

UPLC-TQ-MS 同时测定金红片中 12 个成分

刘苓嫻¹, 李海波², 石丹枫¹, 王振中², 姚新生¹, 肖伟^{2*}, 于洋^{1*}

1. 暨南大学中药及天然药物研究所, 广东 广州 510632

2. 江苏康缘药业股份有限公司 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 采用超高效液相色谱-电喷雾三重四级杆质谱 (UPLC-TQ-MS) 技术建立了同时快速测定金红片 (Jinhong Tablets) 中 12 个成分 (莽草酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 C、普洛托品、别隐品碱、延胡索乙素、紫堇碱、巴马汀、槲皮素、异川楝素、川楝素) 的定量分析方法。方法 采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸乙腈溶液-0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 0.3 mL/min; 采用多反应监测模式同时对金红片中 12 个成分进行定量分析。结果 在 17 min 内完成 12 个成分的准确定量; 12 个定量成分的线性范围分别为 50.00~6 400.00 μg/mL ($r=0.999\ 1$)、2.28~292.00 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、0.82~104.80 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、1.56~200.00 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、0.91~116.00 μg/mL ($r=0.999\ 0$)、0.94~120.00 μg/mL ($r=0.999\ 0$)、9.38~1 200.00 μg/mL ($r=0.997\ 4$)、2.93~375.00 μg/mL ($r=0.999\ 0$)、1.25~160.00 μg/mL ($r=0.999\ 9$)、31.25~4 000.00 μg/mL ($r=0.999\ 7$)、0.93~120.90 μg/mL ($r=0.999\ 8$)、1.41~180.70 μg/mL ($r=0.999\ 7$), 平均加样回收率分别为 101.9%、101.2%、97.9%、96.8%、100.8%、100.1%、108.7%、100.0%、99.2%、102.0%、99.0%、103.2%, 15 批金红片中 12 个成分的质量分数分别为 10.11~22.72 mg/g、0.16~0.43 mg/g、0.06~0.23 mg/g、0.13~0.42 mg/g、0.08~0.26 mg/g、0.08~0.25 mg/g、1.94~2.59 mg/g、0.20~0.96 mg/g、0.07~0.30 mg/g、1.72~2.14 mg/g、0.03~0.06 mg/g、0.03~0.06 mg/g。结论 采用 UPLC-TQ-MS 所建立的多指标成分定量分析方法可适用于金红片中不同结构类型成分的同时检测, 该方法简单、灵敏度高、专属性好, 为金红片的整体质量控制研究提供参考和借鉴。
关键词: UPLC-TQ-MS; 金红片; 质量控制; 多反应监测; 莽草酸; 绿原酸; 异绿原酸 B; 异绿原酸 C; 普洛托品; 别隐品碱; 延胡索乙素; 紫堇碱; 巴马汀; 槲皮素; 异川楝素; 川楝素

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)12-3552-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.011

Simultaneous determination of 12 components in Jinhong Tablets by UPLC-TQ-MS

LIU Ling-xian¹, LI Hai-bo², SHI Dan-feng¹, WANG Zhen-zhong², YAO Xin-sheng¹, XIAO Wei², YU Yang¹

1. Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, Jinan University, Guangzhou 510632, China

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

Abstract: Objective To establish an effective UPLC-TQ-MS method for the simultaneous determination of 12 components (shikimic acid, chlorogenic acid, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C, protopine, allocryptopine, tetrahydropalmatine, corydaline, palmatine, quercetin, isotoosendanin, and toosendanin) in Jinhong Tablets (金红片, JHT). **Methods** The chromatographic separation was performed on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) with a gradient elution of acetonitrile (0.1% formic acid) and water (0.1% formic acid), and the flow rate was set at 0.3 mL/min; Multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for the quantification of 12 components. **Results** The 12 components were accurately quantified within 17 min, and the linear ranges of 12 quantitation components were 50.00—6 400.00 μg/mL ($r = 0.999\ 1$), 2.28—

收稿日期: 2021-02-21

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81630097); 热毒宁注射液标准化建设项目 (ZYBZH-C-JS-31)

作者简介: 刘苓嫻 (1997—), 女, 江西省赣州市人, 硕士研究生, 研究方向为中药及天然药物的活性成分研究。E-mail: llxi1997@163.com

*通信作者: 于洋, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药及天然药物活性成分研究。Tel: (020)5225849 E-mail: 1018yuyang@163.com

肖伟, 研究员级高级工程师, 博士生导师, 研究方向为中药新剂型的研究与开发。

Tel: (0518)85521956 E-mail: xw_kanion@163.com

292.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 9$), 0.82—104.80 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 8$), 1.56—200.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 7$), 0.91—116.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 0$), 0.94—120.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 0$), 9.38—1 200.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.997\ 4$), 2.93—375.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 0$), 1.25—160.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 9$), 31.25—4 000.00 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 7$), 0.93—120.90 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 8$) and 1.41—180.70 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.999\ 7$). And the average recoveries were 101.9%, 101.2%, 97.9%, 96.8%, 100.8%, 100.1%, 108.7%, 100.0%, 99.2%, 102.0%, 99.0% and 103.2%, respectively. The contents of 15 batches of the 12 major components were in the ranges of 10.11—22.72 mg/g, 0.16—0.43 mg/g, 0.06—0.23 mg/g, 0.13—0.42 mg/g, 0.08—0.26 mg/g, 0.08—0.25 mg/g, 1.94—2.59 mg/g, 0.20—0.96 mg/g, 0.07—0.30 mg/g, 1.72—2.14 mg/g, 0.03—0.06 mg/g and 0.03—0.06 mg/g, respectively. **Conclusion** The multi-index components quantitative analysis method established by UPLC-TQ-MS is simple, sensitive and specific, it can be applied for the detection of ingredients with different structures, and provides a solid basis for overall quality control of JHT.

Key words: UPLC-TQ-MS; Jinhong Tablets; quality control; multiple reaction monitoring; shikimic acid; chlorogenic acid; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid C; protopine; allocryptopine; tetrahydropalmatine; corydaline; palmatine; quercetin; isotoosendanin; toosendanin

金红片 (Jinhong Tablets) 是原中药 3 类新药, 源于金元四大家之首刘完素的《素问·病机气宜保命集》中的金铃子散 (川楝子、延胡索) 化裁而来的中药复方创新药物。由川楝子、延胡索 (醋制)、川木香及红花八角叶 4 味中药组成, 具有疏肝解郁、理气活血、和胃止痛的功效^[1-3]。方中以川楝子为君药, 延胡索为臣药, 红花八角叶与木香为佐使, 川楝子用以清肝火, 延胡索用以理气, 川木香用以行气止痛, 红花八角叶用以散瘀行气, 组方精炼, 诸药合用共奏疏肝解郁、理气活血、和中止痛之功。现代药理学研究表明, 金红片可以使胃液分泌量和总酸排出量降低, 抑制胃蛋白酶的分泌、延缓胃排空; 还具有镇痛、解痉、抗炎以及抗胃溃疡、促进溃疡愈合等药效^[3]。临床上在治疗慢性浅表性胃炎的同时还可改善患者情绪状态、通畅血脉、消散瘀滞, 标本兼治。

金红片临床应用广泛, 但其在质量控制方面, 仅对莽草酸进行限量以及对延胡索乙素进行含量测定, 未建立其与功效相关联的多指标成分的整体质量控制方法。有文献报道, 川楝子、延胡索、木香和红花八角叶的主要有效成分分别为楝烷型三萜类化合物^[4]、生物碱类化合物^[5]、倍半萜类化合物^[6]以及黄酮类化合物^[7-9]。另由于方中君药川楝子具肝毒性^[10]、致肌无力^[11]、呼吸抑制^[12]、妊娠毒性^[13]。因此, 需对其功效成分同时也是毒性成分川楝素进行限量, 提升产品的科学内涵和安全性。本研究采用 UPLC-TQ-MS 技术, 选取覆盖组方 4 个单味药的特征性成分以及活性成分 (莽草酸、绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 C、普洛托品、别隐品碱、延胡索乙素、紫堇碱、巴马汀、槲皮素、异川楝素和川楝素) 为指标成分, 建立与功效相关联的多指标

成分含量测定方法, 并对毒性成分川楝素进行限量, 为金红片质量标准的提升奠定一定的基础。

1 仪器与试剂

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用 (UPLC-TQ-XS-MS) 系统, 包括 Waters Acquity™ I-Class 超高效液相色谱仪 (含二元梯度泵 - 自动进样器 - 柱温箱)、Waters Xevo TQ-XS Triple Quadrupole Mass Spectrometry 三重四极杆质谱, Waters 公司; KQ-250D 型数控超声波清洗器, 昆山市超声波仪器有限公司; XS205 型十万分之一天平, Mettler Toledo 公司; Sigma 台式高速冷冻离心机 3K-15, 德国 Sigma 公司; QL-861 涡旋仪, 海门市其林贝尔仪器有限公司。

质谱级乙腈及质谱级甲醇, 美国赛默飞世尔科技公司; 质谱级甲酸, 美国西格玛奥德里奇公司; 质谱用水, 北京屈臣氏蒸馏水有限公司。

对照品: 莽草酸 (批号 PRF10080721, 质量分数 98%)、绿原酸 (批号 PRF20051641, 质量分数 98%)、普洛托品 (批号 PRF10051621, 质量分数 98%)、别隐品碱 (批号 PRF20030227, 质量分数 98%)、延胡索乙素 (批号 PRF10031241, 质量分数 98%)、紫堇碱 (批号 PRF10022126, 质量分数 98%)、巴马汀 (批号 PRF10030643, 质量分数 97%)、异川楝素 (批号 PRF10120625, 质量分数 98%)、川楝素 (批号 PRF10062524, 质量分数 98%) 均购于成都普瑞法科技开发有限公司; 异绿原酸 B (批号 ST06590120, 质量分数 98%) 购于上海诗丹德标准技术有限公司; 异绿原酸 C (批号 111894-201102, 质量分数 94.1%) 购于中国食品药品检定研究院; 槲皮素 (批号 170813, 质量分数 99%) 购于上海融禾医药科技发展有限公司。

15 批金红片, 规格 0.45 g/片, 批号分别为 180502、190304、190305、190306、190401、190402、190403、190404、190405、190406、190407、200701、200702、201101、201102, 均由江苏康缘药业股份有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 UPLC 分析条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 35 ℃, 体积流量 0.3 mL/min; 流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B), 洗脱梯度: 0~1.5 min, 2%~20% B; 1.5~6.0 min, 20%~22% B; 6.0~10.0 min, 22%~30%

B; 10.0~13.0 min, 30%~60% B; 13.0~14.0 min, 60%~100% B; 14.0~15.0 min, 100% B; 15.0~16.0 min, 100%~2% B; 16.0~17.0 min, 2% B; 进样量 2 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子化电离源(ESI), 毛细管电压为 2.5 kV(正/负离子模式)。离子源温度 150 ℃, 脱溶剂气温度 550 ℃, 反吹气体积流量 50 L/h, 脱溶剂气体积流量 1000 L/h, 碰撞气为氦气。数据采集模式为多反应监测(MRM)模式, 数据采集模式为棒状图(centroid)。各定量成分的参数设定见表 1。12 个化合物的 MRM 叠加色谱图见图 1。

表 1 12 个化合物的多反应监测模式信息

Table 1 MRM information of 12 analytes

编号	成分	<i>t_R</i> /min	离子模式	离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
A	莽草酸	0.94	[M-H] ⁻	173.05→93.04	20	10
B	绿原酸	3.43	[M+H] ⁺	355.10→163.00	25	10
C	异绿原酸 B	3.77	[M+H] ⁺	517.13→163.00	25	20
D	异绿原酸 C	4.58	[M+H] ⁺	517.13→163.00	25	20
E	普洛托品	4.70	[M+H] ⁺	354.13→189.08	22	20
F	别隐品碱	5.45	[M+H] ⁺	370.17→188.18	18	25
G	延胡索乙素	5.57	[M+H] ⁺	356.19→192.10	8	10
H	紫堇碱	7.03	[M+H] ⁺	370.20→192.10	9	13
I	巴马汀	7.73	[M+H] ⁺	352.15→336.00	15	22
J	槲皮素	8.01	[M+H] ⁺	303.05→153.02	18	20
K	异川楝素	10.37/11.27	[M+H] ⁺	557.24→437.19	30	20
L	川楝素	11.95/12.32	[M+H] ⁺	557.24→437.19	30	15

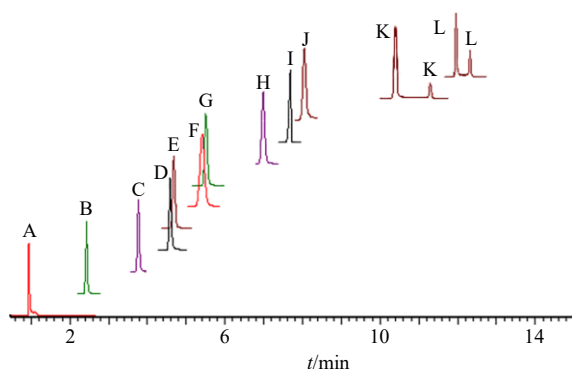


图 1 12 个化合物(A~L)的MRM色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of 12 analytes (A—L)

2.3 溶液的制备

2.3.1 供试品溶液的制备 取金红片(去除包衣, 研磨, 过 50 目筛)约 1.0 g, 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 加入 80%甲醇 10 mL, 超声处理 30 min,

取出, 放冷, 用 80%甲醇补足减失的质量, 摇匀, 稀释质量浓度至 100 μg/mL, 15 521×g 离心 10 min, 取上清液即为供试品溶液。

2.3.2 对照品储备液的制备 分别精密称取 12 个对照品适量, 以甲醇稀释溶解, 分别得到质量浓度为莽草酸(A1)160 μg/mL、绿原酸(B1)146 μg/mL、异绿原酸 B(C1)131 μg/mL、异绿原酸 C(D1)100 μg/mL、普洛托品(E1)145 μg/mL、别隐品碱(F1)120 μg/mL、延胡索乙素(G1)120 μg/mL、紫堇碱(H1)125 μg/mL、巴马汀(I1)100 μg/mL、槲皮素(J1)100 μg/mL、异川楝素(K1)93 μg/mL 以及川楝素(L1)139 μg/mL 的对照品储备液, 精密量取绿原酸、异绿原酸 B、异绿原酸 C、普洛托品、别隐品碱、紫堇碱、巴马汀、异川楝素以及川楝素的对照品储备液各 500 μL 分别置于 5 mL 量瓶

中,加 80%甲醇至刻度线,摇匀,得到分别稀释了 10 倍的对照品(B2、C2、D2、E2、F2、H2、I2、K2、L2)储备液,对照品溶液均置于 4℃冰箱放置,备用。

2.3.3 混合对照品储备液的制备 精密移取各对照品储备液莽草酸(A1)400 μL、绿原酸(B2)200 μL、异绿原酸 B(C2)80 μL、异绿原酸 C(D2)200 μL、普洛托品(E2)80 μL、别隐品碱(F2)100 μL、延胡索乙素(G1)100 μL、紫堇碱(H2)300 μL、巴马汀(I2)160 μL、槲皮素(J1)400 μL、异川楝素(K2)130 μL 及川楝素(L2)130 μL,置于 10 mL

量瓶中,加 80%甲醇至刻度线,摇匀,得到 S1 混合对照品溶液。以 80%甲醇依次倍半稀释得 S2~S8 混合对照品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 分别取金红片供试品溶液(批号 190401)、混合对照品溶液(S5)以及空白溶液(80%甲醇),按“2.1”和“2.2”项下分析测试条件分别进行检测,色谱图见图 2。实验结果表明,空白溶剂在 MRM 分析窗口对供试品溶液的测试不存在干扰,表明所建立的液质方法专属性良好。

2.4.2 线性范围及定量下限考察 取“2.3.3”项下

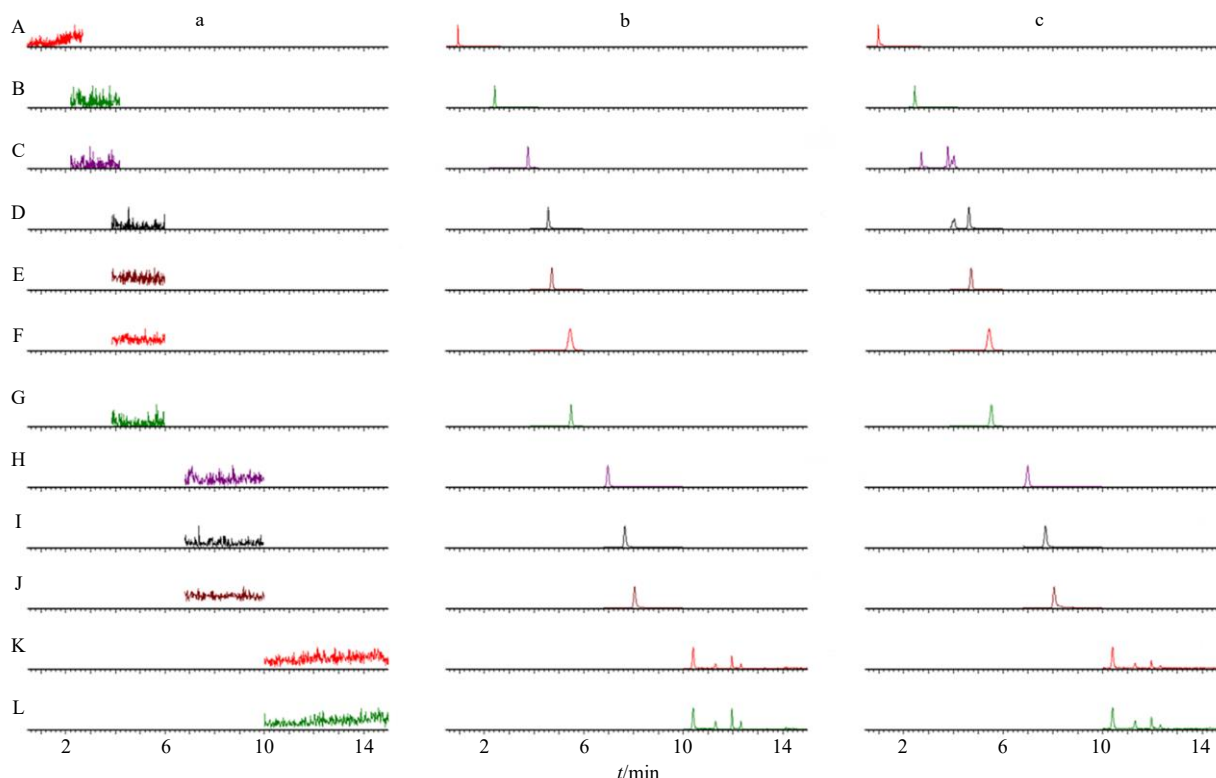


图 2 空白溶剂 (a)、12 个成分混合对照品 (b) 及金红片样品 (c) 的 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of blank sample (a), mixed reference substances of 12 components (b) and JHT sample (c)

方法配制的系列不同质量分数的混合对照品溶液,平行 3 份,按照“2.1”和“2.2”项下 UPLC-TQ-MS 条件分别进样分析并记录上述 12 个定量成分的峰面积,以各对照品质量浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y),对定量成分进行线性回归计算。结果表明 12 个定量成分在线性范围内线性良好(表 2),符合分析测试要求。

2.4.3 重复性考察 按“2.3.1”项下方法平行制备 6 份金红片供试品溶液(批号 190401),并按照“2.1”和“2.2”项下分析条件依次进行测定,随行当日标准曲线,记录统计 12 个定量成分的含量,平均质量

分数及 RSD 值,作为方法重复性结果。结果显示,12 个定量成分质量分数分别为 15.00、0.30、0.12、0.18、0.13、0.13、2.39、0.41、0.12、2.09、0.05、0.04 mg/g, RSD 值分别为 0.7%、0.9%、1.8%、1.1%、1.2%、0.9%、1.0%、1.5%、1.2%、1.6%、1.1%、2.5%。结果表明,各定量成分的重复性良好,满足分析测定要求。

2.4.4 精密度考察 取同一批金红片样品(批号 190401),按“2.3.1”项下方法制备供试品溶液,平行 3 份,并按照“2.1”和“2.2”项下分析测试条件进行测定,随行当日标准曲线,记录统计 12 个定

表 2 12 个化合物的线性范围考察结果

Table 2 Results of liner regression of 12 components

编号	成分	线性方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	r
A	莽草酸	$y=231.055x+10\ 372$	50.00~6 400.00	0.999 1
B	绿原酸	$y=8\ 243.93x-1\ 628.66$	2.28~292.00	0.999 9
C	异绿原酸 B	$y=8\ 241.43x-1\ 056.08$	0.82~104.80	0.999 8
D	异绿原酸 C	$y=9\ 358.69x-3\ 097.54$	1.56~200.00	0.999 7
E	普洛托品	$y=92\ 332.8x+125\ 221$	0.91~116.00	0.999 0
F	别隐品碱	$y=169\ 489x+36\ 576.3$	0.94~120.00	0.999 0
G	延胡索乙素	$y=2\ 220.94x+21\ 115.6$	9.38~1 200.00	0.997 4
H	紫堇碱	$y=3\ 243.6x+11\ 753$	2.93~375.00	0.999 0
I	巴马汀	$y=86\ 537.7x-15\ 281.8$	1.25~160.00	0.999 9
J	槲皮素	$y=920.01x-14\ 323.9$	31.25~4 000.00	0.999 7
K	异川楝素	$y=1\ 591.28x-7.38$	0.93~120.90	0.999 8
L	川楝素	$y=796.62x-35.88$	1.41~180.70	0.999 7

量成分的峰面积并计算其 RSD 值,所得结果作为日内精密度考察结果。连续操作 3 d, 计算定量成分的峰面积及其 RSD 值, 作为方法日间精密度结果。各定量成分日内精密度 RSD 分别为 1.0%、1.1%、0.9%、0.9%、1.2%、1.2%、0.4%、2.0%、0.8%、1.2%、1.1%、0.0%; 日间精密度 RSD 分别为 1.1%、1.4%、1.4%、3.0%、1.0%、0.8%、1.5%、1.5%、1.9%、1.7%、1.9%、1.8%。12 个定量成分日内及日间精密度的 RSD 分别小于 2.0%、3.0%, 结果表明该方法日内、日间精密度良好。

2.4.5 加样回收率考察 取同一批金红片样品(批号 190401, 去除包衣, 研磨, 过 50 目筛)约 1.0 g, 精密称定, 平行 6 份。采用“2.3.2”项下所得各对照品溶液配制混合对照品溶液, 使加入后的各成分含量分别为金红片中相应成分的含量。

供试品溶液并按照“2.1”和“2.2”项下定量测试条件进样分析, 利用当日随行的标准曲线计算各定量成分的含量, 12 个定量成分的平均回收率分别为 101.9%、101.2%、97.9%、96.8%、100.8%、100.1%、108.7%、100.0%、99.2%、102.0%、99.0%、103.2%, RSD 值分别为 2.9%、2.4%、3.1%、3.8%、1.1%、1.9%、1.6%、3.0%、0.9%、2.4%、3.8%、2.6%。结果显示, 12 个化合物的加样回收率为 96.8%~108.7%, RSD 值不大于 3.8%, 表明该方法准确度满足测试要求。

2.4.6 稳定性考察 按“2.3.1”项下供试品溶液制备方法制备金红片供试品溶液(批号 190401)作为

稳定性考察样品, 在 15 ℃ 存放 0、2、4、8、12、24 h 后按照“2.1”和“2.2”项下测试条件依次进行测定, 记录统计 12 个分析物的峰面积变化情况, 以峰面积 RSD 表示。结果显示, 12 个定量成分峰面积的 RSD 分别为 3.2%、2.7%、2.6%、3.4%、2.2%、2.0%、3.7%、3.3%、1.6%、1.9%、2.8%、3.0%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5 样品定量测定

取批号为 180502、190304、190305、190306、190401、190402、190403、190404、190405、190406、190407、200701、200702、201101、201102 的金红片, 按照“2.3.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.1”和“2.2”项下 UPLC-TQ-MS 分析测试条件依次进行测定, 随行当日标准曲线, 测定 15 个批次金红片 12 个定量成分的质量分数分别为 10.11~22.72 mg/g、0.16~0.43 mg/g、0.06~0.23 mg/g、0.13~0.42 mg/g、0.08~0.26 mg/g、0.08~0.25 mg/g、1.94~2.59 mg/g、0.20~0.96 mg/g、0.07~0.30 mg/g、1.72~2.14 mg/g、0.03~0.06 mg/g、0.03~0.06 mg/g。结果见表 3。

3 讨论

3.1 检测方法的选择

川楝子为金红片中的君药, 而川楝素被认为是川楝子的主要药效物质基础, 但也可能是其主要毒性成分^[4]。川楝素具有肝毒性^[10,14-16]及生殖毒性^[17], 小鼠口服急性毒性实验显示, 异川楝素的毒性远高于川楝素^[18]。《中国药典》2020 年版一部^[19], 川楝

表 4 15 批次金红片样品中 12 个成分的含量测定结果

Table 4 Contents of 12 analytes in 15 batches of JHT

批号	质量分数/(mg·g ⁻¹)											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
180502	10.88	0.16	0.07	0.23	0.18	0.19	1.94	0.61	0.30	1.84	0.04	0.04
190304	14.69	0.24	0.06	0.19	0.22	0.21	2.20	0.56	0.29	1.93	0.05	0.04
190305	13.02	0.22	0.08	0.13	0.20	0.20	2.30	0.60	0.26	2.06	0.05	0.03
190306	16.29	0.31	0.13	0.19	0.08	0.08	2.20	0.20	0.07	1.96	0.06	0.06
190401	14.92	0.30	0.12	0.17	0.13	0.13	2.39	0.40	0.11	2.14	0.05	0.04
190402	13.76	0.30	0.12	0.19	0.13	0.13	2.22	0.40	0.15	2.00	0.04	0.04
190403	12.69	0.31	0.13	0.19	0.17	0.16	2.21	0.48	0.20	1.94	0.05	0.03
190404	12.56	0.27	0.12	0.17	0.12	0.11	2.14	0.29	0.12	1.90	0.04	0.05
190405	10.32	0.31	0.14	0.20	0.12	0.12	2.06	0.32	0.14	1.88	0.05	0.05
190406	10.66	0.35	0.18	0.25	0.15	0.15	2.25	0.53	0.17	2.01	0.04	0.04
190407	10.11	0.42	0.23	0.32	0.13	0.12	2.10	0.39	0.14	1.89	0.04	0.05
200701	21.35	0.33	0.17	0.26	0.26	0.23	2.59	0.78	0.22	2.10	0.03	0.05
200702	22.72	0.43	0.21	0.34	0.24	0.21	2.46	0.79	0.29	2.03	0.05	0.05
201101	16.36	0.43	0.22	0.42	0.25	0.25	2.50	0.96	0.27	1.95	0.05	0.03
201102	15.58	0.40	0.20	0.39	0.22	0.23	2.23	0.74	0.22	1.72	0.04	0.03
平均值	14.39	0.32	0.14	0.24	0.17	0.17	2.25	0.54	0.20	1.96	0.04	0.04

子的含量测定项下以川楝素为质控指标成分, 采用了 LC-MS 方法进行定量分析。为提高金红片产品质量标准, 需对其中的毒性成分进行含量限定, 而 HPLC 难以对微量成分进行准确定量。目前, UPLC-TQ-MS 技术的高灵敏、高选择性、MRM 等特性在中药质量控制中具有广阔的应用前景^[20], 故采用 UPLC-TQ-MS 对复方进行含量分析方法的建立。

3.2 前处理方法及分析条件优化

实验过程中对样品前处理方法进行了考察, 考察了多种提取溶剂(纯水、30%甲醇、60%甲醇、80%甲醇和纯甲醇)以及不同超声时间(15、30、45 min)对金红片中 12 个定量成分的影响。根据在不同条件下的各色谱峰的分离度及峰面积比较, 最终选择以 80%甲醇作为提取溶剂, 超声提取 30 min, 做为金红片样品前处理条件。此外, 本实验前期采用了正、负离子扫描模式对单个标准品的质谱响应进行初步探索, 以选择最佳离子监测模式。结果显示, 莽草酸在负离子模式下灵敏度高, 其他各成分在正离子模式下灵敏度高。最终按照各化合物在不同条件下的质谱响应结果, 选择了最佳的离子扫描模式以及最佳离子对, 以使各目标化合物均具有最好的质谱响应, 确保能够满足准确、快速的定性定量要求。

3.3 指标性成分的选择

中药复方化学成分复杂, 是由多成分共同作用于多靶点、多途径而产生药效^[21], 故而对于其产品进行质量控制不能局限于单一指标成分。作为一个有机的整体, 其质量控制方法的建立应选择多指标成分且与功效成分或毒性成分相关联。

在金红片前期物质基础的研究中, 采用 UPLC-Q/TOF-MS 技术及 MassLynx V4.1、MetabolynxTM 数据处理软件对金红片全方及 ig 给药大鼠后生物样本中的体内外源物进行检识分析, 表征金红片的体外化学轮廓及体内代谢轮廓, 共检识得到 96 个化学成分以及 163 个大鼠体内外源物^[22]。而后构建了金红片治疗慢性浅表性胃炎的精细的药理学网络, 预测潜在活性成分, 研究发现发挥药效活性的成分主要为生物碱类、有机酸类和黄酮类^[23]。

基于以上研究结果, 定量成分的选择主要依据以下原则: ①金红片化学成分研究中主含成分且涵盖 4 个组方药味代表性结构类型的成分(川楝素、延胡索乙素和槲皮素); ②金红片体内代谢研究中吸收入血的原型成分, 且其代谢产物较丰富的成分(普洛托品、别隐品碱、延胡索乙素、紫堇碱和巴马汀); ③金红片网络药理学研究中预测具有治疗慢性浅表性胃炎的潜在活性成分(绿原酸、异绿原酸 B 和异

绿原酸 C); ④《中国药典》2020 年版^[14]规定各单味药质控指标性成分、文献报道具有相关活性的成分及毒性成分(川楝素、异川楝素、延胡索乙素和莽草酸)。综上,选择 12 个成分作为指标成分,建立多指标成分含量测定研究方法,同时进一步考察这些成分在多批次产品中的含量变化,为建立现代化金红片产品质量标准提供科学依据。

3.4 定量测定结果分析

依据现行《中国药典》2020 年版^[9]对于川楝子所含毒性成分川楝素的规定(0.06%~0.20%),川楝子的用法与用量(5~10 g/d)以及金红的日用量(1 次 5 片,3 次/d)。据此,金红片所含川楝素($C_{30}H_{38}O_{11}$)不超过 2.96 mg/g 时处于安全剂量水平。定量分析所测定 15 批次的金红片每片所含川楝素平均值为 40 μ g/g,均不超过 0.06 mg/g(批号 190306),结果显示多批次川楝素的含量均处于所规定的安全剂量范围。

根据国家食品药品监督管理局-国家药品标准颁布件 CXZB0500279 苏中的规定,本品每片含红花八角叶以莽草酸($C_7H_{10}O_5$)计,不得超过 50.00 mg,本次实验所测定 15 批次的金红片每片所含莽草酸平均值为 6.48 mg,所含莽草酸含量最高的批次为 200702,该批次金红片每片所含莽草酸为 10.22 mg。CXZB0500279 苏中的规定显示,金红片每片含延胡索以延胡索乙素($C_{21}H_{25}NO_4$)计,不得少于 0.20 mg。本次实验所测定 15 批次的金红片每片所含延胡索乙素平均值为 1.01 mg,所含延胡索乙素最低含量为 0.87 mg(批号 180502)。依据本次实验测量数据对各批次金红片所含莽草酸以及延胡索乙素含量分析显示,所测定的 15 批次金红片含莽草酸均不超过 50 mg,含延胡索均不少于 0.20 mg,均符合 CXZB0500279 苏下对金红片的质量控制规定。

3.5 小结

本实验首次采用 UPLC-TQ-MS 技术对不同批次金红片质量进行了深入探索。综合考虑组方药味的主含特征成分及活性、毒性成分,建立了包含莽草酸、延胡索乙素等 12 个代表性成分的同时定量方法,对 15 批市售制剂进行质量评价。上述建立的 UPLC-TQ-MS 定性定量方法为进一步提升制剂整体质量标准提供了重要证据,为金红片进一步的药效评价,药物代谢动力学研究以及质量标准提升奠定了一定的基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈峰. 金红片联合雷尼替丁治疗慢性浅表性胃炎临床观察 [J]. 临床合理用药杂志, 2010, 3(20): 69.
- [2] 韦虹, 黄泰基, 苟忠萍, 等. 金红片治疗肝胃不和型胃脘痛临床观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2000, 9(5): 385.
- [3] 张俊巍, 宋洁云, 张连富, 等. 金红片治疗肝胃不和型慢性浅表性胃炎 325 例疗效观察 [J]. 中国中医药科技, 1998, 5(4): 251.
- [4] 李海波, 马森菊, 石丹枫, 等. 川楝子的化学成分、药理作用及其毒性研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 4059-4074.
- [5] 关秀峰, 王锐, 曲秀芬, 等. 延胡索的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 化学工程师, 2020, 34(3): 57-60.
- [6] 毛景欣, 王国伟, 易漫, 等. 川木香化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4797-4803.
- [7] 张俊巍. 红花八角茎叶化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1989, 14(1): 36-37, 63.
- [8] Geng D, Weng L J, Han Y Y, et al. Flavonoids from *Illicium dunnianum* [J]. *Adv Mater Res*, 2012, 610-613: 3375-3377.
- [9] Geng D, Weng L J, Han Y Y, et al. Chemical constituents from *Illicium dunnianum* [J]. *Adv Mater Res*, 2012, 550-553: 1586-1589.
- [10] Zheng J, Yu L, Chen W, et al. Circulating exosomal microRNAs reveal the mechanism of *Fructus Meliae Toosendan*-induced liver injury in mice [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2832.
- [11] Nakajima H, Wakabayashi Y, Wakamatsu K, et al. An extract of *Melia toosendan* attenuates endothelin-1-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through the interruption of PKC activity within melanocytes [J]. *Arch Dermatol Res*, 2011, 303(4): 263-276.
- [12] 程蕾, 雷勇, 梁媛媛, 等. 川楝子不同提取部位药效及毒性的比较研究 [J]. 中药材, 2007, 30(10): 1276-1279.
- [13] 王小娟. 川楝子毒性及配伍减毒的代谢组学研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2011.
- [14] Yu J H, Deng P, Zhong D F, et al. Identification of amino acid and glutathione *N*-conjugates of toosendanin: Bioactivation of the furan ring mediated by CYP3A4 [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(9): 1598-1609.
- [15] 赵筱萍, 葛志伟, 张玉峰, 等. 川楝子中肝毒性成分的快速筛查研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1820-1822.
- [16] Zhang Y H, Qi X M, Gong L K, et al. Roles of reactive oxygen species and MAP kinases in the primary rat

- hepatocytes death induced by toosendanin [J]. *Toxicology*, 2008, 249(1): 62-68.
- [17] Zhang J L, Shi W Y, Zhong W, *et al.* Effects of toosendanin on pregnancy and uterine immunity alterations in mice [J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(2): 319-328.
- [18] 谢晶曦, 袁阿兴. 异川楝素的化学结构及其活性 [J]. 中国药理学杂志, 1984, 19(6): 49.
- [19] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [20] 曾永长, 梁少瑜, 吴俊洪, 等. 基于 UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS 技术的中药复方新天泰 1 号多类别多成分质量控制方法研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3835-3841.
- [21] 王升启. 中药作用分子机制研究新策略 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 647.
- [22] Liu L X, Cao L, Shi D F, *et al.* Metabolic profiles of Jin-Hong tablets in rats by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2021, 35(6): e5072.
- [23] Shi D, Liu L, Li H, *et al.* Identifying the molecular basis of Jinhong tablets against chronic superficial gastritis via chemical profile identification and symptom-guided network pharmacology analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.01.005>.

[责任编辑 郑礼胜]