

# 三重四级杆串联质谱(LC-MS/MS)法 同时测定复方广痛消水提物中 5 种有效成分的含量

朱莉<sup>1</sup>, 王锐<sup>1</sup>, 李鹏跃<sup>2</sup>, 邓志灏<sup>1</sup>, 赵宝明<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100300; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

**[摘要]** 目的: 建立同时测定广痛消水提物中延胡索乙素、芍药苷、小檗碱、厚朴酚、和厚朴酚含量的方法。方法: 采用 LC-MS/MS 联用方法。结果: 芍药苷、延胡索乙素、小檗碱、厚朴酚、和厚朴酚线性范围分别为 0.882 8 ~ 113 ( $r = 0.999 8$ ), 1.543 8 ~ 49.4 ( $r = 0.999 5$ ), 0.904 7 ~ 115.8 ( $r = 0.999 7$ ), 0.881 3 ~ 112.8 ( $r = 0.999 4$ ), 0.165 6 ~ 21.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r = 0.999 9$ )。加样回收率分别为 1.998%, 1.14%, 3.117%, 1.828%, 1.596%。结论: 该法专属性强、快速灵敏, 可用于广痛消水提物中延胡索乙素、芍药苷、小檗碱、厚朴酚、和厚朴酚的含量测定。

**[关键词]** 广痛消水提物; 延胡索乙素; 芍药苷; 小檗碱; 厚朴酚; 和厚朴酚; 三重四级杆串联质谱; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0098-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013100098

## Determination of Five Kinds of Effective Components in Guang Tong Xiao Water Extract by LC-MS/MS

ZHU Li<sup>1</sup>, WUANG Rui<sup>1</sup>, LI Peng-yue<sup>2</sup>, DENG Zhi-hao<sup>1</sup>, ZHAO Bao-ming<sup>1\*</sup>

(1. Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100300, China;

2. China Academy of Chinese Medicine Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a LC-MS/MS method for the determination of tetrahydropalmatine, paeoniflorin, berberine, magnolol and honokiol in Guang Tong Xiao water extract. **Method:** To measure the content of the target samples by LC-MS/MS method. **Result:** tetrahydropalmatine, paeoniflorin, berberine, magnolol and honokiol were all analyzed exactly, The linear ranges were 0.882 812 5-113 ( $r = 0.999 8$ ), 1.543 75-49.4 ( $r = 0.999 5$ ), 0.904 687 5-115.8 ( $r = 0.999 7$ ), 0.881 25-112.8 ( $r = 0.999 4$ ), 0.165 625-21.2  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r = 0.999 9$ ) respectively. The spike recovery were 1.998%, 1.14%, 3.117%, 1.828% and 1.596%. **Conclusion:** A sensitive, accuracy and suitable LC-MS/MS method has been developed, and the method can be applied for the determination of tetrahydropalmatine, paeoniflorin, berberine, magnolol and honokiol in Guang Tong Xiao aqueous extract.

**[Key words]** Guang Tong Xiao water extract; tetrahydropalmatine; paeoniflorin; berberine; magnolol; honokiol; LC-MS/MS; content determination

广痛消泡沫气雾剂是北京中医药大学东直门医

院赵宝明教授根据多年的临床经验, 结合肛肠疾病的发病特点及术后常见并发症研制的一种经直肠给药的中药复方制剂, 主要由延胡索、白芍、厚朴、当归等 8 味中药组成, 经动物实验及临床观察表明该方具有抗炎、止血、解痉止痛、消肿、促进创面愈合等作用。该复方制剂经历了提取工艺优化、动物药理实验、剂型优势和药物安全性及大样本的临床药效研究, 作为院内制剂在肛肠科应用。本实验旨在建立

**[收稿日期]** 20121223(021)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81072812)

**[第一作者]** 朱莉, 博士在读, 从事肛肠疾病的防治与研究, Tel: 010-84013137, E-mail: xjzl\_2004@sohu.com

**[通讯作者]** \* 赵宝明, 教授, 博士生导师, 从事肛肠疾病的防治与研究, Tel: 010-84013137, E-mail: zhaobaoming1951@126.com

该复方中延胡索乙素、小檗碱、芍药苷、厚朴酚、和厚朴酚5种主要有效成分含量的测定方法,为研究产生本复方疗效的有效成分提供依据。由于前期采用高效液相色谱法分析广痛消水提物中有效成分时干扰信号较多,分析时间长,不能对提取物中可能的药效成分同时进行准确的定量分析,所以我们采用了LC-MS/MS法对广痛消水提物中5个有效成分进行同时含量测定。

## 1 材料

### 1.1 药物

**1.1.1 原料药** 醋制延胡索(产地浙江,批号103211201)购于北京卫仁中药饮片厂,细辛(产地辽宁,批号1112113)购于北京金崇光药业有限公司,茜草(产地河北,批号11110602),白芍(产地安徽,批号11120201),当归(产地甘肃批号11122201)均购于北京西单医药有限公司责任公司,姜厚朴(产地四川,批号101123919)购于北京同仁堂(亳州)饮片有限公司,生关黄柏(产地辽宁,批号110730009)购于北京仟草中药饮片有限公司。

**1.1.2 试药** 延胡索乙素对照品(批号110726),盐酸小檗碱(批号110713),芍药苷(批号110736),厚朴酚(批号110729),和厚朴酚(批号110730),内标布洛芬(批号100179),消旋山莨菪碱(批号1002492)所有对照品均购自中国食品药品检定研究所,甲醇和乙腈为色谱纯,超纯水(分析室自制)。

**1.2 仪器** Agilent 三重四极杆串联质谱(LC-MS/MS),Agilent RRLC液相色谱仪,Masshunter工作站(美国Agilent公司),德国D-78224 Singer/HEW超声波清洗器,德国KERN ALT100-5AM型1/10万电子天平。SXKW电加热套(北京中兴伟业);狮鼎牌SHB-D微型循环水真空泵(郑州长城科技工贸有限公司)。

## 2 方法与结果

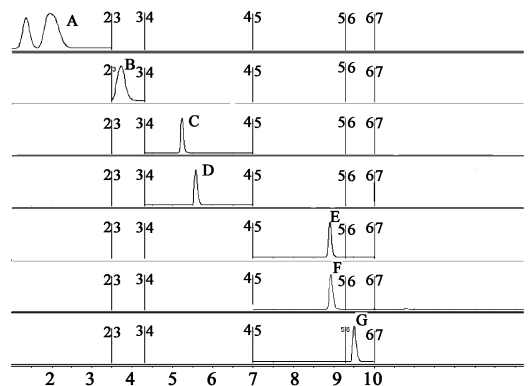
**2.1 色谱条件** Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm),流动相A 0.1%甲酸水,B 乙腈,梯度洗脱 0~1 min(15% B, 0.2 mL·min<sup>-1</sup>); 1~2 min(15%~40% B, 0.3 mL·min<sup>-1</sup>); 2~7 min(40%~80% B, 0.3 mL); 7~9 min(80%~93% B, 0.3 mL·min<sup>-1</sup>); 9~12 min(93%~95% B, 0.3 mL·min<sup>-1</sup>); 12~13 min(95%~15% B, 0.3 mL·min<sup>-1</sup>); 13~18 min(15% B, 流速 0.2 mL·min<sup>-1</sup>); 柱温 30℃。

**2.2 质谱检测条件** ESI离子源,正、负离子检测方式,干燥气温度 300℃,干燥气体流量 10 L·min<sup>-1</sup>;雾

化器压力 30 Pa;毛细管电压正离子 4 000 V,负离子 3 500 V,芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、厚朴酚、和厚朴酚、布洛芬、消旋山莨菪碱监测离子对分别为 479.2/121, 356.2/192.2, 336.1/320.2, 265.1/247.1, 265.2/233.1, 205.1/161.1, 306.1/140。

**2.3 药材提取方法** 厚朴、当归、细辛提取挥发油 6 h,分别收集挥发油及提取液;药渣与白芍、黄柏、茜草加水(8倍)煎煮 3次,每次 1 h,合并煎液滤过,滤液和蒸馏后提取液合并,减压浓缩至稠膏状(相对密度为 1.2~1.3, 55~60℃),加入 95%乙醇,使含醇量达 65%乙醇静置 24 h,滤过,收集滤液并回收乙醇至无醇味,备用;延胡索用 3 倍量 60%乙醇浸泡 24 h后加热回流提取 3 h,收集提取液,再加入 2 倍量 60%乙醇加热回流提取 2 h,收集提取液。合并 2次提取液滤过,随后加蒸馏收集到的挥发油搅拌均匀即得储备液。

**2.4 供试品溶液的制备** 上述储备液中加入内标布洛芬(20 μL/100 μL),消旋山莨菪碱(10 μL/100 μL),混匀,0.22 μm微孔滤膜过滤,即得。见图 1。



A. 消旋山莨菪碱(内标);B. 芍药苷;C. 延胡索乙素;  
D. 盐酸小檗碱;E. 和厚朴酚;F. 布洛芬(内标);G. 厚朴酚

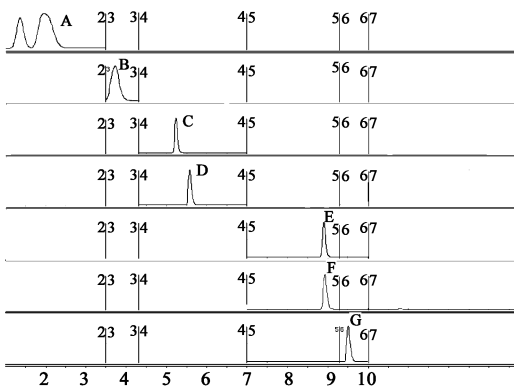
图 1 供试品色谱

**2.5 对照品溶液的配制** 精密称定芍药苷 5 650 μg、延胡索乙 2 470 μg,盐酸小檗碱 5 790 μg,厚朴酚 5 640 μg,和厚朴酚 1 060 μg,用甲醇溶解,并定容至 10 mL 作为对照品储备液,精密称定内标消旋山莨菪碱 7 410 μg 用甲醇定容至 5 mL 布洛芬 930 μg 用甲醇定容至 10 mL,作为内标储备液,按表 1 依次稀释配制混合对照溶液 1~8。临用前加入内标布洛芬(20 μL/100 μL),消旋山莨菪碱(10 μL/100 μL),混匀,0.22 μm微孔滤膜过滤,2.1 和 2.2 试验条件下进行测定。见图 2。

表 1 芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、厚朴酚和厚朴酚的混合对照液配制

mg·L<sup>-1</sup>

No.	芍药苷	延胡索乙素	盐酸小檗碱	厚朴酚和	厚朴酚
1	4. 414 062 5	1. 929 687 5	4. 523 437 5	4. 406 25	0. 828 125
2	8. 828 125	3. 859 375	9. 046 875	8. 812 5	1. 656 25
3	17. 656 25	7. 718 75	18. 093 75	17. 625	3. 312 5
4	35. 312 5	15. 437 5	36. 187 5	35. 25	6. 625
5	70. 625	30. 875	72. 375	70. 5	13. 25
6	141. 25	61. 75	144. 75	141	26. 5
7	282. 5	123. 5	289. 5	282	53
8	565	247	579	564	106



A. 消旋山莨菪碱对照品; B. 芍药苷对照品;  
C. 延胡索乙素对照品; D. 盐酸小檗碱对照品;  
E. 和厚朴酚对照品; F. 布洛芬对照品; G. 厚朴酚对照品

图 2 对照品色谱

**2.6 线性关系的考察** 精密吸取混合的不同质量浓度芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、厚朴酚和厚朴酚的对照液加布洛芬、消旋山莨菪碱定容至 5 mL 量瓶混匀, 每个质量浓度平行 3 份。每个梯度质量浓度进样 5 μL 在拟定 HPLC-ESI-MS-MS 条件下测定, 以质量浓度 (mg·L<sup>-1</sup>) 为横坐标, 对照品峰面积与内标峰面积之比 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线。结果表明各成分在检测浓度范围内线性关系良好, 见表 5。

表 2 5 种成分线性关系表

对照品	标准曲线	r	线性范围 /mg·L <sup>-1</sup>
芍药苷	Y=0.005 2X-0.000 4	0.999 8	0.882 8~113
延胡索乙素	Y=0.005 3X+0.065 9	0.999 5	1.543 8~49.4
盐酸小檗碱	Y=0.002X+0.046 9	0.999 7	0.904 7~115.8
厚朴酚	Y=0.018 65X+4.171 2	0.999 4	0.881 3~112.8
和厚朴酚	Y=0.083 65X+1.231 6	0.999 9	0.165 6~21.2

**2.7 精密度试验** 取高、中、低 3 个浓度 (选取编号 8, 7, 5) 的对照品混合液分别重复进样 6 次, 进样量

5 μL, 按照 2.1 和 2.2 项下进行测定, 记录峰面积, 结果芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.813%, 0.657%, 0.977%; 延胡索乙素峰面积的 RSD 分别为 0.884%, 0.883%, 0.673%; 盐酸小檗碱峰面积的 RSD 分别为 0.616%, 0.6945, 0.952%; 厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 0.743%, 0.721%, 0.802%; 和厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 0.904%, 0.235%, 0.789%。表明仪器精密度良好。

**2.8 稳定性试验** 取同一批号 (20120406) 分别于 0, 6, 12, 18, 24, 30 d 按上述色谱和质谱条件进样测定。结果芍药苷、延胡索乙素、盐酸小檗碱、厚朴酚和厚朴酚峰面积的 RSD 分别为 1.72%, 1.88%, 2.03%, 1.64%, 1.93% 表明供试品溶液在 1 月内稳定。

**2.9 重复性试验** 分别取广痛消水提取物 (批号 20120406) 按 2.4 试验方法进行, 共 6 份, 记录质谱峰面积, 测得水提取物中芍药苷峰面积 RSD 4.02%, 延胡索乙素峰面积 RSD 2.81%, 盐酸小檗碱峰面积 RSD 1.899%, 厚朴酚峰面积 RSD 4.82%, 和厚朴酚峰面积 RSD 2.04%。

**2.10 加样回收率试验** 取已知含量的广痛消水提取物 (批号 20120406) 6 份, 各 100 μL, 分别加入对照品混合液, 按照 2.1 和 2.2 实验条件进行测定, 测得见表各成分的量, 计算各成分的加样回收率和 RSD, 结果见表 3~7。

表 3 芍药苷加样回收率 (n=6)

No.	样品中含量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	606.9	623.4	1 240.8	101.68		
2	606.9	623.4	1 264.9	105.56		
3	606.9	623.4	1 249.1	103.02	102.13	1.998
4	606.9	623.4	1 230.9	100.09		
5	606.9	623.4	1 231.3	100.16		
6	606.9	623.4	1 244.3	102.25		

表4 延胡索乙素加样回收率( $n=6$ )

No.	样品中含量 / $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	667.2	684.3	1 368.9	102.54		
2	667.2	684.3	1 356.7	100.76		
3	667.2	684.3	1 350.1	99.80	101.51	1.14
4	667.2	684.3	1 367.2	102.29		
5	667.2	684.3	1 358.5	101.02		
6	667.2	684.3	1 369.6	102.65		

表5 盐酸小檗碱加样回收率( $n=6$ )

No.	样品中含量 / $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	392.2	408.3	798.4	99.49		
2	392.2	408.3	814.7	103.48		
3	392.2	408.3	800.1	99.90	102.38	3.117
4	392.2	408.3	829.0	106.98		
5	392.2	408.3	798.7	99.56		
6	392.2	408.3	820.3	104.85		

表6 厚朴酚加样回收率( $n=6$ )

No.	样品中含量 / $\mu\text{g}$	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	0.67	0.74	1.40	98.65		
2	0.67	0.74	1.42	101.35		
3	0.67	0.74	1.41	100	100.9	1.828
4	0.67	0.74	1.44	104.05		
5	0.67	0.74	1.42	101.35		
6	0.67	0.74	1.41	100		

表7 和厚朴酚加样回收率( $n=6$ )

No.	样品中含量 / $\mu\text{g}$ $\times 10^{-5}$	加入量 / $\mu\text{g}$ $\times 10^{-5}$	测得量 / $\mu\text{g}$ $\times 10^{-5}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1	5 790	6 410	12 130	98.91		
2	5 790	6 410	12 240	100.62		
3	5 790	6 410	12 290	101.4	100.65	1.596
4	5 790	6 410	12 180	99.69		
5	5 790	6 410	12 420	103.43		
6	5 790	6 410	12 190	99.84		

**2.11 样品含量测定** 取3批广痛消水提物,按供试品制备方法制备供试品溶液,分别进样 $5\mu\text{L}$ ,并按2.1和2.2条件测定,计算各批原液中芍药苷、延

胡索乙素、盐酸小檗碱、厚朴酚和厚朴酚的含量。结果见表8。

表8 样品含量测定( $n=3$ )

成分	批号			平均含量 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
	20120406	20120407	20120408	
芍药苷	147.89	150.11	148.78	148.93
延胡索乙素	39.10	38.25	37.70	38.35
盐酸小檗碱	137.30	133.84	135.36	135.5
厚朴酚	3.25	3.14	3.36	3.25
和厚朴酚	0.428	0.419	0.437	0.428

### 3 讨论

实验前期曾采用高效液相色谱法检测广痛消水提物中有效成分,但存在提取物的药效成分相互干扰严重,无法进行准确的定量分析,一些有效成分含量低,无明显的响应信号;操作繁琐、灵敏度低、分析速度慢、多成分含量同时测定色谱条件摸索困难等问题。

在优化流动相时,优先考虑等度洗脱,虽然洗脱时间较短,但各分析物峰形较差,响应低。调节pH、流速和流动相比比例,峰形和响应值效果仍不理想。采用梯度洗脱,虽然分析时间有所延长,但峰形和响应值都有了显著改善。

根据待测物质的化学性质,同时选取了两个内标,内标的选择校准和消除了由于操作条件的波动而对分析结果产生的影响,从而提高分析结果的准确性,但同时也增加了分析问题的难度和复杂性。

本实验在考察药物稳定性时,选择1个月作为考察时间,主要考虑已灌装的广痛消泡沫气雾剂每瓶质量约28g,根据临床上常规的使用剂量,3~5天用完,故暂时将稳定性试验考察时间暂定为1个月,如果延长考察时间,尚不能排除待测成分仍然稳定的可能性。

### [参考文献]

- [1] 刘昌辉,黄小桃,李颖仪,等. LC-MS/MS法测定酸枣仁中酸枣仁皂苷A、B和斯皮诺素含量[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(1):69.
- [2] 刘晓,范林乾,蔡皓,等. HPLC同时测定四逆汤中4种指标性成分的含量[J]. 中国中药杂志,2012,37(6):803.
- [3] 李春来,李伟东,吴育,等. HPLC同时测定白虎汤中4种有效成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(12):78.

# HPLC同时测定大花红景天提取物中没食子酸、 红景天苷、酪醇、对香豆酸的含量

林夏<sup>1,2</sup>, 胡军华<sup>1,2</sup>, 崔培超<sup>1,2</sup>, 秦建平<sup>1,2</sup>, 仲艳<sup>1,2</sup>, 杨绪芳<sup>1,2</sup>, 李家春<sup>1,2</sup>, 毕宇安<sup>1,2</sup>, 萧伟<sup>1,2\*</sup>

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001;

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001)

**[摘要]** 目的:建立同时测定大花红景天提取物中没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸4种成分含量的HPLC法。方法: Phenomenex Luna C<sub>18</sub>色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-0.3%冰醋酸溶液梯度洗脱,流速0.7 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长275,308 nm,柱温40℃。结果:没食子酸、红景天苷、酪醇、对香豆酸分别在0.435~13.912 mg·L<sup>-1</sup>(*r*=1, *n*=6), 22.813~730 mg·L<sup>-1</sup>(*r*=0.999 8, *n*=6), 7.819~250.200 mg·L<sup>-1</sup>(*r*=0.999 8, *n*=6), 1.618~51.760 mg·L<sup>-1</sup>(*r*=0.999 8, *n*=6)呈良好的线性关系,加样回收率均符合含量测定要求。结论:该含测方法简便、准确,可以用于大花红景天提取物中4个成分的含量测定。

**[关键词]** 高效液相色谱; 红景天提取物; 没食子酸; 红景天苷; 酪醇; 对香豆酸; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0102-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013100102

## Determination of Gallic acid, Salidroside, Tyrosol and *p*-Coumaric Acid in Rhodiola Extract by HPLC

LIN Xia<sup>1,2</sup>, HU Jun-hua<sup>1,2</sup>, CUI Pei-chao<sup>1,2</sup>, QIN Jian-ping<sup>1,2</sup>, ZHONG Yan<sup>1,2</sup>,  
YANG Xu-fang<sup>1,2</sup>, LI Jia-chun<sup>1,2</sup>, BI Yu-an<sup>1,2</sup>, XIAO Wei<sup>1,2\*</sup>

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical CO., LTD, Lianyungang 222001, China;

2. State Key Laboratory of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

**[收稿日期]** 20121018(010)

**[基金项目]** 国家科技部“重大新药创制”项目(2011ZX09401-097)

**[第一作者]** 林夏,助理研究员,从事中药质量标准研究, Tel: 15105130710, E-mail: linxia200408@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 萧伟,研究员,高级工程师,博士,从事中药新剂型的研究与开发, Tel: 0518-85521956, E-mail: wzzhz-nj@tom.com

- [4] 倪琳,杨锡. HPLC测定雪山金罗汉止痛涂膜剂中延胡索乙素的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2):106.
- [5] 叶秀金,宋粉云. HPLC测定清肺抑火丸中盐酸小檗碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):90.
- [6] 张芳向,林朝霞. HPLC法测定温肺止咳软胶囊中甘草酸、6-姜酚、和厚朴酚及厚朴酚[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7):83.
- [7] 姜清华,邓晶晶,吴琼,等. 芍药苷的药代动力学研究进展[J]. 实用药物与临床, 2010, 13(6):451.
- [8] 权勤波,李启红. HPLC法测定胃炎康胶囊中药药苷、盐酸小檗碱及甘草酸的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1):120.
- [9] 艾路,邱落,杜菁,等. 高效液相色谱法测定调胃舒肝丸中厚朴酚、和厚朴酚的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14):87.
- [10] 曹旦华,张剑,朱丹妮. HPLC同时测定乳癖消颗粒中7种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):74.
- [11] 李明,陈志维,黎玉翠,等. 高效液相色谱法测定养坤丸中黄芩苷和芍药苷的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(4):12.

[责任编辑 顾雪竹]