

- [J]. 安徽农业学, 2010, 38(17): 9377-9378.
- [5] 涂显琴, 马超英, 徐寅生, 等. 峨参提取物对肺癌细胞 A549 和 H460 增殖的抑制作用初步观察[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(1): 60-62.
- [6] 涂显琴. 峨参提取物抗肿瘤活性的初步研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2012.
- [7] Wu M J, Jiang Z Z, Duan H Q, et al. Deoxypodophyllotoxin triggers necroptosis in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cell[J]. *Biomed Pharmacother*, 2013, 67(8): 701-706.
- [8] 黄艳娇, 马超英, 马保玉, 等. 峨参内酯对 4 种肿瘤细胞的抑制作用及机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(9): 2133-2135.
- [9] International Organization for Standardization. ISO 18664: 2015 traditional chinese medicine determination of heavy metals in herbal medicines used in traditional chinese medicine[S/OL]. <https://www.iso.org/standard/63150.html>.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [12] 孟冉, 张振凌, 陈晶晶, 等. 中药炮制辅料麦麸有害物质分析[J]. 中成药, 2020, 42(9): 2397-2402.
- [13] 李若诗, 袁会琼, 赵飞亚, 等. 不同产地不同种类重楼药材重金属元素的含量测定及分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(15): 30-36.
- [14] 周浓, 张杰, 郭冬琴, 等. 三峡库区栽培重楼中重金属元素的含量与评价[J]. 环境化学, 2015, 34(9): 1758-1760.

龙胆泻肝丸(片)中当归掺伪情况研究

余荣兰¹, 杨建冬², 袁秀泽¹, 邓杰华², 黄招光², 周云峰^{2*}

(1. 淳安县第一人民医院, 浙江 杭州 311700; 2. 宜春市食品药品检验所, 江西 宜春 336000)

摘要: 目的 建立龙胆泻肝丸(片)中独活成分的测定方法, 考察该市售制剂中当归原料的独活掺伪情况。方法 采用超高效液相串联质谱法(UPLC-MS/MS), Waters ACQUITY UPLC CSH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸-乙腈, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 采用电喷雾离子源(ESI)进行多反应监测(MRM), 扫描方式为正离子模式。结果 49 批龙胆泻肝丸(片)中有 3 批检出蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯, 含量范围分别为 0.005 615~2.601、0.038 43~0.823 2 μg/g。结论 市售龙胆泻肝丸(片)存在当归和独活混用情况。

关键词: 龙胆泻肝丸(片); 当归; 独活; 液质联用; 掺伪

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)11-3739-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.11.063

当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根^[1], 具有补血活血、调经止痛、润肠通便等功效^[2-4]。当归属于食药同源药材, 需求量大^[5], 近年来, 随着野生资源日益枯竭, 当归市场价格水涨船高, 出现了各种混淆品和伪品^[6-8], 其中在当归中掺入价格较为低廉的独活栽培品较为常见。独活为伞形科植物重齿毛当归 *Angelica pubescens* Maxim. f. *biserrata* Shan et Yuan 的干燥根, 具有祛风除湿、通痹止痛的功效, 其与当归同属伞形科, 外观性状差异小, 但临床功效有较大区别, 不可混用。

龙胆泻肝丸(片)是由多种药味组成的复方制剂^[9-10], 具有清肝胆、利湿热的功效, 方中含有当归。鉴于市场上有独活混淆品出现, 其有可能会带入以当归为药味的中药复方制剂中, 有必要开展龙胆泻肝制剂中独活筛查的探索

性研究。当归主要含藁本内酯、阿魏酸、洋川芎内酯 I 等^[11], 独活含有蛇床子素、二氢欧山芹醇当归酸酯、二氢欧山芹醇等成分^[12]。蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯是独活的定量特征成分, 基于此, 本研究建立可测定蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯的超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS), 筛查龙胆泻肝丸(片)中当归原料是否掺杂独活, 为龙胆泻肝制剂整体质量的控制提供科学依据。

1 材料

H-class/xevo 超高效液相色谱-三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司); PL-S60 超声波清洗仪(东莞康士洁超声波科技有限公司)。蛇床子素(批号 110822-201710, 含量 99.5%)、二氢欧山芹醇当归酸酯对照品(批号 111583-

收稿日期: 2022-02-16

基金项目: 江西省药品监督管理局科研项目(2021KY24); 江西省药品监督管理局科研项目(2019JS24)

作者简介: 余荣兰(1988—), 女, 药师, 从事临床药学方向。Tel: 15990011513, E-mail: 739675987@qq.com

* 通信作者: 周云峰(1989—), 男, 主管药师, 硕士, 从事药物分析方向。Tel: 15279874282, E-mail: 768417683@qq.com

201605, 含量 98.6%)。当归对照药材 (批号 120927-201617)、独活对照药材 (批号 120940-201612) 均购自中国食品药品检定研究院; 柴胡 (江西臻药堂药业股份有限公司, 批号 200504, 产地山西)、龙胆 (江西药都堂中药饮片有限公司, 批号 20190301, 产地云南)、黄芩 (江西康齐乐中药材有限公司, 批号 20210401, 产地山西)、栀子 (江西康齐乐中药材有限公司, 批号 20210201, 产地江西)、盐泽泻 (江西宝芝堂中药饮片有限公司, 批号 201001, 产地四川)、木通 (湖南省松龄堂中药饮片有限公司, 批号 201101, 产地湖北)、车前子 (樟树市庆仁中药饮片有限公司, 批号 201905353, 产地江西)、当归 (安徽百岁堂中药饮片有限公司, 批号 210501, 产地甘肃定西)、地黄 (郑州瑞龙制药股份有限公司, 批号 21050405, 产地河南)、炙甘草 (江西康齐乐中药材有限公司, 批号

20201101, 产地甘肃), 由宜春市食品药品检验所杨建东主任中药师鉴定为正品; 龙胆泻肝丸 (片) 共 49 批, 均来源于零售和连锁药店, 生产企业涉及 26 家。实验用水为超纯水; 其他试剂均为质谱级。

2 方法与结果

2.1 质谱和色谱条件 电喷雾离子源; 碰撞气氦气; 脱溶剂气体流量 1 000 L/h; 锥孔气流量 50 L/h; ESI 温度 150 ℃; 脱溶剂气温度 600 ℃; 毛细管电压 0.5 V; 采用多反应检测 (MRM) 模式, 正离子扫描, 其他质谱参数见表 1。Waters ACQUITY UPLC CSH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相 0.1% 甲酸-乙腈, 梯度洗脱 (0~2 min, 25% A; 2~5 min, 25%~75% A; 5~8 min, 75% A; 8~8.5 min, 75%~25% A; 8.5~11 min, 25% A); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 5 μL。

表 1 质谱参数

化合物	分子式	分子量	母离子	子离子	锥孔电压/V	碰撞能量/V
蛇床子素	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	244	245 [M+H] ⁺	103[M+H-C ₄ H ₈ -CH ₂ O-2CO] ⁺	29	36
				131*[M+H-C ₄ H ₈ -CH ₂ O-CO] ⁺	29	27
				189[M+H-C ₄ H ₈] ⁺	29	13
二氢欧山芹醇当归酸酯	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	328	329 [M+H] ⁺	187[M+H-C ₄ H ₇ COOH-C ₃ H ₆] ⁺	16	23
				229*[M+H-C ₄ H ₇ COOH] ⁺	16	8

注: * 为定量离子。

2.2 溶液制备 蛇床子素对照品溶液: 称取蛇床子素对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含蛇床子素 164.0 ng 的溶液, 精密量取 2、5、10、20、25 mL 分别置 50 mL 量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。二氢欧山芹醇当归酸酯对照品溶液: 称取二氢欧山芹醇当归酸酯对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含二氢欧山芹醇当归酸酯 99.59 ng 的溶液, 再精密量取 2、5、10、20、25 mL 分别置 50 mL 量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。供试品溶液: 取本品适量, 片剂、水丸和浓缩丸研细, 大蜜丸加等量硅藻土混匀研细, 取 2 g, 置 100 mL 量瓶中, 加入甲醇约 80 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。自制样品溶液: 称处方比例 (龙胆 120 g、柴胡 120 g、黄芩 60 g、栀子 60 g、泽泻 120 g、木通 60 g、车前子 60 g、当归 60 g、地黄 120 g 和炙甘草 60 g)

自制原粉混合样品约 2 g, 制备样品溶液。阴性样品溶液: 称取不含当归的原粉混合样品约 2 g, 制备阴性样品溶液。当归对照药材溶液: 称取当归对照药材约 2 g, 制备当归对照药材溶液。独活对照药材溶液: 称取独活对照药材约 2 g, 置 100 mL 量瓶中, 加入甲醇约 80 mL, 超声处理 30 min, 放冷, 精密吸取续滤液 0.1 mL 置 100 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.3 线性关系考察 取蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯对照品溶液分别进样测定峰面积, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 见表 2。结果表明, 蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯在各自范围内线性关系良好。以信噪比为 3:1 时的对照品质量浓度作为仪器检测限。

2.4 专属性试验 对阴性样品、对照药材、自制样品、供

表 2 各成分线性关系

化合物	回归方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	检出限/(pg·mL ⁻¹)
蛇床子素	Y=14 918X+60 307	0.998 2	6.560~164.0	1.0
二氢欧山芹醇当归酸酯	Y=1 974.1X-1 739.8	0.999 4	3.984~99.59	3.7

试品、混合对照品溶液依次测定, 见图 1。蛇床子素对照品保留时间约为 6.85 min, 二氢欧山芹醇当归酸酯对照品保留时间约为 7.05 min, 阴性样品、对照药材和正常样品均无色谱峰, 说明样品中各药味对测定无干扰, 专属性良好。

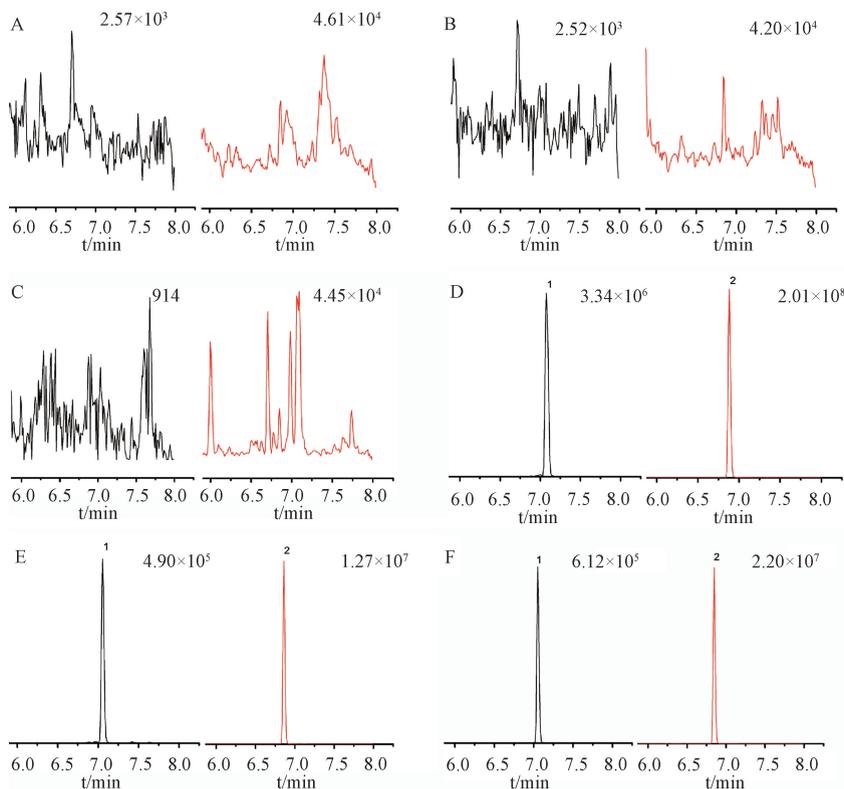
2.5 精密度试验 取混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 蛇床子素峰面积 RSD 为 2.07%, 二氢欧山芹醇当归酸酯峰面积 RSD 为 1.64%, 表明精密度良好。

2.6 重复性试验 取同一批样品 6 份, 每份约 2 g, 测定含量。蛇床子素含量 RSD 为 2.34%, 二氢欧山芹醇当归酸

酯含量 RSD 为 2.75%, 重复性结果符合要求。

2.7 稳定性试验 取供试品溶液, 在 0、1、2、4、8、16 h 测定峰面积。蛇床子素含量 RSD 为 3.16%, 二氢欧山芹醇当归酸酯含量 RSD 为 3.74%, 表明供试品溶液在 16 h 内稳定性良好。

2.8 加样回收率试验 取样品 6 份, 各约 1 g, 置于 100 mL 量瓶中, 精密加入混合对照品溶液 (蛇床子素 573.9 ng/mL、二氢欧山芹醇当归酸酯 149.4 ng/mL) 5 mL, 测定峰面积, 计算回收率, 见表 3。



1. 二氢欧山芹醇当归酸酯 2. 蛇床子素

注：A 为阴性样品，B 为自制样品，C 为当归对照药材，D 为独活对照药材，E 为呈阳性的样品，F 为混合对照品。

图 1 各成分色谱图

表 3 各成分加样回收率试验结果

成分	取样量/g	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	加样回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
蛇床子素	1.012 4	2.633	2.870	5.342	94.39	94.34	3.59
	1.025 4	2.667	2.870	5.441	96.66		
	1.038 7	2.702	2.870	5.296	90.38		
	1.004 7	2.613	2.870	5.201	90.17		
	1.059 8	2.757	2.870	5.516	96.13		
	1.028 7	2.676	2.870	5.497	98.29		
二氢欧山芹醇当归酸酯	1.012 4	0.833 4	0.747 0	1.555	96.60	93.55	2.91
	1.025 4	0.844 1	0.747 0	1.543	93.56		
	1.038 7	0.855 1	0.747 0	1.523	89.41		
	1.004 7	0.827 1	0.747 0	1.510	91.42		
	1.059 8	0.872 4	0.747 0	1.588	95.80		
	1.038 7	0.855 1	0.747 0	1.561	94.50		

2.9 含量测定 49 批龙胆泻肝丸（片）有 3 批样品检出独活特征性成分，其中片剂 2 批、丸剂 1 批，检出率约为 6%。检出蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯的有 3 批样品，计算含量，结果见表 4，每批样品平行测定 2 次。蛇床子素含量范围为 0.005 615~2.601 $\mu\text{g/g}$ ，二氢欧山芹醇当归酸酯含量范围为 0.038 43~0.823 2 $\mu\text{g/g}$ 。

表 4 含量测定结果 ($\mu\text{g/g}$)

编号	剂型	批号	蛇床子素	二氢欧山芹醇当归酸酯
1	素片	410078	2.601	0.823 2
2	水丸	2012062	0.005 615	0.038 43
3	糖衣片	190765	0.822 4	0.236 1

3 讨论

通过质谱发现蛇床子素的主要碎片离子为 245、189、159、131、103、77；二氢欧山芹醇当归酸酯的碎片离子为 329、311、251、229、187、83，有 3 批样品检出与各对照品相应的碎片离子。通过离子丰度比可知，样品与蛇床子素对照品的离子丰度比基本一致，而与二氢欧山芹醇当归酸酯对照品的有一定差别，但独活对照药材与样品基本相同，分析原因可能是二氢欧山芹醇当归酸酯对照品属于纯度较高的化合物，其他杂质对其无干扰，而样品中的二氢欧山芹醇当归酸酯来自独活，可能存在二氢欧山芹醇当归酸酯的立体异构体的干扰^[13]，因为原化合物与立体异构体的离子丰度比会有差异^[14]。蛇床子素和二氢欧山芹醇当归

酸酯属于香豆素类化合物^[15]，在水煎液中的转移率为2.3%~10.1%和2.3%~12.2%^[16]。根据药典中独活含有蛇床子素的下限值和片剂的生产工艺可知，该样品中当归原料可能混有的独活量最高可达19%，超过杂质最大值(3%)，说明该企业的当归原料可能存在问题，采用混有较多独活的当归进行投料生产。

本研究采用的HPLC-MS/MS法灵敏度高、专属性强、分析速度快、样品需要量少、样品前处理简单，能够有效检出龙胆泻肝丸(片)中蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯的含量情况，筛查当归原料是否掺杂独活，为龙胆泻肝制剂整体质量的控制提供借鉴。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[2] 许金国, 梅茜, 夏金鑫, 等. 经典名方当归四逆汤物质基准量值传递分析[J]. 中草药, 2021, 52(21): 6501-6509.

[3] 汪兰, 张梦思, 王顺和, 等. 当归多糖拮抗D-半乳糖致大鼠脑衰老的作用[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(19): 1839-1845.

[4] Liu J, Wei J, Wang C, et al. The combination of *Radix Astragali* and *Radix Angelicae Sinensis* attenuates the IFN- γ -induced immune destruction of hematopoiesis in bone marrow cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 356.

[5] 苟惠, 王译伟, 郑茜, 等. 含当归中成药的DNA提取及其分子鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1):

44-50.

[6] 史中飞, 滕宝霞, 赖晶, 等. PCR-RFLP鉴别当归药材及饮片中掺混伪品—欧当归的方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 168-175.

[7] 张平, 马潇, 王晓琳, 等. 当归中混入不同比例独活HPLC特征指纹图谱研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(11): 83-86.

[8] 郑梦迪, 孙咪咪, 贺紫涵, 等. 基于ITS2序列及二级结构对易混淆药材牛尾独活、当归、独活和羌活的鉴别研究[J]. 药学报, 2021, 56(8): 2289-2294.

[9] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂: 第十二册[S]. 1997: 36.

[10] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂: 第十一册[S]. 1996: 42.

[11] 雒军, 王引权, 吴国泰, 等. 当归根部中主要有效成分的动态积累和转化研究[J]. 中草药, 2021, 52(21): 6663-6668.

[12] 蒋季明, 王男, 朱凤娟, 等. 不同采收期及生长年限独活中蛇床子素和二氢欧山芹醇当归酸酯含量的比较[J]. 华西药理学杂志, 2021, 36(1): 85-89.

[13] 丁丽, 谢复炜, 刘惠民, 等. HPLC-DAD-MS法测定独活酊中的主要活性成分[J]. 烟草科技, 2009(6): 33-37.

[14] 赵磊. HPLC-DAD、HPLC-ESI/MSⁿ研究天然抗癌药物鬼臼类化合物立体异构体[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.

[15] 张元萍, 仇锦林. 不同炮制工艺独活中4种香豆素类成分的定量分析[J]. 中国药师, 2020, 23(8): 1659-1662.

[16] 焦梦娇. 12种中药饮片标准汤剂研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2018.