

HPLC-QqQ-MS法同时测定八味小檗皮胶囊中25种成分的含量^Δ

易欢^{1*}, 彭芳¹, 谢雨宸¹, 苟晓玲², 丁银², 范刚^{2#}(1.成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2.成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)14-1682-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.14.04



摘要 目的 建立同时测定八味小檗皮胶囊中小檗碱、木兰花碱、羟基红花黄色素A等25种成分含量的方法。方法 采用高效液相色谱串联三重四极杆质谱(HPLC-QqQ-MS)法。以WondaSil C₁₈-WR为色谱柱,以0.1%甲酸溶液-甲醇为流动相进行梯度洗脱,柱温为25℃,流速为0.5 mL/min,进样量为5 μL;采用电喷雾离子源,正、负离子模式下同时扫描,多重反应监测模式进行测定,毛细管电压分别为4 000 V(+),2 500 V(-),干燥气流速为11 L/min,温度为300℃,压力为15 psi。结果 八味小檗皮胶囊中木兰花碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、蟾蜍色胺、蟾蜍特尼定、胡椒碱、甘草酸、阿魏酸、阿魏酸4-*O*-β-D-吡喃葡萄糖苷、羟基红花黄色素A、绿原酸、没食子酸、诃子鞣酸、柯里拉京、鞣花酸、甘草素、甘草苷、芦丁、槲皮素、甘氨酸、胆酸、甘氨酸、熊去氧胆酸在各自的质量浓度范围内线性关系良好($r \geq 0.999 0$);定量限为0.62~554.50 ng/mL,检测限为0.18~166.30 ng/mL;精密密度、重复性、稳定性(24 h)试验的RSD均小于3.00%;加样回收率均在80%~115%之间(RSD均小于3.00%, $n=6$)。上述25种成分的含量分别为16.94~20.82, 3.78~5.17, 9.11~11.43, 0.24~0.30, 0.20~0.39, 0.74~1.16, 0.79~0.89, 3.26~3.35, 0.48~0.66, 11.96~13.35, 2.30~3.12, 0.19~0.21, 6.07~8.83, 10.42~10.48, 1.43~1.64, 4.17~4.76, 0.14~0.15, 0.46~0.52, 0.04, 0.01, 0.59~0.63, 0.20~0.23, 0.02, 0.15~0.16, 0.01 mg/g。结论 所建立的含量测定方法简单、灵敏、稳定性好,可用于同时测定八味小檗皮胶囊中25种成分的含量。

关键词 藏药;八味小檗皮胶囊;含量测定;高效液相色谱串联三重四极杆质谱法

Simultaneous determination of 25 components in Bawei xiaobopi capsules by HPLC-QqQ-MS

YI Huan¹, PENG Fang¹, XIE Yuchen¹, GOU Xiaoling², DING Yin², FAN Gang²(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 2. College of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To establish the method for simultaneous determination of 25 components (such as berberine, magnoflorine and hydroxysafflor yellow A) in Bawei xiaobopi capsules. **METHODS** High-performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-QqQ-MS) method was adopted. The determination was performed on WondaSil C₁₈-WR column with mobile phase consisted of 0.1% formic acid solution-methanol (gradient elution) at the flow rate of 0.5 mL/min. The column temperature was 25℃, and sample size was 5 μL. Electrospray ionization source was scanned in positive and negative ion mode at the same time, with multiple reaction monitoring. The capillary voltage was 4 000 V (+) and 2 500 V (-). The drying gas flow rate was 11 L/min with the temperature of 300℃. The pressure was 15 psi. **RESULTS** Totally 25 components of Bawei xiaobopi capsules had good linear relationship within a certain range, such as magnoflorine, jatrorrhizine, berberine, palmatine, bufotenine, bufotenidine, piperine, glycyrrhizic acid, ferulic acid, ferulic acid 4-*O*-β-D-glucopyranoside, hydroxysafflor yellow A, chlorogenic acid, gallic acid, chebulagic acid, corilagin, ellagic acid, liquiritigenin, liquiritin, rutin, quercetin, glycocholic acid, cholic acid, glycochenodeoxycholic acid, glycodeoxycholic acid, ursodeoxycholic acid ($r \geq 0.999 0$). The limits of quantitation were 0.62-554.50 ng/mL; the limits of detection were 0.18-166.30 ng/mL. RSDs of precision, repeatability and stability (24 h) tests were all lower than 3.00%. The recovery rates were 80%-115% (all RSDs lower than 3.00%, $n=6$). The contents of above 25 components were 16.94-20.82, 3.78-5.17, 9.11-11.43, 0.24-0.30, 0.20-0.39, 0.74-1.16, 0.79-0.89, 3.26-3.35, 0.48-0.66, 11.96-13.35, 2.30-3.12, 0.19-0.21, 6.07-8.83, 10.42-10.48, 1.43-1.64, 4.17-4.76, 0.14-0.15, 0.46-0.52, 0.04, 0.01, 0.59-0.63, 0.20-0.23, 0.02, 0.15-0.16, 0.01 mg/g, respectively.

CONCLUSIONS Established method is simple, sensitive and stable, and can be used for content determination of 25 components in Bawei xiaobopi capsules simultaneously.

KEYWORDS Tibetan medicine; Bawei xiaobopi capsules; content determination; HPLC-QqQ-MS

^Δ 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81874370);四川省科技计划项目(No.2022YFS0434)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:中药有效成分分析及应用。E-mail:1227807652@qq.com

通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:民族药质量控制及药效物质基础。E-mail:fangang1111@163.com

八味小檗皮胶囊为常用的藏药复方制剂,由小檗皮、萆薢、红花、余甘子、甘草、熊胆粉、人工麝香、京墨8味药组成,具有消炎止痛、固精止血的功效,临床上常用于治疗尿路感染、尿痛、白浊、血尿、滑精等疾病。八味小檗皮胶囊处方来源于八味小檗皮散,《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药分册》对八味小檗皮散的制法、性状、检查等进行了描述^[1],但无鉴别、含量测定等内容,难以进行有效的质量控制。目前,虽已有文献采用高效液相色谱法测定了八味小檗皮散中没食子酸和小檗碱的含量^[2-3]和八味小檗皮胶囊中盐酸小檗碱的含量^[4],但由于该药成分复杂,且复方制剂具有多成分、多靶点的作用特点,加之羟基红花黄色素A、甘草苷、鞣花酸、熊去氧胆酸、胆酸等成分已被证明具有明显的抗炎、抗氧化、降血糖、免疫调节等活性^[5-8]。因此,建立多成分的含量测定方法有利于控制八味小檗皮胶囊的生产投料和内在质量,也可为其药效物质基础研究奠定基础。

高效液相色谱串联质谱技术具有灵敏度高、分离能力强、分析范围广等特点,可对药材中的微量成分或不易分离的成分进行定性定量分析^[9-10]。本研究充分利用高效液相色谱串联三重四极杆质谱(high-performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry, HPLC-QqQ-MS)技术的分析优势,首次对藏药八味小檗皮胶囊中的25种成分(均为8味药的活性成分)进行了定量测定,旨在为其成分分析提供方法学参考,也为今后探究其药效物质基础提供依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有1260型HPLC仪、G6420A型三重四极杆质谱仪(美国Agilent公司),Sartorius CPA225D型电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],CQ-250型超声清洗器[必能信超声(上海)有限公司]。

1.2 主要药品与试剂

槲皮素对照品(批号100081-200907)、胆酸对照品(批号100078-200414)、药根碱对照品(批号110733-201108)、芦丁对照品(批号080-9303)、柯里拉京对照品(批号111623-200302)、阿魏酸对照品(批号0773-9910)均购于中国食品药品检定研究院;没食子酸对照品(批号MUST-13040103)购于成都曼斯特生物科技有限公司;甘氨酸对照品(批号G131002)、甘氨酸对照品(批号G113438)、甘氨酸对照品(批号S167765)均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;熊去氧胆酸对照品(批号DST200823-076)、胡椒碱对照品(批号DST200109-043)、甘草酸对照品(批号DST-DG000601)、诃子鞣酸对照品(批号DST200927-064)、甘草素对照品(批号DSTDG001001)、蟾蜍色胺对照品(批

号DST201022-175)均购于成都德思特生物技术有限公司;木兰花碱对照品(批号PS170717-08)、鞣花酸对照品(批号PS010827)、羟基红花黄色素A对照品(批号PS000745)均购于成都普思生物科技股份有限公司;甘草苷对照品(批号G-009-121124)、绿原酸对照品(批号RFS-L00701908029)均购于成都瑞芬思生物技术有限公司;巴马汀对照品(批号H-015-150808)、小檗碱对照品(批号Y-035-150818)均购于四川赛因斯特生物科技有限公司;阿魏酸4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷和蟾蜍特尼定对照品均为本课题组自制^[11]。所有对照品纯度均大于96.0%。色谱级甲醇、乙腈购于美国Sigma公司;色谱级甲酸购于成都市科隆化学品有限公司;色谱级醋酸铵购于天津市科密欧化学试剂有限公司;其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。3批八味小檗皮胶囊(国药准字Z20025870,批号分别为20190502、20210617、20211125,规格0.3 g/粒)均购于青海久美藏药药业有限公司。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品溶液 精密称取各对照品适量,分别置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解至刻度,即得各单一对照品母液。量取各单一对照品母液适量,置于10 mL棕色量瓶中,加甲醇定容,即得木兰花碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、蟾蜍色胺、蟾蜍特尼定、胡椒碱、甘草酸、阿魏酸、阿魏酸4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、羟基红花黄色素A、绿原酸、没食子酸、诃子鞣酸、柯里拉京、鞣花酸、甘草素、甘草苷、芦丁、槲皮素、甘氨酸、胆酸、甘氨酸对照品、甘氨酸对照品、甘氨酸对照品、熊去氧胆酸质量浓度分别为110 000.00、91 000.00、110 437.50、8 150.00、2 700.00、21 093.75、9 720.00、18 000.00、3 019.50、61 000.00、11 900.00、3 180.00、61 500.00、56 700.00、9 900.00、21 200.00、900.90、2 484.00、487.50、342.00、5 340.00、3 040.00、300.00、3 030.00、318.00 ng/mL的混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液 取八味小檗皮胶囊内容物约0.1 g,精密称定,置于50 mL锥形瓶中,加入70%甲醇35 mL,称定质量,超声(功率200 W,频率40 kHz)处理30 min,待冷却后,称定质量,用70%甲醇补足减失的质量,摇匀,取上清液,经0.22 μ m微孔滤膜滤过,即得。

2.2 色谱与质谱条件

2.2.1 色谱条件 以WondaSil C₁₈-WR(4.6 mm \times 250 mm,5 μ m)为色谱柱,以0.1%甲酸溶液(A)-甲醇(B)为流动相进行梯度洗脱(0.01~1.00 min,10%B \rightarrow 45%B;1.00~3.00 min,45%B \rightarrow 70%B;3.00~4.00 min,70%B;4.00~5.00 min,70%B \rightarrow 75%B;5.00~7.00 min,75%B;7.00~10.00 min,75%B \rightarrow 95%B;10.00~20.00 min,95%B);柱温为25 $^{\circ}$ C;流速为0.5 mL/min;进样量为5 μ L。

2.2.2 质谱条件 离子源为电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI),正、负离子模式下选择多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式测定各成分含量;毛细管电压分别为4 000 V(+)、2 500 V(-);干燥气为氮气,干燥气流速为11 L/min,温度为300 ℃,压力为15 psi;碰撞气为高纯氮气。详细的质谱参数信息见表1。

表1 25种成分的质谱参数

| 化学成分 | 母离子 m/z | 子离子 m/z | 碎裂电压/V | 碰撞能量/eV | 电离模式 |
|-------------------------------------|-----------|-----------|--------|---------|------|
| 木兰花碱 | 342.1 | 264.9 | 130 | 24 | + |
| 药根碱 | 338.0 | 322.0 | 140 | 27 | + |
| 小檗碱 | 336.0 | 320.1 | 135 | 27 | + |
| 巴马汀 | 351.9 | 336.0 | 145 | 32 | + |
| 蟾蜍色胺 | 205.1 | 160.0 | 90 | 8 | + |
| 蟾蜍特尼定 | 219.0 | 160.0 | 100 | 7 | + |
| 胡椒碱 | 286.0 | 201.0 | 155 | 16 | + |
| 甘草酸 | 823.3 | 453.1 | 150 | 7 | + |
| 阿魏酸 | 193.0 | 134.0 | 90 | 10 | - |
| 阿魏酸 4- <i>O</i> - β -D-吡喃葡萄糖苷 | 355.1 | 193.2 | 130 | 6 | - |
| 羟基红花黄色素A | 611.1 | 490.7 | 160 | 32 | - |
| 绿原酸 | 353.1 | 191.0 | 90 | 8 | - |
| 没食子酸 | 169.0 | 124.9 | 120 | 12 | - |
| 诃子鞣酸 | 953.1 | 301.0 | 270 | 36 | - |
| 柯里拉京 | 633.0 | 300.8 | 180 | 32 | - |
| 鞣花酸 | 300.9 | 144.9 | 170 | 40 | - |
| 甘草素 | 255.0 | 119.1 | 130 | 13 | - |
| 甘草苷 | 417.2 | 255.0 | 160 | 13 | - |
| 芦丁 | 609.1 | 299.9 | 220 | 34 | - |
| 槲皮素 | 300.9 | 150.9 | 140 | 25 | - |
| 甘氨酸 | 464.4 | 74.1 | 190 | 42 | - |
| 胆酸 | 407.3 | 407.4 | 250 | 10 | - |
| 甘氨酸脱氧胆酸 | 448.2 | 74.2 | 190 | 41 | - |
| 甘氨酸脱氧胆酸 | 448.3 | 74.0 | 180 | 40 | - |
| 熊去氧胆酸 | 391.3 | 391.2 | 220 | 5 | - |

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性考察 取“2.1”项下各单一对照品母液及供试品溶液(批号20190502),以70%甲醇作为空白溶液,按“2.2”项下色谱与质谱条件进样,记录色谱图。结果显示,空白溶液对所测成分无干扰,且供试品溶液中25种成分的出峰时间与对照品溶液中的基本一致,说明该方法专属性较好。木兰花碱、小檗碱、蟾蜍色胺、阿魏酸 4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷等8种成分的MRM色谱图见图1(其余成分的MRM色谱图略去)。

2.3.2 线性关系考察及定量限、检测限测定 精密量取“2.1.1”项下混合对照品溶液适量,用甲醇稀释成系列工作溶液。取上述系列工作溶液和混合对照品溶液,按“2.2”项下色谱与质谱条件进样,记录峰面积。以各待测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。以峰高信号为基线噪音信号的10倍测定定量限,以峰高信号为基线噪音信号的3倍测定检测限。结果见表2。

2.3.3 精密度试验 称取八味小檗皮胶囊内容物(批号20190502),按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱与质谱条件于同日内连续进样测定6次,记录峰面积。结果显示,木兰花碱、小檗碱、蟾蜍色胺、阿魏酸 4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷等25种成分峰面积的RSD均小于3.00% ($n=6$),说明仪器精密度较好。

2.3.4 重复性试验 取八味小檗皮胶囊内容物(批号20190502),共6份,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果显示,木兰花碱、小檗碱、蟾蜍色胺、阿魏酸 4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷等25种成分含量的RSD均小于3.00% ($n=6$),说明方法重复性较好。

2.3.5 稳定性试验 取八味小檗皮胶囊内容物(批号20190502),按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,于室温下放置0、2、4、8、10、12、24 h后按“2.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积。结果显示,木兰花碱、小檗碱、蟾蜍色胺、阿魏酸 4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷等25种成分峰面积的RSD均小于3.00% ($n=7$),说明供试品溶液于室温下放置24 h内稳定性较好。

2.3.6 加样回收率试验 取已知含量的八味小檗皮胶囊内容物(批号20190502),共6份,每份约0.05 g,精密称定,按已知含量的100%加入各单一对照品溶液,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果显示,木兰花碱、小檗碱、蟾蜍色胺、阿魏酸 4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷等25种成分的加样回收率均在80%~115%之间,RSD均小于3.00% ($n=6$),表明该方法准确可靠。

2.4 样品含量测定

取3批八味小檗皮胶囊内容物约0.1 g,精密称定,按“2.1.2”项下方法制备供试品溶液,各批样品平行制备3份,按“2.2”项下色谱与质谱条件进样测定,记录峰面积并按标准曲线法计算样品含量。结果显示,木兰花碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、蟾蜍色胺、蟾蜍特尼定、胡椒碱、甘草酸、阿魏酸、阿魏酸 4-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、羟基红花黄色素A、绿原酸、没食子酸、诃子鞣酸、柯里拉京、鞣花酸、甘草素、甘草苷、芦丁、槲皮素、甘氨酸、胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、甘氨酸脱氧胆酸、熊去氧胆酸的含量分别为16.94~20.82、3.78~5.17、9.11~11.43、0.24~0.30、0.20~0.39、0.74~1.16、0.79~0.89、3.26~3.35、0.48~0.66、11.96~13.35、2.30~3.12、0.19~0.21、6.07~8.83、10.42~10.48、1.43~1.64、4.17~4.76、0.14~0.15、0.46~0.52、0.04、0.01、0.59~0.63、0.20~0.23、0.02、0.15~0.16、0.01 mg/g。结果见表3。

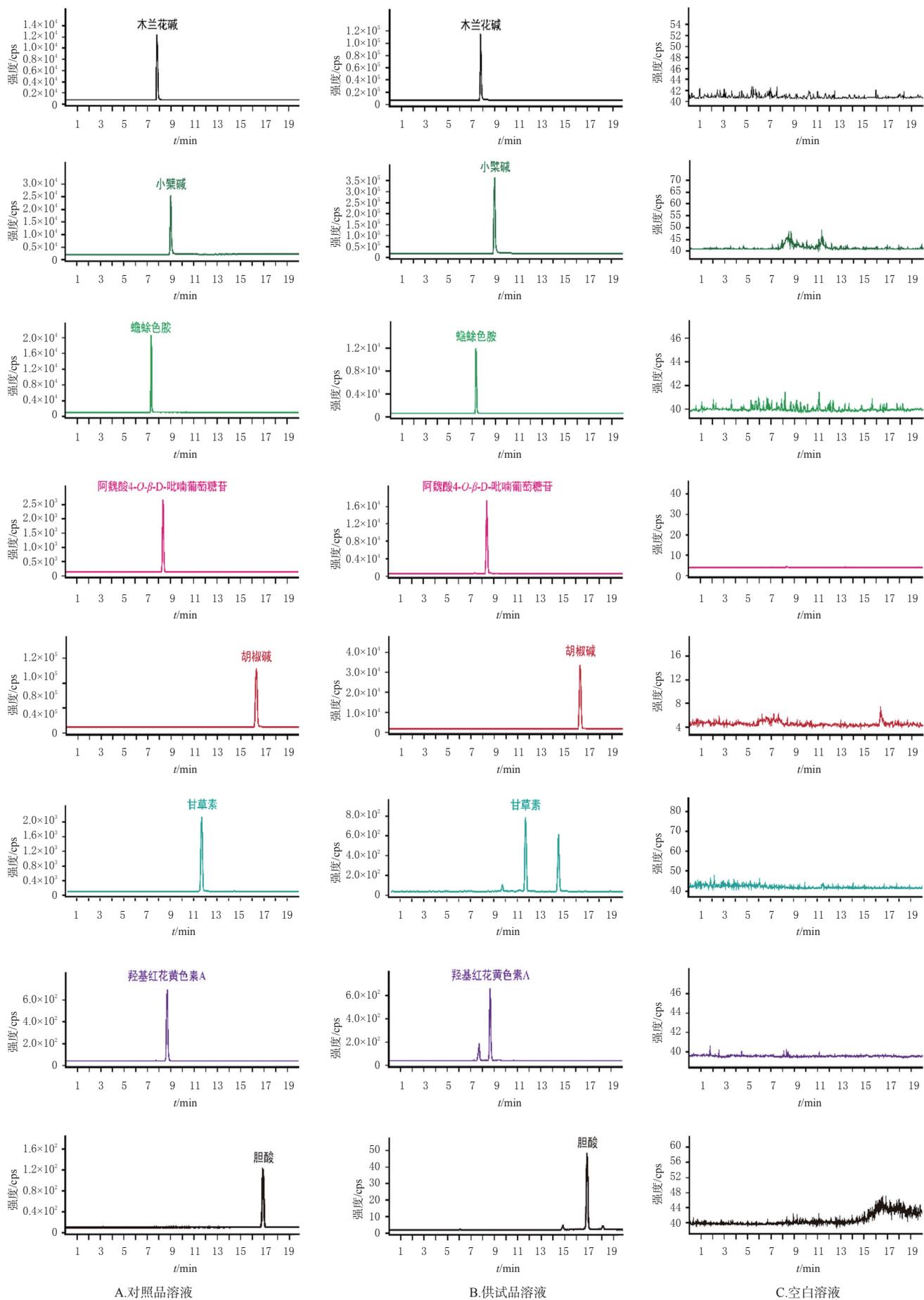


图1 木兰花碱、小檗碱、蟾蜍色胺、阿魏酸4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷等8种成分的MRM色谱图

表2 25种成分的回归方程、线性范围、定量限、检测限测定结果

| 化学成分 | 线性方程 | r | 线性范围/ (ng/mL) | 定量限/ (ng/mL) | 检测限/ (ng/mL) |
|-------------------|--------------------|--------|--------------------|-----------------|-----------------|
| 木兰花碱 | $Y=7.3715X+116310$ | 0.9992 | 11000.00~110000.00 | 16.00 | 4.80 |
| 药根碱 | $Y=9.7715X+222344$ | 0.9992 | 9100.00~91000.00 | 24.00 | 7.10 |
| 小檗碱 | $Y=39.975X+817841$ | 0.9995 | 5890.00~110437.50 | 8.70 | 2.60 |
| 巴马汀 | $Y=97.517X+124633$ | 0.9992 | 815.00~8150.00 | 0.62 | 0.18 |
| 蟾蜍色胺 | $Y=53.302X+5420.7$ | 0.9991 | 67.50~2700.00 | 1.00 | 0.30 |
| 蟾蜍特尼定 | $Y=50.803X+245123$ | 0.9992 | 2109.37~21093.75 | 2.38 | 0.71 |
| 胡椒碱 | $Y=125.07X+35518$ | 0.9992 | 162.00~9720.00 | 2.20 | 0.66 |
| 甘草酸 | $Y=0.2013X+101.86$ | 0.9994 | 450.00~18000.00 | 71.20 | 21.40 |
| 阿魏酸 | $Y=3.22X-540.07$ | 0.9990 | 549.00~3019.50 | 22.30 | 6.70 |
| 阿魏酸4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 | $Y=3.1571X+41693$ | 0.9995 | 10980.00~61000.00 | 5.10 | 1.50 |
| 羟基红花黄色素A | $Y=0.4379X+471.82$ | 0.9993 | 1547.00~11900.00 | 554.50 | 166.30 |
| 绿原酸 | $Y=9.9255X-3211.2$ | 0.9997 | 508.80~3180.00 | 10.00 | 3.00 |
| 没食子酸 | $Y=4.6048X+16167$ | 0.9999 | 11070.00~61500.00 | 24.00 | 7.00 |
| 诃子鞣酸 | $Y=0.8872X-6885.5$ | 0.9991 | 7560.00~56700.00 | 129.10 | 38.70 |
| 柯里拉京 | $Y=6.9694X-9312.7$ | 0.9992 | 1782.00~9900.00 | 87.00 | 26.00 |
| 鞣花酸 | $Y=0.3415X+1868.6$ | 0.9991 | 3074.00~21200.00 | 427.70 | 128.30 |
| 甘草素 | $Y=10.86X+1907$ | 0.9991 | 150.15~900.90 | 6.56 | 1.97 |
| 甘草苷 | $Y=22.015X+866.8$ | 0.9991 | 162.00~2484.00 | 1.80 | 0.54 |
| 芦丁 | $Y=13.815X-129.07$ | 0.9992 | 48.75~487.50 | 3.00 | 0.91 |
| 槲皮素 | $Y=10.65X-72.567$ | 0.9991 | 11.40~342.00 | 10.40 | 3.10 |
| 甘氨酸 | $Y=7.4745X-67.894$ | 0.9992 | 178.00~5340.00 | 4.85 | 1.45 |
| 胆酸 | $Y=35.524X+4238.6$ | 0.9994 | 532.00~3040.00 | 6.80 | 2.04 |
| 甘氨酸脱氧胆酸 | $Y=7.0531X+95.593$ | 0.9995 | 50.00~300.00 | 26.18 | 7.85 |
| 甘氨酸胆酸 | $Y=7.3215X-404.82$ | 0.9991 | 50.00~3030.00 | 31.70 | 9.50 |
| 熊去氧胆酸 | $Y=22.619X+634.39$ | 0.9992 | 10.60~318.00 | 10.00 | 2.80 |

表3 八味小檗皮胶囊中25种成分的含量测定结果 (n=3)

| 化学成分 | 批号20190502 | | 批号20210617 | | 批号20211225 | |
|-------------------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| | 平均含量/ (mg/g) | RSD/ % | 平均含量/ (mg/g) | RSD/ % | 平均含量/ (mg/g) | RSD/ % |
| 木兰花碱 | 16.94 | 0.36 | 18.83 | 2.17 | 20.82 | 2.75 |
| 药根碱 | 3.78 | 2.83 | 4.79 | 1.69 | 5.17 | 2.33 |
| 小檗碱 | 9.11 | 1.34 | 10.89 | 2.86 | 11.43 | 1.69 |
| 巴马汀 | 0.24 | 2.37 | 0.27 | 2.17 | 0.30 | 1.90 |
| 蟾蜍色胺 | 0.20 | 2.94 | 0.33 | 1.77 | 0.39 | 2.99 |
| 蟾蜍特尼定 | 0.74 | 2.34 | 0.95 | 2.20 | 1.16 | 2.18 |
| 胡椒碱 | 0.79 | 2.19 | 0.86 | 1.77 | 0.89 | 0.65 |
| 甘草酸 | 3.26 | 2.62 | 3.28 | 2.88 | 3.35 | 1.70 |
| 阿魏酸 | 0.48 | 2.08 | 0.64 | 2.71 | 0.66 | 1.52 |
| 阿魏酸4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷 | 11.96 | 2.21 | 12.64 | 2.96 | 13.35 | 0.33 |
| 羟基红花黄色素A | 2.30 | 2.42 | 2.73 | 3.00 | 3.12 | 2.40 |
| 绿原酸 | 0.19 | 0 | 0.20 | 2.94 | 0.21 | 2.79 |
| 没食子酸 | 6.07 | 2.29 | 7.61 | 1.47 | 8.83 | 1.13 |
| 诃子鞣酸 | 10.48 | 2.42 | 10.47 | 1.33 | 10.42 | 1.15 |
| 柯里拉京 | 1.64 | 0.61 | 1.43 | 2.02 | 1.51 | 2.33 |
| 鞣花酸 | 4.17 | 1.00 | 4.50 | 1.46 | 4.76 | 2.21 |
| 甘草素 | 0.14 | 0 | 0.15 | 0 | 0.15 | 0 |
| 甘草苷 | 0.46 | 2.17 | 0.50 | 2.32 | 0.52 | 1.10 |
| 芦丁 | 0.04 | 0 | 0.04 | 0 | 0.04 | 0 |
| 槲皮素 | 0.01 | 0 | 0.01 | 0 | 0.01 | 0 |
| 甘氨酸 | 0.59 | 1.69 | 0.60 | 1.67 | 0.63 | 1.84 |
| 胆酸 | 0.20 | 2.84 | 0.21 | 2.71 | 0.23 | 2.55 |
| 甘氨酸脱氧胆酸 | 0.02 | 0 | 0.02 | 0 | 0.02 | 0 |
| 甘氨酸胆酸 | 0.15 | 0 | 0.15 | 0 | 0.16 | 0 |
| 熊去氧胆酸 | 0.01 | 0 | 0.01 | 0 | 0.01 | 0 |

3 讨论

3.1 检测方法的选择

目前,仅有文献采用HPLC法测定了八味小檗皮制剂中小檗碱和没食子酸的含量^[2-4],但由于复方制剂的成分复杂,仅以1个或2个成分进行成分分析不具有代表性。本课题组前期曾尝试采用HPLC法同时测定八味小檗皮胶囊中的多种成分,但结果发现,大部分成分都难以得到有效分离,故本研究充分利用HPLC-QqQ-MS技术的方法学优势对多种成分进行同时测定。通过对正、负离子模式的探索发现,在正离子模式下,木兰花碱、药根碱、小檗碱、巴马汀、蟾蜍色胺、蟾蜍特尼定、胡椒碱、甘草酸的响应值较高,而阿魏酸、阿魏酸4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、羟基红花黄色素A、柯里拉京、甘草素、甘氨酸、甘氨酸脱氧胆酸、甘氨酸胆酸等其他17种成分在负离子模式下的响应值较高。在此基础上,还对各成分的碎裂电压和碰撞能量进行了优化,最终确定了本研究采用的质谱参数。

3.2 色谱条件的考察

本课题组前期分别考察了CAPCELL PAK (4.6 mm×250 mm, 5 μm)和WondaSil C₁₈-WR (4.6 mm×250 mm, 5 μm)色谱柱,结果发现,以WondaSil C₁₈-WR (4.6 mm×250 mm, 5 μm)为色谱柱时,各色谱峰的峰形、分离度均较好。同时考察了甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸溶液、甲醇-5 mmol/L醋酸铵溶液、甲醇-水(含0.1%甲酸和5 mmol/L醋酸铵)、乙腈-0.1%甲酸溶液5个流动相体系,结果发现,以甲醇-0.1%甲酸溶液为流动相时,所得色谱峰的峰形较好、响应值较高。此外,还考察了不同柱温(25、30、35℃),结果发现,在3种柱温条件下,所得色谱峰的峰面积及峰形相差不大。综合各因素,最终确定了本研究采用的色谱条件。

3.3 提取条件的考察

本课题组前期分别考察了冷浸、回流和超声3种提取方法,结果发现,超声提取更加简便、易行,且大部分成分的提取效率较高。此外,还考察了提取溶剂(20%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、甲醇)、超声时间(15、30、45、60 min)和提取溶剂用量(15、25、35、45 mL),根据含量测定结果综合分析,最终确定了本研究采用的供试品溶液制备方法。

3.4 含量测定结果分析

根据3批样品的含量测定结果可知,八味小檗皮胶囊中木兰花碱、阿魏酸4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、小檗碱、诃子鞣酸等成分的含量较高,而槲皮素、熊去氧胆酸、甘氨酸脱氧胆酸等成分的含量较低。

综上所述,八味小檗皮胶囊含有多种藏药材,化学成分复杂多样,相互之间干扰较大,采用常规的HPLC法难以进行多成分的定量分析。本研究采用HPLC-QqQ-MS技术首次测定了八味小檗皮胶囊中小檗碱、木兰花碱、阿魏酸4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷、羟基红花黄色

素A、柯里拉京等25种成分的含量(建立了甘氨酸、甘氨酸鹅脱氧胆酸、甘氨酸胆酸等无紫外吸收的胆汁酸类成分的含量测定方法)。本研究建立的方法操作简单、检测限低、分析时间短、稳定性好,可同时对八味小檗皮胶囊中多种有效成分进行含量测定。

参考文献

[1] 卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:藏药第一册[S].北京:中华人民共和国卫生部,1995:232.

[2] 杨文献,张琦,董林.藏成药八味小檗皮散的药材鉴别和小檗碱的测定[J].华西药学杂志,2007,22(5):572-574.

[3] 张力力,杨晓燕,张琦. HPLC法测定藏成药八味小檗皮散中没食子酸含量[J].西南民族大学学报(自然科学版),2012,38(5):780-784.

[4] 杨月琴,胡凤祖,师治贤.藏药八味小檗皮中盐酸小檗碱含量的分析[C]//西北地区第五届色谱学术报告会暨甘肃省第十届色谱年会论文集.西宁:西北地区第五届色谱学术报告会暨甘肃省第十届色谱年会,2008:204-209.

[5] 牛芬溪,刘悦,刘雅楠,等.羟基红花黄色素A的药理作用及研究进展[J].中国药理学杂志,2021,56(17):1372-1377.

[6] 苏国林,刘刚,刘育辰,等.甘草苷的提取纯化方法和药理作用研究进展[J].中国现代中药,2011,13(10):48-51.

[7] 何宇鸿,梁敏桐,刘璐群,等.鞣花酸药理作用综述[J].化学工程与装备,2022,302(3):216-217.

[8] PERINO A, DEMAGNY H, VELAZQUEZ-VILLEGAS L, et al. Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging[J]. *Physiol Rev*, 2021, 101(2):683-731.

[9] 宁张弛,刘振丽,宋志前,等. HPLC-QqQ-MS测定珠子参中5种皂苷类成分的含量[J].中国中药杂志,2016,41(5):874-878.

[10] 徐东升,何云娇,钟灵佼. UPLC-QQQ-MS/MS在中药分析中的应用研究进展[J].中医临床杂志,2021,33(11):2247-2250.

[11] 李琪,杜欢,文焕松,等.藏族药小檗皮中6种成分的含量测定及不同品种比较研究[J].中国中药杂志,2019,44(5):968-974.

(收稿日期:2022-02-18 修回日期:2022-06-08)

(编辑:曾海蓉)

(上接第1681页)

综上所述,CAG对CCl₄诱导的小鼠HF有改善作用,同时降低了其体内糖酵解关键酶和产物水平。可为CAG相关抗HF药物的研发提供实验依据,也可为靶向HSCs活化过程中糖酵解途径的相关药物研发提供参考。

参考文献

[1] 陈丽霞,刘立新,张海燕,等.抗IGFBPrP1抗体对小鼠肝纤维化的预防作用及其机制的研究[J].中国病理生理杂志,2010,26(11):2185-2190.

[2] 刘毅,刘立新,郭晓红,等. IGFBP-rP1对肝星状细胞活化及核因子- κ B活性的影响[J].中国病理生理杂志,2008,24(9):1789-1793.

[3] CHEN Y P, CHOI S S, MICHELOTTI G A, et al. Hedgehog controls hepatic stellate cell fate by regulating metabolism[J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(5):1319-1329, e11.

[4] 刘雪梅,王新春.补药之长:黄芪[J].内蒙古中医药,2012,31(2):130-131.

[5] 屠鹏飞,郭洪祝,果德安.中药与天然药物活性成分研究及新药的发现[J].北京大学学报(医学版),2002,34(5):513-518.

[6] 李曼,王志菲.环黄芪醇的药理作用研究进展[J].中医学报,2020,35(5):983-989.

[7] GU M, ZHANG S Y, ZHAO Y Y, et al. Cycloastragenol improves hepatic steatosis by activating farnesoid X receptor signalling[J]. *Pharmacol Res*, 2017, 121:22-32.

[8] 张静华,龚志铭,郑基蒙,等.黄芪注射液及提取成分对小鼠肝脂质过氧化物的影响[J].上海医科大学学报,1992,

19(5):378-380.

[9] 蒋园,白云,刘萍,等.黄芪甲苷对CCl₄所致小鼠肝损伤的影响[J].中药药理与临床,2015,31(6):24-27.

[10] 魏宝红,叶静,薛宝娟,等.环黄芪醇连续灌胃对大鼠肝脏P450酶活性的影响[J].中国新药杂志,2014,23(4):476-479.

[11] WANG Z C, LI Q Q, XIANG M P, et al. Astragaloside alleviates hepatic fibrosis function via PAR2 signaling pathway in diabetic rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(3):1156-1166.

[12] 周霖,王肖辉,荆自伟,等.鹿茸多肽对四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化的保护作用及其机制研究[J].中药新药与临床药理,2021,32(3):338-345.

[13] LEE U E, FRIEDMAN S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011, 25(2):195-206.

[14] FRIEDMAN S L. Evolving challenges in hepatic fibrosis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7(8):425-436.

[15] LIM Y S, KIM W R. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver disease[J]. *Clin Liver Dis*, 2008, 12(4):733-746, vii.

[16] 阿比丹·拜合提亚尔,郭津生.肝纤维化发生时活化肝星状细胞的代谢改变[J].中国细胞生物学学报,2021,43(10):2054-2060.

[17] 王敏,汪橙橙,杨振芳,等.肿瘤糖酵解途径中关键限速酶及其调节因子的研究进展[J].解剖科学进展,2021,27(6):755-758.

(收稿日期:2022-02-09 修回日期:2022-06-09)

(编辑:张元媛)