

银翘清热片 HPLC 指纹图谱研究

王 伟^{1,2}, 杨素德^{1,2}, 李家春^{1,2}, 黄文哲^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

摘要:目的 建立银翘清热片(YQT)的HPLC指纹图谱,并采用电喷雾离子源-四极杆-飞行时间质谱(ESI-Q-TOF/MS)对其化学成分进行定性分析。方法 采用Kromasil C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以乙腈-0.1%磷酸水溶液梯度洗脱,体积流量为1 mL/min,柱温为25 ℃,检测波长为230 nm。ESI-Q-TOF/MS正、负2种离子模式扫描对其化学成分定性分析。结果 建立了YQT HPLC指纹图谱,标定28个共有峰,归属到6味药材,其中7个共有峰来源于连翘,9个共有峰来源于金银花,6个共有峰来源于葛根,3个共有峰来源于牛蒡子,1个共有峰(2号)来源于连翘和升麻,另外2个共有峰分别来源于知母和升麻。11批不同批次的YQT制剂相似度均大于0.95。并采用LC-Q-TOF/MS方法鉴定了42个化学成分,其中16个采用对照品比对鉴定,分别为葛根素、大豆苷、大豆苷元、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸A、异绿原酸B、异绿原酸C、断氧化马钱苷、芦丁、连翘苷、连翘酯苷A、牛蒡苷、芒果苷、知母皂苷B II。结论 完善了YQT的质量标准体系,可为同类型的其他复方制剂的物质基础研究和质量控制提供参考。

关键词:银翘清热片;电喷雾离子源-四极杆-飞行时间质谱;指纹图谱;连翘;金银花;葛根;牛蒡子;升麻;知母;LC-Q-TOF/MS;葛根素;大豆苷;大豆苷元;新绿原酸;绿原酸;隐绿原酸;异绿原酸A;异绿原酸B;异绿原酸C;断氧化马钱苷;芦丁;连翘苷;连翘酯苷A;牛蒡苷;芒果苷;知母皂苷B II

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)11-1882-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.11.012

HPLC fingerprint of Yinqiao Qingre Tablet

WANG Wei^{1,2}, YANG Su-de^{1,2}, LI Jia-chun^{1,2}, HUANG Wen-zhe^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective To establish HPLC fingerprint for Yinqiao Qingre Tablet (YQT), and analyze the chemical composition of YQT by ESI-Q-TOF MS. **Methods** The Kromasil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used with a mobile phase of acetonitrile-0.1% phosphoric acid in gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25 ℃, and the detection wavelength was 230 nm. Ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) was used for qualitative analysis in the positive and negative ion modes. **Results** The HPLC fingerprint for 11 batches of YQT and 28 common peaks were obtained, belonging to six medicinal herbs. Among them, seven common peaks came from *Forsythiae Fructus*, nine common peaks came from *Lonicerae Japonicae Flos*, six common peaks came from *Puerariae Lobatae Radix*, three common peaks came from *Arctii Fructus*, one common peak (peak 2) came from *Forsythiae Fructus* and *Cimicifuga Rhizoma*, another two common peaks came from *Anemarrhenae Rhizoma* and *Cimicifuga Rhizoma*, respectively. The similarity of 11 batches of YQT was over 0.95. Totally 42 chemical components were identified by UPLC-Q-TOF/MS, 16 of which were identified by references, such as puerarin, daidzin, daidzein, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, isochlorogenic acid A, isochlorogenic acid B, isochlorogenic acid C, secoxyloganin, rutin, phillyrin, forsythoside A, arctiin, mangiferin, and timosaponin B II, respectively. **Conclusion** This study perfects the system of quality standard and provides the reference for the study of substance basis and quality control of the same type of compound preparations.

Key words: Yinqiao Qingre Tablet; ESI-Q-TOF MS; fingerprint; *Forsythiae Fructus*; *Lonicerae Japonicae Flos*; *Puerariae Lobatae*

收稿日期: 2015-10-26

基金项目: “重大新药创制”科技重大专项“现代中药创新集群与数字制药技术平台”(2013ZX09402203)

作者简介: 王 伟(1985—),女,硕士研究生,研究方向为中药分析与质量标准。Tel: (0518)81152321 E-mail: wangwei-0608@163.com

*通信作者 萧 伟,研究员级高级工程师,博士,研究方向为中药新药的研究与开发。Tel: (0518)81152337 E-mail: wzzh-nj@163.com

Radix; Arctii Fructus; Cimicifuga Rhizoma; Anemarrhenae Rhizoma; UPLC-Q-TOF/MS; puerarin; daidzin; daidzein; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; isochlorogenic acid A; isochlorogenic acid B; isochlorogenic acid C; secoxyloganin; rutin; phillyrin; forsythoside A; arctiin; mangiferin; timosaponin B II

银翘清热片(YQT)是由金银花、葛根、连翘、知母等 9 味药材的提取物加一定的赋形剂,按现代制剂工艺技术制成的片剂,具有辛凉解表、清热解毒之功效。经临床研究显示,YQT 能减轻风热型感冒的症状,提高单项症状的消失率,使中医症状总分下降,且未发生不良事件和不良反应,证明了该制剂治疗风热型感冒的安全性和有效性^[1-2]。现行的质量标准对方中的 5 味药材进行了薄层鉴别,并对 4 个指标成分进行了定量测定,但仍缺少整体评价的质控方法,不能满足中药现代化的质量控制要求。

中药指纹图谱是符合中药特色的评价方法,具有整体性、模糊性和特征性的显著特点,不仅可以定性鉴别,还能利用其进行整体定量,为中药材及中药制剂国内外广泛接受的一种中药质量评价技术^[3-7]。LC-MS 技术结合了 HPLC 的高分离效能和 MS 的高灵敏度、高选择性使之成为药物研究中强有力的工具,在中药质控中得到越来越广泛的应用^[8-10]。本研究建立了 YQT 的 HPLC 指纹图谱,共标定了 28 个共有峰,将共有峰在药材中进行归属,并采用 LC-MS 对其化学成分进行分析鉴定,为 YQT 的物质基础研究提供了数据支撑。

1 仪器与材料

Agilent1260 高效液相色谱仪(配有四元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器)、Agilent 1290 超高压液相色谱仪(配有二元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 紫外检测器)、Agilent 6538 飞行时间质谱检测器(配有 ESI 源,Qualitative Analysis 质谱分析软件)美国 Agilent 公司;BSA224S-CW 型电子分析天平,德国 Sartorius 公司;XP6 型电子分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;Milli-Q Advantage A₁₀ 纯水机,美国 Millipore 公司;KQ5200DA 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司。

乙腈、甲酸,色谱纯,美国天地公司;超纯水;其他试剂均为分析纯,购自南京化学试剂有限公司。YQT 共 11 批(批号分别为 110301、110302、110303、110401、120601、120602、120603、120701、140401、140402、140403),江苏康缘药业股份有限公司。对照品葛根素(批号 110752-200912,质量分数 96.0%)、绿原酸(批号 110753-201314,质量分数 96.6%)、连翘苷(批号 110821-200711,质量分数

98.9%)、牛蒡苷(批号 110819-200606,质量分数 100%)、连翘酯苷 A(批号 111810-201104,质量分数 94.3%)、大豆苷(批号 111738-200501,质量分数 100%)、大豆苷元(批号 111502-200402,质量分数 100%)、芦丁(批号 100080-200707,质量分数 90.5%)、芒果苷(批号 111607-200402,质量分数 100%)、知母皂苷 B II 对照品(批号 111839-201303,质量分数 93.2%),均购自中国食品药品检定研究院;对照品新绿原酸(批号 MUST-13013001)、隐绿原酸(批号 MUST-13013002)、异绿原酸 A(批号 MUST-13101101)、异绿原酸 B(批号 MUST-13081402)、异绿原酸 C(批号 MUST-13081401),购自成都曼斯特生物技术有限公司,HPLC 测定质量分数均 ≥ 98%;对照品断氧化马钱苷(批号 140915),HPLC 测定质量分数 ≥ 98%,购自成都普菲德生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 液相色谱条件 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液,线性洗脱程序为 0~10 min, 5%~10% 乙腈; 10~15 min, 10%~11% 乙腈; 15~25 min, 11%~13% 乙腈; 25~50 min, 13%~20% 乙腈; 50~65 min, 20%~32% 乙腈; 65~80 min, 32%~60% 乙腈; 80~85 min, 60% 乙腈; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温为 25 °C; 检测波长 230 nm; 进样量为 10 μL。质谱检测时将 0.1%磷酸水溶液更换为 0.1%甲酸水溶液。

2.1.2 质谱条件 采用 ESI 源,正离子模式下:毛细管电压 4 000 V,雾化气压力 310.32 kPa (45 psi),干燥气体积流量 10 L/min,加热毛细管温度 350 °C,碎片电压 145 V,锥孔电压 65 V,质量数扫描范围 *m/z* 100~2 000;负离子模式下:毛细管电压 3 500 V,雾化气压力 310.32 kPa (45 psi),干燥气体积流量 10 L/min,加热毛细管温度 350 °C,碎片电压 145 V,锥孔电压 65 V,扫描范围 *m/z* 100~2 000。

2.2 对照品溶液的制备

2.2.1 参照物溶液的制备 取葛根素对照品适量,精密称定,加 50%甲醇制成含葛根素 0.1 mg/mL 的对照品溶液,即得。

2.2.2 混合对照品溶液的制备 取葛根素、大豆苷、大豆苷元、新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、断氧化马钱苷、芦丁、连翘苷、连翘酯苷 A、牛蒡苷、芒果苷、知母皂苷 B II 对照品适量，加 50% 甲醇溶解，制成分别含葛根素 15.8 μg/mL、大豆苷 74.2 μg/mL、大豆苷元 49.7 μg/mL、新绿原酸 10.4 μg/mL、绿原酸 29.8 μg/mL、隐绿原酸 14.1 μg/mL、异绿原酸 A 13.4 μg/mL、异绿原酸 B 9.3 μg/mL、异绿原酸 C 11.7 μg/mL、断氧化马钱苷 14.1 μg/mL、芦丁 9.3 μg/mL、连翘苷 13.0 μg/mL、连翘酯苷 A 74.6 μg/mL、牛蒡苷 57.8 μg/mL、芒果苷 4.9 μg/mL、知母皂苷 B II 75.1 μg/mL 的混合对照品溶液，即得。

2.3 供试品溶液的制备

取重量差异项下的本品，研细，取约 0.2 g，置具塞锥形瓶中，加入 50% 甲醇 25 mL，密塞，超声处理 (40 kHz, 200 W) 30 min，摇匀，离心，取上清液过 0.22 μm 滤膜，取续滤液，即得。

2.4 指纹图谱方法学考察

2.4.1 精密度试验 取批号为 140401 批的 YQT，按“2.3”项方法制备供试品溶液，精密吸取供试品溶液 10 μL，重复进样 6 次，记录色谱图。以分离度好，且为本品功效成分的葛根素为参照峰，计算主要色谱峰 (占总峰面积 1% 以上) 的相对保留时间和相对峰面积。结果 28 个共有峰相对保留时间的

RSD 为 0.0~0.16%，相对峰面积的 RSD 为 0.0~1.15%，表明仪器精密度良好。

2.4.2 稳定性试验 取同一供试品 (批号 140401) 溶液，分别于制备后 0、3、8、11、16、24 h 进样，共记录 6 个时间点的指纹色谱图谱。以葛根素为参照峰，计算主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积。结果 28 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.0~0.25%，相对峰面积的 RSD 为 0.0~1.62%。结果表明供试品溶液在室温条件下 24 h 内稳定性良好。

2.4.3 重复性试验 取 YQT 样品 (批号 140401)，按“2.3”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，依法测定。以葛根素为参照峰，计算主要色谱峰的相对保留时间和相对峰面积，结果 28 个共有峰相对保留时间的 RSD 为 0.0~0.26%，相对峰面积的 RSD 为 0.0~1.28%。结果表明该方法重复性良好。

2.5 指纹图谱的建立

2.5.1 对照指纹图谱的建立 取 11 批 YQT，按“2.1”~“2.3”项下规定的方法进行测定，将其指纹图谱的 AIA 格式从仪器导出，并导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统。选择 10 批 YQT 指纹图谱中均存在的色谱峰作为共有峰，共标定 28 个共有峰，用平均值计算法生成 YQT 的对照指纹图谱，见图 1。以此共有模式为标准，对样品进行整体相似度评价。结果 11 批制剂的相似度分别为 0.997、0.997、0.997、0.982、0.995、0.995、0.995、0.976、

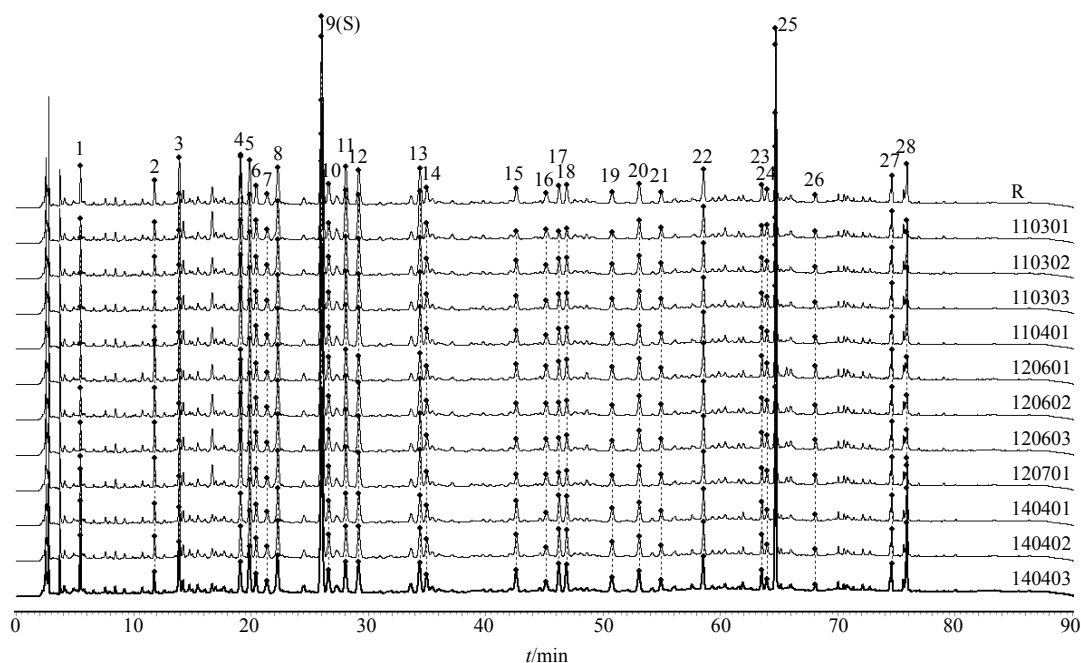


图 1 11 批 YQT HPLC 指纹图谱及对照指纹图谱 (R)

Fig. 1 HPLC fingerprint of 11 batches of YQT and common fingerprint (R)

0.989、0.989、0.989。表明不同批次的 YQT 工艺稳定、质量一致性较好。

2.5.2 制剂与药材相关性研究 通过与处方中的 9 味药材制备的样品图谱比较, 结果显示 YQT 指纹图谱中的成分主要来自葛根、金银花、连翘、牛蒡子、知母和升麻药材。其中 1、15、17、18、19、23、26 号峰来源于连翘, 3、5、6、7、8、14、20、21、22 号峰来源于金银花, 2 号峰来源于连翘和升麻, 4、9 (S)、11、12、13、24 号峰来源于葛根, 25、27、28 号峰来源于牛蒡子, 10 号峰来源于知母,

16 号峰来源于升麻。见图 2。

2.6 化学成分研究

采用正、负离子分别对供试品溶液进行扫描, 结果显示在 2 种模式下, 检测到的成分个数一致, 且负离子模式下样品中大部分成分响应高于正离子模式下的信号 (图 3)。通过对照品比对, 结合紫外吸收曲线、MS 数据和相关文献^[11-30]进行分析, 鉴定出 42 个化学成分, 其中 16 个化学成分为对照品比对鉴定。结合指纹图谱中共有峰的归属、各药味所含化学成分等信息, 分析制剂中的 8 个异黄酮类

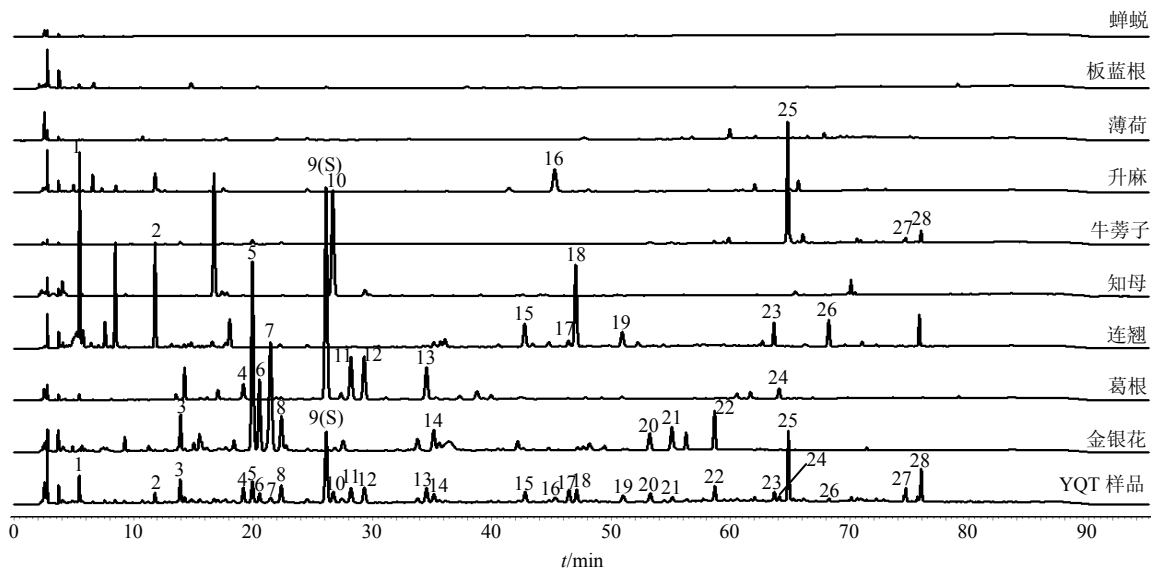


图 2 YQT 指纹图谱中各共有峰归属色谱图

Fig. 2 Fingerprint of characteristic of each common peak in YQT

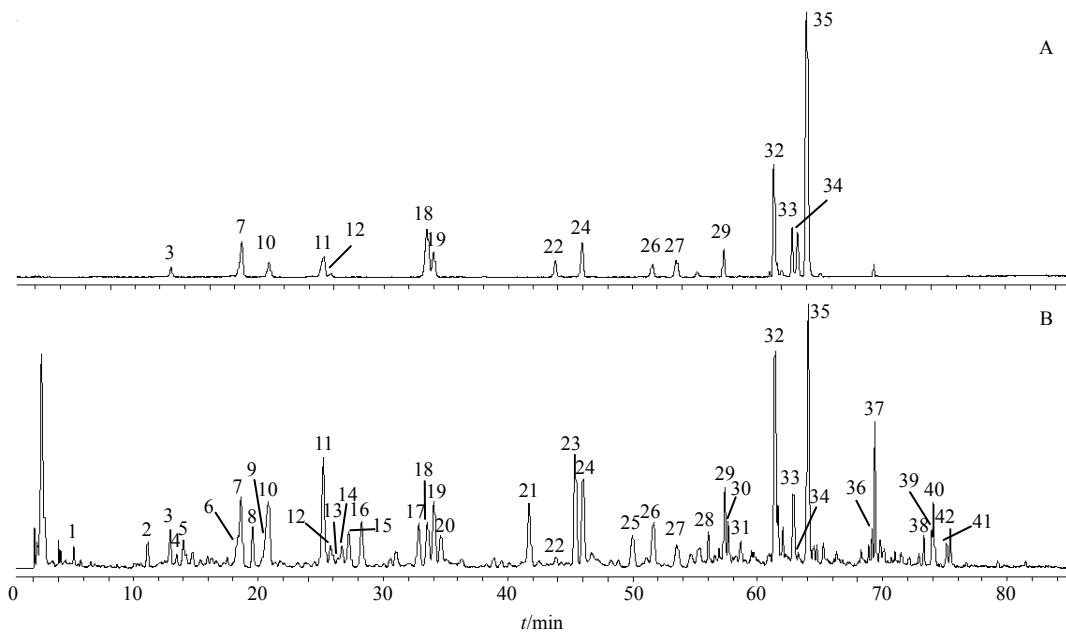


图 3 混合对照品 (A) 和 YQT (B) 负离子模式 TIC 图

Fig. 3 TIC of mixed reference substances (A) and YQT (B) in negative ion mode

成分来源于葛根, 分别为化合物 4、6、11、13、15、16、18、34; 6 个奎宁酸类成分和 6 个环烯醚萜类成分来源于金银花, 分别为化合物 3、7、10、26、27、29 和 8、9、14、17、19、20; 4 个苯乙醇苷类成分、2 个木脂素类成分和 2 个其他类成分来源于连翘, 分别为化合物 5、21、22、23、25、33 和 1、

2; 1 个黄酮类成分和 6 个甾体皂苷类成分来源于知母, 分别为化合物 12 及 28、30、32、36、37、38; 6 个木脂素类成分来源于牛蒡子, 分别为化合物 31、35、39、40、41、42; 芦丁来源不好归属。42 个化学成分的分子式、母离子测定值、理论值、误差、最大吸收波长 (λ_{max})、来源信息见表 1。

表 1 YQT 中化学成分 UPLC-DAD-Q-TOF/MS 数据及鉴定结果
Table 1 Information of identified compounds in YQT by UPLC-DAD-Q-TOF/MS

化合物	t_R /min	λ_{max} /nm	母离子测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差/ $\times 10^{-6}$	分子式	鉴定结果	指纹共有峰号	来源
1	5.2	225	315.108 5 [M-H] ⁻¹	315.108 5	0.17	C ₁₄ H ₂₀ O ₈	连翘酸-1'-O-β-D-	1	连翘
			361.114 4 [M+HCO ₂] ⁻¹	361.114 0	-0.91		葡萄糖苷		
2	11.1	235	375.129 7 [M-H] ⁻¹	375.129 7	-0.20	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	五福花苷酸	2	连翘
			399.126 2 [M+Na] ⁺	399.126 2	-0.19				
3*	12.9	327	353.087 9 [M-H] ⁻¹	353.087 8	-0.36	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	新绿原酸	3	金银花
			355.102 8 [M+H] ⁺	355.102 4	-1.39				
4	13.4	250	577.156 1 [M-H] ⁻¹	577.156 3	0.26	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	葛根素-4'-O-葡		葛根
			579.170 5 [M+H] ⁺	579.170 8	0.52		萄糖苷		
5	14.0	280	461.166 2 [M-H] ⁻¹	461.166 4	0.45	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	连翘酯苷 E		连翘
			485.163 0 [M+Na] ⁺	485.162 9	-0.09				
6	18.2	250	431.098 1 [M-H] ⁻¹	431.098 4	0.73	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	3-羟基葛根素	4	葛根
			433.113 3 [M+H] ⁺	433.112 9	-0.79				
7*	18.6	327	353.087 5 [M-H] ⁻¹	353.087 8	0.85	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸	5	金银花
			355.102 4 [M+H] ⁺	355.102 4	-0.12				
8	19.5	235	389.108 9 [M-H] ⁻¹	389.108 9	0.05	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	断马钱苷	6	金银花
			413.106 2 [M+Na] ⁺	413.105 4	-1.92				
9	20.5	245	373.113 7 [M-H] ⁻¹	373.114 0	0.87	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	断马钱子酸	7	金银花
			397.110 8 [M+Na] ⁺	397.110 5	-0.82				
10*	20.8	327	353.087 8 [M-H] ⁻¹	353.087 8	0.08	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	隐绿原酸	8	金银花
11*	25.1	250	415.103 4 [M-H] ⁻¹	415.103 5	0.23	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	葛根素	9 (S)	葛根
12*	25.7	254	421.077 6 [M-H] ⁻¹	421.077 6	0.19	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₁	芒果苷	10	知母
13	26.3	245	547.145 4 [M-H] ⁻¹	547.145 7	0.65	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	葛根素-6'-O-木糖苷		葛根
			549.160 0 [M+H] ⁺	549.160 3	-0.56				
14	26.6	250	403.124 3 [M+HCO ₂] ⁻¹	403.124 6	0.67	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	獐牙菜苷		金银花
			359.133 5 [M+H] ⁺	359.133 7	0.55				
15	27.2	250	445.113 9 [M-H] ⁻¹	445.114 0	0.40	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	3-甲基葛根素	11	葛根
			447.128 6 [M+H] ⁺	447.128 6	0.00				
16	28.2	250	547.145 9 [M-H] ⁻¹	547.145 7	-0.29	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	葛根素芹菜糖苷	12	葛根
			549.160 4 [M+H] ⁺	549.160 3	-0.32				
17	32.8	245	433.135 2 [M+HCO ₂] ⁻¹	433.135 1	-0.11	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	表断马钱子苷半		金银花
			389.144 3 [M+H] ⁺	389.144 2	-0.18		缩醛内酯		
18*	33.5	250	461.108 6 [M+HCO ₂] ⁻¹	461.108 9	0.70	C ₂₁ H ₂₀ O ₉	大豆苷	13	葛根
			417.117 9 [M+H] ⁺	417.118 0	0.14				
19*	34.0	235	403.124 6 [M-H] ⁻¹	403.124 6	-0.02	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	断氧化马钱苷	14	金银花
			427.121 2 [M+Na] ⁺	427.121 1	-0.37				

续表 1

化合物	t_R /min	λ_{max} /nm	母离子测定值 (m/z)	理论值 (m/z)	误差/ $\times 10^{-6}$	分子式	鉴定结果	指纹共有峰号	来源
20	34.6	245	433.135 2 $[M+HCO_2]^{-1}$	433.135 1	-0.21	$C_{17}H_{24}O_{10}$	断马钱子苷半缩 醛内酯		金银花
			389.144 3 $[M+H]^+$	389.144 2	-0.22				
21	41.6	327	623.198 0 $[M-H]^{-1}$	623.198 1	0.28	$C_{29}H_{36}O_{15}$	阿克苷	15	连翘
			647.194 4 $[M+Na]^+$	647.194 6	0.46				
22*	43.7	350	611.160 7 $[M+H]^+$	611.160 7	-0.09	$C_{27}H_{30}O_{16}$	芦丁		
23	45.3	327	623.198 0 $[M-H]^{-1}$	623.198 1	0.30	$C_{29}H_{36}O_{15}$	异连翘酯苷	17	连翘
			642.239 9 $[M+NH_4]^+$	642.239 2	-1.08				
24*	46.0	327	623.198 1 $[M-H]^{-1}$	623.198 1	0.12	$C_{29}H_{36}O_{15}$	连翘酯苷 A	18	连翘
			642.239 4 $[M+NH_4]^+$	642.239 2	-0.32				
25	49.9	230	519.187 5 $[M-H]^{-1}$	519.187 2	-0.51	$C_{26}H_{32}O_{11}$	(+) -表松脂素-4-O- β -D-葡萄糖苷	19	连翘
			543.183 7 $[M+Na]^+$	543.183 7	-0.01				
26*	51.6	327	515.119 6 $[M-H]^{-1}$	515.119 5	-0.16	$C_{25}H_{24}O_{12}$	异绿原酸 B	20	金银花
27*	53.5	327	515.119 5 $[M-H]^{-1}$	515.119 5	-0.02	$C_{25}H_{24}O_{12}$	异绿原酸 A	21	金银花
28	56.0	-	935.486 0 $[M-H]^{-1}$	935.485 7	-0.32	$C_{45}H_{76}O_{20}$	知母皂苷 E1		知母
			959.481 7 $[M+Na]^+$	959.482 2	0.65				
29*	57.3	327	515.119 6 $[M-H]^{-1}$	515.119 5	-0.27	$C_{25}H_{24}O_{12}$	异绿原酸 C	22	金银花
30	57.6	-	917.475 4 $[M-H]^{-1}$	917.475 2	-0.03	$C_{45}H_{74}O_{19}$	知母皂苷 D		知母
			941.471 5 $[M+Na]^+$	941.471 7	-0.02				
31	58.6	280	519.186 9 $[M-H]^{-1}$	519.187 2	0.62	$C_{26}H_{32}O_{11}$	罗汉松脂素苷		牛蒡子
			543.184 0 $[M+Na]^+$	543.183 7	-0.67				
32*	61.3	-	919.490 9 $[M-H]^{-1}$	919.490 8	-0.15	$C_{45}H_{76}O_{19}$	知母皂苷 B II		知母
33*	62.8	230	579.208 4 $[M+HCO_2]^{-1}$	579.208 3	-0.14	$C_{27}H_{34}O_{11}$	连翘苷	23	连翘
			557.199 7 $[M+Na]^+$	557.199 3	-0.62				
34*	63.3	250	253.050 7 $[M-H]^{-1}$	253.050 6	-0.09	$C_{15}H_{10}O_4$	大豆苷元	24	葛根
35*	64.0	230	579.208 2 $[M+HCO_2]^{-1}$	579.208 3	0.28	$C_{27}H_{34}O_{11}$	牛蒡苷	25	牛蒡子
36	69.1	-	901.480 5 $[M-H]^{-1}$	901.480 2	-0.16	$C_{45}H_{74}O_{18}$	知母皂苷 C		知母
			903.494 9 $[M+H]^+$	903.494 8	-0.05				
37	69.3	-	901.480 2 $[M-H]^{-1}$	901.480 2	-0.08	$C_{45}H_{74}O_{18}$	知母皂苷 B III		知母
			903.496 0 $[M+H]^+$	903.494 8	-1.45				
38	73.3	-	757.437 6 $[M-H]^{-1}$	757.438 0	0.57	$C_{39}H_{66}O_{14}$	知母皂苷 I		知母
			781.433 8 $[M+Na]^+$	781.434 5	0.96				
39	73.9	280	535.197 5 $[M-H]^{-1}$	535.197 4	-0.26	$C_{30}H_{32}O_9$	牛蒡酚 A	27	牛蒡子
			559.193 6 $[M+Na]^+$	559.193 9	0.52				
40	74.1	280	535.197 5 $[M-H]^{-1}$	535.197 4	-0.26	$C_{30}H_{32}O_9$	异牛蒡酚 A		牛蒡子
			559.194 1 $[M+Na]^+$	559.193 9	-0.56				
41	75.1	280	713.260 6 $[M-H]^{-1}$	713.260 4	-0.28	$C_{40}H_{42}O_{12}$	牛蒡酚 F		牛蒡子
			737.256 5 $[M+Na]^+$	737.256 8	0.50				
42	75.4	230	371.150 0 $[M-H]^{-1}$	371.150 0	0.02	$C_{21}H_{24}O_6$	牛蒡苷元	28	牛蒡子
			373.164 7 $[M+H]^+$	373.164 6	-0.33				

“*” 为经过对照品确证的成分

“**” is composition confirmed after reference substance

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

使用 DAD 检测器对样品进行 190~600 nm 全波长扫描, 并对等吸收图进行分析, 提取吸收峰较多的 3 个波长 (230、280、330 nm) 下的色谱图进行比较, 显示 230 nm 检测波长能较全面地反映 YQT 中的化学成分, 且各色谱峰分离较好, 基线平稳, 因此选择 230 nm 作为 YQT 指纹图谱的采集波长。考虑到金银花、连翘中含有大量有机酸类、苯乙醇苷类成分, 选用乙腈-酸水系统进行研究。比较了乙腈-三氟乙酸水溶液、乙腈-甲酸水溶液和乙腈-磷酸水溶液系统, 结果显示乙腈-三氟乙酸水溶液基线漂移, 乙腈-甲酸水溶液系统各成分响应较小, 基线噪音高, 因此选用乙腈-磷酸水溶液系统作为流动相。对不同品牌的色谱柱进行考察, 分别为 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters Symmetry C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和 Luna C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)。结果显示 Kromasil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 对样品的分离效果较好, 用 2 支该类型的色谱柱进行实验, 结果重复性较好, 因此选择用该类型色谱柱为 YQT 指纹图谱分析柱。考察柱温为 20、25、30、35 °C 所得图谱, 结果柱温为 20、25 °C 时各个成分分离度和色谱峰的对称性均较好, 考虑到实验室和仪器的控温能力, 选择柱温为 25 °C。

3.2 提取方法的考察

对供试品的提取方法、提取溶剂、提取时间和溶剂用量分别进行考察, 结果显示超声与回流 2 种方式提取效果相当, 考虑到超声提取操作简单易行, 选择超声提取法。50% 甲醇提取的样品信息较全面, 选择 50% 甲醇为提取溶剂; 超声 20 min 样品中各成分已提取充分, 因此选择提取时间为 20 min。溶剂用量在 10~50 mL, 各色谱峰均提取较充分, 而溶剂用量为 10 mL 时, 样品黏度大, 难于处理, 选择溶剂用量为 25 mL。

3.3 不同批次制剂质量分析

实验测定的 11 批 YQT 指纹图谱相似度较好, 但相对峰面积有一定的差异, 结合定量测定中指标成分的转移率分析, 制剂质量的差异性主要归因于投料药材质量的不均一, 因此若要保证成品质量的稳定性, 控制药材的质量均一性是非常必要的。

3.4 小结

本研究建立了 YQT 指纹图谱, 对照指纹图谱

中的共有峰来源于处方中的 6 味药材, 对制剂有较好的整体质控效果。并结合光谱信息、色谱信息及质谱信息对 YQT 中 42 个成分进行了鉴定, 为深入研究 YQT 的物质基础和质量标准的提升提供有力的技术支持。但不足的是在指纹图谱中板蓝根、薄荷和蝉蜕的化学信息未得到体现, 分析可能因为以上 3 味药材专属性成分为挥发性或水溶性成分, 在现有的洗脱条件和检测条件下, 不能被检识, 需在后续的研究中予以改进。

参考文献

- [1] 梁涛, 方泰惠, 袁冬平, 等. 银翘败毒片抗炎与解热作用的实验研究 [J]. 解放军药学报, 2007, 23(6): 411-413.
- [2] 张洁玉, 周凌, 张瑜, 等. 银翘败毒片治疗感冒 (外感风热证) 有效性和安全性 II 期临床试验报道 [J]. 中医药学报, 2015(3): 72-75.
- [3] 张倩, 霍会霞, 顾宇凡, 等. 沉香药材 HPLC-DAD 特征图谱研究 [J]. 中国药学杂志, 2015, 5(3): 213-216.
- [4] 张永志, 佟玲, 李东翔, 等. 藿香正气滴丸 UFLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2246-2250.
- [5] 秦建平, 吴建雄, 郎悦, 等. 痛宁凝胶的 HPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(4): 427-430.
- [6] 孙国祥, 闫波, 侯志飞, 等. 中药色谱指纹图谱评价方法研究进展 [J]. 中南药学, 2015, 13(7): 673-681.
- [7] 何珊珊, 岳洪水, 宋丽丽, 等. 注射用益气复脉 (冻干) HPLC 指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 390-393.
- [8] 吴定慧, 陈关键. 液质联用技术在中药研究中的应用概述 [J]. 实用中医药杂志, 2012, 28(1): 65-66.
- [9] 罗娟敏, 肖雪, 洪流, 等. HPLC/TOF-MS 和 HPLC/IT-MSⁿ 联合用于补骨脂药材的化学成分分析 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 924-928.
- [10] 吴茵, 穆华, 刘勇, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定玄麦甘桔颗粒中 8 种有效成分 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 3034-3038.
- [11] Song W, Li Y J, Qiao X, et al. Chemistry of the Chinese herbal medicine *Puerariae Radix* (Ge-Gen): A review [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2014, 23(6): 347-360.
- [12] 张梅, 刘静, 刘军, 等. LC-MS/MS 分析含葛根复方制剂给药血浆中来自葛根的移行成分 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(9): 1954-1957.
- [13] Zhao Y, Kang L P, Yu H S, et al. Simultaneous determination of steroidal saponins in *Anemarrhena asphodeloides* Bge. by ultra high-performance liquid chromatography/quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. *J Chin Pharm Sci*, 2013, 22(3):

- 226-233.
- [14] 周永刚, 吴 思, 毛 飞, 等. 葛根中黄酮类化学成分
的UHPLC-Q-TOFMS分析[J]. 药学实践杂志, 2013,
31(2): 116-119.
- [15] 曾建勋, 马龚斌, 李瑞明, 等. 高效液相色谱飞行时间
质谱分析连翘水煎液的有效成分[J]. 中药材, 2013,
4(4): 581-583.
- [16] 向 青, 王小花, 林 慧, 等. HPLC-DAD-Q-TOF-
MS/MS法的银黄颗粒主要成分定性定量研究[J].
中成药, 2015, 37(1): 105-112.
- [17] 宋亚玲, 倪付勇, 赵祎武, 等. 金银花化学成分研究进
展[J]. 中草药, 2014, 45(24): 3656-3664.
- [18] 白 雪, 黄惠锋, 吴修红, 等. HPLC-DAD-MS/MS法
分析金银花中化学成分[J]. 食品与药品, 2015, 17(1):
5-8.
- [19] 蔡恩博, 郭 雪, 赵 岩, 等. 牛蒡子化学成分研究进
展[J]. 人参研究, 2015, 27(1): 45-48.
- [20] Li X Q, Sun X H, Cai S, *et al.* Investigation on the
chemical constituents and variation of the flower buds of
Lonicera species by UPLC-ESI-MS/MS and principle
component analysis [J]. *Acta Pharm Sin*, 2009, 44(8):
895-904.
- [21] 明继阳, 陆园园, 罗建光, 等. HPLC-MSⁿ法分析知母
中的皂苷类成分[J]. 中国药科大学学报, 2009, 40(5):
400-405.
- [22] 秦昆明, 方前波, 蔡 皓, 等. 百合知母汤及其组方药
味的高效液相色谱-电喷雾质谱研究[J]. 分析化学,
2009, 37(12): 1759-1764.
- [23] 张丽媛, 李遇伯, 李利新, 等. RRLC-Q-TOF/MS分析
金银花的化学成分[J]. 中南药学, 2012, 10(3):
204-208.
- [24] 周 伟. 基于“银翘”药对的中药制剂生物有效性综合
评价体系的构建与应用[D]. 南京: 南京中医药大学,
2014.
- [25] 支旭然, 苑 霖, 生 宁, 等. HPLC-MS/MS法测定不
同采收期连翘叶中9种成分[J]. 中草药, 2013, 44(22):
3231-3235.
- [26] 王福男. 中药连翘的化学成分研究[D]. 北京: 中国协
和医科大学, 2009.
- [27] 刘启迪. 牛蒡子炮制工艺及质量标准研究[D]. 南京:
南京中医药大学, 2014.
- [28] 王颖异, 郭宝林, 张立军. 知母化学成分的药理研究进
展[J]. 科技导报, 2010, 28(12): 110-115.
- [29] 胡晓茹, 杨思广, 戴 忠, 等. 葛根苓连片特征图谱及
含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(9):
1590-1596.
- [30] 孙兴欢, 张宇伟, 黄雪峰. 知母的化学成分和药效研究
进展[J]. 海峡药学, 2015, 27(3): 6-12.