

亲水作用色谱-串联质谱法同时测定瓜蒌皮注射液中35种化合物

陶 香^{1,2}, 张静娴^{2*}, 胡 青², 孙 健², 董 莹³, 丁金国³, 于 泓²,
沈盈盈², 毛秀红², 季 申^{1,2*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市食品药品检验研究院, 上海 201203;
3. 上海第一生化药业有限公司, 上海 200240)

摘要: 采用亲水作用色谱-串联质谱的动态多重反应监测模式建立瓜蒌皮注射液中35种化合物的同时定量分析方法。采用ACQUITY XBridge Amide色谱柱分离, 以20 mmol·L⁻¹甲酸铵水溶液(pH 3.0)为流动相A, 20 mmol·L⁻¹甲酸铵溶液(pH 3.0):乙腈(1:9)混合溶液为流动相B, 进行梯度洗脱, 采用外标法定量。结果表明, 35种化合物在各自浓度范围内具有良好的线性关系, 相关系数(R^2) > 0.998 0, 方法回收率范围为77.6%~118.5%。采用建立好的方法测定了10批样品, 结果表明瓜蒌皮注射液中 γ -氨基丁酸、葫芦巴碱、丙氨酸、苏氨酸、高丝氨酸、瓜氨酸、亮氨酸等成分含量较高, 而烟酰胺、甲基琥珀酸、胞嘧啶、胆碱等成分含量较低。本研究为瓜蒌皮注射液的药效物质基础和质量标准提升研究提供了重要参考。

关键词: 瓜蒌皮注射液; 亲水作用色谱串联质谱; 动态多重反应监测; 多指标定量分析
中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)05-1293-08

Simultaneously quantitative analysis of 35 components in gualoupi injection using hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry

TAO Xiang^{1,2}, ZHANG Jing-xian^{2*}, HU Qing², SUN Jian², DONG Ying³, DING Jin-guo³,
YU Hong², SHEN Ying-ying², MAO Xiu-hong², JI Shen^{1,2*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China; 3. SPH No.1 Biochemical & Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200240, China)

Abstract: A hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry method was developed for simultaneous quantification of 35 components in gualoupi injection. The analytes were separated with an ACQUITY XBridge Amide column using 20 mmol·L⁻¹ ammonium formate aqueous solution (pH 3.0) as mobile phase A and 20 mmol·L⁻¹ ammonium formate (pH 3.0): acetonitrile (1:9) as mobile phase B for gradient elution. Mass spectrometry with dynamic multiple reaction monitoring and external standard method were used for quantitative analysis. A total of 35 components were determined in 10 batches of gualoupi injection. The results showed that the 35 compounds had a good linear relationship within their respective concentration ranges with the correlation coefficients ($R^2 > 0.998 0$), the recoveries ranged from 76.6% to 118.5%. The results showed that γ -aminobutyric acid, trigonelline, alanine, threonine, homoserine, citrulline, and leucine were abundant in gualoupi injection, while nicotinamide, methylsuccinic acid, cytosine and choline account for a low percentage. The present study provides

收稿日期: 2022-10-21; 修回日期: 2023-01-15.

基金项目: 上海市中药和保健食品品质与安全检测专业技术服务平台(21DZ2290200); 上海市人才发展资金(2021085).

*通讯作者 Tel: 86-21-50798195, E-mail: jishen2013@163.com;

Tel: 86-21-38839900-26126, E-mail: zhjx_2003@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1123

an important reference for elucidation of the effective material basis and the improvement of quality standard of gualoupi injection.

Key words: gualoupi injection; hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry; dynamic multiple reaction monitoring; multi-component quantification

瓜蒌皮为葫芦科栝楼属植物栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim.) 或双边栝楼 (*Trichosanthes rosthornii* Harms) 的干燥成熟果皮, 具有清热化痰、利气宽胸的传统功效, 主要用于治疗痰热咳嗽、胸闷肋痛等症^[1]。瓜蒌皮注射液是以瓜蒌皮 (来源栝楼) 为原料, 经水提醇沉, 再经过离子交换树脂洗脱而制成的灭菌水溶液, 具有改善心肌缺血、抗血栓、抗氧化、降低胆固醇、抗动脉粥样硬化等药理作用, 临床上用于冠心病、稳定型心绞痛的治疗, 具有行气除满、开胸除痹之功效^[2-6]。

瓜蒌皮化学成分丰富, 文献^[7-15]报道有核苷、氨基酸、黄酮、生物碱等含氮类化合物, 萜类以及甾醇及脂肪酸等。瓜蒌皮经水提醇沉, 经过 732 型阳离子交换树脂等工艺制备瓜蒌皮注射液, 其中的大分子物质多糖、蛋白质, 以及黄酮、萜类、脂肪酸等脂溶性成分均已去除, 而氨基酸、核苷、生物碱等碱性和两性化合物得到富集。本课题组前期采用 HILIC/Orbitrap Fusion Lumos HRMS 从瓜蒌皮注射液中鉴定了 48 个成分, 包括 24 个生物碱、17 个氨基酸、7 个核苷类^[16]。文献^[17]报道采用 UPLC/ESI-QTOF-MS 方法鉴定了瓜蒌皮注射液中 19 个成分, 主要为氨基酸和核苷类。

国家食品药品监督管理局国家药品标准 WS-11417 (ZD-1417)-2002-2008 中规定瓜蒌皮注射液含量测定项以精氨酸为对照品, 采用紫外分光光度法测定总氨基酸的含量^[18], 未对其他类型成分进行控制, 尚未达到《中药注射剂安全性再评价质量控制评价技术原则 (试行)》中中药注射剂中所测各类成分之和应大于总固体的 80% 的有关要求。文献^[19]报道采用 HPLC-MS/MS 法测定瓜蒌皮注射液中腺苷和唾液酸的含量, 一测多评法同时测定瓜蒌皮注射液中 6 种有效成分含量, 包括 3,29-二苯甲酰基栝楼仁三醇、3,29-二苯甲酰基栝楼仁二醇、香草酸、腺苷、槲皮苷和木犀草苷^[20]。尚缺乏对瓜蒌皮注射液中主要成分的全面定量分析。

本研究在对瓜蒌皮注射液化学成分充分定性分析的基础上, 结合文献报道, 筛选出量丰成分, 采用亲水作用色谱-三重四级杆质谱法的动态多重反应监测模式建立了一种同时测定注射液中 35 种成分的测定方法, 方法专属性强、灵敏度高, 对于阐明注射液的药效物质基础和质量标准提高具有重要的指导意义。

材料与方法

仪器 1290 高效液相色谱仪和 6495 三重四极杆质谱仪 (QQQ-MS, 美国 Agilent 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); 电子分析天平 (德国赛多利斯科学仪器有限公司)。

试剂与样品 氨基酸对照品 (批号: 140624-201506, 包括天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、精氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸、脯氨酸、丙氨酸、赖氨酸)、瓜氨酸 (110875-201607)、 γ -氨基丁酸 (100482-201601)、烟酸 (100434-201102)、水苏碱 (110712-201916)、甜菜碱 (110894-202105)、烟酰胺 (100115-200302)、腺嘌呤 (886-200001)、葫芦巴碱 (110883-202105)、尿苷 (110887-202104)、次黄嘌呤 (140661-202005)、鸟嘌呤 (140631-202008) 购自中国食品药品检定研究院; 高丝氨酸购自上海麦克林生化科技有限公司; 胞嘧啶购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 氯化胆碱、胞苷、肉碱盐酸盐、乙酰精氨酸、4-胍基丁酸、乙腈 (质谱纯)、甲酸和甲酸铵 (均为色谱纯) 购自德国 Merck 公司; 高脯氨酸、琥珀酸和甲基琥珀酸均购自加拿大 TRC 试剂公司, 以上对照品纯度均 $\geq 98\%$ 。

样品 10 批瓜蒌皮注射液, 批号 2101201 (编号 S1)、2101205 (S2)、2103204 (S3)、2112209 (S4)、2205201 (S5)、2205202 (S6)、2205203 (S7)、2206201 (S8)、2206202 (S9)、2206203 (S10), 规格均为 4 mL/支, 均由上海第一生化药业有限公司生产。

对照品溶液的制备 根据各成分在注射液中的含量不同, 将对照品分为四组, 分别精密称取组 1 对照品 (包括酪氨酸、丙氨酸、高丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸、丝氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、烟酸、胞苷) 各 10 mg 至同一 50 mL 量瓶中。分别精密称取组 2 对照品 (包括琥珀酸、次黄嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿苷、乙酰精氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、 γ -氨基丁酸、脯氨酸、瓜氨酸、精氨酸) 各 10 mg 至同一 25 mL 量瓶中, 用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液溶解, 稀释至刻度, 制成每 1 mL 含 0.4 mg 的对照品储备液 2。分别精密称取组 3 对照品 (包括烟酰胺、高脯氨酸、葫芦巴碱、4-胍基丁酸、2-甲基琥珀酸、胆碱、水苏碱、甜菜碱、腺嘌呤) 各 10 mg 至同一 50 mL 量瓶中, 用 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液溶解, 稀

释至刻度,制成每1 mL含0.2 mg的对照品储备液3。精密称取组4对照品(肉碱)1 mg至50 mL量瓶中,用0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液溶解,稀释至刻度,制成每1 mL含0.02 mg的对照品储备液4。分别精密量取对照品储备液2、3和4各5、1、1 mL至组1对照品的50 mL量瓶中,加0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液溶解,稀释至刻度,得混合对照品储备液A(组1各对照品为200 μg·mL⁻¹,组2为40 μg·mL⁻¹,组3为4 μg·mL⁻¹,组4为0.4 μg·mL⁻¹),精密量取混合对照品储备液A 2.5 mL至25 mL量瓶中得混合对照品储备液B(组1各对照品为20 μg·mL⁻¹,组2为4 μg·mL⁻¹,组3为0.4 μg·mL⁻¹,组4为0.04 μg·mL⁻¹)。

分别精密量取混合对照品储备液A和B,用50%乙腈稀释配制系列混合对照品工作液(组1为0.5~100 μg·mL⁻¹,组2为0.1~20 μg·mL⁻¹,组3为0.01~2 μg·mL⁻¹,组4为0.001 6~0.04 μg·mL⁻¹)。

供试品溶液的制备 由于瓜蒌皮注射液中成分复杂,且不同化合物含量差异较大,且大多数生物碱类化

合物在质谱上具有较好的响应强度,而氨基酸类化合物质谱响应较生物碱类化合物响应低,为了使不同类别的化合物在质谱上均具有合适的响应强度,根据各成分在注射液中的含量不同,制备了两个浓度水平的供试品溶液。精密量取瓜蒌皮注射液5 mL至10 mL量瓶,用乙腈定容至刻度,即得供试品溶液1(用于测定化合物1~17,编号见表1);精密量取瓜蒌皮注射液0.1 mL至25 mL量瓶,用乙腈定容至刻度,即得供试品溶液2(化合物18~35,见表1)。

色谱条件 ACQUITY XBridge Amide 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm);柱温 25 °C;流速 0.4 mL·min⁻¹;进样量 1 μL;流动相 A 为 20 mmol·L⁻¹ 甲酸铵水溶液(pH 3.0), B 为 20 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液(pH 3.0)-乙腈(1:9)混合溶液。梯度洗脱程序: 0~4 min, 98%~97% B; 4~20 min, 97%~85% B; 20~30 min, 85%~60% B。

质谱条件 电喷雾离子源(ESI), 动态多重反应

Table 1 MS parameters of 35 analytes. *Quantitative ion

No.	Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	<i>t_r</i> /min	Δ <i>t_r</i> /min	Collision energy/eV	Polarity
1	Nicotinamide	123.0	80.1*, 96.1	1.0	3	20, 16	Positive
2	Methylsuccinic acid	131.0	87.1*, 113.0	1.2	3	12, 8	Negative
3	Succinic acid	117.0	73.1*, 99.1	1.3	3	12, 8	Negative
4	Hypoxanthine	137.0	67.2*, 94.3	1.9	3	32, 24	Positive
5	Cytosine	112.0	95.1*, 67.1	2.6	2	20, 16	Positive
6	Guanine	152.0	135.1*, 110.1	3.0	3	21, 21	Positive
7	Uridine	245.0	112.8*, 96.1	4.1	3	9, 41	Positive
8	Tyrosine	182.1	136.1*, 91.1	6.5	3	13, 33	Positive
9	Alanine	90.0	44.2*, 45.3	10.5	3	9, 40	Positive
10	Homoserine	120.0	74.1*, 56.1	12.0	3	9, 21	Positive
11	Threonine	120.1	74.1*, 56.1	11.5	3	8, 20	Positive
12	Acetylarginine	217.1	158.0*, 115.1	11.0	3	20, 16	Positive
13	Glycine	76.0	76.0*, 30.3	12.0	3	0, 12	Positive
14	Serine	106.1	88.1*, 42.2	13.5	3	8, 24	Positive
15	Gutamic acid	148.0	84.1*, 130.0	15.2	3	17, 5	Positive
16	Aspartic acid	134.0	88.1*, 74.1	18.5	3	9, 13	Positive
17	Lysine	147.1	84.1*, 130.1	21.0	5	17, 9	Positive
18	Adenine	136.0	119.1*, 94.0	1.8	3	29, 33	Positive
19	Nicotinic acid	124.0	80.1*, 96.1	1.9	3	24, 20	Positive
20	Choline	104.1	60.1*, 58.1	2.5	3	20, 32	Positive
21	4-Guanidinobutyric acid acid	146.1	86.0*, 69.1	3.9	5	29, 21	Positive
22	Phenylalanine	166.1	120.1*, 103.0	4.0	3	13, 29	Positive
23	Cytidine	244.1	112.1*, 95.1	3.8	3	12, 56	Positive
24	Leucine	132.1	86.1*, 30.2	4.1	3	9, 17	Positive
25	Stachydrine	144.1	58.1*, 84.1	4.7	3	36, 24	Positive
26	Isoleucine	132.1	86.1*, 44.2	4.6	3	8, 25	Positive
27	Betaine	118.1	58.1*, 59.1	5.0	3	10, 10	Positive
28	Trigonelline	138.1	94.1*, 120.1	5.6	3	5, 5	Positive
29	Valine	118.0	72.1*, 55.1	6.6	3	9, 25	Positive
30	γ-Aminobutyric acid butyric acid	104.0	87.1*, 69.2	6.6	5	8, 16	Positive
31	Proline	116.0	70.1*, 43.3	6.9	3	17, 36	Positive
32	Carnitine	162.1	60.1*, 102.1	6.8	3	20, 16	Positive
33	Pipecolic acid	130.1	84.1*, 56.1	6.9	3	15, 15	Positive
34	Citrulline	176.1	70.1*, 159.1	14.2	3	25, 9	Positive
35	Arginine	175.1	70.1*, 60.1	17.9	5	24, 12	Positive

监测模式 (DMRM); 干燥器温度 200 °C, 气体流速 13.0 L·min⁻¹, 雾化器 35 psi, 鞘气流速 12 L·min⁻¹, 碎裂电压 380 V。优化后的其他质谱参数详见表 1。

方法学验证

线性关系与范围 以待测物提取的定量离子流峰面积 y 为纵坐标, 对照品浓度 x ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 进行线性回归分析, 计算相关系数。

精密度 取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 计算峰面积的相对标准偏差 (RSD), 来考察仪器的精密度。

重复性 按照两组供试品溶液的制备方法平行制备 6 份供试品溶液 (S2), 进样分析。以样品中各成分含量的 RSD 来考察供试品制备方法的重复性。

稳定性 分别取重复性实验中的两组供试品溶液, 室温放置, 分别于 0、2、4、8、12 和 24 h 进样测定, 以各成分峰面积 RSD 考察供试品溶液 1 和 2 的稳定性。

加样回收率 精密移取注射液 (S2) 2.5 mL, 平行 6 份, 分别加入含量相当的对照品 (1~17) 混合溶液,

按供试品制备方法制备供试品溶液 1 的加样用供试品溶液; 精密移取注射液 (S2) 0.05 mL, 平行 6 份, 分别加入含量相当的对照品 (18~35) 混合溶液, 按供试品制备方法制备供试品溶液 2 的加样用供试品溶液, 进样测定, 计算回收率, 以考察方法的准确性。

结果

1 方法学验证

1.1 线性关系与范围 35 种化合物在各自范围内线性关系良好, 相关系数 (R^2) 均大于 0.998 0, 结果见表 2。

1.2 精密度 35 种化合物的 RSD 均小于 7%, 表明方法的精密度良好, 结果见表 2。

1.3 重复性 供试品溶液 1 中, 6 份样品各成分 (17 个化合物) 含量的 RSD 均小于 8%; 供试品溶液 2 中, 6 份样品各成分 (18 个化合物) 含量的 RSD 均小于 5%, 结果见表 2, 表明方法重复性较好。

1.4 稳定性 供试品溶液 1 中, 除了烟酰胺、胞嘧啶、

Table 2 The regression equation, correlation coefficients (R^2), linear ranges, precisions, repeatability, stability, and recoveries of the 35 analytes. $n = 6$

Compound	Regression equation	R^2	Linear range / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Precision /%	Repeatability /%	Stability /%	Recovery/%	
							Average	RSD
Nicotinamide	$y = 7.170 \times 10^7 x - 5.276 \times 10^6$	0.999 2	0.01-0.44	3.05	2.85	14.77	80.0	4.56
Methylsuccinic acid	$y = 4.794 \times 10^5 x + 4.000 \times 10^4$	0.999 1	0.11-2.25	14.31	7.78	4.76	116.1	7.14
Succinic acid	$y = 8.883 \times 10^4 x + 6.196 \times 10^5$	0.999 5	2.89-57.80	11.34	6.86	3.32	98.9	5.71
Hypoxanthine	$y = 7.746 \times 10^3 x + 1.487 \times 10^5$	0.999 4	0.26-5.20	6.03	2.37	4.96	78.1	4.34
Cytosine	$y = 1.702 \times 10^7 x - 2.262 \times 10^6$	0.999 9	0.16-3.27	6.28	4.43	12.25	107.8	3.25
Guanine	$y = 1.490 \times 10^7 x - 2.654 \times 10^6$	0.999 7	0.12-4.60	5.10	4.93	14.34	106.9	3.34
Uridine	$y = 1.088 \times 10^6 x - 2.871 \times 10^5$	0.999 1	0.24-4.86	3.78	3.54	6.87	83.1	5.11
Tyrosine	$y = 1.147 \times 10^6 x - 1.248 \times 10^4$	0.999 9	0.65-13.09	4.19	6.95	4.04	106.1	1.83
Alanine	$y = 4.232 \times 10^5 x - 4.073 \times 10^5$	0.999 2	6.90-275.80	2.51	2.46	2.99	94.8	2.37
Homoserine	$y = 9.856 \times 10^5 x - 3.342 \times 10^7$	0.999 6	5.40-107.90	4.35	4.45	9.34	98.8	2.58
Threonine	$y = 4.749 \times 10^3 x - 7.177 \times 10^5$	0.998 8	10.72-214.40	3.44	4.06	5.35	90.2	1.18
Acetylgarginine	$y = 2.762 \times 10^7 x - 3.600 \times 10^7$	0.998 3	0.31-6.18	1.45	3.09	4.02	84.3	0.64
Glycine	$y = 8.096 \times 10^4 x - 2.674 \times 10^5$	0.999 8	1.23-24.58	2.72	3.21	6.93	100.4	1.57
Serine	$y = 3.617 \times 10^3 x - 8.522 \times 10$	0.999 1	1.04-20.84	5.06	3.88	6.47	78.9	6.09
Gutamic acid	$y = 3.761 \times 10^3 x - 8.686 \times 10^5$	0.999 9	1.11-22.14	2.63	1.73	6.98	92.4	1.09
Aspartic acid	$y = 7.312 \times 10^4 x - 2.475 \times 10^4$	0.998 5	1.28-25.56	2.69	3.72	3.48	83.2	6.87
Lysine	$y = 1.738 \times 10^6 x - 6.246 \times 10^6$	0.998 5	2.31-57.65	4.93	4.53	5.71	110.0	0.64
Adenine	$y = 1.485 \times 10^6 x - 1.168 \times 10^6$	0.999 2	0.05-1.35	4.83	1.92	4.20	108.1	5.79
Nicotinic acid	$y = 5.677 \times 10^6 x + 2.633 \times 10^6$	0.998 3	0.05-10.26	1.31	0.71	1.48	92.3	3.08
Choline	$y = 3.391 \times 10^8 x + 2.009 \times 10^6$	0.999 6	0.001-0.137	1.89	2.67	3.24	105.2	6.34
4-Guanidinobutyric acid	$y = 1.093 \times 10^8 x - 5.680 \times 10^5$	0.998 3	0.01-0.22	3.01	2.44	4.90	96.1	10.23
Phenylalanine	$y = 1.130 \times 10^7 x - 5.808 \times 10^6$	0.998 8	0.38-9.57	2.89	2.52	6.94	87.9	5.00
Cytidine	$y = 3.642 \times 10^6 x - 5.987 \times 10^5$	0.998 3	0.07-6.74	5.42	2.61	2.75	103.6	3.40
Leucine	$y = 7.995 \times 10^6 x - 9.412 \times 10^5$	0.999 7	0.18-3.70	1.91	2.69	8.14	84.9	4.75
Stachydrine	$y = 5.794 \times 10^8 x - 1.176 \times 10^7$	0.998 3	0.02-0.45	3.55	4.01	2.58	104.1	8.72
Isoleucine	$y = 1.120 \times 10^7 x - 4.218 \times 10^6$	0.999 8	0.23-4.58	1.62	2.15	6.95	78.5	5.36
Betaine	$y = 3.617 \times 10^6 x + 2.417 \times 10^6$	0.999 7	0.05-2.23	4.98	3.24	3.78	87.4	3.27
Trigonelline	$y = 8.058 \times 10^5 x + 4.432 \times 10^5$	0.999 9	0.09-1.97	3.18	3.18	2.29	97.4	6.01
Valine	$y = 2.579 \times 10^6 x - 8.725 \times 10^5$	0.998 8	0.09-1.98	1.72	2.74	7.14	80.6	8.65
γ -Aminobutyric acid	$y = 2.399 \times 10^6 x - 2.470 \times 10^6$	0.998 1	0.29-5.82	1.08	2.67	5.96	102.3	10.57
Proline	$y = 2.977 \times 10^7 x - 1.391 \times 10^7$	0.999 6	0.18-3.68	0.97	2.95	2.58	102.0	3.50
Carnitine	$y = 3.814 \times 10^8 x - 3.257 \times 10^6$	0.999 9	0.01-0.25	1.66	2.19	2.64	77.6	7.74
Pipecolic acid	$y = 2.121 \times 10^7 x - 1.275 \times 10^6$	0.998 6	0.06-1.53	1.92	1.89	4.83	118.5	4.32
Citrulline	$y = 1.715 \times 10^6 x - 4.862 \times 10^5$	0.998 1	0.90-8.98	2.00	0.57	9.50	77.0	5.26
Arginine	$y = 5.393 \times 10^6 x - 2.240 \times 10^6$	0.996 1	0.12-2.38	4.88	0.51	6.29	93.6	8.75

鸟嘌呤外,各化合物峰强度的RSD均小于10%;供试品溶液2中,各化合物峰强度的RSD均小于15%,结果见表2。

1.5 加样回收率 平行6份样品中35种化合物的平均加样回收率范围为77.6%~118.5%,除4-胍基丁酸和 γ -氨基丁酸外,RSD均小于10%,结果见表2。

2 样品的测定

应用建立好的方法对10批瓜蒌皮注射液进行了测定,利用标准曲线,计算瓜蒌皮注射液中35种成分的含量,典型的总离子流色谱图和提取离子流色谱图见图1,结果见表3和图2。瓜蒌皮注射液在制备工艺中通过了阳离子交换树脂,药材提取液中的碱性和两性物质得到了富集,从测定结果中可以看出氨基酸类、生物碱类尤其是季铵碱(包括葫芦巴碱、甜菜碱、水苏

碱)以及核苷类物质含量较高。在供试品溶液1中,丙氨酸含量最高,含量范围312~411 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;其次是苏氨酸、高丝氨酸。在供试品溶液2中, γ -氨基丁酸含量最高,含量范围659~1 004 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,其次是葫芦巴碱、瓜氨酸、亮氨酸;而烟酰胺、甲基琥珀酸、胞嘧啶、胆碱等含量非常低,低于2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。从箱线图(图2)中可以看出不同批次的注射液整体稳定性较好,仅S1和S10中分别由于甲基琥珀酸含量低(0.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和乙酰精氨酸含量低(4.48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)成为离群样品。另外,在预实验中发现腺苷、鸟苷、色氨酸在瓜蒌皮注射液中的含量也很高,但是由于这些成分在目前条件下,线性关系很差,无法准确测定,由于这些成分都具有紫外吸收,因此后续会将尝试采用液相色谱-紫外检测器建立含量测定方法,但是基于样品的复杂性,需要对样品

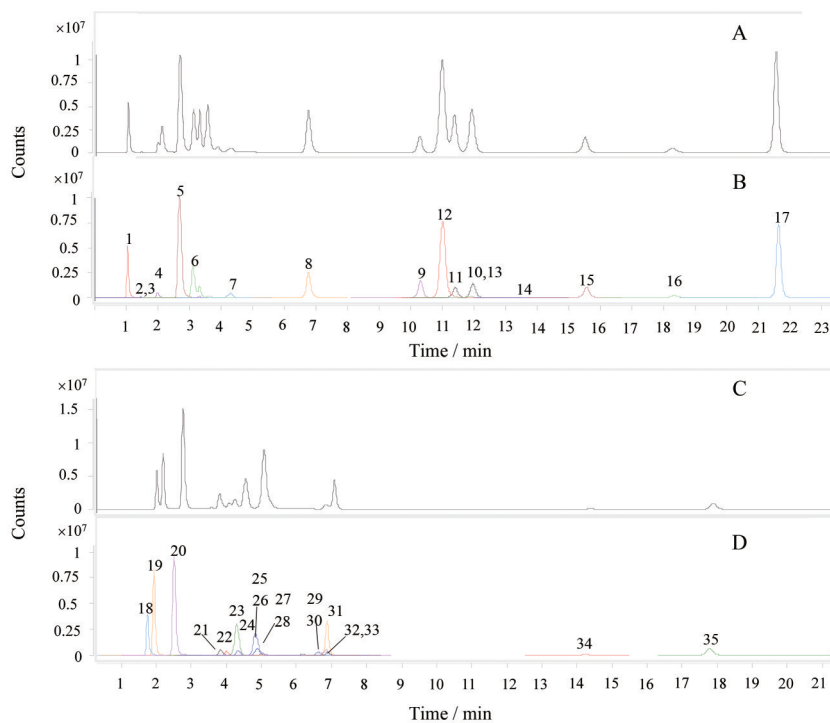


Figure 1 The TICs and EICs (A and C are the TICs of sample solution 1 and 2, respectively; B and D are the EICs of the analytes of sample solution 1 and 2, respectively; the peak numbers are consistent with those in Table 1)

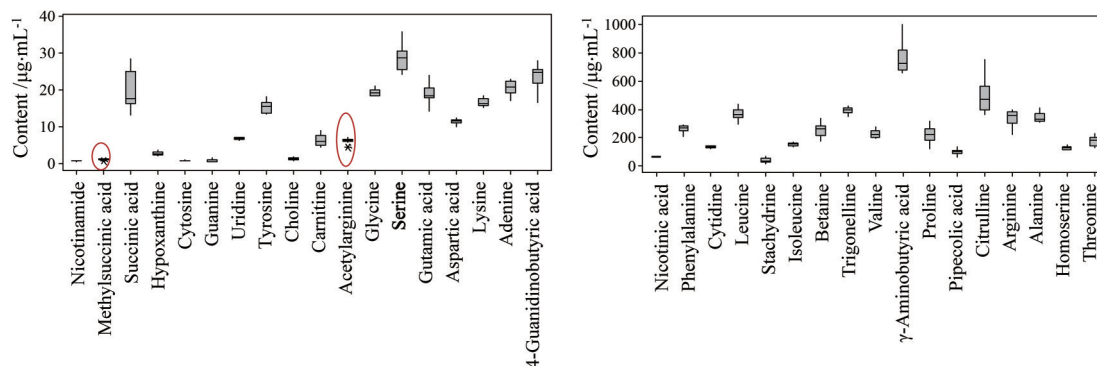


Figure 2 Box plot for the 35 analytes among the ten batches of gualoupi injection

Table 3 The quantification results of ten batches of gualoupi injection ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Compound	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	Average	RSD (% <i>n</i> = 10)
Nicotinamide	0.79	0.76	0.7	0.76	0.60	0.60	0.59	0.56	0.58	0.81	0.68	14.6
Methylsuccinic acid	0.75	1.11	1.24	1.11	0.97	1.03	1.03	1.15	1.22	1.17	1.08	13.3
Succinic acid	24.84	18.84	28.46	25.56	14.04	17.66	17.9	17.21	17.45	13.14	19.51	26.0
Hypoxanthine	3.12	3.43	3.01	3.61	2.28	2.44	2.20	1.99	2.04	2.48	2.66	22.1
Cytosine	0.81	0.80	0.79	0.87	0.82	0.85	0.78	0.77	0.78	0.74	0.80	4.8
Guanine	0.44	1.12	0.82	1.43	0.46	0.45	0.45	0.45	0.45	0.50	0.67	53.7
Uridine	6.72	6.64	6.30	7.07	6.62	6.69	7.05	6.90	7.00	6.69	6.77	3.5
Tyrosine	17.50	16.06	18.28	16.3	14.99	15.93	13.42	13.43	13.77	14.82	15.45	10.8
Alanine	410.08	389.13	364.53	368.46	319.42	343.30	312.67	322.02	323.38	320.25	347.32	9.8
Homoserine	116.84	120.21	113.87	130.4	125.01	131.72	136.81	143.93	146.65	135.32	130.08	8.5
Threonine	138.90	148.6	132.23	180.07	166.65	184.76	201.08	222.45	232.76	198.79	180.63	18.9
Acetylgarginine	5.97	7.03	5.85	6.52	6.27	6.27	6.09	6.47	6.55	4.48	6.15	11.0
Glycine	21.08	19.91	19.01	20.18	18.42	19.88	18.43	18.42	18.98	19.70	19.40	4.6
Serine	30.21	31.21	29.31	30.33	25.75	28.08	24.16	25.20	26.19	35.84	28.63	12.3
Gutamic acid	23.93	20.42	18.33	20.71	18.55	19.64	17.73	17.81	18.12	14.18	18.94	13.3
Aspartic acid	12.44	11.65	10.49	10.10	11.53	12.34	11.49	11.23	11.55	11.74	11.46	6.3
Lysine	17.83	18.44	16.76	15.72	16.15	17.75	15.19	15.57	15.92	16.5	16.58	6.6
Adenine	22.95	19.43	21.27	22.79	20.21	19.6	21.25	17.11	18.98	22.36	20.60	9.1
Nicotinic acid	70.91	59.13	70.82	70.14	59.73	64.07	63.32	60.99	64.1	67.02	65.02	6.9
Choline	1.71	1.60	1.84	0.72	1.58	1.33	1.38	0.61	1.23	1.19	1.32	30.5
4-Guanidinobutyric acid	24.73	20.17	22.45	24.87	23.23	25.46	24.66	25.71	28.02	16.61	23.59	13.7
Phenylalanine	274.33	211.26	272.56	293.31	238.82	286.83	250.04	264.82	285.48	279.78	265.72	9.6
Cytidine	143.12	120.20	134.64	136.42	124.62	144.81	133.54	137.83	144.29	134.30	135.38	6.0
Leucine	360.80	296.17	363.67	436.83	329.77	393.72	346.98	359.9	405.97	368.1	366.19	10.8
Stachydrine	55.93	14.29	55.29	67.69	31.53	34.42	38.93	35.11	36.56	24.62	39.44	40.4
Isoleucine	162.36	133.62	159.87	159.49	144.89	169.81	141.75	153.89	165.67	143.89	153.52	7.7
Betaine	278.31	178.35	279.99	339.82	242.65	272.62	292.32	230.06	253.95	180.73	254.88	19.5
Trigonelline	424.48	352.38	391.89	409.21	383.07	405.92	391.71	365.43	401.41	419.38	394.49	5.8
Valine	277.28	204.21	263.19	245.93	200.24	241.67	198.74	201.69	221.97	218.85	227.38	12.4
γ -Aminobutyric acid	679.56	687.68	1003.61	746.89	659.46	720.9	684.37	739.76	812.59	844.74	757.96	13.8
Proline	314.56	211.17	186.73	254.91	173.85	257.38	122.58	239.88	274.42	197.80	223.33	25.0
Carnitine	8.97	4.400	7.22	8.82	4.92	5.88	7.01	5.44	6.2	5.01	6.39	25.0
Pipecolic acid	108.61	65.09	103.12	139.06	82.87	96.24	114.04	99.72	110.07	90.2	100.90	19.6
Citrulline	366.20	402.64	530.64	570.28	388.56	427.2	436.15	512.51	563.94	755.74	512.77	23.7
Arginine	222.80	243.82	322.79	330.21	367.06	397.73	354.78	365.82	393.33	379.09	337.74	17.8
Total results/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	4.63	4.04	4.96	5.10	4.23	4.78	4.41	4.64	5.03	5.12	4.95	-
Total solid/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	30.22	26.93	32.41	30.04	27.76	30.06	29.59	30.00	30.37	29.80	30.00	-
Content/%	15.3	15.0	15.3	17.0	15.2	15.9	14.9	15.5	16.6	16.6	15.6	-

进行净化前处理。

按照《中药注射剂安全性再评价质量控制评价技术原则(试行)》要求,所测各类成分之和应可能大于总固体的80%,建立较全面的含量测定体系对于控制注射液的安全、有效及质量稳定性至关重要。35个化合物总的含量范围为4.04~5.12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,占总固体的14.9%~17.0%,远未达到80%的要求,仍然需要综合多种技术手段充分挖掘其中的功效成分。基于目前测定结果,建议建立专属的含量测定方法测定所有氨基酸含量;通过优化前处理方法,富集目标成分,分别建立生物碱主要包括葫芦巴碱、甜菜碱、水苏碱等和核苷类主要包括腺苷、鸟苷、胞苷等成分的液相含量测定方法;对于含量较低的烟酰胺、甲基琥珀酸、胞嘧啶、胆碱等成分不建议作为质量控制的指标。

讨论

本课题组前期定性研究中发现瓜蒌皮注射液中含有丰富的生物碱、氨基酸、核苷及其碱基等成分^[6],本研究筛选了含量相对较高的成分作为最初的检测指标。预实验中发现果糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖醇、蔗糖等糖类化合物以及香叶木素、香叶木素-7-*O*-葡萄糖苷、芹菜素-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷等黄酮类化合物含量很低;黄嘌呤、尿嘧啶和乙酰胆碱在色谱柱上保留弱,受杂质干扰严重,难以准确定量;腺苷、鸟苷和色氨酸线性关系差,因此这14种化合物未列入定量范围,最终确定了35个检测指标。

瓜蒌皮注射液中大部分化合物为亲水性成分,在反相色谱上保留差,本研究采用亲水作用色谱柱,其流动相水的洗脱能力大于乙腈。在梯度洗脱的初始阶

段, 乙腈比例较高, 当以水为样品稀释溶剂, 完成进样后待测溶液与流动相发生混合时, 由于待测溶液溶剂洗脱能力强于流动相溶剂, 部分样品得不到保留, 尤其对于出峰较早的成分, 会引起较强的溶剂效应, 表现为峰前伸、展宽、分叉等现象。因此, 为了获得良好峰形, 样品溶剂中的乙腈含量应大于 50%。因此, 本研究中以 50% 乙腈为溶剂来稀释得到对照品溶液和供试品溶液。

为了在较短的分析时间内达到最佳的分离和峰形, 对色谱柱、流动相和梯度程序等色谱条件进行了优化。首先对色谱柱进行考察, 瓜蒌皮注射液中化学成分极性较大, 本研究采用亲水作用色谱柱进行分离, 该类色谱采用极性固定相 (如: 裸二氧化硅、酰胺、羟基、氰基、氨基和离子交换柱) 与反相色谱溶剂系统相结合, 常用于分离多肽、氨基酸、碳水化合物、核苷及其碱基等极性较大的成分。考察了两款亲水作用色谱柱, Agilent HILIC-Z 和 Waters XBridge Amide, HILIC-Z 柱为两性离子型亲水作用色谱柱, XBridge Amide 采用化学稳定的三键键合的酰胺官能团, 经分析发现 Xbridge Amide 柱对瓜蒌皮注射液中极性化合物的保留和分离效果均较好, 因此选择 Xbridge Amide 柱。

其次对流动相进行考察, 瓜蒌皮注射液中主要富集了碱性和两性化合物, 甲酸铵作为流动相改性剂可以有效改善待测化合物的峰形, 流动相的 pH 值对保留时间和峰形也有影响。比较了相同盐浓度下不同 pH 值的影响, 结果显示除了赖氨酸, 瓜氨酸等碱性氨基酸外, 大多数化合物在低 pH 值下均具有较好的峰形和分离度。考察了三种流动相体系, 体系 1: A 相-0.1% 甲酸溶液 (含 20 mmol·L⁻¹ 甲酸铵), B 相-0.1% 甲酸乙腈溶液; 体系 2: A 相-0.2% 甲酸溶液 (含 20 mmol·L⁻¹ 甲酸铵), B 相-0.2% 甲酸乙腈溶液; 体系 3: 配制 200 mmol·L⁻¹ 甲酸铵储备液 (用甲酸调节 pH 值至 3.0), 将水与储备液按 9:1 稀混合得流动相 A, 将乙腈与储备液按 9:1 混合

得流动相 B。根据色谱图整体分离情况和化合物响应, 最终选择了体系 3。

最后是对流动相梯度的优化, 采用 LC-MS/MS 定量分析方法的一个优点在于待测物在保留时间、母离子或者子离子三个因素中, 只要有一个因素可以和其他成分区分开, 即可进行定量分析, 因此色谱分离中大部分成分无需实现基线分离。但是有两组保留时间非常接近的同分异构体, 亮氨酸和异亮氨酸, 苏氨酸和高丝氨酸, 由于具有相同的母离子和子离子, 因此对流动相的洗脱条件进行了细致优化, 最终达到基线分离。

比较了正负离子模式, 结果显示, 除了 2-甲基琥珀酸和琥珀酸外, 待测成分在正离子模式下均具有更好的响应。选择每个化合物前两强的子离子分别作为定量离子和定性离子, 采用 Optimizer 软件逐一优化每个碎片离子的碰撞能量 (collision energy, CE), 以确保其能获得高灵敏度的分析参数。结果显示所有化合物的 [M+H]⁺ 峰响应较高, 选为母离子, 氨基酸二级碎裂中主要是丢失甲酸或者氨气, 产生 [M+H-46]⁺ 或者 [M+H-17]⁺ 的子离子, 进一步产生 [M+H-46-17]⁺ 的碎片离子, 例如赖氨酸 (*m/z* 147.1), 经过二级碎裂产生 *m/z* 130.1 和 *m/z* 84.1 的碎片离子 (图 3A)。精氨酸的裂解行为较为特殊, 主要生成了 *m/z* 70.1 和 *m/z* 60.1 的碎片离子, 其裂解行为与文献报道一致, 其中 *m/z* 60.1 为母离子碎裂后正电荷保留在胍基上得到的产物^[16]。核苷类化合物二级裂解后脱去五元呋喃糖基生成其相应碱基的碎片离子 [M+H-132]⁺, 碱基碎片离子进一步丢失氨气得到 [M+H-132-17]⁺ 离子。嘌呤类化合物二级裂解会脱去氨气得到 [M+H-17]⁺ 离子, 或者母离子失去咪唑环得到 [M+H-42]⁺ 离子。以鸟嘌呤为例, 前体离子 *m/z* 152.1 二级裂解后产生 *m/z* 135.1 离子, 同时生成 *m/z* 110.1 离子 (图 3B)。季胺碱类化合物二级裂解行为差异较大, 葫芦巴碱主要是中性丢失水或者二氧化

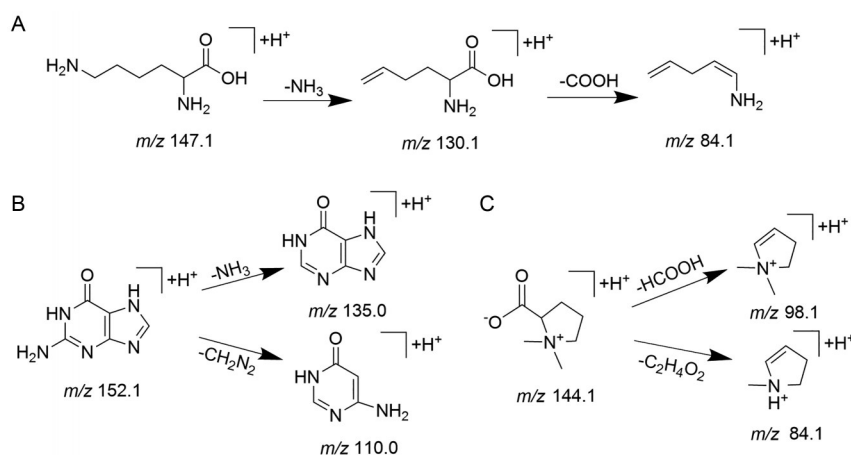


Figure 3 Proposed fragmentation of representative compounds. A: Lysine; B: Guanine; C: Stachydrine

碳, 甜菜碱主要是碳氮键断裂, 水苏碱 (m/z 144.1) 二级裂解后产生丢失甲酸的碎片离子 m/z 98.1, 同时也产生 m/z 84.1 离子 (图 3C), 推测该离子为环上氮甲基与支链羟基成环后整体脱去 $C_2H_4O_2$ 分子得到的。最终优化参数见表 1。

综上, 本研究建立了一种亲水作用色谱串联质谱快速测定瓜蒌皮注射液中多组分的分析方法, 方法专属性好、灵敏度高、重复性好, 是目前瓜蒌皮注射液含量测定最全面的报道, 应用该方法分析测定了 10 批瓜蒌皮注射液, 为更加清晰地解释瓜蒌皮注射液的药效物质基础及注射液的标准提高研究奠定了基础。

作者贡献: 陶香负责数据采集、分析与撰写文章; 张静娴负责数据采集、分析与审阅文章; 胡青负责实验数据、数据分析和阐释; 于泓、孙健、沈盈盈负责数据采集、分析; 董莹、丁金国负责注射液样品收集; 毛秀红负责审阅文章与行政支持; 季申负责技术与材料支持和获取研究经费。

利益冲突: 本文无任何利益冲突。

References

- [1] Liu M, Li H, Li CG, et al. Chemical composition and pharmacological effects of *Trichosanthes kirilowii* [J]. J Fuyang Teach Coll (阜阳师范学院学报), 2018, 35: 23-26.
- [2] Yang L, Yang L. Study on the pharmacological effect of *Trichosanthes kirilowii* on coronary heart disease and its mechanism [J]. Electron J Clin Med Lit (临床医药文献电子杂志), 2016, 3: 7495-7496.
- [3] Feng ZT, Zhong JP, Zhu Y, et al. Research overview of pericarpium *Trichosanthes* Injection [J]. Strait Pharm J (海峡药学), 2021, 33: 10-13.
- [4] Li FG, Liu XZ. Research progresses of the clinical application of Gualoupi Injection [J]. World Chin Med (世界中医药), 2016, 11: 1627-1630.
- [5] Teng YR, Wang LX, Zhang YQ. Research progress on pharmacological effects of *Trichosanthes kirilowii* [J]. Marim J Pharm Res (齐鲁药事), 2010, 29: 417-419.
- [6] Huang Y, Wang Q, Zhu XW, et al. Pharmacological effects and research progress of *Psidium guajava* in the treatment of coronary heart disease [J]. Cardiovasc Dis Electron J Integr Tradit Chin West Med (中西医结合心血管病电子杂志), 2019, 7: 18-19.
- [7] Chu DH, Zhang ZQ. Research progress of Gualou (*Trichosanthes Fructus*) on chemical constituents [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2020, 38: 198-203.
- [8] He HX, Guo QM. Research progress on chemical composition and pharmacological effects of *Trichosanthes Fructus* and predictive analysis on quality marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2019, 50: 4808-4820.
- [9] Teng YR, Zhang YQ. Research progress on the chemical composition of Gualou (*Trichosanthes Fructus*) [J]. J Shandong Univ Tradit Chin Med (山东中医药大学学报), 2011, 35: 85-86.
- [10] Wang SL, Wei GD, Ma ST. Quality standard study on *Trichosanthes Pericarpium* [J]. Asia-Pac Tradit Med (亚太传统医药), 2015, 11: 29-31.
- [11] Zuo CX, Bai ZS, Li N, et al. Identification of fatty acid components from pericarp of *Trichosanthes kirilowii* and their anti-inflammatory activities [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2019, 42: 2070-2073.
- [12] Shi GY, Liu W, Geng YL, et al. HPLC Fingerprint of *Pericarpium trichosanthes* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 73-76.
- [13] Qiao W, Chu DH, Sun YY, et al. Determination of contents of five flavonoids in *Trichosanthes Pericarpium* [J]. Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志), 2019, 46: 591-594.
- [14] Li A, Sun A, Liu R, et al. An efficient preparative procedure for main flavonoids from the peel of *Trichosanthes kirilowii* Maxim using polyamide resin followed by semi-preparative high performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 2014, 965: 150-157.
- [15] Lei X, Li N, Bai Z, et al. Chemical constituent from the peel of *Trichosanthes kirilowii* Maxim and their NF- κ B inhibitory activity [J]. Nat Prod Res, 2021, 35: 5132-5137.
- [16] Zhang JX, Hu Q, Yu H, et al. Rapid and intelligent identification of the constituents in Gualoupi injection by HILIC/ESI-Orbitrap HRMS combined with compound discoverer software [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2018, 53: 1705-1712.
- [17] Wang HJ, Ke Y, Ye G. UPLC/ESI-QTOF-MS analysis of chemical constituents in Gualoupi Injection [J]. Shanghai Med Pharm J (上海医药), 2017, 38: 60-65.
- [18] China Food and Drug Administration. National Drug Standards (Revised): ZGB2008-18 (国家食品药品监督管理局国家药品标准颁布件) [S]. Beijing: China Food and Drug Administration, 2009.
- [19] Wang HJ, Ke Y, Ye G. Determination of the contents of adenosine and *N*-acetylneuraminic acid in Gualoupi injection by HPLC-MS/MS [J]. Shanghai Med Pharm J (上海医药), 2018, 39: 72-75.
- [20] Zhang JJ, Jie Q, Zhu YB. Determination of six active ingredients in Gualoupi Injection by quantitative analysis of multi-components by single marker [J]. China Pharm (中国药师), 2018, 21: 1779-1782.