

UPLC-MS/MS 法同时测定鼻敏胶囊中 22 个成分的含量*

曹蕾^{1,2}, 毕建云¹, 王玉清^{2**}, 张新军², 苏酪^{2,1}, 王博阳², 李鑫蕊², 孙新茹²,
肖康宁², 侯玉洁^{1,2}, 刘圣梅³, 周倩², 刘善新^{2**}

(1. 山东中医药大学, 济南 250355; 2. 山东省中医药研究院, 济南 250014; 3. 山东康众宏医药科技开发有限公司, 济南 250061)

摘要 目的: 建立超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 方法同时测定鼻敏胶囊样品中苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱、附子灵、乌头碱、乌头原碱、新乌头原碱、异甘草素、刺甘草查尔酮、原儿茶酸、甘草素、异甘草苷、甘草香豆素、柚皮素、夏佛塔苷、甘草查尔酮 B、甘草酸铵、甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷 22 个成分的含量。**方法:** 采用 AcclaimTM RSLC 120C₁₈ 型色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm), 以 0.05% 甲酸水 (A) - 乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速为 0.4 mL · min⁻¹; 采用电喷雾离子源 (ESI)、多反应检测 (MRM) 模式进行正、负离子检测。**结果:** 22 个成分在各自的范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.990$), 精密度、重复性、稳定性、加样回收率等均符合要求。结果发现, 22 个成分在鼻敏胶囊中均被检测到, 个别成分含量相差较大。**结论:** 该方法快速、简便、灵敏、可靠, 可为鼻敏胶囊的质量控制提供科学依据。

关键词: 鼻敏胶囊; 化学成分; 超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用法; 含量测定; 变应性鼻炎

中国分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2025) 03-0400-09

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0395

Simultaneous determination of 22 components in Bimin capsules by UPLC-MS/MS*

CAO Lei^{1,2}, BI Jian-yun¹, WANG Yu-qing^{2**}, ZHANG Xin-jun², SU Ming^{2,1},
WANG Bo-yang², LI Xin-rui², SUN Xin-ru², XIAO Kang-ning², HOU Yu-jie^{1,2},
LIU Sheng-mei³, ZHOU Qian², LIU Shan-xin^{2**}

(1. Shandong University of Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Academy of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 3. Shandong Kangzhonghong Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd, Jinan, 250061, China)

Abstract Objective: To establish an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of 22 components of Bimin capsules, including benzoylaconine, benzoylmesaconine, benzoylhypaconitine, hypaconitine, mesaconitine, fuziline, aconitine, aconine, mesaconine, isoliquiritigenin, echinatin, protocatechuic acid, liquiritigenin, isoliquiritoside, glycycomarin, naringenin, schaftoside, licochalcone B, glycyrrhizic acid ammonium salt, liquiritin, liquiritin apioside and

* 山东中医药科技项目 (Q-2023179、Q-2023022、Q-2023169); 山东省新旧动能转换重大工程重大课题攻关项目 (202006)

** 通信作者 王玉清 Tel: (0531) 82949813; E-mail: 1020358979@qq.com

刘善新 Tel: (0531) 82949813; E-mail: liushanxin66@163.com

第一作者 Tel: 17852752632; E-mail: 244526609@qq.com

isoliquiritin apioside. **Methods:** The Acclaim™ RSLC 120C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm) was used with 0.05% formic acid water (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase at a flow rate of 0.4 mL · min⁻¹. Electrospray ionization (ESI) source and multiple reaction monitoring (MRM) mode in both positive and negative were used for ion detections. **Results:** The 22 components displayed a good linear relationship ($R^2 > 0.990$) in their respective ranges, and the precision, repeatability, stability, and sample recovery rate all met the requirements. It was found that all 22 components were detected in the nasal sensitivity capsules, with significant differences in the content of some components. **Conclusion:** This method is fast, simple, sensitive and reliable, and can provide scientific basis for the quality control of the Bimin capsules.

Keywords: Bimin capsules; chemical composition; UPLC-MS/MS; content determination; allergic rhinitis

鼻敏胶囊是中药 I 类创新药,由黑顺片、炙甘草等组成,具有温肾散寒、暖肺通窍的功效,临床上用于治疗变应性鼻炎 (allergic rhinitis, AR)。该方由经典名方“四逆汤”去干姜而成,原方主要治疗脾肾阳虚,阴寒内盛的四肢厥逆证^[1],附子配干姜意在增强回心阳之力,过敏性鼻炎非亡阳之证,无需急温之,只需温肾升阳,缓缓图功,考虑附子配干姜大热,故去干姜,体现了《内经》中的“少火生气”的思想^[2];甘草性甘、平,可调和药性,抑制附片的辛热燥烈之性,去其邪性,留其正性,以便更好地发挥其药理作用^[2-4]。现代药理学研究表明,附子和甘草在抗炎、抗过敏、免疫调节等方面疗效显著^[5-8],已有研究表明,口服去甲乌头碱能显著降低卵白蛋白所诱导的 AR 小鼠血清中 IgE、组胺和 IL-4 的水平,调节 Th 1/Th 2 细胞的失衡^[9]。甘草提取物鼻腔灌洗给药治疗 AR 患者具有明显的疗效且无副作用^[10],甘草酸能逆转组胺对人鼻上皮细胞中呼吸道黏蛋白 (MUC5AC) 表达、炎症细胞因子产生和水通道蛋白 (AQP5) 表达的影响^[11]。

鼻敏胶囊处于临床研究阶段,物质基础研究薄弱,处方成分含量不明确。目前,超高效液相色谱串联质谱 (UPLC-MS/MS) 法越来越多地应用于中药复方的分析,因其具有良好的灵敏度和专属性,故常用于中药复方多成分的质量控制^[12-14]。基于此,本研究采用 UPLC-MS/MS 对鼻敏胶囊中 22 个成分进行含量测定,为鼻敏胶囊的质量控制提供参考,并为其药效物质研究奠定基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Scientific Vanquish 超高效液相色谱仪; TSQ Quantum 三重四极杆质谱仪 (Thermo Fisher Scientific); Acclaim™ RSLC 120C₁₈ 型色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm, Thermo Fisher Scientific); KQ-250DA 型数控

超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); AE224C 型万分之一电子天平 (上海舜宇恒平科学仪器有限公司); MS105 十万分之一电子天平 (METTLER TOLEDO 公司); Milli-QIQ7000 超纯水机 (MERCCK, 德国)。

1.2 试药

对照品苯甲酰乌头原碱 (批号 PS011883, 纯度 > 98.0%)、苯甲酰新乌头原碱 (批号 PS010496, 纯度 > 98.0%)、苯甲酰次乌头原碱 (批号 PS011884, 纯度 > 98.0%)、次乌头碱 (批号 PS010300, 纯度 > 98.0%)、新乌头碱 (批号 PS010171, 纯度 ≥ 98.5%)、异甘草素 (批号 PS001032, 纯度 > 98.0%)、刺甘草查尔酮 (批号 PS000688, 纯度 > 98.0%)、原儿茶酸 (批号 PS012560, 纯度 100%)、甘草素 (批号 PS010083, 纯度 > 98.0%)、乌头原碱 (批号 PS011831, 纯度 ≥ 98.5%)、新乌头原碱 (批号 PS013220, 纯度 ≥ 98.0%)、附子灵 (批号 PS020826, 纯度 ≥ 98.0%)、异甘草苷 (批号 PS012517, 纯度 ≥ 98.5%)、甘草香豆素 (批号 PS012475, 纯度 ≥ 98.0%)、柚皮素 (批号 PS010691, 纯度 ≥ 99.0%)、芹糖异甘草苷 (批号 PS012516, 纯度 99.87%)、夏佛塔苷 (批号 PS012525, 纯度 97.7%)、甘草查尔酮 B (批号 PS011558, 纯度 ≥ 98.0%) 购自成都普思生物科技股份有限公司,甘草酸铵 (批号 110731-201720, 纯度 97.7%)、甘草苷 (批号 111610-201908, 纯度 95.0%) 购自中国食品药品检定研究院,芹糖甘草苷 (批号 PRF9050224, 纯度 98.0%) 购自成都普瑞法科技开发有限公司,乌头碱 (批号 23030417, 纯度 98.61%) 购自北京中科质检生物技术有限公司。黑顺片 (批号 230701), 四川江油鑫临附子药业有限公司; 炙甘草 (批号 C577230502), 河北鹤州药业有限公司; 黑顺片、炙甘草饮片由山东省中医药研究院靳光乾主任药师鉴定; 鼻敏胶囊 (批号: BMJN-01、BMJN-02、BMJN-03),

由本课题组制备;乙腈、甲醇、甲酸为质谱纯(Thermo Fisher);纯净水(超纯水机制备)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Acclaim™ RSLC 120 C₁₈ 型色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 2.2 μm),流动相为 0.05% 甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~7 min, 5%B → 12%B; 7~8 min, 12%B → 17%B; 8~11 min, 17%B → 22%B, 11~17 min, 22%B → 28%B; 17~17.5 min, 28%B → 32%B; 17.5~19 min, 32%B → 35%B; 19~21 min, 35%B → 65%B; 21~24 min, 65%B → 80%B),流速为 0.4 mL · min⁻¹,柱温为 30 °C,进样量为 3 μL。

2.2 质谱条件

离子源为电喷雾离子源(ESI),正负离子检测;多反应监测(MRM)模式;正离子模式毛细管电压为 3 500 V,负离子模式为 -3 000 V,毛细管温度 350 °C,汽化温度 320 °C,鞘气和辅助气均为氮气,鞘气流速为 40 arb,辅助气流速为 10 arb,质谱参数详见表 1。

2.3 对照品溶液的制备

取表 1 中的 22 个对照品适量,精密称定,加入乙腈制备乌头碱对照品储备液,其余各对照品储备液加入甲醇制备。各对照品质量浓度分别为原儿茶酸 107 μg · mL⁻¹、芹糖异甘草苷 82.5 μg · mL⁻¹、异甘草素 110 μg · mL⁻¹、柚皮素 114 μg · mL⁻¹、甘草素 101 μg · mL⁻¹、异甘草苷 109 μg · mL⁻¹、甘草香豆素 109 μg · mL⁻¹、甘草酸铵 110 μg · mL⁻¹、甘草苷 105 μg · mL⁻¹、夏佛塔苷 103 μg · mL⁻¹、甘草查尔酮 B 103 μg · mL⁻¹、刺甘草查尔酮 104 μg · mL⁻¹、芹糖甘草苷 82.5 μg · mL⁻¹、附子灵 115 μg · mL⁻¹、乌头原碱 145 μg · mL⁻¹、新乌头原碱 96 μg · mL⁻¹、苯甲酰新乌头原碱 194 μg · mL⁻¹、苯甲酰次乌头原碱 208 μg · mL⁻¹、苯甲酰乌头原碱 202 μg · mL⁻¹、新乌头碱 226 μg · mL⁻¹、次乌头碱 196 μg · mL⁻¹、乌头碱 180 μg · mL⁻¹。取甘草酸铵储备液用甲醇稀释至 100 μg · mL⁻¹,得单一对照品溶液,取原儿茶酸、异甘草素、柚皮素、甘草素、异甘草苷、甘草香豆素、甘草苷、甘草查尔酮 B、刺甘草查尔酮、夏佛塔苷、附子灵、乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、乌头碱的对照品储备液各 1 mL 至 25 mL 量瓶中,取新乌头原碱、新乌头碱次乌头碱、苯甲酰新乌头原碱的对照品储备液各 1 mL 至 10 mL 量瓶中,取芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷的对照品储备液各 1 mL 至 2 mL 量瓶中,分别加入甲醇定容,摇匀,得各混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取鼻敏胶囊内容物适量,研细,称取 0.1 g,精密

称定,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定,超声(250 W, 40 kHz)30 min,取出放冷再称定,用甲醇补足减失的量,摇匀,过 0.22 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 取“2.3”项下各混合对照品溶液、“2.4”项下供试品溶液以及空白溶剂(甲醇),在“2.1”项色谱条件和“2.2”项质谱条件下进样分析,供试品溶液中 22 个被测成分与对照品的保留时间相同。被测定成分分离效果良好,无其他干扰,比较各测定成分和对照品的色谱图,见图 1,供试品溶液与对照品溶液在相同保留时间出现相应色谱峰,且空白溶剂无干扰;单味药材阴性溶液对照色谱图见图 2。

2.5.2 线性关系与检测限、定量限 取“2.3”项下配制的单一对照品溶液及混合对照品储备液适量,逐级稀释,即得标准曲线各质量浓度点的系列对照品溶液。按照“2.1”项下色谱条件和“2.2”项下质谱条件进行测定,结果见表 2,22 个成分在各自的质量浓度范围内线性良好。

2.5.3 精密度试验 取“2.3”项下混合对照品溶液,在“2.1”项色谱条件和“2.2”项质谱条件下,连续进样 6 次测定峰面积,并计算 RSD,结果显示原儿茶酸、新乌头原碱、乌头原碱、附子灵、夏佛塔苷、甘草苷、芹糖甘草苷、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、芹糖异甘草苷、苯甲酰次乌头原碱、异甘草苷、甘草查尔酮 B、甘草素、新乌头碱、柚皮素、次乌头碱、乌头碱、刺甘草查尔酮、异甘草素、甘草酸铵和甘草香豆素峰面积的 RSD 分别为 0.32%、1.2%、0.51%、0.34%、0.66%、0.43%、0.29%、0.63%、0.18%、0.41%、0.91%、1.7%、0.33%、1.3%、1.2%、0.13%、1.7%、5.1%、0.28%、0.24%、1.8% 和 0.55%。

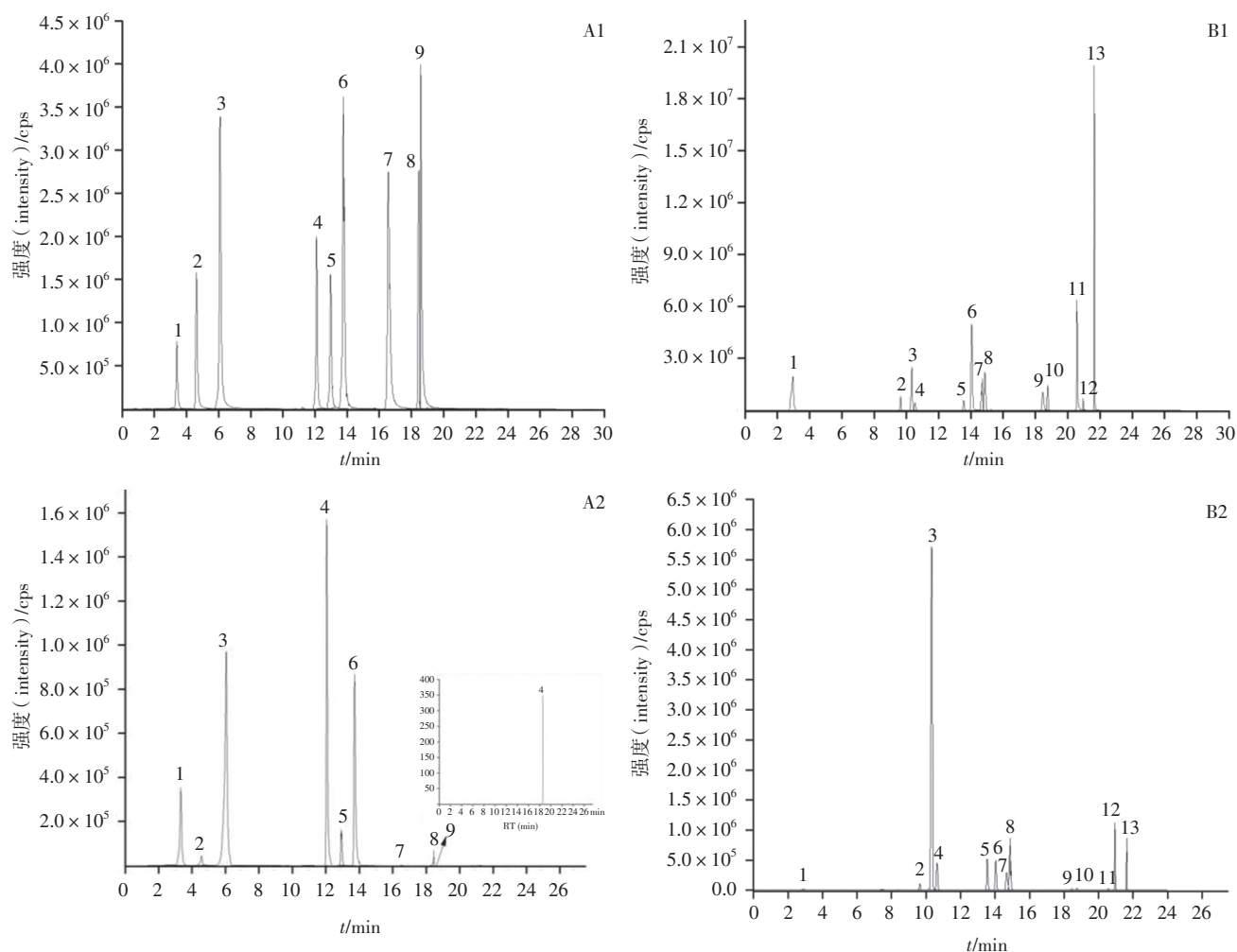
2.5.4 重复性试验 取 BMJN-01 样品,平行制备 6 份鼻敏胶囊供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件和“2.2”项下质谱条件进行测定,根据峰面积计算各成分含量,并计算 RSD。结果显示,原儿茶酸、新乌头原碱、乌头原碱、附子灵、夏佛塔苷、甘草苷、芹糖甘草苷、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、芹糖异甘草苷、苯甲酰次乌头原碱、异甘草苷、甘草查尔酮 B、甘草素、新乌头碱、柚皮素、次乌头碱、乌头碱、刺甘草查尔酮、异甘草素、甘草酸铵和甘草香豆素含量分别为 12.1、1024.0、86.9、711.2、117.0、225.4、1343.0、846.4、93.5、1057.3、171.3、11013.3、82.8、247.5、1.9、21.1、19.3、0.1、27.1、96.1、22352.7、35.9 μg · g⁻¹, RSD 分别为 2.4%、1.7%、1.8%、1.3%、2.0%、3.4%、0.61%、

表 1 各成分质谱参数

Tab. 1 Mass spectrum parameters for various constituents

峰号 (peak No.)	成分 (component)	t_R /min	m/z		碰撞能量 (collision energy)/eV
			母离子 (precuesor ion)	子离子 (product ion)	
1	原儿茶酸 (protocatechuic acid)	2.95	153.08[M-H] ⁻	109.07 [*] 91.03	14.35
2	新乌头原碱 (mesaconine)	3.37	486.34[M+H] ⁺	436.29 [*] 454.22	33.48
3	乌头原碱 (aconine)	4.62	500.33[M+H] ⁺	450.22 [*] 468.21	34.28
4	附子灵 (fuziline)	6.07	454.39[M+H] ⁺	436.29 [*] 404.29	31.96
5	夏佛塔苷 (schaftoside)	9.64	563.14[M-H] ⁻	353.23 [*] 383.50	34.95
6	甘草苷 (liquiritin)	10.33	417.12[M-H] ⁻	255.00 [*] 148.05	17.13
7	芹糖甘草苷 (liquiritin apioside)	10.60	549.21[M-H] ⁻	135.12 [*] 255.12	43.46
8	苯甲酰新乌头原碱 (benzoylmesaconine)	12.08	590.36[M+H] ⁺	540.29 [*] 105.07	34.65
9	苯甲酰乌头原碱 (benzoylaconine)	12.93	604.38[M+H] ⁺	554.29 [*] 105.05	36.09
10	芹糖异甘草苷 (isoliquiritin apioside)	13.53	549.22[M-H] ⁻	255.13 [*] 135.12	28.00
11	苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhypacoitine)	13.73	574.40[M+H] ⁺	542.22 [*] 510.23	33.31
12	异甘草苷 (isoliquiritoside)	14.03	417.20[M-H] ⁻	134.88 [*] 119.08	31.03
13	甘草查尔酮 B (licochalcone B)	14.68	285.06[M-H] ⁻	150.13 [*] 270.05	22.94
14	甘草素 (liquiritigenin)	14.86	255.09[M-H] ⁻	134.93 [*] 119.20	14.86
15	新乌头碱 (mesaconitine)	16.55	632.39[M+H] ⁺	572.29 [*] 354.20	32.59
16	柚皮素 (naringenin)	18.44	271.09[M-H] ⁻	151.20 [*] 119.08	17.3
17	次乌头碱 (hypaconitine)	18.46	616.37[M+H] ⁺	524.29 [*] 338.23	35.88
18	乌头碱 (aconitine)	18.57	646.46[M+H] ⁺	526.39 [*] 105.05	38.95
19	刺甘草查尔酮 (echinatin)	18.74	269.14[M-H] ⁻	237.14 [*] 175.35	17.59
20	异甘草素 (isoliquiritigenin)	20.56	255.06[M-H] ⁻	119.17 [*] 135.17	24.25
21	甘草酸铵 (glycyrrhizic acid ammonium salt)	20.96	821.47[M-H] ⁻	350.71 [*] 645.30	39.96
22	甘草香豆素 (glycoumarin)	21.64	367.25[M-H] ⁻	309.13 [*] 297.05	25.77

注 (note): * 为定量离子对 (*represents quantitative ion pairs)



A1、A2: 正离子模式下对照品、供试品色谱图 (Chromatograms of the reference substance and the test sample in positive ion mode): A. 1. 新乌头原碱 (mesaconitine) 2. 乌头原碱 (aconine) 3. 附子灵 (fuziline) 4. 苯甲酰新乌头原碱 (benzoylmesaconine) 5. 苯甲酰乌头原碱 (benzoylaconine) 6. 苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhypaconitine) 7. 新乌头碱 (mesaconine) 8. 次乌头碱 (hypaconitine) 9. 乌头碱 (aconitine)
 B1、B2: 负离子模式下对照品、供试品色谱图 (Chromatograms of the reference substance and the test sample in negative ion mode.): B. 1. 原儿茶酸 (protocatechuic acid) 2. 夏佛塔苷 (schaftoside) 3. 异甘草苷 (isoliquiritoside) 4. 芹糖甘草苷 (liquiritin apioside) 5. 芹糖异甘草苷 (liquiritin apioside) 6. 甘草苷 (liquiritin) 7. 甘草查尔酮 B (licochalcone B) 8. 甘草素 (liquiritigenin) 9. 柚皮素 (naringenin) 10. 刺甘草查尔酮 (echinatin) 11. 异甘草素 (isoliquiritigenin) 12. 甘草酸铵 (glycyrrhizic acid ammonium salt) 13. 甘草香豆素 (glycycomarin)

图1 正离子模式、负离子模式下对照品溶液及供试品溶液色谱图

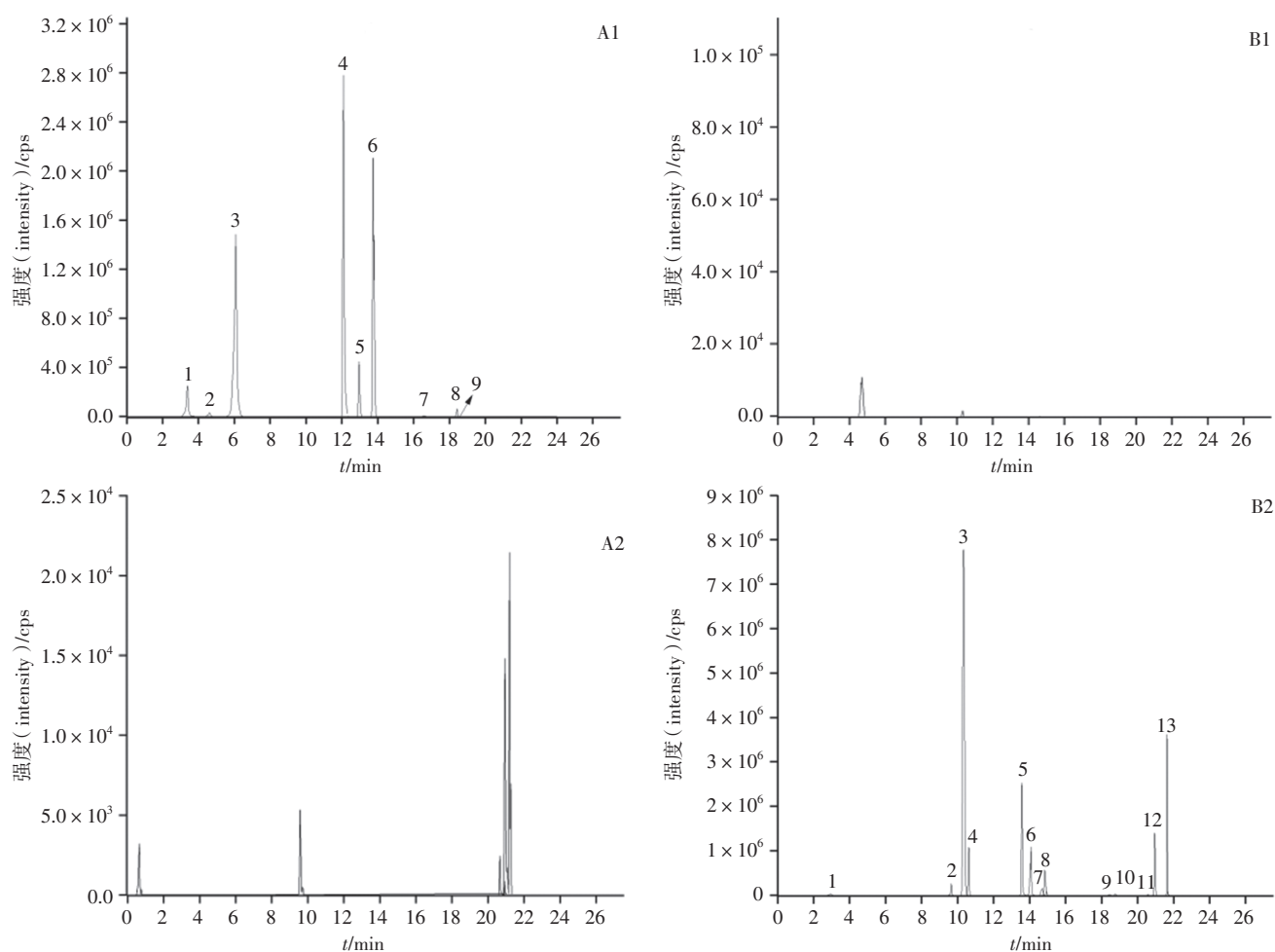
Fig. 1 The chromatograms of mixed control solution and sample solution in positive and negative ion modes

0.70%、1.7%、3.0%、1.3%、0.99%、1.6%、0.32%、1.1%、1.0%、1.4%、2.5%、2.3%、1.2%、0.65% 和 1.5%。

2.5.5 稳定性试验 取同一供试品溶液 (BMJN-01),按照“2.1”项下色谱条件和“2.2”项下质谱条件分别于 0、1、2、4、6、8、12、24 h 进样分析,计算得到各成分的 RSD。结果显示,原儿茶酸、新乌头原碱、乌头原碱、附子灵、夏佛塔苷、甘草苷、芹糖甘草苷、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、芹糖异甘草苷、苯甲酰次乌头原碱、异甘草苷、甘草查尔酮 B、甘草素、新乌头碱、柚皮素、次乌头碱、乌头碱、刺甘草查尔酮、

异甘草素、甘草酸铵和甘草香豆素峰面积的 RSD 分别为 1.4%、2.9%、0.99%、1.4%、1.4%、1.3%、1.5%、1.5%、0.93%、1.9%、1.3%、1.3%、2.1%、3.4%、3.5%、4.5%、4.1%、5.9%、1.7%、2.6%、2.9% 和 2.2%。

2.5.6 加样回收率试验 取含量已知的鼻敏胶囊 (BMJN-01) 0.05 g,研细,平行称定 6 份,加入含与所取胶囊粉末各成分含量大致相等的对照品溶液,按“2.4”项方法制备供试溶液,在“2.1”项色谱条件和“2.2”项质谱条件下进行测定,计算加样回收率及其 RSD。结果见表 3。



A. 缺甘草供试品: A1 正离子模式; A2 负离子模式 (A. Lack of test sample of Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle: A1 positive ion mode; A2 negative ion mode) A. 1. 新乌头原碱 (mesaconitine) 2. 乌头原碱 (aconine) 3. 附子灵 (fuziline) 4. 苯甲酰新乌头原碱 (benzoylmesaconine) 5. 苯甲酰乌头原碱 (benzoylaconine) 6. 苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhypaconitine) 7. 新乌头碱 (mesaconine) 8. 次乌头碱 (hypaconitine) 9. 乌头碱 (aconitine)
B. 缺黑顺片供试品: B1 正离子模式; B2 负离子模式 (B. Lack of test sample of Aconiti Lateralis Radix Praeparata: B1 positive ion mode; B2 negative ion mode) B. 1. 原儿茶酸 (protocatechuic acid) 2. 夏佛塔苷 (schaftoside) 3. 异甘草苷 (isoliquiritoside) 4. 芹糖甘草苷 (liquiritin apioside) 5. 芹糖异甘草苷 (liquiritin apioside) 6. 甘草苷 (liquiritin) 7. 甘草查尔酮 B (licochalcone B) 8. 甘草素 (liquiritigenin) 9. 柚皮素 (naringenin) 10. 刺甘草查尔酮 (echinatin) 11. 异甘草素 (isoliquiritigenin) 12. 甘草酸铵 (glycyrrhizic acid ammonium salt) 13. 甘草香豆素 (glycycomarin)

图2 正负离子模式下缺单味饮片色谱图

Fig. 2 The chromatograms of decoction pieces without single flavor in positive and negative ion modes

2.6 样品含量测定

按照“2.4”项下方法制备鼻敏胶囊供试品溶液,并按照“2.1”项下色谱条件和“2.2”项下质谱条件进样分析,计算各成分含量。结果如表4所示。

3 讨论

3.1 测定成分的选择

在进行测定成分选择时,首先将2020年版《中华人民共和国药典》一部^[15]中指标成分甘草苷、甘草酸铵、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、新乌头碱、次乌头碱、乌头碱纳入含量测

定范围。另根据前期基于UPLC-Q Exactive Orbitrap MS对鼻敏胶囊化学成分进行的全面分析以及结合相关文献检索,在摸索各待测成分含量的离子对后,最终确定22个成分作为待测成分,且22个成分在抗炎、抗过敏、舒张血管、抗氧化、镇痛、镇咳平喘、免疫调节等方面具有显著药理活性,这对于治疗变应性鼻炎具有良好的作用。

3.2 样品提取及分析条件的确定

本实验采用超声提取法,操作简便快速,增加溶剂渗透,加快了组分在溶剂中的溶解速度,提高了提

表 2 线性考察结果

Tab. 2 Linear investigation results

成分 (component)	线性方程 (calibration curve)	R^2	线性范围 (linear range)/(ng·mL ⁻¹)	LOD/(ng·mL ⁻¹)	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
原儿茶酸 (protocatechuic acid)	Y=3 846.6X+2 440.58	0.998 4	0.836~107.000	0.42	0.84
乌头原碱 (aconine)	Y=1 894.83X-3 421.13	0.999 8	2.266~580.000	2.00	2.27
附子灵 (fuziline)	Y=5 013.42X+151 083	0.999 7	0.898~11 500.000	0.20	0.40
夏佛塔苷 (schaftoside)	Y=841.439X+8 802.74	0.999 8	0.805~824.000	0.10	0.20
芹糖甘草苷 (liquiritin apioside)	Y=513.258X+41 761.9	0.999 8	1.259~20 625.000	0.08	0.66
甘草苷 (liquiritin)	Y=2 692.33X+304 991	0.999 0	0.820~15 120.000	0.05	0.10
苯甲酰新乌头原碱 (benzoylmesaconine)	Y=2 598.46X+118 732	0.999 7	1.516~15 520.000	0.10	0.65
苯甲酰乌头原碱 (benzoylaconine)	Y=2 921.6X-18 988.2	0.999 2	1.578~808.000	0.10	1.30
芹糖异甘草苷 (liquiritin apioside)	Y=590.585X+149 480	0.996 6	0.629~20 625.000	0.03	0.05
苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhypacoitine)	Y=7 094.16X-29 329.4	0.999 6	0.813~832.000	0.07	0.10
异甘草苷 (isoliquiritoside)	Y=799.768X+282 187	0.997 0	3.406~50 000.000	0.84	3.38
甘草查尔酮 B (licochalcone B)	Y=4 617X-34 914.4	0.998 3	1.609~824.000	0.41	0.82
甘草素 (liquiritigenin)	Y=2 954.64X+128 838	0.999 6	0.789~10 100.000	0.04	0.10
新乌头原碱 (mesaconine)	Y=1 011.8X+19543.8	0.999 1	4.688~4 800.000	0.59	4.69
柚皮素 (naringenin)	Y=1 987.61X-3 220.28	0.999 5	0.891~228.000	0.89	1.00
刺甘草查尔酮 (echinatin)	Y=2 187.57X+13 546.7	0.999 3	0.813~832.000	0.20	0.60
异甘草素 (isoliquiritigenin)	Y=196.887X+1 588.74	0.999 0	3.438~880.000	1.72	3.00
甘草酸铵 (glycyrrhizic acid ammonium salt)	Y=77.053 8X+57 785	0.999 2	1.526~100 000.000	0.04	0.07
甘草香豆素 (glycoumarin)	Y=16 175.7X+118 800	0.999 0	0.852~872.000	0.01	0.03
次乌头碱 (hypoconitine)	Y=3 198.98X-3 478.19	0.999 6	1.914~122.500	0.98	1.91
乌头碱 (aconitine)	Y=5 964.21X+1 801.04	0.999 5	0.220~112.500	0.12	0.15
新乌头碱 (mesaconitine)	Y=3 997.46X-3 954.52	0.999 7	1.379~88.281	0.50	1.38

表 3 加样回收率考察结果

Tab. 3 Dosing recovery results

成分 (component)	供试品含量 (content)/ng	加入量 (added)/ng	测得量 (measured)/ng	回收率 (recovery)/%	RSD/%
原儿茶酸 (protocatechuic acid)	571.96	575.53	1 151.12	100.6	2.0
乌头原碱 (aconine)	4 410.81	4 457.23	8 716.41	96.6	2.2
附子灵 (fuziline)	25 389.92	26 541.38	53 130.80	104.5	3.5
夏佛塔苷 (schaftoside)	6 716.19	7 020.19	14 049.37	104.5	1.8
芹糖甘草苷 (liquiritin apioside)	66 130.78	67 235.81	134 682.62	102.0	1.5
甘草苷 (liquiritin)	12 310.20	12 919.68	25 841.70	104.7	0.93
苯甲酰新乌头原碱 (benzoylmesaconine)	41 534.14	42 318.52	84 210.62	100.9	1.2
苯甲酰乌头原碱 (benzoylaconine)	4 080.28	3 912.23	7 828.15	95.8	3.7
芹糖异甘草苷 (liquiritin apioside)	48 994.81	51 517.81	101 902.48	102.7	3.9
苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhypacoitine)	8 400.11	8 258.43	16 518.77	98.3	2.8
异甘草苷 (isoliquiritoside)	564 325.23	565 085.98	1 131 515.91	100.4	0.34
甘草查尔酮 B (licochalcone B)	3 711.19	3 604.76	7 237.86	97.8	1.2
甘草素 (liquiritigenin)	12121.18	12 815.10	24 876.02	99.5	4.1
新乌头原碱 (mesaconine)	50 745.01	50 970.72	100 699.40	98.0	1.3
柚皮素 (naringenin)	1 116.64	1 112.43	2 225.34	99.7	3.2
刺甘草查尔酮 (echinatin)	1 220.01	1 334.64	2 613.45	104.41	1.4
异甘草素 (isoliquiritigenin)	4 317.07	4 499.58	9 002.23	104.1	4.7
甘草酸铵 (glycyrrhizic acid ammonium salt)	1 121 932.11	1 107 179.84	2 207 107.68	98.0	1.7
甘草香豆素 (glycoumarin)	1 742.68	1 772.45	3 576.25	103.5	1.5
次乌头碱 (hypoconitine)	1 005.49	983.41	1 966.96	97.8	0.54
乌头碱 (aconitine)	4.35	8.75	13.52	104.8	2.6
新乌头碱 (mesaconitine)	94.71	90.66	185.29	99.9	1.9

表 4 3 批鼻敏胶囊中 22 个成分的含量 ($n=2$)

Tab. 4 The content of 22 components in the three batches of Bimin capsules

成分 (component)	含量 (content) ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)			来源 (source)
	BMJN-01	BMJN-02	BMJN-03	
原儿茶酸 (protocatechuic acid)	12.46	14.89	14.26	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
乌头原碱 (aconine)	85.39	98.16	89.23	黑顺片 (Aconiti Lateralis Radix Praeparata)
附子灵 (fuziline)	720.79	814.85	726.81	黑顺片 (Aconiti Lateralis Radix Praeparata)
夏佛塔苷 (schafotoside)	99.96	107.18	109.87	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
芹糖甘草苷 (liquiritin apioside)	1 196.38	1 451.22	1 378.40	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
甘草苷 (liquiritin)	242.68	243.75	239.15	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
苯甲酰新乌头原碱 (benzoylmesaconine)	781.22	807.33	820.72	黑顺片 (Aconiti Lateralis Radix Praeparata)
苯甲酰乌头原碱 (benzoylaconine)	80.68	128.85	106.77	黑顺片 (Aconiti Lateralis Radix Praeparata)
芹糖异甘草苷 (liquiritin apioside)	1 016.17	1 005.44	994.46	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
苯甲酰次乌头原碱 (benzoylhypaconitine)	175.90	172.53	139.29	黑顺片 (Aconiti Lateralis Radix Praeparata)
异甘草苷 (isoliquiritoside)	10 138.70	11 480.29	11 527.48	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
甘草查尔酮 B (licochalcone B)	78.09	84.00	69.78	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
甘草素 (liquiritigenin)	243.61	192.18	221.41	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
新乌头原碱 (mesaconine)	1 049.27	1 090.95	997.83	黑顺片 (Aconiti Lateralis Radix Praeparata)
柚皮素 (naringenin)	27.87	23.65	30.71	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
刺甘草查尔酮 (echinatin)	26.50	27.99	30.47	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
异甘草素 (isoliquiritigenin)	92.20	91.69	61.97	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
甘草酸铵 (glycyrrhizic acid ammonium salt)	22 442.44	22 877.03	23 505.37	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
甘草香豆素 (glycoumarin)	36.58	68.27	73.21	炙甘草 (Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma Praeparata Cum Melle)
次乌头碱 (hypaconitine)	19.64	20.17	22.97	黑顺片 (Aconiti Lateralis Radix Praeparata)
乌头碱 (aconitine)	0.06	0.06	0.07	黑顺片 (Aconiti Lateralis Radix Praeparata)
新乌头碱 (mesaconitine)	1.71	2.04	2.38	黑顺片 (Aconiti Lateralis Radix Praeparata)

取效率^[16]。本方由黑顺片及炙甘草组成,成分大多为黄酮类、二萜类及生物碱类成分,综合考虑上述待测成分的溶解性,对提取溶剂(70% 甲醇水、甲醇)、样品的称样量(0.1、0.3 g)进行考察,确定最优提取条件为 0.1 g 鼻敏胶囊粉末加入 25 mL 甲醇超声(250 W, 40 kHz)提取 30 min;考察了不同体积分数的甲酸(0.1% 甲酸水-乙腈、0.05% 甲酸水-乙腈)对分离效果的影响,发现后者洗脱时各成分色谱峰响应提高,峰形更对称;考察了体积流量(0.3、0.4 mL·min⁻¹)、柱温(25、30、35 °C),发现在 0.4 mL·min⁻¹、30 °C 下洗脱时间短,各成分色谱峰峰形良好。经查阅文献及 UPLC-Q Exactive Orbitrap MS 分析结果,甘草中的化学成分在正、负离子模式下均有响应^[17-20],黑顺片中化学成分在正离子模式下响应较好^[21-22],故采用正负离子同时检测。

3.3 限度及含量范围

黑顺片中双酯型生物碱为限量检查成分。考虑到乌头碱口服 0.2 mg 即可发生中毒反应^[23],3 批鼻敏胶囊样品中双酯型生物碱新乌头碱、乌头碱、次乌头碱的每粒含量分别为 8.56、8.90、10.16 μg ,3 批鼻敏胶囊样品中双酯型生物碱的日服用量范围为

77.08~91.51 μg ,低于 0.2 mg,表明在该剂量下常规用药合理、安全。3 批鼻敏胶囊中苯甲酰乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱每粒含量分别为 415.12、443.48、426.71 μg ,每粒含量范围在 415.12~443.48 μg ,含量较为稳定,可以为鼻敏胶囊质量标准的完善提供参考。

4 结论

本实验建立了 UPLC-MS/MS 法同时测定鼻敏胶囊中苯甲酰乌头原碱、苯甲酰新乌头原碱、苯甲酰次乌头原碱、次乌头碱、新乌头碱、异甘草素、刺甘草查尔酮、原儿茶酸、甘草素、附子灵、乌头碱、乌头原碱、新乌头原碱、异甘草苷、甘草香豆素、柚皮素、夏佛塔苷、甘草查尔酮 B、甘草酸铵、甘草苷、芹糖甘草苷、芹糖异甘草苷共 22 个成分的含量,可为该制剂质量控制提供理论依据。

参考文献

- [1] 部环宇. “苦-火”与相关脏腑探析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(11): 1696
- [2] BU HY. Analysis of “Bitter-fire” and Related Viscera[J]. Chin J Basic Med, 2021, 27(11): 1696
- [2] 刘朋,滕晶. 从“经气运行”角度解析四逆汤治疗寒郁性“思”志

- 病[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(6): 1403
LIU P, TENG J. From the perspective of “meridian and qi operation”, the four reverse decoction is analyzed for the treatment of cold and depressed “thinking” disease[J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2022, 33(6): 1403
- [3] 苗家燕, 罗赣, 高晓燕, 等. 经典名方当归四逆汤物质基准的关键质量属性研究[J]. 分析测试学报, 2021, 40(5): 740
MIAO JY, LUO G, GAO XY, *et al.* Research on critical quality attributes of substance benchmarks for classical prescription Danggui Sini decoction[J]. *J Instrum Anal*, 2021, 40(5): 740
- [4] 文愈龙, 刘毅. “脏腑-膜原(玄府)-眼目”气血输布轴探讨[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(11): 6818
WEN YL, LIU Y. Discussion on the axis of qi blood transport in “Zang fu organs-sweat pore(membrane source)-eye”[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(11): 6818
- [5] 熊秋韵, 李梦婷, 缪璐琳, 等. 附子不同炮制品抗炎、镇痛和提高免疫功能作用的比较研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(1): 123
XIONG QY, LI MT, MIAO LL, *et al.* Comparative study of different processed products of Aconiti Lateralis Radix Praeparata on effects of anti-inflammation, analgesia and enhancing immune function[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, 2017, 33(1): 123
- [6] 蓝鲜艳, 周畅均, 毛敏, 等. 附子不同炮制品的相关差异及临床合理选用探讨[J]. 中成药, 2021, 43(4): 994
LAN XY, ZHOU CD, MAO M, *et al.* Discussion on the relevant differences of different aconite products and their rational clinical selection[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(4): 994
- [7] WANG H, QI XZ, JIA W, *et al.* The immunoregulatory effect of aconite treatment on H22 tumor-bearing mice via modulating adaptive immunity and natural killer-related immunity[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2023, 2023: 1481114
- [8] 何俊辰, 王绍瑜, 王中江, 等. 单味中药抗 I 型变态反应研究进展[J]. 中成药, 2021, 43(5): 1259
HE JC, WANG SY, WANG ZJ, *et al.* Research progress on the anti-type I allergy reaction of single herbs[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(5): 1259
- [9] WEI X, ZHANG B, LIANG X, *et al.* Higenamine alleviates allergic rhinitis by activating AKT1 and suppressing the EGFR/JAK2/c-JUN signaling[J]. *Phytomedicine*, 2021, 86: 153565
- [10] CHANG GH, LIN YS, HSU KH, *et al.* Nasal irrigation with *Glycyrrhiza glabra* extract for treatment of allergic rhinitis—A study of *in vitro*, *in vivo* and clinical trial[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114116
- [11] LI H, GUO D, ZHANG L, FENG X. Glycyrrhizin attenuates histamine-mediated MUC5AC upregulation, inflammatory cytokine production, and aquaporin 5 downregulation through suppressing the NF- κ B pathway in human nasal epithelial cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 285: 21
- [12] 曹春琪, 孙慧珠, 赵振霞, 等. 基于 UHPLC-MS/MS 技术的导赤丸中 24 个成分定量测定联合化学计量学质量评价[J]. 中草药, 2023, 54(21): 7034
CAO CQ, SUN HZ, ZHAO ZX, *et al.* Quantitative determination of 24 components in Daochi pills based on UHPLC-MS/MS technology combined with chemometrics quality evaluation[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(21): 7034
- [13] 白桦芳, 针涛, 王宏进, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定归脾丸中 14 种成分[J]. 中成药, 2023, 45(7): 2138
BAI HF, ZHEN T, WANG HJ, *et al.* Simultaneous determination of fourteen constituents in Guipi pills by UPLC-ESI-MS/MS[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2023, 45(7): 2138
- [14] 关皎, 王悦, 廖宇, 等. UFLC-MS/MS 法同时测定黄芪建中汤中 6 个活性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(1): 133
GUAN J, WANG Y, LIAO Y, *et al.* Simultaneous determination of six active components in Huangqi Jianzhong decoction by UPLC-MS/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2022, 42(1): 133
- [15] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 191
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 191
- [16] WANG GH, HUANG CT, HUANG HJ, *et al.* Biological activities of *Citrus aurantium* leaf extract by optimized ultrasound-assisted extraction[J]. *Molecules*, 2023, 28(21): 7251
- [17] 麻景梅, 姜晓娅, 麻朝朝, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定经典名方实脾散中 20 个化学成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(3): 429
MA JM, JIANG XY, MA ZZ, *et al.* Simultaneous determination of twenty chemical components in Shipi powder by UPLC-MS/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(3): 429
- [18] 孙慧珠, 王晓蕾, 刘永利. UPLC/MS/MS 法同时测定肾衰宁胶囊中 9 种成分及一致性分析[J]. 中成药, 2023, 45(1): 29
SUN HZ, WANG XL, LIU YL. Simultaneous determination of nine constituents in Shenshuining capsules by UPLC/MS/MS and consistency analysis[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2023, 45(1): 29
- [19] 陈会朋, 王银, 余惠旻, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术分析加味左金丸化学成分及指纹图谱研究[J]. 中草药, 2023, 54(14): 4442
CHEN HP, WANG Y, YU HW, *et al.* Chemical components and chromatographic fingerprints of Jiawei Zuojin pill based on UPLC-Q-TOF/MS[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(14): 4442
- [20] 姜奇瑶, 刘臣臣, 陈惠玲, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 和 UPLC 的六君子汤化学成分定性定量分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(6): 169
JIANG QY, LIU CC, CHEN HL, *et al.* Qualitative and quantitative analysis of chemical constituents in Liu Junzitang by UPLC-Q-TOF-MS/MS and UPLC[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(6): 169
- [21] 代珊, 朱红梅, 李帅, 等. UPLC-MS/MS 法测定不同附子炮制品中 14 种生物碱[J]. 中成药, 2022, 44(4): 1198
DAI S, ZHU HM, LI S, *et al.* Determination of fourteen alkaloids in different processed products of Aconiti Lateralis Radix Praeparata by UPLC-MS/MS[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(4): 1198
- [22] 田萍, 马开, 张薇, 等. UPLC-MS/MS 同时测定真武汤中 16 个成分的含量[J]. 中药材, 2022, 45(1): 1448
TIAN P, MA K, ZHANG W, *et al.* UPLC-MS/MS simultaneously determined the content of 16 components in Zhenwu decoction[J]. *J Chin Med Mater*, 2022, 45(1): 1448
- [23] ZHOU W, LIU H, QIU LZ, *et al.* Cardiac efficacy and toxicity of aconitine: a new frontier for the ancient poison[J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(3): 1798

(本文于 2024 年 6 月 14 日收到)