

HPLC-MS 法测定扶正平消胶囊中 5 种成分

田文君^{1,2}, 吕磊¹, 赵亮¹, 张海¹, 柴逸峰³, 张国庆^{1*}

1. 第二军医大学附属东方肝胆外科医院 药材科, 上海 200438

2. 中国人民解放军第一七五医院厦门大学附属东南医院 药剂科, 福建 漳州 363000

3. 第二军医大学药学院 药物分析学教研室, 上海 200433

摘要: 目的 建立扶正平消胶囊中苦杏仁苷、芍药苷、贝母素甲、黄芪甲苷和吴茱萸次碱 5 种成分的 HPLC-MS 测定方法。方法 色谱条件: 色谱柱为 Agilent Eclipse plus C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 乙腈-0.1% 甲酸水为流动相, 梯度洗脱; 质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子检测, SIM 模式。结果 苦杏仁苷、芍药苷、贝母素甲、黄芪甲苷和吴茱萸次碱的定量限分别为 12.9、32.2、1.00、1.21、0.40 ng/mL, 检测限分别为 6.46、6.44、0.25、0.61、0.16 ng/mL; 在相应的线性范围内 $r > 0.999$ 0; 峰面积之比的日内精密度 (RSD) 和日间精密度 (RSD) 均小于 2%, 平均回收率均在 98%~102%。结论 本方法可同时测定扶正平消胶囊中苦杏仁苷、芍药苷、贝母素甲、黄芪甲苷和吴茱萸次碱的量, 快速简便, 实用性强。**关键词:** 扶正平消胶囊; 苦杏仁苷; 芍药苷; 贝母素甲; 黄芪甲苷; 吴茱萸次碱; HPLC-MS
中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)09-1736-04

Determination of five components in Fuzheng Pingxiao Capsula by HPLC-MS

TIAN Wen-jun^{1,2}, LV Lei¹, ZHAO Liang¹, ZHANG Hai¹, CHAI Yi-feng³, ZHANG Guo-qing¹

1. Department of Pharmacy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Department of Pharmacy, No.175 Hospital of PLA, Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University, Zhangzhou 363000, China

3. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract: **Objective** To simultaneously determine the contents of five components (amygdalin, paeoniflorin, peimine, astragaloside IV and rutaecarpine) in Fuzheng Pingxiao Capsula by LC-MS. **Methods** Chromatographic separation was achieved with gradient elution by Agilent Eclipse plus C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and an Agilent 1100 Mass Spectrometer system was operated under the SIM mode with electrospray positive ionization (ESI). The mobile phase is acetonitrile-0.1% methanoic acid. **Results** The LOQ of amygdalin, paeoniflorin, peimine, astragaloside IV, and rutaecarpine in Fuzheng Pingxiao Capsula were 12.9, 32.2, 1.00, 1.21, and 0.40 ng/mL, and the LOD were 6.46, 6.44, 0.25, 0.61, and 0.16 ng/mL, respectively. Within the linear range, $r > 0.999$ 0. Both intra-day and inter-day precision with RSD was less than 2%. The average recovery rates of the five components were in the range of 98%—102%. **Conclusion** This method is fast, sensitive, and reproducible. It could be used to determine amygdalin, paeoniflorin, peimine, astragaloside IV, and rutaecarpine in Fuzheng Pingxiao Capsula under the same chromatogram condition.

Key words: Fuzheng Pingxiao Capsula; amygdalin; paeoniflorin; peimine; astragaloside IV; rutaecarpine; HPLC-MS

扶正平消胶囊为第二军医大学东方肝胆外科医院院内制剂, 由东方肝胆外科医院肝外二科陈汉教授经多年临床应用验方“清消丸”(曾又名“肿瘤丸”)改变剂型而得。扶正平消胶囊由黄芪、吴茱萸、桃仁、浙贝母、白芍等 28 味中药组成, 针对中医学所称肿瘤患者气滞血瘀、热毒内蕴、肝气疏泄、气阴两虚的病机理论, 采用行气破血、扶正抗邪的抗癌

中药对症治疗, 并结合临床长期研究, 筛选精炼组方而成, 具有扶正祛邪、活血散结的功效。东方肝胆外科医院曾对原方进行过较为深入的基础和临床研究, 证明其能延长肝癌大鼠的生存期^[1]。目前仅有应用比色法对其中的黄芪总皂苷进行定量测定的方法^[2]。随着中药质量标准的进步和发展, 有必要对中药复方制剂中多种成分进行定量测定, 以对其

收稿日期: 2010-12-30

作者简介: 田文君 (1981—), 男, 甘肃陇南人, 硕士研究生, 研究方向为复杂药物体系分析。Tel: (021)81875581 E-mail: jacky0518@tom.com

*通讯作者 张国庆 Tel: (021)81875571 E-mail: gqzhang@smmu.edu.cn

质量进行更好地控制。本实验建立了高效液相-质谱(HPLC-MS)联用法对扶正平消胶囊中的苦杏仁苷、芍药苷、贝母素甲、黄芪甲苷和吴茱萸次碱同时进行测定,为其质量控制提供依据。

1 仪器与材料

Agilent 1100 LC/MSD 高效液相色谱仪(安捷伦公司,美国),四极杆质谱检测器,ChemStation 色谱工作站;Mettler AE240 型电子分析天平(梅特勒-托利多公司,瑞士),SB3200—T 超声仪(上海科导超声仪器公司,中国)。

甲醇、乙腈为色谱纯(购自 Fisher 公司),甲酸为色谱纯(购自 Sigma 公司),水为纯化水。苦杏仁苷(批号 110820-200002)、芍药苷(批号 110736-200933)、贝母素甲(批号 110710-201024)、黄芪甲苷(批号 110781-200613)、吴茱萸次碱(批号 110801-200304)、人参皂苷 R_{g1} (批号 110703-200322)对照品均购自中国药品生物制品检定所,质量分数均大于 98%。扶正平消胶囊(批号 20091201、20100401、20100801)由东方肝胆外科医院制剂室提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent Eclipse plus C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱程序:0~5 min, 5%~20% A; 5~10 min, 20% A; 10~20 min, 20%~25% A; 20~30 min, 25%~60% A; 30~40 min, 60% A; 体积流量 1.0 mL/min,柱后分流比为 3:1,柱温 25 $^{\circ}$ C;进样量 5 μ L。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),正离子检测,选择离子监测模式:苦杏仁苷 $[M+Na]^+$, m/z 480.2;芍药苷 $[M+Na]^+$, m/z 503.2;贝母素甲 $[M+H]^+$, m/z 432.4;黄芪甲苷 $[M+Na]^+$, m/z 807.6;吴茱萸次碱 $[M+H]^+$, m/z 288.1;内标为人参皂苷 R_{g1} $[M+Na]^+$, m/z 823.5。干燥气(N_2)体积流量 9.0 L/min,雾化气压力为 275.8 kPa,干燥气温度 350 $^{\circ}$ C,裂解电压分别为 70 V(苦杏仁苷、黄芪甲苷、人参皂苷 R_{g1})、140 V(芍药苷)、120 V(贝母素甲)、130 V(吴茱萸次碱),毛细管电压为 3.5 kV。

2.3 对照品储备液的制备

精密称取苦杏仁苷对照品 8.08 mg、芍药苷对照品 8.05 mg、贝母素甲对照品 10.04 mg、黄芪甲苷对

照品 6.05 mg、吴茱萸次碱对照品 8.01 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,分别制成含苦杏仁苷 808.0 μ g/mL、芍药苷 805.0 μ g/mL、贝母素甲 1.004 mg/mL、黄芪甲苷 605.0 μ g/mL、吴茱萸次碱 801.0 μ g/mL 的对照品储备液,待用。

2.4 内标溶液的制备

精密称取人参皂苷 R_{g1} 对照品 6.06 mg,置 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,制成人参皂苷 R_{g1} 606.0 μ g/mL 的内标溶液,待用。

2.5 供试品溶液的制备

精密称取扶正平消胶囊内容物 6.484 4 g,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇 25 mL,称定质量,水浴加热回流 1 h,放冷,补足减失的质量,混匀,滤过。精密吸取 5 mL 续滤液置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,混匀,经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存,备用。

2.6 阴性对照液的制备

按处方量精密称取除桃仁、白芍、浙贝母、黄芪、吴茱萸外的 23 种药材,按处方工艺制备阴性对照样品,并按“2.5”项下条件制备阴性对照液。

2.7 线性关系考察

精密吸取苦杏仁苷对照品溶液 2 mL、芍药苷对照品溶液 0.1 mL、贝母素甲对照品溶液 0.2 mL、黄芪甲苷对照品溶液 0.4 mL、吴茱萸次碱对照品溶液 0.2 mL,置 10 mL 量瓶中,甲醇稀释,制成含苦杏仁苷 161.6 μ g/mL、芍药苷 8.05 μ g/mL、贝母素甲 20.08 μ g/mL、黄芪甲苷 24.2 μ g/mL 和吴茱萸次碱 16.02 μ g/mL 的混合对照品溶液。以甲醇按 1、2、5、10、20、50 的比例稀释成不同质量浓度的混合对照品溶液,在每份混合对照品溶液中精密加入内标溶液 1 mL,按“2.1”项和“2.2”项下条件进样分析,以质量浓度为横坐标(X),峰面积值与内标峰面积值的比值为纵坐标(Y)进行线性回归,结果见表 1。

表 1 线性关系考察
Table 1 Linear relationship

化合物	回归方程	r	线性范围/ (μ g·mL $^{-1}$)
苦杏仁苷	$Y=0.0298X+0.1169$	0.9995	3.23~161.60
芍药苷	$Y=0.0424X+0.0095$	0.9993	0.16~8.05
贝母素甲	$Y=0.4804X+0.6295$	0.9991	0.40~20.08
黄芪甲苷	$Y=0.0406X+0.0280$	0.9990	0.48~24.20
吴茱萸次碱	$Y=0.5615X+0.4204$	0.9990	0.32~16.02

2.8 定量限和检测限

取混合对照品溶液,以甲醇依次稀释成梯度质量浓度溶液,按“2.1”项和“2.2”项下条件进行分析,以信噪比10倍($S/N=10$)和3倍($S/N=3$)时的质量浓度为定量限和检测限。苦杏仁苷、芍药苷、贝母素甲、黄芪甲苷和吴茱萸次碱的定量限分别为12.9、32.2、1.00、1.21、0.40 ng/mL,检测限分别为6.46、6.44、0.25、0.61、0.16 ng/mL。

2.9 精密度试验

取低、中、高3种质量浓度(苦杏仁苷3.232、32.32、161.6 $\mu\text{g/mL}$,芍药苷0.161、1.61、8.05 $\mu\text{g/mL}$,贝母素甲0.401 6、4.016、20.08 $\mu\text{g/mL}$,黄芪甲苷0.484、4.840、24.20 $\mu\text{g/mL}$,吴茱萸次碱0.320 4、3.204、16.02 $\mu\text{g/mL}$)的混合对照品溶液5 μL ,各连续进样3次,以及分别连续进样3 d,按“2.1”项和“2.2”项下条件分析,进行日内和日间精密度考察,其峰面积比的RSD见表2。

2.10 稳定性试验

取扶正平消胶囊同一供试品(批号20091201)溶液,精密加入内标溶液1 mL,分别在0、3、6、9、12、18、24、36、48 h,按“2.1”项和“2.2”项下条件进样分析,计算供试品溶液中5种成分对内标的峰面积比,其峰面积比的RSD见表2。结果表明,供试品溶液在48 h内稳定。

2.11 重现性试验

平行精密称取扶正平消胶囊(批号20091201)样品6份,制备供试品溶液,精密加入内标溶液1 mL,按“2.1”项和“2.2”项下条件分析测定5种成分,其5种成分质量分数的RSD见表2。

2.12 回收率试验

称取约6.50 g扶正平消胶囊(批号20091201)药粉3份,精密称定,分别按低、中、高3种水平(苦杏仁苷20、40、60 μL ,芍药苷20、40、60 μL ,

表2 扶正平消胶囊中5种成分的精密性、稳定性、重现性考察结果

Table 2 Precision, stability, and reproducibility of five components in Fuzheng Pingxiao Capsula

化合物	精密度 RSD/%		稳定性	重现性
	日内	日间	RSD/%	RSD/%
苦杏仁苷	1.50	1.4	2.0	1.90
芍药苷	1.10	2.0	2.0	1.40
贝母素甲	0.95	1.6	1.5	0.89
黄芪甲苷	1.20	1.7	1.5	0.98
吴茱萸次碱	0.88	1.9	1.2	1.20

贝母素甲25、50、75 μL ,黄芪甲苷40、80、120 μL ,吴茱萸次碱45、90、135 μL)精密加入5种对照品储备液,按“2.5”项下操作,每个质量浓度平行操作3份,测定并计算回收率。结果苦杏仁苷、芍药苷、贝母素甲、黄芪甲苷、吴茱萸次碱的平均回收率分别为100.6%、101.0%、100.8%、100.1%、99.71%,RSD分别为1.04%、0.61%、0.95%、1.43%、0.89%。

2.13 样品测定

取3个批次扶正平消胶囊各45粒,每个批次取3份,精密称取内容物,制备供试品溶液,精密加入内标溶液1 mL,按“2.1”项和“2.2”项下条件分析测定,计算质量分数,结果见图1及表3。

3 讨论

3.1 检测对象的选择

选择的5种成分分别是本处方中桃仁、白芍、浙贝母、黄芪、吴茱萸5味药材的特有成分,这5味药材在处方中各发挥不同作用。黄芪,为主药,属扶正一族,补气升阳;桃仁,主攻瘀血而为肝药,活血化瘀、破血行气;浙贝母,苦寒泄降、散结解毒;白芍,养阴柔肝、缓中止痛、敛阴收汗;吴茱萸,散寒止痛^[3]。因此,对这5个成分进行定量控制,对此复杂组方的质量控制,具有重要意义。

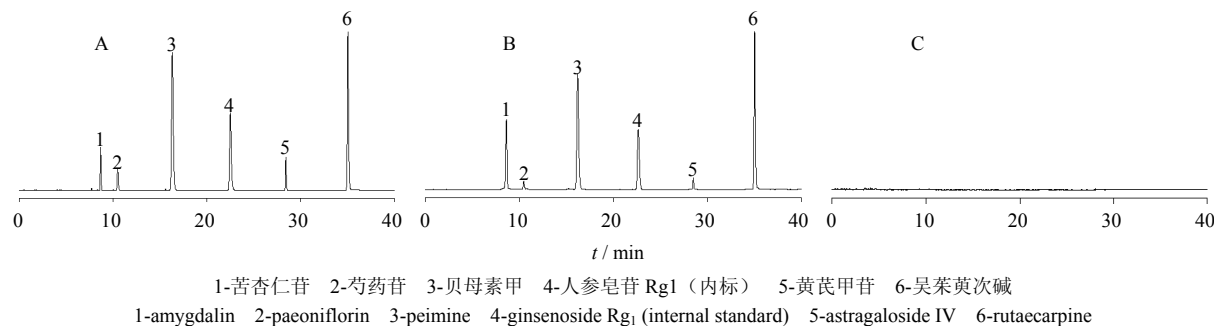


图1 5种对照品(A)、扶正平消胶囊样品(B)、阴性对照(C)的LC-MS色谱图

Fig. 1 LC-MS chromatograms of five reference substances (A), Fuzheng Pingxiao Capsula sample (B), and negative control (C)

表3 扶正平消胶囊中5种成分的测定 ($n=9$)
Table 3 Determination of five components in Fuzheng Pingxiao Capsula ($n=9$)

批 次	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)				
	苦杏仁苷	芍药苷	贝母素甲	黄芪甲苷	吴茱萸次碱
20091201	41.563	4.555	8.218	2.752	5.994
20100401	38.143	4.212	7.089	2.446	5.371
20100801	44.437	3.477	5.030	2.935	2.120

3.2 实验条件的优化

3.2.1 提取条件优化 比较了加热回流和超声提取两种方法,结果表明加热回流好于超声提取。分别考察了70%甲醇溶液、甲醇和70%乙醇溶液、乙醇的提取效果,结果甲醇提取效果最好。以甲醇回流提取30、60、90 min,结果表明60、90 min 5种成分的提取率基本相同。综合考虑多种因素,采用甲醇加热回流60 min制备供试品溶液,简单、快速、提取率高。

3.2.2 色谱柱选择 对Agilent Eclipse plus C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), Agilent Zorbax SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Waters Atiantis C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分别进行了考察,发现Agilent Eclipse plus C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离效果最佳。

3.2.3 色谱、质谱条件优化 对液相流动相甲醇-水和乙腈-水体系进行了比较,选择了乙腈-水体系,同时发现向水中加入甲酸,使得分离效果及峰型更佳,比较了加入0.1%、0.2%、0.5%甲酸的分离效果,发现加入0.1%甲酸效果最佳。对于质谱条件的优化,考察了离子监测模式,本实验中5种成分在正离子检测模式下响应较好。文献报道黄芪甲苷在负离子检测模式下响应较好^[4],而在本实验条件下,黄芪甲苷在负离子检测模式下无响应;此外,芍药苷在正、负离子检测模式下均有响应,但经对比发现在本实验条件下,正离子检测模式下响应更好。质谱的最佳工作参数是通过流动注射分析(FIA)方法,对干燥气体积流量、雾化器压力及裂解电压等条件进行优化后确定的。

3.2.4 内标选择 经预试验表明待测的制剂样品中不含有人参皂苷Rg₁,且在“2.1”项和“2.2”项所述的色谱-质谱条件下,该成分与待测的苦杏仁苷、芍药苷、贝母素甲、黄芪甲苷和吴茱萸次碱能够完全分离,出峰时间稳定,因此本实验选用人参皂苷

Rg₁作为内标。

扶正平消胶囊在东方肝胆外科医院使用多年,临床效果较好,但由于其组方复杂,一直以来缺少质量控制方法。目前对这5种成分的定量测定方法主要有高效液相色谱法^[5-9],薄层扫描法^[10-12],比色法^[2],高效毛细管电泳法^[13-14]。未见有在如此复杂组方中同时测定若干成分的报道。本方法利用LC-MS的选择离子监测模式(SIM),同时测定其中5种成分的量,避免了其他组分的干扰,具有简单、灵敏、准确、实用的特点,有利于进一步完善扶正平消胶囊质量控制及其相关研究。

参考文献

- [1] 胡宏楷. 复方中药“肿瘤丸”对大鼠移植型肝癌的疗效观察 [J]. 第二军医大学学报, 1985, 6(5): 287-289.
- [2] 龚纯贵, 李捷伟, 赵 亮, 等. 比色法测定扶正平消胶囊黄芪总皂苷的含量 [J]. 药学实践杂志, 2002, 20(5): 300-302.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [4] 李 翔, 朱臻宇, 王 彬, 等. HPLC-MS测定黄芪药材中3种成分的含量 [J]. 药学报, 2006, 41(8): 793-796.
- [5] 黄良永, 王永慧, 雷 震, 等. HPLC法同时测定宣肺止咳糖浆中盐酸麻黄碱和苦杏仁苷的含量 [J]. 中国药师, 2010, 13(6): 837-838.
- [6] 柏 冬, 范 斌, 牛晓红, 等. HPLC-系统内标法测定桂枝汤中芍药苷、甘草苷、肉桂酸、桂皮醛和甘草酸 [J]. 中草药, 2010, 41(3): 387-390.
- [7] 曾荣香, 刘丽丽, 陈丽华, 等. HPLC-ELSD测定不同来源浙贝母中贝母素甲的含量研究 [J]. 江西中医学院学报, 2009, 21(5): 51-52.
- [8] 吴青业, 周恩丽, 付小环, 等. HPLC-ELSD法测定芪葛口服液黄芪甲苷 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1305-1306.
- [9] 苏娟娟, 张 璐, 何明珍, 等. HPLC同时测定吴茱萸中吴茱萸碱、吴茱萸次碱和吴茱萸内酯的含量 [J]. 江西中医学院学报, 2009, 21(6): 53-54.
- [10] 苏丽静, 吴伟东. 薄层扫描法测定乳核内消液中贝母素甲的含量 [J]. 广东药学, 2005, 15(1): 4-5.
- [11] 张崇禧, 王艳芳, 蔡恩博, 等. 薄层扫描法分析黄芪中黄芪甲苷含量 [J]. 资源开发与市场, 2010, 26(9): 769-772.
- [12] 朱坤福. 薄层扫描法测定吴茱萸颗粒剂中吴茱萸次碱的含量 [J]. 时珍国医国药, 2003, 14(6): 337-338.
- [13] 钱燕娟, 梁 静, 蒋小丰, 等. 高效毛细管电泳法测定麻黄汤中3种有效成分的含量 [J]. 中国临床药学杂志, 2008, 17(6): 371-373.
- [14] 罗 敏, 罗东玲, 席先蓉. HPCE测定戊己丸中盐酸小檗碱与芍药苷的含量 [J]. 南京中医药大学学报, 2009, 25(1): 67-69.