中的溶剂条件,考察酶解时间和酶量^[10-12]。在37℃恒温水浴中,于酶解8、12、16、20、24 h时分别进样,发现酶解8、12 h时阿胶特征分子离子峰离子信号相对强度一致,因此选择8 h作为酶解时间。将样品和酶比例分别设置为800:3(m/m)、800:6(m/m)、800:9(m/m),发现当比例为800:6(m/m)和800:9(m/m)时,阿胶特征分子离子峰离子信号相对强度一致,考虑尽量降低成本,故选择比例为800:6(m/m)。酶解温度选择30、37、45℃进行考察,发现37℃时阿胶特征分子离子峰离子信号相对强度最大,故选择酶解温度为37℃。

3.3 提取溶剂pH的考察

提取溶剂分别选择1%碳酸氢钠溶液(甲酸调pH至6.0)、1%碳酸氢钠溶液、1%碳酸氢钠溶液(氨试液调pH至9.0),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,分别进样。结果,1%碳酸氢钠溶液阿胶特征分子离子峰离子信号相对强度最大。故选择其作为提取溶剂。

3.4 特征分子离子的选择

在本课题组的前期研究中^[5-9],以主成分分析法找出阿胶与龟甲胶、鹿角胶、黄明胶、新阿胶的区别,并通过偏最小二乘法分析找出特征分子离子。故本试验中以 m/z 539.8(双电荷)→612.4、923.8为样品中阿胶的特征分子离子。

3.5 耐用性考察

笔者主要考察了Ulti Mate 3000/TSQ Endura QQQ/MS仪、API 5500 QQQ/MS仪、Waters I-Class/Xevo TQD QQQ/MS仪。结果表明,3个品牌QQQ/MS仪检测供试品的 m/z 539.8(双电荷)→923.8和 m/z 539.8(双电荷)→612.4提取离子流色谱图中,同时出现与阿胶特征分子离子峰保留时间相同的色谱峰,说明本方法的耐用性较好^[13-14]。

综上所述,本方法专属性强,可用于驴胶补血颗粒中阿胶的检测。

参考文献

- [1] 谷陟欣,张妮瑜,辛秀,等.驴胶补血颗粒中氨基酸成分高效液相色谱指纹图谱研究[J].中南药学,2013,11(12):916-918.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:189-190.
- [3] 刘雅娟,任丽莉,陈国广,等.毛细管GC法同时测定阿胶中5种脂肪酸的含量[J].中国药房,2013,24(7):642-643.

普乐士泰胶囊的质量标准研究^Δ

叶绿萍*, 宾 彬, 龚敏阳, 唐春丽, 马儒清(广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)15-2104-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.15.25

摘要 目的:建立普乐士泰胶囊的质量标准。方法:采用薄层色谱法(TLC)对制剂中太子参、石菖蒲、大血藤、茜草、王不留行进行定性鉴别;采用高效液相色谱法测定制剂中益母草碱的含量;色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C₁₈,流动相为甲醇-0.025 mol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至2.5)(24:76, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为277 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:太子参、石菖蒲、大血藤、茜草、王不留行的TLC图斑点清晰,分离度好,阴性对照无干扰。盐酸益母草碱检测质量浓度线性范围为4.05~81.00 μg/mL($r=0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率为98.47%~103.83%(RSD=2.04%, $n=9$)。结论:该研究所建标准可用于普乐士泰胶囊的质量控制。

关键词 普乐士泰胶囊;质量标准;薄层色谱法;益母草碱;高效液相色谱法

Study on Quality Standard of Prostatitis Capsules

YE Lüping, BIN Bin, GONG Minyang, TANG Chunli, MA Ruqing (The First Affiliated Hospital of Guangxi University of TCM, Nanning 530023, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the quality standard for Prostatitis capsules. METHODS: TLC method was performed to qualitatively identify *Pseudostellaria heterophylla*, *Acortw tatarinowii*, *Sargentodoxa cuneata*, *Rubia cordifolia* and *Vaccaria segetalis* in the preparation. HPLC method was adopted to determine the content of leonurine in the preparation. The determination was performed on Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.025 mol/L potassium dihydrogen phosphate (pH adjusted to 2.5)(24:76, V/V) with phosphoric acid at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 277 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 10 μL. RESULTS: The TLC spots of *P. heterophylla*, *A. tatarinowii*, *S. cuneata*, *R. cordifolia*, and *V. segetalis* were clear and well-separated without interference from negative control. The linear range of leonurine were 4.05-81.00 μg/mL ($r=0.999\ 9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The recovery was 98.47%-103.83% (RSD=2.04%, $n=9$). CONCLUSIONS: Established standard can be used for quality control of Prostatitis capsules.

KEYWORDS Prostatitis capsules; Quality standard; TLC; Leonurine; HPLC

普乐士泰胶囊是由广西中医药大学第一附属医院宾彬教授根据临床经验方研制而成。其处方以益母草

为君药,川牛膝、薏苡仁、苦杏仁为臣药,太子参、石菖蒲、白薏仁、大血藤、败酱草等多味中药相佐使,具有活

- [4] 陈慧慧, 尤金花, 田守生, 等. 郑虹阿胶与易混淆品的鉴别[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(27): 171-173.
- [5] 程显隆, 李文杰, 张小龙, 等. UPLC-QTOF-MS 结合主成分分析法用于龟甲胶、鹿角胶中添加牛皮源成分的检测研究[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(6): 931-935.
- [6] 程显隆, 李佳, 李明峰, 等. 特征肽段检测技术用于胶类药材专属性鉴别方法研究[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(2): 104-108.
- [7] 程显隆, 李佳, 李明峰, 等. 动物胶类药材的鉴别方法研究进展[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(3): 167-168.
- [8] 张贵峰, 刘涛, 王前, 等. 中药阿胶的质量控制方法研究[J]. 药物生物技术, 2009, 16(3): 250-254.
- [9] 张贵峰, 刘涛, 王前, 等. 高效液相色谱/质谱法识别不同明胶酶解产物中特征多肽[J]. 分析化学, 2008, 36(11): 1499-1504.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1022.
- [11] 冯成利, 党蕊叶, 冯慧, 等. 胰蛋白酶水解鲜猪肉的条件选择[J]. 陕西科技大学学报, 2012, 30(3): 23-29.
- [12] 张鹤, 赵雨, 徐云凤, 等. 胰蛋白酶水解梅花鹿鹿筋胶原工艺条件的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(9): 216-222.
- [13] 喻峰, 卢大儒, 陈薇. 测序级胰蛋白酶的制备工艺与质量检测[J]. 生物技术通信, 2014, 25(1): 76-81.
- [14] 茅晓寅, 张梦琪, 周沁逸, 等. 液相色谱-串联质谱法测定晚期实体瘤患者静脉滴注紫杉醇胶束后的药动学[J]. 中国新药与临床杂志, 2015, 34(11): 869-873.

Δ 基金项目: 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项课题(No. GZYZ1105)

* 副主任药师。研究方向: 临床药学、药剂学。电话: 0771-5840015。E-mail: 164589433@qq.com

(收稿日期: 2016-06-24 修回日期: 2016-11-05)

(编辑: 张 静)