

UPLC-MS/MS 法同时测定血必净注射液中 8 种成分

孙志，付俊涛，周霖，楚尧娟，乔高星，杜书章*

(郑州大学第一附属医院，河南 郑州 450000)

摘要：目的 建立超高效液相色谱-质谱联用 (UPLC-MS/MS) 法同时测定血必净注射液 (红花、赤芍、川芎等) 中没食子酸、苦参碱、丹参素、羟基红花黄色素 A、咖啡酸、芍药苷、阿魏酸、木犀草苷的含有量。**方法** 该药物 5% 乙腈提取液的分析采用 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈-0.1% 甲酸, 梯度洗脱; 体积流量 0.2 mL/min; 柱温 40 °C。再对所测定含有量进行聚类分析。**结果** 8 种成分在各自范围内线性关系良好 ($r > 0.9960$), 平均加样回收率 95% ~ 104%, RSD 均小于 3%。10 批样品中各成分含有量总体稳定, 但没食子酸和芍药苷有一定差异。**结论** 不同批次血必净注射液的质量仍参差不齐, 应加以关注。

关键词：血必净注射液；化学成分；UPLC-MS/MS；聚类分析

中图分类号：R927.2 文献标志码：A 文章编号：1001-1528(2017)06-1183-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.015

Simultaneous determination of eight constituents in Xuebijing Injection by UPLC-MS/MS

SUN Zhi, FU Jun-tao, ZHOU Lin, CHU Yao-juan, QIAO Gao-xing, DU Shu-zhang*

(The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China)

ABSTRACT: AIM To establish an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous content determination of gallic acid, matrine, danshensu, hydroxysafflor yellow A, caffeic acid, paeoniflorin, ferulic acid and cynaroside in Xuebijing Injection (*Carthami Flos, Paeoniae Radix Rubra, Chuanxiong Rhizoma*, etc.). **METHODS** The analysis of 5% acetonitrile extract of this drug was performed on a 40 °C thermostatic ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm), with the mobile phase comprising of acetonitrile-0.1% formic acid flowing at 0.2 mL/min in a gradient elution manner, after which cluster analysis was applied to the determined contents. **RESULTS** Eight constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r > 0.9960$), whose average recoveries were 95% – 104% with the RSDs of less than 3%. Generally the contents of various constituents in ten batches of samples were found to be stable except the certain differences contributed by gallic acid and paeoniflorin. **CONCLUSION** We should pay attention to the quality of different batches of Xuebijing Injection due to their uneven performance.

KEY WORDS: Xuebijing Injection; chemical constituents; UPLC-MS/MS; cluster analysis

血必净注射液是由王今达教授开发的复方中药制剂, 由红花、赤芍、川芎、丹参、当归 5 味药材组成, 具有化瘀解毒的功效, 适用于因感染诱发的全身炎症反应综合征, 也可配合治疗多器

官功能失常综合征的脏器功能受损^[1-2], 同时还具有抗细胞凋亡、改善组织器官血液循环、增加组织氧代谢的作用^[3-4], 近年来被广泛应用于感染性疾病 (如脓毒血症、多器官功能障碍综合

收稿日期：2016-07-29

基金项目：郑州大学第一附属医院院内青年创新基金项目（2015）

作者简介：孙志（1985—），男，博士，研究方向为质谱分析和中药质量控制。Tel: (0371) 66862570, E-mail: sunzhi2013@163.com

*通信作者：杜书章（1969—），男，教授，主任药师，研究方向为临床药理学。Tel: 13598802911, E-mail: dushuzhang911@163.com

征), 呼吸系统疾病(如急性化脓性扁桃体炎、化脓性支气管炎)、泌尿系统疾病(如肾盂肾炎、膀胱炎)、腹腔内感染(如化脓性胆囊炎、胆管炎等), 但在使用过程中出现了多种不良反应, 如胸闷、憋气、心慌、心悸、呼吸困难、呼吸急促、血压降低^[5]、过敏性休克^[6]等。中药注射液化学成分复杂, 故对其多组分同时进行测定, 提高其质量控制标准可有利于保证药物生产的稳定性, 减少临床不良反应发生的概率。

查阅相关文献可知, 木犀草苷、羟基红花黄色素A为红花^[7-8]中的主要活性成分, 没食子酸、芍药苷为赤芍^[9]中的主要活性成分, 阿魏酸为川芎^[10]中的主要活性成分, 咖啡酸、丹参素为丹参^[11]中的主要活性成分, 苦参碱为当归^[12]中的主要活性成分, 以上可能是血必净注射液发挥药理作用的重要物质。虽然已有文献报道采用HPLC法对其中多种成分的含有量进行测定^[13], 但由于其选择的定量成分缺乏针对性, 而且该方法存在分析时间长、灵敏度差、干扰多等缺点, 以致实际操作性和可控性较差。近年来随着分析技术的发展, 超高效液相色谱串联三重四极杆质谱(UHPLC-QqQ-MS/MS)由于其分离速度快、灵敏度高、测定准确性强而被广泛运用于中药及复方制剂的分析^[14], 但未应用于血必净注射液多成分的同时定量测定。因此, 本实验通过UPLC-MS/MS法对血必净注射液中8种成分同时进行测定, 可为其质量控制提供新的技术手段和科学依据。

1 仪器与试药

ACQUITY UPLC色谱仪, 配置Xevo TQD三重四极杆质谱(美国Waters公司); AL104分析天平(万分之一, 瑞士Mettler-Toledo公司); BX7200HP台式超声波清洗器(上海新苗医疗器械制造有限公司)。

没食子酸(批号15042910)、苦参碱(批号15082608)、丹参素(批号15082714)、羟基红花黄色素A(批号15072815)、咖啡酸(批号15090803)、芍药苷(批号15090711)、阿魏酸(批号15091605)、木犀草苷(批号15012204)对照品均购自成都曼思特生物科技有限公司, 含有量均大于98%。甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯(美国Fisher公司); 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。血必净注射液共10批(天津红日药业股份有限公司, 批号分别为1509082、1504111、1506181、1504101、1508191、1504121、1505211、1508171、

1509091、1909132)。

2 方法与结果

2.1 色谱及质谱条件

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC[®] BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈(A)-0.1%甲酸(B), 梯度洗脱(0~1 min, 5% A, 1~5 min, 5%~22% A; 5~7 min, 22%~50% A); 体积流量0.2 mL/min; 柱温40℃; 进样量5 μL。

2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 温度150℃; 毛细管电压3.5 kV; 脱溶剂气和辅助气为氮气; 脱溶剂气体积流量650 L/h, 温度350℃; 锥孔气(氮气)体积流量50 L/h; 碰撞气(氩气)压力 2.85×10^{-4} kPa; MRM监测模式。其他参数见表1, 质谱图见图1。

表1 各成分质谱参数

Tab. 1 MS parameters of various constituents

成分	离子模式	母离子/子离子	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
没食子酸	负离子	169.0/125.0	34	14
苦参碱	正离子	249.3/150.2	40	40
丹参素	负离子	197.3/135.0	28	20
羟基红花黄色素A	负离子	611.0/491.0	64	28
咖啡酸	负离子	178.9/134.9	34	14
芍药苷	负离子	525.1/449.1	28	14
阿魏酸	负离子	195.3/144.5	38	16
木犀草苷	负离子	449.2/287.1	74	30

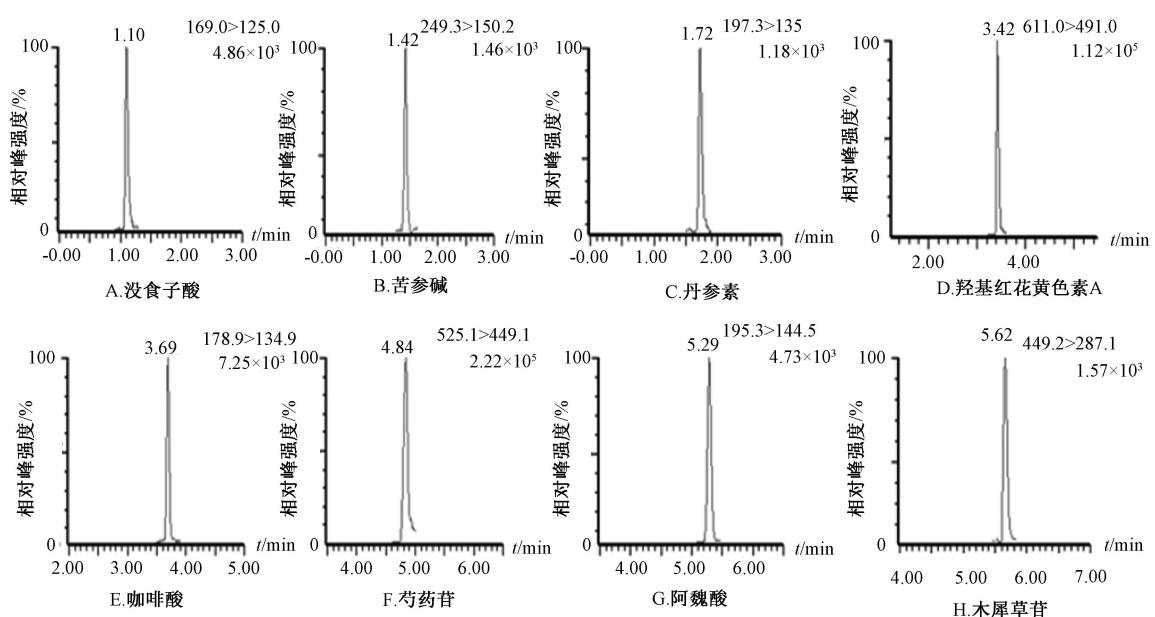
2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取各对照品适量, 加甲醇制成1.0 mg/mL单一对照品贮备液, 精密量取适量, 加5%乙腈制成含2.0 μg/mL没食子酸、0.2 μg/mL苦参碱、2.0 μg/mL丹参素、100.0 μg/mL羟基红花黄色素A、1.0 μg/mL咖啡酸、100.0 μg/mL芍药苷、10.0 μg/mL阿魏酸、0.5 μg/mL木犀草苷的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品1 mL, 置于10 mL量瓶中, 加5%乙腈稀释至刻度, 0.22 μm微孔滤膜过滤, 即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 将对照品溶液用5%乙腈稀释, 配制成系列质量浓度, 在“2.1”项条件下进样5 μL。以质量浓度为横坐标(X), 峰面积积分值为纵坐标(Y)进行回归, 以信噪比S/N=10计算定量限, S/N=3计算检测限, 结果见表2, 可知各成分在各自范围内线性关系良好。



注：各图中色谱峰即为对应的成分

图1 各成分质谱图

Fig. 1 MS spectra of various constituents

表2 各成分线性关系

Tab. 2 Linear relationships of various constituents

成分	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
没食子酸	$A = 434.32X + 7.0868$	0.9974	0.2~2.0	0.0213	0.0064
苦参碱	$A = 1642.70X + 7.7197$	0.9979	0.02~0.20	0.0004	0.0001
丹参素	$A = 109.36X - 6.3556$	0.9991	0.2~2.0	0.0525	0.0157
羟基红花黄色素A	$A = 165.38X + 277.000$	0.9960	10.0~100.0	0.0379	0.0114
咖啡酸	$A = 828.32X + 25.1210$	0.9967	0.1~1.0	0.0062	0.0019
芍药苷	$A = 29.74X + 4.4959$	0.9998	10.0~100.0	0.1032	0.0307
阿魏酸	$A = 169.16X - 52.7970$	0.9961	1.0~10.0	0.0636	0.0191
木犀草苷	$A = 891.76X - 3.1044$	0.9981	0.05~0.50	0.0049	0.0015

2.3.2 精密度试验 将同一对照品溶液同1 d连续进样6次及连续3 d重复进样(每天3次),测得没食子酸、苦参碱、丹参素、羟基红花黄色素A、咖啡酸、芍药苷、阿魏酸、木犀草苷日内精密度RSD分别为4.17%、4.76%、4.75%、1.57%、3.96%、3.85%、2.69%、4.40%,日间精密度RSD分别为3.81%、3.71%、3.44%、2.59%、4.49%、4.97%、1.92%、2.52%,表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 取同一供试品溶液(批号1506181)和对照品溶液,于0、2、6、10、12、24 h进样5 μL 分析,测得没食子酸、苦参碱、丹参素、羟基红花黄色素A、咖啡酸、芍药苷、阿魏酸、木犀草苷供试品各峰面积RSD分别为4.02%、4.51%、4.54%、1.22%、2.64%、2.74%、1.92%、

4.81%,对照品各峰面积RSD分别为4.49%、4.14%、3.01%、4.11%、3.87%、4.41%、2.04%、4.27%,表明供试品及对照品溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 精密量取样品6份(批号1506181),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样分析,测得没食子酸、苦参碱、丹参素、羟基红花黄色素A、咖啡酸、芍药苷、阿魏酸、木犀草苷含有量RSD分别为4.09%、2.98%、4.14%、3.53%、4.61%、2.77%、2.88%、4.50%,表明该方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 取同一样品(批号1506181),按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,平均分成18份,9份直接进样,其余分成3组,精密加入低、中、高3个质量浓度的对照品溶

液, 进样分析, 测得结果没食子酸、苦参碱、丹参素、羟基红花黄色素A、咖啡酸、芍药苷、阿魏酸、木犀草苷低质量浓度的平均加样回收率分别为100.20%、99.35%、101.93%、95.27%、98.64%、102.25%、102.94%、99.88%, RSD 2.31%、1.12%、0.73%、0.14%、1.36%、1.64%、1.16%、2.80%; 中质量浓度的平均加样回收率分别为98.79%、100.65%、100.22%、99.93%、102.38%、98.03%、99.63%、100.77%, RSD 分别为1.70%、3.02%、2.22%、0.78%、1.47%、0.31%、3.10%、3.55%; 高质量浓度的平均加样回收率分别为99.71%、99.24%、97.21%、

103.45%、101.99%、102.86%、99.13%、97.68%, RSD 分别为2.80%、2.64%、0.51%、0.47%、1.28%、1.05%、1.78%、1.40%。

2.4 样品含有量测定与聚类分析 取10批样品, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样5 μL, 记录峰面积, 测定含有量, 结果见表3。再采用Mev软件热图聚类方法进行分析, 结果见图2, 可知各成分颜色在不同批次样品间总体上一致, 含有量大体相似, 但个别成分(没食子酸和芍药苷)颜色略有不同, 表明含有量有一定差异。

表3 各成分含有量测定结果(μg/mL)

Tab. 3 Results of content determination of various constituents (μg/mL)

批号	没食子酸	苦参碱	丹参素	羟基红花黄色素A	咖啡酸	芍药苷	阿魏酸	木犀草苷
1509082	7.00	0.25	4.17	323.87	4.27	950.74	24.47	2.18
1504111	6.21	0.24	4.54	300.57	4.24	758.08	25.71	2.21
1506181	8.20	0.24	5.26	324.46	4.64	676.47	31.47	2.22
1504101	6.37	0.25	4.90	354.68	5.29	771.87	25.79	2.25
1508191	6.67	0.24	4.84	311.62	4.76	701.36	26.13	2.21
1504121	6.02	0.21	4.81	313.27	4.71	660.00	26.57	2.26
1505211	7.67	0.24	5.38	286.52	3.84	904.61	32.02	2.27
1508171	7.41	0.23	4.62	354.93	4.16	902.90	28.11	2.21
1509091	6.97	0.21	4.58	367.72	4.25	945.93	29.81	2.25
1509132	6.21	0.23	4.78	362.61	4.41	973.91	27.97	2.20

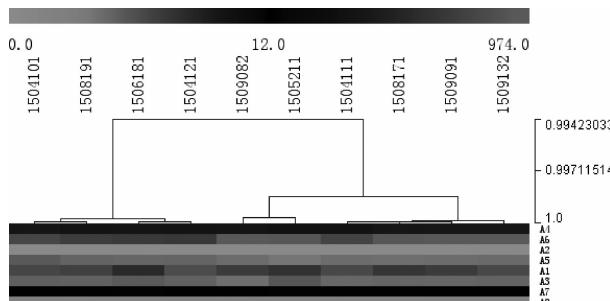


图2 不同批次样品聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis diagram of different batches of samples

3 讨论

3.1 溶液制备方法确定 在溶解对照品时发现, 除了木犀草苷外, 其他对照品在常温甲醇中均有较好的溶解性, 而木犀草苷一直以混悬液形式存在。通过考察加热、超声等助溶手段, 发现其在40 °C甲醇中溶解度较好, 而且溶解后不容易析出, 故先用热甲醇溶解该成分对照品母液, 待其充分溶解后再加入冷甲醇定容。

3.2 流动相优化 通过考察甲醇-水、乙腈-水、

甲醇-甲酸、乙腈-甲酸等流动相体系, 发现在乙腈-0.1%甲酸条件下洗脱时各成分分离效果最佳, 色谱峰峰形较好, 相邻峰之间均能达到基线分离, 故选择其作为流动相。

3.3 含有量测定结果分析 10批血必净注射液中8种成分的含有量总体上稳定, 但个别成分差异仍较大, 提示不同批次该制剂在质量上还是存在一定差异, 这可能是因为其由多味药材组成, 而且制备工艺复杂, 受药材采集季节、产地、入药部位、制剂工艺等因素影响, 导致各批次样品之间的含有量不一致。由于血必净注射剂在临床使用时通过静脉给药直接入血, 相对人体而言属于异物抗原, 其质量不稳定会导致机体直接产生不同的回馈响应, 故保证其质量稳定一致对于药物临床安全和有效应用至关重要。本实验结果表明, 相关厂家在后续研究与生产中应注意采取更先进、科学的方法来提高质控水平, 严格控制批次质量, 保证质量稳定性, 这才能避免由于成分含有量差异所造成的严重不良反应, 同时提高临床疗效, 使血必净注射液治疗更加科学化、安全化。

参考文献:

- [1] 曹书华, 王今达. 血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(8): 489-491.
- [2] 张畔, 曹书华, 崔克亮, 等. 血必净对多脏器功能障碍综合征单核细胞 HLA-DR 表达影响的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(1): 21-23.
- [3] 茅尧生, 吕铁, 孙雪东, 等. 血必净注射液对脓毒性休克患者血流动力学和氧代谢的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(10): 627-628.
- [4] 蔡庆勇, 牛义民, 梁贵友, 等. 血必净注射液对心肌挫伤后家兔心肌细胞凋亡及其相关蛋白表达的影响[J]. 中国中医药现代远程教育, 2006, 4(9): 20-22.
- [5] 孔飞飞, 沈洁, 谭兴起, 等. 血必净注射液致药物不良反应 14 例文献分析[J]. 中国新药杂志, 2012, 1(1): 100-103.
- [6] 李桂莲. 血必净注射液致过敏性休克 1 例[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(30): 3777.
- [7] 韩炜, 杨玉林, 康廷国. HPLC 法测定红花地上部分中木犀草苷和木犀草素的含量[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(6): 1315-1317.
- [8] 杨日丽, 刘静. HPLC 法测定红花中羟基红花黄色素 A 含量的研究[J]. 广东化工, 2007, 34(7): 112-114.
- [9] 胡杰, 李月婷, 侯靖宇. UPLC-MS 同时测定赤芍中五个指标成分的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27: 282-285.
- [10] 吕光华, 程世琼, 陈金泉, 等. HPLC 测定川芎药材和饮片中游离阿魏酸和总阿魏酸的含量及其质量评价指标[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(2): 194-198.
- [11] 赵鸣舒, 赵希贤. 双波长高效液相色谱法测定丹参中多种成分的含量[J]. 中国药事, 2010, 24(8): 804-806.
- [12] 毕映燕, 胡芳弟, 封士兰, 等. 高效液相色谱法同时测定复方当归栓中 5 种活性组分的含量[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2402-2405.
- [13] 冀兰鑫, 黄浩, 姜民, 等. HPLC 测定血必净注射液内 11 种主要成分[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(18): 2395-2398.
- [14] 刘杰, 许文, 李煌, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定白芍饮片中 10 种成分[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(4): 635-643.

HPLC 法同时测定当飞利肝宁胶囊中 7 种成分

龙玉堂, 陈浩, 刘晶

(南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 建立 HPLC 法同时测定当飞利肝宁胶囊(水飞蓟和当药)中獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、当药醇苷、花旗松素、水飞蓟亭、水飞蓟宁、水飞蓟宾的含有量。方法 该药物 75% 甲醇提取液的分析采用 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm); 以甲醇-0.1% 甲酸为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.9 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 254 nm 和 288 nm。结果 7 种成分在各自范围内线性关系良好($r > 0.999$)，平均加样回收率 96.78% ~ 100.45%，RSD 均小于 2.0%。结论 该方法快速准确, 重复性好, 可用于当飞利肝宁胶囊的质量控制。

关键词: 当飞利肝宁胶囊; 化学成分; HPLC

中图分类号: R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2017)06-1187-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2017.06.016

Simultaneous determination of seven constituents in Dangfei Liganning Capsules by HPLC

LONG Yu-tang, CHEN Hao, LIU Jing

(The First Hospital Affiliated to Nanhua University, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT: AIM To establish an HPLC method for the simultaneous content determination of swertiamarin,

收稿日期: 2016-11-15

作者简介: 龙玉堂(1983—), 男, 硕士, 主管药师, 从事药物分析、药物制剂研究。Tel: 15717586119, E-mail: longyutanghengyang@163.com