

UHPLC-Q-TOF-MS 法测定僵蚕及其制剂中白僵菌素

夏倩¹, 尚强², 张润容², 胡坪¹, 欧阳胜^{3*}, 章弘扬^{1*}

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237; 2. 丽珠医药集团股份有限公司, 国家中药现代化工程技术研究中心, 广东 珠海 519090; 3. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004)

摘要: 目的 建立 UHPLC-Q-TOF-MS 法测定僵蚕及其制剂中白僵菌素的含量。方法 僵蚕 80% 甲醇提取物的分析采用 Agilent Eclipse Plus C₁₈ UHPLC 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相乙腈-水 (70:30); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 45 ℃; 检测波长 215 nm。结果 白僵菌素在 0.095 2~47.6 μg/mL 范围内线性关系良好 ($R^2 = 0.999 2$), 平均加样回收率为 98.7%, RSD 为 3.2%。13 批药材中白僵菌素质量分数为 0.045~0.723 mg/g, 3 种制剂中为 0.015~0.026 mg/g, 炮制品中其含量低于生品中。结论 该方法灵敏度高, 选择性好, 可用于僵蚕药材及其制剂的质量控制。

关键词: 僵蚕; 白僵菌素; UHPLC-Q-TOF-MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)10-2652-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.10.022

Determination of beauverin in *Bombyx mori* and its preparations by UHPLC-Q-TOF-MS

XIA Qian¹, SHANG Qiang², ZHANG Run-rong², HU Ping¹, OUYANG Sheng^{3*}, ZHANG Hong-yang^{1*}

(1. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine, Lüzon Pharmaceutical Group Co., Ltd., Zhuhai 519090, China; 3. College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

KEY WORDS: *Bombyx mori* Linnaeus; beauverin; UHPLC-Q-TOF-MS

僵蚕是蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染 (或人工接种) 白僵菌 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuilknt 而致死的干燥体^[1], 具有祛风定惊、化痰散结、美容养颜的功效。僵蚕虽然被收录于 2015 年版《中国药典》, 同时该药材及其制剂在临床上已被广泛应用^[2-4], 但其化学、药效成分并不明确, 因此建立可靠的质量评价手段具有重要意义。

白僵菌素是家蚕感染白僵菌过程中产生的代谢产物^[5], 是家蚕感染白僵菌的特有成分及重要判断依据, 具有抗菌^[6-7]、抗癌^[8-9]作用, 因此可作

为僵蚕的质量评价指标, 具有较强的专属性。它是环状三羧酸肽、弱极性化合物, 分子式为 C₄₅H₅₇N₃O₉, 目前常用液相色谱-紫外检测法 (LC-UV) 测定其含量^[10-11], 但存在灵敏度低、选择性差等不足。近年来, 液相色谱与质谱联用技术 (LC-MS) 凭借其高灵敏度、高选择性等优势, 在中药成分含量测定中被广泛应用^[12-13], 本研究基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱 (UHPLC-Q-TOF-MS) 技术建立僵蚕及其制剂中白僵菌素含量的测定方法, 并对不同批样品进行质量评价。

收稿日期: 2019-10-19

基金项目: 国家自然科学基金面上基金 (81973285)

作者简介: 夏倩 (1995—), 女, 硕士生, 从事天然产物 LC-MS 分析及指纹图谱研究。Tel: (021) 64252844, E-mail: xiaqianecust@163.com

*通信作者: 欧阳胜 (1968—), 女, 博士, 教授, 从事天然产物活性成分筛选研究。Tel: (0791) 87118993, E-mail: 751796752@qq.com

章弘扬 (1981—), 男, 博士, 副教授, 从事天然产物分析及代谢组学研究。Tel: (021) 64252844, E-mail: Hongyang_zhang@ecust.edu.cn

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1290 超高效液相色谱-6530 四极杆-飞行时间质谱仪，配置二元高压梯度泵、可控温自动进样器、可控温柱温箱、二极管阵列检测器和电喷雾离子源（美国安捷伦公司）；电子天平（万分之一，瑞士梅特勒-托利多公司）；KQ-500DE 型数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

1.2 试剂与药物 乙腈（色谱纯，德国默克公司）；甲醇（分析纯，上海泰坦科技股份有限公司）；屈臣氏蒸馏水（北京屈臣氏蒸馏水有限公司）。白僵菌素对照品（批号 419469，纯度 99%，北京百灵威科技有限公司）。13 批僵蚕（S1~S13）由丽珠医药集团研究院中药研究所收集提供，经国家中药现代工程技术研究中心张润容博士鉴定为家蚕 *Bombyx mori* Linnaeus 4~5 龄的幼虫感染白僵菌而致死的干燥体。天蚕片（S14，山西仁源堂药业有限公司）；小儿七珍丸（S15，朗致集团双人药业有限公司）；小儿葫芦散（S16，太原大宁堂药业有限公司）。

2 方法

2.1 精密对照品溶液制备 称取白僵菌素对照品适量，80% 甲醇溶解并定容至 10 mL，得到贮备液，取适量用 80% 甲醇稀释成不同质量浓度（47.6、23.8、11.9、2.4、0.48、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）溶液，即得，均置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下冷藏备用。

2.2 供试品溶液制备 将药材及制剂粉碎，过 40 目筛，称取粉末约 0.5 g，置具塞锥形瓶中，精密加入 80% 甲醇 10 mL，密塞，称定质量，超声（40 kHz、500 W）提取 30 min，放冷，80% 甲醇补足减失的质量，摇匀，过 0.1 μm 微孔滤膜，取续滤液，即得。

2.3 色谱条件 Agilent Eclipse Plus C₁₈ UHPLC 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm ）；流动相乙腈-水（70：30）；体积流量 0.3 mL/min；柱温 45 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长 215 nm；进样量 0.2 μL 。

2.4 质谱条件 采用电喷雾离子源，在 TOF 模式下分别进行正离子全扫描，采集一级质谱数据；雾化气温 350 $^{\circ}\text{C}$ ；雾化器体积流量 10 L/min；雾化气压 30 psi（1 psi=6.895 kPa）；毛细管电压 3 500 V；撇除器电压 65 V；八极杆射频电压 750 V；毛细管出口电压 125 V。质量扫描范围 m/z 50~1 500。选择参比溶液中的 2 个内标离子 m/z 121.050 9、922.009 8，对质量测定结果进行实时校正。

2.5 样品测定 取 13 批药材及 3 批制剂，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”“2.4”条件下进样测定，记录 LC-UV 和总离子流图。质谱数据采用 Agilent MassHunter 软件处理。

3 结果

3.1 白僵菌素测定方法建立 按“2.2”项下方法下制备供试品溶液，在“2.3”“2.4”项条件下进样测定，代表性药材（S4）中白僵菌素 [M+Na]⁺ 提取离子流图（EIC）、LC-UV 图及制剂（小儿七珍宝）LC-UV 图见图 1。如图 1A 所示，白僵菌素分离度良好，峰型对称，质谱响应高于紫外检测，而且杂质无干扰。

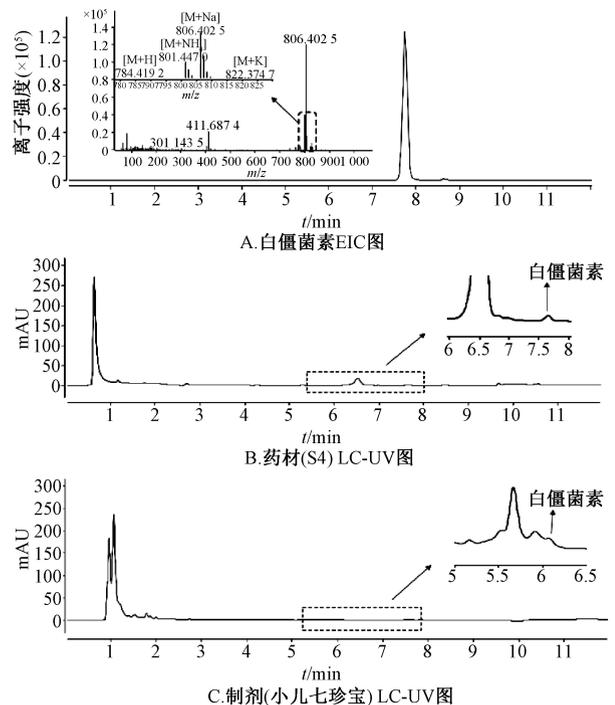


图 1 各样品色谱图

Fig. 1 Chromatograms of various samples

3.2 方法学考察

3.2.1 精密度试验 精密称取 0.5 g 药材粉末（S4）1 份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”“2.4”项条件下连续进样测定 6 次，测得白僵菌素含有量 RSD 小于 3.0%，表明仪器精密度良好。

3.2.2 重复性试验 精密称取 0.5 g 药材粉末（S4）6 份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”“2.4”项条件下进样测定，测得白僵菌素含有量 RSD 小于 2.9%，表明该方法重复性良好。

3.2.3 稳定性试验 精密称取 0.5 g 药材粉末（S4）1 份，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，

在“2.3”“2.4”项条件下0、1、2、4、8、12 h进样测定，测得白僵菌素含有量RSD小于3.1%，表明溶液在12 h内稳定性良好。

3.2.4 线性关系考察 取不同质量浓度对照品溶液，在“2.3”“2.4”项条件下进样测定。以白僵菌素峰面积为纵坐标(Y)，质量浓度为横坐标(X)进行回归，得方程为 $Y = 4.06 \times 10^5 X + 2.30 \times$

10^5 ($R^2 = 0.9992$)，在0.1~47.6 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

3.2.5 加样回收率试验 精密称取药材粉末(S4)5份，精密加入适量对照品溶液，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”“2.4”项条件下进样测定，计算回收率，结果见表1。

表1 白僵菌素加样回收率试验结果 (n=5)

Tab.1 Results of recovery tests for beaverin (n=5)

取样量/g	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.3425	0.0182	0.0165	0.0348	100.8		
0.3476	0.0184	0.0165	0.0340	93.9		
0.3467	0.0184	0.0165	0.0349	99.7	98.7	3.2
0.3421	0.0181	0.0165	0.0350	101.7		
0.3432	0.0182	0.0165	0.0343	97.4		

3.3 样品含有量测定 按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”“2.4”项条件下进样测

定，得到TIC图。通过EIC提取 $[M+Na]^+$ (m/z 806.4025)，外标法计算含有量，结果见表2。

表2 白僵菌素含有量测定结果 (mg/g)

Tab.2 Results of content determination of beaverin (mg/g)

编号	来源	名称	白僵菌素
S1	广西	生僵蚕	0.165
S2	广西	生僵蚕	0.245
S3	广西宜州	生僵蚕	0.340
S4	广西宜宾	生僵蚕	0.045
S5	云南昆明	生僵蚕	0.371
S6	四川攀枝花	生僵蚕	0.417
S7	四川绵阳	生僵蚕	0.723
S8	浙江	炒僵蚕	0.507
S9	浙江	炒僵蚕	0.308
S10	四川	炒僵蚕	0.420
S11	四川	生僵蚕	0.560
S12	四川	炒僵蚕	0.278
S13	四川	生僵蚕	0.348
S14	山西仁源堂药业有限公司	天蚕片	0.026
S15	朗致集团双人药业有限公司	小儿七珍丸	0.018
S16	太原大宁堂药业有限公司	小二葫芦散	0.015

4 讨论

4.1 条件优化 本实验分别对提取方式(超声、回流)、提取溶剂(水、20%、40%、60%、70%、80%、90%甲醇、纯甲醇)、提取时间(10、20、30、40、60 min)、溶剂体积(5、10、20、25、50 mL)进行考察，发现当甲醇体积分数低于40%

时，白僵菌素未能被提取出来，这是由于该成分具有较强的亲脂性^[14]。最终确定，最佳提取方法为0.5 g僵蚕粉末加入10 mL 80%甲醇，超声提取30 min。

4.2 定量方法考察 高分辨质谱测定时发现，白僵菌素在正离子模式下可生成 $[M+H]^+$ 、 $[M+$

Na^+ 、 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 、 $[\text{M}+\text{K}]^+$ 等加合离子, 其中 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 响应最高且信号强度稳定, 因此选择其进行定量。白僵菌素由于共轭基团较少, 为紫外末端吸收, 故利用 LC-UV 法测定时背景干扰较大; 当其含有量较低时, 紫外响应过小, 难以准确定量; 本研究测得检测限、定量限分别是 0.1、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 因此 LC-MS 法具有更高的灵敏度。此外, 由于制剂样品中基质复杂, 常规 LC-UV 方法难以实现白僵菌素与相邻杂质干扰物的基线分离, 见图 2, 而 LC-MS 方法具有良好的选择性, 能将其分离并准确测定。

4.3 定量结果分析 13 批药材中白僵菌素质量分数为 0.045~0.723 mg/g , RSD 为 28.0%, 即不同产地和批次僵蚕差异较大。其中, 四川产僵蚕中白僵菌素含有量相对较高, 而广西产相对较低, 最低仅为 0.045 mg/g (广西宜宾), 而且炮制过的更低。此外, 3 批制剂中白僵菌素含有量更低 (0.015~0.026 mg/g), 利用本研究所建立的方法进行测定时更具优势。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 375.
[2] 景常林. 重用僵蚕治疗糖尿病周围神经病变[J]. 中医杂志, 2009, 50(9): 819.
[3] 涂雅丹, 余小萍. 僵蚕在肺系疾病中的临床应用及不良反应[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(12): 64-66.
[4] 张学华, 张 群. 僵蚕治疗慢性迁延性肝炎患者丙氨酸氨基转移酶升高[J]. 中医杂志, 2009, 50(9): 819.
[5] 田 蜜, 陈 芳, 余 坊. 僵蚕的研究进展[J]. 中医药导

报, 2015, 21(15): 101-104.

[6] Castlebury L A, Sutherland J B, Tanner L A, *et al.* Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria[J]. *World J Microb Biot*, 1999, 15(1): 119-121.
[7] Meca G, Sospedra I, Soriano J M, *et al.* Antibacterial effect of the bioactive compound beauvericin produced by *Fusarium proliferatum* on solid medium of wheat[J]. *Toxicol*, 2010, 56(3): 349-354.
[8] Jow G M, Chou C J, Chen B F, *et al.* Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome C release, caspase 3 activation: the causative role of calcium[J]. *Cancer Lett*, 2004, 216(2): 165-173.
[9] Lucia C, Fornelli F, Ramires R, *et al.* Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin[J]. *Pharmacol Res*, 2004, 49(1): 73-77.
[10] 牛 蓓, 郭晓恒, 严铸云, 等. 16 批不同来源僵蚕白僵菌素含量测定及微量元素分析[J]. 成都大学学报 (自然科学版), 2016, 35(2): 120-123.
[11] 陈 辉, 何金晓, 刘佳灵, 等. 一种安全快速测定僵蚕中白僵菌素含量的高效液相方法研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(4): 823-825.
[12] Cheng T F, Jia Y R, Zuo Z, *et al.* Quality assessment of traditional Chinese medicine herb couple by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry combined with chemometrics[J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(7): 1223-1231.
[13] Li Z, Xiao S, Ai N, *et al.* Derivative multiple reaction monitoring and single herb calibration approach for multiple components quantification of traditional Chinese medicine analogous formulae [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1376: 126-142.
[14] 田婷婷. 白僵菌素的处方前初步药理学研究及酮康唑——白僵菌素复方片剂的研究[D]. 济南: 山东大学, 2015.