

HPLC-MS法同时测定红竹海狗丸中 4种成分的含量

张振¹, 魏春敏, 袁桂艳, 王本杰, 张蕊, 郭瑞臣^{*}

(山东大学 齐鲁医院 临床药理研究所, 济南 250012 1. 山东大学药学院, 济南 250012)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-质谱法同时测定中药复方制剂红竹海狗丸中人参皂苷 R_g、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素的含量。方法: 固定相为 Agilent Tc- C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 醋酸和乙腈, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL · min⁻¹; ESI⁺, 选择性监测 (SM) 质荷比 (*m/z*) 为 209, 321, 677, 823 的离子对, 内标为劳拉西泮。结果: 人参皂苷 R_g、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素分别在 2.02~12.12, 2.0~12.0, 0.53~1.86, 0.4~1.4 μg · mL⁻¹ 浓度范围内线性关系良好。红竹海狗丸每丸分别含人参皂苷 R_g (232.6 ± 0.64) μg, 淫羊藿苷 (669.0 ± 14.51) μg, 补骨脂素 (564 ± 34.71) μg 和异补骨脂素 (428 ± 20.17) μg。结论: 所建立的方法方便、快捷、稳定, 可同时测定红竹海狗丸多种成分含量。结果准确可靠, 可用于红竹海狗丸的制剂质量控制, 为其人体药动学研究提供依据。

关键词: 海狗丸; 高效液相色谱-质谱; 人参皂苷 R_g; 淫羊藿苷; 补骨脂素; 异补骨脂素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1812-05

HPLC-MS simultaneous determination of four constituents in Hongzhu Callrhinus pills

ZHANG Zhen¹, WEI Chun-min, YUAN Gui-yan, WANG Ben-jie, ZHANG Rui, GUO Rui-chen^{*}

(Institute of Clinical Pharmacology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

1. College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract Objective To establish an high-performance liquid chromatography-mass spectrum method for determination of panaxsaponin R_g, icariin, psoralen and isopsoralen in Hongzhu Callrhinus pills. **Methods** An Agilent Tc- C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used for the separation, and gradiently eluted by 0.1% acetic acid-acetonitrile with flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. AP-ESI with positive ion mode and the selected ion monitoring were used. The ion mass spectrum (*m/z*) of 209, 321, 677 and 823 were selected to quantify panaxsaponin R_g, icariin, psoralen and isopsoralen, respectively with lorazepam as an internal standard. **Results** The linear range of the calibration curves for panaxsaponin R_g, icariin, psoralen and isopsoralen were 2.02~12.12, 2.0~12.0, 0.53~1.86, 0.4~1.4 μg · mL⁻¹ respectively. The contents of panaxsaponin R_g, icariin, psoralen and isopsoralen per Hongzhu Callrhinus pill were (232.6 ± 0.64) μg, (669.0 ± 14.51) μg, (564 ± 34.71) μg and (428 ± 20.17) μg. **Conclusion** The established method is convenient, rapid and accurate, which can be used to determine four components in Hongzhu Callrhinus pills to control its qualities or to investigate its pharmacokinetic properties in human or animals.

Key words Callrhinus pills; HPLC-MS; panaxsaponin R_g; icariin; psoralen; isopsoralen

红竹海狗丸是由海马、狗鞭、鹿茸、人参、补骨脂、韭菜子、淫羊藿、当归、熟地及桑螵蛸制成的复方中药制剂, 具有温肾补阳和较强抗疲劳作用, 可增强性功能和性行为, 提高机体对寒冷、过热、剧烈运动、放射线、异体血清、细菌、毒品、麻醉品、激

素等多种有害因素的抵抗能力, 迅速恢复体能, 消除疲劳。本实验采用 HPLC-MS 法, 同时分离测定^[1~3]红竹海狗丸主要成分人参皂苷 R_g、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素的含量, 旨在确定中药复方制剂红竹海狗丸的指标成分及含量, 为红竹

* 通讯作者 Tel: (0531)82169636 E-mail: gwc7636@126.com

海狗丸的质量控制、动物或人体药动学研究提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 HPLC-MS 仪 (美国安捷伦科技公司); METTLER TOLEDO AX-205 电子天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司), 德国 BANDEL 超声波清洗机。

对照品人参皂苷 R_{g_1} (批号 110703-200726)、补骨脂素 (批号 110739-200613)、异补骨脂素 (批号 110738-200309)、劳拉西洋 (171253-200401) 和淫羊藿苷 (批号 110737-200312) 均购自中国药品生物制品检定所。红竹海狗丸 ($0.32\text{ g}\cdot\text{丸}^{-1}$) 由香港澳美制药厂提供, 批号为 071101。乙腈和甲醇均为色谱纯, 批号分别为 G02831 和 G06E1Q 美国 J.T. Baker 公司。醋酸为色谱纯, 批号为 409189 美国 TEDIA 公司。水为二次重蒸水。

2 色谱及质谱条件

采用 Agilent TC-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为 0.1% 醋酸 (A) 和乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~10 min 85% → 70% A; 10~30 min 70% → 50% A), 流速为 $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 检测波长 246 nm, 柱温 25 °C, 进样量 10 μL。

ESI⁺, 电喷雾电压为 344.7 kPa 干燥气 (N₂) 流速 $11\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 干燥气温度 350 °C, 毛细管电压 4 kV, 碎片电压 70 eV, m/z 扫描范围 120.0~1200.0 u 。人参皂苷 R_{g_1} 、补骨脂素、异补骨脂素、淫羊藿苷和劳拉西洋选择离子监测 (SM) 分别为 823.209, 209.677 和 321。

3 溶液的制备

3.1 样品溶液 取红竹海狗丸 40 丸, 研细, 精密称取 0.32 g (相当于 1 丸), 置 100 mL 烧杯中, 加甲醇 50 mL, 超声 (功率 430 W, 频率 35 kHz) 处理 30 min, 过滤, 滤液置 100 mL 量瓶中, 以甲醇定容。

3.2 空白样品溶液 按处方比例制备不含人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素的阴性对照品, 照“3.1”项下方法制成空白样品溶液。

3.3 对照品溶液 取经干燥恒重的人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素对照品适量, 精密称定, 分别以甲醇溶解并稀释成人参皂苷 R_{g_1} 浓度为 $1.01\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、淫羊藿苷浓度为 $1.00\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、补骨脂素浓度为 $106\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和异补骨脂素浓度为 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶

液。

3.4 内标溶液 精密称取劳拉西洋 20 mg 置 10 mL 量瓶中, 以甲醇定容, 得浓度为 $2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。精密吸取该溶液 1 mL, 稀释 10 倍, 得 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标溶液。

3.5 混合对照品溶液 分别取人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素对照品溶液适量, 置 10 mL 量瓶中, 以甲醇定容, 配成 6 组不同浓度人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素的混合对照品溶液。如表 1 所示。

表 1 混合对照品溶液中各成分浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Tab 1 The concentration of panaxaponin R_{g_1} , icariin, psoralen and isopsoralen in composite solution of reference substances

分组 (group)	人参皂苷 R_{g_1} (panaxaponin R_{g_1})	淫羊藿苷 (icariin)	补骨脂素 (psoralen)	异补骨脂素 (isopsoralen)
1	2.02	2.00	0.53	0.40
2	4.04	4.00	0.80	0.60
3	6.06	6.00	1.06	0.80
4	8.08	8.00	1.33	1.00
5	10.10	10.00	1.64	1.20
6	12.12	12.00	1.91	1.40

4 方法学考察

4.1 红竹海狗丸主要成分的确定 采用 HPLC-MS 法对红竹海狗丸样品溶液扫描, 初步确定红竹海狗丸成分。根据各主要指标成分标准对照品质谱图, 最终确定红竹海狗丸人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素为主要指标成分。见图 1。

4.2 特异性考察试验 取混合对照品溶液、样品溶液和空白样品溶液, 在上述条件下测定。各组分分离良好, 人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素的保留时间分别为 13.5, 17.2, 22.3 和 23.0 min, 空白样品 (辅料) 无干扰峰出现, 内标劳拉西洋保留时间为 23.3 min, 如图 2 所示。

4.3 重现性试验 取混合对照品溶液, 按上述条件, 重复进样 5 次, 分别记录人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素的峰面积和保留时间, 结果峰面积基本不变, RSD 分别为 1.7%, 2.3%, 3.0%, 3.8%; 保留时间不变, RSD 分别为 0.03%, 0.03%, 0.01%, 0.02%。说明仪器性能优良, 方法重现性良好。

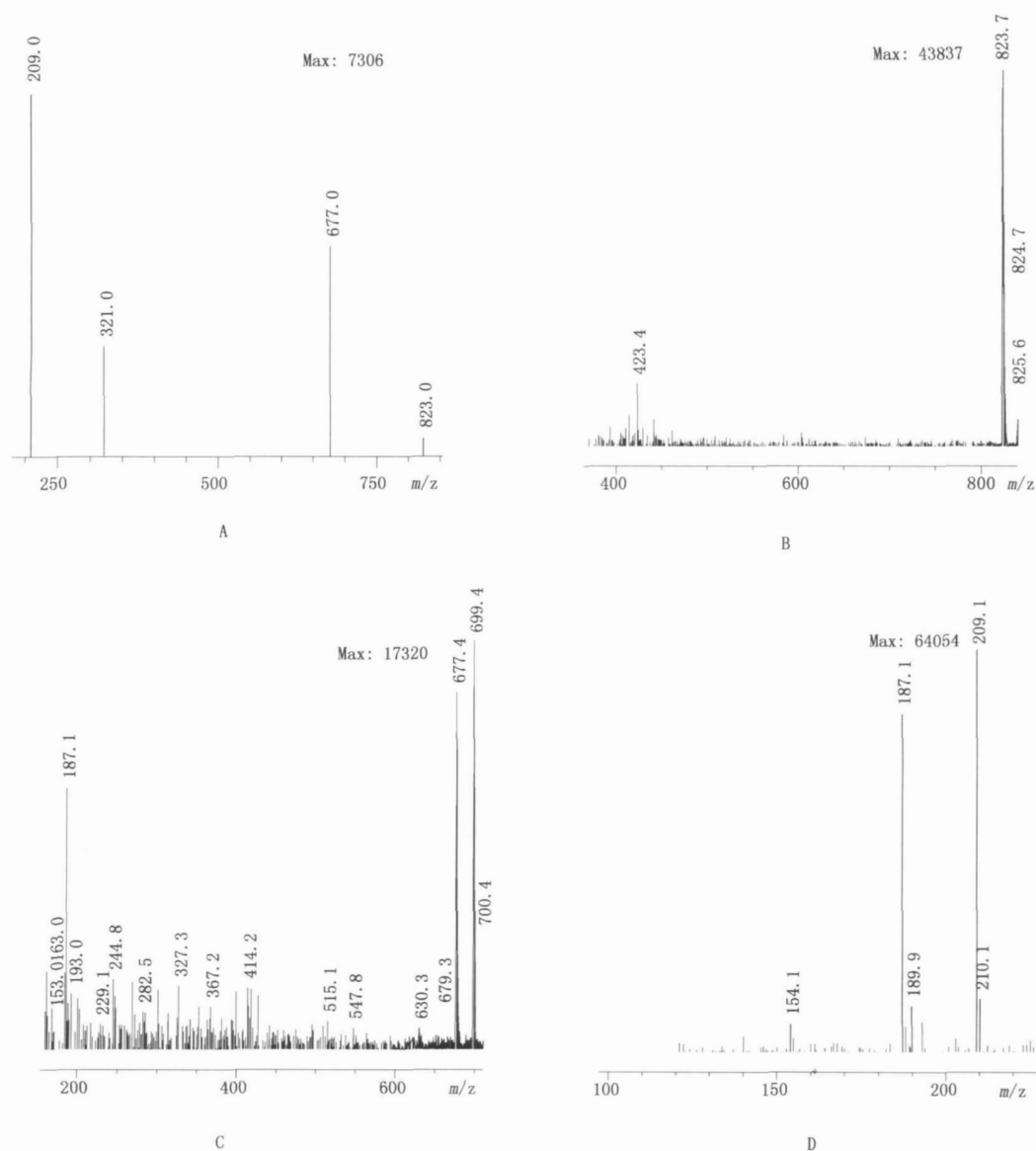


图 1 红竹海狗丸质谱图

Fig 1 The mass spectra of Hongzhu Callthinus pills

A. 标准溶液总离子图 (fig of total ion of standard solution) B. 制剂中人参皂苷 R_{g1} 质谱图 (mass spectrum of panaxsaponin in R_{g1} in praeparatum)
C. 制剂中淫羊藿质谱图 (mass spectrum of icaritin in praeparatum) D. 制剂中补骨脂素和异补骨脂素质谱图 (mass spectrum of psoralein and isopsoralein in praeparatum)

4.4 线性关系考察 取表 1 中 1~6 组混合对照品溶液各 1 mL, 分别加入 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标溶液 10 μL , 涡旋混合 1 min。按上述质谱色谱条件, 进样 10 μL , 记录峰面积。以待测成分与内标峰面积积分值之比 (Y) 为纵坐标, 以待测成分与内标浓度之比 (X) 为横坐标分别绘制标准曲线, 计算得回归方程。见表 2。

4.5 精密度试验 配制低、中、高浓度混合对照品溶液, 各进样 10 μL , 重复进样 5 次, 记录人参皂苷 R_{g1}、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素各成分的峰

面积, 计算平均峰面积和 RSD, 如表 3 所示。

4.6 稳定性试验 取同一批号制剂样品, 按“3.1”项下方法制备溶液, 在室温放置, 每间隔 4 h 测定 1 次, 连续测定 6 次, 人参皂苷 R_{g1}、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素峰面积的 RSD 分别为 4.63%, 4.28%, 4.91%, 3.63%, 保留时间的 RSD 分别为 0.17%, 0.16%, 0.14%, 0.14%。说明样品溶液在 24h 内稳定性良好。

记录人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷和内标峰面积, 计算人参皂苷 R_{g_1} 和淫羊藿苷含量; 另将供试品溶液稀释10倍后, 同上操作, 计算补骨脂素和异补骨脂素含量。结果见表 5。

表 5 红竹海狗丸每丸含人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素的量

Tab 5 The contents of panaxsaponin R_{g_1} , icariin, psoralen and isopsoralen in per Hongzhu Ca lhrinus pills

成分 (component)	含量 (content) mean $\pm$ SD / μ g	RSD /%
人参皂苷 R_{g_1} (panaxsaponin R_{g_1})	232.6 $\pm$ 0.64	0.28
淫羊藿苷 (icariin)	669.0 $\pm$ 14.51	2.2
补骨脂素 (psoralen)	564 $\pm$ 34.71	6.2
异补骨脂素 (isopsoralen)	428 $\pm$ 20.17	4.7

5 讨论

5.1 本研究采用 HPLC-MS 技术, 对中药复方制剂红竹海狗丸成分进行初步定性分析, 根据对照品最终确定人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素为红竹海狗丸主要指标成分, 与此同时测定红竹海狗丸各指标成分的含量。与文献^[3-6]报道较多的 HPLC 中药复方制剂指标成分含量测定方法相比, HPLC-MS 更先进, 灵敏度更高, 检测限更低, 不但可用于提高和控制制剂质量, 也可用于制剂, 特别是中药复方制剂中未知成分的定性分析, 使目标成分的测定更有目的性, 可提高工作效率。中药复方制剂主要指标成分的定量和定性分析, 可为其质量控制、动物或人体药代动力学研究提供依据。

5.2 结合被测成分的理化性质确定梯度洗脱程序, 可实现复方制剂多种成分的良好分离, 缩短样本分析时间。本研究采用梯度洗脱, 可在较短时间内实现红竹海狗丸主要指标成分人参皂苷 R_{g_1} 、淫羊藿苷、补骨脂素和异补骨脂素的同时测定。

5.3 样品的提取, 特别是中药复方制剂中有效成分的提取, 应有效、简便、实用。对有机溶剂超声提取、

水超声提取和冷浸法 3 种提取方法考察比较后发现, 有机溶剂超声提取 30 min, 各成分峰形较好, 杂质干扰少, 基线平稳, 回收率高, 提取完全。

5.4 HPLC-MS 分析显示, 复方制剂红竹海狗丸提取液含有与雄酮质量相当的离子峰, 且有较高含量, 但与普拉雄酮对照品对比认为该成分并非普拉雄酮。限于雄酮对准品种类, 本研究未作进一步定性分析。可能为其他雄酮, 有待于进一步考证。

参考文献

1 ZHOU Jing-an(周静安). Determination of paracetamol and chlorphenamine maleate in Xiao'er Anfen Huang Nan in granules by HPLC(高效液相色谱法同时测定小儿氨酚黄那敏颗粒剂中二组分的含量). *Chin J Mod Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2005, 22(5): 415

2 TANG Kai-zhi(唐开智), FU Xiu-juan(傅秀娟). Simultaneous HPLC determination of chloramphenicol and dexamethason sodium phosphate in L di cream(HPLC 法同时测定氯地乳膏中氯霉素与地塞米松磷酸钠的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(12): 1563

3 ZHOU Ying-chun(周迎春), ZHAO Huai-qing(赵怀清), LIANG Ning(梁宁). Determination of the contents of ginsenoside R_{g_1} , R_e , R_{b_1} and the notoginsenoside R_1 in the total notoginsenosides of the Panax notoginseng (Burk.) F.H. Chen by HPLC(高效液相色谱法同时测定三七总皂苷中人参皂苷 R_{g_1} 、 R_e 、 R_{b_1} 和三七皂苷 R_1 的含量). *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2003, 20(1): 27

4 TONG Yu-xi(童玉玺), XU De-ran(徐德然), KONG Ling-Yi(孔令义). HPLC-MS² analysis of chemical constituents in Epinedium koreanum(HPLC-MS² 法分析朝鲜淫羊藿化学成分). *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2006, 4(1): 58

5 QIAO Ming(乔明), HAN Jian-wei(韩建伟), ZHANG Yu-ling(张玉玲). HPLC determination of psoralen and isopsoralen in BA capsules(HPLC 测定 BA 防喘胶囊中补骨脂素和异补骨脂素的含量). *Chin J Inf Tradit Chin Med* (中国中医药信息杂志), 2004, 11(9): 799

6 ZHENG Kai-ying(邓开英). Determination of psoralen and isopsoralen in Gengnianping capsules by HPLC(HPLC 测定更年平胶囊中补骨脂素和异补骨脂素的含量). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2001, 23(9): 643

(本文于 2008 年 9 月 4 日收到)