

[科研报道]

HPLC-MS 法同时测定锦红片中 8 种活性成分的含量

余奎¹, 梁晓强¹, 胡诚², 戚大川^{1*}, 张静喆^{1*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 2. 上海中医药大学科技实验中心, 上海 201203)

摘要: **目的** 建立 HPLC-MS 法同时测定锦红片中咖啡酸、伞形花内酯、槲皮素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量。**方法** 分析采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相 0.2% 甲酸-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 °C; 电喷雾离子源; 正离子扫描; 多反应监测模式。**结果** 8 种活性成分在各自范围内线性关系良好 ($r>0.990$), 平均加样回收率 97.6%~102.6%, RSD 2.7%~5.6%。**结论** 该方法具有高分离度、高灵敏度、高选择性的特点, 可为锦红片质量控制提供参考依据。

关键词: 锦红片; 活性成分; 含量测定; HPLC-MS

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)02-0557-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.02.029

急性胆道感染是一种由胆道梗阻引发的细菌感染性疾病, 严重者可出现胆道出血、穿孔、中毒性休克等并发症^[1-2]。据统计, 全国有约 10%~15% 的人群患有胆道结石, 其中急性胆道感染发病率为 1%~3%^[3], 《急性胆道系统感染的诊断和治疗指南》(2021 版)^[3]指出, 其西医治疗手段主要包括药物、引流、手术等, 但可能存在滥用抗生素、手术操作难度大并易引发并发症、技术和设备要求高等问题^[4-7]。中药复方具有多成分、多靶点等特点, 能更全面地调节机体生理功能, 在治疗某些疾病时具有独特优势^[8]。

锦红片为上海中医药大学附属龙华医院院内制剂, 是中医专家顾伯华先生和徐长生先生根据“六腑以通为用”原理, 在大黄牡丹汤基础上研制而成, 由大黄、大血藤和蒲公英 3 味中药组成, 具有清热解毒、行气通腑、活血消肿作用, 用于急性胆道感染的辅助治疗已近五十余年, 临床效果良好^[9]。但目前对于锦红片的研究大多集中在药理作用、临床疗效方面, 尚未涉及其指标成分^[8-11], 这也是中药质量控制体系的关键环节之一^[12]。因此, 本实验建立 HPLC-MS 法同时测定锦红片中咖啡酸、伞形花内酯、槲皮素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量, 以期为建立该制剂质量控制体系提供参考, 也为其临床用

药提供科学依据。

1 材料

1.1 试剂与药物 咖啡酸 (批号 23102531)、伞形花内酯 (批号 23102635)、槲皮素 (批号 23090731)、芦荟大黄素 (批号 23071736)、大黄酸 (批号 24042335)、大黄素 (批号 24032931)、大黄酚 (批号 24050842)、大黄素甲醚 (批号 24050841)、卡马西平 (批号 24061044) 对照品均购自上海源叶生物科技有限公司 (纯度 > 98%)。锦红片 (批号 2304001、2310001、2404001) 均购自上海宝龙药业股份有限公司。甲醇 (H1303407345)、乙腈 (JB129430) (色谱纯) 均购自德国 Merck 公司; 甲酸 (20230921) 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器 XPE26 电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); SCRC-H10L 超声波清洗器、MV54 多管涡旋混匀仪 (国药集团化学试剂有限公司); Milli-Q Advantage 超纯水系统 (德国 Millipore 公司); Eppendorf 5427R 微量离心机 (德国 Eppendorf 公司); Triple Quad™ 5500 液相色谱-质谱联用仪 (美国 AB SCIEX 公司)。

2 方法与结果

2.1 对照品、内标溶液制备 精密称取咖啡酸、伞形花内酯、槲皮素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚对照品适量, 置于 10 mL

收稿日期: 2025-09-19

基金项目: 上海市卫生健康委员会医学新技术研究与转化种子计划 (2024ZZ2059); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82004372)

作者简介: 余奎 (1985—), 男, 硕士, 副主任医师, 从事肝胆胰疾病、围手术期和外科感染性疾病基础、临床研究。E-mail: yukuitcm@126.com

* 通信作者: 戚大川 (1973—), 男, 博士, 硕士生导师, 从事肝胆胰疾病基础、临床研究。E-mail: alexqi7@163.com
张静喆 (1955—), 男, 硕士, 博士生导师, 从事肝胆胰疾病基础、临床研究。E-mail: zjzzq@sina.com

量瓶中，甲醇定容，稀释成质量浓度分别为 13.80、8.480、23.70、57.25、99.20、98.75、336.4、86.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液，并按一定比例制成标准曲线溶液。精密称取卡马西平对照品适量，甲醇制成质量浓度为 10.57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标溶液。精密吸取不同质量浓度标准曲线溶液各 10 μL ，加入 90 μL 甲醇和 10 μL 内标溶液，混匀后进样分析。

2.2 供试品溶液制备 取本品 20 片，研碎，混匀，取约 0.3 g，精密称定，加入 15 mL 甲醇，超声提取 15 min，甲醇补足减失的质量，精密量取 1 mL，转移至离心管中，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，即得。精密吸取 10 μL ，加入 90 μL 甲醇及 10 μL 内标溶液，以期减少质谱仪器信

号波动对检测结果的影响，混匀后进样分析。

2.3 HPLC-MS 分析条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm)；流动相 0.2% 甲酸 (A) -乙腈 (B)，梯度洗脱 (0~2 min, 60% A；2~5 min, 60%~44% A；5~10 min, 44%~5% A；10~13 min, 5% A)；体积流量 0.3 mL/min；柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ ；进样量 1 μL ；正离子扫描；多反应监测 (MRM) 模式；离子化电压 (IS) 5 500 V；离子源温度 (TEM) 600 $^{\circ}\text{C}$ ；喷雾气 (GS1) 50 psi (1 psi=0.133 kPa)；辅助加热气 (GS2) 50 psi；气帘气 (CUR) 30 psi；碰撞气 (CAD) 9 psi；入口电压 (EP) 10 V；出口电压 (CXP) 6 V；驻留时间 40 ms。其他参数见表 1。

表 1 各活性成分质谱参数

活性成分	t_{R}/min	母离子 m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^{+}$	子离子 m/z	子离子裂解规律	去簇电压/V	碰撞能量/V
咖啡酸	2.90	181.1	162.9	[$\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}$] $^{+}$	71	15
伞形花内酯	3.39	163.2	107.0	[$\text{M}+\text{H}-\text{CO}-\text{CO}$] $^{+}$	110	31
槲皮素	3.95	303.0	285.0	[$\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}$] $^{+}$	134	35
芦荟大黄素	5.24	271.1	225.1	[$\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}$] $^{+}$	120	35
大黄酸	8.38	285.3	213.2	[$\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2-\text{CO}$] $^{+}$	124	39
大黄素	6.84	271.2	225.1	[$\text{M}+\text{H}-\text{HCOOH}$] $^{+}$	135	42
大黄酚	7.80	255.1	209.1	[$\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2-\text{H}_2$] $^{+}$	122	40
大黄素甲醚	8.38	285.2	242.0	[$\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3-\text{CO}$] $^{+}$	130	43
卡马西平(内标)	4.04	237.1	194.2	[$\text{M}+\text{H}-\text{CONH}_2$] $^{+}$	110	25

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 取空白基质 (甲醇) 及对照品、供试品、阴性样品溶液适量，在“2.3”项条件下进样测定，结果见图 1。由此可知，各活性成分与其他化合物之间不存在干扰，表明该方法专属性良好。

2.4.2 线性关系考察 精密吸取对照品溶液适量，甲醇稀释成系列质量浓度，在“2.3”项条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X)，对照品、内标峰面积比值为纵坐标 (Y) 进行回归，并计算最低定量限，结果见表 2，可知各活性成分在各自范围内线性关系良好。

表 2 各活性成分线性关系

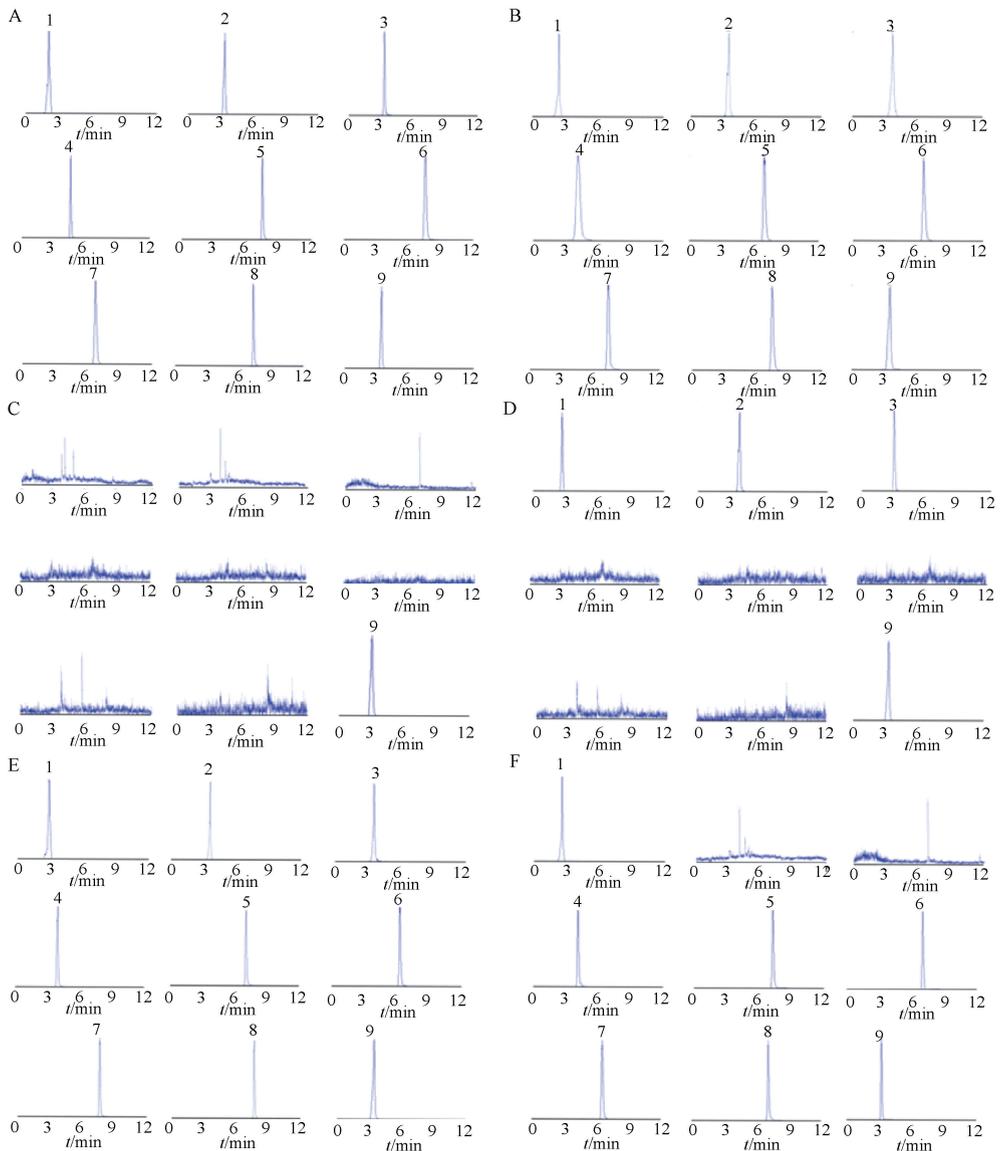
活性成分	回归方程	r	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	最低定量限/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
咖啡酸	$Y=0.002\ 60X+0.034\ 37$	0.994 48	0.013 80~1.380	13.80
伞形花内酯	$Y=0.012\ 11X+0.140\ 06$	0.999 74	0.008 500~0.848 0	8.500
槲皮素	$Y=4.648\ 75\times 10^{-4}X+0.010\ 86$	0.992 77	0.023 7~2.370	23.70
芦荟大黄素	$Y=8.169\ 47\times 10^{-4}X+0.047\ 38$	0.993 22	0.057 25~5.725	57.25
大黄酸	$Y=0.001\ 16X+0.124\ 77$	0.995 68	0.099 20~9.920	99.20
大黄素	$Y=4.289\ 33\times 10^{-4}X+0.014\ 31$	0.999 30	0.098 75~9.875	98.75
大黄酚	$Y=0.001\ 27X+0.186\ 10$	0.998 70	0.336 4~33.64	336.4
大黄素甲醚	$Y=0.001\ 46X+0.133\ 02$	0.994 56	0.086 50~8.650	86.50

2.4.3 精密度试验 取同一份对照品溶液，在“2.3”项条件下进样测定 6 次，测得咖啡酸、伞形花内酯、槲皮素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 1.7%、3.8%、1.2%、1.4%、1.0%、1.0%、1.8%、3.8%，表明仪器精密度良好。

件下进样测定，测得咖啡酸、伞形花内酯、槲皮素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚峰面积 RSD 分别为 2.3%、2.7%、3.0%、2.7%、3.2%、1.2%、2.7%、1.8%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.4.4 稳定性试验 取同一份供试品溶液，于 0、2、4、6、10、12、18、20、24 h 在“2.3”项条

2.4.5 重复性试验 精密称取本品 (批号 2404001) 适量，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下进样测定，测得咖啡酸、伞形花



注：A~F 分别为对照品、供试品、空白基质、缺大黄阴性样品、缺大血藤阴性样品、缺蒲公英阴性样品。

1. 咖啡酸 2. 伞形花内酯 3. 槲皮素 4. 芦荟大黄素 5. 大黄酸 6. 大黄素 7. 大黄酚 8. 大黄素甲醚 9. 卡马西平

图1 各活性成分 MRM 色谱图

内酯、槲皮素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚含量 RSD 分别为 0.8%、3.3%、3.7%、1.2%、2.5%、1.4%、1.7%、1.3%，表明该方法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 精密吸取各活性成分含量已知的本品（批号 2410001）6 份，每份 0.5 mL，按 100% 水平加入对照品溶液，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下进样测定，计算回收率。结果，咖啡酸、伞形花内酯、槲皮素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚平均加样回收率分别为 102.4%、97.8%、98.1%、97.6%、102.1%、102.6%、101.8%、98.8%，RSD 分别为 4.6%、4.4%、4.5%、5.6%、4.4%、

3.1%、3.4%、2.7%。

2.5 样品含量测定 取 3 批样品，按“2.2”项下方法制备供试品溶液，在“2.3”项条件下进样测定，计算含量，结果见表 3。

表 3 各活性成分含量测定结果 (μg/g 生药, n=3)

批号	2304001	2310001	2404001
咖啡酸	46.154	43.068	40.412
伞形花内酯	4.214	2.994	3.539
槲皮素	17.052	15.614	14.763
芦荟大黄素	247.142	261.895	240.775
大黄酸	436.247	408.709	385.587
大黄素	325.580	304.309	289.614
大黄酚	1 107.367	1 212.596	1 085.636
大黄素甲醚	414.538	373.841	386.412

3 讨论

锦红片中大黄主要成分(如大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等)对多种细菌具有较强的抑制作用,而且不易引起机体耐药性^[13],同时该药材还可调节炎性介质的产生和释放,从而抑制炎症反应^[14];大血藤中的酚酸类、木脂素类化合物含量较高^[15],其中咖啡酸可通过抑制促炎细胞因子生成来调节免疫反应,从而减轻炎症^[16];蒲公英有效成分包括黄酮类、香豆素类、酚酸类,以伞形花内酯、咖啡酸、槲皮素含量较高^[17-18],并且槲皮素可通过调节氧化应激和炎症反应来维持生物防御系统的正常生理运作^[19-20],而伞形花内酯能有效降低促炎细胞因子水平,从而抑制氧化损伤和炎症反应^[21],同时对细菌有显著的抑制作用^[22]。由于上述成分均为锦红片药效物质基础,故可作为其质量控制指标。

本实验首先考察了流动相,发现以0.2%甲酸-乙腈洗脱时各活性成分色谱峰峰形最佳。再分别考察了提取溶剂(50%甲醇、75%甲醇、甲醇)、提取时间(15、30、60 min),以峰面积为指标,最终确定为甲醇超声提取15 min。

4 结论

本实验建立UPLC-MS/MS法同时测定锦红片中咖啡酸、伞形花内酯、槲皮素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的含量,该方法快速简便,重复性好,方法学考察结果符合定量分析验证指导原则,可用于完善该制剂质量控制体系。

参考文献:

[1] 杨贻金,许松,邓文娇,等.超声引导下经皮肝胆道穿刺置管引流在急性胆道感染治疗中的应用[J].中国现代医生,2022,60(8):99-102.

[2] Gupta V, Abhinav A, Vuthaluru S, et al. The multifaceted impact of gallstones: Understanding complications and management strategies[J]. *Cureus*, 2024, 16(6): e62500.

[3] 中华医学会外科学分会胆道外科学组.急性胆道系统感染的诊断和治疗指南(2021版)[J].中华外科杂志,2021,59(6):422-429.

[4] Yoon J H, Paik K Y, Chung H Y, et al. Clinical implication of bacteremia in moderate to severe acute cholecystitis undergone cholecystectomy following cholecystectomy[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 11864.

[5] Liu Y Q, Cai X, Zheng Z X, et al. Increased difficulty and complications of delayed laparoscopic cholecystectomy following percutaneous transhepatic gallbladder drainage in acute cholecystitis: a retrospective study[J]. *BMC Surg*, 2023, 23(1): 277.

[6] Fugazza A, Khalaf K, Pawlak K M, et al. Use of endoscopic ultrasound-guided gallbladder drainage as a rescue approach in cases of unsuccessful biliary drainage[J]. *World J Gastroenterol*, 2024, 30(1): 70-78.

[7] Nassar A H M, Sallam M, Khan K S, et al. A proposed difficulty grading system for laparoscopic bile duct exploration: benefits to clinical practice, training and research[J]. *Surg Endosc*, 2023, 37(9): 7012-7023.

[8] 王勇,李春,仇琪,等.中药复方多成分多靶点协同增效药理药效评价体系[J].中国科学(生命科学),2016,46(8):1029-1032.

[9] 高炬,张静喆,朱培庭.锦红片治疗急性胆道感染的临床研究[J].上海中医药大学学报,2002,16(3):42-43.

[10] 王志刚,朱培庭,张静喆,等.锦红片对急性胆道感染大鼠细胞因子调节和肠黏膜屏障保护作用的实验研究[J].上海中医药杂志,2001,35(4):39-42.

[11] 袁作彪,张红英,王志刚,等.锦红片对实验性急性胆道感染大鼠血清细胞因子IL-6和IL-2含量的影响[J].上海中医药大学学报,2000,14(3):45-47.

[12] 李娜,汪潇潇,夏婕妤,等.消核糖浆的指纹图谱及含量测定研究[J].中国药房,2024,35(12):1457-1462.

[13] 刘玲丽,周紫芳,胡婕妤,等.大黄蒽醌类化合物抑菌作用研究进展[J].杭州师范大学学报(自然科学版),2021,20(1):54-58.

[14] 刘桂元,罗利亚,李晓,等.大黄蒽醌类化合物抗炎作用研究进展[J].中成药,2023,45(11):3693-3701.

[15] 汤建,赵康琦,朱锐灵,等.红藤化学成分的研究进展[J].中国野生植物资源,2020,39(7):33-38.

[16] Zielinska D, Zielinski H, Laparra-Llopis J M, et al. Caffeic acid modulates processes associated with intestinal inflammation[J]. *Nutrients*, 2021, 13(2): 554.

[17] 石爱文,姚佳靖,王庆,等.蒲公英化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物预测分析[J].中华中医药学刊,2024,42(9):38-45;259.

[18] 陈倩.蒲公英不同部位多酚类物质的变化及其抑菌作用研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2023.

[19] Nguyen T, Bhattacharya D. Antimicrobial activity of quercetin: An approach to its mechanistic principle[J]. *Molecules*, 2022, 27(8): 2494.

[20] Shi T L, Bian X Y, Yao Z X, et al. Quercetin improves gut dysbiosis in antibiotic-treated mice[J]. *Food Funct*, 2020, 11(9): 8003-8013.

[21] Abdel-Wahab B A, Alkahtani S A, Alqahtani A A, et al. Umbelliferone ameliorates ulcerative colitis induced by acetic acid via modulation of TLR4/NF- κ B-p65/iNOS and SIRT1/PPAR γ signaling pathways in rats[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29(25): 37644-37659.

[22] Kasthuri T, Barath S, Nandhakumar M, et al. Proteomic profiling spotlights the molecular targets and the impact of the natural antivirulent umbelliferone on stress response, virulence factors, and the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 998540.