

痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究

秦建平^{1,2}, 吴建雄^{1,2}, 郎悦^{1,2}, 于雪娥^{2,3}, 黄文哲^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001
2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001
3. 南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210000

摘要: 目的 建立痛宁凝胶的高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)指纹图谱, 为其质量控制提供依据。方法 采用 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A) - 0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱; 检测波长: 240 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。进行质谱分析时, 流动相 B 用 0.1%甲酸溶液替代。结果 测定了 10 批痛宁凝胶的指纹图谱, 提取 18 个色谱峰作为指纹图谱共有峰, 采用 MS 法指认了 12 个共有峰, 并将共有峰归属到各药材; 10 批样品相似度均大于 0.9。结论 该法重复性好, 简便可靠, 为痛宁凝胶的质量控制和评价提供了依据。

关键词: 痛宁凝胶; 指纹图谱; 高效液相色谱-质谱

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2016)04 - 0427 - 04

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2016.04.005

HPLC-MS Fingerprint of Tongning Gel

QIN Jian-ping^{1,2}, WU Jian-xiong^{1,2}, LANG Yue^{1,2}, YU Xue-e^{2,3}, HUANG Wen-zhe^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd, Lianyungang 222001, China
2. State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-tech for Chinese Medicine, Lianyungang 222001, China
3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China

Abstract: Objective To establish HPLC-MS fingerprint of Tongning Gel, and provide reference for the quality control of Tongning Gel. **Methods** The determination was carried out with Kromasil 100-5 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile (A) - 0.1% phosphoric acid solution (B) with gradient elution. The detection wavelengths were 240 nm. The flow rate was 1.0 mL/min, and the column temperature was set at 35 °C with injection volume of 10 μL. 0.1% Formic acid solution was used in the MS analysis instead of the mobile phase B. **Results** Fingerprints of 10 batches of Tongning Gel were analyzed, and 18 common peaks were marked. Twelve Common peaks were identified by MS, and attributed to the herbs. The similarity degrees of 10 batches of the samples were above 0.9. **Conclusion** The method is reproducible, simple, and reliable, which can be used for the quality control and evaluation of Tongning Gel.

Key words: Tongning Gel; fingerprint; HPLC-MS

痛宁凝胶是由醋延胡索、川芎、威灵仙、伸筋草等 12 味中药经提取、浓缩并加一定的赋形剂制成的凝胶剂, 具有活血理气止痛、祛风通络除湿的作用, 用于膝关节骨性关节炎属筋脉瘀滞, 风湿注节证, 症见关节疼痛, 胫软膝酸, 关节活动不利, 局部肿胀, 畏风恶寒, 舌质偏红或边有积斑苔薄白, 脉弦或滑。目前该制剂的质量控制方法主要为生物

碱类成分^[1]和冰片、薄荷脑的含量测定^[2], 难以全面控制制剂的内在质量。为更好地控制痛宁凝胶的质量, 本实验采用 HPLC-MS 法进行指纹图谱研究, 并将 18 个共有峰在药材中进行归属, 使得有关该制剂的质量控制能够深入到相关药材。

1 仪器和试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪、DAD 紫外检测

收稿日期: 2016-01-18

基金项目: 国家重大新药创制科技重大专项(2013ZX09402203); 江苏省科技支撑计划项目(BE2013661)

作者简介: 秦建平(1979—), 女(苗族), 湖南邵阳人, 高级工程师, 从事中药质量标准研究。Tel: (0518)81152321 E-mail: qinjianping111@126.com

*通信作者 萧伟(1959—), 研究员级高级工程师, 博士, 研究方向为中药制剂和创新中药的研究与开发。

器(安捷伦公司); Agilent 1290 超高压液相色谱仪、Agilent 6538 Q-TOF/MS 质谱检测器、电喷雾(ESI)离子源(美国安捷伦公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Mettler AE240 电子分析天平(瑞士梅特勒公司); BP211D 电子分析天平(德国赛多利斯公司); Milli-Q 超纯水仪(密理博公司); Centrifuge 5415D 高速离心机(德国 Eppendorf 公司)。

5-*O*-甲基维斯阿米醇苷(批号 111523-201007, 质量分数以 96.5%计)、升麻素苷(批号 111522-201210, 质量分数以 93.7%计)、阿魏酸(批号 110773-201313, 质量分数以 99.6%计)、绿原酸(批号 110753-201415, 质量分数以 96.2%计)、延胡索乙素(批号 110716-201414, 质量分数以 99.9%计)对照品均购自中国食品药品检定研究院, 隐绿原酸(批号 MUST-11112203, 质量分数 \geq 98%)、新绿原酸(批号 MUST-11112202, 质量分数 \geq 98%)、木兰花碱(批号 MUST-12022901, 质量分数 \geq 98%)对照品均购自成都曼斯特生物科技有限公司; 乙腈(色谱纯, 美国天地公司), 甲酸(色谱纯, 赛默飞世尔科技有限公司), 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

痛宁凝胶(规格 15 g/支, 批号 130201、130202、130203、130301、130302、130303、140401、140402、140403、140404,)均由江苏南星药业有限责任公司生产。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈(A) - 0.1%磷酸溶液(B), 梯度洗脱, 0~10 min 5% \rightarrow 14% A, 10~20 min 14% \rightarrow 18% A, 20~40 min 18% \rightarrow 35% A, 40~60 min 35% \rightarrow 95% A; 检测波长: 240 nm; 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L。进行质谱分析时, 流动相 B 用 0.1%甲酸溶液替代。

2.2 质谱条件

ESI 离子源, 正、负离子模式, 毛细管电压 3 500 V (负离子模式)、4 000 V (正离子模式), 雾化气压力 310 kPa, 干燥气体积流量 10 L/min, 加热毛细管温度 350 $^{\circ}$ C, 源内裂解电压 145 V, 质量数扫描范围 m/z 100~1 000。

2.3 对照品溶液的制备

分别取 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷、升麻素苷、阿魏酸、绿原酸、隐绿原酸和新绿原酸对照品适量,

加甲醇制成 15 μ g/mL 溶液; 分别取延胡索乙素和木兰花碱对照品适量, 加甲醇制成 5 μ g/mL 溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取痛宁凝胶约 1.5 g, 精密称定, 加 70%甲醇 25 mL, 超声(250 W, 40 kHz)提取 30 min, 放冷, 离心, 取上清液, 即得。

2.5 指纹图谱方法学考察

2.5.1 精密度试验 取批号 130401 痛宁凝胶供试品溶液, 连续进样 6 次进行测定。以 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间、相对峰面积。结果 18 个共有峰的相对保留时间 RSD 值 $<$ 0.5%, 相对峰面积 RSD 值 $<$ 2.4%, 6 次测定的色谱图相似度 $>$ 0.996。

2.5.2 稳定性试验 取批号 130401 痛宁凝胶供试品溶液, 分别于 0、3、6、9、12、15、18 h 测定指纹图谱。以 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间、相对峰面积。结果 18 个共有峰的相对保留时间 RSD 值 $<$ 1.9%, 相对峰面积 RSD 值 $<$ 3.4%, 色谱图相似度 $>$ 0.994, 表明供试品溶液在 18 h 内稳定性良好。

2.5.3 重复性试验 取批号 130401 痛宁凝胶 6 份, 制备供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。以 5-*O*-甲基维斯阿米醇苷为参照峰, 计算指纹图谱中各共有峰的相对保留时间、相对峰面积。结果表明, 18 个共有峰的相对保留时间 RSD 值 $<$ 0.7%, 相对峰面积 RSD 值 $<$ 2.9%, 色谱图相似度 $>$ 0.993。

2.6 样品测定

取不同批次的痛宁凝胶样品, 制备供试品溶液, 进样测定, 分别得到 10 批痛宁凝胶样品的指纹图谱, 见图 1。

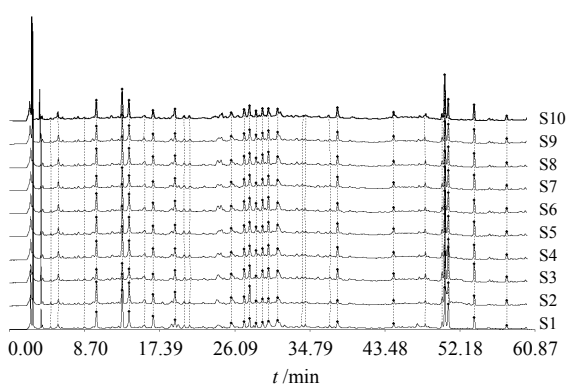


图 1 不同批次痛宁凝胶指纹图谱

Fig. 1 Fingerprints of Tongning Gel for ten batches

2.7 指纹图谱的建立及相似度分析

将10批痛宁凝胶色谱图采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统A版》进行分析,生成痛宁凝胶共有模式的对照指纹图谱,标定18个共有峰,见图2。样品色谱图与对照指纹图谱相似度见表1,结果表明10批痛宁凝胶样品的相似度均在0.90以上。

2.8 药材与制剂的相关性

取痛宁凝胶处方中12味药材及痛宁凝胶制备供试品溶液,进样测定,对比各吸收峰的紫外吸收

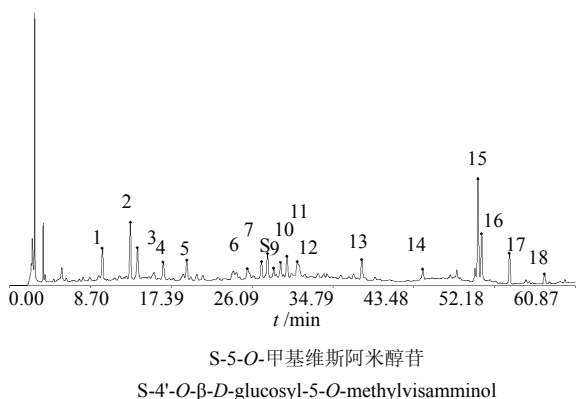


图2 痛宁凝胶对照指纹图谱

Fig. 2 HPLC reference fingerprint of Tongning Gel

表1 痛宁凝胶指纹图谱相似度结果

Table 1 Similarity degrees of Tongning Gel

批号	相似度	批号	相似度
130201	0.964	130303	0.993
130202	0.970	140401	0.977
130203	0.966	140402	0.993
130301	0.991	140403	0.983
130302	0.930	140404	0.995

光谱和相对保留时间,得到痛宁凝胶指纹图谱中的18个特征峰,结果表明1、2、3、15、16号峰来自花椒,4、5、6、10、11、17、18号峰来自海桐皮,12、13号峰来自延胡索,5、8、14号峰来自防风,7号峰来自川芎,9号峰来自威灵仙。提示6味药材对所建立的痛宁凝胶指纹图谱有贡献,其他药味如路路通、冰片和薄荷脑中主要化学成分无紫外吸收或响应较低,在该指纹图谱中无体现。

2.9 指纹图谱共有峰的鉴定

采用对照品比对,结合保留时间、MS数据和相关文献报道^[3-6]对痛宁凝胶指纹图谱中共有峰进行指认,共指认12个共有峰。结果见表2。

表2 12个共有峰通用名称、分子式和质谱数据

Table 2 The common name, molecular formula, and mass spectral data of 12 mutual peaks

峰号	t_R /min	一级离子	实测值 (m/z)	理论值 (m/z)	偏差	分子式	化合物
1*	10.2	$[M-H]^-$	353.088 7	353.087 8	-2.55	$C_{16}H_{18}O_9$	隐绿原酸
		$[2M-H]^-$	707.185 0	707.182 9	-2.97		
2*	13.2	$[M-H]^-$	353.089 4	353.087 8	-4.61	$C_{16}H_{18}O_9$	绿原酸
		$[2M-H]^-$	707.185 2	707.182 9	-3.25		
3*	14.0	$[M-H]^-$	353.088 5	353.087 8	-2.06	$C_{16}H_{18}O_9$	新绿原酸
		$[2M-H]^-$	707.184 4	707.182 9	-2.10		
4*	16.9	$[M+H]^+$	342.170 7	342.170 0	-2.09	$C_{20}H_{23}NO_4$	木兰花碱
5*	19.5	$[M+H]^+$	469.172 7	469.170 4	-4.83	$C_{22}H_{28}O_{11}$	升麻素苷
		$[M-H+HCOOH]^-$	513.160 8	513.161 4	1.10		
7*	27.4	$[M-H]^-$	193.051 3	193.050 6	-3.46	$C_{10}H_{10}O_4$	阿魏酸
8*	28.1	$[M+H]^+$	453.177 1	453.175 5	-3.48	$C_{22}H_{28}O_{10}$	5-O-甲基维斯阿米醇苷
		$[M-H+HCOOH]^-$	497.168 4	497.166 4	-3.92		
12*	31.3	$[M+H]^+$	356.187 0	356.185 6	-3.83	$C_{21}H_{25}NO_4$	延胡索乙素
13	38.3	$[M+H]^+$	366.171 2	366.170 5	-1.82	$C_{22}H_{24}NO_4$	脱氢紫堇碱
15	50.5	$[M+H]^+$	264.196 4	264.195 8	-2.28	$C_{16}H_{25}NO_2$	羟基-α-山椒素
16	50.8	$[M+H]^+$	264.196 3	264.195 8	-2.26	$C_{16}H_{25}NO_2$	羟基山椒素异构体
17	53.8	$[M+H]^+$	259.097 1	259.096 5	-2.37	$C_{15}H_{14}O_4$	美花椒内酯
		$[M+Na]^+$	281.079 0	281.078 4	-2.03		
		$[2M+Na]^+$	539.169 3	539.167 6	-3.08		

*为用对照品比对的化合物

* means compounds identified by reference substances

3 讨论

3.1 供试品溶液制备方法的选择

分别以不同体积分数的乙醇和甲醇为提取溶剂,并比较超声和回流两种提取方式,结果表明 70% 甲醇提取时,供试品色谱图中色谱峰最多且峰型较好;超声和回流两种提取方式得到的色谱图无明显差别。为操作简便,选择 70% 甲醇为提取溶剂进行超声提取。

3.2 色谱条件的选择

比较了乙腈-水、乙腈-0.01%磷酸、乙腈-10 mmol/L 乙酸钠溶液等不同流动相体系对痛宁凝胶指纹图谱的影响,结果流动相为乙腈-0.01%磷酸时,供试品色谱图中色谱峰分离最好。通过 DAD 检测器在 190~400 nm 进行全扫描,结果 240 nm 下的信息较全面,色谱峰较多且各色谱峰分离较好,因此选择 240 nm 作为检测波长。选用 4 根不同厂家色谱柱进行实验,比较分离度和峰型,结果表明 Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)较合适。

3.3 参照物的选择

痛宁凝胶处方由醋延胡索、川芎、威灵仙、伸筋草、东北透骨草、路路通、海桐皮、防风、花椒、牛膝、薄荷脑和冰片共 12 味药组成,根据对各药味的分析,其主要有效可测成分为延胡索乙素、阿魏酸、升麻素苷和 5-O-甲基维斯阿米醇苷等,其中 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量较高,分离较好,保留时

间较为适中,含量较稳定,因此选择其 5-O-甲基维斯阿米醇苷作为参照物。

10 批痛宁凝胶指纹图谱结果表明不同批次样品整体质量差异较小,处方中 6 味药材对该指纹图谱做出贡献,能较好的控制产品质量。在后续的研究中将结合 HPLC-ELSD 和 GC 法继续对其他成分进行考察,并建立质控方法,为全面控制痛宁凝胶质量提供依据。

参考文献

- [1] 王伟,尚强,杨璐,等. HPLC 同时测定痛宁凝胶中延胡索乙素和原阿片碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(12): 93-95.
- [2] 刘莉莉,秦建平,杨素德,等. GC 法测定痛宁凝胶中冰片和薄荷脑的含量 [J]. 中国药科大学学报, 2014, 45(1): 76-78.
- [3] 程志红,陈国强,王昊阳,等. 延胡索中季铵生物碱的高分辨基质辅助激光解吸电离质谱研究 [J]. 中国天然药物, 2004, 2(2): 99-102.
- [4] 苗凤茹,刘光宇,林力. 延胡索总生物碱大鼠灌胃给药后入血成分的定性研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 166-170.
- [5] Kumar V, Kumar S, Singh B, et al. Quantitative and structural analysis of amides and lignans in *Zanthoxylum armatum* by UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, 94(3): 23-29.
- [6] 罗泽渊,陈燕,姜荣兰,等. 海桐皮的化学成分研究 [J]. 中药材, 1995, 18(9): 460-463.