

液相色谱-质谱联用技术鉴定甘草酸二铵肠溶片中有关物质

姜新¹, 余霞霞², 赵慧², 田媛², 张尊建^{2*}

1. 江苏省疾病预防控制中心 理化所, 江苏 南京 210009

2. 中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 建立超高效液相-二极管阵列-离子阱-飞行时间串联质谱(UPLC-DAD-IT-TOF-MS)法分离鉴定甘草酸二铵肠溶片中相关杂质的分析方法。方法 采用 Agilent HC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-水-冰醋酸(380:614:6)为流动相等度洗脱样品, 体积流量 1 mL/min, 紫外检测波长 254 nm, 质谱监测质荷比范围 m/z 100~1 000。结果 分离鉴定出甘草酸皂苷 G2、H2、E2、B2、J2、C2 及 18α-甘草酸、乌拉尔甘草皂苷(A或B) 8种有关物质。结论 研究结果为甘草酸二铵肠溶片的质量控制和工艺优化提供了依据, 同时为中药制剂的杂质鉴定提供可借鉴的分析思路。

关键词: 甘草酸二铵; 超高效液相-二极管阵列-离子阱-飞行时间串联质谱; 杂质鉴定; 甘草皂苷; 甘草酸皂苷; 18α-甘草酸; 乌拉尔甘草皂苷

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)03-0365-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.03.011

Determination of related substances in Diammonium Glycyrrhizinate Enteric Coated Tablet by LC-MS

JIANG Xin¹, YU Xia-xia², ZHAO Hui², TIAN Yuan², ZHANG Zun-jian²

1. Institute of Physical & Chemical Analysis, Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009, China

2. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To establish the methods for identifying the related substances in Diammonium Glycyrrhizinate Enteric Coated Tablet (DGECT) by ultra high performance liquid-diode array-ion trap-the time of flight tandem mass spectrometry (UPLC-DAD-IT-TOF-MS). **Methods** The chromatographic separation was performed on an Agilent HC-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column, mobile phase was acetonitril-H₂O-Hac (380 : 614 : 6), eluting sample was in equal degree flow, with volume flow rate of 1 mL/min, UV detection wavelength of 254 nm, and mass spectrum monitoring mass-to-charge ratio range m/z 100—1 000. **Results** Including licoricesaponine G2, H2, E2, B2, J2, C2, 18α-glycyrrhizic acid, and glycyrrhiza uralensis saponin (A or B), the eight kinds of related compounds existed were found. **Conclusion** The related substances found in DGECT are valuable for the manufacturing process and quality control.

Key words: diammonium glycyrrhizinate; ultra high performance liquid-diode array-ion trap-the time of flight tandem mass spectrometry; impurities identification; glycyrrhizin; licoricesaponine; 18α-glycyrrhizic acid; glycyrrhiza uralensis saponin

甘草酸二铵是甘草有效成分的第3代提取物,具有一定的抗炎、保护肝细胞膜及改善肝功能的作用,此外,还作为甜味剂和表面活性剂广泛应用于食品和日用化学工业,其中 18β-甘草酸(18α-glycyrrhizic acid)是该品的主要成分^[1-2]。目前甘草酸二铵制剂中有关杂质的研究仅停留在有关物质总量检测或几个杂质鉴定阶段^[3-9],未见其有关物质结构种类的系统鉴定研究报道。本实验利用超高效液

相-二极管阵列-离子阱-飞行时间串联质谱(ultra high performance liquid-diode array-ion trap-the time of flight tandem mass spectrometry, UPLC-DAD-IT-TOF-MS)对甘草二铵肠溶片(Diammonium Glycyrrhizinate Enteric Coated Tablet, DGECT)中有关物质进行了分离及鉴定,明确了8种杂质的种类及其相对含量。研究结果为甘草酸二铵产品的质量控制和质量标准完善提供了方向和依据。

收稿日期: 2014-10-30

作者简介: 姜新(1975—),男,硕士,从事食品、保健品、药品质量控制研究工作。E-mail: 345398653@qq.com

*通信作者 张尊建,男,博士,教授,博士生导师。E-mail: zjzhang99@sina.com

1 仪器与材料

UPLC-DAD-IT-TOF-MS, 日本 Shimadzu 公司, 配有电喷雾电离源 (ESI) 和 LC-MS Solution Version 3.60.361 色谱工作站。

甘草酸二铵肠溶片, 规格 50 mg/片, 批号 20130701、20130702、20130703, 福建省力菲克药业有限公司生产; 标准对照品为甘草酸单铵盐 (单铵盐在溶液中即解离为 18 β -甘草酸): 欧洲药典标准品; 产品代码 G046000; 产品系列号 003x89, 乙腈为色谱纯, 默克公司; 冰醋酸为分析纯, 南京化学试剂厂; 纯水为 Milli-Q 新鲜制备。

2 方法

2.1 分析方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent HC-C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水-冰醋酸 (380:614:6); 体积流量 1 mL/min, 柱后分流比为 1:3; DAD 检测波长 254 nm; 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样量 10 μ L。

2.1.2 质谱条件 氮气体积流量 1.5 L/min, 干燥气: 100.0 kPa, 离子累计时间: 10 ms; 离子管路模块温度: 200 $^{\circ}$ C, 检测器电压 1.6 kV, 正/负离子切换监测, 正离子模式电喷雾电压+4.5 kV, 负离子模式电喷雾电压-3.5 kV。

2.2 样品处理方法

取各批次甘草酸二铵肠溶片各 1 片, 研细, 取

相当于 1 片的量, 全部转移至 10 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声 30 min 溶解, 加流动相稀释至刻度, 取 1 mL 该溶液至 1.5 mL 的塑料离心管中, 14 000 r/min 离心 8 min, 上清液 0.22 μ m 滤膜滤过, 取 500 μ L 滤液加入 200 μ L 双蒸水, 摇匀, 取 10 μ L 进样分析。

3 结果

在确定的实验条件下, 甘草酸二铵肠溶片供试品溶液的 UPLC-DAD 色谱图和 IT-TOF 质谱见图 1, 鉴定结果见表 1。

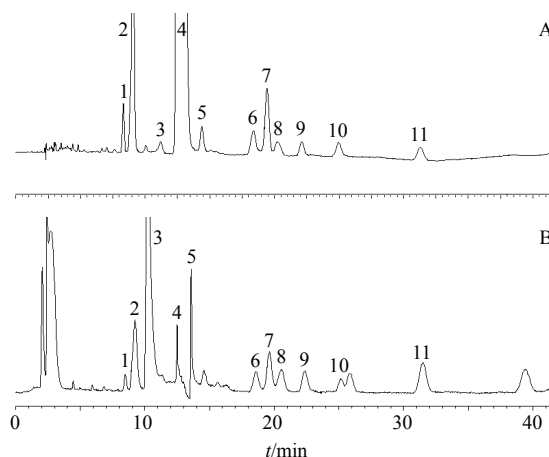


图 1 甘草酸二铵肠溶片的典型的 UPLC-UV 谱图 (A) 和典型 UPLC-IT-TOF-MS 总离子流图 (B)

Fig. 1 Typical UPLC-UV (A) and UPLC-IT-TOF-MS total ions pattern (B) of DGECT

表 1 甘草酸二铵肠溶片相关物质质谱信息

Table 1 Mass spectral data of related substances in DGECT

峰号	t_R /min	面积百分比/%	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	化合物归属
1	8.511	0.309	839.402 8 (469.327 8, 439.170 8)	837.379 6	
2	9.253	3.264	839.403 9 (663.370 1, 645.358 1, 578.260 1, 487.338 7, 469.327 5, 439.177 4, 397.180 9)	837.380 1	甘草酸皂苷 G2
3	10.294	0.132	839.403 6 (651.202 7, 575.226 6, 434.159 9)	837.382 7	
4	12.555	93.838	823.409 3 (647.373 4, 453.333 4, 431.182 8)	821.385 0	18 β -甘草酸*
5	14.519	0.255	823.409 1 (645.348 7, 451.318 5, 430.173 3)	821.387 1	甘草酸皂苷 E2*
6	18.439	0.384	809.428 8 (647.373 1, 453.333 6, 431.179 5, 279.156 9)	807.404 9	甘草酸皂苷 B2
7	19.506	0.887	823.409 3 (647.376 0, 453.332 8, 431.181 6, 279.156 8)	821.383 9	甘草酸皂苷 H2*
8	20.306	0.272	823.407 8 (647.376 0, 453.332 8, 431.181 6, 279.156 8)	821.384 1	18 α -甘草酸*
9	22.197	0.203	823.409 5 (647.373 4, 453.333 4, 431.182 8, 279.156 6)	821.383 7	乌拉尔甘草皂苷 A 或 B*
10	25.100	0.201	825.427 3 (518.320 9, 452.698 8, 432.189 2, 278.636 1)	823.402 5	甘草酸皂苷 J2
11	31.453	0.258	807.402 1 (464.207 8, 437.340 2)	805.391 6	甘草酸皂苷 C2

*互为同分异构体

*Isomers

3.1 18β-甘草酸同分异构体的鉴定

从表 1 可见, 峰 4、5、7、8、9 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 821.38, $[M+H]^+$ 为 823.40, 确定这 5 种物质的相对分子质量为 822.40。

利用工作站的同位素匹配功能对各离子峰的同位素峰进行匹配, 结果见图 2(以 18β-甘草酸为例), 进一步参考 $MS^1 \sim MS^3$ 质谱峰的精确质量信息, 推测该 5 种物质为分子式 $C_{42}H_{62}O_{16}$ 的同分异构体。参考文献推测它们为 18β-甘草酸、18α-甘草酸、甘草酸皂苷 E2、甘草酸皂苷 H2 和乌拉尔甘草皂苷 A

或 B。由对照品峰可知峰 4 为 18β-甘草酸。

3.2 多个未知峰的鉴定

峰 2 的准分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 837.38, $[M+H]^+$ 为 839.40, 确定其相对分子质量为 838.40, 比 18β-甘草酸多了 16, 可能多了 1 个氧, 同时根据同位素匹配、 $MS^1 \sim MS^3$ 质谱峰的精确质量信息, 推测该物质为分子式 $C_{42}H_{62}O_{17}$ 的甘草酸皂苷 G2, 结果见图 3。

同理推测峰 6 为甘草酸皂苷 B2, 峰 10 为甘草酸皂苷 J2, 峰 11 为甘草酸皂苷 C2。

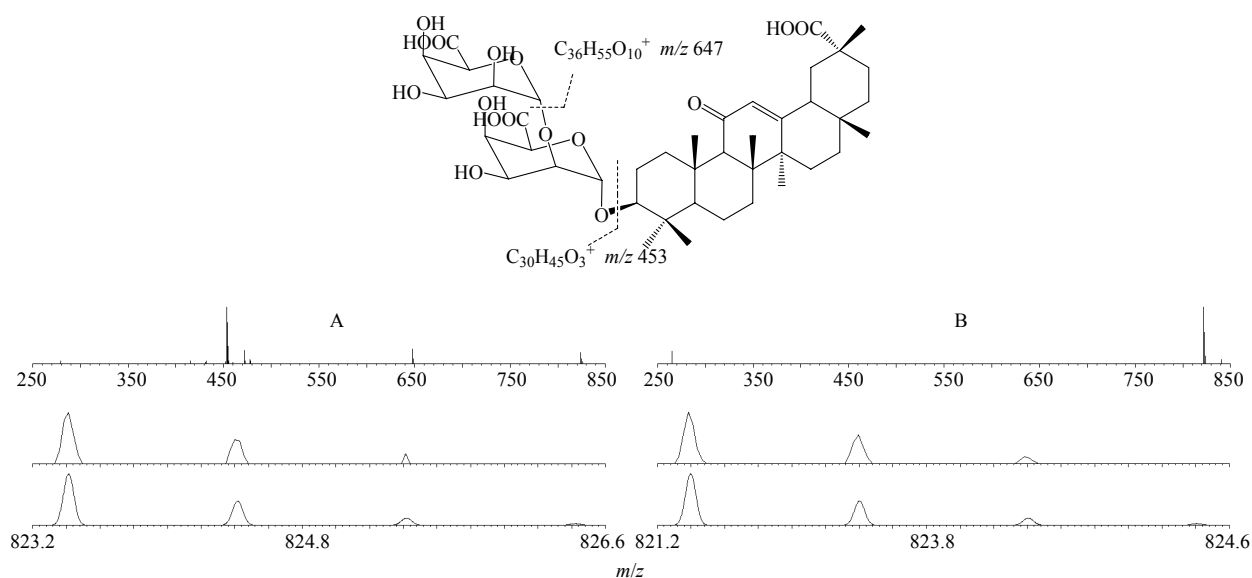


图 2 18β-甘草酸的 $[M+H]^+$ (A) 和 $[M-H]^-$ (B) 同位素匹配结果及裂解示意图

Fig. 2 $[M+H]^+$ (A) and $[M-H]^-$ (B) isotope matching results of 18β-glycyrrhizinate and clearance schematic diagram

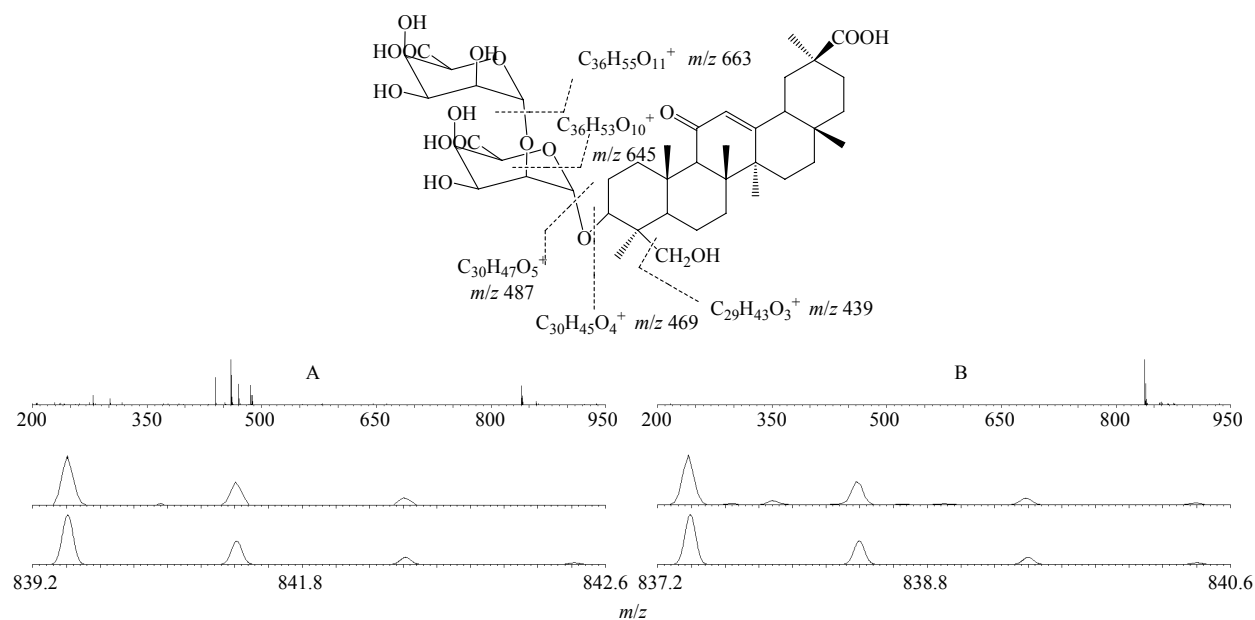


图 3 甘草酸皂苷 G2 的 $[M+H]^+$ (A) 和 $[M-H]^-$ (B) 同位素匹配结果及裂解示意图

Fig. 3 $[M+H]^+$ (A) and $[M-H]^-$ (B) isotope matching results of licorice saponin G2 and clearance schematic diagram

4 讨论

甘草酸二铵是肝病的常用药之一,主要用于伴有谷丙转氨酶(又名丙氨酸转氨酶)升高的慢性迁延性肝炎及慢性活动性肝炎。本品具有较强的抗炎、保护肝细胞膜及改善肝功能的作用。然而,对甘草酸二铵制剂质量控制上却存在诸多不确定因素。本研究成功地建立了 UPLC-DAD-IT-TOF-MS 联用分析甘草酸二铵肠溶片产品中的甘草皂苷类化合物的方法,根据获得的各化合物的母离子和二级离子的精确相对分子质量及同位素信息,参照部分对照品和相关文献,对甘草酸二铵肠溶片中的 9 种化合物进行了快速准确鉴定,为甘草酸二铵产品的质量控制在及潜在药效物质基础的探寻提供了一种快速高效的方法。但多级质谱技术在结构鉴定方面依然存在一定的局限性,18 α -甘草酸、甘草酸皂苷 H2、乌拉尔甘草皂苷 A 与乌拉尔甘草皂苷 B,结构的差别仅在于糖苷键的连接方式不同,仅通过质谱数据信息不能对取代基以及糖基结合位点进行精确确认。

本实验建立了 UPLC-DAD-IT-TOF-MS 定性分析甘草酸二铵肠溶片中有关物质的研究方法,发现了 9 种有关物质,并鉴定了其中的 8 种甘草皂苷。研究结果为甘草酸二铵的质量控制及质量标准完善提供了参考依据。

参考文献

[1] 蒲洁莹,何莉,吴思宇,甘草属植物中三萜类化合物的抗病毒作用研究进展 [J]. 病毒学报,2013,29(6):

673-679.

- [2] 张明发,金玉洁,沈雅琴.甘草酸保护脑损伤及改善记忆功能的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究,2013,36(1): 59-63.
- [3] 李伟,王跃飞,文红梅,等. HPLC-DAD 同时分析甘草中 7 种有效成分 [J]. 中国药学杂志,2008,43(24): 1914-1918.
- [4] 木其尔,刘有平,李萌,等.甘草酸单铵盐中有关物质的 LC-MSⁿ 研究 [J]. 中国医药工业杂志,2009,40(11): 844-847.
- [5] 吴小曼,黄莉,纪宇. HPLC 法分离测定甘草酸二铵及其制剂中的 18 α -、18 β -甘草酸 [J]. 药学与临床研究,2012,20(1): 34-37.
- [6] Montoro P, Maldini M, Russo M, et al. Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS [J]. *J Pharm Biomed*, 2011, 54(3): 535-544.
- [7] 周燕,王明奎,廖循,等.甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析 [J]. 分析化学研究报告,2004,32(2): 174-178.
- [8] 卢定强,戴燕,李晖,等.反相高效液相色谱法同时测定甘草酸及其酶转化产物 [J]. 精细化工,2006,23(4): 355-357.
- [9] 沈阳,沈金灿,庄峙夏,等. HPCE 法与 HPLC 法用于甘草中主要活性成分甘草酸及其降解产物甘草次酸分析的比较 [J]. 药物分析杂志,2006,26(4): 421-425.