

UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 法分析桃红四物汤物质基准中化学成分

李浩然^{1,2}, 王少平¹, 孙志强³, 董萍萍^{1,2}, 柏道明³, 高 鹏², 刘永俊⁴, 代 龙^{1*}, 张加余^{1*}

(1. 滨州医学院药学院, 山东 烟台 264003; 2. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250300; 3. 山东禹泽药康产业技术研究院有限公司, 山东 德州 251200; 4. 山东祥隆医药研究院有限公司, 山东 烟台 264003)

摘要: 目的 建立 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 法分析桃红四物汤物质基准中化学成分。方法 该药物水提液的分析采用 BEH C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相水-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 正负离子模式扫描。结果 共鉴别出 48 种成分, 包括 10 种有机酸、12 种萜类、3 种鞣质、4 种黄酮、2 种苯乙醇苷、17 种其他类。结论 该方法稳定可靠, 可为桃红四物汤相关制剂的研发及质量控制体系的建立提供依据。

关键词: 桃红四物汤; 物质基准; 化学成分; UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)04-1349-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.061

桃红四物汤又名加味四物汤, 是由桃仁、红花、熟地、当归、芍药、川芎构成的活血补血之要方, 最早记载于《医宗金鉴》^[1], 中医临床将该方用于血虚兼血瘀证及经期超前、血多有块、色紫稠粘、腹痛等妇科疾病的治疗^[2-3]。桃红四物汤物质基准是在提取方式遵循古法的前提下, 将煎液冷冻干燥后所得, 但目前关于其质量方面的报道较少, 大多为临床应用与成分定量研究^[4-5], 更缺少全成分表征研究^[6]。

超高效液相色谱串联四极杆静电场轨道阱质谱 (UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS) 技术具有高通量、高灵敏度、高分辨率等优点, 可用于中药复方化学成分的系统分析^[7-9]。本实验采用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 法对桃红四物汤物质基准中化学成分进行分析, 以期为该方药效物质基础、质量控制、现代制剂开发提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 UHPLC-Q Exactive-Orbitrap 高分辨质谱, 配置电喷雾离子源、XCalibur 2.1 质谱工作站 (美国 Thermo Scientific 公司); AB204-N 电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); BT25S 电子天平 (德国 Sartorius 公司); MB-1-2 封闭式调温加热器 (北京科伟永兴仪器有限公司); BIL-500C 超声波清洗仪 (上海比朗仪器制造有限公司); LGJ-10C 冷

冻干燥机 (北京四环福瑞科学仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 芍药内酯苷 (批号 S-011-160304) 对照品购自成都瑞芬思生物科技有限公司; 羟基红花黄色素 A (批号 111637-201810)、毛蕊花糖苷 (批号 111530-201713)、山柰酚 (批号 110861-202013)、阿魏酸 (批号 110773-201614) 对照品均购自中国食品药品检定研究院, 纯度均大于 98%。色谱纯甲酸、乙腈、甲醇购自天津康科德科技有限公司; 水纯净水 (杭州娃哈哈饮用水有限公司)。

1.2 药材 白芍、熟地、红花、桃仁、当归、川芎均由安徽亿帆医药股份有限公司提供, 经济南市食品药品检验所宋希贵研究员鉴定为正品, 均符合 2015 年版《中国药典》规定。

2 方法

2.1 物质基准制备 通过剂量考证, 分别称取酒地黄 11.19 g、酒当归 14.92 g、白芍 5.60 g、川芎 3.73 g、桃仁 3.78 g、红花 3.73 g, 其中酒地黄制法为取生地适量, 加入黄酒, 蒸法蒸至黑润, 取出, 晒至八成干, 切厚片或块, 干燥; 酒当归制法为取当归净片适量, 加黄酒拌匀, 闷透, 置炒制容器内, 用文火炒干; 其余药味均依照 2015 年版《中国药典》方法炮制。桃仁研泥, 与地黄、当归、白芍、川芎、红花一同置砂锅内浸泡 30 min, 第 1 次加 9 倍量水 (385 mL), 用电陶炉作为热源, 先武火 (600 W) 加热至

收稿日期: 2021-08-07

基金项目: 山东省泰山学者青年专家团队 (tsqn202103110); 山东省青创人才引育团队 (10073004); 山东省中药材及饮片标准研究 (2020-201); 烟台市校地融合发展中药大健康产业化平台 (2019XDRHXMPT18)

作者简介: 李浩然 (1996—), 男, 硕士生, 研究方向为中药制剂学。Tel: (0535) 6913713, E-mail: lihaoran19961229@163.com

* 通信作者: 代 龙 (1964—), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药制剂学。Tel: (0535) 6913713, E-mail: 2665275709@qq.com

张加余 (1981—), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药复杂体系作用模式。Tel: (0535) 6913713, E-mail: zhangjiayu0615@163.com

沸, 后文火 (150~200 W) 保持微沸 30 min, 第 2 次加 7 倍量水 (300 mL) 煎煮 20 min, 150 目尼龙滤布过滤, 煎液减压浓缩至相对密度为 1.11 (40 ℃), 冷冻干燥, 粉碎, 混匀, 分装, 即得。

2.2 溶液制备

2.2.1 全方供试品溶液 取物质基准 0.034 g, 置于 10 mL 量瓶中, 加 8 mL 水超声提取, 加水至刻度, 滤过, 即得。

2.2.2 各单味药供试品溶液 按照处方比例称取各单味药适量, 按“2.1”项下方法制备冻干粉, 分别取 0.028 g, 置于 10 mL 量瓶中, 加 8 mL 水超声提取, 加水至刻度, 滤过, 即得。2.2.3 对照品溶液 精密称取芍药内酯苷、阿魏酸、山柰酚、羟基红花黄色素 A、毛蕊花糖苷对照品适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 15.9、9.83、10.14、12.5 μg/mL 的溶液, 即得。

2.3 色谱条件 Waters ACQUITY™ C₁₈ 色谱柱 (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相水 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~1 min, 95% A; 1~35 min, 95%~5% A; 35~37 min, 5%~95% A; 37~40 min, 95% A); 柱温 30 ℃; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 1 μL。

2.4 质谱条件 正负离子扫描模式; 鞘气、辅助气氮气 (纯度 ≥99.99%), 体积流量 30、10 L/min; 毛细管温度 320 ℃; 蒸发器温度 400 ℃; 喷涂电压为 4 500~3 800 V; 分辨率 70 000, dd-MS² 分辨率 17 500; 扫描范围 m/z 80~1 200; 碰撞能 30 eV。

3 结果

3.1 化学成分鉴定 采用 Thermo Xcalibur 2.1 工作站进行数据采集和处理, 通过文献比对、数据库搜索、对照品比对、高分辨质谱数据分析共鉴定出了 48 种成分, 包括 10 种有机酸、12 种萜类、3 种鞣质、4 种黄酮、2 种苯乙醇苷、17 种其他类, 总离子流图见图 1, 具体信息见表 1。

3.2 有机酸 包括 5-*O*-咖啡酰奎尼酸 (4)、对羟基苯甲酸 (5)、3-*O*-咖啡酰奎尼酸 (8)、1-*O*-咖啡酰奎尼酸 (10)、4-*O*-咖啡酰奎尼酸 (14)、对香豆酸 (17) 等, 在负离子模式下由于脱羧基易产生相差 44 (CO₂) 的碎片离子, 因此其准分子离子峰不易被检测, 并且因咖啡酰基断裂, 易产生 m/z 179、191 的特征碎片离子。以 5-*O*-咖啡酰奎尼酸 (4) 为例, 其负离子模式二级质谱图见图 2A, 准分子离子 m/z 353.087 04, 保留时间 3.96 min, 分子式 C₁₆H₁₈O₉; 其二级质谱中 m/z 179 由分子离子于 b 位断裂产生的咖啡酰基碎片离子, 碎片离子 m/z 135 比 m/z 179 少 44, 是由后者中性丢失一分子 CO₂ 得到; 离子 m/z 191 为 a 位酰基断裂产生的奎尼酸碎片离子, 与文献 [14] 报道一致, 并通过对比组方与红花二级质谱图 (图 2B) 鉴定为 5-*O*-咖啡酰奎尼酸, 主要由红花提供。另外, 其余简单有机酸类成分, 如对羟基苯甲酸 (5)、对香豆酸 (17)、苯甲酸 (20) 的二级质谱中也可观察到 [M-H-CO₂]⁻ 或 [M+H-CO₂]⁺ 的特征碎片离子。

3.3 黄酮 裂解途径见图 3。

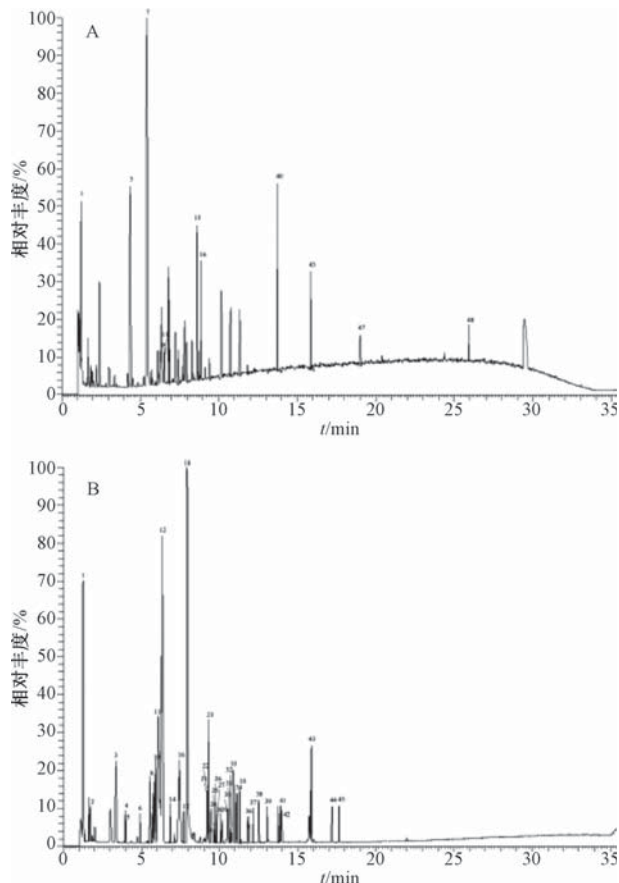


图 1 物质基准在正 (A)、负 (B) 离子模式下总离子流图

11 准分子离子 m/z 611.161 46, 保留时间 6.07 min, 分子式 C₂₇H₃₂O₁₆, 主要碎片离子为 m/z 119、287、259、 m/z 205, 其中 m/z 287 [M-H-2Glu]⁻ 是由分子离子于 a、b 位断裂脱去 2 Glu 中性碎片所产生的碎片离子; m/z 259 比 m/z 287 少 28, 推测为 CO 的中性丢失, 连续丢失 3 分子水后生成 m/z 205; m/z 205 于 c 位断裂后, 生成 m/z 119。与对照品比对, 鉴定为羟基红花黄色素 A。

41 准分子离子 m/z 285.039 55, 保留时间 13.98 min, 分子式 C₁₅H₁₀O₆, 分子离子在 a 位发生 RDA 裂解后产生 m/z 133 碎片离子, m/z 117 比 m/z 133 少 16, 故推断后者脱氧产生 m/z 117, 并于 b 位断裂产生了 m/z 93。与对照品比对, 鉴定为山柰酚。

25 准分子离子 m/z 623.160 34, 保留时间 9.64 min, 分子式 C₂₈H₃₂O₁₆, 通过中性丢失鼠李糖基 (308Da) 产生 m/z 315; 离子 m/z 300 比 m/z 315 少 15, 推测后者丢失 CH₃ 产生 m/z 300; m/z 300 发生 RDA 裂解, 产生 m/z 153, 后者脱去一分子 O 后又产生了 m/z 135。与对照品比对, 鉴定为异鼠李素芸香糖苷。

3.4 萜类 裂解途径见图 3。

18 准分子离子 m/z 479.154 48, 保留时间 7.95 min, 分子式 C₂₃H₂₈O₁₁; 分子离子于 a 位脱去一分子氧后产生 m/z 463, 进而在 b 位脱去蒽烷基本骨架产生 m/z 165、135 的互补离子对; 离子 m/z 121 比 m/z 135 少 14, 故推测后者脱去 CH₂ 后产生前者。与对照品比对, 鉴定为芍药苷。

表 1 物质基准鉴定结果

峰号	模式	t_R / min	化学式	理论值 m/z	实测值 m/z	误差 (1.0×10^{-6})	碎片信息	名称	来源	文献
M1	N	1.29	$C_{16}H_{23}O_{12}$	407.119 49	407.118 19	-0.522	$MS^2(407.11):85.03,123.04,151.04,107.05$	未知	H	—
M2	N	1.67	$C_{19}H_{26}O_{15}$	493.119 89	493.118 99	0.393	$MS^2(493.11):169.01,125.02,170.02$	没食子酰蔗糖	B	[21]
M3	N	3.38	$C_{16}H_{15}O_{11}$	393.140 23	393.139 16	0.056	$MS^2(393.14):106.28,119.66,192.68,228.22$	未知	T	—
M4	N	3.96	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 81	353.087 04	0.939	$MS^2(353.08):135.04,179.03,191.06$	5- <i>O</i> -咖啡酰奎尼酸	H	[19]
M5	N	4.01	$C_8H_8O_3$	151.040 07	151.038 67	-1.990	$MS^2(151.02):93.03$	对羟基苯甲酸	T	[10]
M6	N	4.87	$C_{21}H_{28}O_{13}$	487.145 71	487.144 47	-0.302	$MS^2(487.14):135.04,179.03$	肉苁蓉苷 F	S	[15]
M7	P	5.43	$C_{11}H_{17}O_3$	197.117 76	197.117 96	3.749	$MS^2(197.12):80.05,94.07,121.08,135.09$	未知	B	—
M8	N	5.56	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 81	353.086 94	0.656	$MS^2(353.08):191.05$	3- <i>O</i> -咖啡酰奎尼酸	H	[19]
M9	N	5.66	$C_{14}H_{18}O_8$	313.092 89	313.092 16	1.169	$MS^2(313.09):108.02,152.01,123.01$	rhamnopyranosyl vanilloyl	S	[15]
M10	N	5.96	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 81	353.086 85	0.401	$MS^2(353.08):173.04$	1- <i>O</i> -咖啡酰奎尼酸	H	[20]
M11	N	6.07	$C_{27}H_{32}O_{16}$	611.161 76	611.161 46	-0.329	$MS^2(611.16):119.05,205.01,325.07$	羟基红花黄色素 A *	H	[25]
M12	N	6.36	$C_{27}H_{32}O_{16}$	611.161 76	611.159 97	-1.131	$MS^2(611.16):119.05,205.01,325.07$	羟基红花黄色素 A 异构体	H	[25]
M13	P	6.81	$C_{10}H_{10}O_4$	195.065 19	195.064 47	-3.667	$MS^2(195.06):135.09,149.11,109.08,149.11,134.08$	阿魏酸异构体	D	[17]
M14	N	6.82	$C_{16}H_{18}O_9$	353.087 81	353.086 94	0.656	$MS^2(353.08):191.05,173.04,135.04$	4- <i>O</i> -咖啡酰奎尼酸	H	[19]
M15	P	6.83	$C_{12}H_{18}O_2$	195.137 96	195.136 92	-5.311	$MS^2(195.06):149.11$	蛇床内酯	C	[11]
M16	N	7.44	$C_{24}H_{29}O_{13}$	525.161 36	525.159 67	-1.137	$MS^2(525.13):121.03,146.30,165.40,257.40$	未知	B	—
M17	N	7.71	$C_9H_8O_3$	163.040 07	163.038 68	-1.782	$MS^2(163.03):93.03,119.05$	对香豆酸	H	[17]
M18	N	7.95	$C_{23}H_{28}O_{11}$	479.155 88	479.154 48	-0.643	$MS^2(479.15):121.03,463.24,165.05,135.04$	芍药苷	B	[24]
M19	P	8.59	$C_{10}H_{10}O_4$	195.065 19	195.064 25	-4.795	$MS^2(195.06):135.09,149.11,107.50,117.03$	阿魏酸 *	D	[26]
M20	P	8.89	$C_7H_6O_2$	123.044 06	123.043 91	-1.187	$MS^2(123.03):51.02,77.04,79.05,105.04$	苯甲酸	B	[22]
M21	N	9.27	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623.198 14	623.196 90	-0.235	$MS^2(623.12):161.02,179.03,315.11,135.04$	毛蕊花糖苷 *	S	[15]
M22	N	9.31	$C_{30}H_{32}O_{15}$	631.166 84	631.165 59	-0.248	$MS^2(631.16):169.01,271.05,313.06,121.03$	没食子酰芍药苷	B	[23]
M23	N	9.32	$C_{21}H_{22}O_{11}$	449.108 93	449.107 85	0.027	$MS^2(449.10):287.06$	eriodictyol hexoside	T	[10]
M24	N	9.51	$C_{37}H_{50}O_{20}$	813.282 27	813.280 94	-0.283	$MS^2(813.28):175.04,193.05$	焦地黄苷 B1	S	[15]
M25	N	9.64	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623.161 76	623.160 34	-0.515	$MS^2(623.12):300.03,315.05,153.05,135.04$	异鼠李素芸香糖苷	T	[27]
M26	N	9.71	$C_{37}H_{50}O_{20}$	813.282 27	813.281 01	-0.197	$MS^2(813.28):175.04,193.05,491.18$	焦地黄苷 B2	S	[15]
M27	N	9.76	$C_{29}H_{36}O_{15}$	623.198 14	623.197 08	0.054	$MS^2(623.12):161.02,315.11,135.04$	异毛蕊花糖苷	S	[15]
M28	N	9.80	$C_{23}H_{30}O_{12}$	497.166 45	497.165 37	0.035	$MS^2(497.14):167.03,123.04,152.01,139.00,468.70$	6- <i>O</i> -香草酰基筋骨草醇	S	[15]
M29	N	10.04	$C_{30}H_{32}O_{15}$	631.166 84	631.165 53	-0.343	$MS^2(631.16):169.01,121.03,125.02,313.06$	没食子酰芍药苷	B	[23]
M30	N	10.52	$C_{16}H_{26}O_8$	345.155 49	345.154 45	0.162	$MS^2(345.11):165.09$	地黄苦苷	S	[14]
M31	N	10.64	$C_{21}H_{22}O_{11}$	449.108 93	449.107 76	-0.173	$MS^2(449.10):287.06$	eriodictyol hexoside	T	[10]
M32	N	10.73	$C_{25}H_{32}O_{12}$	523.182 10	523.180 73	-0.521	$MS^2(523.18):134.04,193.05,175.04$	6- <i>O</i> - <i>E</i> -阿魏酰基筋骨草醇	S	[14]
M33	N	10.87	$C_{23}H_{28}O_{11}$	479.155 88	479.154 57	-0.455	$MS^2(479.15):121.03,165.05,163.04,135.04$	芍药内酯苷 *	B	[24]
M34	N	11.10	$C_{25}H_{32}O_{12}$	523.182 10	523.180 73	-0.521	$MS^2(523.18):134.04,193.05,175.04$	6- <i>O</i> - <i>E</i> -阿魏酰基筋骨草醇	S	[14]
M35	N	11.29	$C_{23}H_{26}O_{10}$	507.150 25	507.149 35	-0.695	$MS^2(507.14):121.03,177.05$	芍药新苷	B	[23]
M36	N	11.85	$C_{31}H_{40}O_{15}$	651.229 44	651.228 09	-0.394	$MS^2(651.22):175.04,160.02$	地黄苷或异构体	S	[13]
M37	N	12.13	$C_{31}H_{40}O_{15}$	651.229 44	651.228 09	-0.394	$MS^2(651.22):175.04,160.02$	地黄苷或异构体	S	[13]
M38	N	12.47	$C_{31}H_{40}O_{15}$	651.229 44	651.228 21	-0.210	$MS^2(651.22):175.04,160.02$	地黄苷或异构体	S	[13]
M39	N	13.06	$C_{31}H_{40}O_{15}$	651.229 44	651.228 21	-0.210	$MS^2(651.22):175.04,160.02$	地黄苷或异构体	S	[13]
M40	P	13.74	$C_{12}H_{12}O_2$	189.091 01	189.090 10	-4.792	$MS^2(189.09):131.05$	川芎内酯	D	[16]
M41	N	13.98	$C_{15}H_{10}O_6$	285.040 46	285.039 55	0.651	$MS^2(285.03):93.03,117.03,145.03,133.03,108.02$	山柰酚 *	B	[23]
M42	N	13.99	$C_{31}H_{34}O_{14}$	629.187 58	629.185 97	-0.814	$MS^2(629.18):121.03,123.04,135.04,151.04$	牡丹皮苷 B	B	[22]
M43	P	15.84	$C_{12}H_{12}O_2$	189.091 01	189.090 09	-4.845	$MS^2(189.09):127.05,130.05$	<i>E</i> -丁烯基苯酚	C/D	[16]
M44	N	15.96	$C_{18}H_{34}O_5$	329.233 35	329.232 54	0.289	$MS^2(329.23):201.83,171.10$	十八烯酸/异构体	H	[18]
M45	N	17.20	$C_{18}H_{34}O_5$	329.233 35	329.232 54	0.879	$MS^2(329.23):171.10$	十八烯酸/异构体	H	[18]
M46	N	17.69	$C_{18}H_{34}O_5$	329.233 35	329.232 48	0.697	$MS^2(329.23):171.10$	十八烯酸/异构体	H	[18]
M47	P	19.01	$C_{12}H_{16}O_2$	193.122 31	193.121 41	-4.641	$MS^2(193.12):117.07,115.05,105.04$	洋川芎内酯 A	C/D	[12]
M48	P	25.98	$C_9H_{10}O_3$	167.070 27	167.070 37	0.363	$MS^2(167.01):84.93$	丹皮酚	B	[22]

注:N 为负离子模式,P 为正离子模式,B 为白芍,H 为红花,C 为川芎,D 为当归,S 为熟地,T 为桃仁,* 为经对照品比对的成分。

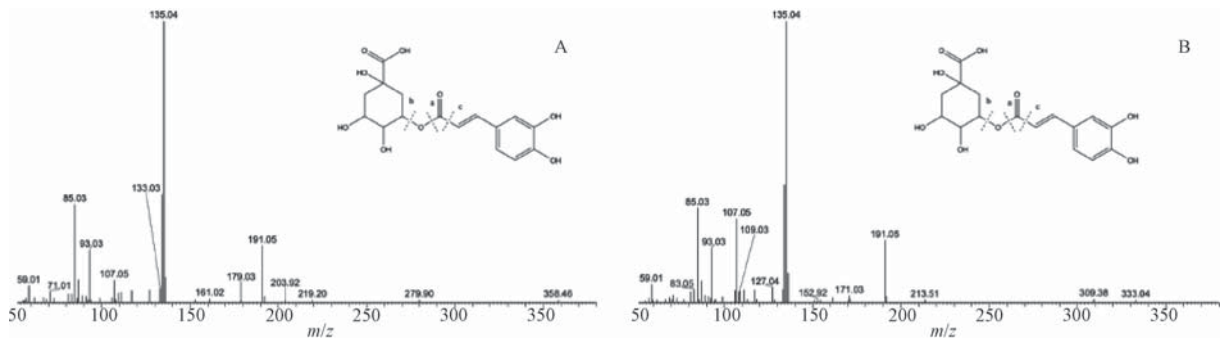


图 2 M4 于桃红四物汤 (A)、红花 (B) 中的二级质谱图

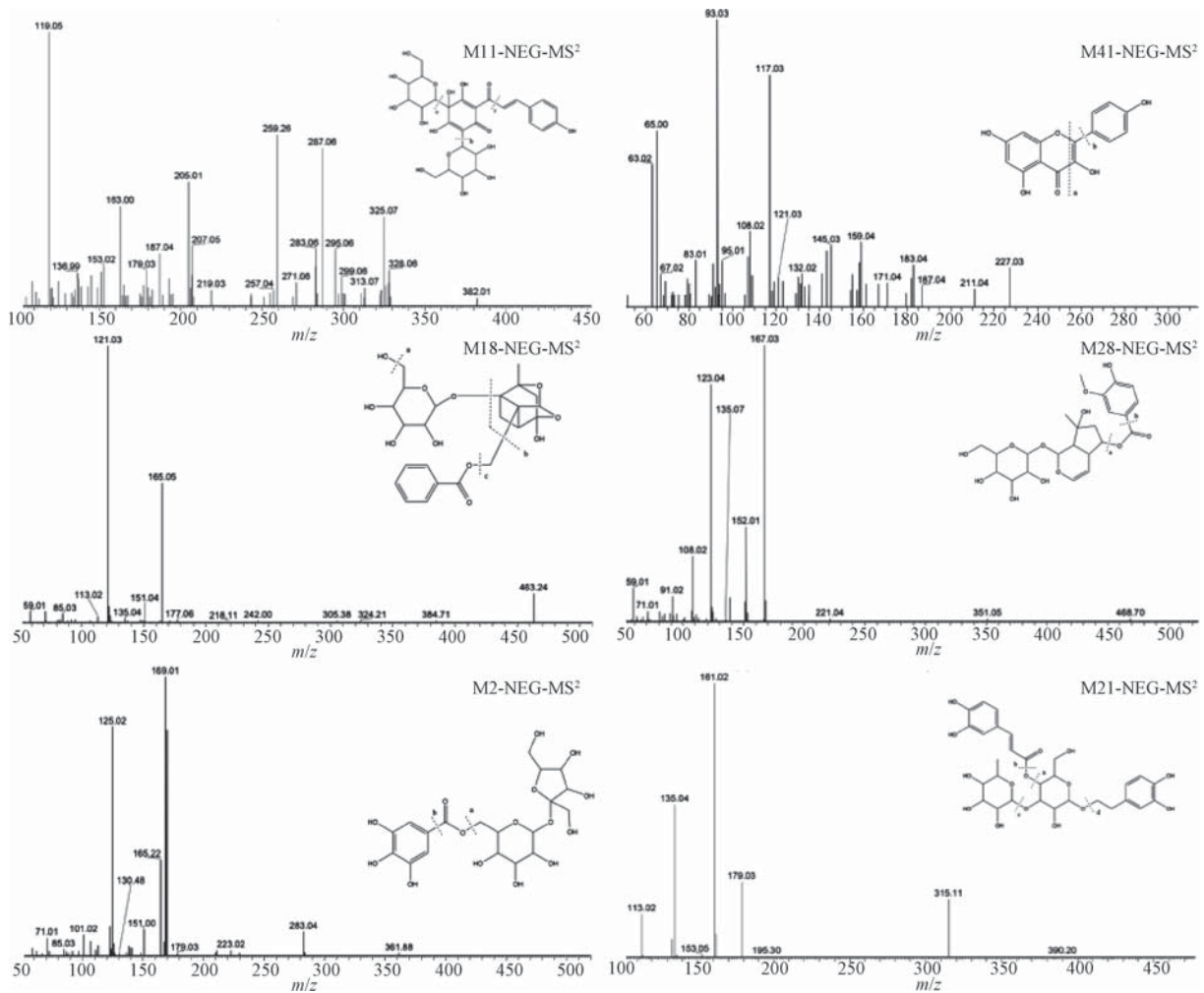


图 3 M11、M41、M18、M28、M2、M21 二级质谱图及裂解规律

28 准分子离子 m/z 497.165 37, 分子式 $C_{23}H_{30}O_{12}$; 分别于 a、b 位发生断裂产生的二级碎片离子 m/z 167 [M-H- $C_{15}H_{22}O_8$]⁻、123 [M-H- $C_{15}H_{22}O_8-CO_2$]⁻ 与上述裂解规律相同。与对照品比对, 鉴定为 6-O-香草酰基筋骨草醇。

22、29 在负离子模式下均检测到了由糖基 6 号位脱去的没食子酰基产生的碎片离子 m/z 169, 以及苯甲酰基碎片所产生的离子 m/z 121, 判断两者为没食子酰芍药苷或其异构体。

33 在负离子模式下产生的碎片离子 m/z 463、121、165

均与芍药苷裂解规律相同。与对照品比对, 鉴定为芍药内酯苷。

30、35、36~39、42 二级碎片离子均与上述裂解规律相同, 或与相关文献报道一致。与对照品比对, 分别鉴定为地黄苦苷、芍药新苷、地黄苦或其异构体、牡丹皮苷 B。

3.5 鞣质类 裂解途径见图 3。

2 准分子离子 m/z 463.118 99, 保留时间 1.67 min, 分子式 $C_{19}H_{26}O_{15}$; 分子离子在 a 位断裂脱去蔗糖后产生 m/z 169, 由于 m/z 125 比 m/z 169 少 44, 推测后者脱去一分子

CO₂ 后产生前者。与文献 [21] 比对, 鉴定为没食子酰蔗糖。

32、34 二级质谱内均发现了阿魏酰基的碎片离子, 两者裂解行为与没食子酰蔗糖类似。与文献 [14] 比对, 鉴定为 6-*O*-*E*-阿魏酰基筋骨草醇或其异构体。

3.6 苯乙醇苷类 裂解途径见图 3。

21 准分子离子 m/z 623.196 90, 保留时间 9.27 min, 分子式 C₂₉H₃₆O₁₅; 二级碎片离子有 m/z 179、161、315、135; 分子离子由 a 位断裂产生咖啡酸离子 m/z 179, 进而脱去一分子 H₂O 生成碎片离子 m/z 161; 离子 m/z 315 [M-H-caffeoyl-C₆H₁₀O₄]⁻是由分子离子依次脱去咖啡酰基、鼠李糖残基产生, 再继续丢失一分子葡萄糖并脱水后得到 m/z 135 [M-H-caffeoyl-C₆H₁₀O₄-Glu-H₂O]⁻。与对照品比对, 鉴定为毛蕊花糖苷。

27 质谱中展现了与毛蕊花糖苷相同的裂解方式。与对照品比对, 鉴定为异毛蕊花糖苷。

3.7 其他 通过数据库分析结合文献比对, 鉴定 9、24、26、31、44~46 分别为 hamnopyranosyl vanilloyl、焦地黄苷 B1、焦地黄苷 B2、eriodictyol hexoside、十八烯酸或其异构体。

4 讨论

桃红四物汤作为传统调经要方之一, 具有活血化淤、调经止痛等功效。咖啡酰奎尼酸类化合物对于改善局部血液微循环有着显著效果^[28], 临床用于急性脑卒中患者的治疗。金鸣等^[29]发现羟基红花黄色素 A 通过拮抗 PAF 受体, 缓解 PAF 诱发人脐静脉血管内皮细胞炎症介质白细胞介素 (IL) -1B、IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1mRNA 的升高, 达到镇痛的效果。吴丽等^[30]研究表明芍药苷对原发性痛经模型小鼠具有解痉镇痛作用, 能使小鼠潜伏期延长、扭体次数减少, 子宫组织 PGF₂ 水平降低、NO 水平升高。本研究鉴定成分与桃红四物汤传统药效的重叠性, 证实了药效化学成分在桃红四物汤内的传递性与可测定性。

综上所述, 桃红四物汤物质基准具成分特有性且关联药效, 与刘昌孝院士提出的中药质量标志物 (Q-marker) 理论^[31]不谋而合。本研究利用 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 技术对桃红四物汤物质基准进行分析鉴定, 初步鉴定并推测出了毛蕊花糖苷, 芍药苷, 地黄苦苷, 羟基红花黄色素 A, 5-*O*-咖啡酰奎尼酸, 对香豆酸等 48 种成分。为探明桃红四物汤质量标志物提供了原始数据库, 为提升桃红四物汤质量标准水平打下了基础。

参考文献:

[1] 吴 谦. 医宗金鉴[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1980.
[2] 刘 立, 段金廛, 宿树兰, 等. 用于妇科血瘀证痛经的四物汤类方—桃红四物汤的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5): 814-821.
[3] 聂 欣, 成颜芬, 王 琳, 等. 桃红四物汤化学成分、药理作用、临床应用的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(4): 226.

[4] 杨艳玲, 刘彩凤, 黄嘉怡, 等. 经典名方桃红四物汤的物质基准量值传递分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 801-809.
[5] 王升菊, 刘倩倩, 江华娟, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨桃红四物汤治疗原发性痛经的有效成分及作用机制[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5373-5382.
[6] 赵赞赞, 刘庆丰, 李亚男, 等. 桃红四物汤药效物质基础与质量控制方法研究进展[J]. 中药材, 2019, 42(11): 2730-2735.
[7] 王喻淇, 梅晓丹, 李 洁, 等. 玫瑰花、玫瑰茄、枸杞子复合发酵液化学成分的 HPLC-HRMS 分析[J]. 中国现代中药, 2020, 22(3): 363-371.
[8] 王喻淇, 刘子菡, 王少平, 等. 蝉拟青霉/黄芩双向发酵菌质化学成分及抗高尿酸血症活性研究[J]. 中国现代中药, 2020, 22(10): 1638-1643.
[9] 李 洁, 刘子菡, 董 凡, 等. 新绿原酸的大鼠体内代谢产物的 UPLC-Q-TOF MS 鉴定[J]. 中国现代中药, 2020, 22(7): 1048-1055; 1071.
[10] Koprivica M R, Anin A M, Fotiri A M, et al. Determination of the phenolic profile of peach (*Prunus persica* L.) kernels using UHPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS technique [J]. *Eur Food Res Technol*, 2018, 244: 2051-2064.
[11] 容悦莹, 冯素香, 刘冬云, 等. HPLC-MS/MS 法鉴定脑脉通中的化学成分[J]. 中成药, 2016, 38(7): 1544-1550.
[12] 孙国东, 霍金海, 张树明, 等. UPLC-Q-TOF/MS 法分析川菊止痛胶囊成分[J]. 中成药, 2019, 41(12): 3052-3060.
[13] 赵婷秀, 曹 迪, 茆文莉, 等. HPLC-QTOF-MS 分析六味地黄丸不同部位的化学成分[J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(4): 489-496.
[14] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分[J]. 中成药, 2016, 38(5): 1104-1108.
[15] 周 菲, 林美斯, 李 锐, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析百合地黄汤的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 15-22.
[16] 张纪红, 吴卫东, 刘建庭, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术活血止痛胶囊化学成分的快速分析[J]. 中草药, 2020, 51(12): 3139-3146.
[17] 王 璐, 范珊珊, 徐 风, 等. HPLC-MSⁿ 法分析当归极性成分及其在大鼠体内的代谢产物[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(22): 4924-4931.
[18] 王松松, 马 艳, 张 毅, 等. UHPLC-MS/MS 快速鉴别红花中的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1347-1354.
[19] 张丽媛, 李遇伯, 李利新, 等. RRLC-Q-TOF/MS 分析金银花的化学成分[J]. 中南药学, 2012, 10(3): 204-208.
[20] 白 雪, 黄惠锋, 吴修红, 等. HPLC-DAD-MS/MS 法分析金银花中化学成分[J]. 食品与药品, 2015, 17(1): 5-8.
[21] 刘 杰, 陈 琳, 范彩荣, 等. 基于 HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 的白芍和赤芍主要成分定性定量研究[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(9): 1762-1770.
[22] 谭淑瑜, 肖 雪, 朴胜华, 等. 白芍水溶性成分快速鉴定研究[J]. 中药材, 2017, 40(1): 94-100.

- [23] 周海玲, 许舜军, 周若龙, 等. 白芍、赤芍化学成分的高效液相色谱-飞行时间串联质谱分析[J]. 中药材, 2018, 41(7): 1637-1640.
- [24] 谭淑瑜, 肖 雪, 朴胜华, 等. 白芍水溶性成分快速鉴定研究[J]. 中药材, 2017, 40(1): 94-100.
- [25] Sheng C, Peng W, Xia Z, et al. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of hydroxysafflor yellow A in patients with traumatic brain injury after intravenous administration of Xuebijing using LC-MS/MS method [J]. *Xenobiotica*, 2020, 50(5): 545-551.
- [26] Zhang C, Ma W, Zhang Y, et al. Pharmacokinetics, Bioavailability, and Tissue Distribution Study of Angoroside C and Its Metabolite Ferulic Acid in Rat Using UPLC-MS/MS[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1186.
- [27] Barros L, Dueñas M, Ferreira I R, et al. Santos-Buelga C (2011) Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal[J]. *Food Chem*, 2011, 127(1): 169-173.
- [28] 柯细彤, 章瑜芳, 朱兆云, 等. 灯盏细辛中咖啡酰奎宁酸防治缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(3): 609-615.
- [29] 金 鸣, 裴崇强, 臧宝霞, 等. 羟基红花黄色素 A 缓解血小板激活因子诱导的内皮细胞炎症因子表达升高作用的研究[J]. 心肺血管病杂志, 2011, 30(5): 429-432.
- [30] 吴 丽, 王丽丽, 费文婷, 等. 芍药苷和芍药内酯苷对小鼠疼痛模型的镇痛作用及对 β -EP、PGE-2 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3): 915-918.
- [31] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.

柴胡注射液细菌内毒素检查法的研究

任仲丽, 张秀花, 王 静, 刘 博, 李秀菊
(菏泽市食品药品检验检测研究院生物检测研究所, 山东 菏泽 274023)

摘要:目的 建立柴胡注射液的细菌内毒素检查方法(凝胶法)。方法 按照 2020 年版《中国药典》四部 1143 细菌内毒素检查法, 设定柴胡注射液细菌内毒素限值, 进行干扰试验预试验、干扰试验及检查验证, 并用凝胶半定量试验进行定量检测。结果 柴胡注射液原液对 2 个厂家的鲎试剂和内毒素均未显示干扰作用, 内毒素限值可定为 15 EU/mL。凝胶半定量试验对 3 批柴胡注射液进行内毒素检查时, 内毒素含量均低于 0.25 EU/mL。结论 本研究建立的细菌内毒素检查法适用于柴胡注射液细菌内毒素检查。

关键词: 柴胡注射液; 细菌内毒素; 凝胶法; 干扰试验

中图分类号: R927.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)04-1354-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.062

柴胡注射液是柴胡干燥根经水蒸气蒸馏制成的灭菌水溶液, 主要成分为挥发油(柴胡醇、丁香酚等), 具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气的作用^[1-3]。高阳等^[4]研究发现, 柴胡注射液对脂多糖导致的高热有较强的解热作用, 解热疗效确切, 临床应用广泛。但由于不良反应较多, 国家食品药品监督管理局批准生产柴胡注射液的企业从 2012 年的 120 家左右减到现在的 70 家^[5-7]。同时, 由于儿童群体的不良反应占比较大^[8-13], 2018 年 5 月 29 日国家食品药品监督管理局发布公告, 修订柴胡注射液说明书, 增加“儿童禁用”条款^[14]。本研究依照 2020 年版《中国药典》四部 1143 细菌内毒素检查法的凝胶法, 建立和探讨柴胡注射液的细菌内毒素检查方法的可行性, 以期制药企业提高药品质量、减少由于热原引起的不良反应、确保用药安全提供依据。

1 材料

1.1 药物 柴胡注射液 1 (河南福森药业有限公司, 批号 1805061, 2 mL/支); 柴胡注射液 2 (河南省康华药业股份有限公司, 批号 18082603A, 2 mL/支); 柴胡注射液 3 (海南制药厂有限公司制药二厂, 批号 180101052, 2 mL/支); 柴胡注射液 4 (河南福森药业有限公司, 批号 1802011, 2 mL/支); 柴胡注射液 5 (河南省康华药业股份有限公司, 批号 19051202, 2 mL/支); 柴胡注射液 6 (海南制药厂有限公司制药二厂, 批号 180101263, 2 mL/支)。

1.2 试剂 细菌内毒素工作标准品 (WSE, 中国食品药品检定研究院, 批号 150601-202088, 60 EU/支)。鲎试剂 1 (TAL1, 湛江安度斯生物有限公司, 灵敏度 0.25 EU/mL, 0.1 mL/支, 批号 1907081); 鲎试剂 2 (TAL2, 湛江博康海洋生物有限公司, 灵敏度 0.25 EU/mL, 0.1 mL/支, 批

收稿日期: 2020-07-06

作者简介: 任仲丽 (1983—), 女, 硕士, 主管药师, 从事药品微生物检验研究。Tel: 15550762299, E-mail: 67790895@qq.com