

金鸡颗粒中毛两面针素的定性测定

LCMSMS-515

摘要： 本文采用岛津 LC-20ADXR 高效液相色谱系统、LCMS-8040 高效液相色谱串联质谱系统，建立了金鸡颗粒中毛两面针素的定性方法。金鸡颗粒经 70% 乙醇提取，Shim-pack GIST C18 色谱柱分离，未检出毛两面针素；金鸡颗粒加标样品在 RT=33.4 min 检出色谱峰（330 nm），经与毛两面针素光谱图（190-400 nm）比较，初步识别为毛两面针素。采用 LCMS-8040 对目标峰进行分析，SCAN+ 触发产物离子扫描模式，目标峰与毛两面针素一级、二级质谱图相似度极高，判断目标峰为毛两面针素。本文建立了基于液相色谱、UV 光谱以及串联质谱的金鸡颗粒掺伪毛两面针的鉴别方法，该方法选择性强，灵敏度高，有效保障了临床用药安全。

关键词： LC-20ADXR LCMS-8040 两面针 毛两面针 毛两面针素 掺伪

两面针，为芸香科植物两面针的干燥根，具有活血化瘀，行气止痛的功效。然而，市售大多数商品药材为毛两面针，不符合药典要求。已有研究表明，两面针与毛两面针药材成分差异较大，不适合替代使用。两面针主要含有乙氧基白屈菜红碱和氯化两面针碱成分，少数含有橙皮苷，毛两面针中木兰花碱，橙皮苷的含量均较高，毛两面针素为特有成分。

2020 年 2 月，国家药监局发布了《金鸡颗粒中毛

两面针素检查项补充检验方法》，对金鸡颗粒中使用毛两面针进行规定。根据保留时间、PDA 光谱图、以及质谱图等信息对毛两面针素进行定性识别。

本文，参考《金鸡颗粒中毛两面针素检查项补充检验方法》，建立了金鸡颗粒中添加毛两面针的定性测定方法。该方法综合考虑色谱分离、UV 光谱以及质谱定性要素，选择性强，灵敏度高，供相关行业参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8040 超高效液相色谱 - 串联质谱系统，配备 PDA 检测器。具体配置如下

输液泵 :LC-20ADXR×2

系统控制器 :CBM-20A

自动进样器 :SIL-20AC

三重四极杆质谱仪 :LCMS-8040

柱温箱 :CTO-20AC

色谱工作站 :LabSolutions Ver. 5.98

在线脱气机 :DGU-20A_{5R}

二极管阵列检测器 :SPD-M20A

1.2 分析条件

1.2.1 液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 色谱柱（250 mm× 4.6 mm I.D.，5 μm），岛津（上海）实验器材有限公司 P/N 227-30017-08

流动相：A-0.1% 磷酸水溶液；B- 乙腈

流速：1 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：10 μL

波长：330 nm

洗脱方式：等度洗脱，B 相浓度为 21%

1.2.2 液相色谱 - 质谱联用条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 色谱柱（250 mm× 4.6 mm I.D.，5 μm），岛津（上海）实验器材有限公司 P/N 227-30017-08

流动相：A-10 mM 乙酸铵溶液；B- 乙腈

流速：1 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：10 μL

进样方式：柱后三通分流，约 30% 进质谱

洗脱方式：等度洗脱，B相浓度为21%

质谱条件

离子源参数

离子源：ESI⁺

加热模块温度：400 °C

雾化气流速：3.0 L/min

干燥气流速：15.0 L/min

DL 温度：250 °C

扫描模式：MS SCAN/ 触发产物离子扫描

MS 参数：扫描范围 m/z100-500，触发产物离子，优选离子 m/z 309.1,CE=-35V

1.3 对照品溶液配制

精密称取毛两面针素标准品 2.5 mg，用 1.0 mL 乙醇溶解，并稀释至 30 µg/mL 工作液，待测。

1.4 供试品制备

取金鸡颗粒适量，研细，置具塞锥形瓶中，精密加入 70% 乙醇 20 ml，密塞，称定重量，超声处理 40 分钟，放冷，再称定重量，用 70% 乙醇补足失重，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

1.5 结果判断

供试品色谱中，应不得出现与对照品色谱保留时间相同的色谱峰。若出现保留时间相同的色谱峰，则采用二级管阵列检测器比较相应色谱峰的紫外 - 可见吸收光谱，吸收光谱应不相同。必要时采用高效液相色谱 - 质谱联用方法确证。建议使用乙腈 -0.01mol/L 乙酸铵溶液流动相系统。（源自《金鸡颗粒中毛两面针素检查项补充检验方法》，国家药品监督管理局，2020 年 2 月）。

■ 结果与讨论

2.1 色谱图

对照品进行分析，毛两面针素保留时间 RT=33.4 min，理论塔板数 16428，大于 3000，系统适应性通过。对照品、供试品、供试品加标进行分析，如下图 1，供试品中未检出毛两面针素，而供试品加标样品可检出毛两面针素，初步判定金鸡颗粒中无毛两面针，结果符合预期。

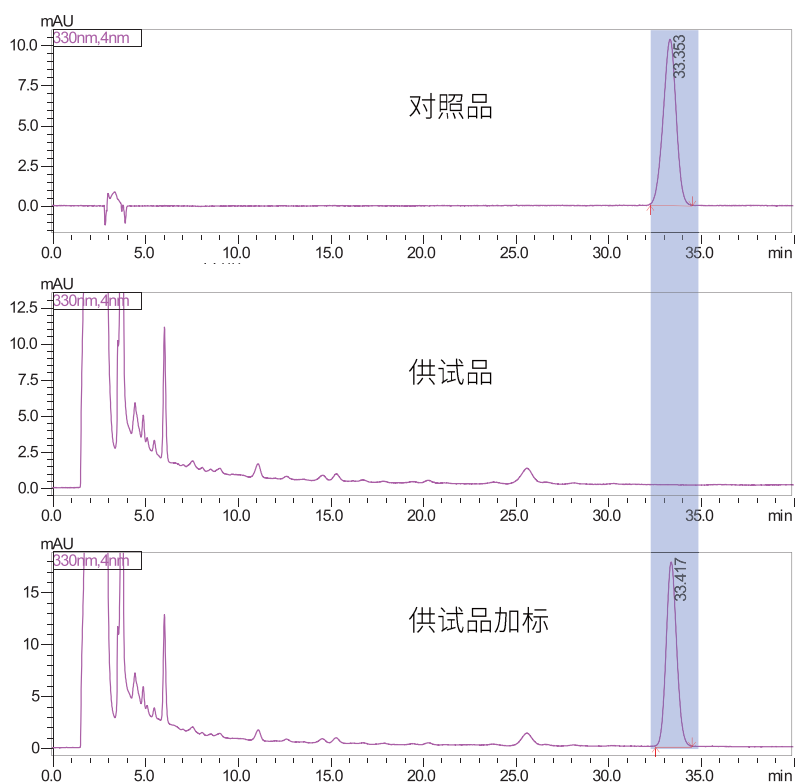


图 1 对照品、供试品、供试品加标色谱图

2.2 检出限及定量限

对浓度为 30 $\mu\text{g/mL}$ 的毛两面针素溶液进样分析，由信噪比计算其检出限及定量限（LOD, $S/N=3$; LOQ, $S/N=10$ ），结果如表 1 所示。

表 1 毛两面针素的检出限和定量限

名称	检出限 ($\mu\text{g/mL}$)	定量限 ($\mu\text{g/mL}$)
毛两面针素	0.09	0.27

2.3 光谱图相似度判别

供试品加标样品中毛两面针素与对照品的保留时间一致，保留时间 $RSD < 2\%$ 。对照品、供试品加标样品在 $RT=32.9 \text{ min}$ 色谱峰，在 190-400 nm 波长范围内的紫外光谱图见图 2，其光谱相似度为 92.2%（图 8）。

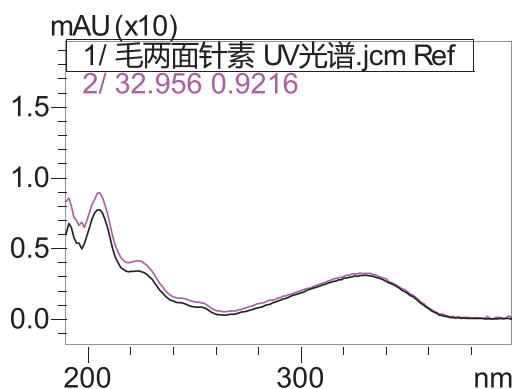


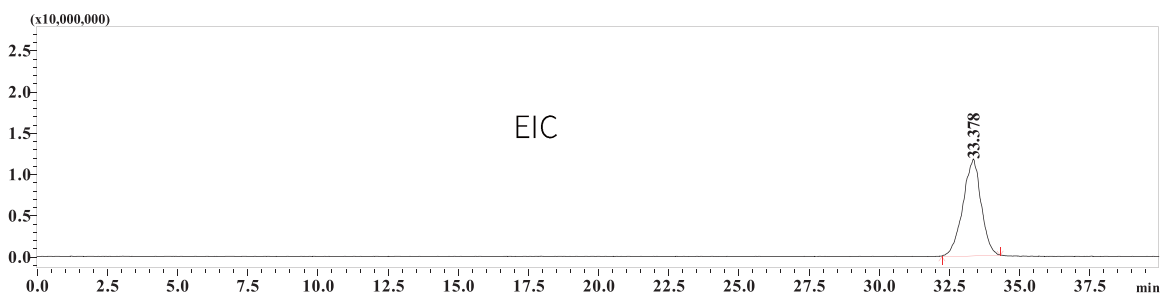
图 2 供试品、供试品加标样品光谱图 ($RT=32.9 \text{ min}$)

ID#	显示	对象	对象参数	比例	缩放倍率	λ_{max}	λ_{min}	相似度	Ch#
1	<input checked="" type="checkbox"/>	光谱	毛两面针素 UV光谱.jcm	设置	1.0	205/329/484/655/626	262/406/620/671/647	Ref	
2	<input checked="" type="checkbox"/>	时间	32.95615	设置	1.0	205/224/328/766/663	199/219/265/643/670	0.9216	1

图 3 光谱相似度对比结果

2.4 液相色谱质谱联用方法确证结果

为了进一步进行定性确认，使用 LCMS-8040 对 $RT=33.4 \text{ min}$ 色谱峰进行分析。在使用液质联用分析时，选择 10 mM 乙酸铵作为水相，并进行柱后分流进样，以保证质谱的离子化效率。对照品中毛两面针素质谱图如下图 4，观测到正离子模式 $[M+H]^+$ 峰， m/z 309.05，对前体离子进行碰撞，碰撞能 $CE=-35\text{V}$ ，二级质谱图登录 MSn 库。金鸡颗粒样品加标样品在 $RT=33.4 \text{ min}$ 色谱峰检出色谱峰，一级质谱图基峰为 m/z 309.00，二级质谱图进行谱库检索，与毛两面针素相似度 99 分（满分 100），主要碎片离子 m/z 235.00、 m/z 219.00、 m/z 205.00、 m/z 191.00 均与毛两面针素碎片离子一致，如图 5 所示。以上结果表明，串联质谱用于毛两面针素定性选择性强，重现性好。



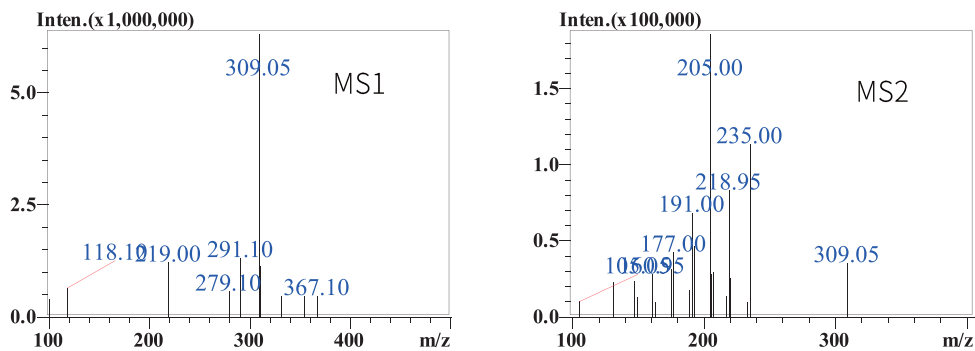


图4 对照品中毛两面针素一级提取离子流图 (EIC)、一级质谱图 (MS1)、二级质谱图 (MS2)



图5 加标样品二级质谱图谱库检索结果

■ 结论

本文采用岛津 LC-20ADXR 高效液相色谱系统、LCMS-8040 高效液相色谱质谱系统，建立了金鸡颗粒中违规添加毛两面针的定性识别方法。该方法基于色谱保留时间、UV 光谱以及一级、二级质谱图定性，选择性强，准确度高，供相关行业参考。

岛津应用云

