

液相串联质谱同时测定艾迪注射液中 9 种成分

徐洁¹, 谢丽艳¹, 居文政^{1,2*}, 戴国梁¹, 程小桂¹, 谈恒山³

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210009

2. 南京中医药大学附属医院 临床药理科, 江苏 南京 210029

3. 南京军区总医院, 江苏 南京 210002

摘要: 目的 建立 LC-MS 法, 同时测定艾迪注射液中斑蝥素, 人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁, 异秦皮啶, 紫丁香苷, 芒柄花素, 黄芪甲苷及绿原酸 9 种成分。方法 使用 Waters Quattro Micro 液质联用仪, 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C₁₈ (100 mm×3.0 mm, 3.5 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸, 梯度洗脱; 柱温 23 ℃; 体积流量 0.22 mL/min。结果 4 个批次艾迪注射液中各成分平均质量浓度分别为 (1.88±0.03)、(0.73±0.12)、(0.66±0.28)、(3.13±0.66)、(7.77±0.56)、(21.71±0.64)、(0.46±0.07)、(17.44±1.00)、(108.76±5.86) μg/mL。结论 建立的 LC-MS 方法, 操作简单、快速、灵敏度高, 可用于艾迪注射液的质量控制。

关键词: 艾迪注射液; 质量控制; 斑蝥素; 人参皂苷; LC-MS

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)05-0566-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.05.013

Simultaneous quantification of nine components in Aidi Injection by LC-MS

XU Jie¹, XIE Li-yan¹, JU Wen-zheng^{1,2}, DAI Guo-liang¹, CHENG Xiao-gui¹, TAN Heng-shan³

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

2. Department of Clinical Pharmacology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

3. General Hospital of Armed Forces of Nanjing, Nanjing 210002, China

Key words: Aidi Injection; quality control; cantharidin; ginsenoside; LC-MS

艾迪注射液是以斑蝥为君药, 佐以人参、黄芪、刺五加, 精制提炼而成的注射用新型双相广谱抗癌药物^[1]。具有清热解毒、消瘀散结之功效。临床广泛用于原发性肝癌、肺癌、直肠癌、恶性淋巴瘤和妇科恶性肿瘤等, 也可作为癌症患者化疗的辅助用药, 减少化疗的不良反应, 提高患者的生存质量^[2]。

艾迪注射液现行质量标准^[3]采用 GC 法测定斑蝥素的量; 采用分光光度法控制人参的量, 但黄芪和刺五加中有关成分的量并未得到控制。现有研究大多采用 HPLC 法测定其中某味中药的指标成分^[4-6]。其中有报道采用 RP-HPLC-ELSD 法同时测定 5 种苷类成分的量^[7], 但忽略了其主要成分斑蝥素。本实验采用 LC-MS 所建立的方法^[8]同时测定注射液中

斑蝥素, 人参皂苷 Rg₁、Re、Rb₁, 异秦皮啶, 紫丁香苷, 芒柄花素, 黄芪甲苷及绿原酸的量, 以完善其质量标准, 为该制剂的质量控制提供强有力的保证, 以便进行更深入的研究。

1 仪器与材料

Quattro Micro LC-MS/MS 联用仪(色谱工作站: Masslynx 4.0, 美国 Waters 公司); Mettler AE240 电子天平(梅特勒-托利多有限公司); KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Micro-17R 冷冻离心机(美国 Thermo 公司); Driect-Q5 超纯水机(法国 Millipore 公司)。

艾迪注射液(10 mL/支, 批号 20110115、20110810、20111015、20111115, 贵州益佰制药股

收稿日期: 2012-07-16

基金项目: 重大新药创制项目(2012ZX09303009-002); 江苏省中医领军人才项目(LJ200906); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(2010)

作者简介: 徐洁(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: (025)86617141-60310 E-mail: luqing1234@126.com

*通信作者 居文政 Tel: (025)86617141-80501 E-mail: wzhu333@163.com

网络出版时间: 2013-01-09 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130109.1522.001.html>

份有限公司)。对照品斑蝥素(批号 110783-200604)、人参皂苷 Rg_1 (批号 110703-200323)、人参皂苷 Re (批号 110754-201123)、人参皂苷 Rb_1 (批号 110704-200217)、异秦皮啶 (批号 110837-201005)、紫丁香苷(批号 111574-200603)、芒柄花素(批号 111703-200602)、黄芪甲苷 (批号 0781-200311)、绿原酸 (批号 1107532-200413), 内标 (IS) 多潘立酮 (批号 100304-2005027)、芬布芬(批号 100415-200301), 均购自中国药品生物制品检定所。甲醇、乙腈(Merk 公司)、甲酸为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 测定条件

2.1.1 液相色谱条件 色谱柱为 Agilent Zorbax SB C_{18} 柱(100 mm×3.0 mm, 3.5 μ m); 保护柱为 Agilent Eclipse XDB2 C_8 柱 (12.5 mm×2.1 mm, 5 μ m); 体积流量 0.22 mL/min; 进样量 5 μ L; 柱温 23 $^{\circ}$ C; 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱, 平衡时间为 5 min, 梯度洗脱程序: 0~5 min, 25%乙腈; 5~8 min, 25%~90%乙腈; 8~13 min, 90%乙腈; 13~15 min, 90%~25%乙腈。

2.1.2 质谱条件 离子化方式为电喷雾 (ESI); 选择性离子检测 (SIR); 正负离子同时检测。检测电压 3.5 kV; 离子源温度 120 $^{\circ}$ C; 脱溶剂温度 350 $^{\circ}$ C; 脱溶剂气体 (N_2) 体积流量 500 L/h。各成分的检测离子, 质核比及锥孔电压见表 1。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品及内标溶液的配制 精密称取斑蝥素、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 、

异秦皮啶、紫丁香苷、芒柄花素、黄芪甲苷及绿原酸各对照品适量, 分别置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得各对照品储备液。另精密移取各储备液适量至另一 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 得质量浓度分别为 1.680、1.696、1.666、9.400、20.800、15.320、9.920、0.510、101.300 mg/L 的混合对照品储备液, 保存于 5 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

精密称取多潘立酮及芬布芬对照品适量, 置于同一 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 即得混合内标溶液, 备用, 其中多潘立酮质量浓度为 8.3 mg/L, 芬布芬质量浓度为 180 mg/L。

2.2.2 供试品溶液的配制 精密吸取艾迪注射液 1 mL、“2.2.1”项下配制的混合内标溶液 50 μ L, 置于 10 mL 量瓶中, 加入 50%甲醇定容, 摇匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为供试品溶液。

2.3 线性关系考察

精密吸取“2.2.1”项下混合对照品溶液 39、78、156、312、624 μ L, 1.25、2.50、5.00 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 分别加入“2.2.1”项下混合内标溶液 50 μ L, 用 50%甲醇溶液定容, 得 8 份不同质量浓度的混合对照品溶液, 各重复进样 5 μ L ($n=3$), 记录各成分色谱峰峰面积积分值。分别计算各成分的平均峰面积 (A_i) 与相应内标的平均峰面积 (A_s) 的比值 Y , 以比值 Y 对进样质量浓度 X (μ g/L) 进行线性回归, 得回归方程。9 种主要成分回归方程、相关系数 (r)、最低检测限 ($S/N>3$) 见表 2。结果表明, 斑蝥素、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 、异秦皮啶、紫丁香苷、芒柄花素、黄芪甲苷及绿原酸在相应质量浓度范围内呈良好的线性关系 (r 为 0.999 1~0.999 9)。所测成分的定量限均为各成分相应的线性范围的最低点 ($S/N>10$)。

2.4 精密度试验

精密吸取艾迪注射液 1 mL (批号 20110810), 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 分别计算各成分的峰面积 (A_i) 与相应内标峰面积 (A_s) 的比值 Y , 结果表明, 斑蝥素、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb_1 、异秦皮啶、紫丁香苷、芒柄花素、黄芪甲苷、绿原酸的 Y 的 RSD 分别为 1.41%、1.02%、1.13%、0.55%、0.81%、1.14%、1.42%、1.22%、0.66%。

2.5 重复性试验

精密吸取艾迪注射液 1 mL (批号 20110810),

表 1 9 种主要成分及内标质谱参数

Table 1 MS parameters of nine main components and IS

检测物	离子模式	m/z	锥孔电压 / V
斑蝥素	$[M+H]^+$	197.1	40
人参皂苷 Rg_1	$[M+Na]^+$	823.5	55
人参皂苷 Re	$[M+Na]^+$	969.5	55
人参皂苷 Rb_1	$[M+Na]^+$	1 131.8	55
异秦皮啶	$[M+Na]^+$	245.1	40
紫丁香苷	$[M+Na]^+$	395.2	45
多潘立酮 (IS)	$[M+H]^+$	426.1	45
芒柄花素	$[M-H]^-$	267.3	40
黄芪甲苷	$[M-H]^-$	829.2	50
绿原酸	$[M-H]^-$	353.3	25
芬布芬 (IS)	$[M-H]^-$	253.3	35

表 2 9 种主要成分线性关系考察结果

Table 2 Linear correlation of nine main components

检测物	回归方程	线性范围 / ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	r	最低检测限 / ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
斑蝥素	$Y=0.002\ 2\ X+0.037$	6.560~840	0.999 8	3
人参皂苷 Rg_1	$Y=0.002\ 8\ X+0.005\ 7$	6.625~848	0.999 9	4
人参皂苷 Re	$Y=0.001\ 9\ X+0.001$	6.510~833	0.999 9	4
人参皂苷 Rb_1	$Y=0.001\ 8\ X+0.055\ 9$	36.718~4 700	0.999 8	8
异秦皮啶	$Y=0.002\ 4\ X+0.381\ 2$	38.750~4 960	0.999 6	4
紫丁香苷	$Y=0.003\ 5\ X+0.318\ 3$	81.250~10 400	0.999 9	3
芒柄花素	$Y=0.012\ 7\ X-0.022\ 5$	1.922~255	0.999 9	1
黄芪甲苷	$Y=0.001\ 4\ X-0.295\ 1$	59.843~7 660	0.999 1	40
绿原酸	$Y=0.000\ 3\ X-0.096\ 9$	395.700~50 650	0.999 9	100

按“2.2.2”项操作,平行制备供试品溶液 6 份,分别测定。结果斑蝥素、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 、人参皂苷 Rb_1 、异秦皮啶、紫丁香苷、芒柄花素、黄芪甲苷、绿原酸的 Y 的 RSD 分别为 1.53%、1.09%、1.23%、0.62%、0.96%、1.20%、1.48%、1.39%、0.73%。

2.6 稳定性试验

取精密度试验项下供试品溶液,自配制后 0、2、4、8、12、24、36、48 h 依次进样 5 μL 测定。结果斑蝥素、人参皂苷 Rg_1 、人参皂苷 Re 、人参皂苷 Rb_1 、异秦皮啶、紫丁香苷、芒柄花素、黄芪甲苷、绿原酸 Y 的 RSD 值分别为 32.5%、3.10%、1.69%、1.26%、2.55%、0.77%、2.00%、2.28%、3.06%。

斑蝥素在 48 h 内稳定性考察结果:斑蝥素在 0、2、4、8、12、24、36、48 h 各时间点相对应的质量浓度为 0.86、0.90、1.18、1.48、1.89、1.90、1.99、2.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。12 h 以后斑蝥素的质量浓度上升极为缓慢,基本趋于平衡。

2.7 加样回收率试验

精密移取已测定的艾迪注射液 0.5 mL,精密加入 3 种不同质量(高、中、低 3 水平)各成分对照品适量,每组平行 3 份,按“2.2.2”项下方法操作,测定各成分的量,计算回收率。结果见表 3。

2.8 样品测定

取 4 个批次艾迪注射液,按“2.2.2”项每个批次制备 5 份供试品,进样分析,测定峰面积,内标法计算,结果见表 4、图 1。

3 讨论

近几年各种中药注射液的不良反应事件接连发生,作为高危品种的中药注射液的质量控制显得尤为重要。本实验采用 LC-MS 所建立的方法,可同

表 3 加样回收率试验 ($n=3$)Table 3 Results of recovery test ($n=3$)

成 分	对照品加入量 / ng			平均回收率 / %	RSD / %
	低水平	中水平	高水平		
斑蝥素	35.3	58.8	82.3	107.6	10.9
人参皂苷 Rg_1	23.5	39.15	54.8	96.7	2.8
人参皂苷 Re	27.2	45.5	63.5	95.6	2.2
人参皂苷 Rb_1	113.5	189.2	264.9	103.7	3.8
异秦皮啶	238.1	396.8	555.5	107.5	2.7
紫丁香苷	661.4	1 102.4	1 543.4	99.9	2.3
芒柄花素	16.1	28.5	41.9	101.2	2.6
黄芪甲苷	574.9	975.0	1 364.9	99.3	3.3
绿原酸	5 341.9	8 906.56	12 469.2	100.2	1.6

时测定艾迪注射液中斑蝥素,人参皂苷 Rg_1 、 Re 、 Rb_1 ,异秦皮啶,紫丁香苷,芒柄花素,黄芪甲苷及绿原酸 9 种成分的量,该方法操作简单、快速,一次测定就能较全面地反映注射液配方中 4 种药材的质量。

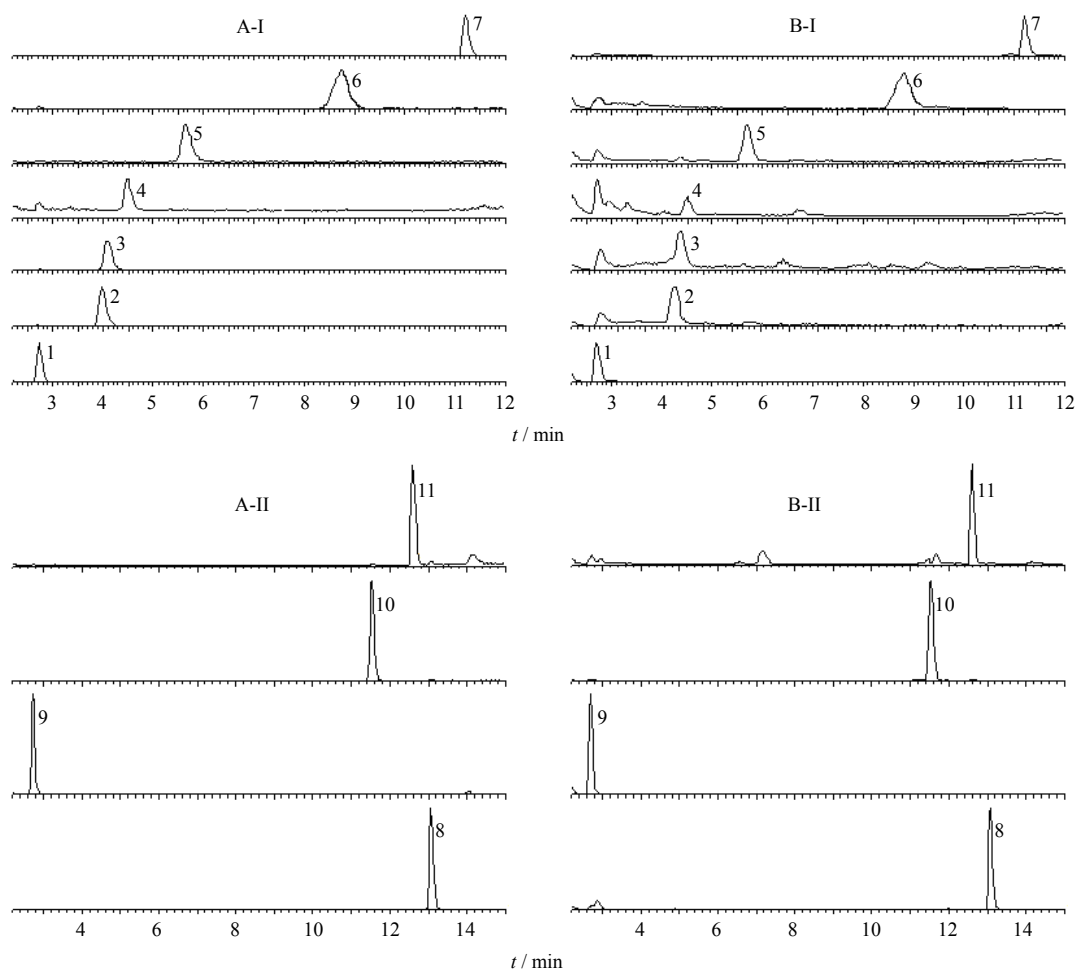
本实验先从优选流动相出发,比较了乙酸-乙腈系统和甲酸-乙腈系统,发现后者有更好的离子响应,在此基础上,比较了甲酸在乙腈中不同比例对离子响应的影响,优选出 0.1%甲酸-乙腈系统。继而通过调节有机相不同比例,梯度洗脱使各成分得到良好分离。艾迪注射液中斑蝥素的水溶性差,人参、黄芪、刺五加中的皂苷类溶解性较好,实验考察了不同稀释剂(30%、50%、70%甲醇;30%、50%、70%乙腈-异丙醇混合液)对各成分保留时间及响应值的影响,最终选择 50%甲醇作为稀释剂。实验表明,斑蝥素在 48 h 内质量浓度有变化,可能与其溶

表4 不同批次艾迪注射液液中9种主要成分的量 ($n=5$)

Table 4 Contents of nine main components in Aidi Injection of different batches ($n=5$)

批 次	质量浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)								
	斑蝥素	人参皂苷 Rg ₁	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb ₁	异秦皮啶	紫丁香苷	芒柄花素	黄芪甲苷	绿原酸
20110115	1.85	0.64	0.49	2.54	7.15	21.65	0.38	16.51	115.20
20110810	1.89	0.85	0.91	3.75	7.53	22.23	0.43	17.68	111.17
20111015	1.92	0.61	0.35	2.58	8.46	20.82	0.55	18.74	107.22
20111115	1.87	0.80	0.88	3.66	7.96	22.12	0.48	16.81	101.46

批 次	RSD / %								
	斑蝥素	人参皂苷 Rg ₁	人参皂苷 Re	人参皂苷 Rb ₁	异秦皮啶	紫丁香苷	芒柄花素	黄芪甲苷	绿原酸
20110115	1.1	4.2	2.9	2.3	3.7	1.7	4.2	3.6	1.7
20110810	1.2	3.1	2.0	0.2	3.8	0.6	0.8	3.4	2.7
20111015	2.1	3.7	1.8	0.3	0.7	1.5	4.8	2.7	0.9
20111115	1.5	1.3	1.1	0.6	0.9	1.2	1.4	1.2	0.6



1-紫丁香苷 2-人参皂苷 Re 3-人参皂苷 Rg₁ 4-斑蝥素 5-异秦皮啶 6-多潘立酮 (IS)

7-人参皂苷 Rb₁ 8-芬布芬 (IS) 9-绿原酸 10-黄芪甲苷 11-芒柄花素

1-syringin 2-ginsenoside Re 3-ginsenoside Rg₁ 4-cantharidin 5-isofraxidin 6-Domperidone (IS)

7-ginsenoside Rb₁ 8-Fenbufen (IS) 9-chlorogenic acid 10-astragaloside IV 11-formononetin

图1 对照品 (A) 和艾迪注射液样品 (B) 的正 (I)、负 (II) 离子的 LC-MS 图谱

Fig. 1 LC-MS positive (I) and negative (II) ion spectra of reference substances (A) and Aidi Injection sample (B)

解性有关,斑蝥素在水中溶解性差,实验中采用50%甲醇稀释,斑蝥素缓慢溶解分散,实验过程发现,艾迪注射液开启后用50%甲醇稀释10倍,放置一段时间(12 h)后测定比较稳定,放置时间对除斑蝥素以外的其他成分影响不大。所有实验数据,均为稀释放置12 h后的测定结果。其他可能引起该现象的原因在进一步探索中。

艾迪注射液中斑蝥素是一种天然毒素,对肝肾等器官有一定的毒性,小鼠 LD_{50} 为1.8 mg/kg^[9]。另有研究表明,斑蝥素能抑制肿瘤细胞的蛋白质合成,继而影响RNA和DNA的合成及细胞周期的进程,促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖^[10],具有强大的抗肿瘤特性。艾迪注射液在临床上效果明显,但由于斑蝥素有剧毒,治疗窗较窄,体内浓度较高时会引起毒副反应。其制剂质量标准要求每支注射液含斑蝥素($C_{10}H_{12}O_4$)控制在0.008~0.030 mg之间,以防体内浓度过高引起毒副反应。本实验建立的方法测得艾迪注射液中斑蝥素的质量浓度为1.88 $\mu\text{g/mL}$ 左右,较一致,符合现行质量标准。

参考文献

- [1] Liu C X, Xiao P G, Peng Y, *et al.* Challenges in research and development of traditional Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2009, 1(1): 1-28.
- [2] 徐洁,居文政,谈恒山. 艾迪注射液药理作用及临床应用研究概况 [J]. *药学与临床研究*, 2012, 20(1): 48-52.
- [3] WS3-B-3809-99-2002. 艾迪注射液现行质量标准 [S].
- [4] 孔维月,林能明,方罗. RP-HPLC法测定艾迪注射液中人参皂苷 Rg_1 的含量 [J]. *中国药房*, 2009, 20(27): 2131-2132.
- [5] 王晓辉,李清,程维明,等. HPLC法测定注射用艾迪(冻干)中紫丁香苷的含量 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2006, 23(12): 782-784.
- [6] 王晓辉,李清,陈晓辉,等. HPLC法同时测定注射用艾迪(冻干)中人参皂苷 Rg_1 和人参皂苷 Re 的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2007, 27(4): 503-505.
- [7] 陈重,张苗苗,李笑然,等. RP-HPLC-ELSD同时测定艾迪注射液中5种苷类成分的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(6): 706-708.
- [8] 张婷,美尔哈巴·热西提,林潇,等. HPLC-MS/MS法测定银黄颗粒中绿原酸和黄芩苷 [J]. *中草药*, 2012, 43(4): 711-713.
- [9] 邹建军,张胜强,冯瑞祥. 斑蝥素毒性及其药(毒)动力学研究 [J]. *中国药科大学学报*, 2002, 33(5): 393-396.
- [10] 施秀青,徐瑞荣. 斑蝥素及其衍生物抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2007, 17(12): 792-793.