

LC-MS 法测定消癌平注射液中两种主要成分的含量

谢丽艳¹, 刘史佳², 徐洁¹, 居文政^{1,2*}, 钦松³, 张仓³, 谈恒山⁴

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210009;

2. 南京中医药大学附属医院临床药理科, 南京 210029;

3. 南京圣和药业有限公司, 南京 210038; 4. 南京军区总医院, 南京 210002)

[摘要] 目的: 建立同时测定消癌平注射液中两种甾体皂苷 17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A 含量的液相色谱-质谱联用法。方法: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱 (3.0 × 100 mm, 3.5 μm), 保护柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (2.1 × 12.5 mm, 5 μm), 流动相甲醇-水 (90:10), 流速 0.25 mL·min⁻¹。甲睾酮为内标, 质谱采用电喷雾离子化 (ESI) 方式, 正离子采集, 以选择离子反应监测 (SIR) 模式对两种甾体皂苷进行含量测定。结果: 17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A 的线性范围分别为 0.625 ~ 20 mg·L⁻¹ ($r=0.9983$), 0.375 ~ 12 mg·L⁻¹ ($r=0.9994$), 加样回收率分别为 100.8% (RSD 3.95%) 101.6%, (RSD 2.71%)。结论: 该方法简便, 准确, 重复性好, 可为消癌平注射液提供质量控制依据。

[关键词] 消癌平注射液; 17β -tenacigenin B; tenacigenoside A; 含量测定

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)23-0090-04

[收稿日期] 20120617(011)

[基金项目] 中药新药临床评价研究技术平台(南京)建设(2012ZX09303009-002); 江苏省中医药领军人才(LJ200906); 江苏高校优势学科建设工程项目 2010

[第一作者] 谢丽艳, 硕士研究生, 中药学专业, E-mail: xieliyan_2008@163.com

[通讯作者] * 居文政, 主任药师, 博士生导师, 从事中药临床药代动力学研究, Tel: 025-86617141-80518, E-mail: wzhju333@163.com

[参考文献]

[1] 王奇, 卢柏震. 齐墩果酸的研究进展[J]. 中国药房, 2008, 19(9): 711.

[2] 胡华杰. 齐墩果酸药理作用与临床应用研究进展[J]. 海峡药学, 2012, 24(3): 92.

[3] 王德仁. 齐墩果酸研究新进展[J]. 天津药学, 2003, 15(3): 57.

[4] 王燕. 新型脂质体作为中药靶向载体在肿瘤治疗中的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 212.

[5] 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: 附录 204.

[6] 张晓丽, 吴品昌, 刘宇, 等. 乙醇注入法制备莪术醇脂质体[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(4): 10.

[7] 白兰, 赵明琴, 尹蓉莉, 等. 龙胆苦苷脂质体含量测定及包封率考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18

(7): 48.

[8] 戎丽娜, 张敏, 徐云龙, 等. 顺磁脂质体包封率测定方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1435.

[9] 王素芳, 刘利萍, 边可君, 等. 微柱凝胶离心-HPLC 测定酮康唑脂质体包封率[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(6): 527.

[10] 雷国峰, 陈琳, 邓英杰, 等. 超滤法-HPLC 法测定灯盏花素脂质体包封率[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(4): 237.

[11] 刘卫斌, 薛彦宁, 秦永刚, 等. 鱼精蛋白凝聚法测定和厚朴酚脂质体的包封率[J]. 中国药房, 2010, 21(39): 3695.

[12] 吴瑾瑾, 朱雨晴, 葛卫红, 等. 猕猴桃多糖脂质体包封率测定方法研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 20.

[责任编辑 顾雪竹]

Simultaneous Determination of Two Major Compound in Xiao Aiping Injection by LC-MS

XIE Li-yan¹, LIU Shi-jia², XU Jie¹, JU Wen-zheng^{1,2*},
QIN Song³, ZHANG Cang³, TAN Heng-shan⁴

- (1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
2. Department of Clinical Pharmacology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
3. Nanjing Sanhome Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210038, China;
4. General Hospital of Armed Forces of Nanjing, Nanjing 210002, China)

[Abstract] **Objective:** A rapid and specific high performance liquid chromatography-mass spectrometric method was developed for determination of 17β -tenacigenin B and tenacigenoside A in Xiaoaiping injection. **Method:** The analytical column was Agilent Zorbax SB-C₁₈ (3.0 mm × 100 mm, 3.5 μm) and the security guard column was Agilent Zorbax SB-C₁₈ (2.1 mm × 12.5 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol-water (90:10) at a flow rate of 0.25 mL · min⁻¹. Methyltestosterone was used as internal standard; electrospray ionization model (ESI) and SIM model were used for quantification. **Result:** The linear ranges of two compounds were as follows: 0.625-20 mg · L⁻¹ ($r=0.9983$) for 17β -tenacigenin B, 0.375-12 mg · L⁻¹ ($r=0.9994$) for tenacigenoside A. The average recoveries were 100.8% (RSD 3.95%), 101.6% (RSD 2.71%), respectively. **Conclusion:** This established method was sensitive, fast, accurate and available for the quality control of Xiaoaiping Injection.

[Key words] Xiaoaiping injection; 17β -tenacigenin B; tenacigenoside A; simultaneous determination

消癌平注射液由萝藦科植物通关藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎经水提醇沉制得的制剂,具有清热解毒,化痰软坚的功效^[1]。消癌平注射液中主要含有甾体皂苷类、酚酸类、生物碱、多糖等化合物,其中甾体皂苷为主要抗癌活性成分^[2-3],也是目前研究通关藤及其制剂的热点。甾体皂苷 17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A 是从该中药中提取而得的有效成分^[4-5]。该注射液在临床上主要用于治疗食管癌、胃癌、肺癌、肝癌等多种恶性肿瘤^[6-7],并可配合放疗、化疗的辅助治疗。

有关文献^[8-11]中报道用 HPLC 测定消癌平注射液中绿原酸、咖啡酸等成分的含量,采用 HPLC-ELSD 方法^[12]同时测定通关藤药材中 7 种甾体皂苷类成分的含量,但注射液中甾体含量测定未见报道。 17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A 两种成分均无紫外吸收,相对于 HPLC-ELSD 来说 LC-MS 具有更高的灵敏度及专属性,因此,本实验建立 LC-MS 方法测定消癌平注射液中两种成分的含量为制剂控制方面提供可靠准确的检测手段。

1 仪器与试剂

Waters Quattro Micro 液质联用仪(美国 Waters 公司),色谱工作站:Masslynx 4.1,Labconco 梅特勒-托利多 AE240 型电子天平(上海梅特勒-托利多有限公司),Biofuge PrimoR 型冷冻高速离心机(德国 Heraeus 公司),Millipore Driect-Q5 型超纯水机(法国 Millipore 公司),WH-2 型微型漩涡混合仪(上海沪西分析仪器厂)。

17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A 对照品(南京圣和药业有限公司,纯度 98%),甲睾酮(中国药品生物制品检定所,纯度 98%),消癌平注射液(南京圣和药业有限公司,20 mL/支,批号 201112061,201011101,201011161,201012091);甲醇为色谱纯,超纯水由 Millipore 超纯水系统制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 3.5 μm),保护柱 Agilent Zorbax SB-C₁₈(2.1 mm × 12.5 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(90:10),流速 0.25 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,进样量为 5 μL。

2.2 质谱条件 离子化方式为电喷雾 (ESI); 选择监测 (SIM); 监测离子为正离子, 17β -tenacigenin B 为 $[M + Na]^+$, m/z 387.5, tenacigenoside A 为 $[M + Na]^+$, m/z 691.8, 甲睾酮为 $[M + Na]^+$, m/z 325.5。毛细管电压 3 kV, 锥孔电压 40 V, 离子源温度 120 °C, 脱溶剂温度 350 °C, 脱溶剂气体流速 5×10^2 L·h⁻¹。

2.3 供试品溶液的配制 精密移取 1 mL 消癌平注射液于 100 mL 量瓶中, 50% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 上清液即为供试品溶液。

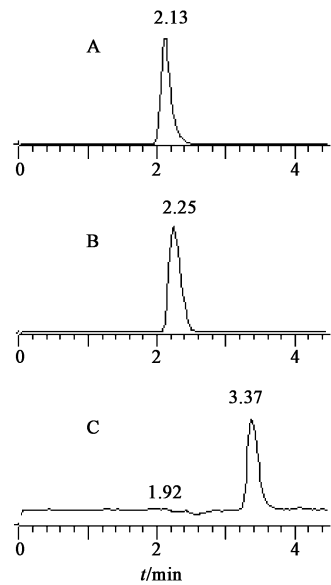
2.4 对照品储备液的配制 精密称取 17β -tenacigenin B, tenacigenoside A 和甲睾酮对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀即得 17β -tenacigenin B ($2.07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 tenacigenoside A ($2.014 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的对照品储备液, 另配制甲睾酮 ($1.037 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 对照品储备液。

2.5 线性关系考察 精密吸取 2.4 项下的混合对照品溶液适量, 倍比稀释成 6 个不同浓度的混合对照品溶液摇匀, 17β -tenacigenin B 配成 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 mg·L⁻¹, tenacigenoside A 配成 0.375, 0.75, 1.5, 3, 6, 12 mg·L⁻¹ 系列浓度, 每次进样中内标甲睾酮的浓度为相同的浓度 1 μg, 取 5 μL 注入液相色谱-质谱仪进行测定, 其中 17β -tenacigenin B, tenacigenoside A 和甲睾酮的保留时间分别为 2.13, 2.25, 3.37 min (图 1), 分别以 17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A 与甲睾酮的峰面积比值 A 为纵坐标, 质量浓度 C 为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程及线性范围, 结果为 $A_{17\beta\text{-tenacigenin B}} = 0.114C - 1.31$ ($r = 0.9983$), $A_{\text{tenacigenoside A}} = 0.0398C - 0.642$ ($r = 0.9994$), 线性关系分别为 0.625 ~ 20 mg·L⁻¹ 和 0.375 ~ 12 mg·L⁻¹。

2.6 精密度试验 分别取 17β -tenacigenin B, tenacigenoside A 和内标甲睾酮混合对照品溶液 5 μL, 按 2.1 和 2.2 实验条件进行测定, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A RSD 分别为 0.56%, 0.91%, 表明精密度良好。

2.7 重复性试验 取同一批 (批号 201012091) 样品, 按 2.3 项下方法制备 6 份供试品溶液, 2.1 和 2.2 实验条件进行测定, 记录质谱峰面积。结果 17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A 的平均含量分别为 8.41, 2.69 mg·L⁻¹, RSD 分别为 1.71%, 0.73%。

2.8 稳定性试验 取上述供试品溶液, 自配制后



$T_{17\beta\text{-tenacigenin B}} = 2.13 \text{ min}; T_{\text{tenacigenoside A}} = 2.25 \text{ min}; T_{\text{甲睾酮}} = 3.37 \text{ min}$

图 1 17β -tenacigenin B, tenacigenoside A 和内标甲睾酮的离子流图

0, 2, 6, 12, 24, 48 h 按 2.3 项下进行分析测定。结果 17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A 峰面积积分值的 RSD 分别为 0.93%, 0.74%, 说明样品在 48 h 内稳定。

2.9 加样回收率试验 取已知含量的消癌平注射液 0.5 mL, 分别加入适量的 17β -tenacigenin B, tenacigenoside A 和内标甲睾酮对照品储备液, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 平行操作 6 份, LC-MS 检测各成分的含量, 计算回收率, 结果见表 1。

2.10 样品测定 4 个批次消癌平注射液, 按 2.3 项下方法制备供试品, 2.1 和 2.2 实验条件进行测定, 按内标法带入回归方程, 计算 17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A 的含量, 结果见表 2。

3 讨论

实验中测得两种甾体皂苷的含量相近, 表面消癌平注射液制备工艺稳定, 同时此测定方法简便, 准确, 重复性好, 可作为消癌平注射液质量控制的指标。

所测定的两个成分均为甾体皂苷类, 因此选择甲睾酮作为内标, 它们具有相似的化学结构, 便于分析。 17β -tenacigenin B 和 tenacigenoside A 无紫外吸收, 所以 HPLC-UV 不能用于测定其含量。 LC-MS 相对于 HPLC-ELSD 来说具有特别的优越性, 检测灵敏度高, 专属性强, 为消癌平注射液提供稳定可靠而又方便易行的检测手段。

表 1 加样回收率试验结果($n=6$)

成分	样品	样品量 /mg·L ⁻¹	加入量 /mg·L ⁻¹	测得量 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	\bar{x} /%	RSD/%
17 β -tenacigenin B	1	4.20	2.52	6.84	104.6	100.8	3.95
	2	4.20	2.52	6.75	101.2		
	3	4.20	4.20	8.15	94.0		
	4	4.20	4.20	8.41	100.2		
	5	4.20	5.88	10.06	99.7		
	6	4.20	5.88	10.37	104.9		
tenacigenoside A	1	1.30	0.78	2.09	101.3	101.6	2.71
	2	1.30	0.78	2.10	102.6		
	3	1.30	1.3	2.59	99.2		
	4	1.30	1.3	2.57	97.7		
	5	1.30	1.82	3.19	103.8		
	6	1.30	1.82	3.21	104.9		

表 2 4 个批次消癌平注射液中两种甾体类化合物含量

批次	mg·L ⁻¹	
	17 β -tenacigenin B	tenacigenoside A
201011101	870.59	259.64
201011161	893.52	268.64
201012091	842.13	274.61
201112061	840.94	268.29
RSD/%	2.92	2.30

目前,消癌平注射液缺乏较好的质量控制方法,其中多数以绿原酸为评价指标,但消癌平注射液主要活性成分为 C₂₁ 甾体苷,因此本实验对消癌平注射用中两个甾体皂苷进行含量测定,对于该注射液进一步研究提供理论基础。

[参考文献]

- [1] 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,2010:315.
- [2] 成冠蓝,孔令义,张仓. 通关藤化学成分和药理作用研究进展[J]. 药学与临床研究,2009,17(2):135.
- [3] Hu Y J, Shen X L, Lu H L, et al. Tenacigenin B derivatives reverse p-glycoprotein-mediated multidrug resistance in HepG2/Dox cells[J]. J N at Prod,2008,71(6):1049.
- [4] Wang Xiao-Ling, Li Qi-Fa, Yu Kai-Bei, et al. Four new pregnane glycosides from the stems of *Marsdenia*

- tenacissima* [J]. Helvetica Chimica Acta, 2006, 89 (11):2738.
- [5] Lei Y S, Li Z L, Yang S S. C₂₁ steroids from the stems of *Marsdenia tenacissima*[J]. Yao Xue Xue Bao,2008,43(5):509.
- [6] 钱军. 通关藤注射液联合铂类药物治疗原发性肝癌的研究[D]. 南京:南京中医药大学,2010.
- [7] Han S Y, Zhao M B, Zhuang G B, et al. *Marsdenia tenacissima* extract restored gefitinib sensitivity in resistant non-small cell lung cancer cells [J]. Lung Cancer, 2011, 16: 3870.
- [8] 王青. HPLC 法测定消癌平注射液中绿原酸的含量[J]. 中医药导报,2006,12(3):60.
- [9] 施能胜,石涛. 基于 HPLC 指纹图谱的消癌平注射液的稳定性[J]. 江苏医药,2010,36(15):1814.
- [10] 刘峰群,曹红,靳守东,等. 通关藤注射液酚酸类成分指纹图谱的 HPLC 测定 [J]. 中成药, 2003, 25 (3): 175.
- [11] 张阿琴,张仓,梁敬钰. HPLC 法测定消癌平注射液中 5 种酚酸的含量 [J]. 药学与临床研究,2011,19 (6):498.
- [12] Deng Jun, Shen Fan, Chen Dao feng. Quantitation of seven polyoxypregnane glycosides in *Marsdenia tenacissima* using reversed-phase high-performance liquid chromatography-evaporative light-scattering detection[J]. J Chromatogr A,2006,1116(1/2):83.

[责任编辑 顾雪竹]