

肝泰舒胶囊的成分鉴别及指标成分含量测定方法建立^Δ

王晓丽*,朱平,周燕妮,鲍蕾蕾[#](海军军医大学第三附属医院药剂科,上海 200438)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2023)18-2198-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2023.18.05



摘要 目的 建立分别鉴别肝泰舒胶囊的化学成分以及甘草酸等6种指标成分的含量测定方法。方法 采用高效液相-飞行时间质谱技术鉴别肝泰舒胶囊中的化学成分;采用超高效液相-串联质谱技术测定甘草酸等6种指标成分的含量。结果 肝泰舒胶囊中共鉴别出41种化学成分。甘草酸、芒果苷、木犀草苷、木香炔内酯、齐墩果酸和小檗碱检测质量浓度的线性范围均为200~10 000 ng/mL(r 均大于0.999);定量限分别为200、20、10、1、10、0.5 ng/mL,检测限分别为100、10、5、0.5、5、0.25 ng/mL;精密性、稳定性(24 h)、重复性试验的RSD均小于5.0%($n=6$ 或 $n=3$);加样回收率为99.05%~101.08%(RSD均小于2.0%, $n=6$);含量分别为2.42~2.66、0.85~1.16、0.35~0.46、6.18~6.46、0.99~1.29、5.22~5.56 mg/g。结论 本研究建立的鉴别和含量测定方法快速、简便,可用于肝泰舒胶囊化学成分的鉴别和指标成分的含量测定。

关键词 肝泰舒胶囊;成分鉴别;含量测定;高效液相-飞行时间质谱技术;超高效液相-串联质谱技术

Method establishment of components identification and content determination of index components in Gantaishu capsules

WANG Xiaoli, ZHU Ping, ZHOU Yanni, BAO Leilei (Dept. of Pharmacy, the Third Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai 200438, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish methods to identify the chemical components of Gantaishu capsule, and determine the contents of 6 index components including glycyrrhizic acid. **METHODS** The chemical components of Gantaishu capsule were determined by HPLC-TOF/MS; the contents of 6 index components including glycyrrhizic acid were determined by UPLC-MS/MS. **RESULTS** A total of 41 chemical components were identified in Gantaishu capsules. The linear ranges of glycyrrhizic acid, mangiferin, luteolin, costunolide, oleanolic acid and berberine were 200-10 000 ng/mL (r were all greater than 0.999). The limits of quantification were 200, 20, 10, 1, 10, 0.5 ng/mL, and the limits of detection were 100, 10, 5, 0.5, 5, 0.25 ng/mL, respectively; RSDs of precision, stability (24 h) and reproducibility tests were all less than 5.0% ($n=6$ or $n=3$); the recoveries were 99.05%-101.08% (RSD were all less than 2.0%, $n=6$). The contents of them were 2.42-2.66, 0.85-1.16, 0.35-0.46, 6.18-6.46, 0.99-1.29, 5.22-5.56 mg/g. **CONCLUSIONS** The established methods for identification and content determination are rapid and simple, and can be used for the identification of chemical components and the content determination of index components in Gantaishu capsule.

KEYWORDS Gantaishu capsules; component identification; content determination; HPLC-TOF/MS; UPLC-MS/MS

肝泰舒胶囊是根据藏医药名著《四部医典》《晶珠本草》及相关藏医药传统名方研发而成^[1]。该药由獐牙菜、唐古特乌头、山苦荬、小檗皮、节裂角茴香、木香、黄芪、甘草8味藏药材组成。方中獐牙菜为君药,具有清热利湿解毒的功效,芒果苷和齐墩果酸为其主要成分,具有改善脂肪肝、抑制肝纤维化和减轻急性肝损伤等作

用^[2-5]。唐古特乌头、山苦荬、小檗皮、节裂角茴香同为臣药,具有清热利湿解毒和祛瘀通络的功效,其中山苦荬的有效成分木犀草苷、小檗皮的有效成分小檗碱还对非酒精性脂肪肝具有较好的保护作用,可有效减轻肝纤维化、抗肝癌^[6-8]。木香、黄芪为佐药,具有甘温益气的功效,可调节机体免疫功能,其中木香的有效成分木香炔内酯可抑制乙醇诱导的肝细胞损伤与脂肪变性、抑制急性肝损伤^[9-10]。甘草调和诸药,兼以补中扶土为使药,其有效成分甘草酸具有显著的保肝、抗肝癌、治疗丙型肝炎病毒性肝炎等作用^[11]。诸药共奏清热解毒、疏肝利胆的功效^[12-14]。临床研究表明,肝泰舒胶囊可诱生内源性干

^Δ基金项目 上海市科技计划项目(No.23ZR1478100)

* 第一作者 药师。研究方向:药物分析。电话:021-81887226。

E-mail: wxlcpu09@sina.com

[#] 通信作者 副主任药师,硕士生导师。研究方向:中药药理学、天然产物抗肿瘤活性成分筛选及耐药机制。电话:021-81875571。E-mail: annabao212@126.com

扰素,抑制乙型病毒性肝炎病毒复制,增加胆汁分泌,消除胆道炎症,减轻肝纤维化,修复受损肝细胞,对乙型病毒性肝炎、急性肝炎、早中期肝硬化、胆囊炎等肝胆疾病有显著疗效^[13-16]。

肝泰舒胶囊现行质量标准为国家食品药品监督管理局药品标准 WS-10133(ZD-0133)-2002-2012Z。该标准仅对獐牙菜、节裂角茴香、小檗皮和木香进行了薄层鉴别,也仅采用薄层扫描法对獐牙菜进行含量测定(以齐墩果酸计)。虽然,郭珊珊等^[17]采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定了肝泰舒胶囊中獐牙菜苦苷的含量;杨凤梅等^[18]对肝泰舒胶囊质量标准进行了研究,但这些研究的指标成分单一且方法专属性和灵敏度不高。由于中药复方制剂成分复杂,药效往往是多种成分相互作用的结果,单一成分难以全面反映制剂的质量,加之目前关于肝泰舒胶囊物质基础的研究较少,因此,明确肝泰舒胶囊的化学成分并进行质量控制对确保临床用药的安全性和有效性具有重要意义。基于此,本研究采用高效液相-飞行时间质谱(high performance liquid chromatography-time of flight mass spectrometry, HPLC-TOF/MS)技术鉴别了肝泰舒胶囊中的化学成分,并采用超高效液相-串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)技术测定了肝泰舒胶囊中甘草酸、芒果苷、木犀草苷、木香炔内酯、齐墩果酸、小檗碱6种指标成分的含量,旨在为肝泰舒胶囊的质量控制及体内研究提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括 Agilent 1100 型 HPLC 仪、Agilent 1290 型 UPLC 仪、Agilent 6220 型高分辨飞行时间质谱仪、Agilent 6470 型三重四极杆质谱仪(美国 Agilent 公司),125D-1CN 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司),ST-40R 型低温离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),Vortex-5 型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),PW-UV/VF 型超纯水系统(力康生物医疗科技控股有限公司),SB3200-T 型超声机[必能信超声(上海)有限公司]。

1.2 主要药品与试剂

甘草酸对照品(批号 Y02J11L113432)、芒果苷对照品(批号 C21M9Y61363)、木犀草苷对照品(批号 A22GB141264)、木香炔内酯对照品(批号 J22GB152180)、齐墩果酸对照品(批号 J24HB174960)、小檗碱对照品(批号 S01A10K94340)均购自上海源叶生物科技有限公司,纯度均大于 98.0%;甲苯磺丁脲(内标,批号 I1820190,纯度>99%)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;肝泰舒胶囊(批号 01211202、01220701、

01220704,规格为每粒装 0.4 g)购自青海晶珠藏药高新技术产业股份有限公司;乙腈、甲酸均为质谱纯,甲醇为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液及内标溶液

精密称取甘草酸、芒果苷、木犀草苷、木香炔内酯、齐墩果酸、小檗碱对照品各 2.0 mg,分别置于 2 mL 容量瓶中,加甲醇溶解混匀,制成上述成分质量浓度均为 1.0 mg/mL 的单一对照品储备液。分别取上述各单一对照品储备液适量,用甲醇制成各成分质量浓度均为 10 000 ng/mL 的混合对照品储备液。取上述混合对照品储备液适量,用甲醇按 1、2.5、5、10、25、50 倍稀释,得质量浓度分别为 10 000、4 000、2 000、1 000、400、200 ng/mL 的系列混合对照品溶液。同法制备质量浓度为 1 μ g/mL 的内标溶液。

2.1.2 供试品溶液

精密称取肝泰舒胶囊粉末 1 g(过 40 目筛),置于 100 mL 烧瓶中,加 50% 甲醇 50 mL,超声(功率 2.0 kW,频率 50 kHz)处理 30 min,放至室温,用 50% 甲醇补足缺失的质量,摇匀,经 0.22 μ m 微孔滤膜,滤过,取续滤液,加甲醇稀释 20 倍,即得供试品溶液。

2.2 试验条件

2.2.1 色谱条件

以 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈(2.1 mm \times 50 mm,1.9 μ m)为色谱柱,乙腈(A)-0.1% 甲酸溶液(B)为流动相进行梯度洗脱(成分鉴别:0~5 min,5%A \rightarrow 15%A;5~15 min,15%A \rightarrow 35%A;15~25 min,35%A \rightarrow 70%A;25~35 min,70%A。含量测定:0~3.5 min,10%A \rightarrow 90%A;3.5~5 min,90%A);流速为 0.5 mL/min;柱温为 25 $^{\circ}$ C;进样量为 3 μ L。

2.2.2 质谱条件

(1)成分鉴别的质谱条件为:采用电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)以正负离子模式扫描;毛细管电压为 4 000 V(+)/3 500 V(-);干燥气温度为 350 $^{\circ}$ C;干燥气流速为 10 L/min;雾化器压力为 40 psi;碎片电压为 180 V;扫描范围为 m/z 100~1 100。

(2)含量测定的质谱条件为:采用喷射流技术的电喷雾离子源(electrospray ionization with Agilent jet stream technology, AJST-ESI)以正负离子模式扫描;毛细管电压为 4 000 V(+)/3 500 V(-);干燥气温度为 350 $^{\circ}$ C;干燥气流速为 10 L/min;雾化器压力为 40 psi;鞘气温度为 350 $^{\circ}$ C;鞘气流速为 11 L/min。在多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)正离子模式下的质谱参数为:甘草酸 m/z 823.0 \rightarrow 453.0,碎片电压为 166 V,

碰撞能量为 25 eV;芒果苷 m/z 423.0 \rightarrow 273.0, 碎片电压为 123 V, 碰撞能量为 25 eV;木犀草苷 m/z 449.0 \rightarrow 287.0, 碎片电压为 123 V, 碰撞能量为 25 eV;木香炔内酯 m/z 233.0 \rightarrow 187.0, 碎片电压为 118 V, 碰撞能量为 13 eV;小檗碱 m/z 337.0 \rightarrow 321.0, 碎片电压为 146 V, 碰撞能量为 33 eV;内标 m/z 271.0 \rightarrow 91.0, 碎片电压为 90 V, 碰撞能量为 37 eV。在 MRM 负离子模式下的质谱参数为:齐墩果酸 m/z 455.4 \rightarrow 407.3, 碎片电压为 100 V, 碰撞能量为 60 eV;内标 m/z 269.0 \rightarrow 169.0, 碎片电压为 108 V, 碰撞能量为 17 eV。

2.3 化学成分鉴别分析

2.3.1 化学成分数据库的建立

参考 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、ChemSpider (<http://www.chemspider.com>) 数据库及相关文献,共收集到 181 种肝泰舒胶囊的核心化学成分。采用 Agilent “formula-database generator” 软件建立化学成分鉴别数据库,信息包括化合物名称、化合物类别、分子式、分子量、准分子离子峰等。

2.3.2 肝泰舒胶囊的总离子流图

取“2.1.2”项下供试品溶液(批号 01211202),按“2.2”项下条件进样测定,得样品溶液的总离子流图(图 1)。根据飞行时间质谱测得精确分子量和各成分峰的离子信息,与“2.3.1”项下所建数据库对比后,再应用 Qualitative Analysis 质谱分析软件计算分子组成及同位素分布,将理论值与实测值进行比对,选取误差小于 5 ppm 的化合物。结果显示,肝泰舒胶囊中初步鉴别出 41 种化学成分,正离子模式下鉴别出 37 种化学成分,负离子模式下鉴别出 23 种化学成分,主要包括芒果苷、汉黄芩素、木犀草苷等黄酮类成分,小檗碱、阿替新、直立角茴香碱等生物碱类和其他成分。结果见表 1。

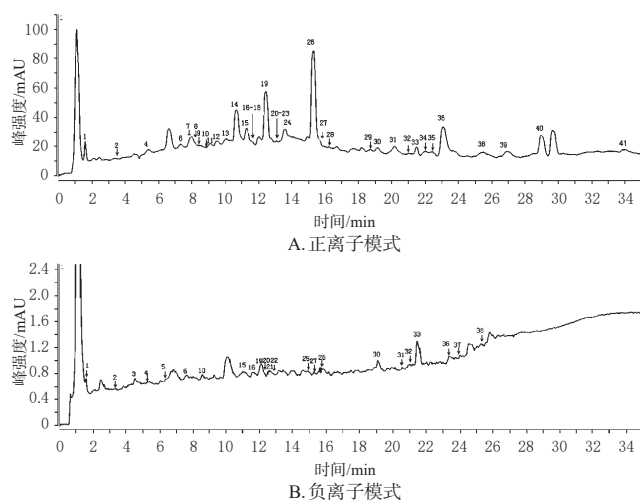


图 1 肝泰舒胶囊的总离子流图

表 1 肝泰舒胶囊中化学成分的分析结果

编号	保留时间/min	分子式	准分子离子峰	理论分子量(m/z)	实际分子量(m/z)	化合物名称	药材归属	误差/ppm
1	1.44	$C_{20}H_{30}O_{11}$	$[M+Na]^+$	459.089 8	459.090 5	当药醇苷	獐牙菜	1.52
			$[M-H]^-$	435.093 3	435.095 1			4.14
2	3.75	$C_{18}H_{16}O_8$	$[M+H]^+$	355.102 4	355.101 8	绿原酸	山苦荬	-1.69
			$[M-H]^-$	353.087 8	353.087 8			0.00
3	4.89	$C_8H_8O_4$	$[M+H]^+$	181.049 5	-			-
			$[M-H]^-$	179.035 0	179.034 3	咖啡酸	山苦荬	-3.91
4	5.31	$C_{13}H_{20}O_4$	$[M+H]^+$	373.149 3	373.149 9	紫丁香苷	木香	1.61
			$[M+COOH]^-$	417.140 2	417.139 2			-2.40
5	6.54	$C_7H_{12}O_6$	$[M+H]^+$	193.070 7	-			-
			$[M-H]^-$	191.056 1	191.055 3	奎宁酸	小檗皮	-4.19
6	7.88	$C_{20}H_{20}NO_4$	$[M+H]^+$	342.170 5	342.172 0	紫堇定	节裂角茴香	4.38
			$[M-H]^-$	340.155 4	340.155 9			1.47
7	8.03	$C_{22}H_{25}NO_2$	$[M+H]^+$	344.258 4	344.257 8	阿替新	唐古特乌头	-1.74
			$[M-H]^-$	342.243 9	-			-
8	8.24	$C_{20}H_{30}O_{12}$	$[M+NH_4]^+$	558.254 5	558.256 4	苦苣菜木脂素 A	山苦荬	3.40
			$[M-H]^-$	539.213 4	-			-
9	8.25	$C_{21}H_{31}NO_4$	$[M+Na]^+$	384.214 5	384.213 8	夹竹桃碱	唐古特乌头	-1.82
			$[M-H]^-$	360.218 0	-			-
10	8.59	$C_{18}H_{18}O_{11}$	$[M+H]^+$	423.092 7	423.094 4	芒果苷	獐牙菜	4.02
			$[M-H]^-$	421.077 6	421.076 8			-1.90
11	9.02	$C_{20}H_{19}NO_5$	$[M+H]^+$	354.133 6	354.134 7	原阿片碱	节裂角茴香	3.11
			$[M-H]^-$	352.119 0	-			-
12	9.56	$C_{21}H_{25}O_7$	$[M+H]^+$	385.128 2	385.126 3	甘草吡喃香豆素	甘草	-4.93
			$[M-H]^-$	383.113 6	-			-
13	10.76	$C_{24}H_{31}NO_6$	$[M+H]^+$	430.222 4	430.223 0	关附甲素	唐古特乌头	1.39
			$[M-H]^-$	428.207 9	-			-
14	10.99	$C_{21}H_{26}O_6$	$[M+NH_4]^+$	386.159 8	386.161 1	甘草香豆素	甘草	3.37
			$[M-H]^-$	367.118 7	-			-
15	11.53	$C_{22}H_{22}O_{10}$	$[M+H]^+$	447.128 6	447.130 8	当药黄素	獐牙菜	4.92
			$[M+COOH]^-$	491.119 5	491.119 9			0.81
16	11.54	$C_{18}H_{16}O_8$	$[M+H]^+$	285.075 7	285.076 4	汉黄芩素	黄芪	2.46
			$[M-H]^-$	283.062 2	283.063 1			3.18
17	11.84	$C_{21}H_{22}O_4$	$[M+NH_4]^+$	356.185 6	356.185 9	甘草查尔酮 A	甘草	0.84
			$[M-H]^-$	337.144 5	-			-
18	12.04	$C_{21}H_{23}NO_5$	$[M+H]^+$	370.164 9	370.165 7	别隐品碱	节裂角茴香	2.16
			$[M-H]^-$	368.150 3	-			-
19	12.05	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M+H]^+$	611.160 7	611.163 4	芦丁	木香	4.42
			$[M-H]^-$	609.146 1	609.145 3			-1.31
20	12.17	$C_{21}H_{22}O_6$	$[M+H]^+$	419.133 7	419.135 6	甘草苷	甘草	4.53
			$[M-H]^-$	417.119 1	417.117 5			-3.84
21	12.55	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	449.107 8	449.108 8	异荭草苷	獐牙菜	2.23
			$[M-H]^-$	447.093 3	447.095 0			3.80
22	12.60	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	449.107 8	449.108 0	木犀草苷	山苦荬	0.45
			$[M-H]^-$	447.093 3	447.093 0			-0.67
23	12.62	$C_{21}H_{22}O_5$	$[M+H]^+$	355.154 0	355.153 9	甘草苯并呋喃	甘草	-0.28
			$[M-H]^-$	353.139 4	-			-
24	13.35	$C_{24}H_{21}N_3O_6$	$[M+NH_4]^+$	465.174 3	465.176 4	直立角茴香碱	节裂角茴香	4.51
			$[M-H]^-$	446.135 8	-			-
25	15.26	$C_{22}H_{22}O_9$	$[M+H]^+$	431.133 7	-			-
			$[M+COOH]^-$	475.124 6	475.124 3	芒果花苷	黄芪	-0.63
26	15.30	$C_{20}H_{18}NO_4$	$[M+H]^+$	337.130 9	337.130 7	小檗碱	小檗皮	-0.59
			$[M-H]^-$	335.116 3	-			-
27	15.60	$C_{21}H_{22}O_6$	$[M+H]^+$	419.133 7	419.133 7	异荭草苷	甘草	0.00
			$[M-H]^-$	417.119 1	417.117 5			-3.84
28	15.64	$C_{28}H_{30}O_{13}$	$[M+H]^+$	587.175 9	587.178 6	苦龙苷	獐牙菜	4.6
			$[M-H]^-$	585.161 4	585.162 2			1.37

- : 在对应模式下该化合物无响应;误差(ppm)=(实际分子量-理论分子量)/理论分子量 $\times 10^6$ 。

续表 1

编号	保留时间/min	分子式	准分子离子峰	理论分子量(m/z)	实际分子量(m/z)	化合物名称	药材归属	误差/ppm
29	18.90	$C_{15}H_{14}O_2$	$[M+H]^+$	231.138 0	231.138 9	去氢木香内酯	木香	3.89
			$[M-H]^-$	229.123 4	—	—	—	—
30	19.63	$C_{21}H_{30}O_{14}$	$[M+Na]^+$	807.450 1	807.453 2	黄芪皂苷 III	黄芪	3.84
			$[M+COOH]^-$	829.459 1	829.457 1	—	—	-2.41
31	20.63	$C_{16}H_{22}O_2$	$[M+NH_4]^+$	274.274 1	274.273 5	棕榈酸	唐古特乌头	-2.19
			$[M-H]^-$	255.233 0	255.233 1	—	—	0.39
32	21.17	$C_{28}H_{40}O_{15}$	$[M+Na]^+$	849.460 7	849.460 6	异黄芪皂苷 II	黄芪	-0.12
			$[M+COOH]^-$	871.469 7	871.468 2	—	—	-1.72
33	21.42	$C_{12}H_{16}O_6$	$[M+H]^+$	823.411 1	823.411 9	甘草酸	甘草	0.97
			$[M-H]^-$	821.396 5	821.398 2	—	—	2.07
34	21.44	$C_{18}H_{24}O_4$	$[M+H]^+$	471.346 9	471.348 3	甘草次酸	甘草	2.97
			$[M-H]^-$	469.332 3	—	—	—	—
35	22.19	$C_{18}H_{28}O_{18}$	$[M+H]^+$	943.526 1	943.526 1	大豆皂苷 I	黄芪	0.00
			$[M-H]^-$	941.511 5	—	—	—	—
36	23.98	$C_{28}H_{40}O_{16}$	$[M+Na]^+$	891.471 3	891.475 6	异黄芪皂苷 I	黄芪	4.82
			$[M+COOH]^-$	913.480 2	913.478 2	—	—	-2.19
37	24.66	$C_{30}H_{40}O_3$	$[M+H]^+$	457.367 6	—	—	—	—
			$[M-H]^-$	455.353 1	455.352 9	齐墩果酸	獐牙菜	-0.44
38	25.74	$C_{14}H_{18}O_6$	$[M+H]^+$	275.055 0	275.055 6	獐牙菜龙胆酮	獐牙菜	2.18
			$[M-H]^-$	273.040 5	273.039 9	—	—	-2.19
39	27.56	$C_{29}H_{39}NO_3$	$[M+NH_4]^+$	439.316 6	439.315 3	塔拉胺	唐古特乌头	-2.96
			$[M-H]^-$	420.275 5	—	—	—	—
40	28.91	$C_{15}H_{14}O_2$	$[M+H]^+$	233.153 6	233.154 0	木香烃内酯	木香	1.72
			$[M-H]^-$	231.139 1	—	—	—	—
41	33.90	$C_{20}H_{15}NO_4$	$[M+H]^+$	334.107 4	334.108 3	二氢血根碱	节裂角茴香	2.69
			$[M-H]^-$	332.092 8	—	—	—	—

2.3.3 化合物鉴别

以保留时间为 11.54 min 的化合物 16 为例,在正离子模式下的准分子离子峰为 285.076 4 $[M+H]^+$,负离子模式下的准分子离子峰为 283.063 1 $[M-H]^-$,利用 Qualitative Analysis 质谱分析软件计算精确分子量的可能元素组成(误差 < 5 ppm),推算分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$,经与“2.3.1”项下数据库中已知化合物对比,确定该化合物为汉黄芩素。结果见图 2。

2.3.4 化合物的同位素分布验证

以保留时间为 11.54 min 的汉黄芩素为例,其分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$,利用 Qualitative Analysis 质谱分析软件计算正负离子模式下的同位素分布情况,并与实际分子量进行比对。结果显示,汉黄芩素的同位素分布理论值(方框所示)与实际值(方框内峰所示)吻合良好,确定 16 号峰为汉黄芩素。结果见图 3。

2.4 甘草酸等 6 种指标成分的含量测定

2.4.1 专属性考察

取空白溶液(甲醇)、“2.1.1”项下混合对照品溶液(质量浓度为 1 000 ng/mL)、“2.1.2”项下供试品溶液,按“2.2”项下条件进样测定,记录色谱图。结果显示,甘草酸、芒果苷、木犀草苷、木香烃内酯、齐墩果酸、小檗碱和内标(负离子模式)、内标(正离子模式)的保留时间分别

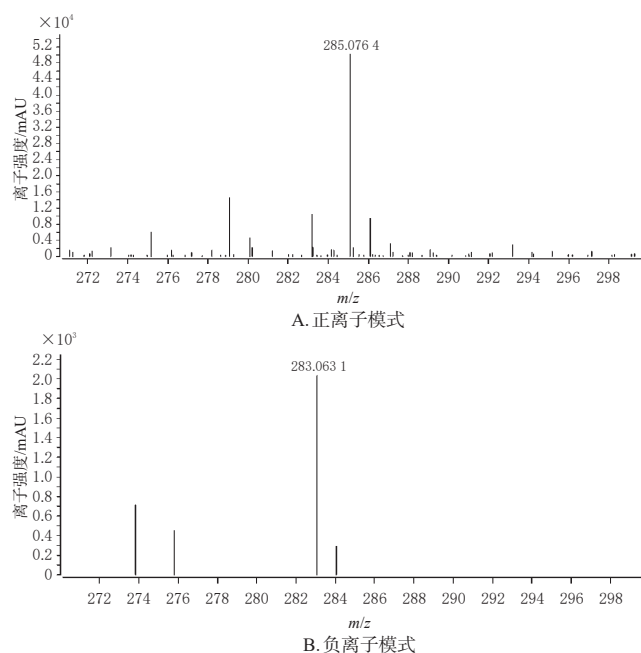


图 2 汉黄芩素的精确质量棒状图

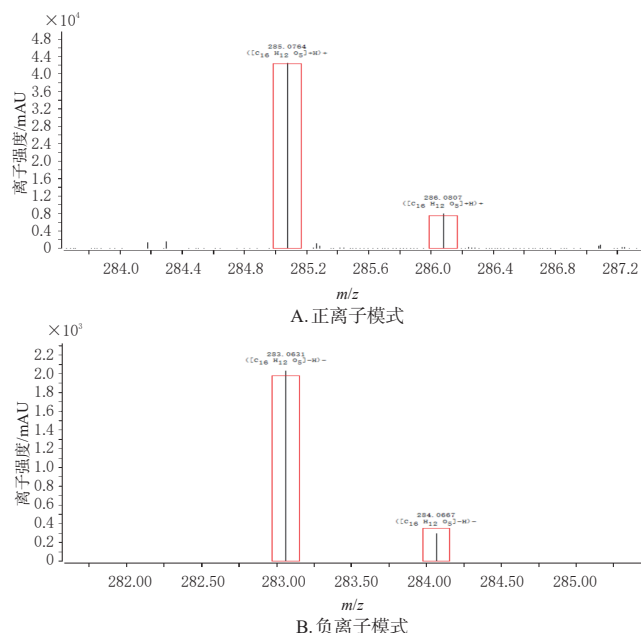


图 3 汉黄芩素的同位素分布图

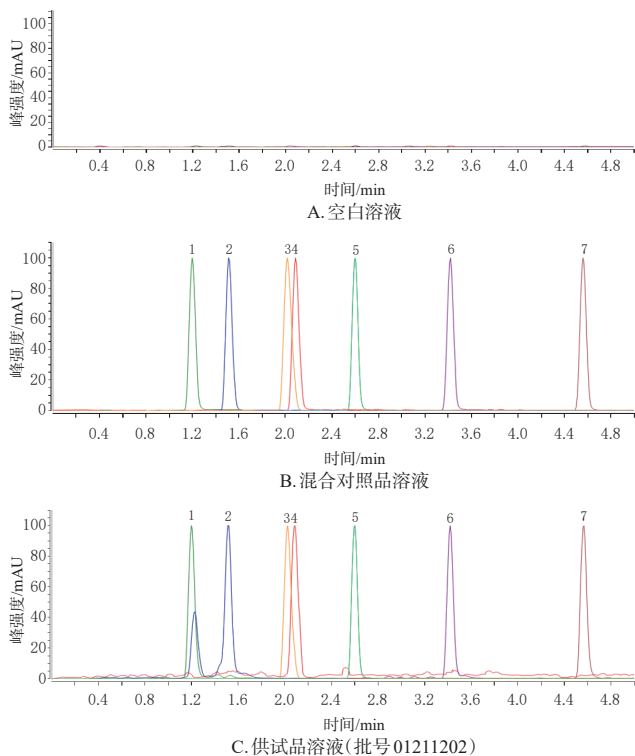
为 2.1、1.2、1.5、3.4、4.5、2.0、2.6、2.6 min,无杂峰干扰,理论板数均大于 8 000,相邻峰的分度均大于 1.5,脱尾因子为 0.95~1.05。结果见图 4。

2.4.2 线性关系考察

取“2.1.1”项下系列混合对照品溶液,按“2.2”项下条件进样测定,以各成分质量浓度为横坐标(X)、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归。结果见表 2。

2.4.3 定量限与检测限考察

取“2.1.1”项下混合对照品溶液(质量浓度 200 ng/mL),用甲醇逐级稀释,以信噪比 10:1 计算定量限,信噪比 3:1 计算检测限。结果显示,甘草酸、芒果苷、木



1: 芒果苷; 2: 木犀草苷; 3: 小檗碱; 4: 甘草酸; 5: 内标; 6: 木香羟内酯; 7: 齐墩果酸。

图4 混合对照品溶液、供试品溶液、空白溶液的UPLC-MS/MS图

表2 甘草酸等6种指标成分的回归方程和线性范围

化合物	回归方程	r	线性范围/(ng/mL)
甘草酸	$Y=7.5885 \times 10^4 X - 5.9981 \times 10^{-6}$	0.9997	200~10 000
芒果苷	$Y=0.0230X - 0.0039$	0.9999	200~10 000
木犀草苷	$Y=0.0954X + 0.0154$	0.9995	200~10 000
木香羟内酯	$Y=0.0818X + 0.0862$	0.9997	200~10 000
齐墩果酸	$Y=0.0019X + 7.2027 \times 10^{-4}$	0.9995	200~10 000
小檗碱	$Y=0.2583X + 0.3254$	0.9996	200~10 000

犀草苷、木香羟内酯、齐墩果酸、小檗碱的定量限分别为200、20、10、1、10、0.5 ng/mL, 检测限分别为100、10、5、0.5、5、0.25 ng/mL。

2.4.4 精密度试验

取“2.1.1”项下混合对照品溶液(质量浓度1 000 ng/mL),于1 d内按“2.2”项下条件连续进样6次考察日内精密度,连续3 d考察日间精密度。结果显示,甘草酸等6种指标成分日内、日间精密度的RSD均小于5.0% ($n=6$ 或 $n=3$),表明仪器精密度良好。

2.4.5 重复性试验

精密称取样品(批号01211202)1 g,共6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果显示,甘草酸等6种指标成分含量的RSD均小于5.0% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.4.6 稳定性试验

取“2.1.2”项下供试品溶液(批号01211202),分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h时按“2.2”项下条件进样测定,记录峰面积。结果显示,甘草酸等6种指标成分峰面积的RSD均小于5.0% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好。

2.4.7 耐用性试验

取“2.1.2”项下供试品溶液(批号01211202),按“2.2”项下条件分别考察不同流速(0.29、0.3、0.31 mL/min)、流动相中乙腈初始比例(9%、10%、11%)、柱温(23、25、27 °C)对试验结果的影响。结果显示,甘草酸等6种指标成分峰面积及保留时间的RSD均小于10.0%,分离度和拖尾因子等均符合方法学要求^[9],表明本方法耐用性良好。

2.4.8 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号01211202)0.5 g,共6份,分别加入一定量的对照品溶液(样品中各成分含量的100%),按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,甘草酸、芒果苷、木犀草苷、木香羟内酯、齐墩果酸和小檗碱的平均加样回收率分别为100.32%、100.00%、100.64%、100.17%、99.05%、101.08%,RSD均小于2.0% ($n=6$),表明本方法准确度良好。

2.4.9 样品的含量测定

取3批样品,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量,每样品测定3次。结果见表3。

表3 甘草酸等6种指标成分的含量测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=3$, mg/g)

批号	甘草酸	芒果苷	木犀草苷	木香羟内酯	齐墩果酸	小檗碱
01211202	2.42 ± 0.05	0.85 ± 0.01	0.35 ± 0.01	6.18 ± 0.06	0.99 ± 0.03	5.22 ± 0.03
01220701	2.66 ± 0.03	1.16 ± 0.01	0.46 ± 0.01	6.41 ± 0.06	1.29 ± 0.02	5.51 ± 0.05
01220704	2.64 ± 0.03	1.08 ± 0.01	0.42 ± 0.02	6.46 ± 0.08	1.22 ± 0.02	5.56 ± 0.03

3 讨论

3.1 样品前处理条件优化

本课题组前期对不同提取溶剂(水、甲醇、乙醇)进行了考察,结果显示,以50%甲醇为提取溶剂时,各成分的提取率较高。同时,笔者对不同溶剂体积(30、40、50 mL)、提取时间(15、30、45 min)、提取次数(1、2、3次)进行了考察,结果显示,以50%甲醇50 mL,超声提取30 min,提取1次时,所得色谱峰信息较多,提取充分且操作简单。

3.2 色谱条件优化

本课题组前期对不同流动相(乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液、甲醇-0.1%甲酸溶液)进行了考察,结果显示,

加入0.1%甲酸溶液可以显著改善各色谱峰峰形和拖尾现象,以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相时,各成分分离良好,响应较高,且峰形最佳,故选择乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相。本研究采用了Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.9 μm)色谱柱,该色谱柱的内径更窄、粒径更小,同时对不同流速(0.4、0.5、0.6 mL/min)考察后,结果显示,流速为0.5 mL/min时的柱压相对较低,分离度良好,故选择流速为0.5 mL/min。

3.3 化学成分鉴别结果分析

本研究采用HPLC-TOF/MS技术从肝泰舒胶囊中共鉴别出41种化学成分,较已有研究,除齐墩果酸、獐牙菜苦苷、小檗碱和芒果苷4种成分有报道外,木犀草苷、甘草苷、直立角茴香碱等37种成分均为首次鉴别。该结果为肝泰舒胶囊的药理作用研究奠定了基础。

3.4 含量结果分析

不同批次肝泰舒胶囊中各成分含量存在差异,批号01211202样品中各成分含量均低于其他2批次样品;3批样品中均以木香烃内酯和小檗碱含量较高,木犀草苷含量最低。究其原因可能为中药材来源复杂、生产工艺不同、质量标准不完善等。这提示,应进一步加强中药制剂的基础性研究,完善质量控制评价标准,逐步实现中药制剂质量均一稳定,保证临床用药的安全性和有效性。

综上所述,本研究所建立的鉴别和含量测定方法快速、简便,可用于肝泰舒胶囊化学成分的鉴别和指标成分的含量测定。

参考文献

[1] 刘红文,刘艳.晶珠肝泰舒对大鼠实验性肝损伤的影响[J].华西药理学杂志,2012,27(1):30-31.

[2] WANG H, ZHU Y Y, WANG L, et al. Mangiferin ameliorates fatty liver via modulation of autophagy and inflammation in high-fat-diet induced mice[J]. Biomedicine Pharmacother, 2017, 96: 328-335.

[3] 施峰,黄一平,孙忠文.藏药印度獐牙菜的研究进展[J].中国药房,2010,21(19):1815-1817.

[4] 张明发,沈雅琴.熊果酸和齐墩果酸抗肝脂肪变和纤维化作用研究进展[J].药物评价研究,2017,40(2):270-278.

[5] 郝艳丽,吴启坤,冯威,等.齐墩果酸对CCl₄诱导小鼠急性肝损伤保护作用的实验研究[J].吉林医药学院学报,2015,36(1):1-3.

[6] 孙丽君,常福厚,白图雅,等.山苦荚保肝活性部位筛选及其化学成分研究[J].中国药房,2021,32(9):1089-1092.

[7] XIU M, ZHAO Y, WANG X, et al. Regulation of SIRT1-TLR2/TLR4 pathway in cell communication from macrophages to hepatic stellate cells contribute to alleviates hepatic fibrosis by luteoloside[J]. Acta Histochem, 2023, 125(1):151989.

[8] 郭江红,任刚,蒋建东.小檗碱通过改善代谢水平抗肝细胞癌的研究进展[J].现代药物与临床,2018,33(3):703-708.

[9] 班笃敬,魏炜,申超,等.木香烃内酯抑制乙醇诱导的肝细胞损伤与脂肪变性[J].天然产物研究与开发,2019,31(4):608-614.

[10] WANG Y N, ZHANG X, ZHAO L L, et al. Costunolide protects lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury in mice by inhibiting NF-κB signaling pathway[J]. J Surg Res, 2017, 220:40-45.

[11] 韩瑶聃,王彬,王政雨,等.甘草酸药理作用的研究进展[J].中国新药杂志,2012,21(21):2499-2505.

[12] 李德恒,黄坡,李博,等.肝泰舒胶囊治疗病毒性乙型肝炎的系统评价与Meta分析[J].中国中药杂志,2019,44(13):2858-2864.

[13] 刘红,杨大国,舒丹,等.晶珠肝泰舒对慢性乙型肝炎患者Th1/Th2应答的影响[J].广东医学,2002,23(3):309-311.

[14] 刘馨安,潘琳,杨春红,等.藏医药对肝胆疾病的认识与治疗[J].中药与临床,2022,13(4):58-64.

[15] 王玉清,马晓雨,张玉良.晶珠肝泰舒胶囊治疗80例病毒性肝炎疗效分析[J].青海医药杂志,2001,31(2):54-55.

[16] 顾群.晶珠肝泰舒胶囊治疗慢性肝炎60例疗效观察[J].辽宁中医杂志,2000,27(9):407-408.

[17] 郭珊珊,曹文静,笔雪艳,等.HPLC测定肝泰舒胶囊中獐牙菜苦苷含量[J].中国中医药信息杂志,2014,21(1):69-70,71.

[18] 杨凤梅,吕东,张玉良.晶珠肝泰舒胶囊的质量标准研究[J].中国药学杂志,2000,35(3):196-198.

[19] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[M].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:61-65.

(收稿日期:2023-03-20 修回日期:2023-08-09)

(编辑:陈宏)