

UPLC-MS-MS 法同时测定颠茄片中 2 个有效成分的含量*

董丽荣¹, 李应才¹, 孙 贇^{2△}

(1. 昆明市食品药品检验所, 云南 昆明 650031; 2. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 建立同时测定颠茄片中硫酸天仙子胺、东莨菪内酯含量的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS-MS)分析方法。**方法** 采用 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 用 0.1% 甲酸水溶液-甲醇为流动相, 进行梯度洗脱(0~1 min, 10% B; 1~4 min, 10% B→90% B; 4~6 min, 90% B; 6~6.2 min, 90% B→10% B; 6.2~8 min, 10% B), 流速为 0.2 mL·min⁻¹, 柱温为 40 ℃, 进样量 4 μL; 质谱采用电喷雾离子源, 正负离子模式, 多反应监测模式进行扫描。**结果** 硫酸天仙子胺、东莨菪内酯分别在 193.6~968.0 ng·mL⁻¹ ($r=0.9996$)、1.00~50.00 ng·mL⁻¹ ($r=0.9999$) 范围内呈良好线性关系; 平均回收率($n=6$)分别为 94.3%, 98.0%, RSD 分别为 1.18%, 2.26%。**结论** 该方法简便、灵敏、准确、高效, 可用于颠茄片的质量控制。

关键词: 超高效液相色谱串联质谱法; 颠茄片; 硫酸天仙子胺; 东莨菪内酯

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2023)02-0086-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2023.02.017

Simultaneous Determination of Two Active Components in Belladonna Tablets by UPLC-MS-MS

DONG Lirong¹, LI Yingcai¹, SUN Yun²

(1. Kunming Institute for Food and Drug Control, Kunming 650031, China;

2. Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China)

ABSTRACT: Objective To establish an ultra-fast liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-MS-MS) method for simultaneous determination of two active components in Belladonna tablets (hyoscyamine sulfate, scopolin). **Methods** Chromatographic separation was performed on a Waters Acquity UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water-methanol B was subjected to gradient elution (0~1 min 10% B; 1~4 min, 10% B→90% B; 4~6 min, 90% B; 6~6.2 min, 90% B→10% B; 6.2~8 min, 10%B) at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹. The column temperature was maintained at 40 ℃, and injection volume was 4 μL. Detection was performed with electrospray ionization source in positive and negative ionization mode. Quantification was performed using multiple reactions monitoring (MRM) mode. **Results** The linear range of hyoscyamine sulfate and scopolin were 193.6~968.0 ng·mL⁻¹ ($r=0.9996$) and 1.00~50.00 ng·mL⁻¹ ($r=0.9999$). Whose average recoveries were 94.3% and 98.0% ($n=6$). The RSD were 1.18% and 2.26%. **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate and efficient. It can be used for the quality control of Belladonna tablets.

KEY WORDS: UPLC-MS-MS; Belladonna tablets; hyoscyamine; scopolin

颠茄片主要有效成分为阿托品、山莨菪碱、东莨菪碱等托烷类生物碱^[1-2]。由于含量高低相差悬殊,不

适宜同时建立多成分的含量测定方法^[3]。近年文献报道,关于颠茄制剂的生物碱类有效成分的测定,均采

收稿日期: 2022-11-03

* 基金项目: 云南省科技厅中医联合专项重点项目[2019FF029(-010)]

第一作者简介: 董丽荣(1980-),女,副主任药师,研究方向:药品检验,药品质量标准,实验室质量控制。

△通信作者: 孙贇, E-mail: 41546147@qq.com

用高效液相色谱法^[4-5]。《中国药典》2020版一部对颠茄片中的硫酸天仙子胺、东莨菪内酯分别采用2个不同的高效液相色谱法进行含量测定,方法分析时间长、效率低、操作繁琐,其他峰对主峰干扰大。供试品取样量样量大(100片),在实际监督抽检工作中,往往样品量难于满足检验需求。本试验建立了采用UPLC-MS/MS法同时测定颠茄片中硫酸天仙子胺、东莨菪内酯2种有效成分的定量分析方法。该方法灵敏准确,取样量少,效率高,可为颠茄片质量标准的优化提升提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器 AB 4500 质谱仪 (SCIEX);LC-40 超高效液相色谱仪(岛津公司);AL204(万分之一)电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);MS205DU(十万分之一)电子天平(特勒-托利多仪器上海有限公司);Arium comfort II 超纯水仪(赛多利斯);SK8210HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司)。

1.2 对照品及试剂试药 硫酸天仙子胺(批号110752-500912,纯度96.0%),东莨菪内酯(批号110826-501616,纯度99.6%),均来源于中国食品药品检定研究院;色谱纯甲醇(Fisher公司),色谱纯甲酸(国药集团化学试剂有限公司)。3批颠茄片均为天津力生制药股份有限公司生产,批号分别为2101002、2111021、2110019。

2 方法与结果

2.1 色谱-质谱条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液-甲醇,按照表1进行梯度洗脱;流速:0.2 mL·min⁻¹;柱温:40℃;进样量4.0 μL。

表1 梯度洗脱程序

时间(min)	0.1%甲酸水溶液(%)	甲醇(%)
0.00	90	10
1.00	90	10
4.00	10	90
6.00	10	90
6.20	90	10
8.00	90	10

2.1.2 质谱条件 采用AB 4500质谱系统,ESI源,多反应监测(multiple reactions monitoring,MRM)模式,离子源温度为550℃,正负离子扫描,得硫酸天仙子胺、东莨菪内酯的质谱参数见表2,与文献[7]报道基本一致。

表2 各成分质谱参数

成分名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压(V)	碰撞能量(eV)
硫酸天仙子胺	290.3 [M+H] ⁺	124.1 [*]	20	33.0
		93.1		40.0
东莨菪内酯	190.7 [M-H] ⁻	175.9 [*]	-80	-20.0
		147.9		-27.0

注:标有*的离子为定量离子。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取硫酸天仙子胺、东莨菪内酯两种对照品各适量,分别置于10 mL量瓶中,用50%甲醇定容,得硫酸天仙子胺、东莨菪内酯的质量浓度分别为0.212、0.180 mg·mL⁻¹的单一对照品溶液。分别精密量取上述对照品溶液适量,置同一10 mL量瓶中,用50%甲醇定容,得硫酸天仙子胺、东莨菪内酯分别为0.998、1.001 μg·mL⁻¹的混合对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液 分别取不同批次的颠茄片20片,精密称定,研细,精密称取约0.1 g置于50 mL量瓶中,加入50%甲醇溶液适量,超声提取(频率33 kHz,功率250 W)15 min,放冷,用50%甲醇溶液定容至刻度,摇匀,滤过,精密吸取续滤液1.0 mL至10 mL量瓶中,用50%甲醇溶液定容,摇匀,经0.22 μm滤头滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品储备液适量,用50%甲醇稀释成系列浓度混合对照品溶液,其中硫酸天仙子胺质量浓度分别为:193.6、387.2、580.8、774.4、968.0 ng·mL⁻¹,东莨菪内酯质量浓度分别为:1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 ng·mL⁻¹。取上述系列混合对照溶液,分别按“2.1”项下条件测定,线性回归计算。结果见表3。结果表明,上述2个成分在各自线性范围内呈良好线性关系。

表 3 回归方程与线性范围测定结果

成分名称	回归方程	相关系数 (<i>r</i>)	线性范围 (ng·mL ⁻¹)
硫酸天仙子胺	$y=126930x+14911800$	0.9996	193.6~968.0
东莨菪内酯	$y=72822x+208666$	0.9999	1.00~50.00

2.3.2 检测限与定量限测定 精密吸取“2.2.1”项下的混合对照品储备液,逐级稀释后按“2.1”项条件测定,以离子对 S/N 为 3 考察其检出限,结果硫酸天仙子胺和东莨菪内酯的检出限分别为 0.25 pg·mL⁻¹ 和 0.10 pg·mL⁻¹; 以离子对 S/N 为 10 考察其定量限,结果硫酸天仙子胺和东莨菪内酯的定量限分别为 0.87 pg·mL⁻¹ 和 0.49 pg·mL⁻¹。

2.3.3 精密度试验 精密吸取“2.3.1”项下项下的混合对照品溶液(硫酸天仙子胺、东莨菪内酯的质量浓度分别为 387.19 ng·mL⁻¹、200 ng·mL⁻¹),按“2.1”项条件测定,连续进样 6 次,记录各指标成分峰面积并计算其 RSD 值。结果硫酸天仙子胺和东莨菪内酯峰面积的 RSD 分别为 0.91% 和 1.11%,表明仪器精密度良好。

2.3.4 稳定性试验 取批号为 2101002 的样品,制备供试品溶液,室温下放置 0、2、4、8、12、24 h,按“2.1”项条件测定,记录各指标成分峰面积并计算其 RSD 值。结果硫酸天仙子胺和东莨菪内酯峰面积的 RSD 分别为 1.25% 和 1.30%,表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内稳定性良好。

2.3.5 重复性试验 取同一批号样品 6 份,制备供试品溶液,按“2.1”项条件分别进样测定,计算各指标成分的含量。结果硫酸天仙子胺、东莨菪内酯含量的 RSD 分别为 1.41% 和 0.97%,表明该方法重复性良好。

2.3.6 准确度试验 分别取已测含量的同一批号(批号为 2101002)样品 6 份,每份取约 0.1 g,精密称定,置于 50 mL 容量瓶中,分别精密加入硫酸天仙子胺和东莨菪内酯对照品溶液适量,按“2.2.2”项下的方法制备成供试品溶液。按“2.1”项下条件测定。结果见表 4。

2.3.7 样品含量测定 分别不同批号样品,按“2.2.2”项下的方法制备成供试品溶液。按“2.1”项下条件分别进样测定,计算含量。测定结果见表 5。对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的 MRM 色谱图见图 1。

表 4 各成分加样回收率试验结果(*n*=6)

组分	取样量 (g)	样品中 含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
硫酸天 仙子胺	0.1047	198.37	110	300.73	93.05	94.3	1.18
	0.1058	200.58		304.96	94.89		
	0.1068	202.29		307.75	95.87		
	0.1079	204.44		307.82	93.98		
	0.1006	190.56		293.09	93.20		
	0.1067	202.14		306.73	95.08		
东莨菪 内酯	0.1047	10.35	9.05	19.07	96.35	98.0	2.26
	0.1058	10.46		19.10	95.46		
	0.1068	10.56		19.34	97.01		
	0.1079	10.67		19.82	101.10		
	0.1006	9.95		19.02	100.22		
	0.1067	10.55		19.40	97.79		

表 5 各成分含量测定结果(*n*=2)

样品批号	取样量 (g)	硫酸天仙子胺 (μg/片)	东莨菪内酯 (μg/片)
2101002	0.1435	115	5.89
	0.1439		
2111021	0.1348	108	7.98
	0.1405		
2110019	0.1388	103	6.86
	0.1329		

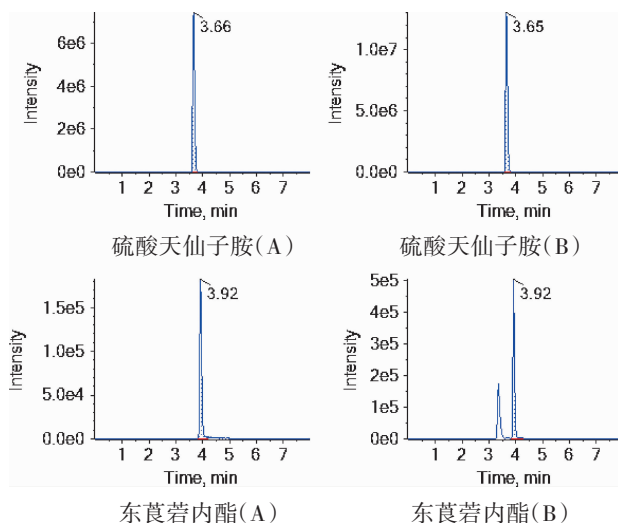


图 1 对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的 MRM 色谱对比图

3 讨论与结论

3.1 色谱条件的优化 本实验考察了有机相甲醇和乙腈及梯度洗脱对分离效果的影响。结果用乙腈作为流动相时,硫酸天仙子胺色谱峰出现分叉现象。本实验通过更换色谱柱、调整梯等,依旧无法消除硫酸天仙子胺色谱峰出现分叉现象。故采用甲醇作为流动相,能得到理想的色谱峰形和分离效果,且质谱信号响应较强。

3.2 质谱条件的优化 东莨菪内酯在负离子模式形成的离子比正离子模式形成的离子丰度比更强,碎片离子稳定。综合考虑选择正负离子模式。

3.3 提取溶剂的选择 本文参考 2020 版《中国药典》标准,对提取溶剂甲醇和水的比例进行了比较,综合考虑了提取率,基质效应干扰等指标,最终确定甲醇-水(50:50)为提取溶剂。

3.4 供试品溶液杂质峰探讨 图 1 中显示,供试品溶液中存在东莨菪内酯的杂峰,其离子对信息和东莨菪内酯一致。通过查阅文献可能是属于和东莨菪内酯的同类生物碱。该生物碱是否为活性成分,需要进行质量标准控制,应需进一步研究。

3.5 结论 《中国药典》2020 年版一部采用两种 HPLC 法测定该药中 2 种成分的含量,硫酸天仙子胺和东莨菪内酯含量差异大(硫酸天仙子胺为每片 70~120 μg 、东莨菪内酯含量为每片不得少于 2.2 μg),

难于同时进混标测定,方法分离时间为 50 min,杂峰干扰明显。UPLC-MS/MS 法定性定量具有灵敏度高、分析速度快、抗干扰强等优势,能大大缩短实验时间,提高效率。本实验建立了 UPLC-MS/MS 法同时测定颠茄片中 2 种成分的含量。该方法简便快速、灵敏高效、所需样品量小,可为优化提升该制剂质量标准提供参考。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社,2020:1796-1797.
- [2] 张楠,郭新红,张振中. RP-HPLC 测定颠茄片中 3 种主要成分含量[J]. 医药论坛杂志. 2005,26(19):19-22.
- [3] 陈浩,张文婷,陈勇,等. RP-HPLC 法测定颠茄片中硫酸阿托品的含量[J]. 西北药学杂志,2010,25(5):328-329.
- [4] 黄良永,房耿静,梁文斌,等. 颠茄口服溶液质量控制方法的改进[J]. 中国药师,2017,20(4):760-762.
- [5] 吴玉婷,吕伟旗,汤晟凌. 6 省 13 个产地颠茄草中 2 种成分测定及相关性分析[J]. 中成药,2019,41(7):1618-1623.
- [6] 刘勇,刘雅琳,江雪,等. 颠茄草的质量标准提升中国实验方剂学杂志[J]. 2022,28(2):175-181.
- [7] 王宇卿,庄果,王晓瑜,等. 基于 UPLC-ESI-Q-TOF-MSE 技术分析颠茄草化学成分[J]. 药物分析杂志,2019,9(6):1063-1068.