

HPLC-MS-MS 法测定牛黄降压丸中芍药苷的含量

林景^{1*}, 陈桐楷²

(1. 海南省皮肤病医院, 海口 570206; 2. 广州医药研究总院, 广州 510240)

[摘要] 目的: 建立 HPLC-MS-MS 法测定牛黄降压丸中芍药苷的含量。方法: 采用 HPLC-MS-MS 法对牛黄降压丸中芍药苷进行含量测定, 选用 Agilent 20RBA × SB-C₁₈ 反相柱 (2.1 mm × 30 mm, 3.5 μm) 为色谱柱, 流动相为甲醇-5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵 (75:25), 流速 0.4 mL·min⁻¹, 柱温 25 °C。质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 检测方式为多离子反应监测 (MRM), 负离子模式, 用于定量分析的离子为 *m/z* 525 ~ 449。结果: 芍药苷的线性范围为 20 ~ 2 000 mg·L⁻¹ (*r* = 1.000 0); 样品平均加样回收率为 99.56%, RSD 0.86%。结论: 该方法操作简便, 快速, 准确度高, 能有效控制牛黄降压丸的质量。

[关键词] 牛黄降压丸; 芍药苷; 高效液相串联质谱检测法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0084-03

[doi] 10.11653/syfy2014010084

Determination of Paeoniflorin Content in Niu Huang Jiangya Pills by HPLC-MS-MS

LIN Jing^{1*}, CHEN Tong-kai²

(1. Hainan Provincial Hospital of Skin Disease, Haikou 570206, China;

2. Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute, Guangzhou 510240, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC-MS-MS method for the determination of paeoniflorin content in Niu Huang Jiangya pills. **Method:** Using a Agilent 20RBA × SB-C₁₈ column (2.1 mm × 30 mm, 3.5 μm), the mobile phase was consisted of methanol-water solution (75:25), with 5 mmol ammonium formate solvent mixture that prepared for the LC conditioning. The flow rate was 0.4 mL·min⁻¹, column temperature was 25 °C. Using gas-auxiliary electrospray ionization source. Paeoniflorin (MRM *m/z* 525 ~ 449) were detected by the LC-MS. **Result:** The linear range was 20-2 000 mg·L⁻¹, *r* = 1.000 0. The average recovery of paeoniflorin was 99.56% with RSD of 0.86%. **Conclusion:** This method is simple, efficient and accurate, which can be used for the quality control of paeoniflorin in Niu Huang Jiangya pills.

[Key words] Niu Huang Jiangya pills; paeoniflorin; HPLC-MS-MS

牛黄降压丸由人工牛黄、羚羊角、珍珠、水牛角浓缩粉、白芍、决明子、川芎、黄芩提取物、郁金、冰片、甘松、薄荷、党参、黄芪这 14 味中药组成。主要用于治疗心肝火旺、痰热壅盛所致的头晕目眩、头痛失眠、烦躁不安、高血压症^[1-6]。方中白芍提取物的主要活性成分为芍药苷, 具有明显的降

血糖、降压作用^[7]。为有效控制牛黄降压丸的质量, 保证临床用药安全有效, 必须建立准确测定该制剂中芍药苷含量的方法。目前, 国内对牛黄降压丸中芍药苷的含量测定已有相关的研究报告^[8-9], 但芍药苷的含量测定均存在芍药苷色谱峰与杂质峰分不开, 且检测灵敏度达不到实验要求的问题。

本文采用高效液相色谱-三重串联四极质谱联用法测定牛黄降压丸中芍药苷的含量, 以更好地控制成品的质量, 旨在为该制剂的质量控制提供一种新的检测方法。

[收稿日期] 20130605(013)

[基金项目] 广州地区分析测试基金专题项目(201011)

[通讯作者] * 林景, 主管药师, 从事医院制剂研究, Tel: 0898-66744041, E-mail: 13876300091@163.com

1 材料

1.1 仪器 HPLC Agilent 1200, Agilent 6410 Triple Quad LC-MS, Agilent 色谱化学工作站(软件版本号 B.01.00), 旋涡混合器(原上海医科大学仪器厂), Mettler AS 256-S 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多集团), 80-2 型离心沉淀器(上海手术器械厂), 真空干燥箱(德国 MMM-GROUP)。

1.2 试药 芍药苷对照品(中国药品生物制品检定所,批号 110736-200320,供含量测定用);牛黄降压丸(天津某厂,批号 2010105,2010308,2011029);乙腈(Sigma Aldrich Inc,色谱纯),甲醇(广州化学试剂厂,色谱纯),乙醇(广州化学试剂厂,分析纯);其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 液相条件^[10-12]: Agilent 20RBA × SB 反相色谱柱(2.1 mm × 30 mm, 3.5 μm), 流动相 甲醇-5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵(75:25), 流速 0.4 mL · min⁻¹, 柱温 25 °C。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),毛细管电压 3 500 V,干燥气温度 350 °C,干燥气流量 10 L · min⁻¹,雾化气压力 45 Psi,四级杆停留时间 200 ms,裂解电压 150 V,碰撞能量 28 V,检测方式为负离子多离子反应监测(MRM),用于定量分析的离子对为 m/z 525 → 449,进样量为 5 μL。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取芍药苷对照品适量,用乙醇配制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,即得。

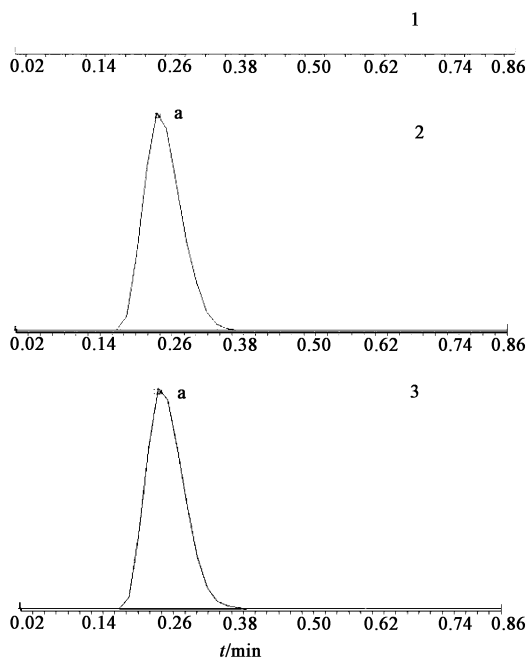
2.2.2 供试品溶液^[13] 取本品大蜜丸,切碎,取约 2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加水 50 mL,超声处理 45 min(功率 220 W,频率 50 kHz),离心(转速为 3 000 r · min⁻¹),精密吸取上清液 10 mL,加至聚酰胺柱(3 g,内径为 15 mm),用水洗脱,收集洗脱液 60 mL,水浴蒸干,加乙醇溶解,转移至 10 mL 量瓶中,并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按处方制备不含白芍的阴性样品,取水蜜丸约 2 g,剪碎,同 2.2.2 项下制成阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 特征质谱图 取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照品溶液,在上述质谱条件下测绘 HPLC-MS-MS 图谱,结果见图 1。由图可知,阴性样品对芍药苷的测定无干扰,样品检测介质效应考察结果不影响测定。

2.3.2 标准曲线的制备 精密量取适量对照品溶液



1. 阳性对照品;2. 对照品;3. 供试品;a. 芍药苷

图 1 牛黄降压丸 HPLC-MS-MS 色谱

置 10 mL 量瓶中,用乙醇稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为 20,50,100,500,1 000,2 000 mg · L⁻¹ 的系列对照品溶液,分别进样 10 μL,按 2.1 项下色谱分离条件分别进样测定,记录色谱图。以质量浓度 C (mg · L⁻¹) 为横坐标,以峰面积 (A) 为纵坐标,绘制标准曲线,得到回归方程 $C = 0.049\ 9\ A + 14.734$ ($r = 1.000\ 0$)。试验表明,芍药苷在 20 ~ 2 000 mg · L⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.3 精密度试验 精密吸取低、中、高浓度(50,500,1 000 mg · L⁻¹) 对照品溶液,重复进样 5 次,测得其 RSD 分别为 1.65%,1.04%,0.81%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0,1,2,6,12,24 h 进样,每次 10 μL,测定峰面积。结果 RSD 为 1.15%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 重复性试验 取同批样品,按 2.2.2 项下平行制备 6 份供试品溶液,分别进样 10 μL,测得其 RSD 为 1.46%。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已知质量浓度(0.099 1 g · L⁻¹) 的样品 9 份,每份 2 mL,分别精密加入对照品(0.1 g · L⁻¹) 适量,按 2.2.2 项下供试品溶液制备方法制备,按上述色谱条件,进样 10 μL 进行测定,计算含量,平均回收率为 99.56%,RSD 为 0.86%,结果见表 1。

表 1 牛黄降压丸中芍药苷加样回收率试验

No.	样品的 含量 /mg	对照品 加入量 /mg	实测含量 /mg	回收率 /%	平均 回收率 /%	RSD /%
1	0.198 2	0.16	0.350 1	97.75		
2	0.198 2	0.16	0.359 3	100.32		
3	0.198 2	0.16	0.356 9	99.64		
4	0.198 2	0.20	0.400 3	100.53		
5	0.198 2	0.20	0.393 7	98.87	99.56	0.86
6	0.198 2	0.20	0.395 2	99.25		
7	0.198 2	0.24	0.439 0	100.19		
8	0.198 2	0.24	0.436 9	99.71		
9	0.198 2	0.24	0.437 5	99.84		

2.4 样品含量的测定 分别取牛黄降压丸 3 批按 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱分离条件进样测定,记录色谱图,计算样品含量,结果 3 批样品中芍药苷的含量分别为 0.954,0.869,0.933 mg·g⁻¹。

3 讨论

中药制剂中芍药苷的含量测定方法,有文献报道采用 HPLC 法、薄层扫描法和毛细管电泳法等。本试验曾试用 HPLC 法测定牛黄降压丸中芍药苷的含量,发现芍药苷色谱峰均存在拖尾和保留时间长等现象,与杂质峰分不开,灵敏度低,耗时,不利于检测,故选用 HPLC-MS-MS 法测定牛黄降压丸中芍药苷的含量。

本试验在正离子和负离子模式下对芍药苷进行全扫描以选择适当的分子离子峰和电离方式,发现芍药苷在电喷雾负离子模式 MS2 Scan 的扫描下形成的 [M + HCOO]⁻ m/z 525 的丰度最高,因此选择 [M + HCOO]⁻ m/z 525 作为碰撞诱导解离的母离子;以 m/z 525 为母离子,在 Product scan 的扫描模式下进行子离子扫描,可形成质荷比 m/z 449, 479, 327 等的子离子峰,其中以子离子 m/z 449 的丰度最高,故选择其为定量离子。这些子离子都是由母离子 [M + HCOO]⁻ 首先失去甲酸分子,得到 [M - H]⁻ m/z 479 碎片离子,而糖上的羟甲基继续发生断裂形成特征碎片离子 [M-H-CH₂O]⁻ m/z 449 和 [M-H-CH₂O-C₆H₅COOH]⁻ m/z 327 的碎片离子峰。在确定芍药苷的母离子和子离子后进行多离子反应监测 (MRM),当参数四级杆停留时间 (Dwell) 为 200 ms,裂解电压 (Fragmentor) 为 150 V,碰撞能

量 (Collision Energy) 为 28 V 时,得到芍药苷的 MRM 色谱峰丰度最高。该法方便快捷,灵敏度高,重复性好,准确可行,为相关药材及制剂中芍药苷的含量测定提供了另一种新方法。

从本试验所测牛黄降压丸产品中芍药苷的含量可知,不同批号之间的含量差异较大。笔者认为,药材的产地及采收季节不同可能导致产品中芒果苷的含量不同。建议厂家加强对原料药材的质量监控,建立有效的检测方法控制工艺的稳定性是当务之急。

[参考文献]

[1] 王存选,张刚,王玥坤. 牛黄降压丸的临床研究概况[J]. 医学综述,2009, 15(15):2342.

[2] 吴学秀,韩玉全. 牛黄降压丸治疗高血压的临床应用[J]. 青岛医药卫生,2005, 37(4):275.

[3] 周端求,周海燕,杨铮铮,等. 牛黄降压丸治疗原发性高血压的临床研究[J]. 中国中药杂志,2005, 31(7):612.

[4] 徐芳,高林善. 牛黄降压丸(胶囊、片)降压疗效及药理研究概述[J]. 中草药,2005, 36(9):1.

[5] 戴伦,王拥军. 牛黄降压丸对伴有焦虑的高血压患者的疗效观察[J]. 中国中药杂志,2006, 31(10):1743.

[6] 刘遂心,孙明,罗由夫,等. 牛黄降压胶囊治疗原发性高血压病的临床研究[J]. 中草药,2004, 24(6):553.

[7] 孙丽荣,曹雄,侯凤青,等. 芍药苷研究进展[J]. 中国中药杂志,2008, 33(18):2028.

[8] 杨书良. HPLC 法测定牛黄降压丸中芍药苷的含量[J]. 中草药,2003, 34(11):1006.

[9] 纪松岗,费扬,赵亮,等. 高效液相色谱法同时测定牛黄降压丸中芍药苷和黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志,2009, 29(4):602.

[10] 纪松岗,费扬,赵亮,等. 高效液相色谱法同时测定牛黄降压丸中芍药苷和黄芩苷的含量[J]. 药物分析杂志,2009, 29(4):602.

[11] 杨书良. HPLC 法测定牛黄降压丸中芍药苷的含量[J]. 中草药,2003, 34(11):1006.

[12] 王明星,于秀华,刘永强. HPLC 法测定利胆止痛胶囊中芍药苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012, 18(22):142.

[13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:560.

[责任编辑 顾雪竹]