

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.22.016

银翘解毒口服液中山银花鉴别方法研究*

朱泽兵,何世新[△]

(重庆市万州食品药品检验所·三峡库区道地药材开发利用重庆市重点实验室,重庆 404100)

摘要:目的 建立鉴别银翘解毒口服液中山银花投料的高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)法。方法 色谱柱为 Thermo C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm,1.7 μm),流动相为甲醇-0.1%甲酸溶液(梯度洗脱),流速为 0.3 mL/min,柱温为 40℃,进样量为 5 μL;电喷雾离子源(ESI),质谱多反应监测模式检测。结果 灰毡毛忍冬皂苷乙的质量浓度在 5.299 86~211.994 29 ng/mL($r \geq 0.999\ 9$)范围内与峰面积对数值线性关系良好,检测限为 1.50 ng/mL,定量限为 5.00 ng/mL;精密性、稳定性及重复性试验结果 RSD 均小于 3.50%,平均加样回收率为 93.66%,RSD 为 2.41%($n=6$)。HPLC-MS 法可从 29 批次样品中检出山银花投料 7 批次,多于现有高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法检出的 5 批次。结论 相对于 HPLC-ELSD 法,HPLC-MS 法更适用于银翘解毒口服液中山银花投料的鉴别。

关键词:银翘解毒口服液;山银花;灰毡毛忍冬皂苷乙;高效液相色谱-质谱联用法

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)22-0064-04

Identification of Lonicerae Flos in Yinqiao Jiedu Oral Liquid

ZHU Zebing, HE Shixin

(Chongqing Wanzhou Food and Drug Inspection Institute · Chongqing Key Laboratory of Development and Utilization of Dao-di Herbs in the Three Gorges Reservoir Area, Chongqing, China 404100)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) method for the identification of the Lonicerae Flos in Yinqiao Jiedu Oral Liquid. **Methods** The chromatographic column was Thermo C₁₈ column (150 mm×2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was methanol-0.1% formic acid solution (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 40℃, and the injection volume was 5 μL. Electrospray spray ion (ESI) source was adopted with mass spectrometry multi-reaction monitoring (MRM) mode for the detection. **Results** The linear range of macranthoidin B was 5.299 86-211.994 29 ng/mL ($r \geq 0.999\ 9$). The limit of detection (LOD) was 1.50 ng/mL, and the limit of quantification (LOQ) was 5.00 ng/mL. The RSDs of the precision, stability and repeatability tests were all less than 3.50%, the average recovery of macranthoidin B was 93.66% with an RSD of 2.41% ($n=6$). Among twenty-nine batches of samples, seven batches containing Lonicerae Flos could be detected by the HPLC-MS method, which was more than the five batches detected by the HPLC-evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) method. **Conclusion** Compared with the HPLC-ELSD method, HPLC-MS method is more suitable for the identification of Lonicerae Flos in Yinqiao Jiedu Oral Liquid.

Key words: Yinqiao Jiedu Oral Liquid; Lonicerae Flos; macranthoidin B; HPLC-MS

*基金项目:重庆市2021年度药品科研项目[渝药监[2021]30号]。

第一作者:朱泽兵,男,大学本科,主管中药师,研究方向为食品、药品、保健食品和化妆品的检验,(电子信箱)420783630@qq.com。

[△]通信作者:何世新,男,大学本科,主任药师,研究方向为食品、药品、保健食品和化妆品的检验,(电子信箱)1053201167@qq.com。

- 中去甲乌药碱的含量[J]. 西北药学杂志,2014,29(1):14-16.
- [10] 边钰雅. 柱前衍生化 HPLC 分离分析去甲乌药碱与辛弗林的研究[D]. 延边:延边大学,2012.
- [11] 田海峰,衣涛,金东日,等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定莲子心中去甲乌药碱的含量[J]. 延边大学学报(自然科学版),2012,38(2):150-153.
- [12] 洪海辛. 柱前手性荧光衍生化高效液相色谱法分离去甲乌药碱对映体[D]. 延边:延边大学,2010.
- [13] 陈宝玲,郑英丽,陆直,等. HPLC 法测定去甲乌药碱的含量[J]. 中国新药杂志,2004(7):628-630.
- [14] 王颖,张勇,张萍,等. 超高效液相色谱-电化学检测测定莲子中的去甲乌药碱[J]. 分析试验室,2020,39(11):1276-1280.
- [15] SN/T 5171-2019,出口植物源性食品中去甲乌药碱的测定液相色谱质谱/质谱法[S].
- [16] 王晗,汤一铸,赵晓亚,等. QuChERS 与液相色谱-串联质谱联用检测中药、调味品及外敷药物中去甲乌药碱的含量[J]. 色谱,2019,37(10):1036-1041.
- [17] 王立琦,贺利民,曾振灵,等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J]. 质谱学报,2011,32(6):321-332.
- [18] 周剑,王敏,杨梦瑞. 液相色谱质谱分析中的基质效应研究[J]. 农产品质量与安全,2018(1):67-70.
- [19] 李淑娟,于杰,高玉生,等. HPLC-MS/MS 测定果蔬中有机磷类农药的基质效应[J]. 食品工业科技,2017,38(6):49-53.
- [20] 顾亚萍,乔方,林惠纯,等. 4 种蔬菜中 20 种农药残留的基质效应的研究[J]. 标准与检测,2017,38(22):148-152.
- [21] 刘进奎,秦珊珊,冯书惠,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定食用菌中农药多残留的基质效应[J]. 食品科学,2016,37(18):171-177.

(收稿日期:2022-04-07;修回日期:2022-06-29)

银翘解毒口服液,由金银花、连翘、薄荷等9种中药材组方,有辛凉解表、清热解毒等功效,主要用于治疗风热感冒、发热头痛、咳嗽口干、咽喉疼痛等^[1-4]。2000年版《中国药典(一部)》将忍冬 *Lonicera japonica* Thunb., 灰毡毛忍冬 *Lonicera macranthoides* Hand. - Mazz., 红腺忍冬 *Lonicera hypoglauca* Miq., 华南忍冬 *Lonicera confusa* DC., 黄褐毛忍冬 *Lonicera fulvotomentosa* Hsu et S. C. Chen)共同归属于金银花,但2005年版《中国药典》及以后版本将忍冬归属为金银花,其余4种忍冬均归属山银花^[5-6]。银翘解毒颗粒中金银花的投料不合格率较高^[7],使用山银花代替金银花仍是较普遍现象,鉴别关键是找出两种药材中的特征性标志物质,即灰毡毛忍冬皂苷乙^[8-10]。此外,2020年版《中国药典(一部)》中银黄类制剂中山银花的鉴别均以灰毡毛忍冬皂苷乙为特征性成分^[11]。为此,本研究中以灰毡毛忍冬皂苷乙为特征性成分,采用高效液相-质谱联用(HPLC-MS)法对银翘解毒口服液中的金银花及山银花进行了鉴别,并与现行高效液相色谱法-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法进行比较。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Shimadzu-20A型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);QE Focus型超高效液相色谱串联质谱仪(美国Thermo Fisher公司);SDLA-B-1101型超纯水机(重庆圣德利医疗器械研究有限公司);AB204S型分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为万分之一);MSE225S型分析天平(德国Sartorius公司,精度为十万分之一)。

1.2 试药

29批银翘解毒口服液购自不同省市的不同药店,涉及全国22家生产企业,规格为每支10 mL(样品来源与批号见表1);灰毡毛忍冬皂苷乙对照品(中国食品药品检定研究院,批号为111814-201604,含量94.4%);甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。金银花和山银花药材均经重庆市万州食品药品检验所郭娅中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为Thermo C₁₈柱(150 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为甲醇(A)-0.1%甲酸溶液(B,含5.0 mmol/L乙酸铵),梯度洗脱(0~2 min时10%A,2~4.5 min时10%A→90%A,4.5~6 min时90%A,6~6.01 min时90%A→10%A,6.01~8 min时,10%A);流速为0.3 mL/min;柱温为40℃;进样量为5 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),质谱多反应监测(MRM),正离子模式,电离电压(IS)为3.2 kV,鞘气流

表1 样品来源与批号

Tab. 1 Source and batch numbers of samples

编号	批号	来源	编号	批号	来源	编号	批号	来源
S1	200202	河南	S11	2003020	陕西	S21	201020	吉林
S2	200201	河南	S12	200101	陕西	S22	200309	吉林
S3	180806	河南	S13	200203	四川	S23	211008	吉林
S4	20120216	北京	S14	2004030	四川	S24	210313	重庆
S5	19910003	北京	S15	190402	四川	S25	210522	浙江
S6	400326	江西	S16	2004	广西	S26	211002	天津
S7	19001	江西	S17	190228	广西	S27	20210127	黑龙江
S8	1201001	江西	S18	201115	广东	S28	200611	云南
S9	200501	江西	S19	210401	广东	S29	210811	云南
S10	18005	江西	S20	210806	吉林			

速为30 mL/min,辅助气流速为10 mL/min,离子化温度(TEM)为350℃。灰毡毛忍冬皂苷乙的定性离子对 m/z 1 421.7/1 097.6,碰撞能量1(CE1)为107 eV,定量离子对为 m/z 1 421.7/493.1,碰撞能量2(CE2)为121 eV,去簇电压(DP)为250 V。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取灰毡毛忍冬皂苷乙对照品适量,精密称定,加50%甲醇制成每1 mL含灰毡毛忍冬皂苷乙0.7 mg的对照品溶液。

对照药材溶液:分别取金银花药材和山银花药材,按2020年版《中国药典》金银花处理方法处理,制得单一对照药材溶液。

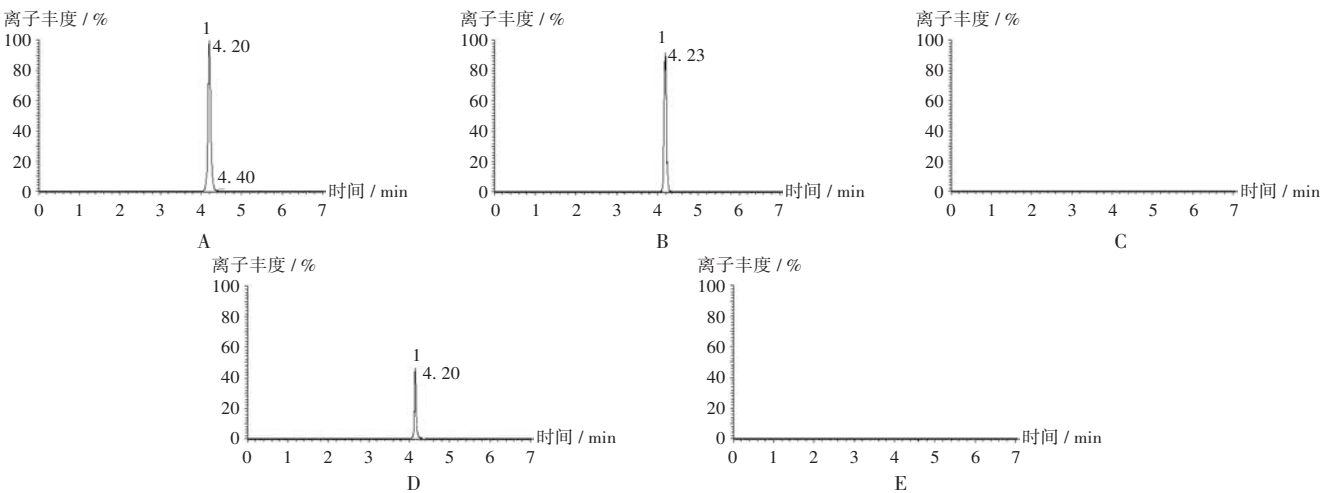
供试品溶液:取样品2 mL,置50 mL容量瓶中,加入50%甲醇适量,超声(功率250 W,频率40 kHz)处理30 min,放冷,加50%甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:按银翘解毒口服液处方和工艺制备缺金银花及山银花的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取上述对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果,阴性对照品溶液色谱在与灰毡毛忍冬皂苷乙对照品溶液色谱保留时间相同处无干扰峰,表明专属性良好。详见图1。

线性关系考察:取对照品溶液适量,用50%甲醇溶液稀释制成质量浓度分别为5,10,20,50,100,200 ng/mL的系列对照品溶液。精密量取5 μL,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,以灰毡毛忍冬皂苷质量浓度对数值(X)为横坐标、峰面积对数值(Y)为纵坐标进行线性回归,回归方程 $Y = 1\,805.210\,03\,X + 823.135\,72$ ($r = 0.999\,90$)。结果表明,毛毡忍冬皂苷质量浓度在5.299 86~211.994 29 ng/mL范围内与峰面积对数值



1. 灰毡毛忍冬皂苷乙
A. 对照品溶液 B. 山银花对照药材溶液 C. 金银花对照药材溶液 D. 供试品溶液 E. 阴性对照品溶液

图1 质谱图

1. Macranthoidin B

A. Reference solution B. Reference material solution of Lonicerae Flos C. Reference material solution of Lonicerae Japonicae Flos D. Test solution
E. Negative reference solution

Fig. 1 Mass spectrograms

线性关系良好。

检测限与定量限考察:精密吸取灰毡毛忍冬皂苷乙对照品溶液倍比稀释,按2.1项下试验条件进样测定,以信噪比(S/N)为3:1和10:1时的质量浓度分别记作检测限和定量限。结果分别为1.50 ng/mL及5.0 ng/mL。

精密度试验:取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下试验条件进样测定,重复进样6次,记录离子丰度。结果的 RSD 为0.93%($n=6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(编号为S1)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0,3,6,9,12,24,36,48 h时按2.1项下试验条件进样测定,记录离子丰度。结果的 RSD 为3.47%($n=8$),表明供试品溶液在室温下放置48 h内稳定。

重复性试验:取样品(编号为S1)各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录离子丰度并计算含量。结果毛毡忍冬皂苷含量为每片2.31 mg, RSD 为1.70%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(编号为S1)适量,加入对照品溶液3 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,并按2.1项下试验条件进样测定,记录离子丰度并计算加样回收率。结果平均加样回收率为93.66%, RSD 为2.41%($n=6$)。

2.4 样品含量测定

取29批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,均取2份。并按2.1项下试验条件进样测定,记录离子丰度,计算样品含量,并与HPLC-ELSD法比较,结果见

表2 样品中灰毡毛忍冬皂苷乙的含量测定结果($n=2$)

Tab. 2 Results of content determination of macranthoidin B in samples ($n=2$)

编 号	含量(mg/mL)		RSD (%)	编 号	含量(mg/mL)		RSD (%)	编 号	含量(mg/mL)		RSD (%)
	HPLC-ELSD法	HPLC-MS法			HPLC-ELSD法	HPLC-MS法			HPLC-ELSD法	HPLC-MS法	
S1	2.25	2.44	2.14	S11	-	-		S21	-	-	
S2	-	-		S12	2.01	2.30	1.43	S22	-	-	
S3	-	-		S13	0.78	0.82	1.05	S23	-	-	
S4	-	-		S14	-	-		S24	-	-	
S5	-	-		S15	-	-		S25	-	-	
S6	-	-		S16	-	-		S26	-	-	
S7	-	0.13		S17	-	-		S27	-	-	
S8	-	-		S18	-	-		S28	2.25	2.28	1.69
S9	-	0.24		S19	-	-		S29	4.23	4.27	2.27
S10	-	-		S20	-	-					

注:- 为未检出。

Note:- indicates that no macranthoidin B is detected.

表2.HPLC-ELSD法及HPLC-MS法分别检测出5批次及7批次不符合规定的样品。且2种方法测定结果的 $RSD \leq 2.5\%$,表明2种方法均具有较好的兼容性,均可用于银翘解毒口服液中山银花投料的鉴别,后者标准更严格。

3 讨论

目前,金银花制剂中山银花的鉴别主要均是以灰毡毛忍冬皂苷乙为特征性物质,采用薄层色谱法和HPLC-ELSD法进行鉴别^[11-15]。陆静娴等^[7]以灰毡毛忍冬皂苷乙为特征性物质,采用HPLC-ELSD法测定了189批次银翘解毒颗粒,其中有22批次样品仅达到