

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00524

· 论 著 ·

HPLC-MS 法同时测定扶正平消胶囊中龙胆苦苷、甘草苷、迷迭香酸、哈巴俄苷的含量

田文君^{1,2}, 贾 静¹, 赵 亮¹, 吕 磊¹, 李悦悦¹, 张 海¹, 张国庆^{1*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院药材料科, 上海 200438

2. 解放军 175 医院暨厦门大学附属东南医院药剂科, 漳州 363000

[摘要] **目的** 建立扶正平消胶囊中 4 种成分含量的高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)测定方法。**方法** 色谱条件: Agilent Eclipse plus C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 乙腈(A)-0.1%甲酸水(B)为流动相, 梯度洗脱程序为 0 min(A:B=15:85); 30 min(A:B=40:60)。质谱条件: 采用电喷雾离子源(ESI), 负离子电离, 选择性离子监测(SIM)模式。**结果** 龙胆苦苷、甘草苷、迷迭香酸和哈巴俄苷的定量限分别为 5.73、6.37、6.50 和 6.46 ng/ml, 检测限分别为 0.46、0.32、0.33 和 0.32 ng/ml; 在相应的线性范围内, $r > 0.999 0$; 待测物与内标的峰面积之比的日内精密度和日间精密密度均小于 2%, 平均回收率为 98%~102%。**结论** 所建立的 HPLC-MS 方法可同时测定扶正平消胶囊中龙胆苦苷、甘草苷、迷迭香酸和哈巴俄苷的含量, 快速、简便, 实用性强。

[关键词] 扶正平消胶囊; 龙胆苦苷; 甘草苷; 迷迭香酸; 哈巴俄苷; HPLC-MS**[中图分类号]** R 927.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2011)05-0524-04

HPLC-MS in simultaneous determination of 4 compounds in *Fuzhengpingxiao* capsule: gentiopicroside, liquiritin, rosmarinic acid and harpagoside

TIAN Wen-jun^{1,2}, JIA Jing¹, ZHAO Liang¹, LÜ Lei¹, LI Yue-yue¹, ZHANG Hai¹, ZHANG Guo-qing^{1*}

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, Fujian, China

[Abstract] **Objective** To establish a HPLC-MS method to simultaneously determine the contents of gentiopicroside, liquiritin, rosmarinic acid and harpagoside in *Fuzhengpingxiao* capsule. **Methods** The chromatographic separation was performed on a Agilent Eclipse plus C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase of acetonitrile(A)-0.1% methanoic acid(B) (0-30 min, 15%A-40%A), eluted at a flow rate of 1.0 ml/min and with a split ratio of 3:1. Negative ionization and selected ion monitoring(SIM) mode on Mass were selected. **Results** The limit of quantitation(LOQ) values of gentiopicroside, liquiritin, rosmarinic acid and harpagoside were 5.73, 6.37, 6.50, and 6.46 ng/ml, and the limit of detection (LOD) values were 0.46, 0.32, 0.33 and 0.32 ng/ml, respectively. Good linearity ($r > 0.999 0$) was obtained over the investigated concentration ranges. Reproducibility was evaluated by intra- and inter-day assays, and RSD values were below 2%. The average recoveries of the 4 compounds were within the range of 98%-102%. **Conclusion** We have established a rapid and efficient HPLC-MS method for determination of 4 constituents in *Fuzhengpingxiao* capsule: gentiopicroside, liquiritin, rosmarinic acid and harpagoside.

[Key words] *Fuzhengpingxiao* capsule; gentiopicroside; liquiritin; rosmarinic acid; harpagoside; HPLC-MS

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(5):524-527]

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, 由肝外二科陈汉教授经多年临床应用方“清消丸”(曾用名“肿瘤丸”)改变剂型而得。扶正平消胶囊由玄参、夏枯草、龙胆、甘草、黄芪等 28

味中药组成, 针对中医学所称肿瘤患者气滞血瘀、热度内蕴、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

[收稿日期] 2010-12-29

[接受日期] 2011-03-09

[作者简介] 田文君, 硕士生. E-mail: jacky0518@tom.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875571, E-mail: gqzhang@smmu.edu.cn

的功效,基础和临床研究证明其能延长肝癌鼠的生存期^[1]。扶正平消胶囊在我院使用多年,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。目前仅有应用比色法对其中的黄芪总皂苷进行含量测定的报道^[2]。本研究建立了高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)联用法同时对扶正平消胶囊中的龙胆苦苷、甘草苷、迷迭香酸和哈巴俄苷进行含量测定,为其质量控制提供依据。文献显示,对这4种成分的含量测定方法主要有高效液相色谱法^[3-6]、毛细管电泳法^[7-9]、薄层扫描法^[10]。本方法利用 HPLC-MS 的选择离子监测(SIM)模式同时测定其中4种成分的含量,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的质量控制及其相关研究。

1 仪器和试剂

1.1 仪器设备 Agilent 1100 HPLC/MSD 高效液相色谱仪,四极杆质谱检测器,ChemStation 色谱工作站;分析天平(Mettler AE240),超声清洗机[SB3200-T,必能信超声(上海)有限公司]。

1.2 实验试剂 甲醇和乙腈为色谱纯(Fisher 公司),甲酸为色谱纯(Sigma 公司),水为纯化水。龙胆苦苷、甘草苷、迷迭香酸、哈巴俄苷对照品均购自中国药品生物制品检定所,纯度均大于98%。扶正平消胶囊(批号分别为20091201、20100401、20100801)由第二军医大学东方肝胆外科医院制剂室提供。

2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Eclipse plus C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)。流动相:A 为乙腈,B 为 0.1% 甲酸水;梯度洗脱程序(0 min, A : B=15 : 85; 30 min, A : B=40 : 60)。流速 1.0 ml/min,柱后分流比为 3 : 1,柱温 25℃;进样量 5 μl。

2.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI)负离子模式检测:龙胆苦苷[M+HCOO]⁻, *m/z* 401.1;甘草苷[M-H]⁻, *m/z* 417.1;迷迭香酸[M-H]⁻, *m/z* 359.1;哈巴俄苷[M+HCOO]⁻, *m/z* 539.2;内标为人参皂苷 Rf [M-H]⁻, *m/z* 799.5。干燥气(N₂)流速为 8.0 L/min,雾化气压力为 35 psi(1 psi=6 894.8 Pa),干燥气温度为 350℃,裂解电压分别为 70 V(龙胆苦苷)、130 V(甘草苷、人参皂苷 Rf)、120 V(迷迭香酸)、100 V(哈巴俄苷),毛细管电压为 3.5 kV。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取龙胆苦苷对照品 11.45 mg、甘草苷对照品 7.96 mg、迷迭香酸对照

品 8.13 mg、哈巴俄苷对照品 8.08 mg,置于 10 ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,分别制成龙胆苦苷 1.145 0 mg/ml、甘草苷 0.796 0 mg/ml、迷迭香酸 0.813 0 mg/ml、哈巴俄苷 0.808 0 mg/ml 的对照品溶液,待用。

2.3.2 内标溶液制备 精密称取人参皂苷 Rf 对照品 5.06 mg,置于 10 ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,制成人参皂苷 Rf 0.506 0 mg/ml 的内标溶液,待用。

2.3.3 样品溶液制备 精密称取扶正平消胶囊内容物适量,置圆底烧瓶中,精密加入甲醇 25 ml,称质量,水浴加热回流 1 h,放冷,补足失质量,混匀,过滤。精密吸取 5 ml 续滤液置 10 ml 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,混匀,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,置于 4℃ 冰箱保存备用。

2.3.4 空白对照样品溶液制备 按处方量精密称取除龙胆、甘草、夏枯草、玄参外的 24 种药材,按处方工艺制备空白对照样品,并按 2.3.3 项下条件制备空白对照样品溶液。

2.4 标准曲线的制备 精密吸取龙胆苦苷及甘草苷对照品溶液各 1 ml、迷迭香酸对照品溶液 0.4 ml、哈巴俄苷对照品溶液 0.2 ml,置于 10 ml 容量瓶中,甲醇稀释,制成内含龙胆苦苷 114.50 μg/ml、甘草苷 79.60 μg/ml、迷迭香酸 32.52 μg/ml 和哈巴俄苷 16.16 μg/ml 的混合对照品溶液。以甲醇按 1、2、5、10、20、50 的比例稀释成不同浓度的混标溶液,在每个混标溶液中加入 0.6 ml 内标溶液,按 2.1 项和 2.2 项下条件分析。以对照品溶液的浓度为横坐标(*x*),峰面积值与内标峰面积值之比为纵坐标(*y*)进行线性回归,结果见表 1。

表 1 标准曲线结果

Tab 1 Results of standard curves

| Compound | Linear equation | <i>r</i> | Linear range $\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$ |
|-----------------|--------------------|----------|---|
| Gentiopicroside | $y=0.0438x+0.1720$ | 0.9990 | 2.29-114.50 |
| Liquiritin | $y=0.0640x+0.0234$ | 0.9992 | 1.59-79.60 |
| Rosmarinic acid | $y=0.0720x+0.0257$ | 0.9994 | 0.65-32.52 |
| Harpagoside | $y=0.0821x+0.0144$ | 0.9995 | 0.32-16.16 |

2.5 方法学考察

2.5.1 精密度实验 以低、中、高 3 种浓度的混合对照品溶液连续进样 3 次,以及连续 3 d 分别进样,按 2.1 项和 2.2 项下条件分析,进行日内和日间精密度(RSD)考察,结果(表 2)表明精密度均良好。

2.5.2 稳定性实验 分别取扶正平消胶囊同一样品溶液在 0、3、6、9、12、18、24、36、48 h 加入等量内标

溶液,按 2.1 项和 2.2 项下条件进行分析,计算样品溶液中 4 种成分对内标的峰面积比,进行稳定性考察,其峰面积比的 RSD 见表 3。结果表明,样品 48 h 内稳定性良好。

表 2 4 种化合物精密考察结果

Tab 2 Precision results of 4 compounds

| Compound | Concentration $\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1})$ | RSD(%) | |
|-----------------|--|-----------|-----------|
| | | Intra-day | Inter-day |
| Gentiopicroside | 2.29 | 0.60 | 1.83 |
| | 11.45 | 0.84 | 1.67 |
| | 114.50 | 1.30 | 0.53 |
| Liquiritin | 1.59 | 1.19 | 1.48 |
| | 7.96 | 0.78 | 1.46 |
| | 79.60 | 0.31 | 1.44 |
| Rosmarinic acid | 0.65 | 0.84 | 1.85 |
| | 3.25 | 1.43 | 1.90 |
| | 32.52 | 0.70 | 1.68 |
| Harpagoside | 0.32 | 0.51 | 1.99 |
| | 1.61 | 0.79 | 0.83 |
| | 16.16 | 0.46 | 1.55 |

RSD: Relative standard deviation

2.5.3 重复性实验 平行精密称取扶正平消胶囊样品 6 份,按 2.3.3 项下方法制备样品溶液,加入等量内标溶液,按 2.1 项和 2.2 项下条件分析测定 4 种成分的含量,其峰面积比 RSD 见表 3。结果表明,样品重复性均良好。

表 3 扶正平消胶囊中 4 种成分的稳定性、重复性考察结果

Tab 3 Stability and reproducibility of 4 compounds in *Fuzhengpingxiao* capsule

| Compound | Stability RSD | Reproducibility RSD |
|-----------------|---------------|---------------------|
| | | |
| Gentiopicroside | 1.23 | 1.31 |
| Liquiritin | 1.77 | 1.68 |
| Rosmarinic acid | 1.69 | 1.01 |
| Harpagoside | 1.36 | 1.03 |

RSD: Relative standard deviation

2.5.4 定量限和检测限 取混合对照品溶液,用甲醇依次稀释成梯度浓度溶液,按 2.1 项和 2.2 项下条件进行分析,按信噪比 10 倍(S/N=10)和 3 倍(S/N=3)时的浓度为定量限(LOQs)和检测限(LODs)。龙胆苦苷、甘草苷、迷迭香酸和哈巴俄苷的定量限分别为 5.73、6.37、6.50 和 6.46 ng/ml,检测限分别为 0.46、0.32、0.33 和 0.32 ng/ml。

2.5.5 加样回收率实验 精密称取扶正平消胶囊药粉 3 份,分别按低、中、高 3 种浓度精密加入 4 种对照贮备液龙胆苦苷 45、90、135 μl ,甘草苷 25、50、75 μl ,迷迭香酸 10、20、30 μl ,哈巴俄苷 10、20、30 μl ,按 2.3.3 项下条件操作,每个浓度平行实验 3 份,测定并计算回收率。结果(表 4)表明,回收率良好。

表 4 扶正平消胶囊中 4 种成分加样回收率考察结果

Tab 4 Recovery of 4 compounds in *Fuzhengpingxiao* capsule

| Compound | Content $m/\mu\text{g}$ | Dosage $m/\mu\text{g}$ | Recovery ($n=3, \%$) |
|-----------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Gentiopicroside | 147.50 | 51.52 | 99.53±0.85 |
| | | 103.1 | 99.91±0.27 |
| | | 154.6 | 101.10±0.32 |
| Liquiritin | 45.49 | 19.90 | 101.62±0.86 |
| | | 39.80 | 100.71±1.34 |
| | | 59.70 | 100.58±0.43 |
| Rosmarinic acid | 16.39 | 8.130 | 101.79±0.65 |
| | | 16.26 | 101.44±0.43 |
| | | 24.39 | 101.45±0.27 |
| Harpagoside | 2.56 | 8.080 | 101.26±1.25 |
| | | 16.16 | 101.38±0.73 |
| | | 24.24 | 101.29±1.17 |

2.6 样品含量测定 取 3 个批次扶正平消胶囊各 45 粒,精密称取内容物,按 2.3.3 项下方法制备样品溶液,加入等量内标溶液,按 2.1 项和 2.2 项下条件分析测定并计算含量,结果见表 5 及图 1。

表 5 不同批次扶正平消胶囊中 4 种成分的含量

Tab 5 Determination of 4 compounds in *Fuzhengpingxiao* capsule

($n=9, \bar{x}\pm s, 10^{-6}$)

| Batch | Gentiopicroside | Liquiritin | Rosmarinic acid | Harpagoside |
|----------|-----------------|------------|-----------------|-------------|
| 20091201 | 176.8±0.1 | 61.51±0.04 | 25.58±0.03 | 5.34±0.012 |
| 20100401 | 182.2±0.1 | 60.83±0.06 | 26.48±0.03 | 6.45±0.008 |
| 20100801 | 151.0±0.1 | 45.40±0.11 | 18.17±0.02 | 5.66±0.001 |

3 讨论

3.1 检测对象选择 选择龙胆苦苷、甘草苷、迷迭香酸、哈巴俄苷作为检测对象,是因为它们分别是本

处方中龙胆、甘草、夏枯草、玄参四味药材的特有成分,且为《中华人民共和国药典》规定的含量测定成分^[11]。这四味药材在处方中各发挥不同作用。龙胆:泄肝胆实火,除下焦湿热;夏枯草:清肝散结,治

瘰疬、癭瘤;玄参:滋阴,降火,除烦,解毒;甘草:和中缓急,调和诸药^[11]。因此,对这四个成分进行含量控制,对此复杂组方的质量控制具有重要意义。

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,加热回流提取更充分,所测组分峰高更高。分别考察了70%、100%甲醇溶液和70%、100%乙醇溶液的提取效果,结果100%甲醇溶液提取更充分,所测组分峰高更高。以100%甲醇水溶液回流提取30、60、90 min,结果表明,60 min和90 min时4种成分的提取率基本相同。综合考虑多种因素,应用100%甲醇加热回流60 min制备供试溶液,简单、快速、提取率高。

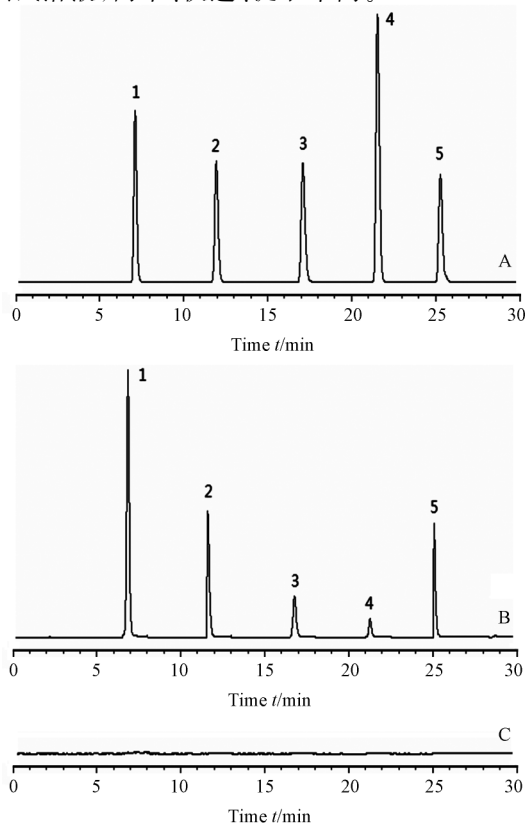


图1 4种对照品、扶正平消胶囊样品、空白对照样品 HPLC-MS 色谱图

Fig 1 HPLC-MS chromatograms of 4 reference substances(A), *Fuzhengpingxiao* capsule sample(B) and blank control(C)

1: Gentiopicroside; 2: Liquiritin; 3: Rosmarinic acid; 4: Harpagoside; 5: Ginsenoside Rf(Internal standard)

3.2.2 色谱柱的选择 我们对 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,乙腈-水体系分离效果好于甲醇-水体系,因此选择了乙腈-水体系,同时向水中加入甲酸,使得分离效果及峰型更佳,比较了加入0.1%、0.2%、0.5%甲酸,发现加入0.1%甲酸峰型好,且加大浓度后无明显改变,因此选用0.1%甲酸。对于质谱条件的优化,考察了离子检测模式,甘草苷、迷迭香酸在正、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,4种待测成分在负离子检测模式下峰高比正离子模式下更高。质谱的最佳工作参数通过流动注射分析(FIA)方法,对干燥气流速、雾化器压力及裂解电压等条件进行优化后确定。

3.2.4 内标选择 经预实验证明,待测的制剂样品中不含有参皂苷 Rf,且在2.1项和2.2项所述的色谱质谱条件下,该成分与待测的龙胆苦苷、甘草苷、迷迭香酸和哈巴俄苷能够完全分离,出峰时间稳定,因此本实验选用人参皂苷 Rf 作为内标。

本方法的精密度、稳定性、重复性及回收率均较好,可同时分析扶正平消胶囊中的4种成分,并且最低定量浓度为5.70 ng/ml,可用于活性成分浓度较低的相关研究。

[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: 287-289.
Hu H K. The curative effect of the Chinese medicine “Tumor Pill” on transplanted hepatoma of rats[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 1985, 6: 287-289.
- [2] 龚纯贵, 李捷伟, 赵亮, 张国庆. 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: 300-302.
- [3] 宋愿智, 姜华, 唐永红. HPLC法测定耳聾通窍丸中龙胆苦苷的含量[J]. 西北药学杂志, 2010, 25: 168-169.
- [4] 柏冬, 范斌, 牛晓红, 宋剑南. 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: 387-390.
- [5] 张小娟, 冯育林, 刘海燕, 王跃生, 杨世林, 刘红宁. RP-HPLC法测定肿节风饮片中异嗪皮啶和迷迭香酸[J]. 中草药, 2009, 40: 1917-1919.
- [6] 徐圣秋, 严令耕. RP-HPLC测定玄参配方颗粒中的哈巴俄苷[J]. 华西药理学杂志, 2009, 24: 655-656.
- [7] 高言明, 宋勤, 陈惠玲, 魏升华, 杨玉琴, 张丽艳, 等. 高效毛细管电泳测定龙胆中龙胆苦苷的含量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27: 1572-1574.
- [8] 李伟东, 蔡宝昌. HPCE法测定通塞脉微丸中甘草苷、甘草素和阿魏酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29: 599-601.
- [9] 刘伟, 郭兴辉. HPCE测定夏枯草中迷迭香酸含量[J]. 中国现代应用药理学杂志, 2009, 26: 632-634.
- [10] 江蔚新, 闫丽丽. 双波长薄层扫描法测定东北龙胆中龙胆苦苷的含量[J]. 黑龙江医药, 2008, 21: 5-6.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 80-81, 89, 108-109, 263.

[本文编辑] 尹茶