

UPLC-MS/MS 法测定舒肝丸中川楝素的含量

马永青, 刘晓明, 刘永利*

(河北省药品检验研究院, 石家庄 050011)

摘要 目的: 建立 UPLC-MS/MS 定量测定舒肝丸中川楝素含量的分析方法。方法: 采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 mm), 以乙腈-0.01% 甲酸溶液为流动相进行等度洗脱, 流速 0.35 mL · min⁻¹, 质谱使用电喷雾电离源 (ESI) 负离子模式, 多反应检测 (MRM) 扫描方式检测, 分析时间 3.5 min。结果: 川楝素质量浓度在 1.115~1 115 ng · mL⁻¹ 范围内线性关系良好 ($r=0.999\ 9$); 平均加样回收率 ($n=9$) 为 99.0%。21 批舒肝丸样品中川楝素含量为 2.40~40.0 μg · g⁻¹。结论: 本法可推荐用于舒肝丸中川楝素的含量测定标准制定。

关键词: 舒肝丸; 川楝子; 川楝素; 超高效液相色谱-串联质谱; 多反应检测

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2017) 03-0545-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.03.27

Determination of toosendanin in Shugan pills by UPLC-MS/MS

MA Yong-qing, LIU Xiao-ming, LIU Yong-li*

(Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang, 050011)

Abstract Objective: To establish an UPLC-MS/MS method for determination of toosendanin in Shugan pills. **Methods:** The analysis was performed on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.7 mm) with acetonitrile and 0.01% formic acid as mobile phase at a flow rate of 0.35 mL · min⁻¹. The mass spectrometer was operated in the positive ionization electrospray mode using multiple reaction monitoring (MRM) for analysis of toosendanin. **Results:** The linear range of toosendanin was 1.115~1 115 ng · mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$) and the average recovery ($n=9$) was 99.0%. The content range of toosendanin in 21 batches of Shugan pills was 2.40~40.0 μg · g⁻¹. **Conclusion:** The method was recommended to be used to formulate the assay standard of toosendanin in Shugan pills. **Keywords:** Shugan pills; Toosendan Fructus; toosendanin; UPLC-MS/MS; multiple reaction monitoring

舒肝丸由川楝子、白芍、延胡索、沉香等数味中药制成, 具有舒肝和胃、理气止痛的功效, 主要用于肝郁气滞、胸胁胀满、胃脘疼痛、嘈杂呕吐、嗝气泛酸等症的治疗^[1]; 方中川楝子为君药, 其中川楝素 (toosendanin) 是舒肝丸中药理活性较为明确的重要

成分之一 (结构式见图 1), 中国药典 2015 年版记载其功能主治为疏肝泄热、行气止痛、杀虫。用于肝郁化火、胸胁、脘腹胀痛、疝气疼痛、虫积腹痛。据《本草纲目》记载该药性味苦寒, 有小毒, 并有酸味; 入肝、胃、小肠经。药理作用研究显示川楝素药理作用

* 通信作者 Tel: 13932166206; E-mail: liuyongli2008@126.com

第一作者 Tel: 15232189998; E-mail: myq610@126.com

广泛,驱蛔杀虫作用^[2]、抗病毒作用尤为明显^[3];同时,川楝素毒理研究表明川楝子单次灌服即可产生明显肝脏毒性,表现为血清酶学和肝脏组织病理形态学改变^[4],川楝素对昆明小鼠具胚胎毒性^[5],临床应用时应引起注意。

目前,关于川楝素的检测方法主要有高效液相色谱法^[6-9],液相色谱质谱联用法等^[10-12],中成药成分复杂,干扰多,采用高效液相色谱法或液相色谱-串联质谱联用法难以准确测定其含量,由于超高效液相色谱-串联质谱法具有选择性高,专属性强,灵敏度高等特点,所以本文建立了超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱测定舒肝丸中川楝素含量方法,为科学评价舒肝丸质量提供参考。

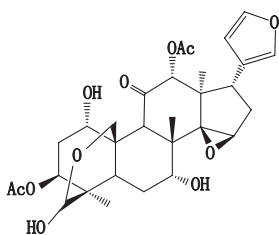


图1 川楝素化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of toosendanin

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 公司 ACQUITY UPLC[®] 液相色谱仪; Waters 公司 XEVO TQ-S 质谱仪, Masslynx V4.1 分析软件; Waters 公司 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶); Millipore 公司 Milli-Q 超纯水机; Mettler 公司 TOLEDO XS105 电子分析天平。

1.2 试剂

甲醇、乙腈为色谱纯; 川楝素对照品, 中国食品药品检定研究院, 批号 111842-201102; 舒肝丸, 规格为大蜜丸, 每丸重 6 g, 由生产单位提供。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件 采用 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈-0.01% 甲酸水 (36:64), 流速 0.35 mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样量 1 μL。

2.1.2 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI) 负离子模式, 多反应监测 (MRM); 毛细管电压 2.8 kV, 使用高纯氮作为辅助

喷雾电离与脱溶剂气体, 脱溶剂气流速 995 L · h⁻¹, 锥孔气流速 152 L · h⁻¹, 去溶剂气温度 500 °C; 离子源温度 150 °C; 碰撞气体氩气; 采用多反应检测模式 (MRM) 定量模式, 监测离子对分别为 m/z (-) 573.3 → 425.3; m/z (-) 573.3 → 531.4; 锥孔电压均为 25 V, 碰撞电压分别为 25 V 和 20 V。川楝素质谱图见图 2, 川楝素对照品及舒肝丸总离子流图见图 3-A、B, 总离子流图见图 4。

2.2 溶液的制备

2.2.1 系列对照品溶液 取川楝素对照品适量, 精密称定, 加甲醇溶解制成川楝素质量浓度分别为 1.115、5.575、22.30、44.60、89.20、178.4 和 1 115 ng · mL⁻¹ 的系列溶液, 即得, 备用。

2.2.2 供试品溶液 取装量差异项下本品约 1 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 称量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称量, 用甲醇补足减失的量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.3 线性范围考察与定量限测定

分别精密吸取系列对照品溶液 (1.115、5.575、22.3、44.6、89.2、178.4、1 115 ng · mL⁻¹) 各 1 μL, 进样测定峰面积; 川楝素结构中存在半缩醛结构, 始终有 2 个互变异构体, 以川楝素 2 个峰面积之和 (Y) 对质量浓度 (X) 进行线性回归, 绘制标准曲线, 得回归方程:

$$Y = 778.74X + 629.44 \quad r = 0.9999$$

结果表明, 川楝素质量浓度在 1.115~1 115 ng · mL⁻¹ 范围内, 线性关系良好。取对照品溶液逐级稀释, 通过测定峰高 (S) 和基线噪音 (N), 按信噪比 (S/N) 3:1 确定检出限为 0.5 ng · mL⁻¹, 按信噪比 (S/N) 10:1 确定最低定量限为 1 ng · mL⁻¹。

2.4 精密度考察

取舒肝丸, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 连续进样 6 次, 计算峰面积的 RSD 为 1.6%, 表明仪器精密度良好。

2.5 重复性试验

取同一批样品 0.5、1.0、1.5 g 各 3 份, 精密称定, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下条件进行测定, 得川楝素平均含量为 10.2 mg · g⁻¹, RSD 为 2.7%, 结果表明该方法重复性良好。

2.6 回收率试验

精密称取已知含量的同一批样品, 每份约 0.5 g, 每 3 份为一组, 分别加入用甲醇配制的低、中、高 3 个

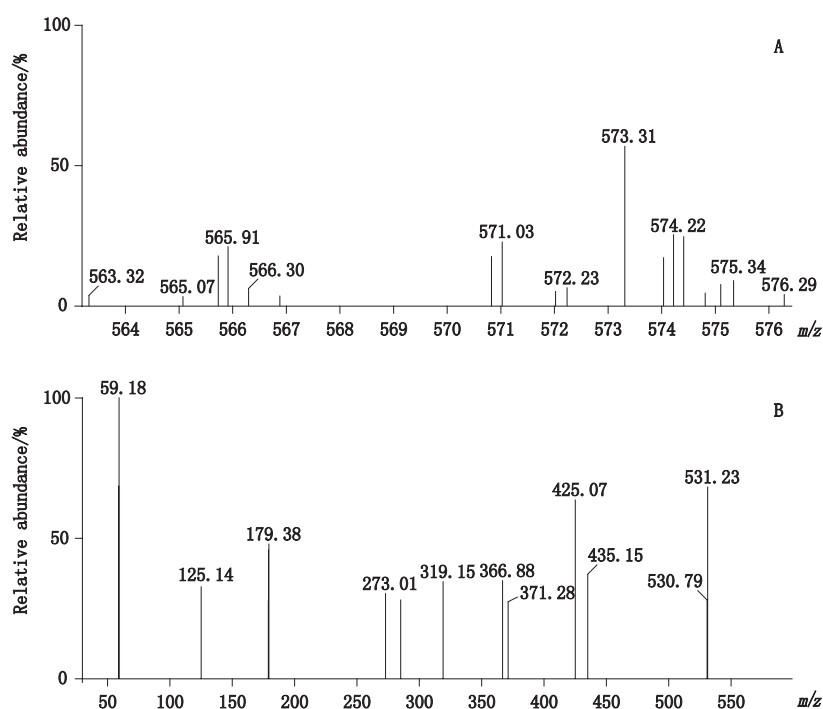
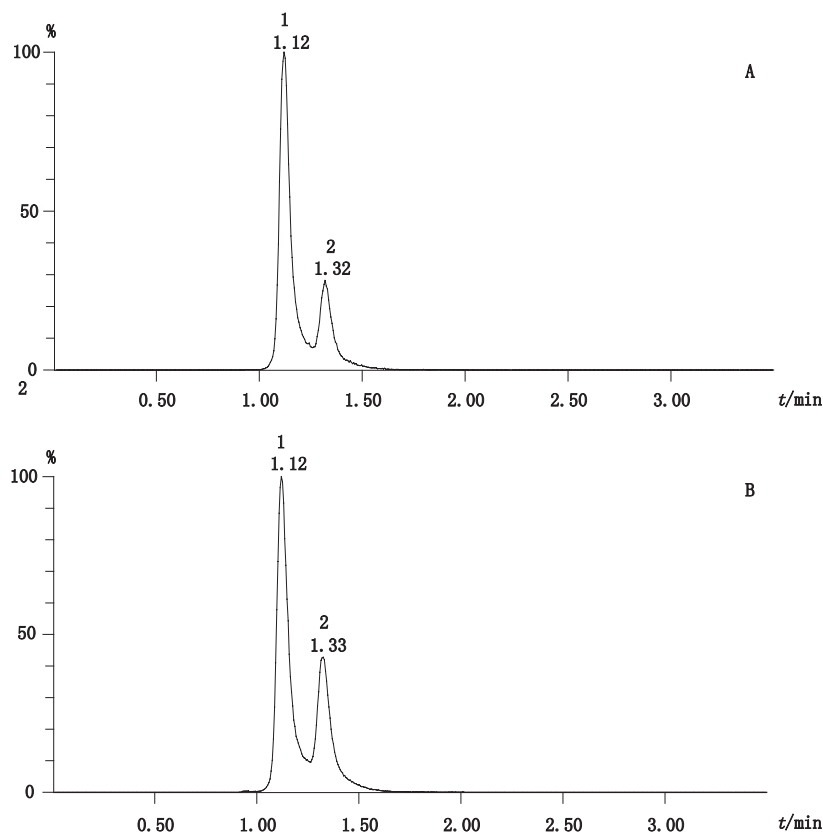


图2 川楝素负离子模式扫描一级质谱 (A) 及二级质谱 (B) 图

Fig.2 MS spectrum (A) and MS/MS spectrum (B) of toosendanin at negative ion mode



1、2. 川楝素异构体 (toosendanin isomers)

图3 川楝素对照品 (A) 及舒肝丸 (B) 总离子流图

Fig.3 Total ion chromatograms of reference substance and Shugan pills (B)

浓度的对照品溶液,按“2.2.2”项下方法制备供试溶液,进样测定,结果(表1)表明样品处理方法提取效率稳定。

表1 回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery test

编号 (No.)	称样量 (sample weight) / μg	样品中 含量 (original) / μg · g ⁻¹	加入量 (added) / μg	测得量 (found) / μg	回收率 (recovery) /%	平均回收 率(average RSD/ recovery) % /(n=3)	
1	0.529 7	9.290	6.322	15.78	102.7	101.2	2.1
2	0.550 1	9.648	6.322	15.95	99.7		
3	0.581 4	10.20	6.322	16.34	97.1		
4	0.502 5	8.813	10.54	19.71	103.4	102.8	0.8
5	0.524 6	9.201	10.54	19.97	102.2		
6	0.535 3	9.388	10.54	19.75	98.3		
7	0.523 5	9.181	14.75	23.31	95.8	94.7	1.7
8	0.527 4	9.250	14.75	23.04	93.5		
9	0.530 7	9.308	14.75	23.81	98.3		

2.7 稳定性

将质量浓度为 84.29 ng · mL⁻¹ 的对照品溶液分别放置 0、1、3、5、12 h 后进行测定,计算川楝素的 2 个峰面积之和的 RSD 为 1.9%,表明川楝素对照品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 含量测定

取舒肝丸 21 批次,按照“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,进样分析,以外标法计算得到川楝素含量,结果见表 2。

3 讨论

实验中分别考察了甲醇超声和甲醇回流 2 种提取方式,结果表明,当用甲醇超声提取时,结果发现第 1 个主峰前出现 1 个小峰,与主峰无法实现基线分离,干扰测定,用甲醇回流提取时,干扰峰消失,最终选择甲醇回流提取方式。

由于川楝素结构中存在半缩醛结构,始终有 2 个互变异构体^[13],优化质谱条件时,确定母离子质量数,发现在负离子全扫描模式(MS Scan)得到 m/z 573.3 的 $[M-H]^-$ 准分子离子峰,以此为母离子,再进行子离子选择,通过子离子扫描(daughter scan)选择 2 个子离子碎片,优化碰撞能力,得到川楝素 2 个子离子碎片 m/z 531.4 和 m/z 425.3,其中 m/z 531.4 为川楝素

表2 舒肝丸中川楝素含量测定结果(n=2)

Tab. 2 Content of toosendanin in Shugan pills

厂家 (manufacture)	批号 (lot No.)	含量 (content) / (μg · g ⁻¹)
A	15015196	9.90
A	15015054	10.0
A	15015052	10.6
A	4015302	11.7
A	3015521	11.9
A	15015195	10.7
B	1506107	20.6
B	1504110	18.4
B	1506141	19.8
D	20130602	2.40
E	150101	36.1
E	20150801	33.8
E	150301	40.0
E	20141002	22.9
F	140301	4.70
G	20150101	4.40
H	150104	29.0
I	150302	14.5
J	150102	8.30
K	WJ631712	10.8
L	15031021	39.9

在负离子条件下通过丢失乙酰基团形成的碎片离子 $[M-CH_3CO]^-$, 而 m/z 425.3 可能是川楝素丢失 CH_3CO 、 H_2O 、 CO 等多个基团后形成的碎片离子 $[M-2CH_3CO-CO-2H_2O]^-$; 最终确定多反应检测模式(MRM), m/z 531.4 为定量离子, m/z 425.3 为定性离子, 根据保留时间和定量离子计算含量, 此方法优于选择离子监测(SIR)中用分子离子进行计算模式, 含量测定结果更为准确。

本研究建立了舒肝丸中川楝素 UPLC-MS/MS 测定方法, 在质量浓度范围内线性良好, 分析时间大大缩短, 准确度、精密度、回收率、稳定性等均满足定量分析要求, 应用于 21 批舒肝丸中川楝素定量分析, 样品中川楝素含量为 2.40~40.0 μg · g⁻¹。舒肝丸样品测定结果表明, 舒肝丸中川楝素含量批次间差异较大, 反应药品质量存在一定差异, 建议制定舒肝丸中

川楝素范围标准。

参考文献

- [1] 中国药典 2015 年版. 一部[S]. 2015: 1600
ChP 2015. Vol I [S]. 2015: 1600
- [2] 李志敏, 左新, 王兆伟, 等. 川楝素驱猪蛔虫体外杀虫试验研究[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(3): 28
LI ZM, ZUO X, WANG ZW, *et al.* Studies on the effects of toosendanin on ascaris sum *in vitro* [J]. Chin J Vet Med, 2008, 42(3): 28
- [3] WATANABE T, SAKAMOTO N, NAKAGAWA M, *et al.* Inhibitory effect of a triterpenoid compound, with or without alpha interferon, on hepatitis C virus infection [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(6): 2537
- [4] 齐双岩, 熊彦红, 金若敏. 川楝子致小鼠肝毒性时效、量效关系研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11): 2694
QI SY, XIONG YH, JIN RM. Time-dose-effect studies on hepatotoxicity of mice induced by Fructus Toosendan [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2008, 19(11): 2694
- [5] 张先福, 王建华, 张树方, 等. 川楝素对昆明小鼠的胚胎毒性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(3): 301
ZHANG XF, WANG JH, ZHANG SF, *et al.* Research of embryotoxicity of toosendanin in Kunming mice [J]. Acta Vet Zootech Sin, 2005, 36(3): 301
- [6] 周乐华, 李迎春, 窦志英. 川楝子及其炮制品中川楝素含量测定研究[J]. 天津药学, 2011, 23(1): 20
ZHOU LH, LI YC, DOU ZY. Determination of toosendanin in processed products of Toosendan Fructus [J]. Tianjin Pharm, 2011, 23(1): 20
- [7] 陈强, 周浓, 王荣繁. HPLC 测定川楝子不同采收期及不同部位中川楝素的含量[J]. 资源开发与市场, 2012, 28(9): 777
CHEN Q, ZHOU N, WANG RF. Determination of toosendanin in different parts of *Melia toosendan* in different seasons by HPLC [J]. Resour Dev Mark, 2012, 28(9): 777
- [8] 李洁玉, 沈力, 周浓, 等. HPLC 测定不同来源川楝子中川楝素[J]. 光谱实验室, 2013, 30(1): 294
LI JY, SHEN L, ZHOU N, *et al.* Determination of toosendanin in different sources of *Melia toosendan* by HPLC [J]. Chin J Spectrosc Lab, 2013, 30(1): 294
- [9] 张烨, 周浓, 夏从龙. HPLC 测定妇乐颗粒中川楝素含量[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(4): 220
ZHANG Y, ZHOU N, XIA CL. Quantitative determination of toosendanin in Fule Keli by HPLC [J]. J Liaoning Univ TCM, 2010, 12(4): 220
- [10] 罗文汇, 毕晓黎, 孙冬梅. LC-MS 法测定川楝子中川楝素[J]. 中成药, 2014, 36(7): 1556
LUO WH, BI XL, SUN DM. Determination of toosendanin in Toosendan Fructus by LC-lus [J]. Chin Tradit Pat Med, 2014, 36(7): 1556
- [11] 吴忠杰. 超高效液相色谱-质谱联用法测定川楝子中川楝素的含量[J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(7): 940
WU ZJ. Determination of toosendanin content in Toosendan Fruit by UPLC/MS [J]. World J Integr Tradit West Med, 2015, 10(7): 940
- [12] 吕卓, 张明, 王莉, 等. HPLC-MS/MS 法测定川楝子中川楝素的研究[J]. 西北药学杂志, 2015, 30(5): 572
LÜ Z, ZHANG M, WANG L, *et al.* Determination of toosendanin in Toosendan Fructus by HPLC-MS/MS [J]. Northwest Pharm J, 2015, 30(5): 572
- [13] 钟炽昌, 谢晶曦, 陈淑凤, 等. 川楝素的化学结构[J]. 化学学报, 1975, 33(1): 35
ZHONG ZC, XIE JX, CHEN SF, *et al.* The chemical structure of toosendanin [J]. Acta Chim Sin, 1975, 33(1): 35

(本文于 2016 年 3 月 21 日收到)