

UPLC-MS/MS 同时测定双黄连口服液中 17 种有效成分

刘 廷¹, 狄留庆^{1,2*}, 彭琳秀¹, 康 安^{1,2}, 李俊松^{1,2}, 赵晓莉^{1,2}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 同时测定双黄连口服液中 17 种成分 (新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、3,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、异连翘酯苷、连翘酯苷 A、连翘苷、芦丁、黄芩素、黄芩苷、野黄芩苷、汉黄芩苷、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷、汉黄芩素、千层纸素 A) 的分析方法。**方法** 采用 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以乙腈-甲醇 (4:1)-0.4% 甲酸水为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 0.4 mL/min, 柱温 40 °C, 采用电喷雾电离源 (ESI), 多反应离子监测 (MRM) 扫描方式进行检测, 分析时间为 7 min。**结果** 所测 17 种有效成分在测定质量浓度范围内线性关系良好, r^2 均大于 0.990 1, 实验精密性、准确性和稳定性良好, 平均加样回收率为 95.81%~102.42%, 所测 5 批样品中 17 种成分定量范围依次为: 新绿原酸 782.68~1 034.27 μg/mL、绿原酸 786.35~1 103.77 μg/mL、隐绿原酸 898.00~1 238.94 μg/mL、咖啡酸 82.85~115.17 μg/mL、3,5-二咖啡酰奎宁酸 226.02~461.63 μg/mL、3,4-二咖啡酰奎宁酸 191.59~404.21 μg/mL、异连翘酯苷 243.62~298.51 μg/mL、连翘酯苷 A 978.43~1 487.37 μg/mL、连翘苷 351.97~435.82 μg/mL、芦丁 41.19~75.65 μg/mL、黄芩素 40.28~73.73 μg/mL、黄芩苷 10 080.54~10 820.35 μg/mL、野黄芩苷 40.88~50.51 μg/mL、汉黄芩苷 187.73~204.85 μg/mL、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷 144.92~335.08 μg/mL、汉黄芩素 9.30~25.58 μg/mL、千层纸素 A 7.51~16.58 μg/mL。**结论** 方法简单、快速、准确度及灵敏度高、专属性好, 可用于双黄连口服液中 3 大类 17 个主要成分的快速定量测定。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 双黄连口服液; 新绿原酸; 绿原酸; 隐绿原酸; 咖啡酸; 3,5-二咖啡酰奎宁酸; 3,4-二咖啡酰奎宁酸; 异连翘酯苷; 连翘酯苷 A; 连翘苷; 芦丁; 黄芩素; 黄芩苷; 野黄芩苷; 汉黄芩苷; 千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷; 汉黄芩素; 千层纸素 A

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)22-3357-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.22.012

Simultaneous determination of 17 major components of Shuang-Huang-Lian Oral Liquid by UPLC-MS/MS

LIU Ting¹, DI Liu-qing^{1,2}, PENG Lin-xiu¹, KANG An^{1,2}, LI Jun-song^{1,2}, ZHAO Xiao-li^{1,2}

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

2. Jiangsu Provincial TCM Engineering Technology Research Center of High Efficient Drug Delivery System (DDS), Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To establish a UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of 17 bioactive compounds in Shuang-Huang-Lian Oral Liquid. **Methods** The separation was performed on an Acquity UPLC HSS T3 C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) and the flow rate was set at 0.4 mL/min with acetonitrile/methanol (4:1)-0.4% formic acid as the mobile phase. The column temperature was 40 °C and only 7 min was needed for separating the five pairs of isomers. The detection was performed on a triple quadrupole tandem mass spectrometer by multiple reaction monitoring (MRM) via electrospray ionization (ESI) source with positive and negative modes. **Results** All calibration curves had good linearity ($r^2 > 0.990$ 1). The precisions and accuracies of the 17 analytes were all satisfied and the recoveries were 95.81%—102.42%. The content ranges of the 17 compounds were 782.68—1 034.27 μg/mL for neochlorogenic acid, 786.35—1 103.77 μg/mL for chlorogenic acid, 898.00—1 238.94 μg/mL for cryptochlorogenic acid,

收稿日期: 2015-07-04

基金项目: 江苏省“333 高层次人才培养工程”资助项目 (BRA2013201); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (ysxk-2010)

作者简介: 刘 廷 (1990—), 男, 硕士在读。E-mail: liuting19900902@163.com

*通信作者 狄留庆 (1964—), 教授, 博士生导师。Tel: (025)85811230 E-mail: diliuqing928@163.com

82.85—115.17 $\mu\text{g/mL}$ for caffeic acid, 226.02—461.63 $\mu\text{g/mL}$ for 3,5-dicaffeoylquinic acid, 191.59—404.21 $\mu\text{g/mL}$ for 3,4-dicaffeoylquinic acid, 243.62—298.51 $\mu\text{g/mL}$ for isoforsythiaside, 978.43—1487.37 $\mu\text{g/mL}$ for forsythoside A, 351.97—435.82 $\mu\text{g/mL}$ for forsythin, 41.19—75.65 $\mu\text{g/mL}$ for rutin, 40.28—73.73 $\mu\text{g/mL}$ for baicalein, 10 080.54—10 820.35 $\mu\text{g/mL}$ for baicalin, 40.88—50.51 $\mu\text{g/mL}$ for scutellarin, 187.73—204.85 $\mu\text{g/mL}$ for wogonoside, 144.92—335.08 $\mu\text{g/mL}$ for oroxylin A-7-*O*- β -*D*-glucuronide, 9.30—25.58 $\mu\text{g/mL}$ for wogonin, and 7.51—16.58 $\mu\text{g/mL}$ for oroxylin A, respectively. **Conclusion** The developed UPLC-MS/MS method is simple, sensitive, and accurate, and could be applied for simultaneous determination of the 17 components in Shuang-Huang-Lian Oral Liquid.

Key words: UPLC-MS/MS; Shuang-Huang-Lian Oral Liquid; neochlorogenic acid; chlorogenic acid; cryptochlorogenic acid; caffeic acid; 3,5-dicaffeoylquinic acid; 3,4-dicaffeoylquinic acid; isoforsythiaside; forsythoside A; forsythin; rutin; baicalein; baicalin; scutellarin; wogonoside; oroxylin A-7-*O*- β -*D*-glucuronide; wogonin; oroxylin A

双黄连口服液由金银花、连翘、黄芩 3 味药组成, 具有清热解毒的功效^[1-3], 临床上主要用于治疗由上呼吸道感染引起的头痛、发热等, 而发挥药效的物质基础主要为酚酸类、苯乙醇苷类和黄酮类成分^[4-9]。中药复方制剂组成复杂, 杂质较多, 成分的量差异较大, 且双黄连口服液中不少有效成分是以同分异构体形式存在, HPLC-UV 法干扰多, 耗时长, 只能通过测定几个指标性成分对双黄连口服液进行质量控制^[10-11]。超高效液相色谱-串联质谱联用技术 (UPLC-MS/MS) 具有专属性好、灵敏度高、快速等特点, 可以排除复杂基质中相似化学成分的干扰, 为中药及其复方制剂的多组分快速分析提供了强有力的技术支持^[12-15]。

本实验采用 UPLC-MS/MS 同时测定双黄连口服液中的 17 个指标性成分 (6 个酚酸类成分、3 个苯乙醇苷类成分、8 个黄酮类成分), 分别主要来源于金银花、连翘和黄芩, 兼顾全方, 以期对该制剂的质量控制提供全面、快速、可靠的分析方法。

1 仪器与材料

超高效液相色谱-TQD 质谱联用仪, Acquity 系统, MassLynx V4.1 工作站, 美国 Waters 公司; MicroCL 21R 微量离心机, 美国 Thermo Scientific 公司; 微量移液器, 上海科华实验系统有限公司; Milli-Q Synthesis 108 超纯水仪, 美国密理博公司; 梅特勒-托利多 XP6 百万分之一天平, 瑞士梅特勒-托利多公司。

连翘苷 (批号 110821-201514)、黄芩苷 (批号 110715-201318)、替硝唑 (批号 100336-200703) 对照品购自中国食品药品检定研究院; 连翘酯苷 A (批号 L-012-140730)、绿原酸 (批号 L-007-130130)、新绿原酸 (批号 X-014-130126)、隐绿原酸 (批号 Y-067-140116)、3,5-二咖啡酰奎宁酸 (批号 Y-069-130126)、3,4-二咖啡酰奎宁酸 (批号 Y-068-150113)、

咖啡酸 (批号 K-003-130501)、异连翘酯苷 (批号 Y-184-131108)、野黄芩苷 (批号 Y-012-140801)、汉黄芩苷 (批号 H-019-140729)、千层纸素 A-7-*O*- β -*D*-葡萄糖苷 (批号 Q-046-140111)、黄芩素 (批号 H-018-140729)、芦丁 (批号 L-001-130615)、汉黄芩素 (批号 H-029-140729)、氯霉素 (批号 2013091003)、千层纸素 A (批号 Q-020-140731) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司, 质量分数均大于 98% (采用色谱峰面积归一化法计算而得)。乙腈、甲醇, 色谱纯, 德国 Merck 公司; 重蒸水, Milli-Q Synthesis 108 超纯水仪制得。双黄连口服液, 哈药集团三精制药股份有限公司提供, 批号 13020715、13020562、13021633、13022231、13060641, 规格 10 mL。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.4% 甲酸水溶液 (A)-乙腈-甲醇 (4:1, B), 体积流量 0.4 mL/min, 梯度洗脱程序为 0~0.5 min, 10%~11% B; 0.5~0.75 min, 11%~13% B; 0.75~1.5 min, 13%~15% B, 1.5~2 min, 15%~10% B; 2~3 min, 10%~30% B; 3~6.2 min, 30%~70% B; 6.2~6.5 min, 70%~10% B; 6.5~7 min, 10%~10% B。柱温 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积 5 μL 。

2.2 质谱条件

Waters 三重四级杆串联质谱仪 (TQD), 离子化方式为电喷雾离子化 (ESI), 采用多反应监测离子扫描 (MRM) 模式; 主要质谱参数: 毛细管电压为 3.5 kV, 脱溶剂温度为 400 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气体积流量为 800 L/h, 锥孔气体积流量为 50 L/h。各成分的部分质谱分析参数见表 1。双黄连口服液样品及混合对照品中 17 种成分及内标的提取离子流图见图 1。

表 1 17 种成分的部分质谱分析参数
Table 1 MS parameters of 17 compounds

成分	分子式	相对分子质量	母离子	子离子	锥孔电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min
新绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	354.88 [M+H] ⁺	162.90	18	12	1.26
绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	354.88 [M+H] ⁺	162.90	18	12	1.75
隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354.31	354.88 [M+H] ⁺	162.90	18	12	1.88
咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	180.16	180.80 [M+H] ⁺	163.10	22	12	2.15
3,5-二咖啡酰奎宁酸	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.45	516.92 [M+H] ⁺	162.88	24	20	3.77
3,4-二咖啡酰奎宁酸	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	516.45	516.92 [M+H] ⁺	162.88	24	20	3.92
异连翘酯苷	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.59	622.95 [M-H] ⁻	160.93	64	50	3.55
连翘酯苷 A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	624.59	622.95 [M-H] ⁻	160.93	64	50	3.64
连翘苷	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	534.55	556.91 [M+Na] ⁺	309.05	64	30	4.39
芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610.52	610.92 [M+H] ⁺	302.93	30	22	3.58
黄芩素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24	270.89 [M+H] ⁺	122.93	62	36	5.21
黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	446.36	446.83 [M+H] ⁺	271.07	44	26	4.27
野黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	462.36	462.89 [M+H] ⁺	287.06	38	22	3.67
汉黄芩苷	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	460.39	460.83 [M+H] ⁺	271.07	44	26	4.60
千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	460.39	460.83 [M+H] ⁺	271.07	44	26	4.75
汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.26	284.86 [M+H] ⁺	270.00	48	22	5.79
千层纸素 A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	284.26	284.86 [M+H] ⁺	270.00	48	22	5.97
替硝唑 (内标 1)	C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	247.27	247.84 [M+H] ⁺	120.85	36	16	2.21
氯霉素 (内标 2)	C ₁₁ H ₁₂ C ₁₂ N ₂ O ₅	323.13	320.77 [M-H] ⁻	151.81	30	18	4.23

2.3 对照品储备液的制备

分别精密称取新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、咖啡酸、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、3,5-二咖啡酰奎宁酸、3,4-二咖啡酰奎宁酸、芦丁、汉黄芩素、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷、千层纸素 A、野黄芩苷、连翘酯苷 A、异连翘酯苷、连翘苷对照品适量置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,制得质量浓度分别为 261、201、211、268、618、206、102、238、213、242、123、201、210、265、222、210 及 470 μg/mL 的对照品储备液,4 °C 保存,备用。

2.4 内标溶液的制备

分别精密称取替硝唑和氯霉素适量置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,制得质量浓度分别为 240 μg/mL 和 533 μg/mL 的混合内标储备液,精密量取 0.1 mL 混合内标溶液至 10 mL 量瓶中,用甲醇定容至刻度,得含替硝唑和氯霉素质量浓度分别为 2.40 μg/mL 和 5.33 μg/mL 的混合内标溶液。

2.5 供试品溶液的制备^[16-17]

精密量取 1 mL 双黄连口服液至 100 mL 量瓶中,用初始流动相乙腈-甲醇 (4:1) -0.4% 甲酸水

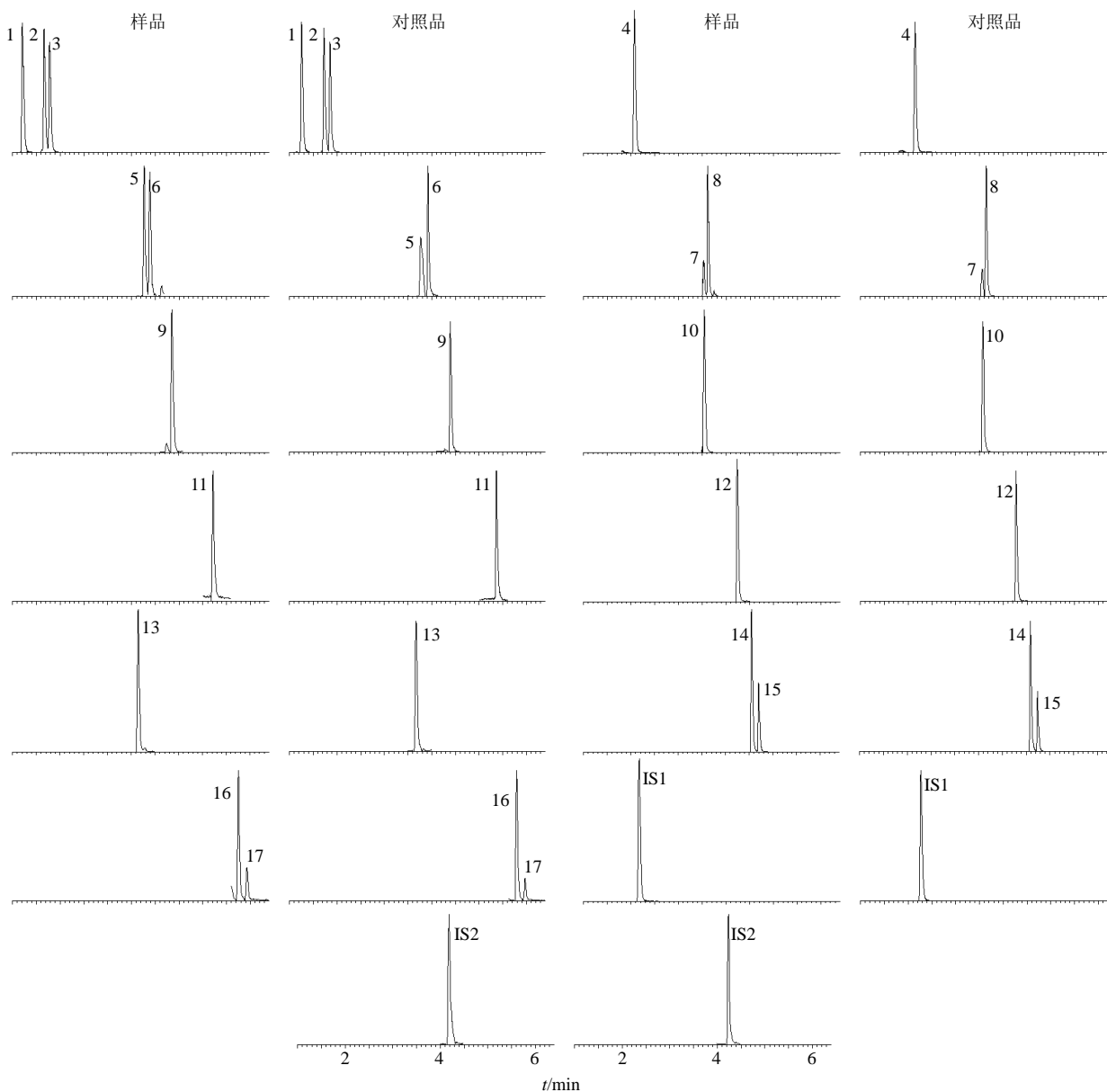
溶液 (1:9) 稀释至刻度,摇匀后过 0.22 μm 滤膜,移取 10 μL 续滤液加入 10 μL 内标液和 80 μL 初始流动相,涡旋混匀,14 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,即得供试品溶液。

2.6 线性关系与定量限

分别精密量取“2.3”项下对照品储备液适量,置于 10 mL 量瓶中,用初始流动相乙腈-甲醇 (4:1) -0.4% 甲酸水溶液 (1:9) 稀释至刻度,得系列质量浓度的混合对照品溶液,取 10 μL 混合对照品溶液加入 10 μL 内标液和 80 μL 初始流动相,涡旋混匀,14 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,按照“2.1”和“2.2”项下条件测定。以质量浓度为横坐标 (X),对照品与内标峰面积比值为纵坐标 (Y) 进行线性回归,得各成分的回归方程、相关系数及线性范围,以信噪比为 10 确定各成分的定量限 (LOQ),结果见表 2。结果表明,各成分在各自的线性范围内具有良好的线性关系。

2.7 精密度考察

取双黄连口服液 (批号 13021633),按“2.5”项下方法操作制备供试品溶液,按“2.1”和“2.2”



1-新绿原酸 2-绿原酸 3-隐绿原酸 4-咖啡酸 5-3,5-二咖啡酰奎宁酸 6-3,4-二咖啡酰奎宁酸 7-异连翘酯苷 8-连翘酯苷 A 9-连翘苷 10-芦丁 11-黄芩素 12-黄芩苷 13-野黄芩苷 14-汉黄芩苷 15-千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷 16-汉黄芩素 17-千层纸素 A IS1-替硝唑 IS2-氯霉素
 1-neochlorogenic acid 2-chlorogenic acid 3-cryptochlorogenic acid 4-caffeic acid 5-3,5-dicaffeoylquinic acid 6-3,4-dicaffeoylquinic acid 7-isoforsythiaside 8-forsythoside A 9-forsythiin 10-rutin 11-baicalein 12-baicalin 13-scutellarin 14-wogonoside 15-oroxylin A-7-O-glucuronide 16-wogonin 17-oroxylin A IS1-tinidazole IS2-chloramphenicol

图 1 双黄连口服液样品及混合对照品中 17 种成分及内标的提取离子流图

Fig. 1 Extracting ion flow chart of 17 compounds and internal standards in Shuang-Huang-Lian Oral Liquid and mixed reference solution

项下条件测定，连续进样 6 次，以对照品与内标峰面积比值计算，17 个成分的 RSD 分别为新绿原酸 1.18%、绿原酸 1.27%、隐绿原酸 1.57%、咖啡酸 0.45%、3,5-二咖啡酰奎宁酸 1.25%、3,4-二咖啡酰奎宁酸 1.20%、异连翘酯苷 1.55%、连翘酯苷 A 1.29%、连翘苷 2.49%、芦丁 1.09%、黄芩素 1.37%、黄芩苷 0.50%、野黄芩苷 2.63%、汉黄芩苷 0.67%、

千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷 1.69%、汉黄芩素 2.16%、千层纸素 A 0.64%，表明仪器精密度良好。

2.8 重复性考察

取双黄连口服液（批号 13021633），按“2.5”项下方法操作制备供试品溶液 6 份，按“2.1”和“2.2”项下条件测定，以对照品与内标峰面积比值计算，17 个成分的 RSD 分别为新绿原酸 1.23%、绿原酸

表2 17种化学成分的线性回归方程及定量限

Table 2 Linear regression equations and LOQs of 17 compounds

成分	回归方程	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	r ²	LOQ/(ng·mL ⁻¹)
新绿原酸	$Y=0.0006X-0.0059$	17.40~2175	0.9999	0.70
绿原酸	$Y=0.0005X+0.0071$	33.50~1675	0.9906	0.54
隐绿原酸	$Y=0.0004X+0.0058$	35.16~1758	0.9918	0.56
咖啡酸	$Y=0.0042X-0.0070$	8.92~446.0	0.9999	0.71
3,5-二咖啡酰奎宁酸	$Y=0.00008X-0.0005$	9.96~495.8	0.9943	1.98
3,4-二咖啡酰奎宁酸	$Y=0.000093X-0.0004$	8.88~443.7	0.9967	0.71
异连翘酯苷	$Y=0.0131X+0.0816$	26.26~1313	0.9917	2.10
连翘酯苷 A	$Y=0.0157X+0.1715$	27.76~2776	0.9901	2.22
连翘苷	$Y=0.000026X+0.0002$	23.50~2938	0.9977	2.35
芦丁	$Y=0.0019X+0.0005$	4.03~201.6	0.9917	0.81
黄芩素	$Y=0.0008X+0.0004$	1.72~85.80	0.9961	0.34
黄芩苷	$Y=0.0011X-0.1512$	61.80~15450	0.9974	0.99
野黄芩苷	$Y=0.0027X-0.0021$	1.77~88.30	0.9988	0.71
汉黄芩苷	$Y=0.0031X-0.0062$	17.00~850.0	0.9955	1.36
千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷	$Y=0.0008X-0.0029$	13.40~1675	0.9906	0.54
汉黄芩素	$Y=0.0015X-0.0002$	0.41~41.00	0.9996	0.16
千层纸素 A	$Y=0.0003X-0.0002$	0.88~43.75	0.9983	0.35

1.41%、隐绿原酸 1.96%、咖啡酸 2.49%、3,5-二咖啡酰奎宁酸 0.76%、3,4-二咖啡酰奎宁酸 1.23%、异连翘酯苷 0.67%、连翘酯苷 A 1.48%、连翘苷 0.27%、芦丁 2.10%、黄芩素 2.20%、黄芩苷 2.12%、野黄芩苷 0.71%、汉黄芩苷 2.84%、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷 2.58%、汉黄芩素 1.60%、千层纸素 A 2.48%，表明该方法重复性良好。

2.9 稳定性试验

取双黄连口服液（批号 13021633），按“2.5”项下方法操作制备供试品溶液，分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 按“2.1”和“2.2”项下条件测定，以对照品与内标峰面积比值计算，17 个成分的 RSD 分别为新绿原酸 2.10%、绿原酸 2.00%、隐绿原酸 1.62%、咖啡酸 2.58%、3,5-二咖啡酰奎宁酸 2.93%、3,4-二咖啡酰奎宁酸 1.17%、异连翘酯苷 1.48%、连翘酯苷 A 1.08%、连翘苷 1.67%、芦丁 1.38%、黄芩素 1.28%、黄芩苷 1.61%、野黄芩苷 2.13%、汉黄芩苷 1.70%、千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷 1.97%、汉黄芩素 1.71%、千层纸素 A 1.55%，表明供试品溶液室温放置 12 h 稳定。

2.10 加样回收率试验

精密移取 6 份（批号 13021633）1 mL 双黄连

口服液至 100 mL 量瓶中，并加入初始流动相至刻度得样品溶液，精密移取各对照品储备液适量置于 10 mL 量瓶中得混合对照品溶液，将样品溶液和混合对照品溶液按 1:1 混合后精密移取 10 μL 加入 10 μL 内标液及 80 μL 初始流动相，涡旋混匀，14 000 r/min 离心 10 min 后取上清液，即得供试品溶液，按“2.1”和“2.2”项下条件测定，计算各成分回收率，结果平均回收率及 RSD 分别为新绿原酸 100.47%、1.11%，绿原酸 96.72%、1.82%，隐绿原酸 99.57%、1.24%，咖啡酸 99.82%、2.69%，3,5-二咖啡酰奎宁酸 102.42%、1.26%，3,4-二咖啡酰奎宁酸 101.27%、2.85%，异连翘酯苷 95.81%、1.25%，连翘酯苷 A 101.85%、2.71%，连翘苷 98.31%、2.84%，芦丁 100.69%、2.30%，黄芩素 101.04%、2.44%，黄芩苷 97.21%、2.45%，野黄芩苷 96.64%、0.91%，汉黄芩苷 96.33%、1.26%，千层纸素 A-7-O-β-D-葡萄糖苷 99.41%、1.04%，汉黄芩素 96.02%、2.51%，千层纸素 A 100.70%、1.66%。

2.11 样品测定

取 5 个批次的双黄连口服液，按照“2.5”项下方法处理，平行制得各组待测样品溶液 3 份，进样分析，经计算得到各成分的量，结果见表 3。

表 3 不同批次双黄连口服液中多组分的定量测定 ($n = 3$)Table 3 Quantitative determination of multi-components in different batches of Shuang-Huang-Lian Oral Liquid ($n = 3$)

批号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)								
	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	咖啡酸	3,5-二咖啡酰奎宁酸	3,4-二咖啡酰奎宁酸	异连翘酯苷	连翘酯苷 A	连翘苷
13020715	888.10	910.31	1 036.35	82.85	226.02	191.59	274.84	1 379.67	390.19
13020562	918.50	996.73	1 100.32	115.17	461.63	404.21	298.51	1 487.37	435.82
13021633	1 034.27	1 103.77	1 238.94	102.41	378.17	363.01	243.62	978.43	432.72
13022231	912.05	949.27	1 047.05	95.03	295.83	286.02	286.16	1 495.33	420.58
13060641	782.68	786.35	898.00	107.41	451.02	382.67	296.96	1 470.07	351.97

批号	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)								
	芦丁	黄芩素	黄芩苷	野黄芩苷	汉黄芩苷	千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷	汉黄芩素	千层纸素 A	
13020715	55.36	71.95	10 502.01	50.51	202.23	189.93	11.57	12.47	
13020562	41.19	52.99	10 080.54	43.79	203.20	172.96	9.30	7.51	
13021633	65.83	40.28	10 820.35	50.44	204.85	309.52	11.28	9.35	
13022231	75.65	57.57	10 172.48	44.85	200.96	335.08	11.57	12.20	
13060641	53.11	73.73	10 546.96	40.88	187.73	144.92	25.58	16.58	

3 讨论

本实验考察了正、负离子扫描方式下待测物的响应强度, 并进行比较, 酚酸和黄酮类成分在正离子模式下 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 响应较高, 而苯乙醇苷类成分在负离子模式下 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 响应较高 (连翘苷为 $[\text{M}+\text{Na}]^+$), 因此采用正、负 2 种离子模式转换实现双黄连口服液中 3 类成分的同时测定, 在流动相中加入不同浓度的甲酸溶液, 结果发现 0.4% 的甲酸水溶液使正离子模式下的被测物响应增高, 对负离子模式下的被测物影响较小, 并且可以抑制色谱峰的拖尾, 使同分异构体之间达到理想的分离效果; 分别选择替硝唑和氯霉素作为正、负离子模式下的内标物, 保留时间适当, 峰形良好, 实验过程中稳定可靠; 本实验建立的同时测定双黄连口服液中酚酸类、黄酮类和苯乙醇苷类成分 UPLC-MS/MS 方法, 17 种成分在各自的质量浓度范围内, 线性良好, 分析时间较 HPLC-UV 法大大缩短, 准确度、精密度、回收率、稳定性等均满足定量分析要求, 并成功应用于 5 批双黄连口服液样品的多成分定量分析, 为双黄连口服液的质量控制提供了一定的参考; 所测 5 批样品中 17 种成分质量分数分别为新绿原酸 782.68~1034.27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、绿原酸 786.35~1103.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、隐绿原酸 898.00~1 238.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、咖啡酸 82.85~115.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3,5-二咖啡酰奎宁酸 226.02~

461.63 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3,4-二咖啡酰奎宁酸 191.59~404.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、异连翘酯苷 243.62~298.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、连翘酯苷 A 978.43~1 487.37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、连翘苷 351.97~435.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、芦丁 41.19~75.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、黄芩素 40.28~73.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、黄芩苷 10 080.54~10 820.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、野黄芩苷 40.88~50.51 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、汉黄芩苷 187.73~204.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、千层纸素 A-7-O- β -D-葡萄糖苷 144.92~335.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、汉黄芩素 9.30~25.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、千层纸素 A 7.51~16.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 其中绿原酸、黄芩苷及连翘苷的量均符合《中国药典》2010 年版双黄连口服液项下规定, 且批间差异较小, 而量较小的成分如汉黄芩素、千层纸素 A 批间的量差异较大。

参考文献

- [1] 梁业飞, 周有旺. 双黄连口服液解热抗炎作用的实验研究 [J]. 临床合理用药, 2011, 4(9C): 51-52.
- [2] 莫红缨, 赖克方, 江永南, 等. 双黄连及其拆方抗呼吸道合胞病毒作用的药理学研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2005, 11(3): 194-196.
- [3] 莫红缨, 赖克方, 江永南, 等. 双黄连对呼吸道合胞病毒感染的气道上皮细胞炎症因子释放的影响 [J]. 广州医学院学报, 2005, 33(2): 16-19.
- [4] 王建明, 赵楚文. 双黄连制剂中连翘苷含量与退热作用相关性研究 [J]. 中国药师, 2010, 13(10): 1405-1407.
- [5] 于宜平, 张艳, 李红, 等. 黄芩苷对角叉菜胶致热

- 大鼠解热作用的 PK-PD 模型研究 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 527-531.
- [6] 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.
- [7] Ding Y, Dou J, Teng Z J, *et al.* Antiviral activity of baicalin against influenza A (H1N1/H3N2) virus in cell culture and in mice and its inhibition of neuraminidase [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(12): 3269-3278.
- [8] Gao R, Lin Y N, Liang G, *et al.* Comparative pharmacokinetic study of chlorogenic acid after oral administration of *Lonicerae Japonicae Flos* and Shuang-Huang-Lian in normal and febrile rats [J]. *Phytother Res*, 2014, 28(1): 144-147.
- [9] Gao Y, Feng L, Cai R L, *et al.* Shuang-Huang-Lian exerts anti-inflammatory and anti-oxidative activities in lipopolysaccharide-stimulated murine alveolar macrophages [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(4): 461-469.
- [10] 杜英峰, 张兰桐, 靳怡然, 等. 多波长 RP-HPLC 法测定双黄连口服液中黄芩苷、绿原酸和连翘苷 [J]. 中成药, 2009, 31(9): 1368-1371.
- [11] 徐大志, 张荣, 刘启德, 等. HPLC 波长转换法同时检测双黄连口服液中 4 种有效成分的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(1): 73-76.
- [12] 程健, 狄留庆, 李俊松, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定通塞脉微丸中 10 种有效成分 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 659-664.
- [13] 吴茵, 魏欣, 张黎媛, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定参麦注射液 7 种主要有效成分 [J]. 中草药, 2014, 45(18): 2625-2630.
- [14] 乔晓莉, 肖学风, 周大铮. UPLC-MS/MS 法同时测定注射用益气复脉 (冻干) 中 13 种成分 [J]. 中草药, 2014, 45(23): 3402-3407.
- [15] 刘姗, 杨涛, 刘成海. UPLC-MS/MS 法同时测定扶正化瘀胶囊中 12 种成分 [J]. 中草药, 2014, 45(2): 214-219.
- [16] Zhou W, Liu S J, Ju W Z, *et al.* Simultaneous determination of phenolic acids by UPLC-MS/MS in rat plasma and its application in pharmacokinetic study after oral administration of *Flos Lonicerae* preparations [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2013, 86: 189-197.
- [17] He W, Liu G H, Cai H, *et al.* Integrated pharmacokinetics of five protoberberine-type alkaloids in normal and insomnic rats after single and multiple oral administration of Jiao-Tai-Wan [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(3): 635-644.