

劳永真, 苏江敏, 章军, 等. 高效液相色谱-电雾式检测法测定复方益母草胶囊中盐酸水苏碱[J]. 环境化学, 2023, 42(2): 675-678.
LAO Yongzhen, SU Jiangmin, ZHANG Jun, et al. Determination of stachydrine hydrochloride in compound leonurus japonicus capsules by high performance liquid chromatography-charged aerosol detector[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42 (2): 675-678.

高效液相色谱-电雾式检测法测定复方益母草胶囊 中盐酸水苏碱

劳永真¹ 苏江敏² 章军² 郭丛² 邱继鹏² 崔宇³ 胡金胜³
刘艳² 徐凌川¹ 陈莎²

(1. 山东中医药大学, 济南, 250355; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京, 100700; 3. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海, 201206)

摘要 盐酸水苏碱是复方益母草胶囊的主要质控成分, 目前主要使用高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)测定其含量. 本文采用高效液相色谱-电雾式检测器法(HPLC-CAD), 建立定量测定复方益母草胶囊中盐酸水苏碱的新分析方法, 快速有效的评价复方益母草胶囊的质量. 对比ELSD和CAD不同检测器的检测限(LOD)和定量限(LOQ), 考察市场不同型号色谱柱对复方益母草胶囊中盐酸水苏碱的分离效果, 以及提取溶剂对盐酸水苏碱提取效率的影响. 结果表明, 盐酸水苏碱浓度在9.3—465.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内具有良好的线性关系, 相关系数(r)为0.9995. 方法精密性、重复性和24 h稳定性RSD值均小于2.0% ($n=6$), 盐酸水苏碱加样回收率在95.7%—99.2%范围内, RSD值为1.1%. 5批复方益母草胶囊盐酸水苏碱含量每粒14.94—15.92 mg, 均符合《中国药典》(2020版)一部复方益母草胶囊含量要求. 批内一致性 P_A 为6.5%, 批间一致性 P_B 为28.9%.

关键词 高效液相色谱-电雾式检测器, 高效液相色谱-蒸发光散射检测器, 益母草, 复方益母草胶囊, 盐酸水苏碱.

Determination of stachydrine hydrochloride in compound leonurus japonicus capsules by high performance liquid chromatography-charged aerosol detector

LAO Yongzhen¹ SU Jiangmin² ZHANG Jun² GUO Cong² QI Jipeng² CUI Yu³
HU Jinsheng³ LIU Yan² XU Lingchuan¹ CHEN Sha²

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, 250355, China; 2. Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100700, China; 3. Thermo Fisher Scientific(China)Co.Ltd., Shanghai, 201206, China)

Abstract Stachydrine hydrochloride is the main quality control component of compound Leonurus japonicus capsules. Due to its non conjugated structure and weak ultraviolet absorption, the content of stachydrine hydrochloride is mainly determined by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector(HPLC-ELSD). In this study, a new method for the quantitative determination of stachydrine hydrochloride in compound Leonurus japonicus capsule was established by high performance liquid chromatography-charged aerosol detector(HPLC-CAD), and the quality of compound Leonurus japonicus capsule was evaluated rapidly and effectively. Firstly, the detection limit (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of different detectors in ELSD and CAD were compared, and the detector with better sensitivity was selected; Secondly, the separation effect of stachydrine hydrochloride in compound Leonurus japonicus capsules by different types of chromatographic columns in the market was investigated to select the best chromatographic column

for subsequent experiments; Thirdly, the influence of extraction solvent on the extraction efficiency of stachydrine hydrochloride was also investigated; Results indicated that the concentration of stachydrine hydrochloride had a linear relationship with the concentration of stachydrine hydrochloride in the range of 9.3—465.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and the correlation coefficient (r) was 0.9995. The RSD values of the precision, 24 h stability and repeatability of the method were less than 2.0% ($n=6$). The recovery of stachydrine hydrochloride was 95.7%—99.2%, and the RSD value was 1.1%. The content of stachydrine hydrochloride in 5 batches of compound Leonurus japonicus capsules was 14.94—15.92 mg/capsule, which was in line with the requirements of compound Leonurus japonicus in the Chinese Pharmacopoeia 2020 (Volume I). The intra assay consistency was 6.5%, and the inter assay consistency was 28.9%.

Keywords HPLC-CAD, HPLC-ELSD, leonurus japonicus, compound Leonurus japonicus capsules, stachydrine hydrochloride.

复方益母草胶囊是由益母草、当归和熟地 3 味药材经过一定的工序加工制成的复方制剂, 该胶囊主要药味益母草中含有生物碱类、黄酮类、二萜类、苷类、脂肪酸类、挥发油类等成分^[1]. 生物碱类盐酸水苏碱是益母草的主要药效成分^[2]. 盐酸水苏碱是季胺碱, 极性较强, 无共轭结构, 紫外吸收弱, 属于末端吸收. 高效液相色谱法是盐酸水苏碱目前最为普遍的检测方法, 盐酸水苏碱常用的检测器有紫外检测器 (DAD 等)^[3]、质谱检测器 (MS)^[4]、示差检测器 (RID) 和蒸发光散射检测器 (ELSD)^[5] 等, 目前尚未报道电雾式检测器 (CAD) 被用于盐酸水苏碱的定量分析. 用紫外检测器测定盐酸水苏碱, 存在方法重复性差、溶剂末端吸收干扰、梯度洗脱时容易出现基线漂移检测不稳定等局限性^[6]; 依据盐酸水苏碱的结构中有旋光性的特点, 采用 RID 检测器测定其含量, 无需特殊样品处理方法就有很好的峰形, 但专属性不强、灵敏度较低, 且不能使用梯度洗脱分离效果不佳, 应用相对较少^[7-8]; ELSD 检测器是目前定量分析盐酸水苏碱最常用的检测器, 据报道其灵敏度也较低^[9]. 电雾式检测器 (CAD) 是一种质量相关的通用型检测器, 其检测信号不依赖于被测物质的化学结构, 更适用于无紫外吸收或只有较弱紫外吸收成分的定量分析.

本研究利用 Thermo-fisher Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1 色谱柱结合 HPLC-CAD 法分离测定复方益母草胶囊中主要成分盐酸水苏碱含量, 探讨该方法对比现行《中国药典》(2020 版) 一部中 ELSD 测定盐酸水苏碱的优势, 为其质量评价和标准制定提供理论依据, 同时为未来推广到其它含益母草类制剂中使用提供科学参考, 具有现实应用价值, 且目前缺少相关报道.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

试剂: 甲酸分析纯 (纯度 99.9%) (天津市科密欧化学试剂有限公司); 甲酸铵质谱级 (纯度 99%) (Roe Scientific Inc 公司); 无水乙醇分析纯 (天津市富宇精细化工有限公司); 甲醇 HPLC 级 (上海星可高纯溶剂有限公司); 乙腈 HPLC 级 (上海星可高纯溶剂有限公司); 屈臣氏饮用水 (广州屈臣氏食品饮料有限公司); 盐酸水苏碱对照品 (纯度 98.91%) (成都普思生物科技股份有限公司).

液相色谱 (美国赛默飞公司), Vanquish Core 系列双三元泵: VC-P33-A-01; 自动进样器: VC-A12-A-02; 柱温箱: Column compartment VC-C10-A-03; 可变波长检测器: Variable Wavelength Detector VC-D40-A-01; CAD 检测器: Charged Aerosol Detector H VH-D20-A; 变色龙色谱管理软件 Chromeleon CDS 7.3; Waters Acquity 超高效液相色谱仪 ELS Detector 检测器; 电子天平 YP30002 (上海佑科仪器仪表公司); 分析天平 B931029762 (北京艾斯瑞克商贸公司); 超声仪 KQ-250DB (昆山市超声仪器公司).

色谱柱: Accucore™-Amide-HILIC (150 mm × 4.6 mm, 5 μm , Thermo-Fisher 公司); Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm , Thermo-Fisher 公司); Acclaim™ Mixed-Mode WCX-1 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm , Thermo-Fisher 公司); Ascentis Express OH5 (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm , 美国 merck 公司); Polar-Phenyl (250 mm × 4.6 mm, 5 μm , 济南赛物科学仪器有限公司); ShimNex HE Amide (250 mm × 4.6 mm, 5 μm , 岛津中国公司); Poroshell 120 HILIC-Z (150 mm × 4.6 mm, 2.7 μm , 安捷伦公司); Venusil HILIC (250 mm × 4.6 mm, 5 μm , Agelag 公司); XBridge BEH Amide (150 mm × 4.6 mm, 5 μm Waters 公司); 60-5-HILIC-D (250 mm × 4.6 mm, 5 μm Kromasil 公司); XBridge Amide (250 mm × 4.6 mm, 5 μm Waters 公司).

1.2 溶液配制

对照品溶液 取盐酸水苏碱对照品适量, 精密测定, 加入 70% 乙腈 (乙醇) 制成每 1 mL 含 0.5 mg 的溶液, 即得.

供试品溶液 按 2020 版《中国药典》方法制备, 取装量差异项下的复方益母草胶囊内容物, 混匀, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 乙腈 (乙醇) 25 mL, 称定重量, 加热回流 2 h, 放冷, 再称定重量, 用 70% 乙腈 (乙醇) 补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得.

阴性对照的制备: 按照复方益母草胶囊处方药物组成, 不加益母草和辅料, 同供试品制备方法.

2 结果与讨论

2.1 检测器选择

精密量取盐酸水苏碱对照品储备液 1 mL, 分别置于 5、10、20、50、100 mL 容量瓶中, 至刻度. 再精密量取 1 mL 上述 50 mL 容量瓶溶液置于 10 mL、25 mL 容量瓶中, 加 70% 乙醇置刻度, 摇匀. 按照《中国药典》(2020 版) 一部复方益母草胶囊方法, 采用 Accucore™-150-Amide-HILIC (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以乙腈-0.2% 冰醋酸溶液 (80 : 20) 为流动相, 进样量 5 μL, 分别用 ELSD 和 CAD 检测器测定盐酸水苏碱的信噪比, 进行灵敏度对比. 按信噪比 3 : 1 及 10 : 1 计算, 盐酸水苏碱的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 结果显示, CAD 检测限是 ELSD 的 34 倍, 定量限是 37 倍, 表明 CAD 有更好的灵敏度.

2.2 色谱柱选择

取盐酸水苏碱标准品适量, 分别采用 10 种不同厂家的色谱柱进行测定, 其中 Poroshell 120 HILIC-Z 和 Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1 色谱柱对复方益母草中盐酸水苏碱分离效果最好, 前者理论塔板数高达 26430, 后者理论塔板数 18413, 且前后无干扰峰, 因此本研究最终选择 Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1 柱子作为盐酸水苏碱的定量分析.

2.3 检测方法研究

盐酸水苏碱是最简单的吡咯生物碱, 其分子结构含有季铵根和羧基, 极性较强. 实验室尝试了 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 和 WCX-1 两款色谱柱的 RP+IEX 保留模式, 保留均较弱. 其中 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱键合相为带有叔胺末端的疏水烷基链键合硅胶, 除去反相保留 (RP) 和弱阴离子交换 (WAX), 还可提供亲水作用 (HILIC) 保留机制. 经试验确定采用 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱的 HILIC 模式进行盐酸水苏碱的分离保留效果优异, 因而流动相有机相优先选择乙腈. 由于 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱必须始终使用含有缓冲盐的流动相进行活化、分析或保存, 在配合 CAD 使用时, 须使用挥发性缓冲盐, 流动相水相可选用甲酸铵或乙酸铵.

除了色谱柱和流动相的选择外, 供试品溶液的制备也需要重点考察. 取复方益母草胶囊数粒去壳, 将内容物混匀研细, 取 0.2 g, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 分别精密加入 30%、50%、70% 的甲醇, 30%、50%、70% 的乙醇和 30%、50%、70% 的乙腈, 超声提取 40 min (功率 250 W, 频率 40 kHz), 冷却至室温, 摇匀. 离心 5 min (5000 r·min⁻¹). 转移至 25 mL 容量瓶并定容至刻度, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得. 进样检测, 计算各提取溶剂下盐酸水苏碱的相对含量. 3 种不同浓度的乙腈对盐酸水苏碱成分提取效果最好, 在 HILIC 模式下, 流动相通常推荐使用非质子溶剂乙腈, 并且初始流动相为较高比例的乙腈, 当对照品或供试品溶液乙腈比例较低时, 进样后容易形成溶剂效应, 影响水苏碱的峰形和响应. 试验表明, 采用 70% 乙腈水提取效果较好, 因此本研究最终选择 70% 乙腈作为提取溶剂.

最终确定以 CAD 为检测器, 采用 Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱, 以 20 mmol·L⁻¹ 甲酸铵 (甲酸调节 pH 至 4.0) (A)-乙腈 (B) 为流动相, 梯度洗脱: 0—8 min, 10%A; 8—12 min, 10%—50%A; 12—15 min, 50%A; 15—20 min, 50%—10%A. 柱温 30 °C, 蒸发温度 35 °C; 采集频率 5 Hz, 过滤常数 3.6 s; 进样体积 5 μL. 该色谱条件通过系统考察得到较好的分离效果.

2.4 方法学验证

分别取盐酸水苏碱标准对照品溶液, 供试品溶液, 缺益母草阴性对照液适量, 注入高效液相色谱仪, 按 2.3 节色谱条件进样测定. 供试品色谱图中出现与标准对照品中保留时间相同的峰, 且理论塔板数不低于 18000, 缺益母草阴性对照色谱图中显示阴性样品无干扰, 表明该方法专属性较好 (图 1).

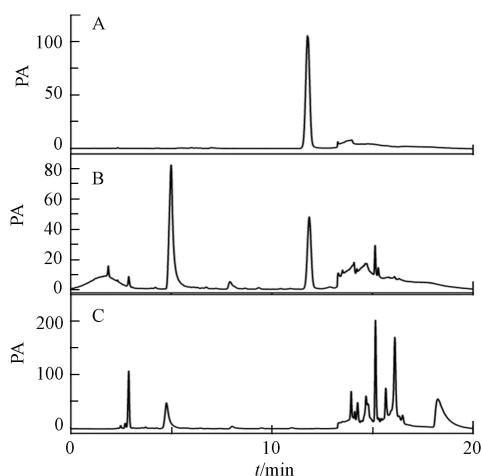


图 1 盐酸水苏碱对照品、供试品、阴性对照 HPLC-CAD 色谱图 (A) 盐酸水苏碱对照品 (B) 供试品 (C) 阴性对照
Fig.1 HPLC-CAD chromatogram of stachydrine hydrochloride reference, test and negative control (A) stachydrine hydrochloride control (B) test article (C) negative control

取盐酸水苏碱对照品溶液, 按 2.3 节色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积, 结果峰面积 RSD 为 1.13%. 按上述样品制备方法, 制备供试品溶液, 分别于 0、2、6、10、24 h 进样, RSD 为 1.93%, 表明供试品在 24 h 内稳定性良好. 取同一

批号样品(批号: 20220301), 按 2.3 节方法平行制备 6 份供试品溶液, 在 2.3 节色谱条件进样分析, 样品中盐酸水苏碱平均含量 $33.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 1.38%.

采用加样回收法, 精密称取 0.1 g 已知含量的复方益母草胶囊样品 8 份, 分别加入适量的盐酸水苏碱标准品, 按 2.3 节供试品制备方式制备供试品. 计算加样回收率在 95.70%—99.20%, 平均回收率 97.37%, RSD 为 1.14%(表 1).

表 1 盐酸水苏碱回收率($n=2$)

Table 1 Recovery rate of stachydrine hydrochloride($n=2$)

序号	取样量/g	样品含有量/mg	加标量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
1	0.1042	3.4821	3.3420	6.7972	99.1953		
2	0.1095	3.5389	3.3420	6.7904	97.2901		
3	0.1079	3.6058	3.3420	6.8040	95.6998		
4	0.1031	3.4454	3.3420	6.6717	96.5381		
5	0.1096	3.6626	3.3420	6.9328	97.8527	97.37	1.14
6	0.1062	3.5489	3.3420	6.8387	98.4361		
7	0.1040	3.4754	3.3420	6.7093	96.7638		
8	0.1047	3.4988	3.3420	6.7481	97.2262		

精密称量盐酸水苏碱对照品 9.30 g 于 20 mL 容量瓶中, 加 70% 乙腈水溶液逐级稀释, 制成盐酸水苏碱浓度分别为 0.465、0.279、0.186、0.093、0.047、0.019 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按 2.3 项下色谱条件下进样分析, 记录相应峰面积. 以待测组分质量浓度 (X) 为横坐标, 以峰面积 (Y) 为纵坐标, 对一次曲线和二次曲线进行了比较, 一次曲线函数为 $Y=52.989X+1.5521$, r^2 为 0.9862, 二次曲线函数为 $Y=-54.114X^2+78.28X+0.4612$, r^2 为 0.9995, 二次曲线拟合较好, 故选二次曲线进行计算.

2.5 复方益母草胶囊含量测定

依据前述盐酸水苏碱含量测定方法, 分别对随机选取的同批次和不同批次(5 批)复方益母草胶囊中盐酸水苏碱含量进行测定, 分别计算其批内(P_A)和批间(P_B)盐酸水苏碱含量的差异值. 结果表明, 复方益母草胶囊批内差异 P_A 值为 6.3%, 反映该厂家与益母草相关的生产工艺较稳定. 批间一致性差异较大, 每粒含量 12.00—16.14 mg 不等, P_B 值为 28.98%, 推测可能是益母草原料质量差异造成.

3 结论

通过对比 10 种亲水型作用色谱柱(HILIC), 最终确定利用 Acclaim Mixed-Mode WAX-1 色谱柱键合相的叔胺官能团, 在 HILIC 模式下对水苏碱的强保留能力, 可有效与供试品杂质峰分离, 避免基质干扰. 采用乙腈-20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵缓冲液 ($\text{pH}=4.0$) = 90:10 作为初始流动相进行梯度洗脱, 配合 CAD 检测器测定盐酸水苏碱含量, 结果显示 CAD 具有较高的灵敏度, 为定量分析盐酸水苏碱提供了新方法新参考. 本研究所建立用于测定盐酸水苏碱 HPLC-CAD 方法, 专属性强、重复性好、灵敏度高, 为复方益母草胶囊及相关制剂中盐酸水苏碱的质量检测提供可行方案.

参考文献 (References)

- [1] 李锐, 王树真, 李乐, 等. 益母草的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 广东化工, 2014, 41(2): 54-55.
- [2] 乔晶晶, 吴敬南, 许一鸣, 等. HPLC法同时测定益母草中4种成分 [J]. 中成药, 2018, 40(11): 2467-2471.
- [3] 伍涛, 肖裕章, 李成洪, 等. HPLC-DAD法测定益母草颗粒中盐酸水苏碱含量的方法 [J]. 甘肃农业大学学报, 2020, 55(3): 23-28, 37.
- [4] 宋珊, 郭红丽, 康江鹏. HPLC-ESI-MS/MS同时测定八珍益母丸中9种有效成分 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 402-407.
- [5] 胡彬, 越亮, 孙建彬, 等. HPLC-ELSD梯度洗脱法测定八珍益母丸(浓缩丸)中水苏碱的含量 [J]. 中国药品标准, 2022, 23(1): 91-94.
- [6] 李伟, 张建军, 王小花, 等. HPLC-ELSD测定益母草颗粒中盐酸水苏碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 100-103.
- [7] 黄强增. HPLC-RID法测定益母草颗粒中盐酸水苏碱含量 [J]. 海峡药学, 2012, 24(11): 63-65.
- [8] 尹金磊, 关素珍. 益母草饮片中盐酸水苏碱、益母草碱含量测定的应用研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(4): 459-460, 471.
- [9] 王莹, 刘芫汐, 岳洪水, 等. 电喷雾式检测器与蒸发光散射检测器用于注射用益气复脉中糖成分测定比较及方法准确性探讨 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5511-5517.