

UPLC – MS/MS 同法测定通敷颈腰痛酊中 9 个有效成分的含量*

赵继荣¹, 杨文通^{1**}, 李硕¹, 朱宝², 李喜香², 冯文渊¹, 裴亮¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730030; 2. 甘肃省中医院, 兰州 730050)

摘要 目的: 建立一种同时测定通敷颈腰痛酊中大豆苷元、芒柄花黄素、芫花素、槲皮素、芦丁、芹菜素、山柰酚、木犀草素、葛根素含量的超高效液相色谱串联质谱法(UPLC – MS/MS)。**方法:** 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL · min⁻¹, 柱温为 45 °C, 进样量为 2.0 μL; 电喷雾(ESI)离子源, 正、负离子模式多反应监测采集。**结果:** 芹菜素、芫花素、大豆苷元在 0.2 ~ 1 000 ng · mL⁻¹ 范围内线性良好, 葛根素、芦丁、木犀草素、山柰酚、芒柄花黄素在 0.2 ~ 2 000 ng · mL⁻¹ 范围内线性良好, 槲皮素在 1.0 ~ 5 000 ng · mL⁻¹ 范围内线性良好; 分离度较好, 精密度、重复性、重现性、稳定性试验 RSD 均小于 5% (n = 6); 平均加样回收率在 82.7% ~ 111.8%, RSD 为 2.0% ~ 5.4% (n = 6)。6 批通敷颈腰痛酊中大豆苷元、芒柄花黄素、芫花素、槲皮素、芦丁、芹菜素、山柰酚、木犀草素、葛根素的含量范围分别为 8.46 ~ 17.97 μg · mL⁻¹、0.62 ~ 1.67 μg · mL⁻¹、0.03 ~ 0.08 μg · mL⁻¹、1.34 ~ 2.22 μg · mL⁻¹、0.70 ~ 1.14 μg · mL⁻¹、0.48 ~ 0.99 μg · mL⁻¹、0.20 ~ 0.90 μg · mL⁻¹、0.10 ~ 0.16 μg · mL⁻¹、167.95 ~ 227.75 μg · mL⁻¹。**结论:** 本方法专属性强, 线性范围宽, 准确高效, 可同时通敷颈腰痛酊中 9 个有效成分进行含量检测, 为该方建立有效的质量控制方法。

关键词: 通敷颈腰痛酊; 超高效液相色谱串联质谱法; 液质联用; 活性成分; 含量测定; 质量控制

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2024)06 – 0952 – 08

doi: 10.16155/j.0254 – 1793.2024.06.05

Simultaneous determination of 9 active ingredients in Tongfu Jingyaotong tincture by UPLC – MS/MS*

ZHAO Ji – rong¹, YANG Wen – tong^{1**}, LI Shuo¹, ZHU Bao², LI Xi – xiang²,
FENG Wen – yuan¹, PEI Liang¹

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine Lanzhou 730030, China; 2. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

Abstract Objective: To establish an ultra – high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS) for the simultaneous determination of daidzein, formononetin, genkwanin, quercetin, rutin, apigenin, kaempferol, luteolin and puerarin in Tongfu Jingyaotong tincture. **Methods:** The Waters ACQUITY UPLC HSS T3 Column (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) was used with methanol and 0.1% formic acid (gradient elution) as the mobile phase at a flow rate of 0.3 mL · min⁻¹. Column temperature was 45 °C, and injection volume was 2.0 μL. Electrospray ion source was adopted with positive and negative ion modes and multi – reaction monitoring and acquisition. **Results:** Apigenin, genkwanin and daidzein had good linearity in the range

* 甘肃省中医药项目(GZKZ – 2020 – 3); 甘肃省中医药产业精准对接就业创业人才科学化基地(3016170106)

** 通信作者 Tel: 13659449464; E – mail: 2239578929@qq.com

第一作者 Tel: 15084981201; E – mail: zhaojr@gszy.edu.cn

of 0.2 – 1 000 ng · mL⁻¹, puerarin, rutin, luteolin, kaempferol and formononetin in the range of 0.2 – 2 000 ng · mL⁻¹, and quercetin in the range of 1.0 – 5 000 ng · mL⁻¹. The resolution was good, and the RSDs of precision, repeatability, reproducibility and stability test were all below 5% ($n=6$). The average recoveries ranged from 82.7% to 111.8% with RSDs ($n=6$) of 2.0%–5.4%. The contents of daidzein, formononetin, genkwanin, quercetin, rutin, apigenin, kaempferol, luteolin and puerarin in 6 batches of Tongfu Jingyaotong tincture were 8.46 – 17.97 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.62 – 1.67 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.03 – 0.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 1.34 – 2.22 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.70 – 1.14 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.48 – 0.99 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.20 – 0.90 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 0.10 – 0.16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 167.95 – 227.75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. **Conclusion:** This method has strong specificity, wide linear range, accuracy and efficiency, and can detect the contents of 9 active ingredients in Tongfu Jingyaotong tincture at the same time, which offers an effective quality control method for Tongfu Jingyaotong tincture.

Keywords: Tongfu Jingyaotong tincture; ultra – high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; LC – MS; active ingredients; Content determination; quality control

燧敷颈腰痛酊是甘肃省名中医赵继荣教授的经验效方,是由伸筋草、透骨草、威灵仙、葛根等 8 味药物经酊剂之浸渍法制备而成的外用制剂,方中伸筋草、透骨草为君药,以舒筋通络、活血止痛,两药相须为用增强彼此疗效;威灵仙、木瓜、桂枝、葛根共为臣药,威灵仙和木瓜祛风湿、通经络,桂枝温经通络、散寒止痛,葛根解肌舒筋止痛,桂枝与葛根相配伍,表里同治、寒温相合,温通筋脉,解肌养筋;红花、鸡血藤为佐药,补血活血、通络止痛。以上诸药合用,共奏温经通络、舒筋活血、散寒止痛之功效^[1]。

既往研究表明,伸筋草乙醇、正丁醇、三氯甲烷提取物抗炎镇痛作用良好,可降低佐剂性关节炎大鼠血清中白细胞介素(IL) – 1 β 、IL – 6、肿瘤坏死因子 – α (TNF – α) 的水平^[2]。申鸽等^[3]的动物实验研究发现,珍珠透骨草醇提取物通过多组分、多靶点联合发挥抗炎活性。威灵仙中槲皮素、山柰酚、芦丁等多种化合物具有抗炎、抗氧化、镇痛的药物作用^[4]。葛根中的葛根素、大豆苷元对神经组织损害和炎症导致的神经性疼痛具有缓解作用,抑制 IL – 1、IL – 6 和 TNF – α 的表达,减轻大鼠背根神经节引起的机械痛觉敏化^[5]。桂枝醇提物具有较好的抗炎活性,木瓜中芦丁、槲皮素、山柰酚通过抑制 Akt/NF – κB 信号通路激活及促炎因子 IL – 1 β 、IL – 6 和 TNF – α 生成发挥抗炎镇痛活性^[6-7]。鸡血藤中的儿茶素、芒柄花黄素具有抗炎、保护血管、改善血液流速的药理作用,红花中的山柰酚、芫花素、姜黄素等通过抑制一氧化氮(NO)的释放而起到抗炎活性^[8-9]。综上可知,燧敷颈腰痛酊药物组成中所含共

有化合物槲皮素、山柰酚、芒柄花黄素、芦丁等具有广泛的抗炎、镇痛、抗氧化、保护血管、抑制神经病理性疼痛的作用,其机制可能是多药物、多途径、多靶点共同起效,因此值得进一步研究。2020 年版《中华人民共和国药典》中关于伸筋草、透骨草等中药的质量控制仅限于高效液相色谱法,但该法的专属性及灵敏性不及液质联用技术^[10-11]。本课题组前期研究表明,“燧敷系列”中成药能够改善腰椎间盘突出症患者腰腿疼痛症状,降低炎症指标水平,提高生活质量,其功效为活血化瘀、温通经络、抗炎镇痛,但对其有效成分和作用机制尚未研究^[12-14]。故此,本研究采用 UPLC – MS/MS 同时测定燧敷颈腰痛酊中 9 个化学成分的含量,旨在为该制剂的质量控制提供方法学参考,为中药酊剂的开发研究提供借鉴。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC I – Class 超高液相色谱仪、XEVO TQ – XS 串联四极杆质谱系统、Masslynx 质谱数据采集软件(Waters 公司),Mikro 220R 台式高速冷冻离心机(Hettich 科学仪器公司),Vortex 2 涡旋混匀仪(IKA 集团),ME55/155DU 十万分之一电子分析天平(METTLER TOLEDO 科技有限公司),KQ3200 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 试剂及试药

对照品大豆苷元(含量 99.99%,批号 MUST – 22101117)、芒柄花黄素(含量 99.03%,批号 MUST – 23033005)、芫花素(含量 98.80%,批号 MUST – 23061014)、槲皮素(含量 98.85%,批号 MUST –

23042008)、芹菜素(含量 98.12%,批号 MUST-22120111)、山柰酚(含量 99.99%,批号 MUST-23030915)购于成都曼思特生物科技有限公司;对照品芦丁(含量 \geq 98%,批号 MUST-22039021)、木犀草素(含量 \geq 98%,批号 MUST-23010018)、葛根素(含量 \geq 98%,批号 MUST-22110405)购于中国食品药品检定研究院;色谱级甲酸和甲醇购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司,超纯水(杭州娃哈哈集团有限公司);熨敷颈腰痛酊样品(甘肃省中医院药学部,批号 20220101、20220301、20220701、20221001、20230101、20230401)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Waters ACQUITY UPLC I-Class 超高效液

相色谱系统,色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm \times 2.1 mm,1.8 μ m),以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A,甲醇为流动相 B,梯度洗脱(0~1 min,80%A;1~11 min,80%A \rightarrow 0%A;11~15 min,0%A;15~15.1 min,0%A \rightarrow 80%A;15.1~17 min,80%A),流速为 0.3 mL \cdot min $^{-1}$,柱温为 45 $^{\circ}$ C,进样量为 2.0 μ L。

2.2 质谱条件

采用 Waters XEVO TQ XS 串联四极杆质谱系统,电喷雾离子源,正、负离子模式多反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)采集,正离子离子源电压为 3.0 kV,负离子离子源电压为 2.0 kV,去溶剂温度为 550 $^{\circ}$ C,去溶剂气体流速为 1 000 L \cdot h $^{-1}$,锥孔气体流速为 150 L \cdot h $^{-1}$ 。各成分的质谱采集参数见表 1。

表 1 熨敷颈腰痛酊中 9 个被测成分的质谱检测参数

Tab. 1 MS parameters of the 9 measured components in Tongfu Jingyaotong tincture

成分 (component)	保留时间 (retention time)/min	离子模式 (ion mode)	MRM	锥孔电压 (cone voltage)/V	碰撞能 (collision energy)/V
葛根素(puerarin)	4.18	-	415.096 > 267.106	30	32
槲皮素(querceetin)	5.89	+	302.954 > 69.019	20	45
芦丁(rutin)	5.89	+	611.332 > 303.352	30	20
大豆苷元(daidzein)	7.03	+	255.018 > 91.043	24	36
木犀草素(luteolin)	7.59	-	285.232 > 133.298	66	32
山柰酚(kaempferol)	8.02	-	285.1 > 93.025	15	35
芹菜素(apigenin)	8.19	-	269.223 > 117.291	36	36
芒柄花黄素(formononetin)	8.55	+	269.16 > 197.358	18	36
芫花素(genkwanin)	9.57	+	285.032 > 242.072	50	30

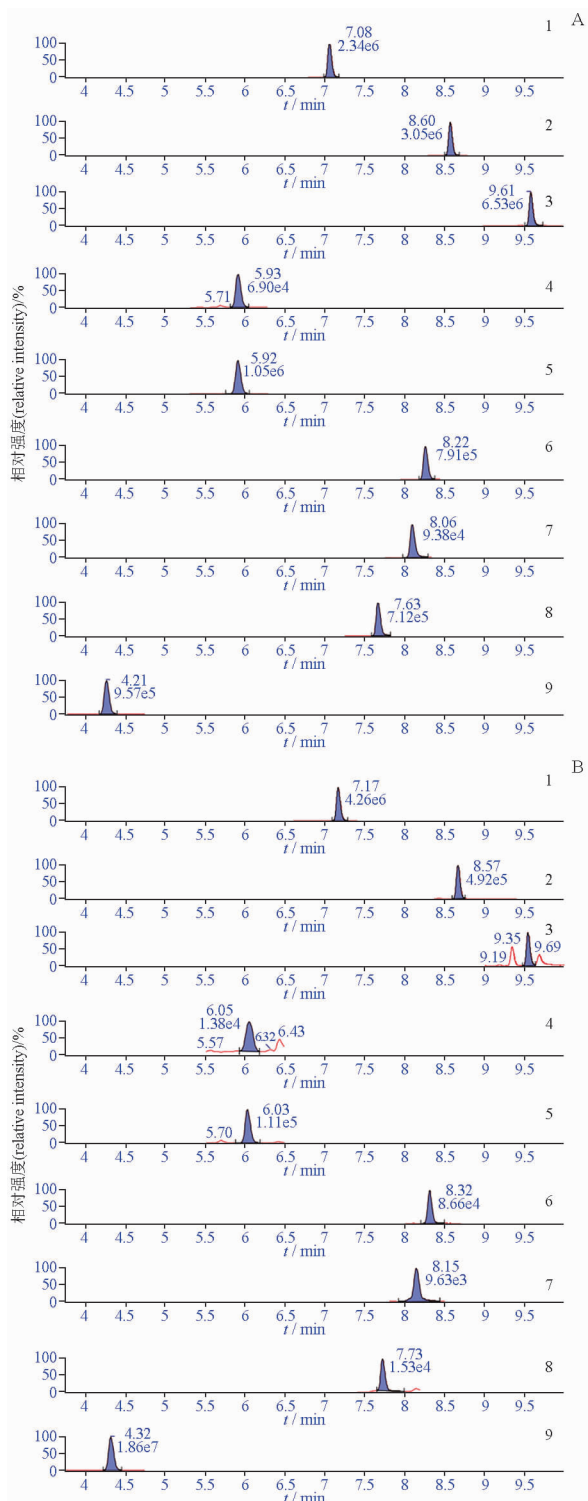
2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液 精密称取大豆苷元、芒柄花黄素、芫花素、槲皮素、芦丁、芹菜素、山柰酚、木犀草素、葛根素的对照品各 10 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇-水(1:1)5 mL 充分溶解,定容至 10 mL,制成质量浓度分别为 1.12、1.07、0.98、1.05、0.96、1.01、1.14、0.94、1.02 mg \cdot mL $^{-1}$ 的对照品储备液。取上述对照品储备液各 1 mL,置于同一 20 mL 量瓶中,加 50% 的甲醇水溶液稀释至刻度,摇匀,得到大豆苷元、芒柄花黄素、芫花素、槲皮素、芦丁、芹菜素、山柰酚、木犀草素、葛根素的质量浓度分别为 56.00、53.50、49.00、52.50、48.00、50.50、57.00、47.00、51.00 μ g \cdot mL $^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3.2 供试品溶液 精密量取 100 μ L 样品,置于 1.5 mL 离心管中,加入甲醇-水(1:1)900 μ L,涡旋混匀 10 min 后,在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min。再用移液枪移取 100 μ L 上清,置于 1.5 mL 离心管中,加入甲醇-水(1:1)700 μ L,涡旋混匀 10 min 后,在 4 $^{\circ}$ C、12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min。取上清液 200 μ L,置于带 250 μ L 内插管的进样瓶中,进行质谱检测。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 精密吸取“2.3.1”项下配制的对照品溶液和“2.3.2”项下制备的供试品溶液、50% 甲醇水溶液分别进样,色谱图见图 1,各成分均未检测到干扰性成分,表明该方法专属性良好。



1. 大豆苷元 (daidzein) 2. 芒柄花黄素 (formononetin) 3. 芫花素 (genkwanin) 4. 槲皮素 (quercetin) 5. 芦丁 (rutin) 6. 芹菜素 (apigenin) 7. 山柰酚 (kaempferol) 8. 木犀草素 (luteolin) 9. 葛根素 (puerarin)

图1 对照品溶液(A)和供试品溶液(B)的MRM质谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of reference standards (A) and the samples (B)

2.4.2 线性关系考察 精密吸取“2.3.1”项下配制的对照品溶液,逐级稀释,以 $S/N = 10$ 时被测定成分的浓度为定量限 (LOQ), $S/N = 3$ 时被测定成分的浓度为检测限 (LOD)。依次进样,以各成分的质量浓度 X 为横坐标、峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线,结果见表2,各成分的线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 精密吸取“2.3.1”项下配制的中浓度 ($100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的对照品溶液,连续进样6次,测得大豆苷元、芒柄花黄素、芫花素、槲皮素、芦丁、芹菜素、山柰酚、木犀草素和葛根素峰面积的RSD分别是0.63%、0.40%、1.2%、1.4%、1.3%、1.3%、13%、0.66%、0.59%,RSD均小于2%,表明该方法具有良好的精密度。

2.4.4 重复性试验 取同一批号(20220101)样品6份,按“2.3.2”项方法配制供试品溶液,依次进样,计算得大豆苷元、芒柄花黄素、芫花素、槲皮素、芦丁、芹菜素、山柰酚、木犀草素和葛根素的平均含量分别为 15.32 、 1.48 、 0.06 、 1.52 、 0.78 、 0.80 、 0.66 、 0.14 、 $196.79 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,各成分RSD分别为0.51%、1.4%、3.6%、4.0%、1.9%、2.1%、3.1%、1.6%、0.77%,RSD均小于5%,表明该方法具有良好的重复性。

2.4.5 稳定性试验 取同一批号(20220101)样品6份,按“2.3.2”项方法制备供试品溶液,等分为6份,分别于室温下放置0、2、4、8、12、24 h后测定,记录峰面积,计算得大豆苷元、芒柄花黄素、芫花素、槲皮素、芦丁、芹菜素、山柰酚、木犀草素和葛根素峰面积的RSD分别为0.42%、0.76%、2.2%、4.3%、1.7%、1.8%、1.0%、1.2%、0.92%,RSD均小于5%,表明供试品溶液于室温下放置24 h内保持稳定。

2.4.6 加样回收率试验 精密量取已知目标成分含量的鼯敷颈腰痛酊样品溶液6份,按照目标成分约100%的含量精密加入相应质量的对照品溶液,按照“2.3.2”项方法制备供试品溶液并进行测定,记录峰面积。计算加样回收率及RSD,结果见表3,平均回收率范围为82.7%~111.8%,RSD < 6%,表明该方法准确。

2.5 样品含量测定

取6批样品,分别按“2.3.2”项方法制备供试品溶液并进行测定,记录峰面积,计算各成分含量,结果见表4。

表 2 焮敷颈腰痛酊中 9 个成分的线性关系方程和定量限、检测限

Tab. 2 Linear equations, LOQs and LODs of 9 components in Tongfu Jingyaotong tincture

成分 (component)	线性方程 (linear equation)	<i>r</i>	线性范围 (liner range)/(ng · mL ⁻¹)	LOQ/ (pg · mL ⁻¹)	LOD/ (pg · mL ⁻¹)
葛根素 (puerarin)	$Y = 8.857 \times 10^3 X + 43.04$	0.998 0	0.11 ~ 2 240.00	10.00	3.00
槲皮素 (quercetin)	$Y = 0.714 0 \times 10^3 X - 31.63$	0.998 0	0.11 ~ 5 350.00	10.00	3.00
芦丁 (rutin)	$Y = 1.052 \times 10^4 X + 0.634 6 \times 10^3$	0.997 0	0.10 ~ 4 900.00	10.00	3.00
大豆苷元 (daidzein)	$Y = 2.305 \times 10^4 X - 65.35$	0.995 0	0.11 ~ 1 050.00	10.00	3.00
木犀草素 (luteolin)	$Y = 7.035 \times 10^3 X + 1.111 \times 10^3$	0.996 0	0.10 ~ 1 920.00	10.00	3.00
山柰酚 (kaempferol)	$Y = 0.898 0 \times 10^3 X + 0.517 4 \times 10^3$	0.995 0	0.10 ~ 2 020.00	10.00	3.00
芹菜素 (apigenin)	$Y = 7.686 \times 10^3 X + 0.432 0 \times 10^3$	0.995 0	0.11 ~ 1 140.00	10.00	3.00
芒柄花黄 (formononetin)	$Y = 2.884 \times 10^4 X + 0.866 5 \times 10^3$	0.992 0	0.09 ~ 1 880.00	9.00	3.00
芫花素 (genkwanin)	$Y = 6.177 \times 10^4 X + 2.276 \times 10^3$	0.998 0	0.10 ~ 1 020.00	10.00	3.00

表 3 焮敷颈腰痛酊中 9 个成分加样回收率试验 ($n=6$)

Tab. 3 Recovery test of 9 components in Tongfu Jingyaotong tincture

成分 (component)	原始量 (original amount)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量 (added amount)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量 (measured amount)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/ %	RSD/ %
大豆苷元 (daidzein)	17.97	18.00	34.22	90.2	92.9	2.4
	17.97	18.00	34.47	91.7		
	17.97	18.00	34.50	91.8		
	17.97	18.00	34.69	92.9		
	17.97	18.00	35.07	95.0		
	17.97	18.00	35.29	96.2		
芒柄花黄素 (formononetin)	1.67	1.65	3.25	96.2	99.9	5.0
	1.67	1.65	3.24	95.3		
	1.67	1.65	3.27	97.2		
	1.67	1.65	3.29	98.3		
	1.67	1.65	3.43	106.7		
	1.67	1.65	3.41	105.8		
芫花素 (genkwanin)	0.08	0.08	0.15	96.9	97.3	3.53
	0.08	0.08	0.16	101.5		
	0.08	0.08	0.15	96.9		
	0.08	0.08	0.15	92.7		
	0.08	0.08	0.16	101.0		
	0.08	0.08	0.15	94.8		
槲皮素 (quercetin)	1.34	1.30	2.79	111.4	108.9	2.0
	1.34	1.30	2.76	109.2		
	1.34	1.30	2.72	105.9		
	1.34	1.30	2.79	111.1		

表 3(续)

成分 (component)	原始量 (original amount)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加入量 (added amount)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	测得量 (measured amount)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/ %	RSD/ %
芦丁(rutin)	1.34	1.30	2.74	107.4	103.7	5.4
	1.34	1.30	2.75	108.4		
	0.70	0.70	1.38	97.5		
	0.70	0.70	1.42	102.9		
	0.70	0.70	1.49	113.21		
	0.70	0.70	1.42	103.5		
	0.70	0.70	1.39	99.1		
芹菜素(apigenin)	0.70	0.70	1.44	106.2	111.8	3.3
	0.98	1.05	2.15	111.1		
	0.98	1.05	2.17	112.8		
	0.98	1.05	2.17	113.2		
	0.98	1.05	2.21	117.0		
	0.98	1.05	2.09	106.0		
	0.98	1.05	2.14	110.5		
山柰酚(kaempferol)	0.90	0.90	1.84	104.5	104.2	2.6
	0.90	0.90	1.81	100.6		
	0.90	0.90	1.88	108.9		
	0.90	0.90	1.84	104.4		
	0.90	0.90	1.83	102.7		
	0.90	0.90	1.84	104.2		
	0.90	0.90	1.84	104.2		
木犀草素(luteolin)	0.15	0.18	0.33	100.2	104.8	3.0
	0.15	0.18	0.34	102.3		
	0.15	0.18	0.34	104.8		
	0.15	0.18	0.34	105.2		
	0.15	0.18	0.35	107.8		
	0.15	0.18	0.35	108.3		
	0.15	0.18	0.35	108.3		
葛根素(puerarin)	190.79	190.50	345.37	81.1	82.7	2.7
	190.79	190.50	343.89	80.4		
	190.79	190.50	352.88	85.1		
	190.79	190.50	346.34	81.7		
	190.79	190.50	347.72	82.4		
	190.79	190.50	347.72	82.4		
	190.79	190.50	354.31	85.83		

3 讨论

3.1 检测技术的选择

HPLC 法是药物制剂成分测定的常用方法,但对于多组分的制剂检测,同时检测的难度较大,需要使

用 DAD 二极管阵列检测器筛选各自合适的检测波长,早年质谱前端连接的都是 HPLC,但近些年发现 UPLC 有更好的分离效果,更适合作为质谱前端的分离设备^[15]。预试验阶段曾尝试以 HPLC 法对烇敷

表 4 熨敷颈腰痛酊中 9 个成分的含量测定结果

Tab. 4 Determination results of 9 components in Tongfu Jingyaotong tincture

批号 (lot No.)	含量(content)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)								
	大豆苷元 (daidzein)	芒柄花黄素 (formononetin)	芫花素 (genkwanin)	槲皮素 (quercetin)	芦丁 (rutin)	芹菜素 (apigenin)	山柰酚 (kaempferol)	木犀草素 (luteolin)	葛根素 (puerarin)
20220101	14.80	1.36	0.06	1.54	0.84	0.90	0.81	0.16	167.95
20220301	15.91	1.44	0.06	1.54	0.82	0.88	0.72	0.14	194.56
20220701	8.47	0.64	0.03	2.15	1.11	0.48	0.21	0.10	225.98
20221001	8.46	0.62	0.03	2.22	1.14	0.48	0.20	0.10	227.75
20230101	17.52	1.64	0.07	1.34	0.71	0.99	0.85	0.15	189.38
20230401	17.97	1.67	0.08	1.34	0.70	0.98	0.90	0.15	190.79

颈腰痛酊进行定量分析,结果发现复方中各成分含量差异较大,究其原因 HPLC 法无法达到同法检测,因此采用分离能力高、选择能力强、灵敏度精准的 UPLC-MS/MS 技术进行筛选、检测^[16]。

3.2 提取方法的选择

实验过程中将熨敷颈腰痛酊样品分别稀释 10、50、80、100 和 150 倍后上机检测,最后发现 80 倍浓度时所有待测成分都能够各自的线性范围内显示,所以对熨敷颈腰痛酊样品的提取方法规定为以 50% 的甲醇水溶液稀释至 80 倍浓度。

3.3 检测参数的设置

测试过程中对流动相梯度进行了优化,结果表明梯度条件甲醇从 20% 升高到 100% 的时间越长,各色谱峰的分离会越好,但是槲皮素和芦丁 2 个成分在各种时间的梯度洗脱下都难使其保留时间分离,由于使用的是质谱检测,保留时间虽然区分不开,但是 2 个成分的检测离子对不同:槲皮素是 302.954 > 69.019,芦丁是 611.332 > 303.352,2 个成分的提取离子流图不互相干扰,因此 2 个成分的含量测定不受影响。检测结果中,样品批号 20220101 和 20220301 结果较为相似,批号 20220701 和 20221001 结果较为相似,20230101 和 20230401 结果较为相似,这可能与熨敷颈腰痛酊中各中药原料原产地、采收季节和炮制工艺的差异有关。

3.4 小结

本研究建立的同时测定熨敷颈腰痛酊中 9 个成分大豆苷元、芒柄花黄素、芫花素、槲皮素、芦丁、芹菜素、山柰酚、木犀草素、葛根素的 UPLC-MS/MS 方法,具备简单易操作,准确效率高,专属性强,精密度高,重复性好,可作为熨敷颈腰痛酊质量评价参考。

参考文献

- [1] 兰晓飞. 熨敷合剂热敷联合仙灵骨葆胶囊治疗 OVCF 患者 PKP 术后残留腰背痛的疗效观察 [D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2018
LAN XF. Observation on Curative Effect of Tongfu Mixture Hot Compress Combined with Xianling Gubao Capsule on Residual Low Back Pain After PKP in Patients with OVCF [D]. Lanzhou: Gansu University of Traditional Chinese Medicine, 2018
- [2] 蔡卓亚, 周自桂, 李萍, 等. 伸筋草化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(2): 297
CAI ZY, ZHOU ZG, LI P, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Herba sinuscens* [J]. Chin Herb Med, 2015, 46(2): 297
- [3] 申鸽, 景大山, 杨飞, 等. 珍珠透骨草 HPLC 指纹图谱及抗炎活性的谱效关系 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 174
SHEN G, JING DS, YANG F, et al. HPLC fingerprint and spectral effect relationship of anti-inflammatory activity of peregrine [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(12): 174
- [4] 赵继荣, 杨文通, 陈文, 等. 威灵仙有效化学成分及镇痛机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9): 9
ZHAO JR, YANG WT, CHEN W, et al. Research progress of effective chemical constituents and analgesic mechanism of *Wilingiaceae* [J]. Chine Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(9): 9
- [5] 史晨旭, 杜佳蓉, 吴威, 等. 葛根化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(12): 2177-2195
SHI CX, DU JR, WU W, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Pueraria* [J]. Mod Chin Med, 2021, 23(12): 2177
- [6] 钱纯果, 金路, 朱龙平, 等. 桂枝中化学成分及抗肿瘤和抗炎活性研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 31
QIAN CG, JIN L, ZHU LP, et al. Study on chemical constituents and anti-tumor and anti-inflammatory activities of *Cassia twig* [J]. Chin Herb Med, 2022, 53(1): 31
- [7] 邹妍, 鄢海燕. 中药木瓜的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2019, 46(7): 507

- ZOU Y, YAN HY. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of Papaya [J]. *J Int Pharm Res*, 2019, 46(7): 507
- [8] 高志杰, 朱彤彤, 牛新茹, 等. 鸡血藤化学成分及药理活性研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(4): 67
- GAO ZJ, ZHU TT, NIU XR, *et al.* Research progress of chemical constituents and pharmacological activities of *Caulis spatholobi* [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2022, 24(4): 67
- [9] 童鑫, 洪吟秋, 张涛, 等. 西红花柱头化学成分及其抗炎活性 [J]. *中成药*, 2022, 44(4): 1142
- TONG X, HONG YQ, ZHANG T, *et al.* Chemical composition and anti-inflammatory activity of stigma on saffron [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(4): 1142
- [10] 2020 年中华人民共和国药典. Vol I [S]. 2020:445
- ChP 2020. Vol I [S]. 2020:445
- [11] 张婉婉, 刘懿萌, 解爽, 等. 液质联用技术同时测定金钱草颗粒中 4 种成分的含量 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2023, 40(9): 1158
- ZHANG WW, LIU YM, XIE S, *et al.* Simultaneous determination of four components in the granules by LC-MS [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2023, 40(9): 1158
- [12] 赵继荣, 薛旭, 陈文, 等. 经皮激光汽化减压术联合脊柱调衡手法及熨敷合剂治疗腰椎间盘突出症的疗效观察 [J]. *中医药导报*, 2019, 25(7): 71
- ZHAO JR, XUE X, CHEN W, *et al.* Effect of percutaneous laser vaporization decompression combined with spinal balancing manipulation and Tongfu compress in the treatment of lumbar disc herniation [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 25(7): 71
- [13] 邢涛, 赵继荣. PLDD 联合杜仲腰痛丸及熨敷合剂治疗腰椎间盘突出症的临床疗效观察 [J]. *中国激光医学杂志*, 2020, 29(2): 73
- XING T, ZHAO JR. Clinical effect of PLDD combined with Duzhong Waitong Pill and Tongfu mixture in the treatment of lumbar disc herniation [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 29(2): 73
- [14] 杨德龙, 赵继荣, 陈文, 等. 熨敷颈腰痛贴治疗腰椎间盘突出症临床研究 [J]. *河南中医*, 2023, 43(3): 424
- YANG DL, ZHAO JR, CHEN W, *et al.* Clinical study on treatment of lumbar disc herniation by applying Tongfu Jingyao patch [J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2023, 43(3): 424
- [15] 师艺玮, 王洪玲, 黄慧莲, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定经典方剂槐花散中 7 个成分含量 [J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(2): 219
- SHI YW, WANG HL, HUANG HL, *et al.* Simultaneous determination of 7 components in Huaihua Powder by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(2): 219
- [16] ZHAO J, WANG X, WANG Y, *et al.* UPLC-MS/MS profiling, antioxidant and anti-inflammatory activities, and potential health benefits prediction of phenolic compounds in Hazel leaf [J]. *Front Nut*, 2023, 10:1092071

(本文于 2023 年 10 月 27 日收到)