

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)22-0081-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.22.017



超高效液相色谱串联质谱法检测小儿咳喘灵口服液中山银花*

谢 婷¹, 周云峰², 廖圆月^{3△}, 彭 真¹, 黄招光²

(1. 江西省宜春市人民医院, 江西 宜春 336000; 2. 江西省宜春市检验检测中心, 江西 宜春 336000;
3. 江西省赣州市人民医院, 江西 赣州 341000)

摘要:目的 建立小儿咳喘灵口服液中掺伪山银花检查方法。方法 采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定制剂中灰毡毛忍冬皂苷乙(MB)的含量。色谱条件, 色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸溶液(含 8 mmol/L 甲酸铵)-乙腈(梯度洗脱), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 35 °C, 进样量为 5 μL; 质谱条件, 电喷雾离子源(ESI), 负离子扫描, 以多反应监测(MRM)模式, MB 的定量离子对为 m/z 1397.5 → 1074.5。结果 MB 质量浓度在 0~9.214 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9993$), 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 5.0%; 平均加样回收率为 93.63%, RSD 为 4.35% ($n=9$)。29 批次样品中 19 批次检出 MB, 但含量均低于拟订杂质限度。结论 该方法专属性强, 灵敏度高, 分析速度快, 结果稳定可靠, 能有效监控小儿咳喘灵口服液中银花掺伪情况, 可用于该制剂的质量控制。

关键词: 小儿咳喘灵口服液; 灰毡毛忍冬皂苷乙; 山银花; 掺伪; 杂质限度

Determination of Lonicerae Flos in Xiaoer Kechuanling Oral Liquid by UPLC-MS/MS

XIE Ting¹, ZHOU Yunfeng², LIAO Yuanyue³, PENG Zhen¹, HUANG Zhaoguang²

(1. Yichun People's Hospital, Yichun, Jiangxi, China 336000; 2. Yichun Inspection and Testing Center, Yichun, Jiangxi, China 336000; 3. Ganzhou People's Hospital, Ganzhou, Jiangxi, China 341000)

Abstract: Objective To establish a method for detecting adulteration of Lonicerae Flos in Xiaoer Kechuanling Oral Liquid. **Methods** An ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was used to determine the content of macranthoidin B (MB) in the preparation. Chromatographic conditions as follows: the chromatographic column was Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ column (200 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid solution (containing 8 mmol/L ammonium formate)-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 5 μL; mass spectrometry conditions as follows: electrospray ionization (ESI) source, with negative ion scanning, and multiple reaction monitoring (MRM) mode were used. The quantitative ion pair of MB was m/z 1397.5 → 1074.5. **Results** The linear range of MB was 0-9.214 μg/mL ($r \geq 0.9993$). The RSDs of precision, stability and repeatability test were all lower than 5.0%; the average recovery rate was 93.63%, with RSD of 4.35% ($n=9$). MB was detected in 19 of 29 batches of samples, but the content was lower than the proposed limit of impurity. **Conclusion** The method has strong specificity, high sensitivity, fast analysis speed, stable and reliable, which can effectively monitor the adulteration of Lonicerae Flos in Xiaoer Kechuanling Oral Liquid, and can be used for quality control of the preparation.

Key words: Xiaoer Kechuanling Oral Liquid; macranthoidin B; Lonicerae Flos; adulteration; limit of impurity

近年来,随着监管技术的提高,中药材市场上直接以伪品替代正品使用的情况得到有效遏制,而在中药制剂处方中掺入伪品进行投料生产的行为仍时有发生^[1-4],如红参和人参中掺有西洋参,血竭中掺有龙血竭,浙贝母中混有湖北贝母等^[5]。这些情况会给中药制剂的质量监管带来一定难度,因为难以利用中药饮片鉴别方法进行直观鉴定,且不少伪品含有的主要成分与正品相同,成药后更难区分两者的差异^[6-7]。小儿咳喘灵口服液有祛痰、止咳功效,临床主要用于治疗上呼吸道感染、肺炎、咳嗽等^[8-11]。该制剂组方中的金银花

来源为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花^[12],有良好的消炎、抗病毒作用^[13-16]。近年来随着饮料、保健品、茶叶等行业对金银花原料需求的增加^[17-18],其价格也持续升高,部分生产企业为节约成本,可能会采用价格较低廉的山银花掺伪或冒充金银花进行投料生产。文献显示,已有不少中药制剂如银翘解毒颗粒、清热解毒口服液等检出山银花掺伪问题^[19-21]。山银花与金银花同属忍冬科^[12],两者性状相近、疗效类似,但 2020 年版《中国药典(一部)》明确规定两者为不同品种,不可混用。目前小儿咳

*基金项目:江西省宜春市科技计划项目[2023ZDJH2693]。

第一作者:谢婷,女,硕士,主管药师,研究方向为药品质量评价,(电子信箱)746195241@qq.com。

△通信作者:廖圆月,男,硕士,主管药师,研究方向为药物分析、质量控制,(电子信箱)576061008@qq.com。

喘灵口服液现行标准^[8,12]中并无山银花掺伪检查项目,相关文献也报道较少,故难以保证金银花投料的真实性。研究表明,灰毡毛忍冬皂苷乙(MB)是山银花的特征性成分,金银花中不含^[22-23],可检测该成分,以考察含金银花的中药制剂中是否掺有山银花。为此,本研究中拟采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法检测制剂中MB含量,以考察小儿咳喘灵口服液中金银花的真实投料情况。现报道见下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

H-class / xevo TQD 型超高效液相色谱串联质谱仪(沃特世科技<上海>有限公司);KH-250DB型超声波清洗仪(昆山禾创超声仪器有限公司);MS205DU型及TLE204E型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度分别为0.01 mg和0.1 mg)。

1.2 试药

小儿咳喘灵口服液(29批,9个生产企业,记为A-I,样品信息见表1(规格B₁为1.25 mL/支,I₁,I₂均为100 mL/瓶,其余均为10 mL/支);MB对照品(中国食品药品检定研究院,批号为111814-202106,含量96.1%);辅料苯甲酸钠(国药集团化学试剂有限公司,批号为20201124),甜菊素(曲阜圣仁制药有限公司,批号为20131103)。药材饮片金银花(湖南春可回中药饮片有限公司,批号为230101);山银花[江西彭氏国药堂饮片有限公司(批号分别为22123006和22071303);江西国都中药饮片有限公司(批号为20221201);湖南省南国药都中药饮片有限公司(批号为220302)];麻黄(河北康益强药业有限公司,批号为22121501);苦杏仁(惠州市泛生中药饮片有限公司,批号为221202);板蓝根(河北康盛华药业有限公司,批号为202109001);石膏(湖南省松龄堂中药饮片有限公司,批号为190301);甘草(河南宝德中药饮片科技有限公司,批号为240202),瓜蒌(安徽九合堂国药有限公司,批号为20230301)。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相为0.1%甲酸溶液(含8 mmol/L甲酸铵,A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~2 min时5%B,2~5 min时5%B→75%B,5~7 min时75%B,7~9 min时75%B→5%B,9~12 min时5%B);流速为0.3 mL/min,柱温为35℃,进样量为5 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),负离子扫描,多反应监测(MRM)模式;脱溶剂气流量:1 000 L/h;锥孔气流量:50 L/h;脱溶剂气温度:550℃;MB的定量离子对为m/z 1 397.5→1 074.5。

表1 样品信息

Tab. 1 Samples information

企业	批号	编号	企业	批号	编号	企业	批号	编号
A	20221001	A ₁		230117	E ₃		23050131	G ₂
B	2112020-0	B ₁		221216	E ₄		23011631	G ₃
	2208009-0	B ₂		230105	E ₅		23040131	G ₄
C	202305002	C ₁		221211	E ₆		22122531	G ₅
	202201001	C ₂		221228	E ₇		22122531	G ₆
D	220901	D ₁		221227	E ₈	H	220171	H ₁
	220902	D ₂		221214	E ₉		220171	H ₂
	221101	D ₃		220504	E ₁₀	I	221210	I ₁
E	221223	E ₁	F	22110306	F ₁		220910	I ₂
	221201	E ₂	G	23050131	G ₁			

2.2 溶液制备

对照品溶液:称取MB对照品10.22 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,得对照品贮备液;精密量取适量,用50%甲醇稀释,制成每1 mL约含0.4 μg的对照品溶液。

供试品溶液:精密量取样品1 mL,置50 mL容量瓶中,加入约40 mL 50%甲醇,超声(功率250 W,频率40 kHz,下同)处理10 min,放冷,用50%甲醇定容,摇匀,即得。

对照药材溶液:取金银花药材125 g,按小儿咳喘灵口服液的制备工艺制成仅含金银花的溶液(规格1^[8,12],下同),精密量取1 mL,置50 mL容量瓶中;同供试品溶液制备方法制成对照药材溶液。

加标供试品溶液:处方中的金银花掺入3%山银花,按小儿咳喘灵口服液的制备工艺制成样品(规格1);精密量取1 mL,置50 mL容量瓶中,按供试品溶液制备方法制成含3%山银花的加标供试品溶液。

阴性对照品溶液:按小儿咳喘灵口服液的处方工艺制备缺金银花的阴性样品(规格1),精密量取1 mL,置50 mL容量瓶中,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2.2项下5种溶液各适量,按2.1项下试验条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液(批号为202201001)、加标供试品溶液在与对照品溶液色谱相同保留时间处均出现相应的色谱峰,而阴性对照品溶液、供试品溶液(批号为221210)、对照药材溶液色谱图中未出现相应色谱峰,说明该方法专属性良好。详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下对照品贮备液各适量,加阴性对照品溶液稀释,制成每1 mL含0,0.007 9,0.023 6,0.078 6,0.392 9,1.964 3,5.892 9,9.821 4 μg的系列对照品溶液;取适量,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,以对照品质量浓度(X, μg/mL)为横

坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1\,733X - 84.132$ ($r = 0.999\,3$, $n = 7$)。结果表明,MB 质量浓度在 $0 \sim 9.214\,\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限考察:取对照品溶液($0.007\,9\,\mu\text{g}/\text{mL}$),用阴性对照品溶液倍比稀释,按 2.1 项下试验条件进样测定,记录峰面积。以信噪比约为 3:1 时的 MB 质量浓度作为检测限,结果为 $0.2\,\text{ng}/\text{mL}$ 。

精密度试验:取已知含量对照品溶液($1.964\,3\,\mu\text{g}/\text{mL}$),按 2.1 项下试验条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果的 RSD 为 0.96% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为 202201001),按 2.1 项下试验条件,于仪器进样室(温度 $20\,^{\circ}\text{C}$)放置 0, 2, 4, 6, 8 h 时进样测定,记录峰面积。结果的 RSD 为 4.57% ($n = 5$),表明供试品溶液 $20\,^{\circ}\text{C}$ 放置 8 h 内稳定性良好。

重复性试验:精密量取样品(批号为 202201001) $1\,\text{mL}$,平行 6 份,按 2.2 项下方法制成供试品溶液,按 2.1 项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量。结果的 RSD 为 2.91% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为 202201001) $0.5\,\text{mL}$,共 9 份,置 $50\,\text{mL}$ 容量瓶中,精密加入低、中、高质量浓

表 2 加样回收试验结果 ($n = 9$)

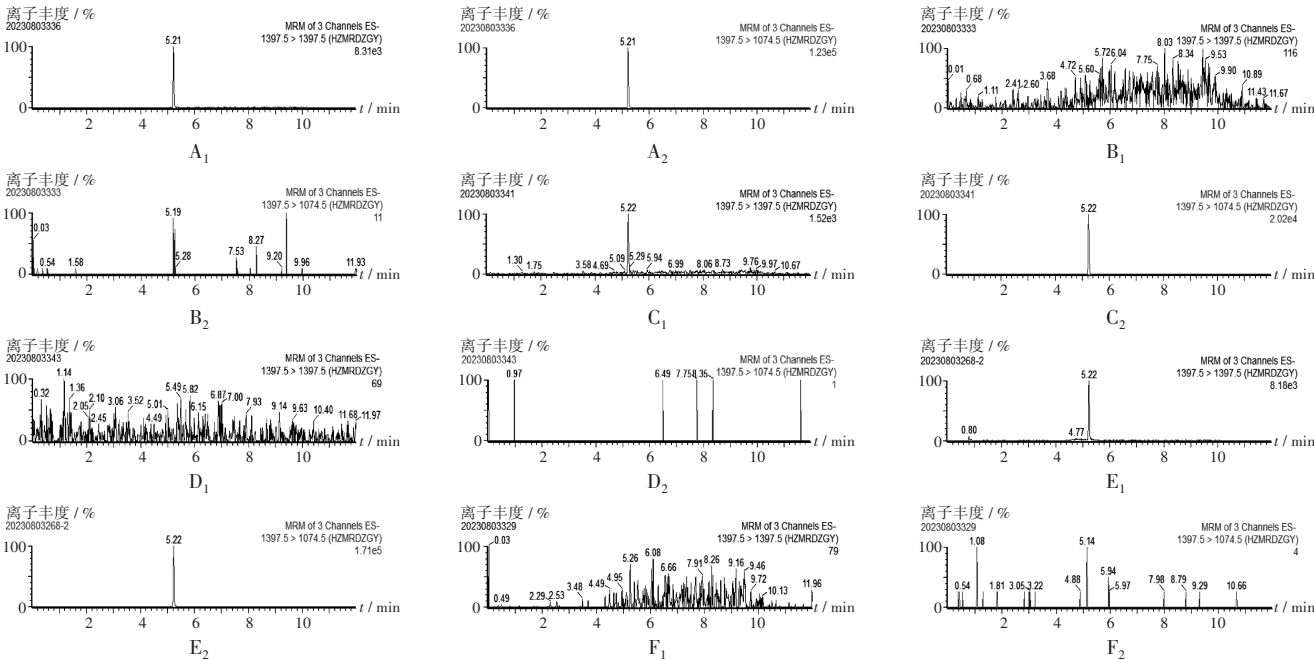
Tab. 2 Results of the recovery test ($n = 9$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
2.80	2.36	4.91	89.41		
2.80	2.36	5.04	94.92		
2.80	2.36	4.94	90.68		
2.80	2.95	5.50	91.53		
2.80	2.95	5.42	88.81	93.63	4.35
2.80	2.95	5.56	93.56		
2.80	3.54	6.21	96.33		
2.80	3.54	6.40	101.69		
2.80	3.54	6.19	95.76		

度的对照品溶液适量,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,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表 2。

2.4 样品含量测定

取 29 批样品各适量,分别按 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,记录峰面积并计算样品含量。结果见表 3。19 批样品中检出 MB(6 家生产企业样品全部检出,1 家部分检出,2 家均未检出),检出范围为 $2.74 \sim 5.61\,\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



A_1, A_2 . 对照品溶液 B_1, B_2 . 对照药材溶液 $C - D$. 供试品溶液 (C_1, C_2 批号为 202201001; D_1, D_2 批号为 221210) E_1, E_2 . 加标供试品溶液 F_1, F_2 . 阴性对照品溶液

$A_1 - F_1$. 总离子流图 $A_2 - F_2$. 提取离子流图

图 1 离子色谱图

A_1, A_2 . Reference solution B_1, B_2 . Reference medicinal material solution $C - D$. Test solution (C_1, C_2 : batch number 202201001; D_1, D_2 : batch number 221210) E_1, E_2 . Spiked test solution F_1, F_2 . Negative reference solution
 $A_1 - F_1$. Total ion chromatograms $A_2 - F_2$. Extracted ion chromatograms

Fig. 1 Ion chromatograms

表3 样品含量测定结果($\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=2$)
Tab.3 Results of the content determination of samples
($\mu\text{g}/\text{mL}$, $n=2$)

编号	含量	编号	含量	编号	含量	编号	含量
A ₁	3.28	E ₁	2.90	F ₁	4.09	G ₅	2.89
B ₁	3.98	E ₃	2.82	G ₁	2.99	G ₆	2.96
B ₂	3.04	E ₅	2.74	G ₂	2.84	H ₁	2.98
C ₁	4.62	E ₇	2.74	G ₃	2.97	H ₂	2.88
C ₂	5.61	E ₈	2.82	G ₄	3.67		

2.5 掺伪判定原则

判定原则设定:王莹等^[24]对220份山银花样品进行含量测定,其中灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬属山银花均含有MB成分,含量平均值分别为8.16%, 3.57%, 5.32%。2020年版《中国药典(四部)》规定药材和饮片中杂质不得过3%^[25],同时考虑到各生产企业制备工艺的差异和不同品牌仪器检测误差,为提高阳性判断的准确性,将山银花的检出比例放宽至5%,以3.57%作为山银花中MB的含量,设转移率为100%,基质抑制效应为15%,则掺有5%山银花的小儿咳喘灵口服液按2.2项下方法制成供试品溶液时MB的质量浓度分别应不低于4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (规格1)和8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (规格2),并作为MB限度溶液浓度。则小儿咳喘灵口服液中银花掺伪的判定原则为:供试品溶液色谱图中,在与MB对照品溶液色谱图保留时间相同处不得出现相同色谱峰,若出现且供试品色谱中 m/z 1397.5 $\rightarrow$ 1074.5的色谱峰面积大于对照品限度溶液(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)色谱峰的峰面积值(规格1)或大于对照品限度溶液(8 $\mu\text{g}/\text{mL}$)色谱峰的峰面积值(规格2),则视为阳性检出。

验证结果:另取3批山银花饮片,按小儿咳喘灵口服液处方及工艺,分别制成2种制剂规格掺有6%山银花的样品,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,记录峰面积。结果MB峰面积值均高于相应的对照品限度溶液,表明该方法可用于山银花掺伪的检查。同时依据此判定原则,所有样品按2.2项下方法制成供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果检出的MB峰面积均低于对照品限度溶液(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$),说明样品未达到山银花掺伪限度。

3 讨论

预试验中,流动相考察了乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液(含8 mmol/L 甲酸铵)3个系统,质谱参数考察正、负离子2种扫描模式,发现在乙腈-0.1%甲酸溶液(含8 mmol/L 甲酸铵)系统及负离子模式下,MB响应值较高。MB可溶于甲醇和水中,考虑到对色谱柱的耐用性、稳定性和对流动相的兼容性等因素,选择50%甲醇作为样品的提取溶剂,并采用操作简便、提取效果较高的超声方式提取样品,且经

过10 min,MB成分已提取完全。预试验中,取对照品贮备液适量,分别用50%甲醇和阴性对照品溶液稀释,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积(A),结果在同一质量浓度下, $A_{\text{阴}}/A_{\text{甲}}=0.85$,说明具有基质效应,处方中其他原辅料对MB的质谱响应具有抑制作用。为减少误差,用于绘制标准曲线的对照品溶液需以阴性样品溶液为溶剂。进行山银花掺伪判定时,因小儿咳喘灵口服液的工艺制法^[8,12]为“以上7味,苦杏仁、石膏、板蓝根、甘草、瓜蒌加水煎煮1小时…,滤过,滤液加水至1 000 mL(规格1)或加水至500 mL(剂规格2)”,对照品限度溶液需考虑2种制剂规格的差异设定相应的浓度,以有效提高判定的准确性。结果表明,部分样品含有该成分,但均低于掺伪限度,原因可能为采收时无意带入,不具有掺伪主观性,但生产企业仍应严格控制原料的质量,减少杂质。

综上所述,本研究中建立了检测小儿咳喘灵口服液中银花的UPLC-MS/MS法,该方法专属性好,精密度、稳定性、重复性结果符合要求,含量测定及掺伪验证试验表明结果稳定可靠,且该方法可转化为技术监督手段,用于监控该制剂中银花的掺伪情况,对于提升该制剂的质量标准及规范企业的生产行为具有重要意义。

参考文献

[1] 余荣兰,杨建冬,袁秀泽,等. 龙胆泻肝丸(片)中当归掺伪情况研究[J]. 中成药,2022,44(11):3739-3742.
[2] 陈 馥,黄俊忠,李 华,等. UPLC-MS/MS检测全粉投料中成药制剂中柴胡掺杂藏柴胡成分方法的研究[J]. 药物分析杂志,2023,43(7):1245-1254.
[3] 雷 蓉,刘亚茹,王晓蕾,等. 参麦颗粒中红参掺伪研究[J]. 中国药业,2024,33(8):71-75.
[4] 胡 亮,周 明,王银红,等. 基于特征性成分的肾石通颗粒中金钱草投料真实性考察[J]. 中国药业,2023,32(23):88-92.
[5] 刘 静,朱 炯,王 翀,等. 2022年国家药品抽检中成药质量状况分析[J]. 中国现代中药,2023,25(10):2055-2060.
[6] 朱 韬,何颂华,李丽莉,等. HPLC-ELSD法和UPLC-MS/MS法评价石斛夜光丸中人参投料掺伪情况[J]. 中草药,2023,21(10):2729-2733.
[7] 陈 馥,黄俊忠,徐万帮,等. 基于UPLC-MS/MS技术检查银柴颗粒中柴胡掺伪的鉴别研究[J]. 中国药事,2023,37(4):426-433.
[8] WS₃-B-0689-91,卫生部药品标准·中药成方制剂(第四册)[S].
[9] 李洪斌,吕紫璇,陈 健. 原子吸收分光光度法测定小儿咳喘灵口服液中微量钙[J]. 中国药业,2014,23(24):80-81.
[10] 周 燕,吴 新,冯 伟,等. 小儿咳喘灵口服液辅助治疗小儿哮喘临床疗效观察[J]. 中国妇幼保健研究,2021,32(7):1020-1024.
[11] 吴力群,丁 樱,庄探月,等. 浓缩型小儿咳喘灵口服液