

基于 UHPLC-MS/MS 技术的导赤丸中 24 个成分定量测定联合化学计量学质量评价

曹春琪¹, 孙慧珠¹, 赵振霞¹, 薛 忠², 雷 蓉^{1*}, 刘永利^{1*}

1. 河北省药品医疗器械检验研究院, 河北 石家庄 050227

2. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017

摘要: 目的 建立 UHPLC-MS/MS 法同时测定导赤丸中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A、盐酸小檗碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、栀子苷、西红花苷 I、西红花苷 II、哈巴苷、哈巴俄苷、木通苯乙醇苷 B、芍药苷、连翘酯苷 A 和连翘苷的含量。方法 采用 Phenomenon C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm) 色谱柱; 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 40 ℃; 进样量为 1 μL; 采用电喷雾离子源 (ESI), 以多反应监测 (MRM) 模式正、负离子同时扫描。结果 24 种成分在各自的质量浓度范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9977$); 精密度、稳定性、重复性等均符合方法学要求, 平均加样回收率为 92.7%~107.9%, RSD 均小于 6.5%。15 批样品中 24 种成分的平均质量分数在 6.834~7 667.200 μg/g, 聚类分析、主成分分析结果一致, 均可将 3 个厂家的样品准确划分为 3 类。结论 所建立的 UPLC-MS/MS 法 24 个成分含量测定方法重现性好, 简便、准确、稳定, 能客观、全面、有效地确定不同生产企业样品中主要成分的差异, 可为导赤丸质量评价体系的完善提供依据。

关键词: 导赤丸; UHPLC-MS/MS 技术; 化学计量学; 质量评价; 黄芩苷; 汉黄芩苷; 黄芩素; 汉黄芩素; 千层纸素 A; 盐酸小檗碱; 表小檗碱; 盐酸黄连碱; 盐酸药根碱; 盐酸巴马汀; 大黄素; 大黄酸; 大黄素甲醚; 芦荟大黄素; 大黄酚; 栀子苷; 西红花苷 I; 西红花苷 II; 哈巴苷; 哈巴俄苷; 木通苯乙醇苷 B; 芍药苷; 连翘酯苷 A; 连翘苷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)21-7034-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.21.012

Quantitative determination of 24 components in Daochi Pills based on UHPLC-MS/MS technology combined with chemometrics quality evaluation

CAO Chun-qi¹, SUN Hui-zhu¹, ZHAO Zhen-xia¹, XUE Zhong², LEI Rong¹, LIU Yong-li¹

1. Hebei Institute for Drug and Medical Device Control, Shijiazhuang 050227, China

2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China

Abstract: Objective To establish an UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of baicalin, wogonoside, baicalein, wogonin, melaeuca A, berberine hydrochloride, epiberberine, coptisine chloride, jatrorrhizine, palmatine hydrochloride, emodin, rhein, physcion, aloe emodin, chrysophanol, geniposide, crocetin I, crocetin II, harpagide, harpagoside, calceolarioside B, paeoniflorin, forsythoside A, and forsythin in Daochi Pills. **Methods** The components were separated on phenomenon C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) with acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution as the mobile phase by gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min. The column temperature was set at 40 ℃. The injection volume was 1 μL. The detection was carried out by electrospray ionization (ESI), positive and negative electrospray ionization was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode to scan. **Results** A total of 24 constituents showed good linear relationships within their own ranges ($r \geq 0.9977$), and the precision, stability and repeatability complied with the requirements of methodology. The average recoveries were between 92.7%—107.9% respectively, and RSD were below 6.5%. The average mass fractions of 24 constituents in 15 batches of samples were 6.834—7 667.200 μg/g. The results of cluster analysis and principal component analysis were consistent, and could accurately classify three manufacturers of

收稿日期: 2023-04-27

基金项目: 河北省重点研发计划 (21372502D); 河北省药品监督管理局科技计划项目 (2022ZC1019)

作者简介: 曹春琪 (1991—), 女, 工程师, 硕士, 主要从事中药质量分析研究。Tel: (0311)69086157 E-mail: 1227519372@qq.com

*通信作者: 雷 蓉 (1988—), 女, 工程师, 硕士, 主要从事中药质量分析研究。Tel: (0311)69086157 E-mail: honaaa@126.com

刘永利 (1973—), 男, 主任药师, 硕士, 主要从事中药质量控制研究。Tel: (0311)89892091 E-mail: liuyongli2008@126.com

samples into three categories. **Conclusion** The established UHPLC-MS/MS method for determining the content of 24 components has good reproducibility, which is simple, accurate and stable, and can objectively, comprehensively, and effectively determine the differences in the main components in samples from different production enterprises. It can provide a basis for improving the quality evaluation system of Daochi Pills.

Key words: Daochi Pills; UHPLC-MS/MS technology; chemometrics; quality evaluation; baicalin; wogonoside; baicalein; wogonin; melaeuca A; berberine hydrochloride; epiberberine; coptisine chloride; jatrorrhizine; palmatine hydrochloride; emodin; rhein; physcion; aloe emodin; chrysophanol; geniposide; crocetin I; crocetin II; harpagide; harpagoside; calceolarioside B; paeoniflorin; forsythoside A; forsythin

导赤丸出自宋代太平惠民和剂局编写的《太平惠民和剂局方》卷六,由连翘、黄连、栀子(姜炒)、木通、玄参、天花粉、赤芍、大黄、黄芩、滑石共 10 味药组成,方中黄连、栀子、黄芩为君药;连翘、木通、大黄、玄参、赤芍为臣药;滑石、天花粉为佐药。具清热泻火、利尿通便之功效,临床常用于火热内盛所致的口舌生疮、咽喉疼痛、心胸烦热、小便短赤、大便秘结等症^[1]。导赤丸现行质量标准中采用 HPLC 法对盐酸小檗碱的含量进行测定,相关文献报道,多为 HPLC 法测定黄芩苷、大黄素等一两种成分的含量^[2-3]。中成药成分复杂,有效成分较多,发挥药效往往是由多种活性组分协同作用的结果,因此,仅对单一成分进行质量控制,不足以充分、全面、有效地评价导赤丸的质量。

为全面评价药品质量,应对处方中的多味饮片中的特征成分进行考察。现代药理研究表明,黄芩中的黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素^[4-5]、黄连中的盐酸小檗碱、表小檗碱^[6-7]、连翘中的连翘苷、连翘酯苷 A^[8]、栀子中的栀子苷、西红花苷 I、西红花苷 II^[9]均具有抑菌抗炎、泻火解毒的作用;木通中的木通苯乙醇苷 B^[10]具利尿通淋之功效;玄参中的哈巴苷、哈巴俄苷是与清热凉血、滋阴降火功效相关的主要化合物^[11];赤芍的芍药苷具散瘀止痛之功效^[12];大黄中的蒽醌类化合物为泻下攻积的主要成分^[13]。因此,本实验选定此 8 味药中的特征成分进行检测,以对药品质量进行全面评估,保证药品疗效。

目前,灵敏度高、专属性好的液质联用法已广泛应用于中成药的含量测定,尤其适用于某些含量较低的成分^[14-15]。实验过程中曾尝试采用 HPLC-UV 法测定上述相关成分,但由于成分较多,难于达到有效分离,紫外检测器的灵敏度和选择性都不足以同时对测定成分进行定量分析,因此,本实验采用 UHPLC-MS/MS 分析方法建立了同时测定导赤丸中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A、盐酸小檗碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸药根

碱、盐酸巴马汀、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、栀子苷、西红花苷 I、西红花苷 II、哈巴苷、哈巴俄苷、木通苯乙醇苷 B、芍药苷、连翘酯苷 A 和连翘苷 24 种成分含量的分析方法,为该制剂的质量标准的建立提供参考,为相关部门的全面监管提供技术保障。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Qtrap 6500 型超高效液相色谱-离子阱质谱联用仪,美国 AB SCIEX 公司;XPE26 型百万分电子天平、XS105 型十万分电子天平,梅特勒托利多科技有限公司;KQ-250ES 型超声波清洗器,昆山超声仪器有限公司;乙腈、甲醇,色谱纯,德国 Merck 公司;甲酸,色谱纯,天津大茂化学试剂厂;其余试剂均为分析纯;实验用水为屈臣氏蒸馏水。

1.2 试药

对照品黄芩苷(批号 110715-201117,质量分数 91.7%)、汉黄芩苷(批号 112002-201702,质量分数 98.5%)、黄芩素(批号 111595-201808,质量分数 97.9%)、汉黄芩素(批号 111514-201706,质量分数 100.0%)、盐酸小檗碱(批号 110713-201814,质量分数 86.7%)、盐酸巴马汀(批号 110732-201913,质量分数 85.7%)、盐酸黄连碱(批号 112026-201601,质量分数 95.1%)、盐酸药根碱(批号 110733-201108,质量分数 90.3%)、大黄酚(批号 110796-201922,质量分数 99.4%)、大黄素甲醚(批号 110758-201817,质量分数 99.2%)、芦荟大黄素(批号 110795-201308,质量分数 97.8%)、大黄素甲醚(批号 110758-201817,质量分数 99.2%)、大黄酸(批号 110757-201607,质量分数 99.3%)、木通苯乙醇苷 B(批号 111910-201604,质量分数 98.2%)、哈巴苷(批号 111729-201707,质量分数 96.8%)、哈巴俄苷(批号 111730-201709,质量分数 95.9%)、芍药苷(批号 110736-201942,质量分数 95.1%)、连翘苷(批号 110821-201816,质量分数 95.1%)、连翘酯苷 A(批号 111810-201606,

质量分数 93.4%)、栀子苷(批号 110749-201919, 质量分数 97.1%)、西红花苷 I(批号 111588-201303, 质量分数 92.6%)、西红花苷 II(批号 111589-201705, 质量分数 92.2%) 购自中国食品药品检定研究院; 对照品千层纸素 A(批号 ST23660120, 质量分数 98.0%)、表小檗碱(批号 ST23680105, 质量分数 98.0%) 购自上海诗丹德生物技术有限公司。

1.3 样品

导赤丸样品共 15 个批次, 其中样品 S1~S4(批号 19013293、19013294、19013728、19013729) 来自天津中新药业股份有限公司(TZ), 样品 S5~S10(批号 11170816、11180622、11180704、11190026、11190032、11190073) 来自北京同仁堂股份有限公司(BT), 样品 S11~S15(批号 20210402、20210403、20210801、20220302、20221003) 来自内蒙古天奇药业股份有限公司(NT)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Phenomenon C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm); 流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~15 min, 10%~40%乙腈; 15~20 min, 40%~60%乙腈; 柱温为 40 ℃; 体积流量为 0.3 mL/min; 进样量为 1 μL。

2.2 质谱条件

以三重四极杆串联质谱仪检测; 电喷雾离子源(ESI), 扫描方式为正、负离子同时扫描, 监测模式为多反应监测模式(MRM), 正离子化电压 5500 V, 负离子化电压-4500 V, 脱溶剂气温度 500 ℃; 碰撞气(CAD)压力为“medium”, 每个离子对的滞留时间为 50 ms; 气帘气(CUR)压力 277 kPa, 雾化气(GS1)压力 330 kPa, 加热辅助气(GS2)压力 420 kPa。各化合物质谱参数详见表 1。

表 1 导赤丸中 24 个成分的质谱参数

Table 1 MS parameters of 24 components in Daochi Pills

成分	分子式	离子模式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能/V	解簇电压/eV
黄芩苷	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	+	447.0	385.1	37	189
汉黄芩苷	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	+	461.0	270.0	60	151
黄芩素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-	269.2	137.1	-36	-108
汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	-	283.0	139.0	-47	-97
千层纸素 A	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	+	285.1	140.0	53	87
盐酸小檗碱	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₄	+	336.1	278.0	56	95
表小檗碱	C ₂₀ H ₁₈ NO ₄	+	336.0	262.0	65	82
盐酸黄连碱	C ₁₉ H ₁₄ ClNO ₄	+	320.0	262.0	50	83
盐酸药根碱	C ₂₀ H ₂₀ ClNO ₄	+	338.0	279.0	55	86
盐酸巴马汀	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	+	352.0	320.0	57	73
大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	-	269.1	182.1	-50	-137
大黄酸	C ₁₅ H ₈ O ₆	-	283.0	183.0	-36	-16
大黄素甲醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	+	285.2	211.3	40	119
芦荟大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	+	271.0	141.0	49	98
大黄酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	+	255.0	181.0	41	150
栀子苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	-	387.2	123.1	-21	-50
西红花苷 I	C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄	-	975.3	323.0	-35	-191
西红花苷 II	C ₃₈ H ₅₄ O ₁₉	-	813.1	651.0	-20	-150
哈巴苷	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀	-	363.0	201.0	-18	-102
哈巴俄苷	C ₂₄ H ₃₀ O ₁₁	-	493.1	345.0	-13	-46
木通苯乙醇苷 B	C ₂₃ H ₂₆ O ₁₁	-	477.0	315.0	-33	-116
芍药苷	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	-	479.0	121.0	-20	-91
连翘酯苷 A	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	-	623.0	461.0	-43	-163
连翘苷	C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁	-	533.0	161.0	-13	-58

2.3 混合对照品溶液的制备

取各待测成分对照品适量,精密称定,分别加 70%甲醇溶液溶解,并制备成单一的对照品储备液。将上述对照品储备液加 70%甲醇稀释制成含黄芩苷 70 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩苷 25 $\mu\text{g/mL}$ 、黄芩素 3 $\mu\text{g/mL}$ 、汉黄芩素 1 $\mu\text{g/mL}$ 、千层纸素 A 1 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸小檗碱 22 $\mu\text{g/mL}$ 、表小檗碱 3 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸黄连碱 9 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸药根碱 6 $\mu\text{g/mL}$ 、盐酸巴马汀 7 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素 1 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酸 1 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄素甲醚 1 $\mu\text{g/mL}$ 、芦荟大黄素 1 $\mu\text{g/mL}$ 、大黄酚 2 $\mu\text{g/mL}$ 、栀子苷 60 $\mu\text{g/mL}$ 、西红花苷 I 4 $\mu\text{g/mL}$ 、西红花苷 II 1 $\mu\text{g/mL}$ 、哈巴苷 4 $\mu\text{g/mL}$ 、哈巴俄苷 2 $\mu\text{g/mL}$ 、木通苯乙醇苷 B 1 $\mu\text{g/mL}$ 、芍药苷 14 $\mu\text{g/mL}$ 、连翘酯苷 A 70 $\mu\text{g/mL}$ 、连翘苷 4 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液,即得。

2.4 供试品溶液的制备

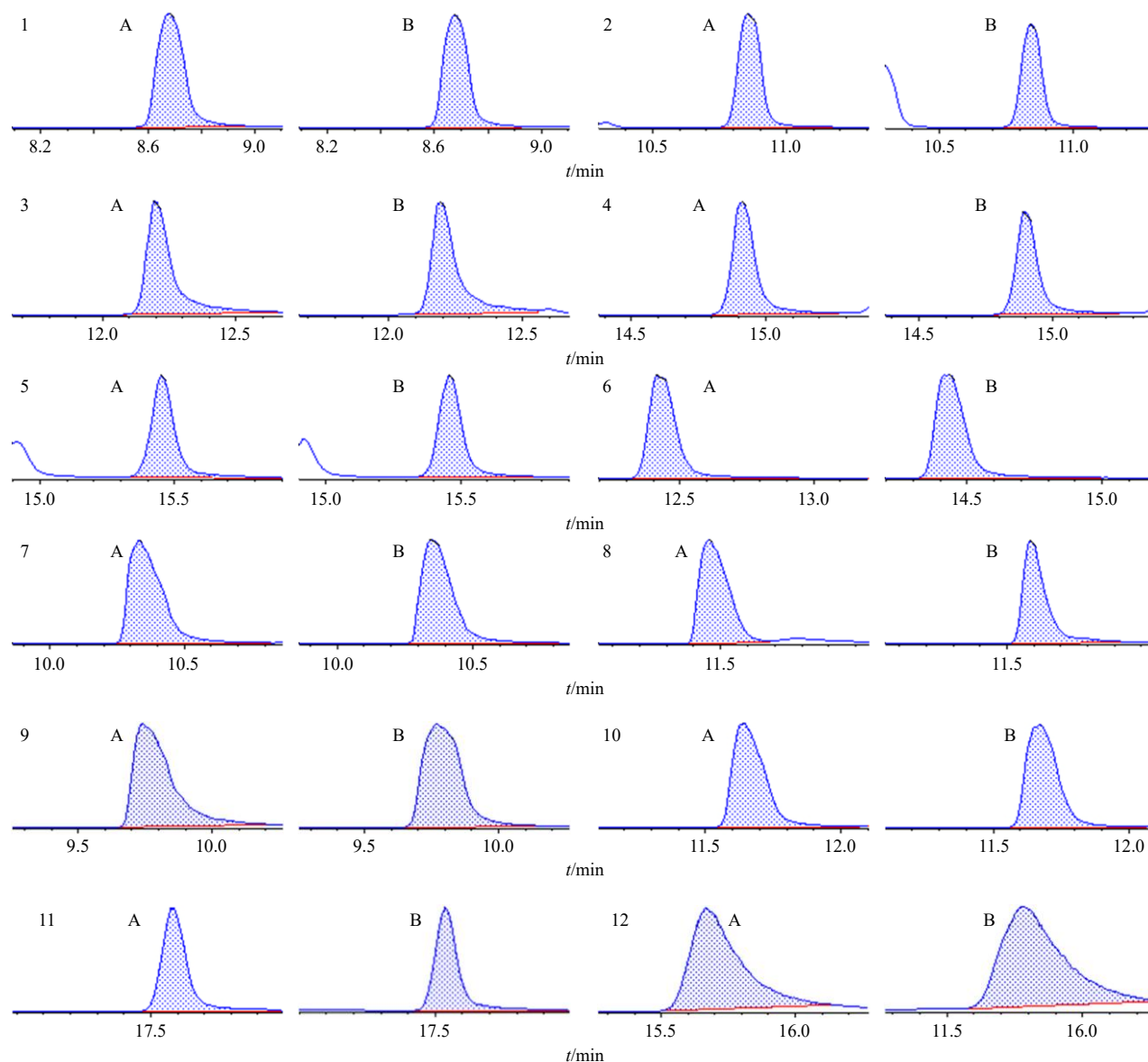
取本品,研细,混匀,取约 0.3 g,精密称定,加 70%甲醇 25 mL,称定质量,密塞,超声处理(功率 250 W、频率 40 kHz) 30 min,取出,放冷,用 70%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

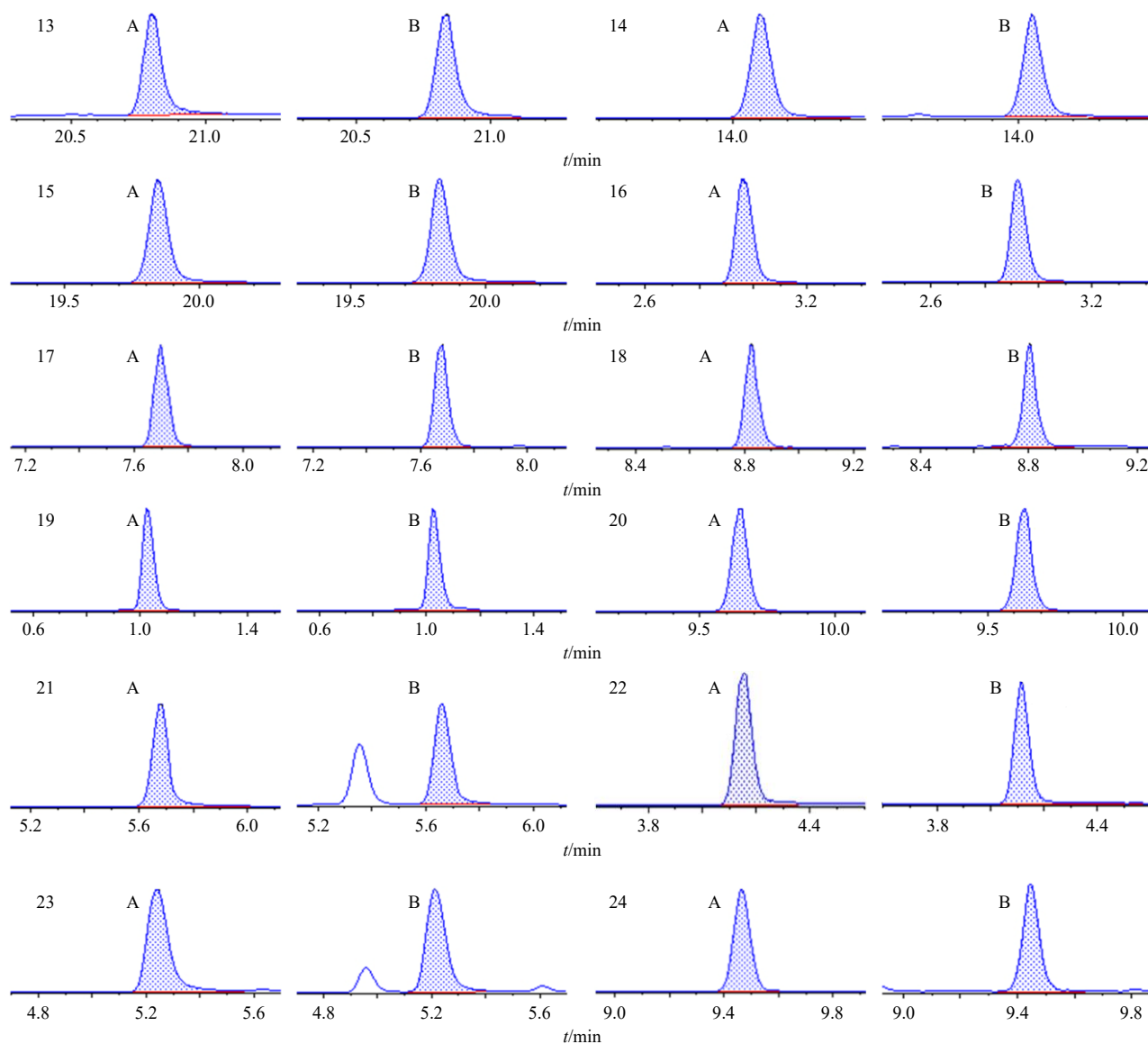
2.5 专属性试验

分别吸取混合对照品溶液和导赤丸(S5)供试品溶液,按“2.1”“2.2”项下液质联用条件进样测定。供试品溶液中被测定成分与对照品的保留时间相对应,样品中待测成分无其他干扰,且分离效果与峰形良好,色谱图见图 1。

2.6 线性关系考察

分别精密量取“2.3”项下对照品储备溶液,用 70%甲醇配制系列质量浓度的混合对照品溶液,按





1-黄芩苷 2-汉黄芩苷 3-黄芩素 4-汉黄芩素 5-千层纸素 A 6-盐酸小檗碱 7-表小檗碱 8-盐酸黄连碱 9-盐酸药根碱 10-盐酸巴马汀
11-大黄素 12-大黄酸 13-大黄素甲醚 14-芦荟大黄素 15-大黄酚 16-栀子苷 17-西红花苷 I 18-西红花苷 II 19-哈巴苷 20-哈巴俄苷
21-木通苯乙醇苷 B 22-芍药苷 23-连翘酯苷 A 24-连翘苷
1-baicalin 2-wogonoside 3-baicalein 4-wogonin 5-melaleuca A 6-berberine hydrochloride 7-epiberberine 8-coptisine chloride 9-jatrorrhizine 10-palmatine hydrochloride 11-emodin 12-rhein 13-phycion 14-aloe emodin 15-chrysophanol 16-geniposide 17-croctetin I 18-croctetin II 19-harpagide 20-harpagoside 21-calceolarioside B 22-paeoniflorin 23-forsythoside A 24-forsythidin

图 1 混合对照品溶液 (A)、导赤丸供试品溶液 (B) 的 UHPLC-MS/MS 谱图

Fig. 1 UHPLC-MS/MS chromatograms of mixed reference substances solution (A) and Daochi Pills sample solution(B)

“2.1”“2.2”项液质联用条件进样测定,以进样质量浓度为横坐标(X),以各成分定量离子对的峰面积积分值为纵坐标(Y),建立标准曲线,进行线性回归,得回归方程、相关系数(r)及线性范围见表2。各待测成分在各自质量浓度范围内线性关系良好。

2.7 精密度试验

取“2.3”项下混合对照品溶液,按“2.1”“2.2”项下条件,连续进样测定6次,记录峰面积,计算黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素

A、盐酸小檗碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、栀子苷、西红花苷 I、西红花苷 II、哈巴苷、哈巴俄苷、木通苯乙醇苷 B、芍药苷、连翘酯苷 A 和连翘苷峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.6%、2.1%、2.4%、3.1%、1.5%、3.2%、1.7%、2.3%、3.5%、2.2%、1.8%、3.6%、4.1%、3.9%、2.4%、1.9%、1.2%、2.2%、3.1%、2.7%、2.5%、2.6%、3.5%,表明仪器精密度良好。

表 2 回归方程和各成分线性范围

Table 2 Regression equations and linear ranges of various constituents

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
黄芩苷	$Y=5.7\times 10^6 X+1.3\times 10^8$	0.999 6	4.201 2~84.024 7
汉黄芩苷	$Y=2.2\times 10^7 X+5.6\times 10^7$	0.999 5	1.505 5~30.110 0
黄芩素	$Y=69\ 835 X-48\ 974$	0.999 9	2.871 9~21.528 2
汉黄芩素	$Y=83\ 373 X-34\ 698$	0.999 2	1.042 1~7.812 0
千层纸素 A	$Y=8.4\times 10^7 X+1.1\times 10^6$	0.999 9	0.760 86~5.703 60
盐酸小檗碱	$Y=4.3\times 10^7 X+2.6\times 10^8$	0.999 1	1.416 9~28.337 9
表小檗碱	$Y=6.9\times 10^7 X+2.1\times 10^8$	0.999 4	2.044 0~15.322 7
盐酸黄连碱	$Y=2.4\times 10^7 X+2.3\times 10^8$	0.999 8	5.332 9~39.976 2
盐酸药根碱	$Y=4.2\times 10^7 X+3.4\times 10^8$	0.999 5	4.796 6~35.956 6
盐酸巴马汀	$Y=5.3\times 10^7 X+1.8\times 10^8$	0.999 1	4.287 1~32.137 5
大黄素	$Y=7.0\times 10^6 X+16\ 170$	0.999 9	0.029 9~1.494 7
大黄酸	$Y=8.0\times 10^6 X+8342$	0.999 9	0.041 6~2.082 5
大黄素甲醚	$Y=1.0\times 10^7 X-51\ 791$	0.999 9	0.077 8~3.888 6
芦荟大黄素	$Y=2.4\times 10^7 X+76\ 860$	0.999 9	0.021 9~1.093 6
大黄酚	$Y=7.2\times 10^6 X-90\ 090$	0.999 8	1.189 7~8.918 6
梔子苷	$Y=22\ 314 X+30\ 746$	0.999 4	25.582 5~191.772 5
西红花苷 I	$Y=25\ 992 X-39\ 099$	0.999 0	2.583 5~19.366 4
西红花苷 II	$Y=21\ 680 X-2131$	0.998 3	0.209 1~1.567 8
哈巴苷	$Y=25\ 902 X-15\ 562$	0.999 8	2.392 5~17.935 1
哈巴俄苷	$Y=57\ 912 X+24\ 622$	0.999 0	1.978 8~14.833 8
木通苯乙醇苷 B	$Y=8.6\times 10^6 X-2.4\times 10^6$	0.999 9	1.074 8~8.056 7
芍药苷	$Y=11\ 666 X+15\ 301$	0.999 6	7.849 8~58.844 1
连翘酯苷 A	$Y=1.3\times 10^6 X+4.2\times 10^7$	0.997 7	26.150 1~196.027 9
连翘苷	$Y=4155 X-2522$	0.999 8	5.167 9~38.739 7

2.8 稳定性试验

取导赤丸样品 (S5), 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”“2.2”项下条件分别于制备后 0、3、6、12、15、20、24 h 测定峰面积, 结果黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A、盐酸小檗碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、梔子苷、西红花苷 I、西红花苷 II、哈巴苷、哈巴俄苷、木通苯乙醇苷 B、芍药苷、连翘酯苷 A 和连翘苷峰面积的 RSD 值分别为 1.8%、3.6%、2.1%、1.7%、2.3%、3.2%、4.8%、1.6%、2.2%、2.0%、3.3%、3.8%、4.1%、4.9%、3.4%、2.9%、4.2%、4.2%、3.1%、1.7%、2.5%、3.6%、2.5%、3.6%, 表明供试品溶液至少在 24 h 内稳定。

2.9 重复性试验

取导赤丸样品 (S5) 适量, 研细, 分别取 0.3 g,

共 6 份, 精密称定, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算含量。结果黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A、盐酸小檗碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、梔子苷、西红花苷 I、西红花苷 II、哈巴苷、哈巴俄苷、木通苯乙醇苷 B、芍药苷、连翘酯苷 A 和连翘苷的平均质量分数分别为 6 217.3、1 691.1、843.8、131.8、71.67、1739.2、273.2、433.1、293.6、599.1、49.52、157.5、359.7、25.91、787.3、3 087.3、747.3、33.99、131.9、81.74、139.3、1 163.1、4 665.4、317.4 $\mu\text{g/g}$, 其 RSD 分别为 2.1%、1.4%、2.2%、1.7%、3.1%、3.8%、2.1%、3.1%、2.5%、2.0%、1.4%、1.7%、2.5%、1.4%、2.7%、2.9%、3.1%、1.6%、2.7%、3.4%、1.3%、2.7%、0.5%、3.9%, 表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

称取已测定 24 种指标成分含量的导赤丸样品(S5)适量, 研细, 分别取 0.15 g, 共 6 份, 精密称定, 再取用 70% 甲醇溶液配制的对照品储备液, 按照近似 1:1 比例加入对照品溶液, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 进样测定, 计算各成分加样回收率及其 RSD 值。结果黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A、盐酸小檗碱、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、栀子苷、西红花苷 I、西红花苷 II、哈巴苷、哈巴俄苷、木通苯乙醇苷 B、芍药苷、连翘酯苷 A 和连翘苷的平均加样回收率分别为 102.2%、101.2%、99.7%、100.2%、100.0%、97.0%、103.0%、99.4%、102.1%、101.5%、99.7%、99.3%、102.3%、100.6%、103.4%、99.3%、100.1%、96.8%、97.0%、96.8%、103.1%、101.3%、102.5%、101.4%, RSD 分别为 1.7%、3.3%、3.1%、3.4%、1.9%、0.6%、0.6%、3.0%、2.4%、1.7%、2.2%、3.0%、2.5%、3.1%、1.7%、1.3%、3.0%、1.1%、1.4%、1.2%、1.7%、1.6%、2.5%、1.8%, 结果表明本方法各成分加样回收率良好。

2.11 样品测定

取不同批号的导赤丸样品(S1~S15), 按“2.4”

项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”“2.2”项下条件进样测定, 计算各成分的含量, 结果见表 3。

2.12 聚类分析

以 15 批导赤丸中 24 个成分的含量为变量, 导入 SPASS 19.0 软件, 采用组间连接聚类, 以平方欧氏距离为测度, 进行聚类分析^[16], 结果见图 2。结果显示, 当度量距离为 10 时, 15 批样品(S1~S15)可聚为 3 类, 其中 S1~S4 来自同一厂家, 聚为第 I 类, S5~S10 来自另一厂家, 聚为第 II 类, S10~S15 为同一厂家, 聚为第 III 类。由此可知, 基于质谱含量测定结果可区分不同厂家的样品, 具体原因可能与原料药材的产地、采收期、生长年限、加工炮制以及成药的生产工艺等有关。

2.13 主成分分析 (principal component analysis, PCA)

PCA 法是将具有多维数据的对象降维化处理, 使其数目繁多且相互关联的大量原始变量转变为少数几个能够代表数据特征的不相关变量, 根据数据特征对样本进行分析和描述^[17-20]。因此, 为更好地客观反映导赤丸各批次之间的差异性, 将 15 批次导赤丸的 24 种成分含量测定结果作为变量导入 SIMCA 14.1 软件, 进行 PCA。建立的模型前 2 个主成分的累积贡献率为 89.6%, 说明前 2 个主成分

表 3 导赤丸中 24 种成分的含量 ($n=3$)

Table 3 Contents of 24 components in Daochi Pills ($n=3$)

样品	质量分数/(μg·g ⁻¹)											
	黄芩苷	汉黄芩苷	黄芩素	汉黄芩素	千层纸素 A	盐酸小檗碱	表小檗碱	盐酸黄连碱	盐酸药根碱	盐酸巴马汀	大黄素	大黄酸
S1	7 395.58	2 027.92	1 228.81	284.48	104.74	2 097.11	285.72	529.71	408.54	503.34	29.88	64.48
S2	7 667.21	1 896.28	1 163.63	235.32	101.67	1 919.74	276.74	476.47	388.71	421.92	32.33	58.51
S3	7 754.14	2 028.34	1 174.07	247.41	102.13	1 912.47	296.27	542.63	370.88	436.89	30.79	59.26
S4	7 764.32	1 972.23	1 288.74	257.13	100.17	1 964.68	281.26	493.24	394.82	460.71	28.19	68.52
S5	6 217.33	1 691.12	843.81	131.81	71.67	1 739.21	273.17	433.14	293.64	599.12	49.52	157.52
S6	5 955.51	1 652.61	941.32	138.87	73.22	1 737.73	210.52	470.55	320.65	530.76	51.88	151.90
S7	5 754.17	1 586.81	946.42	134.88	77.65	1 638.38	206.12	490.46	294.74	338.13	51.42	181.27
S8	5 780.28	1 611.62	904.22	125.73	78.03	1 605.74	199.19	376.71	306.11	362.81	49.27	173.71
S9	5 968.62	1 631.92	864.23	129.26	69.87	1 558.66	203.47	389.94	291.32	350.67	47.96	158.00
S10	5 817.34	1 635.48	935.41	132.54	80.97	1 547.32	201.16	417.53	287.76	340.74	46.99	149.64
S11	3 650.67	1 371.74	404.40	69.88	36.22	1 278.81	244.51	355.43	368.82	317.40	15.36	13.44
S12	3 643.45	1 400.32	392.14	72.12	38.02	1 308.58	269.14	355.78	355.14	415.34	7.54	12.11
S13	3 409.12	1 468.57	353.32	52.16	40.89	1 360.12	260.22	325.17	332.52	407.07	13.93	16.19
S14	3 799.71	1 422.66	469.11	65.82	46.45	1 231.07	239.23	380.92	378.57	338.20	6.83	15.65
S15	3 578.37	1 461.75	416.30	62.03	43.52	1 354.46	255.17	327.47	388.31	361.94	6.94	10.95

续表 3

样品	质量分数/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)											
	大黄素 甲醚	芦荟大 黄素	大黄酚	栀子苷	西红 花苷 I	西红 花苷 II	哈巴苷	哈巴俄苷	木通苯乙 醇苷 B	芍药苷	连翘酯 苷 A	连翘苷
S1	195.92	28.58	399.72	4 095.70	557.64	33.26	180.32	186.84	46.77	1 001.50	5 364.94	562.61
S2	204.33	31.48	381.37	4 188.33	509.12	29.89	184.87	196.32	46.29	1 047.14	5 868.30	677.37
S3	236.38	21.64	451.50	3 810.17	576.70	33.09	224.84	153.40	43.01	1 141.11	5 921.47	494.74
S4	184.12	21.31	374.57	4 155.44	544.73	30.29	217.12	180.47	51.17	948.61	5 687.21	499.62
S5	359.66	25.92	787.32	3 087.27	747.27	33.99	131.90	81.74	139.32	1 163.07	4 665.43	317.44
S6	357.67	40.41	752.61	3 406.71	762.88	68.91	111.76	98.52	153.41	1 023.74	4 787.54	374.20
S7	351.27	52.36	827.06	2 842.09	751.63	74.78	120.91	90.37	154.56	971.61	4 300.20	310.94
S8	340.30	47.71	745.23	2 887.22	673.74	76.35	112.52	95.99	161.54	961.22	4 288.40	393.07
S9	388.17	59.52	671.50	3 149.64	717.81	63.22	111.44	72.31	172.30	976.31	4 251.16	349.29
S10	355.77	42.93	804.64	3 104.76	713.20	70.51	116.53	86.74	147.47	1 187.84	4 252.72	280.11
S11	50.14	11.71	95.83	1 921.79	334.20	16.13	99.90	57.63	22.52	1 216.76	5 219.74	258.54
S12	73.66	17.73	122.82	2 108.24	324.36	16.66	80.05	56.78	21.68	1 185.32	5 336.68	305.42
S13	59.86	10.26	108.44	2 160.20	295.32	13.96	78.84	56.73	19.42	978.20	5 270.34	307.80
S14	64.96	15.88	146.67	1 866.46	305.43	25.53	70.31	69.21	19.13	1 033.50	5 342.31	308.78
S15	73.35	14.64	83.83	1 851.21	291.51	20.54	94.68	66.41	17.68	1 137.84	5 232.11	295.51

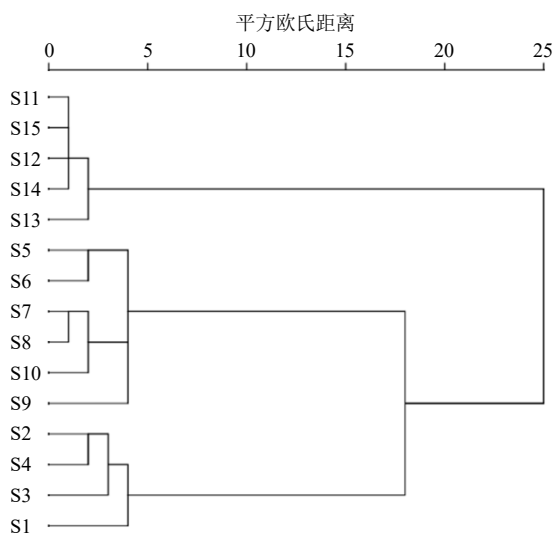


图 2 15 批样品含量测定结果聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis diagram for 15 batches of samples content determination results

已基本能反映不同批次样品的主要特征,模型的累积解释率 R_{Xcum}^2 为 0.962, 累积预测能力 Q_{Xcum}^2 为 0.864, 均大于 0.5, 提示 PCA 模型的区分度和预测程度都较好。得出的 PCA 得分图见图 3, 24 种化学成分的载荷图见图 4。图 3 结果显示, 3 个企业的 15 批导赤丸样品分别聚集在 3 个不同的区域, 说明不同企业间产品质量存在较大差异, 与聚类分析结果基本一致。再通过图 4 载荷图可分析导致不同企

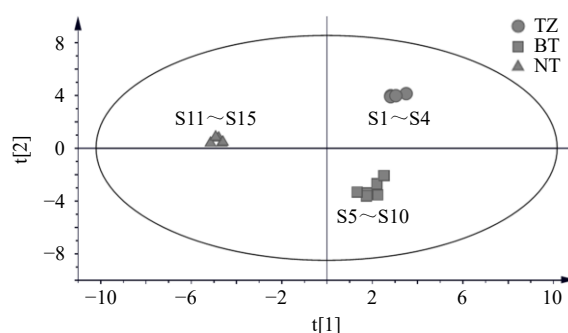


图 3 15 批样品 PCA 得分图

Fig. 3 PCA score plot of 15 batches of samples

业间产品质量差异的主要成分,从其分布可以得出,黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 以及哈巴苷、哈巴俄苷对 TZ 样品的质量偏差贡献最大;大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、木通苯乙醇苷 B 对 BT 样品的质量偏差贡献最大;NT 仅芍药苷 1 个成分的质量偏差贡献较大,提示企业在生产中应对原料药材质量进行控制,以减少成药间质量差异。

3 讨论

3.1 指标性成分的选择及优化

导赤丸所含药味较多,化学成分复杂,且有些成分含有多个同分异构体,为防止各个成分之间互相干扰,故选用单一对照品溶液,通过质谱针泵进

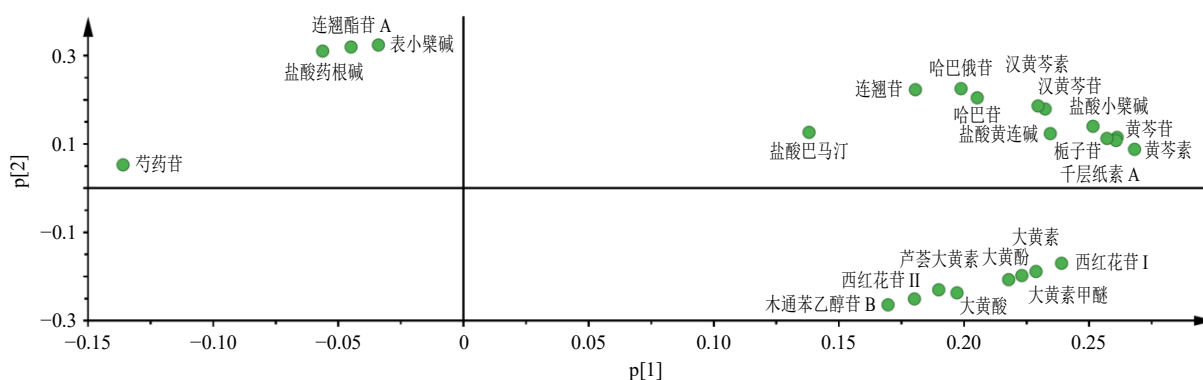


图 4 15 批样品中 24 种成分含量 PCA 载荷图

Fig. 4 PCA loading plot of 24 components in 15 batches of samples

样的方式确定了 24 个成分的母离子、子离子,并且对每个成分的 CE 和 DP 电压等关键参数进行优化,确保定量检测的准确性。黄芩苷、汉黄芩苷、千层纸素 A、盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、表小檗碱、盐酸黄连碱、盐酸药根碱、大黄酚、大黄素甲醚、芦荟大黄素在正离子模式下响应较好,其余成分在负离子模式下响应较好,因此,采用多重反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式对正负离子同时进行扫描。

3.2 供试品溶液的制备及流动相的优化

本实验考察了以甲醇、70%甲醇、50%甲醇、30%甲醇作为提取溶剂,超声 20、30、50、60 min 的提取效果,最终确定 70%甲醇超声 30 min 时,各个目标成分可在较短时间内,均得到完全提取。根据目标化合物的理化性质和色谱行为,比较了以甲醇-水、乙腈-水、甲醇-甲酸水、乙腈-甲酸水的洗脱系统,结果表明,以甲醇为流动相时,各成分的分离效果不理想,乙腈-甲酸水系统各成分的分离效果和峰形较好,各色谱峰的分离度和理论塔板数均符合要求。

3.3 分析结果评价

本研究采用聚类分析和 PCA 化学计量模型,对 3 家生产企业 15 批样品的 24 个化学成分的含量测定结果进行了分析。结果表明,同一企业的样品质量较为均一,不同企业间产品质量存在较大差异,其中 TZ 样品中黄芩和玄参药材所测全部标志性成分,黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、千层纸素 A 以及哈巴苷、哈巴俄苷含量均较高,表明 TZ 所用的上述 2 味原料药材质量较好;梔子中的梔子苷含量较高,但另 2 种成分西红花苷 I、II 含量较低,推测可能是制剂生产过程中环境温湿度、工艺参数等因素的不稳定性,导致化学成分较易发生变

化的西红花苷 I、II 发生降解;BT 样品中大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、木通苯乙醇苷 B 含量较高,提示 BT 投料用大黄与木通质量较好;NT 样品中仅芍药苷含量略高于其他企业,其他成分含量均较低。化学计量分析结果表明,导赤丸全面质量控制方法的建立有其必要性,提示药企在生产过程中应重视原料药材的来源以及质量,并优选工艺参数,提升工艺控制水平,确保药品质量的均一性和稳定性。

综上所述,本实验所建立的 UHPLC-MS/MS 法同时测定导赤丸中 24 种主要活性成分的方法简单,专属性好,灵敏度高,可准确测定样品中 24 种成分的含量,为今后导赤丸质量标准的制定以及含有这 24 种成分中成药的质量控制方法的建立提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 940.
- [2] 师永清, 康淑荷, 王爱军. HPLC 法同时测定导赤丸中梔子苷、芍药苷、黄芩苷和盐酸小檗碱 [J]. 中成药, 2013, 35(7): 1462-1465.
- [3] 吴卓, 郭伟英. HPLC 法测定导赤丸中黄芩苷和大黄素的含量 [J]. 中国药房, 2011, 22(4): 373-375.
- [4] Tsai C C, Lin M T, Wang J J, et al. The antipyretic effects of baicalin in lipopolysaccharide-evoked fever in rabbits [J]. *Neuropharmacology*, 2006, 51(4): 709-717.
- [5] 陈涛. 中药黄芩及其主要成分抗炎活性的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [6] 吴嘉思, 兰悦嘉, 王俊, 等. 表小檗碱调控 CD39-NLRP3-GSDMD 焦亡路径改善脓毒症肺损伤的机制研究 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 112-121.
- [7] 王丽, 胡樱凡, 童东, 等. 黄连碱对内毒素发热大鼠解热作用的 PK-PD 研究 [J]. 中国药理学通报, 2017,

- 33(4): 552-556.
- [8] 王婷婷, 张燕, 杨志敏, 等. 连翘及连翘叶抑菌抗炎活性及其主要化学成分研究 [J]. 中国药物与临床, 2019, 19(14): 2380-2381.
- [9] Fu Y H, Liu B, Liu J H, *et al.* Geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, inhibits the inflammatory response in the primary mouse macrophages and mouse models [J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(4): 792-798.
- [10] 高慧敏, 王智民, 曲莉, 等. RP-HPLC 测定木通中木通苯乙醇苷 B 的含量 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(6): 476-478.
- [11] 范先平, 汪波, 聂晶, 等. 基于中药血清化学与网络药理学筛选玄参质量标志物 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(13): 1305-1310.
- [12] 张育贵, 张淑娟, 边甜甜, 等. 芍药苷药理作用研究新进展 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3735-3740.
- [13] 唐大轩, 谭正怀, 梁媛媛, 等. 大黄蒽醌致泻作用及其机理的初步研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(6): 1312-1314.
- [14] 黄秋妹, 许舒瑜, 邵艳妮, 等. UPLC-MS/MS 同时测定金牡感冒片中 15 个成分 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1453-1460.
- [15] 梁艳, 张峰. UPLC-MS-MS 法同时测定复方益肝丸中 12 种成分 [J]. 中成药, 2022, 44(9): 2783-2789.
- [16] 郝佳旭, 杨丽娟, 范晓, 等. 复方蜘蛛香挥发油 GC-MS 指纹图谱的建立及多组分定量分析 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7048-7057.
- [17] 石岩, 魏锋, 马双成. 关于主成分分析在中药和天然药物分析研究中应用的探讨 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 3031-3035.
- [18] 刘天亮, 杨林林, 董诚明, 等. 基于化学模式识别的不同产地金银花 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2022, 53(15): 4833-4843.
- [19] 高佩云, 杨晓芸, 王丽霞, 等. 炒制对牵牛子中酚酸类成分含量的影响 [J]. 中草药, 2022, 53(24): 7721-7729.
- [20] 杨贵雅, 薛紫鲸, 张丹, 等. 基于指纹图谱和多成分含量测定的丹参药材皮部和木部化学成分比较研究 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5328-5335.

[责任编辑 郑礼胜]