

LC-MS/MS 法同时筛查清热解毒制剂中的山麦冬和山银花

钱叶飞， 张超^{*}， 王亚琼， 陆林玲^{*}
(苏州市药品检验检测研究中心， 江苏苏州 215104)

摘要：目的 建立 LC-MS/MS 法同时筛查清热解毒制剂中的山麦冬和山银花。方法 分析采用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱；流动相乙腈-水（含 0.1% 乙酸），梯度洗脱；体积流量 0.3 mL/min；柱温 35 °C；电喷雾离子源；正负离子扫描；多反应监测模式。结果 108 批清热解毒制剂中有 5 批检出山麦冬特征成分山麦冬皂苷 B 或短葶山麦冬皂苷 C, 13 批检出山银花特征成分灰毡毛忍冬皂苷乙，说明市售该制剂中存在山银花掺伪和山麦冬掺伪投料的情况。结论 该方法专属性好、准确、快速、简便，可为清热解毒制剂中的专项治理提供有力的技术支持。

关键词：清热解毒制剂；山麦冬皂苷 B；短葶山麦冬皂苷 C；灰毡毛忍冬皂苷乙；川续断皂苷乙；LC-MS/MS

中图分类号：R284.1

文献标志码：B

文章编号：1001-1528(2025)02-0664-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2025.02.049

清热解毒制剂由麦冬、金银花、地黄、连翘等 12 味药材制成，具有清热解毒功效^[1-2]。方中麦冬和金银花均是易掺伪的大宗中药材，2020 年版《中国药典》规定麦冬的唯一来源为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f.) Ker-Gawl.^[3]。山麦冬为百合科植物湖北麦冬 *Liriope spicata* (Thunb.) Lour. var. *prolifera* Y. T. Ma 或短葶山麦冬 *Liriope muscari* (Decne.) Baily 的干燥块根，与麦冬性状相近，价格低，产量大^[4]。从 2005 年版《中国药典》开始，金银花的唯一来源为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb.，山银花作为独立中药收录^[5]，价格较低廉。因此，市场上存在以山麦冬混入麦冬、山银花混入金银花投料生产中成药的现象^[6-8]。

山麦冬皂苷 B 和短葶山麦冬皂苷 C 分别为湖北麦冬和短葶山麦冬的特征性成分^[9-10]，灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙是区分金银花、山银花的特征性成分^[11-12]。目前的检验方法仅对制剂中麦冬或金银花其中一味药材的掺伪情况进行筛查^[13-15]。本实验建立快速、专属性强的 LC-MS/MS 法，检测清热解毒制剂中山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙，并采用该方法同时对不同厂家的 108 批清热解毒制剂中山麦冬和山银花掺伪投料进行筛查，以期为该制剂的投料情况及质量控制研究提供参考。

1 材料

Shimadzu LCMS8050 液质联用仪（日本岛津公司）；XS 105DU 电子天平（十万分之一，瑞士梅特勒-托利多公司）；KQ-300DA 数控超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司）。

山麦冬皂苷 B (批号 F0057660, 纯度 99.3%)、短葶山麦冬皂苷 C (批号 F0057671, 纯度 98.5%) 购自北京曼哈格生物科技有限公司；灰毡毛忍冬皂苷乙 (批号 111814-202005, 纯度 97.2%)、川续断皂苷乙 (批号 111813-201804, 纯度 96.8%) 购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈（色谱纯，美国 Honeywell 公司）；水为自制超纯水；其他试剂均为分析纯。清热解毒制剂样品来源于 2022 年国家药品抽检项目。湖北麦冬、短葶山麦冬、山银花均购自安徽省亳州中药材专业市场，经苏州市药品检验检测研究中心王亚琼主任中药师鉴定为正品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱；流动相乙腈 (A)-水 (0.1% 乙酸) (B)，梯度洗脱 (0~3 min, 70%~40% B; 3~7 min, 40%~10% B; 7~8 min, 10% B)；体积流量 0.3 mL/min；柱温 35 °C；进样量 2 μL。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI)；正、负离子扫描；接口电压±4 kV；接口温度 300 °C；加热温度 400 °C；加热气流量 10 L/min；干燥气流量 10 L/min；雾化气流量 3 L/min；碰撞气氩气；多反应监测模式 (MRM)。各化合物质谱参数见表 1。

2.3 对照品溶液制备 取山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C、灰毡毛忍冬皂苷乙、川续断皂苷乙对照品各 10 mg，精密称定，加 50% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中，得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品储备液。取各储备液适量，加 50% 甲醇稀释制得质量浓度为 100 ng/mL 的对照品溶液。

收稿日期：2024-01-24

基金项目：中国药品监管科学行动计划第二批重点项目子课题 (NMPAJGKX-2023-043)；江苏省药品监督管理局科研计划项目 (202459)

作者简介：钱叶飞 (1987—)，男，硕士，副主任中药师，从事药品质量分析研究。E-mail: qian_yefei@126.com

* 通信作者：张超 (1985—)，男，硕士，副主任中药师，从事中药质量控制研究。E-mail: 357827663@qq.com

陆林玲 (1988—)，女，硕士，副主任中药师，从事药品、化妆品质量分析研究。E-mail: lulinling09@163.com

表1 各化合物质谱参数

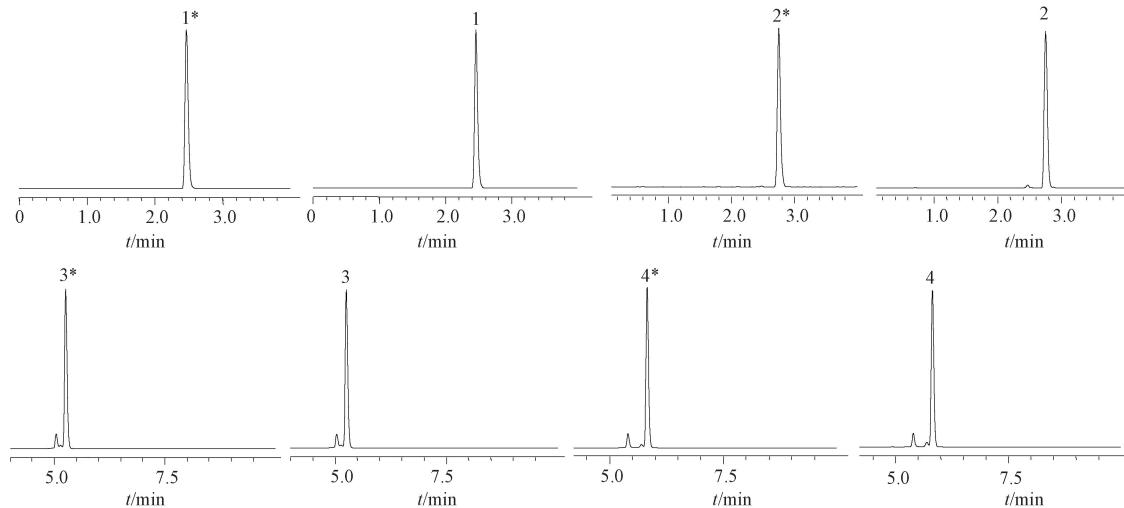
化合物	离子模式	母离子 m/z	子离子 m/z	Q1 偏差/V	碰撞能量/eV	Q3 偏差/V
山麦冬皂苷 B	ESI+	723.50	251.20*	-26	-34	-17
			269.20	-26	-32	-13
短葶山麦冬皂苷 C	ESI+	871.75	431.40*	-26	-20	-22
			413.35	-26	-21	-15
灰毡毛忍冬皂苷乙	ESI-	1 397.80	1 073.75*	30	33	32
			471.45	30	80	23
川续断皂苷乙	ESI+	1 097.85	773.50*	-32	-55	-30
			347.15	-32	-55	-25

注: * 为定量离子。

2.4 供试品溶液制备 取本品 1 mL (口服液) 或 1 g (颗粒剂), 加 50% 甲醇超声处理 30 min, 放冷, 50% 甲醇定容至 10 mL 量瓶中, 摆匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.5 专属性试验 取山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙对照品溶液, 缺麦冬、缺金银花阴性样品溶液, 掺山麦冬、掺山银花阳性样品溶

液适量, 在“2.1”“2.2”项条件下进样测定, 分别选择山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的特征分子离子峰作为检测离子对进行测定, 结果阴性样品和合格样品均未检出山麦冬和山银花, 说明阴性样品无干扰, 该方法专属性好, 典型 MRM 色谱图见图 1。



注: * 为定量离子对。

1. 灰毡毛忍冬皂苷乙 2. 川续断皂苷乙 3. 短葶山麦冬皂苷 C 4. 山麦冬皂苷 B

图1 加标样品中各成分 MRM 色谱图

2.6 线性关系及检测限考察 取各对照品储备液适量, 用 50% 甲醇配制质量浓度分别为 5、10、20、50、100、200、500 ng/mL 的系列溶液, 在“2.1”“2.2”项条件下进样测定。以各成分峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 结果见表 2, 可知各成分在各自范围

内线性关系良好。取阴性样品适量, 加入“2.3”项下对照品溶液, 按“2.4”项下方法制备阴性样品加标溶液, 在“2.1”“2.2”项条件下进样测定, 以信噪比 3:1 为检测限, 10:1 为定量限, 结果见表 2。

表2 各成分线性关系

成分	回归方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	检测限/(ng·mL ⁻¹)	定量限/(ng·mL ⁻¹)
山麦冬皂苷 B	$Y=6 824.86X-3 796.79$	0.999 2	5.015~200.6	0.04	0.13
短葶山麦冬皂苷 C	$Y=6 877.75X-4 163.86$	0.999 4	4.995~199.8	0.03	0.10
灰毡毛忍冬皂苷乙	$Y=207.56X-93.11$	0.997 6	4.738~473.8	0.31	1.02
川续断皂苷乙	$Y=2 649.33X-148.55$	0.999 7	5.045~504.5	0.12	0.40

2.7 精密度试验 取“2.3”项下对照品溶液适量, 在“2.1”“2.2”项条件下进样测定 6 次, 测得山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的峰面积 RSD 分别为 0.73%、1.70%、0.78%、3.96%, 表明

仪器精密度良好。

2.8 稳定性考察 取阴性样品(批号 20220316), 加“2.3”项下对照品溶液适量, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 于 0、1、2、4、8、12、16、24 h 在“2.1”

“2.2”项条件下进样测定，测得山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的峰面积 RSD 分别为 3.37%、3.18%、5.53%、3.12%，表明溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9 重复性考察 取阴性样品（批号 20220316），加“2.3”项下对照品溶液适量，按“2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液，在“2.1”“2.2”项条件下进样测定，测得山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的峰面积 RSD 值分别为 0.97%、3.42%、2.60%、3.16%，表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 采用加标回收法，取阴性样品 6 份，加“2.3”项下对照品溶液适量，按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”“2.2”项条件下进样测定，计算回收率。结果，山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙的平均加样回收率分别为 93.9%、86.1%、89.2%、94.2%，RSD 分别为 1.01%、3.02%、3.87%、0.93%。

2.11 判定浓度考察 取湖北麦冬、短葶山麦冬、山银花，按清热解毒口服液标准制备方法制备麦冬掺 5% 湖北麦冬、麦冬掺 5% 短葶山麦冬和金银花掺 5% 山银花阳性样品，各 3 批，在“2.1”“2.2”项条件下进样测定，测得麦冬掺 5% 湖北麦冬阳性样品中山麦冬皂苷 B 含量为 9.1~19.1 ng/mL，麦冬掺 5% 短葶山麦冬阳性样品中短葶山麦冬皂苷 C 含量为 49.4~92.2 ng/mL，金银花掺 5% 山银花阳性样品

中灰毡毛忍冬皂苷乙含量为 6.4~9.8 μg/mL。2020 年版《中国药典》将山银花检查纳入质量标准的含金银花中成药制剂，均将灰毡毛忍冬皂苷乙作为唯一检查指标，因此本项目判定依据中不设置川续断皂苷乙限度。设定山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C、灰毡毛忍冬皂苷乙参比溶液的质量浓度分别为 20、100、10 000 ng/mL。检测过程中，供试品色谱图中在与山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C、灰毡毛忍冬皂苷乙对照品色谱峰相应保留时间位置不得出现相同的色谱峰。若出现保留时间相同的色谱峰，且该色谱峰的峰面积大于参比溶液的峰面积值，则视为阳性检出。

2.12 样品含量测定 国家评价性抽验的 108 批样品（2 家企业 28 批样品颗粒剂和 29 家企业 80 批的口服液）按“2.4”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”“2.2”项条件下进样测定。结果，28 批颗粒剂均未检出山麦冬专属成分，但其中 9 批检出灰毡毛忍冬皂苷乙，颗粒剂中山银花阳性检出率为 32.14%。80 批口服液中 5 批山麦冬超过拟定限度，其中 4 批检出短葶山麦冬皂苷 C，表明该厂家极可能在投料中掺入了短葶山麦冬，1 批检出山麦冬皂苷 B，表明该厂家极可能在投料中掺入了湖北麦冬，口服液中山麦冬阳性检出率为 6.25%；且有 4 批检出灰毡毛忍冬皂苷乙，口服液中山银花阳性检出率为 5.00%。其中有 1 批口服液中山银花和山麦冬均为阳性检出，阳性结果见表 3。由此可知，市面上山麦冬和麦冬、山银花和金银花混杂使用的现象较为普遍。

表 3 清热解毒制剂超限样品信息

序号	批号	生产企业所在地	检出超限化合物	含量
Y1	20220316	河南	短葶山麦冬皂苷 C	2.40 μg/mL
Y2	20220314	河南	短葶山麦冬皂苷 C	2.49 μg/mL
Y3	20220315	河南	短葶山麦冬皂苷 C	2.75 μg/mL
Y4	20220317	河南	短葶山麦冬皂苷 C	2.46 μg/mL
Y5	20210702	江西	山麦冬皂苷 B	0.98 μg/mL
			灰毡毛忍冬皂苷乙	1.80 mg/mL
Y6	210206	四川	灰毡毛忍冬皂苷乙	1.18 mg/mL
Y7	2104291	河南	灰毡毛忍冬皂苷乙	0.84 mg/mL
Y8	2109091	河南	灰毡毛忍冬皂苷乙	0.95 mg/mL
K1	2105503	湖南	灰毡毛忍冬皂苷乙	1.51 mg/g
K2	2107505	湖南	灰毡毛忍冬皂苷乙	1.55 mg/g
K3	2107506	湖南	灰毡毛忍冬皂苷乙	1.63 mg/g
K4	2101504	湖南	灰毡毛忍冬皂苷乙	1.68 mg/g
K5	2107504	湖南	灰毡毛忍冬皂苷乙	1.66 mg/g
K6	2110503	湖南	灰毡毛忍冬皂苷乙	1.66 mg/g
K7	2101503	湖南	灰毡毛忍冬皂苷乙	1.47 mg/g
K8	2011501	湖南	灰毡毛忍冬皂苷乙	1.66 mg/g
K9	20211313	河南	灰毡毛忍冬皂苷乙	0.33 mg/g

注：K 为颗粒剂，Y 为口服液。

3 讨论

3.1 检测方法选择 清热解毒制剂中共 12 味中药，金银花在处方中占比 8.9%，麦冬在处方中占比 3.6%，目标成分含量不高。LC-MS/MS 专属性强，灵敏度高，且 MRM 模式不需要将待测组分完全色谱分离，可简化样品前处理过

程，避免假阳性，在中药制剂检测中具良好的应用前景^[16-21]，故选择此方法进行测定。

3.2 提取方法选择 考察不同提取方法（加热回流提取和超声提取）、不同溶剂（甲醇、乙酸乙酯、正丁醇）及不同体积分数甲醇（30%、50%、70%、100%）的提取效率，

最终确定以 50% 甲醇超声提取。

3.3 检测模式选择 比较 4 个成分在正、负离子下的响应, 结果显示灰毡毛忍冬皂苷乙在负离子检测模式下 $[M-H]^-$ 的响应较强, 其余 3 个成分在正离子检测模式下 $[M+H]^+$ 响应较强, 故采用正、负离子扫描。

3.4 判定浓度确定 因质谱检测器的高灵敏性, 市面上存在非生产厂家故意为之的情况, 故制订适宜的判定浓度极其重要。本实验以麦冬掺杂 5% 湖北麦冬或 5% 短葶山麦冬、金银花掺杂 5% 山银花为限度进行考察, 所制样品相当于含有 20 ng/mL 山麦冬皂苷 B、100 ng/mL 短葶山麦冬皂苷 C、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 灰毡毛忍冬皂苷乙。以上述质量浓度的山麦冬皂苷 B、短葶山麦冬皂苷 C 和灰毡毛忍冬皂苷乙为参照浓度, 凡峰面积低于参照者, 均视为未检出。

3.5 制剂投料规范性的质量评价 对 30 家生产企业 108 批的清热解毒制剂进行检验, 有 15 批检出灰毡毛忍冬皂苷乙, 4 批检出短葶山麦冬皂苷 C, 1 批检出山麦冬皂苷 B, 说明市售的该制剂品种中存在以山银花替代金银花、山麦冬替代麦冬投料的情况。

4 结论

本实验建立的 LC-MS/MS 法可同时检查清热解毒制剂中的山麦冬和山银花掺伪投料的情况, 高效、快速、简便, 可为该类制剂的质量控制和用药安全提供保障。

参考文献:

- [1] 尤立华, 杨秉呼, 叶萌, 等. 清热解毒口服液 HPLC 指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(14): 84-87.
- [2] 朱雪亚, 李泽运, 张潇, 等. 清热解毒口服液中 6 个药物成分的定量分析与网络药理学研究[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(9): 1537-1545.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 230.
- [4] 刘治民, 胡光华, 孙冶, 等. 吉林省流通麦冬质量评价研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(1): 73-77; 83.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2005 年版一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 152.
- [6] 胡亮, 周明, 王银红, 等. 基于安全监管的玄麦甘桔制剂中麦冬投料真实性的考察[J]. 华西药学杂志, 2023, 38(6): 700-704.
- [7] 郑艳青, 马斐, 张静, 等. 小儿咳喘灵颗粒中金银花的质量分析[J]. 中成药, 2015, 37(12): 2660-2664.
- [8] 刘益庆, 吴琦, 赵猛, 等. 银翘解毒片中掺伪山银花成分监测[J]. 药学与临床研究, 2023, 31(3): 234-237.
- [9] 黄博, 姚力, 张慧, 等. 高分离度快速液相色谱-三重串联四极杆质谱快速检查消渴灵片中山麦冬[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(2): 320-328.
- [10] 谈梦霞, 陈佳丽, 邹立思, 等. 麦冬与山麦冬中多元指标成分的比较分析[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(20): 4084-4092.
- [11] 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.
- [12] 卢凤来, 蒋海英, 陈月圆, 等. HPLC-ELSD 法测定山银花中绿原酸、灰毡毛忍冬皂苷乙和川续断皂苷乙[J]. 中成药, 2013, 35(8): 1821-1823.
- [13] 张炜, 宋文静, 武嘉庚, 等. UPLC-MS/MS 法检测妇康宁片中掺加的山麦冬[J]. 中成药, 2017, 39(4): 867-869.
- [14] 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.
- [15] 姜军华, 吴良发, 许妍, 等. 小儿咽扁颗粒中掺伪山银花检验方法研究[J]. 中国药事, 2023, 37(4): 443-449.
- [16] 范帅帅, 高乐, 田伟, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定养胃汤中 26 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(11): 1875-1884.
- [17] 张钊, 闫武超, 刘阳阳, 等. 女珍颗粒中 4 种成分的含量测定及其主成分分析和聚类分析[J]. 中国药师, 2022, 25(9): 1657-1661.
- [18] Weng Q H, Tan W, Yu R Y, et al. A novel bioanalytical method for the quantification of pemigatinib in rat plasma by UPLC-MS/MS[J]. Pharm Biomed Anal, 2021, 202: 114-137.
- [19] Sun H, Yin Q W, Zhang A H, et al. UPLC-MS/MS performing pharmacokinetic and biodistribution studies of rhein[J]. J Sep Sci, 2012, 35(16): 2063-2068.
- [20] 谭小青, 丘海芯, 高红伟, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定白头翁汤中 13 种成分及其配伍前后含量变化[J]. 中成药, 2023, 45(9): 2832-2838.
- [21] 李丽莉, 吕轶峰, 宁崇良, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定天王补心丸中山麦冬[J]. 化学分析计量, 2023, 32(10): 72-76.