

· 研究报告 ·

LC-MS/MS 法测定红景天胶囊中红景天苷含量的方法

方慧君, 段 焯, 张春丽, 黄隆基, 王 荣 (中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院药剂科, 甘肃 兰州 730050)

[摘要] 目的 建立 LC-MS/MS 测定红景天胶囊中红景天苷的方法。方法 通过电喷雾离子源(ESI), 采用多反应检测方式进行负离子检测, 以茶碱为内标, 用于定量分析的红景天苷、茶碱的检测离子分别为 m/z 299.0→119.0 和 m/z 178.8→164.0。采用 Shim-pack XR-ODS 柱 (3.0 mm×75 mm, 2.0 μm) 分离, 以乙腈: 5 mmol/L 乙酸铵溶液 (90:10, V/V) 为流动相, 流速为 0.40 ml/min, 柱温为 25 °C。结果 在 3 min 内完成红景天苷含量分析, 线性范围为 10~2 000 ng/ml, 最低检测限为 10 ng/ml。结论 该方法重复性好、灵敏度高、分析速度快、操作简单, 可作为红景天胶囊中红景天苷含量的测定方法, 适用于药物质量检验, 方便安全用药。

[关键词] 红景天苷; 红景天胶囊; 液相色谱串联质谱法

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2021)02-0157-03

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202007059

LC-MS/MS method for determination of salidroside in the capsule

FANG Huijun, DUAN Ye, ZHANG Chunli, HUANG Longji, WANG Rong (Department of Pharmacy, No. 940 Hospital of Joint Logistics Support Force of the PLA, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective** To establish a LC-MS/MS method for the determination of salidroside in the capsule. **Methods** An electrospray ionization and multiple reaction detection were used to detect negative ion. Theophylline was used as standard. The detection ions of salidroside and theophylline used for quantitative analysis were m/z 299.0→119.0, and m/z 178.8→164.0, respectively. The Shim-pack XR-ODS (3.0 mm×75 mm, 2.0 μm) column was used for separation. The mobile phase was acetonitrile: 5 mmol/L ammonium acetate solution (90:10, V/V). The flow rate was 0.40 ml/min. The column temperature was 25 °C. **Results** The content of salidroside was analyzed within 3 minutes. The linear range was 10~2 000 ng/ml, and the minimum detection limit was 10 ng/ml. **Conclusion** The method has good repeatability, high sensitivity, fast analysis speed and simple operation. It can be used as a method for the determination of salidroside in the capsule. It is suitable for the quality inspection of drugs and convenient for safe use.

[Key words] salidroside; salidroside capsule; LC-MS/MS

在高原地区, 红景天作为一种常见的抗高原缺氧药, 对其研究和开发具有重要意义。国内外对 20 多种红景天进行了化学成分的研究, 证明红景天苷是有特殊生理、药理功能的有效单体^[1], 而红景天苷和苷元酪醇是迄今为止, 研究最多的有效成分, 且由于红景天中红景天苷的含量较高, 常被用来评价红景天属植物药用价值的指标成分^[2-6]。红景天临床应用广泛, 对冠心病、高血压、心肌损伤、急性脑梗死等心脑血管系统疾病都有着良好的治疗作用。临床研究和现代药理学研究表明, 大株红

景天的主要化学成分为络醇、苷类等化合物, 可通过扩张血管, 增加血流量, 使得心脏后负荷降低, 心绞痛得以治疗; 可使得抗缺氧耐受能力增强, 耗氧量降低。红景天能够改善心肌细胞中的缺氧诱导因子-1(信使核糖核酸)的表达, 从而改善因高原空气稀薄而引起的缺氧症状^[7-9]。

目前测定红景天苷常用高效液相色谱法^[10-13], 但灵敏度较低, 分析时间较长, 为克服这一缺点, 笔者采用 LC-MS/MS 的分析方法来检测红景天胶囊中红景天苷的含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

API3200 三重四极杆串联质谱仪(美国应用生物系统公司); LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); AE240 电子天平(梅特勒-托利多公司); 高

[基金项目] 国家自然科学基金(81673508), 军队后勤科研面上项目(CLB19J049)

[作者简介] 方慧君, 本科, 药师, 研究方向: 高原药物研究, Email: 53188803@qq.com

[通信作者] 王 荣, 教授, 主任药师, 博士生导师, 研究方向: 高原药物研究, Email: wangrong-69@163.com

速离心机(上海安亭科学仪器厂);涡旋混匀器(金坛市金城教学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

红景天苷对照品(美国 SIGMA-ALDRICH 公司);茶碱标准品(美国 SIGMA-ALDRICH 公司);红景天胶囊(西藏军区红景天研制中心,批号:190402、190908、180407)。

乙腈(分析纯,天津光复化工品研究所);灭菌注射用水(四川科伦药业股份有限公司);甲醇(色谱纯,德国 MERCK 公司);乙酸铵(色谱纯,天津市北联精细化学品开发有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱为 Shim-pack XR-ODS 柱(3.0 mm×75 mm, 2.0 μm);流动相为乙腈-5 mmol/L 乙酸铵溶液(90:10, V/V);流速:0.40 ml/min;柱温:25℃;样品采集量:10 μl;分析时间为 3 min。

2.1.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),负离子模式,离子源参数:雾化温度(TEM):250℃;喷雾电压(IS):-3700 V。多反应监测模式(MRM)参数:红景天苷和茶碱定量离子对分别为 m/z 299.0→119.0, m/z 178.8→164.0,碰撞诱导解离电压(DP)均为-55 eV;碰撞能量(CE)均为-14 eV。质谱图见图 1。

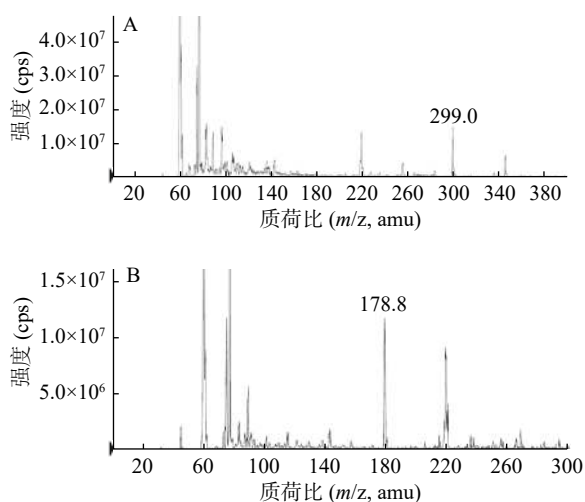


图 1 红景天苷与内标质谱图
A.红景天苷;B.内标茶碱

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

精密称取红景天苷对照品 0.1 mg,置于 5 ml 容量瓶中,加入 5 ml 灭菌注射用水至刻度,摇匀,

得浓度 20 μg/ml 红景天苷对照品储备液,4℃ 冰箱储存备用。

2.2.2 内标溶液

精密称取茶碱对照品 0.1 mg,置于 5 ml 容量瓶中,加入 5 ml 甲醇,摇匀,配成 20 μg/ml 茶碱对照品储备液,4℃ 冰箱中储存备用。

2.2.3 样品溶液

取 10 粒红景天胶囊,称重,称其重量为 4.8076 g。将其去除胶囊壳后,再次称重为 3.6022 g。取胶囊内容物 20 mg,置于 5 ml 的棕色瓶中,加入灭菌用水,摇匀,配制成样品溶液,将此浓度的样品作为母液,过滤,放置在 4℃ 冰箱中保存用于样品浓度的测定。

2.2.4 供试品溶液

分别精确吸取各浓度红景天苷的对照品溶液或样品溶液,置于 5 ml 容量瓶中,加入茶碱对照品溶液,加甲醇稀释至刻度,混匀后,取 100 μl 置于 0.5 ml 离心管中,13 000×g 高速离心 10 min,离心后各吸取 50 μl 进行分析,进样量为 10 μl。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下制备的红景天对照品溶液,按“2.2.4”项下供试品溶液制备方法,配制成 10、50、100、250、500、1000、2000 ng/ml 等 6 种不同浓度的对照品溶液,茶碱对照品浓度为 50 ng/ml。依次进样,记录峰面积。以峰面积求得回归方程: $Y=0.00317X-0.0291$ ($r=0.9991$)。结果表明,样品中红景天苷在 10~2 000 ng/ml 范围内线性关系良好。以 $S/N>10$ 确定,定量下限(LOQ)10 ng/ml。对照品及供试品的色谱图如图 2。

2.3.2 精密度试验

精密量取对照品溶液,按“2.1”项下色谱质谱条件连续进样 6 次,测定峰面积。红景天苷峰面积 RSD 为 1.9%。仪器精密度良好,符合要求。

2.3.3 重复性试验

精密称取同一批号样品 6 份,按“2.2.4”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱质谱条件,分别进样,测定红景天苷的峰面积, RSD 为 2.7% ($n=6$),结果表明本方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验

按“2.1”项下色谱质谱条件,分别精密量取在室温(10~30℃)下放置 0、2.5、5、7.5、10、24 h 的同一份供试品溶液进样测定,记录红景天苷的峰面积,6 次进样结果表明,供试品溶液在 24 h 内基本稳定, RSD 为 2.8%。

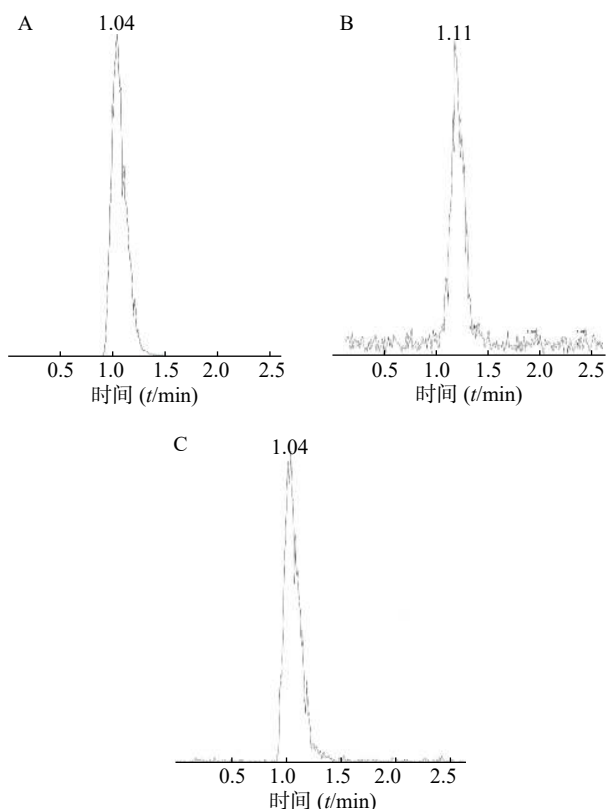


图2 红景天苷 HPLC 图

A.红景天苷对照品; B.茶碱对照品; C.样品

2.3.5 加样回收率试验

取同一批次(批号: 190402)已知含量的红景天胶囊样品 9 份, 分别按相当于样品溶液中红景天苷含量的 80%($n=3$)、100%($n=3$)、120%($n=3$)加入“2.2.4”项下制备的供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。计算回收率, 结果回收率在 98.7%~103.2% 之间, RSD 为 2.96%~4.21%, 符合要求。

2.3.6 样品含量测定

根据建立的红景天苷含量测定方法, 3 批次红景天胶囊(规格: 0.3 g/粒)进行含量测定, 结果见表 1。

表 1 红景天胶囊中红景天苷含量 ($n=3$)

批号	红景天苷浓度(mg/粒)	RSD(%)
190402	15.13	1.26
190908	15.29	2.47
180607	13.48	1.77

3 讨论

3.1 流动相中乙酸铵浓度选择

本实验考察了流动相中不同摩尔浓度的乙酸铵对红景天苷检测的影响。当乙酸铵的浓度由

2 mmol/L 增大到 5 mmol/L 时, 红景天苷色谱峰变尖锐, 且灵敏度升高。综合考虑到色谱峰的峰形、响应值和分析时间, 发现当乙腈: 5 mmol/L 乙酸铵=90: 10(V/V)时色谱图较好。

3.2 定量方法选择

本实验采用内标法, 有效地消除了由于操作以及仪器本身的系统误差, 提高了测量结果的精确度, 特别是在药物含量较低的样品分析中, 优势明显。

综上所述, 所建立测定红景天胶囊中红景天苷含量的测定方法, 灵敏度高、分析速度快、操作简单, 为控制红景天胶囊的质量控制标准提供了方法和依据。

【参考文献】

- [1] 何黎黎, 顾健, 林芸竹. 红景天抗氧化作用对阿尔茨海默病干预机制研究进展[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(2): 440-443.
- [2] 吴少雄, 柳陈坚, 郭亚东, 等. HPLC法测定复方红景天胶囊中红景天苷的含量[J]. 云南中医中药杂志, 2008, 29(6): 52-53.
- [3] 林建阳, 续晋洁, 林秋婕, 等. LC-MS/MS法测定红景天苷在大鼠的血药浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 29(11): 862-864.
- [4] 吴浩, 狄留庆, 单进军, 等. 大鼠血浆中红景天苷UHPLC-MS/MS检测方法的建立及其在药动学研究中的应用[J]. 中成药, 2014, 36(6): 1176-1181.
- [5] 陈帅, 夏媛媛, 魏广力, 等. 柱前衍生化结合UHPLC-MS/MS法同时测定Beagle犬血浆中的红景天苷和酪醇[J]. 药学报, 2017, 52(2): 296-301.
- [6] 吴趋凡, 李耿, 符崖. LC-MS/MS同时测定大鼠血浆中红景天苷和酪醇及其药物动力学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(2): 169-172.
- [7] 崔雅妹, 穆超超, 李书宁, 等. 红景天临床应用概况[J]. 实用中医内科杂志, 2019, 33(4): 74-77.
- [8] 郑巍, 曹旭芳, 张开霞, 等. 红景天苷衍生物的合成及其抗疲劳活性研究[J]. 药实践杂志, 2018, 36(1): 61-63, 67.
- [9] 钟玲, 王若谷, 王洪英, 等. 大株红景天对急性缺血性脑卒中伴心肌损伤患者神经功能及IMA、CK-MB、Hcy、BNP的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(21): 2363-2365, 2372.
- [10] 蔡伟江, 陈彩云. 高效液相色谱法测定益康胶囊中的红景天苷[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(8): 3055-3059.
- [11] 张玲. HPLC测定景参胶囊中红景天苷的含量[J]. 广东药学, 2004, 14(6): 17-19.
- [12] 秦榕, 薄海波, 韩舜愈. 超高效液相色谱法同时测定红景天保健品中红景天苷和甾元酪醇含量[J]. 理化检验-化学分册, 2009, 45(6): 674-675, 678.
- [13] 续晋洁. 大鼠体内红景天苷药代动力学研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2014.

【收稿日期】 2020-07-23 【修回日期】 2021-03-13

【本文编辑】 陈盛新