doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.22.017

超高效液相色谱串联质谱法测定龙胆泻肝丸中木通苯乙醇苷 B 含量*

周云峰，邓杰华，黄招光，吴　喆，黄炳泉△，杨建冬

（江西省宜春市检验检测中心，江西 宜春　336000）

摘要：目的　建立测定龙胆泻肝丸中木通苯乙醇苷 B 含量的超高效液相色谱串联质谱法。**方法**　色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC® BEH C_{18} 柱（100 mm × 2. 1 mm，1. 7 μm），流动相为乙腈 - 0. 1% 甲酸溶液（梯度洗脱），流速为 1. 0 mL / min，柱温为 30 ℃，进样量为 10 μL。电喷雾离子源（ESI - ），多反应监测模式（MRM），毛细管电压 0. 5 kV，锥孔电压 - 55 V，锥孔气流量 50 L / h，脱溶剂气流量 900 L / h，脱溶剂气温度 550 ℃，木通苯乙醇苷 B 检测离子对 *m / z* 477→161、*m / z* 477→133 和 *m / z* 477→315。**结果**　木通苯乙醇苷 B 质量浓度在 0. 103 4 ~ 5. 170 0 μg / mL 范围内与峰面积线性关系良好（r = 0. 999 9）；精密度、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 4. 0%；平均加样回收率为 104. 96%，*RSD* 为 4. 36%（n = 6）。36 批样品中均含有木通苯乙醇苷 B，含量为 14. 42 ~ 255. 02 μg / g。**结论**　所建方法精密度、稳定性、重复性均较好，可用于测定龙胆泻肝丸中木通苯乙醇苷 B 的含量，并可快速甄别是否有不投料或伪品假冒行为。

关键词：龙胆泻肝丸；木通苯乙醇苷 B；超高效液相色谱串联质谱法；木通；含量测定

中图分类号：R917；R927　　**文献标志码：A**　　**文章编号：1006 - 4931（2022）22 - 0067 - 05**

*基金项目：江西省药品监督管理局科研项目［2021KY24］。

第一作者：周云峰，男，硕士，研究方向为药品检测，（电子信箱）768417683@qq. com。

△通信作者：黄炳泉，男，大学本科，副主任药师，研究方向为中药学，（电子信箱）1472949533@qq. com。

检测限而未达到定量限但判定为符合规定，表明 HPLC - ELSD 法在测定金银花中药制剂中的灰毡毛忍冬皂苷乙含量时，其检测灵敏度与目标值还有一定差距。2020 年版《中国药典（一部）》规定，山银花中灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙总含量不得低于 5. 0%[12]，以山银花中可允许的灰毡毛忍冬皂苷乙的最低限量为标准计算，当每 1 mL 银翘解毒口服液中山银花含量为 0. 15 × 10^{-6} 时，就能被检测到，灵敏度较高。

方法学考察结果表明，HPLC - MS 法的线性关系、精密度、重复性、稳定性和加样回收率均良好，测定样品中灰毡毛忍冬皂苷乙的结果真实可靠，重复性好，可用于银翘解毒口服液中山银花投料的鉴别。与 HPLC - ELSD 法检测结果比较，HPLC - MS 法抽检样品不合格率更高，即后者鉴别能力更强，标准更严格。24. 14% 的不合格率表明部分企业仍以山银花替代金银花生产银翘解毒口服液。针对这些问题，应不断提升银翘解毒口服液中山银花的鉴定技术，加强银翘解毒口服液中山银花投料的监管。

参考文献

［1］国家药典委员会．《中成药地方标准上升国家标准部分》内科肺系：一分册［M］. 北京：中国医药科技出版社：389 - 390.

［2］马迪迪，巩丹丹，孙国祥，等．三波长融合指纹图谱结合 6 组分定量和主成分分析评价银翘解毒片的质量［J］. 色谱，2017，35（7）：741 - 747.

［3］刘振海，杨春光，雷　标，等．银翘解毒软胶囊体外抑制人冠状病毒 229E 及其介导的炎症的研究［J］. 中药新药与临床药理，2022，33（1）：64 - 68.

［4］杨美丽，张少杰，杨金蕊，等．银翘解毒丸质量评价研究［J］. 中国药业，2021，30（5）：63 - 69.

［5］国家药典委员会．中华人民共和国药典（一部）［M］. 北京：中国医药科技出版社，2000：147 - 148.

［6］国家药典委员会．中华人民共和国药典（一部）［M］. 北京：中国医药科技出版社，2005：152 - 153.

［7］陆静娴，陈　勇，黄琴伟，等．银翘解毒颗粒中金银花的投料规范性研究［J］. 中国现代应用药学，2019，36（13）：1669 - 1672.

［8］黄玉娟，舒一崧，孔　静，等．基于特征图谱的金银花与山银花（灰毡毛忍冬）质量表征比较研究［J］. 环球中医药，2020，13（4）：600 - 610.

［9］章　娟，黄　琪，曾凡俊，等．金银花和山银花 UPLC 特征图谱 —— 化学成分模式识别方法研究［J］. 辽宁中医药大学学报，2022，34（7）：49 - 53.

［10］林永强．金银花药材及其制剂质量控制技术研究［D］. 济南：山东大学，2019.

［11］国家药典委员会．中华人民共和国药典（一部）［M］. 北京：中国医药科技出版社，2020：230 - 231，1618 - 1623.

［12］王立伟，徐　达，安丽娜，等．金银花及其制剂中掺伪山银花的快速鉴别研究［J］. 中国药业，2019，28（1）：39 - 44.

［13］王浩兵，邓　力，马元春，等．基于 UHPLC 的金银花和山银花的鉴别及测定研究［J］. 中草药，2017，48（12）：2516 - 2521.

［14］高　珊，郭月秋，刘斯亮．现时金银花与山银花比较鉴别分析［J］. 中国医药科学，2017，7（1）：52 - 55.

［15］郑文燕，李　哲，冯启宏，等．HPLC 和 UPLC - MS / MS 法考察清热解毒口服液中金银花投料规范性［J］. 中国药师，2022，25（1）：189 - 193.

（收稿日期：2022 - 02 - 07；修回日期：2022 - 06 - 22）

Content Determination of Calceolarioside B in Longdan Xiegan Pills by UPLC－MS/MS

ZHOU Yunfeng, DENG Jiehua, HUANG Zhaoguang, WU Zhe, HUANG Bingquan, YANG Jiandong
(The Inspection and Testing Center of Yichun, Yichun, Jiangxi, China 336000)

Abstract: Objective To establish a method for the content determination of calceorioside B in Longdan Xiegan Pills by ultra－performance liquid chromatography－tandem mass spectrometry (UPLC－MS/MS). **Methods** The chromatographic column was Waters ACQUITY UPLC® BEH C_{18} column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile－0.1% formic acid solution with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. Electric spray ion (ESI－) source was adopted with multi－reaction monitoring (MRM) mode, the capillary voltage was 0.5 kV, the cone hole voltage was －55 V, the cone hole gas flow was 50 L/h, the desolvent gas flow was 900 L/h, the desolvent gas temperature was 550 ℃, the ion pairs of calceorioside B were *m/z* 477 → 161, *m/z* 477 → 133 and *m/z* 477 → 315 were detected. **Results** The linear range of calceorioside B was 0.103 4－5.170 0 μg/mL (*r* = 0.999 9). The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were less than 4.0%. The average recovery of calceorioside B was 104.96% with an *RSD* of 4.36% (*n* = 6). The 36 batches of samples all contained calceorioside B, the content of which was in the range of 14.42－255.02 μg/g. **Conclusion** The estabiished method has good precision, stability and repeatability, it can be used for the content determination of calceorioside B in Longdan Xiegan Pills, and can quickly identify whether there is no feeding or a counterfeit passing off as the real thing behavior.

Key words: Longdan Xiegan Pills; calceorioside B; UPLC－MS/MS; Akebiae Caulis; content determination

龙胆泻肝丸(水丸)的现行质量标准为2020年版《中国药典(一部)》[1],其对方中龙胆、泽泻、甘草、栀子、黄芩、柴胡、车前子、地黄8种药味进行了定性鉴别或含量测定[2-3],但对方中木通未进行质量控制,现有报道亦鲜见。木通为木通科木通*Akebia quinata*(*Thunb.*)Decne.、三叶木通*Akebia trifoliata*(*Thunb.*)Koidz.或白木通*Akebia trifoliata*(*Thunb.*)*Koidz. var. Australis*(*Diels*)Rehd.的干燥藤茎,品种繁杂。与木通名称相近的有川木通[4-5]、关木通[6-7]和甘木通[8],三者均不属于木通科,与木通的基源差别较大,而在我国中药使用史上木通品种常有混用现象[9-11]。为此,本研究中以木通苯乙醇苷B为定量指标,采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC－MS/MS)法考查制剂中木通的质量水平,为提升该制剂的质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

仪器:H－class型超高效液相色谱－xevo TQD型三重四极杆质谱仪(美国Waters公司);MS205DU型十万分之一电子天平、TLE 204E型万分之一电子天平(梅特勒－托利多仪器有限公司);PL－S60型超声波清洗仪(东莞康士洁超声波科技有限公司)。

试药:龙胆泻肝丸[江西省各地级市17家企业(记为N1－N17),共36批(样品信息见表1),规格包括每100粒6 g,每瓶60 g,每袋3 g或6 g];木通苯乙醇苷B对照品(批号为111910－201604,含量98.2%)、甘木通对照药材(批号为121443－201102)、川木通对照药材(批号为121409－202003),均购自中国食品药品检定研究院;木通对照药材(湖南省松龄堂中药饮片有限公司,批号为201101)、关木通对照药材(成都德思特生物技术有限公司,批号为DST201219－072),均由江西省宜春市食品药品检验所杨建冬主任中药师鉴定为正品;甲酸、乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂为分析纯,水为纯化水。

表1 样品信息及含量测定结果(μg/g, *n* = 3)

Tab. 1 Information of samples and results of content determination of calceorioside B in samples (μg/g, *n* = 3)

厂家	批号	含量	厂家	批号	含量
N1	190501	19.75	N12	13200512	97.28
N2	2009048	248.91	N12	13201005	90.25
N2	2012062	250.67	N12	13201013	132.33
N2	2002011	191.44	N12	13200617	83.64
N2	2011058	255.02	N12	13201016	105.48
N3	2001506	100.90	N12	13200607	102.71
N3	2003212	96.69	N12	13201011	112.57
N4	20201104	15.52	N12	13201014	106.18
N5	121004	216.96	N13	20120604	55.38
N6	20201003	173.51	N14	20200415	117.87
N6	20210302	90.99	N15	471053	77.62
N6	20201109	163.99	N15	471036	165.23
N7	22190926	24.28	N15	471048	73.75
N8	190904	105.19	N15	471059	88.36
N9	200902	14.42	N15	471054	79.62
N9	200413	18.59	N15	471060	78.36
N10	2012050	216.99	N16	20082135	105.60
N11	20201004	66.06	N17	20200702	187.47

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为Waters ACQUITY UPLC® BEH C_{18}柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相为乙腈(A)－0.1%甲酸溶液(B),梯度洗脱(0～13 min时90%B → 25%B, 13～17 min时25%B, 17～17.01 min时25%B → 90%B, 17.01～20 min时90%B);流速为1.0 mL/min;柱温为30 ℃;进样量为10 μL。

质谱条件：电喷雾离子源（ESI－），多反应监测模式（MRM）；毛细管电压 0. 5 kV；锥孔电压 － 55 V，锥孔气流量 50 L / h；脱溶剂气流量 900 L / h，脱溶剂气温度 550 ℃；木通苯乙醇苷 B 检测离子对 *m* / *z* 477 → 161（定量）、*m* / *z* 477 → 133 和 *m* / *z* 477 → 315。

2. 2　溶液制备

取木通苯乙醇苷 B 对照品适量，精密称定，加 70% 甲醇溶解制成质量浓度为 5. 170 μg / mL 的对照品溶液。取样品细粉 0. 5 g，精密称定，置 100 mL 容量瓶中，加入 70% 甲醇 80 mL，超声（功率 250 W，频率 50 kHz，下同）处理 60 min，放冷至室温，加 70% 甲醇定容，摇匀，滤过，取续滤液，即得供试品溶液。取木通对照药材 0. 05 g，精密称定，按供试品溶液制备方法制备对照药材溶液，同法制备川木通、关木通、甘木通对照药材溶液，即伪品对照药材溶液。按龙胆泻肝丸处方和工艺制备缺木通的阴性样品，并按供试品溶液制备方法制成阴性对照品溶液。

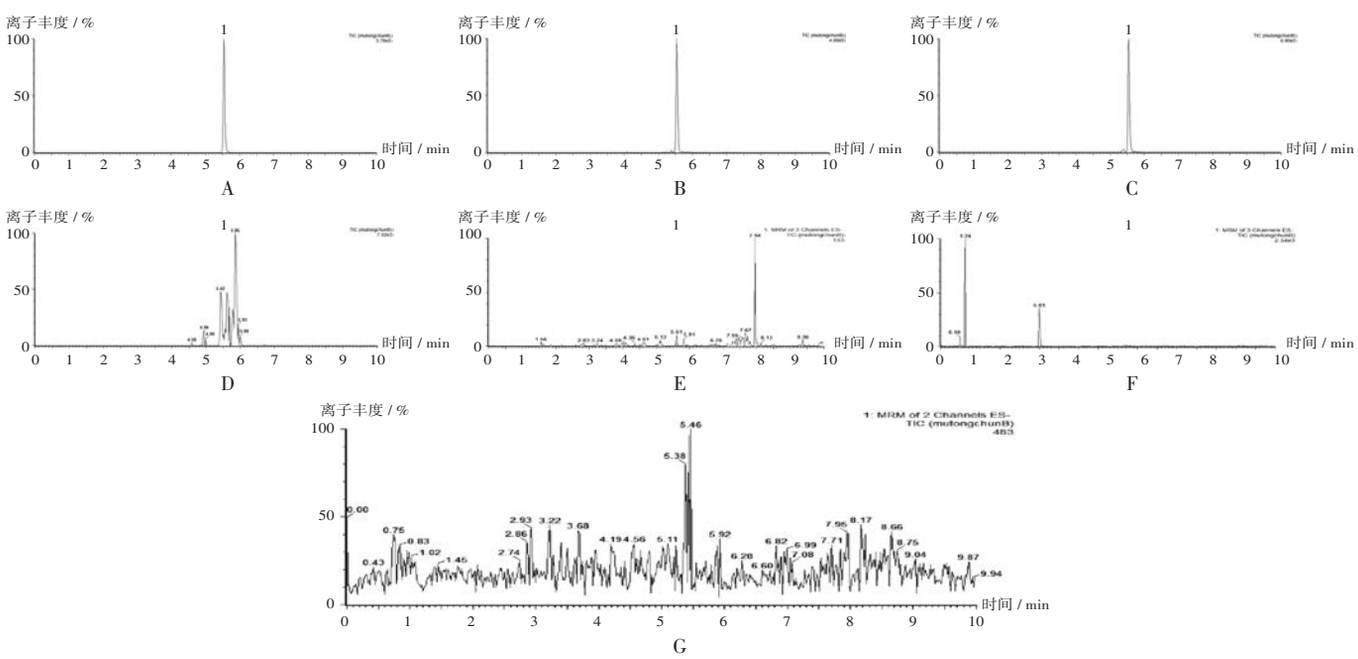
2. 3　方法学考察

专属性试验：取上述供试品溶液、对照品溶液、对照药材溶液、伪品对照药材溶液、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。结果供试品溶液图谱中，出现与木通对照药材溶液、对照品溶液保留时间一致的色谱峰，质谱响应强度较高。阴性对照品溶液的图谱中虽含有 1 个与对照品溶液保留时间相似的色谱峰，但质谱响应很弱。提取阴性对照品溶液的相应离子对发现，定量离子对 *m* / *z* 477→161 的峰面积可忽略不计，定性离子对 *m* / *z* 477→315 无与木通苯乙醇苷 B 保留时间一致的色谱峰，且通过子离子扫描发现阴性对照品溶液与对照品溶液图谱的一、二级质谱不一致，表明阴性对照品溶液对测定无干扰，专属性良好。另外对川木通、关木通、甘木通对照药材溶液进行分析，其色谱图中均未出现与对照品溶液图谱保留时间一致的色谱峰[12－13]。详见图 1。

线性关系考察：分别精密量取 2. 2 项下对照品溶液 0. 4，1. 0，2. 0，4. 0，10. 0 mL，置 10 mL 容量瓶中，加 70% 甲醇定容，制成系列对照品溶液。精密量取 10 μL，按 2. 1 项下试验条件进样测定，记录峰面积。以质量浓度（*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* = 29 941*X* － 227. 86（*r* = 0. 999 9）。结果表明，木通苯乙醇苷 B 质量浓度在 0. 103 4 ~ 5. 170 0 μg / mL 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验：取 2. 2 项下对照品溶液适量，按 2. 1 项下试验条件连续进样测定 6 次，记录离子丰度。结果木通苯乙醇苷 B 峰面积的 *RSD* 为 2. 58%（*n* = 6），表明仪器精密度良好。

稳定性试验：取 2. 2 项下供试品溶液适量，分别于



1. 木通苯乙醇苷 B

A. 对照品溶液　B. 木通对照药材溶液　C. 供试品溶液　D. 阴性对照品溶液　E. 关木通药材溶液　F. 川木通药材溶液　G. 甘木通药材溶液

图 1　总离子流图

1. Calccorioside B

A. Reference solution　B. Akebiae Caulis reference solution　C. Test solution　D. Negative reference solution　E. Aristolochiae Caulis medicinal solution　F. Clematidis Armandii Caulis medicinal solution　G. Clematidis Filamentosae Folium medicinal solution

Fig. 1　Total ion chromatograms

室温下放置0，2，4，6，8，24 h时按2.1项下试验条件进样测定，记录离子丰度。结果，木通苯乙醇苷B峰面积的*RSD*为3.56%（$n=6$），表明供试品溶液在室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验：精密称取样品（批号13200607）适量，共6份，按2.2项下方法制备供试品溶液，再按2.1项下试验条件进样测定，记录离子丰度并计算含量。结果木通苯乙醇苷B含量平均值的*RSD*为3.89%（$n=6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取已知含量样品（批号13200607）适量，共6份，分别加入一定质量浓度的木通苯乙醇苷B对照品溶液适量，按2.2项下方法制备供试品溶液，再按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，结果见表2。

表2 加样回收试验结果（$n=6$）

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=6$)

取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
0.247 3	25.40	25.85	52.14	103.44	104.96	4.36
0.250 2	25.70	25.85	53.83	108.82		
0.250 9	25.77	25.85	52.27	102.51		
0.249 2	25.60	25.85	52.35	103.48		
0.256 7	26.37	25.85	55.32	111.99		
0.253 2	26.01	25.85	51.73	99.50		

2.4 样品含量测定

取36批样品各适量，分别按2.2项下方法制备供试品溶液，再按2.1项下试验条件进样测定，平行测定3次，记录离子丰度并计算样品含量，结果见表1。36批样品均含有木通苯乙醇苷B，含量为14.42～255.02 μg/g。为了解企业间样品中木通苯乙醇苷B含量的差异情况，对同一企业的不同批次样品的含量取平均值，结果见图2。可见，不同企业的样品含量差异显著，推测各企业所采购的样品中木通原料质量差异较大。

3 讨论

预试验中流动相考察了甲醇－0.02%氨溶液、乙腈－0.02%氨溶液、乙腈－0.1%甲酸水溶液和甲醇－0.1%甲酸水溶液4个系统，通过比较离子丰度、目标化合物色谱峰形和仪器耐用性等因素，选择了乙腈－0.1%甲酸溶液（梯度洗脱）作为流动相；质谱参数方面选择了较稳定的MRM模式进行定量分析，且在负离子模式下，木通苯乙醇苷B的离子丰度较高且稳定。

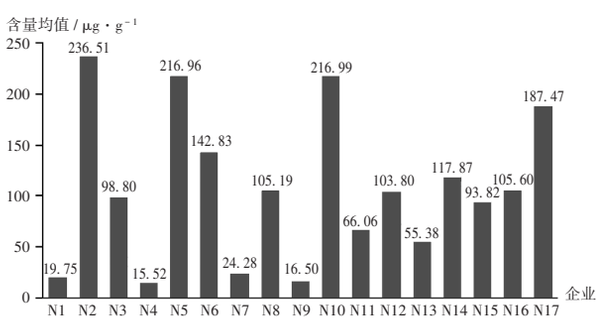


图2 各企业样品中木通苯乙醇苷B平均含量分布图

Fig. 2 Distribution of average content of calceorioside B in samples from different enterprises

木通苯乙醇苷B易溶于70%甲醇[14]，故以70%甲醇为提取溶剂，采用超声提取，比较超声30，40，50，60，70 min结果，发现超声50 min后，木通苯乙醇苷B成分即提取完全，考虑方法的可靠性，最终选择加入70%甲醇超声60 min作为提取方法。为排除假阳性成分对含量测定的干扰，对所有市售样品和木通对照药材溶液进行了子离子扫描，其主要子离子均为477，315，179，161，135，101，89，与木通苯乙醇苷B对照品的碎片离子基本一致，且通过计算MRM模式下的离子丰度可知，其结果均在对照品的离子丰度误差范围内，而在阴性对照品和伪品对照药材中均未检出，说明该含量测定方法可行。

本研究中采用UPLC－MS/MS法建立了水丸中木通的质量控制方法，通过对木通苯乙醇苷B的含量分析可知，各企业样品含量差异显著，表明木通原料质量稳定性较低，有必要对龙胆泻肝丸中木通苯乙醇苷B含量拟定限度值，此项工作有待进一步研究。

考虑到有些不法商家可能会利用现行标准不完善的监管漏洞，在生产过程中以假乱真、以次充好、不投料[15－16]，故进一步补充完善龙胆泻肝丸的质量标准、建立制剂中木通含量测定方法对于保障该制剂的安全性、有效性具有重要意义。

参考文献

[1] 国家药典委员会．中华人民共和国药典（一部）[M]．中国医药科技出版社，2020：65，809.
[2] 郭林新，马养民，乔　珂，等．三叶木通化学成分及其抗氧化活性[J]．中成药，2017，39(2)：338－339.
[3] 胡　峻，詹志来，袁　媛，等．基于熔解曲线分析技术的木通类药材的分子鉴别[J]．中国中药杂志，2015，40(12)：2304－2308.
[4] 白梦娜，戴宇轩，王　艳，等．川木通生药鉴别研究[J]．现代中药研究与实践，2017，31(3)：13－16.
[5] 武尉杰，万萌萌，曹雨虹，等．川木通的质量标准研究[J]．中华中医药学刊，2015，33(2)：313－315.
[6] 邵珠莹，潘金火，张月婵，等．UPLC－TQD－MS法探讨关木通配伍干姜减毒存效机制[J]．中成药，2018，40(11)：2576－2579.
[7] 杨亚蕾，王艳丽，桂新景．关木通的回顾性合理用药分析[J]．中国现代应用药学，2020，37(23)：2925－2931.
[8] 黄海潮，何　欣，周　捷，等．甘木通乙酸乙酯提取物对低糖缺氧诱导的神经细胞的保护作用[J]．中成药，2020，42(5)：1163－1168.
[9] 卢艳丽，项凤莲，任　悦，等．木通、川木通和关木通的鉴别方法[J]．甘肃医药，2017，36(9)：781－783.
[10] 张怀阳．木　通、关木通、川木通的应用鉴别[J]．中医临床研究，2019，11(4)：13－15.